

ISSN 0082-4771

h31e

CODEN: TRENAF

東京都立衛生研究所

# 研 究 年 報

ANNUAL REPORT

OF

TOKYO METROPOLITAN RESEARCH  
LABORATORY OF PUBLIC HEALTH

33

1982



## 序

40歳をすぎてからの一年は、あまりにも短く感ぜられます。子供の頃の一年は長く、正月がなかなか来ない、「あと幾つ寝るとお正月」と月日のたつのがいかにも長く感じたことか。

昭和 57 年度の当所の職員の平均年齢は 39.125 歳で、来年は必然的に、40歳を越えてしまいます。きっと、半数の職員は「もう一年がたってしまった」と月日のたつのを短く思い始めているのではないのでしょうか。

さて、公衆衛生の最終目標は、平均寿命の延長を目指したのでありますが、今年発表された昭和56年度の日本人の平均寿命は、男73.79歳、女79.13歳と、世界各国の中でも一、二位をあらそうような長命になってきました。

従って来る近い将来には当然のことながら、日本は高齢化社会の圧力が増大してまいります。国はこれに対処するために、老人保健法をはじめ、老人対策に力を注ぎ始めました。

われわれ公衆衛生に携わるものとして、日本が平均寿命の延長により、世界一になった蔭の功労者であるとの誇りを持つとともに、今度は、高齢化社会に若さをもたらす方法をあらゆる面で研究する段階に入ってきたと認識するべきでしょう。

一年が短く感じられないように、能率よく数多くの仕事が仕上げられるようするのも一つの若返り方法でしょう。

肉体の機能が最高に達するのは、25歳前後、精神的機能が充実するのは35歳前後といわれています。これを35歳と45歳にするのも、若返りの一方法ですが、これは言いかえれば、成熟を遅らすことになって、公衆衛生的にはマイナスでしょう。やはり、最高に達した機能をいかに、長期にわたって、維持し引き延ばすのが、最良の若返りの方策でありましょう。

われわれ研究者は、すべからく、35歳位までに新しい技術を修得し、それ以後はその技術を駆使し、実践することにより、研究能力維持に努めるべきでありましょう。

少なくとも、新しい科学機器類の力をかりて、人間側の機能低下を補っていく行き方が、これからの日本の進む道と考えます。

当研究所はいまや技術修得を終わり、これから技術実践期に入ったところとも言えましょう。これからの技術応用研究の成果が、数多く研究年報にも盛り込まれることを期待します。

本号には103編の論文が掲載されておりますが、それぞれ著者の自負する新知見を披瀝しております。忌憚のない御指摘、御批判、御鞭撻をいただければ幸いと存じます。

昭和 57 年 12 月

東京都立衛生研究所長      野      牛      弘

# 目 次

## 報文Ⅰ 感染症等に関する調査研究

1967年から1981年に食中毒事例、散発下痢症患者および

健康者から検出されたサルモネラの血清型およびその推移

.....高橋 正樹, 伊藤 武, 斎藤 香彦, 坂井 千三..... 1

1975年～1981年の7年間に東京都内で発生した *Bacillus cereus*

による食中毒15事例の疫学的・細菌学的検討

.....伊藤 武, 甲斐 明美, 斎藤 香彦, 柳川 義勢, 稲葉美佐子, 高橋 正樹, 高野伊知郎,  
新垣 正夫, 坂井 千三, 篠原 楷, 加藤 喜市, 田村 延一, 土屋 伸久, 駒井 嘉明..... 9

1980～1981年分離のA群溶血レンサ球菌の薬剤感受性と菌型について

.....柏木 義勝, 近藤 治美, 徳江シゲ子, 大久保暢夫, 寺山 武..... 19

1971年から1980年までの10年間における STS による梅毒血清反応検査成績

.....石上 武, 堀 幹郎, 平岡陸左右, 落合 泰隆, 宮沢 貞雄,  
安部 昭子, 寺山 武, 大久保暢夫, 大橋 誠..... 26

1971年から1980年までの10年間における梅毒血清反応偽陽性の出現

.....堀 幹郎, 平岡陸左右, 落合 泰隆, 宮沢 貞雄, 石上 武,  
寺山 武, 大久保暢夫, 大橋 誠..... 29

酵素抗体法 (ELISA) による日本住血吸虫症の診断 フィリピンに適合する反応術式の検討 (第1報)

.....村田以和夫, 松田 肇, 田中 寛, BAYANI L. BLAS..... 33

東京都内の急性呼吸器疾患患児および下水からのウイルス検索 (1981年)

.....林 志直, 矢野 一好, 柴田 タツ美, 藪内 清, 岩崎 謙二,  
渡辺 悌吉, 石原 祐, 大久保さつき, 浦野 純子, 河野 弘子..... 41

下水汚泥からのウイルス溶出処理による腸管系ウイルスの検出

——ホウ酸緩衝液およびビーフェキスの効果——

.....矢野 一好, 林 志直, 柴田タツ美, 藪内 清, 岩崎 謙二..... 47

東京都におけるポリオ流行予測調査成績 (1972～1981年)

.....藪内 清, 矢野 一好, 柴田タツ美, 林 志直, 岩崎 謙二..... 54

東京都内における小児急性胃腸炎のウイルス学的・細菌学的検索成績

.....関根 整治, 山田 澄夫, 松下 秀, 矢野 一好, 藪内 清,  
工藤 泰雄, 前木 吾市, 坂井 千三, 大橋 誠, 渡辺 悌吉,  
石原 祐, 大久保さつき, 浦野 純子, 河野 弘子..... 59

東京都における日本脳炎疫学調査 (1980～1981年)

.....吉田 靖子, 関根 整治, 藪内 清, 岩崎 謙二, 山口 安夫, 斎藤 正彦..... 66

飼育ブタにおける日本脳炎ウイルス感染流行の予測

.....岩崎 謙二, 藪内 清, 吉田 靖子, 関根 整治..... 72

高倍率電子顕微鏡の撮影法.....前木 吾市, 木村 康夫..... 78

## 報文Ⅱ 医薬品等に関する調査研究

非ピリン系かぜ薬の定量法 (第2報) 鎮咳去痰剤

.....中山 京子, 高橋美佐子, 岩崎由美子, 秋山 和幸..... 85

|                                                                      |                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 市販軟膏及び坐剤中のプレドニゾロンの安定性について                                            | 上原 眞一, 宮武ノリエ, 重岡 捨身, 風間 成孔, 秋山 和幸                                            | 90  |
| 漢方処方製剤の試験法に関する研究(第1報) 紫雲膏製剤中の shikonin 類の定量                          | 浜野 朋子, 安田 一郎, 瀬戸 隆子, 秋山 和幸, 原田 裕文                                            | 95  |
| <i>In vitro</i> におけるパイロジェンの微量測定法に関する研究(第2報)                          |                                                                              |     |
| 市販品注射剤中のエンドトキシン含量                                                    | 宇佐美博幸, 秋山 和幸                                                                 | 100 |
| 有害物質を含有する家庭用品の試験法に関する研究(第7報)                                         |                                                                              |     |
| 繊維製品中の有機塩素系防虫剤の定量(Ⅲ)                                                 | 寺島 潔, 萩原 輝彦, 奥本千代美, 長嶋真知子, 吉原 武俊, 秋山 和幸                                      | 105 |
| 歯科材料の衛生化学的研究(第2報)                                                    |                                                                              |     |
| フレームレス原子吸光分析法による歯科用セメント中のヒ素, 鉛およびカドミウムの分析法について                       | 植田 忠彦, 西田 茂一, 吉原 武俊                                                          | 110 |
| 化粧品中の特殊成分試験法の設定に関する研究(XIII)                                          |                                                                              |     |
| 高速液体クロマトグラフィーによるブチルヒドロキシアニソールの分析                                     | 鎌田 国広, 観 照雄, 伊藤 弘一, 中村 義昭, 吉原 武俊, 原田 裕文                                      | 115 |
| 家庭用品の衛生化学的研究(第7報) 文書類中の重金属について                                       | 雨宮 敬, 森 謙一郎, 鈴木 助治, 吉原 武俊                                                    | 120 |
| <b>報文III 食品等に関する調査研究</b>                                             |                                                                              |     |
| ブドウ球菌培養液からの簡易・迅速エンテロトキシン検出法としての<br>スライド・逆受身ラテックス凝集反応(Slide-RPLA)について | 新垣 正夫, 五十嵐英夫, 藤川 浩, 潮田 弘, 寺山 武, 坂井 千三                                        | 129 |
| 各種市販食品, 健康人皮膚および電車つり輪からの表皮ブドウ球菌の検出と<br>分離菌株の生化学的性状およびファージ感受性         | 潮田 弘, 五十嵐英夫, 新垣 正夫, 藤川 浩, 坂井 千三                                              | 135 |
| 鶏肉中におけるウェルシュ菌の発育とエンテロトキシンの産生                                         | 稲葉美佐子, 伊藤 武, 坂井 千三                                                           | 143 |
| 食鳥肉処理施設における <i>Campylobacter jejuni</i> の汚染調査                        | 斉藤 香彦, 伊藤 武, 高橋 正樹, 高野伊知郎, 柳川 義勢, 甲斐 明美,<br>坂井 千三, 石川 隆三, 下地 洋三, 酒井 宏, 川崎こずえ | 150 |
| 砂糖, でん粉, 香辛料などの芽胞菌汚染の実態調査                                            | 小久保彌太郎, 神保 勝彦, 村上 文子, 村上 一                                                   | 155 |
| <i>Bacillus cereus</i> の生物型とその芽胞の熱抵抗性                                | 神保 勝彦, 小久保彌太郎                                                                | 161 |
| 動物性食品より分離した黄色ブドウ球菌の性状について ——各種由来菌株の性状の比較——                           | 庭山 邦子, 村上 一, 篠原 楷, 加藤 喜市, 田村 延一, 土屋 伸久                                       | 166 |
| つみれの製造工程における細菌汚染および保存製品の細菌叢                                          | 新井 輝義, 池島 伸至, 神 真知子, 入倉 善久, 古幡 幸子, 松本 昌雄                                     | 170 |
| 東京都における水銀汚染の実態について(第9報) 魚介類中の水銀含有量調査                                 | 山野辺秀夫, 竹内 正博, 吉原 武俊                                                          | 179 |
| 東京都における PCB 汚染の実態について(第10報) 食品中の PCB 含有量調査                           | 山崎 清子, 水石 和子, 竹内 正博, 吉原 武俊                                                   | 182 |
| 牛乳中のシアン反応物質について                                                      | 竹葉 和江, 小久保彌太郎, 村上 文子, 村上 一, 山田 満                                             | 186 |



|                                                                                                         |                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| かんきつ類中の防ばい剤に関する研究(1) 市販品の使用実態調査                                                                         |                                           |
| .....安田 和男, 西島 基弘, 冠 政光, 斉藤 和夫, 中沢久美子,<br>上村 尚, 中里 光男, 菊地 洋子, 井部 明広, 藤沼 賢司,<br>永山 敏廣, 牛山 博文, 直井家壽太..... | 191                                       |
| かんきつ類中の防ばい剤に関する研究(2) 浸透性及び除去方法の検討                                                                       |                                           |
| .....井部 明広, 西島 基弘, 冠 政光, 安田 和男, 斉藤 和夫,<br>中沢久美子, 上村 尚, 中里 光男, 菊地 洋子, 藤沼 賢司,<br>永山 敏廣, 牛山 博文, 直井家壽太..... | 198                                       |
| かんきつ類中の防ばい剤に関する研究(3) 調理加工による挙動                                                                          |                                           |
| .....中沢久美子, 西島 基弘, 冠 政光, 安田 和男, 斉藤 和夫,<br>上村 尚, 中里 光男, 菊地 洋子, 井部 明広, 藤沼 賢治,<br>永山 敏廣, 牛山 博文, 直井家壽太..... | 203                                       |
| クロロフィル分解物およびクロロフィラーゼ活性度の分析法の検討                                                                          |                                           |
| .....観 公子, 田村 行弘, 真木 俊夫, 小関 正道, 直井家壽太.....                                                              | 208                                       |
| みそ, しょう油中のアルコール含有量調査.....                                                                               | 上田 工, 嶋村 保洋, 石川ふさ子, 直井家壽太.....214         |
| 食品工業用洗浄剤の成分分析                                                                                           |                                           |
| .....広門 雅子, 中嶋 巖, 安野 哲子, 荻野 周三, 中島 和雄,<br>溝入 茂, 小野 綾子, 大島 敏子, 遠藤 英美.....                                | 219                                       |
| 市販天然糊料の使用実態調査(第2報)                                                                                      |                                           |
| .....中島 和雄, 広門 雅子, 中嶋 巖, 溝入 茂, 遠藤 英美.....                                                               | 225                                       |
| 食品工業用腐食抑制剤の分析.....                                                                                      | 安野 哲子, 荻野 周三, 小野 綾子, 大島 敏子, 遠藤 英美.....228 |
| 食品包装用フィルムにおける可塑剤の使用実態およびその移行                                                                            |                                           |
| .....渡辺 悠二, 佐藤 憲一, 吉田 令子, 遠藤 英美.....                                                                    | 232                                       |
| SAN 製品からのアクリロニトリルモノマーの移行挙動                                                                              |                                           |
| .....吉田 令子, 渡辺 悠二, 佐藤 憲一, 遠藤 英美, 吉田 博久.....                                                             | 238                                       |
| 市販ポテトチップおよびスナック菓子の栄養学的考察                                                                                |                                           |
| .....牛尾 房雄, 船山 恵市, 西田 甲子, 関 博賢, 道口 正雄.....                                                              | 242                                       |
| 肝臓病治療食の脂肪酸組成                                                                                            |                                           |
| .....井口 正雄, 菊谷 典久, 友松 俊夫, 道口 正雄, 二見 大介,<br>米川 郁毅, 鶴見田鶴子, 鎌田 敏夫, 窪田 英夫.....                              | 246                                       |
| 市販離乳食中のリジノアラニンの分析.....                                                                                  | 菊谷 典久, 井口 正雄, 友松 俊夫, 道口 正雄.....251        |
| フッ素の衛生学的研究(第5報) フッ素投与下における組織中の Ca および P について                                                            |                                           |
| .....友松 俊夫, 道口 正雄.....                                                                                  | 255                                       |
| 高速液体クロマトグラフィーによるしょう油中のパラオキシ安息香酸の分析                                                                      |                                           |
| .....野沢 竹志, 荻原 勉, 榎田 隆一, 大西 和夫, 松本 昌雄.....                                                              | 259                                       |
| 報文 IV 生活環境に関する調査研究                                                                                      |                                           |
| NO <sub>x</sub> 共存下でのメタノール, イソプロパノールの光酸化反応.....                                                         | 太田 与洋, 坂東 博, 秋元 肇.....263                 |
| 負イオン源に関する一考察.....                                                                                       | 瀬戸 博.....266                              |
| ドライクリーニング所におけるテトラクロルエチレン濃度について                                                                          |                                           |
| .....佐藤 泰仁, 多田 宇宏, 青木 実, 小谷野 彰, 吉儀 弘史.....                                                              | 271                                       |

|                                                                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 飲料水の水質と人の健康との関連(第1報) 水道施設に由来する有害元素に関する調査<br>.....笹野 英雄, 斉藤 庄次, 小輪瀬 勉, 高橋 正博, 高橋 保雄, 西垣 進.....                                          | 277 |
| G C・F I D法による井水中の塩素系炭化水素の分析<br>.....大橋 則雄, 矢口久美子, 関山 登, 藤沢 正吉, 渡辺 学, 中村 弘, 松本 昌雄.....                                                  | 280 |
| 水中の下水臭揮発性硫黄化合物の分析<br>.....矢口久美子, 大橋 則雄, 関山 登, 渡辺 学, 藤沢 正吉, 中村 弘, 松本 昌雄.....                                                            | 283 |
| 下水道未整備地域の水質汚濁について(第4報) 平井川水質の経年変化<br>.....栃本 博, 押田 裕子, 有賀 孝成, 池島 伸至, 中村 弘, 松本 昌雄.....                                                  | 288 |
| 三次処理水に関する衛生学的研究(第2報) 下水・再利用水中の多環芳香族炭化水素<br>.....有賀 孝成, 押田 裕子, 栃本 博, 中村 弘, 松本 昌雄.....                                                   | 293 |
| コンクリートアパート4軒におけるダニ相およびダニ数の季節的変動<br>.....吉川 翠, 花岡 暉, 山田百合子.....                                                                         | 299 |
| 殺ダニ試験(第1報) ケナガコナダニに対するフェニトロチオン処理紙の効力試験<br>.....大野 正彦, 吉川 翠.....                                                                        | 307 |
| 神田川に生息するセスジユスリカ(ヨシマツユスリカ)の幼虫, 成虫の<br>個体数の変動, および薬剤散布時の浮遊流出幼虫について.....大野 正彦, 清水 憲一.....                                                 | 314 |
| 都公立小中学校の教師を対象とした重金属モニタリング.....長嶋 親治, 石川 隆章.....                                                                                        | 322 |
| 人腎皮質中のカドミウムを対象とした生物モニタリング.....石川 隆章, 長嶋 親治.....                                                                                        | 328 |
| ラットのムコ多糖代謝に及ぼす NO <sub>2</sub> 及び O <sub>3</sub> 曝露の影響.....鈴木 孝人, 嵯峨 祐一, 溝口 勲.....                                                     | 331 |
| O <sub>3</sub> 単独曝露及び NO <sub>2</sub> と O <sub>3</sub> の複合曝露によるラットの肺の病理形態学的変化<br>.....寺田 伸枝, 鈴木 孝人, 大沢 誠喜, 福田 雅夫, 池田 真悟, 溝口 勲.....     | 337 |
| NO <sub>2</sub> と O <sub>3</sub> 曝露によるラット肺に対する生化学的变化 .....石川 隆章.....                                                                   | 347 |
| 空調ダクト内堆積粉塵の性状について.....佐藤 泰仁.....                                                                                                       | 352 |
| 鉛連続投与によるハト血液中の鉛分布と核封入体<br>.....関 比呂伸, 蓑輪 佳子, 鈴木 昇, 鈴木 重任, 溝口 勲, 寺山 武,<br>中尾 順子, 村上 正孝, 杉森 文夫, 岩間 三郎, 長橋 捷, 大井 玄,<br>中村佳代子, 河村 冷子.....  | 356 |
| <i>Trichomonas gallinae</i> に対するハトの免疫応答に及ぼす鉛の影響<br>.....蓑輪 佳子, 関 比呂伸, 鈴木 昇, 鈴木 重任, 寺山 武, 溝口 勲,<br>村上 正孝, 杉森 文夫, 岩間 三郎, 長橋 捷, 大井 玄..... | 362 |
| 東京都における循環器疾患死亡と社会・環境指標との関連性について.....牧野 国義, 溝口 勲.....                                                                                   | 367 |
| 疫学, 生物調査における異常値, 欠測値処理について.....牧野 国義.....                                                                                              | 376 |
| 皇居外苑濠の水質——植物プランクトン量と栄養塩との関係——<br>.....渡辺真利代, 土屋 悦輝, 西垣 進.....                                                                          | 383 |
| <b>報文 V 毒性に関する調査研究</b>                                                                                                                 |     |
| 直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムとジブチルヒドロキントルエンとの<br>併用によるラット6ヶ月飼育試験<br>.....市川 久次, 米山 允子, 小林 博義, 多田 幸恵, 中尾 順子, 平賀 興吾.....                         | 387 |

|                                                                                     |                                                |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----|
| 直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムとジブチルヒドロキシトルエンとの併用によるラット終生飼育試験                                 | 井口 重孝, 高橋 博, 池田 虎雄, 林田 志信, 平賀 興吾               | 392 |
| 直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムとジブチルヒドロキシトルエンとの併用によるラット終生飼育試験 ——非腫瘍性変化——                      | 藤井 孝, 多田 幸恵, 長澤 明道, 三栗谷久敏, 矢野 範男, 湯澤 勝廣, 平賀 興吾 | 399 |
| 直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムとジブチルヒドロキシトルエンとの併用によるラット終生飼育試験 ——腫瘍性変化——                       | 藤井 孝, 多田 幸恵, 長澤 明道, 三栗谷久敏, 矢野 範男, 湯澤 勝廣, 平賀 興吾 | 413 |
| ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) のFitzgerald 因子, Fletcher 因子, 補体系活性におよぼす影響                       | 高橋 省, 平賀 興吾                                    | 423 |
| ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) 摂取雄ラットのビタミンK欠乏症の原因について                                          | 鈴木 英子, 中尾 順子, 平賀 興吾                            | 429 |
| ラット肝グルタチオン量とグルタチオン—S—トランスフェラーゼ活性に対するジブチルヒドロキシトルエンの影響                                | 中川 好男, 中尾 順子, 平賀 興吾                            | 431 |
| オルトフェニルフェノールのラットを用いた91週間毒性試験                                                        | 中村 清純, 池田 虎雄, 井口 重孝, 平賀 興吾                     | 434 |
| オルトフェニルフェノールナトリウムにより発生したF344ラット膀胱腫瘍の移植性について——途中経過——                                 | 田山 邦昭, 中村 清純, 平賀 興吾                            | 444 |
| オルトフェニルフェノール (OPP) の生体内運命 (第1報) 経口投与によるラット体内分布ならびに排泄                                | 市川 久次, 小林 博義, 中尾 順子                            | 451 |
| オルトフェニルフェノールの代謝 長期間投与における代謝物の推移                                                     | 牛山 慶子, 樺島順一郎, 中尾 順子                            | 455 |
| オルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) のラット尿中酵素活性およびタンパク質への影響                                   | 長井二三子, 中尾 順子                                   | 458 |
| オルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) のラット尿中酸性フォスファターゼにおよぼす影響 (第2報)                            | 樺島順一郎, 中尾 順子                                   | 462 |
| オルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) のラット尿中アルカリフォスファターゼにおよぼす影響                                | 小林 博義, 樺島順一郎, 中尾 順子                            | 467 |
| オルトフェニルフェノール投与ラット肝ミクロゾームフラグションのSDS ゲル電気泳動像                                          | 藤谷 和正, 牛山 慶子, 中尾 順子                            | 470 |
| アデニレートシクラーゼにおよぼすオルトフェニルフェノール (OPP) およびその関連物質の影響                                     | 中川 敦子, 中尾 順子                                   | 473 |
| 馬の腎臓から精製した酵素へのオルトフェニルフェノールおよびその関連物質の影響                                              | 大野 知子, 長井二三子, 中尾 順子                            | 477 |
| Phenobarbital および 3-Methylcholanthrene 誘導の S-9 を用いた In Vitro でのオルトフェニルフェノールの染色体への作用 | 縄井寿美子, 吉田 誠二, 中尾 順子, 平賀 興吾                     | 480 |
| 突然変異誘起性に対するオルトフェニルフェノールの影響                                                          | 藤田 博, 小嶋 昭江, 平賀 興吾                             | 484 |

|                                                                                  |                                         |     |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----|
| オルトフェニルフェノールおよびオルトフェニルフェノールナトリウム<br>長期摂取ラットの細胞遺伝学的研究                             | 吉田 誠二, 平賀 興吾                            | 489 |
| チアベンダゾール投与雌ラットにおける膀胱重量増加について                                                     | 三栗谷久敏, 林田 志信, 藤井 孝, 平賀 興吾               | 492 |
| チアベンダゾール (TBZ) のマウスにおける催奇形性について<br>TBZ をアラビアゴム溶液に懸濁して投与した場合                      | 小縣 昭夫, 安藤 弘, 久保 喜一, 平賀 興吾               | 495 |
| チアベンダゾールのマウスにおける催奇形性について<br>ベアフォーディングテスト                                         | 小縣 昭夫, 安藤 弘, 久保 喜一, 平賀 興吾               | 500 |
| チアベンダゾールのマウスにおける催奇形性について<br>妊娠7—9日投与試験                                           | 安藤 弘, 久保 喜一, 小縣 昭夫, 平賀 興吾               | 506 |
| チアベンダゾールのマウスにおける催奇形性について<br>生産場の異なる3つの ICR 系マウスによる比較                             | 久保 喜一, 安藤 弘, 小縣 昭夫, 平賀 興吾               | 511 |
| クロム鉱さい粉じんのラットによる2年間持続吸入実験 (第1報) ——呼吸器系の病理組織学的観察                                  | 坂本 義光, 神谷 信行, 池田 虎雄, 平賀 興吾              | 518 |
| クロム鉱さい水浸出液の皮膚果積刺激性 (第2報)<br>長期塗布による家兎耳介への影響                                      | 福森 信隆, 樺島順一郎, 井口 重孝, 平賀 興吾              | 527 |
| フタル酸エステルのステロイド代謝におよぼす影響                                                          | 大石 眞之, 平賀 興吾                            | 535 |
| 雄性ラットにおけるリン酸エステル類の比較毒性                                                           | 大石 向江, 大石 眞之, 平賀 興吾                     | 540 |
| 種々の食品添加物, 合成洗剤 (LAS) のチャイニーズハムスター V79 細胞を用いた<br>metabolic cooperation への阻害効果について | 米山 允子, 中尾 順子, 平賀 興吾                     | 544 |
| チャイニーズハムスター培養細胞によるプロモーター物質の検出                                                    | 佐々木美枝子, 中尾 順子, 平賀 興吾                    | 547 |
| F344/DuCrj ラットの寿命について                                                            | 高橋 博, 井口 重孝, 田山 邦昭, 池田 虎雄, 林田 志信, 平賀 興吾 | 552 |
| F344/DuCrj ラットにおける飼料中化学物質添加濃度と<br>化学物質摂取量の関係について (続報)                            | 井口 重孝, 高橋 博, 平賀 興吾                      | 555 |
| 試験飼料中の被験物質濃度の均一性について                                                             | 神谷 信行, 平賀 興吾                            | 561 |
| 他 誌 発 表                                                                          |                                         | 565 |
| 学 会 発 表                                                                          |                                         | 569 |

# CONTENTS

## REPORTS I PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Serotypes of Salmonella Isolated from Food Poisoning, Sporadic Cases<br>and Healthy Carriers in Tokyo (1967—1981)<br>..... M. Takahashi, T. Itoh, K. Saito and S. Sakai.....                                                                                                                                                    | 1  |
| Epidemiological and Bacteriological Examination of Fifteen Vomiting-type<br>Outbreaks of Food Poisoning due to <i>Bacillus cereus</i> in Tokyo<br>..... T. Itoh, A. Kai, K. Saito, Y. Yanagawa, M. Inaba, M. Takahashi,<br>I. Takano, M. Shingaki, S. Sakai, T. Shinohara, K. Kato, N. Tamura,<br>N. Tsuchiya and Y. Komai..... | 9  |
| Antibiotics Sensitivities and Serotypes of Isolates of Group A Hemolytic Streptococci in 1980—1981<br>..... Y. Kashiwagi, H. Kondo, S. Tokue, N. Ohkubo and T. Terayama.....                                                                                                                                                    | 19 |
| Results of Serological Test for Syphilis by STS between 1971~1980 in Tokyoites<br>..... T. Ishikami, M. Hori, R. Hiraoka, Y. Ochiai, S. Miyazawa,<br>A. Abe, T. Terayama, N. Ohkubo and M. Ohashi.....                                                                                                                          | 26 |
| Appearance of False Positive Reaction on Serological Test for Syphilis between<br>1971—1980 in Tokyoites<br>..... M. Hori, R. Hiraoka, Y. Ochiai, S. Miyazawa, T. Ishikami,<br>T. Terayama, N. Ohkubo and M. Ohashi.....                                                                                                        | 29 |
| Serodiagnosis of Schistosomiasis japonica in the Philippines by Enzyme Linked Immunosorbent<br>Assay (ELISA) An Applicable Technique for ELISA at Schistosomiasis Control<br>and Research Project (S.C.R.P.) Laboratory, Palo, Leyte<br>..... I. Murata, H. Matsuda, H. Tanaka and B. L. Blas.....                              | 33 |
| Virological Survey of Acute Respiratory Infection among Pediatric Patients and<br>Eight Sewage Treatment Plants in Tokyo (1981)<br>..... Y. Hayashi, K. Yano, T. Shibata, K. Yabuuchi, K. Iwasaki,<br>T. Watanabe, Y. Ishihara, S. Ohkubo, J. Urano and H. Kohno.....                                                           | 41 |
| Isolation of Enteric Viruses from Wastewater Sludge on Eluting Methods<br>(Borate Buffer and Beef Extract)<br>..... K. Yano, Y. Hayashi, T. Shibata, K. Yabuuchi and K. Iwasaki.....                                                                                                                                            | 47 |
| Epidemiological Survey of Poliomyelitis in Tokyo (1972~1981)<br>..... K. Yabuuchi, K. Yano, T. Shibata, Y. Hayashi and K. Iwasaki.....                                                                                                                                                                                          | 54 |
| Virological and Bacteriological Studies on the Cause of Acute Diarrheal Diseases<br>in a Pediatric Clinic in Tokyo<br>..... S. Sekine, S. Yamada, S. Matsushita, K. Yano, K. Yabuuchi,<br>Y. Kudoh, G. Maeki, S. Sakai, M. Ohashi, T. Watanabe,<br>Y. Ishihara, S. Okubo, J. Urano and H. Kohno.....                            | 59 |
| Epidemiological Survey of Japanese Encephalitis in Tokyo in 1980—1981<br>..... Y. Yoshida, S. Sekine, K. Yabuuchi, K. Iwasaki, Y. Yamaguchi and M. Saito.....                                                                                                                                                                   | 66 |
| Prospective Study of Japanese Encephalitis by Means of Antibody Determination in Swine<br>..... K. Iwasaki, K. Yabuuchi, Y. Yoshida and S. Sekine.....                                                                                                                                                                          | 72 |

|                                                                                                          |                             |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|----|
| Electron Microscopy of Biological Specimens placed on Carbon Support Film strengthen with Microgrid..... | G. Maeki and Y. Kimura..... | 78 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|----|

## REPORTS II PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

|                                                                                                                                                                                        |                                                                                       |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Determination of Non-pyrin Preparations for Common Cold (II) Antitussive-Expectorants .....                                                                                            | K. Nakayama, M. Takahashi, Y. Iwasaki and K. Akiyama.....                             | 85  |
| Stability of Prednisolone in Commercial Ointments and Suppositories .....                                                                                                              | S. Uehara, N. Miyatake, S. Shigeoka, M. Kazama and K. Akiyama.....                    | 90  |
| Studies on Examination Method of Oriental Medicinal Preparations (I)<br>Determination of Total Shikonin in Commercial Preparation 'Shiunkô' .....                                      | T. Hamano, I. Yasuda, T. Seto, K. Akiyama and H. Harada.....                          | 95  |
| Study on Microassay of Pyrogen <i>in vitro</i> (II)<br>Endotoxin Content in Commercial Intravenous Solutions.....                                                                      | H. Usami and K. Akiyama.....                                                          | 100 |
| Studies on Examination Method of Household-Necessities Containing Poisonous Chemical Substances (VII) Determination of Organochlorine Mothproofing Agents from Wool Fabrics (III)..... | K. Terashima, T. Hagiwara, C. Okumoto, M. Nagashima, T. Yoshihara and K. Akiyama..... | 105 |
| Hygienic Chemical Studies on Dental Treatment Materials(II)<br>Determination of Arsenic, Lead and Cadmium in Dental Cements by Flameless Atomic Absorption Spectrophotometry .....     | T. Ueta, S. Nishida and T. Yoshihara.....                                             | 110 |
| Studies on Analytical Method of Specific Materials in Cosmetics (XIII)<br>High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Butylated Hydroxyanisole in Cosmetics .....         | K. Kamata, T. Kan, K. Ito, Y. Nakamura, T. Yoshihara and H. Harada.....               | 115 |
| Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (VII)<br>Heavy Metal Contents in Some Kinds of Stationeries for Children Use .....                                                  | T. Amemiya, K. Mori, S. Suzuki and T. Yoshihara.....                                  | 120 |

## REPORTS III PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

|                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                   |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Slide Reversed Passive Latex Agglutination (Slide-RPLA) for Simple and Rapid Detection of Staphylococcal Enterotoxins A-C in a Culture .....                                     | M. Shingaki, H. Igarashi, H. Fujikawa, H. Ushioda, T. Terayama and S. Sakai.....                                                  | 129 |
| Surveys on the Incidence of <i>Staphylococcus epidermidis</i> in Commercial Foods, Healthy Human Skins and Straps in Electric Train, and Characteristics of their Isolates ..... | H. Ushioda, H. Igarashi, M. Shingaki, H. Fujikawa and S. Sakai.....                                                               | 135 |
| Growth and Production of Enterotoxin of <i>Clostridium perfringens</i> in Chicken .....                                                                                          | M. Inaba, T. Itoh and S. Sakai.....                                                                                               | 143 |
| Surveys for the Contamination of <i>Campylobacter jejuni</i> on Butcherys of Chicken .....                                                                                       | K. Saito, T. Itoh, M. Takahashi, I. Takano, Y. Yanagawa, A. Kai, S. Sakai, R. Ishikawa, H. Shimoji, H. Sakai and K. Kawasaki..... | 150 |
| Prevalence of Spore-forming Bacteria in Sugar, Starch, Spices and Vegetable Protein .....                                                                                        | Y. Kokubo, K. Jinbo, F. Murakami and H. Murakami.....                                                                             | 155 |
| Biological Typing of <i>Bacillus cereus</i> Isolates and Heat Tolerance of Their Spores .....                                                                                    | K. Jinbo and Y. Kokubo.....                                                                                                       | 161 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Biological Properties of <i>Staphylococcus aureus</i> Isolated from Food of Animal Origin<br>—Comparison of Characteristics of the Isolates from Different Sources—<br>.....K. Niwayama, H. Murakami, T. Shinohara, K. Kato, N. Tamura and N. Tsuchiya.....                                                                      | 166 |
| Contamination of Microorganisms through the Manufacturing Process of Fish Jelly Products<br>and the Microflora of the Stored Products at Low Temperatures<br>.....T. Arai, N. Ikejima, M. Jin, Y. Irikura, Y. Furuhashi and M. Matsumoto.....                                                                                    | 170 |
| Survey of Pollution with Mercury in Tokyo (IX)    Mercury Content of Fish and Shellfish<br>.....H. Yamanobe, M. Takeuchi and T. Yoshihara.....                                                                                                                                                                                   | 179 |
| Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (X)<br>Polychlorinated Biphenyl Concentrations of Foods<br>.....K. Yamazaki, K. Mizuishi, M. Takeuchi and T. Yoshihara.....                                                                                                                                          | 182 |
| Cyanogenic Compound in Cow's Milk<br>.....K. Takeba, Y. Kokubo, F. Murakami, H. Murakami and M. Yamada.....                                                                                                                                                                                                                      | 186 |
| Studies on Fungicides in Citrus Fruits (I)    Market Investigation of Citrus Fruits<br>.....K. Yasuda, M. Nishijima, M. Kanmuri, K. Saito, K. Nakazawa,<br>H. Kamimura, M. Nakazato, Y. Kikuchi, A. Ibe, K. Fujinuma,<br>T. Nagayama, H. Ushiyama and Y. Naoi.....                                                               | 191 |
| Studies on Fungicides in Citrus Fruits (II)<br>Permeability and Removal of Diphenyl, <i>o</i> -Phenylphenol and Thiabendazole<br>.....A. Ibe, M. Nishijima, M. Kanmuri, K. Yasuda, K. Saito, K. Nakazawa,<br>H. Kamimura, M. Nakazato, Y. Kikuchi, K. Fujinuma, T. Nagayama,<br>H. Ushiyama and Y. Naoi.....                     | 198 |
| Studies on Fungicides in Citrus Fruits (III)<br>Movement of Diphenyl, <i>o</i> -Phenylphenol and Thiabendazole on Cooking Process of Citrus<br>Fruits.....K. Nakazawa, M. Nishijima, M. Kanmuri, K. Yasuda, K. Saito,<br>H. Kamimura, M. Nakazato, Y. Kikuchi, A. Ibe, K. Fujinuma,<br>T. Nagayama, H. Ushiyama and Y. Naoi..... | 203 |
| Studies on Determination of Degradative Substances of Chlorophyll and Chlorophyllase Activity<br>.....K. Kan, Y. Tamura, T. Maki, M. Koseki and Y. Naoi.....                                                                                                                                                                     | 208 |
| Survey of Alcohol Content in Miso and Soy sauce<br>.....K. Ueda, Y. Shimamura, F. Ishikawa and Y. Naoi.....                                                                                                                                                                                                                      | 214 |
| Analysis of Detergent Products used for Food Industry<br>.....M. Hirokado, I. Nakajima, T. Yasuno, S. Ogino, K. Nakajima,<br>S. Mizoiri, A. Ono, T. Ohata and F. Endo.....                                                                                                                                                       | 219 |
| Survey of Commercial Natural Thickening and Stabilizing Agents (II)<br>.....K. Nakajima, M. Hirokado, I. Nakajima, S. Mizoiri and F. Endo.....                                                                                                                                                                                   | 225 |
| The Analysis of Corrosion Inhibitors for Use in Food Manufactory<br>.....T. Yasuno, S. Ogino, A. Ono, T. Ohata and F. Endo.....                                                                                                                                                                                                  | 228 |
| Survey of Plasticizers in Food Packaging Films and Migration into the Foods<br>.....Y. Watanabe, K. Sato, R. Yoshida and F. Endo.....                                                                                                                                                                                            | 232 |
| Migration Behavior of Acrylonitrile Monomer from SAN Food Container<br>.....R. Yoshida, Y. Watanabe, K. Sato, F. Endo and H. Yoshida.....                                                                                                                                                                                        | 238 |
| Nutritional Evaluation of Some Commercial Potato Chips and Their Analogous Foods<br>.....F. Ushio, K. Funayama, K. Nishida, H. Seki and M. Doguchi.....                                                                                                                                                                          | 242 |

|                                                                                                                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Fatty Acid Composition of Lipids in Diets for Liver Disease Patients                                                                                                                                 |     |
| .....M. Iguchi, N. Kikutani, T. Tomomatsu, M. Doguchi, D. Futami,<br>Y. Yonekawa, T. Tsurumi, T. Kamata and H. Kubota.....                                                                           | 246 |
| The Determination of Lysinoalanine in Commercial Baby Foods                                                                                                                                          |     |
| .....N. Kikutani, M. Iguchi, T. Tomomatsu and M. Doguchi.....                                                                                                                                        | 251 |
| Hygienic Study on Fluoride (V)                                                                                                                                                                       |     |
| Retention of Calcium and Phosphorus in Tissues under Influence of Fluoride                                                                                                                           |     |
| .....T. Tomomatsu and M. Doguchi.....                                                                                                                                                                | 255 |
| Analysis of <i>p</i> -Hydroxybenzoic Acid in Soy Sauce by High Performance Liquid Chromatography                                                                                                     |     |
| .....T. Nozawa, T. Ogiwara, T. Enokida, K. Ohnishi and M. Matsumoto.....                                                                                                                             | 259 |
| <b>REPORTS IV PAPERS CONCERNING ON ENVIRONMENTAL HYGIENE</b>                                                                                                                                         |     |
| Photooxidation of Methanol and iso-Propanol in the Presence of NO <sub>x</sub>                                                                                                                       |     |
| .....T. Ohta, H. Bandow and H. Akimoto.....                                                                                                                                                          | 263 |
| Study of the Reaction Chamber on Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry                                                                                                                      |     |
| .....H. Seto.....                                                                                                                                                                                    | 266 |
| Air Concentration of Tetra-chloroethylene around Dry-cleaner of Laundries                                                                                                                            |     |
| .....Y. Sato, T. Tada, M. Aoki, A. Koyano and H. Yoshigi.....                                                                                                                                        | 271 |
| Relationship between Drinking Water Quality and Human Health (I)                                                                                                                                     |     |
| Investigation of Harmful Elements in Water from Water Supply System                                                                                                                                  |     |
| .....H. Sasano, S. Saito, T. Kowase, M. Takahashi, Y. Takahashi and S. Nishigaki.....                                                                                                                | 277 |
| Analysis of Chlorinated Hydrocarbons in Well Water by Gas Chromatography with a Flame Ionization Detector                                                                                            |     |
| .....N. Ohhashi, K. Yaguchi, N. Sekiyama, M. Fujisawa,<br>S. Watanabe, H. Nakamura and M. Matsumoto.....                                                                                             | 280 |
| Determination of Sewage-Odorless Volatile Sulphur Compounds in Water                                                                                                                                 |     |
| .....K. Yaguchi, N. Ohashi, N. Sekiyama, S. Watanabe,<br>M. Fujisawa, H. Nakamura and M. Matsumoto.....                                                                                              | 283 |
| Studies of Water Pollution in the Area without Sewer Systems (IV)                                                                                                                                    |     |
| The Annual Change of Water Quality in the Hirai River                                                                                                                                                |     |
| .....H. Tochimoto, H. Oshida, T. Ariga, N. Ikejima, H. Nakamura and M. Matsumoto.....                                                                                                                | 288 |
| Hygienic Studies on Tertiary Treatment Waters (II)                                                                                                                                                   |     |
| Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Sewage and Reuse Water                                                                                                                                          |     |
| .....T. Ariga, H. Oshida, H. Tochimoto, H. Nakamura and M. Matsumoto.....                                                                                                                            | 293 |
| Seasonal Changes of Mite Fauna and Population in Four Concrete Apartment Houses                                                                                                                      |     |
| .....M. Yoshikawa, K. Hanaoka and Y. Yamada.....                                                                                                                                                     | 299 |
| Studies in Controlling Mites (I)                                                                                                                                                                     |     |
| Effects of Fenitrothion-Treated Paper on a Cheese Mite, <i>Tyrophagus putrescentiae</i> (Schränk)                                                                                                    |     |
| .....M. Ohno and M. Yoshikawa.....                                                                                                                                                                   | 307 |
| On Changes in Numbers of Larvae and Imagines of <i>Chironomus yoshimatsui</i> Martin et Sublette (Diptera; Chironomidae), and Drifts of the Larvae after Applications of Temephos in the Kanda River |     |
| .....M. Ohno and K. Shimizu.....                                                                                                                                                                     | 314 |



|                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                 |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Biological Monitoring on Lead and Cadmium in Human Blood                                                                                   | C. Nagashima and T. Ishikawa.....                                                                                                                                               | 322 |
| A Biological Monitoring on Cadmium in Normal Human Kidney Cortex                                                                           | T. Ishikawa and C. Nagashima.....                                                                                                                                               | 328 |
| Effects of NO <sub>2</sub> and/or O <sub>3</sub> Exposure on Mucopolysaccharide Metabolism in Rats                                         | T. Suzuki, Y. Saga and I. Mizoguchi.....                                                                                                                                        | 331 |
| Pathological Changes in Lungs of Rats Exposed to Ozone and Mixtures of Nitrogen Dioxide and Ozone                                          | N. Terada, T. Suzuki, M. Ohsawa, M. Fukuda, S. Ikeda and I. Mizoguchi.....                                                                                                      | 337 |
| Effect of Subchronic Exposure of NO <sub>2</sub> and O <sub>3</sub> on Pulmonary Connective Tissue                                         | T. Ishikawa.....                                                                                                                                                                | 347 |
| Properties of Accumulated Dusts in Air-conditioning Duct                                                                                   | Y. Sato.....                                                                                                                                                                    | 352 |
| Subacute Oral Administration of Lead Acetate to the Pigeon—<br>the Distribution of Lead in the Blood and Search for Nuclear Inclusion Body | H. Seki, K. Minowa, N. Suzuki, S. Suzuki, I. Mizoguchi,<br>T. Terayama, T. Nakao, M. Murakami, F. Sugimori, S. Iwama,<br>M. Nagahashi, G. Ohi, K. Nakamura and R. Kawamura..... | 356 |
| Influence of Lead on Immunological Response of Pigeon ( <i>Columba livia var</i> ) to<br>the <i>Trichomonas gallinae</i>                   | K. Minowa, H. Seki, N. Suzuki, S. Suzuki, T. Terayama, I. Mizoguchi,<br>M. Murakami, F. Sugimori, S. Iwama, M. Nagahashi and G. Ohi.....                                        | 362 |
| Relationship between Mortalities from Diseases of the Circulatory Systems and Social<br>and Environmental Indices in Tokyo                 | K. Makino and I. Mizoguchi.....                                                                                                                                                 | 367 |
| On Outlier and Missing Data Problems in Epidemiological and Biological Studies                                                             | K. Makino.....                                                                                                                                                                  | 376 |
| Water Qualities of Outer Moats around the Imperial Palace<br>—Relations between the Amounts of Phytoplankton and Nutrients—                | M. F. Watanabe, Y. Tsuchiya and S. Nishigaki.....                                                                                                                               | 383 |

## REPORTS V PAPERS CONCERNING ON TOXICOLOGY

|                                                                                                                                                       |                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Toxicological Studies on Rats Fed with Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) and Butylated<br>Hydroxytoluene (BHT) for 6 Months                         | H. Ichikawa, M. Yoneyama, H. Kobayashi, Y. Tada, T. Nakao and K. Hiraga.....          | 387 |
| Lifespan Feeding Studies by Combined of Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) and<br>Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats                             | S. Iguchi, H. Takahashi, T. Ikeda, S. Hayashida and K. Hiraga.....                    | 392 |
| Lifespan Feeding Studies by Combined Use of Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) and<br>Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats —Nonneoplastic Changes— | T. Fujii, Y. Tada, A. Nagasawa, H. Mikuriya, N. Yano,<br>K. Yuzawa and K. Hiraga..... | 399 |
| Lifespan Feeding Studies by Combined Use of Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) and<br>Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats —Neoplasms—             | T. Fujii, Y. Tada, A. Nagasawa, H. Mikuriya, N. Yano,<br>K. Yuzawa and K. Hiraga..... | 413 |

|                                                                                                                                                         |                                                        |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----|
| Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on Fitzgerald Factor, Fletcher Factor and Complement Fixation Activity of Rat Plasma                          | O. Takahashi and K. Hiraga.....                        | 423 |
| On the Cause of Vitamin K Deficiency in Male Rat Fed with Butylated Hydroxytoluene (BHT)                                                                | H. Suzuki, T. Nakao and K. Hiraga.....                 | 429 |
| Effects of Butylated Hydroxytoluene on the Level of Glutathione and the Activity of Glutathione-S-transferase in Rat Liver                              | Y. Nakagawa, T. Nakao and K. Hiraga.....               | 431 |
| Toxicity of <i>o</i> -Phenylphenol (OPP) by Dietary Administration to Male Rats for 91 Weeks                                                            | K. Nakamura, T. Ikeda, S. Iguchi and K. Hiraga.....    | 434 |
| Transplantability of Urinary Bladder Tumor Induced in F344 Rats by Dietary Administration of Sodium <i>o</i> -Phenylphenate (OPP-Na) -An Interim Report | K. Tayama, K. Nakamura and K. Hiraga.....              | 444 |
| Biological Fate of <i>o</i> -Phenylphenol in Rats 1. Distribution and Excretion after Oral Administration                                               | H. Ichikawa, H. Kobayashi and T. Nakao.....            | 451 |
| Metabolism of <i>o</i> -Phenylphenol (OPP) in Rats Metabolic Profile of OPP in Rats fed Dietary for Long Period.....                                    | K. Ushiyama, J. Kabashima and T. Nakao.....            | 455 |
| Effect of <i>o</i> -Phenylphenol Sodium Salt (OPP-Na) on Enzymes and Proteins in Rat Urine                                                              | F. Nagai and T. Nakao.....                             | 458 |
| Effect of Sodium <i>o</i> -Phenylphenate (OPP-Na) on Acid Phosphatase in Rat Urine (II)                                                                 | J. Kabashima and T. Nakao.....                         | 462 |
| Effect of Sodium <i>o</i> -Phenylphenate (OPP-Na) on Alkaline Phosphatase in Rat Urine                                                                  | H. Kobayashi, J. Kabashima and T. Nakao.....           | 467 |
| SDS-Gel-Electrophoretic Profile of Liver Microsome Fractions of Rats Injured with <i>o</i> -Phenylphenol                                                | K. Fujitani, K. Ushiyama and T. Nakao.....             | 470 |
| Effects of <i>o</i> -Phenylphenol (OPP) and its Related Compounds on Adenylate Cyclase                                                                  | A. Nakagawa and T. Nakao.....                          | 473 |
| Effect of <i>o</i> -Phenylphenol and its Related Compounds on Horse Kidney Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase                                     | T. Ohno, F. Nagai and T. Nakao.....                    | 477 |
| Effect of <i>o</i> -Phenylphenol Incubated with S-9 mix Induced by Phenobarbital or 3-Methylcholanthrene on Chromosomes in CHO-K1 Cells                 | S. Nawai, S. Yoshida, T. Nakao and K. Hiraga.....      | 480 |
| Effects of <i>o</i> -Phenylphenol (OPP) on the Mutagenicity of Chemical Mutagens in the <i>Salmonella</i> /Microsome Test                               | H. Fujita, A. Kojima and K. Hiraga.....                | 484 |
| Cytogenetic Studies on Rats Fed with <i>o</i> -Phenylphenol (OPP) and Sodium <i>o</i> -Phenylphenate (OPP-Na) for Long Term.....                        | S. Yoshida and K. Hiraga.....                          | 489 |
| Increase of Urinary Bladder Weight in Female F344/DuCrj Rats Fed with Thiabendazole (TBZ)                                                               | H. Mikuriya, S. Hayashida, T. Fujii and K. Hiraga..... | 492 |
| Teratological Studies of Thiabendazole (TBZ) in Mice Single Administration Test with TBZ Suspended in Gum Arabic Solution                               | A. Ogata, H. Ando, Y. Kubo and K. Hiraga.....          | 495 |

|                                                                                                                          |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Teratological Studies of Thiabendazole (TBZ) in Mice Pair-feeding Test                                                   |            |
| .....A. Ogata, H. Ando, Y. Kubo and K. Hiraga.....                                                                       | 500        |
| Teratological Studies of Thiabendazole (TBZ) in Mice                                                                     |            |
| Successive Administration Test in Early Organogenesis from Days 7 through 9 of Gestation                                 |            |
| .....H. Ando, Y. Kubo, A. Ogata and K. Hiraga.....                                                                       | 506        |
| Teratological Studies of Thiabendazole (TBZ) in Mice                                                                     |            |
| Comparative Teratogenicity Using the ICR Strain Mice Purchased from Three Different Commercial Breeders                  |            |
| .....Y. Kubo, H. Ando, A. Ogata and K. Hiraga.....                                                                       | 511        |
| Inhalation Experiment of Chromite Ore Residue Dust on Rats for 2 Years                                                   |            |
| —(I) Histopathological Observation of Respiratory System                                                                 |            |
| .....Y. Sakamoto, N. Kamiya, T. Ikeda and K. Hiraga.....                                                                 | 518        |
| Cumulative Skin Irritation Test by Water Extract of Chromite Ore Residue (II)                                            |            |
| Long-Term Application on Rabbit Auricula                                                                                 |            |
| .....N. Fukumori, J. Kabashima, S. Iguchi and K. Hiraga.....                                                             | 527        |
| Effects of Dietary Exposure to Di-2-ethylhexyl Phthalate on Steroid Metabolism in Male Rats                              |            |
| .....S. Oishi and K. Hiraga.....                                                                                         | 535        |
| Comparative Toxicity of Phosphoric Acid Esters in Male Rats                                                              |            |
| .....H. Oishi, S. Oishi and K. Hiraga.....                                                                               | 540        |
| Effect of Various Food Additives and Linear Alkylbenzene Sulfonate on Metabolic Cooperation in Chinese Hamster Cells     |            |
| .....M. Yoneyama, T. Nakao and K. Hiraga.....                                                                            | 544        |
| <i>In vitro</i> Assay of Tumor Promoter by the Inhibition of Metabolic Cooperation in Cultured Chinese Hamster V79 Cells |            |
| .....M. Sasaki, T. Nakao and K. Hiraga.....                                                                              | 547        |
| Lifespan in F344/DuCrj Rats under Our Laboratory Conditions                                                              |            |
| .....H. Takahashi, S. Iguchi, K. Tayama, T. Ikeda, S. Hayashida and K. Hiraga.....                                       | 552        |
| Relation of Part per Million in Diet to Milligram per Kilogram Body Weight per Day in F344/DuCrj Rat                     |            |
| .....S. Iguchi, H. Takahashi and K. Hiraga.....                                                                          | 555        |
| Uniformity of Test Article Concentrations in Pellet Diet used Feeding Study                                              |            |
| .....N. Kamiya and K. Hiraga.....                                                                                        | 561        |
| <b>PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS.....</b>                                                                                 | <b>565</b> |
| <b>THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS.....</b>                                                         | <b>569</b> |

# 報 文 I

感染症等に関する調査研究

REPORTS I

PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

1967年から1981年に食中毒事例，散発下痢症患者および健康者から検出された  
サルモネラの血清型およびその推移

高橋正樹\*, 伊藤武\*, 斎藤香彦\*, 坂井千三\*

Serotypes of Salmonella Isolated from Food Poisoning, Sporadic Cases  
and Healthy Carriers in Tokyo (1967-1981)

MASAKI TAKAHASHI\*, TAKESHI ITOH\*, KAHIKO SAITO\* and SENZO SAKAI\*

During the period from 1967 through 1981, a total of 177 outbreaks of Salmonella food poisoning had occurred in Tokyo. The causative strains of these Salmonella food poisoning outbreaks were distributed into 31 serotypes. Among them, *S. typhimurium* (38.8%) was the most common, followed by *S. enteritidis* (10.1%), *S. thompson* (9.0%), *S. infantis* (6.7%) and *S. heidelberg* (3.4%).

3,150 Salmonella isolates from sporadic cases during the same period were typed as 87 different Salmonella serotypes. The 20 most frequent serotypes accounted for 83.3% of the total isolates. The predominant serotypes were *S. typhimurium* (41.6%), *S. infantis* (5.1%), *S. thompson* (4.1%) and *S. panama* (3.6%).

Isolation frequency of *S. panama*, *S. agona*, *S. litchfield*, *S. london*, *S. braenderup* and *S. cerro* increased remarkably since 1974, while *S. enteritidis* and *S. shwarzengrund* have decreased.

On the other hand, 5,933 Salmonella isolates from healthy carriers were typed as 115 serotypes. Though most common serotypes were similar to that of sporadic cases, the frequency of *S. typhimurium* (15.7%) was rather low.

**Keywords :** salmonella, serotypes, food poisoning, diarrheal disease, healthy carrier

緒 言

著者らはすでに1966年から1975年までに、東京都内で発生したサルモネラ食中毒あるいは散発下痢症患者から検出されたサルモネラの血清型を検討し、その流行菌型が極めて多彩であること<sup>1)</sup>、また欧米諸外国で検出されるサルモネラの血清型<sup>2-4)</sup>と類似していることを報告してきた。

その後においても、東京都内で発生するサルモネラ食中毒事例は減少する傾向もなく、年間15事例前後の発生がみられ、その原因菌型は *S. typhimurium* の占める割合が高くなってきた。また散発下痢症患者から検出されるサルモネラの菌型はますます多彩化の傾向が認められる。こうしたヒトから分離されるサルモネラの血清型の分布や年次別推移の実態を把握しておくことは、今後

本菌による食中毒事例の流行菌型および生態学的研究に重要な基礎的資料を提供するものと考えられる。

そこで著者らは過去15年間、東京都内で発生した食中毒事例や散発下痢症患者および健康者から分離されたサルモネラの血清型について年次別推移を検討した。

供試菌株および方法

**供試菌株** 食中毒由来株は1967年から1981年の15年間に東京都内で発生したサルモネラ食中毒178件の患者由来株を対象とした。散発下痢症患者由来株は東京都内の病院で、下痢症患者から検出し、当研究所で同定依頼を受けた3,150株である。また健康者由来株は同年間に東京都内在住の健康者から当研究所で分離した菌株ならびにその他の検査機関で分離し、当研究所に同定依頼された計5,933株である。

\* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科 160 東京都新宿区百人町3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Serotypes of Salmonella from Food Poisoning by Year in Tokyo

| Serotypes                     | Year |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |            | Total(%) |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------|----------|
|                               | 1967 | 1968 | 1969 | 1970 | 1971 | 1972 | 1973 | 1974 | 1975 | 1976 | 1977 | 1978 | 1979 | 1980 | 1981 |            |          |
| <i>S. typhimurium</i>         | 6*   | 3    | 2    | 4    | 2    | 5    | 3    | 5    | 4    | 10   | 4    | 2    | 5    | 7    | 7    | 69(38.8)   |          |
| <i>S. enteritidis</i>         |      | 2    | 2    | 3    | 3    | 1    | 3    |      |      |      | 1    |      | 1    |      | 2    | 18(10.1)   |          |
| <i>S. thompson</i>            |      | 1    | 4    | 4    |      | 1    | 1    | 2    | 1    |      | 1    |      |      |      | 1    | 16( 9.0)   |          |
| <i>S. infantis</i>            |      |      | 1    |      | 2    | 1    | 1    | 2    | 1    |      | 1    | 1    |      | 2    |      | 12( 6.7)   |          |
| <i>S. heidelberg</i>          | 3    |      |      |      |      |      | 1    |      |      |      |      | 1    |      | 1    |      | 6( 3.4)    |          |
| <i>S. isangi</i>              |      |      |      | 1    | 1    |      | 1    |      |      |      |      |      |      |      | 1    | 4( 2.2)    |          |
| <i>S. san-diego</i>           |      |      | 2    |      | 1    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 3          |          |
| <i>S. bareilly</i>            |      |      |      |      | 3    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 3          |          |
| <i>S. derby</i>               | 1    | 1    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 1    |      | 3          |          |
| <i>S. schwarzengrund</i>      |      |      | 1    |      | 1    |      |      |      |      | 1    |      |      |      |      |      | 3          |          |
| <i>S. potsdam</i>             |      |      |      |      |      |      |      | 1    | 1    | 1    |      |      |      |      |      | 3          |          |
| <i>S. newport</i>             |      |      |      | 1    |      |      |      |      |      |      |      | 2    |      |      |      | 3          |          |
| <i>S. bovis-morbificans</i>   |      |      |      |      | 2    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 2          |          |
| <i>S. give</i>                |      |      |      | 1    |      | 1    |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 2          |          |
| <i>S. senftenberg</i>         |      |      |      |      | 1    |      | 1    |      |      |      |      |      |      |      |      | 2          |          |
| <i>S. blockley</i>            |      | 1    |      | 1    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 2          |          |
| <i>S. montevideo</i>          |      |      |      |      |      | 1    |      |      |      |      |      |      |      |      | 1    | 2          |          |
| <i>S. oranienburg</i>         | 1    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 1    | 2          |          |
| <i>S. saint-paul</i>          |      | 1    |      |      |      |      |      |      |      |      | 1    |      |      |      |      | 2          |          |
| <i>S. anatum</i>              | 1    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 1    |      |      |      | 2          |          |
| <i>S. litchfield</i>          |      |      |      |      |      |      |      |      | 1    |      |      | 1    |      |      |      | 2          |          |
| <i>S. kottbus</i>             |      |      |      |      |      | 1    |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 1          |          |
| <i>S. krefeld</i>             |      |      |      |      |      |      | 1    |      |      |      |      |      |      |      |      | 1          |          |
| <i>S. muenchen</i>            |      |      |      |      |      | 1    |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 1          |          |
| <i>S. nagoya</i>              |      |      |      | 1    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 1          |          |
| <i>S. newington</i>           | 1    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 1          |          |
| <i>S. hwhittingfoss</i>       |      |      |      |      | 1    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 1          |          |
| <i>S. java</i>                |      |      |      |      |      |      |      | 1    |      |      |      |      |      |      |      | 1          |          |
| <i>S. dublin</i>              |      | 1    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 1          |          |
| <i>S. oslo</i>                |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 1    |      |      |      |      |      | 1          |          |
| <i>S. panama</i>              |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 1    |      | 1          |          |
| <hr/>                         |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |            |          |
| { <i>S. braenderup</i>        |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 1    |      | 1          |          |
| { <i>S. litchfield</i>        |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |            |          |
| { <i>S. java</i>              |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 1    |      | 1          |          |
| { <i>S. isangi</i>            |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |            |          |
| { <i>S. newport</i>           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 1    |      |      |      | 1          |          |
| { <i>S. panama</i>            |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |            |          |
| { <i>S. typhimurium</i>       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |            |          |
| { <i>S. bovis-morbificans</i> |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 1    |      |      |      |      | 1          |          |
| { <i>S. typhimurium</i>       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |            |          |
| { <i>S. enteritidis</i>       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 1    |      |      |      | 1          |          |
| { <i>S. livingstone</i>       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |            |          |
| { <i>S. infantis</i>          |      |      |      | 1    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 1          |          |
| { <i>S. newport</i>           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |            |          |
| { <i>S. infantis</i>          |      |      |      |      | 1    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 1          |          |
| { <i>S. bareilly</i>          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |            |          |
| Total                         | 13   | 10   | 12   | 17   | 18   | 12   | 12   | 11   | 8    | 13   | 10   | 9    | 6    | 14   | 13   | 178(100.0) |          |

\* Number of outbreaks

Table 2. Serological O Groups of Salmonella Isolated from Sporadic Cases

| O groups         | Year |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |              | Total(%) |
|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------------|----------|
|                  | 1967 | 1968 | 1969 | 1970 | 1971 | 1972 | 1973 | 1974 | 1975 | 1976 | 1977 | 1978 | 1979 | 1980 | 1981 |              |          |
| A                | —    | 2    | 1    | 1    | —    | —    | —    | 1    | —    | —    | 1    | 2    | 1    | —    | —    | 9            |          |
| B                | 139  | 51   | 115  | 123  | 116  | 139  | 77   | 103  | 158  | 88   | 182  | 141  | 143  | 96   | 124  | 1,795(57.0)  |          |
| C <sub>1</sub>   | 63   | 20   | 52   | 29   | 27   | 17   | 12   | 24   | 24   | 19   | 42   | 39   | 82   | 54   | 39   | 543(17.2)    |          |
| C <sub>2</sub>   | 15   | 12   | 11   | 15   | 6    | 8    | 2    | 8    | 6    | 4    | 24   | 23   | 39   | 19   | 13   | 205( 6.5)    |          |
| C <sub>3</sub>   | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | 1    | —    | 3    | —    | 4            |          |
| D <sub>1</sub>   | 16   | 16   | 17   | 16   | 12   | 21   | 9    | 20   | 26   | 43   | 21   | 14   | 22   | 4    | 7    | 263( 8.3)    |          |
| E <sub>1</sub>   | 11   | 9    | 6    | 6    | 12   | 3    | 2    | 7    | 15   | 9    | 64   | 18   | 17   | 11   | 5    | 195( 6.2)    |          |
| E <sub>2</sub>   | 6    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | 1    | 4    | 11           |          |
| E <sub>4</sub>   | 8    | 1    | 8    | 5    | 3    | 2    | —    | 1    | 6    | 4    | 4    | 1    | 4    | 3    | 6    | 56( 1.8)     |          |
| G <sub>2</sub>   | —    | —    | 1    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | 2    | —    | 5    | 5    | 4    | 1    | 18           |          |
| H                | —    | —    | 1    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | 1    | —    | —    | 2            |          |
| I                | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | 1    | —    | —    | 2    | 2    | 1    | 1    | 2    | 9            |          |
| K                | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | 1    | —    | 2    | 7    | 6    | 14   | 3    | 2    | 35( 1.1)     |          |
| M                | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | 2    | —    | 2            |          |
| P                | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | 1    | —    | —    | 1            |          |
| Q                | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | 1    | —    | —    | 1            |          |
| R                | —    | —    | —    | —    | 1    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | 1            |          |
| Total            | 258  | 111  | 212  | 195  | 177  | 189  | 102  | 166  | 235  | 171  | 347  | 252  | 331  | 201  | 203  | 3,150(100.0) |          |
| No. of Serotypes | 32   | 22   | 29   | 25   | 25   | 25   | 21   | 28   | 31   | 22   | 41   | 44   | 47   | 38   | 42   | 87           |          |

血清型別 分離菌株の O 群型別は A—E 群ならびに F, G, H, I, K, L, O の O 群は市販診断用抗 O 血清 (市販品: デンカ生研), それ以外の O 群は自家調製の抗 O 因子血清, 一部 Difco 社製抗 O 因子血清を用いて, のセガラス凝集反応により行った。

H 抗原の型別は自家調製<sup>5)</sup>した抗 H 因子血清および一部市販抗 H 血清 (デンカ生研) を用い, 試験管内凝集反応によって実施した。H 抗原の相誘導は Jameson の方法<sup>6)</sup>に従い, 自家調製した抗 H 血清をろ紙片 (5×50mm) に吸収させ, 普通寒天平板上で行った。

#### 成 績

##### 食中毒事例由来株の血清型

1967年から1981年の15年間に東京都内で発生したサルモネラ食中毒事例は178件であり, その菌型数は C<sub>1</sub> 群が8菌型, B群7菌型, C<sub>2</sub> 群7菌型, D<sub>1</sub> 群3菌型, E<sub>1</sub> 群2菌型, E<sub>4</sub> 群2菌型, E<sub>2</sub> 群1菌型および I 群1菌型で, 計31菌型であった。各年次ごとのサルモネラ食中毒事件数とその血清型を Table 1 に示した。検出頻度からみると, *S. typhimurium* によるものが圧倒的に多く 38.8% を占め, 次いで *S. enteritidis* (10.1%), *S.*

*thompson* (9.0%), *S. infantis* (6.7%), *S. heidelberg* (3.4%) の順であった。その他の26菌型は15年間に1～3件であった。

主要流行菌型の年次別成績では, *S. typhimurium* は毎年検出されているが, 最近本菌型の占める割合が高く, 1967～1970年では18～46%であったものが, 1980年では50%, 1981年では53.8%であった。*S. enteritidis* と *S. infantis* もほとんど毎年検出されている。*S. thompson* による食中毒は1970年頃には多数認められていたが, 最近では少なくなった。その他, 特殊な血清型として, 1968年に *S. dublin* が1例, 1971年 *S. bovis-morbificans* 2例および *S. huttingfoss* 1例が認められる。

同一事例より2～3菌型の検出された集団例は7事例で, *S. java* と *S. isangi* 1例, *S. newport* と *S. panama* 1例, *S. typhimurium* と *S. bovis-morbificans* 1例などであった。(Table 1)

##### 散発下痢症患者由来株の血清型

O 群 過去15年間に散発下痢症患者から検出されたサルモネラ 3,150 株の O 群別の成績を Table 2 に示した。A 群から R 群にわたり 17 の O 群が認められた。そのう

Table 3. Serological O Groups and Serotypes of Salmonella Isolated from Sporadic Cases and Healthy Carriers

| O groups       | No. of strains | No. of serotypes | Serotypes                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------|----------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A              | 9              | 1                | <i>S. paratyphi A</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| B              | 3,980          | 22               | <i>S. paratyphi B</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. heidelberg</i> <i>S. bredeney</i> <i>S. derby</i><br><i>S. shwarzengrund</i> <i>S. stanley</i> <i>S. saint-paul</i> <i>S. kiambu</i> <i>S. azteca</i> <i>S. san-diego</i><br><i>S. reading</i> <i>S. agona</i> <i>S. sofia</i> <i>S. abony</i> <i>S. eppendorf</i> <i>S. java</i> <i>S. californica*</i><br><i>S. bradford</i> <i>S. albert</i> <i>S. stanleyville</i> <i>S. chester</i>                                                                                                                                                               |
| C <sub>1</sub> | 2,042          | 30               | <i>S. tennessee</i> <i>S. thompson</i> <i>S. infantis</i> <i>S. montevideo</i> <i>S. livingstone</i><br><i>S. oranienburg</i> <i>S. potsdam</i> <i>S. braenderup</i> <i>S. georgia</i> <i>S. virchow</i> <i>S. bareilly</i><br><i>S. isangi</i> <i>S. oslo</i> <i>S. irumu</i> <i>S. lomita</i> <i>S. ohio</i> <i>S. oritamerin</i> <i>S. kivu*</i><br><i>S. mikawashima*</i> <i>S. concord*</i> <i>S. richmond*</i> <i>S. augustenborg*</i> <i>S. galiema*</i><br><i>S. lille*</i> <i>S. singapore</i> <i>S. inganda</i> <i>S. riggil</i> <i>S. escanaba</i> <i>S. mbandaca</i><br><i>S. coleypark*</i> |
| C <sub>2</sub> | 756            | 15               | <i>S. blockley</i> <i>S. newport</i> <i>S. litchfield</i> <i>S. narashino</i> <i>S. loanda</i> <i>S. kottbus</i><br><i>S. nagoya</i> <i>S. bovis-morbificans</i> <i>S. manchester</i> <i>S. muenchen</i> <i>S. manhattan</i><br><i>S. takoradi</i> <i>S. chailey</i> <i>S. lindenburg*</i> <i>S. tananarive*</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| C <sub>3</sub> | 17             | 2                | <i>S. kentucky</i> <i>S. albany*</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| D <sub>1</sub> | 662            | 10               | <i>S. typhi</i> <i>S. enteritidis</i> <i>S. panama</i> <i>S. jamaica</i> <i>S. mendoza</i> <i>S. eastbourne</i><br><i>S. kapemba*</i> <i>S. onarimon*</i> <i>S. seremban*</i> <i>S. miyazaki*</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| E <sub>1</sub> | 862            | 12               | <i>S. anatum</i> <i>S. give</i> <i>S. muenster</i> <i>S. meleagridis</i> <i>S. london</i> <i>S. sinstorff*</i><br><i>S. jedburgh*</i> <i>S. vejle</i> <i>S. orion</i> <i>S. lexington</i> <i>S. weltevreden</i> <i>S. amsterdam*</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| E <sub>2</sub> | 81             | 5                | <i>S. new-brunswick*</i> <i>S. drypool*</i> <i>S. kinshasa*</i> <i>S. binza*</i> <i>S. newington</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| E <sub>4</sub> | 418            | 9                | <i>S. krefeld</i> <i>S. taksony</i> <i>S. westerstede</i> <i>S. senftenberg</i> <i>S. liverpool*</i> <i>S. calabar*</i><br><i>S. llandoff*</i> <i>S. maiduguri*</i> <i>S. dallgow*</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| F              | 2              | 1                | <i>S. aberdeen*</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| G <sub>1</sub> | 1              | 1                | <i>S. poona*</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| G <sub>2</sub> | 53             | 5                | <i>S. worthington</i> <i>S. havana</i> <i>S. cubana*</i> <i>S. farmsen*</i> <i>S. bracknell*</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| H              | 4              | 3                | <i>S. fischerkietz</i> <i>S. bahrenfeld</i> <i>S. madelia*</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| I              | 13             | 2                | <i>S. hvittingfoss</i> <i>S. hull*</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| K              | 142            | 1                | <i>S. cerro</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| L              | 4              | 2                | <i>S. minnesota*</i> <i>S. good*</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| M              | 2              | 1                | <i>S. pomona</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| O              | 29             | 2                | <i>S. adelaide*</i> <i>S. alachua*</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| P              | 2              | 1                | <i>S. lansing*</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Q              | 2              | 1                | <i>S. wandsworth</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| R              | 2              | 1                | <i>S. johannesburg</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Total          | 9,083          | 127              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

\* The organisms were only isolated from healthy carriers

ち、B群が最も多く57.0%を占め、次いでC<sub>1</sub>群(17.2%)、D<sub>1</sub>群(8.3%)、C<sub>2</sub>群(6.5%)、E<sub>1</sub>群(6.2%)およびE<sub>4</sub>群(1.8%)の順であった。A—E群の占める割合は97.8%で、E群以降の菌株は2.2%にすぎなかった。A—E群以外のO群ではK群(1.1%)とG群(0.6%)の菌株が比較的多く認められた。年次別にみると、1967年から1973年まではほとんどがA—E群であったが、1974年以降にK群、G<sub>2</sub>群、I群、M群、P群、Q群およびR群が検出された。

血清型 散発下痢症患者由来株3,150菌株は87菌型に型別された。年次別の菌型数をTable 2に示した。1967～1976年までの菌型数は22～30前後であったが、1977年以降菌型数の増加傾向が認められる。散発下痢症患者および健康者から検出されたサルモネラの血清型をTable 3に示した。このうち散発下痢症患者由来株の上位20までの血清型をTable 4に示した。主要菌型は*S. typhimurium*(41.6%)が圧倒的に多く、次いで*S. infantis*(5.1%)、*S. thompson*(4.1%)、*S. panama*(3.6%)、



Table 4. Yearly Shift of most Common Serotypes of Salmonella from Sporadic Cases

| Serotypes               | Year |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |              | Total(%) |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------------|----------|
|                         | 1967 | 1968 | 1969 | 1970 | 1971 | 1972 | 1973 | 1974 | 1975 | 1976 | 1977 | 1978 | 1979 | 1980 | 1981 |              |          |
| <i>S. typhimurium</i>   | 84   | 27   | 81   | 107  | 96   | 112  | 63   | 91   | 137  | 72   | 128  | 107  | 75   | 61   | 69   | 1,310(41.6)  |          |
| <i>S. infantis</i>      | 9    | 4    | 15   | 10   | 15   | 9    | 1    | 9    | 10   | 4    | 20   | 13   | 17   | 17   | 8    | 161( 5.1)    |          |
| <i>S. thompson</i>      | 23   | 8    | 22   | 15   | 6    | 3    | —    | 3    | 5    | 11   | 5    | 11   | 10   | 4    | 4    | 130( 4.1)    |          |
| <i>S. panama</i>        | 3    | 1    | —    | —    | 2    | —    | 3    | 11   | 19   | 36   | 9    | 9    | 12   | 2    | 6    | 113( 3.6)    |          |
| <i>S. enteritidis</i>   | 13   | 12   | 14   | 9    | 10   | 12   | 2    | —    | 3    | 7    | 8    | —    | 7    | 1    | 1    | 99( 3.1)     |          |
| <i>S. agona</i>         | —    | —    | —    | —    | 1    | —    | —    | —    | —    | 5    | 23   | 6    | 30   | 3    | 7    | 75( 2.4)     |          |
| <i>S. java</i>          | —    | —    | —    | —    | 2    | 1    | 1    | 2    | 3    | 2    | 3    | 8    | 14   | 13   | 25   | 74           |          |
| <i>S. heidelberg</i>    | 26   | 8    | 4    | 2    | 2    | 7    | 2    | 2    | 5    | —    | 2    | 1    | 2    | 1    | 9    | 73           |          |
| <i>S. litchfield</i>    | 2    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | 4    | —    | 1    | 3    | 9    | 24   | 13   | 11   | 67           |          |
| <i>S. anatum</i>        | 7    | 3    | 5    | 2    | 7    | 1    | 2    | 1    | 4    | 1    | 12   | 10   | 4    | 5    | 3    | 67           |          |
| <i>S. derby</i>         | 7    | 9    | 7    | 3    | 6    | 2    | —    | 1    | 2    | 2    | 3    | 3    | 7    | 8    | 3    | 63           |          |
| <i>S. give</i>          | 4    | 4    | —    | 4    | 2    | 2    | —    | 4    | 7    | 2    | 16   | 2    | 5    | 2    | —    | 54           |          |
| <i>S. london</i>        | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | 1    | 1    | 6    | 33   | 3    | 6    | 3    | 1    | 54           |          |
| <i>S. typhi</i>         | —    | 3    | 3    | 7    | —    | 6    | 4    | 7    | 3    | —    | 4    | 5    | 2    | 1    | —    | 45           |          |
| <i>S. paratyphi B</i>   | 1    | 1    | 4    | 1    | 1    | 4    | 2    | 3    | 2    | 1    | 11   | 5    | 1    | 1    | 6    | 44           |          |
| <i>S. braenderup</i>    | 2    | —    | —    | —    | —    | —    | 3    | —    | —    | —    | —    | 1    | 13   | 12   | 12   | 43           |          |
| <i>S. newport</i>       | 5    | —    | 1    | 4    | —    | 2    | —    | 3    | 4    | 2    | 5    | 8    | 6    | 2    | —    | 42           |          |
| <i>S. senftenberg</i>   | 6    | 1    | 6    | 4    | 3    | 2    | —    | 1    | 2    | 4    | 4    | —    | 3    | 2    | 3    | 41           |          |
| <i>S. shwarzengrund</i> | 2    | 4    | 10   | 6    | 6    | 4    | 2    | 1    | 3    | —    | —    | 3    | —    | —    | —    | 41           |          |
| <i>S. tennessee</i>     | 4    | 1    | 1    | —    | 1    | 1    | —    | 10   | 2    | 1    | 3    | —    | 7    | 5    | 4    | 40           |          |
| Subtotal                | 198  | 86   | 173  | 174  | 160  | 168  | 85   | 154  | 212  | 157  | 292  | 204  | 245  | 156  | 172  | 2,636(83.7)  |          |
| Other serotypes         | 60   | 25   | 39   | 21   | 17   | 21   | 17   | 12   | 23   | 14   | 55   | 48   | 86   | 45   | 31   | 514(16.3)    |          |
| Total                   | 258  | 111  | 212  | 195  | 177  | 189  | 102  | 166  | 235  | 171  | 347  | 252  | 331  | 201  | 203  | 3,150(100.0) |          |

*S. enteritidis* (3.1%) などであった。

主要菌型の年次別推移をみると, *S. typhimurium* は Fig. 1 に示すごとく1967~1969年では分離菌株の30%前後であったが, 1970~1975年ではやや高く50~60%, それ以降減少の傾向がみられ, 1980年では30.3%, 1981年では34.0%であった。 *S. panama*, *S. agona*, *S. litchfield*, *S. london*, *S. braenderup*, *S. cerro* などは1974年以前ではまったく検出されないか, 極めてまれな血清型であったが, それ以後急激に増加した。これとは逆に *S. enteritidis*, *S. shwarzengrund* および *S. blockley* などは年次とともに減少の傾向が認められた。 *S. infantis*, *S. thompson*, *S. anatum*, *S. derby*, *S. give* などはほとんど変動がなく毎年検出されている。

#### 健康者由来株の血清型

**O群** 健康者から検出されたサルモネラ 5,933 株のO

群型別状況は散発下痢症患者由来株とほとんど同様の傾向であった。B群—E群の占める割合は98.6%であった。その内訳はB群が36.8%, C群34.8%, D<sub>1</sub>群6.7%, E群18.5%であった。E群以降ではF, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, H, I, K, L, O, P, Q, Rの各群がみられ, 特にK群が高く1.8%, G<sub>2</sub>群0.6%であった。

**血清型** 健康者由来株 5,933 菌株の血清型は115菌型であった。その主要菌型は Table 5 に示すごとく, *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. thompson*, *S. senftenberg*, *S. anatum*などで, 散発例由来株の主要菌型とほとんど同様の傾向であった。しかし, *S. typhimurium* の占める割合が散発下痢症患者由来株に比較して低く, 全体の15.7%にすぎなかった。また, 散発例では高頻度に検出された *S. enteritidis*, *S. panama* は健康者では比較的検出頻度が低かった。

年次別による血清型の推移も前述の散発例の場合とは

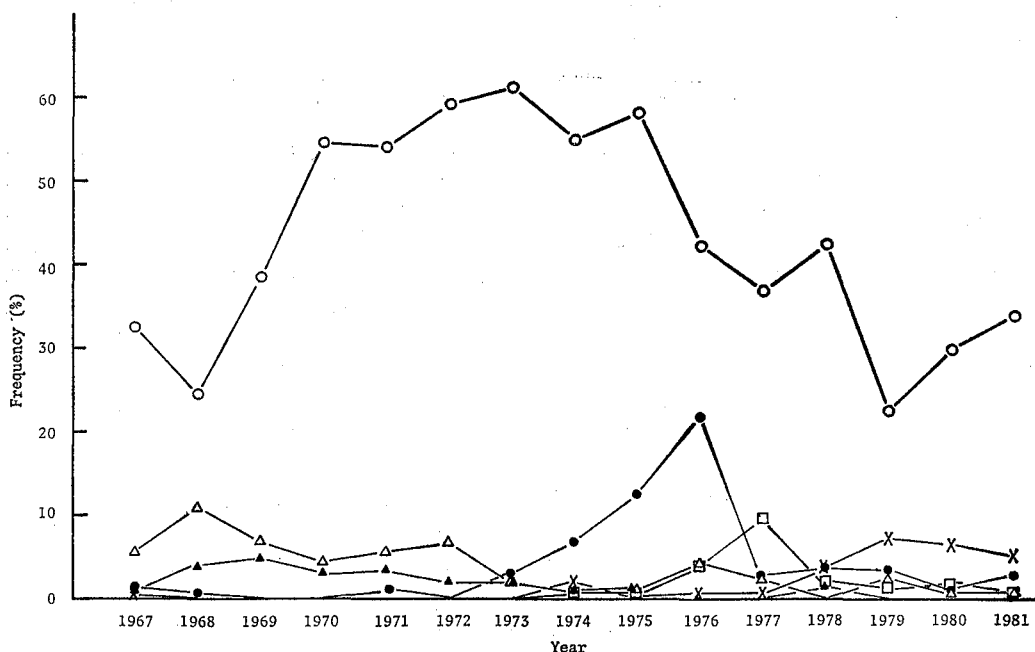


Fig. 1. Frequency of Isolation of *S. typhimurium* from Sporadic Cases by Year

○ : *S. typhimurium* △ : *S. enteritidis* ● : *S. panama*  
 □ : *S. london* × : *S. litchfield* ▲ : *S. shwarzengrund*

とんど同様の傾向であった。ただし、散発例ではほとんど認められていない。*S. sofia* が健康者から1970年～1977年の8年間で102菌株検出されたが、それ以降にはまったく検出されていない。

#### 考 察

近年、我国ではヒトから検出されるサルモネラの流行菌型は多様化の傾向が著しく、著者らは1967年～1975年に東京都内に発生したサルモネラ食中毒事例由来株は*S. typhimurium* が最も多く、次いで*S. infantis*, *S. thompson*, *S. heidelberg* など30菌型に及ぶことを指摘した<sup>1)</sup>。

1975年以降においても東京都内に発生した食中毒事例由来株、散発下痢症患者由来株および健康者由来株を対象にその血清型を検討した結果では95菌型にも及び、血清型の多様化とその推移を明らかにした。特に*S. typhimurium* の占める割合が最も高く、食中毒事例では38.8%、散発例では41.6%にも及んでいる。ただし年次別にみた場合、1972年、1973年では*S. typhimurium* が散発下痢症患者由来株の約60%を占めていたものが最近では30～34%になりやや減少の傾向がうかがえる。

1970年頃よりそれまでに我国では認められなかった

*S. montevideo*, *S. infantis*, *S. krefeld* などのサルモネラの流行がみられるようになったが、その後ではこれらの血清型が我国にも定着し、毎年検出されている。

多様な血清型のサルモネラがヒトから検出されているが、さらに1974年頃より*S. london*, *S. cerro*, *S. agona*, *S. braenderup*, *S. panama* などの新しい血清型のサルモネラが検出されるようになったことは興味ある現象である。また、これとは逆に減少の傾向のあるサルモネラとして*S. shwarzengrund*, *S. enteritidis* があげられる<sup>2)</sup>。

こうした流行菌型の変遷は、市販食肉や家畜、家禽におけるサルモネラの分布と密接に関連しているものと推察される。たとえば、1972年に*S. sofia* が健康者から多数検出されたが、最近ではヒトからは極めてまれにしか検出されていない。本菌は1971年頃よりニワトリやその食肉から多数検出された血清型であったが<sup>3)</sup>、最近ではニワトリからはほとんど検出されていない。またイギリスでは1973年頃より*S. hadar* が七面鳥から多数検出されはじめ、1977年にはヒトにも認められ、現在では*S. typhimurium* について重要な血清型となっている<sup>4)</sup>。

河西<sup>10)</sup>らは我国へ輸入された食肉や鶏卵およびその製

Table 5. Yearly Shift of most Common Serotypes of Salmonella from Healthy Carriers

| Serotypes               | Year |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | Total(%)     |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------------|
|                         | 1967 | 1968 | 1969 | 1970 | 1971 | 1972 | 1973 | 1974 | 1975 | 1976 | 1977 | 1978 | 1979 | 1980 | 1981 |              |
| <i>S. typhimurium</i>   | 23   | 33   | 66   | 122  | 94   | 136  | 200  | 85   | 61   | 22   | 20   | 34   | 7    | 12   | 19   | 934(15.7)    |
| <i>S. infantis</i>      | 9    | 16   | 34   | 40   | 84   | 73   | 57   | 34   | 46   | 33   | 18   | 16   | 4    | 11   | 5    | 480( 8.1)    |
| <i>S. thompson</i>      | 19   | 24   | 54   | 92   | 24   | 9    | 36   | 22   | 19   | 8    | —    | 5    | —    | —    | 1    | 313( 5.3)    |
| <i>S. senftenberg</i>   | 23   | 26   | 49   | 29   | 20   | 64   | 36   | 18   | 15   | 1    | 1    | 6    | 2    | —    | —    | 290( 4.9)    |
| <i>S. anatum</i>        | 33   | 14   | 47   | 40   | 26   | 21   | 28   | 11   | 8    | 2    | 5    | 25   | 1    | 2    | 3    | 266( 4.5)    |
| <i>S. shawrzengrund</i> | 9    | 16   | 48   | 63   | 45   | 26   | 17   | 6    | 16   | 3    | 2    | 3    | —    | 1    | 1    | 256( 4.3)    |
| <i>S. give</i>          | 3    | 4    | 2    | 27   | 37   | 38   | 43   | 14   | 35   | 3    | 14   | 5    | 3    | 2    | —    | 230( 3.9)    |
| <i>S. panama</i>        | 2    | 2    | 4    | 5    | 13   | 4    | 34   | 42   | 62   | 18   | 8    | 8    | —    | 4    | 4    | 210( 3.5)    |
| <i>S. derby</i>         | 21   | 30   | 19   | 26   | 28   | 18   | 28   | 12   | 2    | 1    | —    | 15   | 1    | 4    | 1    | 206( 3.5)    |
| <i>S. heidelberg</i>    | 46   | 25   | 33   | 28   | 16   | 10   | 16   | 3    | 6    | —    | —    | 4    | —    | —    | 3    | 190          |
| <i>S. tennessee</i>     | 51   | 8    | 22   | 16   | 5    | 10   | 1    | 18   | 16   | 2    | 5    | 10   | 3    | —    | 3    | 170          |
| <i>S. enteritidis</i>   | 11   | 10   | 19   | 28   | 20   | 14   | 18   | 4    | 8    | 1    | —    | 4    | 8    | —    | 2    | 147          |
| <i>S. blockley</i>      | 6    | 14   | 26   | 52   | 14   | 7    | 10   | —    | —    | —    | 1    | 6    | 2    | —    | —    | 138          |
| <i>S. agona</i>         | —    | —    | —    | 24   | 19   | 8    | 4    | 9    | 26   | 8    | 16   | 13   | 4    | 1    | 3    | 135          |
| <i>S. bredeney</i>      | 32   | 2    | 20   | 30   | 3    | 7    | 9    | 3    | 1    | —    | 2    | —    | 1    | 1    | —    | 111          |
| <i>S. cerro</i>         | —    | —    | —    | 4    | 9    | 16   | 30   | 18   | 6    | 1    | 2    | 18   | 2    | 1    | —    | 107          |
| <i>S. newport</i>       | 3    | 1    | 5    | 10   | 15   | 16   | 11   | 13   | 3    | 3    | 4    | 19   | 2    | 1    | 1    | 107          |
| <i>S. sofia</i>         | —    | —    | —    | 1    | 20   | 40   | 28   | 10   | 1    | 1    | 1    | —    | —    | —    | —    | 102          |
| <i>S. kottbus</i>       | —    | —    | 11   | 47   | 18   | 14   | 2    | 2    | 4    | —    | —    | 2    | 1    | —    | —    | 101          |
| <i>S. london</i>        | —    | —    | 1    | 1    | —    | 1    | 7    | 4    | 21   | 6    | 21   | 15   | 4    | 1    | 4    | 86           |
| Subtotal                | 291  | 225  | 460  | 685  | 510  | 532  | 615  | 328  | 356  | 113  | 120  | 208  | 45   | 41   | 50   | 4,579(77.2)  |
| Other serotypes         | 108  | 85   | 156  | 146  | 160  | 155  | 129  | 87   | 63   | 16   | 47   | 108  | 36   | 28   | 30   | 1,354(22.8)  |
| Total                   | 399  | 310  | 616  | 831  | 670  | 687  | 744  | 415  | 419  | 129  | 167  | 316  | 81   | 69   | 80   | 5,933(100.0) |

品のサルモネラの血清型も多彩で93菌型に及ぶことを報告している。それらの輸入食品が我国におけるサルモネラの流行菌型の多彩化の要因をなしていることは確かであろう<sup>11,12)</sup>。

また最近、東南アジアなどの海外旅行者から多数サルモネラが検出されており、今後我国におけるサルモネラの分布もこれらの影響を少なからず受けてくるものと考えられる。

### 結 論

1967年～1981年の15年間における食中毒事例、散発下痢症患者および健康者から分離されたサルモネラの血清型および年次別推移について検討した結果、以下の成績を得た。

#### 食中毒事例由来株の血清型

東京都内で発生したサルモネラ食中毒事例178件の血清型はC<sub>1</sub>群8菌型、B群7菌型、C<sub>2</sub>群7菌型、D<sub>1</sub>群3菌

型、E<sub>1</sub>群2菌型、E<sub>4</sub>群2菌型、E<sub>1</sub>群1菌型およびI群1菌型の計31菌型であった。主要原因菌型は*S. typhimurium* (38.8%) によるものが圧倒的に多く、次いで*S. enteritidis* (10.1%)、*S. thompson* (9.0%)、*S. infantis* (6.7%)、*S. heidelberg* (3.4%) の順であった。年次別にみると、*S. enteritidis*、*S. thompson* によるものは1975年以後急激に減少している。

#### 散発下痢症患者由来株の血清型

散発下痢症患者から分離されたサルモネラ3,150株のO群は17のO群にわたり、87菌型であった。主要菌型は*S. typhimurium* (41.6%)、*S. infantis* (5.1%)、*S. thompson* (4.1%)、*S. panama* (3.6%) などであった。年次別では、1974年以後、*S. panama*、*S. agona*、*S. litchfield*、*S. london*、*S. braenderup*、*S. cerro* などが急増し、逆に*S. enteritidis*、*S. shwarzengrund* は減少の傾向がみられた。

## 健康者由来株の血清型

健康者から分離されたサルモネラ 5,933 株の O 群は 19 の O 群に分かれ、115 菌型に型別された。主要菌型は *S. typhimurium* (15.7%), *S. infantis* (8.1%), *S. thompson* (5.3%), *S. senftenberg* (4.9%), *S. anatum* (4.5%) であり、散発下痢症患者由来株と極めて類似していた。ただし散発例ではほとんど認めない *S. sofia* が 102 菌株認められた。

## 文 献

- 1) 坂井千三, 伊藤武, 丸山務, 斎藤香彦, 善養寺浩, 辺野喜正夫: 東京衛研年報, 27-1, 16, 1976
- 2) McCoy, J. H.: *J. Hyg. Camb.*, 74, 271, 1975
- 3) Vernon, E.: *Public Health*, 84, 239, 1970
- 4) Aserkoff, B., Schroeder, S. A. and Brachman, P. S.: *Am. J. Epidemiol.*, 92, 13, 1970
- 5) Kauffman, F.: *The Bacteriology of Enterobacteriaceae*, 55, 1966, Muksgaard, Copenhagen
- 6) Jameson, J. E.: *Mon. Bull. Minist. Hlth. Lab. Serv.*, 20, 14, 1961
- 7) Sakazaki, R. and Nakaya, R.: 長崎大学風土病紀要, 6, 167, 1964
- 8) 貴田正義, 下内啓万, 浅田光雄, 田村和満, 坂崎利一: 日本公衛誌, 19, 83, 1972
- 9) *Wkly. Epidem. Rec.*, 56, 1, 1981
- 10) 河西 勉, 鈴木 昭, 小沼博隆: 衛誌, 93, 138, 1975
- 11) Bailey, G. K., Fraser, P. K., Ward, C. P., Bottell, G. and Kinnear, E.: *J. Hyg., Camb.*, 70, 113, 1972
- 12) Lee, J. A.: *J. Hyg., Camb.*, 72, 185, 1974

1975年～1981年の7年間に東京都内で発生した *Bacillus cereus* による  
食中毒15事例の疫学的・細菌学的検討

伊藤 武\*, 甲斐 明美\*, 斎藤 香彦\*, 柳川 義勢\*  
稲葉 美佐子\*, 高橋 正樹\*, 高野 伊知郎\*, 新垣 正夫\*  
坂井 千三\*, 篠原 楷\*\*, 加藤 喜市\*\*, 田村 延一\*\*  
土屋 伸久\*\*, 駒井 嘉明\*\*\*

Epidemiological and Bacteriological Examination of Fifteen Vomiting-type  
Outbreaks of Food Poisoning due to *Bacillus cereus* in Tokyo

TAKESHI ITOH\*, AKEMI KAI\*, KAHIKO SAITO\*, YOSHITOKI YANAGAWA\*,  
MISAKO INABA\*, MASAKI TAKAHASHI\*, ICHIRO TAKANO\*,  
MASAO SHINGAKI\*, SENZO SAKAI\*, TADASHI SHINOHARA\*\*,  
KIICHI KATO\*\*, NOBUKAZU TAMURA\*\*, NOBUHISA TSUCHIYA\*\* and  
YOSHIAKI KOMAI\*\*\*

During the 7 years from 1975 through 1981, there were 15 vomiting-type outbreaks of food poisoning due to *Bacillus cereus*, involving 97 patients in Tokyo. The incubation period of these food poisoning outbreaks were 30 minutes to 4 hours, and the average 1 hour. Major symptoms observed in the patients were nausea (97.9%) and vomiting (93.8%). Affected individuals also complained of diarrhea (52.6%), abdominal pain (44.3%), chill (26.8%), headache (24.7%) and malaise (39.2%).

Incriminated foods of these food poisonings were pilaff (5 outbreaks), fried rice(5), spaghetti(4), omelet (1), cooked vegetable (1) and fried noodle (1). Two outbreaks were associated with both of pilaff and fried rice.

In 11 of the 15 vomiting-type outbreaks, the causative organisms were typed as H serotype 1 by Taylor and Gilbert's serotyping scheme. Two were H serotype 12, and one was H serotype 5. The isolates from an outbreak, however, could not be typed by Taylor and Gilbert's serotyping system and were typed as H serotype T1 by Terayama's provisional typing procedure.

**Keywords :** *Bacillus cereus*, outbreak, food poisoning

緒 言

*Bacillus cereus* は土壌や食品に広く分布する菌で、従来腐敗細菌として認識され、本菌による食中毒起病性については疑問視されていた。しかし、ノルウェーで1955年 Hauge<sup>1)</sup>がバニラソースを原因食品とする本菌食中毒例を明らかにして以降、主として北欧において多く報告されている。また近年、英国やフィンランド、カナダ、アメリカなどにおいても本菌食中毒が認められてい

る<sup>2,3)</sup>。

本邦においては、1966年田村<sup>4)</sup>によって本菌食中毒例が発表されて以来、下内<sup>5)</sup>や品川<sup>6)</sup>などの報告もあるが、その数はそれほど多くなく本菌食中毒の実態は明確でない。

著者らは *B. cereus* のH抗原の血清学的解析を行い、本菌のH血清型が食品の汚染経路の解明に重要な手段となるばかりでなく、本菌食中毒発生時の疫学調査にも十

\* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科 160 東京都新宿区百人町3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 東京都衛生局環境衛生部食品衛生課

\*\*\* 東京都新宿区新宿保健所

Table 1. Outbreaks of the Food Poisoning of which Causative Agents were suspected to be *B. cereus* in Tokyo

| Outbreak No. | Date            | Location where food eaten | Incriminated food   | Number of persons exposed | Number of persons ill (%) |
|--------------|-----------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1            | Jan., 24, 1975  | Restaurant                | Spaghetti           | 3                         | 3 (100)                   |
| 2            | July, 9, 1975   | Restaurant                | Pilaff              | 9                         | 4 (44.4)                  |
| 3            | Aug., 19, 1977  | Restaurant                | Spaghetti           | 14                        | 10 (71.4)                 |
| 4            | Aug., 22, 1977  | Household                 | Cooked vegetable    | 3                         | 3 (100)                   |
| 5            | Sept., 30, 1977 | Institutional cafeteria   | Omelet              | 38                        | 38 (100)                  |
| 6            | July, 6, 1978   | Restaurant                | Fried rice          | 2                         | 2 (100)                   |
| 7            | July, 26, 1978  | Restaurant                | Pilaff              | 2                         | 2 (100)                   |
| 8            | March, 5, 1979  | Restaurant                | Pilaff              | 4                         | 4 (100)                   |
| 9            | July, 30, 1979  | Restaurant                | Spaghetti           | 3                         | 3 (100)                   |
| 10           | Aug., 15, 1980  | Restaurant                | Fried rice          | 2                         | 2 (100)                   |
| 11           | Sept., 3, 1980  | Restaurant                | Spaghetti           | 4                         | 4 (100)                   |
| 12           | June, 2, 1981   | Restaurant                | Fried rice          | 5                         | 5 (100)                   |
| 13           | June, 17, 1981  | Restaurant                | Fried rice & Pilaff | 8                         | 8 (100)                   |
| 14           | June, 18, 1981  | Restaurant                | Fried noodle        | 9                         | 7 (77.8)                  |
| 15           | Sept., 29, 1981 | Restaurant                | Fried rice & Pilaff | 2                         | 2 (100)                   |

分応用できることを報告した<sup>7)</sup>。

そこで東京都内で発生した食中毒例のうち、既知病原菌が検出されない食中毒例について、*B. cereus* の H 血清型を応用した細菌学的検討を行った結果、1975年から1981年までの7年間に本菌によると推定される15事例の食中毒を認めた。これらの食中毒例には特徴ある共通点が認められるので、その疫学的概要および細菌学的成績について報告する。

#### 被検材料および方法

##### 1. 被検材料

*B. cereus* 食中毒と推定される患者ふん便および同時喫食者で非発病者のふん便について菌検索を実施した。採取したふん便は腸管系病原菌検索用グリセリン保存液に入れ、直ちに当研究所に送付されたものである。

原因食品は、調査時に残品があったものはそのすべてについて、併せて参考食品についても菌検索を行った。

*B. cereus* の健康者保菌状況を検討するためには、東京都内の飲食店調理従業員 200 名、および学童 200 名のふん便を調査対象とした。

##### 2. *B. cereus* の分離・同定

ふん便や原因食品からの *B. cereus* 分離培地として、ポリミキシン B を 50  $\mu$ /ml の割合で加えた卵黄加 CW 寒天 (日水製薬) を用いた。

各材料を本培地に塗抹し、37℃、18~24時間培養後、レンチナーゼ反応陽性のやや拡散した表面粗造、灰白色の集落を釣菌し、各種の生化学的性状を検討し、Gordon<sup>8)</sup>や東ら<sup>9)</sup>に従って同定した。

ふん便および食品中の *B. cereus* 生菌数測定方法は、材料を滅菌生理食塩液で10倍段階希釈液を作り、この0.1 ml ずつをポリミキシン・卵黄加 CW 寒天平板培地 2 枚にそれぞれ接種し、コンラージ棒で全面に塗布して、37℃、18~24時間培養後、出現した *B. cereus* 集落数を算出した。*B. cereus* 芽胞菌数測定は、材料をあらかじめ75℃、20分間加熱処理後、前述の生菌数測定と同様の方法で行った。

##### 3. H 血清型別

分離菌株の H 抗原型別用血清には、Taylor & Gilbert<sup>10)</sup>の抗 H 血清 (以下 T G と略す) 1~18 型と、寺山ら<sup>7)</sup>が新たに追加した抗 H 血清 (以下 T と略す) 1~18 型を用いた。

被検菌を H ブイヨン (Difco) で 37℃、3 時間振とう培養したものを抗原とし、50℃ 2 時間の試験管内凝集反応により H 抗原型別を行った。

#### 15 事例の疫学調査および細菌学的検査成績

##### 1. 事例 1

疫学調査成績: Table 1 に示すごとく、1975年1月24

Table 2. Clinical Symptoms in 15 Outbreaks of *B. cereus* Food Poisoning

| Symptoms           | Frequency of symptoms |           |           |           |           |           |           |           |           |            |            |            |            |            |            |
|--------------------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                    | Out.*<br>1            | Out.<br>2 | Out.<br>3 | Out.<br>4 | Out.<br>5 | Out.<br>6 | Out.<br>7 | Out.<br>8 | Out.<br>9 | Out.<br>10 | Out.<br>11 | Out.<br>12 | Out.<br>13 | Out.<br>14 | Out.<br>15 |
| Nausea             | 3                     | 4         | 10        | 3         | 37        | 2         | 2         | 4         | 3         | 2          | 4          | 4          | 8          | 7          | 2          |
| Vomiting           | 3                     | 4         | 10        | 3         | 36        | 2         | 2         | 1         | 3         | 2          | 4          | 4          | 8          | 7          | 2          |
| Diarrhea           | 1                     |           | 3         |           | 33        |           | 1         |           | 2         | 2          | 1          | 4          | 2          | 2          |            |
| Abdominal pain     |                       |           | 2         |           | 28        |           |           |           | 2         | 1          | 2          | 1          | 3          | 4          |            |
| Chill              |                       | 2         | 2         |           | 18        |           |           | 1         |           |            |            | 1          |            |            | 2          |
| Headache           | 1                     | 1         | 4         |           | 8         | 2         |           |           |           | 1          | 2          | 1          | 3          | 1          |            |
| Malaise            | 2                     | 4         | 4         |           | 21        |           |           |           |           | 1          | 1          | 2          | 3          |            |            |
| Number of subjects | 3                     | 4         | 10        | 3         | 38        | 2         | 2         | 4         | 3         | 2          | 4          | 5          | 8          | 7          | 2          |

\* Outbreak No.

日、東京都内の某飲食店で昼食にスパゲティを喫食した3名全員が50～60分後に食中毒症状を呈した。

患者の主症状は Table 2 に示すように、嘔気、嘔吐である。嘔吐回数は、1名は2回であったが、他の2名は5～8回であった。また、喫食後19時間頃より下痢が認められている。その他倦怠感や頭痛を訴えたが、発熱は認められなかった。

細菌学的検査成績：患者が喫食したスパゲティの残品がなく、病原菌の検査はできなかった。しかし、当日使用したトマトピューレとマッシュルームについて菌検索を実施したところ、開封されていたマッシュルームから患者ふん便由来菌株と同一血清型である *B. cereus* TG 1 型が  $1.0 \times 10^3$ /g 検出された。

患者ふん便からの菌検索では、腸炎ビブリオ、サルモネラ、黄色ブドウ球菌、病原大腸菌、ウェルシュ菌、エルシニア・エンテロコリチカは検出されず、Table 3 に示すごとく、2病日の患者ふん便2件中2件より *B. cereus* が純培養状に検出された。分離菌株の H 抗原型はすべて TG 1 型であった。

## 2. 事例 2

疫学調査成績：1975年7月9日、東京都内の某看護学院学生9名が昼食の仕出し弁当を喫食したところ、4名が45～60分後に発病した (Table 1)。

原因食品は仕出し弁当のピラフと推定された。本食品は、ハム、ピーマン、タマネギ、グリーンピース、玉子を油でいためて米飯に混ぜたものである。後述の細菌学的検査成績よりピラフの中の米飯が原因食品と推察された。

発病者4名の臨床症状は Table 2 に示すごとく、嘔

気、嘔吐が主体で、全員に認められている。嘔吐回数は1名が10回、他の3名は3～5回であった。その他頭痛、悪感、倦怠感がみられたが、下痢、腹痛は認められなかった。患者は発病後12～24時間後に回復した。

細菌学的検査成績：当日の仕出し弁当であるピラフは残品がなく検査できなかったが、当日使用したピーマン、ハムおよび米飯について病原菌を検索したところ、米飯より  $2.0 \times 10^4$ /g の *B. cereus* が検出された (Table 3)。

分離菌株の H 抗原型は Taylor & Gilbert の血清型に該当せず、寺山らが新たに追加した T 1 型に一致した。

2病日の患者ふん便4件中2件より前述の食品材料由来株と同一血清型の *B. cereus* T 1 型が検出された。また、吐物2件中2件からも同一血清型菌が分離された (Table 3)。

## 3. 事例 3

疫学調査成績：1977年8月19日、某飲食店で昼食を喫食した14名中10名 (発病率71.4%) が発病した。潜伏時間は2名が1時間以内、4名が2時間、4名が3時間であった。初発症状は嘔気が主体で、その他に悪感も認められた。主症状は嘔気、嘔吐であった。嘔吐回数は、7名が3回以内であったが、3名は5回であった。その他下痢、腹痛、倦怠感、頭痛も認められた。下痢は1日2～4回程度の水様便であった。患者の予後は良好で、9名は1日、他の1名も3日で回復した。

推定原因食品は昼食のスパゲティと推定された。

細菌学的検査成績：推定原因食品であるスパゲティの原材料として当日使用された食品について病原菌を検索したところ、スパゲティから *B. cereus* TG 1 型

Table 3. Isolation of *B. cereus* from Fecal Specimens and Incriminated Foods

| Outbreak No. | Fecal Specimens          |                                      |          | Incriminated foods  |                                              |          |
|--------------|--------------------------|--------------------------------------|----------|---------------------|----------------------------------------------|----------|
|              | Number of cases examined | Number of <i>B. cereus</i> positives | Serotype | Food                | Viable cells counts of <i>B. cereus</i> (/g) | Serotype |
| 1            | 2                        | 2                                    | T&G 1*   | Spaghetti           | +                                            | T&G 1    |
| 2            | 4                        | 2                                    | T 1**    | Pilaff              | $2.0 \times 10^4$                            | T 1      |
| 3            | 7                        | 7                                    | T&G 1    | Spaghetti           | $3.6 \times 10^5$                            | T&G 1    |
| 4            | 2                        | 2                                    | T&G 1    | Cooked vegetable    | $1.4 \times 10^4$                            | T&G 1    |
| 5            | 11                       | 11                                   | T&G 12   | Omelet              | $4.1 \times 10^4$                            | T&G 12   |
| 6            | 2                        | 2                                    | T&G 12   | Fried rice          | .                                            | .        |
| 7            | .                        | .                                    | .        | Pilaff              | .                                            | .        |
| 8            | 3                        | 2                                    | T&G 1    | Pilaff              | +                                            | T&G 1    |
| 9            | 3                        | 2                                    | T&G 1    | Spaghetti           | +                                            | T&G 1    |
| 10           | 3                        | 1                                    | T&G 1    | Fried rice          | .                                            | .        |
| 11           | 2                        | 1                                    | T&G 1    | Spaghetti           | $2.8 \times 10^8$                            | T&G 1    |
| 12           | 4                        | 4                                    | T&G 5    | Fried rice          | .                                            | .        |
| 13           | 5                        | 3                                    | T&G 1    | Fried rice & Pilaff | +                                            | T&G 1    |
| 14           | 7                        | 5                                    | T&G 1    | Fried noodle        | <300                                         | T&G 1    |
| 15           | 2                        | 2                                    | T&G 1    | Fried rice & Pilaff | .                                            | .        |

\* Serotype by the method described by Taylor and Gilbert.

\*\* Serotype of provisional designation by Terayama et al.

Table 4. Counts of *B. cereus* in Fecal Specimens of Patients

| Outbreak No. | Case No. | Viable cells/g    | Spore cells/g*    |
|--------------|----------|-------------------|-------------------|
| 3            | 1        | $1.3 \times 10^5$ | $1.6 \times 10^5$ |
|              | 2        | $4.8 \times 10^4$ | $6.7 \times 10^4$ |
|              | 3        | $3.7 \times 10^7$ | $4.3 \times 10^7$ |
|              | 4        | $3.9 \times 10^7$ | $5.4 \times 10^8$ |
| 4            | 1        | $7.0 \times 10^5$ | $1.5 \times 10^6$ |
|              | 2        | $2.5 \times 10^6$ | $1.7 \times 10^6$ |
| 5            | 1        | $3.3 \times 10^7$ | $6.8 \times 10^8$ |
|              | 2        | $3.2 \times 10^7$ | $3.0 \times 10^7$ |
|              | 3        | $8.0 \times 10^6$ | $1.1 \times 10^7$ |
|              | 4        | $5.0 \times 10^5$ | $6.2 \times 10^5$ |
|              | 5        | $3.5 \times 10^6$ | $5.4 \times 10^6$ |
|              | 6        | $7.0 \times 10^7$ | $1.1 \times 10^7$ |
|              | 7        | $1.0 \times 10^6$ | $3.8 \times 10^7$ |

\* Prior to enumeration, specimens were heated at 75°C for 20 minutes.

が  $3.1 \times 10^5$ /g 検出された。同一材料を 75°C 20 分間加熱後、生残した芽胞菌数を測定した結果、 $3.6 \times 10^5$ /g であった。なお、トマトケチャップ、ピーマン、タマネギ、ハムおよびミートソースからも同一血清型の *B. cereus* が検出されているが、菌数は極めて少なく 1 g 当たり 100 個以下であった。

1～3 病日の患者ふん便 7 件全てより推定原因食品の原材料由来株と同一血清型の *B. cereus* が検出された (Table 3)。

患者ふん便中の *B. cereus* 排菌状態を検討する目的で、患者 4 名のふん便について定量培養を行った。非加熱ふん便では 1 g 当たり  $10^4 \sim 10^7$  個検出され、同一ふん便を 75°C 20 分間加熱して芽胞数を測定したところ  $10^4 \sim 10^7$ /g であった。すなわち、ふん便中に排菌された *B. cereus* は大多数が芽胞型であった (Table 4)。

#### 4. 事例 4

疫学調査成績：1977 年 8 月 22 日、惣菜店より購入した煮物を一家族で喫食したところ、3 名中 1 名が 1 時間、2 名が 2 時間後に発症した。惣菜の内容は里芋、うずら豆および昆布の煮物であった。

本例では、他の症例に比して症状は軽度で、嘔気、嘔



吐以外の症状は認められず、また嘔吐も1～2回であった。

細菌学的検査成績：患者家庭に保管されていた野菜の煮物について病原菌の検索を行った結果、本食品から *B. cereus* TG 1 型が  $1.4 \times 10^4$ /g 検出された。事例3の場合と同様に芽胞数を算定したところ  $1.1 \times 10^4$ /g であった。

患者2名のふん便について菌検索を実施した結果、Table 3 に示すごとく、原因食品由来株と同一血清型の *B. cereus* が検出された。ふん便中の排菌量は Table 4 に示すごとく、 $10^5 \sim 10^8$ /g、そのうち芽胞数が  $10^6$ /g であった。

#### 5. 事例5

疫学調査成績：1977年9月30日、東京都内某事業所の社員食堂で昼の給食を喫食した38名全員が発症した。発病者はいずれもオムライスを喫食しており、オムライスを喫食せずに発症した者はいないことから本食品が原因食品と推定された。

潜伏時間は初発が15分、ピークが40分、最も遅いもので4時間、平均55分であった。

主症状は Table 2 に示すごとく、嘔気、嘔吐、腹痛、倦怠感、悪感で、その他に下痢も認められた。嘔吐回数は34名中18名が3回以内であったが、9名は4～6回、9回以上が5名で内1名は20数回にも達した。下痢は大部分が水様性であり、下痢回数は約半数が3回以内、残りの半数は4～7回であった。腹痛の部位は胃部ないし下腹部であった。なお、初発症状は少数の患者が腹痛、戦りつ、倦怠感であったが、約87%の患者は嘔気であった。

細菌学的検査成績：推定原因食のオムライスは保管されていなかったが、オムライスに使用した米飯から *B. cereus* TG 12 型が  $4.1 \times 10^4$ /g 検出された。また、芽胞数を算定したところ  $1.0 \times 10^4$  であった。

本事例についても吐物からの菌検索は実施できなかったが、1～3病日の患者ふん便11件について病原菌検索を行った結果、全例から *B. cereus* が検出された。その血清型は米飯由来株と同一の TG 12 型であった。

患者7名について排菌量を検討したところ、Table 4 に示すごとく  $10^5 \sim 10^8$ /g で、その大部分が芽胞型であった。

#### 6. 事例6

疫学調査成績：1978年7月6日、大学生2名が飲食店で昼食にチャーハンを喫食したところ、約30分後に嘔気、嘔吐の症状を呈した。患者2名の共通食品が昼食の

チャーハンであったことから、これが原因食品と推定された。症状は嘔気、嘔吐が主体で、嘔吐回数は2～3回であった。

細菌学的検査成績：当日患者が喫食した推定原因食品であるチャーハンの残品はなく、また同食品に使用した米飯も残されていなかったため、参考としてその後に調製された米飯について細菌学的検査を実施したところ、汚染菌量は少なかったが、*B. cereus* TG 12 型が検出された。

患者ふん便2件より検出された *B. cereus* はいずれも TG 12 型であった。

#### 7. 事例7

疫学調査成績：1978年7月26日、会社員2名が昼食にチキンピラフを喫食したところ、1名は30分後、他の1名も1時間後に嘔気、嘔吐(2～3回)の症状を呈した。

原因食品は患者の共通食であるピラフと考えられた。本食品は、ピーマン、マッシュルーム、チキンに前日残った米飯を加えて調製した。

細菌学的検査成績：当日ピラフに使用した米飯の残品はなく、当飲食店の調理器具・器材の拭き取り材料について検査を行った結果、ピラフ用皿、まな板、冷蔵庫把手、エビとピーマン用容器から、*B. cereus* TG 1 型が検出された。

本事例では患者ふん便の細菌学的検討が実施できなかったが、疫学調査成績や推定原因食品のピラフを調理する時に使用した米飯容器など各種調理器具より、同一血清型の *B. cereus* が検出されたことから本菌食中毒と推定した。

#### 8. 事例8

疫学調査成績：1979年3月5日、会社員4名が昼食を喫食後、30分～2時間以内に全員が食中毒症状を呈した。主症状は Table 2 に示すごとく、嘔気、嘔吐であった。原因食品は患者の共通喫食食品のピラフと推定された。

細菌学的検査成績：当日使用したピラフの材料であるハムより *B. cereus* が1g当たり  $4.5 \times 10^8$  個検出された。その血清型は TG 1 型であった。

患者ふん便3件中2件より、ハム由来株と同一血清型の *B. cereus* TG 1 型が純培養状に検出された。

#### 9. 事例9

疫学調査成績：1979年7月30日、飲食店でスパゲティを喫食した3名全員が1～4時間以内に食中毒症状を呈した。主症状は、嘔気、嘔吐、下痢、腹痛であった。嘔吐回数は、1名が4回、2名が5回のかなり重症例であった。

当日使用したスパゲティーと同一の原材料である乾燥品より患者由来 *B. cereus* と同一血清型の *B. cereus* が検出されており、ゆで上げ後でも生残した *B. cereus* が室温に放置されている間に増殖したものと推定された。

細菌学的検査成績：スパゲティーの残品そのものは保管されていなかったが、未調理（乾燥品）のスパゲティーが残されていたので検査を実施したところ、*B. cereus* TG 1 型が検出された。患者ふん便 3 件中 2 件からも *B. cereus* TG 1 型が検出された。

#### 10. 事例10

疫学調査成績：1980年8月15日、某飲食店でチャーハン、カレーライス、ベーコンエッグ等を喫食した4名のうち、チャーハンを喫食した2名が、嘔気、嘔吐を主徴とする食中毒症状を呈した。潜伏時間は2名とも2時間以内であり、嘔気、嘔吐、下痢が両者に認められた。嘔吐回数は各々1回と4回、下痢は軟便および水様便が1～3回あった。

患者2名の共通食がチャーハン以外になく、本品が原因食と推定された。このチャーハンに使用した米飯は、前日の夕方炊飯後、使用した残りを電源を切ったジャー内で19時間保存したものであった。

細菌学的検査成績：チャーハンの残品はなかったが、参考のために同飲食店より収去したチャーハンの材料である米飯、ベーコンから *B. cereus* TG 1 型が検出された。

5 病日の患者ふん便 2 件中 1 件より *B. cereus* TG 1 型が検出された。

#### 11. 事例11

疫学調査成績：1980年9月3日、某飲食店でスパゲティーを喫食した4名の高校生全員が1～2時間後に、嘔気、嘔吐を主徴とする食中毒症状を呈した。

嘔気、嘔吐は全員に認められ、嘔吐回数は2名が3回、1名は6回であった。2名には腹痛もあり、その部位は上腹部であった。

4名の共通食はスパゲティー以外にはなく、本品が原因食品と推定された。

細菌学的検査成績：残品のスパゲティーは保管されていなかったが、調理前の乾燥スパゲティー残品から *B. cereus* TG 1 型が  $2.8 \times 10^6$ /g 検出された。

2 病日の患者ふん便 2 件中 1 件より *B. cereus* TG 1 型が検出された。

#### 12. 事例12

疫学調査成績：1981年6月2日、8人の会社員が中華

料理店で昼食を喫食したところ、五目チャーハンを食べた5名のみが嘔気、嘔吐、下痢を主徴とする食中毒症状を呈した。潜伏時間は1～2時間が3名、2～3時間が2名であった。嘔気、嘔吐、下痢は全員に認められ、嘔吐回数は2回が1名、3回が2名、4回が1名であった。下痢は水様で1～2回であった。予後は良好で、24時間以内に全員が回復した。

5人の共通食は五目チャーハン以外になく、これが原因食と推定された。

細菌学的検査成績：原因食と推定された五目チャーハンは残品がなく、検査は実施できなかったが、患者の吐物1件および1～3病日の患者ふん便4件中4件のすべてから *B. cereus* TG 5 型が純培養状に検出された。

#### 13. 事例13

疫学調査成績：1981年6月17日、某飲食店でピラフを喫食した4名とドライカレーを喫食した4名の合計8名全員が、喫食後1時間以内に嘔気、嘔吐を主徴とする食中毒症状を呈した。嘔気、嘔吐は8名全員に認められ、嘔吐回数は1回が3名、3回が2名、そして6～8回の重症者が3名であった。このほか、一部の者には軽度の下痢、上腹部痛、発熱（37.5℃以下）、頭痛および倦怠感が認められた。

共通食であるピラフならびにドライカレーが原因食と推定された。これらに使用された米飯は、前日使用した残りを翌朝まで20時間冷蔵庫内で保管、更に3時間常温で放置された後調理して提供されたものである。

細菌学的検査成績：ピラフ、ドライカレーに使用された米飯の残品から *B. cereus* TG 1 型が検出された。また、1病日の患者ふん便2件中2件からも *B. cereus* TG 1 型が検出された。

#### 14. 事例14

疫学調査成績：1981年6月18日、某飲食店で焼そばを喫食した4グループ9名中7名が嘔気、嘔吐を訴えた。潜伏時間は、1時間以内が4名、1～4時間が3名であった。患者の共通症状は、嘔気、嘔吐で、嘔吐回数は2回が2名、3回が3名、4回以上が2名であった。また4名に上腹部痛、2名に下痢が認められた。

患者の共通食は、焼そばとパニラアイスクリームで、細菌検査の成績から焼そばが原因食と推定された。この焼そばは、市販の蒸しそばに熱湯をかけ、油をからめた後6時間常温に放置後、調理して提供されたものである。

細菌学的検査成績：焼そばの残品は保管されていなかったなので参考として、その後に調製された蒸しそばに

Table 5. Biochemical Characteristics of *B. cereus* Strains isolated from Food Poisoning Outbreaks

| Test                    | Outbreak No. (No. of strains examined) |                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-------------------------|----------------------------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|                         | 1                                      | 2               | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 12  | 13  | 14  |  |
|                         | (5)                                    | (5)             | (5) | (5) | (5) | (3) | (3) | (3) | (3) | (3) | (3) | (3) | (3) |  |
| Indole                  | — a                                    | —               | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |  |
| Nitrate reduction       | +                                      | +               | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | —   | +   | +   |  |
| Voges-Proskauer         | +                                      | +               | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |  |
| Christensen's citrate   | +                                      | +               | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | —   | +   | +   |  |
| Urease                  | —                                      | —               | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |  |
| Gelatin hydrolysis      | +                                      | +               | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |  |
| Starch hydrolysis       | —                                      | —               | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |  |
| Lecitinase              | +                                      | +               | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |  |
| Hemolysin               | +                                      | +               | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | —   | +   | +   |  |
| Fermentation of :       |                                        |                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Glucose                 | +                                      | +               | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |  |
| Maltose                 | +                                      | +               | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |  |
| Trehalose               | +                                      | +               | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |  |
| Glycerol                | +                                      | +               | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |  |
| Sucrose                 | +                                      | —               | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | —   | +   | +   |  |
| Salicin                 | —                                      | +               | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |  |
| Esculin                 | +                                      | +               | d   | +   | d   | +   | d   | +   | +   | d   | +   | +   | +   |  |
| Lactose                 | —                                      | —               | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |  |
| Mannitol                | —                                      | —               | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |  |
| Arabinose               | —                                      | —               | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |  |
| Xylose                  | —                                      | —               | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |  |
| Dulcitol                | —                                      | —               | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |  |
| Inositol                | —                                      | —               | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |  |
| Sorbitol                | —                                      | —               | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |  |
| Growth in 7.0% NaCl     | +                                      | +               | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |  |
| Motility                | +                                      | +               | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |  |
| H serotype <sup>b</sup> | 1                                      | T1 <sup>c</sup> | 1   | 1   | 12  | 12  | 1   | 1   | 1   | 1   | 5   | 1   | 1   |  |

a : Symbols; +, positive; —, negative; d, different biochemical.

b : Serotype by the method described by Taylor and Gilbert.

c : Serotype of provisional designation by Terayama et al.

ついて検査を実施したところ、*B. cereus* TG 1型が、1 g当たり 300 個以下であったが検出された。また、患者の吐物 1 件、および 2 病日のふん便 7 件中 5 件から *B. cereus* TG 1型が検出された。

#### 15. 事例15

疫学調査成績：1981年9月29日、某飲食店でピラフとドライカレーを喫食した2名が嘔気、嘔吐を主徴とする食中毒症状を呈した。潜伏時間は1名が1～2時間、他の1名は2～3時間であった。嘔気、嘔吐、悪感2名共に認められ、嘔吐回数は各々1回と4回であった。

細菌学的検査成績：喫食した食品の残品あるいは参考となる食品の検査は実施できなかったが、1病日の患者ふん便2件中2件から *B. cereus* TG 1型が検出された。

#### 16. 分離菌株の生化学的性状

各事例の患者ふん便、吐物および推定原因食品などから分離された *B. cereus* について詳細な生化学的性状を検討した。供試菌株は、各事例より3～5株を選び、合計54株である。

生化学的性状試験の成績は Table 5 に示した。事例12

Table 6. Distribution of *B. cereus* in Faeces of Healthy School-pupils and Adults, and H Serotype of the Isolates

| Samples       | No. of specimens tested | No. of positives (%) | No. of isolates | Serotype<br>by Taylor & Gilbert |   |   |   |   |    |    |    | Serotype<br>by Terayama et al. |   |   |   |   |    |    |    | UT* |    |
|---------------|-------------------------|----------------------|-----------------|---------------------------------|---|---|---|---|----|----|----|--------------------------------|---|---|---|---|----|----|----|-----|----|
|               |                         |                      |                 | 1                               | 3 | 5 | 8 | 9 | 11 | 12 | 14 | 1                              | 3 | 4 | 6 | 7 | 10 | 11 | 13 |     |    |
| School-pupils | 200                     | 31(15.5)             | 39              | 8                               | 2 | 1 | 2 |   | 2  | 4  | 1  |                                | 1 | 4 |   | 2 |    | 1  | 5  |     | 6  |
| Adults        | 200                     | 29(14.5)             | 34              | 13                              |   | 1 | 1 | 2 |    | 2  | 2  |                                |   | 1 | 3 | 1 | 1  |    |    | 1   | 6  |
| Total         | 400                     | 60(15.0)             | 73              | 21                              | 2 | 2 | 3 | 2 | 2  | 6  | 3  |                                | 1 | 5 | 3 | 3 | 1  | 1  | 5  | 1   | 12 |

\* Untypable

由来の3株を除く全菌株は、硝酸塩還元性、VP反応、ゼラチン液化性、レシチナーゼ産生性、ブドウ糖およびマルトースの分解性がすべて陽性、マンニト分解陰性の典型的な *B. cereus* の性状を示した。ただし事例2由来株では、白糖陰性、サリシン陽性であって、他の事例由来株の生化学的性状とはやや異なっていた。

事例12で分離された *B. cereus* TG5型の3株は、いずれも硝酸塩還元性、クリステンゼンのクエン酸塩、溶血性および白糖の分解が陰性で、他の事例由来株とは異なる性状を示した。

澱粉加水分解性は全事例由来株とも陰性であった。

#### 健康人における本菌保有状況

東京都内在住の学童および成人を対象に *B. cereus* の保菌状況を検討し、食中毒患者ふん便の場合と比較した。

Table 6 に示すごとく、学童では200件中31件(15.5%)、成人では200件中29件(14.5%)から本菌が検出された。分離菌株の血清型はTG1型に該当するものが最も多く、次いでTG12型およびT3型、T11型である。

健康人の *B. cereus* 排菌量を患者の場合と同様の方法で測定した。 *B. cereus* 陽性者60名中50名は1g当たり $10^2$ 個以下の排菌量であり、7名が $10^3$ /g、2名が $10^4$ /g、1名が $10^5$ /gであった。すなわち、本菌食中毒患者ふん便では当該菌が $10^5$ /g以上排菌されているのに対し、健康者の場合では大部分が $10^2$ /g以下の排菌であった。

#### 考 察

Gilbertらは *B. cereus* による食中毒をその発生状況や臨床症状の特徴から、下痢型(diarrheal-type syndrome)と嘔吐型(vomiting-type syndrome)に大別した<sup>10)</sup>。前者はHauge<sup>11)</sup>やNikodémuszら<sup>11)</sup>によって報告された食中毒で、プリンおよび肉類や野菜のスープなどを原因食品とし、潜伏時間が8~16時間、主症状は下痢と腹痛である。この型の食中毒事例は1970年以前に多く報告

されたが、それ以降の発生例はほとんど報告されていない。後者は1971年英国<sup>12)</sup>で報告されて以来諸外国で報告され<sup>3,12)</sup>、米飯やフライドリスを原因食品とし、潜伏時間が1~5時間、主症状が嘔気、嘔吐の食中毒である。

今回、東京都内に発生した *B. cereus* によると推定された15事例は、いずれも潜伏時間が4時間以内、主症状も嘔気、嘔吐であることから、Gilbertらの分類によると嘔吐型食中毒に該当するものである。すなわち、15事例の潜伏時間は30分~4時間、平均1時間であった。臨床症状は嘔気と1~5回の嘔吐が主要症状で、下痢、腹痛、悪感、発熱は極めて少なかった。ただし、事例5、9、10、12、14では、嘔気、嘔吐のほかに下痢と腹痛の発現頻度が高く、他の事例とはやや臨床症状を異にしていた。

原因食品は、9事例が米飯に関連した食品であって、諸外国の報告例と類似していた<sup>12)</sup>。米飯以外の原因食品は、スパゲティによるものが4事例、野菜の煮物および焼そばによる例が各々1例ずつ認められた。これらのスパゲティや米飯は、加熱後かなり長時間室温に放置された後、喫食時に他の食品と混ぜ合わされたものである。

*B. cereus* の芽胞の熱抵抗性はかなり高く、100℃に対するD値が1.2~7.5分であると報告されており<sup>13)</sup>、またCleggら<sup>14)</sup>やVasら<sup>15)</sup>は、90℃70分あるいは140℃2秒の加熱に対しても生残できる菌株を認めている。著者らも食品由来株484株中105株(21.7%)の *B. cereus* 芽胞は100℃30分の加熱に抵抗性を示すことを報告した<sup>16)</sup>。従って、通常の調理方法では *B. cereus* の芽胞は生残し、喫食までの保存期間中に食品内で増殖して、食中毒を惹起させたものと推察される。

Mellingら<sup>17)</sup>は、米飯に *B. cereus* を実験的に接種し、食品内にエンテロトキシン様物質が産生されること

を報告している。しかし、他の研究者によって本毒素は未だ確認されておらず、嘔吐型 *B. cereus* の起病性因子に関しては更に詳細な検討が必要であろう。

嘔吐型の本食中毒では、患者の潜伏時間、臨床症状がブドウ球菌食中毒の発生状況と極めて類似しており、疫学的事項から両者を鑑別することは極めて困難であって、本菌食中毒の診断には細菌学的検査が重要である。

また、*B. cereus* による食品汚染が高い豆腐などでは 1 g 当たり  $10^4$  個以上の本菌で汚染されている場合もあり<sup>18)</sup>、食中毒発生時において推定原因食から *B. cereus* が検出されたと言って、それを直ちに原因食とすることはできない。

今回の発生例では推定原因食品中に含まれていた *B. cereus* の生菌数は  $10^4 \sim 10^8$ /g であり、 $10^5 \sim 10^8$ /g 認められている英国などでの発生例<sup>12)</sup>に比較して、菌数がやや少ないが、食品由来株がいずれも患者ふん便由来株の H 血清型と同一型であったことは注目すべきことである。また、患者ふん便からは英国の事例でも高頻度の本菌が検出されており<sup>12)</sup>、今回の 15 事例においてもその検出率は 80% 以上で、しかも同一集団発生例では H 血清型の均一性が認められた。

さらに注目すべきことは、15 事例のうち 7 事例においては原因食品以外にも調理施設の包丁、まな板、バットなどの調理器具・器材拭き取り材料からも患者ふん便由来株と同一血清型の *B. cereus* が多数検出されていることである。すなわち、この事は原因施設では食品に限らずその調理環境まで広く本菌で汚染されていたことを裏付けるものである。

Gilbert ら<sup>12)</sup> は、H 血清型と病型との関連性を報告している。すなわち、TG 1, 3, 4, 5 および 8 型は嘔吐型食中毒例で、TG 2, 6, 9, 10 および 12 型は下痢型食中毒例で認められている。今回の 15 事例のうち、11 事例が TG 1 型、1 例が TG 5 型に該当し、Gilbert らの成績と同様であった。しかし、2 例は TG 12 型であり、他の 1 例は Taylor らの血清型に該当せず、寺山らの血清型 T 1 型であった。

一方、健康人の *B. cereus* 保菌率は平均 15.0% で、その排菌量は患者の場合に比較して極めて少なく、大部分が  $10^3$ /g 以下であった。

これらの事実から、嘔吐型による本菌食中毒の細菌学的診断としては、推定原因食品中の *B. cereus* の生菌数測定、患者ふん便からの本菌検出率の確認および、分離菌株の H 血清型の検討などが重要であると考えられる。

## 結 論

1975 年から 1981 年までの 7 年間に、東京都内で *B. cereus* によると推定される 15 事例の嘔吐型食中毒を認めた。15 事例の患者総数は 97 名であった。潜伏時間は 30 分～4 時間で、平均 1 時間であった。その臨床症状は、嘔気と 1～5 回の嘔吐が主体であり、下痢、腹痛、悪感、発熱は比較的少なかった。

原因食品は、ピラフ (5 例)、チャーハン (5 例)、スパゲティー (4 例)、オムレツ (1 例)、野菜の煮物 (1 例) および焼そば (1 例) であった。このうち、2 例はピラフとチャーハンの両方によるものである。

食中毒起因菌と推定された *B. cereus* の血清型は、Taylor & Gilbert の H 血清型である TG 1 型が 11 例、12 型が 2 例そして 5 型が 1 例であり、他の 1 例は、寺山らの H 血清型 T 1 型であった。

## 文 献

- 1) Hauge, S.: *J. Appl. Bacteriol.*, 18, 591, 1955
- 2) Public Health Laboratory Service: *Brit. Med. J.*, 15, 189, 1971
- 3) Holmes, J.R., Plunkett, T., Pate, P., Roper, W. L. and Alexander, W.J.: *Arch. Intern. Med.*, 141, 766, 1981
- 4) 田村利勝, 紺野哲郎, 白石圭四郎, 大長記興: 日公衛試, 12, 945, 1965
- 5) 下内啓万, 貴田正義, 西尾隆昌, 井上 豊: 兵庫衛研報告, 6, 39, 1971
- 6) 品川邦汎, 新原富夫, 国田信治, 小林 貞: 大阪府公衛研所報, 食品衛生編, 9, 125, 1978
- 7) 寺山 武, 新垣正夫, 山田澄夫, 潮田 弘, 五十嵐英夫, 坂井千三, 善養寺 浩: 食衛試, 19(1), 98, 1978
- 8) Gordon, R.E., Haynes, W.C. and Pang, C.H.: *The Genus Bacillus, Agriculture Handbook* No. 427, 1973, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D. C.
- 9) 東 量三: 食品中好気性芽胞菌とその簡単同定 (I) ニューフードインダストリー, 4(9), 67, 1962
- 10) Taylor, A.J. and Gilbert, R.J.: *J. Med. Microbiol.*, 8, 543, 1975
- 11) Nikodémusz, I.: *Zeit. Hyg.*, 145, 335, 1958
- 12) Gilbert, R.J. and Parry, J.M.: *J. Hyg., Camb.*, 78, 69, 1977
- 13) Gilbert, R.J., Stringer, M.F. and Peace, T.C.: *J. Hyg., Camb.*, 73, 433, 1974
- 14) Clegg, L.F.L., Sergeant, V., Franklin, J.G. and

- Auclairair, J. E. : *Dairy Ind.*, 21, 128, 1956
- 15) Vas, K. and Prosz, G. : *J. Appl. Bacteriol.*, 20, 431, 1957
- 16) 楠 淳, 池島伸至, 新井輝義, 神真知子, 入倉善久, 友成正臣, 伊藤 武, 坂井千三 : 東京衛研年報, 28-1, 11, 1977
- 17) Melling, J., Capel, B. J., Turnbull, P. C. B. and Gilbert, R. J. : *J. Clin. Path.*, 29, 938, 1976
- 18) 寺山 武, 五十嵐英夫, 潮田 弘他 : 東京衛研年報, 29-1, 143, 1978

## 1980～1981年分離のA群溶血レンサ球菌の薬剤感受性と菌型について

柏木 義勝\*, 近藤 治美\*, 徳江 シゲ子\*  
大久保 暢夫\*, 寺山 武\*

### Antibiotics Sensitivities and Serotypes of Isolates of Group A Hemolytic Streptococci in 1980-1981

YOSHIKATSU KASHIWAGI\*, HARUMI KONDO\*, SHIGEKU TOKUE\*,  
NOBUO OHKUBO\* and TAKESHI TERAYAMA\*

**Keywords:** 化膿レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes*, 抗生物質感受性 antibiotics sensitivity, 血清型 serotype

#### 緒言

著者らは、1965年以来、全国で分離されたA群溶血レンサ球菌の各種抗生物質に対する感受性と菌型の推移について検討し考察を加えてきた<sup>1-3)</sup>。

今回は1980年および1981年に分離された猩紅熱由来、猩紅熱以外の各種感染症由来および健康学童由来の各A群溶血レンサ球菌の薬剤感受性および菌型について検討したので報告する。

#### 材料ならびに方法

##### 供試菌株

全国の伝染病院、研究所等より、当研究所に送付された菌株のうち、1980年は猩紅熱由来447株、猩紅熱以外の各種感染症由来172株、健康学童由来174株、計793株、1981年は猩紅熱由来297株、猩紅熱以外の各種感染症由来449株、健康学童199株、計945株を薬剤感受性試験に供試した。

##### 供試薬剤

benzylpenicillin (PCG), ampicillin (ABPC), cephaloridine (CER), tetracycline (TC), chloramphenicol (CP), erythromycin (EM), oleandomycin (OL), lincomycin (LCM) の8剤を供試し、さらに1981年にはcephalexin (CEX) を追加した。

これらの薬剤は、すべて重量単位で供試し、最小発育阻止濃度 (MIC) を感受性値として記載した。なお供試菌のうち、25 $\mu$ g/ml 以上の MIC を示すものを耐性菌として表示した。

##### 感受性測定法

血液寒天平板を用いて、供試菌の集落選別を行った

後、Mueller-Hinton broth (Difco) で増菌し、5%馬血液加感性ディスク用培地-N (ニッスイ) を用いて、化学療法学会最小発育阻止濃度測定法再改訂法<sup>4)</sup>にしたがって、感受性値を測定した。

##### 菌型型別

菌株は、各当該分離収集機関において、T凝集反応により型別が行われた。一部の菌株については、当研究所で型別を行った。

##### 菌株分離収集機関

札幌市立札幌病院、秋田県衛生科学研究所、新潟県衛生研究所、千葉大学医学部付属病院、都立荏原病院、都立墨東病院、都立豊島病院、東京都予防医学協会、埼玉県衛生研究所、横浜市立万治病院、富山県衛生研究所、名古屋市立東市民病院、大阪市立桃山病院の13機関である。

#### 成績

##### 薬剤感受性

##### 1) 猩紅熱由来株 (Group 1)

Table 1, 2 に示したごとく、これらの分離株は、ペニシリン系 (PCs) およびセファロsporin系 (CEPs) 抗生物質に対して高い感受性を示し、過去に供試した菌株と同様に、耐性を示すものは認められなかった。

TCに対しては、25 $\mu$ g/ml 以上の MIC を示すものが、1980年には72.9%、1981年には82.8%であり、CPに対しては、1980年58.2%、1981年57.3%であった。

マクロライド系 (MLs) および類似の抗生物質である LCMには、200 $\mu$ g/ml 以上の MIC を示すものが、1980年は約42%、1981年は約51%分離された。

\* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科 160 東京都新宿区百人町3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Distribution of MIC of Antibiotics on Group A Hemolytic Streptococci Isolated from Patients with Scarlet Fever in 1980

[illegible]

Table 2. Distribution of MIC of Antibiotics on Group A Hemolytic Streptococci Isolated from Patients with Scarlet Fever in 1981

[illegible]



Table 3. Distribution of MIC of Antibiotics on Group A Hemolytic Streptococci Isolated from Patients Other than Scarlet Fever in 1980

[illegible]

Table 4. Distribution of MIC of Antibiotics on Group A Hemolytic Streptococci Isolated from Patients Other than Scarlet Fever in 1981

[illegible]

Table 5. Distribution of MIC of Antibiotics on Group A Hemolytic Streptococci Isolated from Healthy Pupils in 1980

| MIC $\mu\text{g/ml}$ | Number of strains by MIC of antibiotics (%) |           |           |          |          |           |           |          |
|----------------------|---------------------------------------------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|
|                      | PCG                                         | ABPC      | CER       | TC       | CP       | EM        | OL        | LCM      |
| $\geq 400$           |                                             |           |           |          |          | 16 (9.2)  | 16 (9.2)  | 16 (9.2) |
| 200                  |                                             |           |           |          |          |           |           |          |
| 100                  |                                             |           |           | 18(10.3) |          |           |           |          |
| 50                   |                                             |           |           | 26(14.9) | 8 (4.6)  |           |           |          |
| 25                   |                                             |           |           | 37(21.3) | 18(10.3) |           |           |          |
| 12.5                 |                                             |           |           |          | 26(14.9) |           |           |          |
| 6.25                 |                                             |           |           | 2 (1.2)  | 46(26.5) |           |           |          |
| 3.13                 |                                             |           |           | 6 (3.4)  | 59(33.9) |           | 1 (0.6)   |          |
| 1.56                 |                                             |           |           | 37(21.3) | 17 (9.8) |           | 29(16.6)  |          |
| 0.78                 |                                             |           |           | 39(22.4) |          |           | 116(66.7) | 1 (0.6)  |
| 0.39                 |                                             |           |           | 9 (5.2)  |          |           | 12 (6.9)  | 82(47.1) |
| 0.2                  |                                             |           |           |          |          | 6 (3.4)   |           | 65(37.4) |
| 0.1                  |                                             |           |           |          |          | 128(73.6) |           | 10 (5.7) |
| 0.05                 |                                             | 8 (4.6)   |           |          |          | 24(13.8)  |           |          |
| 0.025                | 12 (6.9)                                    | 55(31.6)  | 6 (3.5)   |          |          |           |           |          |
| 0.0125               | 54(31.0)                                    | 110(63.2) | 117(67.2) |          |          |           |           |          |
| 0.006                | 105(60.4)                                   | 1 (0.6)   | 50(28.7)  |          |          |           |           |          |
| 0.003                | 3 (1.7)                                     |           | 1 (0.6)   |          |          |           |           |          |
| Total                | 174(100)                                    | 174(100)  | 174(100)  | 174(100) | 174(100) | 174(100)  | 174(100)  | 174(100) |

Table 6. Distribution of MIC of Antibiotics on Group A Hemolytic Streptococci Isolated from Healthy Pupils in 1981

| MIC $\mu\text{g/ml}$ | Number of strains by MIC of antibiotics (%) |           |           |          |          |           |           |          |          |
|----------------------|---------------------------------------------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|----------|
|                      | PCG                                         | ABPC      | CER       | CEX      | TC       | CP        | EM        | OL       | LCM      |
| $\geq 400$           |                                             |           |           |          |          |           | 27(13.6)  | 28(14.1) | 27(13.6) |
| 200                  |                                             |           |           |          | 1 (0.5)  |           |           |          | 1 (0.5)  |
| 100                  |                                             |           |           |          | 50(25.1) |           |           |          |          |
| 50                   |                                             |           |           |          | 27(13.6) | 6 (3.0)   | 1 (0.5)   |          |          |
| 25                   |                                             |           |           |          | 3 (1.5)  | 30(15.1)  |           |          |          |
| 12.5                 |                                             |           |           |          |          |           |           |          |          |
| 6.25                 |                                             |           |           |          |          | 35(17.6)  |           |          |          |
| 3.13                 |                                             |           |           | 1 (0.8)  |          | 114(57.3) |           |          |          |
| 1.56                 |                                             |           |           | 40(32.8) | 11 (5.5) | 14 (7.0)  |           | 16 (8.0) |          |
| 0.78                 |                                             |           |           | 70(57.4) | 54(27.1) |           |           | 58(29.1) |          |
| 0.39                 |                                             |           |           | 11 (9.0) | 49(24.6) |           |           | 81(40.7) | 31(15.6) |
| 0.2                  |                                             |           |           |          | 4 (2.0)  |           |           | 16 (8.0) | 85(42.7) |
| 0.1                  |                                             | 2 (1.0)   |           |          |          |           | 27(13.6)  |          | 37(18.6) |
| 0.05                 | 2 (1.0)                                     | 15 (7.5)  |           |          |          |           | 109(54.8) |          | 18 (9.0) |
| 0.025                | 1 (0.5)                                     | 164(82.4) | 12 (6.0)  |          |          |           | 34(17.1)  |          |          |
| 0.0125               | 167(83.9)                                   | 18 (9.0)  | 175(87.9) |          |          |           | 1 (0.5)   |          |          |
| 0.006                | 29(14.6)                                    |           | 12 (6.0)  |          |          |           |           |          |          |
| 0.003                |                                             |           |           |          |          |           |           |          |          |
| Total                | 199(100)                                    | 199(100)  | 199(100)  | 122(100) | 199(100) | 199(100)  | 199(100)  | 199(100) | 199(100) |

Table 7. Distribution of Serotypes of Group A Hemolytic Streptococci Isolated in 1980

| Source of isolates                | Number of strains by T serotype (%) |            |             |              |            |            |            |               |              |             |             |              |            |            |              | Total        |
|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|-------------|--------------|------------|------------|------------|---------------|--------------|-------------|-------------|--------------|------------|------------|--------------|--------------|
|                                   | 1                                   | 2          | 4           | 6            | 8          | 9          | 11         | 12            | 13           | 18          | 22          | 28           | 5/27/44    | B3264      | UT           |              |
| Patients of scarlet fever         | 18<br>(5.3)                         | 4<br>(1.2) | 28<br>(8.2) | 39<br>(11.4) | 1<br>(0.3) |            | 2<br>(0.6) | 182<br>(53.2) | 3<br>(0.9)   | 13<br>(3.8) | 7<br>(2.0)  | 26<br>(7.6)  | 1<br>(0.3) | 3<br>(0.9) | 15<br>(4.4)  | 342<br>(100) |
| Patients other than scarlet fever | 12<br>(7.6)                         | 1<br>(0.6) | 11<br>(7.0) | 18<br>(11.5) |            | 1<br>(0.6) | 2<br>(1.3) | 75<br>(47.8)  |              |             | 1<br>(0.6)  | 12<br>(7.6)  |            | 7<br>(4.5) | 17<br>(10.8) | 157<br>(100) |
| Healthy pupils                    | 18<br>(10.3)                        | 4<br>(2.3) | 8<br>(4.6)  | 23<br>(13.2) |            | 2<br>(1.2) |            | 17<br>(9.8)   | 30<br>(17.2) |             | 12<br>(6.9) | 27<br>(15.5) |            | 2<br>(1.2) | 31<br>(17.8) | 174<br>(100) |

Table 8. Distribution of Serotypes of Group A Hemolytic Streptococci Isolated in 1981

| Source of isolates                | Number of strains by T serotype (%) |             |              |            |            |               |              |            |             |            |              |            |            |              | Total        |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------|--------------|------------|------------|---------------|--------------|------------|-------------|------------|--------------|------------|------------|--------------|--------------|
|                                   | 1                                   | 4           | 6            | 9          | 11         | 12            | 13           | 18         | 22          | 25         | 28           | 14/49      | B3264      | UT           |              |
| Patients of scarlet fever         | 8<br>(4.5)                          | 14<br>(7.8) | 9<br>(5.0)   |            | 1<br>(0.6) | 124<br>(69.3) | 2<br>(1.1)   | 7<br>(3.9) | 3<br>(1.7)  |            | 4<br>(2.2)   |            |            | 7<br>(3.9)   | 179<br>(100) |
| Patients other than scarlet fever | 28<br>(15.7)                        | 8<br>(4.5)  | 2<br>(1.1)   | 1<br>(0.6) |            | 94<br>(52.8)  | 3<br>(1.7)   |            | 3<br>(1.7)  | 3<br>(1.7) | 1<br>(0.6)   | 2<br>(1.1) | 8<br>(4.5) | 25<br>(14.0) | 178<br>(100) |
| Healthy pupils                    | 18<br>(9.0)                         | 3<br>(1.5)  | 26<br>(13.1) | 8<br>(4.0) |            | 33<br>(16.6)  | 31<br>(15.6) | 2<br>(1.0) | 11<br>(5.5) |            | 40<br>(20.1) |            | 6<br>(3.0) | 21<br>(10.6) | 199<br>(100) |

## 2) 猩紅熱以外の各種感染症由来株 (Group 2)

PCs, CEPs に対する耐性株は, Group 1 と同様に分離されなかった. TC に対しては, 1980年61.1%, 1981年60.3%, CPは1980年40.1%, 1981年27.1%, MLsは1980年約36%, 1981年約28%の耐性株が分離された. (Table 3, 4)

## 3) 健康学童由来株 (Group 3)

Group 1, 2 と同様に, PCs, CEPs に対する耐性株は分離されなかった. TC耐性株は, 1980年46.5%, 1981年40.7%, CPは1980年14.9%, 1981年18.1%, MLsは, 1980年約9%, 1981年約14%を示した. (Table 5, 6)

## 4) 流行菌型

Group 1, 2 の主要流行菌型は, 両年とも12型で, 50~70%を占めているが, Group 3 では, 際立った主要菌型は存在せず, 28型, 13型, 12型, 6型が比較的多くみられ, これらの血清型の分離率は13~20%であった. (Table 7, 8)

## 5) 耐性パターン

Table 9, 10 に Group 1 の菌型別耐性パターンを示したが, 過去の成績<sup>1-3)</sup>と同様に, 12型に多剤耐性, 6型にTC・CP 2剤耐性, 4型にTC単剤耐性, 18型に感受性株が多い傾向に変動は認められなかった. なお, Group 2, 3 については, 表を示していないが, これらも Group 1 と同様の傾向が認められた.

## 考 察

今回供試したA群溶血レンサ球菌も, 過去の成績<sup>1-3)</sup>に示すものと同様に, PCs および CEPs のβ-ラクタム類抗生物質に耐性を示す菌株は分離されず, また临床上, これらの抗生物質に対して難治の溶連菌感染症の報告もみられないことから, これらの系統の抗生物質は, *in vitro* でも *in vivo* においても, 現在もなお有効な薬剤であると考えられる. かつては, β-ラクタム類抗生物質を用いるにあたり, 患者に対し, アレルギーショック等の懸念があるため, 第一次選択剤としては敬遠されている面もあったが, 近年, 副作用の少ない同系の内服剤も多種開発されてきており, 現在では本剤が, 溶連菌感染症に対しての第一次選択剤として確かなものとなっている.

耐性株の動向については, 1980年と1981年の比較では, TCおよびMLs耐性株分離率が, 約10%上昇しており, CP耐性株は, ほとんど変動を示していないが, 大局的観点からは, 1978年を境にして, 1979年以降は3系薬剤とも増加傾向にあるものと判断できる.

Table 9. Incidence of Drug Resistant Strains by Serotype on Group A Hemolytic Streptococci Isolated from Patient with Scarlet Fever in 1980

| Resistant pattern | Number of strains by T serotype (%) |             |              |              |            |            |               |            |             |            |              |            |             |             | Total         |
|-------------------|-------------------------------------|-------------|--------------|--------------|------------|------------|---------------|------------|-------------|------------|--------------|------------|-------------|-------------|---------------|
|                   | 1                                   | 2           | 4            | 6            | 8          | 11         | 12            | 13         | 18          | 22         | 28           | 5/27/44    | B 3264      | UT          |               |
| TC CP EM LCM      |                                     |             |              | 2<br>(5.1)   | 1<br>(100) |            | 105<br>(57.7) |            |             |            | 1<br>(3.8)   |            |             | 3<br>(20.0) | 112<br>(32.7) |
| TC CP EM          |                                     |             |              |              |            |            | 1<br>(0.5)    |            |             |            |              |            |             |             | 1<br>(0.3)    |
| TC CP             | 1<br>(5.6)                          | 3<br>(75.0) | 4<br>(14.3)  | 37<br>(94.9) |            |            | 18<br>(9.9)   |            |             |            | 16<br>(61.5) |            |             | 4<br>(26.7) | 83<br>(24.3)  |
| TC EM LCM         |                                     |             |              |              |            |            | 14<br>(7.7)   |            |             |            |              |            |             |             | 14<br>(4.1)   |
| TC LCM            |                                     |             | 1<br>(3.6)   |              |            |            |               |            |             |            |              |            |             |             | 1<br>(0.3)    |
| TC                | 3<br>(16.7)                         |             | 21<br>(75.0) |              |            |            | 21<br>(11.5)  | 3<br>(100) |             |            | 1<br>(3.8)   |            | 2<br>(66.7) | 3<br>(20.0) | 54<br>(15.8)  |
| CP EM LCM         |                                     |             |              |              |            |            | 8<br>(4.4)    |            |             |            |              |            |             |             | 8<br>(2.3)    |
| Sensitive         | 14<br>(77.8)                        | 1<br>(25.0) | 2<br>(7.1)   |              |            | 2<br>(100) | 15<br>(8.2)   |            | 13<br>(100) | 7<br>(100) | 8<br>(30.8)  | 1<br>(100) | 1<br>(33.3) | 5<br>(33.3) | 69<br>(20.2)  |
| Total             | 18<br>(100)                         | 4<br>(100)  | 28<br>(100)  | 39<br>(100)  | 1<br>(100) | 2<br>(100) | 182<br>(100)  | 3<br>(100) | 13<br>(100) | 7<br>(100) | 26<br>(100)  | 1<br>(100) | 3<br>(100)  | 15<br>(100) | 342<br>(100)  |

Table 10. Incidence of Drug Resistant Strains by Serotype on Group A Hemolytic Streptococci Isolated from Patient with Scarlet Fever in 1981

| Resistant pattern |    |    |     | Number of strains by T serotype (%) |             |             |            |              |            |            |            |             |              |
|-------------------|----|----|-----|-------------------------------------|-------------|-------------|------------|--------------|------------|------------|------------|-------------|--------------|
|                   |    |    |     | 1                                   | 4           | 6           | 11         | 12           | 13         | 18         | 22         | 28          | UT Total     |
| TC                | CP | EM | LCM | 1<br>(12.5)                         |             | 1<br>(11.1) |            | 71<br>(57.3) |            |            |            | 1<br>(14.3) | 74<br>(41.3) |
| TC                | CP |    |     |                                     | 3<br>(21.4) | 7<br>(77.8) |            | 9<br>(7.3)   |            |            |            | 1<br>(25.0) | 21<br>(11.7) |
| TC                |    | EM | LCM |                                     |             |             |            | 6<br>(4.8)   |            |            |            |             | 6<br>(3.4)   |
| TC                |    |    |     | 2<br>(25.0)                         | 9<br>(64.3) | 1<br>(11.1) | 1<br>(100) | 24<br>(19.4) | 2<br>(100) |            |            | 2<br>(50.0) | 44<br>(24.6) |
|                   |    |    |     | 5<br>(62.5)                         | 2<br>(14.3) |             |            | 14<br>(11.3) |            | 7<br>(100) | 3<br>(100) | 1<br>(25.0) | 34<br>(19.0) |
|                   |    |    |     |                                     |             |             |            |              |            |            |            | 2<br>(28.6) |              |
| Total             |    |    |     | 8<br>(100)                          | 14<br>(100) | 9<br>(100)  | 1<br>(100) | 124<br>(100) | 2<br>(100) | 7<br>(100) | 3<br>(100) | 4<br>(100)  | 179<br>(100) |

次に、これらの各耐性株の年次的動向を、菌型と耐性との関係からみると、1972年以降は、12型が主導型といえよう。すなわち主要流行菌型で且つ多剤耐性株の多い12型の分離率の増減が、TC, CP, MLsの各耐性株分離率に直接的に影響を与えており、これらの動向に、さらに4型、6型等の耐性に特異的に関連性のある菌型の小流行が、多少の影響を与えているものと考えられる。

12型が何故このように永い年月にわたって主要菌型として維持されているのか、未だ解明されていないが、滝沢らの報告<sup>5)</sup>が一つの解答を示唆している。それによると、T4型菌による猩紅熱患者を7日間ペニシリン系薬剤投与によって治療した場合、再排菌を繰り返す症例では、T4抗体価は遅くなって確実に高値に上昇したが、再排菌を認めなかった症例は、抗体の上昇は、ほとんど認められなかったと述べている。このことは、発病初期から抗生物質投与による治療を行い、短期間のうちに治癒してしまう症例の場合、患者の抗体価は、ほとんど上昇しないことを意味しているといえよう。このような症例の多い猩紅熱では、感染を阻止するに必要且つ十分な抗体を保有する者の絶対数が少ないために繰り返し同型菌による流行が起きても何ら不思議ではないと考える。

12型の流行が、約10年間も続いており、衰えをみせないのは、以上のような理由と、もう一つは、12型には多剤耐性を獲得しているものが多く、抗生物質との出会いにも生き残る確率の-highいことが挙げられる。

今後も12型の流行が、このまま続くのか、あるいは菌型の交代が起きるのか、興味ある問題である。

#### 結 論

1980年および1981年に、全国の伝染病院、研究所等で

分離収集されたA群溶血レンサ球菌の菌型型別と薬剤感受性測定により、次の結論を得た。

- 1)  $\beta$ -ラクタム類抗生物質に対する耐性株は、過去の成績と同様に分離されなかった。
- 2) 耐性株の分離率は、猩紅熱由来株が最も高く、以下各種感染症由来株、健康学童由来株の順に低かった。また耐性株の年次的動向については、1978年以降、猩紅熱由来株は、TC, CP, MLsの三系薬剤に対して、耐性傾向を示している。
- 3) 菌型に関しては、猩紅熱由来株および各種感染症由来株については、12型が主要流行菌型であったが、健康学童由来株では、各菌型が比較的平均化しており、主要菌型の存在は認められなかった。
- 4) 菌型と耐性の関係では、12型の多剤耐性、6型のTC・CP2剤耐性、4型のTC単剤耐性の傾向に変動は認められなかった。

(本研究の概要は、第56回日本感染症学会総会1982年4月で発表した。)

#### 文 献

- 1) 柏木義勝, 柴田 実, 徳江シゲ子, 浅野洋子, 大久保暢夫: 東京衛研年報, 27-1, 49, 1976
- 2) 大久保暢夫, 柏木義勝, 柴田 実, 永瀬金一郎: 感染症学雑誌, 53(10), 498, 1979
- 3) 大久保暢夫, 近藤治美, 柏木義勝, 柴田 実, 小野川 尊: 感染症学雑誌, 56(1), 2, 1982
- 4) MIC 測定法改定委員会: CHEMOTHERAPY, 29(1), 76, 1981
- 5) 滝沢慶彦, 高瀬愛子, 富沢 功: 感染症学雑誌, 55(3), 188, 1981

## 1971年から1980年までの10年間にける STS による梅毒血清反応検査成績

石上 武\*, 堀 幹郎\*, 平岡 陸左右\*, 落合 泰隆\*  
宮沢 貞雄\*, 安部 昭子\*, 寺山 武\*  
大久保 暢夫\*, 大橋 誠\*

### Results of Serological Test for Syphilis by STS between 1971~1980 in Tokyoites

TAKESHI ISHIKAMI\*, MIKIO HORI\*, RIKUZO HIRAOKA\*,  
YASUTAKA OCHIAI\*, SADA O MIYAZAWA\*, AKIKO ABE\*,  
TAKESHI TERAYAMA\*, NOBUO OHKUBO\*  
and MAKOTO OHASHI\*

**Keywords:** 梅毒血清反応 serological test for syphilis, 検査成績 results, 年度別陽性率 yearly shift of positive rate, 東京都民 Tokyoites

#### はじめに

梅毒は性病予防法により届出伝染病に指定されており、患者発生の動向は厚生省統計に示されている。それによれば、わが国では、1958年に売春防止法が施行されて以来、梅毒の届出患者数は漸次減少しており、1948年に約21万人の届出患者がいたものが、1979年には2,444人となり、この約30年間に約1/80に減少した。しかしながら一方では、フリーセックスの風潮が国際的に高まるとともに海外旅行者が急増している今日、若年層では逆に早期顕症梅毒が増加していることが指摘されている。また、性病は届出伝染病であるが、無届けの潜在患者もいると考えられ、その実態は厚生省統計による患者数を上回るものとみられている。

わが国では、性病予防対策の一環として、梅毒を対象に結婚前検診、妊婦検診さらに事業所単位の集団検診を各自治体を中心に実施している。著者らは都民を対象として長年にわたり、梅毒血清反応を行っており、1967~1970年の4年間の検査成績をすでに前報<sup>1)</sup>で報告した。本報では、1971~1980年の検査成績を対象群別に検討し報告する。

#### 材料および方法

##### 1) 調査対象

1971~1980年度に都内各保健所、病院等から梅毒血清反応検査のため当研究所に送付された血清374,335件を対象とした。その内訳は、保健所（特別区と島嶼）からの送付検体は、一般事業所単位の集団検診が167,322件、

結婚前検診が75,282件、妊婦検診が8,385件と一般検診（保健所に検査を依頼した一般人）が67,498件である。また、病院からの検体は69,046件、監察医務院からの原因不明死亡者の行政解剖検体が196件、防疫課からの街娼の検体が4,606件である。

##### 2) 試験方法

カルジオライピン抗原によるガラス板法と緒方法（以下 STS と略）の2法を梅毒血清反応検査指針<sup>2)</sup>に準じて行った。なお、集団検診の検体については、ガラス板法でスクリーニングを行い、そのうち陽性のものについては緒方法も実施した。また、一般検診、病院、街娼の検体の一部は、ガラス板法または緒方法の一法のみを検査依頼であり、その割合については表中に（注）として入れた。

#### 成 績

1971~1980年の10年間に都民を対象とした STS による梅毒血清反応検査成績を年度別と検査対象群別にまとめて表1(1)および(2)に示した。表中の陽性数は、ガラス板法と緒方法の2法を行ったものについては、両方が陽性になったものを掲げ、不一致となったものは除外した。また、どちらか一法のみを検査依頼の場合には、それが陽性になったものの数を掲げた。

検査対象群別の陽性率についてみると、集団検診群では1971年度が最高で0.94%、1978年度が最低で0.61%、10年間の平均が0.83%であり、この調査期間内における年度別陽性率に大きな変化はみられなかった。これに対

\* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科 160 東京都新宿区百人町3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1 (1) Results of Serological Test for Syphilis by STS in Tokyoites During the Period 1971 Through 1980

| Year  | Sources of material |                 |                  |                    |                 |                  |                      |                 |                  |               |                 |                  |
|-------|---------------------|-----------------|------------------|--------------------|-----------------|------------------|----------------------|-----------------|------------------|---------------|-----------------|------------------|
|       | Group examination   |                 |                  | Premarriage (male) |                 |                  | Premarriage (female) |                 |                  | Maternity     |                 |                  |
|       | No. of tested       | No. of positive | Positive rate(%) | No. of tested      | No. of positive | Positive rate(%) | No. of tested        | No. of positive | Positive rate(%) | No. of tested | No. of positive | Positive rate(%) |
| 1971  | 37,076              | 345             | 0.94             | 5,889              | 29              | 0.49             | 5,190                | 47              | 0.91             | 1,639         | 31              | 1.89             |
| 1972  | 35,222              | 317             | 0.90             | 5,766              | 31              | 0.54             | 4,727                | 36              | 0.76             | 1,427         | 18              | 1.26             |
| 1973  | 27,329              | 211             | 0.77             | 3,972              | 16              | 0.40             | 3,336                | 21              | 0.63             | 899           | 12              | 1.33             |
| 1974  | 24,447              | 208             | 0.85             | 3,520              | 14              | 0.40             | 3,057                | 14              | 0.46             | 706           | 5               | 0.71             |
| 1975  | 16,386              | 115             | 0.70             | 2,560              | 12              | 0.47             | 2,116                | 10              | 0.47             | 505           | 5               | 0.99             |
| 1976  | 7,438               | 63              | 0.85             | 1,167              | 5               | 0.43             | 978                  | 2               | 0.20             | 260           | 1               | 0.38             |
| 1977  | 6,190               | 40              | 0.66             | 896                | 9               | 1.00             | 774                  | 1               | 0.13             | 211           | 0               | 0.00             |
| 1978  | 6,361               | 38              | 0.61             | 866                | 1               | 0.11             | 741                  | 2               | 0.27             | 201           | 0               | 0.00             |
| 1979  | 3,876               | 31              | 0.80             | 638                | 1               | 0.15             | 609                  | 3               | 0.50             | 161           | 1               | 0.62             |
| 1980  | 2,997               | 24              | 0.80             | 501                | 0               | 0.00             | 530                  | 1               | 0.19             | 140           | 0               | 0.00             |
| Total | 167,322             | 1,392           | 0.83             | 30,690             | 155             | 0.51             | 26,592               | 178             | 0.67             | 8,385         | 113             | 1.35             |

Table 1 (2) Results of Serological Test for Syphilis by STS in Tokyoites During the Period 1971 Through 1980

| Year  | Sources of material         |                 |                  |                    |                 |                  |                  |                 |                  |               |                 |                  |
|-------|-----------------------------|-----------------|------------------|--------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|---------------|-----------------|------------------|
|       | Unspecified (Health center) |                 |                  | Hospital inpatient |                 |                  | Unnatural corpse |                 |                  | Prostitute    |                 |                  |
|       | No. of tested               | No. of positive | Positive rate(%) | No. of tested      | No. of positive | Positive rate(%) | No. of tested    | No. of positive | Positive rate(%) | No. of tested | No. of positive | Positive rate(%) |
| 1971  | *1 14,864                   | 449             | 3.69             | 14,500             | 510             | 3.52             | 63               | 12              | 19.05            | 656           | 88              | 13.41            |
| 1972  | *1 14,209                   | 416             | 2.93             | 14,038             | 457             | 3.26             | 38               | 6               | 15.79            | 578           | 71              | 12.28            |
| 1973  | *1 12,918                   | 321             | 2.48             | *3 8,515           | 316             | 3.71             | 30               | 3               | 10.00            | *6 492        | 56              | 11.38            |
| 1974  | *1 12,494                   | 333             | 2.67             | *3 7,543           | 308             | 4.08             | 17               | 4               | 23.53            | *6 525        | 75              | 14.29            |
| 1975  | *1 7,809                    | 242             | 3.10             | 4,762              | 140             | 2.94             | 11               | 5               | 45.45            | *6 487        | 67              | 13.76            |
| 1976  | *2 2,197                    | 57              | 2.62             | 4,776              | 84              | 1.76             | 11               | 1               | 9.09             | 493           | 57              | 11.56            |
| 1977  | *2 1,248                    | 22              | 1.76             | *4 4,012           | 81              | 2.02             | 13               | 2               | 15.38            | 410           | 30              | 7.32             |
| 1978  | *2 552                      | 29              | 4.89             | *5 2,667           | 76              | 2.85             | 3                | 0               | 0.00             | 324           | 22              | 6.79             |
| 1979  | *2 653                      | 27              | 4.20             | 3,730              | 88              | 2.36             | 4                | 0               | 0.00             | 319           | 27              | 8.46             |
| 1980  | *2 554                      | 30              | 5.23             | 4,503              | 107             | 2.38             | 6                | 2               | 33.33            | 322           | 37              | 11.49            |
| Total | 67,498                      | 1,926           | 2.85             | 69,046             | 2,167           | 3.14             | 196              | 35              | 17.86            | 4,606         | 530             | 11.51            |

Note \*1 : About 3% materials were tested by VDRL or CFR only.

\*2 : About 15% materials were tested by VDRL or CFR only.

\*3 : About 5% materials were tested by VDRL or CFR only.

\*4 : About 17% materials were tested by VDRL or CFR only.

\*5 : 60% materials were tested by CFR only.

\*6 : all materials were tested by VDRL.

して、婚前検診の男性群の陽性率は0～1.00%平均0.51%、同女性群は0.13～0.91%で平均0.67%、また、妊婦検診は0～1.89%で平均1.35%であり、1971～1980年の

間に著明な陽性率の低下がみられた。

保健所からの一般検診群は、1977年度1.76%と最低の陽性率を示し、その後、陽性率に若干の増加がみられる

ものの、10年間の平均で2.85%であった。また、病院からの検体の陽性率は1974年度に最高の4.08%、1976年度に最低の1.76%を示し、この10年間の平均は3.14%と大きな変化はみられなかった。

一方、原因不明死亡者群の10年間における陽性率の平均は17.86%、街娼群のそれは11.51%と他の対象群よりも著明に高いものであった。

### 考 察

最近の梅毒の届出患者数は全国で約2,500人、東京都では約500人となっている。1970年には全国の届出患者数が約6,000人、東京都が約1,000人であった。このことからすると、この約10年間に全国では約1/2.5に、東京都においては1/2に減少したことになる。また、著者が前回報告<sup>1)</sup>した1967～1970年の4年間の陽性率の平均と今回の10年間の平均とを比較してみると、集団検診群が1.09%から0.83%に、婚前検診群が0.80%から0.58%に、妊婦検診群が2.05%から1.35%にと、われわれがいわゆる健康者とみているこれらの検診群における陽性率はいずれも低下していることがわかる。これらのいわゆる健康者における梅毒血清反応陽性者の減少傾向は、梅毒届出患者数の減少ほど著明でないにしても、年度ごとに着実に減少しており、性病予防対策事業の成果といえよう。

保健所からの一般検診群においては、1978年度以降、陽性率に若干の上昇がみられるが、これはガラス板法または緒方法の一方のみの依頼検体の陽性率が高いことによるものであり、このような一法のみの依頼は、再検査の意味合いが強いことからしても、陽性者が増加の傾向にあるとはいいいがたい。

原因不明死亡者群においては、年度別の陽性率に0～45%と著明な差がみられるが、検査件数がきわめて少ないことに起因するものであり、また、平均陽性率が17%と高いことは、監察医が剖検時に梅毒性病変を肉眼的に認めたもののみを選択的に血液を採取して送付するからと思われる。

一方、売春防止法違反により逮捕された街娼における陽性率についてみると、1967～1970年<sup>1)</sup>の平均が13.1%、今回の10年間の平均が11.5%となっており大きな変化はみられない。しかし潜在的売春が行われている現状ではその実態をうかがい知ることは困難である。

最近、海外旅行者が急増し、それらの旅行者の中には発展途上国での売春に関連しているものもあり、それが国際問題化していることがマスコミで指摘されている。

また、先進諸国においては、若年層におけるセックス解放思想が高まっており、こうした事態を反映して性病が広まることも予想される。また、梅毒とともに性病として重要なリン疾の病原体であるリン菌においては、国際的にβラクタマーゼ産生の耐性菌が広まってきており<sup>2)</sup>、わが国でもペニシリン耐性リン菌が検出されるようになってきている<sup>3)</sup>。こうした現実を考慮し、今後とも性病予防対策を進めていく必要があろう。

梅毒血清反応の技術的な問題としては、STSにおける偽陽性反応(以下FPと略)があげられる。FPに関する詳細に関しては続報<sup>4)</sup>で述べるが、それによるとSTS陽性血清について梅毒トレポネーマの特異抗原を用いたTPHAとFTA-ABS法で検討した結果14.0%にFPが認められた。このことから、STS陽性血清については今後ともTPHAやFTA-ABS法を併用して検討する必要がある。

### 結 論

1971～1980年の10年間に、東京都民のべ374,335件の血清についてSTSによる梅毒血清反応を行った。

調査対象別のSTSによる梅毒血清反応の陽性率は婚前検診男性群が0.51% (0～1.0%)、同女性群が0.67% (0.13～0.91%)、妊婦検診群が1.35% (0～1.89%)、事業所別集団検診群が0.83% (0.61～0.94%)であり、これらいわゆる健康者群においては年度別の陽性率が漸次減少する傾向にあった。前報の1967～1970年の調査成績と比較した場合、この傾向はより著明であった。

一方、一般検診群の陽性率の平均は2.85%、病院からの依頼検査群は3.14%、原因不明死亡者群は17.86%、街娼群は11.51%であり、これらの各群においては、前者のいわゆる健康者群に比較的高い陽性率を示すとともに、年度別の陽性率の著明な減少傾向はみられなかった。

STS陽性例中にはFPがかなり認められることから、STS陽性血清についてはTPHAやFTA-ABS法のような特異抗原による再検査が不可欠であると考えられる。

### 文 献

- 1) 大久保暢夫ら：東京衛研年報，22，25，1970
- 2) 日本公衆衛生協会：梅毒血清反応検査指針，1969
- 3) W.H.O：Wkly Epidemiol. 52，357-364，1977
- 4) 加納堯子，大久保暢夫：東京都衛生局学会誌，66，54，1979
- 5) 堀 幹郎ら：東京衛研年報，33，29，1982



## 1971年から1980年までの10年間に於ける梅毒血清反応偽陽性の出現

堀 幹 郎\*, 平 岡 陸左右\*, 落 合 泰 隆\*, 宮 沢 貞 雄\*  
石 上 武\*, 寺 山 武\*, 大久保 暢 夫\*, 大 橋 誠\*

### Appearance of False Positive Reaction on Serological Test for Syphilis between 1971-1980 in Tokyoites

MIKIO HORI\*, RIKUZO HIRAOKA\*, YASUTAKA OCHIAI\*, SADA O MIYAZAWA\*,  
TAKESHI ISHIKAMI\*, TAKESHI TERAYAMA\*, NOBUO OHKUBO\*  
and MAKOTO OHASHI\*

**Keywords:** 梅毒血清反応 serological test for syphilis, 偽陽性反応 false positive reaction, 出現 appearance, TPHA, FTA-ABS, Wassermann reaction, VDRL

#### 緒 言

脂質抗原による梅毒血清反応は精製されたカルジオライピン抗原が使用されるようになって、特異性および鋭敏度ともに非常にすぐれたものになった。しかし、抗原活性をもつと考えられるカルジオライピンが、梅毒病原体の *Treponema pallidum* (以下TPと略) とは無関係のリン脂質であるため、梅毒以外の各種疾患や健康者の血清においてもしばしば反応が陽性になるため、いわゆる偽陽性反応 (以下FPと略) として問題となっている。一般に脂質抗原によって生ずるFPは、日常検査において血清反応陽性者の10~20%の割合でみられるといわれている。特に、ウイルス感染症、膠原病などの疾患、麻薬常用者および種痘、インフルエンザ、日本脳炎などの予防接種後に高い頻度でこれが出現すると報告されている<sup>1)</sup>。また、Harvey ら<sup>2)</sup>はFPを示す年齢は20~30才代の層に多く、そのうち性別では女子が70~80%を占めていると指摘している。このようにカルジオライピンを抗原とする反応において出現するFPは梅毒の血清学的診断の上ばかりでなく、患者の診療の上でも大きな問題といえる。そのため、カルジオライピン抗原による非特異反応を除く目的で、梅毒の病原体であるTPの菌体自体、もしくは菌体成分を抗原とした血清診断法が検討されてきた。現在、こうした目的で開発された梅毒TP感作血球凝集反応 (以下TPHAと略) および梅毒蛍光抗体吸収法 (以下FTA-ABSと略) が精密あるいは確定診断法として多くの検査機関においてルーチン検査に應用されている。

われわれは1971年から1980年までの10年間に梅毒血清反応ガラス板法 (以下VDRLと略) およびワッセルマン反応緒方法 (以下CFRと略) (以下両試験法を合せてSTSと略) が陽性、あるいは不一致となった血清について、TPHAとFTA-ABSで再検査し、FPの出現頻度を検討したので報告する。

#### 材料と方法

調査対象: 1971年から1980年までに都内各所より当所に梅毒血清反応検査のため送付された血清のうち、STSが陽性、ないしはいずれか一方が陽性を示した一般人の血清3,167例と街娼由来の血清861例 (1971年から1975年までの中にはSTS2法ともに陰性でTPHAまたはFTA-ABS陽性血清196例を含む) を対象とした。  
試験方法: VDRL, CFR, TPHA およびFTA-ABSは梅毒血清反応検査指針<sup>3)</sup>に準じて行った。

#### 成 績

1971年から1980年の10年間に調査した、一般人についての梅毒血清反応4法による比較成績をTable 1に示した。TPHAとFTA-ABSとにおいても成績不一致のものが11例に認められたが、これらについては前報<sup>4)</sup>と同様に、いずれか一方が陽性を示したものを梅毒陽性として取り扱うことにした。最近10年間に調査した一般人の血清で、STSが陽性もしくはいずれか一方が陽性のもの3,167例のうち、TPHAとFTA-ABSの両者が陰性でFPと判定されたものは1,471例 (46.4%) であった。FPの出現頻度を年次別にみると、1971年は676例中91例39.2%、1972年から1974年まではそれぞれ45.8

\* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科 160 東京都新宿区百人町3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Appearance of False Positive Reaction on Serological Test for Syphilis During the Period 1971 Through 1980 in Tokyo

| Year  | Number of samples | Number of samples exhibited following reactions (%) |             |             |             |              |              |              |              |              |              |             |             |             |             |
|-------|-------------------|-----------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|       |                   | VDRL                                                | +           | +           | +           | -            | +            | +            | +            | -            | +            | +           | +           | -           | +           |
|       |                   | CFR                                                 | +           | -           | Ab-R        | +            | -            | -            | +            | +            | +            | -           | Ab-R        | +           | Ab-R        |
|       |                   | TPHA                                                | +           | +           | +           | +            | +            | -            | +            | +            | +            | -           | -           | -           | -           |
|       |                   | FTA-ABS                                             | +           | +           | +           | +            | -            | +            | -            | -            | -            | -           | -           | -           | -           |
| 1971  | 676<br>(100)      | 300<br>(44)                                         | 104<br>(15) |             |             | 3<br>(0.44)  | 2*<br>(0.30) | 1*<br>(0.15) |              | 1*<br>(0.15) |              | 165<br>(24) | 1<br>(0.15) | 8<br>(1.2)  | 90<br>(13)  |
| 1972  | 684<br>(100)      | 263<br>(39)                                         | 105<br>(15) | 1<br>(0.15) |             |              |              |              | 1*<br>(0.15) |              | 1*<br>(0.15) | 199<br>(29) | 1<br>(0.15) | 6<br>(0.88) | 107<br>(16) |
| 1973  | 497<br>(100)      | 172<br>(35)                                         | 90<br>(18)  |             |             |              | 1*<br>(0.20) |              |              |              |              | 152<br>(31) | 1<br>(0.20) | 5<br>(1.0)  | 74<br>(15)  |
| 1974  | 514<br>(100)      | 200<br>(39)                                         | 77<br>(15)  |             |             |              | 2*<br>(0.39) |              |              |              |              | 164<br>(32) |             | 9<br>(1.7)  | 61<br>(12)  |
| 1975  | 360<br>(100)      | 95<br>(26)                                          | 47<br>(13)  |             |             |              | 1*<br>(0.27) |              |              |              |              | 160<br>(44) |             | 8<br>(2.2)  | 47<br>(13)  |
| 1976  | 167<br>(100)      | 35<br>(21)                                          | 33<br>(20)  |             | 1<br>(0.60) |              |              |              |              |              |              | 73<br>(44)  |             | 2<br>(1.2)  | 21<br>(13)  |
| 1977  | 95<br>(100)       | 32<br>(33)                                          | 20<br>(21)  |             | 1<br>(1.1)  | 1*<br>(1.1)  |              |              |              |              |              | 26<br>(27)  |             | 3<br>(3.2)  | 11<br>(12)  |
| 1978  | 80<br>(100)       | 26<br>(32)                                          | 22<br>(28)  |             |             |              |              |              |              |              |              | 21<br>(26)  |             |             | 11<br>(14)  |
| 1979  | 59<br>(100)       | 28<br>(48)                                          | 11<br>(19)  |             | 1<br>(1.7)  |              |              |              |              |              |              | 9<br>(15)   |             |             | 10<br>(17)  |
| 1980  | 35<br>(100)       | 14<br>(40)                                          | 3<br>(8.6)  | 1<br>(2.9)  |             |              |              |              |              |              |              | 2<br>(5.7)  |             | 4<br>(11)   | 11<br>(31)  |
| Total | 3167<br>(100)     | 1165<br>(37)                                        | 512<br>(16) | 2<br>(0.06) | 6<br>(0.19) | 7*<br>(0.22) | 1*<br>(0.03) | 1*<br>(0.03) | 1*<br>(0.03) | 1*<br>(0.03) | 1*<br>(0.03) | 971<br>(31) | 3<br>(0.09) | 45<br>(1.4) | 443<br>(14) |

Notice Ab-R : Abnormal Wassermann reaction (Ogata method), CFR : Wassermann reaction (Ogata method)

\* : Disagreement between TPHA and FTA-ABS

%, 47.1%, 45.7%とやや増加傾向を示した。1975年には360例中217例60.3%と例年になくFPが高率に認められた。その後は1979年に59例中19例32.2%と最低率を示したのを除き、ほぼ平均的な出現率を示した。

FPの内訳をみるとVDRLが陽性でCFR, TPHAおよびFTA-ABS 3法が陰性のものが最近10年間に971例31.0%に認められ、VDRLとCFRともに陽性でTPHAとFTA-ABSがともに陰性のものが443例14.0%であった。この他にCFRが陽性でVDRL陰性、そしてTPHAとFTA-ABSがともに陰性のものが45例1.4%認められた。CFRに異常反応を示したものが14例0.44%認められたが、このうちの12例はTPHAおよびFTA-ABSが陰性でFPと判定された。

一方、売春防止法の違反で逮捕された街娼より防疫課菊屋橋分室で採取された血清について、梅毒血清反応検査を実施し、FPを検討した成績をTable 2に示した。

1971年から1980年の10年間に検挙された街娼の梅毒血清反応のうちSTS法の陽性率は別報<sup>5)</sup>で述べたごとく11.5%であるが、STS陽性例のうち、梅毒血清反応の特異反応であるTPHAとFTA-ABSが陽性で梅毒と診断されたものは861例中780例90.6%、STS陽性で特異反応が陰性のFPと診断されたものは81例9.4%であった。年次別のFPの出現頻度は3.3%~13.5%であり、一般人におけるFPの年次別出現頻度の変動のような大きな年次別変化はみられなかった。また、一般人におけるFPの出現頻度が46.4%であったのに対して、街娼におけるFPの出現頻度は9.4%と著しく低率であった。

#### 考 察

現在、一般に行われている梅毒血清反応はワッセルマン反応緒方法、ガラス板法、RPRカードテストなどである。これらの検査法では抗原としてカルジオライピンとレンチンが用いられ、さらに反応増感剤としてコレス

Table 2. Appearance of False Positive Reaction on Serological Test for Syphilis in Prostitutes During the Period 1971 Through 1980 in Tokyo

| Year  | Number of samples | Number of samples exhibited following reactions (%) |             |             |             |             |              |              |             |              |             |             |             |      |             |
|-------|-------------------|-----------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|------|-------------|
|       |                   | VDRL                                                | +           | +           | -           | -           | -            | +            | +           | -            | -           | +           | -           | -    | +           |
|       |                   | CFR                                                 | +           | -           | Ab-R        | +           | -            | -            | -           | -            | -           | -           | +           | Ab-R | +           |
|       |                   | TPHA                                                | +           | +           | +           | +           | +            | +            | -           | +            | -           | -           | -           | -    | -           |
|       |                   | FTA-ABS                                             | +           | +           | +           | +           | +            | -            | +           | -            | +           | -           | -           | -    | -           |
| 1971  | 141<br>(100)      | 74<br>(53)                                          | 22<br>(16)  |             |             | 31<br>(22)  | 1*<br>(0.71) |              |             | 1*<br>(0.71) | 5<br>(3.5)  |             |             |      | 7<br>(5.0)  |
| 1972  | 141<br>(100)      | 64<br>(45)                                          | 20<br>(14)  |             |             | 41<br>(29)  | 1*<br>(0.71) |              |             |              | 10<br>(7.1) |             |             |      | 5<br>(3.5)  |
| 1973  | 119<br>(100)      | 65<br>(55)                                          |             |             |             | 42<br>(35)  |              | 2*<br>(1.7)  | 4*<br>(3.4) |              | 6<br>(5.0)  |             |             |      |             |
| 1974  | 128<br>(100)      | 65<br>(51)                                          |             |             |             | 45<br>(35)  |              | 1*<br>(0.78) | 2*<br>(1.6) |              | 15<br>(12)  |             |             |      |             |
| 1975  | 111<br>(100)      | 56<br>(51)                                          |             |             |             | 37<br>(33)  |              |              |             | 3*<br>(2.7)  | 15<br>(14)  |             |             |      |             |
| 1976  | 72<br>(100)       | 50<br>(69)                                          | 11<br>(15)  |             | 2<br>(2.8)  |             |              | 1*<br>(1.4)  |             |              | 4<br>(5.6)  |             | 1<br>(1.4)  |      | 3<br>(4.2)  |
| 1977  | 41<br>(100)       | 30<br>(73)                                          | 5<br>(12)   | 1<br>(2.4)  |             |             |              |              |             |              | 2<br>(4.9)  | 1<br>(2.4)  | 1<br>(2.4)  |      | 1<br>(2.4)  |
| 1978  | 30<br>(100)       | 18<br>(60)                                          | 10<br>(33)  |             | 1<br>(3.3)  |             |              |              |             |              | 1<br>(3.3)  |             |             |      |             |
| 1979  | 36<br>(100)       | 25<br>(69)                                          | 8<br>(22)   |             | 1<br>(2.8)  |             |              |              |             |              | 2<br>(5.6)  |             |             |      |             |
| 1980  | 42<br>(100)       | 36<br>(86)                                          | 4<br>(9.4)  |             |             |             |              |              |             |              |             | 1<br>(2.4)  | 1<br>(2.4)  |      |             |
| Total | 861<br>(100)      | 483<br>(50)                                         | 80<br>(9.3) | 1<br>(0.12) | 4<br>(0.46) | 196<br>(23) | 2*<br>(0.23) | 4*<br>(0.46) | 9*<br>(10)  | 1*<br>(0.12) | 60<br>(7.0) | 2<br>(0.23) | 3<br>(0.35) |      | 16<br>(1.9) |

Notice Ab-R : Abnormal Wassermann reaction (Ogata method), CFR : Wassermann reaction (Ogata method)

\* : Disagreement between TPHA and FTA-ABS

テロールを加えて用いられている。梅毒血清反応は Wassermann<sup>9)</sup> 以来長年月にわたる検査術式の変遷により、その鋭敏度および特異度ともに著しく改善されているにもかかわらず、非特異抗原を用いている関係から F P の出現を防止することができない。このため、F P を鑑別する種々の努力がなされ、TP を抗原とした TPHA、FTA-ABS などが開発された。両検査法は脂質抗原を使用する方法より非特異反応を除外するには有用である。われわれも1971年から1980年までの最近10年間に実施した梅毒血清反応 STS の成績より、両反応が陽性となった血清の一部について両特異反応で検査した。その4法の成績から一般人の F P 出現率は平均46.4%で、10年間のうち最も高率であったのは1975年の60.3%であった。このように一般人の F P 出現頻度は一般にいわれている割合よりかなり高率であった。これは、STS 不一致例を含めて検討したことに起因するもので、

STS の一致例だけについての F P 出現率は平均14.0%で、われわれが前報<sup>4)</sup> で調査した1970年の14.8%とほぼ同様な成績で、諸氏の報告とも良く一致している。以上の結果が示すように VDRL は梅毒の簡易迅速診断法であるが、F P の出現率が50%にも及ぶことがあるので、この方法はあくまでスクリーニング法とし、本法による陽性例はかならず特異反応による検査を実施しなければならない。

一般人および街娼の F P 例のうち、STS 不一致、主として VDRL 陽性、CFR 陰性例が各年度とも高い頻度に認められるが、この不一致例は TP 特異反応である TPHA および FTA-ABS の検査によって非梅毒との鑑別ができるので、VDRL での梅毒血清反応検査では、反応陽性例の全てについてこれらの特異反応による検査が要求される。梅毒の血清学的診断としての血清反応では梅毒でない人は、絶対に陽性に出さないで、プラス、

マイナスをはっきり区別できる検査法が理想的なものであるが、日常に行われている反応には長所、短所があるため、梅毒の血清学的診断としてはその検査法の長所を生かした組合せによっているのが現状である。

街娼の F P 出現頻度は平均 9.4 % で、STS 2 法の一致例のみのそれは非常に低率であった。しかし、性病の感染源と思われる街娼の中にも F P が存在することは興味深いところである。

一般人および街娼の F P 例についての臨床的所見は不明であるため、どのような疾患あるいは病態によって F P を呈したのか明らかでない。

TP を抗原とする特異反応である TPHA、FTA-ABS の検査法においても脂質抗原を用いる STS 同様に非特異反応を起こすという報告がある。Kraus ら<sup>7,8)</sup> は全身性エリテマトーデス (SLE) の患者血清が、約 8 % の割合で FTA-ABS に反応すると報告している。また、Gerner ら<sup>9)</sup> によるとライ患者の F P 血清 26 例のうち、3 例 (11.5 %) が TPHA に陽性を示し、F P と診断されたと報告している。今回、梅毒陽性例の中に入れた TPHA と FTA-ABS の不一致例が一般人で 11 例、街娼で 16 例、合計 27 例認められた。これらの臨床的所見などは明らかでないが、T P 抗原に対する非特異反応も考慮されるので、特異反応とみられている TPHA や FTA-ABS に出現する F P の発生要因を検討する必要がある。

### 結 論

1971 年から 1980 年までの最近 10 年間に梅毒血清反応 STS が陽性、もしくは不一致となった血清、一般人 3,167 例と街娼 861 例について TPHA と FTA-ABS で再検査し、これらの成績から次の結論を得た。

1 一般人の F P 出現率は 46.4 % であった。10 年間のうち、1975 年が 60.3 % で最高を示し、1979 年は 32.2 % で最低の出現頻度であった。

2 街娼の F P は 9.4 % で、最高が 1975 年の 13.5 %、最低が 1978 年の 3.3 % であった。

3 F P の内訳では VDRL が陽性で CFR、TPHA および FTA-ABS 3 法が陰性のものが最も多く、10 年間に一般人で 31.0 %、街娼で 7.0 % 認められた。

4 梅毒陽性例の中に入れた TPHA と FTA-ABS の不一致血清が一般人および街娼合せて計 27 例認められた。

### 文 献

- 1) Moore, J. E and Mohr, C. F. : *J. Amer. Med. Assoc.*, 150, 467, 1962
- 2) Harvey, A. M. : *J. Amer. Med. Assoc.*, 182, 513, 1962
- 3) 日本公衆衛生協会：梅毒血清反応検査指針，1969
- 4) 大久保暢夫，堀 幹郎，宮沢貞雄，村田以和夫：東京衛研年報，22，29，1970
- 5) 石上 武，堀 幹郎，平岡陸左右，落合泰隆，宮沢貞雄，安部昭子，寺山 武，大久保暢夫，大橋 誠：東京衛研年報，33，26，1982
- 6) 勝又昇一：モダンメディア，10，15，1964
- 7) Kraus, S. J., Haserick, J. R. and Lantz, M. A. : *J. Amer. Med. Assoc.*, 211, 2140, 1970
- 8) Kraus, S. J., Haserick, J. R. and Lantz, M. A. : *J. New Eng. J. Med.*, 282, 1287, 1970
- 9) Garner, M. F., Backhouse, J. L., Daskalopoulos, G. and Walsh, J. L. : *J. Clin. Path.*, 26, 258, 1973

酵素抗体法 (ELISA) による日本住血吸虫症の診断  
フィリピンに適合する反応術式の検討 (第1報)

村田 以和夫\*, 松田 肇\*\*, 田中 寛\*\*, BAYANI L. BLAS\*\*\*

Serodiagnosis of Schistosomiasis japonica in the Philippines  
by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)  
An Applicable Technique for ELISA at Schistosomiasis Control  
and Research Project (S.C.R.P) Laboratory, Palo, Leyte

IWAO MURATA\*, HAJIME MATSUDA\*\*, HIROSHI TANAKA\*\*  
and BAYANI L. BLAS\*\*\*

Stability and usefulness of Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for serodiagnosis of schistosomiasis was evaluated successfully on the activity of antigens, peroxidase conjugated antibody and 3 kinds of substrates in the Philippines. The results are summarized as follows:

1. The antigen for ELISA was prepared from eggs and adult worms of *Schistosoma japonicum* which were collected from naturally infected dogs at the endemic area of schistosomiasis in Leyte and from experimentally infected mice with *S. japonicum*. The activity of the antigens, prepared at S. C. R. P. laboratory (5-15 $\mu$ g/ml protein) was recognized to be equivalent to the antigen, prepared at the Institute of Medical Science, University of Tokyo.
2. The activity of peroxidase conjugated antibody, stored at 5-15°C for more than 6 months functioned optimally at 1:800 dilution for ELISA test in routine use.
3. In the evaluation of 3 kinds of enzyme substrates for ELISA, o-phenylen diamine (OPD) and peroxidase system was the most steady technique in S. C. R. P. laboratory in the other enzyme substrates such as 5-aminosalicylic acid (5AS) and o-tolidine (OT).
4. It was found that ELISA could be used routinely for screening the cases infected with *S. japonicum*, since it was specific, sensitive and rapid.
5. The results on the antibody detection by ELISA with peroxidase-OPD system in patients showed that the positive rate of sera from patients was 100% (63/63) at 1:80 dilution and 93.6% (59/63) at 1:160 dilution in the border line such as optical density at 0.12 (1:80) or 0.11 (1:160), calculated from 2 times of average of optical density in negative control sera.

**Keywords :** ELISA, Serodiagnosis of Schistosomiasis japonica, peroxidase-OPD System, Philippines

はじめに

Engvall and Perlman<sup>1)</sup> (1972) によって考案された酵素抗体法 (ELISA) は、過去 10 年間にめざましい発展をとげ、寄生虫学分野においても広く応用され、多数の報告<sup>2-9)</sup> がなされている。住血吸虫症に関しては、Huldt et al<sup>7)</sup> (1975), McLaren et al<sup>8)</sup> (1978), Deelder et al<sup>9)</sup> (1980) らが、本法をマンスン住血吸虫症に応用した成績を報告している。また Tanaka et al<sup>10)</sup> (1979),

松田ら<sup>11)</sup> (1980), Matsuda et al<sup>12,13)</sup> (1980 a, b), M. G. Yogore et al<sup>14)</sup> (1980), 松田ら<sup>15)</sup> (1981) 中尾ら<sup>16)</sup> (1981) および神谷ら<sup>17)</sup> は ELISA によるフィリピンの日本住血吸虫 (*S. j.*) 症の免疫診断法の有用性を報告している。しかしながら、ELISA には、抗体標識酵素として、alkalinephosphatase と horse-radish peroxidase とが用いられ、前者の発色基質としては p-nitrophenylphosphate、後者には、5-amino salicylic acid (5AS), o-phenylene-

\* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第2研究科 160 東京都新宿区百人町3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 東京大学医科学研究所寄生虫部

\*\*\* Schistosomiasis Control and Research Project, Ministry of Health, Palo, Leyte, 7118, Philippines

diamine (OPD), o-tolidine (OT) および 3-3' diaminobenzidinetetrahydrochloride (DBA) 等がそれぞれ用いられ、様々な反応系がある。また、Macro-Assay や Micro-Assay も試みられており、ELISA 用抗原の作成法や最適な反応術式の設定等、標準化にむけて多くの問題が存在する。今回、筆者らは国際協力事業団のフィリピン住血吸虫症研究対策プロジェクトの一員として、1980年3月から1981年3月までの1年間、Leyte 島 Palo にある Schistosomiasis Control and Research Project (S.C.R.P.) において、日本住血吸虫症の研究対策事業に参画する機会を得た。そこで、本症の高度浸淫地である Leyte 島の S.C.R.P. の研究室において、日常検査法として適応し得る ELISA の反応術式について検討し、良好な成績が得られたので報告する。

#### 材料および方法

材料：A 患者血清；1980年4月より1981年3月までの間、本症診療の目的で S.C.R.P. の病院に来院した外来患者血清80例を被検血清とした。B 対照血清；1980年8月より12月までの間、Manila の San Lazaro 病院に肝炎、消化器系感染症およびその他の診療のため、来院または入院した患者血清70例を対照血清とし、東京都の健康成人50名の凍結乾燥プール血清を陰性対照とした。また、陽性対照血清として、東京大学医科学研究所でプールし凍結乾燥保存中の Leyte 島の *S. j.* 症患者血清を用いた。C ELISA 用抗原；*S. j.* (Philippin系) 実験感染マウスおよび Leyte 島 San Antonio で購入した自然感染イヌ2頭の全腸管壁を漿膜面よりはく離細切後、プロナーゼとコラゲナーゼにより消化して得られた *S. j.* 虫卵を1%食塩水で4℃で数日から4か月間保存したもの3 stock を虫卵粗抗原抽出用の材料とした。また、*S. j.* 自然感染犬の腸間脈静脈および肝門脈より摘出した *S. j.* 成虫は、雌雄を別々に分けて、生理食塩水で数回洗浄後、濾紙で軽く脱水して容器に移し、4℃で保存。老犬および幼犬由来の2 stock を成虫粗抗原抽出用の材料とした。D 虫卵および成虫粗抗原抽出；松田ら<sup>15)</sup>の方法(Fig. 1)に準じ、虫卵3 stock と成虫2 stock より粗抗原を抽出し凍結乾燥後、東大医科研製 *S. j.* 虫卵粗抗原(山梨系)とともに実験に供した。E 標識抗体；Peroxidase 標識抗ヒト IgG (抗 H & L 鎖) ヤギ血清 (MILS YEDA 製) を使用した。本標識抗体は-20℃保存が最良であるが、電力事情が極めて悪い S.C.R.P. の研究室においては、5~15℃のプロパンガス冷蔵庫内に6か月以上保存したものを用いた。

方法：A 抗原および標識抗体の検定；医科研製の凍

Weigh the (lyophilized) eggs or adult worms and place it in a glass homogenizer.

Add 10ml of Carbonate buffered solution (0.05 M, pH 9.6) for every 100 mg of (lyophilized) eggs or worms.

Homogenize 10 times at 1 minute interval in an ice bath.

Transfer the antigen suspension to a glass homogenizer and again homogenize 10 times at 1 minute interval in an ice bath.

Place the antigen suspension in a plastic container and freeze at -70℃, then thaw at 37℃ in a water bath 10 times.

Transfer the antigen suspension to a beaker and stir with a magnetic stirrer at 4℃ for 48 hours.

Centrifuge in a refrigerated centrifuge at 13,500 rpm. (20,000G) for 20 minutes and 1 hour, twice.

Store the supernatant at -70℃ or 4℃ after lyophilize.

Fig. 1. Antigen Preparation for ELISA

結乾燥 *S. j.* 虫卵粗抗原を対照に、現地で作成した *S. j.* 虫卵および成虫粗抗原、計 5 stock について、陽性および陰性コントロール血清を用いて検定し、最適使用濃度を求めた。B 基質の比較；5-aminosalicylic acid (5A S, 関東化学), o-phenylenediamine (OPD, Eastman kodak) および o-tolidine (OT, Sigma) の3基質の調製法は、松田ら<sup>15)</sup>、中尾ら<sup>16)</sup>の方法と独自の方法を比較し、また、3基質の特性を対比しながら、不十分な実験環境での実用性すなわち鋭敏性、安定性、肉眼判定の可否、反応時間および簡便性について検討を加えた。C 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水添加量の比較；H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は酸化性が強いいため、ラベル表示どおりの濃度を保持しているか否か定かでない。そこで、Manila で購入した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水の基質に添加すべき最適添加量を検討した。D 酵素抗体法 (ELISA-microplate 法)；松田ら<sup>15)</sup>、中尾ら<sup>16)</sup>の方法に従い次の要領で実施した。1) microplate (Cooke M129A) の各穴に 0.05 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で抽出および希釈した *S. j.* 虫卵または成虫粗抗原を 0.3 ml ずつ注入、湿潤箱中で 37℃、2 時間感作後 4℃ 1 夜保存する。2) 0.005% NaN<sub>3</sub>、0.05% Tween 20 加 0.15 M PBS (pH 7.2) で 5 分間に 3 回洗浄する。3) 被検血清および対照血清を 0.05% Tween 20、1% Bovine serum albumine 加 0.15 M PBS (pH 7.2) で希釈、

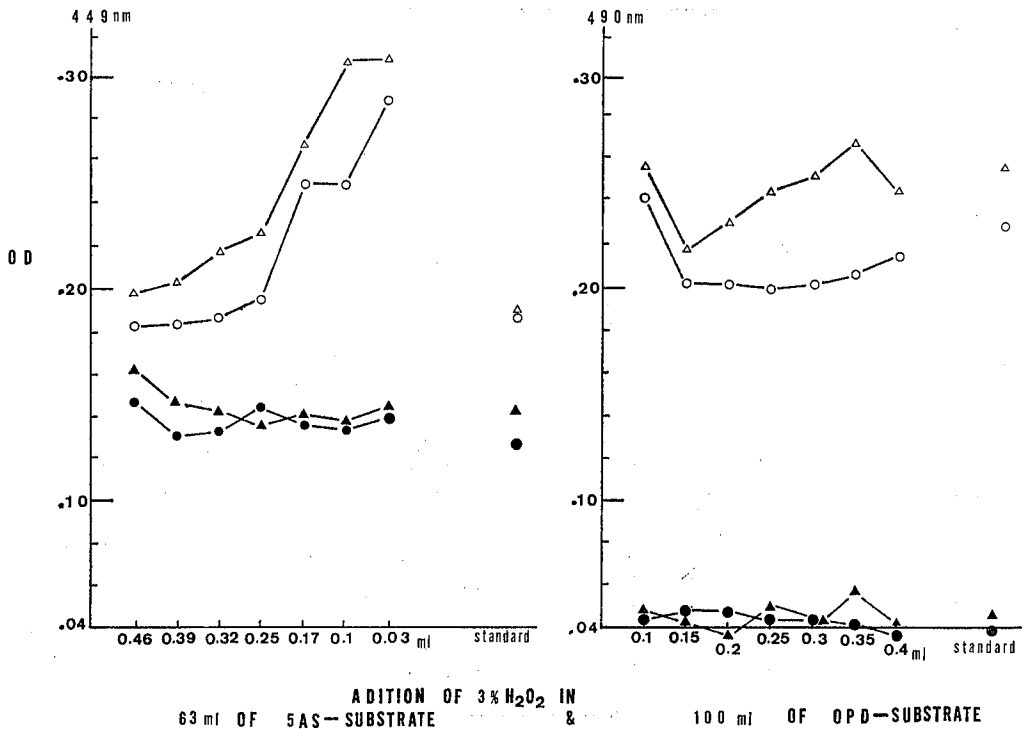


Fig. 2 Effect of addition of  $H_2O_2$  to 2 kinds of Substrate Solution for ELISA

Note:  $\Delta$ - $\Delta$ ; Serum obtained from Patient,  $\bigcirc$ - $\bigcirc$ ; Positive control Serum  
 $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$ ; Serum collected in Mamla  $\bullet$ - $\bullet$ ; Negative control Serum

プレートの各穴に 0.3 ml ずつ注入し、5 AS を基質に用いる場合は 37℃、1 時間、OPD または OT の場合は 37℃、30 分間 1 次反応を行なう。4) 2) と同様に洗浄する。5) Peroxidase 標識血清を 0.05% Tween 20 と 1% Bovine serum albumin 加 0.15 M PBS で適当な濃度に希釈し、プレートの各穴に 0.3 ml ずつ注入する。6) 3) と同様 37℃ で 1 時間 (5 AS) または 30 分間 (OPD, OT) 2 次反応を行なう。7) 2), 4) と同様に洗浄する。8) 各基質液 0.3 ml を速かにプレートの各穴に注入し、室温約 (30℃) で 5 AS は 1 時間、OPD と OT は 30 分間静置して基質反応を行なう。なお、OPD は感光性が強いので暗室で操作する。9) 反応停止液は 5 AS には 25  $\mu$ l の 1 N NaOH, OPD には 25  $\mu$ l の 8 N  $H_2SO_4$  をプレートの各穴に滴加し、パイプレーターで混和する (OT の反応停止液は考案されていない)。10) 吸光度の測定は、プレート直読式 2 波長分光光度計 (コロナ, MTP-12) を使用し、5 AS には 450 nm と 660 nm, OPD には 500 nm と 600 nm, また OT には 610 nm と 500 nm の吸収フィルターの組み合わせにより行ない、

合わせて、肉眼判定の成績と比較する。

#### 実験成績

1. 各基質液への  $H_2O_2$  水最適添加量の検討; 反応条件を 5  $\mu$ g/ml の *S. j.* 虫卵粗抗原 (医科研製, 山梨系) をプレート 1 穴当り 0.3 ml, 標識抗体 (MILES YEDA) を 1:400 希釈, 供試血清を 1:40 希釈と固定した場合の各基質液への  $H_2O_2$  水最適添加量について検討した。供試血清は既知患者血清 1 例, 陽性コントロール血清 1 例, Manila で採取した非 *S. j.* 症血清 1 例および陰性コントロール血清 1 例を用いた。

基質調製時、OT は原因不明の白濁、次いで着色を呈し使用不能であったため、比較試験を中止し、Fig. 2 には、5 AS と OPD の比較成績を示す。Fig. 2 左から明らかなように、松田ら<sup>15)</sup>の調製法 (Standard と表示) すなわち、5 AS 80 mg を 70℃ に加熱した蒸留水 100 ml に溶解、0.1 N NaOH で pH 6.0 に合わせ、その 90 ml に 0.05%  $H_2O_2$  10 ml を加える方法は陽性血清の OD 値が 0.20 と低く、また陰性血清の OD 値 0.12~0.14 との差が少ない。一方、5 AS 溶液 63 ml に 3%  $H_2O_2$  を 0.03

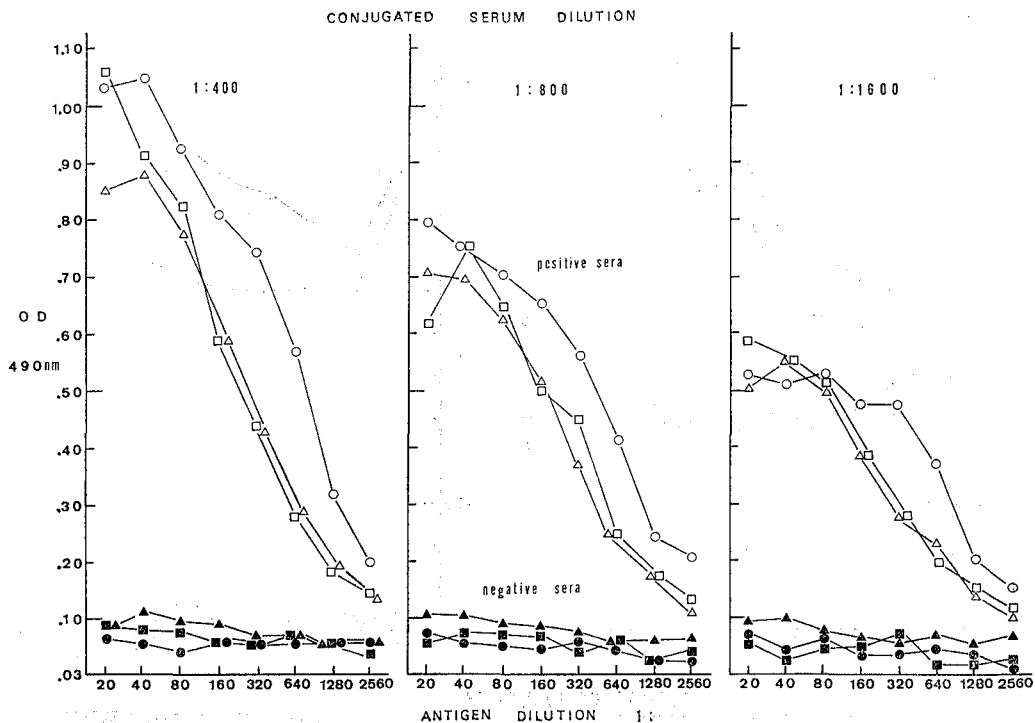


Fig. 3 Results of ELISA with 3 stocked Antigens prepared from *S. japonicum* eggs

Note: □-□ *S. j.* egg Antigen obtained from naturally infected dog (old one)

○-○ " " (young one)

△-△ " " from artificially infected mice

～0.46ml まで 0.07ml 間隔で増減した場合、添加量が増える毎に陽性血清のOD値が下がり、陰性血清のOD値と接近する事が明らかとなった。5A Sにおける  $H_2O_2$  添加量の増減がELISAのOD値に与える影響はきわめて大きい、Fig. 2 右に示すとおり、OPDを反応基質とした場合には、3%  $H_2O_2$  水を0.05ml 間隔で0.1～0.4ml まで増減しても、陽性血清と陰性血清のOD値はほとんど影響を受けない。しかも、陽性と陰性血清のOD値の差が顕著であるため、肉眼判定も容易であった。以上の成績から、S. C. R. P. の研究室で行なうELISAには Peroxidase-OPD systemを採用し、以後の実験はすべてこの方法により行なった。

2. フィリピンで調製した*S. j.* 虫卵粗抗原の活性と最適使用濃度の検討；Fig. 3は、3つの*S. j.* 虫卵（フィリピン系）粗抗原を1:20～1:2560に希釈し、標識抗体を1:400～1:1600に希釈した場合の陽性と陰性コントロール血清に対するELISA反応パターンを示す。それぞれのLowry-Follin法による蛋白濃度は、*S. j.* 自然感染

犬（老犬）より得られた虫卵粗抗原が950 $\mu$ g/ml、同幼犬より得られた虫卵粗抗原が450 $\mu$ g/ml、*S. j.* 実験感染マウスからの虫卵粗抗原が450 $\mu$ g/mlを示した。抗原活性はFig. 3で明らかなように、○-○で示される幼犬から得られたものがやや高く、□-□で示される老犬および△-△で示されるマウスより得られた抗原はほぼ同様の活性を示した。標識抗体の活性は、5～15℃長期保存のためやや低下しつつあったが、抗原濃度1:20 (47.5 $\mu$ g/ml～22.5 $\mu$ g/ml)、標識抗体1:400の条件で、陽性血清のOD値が1.0前後と高く充分な活性を維持している。Fig. 3の成績から、現地で調製した虫卵粗抗原の日常検査法に使用する抗原濃度は1:160希釈（蛋白量5.9～2.8 $\mu$ g/ml）、標識抗体濃度は1:800希釈を採用した。また陰性血清のOD値は、いずれの抗原および標識抗体濃度においても、0.10以下と低く、安定性があり、この濃度以上での陽性と陰性の肉眼判定は容易であった。

3. *S. j.* 自然感染犬より得られた雌雄成虫抗原の活性と最適濃度の検討；Fig. 4は雌雄別々の成虫粗抗原を



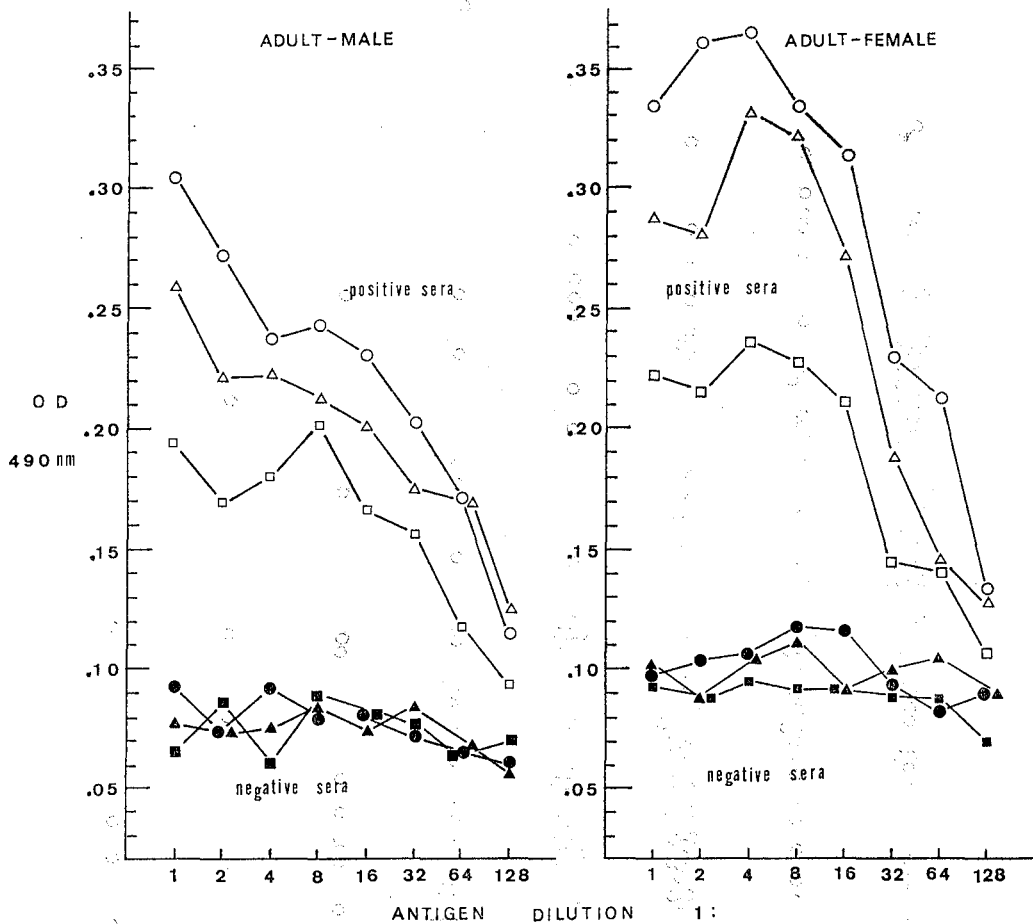


Fig. 4 Results of ELISA with Antigens prepared from *S. japonicum* Adult-Male and Female worm

Note: ○—○; Conjugated Serum diluted at 1:400

△—△; " 1:800

□—□; " 1:1600

1:1~1:128に希釈し、標識抗体を1:400~1:1600に希釈した場合の陽性と陰性コントロール血清に対するELISA反応パターンを示す。Lowry-Follin法による蛋白濃度は雌の成虫粗抗原が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、雄の成虫粗抗原が250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示した。抗原活性は、雌の成虫抗原の方が雄の成虫抗原と比較してやや高い。また、両成虫抗原と虫卵抗原の活性を蛋白濃度20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 前後で比較すると、雌成虫抗原は1:4希釈で最高0.36のOD値を示し、雄の成虫抗原は1:8~1:16希釈で、最高0.24のOD値を示したにすぎない。一方、虫卵抗原では、1:20希釈で最高1.00以上のOD値が得られたことから、虫

卵抗原の活性は成虫抗原の活性より高いことが明らかとなった。両成虫抗原の日常検査法に使用する濃度は、標識抗体濃度を1:800に規定した場合、雌雄抗原とも1:16希釈(15.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~6.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )が適当で、この濃度以上では陽性と陰性血清のOD値の差が明らかで判定も容易であった。

4. *S. j.* 症患者血清およびマニラで採取した対照血清のELISA反応成績；我々が現地で調製した*S. j.* 虫卵と成虫粗抗原の日常検査法として使用する最適抗原および標識抗体濃度が設定されたので、次に*S. j.* 症患者血清70例について、本法による抗体価測定を行ないその有

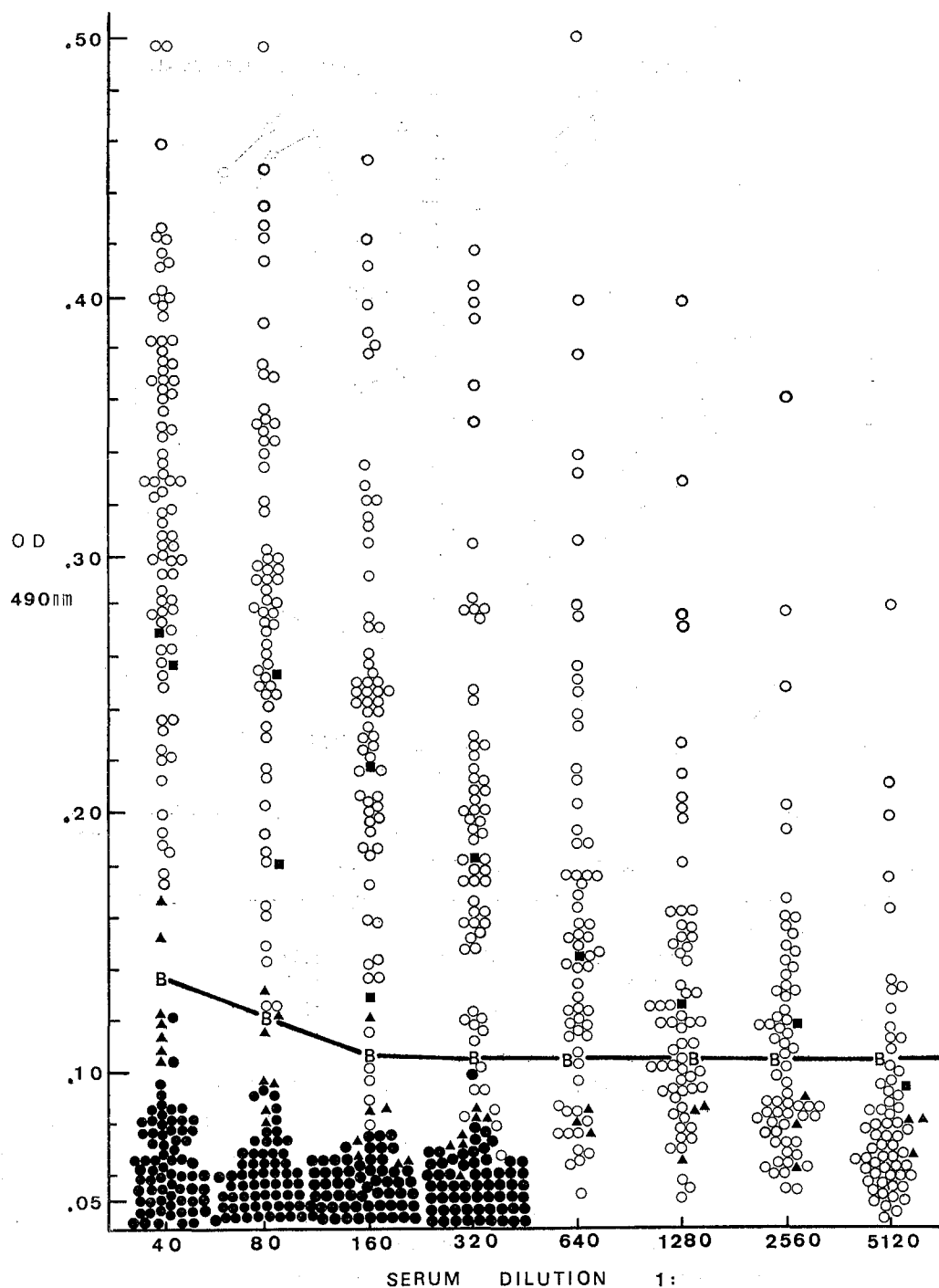


Fig. 5 Results of ELISA with Egg Antigen between Sera from Patient collected in Leyte and Control sera collected in Manila

Note : ○-Sera from Patient collected in Leyte

●-Control Sera collected in Manila

■-Sera from Patient with Hepatitis caused by Schistosomiasis

▲-Sera from Patient with Hepatitis caused by the other disease

用性を検討した。使用抗原は自然感染幼犬より得られた *S. j.* 虫卵粗抗原 1:160 希釈 (蛋白濃度  $5.9 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を用い、標識抗体 1:800 希釈、および基質液  $0.003\% \text{H}_2\text{O}_2$  加 OPD と条件を規定して、定量的に ELISA 抗体価を測定した。Fig. 5 に示されるように対照血清 70 例の平均 OD 値の 2 倍の値 (図中 B-B で示す) を任意に陽性と陰性の限界とした場合、1:40 ~ 1:320 の各段階希釈の OD 値は、ほぼ 0.12 以下であり、対照血清は 1:40 希釈列で 4/70 (5.7%), 1:80 希釈列で 4/70 (5.7%) および 1:160 希釈列で 3/70 (4.3%), 1:320 以上の希釈列では 1/70 (1.4%) がそれぞれ陽性反応を示したにすぎない。

一方、*S. j.* 患者血清では、1:40 希釈列で 79/79 (100%), 1:80 希釈列で 63/63 (100%) が陽性反応を示し、1:160 希釈列では 59/63 (93.6%), 1:320 希釈列で 56/63 (88.9%), 1:640 希釈列で 50/63 (77.8%) のものが陽性反応を示した。以上の成績から、被検血清 1:80 希釈、陽性と陰性の限界を OD 値 0.12 に定めた場合、*S. j.* 患者血清は 100%, 対照血清は 4.7% の陽性率を示し、1 穴法によるスクリーニングテストとして、本法がきわめて有用であることが示された。

#### 考 察

酵素抗体法が考案されてから過去 10 年間に、様々な研究分野で本法の応用が試みられ、特異性、鋭敏性および再現性等の検討を通じて、ELISA の有用性が広く認められつつある。特に、本法の鋭敏性については、Radio Immuno Assay (RIA) に匹敵するものであり、しかも、安全管理面で高度の設備を必要としない、また、標識抗体の長期保存が可能であるなど多くの利点があげられる。加えて、本法の microplate を用いた微量測定法は、 $5 \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の抗原、1 穴当たり  $0.3 \text{ml}$  の感作で、満足すべき ELISA 反応の測定を可能とし、多量の抗原を得ることが困難な寄生虫学分野においては特に有用性が高い。

今回、我々が調製した *S. j.* 虫卵粗抗原 (蛋白濃度  $5.9 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) と標識抗体 (1:800 希釈) および  $0.003\% \text{H}_2\text{O}_2$  加 OPD を基質液とする micro-ELISA は、本症患者血清の抗体検出率が 1:80 希釈列で 100% (63/63), 1:160 希釈列で 93.6% (59/63) と高く、Matsuda et al.<sup>12,13)</sup> (1980) の成績 97.3% (36/37) とほとんど一致している。このことから、1 穴法による患者スクリーニング法として実用化され得ることが明らかとなり、本法は熱帯地域の不十分な実験環境にあっても、安定性、鋭敏性、簡便性および経済性の全ての面で満足すべき成績が得られたと考察される。本法の特異性 (交叉反応性) に

ついて、Matsuda et al.<sup>12,13)</sup> (1980) は、山梨系 *S. j.* 虫卵抗原を用いた ELISA で、日本住血吸虫、宮崎肺吸虫、ウェステルマン肺吸虫、肝蛭、肝吸虫の各症患者血清との間に若干の交叉反応性が認められると報告している。しかしながら、*S. j.* 症と他の疾患による患者血清の OD 値には明らかな差があり、被検血清を 1:500 に希釈することによって明確に区別し得ること、また、フィリピンにおいては、ヒトのマンソンおよびヘマトビウム住血吸虫症ならびに肝蛭症はきわめてまれであることなどから、本法の有用性を強調している。今回、我々がマニラの San Lazalo 病院で採取した対照血清 70 例のうち、4 例に ELISA 陽性反応が出現したが、これらの対照血清は、消化器系および呼吸器系感染症またはウイルス性肝炎などの患者血清である。また、首都マニラ地域は本症の常在地ではないが、本症の高度浸淫地からの人口流入が多いため、Fig. 5 で陽性反応を呈した 4 例 (■または▲で示す) については、基礎疾患として、*S. j.* 症が疑われる可能性が高い。一方、陰性を示した▲印血清は、本症以外の原因による肝炎を主徴とする患者血清と思われるが、これら対照とした患者の虫卵検査や出身地の調査を実施することができなかったため、今後、同様のケースがあれば裏付け調査を行なってゆく必要がある。今回、1 穴法による micro-ELISA が、本症患者のスクリーニングテストとして有用であることが明らかとなったが、さらに広範な本症の疫学調査を実施する際には、静脈採血がきわめて困難な国情に留意して、毛細管による手指採血血漿や採血用紙による乾燥全血の利用についても基礎的な検討を行なう必要がある。また、本症診断のため、従来から行なわれて来た虫卵検査 (MIFC) と卵周囲沈降反応 (COPT) および螢光抗体法 (IFA) の成績と本法の成績の比較分析を今後引き続き行なってゆきたい。

#### 結 論

日本住血吸虫症の高度浸淫地であるフィリピンの Leyte 島 Palo の S. C. R. P. 研究室で日常検査法として利用し得る ELISA の反応術式について検討し、次の結論を得た。

1 現地の自然感染犬より得られた *S. j.* 虫卵および成虫粗抗原は、*S. j.* 実験感染マウスより得られた虫卵粗抗原および医科研製 *S. j.* 虫卵粗抗原 (山梨系) と同様に、蛋白濃度  $5 \sim 15 \mu\text{g}/\text{ml}$  で ELISA に使用できる。

2 熱帯地域の不十分な実験環境にあつて、5 A S, OPD, O T 3 基質のうち、OPD は  $0.003 \sim 0.012\%$  の  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度変化に影響されず、安定性、迅速性、調製法

の簡易性の面で最適基質であると考えられた。

3 Peroxidase 標識抗体は5~15℃, 6か月以上の保存により, 活性低下が認められたが, 1:800希釈が最適使用濃度と判断された。

4 *S. j.* 虫卵粗抗原の1:160希釈液(蛋白濃度5.9μg/ml)をプレートの1穴当たり0.3ml注入感作, 被検血清を1:80または1:160に希釈した, 1穴法による micro-ELISA の成績は, 陽性と陰性の限界を対照群血清の平均OD値の2倍とした場合, 患者血清1:80の希釈列で100% (63/63) 1:160の希釈列で93.6% (59/63) の *S. j.* 抗体検出率を示した。以上の成績から, 本法はスクリーニングテスト(定性試験)および, 抗体価測定法(定量試験)として S. C. R. P. の研究室で実用化されうる。

謝辞: 本研究は国際協力事業団の日本-フィリピン医療技術協力の一環としてなされたものである。本研究の機会を与えられたことに対し, 同事業団に謝意を表するとともに, フィリピンで多大なご協力を下さった同事業団マニラ事務所の越後貫博博士ならびに関係各位, さらに, S. C. R. P., Bureau of Research & Laboratory, Ministry of Health およびフィリピン大学の Institute of Public Health の関係各位に対し深謝します。

(なお, 本研究の概要は第42回日本寄生虫学会東日本大会, 昭和57年10月12日で発表した)

#### 文 献

- 1) Engvall, E. and Perlman, P.: *J. Immunol.*, **109**, 129, 1972
- 2) A. Voller, D. Bidwell, G. Hultdt and E. Engvall: *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **51**, 209, 1974
- 3) A. Bartlett, D. E. Bidwell, A. Voller: *Tropenmed. Parasit.* **26**, 370, 1975
- 4) J. R. Denmark and B. S. Chessum: *Medical Laboratory Science* **35**, 227, 1978
- 5) D. M. Root, F. C. Cole and J. A. Williamson: *Arch. Invest. Med(Mex)*, **9**(Supl 1), 203, 1978
- 6) A. Voller, A. Bartlett and D. E. Bidwell: *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **70**, 2, 98, 1976
- 7) G. Hultdt, B. Lagerquist, T. Phillips, C. C. Draper and A. Voller: *Ann. Trop. Med. Parasit.*, **69**, 4, 483, 1975
- 8) McLaren, M., Draper, C. C., Roberts, J. M., Minter Goedbloed, E., Lighart, G. S., Teesdale, G. H., Amin, M. A., Omer, A. H. S., Bartlett, A. and Voller, A.: *Ann. Trop. Med. Parasit.*, **72**, 243, 1978
- 9) A. M. Deelder, D. Kornelis, M. Marbin, H. N. Noordpool, R. M. Codfried, J. P. Rotmans and B. F. J. Oostburg: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **29**(3), 401, 1980
- 10) Tanaka, H., Matsuda, H. and Nosenās, J. P.: *Japan. J. Exp. Med.*, **49**, 289, 1979
- 11) 松田 肇, 中尾 稔, 田中 寛: 寄生虫学雑誌, **29** (増刊号), 30, 1980
- 12) H. Matsuda, H. Tanaka, B. L. Blas, J. S. Nosenās and A. T. Santos, Jr.: *Proceedings of the Philippine-Japan joint Conference on Schistosomiasis Research and Control*, **34**, 1980
- 13) H. Matsuda, M. Nakao, H. Tanaka, B. L. Blas, J. S. Nosenās and T. Nagata: *10th International Congress on Tropical Medicine and Malaria, Abstracts*, 313, 1980
- 14) M. G. Yogore, R. M. Lewert and B. L. Blas: *10th International Congress on Tropical Medicine and Malaria, Abstracts*, 312, 1980
- 15) 松田 肇, 中尾 稔, 田中 寛, 永田 傳, J. S. Nosenās, B. L. Blas, G. P. Portillo, A. T. Santos, Jr.: 寄生虫学雑誌, **30** (4), 363, 1981
- 16) 中尾 稔, 松田 肇, 田中 寛, 永田 傳: 寄生虫学雑誌, **30** (3), 197, 1981
- 17) 神谷晴夫, 鈴木俊夫, 松田 肇, 田中 寛: 寄生虫学雑誌, **30**(6), 587, 1981

東京都内の急性呼吸器疾患患児および下水からのウイルス検索 (1981年)

林 志 直\*, 矢 野 一 好\*, 柴 田 タツ美\*, 藪 内 清\*  
岩 崎 謙 二\*, 渡 辺 悌 吉\*\*, 石 原 祐\*\*, 大久保 さつき\*\*  
浦 野 純 子\*\*, 河 野 弘 子\*\*

**Virological Survey of Acute Respiratory Infection among Pediatric Patients  
and Eight Sewage Treatment Plants in Tokyo (1981)**

YUKINAO HAYASHI\*, KAZUYOSHI YANO\*, TATSUMI SHIBATA\*,  
KIYOSHI YABUUCHI\*, KENJI IWASAKI\*, TEIKICHI WATANABE\*\*,  
YU ISHIHARA\*\*, SATSUKI OHKUBO\*\*, JUNKO URANO\*\*  
and HIROKO KOHNO\*\*

Throat swab specimens taken from pediatric outpatients were investigated virologically in the 12-month period from January to December, 1981. In the same period, samples of raw sewage, primary effluent, sludge and second effluent from 8 sewage treatment plants were tested for isolation of viruses. From 337 specimens of patients, 76 strains of viruses were isolated. The viruses detected were mainly Adeno types 2, 3, Coxsackie B type 2, ECHO type 11, Polio type 1 (probably vaccine derived) and Influenza types A (H1N1), A (H3N2), B. 210 strains of viruses were isolated from 187 sewage samples, and most common viruses were Adeno type 5, Coxsackie B types 2, 3, 4, ECHO type 11, Polio types 1, 2, 3, and Reo type 1. Some of these viruses were detected from 4 or more out of 8 sewage treatment plants in the same months, such as Coxsackie B type 4 in January from 4 of 8, Coxsackie B type 2 in June from 7 of 8 and in July from 5 of 8, Coxsackie B type 3 in August from 5 of 8 and ECHO type 11 in October from 6 of 8. It was suggested that infections with these viruses were wide spread in Tokyo in 1981.

**Keywords :** virological survey, acute respiratory infection, sewage

緒 言

著者らは東京都内における腸管系ウイルスの流行実態を把握するため、1967年以来下水から、また1977年以来小児科受診患児からのウイルス検索を行ってきた<sup>1,2)</sup>。近年エンテロウイルス感染症への関心が高まり、1981年度より開始された厚生省感染症サーベイランス事業にも対象疾患として取り上げられ、調査が行われている。エンテロウイルスは不顕性感染に終わることが多い。しかし顕性感染を起こした場合の臨床像は多彩であり、そのウイルス学的検索成績は臨床診断、防疫対策に有用な資料を提供するものと考えられる。

本報では1981年の小児科受診患児および下水からのウイルス検索成績にもとづき、都内において流行したウイルスの疫学的考察を行ったので報告する。

材料と方法

ウイルス分離材料

1) 咽頭ぬぐい液 1981年1月～12月に、東京通信病院小児科を受診した急性期患児 337 名から咽頭ぬぐい液を採取した。検体の処理方法は既報<sup>3)</sup>に準じた。臨床症状別の患児数は、上気道炎 (URI) 150 名、下気道炎 (LRI) 25 名、発疹 52 名、発熱 33 名、胃腸炎 31 名、その他の症状 35 名、健康者 (乳幼児健診) 11 名であった。

2) 下水 都内の広域下水処理場 3 か所 (O, S, M) と、公営団地の下水処理場 5 か所 (Tc, Tk, Ky, Tt, Sb) から検体を採取した。広域処理場には特別区内の排水が流入しており、5 団地は都下多摩地区に存在している。検体は返送汚泥を中心に採取した。検体の処理方法は、既報<sup>4)</sup>で述べてきた Earle's BSS 処理の他に、3% ビーフ

\* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 東京通信病院小児科

エキストラクト (pH 9, NaCl 1%), 0.1M ホウ酸緩衝液 (pH 10, NaCl 1%) によるウイルス溶出処理も併用し、ウイルス検出の向上を計った。溶出処理法の詳細は別報<sup>5)</sup>で述べる。

**ウイルス分離試験** ウイルス分離には培養細胞を用い、一部の検体はサックリングマウス (SM) にも接種した。咽頭ぬぐい液からの分離には FL, HEp 2, MDCK, Vero 355, HEL, 下水からの分離には FL, HEp 2, Vero #462, BGM の各培養細胞を用いた。ウイルス分離試験の詳細は既報<sup>5)</sup>に準じた。

**分離ウイルスの同定** エンテロウイルスはポリオ (P) 1～3 型, コクサッキー B 群ウイルス (CB) 2～5 型の単味抗血清でスクリーニングを行い、未同定の場合は Schmidt pool 血清で中和試験<sup>6)</sup>を行った。アデノウイルス (AD) 特有のブドウの房状の CPE (細胞変性) を示した Agent は、抗 AD 血清 (1～18 型) を用いて中和試験を行った。ヘルペスウイルス, コクサッキー A 群ウイルス (CA) の同定は CF 試験<sup>6)</sup>, レオウイルス (Reo), インフルエンザウイルス (Inf.), パラインフルエンザウイルス, ムンプスウイルスの同定は HI 試験<sup>6)</sup>で行った。

**デンドログラム分析法** Sokal and Sneath<sup>7)</sup>の方法に従って解析を行った。character には年次別のウイルス分離率, OTU (operational taxonomic unit) に検出された各ウイルスの分離率の差(下水からの分離率) - (患児からの分離率) の平方根値をとり, OTU 間の平均距離係数<sup>8)</sup>を算出して WPGM (weighted pair-group method) によりデンドログラムを作成した。

## 結 果

### 1. 患児からのウイルス分離状況

東京通信病院小児科を受診した患児 337 名からのウイルス分離成績を表 1 に示した。URI 患児 150 名中 44 名から 45 株 (30.0%) のウイルスが検出された。URI 以外の小児 187 名からは 31 株 (16.6%) のウイルスが検出された。検出ウイルスを種類別にみると、最も多く検出されたのは AD 3 型で、総分離株数 76 株中 16 株 (21.1%) を占めた。AD 2 型, Inf. AH 1, AH 3, B 型, CB 2 型, P 1 型, エコーウイルス (E) 11 型も多く検出された。ヘルパンギーナ, 発疹などの症状を呈した患児 11 名の検体を SM に接種した結果, CA 4, 5 型が各 1 株ずつ検出された。

検出ウイルスの季節消長を表 2 に示した。CA, CB は夏季に, E は 7 月以後に, P は 5, 6 月に検出された。AD は 4, 5 月には検出例がなく, 夏季と冬季を中

表 1. 小児科受診患児からの症状別ウイルス分離株数 (1981 年)

| ウイルス種類      | URI | LRI | 発疹 | 発熱 | 胃腸炎 | その他 | 健康児 | 計   |
|-------------|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| Adeno       | 1   |     |    |    | 1   | 1   |     | 2   |
|             | 2   | 5   |    | 1  | 2   |     | 1   | 9   |
|             | 3   | 9   | 3  |    | 2   | 1   | 1   | 16  |
|             | 5   | 1   |    |    |     |     |     | 1   |
|             | 6   |     |    | 1  |     | 1   |     | 2   |
| Coxsackie A | 4   |     |    |    |     |     | 1   | 1   |
|             | 5   | 1   |    |    |     |     |     | 1   |
|             | B 2 | 4   |    | 1  | 1   | 1   |     | 7   |
|             | 3   | 1   |    |    |     |     |     | 1   |
| ECHO        | 3   |     |    | 1  |     |     |     | 1   |
|             | 11  | 4   |    |    |     | 1   |     | 5   |
| Polio       | 1   | 3   | 1  |    | 2   | 1   |     | 7   |
|             | 2   |     |    |    |     | 1   |     | 1   |
| Influenza   | AH1 | 6   |    | 1  |     |     |     | 7   |
|             | AH3 | 4   |    | 1  |     |     |     | 5   |
|             | B   | 5   |    |    | 1   |     |     | 6   |
| Herpes      |     | 2   |    | 2  |     |     |     | 4   |
| 計           | 45  | 5   | 6  | 7  | 6   | 6   | 1   | 76  |
| 検 体 数       | 150 | 25  | 52 | 33 | 31  | 35  | 11  | 337 |

心に検出された。Inf. は AH 1, AH 3 型が 1～3 月, B 型が 3～5 月と 12 月に検出された。

### 2. 下水からのウイルス分離状況

下水からのウイルス分離成績を表 3 に示した。検出ウイルスを種類別にみると、総分離株数 210 株のうち P と CB の検出例が多かった。P は 1～3 型で 85 株/210 株 (40.5%) となり、型別には 2 型, 1 型, 3 型の順に多かった。CB は 2～5 型で 72 株/210 株 (34.3%) となり、3 型, 2 型, 4 型, 5 型の順に多かった。その他に AD 5 型, E 11 型, Reo 1 型の検出例が多かった。検出ウイルスの季節消長をみると、P は 7～9 月以外は毎月検出された。検出ピークは 4, 5 月と 10 月に認められた。CB は夏季を中心に年間を通じて検出された。E は 7 月以後に検出例が増加し、10 月に最も多く検出された。AD は 1 月に検出例が多く、他の時期には散発的であった。Reo は 2, 3 月に集中して検出された。

P 以外の検出ウイルスの地域的流行経過を表 4 に示した。8 地区の下水処理区域のうち、4 地区以上から検出されたウイルスは 1 月に CB 4 型, 6 月と 7 月に CB 2



表 4. 下水処理場別のウイルス分離状況 (1981年)

| ウイルス種類   | 1月            | 2       | 3         | 4    | 5        | 6                       | 7                | 8                 | 9     | 10                  | 11       | 12    |
|----------|---------------|---------|-----------|------|----------|-------------------------|------------------|-------------------|-------|---------------------|----------|-------|
| Adeno 1  |               |         | S         | O    |          |                         |                  |                   |       | Tt                  |          |       |
| 2        | M             | M       |           |      |          |                         |                  |                   |       | O                   |          |       |
| 5        | M, Tk, Ky     | M       | Tk        |      |          | Tt                      |                  |                   |       | Tt                  | Tt       |       |
| 6        | Sb            |         |           |      |          |                         |                  |                   |       |                     |          |       |
| Cox. B 2 |               | Tt      |           |      | O, S, Tt | O, S, M, Sb, Tk, Ky, Tt | O, M, Tc, Tk, Ky | S, Ky, Tt         | Ky    |                     |          |       |
| 3        | O, Ky, Tt     | O, Ky   |           | O, S | Tk, Ky   | O, Ky                   | S, Ky, Tt        | S, Tk, Ky, Tt, Sb | Sb    |                     | O, M, Tc |       |
| 4        | K, Tc, Tt, Sb | Tc      | S, Tc, Tt |      |          | Tk                      | M, Tt, Sb        | M, Ky             |       | O, Sb               | O, Tc    |       |
| 5        | Tt            |         |           |      |          | Tc                      | Tc               | O                 | S, Tk | O                   |          |       |
| ECHO 3   |               |         | Ky        |      |          |                         |                  |                   |       | Tk                  |          |       |
| 11       |               | Ky      | Ky        |      | O        |                         | Tc, Tk, Sb       |                   |       | O, S, M, Tc, Tk, Sb | S, Sb    | M, Tt |
| Reo 1    |               | O, S, M | O, S      |      | Tk       |                         |                  |                   |       | S                   |          |       |

O, S, M, Tc, Tk, Ky, Tt, Sb : 処理場名

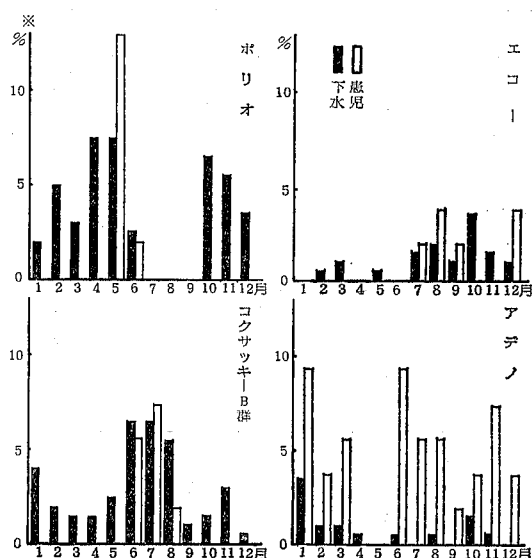


図 1. 患児・下水からのウイルス分離状況の対比

$$\% = \frac{\text{各ウイルスの分離株数}}{\text{各検体からの総ウイルス分離株数}} \times 100$$

型, 8月にCB3型, 10月にE11型であった。

3. 患児と下水からのウイルス分離状況の対比・解析  
表2と表3に示した患児と下水からのエンテロウイルス, アデノウイルスの分離成績を対比させて図1に示した。患児または下水からの総分離株数を母数とし, それ

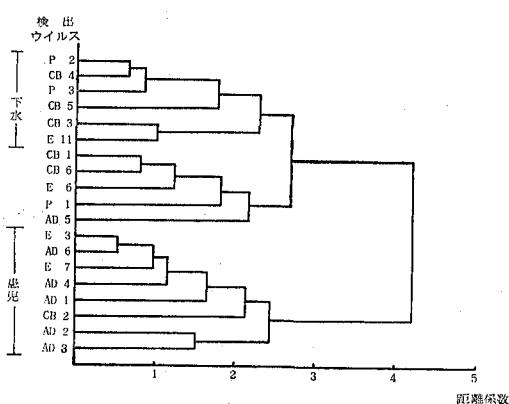


図 2. 患児・下水から検出されたウイルスの群別

P 2: ポリオウイルス2型  
CB4: コクサッキーB群ウイルス4型  
E 11: エコーウイルス11型  
AD5: アデノウイルス5型

ぞれの分離株数を月別に百分率で図示した。エンテロウイルスでは患児, 下水からの検出ピークはほぼ一致した。ADでは両者からの検出状況に大きな差が認められ患児からの検出率が高かった。

1981年の患児, 下水からのウイルス分離成績に加えて, 1977~1980年の成績を基に, デンドログラム解析法により検出ウイルスの群別を行い, 結果を図2に示した。検出ウイルスは3群に大別された。すなわち, 下水からの検出例が多いウイルス群はP2, 3型, CB3~



5 型, E 11 型, 患児からの検出例が多いウイルス群は AD 1~4 型, CB 2 型など, 下水と患児の両検体から検出されるウイルス群は P 1 型, AD 5 型などであった。

### 考 察

腸管系ウイルス感染の多くは不顕性に終わることが多い<sup>9)</sup>。しかし顕性感染の場合, その臨床像は様々である<sup>10,11)</sup>。近年, その中でもエンテロウイルス 70 型による急性出血性結膜炎<sup>12)</sup>や, CA 16 型, エンテロウイルス 71 型による手足口病<sup>13)</sup>, CB 4 型と糖尿病との関連<sup>14)</sup>, AD 3, 8 型による流行性角結膜炎<sup>15)</sup>など社会的に問題となっているものも少なくない。1981 年の小児科受診患児からのウイルス検索では AD 3 型が最も高率に検出された。AD 3 型は表 2 のように夏季と冬季に多く検出された。夏季の検出例は, プールを感染の場とする咽頭結膜熱<sup>16)</sup>の流行を示唆するものと思われる。また当研究科で行ってきた, 都内における学童間の集団カゼの病原検索<sup>17)</sup>によれば, Inf. の流行前後に AD 感染による集団規模の流行がしばしば認められた。1978 年 4 月から 1981 年 3 月にかけて検索を行った 107 集団事例のうち, 18 集団は AD 感染によるものであり, 1978 年には 6 事例から AD 3 型が検出された<sup>17)</sup>。本報における冬季の AD 3 型の検出例も, 集団流行あるいは散発的な流行によるものであろう。

AD 4 型は都内において 1978 年に集団規模の流行<sup>17)</sup>が発生し, 1979, 1980 年にも小児科受診患児から検出された<sup>1)</sup>。しかし, 1981 年には集団流行例が 1 例あったものの, 小児科受診患児からは検出されなかった。同ウイルスは一般住民間での流行はほとんどなく, 抗体保有率は世界的にも国内的にも低レベルであった<sup>18,19)</sup>。その状況下で 1970 年代後半に AD 4 型による咽頭結膜熱の集団発生<sup>20)</sup>が報告され, その後の流行が目立っていた。近年報告された流行の規模から見ても抗体保有率の急激な上昇は望まれないので, 今後とも AD 4 型の流行に注意を払う必要があると思われる。

エンテロウイルスは腸管, 咽頭で増殖し, 体外に排出された後も不活化され難い。このため下水からのウイルス検索により, 地域的な流行を把握できるものと思われる。1967 年以降の下水検索により, 1970 年の CB 3 型, 1971 年の E 11 型, 1972 年の Reo 1 型, 1973, 1974 年の CB 5 型, 1977 年の CB 3 型など, 主流行ウイルスの変遷が認められた<sup>21)</sup>。これらの年次推移をみると, 周期的に検出が認められるもの, 恒常的に検出され始めたものもある。前者としては CB 2 型, E 11 型, 後者としては

CB 4, 5 型が上げられる。しかし, ウイルスの流行周期を論ずるには, 一般住民の抗体保有状況, 環境中でのウイルスの生態などの要因も含めた解析をする必要がある。検出ウイルスを地域別にみると, 表 4 のように CB 2~4 型, E 11 型は同時に多数の地域から検出された。1981 年にはこれらのウイルスが広域的に流行したのと思われる。

AD はエンテロウイルスと同じ部位で増殖するにもかかわらず, 図 1 のように下水からは検出されにくい。その理由として, 検体中にエンテロウイルスが混在する場合, 同ウイルスの培養細胞系での増殖が速いため, AD の存在が隠されてしまうこと, また感染者から下水中に排出されるウイルス量の差なども考えられる。

患児, 下水から検出されたウイルスをデンドログラム分析法により解析すると, 図 2 のように AD 5 型と P 1 型は他の AD および P が含まれるウイルス群とは異なった群に分類された。AD 5 型は患児からの検出例が 1980, 1981 年に減少したのに対して下水からの検出例は増加<sup>1)</sup>, 他の AD とは異なった検出傾向であったが, この分析法でも同様の結果を示した。P 1 型は近年患児の咽頭からの検出が増加している。最近ワクチン株のロットが変更されており, 性状の変化から咽頭でも増殖しやすくなったのかもしれない。また, このような従来の方法とは全く異なった面からの解析結果も, 腸管系ウイルスの流行実態を解明する上で, 有用な資料を提供するものと思われる。

### 結 論

1981 年 1 月~12 月に採取した小児科受診患児の咽頭ぬぐい液 337 件, 8 か所の下水処理場から採取した検体 187 件についてウイルス検索を行い, 以下の結論を得た。

1. 小児科受診患児からは主として AD 2, 3 型, CB 2 型, E 11 型, Inf. AH 1, AH 3, B 型が検出された。AD 3 型は, 総分離株数 76 株中 16 株 (21.1%) を占めた。
2. 下水からは AD 1, 2, 5, 6 型, CB 2~5 型, E 3, 11 型, P 1~3 型, Reo 1 型が検出された。都内で広域的に流行したウイルスは CB 2~4 型, E 11 型であったと推定された。
3. 1977~1981 年の患児および下水からのウイルス検索成績を解析した結果, ①下水から検出されやすいウイルス (P 2, 3 型, CB 3~5 型, E 11 型), ②患児から検出されやすいウイルス (AD 1~4 型, CB 2 型など), ③下水・患児の両者から検出されるウイルス (P 1 型, AD 5 型など) の 3 群に整理することができた。

(本研究の概要は日本感染症学会第56回総会1982年4月で発表した。)

# 文 献

- 1) 矢野一好, 林 志直, 柴田タツ美, 吉田靖子, 関根 整治, 藪内 清, 岩崎謙二, 浦野純子, 河野弘子, 渡辺悌吉: 東京衛研年報, 32-1, 32, 1981
- 2) 矢野一好, 柴田タツ美, 林 志直, 藪内 清, 岩崎 謙二: 東京衛研年報, 32-1, 27, 1981
- 3) 矢野一好, 藪内 清, 柴田タツ美, 岩崎謙二, 浦野 純子, 河野弘子, 渡辺悌吉: 東京衛研年報, 29-1, 49, 1978
- 4) 岩崎謙二, 山田澄夫, 柳沢靖子, 矢野一好, 藪内 清, 根津尚光: 東京衛研年報, 23, 49, 1972
- 5) 矢野一好, 林 志直, 柴田タツ美, 藪内 清, 岩崎 謙二: 東京衛研年報, 33, 47, 1982
- 6) 井上 栄: 微生物検査必携 ウイルス・リケッチア 検査, 第2版, 65, 1978, 日本公衆衛生協会, 東京
- 7) Sokal, R.R. and P.H.A. Sneath: *Principles of numerical taxonomy*, 290, 1963, W.H. Freeman and Co., San Francisco
- 8) 中田英吉: デンドログラム分析法, 1978, 東京都立 衛生研究所
- 9) Hall, C.E., Cooney, M.K. and Fox, J.P.: *Am. J. Pub. Hlth.* 60, 1456, 1970
- 10) Girst, N.R., Bell, E.J. and Assad, F.: *Prog. Med. Virol.*, 24, 114, 1978
- 11) Fox, J.P., Brand, C.D., Wassermann, F.E., Hall, C.E., Spigland, I., Kogon, A. and Elveback, L.R.: *Am. J. Epidem.*, 89, 25, 1969
- 12) 石井慶蔵, 中國直樹, 沢田春美: 小児医学, 10, 345, 1977
- 13) Kennett, M.L., Birch, C.J., Lewis, F.A., Yung, A.P., Locarnini, S.A. and Gust, I.D.: *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 51, 609, 1974
- 14) Yoon, J.W., Austin, M., Onodera, T. and Notkins, A.L.: *N. Eng. J. Med.*, 300, 1173, 1979
- 15) 内田幸男: 臨床ウイルス学, 453, 1978, 講談社, 東京
- 16) Kaji, M., Kimura, M., Kamiya, S., Tatewaki, E., Takahashi, T., Nakajima, O., Koga, T., Ishida, S. and Majima, Y.: *Kyushu J. Med. Sci.*, 12, 8, 1961
- 17) 坂井富士子, 伊藤忠彦, 山崎 清, 岩崎謙二: 東京 衛研年報, 32-1, 48, 1981
- 18) Foy, H.M. and Grayston, J. T.: *Viral infections in humans*, Ed. Evans, A.S., 53, 1976, Plenum, New York
- 19) 遠藤貞郎, 野村泰弘, 小島基義, 母里啓子, 横浜市 医師会: 臨床とウイルス, 10, 71, 1982
- 20) D'Angelo, L.J., Hierholzer, J.C., Keenlyside, R.A., Anderson, L.J. and Martone, W.J.: *J. Inf. Dis.*, 140, 42, 1979
- 21) 岩崎謙二, 藪内 清, 矢野一好, 柴田タツ美: 臨床 とウイルス, 6, 265, 1978

## 下水汚泥からのウイルス溶出処理による腸管系ウイルスの検出

### ——ホウ酸緩衝液およびビーフエキスの効果——

矢野 一好\*, 林 志直\*, 柴田 タツ美\*, 藪内 清\*, 岩崎 謙二\*

## Isolation of Enteric Viruses from Wastewater Sludge on Eluting Methods (Borate Buffer and Beef Extract)

KAZUYOSHI YANO\*, YUKINAO HAYASHI\*, TATSUMI SHIBATA\*,  
KIYOSHI YABUUCHI\* and KENJI IWASAKI\*

**Keywords:** 下水汚泥 wastewater sludge, 腸管系ウイルス enteric virus, 溶出処理 eluting method

### 緒 言

都内における腸管系ウイルスの流行実態をつかむ目的で、我々は、1967年以来毎月定期的に下水からのウイルス検索を継続している<sup>1)</sup>。その調査過程で、下水に流入したウイルスの多くは混在する汚泥粒子に吸着した状態で存在することを知った<sup>2)</sup>。

従って、下水からのウイルス検出率を高めるには、まず汚泥粒子に吸着したウイルスの効率よい回収が不可欠である。今回は、まず基礎実験として下水汚泥に実験的にポリオウイルスを添加し、その吸着効果と吸着したウイルスの溶出条件を検討した。次に、その結果得られた最も効果的な条件をフィールドレベルでの下水からのウイルス分離試験に応用した。以下その成績について報告する。

### 材料と方法

**ウイルス** ポリオウイルスⅠ型弱毒株 (Lsc, 2ab 株) を BGM 細胞を用いて培養した。CPE の出現を確認した後、凍結融解を繰り返し、3,000 rpm, 15 分間遠心した上清をウイルス原液とした。

**下水汚泥** 基礎実験には、1980年6月から8月にかけて都内4か所の団地専用下水処理場で採取した第二沈殿汚泥を用いた。フィールドワークには、1980年11月から1982年1月までに都内9か所の下水処理場で採取した汚泥131件を用いた。検体の採取は、100 ml~5 l の滅菌ポリビンを用いて返送ポンプから直接採取した。

**凝集剤** アニオン系およびカチオン系の高分子凝集剤として9種類のアイケイフロック(市川毛織株式会社製)を使用した。実験には、あらかじめ0.2%の水溶液を作成しておき、検体の1/100量を添加した。

**抗生物質** 下水汚泥の検体処理用として ampicillin, streptomycin, kanamycin をそれぞれ 1,000  $\mu\text{g/ml}$  と amikacin 100  $\mu\text{g/ml}$  を添加した。

**溶出液** M/10 グリシン, M/10 炭酸, M/20 ホウ酸, M/10 リン酸の各緩衝液および、ビーフエキストラクト、牛血清, Tween 20, ブイオン等を用いた。各緩衝液は、さらに異なった pH および塩濃度を組合せて調製した<sup>3-5)</sup>。

**ウイルス量の測定** BGM 細胞を用いたブラック形成法によって測定し PFU/ml で表示した<sup>6)</sup>。組織培養用6穴トレイ(コースター社製3506)に BGM 細胞を単層培養し、検体 1 ml/穴を接種後、37℃の炭酸ガス培養装置内で90分間吸着させた。重層用培地は、2倍濃度の MEM 培地(日水製薬 MEM②)と3% Agar EPI(半井化学)を等量混和したものを用いた。培養3日目に中性紅で染色し、その後4日間ブラック数を計測して判定した。

**ウイルス分離と同定** ウイルス分離に使用した培養細胞は、FL, HEp 2, Vero #462, BGM の4種類である。FL, HEp 2, BGM は6%, Vero #462 は2%の牛胎児血清を添加したイーグル MEM 培地を用いてプラスチックプレート(コースター社製24穴)に培養した。各細胞の培養液を1%牛胎児血清添加 MEM 培地に交換後、検体を0.25 ml ずつ接種し、37℃炭酸ガス培養装置内で1週間培養し毎日観察した。CPE(細胞変性効果)が認められない場合は、さらに3代まで継代した後、ヒト血球を用いた赤血球凝集試験(HA)を行った<sup>9)</sup>。

CPEまたはHAが認められたものは、継代後Schmidt

\* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科 160 東京都新宿区百人町3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

ブル血清または、単味の抗血清を用いたマイクロ中和法、HI試験等により分離ウイルスの同定を行った<sup>9)</sup>。

### 結果と考察

#### I 高分子凝集剤によるウイルスの汚泥吸着効果

下水汚泥は大小様々な粒子から構成されている。低速遠心によってウイルスが吸着した汚泥を微粒子まで効率よく回収するために高分子凝集剤を使用して条件検討を行った。

汚泥10mlにポリオウイルス $1.18 \times 10^2$  PFU/mlを添加し、各種凝集剤を滴下後、3,000 rpm, 15分間遠心分離した。上清中のウイルス量を指標にして汚泥へのウイルスの吸着率を算出し、結果を表1に示した。汚泥に強い凝集を起こした凝集剤は、カチオン系 T895 と T896 であった。上清中のウイルス量は、凝集剤無添加の 17 PFU/ml に比べてカチオン系凝集剤を添加すると 0~7 PFU/ml に減少し、カチオン系凝集剤の有効性が認められた。

処理場および採取日を変えて採取した汚泥における凝集剤の効果を確認する実験も行い、結果を表2に示した。凝集剤無添加のグループでの吸着率は平均82.8%、標準偏差11.1%でかなりのバラツキが認められたが、凝集剤の使用により平均回収率93.0%、標準偏差 6.9%と安定した値を示した。

従って、以下の実験には凝集剤 T896 を滴下後 3,000 rpm, 15分間遠心分離を行って汚泥を回収した。

#### II 汚泥吸着ウイルスの溶出

1. 溶出液の選択 表3に示した21種類の溶出液を調製し汚泥吸着ウイルスの溶出を試みた。

表 1. 凝集剤添加による汚泥へのウイルス吸着効果

| 凝集剤 | 凝集力   | 上清 PFU/ml | 吸着率 (%) |
|-----|-------|-----------|---------|
| ア   | T 212 | —         | 18      |
| ニ   | T 535 | —         | 19      |
| オン  | T 550 | —         | 17      |
|     | T 884 | +         | 3       |
| カ   | T 888 | +++       | 7       |
| チ   | T 895 | ++++      | 0       |
| オ   | T 896 | ++++      | 0       |
|     | T 910 | +         | 0       |
| ン   | T 930 | —         | 0       |
| 無添加 |       |           | 17      |

凝集力：(—)弱→強(++++)

ウイルス添加量： $1.18 \times 10^2$  PFU/ml

遠心分離：3,000 rpm 15分

表 2. 下水処理場別汚泥のウイルス吸着率

| 処理場 Lot | ウイルス添加量 PFU/ml | 吸着率 (%)           | 吸着率 (%) |
|---------|----------------|-------------------|---------|
| A       | 1              | $1.2 \times 10^2$ | 100.0   |
|         | 1              | $8.0 \times 10^2$ | 90.5    |
|         | 2              | $3.6 \times 10^3$ | 97.7    |
|         | 2              | $1.1 \times 10^3$ | 90.4    |
|         | 3              | $7.2 \times 10^2$ | 98.3    |
| B       | 1              | $6.4 \times 10^4$ | 94.1    |
|         | 2              | $8.5 \times 10^3$ | 92.3    |
| C       | 1              | $6.4 \times 10^4$ | 99.3    |
|         | 2              | $8.5 \times 10^3$ | 74.9    |
| D       | 1              | $6.4 \times 10^4$ | 97.7    |
|         | 2              | $4.3 \times 10^3$ | 86.4    |
|         | 2              | $1.3 \times 10^4$ | 96.9    |
|         | 3              | $8.5 \times 10^3$ | 90.0    |
| 平均      |                |                   | 93.0    |
|         |                |                   | 82.8    |

(+)：凝集剤添加 (—)：凝集剤無添加

同一容器内で均一化したポリオウイルス添加汚泥を10 ml ずつ 21 本のスピッツに分注し凝集剤添加後、遠心分離によってウイルス吸着汚泥を回収した。汚泥への吸着ウイルス量は、1,067 PFU/ml、沈渣量は約 1 ml であった。それぞれのスピッツに各溶出液を 9 ml ずつ加え、室温で20分間振とう溶出を行い、遠心上清のウイルス量を測定し、汚泥吸着ウイルスの溶出率を算出した(表3)。

ウイルスの溶出率は、0~68.6%の範囲にあった。比較的効率よくウイルスが溶出されたホウ酸緩衝液とビーフェキストラクトについて詳細な溶出条件を検討した。

#### 2. 溶出条件の検討

1) ホウ酸緩衝液 ホウ酸緩衝液でのウイルス溶出に関与すると思われる要因のうちから、モル濃度、pH、塩化ナトリウム添加量の3要因を選んで、各々の要因について3水準を設定して、27通りの組合せ実験を行った。各組合せでの実験結果は、表4に示した通りで、溶出率は9.7%~87.0%の範囲にあった。最高溶出は、実験 NO. 18 の組合せでみられた。

各要因のウイルスの溶出におよぼす影響を分散分析法により解析し、表5に示した。各要因の分散比からみると、pH 要因が最も大きく、次いで塩化ナトリウム添加量の影響が大きかった。さらに、各要因の変動値、つまり影響力の大きさを算出すると、pH 要因が -22.10~17.88、塩化ナトリウム濃度が -7.84~10.18、モル濃度

表 3. 各種溶出液による汚泥吸着ウイルスの溶出

| 溶出液             | pH | 溶出ウイルス量<br>PFU/ml | 溶出率<br>(%) |
|-----------------|----|-------------------|------------|
| 蒸留水             | 8  | 41                | 3.8        |
|                 | 10 | 72                | 6.7        |
|                 | 12 | 732               | 68.6       |
| M/10グリシン<br>緩衝液 | 8  | 124               | 11.6       |
|                 | 10 | 403               | 37.8       |
|                 | 12 | 0                 | 0          |
| M/10炭酸<br>緩衝液   | 8  | 464               | 43.5       |
|                 | 10 | 522               | 48.9       |
|                 | 12 | 0                 | 0          |
| M/20ホウ酸<br>緩衝液  | 8  | 292               | 27.4       |
|                 | 11 | 716               | 67.1       |
| M/10リン酸<br>緩衝液  | 8  | 274               | 25.7       |
|                 | 11 | 567               | 53.1       |
| 1% NaCl         | 7  | 92                | 8.6        |
| 5% NaCl         | 7  | 333               | 31.2       |
| 10% NaCl        | 7  | 329               | 30.8       |
| 3% ビーフエキス       | 9  | 593               | 55.6       |
| 10% 牛血清         |    | 88                | 8.2        |
| 0.02% Tween 20  |    | 27                | 2.5        |
| 1% BSA          |    | 103               | 9.7        |
| 普通ブイヨン          |    | 266               | 24.9       |

吸着ウイルス量: 1067 PFU/ml

各緩衝液には NaCl を 1% に添加した

—4.42~3.63となった。この変動値を基に、各組合せでの溶出率を算出(表4)し、実験値と対応させると、相関係数は0.898と高くなり各要因の変動は信頼できるものと思われた。

以上の結果に、等張性、pHの上昇によるウイルスの不活化、細胞毒性等の諸条件を考慮して、ホウ酸緩衝液を用いた実用的なウイルスの溶出条件としては、モル濃度0.1M、pH10.0、NaCl 1%添加が有効であろうと判定した。

2) ビーフエキストラクト ホウ酸緩衝液の場合と同様に、3要因3水準の組合せ実験を行い結果を表6, 7に示した。吸着ウイルスの溶出率は、10.7~76.2%の範囲にあり、ビーフエキストラクトの濃度上昇と共に溶出率が上昇した。分散分析の結果(表7)も、濃度要因の分散比が最大(35.637)となり変動値も-11.98~13.54と大きくなった。これらの結果に実用性を加味し

表 4. ウイルス溶出条件の検討 (ホウ酸緩衝液)

| 実験<br>No. | 濃度<br>M | pH | NaCl | 溶出率 %<br>実験値 計算値 |
|-----------|---------|----|------|------------------|
| 1         | 0.05    | 7  | 0%   | 9.7 18.1         |
| 2         |         | 7  | 1    | 24.4 23.6        |
| 3         |         | 7  | 5    | 45.7 36.1        |
| 4         |         | 9  | 0    | 41.0 44.4        |
| 5         |         | 9  | 1    | 48.7 50.0        |
| 6         |         | 9  | 5    | 71.7 62.5        |
| 7         |         | 11 | 0    | 73.4 58.1        |
| 8         |         | 11 | 1    | 63.2 63.6        |
| 9         |         | 11 | 5    | 54.7 76.1        |
| 10        | 0.1     | 7  | 0    | 14.3 23.3        |
| 11        |         | 7  | 1    | 25.2 28.8        |
| 12        |         | 7  | 5    | 34.2 41.3        |
| 13        |         | 9  | 0    | 44.0 49.6        |
| 14        |         | 9  | 1    | 55.8 55.2        |
| 15        |         | 9  | 5    | 70.9 67.7        |
| 16        |         | 11 | 0    | 64.4 63.3        |
| 17        |         | 11 | 1    | 83.6 68.8        |
| 18        |         | 11 | 5    | 87.0 81.3        |
| 19        | 0.2     | 7  | 0    | 23.4 26.2        |
| 20        |         | 7  | 1    | 33.7 31.7        |
| 21        |         | 7  | 5    | 62.8 44.2        |
| 22        |         | 9  | 0    | 55.5 52.5        |
| 23        |         | 9  | 1    | 53.5 58.0        |
| 24        |         | 9  | 5    | 69.2 70.5        |
| 25        |         | 11 | 0    | 76.0 66.1        |
| 26        |         | 11 | 1    | 63.2 71.7        |
| 27        |         | 11 | 5    | 67.7 84.2        |

吸着ウイルス量:  $5.86 \times 10^8$  PFU/ml

実験値と計算値の相関:  $r=0.8980$

て、ビーフエキストラクトを溶出液とした場合の溶出条件は、濃度3%、pH9.0、NaCl 1%の条件を用いた。汚泥吸着ウイルスの溶出に、ホウ酸緩衝液を使用した場合、溶出に關与する最大要因がpHであったのに対し、ビーフエキストラクトの場合は濃度要因であったことから、両者の溶出液は、汚泥からのウイルス溶出機作に何らかの差違があることが示唆された。

### III. 下水汚泥からのウイルス分離

実験的に汚泥に吸着させたポリオウイルスの溶出に用いたホウ酸緩衝液およびビーフエキストラクトの溶出条件を、フィールドワークに応用した。

1. 検体処理の方法 採取した汚泥は、図1に示した

表 5. ウイルス溶出条件の要因解析 (ホウ酸緩衝液)

| 要 因        | A (濃度)    | B (pH) | C (NaCl 量) |     |    |
|------------|-----------|--------|------------|-----|----|
| 水<br><br>準 | A1) 0.05M | B1)    | 7          | C1) | 0% |
|            | A2) 0.1   | B2)    | 9          | C2) | 1  |
|            | A3) 0.2   | B3)    | 11         | C3) | 5  |

| 分散分析表     |     |         |        |          |
|-----------|-----|---------|--------|----------|
| 要 因       | 自由度 | 変 動     | 不偏分散   | 分散比      |
| A (濃度)    | 2   | 300.4   | 150.2  | 1.978    |
| B (pH)    | 2   | 7432.7  | 3716.3 | 48.939** |
| C (NaCl量) | 2   | 1535.1  | 767.6  | 10.107** |
| A × B     | 4   | 493.7   | 123.4  | 1.625    |
| A × C     | 4   | 189.4   | 47.3   | 0.623    |
| B × C     | 4   | 933.5   | 233.4  | 3.073    |
| 誤 差       | 8   | 607.5   | 75.9   |          |
| 計         | 26  | 11492.3 |        |          |

\*\* : 1%以下の危険率で有意差あり

各要因の変動

| 要 因  | A (濃度) | B (pH)  | C (NaCl 量) |
|------|--------|---------|------------|
| 水 1) | — 4.42 | — 22.10 | — 7.84     |
| 2)   | 0.79   | 4.22    | — 2.33     |
| 準 3) | 3.63   | 17.88   | 10.18      |

表 6. ウイルス溶出条件の検討 (ビーフェキス)

| 実 験<br>No. | 濃 度 | pH | NaCl | 溶 出<br>実験値 | %<br>計算値 |
|------------|-----|----|------|------------|----------|
| 1          | 1%  | 7  | 0%   | 10.7       | 30.3     |
| 2          |     | 7  | 1    | 36.4       | 39.5     |
| 3          |     | 7  | 5    | 65.4       | 48.9     |
| 4          |     | 9  | 0    | 38.4       | 39.2     |
| 5          |     | 9  | 1    | 45.5       | 48.4     |
| 6          |     | 9  | 5    | 57.5       | 57.7     |
| 7          |     | 11 | 0    | 44.0       | 37.2     |
| 8          |     | 11 | 1    | 50.2       | 46.4     |
| 9          |     | 11 | 5    | 55.3       | 55.8     |
| 10         | 3%  | 7  | 0    | 30.7       | 40.8     |
| 11         |     | 7  | 1    | 51.3       | 49.9     |
| 12         |     | 7  | 5    | 68.8       | 59.3     |
| 13         |     | 9  | 0    | 49.7       | 49.6     |
| 14         |     | 9  | 1    | 67.1       | 58.8     |
| 15         |     | 9  | 5    | 72.2       | 68.2     |
| 16         |     | 11 | 0    | 53.6       | 47.6     |
| 17         |     | 11 | 1    | 50.8       | 56.8     |
| 18         |     | 11 | 5    | 53.0       | 66.2     |
| 19         | 5%  | 7  | 0    | 63.8       | 55.9     |
| 20         |     | 7  | 1    | 64.9       | 65.0     |
| 21         |     | 7  | 5    | 72.2       | 74.4     |
| 22         |     | 9  | 0    | 66.6       | 64.7     |
| 23         |     | 9  | 1    | 72.2       | 73.9     |
| 24         |     | 9  | 5    | 74.5       | 83.3     |
| 25         |     | 11 | 0    | 70.5       | 62.7     |
| 26         |     | 11 | 1    | 72.2       | 71.9     |
| 27         |     | 11 | 5    | 76.2       | 81.3     |

吸着ウイルス量 :  $8.86 \times 10^8$  PFU/ml実験値と計算値の相関 :  $r=0.8751$ 

(A)~(D)の4種類の処理を行った。処理(A)は従来の方法<sup>1)</sup>と同様であり、処理(B)は(C)と(D)の対照の意味で遠心処理のみを実施したものである。処理(C)は汚泥 9 ml に高分子凝集剤 T896 を添加しフロックを形成させ遠心分離した沈渣から、0.1Mホウ酸緩衝液 (pH10.0, NaCl 1%添加) 9 ml を用いて室温で 20 分間振とう溶出を行った。その後、遠心分離した上清に抗生物質を添加してウイルス分離材料とした。処理(D)は(C)と同様の凝集沈殿を行い、溶出液として 3% ビーフエキストラクト (pH9.0, NaCl 1%添加) を用いて溶出した。

2. ウイルス分離状況 1980年11月から1982年1月までに採取した汚泥 131 件から、ポリオ 1~3 型, コクサ

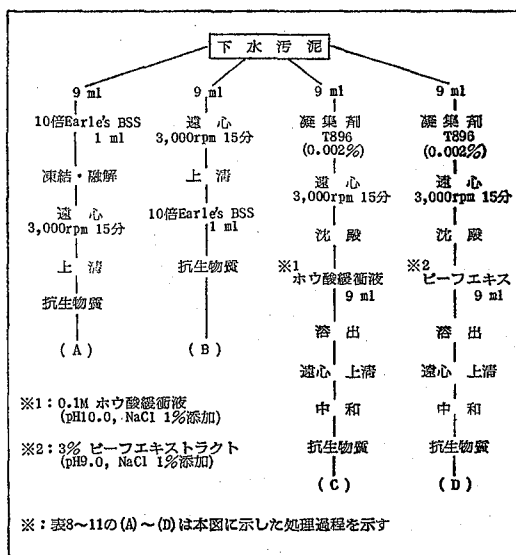


図 1. 下水汚泥の検体処理工程

表 7. ウイルス溶出条件の要因解析 (ビーフエキス)

| 要 因 | A (濃度) |    | B (pH) |    | C (NaCl 量) |    |
|-----|--------|----|--------|----|------------|----|
| 水 準 | A1)    | 1% | B1)    | 7  | C1)        | 0% |
|     | A2)    | 3  | B2)    | 9  | C2)        | 1  |
|     | A3)    | 5  | B3)    | 11 | C3)        | 5  |

分散分析表

| 要 因        | 自由度 | 変 動    | 不偏分散   | 分散比      |
|------------|-----|--------|--------|----------|
| A (濃度)     | 2   | 2964.0 | 1482.0 | 35.637*  |
| B (pH)     | 2   | 386.5  | 193.2  | 4.646**  |
| C (NaCl 量) | 2   | 1551.3 | 775.7  | 18.651** |
| A × B      | 4   | 200.2  | 50.1   | 1.203    |
| A × C      | 4   | 346.7  | 86.7   | 2.084    |
| B × C      | 4   | 619.6  | 154.9  | 3.724    |
| 誤 差        | 8   | 332.7  | 41.6   |          |
| 計          | 26  | 6400.9 |        |          |

各要因の変動

| 要 因 | A (濃度)    | B (pH) | C (NaCl 量) |
|-----|-----------|--------|------------|
| 水   | 1) -11.98 | - 5.23 | - 9.25     |
|     | 2) - 1.56 | 3.61   | - 0.07     |
| 準   | 3) 13.54  | 1.62   | 9.32       |

\*\* : 1%以下の危険率で有意差あり

\* : 5%以下の危険率で有意差あり

ッキーB群2～5型, エコー3, 11型, アデノ1, 2, 5型, レオ1, 2型の各ウイルスを合計348株分離した(表8).

検体処理群別にまとめると, 処理(B)で52株であるのに対して, 溶出処理(C)で103株, (D)で109株と高率に分離された. 従来の方法である処理(A)では, ほぼ中間の84株が分離された.

これらのことから, 溶出処理が汚泥からのウイルス分離に有効であることが確認された. なお, 検出した各ウイルスの疫学的考察は, 別に報告した<sup>7)</sup>.

### 3. ウイルス種類別にみた溶出処理の効果

溶出処理の効果を, 各溶出処理群でのウイルス分離率を指標にして判定した.

1) ポリオウイルス 分離されたポリオウイルスは表9に示した通り合計132株であった. そのうち, 処理(B)で11株, 3.3%であったのに対し, 処理(C)で50株, 37.9%, 処理(D)で52株, 39.4%であった. これらの処理方法別のウイルス分離率を統計学的にみると, 処理

表 8. 汚泥の検体処理群別ウイルス分離株数

| ウイルス 型       |    | 検 体 処 理 方 法 |    |     |     | 合計株数 |
|--------------|----|-------------|----|-----|-----|------|
|              |    | A           | B  | C   | D   |      |
| ポ リ オ        | 1  | 6株          | 3  | 18  | 22  | 49   |
|              | 2  | 9           | 6  | 20  | 18  | 53   |
|              | 3  | 4           | 2  | 12  | 12  | 30   |
| コ ク サ ッ キーB群 | 2  | 4           | 8  | 9   | 9   | 30   |
|              | 3  | 17          | 12 | 14  | 13  | 56   |
|              | 4  | 16          | 8  | 12  | 11  | 47   |
| エ コ ー        | 5  | 1           | 2  | 1   | 4   | 8    |
|              | 3  | 0           | 0  | 1   | 1   | 2    |
|              | 11 | 9           | 6  | 5   | 5   | 25   |
| ア デ ノ        | 1  | 2           | 1  | 0   | 0   | 3    |
|              | 2  | 2           | 2  | 1   | 3   | 8    |
|              | 5  | 8           | 1  | 3   | 1   | 13   |
| レ オ          | 1  | 6           | 1  | 6   | 9   | 22   |
|              | 2  | 0           | 0  | 1   | 1   | 2    |
| 計            |    | 84          | 52 | 103 | 109 | 348  |

(B)と(C)および(B)と(D)の間に1%以下の危険率で有意差が認められた. また処理(C)と(D)すなわち, ホウ酸緩衝液とビーフエキストラクトの間には有意差が認められなかった. これらの傾向は下水処理場別にみても同様であった.

2) コクサッキーB群ウイルス 表10に示した通り, 141株のウイルスが分離されたが, 処理方法別にみると, 処理(B)で30株, 21.3%であるのに対してポリオの場合と異なって他の処理群でも25.5～27.0%となり, ほとんどウイルス分離率の差が認められなかった.

また, 下水処理場別にみると差があり, KおよびM処理場では処理(C)(D)よりむしろ処理(A)(B)のウイルス分離率が高率になった例もあった.

### 4. ウイルス分離に要した培養日数と溶出処理の関係

別の角度からウイルス溶出効果を検討する目的で, 各ウイルスの分離に要した培養日数, つまりCPEが出現するまでの延日数の平均値と標準偏差を基にしてデータ解析を行った(表11).

ポリオウイルスでは, 処理(B)の9.45日に比べて処理(C)で5.60日, 処理(D)で5.61日となり, 統計的にも有意な培養日数の短縮が認められた. コクサッキーB群についても, 処理(B)の8.27日に比べて処理(C)で6.33日, 処理(D)で6.57日と培養日数の短縮が認められた.

表 9. 検体処理群別ポリオウイルス分離状況

| 下水処理場   | 検 体 処 理 方 法 |     |        |        | 分離株数 |
|---------|-------------|-----|--------|--------|------|
|         | A           | B   | C      | D      |      |
| O       | 1株          | 2   | 8      | 4      | 15   |
| K       | 1           | 1   | 1      | 3      | 6    |
| S       | 2           | 2   | 4      | 7      | 15   |
| M       | 5           | 2   | 7      | 7      | 21   |
| Tc      | 2           | 0   | 6      | 9      | 17   |
| Tk      | 2           | 0   | 8      | 7      | 17   |
| Ky      | 3           | 1   | 4      | 3      | 11   |
| Tt      | 2           | 2   | 7      | 7      | 18   |
| Sb      | 1           | 1   | 5      | 5      | 12   |
| 分 離 株 数 | 19          | 11  | 50     | 52     | 132  |
| 分 離 率   | 14.4%       | 8.3 | 37.9** | 39.4** | 100  |

\*\* : 1%以下の危険率で有意差あり

表 10. 検体処理群別コクサッキーB群ウイルス分離状況

| 下水処理場   | 検 体 処 理 方 法 |      |      |      | 分離株数 |
|---------|-------------|------|------|------|------|
|         | A           | B    | C    | D    |      |
| O       | 6株          | 7    | 5    | 7    | 25   |
| K       | 1           | 3    | 1    | 0    | 5    |
| S       | 1           | 2    | 3    | 4    | 10   |
| M       | 5           | 4    | 0    | 1    | 10   |
| Tc      | 7           | 4    | 7    | 6    | 24   |
| Tk      | 4           | 0    | 4    | 4    | 12   |
| Ky      | 7           | 7    | 8    | 10   | 32   |
| Tt      | 5           | 3    | 5    | 3    | 16   |
| Sb      | 2           | 0    | 3    | 2    | 7    |
| 分 離 株 数 | 38          | 30   | 36   | 37   | 141  |
| 分 離 率   | 27.0%       | 21.3 | 25.5 | 26.2 | 100  |

表 11. 各ウイルスの検出に要した平均培養日数の差の検定

| 検 出 ウ イ ル ス |                    | 検 体 処 理 方 法 |       |        |        |
|-------------|--------------------|-------------|-------|--------|--------|
|             |                    | A           | B     | C      | D      |
| ポ リ オ       | 総 株 数 (n)          | 19株         | 11    | 50     | 52     |
|             | 平均日数 ( $\bar{x}$ ) | 8.11日       | 9.45  | 5.60** | 5.61** |
|             | 標準偏差 (SD)          | 3.42日       | 4.23  | 2.82   | 3.10   |
| コクサッキーB群    | (n)                | 38          | 30    | 36     | 37     |
|             | ( $\bar{x}$ )      | 7.58        | 8.27  | 6.33** | 6.57** |
|             | (SD)               | 3.35        | 3.25  | 2.33   | 2.88   |
| エ コ ー       | (n)                | 9           | 6     | 6      | 6      |
|             | ( $\bar{x}$ )      | 6.22        | 4.83  | 3.00*  | 4.50   |
|             | (SD)               | 3.42        | 2.40  | 0.63   | 2.56   |
| ア デ ノ       | (n)                | 12          | 4     | 4      | 4      |
|             | ( $\bar{x}$ )      | 13.45       | 13.25 | 11.5   | 10.8*  |
|             | (SD)               | 2.25        | 0.50  | 1.73   | 2.17   |

\*\* : 1%以下の危険率で有意差あり

\* : 5%以下の危険率で有意差あり

また、例数は少ないがエコー、アデノの各ウイルスについても同様の傾向が認められた。

以上のように、今回検討したウイルス吸着汚泥からの溶出処理によるウイルス分離率は、ウイルスの種類によって必ずしも同じでなく、また、同一ウイルスでも汚泥の種類によって異なる結果であった。このことは、ウイルスの吸着、溶出機作が異なること、下水処理場ごとに

汚泥の成分に差があること等を示唆するものであろう。

しかし、ポリオウイルスについては、これらの溶出液を利用すれば、ウイルス検出率の向上が大いに期待でき、ポリオウイルスの疫学的調査等に有用であると思われる。また、他のウイルスについては、ウイルス分離率に差がなくてもウイルス分離に要する培養日数が短縮されることからみて、ウイルスの回収量が増加したことが



考えられた。

従って、ホウ酸緩衝液およびビーフエキストラクトのウイルス溶出効果は、フィールドワークにおいても有効であることが確認された。

### 結 論

ポリオウイルスを用いて実験室レベルで行った汚泥吸着ウイルスの溶出条件を基に、フィールドレベルでの下水汚泥からウイルス検索を行い好成績を得た。

1) ポリオウイルスを用いたウイルス吸着汚泥の回収には、カチオン系高分子凝集剤を 0.002 % に添加し、3,000 rpm, 15 分間遠心分離することにより効率よく回収できた (平均93.0%, 標準偏差6.9%)。

2) 実験的にポリオウイルスを吸着させた汚泥からのウイルス溶出には、0.1Mホウ酸緩衝液 (pH10.0, NaCl 1 % 添加) または、3 % ビーフエキストラクト (pH9.0, NaCl 1 % 添加) が有効であった。

3) 溶出に関する要因を実験データの分散分析によって解析した結果、ホウ酸緩衝液では pH 要因が、ビーフエキストラクトでは濃度要因が最も大きく影響した。

4) 1980年11月から1982年1月に採取した131件の下水汚泥についてホウ酸緩衝液とビーフエキストラクトを用いて行ったフィールドワークの結果、ポリオウイルスの分離率は明らかに上昇した (無処理 8.3 %, 溶出処理 37.9~39.4%)。コクサッキー B 群, エコー, アデノについては著明な分離率の上昇は認められなかった。しか

し、ウイルス分離に要した平均培養日数は、各ウイルス共に短縮し、ウイルス溶出処理の有効性が示唆された。

謝辞 本研究を行うにあたり、下水汚泥の採取等について御指導と御協力をいただいた、下水道局、ならびに住宅・都市整備公団、団地サービスの方々に対して深甚なる謝意を表します。

(本研究の概要は、第28回日本ウイルス学会総会、1980年10月、第56回日本感染症学会総会、1982年4月で発表した。)

### 文 献

- 1) 矢野一好, 柴田タツ美, 林 志直, 藪内 清, 岩崎謙二: 東京衛研年報, 32-1, 27, 1981
- 2) 岩崎謙二, 藪内 清, 矢野一好, 柴田タツ美: 臨床とウイルス, 6, 265, 1978
- 3) Sørensen, S. P. L.: *Ergeb. Physiol.*, 12, 393, 1912
- 4) Bates, R. G. and Bower, V. E.: *Anal. Chem.*, 28, 1322, 1956
- 5) Atkies, W. R. G. and Pantin, C. F. A.: *Biochem. J.*, 20, 102, 1926
- 6) ウイルス・リケッチア検査, 第2版, 1978, 日本公衆衛生協会, 東京
- 7) 林 志直, 矢野一好, 柴田タツ美, 藪内 清, 岩崎謙二, 渡辺悌吉, 石原 祐, 大久保さつき, 浦野純子, 河野弘子: 東京衛研年報, 33, 41, 1982

## 東京都におけるポリオ流行予測調査成績 (1972~1981年)

藪内 清\*, 矢野 一好\*, 柴田 タツ美\*, 林 志直\*, 岩崎 謙二\*

### Epidemiological Survey of Poliomyelitis in Tokyo (1972~1981)

KIYOSHI YABUUCHI\*, KAZUYOSHI YANO\*, TATSUMI SHIBATA\*,  
YUKINAO HAYASHI\* and KENJI IWASAKI\*

**Keywords:** ポリオウイルス poliovirus, 疫学調査 epidemiological survey

#### 緒 言

1962年以来伝染病流行予測調査が、厚生省の委託事業として全国の地方衛生研究所で実施されている。この事業は既に周知のとおり、伝染病の発生を予測し、予防対策を効果的にたてる目的で、流行発生の要因として考えられる感染源および感受性の調査を全国的規模で行うものである。この内ポリオの感染源調査は、ある一時期に採便して行う断面的検査であって、感染源としてのウイルスの消長を明らかにしない傾向がある。そこで、われわれは、これを毎月定期的に採取した下水検体からのウイルス分離の結果で補足しながら検討した。

また、感受性調査については、現在都民間でポリオウイルスの抗体保有状態が、どのように維持されているかを検討した。本報は、1972~1981年の感染源調査および1981年の感受性調査の成績について報告する。

#### 調査材料と方法

**健康児ふん便** 1972~81年の10年間に、毎年都内の2~3地区を選定し、ポリオ生ワクチン投与後2か月以上を経過した健康児計929名から採便した。年齢構成は、0歳100名、1歳134名、2歳77名、3歳171名、4歳92名、5歳114名、6歳71名、7歳以上170名である。ふん便は、イーグル MEM 培地を用いて10%乳剤とし、3,000rpm 10分間遠心分離した。その上清に ampicillin, streptomycin, kanamycin を1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , amikacin を100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加し37℃で20分間作用させた。処理した検体は、試験まで-20℃に凍結保存した。

**健康都民血清** 1981年8~9月に、都内8か所の保健所を定点として、0~57歳までの都内に在住する健康者159名から採血した。血清の分離を行った後、試験に供するまで-20℃に凍結保存した。

**ウイルス分離同定試験** ふん便からのウイルス分離法

は、流行予測事業急性灰白髄炎検査術式<sup>1)</sup>に、下水検体からのウイルス分離は既報<sup>2)</sup>に準じて行った。使用した細胞は、FL, HEp 2, Vero #462, BGM の4種類である。各細胞系は、イーグル MEM 培地を用いて24穴のプラスチックプレート(コースター社製, クラスター24)に培養して使用した。各細胞は1検体につき各2穴、0.25ml/穴ずつの検体を接種して、37℃炭酸ガス培養装置内で一週間培養した。CPE(細胞変性効果)の観察は毎日行った。最終判定は、3代まで継代した後、CPE およびヒト血球を用いたHA(赤血球凝集能)試験を指標にして行った。

分離したウイルスの同定は、既知の抗血清を用いた中和試験, HI試験, CF反応により行った<sup>3)</sup>。

**中和抗体価測定** 厚生省流行予測事業急性灰白髄炎検査術式<sup>1)</sup>の記載に準拠しながらマイクロ法で実施した。使用細胞はBGM, 使用ウイルスはポリオ1型 Mahoney 株, 2型 MEF-1 株, 3型 Saukett 株である。BGM 細胞は96穴マイクロプレート(コースター社製3596)に培養した。被検血清の希釈は、トランスファプレート(クック社製220-43)で行い、100TCID<sub>50</sub>/0.025ml に調製した各ウイルス液と混和させ、37℃炭酸ガス培養装置内で1時間反応させた後、維持液(1%牛胎児血清添加MEM)に交換したBGM細胞に接種した。使用した抗原の感染価が100TCID<sub>50</sub>/0.025ml に達した時鏡検し、CPE が陰性になっている最高血清希釈倍数をもって、被検血清の中和抗体価とした。

#### 調査成績と考察

**ポリオ感染源調査** 1972~81年の10年間に、採取した健康児ふん便929例についての年次別ウイルス分離状況を表1に示した。929例中106株11.4%にウイルスを検出した。ポリオウイルスは、1972年に1, 2, 3型各2株

\* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科 160 東京都新宿区百人町3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表 1. 健康児ふん便からの年次別ウイルス分離状況 (1972~81年)

| ウイルス  | 型  | 調 査 年 次 |     |     |    |    |    |    |     |     |     | 分離株数 |
|-------|----|---------|-----|-----|----|----|----|----|-----|-----|-----|------|
|       |    | 1972    | 73  | 74  | 75 | 76 | 77 | 78 | 79  | 80  | 81  |      |
| Polio | 1  | 2株      |     |     |    |    |    |    |     |     |     | 2    |
|       | 2  | 2       |     |     | 1  |    |    |    |     |     |     | 3    |
|       | 3  | 2       |     |     |    |    |    |    |     | 2   |     | 4    |
| CB    | 1  |         |     |     |    |    |    |    | 10  |     |     | 10   |
|       | 2  |         |     |     |    |    | 5  |    |     |     | 10  | 15   |
|       | 3  |         |     | 2   | 2  |    |    |    |     |     |     | 4    |
|       | 4  | 3       |     |     |    |    |    | 2  | 2   |     |     | 7    |
|       | 5  |         |     |     |    |    |    |    |     | 3   |     | 3    |
| ECHO  | 3  | 1       |     |     |    |    |    |    |     |     |     | 1    |
|       | 11 |         |     |     |    |    | 7  |    |     |     | 2   | 9    |
| Reo   | 1  |         | 4   |     |    |    |    |    |     |     |     | 4    |
| AD    | 1  |         |     |     |    |    |    | 3  | 2   | 2   | 1   | 8    |
|       | 2  |         |     |     |    |    |    |    | 2   | 3   | 1   | 6    |
|       | 5  |         |     |     |    |    |    | 1  | 2   | 2   | 4   | 9    |
|       | 6  |         |     |     |    |    |    | 1  | 1   |     |     | 2    |
|       | ?  | 2       | 7   | 4   | 1  | 5  |    |    |     |     |     | 19   |
| 分離株数  |    | 12      | 11  | 6   | 4  | 5  | 12 | 7  | 19  | 12  | 18  | 106  |
| 検体数   |    | 154     | 107 | 111 | 40 | 40 | 72 | 68 | 112 | 114 | 111 | 929  |

CB: コクサッキーB群ウイルス, AD: アデノウイルス, ?: アデノウイルス1~6型以外

表 2. 健康児ふん便からの年齢別ウイルス分離状況 (1972~81年)

| 年齢（歳） | 分 離 ウ イ ル ス |   |   |           |    |   |    |   |      |    |     |       |   |   |   |   | 分離<br>株数 | 検体<br>数 | 分離<br>率% |      |
|-------|-------------|---|---|-----------|----|---|----|---|------|----|-----|-------|---|---|---|---|----------|---------|----------|------|
|       | Polio       |   |   | Coxsackie |    |   | B群 |   | ECHO |    | Reo | Adeno |   |   |   |   |          |         |          |      |
|       | 1型          | 2 | 3 | 1         | 2  | 3 | 4  | 5 | 3    | 11 | 1   | 1     | 2 | 5 | 6 | ? |          |         |          |      |
| 0     |             | 2 |   | 6         | 1  |   | 1  |   |      | 1  |     |       | 3 | 1 | 1 | 2 | 5        | 23      | 100      | 23.0 |
| 1     | 2           | 1 | 4 |           | 1  |   | 2  | 3 |      | 5  | 1   | 2     | 3 | 3 |   |   | 8        | 35      | 134      | 26.1 |
| 2     |             |   |   |           | 3  |   | 3  |   |      | 1  | 1   |       |   | 1 |   |   | 2        | 11      | 77       | 14.3 |
| 3     |             |   |   | 2         | 10 | 3 | 1  |   |      | 1  | 1   | 2     | 2 | 2 |   |   | 2        | 26      | 171      | 15.2 |
| 4     |             |   |   |           |    |   |    |   |      |    |     |       |   |   |   |   |          | 0       | 92       | 0.0  |
| 5     |             |   |   |           | 1  |   |    |   |      | 1  |     | 1     |   |   |   |   |          | 3       | 114      | 2.6  |
| 6     |             |   |   |           | 1  |   |    |   |      |    | 1   |       |   | 2 |   |   |          | 4       | 71       | 5.6  |
| ≧7    |             |   |   |           |    | 1 |    |   |      | 1  |     |       |   |   |   |   | 2        | 4       | 170      | 2.4  |
| 分離株数  | 2           | 3 | 4 | 10        | 15 | 4 | 7  | 3 |      | 1  | 9   | 4     | 8 | 6 | 9 | 2 | 19       | 106     | 929      | 11.4 |

ずつ, 1975年に2型1株, 1980年に3型2株を分離した。これらの分離株を予研に送付して, マーカーテストを依頼したが, いずれの分離株も, rct マーカーテスト, Wecker テスト, McBride テストの結果生ワクチン株と同じ抗原性を有していた。従って, 検索対象数が少な

いので断定はできないが, 都内では現在のところ, 野外株は認められず, 安全な環境が維持されていると思われる。また, ポリオウイルスの検出者はすべて0~1歳であり, ポリオ生ワクチン投与年齢層のみで検出された。このことから分離ウイルスは生ワクチン由来であると

表 3. 下水検体からのウイルス分離状況 (1972~81年)

| ウイルス 型  | 調 査 年 次 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    | 分離株数  |
|---------|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-------|
|         | 1972    | 73  | 74  | 75  | 76  | 77  | 78  | 79  | 80  | 81  |    |       |
| Polio   | 1       | 5   | 1   | 3   | 10  | 1   | 3   | 4   | 5   | 15  | 29 | 76    |
|         | 2       | 19  | 17  | 13  | 6   | 17  | 20  | 7   | 9   | 25  | 32 | 165   |
|         | 3       | 3   | 1   | 3   | 5   | 11  | 19  | 4   | 4   | 16  | 24 | 90    |
| CB      | 1       |     |     |     |     |     |     | 2   | 7   |     |    | 9     |
|         | 2       | 6   |     |     | 1   |     | 21  |     |     | 3   | 22 | 53    |
|         | 3       | 5   | 9   | 6   | 11  | 19  | 43  | 1   |     | 16  | 26 | 136   |
|         | 4       | 1   | 20  |     | 2   | 30  | 21  | 10  | 11  | 39  | 19 | 153   |
|         | 5       | 1   | 57  | 45  |     |     | 18  | 31  | 7   | 16  | 5  | 180   |
|         | 6       |     |     |     |     |     |     | 1   |     |     |    | 1     |
| ECHO    | 3       | 1   |     |     |     |     |     |     |     | 2   | 2  | 5     |
|         | 6       |     |     |     |     |     |     |     | 4   |     |    | 4     |
|         | 7       |     |     |     |     | 1   |     |     | 2   |     |    | 3     |
|         | 11      |     |     |     |     |     | 36  | 3   |     | 4   | 23 | 66    |
|         | 16      | 1   |     |     |     |     |     |     |     |     |    | 1     |
| Reo     | 1       | 60  | 40  | 5   | 41  | 1   |     |     |     | 4   | 10 | 161   |
|         | 2       |     |     |     | 3   |     |     |     |     |     |    | 3     |
| AD      | 1       |     |     |     | 1   |     |     | 4   | 3   | 5   | 3  | 16    |
|         | 2       | 1   | 3   | 3   | 6   | 3   | 1   | 2   | 4   | 5   | 4  | 32    |
|         | 3       | 3   | 5   | 1   | 3   | 2   |     |     |     |     |    | 14    |
|         | 5       |     | 6   | 3   | 8   | 4   |     | 3   | 7   | 11  | 10 | 52    |
|         | 6       |     | 6   | 3   | 4   | 9   | 1   |     | 2   |     | 1  | 26    |
|         | ?       | 26  | 29  | 30  | 12  | 23  |     |     |     |     |    | 120   |
| 未 同 定   |         | 3   | 1   | 7   |     |     |     |     |     |     |    | 11    |
| 分 離 株 数 | 132     | 197 | 116 | 120 | 121 | 183 | 72  | 65  | 161 | 210 |    | 1,377 |
| 検 体 数   | 192     | 192 | 192 | 192 | 283 | 327 | 217 | 184 | 191 | 187 |    | 2,157 |

CB: コクサッキーB群ウイルス AD: アデノウイルス ? : アデノウイルス1~6型以外

推測された。しかし、全国的にみるとまれにワクチン株と抗原性の異なる株の検出報告例<sup>4)</sup>もあるので、今後ともポリオのサーベイはより細かな計画のもとに継続する必要がある。

分離された非ポリオウイルスは、コクサッキーB群ウイルス1型10株、2型15株、3型4株、4型7株、5型3株、エコーウイルス3型1株、11型9株、レオウイルス1型4株、アデノウイルス1型8株、2型6株、5型9株、6型2株、型未定19株であった。これらの成績を年齢別にみると表2の通りで、0~3歳までの幼児が全体の分離株106株のうち88%を占めていた。このことか

ら腸管系ウイルスは、3歳以下の低年齢層において、初感染を受けることが多いと思われた。

一方、過去10年間の下水からのウイルス分離状況をみると表3に示した通りで、2,157検体から1,377株の各種ウイルスが分離された。ポリオウイルスは、毎年春秋の2期に限定して検出されており、2型が最も多く、次いで3型、1型の順であった。これらのポリオウイルスについては、その季節消長からみても生ワクチン由来のものと考えられるが、野外株が混在していないか、今後マーカー試験を実施する必要があると考える。

また、各調査年次の下水検索の結果検出された非ポリ

表 4. 下水および健康児ふん便から分離されたウイルスの対比

| ウイルス  | 型  | 調 査 年 次 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|-------|----|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|       |    | 1972    | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 |
| CB    | 1  |         |    |    |    |    |    | ○  | ○● |    |    |
|       | 2  | ○       |    |    | ○  |    | ○● |    |    | ○  | ○● |
|       | 3  | ○       | ○  | ○● | ○● | ○  | ○  | ○  |    | ○  | ○  |
|       | 4  | ○●      | ○  |    | ○  | ○  | ○  | ○● | ○● | ○  | ○  |
|       | 5  | ○       | ○  | ○  |    |    | ○  | ○  | ○  | ○● | ○  |
|       | 6  |         |    |    |    |    |    | ○  |    |    |    |
| ECHO  | 3  | ○●      |    |    |    |    |    |    |    | ○  | ○  |
|       | 6  |         |    |    |    |    |    |    | ○  |    |    |
|       | 7  |         |    |    |    | ○  |    |    | ○  |    |    |
|       | 11 |         |    |    |    |    | ○● |    |    | ○  | ○● |
|       | 16 | ○       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Reo   | 1  | ○       | ○● | ○  | ○  | ○  |    |    |    | ○  | ○  |
|       | 2  |         |    |    | ○  |    |    |    |    |    |    |
| AD    | 1  |         |    |    | ○  |    |    | ○● | ○● | ○● | ○● |
|       | 2  | ○       | ○  | ○  | ○  | ○  | ○  | ○  | ○● | ○● | ○● |
|       | 3  | ○       | ○  | ○  | ○  | ○  |    |    |    |    |    |
|       | 5  |         | ○  | ○  | ○  | ○  |    | ○● | ○● | ○● | ○● |
|       | 6  |         | ○  | ○  | ○  | ○  | ○  | ●  | ○● |    | ○  |
|       | ?  | ○●      | ○● | ○● | ○● | ○● |    |    |    |    |    |
| 未 同 定 |    |         | ○  | ○  | ○  |    |    |    |    |    |    |

CB: コクサッキーB群ウイルス AD: アデノウイルス ? : アデノウイルス1~6型以外

○: 下水検体より分離 ●: 健康児ふん便より分離

オウイルスと同年次におけるふん便からの検出ウイルスの種類を対比させてみると、表4に示すごとくふん便からの検出ウイルスの種類は、1978年のアデノウイルス6型を除いて、すべて下水から検出されたウイルスの種類に含まれていた。このことから、ふん便から検出されたウイルスは、各調査年次に都内において広く流行していたウイルスの種類であったことを示唆するものと思われる。

**ポリオ感受性調査** 1981年8~9月に採血した健康都民血清159件について、ポリオウイルス1, 2, 3型に対する中和抗体価を測定した。結果を年齢別に表5に示した。ポリオウイルス各型に対する抗体価4倍以上の保有状況をみると、1型は0~6歳で76.7%, 7~11歳で88.2%, 12~25歳で80.4%, 26~57歳で92.9%であり、2型は0~6歳で85.0%, 7~11歳で97.1%, 12~25歳で98.0%, 26~57歳で100%であり、3型は0~6歳で

55.0%, 7~11歳で61.8%, 12~25歳で72.5%, 26~57歳で78.6%であった。2型に対する抗体価が各年齢階層とも最も高く、3型は最も低かった。

また、これらの成績は、10年前に行った調査結果とほぼ一致した<sup>5)</sup>。このことから現在でも、都民のポリオウイルスに対する抗体保有状況は、1972年以来、大きな変動もなく比較的高率に維持されていると推測された。

### 結 論

1972~1981年の都内におけるポリオ感染源調査、および1981年に感受性調査を実施し、次の結論を得た。

1) 10年間に採取した健康児ふん便計929件について行った感染源調査の結果106株のウイルスを分離した。その内訳は、ポリオウイルス9株(1型2株, 2型3株, 3型4株), コクサッキーB群ウイルス39株(1型10株, 2型15株, 3型4株, 4型7株, 5型3株), エコーウイルス10株(3型1株, 11型9株), アデノウイ

表 5. ポリオウイラスの年齢階層別中和抗体保有状況 (1981年)

| 年 齡<br>(歳) | 中 和 抗 体 価 $2 \times 2^n$ |           |            |            |            |    |           |             |           |            |            |            |             |              |           |            |           |           |           |           |    | 検体数 |
|------------|--------------------------|-----------|------------|------------|------------|----|-----------|-------------|-----------|------------|------------|------------|-------------|--------------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----|-----|
|            | 1 型                      |           |            |            |            |    |           | 2 型         |           |            |            |            |             |              | 3 型       |            |           |           |           |           |    |     |
|            | <1                       | 1         | 2          | 3          | 4          | 5  | ≥6        | <1          | 1         | 2          | 3          | 4          | 5           | ≥6           | <1        | 1          | 2         | 3         | 4         | 5         | ≥6 |     |
| 0~6        | 14<br>(76.7)             | 3<br>71.7 | 8<br>58.3  | 8<br>45.0  | 11<br>26.7 | 15 | 1<br>1.7) | 9<br>(85.0) | 0<br>85.0 | 2<br>81.7  | 10<br>65.0 | 12<br>45.0 | 12<br>20.0) | 27<br>(55.0) | 2<br>51.7 | 12<br>31.7 | 7<br>20.0 | 6<br>10.0 | 4<br>3.3) | 2         |    | 60  |
| 7~11       | 4<br>(88.2)              | 5<br>73.5 | 8<br>50.0  | 12<br>14.7 | 2<br>8.8   | 3  | 0<br>)    | 1<br>(97.1) | 1<br>94.1 | 5<br>79.4  | 6<br>61.8  | 13<br>23.5 | 3<br>8.8)   | 13<br>(61.8) | 6<br>44.1 | 11<br>11.8 | 2<br>5.9  | 1<br>2.9  | 0<br>2.9) | 1<br>2.9) |    | 34  |
| 12~25      | 10<br>(80.4)             | 3<br>74.5 | 16<br>43.1 | 10<br>23.5 | 8<br>7.8   | 2  | 2<br>3.9) | 1<br>(98.0) | 2<br>94.1 | 10<br>74.5 | 16<br>43.1 | 16<br>11.8 | 2<br>3.9)   | 14<br>(72.5) | 6<br>60.8 | 22<br>17.6 | 6<br>5.9  | 2<br>2.0  | 1<br>0    | 0<br>)    |    | 51  |
| 26~57      | 1<br>(92.9)              | 0<br>92.9 | 1<br>85.7  | 5<br>50.0  | 5<br>14.3  | 1  | 1<br>7.1) | 0<br>(100)  | 1<br>92.9 | 2<br>78.6  | 5<br>42.9  | 3<br>21.4  | 2<br>7.1)   | 3<br>(78.6)  | 0<br>78.6 | 3<br>57.1  | 7<br>7.1  | 0<br>7.1  | 1<br>7.1  | 0<br>)    |    | 14  |

( ) : 累積陽性率 (%)

ルス44株 (1型8株, 2型6株, 5型9株, 6型2株, 型未定19株), レオウイルス4株 (1型) であった。  
 ポリオウイルスは、ワーカーストの結果、生ワクチン由来株と認められた。健康児から検出された上記の非ポリオウイルスは、同時期に採取した下水からも検出された。

2) 感受性調査の結果、1型の抗体保有率 ( $\geq 1:4$ ) は、各年齢階層を通じて76.7~92.9%, 2型は85.0~100%, 3型は55.0~78.6%であった。この傾向は、1972年、78年に実施した成績と同様であった。

## 文 献

- 1) 厚生省：伝染病流行予測事業急性灰白髄炎検査術式, 1972
- 2) 矢野一好, 柴田タツ美, 林 志直, 藪内 清, 岩崎 謙二：東京衛研年報, 32-1, 27, 1981
- 3) 微生物検査必携, 第2版, 1978, 日本公衆衛生協会, 東京
- 4) 原 総, 斎藤芳子：臨床とウイルス, 9, 122, 1981
- 5) 藪内 清, 矢野一好, 柴田タツ美, 林 志直, 岩崎 謙二：東京衛研年報, 30-1, 30, 1979

東京都内における小児急性胃腸炎のウイルス学的・細菌学的検索成績

関根 整治\*, 山田 澄夫\*, 松下 秀\*, 矢野 一好\*  
藪内 清\*, 工藤 泰雄\*, 前木 吾市\*\*, 坂井 千三\*  
大橋 誠\*, 渡辺 倂吉\*\*\*, 石原 祐\*\*\*, 大久保 さつき\*\*\*  
浦野 純子\*\*\*, 河野 弘子\*\*\*

Virological and Bacteriological Studies on the Cause of Acute Diarrheal Diseases in a Pediatric Clinic in Tokyo

SEIJI SEKINE\*, SUMIO YAMADA\*, SHIGERU MATSUSHITA\*,  
KAZUYOSHI YANO\*, KIYOSHI YABUUCHI\*, YASUO KUDOH\*,  
GOICHI MAEKI\*\*, SENZO SAKAI\*, MAKOTO OHASHI\*,  
TEIKICHI WATANABE\*\*\*, YU ISHIHARA\*\*\*, SATSUKI OKUBO\*\*\*,  
JUNKO URANO\*\*\* and HIROKO KOHNO\*\*\*

A prospective study on the cause of acute diarrheal diseases in children was conducted among 361 patients at a pediatric clinic in Tokyo during the period from November 1980 to February 1982.

Known etiological agents were found in 147 (40.7%) of 361 ill children studied. Of 147 children with enteric pathogens, 22 (15%) had multiple agents with various combinations. Among the pathogens detected, rotavirus and *Campylobacter jejuni/coli* were found to be the most common cause, accounting for 33.9% and 28.7% of all the pathogens isolated. Other responsible pathogens included enteropathogenic *Escherichia coli*, enteroviruses, adenovirus, *Salmonella*, enteroinvasive *E. coli*, enterotoxigenic *E. coli* and *Vibrio parahaemolyticus*.

The results of this study suggest that rotavirus and *C. jejuni/coli* play a significant role as pathogens in the etiology of pediatric diarrhea in Tokyo.

**Keywords :** acute gastroenteritis, virological and bacteriological study

緒 言

急性胃腸炎は、発展途上国だけでなく我が国でも日常小児を中心によく遭遇する疾病の1つである<sup>1,2)</sup>。なかでも、細菌やウイルスなどに起因する感染性の疾病は、その発生頻度や病理からみて最も重要なものであり、その実態や病因の究明は公衆衛生上依然重要な課題といえる。

この感染性腸炎の病因としては、これまでに細菌をはじめウイルスなどの多くの病原体が明らかにされてきたが、最近ではさらにカンピロバクター、毒素原性大腸菌、ロタウイルスなどが新たに起因病原体として認識され、それらはまた、特に小児下痢症の病原として極めて重要な存在であることが示唆されてきている<sup>3-6)</sup>。従って、小児における感染性腸炎の把握に当たっては、これらの新たに認識された病原体も含むより幅広い観点から

の病原学的調査が不可欠なものといえる。しかし、我が国ではこの種の調査はほとんど実施されておらず、その実態はまだ十分把握されるまでに至っていないのが現状である。

本報では、小児における急性胃腸炎の病因やその発生頻度などをより明確にする目的で、都内の1病院の小児科を受診した患者について細菌およびウイルスの両者を対象に原因検索を実施したので、その成績の概要につき報告する。

材料と方法

**供試ふん便** 1980年11月から1982年2月にかけて東京通信病院小児科を受診して、急性胃腸炎と診断された生後1か月から15歳までの患児361名から得たふん便を検査対象とした。ふん便は細菌検査用として Amies の輸

\* 東京都立衛生研究所微生物部 160 東京都新宿区百人町3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 同生活科学部乳肉衛生研究科

\*\*\* 東京通信病院小児科

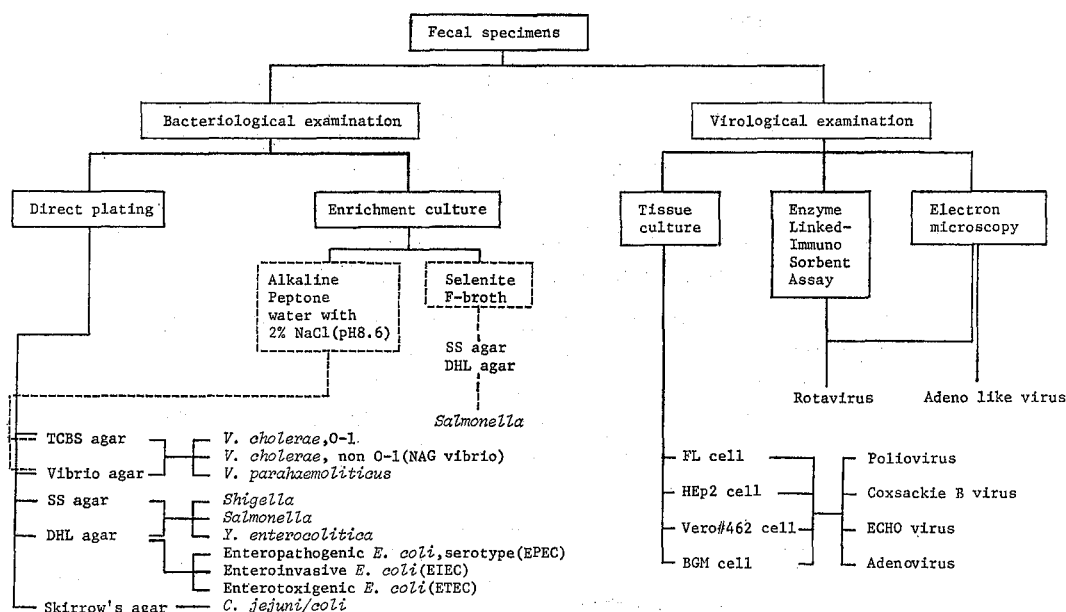


Fig. 1. Procedure for isolation and identification of enteric pathogens

送培地 (Transwab, Medical Wire & Equipment co. Ltd., England) に採取し 4℃ に保存, ウィルス検査用としてはポリ製容器 (Falcon 2070 Tube) に採取後, ただちに -80℃ に凍結保存, 検査に供した。

**検査方法** 検査対象病原体と検査方法の概略を Fig. 1 に示した。コレラ菌 (O-1), NAG ビブリオ (O-1 以外のコレラ菌), 腸炎ビブリオ, 赤痢菌, チフス菌およびパラチフス菌を含むサルモネラ, エルシニアは常法<sup>7)</sup> に準じ分離同定し, カンピロバクターは skirrow 培地に直接塗抹培養後, 鏡検により同定した。腸管起病性大腸菌については, DHL 寒天培地上から疑わしい集落を 1 検体当たり 3~5 個釣菌し, 大腸菌と確認した後, 血清学的試験 (市販診断用血清, デンカ生研) および毒素産生性試験<sup>9)</sup> により, いわゆる病原大腸菌 (Enteropathogenic *Escherichia coli*, serotype, 以下 EPEC), 組織侵入性大腸菌 (Enteroinvasive *E. coli*, 以下 EIEC), および毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *E. coli*, 以下 ETEC) とそれぞれ同定した。なお検出菌の一部については, 必要に応じ血清型別などの試験を実施した。

ポリオウィルス, コクサッキー B 群ウィルス, エコーウィルス, アデノウィルスの分離は, 原則的に組織培養法によった。ふん便はイーグル MEM (日本製薬) で 10% 乳剤とし, その遠心上清に抗生物質を添加したものを

材料とした。培養細胞は FL, Hep2, Vero#462 と BGM 細胞を使用して細胞変性効果 (CPE) を指標に 3 代継代培養した。ロタウィルスは既報<sup>9)</sup> のごとく, ふん便をそのまま (固型の場合は乳剤化) 検体として, ロタウィルス検出用キット (Rotazyme, Abbott Lab., North Chicago, USA) を用いた酵素抗体法によって検出した。また調査初期のふん便の一部については, ショ糖密度勾配遠心法により調製した沈渣を対象にネガティブ染色後, 電子顕微鏡でウィルス粒子存在の有無を観察した。

## 結 果

1. 病原体検出状況について 調査期間中の急性胃腸炎患児からの病原体別検出状況の概要を Table 1 に示した。

供試ふん便 361 件中既知病原体が検出されたのは計 147 件 (40.7%) で, このうち 63 件は細菌が単独, 71 件はウィルスが単独, また 13 件では細菌とウィルスが同時に検出された。また, 細菌あるいはウィルス単独検出例のなかにも複数菌種が同時に検出されたものが 9 例に認められた。これら陽性者 147 名から検出された病原体は計 171 株で, その菌種も 11 種と極めて多彩なものであった。検出病原体のうち最も検出頻度の高かったのはロタウィルス (58 株), ついでカンピロバクター (49 株) で, この両方で全分離株の約 63% を占めた。このほか, EPEC,



EIEC, および ETEC を含む腸管病原性大腸菌 (21 株), アデノウイルス (11株), サルモネラ (10株), ポリオウイルス (9株), コクサッキー B 群ウイルス (9株)

Table 1. Detection of enteropathogens from sporadic acute gastroenteritis in children

|                                            |            |
|--------------------------------------------|------------|
| Number of patients examined                | 361        |
| No. of pathogen positives with :           |            |
| bacterium                                  | 63 (17.5)  |
| virus                                      | 71 (19.7)  |
| bacterium and virus                        | 13 (3.6)   |
| Total                                      | 147 (40.7) |
| Number of positive cases with(%) :         |            |
| Rotavirus                                  | 58 (33.9)  |
| <i>C. jejuni/coli</i>                      | 49 (28.7)  |
| Enteropathogenic <i>E. coli</i> , serotype | 13 (7.6)   |
| Adenovirus                                 | 11 (6.4)   |
| <i>Salmonella</i>                          | 10 (5.8)   |
| Poliovirus                                 | 9 (5.5)    |
| Coxsackie B virus                          | 9 (5.3)    |
| Enteroinvasive <i>E. coli</i>              | 6          |
| Enterotoxigenic <i>E. coli</i>             | 2          |
| <i>V. parahaemolyticus</i>                 | 2          |
| ECHO virus                                 | 2          |
| Total                                      | 171 (100)  |

などが主要なものであった。

2. 年齢別病原体検出状況 調査対象となった患児の年齢別病原体検出状況を Table 2 に示した。患児の年齢は 0 歳～15 歳にわたるが、最も陽性率の高かったのは 1～4 歳の年齢群で 149 名中 68 名 (45.6%) が陽性であり、その検出病原体も 10 種と多彩であった。検出病原体と年齢との関連性をみると、4 歳までの低年齢層では細菌の検出率に比してウイルスの検出率が、年齢が低くなるほど高率であるのに対し、5 歳以上の年齢層では逆に年齢が高いほどウイルスに比して細菌の検出率が高い傾向にあった。

この点を主要な病原体として認められたロタウイルスについてみると、その検出率は 1 歳未満児および 1～4 歳児に高率で、前者では検出病原体全体の 46.8%, 後者でも 36.7% を占める結果であった。これに対してカンピロバクターの検出率は 5～15 歳の年齢層に最も高頻度で、特に 5～9 歳群では本菌が検出病原体全体の 64% を占めていた。このほか検出数は少ないがサルモネラ, EPEC, アデノウイルスおよびコクサッキー B 群ウイルスでは、総体的に 4 歳以下の低年齢層に高い傾向であった。

3. 月別および病日別病原体検出状況 被検患者数は冬期 (12 月～2 月) に最も多く、ついで夏期であったが、病原体の月別検出率に顕著な差は認められなかった。しかし検出病原体別にみると Fig. 2 に示したごとく、その検出数には季節的に違いのあることが示された。すなわちロタウイルスではその検出は、1 月を中心

Table 2. Detection frequency of enteropathogens from sporadic acute gastroenteritis in children, by age

| Age<br>(years) | No. of<br>patients<br>examined | No. of<br>positive<br>cases<br>(%) | Total | Number of cases with : |                   |                            |                                               |                                  |                                   |           |            |            |                   |            |
|----------------|--------------------------------|------------------------------------|-------|------------------------|-------------------|----------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------|------------|------------|-------------------|------------|
|                |                                |                                    |       | <i>C. jejuni/coli</i>  | <i>Salmonella</i> | <i>V. parahaemolyticus</i> | Enteropathogenic<br><i>E. coli</i> , serotype | Enteroinvasive<br><i>E. coli</i> | Enterotoxigenic<br><i>E. coli</i> | Rotavirus | Adenovirus | Poliovirus | Coxsackie B virus | ECHO virus |
| < 1            | 94                             | 38 (40.4)                          | 47    | 5                      | 2                 |                            | 4                                             |                                  |                                   | 22        | 5          | 8          | 1                 |            |
| 1—4            | 149                            | 68 (45.6)                          | 79    | 18                     | 7                 | 1                          | 7                                             | 3                                | 1                                 | 29        | 5          |            | 6                 | 2          |
| 5—9            | 84                             | 30 (35.7)                          | 33    | 21                     |                   | 1                          | 2                                             | 2                                |                                   | 3         | 1          | 1          | 2                 |            |
| 10—15          | 27                             | 9 (33.3)                           | 10    | 5                      | 1                 |                            |                                               | 1                                | 1                                 | 2         |            |            |                   |            |
| Unknown        | 7                              | 2 (28.6)                           | 2     |                        |                   |                            |                                               |                                  |                                   | 2         |            |            |                   |            |
| Total          | 361                            | 147 (40.7)                         | 171   | 49                     | 10                | 2                          | 13                                            | 6                                | 2                                 | 58        | 11         | 9          | 9                 | 2          |

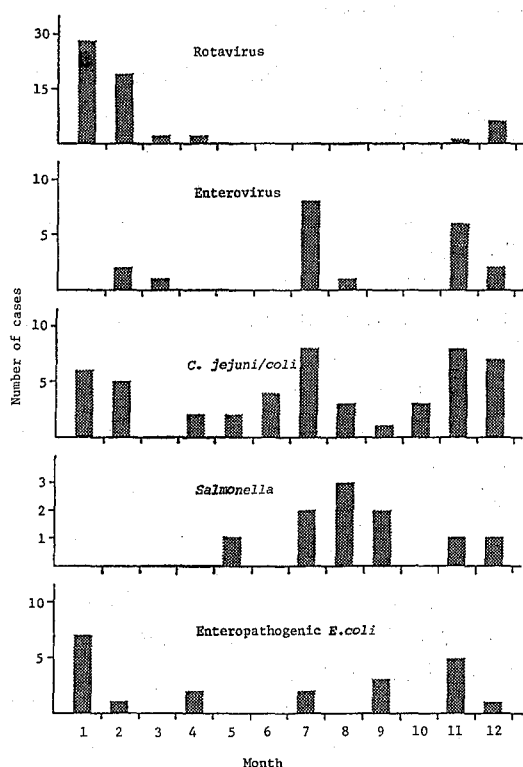


Fig. 2. Monthly distribution of sporadic acute gastroenteritis patients associated with Rotavirus, Enterovirus, *C. jejuni/coli*, *Salmonella* and Enteropathogenic *E. coli*

とした冬期に集中しているのに対し、カンピロバクターでは余り季節の変動がなくほぼ年間を通じて検出されている。

またエンテロウイルスのうち、コクサッキーB群ウイルスおよびエコーウイルスは、サルモネラと同様に7月、8月の夏期を中心に分離され、ポリオウイルスはワクチン投与時期に対応して検出される傾向であった。

患者の病日別に病原体陽性率を検討すると、1～5病日では、265件中114件(43.0%)、6～9病日では59件中21件(35.6%)、11病日以上では20件中5件(25.0%)と、病日の経過とともに陽性率の低下がみられたが、病原体別による検出率の差異は特に認められなかった。

4. 患者の臨床所見の概要 病原体が検出された147名については、可能な範囲でその臨床所見についても調査した。主要病原体別の臨床症状および下痢性状は、Fig. 3 および4に示すとおりである。図から明らかなように、いずれの病原体による感染例でも下痢はほぼ必発

症状として認められたが、ロタウイルスでは、さらに嘔吐が患者の約72%とかなり高率に認められた。またその下痢の多くは、白色水様状を呈するのが特徴的であった。一方カンピロバクターでは、サルモネラの場合と同様腹痛、発熱の発現率が高く下痢の際に粘血便を混じる割合も他の感染例に比して高い傾向であった。

5. 分離株の血清型および産生毒素型 カンピロバクターの血清型は、伊藤らの方法<sup>10)</sup>で検討した結果、15種の血清型に型別されたがその分布には特にかたよりは認められなかった。

EPEC ではO111(4株)、O127およびO146(各2株)のほか、O86、O126、O128、O144も各1株認められた。毒素原性大腸菌はいずれも易熱性毒素産生株であり、腸炎ビブリオは2株とも血清型O4:K8の神奈川現象陽性株であった。分離サルモネラの血清型は、*S. typhimrium* 4株、*S. paratyphi B* (D-酒石酸:+) 2株、*S. enteritidis* 1株であった。

アデノウイルス11株中7株は組織培養法で分離されたもので、その血清型は1型1株、2型2株、5型3株、6型1株であった(他の4株は電子顕微鏡による検出)。エンテロウイルスでは、ポリオウイルス1型4株、2型5株、コクサッキーB群ウイルス2型8株、3型1株およびエコーウイルス11型2株となっている。

## 考 察

小児の急性胃腸炎に関しては、その重要性からこれまでも多くの病原的調査がなされ、最近ではカンピロバクターやロタウイルスなど新たに認められた病原体がその病原として注目されるに至った<sup>8-9)</sup>。しかし、これらの調査は、細菌あるいはウイルスいずれか一方を対象としたものが多いこともあって、これら病原の本症における相対的な病原的意義などについてはまだ明確でない点も多い。

このような状況から、我々は今回小児胃腸炎の病原につき最近確認された病原体も含む、細菌およびウイルスの両者を対象にして検索を試みた結果、患児361名中その約41%に当る147名の病原を明らかにし得た。検出病原についてみると、細菌の検出されたものはウイルスとの同時分離も含め延76名(検出率21.1%)、ウイルスでは延84名(検出率23.3%)となっており、両者の検出にはほとんど差のない結果であった。この成績はこれまでの内外における調査成績<sup>11-14)</sup>とも一致するものであり、検出病原のすべてが原因ではなかったにしても、小児の感染性腸炎においてはこれまで主要とされてきた細菌だけでなく、ウイルスも細菌と同様あるいは、それ以

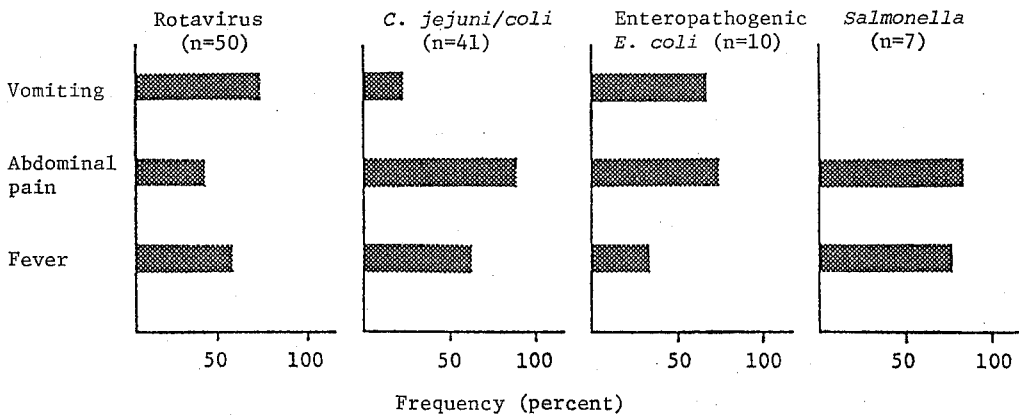


Fig. 3. Clinical symptoms of patients associated with rotavirus, *C. jejuni/coli*, enteropathogenic *E. coli* and *Salmonella*

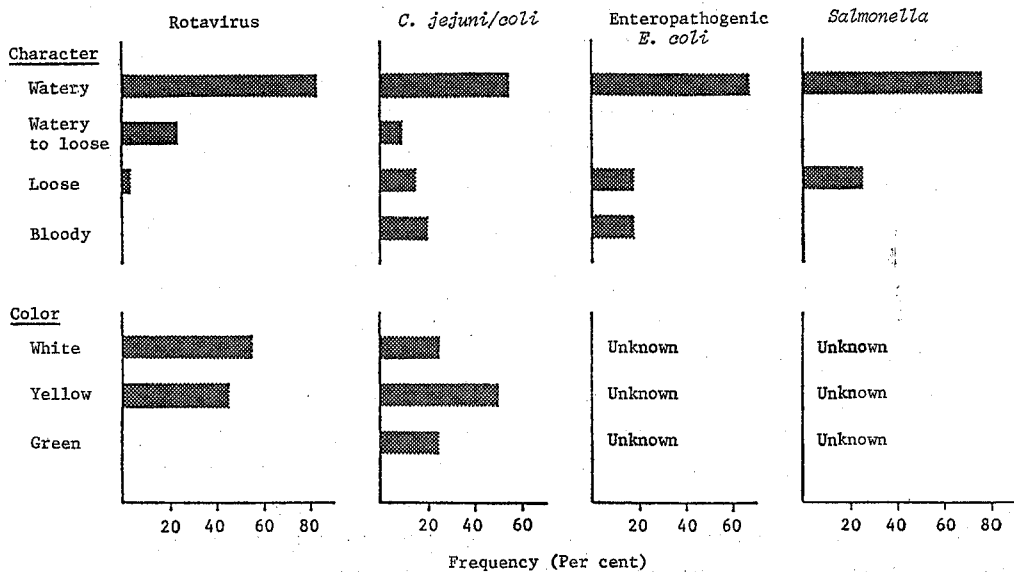


Fig. 4. Features of diarrhea in patients associated with rotavirus, *C. jejuni/coli*, enteropathogenic *E. coli* and *Salmonella*

上に重要な存在であることをよく示している。さらに本症の把握に当っては、単に細菌のみでなくウイルスをも含めたより幅広い診断の必要性を物語るものと言える。

今回の調査では計11種の病原体が検出されたが、最近の報告<sup>14)</sup>ともよく一致して細菌ではカンピロバクター、ウイルスではロタウイルスが主要な病原として認められた。このほか細菌では赤痢菌は認められなかったが、サ

ルモネラや腸管病原性大腸菌がかなり高率に検出されており、この両者も本症における重要な病原とみなしてきしつかえなからう。また、腸管病原性大腸菌として今回EPEC, EIECのほかETECも検出されたことは、本菌がその検出頻度は低いにしても散発下痢症の病原となることを示すものとして興味深い。

一方ロタウイルス以外のウイルスでは、下痢症との関連が示唆されてきているアデノウイルスやエンテロウイ

ルスが、比較的高い割合で検出された。しかしこれらのウイルスはしばしば健康者からも検出されることから<sup>15)</sup>下痢症の病因として断定するには、なお慎重な調査が必要であろう。

これらの病原菌陽性者のなかには、細菌とウイルスの同時検出例が13例、種を異にする細菌あるいはウイルスが同時に検出されたものも9例を数えた。このような混合感染と考えられる事例は、開発途上国や海外旅行者の下痢症ではしばしば経験されるところであるが<sup>16,17)</sup>、我が国の小児下痢症においてもかなりの頻度に認められたことは注目に値しよう。しかし、検出病原体の病原的意義づけをすることは難しく、その理解には、古くから指摘されている下痢成因における細菌とウイルスの相互作用<sup>18)</sup>といった面も考慮した詳細な検討が必要と思われる。

今回の調査では、また、主要病原として認められたロタウイルスおよびカンピロバクターを中心に、その発生状況や臨床所見についてもあわせて若干の検討を加えた。

ロタウイルス下痢症は、従来から温帯地域で冬期に幼児を中心に多発することが知られているが<sup>4)</sup>、今回の我々の調査でも、その発生は冬期に限られ1歳以下の乳児に最も高頻度であることが確認された。また臨床的にも本症の特徴とされる嘔吐と白色水様状の下痢が高率に認められている。カンピロバクターも5～9歳の小児を中心に高率に検出され、その発生時期や臨床症状においてもこれまでの報告と特に違いは認められなかった。

以上のように、今回細菌だけでなくウイルスを含めて急性胃腸炎の病原検索を実施したが、他の報告<sup>11-14)</sup>と同様、およそその半数については病因を明らかにし得なかった。

この原因としては、急性胃腸炎と診断されたなかに感染性でないものが含まれていたことも当然考慮しなければならないが、それだけでなく今回の調査に用いた材料に、病日が経過したものがやや多く含まれていたことや、検査対象とした病原体がまだ十分でなかったことなども影響したと考えられる。対象病原体としては、今回、材料の点などから原虫については検討できなかった。しかし米国における小児下痢症の調査では *Giardia lamblia* が7%に検出されている例<sup>19)</sup>もあることから、我が国においてもこうした原虫性疾患についての考慮は必要と考えられる。また、今回検討した細菌やウイルスでも、下痢症との関連が示唆されているものの全てを対象にしておらず、特にウイルスでは、その検出に組織培

養法を主として用いたため、培養不可能な Norwalk ウィルスや Calici ウィルスなどの下痢原性ウイルス<sup>3,4)</sup>は、全く検出でき得なかった。本邦でもすでに Norwalk ウィルスによる下痢症の存在も確認されており<sup>20)</sup>、とくに小児の急性胃腸炎においては、今後こうしたウイルスを含めたより総合的な調査が望まれよう。

## 結 論

小児の急性胃腸炎の病原を明らかにする目的で、1980年11月から1982年2月にかけて都内1病院小児科を受診した患児361名を対象に、そのふん便について細菌学的・ウイルス学的検索を実施し、以下の成績を得た。

1 患者361名中病原体が検出されたのは147名で、そのうち63名は細菌単独、71名はウイルス単独、他の13名は両者の同時検出例であった。

2 147名からの検出病原体は11種、171株であった。これらのうち最も高頻度に検出されたのはロタウイルスおよびカンピロバクターで、両者が本疾患において最も重要な病原であることが確認された。

3 主要病原として認められたロタウイルスによる感染は1歳未満あるいは1～4歳の年齢層、カンピロバクターは5～9歳あるいはそれ以後の年齢層に高頻度に認められた。その発生は、前者が冬期(12月～2月)に多発するのに対し、後者では特に季節的なかたよりは認められなかった。

(本研究の概要は日本感染症学会第56回総会1982年4月で発表した。)

## 文 献

- 1) WHO: *WHO Chronicle*, 32, 369, 1978
- 2) Kudoh, Y. and Ohashi, M.: *Gastrointestinal Infections in Southeast Asia*(IV), 1982, IMFJ, SEAMIC, Tokyo.
- 3) 鈴木 栄: 最新医学, 33, 1588, 1978
- 4) WHO Scientific Working Group: *Bull. WHO*, 58, 183, 1980
- 5) WHO Scientific Working Group: *Bull. WHO*, 58, 519, 1980
- 6) WHO Scientific Working Group: *Bull. WHO*, 58, 23, 1980
- 7) 善養寺 浩, 坂井千三: 腸管系病原菌の検査法, 第2版, 1974年, 医学書院, 東京
- 8) 山田澄夫, 松下秀, 工藤泰雄: モダンメディア, 26, 545, 1980
- 9) 関根整治, 前木吾市, 矢野一好, 藪内 清, 岩崎謙二, 浦野純子, 河野弘子, 渡辺悌吉: 東京衛研年

- 報, 32-1, 39, 1981
- 10) 伊藤 武: モダンメディア, 27, 312, 1981
- 11) Walker-Smith, J. : *Arch. Dis. Childh*, 53, 355, 1978
- 12) Stintzing, G. et al. : *Bull. WHO*, 59, 67, 1981
- 13) Paniker, C.K.J. : *Bull. WHO*, 60, 123, 1982
- 14) 大瀬戸光明, 田中 博ら: 第30回日本感染症学会東日本地方会総会演説抄録, 80, 1981
- 15) 矢野一好, 藪内 清, 柴田タツ美, 岩崎謙二ら: 東京衛研年報, 29-1, 49, 1978
- 16) Black, R.E. et al. : *Proc. 14th Joint Conf., U.S.-Japan Coop. Med. Sci. Program*, 292, 1979
- 17) 山田澄夫, 津野正朗, 松下 秀, 太田建爾, 工藤泰雄, 坂井千三, 大橋 誠: 第56回日本感染症学会総会演説抄録, 177, 1982
- 18) Reiman, H.A. : *Am. J. Med. Sci*, 246, 404, 1963
- 19) Pickering, L.K. et al : *J. Pediatr*, 93, 383, 1978
- 20) 鈴木 宏ら: 第26回日本ウイルス学会総会演説抄録, 373, 1978

## 東京都における日本脳炎疫学調査 (1980~1981年)

吉田靖子\*, 関根整治\*, 薮内清\*  
岩崎謙二\*, 山口安夫\*\*, 斉藤正度\*\*

## Epidemiological Survey of Japanese Encephalitis in Tokyo in 1980-1981

YASUKO YOSHIDA\*, SEIJI SEKINE\*, KIYOSHI YABUCHI\*,  
KENJI IWASAKI\*, YASUO YAMAGUCHI\*\* and MASANORI SAITO\*\*

**Keywords:** 疫学 epidemiology, 日本脳炎ウイルス Japanese encephalitis virus, ブタ swine, コガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus* mosquitos

### 緒言

わが国における日本脳炎(日脳)患者発生は1968年以後年々低下してきたが, 1978年以降は西日本を中心に増加の傾向がみられ, 東京都においても1981年8月に8年ぶりの日脳真性患者(死亡)の発生があり, 再び関心事になってきた<sup>1)</sup>. 日脳患者は最近の進歩した治療技術を施しても約1/3は死の転帰を, 約1/3は重篤な後遺症を残すことから, 予防に徹しなければならない疾患であると考え.

われわれは都内における日脳ウイルスの汚染状況を知る目的で, 確認患者調査, 感受性調査, 感染源調査を実施してきた<sup>2-5)</sup>.

今回は, 1980・1981年における都内飼育ブタの日脳HI抗体保有状況, ウイルス媒介蚊の消長, 健康都民の抗体保有状況について報告する.

### 材料および方法

**患者検体** 1981年8月16日に発病した76歳の男性(9月8日死亡)から採取した病日別の血清5件と死後採取した脳検体である.

**ブタ血清** 1980年1月から1981年12月の間に都下多摩地区で飼育したブタ(6~8か月齢)から, と殺時に採取した血清2,500件である. 各年とも1~6月・11月・12月は毎月50件, 7~10月は毎週50件のブタ血清について検索した.

**健康都民血清** 1980年5月26日~7月24日, 1981年6月4日~8月24日に都内に居住する健康者各々295名, 319名から採取した血清である. 検索対象者の年齢は, 80年は2~85歳, 81年は2~79歳の範囲であった. なお

これらの血清は, 1980年には東村山・東久留米・本郷・小石川・杉並東・杉並西・志村・城東・中野・中野北・石神井・練馬・豊島池袋の各保健所, 1981年には東村山・東久留米・足立・荒川・千住・板橋・豊島池袋・中野・中野北・石神井・高井戸・大森・練馬の各保健所の協力により採取されたものである.

**HI試験** 常法<sup>6)</sup>に準じてマイクロタイター法により実施した. 使用した抗原は市販品の中山株・JaGAR 01株を用いた.

**中和試験** 鶏胎児繊維芽細胞上のブラック減少測定法を用いた<sup>6)</sup>. 使用した抗原はJaGAR 01株である. 中和抗体価は50%ブラック減少率から算定した.

**コガタアカイエカの捕集** 1980~1981年の6~10月の間に各々25回, 既報<sup>9)</sup>と同一地点で捕集した.

**ウイルス分離試験** 乳のみマウスの脳内接種法によって実施した<sup>6)</sup>. HI抗体価10倍以下のブタ血清, 雌コガタアカイエカの各プール材料から日脳ウイルスの分離を試みた.

### 成績および考察

**日脳患者の血清学的・ウイルス学的検索** 検索した患者は熊本県に住む76歳の男性で, 上京して4日目の1981年8月16日に発病し臨床所見から日脳が疑われた. 病日を追って採取した血清5件のHI・CF試験の結果から, 真性の日脳患者と判定された. 血清学的検索結果は表1に示した.

都内で真性の日脳患者発生が確認されたのは8年ぶりのことである. その後患者は24病日目の9月8日に死亡した. 脳剖検材料からのウイルス分離試験を試みたが,

\* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科 160 東京都新宿区百人町3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 東京都多摩食肉衛生検査所

表 1. 1981年度東京都に発生した真性日脳患者の血清学的検索成績

| 患 者    | 採血月日      | 病 日 | H I 試 験 |          |        |           |        |     | C F 試験 |
|--------|-----------|-----|---------|----------|--------|-----------|--------|-----|--------|
|        |           |     | 中 山 株   |          |        | JaGAr 01株 |        |     |        |
|        |           |     | 対 照     | 2ME 処理** | 感受性*** | 対 照       | 2ME 処理 | 感受性 |        |
| G. F * | 56. 8. 22 | 7   | <10     | <10      | (-)    | 80        | <10    | (+) | <4     |
|        | 8. 24     | 9   | 10      | <10      | (-)    | 80        | <10    | (+) | <4     |
|        | 8. 25     | 10  | 20      | <10      | (±)    | 160       | 20     | (+) | <4     |
|        | 8. 26     | 11  | 40      | <10      | (+)    | 640       | 20     | (+) | 8      |
|        | 8. 27     | 13  | 40      | 10       | (±)    | 640       | 40     | (+) | 16     |

\* G. F (♂, 76歳 熊本県在住)

56. 8. 16発病 (上京中)→56. 9. 8死亡→脳剖検材料からのウイルス分離 (陰性)

\*\* 2ME処理=2-メルカプトエタノール処理

\*\*\* 感受性(+) = 対照と2ME処理との間で8倍以上差があるもの

表 2. 全国日本脳炎患者発生数と日脳ウイルス汚染地区数

| 年 次  | 真性患者 |     | 疑似患者 |    | 日脳ウイルス汚染指定地区数 |
|------|------|-----|------|----|---------------|
|      | 患者   | 死者  | 患者   | 死者 |               |
| 1974 | 16   | 7   | 38   | 16 | 14県           |
| 1975 | 23   | 4   | 41   | 21 | 2府32県         |
| 1976 | 9    | 6   | 20   | 10 | 2府19県         |
| 1977 | 3    | 1   | 18   | 10 | 2府21県         |
| 1978 | 88   | 21  | 48   | 24 | 2府38県         |
| 1979 | 67   | 12  | 36   | 25 | 2府30県         |
| 1980 | 26   | 7   | 20   | 12 | 2府35県         |
| 1981 | 20** | 3** | 9    | 7  | 2府23県         |

\* ブタのHI抗体獲得率より、日脳ウイルスが推定された地区数

\*\* 都内発生1名(死亡)含む

日脳ウイルスは検出されなかった。

この時期における都内飼育ブタの日脳HI抗体獲得状況をみると、9月初旬まで抗体獲得率は全く上昇していなかった。しかし熊本県においては8月7日採取ブタ血清のHI抗体獲得率は50%を示し、新感染を意味する2ME感受性抗体(2ME抗体)陽性率は11%を示していた。さらに8月12日採取ブタ血清では85%とHI抗体獲得率は上昇し、明らかに日脳ウイルスの伝播がみられたことから、この患者は都内での感染発症ではなく、熊本県で感染し上京後発病したと推定された。

表2に示した厚生省保健情報課の全国日本脳炎情報を見ると、1974~1977年は真性日脳患者は減少し、またブタの日脳HI抗体を指標としたウイルスの浸透度調査からも、ウイルスの散布が近年著しく希薄になっていたこ

とが確認されている<sup>1)</sup>。しかし日本脳炎は致命率も高く、また精神障害・運動障害が後遺症として残る重篤な病気であること、さらに汚染源が全くなかったわけではないので今後さらに警戒する必要がある。

**都内飼育ブタの日脳HI抗体獲得状況** 1980~1981年に50回にわたって、都下多摩地区で飼育されたブタ(6~8か月齢)から採取した血清2,500件について測定した日脳HI抗体価の検査成績を表3に示した。

両年とも8月以前に採取した血清には高い抗体価を示したものは少なく、また2ME抗体陽性のものは1件もなかった。HI価160倍以上の抗体価を示した血清および2ME抗体陽性血清は、1980年は9月17日以降、1981年は9月7日以降にみられた。したがって日脳ウイルスの散布がみられたのは、両年とも9月中旬以降と推定された。1980・1981年の1~3月においてHI価80以上の抗体価を示すものがあったが、これらはすべて2ME抗体陰性であったため、1979・1980年の流行時の影響を受けたものと思われる。

1979年9~10月における抗体獲得率は0~8%と低率だったことに対して、80年においては12~66%、81年には8~32%まで上昇した。また1980年10月15日、22日、1981年10月5日採取のHI抗体陰性ブタ血清から日脳ウイルスを各1株分離したことからも、両年における日脳ウイルスの活動期は1979年と同様に9~10月であったといえる。1980年においては一部に極端に高いHI抗体獲得率を示したが、これはブタの飼育地による地域差が生じたのであろうと推定された。

都内での日脳患者の発生がみられていた1967年以前と最近のブタの日脳HI抗体獲得率をくらべると、HI抗

表 3. 1980～1981年都内飼育ブタにおける日本脳炎HI抗体獲得状況

| 採血月日     | 検査数 | H I 抗体価 (JaGAR 01株) |    |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 抗体保有率<br>( $\geq 10$ ) | 2ME**<br>感受性抗体陽性率 | ウイルス分離* |
|----------|-----|---------------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|------|------|-------------|------------------------|-------------------|---------|
|          |     | <10                 | 10 | 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | 640 | 1280 | 2560 | $\geq 5120$ |                        |                   |         |
| 80-1-23  | 50  | 44                  | 1  |    | 2  | 1  | 1   | 1   |     |      |      |             | 12%                    | 0%                | 0/44    |
| 2-20     | 50  | 48                  | 1  | 1  |    |    |     |     |     |      |      |             | 4                      |                   | 0/48    |
| 3-19     | 50  | 45                  | 1  | 3  |    |    |     | 1   |     |      |      |             | 10                     | 0                 | 0/45    |
| 4-23     | 50  | 49                  | 1  |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 2                      |                   | 0/49    |
| 5-21     | 50  | 48                  | 2  |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 4                      |                   | 0/48    |
| 6-18     | 50  | 46                  | 2  | 2  |    |    |     |     |     |      |      |             | 8                      |                   | 0/46    |
| 7- 2     | 50  | 49                  | 1  |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 2                      |                   | 0/49    |
| 7- 9     | 50  | 48                  | 2  |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 4                      |                   | 0/48    |
| 7-16     | 50  | 50                  |    |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 0                      |                   | 0/50    |
| 7-23     | 50  | 49                  | 1  |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 2                      |                   | 0/49    |
| 7-30     | 50  | 44                  | 3  | 2  | 1  |    |     |     |     |      |      |             | 12                     | 0                 | 0/44    |
| 8- 6     | 50  | 47                  | 3  |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 6                      |                   | 0/47    |
| 8-12     | 50  | 49                  | 1  |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 2                      |                   | 0/49    |
| 8-20     | 50  | 46                  | 3  | 1  |    |    |     |     |     |      |      |             | 8                      |                   | 0/46    |
| 8-27     | 50  | 46                  | 4  |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 8                      |                   | 0/46    |
| 9- 3     | 50  | 50                  |    |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 0                      |                   | 0/50    |
| 9-10     | 50  | 50                  |    |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 0                      |                   | 0/50    |
| 9-17     | 50  | 43                  | 3  |    |    |    | 1   | 2   |     | 1    |      |             | 14                     | 2                 | 0/43    |
| 9-24     | 50  | 40                  |    |    |    |    | 2   | 3   | 5   |      |      |             | 20                     | 14                | 0/40    |
| 10- 1    | 50  | 44                  |    |    | 1  |    |     | 1   | 1   | 2    |      | 1           | 12                     | 10                | 0/44    |
| 10- 8    | 50  | 34                  | 1  |    |    | 1  | 1   | 1   | 4   | 8    |      |             | 32                     | 20                | 0/34    |
| 10-15    | 50  | 17                  |    | 1  |    |    | 1   | 7   | 9   | 11   | 3    | 1           | 66                     | 10                | ***1/17 |
| 10-22    | 50  | 39                  |    | 2  |    |    |     |     | 1   | 4    | 4    |             | 22                     | 4                 | ***1/39 |
| 11-19    | 50  | 40                  | 1  |    | 1  | 1  |     | 4   | 1   | 2    |      |             | 20                     | 2                 | 0/40    |
| 12-10    | 50  | 38                  |    | 1  |    |    |     | 2   | 5   | 2    | 2    |             | 24                     | 0                 | 0/38    |
| 81-1-28  | 50  | 31                  | 2  | 1  |    | 2  | 2   | 4   | 3   | 3    | 1    | 1           | 38                     | 0                 | 0/31    |
| 2-18     | 50  | 47                  | 1  | 1  |    |    |     |     | 1   |      |      |             | 6                      | 0                 | 0/47    |
| 3-18     | 50  | 37                  | 5  | 1  |    | 1  | 2   | 2   | 1   | 1    |      |             | 26                     | 0                 | 0/37    |
| 4-22     | 50  | 42                  | 6  | 2  |    |    |     |     |     |      |      |             | 16                     |                   | 0/42    |
| 5-19, 20 | 50  | 48                  |    |    |    |    | 2   |     |     |      |      |             | 4                      | 0                 | 0/48    |
| 6-15, 17 | 50  | 49                  |    |    | 1  |    |     |     |     |      |      |             | 2                      | 0                 | 0/49    |
| 6-29, 30 | 50  | 49                  | 1  |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 2                      |                   | 0/49    |
| 7- 1     |     |                     |    |    |    |    |     |     |     |      |      |             |                        |                   |         |
| 7- 6, 7  | 50  | 50                  |    |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 0                      |                   | 0/50    |
| 7-13, 14 | 50  | 50                  |    |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 0                      |                   | 0/50    |
| 7-20, 21 | 50  | 50                  |    |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 0                      |                   | 0/50    |
| 7-27, 28 | 50  | 50                  |    |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 0                      |                   | 0/50    |
| 8- 3     | 50  | 48                  | 2  |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 4                      |                   | 0/48    |
| 8-10     | 50  | 50                  |    |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 0                      |                   | 0/50    |
| 8-17     | 50  | 50                  |    |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 0                      |                   | 0/50    |
| 8-24     | 50  | 49                  | 1  |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 2                      |                   | 0/49    |
| 8-31     | 50  | 50                  |    |    |    |    |     |     |     |      |      |             | 0                      |                   | 0/50    |
| 9- 7     | 50  | 49                  |    |    |    |    | 1   |     |     |      |      |             | 2                      | 2                 | 0/49    |
| 9-14     | 50  | 46                  | 1  | 1  |    |    | 1   | 1   |     |      |      |             | 8                      | 4                 | 0/46    |
| 9-28     | 50  | 34                  | 1  |    | 2  | 2  | 2   | 2   | 5   | 2    |      |             | 32                     | 30                | 0/34    |
| 10- 5    | 50  | 40                  | 2  |    |    |    |     |     | 6   | 2    |      |             | 20                     | 14                | ***1/40 |
| 10-12    | 50  | 46                  |    |    |    |    | 3   |     |     |      | 1    |             | 8                      | 6                 | 0/46    |
| 10-19    | 50  | 35                  | 1  | 1  |    |    |     | 4   | 4   | 3    | 2    |             | 30                     | 16                | 0/35    |
| 10-26    | 50  | 41                  | 1  | 1  |    |    |     | 2   | 4   | 1    |      |             | 18                     | 4                 | 0/41    |
| 11-16    | 50  | 40                  | 1  |    |    | 3  | 1   | 1   | 4   |      |      |             | 20                     | 8                 | 0/40    |
| 12-14    | 50  | 39                  |    |    | 3  |    | 7   | 1   |     |      |      |             | 22                     | 0                 | 0/39    |

\* ウイルス分離は、HI 抗体価10以下について乳のみマウスを用いて行なった。

\*\* 2ME感受性抗体陽性率(%)=2ME感受性陽性数/検査頭数(50)×100

\*\*\* ウイルス分離陽性例 { 1980年10月15日 (JaTan 1/80), 10月22日 (JaTan 2/80)  
1981年10月5日 (JaTan 1/81)



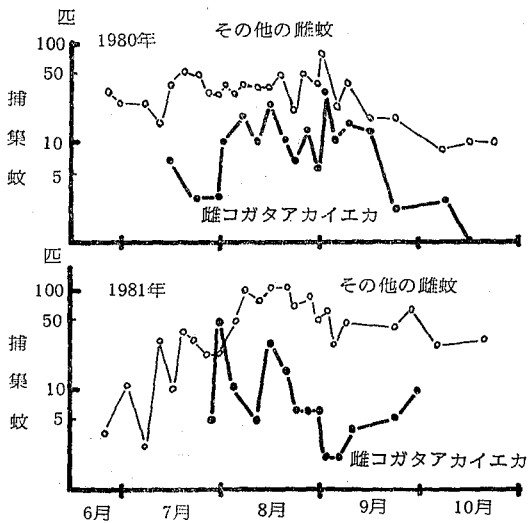


図 1. 雌コガタアカイエカの消長

体獲得率の上昇期は最近において1～2か月遅れている。また全国的にブタでの抗体獲得率からの日脳ウイルス汚染が推定された地区をみても、日脳の感染流行の様相に変化がうかがわれる。

**コガタアカイエカの消長** 1980年6月24日～10月21日, 1981年6月23日～10月20日に各25回, 都心某地区と衛研鶏舎にライトトラップを設置して蚊を捕集し, 雌コガタアカイエカの消長およびウイルス分離試験を行った。同期間中捕集した雌コガタアカイエカの消長は図1に示した。

雌コガタアカイエカが捕集されたのは, 7月中旬以降9月までの期間であった。1980年において雌コガタアカイエカの吸血蚊107匹, 未吸血蚊97匹, その他の雌蚊906匹, 1981年においては各々90匹, 86匹, 1175匹を捕集した。

捕集雌コガタアカイエカ数とブタ血清における日脳HI抗体獲得率とを比較すると, 蚊の捕集ピーク時はブタでの日脳感染ピーク時よりも2か月早期であり, ブタでの日脳感染流行が拡大されつつあるときは, すでに雌コガタアカイエカは捕集されていなかった。ブタでの2ME抗体陽性数が2年とも11月中旬までみられることは, 距離的に離れた飼育場から飼育場への飛来する蚊による日脳ウイルスの伝播はないが, ひとつの飼育場内にとどまっていた蚊によるウイルスの伝播はくり返しおきており, そのために飼育地間に差がでてくと説明すれば容易であろう。

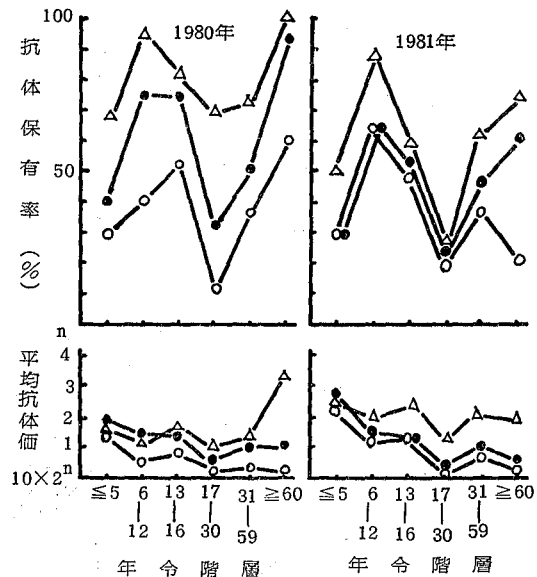


図 2. 1980・1981年における都民の日脳抗体保有率と平均抗体価

○HI抗体 (中山株)  
●HI抗体 (JaGAr 01株)  
△中和抗体 (JaGAr 01株)

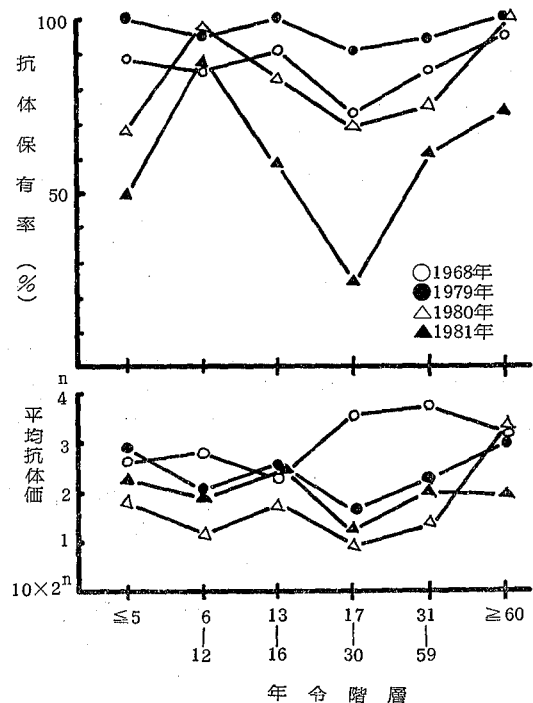


図 3. 日脳中和抗体保有率の年次推移

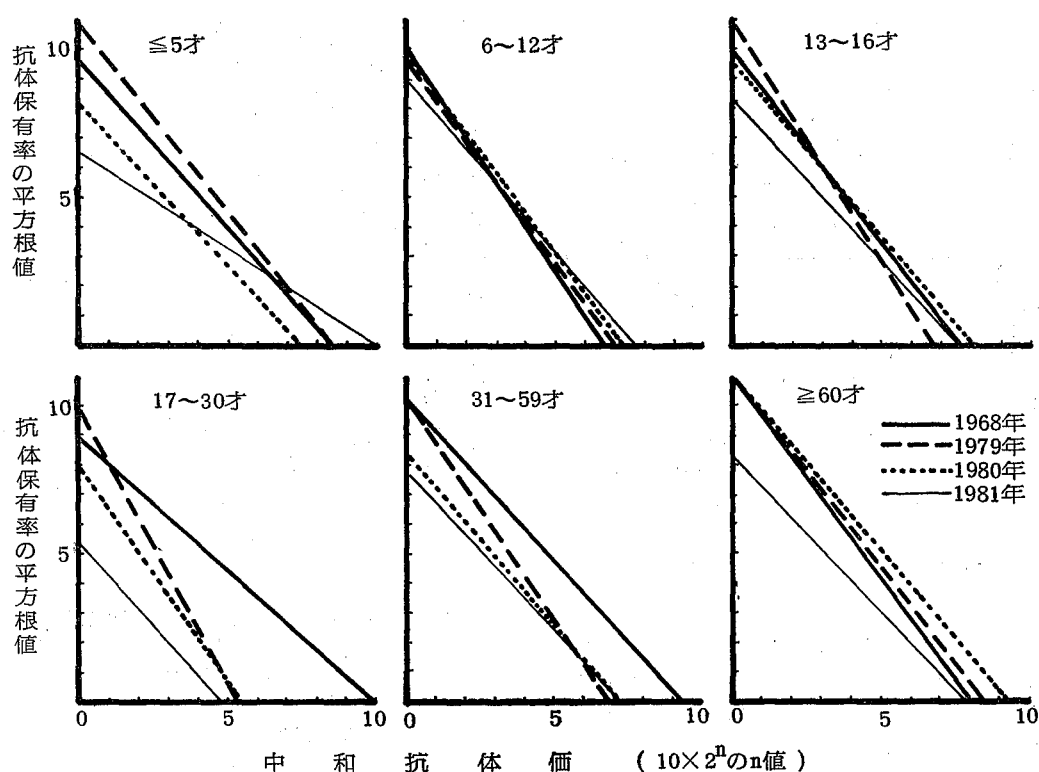


図 4. 日脳中和抗体保有率の回帰直線における年次推移

雌コガタアカイエカの吸血蚊・未吸血蚊を捕集月日、地区別に1980年は60プール、1981年は43プールにわけて乳剤を作り、乳のみマウスの脳内接種法によりウイルス分離試験を試みたが全例陰性であった。また同期間中衛研鶏舎のライトトラップおきで5羽のウサギを飼育し、日脳抗体獲得状況を調査したが、抗体は検出されなかった。

**健康都民血清の日脳抗体保有調査成績** 1980, 1981年の日脳流行期直前の5～8月における一般都民の日脳ウイルス抗体保有状況を調査する目的で、同時点に採取した健康都民血清614件（1980年：295件、1981年：319件）について、日脳ウイルス JaGAr 01株・中山株抗原に対するH I価と JaGAr 01株抗原に対する中和抗体価を測定し、調査成績を図2に示した。

H I抗体保有率は兩年とも12歳以下の低年齢階層で年齢とともに上昇した。その後は17～30歳の年齢階層において最低値を示し、再び上昇する傾向を示していた。

平均H I抗体価と比較してみると、低年齢階層において高く、年齢上昇とともに低下している。特に5歳以下

では調査の前年度にワクチンを受けた者のなかに、高い抗体価（H I価： $10 \times 2^3 \sim 10 \times 2^6$ ）を示す者があった。ワクチン接種を受けていても抗体上昇のみられない者もあったが、総体的にみればワクチン接種効果のあったことを示唆していると思われる<sup>7,8)</sup>。

日脳中和抗体保有率を年齢別にみると、1980年においてはH I抗体保有率でみられたような年齢階層間の差異は顕著でなくなっていた。しかし1981年においてはH I抗体保有率と同様に17～30歳の年齢階層の低下が顕著であった。

1968年と最近3か年の中和抗体保有状況について、年齢階層別の年次推移を図3に示した。

中和抗体価  $10 \times 2^0$  以上の抗体保有率にはバラツキがあるが、1981年以外は大差はなかった。しかし平均抗体価についてみれば、17～30歳・31～59歳の年齢階層において、1968年は  $10 \times 2^{3.5} \sim 10 \times 2^{3.7}$  の抗体価を示していたのに対して、最近3か年は  $10 \times 2^{0.93} \sim 10 \times 2^{2.2}$  に低下していた。その他の年齢階層においては年次によって大きな差はなかった。

各年齢階層別の日脳中和抗体保有状況の年次推移を回歸分析法<sup>4)</sup>によって検討し、その結果を図4に示した。

5歳以下の低年齢階層では、1980・1981年と抗体保有率の低下がみられた。また17～30歳の年齢階層において著明な変化がみられた。すなわち高い抗体価をもつ比率および $10 \times 2^0$ 以上の中和抗体価をもつ比率とも、年次にもなつて減少していた。17～30歳の青壮年層が、最近の都内での日脳ウイルス汚染低下の実態を一番反映しているものと推定された。

6～12歳・13～16歳の年齢階層では、各年次の抗体保有状況に変化はみられなかった。

### 結 果

1980・1981年の東京都における日本脳炎ウイルスの汚染状況を知る目的で、都内飼育ブタの抗体獲得調査、流行期直前の健康都民の抗体保有調査を実施し、次の結果を得た。

1) 1981年8月都内において発生した日脳患者は、血清学的検索によって真性の日脳患者であると確認された。

2) 都内飼育ブタの日脳HI抗体獲得率、2ME感受性抗体陽性ブタの出現状況から、両年におけるブタでの日脳の都内流行は9月中旬から10月にかけて発生し、ピークは1980年は10月初旬、1981年は9月下旬にあったと推測した。

3) 1980年10月15日、22日、1981年10月5日採取のHI抗体陰性ブタ血清から各1株のウイルスを検出した。

4) 健康都民血清における日脳HI抗体保有調査において、年齢階層間で差がみられ、17～30歳の年齢階層が最も低率であった。

5) 日脳中和抗体保有調査成績では、1981年をのぞいて抗体保有率には差がみられなかった。また平均中和抗体価についてみると、17～30歳・31～59歳の年齢階層で著明な低下がみられたが、その他では大きな変化はなかった。

### 文 献

- 1) 厚生省保健情報課：全国日本脳炎情報，1974～1981
- 2) 辺野喜正夫，岩崎謙二，坂井千三，浅田富士子，高山康郎：東京衛研年報，9，25，1957
- 3) 蔽内 清，岩崎謙二，村上 一，坂井富士子，柏木義勝：東京衛研年報，20，39，1967
- 4) 岩崎謙二：東京衛研年報，26-1，81，1975
- 5) 吉田靖子，関根整治，岩崎謙二：東京衛研年報，31-1，29，1980
- 6) 厚生省：微生物検査必携，ウイルス・リケッチア検査，第2版，249，1978，日本公衆衛生協会，東京
- 7) 小林 譲：臨床とウイルス，10，17，1982
- 8) 千々和勝己他：臨床とウイルス，10，75，1982

## 飼育ブタにおける日本脳炎ウイルス感染流行の予測

岩崎 謙二\*, 薮内 清\*, 吉田 靖子\*, 関根 整治\*

### Prospective Study of Japanese Encephalitis by Means of Antibody Determination in Swine

KENJI IWASAKI\*, KIYOSHI YABUCHI\*, YASUKO YOSHIDA\*  
and SEIJI SEKINE\*

**Keywords:** 予測 prospective study, 日本脳炎 Japanese encephalitis, ブタ swine, HI 抗体 HI antibody

#### 緒 言

日本脳炎（日脳）ウイルスの自然感染はウイルス保有蚊の吸血行動で伝播され、わが国では毎年夏～秋にヒトや各種動物の間で感染流行がみられる。通常この感染は不顕性で終わるので流行実態は抗体調査により明らかになる。飼育ブタは感染感受性、抗体産生能が優れているので、抗体獲得状況から飼育地域のウイルス活動様相を把握するのに都合がよい。また感染ブタは数日間血液中に大量のウイルスが出現するので、ウイルス保有蚊を作り出す感染源としても重視されている。

著者らは1962年以降毎年、流行期における都下飼育ブタの日脳HI抗体保有状況を調査し、ブタの流行が日脳患者発生に先行すること、都内での患者発生がなくなった1968年以後ブタの抗体獲得率が年々低下し、近年は低値であることを明らかにしてきた<sup>1-13)</sup>。これら調査データに内在している流行各要因を探る目的で理論的流行曲線導入による解析も試みてきた<sup>14)</sup>。

今回は過去20年のブタ調査データについて、既報<sup>14)</sup>の理論設定で各年流行初期までの一連のデータに適合する理論流行曲線を求め、その延長で流行中期～後期の予測を試み好結果を得たので報告する。

#### 実験材料と方法

**ブタ血清** 被検血清は表2に示した各時点に、都下多摩地区で飼育したブタ（生後6～8か月）から採取した（毎回20～50頭）。

**日脳ウイルスHI試験** 術式は常法<sup>15)</sup>に準拠し、Ja-GAr 01株抗原（市販品）に対する抗体価を測定した。

**流行曲線** グラフ紙上の横軸に流行経過をとり、各時点の抗体陽性率値を縦軸の高さで表わし、各頂点を線で結び実測値流行曲線を描いた。この曲線とのずれが小

さい理論値流行曲線は表1に示したプログラムを入力したマイクロコンピュータ（NEC PC8000 シリーズ）で算出した計算値をもとにして描いた。1/2週単位の流行経過（A(I)）と実測陽性率値（B(I)）を入力し、最後に流行出発時点の感染源サイズをきめれば、実測値流行曲線とのずれが最小になる理論値曲線の各時点における累積感染発生率（抗体陽性率相当値）がプリントアウトされる。各時点の新感染発生率は直前時点の新感染発

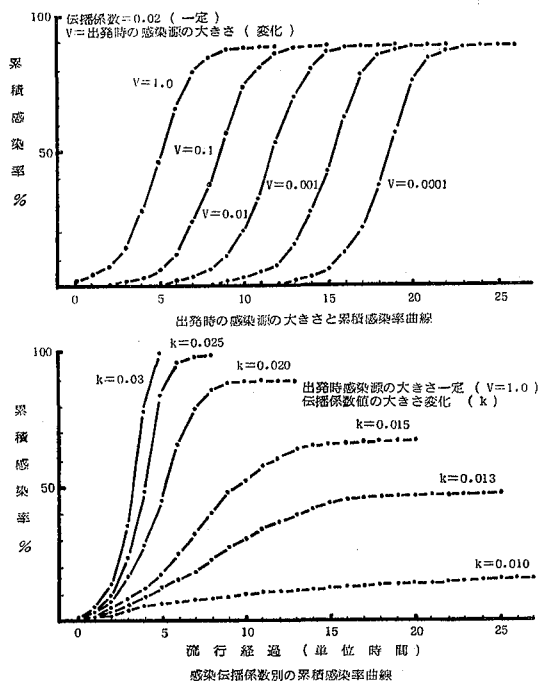


図 1. 理論累積感染率曲線

\* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表 1. 理論流行推移曲線の計算プログラム

```

10 LPRINT " ** PROGRAM NO.80-F6,1982-2-18,IWASAKI ** "
20 LPRINT " *1レンノ コウタイヨウセイリツデータ カラノ リロンチケイサン * "
30 DIM A(50),B(50),VV(55):PRINT :LPRINT :INPUT " チョウサネンジ ";YR
40 LPRINT USING " チョウサネンジ = ##### ";YR
50 PRINT :LPRINT :PRINT " * サイケツビ ト カンサツデータ * "
60 LPRINT " *サイケツビ ト カンサツデータ* "
70 FOR I=1 TO 34:LPRINT "-";NEXT I :LPRINT
80 LPRINT " セット サイケツ ケイカ ヨウセイリツ % "
90 LPRINT "NO. ツキ ニチ 1/2シュウUnit HIコウタイ"
100 FOR I=1 TO 34:LPRINT "-";NEXT I :LPRINT
110 FOR I=1 TO 50:PRINT : PRINT " NO. ";I :INPUT "ツキスウ (オフリ 999) ";D1
120 IF D1=999 THEN 170 ELSE LPRINT USING " ## ## ";I,D1;
130 INPUT " サイケツビ ";D2 :LPRINT USING " ## ";D2;
140 INPUT "ケイカ (タンイ)";A(I):LPRINT USING " ##### ";A(I);
150 INPUT "ヨウセイリツ %";B(I):LPRINT USING " ###.## ";B(I)
160 NA=A(I):N=N+1:NEXT I
170 PRINT :LPRINT :PRINT "**ケイサンノタメノ セッテイジョウケン*"
180 LPRINT "**ケイサンノタメノ セッテイジョウケン*"
190 INPUT "シリョウニスルデータセットスウ";M
200 LPRINT "シリョウニシタデータセット = NO. 1 カラ ";M
210 SC=.01:LPRINT " カリノカンセンデンパケイスウ = ";SC
220 INPUT "スタートノ カンセンゲンサイズ";IR
230 LPRINT "スタートノ カンセンゲンサイズ = ";IR :PRINT :LPRINT
240 D=0:K=1:K1=0:VV(1)=0:VV(2)=0:VV(3)=IR
250 SC=.01:SS=.001:NF=4:Q=0 :S1=30:PRINT :LPRINT
260 S2=S1:V1=IR:V3=IR :WA=(B(1)-V1) 2
270 FOR I=2 TO M:FOR J=1 TO A(I)-A(I-1):S3=100-V3:V1=S3*V1*SC
280 IF V1= 0 THEN V1=1E-08 ELSE 290
290 V3=V3+V1
300 NEXT J: W=B(I)-V3: WA=WA+W*W :NEXT I
310 S1=WA: IF K 1 THEN 330 ELSE K=K+1
320 SC=SC+SS:GOTO 260
330 IF S2 S1 THEN 320
340 K1=K1+1: IF K1 NF THEN 350 ELSE SS=SS*(-.1):GOTO 320
350 PRINT :LPRINT
360 PRINT USING " デンパケイスウ = ###.#####";SC
370 LPRINT USING " デンパケイスウ = ###.#####";SC
380 PRINT USING " ヘイキンゴサ =###.#####";SQR(S1/M)
390 LPRINT USING " ヘイキンゴサ =###.#####";SQR(S1/M)
400 PRINT :LPRINT
410 LPRINT " * ケイサンチトジッソクチ * ";:LPRINT ;YR
420 FOR I=1 TO 40:PRINT "-";NEXT I
430 FOR I=1 TO 36:LPRINT "-";NEXT I :LPRINT
440 PRINT " ケイカ アタラシイ ルイセキ ジッソク "
450 LPRINT " ケイカ アタラシイ ルイセキ ジッソク "
460 PRINT "1/2シュウカンセン% カンセン% HIコウタイ%"
470 LPRINT "1/2シュウカンセン% カンセン% HIコウタイ%"
480 FOR I=1 TO 40:PRINT "-";NEXT I
490 FOR I=1 TO 36:LPRINT "-";NEXT I:LPRINT :V1=IR:V3=IR:Q=0
500 PRINT USING"### ###.### ###.### ###.### ";Q,V1,V3,B(1)
510 LPRINT USING" ### ###.### ###.### ###.### ";Q,V1,V3,B(1)
520 S3=100-V3:V1=S3*V1*SC:V3=V3+V1:Q=Q+1:VV(Q+3)=V1
530 IF Q 40 THEN 580 :IF V1 .00001 THEN 580 :IF V3 99.999 THEN 580
540 PRINT USING"### ###.### ###.### ";Q,V1,V3;
550 LPRINT USING" ### ###.### ###.### ";Q,V1,V3;
560 FOR J=1 TO NA :IF Q=A(J) THEN 570: NEXT J :PRINT :LPRINT :GOTO 520
570 PRINT USING" ###.### ";B(J):LPRINT USING " ###.### ";B(J):GOTO 520
580 PRINT :LPRINT :INPUT"ジョウケンカエテサイケンスル 1: オフリナラ 2 ";Z
590 IF Z=1 THEN 170 :END

```

表 2. 東京都下で飼育したブタにおける日脳ウイルス HI 抗体保有調査成績

| 流行経過     |      |      | 調査年次 と H I 抗体陽性率 ( JaGAR 01株、H I 価 ≧ 1 : 10 ) |      |       |      |       |              |             |              |             |             |             |             |             |             |            |             |             |             |             |             |
|----------|------|------|-----------------------------------------------|------|-------|------|-------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 単位a      | 期    | 間    | 1962                                          | 1963 | 1964  | 1965 | 1966  | 1967         | 1968        | 1969         | 1970        | 1971        | 1972        | 1973        | 1974        | 1975        | 1976       | 1977        | 1978        | 1979        | 1980        | 1981        |
| 0        | ～    | 7・3  |                                               | 35.0 | 13.7  | 6.7  | 17.8  | 6.8          | 4.0         | 18.1         | 0.0         |             | 0.0         | 0.0         | 0.0         | 0.0         | 4.0        |             |             |             | 2.0         |             |
| 1        | 4～   | 7    |                                               |      |       | 2.9  | 1.6   |              |             | 9.1          | 0.0         | 0.0         |             |             |             | 2.0         | 0.0        | 2.0         | 4.0         | 2.0         |             | 0.0         |
| 2        | 8～   | 10   |                                               |      |       |      |       | 3.3          | 0.0         |              |             |             | 0.0         | 2.0         | 0.0         |             |            |             |             |             | 4.0         |             |
| 3        | 11～  | 14   |                                               |      | 4.6   | 0.0  | 8.9   |              |             | 0.0          | 5.0         | 0.0         |             |             |             | 0.0         | 0.0        | 22.0        | 2.0         | 6.0         |             | 0.0         |
| 4        | 15～  | 17   |                                               |      |       |      |       | 11.2         | 2.0         |              |             |             | 0.0         | 2.0         | 0.0         |             |            |             |             |             | 0.0         |             |
| 5        | 18～  | 21   |                                               |      |       | 4.3  | 0.0   |              |             | 0.0          | 0.0         | 9.0         |             |             |             | 0.0         | 0.0        | 18.0        | 6.0         | 2.0         |             | 0.0         |
| 6        | 22～  | 24   |                                               |      |       |      |       | 5.9          | 0.0         |              |             |             | 0.0         | 0.0         | 0.0         |             |            |             |             |             | 2.0         |             |
| 7        | 25～  | 28   |                                               |      |       | 1.3  | 10.7  |              |             | 0.0          | 0.0         | 0.0         |             |             |             | 2.0         | 26.0       | 4.0         | 2.0         | 0.0         |             | 0.0         |
| 8        | 29～  | 31   |                                               |      |       |      |       | <u>12.5</u>  | 2.5         |              |             |             | 0.0         | 0.0         | 0.0         |             |            |             |             |             | 12.0        |             |
| 9        | 8・1～ | 4    |                                               | 14.4 | 78.4  | 1.4  | 3.5   |              |             | 0.0          | 0.0         | 0.0         |             |             |             | 0.0         | 8.0        | 0.0         | 0.0         | 0.0         |             | 4.0         |
| 10       | 5～   | 7    |                                               |      |       |      |       | <u>42.0</u>  | 0.0         |              |             |             | 0.0         | 0.0         | 2.0         |             |            |             |             |             | 6.0         |             |
| 11       | 8～   | 11   |                                               |      | 98.3  | 7.6  | 5.2   |              |             | 0.0          | 0.0         | 0.0         |             |             |             | 0.0         | 0.0        | 12.0        | 0.0         | 2.0         |             | 0.0         |
| 12       | 12～  | 14   |                                               |      |       |      |       | <u>95.0</u>  | 0.0         |              |             | 5.0         | 0.0         | 0.0         | 4.0         |             |            |             |             |             | 2.0         |             |
| 13       | 15～  | 18   |                                               |      |       | 39.4 | 24.6  |              |             | 0.0          | 14.0        |             |             |             |             | 0.0         | 8.0        | 2.0         | 6.0         | 8.0         |             | 0.0         |
| 14       | 19～  | 21   | 77.7                                          | 4.5  | 98.1  |      |       | <u>84.8</u>  | 0.0         |              |             |             | <u>2.0</u>  | 0.0         | 0.0         |             |            |             |             |             | 8.0         |             |
| 15       | 22～  | 25   |                                               |      |       | 62.1 | 90.4  |              |             | 0.0          | 0.0         | 0.0         |             |             |             | <u>8.0</u>  | <u>6.0</u> | 10.0        | <u>4.0</u>  | 0.0         |             | 2.0         |
| 16       | 26～  | 28   | 89.1                                          |      | 100.0 |      |       | <u>100.0</u> | <u>23.0</u> |              |             |             | <u>13.0</u> | 0.0         | 6.0         |             |            |             |             |             | 8.0         |             |
| 17       | 29～  | 9・1  |                                               |      |       | 80.0 | 100.0 |              |             | <u>40.9</u>  | <u>5.0</u>  | 0.0         |             |             |             | 0.0         |            | 2.0         | 10.0        | 2.0         |             | 0.0         |
| 18       | 2～   | 4    | 100.0                                         |      | 100.0 |      |       | <u>100.0</u> | <u>42.8</u> |              |             |             | <u>6.0</u>  | 2.0         | 0.0         |             | 4.0        |             |             |             | 0.0         |             |
| 19       | 5～   | 8    |                                               |      |       | 79.5 | 80.2  |              |             | <u>76.2</u>  | 0.0         | 0.0         |             |             |             | <u>14.0</u> | 0.0        | <u>6.0</u>  | <u>18.0</u> | <u>6.0</u>  |             | <u>2.0</u>  |
| 20       | 9～   | 11   |                                               |      |       |      |       | <u>100.0</u> | <u>61.5</u> |              |             |             | 0.0         | <u>12.0</u> | 0.0         |             |            |             |             |             | 0.0         |             |
| 21       | 12～  | 15   |                                               | 98.2 |       | 93.5 | 100.0 |              |             |              | <u>50.0</u> | <u>13.0</u> |             |             |             |             | 4.0        | <u>16.0</u> | <u>14.0</u> | 0.0         |             | <u>8.0</u>  |
| 22       | 16～  | 18   |                                               | 91.8 |       |      |       | <u>40.0</u>  | <u>95.5</u> |              |             |             | <u>6.0</u>  | <u>2.0</u>  | 4.0         | <u>22.0</u> |            |             |             |             | <u>14.0</u> |             |
| 23       | 19～  | 22   |                                               |      |       | 91.7 |       |              | <u>59.1</u> | <u>36.0</u>  | <u>15.0</u> |             |             |             |             | <u>8.0</u>  | 0.0        | 22.0        | 6.0         | <u>2.0</u>  |             |             |
| 24       | 23～  | 25   |                                               |      |       |      |       | 54.5         |             |              |             |             | <u>20.0</u> |             | <u>16.0</u> |             |            |             |             |             | <u>20.0</u> |             |
| 25       | 26～  | 29   | 89.5                                          |      |       | 97.5 |       |              |             | <u>100.0</u> | <u>36.0</u> | <u>38.0</u> |             | <u>10.0</u> |             | <u>36.0</u> | <u>8.0</u> | <u>32.0</u> | <u>18.0</u> | 0.0         |             | <u>32.0</u> |
| 26       | 30～  | 10・2 |                                               |      |       |      |       | <u>100.0</u> | <u>61.8</u> |              |             |             | <u>29.0</u> | <u>29.0</u> | <u>2.0</u>  |             |            |             |             |             | <u>12.0</u> |             |
| 27       | 3～   | 6    |                                               |      |       |      |       |              |             | <u>36.4</u>  | <u>45.0</u> | 6.0         |             |             |             | <u>14.0</u> | 0.0        | <u>20.0</u> | <u>26.0</u> | 2.0         |             | <u>20.0</u> |
| 28       | 7～   | 9    | 100.0                                         |      |       | 98.6 |       |              | 54.5        |              |             |             | <u>48.0</u> | 25.0        | 0.0         |             |            |             |             |             | <u>32.0</u> |             |
| 29       | 10～  | 13   |                                               |      |       |      | 98.2  |              |             | <u>95.5</u>  | 9.0         | 4.0         |             |             |             | <u>46.0</u> | 0.0        | <u>32.0</u> | <u>14.0</u> | 8.0         |             | <u>8.0</u>  |
| 30       | 14～  | 16   |                                               |      | 98.6  | 85.7 |       |              | <u>90.9</u> |              |             |             |             | 8.0         | 4.0         |             |            |             |             |             | <u>66.0</u> |             |
| 31       | 17～  | 20   |                                               |      |       |      |       |              | 68.2        | <u>55.0</u>  | 12.0        |             | <u>30.0</u> |             |             | <u>26.0</u> | 0.0        | 8.0         | <u>40.0</u> | <u>28.0</u> |             | <u>30.0</u> |
| 32       | 21～  | 23   |                                               | 96.7 |       |      |       | 45.6         |             |              |             |             | <u>14.0</u> | 12.0        |             |             |            |             |             | <u>22.0</u> |             |             |
| 33       | 24～  | 27   | 100.0                                         |      |       |      |       |              |             | 72.7         | 55.0        | 17.0        | <u>17.0</u> |             |             |             | 2.0        | <u>22.0</u> | 12.0        | <u>8.0</u>  |             | <u>18.0</u> |
| 34       | 28～  | 30   |                                               |      |       |      |       |              |             |              |             |             | <u>29.0</u> | <u>6.0</u>  | 0.0         | <u>24.0</u> |            |             |             |             |             |             |
| 都内の年間患者数 |      |      | 52                                            | 16   | 64    | 30   | 32    | 43           |             |              |             |             |             |             |             |             |            |             |             |             |             |             |

a: 1/2週が1単位

1967年以降のデータで \_\_\_\_\_ を付してあるのは 2ME 感受性抗体陽性例を含む

表 3. 1967年流行経過各時点の実測抗体獲得率とその理論計算値

| 流行経過<br>単位 a 月 日 |   |    | H I 抗体陽性率 % |       |      |      |      |      |      |      |      |
|------------------|---|----|-------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|
|                  |   |    | 実測値         | 理論計算値 |      |      |      |      |      |      |      |
|                  |   |    |             | A%    | B    | C    | D    | E    | F    | G    | H    |
| 0                | 7 | 3  | 0.0         | 0.0   | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  |
| 1                |   |    |             | 0.0   | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  |
| 2                |   | 10 | 0.0         | 0.1   | 0.1  | 0.1  | 0.1  | 0.1  | 0.1  | 0.1  | 0.1  |
| 3                |   |    |             | 0.3   | 0.2  | 0.2  | 0.2  | 0.2  | 0.2  | 0.2  | 0.2  |
| 4                |   | 17 | 0.0         | 0.8   | 0.5  | 0.5  | 0.5  | 0.5  | 0.5  | 0.5  | 0.5  |
| 5                |   |    |             | 2.2   | 1.1  | 1.0  | 1.1  | 1.0  | 1.1  | 1.1  | 1.1  |
| 6                |   | 24 | 5.9         | 5.8   | 2.6  | 2.3  | 2.4  | 2.4  | 2.4  | 2.4  | 2.4  |
| 7                |   |    |             | 15.0  | 5.9  | 5.0  | 5.3  | 5.2  | 5.3  | 5.3  | 5.4  |
| 8                |   | 31 | 12.5        | 35.9  | 13.0 | 10.8 | 11.6 | 11.4 | 11.5 | 11.7 | 11.8 |
| 9                |   |    |             | 72.0  | 27.3 | 22.4 | 24.2 | 23.7 | 24.0 | 24.4 | 24.7 |
| 10               | 8 | 7  | 42.0        | 99.1  | 51.2 | 42.6 | 45.9 | 45.0 | 45.5 | 46.1 | 46.6 |
| 11               |   |    |             | 99.8  | 70.0 | 68.6 | 72.4 | 71.4 | 72.0 | 72.7 | 73.3 |
| 12               |   | 14 | 95.0        | 99.8  | 91.6 | 86.9 | 89.0 | 88.5 | 88.8 | 89.1 | 89.5 |
| 13               |   |    |             | 99.8  | 94.3 | 92.3 | 93.1 | 92.9 | 93.1 | 93.2 | 93.3 |
| 14               |   | 21 | 84.8        | 99.8  | 94.6 | 93.2 | 93.8 | 93.6 | 93.7 | 93.8 | 93.9 |
| 15               |   |    |             | 99.8  | 94.6 | 93.3 | 93.9 | 93.7 | 93.8 | 93.9 | 94.0 |
| 16               |   | 28 | 100.0       | 99.8  | 94.7 | 93.4 | 93.9 | 93.7 | 93.8 | 93.9 | 94.0 |
| 17               |   |    |             | 99.8  | 94.7 | 93.4 | 93.9 | 93.7 | 93.8 | 93.9 | 94.0 |
| 18               | 9 | 4  | 100.0       | 99.8  | 94.7 | 93.4 | 93.9 | 93.7 | 93.8 | 93.9 | 94.0 |
| 19               |   |    |             | 99.8  | 94.7 | 93.4 | 93.9 | 93.7 | 93.8 | 93.9 | 94.0 |
| 20               |   | 11 | 100.0       | 99.8  | 94.7 | 93.4 | 93.9 | 93.7 | 93.8 | 93.9 | 94.0 |

※A: 7月3日～7月24日のデータを使って算出 伝播係数 0.0268584

B " ～7月31日 " " 0.0230314

C " ～8月7日 " " 0.0224101

D " ～8月14日 " " 0.0226558

E " ～8月21日 " " 0.0225878

F " ～8月28日 " " 0.0226306

G " ～9月4日 " " 0.0226717

H " ～9月11日 " " 0.0227114

単位 a: 表1に同じ

生率(感染源)と当該時点の感受性個体残存率とウイルス伝播係数の積になるというのが基本設定である。

図1に示したように理論値曲線は0時点の感染源(V)が大きくなるほど曲線の立上りすなわち流行の急拡大期が早い時点でおこり、ウイルス伝播係数(k)が大となるほど曲線の到達上限すなわち流行規模も大となる。

#### 実験成績と考察

1) 1962～81年における都下飼育ブタの日脳ウイルス H I 抗体保有調査成績 各年次に調査した都下飼育ブタの H I 抗体獲得率 (JaGAr 01株抗原, H I 抗体価1:10以上) と都内の年次別日脳患者発生数を表2に示した。

都内での日脳患者発生があった1967年以前の各年は、8月末までに抗体獲得率が100%ないしそれに近い値を示し、抗体獲得率の急上昇期(流行曲線の立上り)が早い年次ほど患者発生数は多くなっていた。

1967年以後は2ME感受性抗体についても調査した。2ME感受性抗体陽性は近い過去の感染であることを裏づけるので、この調査によって流行開始期や終息期が想定できる。H I 抗体および2ME感受性抗体陽性率の調査結果から、患者発生はなくなった1968年以降の流行規模は縮小し、流行発生期は季節的に遅れたことが明らかになった。

表 4. 東京都下で飼育したブタにおける日脳ウイルス HI 抗体保有理論計算値成績

| 流行経過<br>単 位 <sup>a</sup> | 調査年次 と HI 抗体陽性率 ( 計算値 ) |      |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------------------|-------------------------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                          | 1962                    | 1963 | 1964  | 1965 | 1966 | 1967 | 1968 | 1969 | 1970 | 1971 | 1972 | 1973 | 1974 | 1975 | 1976 | 1977 | 1978 | 1979 | 1980 | 1981 |
| 0                        | 0.0                     | 0.0  | 0.0   | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  |
| 1                        | 0.0                     | 0.0  | 0.0   | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  |
| 2                        | 0.0                     | 0.0  | 0.1   | 0.0  | 0.0  | 0.1  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  |
| 3                        | 0.0                     | 0.0  | 0.3   | 0.0  | 0.0  | 0.2  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  |
| 4                        | 0.1                     | 0.0  | 0.9   | 0.0  | 0.1  | 0.5  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  |
| 5                        | 0.1                     | 0.0  | 2.4   | 0.1  | 0.1  | 1.1  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  |
| 6                        | 0.2                     | 0.0  | 6.4   | 0.2  | 0.3  | 2.6  | 0.1  | 0.1  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  |
| 7                        | 0.6                     | 0.0  | 16.7  | 0.4  | 0.6  | 5.9  | 0.1  | 0.1  | 0.1  | 0.1  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.1  | 0.0  | 0.1  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  |
| 8                        | 1.3                     | 0.1  | 40.1  | 0.8  | 1.5  | 13.0 | 0.2  | 0.3  | 0.1  | 0.1  | 0.1  | 0.1  | 0.0  | 0.1  | 0.0  | 0.1  | 0.0  | 0.1  | 0.0  | 0.0  |
| 9                        | 2.8                     | 0.2  | 78.4  | 1.7  | 3.4  | 27.3 | 0.4  | 0.4  | 0.1  | 0.1  | 0.1  | 0.1  | 0.0  | 0.1  | 0.0  | 0.1  | 0.0  | 0.1  | 0.0  | 0.0  |
| 10                       | 6.3                     | 0.4  | 100.0 | 3.6  | 7.7  | 51.2 | 0.8  | 0.8  | 0.2  | 0.2  | 0.1  | 0.1  | 0.0  | 0.2  | 0.0  | 0.1  | 0.0  | 0.1  | 0.0  | 0.0  |
| 11                       | 13.7                    | 0.9  | 100.0 | 7.5  | 17.0 | 78.0 | 1.3  | 1.4  | 0.3  | 0.2  | 0.2  | 0.1  | 0.0  | 0.3  | 0.0  | 0.2  | 0.0  | 0.2  | 0.1  | 0.1  |
| 12                       | 28.2                    | 1.9  | 100.0 | 15.3 | 34.9 | 91.6 | 2.4  | 2.6  | 0.5  | 0.3  | 0.2  | 0.2  | 0.1  | 0.5  | 0.0  | 0.3  | 0.1  | 0.3  | 0.1  | 0.1  |
| 13                       | 51.8                    | 4.0  | 100.0 | 29.2 | 61.9 | 94.3 | 4.1  | 4.5  | 0.8  | 0.5  | 0.3  | 0.3  | 0.1  | 0.7  | 0.1  | 0.4  | 0.1  | 0.4  | 0.2  | 0.2  |
| 14                       | 77.7                    | 8.5  | 100.0 | 50.3 | 85.9 | 94.6 | 7.2  | 7.9  | 1.2  | 0.7  | 0.4  | 0.4  | 0.1  | 1.1  | 0.1  | 0.5  | 0.1  | 0.6  | 0.3  | 0.3  |
| 15                       | 90.8                    | 17.2 | 100.0 | 72.7 | 93.7 | 94.6 | 12.3 | 13.5 | 1.8  | 1.1  | 0.6  | 0.6  | 0.2  | 1.7  | 0.1  | 0.8  | 0.2  | 0.8  | 0.4  | 0.4  |
| 16                       | 93.5                    | 32.9 | 100.0 | 85.8 | 94.9 | 94.7 | 20.3 | 22.2 | 2.8  | 1.6  | 0.9  | 0.8  | 0.3  | 2.5  | 0.2  | 1.1  | 0.3  | 1.1  | 0.7  | 0.7  |
| 17                       | 93.9                    | 55.5 | 100.0 | 89.7 | 95.0 | 94.7 | 31.6 | 34.4 | 4.2  | 2.3  | 1.2  | 1.1  | 0.4  | 3.8  | 0.3  | 1.6  | 0.4  | 1.6  | 1.1  | 1.1  |
| 18                       | 94.0                    | 77.3 | 100.0 | 90.6 | 95.0 | 94.7 | 45.5 | 48.8 | 6.3  | 3.4  | 1.8  | 1.5  | 0.6  | 5.7  | 0.4  | 2.3  | 0.6  | 2.3  | 1.8  | 1.8  |
| 19                       | 94.0                    | 88.0 | 100.0 | 90.8 | 95.0 | 94.7 | 59.0 | 62.1 | 9.3  | 5.0  | 2.5  | 2.2  | 1.0  | 8.4  | 0.6  | 3.2  | 0.9  | 3.3  | 3.0  | 2.9  |
| 20                       | 94.0                    | 90.8 | 100.0 | 90.8 | 95.0 | 94.7 | 68.9 | 71.2 | 13.5 | 7.1  | 3.4  | 3.0  | 1.4  | 12.3 | 0.9  | 4.6  | 1.4  | 4.7  | 4.8  | 4.7  |
| 21                       | 94.0                    | 91.3 | 100.0 | 90.8 | 95.0 | 94.7 | 74.4 | 75.9 | 19.1 | 10.1 | 4.8  | 4.1  | 2.2  | 17.4 | 1.4  | 6.4  | 2.2  | 6.6  | 7.6  | 7.5  |
| 22                       | 94.0                    | 91.4 | 100.0 | 90.8 | 95.0 | 94.7 | 76.9 | 77.9 | 26.1 | 14.1 | 6.6  | 5.7  | 3.3  | 23.9 | 2.0  | 8.9  | 3.3  | 9.1  | 11.9 | 11.7 |
| 23                       | 94.0                    | 91.4 | 100.0 | 90.8 | 95.0 | 94.7 | 77.9 | 78.7 | 34.1 | 19.1 | 9.0  | 7.7  | 5.0  | 31.4 | 3.0  | 12.1 | 4.9  | 12.4 | 18.0 | 17.8 |
| 24                       | 94.0                    | 91.4 | 100.0 | 90.8 | 95.0 | 94.7 | 78.4 | 79.0 | 42.2 | 25.1 | 12.0 | 10.3 | 7.4  | 39.3 | 4.4  | 16.3 | 7.3  | 16.7 | 26.3 | 26.0 |
| 25                       | 94.0                    | 91.4 | 100.0 | 90.8 | 95.0 | 94.7 | 78.5 | 79.1 | 49.4 | 31.8 | 15.9 | 13.7 | 10.8 | 46.7 | 6.4  | 21.3 | 10.7 | 21.7 | 36.3 | 36.0 |
| 26                       | 94.0                    | 91.4 | 100.0 | 90.8 | 95.0 | 94.7 | 78.6 | 79.2 | 55.0 | 38.6 | 20.4 | 17.7 | 15.5 | 52.7 | 9.1  | 26.9 | 15.4 | 27.5 | 46.7 | 46.4 |
| 27                       | 94.0                    | 91.4 | 100.0 | 90.8 | 95.0 | 94.7 | 78.6 | 79.2 | 58.9 | 44.7 | 25.6 | 22.3 | 21.6 | 57.0 | 12.9 | 32.8 | 21.4 | 33.4 | 55.9 | 55.5 |
| 28                       | 94.0                    | 91.4 | 100.0 | 90.8 | 95.0 | 94.7 | 78.6 | 79.2 | 61.3 | 49.7 | 31.0 | 27.4 | 28.9 | 59.9 | 17.8 | 38.6 | 28.7 | 39.2 | 62.4 | 62.2 |
| 29                       | 94.0                    | 91.4 | 100.0 | 90.8 | 95.0 | 94.7 | 78.6 | 79.2 | 62.8 | 53.4 | 36.3 | 32.6 | 36.8 | 61.7 | 23.8 | 43.7 | 36.6 | 44.3 | 66.5 | 66.3 |
| 30                       | 94.0                    | 91.4 | 100.0 | 90.8 | 95.0 | 94.7 | 78.6 | 79.2 | 63.6 | 56.0 | 41.4 | 37.5 | 44.5 | 62.7 | 30.7 | 47.8 | 44.3 | 48.3 | 68.7 | 68.6 |
| 31                       | 94.0                    | 91.4 | 100.0 | 90.8 | 95.0 | 94.7 | 78.6 | 79.2 | 64.1 | 57.7 | 45.1 | 41.8 | 51.4 | 63.3 | 37.8 | 50.9 | 50.8 | 51.3 | 69.9 | 69.8 |
| 32                       | 94.0                    | 91.4 | 100.0 | 90.8 | 95.0 | 94.7 | 78.6 | 79.2 | 64.4 | 58.7 | 48.2 | 45.4 | 56.0 | 63.6 | 44.4 | 53.1 | 55.8 | 53.5 | 70.4 | 70.4 |
| 33                       | 94.0                    | 91.4 | 100.0 | 90.8 | 95.0 | 94.7 | 78.6 | 79.2 | 64.5 | 59.4 | 50.5 | 48.1 | 59.3 | 63.8 | 49.9 | 54.6 | 59.2 | 54.9 | 70.7 | 70.6 |
| 34                       | 94.0                    | 91.4 | 100.0 | 90.8 | 95.0 | 94.7 | 78.6 | 79.2 | 64.6 | 59.8 | 52.1 | 50.0 | 61.3 | 63.9 | 54.0 | 55.6 | 61.3 | 55.8 | 70.8 | 70.8 |

a: 表 1. に同じ



2) 理論値流行曲線を応用した流行予測 表2にある1967年の調査データについて、7月3日～7月31日まで、8月7日まで、8月14日まで、8月21日まで、8月28日まで、9月4日まで、9月11日までの7系列の実測陽性率値流行曲線に適合するそれぞれの理論値曲線の計算累積感染発生率値を表3に示した。2ME感受性抗体陽性例出現前の7月3日、10日、17日のHI抗体陽性率は計算時0%として扱った。7系列の計算値は全経過の対応実測値とほとんど差をみとめなかった。

これは流行初期(7月31日)までの実測陽性率値を参考にして、流行中期～後期の経過を予測することが可能であることを示唆していると考え、同様の解析を1964, 1965, 1966, 1968, 1969年についても行った。結果は1967年と全く同様であり、予測の可能性をより強くした。

表2に示した20年の調査データについて、各年次流行初期までの実測値を参考に、一連の理論計算値を求めて表4に示した。表2との対比を行うと、1970年以前の各年は全経過を通して計算値と対応実測値がよく一致していたが、10月以降になると計算値が実測値を上回った。

1970年以前と異なって1971年以後の流行発生は季節的に遅れ、10月にずれこんでいる。10月以降になると日脳ウイルス伝播の主役であるコガタアカイエカの外界での活動はほとんど停止してしまうので、上記両値のずれはそれによる影響がでたものと思われる。

理論値流行の進行を9月末で停止させて対応実測値と比較すると前述のずれは縮小される。

近年の10月以降における実測抗体陽性率の経過推移をみると、上下変動がはげしく、流行経過が把握し難い。これは10月以降の流行が局地的に不均等に進行している反映と考えられる。

以上は短い生涯で終り、生存中2回以上の流行を経験しない飼育ブタにおける感染流行の予測について検討してきたが、ヒトにおける予測となると関連要因はますます複雑になる。しかし基本的にはブタの感染流行と一致するところも多いはずである。

### 結 論

都下飼育ブタを対象に調査した日脳ウイルスHI抗体獲得率を指標に、流行中期～後期における経過推移を数理論的に予測する試みを行った。

1) 実測抗体陽性率を指標にした流行推移曲線に適合する理論感染発生率推移曲線の導入によって予測の試みを行った。実測抗体陽性率値に相当する理論累積感染発

生率は、流行経過を1/2週単位で刻み、各時点の新感染発生率が直前時点の新感染発生率(感染源)と当該時点の感受性個体残存率とウイルス伝播係数の積になるとの設定で算出した。

2) 上記の設定で、1962～1981年のブタの日脳HI抗体調査データについて、各年次別に流行初期までの一連の実測値に適合する理論流行曲線を描き、その計算値と全経過の実測値と対比したところ、1970年以前の9か年は全経過を通してよく一致したが、流行が10月までずれこんだ1971年以後の各年は9月末まではよく一致し、10月以降は実測値を上回る結果になった。

3) 以上の実験結果から、9月末以前のブタの日脳ウイルス感染流行は、流行初期までの実測抗体陽性率推移を参考にして、その後の流行経過を数理論的に予測できると考えた。

### 文 献

- 1) 藪内 清, 岩崎謙二, 村上 一他: 東京衛研年報, 20, 39, 1969
- 2) 藪内 清, 岩崎謙二, 坂井富士子 他: 東京衛研年報, 21, 19, 1970
- 3) 藪内 清, 佐々木路子, 坂井富士子他: 東京衛研年報, 22, 57, 1971
- 4) 藪内 清, 佐々木路子, 坂井富士子他: 東京衛研年報, 23, 35, 1972
- 5) 藪内 清, 坂井富士子, 伊藤忠彦 他: 東京衛研年報, 24, 75, 1973
- 6) 藪内 清, 坂井富士子, 伊藤忠彦 他: 東京衛研年報, 25, 53, 1974
- 7) 柳沢靖子, 藪内 清, 伊藤忠彦他: 東京衛研年報, 26-1, 73, 1975
- 8) 吉田靖子, 藪内 清, 岩崎謙二他: 東京衛研年報, 27-1, 66, 1976
- 9) 吉田靖子, 藪内 清, 岩崎謙二他: 東京衛研年報, 28-1, 40, 1977
- 10) 吉田靖子, 藪内 清, 関根整治他: 東京衛研年報, 29-1, 79, 1978
- 11) 吉田靖子, 藪内 清, 関根整治他: 東京衛研年報, 30-1, 47, 1979
- 12) 吉田靖子, 関根整治, 岩崎謙二他: 東京衛研年報, 31-1, 30, 1980
- 13) 吉田靖子, 関根整治, 藪内 清他: 東京衛研年報, 33, 66, 1982
- 14) 岩崎謙二, 吉田靖子, 関根整治: 東京衛研年報, 30-1, 43, 1979
- 15) 大谷 明: 微生物検査必携ウイルス・リケッチア検査, 249, 1978, 日本公衆衛生協会, 東京

## 高倍率電子顕微鏡の撮影法

前 木 吾 市\*, 木 村 康 夫\*

### Electron Microscopy of Biological Specimens placed on Carbon Support Film strengthen with Microgrid

GOICHI MAEKI\* and YASUO KIMURA\*

1) By using about 60 Å carbon support film strengthened by plastic microgrid, we took the micrographs of rotavirus directly in 130,000 magnifications (total  $\times$  300,000) with JEM-100 B at 100 kV, and succeeded to get the electron micrographs with higher resolutions than those by the usual carbon monolayer support film.

2) We tried to improve the carbon support films, and by making use of the 'indirect' vacuum evaporation of carbon particles, we got the fine carbon support film.

3) For both rotavirus and adenovirus, we took a series of micrographs with high magnifications in the same pattern in order to obtain the optimum conditions for taking the high magnification micrographs by comparing the support films, the accelerating voltage, the astigmatism, and the electron beam damages and contamination.

4) We experimented with asbestos (cristite) in order to measure the resolving power of the electron microscope, and got 15 Å as the estimator from the micrographs of asbestos on the carbon monolayer film that were taken directly in 130,000 magnifications.

**Keywords** : electron microscopy, negative staining, rotavirus, plastic microgrid, high resolution

#### 緒 言

透過型電子顕微鏡（以下 TEM と略す）を用いてウイルス等の微生物を観察する場合、支持膜としてカーボン膜が有用であり、既報<sup>1,2)</sup>でネガティブ染色における二、三の応用例を示した。しかし急性胃腸炎の病原であるロタウイルスや、さらに小型の病原ウイルスの電顕検査による経験で、単なるカーボン膜では膜切れが生じ、強度が不足することが次第に明らかとなってきた。今回カーボン支持膜を強化する手段として、カーボン膜作製法<sup>3-6)</sup>の再検討をおこなうと共に、市販トリアホール製マイクログリッド（以下 MG と略す）による膜補強を採用し、高倍率撮影を試みたところ好結果を得たので報告する。また10万倍以上の高倍率撮影に必要な加速電圧の選択、非点収差補正、試料の電子ビーム損傷乃至コンタミおよびアスベストを用いた使用電顕性能チェック等についても実験したのであわせて報告する。

#### 実験材料

生物試料として当所微生物部ウイルス研究科で、急性

胃腸炎患者ふん便より超遠心精製したロタウイルス<sup>7)</sup>ならびにアデノウイルスを撮影対象とした。電顕性能チェック用として当所生活科学部食品添加物研究科からのアスベスト（クリソタイル・ソ連）を使用した。

MG は市販品の A 社製（200 メッシュ・カーボン補強済み）および B 社製（150 メッシュ普及品）を用いた。

#### 実験方法

##### カーボン支持膜作製法

今回使用した自製カーボン膜は、既報<sup>1)</sup>の作製法とは異なり、東大・安達式に準じた方法<sup>8)</sup>で作製した。すなわち丸い直径 3 cm のアルミ製遮蔽板を蒸発源と雲母板の間にセットし、真空中を直進する粗いカーボン粒子はカットし、回り込み現象による細かいカーボン粒子で構成された蒸着膜を水面上で剥離し、MG メッシュで掬い上げ使用に供した。こうして出来上がった支持膜を以下 MG-C 膜と略して呼ぶことにする。MG メッシュはカーボンを掬う直前にメッシュセメントで処理を行い、また MG-C 膜は染色前に I B-I 型イオンクリーナで親水

\* 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

化処理をして用いた。

#### ネガティブ染色法

染色剤として常用の2% PTA (pH6.0) を用いた。染色手技は既報<sup>1)</sup>の通りで、ピンセットで挟んだ MG-C 膜上に予め PTA 液の一白金耳を載せておき、試料を白金線で one touch させた後濾紙で余液を吸取る。

#### 電顕観察法

電顕は日本電子 K K 製 JEM-100B, ASID (走査像観察装置) 付き、サイドエントリー方式で、分解能はトップエントリー方式の場合で 4.5 Å (1973) とされている。加速電圧 (以下 HV と略す) は 80kV および 100kV, 電子電流は 20~30 μA 前後で使用した。ここで高倍率とは 10 万倍以上を指すことにする。TEM では 10, 13, 17 万倍 (最高倍率) の 3 段階あるが、主に 13 万倍を用いた。対物絞りは 60 μm を用いた。

#### SEM 観察

メッシュの低倍率観察用に ASID による SEM 観察を行った。カーボン膜および MG-C 膜上で PTA 染色したあと、膜の損傷などを観察する目的で補助的に使用した。HV 20kV。

写真処理として、使用フィルムはフジ FG (6×9cm), 現像にはコダック D-19 (1:1) を常用し、他にカテコール表面現像法を用いた。

#### 観察結果

MG-C 膜の強度は、これまでの単層カーボン支持膜に比較して、予想外に良好であった。すなわち高倍率における電子ビームの連続照射に対して、像の見え方が安定しており、欠点と思われた試料の付き具合や、MG ネットの視野妨害もあまり気にならないことが認められた。

MG-C 膜の撮影結果は、ウイルス試料を 10 万倍以上で撮影した写真フィルム約 50 枚について調べたところ、約 40 枚 (80%) が合格、10 枚 (20%) がボケと判った。とりわけ 100kV 撮影のものが優れていた。一方の単層 C 膜では 160 枚中 80 枚 (50%) が合格と判定されたが、像質は著しく劣ることが判明した。

ここで今回の実験結果を掲載写真について順次説明する。

写真 1 はこれまでウイルス検査用に常用してきた単層 C 膜 (400 メッシュ) の SEM 像で、試料を PTA 染色し電顕観察済みの跡を示した。染色液乾燥時の表面張力と、電子ビーム照射による熱等のため、ほぼ全面にわたり膜切れが生じ、再使用できない状況となっている。MG-C 膜の対照用として掲載した。

写真 2 は市販の 150 メッシュの SEM 像で、ウイルス検査材料を MG-C 膜上でネガティブ染色し、電顕観察を終えたあとの状況を示したもの。粗い間隔の丸穴の残存膜上には、MG のネットがくもの巣状に張られていることを想像して欲しい。支持膜が残存する丸穴は 10 個の同様のメッシュで調べたところ平均 20% で、写真 1 に比較すると著しく強度が優れ、MG-C 膜の実用性を十分に実証している。

写真 3 は写真 2 の中の一穴を拡大した SEM 像である。中央から奥にかけて MG の不揃いのネットが見える。穴の手前半分は薄く張られたカーボン膜の個所で、その上で試料が PTA 染色されているパターンを示す。染色のうまくいった個所を SEM 観察すると、穴の全面をカーボン膜が覆っていて、MG ネットが写真の手前半分にみるように、稍暗く沈んで見えている。写真 3 は写真 2 と写真 4 の間のつながりを説明する役割りを果している。

写真 4 は市販品 (A 社) の 200 メッシュ MG-C 膜上でネガティブ染色されたロタウイルス群を、TEM で低倍率撮影した像で、画面中央に 10 数個のウイルスが点々と数えられる。解像性の良いカテコール表面現像法で処理し、表現することができた、この像は 10 万倍以上の高倍率で約 30 枚連続撮影した後、低倍率撮影したものであるが、低倍率でみた限りでは、撮影当初に撮った低倍率写真と殆ど変化がなく、コンタミの跡が見受けられないことが判った。周囲の太い枠は MG のネットで、カーボン支持膜と一体になった感じで補強しており、これまでの単層のカーボン膜との安定性の違いを充分にうかがわせている。

写真 5 は写真 4 の中央のロタウイルス群を、HV 100 kV, 直接倍率 13 万倍で撮影し、総合倍率 30 万倍に拡大したものである。これは 10 万倍以上で連続撮影したうちの 13 枚目に相当し、電子ビーム損傷やコンタミの影響が少ないため、ロタウイルスの特長ある形態がよく保たれている代表的な高倍率像である。欠点としては、非点収差による像流れの症状が認められることで、原因は、視野のパターンが良好すぎたために、撮影前の非点収差のチェックを怠り、ただちに高倍率撮影に踏み切ってしまった判断のミスによる。写真現像は D-19 によった。

写真 6 は写真 5 と同一視野を連続撮影したものの中から選び出したもので、像質の最も優れた代表写真である。HV 100kV, 直接 13 万倍撮影で、非点収差を予め補正したため像流れの症状がない。フォーカスも良く、カテコール表面現像仕上げで写真的に申し分がない。欠点

としては、電子ビームの連続照射による損傷、コンタミの影響を受けて、ロタウィルスの形態が壊れかけて見えることである。

写真7は写真6とは別の検査材料中から撮影した、単層のカーボン支持膜上のロタウィルス像で、写真6のMG-C膜との比較対照用である。写真6とではHV 100 kV、撮影時期等も共通している。両者の比較ではMG-C膜を用いた写真6が、単層C膜使用の写真7に比べ、像の解像性が著しく優れていることが明瞭に認められる。80kVで両者を撮った写真についても比較し、MG-C膜の優位が確かめられている。なお100kVと80kVの撮影比較では、解像性の点で断然100kVの方が優れていることをつづける(写真掲載は省略)。

写真8, 9は高倍率撮影における電子ビーム損傷、コンタミについて、アデノウィルスを例として明瞭に示したものである。撮影条件はHV 100kV、単層のカーボン支持膜上でネガティブ染色を行っている。写真8は、この視野における10万倍以上の高倍率連続撮影6枚目のもの、写真9は16枚目に相当する。ウィルス表面上のカプソメア粒子の見え方を比較すると、写真8では明瞭に見えていたものが、写真9では殆ど消失して認めることができなくなっている。

写真10, 11は電顕の解像力を測定する目的で、アスベストの同一試料について、倍率を変えて撮影した例である。400メッシュのカーボン支持膜上に試料を載せ、写真10では直接5万倍、写真11では直接13万倍で撮影し、総合倍率をそれぞれ8万倍、21万倍として示した。これらの写真からはクリソタイル特有の構造(直径170Åの管状)は見出されず、300~700Åの値のものが得られたに止まった。写真11の右端にみられる条痕からの測定で、現在の電顕の解像力を最高約15Åと推定した。

一方、同一アスベストをMG上に載せ、MGのネット上に橋渡しさせ、高倍率撮影を試みた実験では、試料にチャージアップ現象が生じて激しく振動し、撮影は不成功に終わっている。

MG膜上と単層のC膜上でのアスベスト試料の見え方の違いを比較したところ、前者ではコントラストが著しく高く、後者ではC膜の存在が邪魔をして著しく低下することが判明した。

### 考 察

これまでにMG補強のコロジオン支持膜については作製経験があり、TEM, SEM両面に応用してきたが、MG-C膜の応用は今回が初めてである。

今回MG-C膜のテストで好成績が得られた証拠とし

て、強度の向上を写真1, 2で、また解像性の向上を写真6, 7の比較でそれぞれ示した。解像性の向上を示す好例として、直接17万倍(最高倍率)で撮影比較した証拠写真もあるが、試料が支持膜表面の粒子(ノイズ)なので写真掲載を省略した。

MG-C膜を用い、HV 100kVで撮影した場合に、著しい解像性の向上がみられた理由を考察すると、単層C膜の場合に比べて、特に薄いカーボン膜(約60Å)が、MGの補強効果で、膜切れの心配なく使用できたためと考えられる。薄い膜の上では、電顕像が著しい鮮鋭さで見えてくることは、大方の知るところである。

市販MGではA社製品は合格で、B社の普及品はバラツキがあって、使用に当っては注意が必要である。

カーボンの回り込み現象を利用して作製するカーボン膜は、文献6の方が5よりも能率的であることが判明した。現在、オベクトグラス3枚分の面積に雲母板を並べ、2回の蒸着処理で必要な膜厚のカーボン膜を得ている。

高倍率撮影における良い像を得るための条件を記載しておきたい。

- ① 液体窒素による試料汚染防止を忘れないこと。
- ② 加速電圧の選択では、試料のコントラストの許す限り高い加速電圧を選ぶこと。
- ③ 撮影以前に非点収差補正についてチェックする。撮影視野をズラして、支持膜表面のカーボン粒子像について補正する。
- ④ 撮影視野について前焦点、正焦点、過焦点の像をチェックし、軸合せの状態を確認しておく。
- ⑤ 焦点合せの要領では、バックの地を目標にすることも一法である。
- ⑥ 素早く撮影を済ませ、試料にビームダメージやコンタミを生じさせないこと。
- ⑦ 試料の動きをチェックし、像流れの原因を突止め、排除し、無益な撮影は避ける。
- ⑧ 適正露光を心掛け、現象ムラなど作らぬよう、丁寧な写真処理をする。

以上の諸点が、これまでの高倍率撮影からの教訓とも云える。今回のロタウィルスの撮影でも、写真5では非点収差による像流れがあり、写真6ではウィルスの形態がビーム損傷やコンタミのため変形し、良い写真が得られなかったことを反省している。

アスベストを利用した電顕の解像力測定は、今後の撮影技術のトレーニングに恰好の目標となろう。ちなみに格子間隔は7.3Å, 4.6Å, 4.5Åが知られているという。

## ま と め

- 1) 市販MGで補強したカーボン膜を用い、JEM-100 B, 100kVにより、ロタウイルスについて直接13万倍の撮影を行い、これまでの単層カーボン膜使用に比べ一段と解像性の優れた電顕写真(30万倍)を得た。
- 2) カーボン支持膜の改良を試み、カーボンの回り込み現象を利用して、良質な支持膜を得る見通しを得た。
- 3) ロタ、アデノ両ウイルスについて、同一視野の高倍率連続撮影テストを行い、支持膜、加速電圧、非点収差および電子ビーム損傷乃至コンタミを比較し、高倍率撮影の基礎データを求めた。
- 4) 電顕の解像力を測定する目的で、アスベストを用いて実験を行った。単層のカーボン支持膜上のアスベストの直接13万倍撮影像から、推定値15Åを得た。

(本研究の要旨は日本医学写真学会第23回学術講演会1982年6月において発表した)

謝辞 本研究にあたり御便宜をはかって頂いた当所微生物部、蔭内清副参事研究員に謝意を表します。

## 文 献

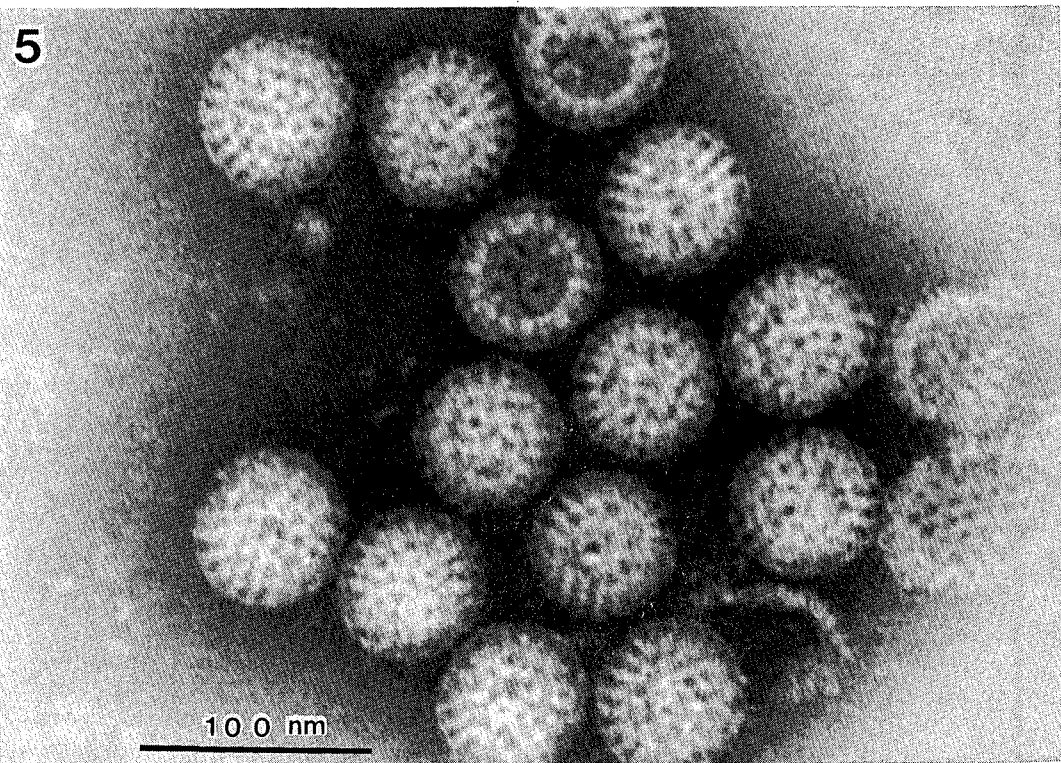
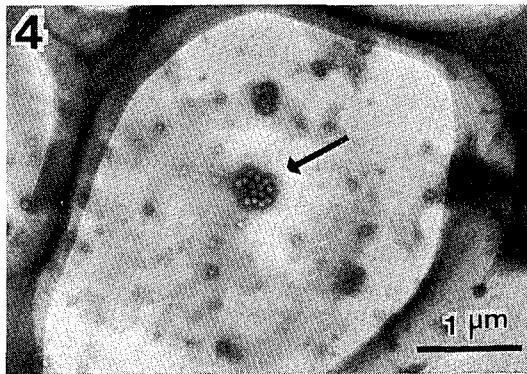
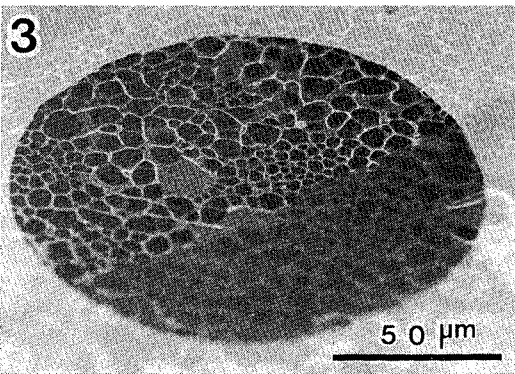
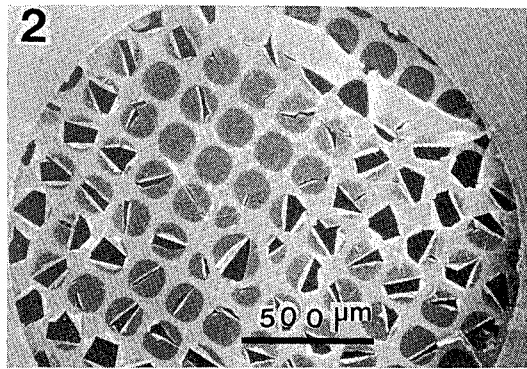
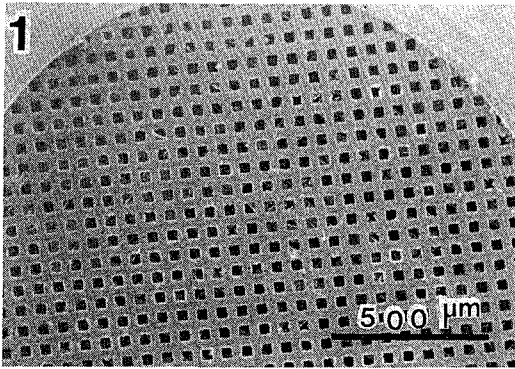
- 1) 前木吾市, 友成正臣: 東京衛研年報, 31-1, 55, 1980
- 2) 関根整治, 前木吾市, 矢野一好ら: 東京衛研年報, 32-1, 39, 1981
- 3) 深見 章, 四本晴夫: 電子顕微鏡, 4, 166, 1956
- 4) 安達公一, 石原信一, 岡田正和ら: 電子顕微鏡利用の基礎, 150, 1975, 共立出版
- 5) 山岸秀夫編: 遺伝子観察への旅, 41, 1981, 東京大学出版会
- 6) 日本電子顕微鏡学会関東支部編: 電子顕微鏡観察法, 146, 1982
- 7) 保坂康弘, 松本 明: 図説ウイルス学, 12, 1979, 朝倉書店

## Explanation of Figures

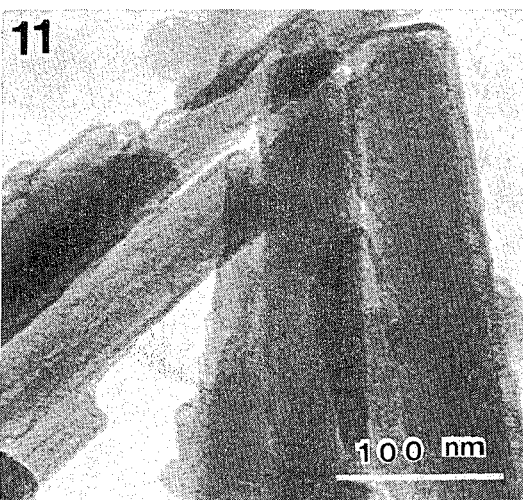
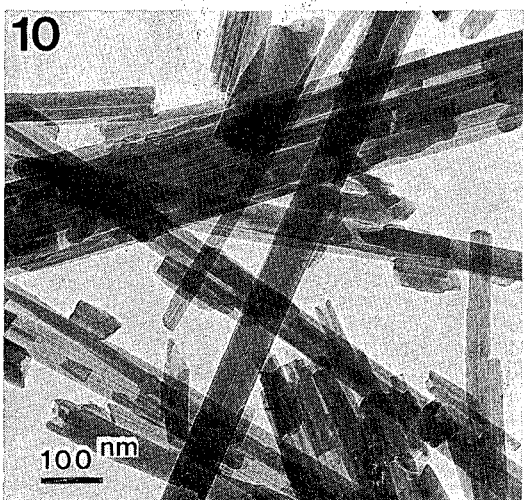
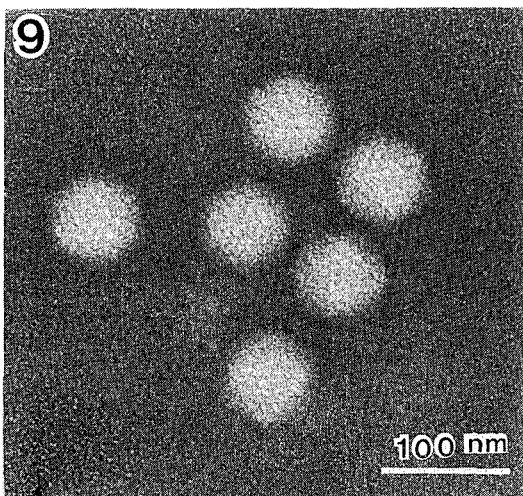
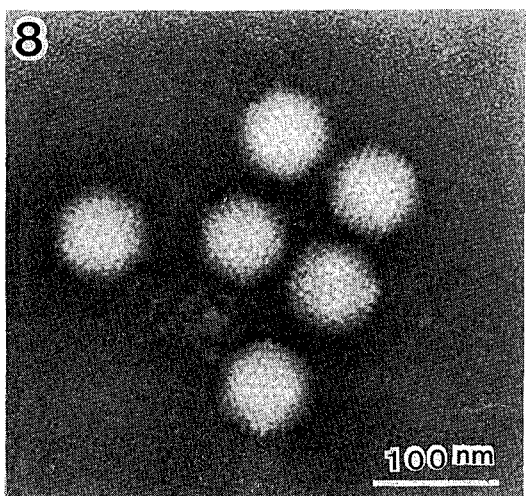
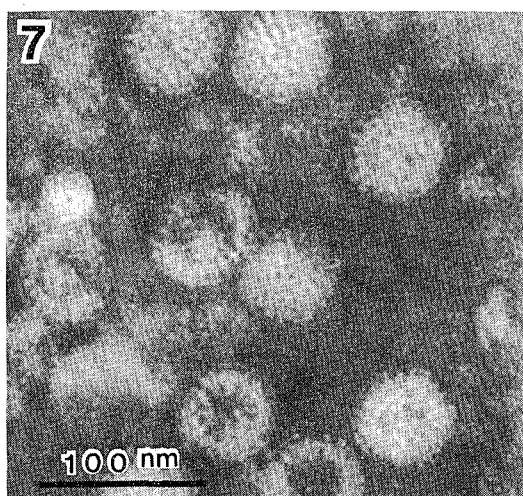
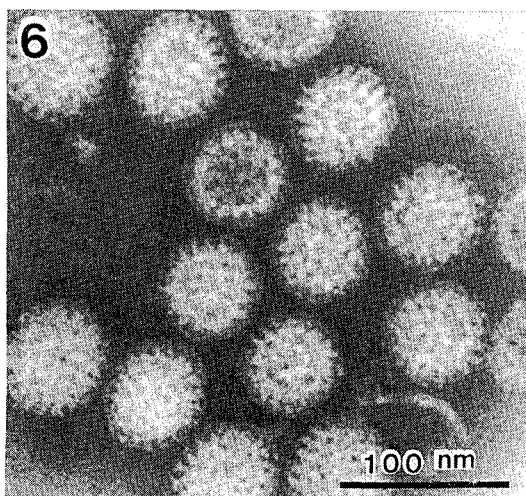
The accelerating voltage of SEM is 20 kV and TEM 100kV.

- Fig. 1. SEM image of a carbon monolayer support film on 400 # gridmesh after TEM microscopic viral examination. The result is useless.  $\times 40$
- Fig. 2. SEM image of a microgrid on 150 # gridmesh after TEM microscopic viral examination. The result can be useful.  $\times 35$
- Fig. 3. A magnified SEM image of the microgrid in Fig. 2. Tilting angle is  $40^\circ$ .  $\times 450$
- Fig. 4. A group of rotavirus particles (arrow) by PTA negative staining on the microgrid. A magnified TEM image of Fig. 3.  $\times 13,000$
- Fig. 5. Rotavirus by PTA negative staining on the microgrid. This pattern is the magnified area in a part of Fig. 4 (arrow).  $\times 300,000$
- Fig. 6. The same pattern as Fig. 5, of which astigmatism is corrected.  $\times 220,000$
- Fig. 7. Rotavirus by negative staining on the carbon monolayer support film as Fig. 1. Compare with Fig. 6.  $\times 220,000$
- Fig. 8. Adenovirus by PTA negative staining. Capsomeres on a virus particle can be seen clearly.  $\times 160,000$
- Fig. 9. The same pattern as Fig. 8, suffering electron beam damages and contamination. Capsomeres are invisible.  $\times 160,000$
- Fig. 10. Asbestos (cristate) on the carbon monolayer support film.  $\times 80,000$
- Fig. 11. Asbestos (cristate) on the carbon monolayer support film. These samples were used as the test for resolving power of JEM-100B.  $\times 210,000$











# 報 文 II

医薬品等に関する調査研究

REPORTS II

PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTICAL HYGIENE



## 非ピリン系かぜ薬の定量法 (第2報) 鎮咳去痰剤

中山京子\*, 高橋美佐子\*, 岩崎由美子\*, 秋山和幸\*

### Determination of Non-pyrin Preparations for Common Cold (II) Antitussive-Expectorants

KYOKO NAKAYAMA\*, MISAKO TAKAHASHI\*, YUMIKO IWASAKI\*  
and KAZUYUKI AKIYAMA\*

**Keywords:** 非ピリン系かぜ薬 non-pyrin preparations for common cold, 鎮咳去痰剤 antitussive-expectorants, ガスクロマトグラフィー gas chromatography, 比色定量法 colorimetric determination, 臭化水素酸デキストロメトルファン dextrometorphan hydrobromide, グリセリンジアセトールエーテル glycerylguaiacolether

#### はじめに

前報<sup>1)</sup>では、かぜ薬中の解熱鎮痛剤について報告したが、今回はかぜ薬中の鎮咳去痰薬として代表的な臭化水素酸デキストロメトルファン (以下 Dx と略す) とグアヤコールグリセリンエーテル (以下 GG と略す) の定量法の検討を行った。Dx はコデインに匹敵する鎮咳薬として、dl-塩酸メチルエフェドリンと並んで広く常用されている。また GG も去痰薬としてだけでなく鎮咳作用を有するので、配合されている風邪薬が多く市販されている。しかし従来の医薬品製造指針による試験法では、Dx については酸性色素との結合反応を利用し、GG は酸化してアルデヒドを生成、これを呈色反応させる試験方法<sup>2)</sup>なので、それぞれ呈色反応の選択性が少なく、混合製剤中の定量は配合成分との分離などに複雑な操作を必要とする。そこで我々は従来の試験法と併用してガスクロマトグラフィー (以下 GC と略す) を用いて比較検討を行った結果、良好な成績が得られたので報告する。

#### 実験の部

**使用機器** GC: 日立 163 型ガスクロマトグラフ, 積算機: 島津クロマトパック RIA, UV モニター: 島津ボシュロム分光光度計スペクトロニック 70UV。

**標準品** Dx, GG, アミノピリン, ベンゾフェノン, フェナントレンいずれも乾燥し定量するとき 99.0% 以上含有するものを標準品として用いた。

**試料** 医薬品製剤は行政検体として衛生局業務部より送付された総合感冒剤および鎮咳去痰剤を用いた。その剤型が錠剤, カプセル剤 (内容物のみ), 分包剤 (内容物のみ) の場合はそれぞれ 10 個以上をとりその平均重量

を算出し、乳鉢でよく研和して均質な粉末とし、シロップ剤はそのままあるいは、水で希釈して試料とした。

**試薬, 試液** 特に本文に記載のないものは日局または日局により調製したもの、および和光純薬試薬特級を用いた。

#### GC による定量法

##### 1. Dx の定量法

1) 内部標準溶液の調製 フェナントレン標準品 50 mg を無水エタノール 100 ml 中に溶かしこれを内部標準溶液とする。

2) 標準溶液の調製 Dx 標準品 150 mg を精密に量り、水を加えて溶かし、水で正確に 100 ml とする。この液 5 ml を正確に共栓遠心沈殿管にとり、水 5 ml, 水酸化ナトリウム溶液 (1→10) 5 ml およびヘキササン 25 ml を正確に加えて 10 分間振り混ぜた後、2 分間遠心分離し、上澄液 15 ml を正確にナス型フラスコにとり、ロータリエバポレーターを用いて溶媒を留去する。残留物に内部標準溶液 2.5 ml を正確に加えて溶かし標準溶液とする。

3) 試料溶液の調製 Dx 約 7.5 mg に対応する試料を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ水 5 ml を加えて 50° の水浴中でときどき振り混ぜながら 10 分間加温する。冷後、水酸化ナトリウム溶液 (1→10) 5 ml, … 以下標準溶液と同様に操作し試料溶液とする。

4) 測定 標準溶液および試料溶液をそれぞれ 1  $\mu$ l とし日局十一般試験法第 6 項「ガスクロマトグラフ法」の内部標準法およびピーク面積法に従い次の条件により測定する。分離用カラム: 5% シリコン SF-96+0.2% ベルサマイド 900/ガスクロム Q (80~100 メッシュ) を

\* 東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

内径 3 mm, 長さ 1.0 m のガラスカラムに充てんして用いる。検出器：水素炎イオン検出器, 温度：カラム 200°, 注入口 220°, 感度  $16 \times 10^2$ ,  $N_2$  30 ml/min.

## 2. GG の定量法

1) 内部標準溶液の調製 ベンゾフェノン 100 mg をクロロホルム 100 ml 中に溶かしこれを内部標準溶液とする。

2) 標準溶液の調製 GG 標準品約 50 mg を精密に量りアセトン・クロロホルム混液 (1:1) を加えて溶かし正確に 50 ml とする。この液 5 ml を正確に三角フラスコにとり, 無水酢酸・ピリジン混液 (1:1) 3 ml を加え, 還流冷却器を付けて 60° の水浴中に 30 分間放置する。この液を 60° の水浴中でエバポレーターを用いて減圧蒸留する。残留物に内部標準溶液 2 ml を正確に加え振り混ぜて溶かし標準溶液とする。

3) 試料溶液の調製 (粉末剤) GG 約 50 mg に対応する試料を 50 ml のメスフラスコに精密に量りアセトン・クロロホルム混液 (1:1) を適量加えた後, 60° の水浴中でときどき振り混ぜながら 30 分間加温する。室温にもどした後, アセトン・クロロホルム混液 (1:1) で正確に 50 ml とする。この液を遠心分離した後, 上澄液 5 ml を正確に三角フラスコにとり, 無水酢酸・ピリジン混液 (1:1) 3 ml を加え…以下標準溶液と同様に操作し試料溶液とする。

(シロップ剤) GG 約 30 mg に対応する試料を正確に分液ロートにとり, 水 10 ml, 50% 水酸化ナトリウム溶液 1.5 ml および塩化ナトリウム 5 g を加え 5 分間放置した後, クロロホルム 25 ml で 1 回, 20 ml で 3 回抽出操作を行う。全抽出液を合わせ無水硫酸ナトリウムで脱水する。この液を 60° の水浴中でエバポレーターを用いて減圧蒸留する。残留物にアセトン・クロロホルム混液 (1:1) 15 ml を正確に加えて溶かし, この液 2.5 ml を正確に三角フラスコにとり, 無水酢酸・ピリジン混液 (1:1) 3 ml を加え, …以下標準溶液と同様に操作し試料溶液とする。

4) 測定 標準溶液および試料溶液をそれぞれ 1  $\mu$ l とし日局十一般試験法第 6 項「ガスクロマトグラフ法」の内部標準法およびピーク面積法に従い次の条件により測定する。分離用カラム 5% シリコン SE-30/クロモソルブ W (80~100 メッシュ) を内径 3 mm, 長さ 2.0 m のガラスカラムに充てんして用いる。検出器：水素炎イオン検出器, 温度：カラム 185°, 注入口 205°, 感度  $32 \times 10^2$ ,  $N_2$  30 ml/min.

## 実験結果および考察

## 1. Dx の GC 法の検討

定量法 1 による市販製剤のガスクロマトグラムを Fig. 1 に示す。我々は 3 種類の充てん剤について至適カラム温度とキャリアーガス ( $N_2$ ) の流量を検討した結果, 次のとおりであった。キャリアーガスの流量は 20~60 ml/min で変化させたところ, 30 ml/min において最も良好なピークが得られた。充てん剤 ① 5% SF-96+0.2% ベルサマイド 900/ガスクロム Q (80~100 メッシュ), カラム温度 200°, ② 2% OV-17/クロモソルブ W (AW-DMCS) (80~100 メッシュ), カラム温度 190° ③ 5% シリコン SE 30/ガスクロム Q (80~100 メッシュ), カラム温度 220°, 注入口温度はいずれもカラム温度より 20° ずつ高温とした。これらの充てん剤の中で①が最も成分分離, 保持時間が定量に適していると思われた。

内部標準物質については, ④ アミノピリン, ⑤ ベンゾフェノン, ⑥ フェナントレンについて検討したところ, 保持時間が④はカフェインと⑤はエテンザミドに近い。今回の分析条件では⑥が他の 2 成分より, ピークの分離, 保持時間は適当と思われる。

抽出溶媒にはクロロホルム, ヘキサンを用いて試験したところ Dx を目的とした定量では他の抽出成分が少ないヘキサンの方が妨害がなくて良好なピークが得られた。

抽出操作は簡易法として錠剤, カプセル剤, 分包剤は試料をそのまま遠心沈殿管にとり, 水 5 ml, 水酸化ナトリウム溶液 (1→10) 5 ml を加えて加温して溶かす。冷後, 定量法 1 の操作により, GC で測定する。なお試料からの抽出は定量的に行われることが確認されている従来法に準じている。ただし, 1 錠 (個, 包) の Dx 含量の多少により, 抽出溶媒のヘキサンおよび, 内部標準溶液の量を加減する必要がある。この方法は色素等の妨害もなく, 含量均一性を検討する場合にも簡易な方法である。しかし顆粒などに滑沢剤その他がコーティングされている場合は粉末としてから, シロップ剤は塩析してからそれぞれ試験を行う。

## 2. GG の GC 法の検討

定量法 2 による市販製剤のガスクロマトグラムを Fig. 2 に示す。充てん剤は Dx と同様の 3 種 ①②③について次の 2 法によりそれぞれ検討した。

(直接法) GG を水酸化ナトリウムアルカリ性でクロロホルム抽出し, GC で測定する。なお試料からの抽出は定量的に行われることが確認されている従来法に準じている。カラム温度は ① 180° ② 175° で定量したところ GG のピークがテーリングし, また他成分との分離が

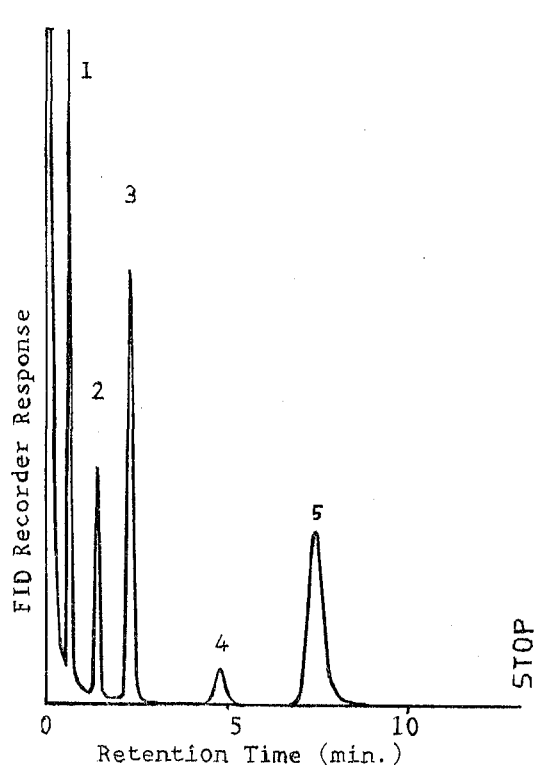


Fig. 1. Gaschromatogram of Antitussive-Expectorants

- Peak 1: dl-Methylephedrine  
 2: Ethenzamide  
 3: Phenanthrene  
 4: Chlorpheniramine  
 5: Dextromethorphan

悪く、ピーク高さ法等により含量を求めるのは再現性も悪く定量には不適である。③は他成分とのピークの分離が悪く定量できない。

(アセチル化法) 直接法では配合薬品との分離に昇温、感度の切替等が必要であり、一斉収去などで大量を試験する場合には、長時間を要するので適当な方法ではないと思われる。そこでアセチル化<sup>3,4)</sup>を検討した。無水酢酸・ピリジン混液(1:1) 3mL, 60°で30分還流冷却器を付けてアセチル化を行い、60°以下で減圧蒸留したのちGC定量する。ピークも鋭敏となり、他の配合薬品とのピークの分離も良好であった。カラム温度は次のとおりである。カラム①200°, ②175°, ③185°でいずれも定量可能である。

### 3. 検量線および再現性

Dx, GGのそれぞれ標準品を用い濃度の標準溶液系

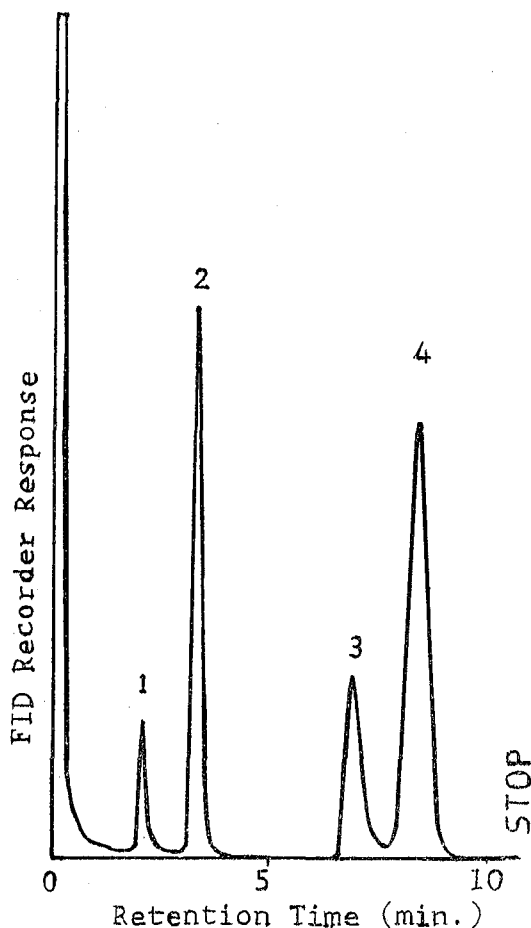


Fig. 2. Gaschromatogram of Antitussive-Expectorants

- Peak 1: dl-Methylephedrine  
 2: Benzophenone  
 3: Caffeine  
 4: Glycerylguaiacolether

列を作り、定量法1, 2にそれぞれ従って操作を行い、内部標準物質とのピーク面積比を求めて検量線を作製するとき、直線が得られ再現性も良好であった。定量法1では内部標準物質フェナントレンに対する比率Dx 0.5-2.5の範囲で、定量法2では内部標準物質ベンゾフェノンに対する比率GG 1.0-7.0の範囲で、装置の設定感度を切り変えずに精度よく測定できた。

### 4. 他の配合成分の影響について

今回、試料とした市販のかぜ薬および鎮咳薬には以下のような成分が配合されていた。Dxの定量では気管支拡張剤のdl-塩酸メチルエフェドリン、解熱鎮痛剤のア

セトアミノフェン、エテンザミド、スルピリン、抗ヒスタミン剤の *dl*-マレイン酸クロルフェニラミン、マレイン酸カルピノキサミン、他にリン酸リボフラビンナトリウム、塩酸チアミン、カフェイン等が主な成分であった。GGの定量に用いた試料中には鎮咳剤の塩酸パペリン、リン酸コデイン、ノスカピン、クロベラスチン、気管支拡張剤の *dl*-塩酸メチルエフェドリン、解熱鎮痛剤のアセトアミノフェン、抗ヒスタミン剤の *dl*-マレイン酸クロルフェニラミン、サリチル酸ジフェンヒドラミン、塩酸ジフェニルピラリン、他にカフェイン、生薬エキス（セネガ、カンゾウ、バクモンドウ、キキョウ等）が配合されていた。GCの結果、通常用いられている配合量では小さなピークのものであるはあっても、それぞれの目的成分の定量には直接影響しないことがわかった。

##### 5. 医薬品製造指針による試験法（比色法）とGC法との比較検討

市販製剤中の Dx および GG について従来用いられている比色法および今回検討した GC 法による比較を行った結果を Table 1 および 2 に示す。比色による Dx および GG のそれぞれの呈色反応機構を Chart 1 に示す。これらを比較検討した結果、測定値には差が認められず（ $P < 0.05$ ）また、測定精度についても GC 法は規格定量試験として十分信頼できると考えられる。

Dx のブロムクレゾールグリーン法<sup>2)</sup>、ブロムフェノールブルー法<sup>2)</sup>は有機塩基化合物を酸性色素と反応させて、色素結合体を生成し、これを有機溶媒で抽出すると

Table 1. Comparison of GC and Colorimetry for Determining Dx in Pharmaceutical Preparations.

| Sample No. | Colo.  | GC     |
|------------|--------|--------|
| 1          | 101.12 | 100.56 |
| 2          | 100.06 | 99.28  |
| 3          | 101.26 | 101.00 |
| 4          | 96.79  | 97.00  |
| 5          | 96.82  | 96.59  |
| 6          | 96.59  | 98.00  |
| 7          | 103.83 | 102.55 |
| 8          | 108.28 | 106.78 |
| 9          | 107.07 | 104.12 |
| 10         | 90.16  | 93.18  |

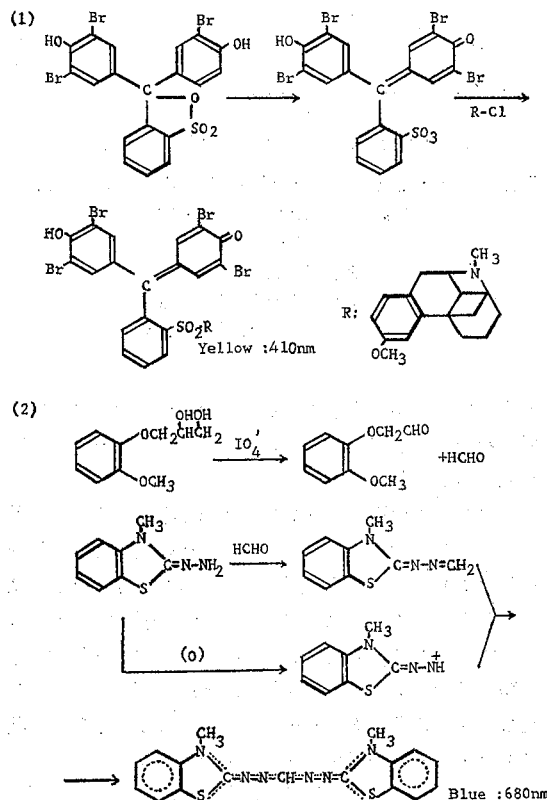
Each values are expressed as ratio (%) to described contents.

Sample No. 1-5 ; Bromcrezol green Method  
6-10; Bromphenol blue Method

Table 2. Comparison of GC and Colorimetry for Determining GG in Pharmaceutical Preparations.

| Sample No. | Colo.  | GG     |
|------------|--------|--------|
| 1          | 108.93 | 100.66 |
| 2          | 95.01  | 94.04  |
| 3          | 97.88  | 98.01  |
| 4          | 94.32  | 95.28  |
| 5          | 93.24  | 92.50  |
| 6          | 93.00  | 93.12  |
| 7          | 99.28  | 99.40  |
| 8          | 101.13 | 102.52 |
| 9          | 100.04 | 99.19  |
| 10         | 96.59  | 97.23  |

Each values are expressed as ratio (%) to described contents.



黄色を呈する。本呈色反応は多くの塩基性物質が同様に反応するため、これらが共存する場合には利用できない。ただし、ブロムフェノールブルー法では、塩酸メチルエフエドリンが共存の場合は、この色素結合体がベンゼンに抽出されないで、Dx の色素結合体をベンゼンで抽出後、定量試験を行っている。しかし本反応は pH の変動が大きく影響するので今回の試験では pH メーターを用いて正確に操作したが定量値はかなりのバラツキを示した。

GG の3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン(以下 MBTH と略す) 法<sup>5,6)</sup>は GG を過ヨウ素酸で酸化してホルムアルデヒドとなし、これに MBTH 試液を酸化剤共存で反応させる方法である。本反応は過ヨウ素酸化によりアルデヒドを生成するものまたは糖類、ピラツォロン系化合物、フェノール芳香族アミノ化合物などは陽性なので、アセチルサリチル酸、サリチルアミド、アセトアミノフェン等は抽出操作で除去する必要がある。このように従来の比色法は繁雑であり、GC 法はより簡便で、迅速に定量することができた。

#### ま と め

かぜ薬中の成分の定量法として、従来個々に比色定量

法が用いられてきたが、鎮咳去痰剤として配合されている Dx と GG について前操作が比較的簡易であり迅速な GC による定量法を検討した。その結果、Dx については内部標準物質をフェナントレン、充てん剤は5%シリコン SF-96+0.2%ベルサマイド900/ガスクロム Q (80~100メッシュ)を、GG については内部標準物質をベンゾフェノン、充てん剤は5%シリコン SE-30/クロモソルブ W (80~100メッシュ)をそれぞれ用いた。この定量結果は従来の比色法と比較しても差がないので、一斉試験にも十分適用できると考えられる。

#### 文 献

- 1) 中山京子, 高橋美佐子, 岩崎由美子: 東京衛研年報, 32-1, 69, 1981
- 2) 日本公定書協会: 医薬品製造指針, 追補, 1971, 薬業時報社
- 3) Anders, M. W. and Mannering, G. J.: *Anal. Chem.*, 34, 730, 1962
- 4) Higginbottom, H. D., Culbertson, H. M. and Woodbrey, J. C.: *Anal. Chem.*, 37, 1021, 1965
- 5) 井上哲男, 立沢政義: 医薬品研究, 1, 40, 1970
- 6) Sawichi.: *Anal. Chem.*, 33, 93, 1961

## 市販軟膏及び坐剤中のプレドニゾロンの安定性について

上 原 眞 一\*, 宮 武 ノリエ\*, 重 岡 捨 身\*, 風 間 成 孔\*, 秋 山 和 幸\*

### Stability of Prednisolone in Commercial Ointments and Suppositories

SHINICHI UEHARA\*, NORIE MIYATAKE\*, SUTEMI SHIGEOKA\*,

MASAYOSHI KAZAMA\* and KAZUYUKI AKIYAMA\*

The possibility of decomposition of Prednisolone (PD) to its 17-ketonic derivatives, 11 $\beta$ -hydroxy-1, 4-androstadiene-3, 17-dione (HA), was examined. After HA was isolated by treating the samples with Girard's Reagent "T", it was identified by thin-layer chromatography and mass spectrometry.

The samples were dissolved in tetrahydrofuran and the amounts of PD and HA were determined by high performance liquid chromatography. HA was identified in three ointments and five suppositories. These samples actually had an extremely low concentration of PD when compared to the labeled amount.

**Keywords** : Prednisolone, stability, commercial ointments and suppositories, decomposition, 11 $\beta$ -hydroxy-1, 4-androstadiene-3, 17-dione, Girard's Reagent "T", thin-layer chromatography, mass spectrometry, high performance liquid chromatography

#### 緒 言

プレドニゾロン（以下PDと略す）を含有する軟膏および坐剤はその抗炎症作用により、広く皮膚疾患等に用いられているが、強い薬理作用を有するためその品質管理は重要である。著者らは、市販の軟膏および坐剤中のPDを定量するとき、その値が極端に低い例をしばしば経験し、PDの安定性に関心を寄せていた。

一方副腎皮質ホルモンの安定性については多くの報告が見られ<sup>1-4)</sup>、PDについては、内藤ら<sup>5)</sup>はポリエチレングリコール400溶液中のPDが、C-17側鎖に分解を生ずることを示唆している。さらに佐藤ら<sup>6)</sup>は軟膏および各種基剤にPDを添加したモデルを作成し、実験的にP

Dがその17-keto 体である。11 $\beta$ -hydroxy-1, 4-androstadiene-3, 17-dione（以下HAと略す）に分解することを確認している。（Chart 1）

著者らは今回、市販されている軟膏および坐剤中のPDの安定性、すなわちPDがHAに分解する可能性について検討した。

市販品のPDの処方量は1mg/g 前後のものが多く、PDがHAに分解しているとすれば、その量はごくわずかで、基剤その他共存物質等の妨害によりHAの分離、確認は困難であると考えられる。そこで、カルボニル化合物分離試薬として知られる、ジラール試薬“T”処理によるクリーンアップ後、薄層クロマトグラフィー（以下TLCと略す）、質量分析計（以下MSと略す）により確認する方法を検討したところ、良好な結果を得、購入した市販品数種からHAを検出し、PDがHAに分解している可能性を示唆する結果を得た。さらに高速液体クロマトグラフィー（以下HPLCと略す）による定量を行い、主成分PDとHAの量的関係を検討した。

#### 実験の部

##### 1. 装置

- 1) HPLC 日立635型, 検出器: 日立634型
- 2) MS: 日本電子 JMS-D300型

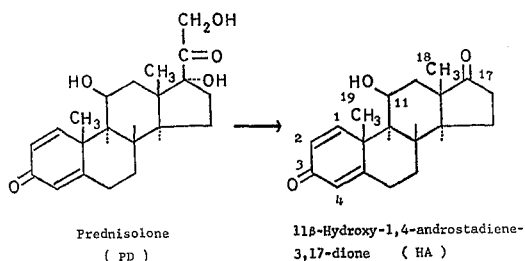


Chart 1.

\* 東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan



3) 赤外分光光度計 (以下IRと略す): 日立EP-IG 3型

4) 紫外分光光度計 (以下UVと略す) 日立320型

5) 核磁気共鳴装置 (以下NMRと略す): 日本電子FT-NMR JNM-FX 270型

## 2. 試薬

1) ジラール試薬 "T": 生化学用 和光純薬

2) ジラール試液: ジラール試薬 "T" 1 gに酢酸9.5 mlを加えて溶かし, メタノールを加えて100 mlとする。

3) 2.8%炭酸水素ナトリウム試液

4) PD標準品: 日本薬局方PD 105° 3 hr 乾燥する。

5) HA標準品: Brookら<sup>7)</sup>の方法にしたがい, PDを50%酢酸水溶液に溶解し, ビスマス酸ナトリウムと共に室温で30分間振とうしながら反応させ, 塩化メチレンで抽出し, アセトンから再結晶し, 105° 3hr 乾燥し, 標準品とする。本品の物性は次のとおりである。

白色針状晶 (アセトン), mp: 189.5~191° 未補正, UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ : 242. IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ : 3400 (OH), 1740 (C=O), 1660 (conjugated C=O).  $^1\text{H-NMR}$   $\delta^{\text{CDCl}_3}$ : 1.19 (3H, s, C<sub>18</sub>-H), 1.49 (3H, s, C<sub>19</sub>-H), 4.49 (1H, brs, C<sub>11</sub>-H), 6.03 (1H, brs, C<sub>4</sub>-H), 6.27 (1H, dd, J=10.1, 1.8, C<sub>2</sub>-H), 7.27 (1H, d, J=10.2, C<sub>1</sub>-H).  $^{13}\text{C-NMR}$   $\delta^{\text{CDCl}_3}$ : 15.6 (C<sub>18</sub>), 21.0 (C<sub>19</sub>), 21.7 (C<sub>15</sub>), 30.7 (C<sub>7</sub>), 31.7 (C<sub>6</sub>), 32.6 (C<sub>16</sub>), 35.1 (C<sub>8</sub>), 40.4 (C<sub>12</sub>), 44.1 (C<sub>10</sub>), 46.9 (C<sub>13</sub>), 51.6 (C<sub>14</sub>), 55.8 (C<sub>9</sub>), 69.3 (C<sub>11</sub>), 122.2 (C<sub>4</sub>), 127.5 (C<sub>2</sub>), 156.5 (C<sub>1</sub>), 170.2 (C<sub>5</sub>), 186.5 (C<sub>3</sub>), 219.1 (C<sub>17</sub>). MS m/z: 300 (M<sup>+</sup>, 19.2%), 282 (50.2%), 122 (100%).

6) TLC プレート シリカゲル60F<sub>254</sub> 厚さ 0.25mm (Merck)

7) その他溶媒および試液: いずれも特級をそのまま使用する。

## 3. 操作

### 1) HAの分離

試料のPD約1 mgに対応する量を100 mlの分液ロートにとり, イソオクタン50 ml, メタノール10 mlをそれぞれ加え, 試料が十分, 分散または溶解するまで振とうする。静置した後, 下層のメタノールを分取する。イソオクタン層はさらに, メタノール 10 mlずつで2回抽出し, 全メタノール層を合し, 減圧下, 留去する。残留物に, ジラール試液 10 mlを加え, 水浴上で30分間還流する。氷冷後, これに氷冷した2.8%炭酸水素ナトリウム

試液50 mlを加えpH 6とし, さらに塩化ナトリウム 6 gを加え, 塩化メチレン 50 mlで3回洗浄する。ついで, 水層に塩酸 6 mlを加え, 10分間放置し, HAを遊離し, 塩化メチレン 50 mlで3回抽出する。塩化メチレン層を合し, 減圧下留去する。残留物に少量のメタノールを加えて溶かし, 試料液とする。(Chart 2)

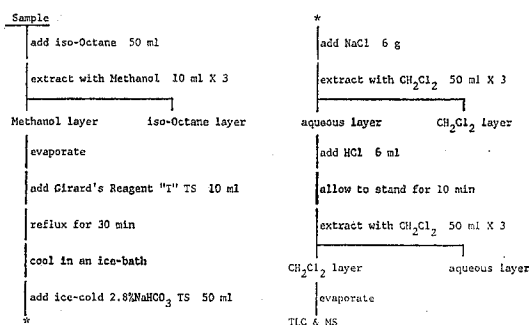


Chart 2. Isolation & Identification Method for HA in Ointment & Suppository

### 2) TLC によるHAの確認

HA標準品のメタノール溶液, 試料溶液のそれぞれについて次の条件で TLC を行う。

固定相: TLC プレート シリカゲル60F<sub>254</sub> 厚さ0.25 mm (Merck)

展開溶媒: クロロホルム-アセトン (3:1)

展開距離: 15cm

検出: (1) UVランプ照射, (2) 硫酸噴霧後100°に加熱。

### 3) MSによるHAの確認

TLC により確認したHA部分をかきとり, 酢酸エチルで抽出し, 次の条件で, 直接導入法 (以下DI-MSと略) によりマススペクトルを測定する。イオン化電圧: 70eV, イオン化電流: 300μA, イオン源温度: 200°。

### 4) HPLC によるPDとHAの定量

試料のPD約0.1 mgに対応する量を精密に量り, テトラヒドロフランに溶解し, 正確に10 mlとし, 試料溶液とする。別にPD, HA標準品をメタノールに溶解し, 2~20 μg/mlの標準溶液系列を作る。標準溶液系列, 試料溶液のそれぞれ10 μlを次の条件でHPLCを行い, 得られたクロマトグラムのピーク高を測定し, PD, HAの定量を行う。

カラム: Lichrosorb RP-18 5μm (Merck), 25cm×4mm i.d. 移動相: 水-アセトンニトリル (2:1), 流速: 1.0 ml/min, 圧力: 220 kg/cm<sup>2</sup>, カラム温度: 室温。検出

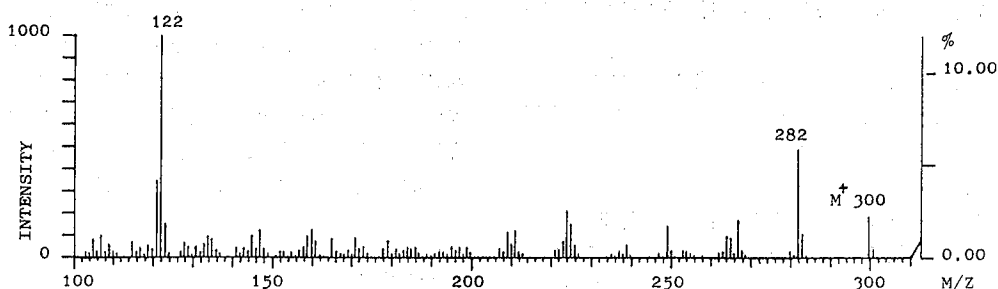


Fig. 1. Mass Spectrum of HA

: UV 242nm, 0.04 AUFS

#### 実験方法の検討

##### 1. HAの抽出

Bailey ら<sup>9)</sup>の方法にしたがって、まずイソオクタン-メタノール抽出による前処理をした。

##### 2. ジラール試薬“T”によるHAの分離

Girard ら<sup>10)</sup>により提案された、ジラール試薬“T” $[(CH_3)_3N^+CH_2CONHNH_2]Cl^-$ はカルボニル化合物と酢酸酸性の有機溶媒中で、容易に水溶性ヒドラゾンを生成し、再び希無機酸により元のカルボニル化合物を遊離するカルボニル化合物分離試薬として知られ、妊娠馬尿からのエストロンの抽出など、ケトステロイドの研究上で、高く評価されてきた。

われわれは、この試薬が17-ケトステロイドであるHAの軟膏および坐剤からの分離にも有用と考え、検討したところ、前記方法により良好な結果が得られた。すなわちHAを水溶性ヒドラゾンとした後、有機溶媒により可溶性夾雑物を除去し、再び塩酸により遊離したHAを有機溶媒により抽出分離するものである。有機溶媒には比較的乳化の起こりにくい塩化メチレンを用いた。中略<sup>11)</sup>はこの方法により軟膏中の4<sup>4</sup>-3-ケトステロイドの分離定量を行っている。

##### 3. TLCによるHAの確認

前記条件によるHA標準品のRf.値は約0.35、UV照射による検出限界は約0.1 $\mu$ g、硫酸噴霧、100°の加熱によりピンクに呈色、検出限界は約0.1 $\mu$ g、さらにUV照射によりピンクの蛍光を発し、その検出限界は約0.05 $\mu$ gであった。

##### 4. MSによるHAの確認

HA標準品のマスペクトルは、 $M^+m/z$  300,  $M^+-H_2O$   $m/z$  282, 基準ピーク  $m/z$  122, が認められた。(Fig. 1)

TLCにより分離、確認したHAの部分をかきとり、

酢酸エチル抽出したものについて、DI-MSにより得られたスペクトルはHA標準品のそれと一致した。

##### 5. 確認方法の検討

本法によりHAが効果的に分離、確認できた。またPD標準品について、本法により操作したがHAは検出されず、したがって主成分PDが実験操作中、HAに分解する恐れはないと考える。一方、試験した試料全部に、それぞれHA標準品10 $\mu$ gを添加し、操作したところ、すべてにHAを検出し、基剤、共存物質による妨害はないと思われる。

##### 6. HPLCによるPDとHAの定量

試料のPDとHAの量的関係を検討した。HPLC条件は、前記条件が最適条件の一つであり、クロマトグラムは(Fig. 2)のとおりで、HA、PDの分離は良好であった。

PD、HA標準品をメタノールに溶解し、2~20 $\mu$ g/mlの標準溶液系列を作り、得られたクロマトグラムのピーク高を測定し、検量線を作成したところ、HA、PDともに、ほぼ原点を通る直線性が得られ、再現性も良好であった。検出限界はS/N=3としてPD、HAとも0.01 $\mu$ gであった。

しかし本法は試料によって共存物質の妨害によりHAの定量が不可能のものが見られた。これについてはジラール試薬処理による分離後HPLCによる定量を試みたが、回収率に問題が残る、今後検討する予定である。

#### 結果及び考察

市販の軟膏11種、坐剤5種について調査した。試料はSa1~8, 12~14は1982年1月, Sa 9, 15, 16は1980年7月, Sa 10, 11は1978年12月に入手したものである。

HAの確認, PD, HAの定量の結果はTable 1のとおりである。軟膏3種、坐剤4種からHAが検出された。

HAの検出されたものは、されなかったものに比べて

Table 1. Analytical Results of PD and HA Contents of Commercial Ointments and Suppositories

| Sample         | Labeled amount,<br>Prednisolone | Prednisolone<br>Found | HA              |                |
|----------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|
|                |                                 |                       | Found           | Identification |
| 1 Ointment     | 5(mg/g)                         | 5.32(mg/g)            | —               | —              |
| 2 "            | 2.5                             | 2.36                  | —               | —              |
| 3 "            | 1                               | 0.985                 | ?               | —              |
| 4 "            | 1                               | 1.04                  | —               | —              |
| 5 "            | 0.3                             | 0.249                 | ?               | —              |
| 6 "            | 1                               | 0.978                 | ?               | —              |
| 7 "            | 0.5                             | 0.028                 | 0.017(mg/g)     | +              |
| 8 "            | 0.5                             | 0.115                 | ?               | +              |
| 9 "            | 2                               | 0.248                 | 0.672           | +              |
| 10 "           | 1                               | 0.911                 | —               | —              |
| 11 "           | 3                               | 2.90                  | —               | —              |
| 12 Suppository | 1(mg/piece)                     | 0.630(mg/piece)       | ?               | —              |
| 13 "           | 1                               | 0.436                 | 0.083(mg/piece) | +              |
| 14 "           | 1                               | 0.135                 | ?               | +              |
| 15 "           | 1                               | trace                 | ?               | +              |
| 16 "           | 1                               | trace                 | ?               | +              |

? : not determined because of interfering substances

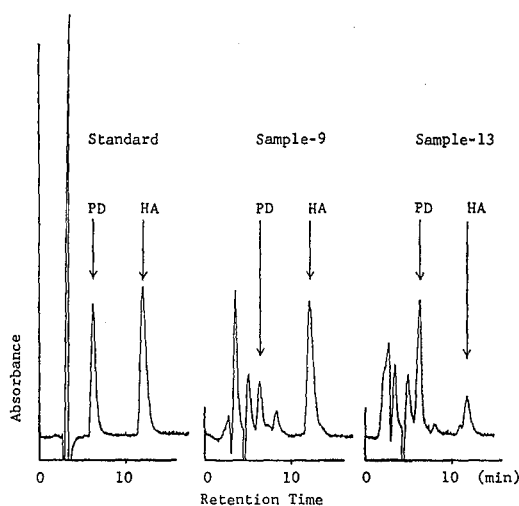


Fig. 2. HPLC Chromatograms of PD &amp; HA

Conditions : Column ; LiChrosorb RP-18 (MERCK), 5 $\mu$ m, 250mm $\times$ 4mm i.d. : Mobile phase ; H<sub>2</sub>O-Acetonitrile(2 : 1) : Flow rate ; 1.0ml/min : Pressure ; 220kg/cm<sup>2</sup> : Column temp. ; room temp. : Detector ; UV 242nm, 0.04 AUFS

どれも主成分PDの量は表示量に対して、極端に低く、とくに、Sa 15, 16についてはPDがほとんど検出されなかった。したがってPDがHAに分解しているものと考えられる。

一方、表示どおりPDが処方されていると仮定し、HAの定量可能であったものについて見ると、PDとHAの定量値の合計が表示量にはかたに及ばない結果が得られた。その理由は不明であるがHAがさらに分解している可能あるいはHA以外の他の分解等も考えられる。

製剤によるPDの安定性については、最も古く入手した、Sa 10, 11 からHAが検出されなかったことから、剤型、成分によりPDの安定性に大きな差があるものと思われる。

今後、PDの経時変化、分解機構、共存成分との相互作用の解明などが検討課題であると考える。

(本研究の概要は日本薬学会第102年会1982年4月で発表した。)

#### 文 献

- 1) 内藤俊一, 進藤健治, 河村文子, 服部たか子, 杉原郁子 : 薬剤学, 30, 174, 1970
- 2) 佐藤孝俊, 斎藤好広, 山岡桂子 : 油化学, 27, 88, 1978

- 3) 吉村三夫, 末広才備, 山本将文, 村松豊二郎, 長井秀隆: 医薬品研究, 11, 216, 1980
- 4) 川野泰明, 有賀晶子, 柴元靖: 薬剂学, 41, 71, 1981
- 5) 内藤俊一, 後藤サユリ, 岡田忠三, 菊森清忠, 進藤健治: 薬剂学, 31, 304, 1971
- 6) 佐藤孝俊, 斎藤好広, 山岡桂子, 西川元博: 薬剂学, 39, 20, 1979
- 7) Brooks, C. J. W. and Norymberski, J. K.: *Biochem. J.*, 55, 371, 1953
- 8) Blunt, J. W. and Stothers, J. B.: *Organic Magnetic Resonance*, 9, 439, 1977
- 9) Bailey, F. and Brittain, P. N.: *J. pharm. pharmac.*, 24, 425, 1972
- 10) Girard, A. and Sandulesco, G.: *Helv. Chim. Acta.*, 19, 1095, 1936
- 11) 中路幸男, 太田美矢子, 早川堯夫, 川村良次: 医薬品研究, 7, 17, 1976

## 漢方処方製剤の試験法に関する研究 (第1報) 紫雲膏製剤中の shikonin 類の定量

浜野 朋子\*, 安田 一郎\*, 瀬戸 隆子\*, 秋山 和幸\*, 原田 裕文\*

### Studies on Examination Method of Oriental Medicinal Preparations (I) Determination of Total Shikonin in Commercial Preparation 'Shiunkô'

TOMOKO HAMANO\*, ICHIRO YASUDA\*, TAKAKO SETO\*,  
KAZUYUKI AKIYAMA\* and HIROFUMI HARADA\*

A visible absorption spectrum method was studied successfully to examine the quality of *Lithospermi Radix* and simply to determine shikonin and its derivatives as the total shikonin of the preparation "Shiunkô". When this was applied to 26 samples of commercial preparation, 24 showed a similar pattern to that of the model preparation, while 2 showed another pattern and were different in appearance and properties from others. The total shikonin values of the former 24 samples varied widely among manufacturers and even among different lots of a manufacturer.

**Keywords :** Oriental medicine, *Lithospermi Radix*, Shiunkô, total shikonin, determination, visible spectrum, commercial preparation

#### 緒 言

紫雲膏は、江戸末期に華岡清洲により製された漢方外用薬で、現在は、一般用医薬品として厚生省がその承認基準を公表している漢方210処方のひとつ<sup>1)</sup>に数えられている。その原料生薬である紫根(*Lithospermi Radix*)には、抗菌・抗炎症作用、肉芽新生・創傷治癒促進作用等のあることが報告され<sup>2-5)</sup>、湿疹・水虫・角皮症等の皮膚疾患、あるいは外傷・火傷等の外科疾患に奏効を示し、さらに痔疾にも応用されている<sup>6,7)</sup>。

現在、紫雲膏として約10社の製品が市販されているが、その医薬品製造承認書には、規格・試験法の記載のないものが多い。そこで、著者等は、この製剤に関し何らかの規格を設ける必要性を感じ、第一段階として、紫根の有効成分である shikonin およびその誘導体 (Chart 1) がすべて紅紫色から暗紫色を呈する naphthoquinone 系色素<sup>8,9-10)</sup>であることを利用し、可視吸光度測定法により、製剤中の shikonin 類を簡易的に定量する方法を検討した。また、その可視吸収スペクトルを、shikonin の吸収スペクトルと比較することによって、定性試験についても同時に検討を行ったところ、いずれも良好な結果を得たので、この方法を市販製剤に応用した結果と併せ、報告する。

#### 実験の部

##### 1. 試薬

とくにことわりのない限り、試薬特級を用いた。

##### 2. 装置

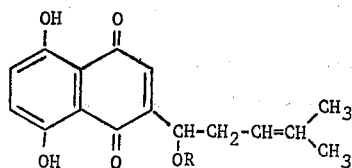
日立320型自記分光光度計、日本電子FX-270型核磁気共鳴装置

##### 3. shikonin 標品および標準溶液の調製

中国産硬紫根160gを粉末とし、これにベンゼン1lを加え、室温で48時間放置して抽出する。さらに、この操作を2回繰返した後、全抽出液を合して減圧濃縮する。ここに得た黒紫色粘稠性残渣10.5gをベンゼン30mlに溶かし、これをKieselgel 60, 300g (0.040~0.063mm, Merck社製)のカラムクロマトグラフィーに付し、ベンゼン:酢酸エチルエステル混液(1:1)で溶出する。溶出物質をメタノールから再結晶して、赤褐色板状結晶を得た。mp 145~147°, UV  $\lambda_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  nm(log  $\epsilon$ ): 278(3.81), 491(3.73), 522(3.78), 561(3.57),  $^{13}\text{C}$ -NMR  $\delta_{\text{ppm}}^{\text{CDCl}_3}$ : 18.1(q), 25.9(q), 35.6(t), 68.3(d), 111.5(s), 112.0(s), 118.5(d), 131.8(d), 132.2(d), 132.3(d), 137.2(s), 151.5(s), 164.9(s), 165.5(s), 179.7(s), 180.5(s)。以上のデータから本品は shikonin と推定され、融点が文献値<sup>8,9)</sup>と一致することから

\* 東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan



|                                                                              |                               |
|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| R                                                                            |                               |
| H                                                                            | shikonin                      |
| COCH <sub>3</sub>                                                            | acetyl-shikonin               |
| COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                          | isobutyl-shikonin             |
| COCH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                        | β,β-dimethylacryl-shikonin    |
| COCH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub><br> <br>OH                | β-hydroxy isovaleryl-shikonin |
| COCH <sub>2</sub> C=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub><br> <br>CH <sub>3</sub> | teracryl-shikonin             |

Chart 1. Shikonin and Shikonin Derivatives

shikonin と同定した。

得られた shikonin 約 20 mg を精秤し、クロロホルムに溶かして正確に 50 ml とする。この液を正確に 5 ml とし、クロロホルムを加えて正確に 100 ml とした液を標準溶液とする。

#### 4. 試料

**硬紫根エキスの調製** 中国産硬紫根を粉末にし、その 2 g を秤り、クロロホルムを加えて一昼夜抽出した後、ろ過する。残留物をクロロホルムで洗い、洗液をろ液に合して 200 ml とする。

**紫雲膏モデル製剤の調製** モデル製剤の製法は、渡辺らの報告<sup>11)</sup>を参考として、漢方処方解説<sup>9)</sup>、漢方処方集<sup>7)</sup>に準じ、以下の方法により製した。

(処方)

J P ゴマ油 500g, J P ミツロウ 190g, 豚脂 12.5g, 紫根および当帰 各 50 g

(製法)

ゴマ油を 160° で 1.5 時間加熱した後当帰を加え、140° で 5 分間静かに攪拌しながら抽出する。当帰を手早く金網ですくい上げ、ミツロウ、豚脂を加えて溶かす。さら

に加熱しながら紫根を加え、140° で 5 分間抽出後、速やかに金網で紫根をすくい上げ、火からおろし、4 枚重ねのガーゼでこす。攪拌しながら氷水中で冷却し、ミツロウが器壁に析出し始めたら室温に放置して、自然固化させる。

また、モデル製剤の処方から紫根を除いた製剤を、同様の方法により製した。

**市販紫雲膏製剤** 衛生局薬務部より送付された検体、および著者等が薬局より直接購入したもの、計 8 社 26 種の紫雲膏製剤を試料に供した。

#### 5. 操作法

**試験溶液の調製** 試料約 1 g を精秤し、クロロホルムに溶かして正確に 50 ml とし、試験溶液とする。

**定性および定量法** 360~600 nm の範囲で、shikonin 標準溶液および試験溶液の吸収スペクトルを測定し、両者の吸収スペクトルを比較して定性試験を行う。また、520~525 nm における吸収の極大波長で試験溶液の吸光度を測定し、別に作製した検量線から shikonin 類の含有量を求める。

#### 結果および考察

##### 1. shikonin 類の定量法について

**溶媒の検討** shikonin 類は、ベンゼン、エチルエーテル、メタノール、*n*-ヘキサン、クロロホルム等に可溶<sup>8,11,12)</sup>であり、各々の溶液の吸収スペクトルも同様のパターンを示すことから、これらの溶媒に対する紫雲膏の溶解性について検討したところ、メタノールには不溶であり、*n*-ヘキサン、エチルエーテルには基剤の一部が溶けず二層となって分離し、ベンゼン、クロロホルムには完全に溶解した。この結果から、操作の簡便性および安全性を考慮して、クロロホルムを溶媒として用いることとした。

**定量法の検討** 紫根中の shikonin 類の簡便な定量法として、二子石らは、可視部および紫外部吸光度測定法<sup>12)</sup>、渡辺らは、アルカリ添加により shikonin 類の赤紫色を青変させて定量する方法<sup>11)</sup>を報告している。これらの方法のうち、紫外部吸光度測定法を紫雲膏製剤に応用した場合、Fig. 1 に示すように、当帰およびその他の基剤の妨害が強く、shikonin 類の定量には不適當であった。また、アルカリを添加する方法は、紫雲膏製剤のクロロホルム溶液に水酸化ナトリウム溶液を添加、混和すると、エマルジョンを形成し易く、操作が煩雑となった。以上のことから、shikonin 類の赤紫色を、直接可視部吸光度測定法により定量することにした。さらに、shikonin、硬紫根エキス、モデル製剤の各々の可視部吸

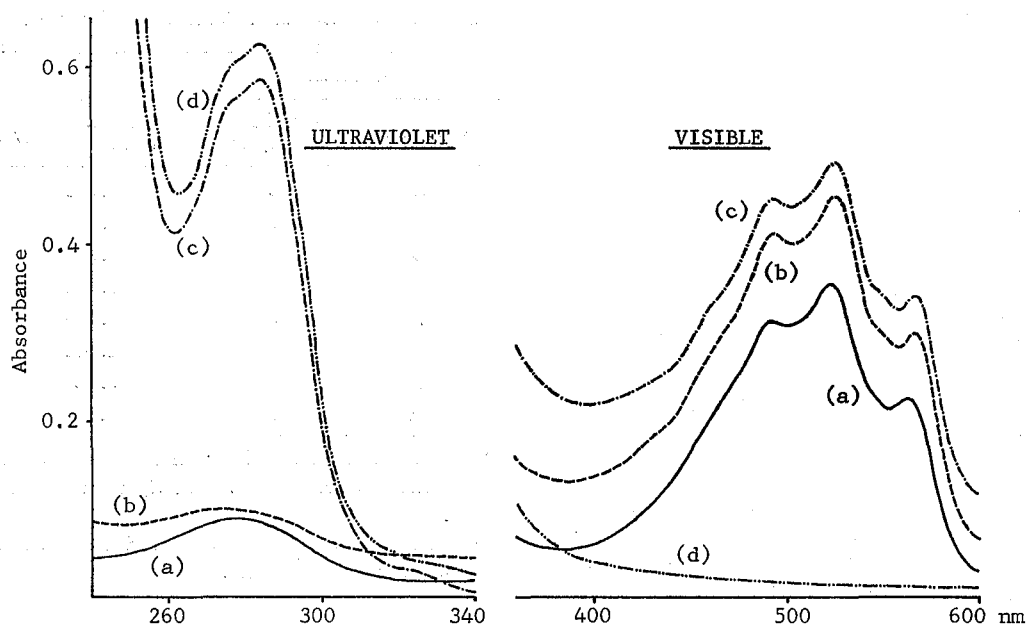


Fig. 1. Ultraviolet and Visible Absorption Spectra of Shikonin(a), *Lithospermi Radix* Extract(b), Model Preparation(c) and Model Preparation without *Lithospermi Radix*(d)

収スペクトルは、Fig. 1 のように、ほぼ同様のパターンを示すため、定量には520nm 付近の最大吸収波長における吸光度を用いた。

試料中の shikonin 類含有量は、shikonin およびその誘導体がいずれも同じ様な吸収スペクトルを有し、かつ、それらの薬理活性がほぼ等しい<sup>3,13)</sup>ことから、shikonin を標品として用い、総 shikonin 量で表わすことにした。

検量線 標準溶液を適宜希釈して、10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0  $\mu\text{g/ml}$  の溶液を作り、520nm 付近における各々の吸光度を測定し検量線を作製したところ、原点を通る直線が得られた。なお、490 nm 付近および560 nm 付近における他の2つの極大吸収に関しても、同様に、原点を通る直線が得られた。

添加回収実験 モデル製剤約1 gを精秤し、これに硬紫根エキス2.5ml (総 shikonin 量0.484mg)を正確に加え、水浴上で加温しながら、融解した製剤と添加したエキスを充分混和させる。以下、前述の方法に従って総 shikonin 量を定量した結果、回収率は平均98.3%、C. V. 1.4% (n=5) と良好であった。

2. 市販紫雲膏製剤の可視部吸収スペクトルについて 市販製剤について可視部吸収スペクトルを測定し定性試験を行ったところ、26種中24種に関しては、モデル製剤と同様のパターン (Pattern I.) を示したが、他2種

は、それらとは異なったパターン (Pattern II.) を示した (Fig. 2, Table 1)。この2種は、橙色の色調を呈し、敗油性の臭いを発するものであり、赤紫色で特異な臭いを有する他の24種とは、外観性状を異にしていた。一方これら2種の製造メーカーの他ロット各1製品について同様に試験したところ、いずれも正常なパターン (Pattern I.) を示したことから、このような異常を生じた要因として、製造工程中、あるいは製品保存中の shikonin 類の分解、経時変化等が示唆された。

### 3. 市販紫雲膏製剤中の総 shikonin 量について

Table 2に、8社の紫雲膏製剤中の総 shikonin 量の測定結果を示す。この結果から明らかなように、総 shikonin 量の最大のもは1.401mg/gで、最小の0.554mg/gの約2.5倍であり、各メーカー間にかなりのバラツキが認められた。また、Table 3に示したように、A製造メーカーのロット別の総 shikonin 量は、最大値(1.732 mg/g)と最小値(0.596 mg/g)の間に約3倍の開きがあり、同一メーカーの製品でも、そのロット間にこのようなバラツキがあることから考えると、メーカー間にバラツキが生じることは当然あり得ることと思われる。しかし、Table 3のB社製品について見ると、他ロットとは異なった系統の製品であると推測される Sample 1の値を除けば、同系統と考えられる他の6ロットの製品 (Sample

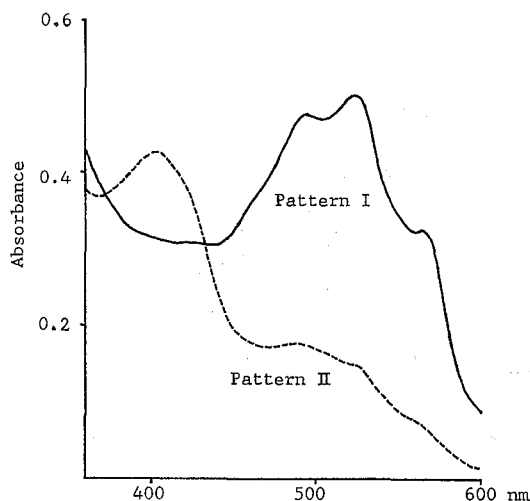


Fig. 2. Visible Absorption Spectra of Commercial Preparation 'Shiunkô' with Pattern I and II

Table 1. Classification of Commercial Preparation 'Shiunkô' by Visible Spectrum Pattern I and II

| Number of Pattern I | Number of Pattern II | Total Number |
|---------------------|----------------------|--------------|
| 24                  | 2                    | 26           |

2~7)の値は、ほぼ近似しており、このことから、原料生薬の選択、製造方法、および製品管理等を一定条件下で行うことにより、製品の均質化をはかり得ることが示唆される。

### 結 論

可視部吸光度測定法を用いて、紫雲膏製剤中の紫根の定性試験を行い、同時に、含有される shikonin 類を簡易的に定量する方法を検討したところ、良好な結果が得られた。そこで、この方法を市販製剤に応用し、各々の吸収スペクトルをモデル製剤と比較したところ、26種の製品中24種が同様のパターンを示したのに対し、2種のみが異なったパターンを示した。この結果は、これら2種のみが外観性状に異常を来していたことと対応しており、これらの異常性は、吸収スペクトルを測定することによっても識別することが可能であった。また、この2種を除く24種について総 shikonin 量を定量した結果、メーカー間および同一メーカーのロット間に、共に大きなバラツキが認められた。しかし、一部にバラツキの小さな製品も見られたこと等を考え合わせ、紫雲膏製剤の

Table 2. Total Shikonin Contents of Commercial Preparation 'Shiunkô'\* of Different Manufacturers

| Manufacturer | Number of Samples | Total Shikonin (mg/g) |
|--------------|-------------------|-----------------------|
| A            | 8                 | 1.015**               |
| B            | 7                 | 0.804**               |
| C            | 4                 | 1.224**               |
| D            | 1                 | 1.401                 |
| E            | 1                 | 0.734                 |
| F            | 1                 | 0.588                 |
| G            | 1                 | 0.554                 |
| H            | 1                 | 0.712                 |

\* Commercial Preparation 'Shiunkô' are defined as those which show Visible Spectrum Pattern I.

\*\* Each value represents the mean value of different lot number samples.

Table 3. Total Shikonin Contents of Commercial Preparation 'Shiunkô' of Manufacturer A and B

| Sample*   | Total Shikonin (mg/g) |       |
|-----------|-----------------------|-------|
|           | A                     | B     |
| 1         | 0.808                 | 1.564 |
| 2         | 0.878                 | 0.689 |
| 3         | 1.178                 | 0.627 |
| 4         | 1.731                 | 0.758 |
| 5         | 0.711                 | 0.753 |
| 6         | 0.596                 | 0.614 |
| 7         | 0.817                 | 0.625 |
| 8         | 1.398                 |       |
| $\bar{x}$ | 1.015                 | 0.804 |
| $\sigma$  | 0.388                 | 0.340 |

\* Lot number of each sample is different.

品質管理の必要性が示唆された。

また、以上得られた知見、すなわち、吸収スペクトルの相違および総 shikonin 量の製品による変動が生じた原因として、原料生薬中の shikonin 類含有量のバラツキ、製造工程中あるいは製品保存中の shikonin 類の分解、経時変化等が考えられるが、これらについて調査するためには、今回行った簡易定量法のほかに、shikonin 類を分別定量する方法も必要と考える。

謝辞 本研究にあたり、紫雲膏製剤の収去にあたられ



た衛生局薬務部の薬事監視員の方々に深謝致します。

# 文 献

- 1) 厚生省薬務局監修：一般用漢方処方の手引き, 1975, 薬事時報社
- 2) 日本公定書協会：第 10 改正日本薬局方解説書, D-400, 1981, 広川書店
- 3) 田中康雄, 小谷 功：薬誌, 92, 525, 1972
- 4) 林 元英, 鶴見介登, 藤村 一：日薬理誌, 65, 1958, 1969
- 5) 林 元英, 鶴見介登, 藤村 一：日薬理誌, 68, 72P., 1972
- 6) 矢数道明：臨床・応用漢方処方解説, 195, 1966, 創元社
- 7) 龍野一雄：漢方処方集, 56, 1974, 中国漢方
- 8) 京極和旭, 寺山博行, 館 安英, 鈴木 堯, 小松曼者：生薬誌, 22, 24, 1973
- 9) Morimoto, I., Kishi, T., Ikegami, S. and Hirata, Y. : *Tetrahedron Letters*, 4737, 1965
- 10) Morimoto, I. and Hirata, Y. : *Tetrahedron Letters*, 3677, 1966
- 11) 渡辺 武, 後藤 実：日本東洋医学会誌, 5, 19, 1955
- 12) 二子石広猛, 安部 隆：日本化粧品技術者連合会会誌, 7, 56, 1971
- 13) Sankawa, U., Ebizuka, Y., Miyazaki, T., Isomura, Y., Otsuka, H., Shibata, S., Inomata, M. and Fukuoka, F. : *Chem. Pharm. Bull.*, 25, 2392, 1977

## *In vitro* におけるパイロジェンの微量測定法に関する研究(第2報)

### 市販品注射剤中のエンドトキシン含量

宇佐美 博 幸\*, 秋 山 和 幸\*

## Study on Microassay of Pyrogen *in vitro* (II) Endotoxin Content in Commercial Intravenous Solutions

HIROYUKI USAMI\* and KAZUYUKI AKIYAMA\*

Studies were undertaken to determine with synthetic chromogenic substrate (SCS) test on the pyrogen contamination in intravenous solutions (large volume solutions) and to define the pyrogenicity of LPSs from various bacterial strains and various doses of LPS(*E. coli* O111 : B4) with J.P. rabbit pyrogen test.

SCS test conducted on 41 commercial intravenous solutions from 1979 to 1981 revealed that endotoxin content was 0.00-0.10 ng/ml in 12 and over 0.10 ng/ml in 29. Only 3 (7%) containing more than 5 ng/ml failed in JP pyrogen test or required retesting and 5 in 6 containing more than 0.9 ng/ml failed in LAL (gel clotting) test.

The rabbit assay was used to measure endotoxin potency. As a result, the febrile potency was found in the following order *Y. enterocolitica* O3 > *E. coli* O55 : B5 > *E. coli* O111 : B4. The order was the same as for the amidase activity with SCS test.

The febrile dose-response curve of rabbits showed linearity in the range of 10-200 ng/kg (1-20 ng/ml) of endotoxin *E. coli* O111 : B4. The result showed ca. 5 ng/ml (50 ng/kg referenced to *E. coli* O111 : B4) as the pass/fail criterion for medical devices.

**Keywords :** pyrogen, endotoxin, lipopolisaccharide, synthetic chromogenic substrate, intravenous solution, *E. coli*, *Limulus amoebocyte lysate*

### 緒 言

発熱性物質(エンドトキシン, LPS)試験の公定法としてウサギの体温上昇値で判定する日本薬局方発熱性物質試験があるが, 放射性医薬品のなかには脊髄腔内投与するものがあり, この場合エンドトキシンの毒性は極めて強く, 静脈内投与の100~1,000分の1が致死量となることから<sup>1,2)</sup> 放射性医薬品基準一般試験法中には局方発熱性物質試験よりもさらに10倍以上高感度の *Limulus test*(カプトガニ試験)が採用されている。これは *Limulus lysate* がエンドトキシンの作用で特異的に凝集するゲル化反応により判定するものである<sup>3)</sup>。また1980年には米国家薬局方一般試験法に *Limulus test* が採用された。しかし, ゲル化判定法は試験者の主観が入る要素があり定量性に欠ける。著者らは, *Limulus test* の原理を応用した新しい発色性合成基質法がゲル化判定法よりもさら

に高感度で定量性を有することを認め<sup>4-6)</sup>, 今回本法を用いて, 市販品輸液製剤中のエンドトキシン測定を試み, 同時に局方発熱性物質試験, ゲル化判定法を行ない, その実態について調査した。またエンドトキシン濃度と発熱活性の関係についても検討したので併せて報告する。

### 実 験

#### 1. 器具および装置

メスピペット, ミクロピペット, アルミキャップ付試験管, メスフラスコなど定量に使用するガラス器具類はすべて250°, 30分以上乾熱滅菌した。

日立 320 型自記分光光度計, 光束幅 2 mm × 光路長 10 mm キュベット, 萱垣製ふ卵器, 飯尾製 Ep 761-2 型 pyrogen test recorder を使用した。

#### 2. 試薬および試料

\* 東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

- 1) 合成基質: pyrodic 生化学工業
- 2) Limulus lysate: プレゲル 生化学工業
- 3) エンドトキシン (内毒素): *E. coli* O111: B4
- 4) 輸液製剤: 衛生局薬務部より送付された 1979～1981年までの収去検体および1981年度の依頼試験検体。

### 3. 実験方法

#### 1) 発熱活性に関する検討

##### ①エンドトキシン (LPS) の発熱活性の比較

日局発熱性物質試験に従い、首架式で、12点式自記体温計を使用、連続記録を行ない、*Yersinia enterocolitica*, *E. coli* O111: B4, *E. coli* O55: B5 の LPS の 1 ng/ml 溶液をウサギの体重 1 kg 当り 10 ml 静注し、5 時間測温して発熱パターンを比較した。

##### ② LPS による発熱の濃度依存性の検討

標準に用いた *E. coli* O111: B4 の 1, 5, 10, 20 ng/ml をウサギの体重 1 kg 当り 10 ml を静注し、最高体温上昇値をプロットし、用量-反応曲線を求めた。また、それぞれの用量での 5 時間の発熱パターンを作成した。

#### 2) Limulus test (ゲル化判定法)

放射性医薬品基準エンドトキシン検出法に従って行なった。

#### 3) 合成基質法

前報の方法に従い LPS: *E. coli* O111: B4 の 0.1～2.5 ng/ml 濃度の溶液を調製し、これを用いて検量線を作成し、同時に操作した輸液中のエンドトキシン含量を測定した。

### 結果および考察

#### 1. 発熱活性に関する検討

標準に用いた LPS: *E. coli* O111: B4 の各用量での最高体温上昇値を求め、用量反応曲線を作成すると Fig. 1 のように 1～20 ng/ml 濃度すなわち 10～200 ng/kg の範囲で濃度依存性を示した。体温上昇値は  $0.08^{\circ}$ ～ $1.4^{\circ}$  であった。5 ng/ml 濃度すなわち 50 ng/kg 用量で最高体温上昇値が局方基準値の  $0.6^{\circ}$  を示した。局方では  $0.6^{\circ}$  を越えるものが 2 匹を越えると陽性、1 匹、または 3 匹の合計が  $1.4^{\circ}$  を越えるときには更に試験を行なうとしている。すなわち再試験にかかる体温上昇をもたらすエンドトキシン濃度は *E. coli* O111: B4 では約 5 ng/ml であった。局方では  $0.6^{\circ}$  の体温上昇を基準としているがヒトの発熱感受性は一般的にウサギの約 3 倍であるのでさらに高い体温上昇値をもたらす可能性がある<sup>1)</sup>。実際にエンドトキシンをヒトに 0.1～1  $\mu$ g を静注した場合  $38^{\circ}$  以上の発熱例が報告されている<sup>7,8)</sup>。また各用量での 5 時間の発熱パターンは Fig. 2 に示すとおりで 1～2 時間

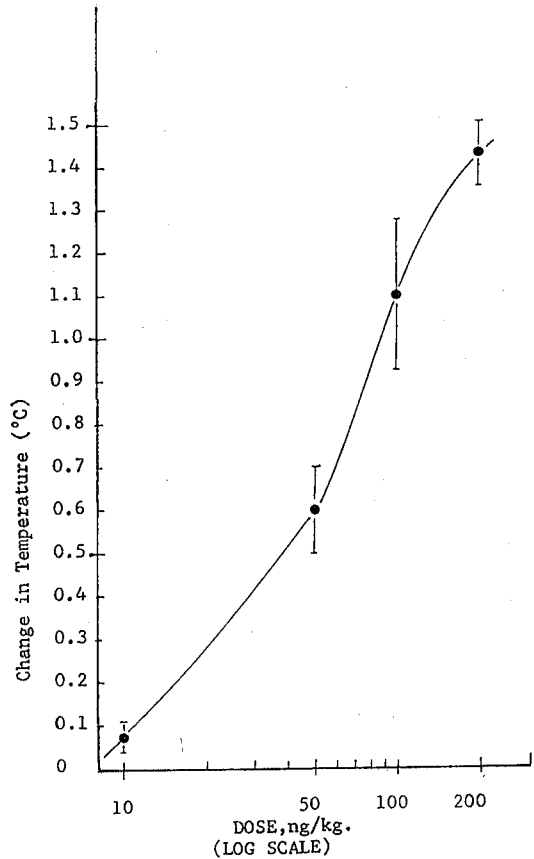


Fig. 1. Rabbit pyrogen test dose-response curve for endotoxin *E. coli* O111: B4. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 3-6 experiments.

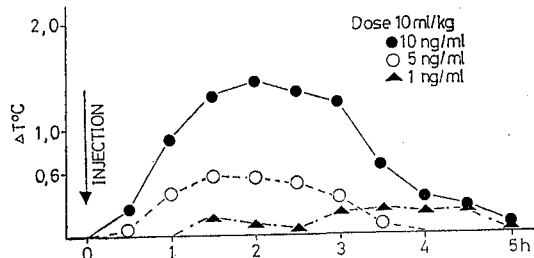


Fig. 2. Febrile responses of rabbits injected with various doses of LPS *E. coli* O111: B4

の間にピークがみられた。

LPS の種類による発熱パターンの違いを Fig. 3 に示す。発熱活性は *Y. enterocolitica* O3 > *E. coli* O55: B5

Table 1. Pyrogen Contamination in Intravenous Solutions

| No. | Formulation     | Manufacturer | Chromogenic assay*<br>ng/ml | Gel clot | Rabbit pyrogen<br>test J. P. |
|-----|-----------------|--------------|-----------------------------|----------|------------------------------|
| 1   | amino acid      | A            | 0.06                        | —        | —                            |
| 2   | "               | "            | 0.19                        | —        | —                            |
| 3   | "               | "            | 0.10                        | —        | —                            |
| 4   | "               | "            | 0.01                        | —        | —                            |
| 5   | "               | "            | 0.03                        | —        | —                            |
| 6   | "               | "            | 0.03                        | —        | —                            |
| 7   | dextran         | "            | 0.41                        | —        | —                            |
| 8   | "               | "            | 0.17                        | —        | —                            |
| 9   | "               | "            | 0.20                        | —        | —                            |
| 10  | xylitol         | "            | 0.09                        | —        | —                            |
| 11  | dextrose        | "            | 0.01                        | —        | —                            |
| 12  | D-sorbitol      | "            | 0.07                        | —        | —                            |
| 13  | amino acid      | B            | 1.21                        | —        | —                            |
| 14  | glycerin        | "            | 0.07                        | —        | —                            |
| 15  | "               | "            | 0.12                        | —        | —                            |
| 16  | xylitol         | C            | 0.18                        | —        | —                            |
| 17  | "               | "            | 0.22                        | —        | —                            |
| 18  | "               | "            | 0.03                        | —        | —                            |
| 19  | maltose         | D            | 0.00                        | —        | —                            |
| 20  | "               | "            | 0.00                        | —        | —                            |
| 21  | amino acid      | E            | 0.49                        | —        | —                            |
| 22  | "               | "            | 0.12                        | —        | —                            |
| 23  | dextrose        | "            | 0.05                        | —        | —                            |
| 24  | sodium chloride | "            | 0.10                        | —        | —                            |
| 25  | xylitol         | "            | 0.20                        | —        | —                            |
| 26  | "               | "            | 0.07                        | —        | —                            |
| 27  | xylitol         | F            | 0.14                        | —        | —                            |
| 28  | "               | "            | 0.23                        | —        | —                            |
| 29  | H. E. S.        | G            | 0.80                        | —        | —                            |
| 30  | maltose         | H            | 0.19                        | —        | —                            |
| 31  | "               | "            | 0.16                        | —        | —                            |
| 32  | gelatin polymer | I            | 0.41                        | +        | —                            |
| 33  | dextrose        | J            | 0.15                        | —        | —                            |
| 34  | fructose        | "            | 0.66                        | —        | —                            |
| 35  | xylitol         | "            | 0.34                        | —        | —                            |
| 36  | "               | "            | 0.70                        | —        | —                            |
| 37  | "               | "            | 0.91                        | +        | —                            |
| 38  | "               | "            | 1.21                        | +        | —                            |
| 39  | "               | "            | 5.22                        | +        | retest                       |
| 40  | "               | "            | 9.80                        | +        | +                            |
| 41  | dextrose        | "            | 45.53                       | +        | +                            |

\* as LPS *E. coli* O111 : B4

● *Y. enterocolitica* ○ *E. coli* O:55 B5 ▲ *E. coli* O111:B4

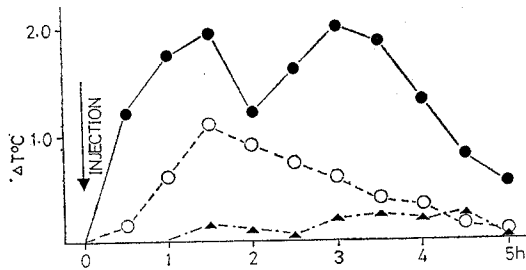


Fig. 3. Comparison of fever reaction of rabbits after intravenous injection of lipopolysaccharides from various bacterial strains  
Dose: 10ng/kg

> *E. coli* O111:B4 の順でアミダーゼ活性化能と同じ傾向がみられた。またピークは1~3時間に現われ、*Y. enterocolitica* の発熱パターンは2峰性を呈し、発熱活性が著しく強いことを示した。

## 2. 市販品輸液製剤中のエンドトキシン測定結果

アミノ酸製剤、キシリトール製剤など輸液製剤41検体についての試験成績を Table 1 に示す、ウサギ発熱反応陽性のもの2例、再試験1例と高濃度汚染を示すものは少なかったが、合成基質法により低濃度ではあるが高率の汚染状況が検出された。すなわち測定値は平均 1.72 ng/ml, 最大値 45.5ng/ml, Fig. 4 に示すように 0.1ng/ml 以上のものは41検体中29例 (71%) であった。0.9

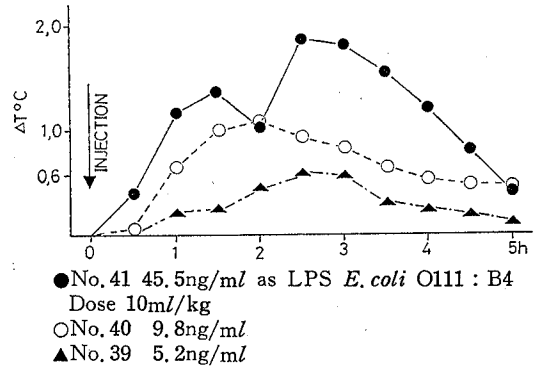


Fig. 5. Comparison of fever reaction of rabbits after intravenous injection of sample solution  
● No. 41 45.5ng/ml as LPS *E. coli* O111:B4  
Dose 10ml/kg  
○ No. 40 9.8ng/ml  
▲ No. 39 5.2ng/ml

ng/ml 濃度を越えるもの6検体中5例はゲル化判定法陽性であった。5ng/ml 濃度を越えるもの3検体中5.2ng/ml の1例は局方発熱性物質試験再試験となったが、9ng/ml を越える2例はいずれも陽性であった。先に述べた LPS: *E. coli* O111:B4 の 5ng/ml が発熱活性を示した結果を裏付けた。発熱パターンは Fig. 5 に示すとおりであり最大値 45.5ng/ml の検体はエンドトキシン特有の2峰性の発熱パターンを呈した、製造業者により品質に差がみられ、D社の製品からは検出されなかったがJ社の製品からは平均 7.2ng/ml と比較的高い値が得られた。また同一業者の製品であってもロットおよび製品の種類により差がみられた。

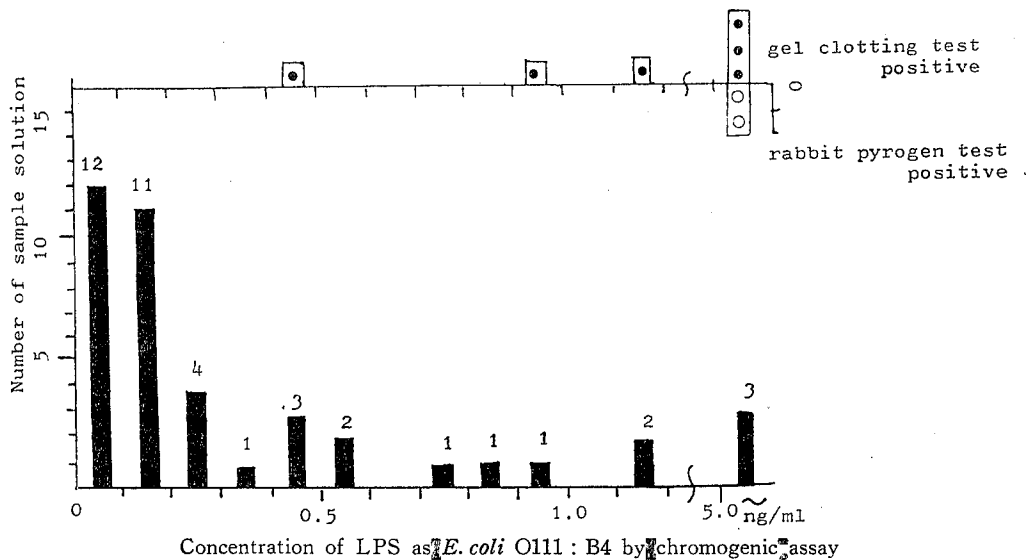


Fig. 4. Chromogenic assay vs. rabbit pyrogen test vs. limulus gelation test

## 総 括

ウサギ発熱活性とエンドトキシン濃度の関係、市販品輸液製剤中のエンドトキシン含量を検討し、以下の結果を得た。

1. 最高体温上昇値はエンドトキシンの一定濃度範囲で濃度依存性があり、*E. coli* O111 : B4 の 5ng/ml 濃度で約0.6°であった。

2. 3種の LPS の発熱活性の強さはアミダーゼ活性化能の強さと同じ傾向を示した。

3. 市販輸液製剤41検体中29例 (71%) がエンドトキシン (*E. coli* O111 : B4) 0.1 ng/ml 濃度以上の活性を示した。

4. 0.9ng/ml 濃度を越えるもの6検体中5例がゲル化法陽性であった。

5. 5ng/ml 濃度を越えるもの3検体中5.2ng/ml のものは局方発熱性物質試験が再試験となったが9ng/ml 濃度を越えるもの2例はいずれも陽性であった。

(本研究の内容は一部第67回東京都衛生局学会、日本薬学会第102年会において報告した。)

## 文 献

- 1) 玉熊正悦, 石山 賢: エンドトキシンショック, 中外医学社, 1977
- 2) 放射性医薬品基準, 第10改正日本薬局方解説書, 広川書店
- 3) Levin, J., Bang, F.B.: Bull. Johns Hopkins Hosp., 115, 265, 1964
- 4) 宇佐美博幸, 下平彰男: 東京衛研年報, 32-1, 83, 1981
- 5) 宇佐美博幸, 下平彰男: 東京都衛生局学会誌, 67, 24, 1981
- 6) 宇佐美博幸, 秋山和幸: 日本薬学会第102年会講演要旨集, 654, 1982
- 7) Westphal O.: Bacterial Endotoxins, The Second Carl Prausnitz Memorial Lecture, Int. Arches Allergy appl. Immun., 49, 1, 1975
- 8) N. シャロン: 複合糖質, 198, 学会出版センター, 1977

有害物質を含有する家庭用品の試験法に関する研究 (第7報)

繊維製品中の有機塩素系防虫剤の定量 (III)

寺 島 潔\*, 萩 原 輝 彦\*, 奥 本 千代美\*, 長 嶋 真知子\*  
吉 原 武 俊\*\*, 秋 山 和 幸\*

Studies on Examination Method of Household-Necessities Containing  
Poisonous Chemical Substances (VII)

Determination of Organochlorine Mothproofing Agents from Wool Fabrics (III)

KIYOSHI TERASHIMA\*, TERUHIKO HAGIWARA\*, CHIYOMI OKUMOTO\*,  
MACHIKO NAGASHIMA\*, TAKETOSHI YOSHIHARA\*\*  
and KAZUYUKI AKIYAMA\*

Mothproofing agents of dieldrin, 4,6-dichloro-7-(2,4,5-trichlorophenoxy)-2-trifluoromethylbenzimidazole (DTTB), Eulan U-33, and Mitin FF in commercial wool fabrics were determined by electron capture gas chromatography.

Some modifications of previous methods were described; methylation of DTTB with 1-methyl-3-p-tolyltriazene and a direct assay of 3,4-dichloroaniline formed from Mitin FF.

Eulan U-33 was used more than any other agents. The pesticides were found in 16 of 32 carpets and 2 of 60 yarns. No pesticide was detected in all of 11 diaper cover samples.

**Keywords** : mothproofing agents, dieldrin, DTTB, Eulan U-33, Mitin FF, Commercial wool fabrics, electron capture gas chromatography

緒 言

従来から我国では、羊毛製品の防虫剤として Fig. 1 に示したような有機塩素系防虫剤が用いられてきた<sup>1)</sup>。このうちディルドリンおよび 4,6-ジクロロ-7-(2,4,5-トリクロロフェノキシ)-2-トリフルオルメチルベンズイミダゾール (DTTB) は、経皮、経口急性毒性が強く、また反復投与による肝臓および生殖器官障害などを生ずるほか、汗により製品から溶出する<sup>2)</sup>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」<sup>4)</sup>により、1978年10月および1982年4月から、羊毛製品中の含有量はそれぞれ 30 $\mu$ g/g 以下に規制された。しかし DTTB およびその類似化合物であるオイランU-33、ミチン FF については分析法、市販製品の加工実態などに関する報告は少なく、鹿庭らの電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ (GC-ECD) を用いた方法<sup>5)</sup> および著者らの高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いた方法<sup>6)</sup> がみられるのみである。そこで著者らは、1976~1980年に衛生局

薬務部より送付された市販羊毛製品について、ディルドリンは公定法に従い 342 検体を、ほか 3 種類の防虫剤については鹿庭らの方法に若干の変更を加え 185 検体を定量した。

実験の部

1 試薬 溶媒、無水硫酸ナトリウム；残留農薬試験用、1-メチル-3-P-トリルトリアゼン (メチル-T)；東京化成特殊用途用、3,4-ジクロロアニリン (3,4-DCA)；試薬特級をヘキサンから再結晶したもの。無色針状結晶，mp. 71.5°。その他の試薬は特にことわりのないかぎり特級を用いた。

加工剤標準物質 ディルドリン；残留農薬試験用。DTTB；和光純薬家庭用品試験用。オイランU-33；かっ色油状。ミチン FF；mp. 230~231°，無色針状結晶

2 器具および装置 GC-ECD；島津製作所製，GC-4CM PFE (<sup>63</sup>Ni-検出器付き)。微量融点測定器；Mettler 社製；FP-1，ロータリーエバポレーター；

\* 東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 同理化学部微量分析研究科

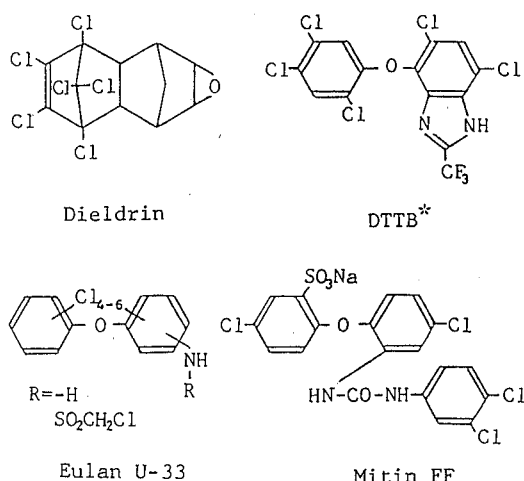


Fig. 1. Mothproofing Agents

\* 4,6-Dichloro-7-(2,4,5-trichlorophenoxy)-2-trifluoromethylbenzimidazole

東京理化学株式会社製。遠心分離器；国産遠心機株式会社製，H-100型。振とう機；イワキ製作所製，U-S型。

3 試料 1976～1980年購入の市販羊毛製品。なおカーペットおよび混紡製品については，分取可能なものは毛のみ，不可能のものはそのまま試料とした。

4 GC-ECD 条件Ⅰ—充填剤；10% Silicone DC QF-1 (Chromosorb W AW-DMCS, 60～80メッシュ)。カラム；内径3mm，長さ2m，ガラス製。温度；注入口および検出器270°，カラム恒温槽230°。キャリアガス；窒素，40ml/min，ECD；Sensitivity 10<sup>2</sup>Ω，range 0.08V

条件Ⅱ—カラム恒温槽 150°，その他の条件はⅠと同じ。

5 分析法 ディルドリン；「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」に準拠して行った。

DTTB，オイランU-33およびミチンFFの試料溶液の調製；防虫剤の抽出は鹿庭らの方法<sup>5)</sup>に従って行った。

細切した試料約0.5gを精秤し，50mlの共栓付き遠心管に入れ10% NaOH 10mlを加えときどき振り混ぜ溶解したのち，エーテル10mlを加え5分間振とう後遠心分離し，エーテル層を分取する。更に同様に抽出を3回繰り返す，全エーテル層を合わせ無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し，エーテルを留去したのちベンゼン10mlを加え溶解し試料溶液として，3種類の防虫剤についてそれぞれ下記操作を行う。

DTTB；試料溶液2mlをとり，0.5%メチル-Tベンゼン溶液1mlを加え，還流冷却器を付け沸騰水浴上で5分間加熱する。冷後ベンゼン5mlを加え5分間振とうしたのちベンゼン層を分取する。更に同様に抽出を3回繰り返す全ベンゼン層を合わせ無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し適宜希釈する。その5μlをGC条件Ⅰで分析し，生じたメチル化体2種に基づくふたつのピーク高の和を求め，標準物質を同様に処理して作成した検量線よりその量を求めた。

オイラン U-33；試料溶液2mlをとりベンゼンで適宜希釈し，その5μlをGC条件Ⅰで分析し，標準物質のピークに対応する全ピークの高さを合計する。別に標準物質について同様に処理して作成した検量線より含有量を求めた。

ミチン FF；試料溶液5mlをとりベンゼンを留去したのち，10% NaOH 10mlを加え30分間直火還流し，ミチン FFを加水分解して3,4-DCAとする。冷後ベンゼン10mlを加え5分間振とうしたのちベンゼン層を分取する。更に同様に抽出を3回繰り返す，全ベンゼン層を合わせ無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥後適宜希釈し，その5μlをGC条件Ⅱで分析しピーク高を求め，別に作成した標準3,4-DCAの検量線からその含有量を求め，次式によりミチン FF量 C<sub>MFF</sub>(μg/g)に換算した。

$$C_{MFF} = 3.03 \times [C_{3,4-DCA}] \times [m]^{-1}$$

C<sub>3,4-DCA</sub>；3,4-DCA量(μg)，m；試料量(g)

### 結果および考察

1 GC-ECD カラムの選択；それぞれの防虫剤のガスクロマトグラムをFig.2に示す。鹿庭らの報告<sup>5)</sup>のようにオイランU-33は複雑なガスクロマトグラムを示すので各ピークの分離を主目的に数種類のシリコン系充填剤を用い検討した結果，GC条件Ⅰの場合に良好なピークを得た。次に同一カラムによる他の防虫剤の分析条件

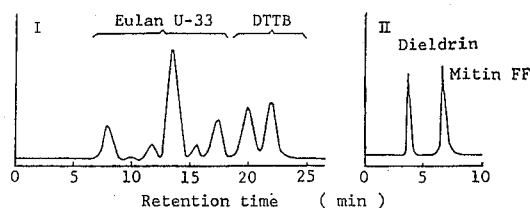


Fig. 2. ECD Gas Chromatogram of Dieldrin, DTTB (as N-Methyl Derivatives), Eulan U-33 and Mitin FF (as 3,4-DCA)

I) : Column temperature 230°

II) : Column temperature 150°



を検討したところGC条件IでDTTBが、また条件IIでミチンFFおよびデイルドリンの同時定量が可能であった。

2 検量線および定量限界 本分析法に従い操作し、それぞれの試料溶液を5mlとしその5 $\mu$ lをGCに注入した。また定量限界はすべてS/N=4とした。

DTTB ; 0.03~0.8ngの間で原点を通る直線関係が成立し、定量限界は0.3 $\mu$ g/gであった。

オイラン U-33 ; 0.1~1.5ng で原点を通る直線関係が成立し、定量限界は1 $\mu$ g/gであった。

ミチン FF ; 0.1~2.0 $\mu$ gの間で原点を通る直線関係が成立し、定量限界は25 $\mu$ g/gであった。

3 誘導体の調製 鹿庭らの分析法<sup>5)</sup>と本分析法の主要な相違点は、DTTBの定量を行うときそのメチル化剤として、分解し易い液体で、有毒、腐蝕性のジメチル硫酸のかわりに、安定な固体で必要に応じて溶解し使用できるメチル-Tの0.5%ベンゼン溶液を用いたこと、およびミチンFFの加水分解によって生成する3,4-DCAをトリフルオロアセチル化せずそのまま定量したことである。

DTTB DTTB標準物質1mg/mlのベンゼン溶液1mlをとり、メチル-Tベンゼン溶液を加え還流冷却器を付け、沸騰水浴上で加熱しメチル化の条件を検討した。

N-メチル体の抽出 ; ベンゼンおよびヘキサンを用いそれぞれ5mlずつ計4回繰り返し抽出した結果、いずれも同様に定量的に抽出された。

メチル-T濃度の影響 ; メチル-Tの0.5, 1.0, 5.0, 10.0%ベンゼン溶液を調製し、その1mlずつを用いそれぞれの濃度で標準物質と共に30分間加熱したところ、Fig. 3aに示したように、すべての濃度で一定のN-メチル体生成量を得たので、0.5%メチル-T溶液1mlを用いることとした。

反応時間および温度 ; 反応条件を沸騰水浴とし、加熱時間を5, 10, 15, 30分間と変化させたところ Fig. 3bに示したようにN-メチル体の生成は5分ですでに一定となり以後変化はなかった。また反応を20°で行うとN-メチル体の生成は非常に遅く、30分後で沸騰水浴で反応させた場合の約17%, 30時間後でも約68%であった。

以上の結果からDTTBのメチル化は、0.5%メチル-Tベンゼン溶液1mlを加え沸騰水浴上5分間還流することとし、その後ベンゼン5mlずつ計4回抽出し分析に供した。

ミチンFF ミチンFF標準物質1.0mgを用い、10%NaOH 10mlを加え直火で還流し、その加熱時間を30,

60, および120分間と変え、それぞれの3,4-DCA生成量を検討したところ、Fig. 4に示したように30分で約95%のミチンFFが分解され以後一定であった。このことから反応条件は還流冷却器を付け直火30分とした。また3,4-DCAの抽出溶媒は鹿庭らの報告<sup>5)</sup>に従いベンゼンとした。

4 市販羊毛製品の加工の実態 本分析法に従って市販羊毛製品中の防虫剤の定量を行いその結果をTable 1に示した。

防虫加工剤の使用量はメーカーにより指定され、それぞれデイルドリン 100~300 $\mu$ g/g, DTTB 250 $\mu$ g/g, オイラン U-33 5000 $\mu$ g/g およびミチンFF 7500 $\mu$ g/gである。試験の結果、通常加工量に比較して著しく低い含有量を示す例および数種類の防虫剤の混在している例などがあった。これらの理由については再生毛の使用によると推定されている<sup>5)</sup>。

このことから防虫剤検出例がすべて防虫加工に由来するとはいえないが、それらの検出は防虫加工剤の使用頻度の指標になると思われる。

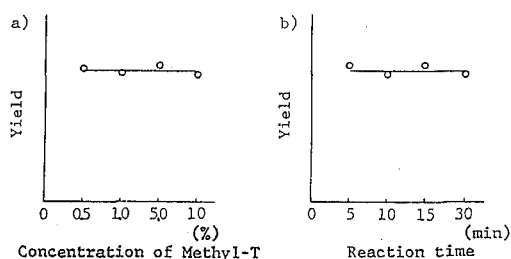


Fig. 3. Effect of Concentration and Reaction Time of Methyl-T on Methylation of DTTB  
DTTB was refluxed with 1 ml of Methyl-T benzene solution  
DTTB : 1 ml of benzene solution (1.0 mg/ml)

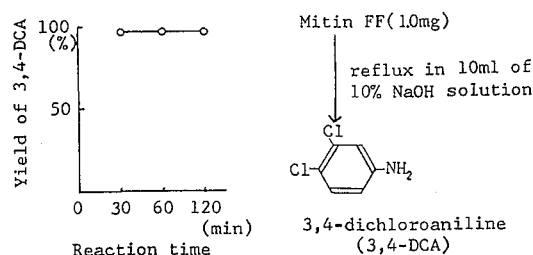


Fig. 4. Effect of Reaction Time on Formation of 3,4-DCA from Mitin FF with NaOH under Reflux

Table 1. Detected Cases of Mothproofing Agents from various wool Fabrics

| Sample              | Material     | %   | Producing country | Agent ( $\mu\text{g/g}$ ) |      |            |         |
|---------------------|--------------|-----|-------------------|---------------------------|------|------------|---------|
|                     |              |     |                   | Dieldrin                  | DTTB | Eulan U-33 | MitinFF |
| Cloth               | Wool         | 100 | Japan             |                           | 1.2  |            |         |
| Lounge Suit A       | "            | 100 | Italy             |                           | 2.0  |            |         |
| B                   | "            | 90  | Japan             |                           | 1.0  |            |         |
|                     | Nylon        | 10  |                   |                           |      |            |         |
| Coat Ladies'        | Wool         | 70  | Swiss             |                           |      | 169        |         |
|                     | Polyester    | 30  |                   |                           |      |            |         |
| Hat A               | Wool         | 100 | Italy             |                           |      | 421        |         |
| B                   | Rabbit       | 100 | Japan             |                           |      | 10.4       |         |
| Sweater             | Wool         | 50  | Italy             |                           |      | 21.8       |         |
|                     | Acryl        | 50  |                   |                           |      |            |         |
| Underwear           | Wool         | 100 | Japan             |                           |      |            | 7240    |
| Waist Colth         | "            | 100 | "                 |                           |      |            | 5500    |
| Long Undergarment A | "            | 100 | "                 | 58.1                      | 33.8 |            |         |
| B                   | "            | 100 | "                 | 82.3                      |      |            |         |
| Glove               | "            | 90  | "                 |                           |      |            | 6300    |
|                     | Nylon        | 10  |                   |                           |      |            |         |
| Socks               | Wool         | 85  | "                 |                           |      | 1360       |         |
|                     | Nylon        | 10  |                   |                           |      |            |         |
|                     | Polyurethane | 5   |                   |                           |      |            |         |
| Yarn A              | Wool         | 100 | Norway            |                           |      |            | 5900    |
| B                   | Alpaca       | 100 | Italy             |                           |      | 84.6       |         |
| Blanket             | Wool         | 100 | Japan             |                           |      |            | 5720    |
| Carpet A            | "            | 100 | Belgium           |                           |      | 1490       |         |
| B                   | "            | 100 | "                 |                           |      | 932        |         |
| C                   | "            | 100 | "                 | 280                       |      |            |         |
| D                   | "            | 100 | "                 | 30.0                      |      |            |         |
| E                   | "            | 100 | "                 |                           |      | 926        |         |
| F                   | "            | 100 | England           | 172                       |      |            |         |
| G                   | "            | 80  | "                 | 129                       |      |            |         |
|                     | Nylon        | 20  |                   |                           |      |            |         |
| H                   | Wool         | 100 | Germany           |                           |      | 1930       |         |
| I                   | "            | 100 | "                 |                           |      | 24.4       |         |
| J                   | "            | 100 | French            |                           |      | 1200       |         |
| K                   | "            | 100 | Hungary           |                           |      | 126        |         |
| L                   | "            | 100 | Japan             |                           |      | 549        |         |
| M                   | "            | 100 | "                 |                           |      | 919        |         |
| N                   | "            | 100 | unknown           |                           |      | 658        |         |
| O                   | "            | 100 | "                 |                           |      | 396        |         |

製品別防虫剤の検出について 本調査において最も高率に防虫剤が検出されたのは床敷物で、50% (32検体中16検体) に達した。家庭用毛糸では検出率が低く60検体中2検体から検出されたが、明らかに加工されたと思わ

れたのは1検体のみであった。そのほか乳幼児用オムツカバー11検体からはまったく検出されなかった。

防虫剤別検出状況 ディルドリン；日本製品からは1976年購入の長襦袢2検体（同一メーカー）を最後に規

制値を超えたものはなかった。DTTB ; 4検体から検出されたが、規制値を超えたのは1検体(1976年購入)だけで、ほか3検体については低濃度であったことから現在繁用されている可能性は少ないと思われた。オイランU-33 ; 今回の調査結果から最も繁用されていると思われ、検出された防虫剤の約50%以上を占めており、特に床敷物に高率に使用されていた。ミチン FF ; オイランに次ぐ検出率で、特に高濃度で検出された。また、毛布、下着など膚に触れ易く柔軟な製品に多く、毛布を除く4検体は毛糸およびその製品であり、床敷物および服地などには検出されなかった。

#### ま と め

市販羊毛製品について、我国で使用されている主要な防虫剤であるディルドリン、DTTB、オイランU-33およびミチン FFの定量法について検討し、またこれらの市場における加工実態を調査した。

1) DTTB のメチル化剤として0.5%メチル-Tベンゼン溶液を用い、通常加工量 1/100~5 倍以上の範囲について定量的にメチル化された。

2) ミチン FFは加水分解し 3, 4-DCA としてGC-ECD で測定可能であった。

3) GC充填剤に10% QF-1 を用い、ディルドリンおよびミチン FFはカラム恒温槽温度 150°で、DTTB およびオイランU-33は 230°でそれぞれ同時定量が可能であった。また本分析法の定量限界は  $S/N=4$  のとき DTTB 0.3 $\mu$ g/g, オイランU-33 1 $\mu$ g/g およびミチン FF 25 $\mu$ g/g であった。

4) 市販羊毛製品の調査結果は次のとおりであった。

a) 床敷物の50%以上に防虫剤が検出され、特に高率

であった。

b) ディルドリンは日本製に限れば1976年以降規制値を超えたものはなかった。

c) DTTB は検出された4検体中1検体だけが規制値を超えたのみで、現在繁用されている可能性は少ないと思われた。

d) オイラン U-33は最も高率で検出され、防虫加工剤検出例の50%を占めた。

e) ミチン FFは5検体に検出されたが、いずれも高濃度であった。

謝辞 本報告にあたり、防虫剤を供与して下さった日本チバガイギー株式会社、バイエル日本株式会社および検体購入にあたられた衛生局薬務部の方々に深謝致します。

#### 文 献

- 1) 厚生省環境衛生局企画課家庭用品安全対策室編：家庭用品規制関係実務便覧，2045の44，1977，第一出版，東京
- 2) 柴田 豊：織消誌，17，7，1976
- 3) 西沢元仁：ibid，23，1，1982
- 4) 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日法第112号）
- 5) 鹿庭正明，小嶋茂雄，中村晃忠，佐藤洋子：衛生化学，25，2，1979
- 6) 萩原輝彦，寺島 潔，吉原武俊，下平彰男：東京衛研年報，31-1，77，1982
- 7) 萩原輝彦，寺島 潔，奥本千代美，長嶋真知子，秋山和幸：衛生化学，投稿中

歯科材料の衛生化学的研究 (第2報)  
フレイムレス原子吸光分析法による歯科用セメント中のヒ素, 鉛  
およびカドミウムの分析法について

植田 忠彦\*, 西田 茂一\*, 吉原 武俊\*

Hygienic Chemical Studies on Dental Treatment Materials (II)  
Determination of Arsenic, Lead and Cadmium in Dental Cements by Flameless  
Atomic Absorption Spectrophotometry

TADAHIKO UETA\*, SHIGEKAZU NISHIDA\* and TAKETOSHI YOSHIHARA\*

Contents of arsenics (As), lead (Pb) and cadmium (Cd) eluted from prepared dental cement were determined by flameless atomic absorption spectrophotometry (FLAAS).

The samples of test pieces and powders were prepared as follows. After dental cement was prepared to obtain the most appropriate consistency, the test pieces were formed in sizes 20×15×1.4mm, and a portion was stored in a desiccator for 24 hours.

The metals in the test pieces were eluted in 14ml of 4% acetic acid for 30 minutes at 60°C. After 1g of the raw cement was pulverized to 200 mesh particle size, the metals in the powder were eluted in 100 ml aqua for 60 minutes in a boiling water bath.

Sodium diethyldithiocarbamate chelates of As, Pb and Cd were separated from coexistent phosphoric and aluminum ions in the eluted solution in di-iso-butyl ketone and further the metals were re-extracted in 0.2N nitric acid solution from organic layer.

Re-extracted metals were detected by FLAAS. Recoveries were 70.5% for As, 101.1% for Pb and 98.3% for Cd and each standard deviation was 3.1%, 1.2% and 4.0% respectively. This method was applied to the analysis of As, Pb and Cd eluted from dental cements satisfactorily.

**Keywords** : atomic absorption spectrophotometric analysis, dental cement, arsenic, lead, cadmium, zinc, aluminum

はじめに

現在市販されている歯科用セメントの主なもの、リン酸亜鉛セメントおよびケイ酸セメントであるが、これらはほぼ JIS<sup>1,2)</sup>に基づく内容で製造承認申請され、許可されている。その中で有害金属の試験としてはヒ素(As)についてのみ規定されており、その試験法はリン酸亜鉛セメントについては Gutzeit 法、ケイ酸セメントについては Bettendorff 法と異なった方法を採用している。

そこで今回、操作法および検出感度の異なるこれらの試験法の統一を計り、また新たに鉛(Pb)およびカドミウム(Cd)についても試験法を設定することを意図した。さらに、試験片を作製し、この試験片による溶出試験を

行ない、原子吸光分析法の適用を検討した。

本試験法を用い、市販の歯科用セメント類の分析を行ったので報告する。

実験方法

1. 試薬 (1)原子吸光用標準溶液: As および Al は関東化学製原子吸光用1000ppm 溶液, Pb, Cd および Zn は和光純薬製金属 Pb, Cd, Zn (各々 99.999% を希硝酸で洗浄し、水洗、乾燥後その 100.0mg を各々精秤し、2N 硝酸 50ml を用いて溶解し、水を加えて正確に100ml とする。この溶液を適宜希釈して用いる。(2)2% ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム (DDTC) 溶液: 和光純薬製 DDTC を水に溶解し用時調製する。使用前にジイソブチルケトンと振りまぜ、洗浄する。(3)25% 酒石酸

\* 東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

カリウムナトリウム溶液および飽和硫酸アンモニウム溶液：和光純薬製原子吸光用試薬を用いて調製する。(4)硝酸、酢酸およびアンモニア水は全て精密分析用を用いる。また、ジイソブチルケトン (DIBK) は東京化成製のものを用いた。(5)水はイオン交換後蒸留したものを用いた。

2. 装置 (1)原子吸光分析計：日本ジャレルアッシュ社製 AA-8500, 同社製 FLA-100型フレームレスアトマイザーを用いた。(2)光源：浜松テレビ社製中空陰極ランプおよびバックグラウンド補正用 D<sub>2</sub> ランプを使用した。

3. 試料 昭和55~56年, 東京都衛生局薬務部より送付された市販の歯科用セメント類, リン酸亜鉛セメント6件, ケイ酸セメント3件, ケイリン酸セメント1件の計3種10検体である。

4. 試験溶液の調製 (1)水溶出 JIS T6602および JIS T6603, または試料に添付された調製法の指示に基づいて粉剤および液剤を練和し, 標準稠度としたものをシリカゲルデシケーター中で24時間放置し硬化させたのち乳鉢を用いて微粉碎し, 200 メッシュ篩を通過する粉末とする。この粉末 1.0g を精秤し, ビーカーに入れ, 水約100 ml を加えて沸とう水浴上で 60 分間加熱したのち, 直ちにガラスフィルター (G-4) を用いてろ過し, ビーカーおよび残渣を少量の水を用いて洗い込む。ろ液および洗液を合せて正確に 100ml とし, 溶出溶液 (I) とする。(2) 4% 酢酸溶液溶出 ①試験片の作製 歯科用パラフィンワックスを用いて縦 20mm×横 15mm×厚さ 1.4mm の凹型を作製し, この中に練和した標準稠度の試料をほぼ型に見合った量だけ入れ, 手早くパラフィンシートを置き更に厚手のガラス板を乗せて加圧成形する。24時間放置後, 型抜きし, 付着したパラフィンワックスを石油エーテルを用いて除去する。さらに注意深くバリを除き試験片とし, シリカゲルデシケーター中に保存する。この試験片の表面積は 7.0cm<sup>2</sup> である。②溶出 ①で作製した試

験片 1 枚を 100ml のコニカルビーカーに入れ, 約 60° に加温した 4% 酢酸溶液を 1cm<sup>2</sup> 当り 2ml の割合で加え, 60° の水浴中で 30 分加熱溶出する。溶出液は直ちにガラスフィルター (G-4) を用いてろ過し, ビーカーおよび試験片を少量の 4% 酢酸を用いて洗い, さきの溶出液と合せて正確に 20ml とし, 溶出溶液 (II) とする。(3)抽出法 ①溶出溶液 (I) について, 溶出液 10ml を分取し, 亜硫酸ナトリウムにより A<sub>s</sub><sup>5+</sup> を A<sub>s</sub><sup>3+</sup> に還元したのち, 酒石酸カリウムナトリウム溶液および硫酸アンモニウム各々 5ml 加え, アンモニア水および硝酸を用いて pH を 4.5 とする。この溶液を分液ロートに採り, 2% DDTC 溶液 5ml を加えたのち含水 DIBK 10ml を用いて 10 分間振とう抽出する。この DIBK 層を遠沈管に採り 3,000rpm で 5 分間遠心分離する。別の遠沈管にこの DIBK 層 5ml を分取し, 0.2N 硝酸 5ml を加え, 5 分間振とう, 逆抽出したのち, 遠心分離し, 水層を試験溶液 (I) とする。②溶出溶液 (II) について, As の場合, ①と同様に抽出し, 試験溶液 (II-1) とする。Pb および Cd の場合, 溶出液 (II) を 50 倍希釈し, その 10ml を採り, 以下 ①と同様に操作し試験溶液 (II-2) とする。

5. 定量法 (1) As, Pb および Cd のフレームレス原子吸光分析の測定条件は Table 1 に示す。各々の標準溶液を適宜希釈し, As 0.2~1.0μg, Pb 0.2~0.5μg および Cd 0.01~0.05μg の範囲で濃度段階を付けて採取し, 4.-(3)項の抽出法に基づいて操作したのち各々の抽出液を測定し, 得られたピーク高と濃度より検量線を作成する。これらの検量線は Fig. 1 に示すようにいずれも原点を通る直線となる。次に各々の試験溶液を測定して得られたピーク高よりさきの検量線を用いて含有量を求める。(2) Zn および Al の原子吸光分析の測定条件は, それぞれ, 測定波長: 218.86nm, 309.3nm, フレーム: C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Air, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-N<sub>2</sub>O により常法に従って測定した。また, 標準溶液の濃度は Zn 0.2~1.5μg/ml, Al 2.0~10μg/ml

Table 1. Analytical Conditions of Each Element by Flameless Atomic Absorption Spectrophotometry

| Element | W. L. (nm) | L. C. (mA) | Operation step |                |                    |
|---------|------------|------------|----------------|----------------|--------------------|
|         |            |            | Dry(ramp mode) | Ash(step mode) | Atomize(step mode) |
| As      | 193.7      | 8          | 300°(30 sec)   | 350°(30 sec)   | 2300°(7 sec)       |
| Pb      | 283.3      | 10         | 300°(30 sec)   | 350°(30 sec)   | 1500°(7 sec)       |
| Cd      | 228.8      | 5          | 300°(30 sec)   | 350°(30 sec)   | 1500°(7 sec)       |

Argon gas flow rate : 2l/min. Sens : 0 Sample size : 20 μl

Background correction : D<sub>2</sub> Lamp

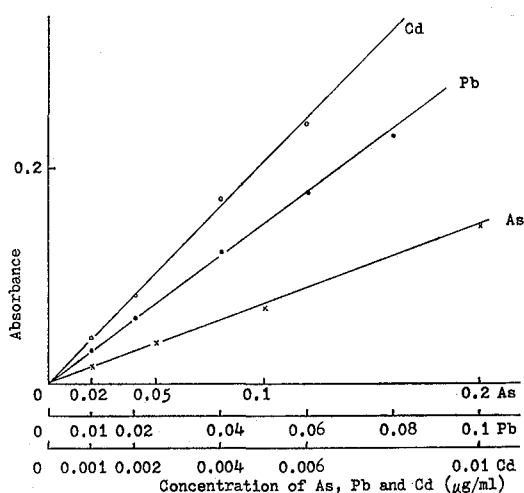


Fig. 1. Calibration Curves of Arsenic, Lead and Cadmium Extracted by Re-extraction Method

とし、検量線を作成した。次に溶出溶液(I)および(II)を適宜希釈して測定し、含有量を求めた。

#### 結果および考察

1. 分析法の検討 (1)測定条件 前報<sup>3)</sup>にはほぼ準じたが、測定溶液として硝酸溶液を用いたため酸のバックグラウンドが高く、測定値が不安定である。そこでDryをRamp modeとし、300°で乾燥することにより安定した測定が可能となった。(2)溶出法 歯科用セメントは粉剤および液剤よりなり、粉剤の主成分はリン酸亜鉛セメントでは酸化亜鉛、ケイ酸セメントでは無水ケイ酸および酸化アルミニウム、また液剤はいずれもリン酸溶液である。使用時にこの二剤を標準稠度に練和して用いる。

現在、これらの歯科用セメントに適用されている試験法<sup>1,2)</sup>のうち有害金属についてはAsについてのみに規定されているが、ケイ酸セメントに適用されている。Bettendorff法は検出感度において不十分であり、また、食品衛生法中容器包装の基準等を勘案する時、PbおよびCdについても基準を設定すべきものと考え。そこで、従来の水による溶出法と共に、新たに試験片を作製し、4%酢酸溶液による溶出試験を行なった。まず、As, PbおよびCdの測定に対する干渉<sup>4)</sup>について考慮し、各々の溶出溶液について、溶出が予想されるZnおよびAlの溶出量を測定したところ、Table 2に示すように、試料1-3のケイ酸セメントおよび4のケイリン酸セメントより、ZnとAlが多量溶出した。これは粉剤はもとより、液剤中にこれらの金属を含有するため溶出し易いと考えら

れる。一方、試料5-10のリン酸亜鉛セメントの液剤中にZnは含有するがAlは検出されなかった、従って4%酢酸溶液による溶出Alは粉剤の酸化亜鉛に由来するものと考えられる。ケイリン酸セメントはリン酸亜鉛セメントとケイ酸セメントの混合体的組成と思われる。また、これらのいずれの溶出液からもリン酸イオンを検出した。(3)溶媒抽出-逆抽出法 ①水溶出液について As, Pb および Cd を直接測定する場合、As はリン酸イオンの干渉により測定不能であった。Pb および Cd は Al の負の干渉により標準添加法に依らなければならない。そこで一般的に用いられている DDTc キレート剤の溶媒抽出法<sup>5)</sup>の適用について検討した。抽出溶媒は、石崎<sup>6)</sup>が As の抽出に用いた DIBK が、逆抽出時、水層に対

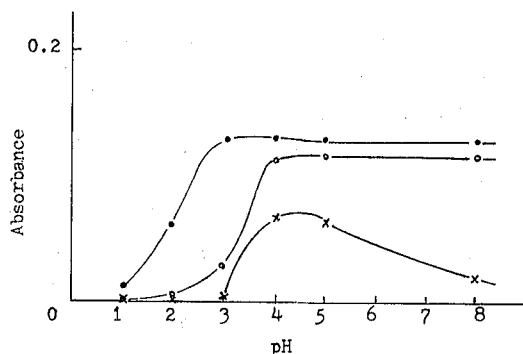


Fig. 2. Effect of pH on the Extraction of Arsenic, Lead and Cadmium with DDTc-DIBK

—x— : Arsenic —●— : Lead  
—○— : Cadmium

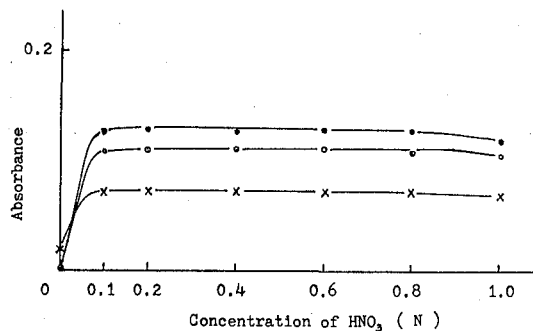


Fig. 3. Relationship between Normality of Solutions of Nitric acid and Re-extracted Amounts of Arsenic, Lead and Cadmium

—x— : Arsenic —●— : Lead  
—○— : Cadmium

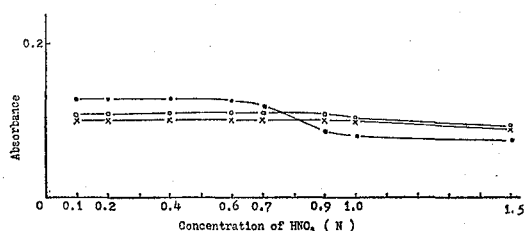


Fig. 4. Affects of Normality of Nitric acid on the Determination of Arsenic, Lead and Cadmium by Atomic Absorption Spectrophotometry

—x—: Arsenic 0.1 µg/ml  
—●—: Lead 0.04 µg/ml  
—○—: Cadmium 0.002 µg/ml

する溶解度 (0.05~0.08wt%, 20°) も小さく, フレームレス分析に当り, 試験溶液注入上の操作性も良いため, これを使用した. 溶媒抽出時の最適 pH は Fig. 2 より, Pb および Cd が 4 以上であるが As は 4~5 であるため 4.5 とした. また, Fig. 3 および 4 に示すように, 逆抽出時の酸は As 測定のパラッキが小さい硝酸とし, 濃度はバックグラウンドの影響の少ない 0.2N とした. この方法による回収率は As 1.0 µg,  $\bar{x}$ =70.5%, SD=3.1%, Pb 0.4 µg,  $\bar{x}$ =101.1%, SD=1.2%, Cd 0.02 µg,  $\bar{x}$ =98.3%, SD=4.0% (各々, n=5) であり, As の回収率は低いパラッキは少なく, また Pb および Cd については回収率はほぼ 100%, パラッキも少なく良好な結果であった. またこの抽出操作により, 干渉を示すリン酸

および Al はほぼ完全に除去された. Zn はほぼ 100% 同時に抽出されるがこの濃度では干渉は認められなかった. ②溶出溶液(Ⅱ)について 溶出溶液(Ⅰ)の場合と同様, 直接測定は困難である. また, ①の抽出法をそのまま適用した場合, 多量の Zn が抽出されるため, Zn により増感作用を受ける Cd については溶出溶液(Ⅱ)を Zn の干渉が認められない濃度まで希釈したのち操作を行った. (4)共存イオンについて 溶媒抽出-逆抽出によってリン酸イオンおよび Al の除去はできたが Zn は目的とする金属とほとんど同様な挙動を示し, 除去できなかった. そこで Pb および Cd に対する Zn の影響について検討したところ, As および Pb 各々 0.1 µg/ml, 0.04 µg/ml 0.2N 硝酸溶液の場合, Zn 500 µg/ml まで共存しても干渉は認められなかった. Cd 0.002 µg/ml の場合, Zn 10 µg/ml まで共存しても干渉は認められなかったが 500 µg/ml では約 20% の強い増感作用を示した.

## 2. 試料の測定結果

この試験法に従って, 実際試料の As, Pb および Cd の測定を行なったが, Table 2 に示すようにいずれの試料からもこれらの有害金属は検出されなかった. 2 $\sigma$ を検出限界とした場合, 本試験法による水溶出の定量限界は As=2.0 µg/g, Pb=1 µg/g および Cd=0.1 µg/g であり, 4%酢酸溶液溶出の定量限界は As=0.06 µg/cm<sup>2</sup>, Pb=1 µg/cm<sup>2</sup> および Cd=0.06 µg/cm<sup>2</sup> であった.

## ま と め

歯科用セメント類中の溶出 As, Pb および Cd の分析

Table 2. Eluted Metal Contents from Dental Cements

| Sample | Aqua (µg/g) <sup>a</sup> |    |    |     |      | 4% Acetic acid (µg/cm <sup>2</sup> ) <sup>b</sup> |    |    |      |    |
|--------|--------------------------|----|----|-----|------|---------------------------------------------------|----|----|------|----|
|        | As                       | Pb | Cd | Zn  | Al   | As                                                | Pb | Cd | Zn   | Al |
| 1      | nd                       | nd | nd | 470 | 5000 | nd                                                | nd | nd | 45   | 54 |
| 2      | nd                       | nd | nd | 660 | 5000 | nd                                                | nd | nd | 45   | 54 |
| 3      | nd                       | nd | nd | 910 | 5000 | nd                                                | nd | nd | 34   | 54 |
| 4      | nd                       | nd | nd | 530 | 2860 | nd                                                | nd | nd | 470  | 34 |
| 5      | nd                       | nd | nd | 90  | nd   | nd                                                | nd | nd | 1650 | 1  |
| 6      | nd                       | nd | nd | 150 | nd   | nd                                                | nd | nd | 1590 | 1  |
| 7      | nd                       | nd | nd | 250 | nd   | nd                                                | nd | nd | 1560 | 1  |
| 8      | nd                       | nd | nd | 230 | nd   | nd                                                | nd | nd | 1560 | 1  |
| 9      | nd                       | nd | nd | 250 | nd   | nd                                                | nd | nd | 1590 | 1  |
| 10     | nd                       | nd | nd | 210 | nd   | nd                                                | nd | nd | 1560 | 1  |

a) : Powder (200 mesh)

b) : Test piece (7.0cm<sup>2</sup>)

nd : No detectable

法としてフレイムレス原子吸光分析法の検討を行なった。キレート化合物の溶媒抽出—逆抽出法により、リン酸イオンおよび Al が分離除去できた。Zn の干渉を受けず十分満足できる感度で As, Pb および Cd の定量が可能となった。

本試験法に基づいて水抽出溶液および 4%酢酸溶出液について As, Pb および Cd の試験を行なったところいずれの試料からも検出されなかった。また本試験法の抽出回収率は As=70.5%, SD=3.1%, Pb=101.1%, SD=1.2%, Cd=98.3%, SD=4.0%(n=5)であった。

#### 文 献

- 1) 日本規格協会編：JIS T6602, 歯科用リン酸亜鉛セメント, 1979 (改正)
- 2) *ibid.* : JIS T6603, 歯科用ケイ酸セメント, 1980 (確認)
- 3) 植田忠彦, 森 謙一郎, 西田茂一, 吉原武俊：東京衛研年報, 32-1, 110, 1981
- 4) F.D. Pierce and H.R. Brown: *Anal. Chem.* 49, 1417, 1977
- 5) 日本薬学会編：衛生試験法注解, 2, 1980, 金原出版
- 6) 石崎睦雄：分化, 26, 667, 1977



化粧品中の特殊成分試験法の設定に関する研究 (XIII)  
高速液体クロマトグラフィーによるブチルヒドロキシアニソールの分析

鎌田 国広\*, 観 照雄\*, 伊藤 弘一\*, 中村 義昭\*  
吉原 武俊\*, 原田 裕文\*

Studies on Analytical Method of Specific Materials in Cosmetics (XIII)  
High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Butylated  
Hydroxyanisole in Cosmetics

KUNIHICO KAMATA\*, TERUO KAN\*, KOICHI ITO\*, YOSHIKI NAKAMURA\*,  
TAKETOSHI YOSHIHARA\* and HIROFUMI HARADA\*

A sensitive, specific high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of butylated hydroxyanisole (BHA) in cosmetics is described.

BHA was extracted from samples with hexane, and then transferred from the hexane phase into acetonitrile. The acetonitrile phase was concentrated and chromatographed on a silica gel column using a mobile phase of 2.5% ethanol in hexane on a high-performance liquid chromatograph fitted with a fluorescence spectrophotometer detector (exciting wave length, 293nm, emission wave length, 323nm).

As a result, the calibration curve showed linearity in the range of 0.5-5.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of BHA, and the detection limit was 0.5ng. Average recoveries of 50  $\mu\text{g}$  BHA added to cosmetic samples were 95.0-96.4%.

When this method was applied to the analysis of BHA in commercial samples, BHA could be determined without any influence of obstructive substance.

**Keywords:** high-performance liquid chromatography, determination, butylated hydroxyanisole, cosmetic, fluorescence detector

緒 言

薬事法の一部改正により化粧品の成分表示の対象品目に指定されたブチルヒドロキシアニソール (BHA)<sup>1)</sup>は、動植物性油脂の酸化防止にすぐれた効果を発揮するとともに、毒性の低いことから食品および化粧品分野に酸化防止剤として従来から広く用いられている<sup>2,3)</sup>。しかし最近、安全性に関して厚生省から発ガン性の疑いありとの報告が出されており<sup>4)</sup>、BHAの今後の取扱いが注目されている。

BHAの分析法としては、比色法<sup>5-7)</sup>、紫外外部吸収スペクトル法<sup>8,9-11)</sup>、蛍光法<sup>12-15)</sup>、薄層クロマトグラフィー法<sup>16-20)</sup>、ガスクロマトグラフィー法<sup>17,20,-25)</sup>、近年では高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による方法<sup>26,27)</sup>など多数報告がなされている。しかし、これらはい

ずれも食品を対象とした分析法であり、多種多様な成分を配合している化粧品を対象とした報告はみられない。そこで今回、著者らは、HPLCによって化粧品中のBHAの分析法を確立することを意図し、BHAの蛍光特性に着目して、HPLC用蛍光検出器 (FD) を用い、前処理操作および HPLCの諸条件を検討した結果、簡単な前処理により迅速にかつ、高感度で精度よく定量することができたので報告する。

実験方法

1. 試薬 BHA標準溶液: BHA (和光純薬 K. K. 製標準品) の10mgを精秤し、エタノールに溶かして100  $\text{ml}$ としたものを標準溶液とした。この標準溶液を必要に応じてエタノールで希釈して用いた。

その他の試薬: すべて試薬特級 (和光純薬 K. K. 製)

\* 東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

を用いた。

2. 器具および装置 遠心分離機：久保田商事株式会社製KN-70型，超音波洗浄器：BRANSON社製220型，Kuderna-Danish濃縮器：(K-D濃縮器と略す)，高速液体クロマトグラフ：日本分光K.K.製TRIOTAR-II，蛍光検出器：日本分光K.K.製FP-550A。

3. 試験溶液の調製 ①液状試料(乳液，クリーム等)：試料約1gをビーカーに精密に秤り，飽和食塩水150mlを加えてよく混和し，これを300mlの分液ロートに移し，10%硫酸5mlおよびヘキサン50mlを加え，5分間振り混ぜ，静置してヘキサン層を分取する。水層はさらにヘキサン50mlずつで2回抽出を行なった後，\*全ヘキサン層を合わせて水100mlで洗い，無水硫酸ナトリウムで脱水した後ヘキサン層を，予めヘキサン飽和アセトニトリル50mlを入れた300mlの分液ロートに移し，5分間振り混ぜ，静置してアセトニトリル層を分取する。ヘキサン層はさらにヘキサン飽和アセトニトリル50mlで2回抽出をおこなった後，アセトニトリル層をK-D濃縮器に移し，*n*-アミルアルコール2mlを加えて50°で約2mlになるまで濃縮後，エタノールで正確に全量を10mlとしてHPLC用試験溶液とする。

②固体試料(口紅，ファンデーション等)：試料約1gを遠濾管に精密に秤り，ヘキサン50mlを加え，ガラス棒で攪拌しながら超音波洗浄器を用いて5分間抽出をおこなった後，毎分3000回転で10分間遠心分離し，上澄液を300mlの分液ロートに分取する。残渣はさらにヘキサン50mlを加えて同様の操作を2回おこなった後，①液状試料\*以下と同様に操作する。

4. HPLCによる定性および定量 BHA標準溶液および試験溶液のそれぞれ5 $\mu$ lを下記のHPLC測定条件に従って操作し，得られたピークの保持時間より定性をおこなう。別にBHA標準溶液を希釈して0.5~5.0 $\mu$ g/mlの標準系列をつくり，定性の場合と同一条件でHPLCをおこない，得られたピーク高さと濃度から検量線を作成して試験溶液中のBHAの含有量を測定する。

HPLC測定条件カラム：Zorbax SIL，25cm $\times$ 4.6mm i.d.，移動相：エタノール・ヘキサン(2.5：97.5)，流速：1ml/min，検出器：FD (Ex.  $\lambda$ ：293nm，Em.  $\lambda$ ：323nm) 温度：室温

#### 実験結果および考察

##### 1. 試験溶液調製方法の検討

1.1 抽出について 従来，食品におけるBHAの抽出法としては，溶媒抽出法<sup>20, 24, 25, 28)</sup>，水蒸気蒸留法<sup>15, 28, 29)</sup>，精油定量器法<sup>30, 31)</sup>などが種々検討されている。これらの

抽出法のうち，水蒸気蒸留法においては回収率が低いことが報告されており<sup>28)</sup>，一方，精油定量器法では回収率は良好であるが蒸留に長時間を要する<sup>31)</sup>ことなどから今回，抽出法として溶媒抽出法を用いることとした。そこで，化粧品のうち乳液，クリーム等の液状試料からBHAを効率よく抽出できる溶媒について検討した。すなわち抽出溶媒としてヘキサン，ベンゼン，ジクロルメタン，クロロホルム，エーテル，石油エーテルの7種類を用いて飽和食塩水150ml，10%硫酸5mlにBHA標準溶液0.5mlを加えた溶液から抽出をおこないBHAの抽出率を比較した。その結果，いずれの溶媒を用いてもBHAはほぼ完全に抽出されることが認められた。今回，これらの溶媒のうち後記のクリーンアップ操作をヘキサン・アセトニトリルによる液-液分配でおこなうため，溶媒の濃縮操作のいらないヘキサンを抽出溶媒として用いることとした。しかし，口紅，ファンデーション等の固体試料では上記の抽出法では，試料の粉碎，均一化が困難で抽出溶媒との親和性が不充分であることが認められたので，今回，超音波洗浄器を用い，ガラス棒で攪拌しながらヘキサンで直接抽出をおこなうこととした。

1.2 クリーンアップについて 一般にBHAのクリーンアップ法としては，カラムクロマトグラフ法<sup>20, 22, 28)</sup>，ヘキサン・アセトニトリル等による液-液分配法<sup>32, 33)</sup>，薄層クロマトグラフ法<sup>16) 23)</sup>などが用いられている。著者らはすでに化粧品中の基剤等，夾雑物の除去にヘキサン・アセトニトリルによる液-液分配法が簡便ですぐれていることを報告した<sup>34)</sup>。そこで今回，クリーンアップ法としてヘキサン・アセトニトリルによる液-液分配法を用いることとした。なお，ヘキサン150mlにBHA標準溶液0.5mlを溶かした溶液にヘキサン飽和のアセトニトリル50mlを加えて抽出をおこないBHAの抽出率を求めた。その結果BHAは3回の抽出操作でほぼ完全にヘキサン層からアセトニトリル層に移行することが認められた。

1.3 濃縮操作について K-D濃縮器で溶媒を除去する場合，BHAの回収率が低下することが報告されている<sup>28)</sup>。事実，アセトニトリル150mlにBHA標準溶液0.5mlを添加し，K-D濃縮器で濃縮をおこなったところ，回収率が低下しかなりのバラツキが認められた。そこでBHAの揮散防止の目的で沸点が高く，アセトニトリルとよく混和する*n*-アミルアルコール2mlを添加して濃縮操作をおこなったところ，濃縮温度70°においてもBHAの損失はおこらず，安定した回収率が得られた。

##### 2. HPLCの測定条件の検討

2.1 蛍光スペクトル エタノール・ヘキサン混液を用

いて BHA の蛍光スペクトルと励起スペクトルを測定したところ、極大蛍光波長 (Em.  $\lambda$ ): 323nm, 極大励起波 (Ex.  $\lambda$ ): 293nm 長であった。したがって、それぞれを分析波長に設定した。

**2.2 充てん剤および移動相の検討** 化粧品中の BHA の分析に、PAGE<sup>26)</sup> が食品中の BHA の分析に用いた HPLC の測定条件を適応したところ、化粧品中に防腐殺菌剤としてよく繁用されているところのイソプロピルメチルフェノール (IPMP) およびパラヒドロキシ安息香酸ブチル (PHBA-B) との分離が不充分であった。そこで、これらと BHA を良く分離し、かつシャープなピークが得られるカラム充てん剤および移動相溶媒について検討した。まずカラム充てん剤として、Zipax PAM, Zipax HCP, Permaphase ETH, Zorbax CN, Zorbax SIL, Lichrosorb RP-8, Lichrosorb RP-18, Finepack SIL C<sub>18</sub>, 日立ゲル3011-0を用い BHA, IPMP, PHBA-B の3種の分離を試みた。その結果、Zorbax SIL が最も良い分離能を示した。一方、カラム充てん剤として、Zorbax SIL を用いた場合の移動相溶媒について①テトラヒドロフラン・ヘキサン混液②酢酸エチル・ヘキサン混液、③エタノール・ヘキサン混液、④ジオキサン・ヘキサン混液の4種類を用いて HPLC をおこなったところ、いずれの溶媒においても分離することが認められたが、②を用いた場合、溶媒効果により BHA の蛍光強度が弱くなり、検出感度が低下する現象が認められた。あとの三者の中では③が最も分離能がすぐれていることが認められた。なお、ジクロルメタン、クロロホルムの溶媒において BHA の蛍光が消失することが報告されている<sup>13)</sup> ので、今回、移動相溶媒の検体から除外した。以上のことより移動相溶媒として③を用いることとし、エタノール濃度を 2.5% とした。さらに本実験では、移動相溶媒の流速 1ml/min, カラム温度は室温でおこなった。なお、Fig. 1 に上記の設定条件で得られた BHA, IPMP, PHBA-B のクロマトグラムを示した。

**3. 検量線の作成** BHA 標準溶液をエタノールで希釈し、0.5—5.0 $\mu$ g/ml の標準系列をつくり、各溶液 5 $\mu$ l を前記の HPLC 測定条件に従って操作し検量線を作成したところ、Fig. 2 に示すとおり直線を示し、蛍光強度の再現性も良好であった。また、検出限界は S/N=3 として 0.5ng であり、紫外吸収光 (UV) 検出器 (293 nm) に比較して10倍以上の高感度であった。

**4. 妨害物質について** 本法で化粧品中の BHA の分析をおこなう場合、化粧品中に配合される成分のうち、BHA とともに試験溶液中に抽出されクロマトグラム上

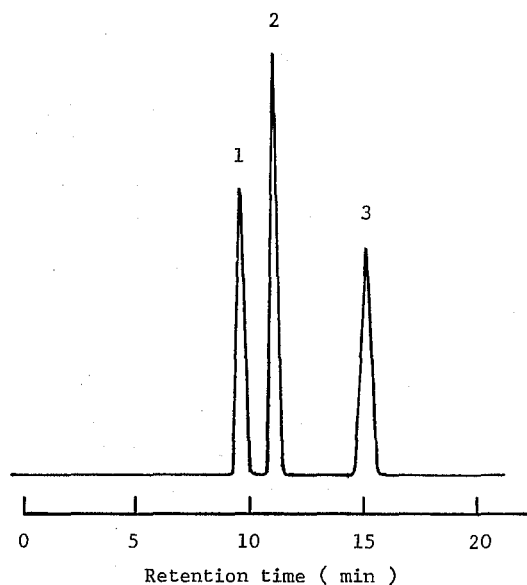


Fig. 1. Liquid Chromatogram of Butylated Hydroxyanisole, Isopropylmethylphenol and Butyl Parahydroxybenzoate  
Peaks; 1: isopropylmethylphenol  
2: butylated hydroxyanisole  
3: butyl parahydroxybenzoate

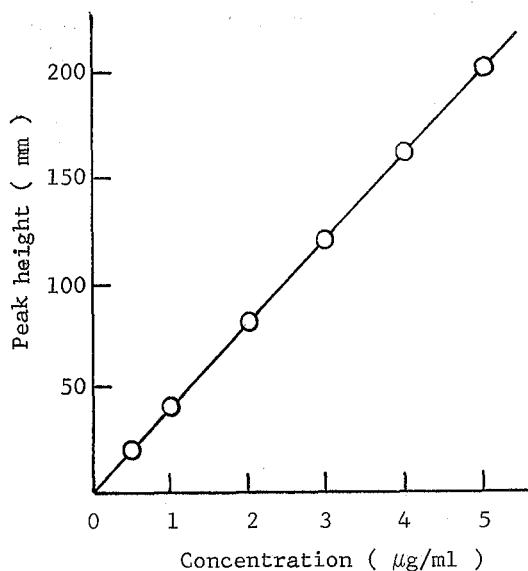


Fig. 2. Calibration Curves of Butylated Hydroxyanisole

で BHA の分析を障害するおそれのあるパラヒドロキシ安息香酸エステル類, IPMP, フェノキセトール, BHT, 没食子酸プロピル, 卵胞ホルモンエストロジオール,

Table 1. Recoveries of BHA Added to Commercial Samples

| Sample      | Weight (g) | runs | Added ( $\mu$ g) | Recovery (%) | C. V. (%) |
|-------------|------------|------|------------------|--------------|-----------|
| Cream       | 1          | 5    | 50               | 95.8         | 4.29      |
| Milk lotion | 1          | 5    | 50               | 96.2         | 4.06      |
| Lip color   | 1          | 5    | 50               | 95.0         | 4.12      |
| Foundation  | 1          | 5    | 50               | 96.4         | 3.93      |

C. V. : Coefficient of variation.

エチルエストラジオール, ジエチルステルベステロール等の存在が分析に及ぼす影響について検討した。その結果, 上記の成分はクロマトグラム上で完全に BHA と分離し障害とならないことが認められた。

5. 添加回収実験 BHA を含まない乳液, クリーム, 口紅, ファンデーションの各1gに BHA 標準溶液 0.5ml を添加し, 本法による回収率を求めた結果を Table 1 に示した。その結果いずれの試料においても 5 回の平均回収率は 95.0% 以上を示しており, それぞれの回収率における変動係数も 3.93~4.29% とほぼ満足する結果が得られた。なお, Fig. 3 に示すようにクロマトグラムにおいても検出器に FD を用いることにより, UV 検出器に比較して他成分のピークの出現が少なく, BHA の分析に

Table 2. Analytical Results of BHA in Commercial Samples

| Sample        | No. of samples | No. of samples detected BHA | Analytical result min.—max. (ppm) |
|---------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| Cream         | 17             | 4                           | 80—375                            |
| Milk lotion   | 35             | 10                          | 10—490                            |
| Lip cream     | 3              | 1                           | 76                                |
| Lip color     | 27             | 11                          | 15—900                            |
| Foundation    | 22             | 4                           | 124—180                           |
| Eye liner     | 17             | 2                           | 100, 143                          |
| Eyebrow color | 5              | 2                           | 200, 230                          |
| Eye shadow    | 27             | 13                          | 1.5—190                           |
| Total         | 153            | 47                          | 1.5—900                           |

妨害ピークも認められず特異的で精度のよい分析法であると考えられる。

6. 市販化粧品品の分析結果 BHA を配合することの多いクリーム, 乳液, 口紅, ファンデーション, アイシャドウ等 153 検体について本法を適用した結果, 全試料に妨害ピークは認められず精度よく定量することができた。この結果を Table 2 に示した。

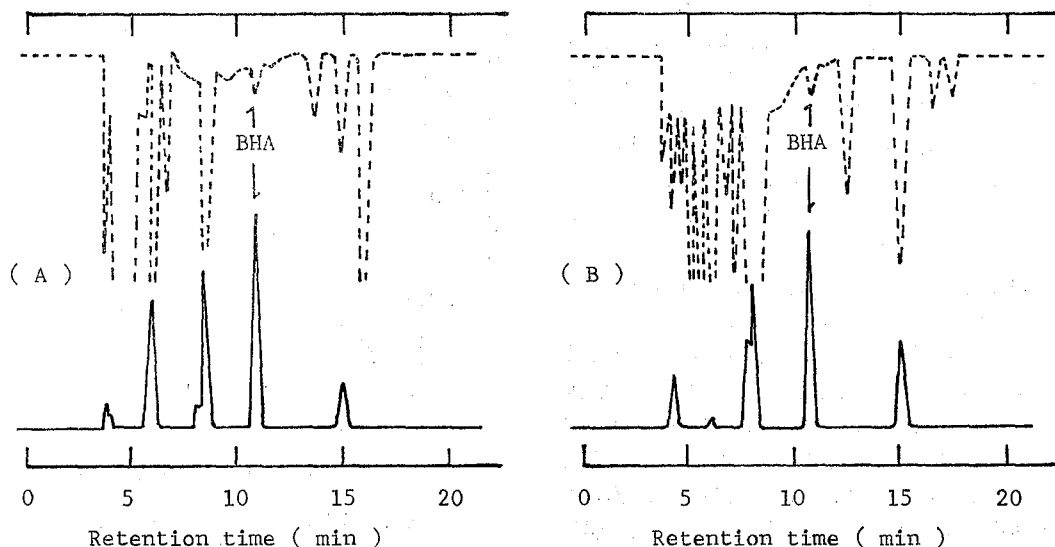


Fig. 3. Liquid Chromatograms of BHA Added to Commercial Samples

Sample; (A): cream, (B): lip color

—: fluorescence detection (Ex.  $\lambda$ : 293nm, Em.  $\lambda$ : 323nm)

.....: absorbance detection (UV: 293nm)

## ま と め

化粧品中の BHA の分析法の確立を意図して抽出法、クリーンアップ操作ならびに HPLC の測定条件について検討した。

その結果、1) 抽出法としてヘキサンによる溶媒抽出、クリーンアップ操作としてヘキサノン-アセトニトリル分配がそれぞれ有効であった。また、HPLC 用カラム充填剤として Zorbax SIL, 移動相溶媒としてエタノール・ヘキサン (2.5 : 97.5), 検出器として蛍光検出器 (Ex.  $\lambda$  : 293nm, Em.  $\lambda$  : 323nm) を用いることにより高感度で精度よく検出することができた。

2) 本法を化粧品中の BHA の分析法に応用した結果、化粧品に含まれる他成分の妨害なしに迅速でかつ精度よく分析することができた。

## 文 献

- 1) 昭和55年9月26日, 官報16105号, 厚生省告示第167号
- 2) 刈米達夫監修: 食品添加物公定書解説書, 第三版, B-793, 1973, 廣川書店
- 3) 化粧品原料基準注解編集委員会編: 化粧品原料基準注解, 第1版, 244, 1968, 薬事日報社
- 4) 昭和57年5月20日, 薬安第81号, 厚生省薬務局安全課長の通知
- 5) Heidrick, P.L. and Conray, H.W.: *J. of the A.O.A.C.*, 45, 244, 1962
- 6) Szalkowski, C.R. and Garber, J.B.: *J. Agr. Food Chem.*, 10, 490, 1962
- 7) 佐藤洋子, 河村太郎: 食衛誌, 13, 53, 1972
- 8) Philips, M.A. and Hinkel, R.D.: *J. Agr. Food Chem.*, 5, 376, 1957
- 9) Alicino, N.J.: *ibid.*, 11, 496, 1963
- 10) Anglin, C., Mahon, J.H. and Chapman, R.A.: *ibid.*, 4, 1018, 1965
- 11) Johnson, D.P.: *J. of the A.O.A.C.*, 50, 1298, 1967
- 12) Latz, H.W. and Hurtubise, R.J.: *J. Agr. Food Chem.*, 17, 352, 1969
- 13) Hurtubise, R.J.: *Anal. Chem.*, 47, 2457, 1975
- 14) Hurtubise, R.J.: *ibid.*, 48, 2092, 1976
- 15) Dilli, S. and Robards, K.: *Analyst*, 102, 201, 1977
- 16) Sahasiabudhe, M.R.: *J. of the A.O.A.C.*, 47, 888, 1964
- 17) 呉地伝夫, 荻野喜文: 衛生化学, 10, 261, 1964
- 18) 竹下隆三, 坂上米次, 伊藤望: 衛生化学, 15, 77, 1969
- 19) 木村庄治, 寺田志保子: 食衛誌, 14, 94, 1973
- 20) 日本薬学会編: 衛生試験法注解, 346, 1980, 金原出版
- 21) Takahashi, D.M.: *J. of the A.O.A.C.*, 53, 39, 1970
- 22) Ellen, E.S.: *ibid.*, 55, 1081, 1972
- 23) 兼松弘, 丸山武紀, 木下華子, 新谷勲, 今村正雄: 食衛誌, 14, 357, 1973
- 24) Jozef, R.S., Jozef, M.W. and Jean, M.C.: *J. of the A.O.A.C.*, 60, 505, 1977
- 25) Kline, D.A., Joe, F.L.J. and Fazio, T.: *ibid.*, 61, 513, 1978
- 26) Page, B.D.: *ibid.*, 62, 1239, 1979
- 27) Mazors, R.E.: *Anal. Chem.*, 45, 755, 1973
- 28) 佐藤洋子, 河村太郎: 食衛誌, 13, 47, 1972
- 29) 谷村顕雄: 食品添加物の分析 I, 52, 1970, 講談社
- 30) 丸山武紀, 村上千秋, 兼松弘, 新谷勲, 今村正男: 食衛誌, 18, 283, 1977
- 31) 石川雅章, 山村政利, 向後勝成, 増井俊夫: 静岡県衛生研究所報告, 21, 39, 1978
- 32) Phipps, A.W.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 50, 21, 1973
- 33) 厚生省環境衛生局監修: 食品衛生検査指針 I, 495, 1973, 日本食品衛生協会
- 34) 鎌田国広, 観照雄, 吉原武俊, 原田裕文: 東京衛研年報, 32-1, 99, 1981

## 家庭用品の衛生化学的研究 (第7報) 文具類中の重金属について

雨宮 敬\*, 森 謙一郎\*, 鈴木 助治\*, 吉原 武俊\*

### Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (VII) Heavy Metal Contents in Some Kinds of Stationeries for Children Use

TAKASHI AMEMIYA\*, KENICHIRO MORI\*, SUKEJI SUZUKI\*  
and TAKETOSHI YOSHIHARA\*

Paint scrapings from 19 pencils, 32 color pencils, 20 plastic erasers, 32 wax crayons, 32 crayon pastels and 10 poster colors were analysed for heavy metal contents by atomic absorption spectrophotometry.

The following results were obtained :

1. A large quantity of Pb was contained in the range of 98.7-612.1 ppm in 3 samples of paint scraping from pencils, and 83.8-165.0 ppm in 3 samples of plastic erasers. A sample of those paint scrapings exceeded the 0.06 % criteria for Pb of Consumer Product Safety Act in the United States.

2. Cr was contained in a large quantity in considerable numbers of samples of pencils (156.0-1,400ppm), color pencils (166.0-600.0ppm), plastic erasers (167.7-213.1ppm), wax crayons (181.5-311.5ppm) and poster colors (42.5-5,200ppm).

3. Cd was contained with av. 36.0ppm (16.2-55.0ppm) in 10 samples of plastic erasers, and almost all of the samples of wax crayons and crayon pastels contained As of av. 12.5 ppm (0.30-47.5ppm) and av. 5.8ppm (0.30-53.0ppm) respectively.

The contents of Ni, Mn, Zn, Fe and Cu were also investigated.

**Keywords :** heavy metal content, stationeries, pencils, erasers, crayons, lead, chromium, arsenic, atomic absorption spectrophotometry, X-ray fluorescence spectrometry

## 緒 言

文具類は、鉛筆、消しゴム、クレヨンや絵具など日用品として広く使用され、学校または家庭において個人が使っている用具である。いわゆる「一般消費者が生活の用に供される製品」の範疇に入り家庭用品に該当する。これらの文具類のなかには美観の向上、表面保護などの目的から重金属を含む無機顔料を用いて、塗装あるいは着色がなされている場合が多い。特に子供用品は、その形態や色彩において多種多様のものが市販されており、使用頻度が高い。

近年、米国の調査では、子供において、ペンキ、クレヨン、おもちゃなどの鉛化合物入りの顔料に由来する鉛の体内蓄積や鉛中毒の可能性が示唆されている<sup>1,2)</sup>。また、最近、中村ら<sup>3)</sup>は、学童用文具類から米国における Consumer Product Safety Act (消費者製品安全法、1978年)<sup>4,5)</sup>の規制値0.06%を越える鉛を検出し、わが国

においても子供の鉛中毒が起こり得ることを警告している。また、山形県消費生活センター<sup>6)</sup>の調査では、学童用プラスチック製消しゴムから最高値で鉛 710.0ppm, クロム 140.0 ppm を認め、着色にクロム酸鉛などの無機顔料の使用を規制するように訴えている。一般に子供の鉛の毒作用に対する感受性が高いことから、学童用文具類による健康被害の可能性が危惧されているが、その他に、特にヒ素、カドミウム、クロムなどの重金属も現在何ら規制されておらず、その含有量の実態について不明な点が多い。

そこで、著者らは、学童用文具類における重金属類の実態調査をするために、鉛筆および色鉛筆の塗膜、プラスチック製消しゴム、クレヨン、クレパス、ポスターカラーについて亜鉛 (Zn)、銅 (Cu)、鉄 (Fe) を含めて、ヒ素 (As)、鉛 (Pb)、カドミウム (Cd)、クロム (Cr)、ニッケル (Ni)、マンガン (Mn) の分析を行った。

\* 東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Instrumental Operating Conditions of Flame Atomic Absorption Spectrophotometry<sup>a)</sup>

| Metal                       | Cd    | Pb    | Cr                            | Mn    | Ni        | Zn    | Fe    | Cu    | As <sup>b)</sup> |
|-----------------------------|-------|-------|-------------------------------|-------|-----------|-------|-------|-------|------------------|
| Wavelength (nm)             | 228.8 | 283.3 | 357.8                         | 279.5 | 232.0     | 213.8 | 248.3 | 324.7 | 193.7            |
| Lamp current (mA)           | 5     | 10    | 10                            | 10    | 10        | 10    | 10    | 10    | 8                |
| Fuel gas                    |       |       | C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> |       | (0.5—2.5) |       |       |       | Ar               |
| (kg/cm <sup>2</sup> -l/min) |       |       |                               |       |           |       |       |       | (1.5—7.0)        |
| Oxidant gas                 |       |       | Air                           |       | (1.5—8.0) |       |       |       | H <sub>2</sub>   |
| (kg/cm <sup>2</sup> -l/min) |       |       |                               |       |           |       |       |       | (0.46—2.5)       |

a) Instrument: Nippon Jarrell-Ash Model AA-8200 Type; Burner head, water-cooled one slot.

b) This instrument equipped with a generation and collection of arsine was also used for arsenic analysis.

Ar carrier flow rate: 5.0 l/min, generation pressure: 0.5 kg/cm<sup>2</sup>.

Asの分析は、還元気化—原子吸光分析法<sup>7)</sup>により行い、その他の重金属の分析は、硫酸酸化ののち、フレイム原子吸光分析法により行った<sup>8)</sup>。

#### 実験方法

1. 試薬 As, Cd, Pb, Ni, Mn, Cr, Zn, Fe および Cu 標準溶液: 1000ppm原子吸光分析用標準液(和光純薬)。亜鉛粉末: 原子吸光分析用(和光純薬)。硫酸, 硝酸, 過塩素酸およびアンモニア水: 精密分析用(和光純薬)。塩酸: 原子吸光分析用(塩化水素 36%, 関東化学)。

2. 装置 原子吸光分析装置: 日本ジャーレールアッシュ社製 AA-8200型, アルシン発生・捕集装置: 日本ジャーレールアッシュ社製 ASDI-A 型。けい光 X線分析装置: 理学電機社製 3063-P 型, X線管球: フィリップス社製 モリブデン (Mo) 対陰極 (2.7kw)

3. 試料 1981年11月—1982年1月の間に東京都内で購入した子供用文具類を試料とした。

色調と試料数のうちわけは、それぞれ鉛筆 8種19, 色鉛筆16種32, プラスチック製消しゴム 8種20, クレヨン 16種32, クレパス16種32およびポスターカラー10種10, 計145試料である。

#### 4. 操作法

4-1 試料の採取 鉛筆, 色鉛筆は木部を取らないように注意しながら塗膜をスライドガラスの切断面を用いてはがしとり細切した。プラスチック製消しゴム, クレヨン, クレパスはラベルをとり除いて細切した。ポスターカラーは容器をよく振り, 内容物を均一にして採取した。

4-2 試験溶液の調製 鉛筆, 色鉛筆は試料約 250 mg を, またプラスチック製消しゴム, クレヨン, クレパスおよびポスターカラーは試料約 1.0 g を石英製丸底分解フラスコにとり, それぞれ硝酸 10ml を加え, 発泡

しないようにおだやかに加熱した。つぎに硫酸 5 ml を加え濃縮したのち, 硝酸 20ml を用いて以下常法通り灰化を行った。灰化後, 飽和シュウ酸アンモニウム溶液を加えて加熱し, この操作を3回くり返して硝酸を除去した。冷後, 水で分解フラスコ内を洗いながら不溶物をろ紙でろ過し, 水を加えて全量を 50ml にし試験溶液とした。

4-3 けい光 X線 (XRF) 分析による定性分析 試料を灰化することなく直接成分元素を把握する目的で XRF 分析を行った。ろ紙を直径 5cm の円形に切り, その上に 4-1 の項で採取した試料をのせ, 厚さ 6μ のマイラー膜でおおってから試料ホルダーに装填し測定した。測定条件は, X線管球: Mo (2.7kw), 印加電圧, 電流: 50 kv, 40 mA, 分光結晶: フッ化リチウム, 検出器: シンチレーションカウンタ, X線通路: 真空, 測定範囲: 5—90° (2θ) である。各元素の同定には, Cd(Kα15.30°, Kβ13.54°), Pb(Lα33.92°, Lβ28.22°), As(Kα34.00°, Kβ30.43°), Cr(Kα69.34°, Kβ62.35°), Mn(Kα62.95°, Kβ56.51°), Ni(Kα48.65°, Kβ43.73°), Cu(Kα45.02°, Kβ40.43°), Zn(Kα41.81°, Kβ37.54°), Fe(Kα57.49°, Kβ51.72°), Sn(Kα14.03°, Kβ12.40°), Ba(Kα11.03°, Kβ9.71°), および Ti(Kα86.08°, Kβ77.24°) の各スペクトル線を用いた。

4-4 分析法 Cd, Pb, Cr, Mn, Ni, Zn, Fe, Cu の定量は, Table 1 に示した測定条件に従って試料溶液を直接原子吸光分析装置に導入し, 別に各標準溶液を希釈して 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0ppm の各段階で検量線を作成し, 直線性を示した濃度範囲内で定量した。また As は還元気化法<sup>7)</sup> (Table 1) によって 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 および 0.6μg の検量線を作成し定量した。

#### 結果および考察

Table 2. Recovery Test on Cd, Pb, Mn, Ni and As from Some Stationery Samples<sup>a)</sup>

|                | Cd                         |                 |              | Pb              |              | Mn              |              | Ni              |              | As                         |                 |              |
|----------------|----------------------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|----------------------------|-----------------|--------------|
|                | Added<br>( $\mu\text{g}$ ) | Recovery<br>(%) | C. V.<br>(%) | Recovery<br>(%) | C. V.<br>(%) | Recovery<br>(%) | C. V.<br>(%) | Recovery<br>(%) | C. V.<br>(%) | Added<br>( $\mu\text{g}$ ) | Recovery<br>(%) | C. V.<br>(%) |
| Pencil         | 5                          | 94.7            | 1.8          | 96.5            | 3.4          | 103.0           | 2.4          | 92.9            | 6.0          | 0.2                        | 92.3            | 2.7          |
|                | 20                         | 93.9            | 3.3          | 94.3            | 4.2          | 101.2           | 1.6          | 94.9            | 3.3          | 0.4                        | 91.3            | 1.8          |
|                | 40                         | 95.9            | 1.5          | 93.9            | 3.8          | 91.1            | 1.8          | 92.9            | 2.7          | 0.6                        | 89.3            | 3.8          |
| Plastic eraser | 5                          | 90.9            | 3.3          | 91.5            | 2.3          | 96.8            | 2.4          | 91.1            | 1.5          | 0.2                        | 94.7            | 1.3          |
|                | 20                         | 93.5            | 1.4          | 89.4            | 2.0          | 96.3            | 1.9          | 97.5            | 2.9          | 0.4                        | 90.0            | 2.4          |
|                | 40                         | 93.6            | 0.7          | 92.3            | 3.4          | 89.9            | 1.3          | 98.0            | 1.2          | 0.6                        | 90.7            | 2.8          |
| Crayon pastel  | 5                          | 91.7            | 3.9          | 90.1            | 1.8          | 99.5            | 1.1          | 95.7            | 5.6          | 0.2                        | 97.7            | 1.1          |
|                | 20                         | 92.0            | 1.5          | 93.9            | 1.7          | 99.6            | 1.0          | 96.5            | 1.6          | 0.4                        | 86.6            | 4.4          |
|                | 40                         | 92.5            | 1.8          | 89.5            | 5.1          | 92.3            | 2.0          | 96.5            | 2.0          | 0.6                        | 88.9            | 7.5          |

a) average value in triplicate.

Table 3. Recovery Test on Cr, Cu, Zn and Fe from Some Stationery Samples<sup>a)</sup>

|                | Cr                         |                 |              | Cu              |              | Zn              |              | Fe              |              |
|----------------|----------------------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|
|                | Added<br>( $\mu\text{g}$ ) | Recovery<br>(%) | C. V.<br>(%) | Recovery<br>(%) | C. V.<br>(%) | Recovery<br>(%) | C. V.<br>(%) | Recovery<br>(%) | C. V.<br>(%) |
| Pencil         | 50                         | 98.8            | 2.2          | 90.5            | 7.5          | 92.8            | 3.8          | 90.1            | 2.1          |
|                | 100                        | 95.8            | 1.9          | 95.5            | 2.8          | 103.4           | 1.1          | 91.3            | 1.7          |
|                | 500                        | 90.9            | 1.1          | 96.7            | 1.9          | 96.0            | 2.3          | 90.9            | 2.5          |
| Plastic eraser | 50                         | 98.0            | 1.5          | 94.0            | 2.8          | 92.8            | 4.4          | 93.8            | 2.0          |
|                | 100                        | 95.9            | 4.2          | 96.4            | 2.0          | 104.9           | 0.9          | 94.6            | 1.0          |
|                | 500                        | 95.4            | 1.9          | 96.5            | 3.9          | 96.0            | 1.9          | 91.2            | 2.7          |
| Crayon pastel  | 50                         | 95.6            | 3.5          | 86.2            | 2.9          | 99.6            | 4.4          | 92.7            | 3.2          |
|                | 100                        | 96.9            | 1.9          | 96.5            | 2.0          | 105.4           | 0.8          | 90.3            | 1.9          |
|                | 500                        | 93.6            | 1.3          | 96.9            | 1.6          | 97.0            | 0.9          | 97.1            | 0.8          |

a) average value in triplicate.

## 1. 分析法の検討

1-1 共存元素の影響 文具類中には、各種の無機顔料の含有が予想されるため、実験方法の4-4の項で示した分析対象金属の定量に対する各種金属塩の影響を検討した。なお、硫酸酸性で不溶なシリカ、アルミナ、硫酸バリウム、酸化チタンは除外した。それぞれ分析対象金属を除いて  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{HAsO}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{SnCl}_2$  および  $\text{FeCl}_3$  を100倍、500倍、1000倍共存させて測定したところ、Crの定量値のみ負の妨害が認められた。すなわち、Crに対し500倍、1000倍のSnの共存は各々-16%、-26%、また1000倍のMnの共存は-13%の妨害を示した。しかし、XRFではSnは含有されず、またMnもその含有量がCrに対し少ないことから実際試料のCrの測定には何ら妨害がないと考えられる。

1-2 回収実験 今回、分析の対象とした金属の含有量ができる限り少ない試料を選び、鉛筆は250mgを、プラスチック製消しゴム、クレパスは1.0gをとり、これにTable 2およびTable 3に示すように各金属の標準液を添加し、実験方法の4-2、4-4の項に従って測定した。Table 2およびTable 3に示すように、回収率は、ほぼ満足すべき結果が得られた。従って各金属の定量は絶対検量法で行った。

## 2. 分析結果

2-1 XRFによる定性分析 原子吸光分析による定量に先だって試料を非破壊でかつ重金属類の同時分析が可能なXRFを行い、今回の文具類の各試料について重金属の定性的スクリーニングを行った。その結果、これらの固形状または液状文具類においてもXRFによる定性分析が有効であることがわかり、Fe、Znおよび-



Table 4. Heavy Metal Contents in Paint Scrapings from Pencils<sup>a)</sup>

| Color of paint | Maker | Pb<br>(ppm) | Cr<br>(ppm) | Mn<br>(ppm) | Zn<br>(ppm) | Fe<br>(ppm) | Cu<br>(ppm) |
|----------------|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Black          | A     | 7.9         | 625.5       | ND          | 117.0       | 0.39*       | 480.0       |
| Black          | B     | 5.7         | 317.3       | ND          | 63.0        | 1.74*       | 356.1       |
| Black          | C     | 98.7        | 344.7       | ND          | 280.0       | 27.3        | 200.6       |
| Black          | C     | 2.1         | 156.0       | ND          | 16.7        | 2.14*       | 868.0       |
| Black          | B     | 8.6         | 350.0       | 35.6        | 26.1        | 0.96*       | 108.5       |
| Magenta        | C     | 2.5         | ND          | 50.9        | 186.1       | 7.62*       | ND          |
| Magenta        | D     | 0.7         | 82.1        | 19.1        | 0.24*       | 1.43*       | ND          |
| Magenta        | C     | 4.1         | ND          | 75.3        | 12.4        | 39.1        | ND          |
| Green          | C     | 4.5         | ND          | 173.0       | 368.7       | 3.13*       | 133.7       |
| Green          | C     | 4.0         | ND          | 75.1        | 408.6       | 2.49*       | 364.6       |
| Green          | D     | ND          | ND          | ND          | 0.51*       | 0.67*       | 264.6       |
| Silver         | D     | 25.7        | ND          | ND          | 13.1        | 143.3       | ND          |
| Silver         | D     | 3.6         | ND          | ND          | 21.9        | 29.1        | ND          |
| Deep green     | C     | 0.7         | ND          | 99.0        | 50.5        | 2.53*       | 171.2       |
| Pale green     | B     | 379.8       | 963.7       | ND          | 0.80*       | 263.5       | 133.5       |
| Pale yellow    | B     | 612.1       | 0.14*       | ND          | 0.65*       | 166.1       | ND          |
| Yellow         | B     | ND          | ND          | ND          | 67.4        | 202.2       | ND          |
| Yellow         | E     | ND          | ND          | ND          | 0.49*       | 26.3        | ND          |
| Yellow         | C     | ND          | ND          | ND          | ND          | 61.5        | ND          |

a) Cd, As and Ni were not detected from any of the samples.

\*: The mark represents the unit of percent (%). ND: not detected.

部の試料から Cu, Pb, Cr, Ba, Ti がかなり多量に含有されることが確認された。さらに現在では顔料としても使用されていないと考えられる Cd, Pb, As, Mn, Ni が微量ながら検出された。また, Hg, Sn については検出されなかった。

以上のことから文具類中の重金属の存在傾向をほぼ把握することができた。これらの結果を考慮して微量に含有する Cd, As, Ni, Mn の測定も併せて意図し、各試料中の目的とした重金属の定量分析を行うことにした。

2-2 測定結果 まず, Pb について考察すると, Table 4 および Table 6 に示すように鉛筆の塗膜, プラスチック製消しゴムの各 3 試料よりかなり多量の Pb が検出された。すなわち, 鉛筆は, 98.7-612.1ppm, プラスチック製消しゴム 83.8-165.0ppm が認められた。このうちの黄色系鉛筆の塗膜は, 鉛含有量が 612.1ppm であり, 米国の Consumer Product Safety Act<sup>4,5)</sup> に基づく鉛化合物入りの塗料やそれを使用している子供用品などに適用される 0.06% の規制値を越えていた。近年, 米国では子供の鉛中毒が社会的な問題になっており<sup>1)</sup>, その原因は鉛入り家庭用塗料, クレヨン, おもちゃ,

家具などの異食症<sup>2)</sup>や pencil chewing habit<sup>10,11)</sup>によると推測され, 現在では, 前述の規制を設けるなどして子供の生活環境の改善がなされている。したがって, わが国においても中村ら<sup>3)</sup>が指摘しているように子供用文具類およびその原料である塗料の実態調査や行政的な規制が望まれる。なお, これら鉛含有の試料はいずれも黄色系の色調を有し, かつ Cr が共存していることから無機顔料として黄鉛 (PbCrO<sub>4</sub>) が推定される<sup>9,12)</sup>。

つぎに, Cr については, Table 4-7 および Table 9 に示すように鉛筆および色鉛筆各 7 試料, プラスチック製消しゴム 3 試料, クレヨン 6 試料, ポスターカラー 2 試料, 計 25 試料から多量の Cr が検出された。これらの試料は, 色調が黒, 赤, 黄または青系に集中しているので, 無機顔料としては黄鉛, 亜鉛黄 (ZnCrO<sub>4</sub>), クロム黒 (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) などの使用が推定される<sup>9,12)</sup>。各試料中のクロム含有量は, 鉛筆では, 156.0-1,400 ppm, 色鉛筆 166.0-600.0 ppm, プラスチック製消しゴム 167.7-213.1ppm, クレヨン 181.5-311.5ppm およびポスターカラー 42.5-5,200ppm であった。これらのうちで黄色系鉛筆は Cr 0.14%, Zn 0.65% 含有されていることから

Table 5. Heavy Metal Contents in Paint Scrapings from Color Pencils<sup>a)</sup>

| Color of paint | Maker | Pb<br>(ppm) | Cr<br>(ppm) | Mn<br>(ppm) | Zn<br>(ppm) | Fe<br>(ppm) | Cu<br>(ppm) |
|----------------|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Green          | F     | 8.5         | 82.3        | 188.9       | 57.3        | 2.72*       | 427.1       |
|                | G     | 15.1        | 600.0       | 18.7        | 53.2        | 748.1       | 660.0       |
| Light blue     | F     | 21.1        | ND          | ND          | 0.97*       | 62.2        | 247.6       |
|                | G     | 11.3        | 444.8       | 21.7        | 65.6        | 624.1       | 717.7       |
| Blue           | F     | 0.7         | 57.9        | 8.6         | 0.54*       | 222.7       | ND          |
|                | G     | 7.0         | 225.7       | 21.6        | ND          | 351.6       | 803.6       |
| Purple         | F     | 40.0        | ND          | 24.4        | 0.21*       | 1.12*       | ND          |
|                | G     | ND          | ND          | 11.5        | ND          | 297.6       | ND          |
| Red            | F     | ND          | ND          | 24.4        | ND          | 0.33*       | ND          |
|                | G     | 4.6         | ND          | 64.7        | ND          | 49.4        | ND          |
| Orange         | F     | 35.0        | ND          | 10.8        | 171.1       | 54.2        | ND          |
|                | G     | ND          | ND          | ND          | ND          | 19.0        | 0.31*       |
| Yellow         | F     | 27.8        | 216.7       | 12.3        | 0.33*       | 167.0       | ND          |
|                | G     | ND          | ND          | 10.6        | ND          | 0.42*       | ND          |
| Bright yellow  | F     | 4.6         | ND          | ND          | 0.48*       | 23.6        | ND          |
|                | G     | ND          | ND          | ND          | 0.60*       | 25.3        | ND          |
| Pale orange    | F     | 10.7        | ND          | ND          | ND          | 1.76*       | ND          |
|                | G     | ND          | ND          | ND          | ND          | 0.96*       | 86.5        |
| Pink           | F     | 11.9        | 91.2        | 19.1        | 0.84*       | 72.3        | ND          |
|                | G     | ND          | ND          | 36.5        | 20.4        | 24.4        | ND          |
| White          | F     | 31.6        | ND          | ND          | ND          | 0.95*       | ND          |
|                | G     | 5.9         | ND          | ND          | 17.2        | 65.3        | ND          |
| Grey           | F     | ND          | ND          | ND          | 2.80*       | 287.4       | ND          |
|                | G     | 1.2         | ND          | ND          | 1.80*       | 48.0        | ND          |
| Brown          | F     | ND          | 29.1        | 74.7        | 183.5       | 3.58*       | 49.7        |
|                | G     | 6.6         | ND          | ND          | ND          | 200.2       | ND          |
| Black          | F     | 2.2         | 457.7       | 51.5        | 247.5       | 1.91*       | 680.5       |
|                | G     | 3.2         | 591.5       | 86.3        | 411.8       | 0.96*       | 258.5       |
| Silver         | F     | 7.8         | 166.0       | ND          | ND          | 171.6       | ND          |
|                | G     | 0.9         | ND          | ND          | ND          | 180.3       | ND          |
| Gold           | F     | 2.1         | ND          | ND          | 0.93*       | 42.0        | 2.56*       |
|                | G     | 3.2         | ND          | ND          | 1.00*       | 20.6        | 1.66*       |

a) Cd, As and Ni were not detected from any of the samples.

\*: The mark represents the unit of percent (%). ND: not detected.

亜鉛黄の顔料が、また赤色系ポスターカラーは Cr 0.52 %でクロムアルミナ系顔料が使用されているものと考えられる<sup>9,12)</sup>。また、クロムに関する毒性は、その酸化力のため一般に3価より6価の方が強いことが知られているが、両者とも発ガン作用を有する。特に6価クロムを含む黄鉛 (PbCrO<sub>4</sub>) や亜鉛黄 (ZnCrO<sub>4</sub>) は実験的に発ガン作用が認められている<sup>13,14)</sup>。さらに、3価および6価クロムは皮膚に対する親和力が強く、皮膚障害を起こ

しやすい<sup>15)</sup>。したがって、このようなクロム化合物が子供の生活環境の中で、少なくとも文具類などに存在することは問題であり、健康保護のためにも何らかの対策が必要であると考えらる。

Mnは、鉛筆の3試料に、75.3—173.0ppm、色鉛筆5試料に51.5—180.9ppm、クレヨン6試料に60.6—191.9ppmが認められたが、その含有量からマンガン緑 (Ba MnO<sub>4</sub>) 等の顔料に由来するものではないと考えられ、

Table 6. Heavy Metal Contents of Plastic Color Eraser<sup>a)</sup>

| Color      | Maker | Cd (ppm) | Pb (ppm) | Cr (ppm) | Mn (ppm) | Zn (ppm) | Fe (ppm) |
|------------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Green      | H     | 16.2     | 31.9     | ND       | 7.0      | 7.9      | 75.7     |
| Green      | H     | 31.5     | 55.0     | ND       | 8.1      | 7.7      | 80.4     |
| Blue       | H     | 55.0     | 40.0     | ND       | 7.5      | 10.0     | 75.2     |
| Blue       | H     | 19.3     | 25.2     | ND       | 7.4      | 9.6      | 101.0    |
| Red        | H     | 45.0     | 31.5     | ND       | 8.5      | 7.8      | 91.5     |
| Red        | H     | 29.5     | 31.2     | ND       | 9.7      | 8.1      | 88.3     |
| Yellow     | H     | 47.5     | 165.0    | 195.0    | 8.0      | 8.8      | 80.0     |
| Yellow     | H     | 36.1     | 121.1    | 213.1    | 9.7      | 6.8      | 77.8     |
| Pink       | H     | 51.7     | 24.3     | ND       | 10.4     | 14.8     | 115.2    |
| Pink       | H     | 28.0     | 40.0     | ND       | 9.4      | 9.9      | 99.8     |
| Green      | I     | ND       | 83.8     | 167.7    | 2.8      | 2.6      | 25.2     |
| Green      | I     | ND       | ND       | ND       | 3.0      | 3.1      | 25.2     |
| Pale green | I     | ND       | ND       | ND       | 2.8      | 14.8     | 17.5     |
| Pale green | I     | ND       | ND       | ND       | 2.9      | 9.9      | 18.3     |
| Purple     | I     | ND       | ND       | ND       | 2.8      | 30.0     | 25.2     |
| Purple     | I     | ND       | ND       | ND       | 2.1      | 23.0     | 23.4     |
| Red        | I     | ND       | 39.6     | 23.1     | 2.0      | 33.1     | 17.9     |
| Red        | I     | ND       | 30.5     | 21.9     | 3.1      | 21.1     | 20.1     |
| White      | I     | ND       | ND       | ND       | 2.8      | 4.0      | 28.1     |
| White      | I     | ND       | ND       | ND       | 2.1      | 6.7      | 26.0     |

a) As, Ni and Cu were not detected from any of the samples.

ND: not detected.

含有量からみて毒性上問題にならないと思われる<sup>15)</sup>.

Cd は、古くから赤色系の顔料としてカドミウム赤 (CdS) が使われてきたが、現在ではその毒性が強いことから着色に用いられておらず、今回の調査でも Table 6 に示すようにプラスチック製消しゴムの10試料に16.2—55.0ppm, 平均36.0ppmのCdが検出されただけである。これらは原材料の不純物から由来しているものと考えられる。

また、As については、Table 7 および Table 8 に示すように(その含有量は微量ではあるが)、クレヨン、クレバスのほぼ全試料から検出された。すなわち、クレヨン 0.3—47.5ppm, 平均値 12.5ppm, クレバス 0.3—53.0ppm, 平均 5.8ppm であった。それぞれクレヨン 47.5ppm, クレバス53.0ppmおよびポスターカラー61.5ppm (Table 9) が今回の最高値を示したものである。それらの試料は色調が黄土色(yellow ochre)で共通している。いずれの試料も Fe が5.63—9.97%と多量に含有しているので、顔料は合成オーカ ( $\alpha$ -FeO $\cdot$ OH) と推定され、前述の As は不純物と考えられる。

さらに Ni は一部の試料に微量の存在が認められ、クレヨン15試料は9.1—18.8ppm, 平均13.6ppm, クレバス10試料は7.1—12.0ppm, 平均9.5ppmであった。

一般に学童用文具類は、その使用頻度が高く、かつ日常的に接触する機会が多いため、特にクレヨンやクレバスは経皮的、経口的な摂取の可能性がある。Cd, As, Ni の含有は好ましくない。これらの有害金属は、可能な限り除去されるべきであり、原材料や無機顔料そのものの品質の改善が求められる。

Zn, Fe および Cu の各化合物は、各種の無機顔料として使用されている<sup>16)</sup>。Table 4—Table 9 に示すようにこれらの重金属はパーセントオーダーで多量に含有されている。分析結果から黒鉛 (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)、ベンガラ (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)、銅フタロシアニン、紺青 (KFe[Fe(CN)<sub>6</sub>])、亜鉛華 (ZnO) などが推定される。

#### ま と め

学童用文具類中の重金属分析において、今回、鉛筆の塗膜より米国の規制値 0.06%を越える Pb が検出された。また Cr については、鉛筆および色鉛筆の塗膜、ブ

Table 7. Heavy Metal Contents of Wax Crayons<sup>a)</sup>

| Color         | Maker | Pb<br>(ppm) | Cr<br>(ppm) | As<br>(ppm) | Ni<br>(ppm) | Mn<br>(ppm) | Zn<br>(ppm) | Fe<br>(ppm) | Cu<br>(ppm) |
|---------------|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Green         | J     | 1.4         | 138.5       | 27.5        | ND          | 60.6        | 20.8        | 0.32*       | 850.0       |
|               | K     | 2.6         | 10.8        | 39.0        | 16.7        | 14.4        | 3.9         | 473.3       | 0.13*       |
| Light blue    | J     | ND          | ND          | 4.5         | ND          | 5.7         | 25.0        | 341.2       | 312.8       |
|               | K     | 2.5         | 3.5         | 8.9         | 10.7        | 13.9        | ND          | 361.2       | 346.0       |
| Blue          | J     | 3.5         | 8.5         | 3.3         | ND          | 8.3         | 4.0         | 388.9       | 0.12*       |
|               | K     | 3.9         | 2.8         | ND          | 12.0        | 16.8        | 5.7         | 0.50*       | 616.0       |
| Purple        | J     | 4.4         | ND          | 3.8         | ND          | 4.4         | 8.3         | 0.16*       | 14.5        |
|               | K     | 2.7         | 10.2        | 0.6         | 11.5        | 10.0        | 14.1        | 1.00*       | ND          |
| Red           | J     | ND          | 51.5        | 37.0        | ND          | 99.9        | 15.4        | 43.0        | ND          |
|               | K     | 2.6         | ND          | ND          | ND          | ND          | 3.9         | 191.8       | ND          |
| Orange        | J     | 4.4         | ND          | 0.9         | ND          | 5.7         | 4.1         | 277.6       | ND          |
|               | K     | 1.1         | ND          | 0.3         | 13.7        | 13.2        | ND          | 323.1       | 8.8         |
| Yellow        | J     | 1.5         | ND          | 0.9         | ND          | 5.7         | 6.1         | 373.0       | ND          |
|               | K     | 1.1         | 4.8         | 6.5         | 17.3        | 8.9         | 8.4         | 231.0       | ND          |
| Yellow ocher  | J     | ND          | 95.0        | 47.5        | ND          | 147.0       | ND          | 9.97*       | ND          |
|               | K     | 3.6         | 11.2        | 1.3         | 11.5        | 32.3        | 12.6        | 6.70*       | ND          |
| Yellow green  | J     | ND          | ND          | 1.8         | ND          | 3.0         | 6.1         | 400.8       | 166.7       |
|               | K     | 1.2         | 7.0         | 0.6         | 19.2        | 12.4        | 5.5         | 360.0       | 114.9       |
| Pale orange   | J     | 3.5         | ND          | 3.3         | ND          | 8.3         | 4.0         | 231.5       | ND          |
|               | K     | 5.7         | ND          | 8.7         | ND          | 10.0        | 8.1         | 118.2       | ND          |
| Pink          | J     | ND          | ND          | 4.0         | ND          | 3.0         | 4.0         | 333.2       | ND          |
|               | K     | 5.7         | 7.7         | 6.5         | 13.7        | 16.7        | 5.3         | 0.15*       | ND          |
| White         | J     | 1.4         | ND          | 2.0         | ND          | ND          | 18.7        | 309.4       | ND          |
|               | K     | 1.2         | ND          | 35.0        | 18.8        | 5.4         | 13.7        | 82.2        | ND          |
| Grey          | J     | 11.9        | 138.5       | 27.0        | ND          | 71.1        | 4.0         | 0.42*       | ND          |
|               | K     | 5.7         | 8.7         | 6.5         | 9.3         | 8.5         | 9.4         | 302.9       | ND          |
| Brown         | J     | ND          | 237.5       | 30.0        | ND          | 191.9       | ND          | 15.60*      | ND          |
|               | K     | 3.9         | 4.6         | 0.9         | 9.3         | 33.4        | 9.2         | 10.19*      | ND          |
| Vandyke brown | J     | 1.6         | 181.5       | 27.0        | ND          | ND          | ND          | 9.97*       | ND          |
|               | K     | 2.7         | 19.7        | 27.7        | 17.3        | 15.0        | 16.9        | 2.64*       | 13.9        |
| Black         | J     | ND          | 311.5       | 37.0        | 9.1         | 126.0       | ND          | ND          | ND          |
|               | K     | 2.2         | 7.0         | 1.0         | 14.2        | 11.2        | 9.8         | 325.0       | ND          |

a) Cd was not detected from any of the samples.

\*: The mark represents the unit of percent (%).

ND: not detected.

ラスチック製消しゴム、クレヨン、ポスターカラーの25試料から 156.0—5,200ppm が認められた。さらに微量ではあるが、一部の試料から Cd, As, Ni などの有害金属が検出された。文具類における子供の使用頻度や直接的な接触を考えると、特に家庭、学校、幼稚園、絵画教室など幼児および学童教育の場において、子供の pencil chewing habit や経皮的、経口的な摂取に基づく有害金属の体内蓄積が危惧される。これらの有害金属

の存在は、少なくとも子供の生活環境にとって好ましいものではなく、子供の健康保護のために文具類の原材料の品質チェックおよび規制が必要であると考ええる。

謝辞 本研究にあたり終始御協力いただきました衛生局薬務部家庭用品担当、乙益励三郎氏ならびに山崎 厚氏に深謝致します。

#### 文 献

- 1) Barnako, D.: JAMA., 220, 1737, 1972

Table 8. Heavy Metal Contents of Crayon Pastels<sup>a)</sup>

| Color         | Maker | Pb<br>(ppm) | Cr<br>(ppm) | As<br>(ppm) | Ni<br>(ppm) | Mn<br>(ppm) | Zn<br>(ppm) | Fe<br>(ppm) | Cu<br>(ppm) |
|---------------|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Green         | L     | 1.2         | 7.5         | 0.8         | ND          | 5.4         | 2.9         | 122.7       | 583.0       |
|               | M     | ND          | 16.5        | 0.4         | ND          | 5.0         | 4.1         | 272.7       | 961.5       |
| Light blue    | L     | 2.7         | 2.0         | 4.5         | ND          | 5.7         | 287.6       | 108.1       | 222.0       |
|               | M     | 1.1         | 9.4         | 9.8         | ND          | 5.7         | 17.1        | 162.2       | 172.0       |
| Blue          | L     | 2.8         | 13.9        | 2.4         | ND          | 5.2         | 84.5        | 114.5       | 0.17*       |
|               | M     | 1.5         | 11.6        | 2.0         | 8.3         | 7.7         | 34.5        | 200.0       | 0.15*       |
| Purple        | L     | 9.5         | 2.8         | 1.1         | ND          | ND          | ND          | 48.9        | 9.5         |
|               | M     | 9.2         | 9.1         | 4.1         | ND          | 7.5         | 21.2        | 0.13*       | ND          |
| Red           | L     | 13.4        | 5.2         | 0.9         | ND          | ND          | 7.5         | 109.0       | ND          |
|               | M     | 1.0         | 7.4         | 0.9         | 7.1         | 4.6         | 3.7         | 211.0       | ND          |
| Orange        | L     | 9.5         | 7.2         | 0.3         | ND          | 6.4         | 4.2         | 147.3       | ND          |
|               | M     | ND          | 10.8        | 0.6         | 9.3         | 5.9         | 5.3         | 205.2       | ND          |
| Yellow        | L     | 2.1         | 7.0         | 1.2         | 9.6         | 6.2         | 8.4         | 47.1        | ND          |
|               | M     | 5.5         | 12.4        | 1.4         | 8.9         | 6.9         | 7.8         | 292.3       | ND          |
| Yellow ocher  | L     | 13.4        | 12.2        | 2.7         | ND          | 25.5        | 40.0        | 4.80*       | ND          |
|               | M     | 4.5         | 22.7        | 53.0        | 12.0        | 20.8        | 23.6        | 7.00*       | ND          |
| Yellow green  | L     | 9.9         | 7.5         | 2.0         | 10.0        | 6.4         | 6.0         | 95.4        | 51.6        |
|               | M     | 1.0         | 8.4         | 0.9         | ND          | 3.6         | 10.4        | 122.7       | 95.6        |
| Pale orange   | L     | 15.1        | 2.6         | 3.8         | ND          | 5.9         | 14.9        | 250.0       | ND          |
|               | M     | 1.2         | 10.3        | 1.1         | ND          | 7.0         | 11.1        | 243.6       | ND          |
| Pink          | L     | 0.1         | 7.4         | 2.2         | ND          | 7.2         | 4.68*       | 178.9       | 9.4         |
|               | M     | 1.0         | 13.9        | 9.3         | 8.6         | 4.5         | 16.5        | 776.0       | ND          |
| White         | L     | ND          | 4.2         | 7.0         | ND          | 4.3         | 500.0       | 57.2        | ND          |
|               | M     | 1.3         | 8.2         | 5.9         | 11.4        | 5.9         | 8.2         | 163.6       | ND          |
| Grey          | L     | 11.5        | 4.5         | 4.3         | ND          | 5.7         | 250.0       | 0.13*       | ND          |
|               | M     | 1.1         | 9.4         | 2.3         | 10.0        | 7.8         | 16.1        | 272.7       | ND          |
| Brown         | L     | 4.2         | 4.6         | 0.3         | ND          | 22.7        | 9.4         | 5.00*       | ND          |
|               | M     | 9.0         | 8.7         | 20.0        | ND          | 13.3        | 10.8        | 6.48*       | ND          |
| Vandyke brown | L     | 2.2         | 6.0         | 1.1         | ND          | 21.7        | 18.4        | 3.65*       | ND          |
|               | M     | ND          | 12.5        | 39.0        | ND          | 19.3        | 25.0        | 7.00*       | ND          |
| Black         | L     | 9.2         | 4.8         | ND          | ND          | 5.0         | 4.1         | 116.4       | ND          |
|               | M     | 8.2         | 13.3        | 1.5         | ND          | 5.4         | 4.4         | 238.5       | ND          |

a) Cd was not detected from any of the samples.

\*: The mark represents the unit of percent (%).

ND : not detected.

- 2) Pueschel, S.M., Kopito, L. and Schwachman, H.: JAMA., 222, 462, 1972
- 3) 鹿庭正昭, 小嶋茂雄, 中村晃忠: 衛生化学, 27, 391, 1981
- 4) Fed., Regist., 42, 44192, 1977
- 5) Chemical and Engineering News, Aug., 21, pg. 13, 1972
- 6) personal communication, 山形県消費生活センタ

-, Apr., 27, 1982

- 7) 江波戸舉秀, 天川映子, 山野辺秀夫: 食衛誌, 15, 469, 1974
- 8) 衛生試験法注解, 6, 1980, 金原出版, 東京
- 9) 塗料便覧, 第2版, 1968, 日刊工業新聞社, 東京
- 10) Pichirallo, J.: Science, 173, 509, 1971
- 11) Seth, T.D., Hasan, M.Z. and Sircan, S.: Chemosphere, 3, 149, 1974

Table 9. Heavy Metal Contents of Poster Color<sup>a)</sup>

| Color        | Maker | Pb<br>(ppm) | Cr<br>(ppm) | As<br>(ppm) | Mn<br>(ppm) | Zn<br>(ppm) | Fe<br>(ppm) | Cu<br>(ppm) |
|--------------|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Green        | N     | ND          | ND          | ND          | 5.8         | 5.4         | 61.3        | 0.10*       |
| Blue         | N     | ND          | 15.0        | ND          | 9.0         | 2.7         | 383.0       | 350.0       |
| Purple       | N     | ND          | ND          | ND          | 4.9         | 30.5        | 0.14*       | 10.6        |
| Vermilion    | N     | 15.8        | 0.52*       | ND          | 5.8         | 13.8        | 159.1       | ND          |
| Red          | N     | ND          | ND          | ND          | 5.8         | 1.52*       | 198.0       | ND          |
| Yellow       | N     | ND          | ND          | ND          | 5.8         | 16.8        | 688.0       | 9.1         |
| Yellow ocher | N     | ND          | 42.5        | 61.5        | 30.0        | 23.1        | 5.63*       | 10.6        |
| White        | N     | ND          | 5.2         | 32.5        | 6.5         | 11.0        | 40.3        | ND          |
| Brown        | N     | 34.3        | 22.5        | 24.5        | 46.8        | 40.7        | 6.88*       | 18.4        |
| Black        | N     | ND          | 596.1       | ND          | ND          | 7.2         | ND          | 0.37*       |

a) Cd and Ni were not detected from any of the samples.

\* : The mark represents the unit of percent (%). ND : not detected.

12) 松本十九 : 新塗料辞典, 第1版, 1979, 技報堂, 東京

14) 石館守三 : 生活環境と発ガン, 152, 1979, 朝倉書店, 東京

13) Hueper, W.C. and Payne, W.W. : Arch., Environ., Health, 5, 445, 1962

15) 加須屋実 : 環境毒性学 (上巻), 1977, 日刊工業新聞社, 東京

# 報 文 Ⅲ

食品等に関する調査研究

REPORTS III

PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE





ブドウ球菌培養液からの簡易・迅速エンテロトキシン検出法としての  
スライド・逆受身ラテックス凝集反応 (Slide-RPLA) について

新垣 正夫\*, 五十嵐 英夫\*, 藤川 浩\*  
潮田 弘\*, 寺山 武\*\*, 坂井 千三\*

Slide Reversed Passive Latex Agglutination (Slide-RPLA) for Simple and  
Rapid Detection of Staphylococcal Enterotoxins A-C in a Culture

MASAO SHINGAKI\*, HIDEO IGARASHI\*, HIROSHI FUJIKAWA\*,  
HIROSHI USHIODA\*, TAKESHI TERAYAMA\*\* and SENZO SAKAI\*

A slide reversed passive latex agglutination (Slide-RPLA) test for the detection of staphylococcal enterotoxins in a culture was developed. For the slide-RPLA, specific immunoglobulin against staphylococcal enterotoxin A to C were purified from the rabbit hyper immune sera by affinity chromatography and coupled to polystyrene latex particles respectively. Strains to be tested were inoculated into BHI broth with 5% rabbit plasma and incubated at 37°C for 24 hours. After coagulase typing, cultures were allowed to stand for additional 24 hours and assayed for enterotoxins.

The procedure of the Slide-RPLA are as follows: One drop each of culture is placed in 4 holes on the test glass slide, added with 1 drop of polystyrene latex particles suspension sensitized with anti A-C immunoglobulins in 3 holes, and the culture in the remaining hole used as a control without addition. The slides are rocked, and the result read one or two minutes later.

In this Slide-RPLA, the latex particles coupled with anti A-C immunoglobulins showed a high level of specificity and sensitivity against homologous types of purified enterotoxins and cultures of toxin producing strains. The minimum detectable amount was 50 ng/mL. Excellent correlation in determination of cultures was found between Slide-RPLA and reversed passive hemagglutination (RPHA) and reversed passive latex agglutination (RPLA) tests.

**Keywords:** Staphylococcus enterotoxin, slide reversed passive latex agglutination, slide-RPLA, latex, polystyrene latex particles, immunoglobulin, coagulase typing

ブドウ球菌食中毒は、喫食後、2～4時間以内に発症するので、他の細菌性食中毒に比較して、原因食品が残されていることが多く、これらの食品からエンテロトキシンを直接証明することにより、短時間に本菌食中毒の診断をすることが可能である。特に近年、食品からのエンテロトキシンの簡易・迅速検出法が開発され、本食中毒の早期診断に応用されている<sup>1-3)</sup>。

一方、汚染源の追跡などの疫学調査は、関連材料から分離された黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型別やファージ型別を応用することによって行なわれている<sup>4)</sup>。この疫学調査の場合、分離菌株のコアグララーゼ型別やファ-

ジ型別と同時に、エンテロトキシン産生性およびエンテロトキシン型を知ることが可能であれば、調査の精度をより高めることができると考えられる。そこでこの目的から、コアグララーゼ型別のために調製された試料を用いて、1～2分以内にエンテロトキシンの産生性とその型別ができる簡便なスライド・ラテックス凝集反応（以下 Slide-RPLA と略）について検討した。その結果、この方法が、ブドウ球菌食中毒から分離された黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンの型別法として、十分利用できることが証明されたので、その成績について報告する。

材料および方法

\* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 同微生物部細菌第二研究科

ポリスチレンラテックス：Slide-RPLA 反応に供試したポリスチレンラテックス粒子（以下ラテックスと略）は、武田薬品工業株式会社より分与された SDL-73（粒子径 0.35 $\mu$ ）を用いた。

エンテロトキシンの精製と型特異免疫グロブリンの調製：精製エンテロトキシン A, B, C および各エンテロトキシンの型特異免疫グロブリンは、すでに著者らが報告している方法により調製した<sup>5)</sup>。

エンテロトキシン特異免疫グロブリン感作ラテックスの調製：0.25%ラテックス懸濁液は、5%ラテックス懸濁液を、1/15Mリン酸緩衝・生理食塩液で20倍希釈して調製した。これに等量の型特異免疫グロブリンの 100 $\mu$ g/ml 溶液を加え、室温で1時間反応させた。この反応液は、4,000 rpm 10分遠心し、その沈渣を1/15Mリン酸緩衝・生理食塩液と希釈液（1/15M PBS：5% BSA：1% PVP=200：40：1）で各々1回ずつ遠心により洗浄した。このように調製したラテックスは、最終濃度0.25%懸濁液になるように調製し、使用時まで4℃に保存した。対照の感作ラテックスは、ウサギ正常血清から作製したウサギ正常 $\gamma$ -グロブリンを前述の方法に従って調製した。

被検菌の抗原液の調製：今回型別に用いた黄色ブドウ球菌の供試菌株数は254株である。これらの菌株は、ブドウ球菌食中毒の推定原因食品、吐物、ふん便、拭取りなどの検査材料から MSEY 寒天平板<sup>6)</sup>を用いて分離した。供試菌株は、約 3ml の 5%ウサギ血漿加 Brain Heart Infusion broth (Difco) に接種し、24時間静置培養後、潮田ら<sup>7)</sup>の方法でコアグラゼ型別を行なった。残りの試料をそのまま室温、または37℃にさらに1日放置して、析出したフィブリンが菌体と共に自然に沈澱した状態の上清を Slide-RPLA 法の試料として用いた。

スライド・ラテックス凝集反応：Slide-RPLAに用いるスライドガラスは、血清反応用に用いられている六穴のガラス板を用いた。このガラス板のホールに毛细キャピラールを用いて、沈澱したフィブリンが巻き上がらないように静かに試料の上清をすいと、ガラス板の4穴にそれぞれ1滴ずつ滴下した。続いて、エンテロトキシン A, B, C の型特異免疫グロブリン感作ラテックス懸濁液と、ウサギ正常血清 $\gamma$ -グロブリン感作ラテックス懸濁液をそれぞれ1滴加え、ガラス板を前後左右に傾けて良く混和して反応させた。肉眼で1～2分以内に生じた凝集塊を観察した。菌株のエンテロトキシン型は、凝集したラテックスに感作した免疫グロブリンのエンテロトキシン型より決定した。エンテロトキシン型が決定され

た分離菌株からのエンテロトキシン産生量は、試料を Slide-RPLA 法用の希釈液で2倍連続希釈を行なった。各希釈された試料と決定されたエンテロトキシン型の免疫グロブリンを感作したラテックスとの Slide-RPLA 反応を行ない、凝集塊を形成した最大希釈倍数と Slide-RPLA 法の最小検出量から算出した。

RPHA および RPLA 法：Slide-RPLA 法に用いた同じ試料を 14,000rpm で20分間遠心し、上清を分離した。この上清に、チメロサルを約1/10,000倍量に加えて、RPHA 法<sup>8)</sup>と RPLA 法<sup>9)</sup>によるエンテロトキシンの検出の試料とした。

## 成 績

Slide-RPLA 法の型特異性と検出感度の検討：Table 1 に、精製エンテロトキシン A, B, C を用いて Slide-RPLA 法の型特異性と最小検出量を検討した成績を示した。各エンテロトキシン型の免疫グロブリンを感作したラテックスは、それぞれ対応するエンテロトキシンとのみ反応し、その型特異性が確認された。またエンテロトキシン A, B および C の 1,000ng, 100ng, 50ng, 25ng, 12.5ng/ml 溶液に対して、各エンテロトキシン型の感作ラテックスは、それぞれ対応するエンテロトキシン50ng/ml 溶液まで凝集が認められた。このことから、Slide-RPLA 法の最小検出量は、約 50ng/ml であると推察された。

Slide-RPLA 法と RPHA および RPLA 法によるエンテロトキシン型別の相関性の検討：Slide-RPLA 法を用いて菌株の型別を行なう手始めとして、すでに食品およ

Table 1. Specificity and Sensitivity of Slide-RPLA Test against Purified Enterotoxins A-C

| Enterotoxin | Latex coupled with : | Concentration of Enterotoxin (ng/ml) |     |    |    |      |
|-------------|----------------------|--------------------------------------|-----|----|----|------|
|             |                      | 1,000                                | 100 | 50 | 25 | 12.5 |
| Ent. A      | Anti-A               | +++                                  | ++  | +  | —  | —    |
|             | Anti-B               | —                                    | —   | —  | —  | —    |
|             | Anti-C               | —                                    | —   | —  | —  | —    |
| Ent. B      | Anti-A               | —                                    | —   | —  | —  | —    |
|             | Anti-B               | +++                                  | ++  | +  | —  | —    |
|             | Anti-C               | —                                    | —   | —  | —  | —    |
| Ent. C      | Anti-A               | —                                    | —   | —  | —  | —    |
|             | Anti-B               | —                                    | —   | —  | —  | —    |
|             | Anti-C               | +++                                  | ++  | +  | —  | —    |

び菌株からのエンテロトキシン型別に実用化されている RPHA 法および RPLA 法との相関性を検討した。Table 2 にその成績を示した。ブドウ球菌食中毒から分離した黄色ブドウ球菌22株を選び、それぞれの菌株のエンテロトキシン産生性を Slide-RPLA 法, RPHA および RPLA 法で比較検討した。その結果, Table 2 に示したように, 17 菌株中 Slide-RPLA 法で型別された菌株のエンテロトキシン型は, A型が9株, B型が2株, C型が2株, A+B型が4株で, 5菌株についてはエンテロトキシン産生性が認められなかった。また RPHA 法および RPLA 法で, 22菌株のエンテロトキシン産生性を検討した結果, 19菌株からエンテロトキシン産生が確認されたが, 3菌株はこの両方法によってもエンテロトキシン産生がみられなかった。RPHA 法や RPLA 法でエンテロトキシンが検出されて, Slide-RPLA 法では検出できなかった2菌株のエンテロトキシンの産生量は, Slide-RPLA 法の検出限界以下の 10ng/ml であった。

次に, Slide-RPLA 法でエンテロトキシンの検出を行なった22菌株のエンテロトキシン産生量について, Slide-RPLA法とRPHA法やRPLA法の相関性を検討した。その結果, Slide-RPLA 法で求めた産生量と RPHA 法および RPLA 法で求めた産生量の間の相関係数は, 0.983 および 0.953 でそれぞれの方法で求めた産生量の間には高い相関が認められた。

各種食中毒検査材料から分離された菌株のエンテロトキシン型別: 1981年に東京都内で発生したブドウ球菌食中毒のうちから15事例を選び, 各事例の種々の検査材料136件から分離された黄色ブドウ球菌254株について, エ

Table 2. Comparison of Slide-RPLA, RPHA and RPLA for the Detection of Enterotoxins from Culture of *Staphylococcus aureus*

| Culture No. | Slide-RPLA  |     |     | RPHA        |     |     | RPLA        |     |     |
|-------------|-------------|-----|-----|-------------|-----|-----|-------------|-----|-----|
|             | Enterotoxin |     |     | Enterotoxin |     |     | Enterotoxin |     |     |
|             | A           | B   | C   | A           | B   | C   | A           | B   | C   |
| 1           | 0.4*        | —   | —   | 0.4         | —   | —   | 0.2         | —   | —   |
| 2           | 0.4         | —   | —   | 0.4         | —   | —   | 0.2         | —   | —   |
| 3           | 0.4         | —   | —   | 0.4         | —   | —   | 0.2         | —   | —   |
| 4           | 0.4         | —   | —   | 0.4         | —   | —   | 0.4         | —   | —   |
| 5           | 0.4         | —   | —   | 0.4         | —   | —   | 0.4         | —   | —   |
| 6           | 0.4         | —   | —   | 0.4         | —   | —   | 0.4         | —   | —   |
| 7           | 0.2         | —   | —   | 0.4         | —   | —   | 0.2         | —   | —   |
| 8           | 0.4         | —   | —   | 0.2         | —   | —   | 0.2         | —   | —   |
| 9           | 0.4         | —   | —   | 0.4         | —   | —   | 0.4         | —   | —   |
| 10          | —           | 1.6 | —   | —           | 1.6 | —   | —           | 1.6 | —   |
| 11          | —           | 1.6 | —   | —           | 1.6 | —   | —           | 2.0 | —   |
| 12          | —           | —   | 1.6 | —           | —   | 1.3 | —           | —   | 1.0 |
| 13          | —           | —   | 0.8 | —           | —   | 0.6 | —           | —   | 0.8 |
| 14          | 0.4         | 0.4 | —   | 0.2         | 0.2 | —   | 0.2         | 0.2 | —   |
| 15          | 0.2         | 0.2 | —   | 0.2         | 0.2 | —   | 0.2         | 0.2 | —   |
| 16          | 0.8         | 1.6 | —   | 0.8         | 1.6 | —   | 0.8         | 2.0 | —   |
| 17          | 0.8         | 1.6 | —   | 0.8         | 1.6 | —   | 0.8         | 1.6 | —   |
| 18          | —           | —   | —   | 0.01        | —   | —   | 0.01        | —   | —   |
| 19          | —           | —   | —   | 0.01        | —   | —   | 0.01        | —   | —   |
| 20          | —           | —   | —   | —           | —   | —   | —           | —   | —   |
| 21          | —           | —   | —   | —           | —   | —   | —           | —   | —   |
| 22          | —           | —   | —   | —           | —   | —   | —           | —   | —   |

\*: Enterotoxin concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )

Table 3. Enterotoxins Produced by *Staphylococcus aureus* Isolated from Food Poisoning Outbreaks

| Source                        | No. of tested | No. of isolates | No. of toxin producers | Types of toxin produced |        |       |       |       | No. of toxin non producers |
|-------------------------------|---------------|-----------------|------------------------|-------------------------|--------|-------|-------|-------|----------------------------|
|                               |               |                 |                        | A                       | B      | C     | A+B   | A+C   |                            |
| Foods                         | 47            | 88              | 69                     | 47                      | 13     | 4     | 1     | 4     | 19                         |
| Feces of patients             | 28            | 56              | 53                     | 37                      | 5      | 0     | 11    | 0     | 3                          |
| Feces of food handlers        | 8             | 17              | 9                      | 8                       | 0      | 1     | 0     | 0     | 8                          |
| Swabs of cooking utensils     | 32            | 56              | 50                     | 25                      | 15     | 0     | 6     | 4     | 6                          |
| Swabs of food handler's hands | 17            | 30              | 16                     | 6                       | 2      | 1     | 5     | 2     | 14                         |
| Swabs of food handler's noses | 4             | 7               | 2                      | 0                       | 0      | 0     | 2     | 0     | 5                          |
| Total                         | 136           | 254             | 199                    | 123                     | 35     | 6     | 25    | 10    | 55                         |
|                               |               | (100)*          | (78.3)                 | (48.4)                  | (13.8) | (2.4) | (9.8) | (3.9) | (21.7)                     |

( )\*: %

Table 4. Relationships between Coagulase Type and Enterotoxin Type with Slide-RPLA of *Staphylococcus aureus* Isolated from Food Poisoning Outbreaks

| Outbreak No. | Food Incriminated  | Source      | No. of isolates | Coagulase type (isolates) | Enterotoxin type (isolates) |
|--------------|--------------------|-------------|-----------------|---------------------------|-----------------------------|
| 1            | Rice ball          | Foods       | 4               | VI(4)                     | A + C (4)                   |
|              |                    | Swabs       | 6               | VI(6)                     | A + C (6)                   |
| 2            | Rice ball          | Swabs       | 10              | VI(10)                    | A + B (10)                  |
| 3            | Rice ball          | Foods       | 5               | VI(5)                     | A (5)                       |
|              |                    | Swabs       | 5               | VI(5)                     | A (5)                       |
| 4            | Rice ball          | Feces(P)*   | 6               | VI(6)                     | A + B (6)                   |
| 5            | Rice ball          | Feces(P)    | 13              | VI(13)                    | A (13)                      |
| 6            | Luncheon with rice | Foods       | 8               | VI(6)                     | A (6)                       |
|              |                    | Swabs       | 7               | III(2)                    | A (2)                       |
|              |                    | Feces(P)    | 2               | VI(7)                     | A (5)                       |
|              |                    | Feces(FH)** | 7               | VI(2)                     | A (2)                       |
|              |                    |             |                 | VI(5)                     | A (5)                       |
|              |                    |             |                 | II(2)                     | —                           |
| 7            | Luncheon with rice | Foods       | 2               | VI(2)                     | A (2)                       |
|              |                    | Swabs       | 4               | VI(4)                     | A (4)                       |
|              |                    | Feces(FH)   | 3               | II(3)                     | —                           |
| 8            | Rice ball          | Foods       | 1               | VI(1)                     | A + B (1)                   |
|              |                    | Swabs       | 3               | VI(3)                     | A + B (3)                   |
|              |                    | Feces(P)    | 5               | VI(5)                     | A + B (5)                   |
| 9            | Ice cream          | Foods       | 15              | II(15)                    | B (13)                      |
|              |                    | Swabs       | 26              | II(20)                    | B (17)                      |
|              |                    |             |                 | III(4)                    | —                           |
|              |                    |             |                 | V(2)                      | —                           |
|              |                    | Feces(P)    | 7               | II(6)                     | B (5)                       |
|              |                    |             |                 | V(1)                      | —                           |
|              |                    | Feces(FH)   | 4               | III(3)                    | —                           |
|              |                    |             |                 | VI(1)                     | C (1)                       |
| 10           | Rice ball          | Foods       | 7               | VI(7)                     | A (4)                       |
|              |                    | Swabs       | 4               | VI(4)                     | A (1)                       |
| 11           | Rice ball          | Foods       | 11              | VI(11)                    | A (5)                       |
|              |                    | Swabs       | 10              | VI(10)                    | A (5)                       |
|              |                    | Feces(P)    | 8               | VI(8)                     | A (8)                       |
| 12           | Luncheon with rice | Foods       | 8               | II(8)                     | —                           |
|              |                    | Swabs       | 5               | II(3)                     | —                           |
|              |                    |             |                 | III(1)                    | —                           |
|              |                    |             |                 | VI(1)                     | C (1)                       |
| 13           | Bread              | Swabs       | 3               | III(3)                    | A (1)                       |
|              |                    | Feces(P)    | 6               | III(6)                    | A (5)                       |
|              |                    | Feces(FH)   | 3               | III(3)                    | A (3)                       |
| 14           | UNKnown            | Foods       | 15              | VI(15)                    | A (11)                      |
|              |                    | Swabs       | 10              | VI(10)                    | C (4)                       |
|              |                    |             |                 |                           | A (10)                      |
| 15           | Rice ball          | Foods       | 12              | VI(12)                    | A (12)                      |
|              |                    | Feces(P)    | 9               | VI(9)                     | A (9)                       |

\* (P) : Patients    \*\* (FH) : Food handlers

ンテロトキシン産生性を Slide-RPLA 法で検討した成績を Table 3 に示した。その結果、254 株のうち 199 株 (78.3%) からエンテロトキシンが検出された。そのエンテロトキシン型は、A 型が最も多く、199 株中 123 株 (61.8%) であった。B 型は 35 株 (17.6%)、A + C 型は 10 株 (5.0%) であった。254 株中 55 株は、Slide-RPLA 法でエンテロトキシンを検出することができなかった。しかしながら、そのうちの 29 株は、RPLA 法によってエンテロトキシンの産生が確認されたが、Slide-RPLA 法の検出限界以下の産生量であった。

各事例ごとの個々の検査材料から分離された菌株のコアグララーゼ型とエンテロトキシン型の関連性：Table 4 に、今回対象にした 15 事例について、各事例ごとに各々の検査材料から分離された菌株のコアグララーゼ型とエンテロトキシン型の成績を示した。ほとんどの事例において、各検査材料から分離された菌株のコアグララーゼ型が一致している場合には、エンテロトキシン型も一致して同一型であることが示された。

事例 9 の場合は、アイスクリームが原因食品であると推定された大変めずらしい事件であった。本事例の各種検査材料から分離された菌株のコアグララーゼ型は、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅶと多彩であった。そこで Slide-RPLA 法でこれらの分離菌株のエンテロトキシン産生を検討した結果、コアグララーゼⅡ型の分離菌株は、すべてエンテロトキシン B を産生した。このような理由から、この事例は、コアグララーゼⅡ型で、エンテロトキシン B 産生菌による黄色ブドウ球菌によるものと判定された。

事例 6 は、慕の内弁当が原因食品とされた事例であるが、原因食品からはコアグララーゼⅦ型とⅢ型の黄色ブドウ球菌が検出された。エンテロトキシン型をみると、Ⅶ型菌もⅢ型菌もエンテロトキシン A を産生した。しかし拭取り材料や患者のふん便からは、コアグララーゼⅦ型菌でエンテロトキシン A を産生する黄色ブドウ球菌が検出されているので、この事例はコアグララーゼⅦ型で、エンテロトキシン A 産生菌によるものと判定された。

事例 14 の場合は、原因食品を特定することができなかった事例であった。原因食品から分離された黄色ブドウ球菌 15 株は、すべてコアグララーゼⅦ型であった。しかしエンテロトキシン型をみると、11 株は A を産生し、4 株は C 産生菌であった。拭取り材料から分離された 10 株は、すべてコアグララーゼⅦ型で A 産生菌であったことから、本事例はコアグララーゼⅦ型のエンテロトキシン A 産生菌によるものと判定された。

事例 12 は、コアグララーゼⅡ型菌による食中毒と推定さ

れたが、Slide-RPLA 法では、エンテロトキシンは検出されなかった。この分離菌株について RPHA 法と RPLA 法でエンテロトキシン産生性を検討した結果、エンテロトキシン A が検出された。その産生量は、10 ng/ml 以下の低い産生量であった。この事例はこのことを裏付けるように、喫食者の多い割には、患者数の少ない事件であった。

## 考 察

今日までブドウ球菌食中毒の原因食品から、エンテロトキシンを検出するために、種々の免疫学的な方法が開発されている<sup>1)</sup>。著者らは簡易・迅速なエンテロトキシンの検出法として、RPHA 法<sup>2)</sup>や RPLA 法<sup>3,6)</sup>を検討し、その有用性について報告してきた。

しかしながら、ブドウ球菌の日常検査において、本菌食中毒の推定原因食品からエンテロトキシンが検出される例は、比較的少なく、多くの事例では、疫学的調査と種々の検査材料から分離される黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型別等によって推定される。さらに、分離菌株のエンテロトキシン産生能を調べるためには、分離菌株を BHI broth に培養し、その培養上清からエンテロトキシンの検出を行なっている。

そこで、私どもは、分離菌株のエンテロトキシン産生性をもっと簡易に試験するための方法について検討している。当研究所では、ブドウ球菌食中毒から分離される菌株は、ほとんどすべて疫学調査のために、コアグララーゼ型別を行なっている。このコアグララーゼ型別は、分離菌株を 5% ウサギ血漿加 BHI broth で培養した培養液について行なわれている。このコアグララーゼ型別で残った培養液そのものを用いて、スライドガラス板上で逆受身ラテックス凝集反応を行なおうというのが、今回の目的であった。

コアグララーゼ型別用の培養液で Slide-RPLA 反応を行なうと、供試した各型特異免疫グロブリンを感作したラテックスが凝集し、エンテロトキシン型別をすることは不可能であった。その理由は、ほとんどの黄色ブドウ球菌は、プロテイン A を産生し、感作ラテックスの免疫グロブリンと反応するためと考えられる。

しかしながら、コアグララーゼ型別で残った培養液を室温に 1 日またはそれ以上放置した上清について、Slide-RPLA 反応を行なうと、対応する型特異免疫グロブリンを感作したラテックスのみが 1~2 分以内に特異的に凝集塊を形成し、エンテロトキシン型別ができることが証明された。また、Slide-RPLA 法に用いたと同じ試料の遠心上清について、RPHA 法と RPLA 法でエンテロ

トキシン産生性を検討すると、Slide-RPLA法の最小検出感度がRPLA法およびRPHA法に比べて、約50倍低いことが明らかになったが、それぞれの方法との間には、高い相関があることが証明された。

1日またはそれ以上放置したコアグラゼ型別用の培養上清がSlide-RPLA法で非特異凝集反応を起こさない理由は明らかでないが、次のように考えることができる。コアグラゼ型別用の培養液には、ウサギ血漿が5%含有しており、この血漿が培養中に産生された感作ラテックスと非特異凝集を起こす物質を不活化しているものと推察される。

以上のように、Slide-RPLA法は、ブドウ球菌食中毒の各種検査材料から分離される菌株の疫学調査のために行なっているコアグラゼ型別の培養液から、エンテロトキシン型別ができることが証明された。Slide-RPLA法に使用するエンテロトキシン型特異免疫グロブリン感作ラテックスが市販されれば、多くの検査機関でブドウ球菌食中毒の日常検査に、これまでのコアグラゼ型別にエンテロトキシン型別が加味されるので、疫学的調査の精度がさらに向上するものと考えられる。

### 結 論

ブドウ球菌食中毒の種々の検査材料から分離される菌株から、ブドウ球菌エンテロトキシン産生性を簡易・迅速に調べるための、スライド・逆受身ラテックス凝集反応(Slide-RPLA)について検討した。

各々の型特異免疫グロブリンを感作したラテックス懸濁液は、精製エンテロトキシンA、B、CとのSlide-RPLA反応において、その型特異性が認められた。その最小検出感度は、各エンテロトキシン型とも約50ng/mlであった。検出までの反応時間は1～2分以内であった。

本法のための特別な試料の調製法は必要とせず、ブドウ球菌食中毒の関連材料から検出された分離菌株を、疫学的調査を行なうために5%ウサギ血漿加BHI brothに培養し、コアグラゼ型別を行なった後、さらに室温

で1日放置したそのものより直接Slide-RPLA法によってエンテロトキシン型別を行なうことができる。そのため、遠心操作等を必要とせずに簡易にエンテロトキシン型別を行なうことができる。

食中毒由来の22株のエンテロトキシン産生性を、Slide-RPLA法と、マイクロタイター法であるRPHAおよびRPLA法で検討を行ない、それぞれの相関性を調べた結果、いずれも高い相関が認められた。

ブドウ球菌食中毒15事例から分離された黄色ブドウ球菌254株のエンテロトキシン産生性をSlide-RPLA法で検討した結果、199株からエンテロトキシンが検出された。55株からは、検出されなかった。55株のうち29株はRPLA法によってエンテロトキシンの産生が認められたが、これら29株のエンテロトキシン産生量は、Slide-RPLA法の検出限界以下であった。

このSlide-RPLA法は、ブドウ球菌食中毒の分離菌株のコアグラゼ型とエンテロトキシン型を同時に知ることができるので、より精度の高い疫学調査ができることが明らかになった。

### 文 献

- 1) 五十嵐英夫, 山田澄夫, 寺山 武: モダンメディア, 24, 519, 1978
- 2) Yamada, S., Igarashi, H. and Terayama, T.: *Microbiol. Immunol.*, 21, 675, 1977
- 3) 小田隆弘, 大久保忠敬, 永井 誠, 西本幸一, 大丸健之助: 福岡市衛試報, 4, 33, 1979
- 4) 寺山 武: メディアサークル, 23, 269, 1978
- 5) 新垣正夫, 五十嵐英夫, 藤川浩, 潮田 弘, 寺山 武, 坂井千三: 東京衛研年報, 32-1, 128, 1981
- 6) 善養寺 浩, 寺山 武, 潮田 弘, 五十嵐英夫, 丸山 務, 坂井千三: 食衛誌, 12, 311, 1971
- 7) 潮田 弘, 寺山 武, 坂井千三, 善養寺 浩: 東京衛研年報, 26-1, 1, 1975
- 8) 五十嵐英夫, 新垣正夫: メディアサークル, 27, 72, 1981

各種市販食品、健康人皮膚および電車つり輪からの表皮ブドウ球菌の検出と  
分離菌株の生化学的性状およびファージ感受性

潮田 弘\*, 五十嵐 英夫\*, 新垣 正夫\*, 藤川 浩\*, 坂井 千三\*

Surveys on the Incidence of *Staphylococcus epidermidis* in  
Commercial Foods, Healthy Human Skins and Straps in  
Electric Train, and Characteristics of their Isolates

HIROSHI USHIODA\*, HIDEO IGARASHI\*, MASAO SHINGAKI\*,  
HIROSHI FUJIKAWA\* and SENZO SAKAI\*

During the period from January 1979 through December 1980, bacteriological examination was carried out using the total of 3,499 samples of commercial foods sold in Tokyo; sandwiches, 610; Japanese box lunch, 595; soybean curd, 593; cakes, 497; boiled noodles, 415; salad, 334; Japanese cakes, 247; and rice balls, 208.

Fifty (24.0%) of rice ball samples, 97 (16.3%) box lunches, 47 (14.7%) salad, 73 (12.0%) sandwiches, 26 (10.5%) Japanese cakes, 18 (3.6%) cakes, 14 (3.4%) boiled noodles and 6 (1.0%) soybean curd were found to be contaminated with *Staphylococcus epidermidis*. It was particularly noted that rice ball and Japanese box lunches were highly contaminated by the organism. These results agreed precisely with the first and second of incriminated foods in staphylococcal food poisoning outbreaks during 1967-1976 in Tokyo.

On the other hand, *S. epidermidis* was isolated from 93 (38.8%) out of 240 swabs of healthy human skin and 82 (74.5%) out of 110 swabs taken from the hand straps in electric trains.

A total of 250 strains of *S. epidermidis* was obtained from various commercial foods, healthy human skins and straps in electric trains, and they were tested biochemically and in respect of their sensitivity to phages (Pulverer' typing phages). The results in all the three categories of source were approximately the same.

The above results suggest the importance to devise counter measures against possible staphylococcal food poisoning due to these contaminated foods which are handled directly by hands.

**Keywords:** *Staphylococcus epidermidis*, commercial foods, bacterial contamination, healthy human skin, Straps, Nigirimeshi (rice ball), Japanese box Lunches

緒 言

近年、食品添加物、特に殺菌剤、保存料などの規制<sup>1)</sup>にともない、食品の細菌汚染および菌の増殖防止が改めて食品衛生の微生物面での重要な課題となっており、その対策が種々検討されてきている<sup>2-10)</sup>。

食品衛生における細菌の分野は、その品質管理に関する面と、食品を介して起こる消化器系伝染病や細菌性食中毒に関する面とがあるが、とくに後者の予防が食品衛生上極めて重要である。

一方、食品の細菌学的検査に必要な培地および試薬類の開発、さらに検査技術の進歩は極めて著しい。しかし、食品中の病原細菌の検索は、それぞれの菌に適した各種分離培地あるいは確認培地を必要とし、大変な手数がかかる上に、既知病原菌が検出されないと言って、安全な食品であるとは一概にいえぬ。

現在、わが国における食品衛生上の細菌学的検査の対象は、通常、汚染指標菌としての一般生菌数および大腸菌群(数)である。これら両者の検査結果は、ある程度

\* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

食品の衛生的評価の基準となることは事実であろう。しかし、これらの汚染指標菌については、学問的にはまだ多くの疑義があると云えよう。

そこで今回は、直接手で触れる食品の汚染指標菌と考えられる表皮ブドウ球菌をとり上げ、各種市販食品の汚染の実態調査を行なうとともに、健康人皮膚およびヒトの手指の最も触れ易い環境から本菌を検出し、検出菌の生化学的性状、ファージ感受性などにより、食品汚染との関連性を検討したので報告する。

### 材料および方法

#### 1. 調査対象

1)市販食品：1979年1月～1980年12月の2年間に食品の細菌検査のため当所に送付された調理パン610件、弁当類595件、豆腐593件、洋菓子497件、ゆでめん類415件、サラダ334件、和菓子247件およびにぎりめし208件、計3,499件を対象とした。

2)健康人皮膚：T大学学生240名の皮膚拭取り材料240件を対象とした。

3)電車つり輪：電車つり輪拭取り材料110件を対象とした。

#### 2. 表皮ブドウ球菌の分離培養法

1)市販食品：食品10gを秤量し、これに滅菌10%ブイヨン加生理食塩液を90ml加え、10%乳剤とした。この乳剤の0.1mlを、3%に卵黄を加えたマニット食塩寒天平板<sup>11)</sup>（以下MSEY平板と略す）に注加し、コンラージ棒で培地全面に塗抹し、37℃48時間培養した。卵黄反応陰性で、マニット非分解の白色、光沢ある集落を対象にコアグラゼ試験を行ない、コアグラゼ陰性でグラム陽性の球菌を暫定的に表皮ブドウ球菌とし、カントン(Difco)を用いた半流動培地に穿刺培養し、室温で保存した。

2)健康人皮膚：滅菌生理食塩液で湿らせた滅菌ガーゼで、健康人の顔面、首すじなどを拭取り、MSEY平板で分離培養を行ない、前記同様に簡易同定し、菌株を保存した。

3)電車つり輪：滅菌生理食塩液で湿らせた滅菌ガーゼで、電車つり輪を拭取り、MSEY平板で分離培養を行ない、発育した集落について前記同様に簡易同定を行ない、菌株を保存した。

#### 3. 供試菌株

各種市販食品由来表皮ブドウ球菌75株、健康人皮膚由来93株および電車つり輪由来82株、計250株である。

#### 4. 生化学的性状試験

1)ブドウ糖発酵試験：簡易同定により、表皮ブドウ球

菌とした供試菌について、GF培地<sup>12)</sup>を用いて、37℃3日間培養し、培地全層に菌の発育が認められ、糖分解により黄変したものをブドウ糖発酵陽性とし、これをCoagulase Negative Staphylococci (CNS) とした。

また、培地表層にのみ菌の発育、pHの変動のみられたものをブドウ糖発酵陰性とし、これをマイクロコックスとした。ブドウ糖発酵性の有無を明確にした上で、それぞれの菌株について、各種生化学的性状を調べた。

2)コアグラゼ産生：試験管法および平板法により行なった。

3)核酸分解酵素産生：市販のDNA培地(栄研)によった。

4)卵黄反応：MSEY平板<sup>11)</sup>によった。

5)ノボビオン感受性：Bergey's manual (8th)<sup>13)</sup>に準じ、0.6および2.0μg/mlの2濃度について調べた。

6)VP反応：市販のVP半流動培地(栄研)によった。

7)糖分解：マニット、ラクトース、マルトース、トレハロースなどの糖分解試験は、バルジコー培地によった。

8)フォスファターゼ産生：市販のPP寒天培地(栄研)によった。

9)Tween分解性：Tween(20, 40, 60, 80)分解性はSierra<sup>14)</sup>の方法によった。

10)リゾチム産生：桎葉ら<sup>15)</sup>の方法によった。

11)アルギニン分解性：Möllerの方法によった。

12)溶血性：ヒト、ウサギ、ヒツジおよびウシの赤血球溶血性は、2%血球寒天平板を用いて行なった。

13)ゼラチナーゼ産生：市販の普通寒天培地(ニッスイ)に3%にゼラチンを加えたものを用いて行なった。

14)フィブリノリジン産生：市販の普通寒天培地(ニッスイ)にウサギ無菌プラズマを20%に加えたものを用い、微生物検査必携<sup>16)</sup>に準じて行なった。

15)プロテアーゼ産生：市販の普通寒天培地(ニッスイ)にスキนมilkを5%に加えたものを用いて行なった。

#### 5. ファージ型別法

1)使用ファージ：Pulvererら<sup>17)</sup>の表皮ブドウ球菌型別用ファージ(Ph5, Ph6, Ph9, Ph10, Ph12, Ph13, Ph14, Ph15, Ph16, U4, U14, U15, U16, U20, U46)15種を用いた。

2)型別法：1RTDのファージ液を使用し、11以上の溶菌と判定されたものを溶菌パターンとして以下の方法により集計した。

3)型別基準：溶菌の組合せによるファージ型別基準は次の通りとした。



I 群は、すべてのファージによる溶菌を認めたもの。

II 群は、Ph5, Ph9, Ph10, Ph12, Ph13, U4, U14, U15, U16, U46 のうち4種以上溶菌を認めたもの。

III 群は、上記以外の組合せによる溶菌を認めたもの。  
型別不能は、すべてのファージによる溶菌が認められなかったもの。

### 成 績

#### 1. 市販食品からの表皮ブドウ球菌検出

各種市販食品からの表皮ブドウ球菌検出率を Table 1 に示した。にぎりめし 208 件中50件 (24.0%) から本菌が検出され、本調査の市販食品 8 品目中最も高い検出率であった。表中に弁当類として記載した食品は、仕出し弁当の外、いなりずし、焼そば、弁当副食類などで 595 件中97件 (16.3%) が陽性、サラダ 334 件中47件 (14.7%)、調理パン610件中73件 (12.0%)、和菓子247件中26件 (10.5%)、洋菓子 497 件中18件 (3.6%)、めん類 415 件中14件 (3.4%) および豆腐 593 件中 6 件 (1.0%) が陽性であった。にぎりめし、弁当類などが表皮ブドウ球菌により高率に汚染されていることが明らかにされた。

#### 2. 健康人および電車つり輪からの表皮ブドウ球菌検出

健康人皮膚および電車つり輪の拭取り材料からの表皮ブドウ球菌検出率を Table 2 に示した。健康人皮膚 240 件中93件 (38.8%)、電車つり輪では110件中82件 (74.5%) が陽性で、前記食品類に比べ高い検出率であった。

#### 3. 表皮ブドウ球菌数と一般生菌数との関係およびその他の細菌の検出状況

表皮ブドウ球菌の検出されたにぎりめしにおける表皮ブドウ球菌数と一般生菌数との関係およびその他の細菌

の検出状況を Table 3 に示した。にぎりめしは表皮ブドウ球菌の検出率が最も高かった食品である。表皮ブドウ球菌が  $10^2 \sim 10^4/g$  検出された50件の一般生菌数は、 $10^2 \sim 10^6/g$  の範囲であり、東京都の食品衛生指導基準（一般生菌数 10万/g 以下）をこえるものが50件中18件 (36.0%) も存在した。また、一般生菌数  $10^3 \sim 10^6/g$  の範囲の

Table 1. Detection and Incidence of *Staphylococcus epidermidis* from Commercial Foods (1979. 1. —1980. 12.)

| Foods                   | No. of tested | <i>S. epidermidis</i><br>No. of positive (%) |
|-------------------------|---------------|----------------------------------------------|
| Nigirimeshi (rice ball) | 208           | 50(24.0)                                     |
| Luncheon with rice      | 595           | 97(16.3)                                     |
| Salads                  | 334           | 47(14.7)                                     |
| Sandwiches              | 610           | 73(12.0)                                     |
| Japanese cakes          | 247           | 26(10.5)                                     |
| Cakes                   | 497           | 18(3.6)                                      |
| Boiled noodles          | 415           | 14(3.4)                                      |
| Soybean curds           | 593           | 6(1.0)                                       |
| Total                   | 3,499         | 331(9.5)                                     |

Table 2. Detection and Incidence of *Staphylococcus epidermidis* from Healthy Human Skins and Straps in Electric Train

| Source                   | No. of tested | <i>S. epidermidis</i><br>No. of positive (%) |
|--------------------------|---------------|----------------------------------------------|
| Healthy human skins      | 240           | 93(38.8)                                     |
| Straps in electric train | 110           | 82(74.5)                                     |

Table 3. Correlation between *Staphylococcus epidermidis* Counts and Standard Plate Counts, and Incidence of the Other Bacteria in Nigirimeshi contaminated with *S. epidermidis*

|                         |                 | <i>S. epidermidis</i> /0.1g |                 |                 | Total   | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>B. cereus</i> |
|-------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------|------------------|----------------|------------------|
|                         |                 | 10 <sup>1</sup>             | 10 <sup>2</sup> | 10 <sup>3</sup> |         |                  |                |                  |
| Standard plate counts/g | 10 <sup>1</sup> |                             |                 |                 |         |                  |                |                  |
|                         | 10 <sup>2</sup> | 2                           |                 |                 | 2       |                  |                |                  |
|                         | 10 <sup>3</sup> | 9                           | 2               |                 | 11      | 3                |                | 1                |
|                         | 10 <sup>4</sup> | 14                          | 5               |                 | 19      | 1                |                | 1                |
|                         | 10 <sup>5</sup> | 7                           | 3               | 1               | 11      | 4                | 1              | 1                |
|                         | 10 <sup>6</sup> | 2                           | 5               |                 | 7       | 3                | 1              | 3                |
|                         | 10 <sup>7</sup> |                             |                 |                 |         |                  |                |                  |
| Total (%)               |                 | 34(68)                      | 15(30)          | 1(2)            | 50(100) | 11(22)           | 2(4)           | 6(12)            |

Table 4. Correlation between *Staphylococcus epidermidis* Counts and Coli-form Counts, and Incidence of the Other Bacteria in Nigirimeshi contaminated with *S. epidermidis*

|                    |                 | <i>S. epidermidis</i> /0.1g |                 |                 | Total   | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>B. cereus</i> |
|--------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------|------------------|----------------|------------------|
|                    |                 | 10 <sup>1</sup>             | 10 <sup>2</sup> | 10 <sup>3</sup> |         |                  |                |                  |
| Coli-form counts/g | 0               | 4                           | 2               |                 | 6       |                  |                | 1                |
|                    | <10             | 14                          | 1               |                 | 15      | 2                | 1              |                  |
|                    | 10 <sup>1</sup> | 5                           | 7               |                 | 12      | 1                |                | 2                |
|                    | 10 <sup>2</sup> | 7                           | 3               | 1               | 11      | 5                | 1              | 2                |
|                    | 10 <sup>3</sup> | 2                           | 2               |                 | 4       | 2                |                |                  |
|                    | 10 <sup>4</sup> | 2                           |                 |                 | 2       | 1                |                | 1                |
| Total (%)          |                 | 34(68)                      | 15(30)          | 1(2)            | 50(100) | 11(22)           | 2(4)           | 6(12)            |

48 件から黄色ブドウ球菌 (以下 *S. aureus* と記す) が 11 件 (22.9%) と高率に検出され, この三者の間に関連性が認められた。また, 大腸菌 (以下 *E. coli* と記す) およびセレウス菌 (以下 *B. cereus* と記す) は, それぞれ 2 件, 6 件検出され, 表皮ブドウ球菌汚染と *E. coli* および *B. cereus* の検出にも関連性が認められた。

#### 4. 表皮ブドウ球菌数と大腸菌群数との関係およびその他の細菌の検出状況

表皮ブドウ球菌の検出されたにぎりめしにおける表皮ブドウ球菌数と大腸菌群数との関係およびその他の細菌の検出状況を Table 4 に示した。大腸菌群数は 0~10<sup>4</sup>/g の範囲で検出され, 表皮ブドウ球菌の検出されたにぎりめしの 88% から大腸菌群が検出された。また, *S. aureus* の検出された 11 件中 8 件 (72.7%) からは大腸菌群が 10<sup>2</sup>/g 以上検出されており, 表皮ブドウ球菌数, 大腸菌群数および *S. aureus* 汚染の関連性が認められた。

しかしながら, *B. cereus* の検出されたものと大腸菌群数との間に関連性は認められなかった。

#### 5. ブドウ糖発酵能

簡易同定法では, 表皮ブドウ球菌との鑑別が難しいマイクロコッカスが混在していると考えられるため, 市販食品, 健康人皮膚および電車つり輪由来表皮ブドウ球菌のブドウ糖発酵能を調べた結果を Table 5 に示した。市販食品由来株 75 株中 29 株 (38.7%), 健康人皮膚由来株 93 株中 76 株 (81.7%) および電車つり輪由来株 82 株中 59 株 (72.0%) がブドウ糖発酵能を有した (以下 GF(+) 菌と記す)。市販食品由来株の約 60% がブドウ糖非発酵菌 (GF(-) 菌と記す) であった。GF(+) 菌を CNS とし, GF(-) 菌をマイクロコッカスとして, さらに詳しく生化学的性状を調べた。

#### 6. 生化学的性状

市販食品, 健康人皮膚および電車つり輪由来 CNS 株

Table 5. Glucose Fermentation of Isolates of *Staphylococcus epidermidis* isolated from Commercial Foods, Healthy Human Skins and Straps in Electric Train

| Source                   | No. of tested | Glucose fermentation<br>No. of positive (%) | No. of negative (%) |
|--------------------------|---------------|---------------------------------------------|---------------------|
| Commercial foods         | 75            | 29(38.7)                                    | 46(61.3)            |
| Healthy human skins      | 93            | 76(81.7)                                    | 17(18.3)            |
| Straps in electric train | 82            | 59(72.0)                                    | 23(28.0)            |
| Total                    | 250           | 164(65.6)*                                  | 86(34.4)**          |

\* : Coagulase Negative Staphylococci,

\*\* : *Micrococcus*

164 株の生化学的性状を検討した成績を Table 6 に示した。核酸分解酵素 (以下 DNase と記す) 産生株は市販食品由来株 29 株中 8 株 (27.6%) および健康人皮膚由来株 76 株中 16 株 (21.1%) とほぼ同率であるのに対し, 電車つり輪由来株は 59 株中 46 株 (78.0%) と極めて高い値を示した。

ノボジオン感受性は, 健康人皮膚由来株に耐性株が 2 株みられたが, 他はすべて感受性であった。

V P 反応および糖分解は全由来株を通して著明な差は認められなかった。

フォスファターゼ産生性は, 食品由来株が 29 株中 17 株 (58.6%) であったが, 健康人皮膚由来株 84.2% および電車つり輪由来株 91.5% と高い値を示した。

ヒト, ウサギ, ヒツジおよびウシ赤血球の溶血性を検討した結果, 食品由来株のウサギ赤血球溶血性は 44.8% であったが, 他の由来株は 80% 以上の溶血性を示した。

β 溶血毒産生株は, いずれの由来株にも, まったく認

Table 6. Biochemical Characteristics of Isolates of Coagulase Negative Staphylococci isolated from Commercial Foods, Healthy Human Skins and Straps in Electric Train

| Source<br>No. of tested | Foods<br>n=29<br>No. of<br>positive<br>(%) | Skins<br>n=76<br>No. of<br>positive<br>(%) | Straps<br>n=59<br>No. of<br>positive<br>(%) |
|-------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Characteristics         |                                            |                                            |                                             |
| Coagulase               | 0                                          | 0                                          | 0                                           |
| DNase                   | 8(27.6)                                    | 16(21.1)                                   | 46(78.0)                                    |
| Egg-yolk factor         | 0                                          | 0                                          | 0                                           |
| Sensitivity to NB* R**0 |                                            | 2( 2.6)                                    | 0                                           |
| Acetoin                 | 24(82.8)                                   | 76 (100)                                   | 57(96.6)                                    |
| Mannitol                | 1( 3.4)                                    | 2( 2.6)                                    | 2( 3.4)                                     |
| Lactose                 | 21(72.4)                                   | 50(65.8)                                   | 42(71.2)                                    |
| Maltose                 | 26(89.7)                                   | 75(98.7)                                   | 59 (100)                                    |
| Trehalose               | 10(34.5)                                   | 4( 5.3)                                    | 3( 5.1)                                     |
| Phosphatase             | 17(58.6)                                   | 64(84.2)                                   | 54(91.5)                                    |
| Tween 20                | 25(86.2)                                   | 73(96.1)                                   | 55(93.2)                                    |
| " 40                    | 20(68.9)                                   | 69(90.8)                                   | 53(89.8)                                    |
| " 60                    | 23(79.3)                                   | 66(86.8)                                   | 53(89.8)                                    |
| " 80                    | 18(62.1)                                   | 52(68.4)                                   | 48(81.4)                                    |
| Lysozyme                | 0                                          | 0                                          | 0                                           |
| Arginine                | 25(86.2)                                   | 72(94.7)                                   | 51(86.2)                                    |
| Hemolysis               |                                            |                                            |                                             |
| Human erythrocytes      | 18(62.1)                                   | 57(75.0)                                   | 50(84.7)                                    |
| Rabbit "                | 13(44.8)                                   | 67(88.2)                                   | 51(86.4)                                    |
| Sheep "                 | 0                                          | 0                                          | 0                                           |
| Bovine "                | 4(13.8)                                    | 18(23.7)                                   | 6(10.2)                                     |
| Gelatinase              | 15(51.7)                                   | 43(56.6)                                   | 26(44.1)                                    |
| Fibrinolysin            | 3(10.3)                                    | 18(23.7)                                   | 5( 8.5)                                     |
| Protease                | 7(24.1)                                    | 29(38.2)                                   | 15(25.4)                                    |

\*: Novobiocin, \*\*: Resistance

められなかった。

アルギニン分解性、ゼラチン分解性、フィブリノリジン産生性およびプロテアーゼ産生性は、全由来株を通してほとんど差が認められなかった。

#### 7. Tween 分解性

市販食品、健康人皮膚および電車つり輪由来 CNS の Tween 分解性についての成績を Table 7 にした。供試した Tween 4 種の分解性を 1~16 型 (パターン分け) に分けて示した。4 種すべての Tween を分解するか、いずれか 3 種の Tween を分解する 1~4 型のものが、食品由来株では 29 株中 21 株 (72.4%) 認められたが、健

康人皮膚由来株では 76 株中 68 株 (89.5%) および電車つり輪由来株は 59 株中 53 株 (89.8%) と、食品由来株とはわずかな違いが認められた。

#### 8. ファージ感受性

Dr. Pulverer から分与を受けた表皮ブドウ球菌型別用ファージ 15 種を用いて、市販食品、健康人皮膚および電車つり輪由来 CNS 株のファージ型別を行なった結果を Table 8, 9 に示した。Table 8 は、食品由来株の溶菌パターンを示したものである。使用ファージ 15 種のすべてに感受性を示す I 群菌は、健康人皮膚由来株に 3 株および電車つり輪由来株に 1 株のみであった。型別株の多くは、ファージ III 群菌であり、菌株由来による溶菌パターンの片寄りは特に認められなかった。

菌株由来株別に各ファージ群の型別率をまとめて Table 9 に示した。型別率は健康人皮膚由来株 47.7%、電車つり輪由来株では 44.1% であったが、市販食品由来株の場合は、29 株中 8 株 (27.6%) と型別率が低かった。

#### 考 察

近年、保存料、殺菌剤の規制<sup>1)</sup>により、食品の品質管理および細菌性食中毒予防の面から、食品への細菌の汚染防止はもちろん、食品中での汚染菌増殖抑制あるいはその除菌方法などが種々検討されてきている<sup>2-10)</sup>。

生肉のサルモネラ汚染<sup>11)</sup>や魚介類の腸炎ビブリオ汚染<sup>12)</sup>のように、すでに食品原料が食中毒菌に汚染されている場合は、食品中での菌の増殖抑制あるいは除菌と、他の食品への二次汚染防止が食中毒予防の最も基本的な対策と言えよう。しかし、健康人あるいは自然界に分布の広い黄色ブドウ球菌などによる食中毒の予防対策では、食品への汚染がどのような経路で起こるのかを明らかにすることが大切ではなからうか。

食品汚染の媒体としては、手指、調理加工器具、ふきんおよび調理環境などが考えられるが、今回は、手指について、その指標菌として表皮ブドウ球菌をとり上げて検討した。素手での食品取扱いの汚染指標菌と考えられる表皮ブドウ球菌について、まず、市販食品における本菌汚染の実態を調査した。市販食品の汚染率の調査では、推測通り、手指が多く触れると考えられる“にぎりめし”が最も汚染率が高く、ついで弁当類であった。この調査の結果は、東京都におけるブドウ球菌食中毒事件の原因食品<sup>20)</sup>の第 1 位、第 2 位とも一致していた。そこで、表皮ブドウ球菌汚染の認められたにぎりめし、その他の食品について、表皮ブドウ球菌汚染と一般生菌数との関連性、さらに *S. aureus*, *E. coli* および *B. cereus*

Table 7. Hydrolysis of Tween with Coagulase Negative Staphylococci isolated from Commercial Foods, Healthy Human Skins and Straps in Electric Train

| Pattern                |                | Hydrolysis patterns of Tween |            |          |          |   |   |   |   |          |          |          |          |          |    |          |          |
|------------------------|----------------|------------------------------|------------|----------|----------|---|---|---|---|----------|----------|----------|----------|----------|----|----------|----------|
| Tween                  |                | 1                            | 2          | 3        | 4        | 5 | 6 | 7 | 8 | 9        | 10       | 11       | 12       | 13       | 14 | 15       | 16       |
| Tween                  | 20             | +                            | +          | +        | +        | - | - | - | - | +        | +        | +        | -        | -        | -  | +        | -        |
| "                      | 40             | +                            | +          | +        | -        | + | - | + | + | -        | -        | +        | -        | -        | +  | -        | -        |
| "                      | 60             | +                            | +          | -        | +        | + | + | - | + | -        | +        | -        | -        | +        | -  | -        | -        |
| "                      | 80             | +                            | -          | +        | +        | + | + | + | - | +        | -        | -        | +        | -        | -  | -        | -        |
| CNS                    | Foods<br>n=29  | 15<br>(52)                   | 4<br>(14)  | 1<br>(3) | 1<br>(3) |   |   |   |   | 1<br>(3) | 1<br>(3) |          | 1<br>(3) | 2<br>(7) |    | 2<br>(7) | 1<br>(3) |
|                        | Skins<br>n=76  | 47<br>(62)                   | 18<br>(24) | 2<br>(3) | 1<br>(1) |   |   |   |   | 1<br>(1) | 1<br>(1) | 2<br>(3) |          |          |    | 2<br>(3) | 2<br>(3) |
|                        | Straps<br>n=59 | 46<br>(78)                   | 7<br>(12)  |          |          |   |   |   |   | 1<br>(2) |          |          | 1<br>(2) |          |    | 1<br>(2) | 3<br>(5) |
| Total 164<br>(%) (100) |                | 108<br>(66)                  | 29<br>(18) | 3<br>(2) | 2<br>(1) |   |   |   |   | 3<br>(2) | 2<br>(1) | 2<br>(1) | 2<br>(1) | 2<br>(1) |    | 5<br>(3) | 6<br>(4) |

Table 8. Results of Grouping and Frequency of Phage Patterns of Coagulase Negative Staphylococci isolated from Commercial Foods

| Group       | Phage lytic pattern                           | No. of typed(%) |
|-------------|-----------------------------------------------|-----------------|
| I           | (-)                                           | 0               |
| II          | Ph5/Ph9/Ph12/U15                              | 1 (3.4)         |
| III         | Ph9                                           | 1               |
|             | Ph15                                          | 1               |
|             | U6                                            | 1               |
|             | Ph9/Ph10/Ph13/U16/U20                         | 1(24.1)         |
|             | Ph5/Ph9/Ph10/Ph12/<br>U15/U16/U20             | 1               |
|             | Ph5/Ph9/Ph10/Ph12/Ph13/<br>U14/U15/U16/U20    | 1               |
|             | Ph5/Ph9/Ph10/Ph12/Ph13/<br>U4/U14/U15/U20/U46 | 1               |
| Not typable |                                               | 21(72.4)        |
| Total       |                                               | 29(100)         |

汚染との関係を検討した結果、これらの菌汚染と表皮ブドウ球菌汚染は明らかに関連性が認められた。また、表皮ブドウ球菌汚染と大腸菌群(数)汚染ならびに *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus* 汚染との関連性についても検討した。その結果、表皮ブドウ球菌汚染の認められるものの約90%は大腸菌群に汚染されており、*S. aureus* の検出されたものも全て大腸菌群陽性であった。しかしながら、*B. cereus* 汚染と大腸菌群(数)との間には著者ら

の既報<sup>21)</sup>と同様に関連性は認められなかった。

簡易同定法により表皮ブドウ球菌とした菌株には、鑑別の困難なマイクロコッカスが多数混在している<sup>22)</sup>ので、ブドウ糖発酵性をGF培地<sup>12)</sup>を用いて検討した結果、皮膚由来株では81.7%，電車つり輪由来株72.0%がGF(+)株であったが、食品由来株では約60%がGF(-)株であった。今回供試した食品由来株については、分離平板上で、性状に幅をもたせての菌株採取であるため、ある程度予測された結果であるが、食品の本菌汚染調査成績の率も、これらの点から推して、若干低下するものと思われた。CNS株とマイクロコッカスとしたGF(-)株に分別した上で、さらに各種生化学的性状およびファージ感受性を検討した。DNase 産生株は、CNS各由来株間に若干の差異が認められた。すなわち、電車つり輪由来株は、78.0%がDNase 産生株であったが、食品由来株27.6%および皮膚由来株21.1%と低い産生率であった。

他の性状では、食品株のトレハロース分解性、フォスファターゼ産生、ウサギ赤血球溶血性などが、他の由来株に比して若干違いがみられたが、著明な差ではなかった。

一方、GF(+)株とGF(-)株では性状に著明な違いが認められた。本報告では、CNSについて論ずるために、マイクロコッカスの性状についてはふれなかったが、特にTween分解性には特徴があり、マイクロコッカスとしたGF(-)株を混在したままで集計を行なったならば、各由来株間に著しい性状の差が生じたであろう。

Table 9. Results of Phage Typing (Pulverer'15 phages) of Coagulase Negative Staphylococci isolated from Commercial Foods, Healthy Human Skins and Straps in Electric Train

| Source                   | No. of tested | No. of typed (%) | I (%)  | Phage group II (%) | III (%)  | Not typable (%) |
|--------------------------|---------------|------------------|--------|--------------------|----------|-----------------|
| Commercial foods         | 29            | 8(27.6)          | 0      | 1(3.4)             | 7(24.1)  | 21(72.4)        |
| Healthy human skins      | 76            | 36(47.4)         | 3(3.9) | 2(2.6)             | 31(40.7) | 40(52.6)        |
| Straps in electric train | 59            | 26(44.1)         | 1(1.7) | 1(1.7)             | 24(40.7) | 33(55.9)        |

今回の検討では、市販食品から検出された CNS と、皮膚および電車つり輪由来 CNS との間にはファージ感受性も含めて際立った差は認められず、市販食品から検出された表皮ブドウ球菌に若干由来を異にするとと思われる株が含まれていたが、多くはヒトの手指由来と考えられるものであった。

これまでの検出率および性状などからも明らかなように、健康人の皮膚や手指には CNS は常在しているが、食品汚染 CNS は手指からの汚染と考えられ、極めて低率であった。この CNS の環境抵抗力は菌株保存条件においても弱く<sup>23)</sup>、生体外での生存は極めて弱いものと推測されることから、手指を介しての食品の細菌汚染の指標菌として適していると考える。他方、表皮ブドウ球菌の検出には黄色ブドウ球菌を対象に作られた現在使用中の分離培地類は適当ではなく、その改良・開発を進めてゆかねばならないと考える。

近年における食品の細菌学的検査の方向は、FDA・食品微生物試験マニュアル<sup>24)</sup>にみられるごとく、各種病原細菌の検索をはじめ、細菌性毒素や真菌毒の検出も行なわれる趨勢にあるかにみえる。しかしながら、病原細菌の検索は、それぞれの菌に合わせて、各種分離培地や確認培地を用意し、多くの労力が必要である。したがって、食品衛生における細菌学的検査は、よりよい指標菌の設定と適切な培地類の開発、そして検査の省力化に向けて、基礎的な検討が進められ、簡便な方法で頻繁に製造工程、製品および流通過程における食品の細菌学的安全性をチェックすべきであると考えられる。

### 結 論

食品取扱における細菌汚染防止の基礎資料を得るために、食品を直接手で触れる場合の汚染指標菌と考えられる表皮ブドウ球菌をとり上げ、各種市販食品を対象に、汚染実態調査を行なうとともに、ヒト健康皮膚および電車つり輪由来株との各種性状を比較検討した。

1. 市販食品の表皮ブドウ球菌検出率は、にぎりめし 24.0%、弁当類 16.3%、サラダ 14.7%、調理パン 12.0

%、和菓子 10.5%、洋菓子 3.6%、ゆでめん類 3.4%および豆腐 1.0%であった。

2. ヒト健康皮膚からの表皮ブドウ球菌検出率は 38.8%、電車つり輪からは 74.5%であった。

3. 食品の表皮ブドウ球菌汚染と一般生菌数および *S. aureus* 汚染とは関連性があり、*E. coli* および *B. cereus* 汚染とも著明な関連性が認められた。

4. 食品の表皮ブドウ球菌汚染と大腸菌群汚染、および *S. aureus* 汚染とは関連性が認められたが、*B. cereus* とは関連性がみられなかった。

5. 簡易同定法により表皮ブドウ球菌とした各由来株のブドウ糖発酵能を調べた結果、食品由来株の 38.7% が陽性であったが、皮膚由来株では 81.7%、電車つり輪由来株は 72.0% がブドウ糖発酵能を有した。

これらブドウ糖発酵能を有する CNS の生化学的性状を由来株間で比較した結果、DNase 産生株が電車つり輪由来株に 78.0% 認められ、食品由来株 27.6% および皮膚由来株 21.1% と違いがみられたが、他の性状では著明な差は認められなかった。

6. ファージ型別を実施した結果、食品由来 CNS 株の 27.6% が型別され、皮膚由来株では 47.7% および電車つり輪由来株は 44.1% の型別率であった。

以上の調査成績および分離菌の性状比較成績から、市販食品汚染 CNS の多くはヒトの手指由来と考えられ、食品取扱における手指の関わりは、ブドウ球菌食中毒発生の大きな要因であることが示唆された。

### 文 献

- 1) 辺野喜正夫、栗飯原景昭、内山 充：食品衛生学，351，1979，朝倉書店
- 2) 金山龍男：ニューフードインダストリー，22，10，1980
- 3) 柴田茂久：ジャパンフードサイエンス，19(4)，30，1980
- 4) 加藤 明：ニューフードインダストリー，22，17，1980

- 5) 野坂宣嘉：ニューフードインダストリー，22，20，1980
- 6) 高野 修，和田安郎，板垣憲吉，矢島日男，鈴木政行，小島照郎，阿部克己：食品衛生研究，32，51，1982
- 7) 木股昌行，広畑佳宏，山本二郎，宮里 嵩，田中敏嗣：食品衛生研究，32，77，1982
- 8) 五十嵐英夫，新垣正夫，山田澄夫，潮田 弘，寺山武，坂井千三：東京衛研年報，29-1，6，1978
- 9) 五十嵐英夫，新垣正夫，高橋正樹，潮田 弘，寺山武，坂井千三：東京衛研年報，30-1，111，1979
- 10) 新井輝義，池島伸至，神 真知子，入倉善久，古幡幸子，松本昌雄：東京衛研年報，32-1，143，1981
- 11) 善養寺 浩，寺山 武，潮田 弘，五十嵐英夫，丸山 務，坂井千三：食衛誌，12，311，1971
- 12) 潮田 弘，辻 明良，小川正俊，五島瑳智子，坂井千三：日細菌誌，35，753，1980
- 13) Baird-Parker, A. C. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th, ed. (Buchanan, R. E. & Gibbon, N. E.), The Williams & Wilkins Co., Baltimore : 478, 1974
- 14) Sierra, G. : *Antonie van Leeuwenhoek, J. Micro Sero.*, 23, 15, 1957
- 15) Kashiba, S., Niizu, K., Tanaka, S., Nozu, H. and Amano, T.: *Biken's J.*, 2, 50, 1959
- 16) 厚生省監修，微生物検査必携，細菌・真菌検査，第2版：日本公衆衛生協会，1978
- 17) Pulverer, G., Pillieh, J. and Klein A.: *J. of Infect. Dis.*, 132, 524, 1975
- 18) 寺山 武，五十嵐英夫，潮田 弘，池島伸至，斎藤香彦，善養寺 浩：東京衛研年報，23，7，1972
- 19) 斎藤香彦，伊藤 武，丸山 務，柳川義勢，稲葉美佐子，甲斐明美，坂井千三，善養寺 浩，駒井嘉明，島田 暁，山本 晃，平川正男，石崎衛治：東京都衛生局学会誌，58，82，1976
- 20) 寺山 武，潮田 弘，新垣正夫，稲葉美佐子，甲斐明美，坂井千三：東京衛研年報，28-1，1，1977
- 21) 潮田 弘，五十嵐英夫，高橋正樹，新垣正夫，寺山武，坂井千三：東京衛研年報，31-1，109，1980
- 22) 潮田 弘，辻 明良，小川正俊，五島瑳智子，坂井千三，寺山 武：日細菌誌，32，733，1977
- 23) 潮田 弘，寺山 武，五十嵐英夫，新垣正夫，坂井千三：東京衛研年報，29-1，39，1978
- 24) 倉田 浩，松井道子，河西 勉，荒瀬賢司訳：FDA・食品微生物試験マニュアル，1979，日本メディカルセンター

## 鶏肉中におけるウェルシュ菌の発育とエンテロトキシンの産生

稲 葉 美佐子\*, 伊 藤 武\*, 坂 井 千 三\*

### Growth and Production of Enterotoxin of *Clostridium perfringens* in Chicken

MISAKO INABA\*, TAKESHI ITOH\* and SENZO SAKAI\*

The growth, the sporulation and the enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A in chicken meat under various temperature was determined.

*C. perfringens* strains NCTC8239, W1415 and W1631 grew at 15–47°C, but not at 4°C when  $10^8$ – $10^4$  cells of the organisms were inoculated into the meat. At 30°C the organism proliferated rapidly, and at 37–47°C these cell counts reached  $10^6$  cells/g after 3 hours. Sporulation of these organisms occurred at 25–42°C, but not at 47°C although vegetative growth was observed.

On the other hand, enterotoxin in chicken was detected at from 25°C to 42°C parallel to the increase in the number of spores.

When the chicken inoculated with ca.  $10^4$  spores/g of NCTC8239 strain was rapidly cooled to 25°C in 2 hours after heating at 75°C for 20 minutes, the growth of the organism was not observed. However, when the chicken was slowly cooled to 25°C over 6 hours, these organisms reached the level of  $10^6$  cells/g after 5 hours although spore formation and enterotoxin were not detected.

**Keywords :** *Clostridium perfringens*, spore, enterotoxin, chicken, growth

#### 緒 言

ウェルシュ菌による食中毒は本菌が大量に増殖した食品を喫食することによっておこる、いわゆる感染型食中毒である。従って本食中毒の根本的予防には、食品への菌の汚染を防止することであるが、本菌は土壌、下水、河川、ヒト、家畜などに広範囲に分布しており、食品への汚染を防ぐことは極めて困難である。従って食品中での本菌の増殖を防ぐことが予防対策上極めて重要である。特に本菌は、サルモネラや腸炎ビブリオの場合と異なり加熱調理された食品中でも本菌芽胞が生残し、食品を放冷、保管する間に芽胞が発芽、増殖する特徴がある。

ウェルシュ菌食中毒の原因食品として鶏肉の調理食品によるものが多いことから、今回の実験では鶏肉を用いてウェルシュ菌の増殖態度ならびに鶏肉内でのウェルシュ菌芽胞形成状態およびエンテロトキシン産生について検討した。

#### 材料および方法

1. 供試菌株 英国の Hobbs 博士より分与を受けた *C. perfringens* NCTC 8239 株および東京都内で発生

したウェルシュ菌食中毒の際に患者ふん便から分離された *C. perfringens* W 1415 株ならびに原因食品由来の *C. perfringens* W1631 株を本実験に用いた。これらの菌株はいずれもエンテロトキシン産生株であり、その芽胞は 100°C 1 時間の加熱に対して抵抗性を示す“いわゆる耐熱性ウェルシュ菌”である。

2. 芽胞液の調整 供試菌株をチオグリコレート培地（以下 TGC と略す）に接種し 37°C 24 時間培養後この培養液を 75°C 20 分間加熱処理をし、再度 TGC 培地に接種した。この加熱処理を 4～5 回くり返し行い芽胞形成培地である D S 培地<sup>1)</sup>に接種して芽胞形成能を高めた菌液を 37°C 18～24 時間培養した。得られた芽胞数は  $10^5$ ～ $10^8$  /ml で、実験に供するまで -20°C に凍結保存した。

3. 供試食品と芽胞液の接種 本実験にはトリのひき肉（以下鶏肉と略す）を用いた。鶏肉にはウェルシュ菌や他の *Clostridium* 属の汚染が認められたので鶏肉 5g を試験管に入れ、あらかじめ 121°C 15 分間滅菌した。上記で調整した芽胞液を 75°C 20 分間加熱し、 $10^3$ ～ $10^4$  /ml の芽胞を直ちに試験管内の鶏肉に接種した。

4. 芽胞を接種した食品の保存条件 (1) 一定温度

\* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

での保存 ウェルシュ菌芽胞を接種した鶏肉は4, 15, 25, 30, 37, 42, および47℃の各温度で保存し、一定時間後における生菌数と芽胞数を測定した。(2) 保存温度を経時的に変化させた場合 芽胞を接種した鶏肉を低温恒温恒湿器(プラチナスルファー, PL-3E型, 田葉井製作所)内に保存し、次の条件によって温度を降下させた。a) 75℃から50℃に30分で下げ、その後徐々に6時間で25℃にした。b) 75℃から25℃に12時間で直線的に降下させた。a)およびb)の条件で一定時間ごとにウェルシュ菌数を測定した。

5. ウェルシュ菌生菌数および芽胞数の算定 ウェルシュ菌生菌数は卵黄加CW寒天平板によって算出した。すなわち供試材料に0.1%ペプトン加生理食塩水を等量に加え乳剤にし、常法に従って十倍段階希釈を行い卵黄加CW寒天平板にコンラージ棒で表面塗抹し37℃24時間嫌気培養を行った。

ウェルシュ菌芽胞数の測定は乳剤にした供試材料の一部を試験管にとり、75℃20分加熱処理後と100℃60分の加熱処理後に行った。算定は上記の生菌数測定方法と同様に卵黄加CW寒天平板を用いて行った。

6. エンテロトキシンの測定 供試材料を0.1%ペプトン加生理食塩水で乳剤にしたものを3,000rpm 10分遠心し、その上清を被検液とした。前報<sup>2,3)</sup>で報告したマイクロタイター法による逆受身血球凝集反応により被検液からエンテロトキシンの検出を行った。

## 成 績

1. 各種温度における鶏肉中のウェルシュ菌の発育態度 *C. perfringens* NCTC8239株の各種温度におけるウェルシュ菌の発育態度をFig. 1に示した。4℃に鶏肉を保存した場合には菌の増殖は全くみられなかった。

15℃では24時間後から徐々に増殖して48時間で $10^7/g$ に達し、5日後までその菌数に著しい変化は認められなかった。

25℃の保存では6時間後から増殖をはじめ、24時間で $10^8/g$ に達し、48時間では $10^4/g$ に減少した。

30℃の場合では3時間後から増殖し6時間で $10^7/g$ に達し、24時間後には減少しはじめ48時間後では25℃の場合と同様に $10^4/g$ に減少した。

37℃では30℃と同様に3時間で増殖しはじめ6時間後 $10^7/g$ に達し、48時間後でもこの菌数を変化することなく維持していた。

42℃になると、3時間で急速に増殖し $10^8/g$ に達したが24時間後からわずかず減少した。

47℃の高温下では42℃と同様に3時間で $10^8/g$ に達

し、12時間後から急速に減少した。

*C. perfringens* W1415株およびW1631株の場合も、ほぼ同様な発育態度を示した。

2. 各種温度条件における鶏肉中のウェルシュ菌生菌数と芽胞数との関係 *C. perfringens* NCTC8239株の15, 25, 30, 37, 42, 47℃の各温度に保存した場合のウェルシュ菌の生菌数と芽胞数の経時的変化をFig. 2に示した。鶏肉中における芽胞の形成は保存温度によって著しい差が認められた。すなわち15℃では鶏肉を48時間保存した場合のウェルシュ菌生菌数が $10^7/g$ であるにもかかわらず芽胞数は約 $10^3/g$ であり、また25℃保存でも24時間保存でウェルシュ菌生菌数が $10^7/g$ に対して芽胞数は $10^3/g$ であった。しかし47℃では菌の増殖速度が早く、保存6時間ですでにウェルシュ菌生菌数が最高になったにもかかわらず、芽胞数はむしろ減少し約 $10/g$ であった。30, 42, 37℃保存ではウェルシュ菌生菌数の増殖と平行して芽胞数の増加が認められた。

100℃60分の加熱に抵抗性を示す耐熱性芽胞の形成状態についても検討した結果、ウェルシュ菌生菌数の増加が観察された30, 37, 42℃において前述のごとく75℃耐熱性の芽胞数は増加し、そのうちの $10^3 \sim 10^4/g$ は100℃耐熱性芽胞であった。

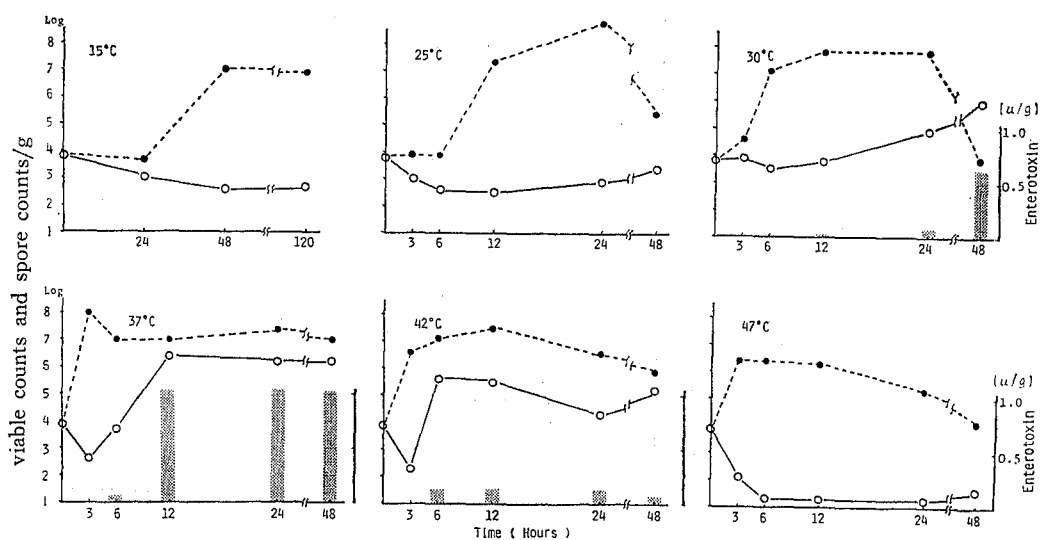
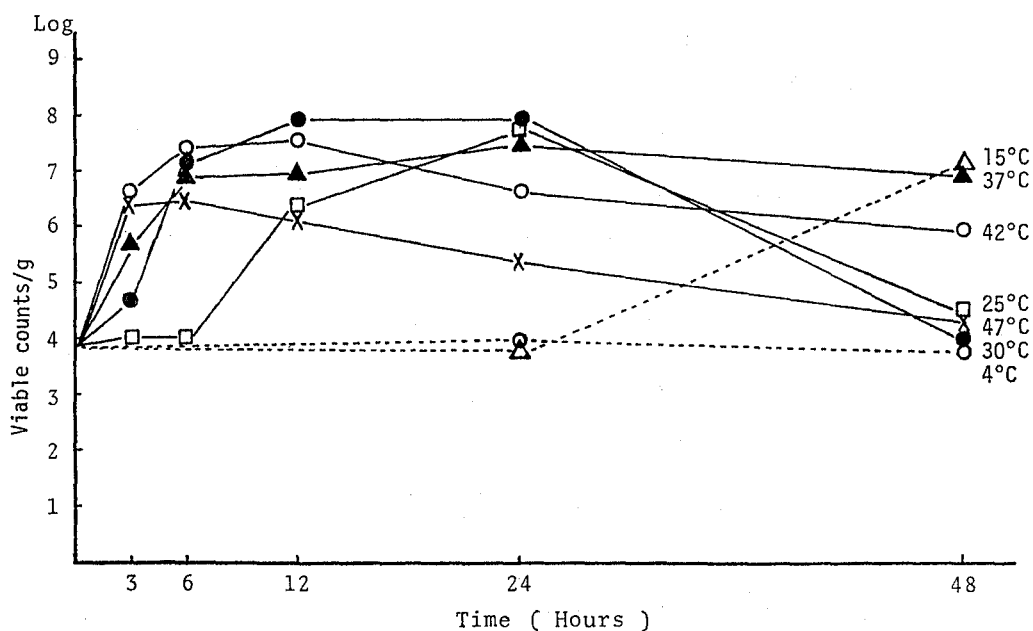
*C. perfringens* W1415株およびW1631株もNCTC8239株の場合とほとんど同様な傾向が認められた。その成績はFig. 3, 4に示すごとく、*C. perfringens* W1415株では、30, 37, 42℃の各温度においてウェルシュ菌の増殖に平行して芽胞数の増加も認められている。

*C. perfringens* W1631株では37, 42℃の保存温度で生菌数と芽胞数の増加が認められたが、30℃の場合では芽胞形成が悪くほとんど芽胞数の増加がみられていない。

3. 各種温度条件における鶏肉中のウェルシュ菌エンテロトキシンの産生性 供試菌株を接種した鶏肉を各種温度条件で保存した場合のエンテロトキシン産生を検討した結果をFig. 2, 3および4に示した。NCTC8239株およびW1415株とも良好なエンテロトキシン産生が認められた。W1631株では芽胞形成が不良であったため、エンテロトキシン産生は少量であった。

NCTC8239株の場合では30℃保存で12時間後よりわずかにエンテロトキシン産生がみられ、芽胞形成が進むにつれてその産生量も増加している。37℃においては6時間後からエンテロトキシン産生がみられ、12時間でエンテロトキシンは $1 \mu g/g$ の産生量となり芽胞数に平行してエンテロトキシン産生量も増加した。42℃では芽胞形





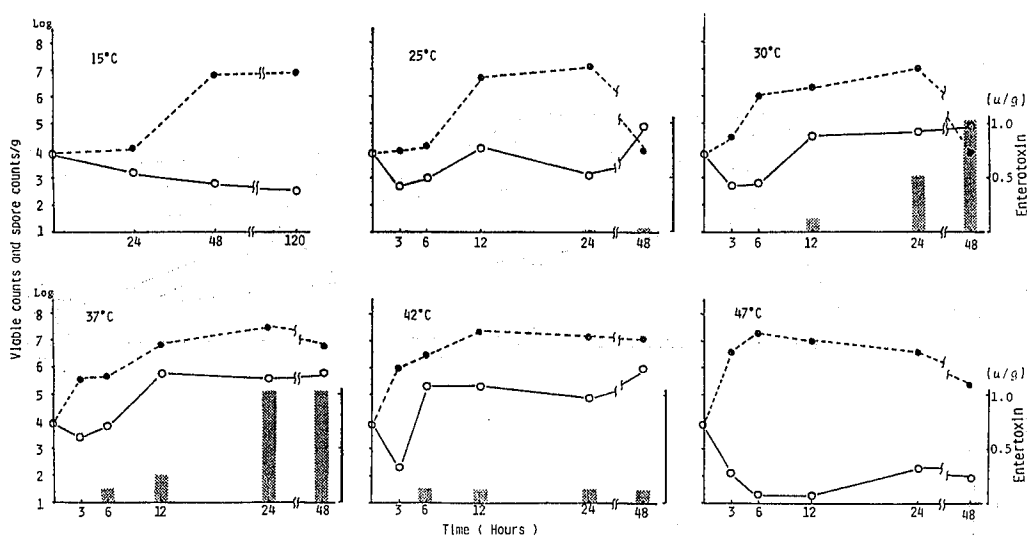


Fig. 3. Viable cell, sporulation and enterotoxin production during growth of *C. perfringens* W1415 in chicken at various temperature

Symbol : ●.....● viable cell, ○—○ spore cell, ■ enterotoxin

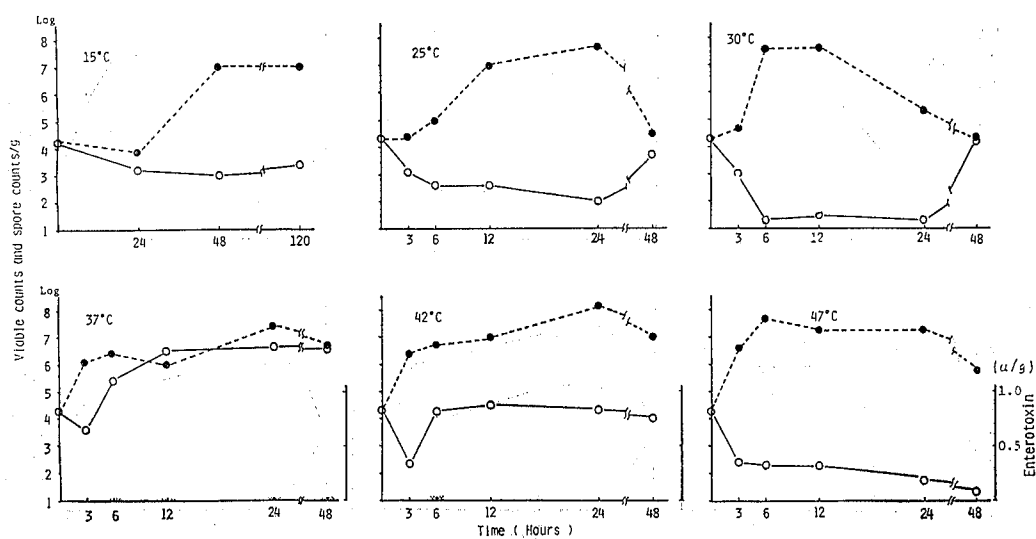


Fig. 4. Viable cell, sporulation and enterotoxin production during growth of *C. perfringens* W1631 at various temperature

Symbol : ●.....● viable cell, ○—○ spore cell, ■ enterotoxin

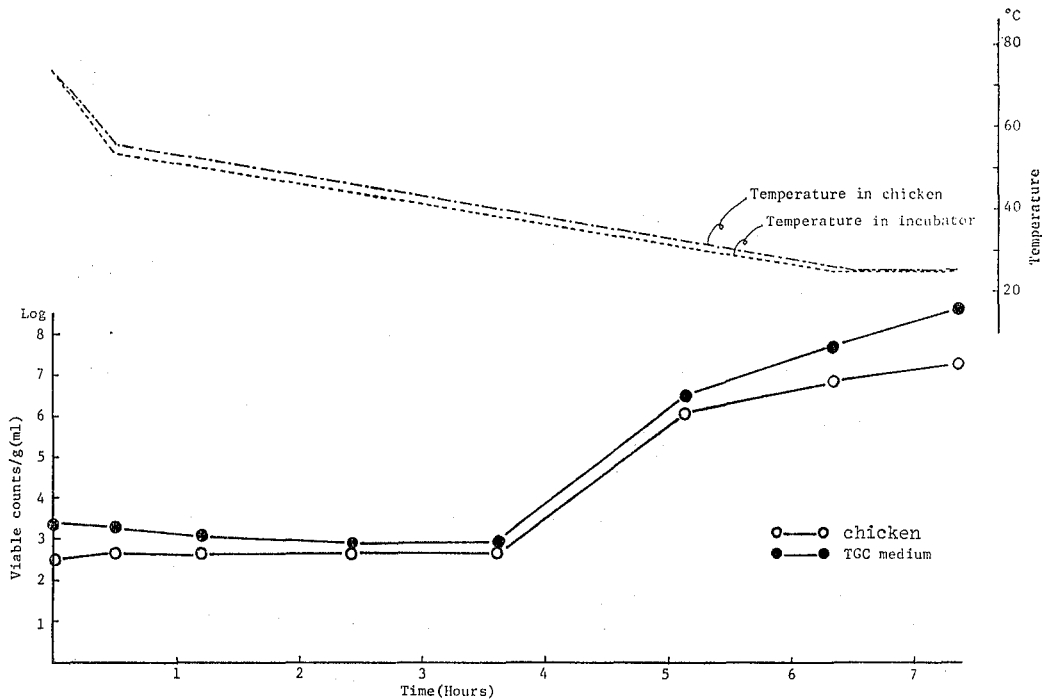


Fig. 5. Growth of *C. perfringens* NCTC8239 in chicken and TGC medium at slowly downning temperature

成は良好であったがエンテロトキシンの産生は少量にとどまった。

W1415株の場合も同様の結果を示していたが、この場合は25℃においても2時間後から芽胞数が増加しており、エンテロトキシンもわずかに産生された。

W1631株の場合、30℃では芽胞形成が悪くエンテロトキシンの産生も認められなかったが、37℃では鶏肉中からエンテロトキシンが少量検出された。

4. 食品の温度を経時的に降下させた場合のウェルシュ菌の発育態度およびエンテロトキシン産生 a) 徐々に冷却した場合 鶏肉に *C. perfringens* NCTC8239株の芽胞を前述の実験と同様に  $10^2 \sim 10^3$ /ml 接種し75℃20分間加熱後75℃から50℃に30分間で降下させ、その後徐々に温度を下げ6時間後に25℃にした。本実験ではスープなどの場合を考えTGC培地におけるウェルシュ菌の増殖も同時に検討した。その成績は Fig. 5 に示すごとく、保存温度が47, 42, 37, 30および25℃に降下した時点でウェルシュ菌の発育状態を検討したところ、食品の温度が40℃前後になった3時間半後からウェルシュ菌の発育がみられ、5時間後には鶏肉およびTGC培地中の

ウェルシュ菌生菌数はいずれも  $10^6$ /g (ml) に達した。

この際鶏肉中の芽胞数ならびに100℃耐熱性の芽胞数も同時に検討したが、菌の著明な増殖にもかかわらず芽胞数は常に  $0 \sim 10^2$ /g であり、エンテロトキシンの産生もすべて陰性であった。

b) 迅速に冷却した場合 a)の場合と同様な処理を行った後75℃から25℃に2時間で温度を直線的に降下させた成績を Fig. 6 に示した。鶏肉およびTGC培地のいずれにおいても菌の増殖は認められなかった。

#### 考 察

食品内でのウェルシュ菌の発育には温度・栄養物質・酸化還元電位・pH・水分活性など各種の因子が関係する<sup>4,5)</sup>が、今回はウェルシュ菌食中毒の原因食品として肉類の調理品が多いことから、鶏肉中でのウェルシュ菌の発育態度を各種の温度条件で検討した。また本中毒の場合、食品の加熱調理でも生残したウェルシュ菌芽胞が食品中で発芽、増殖するものと考えられるので、本実験では鶏肉中にウェルシュ菌芽胞を接種した。鶏肉中では実験に供試したウェルシュ菌3菌株ともほとんど同様な発育態度を示した。すなわち、4℃保存では保存期間5

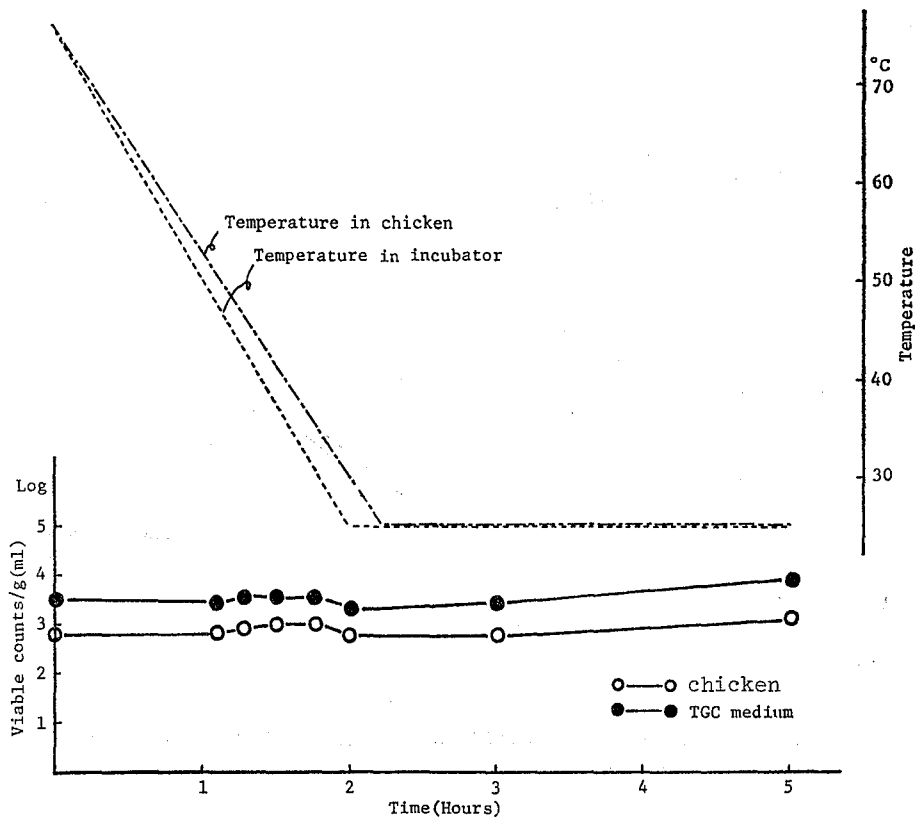


Fig. 6. Growth of *C. perfringens* NCTC8239 in chicken and TGC medium at quickly downing temperature

日後でも接種芽胞の発育は認められず、15℃以上では増殖速度に差があるが明らかな増殖がみられた。15℃では24時間後から徐々に増殖し、2日後に $10^7$ /gに達した。37, 42, 47℃の各温度で保存した場合は増殖速度が早く、3時間後にはすでに芽胞が発芽し $10^6 \sim 10^7$ /gに増殖した。本菌の発育温度は他の食中毒菌とかなり異なり、人工培地中では43~47℃であり、15℃以下では発育しないことが明らかにされている<sup>6)</sup>。今回の鶏肉中でのウェルシュ菌の発育態度もほぼ人工培地での増殖と同じような結果が得られ、42および47℃の各温度では短時間に増殖し保存3時間ですでに感染発症をおこすに必要な菌数にまで達している。ウェルシュ菌食中毒の原因食品は通常、食品中に最初から大量のウェルシュ菌が混入していることは極めて例外的であろう。少数汚染菌が保存方法等が適切でない場合に食品中で増殖し原因食品となることが多い。今回の実験では $10^3 \sim 10^4$ /gのウェルシュ菌を接種して観察しているが、最初の食品への汚染菌数が

もっと多ければ、この時間はさらに短縮されるであろう。Naik<sup>7)</sup>らも調理鶏肉や七面鳥肉中のウェルシュ菌は接種菌量が $10^6$ /gであれば4時間後には $10^8$ /gに達し、短時間で発症に必要な菌量にまで増殖することを報告している。

鶏肉中におけるウェルシュ菌の増殖と芽胞形成との関連では、菌の増殖がみられた30, 37, 42℃の各温度条件において菌の増殖と平行して芽胞数も増加した。しかし47℃の高温条件では急激な菌の増殖がみられたが、芽胞形成は極めて少なく大部分の菌が栄養型であった。Labbe<sup>8)</sup>は芽胞形成培地であるDS培地での芽胞の形成と培養温度との関連を検討しており、その成績でも43℃や46℃の高温培養では芽胞形成が極めて悪く、今回著者らの鶏肉中での芽胞形成と同様の成績を報告している。

またウェルシュ菌食中毒の特徴として、本菌は芽胞の熱抵抗性が高く、通常の調理方法では芽胞が死滅せず加

熱調理食品中で生残した芽胞が発芽し、調理食品が冷却される過程で経時的に菌の増殖があるものと推察されている。今回の成績はこれらのことが実験的に確認された。すなわち供試材料を加熱後急激に25℃まで冷却した場合にはほとんど菌の増殖が認められなかった。しかし徐々に冷却した場合には保存5時間でヒトが発症するに十分な菌の発育が認められた。さらに興味あることは、菌の増殖にもかかわらずほとんど芽胞を形成していないことである。これらのことから本菌食中毒の予防対策として食品の急冷が基本的対策であることが確認された。

一方、ウェルシュ菌のエンテロトキシンは芽胞形成と平行して産生されるが、食品中ではブドウ糖などの炭水化物によってpHが低下し、芽胞の形成が悪く食品内ではエンテロトキシンを産生しないと一般に言われている。しかし今回の実験では鶏肉の保存温度が30~42℃において菌の増殖と共に芽胞も形成されており、エンテロトキシンの産生も認められた。従って食品内でも条件によってはエンテロトキシンの産生も可能である。しかしウェルシュ菌のエンテロトキシンはpH4.0以下で失活してしまうので食品内にエンテロトキシンが存在していてもヒトの胃内でエンテロトキシンが破壊されるものと考えられる。また本菌食中毒発生時の原因食品のように加熱調理された食品が徐々に冷却されていく場合には、著明な菌の発育があるにもかかわらず芽胞の形成がみられず、エンテロトキシンも産生されなかったことは注目すべき成績であろう。

### 結 論

ウェルシュ菌食中毒の予防対策に必要な細菌学的基礎資料を得る目的で、鶏肉中におけるウェルシュ菌の発育態度を温度条件との関連で検討した結果、次のような成績を得た。

1) 鶏肉中に *C. perfringens* NCTC8239株, W1415株, W1631株の芽胞を各々接種し 4, 15, 25, 30, 37, 42, 47℃の各温度に保存した時, *C. perfringens* NCTC 8239株の場合, 4℃では本菌の増殖は認められないが15℃では本菌の増殖が認められた。15および25℃の低温では増殖が遅く, 37℃では24時間で静止期になりその菌数

は約 $10^7$ /gであった。42および47℃では増殖速度が速く, 保存6時間で菌数は最高になりその後徐々に減少した。また30, 37および42℃では菌の増殖と共に芽胞が形成され鶏肉中でエンテロトキシンが産生された。しかし47℃では急激な増殖にもかかわらず芽胞はほとんど形成されなかった。

他の2菌株についても NCTC8239株とほとんど同様に菌の増殖と芽胞形成が認められ、芽胞形成の良好な供試材料からエンテロトキシン産生も認められた。

2) 芽胞を接種した鶏肉および TGC 培地を75℃から50℃に30分で降下させその後徐々に温度を下げ、6時間で25℃に降下させて保存した場合、温度が40℃から30℃に降下する4~6時間で接種菌の急速な増殖がみられた。しかし芽胞はほとんど形成されず、エンテロトキシンの産生も認められなかった。また保存温度を2時間で75℃から25℃に直線的に降下させた場合では、鶏肉および TGC 培地のいずれにおいても接種菌の増殖は認められなかった。

### 文 献

- 1) Duncan, C.L. and Strong, D.H.: *Appl. Microbiol.*, 16, 82, 1968
- 2) 伊藤 武, 稲葉美佐子, 斉藤香彦, 坂井千三, 植村 興, 阪口玄二: 日感染学誌, 53, 409, 1979
- 3) 伊藤 武, 稲葉美佐子, 斉藤香彦, 坂井千三, 植村 興, 阪口玄二: 第9回 嫌気性菌感染症研究会講演録, 95, 1979
- 4) Tabatabai, L.B. et al: *Appl. Microbiol.*, 20, 441, 1970
- 5) Strong, D.H. et al: *Appl. Microbiol.*, 19, 980, 1970
- 6) Boyd, M.J. et al: *J. Biol. Chem.*, 174, 1013, 1948
- 7) Naik, H.S. and Duncan, C.L.: *J. Food Safety*, 1, 7, 1977
- 8) Labbe, R.G. et al: *Can. J. Microbiol.*, 20, 1493, 1974

## 食鳥肉処理施設における *Campylobacter jejuni* の汚染調査

斉 藤 香 彦\*, 伊 藤 武\*, 高 橋 正 樹\*, 高 野 伊知郎\*  
柳 川 義 勢\*, 甲 斐 明 美\*, 坂 井 千 三\*, 石 川 隆 三\*\*  
下 地 洋 三\*\*, 酒 井 宏\*\*, 川 崎 こずえ\*\*

### Surveys for the Contamination of *Campylobacter jejuni* on Butcherys of Chicken

KAHIKO SAITO\*, TAKESHI ITOH\*, MASAKI TAKAHASHI\*, ICHIRO TAKANO\*,  
YOSHITOKI YANAGAWA\*, AKEMI KAI\*, SENZO SAKAI\*, RYUZO ISHIKAWA\*\*,  
HIROMI SHIMOJI\*\*, HIROSHI SAKAI\*\* and KOZUE KAWASAKI\*\*

**Keywords:** カンピロバクター・ジェジュニ *Campylobacter jejuni*, カンピロバクター・コリ *Campylobacter coli*, トリ生肉 raw chicken, 食鳥肉処理場 butcherys of chicken, 血清型 Serotype

#### 緒 言

*Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) は Dekeyser や Butzler ら<sup>1)</sup> によって初めて下痢患者ふん便から検出され、下痢症の原因として注目された。その後、Skirrow<sup>2)</sup> は本菌の分離培地を開発し、下痢患者からの本菌の検出を容易にした。以来諸外国およびわが国においても多くの研究者から *C. jejuni* による腸炎が報告され、今や本菌はサルモネラをしのぎ重要な腸炎起因菌として認識されるに至っている。著者ら<sup>3)</sup> も1979年に本邦で初めて本菌による集団発生例を明らかにして以来1981年までの3年間に16事例の集団発生例に遭遇し、本邦においても本菌が重要な腸炎起因菌であることを明らかにした<sup>4)</sup>。

前述の東京都内で発生した *C. jejuni* による16事例のうちの1事例は、患者ふん便から分離された菌株と、当日患者が喫食した焼肉料理に使用された生ニワトリ肉の残品から分離された菌株とが同一の血清型を示し、本食品を介しての感染例であることが推察された。また、著者ら<sup>5)</sup> はニワトリの *C. jejuni* 保菌について調査した結果、極めて高い保菌率であることを認めた。こうしたニワトリにおける本菌の保菌率の高いことは食用としての解体時に食肉への本菌の汚染、さらにそれらからヒトへの感染も十分に考えられる。

そこで今回は食鳥肉の処理過程における *C. jejuni* の食肉への汚染経路の実態を把握する目的で、某食鳥肉処理場を対象に食鳥の処理経過における本菌の汚染状況を検討した。

#### 材料および方法

#### 1. 供試菌株

集団下痢症患者由来の *C. jejuni* CF-1, 散発下痢症患者由来の HP-347, HP-348, HP-349 および鶏肉由来の CF-395 の5菌株を基礎的実験に供した。

#### 2. 調査材料

東京都内の某食鳥肉処理場を対象に1981年2月の冬期と1981年6月の夏期の2回にわたって調査を実施した。

冬期には食鳥肉処理場での解体過程別に各種検査材料を採取した。すなわち養鶏場からニワトリの輸送に使用した氷1件ニワトリの洗浄水2件、解体施設のまな板や包丁などの拭取り28件を検査対象にした。また当日の解体前のニワトリ6件、解体後の胸肉、手羽肉、もも肉の25件およびその臓器10件についても調査の対象にした。

夏期では冬期の場合と同様に上記処理場内のまな板など拭取り材料9件、生体6件、解体後の胸肉などの製品35件の合計50件を検査対象とした。

#### 3. *C. jejuni* の分離方法

各被検材料からの *C. jejuni* の分離には Skirrow<sup>2)</sup> の血液寒天を用いた直接培養法と、著者ら<sup>6)</sup> が開発した抗生剤加血液ブイヨン (CEM 培地) を用いた増菌培養法とを併用した。

直接分離培養法: 被検材料を Skirrow の血液平板に直接塗布し嫌気培養ジャーにおさめ微好気条件下 ( $O_2$  5%,  $CO_2$  10%,  $N_2$  85%) で43℃48時間培養を行った。

増菌培養法: 被検材料を抗生剤加血液ブイヨン 10ml (CEM培地: 基礎培地; 普通ブイヨン, 抗生剤; vancomycin 20mg/l, polymyxin B 5,000IU/l, amphotericin

\* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 東京都中野区中野北保健所

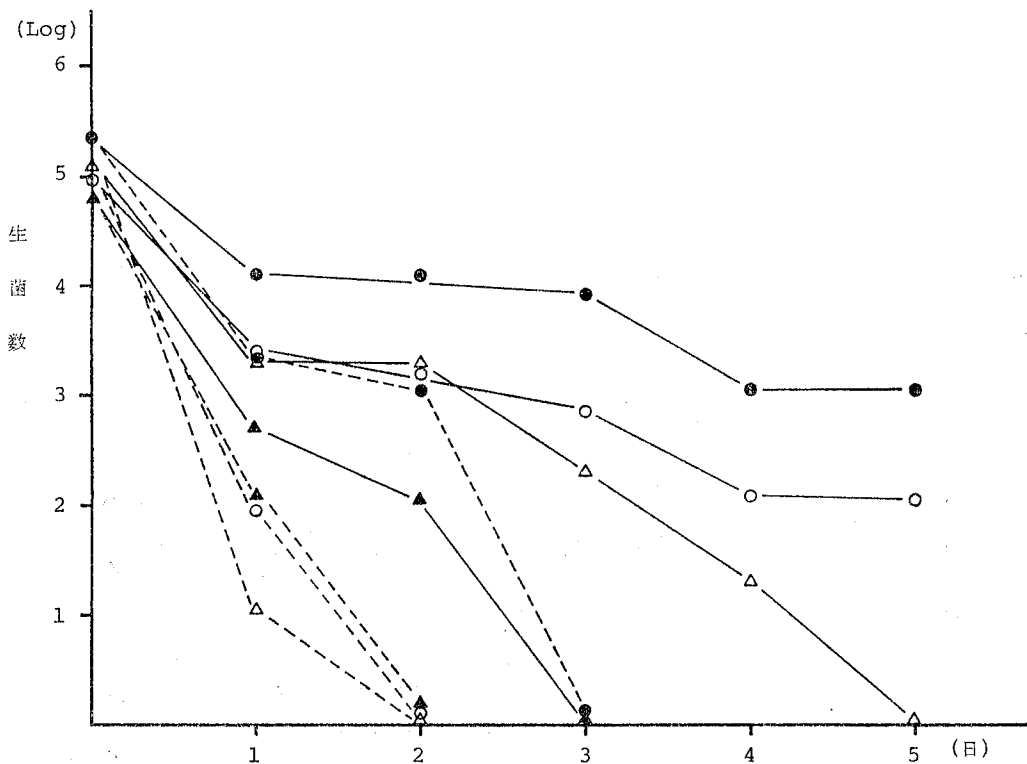


図 1. 生理食塩液中での *C. jejuni* の生存  
●: CF 1, ○: HP347, ▲: HP348, △: HP349, —: 4°C, ---: 25°C

B 2mg/l, trimethoprim 50mg/l, 血液; ウマ脱線維血液 7%)に乳剤あるいはすき液の 1ml を接種し, 43°C 18 時間好気培養後, 上記の分離培地で分離培養を行った。

#### 4. *C. jejuni* の同定

Skirrow の血液寒天平板上の疑わしい集落については, 顕微鏡検査と Véron & Chaterain<sup>7)</sup>および Skirrow & Benjamin<sup>8)</sup>の記載に従って, オキシダーゼ, カタラーゼ, 1% グリシン, 好気培養, 25°C および 43°C での発育, 硫化水素産生, 馬尿酸加水分解の各種生化学的性状試験を行って同定した。なお, 馬尿酸加水分解性は迅速法で判定したが, 不明確な場合には薄層クロマトグラフィーによって検討した。

#### 成 績

##### 1. 被検材料の輸送方法の検討

*C. jejuni* は好気性菌であり, 大気中では極めて死滅しやすいことから, まな板などの拭取り材料や食品の輸送方法が従来の方法で妥当なのか否か明らかでない。そこで, 調理器具・器材の拭取り材料の輸送保存液を, 従来使用されている生理食塩液と 10% ブイヨン加生理食

塩液との 2 種類の保存液を使用し, 4°C と 25°C の温度条件で *C. jejuni* の生存を検討した。

##### a) 生理食塩液中での *C. jejuni* 生存

試験管 (18mm×180mm) に生理食塩液を 10ml 入れ, BHI ブイヨンで 18 時間培養の *C. jejuni* を 1ml 中に  $10^4 \sim 10^5$  個に加えて, 4°C と 25°C の温度条件に保存して経時的に生存菌数を測定した。図 1 に示すごとく, 供試した 4 菌株はいずれも 25°C 保存よりも 4°C に保存の方が生存日数が長い結果を示した。すなわち, *C. jejuni* CF-1 株は 4°C 保存では 5 日目でも  $10^2$ /ml の生存が認められているのに対し 25°C 保存では急激に減少し, 3 日目で検出されなかった。HP-347, HP-348 および HP-349 株の場合も 4°C 保存では 3～5 日間の生存がみられるのに対し, 25°C 保存では 3 菌株とも 1 日目ですべて死滅した。

##### b) 10% ブイヨン加生理食塩液中での *C. jejuni* の生存

前述の生理食塩液の場合と同様に行った 10% ブイヨン加生理食塩液中での *C. jejuni* の生存態度を図 2 に示し

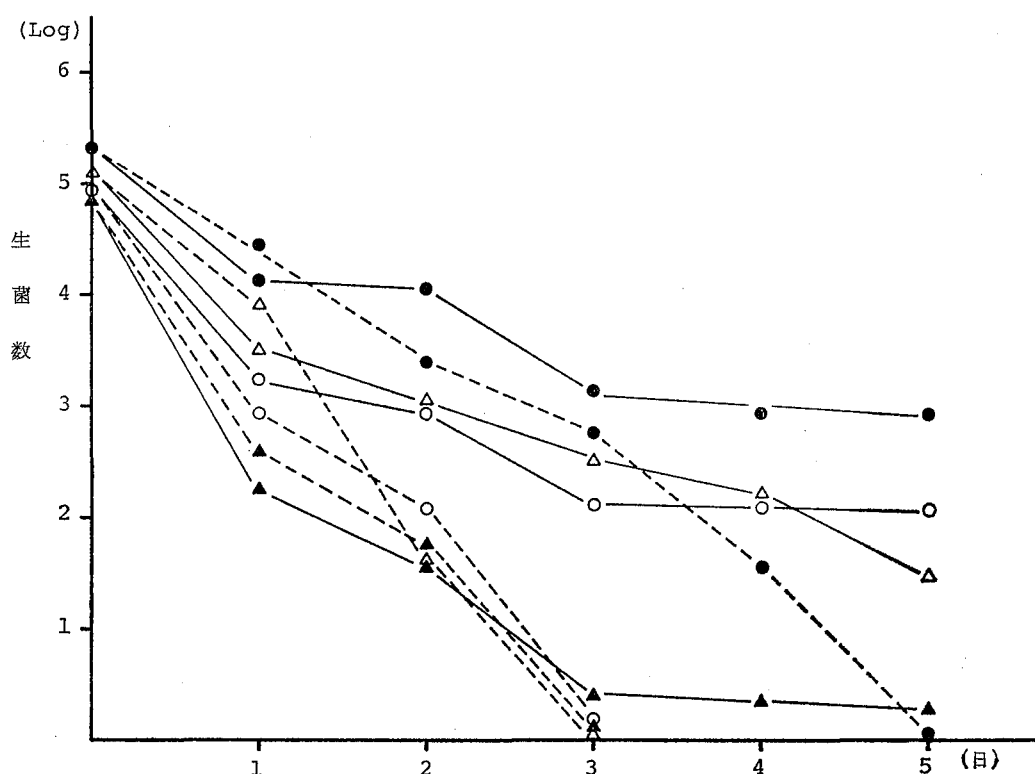


図 2. 10%ブイオン加生理食塩液中での *C. jejuni* の生存  
 ●: CF-1, ○: HP-347, ▲: HP-348, △: HP-349, —: 4°C, ---: 25°C

た。4°Cの低温保存の場合は供試した4菌株とも菌数の減少がゆるやかで5日目でも *C. jejuni* の生存が認められた。一方、25°C保存では4°Cの保存に比して菌数の減少が急激であり、HP-347, HP-348, HP-349の3菌株は保存3日目まで死滅、CF-1株は5日目まで死滅した。

以上のごとく生理食塩液と10%ブイオン加生理食塩液中の *C. jejuni* の生存は保存温度と密接な関連が認められた。すなわち、菌株間に多少の差はみられるが、4°Cの低温に保存した場合の方が、25°C保存よりも長く生存した。さらに生理食塩液中では *C. jejuni* の生菌数が急激に減少するのに対し、10%ブイオン加生理食塩液中では減少傾向がゆるやかであった。

#### c) 生肉中の *C. jejuni* の生存

BHI ブイオンで18時間培養の *C. jejuni* CF-1 およびCF-395株を鶏肉、豚肉、牛肉10gに $10^6$ /g接種し、各種の温度条件で保存後、継時的に接種菌の生存を検討した。その成績は表1に示すごとく4°Cに保存した場合には供試した肉種による差異はほとんど認められず3日

後も接種菌が検出されたが、25°Cや37°C保存では、1日後ですでに検出されない場合もあり、前記の輸送保存液の検討結果と同様に、本菌は低温では比較的長く生存することが判明した。

以上の成績より食鳥肉処理場における *C. jejuni* の汚染調査に関連しての調理器具・器材の拭取りは10%ブイオン加生理食塩液を用いて実施し、また、いずれの検体も低温で実験室まで輸送した。

#### 2. 食鳥肉処理場における *C. jejuni* の汚染状況

同一食鳥肉処理場を対象に冬期と夏期にわけて施設のまな板、包丁などの拭取り材料および解体前のニワトリ、解体後の生肉について *C. jejuni* の汚染状況を調査した。(表2)。

第1回冬期の調査：表2に示すごとくニワトリの解体作業前の施設の拭取り材料、洗浄水からは *C. jejuni* は検出されなかった。しかし、作業中のまな板4件中2件から *C. jejuni* が検出された。包丁、パットはすべて陰性であった。また、生肉の解体ならびに内臓処理従業員の手指からは *C. jejuni* は検出されなかった。



表 1. 各種温度条件下に保存した食肉中における *C. jejuni* の生存

| 供試菌株                       | 食肉の種類 | 保 存 温 度<br>(°C) | 保 存 日 数 |     |     |    |
|----------------------------|-------|-----------------|---------|-----|-----|----|
|                            |       |                 | 8時間     | 1日  | 2日  | 3日 |
| <i>C. jejuni</i><br>CF-1   | 鶏 肉   | 4               | +++     | ++  | ++  | ++ |
|                            |       | 15              | +++     | ++  | +   | +  |
|                            |       | 25              | +++     | +   | +   | +  |
|                            |       | 37              | +++     | +   | +   | +  |
|                            | 豚 肉   | 4               | +++     | +++ | +++ | ++ |
|                            |       | 15              | +++     | +++ | +   | +  |
|                            |       | 25              | +++     | +   | +   | +  |
|                            |       | 37              | +++     | +   | +   | +  |
|                            | 牛 肉   | 4               | +++     | ++  | +   | +  |
|                            |       | 15              | +++     | ++  | +   | +  |
|                            |       | 25              | +++     | +   | +   | +  |
|                            |       | 37              | +++     | +   | +   | +  |
| <i>C. jejuni</i><br>CF-395 | 鶏 肉   | 4               | +++     | +++ | ++  | +  |
|                            |       | 15              | +++     | +++ | +   | +  |
|                            |       | 25              | +++     | +   | +   | +  |
|                            |       | 37              | +++     | +   | +   | +  |
|                            | 豚 肉   | 4               | +       | +   | ++  | +  |
|                            |       | 15              | +       | +   | +   | +  |
|                            |       | 25              | +       | +   | +   | +  |
|                            |       | 37              | +       | +   | +   | +  |
|                            | 牛 肉   | 4               | +       | +   | +   | +  |
|                            |       | 15              | ++      | +   | +   | +  |
|                            |       | 25              | ++      | +   | +   | +  |
|                            |       | 37              | +       | +   | +   | +  |

*C. jejuni* の集落数: +++ 100 以上, ++ 10~100, + 10 以下

前述のごとく作業中のまな板では本菌の汚染が認められたが、同まな板の水洗後ではすべて陰性であった。

同日に処理、解体したニワトリの胸肉、手羽肉、もも肉の計20件中18件、皮5件中2件および肝臓、砂肝の臓器10件中9件から *C. jejuni* が検出された。なお、同日に処理場に入荷したニワトリ6羽の体表面を検査した結果ではいずれも陰性であったが、腸内容を検査した結果1羽の盲腸内容から本菌が検出された。

第2回夏期の調査：夏期に実施した成績では、作業中のまな板の拭取り4件中すべてから *C. jejuni* が検出された。手指については5件いずれも陰性であった。

当日に解体したニワトリの胸肉、手羽肉、もも肉および皮計25件中6件(24.0%)からも本菌が検出された。

肝臓、砂肝はすべて陰性であった。解体前のニワトリ6羽の体表面および腸内容について検討した結果、2羽の体表面と腸内容から *C. jejuni* が検出された。本菌が陽性であった腸内容の内訳は小腸1件、大腸2件および盲腸2件が陽性であった。

表 2. 食鳥肉処理場施設のふき取りおよび生肉の *C. jejuni* 汚染状況

| 被 検 材 料 | 第 1 回<br>(1981 2月) |            | 第 2 回<br>(1981 6月) |            |
|---------|--------------------|------------|--------------------|------------|
|         | 検 査<br>件 数         | 陽 性<br>件 数 | 検 査<br>件 数         | 陽 性<br>件 数 |
| 作 業 前   | まな板                | 8          | 0                  | —          |
|         | 包 丁                | 1          | 0                  | —          |
|         | 手 袋                | 1          | 0                  | —          |
|         | 洗浄水                | 3          | 0                  | —          |
| 作 業 中   | まな板                | 4          | 2                  | 4          |
|         | まな板<br>(水洗後)       | 2          | 0                  | —          |
|         | 包 丁                | 5          | 0                  | —          |
|         | バ ッ ト              | 2          | 0                  | —          |
|         | 手 指                | 5          | 0                  | 5          |
| 解体後の肉   | もも肉                | 5          | 5                  | 5          |
|         | 胸 肉                | 5          | 5                  | 5          |
|         | 手羽肉                | 10         | 8                  | 10         |
| 解体後の臓内  | 皮                  | 5          | 2                  | 5          |
|         | レバー                | 5          | 5                  | 5          |
|         | 砂 肝                | 5          | 4                  | 5          |
| ニワトリ    | 小 腸                | 6          | 0                  | 6          |
|         | 大 腸                | 6          | 0                  | 6          |
|         | 盲 腸                | 6          | 1                  | 6          |
|         | 表 皮                | 6          | 0                  | 6          |

### 3. 分離菌株の生化学的性状および血清型別

食鳥肉処理場の施設および生肉等から分離された *Campylobacter* について各種性状試験および血清型別を行った。各被検材料から分離された *Campylobacter* は全菌株とも微好気性菌で43℃で発育し25℃では発育しない Thermophilic *Campylobacter* であり、馬尿酸加水分解試験陽性の *C. jejuni* であった。

また、各種材料から分離された *C. jejuni* の20菌株については著者ら<sup>9)</sup>が作成した26型の抗血清(TCK1~TCK26)を用いて血清型別を行った。その結果20株中14株(70.0%)が型別され、その内訳はTCK-5に該当するものが4株、TCK-14が4株、TCK-18が2株、TCK3, TCK-7, TCK-9 および TCK-17に該当するものがそれぞれ1株であった。

### 考 察

Thermophilic *Campylobacter*は家畜・家禽の腸管内に保菌されており、その保菌率は極めて高くサルモネラ以上である。例えば影森ら<sup>9)</sup>の成績ではブタでは本菌保

菌率は約68%, ウンでは17%である。著者らはニワトリの腸内容物について検討した結果ブイロー48件中11件(23.9%) 鶏糞76件中28件(36.8%) から *C. jejuni* が検出された。本調査においてもニワトリ12件中3件から同様に本菌が検出された。従ってこれらの家畜・家禽の解体時における本菌の食肉への汚染の危険性は極めて高いことが推察される。

今回の食鳥肉処理場のまな板や包丁などの拭取り調査では、解体中のまな板より多数本菌が検出された。また、同処理場で解体された生肉についてもその汚染率は高く54.3%であった。これらの事実は、ニワトリの腸管内や総排泄腔に保有されていた *C. jejuni* が解体作業中に生肉へ汚染したものと考えられる。

食鳥肉の汚染率が高いサルモネラの場合には腸内容物からも本菌が多数検出されるが、羽毛からの検出頻度が高く渡辺ら<sup>10)</sup>の成績では羽毛のサルモネラ汚染率は9.5%, 体表面3.6%であって羽毛付着菌が重要な汚染源となっている。しかし、*C. jejuni* の場合は本菌が微好気性で、大気中では急速に死滅することと、乾燥にも弱く、著者らの成績では乾燥ふん便中の本菌は1日で死滅することから羽毛からの食肉への汚染は少ないものと考えられる。

今回の食鳥肉の調査で分離された Thermophilic Campylobacter はすべて馬尿酸加水分解陽性の *C. jejuni* と同定された。著者らの成績ではヒトの集団例あるいは散发下痢症由来のほとんどが *C. jejuni* であることから、食鳥肉の本菌汚染はヒトへの感染源として極めて重要であると考えられる。さらに、著者らが提案した血清型からみると、ニワトリおよび食鳥肉由来株の多くが、ヒト下痢症由来株と同一血清型に該当することから、ニワトリ→生肉→ヒトへの感染経路が推察される。

著者らが開発した Thermophilic Campylobacter の増菌培地 (CEM 培地) は食肉からの本菌検出に極めて有効であることを報告した。本調査においてもこれを応用しトリ肉およびその臓器の直接培養では本菌検出率が33%であったのに対して増菌培養により約55%と本菌の検出率を高めることができた。また、本培地は調理器具などの拭取り材料の増菌培養も可能であり Thermophilic Campylobacter の検査に広く応用できるものと考えられる。

### 結 論

食鳥肉処理場のまな板、包丁などの器具類および解体後の生肉における *Campylobacter jejuni* の汚染実態の調査を行い以下の成績を得た。

1) 拭取り材料の保存液および食肉の輸送条件は10% ブイヨン加生理食塩液を用い、4℃の低温で輸送する。

2) 食鳥肉処理場の環境調査では作業中のまな板8件中6件から *C. jejuni* が検出された。包丁やバットおよび作業員の手指12件は陰性であった。

3) 同一食肉処理場で解体された胸肉、もも肉、手羽肉および皮の計50件について菌検索を行ったところ26件(52.0%) から *C. jejuni* が検出された。また、解体後の臓器20件中9件が陽性であった。

4) 解体前のニワトリ12件中3件の腸内容物、2件の体表から *C. jejuni* が検出された。

5) 分離菌株はすべて *C. jejuni* と同定され、*C. coli* は1例も検出されなかった。

6) 分離菌株のうち20菌株を対象に著者らが開発した血清型 (TCK-1~TCK-26) で型別した結果、14菌株(70.0%) が型別された。その血清型は TCK-3, TCK-5, TCK-7, TCK-9, TCK-14, TCK-18 であった。

### 文 献

- 1) Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J. P. and Sternon, J.: *J. Infect. Dis.*, 125, 390, 1972
- 2) Skirrow, M. B.: *Brit. Med. J.*, 2, 9, 1977
- 3) Itoh, T., Saito, K., Maruyama, T., Sakai, S., Ohashi, M. and Oka, A.: *Microbiol. Immunol.*, 24, 371, 1980
- 4) Itoh, T., Saito, K., Yanagawa, Y., Sakai, S. and Ohashi, M.: *Campylobacter*, Ed., Newell, D. G., 1982, MTP Press, Lancaster. Boston. The Hague
- 5) 伊藤 武, 斉藤香彦, 柳川義勢, 高橋正樹, 坂井千三, 大橋 誠, 福山正文, 上村知雄: 第61回日本獣医学会, 1981
- 6) 高橋正樹, 斉藤香彦, 柳川義勢, 伊藤 武, 坂井千三, 大橋 誠: 第56回日本感染症学会総会学術講演抄録, 1982
- 7) Véron, M. and Chatelain, R.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 23, 122, 1973
- 8) Skirrow, M. B. and Benjamin, J.: *J. Clin. Path.*, 33, 1122, 1980
- 9) 景森令克, 竹重都子, 渡辺賢哉, 山口武一, 足達卓治, 中井薫, 丸山 務, 斉藤香彦, 坂井千三: 第89回日本獣医学会要旨, 1980
- 10) 渡辺昭宣: 食品衛生研究, 28(5), 43, 1978

## 砂糖, でん粉, 香辛料などの芽胞菌汚染の実態調査

小久保 彌太郎\*, 神 保 勝 彦\*, 村 上 文 子\*, 村 上 一\*

### Prevalence of Spore-forming Bacteria in Sugar, Starch, Spices and Vegetable Protein

YATARO KOKUBO\*, KATSUHIKO JINBO\*, FUMIKO MURAKAMI\*  
and HAJIME MURAKAMI\*

Total of 214 vegetable ingredients consisted of 21 sugar, 42 starch, 117 spices and 34 vegetable protein collected mainly from meat processing factories were checked for the contamination by *Bacillus* spores and *Clostridium* species.

*Bacillus* spores were detected in 102 samples (47.7%) which had been heated for 20 minutes at 75°C, and in more than half of starch and vegetable protein samples. The bacterial count was >1,000/g in 29 samples, 28 of which were spices. However, 12 samples (5.6%) which had been heated for 10 minutes at 100°C were found positive, and only 1 of which, black pepper, had the count of >1,000/g. Irrespective of the raw materials or heating conditions, *B. licheniformis* was most predominantly isolated, followed by *B. subtilis* and *B. megaterium*.

*Clostridium* species were detected from 66 unheated samples (30.8%) and 52 samples heated at 75°C (24.3%). Similarly to the case of *Bacillus* species, the detection rate was high in starch and vegetable protein samples, although the count was lower by approximately 2 to 3 orders than *Bacillus* spores in all the raw materials. *C. bifermentans* was most frequently isolated from these samples, both raw and heated, followed by *C. perfringens* and *C. butyricum* demonstrating that there were wide ranges of species.

**Keywords :** vegetable ingredients, meat processing factories, *Bacillus*, *Clostridium*, spores

#### はじめに

動物性加工食品に使用する砂糖, でん粉および香辛料などの植物性副原料は土壌由来の芽胞菌に汚染されていることが知られている<sup>1-4)</sup>。これら芽胞菌による事故を未然に防ぐ目的で, わが国では食品衛生法に基づく食肉, 鯨肉および魚肉ねり製品の製造基準の中で, 製品に使用する砂糖, でん粉および香辛料中の耐熱性菌総数(芽胞数)は1g当り1,000以下でなければならないと定めている。この場合, 検出対象となる芽胞は煮沸水浴中で10分間の加熱に耐えるかなり耐熱性の高い*Bacillus*属のものである。

しかし, 製品加工時の実際の加熱条件や, 非加熱食肉製品のようなあまり熱をかけないものが最近消費者に好まれる傾向にあることなどから, 比較的耐熱性の低い芽胞も検査の対象としなければ, 製品の衛生細菌学的な品質が確保できるかどうかは疑わしい。同時に, 嫌気性芽

胞菌である*Clostridium*属も真空包装製品の普及などにともない無視できない存在と思われる。しかし, 副原料中の本菌属の汚染実態については不明な点が多いため, 製品の適確な芽胞菌対策の実施が困難である。

このような観点から, 今回主として食肉製品工場より採取した砂糖, でん粉, 香辛料および現在基準の定められていない植物性蛋白など計214例を対象に, これら副原料中の*Bacillus*属芽胞および*Clostridium*属の汚染実態調査を行なったので報告する。

#### 材料および方法

1) 調査副原料: 1980年12月から1981年6月の間に, 都内およびその周辺地域の主として食肉製品工場より採取した砂糖21例, でん粉42例, 植物性蛋白34例, 約20種類の各種天然香辛料117例の計214例である。

#### 2) 使用培地

①標準寒天: *Bacillus*属芽胞数の測定に用いた培地

\* 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

で、その組成は培地 1,000ml 当りペプトン 5g, 酵母エキス 2.5g, ブドウ糖 1g, 寒天 15g から成り, pH 7.1 ± 0.1 に調整された日水製薬製の粉末培地で、121℃ で 15 分間高圧滅菌後使用した。

② HF ブイヨン: *Clostridium* 属菌数の測定に用いた培地で、その組成は培地 1,000ml 当りトリプトース (Difco) 15g, ソイトン (Difco) 5g, 酵母エキス (Difco) 5g, クエン酸鉄アンモニウム 1g, メタ亜重硫酸ナトリウム 1g, L-システイン塩酸塩 0.5g, 寒天 (Difco) 0.5g から成る。これら組成を蒸留水に溶解後 pH 7.6 ± 0.1 に調整し、中試験管に 10ml ずつ分注後 118℃ で 10 分間高圧滅菌してから使用した。

3) 試料の調製: 滅菌目盛り付き共栓ビンにでん粉は 20g, その他の原料はそれぞれ 10g ずつを秤り取り、滅菌 0.1% ペプトン水ででん粉は 200ml, その他の原料は 100ml の目盛りまで加えた。これを 3 群に分け、I 群はそのまま、II 群は 75℃ で 20 分間、III 群は 100℃ で 10 分間それぞれ加熱したものを試料液とした。

4) *Bacillus* 属芽胞数の測定: 前記 II および III 群試料液について好気性菌数を測定し、得られた菌数を各材料中の *Bacillus* 属芽胞数とした。すなわち、各試料液およびそれらの 10 倍段階希釈液 1ml ずつを滅菌深型プラスチックシャーレ (日水製薬) にとり、これにあらかじめ 50℃ に保持した標準寒天 15ml を注いで混和し、35℃ で 48 時間培養後出現した集落を数えて菌数を算定した。

5) *Clostridium* 属菌数の測定: 前記 I および II 群試

料液について、これらの 10ml を 2 倍濃度の HF ブイヨン、1 および 0.1ml を普通濃度の HF ブイヨンにそれぞれ 3 本ずつ接種した。35℃ で 72 時間培養後 H<sub>2</sub>S 産生による培地の黒変を指標として検体 100g 当りの *Clostridium* 属 MPN 値を求めた。なお、最終的な菌数は次に示す方法で *Clostridium* 属の分離された試験管数から算定した。

6) *Bacillus* および *Clostridium* 属の分離および同定: *Bacillus* 属は菌数測定後の標準寒天平板上の集落を 1 検体当り 1 ~ 5 個ずつ無作為に釣菌して分離し、グラム陽性、カタラーゼ産生の有芽胞菌であることを確認した。これら *Bacillus* 属は著者の分類法<sup>5)</sup>に準拠して、それらの種を同定した。

*Clostridium* 属は H<sub>2</sub>S 産生の認められた HF ブイヨンの試験管底から毛細管ピペットで一滴ずつ HF 寒天平板 (HF ブイヨンの寒天濃度を 2% にしたもの) に塗抹し、35℃ で 72 時間嫌気培養後平板上に発生した黒色集落を分離し、偏性嫌気性の有芽胞菌であることを確認した。分離した菌株は Bergey's Manual<sup>6)</sup> および VPI Manual<sup>7)</sup>などを参考に、Fig. 1 に示したようにゼラチン液化能、芽胞位置、菌の形態、ブドウ糖分解能、卵黄反応の 5 性状により 9 群に群別した。なお、この内の一部の菌株は鈴木らの「臨床嫌気性菌マニュアル」<sup>8)</sup>に準拠してさらに詳細な生物学的性状試験ならびに代謝産物のガスクロマトグラフィー分析を実施して種を同定した。

#### 調査成績

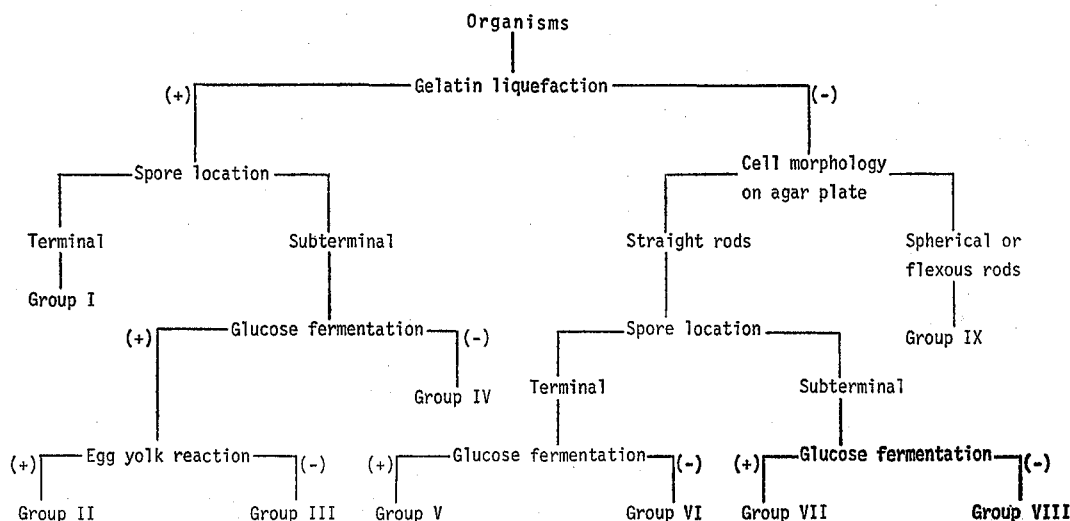


Fig. 1. Schema for Grouping of *Clostridium* Species.

Table 1. Incidence of *Bacillus* Spores in Spices, Starch, Vegetable Protein and Sugar.

| Specimens         | No. of tested | After heating at 75°C for 20min. |                 |                 |                  |                  | After heating at 100°C for 10min. |                 |                 |                  |                  |
|-------------------|---------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
|                   |               | No. of spores/g                  |                 |                 |                  | No. of negatives | No. of spores/g                   |                 |                 |                  | No. of negatives |
|                   |               | ≤10 <sup>1</sup>                 | 10 <sup>2</sup> | 10 <sup>3</sup> | ≥10 <sup>4</sup> |                  | ≤10 <sup>1</sup>                  | 10 <sup>2</sup> | 10 <sup>3</sup> | ≥10 <sup>4</sup> |                  |
| Spices            | 117           | 8                                | 15              | 10              | 18               | 66               | 2                                 | 2               | 1               |                  | 112              |
| Starch            | 42            | 16                               | 11              |                 |                  | 15               |                                   | 2               |                 |                  | 40               |
| Vegetable protein | 34            | 10                               | 9               |                 | 1                | 14               | 2                                 | 1               |                 |                  | 31               |
| Sugar             | 21            | 4                                |                 |                 |                  | 17               | 2                                 |                 |                 |                  | 19               |
| Total             | 214           | 38                               | 35              | 10              | 19               | 112              | 6                                 | 5               | 1               |                  | 202              |

Note: Figures in the table indicate the number of samples.

Table 2. Distribution of Species of *Bacillus* Spores Obtained from Spices, Starch, Vegetable Protein and Sugar.

| Species                 | No. of isolates |        |                   |       |           |
|-------------------------|-----------------|--------|-------------------|-------|-----------|
|                         | Spices          | Starch | Vegetable protein | Sugar | Total (%) |
| <i>B. licheniformis</i> | 154             | 22     | 52                |       | 228(57.0) |
| <i>B. subtilis</i>      | 71              | 13     | 13                |       | 97(24.3)  |
| <i>B. megaterium</i>    | 12              | 18     | 5                 | 3     | 38(9.5)   |
| <i>B. coagulans</i>     | 10              | 4      |                   | 1     | 15(3.8)   |
| <i>B. polymyxa</i>      |                 | 3      | 1                 |       | 4(1.0)    |
| <i>B. sphaericus</i>    |                 | 1      | 3                 |       | 4(1.0)    |
| <i>B. cereus</i>        |                 | 2      | 1                 |       | 3(0.8)    |
| <i>B. laterosporus</i>  |                 | 3      |                   |       | 3(0.8)    |
| <i>B. macerans</i>      |                 | 3      |                   |       | 3(0.8)    |
| <i>B. alvei</i>         | 1               | 1      |                   |       | 2(0.5)    |
| <i>B. brevis</i>        |                 | 1      |                   | 1     | 2(0.5)    |
| Total                   | 248             | 71     | 75                | 5     | 399(100)  |

1) *Bacillus* 属芽胞の分布: 75°Cで20分および100°Cで10分間加熱後に, それぞれ検出された *Bacillus* 属芽胞数の分布を副原料の種類別に Table 1 に示した.

75°C 加熱では全調査原料214例中102例 (47.7%) が陽性で, この内でん粉は42例中27例 (64.3%), 植物性蛋白は34例中20例 (58.8%) が陽性であったが, 砂糖は21例中4例 (19.0%) が陽性にすぎなかった. 陽性検体中29例から1,000/g以上の芽胞が検出され, この内28例はパブリカ, ブラックペッパー, オールスパイスなどの香辛料で, これらの中には10<sup>6</sup>/gレベルのものも認められた.

一方, 100°C加熱では12例 (5.6%) のみ陽性で, この内1,000/g以上のものはブラックペッパー1例のみであった.

Table 2 は各副原料から分離された *Bacillus* 属計399株の菌種構成を示したものである. 表から明らかなように11の菌種に分別され, この内 *B. licheniformis* が香辛料, でん粉および植物性蛋白分離株中いずれも最も多く228株 (57.0%) に認められた. 次いで, *B. subtilis* 97株 (24.3%), *B. megaterium* 38株 (9.5%) の順で, これら3菌種で全分離株の90%以上を占めた. なお, *B. cereus* はでん粉と植物性蛋白から計3株検出されたにすぎなかった. このような菌種構成割合は75および100°C加熱材料ともほぼ同じ傾向であった.

2) *Clostridium* 属の分布: 未加熱および75°Cで20分間加熱後の *Clostridium* 属菌数の分布を副原料の種類別に Table 3 に示した.

未加熱では66例 (30.8%) が陽性で, この内でん粉は29例 (69.0%), 植物性蛋白は16例 (47.1%) が陽性であったが, 香辛料は15例 (12.8%) が陽性にすぎなかった. これらの菌数は80%以上が1,000/100g以下で, 1g当りに換算して1,000以上のものはなかった. なお, 陽性検体は *Bacillus* 属芽胞数の多いものに認められる傾向があった.

一方, 75°C加熱では52例 (24.3%) が陽性で, でん粉と植物性蛋白の陽性率は他の原料よりも高かった. これらの検出状況を未加熱のものと比較すると, 香辛料と植物性蛋白はむしろ高い陽性率を示したが, 菌数は全般的に低かった.

Table 4 は未加熱および加熱両材料から分離された *Clostridium* 属計390株を原料別に9群に群別した成績を示したものである. 表から明らかなように, II群が194株 (49.7%) と最も多く, 次いでVII群が122株 (31.3%)

Table 3. Incidence of *Clostridium* Species in Spices, Starch, Vegetable Protein and Sugar.

| Specimens         | No. of tested | Non heating                            |                 |                 |                  |                  | After heating at 75°C for 20min.       |                 |                 |                  |                  |
|-------------------|---------------|----------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|----------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
|                   |               | No. of <i>Clostridium</i> species/100g |                 |                 |                  | No. of negatives | No. of <i>Clostridium</i> species/100g |                 |                 |                  | No. of negatives |
|                   |               | <10 <sup>2</sup>                       | 10 <sup>2</sup> | 10 <sup>3</sup> | ≥10 <sup>4</sup> |                  | <10 <sup>2</sup>                       | 10 <sup>2</sup> | 10 <sup>3</sup> | ≥10 <sup>4</sup> |                  |
| Spices            | 117           | 1                                      | 6               | 6               | 2                | 102              | 5                                      | 3               | 4               | 4                | 101              |
| Starch            | 42            | 15                                     | 12              | 1               | 1                | 13               | 8                                      | 6               | 2               |                  | 26               |
| Vegetable protein | 34            | 6                                      | 8               | 2               |                  | 18               | 6                                      | 10              | 1               | 1                | 16               |
| Sugar             | 21            | 5                                      | 1               |                 |                  | 15               | 1                                      | 1               |                 |                  | 19               |
| Total             | 214           | 27                                     | 27              | 9               | 3                | 148              | 20                                     | 20              | 7               | 5                | 162              |

Note : Figures in the table indicate the number of samples.

Table 4. Grouping of *Clostridium* Species Obtained from Spices, Starch, Vegetable Protein and Sugar.

| Group | No. of isolates |        |                   |       |           |
|-------|-----------------|--------|-------------------|-------|-----------|
|       | Spices          | Starch | Vegetable protein | Sugar | Total(%)  |
| I     | 1               |        |                   |       | 1( 0.3)   |
| II    | 94              | 46     | 51                | 3     | 194(49.7) |
| III   | 4               | 1      | 4                 | 2     | 11( 2.8)  |
| IV    | 3               | 3      | 3                 |       | 9( 2.3)   |
| V     | 16              | 7      | 7                 | 1     | 31( 7.9)  |
| VI    |                 | 1      |                   |       | 1( 0.3)   |
| VII   | 33              | 49     | 39                | 1     | 122(31.3) |
| VIII  | 1               | 1      | 7                 | 2     | 11( 2.8)  |
| IX    | 1               | 6      | 3                 |       | 10( 2.6)  |
| Total | 153             | 114    | 114               | 9     | 390(100)  |

で、これら2群で全分離株の80%以上を占めた。このような傾向は未加熱、加熱の別なく香辛料、でん粉および植物性蛋白に共通して認められた。この内ⅡおよびⅦ群中に同一性状を示す菌株が多数認められたので、それら菌株の性状をさらに検討した結果、Ⅱ群では *C. bifermentans* (115株)と推定される菌株および *C. perfringens* (62株)、Ⅶ群では *C. butyricum* (53株)と推定される菌株が多数認められた。この内、*C. perfringens* は大半が香辛料から分離されたもので、Hobbs 1, 10および15型に型別される株が6株同定された。なお、*C. botulinum* と同定された菌株はなかった。

#### 考 察

わが国で生産される食肉および魚肉ねり製品は、一部を除いてその製造過程で一定の条件で加熱することが義

務付けられているため、製造直後の製品中に耐熱性のない菌が存在することはほとんどない。しかし、芽胞菌に汚染された植物性副原料を使用した場合は、加熱後も生残した芽胞が製品の品質劣化の原因になることが報告されている<sup>1,4)</sup>。また、芽胞菌中 *B. cereus*, *C. botulinum*, *C. perfringens* などの芽胞が製品中に残存して、これらが発芽し増殖した場合は食中毒発生の原因になる危険性も十分考えられる。

*Bacillus* 属芽胞の汚染状況について今回の成績をみると、製造工程で80℃以上の熱がかかる砂糖は検出率、菌数ともに低かった。これに反して、物性が変化するという理由からあまり加熱されてないでん粉や植物性蛋白は菌数こそ低かったが、ほぼ60%の検体が陽性であった。香辛料もほとんどが殺菌済みとして工場に納入されたものであったが、1,000/g 以上のものがかなりあり、従来から芽胞菌汚染が高いとされている<sup>2,3,9-11)</sup> ブラックペッパーなどに10<sup>6</sup>/g レベルのものも認められた。しかし、これら芽胞は100℃で10分間加熱すると大半が死滅したという事実から、製造基準に適合した香辛料を使用したといえども、製品加工時の実際の加熱条件からみて、かなりの数の *Bacillus* 属が最終製品に移行する可能性があることが示唆された。

従来、香辛料やでん粉を汚染する *Bacillus* 属の主要菌種は *B. subtilis* と云われているが<sup>1,4,10,12)</sup>、今回これらの原料から最も多く分離された菌種は *B. licheniformis* であった。しかし、両者は非常に性状が類似しているところから、これら2菌種が香辛料やでん粉を汚染する主要 *Bacillus* 属と考えられる。一方、香辛料中に高率に分布することが報告<sup>12,13)</sup>されている *B. cereus* は調査した香辛料からは全く分離できず、わずかにでん粉と植物性蛋白から3株同定されたにすぎなかった。しかし、本

菌は食中毒を起こす好気性芽胞菌として注目されており<sup>14)</sup>、今回の成績のみで副原料中の汚染を無視すべきではないと考える。

*Clostridium* 属の汚染状況についてみると、いずれの副原料も 1,000/g 以下で、Karlson<sup>15)</sup>や Jelseth<sup>11)</sup>の報告同様 *Bacillus* 属に比較して 2~3 オーダー低い菌数であった。両者の間には相関性が認められ、一般的に *Bacillus* 属芽胞数の多いものは *Clostridium* 属も検出される傾向がみられた。また、植物性蛋白や香辛料は未加熱、加熱両材料の *Clostridium* 属の検出状況にあまり差がなかったことは、これら副原料中の本菌属の大部分が芽胞であることを示していた。特に植物性蛋白は動物性加工食品の改良ならびに増量剤として広く使用されているが、*Clostridium*, *Bacillus* 属芽胞ともに検出されるものが多かったことは注目すべきことであり、今後他の副原料同様衛生面での規格を設定する必要があると考える。

*Clostridium* 属の種類であるが、今回の分離菌株の性状が広範囲にわたっていたことから、副原料には非常に多種類の菌種が分布していることが推測された。しかし、著者らが試みたように分離菌を 5 つの生物学的性状により 9 群別してみると、各群の菌株数に片寄りがみられ、*C. bifermentans*, *C. perfringens*, *C. butyricum* の 3 菌種が主要菌種であった。この内、*C. perfringens* はその大半が香辛料から分離されたこと、Powers<sup>16)</sup>も香辛料から本菌種を多数分離していることなどから、香辛料中に広く分布していると思われる。同時に、今回調査した香辛料のほとんどがガス殺菌などにより殺菌済みのものであったことは、現在実施されている殺菌法が *C. perfringens* に対してあまり有効でないことを示唆するものであり、今後香辛料の殺菌法について再検討が望まれる。なお、*C. perfringens* 以外は食中毒と直接結びつくと思われる菌種は同定されなかったが製品の品質劣化に結びつくと思われる蛋白やでん粉分解菌が多数認められた。

以上のことから、動物性加工食品の芽胞菌対策を実施するにあたり、製品中の芽胞菌の汚染源として植物性副原料も重要な役割を果たしていることは明らかである。この際、*Bacillus* 属同様 *Clostridium* 属芽胞の存在も無視できない。しかし、現状ではこれら芽胞を副原料から完全に排除することは困難であるため、できるだけ芽胞汚染の少ないものを使用し、また製品については残存しているかもしれない芽胞の発芽および増殖を抑制することが芽胞菌による事故を未然に防止する上で重要

なことを考える。

## 要 約

食肉製品工場から主として採取した砂糖、でん粉、香辛料および植物性蛋白計 214 例を対象に、*Bacillus* 属芽胞および *Clostridium* 属の汚染実態調査を行った。

その結果、*Bacillus* 属芽胞は 75℃ で 20 分間加熱材料では 102 例 (47.7%) から検出され、でん粉と植物性蛋白は半数以上が陽性であった。これらの菌数は 29 例が 1,000/g 以上で、この内の 28 例は香辛料であった。しかし、100℃ で 10 分間加熱では 12 例 (5.6%) が陽性で、この内 1,000/g 以上のものはブラックペッパー 1 例のみであった。これらからの分離菌は原料の種類および加熱条件の別なく *B. licheniformis* が最も多く、次いで *B. subtilis*, *B. megaterium* などが主要菌種であった。

一方、*Clostridium* 属は未加熱材料の 66 例 (30.8%)、75℃ 加熱の 52 例 (24.3%) から検出され、*Bacillus* 属同様でん粉と植物性蛋白の陽性率が高かったが、菌数はいずれの原料も *Bacillus* 属芽胞数よりほぼ 2~3 オーダー低かった。これらからの分離株は原料および加熱の別なく *C. bifermentans* が最も多く、次いで *C. perfringens*, *C. butyricum* など広範囲の菌種が認められた。

(本研究の概要は日本食品衛生学会第 42 回学術講演会 1981 年 11 月で発表した。)

## 文 献

- 1) 木俣正夫、曾々木淑子：日水誌, 22(4), 269, 1956
- 2) 松倉十一：化学と生物, 8(4), 217, 1970
- 3) 金子精一、高橋 久、鶴田益清、山田澄男、野沢竜子、光崎研一：麻布獣医科大学研究報告, 24, 103, 1972
- 4) Palumbo, S. A., Rivenburgh, A. I., Smith, J. L. and Kissinger, J. C. : *J. appl. Bact.*, 38, 99, 1975
- 5) 神保勝彦、小久保弥太郎、村上 一、山田 満：日本食品衛生学会第 42 回学術講演会要旨集, 27, 1981
- 6) Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., 529, 1974, Williams & Wilkins, Baltimore
- 7) Holdeman, L. V., Cato, E. P. and Moore, W. E. : *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th ed., 1977, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia
- 8) 鈴木祥一郎、上野一恵：臨床嫌気性菌マニュアル, 1979, 日水製薬
- 9) Christensen, C. M., Fanse, H. A., Nelson, G. H., Bates, F. and Mirocha, C. J. : *Appl. Microbiol.*,

- 15(3), 622, 1967
- 10) 上田成子, 桑原祥浩 : 栄養と食糧, 31(5), 469, 1978
- 11) Julseth, R. M. and Deibel, R. H. : *J. Milk Food Technol.*, 37(8), 414, 1974
- 12) Seenappa, M. and Kempton, A. G. : *J. appl. Bact.*, 50, 225, 1981
- 13) Powers, E. M., Latt, Y. G. and Brown, T. : *J. Milk Food Technol.*, 39 (10), 668, 1976
- 14) Goepfert, J. M., Spira, W. M. and Kim, H. U. : *J. Milk Food Technol.*, 35(4), 213, 1972
- 15) Karlson, K. E. and Gunderson, M. F. : *Food Technol.*, 19, 86, 1965
- 16) Powers, E. M., Lawyer, R. and Masuoka, Y. : *J. Milk Food Technol.*, 38(11), 683, 1975



## *Bacillus cereus* の生物型とその芽胞の熱抵抗性

神 保 勝 彦\*, 小久保 彌太郎\*

### Biological Typing of *Bacillus cereus* Isolates and Heat Tolerance of Their Spores

KATSUHIKO JINBO\* and YATARO KOKUBO\*

An attempt was made to classify the isolates of *Bacillus cereus* by using the combination of 3 biochemical characteristics of the organisms, such as hydrolysis of starch, reduction of  $\text{NO}_3^-$  to  $\text{NO}_2^-$ , and decomposition of urease. Consequently, 370 strains of *B. cereus* isolated from meat and fish products were classified under 7 biotypes, i. e., 219 strains (59.2%) as type 2, 50 (13.5%) as type 6, 49 (13.2%) as type 3, 25 (6.8%) as type 4, 12 (3.2%) as type 5, 10 (2.7%) as type 1, and 5 (1.4%) as type 7.

In contrast to the food isolates, 17 strains from food poisoning outbreaks were typed as two particular biotypes, viz., 15 strains as type 6 and 2 strains as type 7. This is highly suggestive that these two biotypes have some close connection with the development of enteropathogenicity of the organisms.

With regard to the heat stability of the spores produced by the organisms, it was found that the spores produced by the strains of type 6 and 7 were more resistant to heating than those produced by other types of the organism.

**Keywords:** *Bacillus cereus*, biotype, starch hydrolysis, spore, heat tolerance

#### 緒 言

最近、食中毒起因菌として注目されている *Bacillus cereus* の生物学的性状については、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第8版<sup>1)</sup>および Agriculture Handbook No. 427<sup>2)</sup>などに詳しく記載されている。また、本菌を食品中から分離し同定する方法は、東<sup>3,4)</sup>、Goepfertら<sup>5)</sup>および村上<sup>6)</sup>などにより報告されている。ところが、これらに基づいて分離、同定された *B. cereus* は、きわめて多彩な生物性状の菌群を包含し、しかも、これらすべての *B. cereus* が食中毒に関与するのか、あるいは特定の性状を有するものだけなのか、明らかにされていないのが実状である。*B. cereus* を簡易な方法で分類でき、かつ、食中毒起因菌が鑑別されれば、本菌食中毒予防対策に有効である。しかし、これまでに報告されている生物型<sup>4,7)</sup>および血清型<sup>8-11)</sup>による分類方法は、いずれも操作が繁雑であり日常検査には用いにくい難点がある。そのため、本菌食中毒の疫学および食品細菌学などから、本菌を分類するための簡易な方法の開発が望

まれている。

そこで、著者は、現在 *B. cereus* として扱われている菌株を用いて、詳細にその性状を調べ、本菌を簡易な方法による生物型で分類することを試みた。その結果、本菌をデンプン分解能、硝酸塩還元能および尿素分解能の3生物性状パターンによって7群に分類することができた。この型別法を用いて、食品由来の多数の菌株および食中毒由来菌株を型別し比較検討した。併せて、本菌食中毒は加熱食品を原因食とする事例が多いことから、本菌の芽胞の熱抵抗性、特に生物型によって熱抵抗性に違いがあるかどうかを調べた。

#### 材料および方法

##### 1. 供試菌株

生物型の試験に供試した菌株は、食肉製品由来150株、魚肉ねり製品由来220株、当研究所細菌第1研究科と大阪府立公衆衛生研究所から分与された食中毒由来17株および Taylor らが *B. cereus* 食中毒の血清型別に用いた菌株18株（当研究所細菌第1研究科、寺山博士を通し

\* 東京都立衛生研究所生活科学部肉肉衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

て分与された)の計405株である。

## 2. 生物学的性状試験

供試菌株を普通寒天斜面に30°20時間培養し、これを接種菌とし以下の生物性状について試験した。

1) デンブ分解能 1%可溶性デンプン加普通寒天平板に供試菌を画線塗抹し、30°20時間培養した後、菌苔を半分かき取り、ルゴール液約2mlを平板上に注加した。この時、画線部下側から周辺まで透明域を呈した場合を陽性、透明域を全く示さない場合を陰性と判定した。

2) 硝酸塩還元能 小試験管に分注した0.1% KNO<sub>3</sub>加普通ブイヨン3mlに供試菌を接種し、30°20時間培養後、硝酸塩還元用試液AおよびBを各1mlずつ添加した。この時、赤色を呈した場合を陽性と判定した。赤色を示さなかった場合は、亜鉛末を一耳掻加え、赤色となれば陰性、無色のままであれば陽性と判定した。

試液A: α-ナフチールアミン0.1gを5N酢酸水180mlに溶かしたもの

試液B: スルファニール酸0.5gを5N酢酸水150mlに溶かしたもの

3) 尿素分解能 小試験管に分注した尿素培地(栄研化学)0.5mlに供試菌を接種し、30°20時間培養後、深紅色を呈した場合を陽性、無変化の場合を陰性と判定した。

## 3. 芽胞の熱抵抗性

供試菌をNGKG寒天平板<sup>12,13)</sup>で30°5日間培養し、芽胞が90%以上形成されていることを鏡検で確認後、芽胞が1ml中10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>個となるように滅菌生理食塩水に懸濁し、これを被検液とした。各希釈段階の被検液をより均一条件で加熱するために、各1mlずつ計28個のガラスアンプル(注射用1ml)に封入し、80°および90°の水浴中に8個ずつ、100°の水浴中に12個浸漬した。80°および90°では15, 30, 45, 60分、100°では5, 10, 15, 20, 25, 30分加熱した後、2個ずつ取り出して急冷した。次に、アンプル中の芽胞浮遊液全量を普通ブイヨンに接種し、菌の増殖が認められた場合を耐熱性ありと判定した。

## 実験成績

### 1. 供試菌株の生物型

*B. cereus*を生物型で分類することを目的として生物性状を検討すると、分類のためにはデンプン分解能、硝酸塩還元能および尿素分解能の3性状が鍵であり、そのパターンによって7生物型に分類できることが判った。この方法で供試菌を由来別に分類してみるとTable1の

Table 1. Biotype of the 405 *B. cereus* Isolates and Origin of Strains

| Biotype          | Biochemical characteristics |                   |                    | Source of the strains |               |                |                              |
|------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|---------------|----------------|------------------------------|
|                  | Starch hydrolysis           | Nitrate reduction | Urea decomposition | Meat products         | Fish products | Food poisoning | Pilot strains for serotyping |
| 1                | +                           | +                 | +                  | 4                     | 6             |                | 1                            |
| 2                | +                           | +                 | -                  | 81                    | 138           |                | 11                           |
| 3                | +                           | -                 | +                  | 2                     | 47            |                |                              |
| 4                | +                           | -                 | -                  | 17                    | 8             |                |                              |
| 5                | -                           | +                 | +                  | 10                    | 2             |                |                              |
| 6                | -                           | +                 | -                  | 32                    | 18            | 15             | 5                            |
| 7                | -                           | -                 | -                  | 4                     | 1             | 2              | 1                            |
| Number of strain |                             |                   |                    | 150                   | 220           | 17             | 18                           |

通りであった。すなわち、食肉製品、魚肉ねり製品由来株はともに2型が最も多く、それぞれ150株中81株(54.0%)、220株中138株(62.7%)であった。以下、食肉製品由来株では6型32株(21.3%)、4型17株(11.3%)、魚肉ねり製品由来株では3型47株(21.4%)で、それら以外の残りの生物型に占める菌株の割合はいずれも10%以下であった。これに対して、食中毒由来株は6型が17株中15株(88.2%)と圧倒的に多く、残りの2株は7型であった。また、Taylorらの血清型別用菌株は2型が18株中11株(61.1%)と最も多く占め、以下、6型5株(27.8%)、1型と7型が各々1株ずつであった。なお、血清型別用菌株のうちの食中毒由来8株は、2型3株、6型4株、7型1株であった。

食中毒由来株の生物型と食中毒症状の関係はTable2のとおりであった。すなわち、嘔吐型を示した11株はすべて6型であったのに対して、下痢型の6株は6型4株、7型2株であった。一方、血清型別用菌株のうち食中毒由来8株は、嘔吐型3株は6型2株、7型1株であり、下痢型5株は2型3株、6型2株であった。

### 2. 芽胞の熱抵抗性

*B. cereus*の芽胞がどの程度の加熱温度および加熱時間に耐えるかを知る目的で、血清型別用菌株のうちのNo.4433(2型)とNo.88(6型)の2株を用いて、基礎的検討を行いその結果をTable3に示した。両菌株は80°および90°の加熱では同様の傾向を示し、差は認めら

Table 2. Biotype and Heat Resistance of *B. cereus* Strains Originated from Food Poisoning Outbreaks or Pilot Strains for Serotyping

| Strains from food poisoning outbreaks |                     |         |                                        |                     | Pilot strains for serotyping |                     |         |                                        |                     |
|---------------------------------------|---------------------|---------|----------------------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|---------|----------------------------------------|---------------------|
| Strain no.                            | Food poisoning type | Biotype | 100°C for 15min<br>10 <sup>6</sup> /ml | 10 <sup>7</sup> /ml | Strain no.                   | Food poisoning type | Biotype | 100°C for 15min<br>10 <sup>6</sup> /ml | 10 <sup>7</sup> /ml |
| 1                                     | Diarrhea            | 7       | 2/2                                    | 2/2                 | 88                           | Vomiting            | 6       | 2/2                                    | 2/2                 |
| 2                                     | Vomiting            | 6       | 0/2                                    | 1/2                 | 4433                         | Diarrhea            | 2       | 0/2                                    | 0/2                 |
| 3                                     | Diarrhea            | 7       | 2/2                                    | 2/2                 | 214                          | Vomiting            | 6       | 1/2                                    | 2/2                 |
| 4                                     | Vomiting            | 6       | 2/2                                    | 2/2                 | 264                          |                     | 2       | 0/2                                    | 0/2                 |
| 5                                     | Vomiting            | 6       | 2/2                                    | 2/2                 | 186                          | Vomiting            | 7       | 0/2                                    | 1/2                 |
| 6                                     | Vomiting            | 6       | 2/2                                    | 2/2                 | CAN30                        | Diarrhea            | 2       | 0/2                                    | 0/2                 |
| 7                                     | Vomiting            | 6       | 2/2                                    | 2/2                 | 277                          |                     | 2       | 0/2                                    | 0/2                 |
| 8                                     | Diarrhea            | 6       | 2/2                                    | 2/2                 | 4431                         | Diarrhea            | 6       | 1/2                                    | 2/2                 |
| 9                                     | Diarrhea            | 6       | 2/2                                    | 2/2                 | 4429                         | Diarrhea            | 6       | 2/2                                    | 2/2                 |
| 10                                    | Vomiting            | 6       | 2/2                                    | 2/2                 | 4432                         | Diarrhea            | 2       | 0/2                                    | 1/2                 |
| 11                                    | Vomiting            | 6       | 2/2                                    | 2/2                 | 2140                         |                     | 2       | 0/2                                    | 2/2                 |
| 12                                    | Vomiting            | 6       | 1/2                                    | 2/2                 | 118                          |                     | 6       | 2/2                                    | 2/2                 |
| 13                                    | Vomiting            | 6       | 2/2                                    | 2/2                 | 167                          |                     | 2       | 0/2                                    | 1/2                 |
| 14                                    | Vomiting            | 6       | 2/2                                    | 2/2                 | 262                          |                     | 2       | 1/2                                    | 2/2                 |
| 15                                    | Vomiting            | 6       | 2/2                                    | 2/2                 | R R 60                       |                     | 2       | 0/2                                    | 2/2                 |
| 16                                    | Diarrhea            | 6       | 2/2                                    | 2/2                 | R R 43                       |                     | 2       | 0/2                                    | 0/2                 |
| 17                                    | Diarrhea            | 6       | 2/2                                    | 2/2                 | 202                          |                     | 2       | 0/2                                    | 0/2                 |
|                                       |                     |         |                                        |                     | 6833                         |                     | 1       | 0/2                                    | 0/2                 |

Note : Number of positives/number tested

Table 3. Heat Resistance of Strain No. 4433 (Biotype 2) and Strain No. 88 (Biotype 6) of Pilot Strains for Serotyping

| Strain                  | No. of cells/ml | Resistant strains against heating at |     |     |         |      |     |     |         |       |     |     |     |     |         |
|-------------------------|-----------------|--------------------------------------|-----|-----|---------|------|-----|-----|---------|-------|-----|-----|-----|-----|---------|
|                         |                 | 80°C                                 |     |     |         | 90°C |     |     |         | 100°C |     |     |     |     |         |
|                         |                 | 15                                   | 30  | 45  | 60 min. | 15   | 30  | 45  | 60 min. | 5     | 10  | 15  | 20  | 25  | 30 min. |
| No. 4433<br>(Biotype 2) | 10 <sup>4</sup> | 2/2                                  | 2/2 | 0/2 | 0/2     | 2/2  | 2/2 | 0/2 | 0/2     | 0/2   | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2     |
|                         | 10 <sup>5</sup> | 2/2                                  | 2/2 | 2/2 | 0/2     | 2/2  | 2/2 | 0/2 | 0/2     | 1/2   | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2     |
|                         | 10 <sup>6</sup> | 2/2                                  | 2/2 | 1/2 | 2/2     | 2/2  | 2/2 | 1/2 | 0/2     | 1/2   | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2     |
|                         | 10 <sup>7</sup> | 2/2                                  | 2/2 | 2/2 | 2/2     | 2/2  | 2/2 | 2/2 | 0/2     | 2/2   | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2     |
| No. 88<br>(Biotype 6)   | 10 <sup>4</sup> | 2/2                                  | 2/2 | 1/2 | 0/2     | 2/2  | 1/2 | 0/2 | 0/2     | 2/2   | 1/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2     |
|                         | 10 <sup>5</sup> | 2/2                                  | 2/2 | 1/2 | 0/2     | 2/2  | 2/2 | 0/2 | 0/2     | 2/2   | 2/2 | 1/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2     |
|                         | 10 <sup>6</sup> | 2/2                                  | 2/2 | 2/2 | 1/2     | 2/2  | 2/2 | 2/2 | 0/2     | 2/2   | 2/2 | 2/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2     |
|                         | 10 <sup>7</sup> | 2/2                                  | 2/2 | 2/2 | 2/2     | 2/2  | 2/2 | 2/2 | 0/2     | 2/2   | 2/2 | 2/2 | 1/2 | 0/2 | 0/2     |

Note : Number of positives/Number tested

れなかったのに対し, 100°の加熱では明らかな差が認められた。すなわち, 両菌株はともに80°および90°の加熱に対し, 菌数が10<sup>5</sup>/mlでは30分, 10<sup>6</sup>/mlでは80° 60分, 90° 45分に抵抗性を示した。一方, 100°の加熱では,

No. 4433株は菌数に関係なく10分ですべて死滅したのに対し, No. 88株は10<sup>5</sup>/mlでは10分, 10<sup>6</sup>/mlでは15分, 10<sup>7</sup>/mlでは20分の加熱に抵抗性を示した。

この実験から10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>/mlの菌数を100° 15分加熱した

Table 4. Heat Resistant of *B. cereus* Strains Originated from Meat and Fish Products at 100°C for 15 min.

| Source        | No. of cells/ml | Biotype |       |      |      |     |       |     |
|---------------|-----------------|---------|-------|------|------|-----|-------|-----|
|               |                 | 1       | 2     | 3    | 4    | 5   | 6     | 7   |
| Meat products | 10 <sup>6</sup> | 0/4     | 2/30  | 1/2  | 5/15 | 1/8 | 14/20 | 2/4 |
|               | 10 <sup>7</sup> | 1/4     | 4/30  | 1/2  | 6/15 | 2/8 | 17/20 | 3/4 |
| Fish products | 10 <sup>6</sup> | 1/6     | 5/30  | 5/15 | 3/8  | 0/2 | 11/15 | 0/1 |
|               | 10 <sup>7</sup> | 2/6     | 12/30 | 7/15 | 4/8  | 1/2 | 13/15 | 1/1 |

Note : Number of positives/Number of strains tested

場合に、最も顕著に差が出ることが判ったので、各生物型菌株の芽胞の熱抵抗性比較試験をこの加熱条件で、食肉製品由来83株、魚肉ねり製品由来77株の計160株を代表株として行い、その結果をTable 4に示した。生物型のなかで最も多く熱抵抗性を示したのは6型の菌株で35株中10<sup>6</sup>/mlでは25株(71.4%)、10<sup>7</sup>/mlでは30株(85.7%)、次が7型で5株中10<sup>6</sup>/mlでは2株(40.0%)、10<sup>7</sup>/mlでは4株(80.0%)が抵抗性を示した。以下、3型が17株中10<sup>6</sup>/mlでは6株(35.3%)、10<sup>7</sup>/mlでは8株(47.1%)、4型が23株中10<sup>6</sup>/mlでは8株(34.8%)、10<sup>7</sup>/mlでは10株(43.5%)が抵抗性を示し、1型、2型および5型で熱抵抗性を示したのは、いずれも30%以下であった。

食中毒由来株および血清型別用菌株の熱抵抗性試験も同様の方法で行い、その結果はTable 2に示した。食中毒由来17株(6型15株、7型2株)は10<sup>6</sup>/mlでは16株、10<sup>7</sup>/mlでは全株が抵抗性を示した。血清型別用菌株は6型の5株が10<sup>6</sup>/mlで全株、7型の1株は10<sup>7</sup>/mlで抵抗性を示したのに対し、それら以外の生物型の12株は10<sup>6</sup>/mlで1株、10<sup>7</sup>/mlで5株が抵抗性を示したにすぎなかった。

#### 考 察

現在、*B. cereus* と呼ばれている菌種は、きわめて多彩な性状の菌群を包含していることから、本菌を分類しようとする試みがなされており、これまでに東<sup>4)</sup> および小佐々<sup>7)</sup> が生物性状パターンによって分類する方法を報告している。しかし、これらの生物型別法は操作が複雑であり、結果を得るまでの所要時間が長いため日常検査には用いられていないのが現状である。今回著者が提案した方法は、デンプン分解能を鍵とし、これに硝酸塩還元能と尿素分解能を加えた3生物性状パターンで分類する方法である。これら3性状試験はいずれも操作が容易で迅速かつ明確に判定できることから、本法はこれま

での方法に比べて簡易かつ迅速であるので、日常検査の一環として実施し得る方法であると考えられる。3性状の中で特にデンプン分解能は、Bergey's Manual 第8版<sup>1)</sup> および Agriculture Handbook No. 427<sup>2)</sup> などにはいずれも陽性として記載されている。しかし、著者らがこれまでにに行った調査成績では、各種食品から分離された本菌の約15%がデンプン分解能陰性であった。また、品川<sup>13)</sup> および小佐々<sup>7)</sup> も陰性株を分離している。これらのことから、*B. cereus* にはデンプン分解陽性と陰性の菌種が存在することは確かである。さらに、今回の成績から食中毒由来株および Taylor らの血清型別用菌株の中の嘔吐型食中毒由来の菌株は、全てデンプン分解陰性であることが判った。そして、小佐々<sup>7)</sup> および品川<sup>13)</sup> の報告でも食中毒由来株はデンプン分解陰性であることなどから、この性状は食中毒起因菌を鑑別する鍵になるものと考えられる。

3生物性状パターンにより、由来の異なる多数の *B. cereus* の分類を試みた結果、7生物型に型別できることが判った。この方法で、動物性加工食品および食中毒由来の *B. cereus* を型別し比較すると、動物性加工食品由来株のほぼ60%が2型に属したのに対し、食中毒由来株の大部分は6型であり、他は7型であった。また、血清型別用菌株のうちの嘔吐型由来の菌も6型と7型であった。このことは、食中毒由来株はそれ以外の菌と明らかに異なる生物性状を有することを示唆しており、著者の型別法によれば、食中毒起因菌はデンプン分解陰性である6型と7型に限定されるようである。今回の成績だけで、6型および7型の菌株を食中毒起因菌として扱うべきか否かは結論できないが、これらの生物型に属する菌株が食中毒を起こす可能性が高いという見方もできる。一方、血清型別用菌株のうちの下痢型由来の菌がデンプン分解陽性の2型に型別されたが、この生物型は動

動物性加工食品由来株の主要菌型であり、小佐々ら<sup>7)</sup>も食中毒由来株のうち病原性が疑わしいと述べている菌株は、デンプン分解陽性であることなどから、2型に属する菌種を食中毒起因菌として扱うには難点が残る。この種の菌株については、疫学的に証明するとか毒素産生性を検討した上で食中毒起因菌として意義づけしていかなければならないと考える。

*B. cereus* の芽胞は一般的に高い熱抵抗性を示すことが知られており、今回の成績では特に6型と7型の菌がそれら以外の生物型の菌に比較して、高い熱抵抗性を示すものが多いことが判った。また、品川ら<sup>14)</sup>もデンプン分解陰性の食中毒由来株は熱抵抗性が高いことを報告している。これらのことから、デンプン分解陰性の菌株、すなわち6型および7型の菌はそれら以外の生物型の菌種よりも、加熱処理後の食品に残存する可能性が高いことが予想される。そのため、加熱食品においては衛生学的品質管理上、特にこれらの汚染防止、増殖抑制に十分な注意を払わねばならない。

以上、今回の生物型による分類は主として動物性加工食品由来株を対象としたもので、今後植物性食品由来株についても調査し、デンプン分解陰性株すなわち6型および7型の菌種の汚染状況を把握する必要がある。他方、*B. cereus* のすべてが食中毒原性を有するかどうかは今後の研究課題であるが、特に食中毒起因菌となる可能性の高い6型および7型の菌と食中毒原性の関係について、早急に究明していく必要がある。

#### 要 約

*B. cereus* を分類するための簡易な方法を開発する目的で、*B. cereus* の生物性状を観察し生物型による分類を試みた結果、デンプン分解能、硝酸塩還元能および尿素分解能が鍵になることが判った。

この3生物性状パターンによって *B. cereus* を7生物型に分類した。

動物性加工食品由来、食中毒由来および血清型別用菌株などの計405株をこの生物型別法で分類したところ、動物性加工食品由来株の約60%が2型に属したのに対し、食中毒由来株および血清型別用菌株のうち嘔吐型株

の大部分は6型に分類され、それ以外は7型であった。

*B. cereus* の芽胞の熱抵抗性を生物型別に比較したところ、80°および90°の加熱では生物型による差は認められなかったが、100°の加熱に対しては6型および7型の菌種が他の生物型よりも抵抗性を示すものが多かった。

#### 文 献

- 1) Mollaret, H. H. and Thal, E. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th edition p 532, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1974
- 2) Gordon, R. E., Haynes, W. C. and Pang, C. H. : *Agriculture Handbook No. 427*, p23, U. S. Dept. of Agriculture, 1973
- 3) 東 量三 : ニューフードインダストリー, 4 : No9, 67, 1962
- 4) 東 量三 : ニューフードインダストリー, 4 : No10, 61, 1962
- 5) Goepfert, J. M. and Kim, H. : *J. Milk Food Technol.*, 35 : 213, 1972
- 6) 村上 一 : モダンメディア, 23, 131, 1977
- 7) 小佐々学, 和気迪子, 東 量三 : 東獣畜誌, 25, 38, 1977
- 8) Taylor, A. J. and Gilbert, R. J. : *J. Med. Microbiol.*, 8 : 543, 1975
- 9) 小佐々学, 和気迪子, 東 量三 : 東獣畜誌, 25, 43, 1977
- 10) 寺山 武, 新垣正夫, 山田澄夫, 潮田 弘, 五十嵐英夫, 坂井千三, 善養寺 浩 : 食衛誌, 19, 98, 1978
- 11) 品川邦汎, 国田信治, 大中隆史, 武政二郎 : 食衛誌, 21, 266, 1980
- 12) 神保勝彦, 松本昌雄, 村上 一 : 東京衛研年報, 29-1, 158, 1978
- 13) 神保勝彦 : メディヤサークル, 25, 37, 1980
- 14) 品川邦汎, 国田信治, 佐々木寧, 岡本晃 : 食衛誌, 20, 431, 1979

## 動物性食品より分離した黄色ブドウ球菌の性状について

### —各種由来菌株の性状の比較—

庭山 邦子\*, 村上 一\*, 篠原 楷\*\*

加藤 喜市\*\*, 田村 延一\*\*, 土屋 伸久\*\*

## Biological Properties of *Staphylococcus aureus* Isolated from Food of Animal Origin

### —Comparison of Characteristics of the Isolates from Different Sources—

KUNIKO NIWAYAMA\*, HAJIME MURAKAMI\*, TADASHI SHINOHARA\*\*,  
KIICHI KATO\*\*, NOBUKAZU TAMURA\*\* and NOBUHISA TSUCHIYA\*\*

Sixty strains of *S. aureus* were isolated from 12 out of 13 samples of frozen liquid whole eggs produced in Japan; and 87 strains were isolated from 19 samples out of 67 raw meat samples obtained from slaughter houses. The properties of these strains derived from food samples of animal materials were studied in comparison with those of 47 strains obtained in the food poisoning incident caused by cooked rice-balls.

The strains obtained from the frozen liquid eggs and the raw meat had over 40 % of untypable strains by coagulase typing, and  $\beta$  type (including  $\beta\sigma$ ,  $\alpha\beta\sigma$  type) hemolysin producing strains characteristic in animal derived strains were present by 23.3 %, and 56.3 % respectively. They were different from the strains obtained from the human sources (the food poisoning outbreaks). Streptomycin resistant strains were detected in the samples derived not only from chickens but from other animals, but not in the samples obtained from humans.

**Keywords:** frozen liquid whole egg, *Staphylococcus aureus*, hemolysin, coagulase type, drug resistance, raw meat, food poisoning

### はじめに

黄色ブドウ球菌は自然界に広く分布しており、各種動物も高率に本菌を保菌していることが知られている。それと関連して動物性食品からも、しばしば本菌が検出され、それ等を原因食とした食中毒事故が毎年報告されている<sup>1,2)</sup>。

我々は、卵加工品のみならず家庭で調理される卵料理からも食中毒事故が発生していることに注目し、鶏卵およびその加工品における黄色ブドウ球菌の汚染実態と、それらからの分離菌株の性状を検討した<sup>3-5)</sup>。その成績では、食中毒関連参考検体の冷凍鶏卵への汚染は、人間由来の菌によると思われる点が見られたこと、また液卵製造工程と卵加工工程においては、原料卵から製品となるまでの間、一貫して本菌による汚染を受ける機会があることを報告した。

本報では、国内産冷凍液卵と各種食肉から分離された

黄色ブドウ球菌の性状を検討すると共に、これら分離株と食中毒事例の各種関連材料から分離された菌株の性状を、それぞれ比較検討したので報告する。

### 材料および方法

#### 1) 調査対象

a. 国内産冷凍液卵：昭和55年6月から56年1月に、Fig.1で示してある国内9ヶ所で生産された、ロットの異なる13検体を用いた。

b. 生肉：昭和57年3月に、食肉衛生監視の一環として、食品監視機動班により、都内の食肉処理業者から収去され、当研究室へ搬入された鶏、豚および牛の生肉、鶏モツ、牛舌およびレバー等の合計67検体を用いた。

#### 2) 試料の調製

各検体10gに、滅菌リン酸緩衝食塩液(pH7.2)を90ml加え、ストマッカーで処理し、試料原液とした。

#### 3) 黄色ブドウ球菌の分離同定

\* 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 東京都衛生局食品衛生課

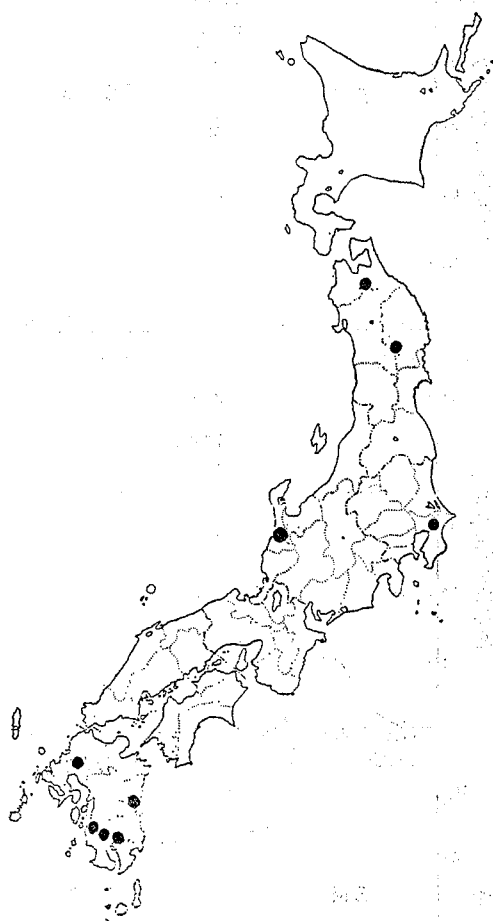


Fig. 1. Distribution of Factories (●) which produced Frozen Liquid Whole Eggs.

増菌培養には、7.5%食塩加ペプトン培地の倍濃度および普通濃度の培地を用い、以後は前報<sup>3)</sup>と同じく3%卵黄加マンニット食塩培地を用いて分離を行なった。コアグララーゼ産生能は、ウサギブラズマ(栄研)を用いて、ブラズマ凝固の有無により判定した。

#### 4) 食中毒事件関連株

1978年および1980年に、にぎりめしを原因食として、都内で発生した黄色ブドウ球菌食中毒事件の原因食品、患者の吐物および糞便それに調理器具等の拭取り材料から分離された、合計47株である。これらの菌株は、当所微生物部細菌第一研究科より分与されたものである。

#### 5) コアグララーゼ型別

前報<sup>4)</sup>と同じく、市販の黄色ブドウ球菌コアグララーゼ型別用免疫血清(デンカ生研)を用いて行なった。

#### 6) エンテロトキシンの検出

前報<sup>4)</sup>に準じて、分離菌株を Brain Heart Infusion broth (Difco) で培養し、市販の黄色ブドウ球菌エンテロトキシン検出用 RPHA キット(デンカ生研)を用いて、エンテロトキシン産生能の有無を検討した。

#### 7) 溶血活性

前報<sup>4)</sup>と同じく、ウサギ、ヒツジおよびヒトの赤血球に対する溶血活性を調べた。

#### 8) 薬剤感受性試験

日本化学療法学会の最小発育阻止濃度(MIC)の測定法(1974)<sup>5)</sup>に準じ、寒天平板希釈法で行なった。使用薬剤は、ベンジルペニシリン Na(PC-G)とストレプトマイシン(SM)である。

### 結 果

#### 動物性原料食品からの黄色ブドウ球菌の分離

国内産冷凍液卵13検体中、直接平板法あるいは増菌法で12検体が陽性となり、各検体より5株、合計60株を分離した。また食肉処理業からの生肉67検体中、直接平板法および増菌法で陽性となった19検体から、合計87株を分離した。

#### コアグララーゼ型

各検体より分離した黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型は Table 1 に示した。食中毒関連検体由来株の47株は、すべて型別可能でⅡ、ⅢそれにⅦ型に型別されている。一方、原料食品の冷凍液卵由来株は60株中24株(40%)が、また生肉由来株中64株(73.6%)が型別不能であった。

Table 1. Coagulase Types of *Staphylococcus aureus* Isolates from Three Sources

| Coagulase type | Number of strains by source (%) |          |                |
|----------------|---------------------------------|----------|----------------|
|                | Frozen liquid whole egg         | Raw meat | Food poisoning |
| I              | 1(1.7)                          | 2(2.3)   |                |
| II             | 11(18.3)                        | 3(3.4)   | 18(38.3)       |
| III            | 11(18.3)                        |          | 2(4.3)         |
| IV             |                                 | 7(8.0)   |                |
| V              |                                 |          |                |
| VI             |                                 |          |                |
| VII            | 13(21.7)                        | 8(9.2)   | 27(57.4)       |
| VIII           |                                 | 3(3.4)   |                |
| NT*            | 24(40.0)                        | 64(73.6) |                |
| Total          | 60(100)                         | 87(100)  | 47(100)        |

\* NT indicates the strains not typed

Table 2. Hemolysin Producibility of *S. aureus* Isolated from Three Sources

| Sources                 | Number of strain tested | Number of strains by hemolysin type (%) |                                               |              |
|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------|
|                         |                         | $\alpha$ , $\alpha\sigma$               | $\beta$ , $\beta\sigma$ , $\alpha\beta\sigma$ | not produced |
| Frozen liquid whole egg | 60                      | 46(76.7)                                | 14(23.3)                                      |              |
| Raw meat                | 87                      | 35(40.2)                                | 49(56.3)                                      | 3(3.4)       |
| Food poisoning          | 47                      | 39(83.0)                                | 9(17.0)                                       |              |

Table 3. Antibiotic Resistances of *S. aureus* Isolated from Three Sources against PC-G and SM.

| Sources                 | Number of Strains tested | Resistant strains(%)* |          |
|-------------------------|--------------------------|-----------------------|----------|
|                         |                          | PC-G                  | SM       |
| Frozen liquid whole egg | 60                       | 11(18)                | 17(28)   |
| Raw meat                | 87                       | 34(41.4)              | 29(37.9) |
| Food poisoning          | 47                       | 34(70.8)              | 0        |

\* Resistance : MIC  $\geq 25\mu\text{g/ml}$ 

## 溶血毒素産生性

冷凍液卵由来株は、ヒト由来株に特有の $\alpha$ 毒素産生株( $\alpha$ ,  $\alpha\sigma$  Type として)が76.7%, また動物由来株に特有の $\beta$ 毒素産生株( $\alpha\beta\sigma$  Typeとして)が23.3%であった。生肉由来株では、前者が40.2%, 後者が( $\beta$ ,  $\beta\sigma$  それに  $\alpha\beta\sigma$  Type として)56.3%, それに非産生株が3.4%含まれていた (Table 2)。

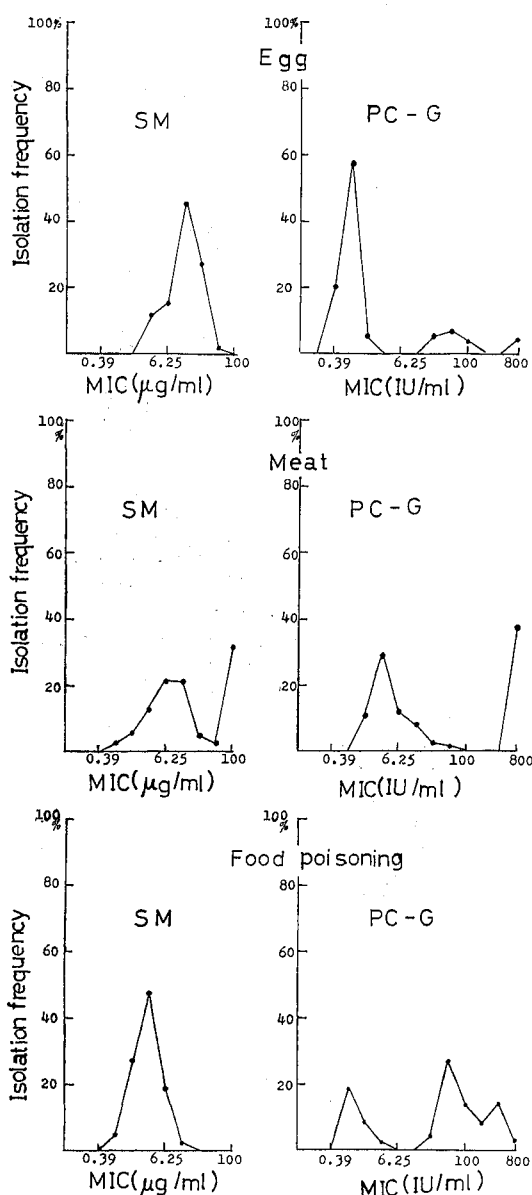
一方、食中毒関連検体由来株においては、 $\alpha$ 毒素産生株が83.0%であり、 $\beta$ 毒素産生株は17%であった。

## エンテロトキシン産生性

冷凍液卵由来の60株中、エンテロトキシンのA, B, Cのいずれか、あるいはその複数の毒素産生が認められたものは、22株(36.7%)であった。また生肉由来の87株中、49株(57.5%)がエンテロトキシンを産生した。

## 薬剤耐性

今回は、ニワトリの飼料中への使用が禁じられている、PC-GおよびSMについて検討を行なった(Table 3)。PC-Gに対しては食中毒関連検体由来株の70.8%が耐性を示したのに対して、原料食品の冷凍液卵、生肉では各々18%, 41.4%にすぎなかった。SMに対しては、冷凍液卵由来株で28%, 生肉由来株で37.9%が耐性を示したが、食中毒関連検体由来株では全く耐性株が認められなかった。

Fig. 2. MIC distribution of various antibiotics in 194 isolates of *S. aureus* from Egg (60 isolates), Meat (87 isolates) and Food poisoning outbreaks (47 isolates). Key for Abbreviations; PC-G=Penicillin G, SM=Streptomycin.

## 考 察

これまでに著者等は鶏卵およびその加工品等での、黄色ブドウ球菌の汚染実態を調査し、分離菌株について性



状の検討を行なって来ている<sup>3-5)</sup>。それらの結果から、食中毒関連参考検体の冷凍錦糸卵と、液卵製造工場あるいは卵加工工場から得られた菌株との間で、コアグラセ型、溶血活性それに薬剤耐性の点で、人間が関与する段階が多い検体と、それが少ない原料由来菌株との間の違いを推測した。

今回調査した、都内へ流通して来た、国内9ヶ所で生産された冷凍液卵からの分離菌株においても、コアグラセ型別不能株が40%以上存在し、動物由来株特有の $\beta$ 毒素産生株( $\alpha\beta\sigma$  Typeとして)が20%以上あり、さらにPC-G耐性株が18%と低いことから、原料液卵の段階での本菌による汚染は、前報で報告した冷凍錦糸卵の結果<sup>3)</sup>と対照的である。この国内産冷凍液卵由来の黄色ブドウ球菌が、動物由来(とくにニワトリ由来)あるいは自然界に普遍的に存在する本菌の特徴になり得るものか、他の由来株についても検討を試みた。

食肉処理業からの生肉と、にぎりめしが原因となった食中毒関連株とのコアグラセ型は、前者に型別不能株が高率に存在しているのに対して、後者では全く存在していないのが対照的であり、また溶血活性の点からも、生肉由来株で $\beta$ 毒素産生株が56.3%も存在しているのに対し、食中毒関連株あるいは前報での冷凍錦糸卵<sup>3)</sup>では20%以下の結果であったことから、生肉あるいは冷凍液卵では、動物固有の菌型による汚染のあることが推察される<sup>7)</sup>。

薬剤耐性の点では、動物性原料食品由来株と食中毒事故関連由来株との間で、SM耐性株の存在が異なり、後者で全くSM耐性株が存在しなかったのは、SMが第8脳神経障害等による副作用があるため、臨床分野での使用が行われなくなったからと思われる。また、過去において臨床上高頻度で使用されたPC-Gにおいて、その耐性株が、動物性原料に由来しない食中毒事故関連由来株で70%以上も存在し、食中毒関連参考検体の冷凍錦糸卵由来株<sup>3)</sup>でも77%であるが、動物性原料食品由来株においては20~40%にとどまっており、この両者間の差異は、興味ある結果であった。

以上の結果より、原料段階における本菌の汚染は、動物に由来していることが示唆された。

鈴木ら<sup>8,9)</sup>は、液卵の本菌による汚染実態および、それに起因する食中毒事故を防ぐため、殺菌法について検討を行ない報告している。しかし、それはグラム陰性菌には有効であるが、黄色ブドウ球菌に対しては完全ではなく、我々の調査による原料段階での汚染実態を考え合

わせると、今後液卵および卵加工品について、食中毒事故を未然に防止するための監視・指導、それに流通過程における調査を続けてゆくことが必要と思われる。

## 結 論

冷凍液卵13検体中、12検体から60株、食肉処理業からの生肉67検体中、19検体から87株を分離し、加えて、にぎりめし食中毒事故関連検体由来株の47株を用いて、動物性原料食品由来株と食中毒事故関連由来株との性状について、比較検討した。

冷凍液卵および生肉由来株は、コアグラセ型別不能株が40%以上存在し、また動物由来株特有の $\beta$ 毒素産生株がそれぞれ23.3%、56.3%も存在しており、ヒト由来性の検体から分離された菌株とは異なっていた。さらにSM耐性株は、ニワトリに限らず他の動物由来性検体からも検出されたが、ヒト由来性検体(食中毒事故関連検体)からは認められなかった。

謝辞 食中毒事故関連株を分与下さいました、当所微生物部細菌第一研究科科长 坂井千三博士に、また多くの御助言を戴きました当所微生物部細菌第二研究科科长 寺山 武博士に深謝致します。

(本研究は昭和56年度当研究所調査研究課題「動物性食品の黄色ブドウ球菌による汚染状況の把握に関する研究」として実施し、東京都衛生局学会 第68回 昭和57年5月で一部発表した。)

## 文 献

- 1) 厚生省環境衛生局食品衛生課編：全国食中毒統計
- 2) 東京都衛生局環境衛生部：食中毒統計表(毎年6月発行)
- 3) 庭山邦子, 村上 一, 五十嵐英夫, 篠原 楷, 山岸 宏, 加藤喜市：東京衛研年報, 31-1, 127, 1980
- 4) 庭山邦子, 五十嵐英夫, 篠原 楷, 加藤喜市, 山岸 宏, 田村延一：東京衛研年報, 32-1, 138, 1981
- 5) 庭山邦子, 村上 一, 篠原 楷, 加藤喜市, 田村延一：東京都衛生局学会誌, 68, 122, 1982
- 6) 日本化学療法学会：Chemotherapy, 22, 1126, 1974
- 7) 寺山 武, 潮田 弘, 新垣正夫, 稲葉美佐子, 甲斐明美, 坂井千三：東京衛研年報, 28-1, 1, 1977
- 8) 鈴木 昭, 小沼博隆, 高山澄江, 今井忠平, 斎藤純子：食衛誌, 23, 45, 1982
- 9) 指原信広, 水谷宏, 高山澄江, 小沼博隆, 鈴木 昭, 今井忠平：食衛誌, 20, 127, 1979

## つみれの製造工程における細菌汚染および保存製品の細菌叢

新井輝義\*, 池島伸至\*, 神真知子\*  
入倉善久\*, 古幡幸子\*, 松本昌雄\*

### Contamination of Microorganisms through the Manufacturing Process of Fish Jelly Products and the Microflora of the Stored Products at Low Temperatures

TERUYOSHI ARAI\*, NOBUYUKI IKEJIMA\*, MACHIKO JIN\*,  
YOSHIHISA IRIKURA\*, YUKIKO FURUHATA\* and MASAO MATSUMOTO\*

Fish jelly products are an important protein source next to the meat products for Japanese. However, they seem to be getting insufficient hygiene guidance from the authorities since some of the commercially sold products contain from less than 10 to more than  $10^8$  per gram of live bacteria. We performed a hazard analysis on the manufacturing process in a small scale factory, and a storage test for Tsumire fish jelly. We propose the following critical points for the food sanitation: separate the heating step from the non-heating step by a physical and systematical barrier in order to exclude the secondary infection sources. That is, divide them by a wall or allot the different work steps to different workers; store the products below the freezing point since storage at 4 to 10 °C temperature accelerate psychrotrophs to vigorously multiply and to putrefy the products within a week.

It was found that psychrotrophs degradate low molecular substance as lipid, and mesophiles degradate high molecular substances as proteins and starch at 20 °C. Putrefaction of the products seems to be accelerated by these organisms synergistically at the temperature of 4 to 10 °C.

**Keywords**: fish jelly products, microflora, psychrotrophs, putrefaction, sanitation control, hazard analysis, manufacturing process, storage test, secondary infection sources, critical control points

#### 緒 言

魚肉ねり製品は、我国では重要な蛋白質源として畜肉製品に次いで消費されているが、衛生上の品質管理において、行政指導の効果が現われにくい食品であり、その生菌数は1g当り10未満から $10^8$ を超えるものまでいろいろである。一定の工程で製造される食品でありながらこのように生菌数が著しく異なるのは、製造工程上の衛生管理および販売に至るまでの保存管理等に起因するものと考えられる。従ってこれらを改善することにより、優良な製品の供給が可能になるであろう。そこで魚肉ねり製品のうち、流通量が多いつみれを対象に原料から販売製品に至るまでの細菌汚染および増殖の要因、すなわち、原料の細菌学的品質、製造工程の二次汚染源および保存中の細菌増殖を明確にすると同時に、低温保存中の製品の細菌叢の変遷と腐敗の進行との関連を検討したの

で報告する。

#### 調査資料、実験材料および方法

**調査資料** 1976年から1981年に多摩地区で製造販売され収去された自家製魚肉ねり製品について、殺菌料および保存料使用の有無、保存温度、保存日数を調査すると共に、細菌検査を実施した。

**実験材料** K工場のつみれ製造機械器具類、冷蔵庫および冷凍庫内外部、コンテナ、水道栓、作業者手指、つみれ原料（生ホッケ、冷凍スケトウダラすり身、パレイショデンプン、食塩および調味料）、中間製品、完成品、製造ラインの使用水等を実験材料とした。

**細菌検査** 機械器具類、冷蔵庫および冷凍庫内外部、コンテナ、水道栓および作業者手指については約100cm<sup>2</sup>を定法に準じて拭取ったものを、また、その他の材料は適当量をそれぞれ採取し、直ちに実験室に持帰り、生菌

\* 東京都立衛生研究所多摩支所 190 東京都立川市柴崎町 3-16-25

\* Tama Branch Laboratory, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, 16-25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan

数, 大腸菌群数, 黄色ブドウ球菌数, サルモネラ, セレウス菌数, 腸炎ビブリオ等の検査を定法どおり行なった。ただし, 生菌数は20°で3日および35°で2日の培養により求めた。

**保存試験** 完成品を3個ずつ滅菌ポリ容器に採取し, 直ちに実験室に持帰り, 4°, 10°および20°の恒温器内に保管し, 経日的に細菌検査に供した。細菌検査項目および方法は前記のとおりである。なお, 恒温器内の温度管理には, 12打点式タカラサーミスタ自記温度記録計 (R 117-3145, TXA-36) を用いた。

**菌株の分離と同定** 供試菌株の同定は, 生菌数測定を行なった各試料の平板から約20集落ずつ無作為に釣菌したものについて, Vanderzant<sup>1)</sup>の分類法に従って菌属の同定を行なった。なお, *Bacillus*の孢子の形成の確認には, Gordon<sup>2)</sup>の方法を参考にした。

**発育温度域の測定** 分離菌株をトリプトソイ寒天斜面に塗抹し, 5°で6日, 10°で5日, 15°で4日, 20°で3日, 25°で3日, 30°で3日, 35°で2日, 40°で2日, 45°で2日, 50°で2日, 55°で2日培養し, 各温度での発育の有無を観察した。発育上限が30°の菌株を低温細菌 (Psychrotrophs), 35°以上の菌株を中温細菌 (Meso-

philes) (一部高温細菌を含む) と規定した。

**基質分解能** 分離菌株につき, 蛋白質, デンプン質および脂質の分解性を検査するため, 10%スキムミルク加普通寒天平板, 0.4%ゼラチン加普通寒天平板, 1%バレイショデンプン加普通寒天平板およびバター脂肪を基質としたクロスリー寒天平板に純粋培養菌の生理食塩水懸濁液を画線し, 20°で3~6日培養して判定した。

## 結 果

**市販魚ねり自家製品の衛生および販売状況** Table 1 に示すように, 1976年以降, つみれ, はんぺんおよび揚げかまぼこは, いずれも保存料および殺菌料の使用例が減少し, 特に殺菌料は1981年にはまったく使用されなくなった。販売品の保管温度および製造後経過日数は, Table 2 および Table 3 に示したように, 0°~10°で多くが保管され, 0°未満例が10%程度であった。また, 製造後2日以内の製品が大半であった。Fig. 1 に示されたように, つみれ, はんぺんおよび揚げかまぼこの生菌数は, いずれも $10^3$ を中心に広く分布しており,  $10^5$ を超えるものが10%以上有った。

**つみれ製造工程の細菌汚染状況** つみれの原料の生菌数をTable 4 に示した。主原料の生ホッケは,  $20 \times 10^2 \sim 77 \times 10^2$ , バレイショデンプンは20~50, 食塩は  $22 \times 10$

Table 1. Application of preservatives or germicide on fish jelly products made by small scale manufactories

| Sample       | 1976       | 1978      | 1980      | 1981       |
|--------------|------------|-----------|-----------|------------|
| Tsumire      | 3/8*(38)** | 18/29(62) | 22/25(88) | 15/15(100) |
| Hanpen       | 2/12(17)   | 8/17(47)  | 13/16(81) | 11/13 (85) |
| Age-kamaboko | 3/5 (60)   | 2/2(100)  | 9/9(100)  | 33/33(100) |

\* Denominators mean number of specimens and numerators mean number of not used

\*\* Numbers given in parentheses mean percentage of not used

Table 2. Storage temperature of fish jelly products made by small scale manufactories

| Storage temperature | 1976 | 1978 | 1980 | 1981 |
|---------------------|------|------|------|------|
| 16°~                | 3    | 4    | 3    | 5    |
| 11°~15°             | 1    | 2    | 0    | 1    |
| 6°~10°              | 6    | 13   | 10   | 15   |
| 1°~ 5°              | 10   | 20   | 10   | 17   |
| ~ 0°                | 7    | 14   | 12   | 14   |

Table 3. Days after production of fish jelly products made by small scale manufactories

| Days after production | 1976 | 1978 | 1980 | 1981 |
|-----------------------|------|------|------|------|
| 0                     | 10   | 18   | 19   | 34   |
| 1                     | 8    | 17   | 14   | 24   |
| 2                     | 2    | 7    | 9    | 2    |
| 3                     | 3    | 3    | 2    | 5    |
| 4 and over            | 5    | 8    | 1    | 4    |

Table 4. Bacterial count of raw materials of tsumire

| Raw material                         | Number of bacteria/g |                  | Number of coli form group/g |
|--------------------------------------|----------------------|------------------|-----------------------------|
|                                      | 20° incubation       | 35° incubation   |                             |
| Raw Atka mackerel                    | $77 \times 10^2$     | $20 \times 10^2$ | <10                         |
| Potato starch                        | 20                   | 50               | <10                         |
| Salt                                 | $22 \times 10$       | $30 \times 10$   | <10                         |
| Seasoning                            | <10                  | 10               | <10                         |
| Frozen fish paste of walleye pollack | $11 \times 10^5$     | $45 \times 10^4$ | 90                          |

Table 5. Bacterial count of machine, tool or material on manufacturing process of tsumire

| Process                           | Machine, tool or material                         | Number of bacteria        |                           | Number of coli form group |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                                   |                                                   | 20° incubation            | 35° incubation            |                           |
| Meatmincing                       | Mincer (before use)                               | $14 \times 10^3$          | $52 \times 10^2$          | $<20$                     |
|                                   | Container for mince (before use)                  | $11 \times 10^2$          | $34 \times 10$            | $<20$                     |
|                                   | Mincer (after use)                                | $92 \times 10^5$          | $12 \times 10^6$          | $68 \times 10$            |
|                                   | Minced meat                                       | $*33 \times 10^4$         | $*12 \times 10^4$         | $* <10$                   |
|                                   | Hand ( at work<br>after wash                      | $62 \times 10^3$<br>$<20$ | $36 \times 10^3$<br>$<20$ | $<20$<br>$<20$            |
| Meatgrinding<br>at low temp.      | Wooden pestle (at use)                            | $16 \times 10^4$          | $10 \times 10^4$          | $52 \times 10$            |
|                                   | Surface of mill stone (at use)                    | $30 \times 10^4$          | $32 \times 10^4$          | $68 \times 10$            |
|                                   | Fish paste                                        | $*32 \times 10^4$         | $*22 \times 10^4$         | $* 90$                    |
|                                   | Thawed fish paste of walleye pollack (for mixing) | $*11 \times 10^5$         | $*45 \times 10^4$         | $* 90$                    |
|                                   | Potato starch (for mixing)                        | $* 20$                    | $* 50$                    | $* <10$                   |
|                                   | Seasoning (for mixing)                            | $* <10$                   | $* 10$                    | $* <10$                   |
|                                   | Salt                                              | $*22 \times 10$           | $*30 \times 10$           | $* <10$                   |
| Rapping                           | Fish paste with seasoning                         | $*57 \times 10^4$         | $*30 \times 10^4$         | $* 20$                    |
|                                   | Roller of rapping machine                         | $24 \times 10^3$          | $40 \times 10^3$          | $<20$                     |
|                                   | Rapping plate of rapping machine                  | $13 \times 10^3$          | $74 \times 10$            | $<20$                     |
|                                   | Belt conveyer of rapping machine                  | $72 \times 10^2$          | $68 \times 10^2$          | $<20$                     |
|                                   | Rubber spatula (at use)                           | $74 \times 10^3$          | $40 \times 10^3$          | $20$                      |
|                                   | Rapping bar of rapping machine                    | $38 \times 10^4$          | $80 \times 10^4$          | $<20$                     |
|                                   | Rapped fish paste with seasoning                  | $*17 \times 10^5$         | $*18 \times 10^5$         | $*38 \times 10$           |
| Boiling                           | Hand (at work)                                    | $66 \times 10^3$          | $76 \times 10^3$          | $<20$                     |
|                                   | Handle of a scoop net                             | $40 \times 10^3$          | $18 \times 10^3$          | $<20$                     |
|                                   | Net of a scoop net                                | $<20$                     | $20$                      | $<20$                     |
|                                   | Boiled fish paste with seasoning                  | $* 10$                    | $30$                      | $<20$                     |
| Cooling                           | Hand (at work)                                    | $22 \times 10^2$          | $32 \times 10^2$          | $<20$                     |
|                                   | Tap water for cooling                             | $* 0$                     | $* 1$                     | $* 0$                     |
|                                   | Water in cooling container                        | $* 22$                    | $* 34$                    | $* 0$                     |
|                                   | Drainer                                           | $76 \times 10^2$          | $76 \times 10$            | $<20$                     |
| Tool of<br>working<br>environment | Tsumire after drained                             | $* 30$                    | $*13 \times 10$           | $* <10$                   |
|                                   | Handle of a refrigerator                          | $32 \times 10^5$          | $60 \times 10^5$          | $<20$                     |
|                                   | Drain board of a refrigerator                     | $50 \times 10^6$          | $24 \times 10^5$          | $28 \times 10$            |
|                                   | Handle of a freezer                               | $46 \times 10^2$          | $24 \times 10^2$          | $<20$                     |
|                                   | Drain board of a freezer                          | $36 \times 10^4$          | $18 \times 10^4$          | $<20$                     |
|                                   | Hydrant                                           | $43 \times 10^6$          | $34 \times 10^6$          | $20$                      |

\* means bacterial count/g or mL, the others means bacterial count/100cm<sup>2</sup>

～30×10, 調味料は<10～10, 冷凍スケトウダラすり身は $45 \times 10^4 \sim 11 \times 10^5$ であった。また、冷凍スケトウダラすり身は大腸菌群が陽性であった。Table 5 に示されたように、頭部と内臓が除去された生ホッケは肉挽機にか

けられ、大骨を除去された挽肉となり、生菌数は $12 \times 10^4 \sim 33 \times 10^4$ であった。次に搥潰機に移され、肉がよくほぐれるまですり身になった後、パレイショデンプン、食塩、調味料および解凍スケトウダラすり身が加えら

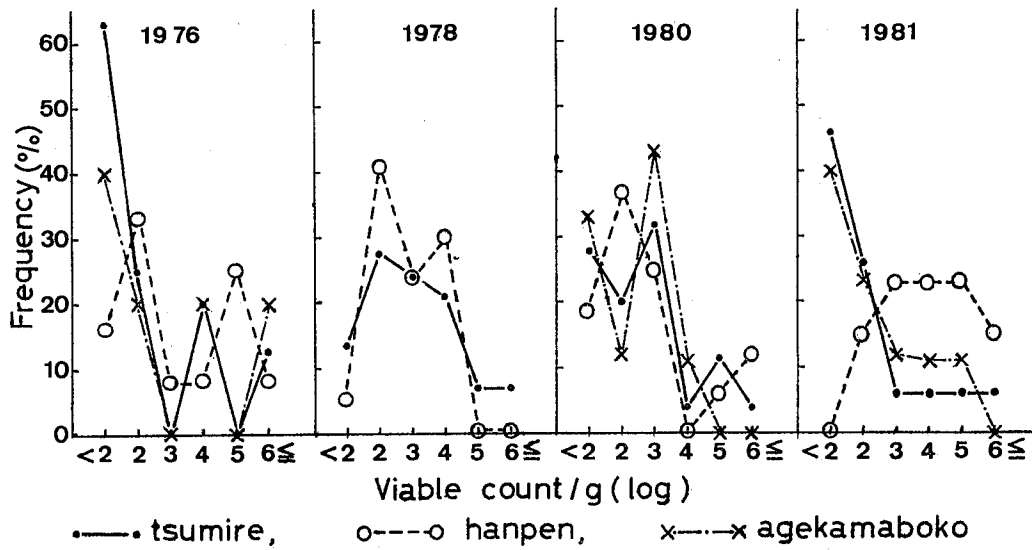


Fig. 1. Frequency of viable count/g of fish jelly products on the shelf

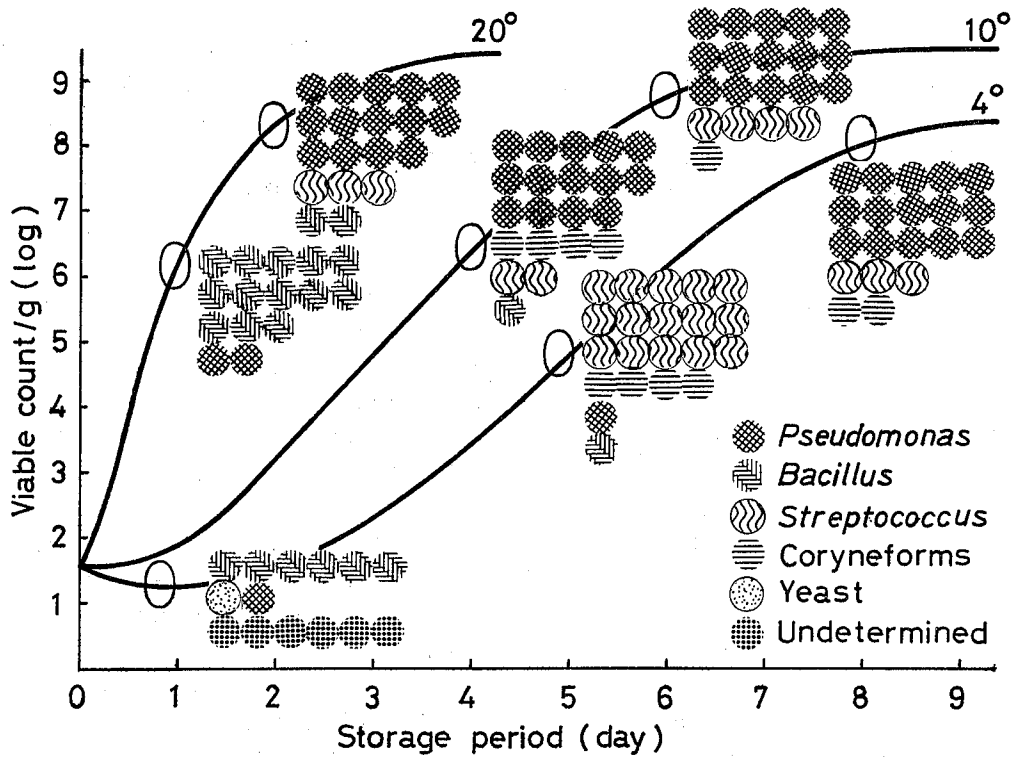


Fig. 2. Time course of viable count/g on tsumire stored at different temperatures and change of microflora

Table 6. Range of growth temperature of strains isolated from stored tsumire

| Storage temperature and period | Incubation temperature for plate counting | No. of strains tested | Temperatures tested (°C) |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|--------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                                |                                           |                       | 55                       | 50 | 45 | 40 | 35 | 30 | 25 | 20 | 15 | 10 | 5  |    |    |
| 4°C                            | 1 day                                     | 20°C                  | 2                        | 1  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | •  | •  |    |
|                                |                                           | 35°C                  | 6                        | 3  | 3  | 4  | 5  | 6  | 6  | 6  | 6  | 4  | 3  | •  |    |
|                                | 5 days                                    | 20°C                  | 4                        | •  | •  | •  | •  | •  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  |    |
|                                |                                           | 35°C                  | 18                       | 2  | 3  | 3  | 8  | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 15 | 10 |    |
|                                | 8 days                                    | 20°C                  | 19                       | •  | •  | •  | •  | •  | 19 | 19 | 19 | 19 | 19 | 19 |    |
|                                |                                           | 35°C                  | 19                       | •  | •  | •  | 1  | 19 | 19 | 19 | 19 | 19 | 19 | 3  |    |
|                                | 10°C                                      | 4 days                | 20°C                     | 18 | •  | •  | •  | •  | 2  | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 |
|                                |                                           |                       | 35°C                     | 16 | •  | •  | •  | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 7  | •  |
| 6 days                         |                                           | 20°C                  | 17                       | •  | •  | •  | 1  | 4  | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 |    |
|                                |                                           | 35°C                  | 19                       | •  | •  | •  | 4  | 19 | 19 | 19 | 19 | 19 | 19 | 9  |    |
| 20°C                           | 1 day                                     | 20°C                  | 15                       | •  | •  | •  | 13 | 13 | 15 | 15 | 15 | 15 | 14 | 3  | 2  |
|                                |                                           | 35°C                  | 20                       | •  | •  | 1  | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 15 | 3  |
|                                | 2 days                                    | 20°C                  | 17                       | •  | •  | 1  | 2  | 9  | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 15 | 14 |
|                                |                                           | 35°C                  | 18                       | •  | •  | •  | 8  | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 14 | 11 |

れ、よく混和される。品温は約 10°であった。出来上ったすり身は生菌数が  $30 \times 10^4 \sim 57 \times 10^4$  で大腸菌群は陽性であった。搥潰機の汚染状況は、生菌数が  $10^5$  オーダーで大腸菌群数は  $10^2$  オーダーであった。成形の工程では付属品の型押し棒および専用ゴムヘラの生菌数は  $10^4 \sim 10^5$  オーダー、すり身成形品の生菌数は  $10^6$  オーダーで大腸菌群数は  $10^2$  オーダーであった。成形されたすり身はベルトコンベアで運ばれ、加熱ナベに落下し、88°~92°の湯で10~15分間ゆでられ、品温は 80°に上昇する。この工程を経て生菌数は10~30に減少し、大腸菌群は陰性となった。次にあげ網ですくわれ、水道水を溢れさせたコンテナに投入され、約10分間冷却され、水切り用ザルにかけられて水切りされ、つみれの完成品となり、生菌数は30~13×10となる。冷却工程で使用された水切り用ザルの生菌数は  $76 \times 10 \sim 76 \times 10^2$ 、あげ網の柄は生菌数  $18 \times 10^3 \sim 40 \times 10^3$ 、作業中の手指の生菌数は  $22 \times 10^2 \sim 32 \times 10^2$  であった。なお、冷蔵庫、冷凍庫および水道栓等の生菌数は  $10^5 \sim 10^7$  オーダー、大腸菌群による汚染は冷蔵庫の取手とスノコおよび水道栓に認められた。作業工程全体の手指の汚れは、生菌数が  $10 \sim 10^4$  オーダーで大腸菌群による汚染も若干認められた。

つみれの保存試験における生菌数と細菌叢の経日変化  
Fig. 2 に示したように、4°保存の場合、1日目は増加は

認められず、*Bacillus* および *Pseudomonas* が少数認められた。2日目以降は、ほぼ対数的に増加し、5日目では  $10^4$  となり、*Streptococcus* および *Coryneforms* が優勢であり、8日目では  $10^7$  となり *Pseudomonas* および *Streptococcus* が優勢であった。10°保存の場合、1日目から対数的に増加し、4日目で  $10^6$  に達し、*Pseudomonas*, *Coryneforms* および *Streptococcus* が優勢であり、6日目で  $10^8$  となり、*Pseudomonas* および *Streptococcus* が優勢であった。20°保存の場合、培養を20°および35°で行なっても生菌数に特に差はみられなかった。1日目は  $10^6$  で *Bacillus* が優勢であり、2日目は  $10^8$  で *Pseudomonas*, *Streptococcus* および *Bacillus* が優勢であった。

保存試料分離菌株の発育温度域 Table 6 に示したように4°保存1日目の試料について20°培養および35°培養で分離された菌株は共に35°で発育できる中温細菌であった。4°で5日および8日保存試料について20°培養で分離された菌株はすべて低温細菌であり、35°培養で分離された菌株はすべて中温細菌であった。10°で4日および6日保存試料について20°培養で分離された菌株のほとんどは低温細菌であり、35°培養で分離された菌株はすべて中温細菌であった。20°で1日および2日保存試料について20°培養で分離された菌株のほとんどお

Table 7. Decomposition of substrates by psychrotrophs and mesophiles isolated from stored tsumire

| Storage Temp. (°C) | Storage period (day) | Group | No. of isolates tested | Decomposition activity rate of the isolates against each substrate at 20°C |         |           |        |                 |         |           |        |                      |         |           |        |             |         |           |        |            |         |           |        |
|--------------------|----------------------|-------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------|-----------|--------|-----------------|---------|-----------|--------|----------------------|---------|-----------|--------|-------------|---------|-----------|--------|------------|---------|-----------|--------|
|                    |                      |       |                        | <i>Pseudomonas</i>                                                         |         |           |        | <i>Bacillus</i> |         |           |        | <i>Streptococcus</i> |         |           |        | Coryneforms |         |           |        | The others |         |           |        |
|                    |                      |       |                        | Starch                                                                     | Geratin | Skim milk | Butter | Starch          | Geratin | Skim milk | Butter | Starch               | Geratin | Skim milk | Butter | Starch      | Geratin | Skim milk | Butter | Starch     | Geratin | Skim milk | Butter |
| 1                  | Psychro-trophs       | 0     | .                      | .                                                                          | .       | .         | .      | .               | .       | .         | .      | .                    | .       | .         | .      | .           | .       | .         | .      | .          | .       | .         |        |
|                    | Mesophiles           | 8     | 0/1*                   | 1/1                                                                        | 1/1     | 1/1       | 4/6    | 5/6             | 4/6     | 1/6       | .      | .                    | .       | .         | .      | .           | .       | .         | 0/1    | 0/1        | 1/1     | 0/1       |        |
| 4°                 | Psychro-trophs       | 4     | .                      | .                                                                          | .       | .         | .      | .               | .       | .         | .      | .                    | .       | .         | 0/4    | 0/4         | 0/4     | 4/4       | .      | .          | .       | .         |        |
|                    | Mesophiles           | 18    | 1/8                    | 5/8                                                                        | 3/8     | 4/8       | 1/3    | 2/3             | 3/3     | 0/3       | .      | .                    | .       | .         | 4/5    | 3/5         | 4/5     | 0/5       | 1/2    | 1/2        | 0/2     | 0/2       |        |
| 8                  | Psychro-trophs       | 19    | 0/15                   | 0/15                                                                       | 0/15    | 9/15      | .      | .               | .       | .         | 0/3    | 0/3                  | 0/3     | 1/3       | 0/1    | 0/1         | 1/1     | 0/1       | .      | .          | .       | .         |        |
|                    | Mesophiles           | 19    | 0/17                   | 17/17                                                                      | 14/17   | 17/17     | .      | .               | .       | .         | 0/2    | 0/2                  | 0/2     | 0/2       | .      | .           | .       | .         | .      | .          | .       | .         |        |
| 10°                | Psychro-trophs       | 16    | 0/12                   | 2/12                                                                       | 6/12    | 1/12      | .      | .               | .       | .         | 0/1    | 0/1                  | 0/1     | 0/1       | 0/3    | 0/3         | 0/3     | 3/3       | .      | .          | .       | .         |        |
|                    | Mesophiles           | 17    | 0/2                    | 0/2                                                                        | 0/2     | 0/2       | 15/15  | 15/15           | 15/15   | 4/15      | .      | .                    | .       | .         | .      | .           | .       | .         | .      | .          | .       | .         |        |
| 6                  | Psychro-trophs       | 13    | 0/11                   | 1/11                                                                       | 2/11    | 4/11      | .      | .               | .       | .         | 0/2    | 0/2                  | 1/2     | 0/2       | .      | .           | .       | .         | .      | .          | .       | .         |        |
|                    | Mesophiles           | 23    | 0/20                   | 19/20                                                                      | 20/20   | 13/20     | 1/1    | 1/1             | 1/1     | 1/1       | 0/1    | 0/1                  | 0/1     | 0/1       | .      | .           | .       | .         | 0/1    | 0/1        | 0/1     | 0/1       |        |
| 20°                | Psychro-trophs       | 2     | 0/2                    | 0/2                                                                        | 0/2     | 0/2       | .      | .               | .       | .         | .      | .                    | .       | .         | .      | .           | .       | .         | .      | .          | .       | .         |        |
|                    | Mesophiles           | 33    | .                      | .                                                                          | .       | .         | 31/31  | 30/31           | 31/31   | 21/31     | .      | .                    | .       | .         | 2/2    | 2/2         | 2/2     | 0/2       | .      | .          | .       | .         |        |
| 2                  | Psychro-trophs       | 8     | 1/7                    | 0/7                                                                        | 0/7     | 0/7       | .      | .               | .       | .         | 0/1    | 0/1                  | 0/1     | 0/1       | .      | .           | .       | .         | .      | .          | .       | .         |        |
|                    | Mesophiles           | 27    | 2/18                   | 12/18                                                                      | 12/18   | 18/18     | 7/7    | 7/7             | 7/7     | 5/7       | 0/1    | 0/1                  | 0/1     | 0/1       | 1/1    | 1/1         | 1/1     | 0/1       | .      | .          | .       | .         |        |

\* Denominators mean number of active isolates and numerators mean number of tested

よび 35° 培養で分離された菌株のすべては中温細菌であった。4° および 10° 保存試料の生菌数は 35° 培養よりも 20° 培養の方が 5~10 倍以上大きい値となったが、これらの菌株は 35° 培養では発育できない低温細菌であることがわかった。また、20° 保存試料の生菌数は、ほぼ中温細菌の数に等しかった。

**保存試料分離株の基質分解性** Table 7 に示したように、4° で 1 日保存試料由来株は、中温細菌の *Bacillus* が主で蛋白質およびデンプン質をよく分解した。4° で 5 日保存試料由来株は、低温細菌の *Coryneforms* が脂質をよく分解した。同試料由来の中温細菌は、低温細菌に比して数は少ないが、*Pseudomonas*, *Coryneforms* および *Bacillus* が蛋白質およびデンプン質をよく分解した。4° で 8 日保存試料由来株は、低温細菌の *Pseudomonas* および *Streptococcus* が脂質を分解し、同試料由来の中温細菌は少数ながら *Pseudomonas* が蛋白質と脂質を分解した。10° で 4 日保存試料由来株は、低温細菌の *Pseudomonas* のうち、一部の株が蛋白質を、また *Coryneforms* のすべての株が脂質をよく分解した。同試料由来の中温細菌の *Bacillus* は少数ながら蛋白質およびデンプン質をよく分解した。10° で 6 日保存試料由来の低温細菌の *Pseudomonas* の一部の株が脂質と蛋白質を、*Streptococcus* がわずかに蛋白質を分解した。同試料由来の中温細菌は、少数ながら、*Pseudomonas* は蛋白質および脂質をよく分解し、*Bacillus* も蛋白質、脂質およびデンプン質をよく分解した。20° で 1 日および 2 日保存試料由来の低温細菌である *Pseudomonas* および *Streptococcus* は蛋白質、デンプン質および脂質をほとんど分解せず、同試料由来株の中温細菌である *Pseudomonas*, *Bacillus* および *Coryneforms* は、これらの基質をよく分解した。

### 考 察

食品の品質をいかなるものにするかは、生産者の食品に対する考え方で決まると言えるであろう。少しでもシェルフライフを延長させようと思えば殺菌料（過酸化水素、次亜塩素酸等）、保存料（ソルビン酸、デヒドロ酢酸等）および酸化防止剤（ブチルヒドロキシアニソール）等のいわゆる食品添加物が使用できるが、これらの安全性についての疑問点が報告されている<sup>8-9)</sup>。一方、食品添加物の使用を極力避けようとする生産者は、製造工程の衛生管理に相当な力を注いでいる<sup>9)</sup>。しかしこれは多大な労力と高度な専門技術の蓄積の上に成立つものであって、一般の製造業者には、それだけの余力が無いのが現状であろう。生産者が個々に莫大な資金と労力を費さ

なくとも、健全な食品を製造し供給するためには、食品衛生行政担当者が個々の加工食品についてその総合的な衛生管理情報を提示してゆかねばならないと思われる。共通の工程で製造される場合でも、各工場にはそれぞれの異なった改善点が指摘されるであろう。従って、それらの個々の改善点の集積は 1 つの食品の製造工程の重要な管理点の総合的な把握へと発展するであろう。

1980年に食品製造に過酸化水素の使用が事実上禁止になってから、その使用は、つまり、はんぺんおよび揚げかまぼこに関しては皆無となった。1981年のはんぺん 2 件については、保存料のみの使用例であった。さて、このような状況下で販売されている魚肉ねり製品の細菌学的な品質は、いずれも過酸化水素の使用規制のいかににかかわらず  $10^8$  を中心とした上下に広い分布パターンを示し、特に変化していない。過酸化水素の使用禁止にもなつて特に保存温度を下げた状況はみられず、例年どおり 0°~10° の範囲が主流であり、0° 未満は 10% 程度であった。販売品の製造後経過日数は半数以上が 2 日以内であつて、毎年同じであつた。以上の成績から、魚肉ねり製品の製造、保存および販売の様式は過去 6 年間変化なしと評価される。唯一、殺菌料を使用しなくなったことだけが変つた点である。ともあれ、生菌数が  $10^5$  を超える製品が常に 10% 以上販売されているのは確かである。製造後 1 日以内の製品でも 20% 程度が  $10^4$ ~ $10^6$  であつて、これは少なくとも製造方法に改善の余地があることを示唆している。

つみれの主原料の生ホッケおよび冷凍スケトウダラすり身の生菌数は、低温細菌に代表されるようであり、それぞれ  $10^3$  オーダーおよび  $10^6$  オーダーであつた。これらの大量の一次汚染細菌は原料肉の移動と共に、肉挽機、コンテナ、摺潰機、成形機、作業者の手指、冷蔵庫、冷凍庫および水道栓を汚染し、加熱工程を経たつみれを再び冷却工程で二次的に汚染するものと推定される。特に作業者の手が頻繁に触れる水道栓、冷蔵庫および冷凍庫の生菌数は  $10^5$ ~ $10^7$  のオーダーであり、最も可能性の高い汚染源であろう。同一のフロアーが原料と加熱製品と一緒に取扱うような施設構造であり、しかも、すべての手作業が 2 人でなされる様式では、製品の二次汚染は防げない。これらの汚染要因を断つために、加熱以後の工程を、構造的に、かつ人的に完全に区切る必要がある。

保存実験によれば、4° で保存された場合、2 日目以降は、ゆっくりではあるが、ほぼ対数的に菌数が増加し、6 日後には  $10^5$  に、9 日後には  $10^8$  になり、ネトが発生した。10° 保存の場合、対数的に増殖し、4 日後で  $10^6$



に達し、ネットを発生した。製品の販売時の保管温度が $0^{\circ}$ ～ $10^{\circ}$ の間に集中している事から、店頭販売品においても数日間保管される場合には同様な速さで腐敗が進行するものと推測される。一般に、市中の魚肉ねり製品製造販売店では、1店で数種類の製品を製造販売しており、1つの製造ラインですべての製品を製造する都合上、各品は1週間分位を大量に製造し、保冷しながら最長1週間程かけて販売するのが平均的な様式である。K製造販売店もこれと同様であって、製造当日に販売されない大部分は、コンテナに収納されて冷凍庫で1晩かけて凍結される。販売に供する場合は、前日にコンテナごと冷蔵庫に移して徐々に解凍するか、または当日コンテナに水道水を注ぎ込み解凍し、売れ残りは再び冷蔵庫にて保冷される。1度解凍されるとコンテナの残品が売れ尽すまで最長1週間かかり、ネットも発生する。従って二次汚染量の少ない製品であっても1週間も冷蔵庫に入れたり出したりしているうちに、低温細菌が確実に増殖し、腐敗に至る。よって製品を少しでも長持ちさせるには、完成品を1日で売り切れる量ずつ袋に小分けして速やかに凍結する方法が好ましい。

つみれを $10^{\circ}$ 以下で保存した場合、最も速やかに増殖するのは低温細菌で、中温細菌の5～10倍以上の値を示す。原材料の生ホッケおよび冷凍スケトウダラすり身も低温細菌が生菌数を代表している。低温細菌は、当該工場の作業環境の汚染細菌として中温細菌と同等に重要な存在である。従って、つみれの製造販売における食品細菌学的な管理事項として、環境汚染箇所の把握および特に保存中の製品の腐敗の進行を判定するためには、低温細菌を指標菌とすることが必須条件である。

低温保存食品の細菌および腐敗に関する報告は多く、生肉<sup>7-10)</sup>、冷凍食品<sup>11,12)</sup>、冷蔵海産魚<sup>13)</sup>、冷凍調理食品<sup>14)</sup>の分離細菌について分類学および生理学的な検討がなされている。また、魚肉ねり製品については、加熱温度と残存細菌の関係<sup>15,16)</sup>や包装かまぼこの変敗菌<sup>17,18)</sup>の報告が有る。しかし、非包装または簡易包装され、冷蔵保存販売される魚肉ねり製品の腐敗に関する報告は類を見ない。しかし、我々が行なった保存実験で分離検討された優勢菌は、つみれの成分である蛋白質、デンプン質および脂質を $20^{\circ}$ で良く分解する事から腐敗の原因菌として興味あるところである。保存実験の各段階で分離された優勢菌の基質分解性の特徴を考慮し、 $4^{\circ}$ ～ $10^{\circ}$ で保存したつみれの腐敗過程を考察する。先ず初期においては、加熱処理後生残した *Bacillus* およびその後二次汚染で付着したと思われる少数の *Pseudomonas* およ

び *Coryneforms* などの中温細菌が徐々に蛋白質およびデンプン質等の高分子基質を分解して低分子基質を産生してゆく。次いで二次汚染で付着したと思われる低温細菌の *Pseudomonas*, *Streptococcus* および *Coryneforms* が産生された低分子基質を利用して速やかに増殖し、優勢菌叢を形成しつつ一挙に腐敗を進行させるのである。また、常に何れかの細菌により脂質の分解が進行してゆくことが充分考えられる。

## 結 論

多摩地区の魚肉ねり製品製造販売店から収去された製品の衛生および販売状況は以下のとおりであった。

1. 1980年以降、殺菌料である過酸化水素による処理製品は皆無となった。
2. 製品の保管温度は $0^{\circ}$ ～ $10^{\circ}$ の範囲が主流であるが、 $0^{\circ}$ 未満の例も10%程度認められた。
3. 製品の大半は2日以内に販売されるが1週間近く残る物もある。
4. 販売品の細菌汚染は、生菌数 $10^3$ を中心にして、少ない例で10未満、多い例では $10^6$ ～ $10^8$ オーダーの物まで広く分布している。製造当日の製品でも20%程度は $10^4$ ～ $10^6$ オーダーであった。

冷蔵保存中の製品の腐敗と対応策

1. 生菌数が $30 \sim 13 \times 10$ の完成品は、 $4^{\circ}$ で保存すると6～7日で、 $10^{\circ}$ で保存すると3日で $10^5$ を超える。
2.  $4^{\circ}$ ～ $10^{\circ}$ で保存されるつみれでは、中温細菌は脂質を利用すると共に蛋白質およびデンプン質等の高分子基質を分解して低分子化させながらゆっくり増殖し、低温細菌は脂質および中温細菌が産生する低分子基質を利用して速やかに増殖すると考えられ、このような共働作用により、その腐敗が進行すると推測される。

3. 製品をこれらの腐敗菌から守るため、保存および販売には凍結したままが望ましい。

謝辞 本調査研究の場をご提供下さった立川保健所衛生課の諸先生ならびに、自記温度記録計を貸与下さった市場衛生検査所の諸先生に深謝いたします。

(本研究は昭和56年度当研究所調査研究課題「魚肉ねり製品製造時の細菌汚染について」同じく「魚肉ねり製品の細菌数の評価について」として実施したものである。)

## 文 献

- 1) Vanderzant, C. and Nickelson, R.: *J. Milk and Food Tech.*, 32, 357, 1969
- 2) Gordon, R.E., Hayness, W. C. and Pang, C. H.-N.: *The Genus Bacillus*, Agriculture Handbook No. 427, U.S. Department of Agriculture,

1973

- 3) 山中英明, 塩見一雄, 宮原むつ子, 菊池武昭: 食衛誌, 20, 270, 1979
- 4) 石崎睦雄, 小山田則孝, 上野清一, 勝村 馨, 細貝祐太郎: 食衛誌, 20, 143, 1979
- 5) 石崎睦雄, 小山田則孝, 上野清一, 勝村 馨, 細貝祐太郎: 食衛誌, 20, 305, 1979
- 6) 新井輝義, 池島伸至, 神真知子, 入倉善久, 古幡幸子, 松本昌雄: 東京衛研年報, 32-1, 143, 1981
- 7) 小久保弥太郎, 梅木富士郎, 春田三佐夫: 食衛誌, 12, 164, 1971
- 8) 小久保弥太郎: 食衛誌, 14, 448, 1973
- 9) 小久保弥太郎: 食衛誌, 15, 188, 1974
- 10) 小久保弥太郎: 東獣畜誌, 19・20合併号, 184, 1973
- 11) 梅木富士郎, 小久保弥太郎, 井草京子, 春田三佐夫, 四宮 栄: 東獣畜誌, 19・20合併号, 178, 1973
- 12) 駒形和男, 小川博望, 勝屋 登: 食衛誌, 5, 441, 1964
- 13) 奥積昌世, 堀江 進, 木村正幸, 赤堀正光, 川前政幸: 食衛誌, 14, 81, 1973
- 14) 堀江 進, 奥積昌世, 小畑一雄, 林 修: 食衛誌, 15, 30, 1974
- 15) 横関源延: 日水誌, 23, 539, 1958
- 16) 横関源延: 日水誌, 23, 543, 1958
- 17) 茂木幸夫, 松原瑞穂: 食衛誌, 11, 49, 1970
- 18) 小川博望, 小名木正躬, 福島 清: 食衛誌, 11, 352, 1970

## 東京都における水銀汚染の実態について（第9報） 魚介類中の水銀含有量調査

山野辺 秀 夫\*, 竹 内 正 博\*, 吉 原 武 俊\*

### Survey of Pollution with Mercury in Tokyo (IX)

### Mercury Content of Fish and Shellfish

HIDEO YAMANOBÉ\*, MASAHIRO TAKEUCHI\* and TAKETOSHI YOSHIHARA\*

**Keywords** : 水銀 mercury, 魚介類 fish and shellfish

#### 緒 言

著者らは昭和48年、国が魚介類に対する水銀の暫定規制値<sup>1)</sup>（総水銀 0.4ppm, メチル水銀 0.3ppm）を定めて以来、都民の食生活の安全を確保する目的で魚介類および水産加工品について水銀含有量調査を実施している。昭和56年度についても中央卸売市場に入荷した魚介類および市場外流通の輸入魚介類等の検査を行なった。

#### 実験方法

試料は昭和56年4月から昭和57年3月までの1年間に中央卸売市場に搬入された、いわゆる市場入荷魚介類17種20検体、市場外流通の輸入魚介類19種60検体、東京湾産アサリ14検体および都内の小売店で入手した水産加工品33検体、計127検体である。

操作および定量は前報<sup>2,3)</sup>にしたがって行なった。

#### 結果および考察

魚介類中の水銀含有量の調査結果を Table 1 に示す。市場入荷魚介類で暫定規制値を越えたものはなかったが、スズキについては2検体中1検体から 0.34ppm が検出された。スズキはこれまでの調査からも高い値が検出されることが知られている魚種であり、特に東京湾で全長 60cm 以上のものは漁獲が規制されているので今後も引き続き調査する必要がある。その他比較的高い値が測定された試料はメルルーサ 0.17ppm, メダイ 0.10ppm 等であった。

輸入魚介類では、イセエビ (lobster) から最高 0.26ppm, サメから 0.21ppm が検出された。しかし他は全体に低い値を示しており、今回調査した試料の55%が0.01ppm未満であった。

アサリについては14検体中7検体が0.01ppm以下であり、残りの7検体も0.01ppmと極めて低い値であった。これらのアサリは前報<sup>4)</sup>と同様に東京湾の水銀汚染の指

標とするために特定の5地点（横浜市野島公園、富津市富津公園、大井ふ頭、葛西沖三枚洲、葛西沖人工渚）から採取したものである。アサリは水銀汚染の生物指標としては必ずしも適当ではないが、これらの結果から少なくとも東京湾の水銀汚染が著しく進行しているということはないと結論できる。

つぎに Table 2 に魚介類を原料とした水産加工品の総水銀測定結果を示す。最も高い値はカマボコ 0.64ppm, 次いでハンペン 0.40ppm であった。これらは魚を原料とする練製品であるため原料から由来すると考えられる。水産加工品中の総水銀含有量は生魚に比べて高く、0.01ppm以上検出した割合は78.8%であった。

#### ま と め

都内で入手した魚介類および水産加工品、合計 127 検体について水銀含有量を調査したところ、暫定規制値を越えたものはなかった。

1. 魚介類94検体中総水銀 0.1ppm を越えたものはスズキ 2 検体、メルルーサ、サメ、キンメダイ各 1 検体、イセエビ (lobster) 3 検体、計 8 検体であった。

2. 水産加工品では練製品で高い値を検出した。これは前報<sup>4)</sup>と同じ傾向であり原料となる魚介類に起因するものと考えられる。

謝辞 本調査を行なうにあたり御協力をいただいた東京都衛生局環境衛生部食品監視課の方々に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 厚生省環境衛生局通達：48衛環乳第 423 号，昭和48年8月6日
- 2) 伊藤弘一，竹内正博，江波戸肇秀，雨宮 敬，原田裕文，戸谷哲也：東京衛研年報，25，141，1974
- 3) 竹内正博，江波戸肇秀，伊藤弘一，雨宮 敬，原田

\* 東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Mercury Content of Muscle in Fish and Shellfish

| Sample                                                      | N  | T-Hg(ppm) |      |
|-------------------------------------------------------------|----|-----------|------|
|                                                             |    | Range     | Mean |
| Ayu (ayu sweetfish, <i>Plecoglossus altivelis</i> )         | 1  |           | 0.02 |
| Bora (grey mullet, <i>Mugil cephalus</i> )                  | 1  |           | 0.01 |
| Hamadai ( <i>Pristipomoides tilamentosus</i> )              | 1  |           | 0.03 |
| Ibodai (sea bream, <i>Pseneopsis anomala</i> )              | 2  | 0.02—0.03 | 0.03 |
| Iwashi (sardine, <i>Sardinops melanosticta</i> )            | 1  |           | 0.00 |
| Kamasu (barracuda, <i>Sphyraena japonicus</i> )             | 1  |           | 0.02 |
| Kinmedai ( <i>Beryx splendens</i> )                         | 1  |           | 0.10 |
| Kisu (sillago, <i>Sillago sihama</i> )                      | 1  |           | 0.01 |
| Konoshiro (gizzard shad, <i>Clupanodon punctatus</i> )      | 1  |           | 0.01 |
| Medai ( <i>Mupus japonicus</i> )                            | 1  |           | 0.10 |
| Merurusa ( <i>Merluccius capensis</i> )                     | 1  |           | 0.17 |
| Nishin (herring, <i>Clupea pallasii</i> )                   | 2  | 0.01—0.03 | 0.02 |
| Shirauo (whitebait, <i>Salanx microdon</i> )                | 1  |           | 0.01 |
| Silver                                                      | 1  |           | 0.06 |
| Suzuki (perch, <i>Lataolabrax japonicus</i> )               | 2  | 0.16—0.34 | 0.25 |
| Unagi (eel, <i>Anguilla japonica</i> )                      | 1  |           | 0.03 |
| Asari (short-neck clam, <i>Tapes japonica</i> )             | 14 | 0.00—0.01 | 0.01 |
| Bai ( <i>Babylonia japonica</i> )                           | 1  |           | 0.03 |
| Awabimodoki ( <i>Concholepas peruviana</i> )*               | 1  |           | 0.00 |
| Aji (horse-mackerel, <i>Trachurus trachurus</i> )*          | 2  | 0.00—0.02 | 0.01 |
| Ara ( <i>Nippon spinosus</i> )*                             | 1  |           | 0.02 |
| Ise-ebi (lobster)*                                          | 9  | 0.00—0.26 | 0.08 |
| Itoyori ( <i>Nemipterus virgatus</i> )*                     | 1  |           | 0.00 |
| Kisu (sillago, <i>Sillago sihama</i> )*                     | 1  |           | 0.01 |
| Kurage (medusa)*                                            | 2  |           | 0.00 |
| Kou-ika (cuttlefish)*                                       | 8  | 0.00—0.09 | 0.02 |
| Sakuradai ( <i>Sacura margaritacea</i> )*                   | 1  |           | 0.02 |
| Same (shark)*                                               | 1  |           | 0.21 |
| Suziko (salmon roe, salted)*                                | 1  |           | 0.00 |
| Taisho-ebi (shrimp)*                                        | 25 | 0.00—0.05 | 0.01 |
| Tachiuo (hair tail, <i>Trichiurus lepturus</i> )*           | 1  |           | 0.07 |
| Tanishi (river snail)*                                      | 1  |           | 0.00 |
| Tarabagani (king crab, <i>Paralithodes camtschaticus</i> )* | 1  |           | 0.00 |
| Tobiuo, tamago (flying-fish roe)*                           | 1  |           | 0.00 |
| Zuwaigani (red crab, <i>Chionoecetes opilio</i> )*          | 1  |           | 0.00 |
| Wakasagi (pond smelt, <i>Hypomesus olidus</i> )*            | 2  | 0.00—0.02 | 0.01 |

\* imported

N : number of samples

裕文, 戸谷哲也: 東京衛研年報, 25, 133, 1974

衛研年報, 32-1, 148, 1981

4) 山野辺秀夫, 雨宮 敬, 竹内正博, 吉原武俊: 東京

Table 2. Mercury Content of Marine Products

| Sample                                                                  | N  | T-Hg(ppm) |      |
|-------------------------------------------------------------------------|----|-----------|------|
|                                                                         |    | Range     | Mean |
| Aji, hiraki (horse-mackerel, <i>Trachurus trachurus</i> , half dried)   | 1  |           | 0.04 |
| Ami, shiokara (mysis, salted viscera)                                   | 1  |           | 0.00 |
| Chikuwa (rolled fish cake)                                              | 1  |           | 0.05 |
| Ei, hire (skate, <i>Raja kenoei</i> , horny fiber)                      | 1  |           | 0.12 |
| Fugu, kunsei (puffer, smoked)                                           | 1  |           | 0.09 |
| Hanpen                                                                  | 2  | 0.33—0.40 | 0.37 |
| Hoya, suzuke ( <i>Halocynthia roretzi</i> , soaked in vinegar)          | 1  |           | 0.00 |
| Iwashi, tatami (sardine, <i>Sardinops melanosticta</i> , dried)         | 1  |           | 0.00 |
| Katsuo, tataki (skipjack, <i>Katsuwonus pelamis</i> , purchased cooked) | 1  |           | 0.03 |
| Kamaboko (fish jelly products, steamed)                                 | 10 | 0.01—0.64 | 0.13 |
| Kawahagi, himono (filefish, <i>Stephanolepis cirrhifer</i> , dried)     | 2  | 0.01—0.05 | 0.03 |
| Kibinago ( <i>Stolephorus japonicus</i> , dried)                        | 1  |           | 0.06 |
| Komai ( <i>Eleginus gracilis</i> , dried)                               | 1  |           | 0.00 |
| Mentaiko (pollack roe, soaked in red pepper)                            | 2  |           | 0.00 |
| Sanma, himon (pacific saury, <i>Cololabis saira</i> , half dried)       | 1  |           | 0.05 |
| Sake, kunsei (salmon, <i>Oncorhynchus keta</i> , smoked)                | 2  | 0.03—0.04 | 0.04 |
| Same, syokuyoyu (shark liver oil)                                       | 1  |           | 0.00 |
| Satsuma-age (fried fish cake)                                           | 1  |           | 0.05 |
| Surume, himono (squid, <i>Todarades pacificus</i> , dried)              | 1  |           | 0.13 |
| Tsumire (boiled fish jelly)                                             | 1  |           | 0.02 |

N : number of samples

## 東京都における PCB 汚染の実態について (第10報) 食品中の PCB 含有量調査

山崎 清子\*, 水石 和子\*, 竹内 正博\*, 吉原 武俊\*

### Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (X) Polychlorinated Biphenyl Concentrations of Foods

KIYOKO YAMAZAKI\*, KAZUKO MIZUISHI\*, MASAHIRO TAKEUCHI\*  
and TAKETOSHI YOSHIHARA\*

**Keywords:** ポリ塩化ビフェニール Polychlorinated Biphenyls, 汚染 pollution, 食品 foods, 母乳 human milk

著者らは都内に流通する食品等のポリ塩化ビフェニール (以下 PCB と略す) による汚染状況を把握するため、その含有量を調査し、また PCB による人体汚染の指標として母乳中の残留量を継続調査してきた<sup>1)</sup>。

本報では1981年度の結果を報告する。

#### 実験方法

調査試料は1981年4月から1982年3月までに入手した。内訳は東京都中央卸売市場で買い上げた魚介類46種類150検体、東京湾沿岸で採取したアサリ15検体、都内の小売店から入手した輸入魚介類18種類60検体、水産加工品30検体、食肉6種類30検体、卵2種類20検体、乳製品5種類70検体、食用油脂3種類20検体、ベビーフード10検体、容器包装20検体および都内在住の産婦から提供された母乳11検体、合計436検体である。

操作および定量は第2報<sup>2)</sup>と同様に、厚生省環境衛生局 PCB 分析研究班による統一分析法に基づき、アルカリ分解法によって前処理を行なったのち、ECD ガスクロマトグラフィーで定量した。

#### 結果および考察

市場入荷魚介類の可食部の PCB 含有量測定結果を Table 1 に示す。なお、0.005ppm 未満は不検出とし、0.00ppm と表わした。150検体について検査したところ、0.01ppm 以上の PCB を検出したものは88検体で、検出率は58.7%、平均値は0.03ppm であった。最高値はスズキの0.28ppm であり、この他に0.2ppm 以上の値を示したのものにはカマス、コノシロ、マダイ、ニベがあげられるが、暫定規制値 (遠洋沖合 魚介類 0.5 ppm, 内海内湾魚介類 3.0ppm) を越えるものは見られなかった。これまでの調査結果から魚介類の各年度全体の平均値を比較すると (Table 2), 1972年に行なわれた PCB の製造

および使用に関する規制措置の成果が調査初期に早くも現われ減少傾向が認められたが、ここ数年は横ばい状態が続いていることが明らかである。化学的安定性が高いという PCB の性質から考えても、この状態は今後しばらく続くと思われる。

東京湾沿岸で採取したアサリの PCB 含有量測定結果を Table 3 に示す。神奈川県野島崎公園 (野島崎), 大井埠頭 (大井), 葛西沖三枚洲 (三枚洲), 葛西沖人工渚 (人工渚), 富津市富津公園 (富津) の5地点で5月, 7月, 10月の3回にわたって調査した。採取時期による PCB 濃度の差は認められないが、地域的には差が現われた。すなわち千葉県側の富津で採取されたアサリからは PCB は検出されず、大井で採取されたアサリからは0.02—0.06ppm が検出された。

輸入魚介類はエビ33検体, イカ9検体, ワカサギ, クラゲ, アジ各2検体, その他キス, イトヨリなど12検体, 合計60検体について調査した。このうちエビ, イカは昨年と同様ほとんど不検出であった。また、オランダ産のアジが0.33ppm, カナダ産のワカサギが0.19ppm, 0.09ppm を示した他はほとんど不検出であった。

水産加工品は魚肉練製品, 魚介類の干物, 明太子など30検体について調査したところ13検体から PCB を検出した。最高値は精製アイザメ油の0.09ppm であり、以下キビナゴの干物0.06ppm, 魚肉練製品0.05ppm, アジの干物0.03ppm などがあげられるが、その他は0.01ppm 以下の低濃度であった。

乳製品の PCB 含有量測定結果を Table 4 に示す。バター6検体中2検体, コンデンスミルク4検体中1検体から低濃度ではあるが検出された。チーズは主にナチュラルチーズであるが30検体中25検体から平均0.02ppm が

\* 東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Concentrations of PCB in Fishes (ppm on wet basis)

| Samples                                                      | N   | Range     | Mean |
|--------------------------------------------------------------|-----|-----------|------|
| Aji (horse-mackerel, <i>Trachurus trachurus</i> )            | 14  | 0.00—0.09 | 0.02 |
| Anago (conger eel, <i>Astroconger myriaster</i> )            | 1   |           | 0.14 |
| Awabi (abalone, <i>Nordotis discus</i> )                     | 2   |           | 0.00 |
| Ayu (ayu sweetfish, <i>Plecoglossus altivelis</i> )          | 3   | 0.00—0.01 | 0.00 |
| Bai ( <i>Babylonia japonica</i> )                            | 2   | 0.00—0.01 | 0.01 |
| Bora (gray mullet, <i>Mugil cephalus</i> )                   | 1   |           | 0.01 |
| Buri (yellow tail, <i>Seriola quinqueradiata</i> )           | 4   | 0.02—0.10 | 0.06 |
| Dojo (mudfish, <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> )           | 1   |           | 0.00 |
| Ginzake ( <i>Oncorhynchus kisutsh</i> )                      | 2   | 0.00—0.01 | 0.01 |
| Hatahata (sandfish, <i>Arcoscopus japonicus</i> )            | 1   |           | 0.01 |
| Hirame (flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> )            | 1   |           | 0.00 |
| Houbou (gurnard, <i>Chelidonichthys kum</i> )                | 2   | 0.00—0.01 | 0.01 |
| Isaki (grunt, <i>Parapristipoma trilineatum</i> )            | 3   | 0.00—0.02 | 0.01 |
| Ishimochi (croaker, <i>Argyrosomus argentatus</i> )          | 1   |           | 0.06 |
| Itoyori ( <i>Nemipterus virgatus</i> )                       | 3   |           | 0.00 |
| Iwashi (sardine, <i>Sardinops melanosticta</i> )             | 5   | 0.01—0.09 | 0.04 |
| Kaki (oyster, <i>Crassostrea gigas</i> )                     | 1   |           | 0.04 |
| Kamasu (barracuda, <i>Sphyræna japonicus</i> )               | 5   | 0.00—0.20 | 0.06 |
| Katsuo (bonito, <i>Katsuwonus pelamis</i> )                  | 4   | 0.00—0.02 | 0.01 |
| Kichiji ( <i>Sebastolobus macrochir</i> )                    | 5   | 0.01—0.03 | 0.02 |
| King klip ( <i>Genypterus capensis</i> )                     | 1   |           | 0.00 |
| Kisu (sillago, <i>Sillago sihama</i> )                       | 1   |           | 0.00 |
| Konoshiro (gizzard shad, <i>Clupanodon punctatus</i> )       | 2   | 0.19—0.25 | 0.22 |
| Madai (sea bream, <i>Chrysophrys major</i> )                 | 14  | 0.00—0.25 | 0.05 |
| Madara (codfish, <i>Gadus macrocephalus</i> )                | 1   |           | 0.00 |
| Magarei (flat fish, <i>Limanda herzensteini</i> )            | 6   | 0.00—0.04 | 0.01 |
| Maguro (tuna, <i>Thunnus albacares</i> )                     | 1   |           | 0.05 |
| Managatsuo (harvest fish, <i>Pampus argenteus</i> )          | 3   | 0.00—0.02 | 0.01 |
| Mebaru (gopher, <i>Sebastes inermis</i> )                    | 4   | 0.00—0.01 | 0.01 |
| Menuke (rockfish, <i>Sebastes matsubara</i> )                | 1   |           | 0.02 |
| Merlusa ( <i>Merluccius capensis</i> )                       | 2   |           | 0.00 |
| Nibe ( <i>Nibe mitsukurii</i> )                              | 1   |           | 0.22 |
| Nishin (herring, <i>Clupea pallasi</i> )                     | 4   | 0.01—0.07 | 0.03 |
| Oakamuro ( <i>Decapterus russelli</i> )                      | 1   |           | 0.00 |
| Saba (mackerel, <i>Pneumatophorus japonicus</i> )            | 8   | 0.01—0.06 | 0.04 |
| Sanma (mackerel pike, <i>Cololabis saira</i> )               | 5   | 0.00—0.04 | 0.01 |
| Sawara (spanish mackerel, <i>Scomberomorus niphonius</i> )   | 4   | 0.02—0.03 | 0.03 |
| Shirauo (whitebait, <i>Salanx microdon</i> )                 | 1   |           | 0.00 |
| Suketo-dara (walleye pollack, <i>Theragra chalcogramma</i> ) | 1   |           | 0.00 |
| Surume-ika (cattlefish, <i>Todarades pacificus</i> )         | 11  |           | 0.00 |
| Suzuki (perch, <i>Lataolabrax japonicus</i> )                | 3   | 0.15—0.28 | 0.21 |
| Tachiuo (hairtail, <i>Trichiurus lepturus</i> )              | 1   |           | 0.15 |
| Tobiuo (flying fish, <i>Prognichthys ago</i> )               | 5   | 0.00—0.02 | 0.01 |
| Unagi (eel, <i>Anguilla japonica</i> )                       | 3   | 0.00—0.07 | 0.03 |
| Ushigaeru (bullfrog, <i>Rana catesbeiana</i> )               | 2   |           | 0.00 |
| Wakasagi (smelt, <i>Hypomesus olidus</i> )                   | 3   | 0.01—0.14 | 0.07 |
| Total                                                        | 150 | 0.00—0.28 | 0.03 |

N : number of samples

Table 2. PCB Concentrations in Fishes in the 1973—1981 Survey (ppm)

| Year | N   | Range     | Mean |
|------|-----|-----------|------|
| 1973 | 130 | 0.00—1.87 | 0.15 |
| 1974 | 86  | 0.00—1.22 | 0.09 |
| 1975 | 70  | 0.00—0.60 | 0.06 |
| 1976 | 150 | 0.00—0.74 | 0.04 |
| 1977 | 156 | 0.00—0.55 | 0.03 |
| 1978 | 300 | 0.00—1.42 | 0.05 |
| 1979 | 139 | 0.00—0.53 | 0.03 |
| 1980 | 144 | 0.00—0.40 | 0.02 |
| 1981 | 150 | 0.00—0.28 | 0.03 |

N : number of samples

Table 3. PCB Concentrations in Short-Necked Clam (ppm)

| Sampling stations | N | Range     | Mean |
|-------------------|---|-----------|------|
| Nojimazaki        | 3 | 0.00—0.01 | 0.01 |
| Ohi               | 4 | 0.02—0.06 | 0.04 |
| Sanmaizu          | 3 |           | 0.01 |
| Jinkonagisa       | 2 | 0.00—0.01 | 0.01 |
| Futtsu            | 3 |           | 0.00 |

N : number of samples

検出された。また牛乳および育児用粉乳からは例年どおり検出されなかった。

母乳は出産後15～48日の産婦11名から提供されたものについて調査した。全乳中では0.010—0.036ppmの範囲で全検体からPCBが検出され、平均値は0.019ppmであった。また母乳の脂肪中濃度は0.283—0.995ppm、平均0.640ppmであった。1972年以来われわれが行なっている母乳汚染の調査結果より、全乳中の平均PCB濃度

を列挙すると、0.031, 0.030, 0.029, 0.035, 0.019, 0.018, 0.023, 0.022, 0.013, 0.019 ppmであった。大きな変動は見られないが、調査初期と比較してわずかに減少していることがわかる。

肉類は豚肉、豚肝、牛肉、牛肝、鶏肉、鶏肝の各5検体について調査したが、PCBは検出されなかった。

鶏卵14検体およびうずら卵6検体についても不検出であった。

食用油脂は合成樹脂製容器入りの精製ラード15検体、豚脂2検体、牛脂3検体のPCB含有量を検査したがいずれも不検出であった。

ベビーフードは肉入り野菜のビン詰め、粉末野菜スープ、ビスケットなど10検体について調査したがPCBは検出されなかった。

容器包装はメタクリル樹脂、ポリプロピレン、メラミン樹脂製の容器やストローなど20検体について検査したが、ポリエチレン製ボールから0.08ppm、表面プラスチックコーティングの紙皿から0.07ppm検出された他は不検出であった。

#### ま と め

1981年度における東京都のPCB汚染状況を調査する目的で食品等のPCB含有量を測定した。魚介類、水産加工品、乳製品、肉類、食用油脂、ベビーフード、容器包装および母乳について検査した結果、暫定規制値を越えるものは見いだされなかった。また、昨年度の調査結果と比較して大きな変動は見られず、全般的に低濃度であった。

謝辞 本調査にご協力いただいた東京都衛生局獣医衛生課、食品監視課ならびに母子衛生課の方々に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 山崎清子, 雨宮敬, 鈴木助治, 風間成孔, 吉原武俊

Table 4. PCB Concentrations in Dairy Products

| Samples              | N  | PCB concentration in wet material (ppm) |       | PCB concentration in extractable fat (ppm) |       |
|----------------------|----|-----------------------------------------|-------|--------------------------------------------|-------|
|                      |    | Range                                   | Mean  | Range                                      | Mean  |
| Butter               | 6  | 0.00—0.04                               | 0.01  |                                            |       |
| Cheese               | 30 | 0.00—0.05                               | 0.02  | 0.00—0.17                                  | 0.07  |
| Condensed milk       | 4  | 0.00—0.01                               | 0.00  | 0.00—0.03                                  | 0.01  |
| Modified milk powder | 10 |                                         | 0.00  |                                            | 0.00  |
| Milk                 | 20 |                                         | 0.00  | 0.00—0.02                                  | 0.00  |
| Human milk           | 11 | 0.010—0.036                             | 0.019 | 0.283—0.995                                | 0.640 |

N : number of samples



Table 5. PCB Concentrations in Marine Products, Meats and others (ppm)

| Samples        |                 | N  | Range     | Mean |
|----------------|-----------------|----|-----------|------|
| Marine product | shrimp*         | 24 |           | 0.00 |
|                | lobster*        | 9  |           | 0.00 |
|                | cuttle fish*    | 9  | 0.00—0.01 | 0.00 |
|                | horse-mackerel* | 2  | 0.00—0.33 | 0.17 |
|                | smelt*          | 2  | 0.09—0.19 | 0.14 |
|                | others*         | 14 | 0.00—0.01 | 0.00 |
|                | processed       | 30 | 0.00—0.09 | 0.01 |
| Meat           | pork            | 5  |           | 0.00 |
|                | pig liver       | 5  |           | 0.00 |
|                | beef            | 5  |           | 0.00 |
|                | cow liver       | 5  |           | 0.00 |
|                | chicken         | 5  |           | 0.00 |
|                | chicken liver   | 5  |           | 0.00 |
| Egg            | hen             | 14 |           | 0.00 |
|                | quail           | 6  |           | 0.00 |
| Edible fat     |                 | 20 |           | 0.00 |
| Baby food      |                 | 10 |           | 0.00 |
| Food wrapper   |                 | 20 | 0.00—0.08 | 0.01 |

N : number of samples

\* imported

: 東京衛研年報, 32-1, 151, 1981

谷哲也: 東京衛研年報, 25, 119, 1974

2) 山野辺秀夫, 天川映子, 鈴木助治, 小泉清太郎, 戸

## 牛乳中のシアン反応物質について

竹 葉 和 江\*, 小久保 彌太郎\*, 村 上 文 子\*, 村 上 一\*, 山 田 満\*\*

### Cyanogenic Compound in Cow's Milk

KAZUE TAKEBA\*, YATARO KOKUBO\*, FUMIKO MURAKAMI\*,  
HAJIME MURAKAMI\* and MITSURU YAMADA\*\*

Cyanide content in 112 samples of milk marketed in the Metropolitan area was measured with pyridine-pyrazolone reagent. Cyanide was detected at the average of  $0.02 \mu\text{g}/\text{mL}$  with the range of  $0.01-0.06 \mu\text{g}/\text{mL}$  in all the samples, and was confirmed to be free cyanide ion by both gas chromatography-mass spectrometry and ion chromatography. These cyanide levels did not show any differences by the districts or the time of production. Cyanide was also measured in 15 samples of individual raw milk and 5 samples of raw milk pooled in the tank lorry: no cyanide was detected in the raw milk immediately after milking; and it was positive with the range of  $0.01-0.02 \mu\text{g}/\text{mL}$  in the pooled raw milk. Serial measurement in the five samples of milk from the same individual stored at  $4^\circ\text{C}$  for 14 days demonstrated no detectable level of cyanide in the initial stage of storage, but cyanide became detectable at day 1 to 2, and reached  $0.05-0.10 \mu\text{g}/\text{mL}$  at day 14.

**Keywords**: cyanide, free cyanide ion, milk marketed, raw milk, tank lorry pyridine-pyrazolone reagent, gas chromatography-mass spectrometry, ion chromatography

牛乳はその製造過程で、食品衛生法に基づいて定められた条件で加熱殺菌する以外は、手を加えてはならない純正食品である。

先に著者らは、牛乳の安全性および健全性を確保する目的で、牛乳中に、その製造過程で混入する可能性のある消毒剤および牛乳から移行残留する恐れのある疾病治療薬について報告してきた<sup>1,2)</sup>。

今回著者らは、市販の牛乳からヒトに対して有害であるシアン化合物イオン（以下シアンと略す）を、ピリジン-ピラゾロン法で検出したので、その検出状況を明らかにすると共に、検出されたシアンが遊離のシアンであるかどうかを、ガスクロマトグラフ質量分析計（以下GC-MSと略す）およびイオンクロマトグラフ（以下ICと略す）を用いて調べた。ついで牛乳中に検出されるシアンが、内因性のものかあるいは外因性のものかを明らかにするため、搾乳直後の生乳および加熱処理前の合乳についてシアンの有無を調べ、また実験的に低温保存した生乳中のシアンを経時的に調べたので、これらの成績について報告する。

### 試料および実験方法

#### 1. 試料

調査牛乳は、1980年6月から1981年9月までの間に都内で販売されていたもの112検体で、これらの牛乳は、北海道、東北、関東そして中部地方の1道1都11県で生産されたものである。生乳は、同時期に都下の牧場で直接採取した15検体、合乳は都内の乳処理工場に入った運搬用ローリーから直接採取した5検体である。

#### 2. 試薬

##### 1) クエン酸緩衝液 (pH5.9)

クエン酸128.1gおよび水酸化ナトリウム64.4gを水に溶かして1ℓとし、pH5.9に調整した。

##### 2) リン酸緩衝液 (pH6.8)

リン酸1カリウム3.40gとリン酸2ナトリウム3.55gを水に溶かし1ℓとした。

##### 3) 1%クロラミンT溶液

クロラミンT 1.25gを水に溶かし100mℓとした。この溶液は使用の直前に調製した。

##### 4) ピリジン-ピラゾロン混液

\* 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 東京都衛生局環境衛生部獣医衛生課

1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン 0.25g を75℃の熱水100ml に溶かしたのち、室温まで冷却し、これにビス(1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン)0.02g をピリジン 20ml に溶かしたものを加えて混合した。この溶液は使用の直前に調製した。

#### 5) シアン標準液

シアン化カリウム 2.51g を水に溶かして 1l とした。この溶液のシアンを常法により N/10 硝酸銀溶液による滴定で求め、この中からシアン 10mg に相当する量を取り、4%水酸化ナトリウム溶液 50ml と水を加え 1l とした (10 $\mu$ g CN<sup>-</sup>/ml)。

#### 6) 飽和臭素溶液

水に臭素を飽和させ、その上澄を使用した。冷所に保存した。

その他の試薬は、すべて特級を使用し、有機溶媒は残留農薬試験用を使用した。

#### 3. 生乳および牛乳中のシアンの測定方法

牛乳中には 1~10 $\mu$ g/ml のチオシアン化物イオン (以下チオシアンと略す) が含まれており<sup>3)</sup>、蒸留条件によってはこれがピリジン-ピラゾロン混液で正の妨害をするので、試料をクエン酸緩衝液で pH5.9 にして蒸留し、チオシアンの影響を防いだ。すなわち、試料 100ml を蒸留フラスコにとり、これにクエン酸緩衝液 50ml と蒸留水 100ml およびシリコーン樹脂 1 滴を加え、毎分 1ml の流出速度で蒸留した。共栓付 100ml メスリンダーにあらかじめ 2%水酸化ナトリウム溶液 20ml を入れておき冷却器の先端をこの中に浸し、受器中の液量が 90ml になったら蒸留をやめ、冷却器をはずし管の先端を少量の水で洗い、洗液は受器に合わせ水で 100ml とし、これを試験溶液とした。以下シアンの定量方法は、JIS の工場排水試験方法 (JIS K 0102 1974) のピリジン-ピラゾロン法に従って行った。すなわち試験溶液 20ml を 50ml の比色管にとり、酢酸 (1+1) で中和した後、リン酸緩衝液 10ml と 1%クロラミン T 溶液 0.25ml 加え、ただちに栓をして振り混ぜ、3~5 分間後ピリジン-ピラゾロン混液 15ml を加え、室温で 30 分間放置後水を加えて 50ml とした。これを波長 620nm で測定し、あらかじめ作成した検量線からシアンの濃度を求めた。全操作にわたって空試験を行い結果を補正した。

分光光度計は、日立 EPS-3T 型自記分光光度計を使用した。

#### 4. GC-MS 用試料の調製および測定条件

GC-MS 用試料の調製は、BRABANDER らの方法に準拠して行い、シアンをブロムシアンとして測定し

た<sup>4)</sup>。すなわち、3. のシアンの測定に使用した蒸留液をすべて合わせて再蒸留し濃縮した。これを 10ml 共栓試験管にとり、酢酸 (1+1) で中和後、塩酸 (1+2) 0.7 ml、飽和臭素溶液 0.3ml を加え混和し、5 分間放置した。これにアスコルビン酸約 50mg とベンゼン 2ml 加えて激しく振り、3000rpm で 5 分間遠心分離し、上澄のベンゼン層を GC-MS 用試料とした。

GC-MS は、Hewlett-Packard 5710A-JEOL JMS-D 300, JMA 2000 Disc System を使用した。カラムは、PORAPAK QS, 2mm $\times$ 3feet ガラスカラム、カラム温度 160℃、セパレーター温度 250℃、ヘリウムガス流量 15ml/min そしてイオン化電圧 70eV で操作した。

#### 5. IC 用試料の調製および測定条件

3. のシアンの測定に使用した蒸留液をすべて合わせて再蒸留し濃縮したものを IC 用試料とした。

IC は、Dionex IC Model 10 (エレクトロケミカル検出器付) を使用した。カラムは、HPIC 4 $\times$ 250mm、溶離液は、0.002M 炭酸ナトリウム、0.012M エチレンジアミンおよび 5% イソプロピルアルコールを用い、流量は 195ml/hr で操作した。

### 実験結果

#### 1. 牛乳および生乳中のシアンの検出状況

都内で販売されていた牛乳 112 検体の測定結果を生産地別に Table 1 に示した。すべての牛乳から微量のシアンが検出され、その平均値と検出範囲は、それぞれ 0.02  $\mu$ g/ml、0.01~0.06  $\mu$ g/ml であった。牛乳の生産地によるシアンレベルの差は認められなかった。

Table 1. Cyanide Content of Liquid Whole Milk Obtained from Various Districts

| District | No. of Sample | Cyanide ( $\mu$ g/ml) Range | Mean |
|----------|---------------|-----------------------------|------|
| Hokkaido | 9             | 0.01—0.03                   | 0.02 |
| Iwate    | 1             |                             | 0.02 |
| Yamagata | 1             |                             | 0.02 |
| Tochigi  | 1             |                             | 0.03 |
| Ibaragi  | 1             |                             | 0.02 |
| Gunma    | 5             | 0.01—0.04                   | 0.02 |
| Saitama  | 11            | 0.01—0.06                   | 0.03 |
| Chiba    | 28            | 0.01—0.04                   | 0.03 |
| Tokyo    | 36            | 0.02—0.03                   | 0.03 |
| Kanagawa | 9             | 0.02—0.03                   | 0.03 |
| Niigata  | 1             |                             | 0.02 |
| Nagano   | 2             |                             | 0.02 |
| Shizuoka | 7             | 0.02—0.03                   | 0.02 |

Table 2. Cyanide Content of Liquid Whole Milk Obtained from Eight Dairy Plants

| Dairy Plant |           | A    | B    | C    | D    | E    | F    | G    | H    |
|-------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1980        | June      | 0.03 | 0.02 | 0.04 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.03 |
|             | July      | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.03 |
|             | December  | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.02 |
| 1981        | February  | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.06 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.02 |
|             | March     | 0.03 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.02 | 0.03 |
|             | June      | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.04 | 0.03 | 0.01 |
|             | July      | 0.03 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.02 |
|             | September | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.04 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.02 |

(μg/ml)

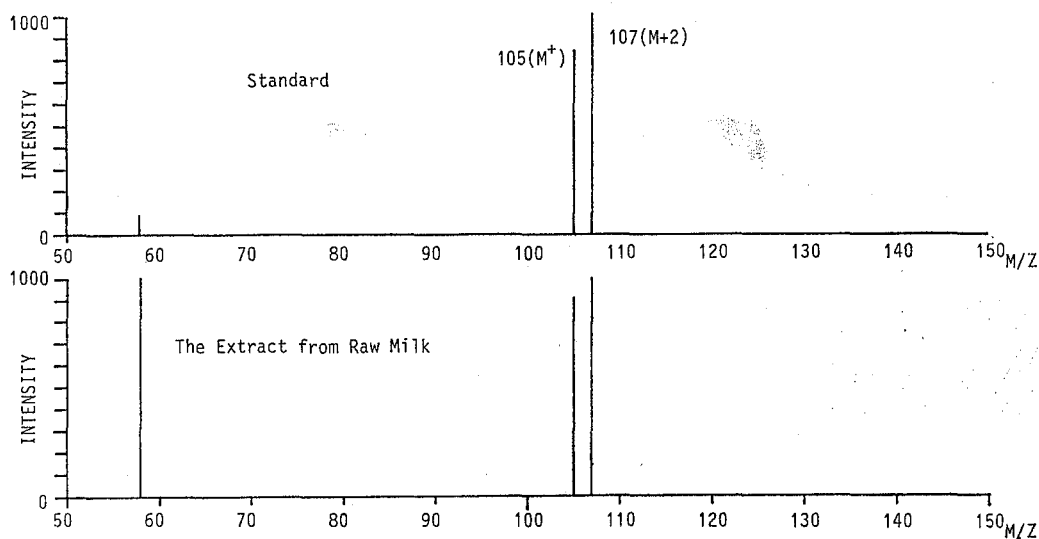


Fig. 1. Mass Spectra of Bromine Cyanide

Table 2 は、東京近郊にある 8 ケ所の乳処理工場で製造された牛乳について、シアンの測定を 1 年間実施した成績である。表から明らかなように、シアンレベルは季節による変化および工場別による差異は認められず、年間を通してほぼ一定であった。

なお、1 例ではあるが、製造後 5 日以内のオランダの牛乳を入手したので、このシアン量を測定したところ 0.13 μg/ml で、わが国の牛乳に比べやや高いレベルであった。

これらの牛乳については、ビリジノーピラゾン法と平行して、JIS の通気法でも測定したところ同様な結果が得られた。

また搾乳直後の個別生乳 15 検体および運搬用タンク

ローリーの合乳 5 検体についてシアンの測定を行ったところ、搾乳直後の生乳については、いずれからも検出されなかったが、合乳からは 0.01~0.02 μg/ml の範囲で検出された。

## 2. GC-MS および IC による牛乳中のシアンの確認

Fig. 1 に GC-MS で測定した結果を示した。ブロムシアン標準品は、保持時間 1.4 分で、分子イオンピーク ( $M^+$ ,  $m/z$  105) およびそのアイソトープピーク ( $m/z$  107) の臭素化合物にみられる特徴的のピークパターンを示し、試料についても全く同様なスペクトルが得られた。つぎに Fig. 2 に IC の結果を示した。標準品の遊離シアンの保持時間に一致するピークが、試料についても認められ

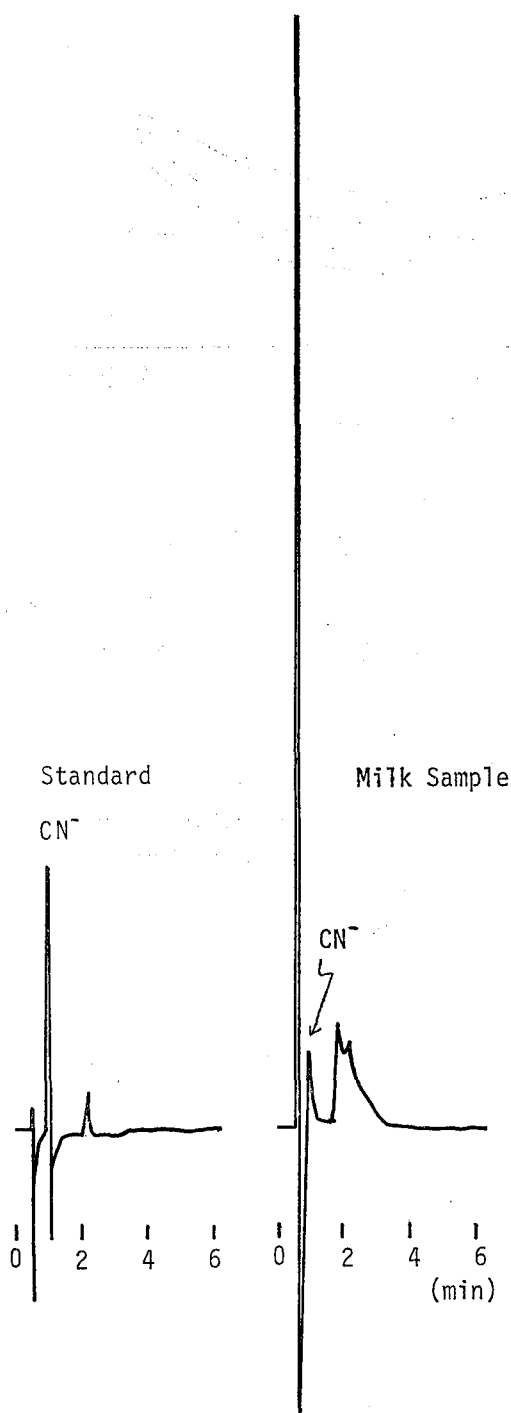


Fig. 2. Ion Chromatograms of Cyanide

た。

### 3. 実験的に低温保存した生乳中のシアンの消長

搾乳直後の個体別生乳5検体を4℃で14日間保存し、経時的にシアンの測定を行った。その結果、Fig. 3 に示すように、搾乳直後には検出されなかったシアンは、1～2日後から検出されるようになり、以後はゆるやかに増加して14日目には0.05～0.10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となった。

### 考 察

乳汁中には、通常の成分としてチオシアンやビタミンB<sub>12</sub>などのシアン化合物が存在しており、これらの化合物はヒトに対して有害なものでなく、牛乳の安全性および健全性の上でも何ら問題はない。しかし、遊離のシアンの牛乳から検出されることは、たとえその量が微量であっても好ましいことではないと思われる。

今回検査したすべての牛乳から、遊離のシアンの0.01～0.06  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲で検出され、そのシアンレベルは、生産地や生産時期による差は認められなかった。また参考のため調べたオランダの牛乳からも同様に遊離シアンが検出されたことから、牛乳中には一般的に微量の遊離シアンが存在するものと考えられる。

これらの牛乳中の遊離シアンの、

- ①搾乳直後の生乳からは、検出されなかった
- ②搾乳後時間の経過している合乳からは、市販牛乳と同レベルに検出された
- ③搾乳直後の生乳を、遊離シアンの汚染が全く考えられない条件下で、実験的に4℃で保存すると、1～2日後から検出されはじめ、以後検出量は経時的に増加した

などの一連の成績から、外因性のものではなく、内因性のものではないかと考えられる。すなわち、生体内の乳汁中に遊離シアンは存在しないが、搾乳後低温による保存中に、何らかの要因により生乳中に生成されたものと考えられ、この際に Wood の記載に見られるように<sup>9)</sup>、乳汁中のチオシアンが重要な役割を演じているものと考えられる。

今後、この点についてさらに検討を加え、牛乳から検出される遊離シアンとの関係を明らかにしておく必要がある。

### 要 約

都内で販売されている牛乳112検体について、ビリジーン-ピラゾロン法によりシアンを測定した結果、すべての牛乳から0.01～0.06  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲で、平均0.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$  検出され、これはGC-MSおよびICでも遊離のシアンであることが確認された。なお、これらのシアンレベ

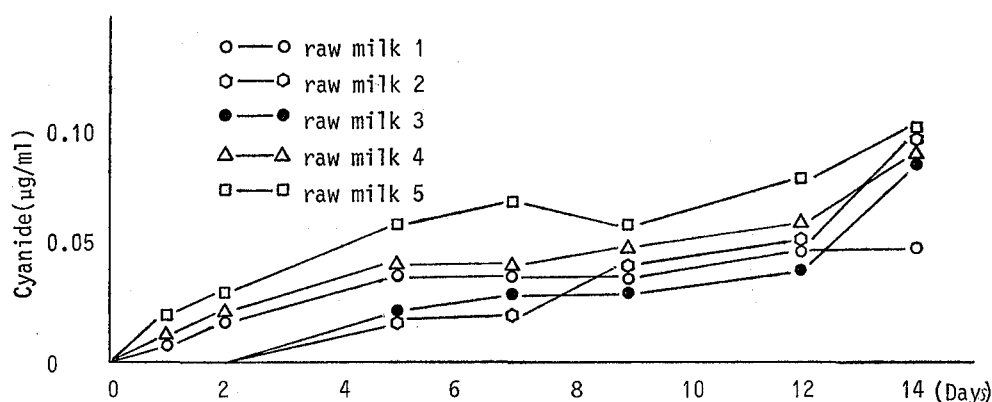


Fig. 3. Increase of Cyanide Levels in Raw Milk during Storage at 4°C

ルには、生産地および生産時期による差は認められなかった。また、搾乳直後の個体別生乳15検体とタンクローリーの合乳5検体についても遊離シアンを測定したところ、搾乳直後の生乳は、いずれからも検出されず、合乳からは0.01~0.02µg/mlの範囲で検出された。ついで個体別生乳5検体を用い、4°Cで14日間保存し、経時的に遊離シアンの測定をしたところ、保存当初検出されなかった遊離シアンは、1~2日後から検出されはじめ、14日目には0.05~0.10µg/mlのレベルとなった。

謝辞 本研究にあたり、有益な助言をいただいた環境保健部水質研究科土屋悦輝主任研究員に深謝致します。

#### 文 献

1) 竹葉和江, 松本昌雄, 村上 一: 東京衛研年報, 31

-1, 166, 1980

2) 竹葉和江, 松本昌雄, 村上 一: 東京衛研年報, 32  
-1, 155, 1981

3) Wood, J.L. : *Chemistry and Biochemistry of Thiocyanic Acid and its Derivatives*, Ed. Newman, A.A., 161, 1975, Academic Press, New York

4) De Brabander, H.F. and Verbeke, R. : *Journal of Chromatography*, 138, 131, 1977

5) Wood, J.L. : *Chemistry and Biochemistry of Thiocyanic Acid and its Derivatives*, Ed. Neuman, A.A. 199, 1975, Academic Press, New York

## かんきつ類中の防ばい剤に関する研究(1) 市販品の使用実態調査

安田 和男\*, 西島 基弘\*, 冠 政光\*, 斉藤 和夫\*  
中沢 久美子\*, 上村 尚\*, 中里 光男\*, 菊地 洋子\*  
井部 明広\*, 藤沼 賢司\*, 永山 敏廣\*, 牛山 博文\*  
直井 家壽太\*

## Studies on Fungicides in Citrus Fruits (I) Market Investigation of Citrus Fruits

KAZUO YASUDA\*, MOTOHIRO NISHIJIMA\*, MASAMITSU KANMURI\*,  
KAZUO SAITO\*, KUMIKO NAKAZAWA\*, HISASHI KAMIMURA\*,  
MITSUO NAKAZATO\*, YOKO KIKUCHI\*, AKIHIRO IBE\*, KENJI FUJINUMA\*,  
TOSHIHIRO NAGAYAMA\*, HIROFUMI USHIYAMA\* and YASUTA NAOI\*

**Keywords:** 防ばい剤 fungicide, ジフェニル diphenyl, オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, チアベンダゾール thiabendazole, かんきつ類 citrus fruits, 実態調査 market investigation, サンプルング方法 sampling method

### 緒 言

現在, 我国ではレモン, オレンジ, グレープフルーツ等のかんきつ類およびバナナにカビの発生防止を目的として, ジフェニル(以下DPと略す), オルトフェニルフェノール(以下OPPと略す), そのナトリウム塩およびチアベンダゾール(以下TBZと略す)を基準値を定めて使用することが許可されている。

かんきつ類は米国の農業政策にも関連し, 輸入量が年々増加しているが, これら防ばい剤の種類および使用量は日本の食品衛生法に適合しなければならないことは当然である。

そこで, 我々は昭和49年より継続的にレモン, オレンジおよびグレープフルーツ等の輸入かんきつ類について, 昭和56年にはマーマレードおよびジャム等の加工品について防ばい剤の使用実態を調査したのでその結果を報告する。また, 調査を開始するに先立ち, サンプルング方法を検討した。すなわち, 一箱中の各個体間の含有量の比較および一個体内での部位別含有量の調査を行ったので併せて報告する。

### 実験方法

#### 1. 試料

試料のかんきつ類は昭和49年から56年までに, 東京築地市場, デパートあるいは小売店等で市販されていたもののうち, レモン137検体, オレンジ128検体およびグレープフルーツ370検体, 計635検体を試料とした。なお,

加工品は昭和56年に市販されていたマーマレード, ピール, ジャム,ゼリーおよびジュースの計34検体を試料とした。

#### 2. 試薬及び装置

- 1) DP: 東京化成工業株式会社製 99%以上
- 2) OPP: 東京化成工業株式会社製 95%以上
- 3) TBZ: 東京化成工業株式会社製 98%以上
- 4) DP, OPP および TBZ 標準溶液: DP はシクロヘキサンに, OPP は *n*-ヘキサンに, TBZ は 0.1 N・HCl に溶解し, それぞれ 1mg/ml になるように調製した。
- 5) シクロヘキサン: 吸収スペクトル測定用 関東化学株式会社製
- 6) その他の試薬: すべて市販特級品を用いた。
- 7) 薄層クロマトグラフィー用プレート: DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F-254 Merck社製
- 8) 紫外線照射器: Camag 社製 Reproster
- 9) 蒸留装置: 第9改正薬局方に規定された精油定量器に還流冷却器を装着したもの
- 10) 自記分光光度計: (株)日立製作所製 EPS-3T
- 11) 分光けい光光度計: (株)日立製作所製 MPF-4
- 12) ガスクロマトグラフ: (株)島津製作所製 GC-5A
- 13) ガスクロマトグラフィー用充填剤およびカラム: 5%ポリエチレングリコール 20M (Gaschrom Q) 3 mmφ×2m ガラスカラム

\* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

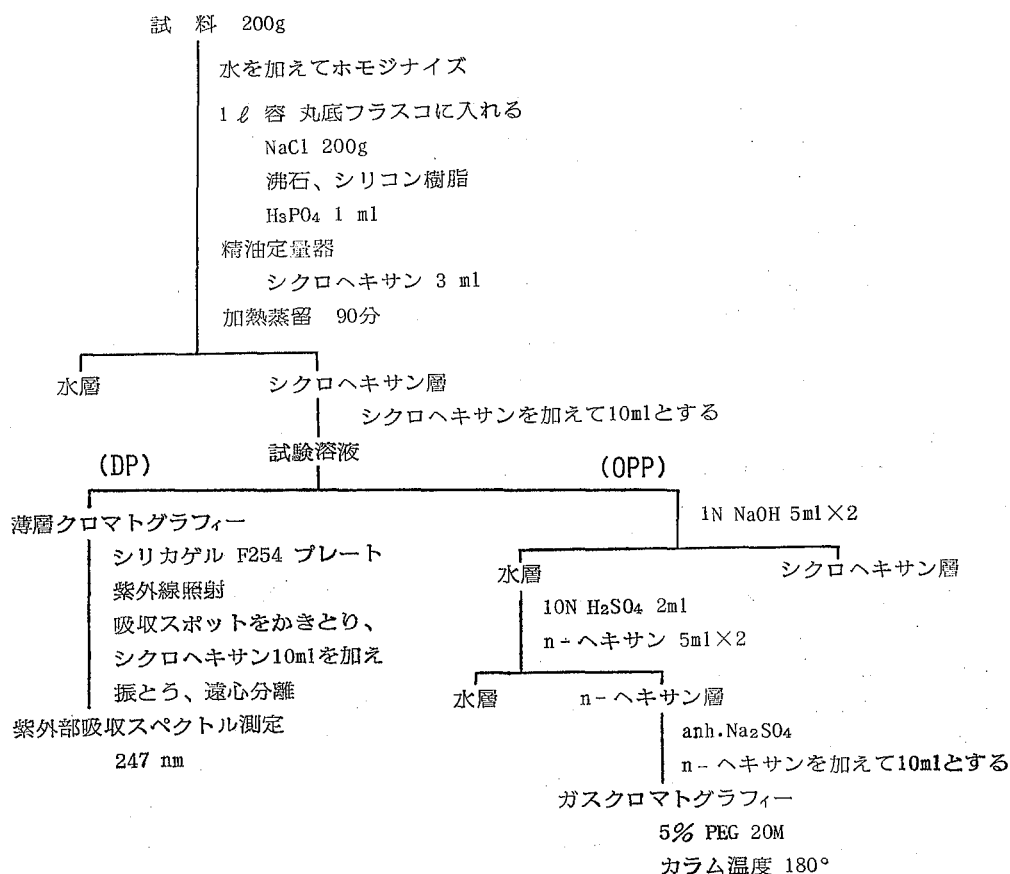


図 1. ジフェニルおよびオルトフェニルフェノール分析法

## 3. 分析法

- 1) DP: 衛生試験法注解に準じた.
- 2) OPP: 衛生試験法注解に準じた.
- 3) TBZ: 三原<sup>1)</sup>の方法に準じた.

それぞれの分析法の概要を図1および2に示した.

## 結果および考察

## 1. 一箱中の箱詰め的位置による含有量

## 1) 一箱中の各段での含有量の差

輸入かんきつ類はダンボールに詰め輸入される場合が多く、特に、グレープフルーツは上、中、下、3段に重ね各段の間にケーシングが入れてある場合が多い.

そこで、市販品一箱中の各個体について、箱詰め位置の違いによりどの程度の差があるかを知るため、各段より3~5個を取りDP、OPPおよびTBZ含有量を測定し、各段における含有量の範囲および平均値を求め表1に示した.

各かんきつ類の各段のDP、OPPおよびTBZ含有量を平均値と比較すると、1.2~2.1倍の差がみられたが、段別による含有量の違いに、特に傾向はみられなかった. また、各段での個体間における含有量を最小値および最大値と比較すると、TBZはレモンで19倍、オレンジで6倍、グレープフルーツで4.6倍と大きな差がみられた. DPおよびOPPについても約2倍の差がみられた.

## 2) 一箱中での含有量の個体差

一箱中のDP、OPPおよびTBZ含有量の最小値、最大値を比較すると、レモンでそれぞれ3.1倍、2.5倍および19倍と大きな差がみられた. TBZはオレンジおよびグレープフルーツでもそれぞれ6倍および4.6倍の差が認められた.

このように各かんきつ類とも同一箱中で含有量に大きな差がみられた原因は、OPPおよびTBZについては



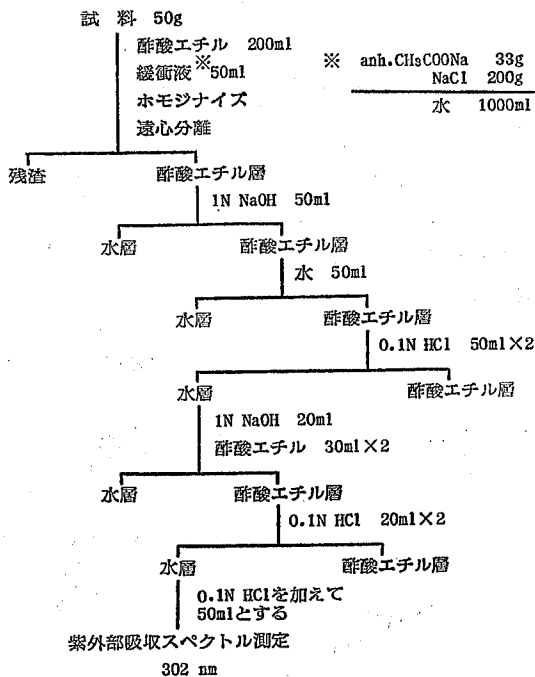
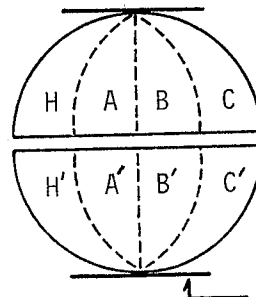
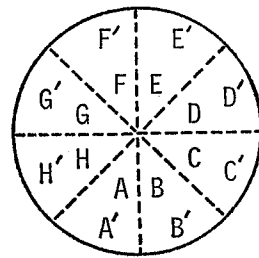


図 2. チアペンダゾール分析法



ケーシング

| (ppm) |     |
|-------|-----|
| 部位    | 含有量 |
| A     | 111 |
| B'    | 115 |
| C     | 134 |
| D'    | 138 |
| E     | 110 |
| F'    | 117 |
| G     | 92  |
| H'    | 119 |

図 3. グレープフルーツ個体内の測定部位  
およびDP含有量

表 1. 箱詰めの各位置による含有量

(ppm)

| 試料       | 位置(段) | 試料数 | DP    |     | OPP     |     | TBZ       |      |
|----------|-------|-----|-------|-----|---------|-----|-----------|------|
|          |       |     | 範囲    | 平均値 | 範囲      | 平均値 | 範囲        | 平均値  |
| レモン      | 上     | 3   | 10—16 | 13  | 3.1—3.5 | 3.3 | 0.10—1.9  | 0.70 |
|          | 中     | 5   | 15—26 | 20  | 2.3—5.8 | 4.4 | 0.26—1.8  | 0.92 |
|          | 下     | 3   | 22—31 | 26  | 4.2—5.1 | 4.6 | 0.88—1.5  | 1.3  |
| オレンジ     | 上     | 3   | 18—20 | 19  | 1.5—2.1 | 1.9 | 1.4—8.5   | 4.7  |
|          | 中     | 5   | 12—18 | 14  | 1.1—2.0 | 1.6 | 1.9—6.5   | 4.2  |
|          | 下     | 3   | 11—16 | 14  | 1.5—2.5 | 1.9 | 2.9—4.6   | 3.5  |
| グレープフルーツ | 上     | 3   | 16—38 | 27  | 1.6—1.7 | 1.7 | 0.32—0.77 | 0.52 |
|          | 中     | 5   | 18—26 | 22  | 2.0—2.6 | 2.3 | 0.30—1.4  | 0.69 |
|          | 下     | 3   | 18—20 | 19  | 1.8—2.6 | 2.1 | 0.84—1.3  | 1.1  |

輸出国での塗布方法が不明であるため詳細な考察は不可能である。しかし、それらが均一に塗布されていたと仮定した場合でも、日本に輸入後、腐敗したものを除去する目的で開封し、仕分けをした後、再度、詰め替えを行うため必ずしも輸入時と同一の箱ではないことも原因の一つと考えられる。特に、DP は詰め替えを行うことにより、それぞれの個体におけるケーシングとの接触場所が変わるため、含有量に差があらわれるものと推察され

る。

これらのことから、市販品の防ばい剤含有量の検査をする場合は、サンプリング方法により結果が大きく変わるため、以後の実験は数個分を合せて試料とすることとした。

## 2. グレープフルーツ個体内の部位別 DP 含有量

ダンボール箱の中段からグレープフルーツを取り、ケーシングに接触していた面を上下とし図 3 に示したと

おり2等分後、上部をA～H、下部をA'～H'にそれぞれ8等分し16部位に分けた。上、下それぞれを一つおきに取り、8部位についてDP含有量を測定し、図3に併せて示した。

各部位の含有量を比較すると、C部の134ppm、D'部の138ppmは最も少ないG部の92ppmに対し、約1.5倍の値であった。

そこで、サンプリングは数個（3個以上）を取り、かつ、一個体について2ヶ所以上の部位を取り、合せることとした。

### 3. 市販品の年度別使用実態調査

レモン、オレンジおよびグレープフルーツについて昭和49年から56年までDP、OPPおよびTBZ含有量を測定し、年度別に検出したものの平均値（以下、平均値という）を求め、その結果を図4に示した。

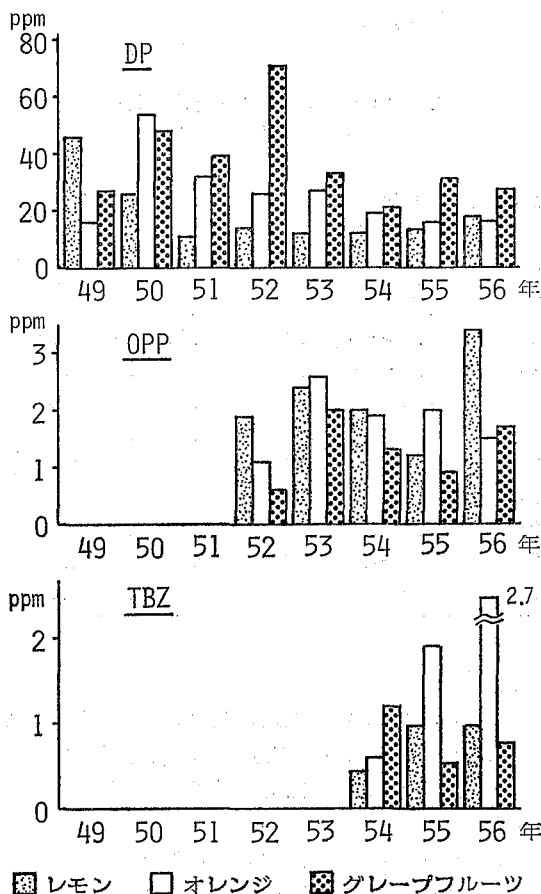


図4. 年度別使用実態

1) DP: レモンは49, 50年の平均値は、それぞれ46ppmおよび26ppmと比較的高い値を示したが、51年以降は11～18ppmとほぼ同程度の値がみられた。

オレンジは使用基準値の70ppmを越えるものが50年に2検体（75ppmおよび87ppm）52年に1検体（83ppm）検出され、平均値も50年は54ppmと最も高く、以後は56年まで徐々に減少する傾向を示した。

グレープフルーツは使用基準値を越えるものが50年に1検体、52年に97検体、53年に1検体がそれぞれ検出された。特に、52年は180検体のうち54%が基準値を上回り、平均値でも71ppmと高い値が得られた。53年以降の平均値は21～33ppmの範囲であった。

各年を通算したレモン、オレンジおよびグレープフルーツのDP検出率はそれぞれ、93%、97%および92%といずれも非常に高率であることがわかった。

2) OPP: レモン、オレンジおよびグレープフルーツとも含有パターンはほぼ同様の傾向を示した。各かんきつ類の平均値を比較すると、53年にはそれぞれ2.4ppm、2.6ppmおよび2.0ppmと高く、以後、レモンが56年に3.4ppmと比較的高い値を示した以外は、いずれも1～2ppm程度の値が得られた。なお、OPPは食品添加物として昭和52年に許可されたがそれ以前の50年にオレンジで1検体（4.7ppm）グレープフルーツで1検体（0.6ppm）検出されたものがあつた。

3) TBZ: 昭和53年8月に使用が許可されたことから、53年以前には50年にグレープフルーツで1検体（3.2ppm）53年にオレンジで1検体（0.5ppm）検出したのみであった。しかし、54年以降は検出率が高く、56年は全てのオレンジから検出されその平均値も2.7ppmと高い値を示した。グレープフルーツは54年に平均値1.2ppmと最も高い値を示した。

### 4. 市販品の含有量別分布

レモン、オレンジおよびグレープフルーツにおけるDP、OPPおよびTBZの含有量別の検出率を図5に示した。

1) DP: レモンは全試料の約半数が5～15ppmの範囲で検出された。平均値は14ppm、最高値は59ppmであった。

オレンジは10～20ppmの範囲で最も多く検出された。平均値は23ppmであったが、128検体のうち使用基準値を越えるものが3検体にみられ、最高値は87ppmであった。

グレープフルーツはレモンおよびオレンジに比較して含有量が多く、平均値も50ppmであり370検体のうち

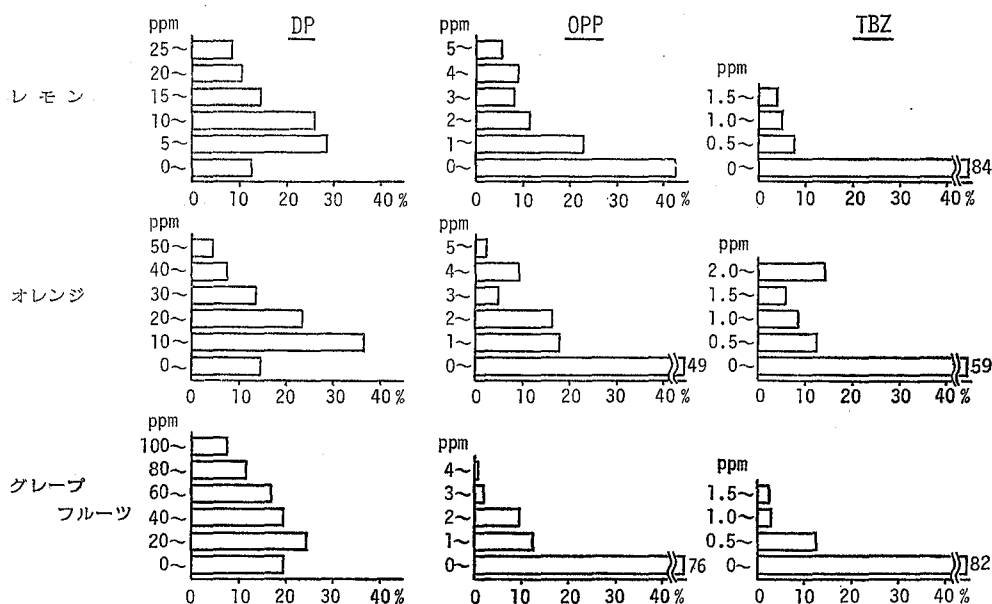


図 5. 市販品の使用実態

27%の99検体が使用基準値を上回り、その最高値は 150 ppmであった。

2) **OPP**: レモンは全試料の43%が 1ppm 未満であり、平均値は2.3ppm, 最高値は5.8ppmであった。

オレンジはレモンと同様、1ppm 未満のものが 49%と多く、平均値は2.2ppm, 最高値は6.5ppmであった。

グレープフルーツは 1ppm 未満のものが76%であり、それらのうちの83%は全く検出しないものであった。なお、全試料の平均値は1.4ppm, 最高値は4.0ppmであり基準値の 10ppm を越えるものはみられなかった。レモン、オレンジおよびグレープフルーツとも全試料の約80

%が 3ppm 未満であった。

3) **TBZ**: レモン、オレンジおよびグレープフルーツとも TBZ を検出しないものが全試料中、それぞれ73%, 56%および74%を占めたが、これは TBZ が使用許可になる以前に調査を行った試料が多いためと思われる。各種類の平均値を比較すると、レモン 0.8ppm, グレープフルーツ 0.9ppm に対し、オレンジは 2.0ppm と高く、2ppm を越えるものが14%みられた。最高値は8.5ppmであり、基準値の10ppm を越えるものはみられなかった。

#### 5. DP, OPP および TBZ の混合使用割合

3種の防ばい剤が使用可能となった54年以降について DP, OPP および TBZ の混合使用割合を図 6 に示した。

レモンは、54, 55年には主に DP および OPP の2種併用のものが、それぞれ59%および47%みられたが、56年には DP, OPP および TBZ の3種併用が80%を占めた。

オレンジは54, 55年には主に DP および TBZ の2種併用がそれぞれ42%および69%であったが、56年には3種併用が92%と多く、1種あるいは2種併用のものはみられず、いずれも3種併用していることがわかった。

グレープフルーツは54, 55年は単一の防ばい剤を使用していたものが約50%みられたが、56年には3種を併用しているものが57%と最も多くみられた。

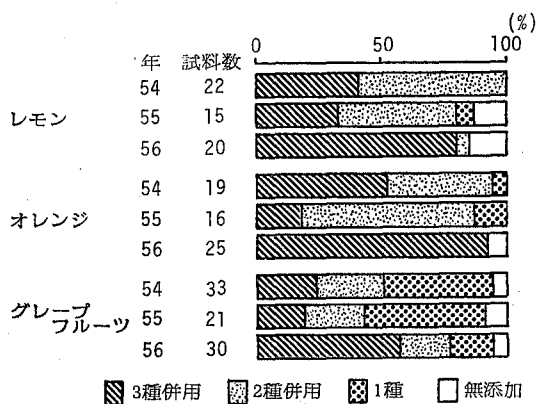


図 6. DP, OPP および TBZ の混合使用割合

表 2. かんきつ類加工品における使用実態

| 試料     | 原料       | 試料数 | 検出数 | DP(ppm) | OPP(ppm) | TBZ(ppm) | 製造国名    |
|--------|----------|-----|-----|---------|----------|----------|---------|
| マーマレード | オレンジ     | 21  | 5   | —       | —        | —        | スイス     |
|        |          |     |     | —       | —        | —        | "       |
|        |          |     |     | —       | —        | 0.43     | フランス    |
|        |          |     |     | —       | —        | 0.27     | "       |
|        |          |     |     | —       | —        | 0.02     | アメリカ    |
|        |          |     |     | —       | —        | —        | "       |
|        |          |     |     | —       | 0.33     | 0.05     | 日本      |
|        |          |     |     | —       | —        | 0.02     | "       |
|        |          |     |     | —       | —        | —        | "       |
|        |          |     |     | —       | —        | —        | "       |
|        |          |     |     | —       | —        | —        | "       |
|        |          |     |     | —       | —        | —        | "       |
|        |          |     |     | —       | —        | —        | "       |
|        |          |     |     | —       | —        | —        | "       |
|        | グレープフルーツ | 4   | 3   | —       | 0.17     | 0.67     | イギリス    |
|        |          |     |     | —       | —        | 0.20     | "       |
|        |          |     |     | 1.5     | —        | —        | 日本      |
|        |          |     |     | —       | —        | —        | "       |
| ビール    | オレンジ     | 3   | 1   | 6.3     | —        | —        | 日本      |
|        |          |     |     | —       | —        | —        | "       |
|        |          |     |     | —       | —        | —        | "       |
|        | レモン      | 2   | 2   | 7.8     | —        | 0.01     | 日本      |
|        |          |     |     | —       | —        | 0.01     | "       |
| ジャム    | レモン      | 2   | 0   | —       | —        | —        | オーストラリア |
|        |          |     |     | —       | —        | —        | イギリス    |
| ゼリー    | グレープフルーツ | 1   | 0   | —       | —        | —        | 日本      |
| ジュース   | レモン      | 1   | 0   | —       | —        | 0.06     | スイス     |

これらのことから、レモン、オレンジおよびグレープフルーツともに、56年は明らかに DP, OPP および TBZ の 3 種を同時に使用する場合が多くみられ、今後 3 種の防ばい剤を併用する傾向が強くなるものと考えられる。

#### 6. かんきつ類加工品の含有量調査

56年に市販のマーマレード25検体、ビール5検体、ジャム2検体、ゼリー1検体およびジュース1検体について、DP, OPP および TBZ 含有量を測定し、その結

果を表2に示した。

マーマレードは TBZ を含有するものが25検体中7検体あり、特に、オレンジマーマレード5検体から0.02～0.43ppm、グレープフルーツマーマレード2検体から0.20ppm、0.67ppmが検出された。また、日本で製造されたオレンジマーマレードから OPP が0.33ppm、グレープフルーツマーマレードから DP が1.5ppm 検出された。その他、イギリス製のグレープフルーツマーマレードから OPP が0.17ppm検出された。日本製のオレンジ

ビールから DP 6.3 ppm, レモンビールから DP 7.8 ppm および TBZ 0.01 ppm が検出された。

国産のマーマレードおよびビールから防ばい剤が検出された原因は、加工品に防ばい剤を添加することはないと考えられることから、原料に輸入かんきつ類を使用したためと思われる。

また、レモンジュースから TBZ が 0.06 ppm 検出されるものがあった。

### 結 論

輸入かんきつ類に使用されている DP, OPP および TBZ の一箱中での個体差および一個体中での部位差を調査し、サンプリング方法を検討した。

さらに、昭和49年より56年に市販されていたレモン137検体、オレンジ128検体およびグレープフルーツ370検体について防ばい剤の使用実態を調査した。また、昭和56年にそれらの加工品であるマーマレード、ビールおよびジャム等34検体について調査し、次の結果を得た。

1) 一箱中での箱詰め的位置の違いによる防ばい剤の含有量は、上、中、下段それぞれの平均値と比較すると、1.2~2.1倍の差がみられた。また、同一箱中の個体間では1~19倍の大きな差がみられた。そこで、サンプリングは、一箱中より数個(3個以上)を取り、合せた。

2) グレープフルーツ個体内の部位別 DP 含有量の最小値と最大値を比較すると約1.5倍の差がみられた。そこで、サンプリングは、一個体を大きさにより4~16部

位に分割し、その2ヶ所以上を取り、合せた。

3) 年度別に使用実態調査を行ったところ、DP は平均値と比較すると、レモンは49, 50年に高く、オレンジは50年、グレープフルーツは52年に最も高い値を示した。特に、グレープフルーツの DP 含有量は多く、52年に調査した試料では54%が使用基準値の70 ppm を越え、最高値は150 ppm であった。オレンジは50, 52年に計3検体で基準値を越える値がみられた。

OPP は各かんきつ類とも年度別の平均値およびその傾向はよく類似しており、53年に高い傾向を示した。

TBZ は各かんきつ類ともほとんどが54年以降に検出され、オレンジは55, 56年と年々平均値は高くなる傾向を示した。

4) 54年以降の防ばい剤の使用割合は、54, 55年に比較して56年は DP, OPP および TBZ の3種を同時に使用する場合が多く、特に、オレンジでは防ばい剤が使用されているものは全て3種使用されていることがわかった。

5) 加工品では果皮を使用するマーマレードおよびビールで、微量の DP, OPP および TBZ を検出するものがあった。特に、マーマレードでは25検体中7検体から TBZ が0.02~0.67 ppm 検出された。

### 文 献

- 1) 三原 翠, 近藤龍雄, 田辺弘也: 食衛誌, 14, 179, 1973

## かんきつ類中の防ばい剤に関する研究 (2) 浸透性および除去方法の検討

井部 明 広\*, 西 島 基 弘\*, 冠 政 光\*, 安 田 和 男\*  
斉 藤 和 夫\*, 中 沢 久 美 子\*, 上 村 尚\*, 中 里 光 男\*  
菊 地 洋 子\*, 藤 沼 賢 司\*, 永 山 敏 廣\*, 牛 山 博 文\*  
直 井 家 壽 太\*

### Studies on Fungicides in Citrus Fruits (II)

#### Permeability and Removal of Diphenyl, o-Phenylphenol and Thiabendazole

AKIHIRO IBE\*, MOTOHIRO NISHIJIMA\*, MASAMITSU KANMURI\*,  
KAZUO YASUDA\*, KAZUO SAITO\*, KUMIKO NAKAZAWA\*, HISASHI KAMIMURA\*,  
MITSUO NAKAZATO\*, YOKO KIKUCHI\*, KENJI FUJINUMA\*,  
TOSHIHIRO NAGAYAMA\*, HIROFUMI USHIYAMA\* and YASUTA NAOI\*

**Keywords:** 防ばい剤 fungicide, ジフェニル diphenyl, オルトフェニルフェノール o-phenylphenol, チアベンダゾール thiabendazole, かんきつ類 citrus fruits, 浸透性 permeability, 除去 removal

#### 緒 言

前報<sup>1)</sup>において著者らは市販のレモン、オレンジおよびグレープフルーツの防ばい剤使用実態調査の結果を報告した。

そこで今回、かんきつ類に使用された防ばい剤が可食部に浸透しているか否かを調査すると共に、実験的に防ばい剤を添加して浸透性を調べた。また、市販かんきつ類に使用された防ばい剤の除去方法を検討したので併せて報告する。

#### 実験方法

1. 試料 レモン、オレンジおよびグレープフルーツは前報<sup>1)</sup>と同じ試料を用いた。

##### 2. 試薬および装置

1) フルーツ用ワックス ポンドワックス社製  
2) オルトフェニルフェノールナトリウム (以下 OPP-Na と略す) DowChemical社製 DovicideA Lot No. MMO 1044

3) その他の試薬および装置は前報<sup>1)</sup>に準じた。

3. 分析法 前報<sup>1)</sup>に準じた。なお微量のジフェニル (以下 DP と略す) の測定には試験溶液をガスクロマトグラフィー (GC) に付し、定性定量を行った。本法における確認限度は、試料あたり 0.1ppm とした。

GC測定条件 装置: 島津 GC-5A ガスクロマトグラフ (FID付), カラム: 5% PEG 20M (GaschromQ)

60~80mesh 3mmφ×2m ガラスカラム, カラム温度: 140°, キャリアガス: 窒素, 流量: 60ml/min

#### 結果および考察

##### 1. 防ばい剤の果肉への浸透性

1) 市販品 あらかじめ防ばい剤の添加されていることを確認したレモン、オレンジおよびグレープフルーツについて果皮 (フラベド, 油胞およびアルベド) および果肉 (じょうのうおよびじょうのう膜) の部分に分け、それぞれ DP, オルトフェニルフェノール (以下 OPP と略す) およびチアベンダゾール (以下 TBZ と略す) の含有量を調査した。なお OPP については果肉へ浸透するという報告<sup>2)</sup>, あるいは浸透しないという報告<sup>3)</sup>があるため、果肉の含有量を調査する場合は、果皮の防ばい剤が汚染しないよう特に注意してサンプリングを行った。果皮および果肉の含有量は部位別に定量し、それらを合わせた量を 100% とした時の果皮および果肉それぞれの各防ばい剤量を比率で表わし、表 1 に示した。

レモン、オレンジおよびグレープフルーツの各防ばい剤はいずれも果皮から検出され、果肉からは検出されなかった。

2) モデル実験 1)の市販品の結果から、防ばい剤の果肉への浸透はみられなかった。しかし、高濃度に添加された場合、挙動が異なることも考慮して、さらに実験的に確認することとした。

\* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表 1. 市販品の内部浸透の実態 (%)

|     | レモン |    | オレンジ |    | グレープフルーツ |    |
|-----|-----|----|------|----|----------|----|
|     | 果皮  | 果肉 | 果皮   | 果肉 | 果皮       | 果肉 |
| DP  | 100 | 0  | 100  | 0  | 100      | 0  |
| OPP | 100 | 0  | 100  | 0  | 100      | 0  |
| TBZ | 100 | 0  | 100  | 0  | 100      | 0  |

数値はいずれも5個の平均値

各防ばい剤は下記に示す方法で添加し、各試料を所定の日時に取り出し分析に供した。

i) DP: 試料はレモン、オレンジおよびグレープフルーツを用いた。なお、それらのDP含有量はそれぞれ20ppm, 0.1ppm以下, 36ppmであった。

ガラス製容器 (15×15×25cm) にDP標準品約 2gを投入し、DPに直接接触しないようにレモンは3個、オレンジは1個、グレープフルーツは1個を入れ、ガラス板でフタをし室内に放置した。

ii) OPP: 試料はレモン、オレンジおよびグレープフルーツを用いた。なお、それらのOPP含有量はそれぞれ1.5ppm, 0.69ppm, 0.01ppm以下であった。

OPPが2000ppmとなるように混和したフルーツ用ワックスをレモンは1個あたり0.5ml, オレンジは1個あたり1ml, グレープフルーツは1個あたり2mlを表面に均一に塗布し、室内に放置した。

iii) OPP-Na: OPPの時と同様の試料を用いた。

OPP-Naが2000ppmとなるように混和したフルーツ用ワックスをOPPの時と同様に塗布し放置した。

iv) TBZ: 試料はレモン、オレンジおよびグレープフルーツを用いた。なお、それらのTBZ含有量はそれぞれ0.01ppm以下, 0.71ppm, 0.19ppmであった。

TBZが2000ppmとなるように混和したフルーツ用ワックスをOPPと同様に塗布し放置した。

DPについてはレモン3個、オレンジおよびグレープフルーツ各1個をそれぞれ1回分として、1, 7, 14, 21および30日目に取り出し、果皮および果肉の部分についてそれぞれのDPを定量した。両者の含有量は合わせて100%とし、果皮および果肉それぞれの部分のDP量を比率で表わし、表2に示した。なおDPの場合は直接標準品と接触しないことから、表面の付着分はすべて浸透したものとみなした。

OPP, OPP-Na および TBZ を添加したものについては、各ワックスを塗布後3時間、1, 3, 7, 14, 21

表 2. DPの浸透試験結果

| 日数   | レモン                    |    | オレンジ            |    | グレープフルーツ    |    |
|------|------------------------|----|-----------------|----|-------------|----|
|      | 果皮                     | 果肉 | 果皮              | 果肉 | 果皮          | 果肉 |
| 1日目  | 含有量mg 6.4<br>含有率% 100  | 0  | 5.0<br>100      | 0  | 6.0<br>100  | 0  |
| 7日目  | 含有量mg 9.5<br>含有率% 100  | 0  | 10.7<br>100     | 0  | 12.6<br>100 | 0  |
| 14日目 | 含有量mg 10.3<br>含有率% 100 | 0  | 15.0<br>100     | 0  | 17.7<br>100 | 0  |
| 21日目 | 含有量mg 10.4<br>含有率% 100 | 0  | 22.2<br>100     | 0  | 20.7<br>100 | 0  |
| 30日目 | 含有量mg 11.7<br>含有率% 100 | 0  | カビ発生のため<br>検査不能 |    | 24.2<br>100 | 0  |

および30日目にDPの場合と同様に試料を取り出し、それぞれのかんきつ類の表面を酢酸エチルをしみこませたガーゼ (30×30cm) 3枚で順次よく拭き、表面に付着したワックスおよび防ばい剤を除去した。それぞれを果皮および果肉に分けて、ガーゼ、果皮および果肉の各防ばい剤の含有量を定量し、DPと同様にそれぞれの存在量を比率で表わし、その結果を表3, 4, 5に示した。

DPは標準品を暴露した状態で放置したことから表2に示したとおり、含有量はレモンで1日目に6.4mgであったものが日数の経過とともに増加し、30日目には11.7mgとなった。オレンジでは1日目に5.0mgであったものが21日目には22.2mg、グレープフルーツでは1日目に6.0mgであったものが30日目には24.2mgとそれぞれ含有量が増加することが確認された。果肉への浸透はいずれも30日目でも認められず、果皮の部分にのみ浸透することが判明した。

OPPの場合、塗布後の濃度はレモンで3.1~5.1ppm,

表 3. OPPの浸透試験結果 (%)

| 日数   | レモン         |        |        | オレンジ        |        |        | グレープフルーツ    |        |        |
|------|-------------|--------|--------|-------------|--------|--------|-------------|--------|--------|
|      | ガ<br>1<br>ゼ | 果<br>皮 | 果<br>肉 | ガ<br>1<br>ゼ | 果<br>皮 | 果<br>肉 | ガ<br>1<br>ゼ | 果<br>皮 | 果<br>肉 |
| 3時間目 | 47          | 53     | 0      | 66          | 34     | 0      | 73          | 27     | 0      |
| 1日目  | 37          | 63     | 0      | 28          | 72     | 0      | 70          | 30     | 0      |
| 3日目  | 13          | 87     | 0      | 5           | 95     | 0      | 53          | 47     | 0      |
| 7日目  | 9           | 91     | 0      | 0           | 100    | 0      | 47          | 53     | 0      |
| 14日目 | 7           | 93     | 0      | 0           | 100    | 0      | 33          | 67     | 0      |
| 21日目 | 3           | 97     | 0      | 0           | 100    | 0      | 20          | 80     | 0      |
| 30日目 | 0           | 100    | 0      | 0           | 100    | 0      | 0           | 100    | 0      |

表 4. OPP-Naの浸透試験結果 (%)

| 日 数  | レ モ ン           |        |        | オ レ ン ジ     |        |        | グ レ ー プ<br>フ ル ー ツ |        |        |
|------|-----------------|--------|--------|-------------|--------|--------|--------------------|--------|--------|
|      | ガ<br>ー<br>ゼ     | 果<br>皮 | 果<br>肉 | ガ<br>ー<br>ゼ | 果<br>皮 | 果<br>肉 | ガ<br>ー<br>ゼ        | 果<br>皮 | 果<br>肉 |
| 3時間目 | 37              | 63     | 0      | 58          | 42     | 0      | 79                 | 21     | 0      |
| 1日目  | 26              | 74     | 0      | 34          | 66     | 0      | 71                 | 29     | 0      |
| 3日目  | 7               | 93     | 0      | 9           | 91     | 0      | 36                 | 64     | 0      |
| 7日目  | 0               | 100    | 0      | 0           | 100    | 0      | 7                  | 93     | 0      |
| 14日目 | 0               | 100    | 0      | 0           | 100    | 0      | 0                  | 100    | 0      |
| 21日目 | 0               | 100    | 0      | 0           | 100    | 0      | 0                  | 100    | 0      |
| 30日目 | ガビ発生のため<br>検査不能 |        |        | 0           | 100    | 0      | 0                  | 100    | 0      |

表 5. TBZ の浸透試験結果 (%)

| 日 数  | レ モ ン       |        |        | オ レ ン ジ     |        |        | グ レ ー プ<br>フ ル ー ツ |        |        |
|------|-------------|--------|--------|-------------|--------|--------|--------------------|--------|--------|
|      | ガ<br>ー<br>ゼ | 果<br>皮 | 果<br>肉 | ガ<br>ー<br>ゼ | 果<br>皮 | 果<br>肉 | ガ<br>ー<br>ゼ        | 果<br>皮 | 果<br>肉 |
| 3時間目 | 99          | 1      | 0      | 97          | 3      | 0      | 98                 | 2      | 0      |
| 1日目  | 99          | 1      | 0      | 76          | 24     | 0      | 84                 | 16     | 0      |
| 3日目  | 91          | 9      | 0      | 75          | 25     | 0      | 71                 | 29     | 0      |
| 7日目  | 92          | 7      | 1      | 81          | 19     | 0      | 98                 | 2      | 0      |
| 14日目 | 96          | 2      | 2      | 71          | 27     | 2      | 56                 | 43     | 1      |
| 21日目 | 91          | 7      | 2      | 65          | 33     | 2      | 79                 | 20     | 1      |
| 30日目 | 93          | 5      | 2      | 83          | 16     | 1      | 82                 | 16     | 2      |

オレンジで 3.3~5.4ppm, グレープフルーツで 0.89~3.7ppm の範囲であった。これらの果皮および果肉への浸透性の結果を表 3 に示した。塗布後 3 時間でレモンは 53%, オレンジは 34%, グレープフルーツは 27% がそれぞれ果皮へ浸透していることがわかった。以後は各かんきつ類とも日数の経過にともない果皮への浸透がみられ、オレンジは 7 日目に、レモン及びグレープフルーツは 30 日目にガーゼから検出されなくなった。しかし、果肉については 30 日目でもいずれも検出されなかった。

OPP-Na は OPP に比較して水溶性であることから浸透性の挙動に興味を持たれた。そこでかんきつ類に OPP-Na を塗布して浸透性を調べた。なお OPP-Na 塗布後の濃度は OPP としてレモンで 1.6~3.5ppm, オレンジで 2.0~4.2 ppm, グレープフルーツで 0.65~2.4 ppm の範囲であった。結果は表 4 に示したとおり OPP の場合とはほぼ同様であった。

TBZ の場合、塗布後の濃度はレモンで 2.0~5.7ppm,

オレンジで 4.9~8.7ppm, グレープフルーツで 1.4~4.4 ppm の範囲であった。結果は表 5 に示したとおり、いずれのかんきつ類も 30 日目でも 80% 以上が表面に付着していることがわかった。レモンについては果皮への浸透は極めて少なく、7 日目には塗布量に対し果肉へ 1~2% 浸透していることが認められた。オレンジ, グレープフルーツはほぼ同様な傾向を示し、14 日目には塗布量に対し 1~2% の浸透が認められた。いずれのかんきつ類も 1~2% 浸透した後は特に増加の傾向は見られなかった。

以上の結果、TBZ が約 2ppm 以上添加された場合、その 1~2% が果肉へ浸透することが判明した。そこで TBZ の浸透性についてさらに詳細な検討を行った。すなわち TBZ が検出されなかったグレープフルーツを用い、先と同様に TBZ を添加し、添加後 6 時間、1, 3, 7, 14 日目に外皮 (フラベド, 油胞), 中外皮 (アルベド), 中皮 (じょうのう膜) および果肉 (じょうのう) の 4 つの部分に分け TBZ の含有量を定量した。各部位の含有量を合わせて 100% とし、それぞれの部位の TBZ 量を比率で表わし、その結果を表 6 に示した。

TBZ は塗布後 6 時間目にはその一部が中外皮に浸透し、1 日目には 6% が中外皮に浸透した。3 日目には中皮を経て果肉に 2% が浸透し、14 日目には果肉に 9% が浸透することがわかった。

TBZ が DP, OPP に比較して浸透性がある理由としては、酸性で水に溶解し易い TBZ の性質から、かんきつ類の油胞の間隙をぬって内部まで浸透していくためと思われる。

表 6. TBZ のグレープフルーツ内部浸透試験結果 (%)

| 日 数  | 外 皮 | 中外皮 | 中 皮 | 果 肉 |
|------|-----|-----|-----|-----|
| 6時間目 | 98  | 2   | 0   | 0   |
| 1日目  | 94  | 6   | 0   | 0   |
| 3日目  | 84  | 13  | 1   | 2   |
| 7日目  | 74  | 19  | 1   | 6   |
| 14日目 | 74  | 15  | 2   | 9   |

## 2. 防ばい剤の除去方法の検討

防ばい剤の浸透性の調査結果から、防ばい剤はそのほとんど全部が果皮に移行することが明らかとなった。かんきつ類は果肉を食する他に、レモンなどは紅茶に入れ、オレンジはマーマレード等として食する場合も多い、そこで防ばい剤を除去あるいは少なくすることができるか否かの検討を行った。



## 1) DP の除去について

DP の使用法は、あらかじめDPを滲みこませた紙(ケーシング)を、かんきつ類用ダンボール箱に敷紙として入れ、その昇華性を利用して防ばい効果を得ている。そこでかんきつ類に付着し、あるいは吸着されたDPが実用上利用できる次に示す6通りの方法で除去されるか否かを、DPが70ppm以上検出された市販グレープフルーツを用いて検討した。すなわち、i) グレープフルーツのはいったダンボール箱(35×47×30cm, 36個入)を閉封したまま室温(15~20°)に放置。ii) ダンボール箱を開封して室温に放置。iii) ダンボール箱を開封し、家庭用扇風機(羽根の径30cm)で1mの距離から1日4時間送風。iv) ダンボール箱を開封してドラフト内に放置。v) ダンボール箱からグレープフルーツを出し、互いに接触しないようにして室温に放置。vi) v)と同様にして、さらに扇風機で1日8時間送風。

それぞれの含有量を20日後に調べたが、いずれもDPの減少はみられなかったことから、DPは昇華性が高いにもかかわらず、果皮中に取りこまれると容易に除去できないことがわかった。

## 2) 市販かんきつ類からの防ばい剤の除去

あらかじめ防ばい剤が使用されていることを確認した市販のレモン、オレンジおよびグレープフルーツを用い、次の6通りの処理方法で防ばい剤ごとにそれらが除去されるか否かを検討した。

試料はレモン2個、オレンジ1個およびグレープフルーツ1個をそれぞれ用いた。

## i) 水に浸漬

試料は20°の水500ml中に投入し、30分間放置した。

## ii) 浸漬および流水洗浄

試料は20°の水500ml中に投入し、5分間放置した後、噴射ビンの水100mlで試料の表面をよく洗い流した。洗い液は浸漬水と合わせた。

## iii) タワシ洗い

試料は20°の水500ml中に投入し、亀の子タワシで表面を洗浄後、噴射ビンの水50mlで洗い流した。タワシはさらに水50mlでよく洗い、洗い液を先の洗い液と合わせた。

## iv) クレンザー、ナイロンタワシ洗い

試料は40°の水500ml中に投入し、クレンザー1gをつけたナイロンタワシ(15×11cm)でよく表面を洗浄後、噴射ビンの水50mlで洗い流した。ナイロンタワシは細

表 7. 各防ばい剤の除去試験結果

| 処理法  | DP (%) |    |      |   |          |   |
|------|--------|----|------|---|----------|---|
|      | レモン    |    | オレンジ |   | グレープフルーツ |   |
|      | A      | B  | A    | B | A        | B |
| i)   | 100    | 0  | 100  | 0 | 100      | 0 |
| ii)  | 100    | 0  | 100  | 0 | 100      | 0 |
| iii) | 100    | 0  | 99   | 1 | 100      | 0 |
| iv)  | 99     | 1  | 99   | 1 | 99       | 1 |
| v)   | 100    | 0  | 100  | 0 | 100      | 0 |
| vi)  | 89     | 11 | 96   | 4 | 98       | 2 |

| 処理法  | OPP (%) |   |      |   |          |   |
|------|---------|---|------|---|----------|---|
|      | レモン     |   | オレンジ |   | グレープフルーツ |   |
|      | A       | B | A    | B | A        | B |
| i)   | 100     | 0 | 100  | 0 | 100      | 0 |
| ii)  | 100     | 0 | 100  | 0 | 100      | 0 |
| iii) | 100     | 0 | 100  | 0 | 100      | 0 |
| iv)  | 100     | 0 | 100  | 0 | 100      | 0 |
| v)   | 100     | 0 | 100  | 0 | 100      | 0 |
| vi)  | 100     | 0 | 100  | 0 | 100      | 0 |

| 処理法  | TBZ (%) |    |      |    |          |    |
|------|---------|----|------|----|----------|----|
|      | レモン     |    | オレンジ |    | グレープフルーツ |    |
|      | A       | B  | A    | B  | A        | B  |
| i)   | 79      | 21 | 83   | 17 | 88       | 12 |
| ii)  | 87      | 13 | 83   | 17 | 91       | 9  |
| iii) | 65      | 35 | 76   | 24 | 78       | 22 |
| iv)  | 33      | 67 | 41   | 59 | 63       | 37 |
| v)   | 72      | 28 | 70   | 30 | 79       | 21 |
| vi)  | 7       | 93 | 18   | 82 | 35       | 65 |

A…残存率

B…除去率

i) 水に浸漬

ii) 水に浸漬および流水洗浄

iii) タワシ洗い

iv) クレンザー、ナイロンタワシ洗い

v) ガーゼ(含水)による拭き取り

vi) ガーゼ(含酢酸エチル)による拭き取り

切し、先の水と合わせた。

v) 水を含ませたガーゼによる拭き取り

水に浸し軽くしぼったガーゼ (30×30cm) で試料の表面を1回十分に拭いた。

vi) 酢酸エチルを含ませたガーゼによる拭き取り

酢酸エチルに浸し軽くしぼったガーゼ (30×30cm) で試料の表面を1回十分に拭いた。

以上の方法で処理した後、かんきつ類および洗い液、あるいはかんきつ類およびガーゼ中の防ばい剤の含有量を定量し、それぞれの合計を100%として、かんきつ類中の含有量の比率を残存率とし、洗い液あるいはガーゼ中の含有量の比率を除去率としてその結果を表7に示した。

DPはi)~v)の処理ではほとんど除去できなかった。

vi)の酢酸エチルによる処理では、2~11%が除去できた。DPが酢酸エチル処理にのみ若干ではあるが、ガーゼに移行するのは、ガーゼにかんきつ類の皮の色が着色することから、酢酸エチルがワックスおよび果皮表面の精油分を若干溶解するためと思われる。

OPPはいずれの処理でも全く除去できなかった。

TBZはi)の水に浸漬で12~21%が、iv)のタワシを使用しての洗浄では37~67%が、vi)の酢酸エチルによる処理では65~93%が除去できることが分った。各処理ごとにTBZの除去率をかんきつ類で比較するとレモンが最も高く、次いでオレンジ、グレープフルーツの順であった。これは各かんきつ類の大きさが大きい程除去率が悪くなることから、表面積の占める割合によるものと思われる。

## 結 論

かんきつ類に使用された防ばい剤の果肉への浸透性および防ばい剤の除去方法について検討を行ったところ、次の結果が得られた。

1. DPが70ppm以上検出された市販グレープフルーツを用い、各種条件下で放置した所、いずれの条件でもDPは全く減少しなかった。

2. DPはかんきつ類に暴露後、果皮に浸透するが、果肉には浸透しなかった。しかし、果皮に浸透したDPは各種処理でもほとんど除去されなかった。

3. OPPはワックスに混ぜてかんきつ類に塗布後、速やかに果皮に浸透するが、果肉には浸透しなかった。しかし、果皮に浸透したOPPは各種処理でも全く除去されなかった。

4. TBZはワックスに混ぜてかんきつ類に塗布後、一部が果皮に浸透したが、ほとんどは果皮表面に付着残存していた。しかし、果肉には1~2%の浸透がみられた。表面に付着しているTBZは、水あるいは溶媒による洗浄により、除去することが可能であった。

## 文 献

- 1) 安田和男, 西島基弘, 冠 政光, 斉藤和夫, 中沢久美子, 上村 尚, 中里光男, 菊地洋子, 井部明広, 藤沼賢司, 永山敏廣, 牛山博文, 直井家壽太: 東京衛研年報, 33, 191, 1982
- 2) 花田信次郎: 名市大医誌, 26, 78, 1975
- 3) 永井祐治, 石原利克, 坂部美雄: 名古屋市衛生研究所報, 22, 46, 1975

### かんきつ類中の防ばい剤に関する研究 (3) 調理加工による挙動

中 沢 久美子\*, 西 島 基 弘\*, 冠 政 光\*, 安 田 和 男\*, 齊 藤 和 夫\*  
上 村 尚\*, 中 里 光 男\*, 菊 地 洋 子\*, 井 部 明 広\*, 藤 沼 賢 治\*  
永 山 敏 廣\*, 牛 山 博 文\*, 直 井 家 壽 太\*

### Studies on Fungicides in Citrus Fruits (III)

#### Movement of Diphenyl, *o*-Phenylphenol and Thiabendazole on Cooking Process of Citrus Fruits

KUMIKO NAKAZAWA\*, MOTOHIRO NISHIJIMA\*, MASAMITSU KANMURI\*,  
KAZUO YASUDA\*, KAZUO SAITO\*, HISASHI KAMIMURA\*, MITSUO NAKAZATO\*,  
YOKO KIKUCHI\*, AKIHIRO IBE\*, KENJI FUJINUMA\*, TOSHIHIRO NAGAYAMA\*,  
HIROFUMI USHIYAMA\* and YASUTA NAOI\*

**Keywords**: かんきつ類 citrus fruits, 防ばい剤 fungicides, ジフェニル diphenyl, オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, チアベンダゾール thiabendazole, レモンティー lemon tea, レモン酒 lemon liquor, マーマレード marmalade, 調理加工 cooking process

#### 緒 言

前報<sup>1,2)</sup>で、市販かんきつ類およびそれらの加工品についてジフェニル(以下DPと略す)、オルトフェニルフェノール(以下OPPと略す)およびチアベンダゾール(以下TBZと略す)の使用実態調査を行うとともに、果肉への浸透性および除去方法等について報告した。今回は、従来の方法<sup>3-6)</sup>では分析不可能であったレモン酒からのこれら防ばい剤の分析方法を確立するとともに、防ばい剤を添加したレモンを用いてレモン酒を作製し、酒中への移行を調査した。また紅茶にレモンを入れた場合の紅茶への溶出およびマーマレードを作成した場合の残存率を調べた。さらにこれらの値をもとにして防ばい剤の摂取量を算出し、FAO/WHOによる1日摂取許容量(ADI)と比較したので併せて報告する。

#### 実験方法

##### 1. 試料

レモン、オレンジおよびグレープフルーツは、昭和56年4月都内市場から同一ロットと称して販売されていたものを購入して使用した。

なおOPPおよびOPP-Na添加実験用レモンは、OPP含有量0.1ppm以下のレモンにOPPおよびOPP-Naをそれぞれ2000ppm含有するワックスを0.5ml塗布し、室温で7日間放置後、酢酸エチルを浸したガーゼ(30×

30cm)で3回拭き取ったものを用いた。

##### 2. 試薬および装置

前報<sup>1,2)</sup>に準じた。

##### 3. 分析方法

##### レモン酒中の防ばい剤の分析方法

##### 1) DP および OPP

試料が酒の場合は200mlを秤取し、リン酸々性とした後塩化ナトリウムで飽和し、*n*-ヘキサン200mlで3回抽出した。

試料がレモン酒中の果皮および果肉の場合は、試料全量に水300mlを加えホモジナイズした後、その200gを秤取してリン酸々性とした。この溶液に*n*-ヘキサン200mlを加え、ホモジナイズした後遠心分離し*n*-ヘキサン層を分取した。水層はさらに*n*-ヘキサン200mlを加えて同様の操作を2回繰り返す、*n*-ヘキサン層を合した。抽出液は無水硫酸ナトリウムを加え一昼夜放置して脱水後濾過した。濾液にキシレン3mlを加え、減圧下40℃で*n*-ヘキサンを留去し、濃縮後*n*-ヘキサンで10mlとしたものをDP用試験溶液とした。OPP用試験溶液はDP用試験溶液を用い前報<sup>1,2)</sup>に準じて調製した。試験溶液は前報<sup>1,2)</sup>と同様の方法で定量した。

##### 2) TBZ

試料が酒の場合は100mlを秤取し、1*N*-水酸化ナト

\* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

リウムでアルカリ性とし、塩化ナトリウムで飽和後酢酸エチル100mlで3回抽出した。

試料がレモン酒中の果皮および果肉の場合は、試料全量に酢酸ナトリウム—塩化ナトリウム緩衝液を300g加え、ホモジナイズした後その100gを秤取し、酢酸エチル100mlで3回抽出した。抽出液は前報<sup>1,2)</sup>と同様の方法で調製し、定量した。

他の試料についての分析方法は、いずれも前報<sup>1,2)</sup>に準じた。

### 結果および考察

#### 1. レモン酒からの防ばい剤の分析方法の検討

レモン酒中の防ばい剤の挙動を調査する目的で酒、果皮および果肉の各部位について防ばい剤の分析方法を検討したところ、従来の方法<sup>3-6)</sup>ではアルコール含有量が高いためDPおよびOPPが蒸留されないことから適用できないことがわかった。そこでDPおよびOPPの分析は、酒の場合は塩化ナトリウムで飽和し、果皮および果肉の場合は試料をホモジナイズした後、リン酸々性としn-ヘキサンを用いて溶媒抽出したところ、いずれの部位についても90%以上の高い回収率が得られた。

TBZの分析は、酒の場合は試料をIN-水酸化ナトリウムでアルカリ性とし、塩化ナトリウムを飽和した。果皮および果肉の場合は、試料に酢酸ナトリウム—塩化ナトリウム緩衝液を加えホモジナイズした後酢酸エチルで抽出した。抽出液は三原らの方法<sup>7)</sup>に準じて定量した。

以上の点を改良することにより、アルコールは測定に妨害を与えず、いずれも92%以上の回収率が得られた。

#### 2. レモン中の防ばい剤のレモン酒への溶出

水洗したレモン800g（果皮は約1×5cmに細切し、果肉は約1cmに輪切りにした）にホワイトリカー1.8l、水砂糖800gを加え蓋をして室内に放置し、果皮は7日目

に、果肉は30日目にいずれも除去してレモン酒を作製した。なおレモン酒は12瓶を同時に作製し、各測定回ごとに2瓶を開封して一方をDPおよびOPP用試料に、他方をTBZ用試料とした。酒、果皮および果肉の各部位の防ばい剤含有量を測定し、それぞれ各部位にしめる割合を算出した。その結果は表1に示した。

DPは酒中に2日目で10%溶出したが、7日目では4%に減少した。果肉部は2日目に6%、30日目で7%とほとんど変化がみられなかった。

OPPは酒中に2日目で60%と最も高い値を示し、以後は7日目で52%、20日目で44%と減少した。これに対して果肉部は2日目で9%、7日目で13%、20日目で21%となり増加する傾向を示した。

TBZは酒中に2日目で73%とDP、OPPと比較して溶出率は非常に高い値を示した。その後はわずかに減少する傾向を示した。それに対し果肉部はわずかに増加する傾向が認められた。

以上のことからレモン酒中の防ばい剤はいずれも2日目に最も高い値を示し、以後若干減少する傾向を示した。一般に飲用される1ヶ月後の酒中には、DP3%、OPP44%およびTBZ64%がそれぞれ溶出することが判明した。

#### 3. レモン中防ばい剤の紅茶への溶出

紅茶は、レモンティーとして飲用される場合が多く、このレモンに使用された防ばい剤が紅茶中に溶出する可能性が十分考えられる。そこで、レモン中の防ばい剤がどの程度紅茶へ溶出するか調べた。すなわちレモンの両端を除き、2~3mmの厚さに輪切りとし、輪切りとした部位を端から交互に取り2試料とし、一方を紅茶への溶出調査用の試料に、他方を対照用の試料とした。なおレモンティーはレモン100gをあらかじめ90℃に加温した紅

表1. レモン酒製造工程におけるレモン中防ばい剤の溶出率

| 日 数 | 含 有 量 (%) |     |      |     |      |      |     |      |      |
|-----|-----------|-----|------|-----|------|------|-----|------|------|
|     | DP        |     |      | OPP |      |      | TBZ |      |      |
|     | 酒         | 果 肉 | 果 皮  | 酒   | 果 肉  | 果 皮  | 酒   | 果 肉  | 果 皮  |
| 2   | 10        | 6   | 84   | 60  | 9    | 31   | 73  | 10   | 17   |
| 7   | 4         | 6   | 90   | 52  | 13   | 35   | 69  | 13   | 18   |
| 20  | 3         | 7   | (90) | 44  | 21   | (35) | 66  | 18   | (16) |
| 30  | 3         | 7   | (90) | 44  | 18   | (38) | 64  | 19   | (17) |
| 37  | 3         | (7) | (90) | 44  | (18) | (38) | 64  | (19) | (17) |
| 44  | 3         | (7) | (90) | 44  | (18) | (38) | 64  | (19) | (17) |

( ) 内の数値のうち、果皮部は7日目、果肉部は30日目に測定した値である。

表 2. レモン中防ばい剤の紅茶への溶出率

| 処理時間<br>(分) | 含 有 量 (%) |     |     |     |     |     |
|-------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|
|             | DP        |     | OPP |     | TBZ |     |
|             | 紅茶        | レモン | 紅茶  | レモン | 紅茶  | レモン |
| 0.5         | 3         | 82  | 22  | 78  | 82  | 18  |
| 2           | 5         | 71  | 25  | 75  | 86  | 14  |
| 10          | 5         | 70  | 30  | 70  | 90  | 10  |
| 30          | 7         | 72  | 44  | 56  | 89  | 11  |

表 3. OPP および OPP-Na 添加レモンを使用し  
た時の紅茶への溶出率

| 処理時間<br>(分) | 含 有 量 (%) |     |           |     |
|-------------|-----------|-----|-----------|-----|
|             | OPP 添加    |     | OPP-Na 添加 |     |
|             | 紅茶        | レモン | 紅茶        | レモン |
| 0.5         | 13        | 87  | 14        | 86  |
| 2           | 15        | 85  | 18        | 82  |
| 10          | 23        | 77  | 22        | 78  |
| 30          | 34        | 66  | 31        | 69  |

表 1 に一定時間投入して作製した。レモンの各浸漬時間における防ばい剤の溶出率を表 2 に示した。

DP は 30 秒で 3%, 2 分および 10 分で 5%, 30 分で 7% がそれぞれ溶出することがわかった。紅茶への溶出率とレモン中の残存率の総和が対照用試料に対し 75~85% である原因は、DP が非常に揮散し易いことから紅茶の湯気と共に大気中に揮散したためと考えられる。

OPP は 30 秒で 22% が溶出し、以後処理時間が増加するに伴い紅茶中への溶出量が増加する傾向を示し、30 分では 44% まで溶出した。

TBZ は 30 秒で 82% と非常に溶出速度が速く、2 分後には 86% が溶出し、以後はほとんど変化しないことがわかった。

かんきつ類には OPP の他に OPP-Na の使用が許可されている。しかし分析方法はいずれも酸性下で抽出あるいは蒸留を行っているため、OPP と OPP-Na のいずれが使用されているか不明である。そこでレモンに OPP-Na が使用されていることも想定して、OPP および OPP-Na を塗布し 7 日間放置したレモンを用いて紅茶への溶出率を調べ表 3 に示した。いずれも 30 秒で 13~14%, 以後は時間の経過に伴い増加し、30 分で 31~34% と両者の差はほとんど認められなかった。

またレモンを使用前に水洗した場合と、そのまま使用

表 4. マーマレード中の防ばい剤の残存率

| マーマ<br>レード<br>原 料 | 防ばい剤 | 含 有 量 (ppm) |                | 残存率<br>(%) |
|-------------------|------|-------------|----------------|------------|
|                   |      | 原 料<br>(果皮) | 製 品<br>(原料あたり) |            |
|                   |      |             |                |            |
| レ モ ン             | DP   | 73          | 30             | 41         |
|                   | OPP  | 12          | 1.2            | 10         |
|                   | TBZ  | 5.6         | ND             | 0          |
| オレンジ              | DP   | 71          | 32             | 44         |
|                   | OPP  | 18          | 4.3            | 24         |
|                   | TBZ  | 6.3         | 0.71           | 11         |
| グレープ<br>フルーツ      | DP   | 31          | 12             | 40         |
|                   | OPP  | 15          | 1.4            | 9          |
|                   | TBZ  | 2.5         | 0.12           | 4          |

した場合の防ばい剤の紅茶への溶出率を検討したが、両者ともほぼ同じ値を示した。

#### 4. マーマレード中の防ばい剤の残存率

レモン、オレンジおよびグレープフルーツのマーマレードを作成し、原料中の防ばい剤がどの程度残存するかを検討した。すなわち、各々のかんきつ類を縦に 8 等分し、1 片おきに取り、一方をマーマレード作製用試料とし、他方を対照用試料とした。マーマレード作製用試料は、果皮および果肉の部分に分け、果皮を薄切りとし、その 50g を秤取し、約 200ml の水で 5 分間煮沸しゆでこぼしを行った。同様のゆでこぼしを 3 回行った後、果皮に蔗糖 100g および水 200ml を加え約 40 分間煮沸して、原料のかんきつ類と同じ重量になるまで煮つめてマーマレードを作製した。原料としたかんきつ類の防ばい剤含有量およびマーマレード中の防ばい剤残存量および残存率を求め、その結果を表 4 に示した。

残存率は DP で 40~44% と比較的多く、OPP では 9~24%, TBZ では 0~11% であった。DP の残存率が高く、OPP および TBZ が低い原因は温湯に DP が難溶であるのに対し、OPP および TBZ は可溶であるため、ゆでこぼし工程で除去され易いか否かの差によるものと考えられる。

本実験の結果と、前報<sup>1)</sup>で示した市販かんきつ類およびそれらの加工品中の防ばい剤の含有量を比較すると、特に市販かんきつ類の 93% から DP が平均 36.6ppm 検出されたことおよび本実験の結果その 40~45% がマーマレード中に残存すること等を考慮すると、市販品の 12% から平均 5.2ppm しか検出されなかったことは大きな矛盾である。これは、レモン、オレンジおよびグレープフル

表 5. かんきつ類およびその加工品からの防ばい剤の摂取推定量

| 品 名         | 防ばい剤              | 市販かんきつ類中の* <sup>1</sup><br>防ばい剤含有量(ppm) | 摂食部への<br>移行率(%) | 推定摂食量               | 防ばい剤摂取量<br>( $\mu$ g)   |
|-------------|-------------------|-----------------------------------------|-----------------|---------------------|-------------------------|
| 生 レ モ ン     | TBZ* <sup>2</sup> | 0.49(10)* <sup>3</sup>                  | 2               | 100g                | 0.98 (20)* <sup>3</sup> |
| 生 オ レ ン ジ   | TBZ               | 1.7 (10)                                | 2               | 200                 | 6.8 (40)                |
| 生グレープフルーツ   | TBZ               | 0.45(10)                                | 2               | 450                 | 4.1 (90)                |
| レ モ ン 酒     | DP                | 13 (70)                                 | 3               | 30ml* <sup>4</sup>  | 5.1 (27)                |
|             | OPP               | 2.0 (10)                                | 44              | 30                  | 11 (57)                 |
|             | TBZ               | 0.49(10)                                | 64              | 30                  | 4.1 (83)                |
| レ モ ン テ ィ ー | DP                | 13 (70)                                 | 3               | 100ml* <sup>5</sup> | 3.9 (21)                |
|             | OPP               | 2.0 (10)                                | 22              | 100                 | 4.4 (22)                |
|             | TBZ               | 0.49(10)                                | 82              | 100                 | 4.0 (82)                |
| マーマレード      | DP                | 13~31 (70)                              | 40~44           | 10g* <sup>6</sup>   | 53~123(280~308)         |
| (レ モ ン ジ)   | OPP               | 0.87~2.0(10)                            | 9~24            | 10                  | 0.78~3.6 (9~24)         |
| グレープフルーツ    | TBZ               | 0.45~1.7(10)                            | 0~11            | 10                  | 0~1.9 (0~11)            |

\*<sup>1</sup> 市販かんきつ類中の防ばい剤含有量は DP が昭和49年から, OPP が昭和53年から, TBZ が昭和54年から昭和56年までのものの平均値である.

\*<sup>2</sup> DP および OPP は果肉部へ移行しない.

\*<sup>3</sup> ( ) 内の数値は, 防ばい剤を使用基準量含んだ場合の値である.

\*<sup>4</sup> 生レモン 13g に相当する.

\*<sup>5</sup> 生レモン 10g に相当する.

\*<sup>6</sup> かんきつ類 10g に相当する.

ーツのほとんどが輸入品であることから, 原産国で加工される場合は防ばい剤の使用が不必要であるため, 添加していないものを原料としていること, あるいは製造方法が異なること等が考えられる.

## 5. 防ばい剤の摂取状況

かんきつ類は一般に果肉を食べる場合が最も多いと考えられる. そこで前報<sup>1,2)</sup>で使用実態および果肉部への浸透性等を調査した. また本実験で果実酒, マーマレードおよび紅茶に入れた場合の残存率あるいは溶出率等の調査を行った. これらの結果をもとに摂取量の推定を行い表5に示した. すなわち, かんきつ類およびそれらの加工品を通常摂食すると考えられる量を仮定し, かつ市販品の平均値および使用基準量の防かび剤がかんきつ類および加工原料のかんきつ類に添加されている場合を想定し, それぞれ本実験で得られた溶出率および残存率から摂取量を推定した.

以上の結果と FAO/WHO による1日摂取許容量(ADI)である DP 6250 $\mu$ g/50kg 体重, OPP 50000 $\mu$ g/50kg 体重および TBZ 15000 $\mu$ g/50kg 体重とを比較した. 表5に示した各かんきつ類および加工品の摂食量を体重50kgの人が1日に全て食べたときと仮定した場合, DP OPP および TBZ は市販品の平均値を含んだ場合では

それぞれ97 $\mu$ g, 18 $\mu$ g, 21 $\mu$ gであり, 使用基準量含んだ場合ではそれぞれ 342 $\mu$ g, 96 $\mu$ g, 321 $\mu$ g といずれも ADI に比較して極めて少ない摂取量であった.

## 結 論

1. レモン酒中の DP, OPP および TBZ の分析方法を検討したところ, DP および OPP は抽出液を酸性とした後 n-ヘキサンで, TBZ は酢酸ナトリウム塩化ナトリウム緩衝液あるいはアルカリを加えた後酢酸エチルで抽出することにより, いずれも90%以上の良好な回収率が得られた.

2. レモンを酒に投入しレモン酒を作製した場合, 通常飲用される30日目以降の防ばい剤の溶出率は DP が3%, OPP 44%, TBZ 64%であった.

3. 紅茶にレモン片を30秒間入れた場合, 溶出率は DP が3%, OPP が22%, TBZ が82%であった.

4. レモン, オレンジおよびグレープフルーツを原料としてマーマレードを作製した場合, 防ばい剤の残存率は DP が40~44%, OPP が9~24%, TBZ が0~11%であった.

5. 市販かんきつ類, レモン酒, 紅茶およびマーマレードにおける防ばい剤の摂取量を推定し, FAO/WHO による ADI 値と比較したところ摂取量は極めて低い値

であった。

#### 文 献

- 1) 安田和男, 西島基弘, 冠 政光, 斉藤和夫, 中沢久美子, 上村 尚, 中里光男, 菊地洋子, 井部明広, 藤沼賢司, 永山敏廣, 牛山博文, 直井家壽太: 東京衛研年報, 33, 191, 1982
- 2) 井部明広, 西島基弘, 冠 政光, 安田和男, 斉藤和夫, 中沢久美子, 上村 尚, 中里光男, 菊地洋子, 藤沼賢司, 永山敏廣, 牛山博文, 直井家壽太: 東京衛研年報, 33, 198, 1982
- 3) 林 敏夫, 加藤三郎: 食衛誌, 13(1), 78, 1972
- 4) 鈴木二郎, 友松俊夫, 冠 政光, 押田久美子, 片倉栄一, 木村康夫: 東京衛研年報, 23, 231, 1971
- 5) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解 308, 1980
- 6) 厚生省環境衛生局食品化学課監修: 食品中の添加物分析法
- 7) 三原 翠, 近藤龍雄, 田辺弘也: 食衛誌, 14, 179, 1973

## クロロフィル分解物およびクロロフィラーゼ活性度の分析法の検討

観 公 子\*, 田 村 行 弘\*, 真 木 俊 夫\*, 小 関 正 道\*, 直 井 家 壽 太\*

### Studies on Determination of Degradative Substances of Chlorophyll and Chlorophyllase Activity

KIMIKO KAN\*, YUKIHIRO TAMURA\*, TOSHIO MAKI\*,  
MASAMICHI KOSEKI\* and YASUTA NAOI\*

**Keywords:** クロレラ *chlorella*, 光過敏性皮膚炎 *photosensitive dermatitis*, クロロフィル分解物 *degradative substances of chlorophyll*, フェオホルバイド *pheophorbide*, クロロフィラーゼ *chlorophyllase*, 総フェオホルバイド *total pheophorbide*, 分析法 *determination*, 市場調査 *marketing research*

#### 緒 言

近年のいわゆる健康食品ブームに伴い、クロレラ製品も多種類にわたり市場に出回っている。ところが昭和52年にクロレラを摂取した人の間に光過敏性の皮膚炎を起こす事件が発生し、原因物質の究明が行なわれた<sup>1-5)</sup>。この原因物質はクロロフィル分解物（主としてフェオホルバイド）であり、その生因はクロレラ中に同時に存在するクロロフィラーゼが活性化され、クロロフィルに作用したと結論づけられた。

今回、厚生省環境衛生局長通達、昭和56年5月8日、環食第99号から、いわゆる健康食品としては初めて、クロレラ中のクロロフィル分解物量（フェオホルバイドの換算値）およびクロロフィラーゼ活性度について指導基準が設けられるはこびとなった。この基準値は既存フェオホルバイド量100mg%以下、および総フェオホルバイド量160mg%以下と決まり、総フェオホルバイド量がクロロフィラーゼ活性度を測定するための指標値としてつかわれた。厚生省通知の分析法を確立するにあたり、分析条件を検討したので報告する。また本分析法を用いて、市場調査も行ったので報告する。

#### 実験方法

##### 1. 試料

- 1) 凍結乾燥クロレラ粉末
- 2) 加熱処理クロレラ粉末
- 3) クロレラ 26検体
- 4) クロレラ類似製品 5検体

原末はそのまま、錠剤、顆粒等は乳鉢で粉碎して用いた。

##### 2. 試薬

1) エチルエーテル：試薬特級品を蒸留精製して用いた。過酸化物の多いものを用いると抽出されたフェオホルバイドの667nmの吸収が670~680nmにシフトすることがある。

2) その他の試薬は全て試薬特級品を用いた。

3) M/15 リン酸緩衝液：M/15 リン酸二ナトリウムとM/15 リン酸一カリウムを用いて適宜混合しpH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 の各緩衝液を調整した。

4) アセトン-リン酸緩衝液混液：アセトンと冷M/15リン酸緩衝液（pH8.0）を用いアセトンが30%, 50%, 70%, になるようにそれぞれ調整した。

##### 3. 装置

1) ミキサー：Ultra-Turrax, TP18-10(IKA Weark社製)またはBio-mixer（日本精機製）

2) 分光光度計：自記分光光度計 EPS-3T（日立製作所製）

##### 4. 既存フェオホルバイド量の分析法

よく粉末化したクロレラ100mgを10ml容試験管に精秤し、85%アセトン水溶液10mlを加えホモジナイズ後、遠心分離（3000rpm, 5分間）し、その上清をエチルエーテル30mlを入れた分液ロートに移す。沈査は85%アセトン水溶液10mlずつで2回同様に処理する。次いで、この分液ロート中のエチルエーテル・アセトン混液に5%硫酸ナトリウム溶液50mlを加え、軽く振とうし、硫酸ナトリウム層を捨てる。この洗浄操作を3回繰り返したのち、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、エーテル層を取り、エチルエーテルで全量を50mlとし、色素原液とする。

この色素原液20mlを取り、17%塩酸20ml, 10mlずつ

\* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan



で順次振とう抽出後、塩酸層を飽和硫酸ナトリウム溶液 150ml およびエチルエーテル 20ml を入れた分液ロート中に移す。これを振とう抽出し、エーテル層を分取し、エチルエーテルを加えて全量を 20ml としたものを分解物抽出液とする。この分解物抽出液を 667nm の吸光度で測定する。フェオホルバイド a の 667 nm の比吸光係数 70.2<sup>9)</sup> からクロロフィル分解物を算出し、既存フェオホルバイド量 (mg%) とする。なお Corning G. W. filter's C. S. No. 2-60 で標準化した。

### 5. 総フェオホルバイド量の分析法

粉末化したクロレラ 100mg を 10ml 容試験管に精秤し、これに冷 M/15 リン酸緩衝液 (pH 8.0) - アセトン混液 (7:3) 10ml を加え、37° で 3 時間インキュベートする。その後 10% 塩酸で弱酸性としたのち、前記の既存フェオホルバイド量の分析法により測定する。なお本測定値は既存フェオホルバイドとの総和であることから総フェオホルバイド量として表示し、この総フェオホルバイド量から既存フェオホルバイド量を差し引き増加量をもとめ、その増加量をクロロフィル活性度とした。

### 結果と考察

#### 1. 既存フェオホルバイドの分析法の検討

本分析法の特長はポルフィリン化合物がある塩酸数<sup>7)</sup>、すなわちある塩酸濃度によりエーテル溶液中より一定の割合で抽出される性質を利用したもので、17% 塩酸濃度において抽出されるクロロフィル分解物をフェオホルバイド a に換算し現わすこととした点である。この 17% 塩酸区分には塩酸数 15 のフェオホルバイド a、塩酸数 12~13 のピロフェオホルバイド a、塩酸数 16 のフェオホルバイドのメチルまたはエチルエステル、塩酸数 3 のクロリン e など光過敏症発現に関係するものが抽出される。そしてクロロフィルが酸により変換するフェオフィチンや、上記フェオホルバイド等の b 型のものの多くは塩酸数の違いにより抽出されない<sup>7)</sup>。

本分析法は抽出過程においてアセトンを用いるため、5% 硫酸ナトリウム溶液での洗浄が充分に行われない場合、アセトンの残存によってクロロフィル分解物の塩酸抽出率が悪いのではないかと、あるいはフェオフィチン等塩酸数の高値のものが塩酸へ移行する恐れもあり、また操作の際にわずかにエマルジョンがおこるため、抽出時に損失があるのではないかと等を考慮し検討した。

そこで色素原液中のアセトン残存含量を 0%, 10%, 20%, 30% と想定し、一定量の色素原液にアセトンを加え抽出操作を行ない、その影響を調べた。

結果を表 1 に示したがフェオホルバイド量に対する抽

表 1. 色素原液中のアセトン含量とクロロフィル分解物量 n=3

| アセトン含量(%)       | 0     | 10      | 20    | 30    |
|-----------------|-------|---------|-------|-------|
| フェオホルバイド量 (mg%) | 261±0 | 259±4.0 | 261±0 | 261±0 |

表 2. インキュベート溶液中のアセトン含有量とクロロフィル分解物生成量 n=3

| アセトン: リン酸緩衝液 (アセトン濃度) | 3:7 (30%) | 5:5 (50%) | 7:3 (70%) |
|-----------------------|-----------|-----------|-----------|
| フェオホルバイド量 (mg%)       | 428±2.3   | 353±4.0   | 346±2.3   |

備考: 分析に供したクロレラ中の既存フェオホルバイド量は 70mg%

出時のアセトン含量の影響は少ないものと思われる。又アセトン除去するために 5% 硫酸ナトリウム溶液で洗浄の際のエマルジョン生成は、初回の洗浄では強く振とうしてもほとんどおこらないが、二回目以降は強振すると生成することが多い。そこでゆるやかに円をえがくように混和するならばエマルジョン生成も少なく回収率に影響はほとんど生じない。

#### 2. 総フェオホルバイドの測定法の検討

クロレラ中にはクロロフィルと同時にクロロフィラーゼが存在し、クロレラを保存時に多湿条件下においた場合、あるいは製造工程において水や有機溶剤と接触させた場合にクロロフィラーゼが働いて光過敏症の原因物質であるフェオホルバイド等を生成することがある。このようなことからクロロフィラーゼの活性を知ることはクロレラの安全性を確保するために必要なことであり、その測定条件の検討を行った。

クロロフィラーゼはアセトン含有溶液中でクロロフィルに作用し、主としてフェオホルバイドを生じさせる。そこで今回はクロレラをアセトン含有溶液中でインキュベートし、生成したフェオホルバイドを 17% 塩酸で抽出し、そこに抽出されるクロロフィル分解物量をフェオホルバイド量に換算し、総フェオホルバイド量として表示することとした。

#### 1) インキュベート時のアセトン含有量とクロロフィラーゼ活性の検討

千葉等<sup>9)</sup>はクロレラ中のクロロフィラーゼ活性が、インキュベート時のアセトン濃度 30~40% において最高の活性度を示すと報告している。またハウレン草中のクロロフィラーゼでは、10~50% あるいは 40~70% が最高の活性度を示すという報告もある<sup>9,10)</sup>。そこで酵素活性の

表 3. インキュベート時間とクロロフィル分解物生成量

| インキュベート時間 | 凍結乾燥クロレラ       |     |      | 増加率 | 加熱クロレラ         |     |     | 増加率 |
|-----------|----------------|-----|------|-----|----------------|-----|-----|-----|
|           | フェオホルバイド量 変動係数 |     |      |     | フェオホルバイド量 変動係数 |     |     |     |
| 0 hr      | 70             | mg% | 0 %  | 0   | 71             | mg% | %   | 0   |
| 0.5       | 202±30         |     | 14.8 | 1.9 | 102            |     |     | 0.4 |
| 3         | 427±24         |     | 5.6  | 5.1 | 113±5.4        |     | 4.7 | 0.6 |
| 7         | 752±73         |     | 9.7  | 9.7 | 193            |     |     | 1.7 |
| 16        | 583±50         |     | 8.5  | 7.3 | 182            |     |     | 1.6 |

備考：増加率とはインキュベートした時の値からインキュベートしない時の値を差し引きその値をインキュベートしない時の値で割ったものである。

ほぼ完全に残っている凍結乾燥クロレラを用い、アセトン濃度を30%, 50%, 70%としリン酸緩衝液 (pH8.0) の混液でインキュベートし、その他の測定条件は分析法に準じて検討した。

結果は表2に示した通りであり、30%含有アセトン—リン酸緩衝液 (pH8.0) 混液がクロロフィル分解物の生成量  $428 \pm 2.3 \text{ mg\%}$  であり最高値を示し、クロロフィルラーゼが最もよく作用したものと考えられる。これは千葉等の報告<sup>8)</sup>と一致する結果であった。

## 2) インキュベート時間とクロロフィルラーゼ活性の検討

酵素活性のほぼ完全に残っている凍結乾燥クロレラ、および酵素活性のほとんど失活している加熱クロレラを用いてインキュベート時間の検討を行った。インキュベート時間を30分、3時間、7時間、16時間とし、その他の条件は分析法に準じて検討を行った。

結果は表3に示した通り凍結乾燥クロレラおよび加熱クロレラ共に、インキュベート時間が7時間までクロロフィル分解物の生成は増加し、16時間ではやや減少する傾向がみられた。また7時間のインキュベートでは酵素のほとんどが失活している加熱処理クロレラにおいてもクロロフィル分解物の生成が1.7倍とかなり増加し、真の酵素活性を比較する時、判別がつきにくくなる傾向を示した。またクロロフィル分解物量の変動係数 (%) からみると3時間のインキュベートが5.6%と最も少なく、他は8.5~14.8%と大きな変動を示した。そこでインキュベート時間は分析時間も考慮し、3時間が良好であると考えた。

## 3) リン酸緩衝液の pH とクロロフィルラーゼ活性の検討

クロロフィルラーゼが作用する至適 pH については、千葉等<sup>8)</sup>が pH8.0 で良好な結果を得ているが最も良い条件

表 4. インキュベート溶液中のリン酸緩衝液の pH とクロロフィル分解物生成量  $n=3$ 

| pH              | 5              | 6              | 7              | 8           |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|-------------|
| フェオホルバイド量 (mg%) | $386 \pm 7.37$ | $405 \pm 3.51$ | $426 \pm 3.53$ | $441 \pm 0$ |

備考：分析に供したクロレラ中の既存フェオホルバイド量は70mg%

は明らかでない。そこで酵素活性のほぼ完全に残っている凍結乾燥クロレラを用い、至適 pH について検討を行った。30%含有アセトン—M/15 リン酸緩衝液 pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 の各混液を用い、その他の条件は分析法に準じて検討を行った。

結果は表4に示した。クロロフィル分解物量は pH5.0 の時  $386 \text{ mg\%}$  であり、pH8.0 では  $441 \text{ mg\%}$  で最高のクロロフィルラーゼ活性を示した。

以上のことから、これらの最も良い条件を用いて前記のとおり分析法を設定した。そこで市販されているクロレラ12試料を用いてそれぞれ3回ずつ試験し、その変動係数を調べ、結果を表5に示した。本分析法の変動係数では既存フェオホルバイドは平均  $6.7 \pm 3.3\%$ 、総フェオホルバイドは  $7.5 \pm 4.4\%$  であった。また同一試料について分析者3名によって分析した結果を表6に示した。変動係数は1.8~12.4%であった。なお参考のために総クロロフィル量について色素原液から AOAC 法の試算式を用いて算出し、その変動係数も示した。以上のように良好な分析結果が得られた。

## 3. 酸性条件下におけるクロレラ中のクロロフィル分解物量について

最近、市販品の中にクロレラジュース等のクロレラが酸性条件下におかれている製品がある。これら酸性条件下においてもクロロフィル分解物の生成がおこる可能性

表 5. 本分析法による各種クロレラの分析値および変動係数

n=3

| No. | 品 名  | 既存フェオホルバイド |      | 総フェオホルバイド  |      | クロロフィ<br>ラーゼ活性 |
|-----|------|------------|------|------------|------|----------------|
|     |      | 平均値±標準偏差   | 変動係数 | 平均値±標準偏差   | 変動係数 |                |
| 1   | クロレラ | 114±7.8mg% | 6.8% | 150±15 mg% | 10 % | 36mg%          |
| 2   | "    | 144±9.2    | 6.4  | 370±14     | 3.8  | 227            |
| 3   | "    | 59±6       | 10.2 | 464±15     | 3.2  | 405            |
| 4   | "    | 38±1.4     | 3.7  | 291±24     | 8.2  | 253            |
| 5   | "    | 38±3.5     | 9.2  | 71±7.1     | 10   | 41             |
| 6   | "    | 77±7.8     | 10.1 | 608±13     | 2.1  | 531            |
| 7   | "    | 86±6       | 7.5  | 472±12     | 2.5  | 385            |
| 8   | "    | 51±4.2     | 8.2  | 248±15     | 6.0  | 197            |
| 9   | "    | 38±0.7     | 1.8  | 126±20     | 15.9 | 88             |
| 10  | "    | 22±0       | 0    | 138±13     | 9.4  | 116            |
| 11  | "    | 32±2.8     | 8.8  | 776±41     | 5.3  | 744            |
| 12  | "    | 149±12     | 8.1  | 269±36     | 13.3 | 120            |
| 平 均 |      | 6.7±3.3    |      | 7.5±4.4    |      |                |

備考：変動係数とは標準偏差を平均値で割って100倍した値である。

クロロフィラーゼ活性とは総フェオホルバイド値から既存フェオホルバイド値を差し引いた値である。

表 6. 分析者3名によるクロレラの分析値

|                    | 総クロロフィル量 (mg%) |         |         | 既存フェオホルバイド量(mg%) |          |          | 総フェオホルバイド量 (mg%) |          |          |
|--------------------|----------------|---------|---------|------------------|----------|----------|------------------|----------|----------|
|                    | AH             | BI      | CJ      | AH               | BI       | CJ       | AH               | BI       | CJ       |
| 試 料 1              | 1271           | 1185    | 1176    | 56.8             | 52.6     | 45.6     | 277              | 248      | 331      |
|                    | 1263           | 1252    | 1220    | 53.6             | 48.1     | 51.5     | 283              | 245      | 322      |
|                    | 1286           | 1229    | 1172    | 55.4             | 54.5     | 45.7     | 256              | 253      | 298      |
| 平均値±標準偏差           | 1273±11        | 1222±34 | 1189±26 | 55.3±1.6         | 51.7±3.3 | 47.6±3.4 | 272±14           | 249±4.4  | 317±17   |
| 平均値±標準偏差<br>(変動係数) | 1228±42 (3.4%) |         |         | 51.5±3.9 (7.6%)  |          |          | 279±34(12.4%)    |          |          |
| 試 料 2              | 772            | 686     | 701     | 35.1             | 34.7     | 37.7     | 55.5             | 56.8     | 66.7     |
|                    | 773            | 669     | 707     | 39.8             | 37.0     | 35.2     | 59.3             | 56.6     | 64.6     |
|                    | 725            | 738     | 696     | 41.9             | 34.6     | 36.5     | 63.5             | 60.5     | 66.9     |
| 平均値±標準偏差           | 757±27         | 698±35  | 701±5.5 | 38.9±3.5         | 35.4±1.4 | 36.5±1.2 | 59.4±4.1         | 58.0±2.2 | 66.1±1.3 |
| 平均値±標準偏差<br>(変動係数) | 719±33 (4.6%)  |         |         | 36.9±1.8 (1.8%)  |          |          | 61.2±4.4(7.2%)   |          |          |

が十分に考えられる。すなわち、乳酸発酵をとまなう漬物ではピロフェオホルバイドが生成すると報告されている<sup>11,12)</sup>。そこで各種酸性溶液中におけるクロロフィル分解物の生成量について検討を行った。

クロレラはクロロフィラーゼ活性の存在する凍結乾燥クロレラを用い、塩酸、クエン酸、乳酸、酢酸およびpH

7.0と8.0のリン酸緩衝溶液中で3時間および16時間、37°でインキュベートを行い検討した。

結果は表7に示した通り既存フェオホルバイドは70mg%であったものが、pH7.0および8.0のリン酸緩衝液では8～14倍のクロロフィル分解物生成がみられる。しかし、pH1.9～3.0の各種酸溶液中においても3～7倍

表 7. 酸性条件下におけるクロレラ中のクロロフィル分解物生成量

| 酸の種類        | pH  | インキュベート時間 |        |
|-------------|-----|-----------|--------|
|             |     | 3 hr      | 6 hr   |
| 0.02M塩 酸    | 1.9 | 303mg%    | 396mg% |
| 0.1M クエン酸   | 2.3 | 207       | 343    |
| 0.1M 乳 酸    | 2.6 | 384       | 546    |
| 0.1M 酢 酸    | 3.0 | 444       | 507    |
| 1/15Mリン酸緩衝液 | 7.0 | 594       | 1019   |
| "           | 8.0 | 744       | 1034   |

備考：分析に供したクロレラ中の既存フェオホルバイド量は70mg%

のクロロフィル分解物生成がみられ、インキュベート時間が長くなるに従い増加した。このことからクロロフィラーゼが存在するならばクロロフィル分解物は多量に生成することが明らかとなった。これら分解物は含水アセトン中に生ずるフェオホルバイドと異なり667nmの吸収が670~680nmに移行し、外観的にもエーテル溶液が褐色を呈する色素であったことから酸化されたクロロフィル誘導体<sup>13)</sup>であると考えられる。このものの光過敏症の発現性については未だ明らかでなく、今後の研究が待たれる。

しかし、中毒のおこる可能性もあることから、もし多量のクロレラを添加したものが流通するならば行政上何らかの措置が必要となることも考えられる。

#### 4. 市場調査

クロレラによる中毒がおこった当時、その製品から既存フェオホルバイドが平均で $510 \pm 150 \text{mg}\%$ <sup>1,11)</sup>も含まれていた。そこで昭和57年1月から4月までの市販されているクロレラおよびクロレラ類似製品について調査し、現況を把握して規制値を越すものがないか、また中毒をおこす可能性のあるものが流通していないか調べた。

結果を表8に示した。現行の指導基準に適合しないものが31検体中既存フェオホルバイドにおいて3検体、また総フェオホルバイドにおいて13検体検出された。既存フェオホルバイド量からみるならば、今回の調査結果の最高値は149mg%であり、中毒をおこしたクロレラの最低値 $300 \text{mg}\%$ <sup>1,12)</sup>からははるかに低く、行政指導の効果があらわれているように思われる。しかしながら総フェオホルバイド量からみるならばクロロフィラーゼは未だ約4割近い製品において活性度の高いものがあり、多量購入した場合は飲み方によって保存期間が長くなることもあることから、さらに注意を喚起していくことが必要ではないかと考える。

#### 結 論

表 8. 市 場 調 査 結 果

| No.                        | 品 名     | 既存フェオホルバイド量 | 総フェオホルバイド量 | No. | 品 名       | 既存フェオホルバイド量 | 総フェオホルバイド量 |
|----------------------------|---------|-------------|------------|-----|-----------|-------------|------------|
| 1                          | ク ロ レ ラ | 114mg%      | 150mg%     | 17  | ク ロ レ ラ   | 30mg%       | 128mg%     |
| 2                          | "       | 144         | 371        | 18  | "         | 21          | 63         |
| 3                          | "       | 59          | 464        | 19  | "         | 23          | 96         |
| 4                          | "       | 38          | 291        | 20  | "         | 22          | 26         |
| 5                          | "       | 38          | 71         | 21  | "         | 43          | 243        |
| 6                          | "       | 77          | 608        | 22  | "         | 83          | 243        |
| 7                          | "       | 86          | 472        | 23  | "         | 7           | 50         |
| 8                          | "       | 51          | 248        | 24  | "         | 22          | 260        |
| 9                          | "       | 38          | 126        | 25  | "         | 20          | 185        |
| 10                         | "       | 22          | 138        | 26  | "         | 72          | 300        |
| 11                         | "       | 32          | 776        | 27  | クロレラ複合製剤  | 13          | 16         |
| 12                         | "       | 149         | 269        | 28  | スピルリナ     | 7           | 20         |
| 13                         | "       | 38          | 69         | 29  | 熊 笹 製 剤   | 5           | 5          |
| 14                         | "       | 23          | 49         | 30  | アルファルファ製剤 | 6           | 6          |
| 15                         | "       | 19          | 29         | 31  | クロレラ核酸製剤  | ND          | ND         |
| 16                         | "       | 29          | 135        |     |           |             |            |
| 平均値±標準偏差<br>(No. 27~31を除く) |         |             |            |     |           | 50±38mg%    | 225±187mg% |

クロレラ中のクロロフィル分解物量およびクロロフィラーゼ活性度の分析法の条件について検討した。クロロフィル分解物量は17%塩酸とエーテル間における液々分配後、667nmの吸光度を測定し、フェオホルバイドaに換算して表した。クロロフィラーゼ活性は、クロロフィラーゼを働かせるためにクロレラをインキュベートして、増加したクロロフィル分解物量を測定し表わした。インキュベート時の時間は3時間、アセトンーリン酸緩衝液混液のアセトン含有量は30%、アセトンーリン酸緩衝液混液のpHは8.0が最も良い分析条件であると考えられた。市場調査をクロレラおよびクロレラ類似製品31検体について行った。既存フェオホルバイド量ND~149mg%、総フェオホルバイド量ND~608mg%であり、指導基準に適合しないものが各々3, 13検体あった。このことから今後さらに幅広く調査を行い、中毒防止のために監視あるいは指導を強化していく必要があると考える。

#### 文 献

- 1) 田村行弘, 真木俊夫, 嶋村保洋, 西垣 進, 直井家壽太: 東京衛研年報, 29-1, 250, 1978
- 2) 田村行弘, 西垣 進, 真木俊夫, 嶋村保洋, 直井家壽太: 食衛誌, 20, 173, 1979
- 3) 天野立爾, 池 慶子, 内山 充: 食品衛生研究, 28, 739, 1978
- 4) 駒井嘉明, 大貫憲一, 山岸 宏, 白鳥憲行: 食品衛生研究, 28, 747, 1978
- 5) 田村行弘, 西垣 進, 真木俊夫, 嶋村保洋, 直井家壽太: 食品衛生研究, 28, 753, 1978
- 6) Brown S.R. : *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 25, 523, 1968
- 7) Vernon L. P. and Seely G. R. : *The Chlorophylls*, 77, 1966, Academic Press, New York and London
- 8) Chiba Y., Aiga I., Idemori M., *et al* : *Plant & Cell Physiol.*, 8, 623, 1967
- 9) Ellsworth R. K. : *Photosynthetica*, 6, 32, 1972
- 10) Weast C. A. and Mackinney G. : *J. Biol. Chem.*, 133, 551, 1941
- 11) Jones I. D., White R. C. and Gibbs E. : *Food Technol.*, 15, 172, 1961
- 12) 山田幸二, 中村延生蔵: 栄養と食糧, 25, 466, 1972
- 13) Holt A. S. : *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 36, 439, 1958

## みそ、しょう油中のアルコール含有量調査

上 田 工\*, 嶋 村 保 洋\*, 石 川 ふさ子\*, 直 井 家壽太\*

### Survey of Alcohol Content in Miso and Soy sauce

KOU UEDA\*, YASUHIRO SHIMAMURA\*, FUSAKO ISHIKAWA\* and YASUTA NAOI\*

**Keywords** : みそ miso, しょう油 soy sauce, エタノール ethanol, メタノール methanol, 保存料 Preservative

#### 緒 言

みそ、しょう油は日本古来の食品であり、その保存方法は時代とともに変遷している。特に近年消費者が食品添加物を忌避する傾向にあり、それに呼応して、我々がおこなった市販みそ、しょう油の保存料含有量調査でも、検出されない場合が多くなってきた。

そこで市販みそ、しょう油の品質保持の方法の実態を調査するため、多くの食品に保存の目的で使用されるようになってきたエタノールの他に、品質保持に関係のある水分活性、水分、塩分、pH および保存料について調査をおこなった。

また、みそ、しょう油は発酵食品であることから、エタノールの他にメタノールが生成されることが考えられる。すでに食品中のメタノールについては、種々の調査報告<sup>1-4)</sup>がみられるが、みそ、しょう油については特に報告がみられない。そこでメタノールについても調査をおこなったので、併せて報告する。

#### 実験方法

##### 1. 試料

試料は1981年に購入した市販みそ25検体、しょう油12検体、および都内しょう油製造元より購入した業務用しょう油9検体を対象とした。

##### 2. 分析方法

###### 1) エタノールおよびメタノール

みそおよびしょう油それぞれ20gに水60mlを加え、直接蒸留し、留液50mlについて次の条件でガスクロマトグラフィーをおこなった。(1)機種：日立製163型(FID付)(2)充てん剤：ポーラスポリマービーズ系およびポリエレングリコール系 (3)カラム：ガラス製(3mm×2m)

###### 2) 水分活性

コンウェイのユニットを用い、グラフ挿入法<sup>5)</sup>で測定した。

###### 3) 塩分

モール法を用い、食塩として換算した。

###### 4) 水分、pH、保存料

衛生試験法注解に準じた。

#### 結果および考察

##### 1. エタノールおよびメタノール

みそは25検体を麴原料により、米みそ17、豆みそ6、そばみそ1、麦みそ1に分類した。米みそはさらに外観により白6、赤5およびその中間色6検体に分類し、それらの結果を表1に示した。しょう油は市販品12、業務用9検体に分類した。市販しょう油はさらに、こいくち、うすくち、しろ、さしみの各しょう油に分類し、それらの結果を表2に示した。

###### 1) エタノール

みそ：エタノール使用の表示とエタノール含有量の関係を調査した。米みそのうち色調の白いもの6検体にいずれも表示があり、それらのエタノール含有量は1.96～3.80(平均2.65)%であった。淡赤色のものは6検体中3検体に表示があり、表示のあるものの含有量は1.73～3.66(平均2.42)%、表示のないもの0.38～2.46(平均1.18)%と差がみられた。色調の赤いものは5検体中4検体に表示があり、その含有量は1.00～3.58(平均1.96)%であり表示のないもの0.54%と大きな差がみられた。

また麴原料の差によりエタノール含有量を比較すると、米みそは17検体中13検体にエタノール使用の表示がみられたが、それらのエタノール含有量は1.00～3.80(平均2.39)%であった。この含有量は岡田ら<sup>6)</sup>の仕込実験や、エタノールの実用的使用レベル<sup>7)</sup>2%と比較して妥当な量と思われる。

しかし、豆みそでは6検体中5検体にエタノール使用の表示があるにもかかわらず0.03～1.08(平均0.47)%と低い値が得られた。米みそに比較して豆みそにエタノ

\* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表 1. みそ中のエタノール及びメタノール含有量

| 種 類         | 色調 | 表示* | エタノール (%) | メタノール (ppm) |
|-------------|----|-----|-----------|-------------|
| 1           |    | +   | 2.75      | 27          |
| 2           |    | +   | 2.52      | 26          |
| 3           |    | +   | 2.18      | 25          |
| 4           |    | +   | 1.96      | 24          |
| 5           |    | +   | 2.68      | 21          |
| 6           |    | +   | 3.80      | 55          |
| 7           |    | +   | 3.66      | 36          |
| 8           |    | +   | 1.88      | 77          |
| 9 米 み そ     |    | -   | 0.38      | 43          |
| 10          |    | -   | 2.46      | 44          |
| 11          |    | +   | 1.73      | 38          |
| 12          |    | -   | 0.70      | 30          |
| 13          |    | +   | 3.58      | 41          |
| 14          |    | -   | 0.54      | 38          |
| 15          |    | +   | 1.77      | 33          |
| 16          |    | +   | 1.00      | 29          |
| 17          |    | +   | 1.50      | 31          |
| 18 調合(そば)みそ |    | +   | 2.32      | 49          |
| 19 麦 み そ    |    | +   | 1.95      | 17          |
| 20          |    | +   | 0.74      | 36          |
| 21          |    | +   | 0.03      | 71          |
| 22 豆 み そ    |    | -   | 0.06      | 40          |
| 23          |    | +   | 0.42      | 38          |
| 24          |    | +   | 0.47      | 15          |
| 25          |    | +   | 1.08      | 49          |

\* エタノール使用の表示: +有り, -なし

ール含有量が少ない原因は、米みその醸造期間が甘口で数日から1ヶ月、辛口でも6ヶ月前後であるのに対し、豆みその熟成は天然醸造では一般に12ヶ月前後と長期間であるため醸造育成中に、アルコールが発散するためと考えられる。また豆みその原料である大豆中には、でん粉、糖などの発酵基質が少量しか含有されず、比較的な白質が多いため、酵母の増殖やアルコール発酵が微弱であることに起因していると考えられる。

しょう油: 市販しょう油ではエタノール使用の表示は12検体中10検体に見られた。表示を有するもののエタノール含有量は1.31~2.54 (平均1.86) %であり、表示のなかったしろしょう油0.98~1.00 (平均0.99) %と比較して高い値が得られた。また市販しょう油のこいくちのエタノール含有量は1.66~2.54 (平均1.87) %, うすく

表 2. しょう油中のエタノール及びメタノール含有量

| 種 類 | 表示* | エタノール (%) | メタノール (ppm) |
|-----|-----|-----------|-------------|
| 1   | +   | 1.74      | 54          |
| 2   | +   | 1.67      | 56          |
| 3   | +   | 1.69      | 64          |
| 4   | +   | 1.94      | 58          |
| 5 市 | +   | 1.66      | 59          |
| 6   | +   | 2.54      | 65          |
| 7 販 | +   | 2.21      | 37          |
| 8   | +   | 1.98      | 18          |
| 9 品 | +   | 1.89      | 21          |
| 10  | -   | 0.98      | tr.         |
| 11  | -   | 1.00      | tr.         |
| 12  | +   | 1.31      | 59          |
| 13  | -   | 0.06      | tr.         |
| 14  | -   | 0.28      | 6.9         |
| 15  | -   | 0.06      | 6.7         |
| 16  | -   | N. D.     | N. D.       |
| 17  | -   | 0.12      | 9.1         |
| 18  | -   | 0.03      | tr.         |
| 19  | -   | 0.12      | tr.         |
| 20  | -   | 0.02      | tr.         |
| 21  | -   | 0.05      | tr.         |

tr. : trace N. D. : none detect

\* エタノール使用の表示: +有り, -なし

ちは1.89~2.21 (平均2.03) %と両者に差はみられなかった。

一方、業務用しょう油は9検体いずれもエタノール使用の表示はなく、エタノール含有量はND~0.28 (平均0.08) %と低い値が得られた。

市販しょう油はいずれも本醸造製品であり、熟成まで約1年を要するのに対し、業務用は新式醸造製品であるため、熟成まで1~2ヶ月と短い。そのためにエタノールの産生が少ないものと思われる。これら業務用しょう油のエタノール量は、添加していない新式醸造製品のバックグランド値と思われる。

## 2) メタノール

みそ: みそ25検体の全てからメタノールが検出された。米みそは21~77 (平均36) ppm, 豆みそは15~71 (平均42) ppm, そばみそ49ppm, 麦みそ17ppmであった。米みそを色調別に比較すると、白いみそは平均30

表 3. みそ中の水分活性, 水分, 塩分, pH, 保存料

| 種 類           | 色 調   | 水分活性 | 水 分 (%) | 塩 分 (%) | pH  | 保 存 料 |
|---------------|-------|------|---------|---------|-----|-------|
| 1             | 白     | 0.83 | 54      | 12.1    | 5.4 | —     |
| 2             |       | 0.75 | 51      | 12.8    | 5.5 | —     |
| 3             |       | 0.76 | 51      | 13.5    | 5.2 | —     |
| 4             |       | 0.77 | 49      | 12.0    | 5.4 | —     |
| 5             |       | 0.76 | 47      | 11.6    | 5.4 | —     |
| 6             |       | 0.87 | 53      | 9.3*    | 5.3 | —     |
| 7             | 淡 赤   | 0.80 | 54      | 11.9    | 5.2 | —     |
| 8             |       | 0.77 | 49      | 12.8    | 5.2 | —     |
| 9 米 み そ       |       | 0.75 | 48      | 13.2    | 5.2 | —     |
| 10            |       | 0.83 | 53      | 12.3    | 5.3 | —     |
| 11            |       | 0.84 | 55      | 10.1*   | 5.3 | —     |
| 12            |       | 0.75 | 49      | 13.6    | 5.2 | —     |
| 13            | 赤     | 0.82 | 55      | 8.6*    | 5.2 | —     |
| 14            |       | 0.73 | 49      | 14.0    | 5.2 | —     |
| 15            |       | 0.76 | 51      | 12.3    | 5.2 | —     |
| 16            |       | 0.75 | 49      | 14.1    | 5.1 | —     |
| 17            |       | 0.80 | 48      | 11.5    | 5.0 | —     |
| 18 調合 (そば) みそ |       | 0.80 | 51      | 13.2    | 5.0 | —     |
| 19 麦 み そ      |       | 0.79 | 49      | 11.6    | 5.1 | —     |
| 20            | 豆 み そ | 0.73 | 41      | 10.8    | 5.1 | —     |
| 21            |       | 0.77 | 41      | 11.4    | 4.9 | —     |
| 22            |       | 0.77 | 48      | 11.2    | 4.9 | —     |
| 23            |       | 0.77 | 46      | 11.1    | 4.9 | —     |
| 24            |       | 0.77 | 51      | 12.9    | 5.0 | —     |
| 25            |       | 0.79 | 44      | 10.1    | 4.9 | —     |

\*: 減塩みそ

ppmであり, 其他のみその平均が40ppmであるのに対し, 低い傾向がみられた.

しょう油: 市販しょう油中のメタノールの含有量はTrace~65 (平均41) ppmであるのに対し, 新式醸造品の業務用はND~9.1 (平均2.5) ppmと低い値が得られた.

市販しょう油のこいくちは54~65 (平均59) ppm, うすくちは18~37 (平均25) ppm, しろしょう油は2検体とも痕跡であった.

メタノール含有量はこいくちが最も高く, 次いでうすくち, しろしょう油と大きな差がみられた. その原因はこいくちに比較し, うすくちおよびしろしょう油は淡色化のために, 原料として大豆に比較して麦の割合が多いこと, また熟成期間が比較的短いと思われる.

みそ, しょう油ともにエタノール含有量とメタノールの間には相関が全くみられなかった.

## 2. 水分活性, 水分, pH, 保存料

保存性に関与していると考えられる水分活性, 水分, 塩分, pH, 保存料について調査をおこなった. みそについての結果は表3, しょう油の結果は表4に示した.

### 1) 水分活性 ( $A_w$ )

みそは  $0.78 \pm 0.007$ , しょう油は  $0.82 \pm 0.004$  で, みそ, しょう油ともにそれらの種類による差は特にみられなかった.

### 2) 水分

米みそおよび豆みその水分含有量を比較すると, 米みそは44~55 (平均51) %であるのに対し, 豆みそは41~48 (平均45) %と若干低い傾向がみられた.



表 4. しょう油中の水分活性, 水分, 塩分, pH, 保存料

| 種 類 | 水分活性 | 水 分<br>(%) | 塩 分<br>(%) | pH  | 保 存 料          |                            |
|-----|------|------------|------------|-----|----------------|----------------------------|
|     |      |            |            |     | 安息香酸<br>(g/kg) | P-オキシ安息<br>香酸エステル<br>(g/L) |
| 1   | 0.83 | 69         | 17.1       | 4.6 | —              | —                          |
| 2   | 0.82 | 70         | 17.1       | 4.6 | —              | —                          |
| 3   | 0.83 | 68         | 16.5       | 4.6 | —              | —                          |
| 4   | 0.82 | 70         | 17.0       | 4.7 | —              | —                          |
| 5 市 | 0.83 | 68         | 17.3       | 4.7 | —              | —                          |
| 6 販 | 0.87 | 72         | 12.1*      | 4.7 | —              | —                          |
| 7   | 0.81 | 71         | 18.4       | 4.7 | —              | —                          |
| 8   | 0.82 | 70         | 18.5       | 4.7 | —              | —                          |
| 9 品 | 0.81 | 72         | 18.3       | 4.7 | —              | —                          |
| 10  | 0.83 | 57         | 17.4       | 4.5 | 0.45           | —                          |
| 11  | 0.83 | 60         | 17.4       | 4.4 | 0.44           | —                          |
| 12  | 0.83 | 65         | 17.4       | 4.6 | —              | —                          |
| 13  | 0.84 | 75         | 15.4       | 4.7 | —              | 0.05                       |
| 14  | 0.81 | 70         | 17.7       | 4.8 | —              | 0.05                       |
| 15  | 0.83 | 71         | 17.2       | 4.9 | —              | 0.06                       |
| 16  | 0.82 | 72         | 17.4       | 4.9 | —              | 0.05                       |
| 17  | 0.80 | 68         | 17.1       | 4.8 | —              | 0.06                       |
| 18  | 0.84 | 76         | 17.0       | 4.9 | —              | 0.03                       |
| 19  | 0.82 | 71         | 17.8       | 4.7 | —              | 0.04                       |
| 20  | 0.83 | 71         | 17.5       | 4.6 | —              | 0.05                       |
| 21  | 0.77 | 57         | 17.1       | 4.8 | 0.42           | 0.04                       |

\*: 減塩しょう油

しょう油は, 市販品57~72 (平均68) %, 業務用57~75 (平均70) %であり, 両者に差はみられなかった。

### 3) 塩分

米みそは 8.6~14.1 (平均12.1) %であり, また色調による分類では差はみられなかった。また豆みそは10.1~12.9 (平均11.3) %と, 米みそにくらべて差は認められなかった。

しょう油は, 市販品で減塩製品の 12.1 %を除くと, 16.5~18.5 (平均 17.5) %であった。業務用は 15.4~17.8 (平均17.1) %であり, ほとんど差はみられなかった。

なお, 減塩製品ではその他の製品よりも低かった。

### 4) pH

みそでは, 米みそ 5.0~5.4 (平均5.2), 豆みそ 4.9~5.1 (平均4.9), しょう油では, 市販品 4.4~4.7 (平均

4.6), 業務用4.6~4.9 (平均4.8) であった。

みそ, しょう油ともにそれらの種類による差はみられなかった。

### 5) 保存料

みそのいずれからも検出されなかった。しょう油は市販品でしろしょう油のみから, 安息香酸が検出された。業務用しょう油は9検体すべてから0.03~0.06g/Lの p-オキシ安息香酸エステル類が検出された。

また, たまりしょう油には安息香酸が併用されていた。

### 6) 各試験項目の比較

保存料とエタノールの含有量を各試料ごとに比較した場合, みそは25検体いずれからも保存料は検出されず, エタノール含有量は0.03~3.80(平均1.69)%であった。

しょう油のうち保存料が検出されなかったもののエタ

ノール含有量は1.31~2.54 (平均1.86) %であるのに対し、保存料の検出されたもののエタノール量はN. D. ~ 1.00 (平均0.25) %で、あきらかに差が認められた。

このようなことから、エタノールは保存料として添加されている事が推察される。

また、水分活性、水分、塩分、pH と、エタノール含有量および保存料の使用の有無との間には特に関係がみられなかった。

### ま と め

みそおよびしょう油の品質保持の方法の実態を知るため、品質保存に関係のあるエタノール含有量、水分活性、水分、塩分、pH および保存料を調査すると共に、発酵過程に生成すると考えられるメタノール含有量を調査し、次の結果を得た。

1. みそ中のエタノール含有量は、米みそで平均 $2.39 \pm 0.24\%$ 、豆みそで平均 $0.47 \pm 0.16\%$ であり、米みそに多く含有されている事がわかった。

2. しょう油中のエタノール含有量は、本醸造である市販しょう油で平均 $1.72 \pm 0.13\%$ であるのに対し、新式醸造である業務用では平均 $0.08 \sim 0.03\%$ と大きな差がみられた。

3. みそ中のメタノール含有量は原料による差はみられず、米みそのうちで色調の白いみそが平均 $30 \pm 5\text{ppm}$ であり、その他のみその平均 $40 \pm 3\text{ppm}$ に比較して低い値を示した。

4. しょう油中のメタノール含有量は、市販しょう油の中では、こいくちが平均 $59\text{ppm}$ と最も多く、次いでう

すくちの平均 $25\text{ppm}$ 、しろしょう油は痕跡と差がみられた。

5. みそ、しょう油ともにエタノールとメタノールの含有量の間に相関はみられなかった。

6. 水分活性、水分、塩分、pH 等はみそ、しょう油について種類別で特に差はみられなかった。

7. いずれのみそからも保存料は検出されなかった。しょう油は、業務用すべてから保存料が検出された。

8. 保存料の検出されたしょう油のエタノール含有量は検出されないものに比較して明らかに低い傾向がみられた。

これらのことから、エタノールは合成保存料の代りに使用されているものと推察される。

### 文 献

- 1) 平友 恒：農化，35，298，1961
- 2) 川田公平，細貝祐太郎：衛生試験所報告，74，443，1956
- 3) Hogbrn, R. and Mular, M. : *J. Sci. Fd Agric.* 27, 1108, 1976
- 4) Lee, C., Acree, T. and Butts, R. : *Anal. Chem.* 47, 747, 1975
- 5) 佐藤南理子，清水恵美子，鈴木 健，森 光國：缶詰時報，56，87，1977
- 6) 岡田安司，好井久雄，加藤 熙，竹内徳男：日食工誌，28，26，1981
- 7) 川村 渉，松下善一，中野政弘，*et al.*：食の科学 No. 21：農政調査委員会編，14，1974，丸の内出版

## 食品工業用洗淨剤の成分分析

広 門 雅 子\*, 中 嶋 巖\*, 安 野 哲 子\*, 荻 野 周 三\*

中 島 和 雄\*, 溝 入 茂\*

小 野 綾 子\*, 大 島 敏 子\*, 遠 藤 英 美\*

## Analysis of Detergent Products used for Food Industry

MASAKO HIROKADO\*, IWAO NAKAJIMA\*, TETSUKO YASUNO\*, SHUZO OGINO\*,  
KAZUO NAKAJIMA\*, SHIGERU MIZOIRI\*, AYAKO ONO\*, TOSHIKO OHATA\*  
and FUSAYOSHI ENDO\*

Fourty five species of detergent products, which were collected from 37 food manufacturers in Tokyo, were analyzed by the method of the Japanese Industrial Standard in respect of pH, surfactants, inorganic builders, arsenic, heavy metals and fluorescent material.

The results were as follows: pH were 6.8—12.0 for powdered type, 2.4—11.8 for liquid type. Total contents of surfactants were 0—98.6%. Many of the detergent products contained anionic and nonionic surfactants. Contents of  $P_2O_5$ ,  $SiO_2$ ,  $Na_2SO_4$  and  $Na_2CO_3$  of inorganic builders in powder samples were 4—8.1%, 2.2—8.3%, 2.5—67.2% and 2.0—96.0% respectively. Arsenic and heavy metal contents in all the samples were less than 0.0001% and 0.002% respectively. Fluorescent materials were not detected in all the samples.

**Keywords**: detergent product, anionic surfactant, nonionic surfactant, inorganic builder, Japanese Industrial Standard, food industry

### 緒 言

現在、消費者向けの台所用洗剤については、食品衛生法による成分規格や使用基準<sup>1)</sup>および家庭用品品質表示法による表示の基準<sup>2)</sup>が定められているが、食品製造工場で使用される業務用の洗剤については特に規制がなく、成分表示のないものが多い。またその内容成分や品質等も明らかにされていない。

洗剤成分の機械や器具容器等への残留による食品への混入が避けられない以上、食品衛生面からその成分組成の実態を把握する必要があると考え、昭和55年5月～12月に東京都食品監視課より収去された食品工業用洗剤45種について、JIS規格中の台所用合成洗剤試験法<sup>3)</sup>に基づいたヒ素および重金属、合成洗剤試験法<sup>4)</sup>に基づいたpH、界面活性成分、無機洗浄補助剤、ケイ光増白剤および酸化剤等の分析を行い、それらの成分の特徴と台所用合成洗剤の規格との関係について調査したので報告する。

### 実験の部

#### I 試料 東京都食品監視課が昭和55年5月～12月に

都内37の食品製造工場から入手し、当所に送付した食品工業用洗剤45試料（粉末型10試料、液体型35試料）を用いた。そのうち成分含量の表示のあるものは10試料であった。

#### II 試験項目および方法

1. pH pHメーターHM 20E（東亜電波工業製）を用い、JIS規格K3362の6.3に従って測定した。
2. 石けん分 衛生試験法3.2.3食品・飲食物器具用洗剤試験法に準じた。
3. 硫酸エステル系アニオン、4. 非イオン界面活性剤、5. カチオン界面活性剤、6. 全リン酸塩、7. ケイ酸塩、8. 硫酸塩、9. 炭酸塩、10. ケイ光増白剤、11. 酸化剤、以上の試験はJIS規格K—3362合成洗剤試験法に基づいた。
12. LAS系アニオン界面活性剤 JIS規格K3362合成洗剤試験法中の全アニオン界面活性剤および硫酸エステル系アニオン界面活性剤の定量を行い、次式により算出した。LAS系アニオン界面活性剤( $SO_3$ として)(%) = 全アニオン界面活性剤( $SO_3$ として)(%) - 硫酸エステル

\* 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科 160 東京都新宿区百人町 3—24—1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Analyzed Values of pH, Surfactants, Inorganic Constituents and Oxidizing Agent in Detergent Products used for Food Industry

| Sample | Form   | pH   | Soap  | Content of Surfactants (%) |        |        |                               | Total<br>Content | Content of Inorganic<br>Constituents (%) |                                 |                                 |           | Oxidizing<br>Agent |
|--------|--------|------|-------|----------------------------|--------|--------|-------------------------------|------------------|------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------|--------------------|
|        |        |      |       | Synthetic Surfactants      |        |        | P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> |                  | SiO <sub>2</sub>                         | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> |           |                    |
|        |        |      |       | Anion(SO <sub>3</sub> )*   | Nonion | Cation |                               |                  |                                          |                                 |                                 |           |                    |
|        |        |      |       |                            |        |        |                               |                  |                                          |                                 |                                 | Sulfone** |                    |
| 1      | Powder | 6.8  | -     | 13.40                      | -      | -      | -                             | 29.90            | -                                        | -                               | 67.2                            | -         | -                  |
| 2      | "      | 10.4 | -     | -                          | 5.36   | -      | -                             | 15.42            | 7.5                                      | 6.8                             | 50.8                            | 2.0       | -                  |
| 3      | "      | 10.4 | -     | 1.27                       | 0.50   | 1.16   | -                             | 6.11             | 8.1                                      | 4.2                             | 2.5                             | 58.0      | -                  |
| 4      | "      | 10.4 | 0.42  | 5.75                       | 0.95   | 1.41   | -                             | 16.29            | 4.3                                      | 8.3                             | 51.7                            | 4.0       | -                  |
| 5      | "      | 10.7 | -     | -                          | -      | 3.89   | -                             | 7.13             | 14.0                                     | -                               | -                               | 48.0      | +                  |
| 6      | "      | 11.1 | 0.76  | -                          | -      | 9.64   | -                             | 8.75             | -                                        | -                               | -                               | 90.0      | +                  |
| 7      | "      | 11.3 | 1.65  | -                          | -      | 9.99   | -                             | 11.64            | 8.0                                      | -                               | 20.4                            | 62.0      | -                  |
| 8      | "      | 11.7 | -     | 1.19                       | -      | -      | -                             | 4.60             | 4.0                                      | 3.6                             | -                               | 96.0      | -                  |
| 9      | "      | 11.7 | -     | 1.57                       | -      | -      | -                             | 5.88             | -                                        | 2.2                             | 34.1                            | 54.0      | -                  |
| 10     | "      | 12.0 | 1.39  | -                          | -      | 4.66   | -                             | 7.15             | -                                        | 7.1                             | 19.3                            | 48.0      | -                  |
| 11     | Liquid | 2.4  | -     | -                          | -      | 11.13  | -                             | 18.09            | 0.8                                      | -                               | -                               | -         | -                  |
| 12     | "      | 5.2  | -     | -                          | -      | 98.35  | -                             | 98.59            | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 13     | "      | 5.4  | 3.59  | -                          | -      | 4.21   | +                             | 8.21             | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 14     | "      | 5.6  | 3.74  | -                          | -      | 3.98   | +                             | 9.88             | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 15     | "      | 5.9  | -     | -                          | -      | -      | +                             | 9.56             | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 16     | "      | 6.0  | -     | 1.42                       | 8.10   | 0.75   | -                             | 24.54            | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 17     | "      | 6.1  | -     | 3.81                       | -      | 4.80   | -                             | 13.86            | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 18     | "      | 6.2  | -     | 2.94                       | -      | 17.69  | -                             | 24.73            | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 19     | "      | 6.3  | -     | 4.22                       | -      | 6.15   | -                             | 16.05            | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 20     | "      | 6.4  | -     | 4.47                       | -      | 9.09   | -                             | 18.93            | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 21     | "      | 6.5  | -     | 7.32                       | 1.78   | 5.82   | -                             | 21.78            | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 22     | "      | 6.6  | -     | 6.78                       | 1.27   | 1.26   | -                             | 22.79            | -                                        | -                               | 0.8                             | -         | -                  |
| 23     | "      | 6.4  | -     | -                          | -      | 17.39  | +                             | 18.93            | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 24     | "      | 6.6  | -     | 4.23                       | -      | 5.83   | -                             | 17.80            | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 25     | "      | 6.6  | -     | 3.59                       | -      | 5.17   | -                             | 13.92            | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 26     | "      | 6.7  | -     | 6.78                       | 1.14   | 1.59   | -                             | 24.37            | -                                        | -                               | 0.8                             | -         | -                  |
| 27     | "      | 6.8  | -     | 2.12                       | 5.01   | 2.34   | -                             | 18.06            | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 28     | "      | 6.8  | -     | 3.74                       | -      | 4.09   | -                             | 12.92            | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 29     | "      | 6.9  | -     | 3.89                       | -      | 4.04   | -                             | 12.86            | -                                        | -                               | 1.0                             | -         | -                  |
| 30     | "      | 6.9  | -     | -                          | 2.48   | 9.23   | -                             | 15.95            | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 31     | "      | 7.0  | -     | 3.73                       | -      | 6.98   | -                             | 18.84            | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 32     | "      | 7.3  | -     | 3.55                       | -      | 5.82   | -                             | 13.95            | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 33     | "      | 7.5  | -     | 5.86                       | -      | 0.81   | -                             | 14.10            | -                                        | -                               | 1.2                             | -         | -                  |
| 34     | "      | 7.5  | -     | 5.78                       | -      | 0.65   | -                             | 13.88            | -                                        | -                               | 1.1                             | -         | -                  |
| 35     | "      | 7.6  | -     | 5.87                       | -      | 0.72   | -                             | 14.35            | -                                        | -                               | 1.2                             | -         | -                  |
| 36     | "      | 7.6  | -     | 5.65                       | -      | 0.69   | -                             | 14.11            | -                                        | -                               | 1.2                             | -         | -                  |
| 37     | "      | 7.7  | -     | 5.41                       | -      | 4.12   | -                             | 14.39            | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 38     | "      | 7.7  | -     | 6.05                       | -      | 0.64   | -                             | 14.39            | -                                        | -                               | 1.2                             | -         | -                  |
| 39     | "      | 7.8  | -     | 0.80                       | -      | 2.28   | -                             | 4.52             | -                                        | -                               | 1.1                             | -         | -                  |
| 40     | "      | 7.9  | 0.90  | 1.59                       | -      | 0.71   | -                             | 6.57             | -                                        | -                               | 4.1                             | -         | -                  |
| 41     | "      | 9.4  | 9.49  | -                          | -      | -      | -                             | 8.05             | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 42     | "      | 9.8  | -     | 5.02                       | -      | 1.04   | -                             | 12.56            | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 43     | "      | 10.9 | -     | -                          | 0.34   | -      | -                             | 2.36             | 1.8                                      | 1.0                             | -                               | -         | -                  |
| 44     | "      | 11.1 | -     | -                          | -      | -      | -                             | -                | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |
| 45     | "      | 11.8 | 19.68 | -                          | -      | 3.92   | -                             | 20.85            | -                                        | -                               | -                               | -         | -                  |

\* The Value estimated the Content of Anionic Surfactant into Content of SO<sub>3</sub>

\*\* LAS(Linear Alkylbenzene Sulfonate), AOS(Alkylolefine Sulfonate) etc.

\*\*\* AS(Alkyl Sulfate), AES(Alkyletoxy Sulfate) etc.

系アニオン界面活性剤 (SO<sub>3</sub>として)(%)

13. 界面活性剤相当分 (界面活性成分の総量) JIS規格K-3362合成洗剤試験法中アルコール可溶分、石油エーテル可溶分および尿素等の定量を行い、次式により界面活性剤相当分を算出した。界面活性剤相当分(%) = アルコール可溶分(%) - (石油エーテル可溶分(%) + 尿素(%))

14. ヒ素および 15. 重金属 JIS規格K3370台所用合成洗剤試験法を用いた。

## 結果および考察

JIS規格試験法および衛生試験法に基づいて行った、pH、石けん分、合成界面活性成分、無機洗浄補助剤および酸化剤等の分析結果をまとめて Table 1 に示した。

## 1. pH

粉末型 (10検体) の場合, pH6.8が1検体, pH9~11が4検体 (40%), pH11以上が5検体 (50%) で大部分 (90%) がアルカリ性であった。これらアルカリ性検体中にはすべて炭酸ナトリウムが含まれていた。

液体型 (35検体) の場合, pH3以下が1検体 (2.9%), pH5~6.5が10検体 (28.6%), pH6.5~7.5が11検体 (31.4%), pH7.5~9.0が8検体 (22.9%), pH9~11が3検体, pH11以上が2検体で、大部分 (82.9%) が微酸性~微アルカリ性であった。液性の違いから、粉末型と液体型は、用途が異なることが予想される。

台所用合成洗剤の JIS 規格および食品衛生法規格 (非脂肪酸系) の pH6.0~8.0 の範囲に入ったものは、粉末型1検体、液体型25検体で、液体型は大部分 (71%) が台所用合成洗剤に類似していた。また食品衛生法規格 (脂肪酸系) の pH6.0~10.5 の範囲に入ったものは、粉末型3検体、液体型27検体 (78%) であった。しかし、このうち脂肪酸系石けん分を含む検体は、粉末型3検体中1検体、液体型27検体中2検体と非常に少なく、脂肪酸系で食品衛生法規格品と推定されたのは、1検体 (Table 1 中の検体番号41) のみであった。

検体 No. 11 は強酸性を示したが、この検体中からリン酸および殺菌剤のヨウ素が検出されたことから、これらがその酸性要因であると推定された。

## II 界面活性成分

界面活性成分は多種多様の化学構造をもち、分析法が複雑なため個々の化合物の分離が困難であったので、JIS 規格試験法に基づいたアニオン、カチオンおよび非イオン、衛生試験法に基づいた石けん分の大まかな分析にとどめその結果を Table 1 に示した。

界面活性成分の総量は、0~98.6%と広い濃度範囲に分布していた。この成分含量を濃度別に分類すると Fig. 1 のごとくになった。検体の大部分 (84%) が 5~25% の濃度範囲に入っていた。しかし、JIS 規格の台所用合成洗剤では界面活性剤相当分が15%以上と定められているが、これに相当する検体はわずかに18品目 (40%) であった。また界面活性成分を配合組成別 (石けん分単独、アニオン単独、ノニオン単独、カチオン単独、アニオン+ノニオン、ノニオン+石けん、ノニオン+カチオン、アニオン+ノニオン+石けん、ノニオン+石けん+カチオン) に分類すると Fig. 2 のごとくになった。アニオンと非イオンの混合製剤が最も多く、全体の50%を占めていた。この混合製剤は液体型に多く、また Table 2 に示したごとくアニオン含量の非イオン含量に対する比が2以上 (これはアニオンが主体で非イオンが補助的に配合

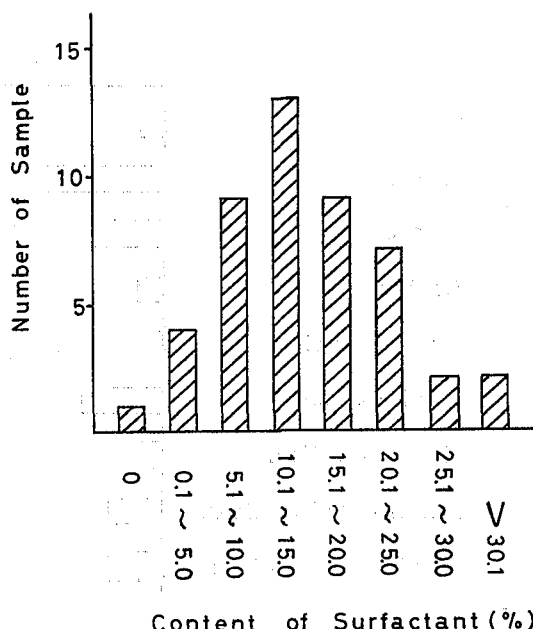


Fig. 1. Histogram of Total Contents of Surfactants in Detergent Products

されていることを示す) のものが多いのが特徴であった。このアニオンと非イオンの構成比は1975年に著者らの行った台所用洗剤の成分分析結果<sup>5)</sup>と類似していた。

1. 石けん分 石けん分が主成分の検体は、45検体中4検体と非常に少なかった。

粉末型4検体および液体型1検体中に0.42~1.65%含有されていたが、この濃度は洗浄剤としての効果より消泡の目的で補助的に加えられたものであると考えられた。1975年の著者らの台所用洗剤の報告<sup>5)</sup>では、石けん分が消泡剤として補助的に配合されていた検体が79%と多かったのに比べ、今回の工業用洗剤では11%と少なかった。

2. アニオン系界面活性剤 アニオン型にはスルホン酸型 (直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS), アルファオレフィンスルホン酸 (AOS), アルキルスルホン酸 (AS)) とエステル型 (アルキル硫酸エステル, アルキルエーテル硫酸エステル) があるが、Table 1 に示したごとく、スルホン酸型単独のもの32検体中22検体 (68.8%), スルホン酸型+硫酸エステル型のもの7検体 (21.9%), 硫酸エステル型単独のもの3検体 (9.4%) で、スルホン酸型含有のものが約90%と多かった。アルコール可溶分 (界面活性成分を含む) について IR で確

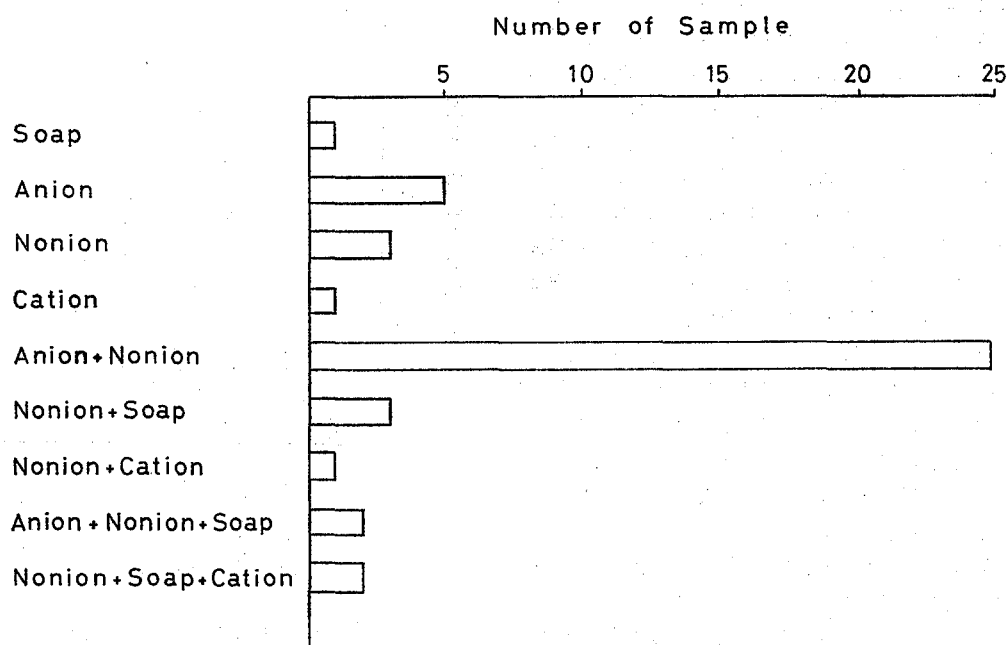


Fig. 2. Histogram of Composition of Surfactants in Detergent Products

Table 2. Ratio of Anionic Content to Nonionic Content in Detergent Product contained Anionic and Nonionic Surfactants

| Sample | Content of Surfactant |            | Ratio (A/B) | Sample | Content of Surfactant |            | Ratio (A/B) |
|--------|-----------------------|------------|-------------|--------|-----------------------|------------|-------------|
|        | Anion (A)             | Nonion (B) |             |        | Anion (A)             | Nonion (B) |             |
| 16     | 23.79                 | 0.75       | 31.7        | 29     | 8.82                  | 4.04       | 2.2         |
| 17     | 9.06                  | 4.80       | 1.9         | 30     | 6.72                  | 9.23       | 0.7         |
| 18     | 7.04                  | 17.69      | 0.4         | 31     | 11.86                 | 6.98       | 1.7         |
| 19     | 9.90                  | 6.15       | 1.6         | 32     | 8.13                  | 5.82       | 1.4         |
| 20     | 9.84                  | 9.09       | 1.1         | 33     | 13.29                 | 0.81       | 16.4        |
| 21     | 15.96                 | 5.82       | 2.7         | 34     | 13.23                 | 0.65       | 20.4        |
| 22     | 21.53                 | 1.26       | 17.1        | 35     | 13.63                 | 0.72       | 18.9        |
| 24     | 11.97                 | 5.83       | 2.1         | 36     | 13.42                 | 0.69       | 19.4        |
| 25     | 4.95                  | 1.16       | 4.3         | 37     | 10.27                 | 4.12       | 2.5         |
| 26     | 22.78                 | 1.59       | 14.3        | 38     | 13.75                 | 0.64       | 21.5        |
| 27     | 13.63                 | 0.72       | 18.9        | 39     | 2.24                  | 2.28       | 1.0         |
| 28     | 8.83                  | 4.09       | 2.2         | 42     | 11.52                 | 1.04       | 11.1        |

認試験を行ったところ、スルホン酸型を含む検体の大部分から LAS が検出された。おそらくスルホン酸型の主流は LAS であると推定された。

3. 非イオン系界面活性剤 非イオンを含む試料は、45検体中37検体 (82%) と多いが、これを洗浄剤の主成

分とする検体は10品目 (22%) と少なかった。カラムクロマトグラフ法で得られた非イオン界面活性成分を薄層クロマトグラフ法および IR で確認したところ、ポリオキシエチレン系非イオンが37検体中28検体 (76%) から検出された。ポリオキシエチレン系中、ポリオキシエチ

レンアルキルエーテルが確認されたものは14検体(50%)であった。

4. カチオン系界面活性剤 液体型4検体 (Table 1 中の検体番号13, 14, 15, 23) 中から検出された。これらについてはすべて成分表示があり、石けん分と配合されていた13番および14番のものは両性界面活性剤で、カチオン単独の15番および23番のものは塩化ベンザルコウムであった。これらは洗浄効果を期待するものではなく、殺菌効果を目的としたものである。

### Ⅲ 無機洗浄補助剤

1. 全リン酸塩 (縮合リン酸塩) 粉末型10検体中6検体に4.0~14.0%含まれていたが、液体型からは1検体を除き全く検出されなかった。また粉末・液体型とも縮合リン酸塩を含む試料はすべてアルカリ性であった。これは縮合リン酸塩がアルカリ緩衝作用をもち(酸性汚れに有効)、アルカリ塩とともに配合されるためと考えられる。また洗たく排水中の縮合リン酸塩が湖や海の富栄養化の原因物質の1つとされ問題になり、環境庁の要請で自主規制値が定められたが、この規制値の12%をこえたものは1検体のみであった。この減量分の代替としてゼオライトおよび有機ビルダーが使用されるようになったと報告されている<sup>9)</sup>。

2. ケイ酸塩 粉末型10検体中6検体に2.2~8.3%含まれていたが、液体型からは縮合リン酸塩と同様の1検体を除き、全く検出されなかった。またケイ酸塩含有試料は縮合リン酸塩の場合と同様に、アルカリ性であった。

縮合リン酸塩とケイ酸塩が併用されているもの40%, それぞれ単独のものはともに20%, 両者とも含まないもの20%で、粉末型においてはどちらかが含まれる場合が多いことが判明した。

3. 硫酸塩 粉末型の場合、50%以上含有のもの10検体中3検体、19%以上含有のもの6検体であり、増量およびケーキング防止の目的でこのように多量に用いられていると考えられる。なお硫酸塩を含まない2検体と含有量の少ない1検体中には、炭酸塩が多量に含まれていた。

液体型の場合は、35検体中10検体に0.8~4.1%含まれていた。これは可溶性促進の目的で使用されていると考えられる。

4. 炭酸塩 粉末型アルカリ性の検体には、すべて配合されており、しかも10検体中7検体に48~96%と多量に含まれていた。これは炭酸塩が油性汚れの除去等に有効なアルカリ作用と同時に、増量の目的もかねて使用さ

れるためである。

現在、洗浄補助剤については、台所用洗剤にも pH や界面活性相当分のような JIS 規格や食品衛生法による規制値がなくその制定が望まれる。

### Ⅳ その他

1. ヒ素および重金属 すべての検体中のヒ素含量は0.0001%以下、重金属含量は0.002%以下であり、食品衛生法および JIS 規格で定められた規制値以下であった。

2. ケイ光増白剤 JIS 規格(台所用合成洗剤)でケイ光増白剤を検出してはならないと規定されているが、すべてこれに適合した。

3. 酸化剤 食品衛生法の洗剤の成分規格で、漂白作用を有する成分を含んではならないと定められている。液体型はこの規制にすべて適合したが、粉末型2検体 (Table 1 の検体番号5, 9) から検出された。

### 要 約

食品工業用洗浄剤の成分および純度を把握する目的で、1980年東京都内37の食品製造工場から入手した洗浄剤45試料につき、JIS 規格中台所用合成洗剤試験法に基づいたヒ素および重金属、合成洗剤試験法に基づいた pH, 界面活性成分、無機洗浄補助剤、ケイ光増白剤および酸化剤等の成分分析を行い、それらの成分の特徴と食品衛生面上の問題について調査した。

1. 液性は、粉末型の9割がアルカリ性、液体型の約7割が中性であり、粉末型と液体型では用途が異なると考えられる。

2. 界面活性成分量は、0~98.6%と広い濃度範囲に分布し品質のバラツキが認められた。

3. pH6.0~8.0 および界面活性成分量15%以上(台所用合成洗剤の JIS 規格)の両規制値に適合したものは、わずかに33%であった。

4. 界面活性成分組成はアニオンと非イオンの配合型が最も多く、また石けん分が主成分と推定されたものが9%と少なかったことから、大部分が合成洗剤であることが判明した。

5. 無機系洗浄補助剤の縮合リン酸塩およびケイ酸塩は、粉末検体中に、それぞれ4~8.1%, 2.2~8.3%含まれ、液体型からは1検体を除き全く検出されなかった。縮合リン酸塩の含量が環境庁要請の自主規制値をこえたものは1検体のみで、やはりリンの使用量が抑制されていることが判明した。硫酸塩および炭酸塩は、粉末型に多量配合されていた。

6. ヒ素および重金属はすべて食品衛生法の規制値に

適合し、ケイ光増白剤も全く検出されず JIS 規格（台所用合成洗剤）に適合した。しかし酸化剤が粉末型 2 検体から検出された。

本調査で台所用合成洗剤と推定されたものはわずかに 33% であった。洗剤成分の機械等への残留による食品への混入が避けられない以上、法的規制のある台所用合成洗剤を用いるのが望ましい。しかし食品工業用は台所用と異なり、種々な用途に用いるため、台所用合成洗剤だけでは、十分に目的が達せられない。したがって食品工業用洗剤にも規格基準、使用基準および表示基準等の法的規制を設け、安全性を確保すべきである。

謝辞 本調査に当り、試料収集にご尽力下さいました東京都衛生局環境衛生部食品監視課の方々に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 食品，添加物等の規格基準（昭和56年6月20日厚生省告示第121号）第5 洗淨剤
- 2) 雑貨工業品品質表示規程（昭和54年5月25日通商産業省告示第222号）第4 合成洗剤
- 3) 日本工業標準調査会：日本工業規格台所用合成洗剤，K-3370，1979
- 4) 日本工業標準調査会：日本工業規格合成洗剤，K-3362，1978
- 5) 遠藤英美，広門雅子，宇佐美博幸：東京衛研年報，26-1，208，1975
- 6) 村田守康，荒井明彦：油化学，24，281，1975



## 市販天然糊料の使用実態調査 (第2報)

中 島 和 雄\*, 広 門 雅 子\*, 中 嶋 巖\*, 溝 入 茂\*, 遠 藤 英 美\*

### Survey of Commercial Natural Thickening and Stabilizing Agents (II)

KAZUO NAKAJIMA\*, MASAKO HIROKADO\*, IWAO NAKAJIMA\*,  
SHIGERU MIZOIRI\* and FUSAYOSHI ENDO\*

Natural thickening and stabilizing agents in 12 commercial natural food additives were determined by gas chromatography (GC).

The monosaccharides obtained by hydrolysis with 2M trifluoroacetic acid were determined by GC as aldononitrile acetates.

The principal constituents of 6 samples out of 12 samples tested were carob bean gum and carrageenan which ranged between 13 to 29% and 34 to 75% respectively. One, 3 and 2 samples of the remainder respectively showed to be consisted of guar gum and carrageenan, guar gum and xanthan gum, and guar gum and tamarind seed gum.

**Keywords** : thickening and stabilizing agents, aldononitrileacetates, carob bean gum, guar gum, carrageenan, xanthan gum, tamarind seed gum

#### 緒 言

昭和49年以降、東京都における天然添加物の使用実態調査を行ってきた。

前報<sup>1)</sup>において、天然糊料の定性分析による使用実態調査を報告したが、今回定量分析による調査を行った。糖のGC法による定量分析としては、TMS 化法<sup>2)</sup>、アルジトールアセテート法<sup>3)</sup>、アルドノニトリルアセテート法<sup>4-7)</sup>、メチル化法<sup>8)</sup>、ジチオアセタール法<sup>9,10)</sup>が報告されている。今回迅速で簡便な方法である、アルドノニトリルアセテート法を応用して天然糊料を分析した。

#### 実 験 の 部

**試料** 都食品監視課より昭和55年4月～57年3月にかけて当所に送付された天然糊料12検体を用いた。

**標準品** ローカストビーンガム (旭東化学産業㈱)、グァーガム (旭東化学産業㈱)、カラギーナン (タカラゲン㈱)、タマリンド種子多糖類 (大日本製薬㈱)、キサンタンガム (大日本製薬㈱) 各々の会社を用いた。

**試薬** すべて試薬特級品を用いた。

**装置** ガスクロマトグラフ：柳本G-80型 (検出器FID)

**試料溶液の調製** 試料100mgに2Mトリフルオロ酢酸6mlを加える。窒素で置換した後、封管し、水浴中で5

時間加熱する。その加水分解液を蒸発乾固する。塩酸ヒドロキシルアミンのピリジン溶液 (17mg/ml) 3mlを加え、封管し、90°で30分間加熱する。冷後無水酢酸10mlを加え、封管し、さらに30分間加熱する。その液を蒸発し、内部標準としてイノシトールペンタアセテートのクロロホルム溶液 (30mg/ml) 1mlを加え、全量をクロロホルムで5mlとし、これを試料溶液とする。

**標準溶液の調製** 標準品500mgにつき試料溶液と同様に操作し、クロロホルムにとかした 20mg/ml～0.2mg/mlの標準溶液を調製する。

**定量法** 各溶液5μlをGCに注入し、標準糊料の構成単糖の中の一つの単糖の濃度と面積から検量線を作成し、この検量線から試料溶液の単糖の濃度を求め、その値から糊料の値を求める。GCの条件：1% LAC-4R-886/Chromosorb W/AW-DMCS, 80～100mesh, ガラスカラム 3φ×1.5m, カラム温度180°, キャリヤガス N<sub>2</sub> 25ml/min, 注入量 5μl

#### 結果と考察

糊料の標準品の、アルドノニトリルアセテート法を用いた分析によると、グァーガムおよびローカストビーンガムの構成中性糖は、ガラクトースとマンノースであり、カラギーナンは、ガラクトースであり、キサンタンガム

\* 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Retention Times of Aldononitrile Acetates of Monosaccharides

| Monosaccharide        | Retention Time(min) |
|-----------------------|---------------------|
| L-Arabinose           | 8                   |
| D-Xylose              | 11                  |
| D-Mannose             | 22                  |
| D-Glucose             | 29                  |
| D-Galactose           | 32                  |
| Inositol Pentaacetate | 45                  |

は、グルコースとマンノースであり、タマリンド種子多糖類は、ガラクトース、グルコース、キシロースおよびアラビノースであった。これらの単糖の、GCによる保持時間を Table 1 に示した。またすべての単糖の検量線は 0.2mg/ml~20mg/ml の範囲で直線性を示した。

糊料製剤中に二つ以上の糊料を含んだものについては、互いに重複しない単糖により、各糊料の定量をおこなった。すなわちグァーガム・キサンタンガム製剤の場合は、ガラクトースからグァーガムを定量し、グルコースからキサンタンガムを定量した。また重複する単糖をもつ糊料製剤、すなわちローカストビーンガム・カラギーナン製剤の場合は、マンノースからローカストビーンガムを定量し、ガラクトースの総量からローカストビーンガムに相当するガラクトースの量を引いた、ガラクトースからカラギーナンを定量した。なおグルコースで糊料を定量する場合は、定量する前に、でんぶん、乳糖、ショ糖、およびグルコースなどが、糊料製剤中に含まれ

ていないことを確認する必要がある。この方法によると、重複する単糖をもつ糊料製剤の測定誤差は、単一の糊料を定量する場合にくらべて大きくなるが、他の測定法がない現状では、この方法は有用である。

市販糊料製剤の分析結果を Table 2 に示した。この結果によると、ローカストビーンガム・カラギーナン製剤は12検体中6検体であった。ローカストビーンガムの含有量は13%~29%であり、カラギーナンの含有量は34%~75%であった。種々な比率の製剤があることから、多種多様の用途にもちいられていることが推定された。グァーガム・カラギーナン製剤は1検体であった。グァーガム・キサンタンガム製剤は3検体であった。その比率は、すべて約4:1であった。用途がかぎられていることが推定された。グァーガム・タマリンド種子多糖類製剤は2検体であった。

#### ま と め

市販天然糊料製剤12検体中の糊料を、アルドノニトリルアセテート法でGCにより定量した。

その結果は、ローカストビーンガム・カラギーナン製剤6検体、グァーガム・カラギーナン製剤1検体、グァーガム・キサンタンガム製剤3検体、グァーガム・タマリンド種子多糖類製剤2検体であった。グァーガム・カラギーナン製剤は、成分比が種々なものがあったが、グァーガム・キサンタンガム製剤は、すべて約4:1であった。

謝辞 試料収集に当り御協力いただいた都食品監視課ならびに食品機動監視班各位、および標準糊料サンプルを提供して下さいた糊料会社各位に深謝いたします。

Table 2. Determination of Commercial Natural Thickening and Stabilizing Agents

| Sample | Carob bean gum | Carrageenan | Guar gum | Xanthan gum | Tamarind seed gum |
|--------|----------------|-------------|----------|-------------|-------------------|
| 1      | 13%            | 55%         |          |             |                   |
| 2      | 13             | 75          |          |             |                   |
| 3      | 18             | 45          |          |             |                   |
| 4      | 26             | 41          |          |             |                   |
| 5      | 29             | 34          |          |             |                   |
| 6      | 29             | 37          |          |             |                   |
| 7      |                | 58          | 17%      |             |                   |
| 8      |                |             | 76       | 21%         |                   |
| 9      |                |             | 77       | 19          |                   |
| 10     |                |             | 78       | 22          |                   |
| 11     |                |             | 21       |             | 74%               |
| 12     |                |             | 16       |             | 34                |

## 文 献

- 1) 中島和雄, 広門雅子, 中嶋 巖, 溝入 茂, 遠藤英美: 東京衛研年報, 32-1, 177, 1981
- 2) Schmolck, W. and Mergenthaler, E.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, 152, 263, 1973
- 3) Sawardeker, J., Sloneker, J. and Jeanes, A.: *Anal. Chem.*, 37, 1602, 1965
- 4) Varma, R., Varma, R. and Wardi, A.: *J. Chromatogr.*, 77, 222, 1973
- 5) Mergenthaler, E. and Scherz, H.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, 162, 25, 1976
- 6) Varma, R. and Varma, R.: *J. Chromatogr.*, 128, 45, 1976
- 7) Glück, U. and Thier, H.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, 170, 272, 1980
- 8) Mergenthaler, E. and Scherz, H.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, 166, 225, 1978
- 9) Honda, S., Fukuhara, Y. and Kakehi, K.: *Anal. Chem.*, 50, 55, 1978
- 10) Honda, S., Yamauchi, N. and Kakehi, K.: *J. Chromatogr.*, 169, 287, 1979

## 食品工業用腐食抑制剤の分析

安野哲子\*, 荻野周三\*, 小野綾子\*, 大畠敏子\*, 遠藤英美\*

### The Analysis of Corrosion Inhibitors for Use in Food Manufactory

TETSUKO YASUNO\*, SHUZO OGINO\*, AYAKO ONO\*, TOSHIKO OHATA\*  
and FUSAYOSHI ENDO\*

In order to learn the ingredients and purity of corrosion inhibitors used in food factories, we analyzed 33 water-soluble corrosion inhibitors (2 rust preventing agents, 22 boiler compounds and 9 deoxygenating agents) which were obtained from 21 food factories in Tokyo in 1981, and measured the arsenic and heavy metal contents in those samples.

We detected hydrazine and silicate in rust preventing agents, and phosphate, hydrazine and sulfite in boiler compounds. In deoxygenating agents, we detected sulfite and hydrazine. The maximum amounts of arsenic and heavy metals in 33 samples were 8.7 ppm (as  $As_2O_3$ ) and 110.2 ppm (as Pb) respectively.

**Keywords** : food manufactory, corrosion inhibitor, rust preventing agent, boiler compound, deoxygenating agent, ingredient, purity

#### はじめに

食品製造工場で、機材などの腐食防止のために使用されている腐食抑制剤には、誤用や事故による食品への混入が十分に想像されるにもかかわらず、食品衛生法のような法律に裏づけられた規格基準もなく、その法的規制に関しては、まったく野放しの状態にある。したがって、当然その内容成分や品質なども明らかにされておらず、消費者側の不安は大きい。

そこで、この腐食抑制剤の実態を把握するために、現在実際に食品製造工場で使用されている腐食抑制剤について、その内容成分の分析と不純物の検索を行ったので、結果を報告する。ただし、今回は水溶性の腐食抑制剤を分析の対象とし、文献的に成分としての使用頻度が高いと考えられる<sup>1-4)</sup>亜硝酸塩、亜硫酸塩、安息香酸塩、ケイ酸塩、ヒドラジン、リン酸塩の6成分の分析と、不純物として混在が予想されるヒ素ならびに重金属の定量を目的とした。

#### 試料および分析法

**試料** 昭和56年5月より11月までの間に、東京都内の21の食品製造工場から入手した、水溶性の腐食抑制剤33種を分析試料とした。これらはいずれも、機材の腐食防止を最終目的とするものであったが、製品に表示された

主な用途から、防錆剤、清缶剤、および脱酸素剤の3つに大別することができた。33種の内訳は、防錆剤2、清缶剤22、脱酸素剤9であった。

**分析法** 分析にあたっては、試験管分析をはじめとして、粉末X線回折法、けい光X線法、高速液体クロマトグラフィー（以下 HPLC と略す）などの方法により定性、確認したのち定量したが、個々の試料によって細部の操作が異なるため、定量法の概要のみを以下に記す。

1) **亜硝酸塩** 試料の水溶液を塩酸で弱酸性とし、HPLC により分析した<sup>5)</sup>。カラム：Partisil 10-SAX (Wattman) 4.6×250mm, 溶離液：0.005M  $KH_2PO_4$ - $Na_2HPO_4$  (pH6.4), 検出器：UV モニター (205nm)。

2) **亜硫酸塩** 試料を一定過量の0.1Nヨウ素溶液に溶かしたのち、塩酸を加え、過剰のヨウ素を0.1Nチオ硫酸ナトリウム溶液で滴定した（指示薬 デンプン溶液）<sup>6,7)</sup>。

3) **安息香酸塩** 試料の水溶液に塩酸を加え、エーテルで抽出したのち、これを減圧で留去し、残留物をメタノールに溶かして HPLC により分析した。カラム：Finepack C18 (Jasco) 4.6×250mm, 溶離液： $CH_3OH-H_2O$  (8:2), 検出器：UV モニター (254nm)。

4) **ケイ酸塩** 試料の水溶液を、 $C_2H_2-N_2O$  フレーム

\* 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Values of Analysis of Corrosion Inhibitors for Use in Food Manufactory

| sample                 | pH*  | nitrite<br>( $\text{NaNO}_2$ ) | sulfite<br>( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) | benzoate<br>( $\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2$ ) | silicate<br>( $\text{SiO}_2$ ) | hydrazine<br>( $\text{N}_2\text{H}_4$ ) | phosphate<br>( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) | arsenic<br>( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) | heavy<br>metals<br>(Pb) |
|------------------------|------|--------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------|
| rust preventing agents |      |                                |                                         |                                                    |                                |                                         |                                         |                                        |                         |
| 1 liquid               | 8.6  | <0.1%                          | <1.0%                                   | <0.1%                                              | <1.0%                          | 27.2%                                   | <0.1%                                   | <2ppm                                  | 110.2ppm                |
| 2 "                    | 10.8 | "                              | "                                       | "                                                  | 14.8                           | <1.0                                    | "                                       | "                                      | <20                     |
| boiler compounds       |      |                                |                                         |                                                    |                                |                                         |                                         |                                        |                         |
| 1 powder               | 4.8  | "                              | "                                       | "                                                  | <1.0                           | "                                       | 56.5                                    | "                                      | "                       |
| 2 "                    | 9.6  | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | "                                       | 54.7                                    | "                                      | "                       |
| 3 "                    | 10.7 | "                              | 8.2                                     | "                                                  | "                              | "                                       | 32.1                                    | 5.1                                    | "                       |
| 4 "                    | 11.0 | "                              | <1.0                                    | "                                                  | "                              | "                                       | 37.4                                    | <2                                     | "                       |
| 5 "                    | "    | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | "                                       | 26.5                                    | "                                      | "                       |
| 6 "                    | "    | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | "                                       | 41.6                                    | 8.7                                    | "                       |
| 7 "                    | 11.2 | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | "                                       | 10.3                                    | <2                                     | "                       |
| 8 "                    | "    | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | "                                       | 23.1                                    | 4.5                                    | "                       |
| 9 "                    | 11.4 | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | "                                       | 20.4                                    | <2                                     | "                       |
| 10 "                   | 12.0 | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | "                                       | 26.4                                    | "                                      | "                       |
| 11 "                   | "    | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | "                                       | 15.8                                    | "                                      | "                       |
| 12 "                   | 12.1 | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | "                                       | 21.4                                    | "                                      | "                       |
| 13 "                   | 12.7 | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | "                                       | 27.3                                    | 4.8                                    | "                       |
| 14 "                   | 13.0 | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | "                                       | 26.4                                    | <2                                     | "                       |
| 15 liquid              | 11.2 | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | "                                       | 4.8                                     | "                                      | "                       |
| 16 "                   | 4.6  | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | "                                       | 17.8                                    | "                                      | "                       |
| 17 "                   | 9.2  | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | "                                       | 4.4                                     | "                                      | "                       |
| 18 "                   | 9.6  | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | 1.1                                     | <0.1                                    | "                                      | "                       |
| 19 "                   | 11.0 | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | <1.0                                    | 0.6                                     | "                                      | "                       |
| 20 "                   | 11.8 | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | 3.6                                     | 4.2                                     | "                                      | "                       |
| 21 "                   | 12.0 | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | <1.0                                    | 13.6                                    | "                                      | "                       |
| 22 "                   | 12.2 | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | "                                       | 3.4                                     | "                                      | "                       |
| deoxygenating agents   |      |                                |                                         |                                                    |                                |                                         |                                         |                                        |                         |
| 1 powder               | 9.5  | "                              | 97.5                                    | "                                                  | "                              | "                                       | <0.1                                    | "                                      | "                       |
| 2 "                    | 9.6  | "                              | 98.0                                    | "                                                  | "                              | "                                       | "                                       | "                                      | "                       |
| 3 "                    | 9.7  | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | "                                       | "                                       | "                                      | "                       |
| 4 "                    | 9.8  | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | "                                       | "                                       | "                                      | "                       |
| 5 "                    | "    | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | "                                       | "                                       | "                                      | "                       |
| 6 "                    | "    | "                              | 97.7                                    | "                                                  | "                              | "                                       | "                                       | "                                      | "                       |
| 7 liquid               | 10.1 | "                              | <1.0                                    | "                                                  | "                              | 11.6                                    | "                                       | "                                      | "                       |
| 8 "                    | 10.4 | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | 30.6                                    | "                                       | "                                      | "                       |
| 9 "                    | 10.5 | "                              | "                                       | "                                                  | "                              | 32.0                                    | "                                       | "                                      | "                       |

\* 1w/v% solution

で原子吸光法により測定した。

5) ヒドラジン 試料の水溶液に塩酸を加えて冷却したのち、0.05Mヨウ素酸カリウム溶液で滴定した。終点近くでクロロホルムを加え、このクロロホルム層の紅色が消える点を滴定の終末点とした<sup>8)</sup>。

6) リン酸塩 試料に硝酸と水を加えて煮沸し、冷後バナジウム・モリブデン酸溶液で発色させて、400nmにおける吸光度を測定した<sup>6,9)</sup>。

7) ヒ素 試料の塩酸酸性溶液にヨウ化カリウム溶液、塩化第一スズ塩酸溶液、亜鉛を加えて還元し、発生

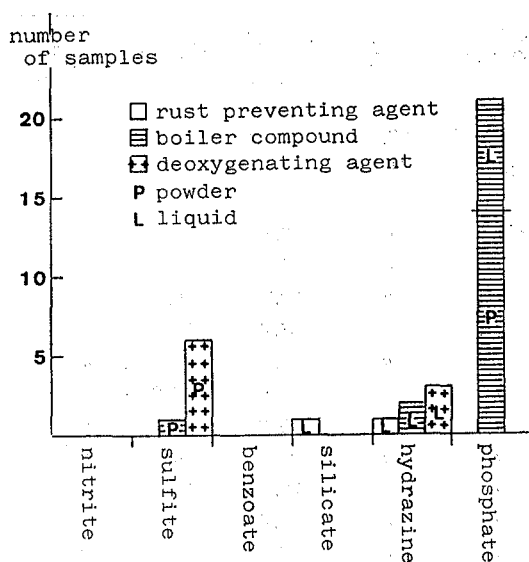


Fig. 1. Ingredients of Corrosion Inhibitors for Use in Food Manufactory

したヒ化水素を  $H_2-Ar$  フレームに導入して、原子吸光法で測定した。

8) 重金属 試料の酢酸酸性溶液に硫化ナトリウム溶液を加えて、生ずる呈色物質の量を鉛の標準溶液の呈色と比較した<sup>9)</sup>。ただし、一部の試料については、その水溶液を  $C_2H_2-Air$  フレームで原子吸光法により測定した。

#### 結果と考察

1. 腐食抑制剤の成分 腐食抑制剤についての分析結果を、製品の表示をもとに防錆剤、清浄剤、脱酸素剤の3つに分類して、Table 1 および Fig. 1 に示した。表中、亜硝酸塩、亜硫酸塩、安息香酸塩はナトリウム塩 ( $NaNO_2$ ,  $Na_2SO_3$ ,  $C_7H_5NaO_2$ ) として、ケイ酸塩、ヒドラジン、リン酸塩は、それぞれ  $SiO_2$ ,  $N_2H_4$ ,  $P_2O_5$  として算出した。

防錆剤2種(液状2)からは、ヒドラジンとケイ酸塩が検出された。ヒドラジンは、 $N_2H_4 + O_2 \rightarrow N_2 + 2H_2O$  の反応によって腐食の原因となる水中の溶存酸素を除去する還元剤であり、ケイ酸塩は、水の pH を微アルカリ性に保つと同時に、水中のカルシウムイオンやマグネシウムイオンと不溶性の保護皮膜を生成して防食する。

清浄剤は、スケールの生成防止や防食の目的で 사용되는ものであるが、22種(粉末14, 液状8)中21種からリン酸塩が検出されたほか、液状の2種からはヒドラジ

ンが、粉末試料1種から亜硫酸塩が検出されている。リン酸塩がスケール防止に効果があるのは、そのキレート作用のためであり、添加濃度が増大すれば、保護皮膜を形成して、防食効果が発現するといわれている。

脱酸素剤9種は、亜硫酸塩が主剤の粉末試料6種と、ヒドラジン主剤の液体試料3種に二分された。亜硫酸塩はヒドラジンと同様、水中の溶存酸素を除去するための還元剤である。

亜硝酸塩と安息香酸塩は、いずれも検出されなかった ( $<0.1\%$ )。

なお、今回試料となった製品には、その内容成分と配合割合が明確に表示されていたものは、1種もなかった。

2. 製品中のヒ素、重金属量 表中、ヒ素の量は  $As_2O_3$  として、重金属は Pb として表わした。

食品工業用腐食抑制剤には、食品添加物とその成分として使用されることが多く、この場合、規格適合品を使用しているというのがメーカー側の宣伝文句の一つでもある。現在、食品添加物の規格の中で、ヒ素ならびに重金属の許容限度は、それぞれ  $As_2O_3$  として 2ppm, Pb として 20ppm であることが多く、したがって、今回も一応の基準をこの値に設定して限度試験を行い、基準値をこえるものについてのみ定量値を記した。

結果として、ヒ素の場合 2ppm をこえたのは、試料 33 種中 4 種で、最高は 8.7ppm であった。この 4 種はすべて清浄剤であることから、ヒ素は原料のリン酸塩に由来したとも考えられる。食品添加物としてのリン酸塩に対するヒ素の許容限度は、今回設定した基準値と同じ 2ppm であり、もし仮に、4 種の試料から検出されたヒ素が、リン酸塩由来のものであったとするならば、食品添加物の品質以下のものが使用されていたことになる。また、今回分析の対象とならなかった他成分に起因したとも考えられるが、ちなみに、食品添加物の場合、ヒ素と重金属の許容限度は、それぞれ 5ppm, 70ppm が最高である。重金属に関しては、基準値の 20ppm をこえたのは、1 試料のみであった。鉛が 110.2ppm 検出されたこの試料からは、他にマンガンが 8.5%, 亜鉛が 8.8% 検出されており、これら成分としての金属塩に由来したものと考える。

#### まとめ

食品工業用腐食抑制剤の内容成分や品質についての実態を把握する目的で、昭和56年5～11月までの間に都内の21の食品製造工場から入手した水溶性腐食抑制剤33種を試料として、一部成分について分析を行うとともに、

不純物として混在が予想されると素、重金属の含量を測定した。

試料はその主な用途から防錆剤、清缶剤、脱酸素剤の3つに大別され、防錆剤からはヒドラジンとケイ酸塩が、清缶剤からはリン酸塩、ヒドラジン、亜硫酸塩が、脱酸素剤からは亜硫酸塩とヒドラジンが、それぞれ検出された。製品に成分と配合割合が明確に表示されていたものは、1種もなかった。ヒ素と重金属に関しては、今回食品添加物に準じて設定した基準値 ( $As_2O_3$  として 2 ppm, Pb として 20 ppm) をこえるものが数種認められ、純度の低い原料の使用が推測された。

なお、食品工業用腐食抑制剤の成分や純度を問題にするとき、その使用量、使用箇所（食品との接触の可能性）、保管の場所など、実際の使用状況についての調査が不可欠である。今回把握できなかった他成分の分析とあわせて、これを今後の課題として検討する予定である。

謝辞 試料の入手にご協力下さいました、東京都衛生局食品監視課の皆様に深謝致します。

## 文 献

- 1) 堀口 博：公害と毒・危険物＜腐蝕防錆編＞，1973，三共出版
- 2) 金属防蝕技術便覧，新版，腐食防食協会編，1972，日刊工業新聞社
- 3) イ・エリ・ローゼンフェルド：腐食抑制剤，遠藤敬一訳，1978，日ソ通信社
- 4) Wranglén, G.: 金属の腐食防食序論，吉沢四郎，山川宏二，片桐 晃訳，1973，化学同人
- 5) 高橋 篤：Jasco Report LC family, 16(2), 8, 1981
- 6) 食品添加物公定書，第四版，1978，日本食品衛生協会
- 7) 高木誠司：定量分析の実験と計算＜第2巻 容量分析法＞，改訂版，1971，共立出版
- 8) JIS K8871, 1980，日本規格協会
- 9) 無機応用比色分析＜4 Nb-Sb＞，無機応用比色分析編集委員会編，1975，共立出版

食品包装用フィルムにおける可塑剤の使用実態およびその移行

渡 辺 悠 二\*, 佐 藤 憲 一\*, 吉 田 令 子\*, 遠 藤 英 美\*

Survey of Plasticizers in Food Packaging Films and Migration into the Foods

YUJI WATANABE\*, KENICHI SATO\*, REIKO YOSHIDA\* and FUSAYOSHI ENDO\*

**Keywords:** 食品包装用フィルム food packaging film, 可塑剤 plasticizer, 移行 migration

緒 言

近年, フィルム (いわゆるストレッチあるいはラップフィルムなど) はその収縮性やガス透過性などの利点を生かし, スーパーマーケットなどにおける食品の包装はもとより一般家庭においても使用されるなど多種多様のところで食品の包装材として繁用されており, その素材としてポリ塩化ビニル (以下 PVC と略す), ポリ塩化ビニリデン (PVDC), ポリエチレン (PE) およびブタジエン樹脂 (BDR) などの樹脂が用いられている。中でも業務上主に使用されている PVC の場合, 柔軟性を持たせるため可塑剤が20~40%添加されている。そしてこの可塑剤については, 過去において環境, 食品衛生の面で問題が指摘されたフタル酸エステル類があり, またこれらのフィルムの使用範囲が広くかつ使用頻度が高いことから, 一般消費者の間にはその安全性について不安を持つものも少なくない。一方, 昨年7月新聞報道などで, アメリカ FDA が NCI (国立がん研究所) における動物実験によりアジピン酸ジ-2-エチルヘキシル (DOA) およびフタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DOP) の2種の可塑剤に発がん性の疑いが認められたとしてこの両者について近く使用禁止の提案を行うことが伝えられた<sup>1,2)</sup>。

著者らは, 昭和55年から業務用および一般家庭で使用されるフィルムについて, フィルムの種類, 添加されている可塑剤の種類およびその食品への移行性について調査を行っていたが, 引き続き本年5月まで3回にわたって行い, 若干の知見を得たので報告する。

実 験 の 部

1. 試料

第1回調査 (昭和55年実施) 業務用未使用フィルム20種 (昭和50, 51年頃, 築地市場内包装問屋から購入) および魚肉, 青果, 惣菜などを包んでいたフィルム38種 (昭和55年6~8月, スーパーマーケットなどから購入)

; 家庭用フィルム14種 (昭和55年6~8月, 同様に購入)。

第2回調査 (昭和56年実施) 業務用未使用フィルム49種 (昭和56年6~11月, スーパーマーケットなどから収去); 家庭用フィルム38種 (昭和56年6~11月, 業務用と同様に収去)。

第3回調査 (昭和57年実施) 業務用未使用フィルム28種 (昭和57年5月, 第2回調査と同様に収去) および魚肉などを包んでいたフィルム49種 (昭和57年5月, 一般小売店などから購入); 家庭用フィルム2種 (昭和57年5月, 同様に収去)。なお今回は全て PVC フィルムである。

2. フィルムの材質鑑別

試料をそのまままたはクロロホルムに浸漬後風乾したものについて, 赤外吸収スペクトル法 (透過法) により吸収スペクトルを測定し (日本分光 A-3 型赤外分光光度計を使用), これを標準スペクトルと比較し鑑別を行った。

3. フィルム中の可塑剤の定性・定量

1) 試験溶液の調製 (1) PVC の場合 試料約0.1gを精秤し, これにクロロホルム 20ml を正確に加え室温 (20~23°) で一日放置後, 上澄液を試験溶液とした。

(2) PVDC の場合 試料約0.5gを精秤し, 以下 PVC と同様の操作を行った。

(3) PE の場合 試料約1.0gを精秤し, これにクロロホルム100ml を加え室温で1日放置後, ろ過し, ろ液を40°で約1ml まで減圧濃縮後クロロホルムで正確に2ml とし, これを試験溶液とした。

(4) BDR の場合 試料約0.5gを精秤し, これにクロロホルムを加えて溶かしたのち正確に20ml とし, これを試験溶液とした。

2) 標準可塑剤 以下の可塑剤を標準物質として定性

\* 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan



## ・ 定量を行った。

|              |     |
|--------------|-----|
| フタル酸アルキルエステル | 15種 |
| アジピン酸        | 3   |
| セバシン酸        | 3   |
| アゼライン酸       | 2   |
| クエン酸         | 4   |

なお標準溶液は、それぞれ1.0%クロロホルム液を標準原液とし、以下適宜希釈して調製した。

3) 薄層クロマトグラフィー (TLC) による定性 前報に準じた<sup>3)</sup>。

4) ガスクロマトグラフィー (GC) による定量 試験溶液についてGCによる定量を行った (パーキンエルマー-2-3B型および日立163型ガスクロマトグラフ, FID検出器付きを使用)。GCの操作条件は次のとおりである。

条件1 カラム: 3% Silicone E-301/Uniport HP (60-80mesh), ガラスカラム 3φ×1.5m; 温度: カラム槽210°, 注入口250°; キャリヤーガス: N<sub>2</sub> 25ml/min.

条件2 カラム: 5% Shinchrom E-71/Shimarite AW (80-100mesh), ガラスカラム2φ×1.8m; 温度: カラム槽 220°, 注入口 250°; キャリヤーガス: N<sub>2</sub> 18ml/min.

主な可塑剤の t<sub>R</sub> (min) は次のとおりである。

|      | DOA | DOP  | DBS | ATBC |
|------|-----|------|-----|------|
| 条件1: | 8.5 | 12.5 | 3.8 | 5.1  |
| " 2: | 8.0 | 17.0 | 5.1 | 11.4 |

(DBS: セバシン酸ジ-*n*-ブチル, ATBC: アセチルクエン酸トリ-*n*-ブチル)

## 4. 可塑剤の移行試験

1) 食品類似溶媒 (水, 4%酢酸, 20%エタノール, *n*-ヘプタン) への移行 (1) 試料 前述のPVCおよびPVDCフィルムの中から4種 (DOA 平均添加量 23.82%), 2種 (DOA 同 3.31%), 2種 (DOP 添加量 19.60%, 1.37%) および2種 (ATBC 平均添加量 2.41%) をそれぞれ試料とした。

(2) 試料溶液の調製 試料を5×5cmに切り取ってビーカーに入れ、これに40°に加温した水, 4%酢酸, 20%エタノールを各100ml加え, 60°の恒温槽に30分および40°の恒温槽に2時間, 1日, 5日, 10日間それぞれ放置して得たものを試料溶液とした。なお5日, 10日間の場合は1日1回かく拌した。また*n*-ヘプタンにおいては室温 (20~23°) で同様に放置したものを試料溶液とした。

(3) 試験溶液の調製 試料溶液各100mlを分液ロートにとり, 10%硫酸5mlを加えたのちクロロホルム30mlず

つで3回抽出する。抽出液を合わせ, 45°以下で約0.5mlまで減圧濃縮後クロロホルムで正確に1mlとし, これを試験溶液とした。*n*-ヘプタンにおいては試料溶液をそのまま試験溶液とした。

(4) 定量 試験溶液について, 上記3. 4)のGCによる定量に従った。なお本法の回収率は96.3~106.8%であった。

2) オリーブ油およびラードへの移行 添加量既知の試料をオリーブ油またはラードに一定条件で浸漬し, 浸漬前後の試料中の可塑剤の含量を測定することにより, その減少量を移行量とした。試料はPVCフィルム2種 (DOA 25.06, 21.90%) およびPVDCフィルム2種 (DBS 1.81, 1.78%; ATBC 4.48, 4.45%) を用いた。

(1) オリーブ油の場合 試料 (5×5cm) を精秤し, これをクリップを用いて針金に吊り下げて円筒ビーカーに入れ, ついで精製オリーブ油 (和光製) 100mlを加え, 4°および室温でそれぞれ10分, 1時間, 4時間, 8時間, 1日, 2日, 5日, 10日間放置する。浸漬後, 試料に附着しているオリーブ油を軽く拭きとったのち, クロロホルム10mlを加え室温で1日放置後, 上澄液を試験溶液とした。定量は上記3. 4)のGCによる定量に従った。

(2) ラードの場合 市販ラードを加温して液状とし, その約30gをシャーレにとり4°および室温で放冷する。試料 (5×5cm) を精秤し, これをラードの表面にはりつける。以下オリーブ油と同様の操作を行った。

## 3) 電子レンジを使用した場合の食品への移行

試料 (業務用PVCフィルム: DOA 24.19%, 5×10cm) を精秤し, これをハンバーグなど10種類の油性食品の表面にはりつけ, 電子レンジ (三菱RO-2500型) で30秒, 60秒, 90秒間それぞれ食品を調理 (加温) する。ついで試料をはがしとり, 附着した食品を軽く拭きとる。以下オリーブ油の場合と同様の操作を行った。

表 1. フィルムの種類

| フィルムの種類 | 第1回調査     |   | 第2回調査 |    | 第3回調査    |   |
|---------|-----------|---|-------|----|----------|---|
|         | A         | B | A     | B  | A        | B |
| PVC     | 17*<br>38 | 3 | 48    | 7  | 28<br>49 | 2 |
| PVDC    |           | 4 |       | 10 |          |   |
| PE      | 2*        | 5 |       | 20 |          |   |
| BDR     | 1*        | 2 | 1     | 1  |          |   |

A: 業務用 B: 家庭用

\*: 昭和50, 51年購入

表 2. 食品包装用フィルムにおける可塑剤の使用実態およびその添加量

| フィルムの種類 |      | 可 塑 剤 | 第 1 回調査(昭和55年) |                      | 第 2 回調査(昭和56年) |                      | 第 3 回調査(昭和57年)    |                       |        |        |
|---------|------|-------|----------------|----------------------|----------------|----------------------|-------------------|-----------------------|--------|--------|
|         |      |       | 検出数            | 添加量%<br>(平均値)        | 検出数            | 添加量%<br>(平均値)        | 検出数               | 添加量%<br>(平均値)         |        |        |
| 業務用     | PVC  | DOA   | 17/17          | 4.6—30.8<br>(22.78)  | 42/48          | 21.9—26.6<br>(24.25) | 2/28              | 25.2, 20.7<br>(22.95) |        |        |
|         |      |       | 38/38          | 22.2—40.0<br>(28.74) |                |                      | 13/49             | 19.4—25.4<br>(23.65)  |        |        |
|         |      | 魚 用   | 11/11          | 29.45)               | 4/48           | 4.6—19.6<br>(8.63)   | 4/28              | 4.6—5.6<br>(4.80)     |        |        |
|         |      |       | 肉 用            | 15/15                |                |                      |                   |                       | 27.56) |        |
|         |      |       |                | 野菜用                  |                |                      |                   |                       | 12/12  | 29.32) |
|         |      |       |                |                      |                |                      |                   |                       | 惣菜用    | 2/16   |
|         |      | DOP   | 2/17           | 1.4, 19.6<br>(10.50) | 1/28           | 24.0                 |                   |                       |        |        |
|         |      |       | ATBC           |                      |                | 3/49                 | 4.3—4.6<br>(4.50) |                       |        |        |
| 家庭用     | PVC  | DOA   | 3/3            | 9.6—15.6<br>(12.70)  | 5/7            | 13.5—24.7<br>(16.52) |                   |                       |        |        |
|         |      | ATBC  |                |                      |                |                      | 1/2               | 5.1                   |        |        |
| 家庭用     | PVDC | DOA   | 4/4            | 2.2—3.5<br>(3.05)    | 1/10           | 3.9                  |                   |                       |        |        |
|         |      | ATBC  | 4/4            | 2.4—2.7<br>(2.45)    | 10/10          | 2.7—5.2<br>(4.47)    |                   |                       |        |        |
|         |      | DBS   |                |                      | 6/10           | 0.9—1.9<br>(1.65)    |                   |                       |        |        |

## 結果と考察

## 1. フィルムの種類

フィルムの材質鑑別の結果は表1に示すとおりである。

その結果、表1より食品包装用フィルムとしてPVC, PVDC, PE および BDR の4種類が使用されていることが判明した。用途別にみると、業務用としてはどの調査でも PVC フィルムが最も繁用されており、一部PE または BDR フィルムも使用されていると思われたが、第1回(38試料)および第3回(49試料)の包装食品における包装材における調査ではすべて PVC フィルムであった。従って業務上使用されるフィルムは PVC で、食品や容器に対する密着性(収縮性)やガス透過性などの機能性あるいはコストなどの経済性の点から多用されているものと推測される。なお PVC フィルムの製造者は国内9社といわれており、今回の調査では第1回6社、

第3回8社の製品が含まれていることから、わが国のおおよその使用実態が把握できたものと思われる。

家庭用としては、第1回および第2回調査とも BDR, PVC, PVDC, PE フィルムの順に多いが(第3回調査では PVC のみ対象)、これは試料の収集を同一の製造者に重複しないようまたいろいろの商品名のものを集めているので、そのまま市场占有率を示しているわけではない。しかし業務用と比べ PVC フィルムが圧倒的に多用されているわけではなく、店頭でみる限り PVDC および PE フィルムが一般家庭で多用されていると思われる。

## 2. 可塑剤の使用実態

フィルム中の可塑剤の使用実態は表2に示すとおりである。

その結果、可塑剤は PE および BDR フィルムから全く検出されず、PVC および PVDC フィルムから DOA,

DOP, ATBC および DBS の4種が検出された。用途別にみると次のようになる。

#### 1) 業務用フィルム

すべて PVC フィルムで、4種の中でも DOA は第1回調査 100% (55/55)、第2回調査 87.5% (42/48)、第3回調査 19.5% (15/77) の高い検出率を示したが、回を追うごとにその使用は減ってきている。DOP は第1回調査では 3.6% (2/55) 検出したが、第2回調査では検出されず、第3回調査で 3.6% (1/28) 検出した。ATBC は第1回調査では検出されず、第2回調査 8.3% (4/48)、第3回調査 9.1% (7/77) 検出している。なお DBS は全調査で全く検出されず、業務用フィルムには使用されないようである。更に調査毎にみると、第1回調査では、全試料で DOA が検出され、その添加量もほとんどが20%以上で、食品の用途別にみても魚・肉・野菜用の間には差がない。また DOA と DOP の併用が2試料あった(添加量 4.6:19.5%, 21.1:1.4%)。第2回調査では、42/48 試料で DOA が検出され、残り 4/6 試料では ATBC の単独使用 (19.7%) あるいは他の可塑剤(標準可塑剤を除く)との併用が行われ(ATBC それぞれ 4.6, 5.1, 5.1%), 2/6 試料では他の可塑剤を使用していると思われる。これら DOA を使用していない試料はいずれも昭和56年11月以降に収去されたもので、製造者が DOA, DOP の発がん性の問題に対処するべく昭和56年夏頃から代替品を使用したためである。従って昭和56年末には、DOA を使用していないフィルムが市場に出廻り始めてきたことを示している。第3回調査では、収去品のわずか2/28試料で DOA が検出されたにすぎず、調査の結果そのうちの一つは一般小売店が製造年月日の古いものを大量にかかえていたものであることが判明した。一方、市販の包装食品では 13/49 試料で DOA が検出されており、収去品よりも高い検出率であった。また食品の用途別にみると野菜用 62%, 魚用 22%, 惣菜用 12%, 肉用 9% で明らかに野菜の包装に多用されていることがわかる。これは、DOA が油性食品以外の食品にはあまり移行しないなどの理由から一般小売店が依然として DOA 添加のフィルムを多用しているためと思われる。なお収去品で DOA の検出率が低いのは、試料の収集先のほとんどが大手のチェーンストアなどの大規模店で、製造者側が DOA を使用していないフィルムと交換を行うなど、問題発生後迅速に対応した結果であると思われる。

第3回調査の結果、PVC フィルムの全製造者(8社)が DOA を他の可塑剤に切り替えており、一部で ATBC

を使用していたが、その添加量からみて他の可塑剤(抽出物の赤外吸収スペクトルから DOA の同族体など)を主要可塑剤として使用していると思われる。

#### 2) 家庭用フィルム

第1回調査では、PVC および PVDC フィルムの全試料(7/7)で DOA が検出され、かつ PVDC の場合は ATBC との併用であった。第2回調査では、PVC フィルムの 5/7 試料、PVDC フィルムの 1/10 試料で DOA が検出された。後者では DOA の代替えとして DBS が使用されてきており、ATBC の単独使用または ATBC と DBS の併用が行われてきていることを示している。第3回調査では、試料数は少ないが DOA の使用はなく、PVC フィルムの 1/2 試料で ATBC が検出された。

家庭用 PVDC フィルムにおいては、製造者が2社で、かつ素材の性質上可塑剤を多量に添加する必要がなくまた柔軟性が業務用ほど家庭では要求されないことなどから、国内での DOA の消費量が PVC に比べもともと少ないため他の可塑剤への切り替えが円滑に行われたようである。

#### 3. 可塑剤の食品類似溶媒への移行

DOA, DOP および ATBC の3種の可塑剤の食品類似溶媒(水、4%酢酸、20%エタノール、*n*-ヘプタン)への移行試験の結果は表3に示すとおりである。その結果を可塑剤別にみると次のようになる。

1) DOA 添加量の少ない(平均3.31%)試料の場合、水、4%酢酸ではほとんど溶出せず、20%エタノールでわずかに溶出しているが、添加量の多い(平均23.82%)試料の場合、水、4%酢酸では 0.05~0.07ppm 溶出し、20%エタノールではその2倍の溶出を示している。そして溶出量は添加量に比例して高くなっている。40°の経時変化ではどの溶媒でもほとんど変化がない。なお *n*-ヘプタンの場合室温・2時間でフィルム中の DOA が 50% 以上移行してきている。

2) DOP 添加量の少ない試料(1.37%)の場合、水、4%酢酸では全く溶出せず、20%エタノールでわずかに溶出しているが(0.01ppm)、添加量の多い試料(19.60%)の場合、水、4%酢酸、20%エタノールの順に溶出が高くなっている。しかし DOA と違って添加量に比例して溶出量は増えない。40°の経時変化では DOA 同様ほとんど変化がない。なお *n*-ヘプタンの場合室温・2時間でフィルム中の DOA が 60% 以上移行してきている。

3) ATBC DOA, DOP に比べ添加量が少ない(2.41%)にもかかわらずどの溶媒でも高い溶出を示している(0.34~6.08ppm)。そして水、4%酢酸、20%エタノール

表 3. 可塑剤の食品類似溶媒への移行

| 可塑剤  | 溶出条件       | 移行量 (ppm)    |              |              |               |
|------|------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
|      |            | 水            | 4%酢酸         | 20%エタノール     | n-ヘプタン        |
| DOA  | 60°, 30min | 0<br>0.04    | 0<br>0.05    | 0.03<br>0.13 | 10.5<br>100.2 |
|      | 40°, 2hr   | 0<br>0.07    | 0<br>0.05    | 0.02<br>0.10 | 8.0<br>98.3   |
|      | " , 1day   | 0<br>0.07    | 0.01<br>0.06 | 0.02<br>0.13 | 10.8<br>108.8 |
|      | " , 5 "    | 0.01<br>0.06 | 0.01<br>0.07 | 0.02<br>0.13 | 13.7<br>112.1 |
|      | " , 10 "   | 0.01<br>0.07 | 0.01<br>0.07 | 0.05<br>0.15 | 14.1<br>114.6 |
| DOP  | 60°, 30min | 0<br>0.01    | 0<br>0.01    | 0.01<br>0.05 | 6.3<br>72.0   |
|      | 40°, 2hr   | 0<br>0.01    | 0<br>0.01    | 0.01<br>0.02 | 6.0<br>78.4   |
|      | " , 1day   | 0<br>0.01    | 0<br>0.02    | 0.01<br>0.04 | 7.2<br>78.8   |
|      | " , 5 "    | 0<br>0.01    | 0<br>0.02    | 0.01<br>0.03 | 7.3<br>92.4   |
|      | " , 10 "   | 0<br>0.01    | 0<br>0.02    | 0.01<br>0.03 | 7.3<br>94.4   |
| ATBC | 60°, 30min | 0.54         | 0.34         | 2.90         | 3.55          |
|      | 40°, 2hr   | 0.41         | 0.53         | 1.80         | 1.35          |
|      | " , 1day   | 1.35         | 2.08         | 4.42         | 3.65          |
|      | " , 5 "    | 1.28         | 2.15         | 4.79         | 5.75          |
|      | " , 10 "   | 1.33         | 2.12         | 6.08         | 5.95          |

- 1) n-ヘプタンにおける40°の条件は室温で行う
- 2) DOA 添加量 上段 3.31%, 下段 23.82%  
DOP " " 1.37%, " 19.60%  
ATBC " " 2.41%

ルの順に高く、20%エタノールでは水の4倍の溶出を示している。40°の経時変化では1日以降はあまり増えない。なおn-ヘプタンの場合 DOA, DOP のような高い溶出を示さず、室温・2時間で12%移行している。

#### 4. 可塑剤のオリーブ油およびラードへの移行

DOA, DBS および ATBC の3種の可塑剤のオリーブ油およびラードへの移行試験の結果は図1に示すとおりである。なおここでは溶出量が多いことから移行率で示してある。その結果を可塑剤別にみると次のようになる。

- 1) DOA DBS, ATBC に比べ高い移行率を示しており、油脂に溶けやすい可塑剤といえる。固形油脂のラードよりも液状油脂のオリーブ油に高い移行率を示し、溶出温度も高い程移行率も高い。また溶出時間10分での

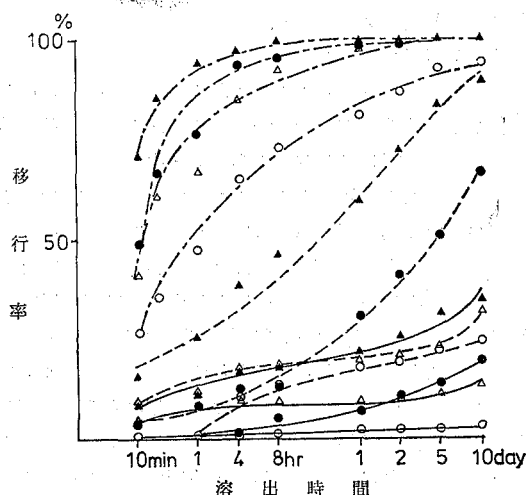


図 1. 可塑剤のオリーブ油およびラードへの移行  
 --- DOA ○ ラード, 4°  
 ..... DBS ● " , 室温  
 — ATBC △ オリーブ油, 4°  
 ▲ " , 室温

移行率は25~75%で、以後急速に増加し4時間では65~98%であった。

- 2) DBS ATBC に比べ高い移行率を示している。移行率は、溶出温度4°では徐々に増加しているが、室温ではゆるやかな増加を示し、溶出時間10日で65~90%であった。

- 3) ATBC n-ヘプタンの場合と同様DOA, DBSに比べ低い移行率を示している。移行率は、溶出温度4°ではほとんど増加せず、室温でもおだやかな増加で、溶出時間10日で20~35%であった。しかし、この可塑剤は水、4%酢酸への移行率も10%以上あるので、DOAなどに比べどの食品へも移行しやすい可塑剤といえる。

#### 5. 電子レンジ使用による可塑剤の食品への移行

油性食品を加温するため電子レンジを使用した場合の可塑剤の移行について、その結果を表4に示してある。

その結果、どの食品でも調理(加温)時間の長い程DOAの移行率が高く、30秒:24.0~44.8%(平均34.1%); 60秒:35.8~65.2%(50.7%); 90秒:45.2~71.9%(59.0%)の移行率を示している。この移行率はオリーブ油やラードにおけるそれと同程度と思われる。

以上の結果、食品の包装にPVCあるいはPVDCフィルムを使用した場合、使用条件によってはフィルム中の可塑剤が食品へ移行する恐れが強く、とりわけ前者で

表 4. 電子レンジ使用による可塑剤の食品への移行

| 食 品              | 移 行 率 % |                |      |
|------------------|---------|----------------|------|
|                  | 30秒     | 調 理 時 間<br>60秒 | 90秒  |
| ハンバーグ            | 24.0    | 44.7           | 59.3 |
| コ ロ ッ ケ          | 43.5    | 43.7           | 50.1 |
| 魚 フ ラ イ          | 27.4    | 35.8           | 45.2 |
| チキンドッグ           | 28.1    | 40.2           | 49.2 |
| フランクフルト<br>ソーセージ | 32.9    | 51.8           | 60.8 |
| 餃 子              | 41.4    | 45.0           | 61.4 |
| とりも焼き            | 34.8    | 62.2           | 71.9 |
| 天 ぶ ら            | 30.5    | 65.2           | 69.5 |
| さつまあげ            | 34.0    | 53.7           | 56.1 |
| 春 巻              | 44.8    | 65.0           | 66.8 |
| オリーブ油            | 58.7    | 68.6           | 74.8 |
| ラ ー ド            | 26.2    | 61.7           | 73.6 |

は20%以上添加されているので、油性食品においては、これまでの一般の器具・容器包装から食品への溶出量をはるかに超える量が移行するものと思われる。因みに餃子を例にとってみると、1パック(10コ入)では約100cm<sup>2</sup>のフィルム(DOA 50mg含有)が餃子に接触するので、電子レンジで調理して食べると20~30mgのDOAを摂取することになる。現在DOAは他の可塑剤に切り替えられつつあるとはいえ同じように高い移行性を示すものと考えられるので、フィルムが油性食品と直接接触するような使用法は業務上(例えば温蔵庫による惣菜類の保温など)あるいは一般家庭でも避けた方が望ましいと思われる。また素材に対し20%以上添加される物質はもはや素材の一部であり、しかもその大部分が溶出するとなるとそのフィルムの持つ性質(機能)は当然劣化するものと考えられ、製造者および販売者はこれを使用する者に対しその適切な使用法をより一層徹底させることが要求される。

## ま と め

食品包装用フィルムにおける可塑剤の使用実態およびその移行性について、昭和55年から3回にわたって調査を行った。その結果は次のとおりである。

1. 使用されているフィルムは、業務用ではPVC、家庭用ではPVDC、PE、PVCが繁用されていた。

2. フィルム中検出された可塑剤は、DOA、DOP、ATBC、DBSの4種で、業務用PVCではDOAが添加量20~40%の範囲で多用されていたが、昭和56年末からATBCなど他の可塑剤に切り替えられつつある。家庭用PVDCではDOAとATBCの併用からATBC単独またはATBCとDBSの併用に切り替えられている。なおPE、BDRフィルムからは可塑剤が全く検出されなかった。

3. DOA、DOPは食品類似溶媒(水、4%酢酸、20%エタノール)にわずかに溶出するが(4°, 10日間で0.07~0.15ppm)、ATBCはどの溶媒にもより多い溶出を示した(0.13~6.08ppm)。

4. オリーブ油およびラードに対しては、ATBC、DBS、DOAの順に高い移行率を示し、中でもDOAはわずか10分間で25~75%の移行率であり、DBS、ATBCは10日間でそれぞれ23~89%、2~34%の移行率であった。

5. 電子レンジを使用して油性食品を加温すると、調理時間30、60、90秒で各々34、51、59%(平均)の移行率でフィルム中のDOAが食品に溶出した。

謝辞 本調査に御協力いただいた衛生局環境衛生部食品監視課の各位に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Food Chemical News, May 25, 3 (1981)
- 2) 厚生省, 食品化学・行政連絡報, No. 3 (1981)
- 3) 渡辺悠二, 佐藤憲一, 吉田令子, 諏訪世津子, 藤居英: 東京衛研年報, 26-1, 232 (1975)

## SAN製品からのアクリロニトリルモノマーの移行挙動

吉田 令子\*, 渡辺 悠二\*, 佐藤 憲一\*, 遠藤 英美\*, 吉田 博久\*\*

### Migration Behavior of Acrylonitrile Monomer from SAN Food Container

REIKO YOSHIDA\*, YUJI WATANABE\*, KENICHI SATO\*,  
FUSAYOSHI ENDO\* and HIROHISA YOSHIDA\*\*

The migration of acrylonitrile (AN) monomer from styrene-acrylonitrile (SAN) food container into 5 kinds of solvent were studied. The migration process was made up by 2 kinds of diffusion step; the initial step was the migration process from the non-plasticized polymer and the second step was from the solvent-plasticized polymer. Respective diffusion coefficient was obtained as a slope by the assumption of the Fickian diffusion. Therefore, it is possible that we forecast the amount of migrated substances from samples which require a long period of time to reach an equilibrium by using the obtained migration process. This process was affected by the ethanol concentration. The diffusion coefficient changed linearly with the increased concentration of ethanol.

**Keywords:** acrylonitrile monomer, SAN, migration, diffusion, glass transition temperature, swelling

#### 緒 言

プラスチックは安価で取り扱いやすいなどの理由から現在食品包装、容器、器具などに広く使われ食品流通システムにも大きな変化をもたらした。それに伴ない製品中に含まれる種々の添加剤や未反応モノマーなどの成分が食品中へ移行することに関心がもたれ、最近我国ではあいついで法的規制<sup>1)</sup>が実施されるようになった。しかし衝撃強度や加工性に優れているため、食品保存容器などに多く使用されているスチレン・アクリロニトリル樹脂（以下 SAN と略す）や調理器具などによく使われている ABS 樹脂から移行するアクリロニトリル（以下 AN と略す）モノマーについては未だ規制が行われていない。AN モノマーは水への溶解度が高く、強い毒性があり発ガン性の疑いももたれているため欧米各国では移行規制が実施されている。我々は1979、1980年に市販品における残留量と移行量の実態調査を報告した<sup>2,3)</sup>。また分析法や移行量測定に関して多くの報告がなされているが、移行過程のメカニズムの解明については報告が少ないのが現状である。そこで我々は拡散係数を用い、ポリマーの分子運動性の立場から移行過程の分析を試みた。

#### 実験の部

1. 試料 市販の SAN 製保存容器（AN モノマー残留量 30ppm）を 10mm×80mm の大きさに切断したものを使用した。なお切断面からの移行を防ぐために加熱カッターを用いた。

2. 装置 パーキンエルマーシングマ 3 B 型ガスクロマトグラフ（窒素・りん検出器付き）。パーキンエルマー 1 B 型示差走査熱量計（以下 DSC と略す）。

3. 試薬・試液 1) 蒸留水 2) 4% 酢酸 3) 20% エタノール 4) 35% エタノール 5) 50% エタノール、以上についてはガスクロマトグラフィー（以下 GC と略す）で妨害ピークのないことを確認したものを使用した。6) AN:AN（東京化成 98%）を用いた。

4. 試験法 1) 試験溶液の調製 蒸留水、4% 酢酸、20%、35%、50% エタノールを 40° に加温し、それぞれの溶液を試料表面積 1cm<sup>2</sup> あたり 2ml の割合で試料とともに共栓つき試験管に入れ密封し、40° に保ちながら放置したものを試験溶液とした。

2) AN 標準溶液の調製 AN 25 $\mu$ l をとり、蒸留水、4% 酢酸、20%、35%、50% エタノールに溶かし、それぞれ全容 25ml とし標準原液（800ppm）とした。この原液を 0.8、0.08ppm にそれぞれの液で希釈したものを標準溶液とした。

\* 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 東京都立大学工学部工業化学科

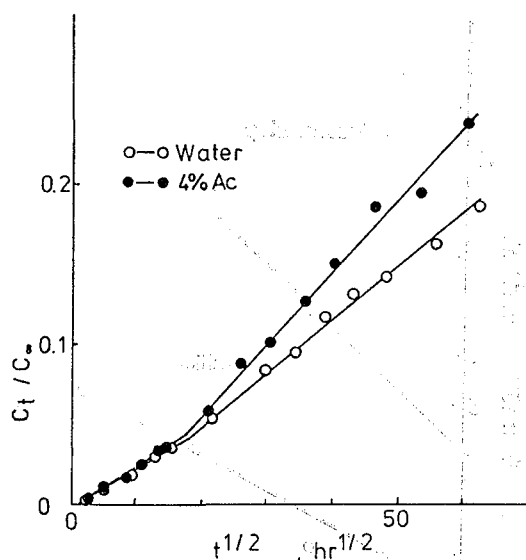


Fig. 1. Migration process of AN monomer from sample into water and 4% acetic acid at 40°

3) ANモノマーの定量 それぞれの試験溶液について次の条件でGCを行ない、同様に操作して得た標準溶液の示すピーク高から検量線を作成し、これを用いて定量を行なった。なお検出限度は 2pg であった。

カラム: Chromosorb 101 80/100mesh; ガラス製内径 2mm×1.8m; 温度: カラム槽150°, 注入口200°, 検出器250°; キャリヤガス: N<sub>2</sub> 25ml/min; 保持時間 1.5分

4) ガラス転移温度 (以下 T<sub>g</sub> と略す) の測定 DSC を用い昇温速度 16°/min, 窒素気流中で測定した。T<sub>g</sub> はガラス転移における DSC 曲線と転移前のベースラインとの交点とした。

### 結果と考察

移行量の経時変化を Fig. 1, 2 に示した。どの溶媒においても移行現象はおそい第1段階とやや早い第2段階から成っていることが認められた。水と 4% 酢酸を比較すると第1段階では移行量にあまり差は認められなかったが、第2段階では水より 4% 酢酸への移行量が多くなっていた。従来の報告では水と 4% 酢酸への移行量はほぼ同程度であるとされているが、これは第1段階の移行過程のみをとらえているためと考えられる。エタノール溶液の場合、2段階の移行過程はより明確にあらわれ直線の傾きはエタノール濃度が高くなるにともない大きくなった。また水に比較して第1段階から第2段階へ変化する

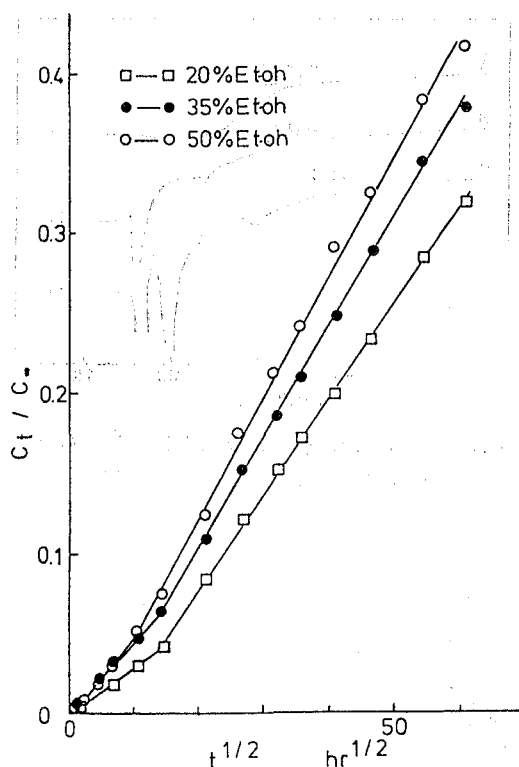


Fig. 2. Migration process of AN monomer from sample into 20%, 35% and 50% ethanol at 40°

る時間が短くなっていた。この2段階の移行過程は溶媒の吸脱着および膨潤過程が関係していると考えられる。なお、いずれの溶媒でも試料の外見上の変化は認められなかった。Fig. 3 に水に浸漬した試料の DSC 曲線を示した。それぞれ浸漬前 A, 移行過程の第1段階 B, 第2段階 C の試料である。B は A と比較して T<sub>g</sub> にほとんど変化がなかった。しかし T<sub>g</sub> 以上の温度になると水の蒸発による乱れが認められた。C は A, B と比較して T<sub>g</sub> は 4.5° 低下していた。さらに T<sub>g</sub> 以上になると乱れは B より大きくなった。一般に高分子中に溶媒などの低分子物質がまじると系の T<sub>g</sub> が低下することから B では水は表面層にのみ吸着しており、C になると高分子内部に拡散して存在すると考えられる。Fig. 4 に 35% エタノールに浸漬した試料の T<sub>g</sub> の経時変化を示した。T<sub>g</sub> も移行量と同様に2段階から成っていた。また第1段階から第2段階へ移る時間も一致した。

移行現象は一般に Fig. 5 に示したように3種類に分類される<sup>5)</sup>。1は高分子中の物質の拡散係数が 0 かほとん

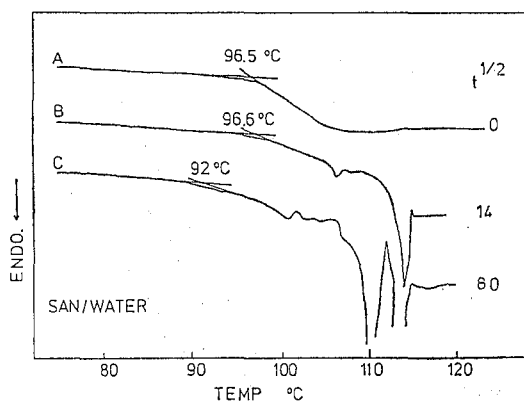


Fig. 3. DSC thermograms of original SAN(A), steeping SAN in water for 190 hr (B) and for 6480 hr (C)

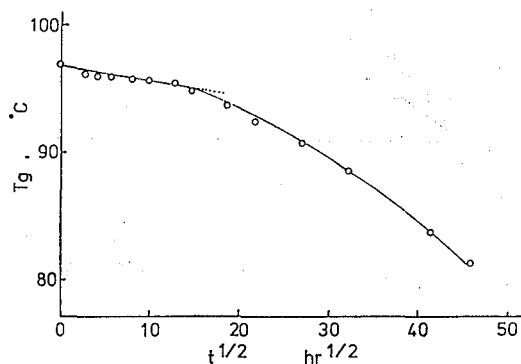


Fig. 4. Tg changes of samples with steeping in 35% ethanol at 40°

- 1 NON-MIGRATING SYSTEM
- 2 INDEPENDENTLY MIGRATING SYSTEM
- 3 SOLVENT-CONTROLLED SYSTEM

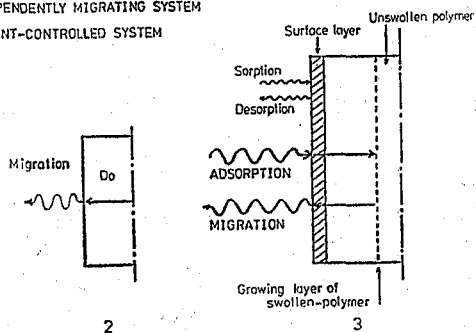


Fig. 5. Model of migrating system

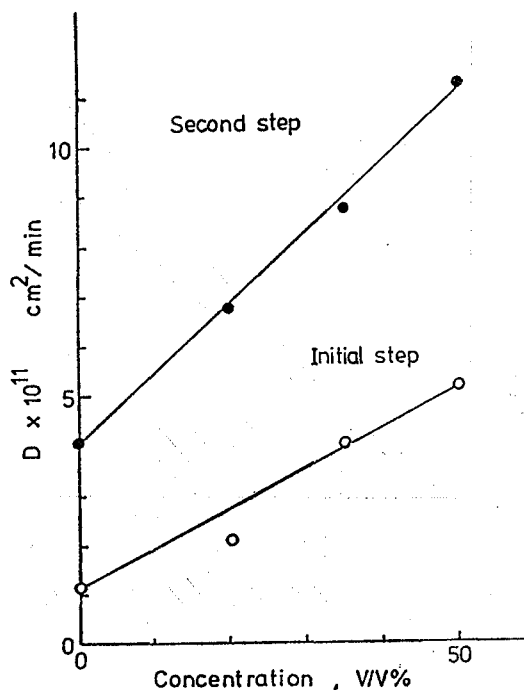


Fig. 6. Diffusion coefficients changes with ethanol concentration at the initial and second step

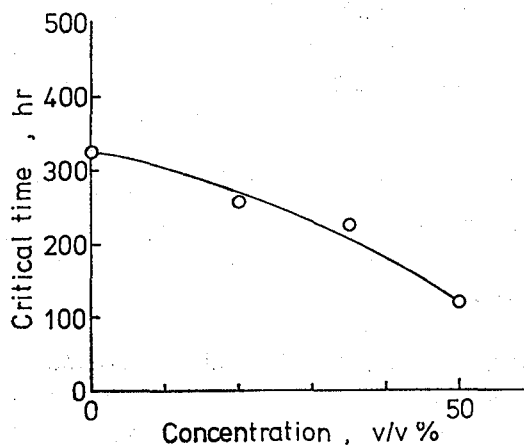


Fig. 7. Critical time changes with ethanol concentration

ど0に近く、高分子と溶媒の間に相互作用が全くない場合。2は物質の拡散係数が0より大きい場合。3はさらに相互作用が働き移行現象が強く影響をうける場合である。SAN からのANモノマーの移行は、ANモノマーが溶媒に溶けること、SAN が膨潤することから3の場合



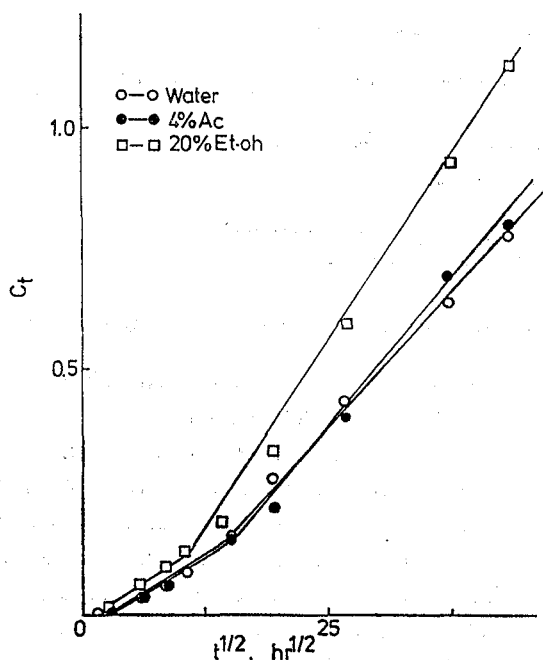


Fig. 8. Migration process of AN monomer from commercial products into water, 4% acetic acid and 20% ethanol

合に相当する。したがって第1段階は高分子表面層への溶媒の吸脱着が生じ吸着が平衡に達する過程で表面層に存在していた物質のみが移行している。またFig. 5における2の場合にとどまっている段階であるといえる。第2段階は $T_g$ の急激な減少にみられるように高分子内部に溶媒の拡散が進行する過程で、高分子は可塑化され分子運動が活発になり移行現象が加速される。拡散係数は時間 $t$ 後のANモノマー移行量が $t^{1/2}$ に比例することからFickの拡散則にしたがうと考えられるので、 $t^{1/2}$ に対する $Ct$  ( $t$ 後のANモノマー濃度)/ $C_\infty$  ( $\infty$ 後の濃度すなわちSAN材質中の残留量)の傾きとなる。Fig. 6に第1段階と第2段階の試料の拡散係数、Fig. 7に第1から第2段階へ変化する時間をそれぞれエタノール濃度との関係で

示した。エタノール濃度にともない拡散係数は増加し、変化する時間は減少した。これはエタノールがSANを膨潤すなわち可塑化させANモノマーを移行させやすくする作用が強いことを示している。したがってANはエタノールより水に溶けやすいにもかかわらず、移行量はエタノール溶液に多いのはこのSANを膨潤させやすいという理由によると考えられる。

以上のモデル実験を通常行なう溶出試験と比較するためFig. 8に消費者が実際に使用する状態で測定したANモノマーの経時変化を示した。やはり移行過程は2段階から成っていた。第1段階では水、4%酢酸の傾きは同程度、エタノール溶液はより多くなっており、第2段階は水、4%酢酸、エタノール溶液の順に多くなりモデル実験と同結果を示していた。

#### まとめ

SANからのANモノマーの移行過程は2段階から成り、第1段階はSAN表面層への溶媒の吸着平衡の間に起こる現象であり、第2段階は溶媒によりSANが膨潤するため可塑化されて移行が加速される現象である。従来の移行試験はほとんどの場合第1段階の移行量の測定にとどまっていると考えられる。SAN中のANモノマーのように移行量が平衡に達するまで長期間を要するものは短期間の測定から予測できることがわかった。Fickの拡散則より得た拡散係数はエタノール濃度にともない直線的に増加した。したがってANモノマー移行量がエタノール溶液に多いのは、エタノールがSANを可塑化させ移行させやすくする作用が強いことを示していた。

#### 文献

- 1) 厚生省告示第20号 官報 1982, 2, 16
- 2) 吉田令子, 渡辺悠二, 佐藤憲一, 遠藤英美: 東京衛研年報, 30-1, 163, 1979
- 3) 吉田令子, 渡辺悠二, 佐藤憲一, 遠藤英美: *ibid.*, 31-1, 190, 1980
- 4) 村井孝一: 可塑剤, 1973, 幸書房
- 5) Knibbe: *Plastica*, 24, 358, 1971

## 市販ポテトチップおよびスナック菓子の栄養学的考察

牛尾 房雄\*, 船山 恵市\*, 西田 甲子\*, 関 博磨\*, 道口 正雄\*

### Nutritional Evaluation of Some Commercial Potato Chips and Their Analogous Foods

FUSAO USHIO\*, KEIICHI FUNAYAMA\*, KOKO NISHIDA\*,  
HIROMARO SEKI\* and MASAO DOGUCHI\*

**Keywords:** ポテトチップ potato chip, 脂質含有量 lipid content, エネルギー(キロカロリー)energy(kilocalorie)

#### 緒 言

最近の学童の食生活実態について、昨年、厚生省高脂血症研究班は調査報告<sup>1)</sup>し、食事内容の偏りから来る栄養素のアンバランスと過剰エネルギーの摂取を指摘し、その原因の1つとして間食が多いことをあげている。児童の間食としては最近、ポテトチップをはじめ馬鈴薯、トウモロコシ等を原材料としたスナック菓子が繁用され、しかもその需要増加にともない年々各社がその種類を増やして販売している。一般にこれらスナック菓子は油脂を使って製造しているため、高脂質、高カロリーの菓子と言われており、これら菓子類を多食することにより食生活の栄養バランスが損われ、肥満につながるものが危惧されてくる。

本報告は市販ポテトチップおよびスナック菓子60種について、脂質、蛋白質、水分、灰分を調べ、エネルギー量を算出しさらに食塩含有量、脂肪酸組成についても検討を加え、それら菓子の栄養学的考察を行った。なお油脂で加工された食品についてはその油脂の変敗が問題とされるため、酸価、過酸化価についても調査した。

#### 実験の部

本調査に用いたポテトチップおよびスナック菓子の種類、試料数を表1に示す。

**分析方法** 脂質：全試料について、酸分解法<sup>2)</sup>、エチルエーテルを用いたソックスレー抽出法<sup>3)</sup>の両方法を用いた。両方法から得られた測定値はいずれの試料においてもほぼ一致していたが、ポテトチップのような油脂で揚げたものおよび油脂を吹きつけるように処理した試料についてはソックスレー抽出法による測定値を、それ以外の油脂を練り込んで製造した試料については酸分解法の測定値を用いた。

蛋白質：エチルエーテルによる浸出法により脱脂を行った後、ケルダール法<sup>4)</sup>により行った。

水分、灰分：衛生試験法の常法<sup>5)</sup>により行った。

炭水化物(糖質+繊維)含有量は100gから100g中の脂質、蛋白質、灰分、水分含有量の合計を差し引きたいわゆる差し引き炭水化物として表わした。またエネルギー換算係数は Atwater の係数、すなわち炭水化物、蛋白質には 4kcal/g、脂質では 9kcal/g を用い算出した。

食塩：モール法<sup>6)</sup>により行った。

酸価、過酸化価：衛生試験法の常法<sup>7)</sup>により行った。

脂肪酸：脂肪抽出は Folch の方法<sup>8)</sup>を用い、抽出脂肪の加水分解、遊離させた脂肪酸のエステル化の工程は衛生試験法<sup>9)</sup>に準じ行った。

すなわち、試料よりの脂肪抽出はクロロホルム、メチルアルコール(2:1)混液を用いた。抽出した脂肪は10%水酸化カリウム・エチルアルコール溶液により加水分解し、ついで不鹸化物除去を行った後、エチルエーテル抽出により脂肪酸を得る。脂肪酸は3フッ化ホウ素・メチルアルコール溶液によりメチルエステルとし、石油エーテルで抽出する。抽出石油エーテル層は水洗後、脱水する。石油エーテルを留去した後、残渣を適量のヘキサ

表 1. 試料の内訳

| 種 類           | 検体数 |
|---------------|-----|
| ポテトチップ        | 14  |
| ファブリケートポテトチップ | 10  |
| ポテト系スナック菓子    | 8   |
| コーン系スナック菓子    | 18  |
| 小麦粉系スナック菓子    | 5   |
| 米系スナック菓子      | 5   |

\* 東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表 2. ポテトチップ類およびスナック菓子の一般成分値, 酸価, 過酸化物質

| 脂        | 質*    | 蛋    | 白    | 質*   | 炭     | 水    | 分*   | 灰    | 分*   | エ    | ネ     | ル    | ギ    | ー    | 塩     | 分*    | 酸     | 価     | 過 | 酸 | 化 | 物 | 価 | ** |
|----------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|---|---|---|---|---|----|
| ポテトチップ   | n=14  |      |      |      |       |      |      |      |      |      |       |      |      |      |       |       |       |       |   |   |   |   |   |    |
| 平均値      | 27.7  | 42.0 | 2.1  | 5.7  | 47.6  | 58.8 | 2.1  | 5.3  | 2.1  | 3.7  | 513   | 587  | 0.5  | 2.0  | 0.25  | 1.27  | 3.4   | 22.4  |   |   |   |   |   |    |
| 標準偏差     | 33.00 | 3.31 | 4.43 | 1.10 | 55.77 | 2.98 | 3.47 | 1.04 | 3.03 | 0.46 | 540.0 | 17.6 | 0.84 | 0.35 | 0.777 | 0.281 | 9.10  | 5.26  |   |   |   |   |   |    |
| ファブリケート  | n=10  |      |      |      |       |      |      |      |      |      |       |      |      |      |       |       |       |       |   |   |   |   |   |    |
| 平均値      | 25.5  | 34.6 | 3.4  | 7.4  | 52.8  | 61.3 | 1.9  | 3.7  | 2.2  | 3.6  | 475   | 553  | 0.7  | 1.6  | 0.35  | 0.82  | 3.7   | 48.4  |   |   |   |   |   |    |
| 標準偏差     | 30.08 | 3.03 | 6.08 | 1.21 | 58.11 | 2.88 | 2.93 | 0.56 | 2.80 | 0.43 | 524.7 | 23.0 | 1.14 | 0.32 | 0.587 | 0.162 | 10.96 | 13.26 |   |   |   |   |   |    |
| ポテト系スナック | n=8   |      |      |      |       |      |      |      |      |      |       |      |      |      |       |       |       |       |   |   |   |   |   |    |
| 平均値      | 5.6   | 33.7 | 2.5  | 7.0  | 58.8  | 80.4 | 2.4  | 5.2  | 0.7  | 3.6  | 394   | 554  | 0.4  | 1.5  | 0.14  | 0.82  | 2.9   | 11.9  |   |   |   |   |   |    |
| 標準偏差     | 19.68 | 8.47 | 4.25 | 1.86 | 70.18 | 6.11 | 3.43 | 0.95 | 2.48 | 1.06 | 474.8 | 48.0 | 1.06 | 0.50 | 0.419 | 0.235 | 6.89  | 3.29  |   |   |   |   |   |    |
| コーン系スナック | n=17  |      |      |      |       |      |      |      |      |      |       |      |      |      |       |       |       |       |   |   |   |   |   |    |
| 平均値      | 14.2  | 38.5 | 2.6  | 7.6  | 53.4  | 76.0 | 1.4  | 4.8  | 1.4  | 3.9  | 452   | 578  | 0.3  | 3.1  | 0.14  | 1.26  | 1.0   | 21.1  |   |   |   |   |   |    |
| 標準偏差     | 25.47 | 5.76 | 5.72 | 1.34 | 63.89 | 5.25 | 2.88 | 1.12 | 2.06 | 0.75 | 507.6 | 32.2 | 1.34 | 0.56 | 0.528 | 0.299 | 8.21  | 5.53  |   |   |   |   |   |    |
| 小麦粉系スナック | n=5   |      |      |      |       |      |      |      |      |      |       |      |      |      |       |       |       |       |   |   |   |   |   |    |
| 平均値      | 9.9   | 25.1 | 5.4  | 6.9  | 62.4  | 77.4 | 2.8  | 4.0  | 1.7  | 3.8  | 419   | 501  | 1.0  | 1.9  | 0.14  | 0.84  | 14.1  | 29.2  |   |   |   |   |   |    |
| 標準偏差     | 18.46 | 7.22 | 6.18 | 0.56 | 69.28 | 6.75 | 3.64 | 0.49 | 2.44 | 0.83 | 468.0 | 37.5 | 1.32 | 0.34 | 0.498 | 0.301 | 21.06 | 5.88  |   |   |   |   |   |    |
| 米系スナック   | n=5   |      |      |      |       |      |      |      |      |      |       |      |      |      |       |       |       |       |   |   |   |   |   |    |
| 平均値      | 9.3   | 32.1 | 5.4  | 7.4  | 57.6  | 79.7 | 2.5  | 5.8  | 2.0  | 2.5  | 427   | 541  | 1.5  | 2.0  | 0.45  | 1.88  | 7.9   | 27.6  |   |   |   |   |   |    |
| 標準偏差     | 21.22 | 8.82 | 6.3  | 0.77 | 66.8  | 8.94 | 3.54 | 1.42 | 2.28 | 0.19 | 482.8 | 42.5 | 1.64 | 0.20 | 0.860 | 0.593 | 15.94 | 10.01 |   |   |   |   |   |    |

\* 単位: g/100g  
\*\* 単位: meq/kg

ンに溶解し, ガスクロマトグラフィー供試試料とした。構成脂肪酸含有比率はガスクロマトグラム上のピーク面積比をもって表した。

#### ガスクロマトグラフィー条件

検出器: FID, カラム: 5% Advance (担体 Chromosorb W, AD-DMCS 処理 80-100mesh) 3mmφ×2 m, カラム温度: 190°, 注入口温度: 250°, Carrier gas: N<sub>2</sub> 30ml/min, Sensitivity: 10<sup>2</sup>, Range: 16, 積分計: Varian CDS 401

#### 結果および考察

脂質, 蛋白質, 食塩等の含有量および算出エネルギー量さらに酸価, 過酸化物質を表2に示す。

ポテトチップ, ファブリケートポテトチップ類では多くの試料が脂質含有量 30g 前後の値を示し, その平均値もその他のスナック菓子類より高い値であった。特にポテトチップは14試料中12試料が脂質含有量 30g 以上を示し, 全試料中最高値の 42g を示したのもポテトチップの1試料である。トウモロコシを主原料としたスナック菓子においても, その平均脂質含有量はポテトチップ類より若干低い値であるが, 18試料中5試料が 30g 以上の脂質含有量を示していた。小麦粉, 米を主原料としたスナック菓子ではその脂質含有量は10g未満-30g以上の範囲にわたっており, 試料により差があることが認められた。

これに対して蛋白質含有量は殆どどの試料が 4~6g の範囲にあり, 最高値でもトウモロコシ系スナック菓子1試料に見られた7.6gであった。炭水化物含有量は全試料を通じ, 1例を除き50g以上を示している。

以上の様な高脂質を反映し, 算出されたこれら菓子類のエネルギー量はポテトチップでは全試料が, ファブリケートポテトチップでは1試料を除き 500kcal 以上を示し, トウモロコシ系スナック菓子でも18試料中11試料が 500kcal 以上を示した。その他のスナック菓子ではポテト系スナック菓子の1試料を除き, 400kcal 以上となっている。

これら菓子類を多食していると思われる5~10歳の子供の1日エネルギー所要量は1500~2000kcalとされている<sup>10)</sup>。しかるに, 子供がこれら菓子類の1袋(ほぼ70~100g)を食すれば少なくとも1日の所要エネルギー量の1/4ほどが供給されることとなり, もしそのために通常の食事摂取量の減少を来たせば各種栄養素摂取に偏りを生じることもありえよう。

これらスナック菓子はまた塩分含有量の高い菓子と言われている。今回の調査では多くの試料が 1g 前後から

表 3. ポテトチップおよびスナック菓子の脂質の主要脂肪酸組成

単位: 重量%

|            | ミリスチン酸<br>C 14:0 | パルミチン酸<br>C 16:0 | ステアリン酸<br>C 18:0 | オレイン酸<br>C 18:1 | リノール酸<br>C 18:2 | リノレン酸<br>C 18:3 | アラキジン酸<br>C 20:0 | その他        |
|------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------|
| ポテトチップ     | 0.2-0.5          | 16.3-26.2        | 1.7-2.6          | 39.4-43.6       | 27.6-35.9       | 1.1-2.7         | 0.4-1.2          | 0.6-2.1    |
| 平均値±標準偏差   | 0.48±0.08        | 23.68±2.51       | 2.53±0.28        | 40.55±1.18      | 29.56±2.00      | 1.57±0.40       | 0.56±0.19        | 1.13±0.40  |
| フレンチポテトチップ | 1.0-1.1          | 33.3-43.4        | 4.8-6.7          | 38.9-56.1       | 2.7-10.3        | N.D.-0.4        | 0.3-0.4          | 0.4-1.1    |
| 平均値±標準偏差   | 1.03±0.05        | 39.79±3.63       | 5.43±0.51        | 44.05±5.99      | 8.28±2.75       | 0.25±0.15       | 0.38±0.04        | 0.79±0.29  |
| ポテト菓子      | 0.1-11.4         | 6.3-31.4         | 2.5-9.1          | 18.4-76.4       | 5.0-20.8        | N.D.-6.5        | N.D.-1.0         | 1.0-41.7   |
| 平均値±標準偏差   | 3.84±1.94        | 20.13±9.97       | 4.66±2.22        | 48.69±15.94     | 14.24±6.58      | 2.43±2.96       | 0.40±0.33        | 7.93±13.74 |
| コーン系スナック菓子 | 0.1-4.0          | 17.0-43.2        | 2.4-8.9          | 35.9-77.0       | 2.1-29.7        | N.D.-2.7        | 0.3-0.7          | 0.3-10.9   |
| 平均値±標準偏差   | 1.12±0.87        | 29.32±9.77       | 4.89±1.72        | 47.54±11.59     | 13.52±9.99      | 0.76±0.91       | 0.47±0.11        | 2.58±2.82  |
| 小麦粉系スナック菓子 | 0.2-7.1          | 6.3-25.7         | 2.0-3.6          | 37.4-54.6       | 13.4-26.5       | 1.2-8.0         | 0.2-0.5          | 1.2-26.3   |
| 平均値±標準偏差   | 3.16±2.88        | 14.8±8.76        | 2.52±0.67        | 42.76±6.83      | 19.82±5.75      | 4.72±2.49       | 0.30±0.20        | 11.92±9.8  |
| 米系スナック菓子   | 0.1-0.4          | 8.4-17.3         | 1.6-2.9          | 39.8-53.0       | 19.2-37.4       | 1.2-7.2         | N.D.-0.7         | 1.8-5.5    |
| 平均値±標準偏差   | 0.26±0.30        | 13.94±3.69       | 2.14±0.55        | 45.96±6.23      | 29.52±8.24      | 4.16±2.74       | 0.48±0.28        | 3.54±1.63  |

2gの範囲で食塩量を示し、最高値はトウモロコシ系スナック菓子1試料に見られた3.1gであった。現在、成人に対して10g/day以下の食塩摂取が望ましいとされている<sup>11)</sup>。子供に対する適正な食塩一日摂取量は明確ではないが、この成人に対する努力目標を考慮すれば間食からの1~2gは無視しえないものと思われる。

ポテトチップ、スナック菓子などの油脂処理した食品については油脂の変敗は常に注意が喚起されるところである。現在、これら菓子類についての指導基準は酸価3、過酸化価30あるいは酸価5、過酸化価50を超えてはならないとされている<sup>12)</sup>。

本調査で酸価3を超えたものは見当らず、米系スナック菓子の1試料に見られた1.88が最高値であった。また過酸化価価ではファブリケートポテトチップの1試料において基準値30を超えた48.4を示したが、その酸価は0.8であり、指導要綱の適用には当てはまらなかった。

脂質の脂肪酸組成を表3に示す。

スナック菓子、ポテトチップには一般にナタネ油、米油、パーム油等を各種各様にブレンドし、使用している様である<sup>13)</sup>。本試料では殆んどの場合、パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸を主要脂肪酸としていたが、その構成比率パターンは7~8種類の異なったものが認められた。ただし、ポテトチップ、ファブリケートポテトチップではパルミチン酸、オレイン酸、リノール酸の比率が平均では各々24:41:30、40:44:8であり、この比率パターンは各々のポテトチップ類において試料間ではほぼ一定しており、これらポテトチップ類では各社ともほぼ同じ種類の油脂を使用していることを予想させる。

以上の様に本調査のポテトチップ、スナック菓子は油脂の変敗には問題はないものの、従来から指摘されるごとく高脂質、高カロリーの菓子であることを確認した。またある種のスナック菓子においては3%以上の比較的高食塩含有のもののあることも認めた。

従ってこれらポテトチップ、スナック菓子子供に間食として与える際にはその種類、量などにコントロールを加える必要があると思われる。またこれら食品については、適切な栄養指導を行う上から脂質、食塩含有量の表示を義務づけるべきと考える。さらに最近、食物から摂取する脂質の脂肪酸構成について、飽和、モノ不飽和、ポリ不飽和脂肪酸の比率が栄養学的に注意が払われており、菓子類を含めた加工食品については特に総脂質含有量とともに、脂肪酸構成の表示のあるのが望ましいと思われた。

要 約

市販ポテトチップ、スナック菓子60種について、脂質、蛋白質など一般成分を調べ、エネルギー量を算出し、さらに食塩含有量、脂肪酸組成についても検討し、これら菓子類の栄養学的考察を行った。また酸価、過酸化価についても調べた。その結果、下記のことを確認した。

1. ポテトチップ、ファブリケートポテトチップでは多くの試料が100g当り30g以上の脂質含有量を示した。トウモロコシ系スナック菓子では18試料中8試料が25g以上の脂質含有量を示し、その他のスナック菓子でも半数以上の試料が20g以上を示した。これに対して、蛋白質では多くの試料が4~6gの範囲の含有量であった。以上の様な高脂質含有量を反映し、これら菓子100gのエネルギー量はポテトチップ類、トウモロコシ系スナック菓子では多くの試料が500kcal以上を示した。またその他のスナック菓子でも1例を除き400kcal以上を示した。
  2. 食塩含有量では全試料を通じ、多くの試料が100g中1g前後から2gの範囲の含有量を示した。
  3. 酸価、過酸化価では全ての試料が食品衛生法の指導要綱に抵触しなかった。
  4. 脂質の脂肪酸構成は殆んどどの試料がパルミチン酸、オレイン酸、リノール酸を主要脂肪酸としていた。
- 謝辞 本調査遂行にあたり、試料収集にご協力いた

いた衛生局環境衛生部食品監視課各位に深謝致します。

(本研究は昭和56年度当研究所調査研究課題「不当表示食品の成分分析に関する研究」として実施し、その概要は第68回東京都衛生局学会1982年5月で発表した。)

#### 文 献

- 1) 朝日新聞：1981年2月17日朝刊
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法注解，178，1980，金原出版，東京
- 3) 日本薬学会編：*ibid*，177，1980
- 4) 日本薬学会編：*ibid*，153，1980
- 5) 日本薬学会編：*ibid*，139，1980
- 6) 日本薬学会編：*ibid*，62，1980
- 7) 日本薬学会編：*ibid*，186，1980
- 8) Folch, J., Lees, M. and Stanley, G. H. S.: J. Biol. Chem., **226**, 497, 1957
- 9) 日本薬学会編：衛生試験法注解，185，1980，金原出版，東京
- 10) 厚生省公衆衛生局栄養課：日本人の栄養所要量，34，1979
- 11) 厚生省公衆衛生局栄養課：*ibid*，105，1979
- 12) 昭和52年11月16日厚生省告示環食第249号
- 13) 湯木悦二：食の科学，No.44，49，1978

## 肝臓病治療食の脂肪酸組成

井口正雄\*, 菊谷典久\*, 友松俊夫\*, 道口正雄\*

二見大介\*\*, 米川郁毅\*\*

鶴見田鶴子\*\*, 鎌田敏夫\*\*, 窪田英夫\*\*\*

## Fatty Acid Composition of Lipids in Diets for Liver Disease Patients

MASAO IGUCHI\*, NORIHISA KIKUTANI\*, TOSHIO TOMOMATSU\*,

MASAO DOGUCHI\*, DAISUKE FUTAMI\*\*, YUKI YONEKAWA\*\*,

TAZUKO TSURUMI\*\*, TOSHIO KAMATA\*\* and HIDEO KUBOTA\*\*\*

**Keywords:** 脂肪酸 Fatty acid, 脂質 Lipid, 肝臓病患者 Liver disease patient, 食事 Diet

### 緒言

わが国の肝炎の多くは、ウイルス感染によるものであり、肝炎、あるいはこれに由来する肝臓病に対して有効な薬物療法は、現在ほとんどないといわれている<sup>1)</sup>。現状では、肝臓病の治療の基本は安静と食事療法であり、食事療法としては、高たんぱく、高カロリー食が古くから実施されている<sup>2)</sup>。肝臓病治療食のエネルギー、たんぱく質、脂質、糖質の摂取基準は、肝臓病の種類、病状により異なる。例えば急性肝炎の場合には、胆汁分泌が低下し、特に脂肪の消化力が落ちるため脂肪を制限する。慢性肝炎では、高たんぱく、高カロリー食とするが、場合によっては、肥満、脂肪肝を防止するために、脂肪を制限した食事が供される。このような制限下において摂取する脂肪であるだけに、その質ともいえる脂肪酸組成は脂質代謝の面から重要であると考えられる。そこで著者らは、これらの食事の献立内容と脂肪酸組成との関連を知る目的で、分析を行ない、検討したので報告する。

### 試料および実験方法

1. 試料 都内の3総合病院において、肝臓病患者に供される特別治療食(脂肪制限15~30g/日、常食常業)の主食および副食を試料とした。試料は、1980年7月の3日間にわたって調製された朝食、昼食および夕食の計27食を対象とした。

2. 脂質の抽出 各々の食事の主食および副食の1食分を合し、これに、1~2倍容の蒸留水を加え、ミキサーで混合し、均一なペースト状にした後、その200gを分

析試料とした。試料からの脂質の抽出は、AOAC法の残留農薬分析法<sup>3)</sup>に準じた。すなわち、試料に、エタノール150ml、エチルエーテル75mlを加えて、振とう後、更にヘキサン75mlを加えて振とうした。遠心分離後、水層を再び50mlヘキサノールエーテル混液(1:1)で2回抽出し、沈でんした固形物は、ヘキサノールエーテル混液(1:1)150mlで2回抽出し、全抽出液を合わせて、蒸留水および食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。有機溶媒をロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、溶媒を完全に留去したものを総脂質試料とした。これらは分析するまで、クロロホルムに溶解し、共栓バイアルびんに入れ、-25℃にて凍結保存した。

3. 脂肪酸の抽出およびメチルエステルの調製 試料から抽出した総脂質試料の一部を秤とり、常法<sup>3)</sup>により、けん化後、脂肪酸を抽出した。抽出した脂肪酸を三フッ化ホウ素-メタノール法<sup>4)</sup>により脂肪酸メチルエステルを調製した。

4. 脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラフィー 脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラフィーは、日立163型、水素炎イオン化検出器を用い、次の条件で実施した。カラム: 内径3mm、長さ3mガラスカラム。充てん剤: 5% Shinchrom E-71, Shimalite (Aw), 80-100メッシュ。カラム温度: 220℃。検出器温度: 250℃。試料注入部温度: 250℃。キャリアーガス(N<sub>2</sub>)流量: 40ml/min。水素ガス流量: 40ml/min。空気流量: 1l/min。試料注入量: 2~5μlであった。クロマトグラムの同定には、標準物質として、SERDARY RESEA-

\* 東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 東京都衛生局公衆衛生部保健栄養課

\*\*\* 東京都衛生局公衆衛生部

表 1. 肝臓病治療食の献立内容

| A 病院         |   |            |              | B 病院       |                |         |       | C 病院     |        |        |        |                 |         |        |    |        |    |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |
|--------------|---|------------|--------------|------------|----------------|---------|-------|----------|--------|--------|--------|-----------------|---------|--------|----|--------|----|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|-----------|---|---|---|---|---|
|              |   | 第 1 日      | 第 2 日        | 第 3 日      |                |         | 第 1 日 | 第 2 日    | 第 3 日  |        |        | 第 1 日           | 第 2 日   | 第 3 日  |    |        |    |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |
| 朝            | 食 | 米          | 飯            | 米          | 飯              | パ       | ン     | 米        | 飯      | 米      | 飯      | 米               | 飯       | 米      | 飯  |        |    |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |
|              |   | みそ汁(白菜)    | みそ汁(豆腐)      | ふ          | 煮              | つ       | け     | みそ汁(白菜)  | み      | そ      | 汁      | みそ汁(かぶ)         | みそ汁(豆腐) | み      | そ  | 汁      |    |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |
|              |   | ふ          | き            | 豆          | しらす干 20g       | 果物(ぶどう) | 魚     | 干        | 物      | (玉     | ね      | ぎ)              | 豆腐たきあわ  | み      | そ  | 汁      |    |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |
|              |   | 果物(ぶどう)    | つ            | く          | だ              | 煮       | オ     | レ        | ン      | ジ      | ユ      | ー               | ス       | せ      | (卵 | 25g)   | み  | そ   | 汁 |     |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |
| 野            | 沢 | 菜          | 漬            | 果物(プラム)    | きゅうり漬物         | 小松菜つけあ  | わ     | せ        | きゅうり漬物 | の      | り      | きゅうり漬物          | ヨーグルト   | ほうれんそう | ひ  | た      | し  |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |
|              |   |            |              |            |                | う       | ず     | ら        | 豆      | 煮      | つ      | く               | だ       | 煮      |    |        |    |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |
| 昼            | 食 | う          | ど            | ん          | 米              | 飯       | 米     | 飯        | パ      | ン      | 米      | 飯               | 米       | 飯      | 米  | 飯      | そ  | ば   |   |     |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |
|              |   | 蒸          | 魚            | (おひょう) 50g | ハンバーグ (鶏肉 40g) | 焼       | 魚     | (あこ      | う      | だ      | い)     | 50g             | 豆腐たきあわ  | 野      | 菜  | 煮      | 物  | 魚   |   |     |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |
|              |   | ほうれんそう     | 野            | 菜          | 煮              | 付       | か     | ぼ        | ち      | ゃ      | 煮      | 付               | 魚       | 照      | 焼  | き      | め  | だ   | い | 50g |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |
|              |   | ひたし        | 果物(グレープフルーツ) | 小松菜ひたし     | 果物(すいか)        | きゅうり漬物  | オ     | レ        | ン      | ジ      | ユ      | ー               | ス       | せ      | (ま | ぐ      | ろ) | 50g | 大 | 根   | つ | け | あ | わ | せ |   |   |           |   |   |   |   |   |
| そ            | ぼ | ろ          | 煮            | (鶏肉 10g)   | 白              | 菜       | 漬     | 物        | オ      | レ      | ン      | ジ               | ユ       | ー      | ス  | な      | す  | み   | そ | 煮   | フ | ル | ー | ツ | ポ | ン | チ | (もも・みかん缶) |   |   |   |   |   |
|              |   |            |              |            |                |         |       |          |        |        |        |                 |         |        |    |        |    |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |
| 夕            | 食 | 米          | 飯            | 米          | 飯              | 米       | 飯     | 米        | 飯      | 米      | 飯      | 米               | 飯       | 米      | 飯  | 米      | 飯  | 米   | 飯 |     |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |
|              |   | う          | ま            | 煮          | 魚              | み       | ぞ     | れ        | 煮      | 豆腐野菜あん | 豆腐よしの汁 | コーンスープ (鶏肉 10g) | みそ汁(白菜) | ポテトスープ | 焼  | 魚      | 蒸  | 魚   |   |     |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |
|              |   | 小松菜ひたし     | ほうれんそう       | と          | り              | 煮       | 付     | (鶏肉 20g) | み      | そ      | 汁      | (じゃがいも)         | きゅうり漬物  | 果      | 物  | (ネーブル) | い  | ん   | げ | ん   | ひ | た | し | 野 | 菜 | 煮 | 物 | フ         | ル | ー | ツ | ゼ | リ |
|              |   | 果物(マスクメロン) | す            | ま          | し              | 汁       | し     | ば        | 漬      |        |        |                 |         |        |    |        |    |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |
|              |   |            |              |            |                |         |       |          |        |        |        |                 |         |        |    |        |    |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |
| たんぱく質 (g)    |   | 55.5       | 61.4         | 55.9       | 59.9           |         | 68.8  | 72.3     | 66.0   |        | 63.0   | 62.4            |         |        |    |        |    |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |
| 脂 肪 (g)      |   | 15.0       | 19.9         | 15.7       | 33.0           |         | 19.9  | 30.9     | 18.8   |        | 26.3   | 23.0            |         |        |    |        |    |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |
| 糖 質 (g)      |   | 224.3      | 307.6        | 327.3      | 366.1          |         | 332.9 | 322.8    | 323.0  |        | 311.2  | 301.5           |         |        |    |        |    |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |
| エネルギー (kcal) |   | 1,619      | 1,517        | 1,650      | 2,063          |         | 1,816 | 1,925    | 1,736  |        | 1,749  | 1,743           |         |        |    |        |    |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |           |   |   |   |   |   |

表 2. 肝臓病治療食の脂肪酸組成

(%)

|       | 脂 肪 酸      | 第 1 日 |      |      | 第 2 日 |      |      | 第 3 日 |      |      |
|-------|------------|-------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|
|       |            | 朝     | 昼    | 夕    | 朝     | 昼    | 夕    | 朝     | 昼    | 夕    |
| A 病 院 | C14:0      | 1.5   | 1.9  | 1.4  | 1.6   | 1.4  | 4.0  | 6.9   | 7.9  | 1.1  |
|       | C16:0      | 18.3  | 16.2 | 23.9 | 16.4  | 24.4 | 25.8 | 23.6  | 19.1 | 17.0 |
|       | C18:0      | 7.8   | 4.6  | 7.9  | 7.2   | 7.0  | 4.9  | 8.9   | 5.6  | 4.5  |
|       | C18:1      | 19.3  | 7.6  | 27.2 | 19.0  | 42.6 | 14.2 | 27.4  | 18.8 | 14.7 |
|       | C18:2      | 39.8  | 9.7  | 16.3 | 47.1  | 16.7 | 25.8 | 16.5  | 8.2  | 42.4 |
|       | C18:3      | 4.7   | 0.9  | 3.0  | 1.7   | 1.3  | 15.0 | 0.5   | 1.5  | 6.9  |
|       | C20:0      | 0.2   |      | tr   | 0.6   | 0.7  | 0.3  | 1.5   |      | tr   |
|       | C20:1      |       |      | 0.4  |       |      | 0.1  | 5.2   | 8.9  | tr   |
|       | C20:2      |       |      |      | tr    |      | tr   |       |      |      |
|       | C20:3      |       |      |      | tr    |      |      |       |      |      |
|       | C20:4      | 3.9   | 11.8 | 0.7  | 2.8   | 0.4  | 2.7  |       | 0.7  | 1.5  |
|       | C20:5+22:0 |       |      |      | 0.8   | 0.2  | 1.2  | 1.8   |      |      |
|       | C22:1      |       | 15.0 | 12.8 |       | 0.1  | 0.1  | 2.3   | 7.8  |      |
|       | others     | 4.4   | 32.3 | 6.2  | 2.8   | 5.1  | 5.8  | 5.4   | 21.4 | 11.8 |
| B 病 院 | C14:0      | 5.2   | 1.1  | 1.8  | 1.3   | 9.4  | 1.2  | 1.4   | 8.7  | 2.4  |
|       | C16:0      | 22.5  | 13.0 | 24.3 | 27.3  | 29.4 | 15.9 | 10.8  | 27.2 | 24.4 |
|       | C18:0      | 8.0   | 5.1  | 6.5  | 8.8   | 9.6  | 6.8  | 3.4   | 10.8 | 6.8  |
|       | C18:1      | 21.8  | 34.8 | 26.1 | 26.4  | 22.2 | 29.0 | 20.7  | 30.0 | 23.3 |
|       | C18:2      | 12.2  | 32.5 | 27.3 | 18.5  | 16.7 | 27.0 | 24.1  | 11.4 | 26.0 |
|       | C18:3      | 3.9   | 6.9  | 4.2  | 1.8   | 2.8  | 5.3  | 6.1   | 2.7  | 3.2  |
|       | C20:0      |       | 0.8  | 0.5  |       | 0.2  | tr   | 0.2   | 0.2  | 0.3  |
|       | C20:1      | 2.3   | 2.0  |      |       | 2.5  | 0.7  | 0.5   | 1.6  | 0.4  |
|       | C20:2      |       | 0.3  |      |       |      |      | tr    | 0.2  | tr   |
|       | C20:3      |       | tr   |      |       | tr   |      | tr    | tr   | tr   |
|       | C20:4      | 0.2   | tr   | 4.4  | 2.2   | 0.7  | 1.9  | 1.4   | 0.7  | 1.7  |
|       | C20:5+22:0 | 3.6   | 0.7  | 0.2  | 0.6   | 0.6  | 0.6  |       | 0.6  | 0.5  |
|       | C22:1      | 0.9   | 1.2  | 0.9  |       | 1.4  | 0.6  |       | 0.5  |      |
|       | others     | 19.4  | 1.5  | 3.7  | 13.2  | 4.4  | 11.0 | 31.3  | 5.3  | 10.8 |
| C 病 院 | C14:0      | 7.8   | 7.4  | 1.8  | 9.9   | 0.4  | 1.9  | 4.9   | 2.0  | 2.5  |
|       | C16:0      | 27.5  | 22.7 | 27.0 | 25.8  | 12.9 | 20.5 | 20.4  | 26.5 | 25.9 |
|       | C18:0      | 6.4   | 9.9  | 3.0  | 6.5   | 5.6  | 6.5  | 8.3   | 11.0 | 6.3  |
|       | C18:1      | 10.6  | 35.6 | 9.9  | 23.6  | 14.3 | 17.4 | 21.3  | 24.5 | 33.7 |
|       | C18:2      | 23.4  | 5.5  | 32.3 | 20.0  | 55.4 | 32.3 | 37.2  | 14.0 | 3.8  |
|       | C18:3      | 4.5   | 0.7  | 15.9 | 3.5   | 8.5  | 10.4 | 5.7   | 0.6  | 1.3  |
|       | C20:0      |       | tr   | 1.0  | 0.6   | 0.6  | 0.3  | 0.3   | tr   | tr   |
|       | C20:1      |       | 2.3  |      | 0.4   | tr   | 0.4  | tr    | tr   | 2.1  |
|       | C20:2      | tr    | 0.2  |      | 0.2   |      | 0.1  |       |      | tr   |
|       | C20:3      | 0.3   | tr   |      |       | tr   |      |       |      | 0.5  |
|       | C20:4      | 3.3   | 2.8  | 1.8  | 2.3   | tr   | 0.8  |       | 18.1 | 0.9  |
|       | C20:5+22:0 |       | 2.1  |      | 0.3   | 0.6  | 1.3  | 0.1   |      | 3.2  |
|       | C22:1      |       |      |      | 0.2   |      | 0.2  |       |      | 0.2  |
|       | others     | 16.2  | 10.6 | 7.2  | 6.8   | 1.5  | 8.0  | 1.7   | 3.3  | 19.3 |

tr: &lt;0.1%



RCH LABORATORIES 社の D-98, D-104 を用いた。また 20:4 は SIGMA 社のアラキドン酸メチルエステル (A-6507), 20:5 は 5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸メチルエステル (和光純薬), 22:6 は 魚肉 (マグロ, カジキ) の脂肪酸メチルエステルとの比較によって同定した。それ以外のピークについては ECL (Equivalent Chain Length) 値から推定した。また使用した試薬は試薬特級を用いた。

#### 結果および考察

病院 A, B, C の献立内容を表 1 に示した。また各々の食事について実施した脂肪酸組成の測定結果を表 2 に示した。また脂質の評価をするための指標として、飽和脂肪酸 (以下 S と略す), モノ不飽和脂肪酸 (以下 M と略す), 多価不飽和脂肪酸 (以下 P と略す) の構成比と, 抽出脂質量を図 1 に示した。

表 1 に示したように, 献立内容は, 脂肪制限のために, 調理の際に油脂を使用しないものが多くを占めている。主食は米飯が中心であり, 副食にみそ汁, 野菜, 果実など植物性食品が多く, 魚類, 肉類は 3 食に 1 食程度が使われている。それも魚類は白身の魚が多く, 肉類は鶏肉の手羽肉のみが使われている。

これらの食事の脂肪酸組成 (表 2) は, 全体を通じて, 16:0, 18:1, 18:2 が高い値を示した。その範囲は 16:0 が 10.8~29.4%, 18:1 は 7.6~42.6%, 18:2 は 1.3~55.4% であった。また, 次いで高い値が多かったのは 14:0 (1.1~9.9%), 18:0 (3.0~11.0%), 18:3 (0.5~15.9%) であった。これら 6 種の脂肪酸が主たる構成脂肪酸であった。20:0, 20:1, 20:2, 20:3 は全体に低い値を示した。20:4, 20:5 は, 献立

中で魚由来の脂肪が優位を占める場合は高い値を示す傾向にあった。この場合 22:6 以上の長鎖脂肪酸も認められた。

食事の中の脂肪の栄養評価をする場合, エネルギー源としての量的な面と, 生理作用に関する質的な面がある。後者を表わす指標の一つとして, 米国上院の「栄養および人間ニーズに関する特別委員会」が提案した「米国の食事目標 (改訂 2 版)<sup>9)</sup>」がある。それによると, 食事から摂る総エネルギーの 30% 以下を脂肪に依存するようにし, そのうち, S を 10% 以下, P を同じく 10%, 残余を M とすべきであるとしている。つまり S:M:P を 1:1:1 に近づけるようにするということである。また日本においては, 脂肪摂取量を考慮して, 不飽和脂肪酸 (以下 UNS と略す) と S の比 2:1 を目標とするが, 少なくとも 1:1 より低下させないことが望ましい<sup>10)</sup>とされている。またこれ以外に, P と S の比, Keys らの 2 S-P 値があげられる。P の生物学的作用として, 成長促進, 毛の発育の効果などがあるといわれる。またコレステロール代謝の調節作用もあるといわれるが未だ判然としていない。更にビタミン E の必要量との関連性もあり, 未知の部分が多いが, 兼松ら<sup>7)</sup>がマーガリンの評価に P/S 値を指標として用い, 0.7 以上が望ましいとしているので, ここでは, この値をめやすとした。また P のうち, 必須脂肪酸である 18:2 の含量についても注目した。

これらの指標をもとに, 各々の献立内容と構成脂肪酸との関連について, 抽出脂質量の多い順から検討した (図 1)。B 病院の第 1 日の昼食 (以下 B-1 (昼) と略す) は全食事中, 脂質量が最も高い値を示した。献立に

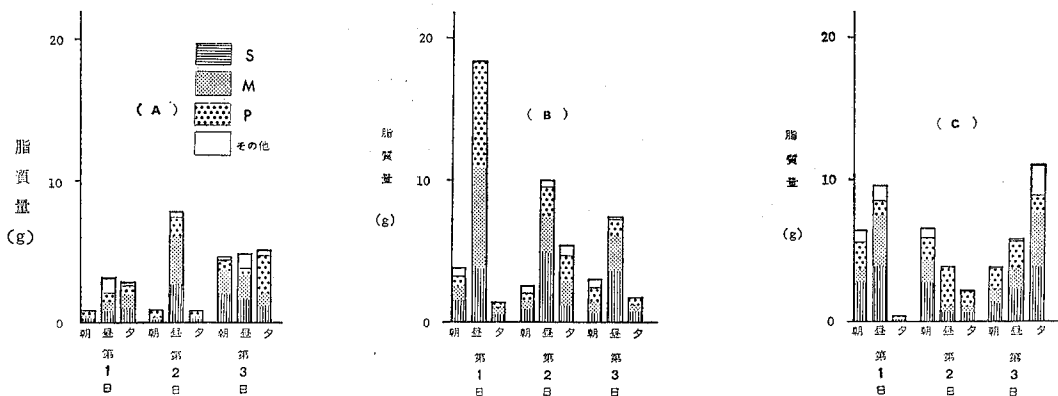


図 1. 食事の中の脂質量および脂肪酸組成  
S 飽和脂肪酸 M モノ不飽和脂肪酸 P 多価不飽和脂肪酸

は、サラダ油を含めて、11gの植物油が使用されている。SMP比は1.0:1.9:2.0, UNS/S, P/Sはそれぞれ3.9および1.99で、Sに比べ、M, Pが高い値を示した。1食中から摂取する脂肪の約半分をサラダのみで占めていることになる。18:2の比率も高く、エネルギーも高いので、患者の油ものに対する食欲がでてくる回復期などに用いれば、効果的な献立であろう。ついで脂質量が比較的高い献立は、A-2(昼), B-2(昼), B-3(昼), C-1(昼), C-3(夕)であった。A-2(昼)をのぞいて、魚が40~70g用いられているが、1食中の脂肪のうち、魚に由来する脂肪が優位を占め、次いで米飯が続いている。これらのSMP比はそれぞれ1.0:1.3:0.6, 1.0:0.5:0.4, 1.0:0.7:0.3, 1.0:0.3:0.8, 1.0:1.0:0.2であり、その他のピークを考慮にいれても、Pの値は、魚油のPの文献値に比べかなり下回っていた。またUNS/Sは、それぞれ1.8, 1.0, 1.0, 1.2, 1.2でP/Sは0.17~0.50の範囲にあった。A-2(昼)は、ちょうど副食の魚が鶏肉(手羽肉)に入れかわった献立といえるが、Mの値が、魚の献立に比べ高い値であった。病院A, Bで使用された鶏肉はすべて手羽肉である。価格を考慮しなければ、SMP比、たんばく含量からみて、白身の魚の方が適当な材料と思われる。次に献立内容の副食にしばしば豆腐が使用されている。豆腐の脂肪含量は3~5%であるが、米飯、みそ汁、野菜と組みあわせた献立では、豆腐由来の脂肪が優位を占めている。A-3(夕), C-1(朝), C-2(昼), C-3(朝)がそれにあたる。これらのSMP比は、それぞれ、1.0:0.7:2.2, 1.0:0.3:0.8, 1.0:0.7:3.3, 1.0:0.6:1.3でMは0.3~0.7と低く、Pは0.8~3.3と高い値を示した。C-2(昼)の食事では18:2が55.4%と全食事中最も高い値であった。豆腐は必須脂肪酸である18:2の良好な給源となり得る。

以上、食事の脂質の脂肪酸組成と献立内容との関連について、指標をもとに検討した。3病院の食事全体をとおしてみると、UNS/S値はいずれも1.0以上であり、指標の基準を満たしていた。1.0~2.0の範囲の食事が最も多く、27食中18食(67%)で、2.0以上は9食(33%)

であった。またP/S値についてみると、0.7未満が11食(41%), 0.7以上は16食(59%)であった。またこれらのうち2.0以上の高い値を示したものは4食あり、そのうち3食については、その脂肪酸組成は18:2が42.4%~55.4%と高かった。

脂肪酸組成と同時に、1食あたりの脂質量の測定も行った。その結果、測定値と個々の原材料について食品成分表から計算した値とは必ずしも一致しなかった。この原因としては、食品成分表の値は、未調理の原材料のそれであること、またそれらは、平均値であること、調理方法によっては調理器具に付着するロスがあること、分析時の抽出効率によることなどが考えられる。実際の食事献立は食品成分表に基づいて計算、作製されるが、計算値必ずしも実体を反映しないことを認識しておくべきである。

謝辞 終りにあたって、食事提供に御協力いただいた病院の各位に感謝いたします。

(なお、本報告は、第35回日本栄養食糧学会総会で口頭発表した一部である。)

#### 文 献

- 1) 堺崎清人：食の科学, 53, 88, 1980
- 2) Official methods of the A. O. A. C., 12th Ed., Ed. William Horwitz, 523, 1975, Association of Official Analytical Chemists, Washington
- 3) 日本薬学会編：衛生試験法注解, 113, 1973, 金原出版
- 4) 日本油化学協会：基準油脂分析試験法, 2. 4. 20. 2-77, 1977
- 5) Select Committee on Nutrition and Human Needs United States Senate: Dietary Goals for the United States, 2nd Ed., 1977, U. S. Government printing office, Washington
- 6) 厚生省公衆衛生局栄養課編：昭和54年改定日本人の栄養所要量, 51, 1979, 第一出版
- 7) 兼松 弘, 木下葉子, 丸山武紀, 新谷 勲：栄養と食糧, 33, 423, 1980

## 市販離乳食中のリジノアラニンの分析

菊谷典久\*, 井口正雄\*, 友松俊夫\*, 道口正雄\*

### The Determination of Lysinoalanine in Commercial Baby Foods

NORIHISA KIKUTANI\*, MASAO IGUCHI\*, TOSHIO TOMOMATSU\*  
and MASAO DOGUCHI\*

A study was made to determine lysinoalanine, an unusual amino acid yielded during food processing and implicated as a renal toxic factor, in 9 commercial baby foods from 3 manufacturers. Lysinoalanine liberated from protein by acid hydrolysis was separated on a high pressure cation exchange column with sodium citrate buffer system. The ninhydrin reaction was used for the detection of lysinoalanine by a photometer (570nm).

Lysinoalanine was found in all the samples tested. The content was shown to be within the range of 370 to 1190  $\mu\text{g/g}$  protein, and the average at 830  $\mu\text{g/g}$  protein.

**Keywords :** lysinoalanine, unusual amino acid, commercial baby food, renal toxic factor

#### 緒言

リジノアラニン [ $\text{N}^6$ -(DL-2-amino-2-carboxyethyl)-L-lysine] (以下 LAL と略す) は, 1964年, Bohak<sup>1)</sup>, Patchornik ら<sup>2)</sup>が, ウシ脾臓リボヌクレアーゼのアルカリ処理による変化を研究中, 初めて発見されたもので, Fig. 1 のような構造をもつ非通常型アミノ酸である。

これは, タンパク質中のリジン残基の  $\epsilon$  位のアミノ基が, セリンあるいはシステイン残基の  $\beta$  脱離反応によって生じた, デヒドロアラニン残基の二重結合と反応するために生ずると考えられている<sup>3)</sup>。

食品中の LAL については, De Groot ら<sup>4)</sup>が, 大豆タンパク質のアルカリ処理による生成を報告しているが, 1975年, Sternberg ら<sup>5)</sup>は, LAL の生成が, 食品の加熱によっても引き起こされることを示し, 改めて, その存在が広く各種食品にわたっていることを世に知らしめた。

LAL の生成は, タンパク質中のシステインやリジンの減少を伴うため, タンパク質の利用効率を低下させる一方, LAL それ自体が, 生体にとって有害な作用を与えることが知られている。即ち, Woodard ら<sup>6)</sup>は, 離乳期のラットにアルカリ処理した大豆タンパク質を投与すると, 腎管細胞の肥大化 (Renal Cytomegalia) が生じ, その原因が LAL であることを報告している。また, LAL そのものと, タンパク結合型 LAL では, 腎毒性

は前者が著しいこと<sup>7)</sup>, LAL 高濃度飼料を与えられたラットから生まれた新生児に, 発育不良が見られること<sup>8)</sup>, なども報告されている。

従来, 我々は, 加工過程によって生じる食品の栄養価低下および安全性の検討を行ってきたが, 今回, 以上述べたように種々の作用をもつ LAL に注目し, 市販乳幼児用離乳食中の含有量の分析を行った。以下, これらの結果を報告する。

#### 実験方法

##### 1. 試料

国内におけるシェアが高い, 3 メーカー, 9 品目の離乳食を供試した。

A 社ベビーフード: 「牛肉野菜」, 「レバー野菜」, 「鶏肉野菜」。

B 社ベビーフード: 「牛肉野菜」, 「レバー野菜」, 「鶏肉野菜」, 「魚野菜」。

C 社ベビーフード: 「レバー野菜」, 「鶏肉野菜」。

なお, A 社の製品は純国産品, B 社の製品は外国のライセンスによる国内生産品, C 社の製品は輸入品 (原産国・米国) である。

##### 2. 試薬

LAL 標準品: Finley らの方法<sup>9)</sup>により合成を行ったものを使用した。

試料の加水分解には, 精密分析用定沸点塩酸 (和光純

\* 東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

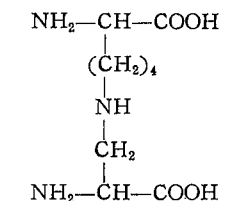


Fig. 1. Lysinoalanine

薬K. K.) を用いた。アミノ酸自動分析用緩衝液は、テクノバッファーRHシリーズ (Techno Chemical Corp.) を用いたが、一部自製の緩衝液については、和光純薬K. K. 製のアミノ酸自動分析用試薬、同試薬特級品を用いた。他の試薬については、すべて試薬特級品を用いた。

### 3. LALの分析

**試料調製：**試料は凍結乾燥後、細砕し、均一な状態にした。加水分解は、タンパク質約20mgに相当する量を秤取し、6N-塩酸を加え、110℃で24時間行った。6N-塩酸の量は、上記タンパク量の200倍とした。なお、加水分解中の酸化などの副反応を防ぐため、試料は、ロータリー真空ポンプおよびドライアイス・エタノール冷却トラップを用いて脱気 (約 $3 \times 10^{-2}$  mmHg)、封管後に加熱した。加水分解終了後、試料溶液は定容後ろ過し、その一定量を蒸発乾固したものを0.02N-塩酸で溶解し、LAL分析試料溶液とした。

**アミノ酸分析：**日立835形高速アミノ酸分析計を使用した。諸条件は以下のとおりである。カラム：4.0 (I. D.) $\times$ 150 [mm]、温度58℃、アンモニアフィルターカラム併用。樹脂：日立カスタマイオン交換樹脂 #2619。溶

出緩衝液：テクノバッファーRH-1, 2, 3, 4 および、0.35MNa, pH6.2 クエン酸—クエン酸ナトリウム緩衝液。

フェニルアラニンとヒスチジンの間を離し、その間にLALを溶出させる目的で、上記緩衝液系を使用した。また、他の通常型アミノ酸は、LALに比し、極めて高濃度に存在するところから、試料の分析にあたっては、ニンヒドリンはLAL溶出時間に合わせて反応させた。分析は1サイクル140分で行った。

### 4. タンパク量の測定

凍結乾燥を行った試料について、セミマイクロゲルダール法<sup>9)</sup>により総窒素を測定し、窒素係数を6.25としてタンパク量を求めた。

## 結 果

1. LALおよび各種通常型アミノ酸標準のクロマトグラムをFig. 2に示す。LALピークの前後の間隔を広くとり、試料分析時、ニンヒドリンポンプの途中入力においても、ベースラインの安定性が保たれるように条件を設定した。なお、今回使用の緩衝液系では、通常の場合とは異なり、塩基性アミノ酸の溶出順序は一部逆転している。

2. 離乳食の加水分解試料のクロマトグラムの1例をFig. 3に示す。LALの分離は良好であるが、ニンヒドリン反応物質が他に多く含まれていることが認められた。

3. 3メーカー、9品目の離乳食について、LAL含有量の分析結果をTable 1に示す。結果は、各品目単位重量比およびセミマイクロゲルダール法により求めたタン

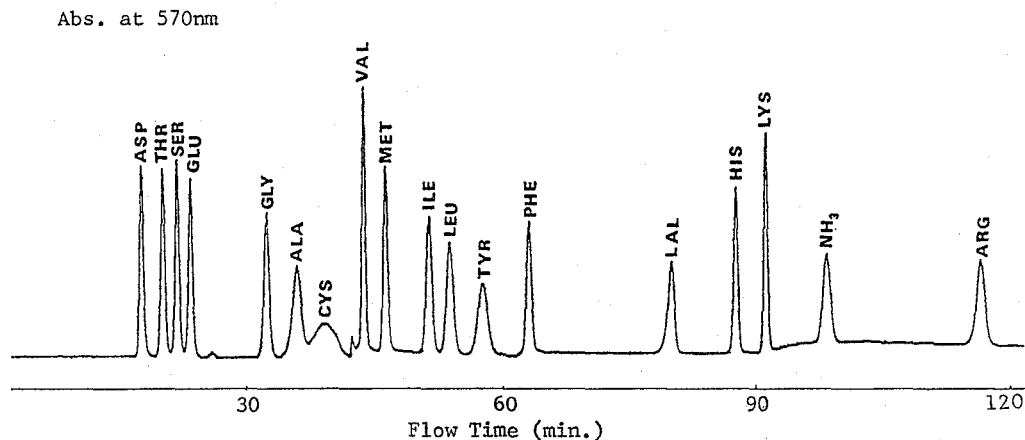


Fig. 2. Amino Acid Chromatogram of Standard Solution

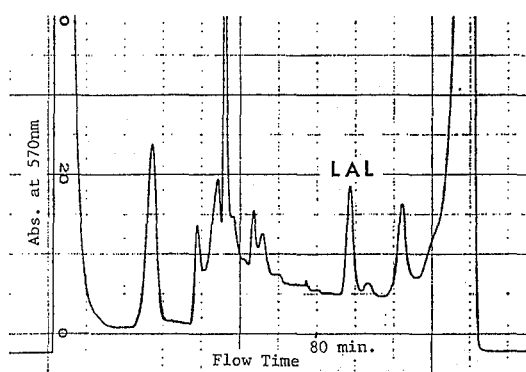


Fig. 3. Amino Acid Chromatogram of Hydrolyzed Baby Food

バク質の単位重量比で表わしている。品目別では、各メーカーとも、「鶏肉野菜」が比較的低含有量であった。また、メーカー別では、A、B両社の製品は、それぞれほぼ一定レベルの値を示した。なおA社3品目およびB社の同品目について比較したところ、その平均値は、それぞれ620, 1080  $\mu\text{g/g}$  protein となり、両者には有意の差 ( $P < 0.01$ ) が見いだされた。

#### 考 察

1. LAL の分析法については、ガスクロマトグラフィーによる方法<sup>10)</sup>、イオン交換クロマトグラフィーによる方法<sup>2, 3)</sup>、電気泳動による方法<sup>11)</sup>、薄層クロマトグラフィーによる方法<sup>12)</sup>、などが報告されている。最近では、その迅速性、再現性などの点から、イオン交換クロマトグラフィーを応用したアミノ酸自動分析機の使用が一般的となってきた。この場合、加水分解試料の分析にあたっては、通常型アミノ酸が LAL に比べ、極めて高濃度に存在することが問題となる。LAL 区分以外をドレインに導く方法<sup>13)</sup>もあるが、今回、我々はニンヒドリン送液ポンプを LAL 区分にだけ作動させることで、その解決を図り、良好な結果を得た。

2. Fig. 3 に見られるように、一般に食品の酸加水分解物は、数多くのニンヒドリン反応物質を含んでいる。ニンヒドリン反応物質については、アミノ酸類に加え、各種アミノ糖類の存在なども広く知られているが、今回の実験では、それらの同定は行わなかった。

3. タンパク質中における LAL の形成は、アルカリ処理および加熱処理により促進される。Sternberg ら<sup>4)</sup>は、アルカリ処理により製造されるカゼインナトリウムでは、製品によっては LAL が 6,900  $\mu\text{g/g}$  protein に

Table 1. Content of Lysinoalanine (LAL) in Baby Food

| Manu-<br>facturer | Baby Food            | $\mu\text{g}$ LAL/g<br>Sample | $\mu\text{g}$ LAL/g<br>Protein |
|-------------------|----------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| A                 | Beef & Vegetables    | 20                            | 690                            |
|                   | Liver & Vegetables   | 20                            | 620                            |
|                   | Chicken & Vegetables | 15                            | 560                            |
| B                 | Beef & Vegetables    | 60                            | 980                            |
|                   | Liver & Vegetables   | 85                            | 1190                           |
|                   | Chicken & Vegetables | 70                            | 1080                           |
|                   | Halibut & Vegetables | 40                            | 1000                           |
| C                 | Liver & Vegetables   | 30                            | 950                            |
|                   | Chicken & Vegetables | 10                            | 370                            |

達すること、また、卵白を用いた実験では、150℃、10分の加熱で 350  $\mu\text{g/g}$  protein、同温度、30分では 1,100  $\mu\text{g/g}$  protein に LAL が増加することを報告している。

今回の実験では、総平均で 830  $\mu\text{g/g}$  protein の LAL が検出された。これは、ビン詰め、カン詰め食品については、殺菌のための加熱は不可欠であり、また離乳食では調理の加熱もあるところから、LAL 生成が促進されたものと考えられる。

A、B両メーカーの製品の差については、加工プロセスにおける加熱条件が、B社の方がより苛酷なためである可能性が考えられる。

品目別では、「鶏肉野菜」が、他に比べて比較的低い数値を示した。原材料としての肉類の比較では、鶏肉は牛肉、牛レバーに比べ、リジン含量は多く、またセリン、シスチン含量には大きい差はない<sup>14)</sup>。このため、材料面よりも調理過程の諸条件の違いが LAL 量に影響していると推察される。

謝辞 LAL 標準品の合成にあたり、多大なる御助力をいただいた東京大学薬学部・太田敏晴博士に深謝します。

(本研究は昭和56年度当研究所調査研究課題「加工過程によって生じる食品の栄養価低下に関する研究」として実施したものである。)

#### 文 献

- 1) Bohak, Z.: *J. Biol. Chem.*, 239, 2878, 1964
- 2) Patchornik, A.: *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 1860, 1964
- 3) De Groot, A. P. and Slump, P.: *J. Nutrition*, 98, 45, 1969

- 4) Sternberg, M., Kim, C. Y. and Schwende, F. J.  
: *Science*, 190, 992, 1975
- 5) Woodard, J. C. and Short, D. D.: *J. Nutrition*,  
103, 569, 1973
- 6) De Groot, A. P., Slump, P., Feron, V. J. and  
Van Beek, L.: *J. Nutrition*, 106, 1527, 1976
- 7) Struthers, B. J., Hopkins, D. T., Prescher, E. E.  
and Dahlgren, R. R.: *J. Nutrition*, 108, 954,  
1978
- 8) Finley, J. W. and Snow, J. T.: *J. Agric. Food  
Chem.*, 25, 1421, 1977
- 9) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，153，1980，金  
原出版
- 10) Tajima, M., Tadokoro, S., Suzuki, T., Shinoda,  
K., Kitano, T., Tsuchiya, K. and Fukushima,  
H.: *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1949, 1978
- 11) Asquith, R. S. and Carthew, P.: *Biochim.  
Biophys. Acta*, 278, 8, 1972
- 12) Sternberg, M., Kim, C. Y. and Plunkett, R. A.:  
*J. Food Science*, 40, 1168, 1975
- 13) Murase, M.: *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 54,  
13, 1980
- 14) 科学技術庁・資源調査会編：日本食品アミノ酸組成  
表，1975，大蔵省印刷局

フッ素の衛生学的研究 (第5報) フッ素投与下における組織中の Ca および P について

友松 俊夫\*, 道口 正雄\*

Hygienic Study on Fluoride (V)

Retention of Calcium and Phosphorus in Tissues under Influence of Fluoride

TOSHIO TOMOMATSU\* and MASAO DOGUCHI\*

Previous study has shown that elevated intake of fluoride (F) by weanling male rats resulted in a remarkable accumulation of F in the brain, heart, thymus, kidney, testis, adrenal and femur.

This work describes relationship between fluoride accumulation and calcium (Ca) and phosphorus (P) concentrations in similar organs and tissues. Ca and P contents in the organs and tissues of the Wistar strain rats receiving 50 mg% F in diet for 30 days were determined and compared with those of controls.

The results were as follows:

1. Ca, P and Ash increased in the adrenal.
2. Ca and P decreased, but Ash remained unchanged in the brain.
3. Ca decreased, although P and Ash increased in the kidney.
4. Ca decreased, but P and Ash remained in the spleen and muscle.
5. Ca and Ash decreased, but P remained unchanged in the tendon.

It is presumed that the excessive oral dose of fluoride to rats induces adrenal calcification, and blood-brain barrier is responsible for decrease in Ca and P concentration in the brain of F treated rats.

**Keywords:** fluoride, mineral accumulation, calcium, phosphorus, rat, calcification, blood-brain barrier

フッ素中毒症としての斑状歯には年齢依存性があることから、その発症に関しては、歯芽に対するフッ素の直接的作用のみでは理解し難く、無機質代謝に影響を与える、より間接的な因子が介在すると考えられる。前回、ラットに対してフッ素添加飼料を与え、無機質平衡ならびに臓器等へのフッ素の蓄積を調査したところ、フッ素の影響によって、経口摂取された無機質の体内保持が、はじめは阻害されたが、後に促進されるようになった。即ち、フッ素の生体に与える影響が、互いに相反する効果を及ぼすように経時的に変化することが判明した。また、これらラットの臓器および組織のあるものに、特異的にフッ素が蓄積されることを知った。これらの臓器類中に無機質代謝に関係が深いと思われる胸腺<sup>1)</sup>、副腎および腎臓が含まれており、フッ素の蓄積と平行して、石灰化<sup>2)</sup>のような変性が生じている疑いもたれた。

そこで今回は、フッ素の影響下における臓器の石灰化を調査する目的で、前回と同様の条件で飼育したラット

の臓器および組織中の灰分、カルシウムおよびリンを測定し、臓器石灰化の可能性について検討したので報告する。

実験方法

被験動物、飼育条件、飼料および分析用試料の採取方法、カルシウム(以下 Ca と略す)ならびにリン(以下 P と略す)の分析方法は前報<sup>3)</sup>の通りである。但し、被験動物数は、前回ではフッ素(以下 F と略す)投与群(以下 F 群と略す)および対照群(以下 C 群と略す)ともに、各々 6 匹 1 群であったが、今回は各々 3 匹 1 群とした。また前回使用したステンレス製個別採尿ケージを、オーラルガラス製メタボリズムケージに換えた。

実験結果

臓器および組織中の水分、灰分、Ca および P、脳、心臓、胸腺、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、睪丸、筋肉、腱および大腿骨の試料重量ならびに、水分、灰分、Ca および P 含有率を表 1 に示す。但し、灰分、Ca およ

\* 東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Sample Weight, and Water, Ash, Calcium and Phosphorus Concentration of Organs and Tissues

|         |   | Fresh, g.  | Dry, g.    | Water, %   | Ash, %     | Ca, ppm    | P, %       |
|---------|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Brain   | F | 1.77±0.03  | 0.37±0.01  | 78.9±0.7   | 6.44±0.05  | 288±36     | 1.43±0.02  |
|         | C | 1.91±0.04  | 0.41±0.01  | 78.6±0.7   | 6.48±0.13  | 562±143    | 1.49±0.02  |
|         |   | F<C P<0.10 | F<C P<0.10 | N. S.      | N. S.      | F<C P<0.20 | F<C P<0.20 |
| Heart   | F | 0.47±0.02  | 0.09±0.01  | 81.2±2.0   | 7.48±1.60  | 339±135    | 1.32±0.26  |
|         | C | 0.54±0.03  | 0.11±0.01  | 79.4±2.7   | 8.21±2.50  | 324±129    | 1.52±0.50  |
|         |   | F<C P<0.20 | F<C P<0.20 | N. S.      | N. S.      | N. S.      | N. S.      |
| Thymus  | F | 0.34±0.01  | 0.07±0.00  | 78.9±0.4   | 10.01±0.70 | 146±38     | 2.26±0.04  |
|         | C | 0.41±0.01  | 0.09±0.00  | 78.6±1.1   | 9.56±0.44  | 235±35     | 2.28±0.04  |
|         |   | F<C P<0.01 | F<C P<0.01 | N. S.      | N. S.      | N. S.      | N. S.      |
| Lung    | F | 0.95±0.01  | 0.20±0.01  | 79.4±0.4   | 5.29±0.09  | 332±51     | 0.94±0.05  |
|         | C | 0.90±0.04  | 0.17±0.02  | 81.5±2.1   | 5.82±0.34  | 384±40     | 1.05±0.04  |
|         |   | N. S.      | N. S.      | N. S.      | N. S.      | N. S.      | N. S.      |
| Liver   | F | 5.69±0.34  | 1.61±0.31  | 71.7±1.2   | 5.09±0.17  | 164±18     | 0.25±0.01  |
|         | C | 6.37±0.26  | 1.91±0.06  | 69.9±2.2   | 4.79±0.01  | 166±4      | 0.24±0.01  |
|         |   | N. S.      | N. S.      | N. S.      | F>C P<0.20 | N. S.      | N. S.      |
| Spleen  | F | 0.39±0.01  | 0.10±0.01  | 75.2±2.5   | 6.64±0.96  | 260±39     | 1.40±0.09  |
|         | C | 0.44±0.03  | 0.10±0.01  | 77.1±2.0   | 10.94±3.32 | 442±94     | 2.36±0.70  |
|         |   | N. S.      | N. S.      | N. S.      | N. S.      | F<C P<0.20 | N. S.      |
| Kidney  | F | 1.60±0.11  | 0.30±0.02  | 81.1±0.3   | 6.42±0.04  | 316±16     | 1.30±0.01  |
|         | C | 1.36±0.11  | 0.31±0.02  | 67.5±5.6   | 5.72±0.13  | 577±114    | 1.24±0.03  |
|         |   | N. S.      | N. S.      | F>C P<0.20 | F>C P<0.02 | F<C P<0.20 | F>C P<0.02 |
| Adrenal | F | 32.3±1.4*  | 8.5±1.0*   | 73.6±0.7   | 7.89       | 520        | 1.15       |
|         | C | 40.7±1.0*  | 12.7±1.1*  | 68.5±3.6   | 6.40       | 134        | 0.87       |
|         |   | F<C P<0.02 | F<C P<0.05 | N. S.      | F>C        | F>C        | F>C        |
| Testis  | F | 2.41±0.04  | 0.32±0.00  | 86.6±0.2   | 7.80±0.15  | 246±21     | 1.49±0.03  |
|         | C | 2.62±0.23  | 0.35±0.01  | 86.5±1.1   | 8.06±0.11  | 241±24     | 1.50±0.04  |
|         |   | F<C P<0.20 | F<C P<0.20 | N. S.      | N. S.      | N. S.      | N. S.      |
| Muscle  | F | 1.25±0.49  | 0.33±0.12  | 72.9±2.0   | 5.15±0.18  | 644±27     | 0.80±0.02  |
|         | C | 1.48±0.31  | 0.37±0.07  | 74.1±1.0   | 5.10±0.06  | 725±29     | 0.83±0.02  |
|         |   | —          | —          | N. S.      | N. S.      | F<C P<0.20 | N. S.      |
| Tendon  | F | 0.47±0.14  | 0.20±0.04  | 53.3±6.7   | 2.98±0.15  | 317±33     | 0.51±0.05  |
|         | C | 0.33±0.04  | 0.14±0.03  | 59.4±3.7   | 4.00±0.03  | 497±79     | 0.51±0.05  |
|         |   | —          | —          | N. S.      | F<C P<0.01 | F<C P<0.20 | N. S.      |
| Femur   | F | 0.96±0.02  | 0.28±0.01  | 59.2±0.6   | 56.0±0.3   | 21.5±0.4** | 10.3±0.1   |
|         | C | 0.53±0.05  | 0.21±0.02  | 59.9±0.8   | 61.8±2.3   | 22.7±1.0** | 10.0±0.8   |
|         |   | F>C P<0.10 | F>C P<0.10 | N. S.      | F<C P<0.10 | N. S.      | N. S.      |

F designate fluoride fed group and C, control.

Values represent the Mean±SE. \*: mg, \*\*: %.

Mineral concentration of adrenal shows the concentration in the samples prepared by mixing 3 adrenals from experimental animals



Table 2. Comparison of statistically significant difference in mineral content of Organs and Tissues between fluoride fed group and control group.

| Minerals | Brain      | Heart      | Thymus      | Lung       | Liver      | Spleen      |
|----------|------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|
| F*       | F>C P<0.20 | F>C P<0.20 | F>C P<0.001 | N. S.      | N. S.      | N. S.       |
| Ca       | F<C P<0.20 | N. S.      | N. S.       | N. S.      | N. S.      | F<C P<0.20  |
| P        | F<C P<0.20 | N. S.      | N. S.       | N. S.      | N. S.      | N. S.       |
| Minerals | Kidney     | Adrenal    | Testis      | Muscle     | Tendon     | Femur       |
| F*       | F>C P<0.05 | F>C        | F>C P<0.02  | —          | —          | F>C P<0.001 |
| Ca       | F<C P<0.20 | F>C        | N. S.       | F<C P<0.20 | F<C P<0.20 | N. S.       |
| P        | F>C P<0.20 | F>C        | N. S.       | N. S.      | N. S.      | N. S.       |

F, Ca and P described in the Minerals item express Fluoride, Calcium and Phosphorus respectively. Another F in this table designate fluoride fed group and C, control group.

\* Selected data from previous work.<sup>3)</sup>

びP含有率は乾燥試料重量に基づいた値である。

分析に供された臓器および組織中の水分含有率は睪丸において最も高く、腱および骨では最も低い値を示した。そして水分の平均含有率はF, C群各々約74%と73%であった。灰分含有率は骨が最も高いことはいうまでもない。しかし、それ以外の試料では胸腺が高く、F, C両群共に約10%であり、一方腱では最も低く、F, C両群のそれは各々3%および4%であった。灰分の平均含有率は、骨以外で、F群, C群各々6.5%および6.8%であった。Ca含有率は骨以外では筋肉が最も高く、肝臓が最も低いレベルにあった。そして骨以外の試料の平均値はF, C群各々325ppmおよび390ppmであった。そしてCa含有率は多くの臓器および組織でF群<C群の傾向を示した。P含有率は骨で約10%であり、次いで胸腺で高く、2.3%であった。一方肝臓では分析試料中最も低く、F群, C群のそれは各々0.2%および0.3%であった。

次に各臓器および組織ごとに、水分、灰分、CaおよびP含有率について、F, C両群を比較したところ、脳においては、CaおよびPのいずれも、F群が有意に低い値を示した。心臓の場合には、いずれの含有率に関しても、両群間に有意差が認められなかった。但し両群の各々3例のうち、各1例にCaおよびPの含有率が他の2例の値の約2倍から6倍を示すものがあった。心筋の場合には、健全な組織においても石灰沈着が起るといわれており、今回両群にみられたCaおよびPの高含有率は、このようなことが同時に発生した結果と思われる。胸腺および肺の灰分、CaおよびP含有率に関しては、F, C両群間に有意差が認められなかった。肝臓では、その

灰分含有率にF群>C群の有意差が認められた。脾臓についてはF群のCa含有率が有意に低い値を示した。腎臓は水分含有率に関してF, C両群間に有意差が認められた唯一の試料であった。また灰分、CaおよびP含有率にも有意差が認められた。即ち、水分、灰分およびPではF群>C群であり、Ca含有率に関しては逆にF群<C群の差が認められた。副腎の場合には、個々の臓器重量が30.1mgないし42.2mgと微少であったため、各群ごとに均一試料として分析した結果、灰分、CaおよびP含有率が全てF群において大であった。睪丸の場合には胸腺または肺と同様に灰分、CaおよびPに関して両群間に有意差が認められなかった。筋肉についてはCa含有率に、また腱については灰分およびCa含有率に関して、いずれもF群<C群の有意差が認められた。大腿骨については、灰分含有率にF群<C群の有意差が認められたが、CaおよびP含有率に有意差がみられなかった。

以上のごとく、Fの投与下においては、灰分、CaおよびPの蓄積は、各種臓器あるいは組織でかなり異なった様相を呈することが明らかとなった。そこで、これらの臓器および組織について、前回認められたFの蓄積と、今回測定されたCaおよびPの増加あるいは減少傾向とを対比させ表2に示す。

前回、臓器あるいは組織中に認められたF含有率の有意差は、全てF群がC群よりも大であったが、今回測定されたCaおよびP含有率について、F, C両群間に認められたそれは、F含有率の場合のように一定ではなかった。即ち、脳においてはCaおよびP共にF群がC群よりも小さく、脾臓ではCaのみがF群において小であった。腎臓では、CaがF群で小であったのに対して、Pは

反対にF群が大であった。副腎においては、脳の場合とは逆に、CaおよびP共にF群が大であり、筋肉および腱ではCaのみにF群がC群よりも小の有意差が認められた。

### 考 察

離乳期のウィスター系雄ラットに対して、50mg%のF添加飼料を与え、その影響を調査したところ、ラットの無機質代謝における特異な変化を認めた。即ち、無機質代謝に関するFの効果が、経時的に変化し、成長期の一時期を隔てて、無機質平衡を逆転させることを認め、また、投与したFが、脳、心臓、胸腺、腎臓、睪丸、副腎および大腿骨に蓄積されることを知った。これらの臓器のうちのあるものは、無機質代謝に関係が深く、もしも、石灰変性などによって機能の減退や異状をきたした場合には、無機質代謝に重大な影響を与える可能性があることから、Fの蓄積と平行して臓器あるいは組織の石灰化が進んでいるか否かを知ることは、興味のあるところであった。そこで前回と同様の条件でラットを飼育し、その臓器および組織中のCaならびにPを測定した結果、脳、脾臓、腎臓、副腎、筋肉ならびに腱におけるCaとPが有意に変化していることを認めた。これをF蓄積臓器と対比させたところ、次のごとき結果を得た。即ち、副腎においてはFの蓄積がみられ、なおかつ、灰分、CaおよびP含有率の全てがC群よりも増加していた。これは本臓器が石灰化されたとみなされる有力な証拠と考えられる。一方、脾臓、腎臓、筋肉および腱については、僅かに腎臓のPがF群において増加しており、またCaに関しては、これらの試料のいずれにおいてもF群がC群よりも減少していた。そして脳にいたっては、CaおよびPがともにF群で減少していた。

これらの現象については次のように考えることができる。即ち、前報に述べた通り、F群におけるCaおよびPは実験期間初期に体内保持が阻害され、その結果、C群と比べて体内のCaおよびPが減少する。そして期間後期に至り、無機質の体内保持が促進されるようになるが、その場合、Pの体内保持促進が比較的早期に開始されるのに対し、Caのそれは、かなり遅れて始まる。その開始時期の差が、F群の多くの試料でCaが減少傾向を示し、Pは腎臓と副腎で増加が認められた原因であると思われる。

無機質平衡における、かくのごとき経時変化上の傾向から推測して、脳においてCaおよびPが共に減少して

いたことは、この臓器におけるCaおよびP保持量の回復が最も遅れていたものと考えられる。そして、このように考えることは、中枢神経系における毛細血管の透過性が、血液脳関門現象によって、他の臓器器管の血管と大いに異なること、さらには、Manery等<sup>4)</sup>およびGreenberg等<sup>5)</sup>が述べているように、血漿と筋肉間では放射性のナトリウムやPが20分間で濃度平衡に達するのに対して、脳においては21時間を要するという知見などから類推して、概ね妥当なものと思われる。

以上の結果は、30日間に亘ってFの影響下にあった離乳期のラットの臓器および組織に関するものであって、無機質平衡の経時変化における特徴を考慮すれば、この実験期間を延長することによって、臓器あるいは組織の石灰化に関するより明瞭な結果が得られると思われる。

### 結 論

離乳期のウィスター系雄ラットに50mgFを添加した飼料を与えて30日間飼育し、臓器および組織中に含まれるCaおよびP含有量の調査を行った。そして、前回の実験で検知された臓器あるいは組織へのFの蓄積と平行して生ずる可能性のある石灰化の有無について検討し、以下の結論を得た。

- 1) 副腎において灰分、CaおよびP含有率が全て増加していることを認めた。
- 2) 脳においてはCaおよびPが共に減少していた。
- 3) 腎臓ではCaが減少していたが、Pは逆に増加していた。
- 4) 胸腺および筋肉ではCaのみが減少した。
- 5) 腱では灰分およびCaが減少していた。

以上の結果から、副腎においては石灰化が生じていることが示唆される。また脳において検知されたCaおよびPの減少は、血液脳関門に起因する現象と思われる。

### 文 献

- 1) 大谷重夫：医学研究，14，1291，1938
- 2) Stookey, G.K. and Muhler, J.C.: *Proc. Soc. exp. Biol.* (N.Y.), 113, 720, 1963
- 3) 友松俊夫：東京医科大学雑誌，39，441，1981
- 4) Manery, J.F. and Bale, W.F.: *Am. J. Physiol.*, 132, 215, 1941
- 5) Greenberg, D.M., Aird, R.B., Boelter, M.D., Campbell, W.W., Cohn, W.E. and Murayama, M.: *Am. J. Physiol.*, 140, 47, 1943

## 高速液体クロマトグラフィーによるしょう油中のパラオキシ安息香酸の分析

野 沢 竹 志\*, 荻 原 勉\*, 榎 田 隆 一\*, 大 西 和 夫\*, 松 本 昌 雄\*

### Analysis of *p*-Hydroxybenzoic Acid in Soy Sauce by High Performance Liquid Chromatography

TAKESHI NOZAWA\*, TSUTOMU OGIWARA\*, TAKAKAZU ENOKIDA\*,  
KAZUO OHNISHI\* and MASAO MATSUMOTO\*

**Keywords**: 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography, パラオキシ安息香酸 *p*-hydroxybenzoic acid, しょう油 soy sauce

#### まえがき

現在しょう油には保存料として安息香酸およびパラオキシ安息香酸エステル類（エチル，イソプロピル，*n*-プロピル，イソブチル，*n*-ブチル）が許可されている。市販の家庭用しょう油から保存料を検出したものは少なかったが，業務用しょう油からは保存料を検出したものが多かった。最近実施した業務用しょう油の検査でパラオキシ安息香酸エステルが添加されたしょう油中に比較的多量の遊離のパラオキシ安息香酸と思われる物質が含まれていた。これは PHBA エステルの使用条件が適切でなかったために PHBA エステルが加水分解して，保存効力の弱い遊離の PHBA に変化したと思われる。そこで保存料の有効かつ適正使用の見地から，しょう油製造業者に対し適切な行政指導が望まれる。

しょう油中のパラオキシ安息香酸の分析については紫外外部吸収法<sup>1)</sup>，マイクロ高速液体クロマトグラフ法<sup>2)</sup>の報告があるが，いずれもしょう油成分の妨害を受け正確な測定ができなかった。またガスクロマトグラフ法<sup>3)</sup>ではメチル化等の煩雑な操作を必要とする上，低濃度ではメチル化に問題がある。そこで筆者らはパラオキシ安息香酸の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分析を検討したところ，良好な結果を得たので報告する。

#### 実験方法

1. 装置 高速液体クロマトグラフ：日本分光 TWI NCLE型，検出器：日本分光紫外部分光光度計 UVIDE C 100 III
2. 試薬 パラオキシ安息香酸メチル（PHBA-Met），エチル（PHBA-Et），*n*-ブチル（PHBA-*n*Bu），安息香酸（BA）（以上和光純薬），イソプロピル（PH

BA-*iso*Pr），イソブチル（PHBA-*iso*Bu）（以上関東化学）は試薬特級品を，パラオキシ安息香酸（PHBA），*n*-プロピル（PHBA-*n*Pr）（以上和光純薬）は純度95%以上のものを用いた。その他の試薬はすべて特級品を用いた。

標準溶液：PHBA，PHBA エステル類，BAは各50 mgを正確にはかり，メタノール30mlに溶解したのち水で50mlとした。これらを20%メタノールで適宜希釈して標準溶液とした。

3. 分析に用いたしょう油 業務用しょう油（保存料添加のもの）19種と無添加のもの1種，計20種を用いた。

4. 試験溶液の調製 しょう油5mlをとり，重量を測定した後，分液ロートに移し，10%HClで酸性とした。エチルエーテル30，20および20mlと3回抽出し，エーテル抽出液を合わせ水5mlで振りまぜて洗う。エーテルをエバポレーターにより40℃で乾固しない程度に減圧濃縮し，メタノール2mlを加え混和した後，水で10mlとした後，マイクロフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

5. HPLCによる定量 試験溶液10μlをマイクロシリンジにとり，Table 1の測定条件で分析した。定量はピーク高による絶対検量線法で行なった。

6. 検量線の作成 各標準溶液を20% MeOHで希釈し，PHBAは0.3~5ppm，PHBA-*iso*Prは1.0~4.0ppm，PHBA-*iso*BuとPHBA-*n*Buは1.5~5.0ppm，BAは100~400ppmの間で検量線を作成し，これをFig. 1に示した。いずれもそれぞれの範囲で直線性を示した。またPHBAの検出感度は2ngであった。

\* 東京都立衛生研究所多摩支所 190 東京都立川市柴崎町 3-16-25

\* Tama Branch Laboratory, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
16-25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan

Table 1. Determination Conditions for *p*-Hydroxybenzoic Acid (PHBA), Benzoic Acid (BA) and *p*-Hydroxybenzoate Esters (PHBA Esters) by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

|              |                                                                                                                                         |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Column       | 4.6mm×25cm Zorbax ODS                                                                                                                   |
| Mobile Phase | A) 0.1M Acetic Acid-0.1M Sodium Acetate-Methanol-Water (4:1:8:27)<br>B) 0.1M Acetic Acid-0.1M Sodium Acetate-Methanol-Water (4:1:24:11) |
| Column Temp. | 25°                                                                                                                                     |
| Flow Rate    | 1.7ml/min (Mobile Phase A), 1.3ml/min (Mobile Phase B)                                                                                  |
| Detector     | UV (254nm)                                                                                                                              |
| Sensitivity  | $2 \times 10^{-2}$ AUFS, Recorder Attenuation 8                                                                                         |
| Sample Size  | 10 $\mu$ l                                                                                                                              |
| Chart Speed  | 5mm/min                                                                                                                                 |

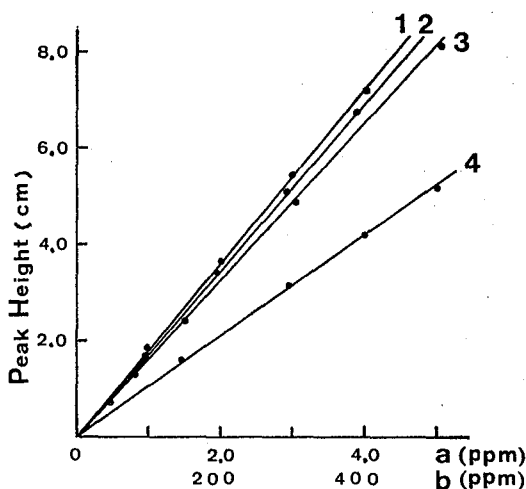


Fig. 1. Calibration Curve of PHBA, BA and PHBA Esters

a) PHBA, PHBA-*iso*Pr, PHBA-*iso*Bu, PHBA-*n*Bu

b) BA

1: BA 2: PHBA-*iso*Pr 3: PHBA4: PHBA-*iso*Bu, PHBA-*n*Bu

Condition: Mobile Phase A for 1, 3

Mobile Phase B for 2, 4

Range  $4 \times 10^{-2}$  for 1Range  $2 \times 10^{-2}$  for 2, 3, 4

### 実験結果および考察

1. HPLC の測定条件の検討 分析用カラムとして Finepack C<sub>18</sub>,  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> および Zorbax ODS の3種を比較検討したところ、Zorbax ODS が他のカラムよりも PHBA-*iso*Bu と PHBA-*n*Bu の分離において良好で<sup>4)</sup>、しかも PHBA と BA の分析も可能なため、Zorbax ODS を用いることにした。木原<sup>2)</sup>はしょう

油中にその天然成分として含まれているパニリン酸が PHBA を妨害すると報告しているが、Table 1 の A の溶出溶媒を用いたところ、Fig. 2 に示したように PHBA とパニリン酸は完全に分離した。また、しょう油の成分の1種であり、パニリン酸と類似の構造を持つシリンギン酸とも分離し、同時に BA も分析することができた。また、B の溶出溶媒で分析した結果を Fig. 3 に示した。PHBA-Et と PHBA-*iso*Pr の近辺にしょう油由来の妨害ピークがみられたが、添加された PHBA エステルの方がはるかに多いので、実際の定量にはさしつかえないと思われた。また、PHBA-*iso*Bu と PHBA-*n*Bu が完全に分離しなかったが、定量は可能であった。また PHBA と PHBA エステルは 254nm で高感度を示したので、この波長で測定を行なった。

2. 試験溶液の調製 しょう油を水で希釈し、直接 HPLC で分析したところ、PHBA の前にしょう油由来の大きなピークが現われた。そこでしょう油を HCl 酸性でエーテル抽出したところ、HPLC クロマト上の妨害物質が減少しベースが安定したため、微量の PHBA を分析することができた。

3. 添加回収実験 PHBA の標準溶液を水で希釈し、PHBA として 20 $\mu$ g と 100 $\mu$ g をそれぞれしょう油 5ml に添加し、本法により回収率を求めたところ、Table 2 に示したように回収率は 97% と良好な結果が得られた。それぞれ 5 回測定を行なった時の変動係数は 1.1% と 0.9% であった。また BA は 200 $\mu$ g、PHBA-*iso*Pr、PHBA-*iso*Bu、PHBA-*n*Bu は各 20 $\mu$ g をそれぞれ同様に添加したところ、すべて 95% 以上の回収率を示した。

4. しょう油の分析 業務用しょう油 20 種 (こいくち 16 種、うすくち 2 種、こいくちとうすくちの混合 1 種、しろしょう油 1 種) について、しょう油中の遊離の PH

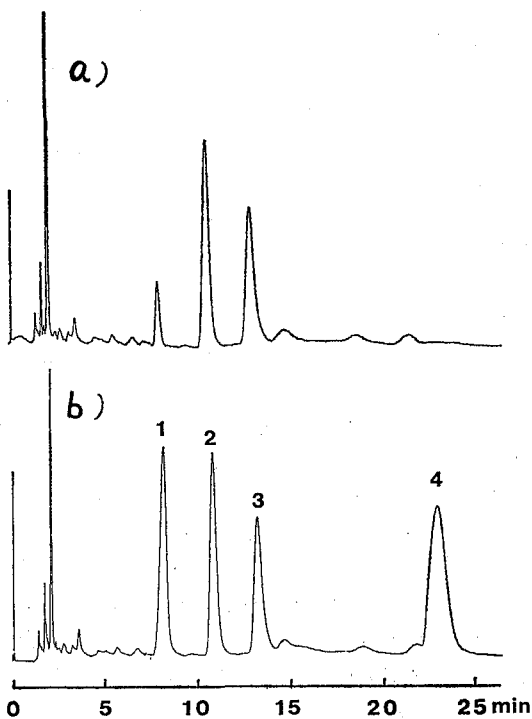


Fig. 2. Liquid Chromatograms of Soy Sauce Extract  
 a) Non added Soy Sauce  
 b) Non added Soy Sauce + PHBA + BA  
 1: PHBA 2: Vanillic Acid  
 3: Syringic Acid 4: BA  
 Condition: Mobile Phase A, Range  $2 \times 10^{-2}$   
 See Table 1

BA, BA および PHBA エステルの分析を行なった。その結果を Table 3 に示した。しょう油中の PHBA はこいくちで 2~3ppm, うすくちで 0.8~1.6ppm 含まれていた。また、しろう油からは検出されなかった。PHBA の含量がしょう油の種類によって異なるのは、用いられた原料の種類および量的な違いによるものと思われる。No.1, No.2, No.3 および No.8 の試料からは 7~50ppm の PHBA が検出された。No.1, No.2 および No.3 の試料の製造所では PHBA-*n*Bu を 60℃ に加温したプロピレングリコールに溶解して添加していたが、この条件では遊離の PHBA は生成しなかった。したがって、しょう油中に完全に不活性化されずに残存していたエステラーゼの作用により<sup>9)</sup> 添加した PHBA エステルから生成したと思われる。生しょう油中には PHBA エステルを分解するエステラーゼが存在することが

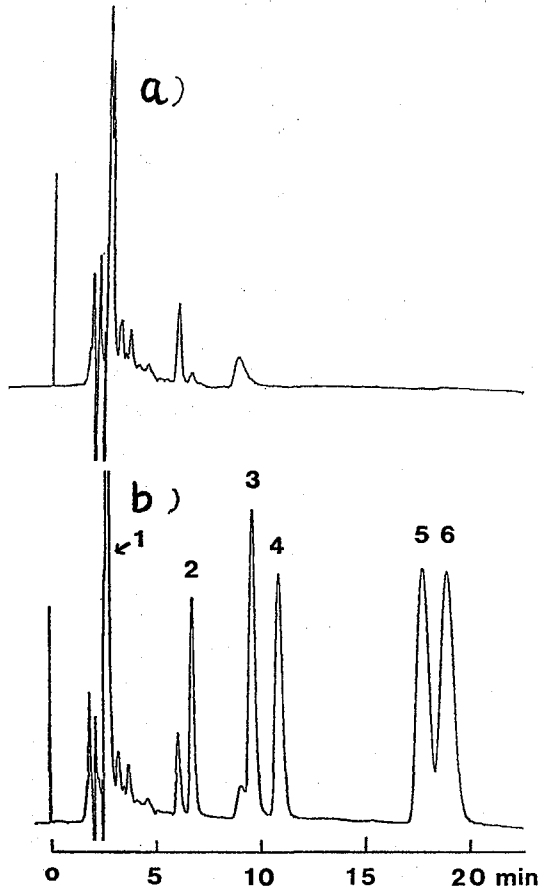


Fig. 3. Liquid Chromatograms of Soy Sauce Extract  
 a) Non added Soy Sauce  
 b) Non added Soy Sauce + Standard Chemicals  
 1: PHBA 2: PHBA-Et  
 3: PHBA-*iso*Pr 4: PHBA-*n*Pr  
 5: PHBA-*iso*Bu 6: PHBA-*n*Bu  
 Condition: Mobile Phase B, Range  $8 \times 10^{-2}$   
 See Table 1

知られており、PHBA エステルの分解を防ぐためには生しょう油を十分加熱し、エステラーゼを不活性化させる必要がある。また、No.8 の試料の製造所では PHBA-*n*Bu を溶解するのに、5% 水酸化ナトリウムを用いており、PHBA-*n*Bu が 5% 水酸化ナトリウムに対して 20~25% になるように溶解すれば、ほとんど加水分解しないが<sup>9)</sup>、アルカリの量が PHBA-*n*Bu より相対的に多いと分解が起こり、PHBA が生成する。アルカリの添加が過剰だったため高濃度の PHBA が検出された

Table 2. Recovery of PHBA added to Soy Sauce

| Added ( $\mu$ g) | Found ( $\mu$ g) | Recovery (%) $\pm$<br>S.D. |
|------------------|------------------|----------------------------|
| 0                | 10.6             | —                          |
| 20               | 29.9             | 96.5 $\pm$ 1.1             |
| 100              | 108.3            | 97.7 $\pm$ 0.9             |

n=5

Table 3. Analysis of PHBA, PHBA Esters and BA in Soy Sauce

| Sample | PHBA<br>(mg/L) | PHBA-<br>isoPr<br>(mg/L) | PHBA-<br>isoBu<br>(mg/L) | PHBA-<br>nBu<br>(mg/L) | BA<br>(mg/kg) |
|--------|----------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|---------------|
| 1      | 14.0           | —                        | —                        | 36.4                   | —             |
| 2      | 11.2           | —                        | —                        | 25.2                   | —             |
| 3      | 7.2            | —                        | —                        | 39.2                   | —             |
| 4      | 2.6            | 46.8                     | 23.4                     | 22.1                   | —             |
| 5      | 2.0            | 50.7                     | 27.3                     | 23.4                   | —             |
| 6      | 3.7            | 37.2                     | 19.5                     | 16.9                   | —             |
| 7      | 2.9            | 33.8                     | 14.3                     | 13.0                   | —             |
| 8      | 51.5           | —                        | —                        | 12.6                   | —             |
| 9      | 2.9            | —                        | —                        | 63.0                   | —             |
| 10     | 3.0            | —                        | —                        | —                      | 422           |
| 11*    | —              | —                        | —                        | —                      | 470           |
| 12     | 2.2            | —                        | —                        | —                      | 430           |
| 13**   | 0.8            | —                        | —                        | —                      | 450           |
| 14     | 2.3            | —                        | —                        | —                      | 460           |
| 15***  | 1.7            | —                        | —                        | —                      | 460           |
| 16     | 2.4            | —                        | —                        | —                      | 450           |
| 17     | 2.6            | —                        | —                        | —                      | 440           |
| 18     | 2.1            | —                        | —                        | —                      | 440           |
| 19**   | 1.6            | —                        | —                        | —                      | 380           |
| 20     | 2.1            | —                        | —                        | —                      | —             |

\* White Soy Sauce

\*\* Thin Soy Sauce

\*\*\* Normal Soy Sauce + Thin Soy Sauce

と思われる。以上のように業務用しょう油中に遊離の PHBA をかなり多量に含むものがあることがわかった。このように PHBA エステルの相当量が保存効果の弱い PHBA に分解してしまうことはしょう油の品質保持に支障があると同時に、保存料の適正使用の点からも好ましくないとと思われる。

5. PHBA の確認 PHBA エステルが添加されていない 11 種のしょう油のうち 10 種からも、微量の PHBA 類似物質を検出したが、その物質が PHBA であることを薄層クロマトグラフィー、HPLC および紫外外部吸収などの方法により確認した。これらの結果から PHBA エステルが添加されていないしょう油から検出した 0.8~3ppm の遊離の PHBA はしょう油の天然成分であると思われる。

### ま と め

業務用しょう油中に含まれる遊離の PHBA, PHBA エステル類および BA の HPLC を用いた分析法について検討した。

1) しょう油を塩酸酸性でエーテル抽出して、これを減圧濃縮したのち、メタノールおよび水を加えたものを HPLC で分析したところ、遊離の PHBA をふくめて高感度で分析することができた。分析には Zorbax ODS カラムを用い、PHBA と BA の溶出溶媒としては 0.1M 酢酸—0.1M 酢酸ナトリウム—メタノール—水 (4:1:8:27) を用いた。PHBA エステル類は溶媒混合比を (4:1:24:11) に変えることにより、良好な分離を示した。遊離の PHBA, PHBA エステル類および BA の回収率はすべて 95% 以上であった。

2) 業務用しょう油中の遊離の PHBA を分析した結果、0.8~3ppm の天然由来と思われる PHBA を検出した。

また PHBA エステル含有のしょう油中に天然由来の PHBA よりも高濃度な遊離の PHBA を検出したものがあったが、これらの遊離の PHBA は PHBA エステルが加水分解したために生成したものと思われる。

謝辞 本研究にあたり、試料の収集および調査にあられた食品監視課日野機動班の方々に感謝いたします。

### 文 献

- 1) 木原 清：醬研, 5, 204, 1979
- 2) 木原 清：醬研, 7, 112, 1981
- 3) 日本薬学会編：衛生試験法注解, 305~308, 1980, 金原出版
- 4) 北田善三, 関口道子, 五十嵐友二：食衛誌, 21, 480, 1980
- 5) 古市達也：調科, 9, 4, 1, 1961
- 6) 食品添加物公定書解説書編集委員会編：第 4 版食品添加物公定書解説書, B-743, 1979, 広川書店

報 文 IV

生活環境に関する調査研究

REPORTS IV

PAPERS CONCERNING ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

## NO<sub>x</sub> 共存下でのメタノール、イソプロパノールの光酸化反応

太田 与洋\*, 坂東 博\*\*, 秋元 肇\*\*

### Photooxidation of Methanol and iso-Propanol in the Presence of NO<sub>x</sub>

TOMOHIRO OHTA\*, HIROSHI BANDOW\*\* and HAJIME AKIMOTO\*\*

The photolysis of CH<sub>3</sub>OH/Cl<sub>2</sub>/NO<sub>2</sub>/air and (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHOH/Cl<sub>2</sub>/NO<sub>2</sub>/air at 28±2°C was studied using long-path FTIR method. The primary reactions of methanol and isopropanol with Cl atoms were α-hydrogen abstraction (100%), and α-hydrogen (85%), and β-hydrogen abstraction (15%), respectively. The failure to detect hydroxyalkylperoxy nitrates suggested that the oxygen addition to α-hydroxy radicals is not important. From the product distribution an upper limit of the ratio of oxygen addition to CH<sub>2</sub>OH and CH<sub>3</sub>CHOH was estimated to be about 6 and 7 %, respectively. The oxygen addition ratio to (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>COH was very low. The reaction mechanism is also discussed.

**Keywords** : photooxidation, methanol, isopropanol

#### 緒 言

原油の生産の地域的片寄りなどによる供給の不安定さ,あるいは,原油の資源としての限界などにより,代替エネルギーが模索されている。そのなかで,自動車などに対する石油燃料にかわるものとして,アルコールが考えられている。すでにブラジルでは,さとうきびなどから造られるエチルアルコールだけで走るアルコール自動車 が法的に奨励されているとの報告がなされている<sup>1)</sup>。しかし, NO<sub>x</sub> が共存する汚染大気中にアルコールが放出されて,太陽光が照射されるとそのアルコールがどういふものに転化していくかは充分には理解されていない。大気中の NO<sub>x</sub> と水との反応から亜硝酸(HONO)が生成されそれが光分解することから OH ラジカルが生成し,大気中に放出されたアルコールが水素引き抜き反応をうけ,アルコールラジカルが生成される。これが NO<sub>x</sub> の共存する空気の中で, RO<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> の一般型をもつ過硝酸物となり高い毒性,あるいは眼などへの刺激性を示すようになる可能性が考えられる。この点についても検討を加える必要がある。

アルコールとしては,今回は最も簡単なメチルアルコールと,大気中で OH ラジカルの攻撃を受けたとき,安定なアルコールラジカルを生成すると考えられるイソプロパノールを選択した。

#### 実 験

反応装置は国立公害研究所の FT・IR 付きのスモッグチャンバーを用いた<sup>2)</sup>。内径 50cm, 長さ 350cm で 794l の容積を持つステンレスシリンダーで,内壁はテフロンコーティングされており,内部には 40 watt BLB ランプが 14 本付けられていて,それが光源である。光路長は多重反射さすことにより 210.8m である。

本実験では,アルコールから OH ラジカルによる水素引き抜きをさすために, OH ラジカルのかわりに塩素原子を用いた。空気中に低濃度のアルコール, NO<sub>x</sub>, 塩素を入れ, BLB で照射することにより容易にアルコールラジカルと酸素分子, NO<sub>x</sub> との反応を観察することができる。

メタノールについての初期条件はメタノール (1.07 ppm)/塩素 (1.47 ppm)/二酸化窒素 (1.02 ppm)/空気, イソプロパノールではイソプロパノール (1.01 ppm)/塩素 (1.05 ppm)/二酸化窒素 (1.06 ppm)/空気であった。主たる生成物と反応物の濃度の照射時間に対するプロフィールをそれぞれ図 1, 図 2 に示した。

#### 結果と考察

##### (1) メタノール系

検出された生成物はホルムアルデヒド, ギ酸, 過硝酸, 硝酸, オゾン, 塩酸と, *trans* と *cis* の亜硝酸である。主生成物は図 1 に示すように,ホルムアルデヒド, ギ酸, 過硝酸である。この結果から予想される反応スキ

\* 東京都衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 国立公害研究所大気環境部



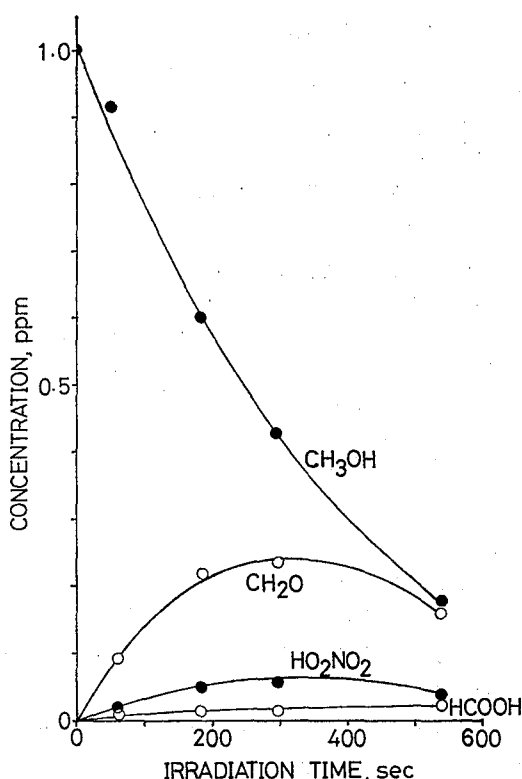


Fig. 1. Concentration-time profile of the photolysis of the mixture of  $\text{CH}_3\text{OH}$  (1.07ppm)/ $\text{Cl}_2$  (1.47ppm)/ $\text{NO}_2$  (1.02ppm)/air.

ームを図3に示した。すなわち塩素原子により反応が開始されるが、OH-水素の引き抜き(1)は吸熱的で不利であり、ほとんど、 $\text{CH}_3$ -水素が引き抜かれる(2)。亜硝酸メチル、硝酸メチルが検出されなかったこともこのことを支持している。生成した  $\text{CH}_2\text{OH}$  は付加(3)と、水素引き抜き(4)が可能である。 $\text{CH}_2(\text{OH})\text{OONO}_2$  の特異な吸収1720, 1300, 800  $\text{cm}^{-1}$  付近の吸収がみられなかった。 $\text{HO}_2\text{NO}_2$  が生成しているにもかかわらず、検出されなかったことは、 $\text{O}_2$  付加のパスが遅いためだと考えられる。Benson の Additivity rule<sup>33</sup> から、 $\Delta H_3^\circ = -33.6 \text{ kcal/mol}$ ,  $\Delta S_3^\circ = -30.2 \text{ e.u.}$  (25°C, 1atm, standard state) となり、 $k_3$  と(3)の逆反応速度定数  $k_{-3}$  の比は、 $1.1 \times 10^{18} \text{ atm}^{-1}$  となり逆反応は極めて小さい。したがって、 $\text{CH}_2\text{O}$  と  $\text{HCOOH}$  の初期生成速度の比から(3)と(4)の反応速度の比が求められる。結果として、 $\text{CH}_2\text{OH}$  の94%は水素引き抜きを受けると考えられる。Carter<sup>43</sup> らにより、他のアルコールラジカルである  $\alpha$ -エタノール、 $\alpha$ -ブタノールラジカルと酸素分子との反応ではほとんど引き抜きの

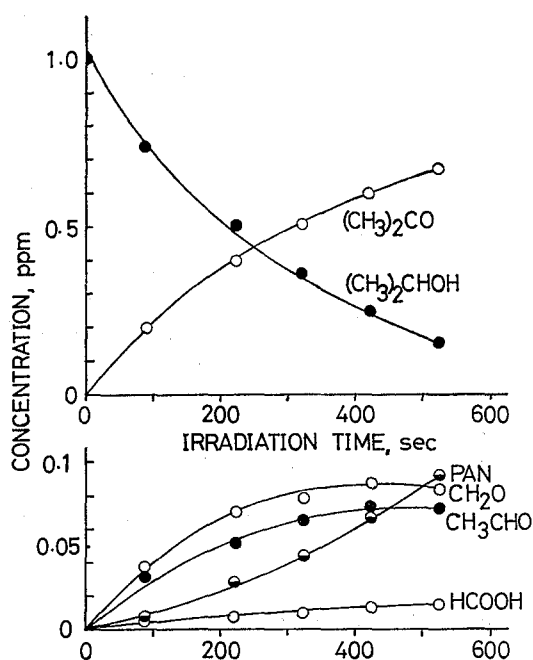


Fig. 2. Concentration-time profile of the photolysis of the mixture of  $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$  (1.01 ppm)/ $\text{Cl}_2$  (1.05ppm)/ $\text{NO}_2$  (1.06ppm)/air

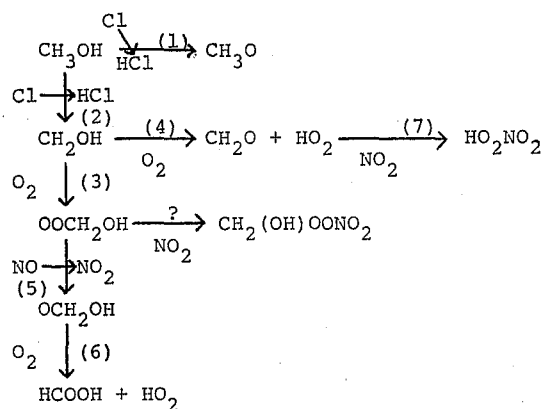


Fig. 3. Reaction scheme for photooxidation of methanol

反応が主であり、酸素付加が少ないことが報告されているが、今回の結果と彼らの結果を合わせて、 $\alpha$ -ヒドロキシルラジカルと酸素分子の反応は主として、引き抜きであるということがいえる。このことは Washida<sup>51</sup> の光イオン化マスをを用いた、 $\alpha$ -エタノールの系の実験でも認められている。

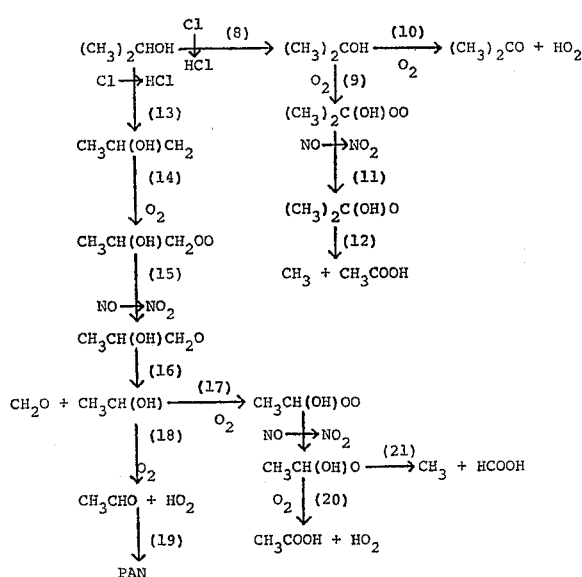


Fig. 4. Reaction scheme for photooxidation of isopropanol

## (2) イソプロパノール系

生成物はアセトン, アセトアルデヒド, ペルオキシアセチルナイトレート (PAN), ホルムアルデヒド, ギ酸, オゾン, 硝酸, 過硝酸, 塩酸そして, *trans* と *cis* の亜硝酸である. 予想される反応スキームを図4に示す.

OH-水素の塩素原子による引き抜きはその結合の強さ, およびイソプロピルナイトレート, ナイトライトの検出ができないことから, ほとんどないと考えられる.  $\alpha$ -水素引き抜き(8)と $\beta$ -水素引き抜き(13)が考えられる.  $\alpha$ -水素引き抜きにより生じた  $(\text{CH}_3)_2\text{COH}$  は  $\text{O}_2$  により, 水素の引き抜き(10)と $\alpha$ -炭素への  $\text{O}_2$  付加(9)とが考え

られる. このパスにより主生成物のアセトンの生成を説明することができる.  $\beta$  水素引き抜き(13)の結果生じた,  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$  ラジカルは  $\text{O}_2$  付加(14)が主たるパスであろうと考える. パス(15)を経て生成した,  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OO}$  は(16)により単分子分解し,  $\text{CH}_2\text{O}$  とエタノールラジカルを生成する. これも同様に酸素付加(17)と水素引き抜き(18)の可能性ある. パス(19)によりアセトアルデヒドおよび PAN が生成する. (17)からギ酸が生成する. 生成物分布から,  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})$  に対する酸素分子の水素引き抜きの割合は全体に対して,  $0.93 (=k_{18}/(k_{17}+k_{18}))$  となる. アセトンとホルムアルデヒドの初期生成速度の比から, 塩素原子による $\alpha$ -水素引き抜きと $\beta$ -水素引き抜きの速度定数比は 5.7 となった.

## 結 語

メタノールは  $\text{NO}_x$  が存在している汚染大気中で光酸化反応を受けると主として, ギ酸とホルムアルデヒドを生成する. ホルムアルデヒドはさらに光酸化反応を受け, 大気中のオゾン濃度を増進することになる. イソプロパノールなど他のアルコールでも, 間接的, 直接的に光化学オキシダントを増加させる.

## 文 献

- 1) 上田誠之助: 科学朝日, 41, 66, 1981
- 2) Ohta, T., Bandow, H. and Akimoto, H.: *Int. J. Chemical Kinetics*, 14, 174, 1982
- 3) Benson, S.W.: *Thermochemical Kinetics*, 2nd Ed. 1976, Wiley, New York
- 4) Carter, W.P.L., Darnall, K.R., Graham, R.A., Winer, A.M. and Pitts, J.N.: *J. Phys. Chem.*, 83, 2305, 1979
- 5) Washida, N.: *J. Chem. Phys.*, 75, 2715, 1981

## 負イオン源に関する一考察

瀬戸 博\*

### Study of the Reaction Chamber on Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry

HIROSHI SETO\*

The configuration of the chamber in negative chemical ionization (NCI) mass spectrometry was studied. A CI/EI (electron impact) combination ion source was used with isobutane or  $H_2/N_2O$  (1/1) mixed gas as a reagent gas. The EI chamber was also applied for the reaction chamber. NCI reaction occurred in these reaction chambers and the possibility of direct electron impact ionization was excluded. The sensitivity for hexachlorobenzene, obtained from the CI chamber, was higher than that from the "EI" chamber. However, a  $M-Cl+O$  ion was formed by a side reaction in the CI chamber. The NCI spectra of nucleosides and a base, obtained from the CI chamber, showed a further degradation and a low intensity of molecular weight-related ion. It was possible to prevent the unfavorable degradation when the "EI" chamber was used as NCI reaction chamber. The further degradation in the CI chamber may be attributed to a greater number of collisions of the sample and a higher vaporization temperature than that in the "EI" chamber. In NCI measurement of relatively non-volatile and polar substances such as guanine base or nucleosides, a lower pressure in a reaction chamber or a wider cross section of electron impact and/or ion pull out is recommended.

**Keywords** : mass spectrometry, negative chemical ionization, ion source, non-volatile substances, nucleosides

#### 緒 言

最近、質量分析の分野において負イオン化学イオン化 (NCI) 法が注目されている。特に電子捕獲型の NCI 反応は非常に高感度のため有機塩素化合物<sup>1-4)</sup>や生体成分の分析<sup>5,6)</sup>に応用されている。また、反応負イオンの NCI (negative reactant ion chemical ionization) も感度のよい検出法であり、試料分子の構造の情報を得ることができる<sup>7-9)</sup>。分析装置の改良も進み、正負イオンを同時に測定できる<sup>10)</sup>ようにまでなっている。

著者は種々の試料について負イオン生成の条件を検討した。比較的難揮発性の物質については通常の CI チャンバーでは測定中の感度の低下や、分解によると思われる異常なフラグメントイオンが生成するなどの支障があることを認めた。そこで、電子衝撃 (EI) 用チャンバーを反応室とし外部から反応ガスを通じたところ、難揮発性の物質においても再現性のある、しかも解析可能なフラグメントイオンが得られた。

本報では、2つのチャンバーを使用して得られた各々のデータを比較し、負イオン化学イオン化法におけるイオン源の構造とスペクトルとの関係について考察する。

#### 実 験

**質量分析装置 (MS)** : 日本電子 JMS-D300 に同負イオン検出器 (MS-NIO3) を付し、さらにヒューレットパッカード HP-5710A ガスクロマトグラフ (GC) を接続したものを使用した (Fig. 1), CI/EI コンビネーションイオン源の概念図を Fig. 2 に示した。データ処理は日本電子 JMA-2000 データ処理システムで行なった。

**分析条件 MS** : 加速電圧 3kV, イオン化電流 300 $\mu$ A, イオン化電圧 70eV および 200eV, 反応ガス圧力 0.3~ $1.5 \times 10^{-5}$  Torr (イオン源ハウジング内の圧力), イオン源温度  $220 \pm 10^\circ\text{C}$ , イオンマルチ電圧 1.6kV, **GC** : カラム 2% QF-1/shimalite W (80-100mesh) 2mm  $\phi \times 6$  feet, 温度 カラム  $160^\circ\text{C}$ , 注入部  $250^\circ\text{C}$ , セパレーター  $250^\circ\text{C}$ , キャリヤーガス ヘリウム 30ml/min.

**反応ガスおよび試薬** 反応ガスは主として,  $H_2/N_2O$  (1:1) の混合ガス<sup>11)</sup>を用いたが、一部の実験ではイソブタンも使用した (巴商会 東京)。試薬はすべて市販品をそのまま使用した。

**操作 (1)** 5ppm のヘキサクロロベンゼン (HCB)/

\* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

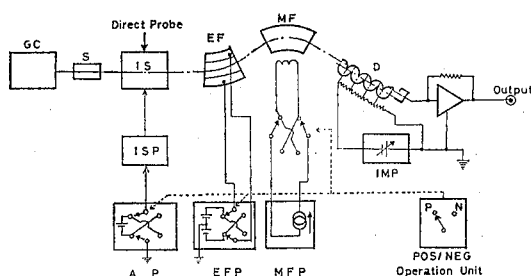


Fig. 1. Block Diagram of GC-MS Equipped with Negative Ion Detector Unit.

GC : gas chromatograph, S : separator,  
IS : ion source, ISP : IS power supply,  
AP : acceleration power supply,  
EF : electrostatic field,  
EFP : EF power supply,  
MF : magnetic field,  
MFP : MF power supply,  
IMP : ion multiplier power supply,  
D : detector.

n-ヘキサン溶液 5 $\mu$ l (25ng) をGCに注入し、マススペクトルを測定、さらにマス chromatogラフイーの手法により m/z 282 (M<sup>-</sup>) のピーク強度 (raw intensityで表示) の最大値を求めた。

(2) スクレオンドおよび核酸塩基類 (0.5~3 $\mu$ g) を直接試料導入したのち徐々に 350 $^{\circ}$ C まで加熱し、マススペクトルを測定した。

(3) 本機種の場合、EIチャンバーをイオン源となるようにセットすると、反応ガス流路が断たれるように設計されているので、ガス流路も兼ねているチャンバー切替用ノブの「アソビ」を利用して反応ガスがEIチャンバーに導入されるように調節した。(Fig.2 参照)

#### 結果および考察

(1) H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O 混合ガスから生成する負イオン 反応ガス圧力を高めると、Table 1 に示すように、CI/EI 両チャンバーともイオン種の数が増加し全負イオン量も増加する傾向がある。CIチャンバーではイオン化電圧を 200eV として、反応ガスの圧力を高めるとイオン量は低下する。この実験では、イオン源ハウジング内の圧力表示をもとに反応ガス流量を調節している。反応ガス流量を一定にしておけば、いずれのチャンバーをセットしてもイオン源ハウジング内の圧力はほぼ同じであることから、逆にイオン源ハウジング内の圧力が一定であれば、反応ガス流量は同じとみなすことができる。結局、同一の反応ガス流量に対しEIチャンバーを用いた方がイオン量がよく観測されていることになる。これはEI

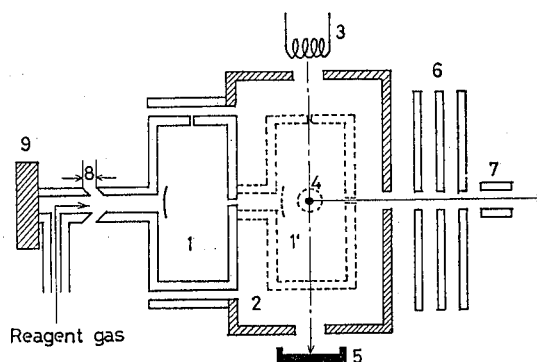
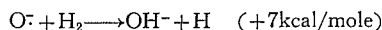


Fig. 2. CI/EI Combination Ion Source.

1 : CI chamber,  
2 : ion source (EI chamber),  
3 : filament, 4 : sample inlet,  
5 : electron trap, 6 : focus,  
7 : deflector, 8 : gap, 9 : knob

チャンバーの方が容積が大きく、反応にあずかるガス量も多いためと考えられる。

ところで Smit ら<sup>11)</sup>によれば、この反応ガスはOH<sup>-</sup>イオンが選択的に生成し分析的にも有用であるとされている。しかし、著者らの実験では形状の異なる2つのチャンバーでも、OH<sup>-</sup>イオンが優勢ではなく、むしろO<sup>-</sup>イオンが主であった。彼らの説明によれば



によりOH<sup>-</sup>が生成する。N<sub>2</sub>OからはO<sup>-</sup>が生成する<sup>12)</sup>。たとえ水素が存在して上記の反応が進行したとしても残存するO<sup>-</sup>イオンが観測されるはずであるが、彼らのデータにはO<sup>-</sup>イオンの記載はない。この点については、使用機器の違いにもよると思われるが、さらに検討する必要がある。

(2) NCI スペクトルの比較 (a) パーフルオロケロセン (PFK) : 両チャンバーを使用して得られた PFK の各々のスペクトルを Fig. 3 に示した。CIチャンバーの場合 m/z 261, 311, 361 などが強くあらわれ、イオンの種類も多く観測されるのが特徴である。一方、EIチャンバーを使用した場合の NCI スペクトルは、負イオン電子衝撃 (NEI) のそれとよく似ているが m/z 80~150 のピークが観測されないことから NEI と区別できる。(b) HCB : HCBでは分子イオンピーク M<sup>-</sup>の他は目立ったピークはない (Fig. 4)。しかし、CIチャンバーを使用すると m/z 263 に (M-Cl+O)<sup>-</sup> のイオンが現われる。これは分析上好ましい現象ではない。CIチャンバー内では圧力が高いため、分子-イオン反応が

Table 1. Negative Ion Formation from Mixed Reagent Gas ( $H_2/N_2O$ , 1/1)

|                                   |          |            |       |     |     | raw intensity |      |       |       |
|-----------------------------------|----------|------------|-------|-----|-----|---------------|------|-------|-------|
| chamber                           |          | CI chamber |       |     |     | EI chamber    |      |       |       |
| ionization voltage (eV)           |          | 70         |       | 200 |     | 200           |      |       |       |
| pressure ( $\times 10^{-5}$ Torr) |          | 0.5        | 1.5   | 0.5 | 1.5 | 0.5           | 1.0  | 1.5   | 2.0   |
| m/z                               | ion      |            |       |     |     |               |      |       |       |
| 16                                | $O^-$    | 9.0        | 8.2   | 5.9 | 0.9 | 31.8          | over | over  | over  |
| 17                                | $OH^-$   | 0.4        | 32.0  |     | 0.7 |               | 6.3  | 42.9  | 229.6 |
| 18                                | $H_2O^-$ |            |       |     |     |               | 2.2  | 9.0   | 31.6  |
| 19                                | $F^-$    |            |       |     |     |               |      | 1.0   | 1.3   |
| 26                                | $CN^-$   |            | 24.0  |     |     |               |      | 0.8   | 1.2   |
| 30                                | $NO^-$   | 1.0        | 13.3  | 0.8 |     |               | 23.2 | 188.8 | over  |
| 31                                | $HNO^-$  |            |       |     |     |               | 1.8  | 0.8   | 5.3   |
| 32                                | $O_2^-$  | 0.7        | 129.6 |     | 2.4 |               | 0.8  | 10.9  | 92.8  |
| 35                                | $Cl^-$   |            | 10.4  |     |     |               |      | 3.7   | 15.3  |
| 37                                | $Cl^-$   |            | 2.9   |     |     |               |      | 1.2   | 5.0   |
| 42                                | $CNO^-$  |            | 34.7  |     | 0.5 |               |      | 1.3   | 2.4   |
| 44                                | $N_2O^-$ |            |       |     |     |               |      | 1.4   | 12.2  |
| 46                                | $NO_2^-$ |            | 7.1   |     |     |               |      | 0.8   | 4.7   |

over ; &gt;1000

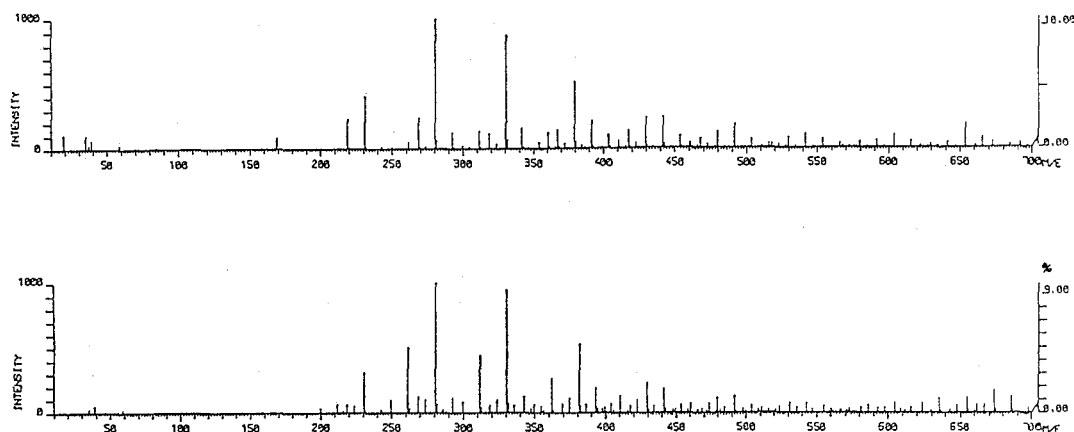


Fig. 3. NCI Spectra of PFK, Obtained from CI and EI Chambers.

upper : EI chamber (200eV), lower : CI chamber (70eV),

reagent gas :  $i-C_4H_{10}$   $1.5 \times 10^{-5}$  Torr

より進行するために生ずるイオンと思われる。(c)ヌクレオシドおよび核酸塩基：これらの物質は比較的難揮発性で、かなり高温(200~350℃)でないとスペクトルを与えず、その際、多かれ少なかれ熱分解を伴うものと思われる。両チャンバーでの比較をFig. 5に示した。まず、アデノシン(A)では、CIチャンバーの場合( $M-H$ ) $^-$ がみられず塩基部(b)のフラグメントイオン(m/z

134)も弱く、低質量部に分解によると思われるピークが強くでている。シチジン(B)では、特に大きな違いはない。 $\beta$ -プソイドウリジンの(C)では、CIチャンバーの場合、この化合物の構造的特徴を示す重要なピーク( $b+C_2H_2O$ ) $^-$ , m/z 153が弱く低質量部のイオンが強くなっている。グアニン(D)は、これらの中で最も測定しにくい難揮発性化合物だが、両チャンバーの差が極めて

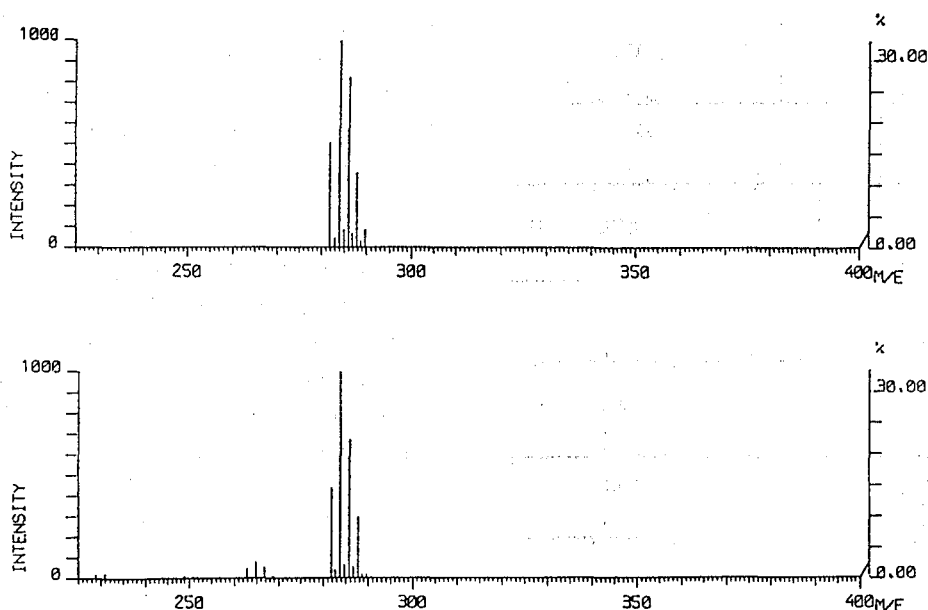


Fig. 4. NCI Spectra of HCB, Obtained from CI and EI Chambers.  
upper; EI chamber, lower; CI chamber, reagent gas;  $i\text{-C}_4\text{H}_{10}$   
 $1.5 \times 10^{-5}$  Torr, ionization voltage; 70eV.

明瞭にあらわれた例である。EIチャンパーでは、 $(\text{M}-\text{H})^-$ イオンが強く、分解はほとんどみられないのに、CIチャンパーでは、 $(\text{M}-\text{H})^-$ イオンが弱く、不規則な分解を示すイオンが数多く出現している。

以上のように、比較的難揮発性の物質では、EIチャンパーを用いた方がより単純なスペクトルを与え、分解も少なく、分子量関連のイオン強度が強い。

(3) 感度の比較 25ngのHCBをGCへ注入し、その強度をTable 2のような条件で比較した。明らかに、CIチャンパーを使用した方がイオン強度は強い。特に、イソブタンを反応ガスとした場合、著しい差がみられる。これは、CI条件下での電子捕獲反応の速度が、第3体の圧力に比例する<sup>13)</sup>ことから当然とも言える。しかし、 $\text{H}_2/\text{N}_2\text{O}$ 混合ガスでは、あまり差がなく、強度も弱いので、このガスは電子捕獲型のNCIの反応ガスとしては、不向きなのかも知れない。

(4) チャンパーの構造の比較検討 CIチャンパーは、イオン-分子反応を起こり易くするように設計されており、試料分子濃度を高め、反応ガスイオンとの衝突効率を高めるために、コンパクトで、高い圧力(0.5~1 Torr)が得られるようになっている。直接的な電子衝撃によるイオン化を避けるため、電子ビームの入口面積は

Table 2. Comparison of Ion Intensity  
(25ng of HCB)

| chamber                                 | CI chamber                               | EI chamber |     |
|-----------------------------------------|------------------------------------------|------------|-----|
| ionization voltage(eV)                  | 70                                       | 70         | 200 |
| pressure ( $\times 10^{-5}$ Torr)       | 0.3                                      | 1.5        | 1.5 |
| reagent gas                             | ion intensity of $\text{M}^-(m/z \ 282)$ |            |     |
| $i\text{-C}_4\text{H}_{10}$             | 2928                                     | 566        | 419 |
| $\text{H}_2/\text{N}_2\text{O} \ (1/1)$ | 302                                      | 252        | —   |

狭くしてある。本CIチャンパーの場合、電子ビームの当たる断面、およびイオンの引き出し口ともに直径 300  $\mu\text{m}$  である。このような構造は、揮発性の物質には好都合で、本実験でもHCBの例で示したように、良好な感度が得られている。しかし、比較的難揮発性の物質の場合には、不規則な分解(主として熱分解)を起こし易いことがわかった。この理由は、チャンパー内圧力を高めたために、試料の気化温度を引き上げる結果となり、熱分解をおこすためと考えられる。また、滞留時間が長くなり衝突回数も増加すると思われる。CI反応では一般的にイオン源の汚れが激しい。本実験でも、CIチャンパーを使用すると、測定中の感度の低下が著しかった。

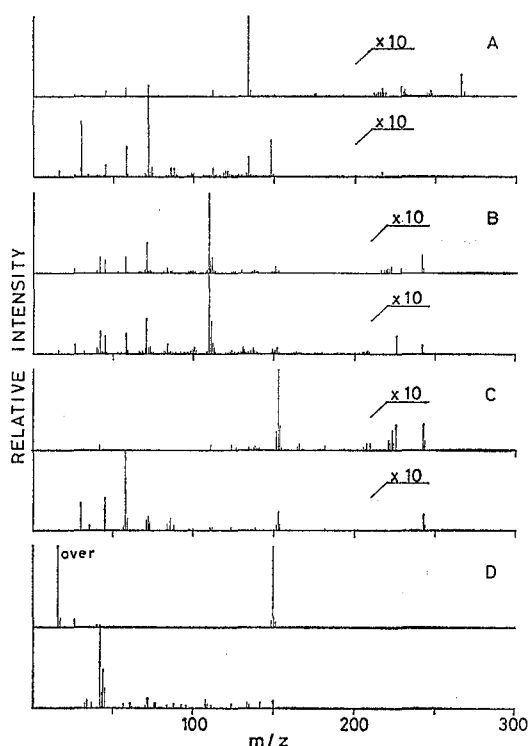


Fig. 5. NCI Spectra of Nucleosides and a Base, Obtained from CI and EI Chambers.  
upper : EI chamber, lower : CI chamber,  
reagent gas :  $\text{H}_2/\text{N}_2\text{O}$  (1/1)  $1.5 \times 10^{-6}$  Torr,  
ionization voltage : 200eV.  
A : adenosine, B : cytidine,  
C :  $\beta$ -pseudouridine, D : guanine

これは、電子、イオンの出入口が共に  $300\mu\text{m}$  と狭く、ここに汚れが集積するためと考えられた。

EI チャンバーを使う場合、問題となるのは電子ビームの照射面が大きい (約  $1.5 \times 6\text{mm}$ ) ために直接的な電子衝撃によるイオン化が起こるのではないかということである。しかし、スペクトルをみる限りでは、CI 反応の特徴が良くでている。例えば、PFKでの  $m/z$  80~150 のイオン強度の減少とか、反応負イオンの NCI での  $(\text{M}-\text{H})^- \rightarrow \text{M}^-$  がはっきり認められることなどである。また、反応ガス量を少なくしていくと、試料のイオン強

度も減少し、やがて観測できなくなることなどから、たとえ EI チャンバーを使用しても十分な量の反応ガスを流すかぎり NCI 反応が優勢であり、直接的な EI によるイオン化は無視できるものと考えられる。

また、EI チャンバーを NCI 反応に利用すると、副次的なメリットとして、イオンビームのレンズ系の調整が容易となり、ほとんど無調整でも NEI 測定から NCI 測定に移行できる点があげられる。

以上のデータから総合的に判断すると、現用の CI チャンバーは NCI 反応には必ずしも最良のものではない。測定対象を比較的難揮発性の物質にまで広げるためには、多少の感度を犠牲にしても、電子照射面積の拡大、イオン引き出し口の拡大などが必要であろう。

#### 文 献

- 1) Dougherty, R. C. and Dalton, J.: *Org. Mass Spectrom.*, 6, 1171, 1972
- 2) Hunt, D.F., Harvey, T.M. and Russel, J. W.: *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 151, 1975
- 3) Hass, J.R., Friesen, M.D., Narvan, D. J. and Parker, C.E.: *Anal. Chem.*, 50, 1474, 1978
- 4) Mitchum, R.K., Korfmacher, W.A., Moler, G. F. and Stalling, D.L.: *ibid*, 54, 719, 1982
- 5) Hunt, D.F. and Crow, F.W.: *ibid*, 50, 1781, 1978
- 6) Lewy, A.A. and Markey, S.P.: *Science*, 201, 741, 1978
- 7) Bruins, A.P.: *Anal. Chem.*, 51, 967, 1979
- 8) Roy, T.A., Field, F.H. and Lin, Y.Y.: *ibid*, 51, 272, 1979
- 9) Seto, H., Okuda, T., Takesue, T. and Ikemura, T.: 投稿中
- 10) Hunt, D.F., Stafford, G. C., Crow, F. W. and Russel, J.W.: *Anal. Chem.*, 48, 2098, 1976
- 11) Smit, A.L.C. and Field, F.H.: *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 6471, 1977
- 12) Chantry, J.P.: *J. Chem. Phys.*, 51, 3369, 1969
- 13) Caledonia, G.E.: *Chem. Rev.*, 75, 333, 1975

## ドライクリーニング所におけるテトラクロロエチレン濃度について

佐藤 泰仁\*, 多田 宇宏\*, 青木 実\*, 小谷野 彰\*\*, 吉儀 弘史\*\*

### Air Concentration of Tetra-chloroethylene around Dry-cleaner of Laundries

YASUHIITO SATO\*, TAKAHIRO TADA\*, MINORU AOKI\*,  
AKIRA KOYANO\*\* and HIROSHI YOSHIGI\*\*

In three dry cleaning factories, concentration of perchloroethylene was measured using passive gas monitors and a gas chromatography in order to learn how the air was contaminated by the gas and how the workers were exposed to the gas.

At all of the measuring points in all the factories TWA less than threshold value of 50 ppm were observed. However, the maximum instantaneous gas concentration measured by the gas chromatography reached 250ppm, which value might be recorded when a cover of a washing machine containing perchloroethylene was removed and then garments were picked up out of the machine.

Both the workers who handle the gas and those who do not were exposed to the same volume of perchloroethylene if they were working on the same floor or a restricted work area.

**Keywords** : environmental survey, dry-cleaning, tetra-chloroethylene

#### はじめに

従来よりドライクリーニング所においては、テトラクロロエチレン (=パークロロエチレン, 以下パークレンと記す) をはじめ、石油系ドライソルベント (ターペン, ミネラルスピリット) およびフッ素系溶剤 (フレオン-11, フレオン-113) 等の有機溶剤が多量に使用されている。最近の実態<sup>1)</sup> をみると価格の安さ等の点から石油系を利用する所が増えているが、まだドライ=パークレンという所が多い。したがってドライクリーニング従事者の健康に関しては、クリーニング業法に基づいてパークレンのみ健康診断の機会があるが、他の溶剤については明文化されておらず、今後への問題として残されている。我が国のドライクリーニング所における環境状態や健康に関する調査報告は比較的多くあり<sup>2-7)</sup> 実態把握はなされているが、それらの多くは気中濃度としてのとらえ方であるため、作業従事者自身がどの程度の曝露をうけているかについてはほとんど不明である。今回我々は Passive Gas Monitor (=個人用ガスバッジ) および連続ガスクロ分析装置を併用させ、パークレン使用所について環境 (気中) 濃度と個人曝露濃度の関係、パークレンの瞬時濃度およびその経時変化等の実態について

検討したので、その調査結果について報告する。

#### 調査方法および分析方法

今回調査を行なったのは3ヶ所 (A, B, C) であるが、A所のみ夏および冬の時期に行なったが、B, Cについては中間期である。クリーニング各所の概要はTable 1に示す通りである。B所は小規模であるが、A, Cは中規模クラスであり、多くの取次店よりの材料が多く持ちこまれており、パークレン洗浄機の稼動も多いと見うけられた。試料採取については1ヶ所2日間としPRO-TEK (DU PONT 社製) 有機溶剤ガスモニタリングバッジ (以下ガスバッジと記す) を使用し、個人曝露濃度については、主にパークレン洗浄作業に従事する者その他の作業 (アイロンがけ, 整理分包, 受付け) 従事者の衣服の胸元にバッジを装着した。気中濃度については作業場の数ヶ所にガスバッジを設置し約7時間曝露したが、A所 (冬) およびC所についてはパークレン洗浄機の周辺にオートガスサンプラーとガスクロマトグラフを接続し、15分間隔で1mlの気中ガスを吸引し連続分析した。ガスバッジの分析方法はバッジ内の活性炭捕集エレメントを取り出し、2mlのバイアル瓶に直接入れ、脱着溶媒としてCS<sub>2</sub>を2ml加え密栓し、バイアル瓶を30分以上ゆっ

\* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 東京都豊島区池袋保健所衛生課



Table 1. Outline of workshops scale

| workshop                      | A                                      | B                                | C                   |
|-------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|---------------------|
| Efficiency area               | 280.4m <sup>2</sup>                    | 33.6m <sup>2</sup>               | 151.5m <sup>2</sup> |
| Efficiency volume             | 961.8m <sup>3</sup>                    | 101.0m <sup>3</sup>              | 625.7m <sup>3</sup> |
| Workers number                | 20                                     | 8                                | 14                  |
| Amount of machine (Perchrene) | 1                                      | 1                                | 2                   |
| Runningtimes of machine       | 15—20 time/day(S)<br>10—11 time/day(W) | 16 time/day(S)<br>8 time/day(W)  | 18 time/day         |
| Years of use                  | 9                                      | 5                                | 2.5, 11             |
| Consumption of perchrene      | 600kg/month(S)<br>300kg/month(W)       | 300kg/month(S)<br>150kg/month(W) | 900kg/month         |
| Ventilation system            | natural and forced                     | natural and forced               | natural and forced  |

(S) = summer, (W) = winter

くりと振盪し、その溶液を試料溶液とした。また試料溶液の濃度が高い場合は希釈して用いた。そして試料溶液 1  $\mu$ l をガスクロマトグラフに注入し、得られたガスクロマトグラムをあらかじめパークレンの標準品で得た検量線により吸着量を換算し、(1)式により濃度に換算した。また時間荷重平均(Time Weighted Average)以下TWAと記す) 濃度は(2)式により算出した。

$$\frac{\text{mg}}{\text{m}^3} = \frac{\text{ng}}{\text{cm}^3} = \frac{\text{吸着量 (ng)}}{\text{脱着率} \times \text{サンプリングレート (cm}^3/\text{min)} \times \text{総曝露時間 (min)}} \dots (1)$$

$$\text{TWA 濃度 (ppm)} = \frac{\text{ng}}{\text{cm}^3} \times \frac{24.46}{\text{分子量}} (25^\circ\text{C } 1\text{ atm}) \dots (2)$$

脱着率とは、活性炭に吸着された物質が脱着溶媒に溶出される割合を意味し、今回は0.98を用いた。またサンプリングレートとは活性炭に吸着される物質の単位時間当りの量を意味し、今回は35.4を用いた。

#### ガスクロマトグラフ測定条件

装置：島津GC-5A, カラム：ガラスカラム 3×2000 mm, 充填剤：Tricresyl phosphate (TCP) 20%, chromosorb W-AW, DMCS, カラム温度：80℃, 検出器：ECD (<sup>63</sup>Ni), キャリヤーガス：N<sub>2</sub>(流量60ml/min)

#### 連続ガスクロマトグラフ測定条件

装置：自動ガスサンプラー（日本クロマト）に柴田FGC-110を接続, カラム：ステンレスカラム 3×2000 mm, 充填剤：Polyethylene glycol 600(PEG 600) 5%, Fujichrom A, カラム温度：80℃, 検出器：FID, キャリヤーガス：N<sub>2</sub>(流量 30ml/min)

#### 測定結果および考察

パークレン洗浄機による作業はどのクリーニング所でも大体同じようであり、洗濯物(材料) 20kg前後に対し

Table 2. Perchrene TWA concentration of A cleaningshop (summer) UNIT. ppm

| perchrene conc. | Workers                                    | 1st day | 2nd day |
|-----------------|--------------------------------------------|---------|---------|
| on person       | washing (perchrene) (1F)                   | 4.072   | 1.735   |
|                 | ironing (1F)                               | 0.951   | 0.581   |
|                 | washing (water) (1F)                       | —       | 0.490   |
|                 | ironing (2F)                               | 0.080   | 0.053   |
| in air          | front of machine                           | 1.918   | 1.238   |
|                 | around of arrange outdoor (IKEBUKURO H. C) | 0.390   | 0.271   |
|                 |                                            | 0.001   | 0.001   |

て1工程(約30~40分)で、その間に洗浄、しぼり、乾燥、脱臭を行なっている。そしてパークレンの使用量としては1回当り100~150lを循環させている。

#### i) A所における結果(夏)

測定結果はTable 2に示したが、2日間の平均値で気中濃度を求めてみると、パークレン洗浄機前が1.58ppm、同室内の6~7m離れた仕付け台付近が0.33ppmとなり、パークレンの許容濃度(日本産業衛生学会の勧告値)は50ppmであることから、パークレン洗浄機前はその1/25以下ということになるが、同時に測定した外気濃度に比べると1580倍、330倍という結果であった。個人曝露濃度についても前記の許容濃度を照合してみると、パークレン洗浄従事者は2日間の平均が2.9ppmであったが、他の作業者は1ppm以下であり、気中濃度を含め予想された高濃度の環境でないことが認められた。このことは今回の調査は夏期(9月上旬)で気温が高く、作業場内

Table 3. Perchrene TWA concentration of B cleaningshop UNIT. ppm

| perchrene conc. | Workers                  | 1st day | 2nd day |
|-----------------|--------------------------|---------|---------|
| on person       | washing (perchrene)      | —       | 4.017   |
|                 | ironing                  | 2.484   | 3.424   |
|                 | receptionist             | 1.928   | 1.195   |
| in air          | front of machine         | 2.302   | 2.799   |
|                 | front of reception       | 1.538   | 0.846   |
|                 | outdoor (IKEBUKURO H. C) | 0.002   | 0.002   |

の扉、窓をすべて開放していたため自然風による希釈拡散があったためと想定される。当クリーニング所は取次店よりの材料を相当量扱っているため機械化がすすんでおり、パークレンの回収装置、換気ファン、自然換気口などが完備しており、一応理想的（模範的）なクリーニング所と思えるが洗たく材料の取り出しの際、洗浄機の自動運転時に弁が切り換わる時および再度別の乾燥兼しわのぼし機に入れる時の風乾状態の際、パークレンの蒸散臭が感じられるため、作業場が開放状態でない時期の再調査が必要と感じられた。

## ii) B所における結果

測定結果は Table 3 として示した。同所は代表的小規模クリーニング所の一つであり、狭いスペースにパークレン洗浄機1台をもち、近接してアイロンがけ作業、受付けという配置形態であった。気中濃度を2日間の平均値でみると、パークレン洗浄機前が2.55ppm、受付カウンター付近が1.19ppmとなり、ここも許容濃度以下ではあった。しかし配置関係をみると、パークレン洗浄作業および受付けとの距離が近いこと、さらに受付けとの間仕切りがカーテン1枚のためか、作業場と店の濃度がほぼ均一化されている傾向が認められる。個人曝露濃度についてもパークレン洗浄従事者とアイロンがけ従事者の距離が近い(1m)ため、パークレン作業従事者と同等の量を曝露されていることが判った。更に受付者の濃度も店全体の均一化傾向と相関する値を示しており、発生源（パークレン洗浄機）からの距離も含め間仕切りが不十分な作業場では、他の作業であっても発生源従事者と同じ程度の曝露を受けていると言えよう。なお、パークレン洗浄従事者の第一日目の試料はバッジ不良につき欠測となった。

## iii) A所における結果（冬）

測定結果を Table 4 に示す。前回実施において検討課

Table 4. Perchrene TWA concentration of A cleaningshop (winter) UNIT. ppm

| perchrene conc. | Workers                  | 1st day | 2nd day |
|-----------------|--------------------------|---------|---------|
| on person       | washing (perchrene) (1F) | 4.705   | 8.618   |
|                 | ironing (1F)             | 1.479   | 5.255   |
|                 | arranging (1F)           | 3.894   | 6.316   |
|                 | ironing (2F)             | 0.209   | 0.235   |
| in air          | front of machine         | 2.732   | 4.094   |
|                 | around of arrange        | 2.483   | 4.186   |
|                 | outdoor (IKEBUKURO H. C) | 0.001   | 0.001   |

題が残ったため、今回は冬の時期に同じ測定ポイントで行なった。2日間の平均値で気中濃度を求めてみると、パークレン洗浄機前が3.41ppm、同室内仕分け作業付近が3.33ppmとなり今回も許容濃度以下ではあった。また、個人曝露濃度についてはパークレン洗浄従事者が6.7ppm、アイロンがけ従事者が3.4ppm、仕分け作業従事者が5.1ppmで、同じフロアーの人々は作業による違いはみられず、いずれも前回より高濃度を示していた。一方、2Fのアイロンがけ従事者は0.22ppmと1Fに比べ1/30以下の濃度であった。今回は作業場の換気フロンは作動していたが、位置的に広いスペースの中央付近にあるパークレン洗浄機から遠く、加えて窓、扉の開放が少ないため、パークレン洗浄機周辺の蒸散パークレンが十分に拡散置換できないために生じていると考えられるので、作業場内の気流の方向を再調査し、適切な位置への強制ファンの増設等の処置が必要と考えられた。今回より連続ガスクロマトグラフ装置を導入し、パークレン洗浄機周辺のパークレンの瞬時（15分間毎）の濃度の変動をとらえてみた。その結果を Fig. 1 として示したが、その濃度変化は著しく、瞬時的には許容濃度の50ppmを越える現象が何回かみられている。また、昼前後から夕方にかけて比較的高濃度になっている傾向がうかがえ、作業量の大小に関連しているものと思われた。

## iv) C所における結果

測定結果を Table 5 に示す。同所についても今までと同じように2日間の平均値を求めてみると気中濃度はパークレン洗浄機前が8.02ppm、同じフロアーの中央付近が6.78ppm、1階受付カウンター付近が1.64ppmとなり前述のA、B所より高濃度ではあったが許容濃度を越えることはなかった。個人曝露濃度については、パーク

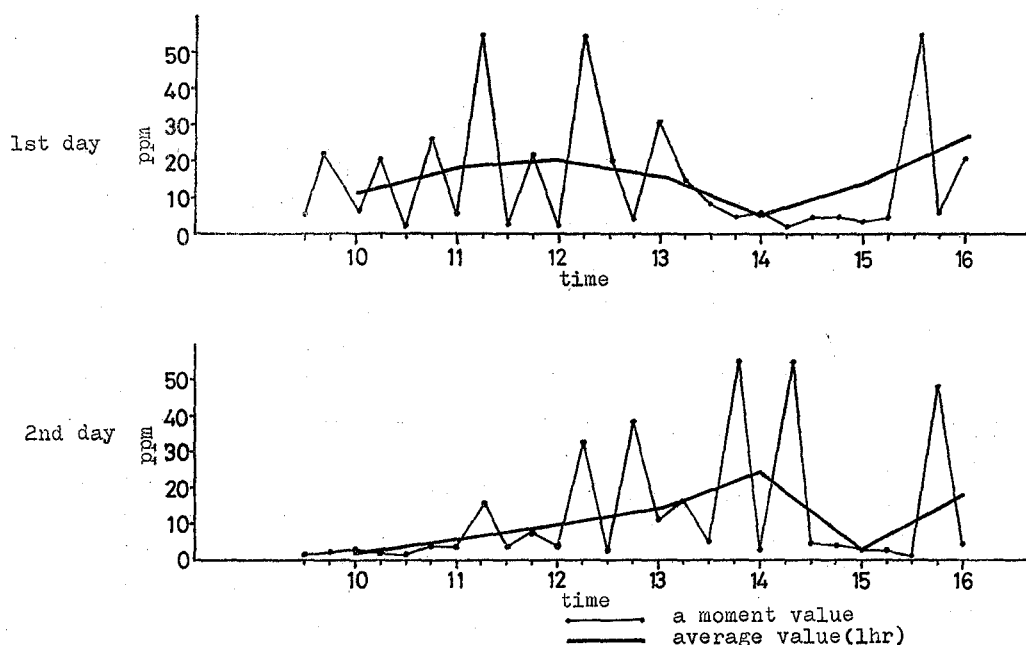


Fig. 1. Variation of perchrene concentration of A cleaningshop (winter)

Table 5. Perchrene TWA concentration of C cleaningshop UNIT. ppm

| perchrene conc. | Workers                  | 1st day | 2nd day |
|-----------------|--------------------------|---------|---------|
| on person       | washing (perchrene) (2F) | 11.290  | 9.970   |
|                 | ironing (2F)             | 5.042   | 2.856   |
|                 | washing (water) (3F)     | 0.915   | 1.508   |
|                 | receptionist (1F)        | 0.232   | 0.351   |
| in air          | front of machine (2F)    | 9.805   | 6.231   |
|                 | center of room (2F)      | 6.941   | 6.616   |
|                 | front of reception (1F)  | 1.869   | 1.415   |
|                 | outdoor (IKEBUKURO H. C) | 0.001   | 0.001   |

レン洗浄従事者 10.63 ppm, 同じフロアのアイロンがけ従事者が 1.21 ppm, 1 F 受付作業従事者が 0.29 ppm となり, いずれも基準以下であった。このクリーニング所の場合は作業形態を立体的に行っており, つまり 2 F はパークレンの洗浄機を 2 台とフッ素洗浄機 1 台 (非稼動) を置くとともにアイロンがけ作業も行っており, クリーニング業のメインフロアとなっており, 3 F は水洗い作業専用フロア, 1 F に受けおよび仕分け作業をす

る場所と区分されている。そのためかパークレン使用階 (2 F) の上, 下階については気中濃度で 1/5, 個人曝露濃度で 1/10~1/40 の低濃度になっていたが, 2 F フロアについては作業の違いによる濃度差というよりも, 作業の位置による影響の方が大きいと考えられた。ここの窓等の開放があったが, 自然風による拡散は少なく, フロア中央付近にたまってしまふものと考えられる。これを助長する要因として, 1 フロアが余り広くないスペースで, 処理する材料が多く, 洗浄機より取り出したものを中央の移動式レールにかけ下階に移しているため, 洗浄済材料からの蒸散が高濃度を起していると思われる。また, 当所でもガスクロマトグラフィによる気中濃度の連続分析を行なった。2 日間の変動を Fig. 2 として示したが, 今回の場合は許容濃度を越える現象が 6 回ほどとらえられるとともに, 最高濃度として 250 ppm に達することが認められた。今回も含め前回のガスクロ連続分析の変動をみても, 各ピーク値は連続して起っておらず, 一定の間隔をおいて生じていることがうかがえ, 1 作業工程 (30~40 分) による洗浄済材料の取り出し入れの際の濃度と判断される。以上 3 つのクリーニング所について調査を行なったが, 気中濃度と個人曝露濃度の関係を見るためそれぞれの値をプロットしてみたのが Fig. 3 である。

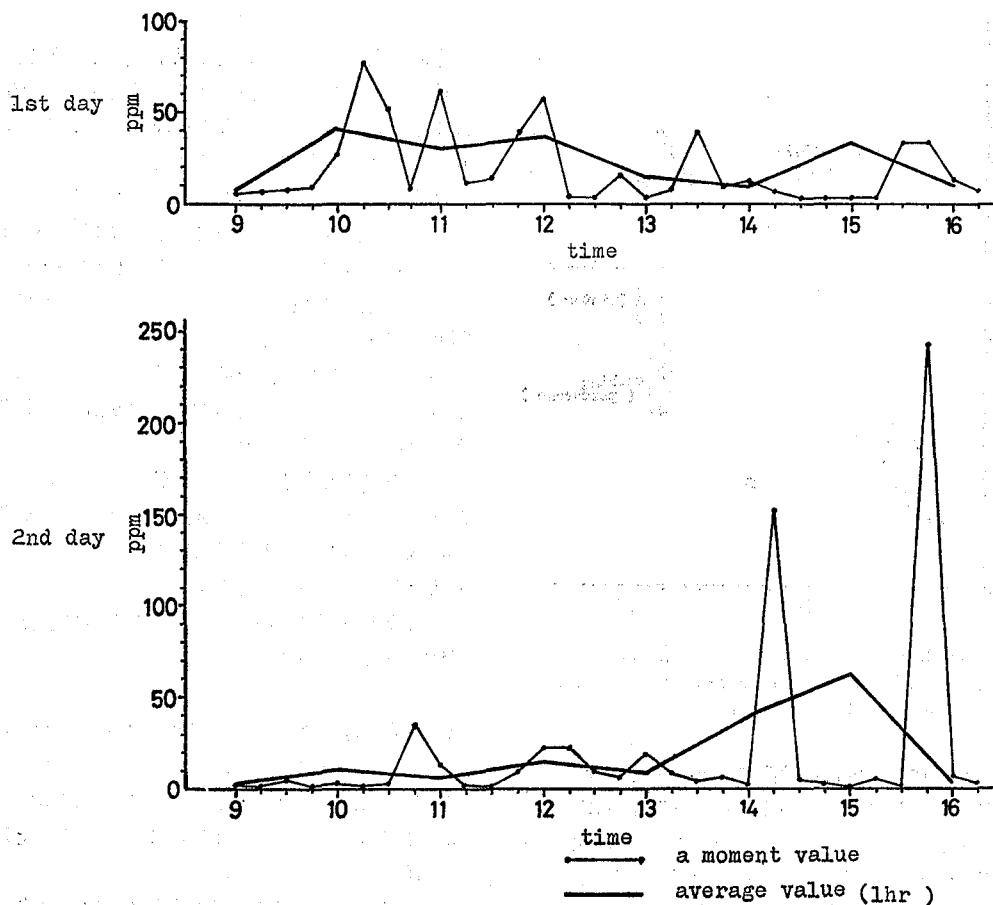


Fig. 2. Variation of perchrene concentration of C cleaningshop.

気中濃度、個人曝露濃度共 5ppm 以内に多く分布しているのがみられるが、一部（C所）についてはそれ以上のところがありこれは前述した理由によるものと思われる。図中●印などはパークレン従事者を意味しているが、パークレン従事者といっても、一日中その作業を行なっているのではなく、アイロンがけなども行なっているため、高濃度曝露の危険性といえ、洗たく物取り出しの際およびパークレンによるシミぬきの時であり、一日の曝露濃度としてみた場合は、他の作業者に比べても極端に高いということはないようである。両者の関係式を求めてみると  $Y=0.64X+0.71$  となり、相関係数も 0.81 と高く、危険率 0.1% で有意であるという結果が得られた。

現在、許容濃度については主に二つの評価法があり、一つは TLV-TWA（時間荷重平均）で、もう一つは TLV-STEL（短期間曝露限界）である。前者は労働時

間の 8 時間を前提とした平均値を示しているが、後者は短時間の曝露濃度という見方で、単位時間を 15 分間の最大濃度としている。TLV-STEL での許容濃度はパークレンの場合、日本ではまだ規定されていないが、アメリカの米国産業衛生監督者会議（ACGIH）では 150ppm を勧告している。今回の一連の調査においては、TLV-TWA 値でみるかぎり、どのクリーニング所も許容濃度以下であったが、瞬時的な見方からは許容濃度を越えている現象がみられており、このような現場の調査および行政指導については、両者の評価法に基づく手法を用いたデータによりチェックを行なう必要があると思われる。

許容濃度を越える原因としては、洗浄機からの材料の取り出しの際に生じていることが三谷ら<sup>9</sup>の報告にもあるが、本来、機械の開口部（取り出し口）はトビラ開放により機内が陰圧になるように設計されているためリークはないと考えられるので、材料に含有しているものが

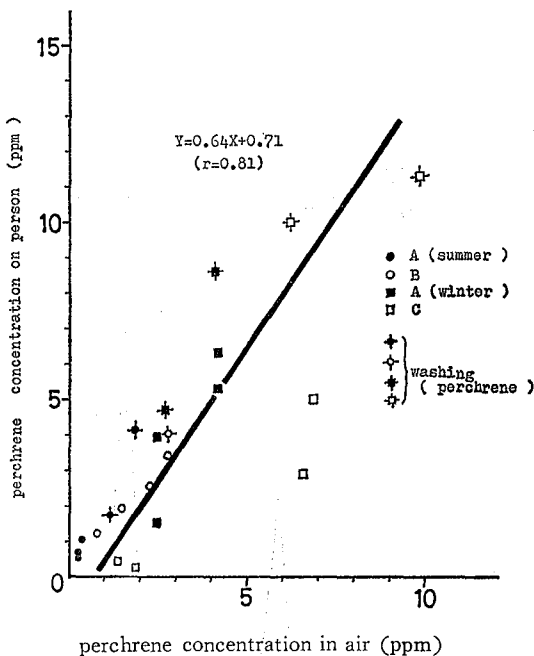


Fig. 3. Relationship of perchrene concentration between air and person

蒸散するために一時的に高濃度になると判断する。さらに洗浄機が全自動になっているため、一工程毎に電磁弁による切り換えがあり、その時にリークと思われるパークレン臭をたびたび感知しており、機械の保守、点検についてもチェックすべきことと考える。

最近、高橋等<sup>8)</sup>によりクリーニング作業従事者の死因調査がなされ、全国平均より若くして死亡すること、男女共肝臓ガンによる死亡率が高いことを報告している。

したがって、このような現場では低濃度であっても慢性的影響があるわけで、十分な換気性を考えた設備の配置、他の代替物の使用、洗浄済材料再脱臭装置の設置などの対応により、大気レベルまでは無理としても、より低濃度に維持することの必要性を強く感じた。

## まとめ

今回の調査の結果の概要は以下の如くである。

1) パークレン作業従事者は固定化されており、現場によって異なるが、平均 $6.3 \pm 3.6$ ppmの曝露をうけており、これは他の作業者の3倍になる。しかし、狭い現場では他の作業者といえども同じ程度の曝露がある。

2) 気中濃度としては一日の平均(TWA)濃度としてはクリーニング所によって異なるが $3.2 \pm 2.6$ ppmであるが、瞬時的には相当変動しており、今回の場合最高250ppmが検出された。

3) パークレンの高濃度を起す要因としては、機械的なものからのリーク、洗浄材料の取り出しの際等の蒸散が主たることと考えられる。

4) 現在の監視業務では検知管方式によるチェックがなされているが、常に痕跡程度であり正確な数値の把握が困難であるため、瞬時的濃度等を検知できる手法を取り入れる必要があると考える。

本研究の概要については、東京都衛生局学会(第69回)1982年11月で発表した。

## 参考文献

- 1) 毛利可淳：クリーニング資料集成，昭和54年度版，クリーニングライフ，23(7)，1-7，1980
- 2) 奥田久徳他：日本公衛誌，23(9)，545-548，1976
- 3) 笈川和男他：第38回日本公衆衛生学会大会抄録，709，1978
- 4) 三谷一憲他：第53回日本産業衛生学会講演集，193-194，1980
- 5) 児玉京子他：第53回日本産業衛生学会講演集，195-196，1980
- 6) 竹内康浩他：産業医学，23，407-418，1981
- 7) 高橋英尚他：第54回日本産業衛生学会講演集，244-245，1981
- 8) 高橋英尚他：第55回日本産業衛生学会講演集，434-435，1982

## 飲料水の水質と人の健康との関連 (第1報) 水道施設に由来する有害元素に関する調査

笹野 英雄\*, 斉藤 庄次\*, 小輪 瀬勉\*, 高橋 正博\*  
高橋 保雄\*, 西垣 進\*

### Relationship between Drinking Water Quality and Human Health (I) Investigation of Harmful Elements in Water from Water Supply System

HIDEO SASANO\*, SHOJI SAITO\*, TSUTOMU KOWASE\*,  
MASAHIRO TAKAHASHI\*, YASUO TAKAHASHI\* and SUSUMU NISHIGAKI\*

**Keywords** : 人の健康 human health, 水質 water quality, 有害元素 harmful elements, 滞留水 standing water, 昼間水 running water

#### はじめに

飲料水と人の健康に関し、硬度が高い給水地域では心臓血管症や高血圧症による死亡率が低く、軟水の供給を受けている地域では逆に死亡率が高いという多くの報告<sup>1-5)</sup>がある。WHO. Cardiovascular Disease. Expert Committee<sup>6)</sup>では、1968年頃からこの地理疫学的調査結果を重視しているが、その機序は未だ明らかではない。これらに関連したものとしては重金属、特に Pb と Cd について討論したもので腸管 Ca が上昇すると Cd や Pb などの有害金属の腸管吸収を抑制する効果があるという論文や、硬水は軟水よりも腐食性が弱く水道管から Pb や Cd が溶出されにくいという報告などがある。さらに、Kansas, Missouri<sup>7)</sup>地方で飲料水中 Cd 濃度と人体臓器中 Cd 濃度との間に相関を認めているものや、軟水地区の馬に高血圧症が多く、馬臓器中の Cd 蓄積量が高いことなどが報告<sup>8)</sup>されている。そのほかにも微量 Pb の生体影響について Thomas ら<sup>9)</sup>は水道水中特に滞留水中の Pb が多い地域では人血中 Pb の50%が水道水中 Pb によると報告している。一方我が国の水道管は、亜鉛引鋼管や鉛管などが多い上に水質も浄水過程で軟水化され易い傾向にあるにもかかわらず、金属の溶出に関する論文はほとんどみられない。そこで東京都における水道水について、水道管直結栓水と受水槽経由栓水中の Pb, Cd, Cu, Zn, Fe, Mn の溶出挙動を一夜滞留水と昼間使用水について調査を行うことにした。

#### 研究方法

##### 1. 調査地区の選定

東京都を代表する水系地区として、多摩川水系から世

田谷区、利根川水系から葛飾区、多摩川、利根川混合水系として新宿区を選定した。

##### 2. 採水場所および採水条件

世田谷区、葛飾区は屋内の水道管直結栓水各10ヶ所から、新宿区は受水槽経由屋内給水栓水10ヶ所から、一夜滞留水と昼間使用水を1対ずつ採水した。(一夜滞留水とは採水当日の初流水であり、昼間水とは約3分間放流後の流出水である。)

#### 実験方法

1. 試料水：あらかじめ酸洗浄処理をした白色ポリエチレンビンに5lを採水し、そのうちから金属分析用に2lを分取し、1lにつき有害金属測定用硝酸 3mlを添加したものを用意した。

2. 試薬：金属測定標準溶液として原子吸光分析用 1,000ppm 溶液を用い、酸類は有害金属測定用を、その他の試薬は可能な限り特級以上を使用した。

##### 3. 分析装置

(1)原子吸光分析計：Varian AA-875, CRA-90 (Carbon Rod Atomizer), ASD-53 (Automatic Sample Dispenser)

(2)自記分光光度計：Shimadzu-UV-210A

4. 分析方法：Pb, Cd, Cu, Zn, Mn, Feはフレイムレス原子吸光分析法, Ca, Mgはフレイム原子吸光分析法, Na, Kは炎光分析法, その他の項目は上水試験方法に準じた。

#### 結果および考察

調査地区における昼間水 (Running Sample), 一夜滞留水 (Standing Sample) の測定結果は Table 1, 2の通

\* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Distribution Sampling in Setagaya, Katsushika and Shinjuku

| Element    | Running Samples               |                               |                       |    | Standing Samples              |                               |                       |
|------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------|----|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
|            | Max. Conc.<br>$\mu\text{g/l}$ | Min. Conc.<br>$\mu\text{g/l}$ | Standard<br>Deviation | N  | Max. Conc.<br>$\mu\text{g/l}$ | Min. Conc.<br>$\mu\text{g/l}$ | Standard<br>Deviation |
| Setagaya   |                               |                               |                       |    |                               |                               |                       |
| Cd         | 0                             | 0                             | —                     | 10 | 0                             | 0                             | —                     |
| Pb         | 2                             | 1                             | 0.0                   | 10 | 3                             | 1                             | 1.0                   |
| Cu         | 5                             | 1                             | 2.0                   | 10 | 5                             | 2                             | 1.0                   |
| Zn         | 44                            | 30                            | 4.0                   | 10 | 50                            | 35                            | 5.0                   |
| Mn         | 6                             | 1                             | 2.0                   | 10 | 6                             | 2                             | 1.0                   |
| Fe         | 70                            | 30                            | 13.0                  | 10 | 80                            | 44                            | 16.0                  |
| Katsushika |                               |                               |                       |    |                               |                               |                       |
| Cd         | 0                             | 0                             | —                     | 10 | 0                             | 0                             | —                     |
| Pb         | 2                             | 1                             | 0.0                   | 10 | 3                             | 1                             | 0.6                   |
| Cu         | 14                            | 3                             | 3.0                   | 10 | 10                            | 1                             | 3.0                   |
| Zn         | 54                            | 44                            | 39.0                  | 10 | 58                            | 44                            | 4.0                   |
| Mn         | 10                            | 2                             | 3.0                   | 10 | 12                            | 2                             | 3.0                   |
| Fe         | 80                            | 20                            | 19.0                  | 10 | 100                           | 30                            | 22.0                  |
| Shinjuku   |                               |                               |                       |    |                               |                               |                       |
| Cd         | 2                             | 0                             | 0.4                   | 10 | 4                             | 1                             | 0.8                   |
| Pb         | 8                             | 0                             | 2.3                   | 10 | 50                            | 2                             | 17.3                  |
| Cu         | 2                             | 0                             | 0.5                   | 10 | 11                            | 0                             | 2.8                   |
| Zn         | 141                           | 3                             | 52.0                  | 10 | 1560                          | 21                            | 429.0                 |
| Mn         | 27                            | 2                             | 6.8                   | 10 | 43                            | 5                             | 15.0                  |
| Fe         | 760                           | 10                            | 203.0                 | 10 | 5900                          | 20                            | 1947.0                |

りである。

多摩川水系の世田谷区、利根川水系の葛飾区の水質は、Table 1 のように昼間水、一夜滞留水の濃度に大きな差がみられないのに対し、混合水系の新宿区は Cd, Pb, Cu, Zn, Mn, Fe の濃度が昼間水よりも滞留水が高く、オーダーは低い可他 2 地区と比較して10倍以上も差がみられるものがあった。このような差の出る原因としては、世田谷区、葛飾区は直結栓水を使用する一般家庭住宅であり、夜間の水洗便所使用による放流などで管内の滞留時間が短くなることや屋内引込配管の距離が短いことなどによると考えられる。一方新宿区の場合は受水槽→高置水槽を経由する上に屋内の配管距離が長く、水と配管との接触時間が長くなるため滞留水中の金属濃度が高くなるものと思われる。さらにこの地区はTable 2 のように Ca や Mg が少なく、硬度が世田谷、葛飾両区よりも低いため腐食性が大きくなり金属類の溶出を強めていることが考えられる。

水中の金属類の中で人の健康に有害に働く代表的な元

素は Pb と Cd である。水道水を1日に 2l 摂取するとして、Table 1 の最大値から金属量を計算すると、直結栓水は Pb 6 $\mu\text{g}$ 、Cd 0 $\mu\text{g}$ 、Cu 20 $\mu\text{g}$ 、Zn 200 $\mu\text{g}$  であり、受水槽経由栓水は Pb 100 $\mu\text{g}$ 、Cd 8 $\mu\text{g}$ 、Cu 22 $\mu\text{g}$ 、Zn 3120 $\mu\text{g}$  になる。この量が直ちに有害であるとはいえないが、受水槽経由栓水からの有害元素負荷は直結栓水の約10倍になり、Zn は約15倍にもなる。一般的に炊飯、みそ汁の調理、茶用などに使う水をその都度滞留水を全部流してから使用することは少ないことから、団地、マンションなど受水槽経由栓水を使用する住民は直結栓水を使用する住民よりも有害元素の曝露が大きくなっていることが考えられる。

#### ま と め

今回の調査から受水槽経由栓水を使用している住民は、直結栓水を使用している住民よりも Pb, Cd などの有害元素に曝露される率の大きいことが判明した。東京のような大都会では今後もビル住民が増えることが予想されることから、このような滞留水を飲んでいる住民を

Table 2. Distribution Sampling In Setagaya Katsushika, and Shinjuku

| Element            | Running Samples    |                    |                       |    | Standing Samples   |                    |                       |
|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|----|--------------------|--------------------|-----------------------|
|                    | Max. Conc.<br>mg/l | Min. Conc.<br>mg/l | Standard<br>Deviation | N  | Max. Conc.<br>mg/l | Min. Conc.<br>mg/l | Standard<br>Deviation |
| Setagaya           |                    |                    |                       |    |                    |                    |                       |
| K                  | 1.0                | 0.9                | 0.06                  | 10 | 1.0                | 0.8                | 0.06                  |
| Na                 | 16.4               | 14.6               | 0.65                  | 10 | 16.7               | 14.7               | 0.75                  |
| Ca                 | 25.6               | 20.0               | 2.38                  | 10 | 24.8               | 18.4               | 2.20                  |
| Mg                 | 11.2               | 6.3                | 1.67                  | 10 | 10.2               | 6.8                | 0.99                  |
| Si                 | 10.2               | 8.6                | 0.60                  | 10 | 10.3               | 8.2                | 0.60                  |
| SO <sub>4</sub>    | 41.2               | 36.2               | 1.80                  | 10 | 43.6               | 36.6               | 1.88                  |
| NO <sub>3</sub> -N | 3.0                | 2.0                | 0.27                  | 10 | 3.5                | 2.0                | 0.52                  |
| Cl                 | 25.3               | 17.6               | 0.30                  | 10 | 25.3               | 16.9               | 3.50                  |
| Katsushika         |                    |                    |                       |    |                    |                    |                       |
| K                  | 1.3                | 1.1                | 0.04                  | 10 | 1.2                | 1.2                | 0.00                  |
| Na                 | 19.2               | 11.3               | 2.53                  | 10 | 19.8               | 17.1               | 0.81                  |
| Ca                 | 23.2               | 21.6               | 0.62                  | 10 | 23.2               | 21.6               | 0.43                  |
| Mg                 | 9.2                | 4.9                | 1.04                  | 10 | 10.2               | 6.3                | 1.30                  |
| Si                 | 10.8               | 9.7                | 0.40                  | 10 | 10.8               | 10.1               | 0.20                  |
| SO <sub>4</sub>    | 51.0               | 38.0               | 4.60                  | 10 | 11.0               | 10.0               | 5.00                  |
| NO <sub>3</sub> -N | 3.5                | 1.5                | 0.50                  | 10 | 4.0                | 1.5                | 0.64                  |
| Cl                 | 26.0               | 25.3               | 0.34                  | 10 | 27.4               | 24.6               | 0.80                  |
| Shinjuku           |                    |                    |                       |    |                    |                    |                       |
| K                  | 2.3                | 2.3                | 0.00                  | 10 | 2.5                | 2.4                | 0.80                  |
| Na                 | 60.0               | 55.0               | 1.40                  | 10 | 65.0               | 55.0               | 2.60                  |
| Ca                 | 15.2               | 14.4               | 0.40                  | 10 | 18.4               | 13.6               | 1.30                  |
| Mg                 | 3.4                | 1.0                | 0.70                  | 10 | 3.9                | 1.5                | 0.70                  |
| Si                 | 9.8                | 9.8                | 0.00                  | 10 | 9.7                | 9.0                | 1.30                  |
| SO <sub>4</sub>    | 23.1               | 17.1               | 1.60                  | 10 | 23.3               | 17.0               | 1.60                  |
| NO <sub>3</sub> -N | 0.7                | 0.5                | 0.34                  | 10 | 1.8                | 1.5                | 1.00                  |
| Cl                 | 26.3               | 16.1               | 0.80                  | 10 | 26.3               | 16.1               | 0.71                  |

対象に血中あるいは毛髪中の Pb, Cd を調査し, 水道水と人の健康についての評価の一資料としたい。

#### 文 献

- Schroeder, H. A. and Brattleboro, W. : J. A. M. A., 172, 1902, 1960
- Muss, D. L. : J. AWWA., 54, 1371, 1962
- Schroeder, H. A. : J. A. M. A., 195, 125, 1966
- Masironi, R., Miesch, A. T., Crawford, M. D. and Hamilton, E. I. : Bull. WHO, 47, 139, 1972
- Robertson, J. S. : J. AWWA, 71, 408, 1979
- Report of a WHO Expert Committee : Technical Report Series 532
- Westendorf, J. R. and Middleton, A. C. : J. AWWA, 71, 417, 1979
- Elinder, C. G., Stenstrom, T., Piscator, M. and Linnman L. : Arch. of Env. Health, 35, 81, 1981
- Thomas, H. F., Elwood, P. C., Welsby, E. and St. Leger, A. S. : Natur, 282, 712, 1979
- Moore, M. R. : Sci. of Total Env. 7, 109, 1977
- Sharrett, A. R. : Sci. of Total Env. 7, 217, 1977



## GC-FID 法による井水中の塩素系炭化水素の分析

大橋 則雄\*, 矢口 久美子\*, 関山 登\*, 藤沢 正吉\*  
渡辺 学\*, 中村 弘\*, 松本 昌雄\*

### Analysis of Chlorinated Hydrocarbons in Well Water by Gas Chromatography with a Flame Ionization Detector

NORIO OHHASHI\*, KUMIKO YAGUCHI\*, NOBORU SEKIYAMA\*,  
MASAYOSHI FUJISAWA\*, SATORU WATANABE\*,  
HIROSHI NAKAMURA\* and MASAO MATSUMOTO\*

**Keywords:** 揮発性塩素系炭化水素 volatile chlorinated hydrocarbons, 井戸水 well water, ヘッドスペース head space, ガスクロマトグラフィー gas chromatography, 水素炎イオン化検出器 flame ionization detector

#### 緒 言

井戸水中よりしばしば検出される揮発性塩素系炭化水素（主として, 1,1,1-trichloroethane  $1,1,1-\text{CH}_3\text{CCl}_3$ , trichloroethylene  $\text{CHClCCl}_2$ , tetrachloroethylene  $\text{CCl}_2\text{CCl}_2$ ）は, トリハロメタン分析法<sup>1)</sup>に準じてヘッドスペース法によりガスクロマトグラフィー電子捕獲検出器 (GC-ECD) で測定するのが一般的である。しかし, ECD は物質により相対感度が著しく異なりダイナミックレンジも狭いので試料中濃度が高い場合, 定周波パルス型 ECD では応答が飽和し希釈して測定しなおしたり, 線源の汚れによる感度の変動がおこることがある。汚染井戸水の分析例<sup>2,3)</sup>にみられるような多成分で各物質の濃度が異なる検水を数多く測定する場合には必ずしも適した方法とはいえない。そこで, われわれは水素炎イオン化検出器 (FID) による分析法を検討した。FID によるこれら物質の分析例としては, Kolb<sup>4)</sup> や加藤<sup>5)</sup> の報告があるが, 前者は市販のヘッドスペースオートアナライザーの応用例であり, 後者は真空びんを利用して気相を一度 GC 試料管に濃縮後, それを加熱し GC に導入する方法で, それぞれ一般的でなく操作が繁雑である。われわれは, 市販のバイアルびんを用い, 前記 3 種の化合物のほかにかつて検出例のあった *cis*-1,2-dichloroethylene (*cis*-1,2- $\text{CHClCHCl}$ ) の 4 種についてヘッドスペース・GC-FID による分析法を検討した。

#### 実 験 法

**装置** ガスクロマトグラフ; 島津 GC-7APE 周波数制御型定電流方式, 線源 <sup>63</sup>Ni 10mCi・日立 GC163FID: インテグレーター; 島津クロマトパック C-R1A: 恒

温循環水槽; 小松エレクトロニクス CTE-220

**試薬** 標準物質は和光純薬工業の試薬特級をそのまま用いた。これらの物質を関東化学の残留農薬用メタノールで適宜希釈して標準溶液を作成した。検量線作成のための精製水は蒸留脱イオン水 1l を *n*-ヘキサン 100ml で 2 回洗い, ホットスターラーでゆるやかに沸騰させ, 空試験でガスクロマトグラムに 4 物質のピークを認めなくなったことを確かめた後, 共栓試薬びんに入れ冷蔵庫に保存した。

**定量方法** 1. ECD 法; トリハロメタン分析法に準じて行なった。すなわち, 市販品の容量 63ml のバイアルびんに検水 50ml を入れ, テフロンシートをはさんでシリコンゴム栓をし, 中央に穴のあいたアルミキャップをクリッパーで固定した。これを数回転倒し, 20℃の恒温水槽中に 2 時間静置後, ガスタイトシリンジでバイアルびん中の気相 100 $\mu$ l をとり GC-ECD に注入した。検量線は精製水をバイアルびんに 50ml 封入し, これにメタノールに溶かした標準試薬をマイクロシリンジで, シリコンゴム栓を通して直接注入し, よく攪拌した後, 試料と同様に操作し作成した。GC の分析条件は次のとおりである。20% Silicone DC-550 Chromosorb W AW 80/100 メッシュ 3m $\times$ 3mm, カラム温度 100℃, 注入口温度 250℃, ECD セル電流 1.0nA, 窒素ガス流量 50ml/min

2. FID 法: 検水 100ml を容量 125ml のバイアルびんに入れ, ECD 法と同様に操作する。それを 50℃の恒温水槽に 2 時間静置後, 気相 2.5ml を GC-FID に注入した。GC の分析条件は次のとおりである。20% TCP Chro-

\* 東京都立衛生研究所多摩支所 190 東京都立川市柴崎町 3-16-25

\* Tama Branch Laboratory, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 16-25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan

表 1. 水中の塩素系炭化水素の検出限界

| 化 合 物                                | 検出限界 (ppb) |       |
|--------------------------------------|------------|-------|
|                                      | FID 法      | ECD 法 |
| 1, 1, 1- $\text{CH}_3\text{CCl}_3$   | 2          | 0.5   |
| <i>cis</i> -1, 2- $\text{CHCl/CHCl}$ | 4          | 50    |
| $\text{CHCl/CCl}_2$                  | 2          | 2.0   |
| $\text{CCl}_2\text{CCl}_2$           | 2          | 0.3   |

表 2. FID 法の変動係数 (%)

| 化 合 物                                | 平 衡 温 度 |     |
|--------------------------------------|---------|-----|
|                                      | 50℃     | 70℃ |
| 1, 1, 1- $\text{CH}_3\text{CCl}_3$   | 3.8     | 5.6 |
| <i>cis</i> -1, 2- $\text{CHCl/CHCl}$ | 3.5     | 4.9 |
| $\text{CHCl/CCl}_2$                  | 5.4     | 7.9 |
| $\text{CCl}_2\text{CCl}_2$           | 5.6     | 8.2 |

試料注入量 2.5ml

各試料濃度 100ppb

n=10

mosorb W AW DMCS 80/100 メッシュ 3m×3mm,  
カラム温度80℃, 注入口温度140℃, 窒素ガス流量 50ml/min, Range 10, Attenuation 1.

各物質の検出限界は、インテグレーターのパーク面積が1000 $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ を示す濃度をもって表わした。

#### 結果と考察

**FID 法と ECD 法との検出限界の比較** ECD法と FID 法による各物質の検出限界を表 1 に示す。ECD 法の各物質の感度は、1, 1, 1- $\text{CH}_3\text{CCl}_3$ ,  $\text{CHCl/CCl}_2$ ,  $\text{CCl}_2\text{CCl}_2$  に対しては高いが、*cis*-1, 2- $\text{CHCl/CHCl}$  に対しては著しく低い。これは 4 物質の気液相間の分配率の違い<sup>7)</sup> によるものではなく、ECD の *cis*-1, 2- $\text{CHCl/CHCl}$  に対する応答の悪さ<sup>8)</sup> に起因する。

一方、FID 法は測定物質の絶対量が最低 1ng 以上必要であるために試料注入量は 2.5ml と多くなるが、各物質共ほぼ同じ検出感度を示した。平衡温度を 50℃ から 70℃ に上昇させた場合、気相への分配率はクロロホルムの場合<sup>9)</sup> と同様に、各物質共約 2 倍増加した。各温度における変動係数を表 2 に示したように再現性もそれほど悪くなく充分定量が可能であった。また、塩化ナトリウムまたは硫酸アンモニウム 20g の添加で各物質共約 2 倍に分配率が上昇した。よって、平衡温度の上昇と塩類の添加により、4 物質共 1ppb までの検出が可能であった。

**検量線と測定範囲** FID 法による各物質の検量線を図

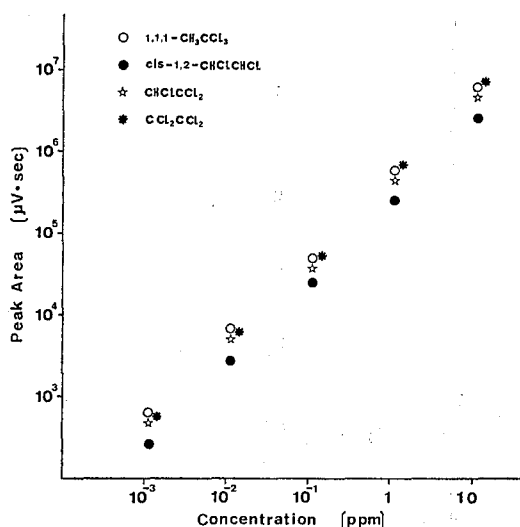


図 1. GC-FID 法による塩素系炭化水素の検量線

1 に示す。各物質共 1ppb レベルから 10ppm レベルまでの広い濃度範囲で直線を示し、ヘンリーの法則に従った。汚染井戸水を分析する場合に、森田<sup>2)</sup> や加藤<sup>3)</sup> はこれらの物質が最大値で数 ppm のレベルで検出されることがあると報告しており、幅広い濃度範囲の測定が必要で、このために、ECD 法では 4 物質を 1 回で測定することができず、検水の希釈などの複雑な操作が必要となってくる。これに対し、FID 法は広い濃度範囲で 4 物質が同時に測定可能であり、個々の濃度差の大きい多数の検体の連続測定に有利な方法であるといえる。

**妨害物質とカラム充てん剤** FID 法で分析した汚染井戸水のガスクロマトグラムを図 2 に示す。これまでに約 300 件の井戸水について分析を行なったが、4 物質の他に特にピークは検出されなかった。図 3 に標準物質のガスクロマトグラムを示したように、benzene, toluene, chloroform, bromodichloromethane などとの分離が可能であった。また平衡温度が高温の場合、ガスタイトシリンジで採取した気相中の水蒸気の影響が心配されるが、半年間頻度高く分析を行なってもカラムの劣化は認められなかった。なお、BX-1 もこれら 4 物質の分離定量に使用可能であった。

#### ま と め

井水中の揮発性塩素系炭化水素の測定法として、ヘッドスペース・GC-FID 法について検討した。その結果、GC-ECD 法は物質による感度差が大きく、測定できる濃度範囲も狭いが、GC-FID 法は、1, 1, 1- $\text{CH}_3\text{CCl}_3$ ,

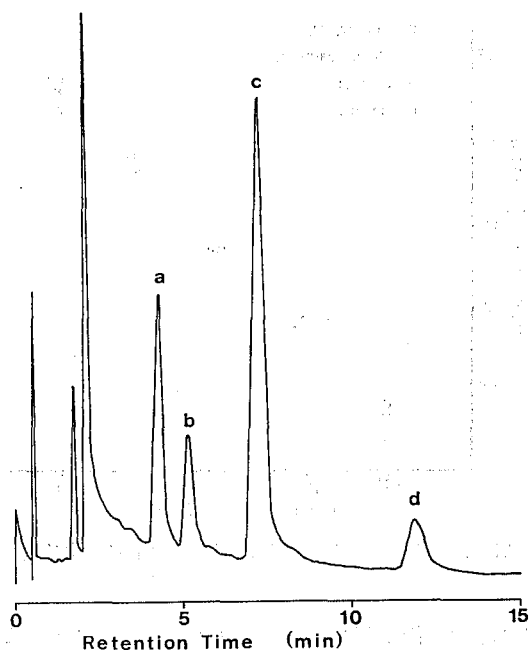


図 2. GC-FID 法による汚染井戸水のガスクロマトグラム

a : 1,1,1-trichloroethane,  
b : *cis*-1,2-dichloroethylene,  
c : trichloroethylene, d : tetrachloroethylene

*cis*-1,2- $\text{CHCl/CHCl}$ ,  $\text{CHCl/CCl}_2$ ,  $\text{CCl}_2\text{CCl}_2$  の 4 物質について 1ppb レベルから 10ppm レベルまで広い濃度範囲で検量線が直線性を示し、検出限界も 1ppb 程度で実用性の高い分析法であった。

(本研究の概要は日本公衆衛生学会総会第40回名古屋大会1981年10月で発表した。)

#### 文 献

- 1) 厚生省環境衛生局水道環境部水道整備課：水道水中の総トリハロメタン測定方法(案)について，水道協会雑誌，551，205，1980
- 2) 森田昌敏，中村弘，三村秀一：東京衛研年報，25，399，1974
- 3) 加藤龍夫，仲山伸次：横浜国大環境科学研究センター紀要，2-1，27，1976

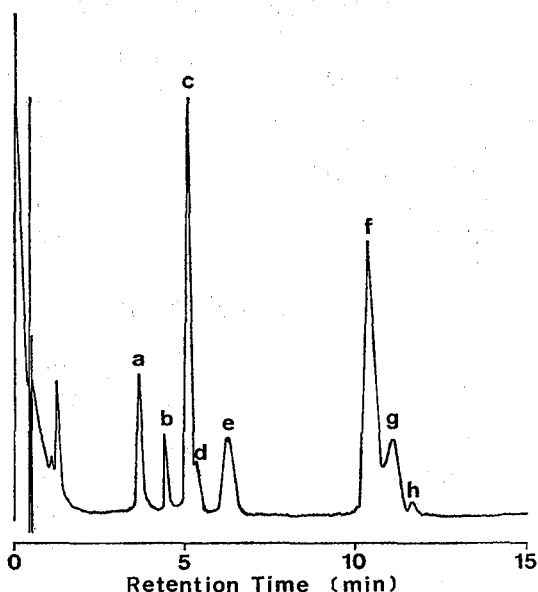


図 3. GC-FID 法による標準物質のガスクロマトグラム

a : 1,1,1-trichloroethane,  
b : *cis*-1,2-dichloroethylene, c : benzene,  
d : chloroform, e : trichloroethylene,  
f : toluene, g : tetrachloroethylene,  
h : bromodichloromethane

各試料濃度 10ppb 平衡温度 50℃  
試料注入量 2.5ml

- 4) Kolb, B.: *J. Chromatogr.*, 122, 553, 1976
- 5) Kolb, B., Krauß, H. and Auer, M.: パーキンエルマー・ヘッドスペースガスクロマトグラフィー応用集第1巻，1980
- 6) 加藤龍夫著：大気汚染のガスクロマト技術，1975，三共出版
- 7) Cowen, W.F. and Baynes, R.K.: *J. Environ. Sci. Health.*, A15, 413, 1980
- 8) 島津製作所：エレクトロンキャブ チャディテクタ ECD-7 取扱説明書
- 9) Kaiser, K.L.E. and Oliver, B.G.: *Anal. Chem.*, 48, 2207, 1976

## 水中の下水臭揮発性硫黄化合物の分析

矢口 久美子\*, 大橋 則雄\*, 関山 登\*, 渡辺 学\*  
藤沢 正吉, 中村 弘\*, 松本 昌雄\*

### Determination of Sewage-Odoriferous Volatile Sulphur Compounds in Water

KUMIKO YAGUCHI\*, NORIO OHASHI\*, NOBORU SEKIYAMA\*, SATORU WATANABE\*,  
MASAYOSHI FUJISAWA, HIROSHI NAKAMURA\* and MASAO MATSUMOTO\*

**Keywords**: 下水臭 sewageodor, 揮発性硫黄化合物 volatile sulphur compounds, ヘッドスペース法 head space analysis, 水 water

#### まえがき

我々が水質検査を行なっている多摩地区の井戸水のうち約5%に異臭を認め、その中で下水臭のする水が最も多い。そこでこのような下水臭の質を解明するために、成分の一部である<sup>1)</sup>と考えられる揮発性硫黄化合物の分析法を検討することにした。

水中の悪臭成分の分析方法として武藤らのヘッドスペース法<sup>2)</sup>や加藤らの真空びん法<sup>3)</sup>、バブリング法<sup>4)</sup>がある。武藤らのヘッドスペース法は特別の装置と多量の検水が必要である。真空びん法やバブリング法も低温濃縮法の一つで操作が煩雑であり、液体酸素などを寒剤として使うため、水蒸気や空気による汚染も生じやすく分析がむずかしい面がある。そこで我々は簡便に測定できる方法として100ml用バイアルびんを用いたヘッドスペース法と炎光光度検出器(FPD)付ガスクロマトグラフによる分析を検討した結果、実用的に応用できることがわかったので報告する。

#### 実験方法

##### 1. 試薬

メチルメルカプタン, 硫化メチル, 二硫化ジメチルは悪臭物質試験用の標準液(和光純薬)。エチルメルカプタン, 二硫化炭素, 硫化エチルは試薬特級(和光純薬)を残農用ベンゼンで希釈して使用した。

##### 2. 装置

ガスクロマトグラフ: FPD付ガスクロマトグラフ(日立163型)。

##### 3. 分析方法

市販の100ml用プレバイアルびん(全容量は125ml)に検水100mlを採取し、テフロンシートにシリコンセプタを重ねてふたをし、アルミシールで固定した。40℃～

70℃の恒温水槽中に30分間静置し、上部の気相をガストイトシリンジで1ml採取し、FPD付ガスクロマトグラフにより測定した。検量線は50℃に30分間静置した。

##### 4. ガスクロマトグラフィーの条件

カラム: 25% TCEP chromosorb P 3m ガラスカラム, または 5% PPE chromosorb W 3m ガラスカラム。カラム温度: 70℃。導入部温度: 130℃。キャリアガス流量: 50ml/min。

##### 5. 水中の臭閾値の測定

メチルメルカプタン, エチルメルカプタンは0.01ppb～0.1ppbまで8種, 硫化メチル, 硫化エチルは0.05ppb～1.0ppbまで7種, 二硫化炭素は0.01ppm～0.06ppmまで6種の標準液を次のように調製した。まず初めにメチルメルカプタンは1ppmから10ppmの濃度になるようにメチルアルコールに溶かし標準液を調製した。それらを活性炭を通して無臭にした水1lに10μlずつ注入し、標準液中のメチルアルコール濃度が一定になるようにした。他の化合物についても同様にして調製した。臭閾値は6～10人の当所職員が前記の標準液を試験し、半数以上が臭いを感じた低い方の濃度とした。

##### 6. 水試料

下水臭のした井戸水, 河川水および下水処理場流入水。

#### 結果と考察

##### 1. 分析条件の検討

恒温水槽の温度を40℃, 50℃, 60℃, 70℃の4段階にかえ、バイアルびん中の気液相間の化合物の濃度が平衡に達する時間について検討を行なった。結果を図1と図2に示す。ガスクロマトグラフにおける感度が物質により異なるのでそれぞれメチルメルカプタンは2.5ppb, 硫

\* 東京都立衛生研究所多摩支所 190 東京都立川市柴崎町 3-16-25

\* Tama Branch Laboratory, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
16-25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan

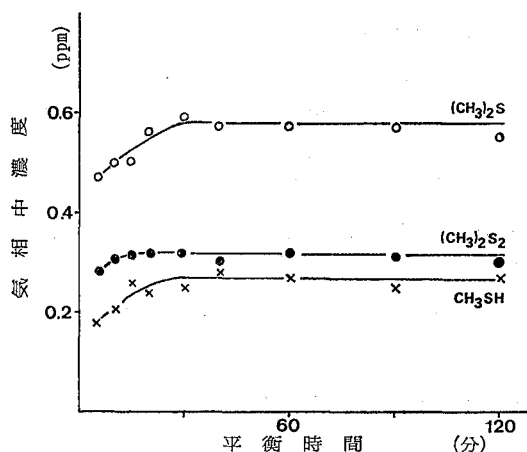


図 1. 化合物別平衡時間

恒温水槽の温度: 50°C

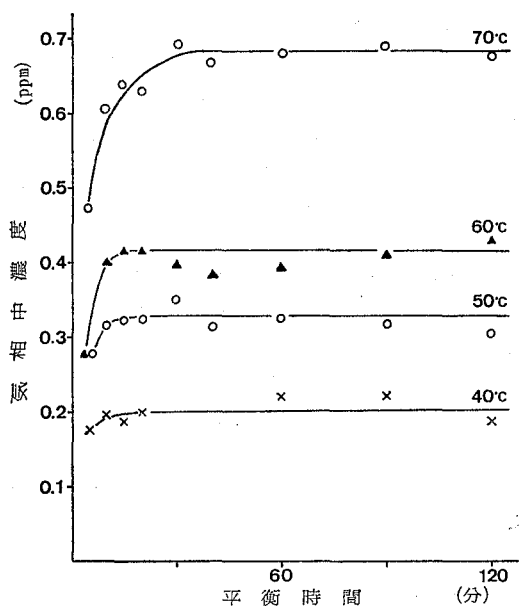
試料: CH<sub>3</sub>SH 2.5ppb 水溶液(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S 8.5ppb 水溶液(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 10ppb 水溶液

図 2. 二硫化ジメチルの温度別平衡時間

試料: 0.01ppm 水溶液

化メチルは 8.5ppb, 二硫化ジメチルは 10ppb 水溶液を用いたが, 3 化合物ともいずれの温度においても 30 分で平衡に達した。

表 1 に恒温水槽の温度を変えて測定した時の各温度における変動係数を示す。また図 3 に 50°C の恒温水槽に 30

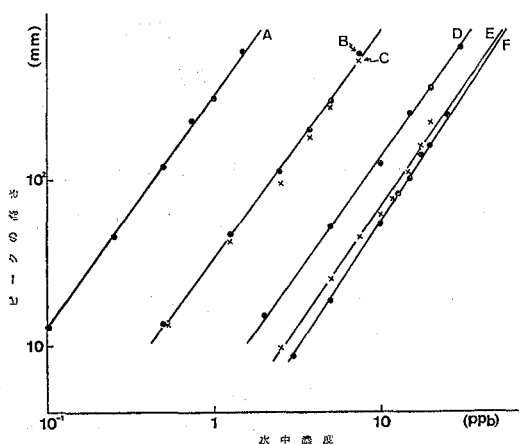


図 3. 検量線

A: CS<sub>2</sub> B: CH<sub>3</sub>SH C: C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>SHD: (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>S E: (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S F: (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>

表 1. 温度別変動係数

| 化 合 物                                                  | 40°C   | 50°C   | 60°C   | 70°C   |
|--------------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| CH <sub>3</sub> SH (2.5ppb)                            | 5.4**  | 7.2*** | 9.3**  |        |
| (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S (8.5ppb)             | 4.3**  | 5.3*** | 5.8*** | 3.5*** |
| (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> (10ppb) | 3.6*** | 5.2*** | 7.2*** | 4.9*   |
| *: n=5    **: n=6    ***: n=10                         |        |        |        | (%)    |

表 2. ヘッドスペース法による検出限界と水中の臭閾値

| 化 合 物                                           | 検 出 限 界 |      | 臭 閾 値 |
|-------------------------------------------------|---------|------|-------|
|                                                 | 50°C    | 70°C |       |
| CH <sub>3</sub> SH                              | 0.5     | 0.1  | 0.05  |
| C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> SH                | 0.5     | 0.1  | 0.02  |
| (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S               | 2.0     | 0.2  | 0.4   |
| (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> S | 2.0     | 0.4  | 0.2   |
| (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub>  | 2.5     | 0.6  | —     |
| CS <sub>2</sub>                                 | 0.1     | 0.02 | 20    |
|                                                 |         |      | (ppb) |

分間静止の条件で測定した検量線を示す。変動係数が 5 ~ 7% であったが, いずれの化合物も両対数目盛で直線性があり, 本法は定量分析にも応用できる。恒温水槽を 70°C にした時はメチルメルカプタン, エチルメルカプタンについては変動が大きすぎて定量分析は不可能であった。

図 4 に本法で用いた 2 種類の GC カラムを使用した時

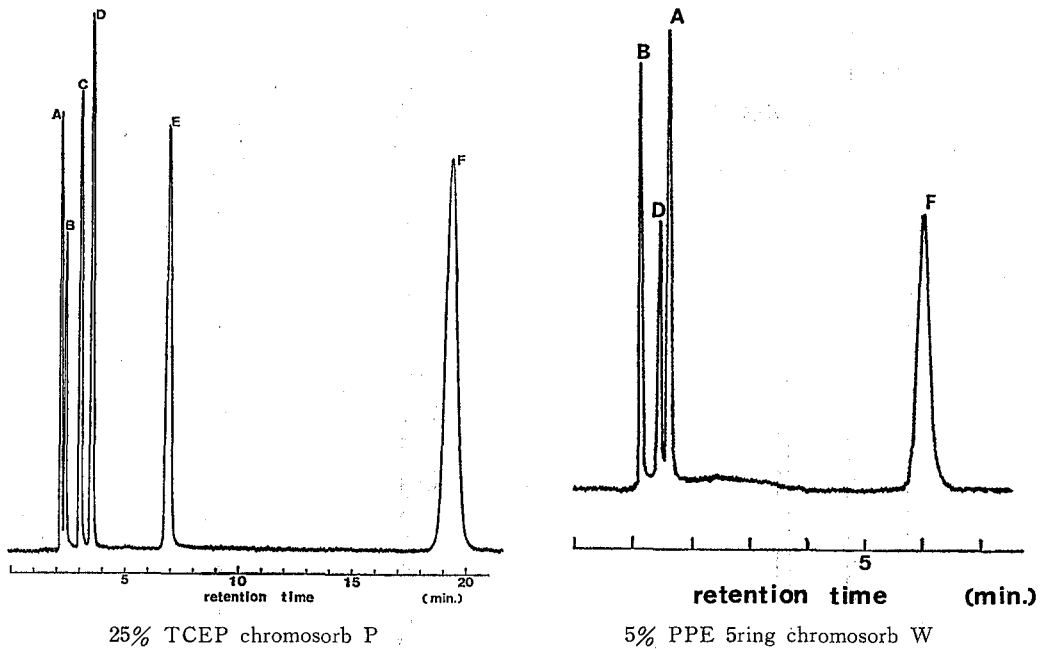


図 4. 揮発性硫黄化合物の2種のGC-カラムにおけるガスクロマトグラム

A:  $\text{CS}_2$  B:  $\text{CH}_3\text{SH}$  C:  $\text{C}_2\text{H}_5\text{SH}$  D:  $(\text{CH}_3)_2\text{S}$   
 E:  $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{S}$  F:  $(\text{CH}_3)_2\text{S}_2$

表 3. 下水臭・腐敗臭の水のGC-FPDによる分析

| 水の種類     |   | 臭いの種類  | 検出化合物         |                           |                        |                             | 未確認化合物数 |
|----------|---|--------|---------------|---------------------------|------------------------|-----------------------------|---------|
|          |   |        | $\text{CS}_2$ | $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ | $\text{CH}_3\text{SH}$ | $(\text{CH}_3)_2\text{S}_2$ |         |
| 井戸水      | A | 下水臭    | +             | +                         | —                      | —                           | 2       |
|          | B | 下水臭    | +             | +                         | —                      | —                           |         |
|          | C | 下水臭    | +             | +                         | —                      | —                           |         |
|          | D | 下水臭    | +             | +                         | —                      | —                           |         |
|          | E | 硫化水素様臭 | +             | +                         | —                      | —                           |         |
|          | F | 硫化水素様臭 | +             | +                         | —                      | —                           |         |
|          | G | 腐敗臭    | +             | +                         | +                      | —                           | 3       |
|          | H | 腐敗臭    | +             | +                         | —                      | —                           |         |
|          | I | 腐敗臭    | +             | +                         | —                      | —                           |         |
|          | J | 腐敗臭    | +             | +                         | —                      | —                           | 1       |
| 河川水      | A | 下水臭    | +             | +                         | +                      | +                           | 4       |
|          | B | 下水臭    | +             | +                         | +                      | —                           | 2       |
| 下水処理場流入水 |   | 下水臭    | —             | +                         | +                      | +                           |         |

—: 検出限界未満

+:  $\text{CH}_3\text{SH}$  検出限界以上 1ppb 未満 $\text{CS}_2$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{S}_2$  検出限界以上 5ppb 未満+:  $\text{CH}_3\text{SH}$  1ppb 以上 $\text{CS}_2$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{S}_2$  5ppb 以上

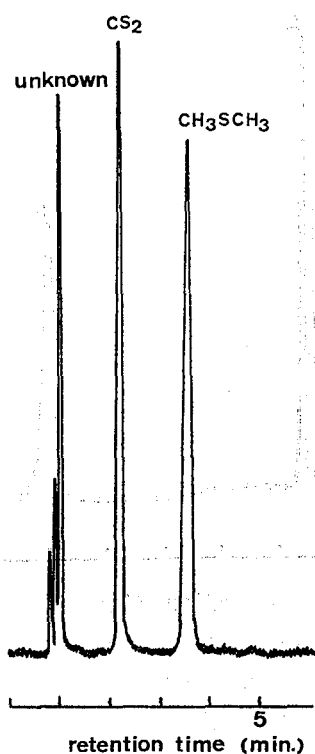


図 5. 下水臭井戸水のガスクロマトグラム  
カラム: 25% TCEP chromosorb P  
恒温水槽: 50°C

のクロマトグラムを示す。下水臭の水からしばしば検出される低沸点硫黄化合物の分離は25% TCEP chromosorb Pの方が良いが、硫化メチルと二硫化炭素の分離が悪い。しかし5% PPE では分離するので2つのカラムを併用するとよい。

## 2. 検出限界と臭閾値

本法による検出限界と臭閾値との関係を表2に示す。ここにみられるように硫化メチルと硫化エチルは恒温水槽70°Cにおいて閾値付近まで測定できる。メルカプタン類については臭閾値が著しく低く閾値の一桁上が測定下限であった。しかし、実際に分析した環境水ではメチルメルカプタンは0.5ppb以上含まれており、定性的な確認はでき実用的には充分に応用できる。

## 3. 下水臭のする水の分析

以上の方法を用いて下水臭や腐敗臭のする井戸水、河川水、下水処理場流入水を分析した結果を表3に示す。臭閾値の低いメチルメルカプタンについては1ppb以上検出したものを計、それ以外の化合物についてはほぼ臭閾値の10倍程度の濃度をめやすとして5ppb以上検出し

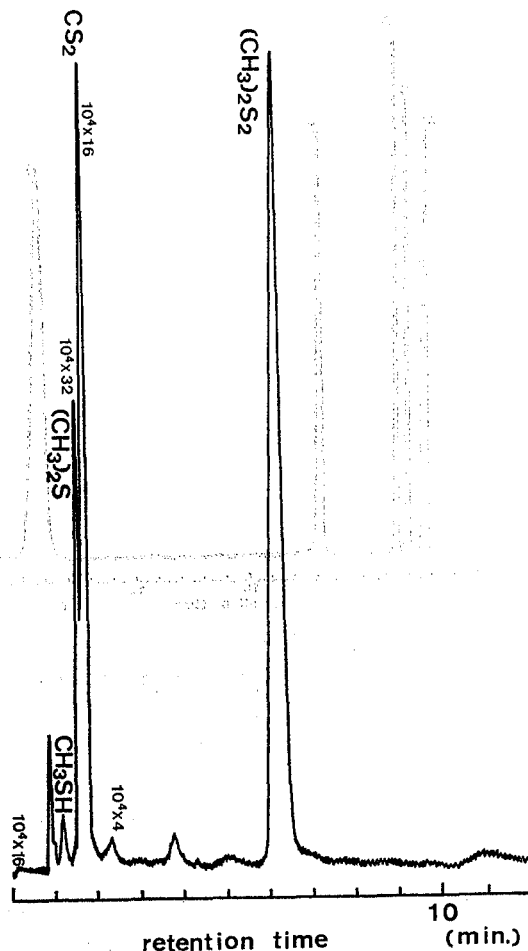


図 6. 下水臭河川水Aのガスクロマトグラム  
カラム: 5% PPE 5ring chromosorb W  
恒温水槽: 70°C

たものを計で表示した。ほとんどの検水から二硫化炭素と硫化メチルの2種類が検出された。メチルメルカプタンや二硫化ジメチルは臭いの強かった河川水や下水処理場流入水からは検出されたが、井戸水からは検出されなかった。なお、環境水の分析例として図5に井戸水Aの、図6に河川水Aの、図7に下水処理場流入水のガスクロマトグラムを示す。

## ま と め

水の下水臭成分の一部である低沸点硫黄化合物(メチルメルカプタン、エチルメルカプタン、二硫化炭素、硫化メチル、二硫化ジメチル)についてバイアルびんを用いたヘッドスペース法とFPD-ガスクロマトグラフィーによる方法を検討した。100ml用バイアルびんに検水

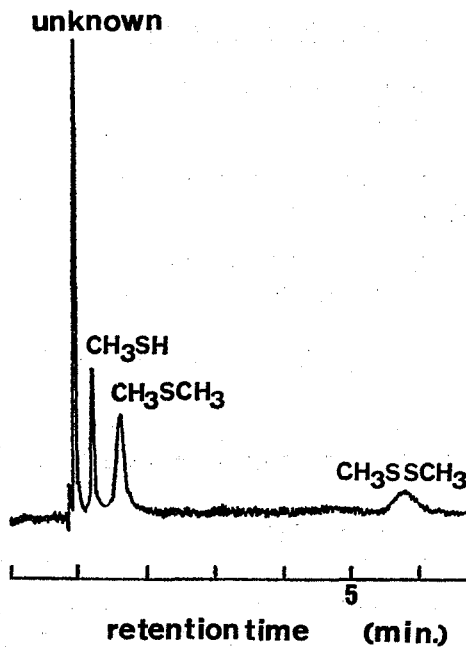


図 7. 下水処理場流入水のガスクロマトグラム  
 カラム : 5% PPE 5ring chromosorb W  
 恒温水槽 : 40℃

100ml を入れ、恒温水槽 40℃, 50℃, 60℃, 70℃ に 30 分間静置し、気相をガスクロマトグラフに注入することによって分析を行なう。50℃ では変動係数も少なく定量性も良好である。しかし 70℃ ではメルカプタン類は変動係数が大きくなり定量性にとぼしかった。本法を使って下水臭の水を実際に分析した結果、多くの試料から 4 種の硫黄化合物（二硫化炭素、メチルメルカプタン、硫化メチル、二硫化ジメチル）が確認された。以上のように本法は揮発性硫黄化合物の分析に有効な方法である。

#### 文 献

- 1) 高橋正宏：下水道協会雑誌, 17(196), 50, 1980
- 2) 悪臭の測定等に関する研究報告書（昭和51年度 環境庁委託研究）：日本環境衛生センター, 96, 1977
- 3) 加藤龍夫, 仲山伸次：横浜国立大学環境科学研究センター紀要, 2(1), 13, 1976
- 4) 加藤龍夫著：大気汚染のガスクロマトグラフ技術, 初版, 238, 1975, 三共出版



## 下水道未整備地域の水質汚濁について (第4報) 平井川水質の経年変化

梶 本 博\*, 押 田 裕 子\*, 有 賀 孝 成\*, 池 島 伸 至\*  
中 村 弘\*, 松 本 昌 雄\*

### Studies of Water Pollution in the Area without Sewer Systems (IV) The Annual Change of Water Quality in the Hirai River

HIROSHI TOCHIMOTO\*, HIROKO OSHIDA\*, TAKANARI ARIGA\*,  
NOBUYUKI IKEJIMA\*, HIROSHI NAKAMURA\* and MASAO MATSUMOTO\*

**Keywords:** 水質汚濁 water pollution, 生活排水 domestic sewage, 経年変化 annual change, 平井川 the Hirai River, 小河川 town stream

#### 緒 言

大都市周辺の地域は下水道が未整備のままベッドタウンとして発展しているため、新興住宅の建設が進むにつれその地域の中小河川は生活排水等の流入によりその汚濁が問題となっている<sup>1)</sup>。そこで著者らは、東京都西多摩地区において、近年、町のベッドタウン化にともない水質汚濁が問題となっている日の出町の平井川に注目し、昭和50年から当河川の水質調査を実施してきた。すでに第1報<sup>2)</sup>・第2報<sup>3)</sup>において当初の汚濁状況については報告した。その後、日の出町もさらにベッドタウン化も進み、発展をとげている。こうした背景における平井川水質の経年変化を10地点について観察しているが、今回は人間活動の影響が大きく反映する下流の3地点の水質変化を検討したので報告する。

#### 調査方法

1. 調査期間および測定地点 本報では昭和50年2月より56年12月まで毎月1回の計83回の測定を行った。なお採水にあたって降雨日および台風等大雨による異常流量の時は避けた。図1に測定地点を示したが、これらの地点の特徴を次に示す。

st.1 付近は森林で川幅わずか2~3mの沢であり、汚染源は特になく本調査の対照地点とした。

st.2 この地点の上流部には、約2,000人の市街化区域があるが、ほとんど人口の増加はみられない。

st.3 st.2より1.8km下流の地点で、この流域が最もベッドタウン化が進んでおり、人口増加が顕著な地域である。

st.4 st.3より1.3km下流の地点で、この流域におい

てもベッドタウン化、それにともなう人口増加が認められる。

#### 2. 測定項目および方法

水質測定項目は、BOD (ウィンクラー・アジ化ナトリウム変法)、COD (過マンガン酸カリウム・酸性直火5分法)、アンモニア性窒素 (ネスラー法)、リン酸イオン (モリブデンブルー法)、MBAS (メチレンブルー法)、塩素イオン (硝酸第二水銀法)、濁度 (比濁法)、大腸菌群数 (デオキシコレーテ培地法) の計8種をとりあげた。

#### 結 果

図2-1、2-2に各測定項目の水質の経年変化を示した。大腸菌群数を除く測定項目については、各年における測定値の平均値と標準偏差により、大腸菌群数は個々の測定値をそのままプロットして経年変化を示した。

BOD st.1は各年平均0.2mg/l程度である。st.2は各年平均1mg/l前後であるが、時々環境基準の2mg/lを上回ることがあり、標準偏差が大きくなっている。st.3は50年に2mg/lを上回ることがしばしばあり標準偏差が大きく平均値も高かったが、51年以後平均1mg/l程度に減少し標準偏差も小さくなっている。st.4は各年平均1mg/l程度で標準偏差は小さい。

COD st.1は各年平均0.3mg/l程度である。st.2~4とも50年~53年の頃は1mg/lを上回る値もみられ標準偏差も大きかったが、その後高い値はみられなくなり平均値も0.5mg/l前後に減少している。

アンモニア性窒素 st.1は全く検出されていない。st.2は50年に0.05mg/lを上回る値もみられたが、その

\* 東京都立衛生研究所多摩支所 190 東京都立川市柴崎町 3-16-25

\* Tama Branch Laboratory, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
16-25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan

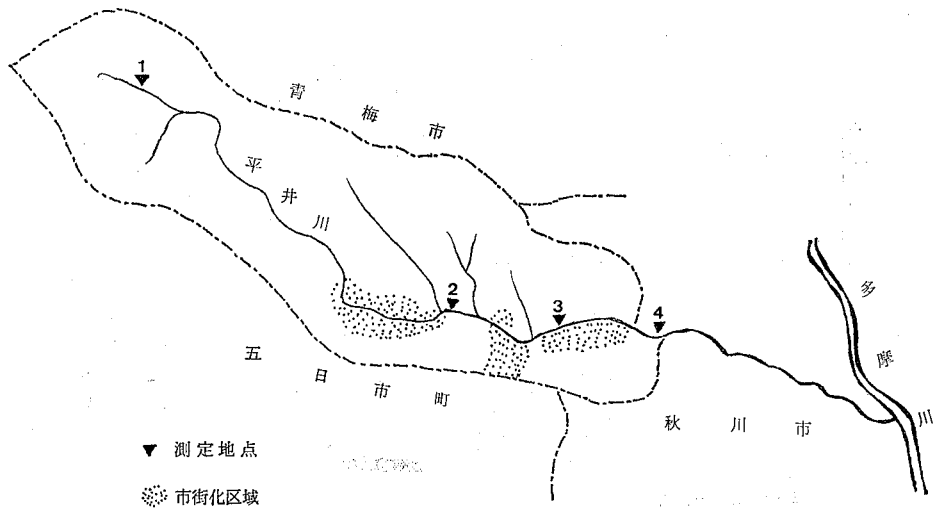


図 1. 平井川と測定地点

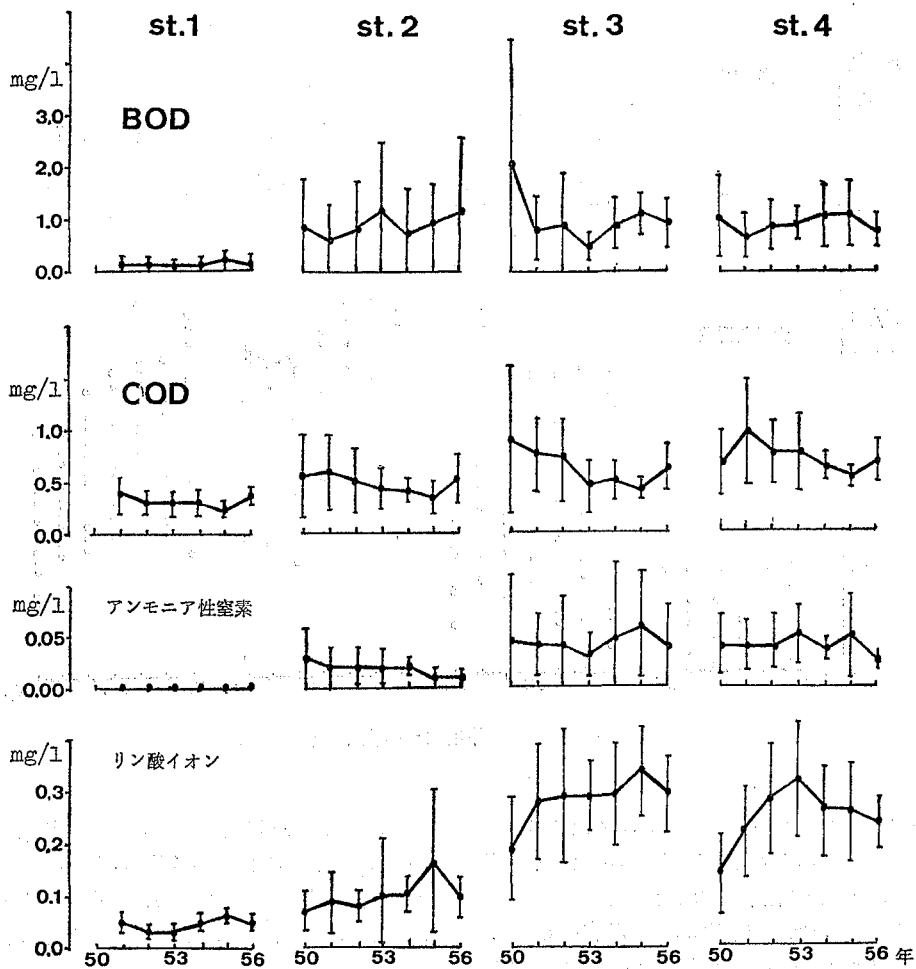


図 2-1. 平井川水質の経年変化

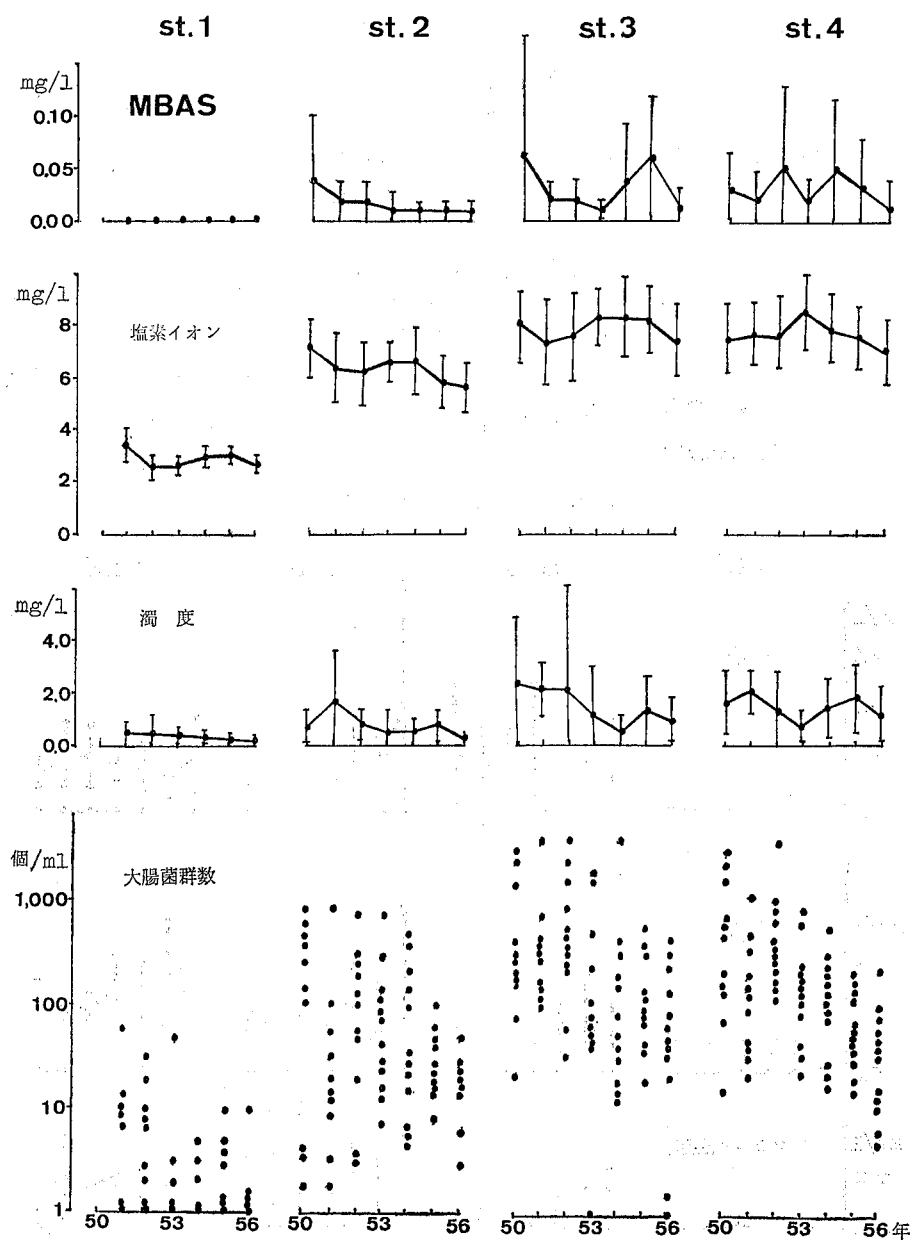


図 2-2. 平井川水質の経年変化

後この値を超えることはなくなった。st.3,4は各年平均0.05mg/l前後で経年変化はみられず、st.3は0.1mg/l以上の値もみられるため標準偏差は大きい。

リン酸イオン st.1は各年平均0.05mg/l程度である。st.2は53年55年には突発的な高い値により標準偏差が大

きくなっているが各年平均0.1mg/l程度で経年変化は認められない。st.3は50年が平均0.2mg/lであるがその後0.3mg/l程度に増加している。st.4は50年から53年にかけてやや増加傾向がみられたが、その後平均0.25mg/l程度で変化はみられない。

表 1. 日の出町における排水処理形態

|        | 雑排水       |          |            |            | し尿         |           |            |  |
|--------|-----------|----------|------------|------------|------------|-----------|------------|--|
|        | 浄化槽処理     |          | 無処理        |            | 浄化槽処理      |           | くみ取り       |  |
|        | 河川放流      | 吸い込み     | 河川放流       | 吸い込み       | 河川放流       | 吸い込み      |            |  |
| 昭和50年  | 1000人(9%) | 0人(0%)   | 5300人(48%) | 4700人(43%) | 1250人(11%) | 750人(7%)  | 9000人(82%) |  |
| 56     | 2500 (18) | 650 (5)  | 6000 (43)  | 4750 (34)  | 3100 (22)  | 1100 (8)  | 9700 (70)  |  |
| 65(推定) | 3950 (20) | 1000 (5) | 8850 (45)  | 5900 (30)  | 5500 (28)  | 2400 (12) | 11800 (60) |  |

表 2. 生活排水の汚濁原単位<sup>4)</sup>

| 項 目 | 昭和45年 |      |      | 昭和65年 |      |           | 備 考              |
|-----|-------|------|------|-------|------|-----------|------------------|
|     | 計     | し尿   | 雑排水  | 計     | し尿   | 雑排水       |                  |
| BOD | 44    | 13   | 31   | 64~84 | 13   | 51~71     | 年に1~2g/人・日の増加とみる |
| COD | 22    | 6.5  | 15.5 | 32~42 | 6.5  | 25.5~35.5 | COD=BOD/2        |
| S S | 40    | 10   | 30   | 58~76 | 10   | 48~66     | SS : BOD=0.9 : 1 |
| 全窒素 | 12    | 9    | 3    | 13    | 9    | 4         | ドイツと同じ           |
| 全リン | 1.4   | 0.57 | 0.83 | 2.2   | 0.57 | 1.63      | 合成洗剤使用量増加        |

(単位: g)

**MBAS** st.1 は全く検出されていない。st.2~3 とともに突発的な0.1mg/lを上回る値により標準偏差、平均値とも高くなる年があるが、経年変化は特に認められない。

**塩素イオン** st.1 は各年平均3mg/l程度である。st.2 は平均6mg/l前後、st.3, 4 は平均8mg/l前後で変動はみられず、標準偏差は一定しており経年変化は認められない。

**濁度** st.1 は毎年平均0.5mg/l以下である。st.2 は51年に2mg/lを上回る値もみられたが、その後みられなくなった。st.3 は50年から52年にかけて平均2mg/lで5mg/lを上回る値もしばしばみられたが、その後平均1mg/l前後に減少し標準偏差も小さくなっている。st.4 は平均1.5mg/l前後で経年変化は認められない。

**大腸菌群数** st.1 においても100個/ml以下の大腸菌が検出されている。st.2 は50年から54年にかけて1~1,000個/mlのレベルであったが、その後100個/mlを上回ることにはなくなった。st.3 は50年から54年にかけて、st.4 は50年から52年にかけて10~10,000個/mlのレベルであったものが、その後減少傾向がみられ、100個/mlを上回る回数は減少している。しかし、st.2~4 はほとんど環境基準の1,000MPN/100mlを上回っている。

#### 考 察

経年変化をまとめてみると、st.2~4ではBOD、アンモニア性窒素、MBAS、塩素イオンについてはほとん

ど変化は認められない。st.2~4 のCOD, st.2~3の濁度については測定値の有意差は認められないが、標準偏差は小さくなり、年間平均値も減少傾向を示し、大腸菌群数についてはst.2~4で明らかにそのレベルの減少が観察される。リン酸イオンのみがst.4で50年から53年にかけてやや増加の傾向がみられるが、これ以後上昇傾向がみられなくなった。以上により日の出町を流れる平井川の水質はほとんど経年変化をしていないと考えられる。

しかし、町の人口は50年の11,000人が56年の13,900人と26%増加しており、特にベッドタウン化の進んでいるst.2~4の流域の人口は6,850人から10,000人へと46%の増加をみている。そこで平井川へのBOD排出負荷量を日の出町の排水処理形態(表1)の雑排水と浄化槽処理水の河川放流人口および生活排水の汚濁原単位(表2)等に基づいて算出を試みた。表2によると雑排水のBOD等の原単位は毎年増加する。これは生活水準の向上にもなって1人当たりの水道水使用量も増加し、排水量および汚濁負荷量も増大していくからである。たとえば日の出町の1人当たりの水道水使用量は50年190l、56年280lで急激に増加している。これはトイレの水洗化(1人約60l/日<sup>5)</sup>、普及率50年18%・56年30%)による増加量をはるかに上回っている。このような推移により、平井川へのBOD排出負荷量は概算で50年の210kgから56

年の300kgへと44%増加していることになる。また、この負荷量に占める雑排水および浄化槽放流水の割合をみるとそれぞれ50年は97.5%・2.5%, 56年は95%・5%で大部分は雑排水である。一方、COD・SS・全窒素・全りんについてもBOD同様の負荷量の増加が推定される。

こうしたベッドタウン化による人口増加および生活様式の変化にともなう排出負荷量の増加にもかかわらず、平井川の汚濁の進行がみられないのは、平井川への流入負荷量が増加していないためと考えられ、この原因としては次のことがあげられる。

町で50年以降積極的に河川の汚濁防止対策にとりくみ、52年には排出負荷量の大部分を占める雑排水の集水樹による処理の指導、すなわち、集水樹の清掃の励行、新築住宅等における集水樹の設置の推進を行っており、雑排水の負荷量がかかなり削減できたこと、このことは53年以降COD、濁度が高い値を示すことが少なくなり、その平均値は減少傾向を示し、さらにこれにともなうと考えられる大腸菌群数のレベルの減少もみられることから推定される。大腸菌群数の減少については、この他に浄化槽放流水の次亜塩素酸塩による消毒強化の効果も考えられる。この他表1にみられるように負荷量の大部分を占める無処理の雑排水の放流人口がそれほど増加せず、浄化槽による処理人口が2倍以上に増加していることは、排出負荷量の削減に貢献していると考えられる。一方、町の指導や広報等により住民の河川汚濁防止に対する関心が高まり、河川をゴミ捨て場とする従来の意識はなくなり、河川へ汚濁物を流入させない工夫、たとえば台所の食物などの残渣や油を厨芥として取り去ること

も行われてきたことが反映している結果と考えられる。

### ま と め

1. ベッドタウン化の進行している東京都多摩地区の日の出町を流れる平井川について昭和50年から56年にかけて水質調査を行った結果、人口が増加し、排出汚濁負荷量も増加しているにもかかわらず、汚濁の進行はみられなかった。この原因は町が積極的に平井川の汚濁防止に取り組み、特に負荷量の大部分を占める雑排水の集水樹による処理の指導等により、川に直接流入する負荷量が増加していないためと推定される。

2. 今後さらに人口増加等による負荷量の増加が予想されるが、下水道が整備されるまでの汚濁防止対策としては、雑排水の集水樹等による処理の徹底<sup>6)</sup>、浄化槽放流水の三次処理の推進、有りりん洗剤の使用の削減等が考えられる。

謝辞 本調査を実施するにあたり、採水を行ない多数の資料を提供された日の出町役場衛生課の方々に深謝いたします。

### 文 献

- 1) 環境庁：環境白書，267，1981，大蔵省印刷局
- 2) 栃本博，笹野英雄，池島伸至他：東京衛研年報，27-1，342，1976
- 3) 栃本博，中村弘，押田裕子他：東京衛研年報，29-1，374，1978
- 4) 市川新：都市河川の環境科学，140，1980，培風館，東京
- 5) 和田安彦：下水道協会誌，13(10)，13，1976
- 6) 須藤隆一：用水と廃水，24，397，1982

三次処理水に関する衛生学的研究 (第2報) 下水・再利用水中の多環芳香族炭化水素

有賀孝成\*, 押田裕子\*, 栃本博\*, 中村弘\*, 松本昌雄\*

Hygienic Studies on Tertiary Treatment Waters (II)  
Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Sewage and Reuse Water

TAKANARI ARIGA\*, HIROKO OSHIDA\*, HIROSHI TOCHIMOTO\*,  
HIROSHI NAKAMURA\* and MASAO MATSUMOTO\*

The levels of 6 polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in raw sewage and reuse water collected from 12 office buildings and 10 sewage treatment plants in Tokyo metropolitan area during the period from January to March in 1982 were investigated.

The analytical technique for the quantitative determination of PAHs in the water samples utilized benzene extraction, cleanup with florisil, reversed-phase liquid chromatography, and fluorescence detection. The recovery of the 6 PAHs from raw sewage ranged from 84 to 97% (average 89%) and the lower limit detection was between 0.5ng/l and 1.0ng/l in samples.

PAHs were detected in the nanogram per liter range in all the samples. Levels of the total concentration of 6 PAHs in raw sewages from office buildings and sewage treatment plants were 23~424 ng/l (average 136 ng/l) and 41~546 ng/l (average 164 ng/l) respectively; in reuse waters 6~65 ng/l (average 29 ng/l) and 9~48 ng/l (average 24 ng/l) respectively; and in effluents of sewage treatment plants 13~88 ng/l (average 39 ng/l).

A considerable reduction of PAHs was noted as a result of the water treatment. The levels of the total concentration of 6 PAHs in the reuse waters were below 200ng/l, the value recommended by WHO, for drinking water.

**Keywords**: polynuclear aromatic hydrocarbons, tertiary treatment water, reuse water, raw sewage, effluent, office building, sewage treatment plant, HPLC, fluorescence detection

緒言

大都市における水需要の増大にともない、水資源を安定的に確保する施策の一環として、下水処理場、業務用ビルあるいは工場からの排水を高度処理した後、雑用水等に再利用する、いわゆる中水道が注目され、その設置が積極的に推進されている<sup>1,2)</sup>。再利用水は工業用水または水洗便所用水に限定されている場合もあるが、散水、環境用水(池、流水等)、空調用水あるいは洗車用水等にも利用されている。今後、再利用水の用途はますます多様化すると考えられるが、それと同時にその水質については高い衛生学的安全性が求められるのは当然である。前報<sup>3)</sup>では三次処理水の水質特性から生じる塩素消毒時の問題点を指摘し、塩素化合物を中心に種々の有機化合物を検出したのでその結果を報告した。

多環芳香族炭化水素(PAH)はその中に強い発がん性

を有するものが知られており、環境汚染物質あるいは環境汚染の指標物質として注目されている。WHOは1971年に飲料水中の6つのPAHの合計(総PAH)の最大許容量(200ng/l)を勧告した<sup>4)</sup>。PAHは地下水あるいは河川水中にもその存在は認められているが、工場排水あるいは生活排水からはより高い濃度で検出されている<sup>5)</sup>。中水道はこれらの排水を原水として利用することから、再利用水の安全性を確認する上で、PAHのレベルを調査することは重要であると考えられる。

今回、著者らは水試料中のPAHの分析法として、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)―蛍光光度法について検討し、WHOが勧告した6つのPAH、すなわち fluoranthene (Fl), benzo (b) fluoranthene (BbF), benzo (k) fluoranthene (BkF), benzo (a) pyrene (BaP), benzo (ghi) perylene (BghiP) および indeno (1, 2, 3-cd)

\* 東京都立衛生研究所多摩支所 190 東京都立川市柴崎町 3-16-25

\* Tama Branch Laboratory, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
16-25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan

pyrene(IP)を業務用ビルおよび下水処理場の下水および再利用水等について調査したので、その成績を報告する。

### 実験方法

#### 1. 試料

採水は1982年1月から3月までの期間に行った。試料は東京都内の業務用ビル12施設の原水と再利用水および下水処理場10施設（うち、再利用のための三次処理を行っているものは4施設）の流入水、放流水および再利用水である。

#### 2. 装置

1) 高速液体クロマトグラフ：日本分光 TWINCLE 型

2) 分光蛍光光度計：日本分光 FP-550A型

#### 3. 試薬

1) PAH混合標準溶液：Fl, BaP (以上、和光純薬)、IP (関東化学)、BghiP, BkF, BbF (以上、Aldrich Chemical) をそれぞれ、ベンゼンで  $100\mu\text{g/ml}$  となるように調製し、標準原液とした。この液をベンゼンで希釈し、それぞれの濃度が、Fl, BbF, BghiP および IP は  $0.5\mu\text{g/ml}$ , BkF および BaP は  $0.25\mu\text{g/ml}$  となるような混合溶液を調製した。なお、添加回収実験用の PAH 混合標準溶液は標準原液をアセトニトリルで希釈して調製した。

2) フロリジルカラム：フロリジル 60-100 mesh (Floridin) を  $140^\circ$  で4時間活性化した後、デシケター中で放冷し、水を2%の割合で加えてよく振り混ぜ、4時間以上放置した後、その10gを内径1.0cm、長さ30cmのガラスカラムにベンゼンを用いて湿式充てんし、ベンゼン 50ml で洗浄して使用した。

3) ベンゼンは nanograde (Mallinkrodt), 無水硫酸ナトリウムおよびエタノールは残留農薬試験用 (和光純薬) を用い、その他の試薬はすべて特級品を用いた。

#### 4. PAH の分析法

試料 5l を分液ロートに取り、エタノール 100ml を加えた後、ベンゼン 100ml ずつで3回抽出した。振とうは振とう機を用いて10分間行い、ベンゼン層は遠心分離 (3,000rpm, 10分間) して得た。抽出液は無水硫酸ナトリウムで脱水後、KD濃縮器を用いて1mlまで濃縮し、カラムクロマト用試験溶液とした。クリーンアップはあらかじめ調製したフロリジルカラムにカラムクロマト用試験溶液の全量を入れ、これをベンゼン 60ml で溶出した (流速  $2\text{ml/min}$ )。溶出液はKD濃縮器で濃縮後、 $1.0\text{ml}$  とし HPLC 用試験溶液とした。

HPLC および分光蛍光光度計の条件は次の通りであ

る。

カラム： $0.26 \times 25\text{cm}$ , HC-ODS,  $10\mu\text{m}$ ,  $\text{C}_{18}$  (Perkin Elmer), 試料注入量： $5\mu\text{l}$

Fl, BbF, BkF, BaP および BghiP の測定；移動層：アセトニトリル-水 (80:20), 流速： $1.0\text{ml/min}$ , 励起波長： $360\text{nm}$ , 蛍光波長： $430\text{nm}$

IP の測定；移動層：100% アセトニトリル, 流速： $0.5\text{ml/min}$ , 励起波長： $360\text{nm}$ , 蛍光波長： $500\text{nm}$

PAH の濃度はあらかじめ標準溶液のピーク高から作成した検量線から求めた。

なお、放流水および再利用水からの抽出操作は採水当日に行った。

#### 5. その他の測定項目

pH, COD および懸濁物質 (SS) の測定は JIS 法<sup>\*)</sup> による。

### 結果および考察

#### 1. 分析法の検討

PAH の抽出率および回収率の検討は PAH 混合標準溶液  $0.5\text{ml}$  を下水処理場の流入水 (SS  $273\text{mg/l}$ , COD  $118\text{mg/l}$ ) 5l に添加して行った。抽出率は蒸留水を用いた場合には1回目で96%以上であったが、下水の場合は1回の抽出では72~78%と低く、2回抽出でも91~96%であった。そこで抽出は3回行い、95~100%の抽出率を得た。

グリーンアップはフロリジルカラムを用い、抽出溶媒と同じベンゼンで溶出する簡便な方法で充分であった。PAH混合標準溶液  $1.0\text{ml}$  を加え、ベンゼンで溶出し、溶出液を  $5\text{ml}$  ずつ分取し、PAH 含量を測定した結果、6つのPAHはいずれも  $40\text{ml}$  までに溶出し、回収率は91~98%の範囲であった。

検出器の励起波長および蛍光波長はそれぞれの PAH が同等の感度が得られるように選択した。IPを除く5

Table 1. Recoveries of Six PAHs from Raw Sewage<sup>\*)</sup>

| Compound                   | Added (ng/l) | Recovery <sup>*)</sup> (%) |
|----------------------------|--------------|----------------------------|
| Fluoranthene               | 50           | 96.7                       |
| Benzo (b) fluoranthene     | 50           | 88.6                       |
| Benzo (k) fluoranthene     | 25           | 93.7                       |
| Benzo (a) pyrene           | 25           | 85.3                       |
| Benzo (ghi) perylene       | 50           | 87.6                       |
| Indeno (1, 2, 3-cd) pyrene | 50           | 83.9                       |

<sup>\*)</sup> SS  $273\text{mg/l}$ , COD  $118\text{mg/l}$

<sup>\*)</sup> Average of three measurement

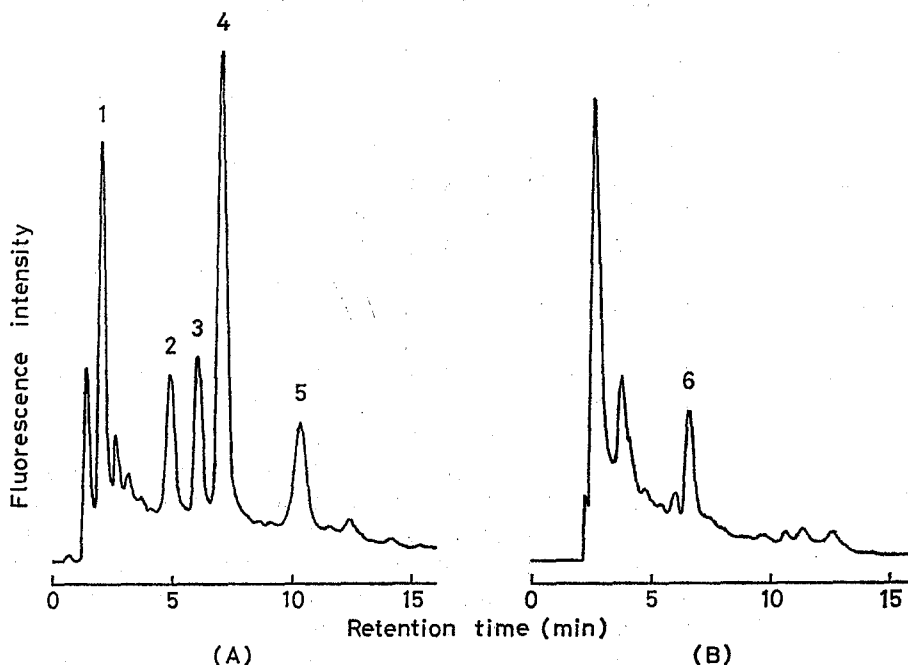


Fig. 1. Liquid Chromatograms of PAHs in Raw Sewage from O Sewage Treatment Plant

(A) Mobile phase: acetonitrile-water (80:20), Flow rate: 1.0ml/min,  
Detector wavelength: ex 360nm, em 430nm

(B) Mobile phase: 100% acetonitrile, Flow rate: 0.5ml/min,  
Detector wavelength: ex 360nm, em 500nm

Column: 0.26×25cm, HC-ODS, 10 $\mu$ m, C<sub>18</sub> packing (Perkin Elmer), Sample size: 5 $\mu$ l

Peak 1: Fluoranthene, 2: Benzo (b) fluoranthene, 3: Benzo (k) fluoranthene,

4: Benzo (a) pyrene, 5: benzo (ghi) perylene, 6: Indeno (1,2,3-cd) pyrene

つのPAHは励起波長 360nm, 蛍光波長 430nmで同時に測定することが可能であったが, IPの測定は励起波長 360nm, 蛍光波長 500nmで行う必要があった。

本分析法の全行程の回収率は Table 1 に示した通り, 3回の平均で84~97% (平均89%) の範囲であった。また, 6つの PAH の検出限界はそれぞれ, BkF および BaPで, 0.5ng/l, Fl, BbF, BghiP および IPは1.0 ng/lであった。

下水処理場の流入水中の PAH のクロマトグラムの一例を Fig. 1 に示した。

## 2. 業務用ビル中水道の原水および再利用水

原水および再利用水の分析結果を Table 2 に示した。

原水の種類はビルの全排水 (I~L), 冷却塔ブロー水と雑排水 (A~G) および厨房排水のみのもの (H) とがあった。再利用水はすべて三次処理されており, その方法は沈澱, 生物処理の後に砂ろ過して塩素消毒を行うも

の, さらに, 活性炭処理 (E, L) あるいはオゾン酸化 (A, K) を併用するものもあった。再利用水の目標水質は各施設で異なっていたが, SSは5~10mg/l, CODは10~15mg/l の範囲であって, この目標値を上回ったものはSSで1件(K), CODで2件(G, H) だけであった。このことから, 各施設ともその運転状態はほぼ正常であったと考えられる。

原水中の総PAH濃度は23~424ng/lの広い範囲であったが, SSあるいはCOD値との相関は特に認められなかった。6つの PAH のうち, Fl, BbF, BaP および IP はすべての試料から検出されたが, BbF および BghiP は検出されないものもあった。試料中の6つの PAH の濃度比率はすべての試料で似た傾向を示し, Fl は他の PAH に比較して特に高かった。

再利用水中の総 PAH 濃度は原水に比較してD, E, Gの3例を除いて1桁位低く, 6~65ng/l の範囲であっ



Table 2. Concentration of Six PAHs in Raw Sewage and Reuse Water from Office Building

| Compound (ng/l)            |                 | Office building |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Range   | Mean |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|------|
|                            |                 | A               | B   | C   | D   | E   | F   | G   | H   | I   | J   | K   | L   |         |      |
| Fluoranthene               | S <sup>*1</sup> | 122             | 84  | 172 | 14  | 8   | 226 | 19  | 31  | 42  | 120 | 32  | 57  | 8—226   | 77   |
|                            | R <sup>*2</sup> | 4               | 3   | 12  | 11  | 7   | 29  | 17  | 3   | 20  | 17  | 4   | 35  | 3—35    | 14   |
| Benzo (b) fluoranthene     | S               | 23              | 4   | 60  | 2   | 4   | 45  | 2   | 6   | 17  | 6   | ND  | 27  | ND—60   | 16   |
|                            | R               | 2               | 2   | 2   | 6   | 4   | 7   | 10  | ND  | 9   | 2   | ND  | 10  | ND—10   | 4.5  |
| Benzo (k) fluoranthene     | S               | 12              | 3   | 30  | 1   | 2   | 17  | 1   | 3   | 8   | 3   | 1   | 14  | 1—30    | 7.9  |
|                            | R               | 1               | 1   | 1   | 3   | 1   | 3   | 5   | ND  | 4   | 1   | ND  | 5   | ND—5    | 2.1  |
| Benzo (a) pyrene           | S               | 19              | 4   | 66  | 1   | 3   | 6   | 2   | 4   | 14  | 5   | 2   | 20  | 2—66    | 12   |
|                            | R               | 1               | 1   | 1   | 4   | 2   | 2   | 6   | 1   | 7   | 1   | ND  | 4   | ND—7    | 2.5  |
| Benzo (ghi) perylene       | S               | 17              | 9   | 47  | 3   | 2   | 18  | ND  | 5   | 12  | ND  | ND  | 17  | ND—47   | 11   |
|                            | R               | ND              | ND  | 3   | 3   | 3   | 4   | 5   | ND  | 9   | ND  | ND  | 5   | ND—9    | 2.7  |
| Indeno (1, 2, 3-cd) pyrene | S               | 12              | 5   | 49  | 2   | 4   | 17  | 2   | 2   | 12  | 3   | 6   | 17  | 2—49    | 11   |
|                            | R               | 3               | 2   | 2   | 4   | 3   | 4   | 7   | 2   | 10  | ND  | 2   | 6   | ND—10   | 3.8  |
| Total PAH                  | S               | 205             | 109 | 424 | 23  | 23  | 329 | 26  | 51  | 105 | 137 | 41  | 152 | 23—424  | 136  |
|                            | R               | 11              | 9   | 21  | 31  | 20  | 49  | 50  | 6   | 59  | 21  | 6   | 65  | 6—65    | 29   |
| pH                         | S               | 7.1             | 6.8 | 7.4 | 6.8 | 8.5 | 7.0 | 7.2 | 4.0 | 8.0 | 7.5 | 8.7 | 7.3 | 4.0—8.7 | 7.2  |
|                            | R               | 7.8             | 7.3 | 7.7 | 7.0 | 7.4 | 7.1 | 7.2 | 7.3 | 7.5 | 6.0 | 7.5 | 7.3 | 6.0—7.8 | 7.3  |
| SS (mg/l)                  | S               | 145             | 69  | 31  | 24  | 4   | 160 | 19  | 444 | 336 | 139 | 237 | 63  | 4—444   | 139  |
|                            | R               | 2               | 3   | 8   | 7   | 3   | 2   | 5   | 10  | 2   | 1   | 12  | 0   | 0—12    | 4.6  |
| COD (mg/l)                 | S               | 98              | 62  | 33  | 58  | 11  | 76  | 22  | 450 | 264 | 78  | 132 | 34  | 11—450  | 110  |
|                            | R               | 4.4             | 4.0 | 6.2 | 4.4 | 0.6 | 5.6 | 12  | 12  | 3.6 | 9.2 | 5.8 | 1.8 | 0.6—12  | 5.8  |

\*1 Raw sewage

\*2 Reuse water

た。また、試料中の PAH の濃度比率は原水と同じ傾向を示し、Fl はすべての試料から検出され、濃度も他の PAH に比較して高く、総 PAH の大半を占めるものが多かった。総 PAH 濃度は WHO が飲料水について勧告した 200ng/l という値より 1～2 桁低いものであった。また、発がん性を有する BaP, BkF および BghiP の合計は原水では 3～51ng/l (平均値 31ng/l) であったが、再利用水では ND～20ng/l (平均値 7.3ng/l) の範囲であった。一般に、水処理には 4～10 時間を要し、原水の水質も変動することから、再利用水と原水は直接対応するものではないが、再利用水中の総 PAH の残存率は原水中の総 PAH に対して、半数以上の 7 件が 5～15% の範囲であった。

### 3. 下水処理場の流入水、放流水および再利用水 分析結果を Table 3 に示した。

再利用施設 (4 ケ所) はいずれも放流水の一部を原水とし、これを三次処理するものであった。処理方法は業務用ビルと同様、砂ろ過した後塩素消毒を行うものであったが、S および V 処理場では凝集沈殿も行っていた。

再利用水は場内の清掃用水等の雑用水としての利用の他に、工業用水 (V)、清掃工場の焼却灰の冷却用水 (S, T) あるいは鉄道車両の洗浄用水 (U) 等として他の施設にも供給されていた。再利用水の水質は業務用ビルと比較して、COD の平均値は約 2 倍高く、SS も 21mg/l と高いものがあつた。

流入水中の総 PAH 濃度は 41～546ng/l の範囲で、業務用ビルの原水とはほぼ同レベルであった。また、6 つの PAH はいずれもすべての試料から検出され、それぞれの濃度比率は業務用ビルの原水と同じ傾向であった。

放流水中の総 PAH 濃度は 13～88ng/l の範囲で、流入水中の総 PAH に対する残存率は半数以上の 6 件が 4.8～27% の範囲で、かなり低減されたレベルになっていた。また、PAH の濃度比率は流入水と同じ傾向であった。

再利用水中の総 PAH 濃度は 9～48ng/l の範囲で、これは業務用ビルの再利用水と同じレベルであった。また、流入水の総 PAH に対する残存率は 2.7～32% の範囲であった。発がん性を有する 3 つの PAH の合計は流

Table 3. Concentration of Six PAHs in Raw Sewage, Effluent and Reuse Water from Sewage Treatment Plant

| Compound (ng/l)            |      | Sewage treatment plant |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Range   | Mean |
|----------------------------|------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|------|
|                            |      | M                      | N   | O   | P   | Q   | R   | S   | T   | U   | V   |         |      |
| Fluoranthene               | S *1 | 68                     | 62  | 98  | 106 | 24  | 35  | 29  | 72  | 69  | 309 | 24—309  | 87   |
|                            | E *2 | 40                     | 18  | 16  | 13  | 5   | 24  | 7   | 13  | 7   | 11  | 5—40    | 15   |
|                            | R *3 |                        |     |     |     |     |     | 5   | 13  | 11  | 11  | 5—13    | 10   |
| Benzo (b) fluoranthene     | S    | 17                     | 12  | 25  | 7   | 3   | 6   | 8   | 18  | 14  | 55  | 3—55    | 17   |
|                            | E    | 10                     | 7   | 4   | 7   | 2   | 21  | 2   | ND  | 3   | 4   | ND—21   | 6.0  |
|                            | R    |                        |     |     |     |     |     | 2   | 3   | 5   | ND  | ND—5    | 2.5  |
| Benzo (k) fluoranthene     | S    | 11                     | 9   | 12  | 6   | 2   | 3   | 5   | 10  | 8   | 28  | 2—28    | 9.4  |
|                            | E    | 5                      | 3   | 1   | 3   | 1   | 9   | 2   | 1   | 1   | 2   | 1—9     | 2.8  |
|                            | R    |                        |     |     |     |     |     | 1   | 1   | 2   | ND  | ND—2    | 1.0  |
| Benzo (a) pyrene           | S    | 17                     | 14  | 22  | 10  | 3   | 5   | 6   | 11  | 17  | 69  | 3—69    | 17   |
|                            | E    | 7                      | 7   | 3   | 7   | 1   | 13  | 2   | 1   | 2   | 3   | 1—13    | 4.6  |
|                            | R    |                        |     |     |     |     |     | 1   | 2   | 2   | 1   | 1—2     | 1.5  |
| Benzo (ghi) perylene       | S    | 20                     | 16  | 24  | 15  | 5   | 7   | 7   | 15  | 13  | 47  | 5—47    | 17   |
|                            | E    | 5                      | 11  | 4   | 6   | 3   | 10  | ND  | ND  | 2   | 3   | ND—11   | 4.4  |
|                            | R    |                        |     |     |     |     |     | ND  | ND  | 3   | 3   | ND—3    | 1.5  |
| Indeno (1, 2, 3-cd) pyrene | S    | 16                     | 14  | 20  | 10  | 4   | 5   | 6   | 20  | 27  | 38  | 4—38    | 16   |
|                            | E    | 6                      | 16  | 8   | 6   | 5   | 11  | ND  | 3   | ND  | 3   | ND—16   | 5.8  |
|                            | R    |                        |     |     |     |     |     | ND  | 4   | 25  | ND  | ND—25   | 7.3  |
| Total PAH                  | S    | 149                    | 127 | 201 | 154 | 41  | 61  | 61  | 146 | 149 | 546 | 41—546  | 164  |
|                            | E    | 73                     | 62  | 36  | 42  | 17  | 88  | 13  | 18  | 15  | 26  | 13—88   | 39   |
|                            | R    |                        |     |     |     |     |     | 9   | 23  | 48  | 15  | 9—48    | 24   |
| pH                         | S    | 7.3                    | 8.2 | 8.3 | 7.6 | 7.6 | 7.3 | 8.4 | 7.6 | 7.4 | 7.4 | 7.3—8.4 | 7.7  |
|                            | E    | 7.6                    | 7.5 | 7.3 | 7.5 | 7.6 | 7.3 | 7.3 | 7.2 | 7.3 | 7.4 | 7.2—7.6 | 7.4  |
|                            | R    |                        |     |     |     |     |     | 7.3 | 7.0 | 7.4 | 7.3 | 7.0—7.4 | 7.3  |
| SS (mg/l)                  | S    | 83                     | 487 | 273 | 83  | 115 | 113 | 264 | 137 | 237 | 140 | 83—487  | 193  |
|                            | E    | 7                      | 1   | 4   | 6   | 30  | 24  | 10  | 9   | 26  | 19  | 1—30    | 14   |
|                            | R    |                        |     |     |     |     |     | 4   | 4   | 21  | 8   | 4—21    | 9.3  |
| COD (mg/l)                 | S    | 68                     | 160 | 118 | 90  | 86  | 118 | 152 | 70  | 116 | 80  | 68—160  | 106  |
|                            | E    | 18                     | 12  | 7.6 | 9.6 | 20  | 22  | 13  | 12  | 14  | 20  | 7.6—22  | 15   |
|                            | R    |                        |     |     |     |     |     | 8.4 | 11  | 11  | 15  | 8.4—15  | 11   |

\*1 Raw sewage

\*2 Effluent

\*3 Reuse water

入水では10~144ng/l (平均値44ng/l)であったが、放流水では2~32ng/l (平均値12ng/l)、再利用水では2~7ng/l (平均値4ng/l) の範囲であった。

原水(流入水)中のPAHは水処理の過程で減少する傾向を示した。これは、PAHが水処理の過程でSS、活性炭等による吸着、細菌による分解あるいは残留塩素およびオゾン等によって分解されたためと思われる<sup>5)</sup>。しかし、再利用水中の6つのPAHの濃度比率は原水

(流入水)あるいは放流水と同じ傾向を示したことから、6つのPAHはいずれも水処理の過程では同じ挙動を示すものと考えられる。

### ま と め

東京都内の業務用ビル中水道の原水および再利用水ならびに下水処理場の流入水、放流水および再利用水中のPAH濃度を調査した。

1) 業務用ビル中水道の原水および下水処理場の流入

水中の総 PAH 濃度はそれぞれ, 23~424ng/l (平均値 136ng/l) および 41~546ng/l (平均値 164ng/l) で, ほぼ同レベルであった.

2) 業務用ビルおよび下水処理場の再利用水中の総 PAH 濃度は 6~65ng/l (平均値 28ng/l) の範囲で, WHO が飲料水について勧告した値 (200ng/l) よりかなり低い値であった. また, 発がん性を有する BaP, BbF および BghiP の合計は ND~20ng/l (平均値 6.4ng/l) の範囲であった.

3) 下水処理場の放流水中の総 PAH 濃度は 13~88ng/l (平均値 39ng/l) の範囲であった.

4) 試料中の 6 つの PAH 濃度比率はすべての試料で同じ傾向を示し, Fl の比率が最も高く, すべての試料

から検出された. このことは 6 つの PAH が水処理の過程では同じ挙動を示すためと考えられる.

#### 文 献

- 1) 振井茂宏: 公害と対策, 16, (7)2, 1980
- 3) 市川博昭: 用水と廃水, 21, (1)5, 1979
- 3) 中村 弘, 斉藤庄次, 高橋正博, 松本淳彦, 根津尚光, 三村秀一: 東京衛研年報, 29-1, 367, 1978
- 4) WHO, International Standards for Drinking Water, 3rd Edition, Geneva, 1971
- 5) Harrison, R. M., Perry, R. and Welling, R. A.: *Water Res.*, 9, 331, 1975
- 6) 日本規格協会, 工場排水試験方法, JIS K 0102, 1981

## Seasonal Changes of Mite Fauna and Population in Four Concrete Apartment Houses

MIDORI YOSHIKAWA\*, KIYOSHI HANAOKA\*\* and YURIKO YAMADA\*\*\*

From May 1981 through 1982, mites in house dust samples were examined monthly in six-straw-mat bedrooms of four concrete apartment houses.

A total of 19,518 mites were collected. At least 21 families, 29 genera and 33 species were represented in the collection. Pyroglyphidae accounts for 74.7% of all the mites collected. The average mite numbers in each month reached a peak in July. Pyroglyphidae, Cheyletidae and Oribatei had their peaks in July; however, Glycyphagidae and Acaridae had their peaks in November and December respectively.

Clustering analysis which studied the relation between mite fauna and its changes of mite numbers in each month showed that twelve months were separated into two groups such as summer or winter group, although each month has high correlation coefficients with each other.

**Keywords :** dermatitis

### Introduction

Many kinds of mites live in house dust in Japan. Of these mites, *Dermatophagoides* spp. of Pyroglyphidae become an allergen which cause bronchial asthma to house dust sensitive patients<sup>1-2)</sup>. In addition, some mites such as Tydeidae, Pyemotidae and Cheyletidae cause itching dermatitis. The cheyletids are especially important species for Tokyo residents as they are the cause of itching dermatitis or red rashes suffered by the residents of many concrete apartment houses in summer and autumn in the Tokyo area<sup>3-5)</sup>. Thus, data concerning how mites increase or decrease in such houses by season and what kinds of mites live in such houses are required in order to prevent the above problems. Although the mite fauna in Japanese houses has already been investigated in past years by Oshima<sup>6-8)</sup> and Miyamoto et al<sup>9)</sup>, documentation of the recent changes in the fauna and population are needed because the ecological tendency has slightly changed from year to year.

From May 1981 to April 1982, the mite fauna and population were investigated in four concrete apartment houses in the Tama area of Tokyo. Only tatami rooms were selected for this survey because the straw mats of tatami rooms are not easy to clean with a vacuum sweeper because of the unevenness and thickness of the surface. The seasonal changes were checked at monthly intervals.

### Collection

This survey was conducted near the end of every month. Using a vacuum sweeper, dust samples were collected from the surface of a six-straw-mat bedroom in each of four houses, which were built 5, 6, 7 and 9 years ago and were closed in the daytime since all the adult residents make a livelihood outside their homes, while their children attend kindergartens or schools. A core of porous paper was inserted into the distal end of the vacuum sweeper for serving as a repository of the dust collection<sup>10)</sup>. Each sample was weighed in the Hino Health Centre and all of it was examined for this investigation. The samples were sieved through a 10-mesh sieve. The sieved dust was stirred with saturated sodium chloride solution

\* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 160 東京都新宿区百人町3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 東京都日野保健所衛生課

\*\*\* 東京都八王子保健所衛生課

and then centrifuged. The supernatant were filtered and the mites were picked up from the filter paper with a needle. All the mites collected were identified; however, when only a fragment of a mite was found so that its identification was impossible, it is mentioned as "indet". The mites in each sample were calculated as those in one gram dust.

### Results

#### 1. Mite fauna

A total of 19,518 mites were collected in the four houses. At least 21 families, 29 genera and 33 species were represented in the collection (Table). Pyroglyphidae has the highest frequency of 74.7% among the 21 families. Of these pyroglyphids, *Dermatophagoides* accounts for 86.1% as *D. farinae* was 11.7% of the pyroglyphids and *D. pteronyssinus* 74.4%. However, *Dermatophagoides* would be over 99% of Pyroglyphidae, if "indet" pyroglyphids were added to *Dermatophagoides* since most of them were thought to be *D. farinae* or *D. pteronyssinus*. Glycyphagidae of 7.4% is next to Pyroglyphidae in its frequency. *G. domesticus* accounts for 93.5% of Glycyphagidae. The third highest in occurrence was Cheyletidae with 5.3%, followed by Haplochthoniidae, 3.1%; Tarsonemidae, 2.9%; Acaridae, 2.8%; and Cosmochthoniidae, 1.4%. The percentage of the remaining mites in each family accounted for less than 1%.

#### 2. Changes in mite population

Table 1. Mites collected from four houses in the period from May 1981 through April 1982

| Mites                               | No. | Mites                                 | No.   |
|-------------------------------------|-----|---------------------------------------|-------|
| Ascidae                             |     | Acaridae                              |       |
| <i>Blattisocius keegani</i>         | 11  | <i>Tyrophagus putrescentiae</i>       | 216   |
| <i>Blattisocius dentriticus</i>     | 11  | <i>Suidasia nesbitti</i>              | 2     |
| indet                               | 18  | <i>Acarus siro</i>                    | 278   |
| Ameroseiidae                        |     | Acaridae hypopus                      | 11    |
| <i>Kleemannia plumosus</i>          | 2   | indet                                 | 37    |
| indet                               | 2   | Carpoglyphidae                        |       |
| Phytoseiidae                        | 44  | <i>Carpoglyphus lactis</i>            | 2     |
| Laelapidae                          |     | Glycyphagidae                         |       |
| <i>Androlaelaps casalis</i>         | 3   | <i>Glycyphagus domesticus</i>         | 1346  |
| indet Gamasida                      | 13  | <i>Glycyphagus privatus</i>           | 2     |
| Tydeidae                            | 28  | <i>Lepidoglyphus destructor</i>       | 8     |
| Bdellidae                           | 43  | indet                                 | 84    |
| Cunaxidae                           | 23  | Pyroglyphidae                         |       |
| Pygmephoridae                       | 7   | <i>Dermatophagoides farinae</i>       | 1703  |
| Tarsonemidae                        | 567 | <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> | 10846 |
| Cheyletidae                         |     | <i>Hirstia domicola</i>               | 33    |
| <i>Cheyletus malaccensis</i>        | 142 | <i>Euroglyphus maynei</i>             | 10    |
| <i>Cheyletus trouessarti</i>        | 57  | indet                                 | 1985  |
| <i>Cheyletus</i> spp.               | 219 | Haplochthoniidae                      |       |
| <i>Cheletomorpha lepidopterorum</i> | 47  | <i>Haplochthonius simplex</i>         | 606   |
| <i>Chelacaropsis</i> sp.            | 87  | Cosmochthoniidae                      |       |
| <i>Bak</i> sp.                      | 42  | <i>Cosmochthonius reticulatus</i>     | 269   |
| indet                               | 440 | Other Oribatei                        | 33    |
| Tetranychidae                       | 56  |                                       |       |
| Tenuipalpidae                       | 13  |                                       |       |
| Tuckerellidae                       | 3   |                                       |       |
| Chortoglyphidae                     |     |                                       |       |
| <i>Chortoglyphus</i> spp.           | 169 |                                       |       |
|                                     |     | TOTAL                                 | 19518 |

The numbers of mites collected in four houses were averaged monthly (Fig.1). The average mite numbers in each month reach a peak in July, but afterwards they continue to decrease until April. The standard deviation has wide ranges in September and November since the mite numbers collected in those two months were quite different in each house; for example, the numbers collected in four houses differed from 151 to 960 in September, while from 142 to 970 in November.

The increase and decrease of six mite groups such as Gamasida, Tarsonemidae, Cheyletidae, Glycyphagidae, Acaridae and Oribatei in each month are shown in graphs (Fig.2). Gamasida population has its peak in September, although the numbers are small in all months. Tarsonemidae has three peaks, i.e. in July, October and April. The tarsonemids in April are about two times larger in number in July, while Glycyphagidae and Acaridae have their peaks in November and December respectively. The changes of these six mite groups, however, are not large in number compared with those of pyroglyphids (Fig.3). The Pyroglyphidae reaches the peak of its population in July since it has a rise and fall similar to the average line of Fig.1 as pyroglyphids account for over 70% of the all mites collected. In order to know what part of the mite numbers collected in the houses are pyroglyphids they are compared with the other mite families in percentages in each month (Fig.4).

Factors which may affect the change of mite population except seasons are also checked in each house (Table 2). The chisquare test was used for comparing differences between mite numbers and years after construction of the house, average per person area space of a house, or how often the residents clean their rooms in a week. No difference appeared between mite numbers and other factors at the 5% level. However, the difference between mite numbers and area space was significant at the 10% level.

### 3. Clustering analysis using mite fauna and season

The mite fauna similarity in each month was checked using the clustering analysis of correlation coefficients (Fig.5). Twelve months were clustered using mite numbers in each mite fauna group for the purpose of showing how a month is affected by mite numbers in mite fauna groups and how the month is related to the other months in terms of its mite fauna. The kinds of mites used for this analysis were eleven groups such as Gamasida, a total number of Tydeidae, Bdellidae and Cunaxidae, Tarsonemidae, Cheyletidae, a total of Tetranychidae, Tenuipalpidae and Tuckerellidae, Chortoglyphidae, Acaridae, Glycyphagidae, Pyroglyphidae, Haplochthoniidae and Cosmochthoniidae. In this analysis, mite fauna was most similar in a group of May and June, in August and October, and in December and March. The next most similar group was that of November, December and March, and that of January and April. The third most similar was a group of July, August, October and February, and the fourth was a group which was made by a linkage of the two second groups. The third group, which linked May and June, made the fifth. The fourth group clustered by September became the

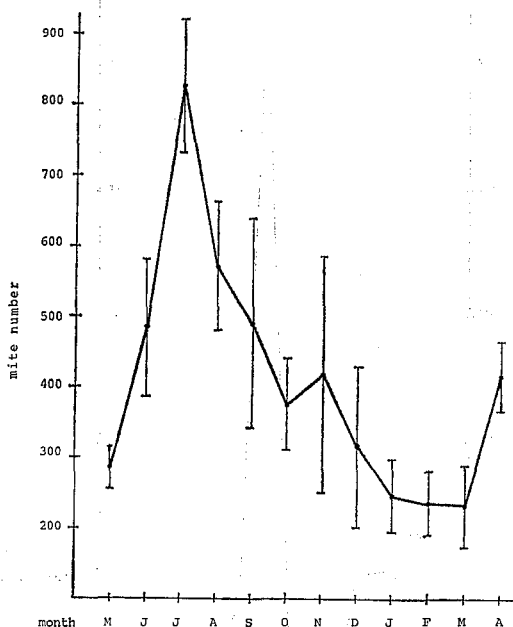


Fig.1. Monthly changes in averaged mite numbers in dust samples of four houses with standard deviations

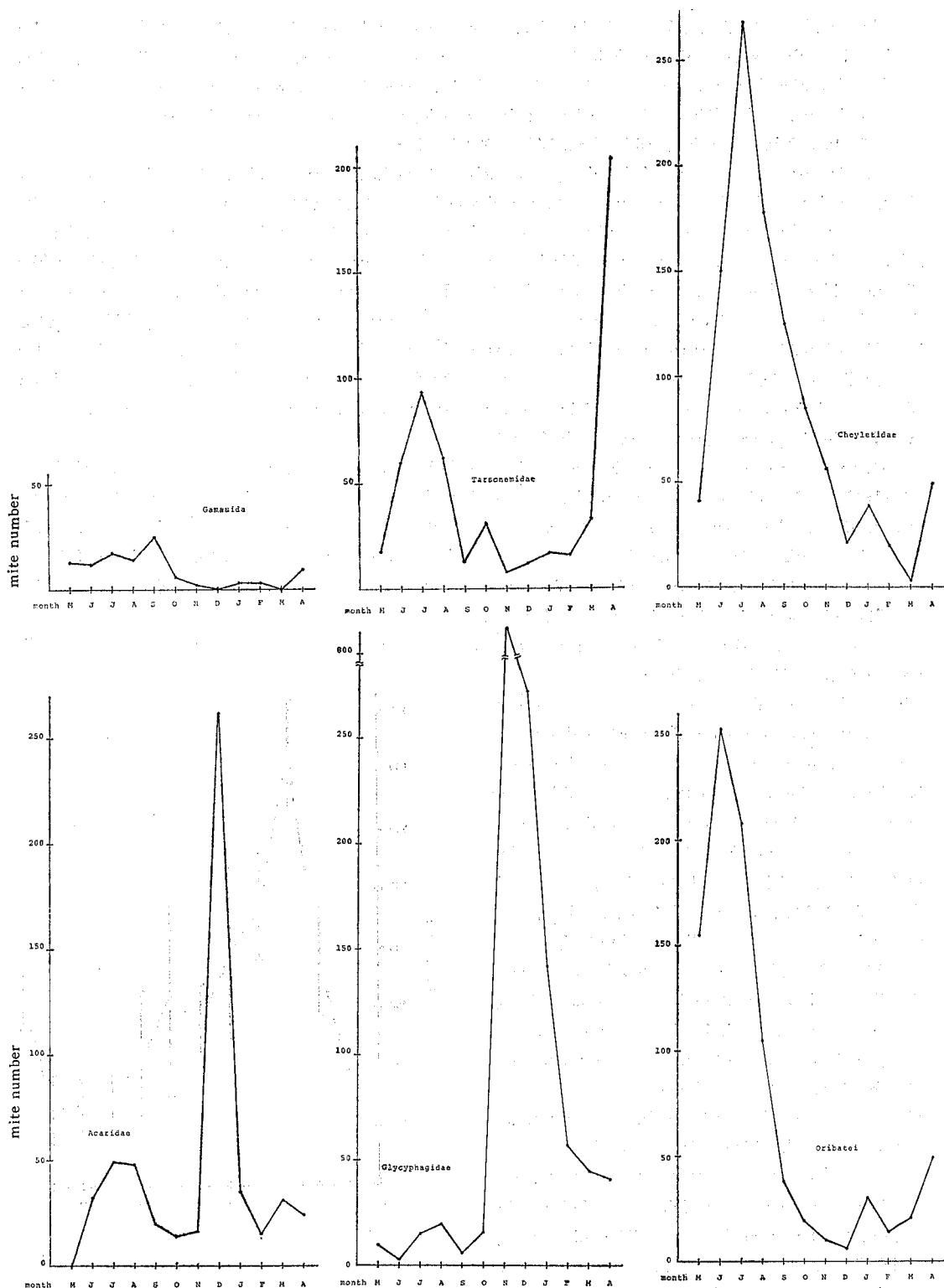


Fig. 2. Monthly changes in numbers of Gamasida, Tarsonemidae, Cheyletidae, Acaridae, Glycyphagidae and Oribatei in dust samples collected from four houses in the period from May 1981 through April 1982

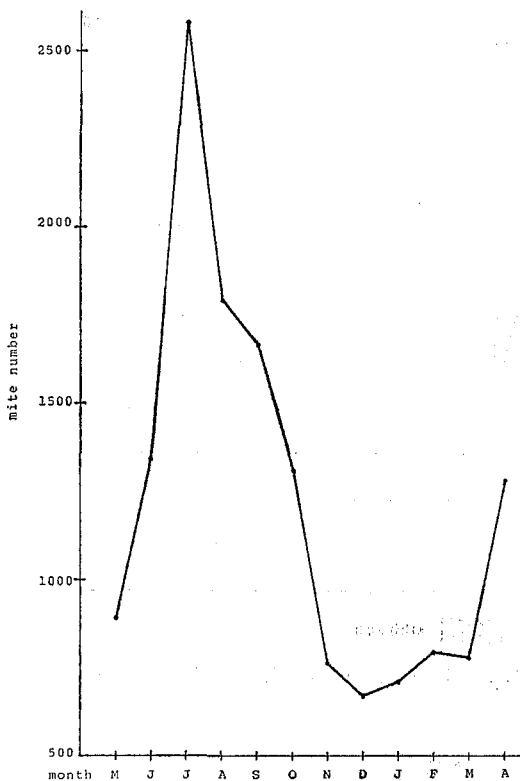


Fig. 3. Monthly changes in numbers of Pyroglyphidae in dust samples collected from four houses in the period from May 1981 through April 1982

Table 2. Mite numbers and factors which may affect changes in the number

|   | Mite number | Years after construction | Space m <sup>2</sup> * per person | Cleaning times per week |
|---|-------------|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| A | 3804        | 9                        | 10.1                              | 2                       |
| B | 3174        | 5                        | 9.1                               | 3                       |
| C | 6039        | 6                        | 8.0                               | 6                       |
| D | 6501        | 7                        | 6.8                               | 2                       |

\* Area space m<sup>2</sup> occupied by one person in a house, excluding such spaces as entrance hall, wash room and bath room.

*D. pteronyssinus* feed on dandruff which is easily accumulated around bedding. *D. pteronyssinus* was collected much more frequently than *D. farinae* in this survey. These two species were compared in a graph (Fig. 6). The slope of rise and fall of *D. farinae* is gradual, while it is sharp in *D. pteronyssinus*. *D. pteronyssinus* needs higher relative humidity in its surrounding air than *D. farinae* for its growth when their equilibrium activities are calculated<sup>12-14</sup>. Matsumoto mentioned that *D. farinae* can live in a place where the air contains nearly 60% R.H. when foods for mite retain at least 13% of their water content<sup>15</sup>, but as for *D. pteronyssinus*, Spielsma mentioned that there is a correlation between the degree of dampness

sixth. The fifth and sixth made the final linkage. All these groups, however, had very high correlation coefficients with each other.

### Discussion

The average mite numbers in each month reached a peak in July. This result was produced by high humidity and the temperature of the air, as mites often breed in damp places, and the mite numbers will be larger if the temperature is higher. Standard deviation had wide ranges in some months for two reasons: One is that two of the houses had twice as many mites as the other two houses in total numbers (Table 2). The second is that there were rapid increases of *G. domesticus* in November and December in one house and *A. siro* in December in another house. These rapid increases might have been caused by bad food controls since *G. domesticus* likes to feed on dry fishes and *A. siro* eats many kinds of human foods.

The occurrences of cheyletids in each house ranged only from 4 to 7%, although Cheyletidae was third high in its frequency in all the mites collected. The cheyletids usually bite humans and cause itching dermatitis. But no such problems were found in this survey. This fact agrees with our theory in which itching problems occur very seldom in such houses, as cheyletids account for less than 10% of all the mites collected<sup>11</sup>. Cheyletids feed on other mites such as pyroglyphids or acarids, but sometimes they bite humans by mistake. How often humans are bitten by this mite depends on the occurrence percentage of Cheyletidae. That is, the higher the occurrence of the mite, the more often humans are bitten.

Most of the mites collected in the dust were *D. farinae* and *D. pteronyssinus* since all the house dust was collected from bedrooms. *D. farinae* and



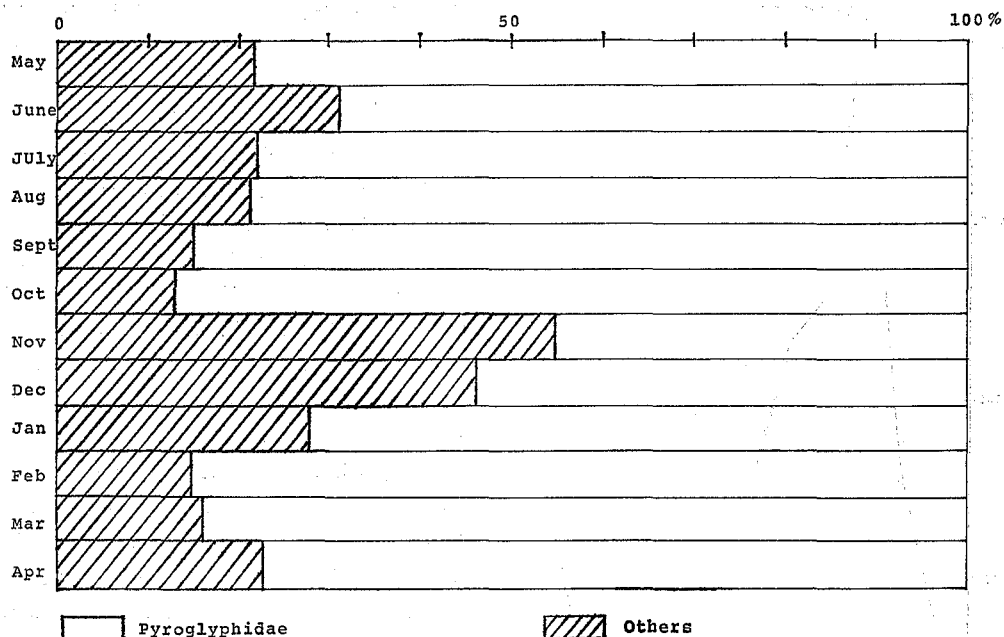


Fig. 4. The component ratio (percentage) of Pyroglyphidae and other mite families in each month

and the number of *D. pteronyssinus* found in a house<sup>10</sup>. On the contrary, Oshima suggested that *D. farinae* was greater in number than *D. pteronyssinus* found in such places as tatami, which has a water content of over 30%<sup>9</sup>. However, in our past survey in air-conditioned offices of concrete buildings where the humidity was less than 60% throughout a year, *D. farinae* was dominant. From this evidence, the air in the four apartment houses might have been somewhat damp as all of the houses were closed most of the time in a day, and foods for mites might have contained a water content of over 13% so that *D. pteronyssinus* could breed so often and the numbers could become dramatically large, especially in June through October when outside air provided the mite higher humidity.

As for the relation between mite numbers and factors on table 2, mite numbers are closely related to per person space area in a house. Consequently, rooms will soon become dirty and accumulate many kinds of food particles for mites if a person has only a small living space. Cleaning several times a week can also control mite numbers as a vacuum

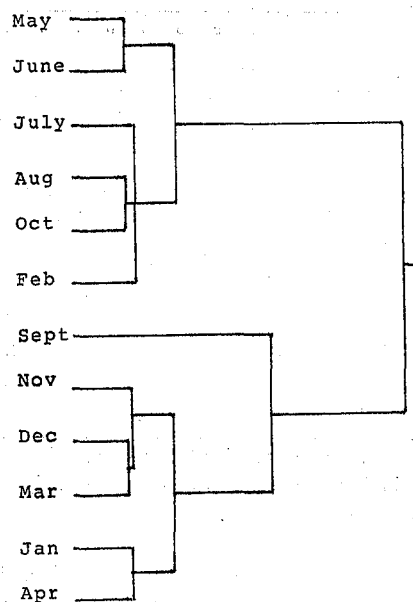


Fig. 5. Dendrogram of the relations of twelve months based on the clustering analysis of correlation coefficients

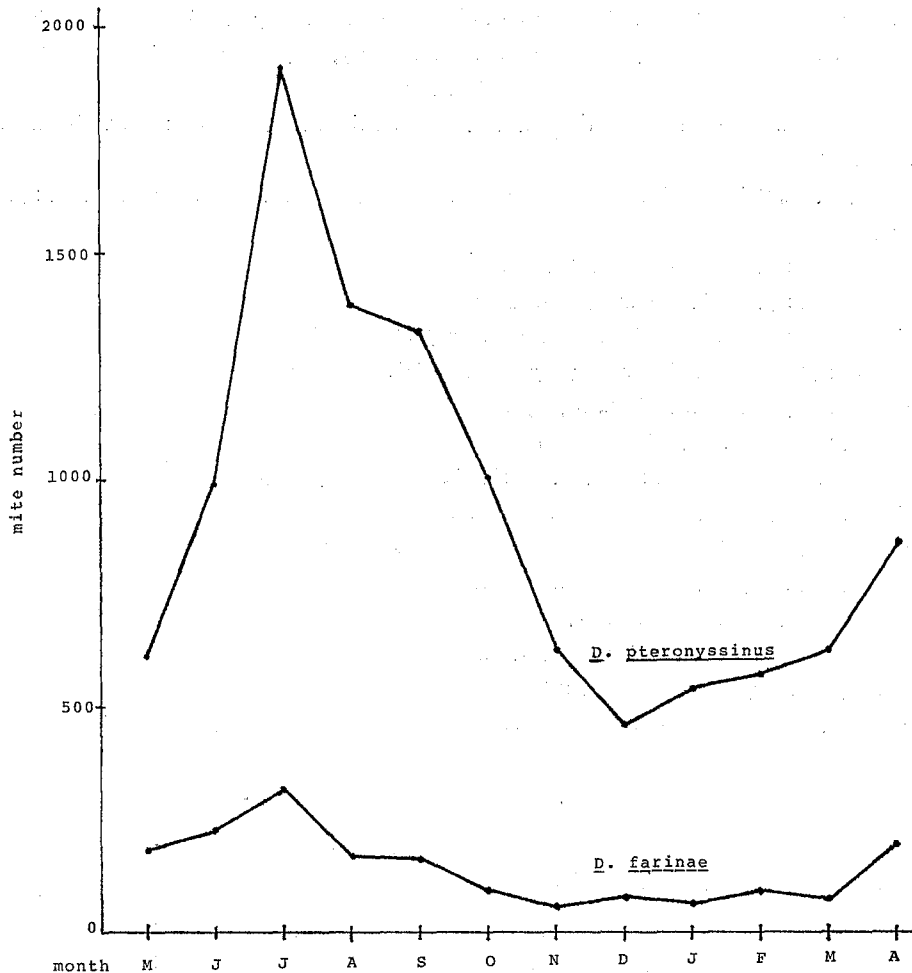


Fig. 6. Monthly changes of *D. pteronyssinus* and *D. farinae* in numbers in dust samples collected from four houses in the period from May 1981 through April 1982

sweeper removes mite bodies from floors. But no relation between mite numbers and cleaning times was found in our survey. A possible explanation is that our samples might not have been large enough for the analysis, or that residents in the four houses might not have been telling the truth concerning frequency of cleaning as no one wants to be considered a poor housekeeper.

In clustering analysis, twelve months were separated into two types by mite fauna groups. May through October, excluding September but including February, comprised one large group, and November through April, excluding February but including September, made another group. The fact that the numbers of Gamasida and Chortoglyphidae were large in September while small in other months in the May group, and the numbers of Haplochthoniidae and Cosmochthoniidae were the reverse are reasons to present September separately from the May group. On the other hand, the rise and fall of the mite numbers in eleven mite fauna groups in February were somewhat similar to that in October, so that February might be clustered with October. These two types of groups might be called the summer type mite fauna and the winter type mite fauna. However, more investigation is required to decide whether or not the mite fauna in September

belong to the winter type or that in February belongs to the summer type. Because the mite fauna in September was similar to the fauna in October in our past survey, September may be linked with October.

#### References

- 1) Voorhorst, R. M., Spieksma-Boezeman, M. I. A. and Spieksma, F. Th. M.: *Allergie und Asthma*, 10, 329, 1964
- 2) Voorhorst, R. M., Spieksma, F. Th. M., Varekamp, H., Leupen, M. J. and Lyklema, A. W.: *J. Allergy*, 39, 325, 1967
- 3) Yoshikawa, M.: *J. the Toyaku*, 4, 33, 1982
- 4) Yoshikawa, M.: *J. sanit. zool.*, 33, 291, 1982
- 5) Yoshikawa, M.: *J. House and Household Insect pests*, 11, 62, 1982
- 6) Oshima, S.: *Jap. J. Paediatric Surgery and Medicine*, 7, 461, 1975
- 7) Oshima, S.: *Jap. J. Sanit. Zool.*, 21, 1, 1970
- 8) Oshima, S.: *Pest Control*, 15, 13, 1976
- 9) Miyamoto, J. and Ouchi, T.: *Jap. J. Sanit. Zool.*, 27, 251, 1976
- 10) Yoshikawa, M.: *Jap. J. Public Health*, 28, 141, 1981
- 11) Yoshikawa, M. and Makino, K.: *Pest Control*, 38, 1, 1982
- 12) Yoshikawa, M.: *Jap. J. Sanit. Zool.*, 30, 271, 1979
- 13) Arlian, L. G.: *J. Med. Entomol.*, 12, 437, 1975
- 14) Larson, D. G.: *Ph. D dissertation of O. H. U.*, 1969
- 15) Matsumoto, K.: *Jap. J. Sanit. Zool.*, 23, 159, 1973
- 16) Spieksma, F. Th. M. and Spieksma-Boezeman, M. I. A.: *Acarologia*, 4, 226, 1967

#### コンクリートアパート4軒におけるダニ相およびダニ数の季節的変動

吉川 翠\*, 花岡 暉\*\*, 山田 百合子\*\*\*

1981年5月から1982年4月までの1年間、4軒のコンクリートアパートの和室6畳で、毎月ゴミを集めた。合計19,518匹のダニがゴミから採取された。それらのダニは、21科29属33種以上におよんだ。チリダニ科の発生数が一番多く、全ダニ数の74.7%を占めた。採取されたダニ数の月平均をみると、7月に一番ダニ数が多かつ

た。チリダニ、ツメダニ、ササラダニ数も7月に一番多くとれている。しかし、ニクダニとコナダニの最高数採取月は、それぞれ11月と12月であった。月々のダニ相を基底にすると、12か月は大きく2つのグループに分けられた。すなわち、夏型ダニ相をもつ月と、冬型ダニ相を持つ月である。

殺ダニ試験 (第1報) ケナガコナダニに対するフェニトロチオン処理紙の効力試験

大野正彦\*, 吉川 翠\*

Studies in Controlling Mites (I) Effects of Fenitrothion-Treated Paper on a Cheese Mite, *Tyrophagus putrescentiae* (Schränk)

MASAHIKO OHNO\* and MIDORI YOSHIKAWA\*

Three methods were used for testing how cheese mite, *Tyrophagus putrescentiae*, can be controlled by a fenitrothion-treated paper.

Fifty to 300 mites were kept for 24 hours in Petri dishes in three kinds of experimental methods, such as A: a fenitrothion-treated paper spread on the bottom of a Petri dish which was covered with both Parafilm paper and plain Japanese paper, B: a fenitrothion-treated paper spread on the bottom of a Petri dish and covered with plain Japanese paper and C: a Petri dish covered with both Parafilm paper and PTFE (Polytetrafluoroethylene) membrane with a fenitrothion-treated paper folded between them.

In experiments A and B, the mite mortality increased as the fenitrothion treated space (0.1-1g/m<sup>2</sup>) increases. However, there was no relation between the mite mortality and the dosage of fenitrothion in the experiment C. The mite mortality was in the order of A, B and C. When the mite mortality was compared with that on the surface of the paper where fenitrothion was used and that of outside the surface where no insecticide was used, it was much higher on the surface than the outside.

**Keywords:** mite, *Tyrophagus putrescentiae*, fenitrothion, mortality

緒 言

近年、高層住宅の畳からケナガコナダニ *Tyrophagus putrescentiae* (Schränk) が大量に発生している<sup>1-3)</sup>。

高層住宅は気密性が高いので水分は家屋内に留まり、水分のほとんどを畳が吸うため、この種にとって好適な環境になり、大発生がおこると考えられている。多量に発生すると住民にとって不快であるだけでなく、様々な食品に混入する<sup>4)</sup>。この種が人体内ダニ症、気管支ぜんそく、アレルギー性皮膚炎の病原になるといわれ<sup>5,6)</sup>、大量発生は衛生的にみて問題である。また、この種が多くなると、その体液を吸うツメダニが集まり、それが人を刺すようになる。それにより刺された所が赤く腫れ、かゆみを生じる<sup>8,7)</sup>といわれている。

以上のことから、ケナガコナダニの駆除について研究がなされ<sup>1,2,8-12)</sup>、フェニチオン、フェニトロチオンなどの薬剤の塗布された防虫加工紙を畳に縫い込む方法が開発された。公団、公社などの機関が建てた高層住宅は、

防虫加工紙を入れた畳か、加熱処理をした畳しか許可されなくなった。しかし、搬入してから1年もたつと、防虫加工紙の効力がなくなり、畳の水分も増えてきて、ケナガコナダニなどが発生する。畳を日光または蒲団乾燥車などで充分乾燥すれば問題は起きないように思われるが、現実には物理的、経済的に無理な場合も多いように思われる。

ケナガコナダニの大量発生を防ぐため、また、発生時の駆除のため、畳の防虫加工紙のように紙に薬剤を塗布したものを畳の上や、じゅうたんの下に敷けば、防虫効果が期待できると筆者らは考えた。薬剤を塗布した紙（以下、殺ダニ紙と称す。）をつくり、ケナガコナダニに対する効力試験を試みた。この種に対する殺虫剤効力試験は、実地試験を除き、主に密閉した容器の中でダニを殺虫剤に強制的に接触させる方法をとったものである<sup>2,8,11-13)</sup>。ケナガコナダニを容器の中で密閉状態にして薬剤と接触させたもの以外に、比較的空気の流通のあ

\* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

る状態のもとでも、試験を行なった。また、薬剤と直接接触できない状態にして、薬剤の蒸散の効果（呼吸毒）も調べた。

### 実験方法

殺ダニ紙として、有機リン系殺虫剤フェニトロチオン fenitrothion (商品名スミチオン) をポリビニルアルコール (ポバール) に溶かし、クラフト紙 ( $73\text{g}/\text{m}^2$  の紙質) に塗布したものを用いた。フェニトロチオンを  $1\text{m}^2$  当たり 2, 1, 0.5, 0.1g 塗布したものを実験に用いた。また、薬剤の蒸散を防ぎ、薬剤効力を持続させるため、薬剤  $1\text{g}/\text{m}^2$  の塗布面上にポリビニルアルコールを塗ったもの (以下、barrier 1 と称す.)、薬剤と吸着剤とポリビニルアルコールを混ぜて薬剤が  $1\text{g}/\text{m}^2$  になるよう塗ったもの (barrier 2 と称す.) についてもその効力を調べた。次の3種類の実験方法で、薬剤塗布量、塗布方法ごとに殺ダニ紙の効力を調べた。

A. 密閉状態でダニを殺ダニ紙に接触させた実験 (以下、実験Aと称す)

口径5.4cm、高さ2.6cmの腰高シャーレの底面に、その底面積よりやや大きな円形に切った殺ダニ紙を薬剤の塗布面が上になるように敷いた。殺ダニ紙の回りの端を折り曲げ、シャーレ側面に付けるようにした。研究室で果代飼育中のケナガコナダニを別のシャーレにとり、動きを止めるため、約10分間 $-10^\circ\text{C}$ の家庭用冷凍庫に入れた。動かなくなったところで、50~300個体を面相筆でとり出し、殺ダニ紙の塗布面中央においた。約5分間室温に放置した。温度が上がり動き出すダニのみを実体顕微鏡で選び、動かないもの、不活発なものを取り除いた。和紙を被せ、輪ゴムで止め、水蒸気の飽和した飼育室に20~30分間入れた。そして、密閉する目的でパラフィルムを被せ輪ゴムで止め、ビニール袋に入れた (Fig. 1 A)、さらにそれを、12時間ごとに明暗をかえた、湿度85%以上、 $25^\circ\text{C}$ の恒温室 (小糸工業社製生物環境用調節装置コイトロン3HN型) の中に置いた。この恒温室の容積は  $1.25\text{m}^3$  で内部の空気は循環されていた。

B. 半密閉状態でダニを殺ダニ紙に接触させた実験 (以下、実験Bと称す)。

殺ダニ紙はダニの発生を防ぐため、じゅうたんの下に敷かれ、効果を発揮するものと思われる。その場所は外部の空気と全く接触がない密閉状態とは考えられないので、殺ダニ紙の使用場所と近似させる設定で実験を行なった。Aと同様に殺ダニ紙上にケナガコナダニをおき、シャーレに和紙だけを被せ、輪ゴムで止め、前述の恒温室に入れた。恒温室の空気が動いているため、和紙を通

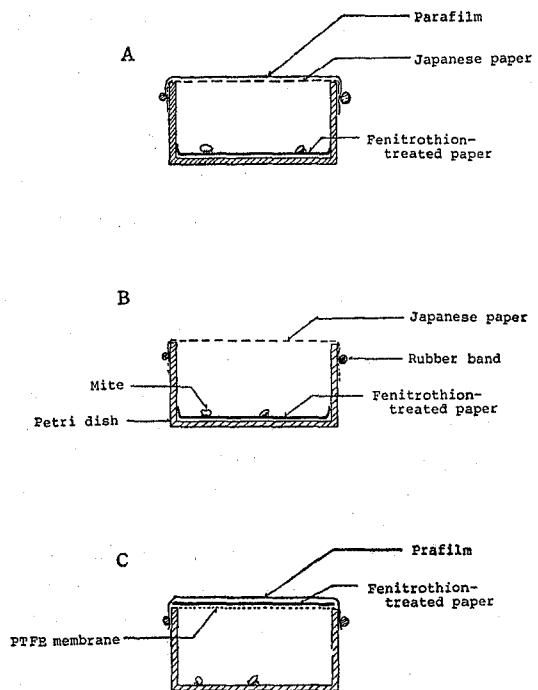


Fig. 1. Three Kinds of Experiments used for Testing Effects of Fenitrothion-Treated Papers on Cheese Mites

A : A fenitrothion-treated paper spread at the bottom of a Petri dish, which was covered with both a Parafilm paper and a plain Japanese paper.

B : A fenitrothion-treated paper spread at the bottom of a Petri dish, which was covered with a plain Japanese paper.

C : A Petri dish covered with both a Parafilm paper and PTFE membrane, holding a fenitrothion-treated paper between them.

し、シャーレ内の空気と外部の空気の交換がおこなわれるものと思われた (Fig. 1 B)。なお、恒温室の天井から水滴が落ちるため、空気の流通をさまたげない程度に上部におおいをした。

C. 密閉状態でダニと殺ダニ紙が直接接触せず、薬剤の蒸散の効果を調べる実験 (以下、実験Cと称す)

殺ダニ紙を敷いていないシャーレに、ケナガコナダニを入れ、四弗化エチレン樹脂膜 (潤工社製ゴアテックス  $3\mu\text{m}$  pore size) を被せ、輪ゴムで止めた。Aと同様、水蒸気の飽和した飼育室に20~30分間入れた。そして、殺ダニ紙の塗布面が下になるように (フェニトロチオン

の蒸気は空気より重い) 四弗化エチレン樹脂膜上においた。さらにパラフィルムを被せ、輪ゴムで止め、ビニール袋に入れ、前述の恒温室においた (Fig. 1 C)。

A, B, Cとも同様の実験を3回繰り返した。また、コントロールとして、薬剤の塗布していないクラフト紙を使用し、各々の実験で同様の処理をした。

ケナガコナダニを殺ダニ紙上においてから24時間後、

実体顕微鏡下でその生死を判定した。少しでも足を動かすものはすべて「生」とみなした。その判定時に、殺ダニ紙の薬剤塗布面および塗布面以外の面 (塗布面の裏、シャーレ側面、底面、シャーレに被せてある和紙) に存在している各々のダニの個体数を調べた。そして、それぞれ死亡率を算出した。

Table 1. Dead Mites against Total Mites after Exposing the Mites to Fenitrothion-Treated Papers

|         | 2g/m <sup>2</sup> | 1g/m <sup>2</sup> | 0.5g/m <sup>2</sup> | 0.1g/m <sup>2</sup> | barrier 1.<br>1g/m <sup>2</sup> | barrier 2.<br>1g/m <sup>2</sup> |
|---------|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| A       | 143/143           | 111/115           | 206/294             | 47/85               | 80/92                           | 141/185                         |
|         | 150/155           | 98/103            | 278/336             | 60/90               | 135/152                         | 190/210                         |
|         | 141/152           | 73/78             | 182/240             | 11/64               | 123/152                         | 176/216                         |
| B       | 148/162           | 122/163           | 38/64               | 40/78               | 167/185                         | 212/305                         |
|         | 211/254           | 93/118            | 74/112              | 19/67               | 103/133                         | 144/194                         |
|         | 155/222           | 96/112            |                     | 41/76               | 97/110                          | 147/260                         |
| C       | 52/108            | 32/69             | 102/219             | 20/78               | 71/115                          | 20/77                           |
|         | 33/95             | 34/50             | 61/110              | 15/29               | 81/145                          | 67/89                           |
|         | 25/76             | 19/61             |                     | 6/28                | 71/158                          | 20/94                           |
| Control |                   |                   |                     |                     |                                 |                                 |
| A       | 10/206            | 5/41              | 4/73                | 0/49                | 2/120                           | 5/68                            |
| B       | 2/87              | 3/43              | 0/47                | 0/47                | 1/116                           | 11/128                          |
| C       | 5/67              | 6/61              | 6/147               | 5/29                | 1/80                            | 1/69                            |

A, B, C : same as Fig. 1.

denominator : Number of the mites used for the each experiment

numerator : Number of the dead mites

Table 2. Mortality Percentage of the Mite in the Three Kinds of Experiments

|   | 2g/m <sup>2</sup> | 1g/m <sup>2</sup> | 0.5g/m <sup>2</sup> | 0.1g/m <sup>2</sup> | barrier 1.<br>1g/m <sup>2</sup> | barrier 2.<br>1g/m <sup>2</sup> |
|---|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| A | 100.0             | 96.0              | 69.7                | 55.3                | 86.8                            | 74.3                            |
|   | 96.6              | 94.5              | 81.7                | 66.7                | 88.6                            | 89.7                            |
|   | 92.4              | 92.7              | 74.4                | 17.2                | 80.6                            | 80.0                            |
|   | average 96.3      | 94.4              | 75.2                | 46.4                | 85.3                            | 81.3                            |
| B | 91.2              | 72.9              | 59.4                | 51.3                | 90.2                            | 66.6                            |
|   | 82.7              | 77.2              | 66.1                | 28.4                | 77.2                            | 71.8                            |
|   | 69.1              | 84.6              |                     | 53.9                | 88.1                            | 52.4                            |
|   | ave. 81.0         | 78.2              | 62.8                | 45.5                | 85.2                            | 63.6                            |
| C | 46.0              | 40.6              | 44.3                | 10.1                | 61.3                            | 24.9                            |
|   | 29.5              | 42.4              | 53.6                | 41.7                | 55.4                            | 23.6                            |
|   | 27.5              | 23.7              |                     | 5.1                 | 44.3                            | 20.5                            |
|   | ave. 34.3         | 35.6              | 49.0                | 19.0                | 53.7                            | 23.0                            |

A, B, C : same as Fig. 1.

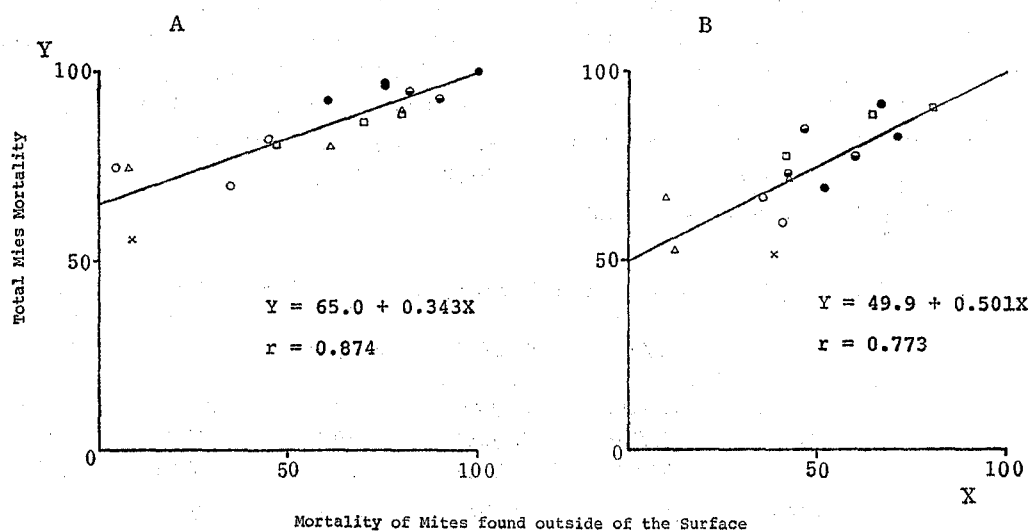


Fig. 2. Correlation between Mortality of Total Mites and Mortality of Mites which were found Outside of the Surface when Fenitrothion was used

A, B: same as Fig. 1.

●: 2g/m<sup>2</sup>    ○: 1g/m<sup>2</sup>    ○: 0.5g/m<sup>2</sup>  
 ×: 0.1g/m<sup>2</sup>    □: barrier 1    △: barrier 2

### 結 果

3種類の実験〔実験A（密閉状態でダニを殺ダニ紙に接触させたもの）、実験B（半密閉状態でダニを殺ダニ紙に接触させたもの）、実験C（密閉状態でダニを殺ダニ紙に接触させず、薬剤の蒸散の効果をみたもの）〕における各塗布量ごとの、薬剤の効力試験結果をTable 1, 2に示した。

ケナガコナダニの補正死亡率（以下、死亡率と称す）は実験A, B, Cの順に高かった。

ダニを薬剤に接触させた実験A, Bにおいて、塗布量が0.1~1g/m<sup>2</sup>の範囲では、塗布量が多くなるにしたがい、死亡率は増加する傾向にあった。しかし、2g/m<sup>2</sup>と1g/m<sup>2</sup>の死亡率には顕著なちがいは認められなかった。

実験Cでは、0.5g/m<sup>2</sup>の2回繰り返した実験の平均死亡率は49.0%で、2g/m<sup>2</sup> (34.3%), 1g/m<sup>2</sup> (35.6%) より大きく、死亡率と塗布量との間には、はっきりした関係は認められなかった。

barrier 1, 2の死亡率は実験A, Bにおいては、何も施していない1g/m<sup>2</sup>のものとかかわらなかった。しかし、薬剤の蒸散効果を調べる実験Cにおける barrier 1の平均死亡率は53.7%で、この実験方法中、最も高かった。

生死の判定時に殺ダニ紙の薬剤塗布面および塗布面以外の面に存在していたケナガコナダニの死亡率をTable 3に示した。実験Aでの塗布面にいたダニの平均死亡率は0.1g/m<sup>2</sup>で89.8%, その他は90%以上であった。死亡率は塗布量の多少にかかわらず、顕著な差はなかった。実験Bの塗布面にいたものでは、0.1g/m<sup>2</sup>で64.1%, その他は85%以上であった。Aと同様、塗布量間に死亡率の明瞭なちがいは認められなかった。

塗布面以外にいたものの平均死亡率は実験Aにおいて、2, 1g/m<sup>2</sup>ではそれぞれ77.9, 82.0%であった。この値は塗布面にいたもの（それぞれ98.4, 98.3%）より低かった。0.5, 0.1g/m<sup>2</sup>では27.6, 8.3%で、上記の2, 1g/m<sup>2</sup>の死亡率、および、0.5, 0.1g/m<sup>2</sup>の塗布面にいたものの死亡率（それぞれ94.7, 89.8%）に比べ、かなり低かった。実験Bでの0.5, 0.1g/m<sup>2</sup>の塗布面外にいたものの死亡率はそれぞれ38.1, 38.5%で、同様の実験の2, 1g/m<sup>2</sup>の死亡率（62.0, 49.3%）より低かった。塗布面以外の面にいたものの死亡率は塗布面にいたものに比べ小さく、塗布量が増すごとに増加する傾向があった。

全体の死亡率（塗布面とそれ以外の面にいたものを合わせて計算した。）は塗布量が0.1g/m<sup>2</sup>以上では、塗布

Table 3. Comparison of Mortality Percentages of the Mite between on the Surface where Fenitrothion was used and outside of the surface

|                                                                     | 2g/m <sup>2</sup> | 1g/m <sup>2</sup> | 0.5g/m <sup>2</sup> | 0.1g/m <sup>2</sup> | barrier 1.<br>1g/m <sup>2</sup> | barrier 2.<br>1g/m <sup>2</sup> |
|---------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| mites on the surface<br>of the paper where<br>fenitrothion was used | mortality         | mortality         | mortality           | mortality           | mortality                       | mortality                       |
| A                                                                   | 141/141 100.0     | 97/97 100.0       | 154/158 97.3        | 44/49 89.8          | 57/59 96.6                      | 134/135 99.2                    |
|                                                                     | 138/139 99.2      | 72/72 100.0       | 232/239 96.9        |                     | 73/74 98.6                      | 136/143 94.7                    |
|                                                                     | 132/137 96.2      | 43/45 94.9        | 178/197 89.8        |                     | 104/112 92.7                    | 116/121 95.5                    |
|                                                                     | average 98.4      | ave. 98.3         | ave. 94.7           | ave. 89.8           | ave. 96.0                       | ave. 96.5                       |
| B                                                                   | 120/120 100.0     | 104/124 82.7      | 21/22 95.5          | 25/39 64.1          | 125/133 93.9                    | 196/213 91.3                    |
|                                                                     | 144/159 90.3      | 68/78 86.2        | 58/67 86.6          |                     | 81/81 100.0                     | 111/124 88.5                    |
|                                                                     | 90/96 93.6        | 91/102 88.4       |                     |                     | 75/76 98.7                      | 125/150 81.8                    |
|                                                                     | ave. 94.7         | ave. 85.7         | ave. 91.1           | ave. 64.1           | ave. 97.5                       | ave. 87.2                       |
| mites outside the<br>surface                                        |                   |                   |                     |                     |                                 |                                 |
| A                                                                   | 2/2 100.0         | 14/18 74.7        | 52/136 34.6         | 3/36 8.3            | 23/33 69.2                      | 7/50 7.1                        |
|                                                                     | 12/16 73.7        | 26/31 81.6        | 46/97 44.3          |                     | 62/78 79.1                      | 54/67 79.0                      |
|                                                                     | 9/15 60.0         | 30/33 89.6        | 4/43 4.0            |                     | 19/40 46.6                      | 60/95 60.3                      |
|                                                                     | ave. 77.9         | ave. 82.0         | ave. 27.6           | ave. 8.3            | ave. 65.0                       | ave. 48.8                       |
| B                                                                   | 28/42 65.9        | 18/39 42.1        | 17/42 40.5          | 15/39 38.5          | 40/52 80.6                      | 16/92 9.6                       |
|                                                                     | 67/95 69.8        | 25/40 59.7        | 16/45 35.6          |                     | 22/52 41.8                      | 33/70 42.1                      |
|                                                                     | 65/126 50.4       | 5/10 46.2         |                     |                     | 22/34 64.4                      | 22/110 12.5                     |
|                                                                     | ave. 62.0         | ave. 49.3         | ave. 38.1           | ave. 38.5           | ave. 62.3                       | ave. 21.4                       |

A, B : same as Fig. 1.

denominator, numerator : same as Table 1.

Table 4. Percentages of Mite Numbers which escaped from the Surface where Fenitrothion was used

|         | 2g/m <sup>2</sup> | 1g/m <sup>2</sup> | 0.5g/m <sup>2</sup> | 0.1g/m <sup>2</sup> | barrier 1.<br>1g/m <sup>2</sup> | barrier 2.<br>1g/m <sup>2</sup> |
|---------|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| A       | 1.4               | 15.7              | 46.3                | 42.4                | 35.9                            | 27.0                            |
|         | 10.3              | 30.1              | 28.9                |                     | 51.3                            | 31.9                            |
|         | 9.9               | 42.3              | 17.9                |                     | 26.3                            | 44.0                            |
| average | 7.2               | 29.3              | 31.0                | 42.4                | 37.8                            | 34.3                            |
| B       | 25.9              | 23.9              | 65.6                | 50.0                | 28.1                            | 30.2                            |
|         | 37.4              | 33.9              | 40.2                |                     | 39.1                            | 36.1                            |
|         | 56.8              | 8.9               |                     |                     | 30.9                            | 42.3                            |
| average | 40.0              | 22.2              | 35.3                | 50.0                | 32.7                            | 36.2                            |

A, B : same as Fig. 1.

面以外にいたものの死亡率と相関があった (Fig. 2).

生死の判定時に塗布面以外の面へ移動した個体の割合を Table 4 に示した。実験Aの 2g/m<sup>2</sup> の移動した割合 (3回行なった実験の平均値) は7.2%で最も小さく、実

験Bの0.1g/m<sup>2</sup> が50%で最も大きかった。その他移動した割合 (平均値) は20~40%で、塗布量とあまり相関がなかった。



## 考 察

3種類の実験の中で、Aのダニの死亡率が最も高いのは、この実験において薬剤（フェントロチオン）が接触毒、呼吸毒という両方の効力を発揮したからであろう。実験Bでは、蒸散した薬剤が和紙を通して外部へ逸散するため、Aに比べ死亡率は低くなったと思われる。すなわち、AとBの死亡率の差が、和紙を通して薬剤が外部に蒸散したことによる効力の低下を示すと考えられる。前述したように、実験Cにおけるダニの死亡率がA、Bに比べ低く、これは、ダニが薬剤と接触していないためである。AとCの死亡率の差が、この薬剤の接触毒の効力を示すと考える。

接触毒と呼吸毒の効果が単純に相加的に働くと仮定すると、実験Aにおける薬剤の効力は接触毒と呼吸毒を合わせたもの、Bでは接触毒と、蒸気が外部へ逸散するためAより効力の低下すると思われる呼吸毒を合わせたもの、Cでは呼吸毒のみの効力ということになる。AとBでは、薬剤の接触毒として効力、A、Cでは呼吸毒としての効力が各々等しいと思われる。薬剤の効力の程度をダニの死亡率で表現してBの接触以外すなわち蒸散の効果を求めてみると、BとCの死亡率の和からAの死亡率を引いたものになる。この値はどの実験でも正であり、Cの死亡率より小さかった。やはり、Bでも呼吸毒がかなり働いていたことがわかる。ただし、接触毒、呼吸毒が相乗的に働くことも充分考えられ、この仮定の是非は今後検討すべきであろう。

$2g/m^2$ と $1g/m^2$ におけるダニの死亡率に差がなかった。これは、 $2g/m^2$ は塗布する薬剤の濃度を2倍にして $2g/m^2$ になるように塗ったのではなく、紙に塗れば $1g/m^2$ になる量を2度塗りしたため、 $2g/m^2$ の殺ダニ紙は見た目にも厚く感じられ、ダニと接触する表面の状態が $1g/m^2$ と $2g/m^2$ であまりかわらなかったためと思われる。

Cの実験では、シャーレ中のどこにいるダニでも蒸散する薬剤が均一に影響を及ぼすので、死亡率は塗布量と関係があるように思われたが、今回の実験結果はそうではなかった。塗布直後の殺ダニ紙から蒸散する薬剤の量は、 $0.1\sim 2g/m^2$ の間であまりかわらなかったためとも考えられるが、その原因は不明である。

塗布直後の barrier の結果からは、その処理が薬剤の蒸散を抑えているかどうかはわからなかった。塗布2ヶ月後のものについて現在実験中であり、その効果を次報で報告したい。

最後に、ダニが塗布面以外の面へ移動することが、全体の死亡率にどう影響するかについて考察し、実際に殺

ダニ紙を畳などに適用する場合について検討する。Fig. 2 から、たとえ、塗布面以外へ移動したものの死亡率が0でも、実験A、Bとも塗布量が $0.1g/m^2$ 以上では、塗布面に残ったもので全体の死亡率の半分程度は保持できることがわかる。これはTable 3で示したように、塗布面にいたもの（全体の過半数）の大部分が死ぬためであろう。塗布面にいたものの死亡率に塗布面以外へ移動したものの死亡率（それは移動する前に接触した薬剤の塗布量によりきまる）が上乘せられ、全体の死亡率の大体の値がきまるように思われる。ただし、移動するダニの割合はTable 4で示したように、塗布量とあまり相関がなく、これといった傾向が認められないことから、Fig. 2のような値のばらつきが生じたものと思われる。

今回の実験では、塗布量間に薬剤の蒸散の効果（呼吸毒）はあまり差がないことから、この薬剤（フェントロチオン）はダニに対し接触毒として働くことがわかる。全体の死亡率を高めるためには、塗布面から塗布面以外へ移動する（逃げ出す）ダニの死亡率を高めなければならない。この実験に用いた薬剤の塗布量（ $0.1\sim 2g/m^2$ ）はその塗布面にいるケナガコナダニに対し有効だが、 $0.1g/m^2$ 程度の塗布量では塗布面から塗布面以外へ移動することの多いケナガコナダニに対し、有効かどうかは疑問である。

もし、この殺ダニ紙を実際、畳の上やじゅうたんの下に敷くとすれば、薬剤の蒸散の効力はシャーレを密閉にして蒸散のみの効果を調べた実験C（24時間後の死亡率19～54%）より劣ると思われる。また、そこでは、多様な環境で、逃げる所が多くあり、多くのものが塗布面以外へ移動すると思われる。畳、じゅうたんにおいて塗布面以外へいったものの死亡率は、実験に用いたシャーレ（容積約 $60cm^3$ ）での死亡率より低くなることが考えられる。しかし、今回の実験と異なり、実際の畳などでは薬剤の影響が長期にわたり、様々な要因が複雑に絡むため、実際の畳などを使用し、ケナガコナダニに対するこの殺ダニ紙の効力を調査する必要がある。また、この殺ダニ紙の効力の持続性も検討しなければならない。ダニが薬剤の塗布面からそれ以外の面へ、どういう経過で移動するのかについても、今後調査の予定である。

## 摘 要

1. 有機リン系殺虫剤フェントロチオンを塗布した紙、いわゆる殺ダニ紙のケナガコナダニに対する効力試験を行なった。

2. 殺ダニ紙の短期間の効力をみるため、次のような3種類の実験を試みた。シャーレ内でダニを殺ダニ紙に

接触させ、シャーレの口をパラフィルムでふさいだもの（実験A）、和紙だけを被せたもの（実験B）、密閉状態でダニと殺ダニ紙が直接に接触しないもの（実験C）をつくり、それぞれ、薬剤の塗布量ごとにその効力を調べた。

3. ダニの死亡率は実験A, B, Cの順に高かった。

4. 実験A, Bでは、塗布量 ( $0.1 \sim 1 \text{ g/m}^2$  の範囲) が増すにつれ、その死亡率は増加する傾向にあった。しかし、殺ダニ紙と直接接触しない実験Cでは死亡率と塗布量との間に明瞭な関係は認められなかった。

5. 生死の判定時に殺ダニ紙の薬剤塗布面にいたものの死亡率は、ほとんどが85%以上であった。塗布面以外へ移動したものの死亡率は塗布面のものに比べ小さく、塗布量が増すごとに増加する傾向にあった。

6. 全体の死亡率（塗布面と塗布面外にいたものを合わせて計算した死亡率）は塗布量が  $0.1 \text{ g/m}^2$  以上では、塗布面以外にいたものの死亡率と相関があった。

7. 3種類の実験方法でのダニの死亡率を比較した。死亡率と殺ダニ紙の薬剤塗布量、および塗布面以外の面への移動との関係について考察した。

#### 文 献

1) 佐々学：生活と環境, 15(7), 7, 1970

2) 平社俊之助, 宮本詢子, 水谷澄, 宮崎光男, 白坂昭

子：衛生動物, 22, 62, 1971

3) 吉川翠：イヤな虫退治百科, 1981, 潮文社

4) Hughes, A. M. : The mites of stored food and houses, 57, Second Ed., Her Majesty's stationery office, London, 1976

5) 指宿考博：大阪市大医誌, 8, 93, 1959

6) 佐々学：食品害虫および衛生害虫としてのコナダニ, 1954, 医学書院

7) 吉川翠, 花岡暁, 山田百合子, 箕形崇史：衛生動物 33, 291, 1982

8) 平社俊之助, 水谷澄, 宮本詢子, 宮崎光男, 保久村俊江, 今中健一, 白坂昭子：衛生動物, 22, 200, 1971

9) 白石昭子, 宮本詢子, 水谷澄, 和田芳武, 田中生男, 宮崎光男, 今中健一, 平社俊之助：ibid, 22, 210, 1971

10) 中里良治, 宮崎光男, 平社俊之助：ibid, 26, 213, 1975

11) 平社俊之助, 宮崎光男, 中里良治：ibid, 26, 221, 1975

12) 鈴木猛, 平社俊之助, 佐藤富一：ibid, 8, 28, 1957

13) 水谷澄：生活と環境, 15(7), 19, 1970

神田川に生息するセスジユスリカ (ヨシマツユスリカ) の幼虫、成虫の個体数の変動、  
および薬剤散布時の浮遊流出幼虫について

大野正彦\*, 清水憲一\*\*

On Changes in Numbers of Larvae and Imagines of *Chironomus yoshimatsui*  
Martin et Sublette (Diptera; Chironomidae), and Drifts of the Larvae after  
Applications of Temephos in the Kanda River

MASAHIKO OHNO\* and KEN-ICHI SHIMIZU\*\*

In order to study the seasonal changes of *Chironomus yoshimatsui* Martin et Sublette (Diptera; Chironomidae), the larval and imaginal chironomids were collected in the Kanda River during the period from January 1978 to November 1980.

The number (densities) of the larvae was minimum from March through the middle of April. However, it gradually increased in the latter half of April and May. After that, the range of rise and fall in the larval number was extremely wide. The number decreased abruptly whenever the wettable powder of temephos which is an organophosphorus insecticide was applied. But the number was recovered in about half a month after the application.

The number of the imagines seemed to follow the number of the larvae in 1980, but not in 1978 and 1979.

In order to observe the drifting pattern at the applications of temephos, the larvae were captured. The drift began within an hour after the application. The maximum drifts occurred after 2-3 hours. Some of the drifting larvae were alive for 4 days after the application.

Some factors which influenced the number of the larvae and imagines and the efficiency of the application of temephos are discussed.

**Keywords :** chironomid, seasonal change, insecticide, drift

緒 言

各地の河川、下水処理場でセスジユスリカ (ヨシマツユスリカ) *Chironomus yoshimatsui* Martin et Sublette の大量発生が問題になって久しく<sup>1)</sup>, その概要について広く論議され<sup>2-7)</sup>, また、この種の個体群の動態について調査がなされ、その生態がしだいに明らかになりつつある<sup>8-13)</sup>。同時にその駆除に伴って各種殺虫剤に対する感受性が調査され<sup>14-16)</sup>、野外での薬剤散布効果が報告されている<sup>17,18)</sup>。しかし、薬剤散布がこの種の個体群に及ぼす影響や散布後の回復過程について、年間を通して調べたものはみあたらない。筆者らは神田川のセスジユスリカの大量発生を防除するため、年間を通しての幼虫の個体数の変動、および羽化個体が多くみられる時期におけるその発生状況を調べてきた。それらについて若干の知見が得られたので報告する。併せて、薬剤散布時に

浮遊流出する幼虫についても述べる。

調査方法

1. 調査地点

神田川水系は東京の西郊、井の頭池に源を発する神田川 (旧神田上水)、善福寺池に源を発する善福寺川、妙正寺公園附近に源をもつ妙正寺川からなり、住宅地域を流れ隅田川へそそぐ都市河川である (Fig. 1)。治水のため、殆んど全流域にわたり護岸工事が施されているが、多量の降雨時においては下水道管より溢水のため、流量が極めて増大する。一方、下水道の普及に伴い、水質が回復しつつある<sup>19)</sup>。セスジユスリカの大量発生で問題になる水域は水源から飯田橋附近までである。それより下流は流速が低下し、海水の影響があるためか、あまり発生がみられない。

調査はセスジユスリカの大量発生している面影橋附近

\* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\*\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 東京都文京区役所

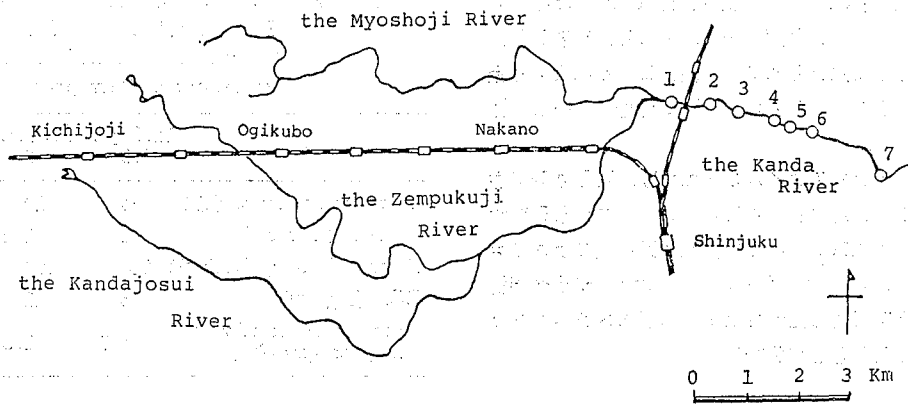


Fig. 1. Map showing the Kanda River.

1: Tajima Br., 2: Takada Br., 3: Omokage Br., 4: Komazuka Br.,  
5: Ohtaki Br., 6: Edogawa Br., 7: Iida Br.

A. Komazuka Br.

B. Ohtaki Br.

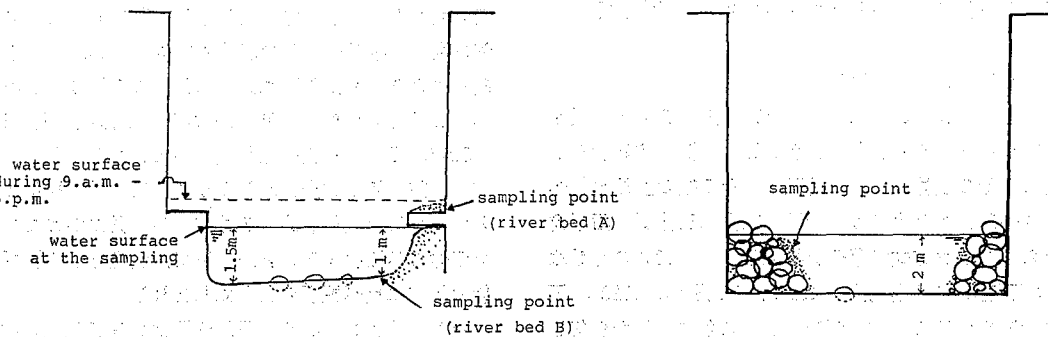


Fig. 2. Sections of the River at the Two Sampling Stations.

Table 1. Water Quality of the Kanda River at Komazuka Br., January 1978–December 1980.

|         | Dissolved oxygen   | BOD                | Total-N            | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N |
|---------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------------------|
|         | mg·l <sup>-1</sup> | mg·l <sup>-1</sup> | mg·l <sup>-1</sup> | mg·l <sup>-1</sup>              |
| Minimum | 4.3                | 2.8                | 5.2                | 4.1                             |
| Maximum | 14.0               | 28.0               | 22.1               | 12.6                            |
| Average | 7.6                | 11.3               | 12.0               | 8.2                             |

より江戸川橋にかけての水域でおこなった。この水域の平水時の水深は1~2m、流速は1m·sec<sup>-1</sup>程度であった。砂礫底で、礫のはまり石の状態で堆積していた。水は微かな灰色を呈し、下水臭を有していた。駒塚橋附近の調査期間(1978—80年)中の水質(文京区環境部調査)をTable 1に示した。

## 2. 採集方法

### 1) 幼虫

1978年1月から79年12月まで週に4回程度、午前8時ごろ、駒塚橋附近の水域(Fig. 2A)で調査をおこなった。夕方から翌朝にかけて水位が低下し、護岸補強のため設けられた幅約1m、長さ約100mの河床(以下河床Aと称す)が露出する。この時期にこの河床の砂泥を採集した。常時上流からこの河床部に砂泥が流下し、堆積するように思われた。また、水深約1m程度の河床(河床Bと称す)の砂泥をひしゃくで採集した。採集した砂泥をメスマリリンダーに入れ、全量を500cm<sup>3</sup>にし、ビニール袋に入れ持ち帰った。なお、幼虫が多いと思われる時は100cm<sup>3</sup>の砂泥を採集した。

80年になり、駒塚橋附近で護岸の補強工事が始まり、継続調査が不可能となったので、約330m下流の大滝橋

附近の水域 (Fig. 2B) に調査地点を移した。80年7月から11月まで週に4回程度、午前11時ごろ、調査した。護岸の補強として用いられている蒲団簀 (石に太い針金を巻きつけたもの、蛇簀ともいう) に付着している砂泥を採集した。

採集した試料を白色タイルの上にあげ、数取り器で主に3令4令の赤い幼虫を計数した。この幼虫の種別については、神田川水系においては夏期に近縁種のウスヨロユスリカ *Chironomus kiiensis* Tokunaga が少数出現した<sup>20)</sup>が、今回採集した幼虫はほとんどセスジユスリカであったので同種として集計した。

## 2) 成虫

駒塚橋附近の、川から約5m離れた民家にライトトラップ (富士工業製) を設置し、期間中、1日中点灯しセスジユスリカ成虫を集めた。78, 79年は5月から12月までの期間、1週間ごとに捕集した成虫の個体数を数えた。80年7月から11月までは、毎日、個体数を数えた。形態および色彩などからセスジユスリカの同定を行なった。

## 3) 薬剤散布時の浮遊流出幼虫

1979年9, 10, 11月に有機リン系殺虫剤テメホス (商品名アベイト) 5%水和剤を散布して、流出する幼虫を採集し、その個体数の経時的变化、その後の生死を調べた。9~10月にかけては1時間、11月に80分間、面影橋上からドリップ方式で薬剤を投入し、9, 10月の時期は790m下流の駒塚橋附近の水域で、11月には1120m下流の大滝橋附近の水域で浮遊流出する幼虫、蛹を採集した。なお、採集時における河川水中の薬剤濃度はそれぞれ流量から計算して1.7, 1.3, 1.7mg・l<sup>-1</sup>であった。縦横90cm×80cm, 60メッシュの金網、直径21cm, 60メッシュのふるいで1時間に2~3回、10分間の採集をおこなった。なお、ここでも赤色のユスリカ幼虫を数えた。大型の蛹をセスジユスリカとみなした。数え終えた幼虫蛹は、散布前に採水した河川水の入った容器へ移した。各散布時の水温、流速、流量、水質をTable 2に示した。

10, 11月の調査では流出幼虫を実験室に持ち帰った。白色バットに移し、散布前に採水した河川水を加え、約5cmの深さとした。鑑賞魚用エアープンプで通気した。室温におき、日ごとに幼虫の生存を調べた。

## 結 果

### 1. 幼虫の個体数の変動

1978, 79年の幼虫の個体数は、河床A, Bとも、3, 4月ごろ最も少なく、5月になり増加し始め、その後、

Table 2. Conditions of the Kanda River at Three Applications of Temephos Wettable Powder and Target Concentrations of Temephos

|                                                        | 12. Sept.<br>'79 | 12. Oct.<br>'79 | 6. Nov.<br>'79 |
|--------------------------------------------------------|------------------|-----------------|----------------|
| Water temperature (°C)                                 | 24               | 20              | 17             |
| Current (m・sec <sup>-1</sup> )                         | 1.1              | 1.2             | 1.1            |
| Discharge rate (m <sup>3</sup> ・min <sup>-1</sup> )    | 920              | 1180            | 670            |
| BOD (mg・l <sup>-1</sup> )                              | 16               | 11              | 15             |
| Target concentration of temephos (mg・l <sup>-1</sup> ) | 1.7              | 1.3             | 1.7            |

極めて大きな幅で変動した。Fig. 3, 4で明らかのように、薬剤散布 (5%テメホス水和剤を約1時間散布し、流量から計算した薬剤濃度は0.9~2.0mg・l<sup>-1</sup>であった) をした場合、個体数は急激に減少した。それに反し、降雨による流量の増大は薬剤散布に比べ、ユスリカ幼虫の個体数をあまり減少させなかった。薬剤散布で減少した個体数は約半月後に元の状態に回復したが、再び薬剤の散布により、また急激に減少した。この繰り返しが5月から11月まで継続したが、12月以後、個体数が漸減した。

80年は極めて不十分な調査しかできなかった。しかし前年、前々年の調査と同じように、個体数は薬剤散布ごとに減少した (Fig. 5)。7月末から8月にかけての降雨で個体数が減少することからみて、流量増加の影響は以前の調査に比べ顕著のように思われる。

なお、Fig. 3, 4, 5の平均気温は東京気象表の数値を用いた。河川の最大水位は東京都建設局河川部の測定した田島橋 (駒塚橋より約2km上流) の資料を用いた。水温は調査時 (78, 79年は午前8時, 80年は11時ごろ) のものである。

### 2. 成虫の個体数の変動

ライトトラップで捕集した成虫の個体数は78, 79年の調査では、幼虫の個体数の変動と一致しなかった (Fig. 3, 4) が、80年では比較的一致し、薬剤散布ごとに成虫幼虫共に減少した (Fig. 5)。成虫の捕集期間を大発生で問題がおこる5月から12月までとしたため、年間を通しての消長がわからなかった。

### 3. 薬剤散布時の浮遊流出幼虫

流出幼虫の個体数は散布から2~3時間後にピークに達した。以後、漸減し、5時間後にはほとんど流出を認めなかった (Fig. 6)。また、流出幼虫はすべて死ぬわけではなく、散布から4日後の死亡率は10, 11月の調査でそれぞれ63, 82%であった (Table 3)。

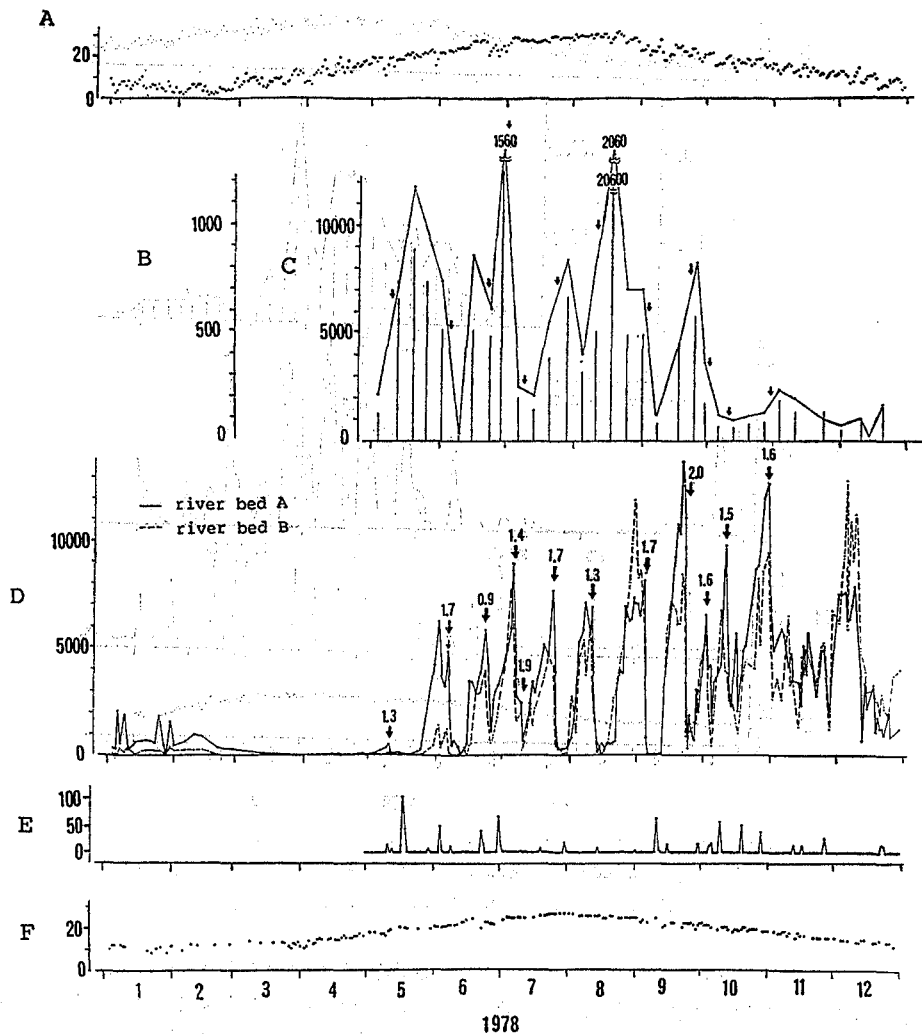


Fig. 3. Changes in the Numbers of Larvae and Imagines of *Ch. yoshimatsui* at Komazuka Br. in the Kanda River, 1978.

A: Average atmospheric temperature (°C)

B: Average number of the imagines collected per day (broken arrow)

C: Number of the imagines collected per the sampling (bar diagram)

D: Number of the larvae per 500cm<sup>3</sup>

E: Maximum water level (cm), F: Water temperature at 8. A.M. (°C)

Arrow: Application of temephos wettable powder

Figure: Target concentration of temephos (mg·l<sup>-1</sup>)

薬剤散布により白濁した河川水が各地点（三島橋、散布地点より60m下流、中之橋200m下流、駒塚橋790m下流、江戸川橋1650m下流）に流下してから30分後に採水した河川水の薬剤濃度を Table 4 に示した。薬剤濃度は 1.3~1.6mg·l<sup>-1</sup>で、地点間に差がないように思われた。

また、駒塚橋における河川水の薬剤濃度は、白濁した河川水の流下がみられてから5分後に 2.1mg·l<sup>-1</sup> と最も高く、以後徐々に減少した (Fig. 7)。調査した範囲では、流下する過程で薬剤の吸着がなく、規定の濃度が維持され、散布が順調に行なわれていることがわかった。

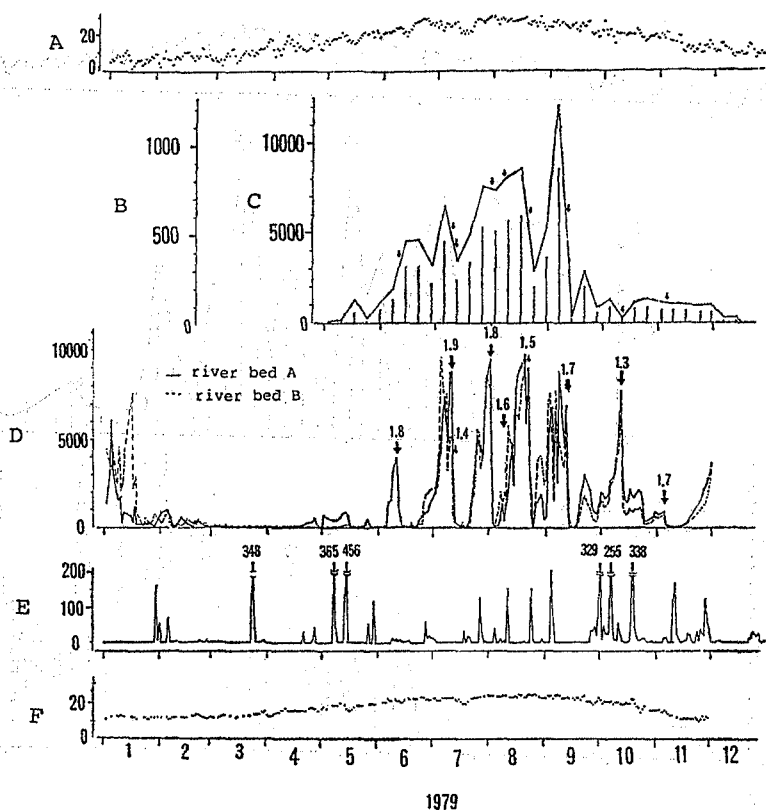


Fig. 4. Changes in the Numbers of Larvae and Imagines of *Ch. yoshimatsui* at Komazuka Br. in the Kanda River, 1979  
A-F, Arrow and Figure: same as Fig. 3

### 考 察

神田川水系のセスジユスリカ 個体群の消長は薬剤散布, 降雨による増水, 汚濁した水の流入, 護岸工事, 魚の放流など様々な影響を受けている。その個体数の変化は, それ自身の生活史以外に上記の要因などがからみ, 極めて複雑なものになっている。しかし, 現在までのこの種についての知見から, 今回の調査における個体数の変動の一部を説明できるように思われる。

冬から春にかけてのセスジユスリカ 幼虫の個体数の減少は, 森谷<sup>12)</sup>が調べた鎌倉砂押川のセスジユスリカ (ヨシマツユスリカ) でも報告されている。また, セスジユスリカと同じように汚濁河川に多いユスリカの一種 *Chironomus ripalius* K. (*Ch. thummi* K.) は4月から12月まで羽化し, 年間少なくとも5世代を繰り返す, 冬から春にかけて, その個体数が減少すると Gower & Buckland<sup>21)</sup>は述べている。以上の報文, および, 神田川水系でのセスジユスリカの羽化期が3月下旬から11月で<sup>18)</sup>

冬以降, 次の羽化期まで新しい個体の加入がないと思われることから, この個体数の減少は11月ごろ産卵された世代のものが徐々に死亡することによると思われる。

薬剤散布後, 前述したように幼虫の個体数が半月程度で回復した。セスジユスリカが20℃で卵から3, 4令幼虫になるのにそれぞれ9, 16日要するといわれている<sup>9)</sup>。この回復に要する期間は, 散布後に産みつけられた卵から3, 4令幼虫に生長する期間と思われる。

78, 79年の調査では, 降雨時の増水は薬剤散布に比べ幼虫の個体数を減少させなかった。これは, 採集地点が流心部に比べ上流からの流下物がよく堆積する場所で, 増水の影響をあまり受けなかったことによるかもしれないが, その原因は不明である。

結果の項で述べたように, 1年を通して成虫をライトトラップで捕集しなかったため, 今回の調査では成虫の年間の発生状況はわからなかった。しかし, 前述の鎌倉砂押川のセスジユスリカ (ヨシマツユスリカ) は冬期に

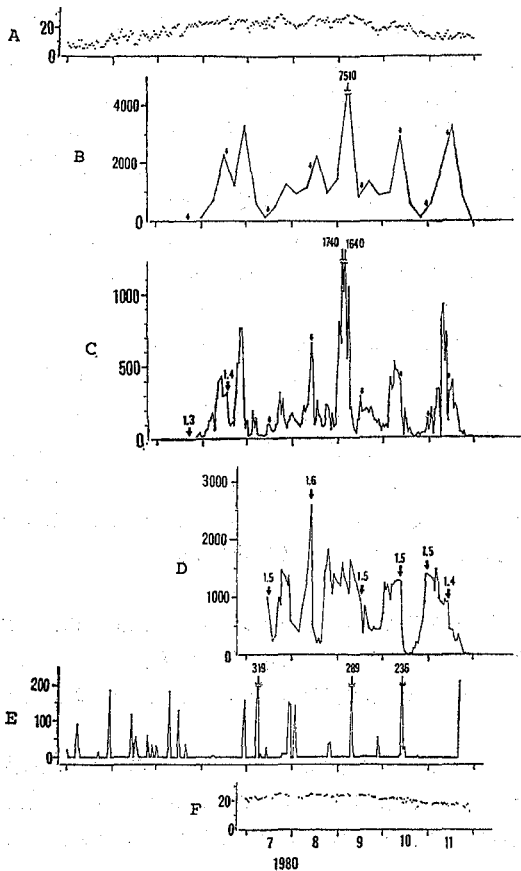


Fig. 5. Changes in the Numbers of Larvae and Imagines of *Ch. yoshimatsui* at Ohtaki Br. in the Kanda River, 1980

A, D-F, Arrow and Figure: same as Fig. 3

B: Number of the imagines collected a week

C: Number of the imagines collected per day

ほとんど羽化せず、3、4月に少数のものが羽化するだけで、羽化の最盛期は5月以降であった<sup>12)</sup>。神田川水系善福寺川でも3月下旬から産卵が始まった<sup>13)</sup>。以上のことから駒塚橋附近の水域でも5月以前に少数のものが羽化し、その後、羽化数が増加し大量発生になるものと思われる。

次に、浮遊流出幼虫、およびテメホスを用いた薬剤散布について考察する。田原<sup>18)</sup>は東京都小金井市を流れる野川（水温 19℃、流速 70 m・min<sup>-1</sup>）でテメホス水和剤を60分間連続投入した。その時の河川水の薬剤濃度は

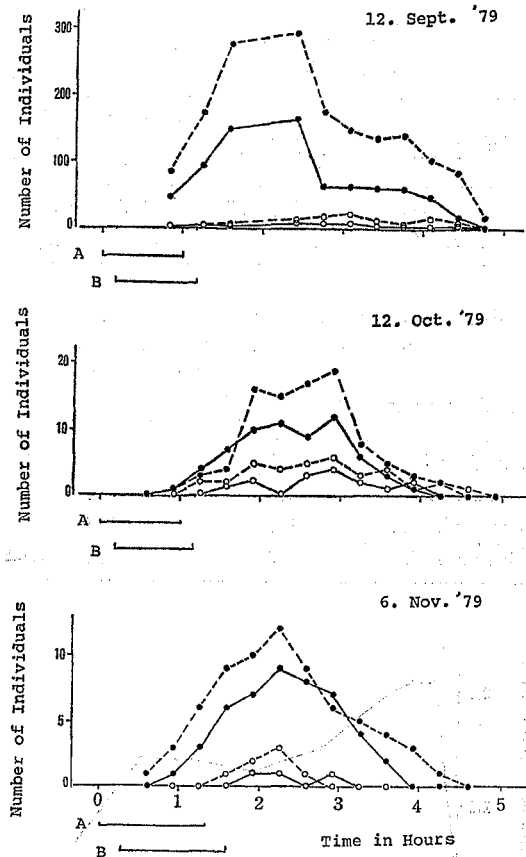


Fig. 6. Numbers of the Drifting Larvae and Pupae of *Ch. yoshimatsui* at Komazuka Br. (September, October) and Ohtaki Br. (November) after the Applications of Temephos Wettable Powder.

A: Period of the application of temephos W. P.

B: Period of the drift of temephos W. P.

●: Larvae of *Ch. yoshimatsui*

○: Pupae of *Ch. yoshimatsui*

—: collected by the sieve with 60 mesh

.....: collected by the wire gauze (60 mesh)

0.68ppmであったという。浮遊流出幼虫は散布120分後より増加し、210分後にピークに達し、以後漸減すると報じた。そして、その幼虫全部が苦悶状態を呈し、終令幼虫を飼育したところ、72時間後には全部死滅したと述べている。今回の調査の浮遊流出は散布から1時間もたたない内に始まり、そのピークは2～3時間後であった。しかし前述したように、浮遊流出幼虫のすべてがその後死ぬわ



Table 3. Mortalities of the Larvae of *Ch. yoshimatsui* during the Laboratory Rearing Period after the Temephos Applications.

| Date of temephos application | Time after temephos application |        |        |        |
|------------------------------|---------------------------------|--------|--------|--------|
|                              | 1 day                           | 2 days | 3 days | 4 days |
| Oct. 12.                     | 12.8%                           | 25.6%  | 44.7%  | 62.6%  |
| Nov. 16.                     | 0                               | 0      | 11.2   | 81.9   |

Table 4. Concentrations of Temephos in Water of the Kanda River at Each Stations

| Sampling station | Distance from application spot | Concentration of temephos |
|------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Mishima Br.      | 60m                            | 1.3mg/l <sup>-1</sup>     |
| Nakano Br.       | 200                            | 1.6                       |
| Komazuka Br.     | 790                            | 1.5                       |
| Edogawa Br.      | 1650                           | 1.5                       |

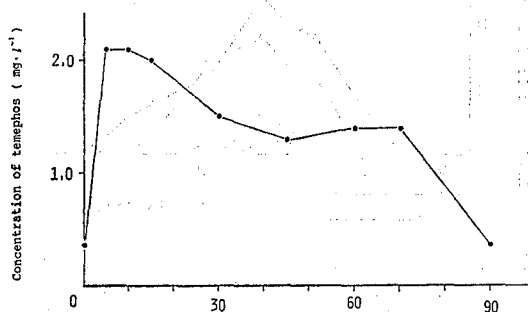


Fig. 7. Change in the Concentration of Temephos in Water after the beginning of the Drift of the Temephos Wettable Powder at Komazuka Br.

けではなかった。このことにより、調査地点附近のセシジユスリカ幼虫のテメホスに対する感受性が低下していることが推定できる。この調査とほぼ同時期(79年10月)にこの附近で採集した卵塊から実験室で成長させたセシジユスリカ終令幼虫のテメホス原体の水溶液1時間浸漬のEC<sub>50</sub>(実験に用いた幼虫の半数が巣を造れない濃度)は3.6mg/l<sup>-1</sup>であり、薬剤散布がされていない善福寺川のもの(1.7mg/l<sup>-1</sup>)より高かった<sup>16)</sup>。今回の浮遊流出幼虫の死亡率はこの感受性試験結果に比べ高かったが、神田川のセシジユスリカ幼虫に対し従来いわれてきたテメホスの散布濃度<sup>14, 17, 18)</sup>および今回の散布濃度では生き残

るものがある程度存在するものと思われる。砂泥に残ったものも浮遊流出する幼虫と同様、ある程度生き残ると思われるから、幼虫の流出が、散布後の個体数の急激な減少の大きな原因になっていると考えられる。

以上、述べてきたように、今回の調査で、神田川における薬剤散布はそこに生息する幼虫の個体数を減少させていることがわかった。この薬剤散布が成虫の発生をある程度抑えていると思われる。しかし、散布時に浮遊流出する幼虫はその後、すべて死ぬわけではなく、幼虫の個体数も約半月後には元の状態に回復することが明らかになった。以前筆者の一人はセシジユスリカの大量発生を防ぐには、ほぼ1ヶ月の間隔で薬剤散布をすればよいと述べた<sup>22)</sup>が、今回の調査結果からみて、その方法で防除ができるか疑問である。テメホスの散布は、さらに有効な方法がみつかるまで当面の間、続けていかねばならないため、その散布をどのように行なえば防除に効果があるのか、今後検討する必要がある。

#### 摘 要

1. 神田川に生息するセシジユスリカ幼虫、成虫の個体数の変動を1978年から80年にかけて調査した。また、薬剤(テメホス水和剤)散布時に浮遊流出する幼虫を調べた。
2. 幼虫の個体数は3月から4月上旬にかけて最も少なく、4月下旬から5月に増加し始めた。その後、薬剤散布ごとに極めて大きな変動を示した。12月以後、漸減した。
3. ライトトラップで捕獲した成虫の個体数の変動は78, 79年の調査では幼虫の個体数の変動と一致しなかった。80年の調査では比較的一致した。
4. 薬剤散布時に浮遊流出する幼虫の個体数は散布から、2, 3時間後にピークに達した。浮遊流出幼虫はその後一部生存することが確認された。
5. この種についての現在までの知見でもって、今回の調査での、幼虫、成虫の個体数の変動を説明した。
6. テメホス散布の有効性を検討した結果、成虫の発生を抑える効果は認められたが、セシジユスリカの大量発生防除のためには、さらに検討を要すると思われた。

謝辞 調査にご協力いただいた東京都衛生局環境衛生部環境衛生課、文京区役所環境部の皆様、および神田川の水位の資料を見せて下さった東京都建設局河川部計画課の皆様に感謝いたします。また、薬剤の分析をして下さった当所水質研究科岡本寛主任研究員に深甚の謝意を表します。(本研究の一部は第5回水生昆虫研究会1981年9月で発表した)

## 文 献

- 1) 朝日新聞1980年4月11日号：ユスリカ公害・住民の不快感いつ消える。
- 2) 井上義郷：応用昆虫学総説，野村健一編，236, 1981 養賢堂
- 3) 森下郁子：川の健康診断，1977，日本放送出版協会
- 4) 緒方一喜：東京の生物史，沼田 真・小原秀雄編，153, 1982，紀伊国屋書店
- 5) 清水憲一：生活と環境，23 (4)，25, 1978
- 6) 佐藤英毅：昆虫と自然，15 (4)，20, 1980
- 7) 圓谷哲男，森 忠洋，松本利通：用水と廃水，23, 331, 1982
- 8) 狩谷貞二：水産増殖，3 (2)，1, 1955
- 9) 代谷昭彦：アカムシの研究，1969，恒星社厚生閣
- 10) Sugimoto, T.：日生態会誌，19, 1, 1969
- 11) 三原 実，井上義郷：衛生動物，28, 431, 1977
- 12) 森谷清樹：神奈川県衛研年報，26, 101, 1977
- 13) 大野正彦：日生態会誌，31, 155, 1981
- 14) 井上義郷，三原 実：衛生動物，26, 135, 1975
- 15) 佐藤英毅，安野正之：ibid, 30, 361, 1979  
佐藤英毅：川崎市衛研年報，16, 39, 1980
- 16) 大野正彦，岡本 寛：都衛研年報，31-1, 261, 1980
- 17) 田原雄一郎：衛生動物，26, 247, 1975
- 18) 田原雄一郎，松永秀子，佐藤淳夫：ibid, 29, 87, 1978
- 19) 文京区役所環境部：文京の公害，昭和53, 54, 55年度版，1979, 80, 81
- 20) 大野正彦：都衛研年報，32-1, 288, 1981
- 21) Gower, A.M. and Buckland, P.J.: *Freshwat Biol.* 8, 153, 1978
- 22) 大野正彦，松本浩一：都衛研年報，30-1, 256, 1979

都公立小中学校の教師を対象とした重金属モニタリング

長嶋親治\*, 石川隆章\*

Biological Monitoring on Lead and Cadmium in Human Blood

CHIKAHARU NAGASHIMA\* and TAKAAKI ISHIKAWA\*

This study was carried out on the basis of a UNEP/WHO project on assessment of human exposure to lead and cadmium through analysis of blood in different countries: Belgium, India, Japan, Mexico, People's Republic of China, Peru, Sweden, U.S.A., and Yugoslavia. It was emphasized that there was a great need for quality control programme to enable comparison of monitoring data. There was considerable variation in metal exposure among different countries ranging from 225  $\mu\text{g Pb/l}$  in Mexico City to 60  $\mu\text{g Pb/l}$  in Tokyo, and 1.2  $\mu\text{g Cd/l}$  in Brussel and Tokyo to 0.5  $\mu\text{g Cd/l}$  in Tel Aviv/Jerusalem.

**Keywords** : Global Environmental Monitoring System (GEMS), Quality Control, Internal marker Pb, Cd

緒言

環境汚染物質による汚染の状況を国際的視野から把握することは、今日の問題としてのみならず将来に対する貴重なデータの蓄積ともなる。人を対象とした生物モニタリングに関して、各先進国を中心とした研究所から単発的に報告されている。しかし、地域、人種、経済並びに社会的相違など標的集団の選択によって、その値は大きく変化している。さらに微量重金属を対象とした場合測定方法や測定技術などの相違で、その変動は、さらに増大すると思われる。各国からの要請によって世界各地の汚染状況を global に把握すべく、WHO/UNEP は、Global Environmental Monitoring System Programme を企画した。それに基づいて、対象として重金属に対する生物モニタリングが計画され、厚生省を通してプロジェクトへの参加が当研究所に要請された。プロジェクトを通して得られた若干の知見を報告する。

試料および分析方法

試薬および器具：Pb および Cd の金属標準液は、和光純薬の金属標準液 1000ppm を、硝酸、硫酸および過塩素酸は同社の有害金属測定用を使用した。実験に用いられた水は、蒸留後イオン交換樹脂を通し、さらに蒸留した再留水を用いた。灰化試験管として Pyrex 製ガラスチューブ (10ml) を使用した。すべてのガラスチューブは、硫酸および硝酸 (1:1) 溶液中で加熱 (200°C, 24時間) 洗浄したものを用いた。さらに、その灰化チューブ

Table 1. Analytical Condition by Flameless Atomic Absorption Spectrophotometry

|                               | Pb    | Cd    |
|-------------------------------|-------|-------|
| Wave Length (nm)              | 283.3 | 228.8 |
| Current of Lamp (mA)          | 10    | 5     |
| Current of D Lamp (mA)        | 200   | 200   |
| Drying Current (A)            | 27    | 27    |
| Times (sec)                   | 20    | 20    |
| Ashing Current (A)            | 70    | 65    |
| Times (sec)                   | 10    | 10    |
| Atomize Current (A)           | 280   | 280   |
| Times (sec)                   | 5     | 5     |
| Ar Gas (l/min)                | 2     | 2     |
| Sample Size ( $\mu\text{l}$ ) | 20    | 20    |

Auto 1

B. K. G Mode

は 3ml の濃硝酸を加え血液の湿式灰化条件で処理後、2ml の 2% 硝酸液に溶解、Pb および Cd に関して原子吸光で汚染のないもののみを使用した。分注器とピペットは Gilson 社の distrirar および Pipetman を用いた。Pipetman のチップは Gilson 社のものを硝酸で洗浄して使用した。原子吸光 (日本ジャーレルアッシュ AA-8500) の測定条件は、Table 1 にまとめてある。

結果および考察

精度管理：絶対値に近い値が知られている血液標準試

\* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

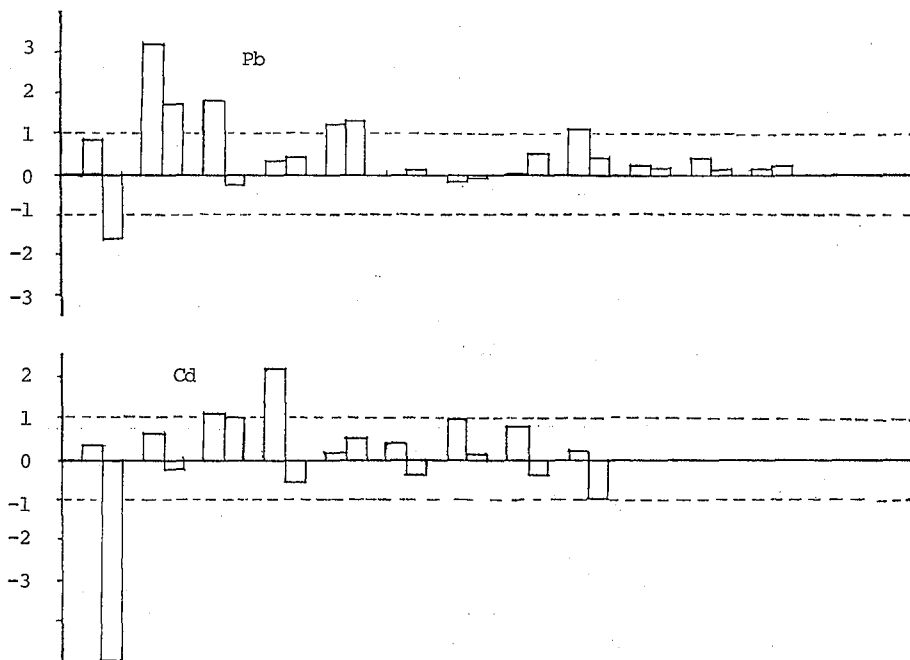


Fig. 1 The results of analysis of lead and cadmium in blood for quality control runs expressed as ratios between calculated and accepted deviation from true values. Dotted lines represent the acceptance interval.

料を用いて精度管理が行なわれた。血液として、大量にしかも重金属添加後重金属が均一に分散することから牛血が用いられた。ultrasonic 処理後も抗凝性を有するとの理由から抗凝固剤として EDTA が使用された。しかも添加前の血液は標的とされる重金属に関して、出来る限り低濃度であることが重要である。血液を採血後、直ちに ultrasonic で処理し、既知の重金属を添加し、各濃度の重金属添加血液試料を作成した。添加前の血中重金属は繰り返し測定され、その値と添加量から理論値が決定された。しかも、理論値に対して実測値が 5% 以内であった試料を精度管理に用いた。さらに二つの reference laboratory (the U.S. National Bureau of Standards the CEC Joint Research Center, Ispra, Italy.) を別に設定し、理論値の確かさをさらに確認した。1 回の精度管理は、6 本の未知試料と Internal marker の 2 本の既知試料からなる。Internal marker を導入したことで血液の前操作中の汚染や原子吸光の状態をある程度把握しながら未知試料の測定が行える。得られたデータから回帰直線が求められ Pb は  $y = X \pm (0.1X + 10) \mu\text{g/l}$ , Cd は  $y = X \pm (0.1X + 1) \mu\text{g/l}$  の範囲内を許容誤差範囲とした。実際に行なわれた WHO の精度管理の経過を

Fig. 1 に示した。精度管理ごとに回帰直線が求められ、Pb は 100 および 400  $\mu\text{g/l}$  が、Cd では 1.5 と 12  $\mu\text{g/l}$  の二点が Checkpoint とされた。(回帰直線より算出される Checkpoint の値—その理論値)/Checkpoint の最大許容誤差値=誤差率とされ、誤差率が  $\pm 1$  の範囲が acceptance interval とされた。その値が大きければ誤差が大である。血中重金属の定量法は WHO から送付されてくるサンプル量が少ないため 250  $\mu\text{l}$  と少量で行う以外、原則として当研究室で最も慣れている湿式灰化法を採用した。この方式で WHO の精度管理に望んだが Pb は初回から連続 3 回 reject された。そのため誤差の原因と改善の必要に迫られた。その原因として前処理中の汚染がその大きな要因と考えられた。ドラフト内で行っている灰化装置全体をさらにガラス箱でおおって、ガラス箱の底に水道水を流し、外界の浮遊粉塵からの混入を極力防いだ。一方灰化中に灰化チューブから Pb が硝酸溶液中に溶出するという現象を確認した。この点を克服するために硝酸より沸点の高い硫酸溶液中 (200°C) で長時間灰化チューブを加熱洗浄した。この操作で硝酸灰化中ガラス壁からの Pb 溶出は著しく改善された。しかし、このような灰化チューブを用いても時にガラス壁からの溶出がみられ

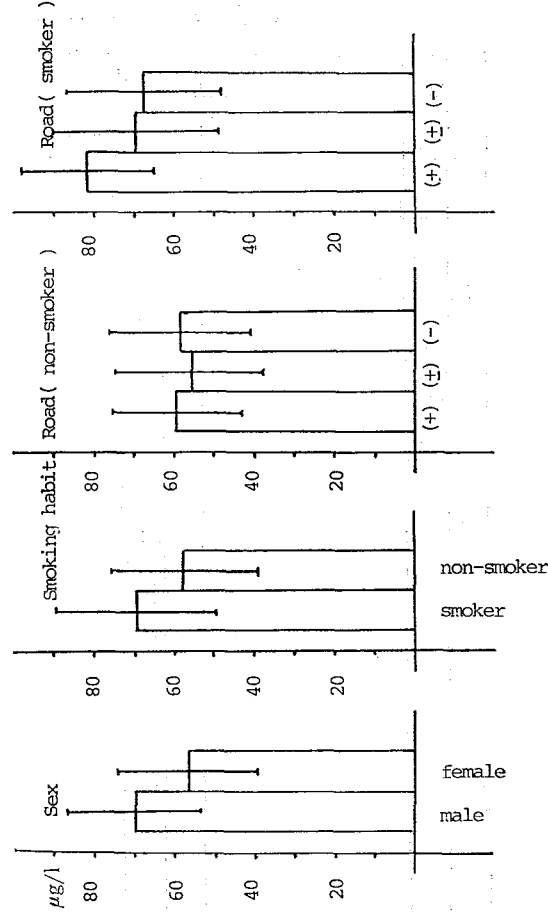


Fig. II-a The relation of lead in blood from Tokyo are expressed in relation to sex, smoking habit and the distance from main road.  
(+) less than 200 meters from main road, (-) 100—200 meters,  
(-) more than 200 meters.

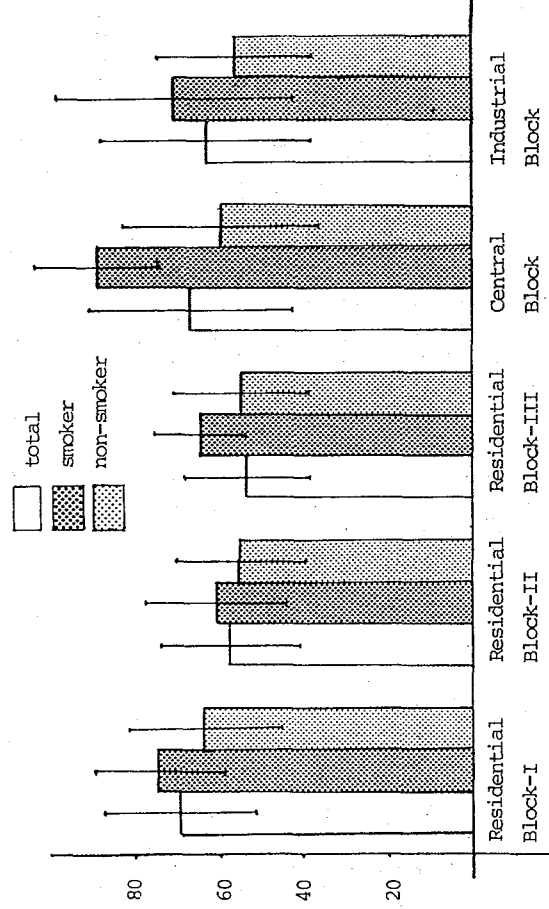


Fig. II-b The results of lead in blood from Tokyo are expressed in relation to area stratification

るため、灰化はすべて duplicate で行うことが必須条件となる。前処理中の汚染に対処したことで4回以降の精密度管理テストの結果はFig. 1に見られるように著しく改善した。しかも精度管理が繰り返されることで、誤差率が0に近づく傾向を示した。このことは、Cd について

もほぼ Pb と同一のパターンをとっている。標的重金属と集団の選択：モニタリングされた重金属の種類や標的集団はこのプロジェクトに参加した各研究機関の合意の下に決定された。重金属の種類に関して各研究機関によって比較的興味のある、しかもある程度間

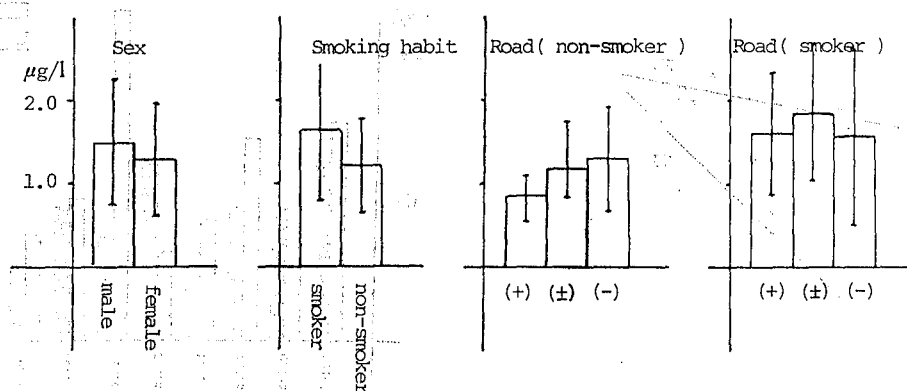


Fig. III-a The relation of cadmium in blood from Tokyo are expressed in relation to sex, smoking habit, and the distance from main road.  
(+) less than 100 meters from main road. (±) 100—200 meters.  
(-) more than 200 meters

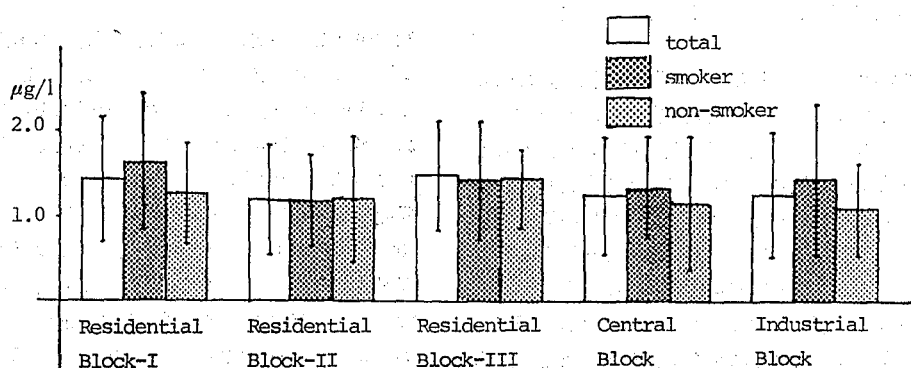


Fig. III-b The results of cadmium in blood from Tokyo are expressed in relation to area stratification

題になっている重金属としてPbおよびCdが選ばれた。標的集団については、各研究機関それぞれ事情も異なり議論的であったが、比較的均一な集団で経済的にも社会的にも各国間での差が少ないとの理由から公立小中学校の教師が選ばれた。各国が一つの大都市を選び、そこから原則として random sampling を行い男女各100例、計200例とされた。その guideline として、都市を二つの地域に層別し、各地域で10校を抽出し、さらに各校から10例を sampling するという方法が採用された。東京の場合、5地域に層別化し、そこから13校を抽出した。13校すべての教師がモニタリング対象とされ採血された。そこから200例を random に sampling し、WHO に報告した。このモニタリングに対する東京の参加率は94%を

こえていた。なお、食生活、喫煙、薬物などに関するアンケート調査を同時に行い、生活環境についてある程度の情報を集めた。

血中PbとCd値：東京でモニタリングされた200例の平均血中PbおよびCd値は、63.21μg/l、1.38μg/lであった。血中PbおよびCd値の男女差、喫煙習慣、居住地の幹線道路からの距離および地域等をFig. II、IIIに示した。血中PbおよびCd値の男女差を検討すると、Pbは危険率1%で有意であったが、Cdの有意差は認められない。男64%、女15%と喫煙率に差があることから男女の差は、喫煙習慣の違いと考え全体を喫煙者と非喫煙者に分けてPbおよびCdについてみると喫煙群がいずれの場合にも有意に高かった。さらに、Cdに関して喫煙、

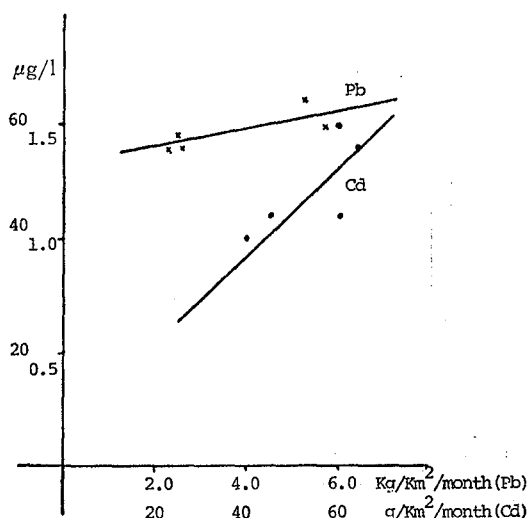


Fig. IV The relation of blood Pb and Cd to fall-dust Pb and Cd concentration

非喫煙とに分け男女差をみると、いずれも男女差はない。また逆に、男女に分けてから喫煙、非喫煙群を比較すると、いずれの場合にも喫煙群が有意に高かった。このことから、喫煙の有無が血中 Cd 値に大きく影響していることが明らかである。一方、Pb については喫煙に関係なく男女差があること、男性群の喫煙と非喫煙との間に有意差がないこと、さらに非喫煙群の中に男女差があることなどから血中 Pb に関しては、喫煙による影響があるにしても Cd ほど大きくはなく、男女差の重要な原因として他の因子も考慮しなければならない。いずれにせよ、血中 Pb および Cd と種々の因子を検討する際、喫煙の有無を絶えず考慮する必要がある。

自動車による排気ガスの影響をみるため、比較的交通量の多い道路から各人の住居までの距離を 100m 以内(+), 100—200m(±), 200m 以上(−)の三段階に分け、それを喫煙、非喫煙群について検討した。Fig. II-a, III-a に示すように、Cd の非喫煙群で道路の遠近による有意差がある以外道路の影響は認められなかった。地域差についてみると、東京を 5 ブロックに分け、その地域差を Fig. II-b, III-b に示した。江東デルタ地域を中心とした  $R_1$  block ( $R_1B$ )、世田谷や杉並などの旧住宅街を  $R_2B$ 、立川や八王子などの新興住宅街を  $R_3B$ 、旧市街としての Central block (CB)、さらに京浜工業地帯を中心とした Industrial block (IB) に区分した。地域差をみるために喫煙による影響のない非喫煙グループについて地域差を検討すると、Pb に関して  $R_1$  と  $R_3$  の間に危険率 5% で有

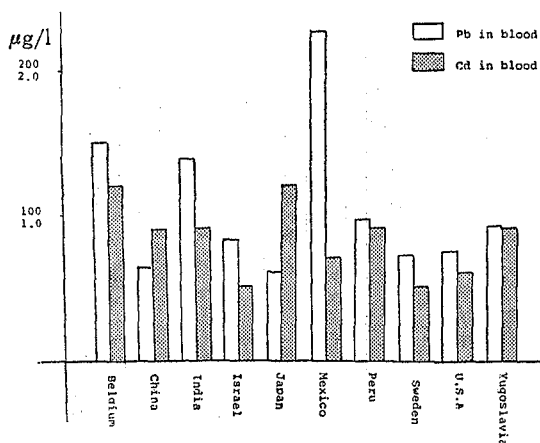


Fig. V Comparison of the results of lead and cadmium in teachers' blood obtained from different countries

意差がある。一方、Cd に関して  $R_1$  と  $R_3$  が高値を示し、CB、 $R_2B$  および IB で低値を示した。 $R_3$  の高値、そして CB と IB の低値は、いかなる因子によるか解析困難であるが、53—54 年にかけて測定された 1 年間の降下煤塵中の Cd 値と血中 Cd 値の間に Fig. IV に示したような程度の相関を思わせる傾向が認められる。いずれにしろ 200 例のデータから地域性を短絡的に検討することは無理があるので、さらに例数を増して検討することが必要である。東京の血中重金属を各参加国の値と比較したのが Fig. V である。血中 Pb 値について参加国中、東京は北京と共に最低であったが、Cd はベルギーと共に高値を示した。Pb の低値は、東京の飲料水や食物中の Pb が低いためか、ガソリン中の Pb 添加がほとんどないために大気中の Pb 含量が少ないことに由来するのか、いずれにしろ非常に興味ある結果を得た。Cd の高値は、日本人の主食による米の Cd 含量を反映するか否か、大気中の Cd 濃度に比例するのか、さらに検討しなければならない。いずれにしろ Cd 値は、他の国と比較して臓器中 Cd を含め高値を示すことから Cd の摂取源として何がその有力な因子となっているのか十分検討する必要がある。血中 Pb や Cd について文献的に考察してみると Pb では、Napal<sup>1)</sup>(40 µg/l)、Papua Guinea<sup>2)</sup>(50)、Sweden<sup>3)</sup>(56—94)、Hokkaido<sup>4)</sup>(70)、Tokyo<sup>5)</sup>(180)、Netherlands<sup>6)</sup>(140)、UK<sup>7)</sup>(190—250)、U. S. A<sup>8)</sup>(130—180)、Yugoslavia<sup>9)</sup>(185)、など、さらに Cd についてみると、Netherlands<sup>10)</sup>(0.6 µg/l)、U. S. A<sup>11)</sup>(1.1)、U. K<sup>7)</sup>(2.3)、Sweden<sup>12)</sup>(3.8)、Japan<sup>12)</sup>(4.9, 3.8, 170) などの報告がある。同

一国からの報告についても年代、発表者が異なると相当に値も異なることや、今回のプロジェクトに参加した各国からのデータと上述の文献からの値を比較しても、Pb および Cd のいずれも、かなり差がある。この原因を地域差やモニタリングの標的集団の相違に帰着させるより測定技術を含む測定法の未熟さと考える方が妥当と思われる。それ故、微量重金属のモニタリングには、厳しい精度管理が重要であると同時に精度管理の考え方やその進め方に十分な配慮が不可欠である。

#### 文 献

- 1) Piomelli, S., Corash, L., Corash, M.B., Seaman, C., Mushak, P., Glover, B. and Padgett, R.: *Science*, 210, 1137, 1980
- 2) Poole, C., Smythe, L.E. and Alpers, M.: *Sci. Total Environ.*, 15, 17, 1980
- 3) Andersson, K., Andersson, I., Botvalde, M., Hjelm, L., Fredriksson, R., Hogstedt, C., Oliv, Å., Sandegren, G., Sundell, L. and Ulander, A.: *Läkartidningen*, 78, 3378, 1981
- 4) Saito, K., Sasaki, T., Sato, Y. and Yasuda, H.: *Trace Substances in Environmental Health-XIII*. Columbia, University of Missouri Press, 68, 1979
- 5) Tsuchiya, K., Sugita, M., Seki, Y., Kobayashi, Y., Hori, M. and Park, C.B.: *Environmental Quality and Safety*, Vol. 2, Suppl. Stuttgart, George Thieme, 95, 1975
- 6) Wibowo, A.A.E., Del Castilho, P., Herber, R.F.M. and Zielhuis, R.L.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 39, 113, 1977
- 7) Beevers, D.G., Cruickshank, J.K., Yeoman, W.B., Carter, G.F., Golderg, A. and Moore, M.R.: *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4-2, 3, 251, 1980
- 8) Mahaffey, K.R., Anness, J.L., Barbano, H.E. and Murphy, R.S.: *Trace Substances in Environmental Health-XIII*. Columbia, University of Missouri Press, 1979
- 9) Dragovic, D.: *Acta Biol. Med. Exp.*, 5, 63, 1980
- 10) Zielhuis, R.L., Stuik, E.J., Herber, R.F.M., Salle, H.J.A., Verberk, M.M., Posma, F.D. and Jager, J.H.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 39, 53, 1977
- 11) Kowal, N.E., Johnson, D.E., Kraemer, D.F. and Pahren, N.R.: *J. Toxicol. Environ.*, 1979
- 12) Kjells tröm, T.: *Health Perspect.*, 28, 169, 1979



## 人腎皮質中のカドミウムを対象とした生物モニタリング

石川 隆章\*, 長嶋 親治\*

### A Biological Monitoring on Cadmium in Normal Human Kidney Cortex

TAKA AKI ISHIKAWA\* and CHIKAHARU NAGASHIMA\*

The cadmium concentrations in human kidney cortex, obtained in autopsies, were studied with the aim to estimate the accumulation of cadmium in different countries. The kidney samples were analysed with quality control samples to confirm the analytical accuracy. The geometric mean values varied considerably among the areas studied from China (13.0mg/kg) to Japan (62.4mg/kg).

**Keywords :** WHO/UNEP, Biological monitoring, cadmium Kidney cortex

#### 緒 言

人を対象とした重金属生物モニタリングに関しては血液、尿、毛髪など多く報告されている。一方、正常人の臓器中重金属については特定の疾患や薬物を有さない臓器が望まれるためサンプリングが困難であり、その報告は比較的限定されている。今回、WHO/UNEPのGlobal Environmental Monitoring System (GEMs) の一環として重金属に対する Pilot Study が行なわれ、当研究所もそのプロジェクトに参加した。東京都監察医務院で得られた50例の autopsy サンプル（腎皮質）のカドミウム (Cd) を測定し、若干の知見が得られたので、その結果を報告する。

#### 試料および分析方法

東京都監察医務院の協力の下に腎臓の一部を採集した。すべての検体は死後24時間以内に剖検したもので剖検時に慢性疾患のない症例を原則として選択した。喫煙を含む薬物等の常用に関して手紙による質問状を送り、薬物等の常用がないものを分析の対象試料とした。

剖検時にステンレス・スチールナイフで腎髄質と共に腎皮質を楔状に (5~10g) カットした。各腎組織は、あらかじめ硝酸と再留水で洗浄されたポリプロピレンの容器に移され、測定するまで-20℃で凍結保存した。測定時、室温で融解した組織片はプラスチックのピンセットを用いて再留水中で数回洗浄した。外界からの汚染をできる限り妨ぐため剖検時の剖面が測定試料中に入らない様に注意深く腎皮質をステンレス製スチールナイフでカットし、再留水で洗浄後、湿重量を測定した。湿重量と

して1g前後の組織は、パイレックス製灰化用ガラスチューブ（容量10ml）に移し、電気炉（100℃）中で乾燥した。乾燥した試料へ3.2mlの61%硝酸と0.4mlの過塩素酸を加えて、アルミブロック（130℃）中で加熱分解した。湿式灰化後さらに、150℃、30分加熱によって乾固した灰化サンプルは、0.25%硝酸の5mlを加えて溶解した。その硝酸溶液は、さらに適度に希釈し Jarrell Ash（型）フレイム原子吸光で標準添加法を用いて測定した。

#### 結果および考察

1. 精度管理：WHO/UNEP による重金属モニタリングの様に global なデータを比較検討するためには得られたデータの精度が重要な因子となる。そのため、精度管理に重点が置かれ、前後10回にわたる精度管理が行なわれた。統括研究所となったカロリンスカ研究所から精度管理用サンプル（1回の精度管理4本のテストサンプル）と2本の濃度の異なる Internal marker (Cd 濃度既知である試料) が当プロジェクトの参加研究所に送られ、各研究所で測定された。1回に4本からなるテストサンプルの値から回帰直線が求められ、精度の範囲として  $y = x \pm 0.15$  の範囲内を満足する値であれば accept、範囲外であれば reject とされた。10回にわたる繰り返しテストを受けた当研究所は9/10の acceptance ratio を得た。腎臓中の Cd 値は血液のそれに比べ比較的濃度が高いため、精度的には、それ程問題がないことが判明した。

#### 2. モニタリングサンプルの Cd 値：モニタリングさ

\* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

れた腎皮質は、50例のサンプルを各25例の2群に分け、皮質 Cd 値の測定前、25例測定後、さらに50例終了時の各時点で精度管理が行なわれた。勿論、その結果が上記の精度範囲 ( $y = x \pm 0.15$ ) を満足した場合のみデータは有効とされた。当研究所でのモニタリングサンプル中に行なわれた精度管理は、いずれも上記の acceptance interval を満足していたことから精度に関しては十分に信頼性があると思われる。

50例の平均値は  $62.4 \text{ mg/kg (湿重量)} \pm 26.0 \text{ (SD)}$  であり、39例の男子平均値  $59.8 \text{ mg/kg (湿重量)} \pm 25.4 \text{ (SD)}$  および、11例の女子平均値  $71.7 \text{ mg/kg (湿重量)} \pm 25.9 \text{ (SD)}$  であった。これまでに国内で報告されている腎臓中の Cd 濃度に関して、喜多村<sup>1)</sup>らの30例の腎全体の Cd 濃度  $46.9 \pm 23.9 \text{ mg/kg (湿重量)}$  および石崎<sup>2)</sup>らの38例の腎皮質  $108 \text{ mg/kg}$  などがある。皮質と髓質では一般に皮質に高濃度の Cd が蓄積しているとの報告を考慮すれば喜多村らの報告とほぼ一致している。石崎らの症例は附属病院での剖検症例であり、我々の症例 (監察医務院から入手) と質的に異なるためか、Cd 測定上の技術的な問題によるか不明であるが、いずれにせよ我々の値より約2倍程、高値を示している。

腎皮質 Cd 濃度と年齢、男女差および喫煙習慣との関係を図 I、III に表した。図に示した様に、個体差が大きく一定の傾向を示すことは困難である。年齢に関して20代の6例の平均 Cd 濃度は  $27.5 \text{ mg/kg 湿重量} \pm 11.4$  に比べ、30代以降の世代44例の平均値は  $67.2 \text{ mg/kg 湿重量} \pm 23.6$  と著しく高値であり、20代と30代以降の世代間では危険率1%で有意であった。一方、30から70代までの各世代間には有意差は認められなかった。Cd の平均1日摂取量は  $30 \sim 60 \mu\text{g/day}$  と報告<sup>3)</sup>され、その内の約5%前後が生体に吸収されると考えられている。日本で市販されている紙巻タバコ1本中に約  $1 \mu\text{g}$  前後の Cd を含む (図 II) ことから、喫煙は生体への Cd 負荷の大きな要因と考えられる。

しかし、今回の50例の腎皮質中の Cd 値と喫煙習慣との間には全く有意差は認められなかった。喫煙と血中 Cd 濃度との間に有意差があるとの我々<sup>4)</sup>等の報告を考慮すれば症例を増すと同時に、各症例の喫煙習慣に関する情報をより正確に把握して再検討する必要があると思われる。今回、参加した8ヶ国の各々の腎皮質 Cd 濃度の平均値はアメリカ合衆国  $26.1 \text{ mg/kg (湿重量)}$ 、中国  $13.0 \text{ mg/kg}$ 、インド  $17.8 \text{ mg/kg}$ 、イスラエル  $15.1 \text{ mg/kg}$ 、ベルギー  $30.5 \text{ mg/kg}$ 、ユーゴスラビア  $24.2 \text{ mg/kg}$ 、スウェーデン  $13.1 \text{ mg/kg}$ 、日本  $62.4 \text{ mg/kg}$  である。その値

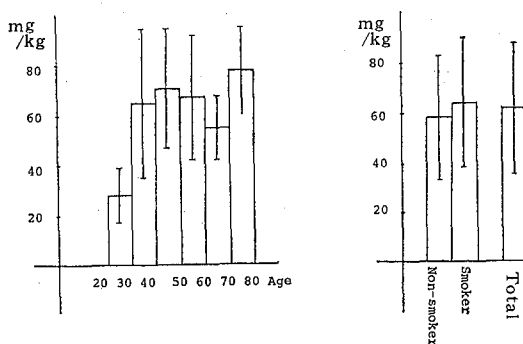


Fig. I Concentration of cadmium in kidney cortex in relation to ages and smoking habit

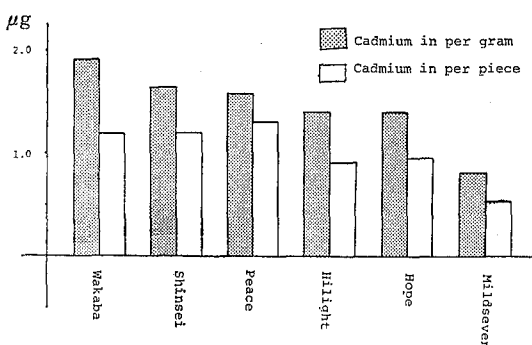


Fig. II Cadmium concentrations in various cigarettes

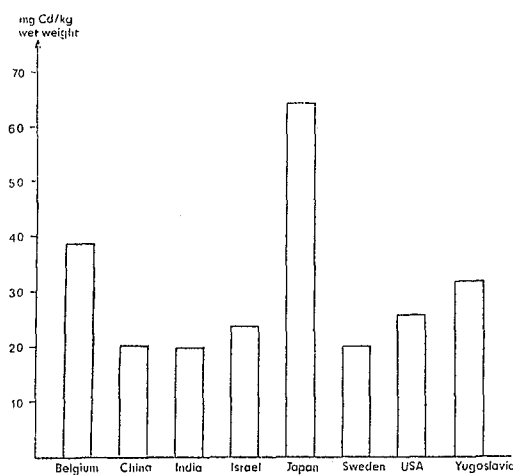


Fig. III Comparison of cadmium concentration of kidney cortex in the different countries

を男女別に図Ⅲに示した。今回得られた東京からの腎皮質 Cd 濃度は、参加国中一番高値を示した。第二位のベルギーの約2倍であり、血中濃度がベルギーとほぼ同一であることを考慮すると、現在より強い Cd 汚染が過去にあったことを示唆するものかもしれない。特に30代以後の世代が20代のそれと比較して有意に高値を示すことを考えると30年前の Cd 摂取量は現在よりも多かったと推定される。

今回の腎皮質の Cd 値に対する生物モニタリングを通して過去の汚染状況を明確にするため、さらに腎皮質を

対象とした経年変化の追跡および症例数の増大が重要な課題となる。

#### 文 献

- 1) 喜多村正治, 住野公昭, 早川清子, 柴田孝子: 環境保健レポート, 28, 29, 1974
- 2) 石崎有信, 福島匡昭, 坂本倫子: 日衛誌 (Jap. J. Hyg.) 25, 1, 86, 1970
- 3) E. J. Underwood: 微量元素「栄養と毒性」, 277, 1975, 丸善
- 4) 長嶋親治, 石川隆章: 東京衛研年報, 33, 322, 1982

## ラットのムコ多糖代謝に及ぼす NO<sub>2</sub> および O<sub>3</sub> 曝露の影響

鈴木孝人\*, 嵯峨祐一\*\*, 溝口 薫\*

### Effects of NO<sub>2</sub> and/or O<sub>3</sub> Exposure on Mucopolysaccharide Metabolism in Rats

TAKAHITO SUZUKI\*, YUICHI SAGA\*\* and ISAO MIZOGUCHI\*

Rats were exposed to nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) and ozone (O<sub>3</sub>), separately or alternately for 15 days. The exposure was at 9.5 ppm NO<sub>2</sub> for 16 hours/day and 1.0 ppm O<sub>3</sub> for 8 hours/day. After sacrifice, the activity levels of mucopolysaccharide enzymes, hyaluronidase,  $\beta$ -glucuronidase and N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase, were determined in the lung and liver.

The increase of these enzyme activities was observed in the lung of each group when compared to those in control animals. On the other hand, the decrease of these enzymes of the liver was observed in both NO<sub>2</sub> exposure group and NO<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> exposure group. The changes of the activity levels of these enzymes were generally in the order of NO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> and O<sub>3</sub> exposure.

These results suggest that NO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> affected the mucopolysaccharide metabolism and that the effects in NO<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> exposure group were due to the induction of cross tolerance between NO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>.

**Keywords** : nitrogen dioxide, ozone, hyaluronidase,  $\beta$ -glucuronidase, N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase, rat

#### 緒 言

主要な大気汚染物質である NO<sub>2</sub> や O<sub>3</sub> は肺気腫<sup>1-3)</sup>, 肺線維症<sup>4-6)</sup>, 肺胞壁肥厚<sup>7)</sup> を生じさせるが, その成因として結合組織の変化が関与することを示唆する報告がいくつかなされており<sup>8-24)</sup>, さらに, 電顕的にも肺の結合組織に変化が生じることが認められている<sup>25,26)</sup>. 結合組織の主要成分はコラーゲンであるが, その他にエラスチン, プロテオグリカン (ムコ多糖-蛋白複合体) および糖蛋白などが存在し<sup>27,28)</sup>, これらは細胞間マトリックスを構成している. 今まで, NO<sub>2</sub> や O<sub>3</sub> による結合組織に及ぼす影響についての研究の対象は主にコラーゲン, エラスチン, 糖蛋白に関するものが多かった. すなわち, 肺と皮膚のコラーゲン含量の変化<sup>8-13)</sup>, 肺のエラスチン含量の変化<sup>13)</sup>, 肺のコラーゲンとエラスチンの構造変化<sup>14-16)</sup>, コラーゲンの合成酵素である prolyl hydroxylase の肺における活性変動<sup>9,17)</sup>, エラスチンの分解酵素である elastase の肺における活性変動<sup>18)</sup>, コラーゲンの代謝産物であるハイドロキシプロリンとハイドロキシリジンの尿中排泄量の変化<sup>10,17-22)</sup>, 肺の蛋白結合ヘキサミンと蛋白結合シアル酸含量の変化<sup>23)</sup>, 分泌液中の糖蛋白含量の変化<sup>24)</sup>などが報告されている. 一

方, ムコ多糖に関しては NO<sub>2</sub> 曝露によって酸性ムコ多糖の尿中排泄量の増加<sup>19,20)</sup>, O<sub>3</sub> やフリーラジカルによるヒアロン酸の分解を示唆する報告<sup>30,31)</sup>があったが, 余り注目されていなかった. ムコ多糖は主に結合組織中に存在し, 細胞外液の容量調節, 電解質の交換と調節, 細菌感染に対する防禦, コラーゲン線維の生合成の調節などに重要な役割を果たしている<sup>32,33)</sup>. また, 実験的に生じさせた線維症では肝組織内のコラーゲンの形成に先行して酸性ムコ多糖が増加すること<sup>34,35)</sup>, in vitro では酸性ムコ多糖がコラーゲン線維の形成を促進するという報告<sup>36)</sup>もなされている.

本研究では大気汚染物質である NO<sub>2</sub> と O<sub>3</sub> による生体内の酸性ムコ多糖の代謝に及ぼす作用について検討することを目的として, NO<sub>2</sub> と O<sub>3</sub> を単独あるいは交互に曝露したラットの肺と肝における酸性ムコ多糖の代謝酵素である hyaluronidase,  $\beta$ -glucuronidase, N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase の活性変化を把握し, その結果にもとづいて NO<sub>2</sub> と O<sub>3</sub> の作用の違いや肺と肝における影響のうけかたの違い, さらに, NO<sub>2</sub> と O<sub>3</sub> による交叉耐性の発現を示唆する知見が得られたので報告する.

#### 実験方法

\* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 北里大学衛生学部化学科

## (I) 動物の曝露

温度を $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度を $60 \pm 10\%$ 、換気回数を10回/時に調整した各動物曝露チャンパー（内容積、約 $1.6\text{m}^3$ ）内に Fischer 系の 8 週令の雄ラットを対照群（ $\text{NO}_2$   $0.02\text{ppm}$ 以下、 $\text{O}_3$   $0.01\text{ppm}$ 以下）、 $\text{NO}_2$  単独曝露群（ $9.5 \pm 0.2\text{ppm}$ 、16時間/日）、 $\text{NO}_2$ - $\text{O}_3$  交互曝露群（ $\text{NO}_2$   $9.5 \pm 0.2\text{ppm}$ 、16時間/日； $\text{O}_3$   $1.0 \pm 0.05\text{ppm}$ 、8時間/日）および  $\text{O}_3$  単独曝露群（ $1.0 \pm 0.05\text{ppm}$ 、8時間/日）の 4 群（5 匹/群）に分けて 15 日間の曝露を行った。曝露を実施した時間帯は $\text{NO}_2$ を17時から翌日の9時まで、 $\text{O}_3$ を9時から17時までとした。ガス濃度はケミルミネッセンス法による測定機によって連続測定した。

## (II) 検体の調製

動物は曝露終了後、ネンブータル麻酔下で放血により屠殺した。摘出した肺と肝は重量を測定したのち、 $0.25\text{M}$ 蔗糖- $0.2\text{M}$ 塩化カリウム溶液（ $\text{pH} 7.0$ ）を9倍容加えてから、肺については Ultra-Turrax を用い、肝は Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーを用いてホモジナイズ後、 $3300 \times g_{\text{max}}$  で10分間遠心して得られた上清を検体とした。

## (III) 酵素活性と蛋白含量の分析

hyaluronidase 活性は Aronson と Davidson の方法<sup>37)</sup>によって、ヒアロン酸を基質として反応させ、遊離した N-acetylglucosamine を Reissig らの方法<sup>38)</sup>によって比色定量した。活性単位は遊離した N-acetylglucosamine の量（ $\mu\text{mol/hr}$ ）で示した。

$\beta$ -glucuronidase 活性は Kato らの方法<sup>39)</sup>によって、

*p*-nitrophenyl- $\beta$ -glucuronide を基質として反応後、遊離した *p*-nitrophenol を比色定量した。活性単位は遊離した *p*-nitrophenol の量（ $\mu\text{g/min}$ ）で示した。

N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase 活性は Woollen らの方法<sup>40)</sup>によって *p*-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -glucosaminide を基質として反応後、遊離した *p*-nitrophenol を比色定量した。活性単位は遊離した *p*-nitrophenol の量（ $\mu\text{g/min}$ ）で示した。

なお、分析の際には原法の方法に準じて、それぞれ酵素量、基質濃度、反応時間について検討した上で一部分改変して実施した。

肺および肝の蛋白含量は Lowry の方法<sup>41)</sup>を用いて測定した。

## 結果と考察

体重は対照群に対して  $\text{NO}_2$  群で19%（平均52g）、 $\text{NO}_2$ - $\text{O}_3$  交互群で18%（平均48g）の有意な減少を示したが、 $\text{O}_3$  群では有意な変化が認められなかった（図1）。この体重変化は高濃度の  $\text{NO}_2$  曝露によるものと思われる。肺重量は  $\text{NO}_2$  群で10%の有意な増加を示したが、他の群では有意差は認められなかった（図1）。肺の蛋白含量は各群とも16%程度の有意な増加が認められた（図2）。 $\text{NO}_2$  群での肺重量の増加は単なる肺水腫によるものではないと思える。また、Freeman らは10~25ppmの  $\text{NO}_2$  曝露ラットの肺重量の増加の原因については浮腫などによるものではなく、肺胞壁や肺胞上皮細胞の肥大、肺胞間質のコラーゲンやエラスチンの増加によるものと報告している<sup>42,43)</sup>。肝重量は  $\text{NO}_2$  群で20%、 $\text{NO}_2$ - $\text{O}_3$  交互

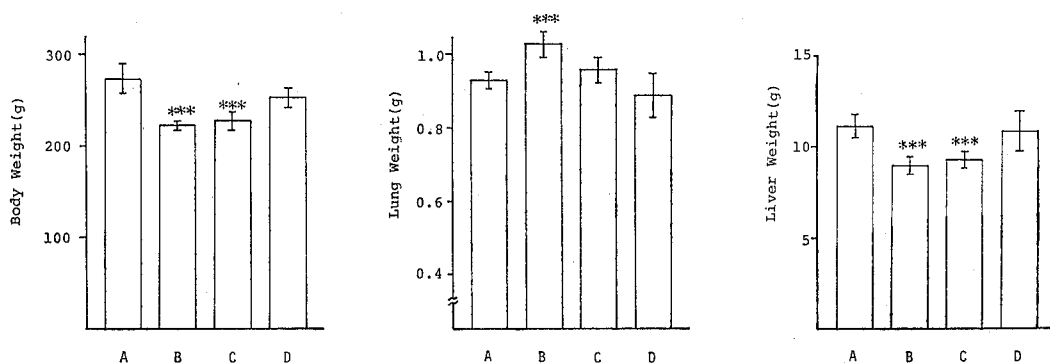


Fig. 1. Changes on Body Weight, Lung Weight and Liver Weight of Rats Exposed to  $\text{NO}_2$  and/or  $\text{O}_3$

All results indicated are means  $\pm$  S.D. (n=5).

A : Control Group, B :  $\text{NO}_2$  Exposure Group

C :  $\text{NO}_2$ - $\text{O}_3$  Exposure Group, D :  $\text{O}_3$  Exposure Group

\* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.02$ , \*\*\* :  $P < 0.01$

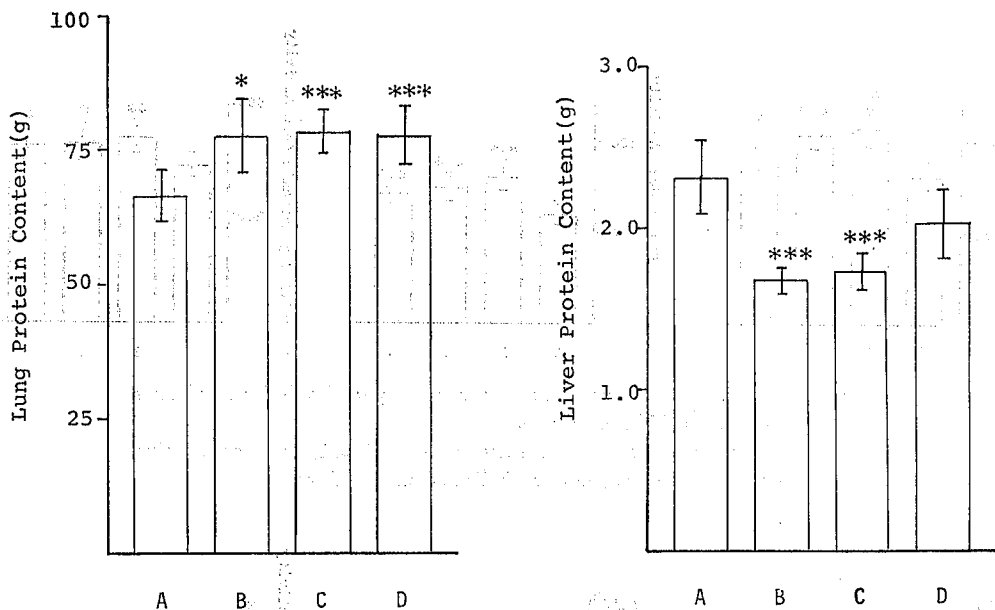


Fig. 2. Changes of Protein Contents per Whole Tissues on Lung or Liver of Rats Exposed to  $\text{NO}_2$  and/or  $\text{O}_3$ . All groups, symbols and results are as in Fig. 1.

群で17%の有意な減少を示したが、 $\text{O}_3$  群では有意差は認められなかった(図1)。肝の蛋白含量は $\text{NO}_2$  群で17%、 $\text{NO}_2$ - $\text{O}_3$  交互群で15%の有意な減少を示した(図2)。肝重量の減少の原因としては蛋白、グリコーゲン、脂質の含量減少などが考えられるが、肝における蛋白含量の減少分(0.6g)とグリコーゲン含量(2.5~7.2%<sup>44)</sup>、約0.25~0.72g)および脂質含量(約6%<sup>45)</sup>、約0.6g)を合計しても $\text{NO}_2$  群での2.2gの肝重量の減少分には満たない。前報<sup>46)</sup>でも、8 ppm  $\text{NO}_2$ 、4週間曝露ラットで15%程度の肝重量の減少も認められている。対照群に比べて、高濃度の $\text{NO}_2$  曝露群で体重と肝重量の減少が生じたことは何らかの生長抑制が生じたものと思われる。

肺での酵素活性の変化は図3に示したが、hyaluronidase 活性は $\text{NO}_2$  群で32%、 $\text{NO}_2$ - $\text{O}_3$  交互群で28%の有意な増加を示した。 $\text{O}_3$  曝露群は増加傾向を示した。 $\beta$ -glucuronidase 活性は $\text{NO}_2$  群で33%、 $\text{NO}_2$ - $\text{O}_3$  交互群で25%、 $\text{O}_3$  群で19%の有意な増加を示した。N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase 活性は $\text{NO}_2$  群で17%、 $\text{NO}_2$ - $\text{O}_3$  交互群で15%、 $\text{O}_3$  群で14%の有意な増加を示した。肺のこれらの酵素活性に対するガス曝露による影響が最も強かったのは $\text{NO}_2$  群であり、最も弱かったのは $\text{O}_3$  群であった。当初、最も強い影響を受けると予想していた $\text{NO}_2$ -

$\text{O}_3$  交互群はその中間であった。この結果は比較的高濃度の $\text{NO}_2$  と $\text{O}_3$  との間に交叉耐性が生じるという報告<sup>47,48)</sup>と考え合えると、今回の実験でも $\text{NO}_2$  と $\text{O}_3$  の交互曝露によって生体内で交叉耐性が働き、生体を受ける影響が弱くなった可能性が示唆される。また、これらのムコ多糖代謝酵素の活性上昇の結果から考えると、高濃度の $\text{NO}_2$  および $\text{O}_3$  の曝露により肺に炎症等が生じ、さらにその修復過程において結合組織の増殖の必要性から酸性ムコ多糖の生合成が活発化し、それに伴ってこれらの分解酵素の活性亢進が生じたものと推定される。

肝の酵素活性の変化は図4に示したが、hyaluronidase 活性は $\text{NO}_2$  群で35%、 $\text{NO}_2$ - $\text{O}_3$  交互群で26%、 $\text{O}_3$  群で19%の有意な活性低下を示した。 $\beta$ -glucuronidase 活性は $\text{NO}_2$  群で21%、 $\text{NO}_2$ - $\text{O}_3$  交互群で22%の有意な活性低下が認められたが、 $\text{O}_3$  群では有意な差は認められなかった。N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase 活性は $\text{NO}_2$  群では18%、 $\text{NO}_2$ - $\text{O}_3$  交互群で24%の有意な活性低下を示したが、 $\text{O}_3$  群では有意差は認められなかった。これらの結果を見ると肝におけるガス曝露の影響は肺での結果と同様に $\text{O}_3$  群が最も弱かった。また、 $\text{NO}_2$  群および $\text{O}_3$  群と比べて、 $\text{NO}_2$ - $\text{O}_3$  交互群では単に $\text{NO}_2$  と $\text{O}_3$  の影響を相加したものではなく、主として $\text{NO}_2$  曝露によって生じたと

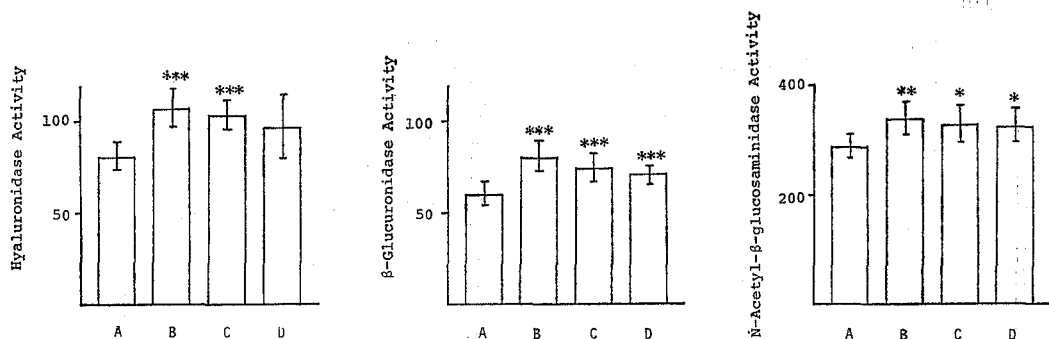


Fig. 3. Changes of Various Enzyme Activities per Whole Lung of Rats Exposed to  $\text{NO}_2$  and/or  $\text{O}_3$

All group, symbols and results are as in Fig. 1, and the activity units of these enzymes are indicated in the Text.

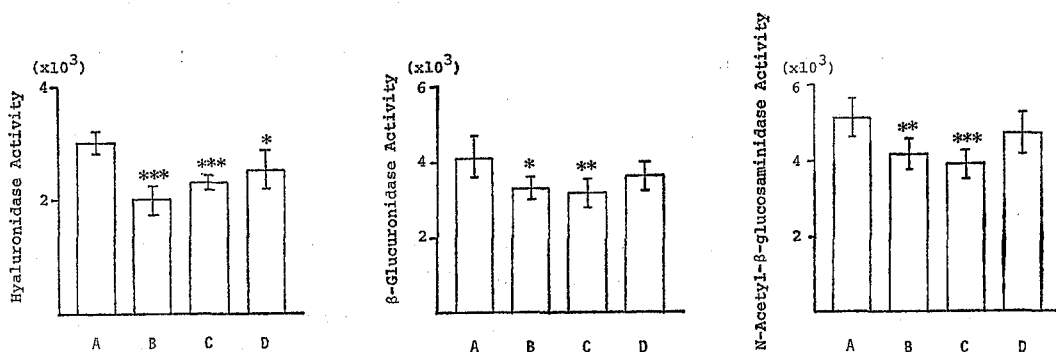


Fig. 4. Changes of Various Enzyme Activities per Whole Liver of Rats Exposed to  $\text{NO}_2$  and/or  $\text{O}_3$

All group, symbols and results are as in Fig. 1, and the activity units of these enzymes are indicated in the Text.

思われる活性低下を示している。肝が主要なムコ多糖代謝臓器であるか否かは不明であるが、*in vivo* で酸性ムコ多糖が肝 hyaluronidase などのライソゾームで処理されること<sup>37)</sup>、また、コンドロイチン硫酸が肝のライソゾームにとり込まれるという報告<sup>37)</sup>、また、実験的肝障害時には肝の  $\beta$ -glucuronidase と N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase 活性の変動が生じること<sup>40)</sup>、さらに、肝疾患、特に活動性慢性肝炎および初期肝硬変患者尿の酸性ムコ多糖排泄量の増加が認められることなどを考えると<sup>50-52)</sup>、肝のムコ多糖代謝酵素の活性変動が尿中ムコ多糖排泄量に関連することが推測される。Kosmider らによる 1 ppm  $\text{NO}_x$  曝露モルモット、2 ppm の  $\text{NO}_2$  曝露ラットにおける酸性ムコ多糖の尿中排泄量の増加の報告<sup>19,20)</sup>と今回の

$\text{NO}_2$  曝露群の肝におけるムコ多糖代謝酵素の活性低下の結果と合せて考えると、 $\text{NO}_2$  曝露が肝における酸性ムコ多糖代謝阻害を生じさせ、尿中へのその排泄量を増加させることが推測される。

今回の高濃度の  $\text{NO}_2$  と  $\text{O}_3$  の単独あるいは交互曝露実験によって、ムコ多糖代謝の酵素活性に及ぼす影響は肺と肝では異なること、また、 $\text{NO}_2$  と  $\text{O}_3$  の相互作用に関しては両者間における交叉耐性とも考えられる結果が得られた。今後はそのメカニズムの解明と肺や肝における酸性ムコ多糖含量およびその組成変化に対する  $\text{NO}_2$  や  $\text{O}_3$  曝露の影響についての検討が必要であると思われる。

謝辞 本研究にあたり有益なご助言をいただいた環境保健部の石川隆章氏に感謝いたします。

(本研究は昭和56年度当研究所調査研究課題「複合大気汚染に係る健康影響調査に関する研究」として実施したものである。)

## 文 献

- 1) Blair, W. H., Henry, M. C. and Ehrlich, R. : *Arch. Environ. Health*, 18, 186, 1969
- 2) Freeman, G., Juhos, L. T., Furiosi, N. J. et al. : *Arch. Environ. Health*, 29, 203, 1974
- 3) Gross, P. G., de Treville, R. T. P., Babyak, M. A. et al. : *Arch. Environ. Health*, 16, 51, 1968
- 4) Hattori, S. and Takemura, K. : *J. Clin. Microscopy*, 6, 350, 1973
- 5) Stokinger, H. E., Wagner, W. D. and Dobrogorski, O. L. : *Arch. Ind. Health*, 16, 514, 1957
- 6) Scheel, L. D., Dobrogorski, O. J., Mountain, J. T. et al. : *J. Appl. Physiol.*, 14, 67, 1959
- 7) 京野洋子, 河合清之 : 第18回大気汚染研究全国協議会講演集, 220, 1977
- 8) 深瀬 治, 橋本清澄 : 第22回大気汚染学会講演集, 389, 1981
- 9) Orthofer, J. G., Bhatnagar, R. S., Rahman, A. et al. : *Environ. Res.*, 12, 299, 1976
- 10) Drozd, M., Kucharz, E. and Szyja, J. : *Environ. Res.*, 13, 369, 1977
- 11) Last, J. A. and Greenberg, D. B. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 55, 108, 1980
- 12) Last, J. A., Greenberg, D. B. and Castleman, W. L. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 51, 247, 1979
- 13) Kleinerman, J. : *Arch. Environ. Health*, 34, 228, 1979
- 14) Buell, G. : 59th Annual Meeting of Air Poll. Contr. Assoc., San Francisco, 1966
- 15) Buell, G. : *Inhalation Carcinogenesis*, 209, 1970, U. S. Atomic Energy Commission
- 16) Hueter, F. G. and Fritzhand, M. : *Arch. Intern. Med.*, 128, 48, 1971
- 17) Hussain, M. Z., Mustafa, M. G., Chow, C. K. et al. : *Chest*, 69, 273, 1976
- 18) Kleinerman, J. and Sorensen, J. : *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 125, 203, 1982
- 19) Kosmider, S., Luciak, M., Zajusz, K. et al. : *Patol. Polska*, 24, 107, 1973
- 20) Hatton, D. V., Leach, C. S., Nicogossian, A. E. : *Arch. Environ. Health*, 32, 33, 1977
- 21) 笠原利英, 大沢誠喜, 鈴木孝人ら : 東京衛研年報, 30-1, 195, 1979
- 22) 松木秀明, 逢坂文夫, 春日 斉ら : 日本公衛誌, 28, 505, 1981
- 23) Drozd, M. and Kucharz, E. : *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 38, 259, 1977
- 24) Last, J. A. and Kaizu, T. : *Environ. Health Perspectives*, 35, 131, 1980
- 25) 服部正次, 建石竜平, 宝来 威ら : 日本胸部疾患学会雑誌, 10, 16, 1972
- 26) Stephens, R. J., Freeman, G. and Evans, M. J. : *Arch. Intern. Med.*, 127, 873, 1971
- 27) Hance, A. J. and Grystal, R. G. : *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 112, 657, 1975
- 28) 本宮雅吉, 永井宏美, 佐藤 研ら : 医学のあゆみ, 117, 587, 1981
- 29) Kosmider, S. : *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 50, 417, 1973
- 30) Buell, G. C., Tokiwa, Y. and Mueller, P. K. : *Arch. Environ. Health*, 10, 213, 1965
- 31) McCord, J. M. : *Science*, 185, 529, 1974
- 32) 畑 隆一郎, 永井 裕 : 代謝, 9, 858, 1972
- 33) Slavkin, H. C. and Grewich, R. C. : *Extracellular Matrix Influences on Gene Expression*, Academic Press, New York, 1975
- 34) 中村允人 : 肝臓, 10, 275, 1969
- 35) Koizumi, T., Nakamura, N. and Abe, H. : *Biochem. Biophys. Acta*, 148, 749, 1967
- 36) Wood, G. C. : *Int. Rev. of Connective Tissue Res.*, Vol. II, 1, 1964, Academic Press, New York
- 37) Aronson, N. V. and Davidson, E. A. : *J. Biol. Chem.*, 243, 4944, 1968
- 38) Reissig, J. L., Strominger, J. L. and Leloir, L. F. : *J. Biol. Chem.*, 217, 959, 1955
- 39) Kato, K., Yoshida, K., Tsukamoto, H. et al. : *Chem. Pharmac. Bull.*, 8, 239, 1960
- 40) Woollen, J. W., Heyworth, R. and Walker, P. G. : *Biochem. J.*, 78, 111, 1961
- 41) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. and Farr, A. L. et al. : *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
- 42) Freeman, G., Grane, S. C., Stephens, R. J. et al. : *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 98, 429, 1968



- 43) Freeman, G., Grane, S.C. and Fruiosi, N.J.:  
*Amer. Rev. Respir. Dis.*, 100, 662, 1969
- 44) 日本生化学会編：生化学データブック(Ⅰ), 1705,  
1979, 東京化学同人, 東京
- 45) Cook, R.P.: *Distribution of Sterols in Organism  
and in Tissue, in Cholesterol*, 145, 1958,  
Academic Press, New York
- 46) 鈴木孝人, 大沢誠喜, 狩野文雄ら：東京衛研年報,  
31-1, 219, 1980
- 47) Stern, A.C.: *Air Pollution*, Vol.1, 445, 1968,  
2nd edition, Academic Press, New York,  
London.
- 48) Yokoyama, E., Ichikawa, I. and Kawai, K.:  
*Nitrogen Oxide and Their Effects on Health*,  
Lee, S.D. editor, 217, 1980, Ann Arbor Science,  
Michigan
- 49) 岡崎 勲：肝臓, 13, 138, 1972
- 50) 和田龍七：大阪大学医学雑誌, 11, 2177, 昭和34年
- 51) 満谷夏樹：大阪大学医学雑誌, 16, 第7~9号, 281,  
昭和39年
- 52) Kawata, H., Koizumi, T., Wada, R. et al.:  
*Gastroent.*, 40, 507, 1961

## O<sub>3</sub> 単独暴露および NO<sub>2</sub> と O<sub>3</sub> の複合暴露によるラットの肺の病理形態学的変化

寺田 伸枝\*, 鈴木 孝人\*, 大沢 誠喜\*, 福田 雅夫\*  
池田 真悟\*, 溝口 勲\*

### Pathological Changes in Lungs of Rats Exposed to Ozone and Mixtures of Nitrogen Dioxide and Ozone

NOBUE TERADA\*, TAKAHITO SUZUKI\*, MASANOBU OHSAWA\*,  
MASAO FUKUDA\*, SHINGO IKEDA\* and ISAO MIZOGUCHI\*

Pulmonary response of rats exposed to 0.1 ppm ozone (O<sub>3</sub>) and mixtures of 0.1 ppm O<sub>3</sub> and 0.5, 1.0, 2.0 ppm nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) respectively were observed after the continuous exposure for 1, 3, 7, 14, 30, 60 and 90 days by light and electron microscopy.

Rats exposed to O<sub>3</sub> showed slight hypertrophy, proliferation, injury of cilia in the bronchial epithelium and thickening of the ductal alveolar walls. Although the pulmonary tissue, after exposure of O<sub>3</sub> for 90 days, seemed to be almost normal from the observation by light microscopy, it was found by electron microscopy that alveolar walls were thickened with collagen fibers and interstitial cells, and that the basement lamina was exposed to the alveolus due to the defection of Type 1 from the alveolar walls.

There were some differences in the changes caused by the exposure to single O<sub>3</sub> and to the mixtures of NO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> were found. Changes caused by the combined exposure at the bronchiolo-pulmonary junction appeared to be somewhat more marked than those by O<sub>3</sub> alone. The lesions of the pulmonary tissues by the combined exposure were more persistent than those by the single exposure.

**Keywords** : ozone, mixtures of nitrogen dioxide and ozone, continuous exposure, pulmonary response, rat, light and electron microscopies, bronchiolo-pulmonary junction

#### 緒 言

二酸化窒素 (NO<sub>2</sub>) は、複合大気汚染成分のひとつとして、最近とくに重視されているガス状成分であり、その生体影響に関する研究も数多くなされている。

動物実験も、長期吸入実験を含めて少なくないが<sup>1,2)</sup>、比較的低濃度領域において、暴露濃度段階と暴露期間を十分にとって、暴露量と病変の進展を系統的に検討した実験は稀である。また、他の大気汚染成分の共存下における NO<sub>2</sub> の毒性に関する研究は、ほとんどなされていない。

NO<sub>2</sub> の生体影響を評価するにあたって、種々の条件下における NO<sub>2</sub> の最少有効濃度を決定するに必要な範囲の濃度と、暴露期間を取扱った実験、並びに生化学的・機能的・形態学的に見出された影響を、相互に関連づ

け得る系統的な研究が必要と考える。

著者らの一連の NO<sub>2</sub> に関する暴露実験は、このような観点に立て行われており、すでに低濃度領域における NO<sub>2</sub> の短期・長期単独暴露によるラットの呼吸器病変について報告した<sup>3)</sup>。本研究は、NO<sub>2</sub> と、NO<sub>2</sub> と同様に主な大気汚染物質の一つであるオゾン (O<sub>3</sub>) を複合した条件下に暴露されたラットの肺の病理形態学的検索を目的としたものである。

#### 方 法

5 週令の Fischer 系雄ラットを、0.1 ppm 濃度の O<sub>3</sub> に単独暴露した群、0.5, 1.0, 2.0 ppm 濃度の NO<sub>2</sub> に、各々 0.1 ppm 濃度の O<sub>3</sub> を複合暴露した 3 群、および対照群の 5 群にわけ、1, 3, 7, 14, 30, 60, 90 日間連続暴露を行った。なお O<sub>3</sub> は 1 日 8 時間、NO<sub>2</sub> については終日

\* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

暴露である。

病理学的検索のためには、各群35頭の中から無作為に5頭を選び、ネブタール腹腔内注射による深麻酔下で開胸し、クレンメを用いて離断標本を得るために心葉肺門部を閉止した後、気管支から2.5% 氷冷グルタルアルデヒド固定液を、20cm 水柱圧で注入し、再拡張固定を行った。

再拡張固定した左肺の中央部から2片の水平断切片を採取し、透過電顕および光顕用試料とした。電顕用試料は、常法に従ってオスミウム酸後固定し、Epon 包埋、薄切、錯酸鉛・ウラニル重染色を行って観察した。光顕用標本のためには、上記の他、肺の各葉から試料を採取し、パラフィン包埋切片を作成し、H・E染色を行って観察した。

暴露実験に用いられた吸入装置と、その実験条件は前報<sup>9)</sup>と同様である。

## 結 果

NO<sub>2</sub> および O<sub>3</sub> の呼吸器に及ぼす影響を評価するために、肺を気管支上皮、末梢気管支上皮および気管支・肺接合部、肺胞道および肺胞道付近の肺胞の3つの部位にわけ、主に線毛の損傷、上皮細胞の肥大と増殖、肺胞道壁および肺胞壁の細胞の増加と肥厚に注目し、変化を示す気管支また肺領域の多少と、各部位での変化の強さを考慮し、gradingを行った (Table 1)。Fig. 1は、Table 1 に示した方法に従って評価した O<sub>3</sub> 単独暴露群、NO<sub>2</sub> と O<sub>3</sub> の複合暴露群、並びに前報<sup>9)</sup>の NO<sub>2</sub> 単独暴露群の肺の各部位における変化の様相を経日的に示したものである。

### I 0.1ppm O<sub>3</sub> 単独暴露群

気管支上皮における変化は、暴露後1日目より、線毛の損傷が認められ、7～30日後には、上皮の肥大性変化と増殖が、時間の経過とともに、変化の程度を増し、また変化を示す範囲を拡げていった。しかし、60～90日後では、上記の変化は急速に弱まり、局所的に軽度の線毛損傷を伴う肥大性変化を示すに過ぎなかった。

末梢気管支、気管支・肺接合部においては、3日後より、局所的に突出細胞の減少、7～14日後より、局所的に軽度の肥大性変化がみられ、30日後には、ほぼ全葉にわたって上皮の肥大と軽度の増殖がみられた (Fig. 3)。しかし60日後より肥大性変化の消失と突出細胞の回復がみられ、90日後では、光顕的には対照群との差違は認められない (Fig. 4)。肺胞領域においては、3日後より、マクロファージの遊出と、肺胞道壁細胞の増加が局所的にみられ、7～30日後には、肺胞道壁の細胞の増加と肥

厚、並びに肺胞道付近の肺胞壁の細胞の増多が全葉にみられた (Fig. 3)。60～90日後では、肺胞領域の細胞の増多は消失し、肺胞道壁の局所的な軽度の肥厚を認めるにすぎなかった (Fig. 4)。

O<sub>3</sub> 単独暴露による、肺の各部位における初期反応は光顕的には暴露60～90日後に消失する傾向が認められたが、電顕的観察によれば、暴露90日後においても、種々の変化が見出された。特に肺胞領域における変化が注目され、肺胞壁の間質細胞と膠原線維の増加に伴う air-blood barrier の肥厚、I 型上皮の剥離によって肺胞腔に露出した構造の乱れた基底膜、腔内に剥離・変性した肺胞上皮などが認められた。II 型上皮の増加は、それほど顕著ではない (Fig. 10, 11)。

II 2.0 ppm NO<sub>2</sub> と 0.1 ppm O<sub>3</sub> による複合暴露群  
複合暴露群の気管支上皮の変化は、暴露30日後までは O<sub>3</sub> 単独暴露群の場合と同様であった。しかし、60～90日後においても、上皮細胞の肥大性変化と、軽度の増殖が、30日後とほぼ同じ強さで持続していた。

末梢気管支では、O<sub>3</sub> 単独暴露群に比べ、上皮の肥大性変化の程度が強く、また増殖性変化のみられる部分もあった (Fig. 5)。60～90日後にも、この変化は持続、あるいは進展しており、塊状の増殖を呈する部位も認められた (Fig. 7)。

肺胞領域においては、暴露30日後までは O<sub>3</sub> 単独暴露群と同様の推移を示したが (Fig. 6)、90日後においても、肺胞道および肺胞壁の細胞の増多と肥厚が、30日後よりやや強さを減じながらも持続していた (Fig. 7)。

肺胞領域の電顕所見では、II 型上皮の増加と大型化、I 型上皮細胞質の不規則な厚薄、膠原線維と基質の増加による間質の拡大などが認められた (Fig. 12, 13, 14, 15)。複合暴露群では、O<sub>3</sub> 単独暴露群に比べ、特に間質の拡大が特徴的であり、またII 型上皮の増加が注目された。

### III 1.0, 0.5ppm NO<sub>2</sub> と 0.1ppm O<sub>3</sub> による複合暴露群

複合した NO<sub>2</sub> 濃度が 1.0ppm および 0.5ppm であった 2 群は、同様の変化を示した。

気管支上皮および末梢気管支では、暴露 30 日後までは、2.0ppm の NO<sub>2</sub> を複合した群と同様に、線毛の消失・上皮の軽度の肥大性変化が認められたが、増殖性変化が、2.0ppm NO<sub>2</sub> 複合群より弱い傾向がみられた。また90日後には、上記の変化は弱まり、局所的にごく軽度の肥大を示した。

肺胞領域においては、2.0ppm NO<sub>2</sub> 複合群と同様の変

Table 1. Method of Grading

|   | Bronchial                                   | Terminal Bronchiole                                    | Proximal Alveoli & Intralveolar Septa of Alveolar Ducts                                          |
|---|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7 |                                             | proliferation $\equiv$                                 |                                                                                                  |
| 6 | proliferation $\equiv$                      | proliferation $\equiv$                                 |                                                                                                  |
| 5 | proliferation +<br>hypertrophy $\equiv$     | proliferation +<br>hypertrophy $\equiv$                | thickening of the walls of the alveolar ducts & adjacent alveoli                                 |
| 4 | proliferation $\pm$<br>hypertrophy $\equiv$ | proliferation $\pm$<br>hypertrophy $\equiv$            | thickening of the ductal walls                                                                   |
| 3 | hypertrophy +                               | hypertrophy +                                          | increased cellularity of the alveolar walls +<br>slight thickening of the ductal walls           |
| 2 | hypertrophy $\pm$                           | hypertrophy $\pm$<br>uniform appearance of the surface | increased cellularity of the alveolar walls $\pm$<br>increased cellularity of the ductal walls + |
| 1 | injury of cilia                             | uniform appearance of the surface                      | increased cellularity of the ductal walls $\pm$                                                  |
| 0 | no remarkable change                        | no remarkable change                                   | no remarkable change                                                                             |

$\equiv$  remarkable change,  $\equiv$  diffusion of moderately change  
 + moderately partial change,  $\pm$  slightly partial change

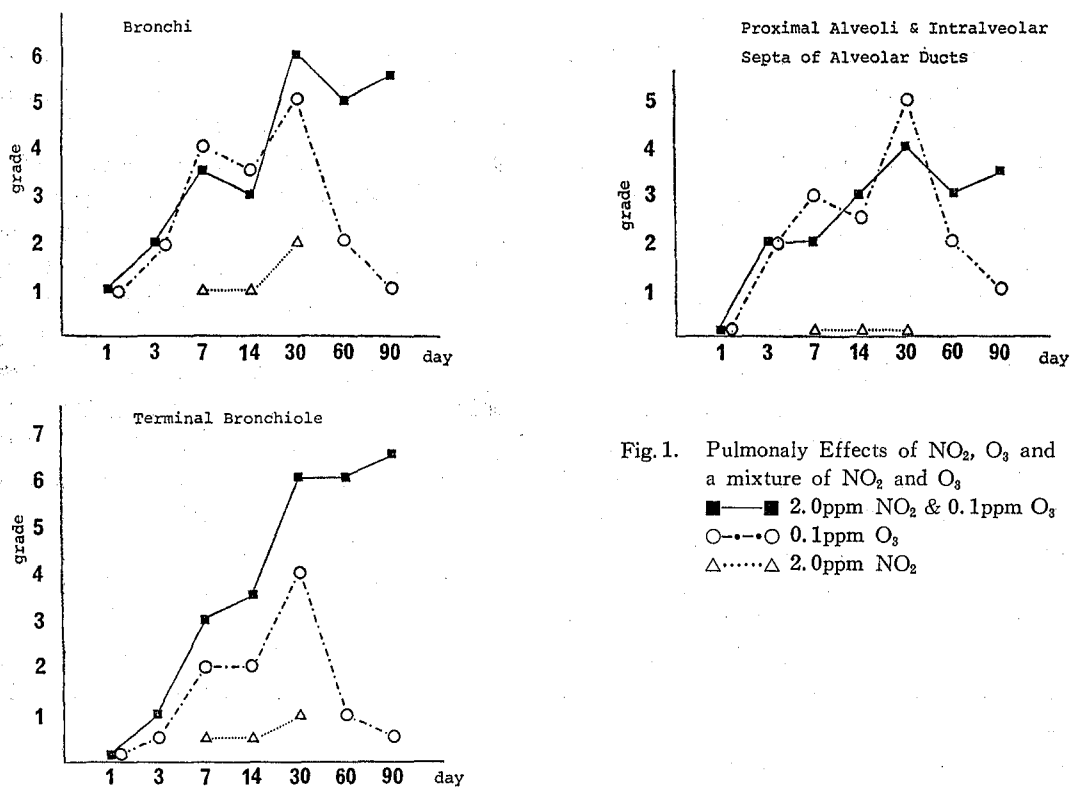


Fig. 1. Pulmonary Effects of NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> and a mixture of NO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>  
 ■—■ 2.0ppm NO<sub>2</sub> & 0.1ppm O<sub>3</sub>  
 ○---○ 0.1ppm O<sub>3</sub>  
 △.....△ 2.0ppm NO<sub>2</sub>

化の推移を示したが、細胞の増加はやや弱い傾向にあった。

### 考 察

0.1ppm濃度の $O_3$ に1~90日間連続暴露されたラットの呼吸器病変は、気管支粘膜上皮の線毛異常を伴う肥大性変化、非線毛細胞の減少、粘膜上皮の増殖、細胞浸潤を伴う肺泡道壁肥厚、肺泡道付近肺胞壁の肥厚と細胞増加、マクロファージの遊出などが主要所見である。これらの変化は、暴露期間に対応して様々な程度と範囲で出現している。また、 $O_3$ の呼吸器に及ぼす影響は、 $NO_2$ の場合に比べ、呼吸器のさらに深部に達することが認められ、肺胞領域における変化が目される。

本実験で観察された変化は、低濃度の $O_3$ への暴露による呼吸器影響に関する従来の記載と基本的には同様であると考えられる<sup>5-8)</sup>。

$O_3$ への連続暴露の病変の出現と推移の様相は、暴露1日後より中等大気管支に、3日後より気管支樹全域および肺野に変化が認められ、14~30日後には、これらの変化が、ほぼ全葉にびまん性に見出されるが、60日後より消失する傾向がみられ、90日後では、対照群との差違を認めない。しかし、電顕的には、肺胞壁の間質細胞並びに膠原線維の増殖、I型上皮の変性などが認められ、肺胞領域における $O_3$ 暴露による変化は、持続的に進行していることも考えられる。

低濃度 $O_3$ への長期連続暴露実験の報告は少なく、さらに、病変の推移について記載した例は稀である。Boormanらは<sup>9)</sup>、0.2ppmの $O_3$ に暴露されたラットについて電顕による形態計測を行い、暴露7日後には上昇したマクロファージおよび炎症細胞の数、air-blood barrierの厚さなどの指標が、90日後には減少したことを報告している。

低濃度 $NO_2$ の暴露実験において観察されたように<sup>8)</sup>、一旦成立した定型的病変が弱くなり、同程度の強さの病変がかなりの期間持続し、実験の長期化に伴って再び定型的病変、あるいは次の段階に進んだ病変が出現する可能性も考えられ、さらに長期の実験が必要と思われる。

0.5~2.0ppm濃度の $NO_2$ と0.1ppm濃度の $O_3$ に複合暴露されたラットの主な呼吸器病変は、 $O_3$ 単独暴露群の場合と同様であったが、肺の各部位における病変の強さと、変化の推移の様相において違いが認められた。また、複合した $NO_2$ 濃度によって病変の強さに違いが認められた。

複合暴露群では、 $O_3$ 単独暴露群に比べ、末梢気管支上皮の肥大及び増殖性変化が増強された。また $O_3$ 単独

暴露群では、暴露60日後より、病変の消失する傾向が認められたが、複合暴露群では、暴露90日後においても、30日後とほぼ同様の変化が持続していた。90日後の電顕所見では、II型細胞の増殖、I型上皮細胞質の不規則な厚薄、間質細胞・膠原線維の増殖並びに基質成分の増加による間質の拡大等が認められ、 $O_3$ 単独暴露群に比べ、間質の拡大が著しい傾向がみられた。

一方、2.0ppmの $NO_2$ の単独暴露群では、気管支・肺接合部および肺胞の変化は認められなかった<sup>3)</sup>。以上のことから、複合暴露群の変化は、 $O_3$ の寄与度が強いと考えられるが、 $O_3$ 単独群とは、変化の性質が異なる点も認められ、 $NO_2$ の影響、あるいは $NO_2$ と $O_3$ の反応によって生じた他のガスの影響が存在することも考えられる。

$NO_2$ と $O_3$ の複合暴露実験はほとんどなされていない。Freemanらは<sup>9)</sup>、2.5ppmの $NO_2$ と0.25ppmの $O_3$ に複合暴露されたラットにおいて観察された肺泡道と末梢気管支における病変は、主に $O_3$ によるものであり、暴露6ヶ月後には、正常に復したことを報告している。また、横山らは<sup>10)</sup>、5.5ppmの $NO_2$ と、1.1ppmの $O_3$ に交互暴露したラットの主要病変は、 $O_3$ 単独暴露群の場合と同様であったが、気管支・肺接合部における変化は、 $O_3$ 単独群よりやや強い傾向にあることを報告している。

Ehrlichらは<sup>11)</sup>、1.5~5.0ppmの $NO_2$ と、0.05~0.5ppmの $O_3$ に1日3時間、20日間くりかえし暴露されたマウスでは、呼吸器感染に対する抵抗性が低下しており、相乗作用がみられたとしている。一方、Goldsteinらは<sup>12)</sup>、2.0~7.5ppmの $NO_2$ と0.1~0.4ppmの $O_3$ に複合暴露されたマウスの肺の防御機構について、黄色ブドウ球菌の殺菌能を指標として検討した結果、両汚染物質の相乗作用は認められないことを報告している。

本実験の結果から、 $NO_2$ と $O_3$ の複合暴露の影響は、 $O_3$ 単独暴露の場合に比べ、病理形態学的には気管支・肺接合部における病変の増強と、肺の各部位における病変の持続として認められた。現在、さらに低濃度の長期暴露実験を行っており、 $NO_2$ と $O_3$ の複合暴露による生体影響について新たな知見を加える所存である。

謝辞 本実験材料の電子顕微鏡による検索に当って、御指導をいただいた、当所肉肉衛生研究科、前木吾市主任研究員に深謝いたします。

(本研究は昭和55年度当研究所調査研究課題「複合大気汚染に係わる健康影響調査に関する研究」として実施したものである。)

### 文 献

- 1) Stephens, R. J., Freeman, G. and Evans, M. J.:

*Arch. Environ. Health*, 24, 160, 1972

- 2) Stephens, R. J., Freeman, G., Crane, S. C. and Furiosi, N. J.: *Exp. Mol. Pathol.*, 14, 1, 1971
- 3) 寺田伸枝, 鈴木孝人, 大沢誠喜, 福田雅夫, 溝口 勲, 河合清之: 東京衛研年報, 32-1, 250, 1981
- 4) 福田雅夫, 狩野文雄, 寺田伸枝, 溝口 勲: 東京衛研年報, 30-1, 189, 1979
- 5) Schwartz, L. W., Dungworth, D. L., Mustafa, M. G., Tarkington, B. K. and Tyler, W. S.: *Lab. Invest.*, 34, 565, 1976
- 6) Boorman, G. A., Schwartz, L. W. and Dungworth, D. L.: *Lab. Invest.*, 43, 108, 1980
- 7) Plopper, C. G., Dungworth, D. L., Tyler, W. S. and Chow, C. K.: *Arch. Environ. Health*, 34, 390, 1979
- 8) Stephens, R. J., Sloan, M. F., Evans, M. J. and Freeman, G.: *Am. J. Pathol.*, 74, 31, 1974
- 9) Freeman, G., Juhos, L. T., Furiosi, N. J., Mussenden, R., Stephens, R. J. and Evans, M. J.: *Arch. Environ. Health*, 29, 203, 1974
- 10) Yokoyama, E., Ichikawa, I. and Kawai, K.: Nitrogen Oxides and Their Effects on Health, Ed. Lee, S. D., *Ann Arbor Science*, 217, 1980
- 11) Ehrlich, R., Findlay, J. C., Fenters, J. D. and Gardner, D. E.: *Environ. Res.*, 14, 223, 1977
- 12) Goldstein, E., Warshauer, D., Lippert, W. and Tarkington, B.: *Arch. Environ. Health*, 28, 85, 1974

#### Explanation of figures

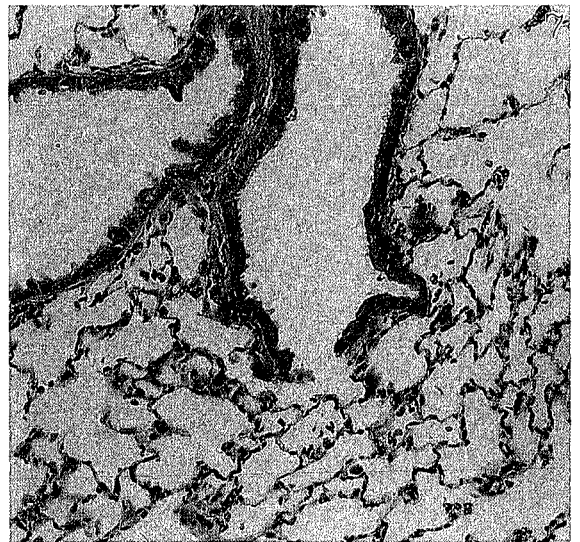
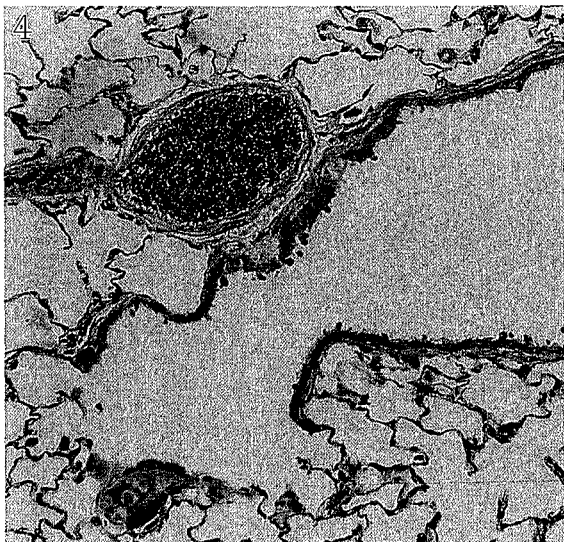
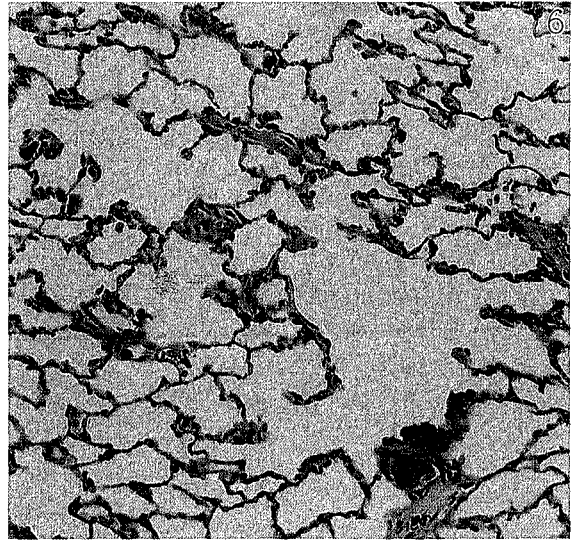
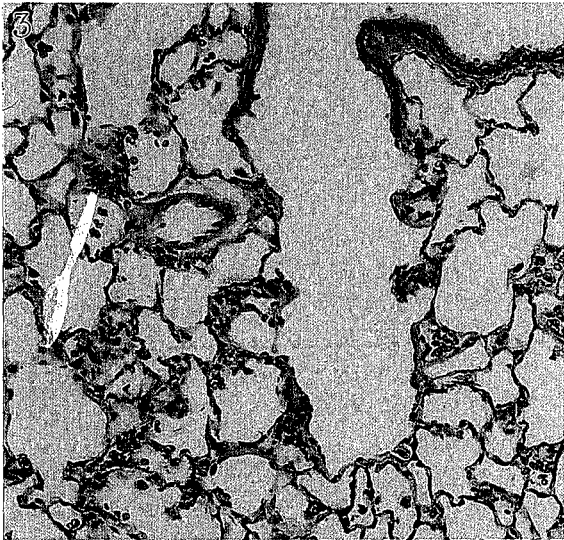
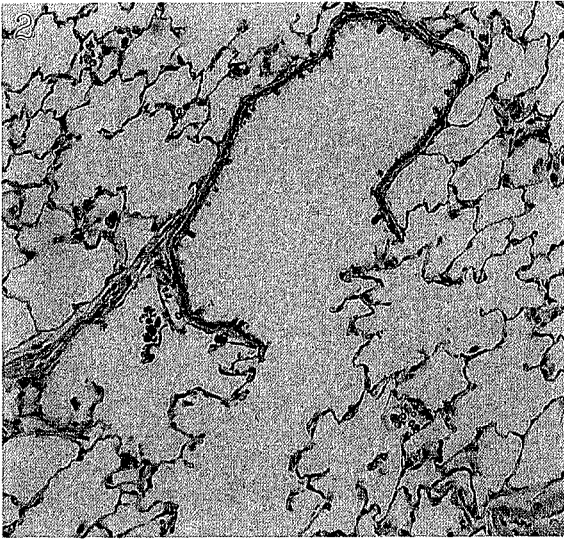
- Fig. 2. Light micrograph of a centriacinar region from the control rat
- Fig. 3. 30 days exposure to 0.1ppm O<sub>3</sub>. Hypertrophy in the epithelium of the terminal bronchiolar and alveolar ducts. Alveolar ducts are thickened by accumulations of mononuclear cells and depositions of connective tissue. The walls of alveoli increased cellularity and thickening with connective tissue (100×)
- Fig. 4. Exposure to 0.1 ppm O<sub>3</sub> for 90 days. The epithelium seemed almost normal. Connective tissue deposition remained sporadically in the walls of alveolar ducts and alveoli (100×)
- Fig. 5. 30 days exposure to a mixture of 2.0ppm

NO<sub>2</sub> and 0.1ppm O<sub>3</sub>. Hypertrophy and proliferation in the terminal airway. Changes are more markedly than that shown in fig. 3 (100×)

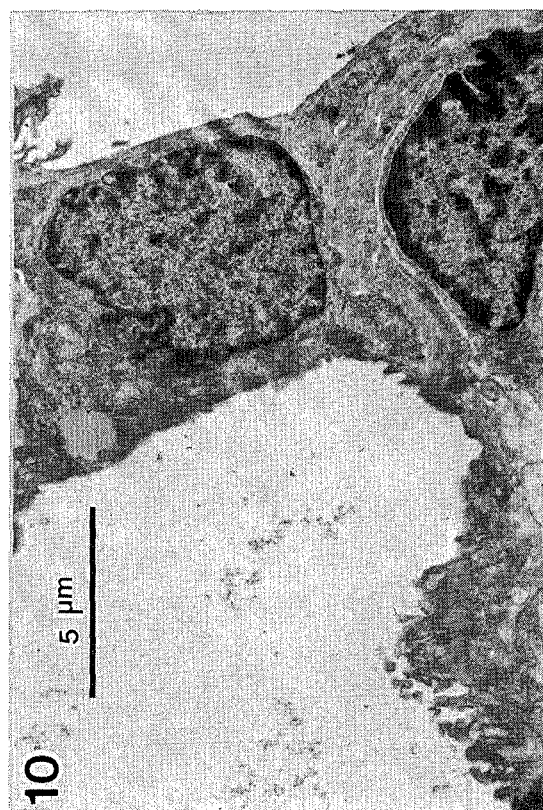
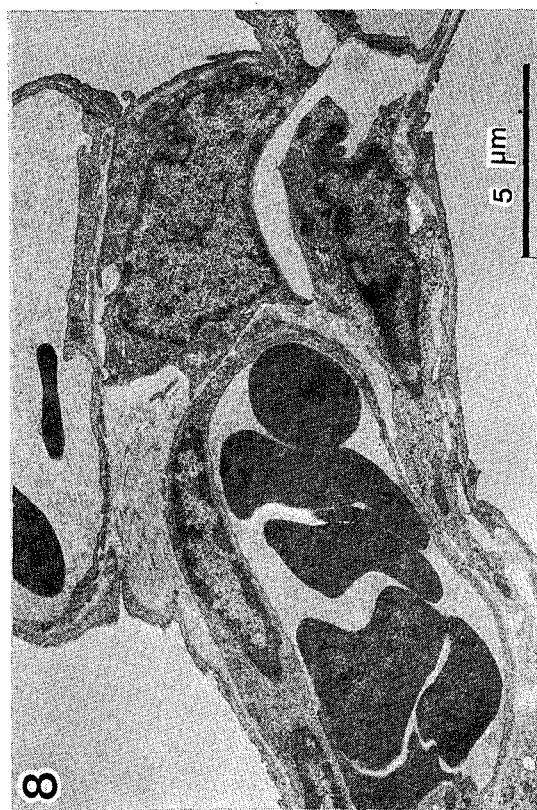
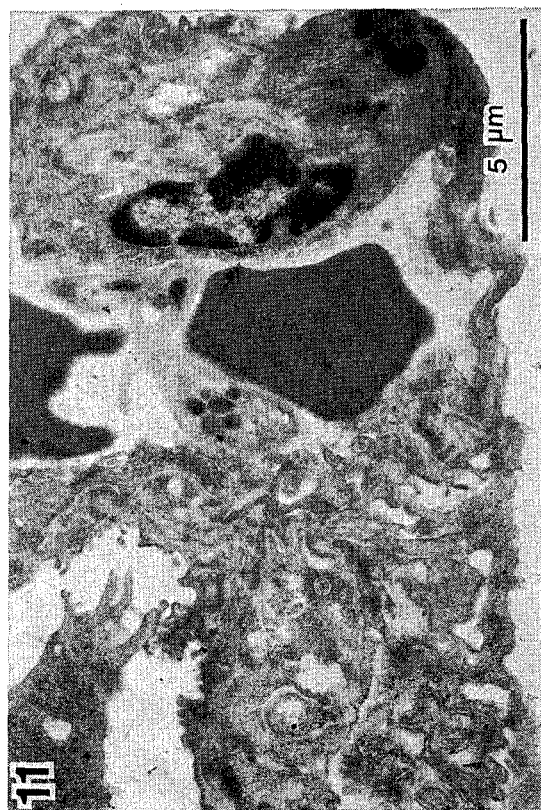
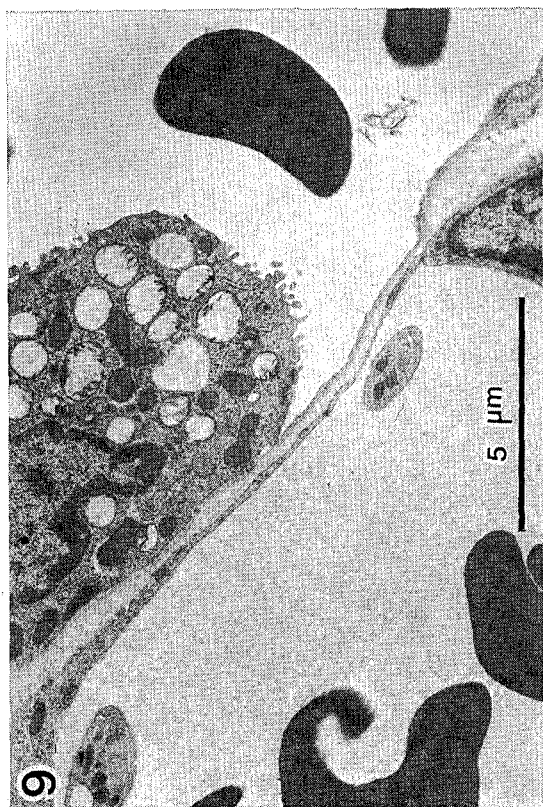
- Fig. 6. Same treatment as fig. 5. The cellularity and thickening of the alveolar ducts and alveoli (100×)
- Fig. 7. 90 days exposure to a mixture of 2.0ppm NO<sub>2</sub> and 0.1ppm O<sub>3</sub>. Hypertrophy was remarkable in the epithelium of the terminal airway. Thickness and depositions of connective tissue in the walls of alveolar ducts were observed (100×)
- Fig. 8. An electron micrograph of alveolar walls in the control rat. Interstitial tissue has little fibers and the cytoplasm of Type 1 cells has thin and uniform thickness (5000×)
- Fig. 9. Type 2 epithelium in the normal rat. Interstitial tissue has little fibers and ground substance, and air-blood barrier is very thin (6000×)
- Fig. 10. Increased interstitial cells and thickened alveolar walls can be observed following exposure to 0.1ppm of O<sub>3</sub>. Type 1 cells are peeled away from the underlying basement lamina (5000×)
- Fig. 11. Same treatment as fig. 10. Interstitial tissue is thickened with collagen fiber. Basement lamina devoid of an epithelial covering is exposed to the alveolus. Degenerated epithelial cell in alveolar space (6000×)

Fig. 12, 13, 14 and 15 show rat lung exposed to a mixture of 2.0ppm NO<sub>2</sub> and 0.1ppm O<sub>3</sub> for 90 days.

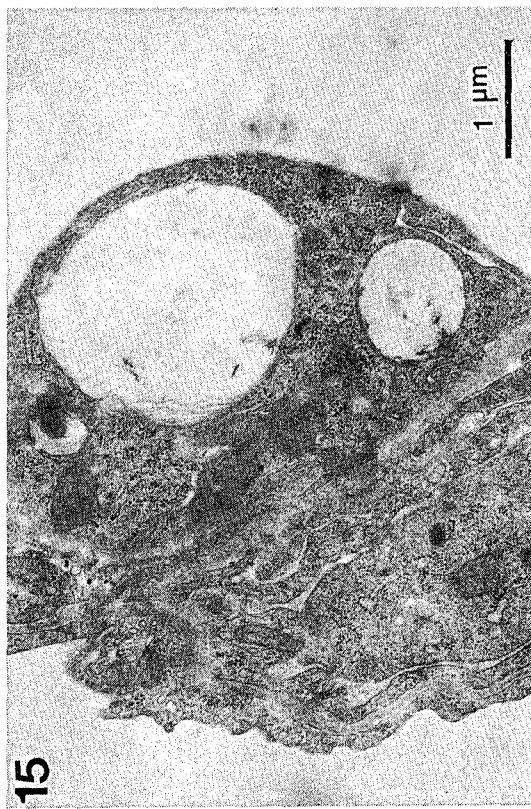
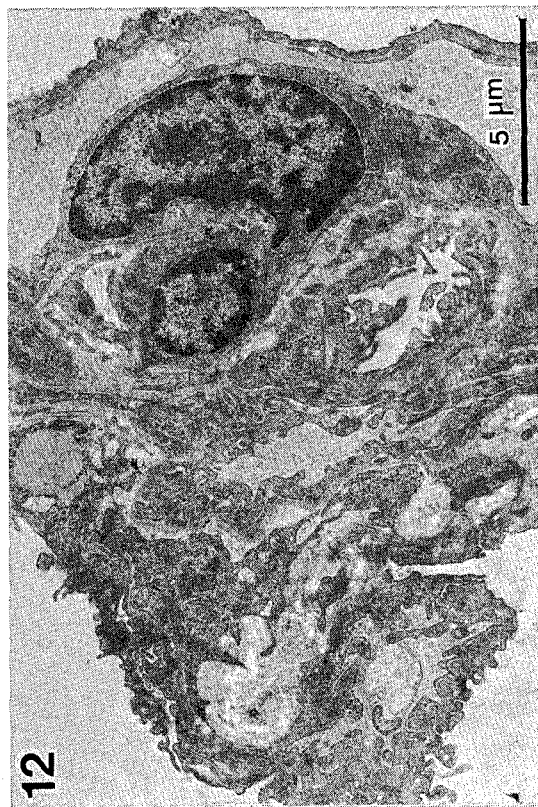
- Fig. 12. Thickened interstitial tissue with collagen fiber and ground substance. Irregular surface of the cytoplasm of Type 1 (5000×)
- Fig. 13. Increased collagen fiber remarkably in interstitial tissue. Compare with fig. 9. (6000×)
- Fig. 14. Hypertrophied Type 2 epithelia and thickened connective tissue (5000×)
- Fig. 15. Vacuoles with remnant lamellar bodies (15000×)











## NO<sub>2</sub> と O<sub>3</sub> 暴露によるラット肺に対する生化学的变化

石川 隆 章\*

### Effect of Subchronic Exposure of NO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> on Pulmonary Connective Tissue

TAKA AKI ISHIKAWA\*

The influence of nitrogen dioxide and ozone on the connective tissues of rat lungs was studied after 14 days of exposure at 10 ppm in NO<sub>2</sub> (16 hours per day), and 1 ppm in O<sub>3</sub> (8 hours per day), and alternate exposure of NO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>.

NO<sub>2</sub> exposure induced a decreased rate of body weight in spite of the increase of lung weight, collagen, and non-collagen protein content which might be indicative for the prompted pulmonary connective tissue metabolism. On the other hand, it was found that the ratio of collagen to dry weight was increased compared with that of control and NO<sub>2</sub>. The increase of collagen content in O<sub>3</sub> may be suggestive for the abnormal collagen metabolism which leads to pulmonary fibrosis.

**Keywords :** Nitrogen dioxide, ozone, gas exposure target organ connective tissue collagen.

#### 緒 言

大気汚染の生体影響を適確に把握することは、NO<sub>2</sub> や O<sub>3</sub> などの大気汚染にさらされる危険の多い大都市住民の疾病形態を理解する上で貴重なデータを提供する。

NO<sub>2</sub> ガスの暴露が標的臓器としての肺に肺気腫<sup>1)</sup>、肺線維症<sup>2)</sup>を惹起することが病理学的な立場から報告されている。今回、ラットを用いて NO<sub>2</sub> (10ppm)、O<sub>3</sub> (1.0 ppm) の単独および交互暴露実験を2週間に涉って行った。NO<sub>2</sub> や O<sub>3</sub> が肺の線維性タンパクである膠原線維(コラーゲン)や非コラーゲンタンパクに、どのような影響をもたらすかを解明する目的で、暴露後のラット肺の湿また乾燥重量、非コラーゲンタンパク、そしてコラーゲンを量的に検討した。なお、コラーゲンは一部溶解性の差を利用して抽出し、質的な面からも検討した。肺のコラーゲンタンパクに関して、若干の知見を得たので報告する。

#### 実験操作

1) 試薬 : Pepsin および bovine serum albumine は Sigma を、その他の試薬はすべて和光純薬の試薬特級を使用した。

2) 方法 : 非コラーゲンタンパクは、bovine serum albumine を standard として Lowry 法<sup>3)</sup>で測定した。OH proline は試料を 6 N 塩酸で酸加水分解後、Bergman and Loxley 法<sup>4)</sup>により定量された。

3) コラーゲンの抽出<sup>5)</sup> : ガス暴露終了後、生食で十分に還流された肺は湿重量を測定後、凍結乾燥され乾燥重量が測定された。乾燥された肺は、ハサミで細片化され 100mg 前後の試料からコラーゲン抽出が行なわれた。細片化された乾燥肺は、10ml 用の試験管に移され、0.1 M 酢酸の 7ml 中で 24 時間攪拌抽出された。遠心分離後、沈査は同条件でさらに酢酸抽出された。各上澄は mix され、5% NaCl 溶液となるように NaCl が添加され、コラーゲンを分離した。この分画を酸可溶性分画とした。酸抽出後の沈査は、pepsin を含む 0.5M 酢酸の 7ml で 24 時間攪拌抽出された。その上澄は、さらに酢酸抽出分画と同様に塩析によりコラーゲンを分離した。この分画が pepsin 可溶性分画である。pepsin により可溶化されない沈査は、さらに 2-mercaptoethanol を含む 4M guanidine HCl (guanidine) 溶液を用いて抽出した。遠心後、沈査は 4M guanidine で数回洗浄され、各上澄は mix された。その上澄は、0.5M 酢酸溶液で十分透析され、塩析にてコラーゲンを分離した。この分画は、guanidine 可溶分画とされた。guanidine で抽出されなかった残渣は不溶性分画とされ、0.1N 水酸化ナトリウム溶液を加えて、60℃で加熱溶解した。この溶液の OH proline 値から不溶性コラーゲンが求められた。

4) 動物に対する暴露条件 : 実験動物として Fischer 系の 8 週令の雄ラット 20 匹が使用された。control 群、

\* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

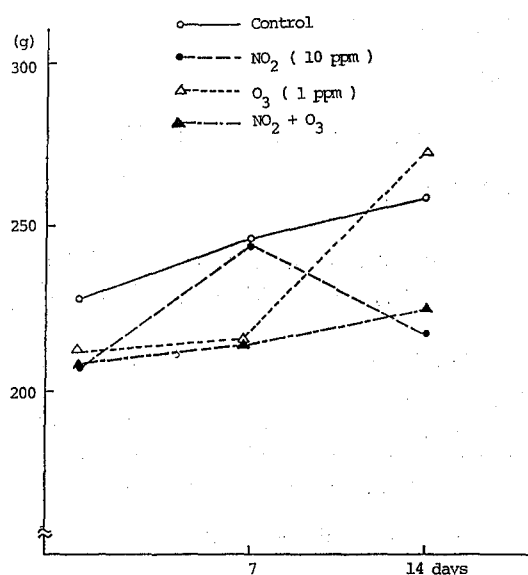


Fig. 1. The changes of body weight during NO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> exposure for two weeks.

NO<sub>2</sub>群, O<sub>3</sub>群および交互群の4群に分けられた。NO<sub>2</sub>群は、10 ppmの濃度を17:00から翌朝9:00まで16時間、O<sub>3</sub>群は1 ppmを9:00から17:00までの8時間、交互群はNO<sub>2</sub>の10 ppmを16時間暴露後O<sub>3</sub>の1 ppmを8時間交互に暴露された。各暴露室は、温度22~24℃、湿度50~70%、換気回数10回/時間に調節された。NO<sub>2</sub>とO<sub>3</sub>の濃度測定は、ケミルミネッセンス法により行なわれた。

### 結 果

1) 暴露実験中のラットの体重変化: 2週間の短期実験であるけれど、8週令という成長期のラットは、当然、一定の増加傾向を示した。その体重変化の経過を図1に示した。control群の2週後の体重は、平均して13%増であった。NO<sub>2</sub>群は、1週後にcontrolの増加率の約2倍と体重が増加したが、2週後には前週より体重が減少し実験開始時の体重とほぼ同一であった。O<sub>3</sub>群は、1週目はほとんど変化せず、2週間目にはcontrolの増加率の約2倍(25%)を示した。交互群(NO<sub>2</sub>とO<sub>3</sub>を交互に暴露した)は、経時的にcontrolと同様な増加傾向を示したが、増加率は多少低値であった(9%)。

2) 肺の湿重量と乾燥重量: 暴露終了時、ラットはバルビタール麻酔下で生食による血液還流を行った後、臓器を摘出した。肺の湿重量は、図2-aに示した。control群に比べNO<sub>2</sub>群(20%)および交互群(7%)は増加していたが、O<sub>3</sub>群はほとんど差が認められなかった。一

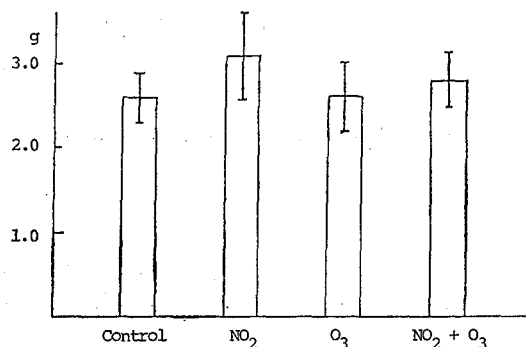


Fig. 2-a Wet weight of lung (mean ± SD)

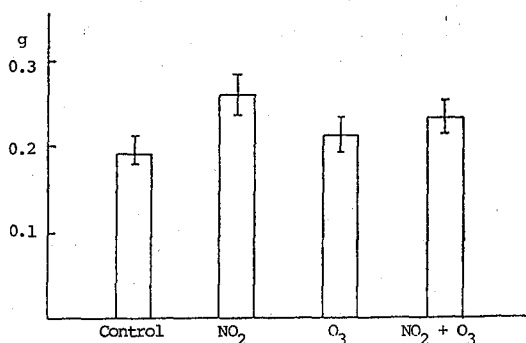


Fig. 2-b Dry weight of lung (mean ± SD)

方、乾燥重量は図2-bに示した。NO<sub>2</sub>群(36%)、交互群(20%)、O<sub>3</sub>群(9%)といずれもcontrolのそれより増加していた。さらに、肺の水分含量を算出するといずれも湿重量の92%前後であり、controlと暴露群との間に相違は全く認められない。

3) 肺のタンパク量の変化: 乾燥された肺の一部は、Lowry法によりタンパクが定量された。図3-aに肺タンパク量を示した。control群における肺のタンパク量は、0.1g前後である。一方、NO<sub>2</sub>群は1.37倍、交互群は1.15倍と増加していたが、O<sub>3</sub>群はほとんどcontrol群との間に差がない。これを乾燥重量に対するタンパク量で比較すると図3-bに示す様に各群間ではっきりした違いはみられない。

4) 肺のコラーゲン量: 乾燥された肺の一部は6N塩酸、110℃の条件でovernight加水分解され、hydroxyproline(OH proline)が定量された。総コラーゲン量を図4-a, bに示した。controlに比べてNO<sub>2</sub>群およびO<sub>3</sub>群は1.3倍、交互群は1.2倍といずれも増加していた。これもタンパク量と同様に乾燥重量に対するコラーゲン量

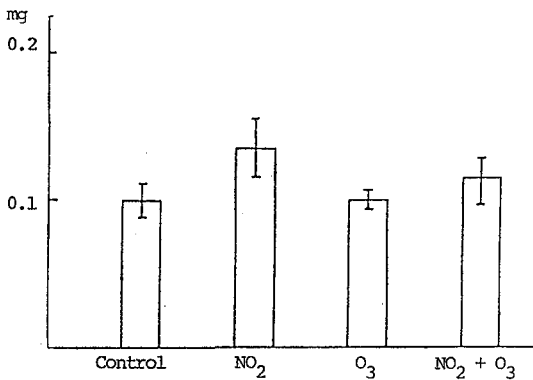


Fig. 3-a Non-collagen Protein of Lung (mean±SD)

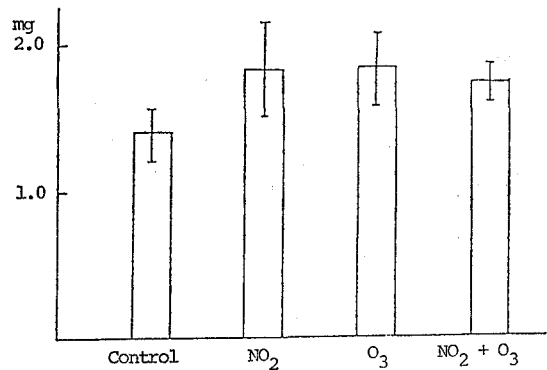


Fig. 4-a Collagen of Lung (mean±SD)

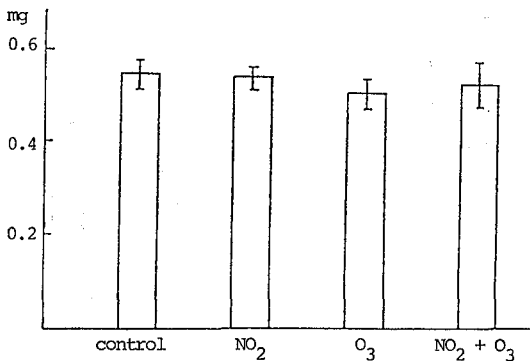


Fig. 3-b Non-collagen protein to dry weight (mean±SD)

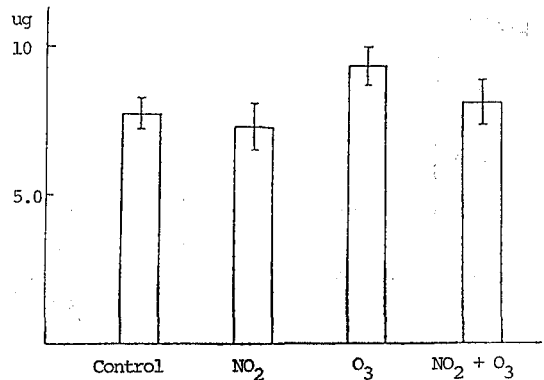


Fig. 4-b Collagen to Dry Lung Weight (mean±SD)

で表わすと O<sub>3</sub> 群は 1.2 倍と増加していたが、交互群は control と変わらず、そして NO<sub>2</sub> 群はむしろ低下の傾向がある。

5) コラーゲンの質的变化：乾燥された肺の残りは、すべてコラーゲンの抽出に使用された。0.5M 酢酸、pepsin 処理分の 0.5M 酢酸、4M guanidine の各溶液中で撹拌抽出された。この操作で抽出されない残査を不溶性画分とした。いずれも加水分解後、OHproline が定量されコラーゲンが算出された。肺のコラーゲンに対する各抽出分画での比率を検討すると、図 5 に示すように酸分画は 0.75~0.94%，pepsin 分画は 15.0~21.8%，グアニジン分画は 38.0~54.0%，不溶性分画は 18.2~25.6% である。

i) 酸可溶性分画：この分画のコラーゲンは、全体のコラーゲンの 1% 以下が抽出されるに過ぎない。皮膚のコラーゲンの 50 前後が酸で抽出されることを考えれば肺のコラーゲンが物理、化学的に非常に安定であることを

示唆している。control 群と暴露群を酢酸抽出の量で検討すると、NO<sub>2</sub> 群 1.3 倍、O<sub>3</sub> 群 1.08 倍、交互群 1.07 倍といずれも増加しているが乾燥重量当りでみると、むしろ暴露群の方が減少している。

ii) pepsin 可溶性分画：この分画はコラーゲン分子のテロペプチド部分を pepsin で分解した後、酢酸で抽出されたコラーゲンである。ペプシン分画のコラーゲン量は、NO<sub>2</sub> 群、交互群とも control 群とはほぼ同じ値を示したが、O<sub>3</sub> 群は control より 1.3 倍と高い。肺の乾燥重量でみると NO<sub>2</sub>、交互群は control 群のそれより 0.6 および 0.8 と減少していたが O<sub>3</sub> 群は、全く control と同じ値を示した。

iii) guanidine 可溶性分画：NO<sub>2</sub>、O<sub>3</sub> 群とも control との間に差はないが、交互群で多少減少している。肺の乾燥重量に対するコラーゲン量でみると NO<sub>2</sub> と交互群は、それぞれ 0.7 倍その 0.9 倍と control に対して低下している。

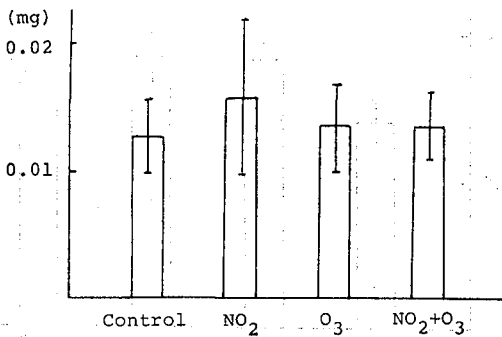


Fig. 5-a Acid soluble collagen

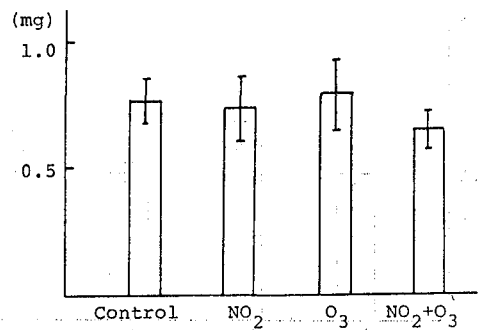


Fig. 5-c Guanidine soluble collagen

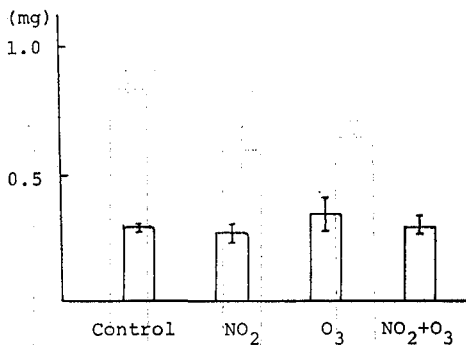


Fig. 5-b Pepsin soluble collagen

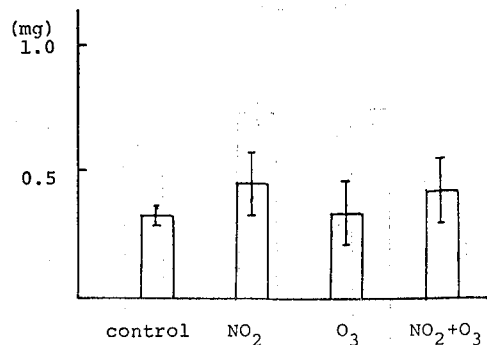


Fig. 5-d Insoluble collagen

iv) 不溶性分画: guanidine 抽出後の沈査は十分水で洗浄され、凍結乾燥された。その一部が 0.1N 水酸化ナトリウム溶液の中でオートクレーブ処理された。中和後酸加水分解され、そのOHprolineが定量された。不溶性コラーゲンは、NO<sub>2</sub>群の1.4倍と交互群1.3倍と抽出困難なコラーゲンが増大するが、O<sub>3</sub>群ではcontrol群との間に差が認められない。乾燥重量当りに換算すると交互群で、わずかに増加している程度で他の二群は control とほぼ同一の値であった。体重増加曲線から control 群は、経時的に漸増傾向を示す。NO<sub>2</sub> 群の体重の増加は、ほとんど認められない。一方、O<sub>3</sub> 群は control をこえる増加率を示した。この結果からこの実験に用いられた NO<sub>2</sub> (10 ppm) および O<sub>3</sub> (1 ppm)、濃度では NO<sub>2</sub> は体重減少作用があり、O<sub>3</sub> はむしろ体重を増加させる何等かの作用があるのかも知れない。文献的<sup>6)</sup>にも NO<sub>2</sub> 30ppm の暴露で24時間後に体重が減少したとの報告がある。その報告と1週目がむしろ増加している今回のデータとの相違は、用いたガスの濃度差に由来するものと思われる。肺の重量、タンパク、そしてコラーゲン量から NO<sub>2</sub> や O<sub>3</sub> の影響を

みると、NO<sub>2</sub> 群の体重は増加しないのにも拘らず肺の湿重量、乾燥重量、タンパクおよびコラーゲン量とも control のそれらよりはるかに増加していた。しかも乾燥重量に対する水分含量、タンパク量およびコラーゲン量の比率が control のそれと全く変わらないことから肺水腫や肺線維によるものでなく、肺の組織全体が代償性に大きくなったと考えられる。一方、文献上<sup>7)</sup> ラットに対する 1.5 ppm O<sub>3</sub> の3週間暴露で肺の湿重量が増大したとの報告もあるが、我々の結果は、O<sub>3</sub> 群の湿、乾燥重量が control のそれと変わらず乾燥重量に対するコラーゲン量のみが増大していた。このことは、肺の線維性タンパクの増大を意味し、肺の線維化と何等かの関係があることを示唆している。交互群は、NO<sub>2</sub>群程のタンパクおよびコラーゲンの増加は認められないが、ほぼNO<sub>2</sub>群に類似したパターンを示す。コラーゲンの質的变化を検討するため、肺組織のコラーゲンを変性させることなく凍結乾燥した。それを酸、ペプシン、グアニジン等で処理してコラーゲンを抽出分画した。各分画のコラーゲン量を control のそれと比較してみると、酢酸可溶性コラーゲ

ンは  $\text{NO}_2$  群のそれが多少増加する程度であり両分画とも有意差はない。グアニジン可溶性分画においては、 $\text{NO}_2$ ,  $\text{O}_3$ , 交互群のいずれも control との間に差がない。結果的に各抽出液で溶出されるコラーゲンは、量的に各群とも差が認められなかった。しかし、不溶性分画のコラーゲンが  $\text{NO}_2$  暴露で control に対して30%も増加していることは、コラーゲンが質的に変化していることを示唆するものかも知れない。いずれにしろ、 $\text{NO}_2$  や  $\text{O}_3$  の暴露により肺のコラーゲン量が増大する結果を得た。このコラーゲン増大を引き起こす因子として、コラーゲン合成中の proline から OHproline への水酸化の過程が free radical 的な反応に基づいて起きるのか、 $\text{NO}_2$  や  $\text{O}_3$  により proline hydroxylase の活性が亢進しているか、さらに検討する必要がある。

#### 文 献

- 1) Drożdż, M., Kucharz, E. and Szyja, J.: *Environ. Res.*, 13, 369, 1977
- 2) Hattori, S. and Takemura, K.: *J. Clin. Microscopy*. 6, 350, 1973
- 3) Lowry, R. B., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: *J. Biol. chem.* 193, 265, 1951
- 4) Bergman, I., and Loxley, R.: *Anal. Chem.*, 35, 1961, 1963
- 5) Ishikawa, T., and Nimni, N. E.: *Anal. Biochem.*, 92, 136, 1979
- 6) Kleinerman, J.: *Arch. Environ. Health.*, 34, 228, 1979
- 7) Last, J. A., Greenberg, D. B. and Castleman, W. L.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 51, 247, 1979

1) Drożdż, M., Kucharz, E. and Szyja, J.: *Environ.*

## 空調ダクト内堆積粉塵の性状について

佐藤 泰 仁\*

### Properties of Accumulated Dusts in Air-conditioning Duct

YASUHITO SATO\*

Removing dust particles from ducts in the air conditioning system is an important job for building maintenance as dust particles blown out from the duct opening may cause problems to residents. Properties of particles such as element components, crystal structures, ratio of inorganic to organic substances and tar rate were investigated in six buildings. Elements extracted from the dust particles were Si, S, Ca, Fe, K, Mg, Ti, V, Zn, Cu, Cl, Cr, Al and Pb, and the crystal structures were  $\alpha$ -SiO<sub>2</sub>, CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, CaCO<sub>3</sub> and NaAlSi<sub>3</sub>O<sub>8</sub>.

The ratio of inorganic to organic substances was six to four. The particles contained an average of 8.4 % of tar, which value was as high as in the air around a street with a heavy traffic. This high value of tar may be attributable to smoking.

**Keywords** : component analysis, accumulated-dust, air-con duct

#### はじめに

室内の空気汚染を制御するには、最近のように外気が清浄でなくなると、取り入れ外気を浄化することが必要であり、ビルにおける空気調和装置の普及もあり、大部分のビルでは空気の浄化が行なわれている。しかし最近のビルの室内環境をみると有害ガスとともに、粉じんに対しての問題が指摘されている。居住者の快適性または建物のよごれ防止などの点からも、建物内で発生するタバコの煙をはじめ、土砂、紙ホコリ、布くずなどの粉じんについては循環空気についても浄化する必要がある、各種エアフィルターによる対応がなされている。しかし、現在の事務所ビル等で用いられている空気調和設備では外気および室内発生した粉じんを完全に捕集することはむずかしいため、長い間には室内に空気を送りこんでいるダクト内がよごれてくることは当然であり、実際ダクト内に粉じんが堆積されている現状である。例えば空調運転時に吹出し口より黒っぽいものが落ちてきたり、吹出し口のまわりが黒ずんでいたりするのを経験するが、これらの本体について調べられた報告はない。

ビルの環境管理の一つに空調ダクト内清掃という仕事があり、いくつかの業者が行なっている。今回、一業者より試料の提供が得られる機会があったので、堆積粉じんの性状について基礎データを得るための分析を行な

い、いくつかの知見を得たので報告する。

#### 試料の採取及び分析方法

ダクト内堆積粉じんの清掃については次のようにして行なっている。まず空調用ダクトを数ヶ所切開して、その開口部より床においたコンプレッサーからのホースを接続した小型電動車 (30×20cm) を入れ、ダクト内を走らせながらコンプレッサーからの Air により、堆積塵を飛散させる。採塵しない吹出し口には特殊なフィルターにより目張りをしてゴミが漏出するのを防ぎ、採塵すべき吹出し口には電気集塵器からのホースを当てがい、ゴミを吸引するという手法である。しかし、ゴミは集塵器の中で水洗されてしまい、ここからの採取ができないので、吸引ホースをはずした際の採塵吹出し口のまわりに残っている粉じんを集めて分析用試料とした。粉じんの性状解析は、組成元素、状態分析(結晶構造)、無機分、有機分、タール分の割合等について行なった。はじめに元素の組成分析を行なうため蛍光 X 線分析装置 (物理学電機製、ガイガーフレックス K G-X) を用いて元素の確認を行ない、続いて X 線回折装置 (物理学電機製、ガイガーフレックス D-2) にかけて状態分析を行なった。蛍光 X 線用の試料の作成は、Al 製リングにセルローズパウダー (Whatman CF-11) を一定量入れ圧延機によりケーキ状にし、次いでその上に実試料をのせ再度圧延機

\* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

にかけ、全圧 40kg/cm<sup>2</sup> による加圧成型法を用い、定性分析に供した。また、X線回折用の試料は Al 製試料ホルダーに粉じんをつめ、両側よりガラス板ではさんで固定させ、装置の回転試料台にセットし、試料を回転させながら分析(同定)を行なった。各々の測定条件は Table

Table 1. Analytical conditions

|                    | X-ray<br>fluorescent<br>spectrometer | X-ray<br>diffractometer |
|--------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| Target             | Cr, Mo                               | Cu                      |
| Voltage            | 40Kv                                 | 40Kv                    |
| Current            | 60mA                                 | 30mA                    |
| Counter full scall | 2000c/s                              | 1000c/s                 |
| Time constant      | 1sec                                 | 1sec                    |
| Scanning speed     | 4°/min                               | 2°/min                  |
| Chart speed        | 40mm/min                             | 20mm/min                |
| Divergency         | —                                    | 1°                      |
| Receiving slit     | —                                    | 0.15mm                  |
| Crystal            | LiF, EDDT, ADP                       | —                       |
| Monochrometer      | —                                    | Graphite                |
| Detector           | SC, PC                               | PC                      |

1 に示す通りである。さらに、試料に含まれる無機分、有機分については、試料 (2g) を正確にはかり、それを磁製皿に入れ電気炉にて 800℃、7 時間の焼却灰化を行ない、デシケーター内で常温冷却し再度秤量し、熱灼減量を有機成分とし、灰分を無機成分とした。また、タール分については 2g の試料をベンゼンを用い、ソックスレー抽出を行ない測定した。

今回対象となったビルは 6 つであり、それぞれの概要を Table 2 として示したが、古くは建築後 20 年を経たものから新しいものでも 12 年という状態であり、すべて今回初めて清掃を行なったものばかりである。そして全部のビルが中央式空調システムをとり再循環換気を行っており、フィルター機構としてはすべてロール形 (自動巻取形) エアーフィルターを設置し、汙材としては不織布およびポリウレタンホームであった。フィルターの洗浄は月 1 回の割で行なわれているようである。また、ビルの使用形態については C ビルのみ雑居 (他のテナントが入っている) であるが、他は専用ビルとして使用している。

## 測定結果および考察

蛍光 X 線による分析 (定性) の結果、6 つのビルの試

Table 2. Outline of the equipment at each building

| Building | Year of construction | Area (m <sup>2</sup> ) | Air-con system          | Filter material | Cleaning times | Use of a building floors |
|----------|----------------------|------------------------|-------------------------|-----------------|----------------|--------------------------|
| A        | 1966                 | 3850                   | Central (recirculation) | N               | 1 time/month   | S                        |
| B        | 1970                 | 5225                   | "                       | P               | "              | S                        |
| C        | 1963                 | 198900                 | "                       | N               | "              | W                        |
| D        | 1956                 | 10936                  | "                       | N               | "              | S                        |
| E        | 1964                 | 9100                   | "                       | P               | "              | S                        |
| F        | 1962                 | 21000                  | "                       | N               | "              | S                        |

N=Nonwoven fabric      S=A company uses the whole floors  
P=Polyurethane foam      W=Several companies share floors

Table 3. Extracted elements from each buildings

| Building | Si | S | Ca | Fe | K | Mg | Ti | V | Zn | Cu | Cl | Cr | Al | Pb |
|----------|----|---|----|----|---|----|----|---|----|----|----|----|----|----|
| A        | ○  | ○ | ○  | ○  | ○ | ○  | ○  |   | ○  |    | ○  |    | ○  | ○  |
| B        | ○  | ○ | ○  | ○  | ○ |    | ○  | ○ | ○  | ○  | ○  | ○  | ○  | ○  |
| C        | ○  | ○ | ○  | ○  | ○ |    |    |   | ○  |    | ○  |    | ○  | ○  |
| D        | ○  | ○ | ○  | ○  | ○ | ○  | ○  |   | ○  |    | ○  | ○  | ○  | ○  |
| E        | ○  | ○ | ○  | ○  | ○ |    |    | ○ | ○  | ○  | ○  |    | ○  | ○  |
| F        | ○  | ○ | ○  | ○  | ○ | ○  | ○  |   | ○  | ○  | ○  |    | ○  | ○  |



Table 4. Identified crystal structure in dust

| Building | $\alpha$ -SiO <sub>2</sub> | CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | CaCO <sub>3</sub> | NaAlSi <sub>3</sub> O <sub>8</sub> | Mg(OH) <sub>2</sub> | Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> | Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> |
|----------|----------------------------|--------------------------------------|-------------------|------------------------------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| A        | ○                          | ○                                    | ○                 | ○                                  | ○                   | ○                              |                                |
| B        | ○                          | ○                                    | ○                 | ○                                  |                     | ○                              |                                |
| C        | ○                          | ○                                    | ○                 | ○                                  |                     | ○                              | ○                              |
| D        | ○                          | ○                                    | ○                 | ○                                  | ○                   |                                |                                |
| E        | ○                          | ○                                    | ○                 | ○                                  |                     |                                | ○                              |
| F        | ○                          | ○                                    | ○                 | ○                                  | ○                   |                                |                                |

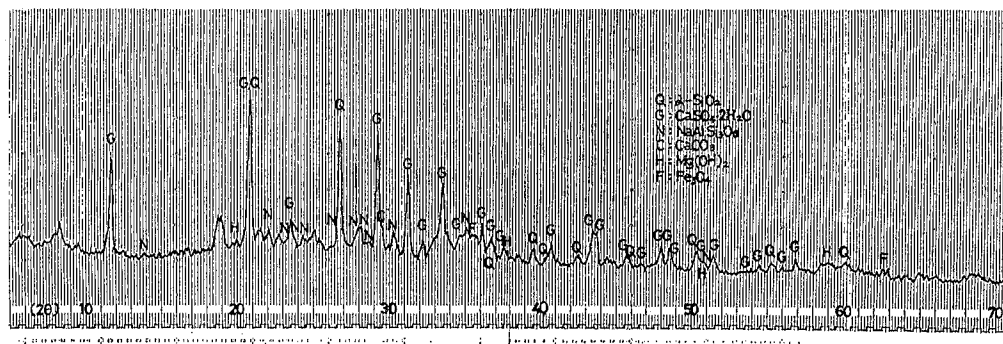


Fig. 1. Chart analyzed by X-ray diffractometer

料より検出された元素は、Siをはじめ S, Ca, Fe, K, Mg, Ti, V, Zn, Cu, Cl, Cr, Al, Pb の14種であった。

そのうち Si, S, Ca, Fe, K, Zn, Cl, Al, Pb などの元素は Table 3 に示したように、共通の元素としていずれの試料からも検出されたが、他の Mg, Ti, V, Cu, Cr の元素については検出されないところが見られた。

室内浮遊粉じん中の元素組成分析については、Weschler<sup>1)</sup>、竹内<sup>2)</sup>、上原<sup>3)</sup>らが報告しており、Weschlerによると C が一番多く、次いで O, Ca, H, Si, Cl, S の順になっている。今回、我々は定量を行っていないが、ピークの大きさから相対強度を推測比較してみると Ca が一番大きく、次いで Si=Cl>S>Al>K>Fe の順になる。一方、C と O については装置の都合上分析できなかったが、若し他の適当な装置により分析できれば、おそらく最も多い成分となることが予想され、ダクト内堆積塵も室内粉じんの組成比と同じ傾向を示すものと判断される。次に X 線回折分析の結果得られた各元素の状態（結晶構造）をみると Table 4 の如くであった。表中 ○印が検出されたことを示すが、先の蛍光 X 線分析において相対強度の大きかった Ca および Si の化合物状態と

しては CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O（石膏）、CaCO<sub>3</sub>（方解石）であり、 $\alpha$ -SiO<sub>2</sub>（ $\alpha$ -石英）、NaAlSi<sub>3</sub>O<sub>8</sub>（曹長石）であるといえる。そのほか Mg(OH)<sub>2</sub>（水酸化マグネシウム）、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>（四三酸化鉄）、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>（酸化アルミニウム）などが検出、同定されたが、これらについては検出されたところと、未検出のところがみられた。

分析チャートの一例を Fig. 1 に示したが、回折角度(2 $\theta$ )が 20° 以下のところにもいくつかのピークがみられた。それらはおそらく粘土鉱物の類と思われるが、同定するところまではいかなかった。また、20° から 40° にかけてバックグラウンドがあがっている現象がみられたが、これについては汚材の成分と思われるものが関与していると判断され、さらに蛍光 X 線分析において検出された元素を含む物質の化合物状態が検出されていない点について推測すると、その元素を含む物質の量が微量であること、もしくはその元素を含む物質が結晶状態として存在していない、非晶質のままでいることが要因と考えられる。次に、ダクト内粉じんの無機分、有機分、タール分の割合について Table 5 に示したが、各ビルによって若干異なり、6 つのビルの平均値でみると無機分と有機分の割合は 6 : 4 という結果であった。現在、当所で継続調査

Table 5. Ratio of each components in dust

| Building | Inorganic<br>Component<br>% | Organic<br>Component<br>% | Tar<br>Component<br>% |
|----------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------|
| A        | 58                          | 42                        | 3.6                   |
| B        | 50                          | 50                        | 8.9                   |
| C        | 63                          | 37                        | 6.2                   |
| D        | 46                          | 54                        | 13.2                  |
| E        | 67                          | 33                        | 9.5                   |
| F        | 65                          | 35                        | 9.2                   |

中の降下ばいじんの不溶性成分に占める無機分と有機分の割合は7:3であるとの報告<sup>4)</sup>を参照すると若干の割合の相違がみられている。これについてはダクト内粉じんもしくは室内粉じんについては室内で発生する有機性の粉じん（ペーパーダスト、繊維性ダストなど）が相当あるためと、空調機のフィルターにより何回か汙過されるため、大気割合より無機成分が少なくなっているものとする。タール分についてみると、室内粉じん等の割合を調査した報告がないので今回の数字が妥当か否かの判断が困難であるが、瓦家等<sup>5)</sup>が報告している大気浮遊粉じん中のタール分の割合を参考にしてみると、交通量の多い街道近くで8.3%、工業地域で5.8%、商業地域で8.0%とあることから、ダクト内粉じんについては大小あったが、6つのビルの平均値としては8.4%で、交通量頻繁な道路近傍と同じ程度であり、タール分が多いと判断される。この原因として考えられる室内で発生するタール分としてはタバコがあり、タバコの煙中のタール含有量としては平均15mg/本であることから、ビル居住者の喫煙の程度に関連してくると思うが、室内への給気がダクト内を再循環するたびに、堆積している粉じんに吸着されていくためと考える。今回の調査結果からは、フィルター（汙材）の種類との関係についてまでは言及

するにいたらなかったが、当然長い間には汙材の剥離等が考えられるので、今後の課題として定量性も含め追試したいと考えている。

### ま と め

今回の調査の結果の概要は以下の如くであった。

1) 空調ダクト内粉じんより検出された元素としては、Si, S, Ca, Fe, K, Mg, Ti, V, Zn, Cu, Cl, Cr, Al, Pb であり、相対強度でみるかぎり Ca が一番大きく、次いで Si=Cl, S, Al, K, Fe の順であった。

2) すべてのビルより同定された粉じんの化合物状態としては、 $\alpha$ -SiO<sub>2</sub>, CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, CaCO<sub>3</sub>, NaAlSi<sub>3</sub>O<sub>8</sub> であった。

3) 粉じんに占める無機分、有機分の割合は6つのビルの平均で6:4であり、大気中より有機成分が多いと認められた。

4) タール分については平均8.4%と高く、室内発生由来のタバコ煙中のタールの影響と考えられる。

謝辞 本調査の試料の採取に際しては、(株)東亜管材、江口 弘氏に多大の御協力をいただいたことを記して深謝いたします。

(本研究は昭和57年度当研究所調査研究課題「大気中の浮遊粉塵に関する調査研究」の一部として実施し、概要は日本公衆衛生学会第41回大会 1982年10月で発表した。)

### 参 考 文 献

- 1) C. J. Weschler: Environmental Science & Technology, 12(8), 923-926, 1978
- 2) 竹内貢三他: 空気清浄, 12(2), 33-42, 1974
- 3) 上原秀夫他: 第21回大気汚染学会講演要旨集, 345, 1980
- 4) 佐藤泰仁他: 東京衛研年報, 26-1, 265-271, 1975
- 5) 瓦家敏男他: 空気清浄, 19(2), 1-18, 1981

鉛連続投与によるハト血液中の鉛分布と核封入体

関 比呂伸<sup>\*1</sup>, 藁 輪 佳 子<sup>\*1</sup>, 鈴 木 昇<sup>\*1</sup>, 鈴 木 重 任<sup>\*1</sup>  
溝 口 勲<sup>\*1</sup>, 寺 山 武<sup>\*2</sup>, 中 尾 順 子<sup>\*3</sup>, 村 上 正 孝<sup>\*\*</sup>  
杉 森 文 夫<sup>\*\*\*</sup>, 岩 間 三 郎<sup>\*\*\*\*</sup>, 長 橋 捷<sup>\*\*\*\*\*</sup>, 大 井 玄<sup>\*\*\*\*\*</sup>  
中 村 佳 代 子<sup>\*\*\*\*\*</sup>, 河 村 冷 子<sup>\*\*\*\*\*</sup>

Subacute Oral Administration of Lead Acetate to the Pigeon—  
the Distribution of Lead in the Blood and Search for Nuclear Inclusion Body

HIRONOBU SEKI<sup>\*1</sup>, KEIKO MINOWA<sup>\*1</sup>, NOBORU SUZUKI<sup>\*1</sup>, SHIGETOU SUZUKI<sup>\*1</sup>,  
ISAO MIZOGUCHI<sup>\*1</sup>, TAKESHI TERAYAMA<sup>\*2</sup>, TOSHIKO NAKAO<sup>\*3</sup>,  
MASATAKA MURAKAMI<sup>\*\*</sup>, FUMIO SUGIMORI<sup>\*\*\*</sup>, SABURO IWAMA<sup>\*\*\*\*</sup>,  
MASARU NAGAHASHI<sup>\*\*\*\*\*</sup>, GEN OHI<sup>\*\*\*\*\*</sup>, KAYOKO NAKAMURA<sup>\*\*\*\*\*</sup>  
and REIKO KAWAMURA<sup>\*\*\*\*\*</sup>

The pigeon can survive with high levels of lead in blood under experimental or urban environments. To explain this fact, it was postulated that lead was trapped in intranuclear inclusion body of erythrocyte to reduce the concentration in vital organs. In this experiment, we tried to confirm this phenomenon and elucidate the mechanism.

Pigeons were administered with lead intragastrically, successively at the doses of 6.25, 12.5, 25.0, 48.5mg/kg as lead acetate. We observed the change in body weight, hematocrit and lead concentration in blood.

No inclusion body was found in erythrocyte by electron microscope. When examined by electron probe microanalyzer, however, there were concentrated parts of lead in erythrocytic nuclei. It is suggested that lead accumulation in erythrocyte may serve as one of the protective mechanisms of the pigeon against lead poisoning.

**Keywords :** pigeon, lead, subacute toxicity, blood lead, inclusion body

緒 言

我々は、ドバトが、都市鉛汚染の鋭敏な生物指標であることに着目し<sup>1)</sup>、過去10年間、汚染の経年変化を観察してきた<sup>2)</sup>。この10年間を通して、都心に生息するドバトにおいて、50 $\mu$ g/100g以上の高い血液中鉛濃度を示したのは、全体の13%であった。

その後、生理学的影響を調べるうちに鉛の投与方法に

より、ドバトの致死作用が、大きく異なってくるということがわかった。例えば、高濃度の酢酸鉛(150mg/kg)を腹腔内に一回投与した場合、血液中鉛濃度 500 $\mu$ g/100g 以上は、致死性であったが<sup>3)</sup>、Barthalamus 等<sup>4)</sup>が、経口的に酢酸鉛を 25mgPb/kg/day 数週間投与を行った時、2000 $\mu$ g/100g 以上でも生存しており、形成された赤血球核封入体が、減毒作用を示しているとした。

<sup>\*1</sup> 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科

160 東京都新宿区百人町 3-24-1

<sup>\*2</sup> 同微生物部細菌第二研究科

<sup>\*3</sup> 同毒性部薬理研究科

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 筑波大学社会医学系

\*\*\* 山階鳥類研究所

\*\*\*\* 岩間動物医院

\*\*\*\*\* 東京大学医学部衛生学教室

\*\*\*\*\* 財団法人東京都臨床医学総合研究所

\*\*\*\*\* 国立公害研究所

Table 1. Concentration of Lead in Blood and Body Weight

| Group | No. | Blood Pb ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) | Body Weight(g) |
|-------|-----|----------------------------------------|----------------|
| A     | 6   | $7.5 \pm 3.4$                          | $326 \pm 23$   |
| B     | 6   | $9.7 \pm 2.8$                          | $321 \pm 16$   |
| C     | 6   | $8.8 \pm 4.0$                          | $327 \pm 10$   |
| D     | 3   | $7.5 \pm 1.5$                          | $326 \pm 15$   |

我々は、ハトにおける、このような鉛の毒性影響の機作を調べるために、鉛を連続経口投与して、血液における鉛の経時的分布を測定し、血液・腎の形態学的変化を観察した。

#### 方法・材料

実験1：都内に生息するドバト27羽を捕獲し、体重が295~360g (平均 $325 \pm 17\text{g}$ )、血液中鉛濃度 $3.2 \sim 14.5 \mu\text{g}/100\text{g}$  ( $8.5 \pm 3.4 \mu\text{g}/100\text{g}$ ) のドバト21羽を用いて、表1のように4群に分けた。ABCの3群は、6羽ずつ、D群は、3羽とした。ABCの鉛投与群は、再留水に溶かした各濃度の酢酸鉛溶液を、A)  $25\text{mg}/\text{kg}$ , B)  $12.5\text{mg}/\text{kg}$ , C)  $6.25\text{mg}/\text{kg}$  として、コントロールのD群は、A群と等モルの酢酸ナトリウムを溶液 $1\text{ml}/\text{kg}$ の投与量とした。投与は、一週間に6日間連続して、ゾンデにて20週間強制経口投与した。体重は、週一回測定した。投与期間中は、午後1時より5時までを給餌および飲水時間とした。採血は、翼下静脈より $2 \sim 2.5\text{ml}$ 、4週目まで毎週行い、それ以降は、2週間に一回とした。ヘマトクリットは、微量毛细管にて、採血時に測定した。採取した血液は、2500r.p.m., 10分間遠沈し、血球、血漿に分離して、Hessel 法<sup>5)</sup>にて鉛量を測定した。死亡および20週間生存したハト臓器中鉛量は、乾式灰化後、酸処理し直接法にて<sup>6)</sup> 原子吸光分析した。血液、腎臓の病変の観察と元素分析のために、リン酸緩衝液によるグルター固定、オスミウム後固定、エポキシ樹脂包埋を行って、試料を作成し、光顕、電顕で観察した。なお、元素分析は、エネルギー分散形X線分析装置により Spot Analysis を行った。

実験2：13羽のレース鳩のうち体重 $410 \sim 480\text{g}$  (平均 $439 \pm 23\text{g}$ )、血液中鉛濃度 $0.5 \sim 1.8 \mu\text{g}/100\text{g}$  (平均 $1.2 \pm 0.4 \mu\text{g}/100\text{g}$ ) のものを8羽用い、酢酸鉛投与群( $45.8\text{mg}/\text{kg}$ )を6羽、コントロール群(等モルの酢酸ナトリウム)を2羽とした。強制経口投与は、一週間に6日間連続、8週間行った。体重は、週2回秤量、採血は、翼下静脈より $1\text{ml}$  毎週行い、血液中鉛、ヘマトクリットを測定し

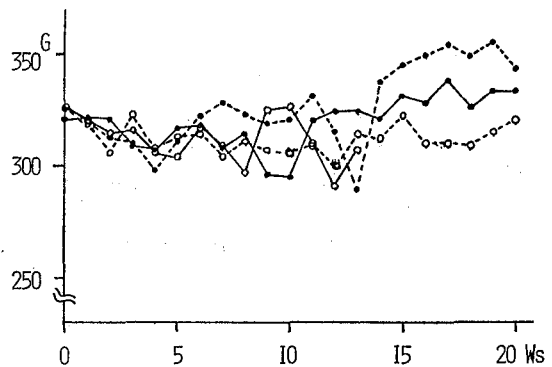


Fig. 1. Chronological Change of Body Weight

A : ○—○ C : ○·····○  
B : ●—● D : ●·····●

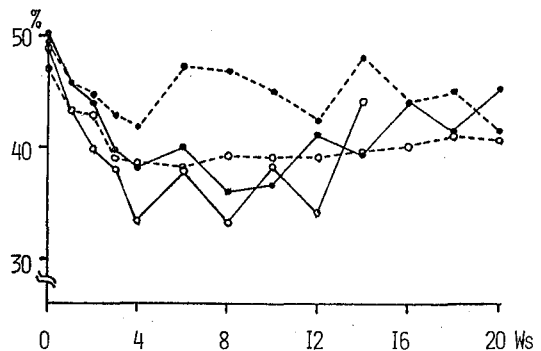


Fig. 2. Chronological Change of Hematocrit

A : ○—○ C : ○·····○  
B : ●—● D : ●·····●

た。また実験1と同様に、病変の観察と元素分析を行った。

#### 結果・考察

実験1：図1に示した如く、体重の増減はほとんどみられず、各群の平均は、12週目まで $300 \sim 330\text{g}$ の間にあり、我々の他のドバトの実験によって得られている正常時の体重変動が $36 \pm 13\text{g}$ であった<sup>7)</sup>ことから、正常範囲内にあると考えられる。但し、D群の14週以後の増加は、1羽死亡による上昇を示す。ヘマトクリットは、図2に示したように、鉛投与前の値を100%とするならば、当初の20~30%の減少を示したが、第4週目以後大きな変化は認められなかった。すなわち、ABCの各鉛投与群のヘマトクリットは、40%前後にあり、我々の鉛汚染の経年変化の野外調査から<sup>8)</sup>得た47~55% (総数711羽の平

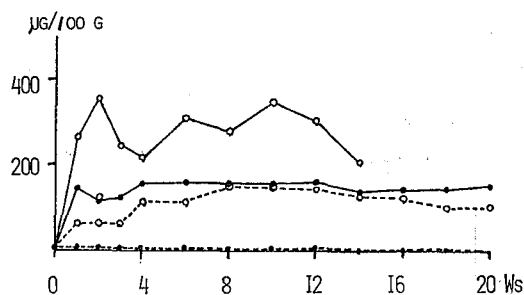


Fig. 3. Chronological Change of Lead in Whole Blood

A : ○—○ C : ○·····○  
B : ●—● D : ●·····●

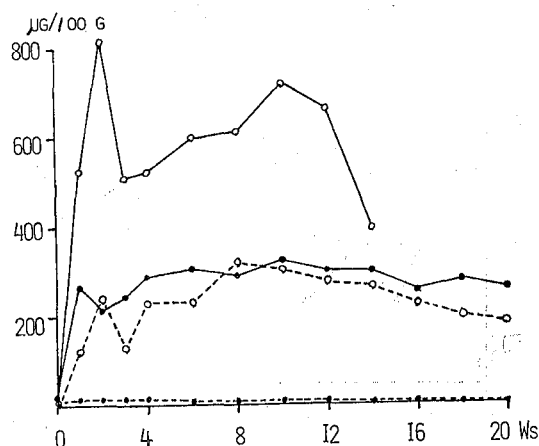


Fig. 4. Chronological Change of Lead in Erythrocyte

A : ○—○ C : ○·····○  
B : ●—● D : ●·····●

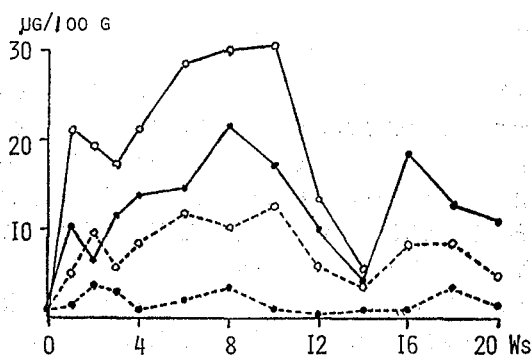


Fig. 5. Chronological Change of Lead in Plasma

A : ○—○ C : ○·····○  
B : ●—● D : ●·····●

均  $49.5 \pm 5.2\%$ ) を正常値の範囲とするならば、貧血状態にあるものと考えられる。全血中鉛量は、血球、血漿中鉛量より算出し、経時変化を図3に示した。図3から5までの全血、赤血球、血漿中鉛量は各鉛投与量に応じて分布、蓄積している。BCの両群において、全血、赤血球中鉛量は、4週目以後の増減が、A群と比べて少なく、ほぼプラトーに達しているものと考えられた。鉛の血漿と血球との分配比を計算すると、ABCの3群は1:20の割合を示した。野外で生息のドバト43羽(血液中鉛平均  $7.9 \mu\text{g}/100\text{g}$ ) の血漿と血球との比は、 $13.6 \pm 16.7\%$ であった<sup>9)</sup> ことから、鉛の強制投与により、血漿よりも血球への移行蓄積量が多い事が認められた。ヒトでは、全血中鉛の増加に伴い血漿中鉛量が増加するという説と変化しないという報告があるが、ヒトにおける血漿と血球との分配比についての報告例はない。ヒトにおける増加説では、Desilva<sup>9)</sup> が、103人の赤血球鉛量  $39 \mu\text{g}/100\text{g}$  以下から  $200 \mu\text{g}/100\text{g}$  以上の6段階のレベルに分けて血漿中鉛量を測定した時、 $0.27 \pm 0.11$  から  $2.64 \pm 0.78 \mu\text{g}/100\text{g}$  へと増加しているが、分配比は  $1.0 \pm 0.4$  から  $1.2 \pm 0.3\%$  と変化しなかった事を報告している。Cavalleri 等<sup>10)</sup> も同様の結果を示している。反対に、Rosn 等<sup>11)</sup> は、健康児、鎌状赤血球患者、新生児と全血中鉛量の各々のレベル ( $20 \sim 136 \mu\text{g}/100\text{g}$ ) とヘマトクリットの影響について検討した結果、いずれの影響も受けず、血漿中鉛量は変化しない事を報告している。また、clarkson 等<sup>12)</sup> は、in vitro において、全血中鉛量  $35 \sim 123 \mu\text{g}/100\text{g}$  の時、血漿中鉛量のレベルは一貫して約  $3 \mu\text{g}/100\text{g}$  であったと報告している。ハトの場合、図5に示されているように、投与開始後、血漿中鉛量は増加することを表わしている(10週目から14週目まで減少していたが、この原因については不明である)。このように、ヒトの場合と異なり、強制的に連続して鉛を投与した時、投与量に応じて血漿中鉛量が上昇し、当初の分配比が変化した。しかし、投与期間中は、ほぼ1:20の割合を示していた。ヒトにおいて<sup>13)</sup> も、ハトでも<sup>4)</sup>、赤血球は、侵入してきた鉛の“保護的な”貯蔵庫としての役割を果たしていると報告されている。死亡したハト臓器中鉛蓄積量は、表2に示した。腎臓と大腿骨中の鉛量は、都心部に生息しているドバトの蓄積量<sup>1)</sup> の約10倍ぐらい高いことがみられた。表3の20週間生存したハトの臓器中鉛量も同様な蓄積を示したが、鉛投与量が多いほど、多く蓄積していた。生体内に取り込まれた鉛は、主として、骨組織に蓄積することは、ヒト、ラット、犬等で既に知られている<sup>14-20)</sup>。ドバトの野外調査によれば<sup>1)</sup>、

Table 2. Lead Concentration in Organs of the Pigeons died before 20 Weeks

| Group No. | B. W.* | Liver** | Kidney** | Femur** |
|-----------|--------|---------|----------|---------|
| A 4       | 214±31 | 7.7±2.8 | 24.4±4.4 | 259±65  |
| B 1       | 314    | 3.8     | 19.5     | 239     |
| C 1       | 232    | 14.7    | 30.6     | 203     |
| D 1       | 190    | 0.4     | 1.9      | 3.0     |

\*: Body Weight (g)

\*\*: Expressed on a wet basis ( $\mu\text{g/g}$ )

Table 3. Lead Concentration in Organs of the Pigeons Survived for 20 Weeks

| Group No. | Body Weight | Liver*  | Kidney*   | Femur*  |
|-----------|-------------|---------|-----------|---------|
| B 3       | 331±25g     | 4.0±1.1 | 40.6±13.5 | 312±118 |
| C 4       | 315±16      | 2.8±0.4 | 24.1±6.0  | 198±47  |
| D 2       | 343±27      | 0.2±0.1 | 0.9±0.1   | 4.4±3.9 |

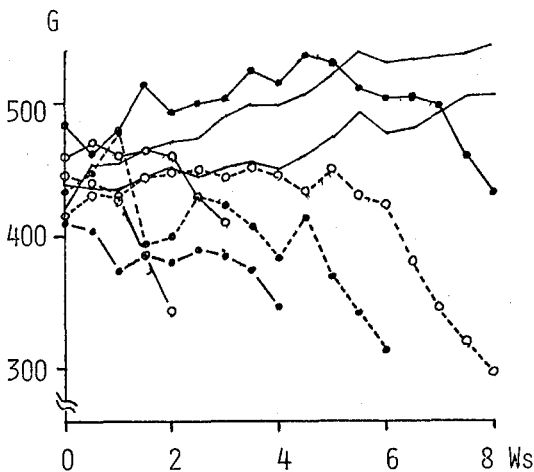
\*: Expressed on a wet basis ( $\mu\text{g/g}$ )

Fig. 6. Chronological Change of Individual Body Weight

Control Pigeon : —

Administered Pigeon :

○—○, ○—○, ○—○  
●—●, ●—●, ●—●

汚染地区の大腿骨中鉛量は、対称地区の約10倍ぐらいであった。今回の長期投与実験では、約70~120倍も多く蓄積しており、ハトにおいても、骨は主たる蓄積部位と考えられる。

実験2：図6よりレース鳩の体重変動は、コントロー

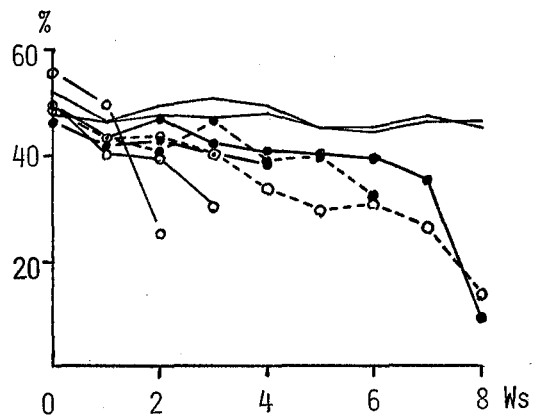


Fig. 7. Chronological Change of Individual Hematocrit

Control Pigeon : —

Administered Pigeon :

○—○, ○—○, ○—○  
●—●, ●—●, ●—●

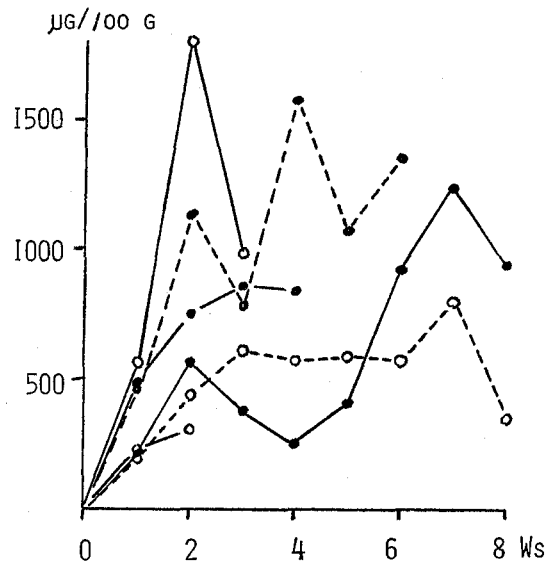


Fig. 8. Chronological Change of Lead in Individual Whole Blood

Administered Pigeon :

○—○, ○—○, ○—○  
●—●, ●—●, ●—●

ル群の2羽を参考にとすると、実験1のドバトよりも少なく、次第に増加していた。鉛投与群の平均体重は、7週目まで大幅な減少は認められなかったが、しかし、個々のハトにおいては、体重減少の現われ方が異なっており、同様に、死亡あるいは衰弱した時期も、2, 3, 4,

6, 8週目とバラツキが認められた。この時の平均体重は、約350gであり、ドバトの死亡時は約220gで、いずれも、初期体重より100g以上減少すると、死亡する臨界域に達すると思われる。ヘマトクリット(図7)について、コントロール群は、実験期間中45%~50%と正常値内であった。鉛投与群は、体重の個々の減少期に一致して、低値を示した。特に、8週目まで生存した2羽のヘマトクリットは、9.0, 13.5%と極端に低い値を示した。血中鉛(図8)は、6羽中4羽が500 $\mu$ g/100g以上まで上昇した。個々の違いはあるが平均値でみるならば、500~1000 $\mu$ g/100gのレベルにあり、1000 $\mu$ g/100g以上を示したのは、3羽であった。Barthalmus等<sup>4)</sup>は、我々と同じ程度の経口投与で、最高3470 $\mu$ g/dlを示した1羽の例外を除いては、ほぼ500~1000 $\mu$ g/dlのレベルにあり、我々と同様の結果を示していた。更に、全血中の95%が赤血球中鉛量であるとし、ヘマトクリットより補正した推定計算値を試みるならば、ドバトに比較して、多くの鉛が、赤血球に蓄積していると考えられた。形態学的所見について、腎上皮細胞に核封入体形成が認められたが、有核赤血球には、核封入体の特徴である線維状構造も観察されなかった。電顕標本試料の元素分析では、オスミウムのL<sub>β2</sub>が鉛のL<sub>α</sub>と一部重複する事から、コンピューターを用い、補正した結果、腎の核封入体には明らかに、そして赤血球核内にも鉛が沈着しているが、正確な量の評価のためには、なお種々の検討が必要である。Goyer等<sup>21-23)</sup>を始めとする研究者が、種々の動物に、鉛を大量に与えた場合、腎の上皮細胞核に、鉛を含む核封入体が存在することを報告している。我々の実験において初めて、ハトの腎上皮細胞内にも核封入体が存在し、鉛が蓄積していることを確認した。ハト赤血球の核封入体は、認められなかったが、明らかに、鉛が赤血球内の局所的に高濃度に存在する事が観察された。しかしながら、赤血球の核封入体については、Barthalmus等<sup>4)</sup>が、形成を報告していることから、この核封入体の有無についての論議は、ハトの特に赤血球内の鉛の蓄積とその毒性発現機構を解明するうえで重要な課題であると考ええる。

#### 要 約

ハトは、都市環境中でも、実験的にも、高濃度の血中鉛濃度を保ちつつ生存しうる。

この機作を説明するものとして、赤血球中に形成された核封入体に鉛が蓄積することが示唆されているため、我々は、これが事実であるか否かを解明しようとした。

ドバト21羽、レース鳩8羽を用い、6.25, 12.5, 25,

45.8mg/kgの酢酸鉛を強制的連続経口投与し、体重、ヘマトクリット、血液および臓器中鉛、電顕による核封入体の確認と元素分析を行った。

各鉛の投与量に応じて、各パラメーターの変化が認められたが、赤血球核封入体は、電顕的に認められなかった。しかし、X線アナライザーによると、明らかに赤血球核内に鉛の蓄積がみられた。この現象が、鉛毒性に対するハトの防御機構の一助として働いていることが示唆される。

(本研究は、昭和56年度当研究所調査研究課題「重金属汚染の生体影響に関する研究」として実施し、その概要は日本衛生学会第51回総会1981年5月で発表した。)

#### 文 献

- 1) Ohi, G., Seki, H., Akiyama, K. and Yagyū, H.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 12, 92, 1974
- 2) Ohi, G., Seki, H., Minowa, K., Ohsawa, M., Mizoguchi, I. and Sugimori, F.: *Environ. Res.*, 26, 125, 1981
- 3) Ohi, G., Seki, H., Minowa, K., Mizoguchi, I. and Sugimori, F.: *Arch. Toxicol.*, 46, 265, 1980
- 4) Barthalmus, G. T., Leander, J. D., McMillan, D. E., Mushak, P. and Krigman, M.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 42, 271, 1977
- 5) Hessel, D. W.: *Atom. Absorp. Newsletter*, 7, 55, 1968
- 6) 日本薬学会編: 衛生試験法, 注解, 1980, 6, 1980, 金原出版
- 7) 関 比呂伸: 未発表資料
- 8) 関 比呂伸: 未発表資料
- 9) Desilva, P. E.: *Brit. J. Industr. Med.*, 38, 209, 1981
- 10) Cavalleri, A., Minoia, C., Pozzoli, L. and Baruffini, A.: *ibid.*, 35, 21, 1978
- 11) Rosen, J. F., Zarate-Salvador, C. and Trinidad, E. E.: *J. Pediatr.*, 84, 45, 1974
- 12) Clarkson, T. W. and Kench, J. E.: *Biochem. J.*, 69, 432, 1958
- 13) Goyer, R. A.: *Am. J. Pathol.*, 64, 167, 1971
- 14) Cantarow, A. and Trumper, M.: *Lead Poisoning*, 1944, Williams and Wilkins, Co., Baltimore
- 15) National Research Council: *Lead. Airborne lead in perspective*, 1972, Natl. Acad. Sci., Washing-

- ton, D. C.
- 16) Blac, S. C.: *Arch. Environ. Health*, 5, 423, 1962
- 17) Schroeder, H. A., Bratteboro, Vt. and Tipton, I. H.: *ibid.*, 17, 965, 1968
- 18) Castellino, N. and Aloj, S.: *Brit. J. Industr. Med.*, 21, 308, 1964
- 19) Barry, P. S. I. and Mossman, D. B.: *ibid.*, 27, 339, 1970
- 20) Barry, P. S. I.: *ibid.*, 32, 119, 1975
- 21) Goyer, R. A., May, P., Cates, M. M. and Krigman, M. R.: *Lab. Invest.*, 22, 245, 1970
- 22) Goyer, R. A., Leonard, D. L., Moor, J. F., Rhyne, B. and Kringman, M.: *Arch. Environ. Health*, 20, 705, 1970
- 23) 村上正孝: 産業医学, 13, 37, 1971



*Trichomonas gallinae* に対するハトの免疫応答に及ぼす鉛の影響

菱 輪 佳 子<sup>\*1</sup>, 関 比 呂 伸<sup>\*2</sup>, 鈴 木 昇<sup>\*2</sup>, 鈴 木 重 任<sup>\*1</sup>  
寺 山 武<sup>\*3</sup>, 溝 口 勲<sup>\*2</sup>, 村 上 正 孝<sup>\*\*</sup>, 杉 森 文 夫<sup>\*\*\*</sup>  
岩 間 三 郎<sup>\*\*\*\*</sup>, 長 橋 捷<sup>\*\*\*\*\*</sup>, 大 井 玄<sup>\*\*\*\*\*</sup>

Influence of Lead on Immunological Response of Pigeon (*Columba livia* var)  
to the *Trichomonas gallinae*

KEIKO MINOWA<sup>\*1</sup>, HIRONOBU SEKI<sup>\*2</sup>, NOBORU SUZUKI<sup>\*2</sup>, SHIGETOU SUZUKI<sup>\*1</sup>,  
TAKESHI TERAYAMA<sup>\*3</sup>, ISAO MIZOGUCHI<sup>\*2</sup>, MASATAKA MURAKAMI<sup>\*\*</sup>,  
FUMIO SUGIMORI <sup>\*\*</sup>, SABURO IWAMA<sup>\*\*\*\*</sup>, MASARU NAGAHASHI<sup>\*\*\*\*\*</sup>  
and GEN OHI<sup>\*\*\*\*\*</sup>

We found high incidence of "Muget's disease" (*Trichomonas gallinae* infection) among pigeons caught in Shibuya bus terminal area. On the other hand, it was reported that even a subclinical level of lead in blood can reduce the humoral immunity. It is reasonable to assume therefore that the environment highly polluted with lead around the bus terminal may reduce the humoral immunity of pigeons and in turn increase the susceptibility to the infection. We planned this experiment to see whether this hypothesis is true.

Agglomeration and agglutination titers of immune pigeon sera vary according to strains. Agglomeration titer reached the maximum within an hour and then lowered as dissociation process of aggregate. Agglutination titer reached the plateau in one or two hours.

*T. gallinae* (Nichiju strain) was placed orally in two conditions of pigeons; lead loaded pigeons, and those administered with lead and are malnourished. Although *T. gallinae* could survive in the crop of some pigeons, all were resistant to infection.

The fresh *T. gallinae* after isolation was placed orally in the five racing pigeons; one was infected with *T. gallinae* and died after 16 days. It was concluded that virulence was different according to the strains and can be changed by incubation.

**Keywords :** pigeon, *Trichomonas gallinae*, lead, immune response

緒 言

生活空間が一定で、呼吸量が非常に多い等の特性をもつドバト(*Columba livia* var)が鉛による環境汚染の生物指標として有効であることを我々は報告してきた<sup>1-3)</sup>。環境中の鉛濃度が高い渋谷駅バスターミナル付近で捕獲したドバトには、*Trichomonas gallinae*(*T. gallinae*)によるミュゲ氏病の発生頻度が高いことが杉森等によ

り報告されている<sup>4)</sup>。*T. gallinae* はドバトの嗦のうちに常在している原虫であることは周知のことであり、ミュゲ氏病は、この *T. gallinae* により引き起こされる疾病である。

ミュゲ氏病の発症においては、免疫応答を抑制する鉛<sup>5-9)</sup> が何らかの形で関与し、その感染は opportunistic typeであることが予想された。そこで鉛の前投与により

<sup>\*1</sup> 東京都立衛生研究所精度管理室 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

<sup>\*2</sup> 同環境保健部環境衛生研究科

<sup>\*3</sup> 同微生物部細菌第二研究科

<sup>\*</sup> Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

<sup>\*\*</sup> 筑波大学社会医学系

<sup>\*\*\*</sup> 山階鳥類研究所

<sup>\*\*\*\*</sup> 岩間動物病院

<sup>\*\*\*\*\*</sup> 東京大学医学部衛生学教室

鉛に汚染されたハトおよび鉛投与に加え絶食・制限食による栄養不良状態のハトを用い、*T. gallinae* の感染実験を試みた。この感染に *T. gallinae* の virulence の差、継代期間による *T. gallinae* の変化がどのように影響するか同時に観察した。

また、*T. gallinae* の凝塊反応 agglomeration, 制動反応 immobilization, 凝集反応 agglutination といった基礎的な免疫反応についての観察結果をも加えてここに報告する。

### 実験方法

#### 1. 免疫血清による反応

1) 原虫 *T. gallinae* は日猷株（日本獣医畜産大学、石井博士より分与）と渋谷株（Ⅰ）（Ⅱ）（渋谷駅バスターミナル付近で捕獲したミューゲ氏病ドバトより分離）を使用した。*T. gallinae* の培養には Diamond 培地<sup>10</sup>（pH7.2調整）を使用し、2日毎に継代を行なった。至適培養温度は37℃である。

2) ハト免疫血清 日猷株の培養原虫を2000r.p.m., 10分遠心沈殿後、生理食塩水で2回洗浄を繰り返し、原虫浮遊液を作製した。体重300~350gのドバト4羽に以下のような免疫スケジュールで原虫を接種した。初めにホルマリン不活化原虫浮遊液（ $1 \times 10^7$ /ml）を0.5ml, 1.0mlと2回筋肉注射し、ついで同処理浮遊液1.5mlを静脈内注射した。その後、生原虫浮遊液（ $2 \times 10^7$ /ml）を1.0ml, 1.25mlと2回静脈内注射した。5回の接種は5日の間隔をおいて行なった。最終免疫から7日後に心臓採血を行ない血清を採取し、非働化後-20℃で保存した。対照として体重300g前後のドバト3羽に同様のスケジュールで生理食塩水を接種し、血清を採取した。

3) 抗原 凝塊反応、制動反応は生原虫を、凝集反応はホルマリン不活化原虫を用いた。

#### 4) 凝塊反応と凝集反応

反応時間の決定：日猷株、渋谷（Ⅱ）株各々 $2 \times 10^6$ 個と希釈した免疫血清0.5mlを、小試験管内で混ぜ37℃孵卵器中で反応させた。20分、40分、1、2、3、4、5時間毎にスライドガラス上に一滴を静かにとり、倒立顕微鏡下で観察した。反応強度の判定は中林の基準<sup>11</sup>に準じて行なった。

異株原虫間の凝塊価、凝集価の測定：抗原として日猷株、渋谷（Ⅰ）株を用い、抗日猷株血清との凝塊、凝集反応を上述の方法で行なった。先述の実験結果より、凝塊反応の反応時間は30分、凝集反応では2時間と定めて観察した。

#### 2. ハトへの *T. gallinae* 経口投与による発症

ドバト成鳥20羽をA~Dの4群に分け、Table 2の如く各量の *T. gallinae* 日猷株を1回経口投与した。幼鳥6羽を選びE群とした。1週間に2回体重測定、喙のうの触診を行なった。投与3週後喙のう中の *T. gallinae* 検出と解剖を行ない、肉眼的に口腔、喙のう、食道、筋胃、肝臓を観察した。

3. 鉛投与、栄養不良状態にあるドバトへの *T. gallinae* 感染、分離直後の *T. gallinae* 感染

1) 血中鉛濃度10 $\mu$ g/dl以下のドバト14羽をA・B群各4羽、C・D群各3羽に分け、A群酢酸鉛1000 $\mu$ g/kg、B群酢酸鉛500 $\mu$ g/kg、C群酢酸鉛250 $\mu$ g/kg、D群酢酸ナトリウムをそれぞれ6回/週、3週間腹腔内投与した。投与終了2日後に *T. gallinae* 日猷株をA~D群共に $1 \times 10^8$ 個/羽、1回経口投与した。一週間後、*T. gallinae* 検出、解剖を行なった。

2) ドバトを鉛投与群3羽、コントロール群3羽に分け、制限食、絶食により体重を減少させ、約20%減少した時点で酢酸鉛または酢酸ナトリウムを腹腔内投与した。鉛投与群の血中鉛濃度が100 $\mu$ g/dl以上になった時、*T. gallinae* 日猷株 $2 \times 10^8$ 個を上顎から咽頭にかけ針先で傷をつけた部位に塗布しながら経口投与した。2週間後、*T. gallinae* 検出、解剖を行なった。

3) 体重約320g、喙のう中 *T. gallinae*（-）のレースバト5羽にミューゲ氏病ドバトより分離した新鮮（分離後1週間継代保存）な *T. gallinae* 渋谷（Ⅱ）株 $5 \times 10^7$ 個/羽を上述のように傷をつけた部位に塗布しながら経口投与し、5週間観察した。

### 結果および考察

免疫血清による反応で、凝塊・凝集反応は *T. gallinae* の鞭毛がからみ合う形で集塊し菊花状となる。この状態は死原虫を用いる凝集反応よりも生原虫を用いた凝塊反応で、より顕著に認められる。5~10個の原虫が集塊し単個原虫もかなり多い場合を（+）、集塊が大きくなるにつれ（++）、（+++）、（++++）とした。反応価は（+）を示す最高血清希釈倍数で表わしたものである。また、鞭毛運動が止まる制動反応では、ほぼ全数に運動停止が認められた場合を（+）とし、制動価を求めた。

各反応の時間経過に伴う変化は、Fig. 1に示してある。日猷株を用いた凝塊反応の場合、凝塊価は反応開始後20分で最高値を示し、1時間持続、その後時間と共に低下し、集塊の解離が観察された。さらに最も血清濃度の高い部分では制動反応が生じているのが認められた。抗原として渋谷（Ⅰ）株を用いた反応では凝塊価は上がらず、制動現象も生じなかった。凝集反応の場合、1時間

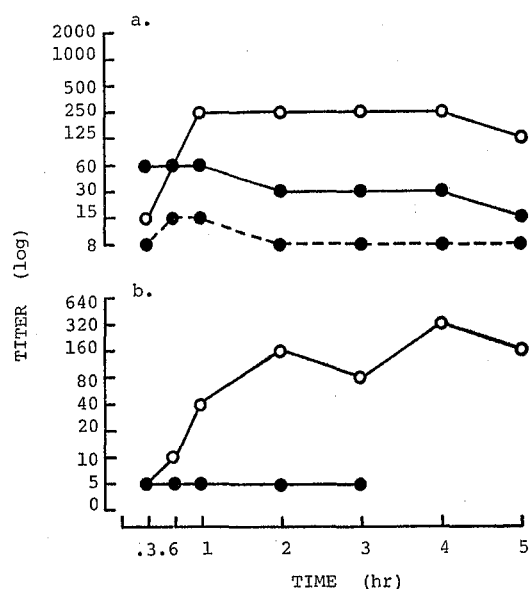


Fig. 1. Changes of agglomeration and agglutination titers against immunized serum as function of time

a: *T. gallinae* (Nichiju strain)  
b: *T. gallinae* (Shibuya (I) strain)  
—○— agglutination titer  
—●— agglomeration titer  
--- immobilization titer

後まで、日獣株の凝集価は上昇し、以後持続した。渋谷(I)株は2時間まで上昇を続け、それ以後多少の変動はあるがプラトーに達した。解離による凝集価の低下は認められなかった。以上より、両反応の判定に要する時間を凝塊反応30分、凝集反応2時間と決めた。

異株原虫間の反応価は、同株原虫間よりも凝塊・凝集反応いずれにおいても低く、株による特異性が観察された (Table 1)。ドバト4羽は同株原虫、同一方法で免疫されたにもかかわらず凝塊価で640倍まで上昇した個体と80倍にとどまった個体があり、*T. gallinae* に対する各個体の感受性にも差があることが示唆される。bovine serum albumin でドバトを免疫した Guttman 等<sup>12)</sup>は、鳥類の中でもドバトの抗体産生能は遅くかつ低いことを報告している。ドバトを *T. gallinae* で免疫した我々の実験でも抗体価の上昇は認められたが、その値が低いことから一般にドバトの免疫能は低いと推測できる。我々が行った他の実験によると、靖国神社で捕獲した喉のうち *T. gallinae* (+) 3羽、*T. gallinae* (−) 2羽から得た血清の日獣・渋谷(II)株に対する両反応価はいずれ

Table 1. Agglomeration and agglutination titers on the two strains of *Trichomonas gallinae*

|          | Agglomeration   |    |     |     |               |    |   |  |
|----------|-----------------|----|-----|-----|---------------|----|---|--|
|          | Immunized Group |    |     |     | Control Group |    |   |  |
|          | 1               | 2  | 3   | 4   | 1             | 2  | 3 |  |
| Strain A | 80              | 80 | 640 | 320 | 5             | <5 | 5 |  |
| Strain B | <5              | 5  | 5   | <5  | 5             | <5 | 5 |  |

|          | Agglutination   |    |     |     |               |   |    |  |
|----------|-----------------|----|-----|-----|---------------|---|----|--|
|          | Immunized Group |    |     |     | Control Group |   |    |  |
|          | 1               | 2  | 3   | 4   | 1             | 2 | 3  |  |
| Strain A | 160             | 80 | 320 | 320 | 10            | 5 | 5  |  |
| Strain B | 40              | 40 | 40  | 80  | 10            | 5 | 20 |  |

Strain A: Nichiju strain

Strain B: Shibuya (II) strain

も20倍以下で差はなかった。反応価が低いことから非特異反応によるものと考えられ、通常の生息状態での喉のうち *T. gallinae* 定着の有無が反応価へ影響する事実は認められなかった。自然感染において抗体価が上昇するか否かについてはより詳細な検討を要するであろう。

ドバト26羽に各量の *T. gallinae* を経口投与した結果を Table 2 に示した。A〜E 群共に体重での顕著な変動はなかった。投与量の少ないD群では *T. gallinae* の定着したドバトはなかったが、A群2羽、B群1羽、C群3羽には定着を確認した。しかし、投与量と定着との間に相関は認められなかった。親バトから子バトへの pigeon milk によるトリコモナス感染の発生<sup>13)</sup>、体力が弱いなどにより幼鳥においてミューゲ氏病の発生が高いことより幼鳥6羽を用いて *T. gallinae*  $1 \times 10^8$  個を投与した。幼鳥といえども成鳥に近かったという事もあるが、*T. gallinae* 定着において成鳥との差は認められなかった。野外調査等で観察したミューゲ氏病のハトでは、咽頭深部、前胃に続く喉のう部にチーズ状の膿瘍が生じ、食物通過が妨害され衰弱死に至るように観察されたが各臓器特に肝臓の壊死を生じ死亡する<sup>16)</sup>ケースの報告もある。この実験で、死亡したハトはなく、顕性病的状態は全羽共認められなかった。

Stabler 等は、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^4$  個の *T. gallinae* をハトに経口投与すると平均8.2日で95.8%を死亡させる virulence の強い株<sup>14,15)</sup>、8羽中2羽にごくわずかな咽候壊死を起こすだけの virulence の弱い株<sup>16,17)</sup>等があることを報告している。今回用いた日獣株では発症が認め

Table 2. Changes of body weight and *T. gallinae* in crop of pigeons to *T. gallinae* peroral injection

| Group | <i>T. gallinae</i><br>(organisms/pigeon) | Pigeons<br>(No.) | 0-Day              |                             | 21-Days            |                             |
|-------|------------------------------------------|------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|
|       |                                          |                  | Body weight<br>(g) | <i>T. g.</i> (+)<br>in crop | Body weight<br>(g) | <i>T. g.</i> (+)<br>in crop |
| A     | $2 \times 10^8$                          | 5                | $313 \pm 23$       | 0/5                         | $286 \pm 34$       | 2/5                         |
| B     | $1 \times 10^8$                          | 5                | $314 \pm 21$       | 0/5                         | $286 \pm 36$       | 1/5                         |
| C     | $1 \times 10^7$                          | 5                | $312 \pm 15$       | 0/5                         | $300 \pm 28$       | 3/5                         |
| D     | $1 \times 10^6$                          | 5                | $320 \pm 22$       | 0/5                         | $296 \pm 28$       | 0/5                         |
| E     | $1 \times 10^5$                          | 6                | $253 \pm 29$       | 0/6                         | $251 \pm 23$       | 1/6                         |

られず、ミューゲ氏病のハトより分離した *T. gallinae* ではあるが、非常に virulence の弱い株であったと思われる。さらに分離後約6ヶ月間継代培養していた株であり、長期継代により virulence が減弱<sup>15)</sup>したことも考えられる。

鉛はマウス・ラットにおいて免疫応答能減弱<sup>5-9)</sup>、サルモネラ菌<sup>18)</sup>、エンドトキシン<sup>19)</sup>に対する抵抗性の減少を引き起こす。ハトでは喉のうのぜん動運動障害<sup>20)</sup>を引き起こし食物等の移動を遅くさせる。mullard duck では前胃に障害<sup>21)</sup>を与える等の報告もあることから、ドバトに予め鉛投与を行ない、*T. gallinae* 感染を試みた。3週間の鉛連続投与では体重の減少はなかったが、A.  $81.2 \pm 3.6 \mu\text{g/dl}$  B.  $58.3 \pm 10.7 \mu\text{g/dl}$  C.  $79.6 \pm 2.5 \mu\text{g/dl}$  と血中鉛濃度は上昇していた。一部のハトに *T. gallinae* の定着が認められたのみで、肉眼的観察ではコントロール同様変化はなかった。A群の3羽について凝集・凝塊反応を行なったが反応価の上昇はなく1回経口投与で抗体産生は起こらないことが示された。鉛投与と同時に体重を20%減少させた3羽にも、感染ならびに発症は認められなかった。

新鮮な *T. gallinae* 渋谷(Ⅱ)株を投与したレースバト5羽中1羽に、7日目から針先で傷をつけたと思われる部位にチーズ状の固まりが認められ次第に大きくなり、16日目に死亡した。死亡時の体重は40%近く減少していた。同様に7日目からチーズ状の固まりを認めた他の1羽では、次第に消失した。このように5羽中1羽ではあるが、ミューゲ氏病の発症をみたことは、使用した原虫が virulence の比較的強い株であり、継代期間も短かい株であったことに因るであろう。

今回の報告では、ハトにおけるミューゲ氏病の発生が鉛の関与する opportunistic type の感染であるとの推論は否定されたが、一概に opportunistic infection ではないと断定することもできないであろう。感染実験に使用

した *T. gallinae* は virulence が非常に低いものであり、そのような株を用いての感染には、鉛投与あるいは若干の体重減少という宿主側の変化が影響しないならば、virulence が強くかつ新鮮な *T. gallinae* を用い鉛の影響を再度観ることが必要と考える。また、*T. gallinae* 多量を1回投与しているのみであるが、自然界の感染では少量に繰り返し曝露されていることが考えられる。今後、環境中の鉛汚染とミューゲ氏病発生の関連を調査していく上の課題となろう。

#### 摘 要

ドバトから分離した *T. gallinae* を用いて免疫反応(凝塊・凝集反応)を行ない基礎的な現象を観ると共に、免疫応答の抑制を引き起こす鉛の前投与、栄養不良状態にいるハトへの *T. gallinae* 感染実験を試みミューゲ氏病の発症が opportunistic infection によるものか観察する。さらに、*T. gallinae* の virulence の差についても検討する。

1. 免疫ハト血清は、凝塊・凝集反応共株により反応価が異なり、株特異性が観られた。

2. 凝塊反応価は、反応開始後1時間最高値を持続し、以後凝塊解離と共に減少した。凝集反応価は、1～2時間まで上昇し、その後も持続した。

3. 鉛投与のみ(血中鉛濃度  $70 \mu\text{g/dl}$  前後)、鉛投与(血中鉛濃度  $100 \mu\text{g/dl}$  以上)と体重20%減少状態下のハトに *T. gallinae* 日猷株を経口投与したが、一部に *T. gallinae* の定着が確認されたのみで、発症した個体はなかった。

4. 分離後1週間の新鮮な *T. gallinae* 渋谷(Ⅱ)株を投与した場合、5羽中1羽が発症後死亡し、継代期間、virulence による差が認められた。

(本研究は昭和56年度当研究所調査研究課題「重金属汚染の生体影響に関する研究」として実施したものである。)

#### 文 献

- 1) Ohi, G., Seki, H., Akiyama, K. and Yagyu, H. : *Bull. Environ. Contami. Toxicol.*, 12, 92, 1974
- 2) Ohi, G., Seki, H., Minowa, K., Ohsawa, M. and Mizoguchi, I. : *Environ. Res.*, 26, 125, 1981
- 3) 関 比呂伸, 大沢誠喜, 今野ヒロ子等 : 東京衛研年報, 28-1, 224, 1977
- 4) 杉森文夫, 中村文夫, 久米宗男 : ドバト害防除に関する基礎的研究, 58, 1979, 山階鳥類研究所
- 5) Koller, L.D. : *Amer. J. Vet. Res.*, 34, 1457, 1973
- 6) Koller, L.D. and Kovacic, S. : *Nature*, 250, 148, 1974
- 7) Koller, L.D., Exon, J.H. and Roan, J.G. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 151, 339, 1976
- 8) Koller, L.D. and Brauner, J.A. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 42, 621, 1977
- 9) Gaworski, C.L. and Sharma, R.P. : *ibid.*, 46, 305, 1978
- 10) Diamond, L.S. : *J. Parasitol.*, 46, 484, 1960
- 11) 中林敏夫 : 大阪大学医学雑誌, 4, 11, 1952
- 12) Guttman, R.M., Tebo, T., Edwards, J., Barboriak, J.J. and Fink, J.N. : *J. of Immunology*, 106, 392, 1971
- 13) 岩間三郎 : 私信
- 14) Stabler, R.M. and Kihara, J.T. : *J. Parasitol.*, 40, 706, 1954
- 15) Stabler, R.M., Honigberg, B.M. and King, V. M. : *ibid.*, 50, 36, 1964
- 16) Stabler, R.M. : *ibid.*, 34, 147, 1948
- 17) Stabler, R.M. and Braun, C.E. : *J. of Wildlife Disease*, 11, 482, 1975
- 18) Hemphill, F.E., Kaeberle, M. L., Buck, W.B. : *Science*, 172, 1031, 1971
- 19) Selye, H., Tuchweber, B. and Bertók, L. : *J. of Bacteriology*, 91, 884, 1966
- 20) Cory-Slechta, D.A., Garman, R.H. and Seidman, D. : *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, 52, 462, 1980
- 21) Clemens, E.T., Krook, L., Aronson, A.L. and Stevens, C.E. : *Cornell Vet.*, 65, 248, 1975

## 東京都における循環器疾患死亡と社会・環境指標との関連性について

牧 野 国 義\*, 溝 口 勲\*

### Relationship between Mortalities from Diseases of the Circulatory Systems and Social and Environmental Indices in Tokyo

KUNIYOSHI MAKINO\* and ISAO MIZOGUCHI\*

Recently it became known that the mortality from diseases of the circulatory systems is closely related with social and environmental factors, such as medical facilities, industrial structure, living environment and eating habit. In addition, it has been also become to be known that regional differences in the mortality were also caused by these factors.

In this report, mortality from circulatory diseases (total cardiopathy, ischemic heart diseases, hypertension and cerebrovascular diseases) and 28 social and environmental indices (8 indices on residents, 4 on industry, 7 on living environment, 4 on public welfare and 5 on pollution) in Tokyo were used for the analysis, and the relationship of these mortality rates with these indices was statistically studied.

The obtained results were as follows.

(1) The mortality from the total cardiopathy (age group: 65—) and the cerebrovascular diseases (age group: 45—64) showed significant differences among 6 blocks of Tokyo divided by socio-economic factors.

(2) The mortality from the total cardiopathy (age group: 65—) and the hypertension (male) correlated significantly with the indices of residents, e.g. the income or the status in work. The mortality from the cerebrovascular diseases was particularly closely associated with the indices of the income and the living space.

**Keywords :** Mortality, Social index, Environmental index, Disease of circulatory system

#### 1. 緒 言

虚血性心疾患などの心臓病や高血圧性疾患および脳出血、脳梗塞などの脳血管疾患を含む循環器疾患の死亡率は、その地域における医療施設、産業構造、住環境、食生活などの社会的、経済的、環境的要因や医師の診断習慣などによって影響を受けているといわれている。そのために死亡率の地域差が大きく、例えば我が国で悪性新生物に次ぐ死因順位2位の脳血管疾患死亡率では、昭和50年の都道府県別地域格差をみると、最高率の秋田県は最低率の香川県に比べて約2倍であった。東京都の脳血管死亡率は全国平均以下であるが、東京都内部の地域差を考慮すると、全国平均を上回る地域のあることが推定されている<sup>1)</sup>。

この研究は、上記地域差を生じた中年期、高年期の循環器疾患（全心疾患、虚血性心疾患、高血圧性疾患、脳

血管疾患）死亡について、社会的、環境的要因との関連性を統計学的手法を用いて検討したものである。

#### 2. 方 法

##### (1) 死亡指標

特定死因死亡の地域差を検討する場合に、死亡指標の選択にはいくつかの点に注意しなければならない。先ず第1に、地域により年齢構成が異なると考えられるので、死亡指標は年齢で訂正された指標を用いる必要がある。福富は死亡指標としてSMRが適当であると述べ<sup>2)</sup>、杉田らは年齢訂正比較頻度を提案している<sup>3)</sup>。また、Mantelらは訂正死亡率を応用した比率の標準化を試みている<sup>4)</sup>。このほかにも生命表を応用した指標<sup>5)</sup>などが提案されているが、どの指標が最良であるかは明らかでない。要は年齢構成の地域間の相違による死亡指標への相対的影響を除去することにあり、除去されたならばどの

\* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

指標を用いても差しつかえないと思われる。恐らく大きな人口地域の場合にはどの指標でも相対的に大差ないであろう。大谷らはむしろ死亡頻度に対する地域の人口規模を問題としている<sup>9)</sup>。小人口規模の地域では死亡率の標準誤差が大きくなるからで、一般にその対策として数年間分のデータを合わせて死亡率を算出し、値の信頼性を確保している。一方、一定人口規模を確保するために地域分析からの検討がなされており<sup>7,8)</sup>、代表的な一つの方法が地域メッシュ統計である。地域メッシュとは、日本全国を緯度と経度を基準に網目状に分割したもので、現在統計用の標準地域メッシュとしてJISに採用され、規格化されている<sup>9)</sup>。地域メッシュ統計には、市町村合併の影響を受けないこと、時系列解析や各種のデータリサンキングが可能で、メッシュの統合で自由に大きさを変えられること、位置表示が簡単で明確なことなどの利点があり、コンピュータの利用によりいろいろな解析、シミュレーションが可能になった。大久保らは死亡統計におけるメッシュ区分を検討して東京都23区のがん死亡や東京都の主要死因別死亡の地理分布を報告している<sup>10,11)</sup>。今後ますます充実が予想され、望まれるメッシュ統計であるが、伊藤が述べるように<sup>12)</sup>、全く批判がないわけではない。その一つは、各種の情報が地域メッシュ編集を前提に収集されていると限らず、矩形の地域メッシュではその地域を代表し難い場合が多いこと、したがって、市区町村レベルで地域メッシュを用いる場合、一辺を250mのような小さいメッシュにしなければ現実との適合性が得られないことである。

本研究で用いた死亡統計は、昭和50年から52年の東京都23区26市(49地区)の循環器疾患の4特定死因(全心疾患、虚血性心疾患、高血圧性疾患、脳血管疾患)死亡で、死亡指標として、45~64歳、65~歳、0~歳(全体)の訂正死亡率を用いた。年齢をこのように区分すると死亡率の基礎となる人口、死亡数が減少し、精度が低下する。しかし、わが国の45~64歳といった働き盛りの脳血管疾患死亡は欧米諸国の2、3倍の高率であり、また、高齢者が年次的減少傾向にあるのに対し、40~60歳代では明らかな傾向が認められていないなど<sup>13)</sup>、両年代とも検討すべきであると考えられる<sup>14)</sup>。ただし、3年間の死亡統計を年代別にとる場合、死亡率の精度の点から通算人口10万人以下の東京都6町村については除外せざるを得ない。訂正死亡率を指標とする場合には標準人口が問題となる<sup>2)</sup>。本研究では死亡率の絶対値を問題にしないので、通例用いられることの多い20年毎の標準人口でなく、調査年度に含まれる昭和50年の国勢調査による全国

人口を標準人口とした。さらに、本研究は後述の理由で地域メッシュ統計を採用しなかった。

## (2) 社会・環境指標

我々の生活に関連する社会指標、環境指標(両指標を併せて社会・環境指標と記す)は数限りなく、資料が得られる指標だけでも指標間の組み合わせを行うことにより相当数の指標を得ることができる。しかし、一方では重要と思われる指標が得られないことも多い。例えば、循環器疾患死亡は喫煙により大きな影響を受けることが考えられ、平山らの報告でもその影響が確認されている<sup>15)</sup>。この喫煙の指標は特殊の実験計画に基づいて得られた指標であり、一般には得られない指標である。また、Masironiが述べる食品や飲料水からの微量元素の影響<sup>16)</sup>についても重要ではあるが、適当な指標を得ることは容易でない。したがって、得られた指標を吟味し、死亡との関連を仮説できる指標を選択する必要がある。例えば、病院数は医療面で重要な指標であるが、各地域の人口、面積は均一でないので、医療の充実性を示す指標としては一定人口当りで、応急体制を示す指標としては面積で割った値として初めて効果的な指標となり得る。これらの社会・環境(または社会経済)指標を用いて死亡との関連性を検討した報告はいくつかあるが、産業や職業に関する指標を用いた報告が多いようである。丸地らは12種の産業、10種の職種について肺がん死亡との統計的分析を行い<sup>17)</sup>、永田は産業に関する指標を含む11種の社会変数と年代別死亡率との関連性を検討している<sup>18)</sup>。また、山本らは産業や職業に関する指標のほか、栄養摂取、気候、医療などから計38種の指標を選び、12死因死亡との関連性を検討した<sup>19)</sup>。これらの報告はいずれも地域を行政区別(都道府県別、市区町村別)にしており、同様に、愛知県における循環器疾患死亡と13種の産業に関する指標との関連性を検討した青木ら<sup>20)</sup>は、地域を市区町村単位とする長所として、各種の統計資料が既に得られていること、よって多数の関連要因を検討できること、地域内の社会経済的構造、自然環境、生活習慣が比較的均一であることを挙げている<sup>20)</sup>。一方、大久保は地域メッシュ統計を用いて東京都における主要死因別死亡と24社会経済指標との関連性を検討した<sup>21)</sup>。この24指標は全て国勢調査報告によるものである。

この研究では、循環器疾患死亡が多関連要因を有することを考慮して地域メッシュ統計を採用しなかった。しかし、余り多くの社会・環境指標を選択しても解釈が困難となる。そこで、以下のように社会・環境指標を5項目、28指標とし、Table 1に示した。

Table 1. 解析に用いた社会・環境指標

| 項目  | 番号 | 社会・環境指標                     |
|-----|----|-----------------------------|
| (1) | 1  | 所得額（納税者一人当り）                |
|     | 2  | 預貯金対数値（人口一人当り）              |
|     | 3  | 高利得者数（人口千人当り）               |
|     | 4  | 完全失業率（男）                    |
|     | 5  | 家事兼就業率（女）                   |
|     | 6  | 管理的職業者率（男）                  |
|     | 7  | 単純労働者率（男）                   |
|     | 8  | 第一次産業従事者率                   |
| (2) | 9  | 乗用車登録台数（一平方キロ当り）            |
|     | 10 | 卸・小売商店数（人口千人当り）             |
|     | 11 | 工場密度                        |
| (3) | 12 | 工場従業者数（一工場当り）               |
|     | 13 | 畳数（人口一人当り）                  |
|     | 14 | 借家住宅比率                      |
|     | 15 | 下水道普及率                      |
|     | 16 | 病院数（人口十万人当り）                |
|     | 17 | 病院密度                        |
|     | 18 | 人口密度                        |
| (4) | 19 | 総人口に占める65歳以上の人口割合           |
|     | 20 | 健康保険受給率（被保険者百人当り）           |
|     | 21 | 保護率                         |
|     | 22 | 老人医療対象助成者数（人口千人当り）          |
|     | 23 | 財政歳出額（人口一人当り）               |
| (5) | 24 | 大気汚染健康被害者認定患者数<br>（人口十万人当り） |
|     | 25 | 騒音振動苦情受付数（一万世帯当り）           |
|     | 26 | ばい煙粉塵苦情受付数（一万世帯当り）          |
|     | 27 | ガス臭気等苦情受付数（一万世帯当り）          |
|     | 28 | 水質汚濁苦情受付数（一万世帯当り）           |

①地域住民に関する指標（所得，職種など8指標）

②地域の産業に関する指標（4指標）

③住宅または住環境に関する指標（7指標）

④国または自治体による厚生面の指標（4指標）

⑤地域の公害に関する指標（5指標）

## (3) 解析方法

まず，死亡率の地域差の意味を考えると，第1に，その地域差が有意であるか，第2に，その地域差が何故生じたかが問題となる．第1の問題で，大野らは統計的有意性を検討する方法は今のところないようだと言っている<sup>22)</sup>．直接的に検討する方法は困難であるかもしれないが，間接的な方法であれば次の考え方が可能である．つまり，地域性（地域の社会的環境的性質）の異なる地域

間で死亡率に有意な差があれば，その地域間に死亡率の差があると考えられる．したがって，地域性が同じような地区，できれば隣接地区を集めて一群とし群間の分散分析により検討することができる．

第2の問題で死亡率と社会・環境指標との関連性を検討するわけであるが，解析手法は必ずしも確立していないので，各研究者はそれぞれ工夫している．例えば，相関分析は比較的共通した手法であるが，永田はデータの対称性を確認するため  $g_1$  統計量<sup>23)</sup>を用いて変数変換している<sup>19)</sup>．統計学的にはより有効であるが，余り複雑な変数変換を行うと解釈しにくい場合が生じる．Table 1 中の指標番号2の人口1人当り預貯金については偏りが大きい対数正規型の分布であったので対数変換のみを行った．また，稲葉らは因子分析により検討している<sup>24)</sup>．本研究では相関分析，主成分分析を用い，さらに以下の解析を行った．各死亡率毎に49地区を大きさ順に並べて上位，下位より10地区ずつを選んだとき，上位と下位の死亡率の平均値に有意差が認められた場合，仮に同じ地区の社会・環境指標の平均値に有意差が認められたとすると，この社会・環境指標は死亡率の上位，下位の差に寄与した可能性が高いと推定される．よって，この手法は相関分析よりも死亡への寄与度の解析に重点を置いたと言える．

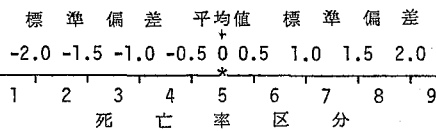
## 3. 結果および考察

## (1) 各死因死亡の地理分布と地域性間の差

まず，参考のために，脂血管疾患死亡の男子45～64歳と65～歳の地理分布を Fig. 1 に示した．地図中の数字は死亡率の高さを表わし，5 が平均値  $\pm 0.5$  標準偏差の範囲にある死亡率を示し，5 より上の数字は0.5 標準偏差ずつ増した範囲の死亡率であることを示す．ただし，9 は平均値  $+2.0$  標準偏差以上の死亡率範囲を示す．5未満の数は対称的な範囲の死亡率である．両分布とも明らかに地域集積性が認められる．しかし，年代による違いは必ずしも明らかでない．各死亡率高さのヒストグラムを分布図左に示した．両分布で尖度に違いはあるが，ほぼ正規性を保持し，正規分布を前提とした検定手法の利用が有効であることが確認された．女子の場合にもほぼ類似した地理分布を示し，また他の3疾患死亡についても分布の正規性が確認された．

Fig. 2 に6地域性の分布地図を示した．この区分は，昼夜間人口比，人口密度，工場密度および28社会・環境指標による主成分分析での因子得点分布図より決定した．6地域性の区分は次のように特徴づけることができる．





(a) 45～64才(男)



(b) 65～才(男)

Fig. 1. 脳血管疾患死亡率の地理分布



Fig. 2. 東京都の地域性区分

- ①都心部商業地区(昼夜間人口比が極端に大きい)
- ②都市部商業地区
- ③商工業地区
- ④住宅地区
- ⑤隣接郊外地区
- ⑥遠隔郊外地区

6地域性間の各死亡率の分散分析結果を Table 2 に示す

Table 2. 4死因死亡率の地域性間分散分析 (F検定)

| 年 齢   | 性  | 全心疾患   | 虚血性心疾患 | 高血圧性疾患 | 脳血管疾患  |
|-------|----|--------|--------|--------|--------|
| 45—64 | 男  | 0.91   | 1.18   | 3.08*  | 4.30** |
|       | 女  | 1.19   | 1.11   | 1.84   | 3.51** |
|       | 全体 | 1.77   | 1.47   | 1.53   | 5.67** |
| 65—   | 男  | 5.60** | 1.12   | 5.50** | 2.25   |
|       | 女  | 5.97** | 2.50*  | 0.54   | 0.96   |
|       | 全体 | 7.16** | 3.99** | 2.06   | 1.87   |
| 0—    | 男  | 4.94** | 1.77   | 6.03** | 3.87** |
|       | 女  | 6.54** | 2.14   | 0.63   | 1.75   |
|       | 全体 | 6.61** | 3.36*  | 2.48*  | 3.46*  |

df = (5, 43), \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

した。全心疾患では、男女いずれも、45～64歳の場合に有意差は認められなかったが、65～歳の場合には危険率1%以下で有意差が認められた。このとき、男女とも死亡率の最高を示した地域は⑥遠隔郊外地区で、最低は④住宅地区であった。一方、脳血管疾患では、男女いずれも、45～64歳の場合に危険率1%以下で有意差が認められたが、65～歳の場合に有意差は認められない結果を示した。45～64歳の場合、死亡率の最高は男女とも③商工業地区で、最低は男が⑤隣接郊外地区、女が④住宅地区であった。虚血性心疾患や高血圧性疾患では明らかな傾向が認められなかったが、全心疾患と脳血管疾患では、死亡率傾向はかなり異なるものの、地域性間で明らかに死亡率の差があり、地域集積性のあることが統計的に確認された。上記の有意差や年代による相違を示した原因について、以下の相関分析でも検討する。

## (2) 各死因死亡と社会・環境指標との相関

四死因死亡と社会・環境指標との相関分析結果を、有意水準表示で、Table 3 に示した。数字が有意水準を表わし(1:危険率5%以下, 2:1%以下, 3:0.1%以下), -を付した所は負相関を示す。全心疾患では、65～歳の場合が45～64歳の場合よりも有意の相関が多く、No. 4～8の職種に関する指標、No. 9の乗用車登録台数、No. 15, 18の下水道普及率および人口密度、No. 22の老人医療対象助成者数が負相関、No. 23の財政歳出額が正相関で有意であった。以上の結果と(1)の地域性間分散分析結果を考え併せると、全心疾患は医療の即応性をはじめ、多くの原因の関与が推察され、単に都市化や経済性だけの問題ではないと考えられる。虚血性心疾患では、年代による相違よりも性別による相違が特徴的で、特に

Table 3. 各死因死亡指標と社会・環境指標との相関 (有意水準表示)

| 項目  | 指標 | 全 心 疾 患 |        |        | 虚 血 性 心 疾 患 |        |        | 高 血 圧 性 疾 患 |        |        | 脳 血 管 疾 患 |        |        |
|-----|----|---------|--------|--------|-------------|--------|--------|-------------|--------|--------|-----------|--------|--------|
|     |    | 45—64歳  | 65— 歳  | 0— 歳   | 45—64歳      | 65— 歳  | 0— 歳   | 45—64歳      | 65— 歳  | 0— 歳   | 45—64歳    | 65— 歳  | 0— 歳   |
|     |    | 男 女 全体  | 男 女 全体 | 男 女 全体 | 男 女 全体      | 男 女 全体 | 男 女 全体 | 男 女 全体      | 男 女 全体 | 男 女 全体 | 男 女 全体    | 男 女 全体 | 男 女 全体 |
| (1) | 1  | -1-1    | -      | -1-1   | -           | -      | -      | -1          | -1     | -1-2   | -3-2-3    | -2- -1 | -3- -2 |
|     | 2  | -       | -      | -      | -           | 1 1    | 1      | -2- -2      | -1- -  | -2- -1 | -         | -      | -      |
|     | 3  | -1- -2  | -      | -1-1-2 | -           | -      | -      | -1- -1      | -2- -1 | -2- -1 | -1- -     | -1- -  | -      |
|     | 4  | -       | -1-1-1 | -1-1-1 | -           | -      | -      | -           | -2- -1 | -2- -1 | -         | -      | -      |
|     | 5  | -       | -1- -1 | - -1   | -           | -      | -      | -           | -1- -  | -2- -1 | -         | -      | -      |
| (2) | 6  | -       | -1-1-2 | -1-1-2 | -           | -      | -      | -1          | -2- -1 | -2- -1 | -         | -      | -      |
|     | 7  | -       | -1- -1 | -      | -           | -      | -      | -           | -1- -  | -2- -  | -         | -      | -      |
|     | 8  | -       | -1-1-1 | -1-1-1 | -           | -      | -      | -1          | -2- -1 | -2- -1 | -         | -      | -      |
|     | 9  | -1      | -2-1-2 | -2-2-2 | -           | -      | -      | -1- -2      | -3- -1 | -3- -2 | -         | -      | -      |
|     | 10 | -       | -      | -      | -           | 1 1    | 1      | -           | -      | -      | -         | -      | -      |
| (3) | 11 | -       | -      | -      | 1 1 2       | 1 1    | 1 1 2  | -           | -      | -      | 1 1       | -      | 1      |
|     | 12 | -       | -      | -      | -           | -2- -1 | -2- -1 | 1           | -      | -      | -         | -      | -      |
|     | 13 | -2- -2  | -      | -1-1-1 | -1- -2      | -      | -2     | -           | -1     | -1     | -3-3-3    | -1- -1 | -3-1-3 |
|     | 14 | -       | -      | -      | -           | -      | -      | -           | -      | -      | -         | -      | -      |
|     | 15 | -1-1    | -2-3-3 | -3-3-3 | -           | -      | -      | -2- -2      | -2- -1 | -3- -2 | -         | -      | -      |
| (4) | 16 | -       | -      | -      | -           | 3 2    | 3 1    | -           | -      | -      | -         | -      | -      |
|     | 17 | -       | -      | -1- -1 | -           | 2 2    | 3 2    | -2- -1      | -1     | -2- -  | -         | -      | -      |
|     | 18 | -       | -3-3-3 | -3-3-3 | 1           | -      | -      | -1- -2      | -3- -1 | -3- -2 | -         | -      | -      |
|     | 19 | -       | -      | -      | -           | -      | -      | -           | -      | -1     | -         | -      | -      |
|     | 20 | -       | -      | -      | 1           | 1      | -      | -1          | -      | -      | 2 2 3     | -      | 2 1 2  |
| (5) | 21 | -       | -      | -      | 1           | -      | -      | -2          | -      | -      | 2 3 3     | -      | 2 1 2  |
|     | 22 | -1- -1  | -2-1-2 | -3-2-3 | -           | -      | -      | -1- -       | -3- -1 | -      | -         | -      | -      |
|     | 23 | -       | 2 1 2  | 1 1 1  | -           | -      | -      | -           | 1 1    | 1 2    | -         | 1      | -      |
|     | 24 | 1       | -      | -      | -           | -      | -      | -           | -      | -      | -         | 1      | -      |
|     | 25 | -       | -      | -      | -           | -      | -      | -           | 1      | -      | 1 1       | -      | -      |
| (5) | 26 | -       | -      | -      | -           | -      | -      | -           | -      | -      | -         | -      | -      |
|     | 27 | -       | -      | -      | -           | -      | -      | 1           | 1-     | 2      | 3 1       | -      | 1      |
|     | 28 | -       | 1      | 1      | -           | -      | -      | -           | -      | -      | 2 3 3     | -      | 1 1 1  |

1:  $p < 0.05$ , 2:  $p < 0.01$ , 3:  $p < 0.001$ , -は負相関

Table 4. 各死因死亡率上位下位各10地区間の社会・環境指標の平均値比較（有意水準表示）

| 項目  | 指標 | 全 心 疾 患 |        |        | 虛 血 性 心 疾 患 |      |       | 高 血 圧 性 疾 患 |        |       | 腦 血 管 疾 患 |        |        |        |
|-----|----|---------|--------|--------|-------------|------|-------|-------------|--------|-------|-----------|--------|--------|--------|
|     |    | 45—64歳  |        | 65— 歳  | 45—64歳      |      | 65— 歳 | 45—64歳      |        | 65— 歳 | 45—64歳    |        | 65— 歳  |        |
|     |    | 男       | 女      | 全体     | 男           | 女    | 全体    | 男           | 女      | 全体    | 男         | 女      | 全体     | 男      |
| (1) | 1  | -1      | -2     | -2-2   | -1          |      |       | -2-2        | -1     | -1    | -2-2-2    | -1-1-1 | -2-2-2 |        |
|     | 2  |         |        | -1-2   |             | 1    |       | -2          | -1     | -2    | -2        |        |        |        |
|     | 3  | -1      | -2     | -2-2-2 |             |      |       | -2-2-2      | -2     | -2    | -1-2      | -1     | -1     | -1-1-1 |
|     | 4  |         | -1-1   | -1     | -1          |      |       | -2          | -2     | -2    | -1        | -1     |        |        |
|     | 5  |         | -1-1   |        |             | 1    |       | -1          | -2     | -2    | -1        | -1     |        |        |
|     | 6  |         | -2-1   | -1-1-1 |             | 1    |       | -2          | -2     | -2    | -2        | -1     |        |        |
|     | 7  |         | -1-1   |        |             | 1    |       | -1          | -2     | -2    | -2        |        |        |        |
|     | 8  |         | -1-1   |        | -1          |      |       | -2          | -2     | -2    | -1        | -1     |        |        |
| (2) | 9  |         | -1-2   | -2-2-2 |             |      | 2     | -2          | -1     | -2    | -2        | -1     | -1     | -1     |
|     | 10 |         |        | -1     | -1          |      | 1     | -2          |        |       |           |        |        |        |
|     | 11 |         | -1     |        |             | 1    | 1     | 1           | -2     | -1    | -1        |        |        |        |
|     | 12 |         |        |        |             | -2-1 | -1    | 1           | 1-1    | 1     | 1         |        |        |        |
| (3) | 13 | -2      | -2     | -1-1-1 | -2          | -1   |       | -2          | -1-1   | -2    | -1        | -2-2-2 | -1     | -1-1-2 |
|     | 14 |         |        |        |             |      |       |             |        |       |           |        | -1     |        |
|     | 15 |         | -1-2-1 | -2-2-2 |             |      | 1     | -2-2-2      | -2     | -1    | -2        | -1     | -1-1   |        |
|     | 16 |         |        | 1      |             |      | 1     |             |        |       |           |        |        |        |
|     | 17 |         |        |        |             | 1    | 1     | 2           | 2      | 1     | -2        | -1     | -2     |        |
|     | 18 |         | -2-2-2 | -2-2-2 |             | 1    |       | 2           | -2-2-1 | -2    | -2        | -2     | -2     |        |
|     | 19 |         |        | -1     | -1          |      |       | -1          | -1     |       |           |        |        |        |
| (4) | 20 | 1       | 1      |        |             |      |       | 2           |        | 1     | 1         | 1      | 2      | 1      |
|     | 21 | 1       | 1      |        |             |      |       | 1           | 1      |       | 2         | 2      | 2      | 1      |
|     | 22 |         | -1-2   | -2-2-2 |             |      |       | -2          |        | -2    | -1        | -2     | -1     |        |
|     | 23 |         | 2      | 1      | 1           | 2    | 2     | 2           |        | 2     |           | 1      |        |        |
| (5) | 24 |         |        |        |             |      |       |             |        |       |           |        |        |        |
|     | 25 |         |        | -1     |             | 1    |       |             |        | 1     |           |        |        |        |
|     | 26 |         |        |        |             | 1    | 2     | 1           | -1     | 1     |           |        |        | 1      |
|     | 27 |         |        |        |             |      |       |             |        | 1     |           |        |        |        |
|     | 28 |         |        | 1      | 1           |      |       | 1           |        | 1     | 1         | 1      |        | 1      |

1:  $p < 0.05$ , 2:  $p < 0.01$ , -は, 下位平均値 > 上位平均値 が有意

65～歳の場合、女がNo. 17, 18の病院密度、人口密度と高い相関を示したのに対し、男は有意の相関を示していない。この相違は生活条件などが寄与したと推察される。高血圧性疾患では、特に性別による相違が特徴的で、男が多く指標と有意の相関を示したのに対し、女は項目4, 5のいくつかの指標と有意の相関を示したに留まった。高血圧性疾患は、男は項目1の住民の所得などに関する指標、項目3の住環境に関する指標と関連することが考えられるが、女については定かでない。脳血管疾患では、年代による相違が明らかで、45～64歳の場合に、No. 1の所得、No. 13の畳数と負相関、No. 20, 21の健康保険受給率、保護率、No. 27, 28のガス臭気その他苦情受付数(女のみ)、水質汚濁苦情受付数と正相関でいずれも高い有意水準を示した。したがって、脳血管疾患は働き盛りの年代で所得や生活条件などと密接に関連することが推定された。この結果は地域性間の分散分析結果から首肯できる。

### (3) 各死因死亡率上位下位地区間の社会・環境指標比較

各死因死亡率毎に大きさ順に並べ、上位下位各10地区を取り、両群間の各社会・環境指標の平均値の差の検定を行って、その結果を有意水準表示でTable 4に示した。1は危険率5%以下、2は1%以下を示し、-を付した所は下位地区の社会・環境指標平均値が上位地区のそれよりも有意に大きいことを示す。Table 4はTable 3と明らかに類似傾向を示した。この結果から、社会・環境指標の項目別に、推定される死亡への寄与を概観すると、項目1の住民に関する指標では全心疾患65～歳、高血圧性疾患男と、さらに所得額や高利得者数 (No. 1, 3) では脳血管疾患との関連性が推定された。項目2の産業に関する指標では高血圧性疾患男、全心疾患65～歳と、項目3の住宅または住環境に関する指標では、畳数 (No. 13)、下水道普及率 (No. 15)、人口密度 (No. 18) が全心疾患、高血圧性疾患と、項目4の国または自治体による厚生面の指標では、健康保健受給率と保護率 (No. 20, 21) が全心疾患45～64歳男、高血圧性疾患女、脳血管疾患45～64歳と、老人医療対象助成者数と財政歳出額 (No. 22, 23)、が全心疾患65～歳、高血圧性疾患男とそれぞれ関連性が推定された。項目5の公害に関する指標ではTable 4のように、他の項目の指標と比較して有意の場合が少なかった。しかし、No. 25～28の指標で苦情が多い地区ほど死亡率が高くなる傾向が現われており、これらの指標についても軽視することはできない。なお、死亡率上位下位各10地区間の死亡率の平均値の差は

全て有意であった。

### (4) 死因別死亡指標、社会・環境指標の主成分分析

各死因毎に死亡指標、社会・環境指標計37指標による主成分分析を行い、第1, 2主成分を軸とした因子負荷量散布図をFig. 3～6に示した。全分散に対する第2主成分までの累積寄与率は、全心疾患を死亡指標としたとき47.6%, 虚血性心疾患のとき44.5%, 高血圧性疾患のとき46.2%, 脳血管疾患のとき46.2%であった。各主成分軸の特徴と各死因の位置による傾向について第1, 2主成分で判断すると、まずFig. 3では、第1主成分軸は

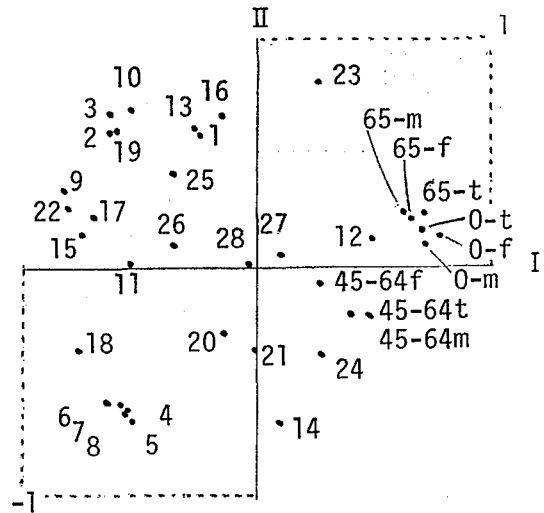


Fig. 3. 因子負荷量散布図 (全心疾患)

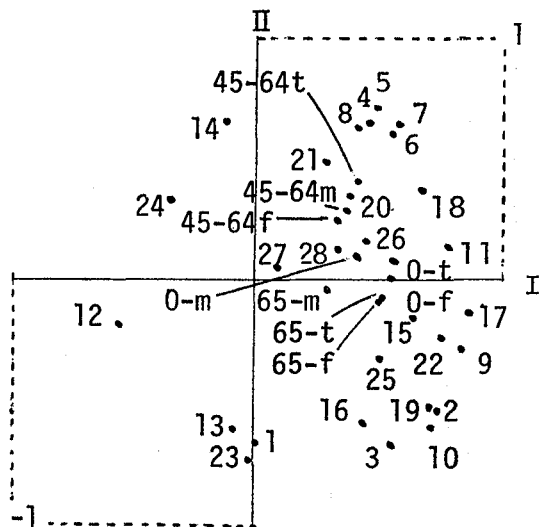


Fig. 4. 因子負荷量散布図 (虚血性心疾患)

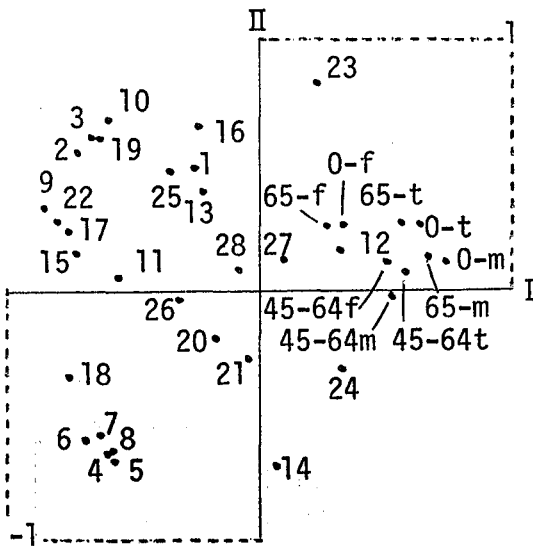


Fig. 5. 因子負荷量散布図 (高血圧性疾患)

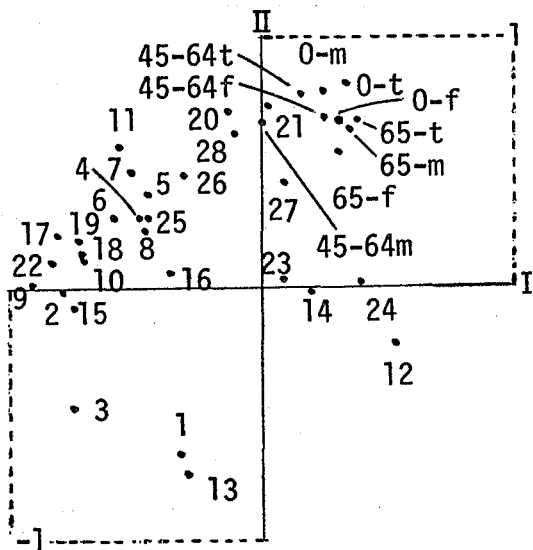


Fig. 6. 因子負荷量散布図 (脳血管疾患)

都市の住みやすさを表わし、正方向は欠点、つまり、空気が悪いこと、公害が進んでいることなどを示し、負方向は長所、つまり、便利なこと、病院・下水道などの施設が完備していることなどを示しており、全心疾患死亡は、特に高年期の場合、都市の活発な産業活動がもたらす弊害と密接に関連することが推定された。しかし、全国レベルでみると東京はほぼ平均的レベルの死亡率であ

ることから、この結果は大都市圏に関してと限定して考えるべきかもしれない。第2主成分軸は地域の経済的傾向を表わし、正方向が経済性が高いと考えられるが、全心疾患死亡との関連性は小さいと思われる。虚血性心疾患の場合のFig. 4では、第1, 2主成分軸の特徴はFig. 3と同じであるが、両軸とも正負方向が逆で、虚血性心疾患死亡の位置傾向は明らかでなかった。高血圧性心疾患の場合のFig. 5では、両軸の特徴は正負方向ともFig. 3の場合とよく似ており、高血圧性疾患死亡の位置傾向も全心疾患の場合と大体一致した。したがって、両死因には年代や性別の差こそあれ、かなり共通する原因のあることが推定される。脳血管疾患の場合のFig. 6では、第1主成分軸の特徴はFig. 3, 5の場合と全く同じであるが、第2主成分軸の特徴は住民の生活条件を表わし、正方向が不良、負方向が良好を示すと考えられる。脳血管疾患死亡は位置傾向より住民の生活条件と密接に関連することが推定された。

#### 4. 結 論

東京都における中高年(45~64歳, 65~歳)の昭和50~52年の循環器疾患(全心疾患, 虚血性心疾患, 高血圧性疾患, 脳血管疾患)訂正死亡率について、先ず、地域性区分により各死因死亡率の地域差を検討した後、循環器疾患死亡と社会・環境指標との関連性を検討した。

各死因死亡率の6地域性間の分散分析を行った結果、全心疾患(65~歳)や脳血管疾患(45~64歳)に有意の地域性間の差が認められた。したがって、死亡率の地域差が統計的に確認されたとともに、地域性は社会・環境要因と関連するので、上記死亡が社会・環境指標と関連性を有することが推察された。

社会・環境指標として5項目の28指標を解析に用いた。相関分析および死亡率上位下位地区間の平均値の差の検定結果によると、全心疾患では中年期と高年期の死亡が顕著に異なり、中年期では2, 3の指標以外有意の関係が認められなかったが、高年期では住民の職種に関する指標、乗用車登録台数、下水道普及率、人口密度などの指標と有意の関係を示し、都市化による弊害や地域の経済性などの原因が推察された。虚血性心疾患では住民自身より地域の産業、住環境に関する指標との関連性が推定され、生活条件などが死亡に寄与することが考えられた。高血圧性疾患では性別で大きく異なり、特に高年期の男の死亡は地域住民や住環境に関するいろいろな指標と関連すると推定され、関連性が明らかでない女の場合と対照的であった。脳血管疾患では高年期よりも中年期の方が所得額や量数などの社会・環境指標と特に密

接な関連性のあることを示唆した。また主成分分析結果によると、第2主成分までの情報量は5割弱であるが、第1主成分軸は4死因とも都市の住みやすさを示唆した。つまり、都市という環境は死亡に関しても住民に大きな影響を及ぼしたと言えよう。

死亡指標と社会・環境指標との関連性を検討する上で重要なことの一つに、社会・環境指標として何をを用いたかがある。用いた指標の良否が研究の鍵を握るとも言え、今後さらに死亡とより密接な関係があると考えられる新たな指標による解析が望まれる。また、解析の厳密性を高める点で地域メッシュ統計は有用であり、その利用のために地域メッシュ資料の充実が望まれる。

#### 文 献

- 1) 成人病の疫学分布協議会：市町村別循環器疾患死亡率の分布図，1979，厚生統計協会
- 2) 福富和夫：厚生指標，26，10，19，1979
- 3) 杉田 稔，大久保利晃：日衛誌，35，565，1980
- 4) Mantel, N. and Stark, C. R.: *Biometrics*, 24, 917, 1968
- 5) 中村文雄，鍵山光庸，妹尾 巖：厚生指標，24，1，12，1977
- 6) 大谷元彦，青木国雄，清水弘之：日本公衛誌，7，393，1975
- 7) 石水照雄：行動計量学，4，44，1976
- 8) 奥野隆史：行動計量学，4，49，1976
- 9) 藤田峯三：統計，25，5，44，1974
- 10) 大久保利晃，安達史朗，外山敏夫：日衛誌，32，534，1977
- 11) 大久保利晃，安達史朗，外山敏夫：日衛誌，32，677，1977
- 12) 伊藤彰彦：行動計量学，4，59，1976
- 13) 小沢秀樹，小町喜男，安西 定，川口 毅：厚生指標，23，4，4，1976
- 14) 柳川 洋，橋本 勉，横山英明，安西 定，川口 毅，重松逸造：日本公衛誌，26，693，1979
- 15) 平山 雄，浜野芳子：厚生指標，28，4，3，1981
- 16) Masironi, R.: *Bull. WHO*, 43, 305, 1970
- 17) 丸地信弘，津田佳世子，田中洋一：日本公衛誌，23，489，1976
- 18) 永田久紀：日本公衛誌，26，693，1979
- 19) 山本幹夫，林知己夫，寺尾浩明，山田和枝：行動計量学，4，64，1976
- 20) 青木伸雄，堀部 博，大野良之，佐々木隆一郎，青木国雄，加藤孝之，岡田 博：日本公衛誌，29，172，1982
- 21) 大久保利晃：日本公衛誌，24，713，1977
- 22) 大野良之，青木国雄，青木伸雄，大谷元彦：日衛誌，34，512，1979
- 23) Snedecor, G. W.: *The Iowa Univ. Press*, 5th Ed., 199, 1963
- 24) 稲葉 裕，高木広文，柳井晴夫：日本公衛誌，26，67，1979

## 疫学、生物調査における異常値、欠測値処理について

牧 野 国 義\*

### On Outlier and Missing Data Problems in Epidemiological and Biological Studies

KUNIYOSHI MAKINO\*

Outlier and missing data problems are statistically important in epidemiological and biological studies, because effective sample number of each variable is not always obtained in the data of those studies. Methods to delete outliers and to estimate missing data are indicated in this report.

An observed value would be judged as an outlier when the value is not within mean value  $\pm 2.5$  SD. But deletion of the outlier is restricted when the outlier occurred by artificial mistake or the value can not occur in common sense.

Two kinds of method by number of variable were selected to estimate missing data. When the number of variable is one and a coefficient of variance of the data was not large, missing data is estimated by the mean value. When the number of variables is more than two and the highest correlation between a variable which contains missing data and other variables is statistically significant, the missing data is estimated by using regression analysis.

Results calculated in some samples were as follows. The estimation method to replace missing data by mean value was easy and calculated for short time. The other method to apply regression analysis had statistically good precision.

**Keywords:** outlier, missing data, statistics

#### 1. 緒 言

我々が行う疫学調査や生物調査は、化学実験などのように、同一条件下で何回でも繰り返しのできる調査でなく、同一条件下では再調査ができない場合が多い。緻密な計画が立てられ、正確な情報収集や分析がなされたとしても、結果的には異常値や欠測値を生じることがある。調査の種類によっては不可避の場合さえある。これらの調査の多くは統計手法を用いて解析される。調査標本数が大量である場合には、異常値、欠測値を全て削除して差しつかえないが、生物調査の場合には経費、時間、人(調査者、解析者)などの事情から、疫学調査の場合には協力者や解析に必要な対照資料などの制約から、必ずしも充分な標本数を得ることができない。このような疫学、生物調査の性格から、異常値、欠測値をどのように処理するかは軽視できない問題である。にもかかわらず、異常値、欠測値は医学、生物学分野で余り問題にされなかった。その理由の一つは、異常値は削除、欠測値は未処理のまままで済ませる考え方があったこと、また

一つは、確立した処理手法が明らかにされていなかったことによると思われる。近年応用統計学の分野で、欠測値処理問題が検討されているが、その手法は統計学的厳密性が高いものの、難解で、計算時間が長い。多変量解析のような完備データ(全変量について欠測値がないデータ)を要求する手法が汎用化したことを考え合わせると、医学、生物学分野では、推定精度を一定の水準に保ち、比較的簡便で計算時間の短い異常値、欠測値処理の手法の開発が望まれる。以下には、異常値、欠測値処理の手法について検討した結果を報告する。

#### 2. 方 法

##### (1) 異常値について

異常値という語は Outlier の訳語として一般化しているが、異常な値の意味ではなく、飛び離れた値という程度の意味である。竹内は誤解を防ぐために“外れ値”と訳すことを提唱しているが<sup>1)</sup>、ここでは一般的訳語に従うこととする。この異常値の処理としては、その値をデータから削除するか否かを判定(棄却検定)することで

\* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

ある。この検定にはいくつかの方法が知られているが、その前に、疫学、生物調査により得られたデータは元来ばらつき易いことを考慮しなければならない。したがって、増山が述べるように<sup>2)</sup>、安易に棄却検定を行うべきでなく、異常値と思われる観測値が、次の項目のどちらかに該当して初めて検定に付すべきと思われる。

- ① 異常値と思われる観測値は、誤操作、誤記、誤計算などの人為的ミスにより生じた可能性が高い。
- ② 異常値と思われる観測値は、常識的、論理的に考えて起こり得ない値である。

上記項目のどちらかに該当したとしても、原因が発見されて訂正可能であれば訂正すべきことは当然である。しかし、多数の者が携わることの多い疫学、生物調査では、異常値の原因を発見することは必ずしも容易でない。そこで、①、②のいずれにも該当しない異常値と思われるデータについては、疑わしきは罰せずとの刑法論理を適用した方がより適切と考えられる。つまり、データがばらつき易いという疫学、生物調査の性質から考えて、第1種の過誤(異常値を採択すべきなのに削除した)の可能性が第2種の過誤(異常値を削除すべきなのに採択した)の可能性よりも大きい。ならば貴重なデータは最大限利用すべきである。

①または②に該当する場合の検定方法として次の3方法が一般的である。

#### (i) 平均値と標準偏差を用いる棄却検定

検出力は高くないが、最も簡便な方法である。データが正規分布をなすと仮定すると、観測値 $X$ が $\bar{x} \pm nSD$  ( $\bar{x}$ : 平均値,  $SD$ : 標準偏差,  $n$ : 定数) の範囲に入る確率は、 $n=1$  のとき68.3%、 $n=2$  のとき95.4%、 $n=3$  のとき99.7%で、通常 $n$ を2~3として範囲外にある観測値を削除する(範囲外確率4.6~0.3%)。奥野は $n$ を2.5とすることを提案している(範囲外確率1.2%)<sup>2)</sup>。生物データなどで対数正規分布に従う場合がみられるが、その場合にはデータを正規化して検定する。

#### (ii) Smirnov-Grubbs の棄却検定

データの最大値、最小値が他のデータから飛び離れているときに用いられる検定法で、観測値と平均値との差の絶対値を分散で割った値 ( $|x - \bar{x}|/SD$ ) と検定表の数値とを比較する。比較的簡便であるが、検定表は標本数が25までの場合が多く、それ以上の標本数の場合には検定表の数値を推定するか精密な検定表によらねばならない。

#### (iii) Mahalanobis 汎距離による棄却検定

高い相関の二変量がある場合、正相関ならば、一方の

変量が相対的に大きな値の場合、もう一方の変量の対応する観測値も相対的に大きな値のはずである。この検定法は実際にはそうでなかった場合などに利用される。

検定方法としてはこのほかに、Dixon の棄却検定、等確率長円を用いる方法、重回帰分析を応用する方法などがある。最良の方法を特定できないこと、簡便さが望まれることから、疫学、生物調査によるデータの場合、 $n$ を2.5とした(i)の方法を採用して支障ないと思われる。

#### (2) 欠測値について

欠測値処理には、欠測値以外の観測値全てを用いる手法と、多変量資料の場合にこれを観測値行列として各変量をベクトルとみなし、欠測値に対応する他の変量の値を削除した残りの観測値(完備化した観測値ベクトルと呼ぶ)を用いる手法とがあり、近年応用統計学の分野で後者の手法がより多く提案されている。しかし、疫学、生物調査データの場合には、調査上の制約から必ずしも充分な標本数を得ることができないので、後者の手法では解析に用いる標本数が一層減ることになり、適切でない。そこで、以下に前者の手法について述べる。

##### (i) Wilks の方法(平均値代替法)

比較的分散の大きくない観測値ベクトルは平均値がその変量を代表する。つまり、欠測値を平均値と推定する。この方法は最も簡便なため古くから利用されている。多変量の場合、平均値ベクトルは不偏であるが、各変量の分散の大きさを無視または均一とみなすという欠点を有する。この欠点防止のために変動係数に上限値を設けて処理を制限している。

##### (ii) 分散分析の応用

二元配置の分散分析を行う場合に、欠測値処理のために次の方法が提案されている<sup>4)</sup>。二元の水準数を $a$ 、 $b$ とし、欠測値のある行の総和を $T_a$ 、列の総和を $T_b$ 、全データの総和を $T$ としたとき、欠測値 $M$ は次式で推定される。

$$M = \frac{bT_a + aT_b - T}{(a-1)(b-1)}$$

分散分析を行うとき、F検定で、全体および誤差項の自由度を各1減らす。欠測値が2以上あるときには1つの欠測値以外に適当な値を入れて推定し、次に適当な値を入れた欠測値を順次推定してゆく。適当な値は当然推定値と異なるので最初の推定値も変化する可能性がある。多欠測値のデータでは、全欠測値が適当な値を得るまで相当数の Iteration を行うことになる。この手法は全変量の分散ベクトルの一致性は高いが、平均値ベクトルの不偏性は保証されない。



## (iii) Buckの方法 (回帰推定法)

回帰式 (または重回帰式) を用いて欠測値を推定する手法で、各変量の欠測値の数が観測値の数に比べて非常に少なく、かつ、回帰推定精度 (相関、重相関分析での有意水準により判定) が非常に高い場合、平均値ベクトルは不偏で、分散ベクトルの一致性も高い。疫学、生物調査データでは各変量に欠測値が存在することも考えられるので、重回帰式よりも推定精度の高い二変量間の回帰式を利用した方が利用標本数が多く、また計算時間も一般に短い。回帰式  $y = ax + b$  としたときの回帰係数推定値  $\hat{a}$ ,  $\hat{b}$ , と有意水準 (以下危険率  $\alpha$  により表わす) は次式で求められる。

$$\hat{b} = \frac{1}{n} (\sum y_i - \hat{a} \sum x_i) \quad (n : \text{標本数})$$

ここで  $\hat{a}$  は、

$$X = \sum x_i y_i - \frac{1}{n} \sum x_i \sum y_i$$

$$Y = \sum x_i^2 - \frac{1}{n} (\sum x_i)^2 - \left\{ \sum y_i^2 - \frac{1}{n} (\sum y_i)^2 \right\}$$

としたとき、

$$\hat{a} = \frac{1}{2X} (-Y + \sqrt{Y^2 + 4X^2})$$

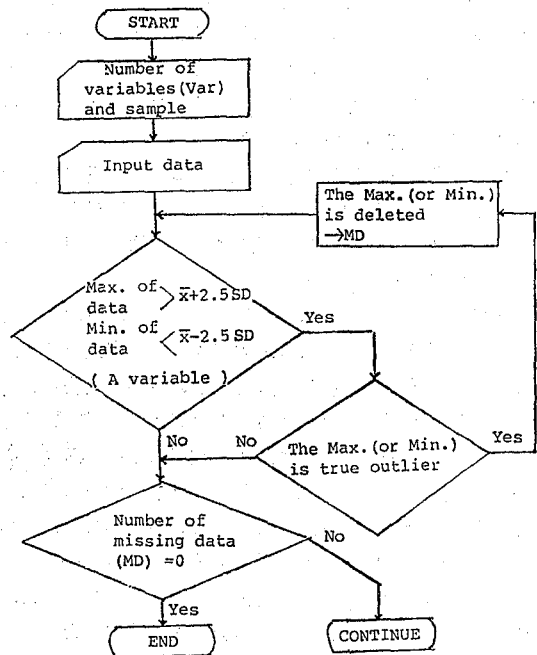


Fig. 1. Flow Chart to detect Outliers and Missing Data

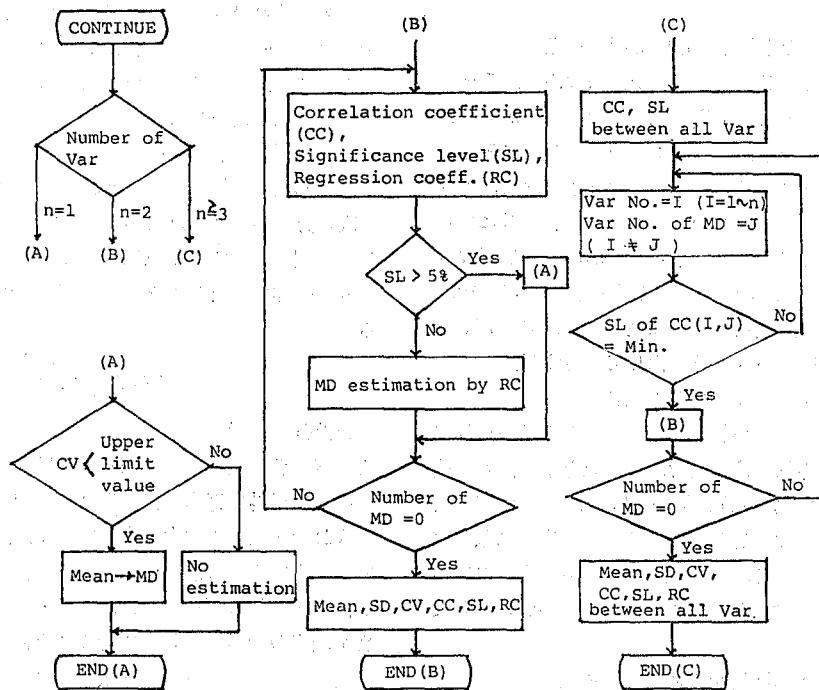


Fig. 2. Flow Chart to estimate Missing Data

Table 1. 2 Data-set of A Variable

| Case | Data No. |      |      |      |      |      |      |      |      |             |
|------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------|
|      | 1        | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10          |
| I    | 1.5      | 2.6  | 3.4  | 1.9  | 4.1  | 2.4  | 3.3  | 1.8  | 3.7  | <u>39.0</u> |
| II   | 14.0     | 14.2 | 13.6 | 12.9 | 15.1 | 14.4 | 13.3 | 13.7 | 14.8 | <u>4.5</u>  |

Underline : Outlier

相関係数が  $r$ , 自由度  $\phi$  のとき,

$$t = \sqrt{\frac{r^2 \phi}{1-r^2}}$$

とおくと,  $t$  は  $t$  分布に従い, このとき危険率  $\alpha$  は,

$$\alpha = \int_t^\infty \frac{2F\left(\frac{\phi+1}{2}\right) dx}{\sqrt{\phi\pi} \Gamma\left(\frac{\phi}{2}\right) \left(1+\frac{x^2}{\phi}\right)^{\frac{\phi+1}{2}}}$$

一般に, 危険率  $\alpha$  が 5 % 以上の場合にはこの手法は利用されない。

疫学, 生物調査データについての欠測値処理の方法として, 1 変量データの場合に平均値代替法を採用し, 2 変量以上のデータの場合に (iii) で述べた回帰推定法を採用して以下に実施例を示す。

## 3. 結果および考察

まず, 解析の手順を明らかにするために, Fig. 1 に異常値, 欠測値を発見するフローチャートを示し, Fig. 2 に欠測値を推定するフローチャートを示した。異常値の多いデータはデータ全体の信頼性が損われ, 好ましくないが, 必ずしも 1 つとは限らないので, Fig. 1 のようにサイクルさせている。欠測値処理は Fig. 2 のように, 変量数によって 3 つに分岐させた。以下には異常値, 欠測値を含む 1 変量, 2 変量, 多変量 (欠測値のみ) の場合についてデータを例示し, 説明する。

## (1) 1 変量の場合

Table 1 に 2 種類の 1 変量データを示した。ケース I の 39.0, ケース II の 4.5 は他のデータから飛び離れてい

Table 2. Deletion of Outliers and Estimation of Missing Data

| Case | $\bar{x}_0$ | $SD_0$ | $\bar{x} \pm 2.5SD$<br>$\bar{x} - 2.5SD$ | Deletion<br>of<br>outliers | Upper<br>limit value<br>of CV |
|------|-------------|--------|------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| I    | 6.37        | 11.50  | 35.11<br>-22.38                          | Yes                        | 10%                           |
| II   | 13.05       | 3.08   | 20.75<br>5.36                            | Yes                        | 10                            |

| Case | $\bar{x}_D$ | $SD_D$ | CV(%) | Estimation<br>of missing<br>data | Estimated<br>value |
|------|-------------|--------|-------|----------------------------------|--------------------|
| I    | 2.74        | 0.92   | 33.6  | No                               | —                  |
| II   | 14.00       | 0.67   | 4.8   | Yes                              | 14.0               |

 $\bar{x}_0, \bar{x}_D$  : Mean value in observed data and the data when outliers were deleted $SD_0, SD_D$  : Similarly standard deviation

る。これらの値が 2. (1) の①または②に該当するとして異常値, 欠測値処理し, 結果を Table 2 に示した。39.0 と 4.5 はともに  $\bar{x} \pm 2.5SD$  の範囲外にあり, 削除は妥当である。欠測値処理の際の変動係数の上限値を 10% としたとき, ケース I では推定が不適であったが, II では適で, 欠測値処理により分散ベクトルに変化が認められた。

## (2) 2 変量の場合

Table 3 に 2 種類の 2 変量データを示した。2 種類とも 1 つずつの欠測値がある。また, 下線で示したように, ケース I の 19.4, ケース II の 14.4 はともに  $\bar{x} \pm 2.5SD$ 

Table 3. 2 data-set of 2 Variables

| Case | Var.<br>No. | Data No. |     |     |     |     |     |             |     |             |     |
|------|-------------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|-----|-------------|-----|
|      |             | 1        | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7           | 8   | 9           | 10  |
| I    | 1           | 4.1      | 3.5 | 9.4 | 6.4 | 4.4 | 5.6 | 7.2         | 2.4 | —           |     |
|      | 2           | 2.8      | 1.6 | 7.5 | 3.7 | 1.9 | 3.9 | <u>19.4</u> | 1.5 | 4.4         |     |
| II   | 1           | 4.1      | 4.4 | 9.0 | 6.3 | —   | 3.5 | 3.4         | 2.8 | 7.4         | 8.4 |
|      | 2           | 2.8      | 2.4 | 3.0 | 2.7 | 2.5 | 2.6 | 2.4         | 3.0 | <u>14.4</u> | 2.4 |

Underline : Outlier, — : Missing data

Table 4. Comparison of Statistical Calculations in Observed Data-set and The Data-set using Deletion of Outliers and Estimation of Missing Data

| Var.<br>Case No. | Statistics                                 | Observed  | Data-set<br>Using del.<br>of outliers | Using est.<br>of missing<br>data |          |
|------------------|--------------------------------------------|-----------|---------------------------------------|----------------------------------|----------|
| I                | 1                                          | $\bar{x}$ | 5.37                                  | 5.49                             |          |
|                  |                                            | S D       | 2.25                                  | 2.14                             |          |
|                  |                                            | C V (%)   | 41.9                                  | 38.9                             |          |
|                  |                                            | n         | 8                                     | 9                                |          |
|                  | 2                                          | $\bar{x}$ | 5.19                                  | 3.41                             | 3.61     |
|                  |                                            | S D       | 5.64                                  | 1.99                             | 1.95     |
|                  |                                            | C V (%)   | 108.8                                 | 58.2                             | 54.0     |
|                  |                                            | n         | 9                                     | 8                                | 9        |
|                  |                                            | C C       | 0.603                                 | 0.963***                         | 0.968*** |
|                  |                                            | D F       | 6                                     | 5                                | 7        |
|                  |                                            | S L (%)   | 11.4                                  | 0.049                            | 0.0019   |
|                  |                                            | R C       |                                       |                                  |          |
|                  |                                            | y=ax+b    |                                       |                                  |          |
|                  |                                            | a         | —                                     | 0.910                            | 0.910    |
|                  |                                            | b         | —                                     | -1.38                            | -1.38    |
|                  | Deleted or<br>estimated<br>data (Var. No.) |           |                                       | (1)5.2<br>(2)6.4                 |          |
|                  |                                            | (2)19.4   |                                       |                                  |          |
| II               | 1                                          | $\bar{x}$ | 5.48                                  | 5.48                             |          |
|                  |                                            | S D       | 2.34                                  | 2.34                             |          |
|                  |                                            | C V (%)   | 42.7                                  | 42.7                             |          |
|                  |                                            | n         | 9                                     | 9                                |          |
|                  | 2                                          | $\bar{x}$ | 3.82                                  | 2.64                             | 2.64     |
|                  |                                            | S D       | 3.72                                  | 0.246                            | 0.232    |
|                  |                                            | C V (%)   | 97.4                                  | 9.28                             | 8.78     |
|                  |                                            | n         | 10                                    | 9                                | 10       |
|                  |                                            | C C       | 0.312                                 | 0.073                            | 0.062    |
|                  |                                            | D F       | 7                                     | 6                                | 8        |
|                  |                                            | S L (%)   | 41.4                                  | 86.4                             | 87.5     |
|                  |                                            | R C       |                                       |                                  |          |
|                  |                                            | y=ax+b    |                                       |                                  |          |
|                  |                                            | a         | —                                     | —                                | —        |
|                  |                                            | b         | —                                     | —                                | —        |
|                  | Deleted or<br>estimated<br>data (Var. No.) |           | (2)14.4                               | (2)2.6                           |          |

CC : Correlation coefficient,

DF : Degree of freedom,

SL : Significance level, RC : Regression coefficient

\*\*\*  $p < 0.001$ 

Table 5. Data-set of 7 Variables

| Var. No. | Data No. |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|          | 1        | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   |
| 1        | 4.1      | 4.3 | 4.4 | 4.7 | 5.1 | 5.1 | 5.4 | 5.4 | —   |
| 2        | 1.9      | 2.7 | 3.5 | 4.1 | 7.5 | 5.3 | 4.7 | —   | 6.1 |
| 3        | 3.6      | 3.5 | 4.1 | 3.9 | 4.0 | 3.7 | —   | 4.3 | 3.8 |
| 4        | 1.5      | 1.7 | 2.1 | 4.0 | 5.1 | 6.0 | 7.4 | 7.7 | 8.0 |
| 5        | 2.8      | 2.7 | 2.4 | 2.0 | 1.7 | —   | 1.4 | 1.4 | 0.9 |
| 6        | 3.3      | 3.6 | 3.8 | 4.4 | —   | 5.6 | 5.7 | 7.7 | —   |
| 7        | 4.1      | 4.4 | 4.8 | —   | 6.3 | 6.6 | 7.3 | 7.6 | 8.4 |

Table 6. Estimation of Missing Data by Regression Analysis

| Var. No. | Var. No. | CC        | DF | RC : $y=ax+b$<br>a | b      | Estimated data |
|----------|----------|-----------|----|--------------------|--------|----------------|
| 1        | 4        | 0.986***  | 6  | 5.000              | -19.62 | 5.5            |
| 2        | 6        | 0.764*    | 5  | 0.769              | 2.505  | 9.0            |
| 3        | —        | —         | —  | —                  | —      | 3.9            |
| 5        | 7        | -0.993*** | 5  | -2.341             | 10.58  | 1.7            |
| 6        | 4        | 0.934***  | 5  | 0.561              | 2.437  | 5.3, 6.9       |
| 7        | 5        | -0.993*** | 5  | -2.341             | 10.58  | 5.7            |

Missing data of Var. 3 was estimated by Mean (CV=6.91%)

\*\*\*  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.05$ 

Table 7. Comparison of Basic Statistical Calculations in Estimation of Missing Data

| Var. No. | Observed data-set |       |       |   | Estimated data-set |       |       |   |
|----------|-------------------|-------|-------|---|--------------------|-------|-------|---|
|          | $\bar{x}$         | SD    | CV(%) | n | $\bar{x}$          | SD    | CV(%) | n |
| 1        | 4.81              | 0.508 | 10.6  | 8 | 4.89               | 0.532 | 10.9  | 9 |
| 2        | 4.47              | 1.83  | 40.9  | 8 | 4.98               | 2.29  | 45.9  | 9 |
| 3        | 3.86              | 0.267 | 6.91  | 8 | 3.86               | 0.250 | 6.47  | 9 |
| 4        | 4.83              | 2.63  | 54.4  | 9 | 4.83               | 2.63  | 54.4  | 9 |
| 5        | 1.91              | 0.681 | 35.6  | 8 | 1.89               | 0.642 | 24.0  | 9 |
| 6        | 4.87              | 1.56  | 32.1  | 7 | 5.15               | 1.52  | 29.5  | 9 |
| 7        | 6.19              | 1.59  | 25.8  | 8 | 6.13               | 1.50  | 24.5  | 9 |

(ケースⅠで19.3, ケースⅡで13.1) を越えており, これらの値が2. (1)の①または②に該当するとして異常値, 欠測値処理し, 処理前後の統計量の比較の結果をTable 4 に示した. 2変量の場合の欠測値処理はFig. 2のように回帰推定法を利用する. ケースⅠでは異常値処理の結果, 相関係数の有意水準が0.049%であったので, 回帰分析より欠測値処理が可能で, その結果5.2, 6.4が推定

Table 8. Comparison of Statistical Calculations in Estimation of Missing Data

| Var. No. | Var. No. | Observed data-set |          |     |               |       |           | Estimated data-set |     |               |       |     |  |
|----------|----------|-------------------|----------|-----|---------------|-------|-----------|--------------------|-----|---------------|-------|-----|--|
|          |          | C C               | S L (%)  | D F | RC : $y=ax+b$ |       | C C       | S L (%)            | D F | RC : $y=ax+b$ |       | C C |  |
| 1        | 2        | 0.799*            | 3.10     | 5   | 4.64          | -17.7 | 0.813**   | 0.778              | 7   | 5.20          | -20.5 |     |  |
| 1        | 3        | 0.629             | 13.0     | 5   | —             | —     | 0.470     | 20.2               | 7   | —             | —     |     |  |
| 1        | 4        | 0.986***          | 0.000643 | 6   | 5.00          | -19.6 | 0.989***  | 0.000049           | 7   | 5.00          | -19.6 |     |  |
| 1        | 5        | -0.990***         | 0.00181  | 5   | -1.10         | 7.31  | -0.982*** | 0.000270           | 7   | -1.21         | 7.81  |     |  |
| 1        | 6        | 0.922**           | 0.313    | 5   | 3.12          | -10.0 | 0.933***  | 0.0243             | 7   | 3.01          | -9.59 |     |  |
| 1        | 7        | 0.993***          | 0.000736 | 5   | 2.62          | -6.78 | 0.985***  | 0.000143           | 7   | 2.86          | -7.85 |     |  |
| 2        | 3        | 0.485             | 27.0     | 5   | —             | —     | 0.707*    | 3.32               | 7   | 0.0775        | 3.48  |     |  |
| 2        | 4        | 0.749*            | 3.23     | 6   | 1.56          | -2.52 | 0.783*    | 1.26               | 7   | 1.20          | -1.12 |     |  |
| 2        | 5        | -0.800*           | 3.07     | 5   | -0.302        | 3.30  | -0.767*   | 1.59               | 7   | -0.222        | 2.99  |     |  |
| 2        | 6        | 0.936**           | 0.595    | 5   | 0.806         | 1.42  | 0.886**   | 0.148              | 7   | 0.631         | 2.01  |     |  |
| 2        | 7        | 0.764*            | 4.55     | 5   | 0.769         | 2.51  | 0.776*    | 1.39               | 7   | 0.587         | 3.20  |     |  |
| 3        | 4        | 0.457             | 25.5     | 6   | —             | —     | 0.443     | 23.2               | 7   | —             | —     |     |  |
| 3        | 5        | -0.512            | 24.1     | 5   | —             | —     | -0.447    | 22.8               | 7   | —             | —     |     |  |
| 3        | 6        | 0.666             | 14.9     | 4   | —             | —     | 0.553     | 12.3               | 7   | —             | —     |     |  |
| 3        | 7        | 0.452             | 30.9     | 5   | —             | —     | 0.440     | 23.6               | 7   | —             | —     |     |  |
| 4        | 5        | -0.974***         | 0.00436  | 6   | -0.240        | 3.04  | -0.973*** | 0.00102            | 7   | -0.238        | 3.04  |     |  |
| 4        | 6        | 0.934**           | 0.207    | 5   | 0.561         | 2.44  | 0.948***  | 0.0101             | 7   | 0.561         | 2.44  |     |  |
| 4        | 7        | 0.988***          | 0.000469 | 6   | 0.567         | 3.39  | 0.988***  | 0.000067           | 7   | 0.567         | 3.39  |     |  |
| 5        | 6        | -0.900*           | 1.45     | 4   | -2.93         | 11.0  | -0.913*** | 0.0391             | 7   | -2.52         | 9.90  |     |  |
| 5        | 7        | -0.993***         | 0.000693 | 5   | -2.34         | 10.6  | -0.992*** | 0.000017           | 7   | -2.35         | 10.6  |     |  |
| 6        | 7        | 0.947**           | 0.420    | 4   | 0.907         | 1.31  | 0.947***  | 0.0109             | 7   | 0.990         | 1.03  |     |  |

された。一方ケースⅡでは同有意水準が86.4%の危険率のため不適で、変量番号2の欠測値のみ平均値代替法により2.6が推定された。欠測値処理前後の統計量を比較すると、平均値ベクトルは不偏で、分散ベクトルの一致性も高い結果が得られた。また、2欠測値を推定したケースⅠの場合、有意水準の危険率が0.049%から0.0019%に大きく減少した。

### (3) 多変量の場合

Table 5に7変量のデータを示した。変量番号1～3, 5, 7に1つずつ、変量番号6に2つ、計7つの欠測値がある。欠測値推定は Fig. 2 の(C)の手順で行い、まず、相関、回帰分析結果を Table 6 に示した。表中の変量の組み合わせは、各変量との相関分析で危険率が最小の場合である。ただし、変量番号3の場合には有意となる相関が得られなかったため、回帰推定法を利用することはできなかった。この場合の欠測値処理は、変動係数が小さい(6.91%) ことにより、平均値代替法を利用した。表に示した通り全欠測値の推定ができたので、この欠測値処理の効果を、処理前後の統計量を比較して検討

した。Table 7 に基本統計量を示し、Table 8 に相関、回帰分析結果を示した。Table 7 のように、平均値、標準偏差に処理前後で大きな変化がなく、平均値ベクトルが不偏で、分散ベクトルの一致性の高いことが確認された。Table 8 のように、回帰係数はいずれも大きな変化がみられないが、有意水準では危険率がいくつかの場合に半減した。以上の結果から欠測値処理が充分有効であったと考えられる。

因みに、Table 5 のデータを、水準数が7と9の繰り返しのない二元配置データと考えれば、2. (2)(ii)で述べた分散分析の応用による欠測値処理が可能であるが、欠測値数が7つあるため、全ての近似解を得ることは容易でなく、得られたとしても長時間の計算を要する。

## 4. 結 論

疫学調査や生物調査では諸々の事情から必ずしも十分な標本数を得ることができない。また、これらの調査は同一条件下で再調査できない場合が多い。したがって、異常値や欠測値が生じたときこれらをどのように処理するかは統計解析などを行う上で重要である。しかしなが

ら、従来医学、生物学分野では異常値、欠測値処理について余り検討されていなかった。本研究では、異常値、欠測値について、一定水準の精度で、比較的簡便で計算時間の短い処理の手法を検討した。

疫学、生物調査によるデータは元来ばらつき易い性質があるので、異常値の判定は、観測値が  $\bar{x} \pm 2.5SD$  ( $\bar{x}$ : 平均値,  $SD$ : 標準偏差) の範囲外にあるときとみなして支障ないと思われる。ただし、異常値を削除するのは、この異常値を生じた原因が人為的ミスによる可能性が高い場合やその値が常識的、論理的に起こり得ない場合に限定した方が適切と考えられる。

欠測値処理はデータの変量数によって方法が異なり、1変量の場合には欠測値を平均値とする平均値代替法を利用し、2変量以上の場合には回帰分析を応用した回帰推定法を利用した。ただし、平均値代替法では変動係数に上限値を設け、回帰推定法では有意の相関の場合のみに限定して精度の維持を図った。具体例によると、平均値代替法を利用した場合には、平均値ベクトルは当然不偏であるが、分散ベクトルの一致性はそれ程高くなかった。回帰推定法を利用した2変量および7変量の場合で

は、いずれの欠測値処理でも平均値ベクトルの不偏性、分散ベクトルの一致性がともに確認された。したがって、簡便さや計算時間の短い点で平均値代替法、推定精度の点で回帰推定法が良好であった。

以上述べたように、疫学、生物調査で生じた異常値や欠測値について統計学的に有効な処理方法が得られた。この報告での異常値、欠測値処理はコンピュータを利用したが、この処理方法はマイコンレベルでも充分可能であり、最近マイコン、パソコンの普及が目ざましいことを考えると、今後この処理方法がより一層利用されることが期待される。

#### 文 献

- 1) 竹内 啓、大橋靖雄：統計的推測—2 標本問題, 29, 1981, 日本評論社
- 2) 増山元三郎：応用統計学, 8, 1, 31, 1979
- 3) 奥野忠一：昭和50年度統計調査技術開発研究報告書, 38, 1976, 全国統計協会連合会
- 4) Pollard, J. H.: *A Handbook of Numerical and Statistical Techniques*, 168, 1977, Cambridge Univ. Press, London

## 皇居外苑濠の水質 —植物プランクトン量と栄養塩との関係—

渡辺 真利代\*, 土屋 悦輝\*, 西垣 進\*

### Water Qualities of Outer Moats around the Imperial Palace —Relations between the Amounts of Phytoplankton and Nutrients—

MARIYO F. WATANABE\*, YOSHITERU TSUCHIYA\* and SUSUMU NISHIGAKI\*

**Keywords:** 濠 moat, 植物プランクトン phytoplankton, 窒素 nitrogen, 磷 phosphorus, 炭素 carbon

#### 緒 言

皇居濠は都心の数少ない緑深き憩いの場として景観上からの望ましい姿を要求されるばかりでなく、地震等の緊急時には、簡易な処理を前提としても飲料水となりうるより良い水質が必要とされる。皇居外濠群の水質は、1930年代のいくつかの報告<sup>1-3)</sup>と比較してみると明らかに富栄養化しており、その結果植物プランクトン量の著しい増加がみられている。植物プランクトンは水界生態系における一次生産者として水界への有機物負荷を増大させるため、この植物プランクトンをいかにして減少させるかが良好な水質維持のための重要な点となってくる。そこでここ2年間のデータのなかから植物プランクトンをめぐる栄養塩の問題を考察した。

#### 調査時期および地点

調査は1980年5月、8月、11月、1981年2月、5月、8月、11月、1982年2月に実施した。調査を実施した濠は日比谷濠 (st. 1, 2), 蛤濠 (st. 3), 桔梗濠 (st. 4), 清水濠 (st. 5), 牛ヶ淵濠 (st. 6), 千鳥ヶ淵濠 (st. 7), 半蔵濠 (st. 8), 桜田濠 (st. 9, 10, 11) の8濠11地点である。

#### 調査方法

採水は表面水について行ない、実験室に持ち帰った後試水をグラスファイバーろ紙 (Whatman GF/C) で濾別した。濾別に際し、懸濁態有機物測定用にはあらかじめ500℃で1時間焼いたろ紙を使用した。クロロフィル a は Strickland & Parsons の法<sup>4)</sup>により、懸濁態有機態磷は Menzel & Corwin の法<sup>5)</sup>により定量した。また懸濁態有機態炭素および懸濁態有機態窒素は CHN コーダ (柳本 Co) を用いて定量した。

#### 結果および考察

図1に各地点毎のここ2年間のクロロフィル a (以下

chl. a) の変化を示した。いずれの地点とも夏期には *Microcystis aeruginosa* の“水の華”の形成がみられるため、夏に最高の chl. a 量が測定されるような富栄養化の進んだ水界である。st. 6 以外の地点では '81 年の chl. a 値のほうが '80 年より高くなっている。ここ数年の値と比較してみると '81 年の値のほうが外濠の平均的値を示している。このようなクロロフィル a 量で示される植物プランクトン量の変化が、外濠全体として何によって制限されているのかを明らかにするため、chl. a と懸濁態有機態炭素 (POC), 懸濁態有機態窒素 (PON), 懸濁態有機態磷 (POP) との関係調べた (図2)。chl. a とフェオフィチン a の合計と POP, PON, POC それぞれとの相関係数は 0.64, 0.85, 0.76 となりいずれも相関の良いことが示された。特にそのなかでは窒素と植物プランクトン量との相関が高いことが示されており、濠水の植物プランクトンの増殖に対しまず窒素が制限要因となっている可能性が示唆された。

次に各地点毎の P/C, N/C, N/P 値を調べてみた (表1)。Heaney & Hendzel<sup>6)</sup> は P 欠乏がおきていない値として P/C 値が 20~30 N/P 値が 10 以下の値を、N 欠乏がおきていない値として N/C 値 140 以上を提出している。P/C 値, N/P 値とも上記の範囲からずれ、P 欠乏の可能性のあるのは st. 9, 10, 11 の桜田濠である。しかし P 欠乏がおこりうる条件としてもっと高い N/P 値をだしている例<sup>9)</sup> もあり、桜田濠は、外濠群のなかでは相対的に P 欠乏がおこり易い条件下にあり、その他の濠は N 欠乏条件下に傾いていると考えた方が妥当であろう。濠による差異については、P や N を添加した際の消費速度<sup>9)</sup> や他のパラメーターなどを測定した後に詳細に検討していく必要がある。Schindler<sup>10)</sup> は植物プランクトンの増殖に対する制限要因として P が最も重要である

\* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

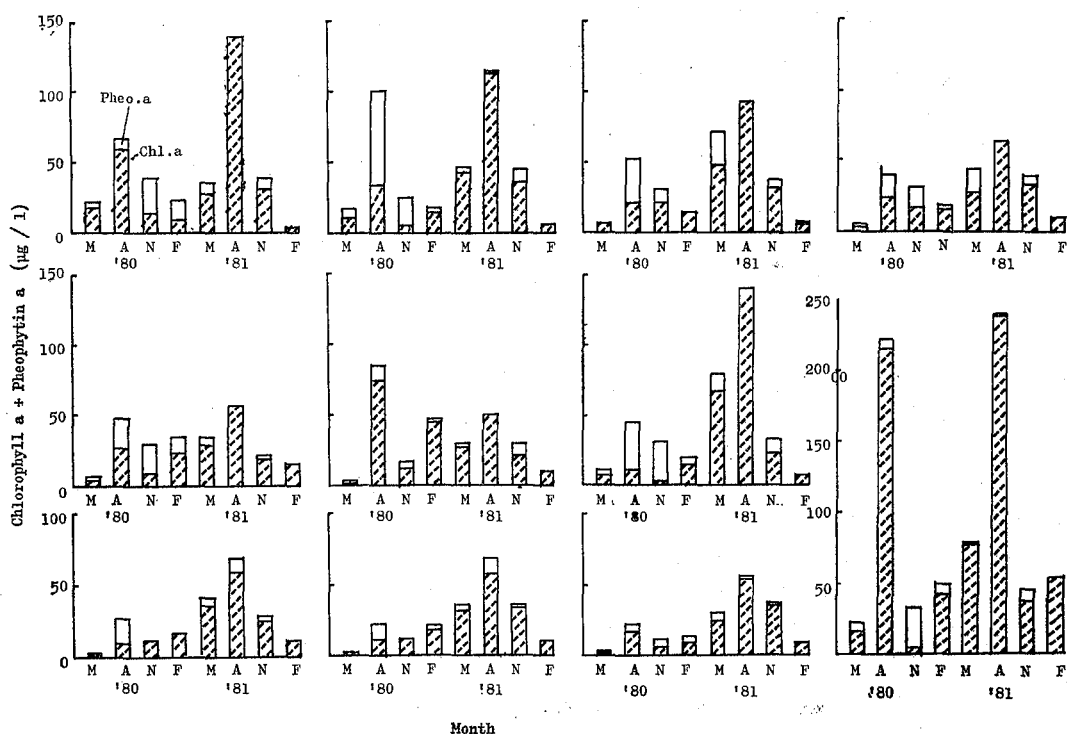


Fig.1. Seasonal Changes in the Amounts of Chlorophyll a+Pheophytin a.

Table 1. Ratios of  $\mu\text{g}$  particulate P/mg particulate C,  $\mu\text{g}$  particulate N/mg particulate C and  $\mu\text{g}$  particulate N/ $\mu\text{g}$  particulate P.

| Station No. | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| P/C         | 22.4 | 22.1 | 32.2 | 25.4 | 28.6 | 17.9 | 22.1 | 21.4 | 11.4 | 11.6 | 15.1 |
| N/C         | 137  | 138  | 140  | 141  | 151  | 169  | 168  | 155  | 140  | 130  | 158  |
| N/P         | 6.12 | 6.26 | 4.34 | 5.56 | 5.31 | 9.45 | 7.63 | 7.24 | 12.3 | 9.13 | 10.5 |

ことを示すとともに、NはPとともに補給された場合にのみ植物プランクトンの増殖を促進すると述べている。藻水のような富栄養あるいは hypertrophic と称される水界においては、この原理があてはまるのだろうか。また藻水がN欠乏の条件下にあるとしたら、何故  $\text{N}_2$  を固定しないような藍藻 *Microcystis* が優占しているのだろうか<sup>11)</sup>。今後、植物プランクトンの増殖を抑制している要因について更に詳細に解析し、藻水浄化の方向をさぐりたい。

#### 文 献

- 1) 倉茂英次郎：気象集誌，10，475，1932
- 2) 洞沢 勇：陸水学会誌，2，29，1932
- 3) 酒井 徹：東京市立衛生研究所報告，8，47，1932
- 4) Strickland, J.D.H. and Parsons, T.R.: *A Practical Handbook of Sea Water Analysis*, 1968, Fish. Res. Bd. Can.
- 5) Menzel, D.W. and Corwin, N.: *Limnol. & Oceanogr.*, 10, 280, 1965
- 6) Healey, F.P. and Hendzel, L.L.: *J. Fish. Res. Bd. Ca.* 36, 1364, 1979
- 7) Healey, F.P. and Hendzel, L.L.: *ibid.*, 37, 442, 1980
- 8) Rhee, G-Y.: *Limnol. & Oceanogr.*, 23, 10, 1978

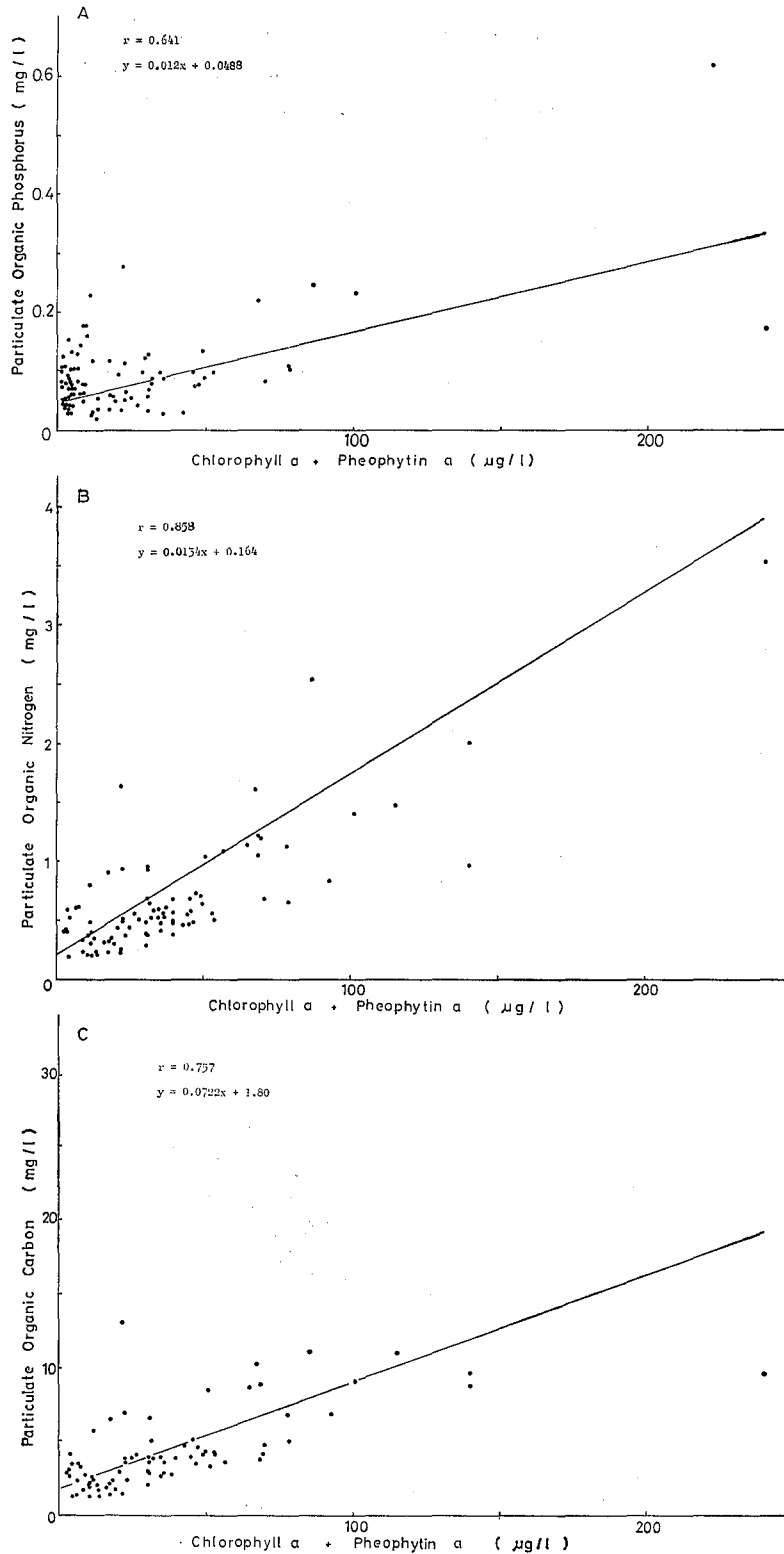


Fig. 2. Relations between Particulate Organic Components and Chlorophyll a+Pheophytin a.  
 A : Particulate Organic Phosphorus    B : Particulate Organic Nitrogen  
 C : Particulate Organic Carbon



- 9) Healey, F. P.: *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.*, 21, 34, 1978  
10) Schindler, D. W.: *Science*, 195, 260, 1977  
11) Zevenboom, W. and Mur, L. R.: *Developments in Hydrobiology II*, Eds. Barica, J. and Mur, L. R., 123, 1980, Dr. W. Junk bv Publishers, Hague

報 文 V

毒性に関する調査研究

REPORTS V

PAPERS CONCERNING ON TOXICOLOGY

Table 1. Body Weight Gain and Growth Rate

|                      | BHT     | % | 0                   | 0.07    | 0.20   | 0.60   | 0       | 0.07   | 0.20    | 0.6    |
|----------------------|---------|---|---------------------|---------|--------|--------|---------|--------|---------|--------|
|                      | LAS     | % | 0                   | 0       | 0      | 0      | 0.20    | 0.20   | 0.20    | 0.20   |
| Male <sup>1)</sup>   | Initial |   | 112±8 <sup>2)</sup> | 115±6   | 113±7  | 112±9  | 110±5   | 112±5  | 111±7   | 110±7  |
|                      | Final   |   | 386±32              | 409±20  | 407±26 | 382±23 | 408±27  | 395±18 | 409±27  | 393±19 |
|                      | Gain    | g | 274±28              | 303±21  | 295±21 | 270±16 | 298±26  | 283±17 | 299±25  | 283±17 |
|                      |         | % | 345±27              | 388±29* | 361±18 | 342±18 | 370±26* | 352±18 | 371±25* | 358±32 |
| Female <sup>1)</sup> | Initial |   | 94±3                | 95±5    | 92±5   | 92±4   | 92±4    | 93±4   | 92±4    | 93±5   |
|                      | Final   |   | 217±15              | 216±11  | 211±7  | 209±10 | 212±12  | 211±14 | 208±10  | 205±11 |
|                      | Gain    | g | 122±13              | 121±10  | 119±8  | 117±10 | 121±12  | 118±14 | 116±10  | 112±9  |
|                      |         | % | 229±12              | 228±13  | 229±5  | 227±13 | 231±17  | 226±17 | 226±14  | 220±9  |

\* p&lt;0.05

<sup>1)</sup> No. of Rats is 10<sup>2)</sup> mean±SD

台にランダムに配置し、6ヶ月(26週)間にわたる試料添加飼料の投与を開始した。

動物の一般状態は毎日観察し、体重は6週までは隔週、以後4～5週毎に測定した。体重は試験開始時体重を100とした増加率について比較した。

#### 4. 検査項目ならびに検査方法

6ヶ月間の試験終了時に次の項目について測定した。

##### i) 血液学的検査

a) 白血球数(WBC), b) 赤血球数(RBC), c) ヘモグロビン量(HGB), d) ヘマトクリット値(HCT), e) 平均赤血球容積(MCV), f) 平均赤血球ヘモグロビン量(MCH), g) 平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC), h) 白血球分画百分率

##### ii) 血清生化学的検査

a) 総蛋白量(TP), b) グルコース量(GLU), c) 総コレステロール量(CHO), d) 尿素窒素量(UN), e) トランスアミナーゼ活性(GOTならびにGPT), f) アルカリフォスファターゼ活性(ALP)

##### iii) 器官重量

脳、心臓、肺、肝臓、腎臓(左、右)、脾臓、胸腺、下垂体、甲状腺、精巣(左、右)、卵巢、副腎(左、右)、前立腺、子宮

なお、ラットの屠殺、採血ならびに血液、血清生化学的検査、器官の秤量等の方法については当部の定法<sup>3,7)</sup>に従った。また、測定値はすべて推計学的に処理し、危険率は5%とした。

#### 試験結果ならびに考察

1. 一般状態: 試験各群と対照群との間に特に差を認めなかった。

2. 体重: 体重の増加ならびに増加率を Table 1 に示した。雄の0.07T, LAS および0.20Tの体重増加率が有意に大きかったが、雌雄を通してBHTの体重増加に対する作用にLASの影響は認めなかった。

3. 血液学的検査: 白血球数(WBC), 赤血球数(RBC), ヘモグロビン量(HGB), ヘマトクリット値(HCT), 平均赤血球容積(MCV), 平均赤血球ヘモグロビン量(MCH), 平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)を Table 2 に、白血球分画百分率を Table 3 に示した。

結果中に推計学的に有意な変動が散見されたが、投与に依存した変化はみられず、従ってBHTの作用に対するLASの影響はみられなかった。

4. 血清生化学的検査: 結果を Table 4 に示した。雌の総コレステロール量(CHO)はBHT単独投与(T)群でBHT投与量に依存した増加がみられ、LASには特に変化がなく、BHTとLAS併用投与(LT)群ではBHT単独投与の場合と同程度、同一傾向の変化を示した。トランスアミナーゼ(GOTならびにGPT)は雌雄を通してBHT単独投与群でBHT投与量に依存した活性の低下がみられたが、BHTとLAS併用投与でも同程度、同傾向の低下がみられた。なお、LASの値はCont.群の値と大差なかった。

5. 器官重量: 結果は Table 5 に示した。BHT単独投与でBHT投与量に依存した重量変動を示した器官は雌雄の肝臓、腎臓、雌の脳、心臓、肺、卵巢、副腎で重量増加であった。これに対してBHTとLAS併用投与群においても同程度、同傾向の重量増加が認められた。

以上本試験条件下ではBHTの作用に対してLASの

Table 2. Hematology

|                      | BHT<br>% | LAS<br>% | WBC<br>$\times 10^3$          | RBC<br>$\times 10^6$ | HGB<br>g/dl    | HCT<br>%        | MCV<br>$\mu^3$  | MCH<br>$\mu\mu\text{g}$ | MCHC<br>%       |
|----------------------|----------|----------|-------------------------------|----------------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------------------|-----------------|
| Male <sup>1)</sup>   | 0        | 0        | 4.36 $\pm$ 0.97 <sup>2)</sup> | 8.228 $\pm$ 0.316    | 15.0 $\pm$ 0.6 | 40.6 $\pm$ 1.8  | 50.1 $\pm$ 0.7  | 18.3 $\pm$ 0.8          | 36.9 $\pm$ 1.0  |
|                      | 0.07     | 0        | 4.00 $\pm$ 1.50               | 8.363 $\pm$ 0.427    | 15.2 $\pm$ 0.7 | 41.6 $\pm$ 2.5  | 49.2 $\pm$ 3.5  | 16.7 $\pm$ 3.5          | 36.6 $\pm$ 1.2  |
|                      | 0.20     | 0        | 4.36 $\pm$ 1.62               | 8.573 $\pm$ 0.442    | 15.3 $\pm$ 0.6 | 42.4 $\pm$ 2.1  | 49.5 $\pm$ 0.5  | 17.9 $\pm$ 0.5          | 36.2 $\pm$ 1.1  |
|                      | 0.60     | 0        | 3.66 $\pm$ 0.64               | 8.189 $\pm$ 0.526    | 14.7 $\pm$ 0.8 | 37.9 $\pm$ 8.8  | 49.3 $\pm$ 0.7  | 18.0 $\pm$ 0.5          | 36.5 $\pm$ 1.1  |
|                      | 0        | 0.20     | 4.78 $\pm$ 1.16               | 8.626 $\pm$ 0.489*   | 15.3 $\pm$ 0.7 | 42.4 $\pm$ 2.5  | 49.7 $\pm$ 0.7  | 17.9 $\pm$ 0.6          | 36.3 $\pm$ 1.0  |
|                      | 0.07     | 0.20     | 4.33 $\pm$ 0.83               | 8.569 $\pm$ 0.476    | 15.2 $\pm$ 0.5 | 41.4 $\pm$ 1.6  | 49.8 $\pm$ 0.6  | 18.3 $\pm$ 0.4          | 36.8 $\pm$ 0.8  |
|                      | 0.20     | 0.20     | 4.68 $\pm$ 1.23               | 8.257 $\pm$ 0.551    | 14.9 $\pm$ 0.8 | 40.1 $\pm$ 3.3  | 49.2 $\pm$ 0.6* | 18.3 $\pm$ 0.4          | 37.1 $\pm$ 1.2  |
|                      | 0.60     | 0.20     | 3.64 $\pm$ 0.84               | 8.341 $\pm$ 0.346    | 14.8 $\pm$ 0.5 | 41.3 $\pm$ 1.0  | 49.0 $\pm$ 0.7  | 17.7 $\pm$ 0.5*         | 35.9 $\pm$ 1.0* |
| Female <sup>1)</sup> | 0        | 0        | 2.37 $\pm$ 0.65               | 7.732 $\pm$ 0.240    | 14.6 $\pm$ 0.4 | 39.8 $\pm$ 1.4  | 51.9 $\pm$ 0.7  | 19.1 $\pm$ 0.5          | 36.5 $\pm$ 0.9  |
|                      | 0.07     | 0        | 2.53 $\pm$ 0.65               | 7.910 $\pm$ 0.282    | 15.0 $\pm$ 0.5 | 41.0 $\pm$ 1.7  | 52.2 $\pm$ 0.6  | 19.1 $\pm$ 0.6          | 36.6 $\pm$ 1.3  |
|                      | 0.20     | 0        | 2.45 $\pm$ 0.49               | 7.945 $\pm$ 0.414    | 14.9 $\pm$ 0.6 | 39.9 $\pm$ 2.1  | 51.5 $\pm$ 1.3  | 19.3 $\pm$ 0.9          | 37.3 $\pm$ 1.6  |
|                      | 0.60     | 0        | 2.19 $\pm$ 0.36               | 7.735 $\pm$ 0.450    | 14.2 $\pm$ 0.7 | 38.5 $\pm$ 2.6  | 50.2 $\pm$ 0.4* | 18.5 $\pm$ 0.5*         | 36.9 $\pm$ 1.2  |
|                      | 0        | 0.20     | 2.53 $\pm$ 0.48               | 8.144 $\pm$ 0.650    | 15.2 $\pm$ 0.9 | 41.9 $\pm$ 3.4  | 52.1 $\pm$ 0.7  | 19.0 $\pm$ 0.5          | 36.4 $\pm$ 0.9  |
|                      | 0.07     | 0.20     | 2.36 $\pm$ 0.56               | 7.856 $\pm$ 0.408    | 14.9 $\pm$ 0.8 | 39.8 $\pm$ 1.8  | 51.6 $\pm$ 0.9  | 19.3 $\pm$ 0.6          | 37.3 $\pm$ 1.1  |
|                      | 0.20     | 0.20     | 2.99 $\pm$ 1.75               | 7.793 $\pm$ 0.244    | 14.5 $\pm$ 0.3 | 39.5 $\pm$ 1.1  | 51.4 $\pm$ 0.5  | 18.9 $\pm$ 0.3          | 36.7 $\pm$ 0.6  |
|                      | 0.60     | 0.20     | 2.66 $\pm$ 0.69               | 7.712 $\pm$ 0.467    | 14.1 $\pm$ 0.7 | 38.1 $\pm$ 2.1* | 50.6 $\pm$ 0.5* | 18.7 $\pm$ 0.7          | 37.9 $\pm$ 2.3  |

\*  $p < 0.05$ <sup>1)</sup> No. of Rats is 10<sup>2)</sup> mean $\pm$ SD

Table 3. Percent Differential of Leucocytes

|                      | BHT<br>% | LAS<br>% | Neutro.                      | Lympho.         | Mono.         | Eosino.        |
|----------------------|----------|----------|------------------------------|-----------------|---------------|----------------|
| Male <sup>1)</sup>   | 0        | 0        | 14.3 $\pm$ 4.6 <sup>2)</sup> | 83.3 $\pm$ 4.4  | 0.9 $\pm$ 1.1 | 0.6 $\pm$ 0.6  |
|                      | 0.07     | 0        | 17.1 $\pm$ 8.2               | 79.8 $\pm$ 7.9  | 1.7 $\pm$ 1.5 | 1.2 $\pm$ 0.7  |
|                      | 0.20     | 0        | 18.9 $\pm$ 7.2               | 77.1 $\pm$ 7.2* | 1.2 $\pm$ 0.6 | 1.8 $\pm$ 1.2* |
|                      | 0.60     | 0        | 13.0 $\pm$ 3.4               | 84.4 $\pm$ 4.4  | 0.8 $\pm$ 0.7 | 1.2 $\pm$ 1.0  |
|                      | 0        | 0.20     | 16.3 $\pm$ 7.0               | 80.3 $\pm$ 6.9  | 1.5 $\pm$ 1.1 | 0.9 $\pm$ 1.1  |
|                      | 0.07     | 0.20     | 18.8 $\pm$ 7.1               | 79.0 $\pm$ 7.2  | 0.9 $\pm$ 1.1 | 0.8 $\pm$ 0.7  |
|                      | 0.20     | 0.20     | 16.8 $\pm$ 3.9               | 81.0 $\pm$ 4.3  | 1.0 $\pm$ 0.8 | 0.5 $\pm$ 0.5  |
|                      | 0.60     | 0.20     | 16.0 $\pm$ 7.9               | 81.5 $\pm$ 8.6  | 0.9 $\pm$ 0.8 | 0.7 $\pm$ 1.0  |
| Female <sup>1)</sup> | 0        | 0        | 14.9 $\pm$ 7.1               | 82.9 $\pm$ 7.4  | 1.0 $\pm$ 1.4 | 0.9 $\pm$ 1.1  |
|                      | 0.07     | 0        | 17.3 $\pm$ 8.6               | 80.4 $\pm$ 8.7  | 1.1 $\pm$ 0.7 | 0.8 $\pm$ 1.0  |
|                      | 0.20     | 0        | 18.8 $\pm$ 8.2               | 79.3 $\pm$ 8.1  | 0.8 $\pm$ 0.6 | 0.7 $\pm$ 0.4  |
|                      | 0.60     | 0        | 16.0 $\pm$ 4.3               | 83.0 $\pm$ 3.9  | 0.6 $\pm$ 0.8 | 0.2 $\pm$ 0.4  |
|                      | 0        | 0.20     | 17.3 $\pm$ 7.6               | 81.3 $\pm$ 8.3  | 0.3 $\pm$ 0.4 | 0.7 $\pm$ 0.6  |
|                      | 0.07     | 0.20     | 16.1 $\pm$ 4.7               | 82.6 $\pm$ 5.7  | 0.5 $\pm$ 0.7 | 0.3 $\pm$ 0.4  |
|                      | 0.20     | 0.20     | 15.1 $\pm$ 4.7               | 84.4 $\pm$ 4.2  | 0.7 $\pm$ 0.6 | 0.6 $\pm$ 0.5  |
|                      | 0.60     | 0.20     | 14.7 $\pm$ 5.2               | 83.5 $\pm$ 5.6  | 1.0 $\pm$ 0.8 | 0.4 $\pm$ 0.6  |

\*  $p < 0.05$ <sup>1)</sup> No. of Rats is 10<sup>2)</sup> mean $\pm$ SD

Table 4. Serum Biochemistry

|                      | BHT<br>% | LAS<br>% | TP<br>g/dl             | GLU<br>mg/dl | CHO<br>mg/dl | UN<br>mg/dl | GOT<br>U/ml | GPT<br>U/ml | ALP<br>U/ml |
|----------------------|----------|----------|------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Male <sup>a)</sup>   | 0        | 0        | 11.4±1.2 <sup>2)</sup> | 205±31       | 125±27       | 28±9        | 152±22      | 94±24       | 57±14       |
|                      | 0.07     | 0        | 11.2±1.8               | 194±31       | 125±26       | 26±8        | 121±12*     | 67±12       | 54±14       |
|                      | 0.20     | 0        | 11.3±1.4               | 194±26       | 121±18       | 26±7        | 121±21*     | 59±11       | 47±13       |
|                      | 0.60     | 0        | 11.3±1.0               | 192±29       | 123±15       | 30±10       | 99±15*      | 53±12       | 43±7        |
|                      | 0        | 0.20     | 10.9±1.3(9)            | 194±36       | 111±14       | 20±4        | 141±30      | 105±25      | 48±15       |
|                      | 0.07     | 0.20     | 11.8±0.9               | 211±24       | 134±12       | 23±4        | 126±22*     | 79±14       | 59±13       |
|                      | 0.20     | 0.20     | 11.8±1.8               | 208±41       | 139±25       | 23±4        | 123±17*     | 65±14       | 58±15       |
|                      | 0.60     | 0.20     | 11.6±1.2               | 180±35       | 127±18       | 27±9        | 102±22*     | 54±9        | 48±7        |
| Female <sup>b)</sup> | 0        | 0        | 10.1±1.5               | 164±29       | 142±25       | 19±5        | 118±31      | 72±27       | 44±12       |
|                      | 0.07     | 0        | 9.6±1.1                | 148±22(9)    | 146±24(9)    | 17±2        | 115±29(9)   | 56±33(9)    | 38±4(9)     |
|                      | 0.20     | 0        | 10.1±0.9               | 154±17       | 159±21       | 21±5        | 107±15      | 55±27       | 42±9        |
|                      | 0.60     | 0        | 11.1±1.3               | 156±24       | 197±26*      | 21±4        | 88±16*      | 35±7*       | 31±8*       |
|                      | 0        | 0.20     | 10.1±1.6               | 168±25       | 138±25       | 20±5        | 116±19      | 62±23       | 40±10       |
|                      | 0.07     | 0.20     | 10.4±2.0(9)            | 159±30(9)    | 145±32(9)    | 18±3(9)     | 100±15(9)   | 50±9*       | 42±13(8)    |
|                      | 0.20     | 0.20     | 10.2±1.1               | 157±17       | 158±20       | 21±7        | 94±14*      | 47±8*       | 36±7        |
|                      | 0.60     | 0.20     | 11.0±1.6               | 156±18       | 189±31*      | 20±4        | 99±32       | 39±8*       | 36±7        |

\* p&lt;0.05

<sup>1)</sup> No. of Rats is 10 except presented in parenthesis<sup>2)</sup> mean±SD

影響は認められなかった。

## ま と め

BHT の作用に対する LAS の影響を5週令 Slc: Wistar ラット雌雄各8群夫々10匹を用い、BHT 0, 0.07, 0.20ならびに0.6%単独添加飼料とこれらに LAS 0.2% を夫々添加した飼料による6ヶ月(26週)間の飼育試験を行った。

観察指標を一般状態、体重変動、血液学的変動、血清生化学的変動ならびに器官重量の変動としたが、BHT の作用に対する LAS の作用は認められなかった。

## 文 献

- 1) 小林博義, 市川久次, 藤井 孝, 矢野範男, 紺野敏秀, 平賀興吾, 中村 弘, 渡辺悠二, 三村秀一: 東京衛研年報, 24, 397, 1972
- 2) 米山允子, 藤井 孝, 伊川三枝子, 柴 英子, 坂本義光, 矢野範男, 小林博義, 市川久次, 平賀興吾: 東京衛研年報, 24, 409, 1972
- 3) 米山允子, 益淵正典, 大石真之, 高橋 省, 伊川三

枝子, 吉田誠二, 大石向江, 三栗谷久敏, 湯沢勝広, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 73, 1977

- 4) 藤井 孝, 坂本義光, 阿部幸恵, 三栗谷久敏, 湯沢勝広, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 85, 1977
- 5) 高橋昭夫, 佐藤 薫, 安藤 弘, 久保喜一, 平賀興吾: 東京衛研年報, 26-2, 67, 1975
- 6) 藤田 博, 小島昭江, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 112, 1977
- 7) 市川久次, 小林博義, 中川好男, 長井二三子, 厚井麻理, 池田虎雄, 矢野範男: 東京衛研年報, 22, 231, 1975
- 8) 平賀興吾, 林田志信, 市川久次, 米山允子, 藤井 孝, 池田虎雄, 矢野範男: 東京衛研年報, 22, 231, 1975
- 9) 市川久次, 林田志信, 米山允子, 藤井 孝, 小林博義, 坂本義光, 池田虎雄, 矢野範男, 紺野敏秀, 平賀興吾: 東京衛研年報, 23, 345, 1971

Table 5. Organ Weights

|                      | BHT<br>% | LAS<br>% | Brain <sup>2)</sup>   | Heart <sup>2)</sup> | Lung <sup>2)</sup> | Liver <sup>3)</sup> | Kidney <sup>2)</sup> |           | Spleen <sup>2)</sup>  | Thymus <sup>2)</sup> | Pituitary <sup>2)</sup> | Thyroid <sup>2)</sup>   | Testis <sup>2)</sup> or Ovary <sup>2)</sup> |          | Adrenal <sup>2)</sup>   |                         | Prostate <sup>2)</sup> or Uterus |
|----------------------|----------|----------|-----------------------|---------------------|--------------------|---------------------|----------------------|-----------|-----------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------------------------|----------|-------------------------|-------------------------|----------------------------------|
|                      |          |          |                       |                     |                    |                     | (L)                  | (R)       |                       |                      |                         |                         | (L)                                         | (R)      | (L)                     | (R)                     |                                  |
| Male <sup>1)</sup>   | 0        | 0        | 2026±93 <sup>2)</sup> | 941±97              | 1136±207           | 11.61±1.20          | 1219±168             | 1196±185  | 681±97                | 134±14               | 10.3±2.8                | 19.7±5.7 <sup>(9)</sup> | 1645±91                                     | 1598±95  | 20.8±5.6                | 18.2±3.3                | 355±119                          |
|                      |          |          | 532±37 <sup>2)</sup>  | 246±18              | 295±40             | 3.03±0.14           | 317±26               | 311±29    | 177±16                | 35±3                 | 2.6±0.7                 | 5.1±1.3 <sup>(9)</sup>  | 432±29                                      | 419±30   | 5.3±1.3                 | 4.7±0.9                 | 91±27                            |
|                      | 0.07     | 0        | 2034±55               | 979±68              | 1181±227           | 12.51±0.60          | 1299±146             | 1323±130  | 689±45                | 145±46               | 9.8±1.8                 | 21.8±4.9 <sup>(9)</sup> | 1723±61*                                    | 1680±51* | 20.2±4.7                | 19.3±2.2                | 329±85                           |
|                      |          |          | 507±28                | 244±15              | 294±54             | 3.11±0.10           | 323±30               | 329±25    | 171±5                 | 36±11                | 2.4±0.4                 | 5.3±1.2 <sup>(9)</sup>  | 429±19                                      | 419±22   | 5.0±1.2                 | 4.8±0.6                 | 82±22                            |
|                      | 0.20     | 0        | 2035±51               | 1007±35             | 1126±104           | 13.32±1.09*         | 1293±100             | 1326±131  | 705±61                | 133±17               | 10.5±2.5                | 21.8±4.3 <sup>(9)</sup> | 1662±157                                    | 1607±120 | 21.9±1.9                | 20.5±2.6                | 357±101                          |
|                      |          |          | 509±28                | 251±20              | 281±23             | 3.32±0.18*          | 322±14               | 331±25    | 176±16                | 33±4                 | 2.9±0.5                 | 5.4±1.1 <sup>(9)</sup>  | 414±26                                      | 401±20   | 5.4±0.6                 | 5.1±0.6                 | 90±30                            |
|                      | 0.60     | 0        | 2008±70               | 980±90              | 1118±120           | 16.36±1.61*         | 1395±140*            | 1355±132* | 692±72                | 134±30               | 10.9±1.9                | 21.6±5.2 <sup>(8)</sup> | 1677±94                                     | 1648±83  | 20.2±4.2                | 19.8±2.1                | 336±108                          |
|                      |          |          | 539±33                | 262±12              | 299±35             | 4.37±0.23*          | 373±25*              | 362±21*   | 185±19                | 36±6                 | 2.9±0.5                 | 5.7±1.3 <sup>(8)</sup>  | 449±23                                      | 442±21   | 5.4±1.0                 | 5.3±0.4                 | 90±26                            |
|                      | 0        | 0.20     | 2017±40               | 970±87              | 1164±110           | 11.43±1.72          | 1237±191             | 1212±142  | 667±105               | 130±39               | 10.3±2.1 <sup>(9)</sup> | 21.2±4.4 <sup>(5)</sup> | 1629±107                                    | 1572±94  | 20.7±4.7                | 20.0±3.2                | 336±129                          |
|                      |          |          | 510±39                | 244±20              | 293±27             | 2.86±0.26           | 310±32               | 304±21    | 167±17                | 33±9                 | 2.5±0.4                 | 5.3±0.9 <sup>(9)</sup>  | 411±31                                      | 397±34   | 5.1±1.2                 | 4.9±0.7                 | 84±30                            |
|                      | 0.07     | 0.20     | 2046±59               | 967±65              | 1085±65            | 11.95±0.68          | 1214±87              | 1219±106  | 725±376               | 122±29               | 10.3±2.0                | 19.9±4.9 <sup>(9)</sup> | 1656±55                                     | 1624±48  | 19.5±3.6                | 18.7±3.5                | 326±79                           |
|                      |          |          | 528±21                | 249±19              | 280±19             | 3.08±0.13           | 313±15               | 314±21    | 185±86                | 31±8                 | 2.6±0.6                 | 5.0±1.3 <sup>(9)</sup>  | 427±19                                      | 419±17   | 5.0±0.9                 | 4.8±0.9                 | 84±20                            |
|                      | 0.20     | 0.20     | 2033±59               | 1011±57             | 1110±158           | 14.42±1.22*         | 1269±104             | 1223±96   | 692±45                | 143±47               | 10.8±2.0                | 22.1±7.2 <sup>(8)</sup> | 1716±58                                     | 1621±215 | 23.4±6.9                | 20.9±5.8                | 337±84                           |
|                      |          |          | 508±36                | 251±9               | 276±40             | 3.59±0.20           | 317±30               | 305±22    | 172±14                | 35±11                | 2.6±0.4                 | 5.4±1.6 <sup>(8)</sup>  | 428±30                                      | 404±52   | 5.8±1.5                 | 5.1±1.3                 | 84±21                            |
|                      | 0.60     | 0.20     | 1989±85               | 972±85              | 1113±228           | 16.70±1.22*         | 1323±103             | 1334±105  | 631±70                | 124±35               | 9.6±0.9 <sup>(9)</sup>  | 23.0±5.7 <sup>(6)</sup> | 1692±113                                    | 1633±97  | 22.6±4.2                | 21.0±1.7                | 384±91                           |
|                      |          |          | 521±32                | 254±17              | 290±51             | 4.37±0.22*          | 346±26*              | 349±24*   | 165±18                | 32±9                 | 2.5±0.2                 | 6.1±1.6 <sup>(6)</sup>  | 443±33                                      | 428±30   | 5.9±1.1                 | 5.5±0.5                 | 101±26                           |
| Female <sup>1)</sup> | 0        | 0        | 1855±44               | 642±73              | 792±81             | 6.35±0.61           | 775±108              | 739±82    | 435±55                | 133±18               | 15.8±3.6                | 17.0±5.7                | 54.1±13.5                                   |          | 23.4±4.4                | 24.0±3.1                | 696±105                          |
|                      |          |          | 883±63                | 304±29              | 376±42             | 3.00±0.20           | 367±46               | 351±40    | 206±23                | 63±9                 | 7.4±1.6                 | 8.2±2.7                 | 25.5±5.6                                    |          | 11.1±4.2                | 11.4±2.3                | 329±35                           |
|                      | 0.07     | 0        | 1876±88               | 647±48              | 783±99             | 6.53±0.72           | 790±83               | 794±148   | 446±40                | 139±27               | 15.5±5.3                | 16.5±4.8                | 55.0±14.0                                   |          | 28.1±4.1*               | 26.0±3.4                | 677±91                           |
|                      |          |          | 903±85                | 311±36              | 377±63             | 3.12±0.17           | 381±59               | 383±91    | 215±29                | 67±13                | 7.5±2.9                 | 8.0±2.7                 | 26.6±7.8                                    |          | 13.4±2.6*               | 12.5±2.1 <sup>(9)</sup> | 324±33                           |
|                      | 0.20     | 0        | 1854±92               | 635±51              | 798±121            | 6.97±0.55*          | 798±82               | 805±124   | 462±43                | 134±17               | 17.0±5.4                | 15.2±5.2                | 55.8±18.0 <sup>(9)</sup>                    |          | 24.4±5.0                | 25.1±3.5                | 661±89                           |
|                      |          |          | 920±76                | 314±23              | 396±65             | 3.45±0.22*          | 395±42               | 399±61*   | 228±19*               | 66±8                 | 8.4±2.5                 | 7.5±2.4                 | 27.5±7.9                                    |          | 12.1±2.7                | 12.4±1.6                | 328±50                           |
|                      | 0.60     | 0        | 1916±70*              | 672±72              | 856±107            | 8.67±0.34*          | 843±85               | 842±115*  | 441±55                | 129±10               | 19.1±2.5*               | 21.6±4.6 <sup>(6)</sup> | 57.3±12.1                                   |          | 31.0±4.4*               | 29.5±5.3*               | 656±122                          |
|                      |          |          | 960±57*               | 335±25*             | 428±54*            | 4.38±0.15*          | 422±54*              | 421±58*   | 219±18                | 65±6                 | 9.5±1.4*                | 10.8±2.2                | 28.5±4.9                                    |          | 15.4±1.6*               | 14.8±2.7*               | 326±45                           |
|                      | 0        | 0.20     | 1884±55               | 607±77              | 798±86             | 5.86±0.54           | 757±68               | 728±66    | 446±23                | 135±16               | 14.5±2.4                | 15.9±4.4                | 52.2±11.0                                   |          | 26.7±3.7                | 25.8±4.3                | 639±116                          |
|                      |          |          | 932±71                | 300±38              | 395±52             | 2.88±0.11           | 373±37               | 359±32    | 222±20 <sup>(9)</sup> | 65±5                 | 7.0±1.1                 | 7.8±1.9                 | 25.6±4.6                                    |          | 13.2±2.2*               | 12.7±2.3                | 313±44                           |
|                      | 0.07     | 0.20     | 1875±62               | 637±72              | 770±56             | 6.34±0.54           | 788±135              | 775±104   | 428±52                | 132±19               | 15.7±4.5                | 17.5±3.3                | 49.9±10.9                                   |          | 25.1±4.2                | 25.0±2.3                | 662±92                           |
|                      |          |          | 909±91                | 307±30              | 373±44             | 3.06±0.28           | 380±63               | 375±51    | 207±29                | 65±6                 | 7.5±2.1                 | 8.6±1.6                 | 24.0±4.7                                    |          | 12.1±2.1                | 12.1±1.6                | 319±39                           |
|                      | 0.20     | 0.20     | 1847±57               | 614±56              | 765±60             | 7.11±0.49*          | 760±87               | 799±128   | 432±46 <sup>(9)</sup> | 136±22               | 17.1±3.2                | 18.5±5.7                | 55.0±13.6                                   |          | 28.9±3.1*               | 27.0±4.0*               | 645±69                           |
|                      |          |          | 914±62                | 304±33              | 378±27             | 3.51±0.12*          | 376±48               | 394±58    | 214±28 <sup>(9)</sup> | 67±12                | 8.5±1.7                 | 9.1±2.8                 | 27.3±7.4                                    |          | 14.2±1.2*               | 13.3±1.9*               | 319±39                           |
|                      | 0.60     | 0.20     | 1847±64               | 647±53              | 776±91             | 8.97±0.84*          | 815±133              | 804±125   | 434±35                | 136±22               | 17.1±2.3                | 20.5±5.9 <sup>(7)</sup> | 65.4±17.3 <sup>(9)</sup>                    |          | 29.0±5.2 <sup>(9)</sup> | 28.2±6.5 <sup>(9)</sup> | 603±120 <sup>(9)</sup>           |
|                      |          |          | 935±34*               | 326±16*             | 392±34             | 4.52±0.27*          | 410±50               | 404±44*   | 219±8                 | 68±9                 | 8.5±0.9 <sup>(9)</sup>  | 10.1±2.7 <sup>(7)</sup> | 32.8±7.9*                                   |          | 14.6±2.2                | 14.1±2.9                | 303±50                           |

\* p&lt;0.05

<sup>1)</sup> No. of Rats is 10 except presented in parenthesis<sup>2)</sup> absolute organ weight, mean±SD<sup>3)</sup> mg<sup>4)</sup> organ weight/100g B. W., mean±SD<sup>5)</sup> g

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムとジブチルヒドロキシトルエン  
との併用によるラット終生飼育試験

井口重孝\*, 高橋 博\*, 池田虎雄\*, 林田志信\*, 平賀興吾\*

Lifespan Feeding Studies by Combined of Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS)  
and Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats

SHIGETAKA IGUCHI\*, HIROSHI TAKAHASHI\*, TORAO IKEDA\*,  
SHINOBU HAYASHIDA\* and KOGO HIRAGA\*

The lifespan feeding studies of linear alkylbenzene sulfonate (LAS), a surfactant, and butylated hydroxytoluene (BHT), an antioxidant food additive, were conducted on Slc: Wistar rats of both sexes to see the interaction in toxicity by the combined use of LAS and BHT. The changes of body weight gain, food consumption and survival rate of the rats fed BHT were similar to those seen in rats fed both BHT and LAS. Thus, it was concluded that there was no effect of LAS to BHT under the conditions employed in this studies.

**Keywords:** linear alkylbenzene sulfonate (LAS), surface active, butylated hydroxytoluene (BHT), anti-oxidant, lifespan feeding studies, rats

合成洗剤の主成分である界面活性剤直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (linear alkylbenzene sulfonate, LAS) の安全性について、当部では急性毒性<sup>1,2)</sup>, 亜急性毒性<sup>3,4)</sup>, 慢性毒性<sup>5,6)</sup>, がん原性<sup>6)</sup>, 催奇形性<sup>7,8)</sup>, 変異原性<sup>9,10)</sup>, その他の面<sup>11-15)</sup>より検討を加えてきたが、今回更に他の化学物質との相互作用について検索した。

他の化学物質としては当部で永年毒性研究を行っている食品添加物・酸化防止剤ジブチルヒドロキシトルエン (butylated hydroxytoluene, BHT)<sup>2,11,14)</sup> を用い、BHT 摂取ラットの症状・体重・飼料摂取量・生存率・生存期間ならびに腫瘍性および非腫瘍性変化におよぼす LAS の影響を終生飼育試験により観察した。

本報では体重・飼料摂取量・生存率および生存期間の変化について報告し、非腫瘍性および腫瘍性変化について別報<sup>17,18)</sup>に報告する。

試験材料および試験方法

試料: LAS は花王アトラス株式会社製ネオベレックス F-60, Lot No. 141 (C<sub>10</sub> 10.6%, C<sub>11</sub> 34.1%, C<sub>12</sub> 27.7%, C<sub>13</sub> 19.0%, C<sub>14</sub> 8.7%, 有効成分 60±2%, 未反応油分 15%以下, 無機塩類 4.0%以下, 水分 38

%, pH(1%)7.1, 平均分子量345.8) を用い、BHT は和光純薬製 Lot No. KIK 5562 (白色結晶性粉末, m.p. 69.5°C) を用いた。

実験動物および飼育環境: 静岡実験動物農業協同組合にて barrier system 下に生育された Slc: Wistar ラット雌雄を 4 週齢で購入し使用した。

動物は室温 25±1°C, 湿度 55±5%, 換気回数毎時 10 回, 照明午前 6 時より午後 5 時の barrier system 飼育室において、前面および床が網のステンレス製個別ケージ (間口 220×奥行 200×高さ 160mm) に収容し、自動給水 (細菌ろ過器経由水道水) 装置付ベルト式飼育架台で飼育した。飼料は日本クレア (株) 製 CE-2 固型飼料 (水分 8.0, 粗蛋白質 24.5, 粗脂肪 4.5, 粗繊維 4.0, 粗灰分 6.6, 可溶性無窒素物 52.4%, 348.1 Cal/100g) を用い、水とともに自由に摂取させた。

投与量 (飼料中添加濃度) の設定: 各試料を表に示すように飼料 CE-2 に添加し、それぞれ雌雄ラットに終生自由摂取せしめた。ラットは 5 週齢時に各群の体重分布をそろえ、飼育架台にランダムに配置し、試料添加飼料の投与を開始した。各群の雌雄ラット数および群の記号は表の通りである。

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

| 試験群記号  | ラット数 |    | 試料添加濃度 |       |
|--------|------|----|--------|-------|
|        | 雄    | 雌  | LAS    | BHT   |
| Cont.  | 40   | 40 | 0.00%  | 0.00% |
| 0.07T  | 40   | 42 | 0.00%  | 0.07% |
| 0.20T  | 40   | 40 | 0.00%  | 0.20% |
| 0.60T  | 40   | 40 | 0.00%  | 0.60% |
| LAS    | 40   | 40 | 0.20%  | 0.00% |
| 0.07LT | 40   | 37 | 0.20%  | 0.07% |
| 0.20LT | 40   | 40 | 0.20%  | 0.20% |
| 0.60LT | 40   | 41 | 0.20%  | 0.60% |

動物の一般状態は毎日観察した。

体重は、各群からおのおの10匹を任意に選び、6週まで毎週、16週まで隔週、以後4および5週毎に測定、試験開始時体重を100とした増加率で表現し、比較した。

飼料摂取量は、各群からおのおの5匹を任意に選び、3週まで毎週、8週から14週まで隔週、以後4および5週毎に測定した。測定は飼料投与量と5日後の残余量およびケージ受皿への飼料コボン量について行い、{投与量 - (残余量 + コボン量)} / 5 より絶対量と体重kg当り摂取量を求め、比較した。

体重および飼料摂取量の測定値は、測定ラットの死亡が1例にとどまった80週までについて検討した。

観察中瀕死と認めた動物は屠殺剖検し、屠殺日を死亡日として死亡率、生存期間の算定を行った。

結果の推計学的検討に当っては危険率を5%に置いた。

なお、LAS および BHT の投与量は当部における亜急性毒性試験の結果を参考として次の基準により設定した。

LAS 投与量はラットにほとんど影響を与えない最大量であること：LAS 0.2%添加飼料はラットで体重増加には殆ど影響を与えず、僅かに盲腸重量を増加させるものであった<sup>3)</sup>。

BHT の最高投与量は体重抑制が10%以内であること：BHT 0.8%添加飼料はラットで顕著な体重増加抑制を示し、0.45%添加飼料では変化なかったことより BHT 0.60%添加飼料は体重増加に対し10%以内の軽度な抑制にとどまると推定し0.60%を最高添加濃度とした<sup>11,16)</sup>。

#### 試験結果と考察

症状：行動その他に各実験群と対照群との間に差は認められなかった。

飼料摂取量：表1～2に示すように、BHT 単独投与群では特に0.6%群雌雄において最初摂取量が有意に少

なかったが、以降は対照群と差がないか雌ではむしろ増大した。

LAS 群雌雄では対照群に対して、推計学的に有意差を示すものが散見されたが、顕著な差は認められなかった。BHT・LAS 併用群では対応する BHT 単独群と有意差なく、特に最高濃度群間ではその増減の傾向が殆ど一致した。

体重の推移：図1～2に示す通りで、推計学的に対照群と有意差を示したのは0.60T群雌の実験76および80週における体重で対照群の夫々90.4, 89.1%であった。この際の0.60LT群雌の体重は対照群の93.0, 93.9%であったが、推計学的には有意ではなかった。すなわち BHT 単独投与と各群とこれに対応する BHT・LAS 併用投与と各群との間には大差なく、特に雌においては殆ど同一の推移を示した。(なお実験36・40週から44・48週にかけて急な体重変化が雌雄においてみられるが、これは、このラットでは生理的とみられ、飼育環境の変化等による影響ではない。)

生存率(死亡率)の推移：図3～4に示した図の生存率曲線において、雄0.60T群および0.60LT群では、特に実験100週以降より左方移動即ち死亡の増加が目立ち、前者において、顕著であった。他の投与群は対照群の推移と大差を示さなかった。雌では0.6T群において実験100週以降やや左方移動が、0.07LT群で実験120週から135週の間に顕著な右方移動がみられた。他の投与群では対照群との間に大差を認めなかった。一般的に、BHT 単独投与群より BHT・LAS 併用投与群の方が右方移動し生存率が高いが、有意とは認められなかった。表3～4に実験四半期における生存率を示した。雄では実験104週および117週において BHT 摂取量に伴った生存率の低下が BHT 単独投与と BHT・LAS 併用投与の両群にみられた。平均生存期間(平均死亡時週齢)は0.60T群108.4±15.2週、0.60LT群112.0±15.2週で、対照群122.6±12.8週より有意に短かった。雌では実験91週においてBHT単独投与のみにBHT摂取量に伴う生存率の低下が認められた。また、130週において0.07LT群が高い生存率を示した。平均死亡時週齢は0.60T群がやや短かったが、対照群に対して有意ではなかった。以上、LAS 併用による BHT の作用には殆ど変化なく、僅かに平均生存期間の延長がみられるが、推計学的に有意ではなかった。

以上、本試験条件下において LAS は BHT 効果に対して特に影響を与えなかったと判断される。

謝辞 市川久次、小林博義、米山允子、樺島順一郎お



Table 1. Food Consumption (Male)

| Wk on study | BHT 0%<br>LAS 0%                                     | 0.07%<br>0.00%             | 0.20%<br>0.00%            | 0.60%<br>0.00%            | 0.00%<br>0.20%             | 0.07%<br>0.20%            | 0.20%<br>0.20%            | 0.60%<br>0.20%             |
|-------------|------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 0           | 10.7± 0.5 <sup>1)</sup><br>(96.8± 8.2) <sup>2)</sup> | 10.6± 1.2<br>(95.5± 8.2)   | 10.1± 0.9<br>(92.1± 5.5)  | 7.5± 0.3*<br>(72.0± 2.9)* | 11.5± 1.1<br>(101.5± 8.3)  | 10.1± 1.2<br>(95.5± 8.2)  | 10.4± 2.1<br>(95.9± 17.6) | 7.9± 1.0*<br>(70.9± 10.1)* |
| 1           | 12.9± 1.0<br>(92.3± 4.6)                             | 13.6± 0.9<br>(91.6± 3.6)   | 11.8± 1.6<br>(83.6± 7.5)  | 11.6± 0.6<br>(87.8± 4.3)  | 12.6± 1.5<br>(85.4± 6.7)   | 12.3± 1.4<br>(90.4± 4.0)  | 12.3± 1.4<br>(88.2± 6.2)  | 12.5± 1.1<br>(88.6± 5.6)   |
| 2           | 14.9± 1.3<br>(83.8± 4.3)                             | 15.0± 1.2<br>(79.9± 4.1)   | 14.6± 1.0<br>(83.2± 3.6)  | 14.2± 0.6<br>(85.1± 4.6)  | 14.1± 2.1<br>(77.3± 7.6)   | 14.5± 1.5<br>(85.8± 4.6)  | 13.7± 2.0<br>(79.2± 6.8)  | 14.7± 1.4<br>(83.6± 6.6)   |
| 3           | 15.9± 1.1<br>(75.9± 4.1)                             | 15.9± 0.8<br>(73.1± 4.3)   | 15.4± 1.3<br>(75.5± 3.0)  | 14.4± 0.7*<br>(74.8± 4.1) | 14.3± 0.6*<br>(68.2± 3.7)* | 15.0± 1.1<br>(76.8± 4.9)  | 14.1± 2.0<br>(70.2± 6.9)  | 14.9± 0.3<br>(74.0± 3.8)   |
| 8           | 16.3± 1.3<br>(54.1± 2.2)                             | 15.8± 0.9<br>(52.6± 2.7)   | 15.6± 0.8<br>(55.0± 4.4)  | 15.8± 1.8<br>(55.7± 7.5)  | 13.9± 3.0<br>(47.1± 10.0)  | 15.0± 0.6<br>(54.0± 1.5)  | 14.3± 2.6<br>(49.9± 10.5) | 16.9± 1.8<br>(57.8± 3.7)   |
| 10          | 14.5± 1.5<br>(44.9± 2.6)                             | 13.6± 0.6<br>(42.2± 1.5)   | 13.5± 1.3<br>(44.3± 2.2)  | 14.8± 1.2<br>(48.3± 2.8)  | 15.2± 1.8<br>(48.1± 4.5)   | 13.2± 1.0<br>(44.2± 1.7)  | 13.7± 0.4<br>(44.2± 1.8)  | 14.9± 1.5<br>(47.1± 2.0)   |
| 12          | 14.1± 2.1<br>(41.9± 5.5)                             | 14.3± 0.4<br>(42.4± 1.6)   | 14.6± 1.1<br>(46.1± 1.6)  | 15.1± 1.2<br>(47.3± 1.7)  | 14.5± 1.6<br>(43.9± 3.0)   | 13.8± 0.8<br>(44.4± 3.0)  | 14.4± 0.8<br>(44.1± 1.1)  | 16.3± 1.1<br>(49.8± 1.7)*  |
| 14          | 14.6± 0.8<br>(41.7± 3.7)                             | 14.5± 0.8<br>(41.8± 3.9)   | 13.4± 1.5<br>(41.3± 4.4)  | 15.3± 1.3<br>(45.4± 3.1)  | 14.3± 1.5<br>(41.5± 2.6)   | 13.3± 0.6<br>(41.6± 2.1)  | 13.8± 1.3<br>(40.8± 2.8)  | 15.8± 0.9<br>(46.7± 3.0)   |
| 18          | 15.8± 0.9<br>(42.3± 2.6)                             | 15.7± 0.8<br>(42.8± 3.1)   | 14.8± 1.0<br>(42.8± 2.2)  | 14.9± 1.5<br>(41.4± 2.8)  | 14.7± 1.5<br>(40.6± 2.5)   | 14.8± 0.4<br>(43.8± 0.9)  | 16.4± 2.5<br>(45.8± 10.0) | 15.6± 1.4<br>(43.3± 1.9)   |
| 22          | 15.0± 1.6<br>(38.6± 2.6)                             | 15.0± 0.2<br>(39.3± 1.6)   | 13.9± 0.3<br>(39.0± 1.6)  | 14.9± 0.2<br>(41.1± 2.3)  | 14.0± 1.0<br>(37.1± 2.2)   | 13.4± 1.0<br>(38.1± 1.9)  | 14.4± 0.7<br>(38.6± 1.1)  | 16.6± 1.0<br>(45.0± 0.7)   |
| 26          | 13.7± 1.3<br>(34.0± 2.6)                             | 14.1± 1.1<br>(35.1± 2.4)   | 14.2± 0.7<br>(38.3± 1.2)  | 13.1± 1.9<br>(34.7± 3.5)  | 14.1± 1.7<br>(36.0± 2.7)   | 12.5± 1.8<br>(33.6± 3.8)  | 13.7± 1.8<br>(35.5± 3.3)  | 14.5± 1.8<br>(37.8± 3.8)   |
| 30          | 14.3± 0.6<br>(34.7± 2.0)                             | 12.5± 0.7*<br>(31.2± 1.8)* | 12.7± 0.3*<br>(33.7± 1.8) | 12.9± 1.4<br>(33.9± 3.1)  | 12.5± 0.5*<br>(31.1± 3.3)  | 12.2± 1.0*<br>(32.3± 1.3) | 13.1± 0.7*<br>(33.5± 1.8) | 12.8± 1.2<br>(33.3± 1.7)   |
| 34          | 13.5± 1.5<br>(32.5± 4.7)                             | 14.0± 0.8<br>(34.3± 1.9)   | 12.7± 3.1<br>(33.8± 8.8)  | 13.6± 1.3<br>(35.3± 2.7)  | 13.7± 0.9<br>(33.9± 1.9)   | 13.6± 1.4<br>(35.5± 2.9)  | 13.9± 0.9<br>(35.2± 1.4)  | 14.5± 1.6<br>(37.6± 3.5)   |
| 39          | 13.1± 0.6<br>(31.4± 1.6)                             | 12.6± 0.9<br>(30.4± 1.3)   | 13.1± 0.5<br>(35.0± 1.3)  | 13.4± 1.5<br>(35.6± 3.0)  | 10.3± 2.0*<br>(25.6± 6.1)  | 12.4± 0.9<br>(32.2± 2.1)  | 12.5± 1.6<br>(31.7± 3.7)  | 13.4± 0.9<br>(35.0± 2.8)*  |
| 43          | 14.3± 0.7<br>(33.4± 2.4)                             | 13.6± 0.5<br>(31.5± 0.8)   | 13.0± 0.4<br>(32.9± 0.8)  | 13.5± 1.7<br>(33.6± 3.4)  | 13.3± 2.0<br>(31.6± 3.9)   | 12.8± 0.9*<br>(32.2± 1.5) | 12.8± 2.0<br>(31.1± 3.4)  | 14.0± 1.1<br>(35.5± 2.7)   |
| 47          | 15.7± 1.6<br>(35.4± 2.4)                             | 15.1± 0.2<br>(33.9± 1.1)   | 13.5± 1.7<br>(33.3± 4.3)  | 14.3± 2.5<br>(34.0± 4.4)  | 14.7± 1.2<br>(33.7± 2.3)   | 13.9± 0.8<br>(34.1± 1.0)  | 15.5± 1.9<br>(37.4± 3.8)  | 16.3± 0.8<br>(40.3± 2.1)*  |
| 53          | 16.6± 2.0<br>(36.7± 2.5)                             | 14.8± 1.0<br>(33.1± 1.9)*  | 16.5± 3.2<br>(38.9± 9.5)  | 17.8± 3.9<br>(42.8± 11.6) | 15.5± 0.5<br>(34.7± 1.7)   | 14.3± 0.8<br>(34.2± 1.3)  | 15.1± 1.1<br>(36.0± 1.4)  | 16.6± 0.6<br>(40.0± 1.4)*  |
| 57          | 16.4± 1.4<br>(35.8± 1.2)                             | 15.1± 1.8<br>(33.9± 4.5)   | 15.5± 1.0<br>(35.6± 1.2)  | 15.4± 1.0<br>(36.5± 2.1)  | 15.4± 1.1<br>(34.2± 1.3)   | 15.2± 1.2<br>(35.9± 2.7)  | 15.5± 1.3<br>(36.3± 1.2)  | 16.3± 1.1<br>(38.9± 1.6)*  |
| 61          | 16.7± 2.1<br>(35.9± 2.7)                             | 15.7± 1.0<br>(35.4± 2.3)   | 16.3± 0.6<br>(37.4± 1.0)  | 15.2± 1.7<br>(36.4± 2.6)  | 15.5± 0.8<br>(34.5± 1.7)   | 16.2± 1.6<br>(37.9± 3.3)  | 16.8± 1.4<br>(39.2± 1.6)  | 16.7± 1.1<br>(39.5± 1.2)*  |
| 66          | 16.9± 1.3<br>(36.5± 1.9)                             | 15.6± 2.3<br>(34.9± 3.8)   | 16.5± 0.5<br>(37.8± 2.6)  | 16.7± 1.4<br>(38.8± 2.7)  | 16.5± 1.5<br>(36.5± 2.3)   | 16.3± 0.9<br>(37.5± 1.1)  | 16.4± 1.2<br>(38.2± 1.0)  | 16.8± 1.3<br>(39.8± 2.5)   |
| 71          | 16.1± 1.5<br>(34.5± 3.6)                             | 14.7± 1.6<br>(33.1± 2.3)   | 15.0± 0.7<br>(33.8± 1.5)  | 15.0± 1.2<br>(34.4± 2.4)  | 15.5± 1.3<br>(34.5± 1.2)   | 15.5± 1.1<br>(35.8± 2.0)  | 16.3± 1.8<br>(37.5± 1.4)  | 15.8± 1.8<br>(37.4± 2.4)   |
| 76          | 15.2± 1.0<br>(32.2± 1.9)                             | 14.4± 1.3<br>(32.5± 2.4)   | 14.4± 1.0<br>(32.4± 1.0)  | 15.4± 2.0<br>(35.8± 3.5)  | 15.8± 1.1<br>(34.9± 2.0)   | 14.4± 2.1<br>(33.1± 5.0)  | 15.5± 1.7<br>(35.5± 1.5)* | 15.4± 1.0<br>(36.3± 1.8)*  |
| 80          | 16.3± 1.3<br>(34.6± 1.2)                             | 14.6± 1.3<br>(32.4± 2.3)   | 14.8± 1.5<br>(33.4± 2.4)  | 15.1± 1.6<br>(35.0± 2.8)  | 15.3± 1.8<br>(33.5± 2.2)   | 14.3± 1.1*<br>(32.5± 2.9) | 15.5± 1.6<br>(35.6± 2.2)  | 15.1± 0.5<br>(35.5± 1.1)   |

1) Mean±SD g/rat 2) Mean±SD g/kg B.W. \* P&lt;0.05

よび神谷信行氏らのご協力をここに感謝いたします。

## 文 献

1) 小林博義ら：東京衛研年報，24，397，1972

2) 市川久次ら：東京衛研年報，27-2，93，1976

3) 米山允子ら：東京衛研年報，27-24，409，1972

4) 伊川三枝子ら：東京衛研年報，29-2，58，1978

5) 米山允子ら：東京衛研年報，28-2，73，1977

6) 藤井 孝ら：東京衛研年報，28-2，85，1977

Table 2. Food Consumption (Female)

| Wk on study | BHT 0%<br>LAS 0%                                     | 0.07%<br>0.00%            | 0.20%<br>0.00%            | 0.60%<br>0.00%            | 0.00%<br>0.20%            | 0.07%<br>0.20%            | 0.20%<br>0.20%            | 0.60%<br>0.20%            |
|-------------|------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0           | 9.6± 0.2 <sup>1)</sup><br>(103.8± 6.1) <sup>2)</sup> | 7.5± 0.2*<br>(83.8± 4.8)* | 5.8± 2.5*<br>(64.5±26.7)* | 6.1± 0.7*<br>(65.4± 9.0)* | 8.4± 0.9*<br>(89.8± 8.1)* | 8.1± 0.5*<br>(90.6± 2.0)* | 7.4± 2.1<br>(82.6±24.3)   | 6.3± 1.8*<br>(68.2±22.9)* |
| 1           | 10.9± 0.5<br>(99.5± 2.4)                             | 9.8± 0.5*<br>(92.9± 2.6)  | 9.4± 1.0<br>(91.6±11.1)   | 8.9± 2.2<br>(83.8±19.8)   | 9.6± 1.1<br>(89.2±10.8)   | 10.5± 0.3<br>(95.4± 7.6)  | 10.1± 1.3<br>(98.7±11.5)  | 10.4± 0.3<br>(94.2± 3.6)  |
| 2           | 11.3± 1.9<br>(91.0±18.8)                             | 9.4± 0.7<br>(78.5± 4.7)   | 9.3± 1.3<br>(79.5±11.5)   | 10.2± 0.6<br>(84.3± 7.9)  | 9.9± 1.3<br>(80.7± 8.1)   | 9.8± 0.9<br>(77.4± 5.3)   | 9.4± 1.2<br>(79.6± 8.5)   | 9.9± 0.4<br>(79.7± 6.2)   |
| 3           | 10.5± 0.4<br>(78.3± 4.3)                             | 8.8± 1.8<br>(68.1±13.5)   | 9.6± 0.5<br>(75.9± 3.1)   | 9.9± 0.6<br>(74.9± 4.8)   | 9.7± 0.9<br>(72.7± 4.1)   | 10.8± 0.6<br>(78.9± 5.8)  | 9.3± 1.3<br>(71.5± 6.3)   | 10.0± 0.8<br>(73.0± 7.7)  |
| 8           | 9.7± 0.5<br>(56.4± 3.2)                              | 9.9± 0.4<br>(59.5± 4.6)   | 8.6± 1.0<br>(54.3± 6.6)   | 10.3± 0.8<br>(61.7± 4.0)  | 9.8± 1.1<br>(57.7± 3.6)   | 9.1± 1.6<br>(52.7± 9.9)   | 9.1± 1.5<br>(55.8± 6.7)   | 10.0± 0.4<br>(58.1± 2.6)  |
| 10          | 9.5± 0.7<br>(52.8± 4.5)                              | 9.7± 0.6<br>(54.9± 5.1)   | 8.1± 1.0*<br>(48.2± 5.6)  | 10.1± 1.7<br>(57.6± 9.7)  | 9.9± 0.9<br>(55.5± 3.7)   | 8.8± 0.9<br>(49.4± 4.5)   | 8.8± 1.2<br>(51.1± 4.2)   | 9.8± 0.8<br>(54.8± 4.2)   |
| 12          | 10.1± 1.3<br>(54.1± 8.3)                             | 9.7± 0.7<br>(52.6± 3.0)   | 8.5± 0.9<br>(49.7± 4.6)   | 9.9± 0.8<br>(55.2± 4.5)   | 9.1± 0.6<br>(49.4± 2.6)   | 9.7± 0.7<br>(53.3± 4.5)   | 10.0± 0.6<br>(56.2± 4.6)  | 11.3± 2.7<br>(61.3±15.9)  |
| 14          | 9.9± 0.5<br>(51.7± 2.8)                              | 10.2± 0.7<br>(53.4± 2.7)  | 9.3± 3.0<br>(53.3±16.1)   | 10.2± 0.8<br>(55.2± 2.2)  | 9.3± 0.4<br>(49.0± 4.2)   | 9.6± 0.7<br>(50.9± 3.7)   | 9.8± 0.7<br>(53.4± 6.7)   | 9.2± 2.3<br>(48.5±11.6)   |
| 18          | 10.2± 0.6<br>(50.2± 3.3)                             | 10.0± 0.8<br>(50.5± 2.6)  | 9.6± 1.4<br>(53.5± 6.5)   | 9.9± 0.7<br>(51.8± 2.8)   | 9.6± 0.6<br>(48.5± 4.1)   | 10.5± 1.2<br>(53.7± 4.9)  | 10.0± 1.4<br>(51.8± 4.0)  | 10.2± 0.8<br>(53.1± 5.4)  |
| 22          | 9.3± 0.7<br>(44.6± 3.7)                              | 9.8± 0.7<br>(48.1± 3.7)   | 9.4± 1.3<br>(50.4± 7.1)   | 10.3± 1.4<br>(51.8± 5.7)  | 9.8± 0.8<br>(47.5± 2.9)   | 10.5± 1.2<br>(51.1± 3.5)  | 10.3± 1.3<br>(51.7± 3.4)  | 10.5± 0.7<br>(52.8± 5.4)  |
| 26          | 9.1± 0.3<br>(42.2± 1.2)                              | 6.6± 2.3<br>(31.6±11.1)   | 8.1± 1.0<br>(42.3± 2.7)   | 10.0± 1.6<br>(49.3± 8.1)  | 9.2± 1.2<br>(43.1± 6.7)   | 8.4± 0.4*<br>(39.8± 2.8)  | 8.5± 0.9<br>(41.3± 2.8)   | 8.3± 0.6*<br>(41.4± 3.6)  |
| 34          | 10.5± 2.0<br>(45.9± 9.3)                             | 10.9± 1.7<br>(50.9±10.0)  | 9.7± 0.8<br>(49.4± 7.7)   | 9.8± 1.3<br>(47.3± 4.9)   | 10.3± 1.3<br>(45.4± 3.8)  | 10.2± 0.7<br>(45.9± 2.0)  | 9.9± 0.6<br>(46.6± 1.4)   | 10.6± 0.5<br>(50.5± 3.2)  |
| 39          | 9.8± 0.9<br>(42.2± 3.9)                              | 9.4± 1.9<br>(41.4± 7.9)   | 9.8 ±1.6<br>(48.3± 6.1)   | 10.7± 0.9<br>(51.3± 4.7)* | 10.1± 1.2<br>(43.4± 4.3)  | 11.8± 4.5<br>(53.1±18.8)  | 12.3± 2.4<br>(56.7± 9.5)* | 10.3± 3.3<br>(48.7±14.9)  |
| 43          | 9.9± 0.8<br>(41.4± 2.8)                              | 10.2± 1.3<br>(43.7± 5.0)  | 9.0± 1.2<br>(44.0± 5.7)   | 11.0± 1.8<br>(50.3± 9.2)  | 8.9± 0.9<br>(36.6± 6.1)   | 9.9± 0.7<br>(43.6± 5.5)   | 11.4± 3.2<br>(51.4±17.1)  | 11.5± 2.3<br>(53.8±11.1)  |
| 47          | 10.2± 1.5<br>(41.8± 6.3)                             | 10.9± 1.5<br>(45.6± 7.9)  | 11.7± 3.0<br>(54.0±11.5)  | 10.0± 0.7<br>(44.7± 4.0)  | 10.9± 1.5<br>(43.5± 7.7)  | 9.2± 0.9<br>(39.5± 4.6)   | 11.2± 0.9<br>(47.7± 3.5)  | 10.6± 1.3<br>(48.0± 5.0)  |
| 53          | 11.7± 1.2<br>(45.4± 4.0)                             | 11.7± 0.4<br>(47.0± 1.5)  | 11.9± 1.3<br>(53.1±11.4)  | 11.9± 1.2<br>(52.1± 6.0)  | 10.2± 0.6<br>(38.1± 4.8)* | 10.6± 1.0<br>(43.0± 1.9)  | 11.1± 1.3<br>(44.5± 3.7)  | 10.4± 0.9<br>(45.1± 3.2)  |
| 57          | 11.6± 1.9<br>(43.3± 6.0)                             | 11.1± 1.5<br>(43.2± 6.7)  | 10.7± 1.2<br>(45.9± 7.2)  | 11.1± 0.5<br>(47.4± 5.9)  | 10.3± 1.9<br>(38.5±10.5)  | 10.7± 0.9<br>(43.1± 1.4)  | 11.6± 1.6<br>(46.8± 7.0)  | 11.0± 0.5<br>(47.0± 3.3)  |
| 61          | 10.8± 1.1<br>(39.9± 5.7)                             | 11.6± 1.4<br>(44.5± 4.8)  | 10.5± 0.7<br>(44.2± 6.1)  | 11.5± 2.5<br>(47.3± 8.7)  | 10.8± 0.7<br>(39.2± 2.5)  | 10.4± 1.2<br>(41.7± 6.4)  | 10.7± 1.3<br>(42.9± 3.2)  | 11.9± 0.8<br>(50.0± 4.1)* |
| 66          | 11.7± 0.8<br>(41.2± 2.3)                             | 11.7± 1.0<br>(43.9± 4.1)  | 11.3± 1.1<br>(45.8± 6.0)  | 13.1± 1.2<br>(53.4± 3.0)* | 11.8± 0.8<br>(42.6± 5.7)  | 11.8± 1.0<br>(45.9± 4.9)  | 11.6± 0.7<br>(47.9± 5.7)* | 12.7± 0.9<br>(51.9± 3.4)* |
| 71          | 11.1± 0.7<br>(37.7± 2.1)                             | 11.5± 1.1<br>(41.2± 4.3)  | 10.6± 1.6<br>(41.6± 9.2)  | 12.6± 1.6<br>(49.0± 4.8)* | 11.8± 0.8<br>(40.7± 3.9)  | 11.6± 0.9<br>(42.2± 4.1)  | 11.7± 0.9<br>(45.9± 1.9)  | 13.6± 2.5<br>(52.4± 8.4)* |
| 76          | 9.4± 2.2<br>(30.7± 6.9)                              | 11.8± 0.7<br>(40.0± 3.4)* | 10.6± 1.1<br>(39.4± 7.1)  | 11.6± 0.9<br>(44.8± 1.6)* | 10.8± 1.1<br>(35.6± 4.3)  | 10.4± 1.1<br>(36.1± 3.5)  | 11.2± 1.6<br>(42.4± 3.1)* | 11.2± 2.0<br>(41.5± 6.6)* |
| 80          | 10.3± 0.4<br>(33.3± 1.5)                             | 11.4± 0.8<br>(37.4± 3.2)  | 10.9± 0.7<br>(38.9± 5.0)  | 11.1± 1.5<br>(41.7± 6.4)* | 12.0± 1.8<br>(38.8± 5.6)  | 11.2± 0.9<br>(38.9± 3.5)* | 10.7± 1.8<br>(39.3± 2.9)* | 11.4± 1.0<br>(41.4± 2.7)* |

1) Mean±SD g/rat 2) Mean±SD g/kg B.W. \* P&lt;0.05

- 7) 佐藤 薫ら：東京衛研年報，24，441，1972  
 8) 高橋昭夫ら：東京衛研年報，26-2，67，1975  
 9) 益淵正典ら：東京衛研年報，27-2，100，1976  
 10) 藤田 博ら：東京衛研年報，28-2，112，1977  
 11) 平賀興吾ら：東京衛研年報，22，231，1970  
 12) 高橋 省ら：東京衛研年報，25，637，1974

- 13) 米山允子ら：東京衛研年報，25，655，1974  
 14) 鈴木英子ら：東京衛研年報，26-2，49，1975  
 15) 高橋 省ら：東京衛研年報，26-2，54，1975  
 16) 市川久次ら：東京衛研年報，23，345，1971  
 17) 藤井 孝ら：東京衛研年報，33，399，1982  
 18) 藤井 孝ら：東京衛研年報，33，413，1982

Table 3. Survival Rate at a Quarter of Year on Study (Male)

| Weeks on<br>age study | BHT 0%<br>LAS 0% | 0.07%<br>0.00% | 0.20%<br>0.00% | 0.60%<br>0.00% | 0.00%<br>0.20% | 0.07%<br>0.20% | 0.20%<br>0.20% | 0.60%<br>0.20% |
|-----------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 44 39                 | 100<br>(40/40)   | 100<br>(40/40) | 100<br>(40/40) | 100<br>(40/40) | 98<br>(39/40)  | 100<br>(40/40) | 100<br>(40/40) | 100<br>(40/40) |
| 57 52                 | 100<br>(40/40)   | 100<br>(40/40) | 100<br>(40/40) | 100<br>(40/40) | 95<br>(38/40)  | 100<br>(40/40) | 100<br>(40/40) | 100<br>(40/40) |
| 70 65                 | 100<br>(40/40)   | 100<br>(40/40) | 100<br>(40/40) | 98<br>(39/40)  | 95<br>(38/40)  | 100<br>(40/40) | 98<br>(39/40)  | 100<br>(40/40) |
| 83 78                 | 100<br>(40/40)   | 98<br>(39/40)  | 98<br>(39/40)  | 93<br>(37/40)  | 90<br>(36/40)  | 100<br>(40/40) | 98<br>(39/40)  | 98<br>(39/40)  |
| 96 91                 | 95<br>(38/40)    | 93<br>(37/40)  | 90<br>(36/40)  | 83<br>(33/40)  | 88<br>(35/40)  | 98<br>(39/40)  | 88<br>(35/40)  | 83<br>(33/40)  |
| 109 104               | 88<br>(35/40)    | 80<br>(32/40)  | 70<br>(28/40)  | 48<br>(19/40)* | 73<br>(29/40)  | 80<br>(32/40)  | 78<br>(31/40)  | 58<br>(23/40)* |
| 122 117               | 55<br>(22/40)    | 45<br>(18/40)  | 40<br>(16/40)  | 5<br>(2/40)*   | 38<br>(15/40)  | 53<br>(21/40)  | 50<br>(20/40)  | 33<br>(13/40)* |
| 135 130               | 13<br>(5/40)     | 15<br>(6/40)   | 15<br>(6/40)   | 3<br>(1/40)    | 13<br>(5/40)   | 20<br>(8/40)   | 10<br>(4/40)   | 5<br>(2/40)    |
| 148 143               | 3<br>(1/40)      | 3<br>(1/40)    | 3<br>(1/40)    | 3<br>(1/40)    | 8<br>(3/40)    | 5<br>(2/40)    | 0<br>(0/40)    | 0<br>(0/40)    |
| 161 156               | 0<br>(0/40)      | 0<br>(0/40)    | 0<br>(0/40)    | 0<br>(0/40)    | 0<br>(0/40)    | 0<br>(0/40)    | 0<br>(0/40)    | 0<br>(0/40)    |
| Mean of age           | 122.6            | 119.9          | 116.5          | 108.4*         | 116.0          | 122.2          | 118.5          | 112.0*         |
| ±SD                   | ±12.8            | ±16.3          | ±16.4          | ±15.2          | ±23.5          | ±14.5          | ±16.3          | ±15.2          |
| Earliest death age    | 90               | 78             | 72             | 70             | 44             | 90             | 66             | 83             |
| Median of age         | 123              | 120            | 117            | 108            | 119            | 123            | 120            | 112            |
| Last death age        | 149              | 149            | 149            | 156            | 156            | 151            | 144            | 143            |

\*  $P < 0.05$ 

Table 4. Survival Rate at a Quarter of Year on Study (Female)

| Weeks on<br>age study | BHT 0%<br>LAS 0% | 0.07%<br>0.00% | 0.20%<br>0.00% | 0.60%<br>0.00% | 0.00%<br>0.20% | 0.07%<br>0.20% | 0.20%<br>0.20% | 0.60%<br>0.20% |
|-----------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 44 39                 | 100<br>(40/40)   | 98<br>(41/42)  | 100<br>(40/40) | 100<br>(40/40) | 100<br>(40/40) | 100<br>(37/37) | 100<br>(40/40) | 100<br>(41/41) |
| 57 52                 | 100<br>(40/40)   | 98<br>(41/42)  | 100<br>(40/40) | 100<br>(40/40) | 100<br>(40/40) | 100<br>(37/37) | 100<br>(40/40) | 98<br>(40/41)  |
| 70 65                 | 100<br>(40/40)   | 95<br>(40/42)  | 98<br>(39/40)  | 95<br>(38/40)  | 98<br>(39/40)  | 100<br>(37/37) | 98<br>(39/40)  | 98<br>(40/41)  |
| 83 78                 | 98<br>(39/40)    | 93<br>(39/42)  | 90<br>(36/40)  | 95<br>(38/40)  | 98<br>(39/40)  | 100<br>(37/37) | 98<br>(39/40)  | 98<br>(40/41)  |
| 96 91                 | 98<br>(39/40)    | 90<br>(38/42)  | 83<br>(33/40)* | 83<br>(33/40)* | 98<br>(39/40)  | 86<br>(32/37)  | 95<br>(38/40)  | 95<br>(39/41)  |
| 109 104               | 75<br>(30/40)    | 81<br>(34/42)  | 75<br>(30/40)  | 68<br>(27/40)  | 85<br>(34/40)  | 73<br>(27/37)  | 73<br>(29/40)  | 78<br>(32/41)  |
| 122 117               | 58<br>(23/40)    | 71<br>(30/42)  | 63<br>(25/40)  | 48<br>(19/40)  | 58<br>(23/40)  | 68<br>(25/37)  | 53<br>(21/40)  | 51<br>(21/41)  |
| 135 130               | 30<br>(12/40)    | 29<br>(12/42)  | 30<br>(12/40)  | 20<br>(8/40)   | 38<br>(15/40)  | 54<br>(20/37)* | 30<br>(12/40)  | 24<br>(10/41)  |
| 148 143               | 20<br>(8/40)     | 7<br>(3/42)    | 8<br>(3/40)    | 5<br>(2/40)    | 20<br>(8/40)   | 16<br>(3/37)   | 10<br>(4/40)   | 5<br>(2/41)    |
| 161 156               | 3<br>(1/40)      | 0<br>(0/40)    | 8<br>(3/40)    | 0<br>(0/40)    | 5<br>(2/40)    | 0<br>(0/37)    | 3<br>(1/40)    | 0<br>(0/41)    |
| Mean of age           | 126.5            | 123.1          | 123.5          | 117.6          | 128.9          | 128.7          | 123.5          | 123.3          |
| ±SD                   | ±20.9            | ±22.4          | ±25.0          | ±20.0          | ±21.0          | ±21.7          | ±19.6          | ±18.8          |
| Earliest death age    | 82               | 39             | 69             | 68             | 66             | 86             | 70             | 55             |
| Median of age         | 127              | 126            | 126            | 116            | 125            | 137            | 125            | 127            |
| Last death age        | 163              | 151            | 179            | 154            | 175            | 158            | 162            | 156            |

\*  $P < 0.05$

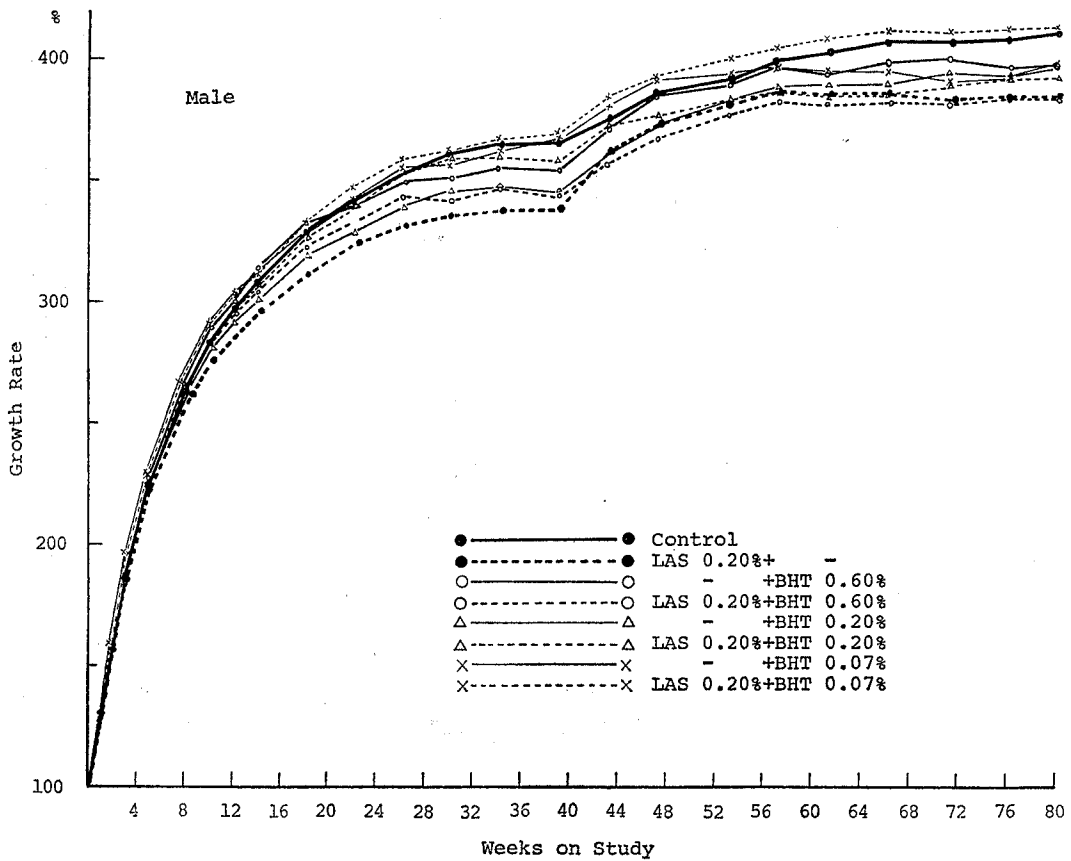


Fig. 1. Body Weight Gain of Rats for 80 Weeks

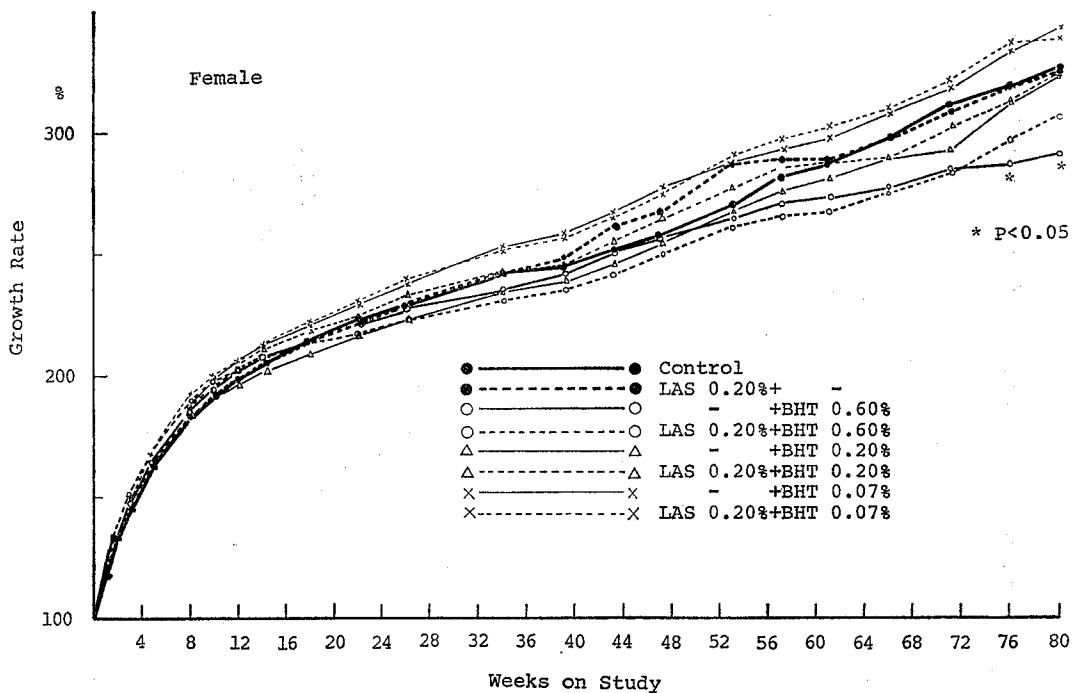


Fig. 2. Body Weight Gain of Rats for 80 Weeks

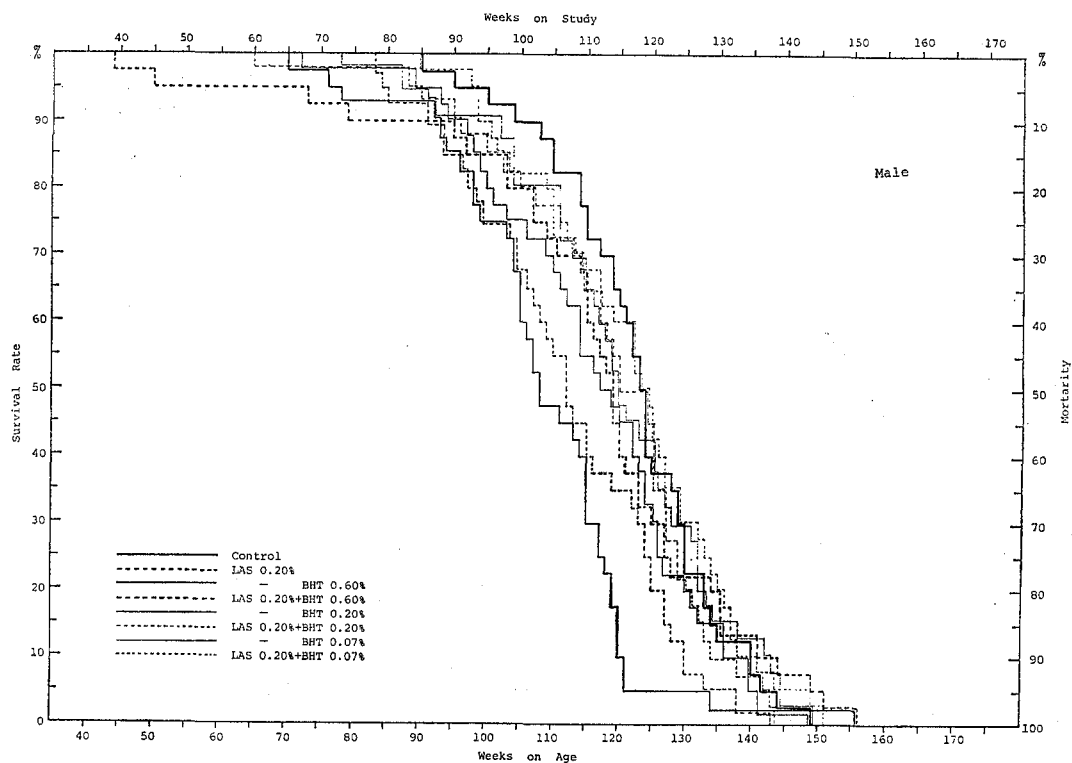


Fig. 3. Survival Rate of Rats for Lifespan

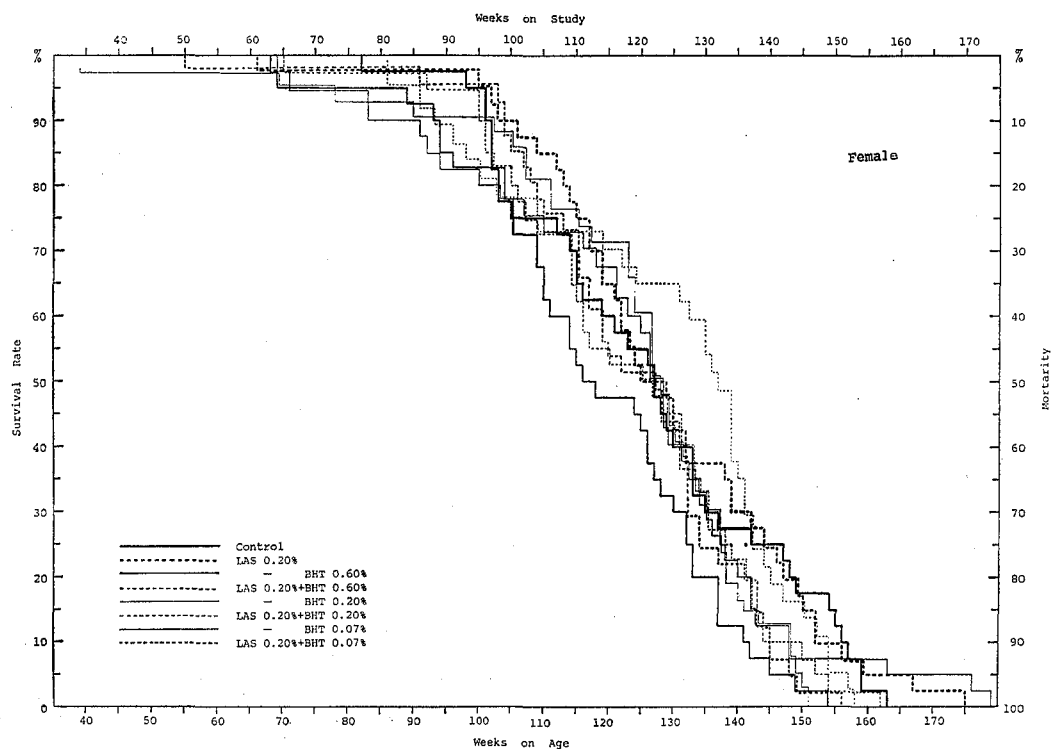


Fig. 4. Survival Rate of Rats for Lifespan

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムとジブチルヒドロキシルエン  
との併用によるラット終生飼育試験 —非腫瘍性変化—

藤井 孝\*, 多田 幸恵\*, 長澤 明道\*, 三栗谷 久敏\*  
矢野 範男\*, 湯澤 勝廣\*, 平賀 興吾\*

Lifespan Feeding Studies by Combined Use of Linear Alkylbenzene Sulfonate  
(LAS) and Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats —Nonneoplastic Changes—

TAKASHI FUJII\*, YUKIE TADA\*, AKEMICHI NAGASAWA\*,  
HISATOSHI MIKURIYA\*, NORIO YANO\*, KATSUHIRO YUZAWA\*  
and KOGO HIRAGA\*

The lifespan feeding studies of linear alkylbenzene sulfonate (LAS), a surfactant, and butylated hydroxytoluene (BHT), an antioxidant food additive, were conducted with Slc: Wistar rats of both sexes to see the interaction between LAS and BHT in terms of their combined toxicity. The dose-related occurrence of nonneoplastic changes in some organs of the rats fed BHT was observed. This trend was not influenced by the concurrent use of LAS and BHT. Thus, it was concluded that there was no effect of LAS on nonneoplastic changes induced by BHT under the conditions employed in this studies.

**Keywords:** linear alkylbenzene sulfonate (LAS), butylated hydroxytoluene (BHT), lifespan feeding study, combined use, rats, nonneoplastic changes

緒 言

界面活性剤で合成洗剤の主成分である直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（以下、LASと略す）の安全性について当部では種々の検討を加えてきた<sup>1-7)</sup>。

今回は LAS を他の化学物質と併用した際の効果、相互作用について、ラットを用い添加飼料摂取試験を行って検索した。併用する化学物質として、当部で長年毒性研究を行っている食品添加物の酸化防止剤ジブチルヒドロキシルエン（以下、BHTと略す）を選んだ<sup>8-20)</sup>。

試験期間6ヶ月では LAS は BHT の作用に著明な影響をおよぼさなかった<sup>21)</sup>。

本報は試験期間を終生とし、病理学的検索で BHT によるラットの非腫瘍性変化におよぼす LAS の影響を観察し、検討した結果の報告である。体重、生存率、生存期間および腫瘍性変化については別報<sup>22, 23)</sup>で報告する。

試料および試験方法

**試料** LAS は花王アトラス株式会社製ネオベレックス F-60, Lot No. 141 (C<sub>10</sub> 10.6%, C<sub>11</sub> 34.1%, C<sub>12</sub> 27.7%, C<sub>13</sub> 19.0%, C<sub>14</sub> 8.7%, 有効成分 60±2%,

未反応油分15%以下, 無機塩類4%以下, 水分38%, 1%濃度でのpH7.1, 平均分子量345.8)を, BHTは和光純薬工業株式会社製 Lot No. KIK 5562 (白色結晶性粉末, m. p. 69.5℃)を用いた。

**実験動物および飼育環境** 静岡実験動物農業協同組合よりバリエーションシステムで生育された Slc: Wistar ラット雌雄を4週齢で購入した。ラットは室温25±1℃, 湿度50~60%, 換気回数毎時10回, 午前6時より午後5時の11時間照明のバリエーションシステム飼育室に収容した。ケージは幅22×奥行20×高16cmで前面および床が網, 他は板のステンレス製の個別式, 飼育架台は自動給水装置付ベルト式をそれぞれ用いた。試験開始時まで飼料は日本クレア株式会社製 CE-2 固型飼料 (水分8%, 粗蛋白質24.5%, 粗脂肪4.5%, 粗繊維4%, 粗灰分6.6%, 可溶性無窒素物52.4%, 348.1Cal/100g)を用いた。水は試験開始前から終了時まで細菌ろ過を経由した水道水を用い, 飼料とともに自由摂取させた。

**試料投与および試験期間** LASおよびBHTをTable 1に示す濃度で粉末飼料CE-2 (固型飼料CE-2を粉末

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Design of Feeding Studies of LAS and BHT

| Group   | Dietary levels of |         | No. of rats |        |
|---------|-------------------|---------|-------------|--------|
|         | BHT (%)           | LAS (%) | Male        | Female |
| Control | 0                 | 0       | 40          | 40     |
| T       |                   |         |             |        |
| 0.07T   | 0.07              | 0       | 40          | 42     |
| 0.2T    | 0.2               | 0       | 40          | 40     |
| 0.6T    | 0.6               | 0       | 40          | 40     |
| LAS     | 0                 | 0.2     | 40          | 40     |
| LT      |                   |         |             |        |
| 0.07LT  | 0.07              | 0.2     | 40          | 37     |
| 0.2LT   | 0.2               | 0.2     | 40          | 40     |
| 0.6LT   | 0.6               | 0.2     | 40          | 41     |

にしたもの)に混合し、固型化したものを試験飼料とした。ラットが5週齢になった時点で各群の体重分布をそろえ、飼育架台にランダムに配置した後、普通飼料から試験飼料に切り替えて試験を開始した。試験期間は終生とし、ラットが死亡あるいは瀕死に至るまで試験飼料を水とともに自由に摂取させた。Table 1 に各群の略号、摂取させた試験飼料および試験開始時の動物数を示した。本試験での各試料の濃度設定に際しては当部でのラットを用いた亜急性毒性試験の結果を参考とした。

LASの0.2%は体重増加にはほとんど影響を与えず、盲腸重量を軽度増加させた濃度である<sup>2)</sup>。BHTの0.6%は体重増加抑制が0.8%では顕著であるのに<sup>3)</sup>、0.45%では変化がみられなかった<sup>4)</sup>ことから、抑制が10%以内にとどまると推定し設定した濃度である。

**病理学的検索方法** 試験期間中、瀕死と認めたラットは断頭・放血し、血液を採取した後解剖した。採取血液は塗抹標本作製 (May-Grünwald-Giemsa 染色)、血液学的検査に用いた。解剖は肉眼的観察を行うとともに腫瘍、結節、その他の障害部分および下記の器官・組織を摘出し、主要器官および腫瘍は秤量した。皮膚(腹・背部)、筋(大腿部)、肺、気管、大腿骨(骨髄を含む)、脾臓、リンパ節(縦隔、頸下、肝門部)、胸腺(大動・静脈を含む縦隔結合組織とともに)、心臓、唾液腺(耳下、舌下および顎下腺)、舌、肝臓、脾臓、食道、胃、大・小腸、腎臓、膀胱、下垂体、副腎、甲状腺(上皮小体を含む)、包皮腺、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、陰核腺、子宮、卵巣、大・小脳、脊髄、眼球、外涙腺、ハーデリアン腺、外耳(Zymbal腺を含む)。死亡ラットは発見後速やかに剖検し、瀕死ラットと同様に器官、組織お

よび腫瘍などの摘出、秤量を行った。摘出した器官・組織および腫瘍などは10%緩衝ホルマリン液で約6時間振盪固定し、液交換を行った後に静置して1週間固定した。固定完了後、器官・組織は定法に従ってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色を行った。また必要に応じてPAS染色、アザン・マロリー染色、PTAH染色、鍍銀染色および凍結切片による脂肪染色(ズダンB)を施し、これらの標本によって光顕的観察を行った。

#### 結果および考察

非腫瘍性変化はTable 2 および3に示す如く、雌雄とも対照群を含む各群で多くの器官・組織に認められた。

脾臓の萎縮(Photo 1)がT群雌雄ではほぼBHT投与量に比例して増加した。同変化はLT群雌雄でもT群と全く同様の発現傾向を示した。肺では大食細胞の集簇(Photo 2)がT群雌雄でBHT投与量に比例して増加した。同変化はLT群雌雄でも高濃度群でやや判然としなものの、T群と同様の傾向を呈した。肝臓ではT群雌雄でBHT投与量に比例して肝細胞の空胞変性(Photo 3)が減少し、肝細胞の萎縮が増加した。同変化はLT群雌雄でもT群と全く同様の発現傾向であった。胃では前胃の潰瘍(Photo 4)、穿通および穿孔が頻度は対照群に比べて低い、T群雌雄でBHT投与量に伴う増加を示した。とくに穿通、穿孔は少数の発生であるが、この傾向が明らかであった。同変化はLT群雌雄でも同様の発現傾向を示した。

これらのことからLASはBHT投与に関連した非腫瘍性変化の発現傾向にとくに影響を与えなかったと考えられる。

対照群を含む各群雌雄では、慢性腎障害、肝臓の小胆管増生、門脈周囲線維化、脾臓腺房細胞の萎縮などが多くみられた。これらの変化はT群雌雄ではBHT投与量に比例した増減を示さず、LT群雌雄でも同様に一定の傾向は認められなかった。また各変化の発生例数はT群とLT群との間で大差がなかった。このようにBHT投与で一定の発現傾向を示さなかった変化はLASを併用しても一定の傾向を現わさず、発生数にも著変がみられなかった。

以上のことから、非腫瘍性変化の発現にはLASおよびBHT併用による相互作用は認められなかったと考えられる。

LASは本試験条件下においてBHTによるラットの非腫瘍性変化に対してとくに影響をおよぼさなかったと判断される。

## 文 献

- 1) 小林博義, 市川久次, 藤井 孝, 矢野範男, 紺野敏秀, 平賀興吾, 中村 弘, 渡辺悠二, 三村秀一: 東京衛研年報, 24, 397, 1972
- 2) 米山允子, 藤井 孝, 伊川三枝子, 柴 英子, 坂本義光, 矢野範男, 小林博義, 市川久次, 平賀興吾: 東京衛研年報, 24, 409, 1972
- 3) 佐藤 薫, 安藤 弘, 湯澤勝廣, 平賀興吾: 東京衛研年報, 24, 441, 1972
- 4) 米山允子, 馬淵依子, 伊川三枝子, 小林博義, 市川久次: 東京衛研年報, 27-2, 105, 1976
- 5) 米山允子, 益淵正典, 大石真之, 高橋 省, 伊川三枝子, 吉田誠二, 大石向江, 三栗谷久敏, 湯澤勝廣, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 73, 1977
- 6) 藤井 孝, 坂本義光, 阿部幸恵, 三栗谷久敏, 湯澤勝廣, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 85, 1977
- 7) 藤田 博, 小嶋昭江, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 112, 1977
- 8) 市川久次, 林田志信, 米山允子, 藤井 孝, 小林博義, 坂本義光, 池田虎雄, 矢野範男, 紺野敏秀, 平賀興吾: 東京衛研年報, 23, 345, 1971
- 9) 平賀興吾, 林田志信, 市川久次, 米山允子, 藤井 孝, 池田虎雄, 矢野範男: 東京衛研年報, 22, 231, 1970
- 10) 市川久次, 小林博義, 中川好男, 長井二三子, 厚井麻里, 池田虎雄, 矢野範男, 平賀興吾: 東京衛研年報, 26-2, 1, 1975
- 11) 坂本義光, 中川好男, 藤井 孝, 福森信隆, 平賀興吾: 東京衛研年報, 26-2, 16, 1975
- 12) 福森信隆, 三栗谷久敏, 平賀興吾: 東京衛研年報, 26-2, 22, 1975
- 13) 中川好男, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 26-2, 31, 1975
- 14) 藤井 孝, 湯澤勝廣, 平賀興吾: 東京衛研年報, 26-2, 36, 1975
- 15) 藤井 孝, 阿部幸恵, 矢野範男, 湯澤勝廣, 平賀興吾: 東京衛研年報, 27-2, 28, 1976
- 16) 市川久次, 小林博義, 中川好男, 長井二三子, 清水麻里, 池田虎雄, 矢野範男, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 1, 1977
- 17) 藤井 孝, 阿部幸恵, 矢野範男, 長澤明道, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 19, 1977
- 18) 高橋昭夫, 安藤弘, 久保喜一, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 45, 1977
- 19) 藤田 博, 小嶋昭江, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 53, 1977
- 20) 福森信隆, 高橋 省, 三栗谷久敏, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 61, 1977
- 21) 藤井 孝, 阿部幸恵, 長澤明道, 三栗谷久敏, 矢野範男, 湯澤勝廣, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 44, 1978
- 22) 井口重孝, 高橋 博, 池田虎雄, 林田志信, 平賀興吾: 東京衛研年報, 33, 392, 1982
- 23) 藤井 孝, 多田幸恵, 長澤明道, 三栗谷久敏, 矢野範男, 湯澤勝廣, 平賀興吾: 東京衛研年報, 33, 413, 1982

## Explanation of Plates

Photo 1. Atrophy and hemosiderosis in spleen of female rat fed basic diet for 118 weeks. H & E, O. M.  $\times 200$

Photo 2. Focal aggregation of foam cells in lung of male rat fed diet containing 0.07% BHT and 0.2% LAS for 128 weeks. H & E, O. M.  $\times 200$

Photo 3. Vacuolization of hepatocytes in liver of male rat fed basic diet for 118 weeks. H & E, O. M.  $\times 100$

Photo 4. Ulcer in forestomach of female rat fed basic diet for 110 weeks. H & E, O. M.  $\times 100$

H & E = Hematoxylin and eosin staining

O. M. = Original magnification

BHT = Butylated hydroxytoluene

LAS = Linear alkylbenzene sulfonate



Table 2. Summary of Nonneoplastic Lesions : Male

| Dietary levels of BHT (%)           |                    | 0  | 0.07 | 0.20 | 0.60 | 0    | 0.07 | 0.20 | 0.60 |
|-------------------------------------|--------------------|----|------|------|------|------|------|------|------|
| Dietary levels of LAS (%)           |                    | 0  | 0    | 0    | 0    | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| No. of rats initially in study      |                    | 40 | 40   | 40   | 40   | 40   | 40   | 40   | 40   |
| No. of rats evaluated <sup>1)</sup> |                    | 40 | 39   | 40   | 40   | 38   | 40   | 39   | 40   |
| MAMMARY GLAND                       |                    |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Hyperplasia of acinar cells         | <sup>2)</sup><br>— | 39 | 37   | 40   | 40   | 36   | 39   | 38   | 49   |
|                                     | +                  | 0  | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|                                     | ++                 | 1  | 1    | 0    | 0    | 2    | 1    | 1    | 0    |
| SPLEEN                              |                    |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Enlargement                         | —                  | 26 | 24   | 23   | 25   | 22   | 26   | 27   | 25   |
|                                     | +                  | 5  | 7    | 8    | 4    | 3    | 5    | 2    | 8    |
|                                     | ++                 | 2  | 6    | 7    | 8    | 11   | 5    | 7    | 4    |
|                                     | +++                | 7  | 2    | 2    | 3    | 2    | 4    | 3    | 3    |
| Atrophy                             | —                  | 29 | 31   | 30   | 24   | 30   | 29   | 27   | 27   |
|                                     | +                  | 8  | 6    | 8    | 9    | 5    | 11   | 11   | 10   |
|                                     | ++                 | 3  | 1    | 2    | 7    | 3    | 0    | 1    | 3    |
|                                     | +++                | 0  | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Extramedullary hematopoiesis        | —                  | 38 | 31   | 36   | 38   | 32   | 38   | 34   | 33   |
|                                     | +                  | 1  | 7    | 1    | 2    | 4    | 1    | 2    | 5    |
|                                     | ++                 | 1  | 1    | 3    | 0    | 2    | 1    | 3    | 2    |
| Congestion                          | —                  | 36 | 35   | 33   | 35   | 32   | 34   | 35   | 36   |
|                                     | +                  | 1  | 3    | 6    | 1    | 3    | 5    | 2    | 3    |
|                                     | ++                 | 2  | 1    | 1    | 3    | 3    | 1    | 2    | 1    |
|                                     | +++                | 1  | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Hemosiderosis                       | —                  | 31 | 33   | 31   | 27   | 26   | 27   | 33   | 31   |
|                                     | +                  | 4  | 2    | 5    | 7    | 8    | 9    | 3    | 5    |
|                                     | ++                 | 5  | 4    | 4    | 6    | 3    | 4    | 3    | 4    |
|                                     | +++                | 0  | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    |
| Infarct                             | —                  | 35 | 35   | 33   | 38   | 32   | 32   | 35   | 37   |
|                                     | +                  | 5  | 4    | 7    | 2    | 6    | 8    | 4    | 3    |
| LUNG                                |                    |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Hyperplasia of alveolar cells       | —                  | 39 | 37   | 39   | 39   | 37   | 38   | 38   | 38   |
|                                     | +                  | 0  | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    |
|                                     | ++                 | 0  | 2    | 0    | 0    | 0    | 2    | 1    | 1    |
|                                     | +++                | 1  | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Foam cell aggregate                 | —                  | 32 | 29   | 27   | 27   | 29   | 32   | 25   | 27   |
|                                     | +                  | 6  | 10   | 6    | 6    | 8    | 5    | 9    | 10   |
|                                     | ++                 | 2  | 0    | 7    | 5    | 1    | 3    | 5    | 3    |
|                                     | +++                | 0  | 0    | 0    | 2    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Edema                               | —                  | 32 | 30   | 31   | 29   | 24   | 28   | 29   | 30   |
|                                     | +                  | 7  | 8    | 3    | 5    | 11   | 10   | 7    | 8    |
|                                     | ++                 | 1  | 1    | 6    | 6    | 3    | 2    | 3    | 2    |

continued on

Table 2. Summary of Nonneoplastic Lesions : Male (Continued)

| Dietary levels of BHT (%)       |     | 0  | 0.07 | 0.20 | 0.60 | 0    | 0.07 | 0.20 | 0.60 |
|---------------------------------|-----|----|------|------|------|------|------|------|------|
| Dietary levels of LAS (%)       |     | 0  | 0    | 0    | 0    | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| LUNG (continued)                |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Pneumonia                       | —   | 39 | 39   | 38   | 38   | 37   | 38   | 38   | 36   |
|                                 | +   | 1  | 0    | 2    | 2    | 1    | 2    | 1    | 4    |
| HEART                           |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Calcification of myocardium     | —   | 32 | 28   | 34   | 32   | 30   | 27   | 35   | 35   |
|                                 | +   | 3  | 3    | 2    | 4    | 3    | 7    | 2    | 2    |
|                                 | ++  | 4  | 8    | 3    | 3    | 3    | 6    | 2    | 3    |
|                                 | +++ | 1  | 0    | 1    | 1    | 2    | 0    | 0    | 0    |
| LIVER                           |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Atrophy of liver cells          | —   | 33 | 31   | 32   | 28   | 33   | 34   | 27   | 27   |
|                                 | +   | 5  | 7    | 4    | 10   | 4    | 6    | 12   | 9    |
|                                 | ++  | 2  | 1    | 4    | 2    | 1    | 0    | 0    | 4    |
| Vacuolization of liver cells    | —   | 21 | 29   | 30   | 34   | 21   | 22   | 30   | 35   |
|                                 | +   | 7  | 6    | 7    | 5    | 10   | 10   | 4    | 4    |
|                                 | ++  | 9  | 2    | 2    | 1    | 4    | 5    | 2    | 1    |
|                                 | +++ | 3  | 2    | 1    | 0    | 3    | 3    | 3    | 0    |
| Necrosis                        | —   | 9  | 12   | 11   | 16   | 12   | 15   | 15   | 11   |
|                                 | +   | 9  | 10   | 5    | 7    | 8    | 10   | 9    | 13   |
|                                 | ++  | 12 | 11   | 13   | 12   | 11   | 8    | 10   | 11   |
|                                 | +++ | 10 | 6    | 11   | 5    | 7    | 7    | 5    | 5    |
| Hyperplasia of small bile ducts | —   | 18 | 8    | 5    | 15   | 7    | 8    | 8    | 15   |
|                                 | +   | 17 | 15   | 12   | 13   | 16   | 20   | 21   | 12   |
|                                 | ++  | 2  | 12   | 16   | 12   | 11   | 9    | 9    | 6    |
|                                 | +++ | 3  | 4    | 7    | 0    | 4    | 3    | 1    | 7    |
| Periportal fibrosis             | —   | 26 | 19   | 9    | 30   | 18   | 17   | 19   | 26   |
|                                 | +   | 11 | 12   | 15   | 6    | 18   | 15   | 14   | 7    |
|                                 | ++  | 2  | 7    | 13   | 4    | 2    | 5    | 5    | 4    |
|                                 | +++ | 1  | 1    | 3    | 0    | 0    | 3    | 1    | 3    |
| Icterus                         | —   | 36 | 34   | 35   | 38   | 30   | 37   | 34   | 37   |
|                                 | +   | 4  | 5    | 5    | 2    | 8    | 3    | 5    | 3    |
| PANCREAS                        |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Atrophy of acinar cells         | —   | 35 | 29   | 33   | 34   | 24   | 34   | 32   | 33   |
|                                 | +   | 3  | 7    | 5    | 6    | 5    | 2    | 4    | 5    |
|                                 | ++  | 1  | 2    | 2    | 0    | 8    | 4    | 3    | 2    |
|                                 | +++ | 1  | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    |
| Hyperplasia of islet cells      | —   | 40 | 38   | 39   | 40   | 36   | 40   | 34   | 39   |
|                                 | +   | 0  | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 3    | 0    |
|                                 | ++  | 0  | 0    | 1    | 0    | 2    | 0    | 2    | 1    |

continued on

Table 2. Summary of Nonneoplastic Lesions : Male (Continued)

| Dietary levels of BHT (%)       |     | 0  | 0.07 | 0.20 | 0.60 | 0    | 0.07 | 0.20 | 0.60 |
|---------------------------------|-----|----|------|------|------|------|------|------|------|
| Dietary levels of LAS (%)       |     | 0  | 0    | 0    | 0    | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| <b>STOMACH</b>                  |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Erosion of glandular stomach    | —   | 37 | 37   | 37   | 38   | 34   | 39   | 37   | 37   |
|                                 | +   | 2  | 2    | 2    | 1    | 1    | 1    | 1    | 2    |
|                                 | ++  | 1  | 0    | 1    | 1    | 3    | 0    | 1    | 1    |
| Ulcer of forestomach            | —   | 37 | 33   | 25   | 33   | 24   | 30   | 30   | 31   |
|                                 | +   | 3  | 6    | 15   | 7    | 14   | 10   | 9    | 9    |
| Penetration                     | —   | 40 | 39   | 40   | 39   | 38   | 40   | 38   | 40   |
|                                 | +   | 0  | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    |
| Perforation                     | —   | 39 | 38   | 40   | 39   | 37   | 40   | 38   | 38   |
|                                 | +   | 1  | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 2    |
| <b>KIDNEY</b>                   |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Chronic nephropathy             | —   | 1  | 1    | 2    | 1    | 0    | 0    | 3    | 2    |
|                                 | +   | 4  | 4    | 2    | 4    | 8    | 5    | 7    | 1    |
|                                 | ++  | 14 | 9    | 16   | 10   | 11   | 16   | 16   | 15   |
|                                 | +++ | 21 | 25   | 20   | 25   | 19   | 19   | 13   | 22   |
| Interstitial nephritis          | —   | 39 | 38   | 38   | 39   | 38   | 40   | 36   | 38   |
|                                 | +   | 0  | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|                                 | ++  | 1  | 1    | 2    | 0    | 0    | 0    | 3    | 2    |
| <b>URINARY BLADDER</b>          |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Hyperplasia of urothelial cells | —   | 40 | 39   | 39   | 40   | 38   | 40   | 39   | 40   |
|                                 | ++  | 0  | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Hemorrhage                      | —   | 40 | 39   | 40   | 39   | 38   | 39   | 36   | 39   |
|                                 | +   | 0  | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 2    | 1    |
|                                 | ++  | 0  | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    |
| <b>TESTIS</b>                   |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Atrophy                         | —   | 38 | 34   | 34   | 33   | 35   | 35   | 38   | 36   |
|                                 | +   | 0  | 0    | 1    | 3    | 0    | 2    | 0    | 2    |
|                                 | ++  | 2  | 5    | 5    | 4    | 3    | 3    | 1    | 2    |
| <b>PROSTATE</b>                 |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Prostatitis                     | —   | 35 | 33   | 38   | 34   | 33   | 32   | 36   | 32   |
|                                 | +   | 4  | 6    | 2    | 6    | 5    | 8    | 2    | 8    |
|                                 | ++  | 1  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |
| <b>PREPUTIAL GLAND</b>          |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Hyperplasia of acinar cells     | —   | 40 | 39   | 40   | 40   | 37   | 40   | 38   | 40   |
|                                 | +   | 0  | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    |
|                                 | ++  | 0  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |
| Abscess                         | —   | 30 | 31   | 35   | 27   | 29   | 35   | 34   | 34   |
|                                 | +   | 10 | 4    | 3    | 7    | 7    | 4    | 3    | 2    |
|                                 | ++  | 0  | 3    | 1    | 6    | 2    | 1    | 2    | 3    |
|                                 | +++ | 0  | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |

continued on

Table 2. Summary of Nonneoplastic Lesions : Male (Continued)

| Dietary levels of BHT (%) |     | 0  | 0.07 | 0.20 | 0.60 | 0    | 0.07 | 0.20 | 0.60 |
|---------------------------|-----|----|------|------|------|------|------|------|------|
| Dietary levels of LAS (%) |     | 0  | 0    | 0    | 0    | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.2  |
| PITUITARY                 |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Hyperplasia               | —   | 40 | 38   | 39   | 40   | 37   | 40   | 39   | 39   |
|                           | +   | 0  | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    |
|                           | ++  | 0  | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Hemorrhage                | —   | 38 | 37   | 39   | 39   | 37   | 36   | 39   | 37   |
|                           | +   | 1  | 0    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 2    |
|                           | ++  | 1  | 2    | 1    | 0    | 0    | 3    | 0    | 1    |
| ADRENAL                   |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Medullary hyperplasia     | —   | 38 | 35   | 34   | 36   | 35   | 36   | 35   | 36   |
|                           | +   | 1  | 2    | 3    | 1    | 1    | 3    | 2    | 1    |
|                           | ++  | 1  | 2    | 3    | 3    | 2    | 1    | 2    | 3    |
| Cyst                      | —   | 40 | 39   | 40   | 39   | 37   | 40   | 39   | 40   |
|                           | ++  | 0  | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    |
| Hemorrhage                | —   | 39 | 38   | 38   | 34   | 37   | 35   | 37   | 38   |
|                           | +   | 0  | 0    | 2    | 2    | 0    | 1    | 2    | 0    |
|                           | ++  | 1  | 1    | 0    | 4    | 1    | 4    | 0    | 2    |
| THYROID                   |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Hyperplasia               | —   | 37 | 39   | 39   | 39   | 37   | 38   | 39   | 37   |
|                           | +   | 1  | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    |
|                           | ++  | 1  | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 3    |
|                           | +++ | 1  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Cyst                      | —   | 40 | 39   | 38   | 38   | 37   | 40   | 37   | 40   |
|                           | +   | 0  | 0    | 2    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|                           | ++  | 0  | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 2    | 0    |
| PARATHYROID               |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Hyperplasia               | —   | 38 | 35   | 37   | 39   | 34   | 39   | 39   | 33   |
|                           | +   | 0  | 2    | 3    | 1    | 4    | 1    | 0    | 2    |
|                           | ++  | 2  | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 5    |
|                           | +++ | 0  | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| BRAIN, SPINAL CORD        |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Hemorrhage                | —   | 36 | 37   | 37   | 34   | 36   | 35   | 38   | 36   |
|                           | +   | 1  | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|                           | ++  | 2  | 1    | 2    | 1    | 1    | 5    | 1    | 3    |
|                           | +++ | 1  | 0    | 0    | 4    | 1    | 1    | 0    | 1    |

<sup>1)</sup> No. of rats examined histologically.<sup>2)</sup> — : No change, + : Slight changes, ++ : Moderate changes, +++ : Marked changes.

Table 3. Summary of Nonneoplastic Lesions : Female

| Dietary levels of BHT (%)           |                 | 0  | 0.07 | 0.20 | 0.60 | 0    | 0.07 | 0.20 | 0.60 |
|-------------------------------------|-----------------|----|------|------|------|------|------|------|------|
| Dietary levels of LAS (%)           |                 | 0  | 0    | 0    | 0    | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| No. of rats initially in study      |                 | 40 | 42   | 40   | 40   | 40   | 36   | 40   | 41   |
| No. of rats evaluated <sup>1)</sup> |                 | 40 | 40   | 40   | 39   | 40   | 36   | 40   | 40   |
| <b>MAMMARY GLAND</b>                |                 |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Hyperplasia of acinar cells         | <sup>2)</sup> — | 33 | 35   | 36   | 35   | 36   | 33   | 36   | 35   |
|                                     | +               | 3  | 3    | 1    | 2    | 2    | 3    | 3    | 4    |
|                                     | ++              | 4  | 2    | 3    | 2    | 2    | 0    | 1    | 1    |
| <b>SPLEEN</b>                       |                 |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Enlargement                         | —               | 27 | 28   | 32   | 30   | 29   | 20   | 28   | 31   |
|                                     | +               | 2  | 4    | 3    | 5    | 7    | 7    | 7    | 1    |
|                                     | ++              | 7  | 7    | 2    | 2    | 4    | 8    | 4    | 7    |
|                                     | +++             | 4  | 1    | 3    | 2    | 0    | 1    | 1    | 1    |
| Atrophy                             | —               | 32 | 33   | 29   | 21   | 31   | 29   | 31   | 22   |
|                                     | +               | 4  | 6    | 8    | 13   | 6    | 7    | 8    | 16   |
|                                     | ++              | 4  | 1    | 3    | 4    | 3    | 0    | 1    | 2    |
|                                     | +++             | 0  | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Extramedullary hematopoiesis        | —               | 37 | 36   | 35   | 37   | 31   | 29   | 33   | 36   |
|                                     | +               | 2  | 3    | 4    | 0    | 6    | 4    | 6    | 2    |
|                                     | ++              | 1  | 1    | 1    | 2    | 3    | 3    | 1    | 2    |
| Congestion                          | —               | 33 | 38   | 37   | 37   | 35   | 29   | 35   | 38   |
|                                     | +               | 4  | 1    | 2    | 2    | 3    | 3    | 4    | 0    |
|                                     | ++              | 2  | 1    | 1    | 0    | 2    | 4    | 1    | 2    |
|                                     | +++             | 1  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Hemosiderosis                       | —               | 30 | 29   | 22   | 27   | 29   | 28   | 25   | 23   |
|                                     | +               | 7  | 6    | 7    | 8    | 4    | 6    | 12   | 11   |
|                                     | ++              | 3  | 5    | 11   | 3    | 7    | 1    | 2    | 6    |
|                                     | +++             | 0  | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    |
| Infarct                             | —               | 39 | 38   | 38   | 39   | 37   | 34   | 38   | 40   |
|                                     | +               | 1  | 2    | 2    | 0    | 3    | 2    | 2    | 0    |
| <b>LUNG</b>                         |                 |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Hyperplasia of alveolar cells       | —               | 39 | 39   | 39   | 39   | 40   | 35   | 38   | 39   |
|                                     | +               | 0  | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    | 1    |
|                                     | ++              | 1  | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |
| Foam cell aggregate                 | —               | 33 | 32   | 32   | 25   | 30   | 26   | 28   | 28   |
|                                     | +               | 5  | 6    | 6    | 7    | 9    | 7    | 7    | 10   |
|                                     | ++              | 2  | 2    | 1    | 8    | 1    | 3    | 5    | 2    |
|                                     | +++             | 0  | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Edema                               | —               | 35 | 34   | 35   | 30   | 31   | 27   | 33   | 31   |
|                                     | +               | 3  | 4    | 2    | 5    | 8    | 7    | 4    | 8    |
|                                     | ++              | 2  | 2    | 3    | 5    | 1    | 2    | 3    | 1    |

continued on

Table 3. Summary of Nonneoplastic Lesions : Female (Continued)

| Dietary levels of BHT (%)       |     | 0  | 0.07 | 0.20 | 0.60 | 0    | 0.07 | 0.20 | 0.60 |
|---------------------------------|-----|----|------|------|------|------|------|------|------|
| Dietary levels of LAS (%)       |     | 0  | 0    | 0    | 0    | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| LUNG (continued)                |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Pneumonia                       | —   | 38 | 39   | 39   | 38   | 39   | 33   | 39   | 39   |
|                                 | +   | 2  | 1    | 1    | 2    | 1    | 3    | 1    | 1    |
| HEART                           |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Calcification of myocardium     | —   | 39 | 36   | 37   | 38   | 36   | 35   | 39   | 38   |
|                                 | +   | 1  | 0    | 2    | 1    | 2    | 1    | 1    | 2    |
|                                 | ++  | 0  | 4    | 1    | 0    | 2    | 0    | 0    | 0    |
| LIVER                           |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Atrophy of liver cells          | —   | 35 | 32   | 27   | 32   | 34   | 27   | 33   | 34   |
|                                 | +   | 4  | 4    | 11   | 4    | 6    | 6    | 7    | 5    |
|                                 | ++  | 1  | 4    | 2    | 3    | 0    | 3    | 0    | 1    |
| Vacuolization of liver cells    | —   | 27 | 23   | 22   | 27   | 24   | 22   | 30   | 28   |
|                                 | +   | 3  | 6    | 15   | 8    | 8    | 6    | 8    | 6    |
|                                 | ++  | 6  | 11   | 3    | 4    | 1    | 5    | 1    | 6    |
| Necrosis                        | ++  | 4  | 0    | 0    | 0    | 7    | 3    | 1    | 0    |
|                                 | —   | 14 | 17   | 20   | 10   | 21   | 17   | 14   | 15   |
|                                 | +   | 4  | 9    | 8    | 12   | 5    | 7    | 12   | 13   |
| Hyperplasia of small bile ducts | ++  | 8  | 12   | 6    | 8    | 7    | 5    | 7    | 5    |
|                                 | +++ | 14 | 2    | 6    | 9    | 7    | 7    | 7    | 7    |
|                                 | —   | 23 | 20   | 24   | 29   | 30   | 19   | 29   | 35   |
| Periportal fibrosis             | +   | 14 | 14   | 14   | 8    | 9    | 14   | 11   | 3    |
|                                 | ++  | 3  | 5    | 2    | 1    | 1    | 3    | 0    | 2    |
|                                 | +++ | 0  | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Icterus                         | —   | 28 | 20   | 31   | 29   | 32   | 21   | 29   | 32   |
|                                 | +   | 11 | 14   | 7    | 8    | 7    | 11   | 11   | 8    |
|                                 | ++  | 1  | 6    | 2    | 2    | 1    | 4    | 0    | 0    |
| PANCREAS                        | —   | 31 | 39   | 38   | 37   | 36   | 31   | 38   | 36   |
|                                 | +   | 9  | 1    | 2    | 2    | 4    | 5    | 2    | 4    |
| PANCREAS                        |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Atrophy of acinar cells         | —   | 36 | 33   | 34   | 35   | 34   | 29   | 30   | 30   |
|                                 | +   | 4  | 6    | 4    | 3    | 4    | 5    | 8    | 9    |
|                                 | ++  | 0  | 1    | 2    | 1    | 2    | 2    | 1    | 1    |
|                                 | +++ | 0  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |
| Hyperplasia of islet cells      | —   | 40 | 39   | 38   | 39   | 38   | 35   | 40   | 40   |
|                                 | +   | 0  | 1    | 2    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|                                 | ++  | 0  | 0    | 0    | 0    | 2    | 1    | 0    | 0    |
| STOMACH                         |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Erosion of glandular stomach    | —   | 37 | 39   | 37   | 36   | 34   | 34   | 40   | 39   |
|                                 | +   | 1  | 0    | 0    | 3    | 1    | 2    | 0    | 0    |
|                                 | ++  | 2  | 1    | 3    | 0    | 5    | 0    | 0    | 1    |

continued on

Table 3. Summary of Nonneoplastic Lesions : Female (Continued)

| Dietary levels of BHT (%)       |     | 0  | 0.07 | 0.20 | 0.60 | 0    | 0.07 | 0.20 | 0.60 |
|---------------------------------|-----|----|------|------|------|------|------|------|------|
| Dietary levels of LAS (%)       |     | 0  | 0    | 0    | 0    | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| STOMACH (continued)             |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Ulcer of forestomach            | -   | 31 | 31   | 32   | 35   | 30   | 24   | 29   | 26   |
|                                 | +   | 9  | 9    | 8    | 4    | 10   | 12   | 11   | 14   |
| Penetration                     | -   | 37 | 40   | 40   | 36   | 40   | 36   | 40   | 37   |
|                                 | +   | 3  | 0    | 0    | 3    | 0    | 0    | 0    | 3    |
| Perforation                     | -   | 37 | 39   | 37   | 34   | 39   | 35   | 38   | 38   |
|                                 | +   | 3  | 1    | 3    | 5    | 1    | 1    | 2    | 2    |
| KIDNEY                          |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Chronic nephropathy             | -   | 3  | 5    | 1    | 1    | 1    | 1    | 3    | 3    |
|                                 | +   | 12 | 8    | 13   | 15   | 19   | 19   | 13   | 9    |
|                                 | ++  | 15 | 14   | 10   | 7    | 8    | 5    | 14   | 14   |
|                                 | +++ | 10 | 13   | 16   | 16   | 12   | 11   | 10   | 14   |
| Interstitial nephritis          | -   | 40 | 39   | 40   | 38   | 39   | 36   | 40   | 40   |
|                                 | +   | 0  | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|                                 | ++  | 0  | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    |
| URINARY BLADDER                 |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Hyperplasia of urothelial cells | -   | 39 | 38   | 40   | 39   | 40   | 35   | 40   | 40   |
|                                 | +   | 0  | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|                                 | ++  | 0  | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    |
|                                 | +++ | 1  | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Hemorrhage                      | -   | 40 | 40   | 40   | 39   | 40   | 34   | 40   | 39   |
|                                 | ++  | 0  | 0    | 0    | 0    | 0    | 2    | 0    | 1    |
| CLITORAL GLAND                  |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Hyperplasia of acinar cells     | -   | 40 | 40   | 40   | 39   | 40   | 35   | 39   | 39   |
|                                 | +   | 0  | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    |
|                                 | ++  | 0  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| Abscess                         | -   | 37 | 36   | 37   | 37   | 37   | 32   | 38   | 38   |
|                                 | +   | 3  | 2    | 1    | 1    | 3    | 3    | 2    | 2    |
|                                 | ++  | 0  | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    |
|                                 | +++ | 0  | 2    | 2    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| PITUITARY                       |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Hyperplasia                     | -   | 40 | 38   | 40   | 39   | 38   | 36   | 40   | 38   |
|                                 | +   | 0  | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 2    |
|                                 | ++  | 0  | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    |
| Hemorrhage                      | -   | 33 | 34   | 37   | 37   | 33   | 34   | 39   | 39   |
|                                 | +   | 1  | 2    | 1    | 2    | 3    | 1    | 1    | 1    |
|                                 | ++  | 6  | 4    | 2    | 0    | 4    | 1    | 0    | 0    |

continued on

Table 3. Summary of Nonneoplastic Lesions : Female (Continued)

| Dietary levels of BHT (%) |     | 0  | 0.07 | 0.20 | 0.60 | 0    | 0.07 | 0.20 | 0.60 |
|---------------------------|-----|----|------|------|------|------|------|------|------|
| Dietary levels of LAS (%) |     | 0  | 0    | 0    | 0    | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| ADRENAL                   |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Medullary hyperplasia     | —   | 39 | 40   | 34   | 35   | 39   | 32   | 39   | 39   |
|                           | +   | 0  | 0    | 4    | 2    | 1    | 2    | 1    | 1    |
|                           | ++  | 1  | 0    | 2    | 2    | 0    | 2    | 0    | 0    |
| Cyst                      | —   | 38 | 37   | 40   | 39   | 39   | 35   | 38   | 39   |
|                           | +   | 0  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |
|                           | ++  | 2  | 3    | 0    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    |
| Hemorrhage                | —   | 33 | 37   | 39   | 34   | 37   | 32   | 35   | 39   |
|                           | +   | 1  | 0    | 0    | 3    | 1    | 2    | 3    | 0    |
|                           | ++  | 6  | 3    | 1    | 2    | 2    | 2    | 2    | 1    |
| THYROID                   |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Hyperplasia               | —   | 38 | 38   | 40   | 38   | 38   | 34   | 38   | 38   |
|                           | +   | 1  | 1    | 0    | 0    | 0    | 2    | 1    | 0    |
|                           | ++  | 0  | 1    | 0    | 1    | 2    | 0    | 1    | 2    |
|                           | +++ | 1  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Cyst                      | —   | 40 | 40   | 38   | 37   | 39   | 36   | 39   | 38   |
|                           | +   | 0  | 0    | 2    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
|                           | ++  | 0  | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    |
| PARATHYROID               |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Hyperplasia               | —   | 40 | 40   | 40   | 39   | 39   | 36   | 40   | 40   |
|                           | +   | 0  | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    |
| BRAIN, SPINAL CORD        |     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Hemorrhage                | —   | 36 | 39   | 38   | 38   | 37   | 34   | 37   | 39   |
|                           | +   | 1  | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    |
|                           | ++  | 3  | 1    | 2    | 0    | 1    | 1    | 2    | 0    |
|                           | +++ | 0  | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    |

<sup>1)</sup> No. of rats examined histologically.<sup>2)</sup> — : No change, + : Slight changes, ++ : Moderate changes, +++ : Marked changes.



直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムとジブチルヒドロキシルエン  
との併用によるラット終生飼育試験 —腫瘍性変化—

藤 井 孝\*, 多 田 幸 恵\*, 長 澤 明 道\*, 三 栗 谷 久 敏\*  
矢 野 範 男\*, 湯 澤 勝 廣\*, 平 賀 興 吾\*

Lifespan Feeding Studies by Combined Use of Linear Alkylbenzene Sulfonate  
(LAS) and Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats —Neoplasms—

TAKASHI FUJII\*, YUKIE TADA\*, AKEMICHI NAGASAWA\*,  
HISATOSHI MIKURIYA\*, NORIO YANO\*, KATSUHIRO YUZAWA\*  
and KOGO HIRAGA\*

The lifespan feeding studies of linear alkylbenzene sulfonate (LAS), a surfactant, and butylated hydroxytoluene (BHT), an antioxidant food additive, were conducted on Slc: Wistar rats of both sexes to see the interaction in tumorigenicity by the combined use of LAS and BHT. The dose-related decrease of incidence of tumors in some organs or tissues of the rats fed BHT was observed.

These incidence did not change by the combined use of LAS and BHT. The dose-related decrease of incidence in leukemia of the rats fed BHT was not observed, but was seen in the rats fed both LAS and BHT. Thus, it was concluded that there was effect of LAS to BHT in the incidence of leukemia under the conditions employed in this studies.

**Keywords** : linear alkylbenzene sulfonate (LAS), butylated hydroxytoluene (BHT), combined use, rats, neoplasms

緒 言

界面活性剤で合成洗剤の主成分である直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (以下, LAS と略す) と食品添加物の酸化防止剤ジブチルヒドロキシルエン (以下, BHT と略す) とを併用した際の相互作用についてラットを用い終生飼育試験を行って検索した。

本報は BHT によるラットの腫瘍性変化に及ぼす LAS の影響を検討した結果の報告である。体重, 生存率, 生存期間および非腫瘍性変化については別報<sup>1,2)</sup>で報告する。

試料および試験方法

**試料** LAS は花王アトラス株式会社製ネオベレックス F-60, Lot No. 141 を, BHT は和光純薬工業株式会社製 Lot No. KIK5562 を用いた。

**実験動物および飼育環境** 静岡実験動物農業協同組合よりバリアーシステムで生育された Slc: Wistar ラット雌雄を 4 週令で購入し, バリアーシステム飼育室の個別ケージに収容した。飼料は日本クレア株式会社製固型飼料 CE-2, 水は細菌ろ過器経由水道水をそれぞれ自由

に摂取させた。

**試料投与および試験期間** LAS および BHT を Table 1 に示す濃度で粉末飼料 CE-2 に混合し, 固型飼料化したものを試験飼料とした。ラットが 5 週令になった時点から試験飼料を与え水とともに終生自由摂取させた。

Table 1. Design of Feeding Studies of LAS and BHT

| Group   | Dietary levels of |         | No. of rats |        |
|---------|-------------------|---------|-------------|--------|
|         | BHT (%)           | LAS (%) | Male        | Female |
| Control | 0                 | 0       | 40          | 40     |
| T       |                   |         |             |        |
| 0.07T   | 0.07              | 0       | 40          | 42     |
| 0.2T    | 0.2               | 0       | 40          | 40     |
| 0.6T    | 0.6               | 0       | 40          | 40     |
| LAS     | 0                 | 0.2     | 40          | 40     |
| LT      |                   |         |             |        |
| 0.07LT  | 0.07              | 0.2     | 40          | 37     |
| 0.2LT   | 0.2               | 0.2     | 40          | 40     |
| 0.6LT   | 0.6               | 0.2     | 40          | 41     |

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 2. Summary of Neoplastic Lesions : Male

| Dietary levels of BHT (%)           | 0  | 0.07 | 0.20 | 0.60 | 0    | 0.07 | 0.20 | 0.60 |
|-------------------------------------|----|------|------|------|------|------|------|------|
| Dietary levels of LAS (%)           | 0  | 0    | 0    | 0    | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| No. of rats initially in study      | 40 | 40   | 40   | 40   | 40   | 40   | 40   | 40   |
| No. of rats evaluated <sup>1)</sup> | 40 | 39   | 40   | 40   | 38   | 40   | 39   | 40   |
| No. of rats with tumor(s)           | 40 | 38   | 39   | 36   | 36   | 38   | 37   | 38   |
| No. of rats with malignant tumor(s) | 19 | 12   | 11   | 14   | 8    | 12   | 13   | 10   |
| <b>SKIN</b>                         |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Papilloma                           | 1  | —    | —    | 1    | —    | 1    | —    | —    |
| Trichoepithelioma                   | —  | 1    | —    | —    | —    | —    | 1    | —    |
| Sebaceous adenoma                   | —  | 1    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |
| Basal cell carcinoma                | —  | —    | —    | —    | —    | —    | 2    | 1    |
| Squamous cell carcinoma             | 1  | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |
| Sebaceous adenocarcinoma            | —  | —    | —    | —    | 1    | 1    | —    | —    |
| <b>SUBCUTIS</b>                     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Fibroma                             | 4  | 2    | 2    | 1    | —    | —    | 2    | —    |
| Hemangioma                          | —  | —    | —    | —    | —    | —    | —    | 1    |
| Lipoma                              | —  | —    | —    | —    | 1    | —    | —    | —    |
| Fibrosarcoma                        | 1  | —    | —    | —    | —    | —    | 1    | —    |
| Rhabdomyosarcoma                    | 1  | —    | —    | —    | —    | —    | 2    | —    |
| <b>EAR DUCT</b>                     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Adenoma                             | —  | —    | —    | —    | —    | 1    | —    | —    |
| Papilloma                           | —  | 1    | —    | —    | 2    | —    | —    | —    |
| Squamous cell carcinoma             | 1  | —    | 1    | 1    | —    | —    | —    | —    |
| <b>MAMMARY GLAND</b>                |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Adenoma                             | 2  | 2    | —    | —    | 3    | 1    | 3    | 1    |
| Fibroadenoma                        | 4  | 1    | 2    | —    | —    | 3    | —    | 1    |
| <b>LYMPH NODE</b>                   |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Malignant lymphoma                  | 1  | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| <b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>         |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Leukemia                            | 11 | 10   | 9    | 11   | 7    | 9    | 7    | 6    |
| <b>SPLEEN</b>                       |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Hemangioma                          | 1  | —    | —    | —    | —    | 1    | —    | —    |
| Fibrosarcoma                        | 1  | —    | —    | —    | —    | —    | 1    | —    |
| Unclassified sarcoma                | 1  | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |
| <b>LUNG</b>                         |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Adenoma                             | 2  | 2    | 2    | —    | 1    | 2    | 1    | —    |
| Squamous cell carcinoma             | —  | —    | —    | —    | —    | 1    | —    | —    |
| <b>TONGUE</b>                       |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Papilloma                           | —  | 1    | —    | 1    | —    | —    | —    | —    |
| <b>LIVER</b>                        |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Unclassified sarcoma                | 1  | —    | —    | —    | —    | 1    | —    | —    |
| <b>COLON</b>                        |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Leiomyosarcoma                      | —  | 1    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |
| <b>RECTUM</b>                       |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Adenoma                             | —  | —    | 1    | —    | —    | —    | —    | —    |

continued on

Table 2. Summary of Neoplastic Lesions : Male (Continued)

| Dietary levels of BHT (%)       | 0  | 0.07 | 0.20 | 0.60 | 0    | 0.07 | 0.20 | 0.60 |
|---------------------------------|----|------|------|------|------|------|------|------|
| Dietary levels of LAS (%)       | 0  | 0    | 0    | 0    | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| ABDOMINAL CAVITY/<br>PERITONEUM |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Mesothelioma                    | 1  | 2    | 2    | 4    | 2    | 1    | —    | —    |
| Fibrosarcoma                    | 1  | 1    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |
| Leiomyosarcoma                  | —  | —    | —    | —    | —    | —    | —    | 1    |
| Unclassified sarcoma            | —  | —    | —    | —    | —    | —    | —    | 1    |
| TESTIS                          |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Interstitial cell tumor         | 37 | 33   | 33   | 30   | 32   | 35   | 36   | 32   |
| PREPUTIAL GLAND                 |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Adenoma                         | 2  | 2    | —    | —    | —    | —    | 1    | —    |
| PITUITARY                       |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Adenoma                         | 6  | 7    | 4    | 3    | 8    | 10   | 4    | 5    |
| Adenocarcinoma                  | —  | —    | —    | 1    | —    | —    | —    | —    |
| ADRENAL                         |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Pheochromocytoma                | 12 | 10   | 9    | 7    | 12   | 13   | 10   | 6    |
| Cortical adenoma                | 1  | 1    | 1    | 1    | 1    | —    | 1    | —    |
| Ganglioneuroma                  | —  | —    | —    | —    | —    | 1    | —    | —    |
| THYROID                         |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Adenoma                         | 5  | 5    | 1    | 1    | 2    | —*   | 3    | 3    |
| Adenocarcinoma                  | 1  | —    | 1    | 1    | —    | —    | —    | —    |
| PARATHYROID                     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Adenoma                         | 1  | —    | —    | —    | 1    | —    | —    | —    |
| PANCREATIC ISLETS               |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Islet cell adenoma              | 3  | 4    | 4    | —    | 4    | 2    | 5    | —    |
| BRAIN                           |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Meningioma                      | —  | 1    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |

<sup>1)</sup> No. of rats examined histologically.\* Significantly different from control group at  $P < 0.05$  (Fisher exact test).

Table 1 に各群の略号，摂取させた試験飼料および試験開始時の動物数を示した。

**病理学的検索方法** 試験期間中，死亡あるいは瀕死屠殺したラットは直ちに剖検し，ほとんどの器官，組織，腫瘍およびその他の障害部分を摘出し，主要器官および腫瘍は秤量した。摘出した器官，組織などは，ホルマリン固定後，定法に従ってパラフィン切片を作製しヘマトキシリン・エオジン重染色，PAS 染色，アザン・マローリー染色を施した。これらの染色標本によって病理組織学的検索を行った。

なお，試料，動物飼育環境および病理学的検索方法の詳細は非腫瘍性変化の報告<sup>2)</sup>で述べた。

結果の推計学的検討に当っては危険率を 5% に置いた<sup>3)</sup>。

## 結 果

腫瘍は Table 2 および 3 に示す如く雌雄とも対照群を含む各群で多くの器官・組織に発生した。各群の有効例数は組織学的検索を行った例数とした。

**腫瘍を有する動物の発現率 (%)** は雄では対照群が最も高く 100% (40/40=腫瘍を有する例数/有効例数) であり最低は 0.6T 群の 90% (36/40) であった。雌では対照群が 90% (36/40) で，各群は 0.2T 群 85% (34/40) と 0.07T 群 92.5% (37/40) との間に分布していた。この発現率は雌雄とも対照群と各投与群間に有意差がみられず，T および LT 群とも試料投与量に伴い高くあるいは低くなる傾向は示さなかった。

**悪性腫瘍を有する動物の発現率**は雄では対照群が最も高く 47.5% (19/40=悪性腫瘍を有する例数/有効例数)

Table 3. Summary of Neoplastic Lesions : Female

|                                     |    |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------------------|----|------|------|------|------|------|------|------|
| Dietary levels of BHT (%)           | 0  | 0.07 | 0.20 | 0.60 | 0    | 0.07 | 0.20 | 0.60 |
| Dietary levels of LAS (%)           | 0  | 0    | 0    | 0    | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| No. of rats initially in study      | 40 | 42   | 40   | 40   | 40   | 37   | 40   | 41   |
| No. of rats evaluated <sup>1)</sup> | 40 | 40   | 40   | 39   | 40   | 36   | 40   | 40   |
| No. of rats with tumor(s)           | 36 | 37   | 34   | 34   | 35   | 33   | 36   | 36   |
| No. of rats with malignant tumor(s) | 18 | 12   | 10   | 10   | 8    | 12   | 10   | 8    |
| SKIN                                |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Basal cell carcinoma                | —  | —    | —    | —    | —    | —    | 1    | —    |
| SUBCUTIS                            |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Fibroma                             | —  | 1    | 1    | —    | —    | 1    | 2    | —    |
| Lipoma                              | 1  | 1    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |
| Fibrosarcoma                        | —  | 2    | —    | 1    | 1    | —    | —    | 1    |
| Rhabdomyosarcoma                    | —  | 1    | —    | 1    | 1    | —    | 1    | —    |
| EAR DUCT                            |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Squamous cell carcinoma             | —  | 1    | —    | —    | 1    | —    | —    | —    |
| MAMMARY GLAND                       |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Adenoma                             | 8  | 6    | 8    | 5    | 11   | 8    | 9    | 7    |
| Fibroadenoma                        | 5  | 6    | 6    | 4    | 6    | 5    | 4    | 3    |
| Squamous cell carcinoma             | —  | 1    | 1    | —    | —    | —    | —    | —    |
| LYMPH NODE                          |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Malignant lymphoma                  | 1  | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 2    | 2    |
| HEMATOPOIETIC SYSTEM                |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Leukemia                            | 10 | 7    | 6    | 6    | 3*   | 8    | 5    | 3*   |
| SPLEEN                              |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Hemangioma                          | —  | —    | 1    | —    | —    | —    | —    | —    |
| Unclassified sarcoma                | 1  | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |
| MUSCLE                              |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Rhabdomyosarcoma                    | 1  | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |
| LUNG                                |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Adenoma                             | —  | 1    | —    | 1    | —    | —    | 1    | —    |
| Squamous cell carcinoma             | —  | —    | —    | —    | —    | —    | 1    | 1    |
| ORAL CAVITY                         |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Papilloma                           | —  | 1    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |
| TONGUE                              |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Papilloma                           | —  | —    | —    | —    | —    | 1    | —    | —    |
| Squamous cell carcinoma             | —  | —    | —    | —    | —    | —    | 1    | —    |
| LIVER                               |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Unclassified sarcoma                | —  | —    | —    | —    | 1    | —    | —    | —    |
| DUODENUM                            |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Adenoma                             | —  | —    | —    | —    | —    | 1    | —    | —    |
| RECTUM                              |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Adenoma                             | —  | —    | —    | —    | —    | —    | —    | 1    |
| ABDOMINAL CAVITY/<br>PERITONEUM     |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Fibrosarcoma                        | 1  | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |
| Hemangiosarcoma                     | 1  | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |
| Liposarcoma                         | —  | 1    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |
| Unclassified sarcoma                | —  | —    | —    | —    | —    | —    | —    | 1    |

continued on

Table 3. Summary of Neoplastic Lesions : Female (Continued)

| Dietary levels of BHT (%)         | 0  | 0.07 | 0.20 | 0.60 | 0    | 0.07 | 0.20 | 0.60 |
|-----------------------------------|----|------|------|------|------|------|------|------|
| Dietary levels of LAS (%)         | 0  | 0    | 0    | 0    | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| KIDNEY                            |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Clear cell carcinoma              | —  | —    | —    | —    | —    | 1    | —    | —    |
| URINARY BLADDER                   |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Papilloma                         | —  | —    | —    | —    | —    | 1    | —    | —    |
| UTERUS                            |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Adenoma                           | 2  | —    | 3    | 1    | 2    | —    | 1    | 1    |
| Leiomyoma                         | 1  | —    | —    | —    | —    | 2    | —    | 2    |
| Hemangioma                        | —  | 2    | —    | 1    | 1    | 1    | 1    | —    |
| Leiomyosarcoma                    | 1  | —    | —    | 1    | —    | —    | —    | —    |
| Endometrial stromal polyp         | 2  | 3    | 2    | 3    | 3    | 3    | 5    | 2    |
| OVARY                             |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Granulosa cell tumor              | —  | 1    | —    | 1    | —    | —    | —    | —    |
| CLITORAL GLAND                    |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Adenoma                           | 2  | 2    | 1    | 1    | 2    | 3    | 4    | 3    |
| Fibroadenoma                      | —  | —    | —    | —    | —    | 1    | —    | —    |
| Adenocarcinoma                    | —  | —    | —    | —    | —    | 1    | 1    | —    |
| Papilloma                         | —  | —    | —    | 1    | —    | —    | —    | —    |
| PITUITARY                         |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Adenoma                           | 14 | 18   | 12   | 14   | 20   | 17   | 16   | 16   |
| Adenocarcinoma                    | 1  | —    | 2    | 1    | —    | 2    | —    | —    |
| ADRENAL                           |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Pheochromocytoma                  | 9  | 8    | 7    | 4    | 11   | 5    | 6    | 3    |
| Cortical adenoma                  | 1  | 2    | 4    | 1    | 2    | 2    | 2    | 1    |
| Ganglioneuroma                    | —  | —    | 1    | —    | —    | —    | —    | 1    |
| THYROID                           |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Adenoma                           | 2  | 2    | 1    | 2    | 4    | 1    | 1    | 2    |
| Adenocarcinoma                    | 1  | —    | 1    | —    | —    | —    | —    | —    |
| PANCREATIC ISLETS                 |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Islet cell adenoma                | 2  | 1    | 2    | —    | 3    | 2    | —    | 2    |
| BRAIN                             |    |      |      |      |      |      |      |      |
| Astrocytoma                       | 1  | —    | —    | —    | 1    | —    | 2    | 2    |
| Malignant meningioma (suspicious) | —  | —    | —    | —    | 1    | —    | —    | —    |

<sup>1)</sup> No. of rats examined histologically.\* Significantly different from control group at  $P < 0.05$  (Fisher exact test).

であり、LAS群21% (8/38) および0.6LT群25% (10/40) との間にそれぞれ有意差が認められた。雌でも対照群が最も高く45% (18/40) であり、LASおよび0.6LT群20% (8/40) との間にそれぞれ有意差が認められた。投与量に伴う発現率の低下傾向は、LT群の雌で明らかに、雄で軽度それぞれ認められた。

多発した腫瘍は雄では精巣間質細胞腫 (Photo 1)、副腎褐色細胞腫 (Photo 2)、白血病 (Photo 3, 4) および

下垂体腺腫 (Photo 5) であった。これらの腫瘍の発現率は対照群が最高であったが各投与群との間に有意差は認められなかった。T群では精巣間質細胞腫、副腎褐色細胞腫および下垂体腺腫が投与量に伴う発現率の低下傾向を示し、LT群にもほぼ同様の傾向が認められた。白血病はいわゆる mononuclear cell leukemia<sup>4,5)</sup> と呼ばれるものがほとんどであり、T群では投与量に伴う低下傾向はみられずLT群のみに認められた。

雌では下垂体腺腫、乳腺腺腫 (Photo 6)、同線維腺腫、白血病および副腎褐色細胞腫が多発した。これら腫瘍のうち、白血病の発現率は対照群が 25% (10/40) と最も高く、LAS および 0.6 L T 群の 7.5% (3/40) との間にそれぞれ有意差を生じた。この発現率は T 群では投与量に伴う一定の傾向は判然としなかったが、L T 群では明らかな低下傾向を示した。副腎褐色細胞腫の発現率は対照群と各投与群間で有意差を生じなかったが、T 群で投与量に伴う低下がみられ、L T 群もほぼ同様の傾向が認められた。残る多発腫瘍の発現率は対照群と各投与群間に有意差がなく、投与量に伴う一定の傾向もみられなかった。

発生総数は多くないが、1 群で 4 例以上発生した腫瘍は、雄では皮下線維腫、乳腺線維腺腫、腹腔内の中皮腫 (Photo 7)、甲状腺腺腫 (Photo 8) および脾臓の島細胞腫であり、雌では子宮内膜ポリープ、陰核腺腫、副腎皮質細胞腫および甲状腺腺腫であった。雄では中皮腫の発現率が T 群では対照群より高く、投与量に伴いやや上昇したが L T 群では対照群より低く、一定傾向はみられなかった。甲状腺腺腫は対照群 12.5% (5/40) で 0.07 L T 群 0% (0/40) との間に有意差を生じたが T および L T 群とも投与量に伴う一定傾向は示さなかった。雌では対照群と比べ内膜ポリープは 0.2 L T 群、皮質細胞腫は 0.2 T 群がやや高い発現率を示したが、その他の各群ではほとんど同じで、投与量に伴う一定傾向もみられなかった。本試験でみられたこの他の腫瘍は、1 群での発生が 3 例以下、各群の発生合計が雌雄とも 12 例以下であり、投与に関連した一定傾向は認められなかった。

#### 考 察

LAS と BHT とを併用した際の相互作用について検討すべくラットを用いて終生飼育試験を行った。

結果に示した如く、BHT 投与に関連して雄の精巢間質細胞腫、下垂体腺腫および雌雄の副腎褐色細胞腫の発現率が低下したが、この傾向は LAS を併用してもほとんど変わらなかった。このことから LAS は BHT 投与に関連した腫瘍の発現率にともに影響を与えなかったと考えられる。

白血病の発現率は T 群雄は対照群とほぼ同じであり、雌はやや低くなっていたが投与量に伴う低下は明らか

ではなかった。LAS 群は雌雄とも T 群より発現率が低く雌は対照群との間に有意差を生じた。L T 群では雌雄とも投与量に伴う低下がみられ、0.6 L T 群雌雄は 0.6 T 群雌雄に比べ半減し、雌は対照群との間に有意差が認められた。このように白血病の発現率は、雄では BHT 投与によりほとんど変化しなかったが LAS を併用すると BHT 投与量に伴う低下傾向を現わした。雌では BHT 投与によって軽度低下したが、LAS を併用すると BHT 投与量に伴う低下傾向がさらに明らかとなった。

悪性腫瘍を有する動物の発現率も白血病とほぼ同様であり、雌雄とも対照群に比べ LAS および 0.6 L T 群で有意に低かったが、BHT 投与では一定傾向を示さなかった。LAS 併用によって投与に伴う低下傾向が、とくに雌で明らかになった。

このように BHT 投与で一定の傾向がみられなかった白血病および悪性腫瘍を有する動物の発現率は、LAS を併用すると投与に関連した低下傾向を現わした。この低下は、雌雄ともとくに 0.6 L T 群に認められ、0.2% LAS が 0.07 および 0.2% BHT よりも 0.6% BHT に強く働きかけたものと思われる。

以上のことから、本試験条件下において、腫瘍性変化のうち雌雄とも白血病および悪性腫瘍を有する動物の発現には LAS および BHT 併用による相互作用が認められたと考えられる。

#### 文 献

- 1) 井口重孝, 高橋 博, 池田虎雄, 林田志信, 平賀興吾: 東京衛研年報, 33, 392, 1982
- 2) 藤井 孝, 多田幸恵, 長澤明道, 三栗谷久敏, 矢野範男, 湯澤勝廣, 平賀興吾: 東京衛研年報, 33, 399, 1982
- 3) Snedecor, G. W. and Cochran, W. G.: *Statistical Methods*, 6th Ed., 1967, The Iowa State University Press, Ames
- 4) Davey, F. R. and Moloney, W. C.: *Lab. Invest.*, 23, 327, 1970
- 5) Coleman, G. L., Barthold, S. W., Osbaldiston, G. W., Foster, S. J. and Jonas, A. M.: *J. Gerontol.*, 32, 258, 1977

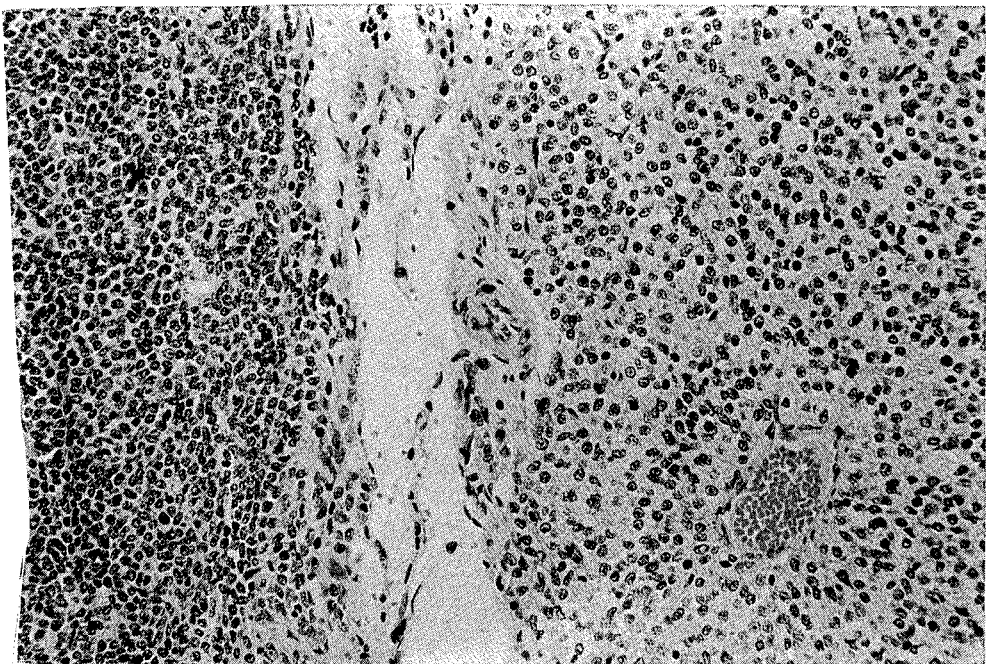


Photo 1. Interstitial cell tumor in testis of male rats fed basic diet for 140 weeks. H & E,  $\times 200$

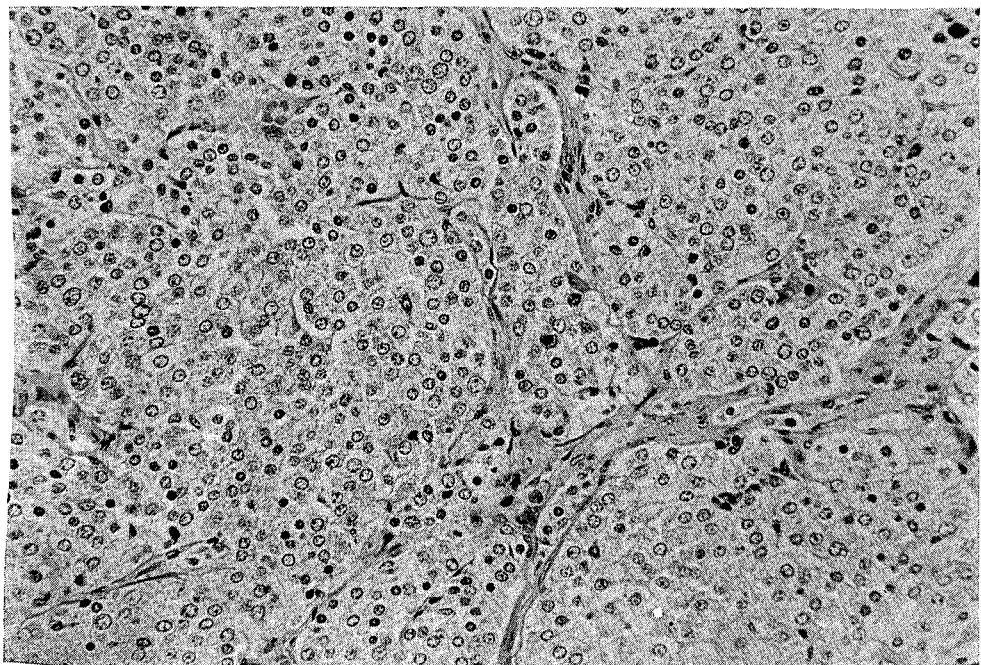


Photo 2. Pheochromocytoma in adrenal of male rat fed basic diet for 144 weeks. H & E,  $\times 200$

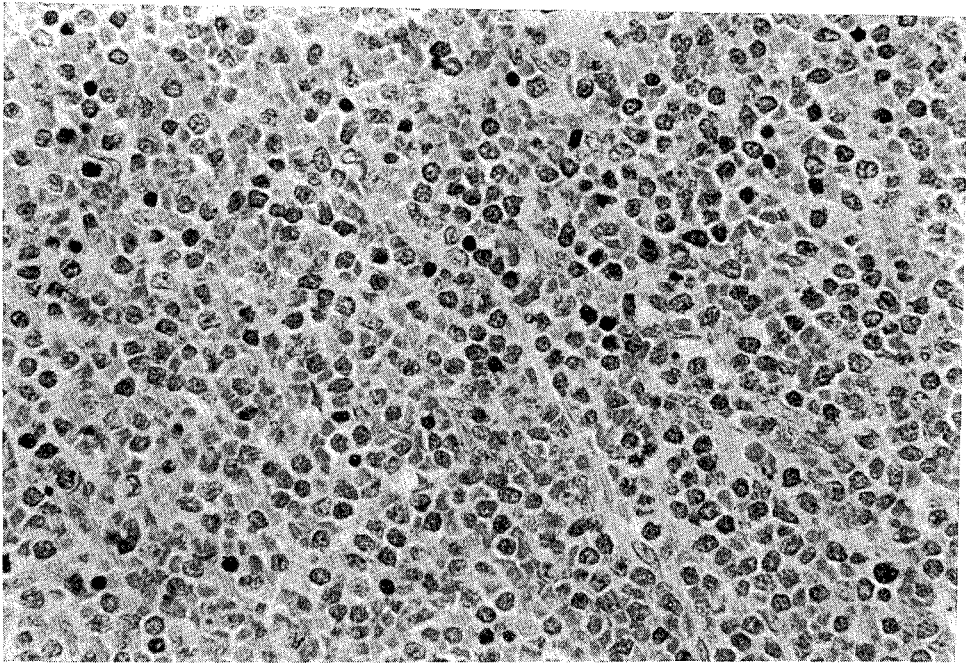


Photo 3. Mononuclear cell leukemic infiltration in spleen of male rats fed basic diet for 105 weeks. H & E,  $\times 400$

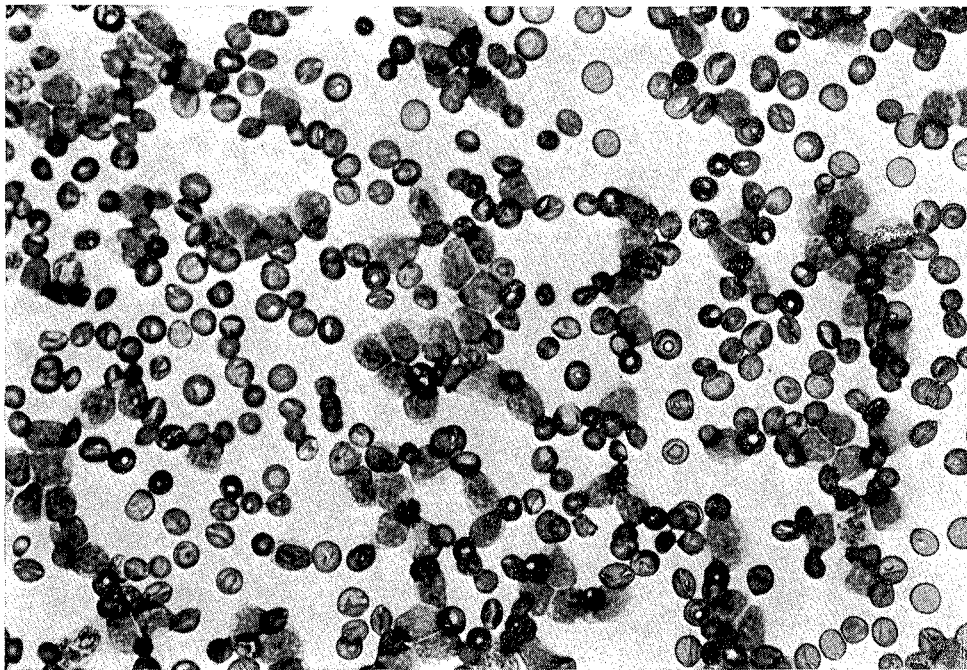


Photo 4. Mononuclear cell leukemic infiltration in peripheral blood of same rat of photo 3. May-Grünwald-Giemsa stain,  $\times 400$



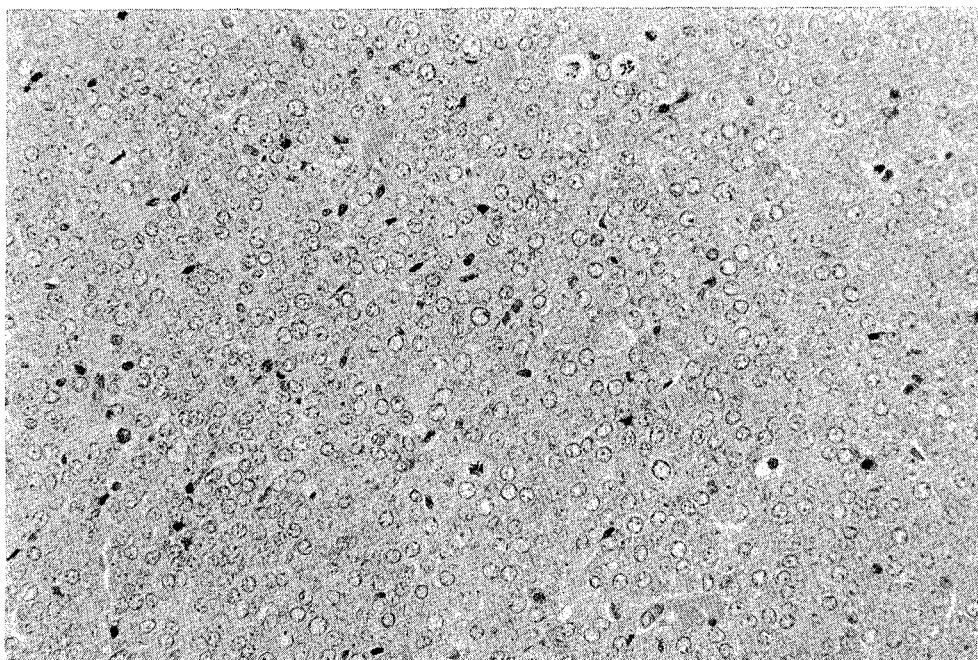


Photo 5. Pituitary adenoma of male rat fed basic diet for 123 weeks.  
H & E,  $\times 200$

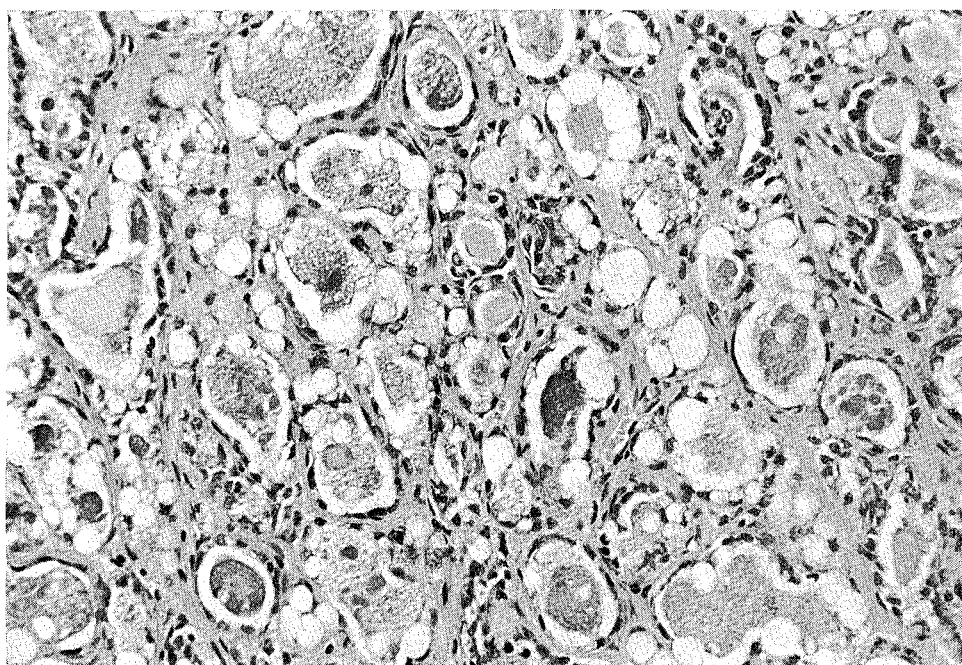


Photo 6. Mammary adenoma with fibrosis of female rat fed basic diet  
for 111 weeks. H & E,  $\times 200$

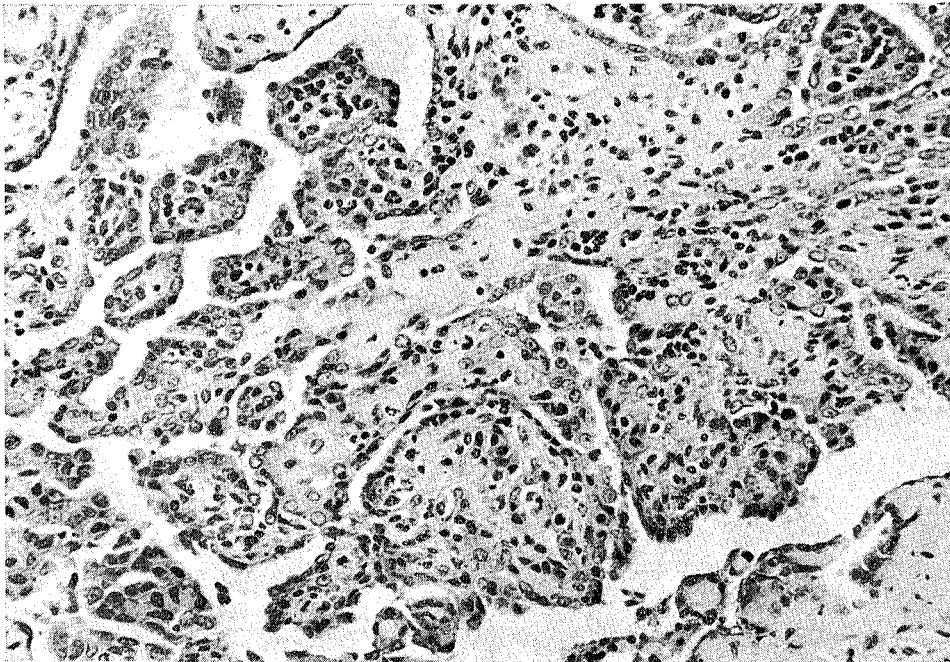


Photo 7. Mesothelioma in peritoneum of male rat fed diet containing 0.6% BHT for 100 weeks. H & E,  $\times 200$

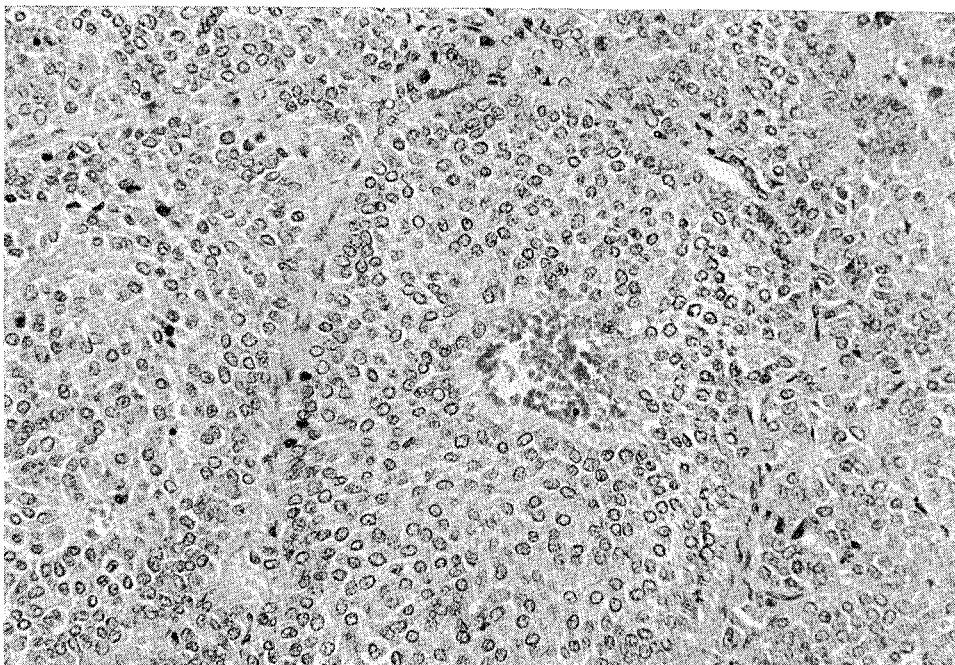


Photo 8. Thyroid adenoma of male rat fed basic diet for 118 weeks. H & E,  $\times 200$

## Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on Fitzgerald Factor, Fletcher Factor and Complement Fixation Activity of Rat Plasma

OSAMU TAKAHASHI\* and KOGO HIRAGA\*

Male Sprague-Dawley rats were fed either a 24% casein basal diet alone or a basal diet containing 1.20% butylated hydroxytoluene (BHT) for 1 week. BHT did not change Fletcher or Fitzgerald factor but increased plasma prekallikrein concentration. BHT did not change the complement fixation activity of rat serum. The effects of BHT on blood coagulation, kallikrein-kinin, fibrinolytic systems and platelets were discussed.

**Keywords :** butylated hydroxytoluene, Fletcher factor, Fitzgerald factor, prekallikrein, complement fixation, rats

### Introduction

Butylated hydroxytoluene (BHT), a sterically hindered phenolic antioxidant, can cause hemorrhagic death and exert a dose-dependent decrease of the prothrombin index in male rats when administered in the diet<sup>1,2)</sup>. The hemorrhagic effect of this antioxidant varies among species<sup>3)</sup>. The hemorrhagic effect of BHT appears to be similar to that of aspirin but more than that of vitamin E in its inducement<sup>4)</sup>. Vitamin K deficiency produced by a direct effect of BHT and/or its metabolites on the liver may be a primary cause in this bleeding<sup>5,6)</sup>, although BHT has also been shown to increase vascular permeability and decrease platelet function<sup>7)</sup>. The nature of the hemorrhagic effect, which differs from that of dicumarol (Warfarin®), has not yet been elucidated but it may be attributable to the structural characteristics of BHT rather than to its antioxidant properties<sup>8-10)</sup>.

Under conditions causing hemorrhagic death, the metabolites excreted in urine and feces are probably equivalent to those reported by Daniel *et al.*<sup>11-13)</sup> The major metabolites, 2,6-di-*tert*-butyl-4-hydroxymethylphenol, 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldehyde and 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoic acid, do not cause hemorrhagic death when administered in the diet<sup>8)</sup>. 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylene-2,5-cyclohexadienone, however, is found in the liver of rats as a major unconjugated metabolite<sup>14)</sup>, and its dietary administration on rats for 2 days led to a rapid decrease in the concentrations of prothrombin and factor VII in the plasma<sup>9)</sup>. This quinone methide also inhibited phyloquinone epoxide-dependent carboxylation of rat liver microsomal protein *in vitro*<sup>15)</sup>.

The present report includes the study of effects of BHT on blood coagulation Fletcher and Fitzgerald factors, since neither factor has been investigated under these conditions. These factors are the constituents of "acute phase" systems of blood coagulation. There is the interdependence between these systems, *i.e.* the complement, blood coagulation kallikrein-kinin, fibrinolytic systems and platelets. The present report also examines the effect of BHT on the complement fixation reaction.

### Materials and Methods

**Animals.** Male Sprague-Dawley rats, obtained when 4 weeks old from CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan, were fed a laboratory ration (CLEA CE-2) for 1 week, and then divided into 2 groups. One group was fed a diet of 24% casein alone while another group was fed a similar diet containing 1.20% BHT for 1 week<sup>1)</sup>.

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

**Determination of Fletcher and Fitzgerald factors:** Under ether anesthesia, whole blood was collected from the inferior vena cava into a plastic syringe containing 1/10 volumes of 3.8% sodium citrate. Plasma was prepared by centrifugation at 2,500 rpm for 10 min at 4 °C. Fletcher and Fitzgerald factors were measured by the activated partial thromboplastin time assay technique, using human plasma congenital-deficient in a single factor<sup>16,17</sup>. For the determination of the Fletcher factor a 0.1ml partial thromboplastin-0.5% kaolin suspension plus a 0.1ml of Fletcher factor deficient plasma and a 0.1-ml of 1/51 diluted rat plasma was mixed in the glass tube and allowed to stand for 1 min at 37°C. The time from the addition of 0.1ml 0.02M  $\text{CaCl}_2$  to the clot formation was measured. For the determination of the Fitzgerald factor a 0.1-ml partial thromboplastin-0.5% kaolin suspension plus a 0.1ml of 1/51 diluted rat plasma was mixed in the glass tube and allowed to stand for 8 min at 37°C. The time from the addition of 0.1 ml 0.02M  $\text{CaCl}_2$  to the clot formation was measured. The percent concentration of factors were calculated from the dilution curves of normal rat plasma. Human plasmas congenital deficient, kaolin, Platelin® and  $\text{CaCl}_2$  solution were purchased from George King Bio-medical, Inc. (Overland Park, KS, USA), Kukita Yakuhin Kogyo Co., LTD. (Tokyo, Japan), Warner-Lambert Co. (Morris Plain, NJ, USA) and Dade Diagnostics Inc. (Miami, FL, USA).

**Determination of prekallikrein:** Under ether anesthesia, venous blood was collected in a plastic syringe and dispensed into a plastic tube containing acid-citrate-dextrose (ACD) solution (0.3ml/2ml blood). The ACD solution consisted of 0.73g citric acid, 2.45g dextrose, 2.20g sodium citrate/100ml water. Plasma prekallikrein concentration was determined by the method of Imanari et al.<sup>18,19</sup> A 50- $\mu\text{l}$  plasma was added with 150 $\mu\text{l}$  acetone and 700 $\mu\text{l}$  0.02M Tris HCl-0.15M saline buffer (pH 8.0), and mixed. After 10min, 100 $\mu\text{l}$  kaolin suspension (12mg/ml of above buffer) was added and mixed. The reaction mixture was allowed to stand for 7 minutes. A 10 $\mu\text{l}$  aliquot of lima bean trypsin inhibitor or soybean trypsin inhibitor solution (2mg/ml of 0.2M Tris buffer at pH 8.0), along with 40 $\mu\text{l}$  of buffer-N- $\alpha$ -p-tosyl-L-arginine [<sup>3</sup>H] methyl ester hydrochloride (TAME) was mixed. Buffer-TAME was the mixture of 1.2ml of 0.2M Tris (pH 8.0) and 10 $\mu\text{l}$  [<sup>3</sup>H] TAME (0.32 $\mu\text{Ci}$ ). A 10 $\mu\text{l}$  of activated plasma was added to initiate the reaction. Incubations were performed in 1.5ml Eppendorf polypropylene micro test tubes. The tubes with caps removed were incubated in glass liquid scintillation-counting vials containing a 10ml toluene-base cocktail. The reaction was terminated with 50 $\mu\text{l}$  of a mixture containing 0.02M TAME in water and acetic acid 9:1 (v/v). After 30min at room temperature, the vials were inverted and shaken for 10-15 seconds to mix the contents of the tubes and vials to stop the reaction. The esterase activity was counted in a Beckman Model LS-355 liquid scintillation system. TAME, [<sup>3</sup>H] TAME (459 mCi/mmol), lima bean and soy bean trypsin inhibitors were purchased from E. Merck (Darmstadt, FRG), the Radiochemical Centre (Amersham, Bucks, UK) and Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

**Complement fixation reaction assay.** Under ether anesthesia, venous blood was collected in a plastic syringe. Complement fixation assay of serum was carried out according to the method described by Garvey et al.<sup>20</sup> Sheep whole blood in sterile Alserver solution (Nihon Seibutsuzairyo Center, Tokyo) was washed with saline and suspended in modified barbital buffer (2.2%). The modified barbital buffer consisted of 2.875g barbital sodium, 0.083g  $\text{CaCl}_2$ , 0.238g  $\text{MgCl}_2$ , 42.50g NaCl/1 liter was diluted to 1/5 (pH 7.3-7.4). Rabbit antiserum prepared against sheep erythrocytes (hemolysin; ca. 5000units/3ml) was purchased from Toshiba Chemicals (Niigata, Japan), but was diluted 400 times with modified barbital buffer prior to use. The relationship between the dilution of hemolysin and the percent hemolysis is shown in Fig. 1. Rat serum complement was also diluted 1:25 with modified barbital buffer. The relationship between this dilution of rat serum and the percent hemolysis is depicted in Fig. 2. A 1/25 dilution caused a 50% hemolysis. Results are expressed as mean percent hemolysis at a 1/25 dilution of serum obtained from 6 rats.

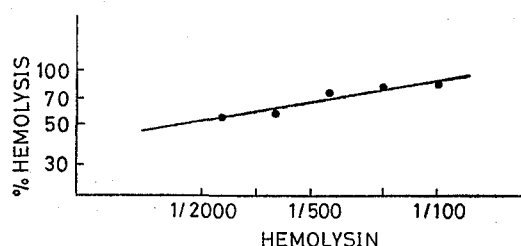


Fig. 1. The relationship between the dilution of hemolysin and % hemolysis. See methods section for more detail.

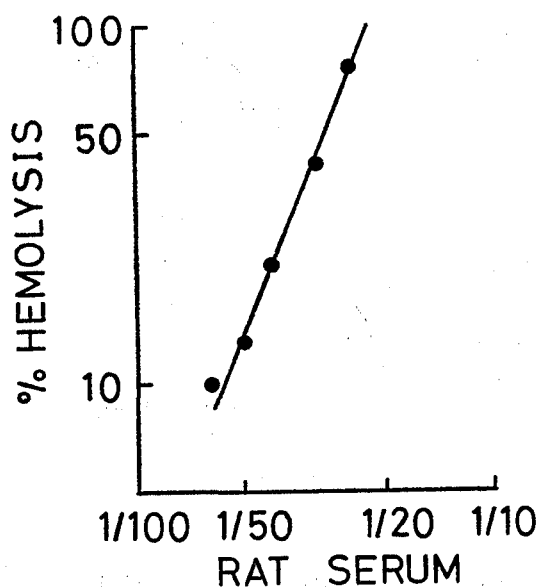


Fig. 2. The relationship between the dilution of rat serum (complement) and % hemolysis. See methods section for more detail.

Table 1. Effects of Dietary Butylated Hydroxytoluene (BHT) on Fletcher or Fitzgerald Factor Activities in Male Rats

| Factor     | Time (seconds) |             | Relative Concentration (% Control) |
|------------|----------------|-------------|------------------------------------|
|            | Control        | BHT-treated |                                    |
| Fletcher   | 87±4*          | 84±3**      | 108                                |
| Fitzgerald | 76±3           | 74±5**      | 115                                |

\* Mean±S.E. for 6 rats. \*\* Dietary BHT did not differ significantly (Student's *t*-test) from the control values.

Table 2. Effects of Dietary Butylated Hydroxytoluene (BHT) on Plasma Esterase and Kallikrein Activities ( $\text{dpm} \times 10^{-4} / \mu\text{l}$  Plasma) in Male Rats

|                                                             | Control   | BHT-treated |
|-------------------------------------------------------------|-----------|-------------|
| LBTI-non-inhibited esterases                                | 39.0±1.8* | 55.4±1.8*** |
| SBTI-non-inhibited esterases                                | 2.8±0.2   | 5.0±0.6**   |
| LBTI-non-inhibited and SBTI-inhibited esterase (kallikrein) | 36.2±1.6  | 50.4±2.2*** |

\*Mean±S.E. of 6 rats/group. The values marked asterisks differ significantly (student's *t*-test) from control values: \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . LBTI = lima bean trypsin inhibitor. SBTI = soy bean trypsin inhibitor.

Table 3. Effects of Dietary Butylated Hydroxytoluene (BHT) on Serum Complement Fixation Activities in Male Rats

|             | Control   | BHT-treated | Relative Activity (% Control) |
|-------------|-----------|-------------|-------------------------------|
| % hemolysis | 68.6±2.7* | 72.1±4.4    | 103                           |

\*Mean±S.E. for 6 rats. No value differed significantly from the control value.

### Results and Discussion

BHT decrease body weight gain and food intake (not shown). Mean BHT intake was estimated to be about 700–1000mg/kg/day. Diarrhea and alopecia were observed in some rats given BHT on days 3–5. Hemorrhages in epididymus were observed in most of rats at day 7. Dietary BHT did not change the factors Fletcher or Fitzgerald (Table 1). BHT increased the plasma pro-enzymes of proteases which could not be inhibited by lima bean trypsin inhibitor and soy bean inhibitor. BHT also increased plasma prekallikrein (Table 2). BHT did not change the complement fixation activity of rat serum (Table 3).

The present studies were conducted on the activity of certain blood coagulation factors. Taking our previous data<sup>7)</sup> into consideration, the effects of BHT are most likely due to the decrease in the vitamin K-dependent factors IX, X, VII and prothrombin, and to the reduction in factor VIII. BHT

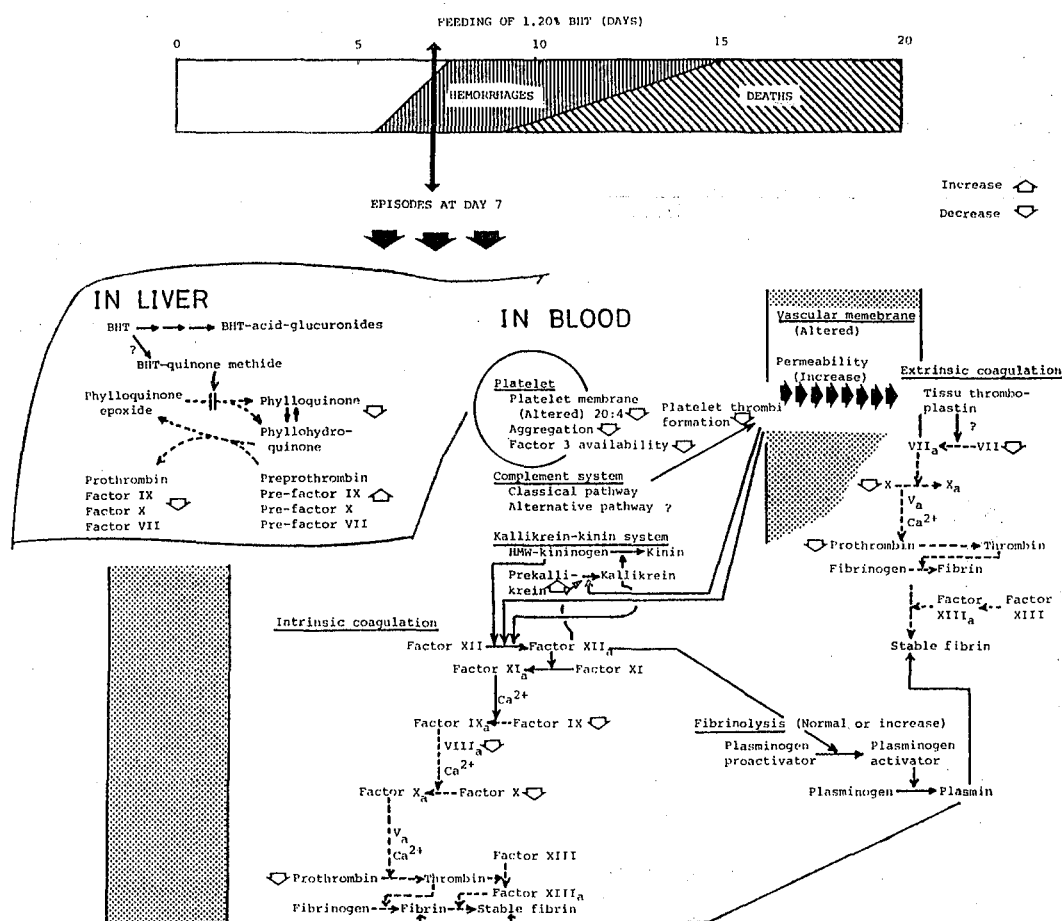


Fig. 3. Proposed relationship between BHT upon hepatic and extra-hepatic and blood coagulation.

does not appear to change other factors. Fitzgerald factor is comparable to the high molecular weight kininogen while Fletcher factor is analogous to prekallikrein. Prekallikrein, as determined by Imanari's method, was increased in BHT-treated rats. Other unknown proteases as shown in Table 2 as ones not inhibited by trypsin inhibitor were also increased in BHT-treated rats. These results are interesting when we consider that vascular permeability has been increased and that intraepididymus hemorrhage has occurred.

The interrelationship between blood coagulation, fibrinolysis, kallikrein-kinin, complement systems, platelets and vascular function is well known. Although BHT did not affect the overall activity of the classical pathway of complements, it may have influence on an alternative pathway.

Mischenko *et al.*<sup>21)</sup> reported that BHT influenced the thromboelastogram of human platelet-rich plasma *in vitro*. These results suggest that there is a defect of platelet function in BHT-added plasma. Since BHT does not change the coagulation activity of platelet-poor plasma, the effect of BHT on coagulation *in vitro* may be mediated through alterations of membrane properties of platelets or erythrocytes. Tissue extracts, for example, from heart or aorta of rats previously treated with BHT changed the activity of coagulation and fibrinolysis. BHT also caused the change of the lipid composition of liver, plasma and platelets<sup>22,23)</sup>. These results suggest that BHT influences the hemostasis through the change in both

protein and lipid metabolism.

The complex interrelationship being in the actions of BHT on blood coagulation are schematized on Fig. 3. Some proposed mechanistic actions of BHT are following: BHT administered with the diet is readily metabolized to the corresponding quinone methide in the rat liver<sup>14)</sup>. This quinone methide may inhibit the synthesis of prothrombin complex through the blocking of phyloquinone-epoxide reduction<sup>15)</sup>. These changes in liver may result in the decrease of vitamin K-dependent coagulation factors in blood<sup>7)</sup>.

In BHT-treated rats, vascular permeability is increased. Its mechanism is little known. Perhaps vascular membrane properties may be also altered. When bleeding into some tissues, blood coagulation has to occur by the function of extrinsic coagulation system initiated with a tissue factor. However, in BHT-ingested rats the extrinsic coagulations almost never take place because of the serious decrease in factor VII, X and prothrombin. The formation of platelet thrombi may be also retarded due to the decrease in platelet functions. The activation process of kallikrein-kinin system and blood coagulation factor XII is normal or rather increased. The intrinsic coagulations initiated by the activation of factor XII cannot proceed because of the decrease of factors IX, VIII, X and prothrombin. On the other hand, the fibrinolytic cascade may come along normally or rather increasingly. Plasmin generated from its cascade may solubilize small and delayedly formed fibrin clot from the abnormal coagulation systems. These effects may enhance the hemorrhagic tendency.

The interdependence between these abnormal alterations is still unclear. Anyway, the general aspects of abnormal hemostatic balance at day 7 appears to be those above mentioned.

#### References

- 1) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 43, 399, 1978
- 2) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 16, 475, 1978
- 3) Takahashi, O., Hayashida, S. and Hiraga, K.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 18, 299, 1980
- 4) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Jpn J. Pharmacol.*, 31, 143P, 1981
- 5) Suzuki, H., Nakao, T. and Hiraga, K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 50, 261, 1979
- 6) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *J. Nutr.*, 109, 453, 1979
- 7) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 49, 14, 1981
- 8) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 46, 811, 1978
- 9) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Toxicol. Lett.*, 5, 147, 1980
- 10) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Toxicol. Lett.*, 8, 77, 1981
- 11) Daniel, J.W. and Gage, J.C.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 3, 405, 1965
- 12) Daniel, J.W., Gage, J.C., and Jones, D.I.: *Biochem. J.*, 106, 783, 1968
- 13) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Toxicol. Lett.*, 6, 287, 1980
- 14) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 17, 451, 1979
- 15) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 701, 1981
- 16) Hathaway, W.E., Belhasen, L.P., and Hathaway, H.S.: *Blood*, 26, 521, 1965
- 17) Saito, H., Goldsmith, G. and Waldmann, R.: *Blood*, 48, 941, 1976
- 18) Imanari, T., Kaizu, T., Toshida, H., Yates, K., Pierce, J.V. and Pisano, J.J.: *Chemistry and Biology of the Kallikrein-Kinin System in Health and Disease*, 205, 1974, NIH
- 19) Imanari, T.: *Farumasia*, 10, 663, 1974 (in Japanese)
- 20) Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Susendorf, D.H.: *Methods in Immunology*, 3rd ed., 1977, W.A. Benjamin Inc., Massachusetts
- 21) Mischenko, V.P., Gol'denberg, Yu. M. and Novosel'tseva, T.V.: *Vopr. Med. Khimii*, 26 (6), 763, 1980 (in Russian)

22) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Toxicology*, 22, 161, 1981

23) Takahashi, O. and Hiraga, K.: In preparation.

### ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の Fitzgerald 因子, Fletcher 因子, 補体系活性におよぼす影響

高橋 省\*, 平賀 興吾\*

Sprague-Dawley 系雄ラットに 24%カゼイン食を基本飼料とし 1.20% ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) を 1 週間投与した。BHT は Fletcher および Fitzgerald 因子に変化を与えなかったが血しょうプレカリクレ

イン濃度を増加させた。BHT はラット血清補体結合活性に影響を与えなかった。BHT の血液凝固, カリクレインーキニン, 線溶系および血小板への影響について考察した。



## ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) 摂取雄ラットのビタミンK欠乏症の原因について

鈴木英子\*, 中尾順子\*, 平賀興吾\*

### On the Cause of Vitamin K Deficiency in Male Rat Fed with Butylated Hydroxytoluene (BHT)

HIDEKO SUZUKI\*, TOSHIKO NAKAO\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** ジブチルヒドロキシトルエン butylated hydroxytoluene, ビタミンK欠乏症 vitamin K deficiency

#### 緒 言

ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) を雄ラットに摂取させた場合、プロトロンビンを含む4つのビタミンK関連凝固因子が減少することは報告した<sup>1)</sup>。この因子は肝臓中でビタミンKの存在のもとに生合成される。しかしながら、BHT は肝臓の組織障害をおこさない<sup>2)</sup>。さらに BHT あるいはその代謝産物はジクマロールのようなビタミンK拮抗物質ではないことを報告した<sup>1)</sup>。

このようなビタミンK関連凝固因子の減少は、ビタミンK投与により回復することにより<sup>1)</sup>、BHTは雄ラットにおいてビタミンK減少症をひきおこすことが示唆される。そこで、BHT を摂取させた雄ラットの肝臓と糞のビタミンK含有量を chick bioassay method によって測定し、ビタミンK欠乏症の原因を検討した。

#### 実験材料および方法

JCL-SD 系雄ラットを生後4週令で購入、室温 25±1℃、湿度55~60%、照明を午前6時より午後6時まで行なう環境下で飼育した。2週間予備飼育後実験に使用した。BHT と phyloquinone (ビタミンK<sub>1</sub>) は和光純薬工業製品を使用した。基本飼料として用いたビタミンK欠乏飼料は Matschiner らの方法<sup>3)</sup>に従い作製した。肝臓のビタミンK含有量を測定するための実験では、一群30匹のラットを用い、ステンレス金網ケージに5匹ずつ収容し、ビタミンK欠乏飼料にBHTを 0, 0.25, 0.50%の割合に添加し、2週間自由摂取させた。なお水も自由に摂取させた。phyloquinone (0.5g) は 100ml の 99.5%エタノールに溶かし、その1mlを蒸留水で5μg/mlの濃度に希釈し、ラットに20μg/kg body weight を屠殺6時間前に経口投与した。BHT 添加飼料を2週間摂取させた後、屠殺し、速やかに肝臓を摘出し、肝重量を測定し、次いで凍結乾燥し、粉碎してビタミンK定量まで

-20℃に保存した。

糞のビタミンK含有量を測定するための実験では、1群10匹のラットを用い、一匹ずつ代謝ケージに収容し、Table 2に示したような BHT あるいは phyloquinone を添加した飼料と水を2週間自由摂取させた。摂取量は毎日測定した。糞は2週間毎日採取した。2週間採取した糞は凍結乾燥し、重量を測定し、次いで粉碎し、ビタミンK定量まで-20℃に保存した。

肝臓あるいは糞のビタミンKの定量は chick bioassay method<sup>4)</sup> によって測定した。粉碎した肝臓および糞は chick 飼料にそれぞれ 10, 0.23%の割合に混合して chick に与えた。

#### 結果ならびに考察

0.5% BHT 添加飼料を摂取させたラット群では3匹のラットが2週間以内に出血死した：最初の死亡は摂取開始後11日目におこった。さらに他の7匹のラットの摂取量は著しく減少し、そのうちの3匹は摂取開始後10日目頃より貧血状態になった。0.25% BHT 添加飼料を摂取させたラット群では出血死したラットはみられず、2週間の飼料摂取後のプロトロンビン時間は著しく減少した。これらのラットは貧血状態も認められなかった。そこで0.25% BHT 添加飼料を2週間与えたラットの肝臓のビタミンK含有量を測定したところ、Table 1に示すようにビタミンKは検出限界以下であった。対照ラットの肝臓のビタミンK濃度は0.06μg/gであった。

phyloquinone をラットに注射した時、肝臓の phyloquinone は6時間後に最高値に達する<sup>5)</sup>ので、屠殺6時間前に、phyloquinone をラットに経口投与した。このような条件下でさえ、BHT 摂取ラットの肝臓のビタミンKは検出限界以下であった。ところが対照ラットでは増加していた (Table 1)。

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Liver Wet Weight and Vitamin K Concentration of Male Rats Fed BHT for 2 Weeks

| Treatment                                  | Weight <sup>a)</sup><br>(g) | Vitamin K <sup>b)</sup><br>( $\mu\text{g/g}$ wet wt) |
|--------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------|
| None                                       | 12.9 $\pm$ 0.3              | 0.06 $\pm$ 0.004                                     |
| 0.25% BHT                                  | 13.3 $\pm$ 0.4              | Not detectable <sup>c)</sup>                         |
| Phylloquinone <sup>d)</sup>                | 12.3 $\pm$ 0.2              | 0.14 $\pm$ 0.030                                     |
| 0.25% BHT +<br>Phylloquinone <sup>d)</sup> | 13.2 $\pm$ 0.2**            | Not detectable <sup>c)</sup>                         |

a) Values are means $\pm$ SE of 30 rats.b) Values are expressed as phylloquinone and are means $\pm$ SE of triplicate assays using different pooled liver samples (ten livers per one pooled sample).c) Sensitivity of the method was 0.03  $\mu\text{g/g}$  liver.d) Phylloquinone (vitamin K<sub>1</sub>) was injected po at a dose of 20  $\mu\text{g/kg}$  body weight 6 hour before sacrifice.

\*\* P&lt;0.01.

一方、ラットでは血液凝固に必要な量のビタミンKを腸内細菌によって合成することができることはよく知られている<sup>6)</sup>。そこでBHTを摂取したラットでは、腸内細菌によるビタミンKの合成が抑制されて肝臓へのビタミンKの供給量が減少し、肝臓中のビタミンK含有量が低下する可能性が考えられる。もしその可能性があるならば、BHT摂取ラットの糞のビタミンK含有量は減少するかもしれない。しかしながら、0.25% BHT摂取ラットの糞のビタミンK含有量は対照ラットのそれと比較

した時、減少せず、むしろ増加する傾向にあった(Table 2)。

BHT添加飼料に phylloquinone を添加した場合、糞のビタミンK含有量は増加傾向にあった。この場合、ラットは摂餌量が減少しているにもかかわらずそれらの糞のビタミンK含有量がより増加傾向にあった。一方、基本飼料に phylloquinone を添加した場合も、糞のビタミンK含有量は増加傾向にあった (Table 2)。

また、BHT 摂取ラット群の糞排泄量は対照ラット群に比べ有意に増加した。この結果は、BHT 摂取ラットが、対照ラットに比べ、ビタミンKの排泄量が多かったことを示す。

以上の結果から、BHT 摂取ラットのビタミンK欠乏症の原因は、BHT がビタミンKの腸管からの吸収を阻害し、糞中により多くのビタミンKを排泄し、肝臓へのビタミンKの供給量を減少する可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) Suzuki, H., Nakao, T. and Hiraga, K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **50**, 261, 1979
- 2) 坂本義光ら: 東京衛研年報, 26-2, 16, 1975
- 3) Matschiner, J. T. and Doisy, E. A., Jr.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **109**, 139, 1962
- 4) Matschiner, J. T. and Doisy, E. A., Jr.: *J. Nutr.*, **90**, 97, 1966
- 5) 堺 敬一: 衛生化学, **12**, 202, 1966
- 6) Nightingale, G., Lockhart, E. E. and Harris, R. S.: *Arch Biochem.*, **12**, 381, 1947

Table 2. Food Intake, Dried Fecal Weight and Fecal Vitamin K Concentration of Male Rats Fed BHT for 2 Weeks<sup>a)</sup>

| Dietary level |                                      | Food intake<br>(g/2 weeks) | Dried fecal<br>weight<br>(g/2 weeks) | Fecal vitamin K<br>concentration <sup>b)</sup><br>( $\mu\text{g/g}$ ) |
|---------------|--------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| BHT<br>(%)    | phylloquinone<br>( $\mu\text{g/g}$ ) |                            |                                      |                                                                       |
| 0             | 0                                    | 265.2 $\pm$ 8.0            | 5.5 $\pm$ 0.2                        | 33.9 $\pm$ 6.0                                                        |
| 0.25          | 0                                    | 219.9 $\pm$ 5.0***         | 6.2 $\pm$ 0.1**                      | 40.9 $\pm$ 6.0                                                        |
| 0             | 0.25                                 | 261.4 $\pm$ 7.9            | 5.6 $\pm$ 0.2                        | 35.9 $\pm$ 6.0                                                        |
| 0.25          | 0.25                                 | 218.9 $\pm$ 4.3***         | 6.2 $\pm$ 0.1*                       | 46.9 $\pm$ 5.7                                                        |
| 0             | 0.50                                 | 272.2 $\pm$ 8.7            | 5.9 $\pm$ 0.2                        | 36.4 $\pm$ 5.5                                                        |
| 0.25          | 0.50                                 | 256.0 $\pm$ 4.9            | 7.3 $\pm$ 0.1***                     | 47.2 $\pm$ 8.3                                                        |

a) Values are means $\pm$ SE of ten rats.

b) Values are expressed as phylloquinone.

\* P&lt;0.05, \*\* P&lt;0.01, \*\*\* P&lt;0.001.

ラット肝グルタチオン量とグルタチオン-S-トランスフェラーゼ  
活性に対するブチルヒドロキシトルエンの影響

中 川 好 男\*, 中 尾 順 子\*, 平 賀 興 吾\*

Effects of Butylated Hydroxytoluene on the Level of Glutathione  
and the Activity of Glutathione-S-transferase in Rat Liver

YOSHIO NAKAGAWA\*, TOSHIKO NAKAO\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** ジブチルヒドロキシトルエン butylated hydroxytoluene, 肝グルタチオン liver glutathione, グル  
タチオン-S-トランスフェラーゼ glutathione-S-transferase

ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) は加工食品の酸化防止剤に、また石油製品の安定剤に広く利用されている。著者らはこれまでにこの化合物の生体内運命、特に生体高分子への結合性について *in vivo*<sup>1-4)</sup> および *in vitro* 実験<sup>5-7)</sup> により検討してきた。その結果、(1) BHT は肝ミクロゾームのチトクロム P-450 に連結したモノオキシゲナーゼ系で酸化され、生成した活性中間体の一部がタンパク質に特異的に共有結合をする、(2) この結合は活性中間体の4-メチル基とシステイン残基のSH基とのチオエーテル結合に起因する、(3) この活性中間体として2,6-di-*tert*-butyl-4-hydroxymethylphenol および2,6-di-*tert*-butyl-4-methylene-2,5-cyclohexadienone などが推定される、などの事実が明らかになった。さらに、この活性中間体は細胞内のグルタチオン (GSH) やシステインなどのチオール化合物のSH基にも反応し、水溶性の抱合体を形成した<sup>7)</sup>。このことは脂溶性化合物であるBHTの代謝にメルカプツール酸生成系も重要な役割を担っていることを示唆しており、実際 Daniel 氏<sup>8)</sup> はBHTを経口投与したラットの尿中からBHT-メルカプツール酸 (投与量の11%) を major metabolites の一部として確認している。一方、著者らはBHTをラットに連続投与することにより、肝の薬物酸化活性の誘導と並行してGSH量およびGSH-S-transferase活性を増加させることを認めた<sup>9)</sup>。今回は前報の結果<sup>9)</sup> に投与数時間後の資料を補足する目的で、6時間後 (経口投与されたBHTの肝における最高濃度時<sup>10)</sup>) の肝GSH含量とGSH-S-transferase活性について検討した。

実験材料と方法

試薬 BHT, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB),

3,4-dichloro-1-nitrobenzene (DCNB) は東京化成工業製, GSH, GSH レダクターゼ, 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) はシグマケミカル製, NADPH はオリエンタル酵母工業製, その他の試薬は市販の特級規格品を用いた。

**動物と処置** ウィスター系雄性ラット (SPF, 体重200~220g) を一群4匹として用いた。BHTはオリーブ油に溶かし、一晩絶食したラットに500mg/kg (LD<sub>50</sub> の約1/4量<sup>10)</sup>)あるいは1000mg/kgの用量で経口投与した。ラットは投与6時間後に断頭屠殺した。摘出し秤量を終えた肝は1.15%KCl (10mMリン酸緩衝液pH7.4と5mMEDTA, 含) で灌流し、ついで同溶液で20%ホモジネートに調製した。この一部にトリクロロ酢酸水溶液 (終濃度7.5%) を加え、遠心 (1000×g, 20min) して上清を分取し、氷冷した2倍量のエーテルで5回洗浄した。N<sub>2</sub>ガスでエーテルを除いた水層はGSH量の測定に供した。一方、残りのホモジネートは105000×g, 90minで遠心して上清を分離し、これをGSH-S-transferase活性の測定に供した。

**GSHの定量** 組織GSHを特異的に定量するDTNB-GSH レダクターゼ法<sup>11)</sup>を用いた。反応はCary 17のキューベット中 (室温) で行ない、412nmの吸光度の増加を3分間記録した後、初速度を求めて測定した。

**GSH-S-transferase活性の測定** 活性はHabig 氏の方法<sup>12)</sup> に準じて測定し、基質としてCDNBとDCNBを用いた。反応はCary 17のキューベット中 (室温) で行ない、340nm (CDNB) あるいは345nm (DCNB) の吸光度の増加から初速度を求めた。

**タンパク質の定量** 牛血清アルブミンを標準品として

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Effects of BHT on the Level of GSH and the Activity of GSH-S-transferase in Rat Liver

|                                 | Dose (mg/kg)          |                     |             |
|---------------------------------|-----------------------|---------------------|-------------|
|                                 | 0                     | 500                 | 1000        |
| Liver weight <sup>a)</sup>      | 7.0±0.5 <sup>e)</sup> | 7.7±0.2             | 6.9±0.2     |
| Protein <sup>b)</sup>           | 177±5                 | 193±8 <sup>f)</sup> | 198±13*     |
| GSH <sup>c)</sup>               | 4.15±0.42             | 0.39±0.28**         | 0.36±0.23** |
| GSH-S-transferase <sup>d)</sup> |                       |                     |             |
| CDNB                            | 1032±56               | 1041±97             | 1074±51     |
| DCNB                            | 47.2±2.5              | 43.6±3.1            | 48.3±2.8    |

a) g, b) mg/g liver, c)  $\mu$ mole/g liver, d) nmole of substrate acted upon/mg protein/min, e) means  $\pm$  S. D., f) statistical difference from control group \*  $P < 0.02$ , \*\*  $P < 0.001$

Lowry らの方法<sup>13)</sup>で定量した。

血清酵素活性の測定 血清は常法<sup>14)</sup>に従って調製し、GOT と GPT 活性は Reitman-Frankel 変法<sup>15)</sup>、アルカリホスファターゼ (Alp) 活性は Kind-King 変法<sup>16)</sup>に準じて測定した。

#### 結果と考察

結果は Table 1 に示した。BHT は GSH-S-transferase 活性に影響を及ぼさなかった。タンパク量は BHT により若干増加する傾向を示した。一方、GSH 量は顕著な減少を示し、500mg/kg 用量で対照群の 9.4%、1000mg/kg 用量で 8.7% までに激減した。なお Table 1 には示さなかったが、血清の GOT、GPT および Alp の各活性については BHT により影響があらわれなかった。

著者らは BHT が肝ミクロソームにより酸化され、生じた活性中間体がタンパク質に共有結合をすることを認めた。タンパク質に結合する BHT の量は経口投与 6 時間後に最大値に達した<sup>3,4)</sup>。これはこの時点の肝において活性中間体も高濃度で存在することを示唆している。親電子性の活性中間体は組織高分子の求核性官能基に不可逆的に結合することが報告されており<sup>17-19)</sup>、事実 BHT の場合も代謝物の一部がタンパク質のシステイン残基の SH 基にチオエーテルを介して結合した<sup>7)</sup>。一方、細胞内においてこのような有害な活性中間体を解毒する機構として GSH 抱合系 (メルカプツロール酸生成系) が知られている<sup>20)</sup>。この GSH 抱合系に対して BHT (連続投与) は誘導し、これと並行して誘導されるチトクロム P-450 により多量に生成した BHT の活性中間体を合目的々に処理することが前実験により推察された<sup>9)</sup>。しかし今回の結果は、多量投与直後の肝において GSH 抱合系の誘導を示しておらず、むしろ生理的に存在する GSH

が活性中間体をトラップすることにより消費され、一時的な枯渇状態に陥っていることを示唆している。

#### 要 旨

BHT (500mg/kg, 1000mg/kg) の経口投与 6 時間後、ラット肝の GSH 含量はコントロールの約 9% までに激減したが、GSH-S-transferase 活性には影響を及ぼさなかった。

#### 文 献

- 1) Nakagawa, Y., Ikawa, M. and Hiraga, K.: *Chem. Pharm. Bull.*, 26, 374, 1978
- 2) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T.: *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 442, 1979
- 3) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T.: *Biochem. Pharmacol.*, 29, 1304, 1980
- 4) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T.: *Biochem. Pharmacol.*, 30, 3132, 1981
- 5) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T.: *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 480, 1979
- 6) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T.: *J. Pharm. Dyn.*, 3, 314, 1980
- 7) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T.: *Biochem. Pharmacol.*, 30, 887, 1981
- 8) Daniel, J. W., Gage, J. C. and Jones, D. I.: *Biochem. J.*, 106, 783, 1968
- 9) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T.: *J. Pharm. Dyn.*, 4, 823, 1981
- 10) Karplyuk, I. A.: *Voprosy Pitaniya*, 18, 24, 1959
- 11) Taniguchi, T., Tsukada, Y. and Hirai, H.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 354, 161, 1974

- 12) Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B.:  
*J. Biol. Chem.*, 249, 7130, 1974
- 13) Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L.  
and Randall, R.R.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265,  
1951
- 14) Nakagawa, Y., Fukuda, H., Shiba, H. and Hiraga,  
K.: *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,  
25, 599, 1974
- 15) Reitman, S. and Frankel, S.: *Am. J. Clin. Path.*,  
28, 56, 1957
- 16) Kind, P.N. and King, E.I.: *J. Clin. Path.*, 7,  
322, 1955
- 17) Gillette, J.R., Mitchell, J.R. and Brodie, B.B.:  
*Ann. Rev. Pharmacol.*, 14, 271, 1974
- 18) Jollow, D.J., Mitchell, J.R., Zampaglione, N.  
and Gillette, J.R.: *Pharmacol.*, 11, 151, 1974
- 19) Weisburger, E. K.: *Ann. Rev. Pharmacol.*  
*Toxicol.*, 18, 395, 1978
- 20) Tate, S.S.: *Enzymatic Basis of Detoxication*  
II, (Ed. Jakoby, J. B.), 95, 1980, Academic  
Press, New York

## オルトフェニルフェノールのラットを用いた91週間毒性試験

中 村 清 純\*, 池 田 虎 雄\*, 井 口 重 孝\*, 平 賀 興 吾\*

### Toxicity of *o*-Phenylphenol (OPP) by Dietary Administration to Male Rats for 91 Weeks

KIYOSUMI NAKAMURA\*, TORAO IKEDA\*, SHIGETAKA IGUCHI\*  
and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, 慢性毒性 chronic toxicity, ラット rats, 食品添加物 food additive, 防ばい剤 fungicide, 腎 kidney, 膀胱 urinary bladder

ビフェニール (biphenyl: 以下BPと略す) ならびにオルトフェニルフェノール (*o*-phenylphenol: OPPと略す) およびそのナトリウム塩 (sodium *o*-phenylphenate: OPP-Naと略す) は、果実や野菜の防ばい剤として欧米で広く用いられてきた。わが国では、1970年代に入ってから食品添加物として指定され、柑きつ類への使用が許可された。

当毒性部では、以前より防ばい剤の安全性についての点検作業を進めており、OPP-Naについては既に、催奇形性試験、変異原性試験、急性・亜急性毒性試験などが行われてきた<sup>1-9)</sup>。とくに癌原性試験では、ラットに膀胱腫瘍が認められた<sup>10)</sup>。OPP については、急性および亜急性毒性試験が実施され報告されている<sup>9, 11)</sup>。その一環として、OPP についての91週間にわたる毒性試験を実施したので報告する。

#### 実験材料ならびに方法

**検体:** OPP は、Dow Chemical Co. 製の DOWICIDE 1 (Lot No. MM01040, 純度98%以上) を使用、日本クレア製 C E-2 粉末飼料<sup>12)</sup> に、OPP をそれぞれ、0% (Control), 0.625%, 1.250% および 2.500% の割合で添加してペレット化し<sup>13)</sup>、実験飼料とした。

**実験動物:** 日本チャールス・リバー飼生育の近交系 Fischer ラット (F344/DuCrj) 雄を4週齢で購入、10日間の予備飼育後発育良好と認めたものを使用した。

**飼育条件:** barrier system 飼育室において、ステンレス製ケージにラットを個別に収容し<sup>14)</sup>、実験開始までは、検体無添加の C E-2 固型飼料および水を自由に与え飼育した。

**実験方法:** 4つの実験飼料投与群は、1群雄20匹を

用い、各群ランダムに飼育架台に配置し、5週齢より、0%, 0.625%, 1.250% および 2.500% の OPP を含む実験飼料を水とともに自由摂取させた。動物の一般状態は毎日午前9~10時に観察し、体重は毎実験週に、飼料摂取量および飲水量は所定の実験週のそれぞれ初めに測定した。実験91週を経過したところで、生存する62匹を屠殺し、血液学検査、血清生化学検査および主要器官重量の測定を行った。

**検査方法:** 飼料摂取量は、飼料投与量、48時間後の飼料残余量およびケージ受皿への飼料コボシ量を測定し、 $(投与量 - 残余量 - コボシ量) \div 2$  により、1日摂取量を求めた。飲水量は、給水ビンを個別に配置して、 $(投与量 - 48時間後の残量) \div 2$  により、1日飲水量を求めた。

血液学、血清生化学検査にあたっては、ラットを背位に固定、そけい部を切開後、大腿動静脈を切断し、放出される血液を EDTA-2K 処理試験管 (血液学検査用) および無処理遠心管 (血清生化学検査用) に採取し、放血致死せしめた。

**血液学検査:** EDTA-2K 処理血液を用い、Coulter Counter Model-S により、白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (Hgb)、ヘマトクリット値 (Hct)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH) および平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) の各項目について測定した。

**血清生化学検査:** HITACHI Automatic Analyzer M-400を用いて、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ活性 (GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性 (GPT)、アルカリフォスファターゼ活性 (Alp)、グルコース量 (Glu)、コレステロール量

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

(Chl), 尿素窒素量 (BUN), [総蛋白量 (TP) およびアルブミン量 (Alb)] を測定した。なお, TP 値および Alb 値よりグロブリン量を求めて, A/G を算出した。

**器官重量:** 脳, 心, 肺, 肝, 脾, 腎, 副腎, 精巣, 前立腺および膀胱を摘出し秤量した。

**尿検査:** 実験30週および90週に, ラット腰部を軽く刺激して滅菌シャーレ上に排尿させ直ちに, マイルス・三共特製の尿試験紙 (Labstix®-II) により, pH, 蛋白量, グルコース量, ケトン体および潜血反応を測定した。また肉眼的にシャーレ上の尿結石を観察した。以上の検査は, 一部を除いてすべて, Student's *t*-test により危険率を5%において推計学的検討を行った。

(解剖・病理組織学所見については別に報告する。)

### 実験結果

**一般状態:** 各実験週における各投与群の生存ラット数は, Table 1 および Table 5 に示した。途中死亡は, 投与後1年以内では, 0.625%群の1例で, 1年以降では, 2.5%群で血尿所見を伴って69週より83週までに, 1.25%群で血尿所見および膀胱腫瘍を伴って81週以降に, それぞれ集中して死亡した。その他の死亡時所見としては, 下垂体血腫 (0.625%群, 76週) や脾出血 (1.25%群, 65週) などであった。91週生存率は, Control 群, 0.625%群, 1.25%群および2.5%群でそれぞれ, 95%, 90%, 65%, 60%であった。

尿潜血反応陽性例が, 1.25%群および2.5%群に15週すぎから出現し, 例数も徐々に増加していったが, ラットを個別にみると, 潜血反応陽性・陰性を繰返して一定しなかった。そのほかには, 91週間生存ラットにおいても, 表在性腫瘍, 眼球白濁あるいは脱毛などがそれぞれ数匹にみられたが, Control 群あるいは OPP 投与群間に差は認められなかった。

**体重・飼料摂取量・OPP 摂取量・飲水量:** Table 1 に体重および体重増加率を, Table 2 に飼料摂取量を, Table 3 に OPP 摂取量を, Table 4 に飲水量を示した。体重は, 絶対重量および体重増加率ともに, 2.5%群で全期間, 1.25%群で17週以降のすべての期間にわたって, Control 群に比較して有意に低く, 0.625%群でも低下の傾向がみられた。体重増加率のピークは, Control 群では73週, 0.625%群では72週, 1.25%群では69週および2.5%群では71週であった。ピーク時の Control 群に対する体重増加率の比率はそれぞれ, 96%, 90%および77%であった。OPP 投与群では絶対体重と体重増加率がともに低く, 用量-反応関係が認められた。

飼料摂取量については, その絶対量が2.5%群におい

て全期間を通して有意に少なかった。一方, 体重当り飼料摂取量は, 体重増加抑制により, 2.5%群, 1.25%群, 0.625%群の順で Control 群と比較して増加する傾向がみられた。飼料摂取量より算出した体重当り OPP 摂取量は, Table 3 の ( ) 中に示す通り, 各測定週における0.625%群, 1.25%群および2.5%群の比は, 約1:2:4.2 となって, 添加飼料中の OPP 濃度にはほぼ比例していた。また, 全実験期間の OPP 総摂取量を概算するとそれぞれ, 56.3g, 107.5g, 199.1g となり, 体重当り一日平均摂取量を求めるとそれぞれ, 269mg/kg, 531mg/kg, 1140mg/kg であった。

飲水量については, 体重当り飲水量が1.25%群および2.5%群で顕著に増加し, 各投与群間に用量-反応関係が認められた。また経時的にみると, 体重当り飲水量は Control 群, 0.625%群および1.25%群では53週まではほぼ一貫して減少するのに反して, 2.5%群では5~7週で最も少量で, その後は28週まで単調に増加していた。73~77週以降になると, 全群とも増加する傾向がみられた。

**器官重量:** 測定結果を Table 5 に示す。絶対重量については, 2.5%群の左右腎で有意に増加していたが, 0.625%群および1.25%群は Control 群と差は認められなかった。また, 精巣にも同様の傾向がみられた。ホルマリン固定後の膀胱重量に, 1.25%群, 2.5%群の順で有意の増加が認められたが, 0.625%群では Control 群と差はなかった。他の器官の絶対重量には, OPP 投与群で増加したものはなく, 減少した器官でも, 体重増加(成長)の抑制によるものと考えられる。体重に対する相対重量については, 2.5%群および1.25%群の大部分の器官で増加していたが, これは体重増加抑制によるものと考えられる。一方, 脾臓の相対重量が, 0.625%群および1.25%群で有意に低下していた。

**血液学検査:** 結果を Table 6 に示す。2.5%群において WBC の有意の増加がみられたが, その他の検査項目には, Control 群との間に差は認められなかった。

**血清生化学検査:** 結果を Table 7 に示す。GOT, GPT および Alp が0.625%群において有意に上昇していた。また, BUN が1.25%群および2.5%群で有意に上昇し, Chl については逆に2つの群で有意に低下し, 両項目において用量-反応関係が認められた。TP および Alb については各群間に差はなかったが, A/G については, OPP 投与群で Control 群に比して上昇傾向がみられた。

**尿検査:** 90週における尿中蛋白量および pH 測定の結果を Table 8 に, 30週および90週における潜血反応検査

および結石所見を Table 9 にそれぞれ示す。蛋白量は、Control 群では排尿した 17 匹中 16 例が 1000mg 以上であったのに対して、OPP 投与群では有意に低下していた。pH は、Control 群および OPP 投与群ともに大部分が 6.0 付近に集中していた。潜血反応については、30週での測定で、Control 群および 0.625% 群では全例陰性であったのに反して、1.25% 群では 10 匹中 4 例に、2.5% 群では 6 匹中 5 例に (++) 以上の陽性反応をみた。また 90 週での測定で、前 2 群では同様に全例陰性であったが、後 2 群ではそれぞれ、11 匹中 7 例、8 匹中 2 例に (++) 以上の陽性反応をみた。30 週と 90 週との陽性率を比較すると、30 週では 2.5% 群が高く、90 週では逆に 1.25% 群の方が高かった。潜血反応を経過を追って観察していくと、1.25% 群および 2.5% 群の陰性例も数回に一回は陽性となる例が多く、そういった観察日による変動を考慮すると、この 2 群では、全くの陰性例は数% 以下とみなしてよい。尿中結石は、30 週より 1.25% 群および 2.5% 群で認められた。結石の大きさは、直径 0.1mm 以下のものから大きい例では 2mm 以上のものまであり、週を追って徐々に大型化する傾向がみられた。一回の排尿 (0.1ml~1.0ml) では、それらが数個から 100 個程度数えられた。色調は概して、2.5% 群では 30 週より赤褐色を呈し、潜血反応陰性例では乳白色のものも見うけられた。尿中グルコースは、全期間の検査を通して陽性例はなく、ケトン体は 90 週で Control 群に 1 例のみ (++) 所見がみられた。

### 考 察

日本における OPP 残留許容量、人体一日摂取許容量はそれぞれ、10ppm 以下、0.2mg/kg/day である<sup>14)</sup>。今回の雄ラットを用いた試験では、91 週間を平均した一日摂取量で、この摂取許容量の 1350~5700 倍の OPP を摂取したことになる。

高濃度投与のため、2.5% 群および 1.25% 群では成長抑制が明らかに認められたが、投与開始後 1 年間の生存率は 98% 以上であった。これは、Hodge らの OPP 2 年間投与試験での初めの 1 年間の生存率、すなわち Control 群、0.02% 群、0.2% 群および 2% 群でそれぞれ、78%、92%、64%、68%<sup>15)</sup> と比較すると、今回の試験での飼育条件はかなり良好であったと思われる。

血清生化学所見において、GOT、GPT および Alp が 0.625% 群でのみ上昇していたのに反して肝重量には、OPP 13 週間投与試験<sup>11)</sup>と同様に今回の試験でも全群間に変化はなかった。Hodge らは、3 ケ月投与では数例に肝重量増加を認めたが、2 年間投与では Control 群と

差がなかった<sup>15)</sup>と報告し、井口らは、OPP-Na 3 ケ月投与試験において肝重量が増加し、4% (OPP 換算では 2.5%) 群では GOT および GPT が低下した<sup>7)</sup>と報告している。また、長井らは、OPP-Na 4 ケ月投与後のラットで、肝中の Alp 活性には変化を認めなかったものの、腎中の Alp 活性低下を認め、尿細管細胞が障害された疑いがある<sup>12)</sup>と報告している。血中コレステロールの低下と考え合せ、肝障害の有無についてはさらに検討する。

BP および OPP の腎毒性については、かなり以前から指摘<sup>15-17)</sup>されており、BP による多尿、血尿および腎組織の可逆的な変化<sup>16)</sup>、あるいは腎重量の増加<sup>7,15)</sup>が報告されている。OPP 13 週間投与試験では、腎重量の増加はなく、BUN も Control 群と差はなかった<sup>11)</sup>が、今回の 91 週間投与試験では、2.5% 群で腎重量および BUN の増加がみられた。

膀胱重量について、2.5% 群よりも 1.25% 群でさらに大きく増加していたが、これは 13 週間投与試験<sup>11)</sup>と同じ結果となった。このことは、今回の試験の 1.25% 群の途中死亡例に、剖検時の肉眼所見で膀胱腫瘍が高頻度に発見された事実からも、濃度段階の逆転の裏付けができた。尿結石が多数発見されたことと膀胱腫瘍との因果関係の検索は今後の重要な課題である。

脾臓の相対重量が、1.25% 群および 0.625% 群で有意に低下していたことについては、これまでに報告例はない。1.25% 群の途中死亡例中の一匹で脾臓より腹腔内への出血がみられたが、これとの関連も不明である。

今回の実験では、RBC や Hgb などの低下は認められず、OPP-Na および OPP の 13 週間投与試験の結果<sup>7,11)</sup>とも一致しなかった。1.25% 群および 2.5% 群では潜血反応が 30 週以前より観察され、肉眼的血尿も散見されたが、貧血に至るまでは至らなかったと考えられる。

### 要 約

オルトフェニルフェノール (OPP) を、0% (Control)、0.625%、1.25% および 2.5% 添加した飼料を与えて、Fischer 系雄ラット (各群 20 匹) を 91 週間にわたって飼育した。実験終了時の生存率はそれぞれ、95%、90%、65%、60% であった。この間のラット体重 (kg) 当りの OPP 一日平均摂取量は、0.625% 群、1.25% 群および 2.5% 群でそれぞれ、269mg、531mg、1140mg であった。1.25% 群および 2.5% 群では体重増加が抑制され、体重のピーク時期での体重増加率は Control 群のそれを 100% としてそれぞれ、90%、77% であった。1.25% 群および 2.5% 群では、尿潜血反応陽性例が 15 週すぎより



出現し、30週では尿中に結石が認められた。

主要器官重量については、2.5%群の腎および精巣に絶対重量の増加がみられ、ホルマリン固定後の膀胱重量でも、1.25%群、2.5%群の順で著明な増加が認められた。

#### 文 献

- 1) 小嶋昭江, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 83, 1978
- 2) 吉田誠二, 益淵正典, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 86, 1978
- 3) 小縣昭夫, 安藤 弘, 久保喜一, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 89, 1978
- 4) 小縣昭夫, 吉田誠一, 縄井寿美子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 99, 1978
- 5) 佐々木美枝子, 縄井寿美子, 中尾順子: 東京衛研年報, 29-2, 104, 1978
- 6) 佐々木美枝子, 中尾順子: 東京衛研年報, 29-2, 109, 1978
- 7) 井口重孝, 田山邦昭, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 67, 1979
- 8) 田山邦昭, 井口重孝, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 57, 1979
- 9) 田山邦昭, 井口重孝, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 1, 1980
- 10) Hiraga, K. and Fujii, T.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 303, 1981
- 11) 中村清純, 井口重孝, 池田虎雄, 平賀興吾: 東京衛研年報, 32-2, 33, 1981
- 12) 長井二三子, 中尾順子: 東京衛研年報, 32-2, 57, 1981
- 13) 樺島順一郎, 中尾順子: 東京衛研年報, 32-2, 61, 1981
- 14) 石館守三監修: 食品添加物公定書解説書, B-158, 1979, 広川書店
- 15) Hodge, H. C., Maynard, E. A., Blanchet, H. J., Jr., Spencer, H. C. and Rowe, V. K.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 104, 202, 1952
- 16) Booth, A. N., Ambrose, A. M., DeEds, F. and Cox, A. J., Jr.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 3, 560, 1961
- 17) Ambrose, A. M., Booth, A. N., DeEds, F. and Cox, A. J., Jr.: *Food Res.*, 25, 328, 1960
- 18) 神谷信行, 平賀興吾: 東京衛研年報, 33, 561, 1982

Table 1. Body Weights of F344 Male Rats Fed OPP for 91 Weeks

| Weeks | 0% (Control)                           | 0.625%                                        | 1.250%                           | 2.500%                           |
|-------|----------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 0     | 101.3±4.3 <sup>1)</sup><br>(100 )      | 101.2±4.5<br>(100 )                           | 102.9±5.0<br>(100 )              | 101.4±5.6<br>(100 )              |
| 1     | 124.4±7.5<br>(122.4±4.6) <sup>2)</sup> | 122.5±5.6<br>(120.6±2.5)                      | 121.6±6.6<br>(117.7±3.3)*        | 100.3±7.0*<br>(98.6±4.0)*        |
| 2     | 145.7±12.1<br>(143.4±8.2)              | 141.9±8.9<br>(139.8±6.8)                      | 139.9±10.4<br>(135.5±7.3)*       | 117.2±11.3*<br>(115.0±7.1)*      |
| 3     | 162.9±18.7<br>(160.2±14.8)             | 157.8±13.4<br>(155.6±11.5)                    | 153.8±14.4<br>(148.9±11.2)*      | 131.9±14.6*<br>(129.4±10.3)*     |
| 5     | 191.2±26.0<br>(188.0±21.8)             | 182.7±22.2<br>(180.1±20.1)                    | 175.6±23.3<br>(170.0±20.1)*      | 153.4±24.5*<br>(150.6±21.0)*     |
| 7     | 215.4±29.9<br>(212.0±25.2)             | 204.9±27.1<br>(202.1±24.8)                    | 196.8±32.2<br>(190.5±28.9)*      | 172.1±31.3*<br>(169.1±29.4)*     |
| 9     | 236.5±30.4<br>(232.7±25.8)             | 224.4±29.2<br>(221.1±26.2)                    | 215.9±37.0<br>(209.0±33.9)*      | 192.1±30.3*<br>(189.2±29.2)*     |
| 13    | 274.9±26.8<br>(270.9±23.0)             | 264.5±22.5<br>(261.0±19.6)                    | 257.7±34.3<br>(249.9±31.2)*      | 228.0±21.9*<br>(224.6±21.0)*     |
| 17    | 301.3±28.2<br>(297.2±25.1)             | 292.5±18.0<br>(288.8±14.3)                    | 286.0±28.5<br>(277.6±26.5)*      | 248.8±17.4*<br>(245.3±18.1)*     |
| 21    | 320.9±29.7<br>(316.5±27.6)             | 312.1±18.3<br>(308.3±16.3)                    | 301.4±27.3*<br>(292.6±25.5)*     | 261.9±16.6*<br>(258.3±19.0)*     |
| 25    | 335.0±31.1<br>(330.5±29.8)             | 324.5±19.2<br>(320.8±18.3)                    | 313.6±27.5*<br>(304.4±26.3)*     | 271.8±17.1*<br>(268.1±20.9)*     |
| 28    | 344.1±32.4<br>(339.5±31.4)             | 334.0±21.3<br>(330.0±20.1)                    | 320.6±28.4*<br>(311.3±28.2)*     | 278.0±18.5*<br>(274.3±21.8)*     |
| 33    | 357.6±33.6<br>(352.9±33.2)             | 344.1±28.3<br>(340.0±27.1)                    | 329.6±29.5*<br>(320.1±30.0)*     | 289.8±21.1*<br>(286.0±24.6)*     |
| 37    | 363.9±36.5<br>(359.1±35.6)             | 356.4±22.1 (19) <sup>a)</sup><br>(352.1±20.6) | 335.3±30.2*<br>(325.8±30.7)*     | 293.7±20.8*<br>(289.8±23.4)*     |
| 41    | 374.3±36.2<br>(369.4±36.2)             | 364.0±24.1 (19)<br>(359.6±21.3)               | 343.3±33.1*<br>(333.4±32.9)*     | 300.8±22.0*<br>(296.8±24.9)*     |
| 49    | 384.6±40.5<br>(379.6±41.3)             | 377.6±25.8 (19)<br>(373.1±23.7)               | 356.8±34.7*<br>(346.6±34.4)*     | 310.1±25.3*<br>(306.1±28.6)*     |
| 53    | 393.7±41.2<br>(388.8±42.6)             | 382.3±26.8 (19)<br>(377.8±25.5)               | 364.2±34.9*<br>(353.8±34.0)*     | 316.1±25.6*(19)<br>(311.7±28.3)* |
| 57    | 402.3±42.7<br>(397.2±43.6)             | 391.1±28.0 (19)<br>(386.4±26.5)               | 370.4±35.7*<br>(359.7±35.0)*     | 321.3±25.9*(19)<br>(316.7±28.5)* |
| 61    | 404.4±44.1<br>(399.4±45.0)             | 396.8±29.2 (19)<br>(392.1±28.4)               | 376.7±37.1*<br>(365.9±36.2)*     | 323.3±28.9*(19)<br>(318.6±30.4)* |
| 65    | 411.6±44.4<br>(406.3±45.3)             | 402.6±27.8 (19)<br>(397.9±26.8)               | 381.2±39.4*<br>(370.2±38.2)*     | 328.2±26.8*(19)<br>(323.6±29.0)* |
| 69    | 419.1±43.3<br>(414.0±45.7)             | 406.5±26.7 (19)<br>(401.8±24.8)               | 389.1±37.8*(19)<br>(377.6±36.8)* | 327.1±26.5*(19)<br>(322.4±28.7)* |
| 73    | 423.9±41.8<br>(418.7±44.0)             | 408.1±26.8 (19)<br>(403.2±24.7)               | 387.5±38.0*(19)<br>(376.2±37.7)* | 327.2±29.0*(16)<br>(322.8±32.2)* |
| 77    | 421.6±40.0<br>(416.4±42.5)             | 405.2±26.8 (18)<br>(399.3±23.8)               | 383.4±37.2*(19)<br>(372.3±36.7)* | 322.2±25.3*(15)<br>(319.2±27.3)* |
| 85    | 418.3±39.9<br>(413.3±42.4)             | 410.9±26.8 (18)<br>(404.8±22.8)               | 366.3±51.4*(16)<br>(356.7±57.0)* | 328.7±22.7*(12)<br>(327.8±24.1)* |
| 89    | 412.4±48.4<br>(407.1±49.2)             | 410.8±25.3 (18)<br>(404.7±21.6)               | 375.1±46.3*(14)<br>(367.7±47.3)* | 330.8±19.2*(12)<br>(329.8±20.7)* |

1) Mean±S.D. (g) 2) Mean of Growth Rates (B.W. ×100/B.W. at Start of Feeding)±S.D.

a) No. of Survived Rats

\* P&lt;0.05

Table 2. Food Consumption of F344 Male Rats Fed OPP in Pellet Diet for 91 Weeks

| Weeks | 0% (Control)                                       | 0.625%                        | 1.250%                       | 2.500%                                        |
|-------|----------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1     | 12.1±1.4 <sup>1)</sup><br>(97.4±9.1) <sup>2)</sup> | 12.1±1.0<br>(98.3±5.8)        | 12.6±1.3<br>(103.3±7.5)*     | 10.4±2.1 *(16) <sup>a)</sup><br>(102.4±20.0)* |
| 2     | 11.5±1.7<br>(78.8±7.6)                             | 10.8±1.4<br>(76.1±6.0)        | 11.0±1.4<br>(78.7±6.3)       | 9.1±1.7 *<br>(77.0±11.0)*                     |
| 3     | 12.1±1.6<br>(74.1±5.7)                             | 11.1±1.6<br>(70.0±5.3)*       | 10.9±1.8 *<br>(70.7±8.2)     | 9.4±1.9 *<br>(70.6±8.8)                       |
| 5     | 11.4±1.9<br>(59.4±5.3)                             | 10.9±1.9<br>(59.5±5.3)        | 10.3±2.3<br>(58.0±6.6)       | 8.8±2.4 *<br>(56.5±7.2)                       |
| 7     | 11.4±2.1<br>(52.5±4.2)                             | 10.7±2.1<br>(52.1±4.5)        | 10.1±2.6<br>(50.9±6.7)       | 9.0±2.5 *<br>(51.8±5.6)                       |
| 9     | 12.6±1.8<br>(53.1±2.2)                             | 11.8±1.9<br>(52.4±3.6)        | 11.4±2.5<br>(52.4±5.3)       | 10.5±2.6 *<br>(54.0±7.7)                      |
| 13    | 13.6±1.0<br>(49.5±2.9)                             | 13.2±0.8<br>(49.8±2.4)        | 12.8±1.8<br>(49.6±3.7)       | 11.7±1.2 *<br>(51.2±3.5)                      |
| 17    | 13.8±1.0<br>(46.0±2.6)                             | 13.5±1.0<br>(46.0±2.0)        | 13.7±0.9<br>(48.0±3.7)       | 12.3±1.1 *<br>(50.0±3.9)*                     |
| 21    | 13.0±1.1<br>(40.8±3.3)                             | 13.2±1.0<br>(42.3±1.8)        | 13.0±1.1<br>(43.2±2.5)*      | 11.9±1.0 *<br>(45.5±3.3)*                     |
| 25    | 13.1±1.0<br>(39.3±3.1)                             | 13.2±1.3<br>(40.6±3.1)        | 13.2±1.2<br>(42.2±1.9)*      | 11.9±1.2 *(18)<br>(43.5±3.2)*                 |
| 28    | 13.9±0.9<br>(40.7±3.0)                             | 13.9±1.0<br>(41.6±1.7)        | 13.1±1.0<br>(41.2±4.0)       | 13.0±0.9 *(18)<br>(46.7±3.6)*                 |
| 33    | 14.9±1.1 (19)<br>(41.5±3.6)                        | 14.8±1.9<br>(42.8±3.8)        | 15.1±1.1 (19)<br>(45.5±2.4)* | 14.3±1.2 (18)<br>(49.4±4.5)*                  |
| 37    | 13.5±1.0<br>(37.3±2.8)                             | 14.2±1.0 *(19)<br>(39.9±2.2)* | 13.2±0.9<br>(39.5±2.1)*      | 12.7±1.0 *(18)<br>(43.3±3.2)*                 |
| 41    | 14.2±1.1<br>(37.9±2.3)                             | 14.4±1.2 (19)<br>(39.6±1.9)*  | 13.2±1.2 *<br>(38.6±1.9)     | 12.5±0.9 *(18)<br>(41.6±3.2)*                 |
| 49    | 14.1±1.2<br>(36.9±2.9)                             | 14.4±1.3 (19)<br>(38.1±2.3)   | 13.8±1.1<br>(38.8±2.3)*      | 12.4±0.8 *(17)<br>(39.9±2.6)*                 |
| 53    | 13.5±1.4<br>(34.3±2.8)                             | 14.1±1.2 (19)<br>(36.9±1.7)*  | 13.4±0.9<br>(36.9±1.9)*      | 12.3±1.0 *(13)<br>(38.1±3.6)*                 |
| 57    | 14.4±1.4<br>(35.8±3.2)                             | 14.6±1.3 (19)<br>(37.4±2.4)   | 14.0±1.1<br>(37.8±2.4)*      | 12.7±0.8 *(15)<br>(39.3±2.8)*                 |
| 61    | 13.9±1.4<br>(34.3±2.4)                             | 14.0±1.3 (19)<br>(35.2±1.9)   | 14.1±1.3<br>(37.6±2.2)*      | 12.5±1.2 *(15)<br>(37.9±4.2)*                 |
| 65    | 14.4±1.5<br>(35.0±3.2)                             | 14.3±1.4 (19)<br>(35.5±2.8)   | 14.3±1.2 (19)<br>(37.3±2.3)* | 12.7±1.1 *(16)<br>(38.1±3.8)*                 |
| 69    | 14.2±0.9 (19)<br>(33.9±2.6)                        | 14.1±1.0 (19)<br>(34.6±1.9)   | 13.5±1.0 *(19)<br>(34.8±3.3) | 12.6±1.2 *(11)<br>(37.7±4.6)*                 |
| 73    | 13.8±1.1<br>(32.7±2.4)                             | 14.0±1.4 (16)<br>(34.0±2.2)   | 13.2±1.3 (19)<br>(34.2±2.7)  | 12.1±1.5 *(6)<br>(35.5±3.2)*                  |
| 77    | 14.3±1.0<br>(34.1±3.2)                             | 14.9±1.1 (18)<br>(36.6±1.8)*  | 14.0±1.0 (19)<br>(36.6±2.4)* | 12.9±1.0 *(10)<br>(38.7±3.5)*                 |
| 85    | 14.5±1.3<br>(34.2±2.1)                             | 14.6±1.2 (18)<br>(35.5±2.2)   | 13.1±1.0 *(13)<br>(34.1±3.1) | 12.6±1.6 *(7)<br>(37.1±4.4)*                  |
| 89    | 15.5±1.4 (18)<br>(36.6±2.7)                        | 16.1±1.2 (18)<br>(39.2±2.6)*  | 14.4±0.8 *(12)<br>(37.3±2.9) | 14.0±2.7 (5)<br>(42.0±6.7)*                   |

1) Mean (Absolute)±S.D. (g/rat/day) 2) Mean (Relative)±S.D. (g/kg/day)

a) No. of Rats

\* P&lt;0.05

Table 3. Intake of OPP in F344 Male Rats for 91 Weeks

| Weeks | 0.625%                                               | 1.250%                         | 2.500%                                        |
|-------|------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1     | 75.3 ± 5.9 <sup>1)</sup><br>(586 ± 36) <sup>2)</sup> | 157.3 ± 15.7<br>(1291 ± 94)    | 259.2 ± 53.4(16)<br>(2560 ± 500)              |
| 2     | 67.7 ± 8.6<br>(476 ± 37)                             | 138.1 ± 18.0<br>(984 ± 78)     | 226.5 ± 42.2<br>(1925 ± 274)                  |
| 3     | 69.3 ± 9.9<br>(437 ± 33)                             | 136.3 ± 22.2<br>(884 ± 103)    | 234.4 ± 47.2<br>(1764 ± 221)                  |
| 5     | 68.3 ± 12.1<br>(372 ± 33)                            | 128.6 ± 28.2<br>(725 ± 82)     | 220.0 ± 59.9<br>(1412 ± 179)                  |
| 7     | 67.2 ± 12.9<br>(326 ± 28)                            | 126.9 ± 32.2<br>(636 ± 84)     | 226.2 ± 61.7<br>(1295 ± 140)                  |
| 9     | 73.7 ± 11.6<br>(328 ± 22)                            | 142.7 ± 31.8<br>(655 ± 66)     | 262.7 ± 64.8<br>(1351 ± 189)                  |
| 13    | 82.2 ± 5.3<br>(311 ± 15)                             | 159.8 ± 22.2<br>(620 ± 46)     | 291.7 ± 28.9<br>(1281 ± 87)                   |
| 17    | 84.1 ± 6.2<br>(287 ± 13)                             | 171.0 ± 11.9<br>(600 ± 47)     | 307.0 ± 27.4(17) <sup>a)</sup><br>(1250 ± 96) |
| 21    | 82.6 ± 6.3<br>(264 ± 11)                             | 162.5 ± 14.0<br>(540 ± 31)     | 296.9 ± 26.1(18)<br>(1136 ± 82)               |
| 25    | 82.4 ± 8.4<br>(253 ± 19)                             | 165.5 ± 14.9<br>(528 ± 23)     | 296.2 ± 29.5(18)<br>(1088 ± 80)               |
| 28    | 87.0 ± 6.5<br>(260 ± 11)                             | 164.2 ± 12.6<br>(515 ± 50)     | 325.1 ± 21.9(17)<br>(1167 ± 90)               |
| 33    | 92.2 ± 11.6<br>(267 ± 24)                            | 188.3 ± 14.3(19)<br>(568 ± 30) | 358.3 ± 30.5(18)<br>(1236 ± 113)              |
| 37    | 88.9 ± 6.5(19)<br>(249 ± 14)                         | 165.1 ± 11.7<br>(493 ± 26)     | 318.8 ± 25.5(18)<br>(1082 ± 79)               |
| 41    | 90.1 ± 7.3(19)<br>(247 ± 12)                         | 165.5 ± 15.6<br>(482 ± 24)     | 312.8 ± 21.3(18)<br>(1041 ± 81)               |
| 49    | 89.9 ± 8.1(19)<br>(238 ± 15)                         | 172.6 ± 13.5<br>(485 ± 28)     | 311.0 ± 19.4(17)<br>(997 ± 65)                |
| 53    | 88.2 ± 7.6(19)<br>(230 ± 11)                         | 167.7 ± 11.0<br>(462 ± 24)     | 307.7 ± 24.5(13)<br>(952 ± 92)                |
| 57    | 91.5 ± 7.8(19)<br>(234 ± 15)                         | 174.7 ± 13.2<br>(473 ± 30)     | 317.7 ± 20.2(15)<br>(982 ± 69)                |
| 61    | 87.5 ± 8.2(19)<br>(220 ± 12)                         | 176.8 ± 15.7<br>(470 ± 28)     | 311.6 ± 30.7(15)<br>(948 ± 106)               |
| 65    | 89.3 ± 8.4(19)<br>(222 ± 17)                         | 179.0 ± 14.4(19)<br>(467 ± 29) | 317.0 ± 27.5(16)<br>(954 ± 95)                |
| 69    | 87.9 ± 6.1(19)<br>(216 ± 12)                         | 168.2 ± 11.9(19)<br>(435 ± 42) | 315.9 ± 30.4(11)<br>(942 ± 114)               |
| 73    | 87.3 ± 8.5(16)<br>(213 ± 14)                         | 165.3 ± 16.6(19)<br>(427 ± 34) | 302.1 ± 61.4( 6)<br>(889 ± 79)                |
| 77    | 92.8 ± 6.6(18)<br>(229 ± 27)                         | 174.8 ± 12.6(19)<br>(457 ± 30) | 323.8 ± 25.2(10)<br>(969 ± 88)                |
| 85    | 91.2 ± 7.4(18)<br>(222 ± 14)                         | 163.2 ± 12.7(13)<br>(426 ± 39) | 314.6 ± 48.4( 7)<br>(929 ± 109)               |
| 89    | 100.7 ± 7.4(18)<br>(245 ± 16)                        | 180.1 ± 9.6(12)<br>(466 ± 36)  | 349.5 ± 15.5( 5)<br>(1051 ± 166)              |
|       | 56.3 <sup>3)</sup>                                   | 107.5                          | 199.1                                         |
|       | 269 <sup>4)</sup>                                    | 531                            | 1140                                          |

1) Mean of Chemical Intake ± S.D. (mg/rat/day) 2) Mean (Relative) ± S.D. (mg/kg/day)

3) Total Dose Intake (g) 4) Relative Intake (mg/kg/day)

a) No. of Rats

Table 4. Water Consumption of F344 Male Rats Fed OPP for 91 Weeks

| Weeks | 0% (Control)                                         | 0.625%                       | 1.250%                        | 2.500%                         |
|-------|------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 1     | 15.9±2.3 <sup>1)</sup><br>(127.8±15.3) <sup>2)</sup> | 16.6±1.6<br>(135.2±10.5)     | 17.9±1.9*<br>(147.1±14.0)*    | 15.7±2.4<br>(156.5±22.4)*      |
| 2     | 16.0±1.9<br>(109.2±8.5)                              | 16.0±1.9<br>(112.5±10.5)     | 16.5±2.1<br>(118.1±11.0)*     | 14.1±2.1*<br>(120.9±16.8)*     |
| 3     | 15.8±2.2<br>(97.2±6.9)                               | 16.3±2.6<br>(102.6±10.3)     | 16.1±2.7<br>(104.1±13.3)*     | 14.1±2.8*<br>(106.6±14.5)*     |
| 5     | 15.8±2.6<br>(82.5±6.1)                               | 16.2±2.9<br>(88.3±7.2)*      | 16.2±3.5<br>(91.5±9.0)*       | 14.9±4.4*<br>(95.6±15.4)*      |
| 7     | 17.0±3.8<br>(78.2±8.8)                               | 16.0±2.9<br>(77.9±6.6)       | 16.5±4.6<br>(82.4±12.0)       | 16.6±5.1<br>(95.4±14.9)*       |
| 9     | 17.5±2.9 (19) <sup>a)</sup><br>(73.4±6.8)            | 16.7±2.8<br>(74.2±5.8)       | 17.2±4.2<br>(79.0±7.8)*       | 20.2±6.1*<br>(103.9±21.7)*     |
| 13    | 18.7±2.3<br>(68.1±5.7)                               | 18.3±1.7<br>(69.5±5.4)       | 19.3±3.4<br>(74.6±6.9)*       | 26.0±4.8*<br>(114.2±19.0)*     |
| 17    | 18.7±2.1<br>(62.4±7.0)                               | 18.9±1.9<br>(64.3±4.1)       | 20.8±2.1*<br>(72.8±5.0)*      | 31.3±5.6*<br>(125.8±20.1)*     |
| 21    | 19.3±2.1<br>(60.3±6.2)                               | 19.9±1.9<br>(63.7±4.5)       | 21.6±2.4*<br>(71.7±5.9)*      | 35.5±5.3*<br>(135.3±17.9)*     |
| 25    | 19.4±2.8<br>(57.9±5.6)                               | 19.7±1.5<br>(60.7±3.8)       | 21.7±2.4*<br>(69.3±6.3)*      | 37.0±4.3*<br>(136.1±14.1)*     |
| 28    | 20.1±2.2<br>(58.4±4.5)                               | 20.3±1.9<br>(60.7±3.4)       | 23.6±2.6*<br>(73.6±6.4)*      | 40.0±3.9*<br>(143.9±12.4)*     |
| 33    | 21.2±1.9 (19)<br>(59.2±4.5)                          | 21.2±2.2<br>(61.5±4.6)       | 25.4±3.2*<br>(77.2±9.0)*      | 39.5±3.7*<br>(136.5±12.5)*     |
| 37    | 19.3±1.7<br>(53.1±4.2)                               | 20.0±2.3 (19)<br>(56.0±4.6)  | 24.2±3.5*<br>(72.1±8.4)*      | 37.0±2.9*<br>(126.3±11.4)*     |
| 41    | 19.4±2.0<br>(51.8±3.5)                               | 20.4±2.1 (19)<br>(56.1±3.6)* | 24.1±3.4*<br>(70.4±8.3)*      | 37.3±2.6*<br>(124.6±12.2)*     |
| 49    | 19.7±2.2<br>(51.5±5.5)                               | 20.0±2.3 (19)<br>(52.8±4.3)  | 25.2±3.7*<br>(71.0±10.1)*     | 37.3±2.7*<br>(121.0±12.6)*     |
| 53    | 19.5±2.6<br>(49.6±5.9)                               | 19.5±2.2 (19)<br>(50.9±3.3)  | 25.2±3.3*<br>(69.5±8.4)*      | 37.9±2.6*(19)<br>(120.6±12.2)* |
| 57    | 19.9±3.1<br>(49.5±6.5)                               | 20.4±2.2 (19)<br>(52.2±3.8)  | 26.2±4.3*<br>(70.9±11.1)*     | 38.7±2.9*(19)<br>(121.1±13.9)* |
| 61    | 19.8±2.4 (19)<br>(49.3±5.9)                          | 20.7±2.3 (18)<br>(52.4±3.7)  | 27.0±4.8*<br>(71.8±11.9)*     | 39.8±3.8*(18)<br>(123.6±14.1)* |
| 65    | 20.6±2.0 (19)<br>(50.5±4.9)                          | 21.4±2.4 (17)<br>(53.1±4.0)  | 28.3±4.6*(19)<br>(73.9±11.8)* | 39.6±4.6*(18)<br>(121.3±20.4)* |
| 69    | 20.2±1.9 (18)<br>(48.4±4.9)                          | 21.3±2.1 (18)<br>(52.5±4.4)* | 28.0±5.4*(19)<br>(72.3±13.7)* | 40.5±3.7*(18)<br>(124.9±19.1)* |
| 73    | 21.0±2.9 (19)<br>(49.6±6.1)                          | 21.7±2.7 (16)<br>(52.8±5.3)  | 30.6±6.6*(19)<br>(79.3±17.0)* | 41.8±5.7*(14)<br>(129.8±30.0)* |
| 77    | 22.1±2.8 (19)<br>(52.4±5.6)                          | 23.6±3.1 (18)<br>(58.0±5.4)* | 32.4±7.2*(19)<br>(84.8±18.7)* | 44.1±4.1*(14)<br>(136.0±17.6)* |
| 85    | 24.2±3.0 (18)<br>(57.3±6.3)                          | 24.7±4.1 (18)<br>(60.0±7.8)  | 31.9±5.6*(13)<br>(83.8±14.4)* | 47.8±7.8*(12)<br>(146.4±27.5)* |
| 89    | 25.8±3.4 (18)<br>(61.1±7.0)                          | 26.6±4.7 (18)<br>(64.6±9.7)  | 33.3±6.0*(13)<br>(88.2±14.1)* | 52.0±7.7*(12)<br>(157.8±25.2)* |

1) Mean (Absolute)±S.D. (g/rat/day) 2) Mean (Relative)±S.D. (g/kg/day)

a) No. of Rats \* P&lt;0.05

Table 5. Organ Weights of F344 Male Rats Fed OPP in Pellet Diet for 91 Weeks

|                               |        | 0% (Control)                                    | 0.625%                    | 1.250%                      | 2.500%                        |
|-------------------------------|--------|-------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| No. of Rats                   |        | 19                                              | 18                        | 13                          | 12                            |
| Brain                         | (mg)   | 2090±62 <sup>1)</sup><br>(506±66) <sup>2)</sup> | 2114±25 (17)<br>(511±27)  | 2095±29<br>(550±54)         | 2062±21 (11)<br>(631±42)*     |
| Heart                         | (mg)   | 1094±92 (18) <sup>a)</sup><br>(261±18)          | 1070±70<br>(257±12)       | 1011±47 *(12)<br>(260±13)   | 957±61 *<br>(290±21)*         |
| Lung                          | (mg)   | 1150±91<br>(277±27)                             | 1146±72 (17)<br>(277±21)  | 1093±51 *<br>(286±25)       | 1049±75 *<br>(316±17)*        |
| Liver                         | (g)    | 14.4±1.5<br>(3458±370)                          | 13.6±1.3<br>(3274±203)    | 12.6±1.7<br>(3278±266)      | 12.4±1.0 *(11)<br>(3795±257)* |
| Spleen                        | (mg)   | 956±141 (18)<br>(231±34)                        | 807±82 *(16)<br>(196±16)* | 727±65 *(11)<br>(185±16)*   | 729±73 *(10)<br>(222±27)      |
| Kidney                        | R (mg) | 1381±81 (17)<br>(321±18)                        | 1362±44 (16)<br>(325±12)  | 1326±85 (12)<br>(349±35)*   | 1884±121 *(11)<br>(578±64)*   |
|                               | L      | 1372±78 (17)<br>(319±18)                        | 1367±72 (16)<br>(325±10)  | 1329±89 (12)<br>(349±30)*   | 2026±210 *(11)<br>(623±98)*   |
| Adrenal Gland                 | R (mg) | 28.5±4.5 (18)<br>(6.7±1.0)                      | 28.0±4.5<br>(6.7±1.0)     | 25.8±3.3 (12)<br>(6.8±1.0)  | 25.7±2.9<br>(7.8±0.8)*        |
|                               | L      | 31.7±4.4 (18)<br>(7.4±1.0)                      | 30.4±5.2<br>(7.3±1.1)     | 28.3±3.6 *(12)<br>(7.4±1.0) | 28.0±3.2 *<br>(8.5±0.9)*      |
| Testis                        | R (mg) | 1869±867 (18)<br>(438±200)                      | 2064±795<br>(499±195)     | 1617±510 (12)<br>(424±128)  | 2341±802<br>(708±246)*        |
|                               | L      | 1996±721 (18)<br>(469±167)                      | 1866±740<br>(448±175)     | 1919±824 (12)<br>(495±196)  | 2844±1046 *<br>(859±310)*     |
| Prostate                      | (mg)   | 274±86<br>(66±21)                               | 265±79<br>(63±17)         | 277±65 (12)<br>(74±21)      | 222±78<br>(69±28)             |
| Urinary Bladder <sup>b)</sup> | (mg)   | 156±24<br>(37.5±6.3)                            | 155±19<br>(37.2±4.0)      | 640±329 *<br>(168.9±96.1)*  | 227±17 *(11)<br>(68.5±7.4)*   |
| Body Weight                   | (g)    | 419.2±49.4                                      | 416.2±23.0                | 384.4±36.6*                 | 330.7±22.1 *                  |

1) Mean of Wet Weights±S.D. 2) Mean of Relative Weights±S.D. (/100g Body Weight)

a) No. of the Organs b) Weighed after Fixation

\* P&lt;0.05

Table 6. Hematological Findings of F344 Male Rats Fed OPP for 91 Weeks

|             |                                     | 0% (Control)           | 0.625%     | 1.250%    | 2.500%     |
|-------------|-------------------------------------|------------------------|------------|-----------|------------|
| No. of Rats |                                     | 17                     | 17         | 12        | 12         |
| WBC         | (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> ) | 7.4 ±1.6 <sup>1)</sup> | 7.1 ±1.5   | 7.5 ±1.3  | 8.9 ±2.0*  |
| RBC         | (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> ) | 9.94±0.83              | 10.50±0.93 | 9.60±1.32 | 10.17±2.04 |
| Hgb         | (g/dl)                              | 19.7 ±1.4              | 20.5 ±1.6  | 18.8 ±2.1 | 19.5 ±3.3  |
| Hct         | (%)                                 | 51.0 ±4.1              | 52.6 ±3.9  | 48.8 ±5.8 | 50.7 ±8.8  |
| MCV         | (μ <sup>3</sup> )                   | 51.4 ±2.0              | 50.2 ±1.7  | 51.0 ±2.0 | 50.2 ±2.2  |
| MCH         | (ng)                                | 19.8 ±0.9              | 19.5 ±0.8  | 19.6 ±1.0 | 19.3 ±1.0  |
| MCHC        | (%)                                 | 38.6 ±1.3              | 38.9 ±1.1  | 38.5 ±1.0 | 38.5 ±1.0  |

1) Mean±S.D. \* P&lt;0.05

Table 7. Biochemical Findings of F344 Male Rats Fed OPP for 91 Weeks

|             |                      | 0% (Control)                       | 0.625%                | 1.250%               | 2.500%               |
|-------------|----------------------|------------------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| No. of Rats |                      | 19                                 | 18                    | 13                   | 12                   |
| GOT         | (K. U/ml)            | 113.3 $\pm$ 20.8 <sup>1)</sup>     | 126.5 $\pm$ 17.7 *    | 119.0 $\pm$ 25.7     | 107.9 $\pm$ 12.4     |
| GPT         | (K. U/ml)            | 59.4 $\pm$ 15.8 (18) <sup>a)</sup> | 81.2 $\pm$ 20.1 *     | 62.9 $\pm$ 13.8      | 53.2 $\pm$ 7.5       |
| Alp         | (KA-U/dl)            | 24.5 $\pm$ 6.0                     | 30.3 $\pm$ 4.8 *      | 26.5 $\pm$ 4.8       | 25.8 $\pm$ 5.0       |
| Glu         | (mg/dl)              | 137.3 $\pm$ 21.0                   | 135.7 $\pm$ 11.7 (16) | 143.2 $\pm$ 13.8     | 136.2 $\pm$ 25.2     |
| Chl         | (mg/dl)              | 41.7 $\pm$ 6.6 (18)                | 38.9 $\pm$ 8.7        | 32.8 $\pm$ 6.0 *(12) | 30.7 $\pm$ 5.5 *     |
| BUN         | (mg/dl)              | 18.1 $\pm$ 2.0                     | 18.8 $\pm$ 1.8        | 22.9 $\pm$ 3.2       | 24.2 $\pm$ 2.8 *(11) |
| TP          | (g/dl)               | 8.21 $\pm$ 0.56(18)                | 7.98 $\pm$ 0.55 (17)  | 8.17 $\pm$ 0.82      | 8.14 $\pm$ 0.64      |
| Alb         | (g/dl) <sup>b)</sup> | 5.04 $\pm$ 0.20(18)                | 5.13 $\pm$ 0.17 (16)  | 5.27 $\pm$ 0.43      | 5.19 $\pm$ 0.26 (11) |
| A/G         |                      | 1.64 $\pm$ 0.33(18)                | 1.88 $\pm$ 0.25*(16)  | 1.85 $\pm$ 0.23      | 1.86 $\pm$ 0.23 (11) |

1) Mean  $\pm$  S. D.

a) No. of Rats    b) by Bromcresolgreen Method    \* P &lt; 0.05

Table 8. Urinalysis of F344 Male Rats Fed Various Percentages of OPP for 90 Weeks

|              | No. of Rats | I. Protein (mg/dl) |           |    |     |     |       | II. pH |     |     |     |
|--------------|-------------|--------------------|-----------|----|-----|-----|-------|--------|-----|-----|-----|
|              |             | (-)                | ( $\pm$ ) | 30 | 100 | 300 | >1000 | 5.5    | 6.0 | 6.5 | 7.0 |
| 0% (Control) | 17          | 0                  | 0         | 0  | 0   | 1   | 16    | 0      | 16  | 1   | 0   |
| 0.625%       | 16          | 0                  | 0         | 2  | 5   | 8   | 1     | 0      | 14  | 2   | 0   |
| 1.250%       | 6           | 0                  | 0         | 3  | 2   | 1   | 0     | 0      | 5   | 1   | 0   |
| 2.500%       | 8           | 0                  | 0         | 3  | 5   | 0   | 0     | 0      | 7   | 1   | 0   |

Test tapes Labstix®-II (Ames Division, Miles-Sankyo Co., LTD.) were used for the examination.

Table 9. Findings of Hematuria and Urinary Calculi of F344 Male Rats on Diet Containing OPP

|              | 30 Week of Study |     |     |           |              |             | 90 Week of Study |     |     |           |              |             |
|--------------|------------------|-----|-----|-----------|--------------|-------------|------------------|-----|-----|-----------|--------------|-------------|
|              | No. of Rats      | (-) | (+) | ( $\pm$ ) | ( $\equiv$ ) | with Stones | No. of Rats      | (-) | (+) | ( $\pm$ ) | ( $\equiv$ ) | with Stones |
| 0% (Control) | 5                | 5   | 0   | 0         | 0            | 0           | 18               | 18  | 0   | 0         | 0            | 0           |
| 0.625%       | 6                | 6   | 0   | 0         | 0            | 0           | 16               | 16  | 0   | 0         | 0            | 0           |
| 1.250%       | 10               | 4   | 2   | 1         | 3            | 2           | 11               | 2   | 2   | 1         | 6            | 10          |
| 2.500%       | 6                | 1   | 0   | 0         | 5            | 3           | 8                | 4   | 2   | 1         | 1            | 4           |

Test tapes Labstix®-II were used for the examination of hematuria.

オルトフェニルフェノールナトリウムにより発生した  
F 344 ラット膀胱腫瘍の移植性について——途中経過

田 山 邦 昭\*, 中 村 清 純\*, 平 賀 興 吾\*

Transplantability of Urinary Bladder Tumor Induced in F344 Rats by Dietary  
Administration of Sodium *o*-Phenylphenate (OPP-Na)——An Interim Report

KUNIAKI TAYAMA\*, KIYOSUMI NAKAMURA\* and KOGO HIRAGA\*

Urinary bladder carcinomas which developed in male F344/DuCrj rats fed 2% *o*-phenylphenate for 115 weeks were transplanted s.c. into male adult rats of the same or other strains. In the rats of the same strain, transplantability of these carcinomas was recognized and some of the recipient rats developed metastatic pulmonary transitional cell carcinomas. Among the rats of other strains, transplantability of these carcinomas was found only in Slc:Wistar rats.

**Keywords** : sodium *o*-phenylphenate, rat, urinary bladder tumor, transplantability, metastasis

かんきつ類の防かび剤として使用許可されているオルトフェニルフェノールおよびそのナトリウム塩（以下、OPP および OPP-Na とする）は、当部で行った経口毒性試験で F 344 ラットに膀胱腫瘍を誘発することが報告された<sup>2,3)</sup>。この腫瘍の生物学的特性を検索する目的で、OPP-Na の投与により F 344 ラットに発生した膀胱腫瘍を同系ラットの皮下に移植したところ移植可能であり、現在継代移植中である。

本報告は継代 5 代目に至った同種同系継代移植実験および同実験の継代 2 代目で行った同種異系移植実験の結果である。

材料および方法

実験1. 同種同系継代移植実験

材料：移植に用いた膀胱腫瘍は、OPP-Na（ダウケミカル社製 Dowicide A : Lot No. MM01044）を日本クレー社製粉末飼料 CE-2 に 2% の濃度で添加し、固型飼料化し、F344/DuCrj 雄ラット 10 匹（日本チャールス・リバー社）に 6 週令時から水とともに自由摂取させ、投与後 115 週目に屠殺して得たもののうちの 3 例である。投与期間中の平均体重および生存率の変化を Fig. 1 に示した。膀胱腫瘍は途中死亡例を含め 10 例全例に発生しており、いずれも移行上皮癌であった。Photo 1 に移植材料摘出後の膀胱腫瘍（ラット No. 3477）を、Photo 5 にその組織像を示した。

実験動物および飼育条件：被移植動物は前述と同じ生育会社より購入した同系・同性のラット 9～10 週令を用いた。飼育は温度  $25 \pm 1^{\circ}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、照明 6～17 時、換気回数 10 回/時にそれぞれ制御してあるバリア区域内飼育室にて行い、ケージは前面および床面が網のステンレス製個別ケージ（W22×L20×H16 cm）、飼育架台は自動給水装置付ベルト式を用いた。飼料は CE-2 固型飼料、水は細菌ろ過器經由水道水を自由に摂取させた。

移植方法および観察：被移植動物はネンブタール麻酔を行い、右背部被毛を剪毛、皮膚を 4mm 程度切開しておき、生理食塩水中で 2mm 角に細切した膀胱腫瘍の一片を移植針で切開部より接種した。腫瘍の摘出から接種までの操作は 15 分以内に終了させた。継代移植は皮下に発育した腫瘍の長径が 15～30mm になったところで摘出し、壊死部を避けて移植材料とし、前述の操作の如く行った。移植後、毎週皮下を触診し、腫瘍の認められた動物はノギスでその長径、短径を測定し、長径が 10mm 以上に達した時点で疑陽性とし、その後組織学的に移行上皮癌と確認されたものを移植陽性、それ以外を移植陰性とした。動物は一部継代あるいは組織培養等のため途中で屠殺したものを除き、死亡するまで観察し、死亡および屠殺例は、肉眼的観察後、主要器官および組織を 10% 緩衝ホルマリン液で固定し、組織学的検査材料とした。

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan



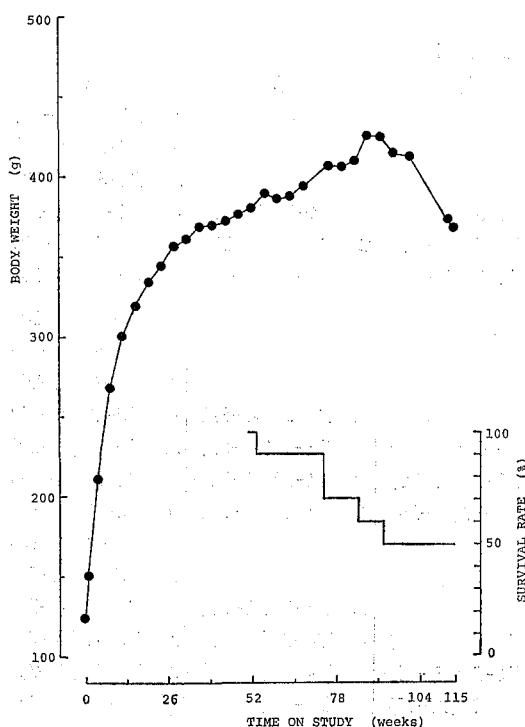


Fig. 1. Changes of Mean Body Weight and Survival Rate in F344/DuCrj Male Rats Fed OPP-Na for 115 Weeks.

## 実験2. 同種異系移植実験

材料 実験1で継代2代目の2例(ラットNo. T2-13, T2-25)の腫瘍を移植材料とした。

実験動物および飼育条件: Slc: Wistar (静岡県実験動物農業協同組合), Jel: SD (日本クレア社), NRC: Donryu (日本ラット社) および対照の F344/DuCrj (日本チャールス・リバー社) いずれも10週令の雄ラットを用いた。飼育は一般飼育室で行い、ケージは W25×L40×H16cm のもので4匹飼いとした他は実験1と同様の飼育条件である。

移植方法および観察: 1例の腫瘍につき4系統のラット各4匹ずつに Donryu, SD, Wistar, F344 の順序で移植し、移植後24週目に屠殺した。移植方法および観察は実験1と同様である。

## 結果および考察

実験1の経過を Fig. 2 に示した。3例の膀胱腫瘍はいずれも増殖が認められ、継代可能であった(Photo 2, 3)。継代は現在まで7~16週間隔で行っており、移植率は生存例を除きほぼ100%である。腫瘍が長径 10mm に達す

る時期は大半が移植後5~11週であったが、3467系の1代目は32~52週で認められている。腫瘍ははじめ硬い結節状であり、嚢胞を形成して徐々に軟化し、皮膚が破れ、その後増殖してやや充実性となった。腫瘍の大きさが約30mm以上になると死亡する例が現われ、死亡時期は大半が移植後20~30週であったが、早いものは13週でみられた。死亡例には腺胃部の出血、精巣の萎縮、副腎の腫大などが共通に認められ、その全例に移植腫瘍の肺転移、一部にリンパ節転移が観察された。また屠殺例の2例にも肺転移がみられた。移植後39週で死亡した1例(T1-2)は、口腔から食道にかけ餌が詰っていた他異常は認められず、触知可能な腫瘍もなく、移植陰性とした。

実験2の結果を Fig. 3 に示した。対照として用いた F344/DuCrj 以外では Slc: Wistar に移植可能であり、移植後24週間に腫瘍を持って死亡する例がみられ、肺転移も Slc: Wistar で F344/DuCrj と同様認められた。一方、Jel: SD および NRC: Donryu では腫瘍の増殖は認められなかった。

実験的膀胱腫瘍については、Ertürk ら<sup>4)</sup>が N-(4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl) formamide により SD ラットに、Yalciner ら<sup>5)</sup>が同物質により Fischer ラットに、さらに Noda ら<sup>6)</sup>が N-butyl-N-butanol(4)nitrosamine により ACI/N ラットにそれぞれ膀胱腫瘍を発生させ、それらが移植可能であることを報告している。OPP-Na により F344/DuCrj ラットに発生させた膀胱腫瘍も同系ラットの皮下に移植可能であることが判明し、その継代も現在5代目に至っている。一般に腫瘍の転移はその悪性度と関係が深いとされているが、本報告の同種同系継代移植実験では腫瘍宿主動物の死亡例すべてに肺転移が認められている。しかし前述の報告では<sup>4-6)</sup> Ertürk らがわずかに1例観察しているに過ぎない。本報告の同種異系移植実験では、異系である Slc: Wistar ラットで同系の F344/DuCrj ラットと同様に移植可能であり、肺転移も認められた。これまでの実験動物の皮下移植による可移植性腫瘍の報告は<sup>7-10)</sup>、そのほとんどが同種同系動物間のものであり、異系動物への成功例は少なく、Slc: Wistar ラットへの移植陽性結果については、今後種々の方面から検討を加えていかねばならない。また移植に用いた膀胱腫瘍は、動物に6週令の時点から OPP-Na を投与し、115週目で屠殺し、発生していたものであったが、膀胱腫瘍を持って死亡したものは53週からみられており、今後、現在継代中のものについてさらに実験を進めると共に、移植時期についても検討を加えたい。

1st Expt.  
Original

Generation

|               | I                            | II             | III            | IV             | V             |
|---------------|------------------------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
|               |                              | ●* T2-13(S-16) |                |                | ▲ T5-1 (A-10) |
|               |                              | ● T2-14(S-11)  |                |                | ▲ T5-2 (A-10) |
|               |                              | ●* T2-15(D-23) |                |                | ▲ T5-3 (A-10) |
|               |                              | ●* T2-16(D-29) | ●* T3-5 (D-26) | ●* T4-5 (D-13) | ▲ T5-4 (A-10) |
|               |                              | ● T2-17(S-10)  | ●* T3-7 (S-16) | ● T4-8 (S-11)  | ▲ T5-5 (A-10) |
|               |                              | ●* T2-18(D-27) | ●* T3-6 (D-19) | ▲ T4-6 (A-21)  | ▲ T5-6 (A-10) |
|               | <sup>1)</sup> ● T1-3 (S-11)  | ●* T2-19(D-26) |                |                | ▲ T5-7 (A-10) |
|               | <sup>2)</sup> ●* T1-1 (D-34) | ●* T2-20(D-27) |                |                | ▲ T5-8 (A-10) |
| Rat No. 3477- | ○ T1-2 (D-39)                | ●* T2-7 (D-22) |                |                | ▲ T5-9 (A-10) |
|               | ● T1-4 (S-7)                 | ●* T2-8 (D-30) |                | ▲ T4-9 (A-21)  | ▲ T5-10(A-10) |
|               |                              | ●* T2-9 (D-22) | ●* T3-8 (D-14) | ▲ T4-11(A-21)  | ▲ T5-11(A-10) |
|               |                              | ● T2-10(S-15)  | ● T3-9 (S-16)  | ● T4-10(S-11)  | ▲ T5-12(A-10) |
|               |                              | ●* T2-11(D-30) | ●* T3-10(D-25) | ▲ T4-12(A-21)  | ▲ T5-13(A-10) |
|               |                              | ●* T2-12(D-24) |                |                | ▲ T5-14(A-10) |
|               |                              | ▲ T2-24(A-47)  |                |                | △ T5-15(A-7)  |
|               | ▲ T1-8 (A-59)                | ▲ T2-22(A-47)  |                | ▲ T4-1 (A-21)  | ▲ T5-16(A-7)  |
|               | ●* T1-9 (D-45)               | ●* T2-23(D-36) | ▲ T3-1 (A-37)  | ▲ T4-2 (A-21)  | ▲ T5-17(A-7)  |
| Rat No. 3472- | ● T1-10(S-11)                | ● T2-21(S-10)* | ● T3-2 (S-16)  | ● T4-4 (S-13)  | △ T5-18(A-7)  |
|               | ●* T1-12(D-40)               | ● T2-25(S-16)  | ▲ T3-3 (A-37)  | ▲ T4-3 (A-21)  | △ T5-19(A-7)  |
|               |                              | ▲ T2-26(A-47)  |                |                | ▲ T5-20(A-7)  |
|               |                              | ▲ T2-27(A-10)  |                |                |               |
|               | ▲ T1-5 (A-59)                | △ T2-28(A-10)  |                |                |               |
|               | △ T1-6 (A-59)                | ▲ T2-29(A-10)  |                |                |               |
| Rat No. 3467- | ● T1-11(S-49)                | ▲ T2-30(A-10)  |                |                |               |
|               | ▲ T1-7 (A-59)                | △ T2-31(A-10)  |                |                |               |
|               |                              | △ T2-32(A-10)  |                |                |               |
|               |                              | ▲ T2-33(A-10)  |                |                |               |

Fig. 2. Chart Demonstrating Frequency of Successful Transplantation of Urinary Bladder Tumor Induced by OPP-Na in F344/DuCrj Rats.

1) ● : Transplantation Positive (palpable tumor larger than 10 mm in diameter; examined histologically), ○ : Transplantation Negative (tumor not palpable or smaller than 10 mm in diameter; examined histologically), ▲ : Pending (palpable tumor larger than 10 mm in diameter; not examined histologically), △ : Pending (tumor not palpable or smaller than 10 mm in diameter; not examined histologically).

2) Rat No.

3) S : Sacrificed, D : Dead, A : Survived - Weeks after Inoculation.

\* Pulmonary Metastasis.

Transitional cell carcinomas of the urinary bladder were chemically induced with sodium *o*-phenylphenate in F344 male rats. The tumor has been transplanted by subcutaneous inoculation through five passage.

### ま と め

2%OPP-Na添加飼料をF344/DuCrjラットに115週間摂取させ、発生した膀胱腫瘍3例を同系ラットの皮下に移植した結果、3例とも腫瘍の増殖が認められた。この

腫瘍の移植率はほぼ100%を維持しており、現在継代5代目に至っている。死亡例はすべて移植腫瘍の肺転移を伴っていた。継代2代目の腫瘍をF344/DuCrjラットおよび他の異系ラットに移植し、その移植可能性を調べた

## 2nd Expt.

| II                           | III'                           | II           | III'                           |
|------------------------------|--------------------------------|--------------|--------------------------------|
|                              | ● <sup>3)</sup> * T3F-30(S-24) |              | ● T3F-14(S-24)                 |
|                              | ● <sup>3)</sup> * T3F-31(S-24) |              | ○ T3F-15(S-24)                 |
|                              | ● <sup>3)</sup> * T3F-32(D-20) |              | ● T3F-16(S-24)                 |
| *T2-13(S-16) <sup>1)</sup> — | ● <sup>3)</sup> * T3F-33(S-24) | T2-25(S-16)— | ● <sup>3)</sup> * T3F-17(S-24) |
|                              | ● <sup>3)</sup> * T3W-34(D-23) |              | ○ T3W-18(S-24)                 |
|                              | ● <sup>3)</sup> * T3W-35(D-23) |              | ○ T3W-19(S-24)                 |
|                              | ● <sup>3)</sup> * T3W-36(D-22) |              | ● <sup>3)</sup> * T3W-20(S-24) |
|                              | ○ T3S-37(S-24)                 |              | ○ T3W-21(S-24)                 |
|                              | ○ T3S-38(S-24)                 |              | ○ T3S-22(S-24)                 |
|                              | ○ T3S-39(S-24)                 |              | ○ T3S-23(S-24)                 |
|                              | ○ T3S-40(S-24)                 |              | ○ T3S-24(S-24)                 |
|                              | ○ T3D-41(S-24)                 |              | ○ T3S-25(S-24)                 |
|                              | ○ T3D-42(S-24)                 |              | ○ T3D-26(S-24)                 |
|                              | ○ T3D-43(S-24)                 |              | ○ T3D-27(S-24)                 |
|                              | ○ T3D-44(S-24)                 |              | ○ T3D-28(S-24)                 |
|                              |                                |              | ○ T3D-29(S-24)                 |

Fig. 3. Chart Demonstrating Transplantability of Transferred Tumors of F344/DuCrj Rats to Other Strains.

1) Rat No.

2) S : Sacrificed, D : Dead-Weeks after Inoculation.

3) ● : Transplantation Positive, ○ : Transplantation Negative.

4) Rat No. ; F- F344/DuCrj, W- Slc : Wistar, S- Jcl : SD, D- NRC : Donryu.

\* Pulmonary Metastasis.

実験では、Slc : Wistar のみに F344/DuCrj と同様皮下における腫瘍の増殖および肺への転移が認められた。

## 文 献

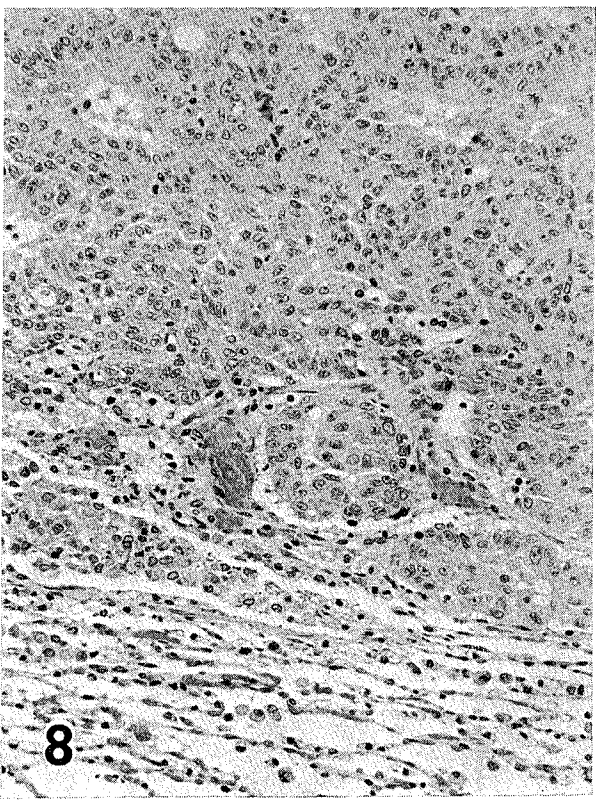
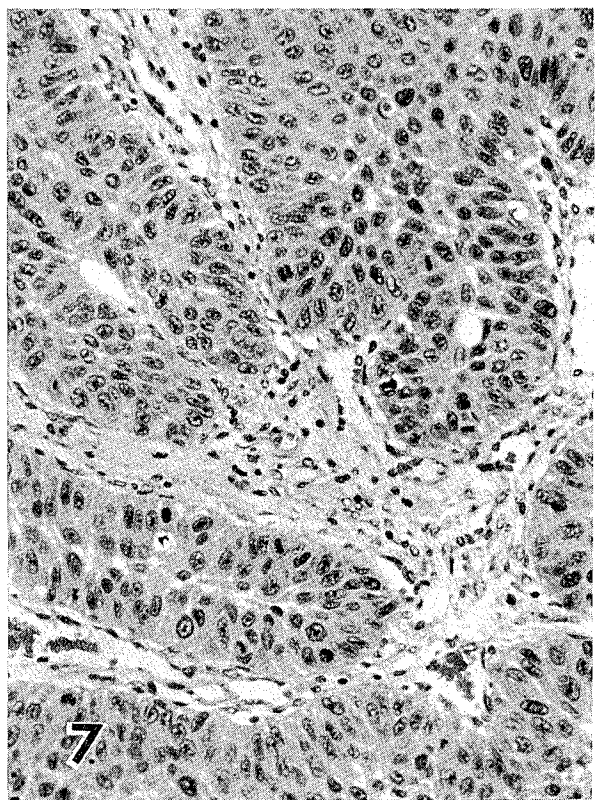
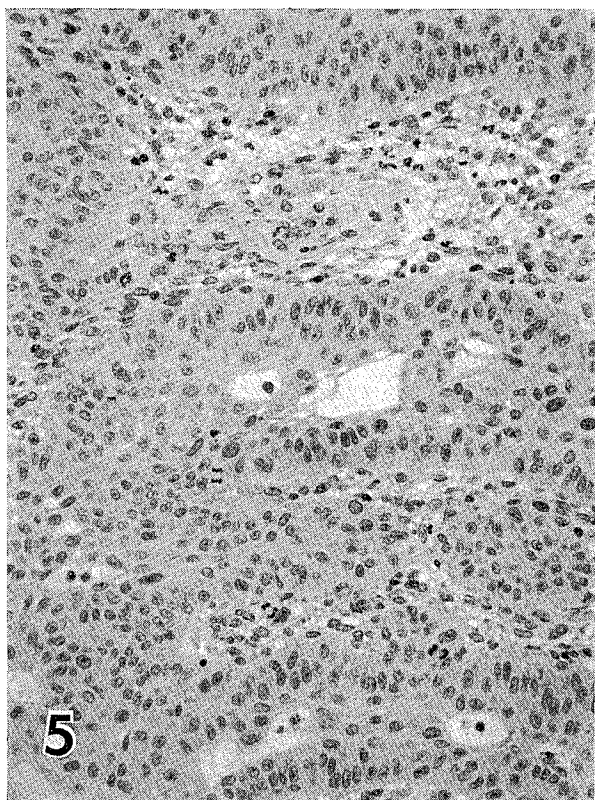
- 1) 石館守三監修：食品添加物公定書・解説書，B-158，1979，広川書店
- 2) Hiraga, K. and Fujii, T.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 303, 1981
- 3) 藤井 孝，平賀興吾：第41回日本癌学会総会記事，41，1982
- 4) Ertürk, E., Cohen, S.M., Price J.M. and Bryan G. T.: *Cancer Res.*, 29, 2219, 1969
- 5) Yalciner, S., Tiltman, A. J. and Friedell G. H.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 51, 1177, 1973
- 6) Noda, M. and Hashimoto, Y.: *Japan. J. Urol.*, 64, 397, 1973
- 7) 佐藤 博：第40回日本癌学会総会記事 付表，1981
- 8) 宮川正澄，佐藤春郎，堀良義彦監修：実験腫瘍学，77，1969，朝倉書店
- 9) Busch H.: *Methods in Cancer Research*, 1,

143, 1967, Academic Press

- 10) 杉原誠一，日浅義雄，牧浦幸男，釜本善之，又吉絹子，伊東信行，塚田欣司：第30回日本癌学会総会記事，44，1971

## Explanation of Plates

- Photo 1. Primary urinary bladder tumor induced in F344 male rat (No. 3477) by dietary administration of 2% sodium *o*-phenylphenate, and bladder calculi having rough surface.
- Photo 2. Transplanted tumor growing subcutaneously in F344 male rat (No. T2-7) after two successive passages.
- Photo 3. Gross appearance of the cut surface of the subcutaneous tumor in Photo 2.
- Photo 4. Gross appearance of pulmonary metastasis of the same rat as seen in Photo 2.
- Photo 5. Microscopic appearance of primary transitional cell carcinoma in F344 rat (No. 3477 in Fig.1). H-E ×200.



## オルトフェニルフェノール (OPP) の生体内運命 (第1報) 経口投与によるラット体内分布ならびに排泄

市川久次\*, 小林博義\*, 中尾順子\*

### Biological Fate of *o*-Phenylphenol in Rats 1. Distribution and Excretion after Oral Administration

HISATSUGU ICHIKAWA\*, HIROYOSHI KOBAYASHI\* and TOSHIKO NAKAO\*

**Keywords:** オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, 生体内運命 biological fate, 分布 distribution, 排泄 excretion

オルトフェニルフェノール (OPP) は柑橘類の防衛剤として使用されている。その安全性については尿路系に強い障害を示し、膀胱腫瘍の発生が報告され<sup>1)</sup>、疑問が投げかけられている。当部では OPP の毒性に関し種々の面からの検討が進行中であるが、著者らはその一環として *o*-[U-<sup>14</sup>C] phenylphenol (OPP-<sup>14</sup>C) を用いて、OPP のラットの生体内運命を検討したところ若干の知見を得たので報告する。

#### 実験材料ならびに方法

##### 1. 使用動物

日本チャールス・リバー株式会社生産の F344/DuCrj ラット雄を用いた。生後4週令のものを購入し、5週間予備飼育を行い、一般状態、体重の増加に異常のないものを実験に供した。実験開始時 (平均体重約180g) に1群3匹とし、ケージに入れ飼育し実験に供した。

##### 2. 試料ならびに試薬

試料として用いた <sup>14</sup>C 標識の OPP (OPP-<sup>14</sup>C) は Radiochemical Centre, Amersham 社に特別注文し、製造、購入したもので (specific activity 1.39 mCi/mmol (51MBq/mmol), 8.2μCi/mg (303KBq/mg)), *o*-[U-<sup>14</sup>C]-phenylphenol (2-hydroxy-[U-<sup>14</sup>C] biphenyl) が正式の化学名である。形状は白色固形物質であった。使用にあたってはベンゼン溶液とし、小分けして使用した。

シンチレーター用の PPO は Dotite PPO (2, 5-diphenyloxazole, 和光純薬製)、POPOP は Dotite Dimethyl-POPOP (1, 4-bis-2[(4-methyl-5-phenyloxazolyl)]-benzene, 和光純薬製) を使用した。また、放射能測定用サンプル調整用に、isopropanol (和光純薬製, 特級, 血液に使用), Soluene-350 (Packard 製, 血液なら

びに組織の溶解に使用), 過酸化水素水 (30%, 和光純薬製, 血液の脱色に使用), Insta-Gel (Packard 製, 血液ならびに尿測定に使用), Carbo-Sorb, Parmafloor V (Packard 製, 糞測定に使用), Dimilume-30 (Packard 製, 化学発光阻止剤に使用) を用いた。他の溶媒, 試薬はすべて JIS 特級を用いた。

##### 3. 投与方法ならびに期間

OPP-<sup>14</sup>C はオリブ油 (局方) に 11.7μCi/0.5ml になるように調製し (OPP-<sup>14</sup>C のベンゼン溶液を器にとり, N<sub>2</sub> ガス気流中でベンゼンを蒸発させ, 残渣にオリブ油 (局方) を加えて調製する), ラット1匹当り0.5ml (各群3匹) を胃ゾンデを用いて経口投与した。OPP-<sup>14</sup>C の投与は1回とし, 投与後, 30分, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 120時間目に屠殺処理した。また, 投与後120時間目処理群はそれぞれ個別に代謝ケージに入れ, 経時的に尿, 糞を採取した。ラットは投与前16時間除餌した。

##### 4. 放射能の測定法

屠殺処理したラットの血液, 血清を採取し, 脳, 心臓, 肺, 肝臓, 脾臓, 小腸, 精巣, 副腎, 膀胱, 脂肪, 尿, 糞を摘出, また, 尿を採取し, 容量, 重量を測定したのち, 血液は 10μl をミニバイアルにとり Soluene-350 + Isopropanol (1:1) 0.5ml を加えて溶解させ, 30% 過酸化水素水 0.2ml を加えて脱色し, Insta-Gel を, 血清は 0.2ml を, 各臓器は精製水を加えて 5~200 倍のホモジネートを調製し, 0.3ml をミニバイアルにとり減圧下室温にて乾燥させたのち, 精製水 75μl を加えて残渣を湿潤させ, Soluene-350 を 0.6ml 加えてオープンにて 50℃ で一夜加温溶解させ, 室温に冷後, 血清, 脳, 精巣, 膀胱, 小腸, 腎臓, 副腎にはトルエンシンチレーター (トルエ

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

ン1 l 中 PPO: 5g, Dimethyl-POPOP: 300mg 含有), 肺, 心臓, 肝臓, 脾臓には Dimilume-30 を 5.0ml 加えた, 脂肪は石油エーテルを加えて 10 倍の溶液を調製し (ガラス製ホモジナイザーで処理), その 0.5ml をミニバイアルにとり (濁りがある時は減量し, 精製水を加えて全量 0.5ml とした) Insta-Gel 5.0ml を加えてよく混合した. 糞はホットプレート上で乾燥し (約 90°C, 24 時間), 重量を測定し, エミーズ粉砕器にて粉末とし, その 50mg をとり, ベックマン社製サンプルオキシダイザー (BMO) にて燃焼させ, 生ずる  $^{14}\text{CO}_2$  ガスを Carbo-Sorb 8.0ml に吸収させ, Permaflour V 12.0ml と共にバイアル (レギュラー) 中に注ぎ込ませた.  $^{14}\text{CO}_2$  の回収率は肝臓のサンプルを用い直接液体シンチレーションカウンター法で測定した値を 100% として補正した (回収率 95.6%), 放射能の測定は液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製, LS-355) にて AQC を作動させ, 外部線源補正法にてクエンチングを補正し, dpm で表わした. なお, 放射能の測定にあたっては, 測定用サンプル調製後少なくとも一夜室温放置した. 測定値は 1 群 3 匹の平均値で表わした.

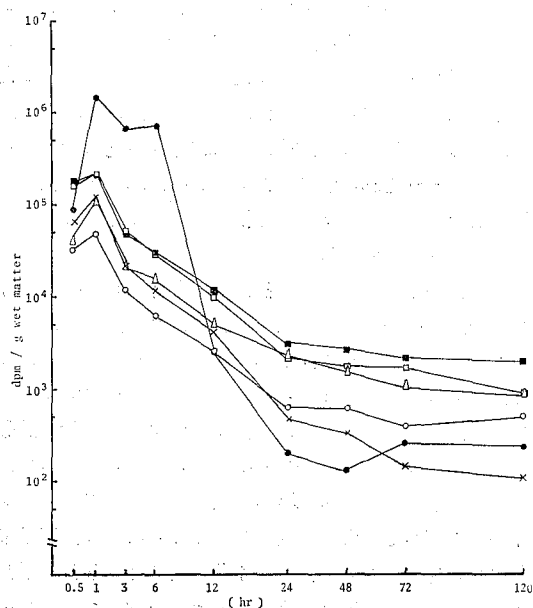


Fig. 1. Changes in Blood and Tissue Level of Radioactivity with Time after Oral Dose of OPP- $^{14}\text{C}$  (11.7  $\mu\text{Ci/Rat}$ ).

○ Blood × Serum △ Liver  
□ Kidney (L) ■ Kidney (R)  
● Bladder

## 実験結果

### 1. 体内分布

OPP- $^{14}\text{C}$  をラットに投与後, 経時的に処理し, 血液ならびに種々の臓器中の分布を測定した結果を Fig. 1, 2, 3, 4, 5 に示した.

血液中の放射能は投与後 1 時間で最高値に達し, 以後急激に減少し, 投与後 24 時間以後はほぼ一定の値を示した. 血清中は血液と同様な経過を示し, その分布濃度もほぼ同程度で, OPP の血中への吸収ならびに血中からの排泄は非常に速いことが明らかになった.

臓器, 組織では各臓器, 組織ともに分布, 排泄の時間的経過は血中濃度と同様で投与後 1 時間で最高値を示し, 以後急激に減少し, 投与後 24 時間以後はほぼ一定の値を示した. 臓器, 組織別に分布をみると, 湿重量 g 当り, 臓器当りでは膀胱, 肝臓, 腎臓に高く, g 当りの小腸の放射能も高かった. 一方, 血中と同程度の放射能濃度を示す臓器として, 肺, 副腎が挙げられた. さらに低い放射能濃度を示したのは, 心臓, 脾臓, 脳, 精巣, 脂肪であった. 投与 5 日後の肝臓, 腎臓, 心臓, 肺, 脾臓, 脳, 精巣, 副腎, 膀胱の残存量を総計したところ全投与量の 0.04% で, その量はわずかであった.

### 2. 尿ならびに糞中への排泄

OPP- $^{14}\text{C}$  をラットに経口投与し, 経口投与後 5 日間の尿ならびに糞中の recovery を Fig. 6 に示した. 尿では

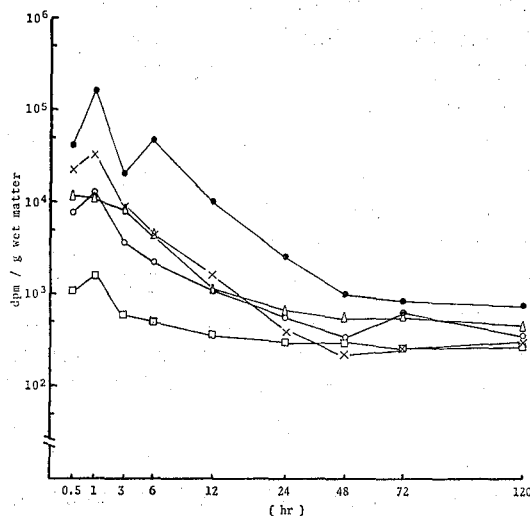


Fig. 2. Changes in Tissue Level of Radioactivity with Time after Oral Dose of OPP- $^{14}\text{C}$  (11.7  $\mu\text{Ci/Rat}$ ).

○ Heart × Lung △ Spleen  
□ Brain ● Intestine

投与後12時間目、糞では投与後24時間目において最高値を示し以後急激に減少した。尿への排泄を経時的にみると、5日間に排泄された量に対する24時間以内に排泄さ

れた割合は96.5% (全投与量に対しては、5日間、53.7%, 24時間以内 51.9%), 糞へは5日間に排泄された量に対する24時間以内に排泄された割合は83.9% (全投与量に対しては; 5日間; 1.9%, 24時間以内1.6%) であ

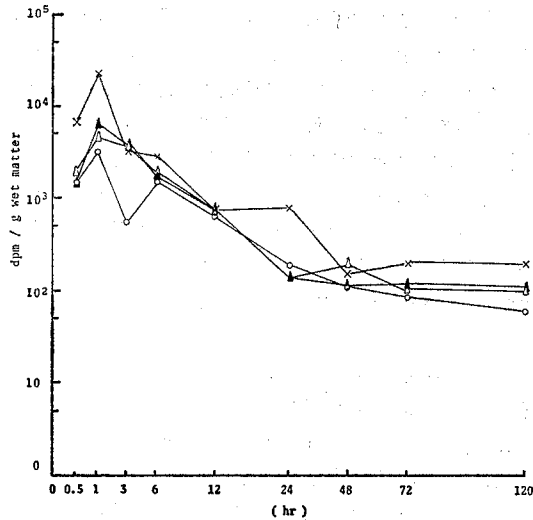


Fig. 3. Changes in Tissue Level of Radioactivity with Time after Oral Dose of OPP-<sup>14</sup>C (11.7  $\mu$ Ci/Rat).

○ Fat × Adrenal △ Testis (L)  
▲ Testis (R)

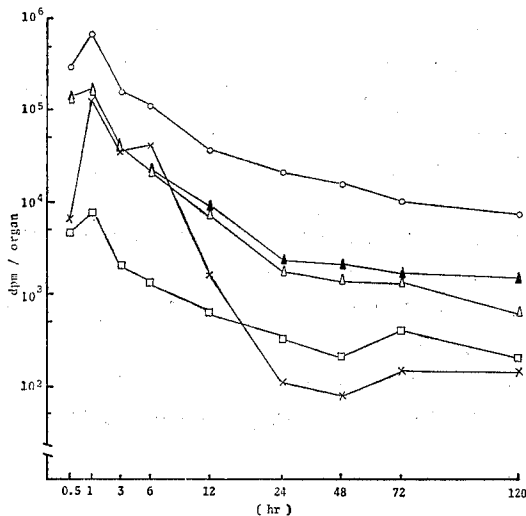


Fig. 4. Changes in Organ Level of Radioactivity with Time after Oral Dose of OPP-<sup>14</sup>C (11.7  $\mu$ Ci/Rat).

○ Liver × Bladder △ Kidney (L)  
▲ Kidney (R) □ Heart

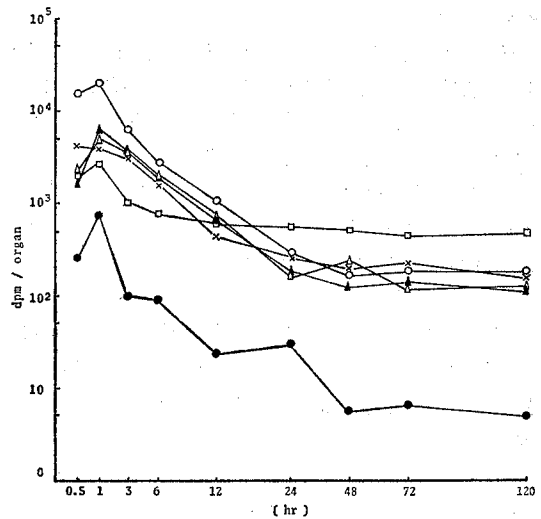


Fig. 5. Changes in Organ Level of Radioactivity with Time after Oral Dose of OPP-<sup>14</sup>C (11.7  $\mu$ Ci/Rat).

○ Lung × Spleen △ Testis (L)  
▲ Testis (R) □ Brain ● Adrenal

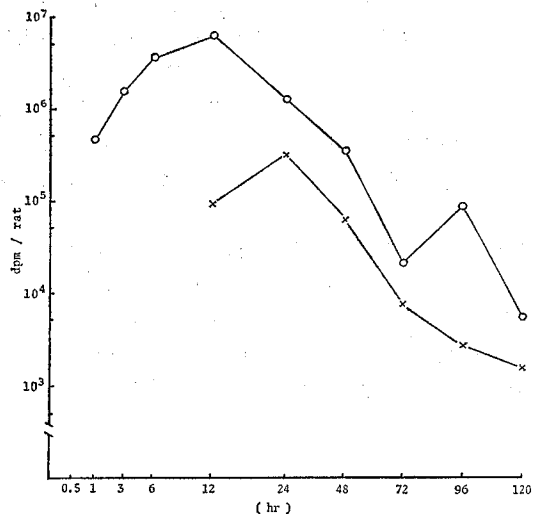


Fig. 6. Changes in Urine and Feces Level of Radioactivity with Time after Oral Dose of OPP-<sup>14</sup>C (11.7  $\mu$ Ci/Rat).

○ Urine × Feces

った。尿、糞中への排泄は、前述の血中、臓器、組織からの排泄同様、非常に速いことが明らかとなった。

#### 総括ならびに考察

OPP-<sup>14</sup>C をオリブ油に溶解し、ラットに経口投与(11.7 $\mu$ Ci/Rat) 後経時的にその体内分布ならびに尿、糞への排泄を検討した。

体内、血液、各臓器、組織への分布は、投与後1時間目に最高値を示し(吸収が非常に早い)、以後急激に減少した。このことより血液と各臓器、組織の間は単純な拡散により transport が行われ、特別な transport 機構が存在する可能性はないと考えられる。また、脂肪組織への分布、蓄積も少ないことから、OPP は小腸から吸収され門脈、肝臓を経て静脈血中に出ていく間に殆んどが極性の高い物質へ変換されているものと考えられる。臓器、組織別の分布をみると major な解毒、排泄臓器である肝臓、腎臓に高いのは当然であると考えられるが、膀胱への分布も非常に高く(測定値に個体差によるバラツキが非常に大きいので再検討を要するところであるが)、膀胱は尿の通過臓器であること、さらに膀胱腫瘍の発生<sup>1)</sup>との関連より非常に興味深い。

尿ならびに糞への排泄は、血中、各臓器、組織からの排泄と平行して速かった。また、尿と糞への排泄量の差は明瞭で、圧倒的に尿中への排泄の方が多かった(5日間に排泄された全投与量に対する割合は尿 53.7%, 糞 1.9%)。Matthews<sup>2)</sup>は排泄に対する分子量の効果について、排泄の基本的経路を決定するのは排泄される物質そのものの分子量であり、胆汁中(糞中)あるいは腎臓から(尿中)排泄されるかどうかの分子量の分岐点(critical molecular weight, 臨界分子量(この分子量よりも大きい分子量のものは胆汁を経て糞へ、小さい分子量のものは腎臓を経て尿へ)は動物により差異があり、ラットでは  $325 \pm 50$  であると述べている。本実験より得た結果より、排泄経路と排泄された物質との関連について考察を加えると、尿中への排泄の割合が糞中に比して圧倒的に多かったことより、排泄された物質の分子量は  $325 \pm 50$  以下であると考えられる(Matthews の説によれば)。一方、牛山ら<sup>3,4)</sup>は尿中代謝産物の大部分はOPP

および PHQ (2,5-dihydroxyphenyl) のグルクロナイドであると報告しているが、OPP グルクロナイドは分子量 349、PHQ グルクロナイドは、モノ体 364、ジ体 542 である。OPP ならびに PHQ モノグルクロナイドは Matthews<sup>2)</sup>の説に矛盾はしないが、PHQ ジグルクロナイドの方は一致しない。しかし、Matthews<sup>2)</sup>の説はハロゲン化ビフェニルについての実験より得た結果をもとにしたもので、むしろこれまで一般的にいわれているように極性が増加すればするほど腎臓からの排泄が増加すると思った方が妥当で、Matthews<sup>2)</sup>の得た結果は偶然性がかかなりあるものと考えられる。また、佐藤ら<sup>5)</sup>も本実験と同様な検討を行い、OPP の体内分布ならびに排泄に関してはほぼ同様な結果を得ている。

#### 結 論

OPP-<sup>14</sup>C をラットに経口投与した後、経時的に体内分布ならびに排泄を検討した。

1. 体内への吸収は非常に速く、血中、各臓器、組織の放射能濃度は投与後1時間で最高値に達した。
2. 尿中、糞中への排泄も非常に速く、それぞれ24時間以内に全排泄量(5日間)の96.5%(尿)、83.9%(糞)が排泄された。
3. 体外への排泄は尿中への排泄が圧倒的に多く、尿中へは全投与量の53.7%、糞中へは全投与量の1.9%が5日間で排泄された。

#### 文 献

- 1) Hiraga, K. and Fujii, T.: Food and Cosmetic Toxicology, 19, 303, 1981
- 2) Matthews, H. B.: Introduction to Biochemical Toxicology, Ed. Hodgson, E. and Guthrie, F. E., 162, 1980, Blackwell Scientific Publications, London
- 3) 中尾順子, 大槻慶子, 樺島順一郎, 平賀興吾: 第54回日本生化学会大会(仙台), 1981
- 4) 牛山慶子, 樺島順一郎, 中尾順子: 東京衛研年報, 33, 455, 1982
- 5) 佐藤道夫, 田中 彰, 土屋利江, 中浦慎介, 田中 悟, 山羽 力: 日本薬学会第102年会(大阪), 1982



## オルトフェニルフェノールの代謝 長期間投与における代謝物の推移

牛山慶子\*, 樺島順一郎\*, 中尾順子\*

### Metabolism of *o*-Phenylphenol (OPP) in Rats

### Metabolic Profile of OPP in Rats fed Dietary for Long Period

KEIKO USHIYAMA\*, JUNICHIRO KABASHIMA\* and TOSHIKO NAKAO\*

**Keywords** オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, 代謝物 metabolites, フェニルハイドロキノン phenylhydroquinone

オルトフェニルフェノール (OPP) は、一般毒性としては弱く、そのため防衛剤として広く使用されている。

OPP-Naの長期間投与による尿路障害および膀胱ガンについての最初の報告は、平賀らによってなされた<sup>1)</sup>。しかし、代謝について、特に長期間投与による代謝物の変遷についての報告はない。動物は長期にわたる異物の食餌を通しての摂取により、さまざまな適応を示す。その結果として排泄された代謝物が、発ガン性を示すといわれているものは、ベンツ (a) ピレンの例のように多くの報告がある。一方、個体の変化としては、薬物代謝酵素の誘導などそれぞれの異物に対応した適応を示すことが、動物実験により示されている。私共は、代謝物と、誘導酵素の両面からOPP-Naの代謝を解明するための実験をすすめているが、本報告は、特に代謝物、排泄の主たる経路、代謝による構造の変化、膀胱中での濃度などについて、130日の長期にわたり、ガスクロマトグラフィー、マススペクトル、高速液体クロマトグラフィーにより追跡した結果を報告し、発ガンの可能性について論じる。

#### 実験材料

**動物** : F344/DuCrj ラット (日本チャールズリバー社) を4週齢で購入し、5週齢より実験を行なった。

**投与方法** : 固型飼料に2%OPP-Naを添加し、自由摂取させた。そのほか飼育条件、採尿方法等は、先に報告してある<sup>2)</sup>。

**試薬** : OPP (関東化学), フェニルハイドロキノン (東京化成), 4-ブロモジフェニル (関東化学), 2-ジブロムキノックロロイミド (和光純薬), ガルバゾール (和光純薬),  $\beta$ -グルクロニダーゼ/アリスルファターゼ (ペーリンガーマンハイム山之内), TRI-SIL (Pierce chemical)

#### 実験方法

OPP 濃度の比色による定量<sup>3)</sup> : 検液 2ml (10~100  $\mu$ mol) に Clark and Lubs 溶液 pH 9.4 (0.05M-KCl, 0.05M-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, NaOH) 0.5ml, 0.3%ジブロムキノックロロイミド (エタノール溶液) 0.1ml を水で 2ml にし、ギルフォード 300N 分光光度計を用い、680nm の吸光度を測定した。

OPP およびその代謝物の測定 : OPP およびその代謝物は、尿中ではほとんどがグルクロン酸抱合体として排泄されている<sup>4)</sup> ので、そのままでは有機溶媒に抽出できない。そのため、 $\beta$ -グルクロニダーゼを作用させた。そのほかは、Meyer らの方法<sup>5)</sup> をもとに行なった。尿 2ml に 0.2M 酢酸バッファー pH 4.5, 3ml,  $\beta$ -グルクロニダーゼ (10~20units) を 37°C, 1 晩インキュベートした。反応液を水で 20ml とし、4 規定塩酸で酸性にして、エーテル 10ml で 5 回抽出した。エーテル層を 5%炭酸水素ナトリウム 10ml で 3 回洗った。これを無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。TRI-SIL でトリメチルシリル化したものと、そのままガスクロマトグラフィーにかけたものと、リテンションタイムは異なるが、両方ともきれいに分離したので、以後 TRI-SIL は使用しなかった。このサンプルを後記ガスクロマトグラフィーにかけた。装置は、島津 4BMPF, FID 検出器, 3%OV-1 ガスクロム Q (80~100メッシュ) 0.4×150 cm, 80~270°C, 8°/min で昇温させた。キャリアガスは、アルゴン 30ml/min で流した。(図 1)

高速液体クロマトグラフィー用のサンプルの調整は、尿 1ml に前記の酢酸バッファー 1ml に  $\beta$ -グルクロニダーゼ 10~20units を入れ、37°C, 1 晩インキュベートした。この反応液に内部標準として、4-ブロモジフェニルを加

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

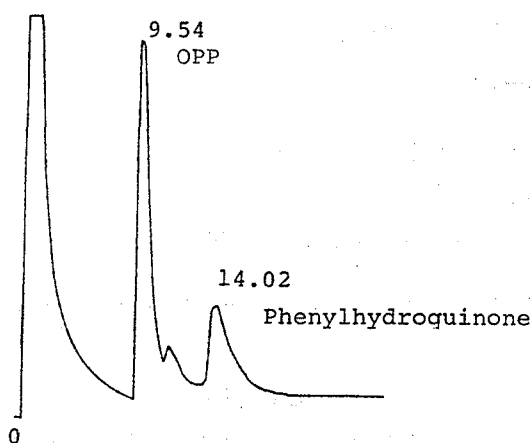


図 1. 尿中フェノール性代謝物のガスクロマトグラム。数字はリテンションタイム単位は分。

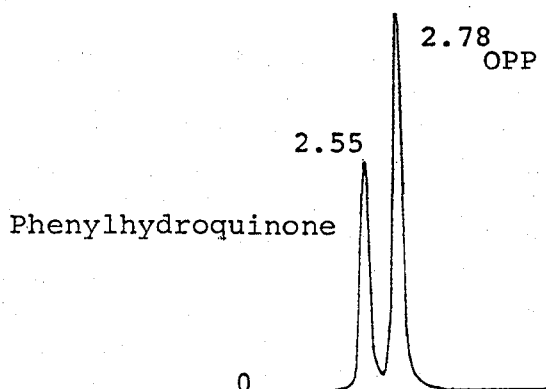


図 2. 尿中フェノール性代謝物の高速液体クロマトグラム。数字はリテンションタイム単位は分。

え、塩酸性として、酢酸エチル 2ml で 2 回抽出し、酢酸エチル層を 5% 炭酸水素ナトリウム 2ml で洗い、メタノールで希釈して用いた。これは、Horning らの方法を参考にした<sup>6)</sup>。高速液体クロマトグラフィーの装置は、バリアン VISTA54 (オートサンプラー付き) にデータシステム VISTA401 をつなぎ、Micro pak MCH-10 (0.4×30cm) で 10 $\mu$ l のループをつけ、1.0ml/min でメタノールを流し、300nm の吸光度で検出した。(図 2)

グルクロン酸の定量：検液をスルファミン酸 0.4M、ホウ酸ナトリウム 0.1M の混液で 0.2ml とし、濃硫酸 1.2ml をよく混和し、0.2% カルバゾール (エタノール溶液) 0.05ml を加え、10 分間沸騰水中で加熱し、冷後富士光

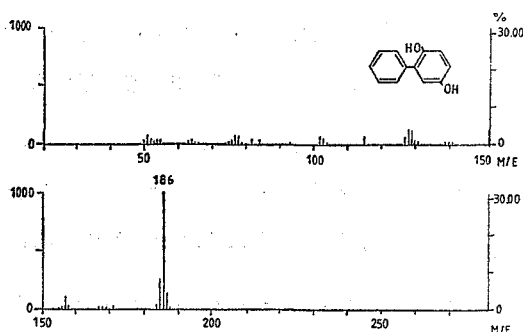


図 3. 尿中代謝物のマススペクトラム。右上はフェニルハイドロキノンの構造式

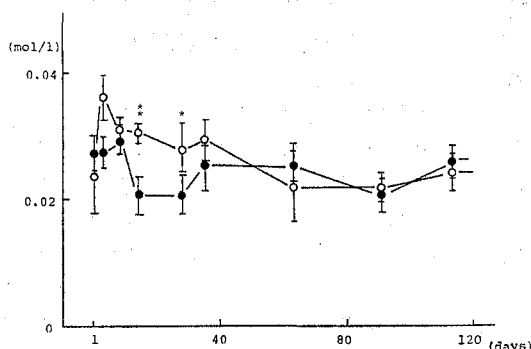


図 4. 尿中 OPP 濃度の変化  
横軸は投与日数。○オス、●メス。上下の線は標準偏差。(n=5)  
\* P<0.05 \*\* P<0.01

電光度計 ADS-Hg を使用して、540nm の吸光度を測定した。

### 結果と考察

尿中フェノール性代謝物をガスクロマトグラフィーで調べたところ、ピークが 2 つ検出された(図 1)。標準物質との関係より、リテンションタイム 9.54 分の物質は OPP である。リテンションタイム 14.02 分の物質を確認するために、マススペクトルを調べた(図 3)。標準物質フェニルハイドロキノンのリテンションタイム、フラグメントとも一致したので、この代謝物をフェニルハイドロキノンの代謝物と確認した。一般の芳香族化合物と同様、より極性の大きい水酸化の方向に代謝されている。この代謝物の毒性に関しては、現在さまざまな方向から調査されている<sup>7-9)</sup>。

尿中 OPP 濃度の変化については、図 4 に示したが、45 日までは、オス (0.03mol/l)、メス (0.02mol/l) の間にかなりの差がみられた。しかし、それ以後、差は減少

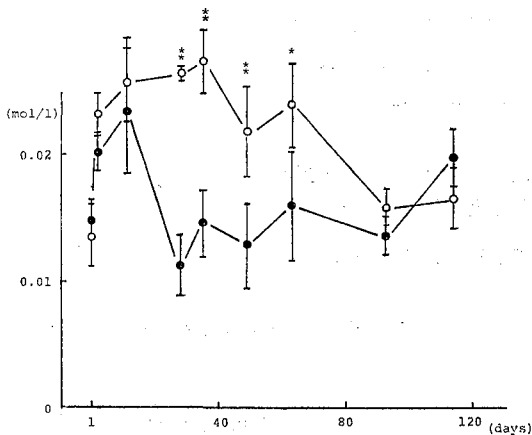


図 5. 尿中フェニルハイドロキノン濃度  
横軸は投与日数. ○オス, ●メス. 上下の線は  
標準偏差. (n=5)

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

し、両方とも  $0.02 \text{ mol/l}$  前後であった。代謝物フェニルハイドロキノン濃度 (図 5) は、80 日までは、オスとメスとは有意に差が認められたが、それ以降はメスもオスと同じ位まで上昇した。

尿中グルクロン酸濃度の変化 (図 6) は、OPP 濃度の変化と一致して、45 日まではオスとメスの間には、有意に差があった。OPP および代謝物の排泄量に対応して、グルクロン酸量は変化しているようである。

オスは、早い時期に代謝酵素が誘導され、フェニルハイドロキノンを大量に排泄する。メスは、オスと同程度に代謝するようになるのは、かなり遅い時期であると考えられ、P-450 の増加のパターンを解析すると、この現象と一致し、オスでは、OPP 投与群で明らかな上昇を示し、メスでは、その差は著しくはなかった<sup>10)</sup>。尿中代謝物の質的な差異に加えて  $10 \text{ mM}$  以上という濃度の量的な差異が示す代謝の相異が、オスに著しく早い膀胱ガンの発生を説明できるのではないかと考え実験をすすめている。

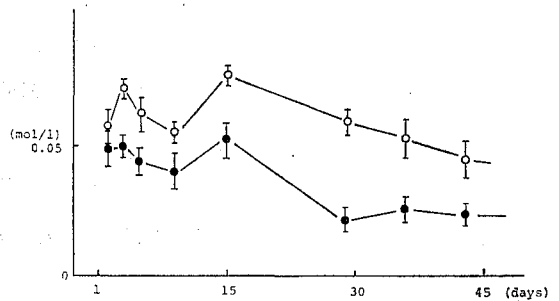


図 6. 尿中グルクロン酸濃度  
横軸は投与日数. ○オス, ●メス. 上下の線は  
標準偏差. (n=5)

## 文 献

- 1) Hiraga, K. and Fujii, T.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 303, 1981
- 2) 樺島順一郎, 中尾順子: 東京衛研年報, 32-2, 61, 1981
- 3) 船久保英一: 有機化合物確認法 I, 14, 1967, 養賢堂
- 4) 大槻慶子, 樺島順一郎, 中尾順子: 東京衛研年報, 32-2, 51, 1981
- 5) Meyer, T. and Scheline, R. R.: *Acta Pharmacol. et toxicol.* 39, 419, 1976
- 6) Horning, M. G. and Gregory, J.: *Clin. Chem.* 20, 282, 1974
- 7) 吉田誠二, 佐々木美枝子, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 32-2, 111, 1981
- 8) 大野知子, 長井二三子, 中尾順子: 東京衛研年報, 33, 477, 1982
- 9) 中川敦子, 中尾順子: 東京衛研年報, 33, 473, 1982
- 10) 藤谷和正, 牛山慶子, 中尾順子: 東京衛研年報, 33, 470, 1982

## オルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) の ラット尿中酵素活性およびタンパク質への影響

長井 二三子\*, 中尾 順子\*

### Effect of *o*-Phenylphenol Sodium Salt (OPP-Na) on Enzymes and Proteins in Rat Urine

FUMIKO NAGAI\* and TOSHIKO NAKAO\*

**Keywords:** オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, ラット rats, 尿 urine,  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GTP)

#### 緒 言

オルトフェニルフェノール (OPP) は輸入柑橘類の防かび剤として使用されているが、当毒性部においてOPPナトリウム (OPP-Na) のラットへの長期投与がぼうこうがんを発生させることを報告<sup>1)</sup>した。さらにこの発がんの機構を解明するために種々の検討<sup>2-5)</sup>が行われているが、著者らは前報<sup>4)</sup>において細胞膜酵素に注目し、尿中に出現する $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ ( $\gamma$ -GTP) の活性および肝、腎中の  $\gamma$ -GTP, アルカリフォスファターゼ, Na, K-ATPase などの活性への OPP-Na の影響について報告し、特に著しい肝  $\gamma$ -GTP の活性上昇を報告した。今回は主として尿中に現われる  $\gamma$ -GTP の活性やタンパク質についてOPP-Naがおよぼす影響を尿のゲルクロマトグラフィー, SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動などによってくわしく調べた。

#### 方 法

4週令のフィッシャー (F344/DuCrj) ラットを日本チャールズリバー社より購入し、一週間予備飼育後、2% OPP-Na含有飼料を用いて約4ヶ月間飼育し、その間一日につき6時間尿を集めた。飼育および採尿に関する詳細は前報において樺島等<sup>5)</sup>が報告した。本実験に用いた尿は、すべて採尿後ビスキングチューブにつめ4℃で一晩再留水に対して透析したあと-80℃に保存したものである。

$\gamma$ -GTP 活性, アルカリフォスファターゼ活性は前報<sup>4)</sup>に示した方法で行った。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は Laemli<sup>6)</sup> または Fairbanks et al<sup>7)</sup> の方法に従った。

ラット尿のゲルクロマトグラフィーは 2.6×30cm の

Sephacrose Cl-4B のカラムを用い、200mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH8.0 の溶出液によって行った。約 1 ml のラット尿を上記のカラムにより分画し、溶出された液を ISCO MODEL UA4 吸収モニターを用いて 280nm の吸収を記録しながら分画した。分画液について  $\gamma$ -GTP 活性, アルカリフォスファターゼ活性の測定および SDS-PAGE を行った。さらにラット尿をベックマン超遠心機により 40A ローターで 40,000 rpm, 一時間遠心し、上清と沈殿にわけ、これらについても SDS-PAGE を行った。

#### 結 果

OPP-Na 投与による尿中  $\gamma$ -GTP 活性の変化を約 20 週間にわたって観察し、結果を図 1 に示した。対照群、投与群ともに雄ラット尿中  $\gamma$ -GTP 活性は雌よりも高く、OPP-Na 投与の影響は投与開始一日目ですでに現われており、雄雌ともに OPP-Na 投与群の活性が減少していた。その後約 20 週間の観察期間中常に OPP-Na 投与尿の  $\gamma$ -GTP 活性は対照群に比べて低下を示した。

尿中に出現するタンパク質と酵素活性の関係を知る目的で、ラット尿のゲルクロマトグラフィーを Sepharose Cl-4B を用いて行った。図 2 に投与開始後 2 週間目の雄と雌のラット尿のゲルクロマトグラフィーの結果を示した。 $\gamma$ -GTP およびアルカリフォスファターゼの活性はボイドボリュームに相当する溶出量 50ml の部位にある 280 nm の吸収ピークに一致していた。OPP-Na 投与尿のゲルクロマトグラフィーにおいてはボイドボリュームに溶出される  $\gamma$ -GTP 活性もアルカリフォスファターゼ活性も減少していた。ボイドボリュームに溶出してくるタンパク質は対照群では飼育日数を増すごとに増大し、OPP-Na

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

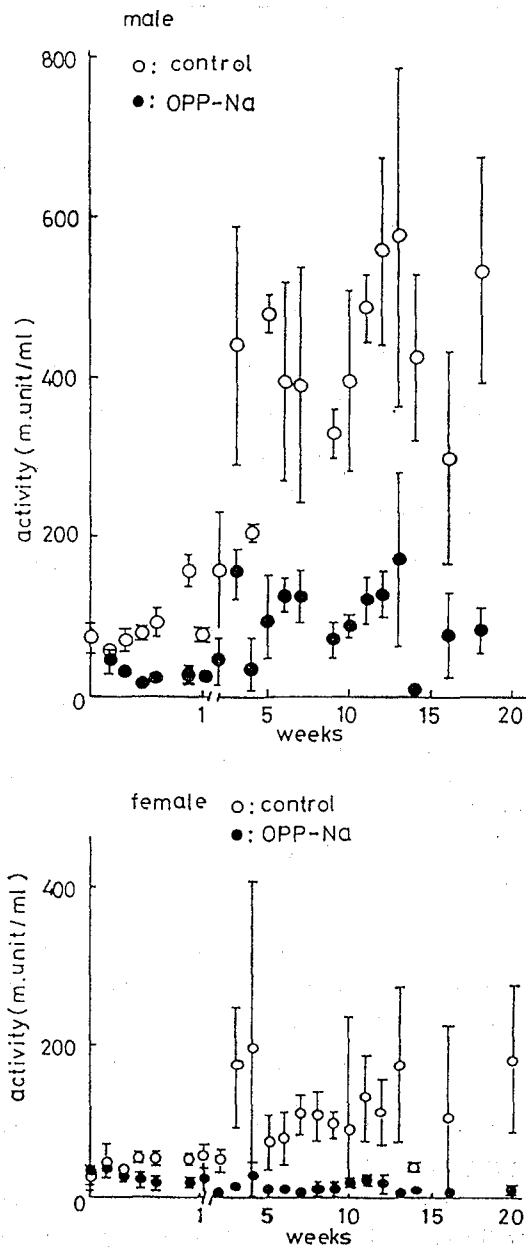


図 1. OPP-Na 投与ラット尿中  $\gamma$ -GTP 活性の変動

投与雄ラット尿においてはこの部分に溶出されるタンパク質の増加率は対照に比べて低かった。また、雌ラット OPP-Na 投与尿では増加傾向はみられなかった。(図 3)

次いでこれら尿中タンパク質のペプチドの大きさを SDS-PAGE により調べた。OPP-Na 投与により次第に

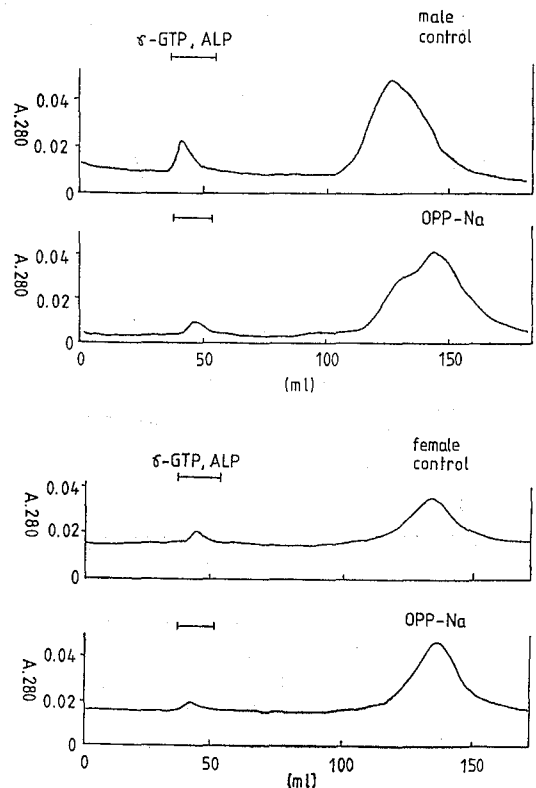


図 2. ラット尿のゲルクロマトグラム  
縦軸 O.D. 280nm, 横軸: 溶出量 (ml)

アルブミン分画の増加を示し、分子量60,000附近のペプチドの欠損が見られた。雌尿についてはアルブミンに相当する部分に若干の増加が見られる程度であった。

#### 考 察

尿中の  $\gamma$ -GTP 活性は OPP-Na 投与開始一日目より減少していた。また尿の Sepharose Cl-4B によるゲルクロマトグラフィーによる結果から  $\gamma$ -GTP とアルカリフォスファターゼ活性はボイドボリュームにのみ現われ、OPP-Na 投与尿では  $\gamma$ -GTP 活性の減少とともにボイドボリュームに出てくる分画のタンパク質が対照尿より少なくなった。尿中の  $\gamma$ -GTP およびアルカリフォスファターゼは腎由来であると考えられており<sup>8)</sup>、腎の  $\gamma$ -GTP やアルカリフォスファターゼは尿細管の上皮細胞に高い密度で分布すると言われている。ゲルろ過の結果および遠心分画による結果からラット尿中の  $\gamma$ -GTP、アルカリフォスファターゼはこの上皮細胞のターンオーバーに伴って尿細管から尿中に直接逸脱してきた細胞またはその破片中に存在していると考えられた。OPP-Na 投与によ

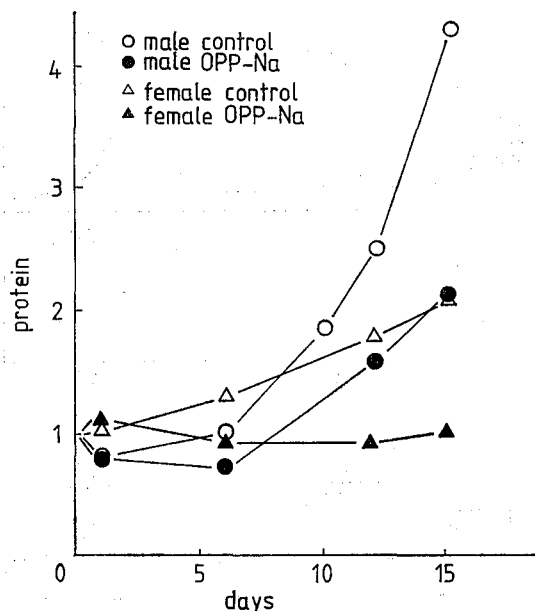


図 3. 投与日数とポイドポリウムに分画されるタンパク質量との関係  
縦軸：投与開始日のポイドポリウムに分画されるタンパク質量に対する比率。

って尿中の  $\gamma$ -GTP 活性が減少したのは OPP-Na 投与によって尿路上皮に何らかの損傷が生じた可能性を示唆した。しかし尿管障害の場合増加するといわれている  $\beta_2$ -ミクログロブリン (M. W. 11800)<sup>9)</sup> の含量については SDS-PAGE では見出すことができず、今後さらに検討しなければならないであろう。

またゲルクロマトグラフィーによってポイドポリウムに分画されてくるタンパク質は SDS-PAGE によるとベブチド量 10 万ダルトンのものが主なバンドであり、後半に溶出されてくる部分にはアルブミンやそれよりも分子量の小さいバンドが見られた。これらのことは尿を 105,000  $\times$  g、一時間遠心し、沈殿と上清に別けて SDS-PAGE したところ、沈殿部分では 10 万のバンドが主であり、上清部分ではアルブミン部分およびそれよりも低分子量のものが見られた結果とほぼ一致した。

原尿の SDS-PAGE では OPP-Na 投与尿ではアルブミン含量が増加しており、糸球体の障害による透過性の亢進も生じている可能性を考える必要があろう。

*in vitro* の OPP-Na の  $\gamma$ -GTP の阻害については、OPP-Na,  $1 \times 10^{-3}$  M により  $\gamma$ -GTP は阻害されず、OPP-Na の代謝産物のフェニルヒドロキノンでは  $1 \times$

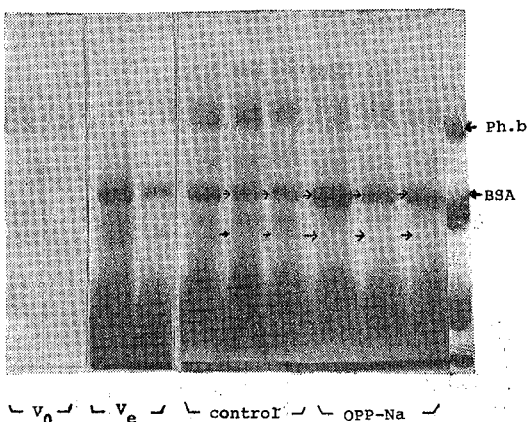


図 4. ラット尿の SDS-PAGE.  
7.5% の Laemli の系によって泳動した。  
Control: 対照ラット尿  
OPP-Na: OPP-Na 投与ラット尿  
Vo: ゲルろ過によって得られたポイドポリウム分画  
Ve: ゲルろ過によって得られた後半の分画

$10^{-3}$  M で約 30% の阻害が見られた。牛山ら<sup>10)</sup>によれば OPP-Na 投与ラット尿には OPP およびその代謝産物であるフェニルヒドロキノンのグルクロン酸抱合体が 20 mM 以上存在するので、これらのものが直接的に  $\gamma$ -GTP 活性を阻害することが考えられる。しかし本実験に用いた尿は透析尿であり、OPP および OPP 由来物質はほぼ除去されているので活性測定時にはこれらのものによる阻害は考えられない。これらの物質が尿中に存在する  $\gamma$ -GTP を不可逆的に失活させる可能性もあるが、Sephacrose Cl-4B を用いた分画の結果から、尿路上皮の障害が主たる変化と考えられる。

#### 要 約

- 1) OPP-Na 投与ラット尿の  $\gamma$ -GTP 活性は投与開始 1 日目より約 20 週間の飼育期間中、常に減少していた。
- 2) ラット尿中  $\gamma$ -GTP, アルカリフォスファターゼは Sepharose Cl-4B によるゲルろ過でポイドポリウムに溶出されてきた。
- 3) OPP-Na 投与尿はゲルろ過によるとポイドポリウムに溶出される  $\gamma$ -GTP, アルカリフォスファターゼ活性およびタンパク質が減少した。
- 4) OPP-Na 投与尿中のアルブミンの含量が増加した。

## 文 献

- 1) Hiraga, K., Fujii, T. : *Fd cosmet, Toxicol.*, 19, 303, 1981
- 2) 大槻慶子, 樺島順一郎, 中尾順子 : 東京衛研年報, 32-2, 51, 1981
- 3) 中川敦子, 中尾順子 : 東京衛研年報, 32-2, 53, 1981
- 4) 長井二三子, 中尾順子 : 東京衛研年報, 32-2, 57, 1981
- 5) 樺島順一郎, 中尾順子 : 東京衛研年報, 32-2, 61, 1981
- 6) Laemmli, U.K. : *Nature*, 227, 680, 1970
- 7) Fairbanks, G., Steck, T.S. and Wallach, D.F.H. : *Biochemistry*, 10, 2606, 1971
- 8) Rosalki, S.B. : *Advanced in Cli. chem.* 17, 53, 1975
- 9) Peterson, P.A., Evin, P-E, and Berggard, I. : *J. Clin. Invest.*, 48, 1189, 1969
- 10) 牛山慶子, 樺島順一郎, 中尾順子 : 東京衛研年報, 33, 455, 1982

オルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) の  
ラット尿中酸性フォスファターゼにおよぼす影響 (第2報)

樺島 順一郎\*, 中尾 順子\*

Effect of Sodium *o*-Phenylphenate (OPP-Na) on Acid  
Phosphatase in Rat Urine (II)

JUNICHIRO KABASHIMA\* and TOSHIKO NAKAO\*

**Keywords:** 酸性フォスファターゼ acid phosphatase, オルトフェニルフェノールナトリウム sodium *o*-phenylphenate, ラット尿 rat urine

緒 言

前報<sup>1)</sup>で、防カビ剤オルトフェニルフェノールナトリウム (以下OPP-Naと略す) 2%添加飼料摂取ラットの尿のpH, 蛋白, グルコース, ケトン体と潜血の尿試験紙による検査と酸性フォスファターゼ (以下AcPと略す) 活性の変動について報告した。その際、尿試験紙による検査は試験37日目以後の尿について行ったため、雄ラットではすでに潜血反応が陽性のものがあつた。そこ

で今回は、尿中潜血発現時期を知るためと、AcP活性変動の再現性を検討するために再実験を行った。また、OPP-Na摂取ラットで排泄されるOPPやフェニルヒドロキノン<sup>2,3)</sup> (以下PHQと略す) などのAcPへの影響についても検討を行った。

実験材料および方法

1. 実験動物, 飼育条件, 投与方法, 測定方法 前報<sup>1)</sup>に準じて行った。

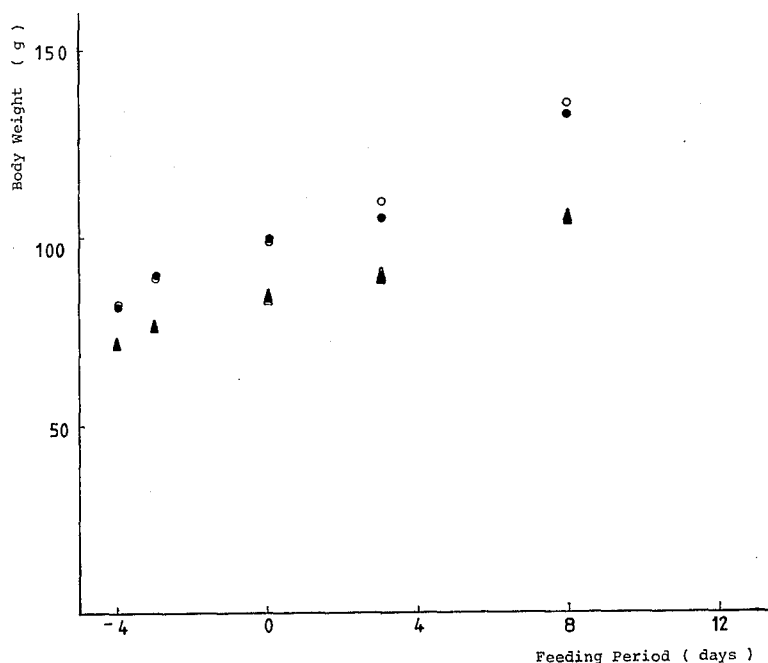


Fig. 1. Curves of Body Weights Gain of Rats

○ control (Male)    △ control (Female)  
● 2% OPP-Na (Male)    ▲ 2% OPP-Na (Female)

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan



Table 1. Urinalysis

| Sex                       |          | Female          |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |
|---------------------------|----------|-----------------|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|
| Days after administration |          | 4               |     | 5 |     | 6 |     | 7 |     | 8 |     | 9 |     | 10 |     | 11 |     | 12 |     | 15 |     | 36 |     | 43 |     | 50 |     | 57 |     | 70 |     |
| Dose                      | %        | 0               | 2.0 | 0 | 2.0 | 0 | 2.0 | 0 | 2.0 | 0 | 2.0 | 0 | 2.0 | 0  | 2.0 | 0  | 2.0 | 0  | 2.0 | 0  | 2.0 | 0  | 2.0 | 0  | 2.0 | 0  | 2.0 | 0  | 2.0 | 0  | 2.0 |
| pH                        | 5>       |                 |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |
|                           | 5-6      |                 |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |
|                           | 6-7      | 5 <sup>1)</sup> |     | 5 |     | 5 |     | 5 |     | 5 |     | 5 | 1   | 2  |     | 1  | 5   | 2  | 5   | 4  | 4   | 4  | 5   | 1  | 1   | 1  | 1   | 5  | 4   | 1  | 5   |
|                           | 7-8      |                 | 5   |   | 2   |   | 2   |   | 4   |   | 5   |   | 4   | 3  | 5   | 5  | 4   | 3  |     | 1  | 1   | 5  |     | 4  | 4   | 4  |     |    | 4   | 1  | 5   |
|                           | 8<       |                 |     |   | 3   |   | 3   |   | 1   |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     | 1  |     |    |     |
| Protein                   | —        |                 |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     | 5  | 5   | 5  | 5   |    |     |    |     |    | 5   |    |     |    |     |    |     | 1  |     |
|                           | 30mg/dl> | 1               | 2   | 2 | 1   | 5 | 4   | 4 | 5   | 5 | 5   | 5 |     |    |     |    |     | 5  | 5   | 4  | 4   | 5  | 5   | 5  |     | 4  | 5   | 1  | 4   | 4  | 5   |
|                           | 30mg/dl  | 4               | 3   | 3 | 4   |   | 1   | 1 |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     | 1  | 1   |    |     |    |     | 1  |     | 4  | 1   |    |     |
|                           | 100mg/dl |                 |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |
| Glucose                   | 300mg/dl |                 |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |
|                           | —        | 5               | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   |
| Ketone-Body               | 1/10%<   | 5               | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   |
|                           | —        | 5               | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   |
| Occult Blood              | 10mg/dl< | 5               | 2   | 5 | 2   | 5 | 4   | 5 | 4   | 5 | 3   | 5 | 5   | 5  | 3   | 5  | 5   | 5  | 4   | 5  | 4   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   |
|                           | —        |                 | 2   |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |
|                           | ±        |                 | 2   |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    | 1   |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |
|                           | +        |                 | 1   |   |     |   | 1   |   | 1   |   | 2   |   |     |    | 2   |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |
|                           | ++       |                 |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |
|                           | +++      |                 |     |   | 2   |   |     |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    | 1   |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |

| Sex                       |          | Male |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |
|---------------------------|----------|------|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|
| Days after administration |          | 4    |     | 5 |     | 6 |     | 7 |     | 8 |     | 9 |     | 10 |     | 11 |     | 12 |     | 15 |     | 35 |     | 42 |     | 49 |     | 56 |     | 71 |     |
| Dose                      | %        | 0    | 2.0 | 0 | 2.0 | 0 | 2.0 | 0 | 2.0 | 0 | 2.0 | 0 | 2.0 | 0  | 2.0 | 0  | 2.0 | 0  | 2.0 | 0  | 2.0 | 0  | 2.0 | 0  | 2.0 | 0  | 2.0 | 0  | 2.0 | 0  | 2.0 |
| pH                        | 5>       |      |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |
|                           | 5-6      |      |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |
|                           | 6-7      | 5    |     | 5 |     | 5 |     | 5 |     | 5 |     | 5 | 1   | 1  |     | 1  | 1   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 2   | 4  | 5   | 5  | 5   | 5  | 4   | 5  | 3   |
|                           | 7-8      |      | 5   |   | 3   |   | 4   |   | 5   |   | 5   |   | 4   | 4  | 5   | 4  | 4   |    |     |    |     | 3  | 1   |    |     |    |     |    | 1   |    | 2   |
|                           | 8<       |      |     |   | 2   |   | 1   |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |
| Protein                   | —        |      |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     | 5  | 5   | 5  | 5   |    |     |    |     |    | 4   |    |     |    |     |    |     |    |     |
|                           | 30mg/dl> | 5    | 5   | 5 | 5   | 5 | 1   | 5 | 4   | 5 | 4   | 5 | 3   |    |     |    |     | 5  | 5   | 3  | 3   | 5  | 1   | 1  | 5   | 5  | 5   | 5  | 2   | 5  | 1   |
|                           | 30mg/dl  |      |     |   |     |   | 4   |   | 1   |   | 1   |   | 2   |    |     |    |     |    |     | 2  | 2   |    | 1   | 1  | 3   |    |     | 3  |     | 4  |     |
|                           | 100mg/dl |      |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    | 1   | 1  | 3   |    |     |    |     |    |     |
| Glucose                   | 300mg/dl |      |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    | 3   |    | 1   |    |     |    |     |    |     |
|                           | —        | 5    | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   |
| Ketone-Body               | 1/10%<   | 5    | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   |
|                           | —        | 5    | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   |
| Occult Blood              | 10mg/dl< | 5    | 5   | 5 | 5   | 5 | 4   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5 | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   | 5  | 5   |
|                           | —        |      |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |
|                           | ±        |      |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |
|                           | +        |      |     |   |     |   | 1   |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |
|                           | ++       |      |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |
|                           | +++      |      |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |

1) No. of three Rats/cage

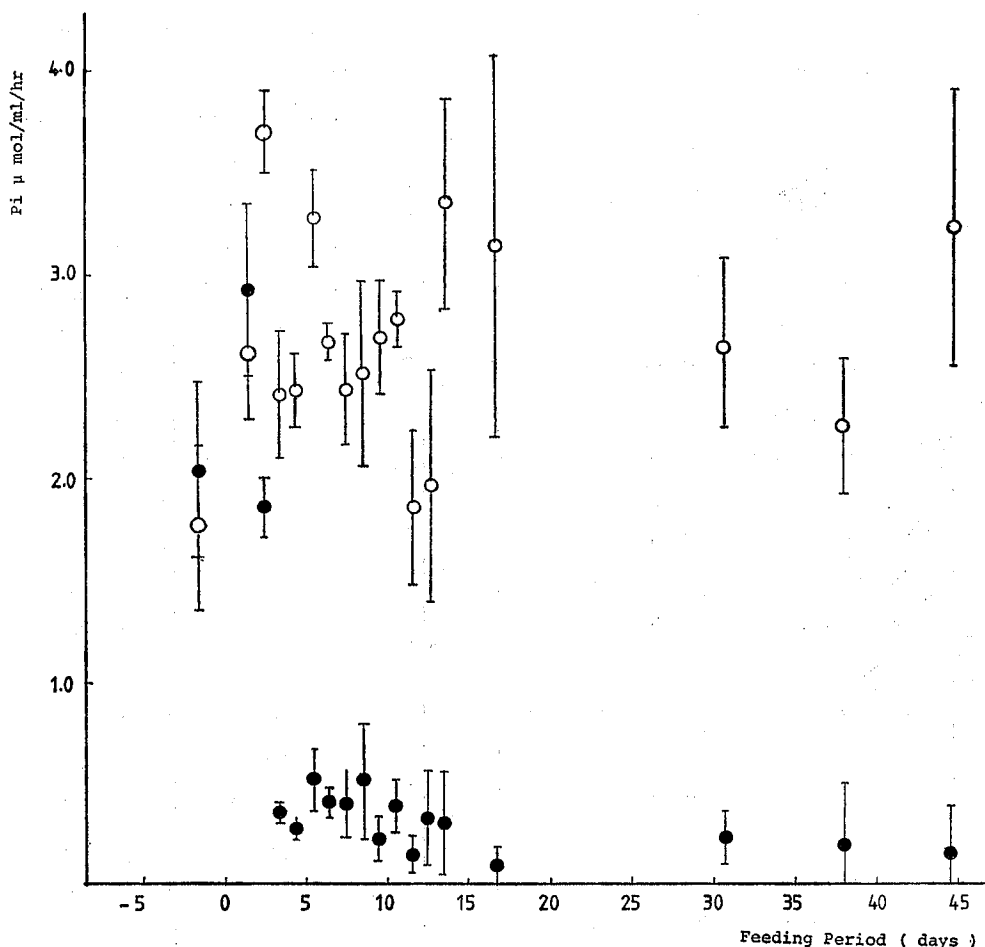


Fig. 2. Effect of OPP-Na on Urinary Acid Phosphatase Activity in Rat (Male)

○ Control ● 2% OPP-Na

2. 採尿方法 採尿は雌雄ともに、投与開始後12日目までは毎日、以後は1週1回の割合で採尿を行った。前回の実験では、投与初期にはラットが小さく、尿量が少なかったため、測定に支障をきたした。そこで今回は、1台の代謝ケージにラットを3匹ずつ入れた。その他の採尿操作は前報<sup>1)</sup>と同様の方法によった。採尿後、尿を2分し、一方は原尿のまま $-30^{\circ}$ に保存し、化学分析および生化学的分析に供した。化学分析については牛山<sup>2)</sup>が、生化学的分析については長井<sup>3)</sup>、中川<sup>4)</sup>らが報告する。もう一方は、氷室中でビスキングチューブを用いて透析を行った。透析には再蒸留水 2l を使用して一夜の透析を行い、透析外液は 1l ずつとして、1回だけ透析外液を交換した。透析尿は、 $-50^{\circ}$ に保存し、AcP 活性の測定を行った。

3. 尿中 AcP 活性の測定 測定方法は前報<sup>1)</sup>に準じて行い、OPP や PHQ による阻害の有無や、OPP-Na 投与ラットの透析尿が対照群の尿に与える影響についての検討を行った。

#### 実験結果と考察

一般状態および体重 雌の投与群で外陰部付近の体毛が茶褐色になったが、ほかは対照群と変わらなかった。体重は、雌雄とも投与開始直後から多少の増加の抑制が認められ、前報<sup>1)</sup>の結果と同様であった (Fig. 1)。

尿検査 Table 1 に投与開始4日目から70日目までの尿検査の結果を示した。pH は投与初期から投与群の方が高い傾向があり、蛋白は、雌よりも雄の方が高く、雄では投与開始7週目から、対照群に比較して投与群の方が高い傾向を示した。またグルコースとケトン体はすべ

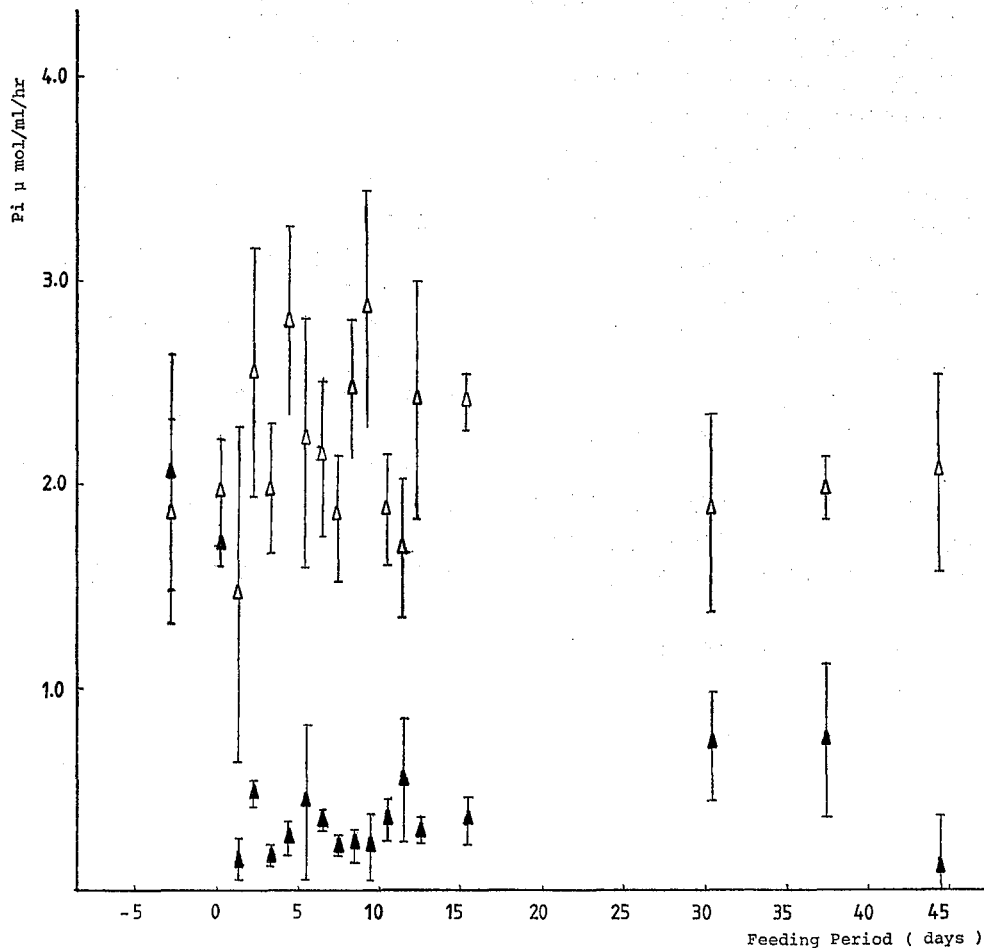


Fig. 3. Effect of OPP-Na on Urinary Acid Phosphatase Activity in Rat (Female)

△ Control    ▲ 2% OPP-Na

て陰性であり、前回の実験とはほぼ同様の結果であった。潜血反応は、雌では投与開始4日目にすでに陽性のものがあり、その後21日目までは陽性のものが認められた。雄では、12日目に1例陽性のものが認められた。このことから雌ではかなり強い一過性の障害が腎あるいは尿路系に起り、以後回復しているものと推察されるが、雄では初期における陽性例はわずかに1例であるため、腎や尿路系の障害によるものか他の原因によるものか不明である。その後の検査では、雄に42日目から潜血反応が陽性のものが出現し、以後、反応の出現と消失をくり返し、全体的に陽性の度合いが高くなる傾向を示し、前報<sup>1)</sup>の結果と一致した。

**尿中 AcP 活性** Fig. 2および Fig. 3に酵素活性の変動を示した。前報<sup>1)</sup>での報告と同様に、投与開始直後から、

著明な活性の低下が起り、雌では投与開始の翌日から、雄では2日目から、対照群と比較して明らかに有意な差があった。AcP活性は、Fiske-SubbaRowの方法によって、遊離したリン酸を定量するため、リン酸の発色に対する尿の影響を検討したが盲検値が幾分高くなるが大きな影響はなかった。透析後の尿中にもOPPやPHQが少量存在する可能性もかなり高いため、OPPやPHQによるAcP活性に対する阻害についても検討したが、両物質とも、データーには示していないが、0.5mMから5mMの濃度では阻害は認められなかった。また対照群の透析尿にOPP-Na投与群の透析尿を添加してAcP活性を測定した結果、対照群の尿20μlの活性を100%としたとき、対照群の尿にOPP-Na投与群の透析尿を20, 50, 100μlを添加したとき、それぞれの残存活性は、88

%, 84%, 28%となった。この結果からOPP-Na投与群の透析尿には、活性の阻害作用があることが認められ、たかい酵素活性測定に用いた量では阻害度が10%前後であるため単なる代謝物の阻害とは考えにくい。また長井らによって、OPP-Na投与群の尿中には酵素量自体が少ないか、酵素の活性が低いことが報告されているが<sup>4,7)</sup>、OPP-Na投与群でのAcP活性が低いことは、アルカリフォスファターゼや $\gamma$ -GTPなどと関連ある障害が起った結果であると推察される。なお前報<sup>1)</sup>での、AcP活性を示した図では活性の単位に誤りがあり、実際の活性は表記の1/10である。

#### ま と め

OPP-Na 2%添加飼料摂取ラット尿の潜血反応とAcP活性の変動を検討した。

1. 潜血反応は、雌では4日より認められたが、その発生頻度は、だんだん減少し15日以降、一度完全に消失した。雄では、42日目より発現し、出現と消失をくり返した。

2. 尿中のAcP活性は、雌雄とも低下し、2日で最

低のレベルに達し、以降これを持続した。OPPやPHQの濃度が5mM以下のときには、AcP活性は阻害を受けなかったが、OPP-Na投与ラットの透析尿は、対照群の尿中のAcP活性を阻害した。

#### 文 献

- 1) 樺島順一郎, 中尾順子: 東京衛研年報, 32-2, 61, 1981
- 2) 大槻慶子, 樺島順一郎, 中尾順子: 東京衛研年報, 32-2, 51, 1981
- 3) 牛山慶子, 樺島順一郎, 中尾順子: 東京衛研年報, 33, 455, 1982
- 4) 長井二三子, 中尾順子: 東京衛研年報, 33, 458, 1982
- 5) 中川敦子, 中尾順子: 東京衛研年報, 33, 473, 1982
- 6) Fiske, C.H. and SubbaRow, Y.H.: *J. Biol. Chem.* 66, 375, 1925
- 7) 長井二三子, 中尾順子: 東京衛研年報, 32-2, 57, 1981

## オルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) の ラット尿中アルカリフォスファターゼにおよぼす影響

小林 博 義\*, 樺 島 順一郎\*, 中 尾 順 子\*

### Effect of Sodium *o*-Phenylphenate (OPP-Na) on Alkaline Phosphatase in Rat Urine

HIROYOSHI KOBAYASHI\*, JUNICHIRO KABASHIMA\* and TOSHIKO NAKAO\*

**Keywords** : アルカリフォスファターゼ Alkaline phosphatase, オルトフェニルフェノールナトリウム Sodium-*o*-phenylphenate, ラット Rat, 尿 Urine

#### 緒 言

オルトフェニルフェノール (以下 OPP) は食品添加物として、柑橘類の防カビ剤に用いられている。当部で行なった、急性および亜急性毒性試験の結果、オルトフェニルフェノールナトリウム (以下 OPP-Na) は尿路系に障害を示し、さらに膀胱での腫瘍発生が報告<sup>1-3)</sup>されている。先に OPP-Na 投与ラットの尿中酵素の変動と膀胱腫瘍の関連として樺島らが酸性フォスファターゼにおよぼす影響を検討して発表した<sup>4)</sup>。今回 OPP-Na 投与ラットの尿中アルカリフォスファターゼ活性 (以下 U-ALP) について検討したので報告する。

#### 実験材料および方法

**実験動物** フイッシャー系ラット F344/DuCrj (日本チャールスリバー社) を生後4週令で購入、1週間予備飼育し5週目より、2% OPP-Na 含有固型飼料 (日本クレア C E-2) で159日間飼育した。

尿は、メタボリカ (スギヤマゲン製) で採取し、再蒸留水で透析後酵素活性測定用尿として調製<sup>4)</sup>し、ガラスビンに密封し、-80° で保存した。測定にあたり、氷水中において融解後測定に用いた。なお採尿、透析条件は樺島の報告<sup>4)</sup>の通りである。

**試薬** P-ニトロフェニルリン酸ニナトリウム、試薬東京化成工業株式会社製 水酸化ナトリウム 試薬特級、関東化学株式会社製、グリシン、塩化マグネシウム 試薬特級、和光純薬株式会社製を用いた。試薬調製は再蒸留水を用いた。

#### 測定方法

1) U-ALP 活性の測定法 Bessey Lowry Brock 法に準じて行なった。すなわち0.05Mグリシン緩衝液 (pH

10.50) 250 $\mu$ l に検体 20 $\mu$ l を加え37°30分 incubation し0.02N. NaOH を加えて反応停止後氷水中に浸し、吸光度 (400nm) をただちにギルフォード 300N分光光度計により測定<sup>5)</sup>した。

なお樺島ら<sup>4)</sup>はOPP-Na投与ラットの尿中にOPP-Naならびに代謝産物が含有されているため測定に支障をきたしたことを報告しているため、このことについて、本条件下で検討し、支障がないことを確認した。

2) 血清生化学的検査 断頭採血後に冷却遠心機で、1時間3000回転で分離して得た血清を-80°に保存し、測定時氷水中で融解し実験に供した。自動分析装置<sup>6)</sup> : 日立M400により、総蛋白量 (TP), グルコース量 (GLU) 尿素窒素量 (S-UN), グルタミン酸ピルビン酸アミノ基転移酵素活性 (GPT) グルタミン酸オキサロ酢酸アミノ基転移酵素活性 (GOT), アルカリフォスファターゼ活性 (ALP), 総コレステロール量 (CHO) アルブミン量 (ALB) について測定を行なった。

#### 結 果

1) 尿中ALP活性 Fig. 1に示したように、尿中ALP活性は雌雄とも OPP-Na 投与群では投与開始24時間後の尿ですでに ALP活性の低下がみられ、以後OPP-Na投与群 ALP 活性は対照群の50~30%の値を示した。

2) 血清生化学的变化 Table 1に示したようにOPP-Na投与群において、全般的に著明な変化はみられなかったが、雌の GOT のみが有意に低下した。

#### 考 察

OPP-Na は尿中 ALP に対して投与開始後早期より抑制的作用を有する結果を得た。市川ら<sup>7)</sup>は、OPP-Naを用いて、ラットの生体内運命に関する実験を行ない、

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

1回投与では比較的早く(24時間), その多くが体外に排出されることを報告している。また大槻ら<sup>8)</sup>はOPPおよび代謝産物である, 2, 5ジハイドロオキシフェニールの尿中排泄も速いことを報告している。このことから今回得た OPP-Na 投与ラット尿中 ALP 測定の結果は OPP ならびに代謝物質による阻害の可能性が推察された。

血清生化学的検査の結果は, 全般的にみて著明な変化はみられなかったが, GOT が雌にのみ対照に比し有意に低下した。

一方, 井口ら<sup>9)</sup>, 樺島ら<sup>4)</sup>により尿のpHが OPP-Na 投与群でアルカリに傾くことが指摘されているが, この pH の変化は尿中 ALP 活性に影響するほどでないと考える。

また樺島<sup>4)</sup>らは尿検査(ろ紙法, マイルス社製)を OPP-Na 投与 4 日目より行なっているが, 尿検査結果の潜血と本実験より得た ALP 活性測定結果は相関はないように思われる。データーには示さなかったが, 対照尿に OPP-Na を添加した時, ALP 活性が抑制されなかったことより OPP-Na 投与群でみられる尿中 ALP 活性の減少は OPP-Na そのものでなく何らかの代謝産物の作用か, ALP 酵素蛋白の減少ではないかと推察される。今後この方面の研究をすすめたい。

### ま と め

OPP-Na の 2% 添加飼料をラット雌雄に投与し, 尿中 ALP 活性を測定しつぎの結果を得た。

尿中 ALP 活性は, 雌雄ラットにおいて投与直後より減少し, 継続した。

### 文 献

- 1) 田山邦昭, 井口重孝, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 57, 1979
- 2) 井口重孝, 田山邦昭, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 67, 1979
- 3) Hiraga, K. and Fujii, T.: Fd Cosmet. Toxicol., 19, 303, 1981
- 4) 樺島順一郎, 中尾順子: 東京衛研年報, 32-2, 61, 1981
- 5) 山村雄一, 勝沼信彦, 藤井節郎: 臨床酵素学必携, 南山堂, 436, 1966
- 6) 中川好男, 福田向江, 紫 英子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 25, 599, 1974
- 7) 市川久次, 小林博義, 中尾順子: 東京衛研年報, 33, 451, 1982
- 8) 大槻慶子, 樺島順一郎, 中尾順子: 東京衛研年報,

Table 1. OPP-Na 投与ラット血清生化学的検査

|               | TP g/dl                | GLU mg/dl                    | SUN mg/dl                | GOT u/ml                     | GPT u/ml                 | ALP u/dl                 | CHO mg/dl                    | ALB mg/dl                |
|---------------|------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|
| Male<br>N=5   | 6.50±0.24<br>6.58±0.86 | 167.20±11.28<br>156.80±20.15 | 22.50±1.00<br>22.50±3.18 | 157.60±17.18<br>156.40±14.36 | 42.20±5.76<br>43.20±4.21 | 72.00±6.82<br>70.60±6.27 | 231.80±10.43<br>250.00±12.61 | 51.80±5.50<br>57.40±6.19 |
| Female<br>N=5 | 6.90±0.27<br>6.78±0.38 | 175.80±10.23<br>166.80±16.13 | 20.70±2.91<br>22.00±3.55 | 198.60±8.56<br>150.00±12.33* | 50.20±2.78<br>40.40±3.65 | 63.00±4.30<br>61.40±5.23 | 261.60±48.46<br>293.20±16.77 | 59.40±3.13<br>58.60±4.56 |

Control  $\bar{x} \pm SD$   
OPP-Na  $\bar{x} \pm SD$

\* 対照群と比較し  $P < 0.05$

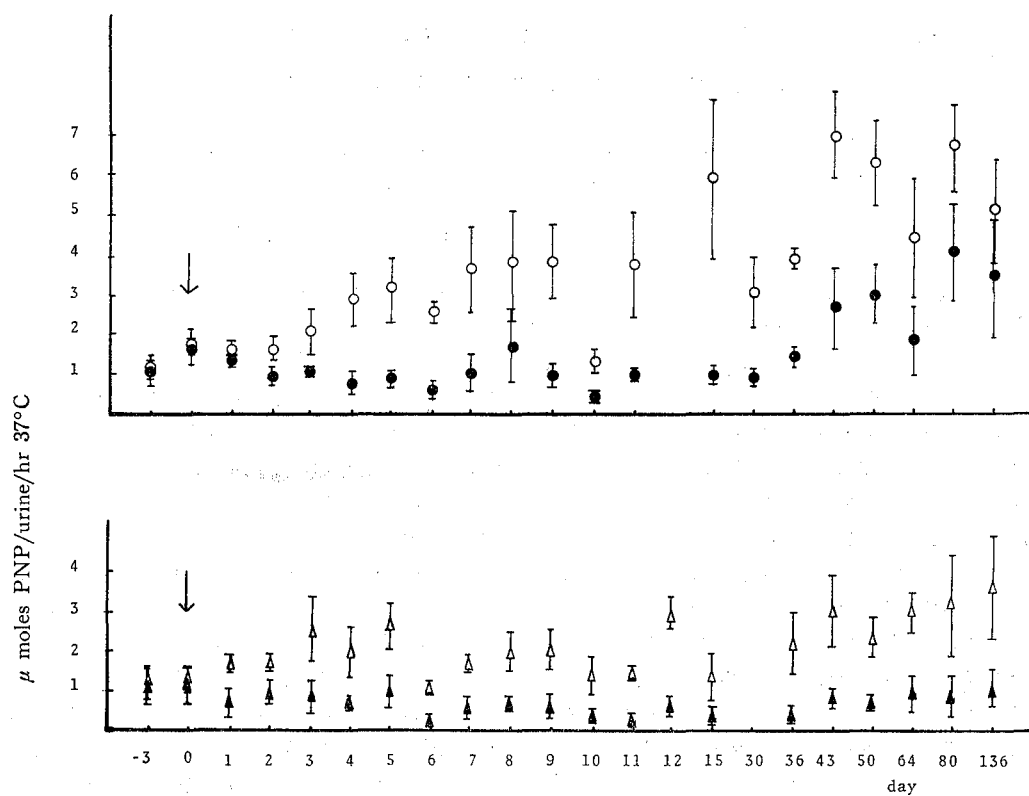


Fig. 1. ○ 雄対照群 ● 雄 OPP-Na 投与群  
 △ 雌対照群 ▲ 雌 OPP-Na 投与群  
 ↓ OPP-Na 投与開始

32-2, 51, 1981

9) 長井二三子, 中尾順子: 東京衛研年報, 32-2, 57, 1981

## オルトフェニルフェノール投与ラット肝ミクロゾームフラクションの SDS ゲル電気泳動像

藤谷 和正\*, 牛山 慶子\*, 中尾 順子\*

### SDS-Gel-Electrophoretic Profile of Liver Microsome Fractions of Rats Injured with *o*-Phenylphenol

KAZUMASA FUJITANI\*, KEIKO USHIYAMA\* and TOSHIKO NAKAO\*

**Keywords:** オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, 肝ミクロゾーム liver microsome, チトクローム P-450 cytochrome P-450, SDS ゲル電気泳動 SDS gel electrophoresis

#### 緒 言

オルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) 投与により, ラットの尿路系の発癌が報告されている<sup>1)</sup>. 尿中代謝物の排泄は, グルクロン酸抱合体としての OPP の他に, 5 の位置が OH 化された 2,5-dihydroxydiphenyl (phenylhydroquinone, PHQ) が約 1/3 含まれていた<sup>2,3)</sup>. このことは肝中での OH 化が活発に行われていることを推定させ, 肝薬物代謝活性についての変動に興味を持たれた. 本報告では, cytochrome P-450 を指標として肝中薬物代謝酵素を, また SDS ポリアクリルアミド電気泳動により肝ミクロゾーム中のペプチド分子の変動を調べた.

#### 材料および方法

**実験動物** フィッシャー系ラット (F344/DuCrj) 雌雄, 4 週令のものを日本チャールズリバー(株)より購入, 1 週間予備飼育後, 2% OPP-Na を含む飼料で約 5 カ月間飼育した. 飼育の詳細は, 樺島ら<sup>4)</sup>が報告した通りである.

**実験方法** 1. 肝ミクロゾーム画分の調製 100 日目および 165 日目にラットを断頭屠殺し, 採取した肝臓, 各群 2~3 匹分を 0.9% NaCl で灌流洗浄後, 川野ら<sup>5)</sup>の方法に準拠して肝ミクロゾーム画分を調製, 4 倍容の 0.1M リン酸緩衝液 pH7.0 に懸濁希釈して凍結保存し, 以後の実験に供した.

2. タンパク濃度の測定 タンパクの定量は, Bradford<sup>6)</sup>の方法により, 標準として BSA 溶液を用いた.

3. 電気泳動による分画 ミクロゾーム画分の一部を分取し, 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  になるように水で希釈して泳動用試料とした. 電気泳動は Fairbanks ら<sup>7)</sup>の方法および Laemmli<sup>8)</sup>の方法に準拠, これを改変し, SDS ポリアク

リルアミドスラブゲル電気泳動を行なった.

(1) Fairbanks らの方法を改変した方法 分離ゲルは終濃度 7.2% acrylamide, 0.27% Bis(N, N'-methylenebisacrylamide), 40mM Tris, 2mM EDTA-2Na, 20mM sodium acetate (pH 7.4), 1% SDS (sodium dodecyl sulfate), 0.025% TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine), 0.15% ammonium persulfate で, 2mm 厚とした. スペーサーゲルは終濃度 2.8% acrylamide, 0.105% Bis, 20mM Tris, 1mM EDTA-2Na, 20mM sodium acetate (pH 6.4), 1% SDS, 0.05% TEMED, 0.3% ammonium persulfate とした.

試料を処理用緩衝液と混ぜ, 終濃度 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  protein, 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA-NaOH (pH 8.0), 10% sucrose, 1% SDS, 40mM DTT (dithiothreitol), 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pyronin Y とし, 45~50°C の水浴中で 20 分間加温した. 分子量の標準として Pharmacia Fine Chemicals の Electrophoresis Calibration Kit を同様に処理した.

泳動緩衝液は終濃度 40mM Tris, 2mM EDTA-2Na, 20mM sodium acetate (pH 7.4), 1% SDS を用いた.

試料溶液各 10  $\mu\text{l}$  を夫々の well にのせ, 40V 定電圧で泳動を始め, dye front が分離ゲルにはいりきったら 80V 定電圧に変えた. はじめから, およそ 4 時間で終了した.

染色条件は①液 25% isopropylalcohol, 10% acetic acid, 0.025% CBB R-250 に一晩浸漬し, 次に②液 10% isopropylalcohol, 10% acetic acid, 0.0025% CBB R-250 に 4~6 時間浸漬, 最後に③液 10% acetic acid に替え, 発泡ウレタンを浮かべて約 50°C の水浴中で, 時々液を交換して一日以上浸漬した.

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan



(2) Laemmli の方法を改変した方法 分離ゲルは終濃度 10% acrylamide, 0.267% Bis, 0.15M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS, 0.05% TEMED, 0.5% ammonium persulfate, スペーサーゲルは 3% acrylamide, 0.08% Bis, 0.0625M Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS, 0.05% TEMED, 0.1% ammonium persulfate とした。

試料を処理用緩衝液と混ぜ、終濃度  $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$  protein, 0.0625M Tris-HCl (pH 6.8), 15% glycerol, 5% SDS, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol, 3ppm BPB とし、45~50℃ の水浴中で20分間加温した。

泳動緩衝液は 0.05M Tris, 0.384M glycine, 0.1% SDS とした。

他は、(1)と同様に行なった。

4. **cytochrome P-450 の測定** Omura and Sato の方法<sup>9)</sup>により 500~400nm を走査することにより、dithionite 還元型 P-450 の CO 差スペクトルを測定し、P-450 の分子吸光係数を

$$91\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}|450\text{nm}-490\text{nm}|$$

として P-450 濃度を求めた。

### 結 果

SDS ポリアクリルアミドスラブ電気泳動の結果を写真 1, 2 に示す。写真 1 (Fairbanks らの方法 7.2% アクリルアミド) では、OPP 投与群でオス・メス共に phosphorylase b のサブユニット (94,000 dalton) 付近のおよそ 96,000 dalton と ovalbumin (43,000 dalton) 付近のおよそ 46,000 dalton で、バンドが薄いか消失している。写真 2 (Laemmli の方法 10% アクリルアミド) では、投与日数 100 日目および 165 日目とも OPP 投与群で、オスのみ ovalbumin 付近に新たなバンド、およそ 45,000 dalton が生じている。また、対照・投与両群のオスとメスの肝ミクロゾームタンパクのパターンに若干の性差が見られる。写真 1 の投与群で薄くなるか消失している phosphorylase b のサブユニット付近は、写真 2 では差が見られない。

cytochrome P-450 の測定結果は表 1 に示した。オスの OPP 投与群で活性の 2 倍以上の上昇を示した。メスで

は対照群との差は殆んど認められなかった。また OPP 投与により増加したピークは、吸収の max. が 450nm であった。

### ま と め

OPP-Na を含む食餌で飼育したフィッシャー系ラット (F344/DuCrj) の肝薬物代謝酵素の誘導を分光学的方法および SDS ポリアクリルアミド電気泳動により分析した。

薬物代謝酵素は、P-450 の増加を測定した結果、オスのラット肝で OPP-Na 投与群は対照群の約 2 倍を示し、メスでは著しい差は無かった。

SDS 電気泳動の結果は、ペプチドの分子量 45,000 付近にバンドの増加が見られた。欠損するバンドも検出されたが、何に対応するかは不明である。

種々の薬物代謝酵素誘導剤との比較で見ると OPP-Na により誘導された酵素はフェノバルビタールに近く、吸収の max. が 450nm にあった。

### 文 献

- 1) Hiraga, K. and Fujii, T.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 303, 1981
- 2) 中尾順子, 大槻慶子, 樺島順一郎, 平賀興吾: 生化学, 53, 737, 1981
- 3) 牛山慶子, 樺島順一郎, 中尾順子: 東京衛研年報, 33, 455, 1982
- 4) 樺島順一郎, 中尾順子: 東京衛研年報, 32-2, 61, 1981
- 5) 川野澄江, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 27-2, 179, 1976
- 6) Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, 72, 248, 1976
- 7) Fairbanks, G., Steck, T.L. and Wallach, D.F. H.: *Biochem.*, 10, 2606, 1971
- 8) Laemmli, U.K.: *Nature*, 227, 680, 1970
- 9) Omura, T. and Sato, R.: *J.B.C.*, 239, 2370, 1964

Phosphorylase b  
(sub unit)  
BSA  
Ovalbumin  
Carbonic Anhydrase  
Trypsin Inhibitor  
 $\alpha$ -Lactalbumin

dye front

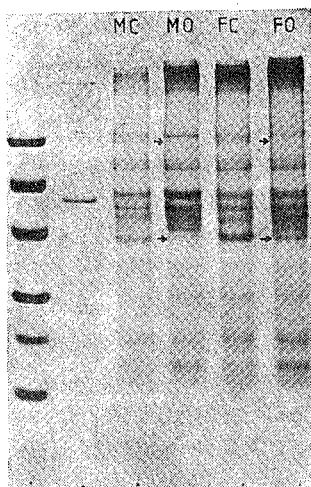


写真 1. SDS ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動の染色像 (Fairbanks らの方法 7.2%アクリルアミド)

MC オス対照群, MO オス投与群,  
FC メス対照群, FO メス投与群  
いずれも投与後100日目の肝ミクロゾーム。  
→のところに差がある。

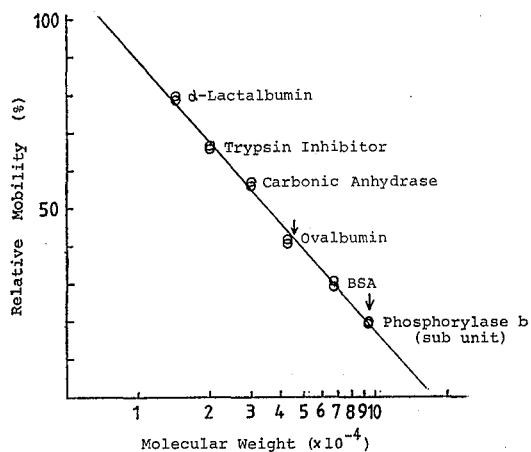


図 1. 分子量検量線 (Fairbanks らの方法 7.2%アクリルアミド)

↓の位置が泳動像に差のあった移動度に相当する。

表 1. 肝ミクロゾーム画分中の P-450 濃度 (n mol/mg protein)

|         | Male  |      | Female |      |
|---------|-------|------|--------|------|
|         | Cont. | OPP  | Cont.  | OPP  |
| 100days | 0.47  | 0.74 | 0.74   | 0.88 |
| 165days | 1.58  | 1.95 | 0.86   | 0.58 |

Phosphorylase b  
(sub unit)  
BSA

Ovalbumin

Carbonic Anhydrase  
dye front

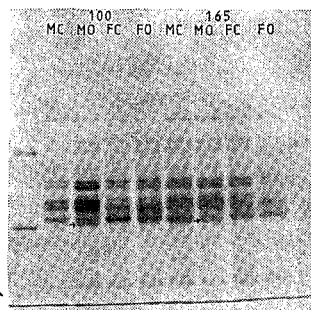


写真 2. SDS ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動の染色像 (Laemmli の方法 10%アクリルアミド)

MC オス対照群, MO オス投与群,  
FC メス対照群, FO メス投与群  
左半分が投与後100日目, 右半分が投与後  
165日目の肝ミクロゾーム。  
→のところに差がある。

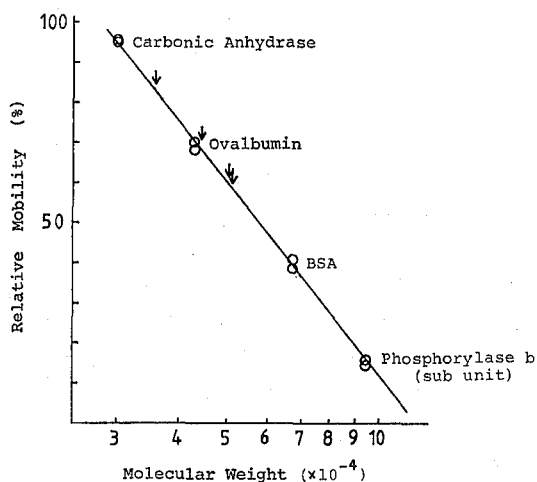


図 2. 分子量検量線 (Laemmli の方法 10%アクリルアミド)

↓の位置が泳動像に差のあった移動度に相当する。

## アデニレートシクラーゼにおよぼすオルトフェニルフェノール (OPP) およびその関連物質の影響

中 川 敦 子\*, 中 尾 順 子\*

### Effects of *o*-Phenylphenol (OPP) and its Related Compounds on Adenylate Cyclase

ATSUKO NAKAGAWA\* and TOSHIKO NAKAO\*

**Keywords:** オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, サイクリック AMP cyclic AMP, アデニレートシクラーゼ adenylate cyclase

#### 緒 言

オルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) を長期間経口投与したラットでは、尿路系にガンの発生がみられることが報告<sup>1)</sup>されている。前報<sup>2)</sup>においてOPP-Na 投与期間中の尿中サイクリック AMP (c-AMP) およびサイクリック GMP (c-GMP) の変動を測定した結果、c-AMP の減少と c-GMP の増加がみられることを報告した。更に c-AMP の減少は組織中のホルモン感受性アデニレートシクラーゼ (AC) 活性の低下に起因する可能性も指摘<sup>3)</sup>した。

今回は経口投与した OPP の AC におよぼす作用を分子レベルで明らかにするため、OPP-Na を長期間投与したラットより得た膜標品 AC に対する OPP とその代謝物の作用、OPP 関連物質による AC 活性の阻害、および構成成分の異なる AC に対する OPP の作用について *in vitro* で観察した。

#### 実験方法

**試薬** OPP および 3,4-ジヒドロキシジフェニル (3,4-diol) は関東化学工業、メタフェニルフェノール (*m*PP), パラフェニルフェノール (*p*PP), 2,5-ジヒドロキシジフェニル (2,5-diol), ジフェニルは東京化成工業, 2,2'-ジヒドロキシジフェニル (2,2'-diol), 4,4'-ジヒドロキシジフェニル (4,4'-diol),  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  は和光純薬, ATP はシグマ社の Grade I, c-AMP, GTP, Gpp (NH)p はシグマ社,  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP はラジオケミカルセンター, コール酸は日水製薬のもので精製したものを使用した。forskolin はカルビオケムのもので使用した。

**AC の調製** 酵素標品は前報<sup>2)</sup> で使用した雄のラット (すなわち 2% OPP-Na 添加飼料を 21 週間投与したもの) の脳、肝臓、腎臓より調製した。肝臓<sup>2)</sup>・腎臓<sup>2)</sup>・

脳<sup>3)</sup> の酵素標品およびニコール可溶性酵素標品は既報<sup>4)</sup>の方法に従った。コール酸可溶性酵素は Strittmatter 等の方法<sup>5)</sup>による preparation A を酵素標品として使用した。

**AC 活性の測定** AC 活性の測定は Salomon 等の方法<sup>6)</sup>に従った。OPP およびその関連物質を作用させる時には、基質を除いた状態で 30℃ 10 分間 preincubation した後、基質を加えて反応を開始した。

タンパク質は BSA を標準として Lowry 法<sup>7)</sup>および Bradford の方法<sup>8)</sup>に従って測定した。

#### 実験結果

対照および OPP-Na を投与したラットの脳から調製した膜標品 AC に対する OPP の阻害を図 1 に示した。いずれの酵素標品も同一の阻害曲線を示し、半阻害濃度はおよそ  $5.5 \times 10^{-4}\text{M}$  となり、OPP-Na を連続投与しても AC の OPP に対する感受性は変化しなかった。また NaF 存在下での AC 活性も OPP 投与による影響はみられなかった。

対照および OPP-Na を投与したラットの組織中の AC 活性を図 2 に示した。各組織とも OPP-Na を投与したラットの NaF 存在下での AC が低下していた。

牛山等<sup>9)</sup>によりラットにおける OPP の尿中代謝産物に 2,5-diol が存在することが明らかにされたので、膜標品 AC に対する 2,5-diol の影響を調べ図 3 に示した。2,5-diol による AC の阻害も対照と OPP-Na を投与したラットで差がなかった。また 2,5-diol の半阻害濃度はおよそ  $1.5 \times 10^{-3}\text{M}$  で AC に対する作用は OPP よりも弱かった。OPP 関連物質の AC におよぼす影響を図 4 に示した。3 種の monohydroxydiphenyl は同程度の阻害を示し、dihydroxydiphenyl よりも強く阻害する傾向が

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

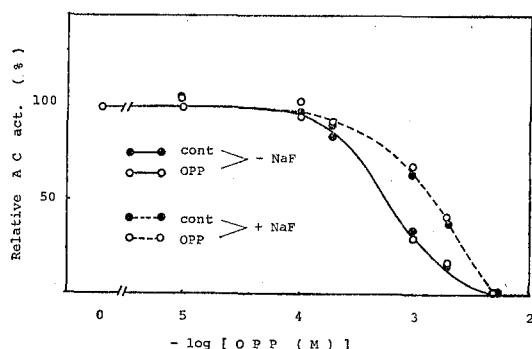


図 1. OPP による AC の阻害曲線  
ラット脳より得た膜標品 AC に対する OPP の  
阻害を OPP 無添加時の活性に対する % で表わ  
した。

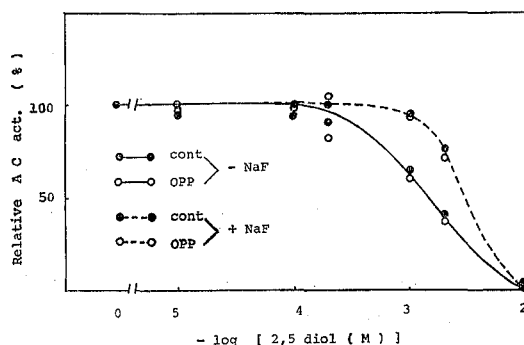


図 3. 2,5-diol による AC の阻害曲線  
ラット脳より得た膜標品 AC に対する 2,5-diol  
の阻害を 2,5-diol 無添加時の活性に対する % で  
表わした。

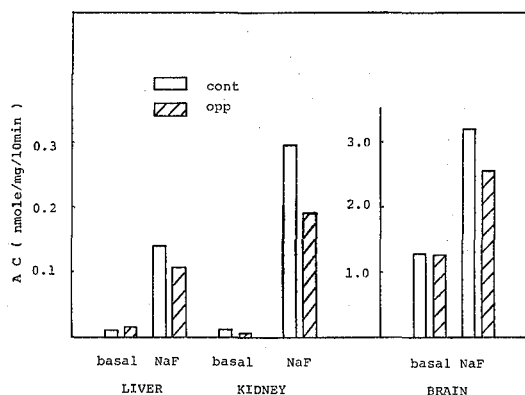


図 2. 組織中の AC 活性  
対照および OPP を 21 週間連続投与したラット  
から得た組織中の AC 活性. NaF の終濃度は  
 $10^{-2}M$  で使用した。

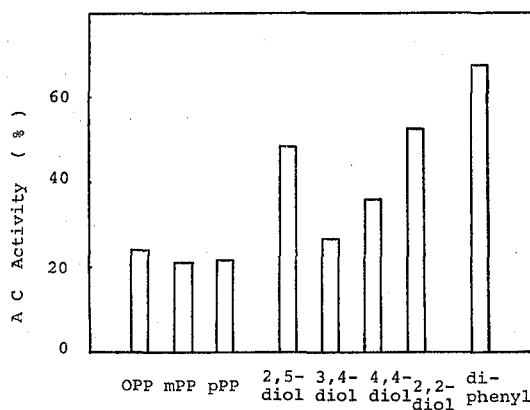


図 4. OPP 関連物質による AC 活性の阻害  
酵素は対照ラット脳より得た膜標品を用いた。  
各関連物質はエタノールに溶かし、反応液中の  
最終濃度はエタノール 7.5%, OPP 関連物質は  
 $10^{-8}M$  とした。  
OPP 関連物質が存在しない時の活性に対する  
関連物質存在下での活性を % で表わした。

みられた。

AC は catalytic unit (C・U), GTP binding unit (G・U) および receptor unit (R・U) より構成され活性の発現にはりん脂質が関与する<sup>10)</sup>とされているので、AC 構成成分の異なる 3 種の酵素標品を用い各標品に対する OPP による阻害を比較した。膜酵素は全ての構成成分を含み、ニッコール可溶性酵素はりん脂質の添加でホルモン感受性 AC に回復し、コール酸可溶性酵素は C・U に富むものであるが、表 1 に示すようにいずれの標品でも OPP による阻害は同程度であった。またコール酸可溶性酵素は  $Mn^{++}$  および forskolin の存在下でみかけ上 OPP による阻害から保護された。

表 1. 異なる酵素標品の OPP による阻害  
 $10^{-8}M$  OPP 添加時の活性を OPP 無添加  
時の活性に対する % で表わした。

| 酵 素                             | OPP 添加時の<br>残存活性 (%) |
|---------------------------------|----------------------|
| 膜 酵 素                           | 26                   |
| ニッコール可溶性酵素                      | 21                   |
| コール酸可溶性酵素                       | 26                   |
| コール酸可溶性酵素+5mM $Mn^{++}$         | 44                   |
| コール酸可溶性酵素+150 $\mu$ M forskolin | 48                   |

## 考 察

対照ラットと OPP-Na 投与ラットより調製した AC は OPP および 2,5-diol により全く同様に阻害され、その半阻害濃度はそれぞれ  $5.5 \times 10^{-4} \text{M}$  と  $1.5 \times 10^{-3} \text{M}$  であった。また NaF 存在下での活性も両酵素間で差がみられなかった(図1・図3)ことから、OPP-Na の連続投与により AC 自体の変化はないものと思われる。 $^{14}\text{C}$ -OPP を用いた市川等<sup>11)</sup>による OPP の代謝実験、および牛山等<sup>9)</sup>による OPP-Na を投与したラットにおける尿中 OPP 量と 2,5-diol 量を調べた結果から、OPP-Na を連続投与したラット血中の OPP 濃度を推測するとおよそ  $3 \times 10^{-4} \text{M}$  となる。これは *in vitro* でみる限り、AC 活性を阻害しうる濃度である。

一方 OPP-Na を投与したラットの basal AC 活性は変化しないが、NaF 存在下での AC 活性は低下していた(図2)ことから、投与された OPP は体内で NaF 依存性 AC 活性の量に影響をおよぼしていることが推測された。

2,5-diol は OPP の代謝産物として同定されている<sup>9)</sup>が AC に対する半阻害濃度は  $1.5 \times 10^{-3} \text{M}$  で OPP よりも高かった。2,5-diol の血中濃度を  $2 \times 10^{-4} \text{M}$  と見積ると、この物質が体内で AC 活性を阻害しているとしても OPP に比べ弱いものと思われた。

牛山等の報告<sup>9)</sup>では尿中に検出された OPP 代謝物は 2,5-diol のみであったが、それ以外の OPP 関連物質が生体内で生成・代謝されているとしても図4に示した関連物質の阻害の強さと生体内濃度から、AC に影響をおよぼし尿中 c-AMP の減少をおこす物質は OPP そのものであろうと思われた。

OPP による AC の阻害を構成成分の異なる標品で測定したところいずれの標品でも同程度に阻害され、OPP は C・U に作用して AC を阻害していると思われた。 $\text{Mn}^{++(12)}$  および forskolin は C・U に直接作用<sup>13,14)</sup>して AC 活性を上昇させる賦活剤である。これら賦活剤の存在下で OPP による阻害の割合が減少していることから OPP は何らかの形で C・U に影響をおよぼしていると思われる。NaF<sup>15-23)</sup> および Gpp(NH)p<sup>24)</sup> は不可逆的に G・U に結合し G・U と C・U の相互作用を通して AC 活性を上昇させる。NaF 存在下で OPP の阻害作用が減少する(図1・図3)が、Gpp(NH)p も OPP による阻害を減少させ、C・U は G・U の作用を受けたような構造(C・U が活性化された状態)の時に OPP の阻害から保護されるのかもしれない。

## 要 約

1) 対照および 21 週間 OPP-Na を投与したラットの脳より得た膜標品 AC は OPP および 2,5-diol による阻害に差がなく、OPP の連続投与により OPP および 2,5-diol に対する AC 感受性は変化しなかった。一方 NaF 依存性 AC のタンパク質あたりの量は減少した。

2) OPP およびその関連物質の AC 活性に対する阻害と、OPP-Na 連続投与後の OPP および関連物質の推定血中濃度から、尿中 c-AMP を減少させる物質は OPP であると推測された。

3) OPP は AC の C・U に影響をおよぼし AC 活性を低下させていると思われた。

## 文 献

- Hiraga, K. and Fujii, T. : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **19**, 303, 1981
- 中川敦子, 中尾順子 : 東京衛研年報, **32-2**, 53, 1981
- 中川敦子, 中尾順子 : 東京衛研年報, **29-2**, 151, 1978
- 中川敦子, 中尾順子 : 東京衛研年報, **30-2**, 136, 1979
- Strittmatter, S. and Neer, E. J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 6344, 1980
- Salomon, Y., Londos, C. and Rodbell, M. : *Anal. Biochem.*, **58**, 541, 1974
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951
- Bradford, M. M. : *Anal. Biochem.*, **72**, 248, 1976
- 牛山慶子, 樺島順一郎, 中尾順子 : 東京衛研年報, **33**, 455, 1982
- Levey, G. S. : *Methods in Enzymol.*, **38**, 174, 1974, Academic Press, New York
- 市川久次, 小林博義, 中尾順子 : 東京衛研年報, **33**, 451, 1982
- Ross, E. M., Howlett, A. C., Ferguson, K. M. and Gilman, A. G. : *J. Biol. Chem.*, **253**, 6401, 1978
- Seamon, K. B., Padgett, W. and Daly, J. W. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 3363, 1981
- Seamon, K. B. and Daly, J. W. : *J. Biol. Chem.*, **256**, 9799, 1981
- Perkins, J. P. and Moore, M. M. : *J. Biol. Chem.*, **246**, 62, 1971

- 16) Schramm, M. and Naim, E. : *J. Biol. Chem.*,  
245, 3225, 1970
- 17) Kelly, L. A. and Koritz, S. B. : *Biochim.*  
*Biophys. Acta*, 237, 141, 1971
- 18) Pastan, I., Pricer, W. and Blanchette-Mackie,  
J. : *Metabolism*, 19, 809, 1970
- 19) Birnbaumer, L., Pohl, S. L., Rodbell, M. and  
Sandby, F. : *J. Biol. Chem.*, 247, 2038, 1972
- 20) Johnson, R. A., Pilkis, S. J. and Hamet, P. :  
*J. Biol. Chem.*, 250, 6599, 1975
- 21) Severson, D. L., Drummond, G. I. and Sulakhe,  
P. V. : *J. Biol. Chem.*, 247, 2949, 1972
- 22) Sulakhe, P. V. and Dhalla, N. S. : *Biochim.*  
*Biophys. Acta*, 293, 379, 1973
- 23) Cuatrecasas, P., Bennett, V. and Jacobs,  
S. : *J. Membrane Biol.*, 23, 249, 1975
- 24) Enomoto, K. and Gill, M. : *J. Biol. Chem.*, 255,  
1252, 1980

## 馬の腎臓から精製した酵素へのオルトフェニルフェノールおよびその関連物質の影響

大野 知子\*, 長井 二三子\*, 中尾 順子\*

### Effect of *o*-Phenylphenol and its Related Compounds on Horse Kidney $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase

TOMOKO OHNO\*, FUMIKO NAGAI\* and TOSHIKO NAKAO\*

**Keywords:**  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -ATPase, オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, フェニルヒドロキノン phenylhydroquinone, ジフェニル誘導体 diphenyl-derivatives

#### 緒 言

ラットにおいて、オルトフェニルフェノール（以下 *o*PP）はその代謝物とともに大部分が尿中に排泄され<sup>1)</sup>、腎障害および膀胱ガンを形成する<sup>2)</sup>。代謝物の分析の詳細は大槻らによって既に報告されている<sup>3)</sup>。 $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -ATPase は腎機能上重要な酵素であり、細尿管での  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$  やある種のアミノ酸類などの排泄・再吸収の機能を担っていることは周知のことである。本報告において、私共は馬腎  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -ATPase を精製し、*o*PP および関連化合物の本酵素に対する阻害を調べた。50%阻害濃度から考えて、尿中に排泄される代謝物（*o*PP, フェニルヒドロキノン）などの濃度はほぼ完全阻害に近い濃度であることが明らかになった。

#### 試薬・材料

ATP-2Na は協和発酵製。ドデシル硫酸ナトリウム（以下 SDS）は和光純薬製生化学用をエタノールから再結晶して用いた。*o*PP, 3,4-ジヒドロキシジフェニル（以下 3,4-diOH）は関東化学。ジフェニル、フェニルヒドロキノン（2,5-ジヒドロキシジフェニル：以下 PHQ）、メタフェニルフェノール（以下 *m*PP）、パラフェニルフェノール（以下 *p*PP）は東京化成工業。2,2'-ジヒドロキシジフェニル（以下 2,2'-diOH）、4,4'-ジヒドロキシジフェニル（以下 4,4'-diOH）は和光純薬の製品を用いた。エタノールは和光純薬製液体クロマトグラフィ用 99.5v/v% を用いた。実験に用いた水は石英二段蒸留装置で再蒸留して得た。馬腎臓は多摩食肉検査所八王子出張所の好意により屠殺放血後新鮮なものを採り出し -80° に保存した。

#### 実験方法

ミクロソームの調製は -80° に保存した腎臓を長井ら

の方法<sup>4)</sup>に準拠し、次のように改変した。ソーバル SS-34 ローターで 6,500rpm 15 分間遠心した上清を SS-34 ローターで 16,500rpm 35 分間遠心し、沈殿を 0.25M Sucrose, 30mM Histidine-HCl pH7.2, 5mM EDTA, 1mM DTT に懸濁した。ミクロソームからの  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -ATPase の精製は Jørgensen らの方法<sup>5)</sup>を改良して行った。SDS 濃度 0.9mg/ml で処理し、Buffer は Histidine-HCl Buffer を用いた。 $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -ATPase 活性の測定は中尾らの方法<sup>6)</sup>によった。基質を除いた酵素反応液に、エタノール溶液の *o*PP 関連化合物を加えて 37° 5 分間プレインキュベーションした後、基質を加えて 37° 5 分間反応させた。酵素反応は、最終 0.5ml で行い、エタノール 5% で行うように調製した。遊離してくる無機リン酸を Fiske-SubbaRow 法<sup>7)</sup>で測定した。 $\text{K}$ -PNPPase ( $\text{K}$ -パラニトロフェニルホスファターゼ) 活性は矢ヶ崎らの方法<sup>8)</sup>をもとにして行った。*o*PP による阻害の実験では、遊離してくるパラニトロフェノール (PNP) をアルカリ液で発色させて測定した。PHQ による阻害の実験では、PHQ がアルカリ性で黄褐色から赤色の発色をするため、遊離してくる無機リン酸を Fiske-SubbaRow 法で測定した。

#### 結果と考察

*o*PP と関連化合物の  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -ATPase 阻害の概要を図 1 に示す。ジフェニル、*p*PP および 4,4'-diOH はそれぞれ、0.2mM, 0.1mM, 0.5mM 以上の濃度には 5% エタノールを含む反応液中に溶解せず析出したため測定不能であった。*o*PP, PHQ と特に阻害作用の強い *m*PP と 3,4-diOH, およびこれらの骨格物質であるジフェニルについてさらにくわしく調べた。図 2 は *o*PP と PHQ の  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -ATPase に対する阻害曲線である。図より、50%阻害濃度は *o*PP については  $7 \times 10^{-4}\text{M}$  附近、PHQ に

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

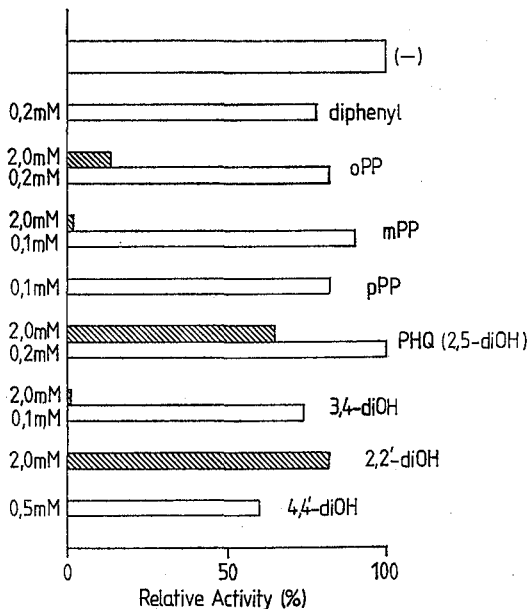


図 1. *o*PP 関連化合物の Na, K-ATPase 阻害各化合物 (右端に名称を記した) の高濃度 (2 mM: 斜線) および低濃度 (0.1, 0.2, 0.5 mM: 白ぬき) における残存活性を濃度ゼロ(—)に対するパーセントで示した。

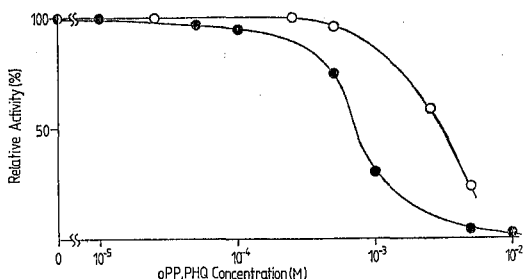


図 2. *o*PP, PHQ の Na, K-ATPase 阻害曲線 ●— *o*PP, ○— PHQ の各濃度 (モル濃度) における残存活性を濃度ゼロに対するパーセントで示した。

については  $3 \times 10^{-3}$  M 附近であり, *o*PP から PHQ へ代謝される事によって *in vitro* の Na, K-ATPase に対する毒性は減少する方向にある。しかし, 尿中の *o*PP 濃度<sup>9)</sup> は 20~30 mM, PHQ 濃度は 10~30 mM であり, これはほぼ完全阻害に近い濃度である。図 3 はジフェニル, *m*PP, 3,4-diOH の Na, K-ATPase に対する阻害曲線である。ジフェニルは 0.2 mM より高濃度になるように反応液に加えると析出し白濁した。白濁した反応液

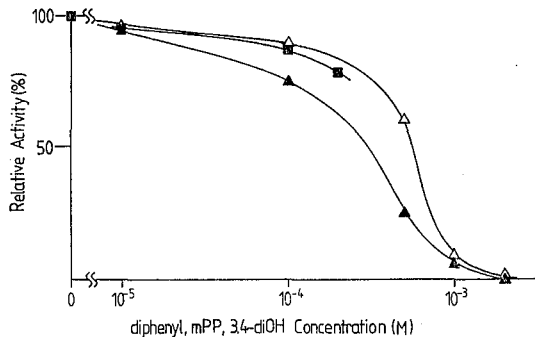


図 3. ジフェニル, *m*PP, 3,4-diOH · Na, K-ATPase 阻害曲線  
■— ジフェニル, △— *m*PP, ▲— 3,4-diOH. 他は図 2 に同じ。

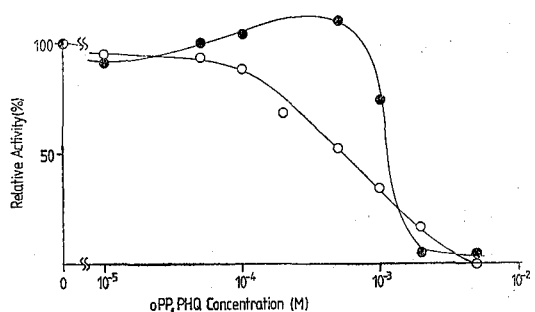


図 4. *o*PP, PHQ の K-PNPPase 阻害曲線 ●— *o*PP, ○— PHQ. 他は図 2 に同じ。

でそのまま酵素反応を行い, 3,000rpm 5 分間遠心した上清について無機リン酸を測定したところ, 残存活性は, 加えたジフェニルの量にかかわらずほぼ 70% で一定であった。このことから, ジフェニルは反応液中に溶けている量だけが阻害に関与していると考えられるので, *p*PP および 4,4'-diOH についてもジフェニルと同様に, 本実験に用いた条件下では Na, K-ATPase に強い阻害作用をおよぼさないとと思われる。図 3 より, 50% 阻害濃度は, *m*PP については  $5.7 \times 10^{-4}$  M, 3,4-diOH については  $3 \times 10^{-4}$  M 附近であり, 他の関連化合物より低い。*m*PP と 3,4-diOH が共に Na, K-ATPase に対して毒性が強い事は, フェニル基の *m* 位に水酸基がある構造と関連があるのではないかと考えられる。

*o*PP と PHQ については, Na, K-ATPase の部分反応である K-PNPPase の阻害も調べた。図 4 にその阻害曲線を示す。*o*PP は,  $10^{-4}$  から  $5 \times 10^{-4}$  附近でわずかに活性化作用 (+10%) を示す。50% 阻害濃度は, *o*PP については  $1.2 \times 10^{-3}$  M, PHQ については  $5.5 \times 10^{-4}$  M



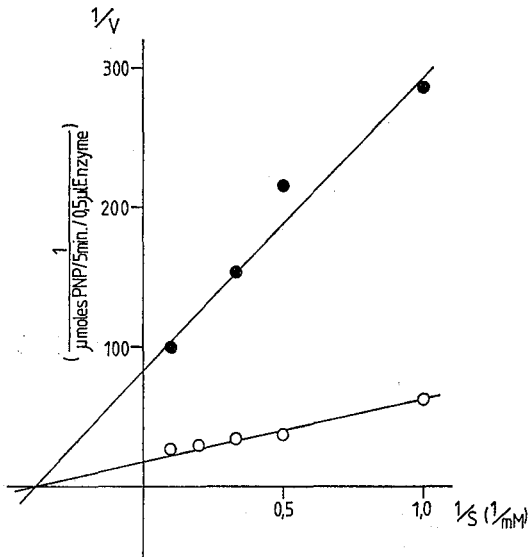


図 5. *o*PP の K-PNPPase 阻害の Lineweaver-Burk プロット

横軸は基質 (mM) の逆数, たて軸は反応速度 ( $\mu$ mole PNP/5 分/0.5  $\mu$ l Enzyme) の逆数.

●— *o*PP 1.5mM, ○— *o*PP なし.

附近である。Na,K-ATPase に対して *o*PP よりも阻害作用の弱かった PHQ が、K-PNPPase に対しては *o*PP よりも阻害作用が強い。この事は、K-PNPPase の基質である PNPP および反応産物である PNP と PHQ との構造上の類似によると考えられる。図 5 は、*o*PP の K-PNPPase 阻害について、阻害の様式を見るために基質濃度を変えて Lineweaver-Burk プロットをかいたものである。この図から、*o*PP の阻害は非競合阻害である

と考えられる。

### ま と め

馬腎臓から精製した Na,K-ATPase および本酵素の部分反応である K-PNPPase に対する *o*PP とその関連化合物の阻害作用を調べた。Na,K-ATPase は、*o*PP, *m*PP, 3,4-diOH で阻害が比較的強かった。牛山らの報告<sup>9)</sup>にある尿中 *o*PP, PHQ 濃度は完全阻害に近い濃度であった。K-PNPPase は、*o*PP よりも PHQ でより強く阻害された。*o*PP による K-PNPPase 阻害は非競合阻害であると考えられる。

### 文 献

- 1) 大槻慶子, 樺島順一郎, 中尾順子: 東京衛研年報, 32-2, 51, 1981
- 2) Hiraga, K. and Fujii, T.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 303, 1981
- 3) 中尾順子, 大槻慶子他: 生化学, 53, 737, 1981
- 4) 長井二三子, 厚井麻里, 中尾順子: 東京衛研年報, 26-2, 143, 1975
- 5) Jørgensen, R. T.: *Methods in ENZYMOLOGY*, 32, 285, Edited by Sidney Fleischer & Lester Packer, ACADEMIC PRESS, 1974
- 6) Nakao, T., Nakao, M., Mizuno, N., Komatsu, Y. and Fujita, M.: *J. Biochem.*, 73, 609, 1973
- 7) Fiske, C. and SubbaRow, Y. H.: *J. Biol. Chem.*, 66, 375, 1925
- 8) 矢ヶ崎しげ子, 原 諭吉, 中尾順子: 東京衛研年報, 26-2, 148, 1975
- 9) 牛山慶子, 樺島順一郎, 中尾順子: 東京衛研年報, 33, 455, 1982

## Phenobarbital および 3-Methylcholanthrene 誘導の S-9 を用いた *In Vitro* での オルトフェニルフェノールの染色体への作用

縄井 寿美子\*, 吉田 誠二\*\*, 中尾 順子\*, 平賀 興吾\*

### Effect of *o*-Phenylphenol Incubated with S-9 mix Induced by Phenobarbital or 3-Methylcholanthrene on Chromosomes in CHO-K1 Cells

SUMIKO NAWAI\*, SEIJI YOSHIDA\*\*, TOSHIKO NAKAO\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, CHO-K1 細胞 CHO-K1 cell line, 姉妹染色分体交換 sister chromatid exchange (SCE), 染色体異常 chromosome aberration, S-9 mix, フェノバルビタール phenobarbital, 3-メチルコランスレン 3-methylcholanthrene

#### はじめに

柑きつ類の防かび剤として用いられている *o*-phenylphenol (OPP) およびそのナトリウム塩は、最近ラット膀胱に腫瘍を誘発することが報告<sup>1,2)</sup>された。しかしその変異原性については、これまで微生物を用いた試験で花田<sup>3)</sup>、西岡ら<sup>4)</sup>がわずかに陽性の疑いの結果を示したのみで、他は陰性の結果<sup>5-7)</sup>であり、哺乳動物細胞を用いた *in vitro* での試験<sup>8-11)</sup>、あるいはラットでの *in vivo* での細胞遺伝学的試験<sup>5,10)</sup>でもすべて陰性の報告であった。われわれは先に CHO-K1 細胞において、OPP の 3 時間処理により姉妹染色分体交換 (SCE)、染色体異常とも有意に高い誘発を認めたが、ラットにおいて OPP の代謝産物としてかなり高濃度に尿中に存在することが大槻ら<sup>12)</sup>により見出された phenylhydroquinone (PHQ) での実験、あるいは PCB で誘導した S-9 mix により代謝活性化を計った実験では、その誘発は OPP 直接のものに比べむしろ少ないという結果<sup>13)</sup>を得ている。そこで今回われわれは、異なる型の薬物代謝酵素を誘導するとされる phenobarbital sodium (PB) あるいは 3-methylcholanthrene (MC) で誘導した S-9 mix を用い、両 S-9 による代謝物の変異原性についてさらに検討を加えた。

#### 材料および方法

1. 試薬 *o*-phenylphenol (OPP): 東京化成工業, Zone Refined, cyclophosphamide (CP): ICN Pharmaceuticals, Inc., dimethylsulfoxide (DMSO): 和光純薬工業, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BUdR): SIGMA,

33258 Hoechst: 和光純薬工業, ギムザ液: MERCK, F12 培養液: 日本製薬, 仔牛血清: 極東製薬工業

2. 細胞および培養 チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO-K1 株を、10% 仔牛血清添加の Ham の F12 培養液を用いて、角型培養ビンにて 37° で密栓培養した。

3. S-9 mix の調製 S-9 は矢作<sup>14)</sup>の方法に基づき、われわれが先に述べた<sup>15)</sup>ように作成した。作成した S-9 は -80° で保存し、S-9 mix は使用時に Natarajan ら<sup>15)</sup>の方法に従い調製した。

4. 薬物調製および処理 OPP は DMSO に溶解、CP は蒸留水に溶解し、その溶媒最終濃度がすべて 1% となる用量で培養液に添加して用いた。培養ビンあたり細胞を約  $3.5 \times 10^5$  個播種し、48 時間培養した後培養液を捨て、薬物を溶かした培養液 5ml および S-9 mix または培養液 0.25ml を加え、3 時間培養した後培養液 5ml で洗い、培養ビンをアルミフイルドで被って BUdR 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を加えた培養液 10ml で 27 時間培養した。

5. 標本作成 培養終了 2 時間前にコルセミド 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を加え、分裂中期細胞を集めた。常法<sup>16)</sup>に従い低張、固定操作を行い、標本を作成し、先に報告した方法<sup>17)</sup>により姉妹染色分体分染を行った。

6. 観察 染色体異常検索については 200 個の分裂中期細胞を調べ、異常保有細胞および異常の種類を記録した。異常の分類は、break, gap, exchange, ot. (その他) とし、fragment (断片) および deletion (欠失) は break に含め、ring (環状), dicentric (2 動原体), pulverization (細片化) は ot. として表わした。SCE に

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\*\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 同毒性部病理研究科

Table 1. Effect of o-Phenylphenol (OPP) Incubated with S-9 mix Prepared from Phenobarbital (PB)-, 3-Methylcholanthren (MC)- Pretreated Rats on Chromosome Aberrations and SCEs in CHO-K1 Cells

| S-9 | Chemicals         | Dose<br>( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | Cells with<br>chromosome<br>aberrations <sup>1)</sup><br>(%) | Various types of chromosome aberrations (%) |                  |              |     |                   |                   |                      | SCEs/Cell <sup>7)</sup><br>(Mean $\pm$ S. E.) |
|-----|-------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------|--------------|-----|-------------------|-------------------|----------------------|-----------------------------------------------|
|     |                   |                                     |                                                              | Gaps<br>C1 <sup>2)</sup>                    | C2 <sup>3)</sup> | Breaks<br>C1 | C2  | Ex. <sup>4)</sup> | Ot. <sup>5)</sup> | E.R.D. <sup>6)</sup> |                                               |
| PB  | OPP               | 0                                   | 3.0                                                          | 1.0                                         | 0                | 0            | 0   | 0                 | 2.0               | 0                    | 5.43 $\pm$ 0.40                               |
|     |                   | 50                                  | 3.5                                                          | 0.5                                         | 0                | 1.0          | 1.0 | 0                 | 1.0               | 0                    | 5.16 $\pm$ 0.44                               |
|     |                   | 75                                  | 2.0                                                          | 0.5                                         | 0                | 1.0          | 0.5 | 0                 | 0                 | 0                    | 7.10 $\pm$ 0.57 <sup>c)</sup>                 |
|     |                   | 100                                 | 4.0                                                          | 0                                           | 0                | 0.4          | 2.2 | 0                 | 1.3               | 1.2                  | 6.93 $\pm$ 0.37 <sup>d)</sup>                 |
|     |                   | 125                                 | 6.0                                                          | 1.0                                         | 0                | 1.5          | 1.0 | 1.0               | 1.5               | 3.2                  | 9.86 $\pm$ 0.73 <sup>e)</sup>                 |
|     |                   | 150                                 | 7.0                                                          | 1.0                                         | 0                | 0.5          | 1.0 | 1.5               | 3.0               | 4.4                  | 9.23 $\pm$ 0.57 <sup>e)</sup>                 |
|     |                   | 175                                 | 22.0 <sup>a)</sup>                                           | 4.6                                         | 0                | 3.7          | 1.8 | 6.9               | 5.0               | 18.2                 | N. D. <sup>9)</sup>                           |
|     |                   | 200                                 | N. M. <sup>8)</sup>                                          | —                                           | —                | —            | —   | —                 | —                 | —                    | —                                             |
|     | CP <sup>10)</sup> | 0                                   | 2.0                                                          | 0                                           | 0                | 0            | 1.0 | 0                 | 1.0               | 0                    | 5.03 $\pm$ 0.36                               |
|     |                   | 5                                   | 2.5                                                          | 0                                           | 0                | 1.5          | 1.0 | 1.0               | 0                 | 0                    | 23.77 $\pm$ 1.43 <sup>e)</sup>                |
|     |                   | 25                                  | 13.5 <sup>a)</sup>                                           | 2.9                                         | 0                | 1.9          | 2.9 | 3.4               | 2.4               | 0                    | too many                                      |
| MC  | OPP               | 0                                   | 4.0                                                          | 0.9                                         | 0                | 0            | 0.4 | 0                 | 2.7               | 0.4                  | 6.26 $\pm$ 0.53                               |
|     |                   | 75                                  | 5.0                                                          | 0.5                                         | 0                | 0            | 2.5 | 0                 | 2.0               | 0.4                  | 6.03 $\pm$ 0.52                               |
|     |                   | 100                                 | 8.5                                                          | 2.5                                         | 0                | 1.0          | 1.0 | 1.5               | 2.5               | 1.2                  | 8.00 $\pm$ 0.53 <sup>d)</sup>                 |
|     |                   | 125                                 | 8.5                                                          | 1.8                                         | 0                | 2.2          | 1.3 | 1.3               | 1.8               | 5.6                  | 8.93 $\pm$ 0.74 <sup>d)</sup>                 |
|     |                   | 150                                 | 9.0 <sup>b)</sup>                                            | 1.9                                         | 0                | 3.8          | 2.4 | 1.0               | 0                 | 9.2                  | 8.43 $\pm$ 0.66 <sup>e)</sup>                 |
|     |                   | 175                                 | 22.0 <sup>a)</sup>                                           | 3.7                                         | 0.9              | 3.7          | 0.5 | 11.9              | 1.4               | 28.4                 | N. D.                                         |
|     |                   | 200                                 | N. M.                                                        | —                                           | —                | —            | —   | —                 | —                 | —                    | —                                             |
|     | CP                | 0                                   | 2.0                                                          | 0                                           | 0.5              | 0            | 1.0 | 0                 | 0.5               | 0.8                  | 6.43 $\pm$ 0.51                               |
|     |                   | 250                                 | 4.5                                                          | 0                                           | 0                | 0.8          | 1.3 | 0                 | 2.0               | 0.4                  | 14.37 $\pm$ 0.71 <sup>e)</sup>                |
|     |                   | 5,000                               | 19.0 <sup>a)</sup>                                           | 0.9                                         | 0                | 5.6          | 2.6 | 4.8               | 5.2               | 0.8                  | too many                                      |

1) For each doses 200 metaphases scored.

2) Aberrations of chromatid type.

3) Aberrations of chromosome type.

4) Exchanges.

5) Other aberrations (dicentric, ring, pulverization).

6) Endoreduplications. 250 metaphases were scored for each doses.

7) For each doses 30 metaphases were scored.

8) No metaphases.

9) No differential staining sister chromatids.

10) Cyclophosphamide for positive control

a)  $\chi^2$  test, significantly different from solvent-control at  $P < 0.001$ b) ib. at  $P < 0.05$ c) Wilcoxon test, significantly different from solvent-control at  $P < 0.05$ d) ib. at  $P < 0.01$ e) ib. at  $P < 0.001$ 

ついで30個の分裂中期細胞を観察し、各々の細胞について SCE 数を記録した。得られた結果は染色体異常については $\chi^2$ 検定、SCEについては Wilcoxon の順位和検定によって対照との有意差の有無を検討した。

## 結果および考察

結果を Table 1 に示す。PBあるいはMC誘導した S-9 mix を添加した対照は、それぞれの S-9 mix 無添加の対照 (PB での実験: 染色体異常保有細胞 2.0%,

SCE  $4.83/\text{cell} \pm 0.36$ , MCでの実験: 同4.5%,  $5.30 \pm 0.36$ ) に比べ特に差は見られなかった。OPP  $200\mu\text{g}/\text{ml}$  処理ではPB, MCとも分裂細胞は得られなかった。染色体異常は  $175\mu\text{g}/\text{ml}$  でMC, PBとも22.0%という高い誘発が見られ, どちらも発癌物質で多く出現するとされる exchange の割合が高く, MCでは異常の約50%, PBでは約30%を占めた。  $150\mu\text{g}/\text{ml}$  では染色体異常出現は大きく低下したが, MCの9.0%は  $P < 0.05$  でなお有意な差を示した。SCEについては, 最大の誘発の見られた  $175\mu\text{g}/\text{ml}$  では分染されている細胞はほとんどなく, 細胞毒性による細胞周期の遅れが認められた。PBでは  $75\mu\text{g}/\text{ml}$  からMCでは  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  から有意差が見られ, その最大 SCE 値は  $125\mu\text{g}/\text{ml}$  で認められ, PB  $9.86/\text{cell}$ , MC  $8.93/\text{cell}$  であった。S-9 mixの活性の目安として用いた陽性対照のCPは, われわれが先に得ている結果<sup>17)</sup>と同様, S-9 mix添加によりMCよりPBにおいてより低用量でSCEおよび染色体異常を誘発し, その値も先の結果とよく一致した。また染色体の数的異常である diplochromosome (複系染色体) を示す E.R.D. (endoreduplication: 核内倍化) が, 先のOPPでの実験<sup>13)</sup>と同様, 濃度依存性に増加することが認められた。特に分裂細胞の得られた最大用量  $175\mu\text{g}/\text{ml}$  では, PB 18.2%, MC 28.4%と非常に高い出現率であった。この倍化は  $G_2$ 期 ブロックによるもの<sup>19)</sup>であるが, 培養細胞および腫瘍細胞で容易に出現するとされる。このE.R.D.は, mercaptoethanol のようなスルフィドリル化合物によりひきおこされる<sup>20,21)</sup>ことが知られており, また亜硝酸にもその作用があることが報告<sup>22)</sup>されている。OPPのE.R.D.を生み出す機構については今後調べて見る必要がある。

PBとMCは異なる型の薬物代謝酵素を誘導すると言われる。PBおよびMC誘導のS-9の添加により *in vitro* でOPPの代謝活性化を計ったが, OPPの染色体への作用は先に報告した<sup>13)</sup>S-9無添加のOPPに比べると, S-9無添加のものでは分裂細胞の得られなかった  $175\mu\text{g}/\text{ml}$  で, 染色体異常はMC, PBとも22%と高い値を示したが,  $150\mu\text{g}/\text{ml}$  でのその誘発はS-9無添加のOPPの値に比べPB, MCともむしろ減少していた。PB, MC誘導のS-9の添加は, OPPのみのものに比べると,  $175\mu\text{g}/\text{ml}$  で細胞毒性を軽減し, 高い染色体異常を出現させたが, これが代謝によるOPPの減少のためか, あるいは代謝物との相互作用によるものか, S-9 mixそのものの関与によるものかは明らかではない。今回の代謝活性化試験では, 陽性対照のCPがPBとMCとで大

きな活性化の違いを見せたのに対し, OPPでは染色体異常誘発に関して, そのexchangeおよびE.R.D.にややMCの方が高い誘発を示したものの, その他には明確な差は見られなかった。OPPは, ラットでは一部PHQ<sup>12,23,24)</sup>あるいは2,4-dihydroxybiphenyl<sup>24)</sup>と推測される形に代謝されて尿中に排泄される。ラットでの膀胱腫瘍誘発の報告を考えると, OPPの代謝過程でより強い変異原作用を示す物質が形成されている可能性も考えられたので, 今回 *in vitro* で代謝活性化試験を試みたが, この条件ではPBおよびMC誘導のいずれからそのような物質の生成は示唆されなかった。

### 要 旨

ラット膀胱に腫瘍の誘発が報告されたOPPについて, 異なる型の薬物代謝酵素を誘導するとされる phenobarbital および 3-methylcholanthrene により酵素誘導したS-9を用い, *in vitro* で代謝活性化を計り, その染色体への作用を調べた。結果は両方のS-9とも有意に高い染色体異常およびSCEの誘発を示したが, 2種のS-9の間に大きな違いは見られなかった。しかし先に報告したS-9無添加のOPPでの結果と比較すると, OPPの代謝過程におけるより強い変異原性を示すような物質の生成は, 特に示唆されなかった。

### 文 献

- 1) Hiraga, K. and Fujii, T.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 303, 1981
- 2) 藤井 孝, 平賀興吾: 第41回日本癌学会総会記事, 41, 1982
- 3) 花田信次郎: 栄養と食糧, 29-1, 66, 1976
- 4) 西岡 一, 小笠原一美: 第6回日本環境変異原研究会講演要旨集, 45, 1977
- 5) 白須泰彦, 森谷正明, 加藤貴美江: 第5回日本環境変異原研究会講演要旨集, 35, 1976
- 6) 河内 卓: 昭和51年度厚生省がん研究会助成金による研究報告集(下), 744, 1976
- 7) 小嶋昭江, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 83, 1978
- 8) 石館 基: 昭和51年度厚生省がん研究会助成金による研究報告集(下), 750, 1976
- 9) 吉田誠二, 益淵正典, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 86, 1978
- 10) 吉田誠二, 縄井寿美子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 44, 1979
- 11) 縄井寿美子, 吉田誠二, 中尾順子: 東京衛研年報, 30-2, 51, 1979

- 12) 大槻慶子, 樺島順一郎, 中尾順子: 第54回日本生化学会抄録号, 生化学, 53-8, 737, 1981
- 13) 縄井寿美子, 吉田誠二, 中尾順子: 第10回日本環境変異原研究会講演要旨集, 82, 1981
- 14) 矢作多貴江: 蛋白質核酸酵素, 20, 16, 1975
- 15) Natarajan, A. T., Tate, A. D. and Van Bull, P. P. W.: *Mutation Res.*, 37, 83, 1976
- 16) 吉田誠二, 益淵正典, 縄井寿美子: 東京衛研年報, 26-2, 166, 1975
- 17) 縄井寿美子, 吉田誠二, 益淵正典: 東京衛研年報, 29-2, 167, 1978
- 18) 縄井寿美子, 吉田誠二, 中尾順子: 東京衛研年報, 32-2, 103, 1981
- 19) Brodsky, W. Y. A. and Uryvaeva, I. V.: *Int. Rev. Cytol.*, 50, 275, 1977
- 20) Jackson, J. F. and Hill, F. S.: *Nature*, 214, 1155, 1967
- 21) Schwarzscher, H. G. and Schnedl, W.: *Nature*, 209, 107, 1966
- 22) Tsuda, H. and Kato, K.: *Mutation Res.*, 56, 69, 1977
- 23) Meyer, T. and Scheline, R. R.: *Acta pharmacol. et. toxicol.*, 39, 419, 1976
- 24) Halpaap, K., Horning, M. G. and Horning, E. C.: *Journal of Chromatography*, 166, 479, 1978

## 突然変異誘起性に対するオルトフェニルフェノールの影響

藤田 博\*, 小嶋 昭江\*, 平賀 興吾\*

### Effects of *o*-Phenylphenol (OPP) on the Mutagenicity of Chemical Mutagens in the *Salmonella*/Microsome Test

HIROSHI FUJITA\*, AKIE KOJIMA\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, 2-アミノアントラセン 2-aminoanthracene, 2-アセチルアミノフルオレン 2-acetylaminofluorene, ベンゾ(a)ピレン benzo(a)pyrene, 突然変異誘起性 mutagenicity, 代謝活性化 metabolic activation

#### 緒 言

Ames の mutation test 系においては、代謝活性化に S-9 (肝臓ホモジネートの9,000×g遠心の上清分画)を用いるが、薬物代謝酵素の誘導に用いる薬剤の種類により突然変異誘起性が変化する<sup>1,2)</sup>。さらに、突然変異誘起物質のある濃度に対して最も高い突然変異誘起性を示すS-9量、すなわち、最適S-9量が存在する<sup>2)</sup>。これらは、S-9中に含まれる薬物代謝酵素による突然変異誘起性を持つ代謝物質への活性化あるいは突然変異誘起性を持たない代謝物質への不活性化からなる代謝の相違<sup>3)</sup>、ならびに、活性化された代謝物質が更に抱合体形成や求核的高分子への吸着<sup>2)</sup>等により不活性化されることによると考えられている。一方、突然変異誘起性に影響を与える要因として“comutagen”あるいは“antimutagen”と呼ばれる化合物が存在する。これらは、突然変異誘起性を増強あるいは抑制する化合物であり、ノルハルマンはオルトトリイジンおよびイエローOBの突然変異誘起性を発現させ、ジメチルアミノアゾベンゼンの突然変異誘起性を増強する<sup>4)</sup>。ジブチルヒドロキントルエン等の酸化防止剤には、突然変異誘起性の抑制<sup>5,6)</sup>あるいは増強<sup>7)</sup>の報告がある。しかし、これらの化合物による効果の検討には、前述のS-9の種類および量による突然変異誘起性の変動を考慮しなければならない<sup>8)</sup>。

前報<sup>9)</sup>において、かび防止剤のチアベンダゾールとオルトフェニルフェノール (OPP と略す) の混合溶液にS-9存在下で弱い突然変異誘起性が検出されたことを報告した。一方、チアベンダゾールと酸化防止剤の混合溶液にもS-9存在下で弱い突然変異誘起性が検出された<sup>10,11)</sup>ことから、OPP が酸化防止剤と同様に、突然変

異誘起性を変動させる可能性が考えられる。そこで、代謝活性化することにより突然変異誘起性を示す2-アミノアントラセン (2-AAと略す)、2-アセチルアミノフルオレン (AAFと略す) およびベンゾ(a)ピレン (B(a)Pと略す) に対するOPPの効果について、薬物代謝酵素誘導剤の異なる2種類のS-9を用いるとともに、S-9量を変えて検討した。さらに、これらの突然変異誘起物質の2種混合溶液の突然変異誘起性についても同様に検討したので報告する。

#### 実験材料と方法

**試料** 2-AA (東京化成 Lot No. LDP-3079), AAF (東京化成 Lot No. FCH-04), B(a)P (和光純薬 Lot No. DWH-3139) および OPP (東京化成 Lot No. FBI-01) をジメチルスルホキシド (DMSO と略す、和光純薬 Lot No. B-805279) に溶かした。薬物代謝酵素の誘導剤としては、フェノバルビタール (PB と略す、岩城製薬 Lot No. 10776) およびポリ塩化ビフェニール (PCB と略す、三菱モンサント、アロクロール1254) を用いた。

**Mutation test** 菌株は *Salmonella typhimurium* TA 98 を用い、Ames 法<sup>1)</sup>の変法<sup>12,13)</sup>により行った。代謝活性化にはPB (0.1%飲水投与) あるいはPCB (500 mg/kg 1回腹腔投与) により薬物代謝酵素を誘導したJcl : SD系ラット雄 (平均体重226g) の肝臓ホモジネートから調製<sup>1)</sup>したS-9を用いた。S-9 Mix<sup>12,13)</sup>中のS-9量は10, 25, 50, 100および150 $\mu$ l/0.5mlの5段階とした。

DMSO に溶かした各試料溶液0.05mlを混合した0.1mlの試料混液に、S-9 Mix 0.5ml および一夜培養の菌液0.1mlを加え、37℃で20分間の前培養を行った。これ

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

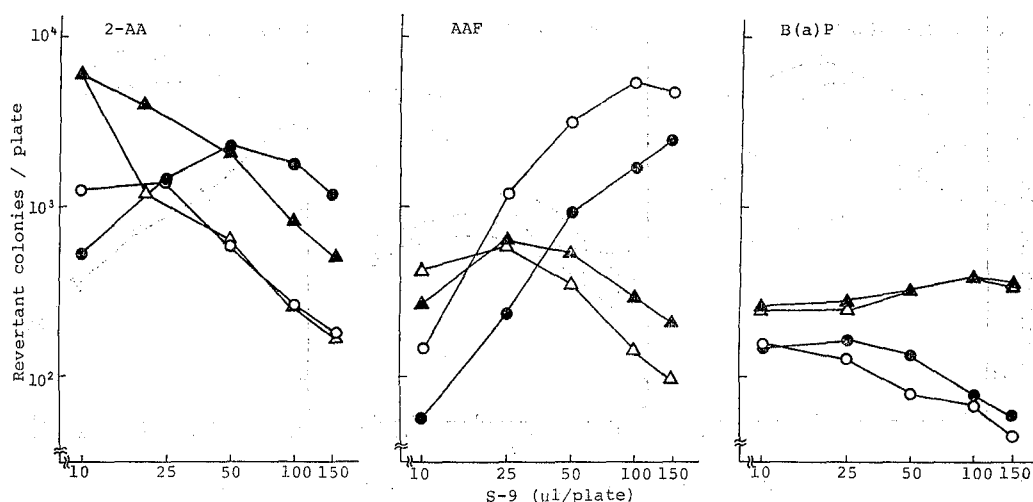


図 1. 突然変異誘起物質と OPP の混合溶液の *Salmonella typhimurium* TA98 を用いた mutation test. 2-AA は  $2\mu\text{g}$ /プレート, AAF は  $5\mu\text{g}$ /プレート, B(a)P は  $5\mu\text{g}$ /プレートおよび OPP は  $50\mu\text{g}$ /プレートを用いた.

○: PB 誘導 S-9, OPP 無添加      ●: PB 誘導 S-9, OPP 添加  
△: PCB 誘導 S-9, OPP 無添加      ▲: PCB 誘導 S-9, OPP 添加

に  $45^\circ\text{C}$  に保温した軟寒天<sup>13)</sup>  $2\text{ml}$  を加え混合後, 最少グルコース寒天培地<sup>13)</sup> に重層した.  $37^\circ\text{C}$  で 48 時間培養後, プレートに生じた復帰コロニーを計数した. なお, 測定値は, プレート 3 枚の平均値で示した.

#### 結果と考察

##### 1. 2-AA, AAF および B(a)P の突然変異誘起性に対する OPP の効果

サルモネラ菌を用いた Ames の mutation test 系において, 代謝活性化による突然変異誘起性は, 用いる S-9 の薬物代謝酵素誘導剤の種類および量によって変化する. 従って, 化学物質の突然変異誘起性に対する OPP の効果について, PB 誘導 S-9 および PCB 誘導 S-9 を用いるとともに, それぞれ S-9 量を変えて行った. 図 1 に, これらの結果を復帰コロニー数の変化で示した. 2-AA ( $2\mu\text{g}$ ) の場合は, PB 誘導 S-9 では S-9 量  $25\mu\text{l}$  が復帰コロニー数最大となり, S-9 量  $25\mu\text{l}$  が最適 S-9 量であった. PCB 誘導 S-9 では  $10\mu\text{l}$  が最大であり, S-9 量の増加は, 復帰コロニー数の著しい減少を示した. OPP ( $50\mu\text{g}$ ) の添加により, PB 誘導 S-9 では全体的に復帰コロニー数の上昇を示した. PCB 誘導 S-9 では 2-AA 単独の最適 S-9 量よりも低 S-9 量では復帰コロニー数は低下し, 高 S-9 量では上昇した. AAF ( $5\mu\text{g}$ ) の場合は, PB 誘導 S-9 では最適 S-9 量

は,  $100\mu\text{l}$  で高い突然変異誘起性を示すが, PCB 誘導 S-9 では最適 S-9 量は  $25\mu\text{l}$  であった. OPP の添加により, PB 誘導 S-9 では全体的な復帰コロニー数の低下を示し, 各 S-9 量において約 70% の低下であった. PCB 誘導 S-9 では最適 S-9 量よりも低 S-9 量では低下し, 高 S-9 量では上昇を示した. B(a)P ( $5\mu\text{g}$ ) の場合は, 最適 S-9 量が PB 誘導 S-9 で  $10\mu\text{l}$ , PCB 誘導 S-9 で  $100\mu\text{l}$  であった. OPP の添加により, PB 誘導 S-9 でわずかな上昇を示すのみであった. なお, OPP は, 単独では突然変異誘起性を示さない<sup>9,14)</sup>. 図には示していないが, 本実験条件下においても陰性であった.

2-AA および AAF の突然変異誘起性に対する OPP の効果には, 最適 S-9 量に至るまでの低 S-9 量域での低下 (抑制) および高 S-9 量域での上昇 (増強), あるいは, 最適 S-9 量の高 S-9 量側への移動と云う共通現象が見られた. ただし, 2-AA の PCB 誘導 S-9 および AAF の PB 誘導 S-9 では一方の変化のみが見られた.

突然変異誘起性に影響を与える化合物についての報告は非常に多い. それらのうち, AAF に対しては,  $\alpha$ -ナフトフラボン<sup>15,16)</sup>, アマランス<sup>17)</sup> による減少, ベンゾ(e)ピレン<sup>8)</sup>, ジエチルスチルベストロール<sup>18)</sup> による増加, あるいは, ノルハルマンによる低 S-9 量での減少および高 S-9 量での増加<sup>4)</sup> が報告されている. 2-AA

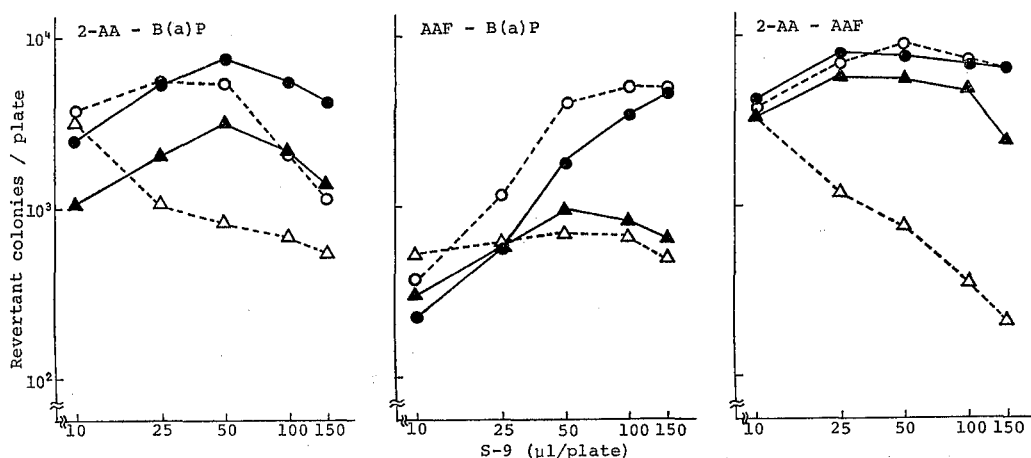


図 2. 2 種の突然変異誘起物質の混合溶液の *Salmonella typhimurium* TA98 を用いた mutation test. 2-AA は 2 $\mu$ g/プレート, AAF は 5 $\mu$ g/プレート, B(a)P は 5 $\mu$ g/プレートを用いた.

●: PB 誘導 S-9, 混合溶液    ○: PB 誘導 S-9, 両化合物の単独復帰コロニー数の加算値  
▲: PCB 誘導 S-9, 混合溶液    △: PCB 誘導 S-9, 両化合物の単独復帰コロニー数の加算値

に対しては、ノルハルマン<sup>19)</sup>、胆汁酸中のリトコール酸<sup>20)</sup>およびタバコの煙濃縮物<sup>21)</sup>による増加の報告がある。B(a)P に対しては、 $\alpha$ -ナフトフラボン<sup>22)</sup>による減少およびノルハルマンによる相反する増加<sup>23)</sup>と減少<sup>24)</sup>の報告がある。何れの化合物においても S-9 の存在が必要であり、突然変異誘起物質の活性化あるいは不活性化反応に対する作用であると考えられている。Razzouk ら<sup>25)</sup>は、B(a)P の代謝に対する  $\alpha$ -ナフトフラボンの作用は、3-メチルコラントレン (3-MC と略す) 誘導 S-9 において拮抗的阻害であり、突然変異誘起性も減少することを報告している。従って、薬物代謝酵素の基質となりうる化合物が 2 種存在する場合の拮抗は、突然変異誘起性の変動の原因となる。そこで、基質となることが明らかな突然変異誘起物質を 2 種混合した場合の突然変異誘起性の変動について検討した。

## 2. 2-AA, AAF および B(a)P の混合溶液の突然変異誘起性

2-AA-B(a)P, AAF-B(a)P および 2-AA-AAF の 3 組の混合溶液の結果を図 2 に示す。3 突然変異誘起物質の代謝系が独立であるならば、混合溶液の突然変異誘起性は、それぞれが単独の時に生じる復帰コロニー数の単純加算値を示すことが期待される。そこで、単純加算による計算値と混合溶液によって生じた復帰コロニー数を比較した。

2-AA-B(a)P の場合は、PB 誘導 S-9 では復帰コ

ロニー数の加算値は、25 $\mu$ l にピークを持っており、混合溶液による値は、これより低 S-9 量域では低下、高 S-9 量域では上昇を示した。PCB 誘導 S-9 では加算値は、10 $\mu$ l にピークがあるが、混合溶液では 50 $\mu$ l にピークが移動し、10 $\mu$ l では低下、25 $\mu$ l 以上では上昇した。AAF-B(a)P の場合は、PB 誘導 S-9 では加算値に対して全 S-9 量で低下し、PCB 誘導 S-9 では低 S-9 量域で低下、高 S-9 量域では上昇し、2-AA-B(a)P の PB 誘導 S-9 に類似した傾向を示した。また、2-AA-AAF の場合は、PB 誘導 S-9 では加算値に比較的近い変化を示したが、PCB 誘導 S-9 では 25 $\mu$ l 以上の S-9 量において高い上昇を示した。

突然変異誘起物質の混合溶液の突然変異誘起性が単独の場合と大きく異なること、また、両者の加算値に対しても異なることは、これら 2 化合物の代謝に共通酵素系が存在すること、すなわち、これらの酵素系に対して両化合物による競合 (拮抗) が起ったことを示している。

突然変異誘起性を有する物質への代謝は、S-9 の誘導に用いた誘導剤の種類あるいは動物種によって同一化合物に対しても大きく異なる。ラットの S-9 においては、AAF の突然変異誘起性は PB で高く、3-MC、非誘導<sup>25,26)</sup>の順で、2-AA では非誘導で高く、PB および PCB は低い<sup>27,28)</sup>。B(a)P は 3-MC で高く、非誘導、PB の順である<sup>29)</sup>。このような誘導剤の種類による違いは、S-9 中の薬物代謝酵素の組成の違いを反映したもの



で、代謝の中心はチトクローム P-450モノオキシダーゼによる水酸化である。この酵素は分子多様性があり、数種類の分子が存在する<sup>3,29,30)</sup>。ところが、何れのチトクローム P-450も基質特異性は極めて低い<sup>30)</sup>、それぞれが触媒する基質の水酸化に部位あるいは立体特異性を有するため、全体として基質の活性化あるいは不活性化の両方向への代謝を行うことが示唆<sup>3)</sup>されている。2-AAあるいは AAF と B(a)P とで活性化に競合が起ると、B(a)P は 2-AA あるいは AAF に比べて突然変異誘起性が比較的低いことから、混合溶液の突然変異誘起性は、加算値あるいは 2-AA および AAF の単独の時の値に対して全体的に低下すると考えられる。しかし、結果は、加算値のピークよりも低 S-9 量域では低下したが、高 S-9 量域では上昇を示した。低下は活性化反応における競合によると考えられるが、上昇は酵素量増大にともなう活性化反応の競合の消失に加えて、2-AA および AAF の不活性化反応においても B(a)P との競合が起ったためと考えられる。2-AA-AAF の場合は、PB誘導 S-9 では加算的傾向を示したのに対して、PCB 誘導 S-9 では高 S-9 量で高い値を示す対照の結果であり、両 S-9 の酵素組成の違いが明確に現われている。2-AA および AAF の活性化はチトクローム P-450による N-水酸化が最初の段階であると報告されている<sup>29)</sup>が、PB誘導 S-9 では競合は現われていない。これは代謝系が独立しているか、または、両化合物が共に高い突然変異誘起性を示すからであろう。一方、PCB 誘導 S-9 で見られた著しい上昇は、2-AA が示す S-9 量増加にともなう著しい復帰コロニー数の減少の原因となる不活化反応において、AAF あるいはその代謝物質が競合していると推察される。

2-AA および AAF に対する OPP の効果は、両化合物に対する B(a)P の効果に類似した結果であった。OPP はラット肝臓の S-9 によって代謝され、2,3-ジヒドロキシビフェニールおよび 2,5-ジヒドロキシビフェニールとなる。非誘導 S-9 では 2,5-ジヒドロキシビフェニールが大部分であるが、3-MC 誘導 S-9 では両代謝物質が非誘導に比べて増加する<sup>31)</sup>、これは OPP がいくつかの P-450 で代謝される可能性を示している。従って、2-AA および AAF に対する効果は、おそらく 2 化合物の活性化および不活性化の反応全体に対する競合の結果であろうと推察される。

最近、2-AA および AAF の突然変異誘起性を増加あるいは減少させる効果についての報告が多い<sup>15-21)</sup>。S-9 量が単一濃度のみの増加または減少は、本報告で見られ

た OPP あるいは B(a)P の効果のように減少あるいは増加の場合の一面を見ている可能性を否定できない。従って、S-9 量を変えて検討することが重要である。また、突然変異誘起性の増減効果を有する化合物を“comutagen”あるいは“antimutagen”と呼ぶが、S-9 存在下で代謝反応に影響を与える化合物では、Ashby ら<sup>32)</sup>は“metabolic potentiation”, Weeks ら<sup>8)</sup>は“metabolic option”が実際の作用としての意味であると述べている。これらの用語についても検討する必要がある。

## 要 約

Ames の mutation test 系において、2-AA, AAF および B(a)P の突然変異誘起性に対する OPP の効果について、PB および PCB 誘導 S-9 を用い、S-9 量を変えて検討した。また、これらの突然変異誘起物質の 2 種混合溶液の突然変異誘起性についても同様に検討した。2-AA および AAF の場合は、単独で最も高い復帰コロニー数が出現する S-9 量よりも低 S-9 量域では、OPP の添加により復帰コロニー数は減少し、高 S-9 量域では増加した。B(a)P の場合は、OPP の添加により変化がなかった。2-AA と B(a)P および AAF と B(a)P の混合溶液の場合は、それぞれが単独の時に示す復帰コロニー数の加算値に対して混合溶液の復帰コロニー数は低 S-9 量域で減少し、高 S-9 量域で増加した。2-AA と AAF の混合溶液の場合は、PB 誘導 S-9 では混合溶液の復帰コロニー数は加算値に近い変化を示したが、PCB 誘導 S-9 では 2-AA と B(a)P および AAF と B(a)P の混合溶液の場合と同様の変化を示した。

## 文 献

- 1) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.: *Mutation Res.*, 31, 347, 1975
- 2) Malaveille, C., Kuroki, T. and Brun, G.: *Mutation Res.*, 63, 245, 1979
- 3) Deutsch, J., Leutz, J.C. and Yang, S.K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 3123, 1978
- 4) Nagao, M., Yahagi, T. and Sugimura, T.: *B. B. R. C.*, 83, 373, 1978
- 5) Rahimtula, A.D., Zachariah, P.K. and O'Brien, P.J.: *Biochem. J.*, 164, 473, 1977
- 6) Calle, L.M., Sullivan, P.D. and Nettleman, M.D.: *B. B. R. C.*, 85, 351, 1978
- 7) 藤田 博, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 41, 1979
- 8) Weeks, C.E., Rao, T.K. and Young, J.A.: *Toxicology*, 14, 255, 1979

- 9) 藤田 博, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 29, 1980
- 10) 藤田 博, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 26, 1980
- 11) 藤田 博, 平賀興吾: 東京衛研年報, 32-2, 25, 1981
- 12) 矢作多貴江: 蛋白質核酸酵素, 20, 1178, 1975
- 13) 藤田 博, 小嶋昭江, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 53, 1977
- 14) 小嶋昭江, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 83, 1978
- 15) Nelson, W.L. and Thorgeirsson, S.S.: *B.B. R.C.*, 71, 1201, 1976
- 16) Kojima, A., Kawano, S. and Hiraga, K.: *Japan. J. Pharmacol.*, 30, 421, 1980
- 17) McCalla, D.R., Kaiser, C. and Lu, C.: *Mutation Res.*, 82, 201, 1981
- 18) Allaben, W.T., Louie, S.C. and Lazear, E.J.: *Cancer Letters*, 7, 109, 1979
- 19) Matsumoto, T., Yoshida, D. and Mizusaki, S.: *Mutation Res.*, 56, 85, 1977
- 20) Silverman, S.J. and Andrews, A.W.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 59, 1557, 1977
- 21) Hannan, M. A., Recio, L., Deluca, P. P. and Enoch, H.: *Cancer Letters*, 13, 203, 1981
- 22) Razzouk, C., Agazzi-Léonard, E. and Cumps, J.: *B.B. R.C.*, 85, 1007, 1978
- 23) Fujino, T., Fujiki, H. and Nagao, M.: *Mutation Res.*, 58, 151, 1978
- 24) Levitt, R. C., Legraverend, C., Nebert, D. W. and Pelkonen, O.: *B.B. R.C.*, 79, 1167, 1977
- 25) Ioannides, C., Parkinson, C. and Parke, D. V.: *Xenobiotica*, 11, 701, 1981
- 26) Schut, H. A. J. and Thorgeirsson, S. S.: *Cancer Res.*, 38, 2501, 1978
- 27) Zeiger, E., Chhabra, R. S. and Margolin, B. H.: *Mutation Res.*, 64, 379, 1979
- 28) Hutton, J. J. and Hackney, C.: *Cancer Res.*, 35, 2461, 1975
- 29) Norman, R. L., Muller-Eberhard, U. and Johnson, E. F.: *B.B. R.C.*, 89, 195, 1979
- 30) 今井嘉郎: 蛋白質核酸酵素, 22, 374, 1977
- 31) Halpaap-Wood, K., Horning, E. C. and Horning, M. G.: *Drug Metab. Dispos.*, 9, 103, 1981
- 32) Ashby, J. and Styles, J. A.: *Mutation Res.*, 54, 105, 1978

オルトフェニルフェノールおよびオルトフェニルフェノールナトリウム  
長期摂取ラットの細胞遺伝学的研究

吉田 誠二\*, 平賀 興吾\*

Cytogenetic Studies on Rats Fed with *o*-Phenylphenol (OPP)  
and Sodium *o*-Phenylphenate (OPP-Na) for Long Term

SEIJI YOSHIDA\* and KOGO HIRAGA\*

Fungicides, *o*-Phenylphenol (OPP), were fed to F344/Du (Fischer) male rats for 13 weeks and sodium *o*-Phenylphenate (OPP-Na) for 104 weeks mixed in the diet. Chromosome preparations were made from the bone marrow and scored for the presence of structural and numerical aberrations. OPP and OPP-Na were found to have no effects on the chromosome of the rat bone marrow cells.

**Keywords:** *o*-phenylphenol, sodium *o*-phenylphenate, rat, long term fed, chromosome analysis

緒 言

かび防止剤であるオルトフェニルフェノール（以下 OPP と略す）およびそのナトリウム塩（以下 OPP-Na と略す）は、わが国では食品添加物として、かんきつ類に限り使用を許可されている。

最近、平賀ら<sup>1)</sup>は、OPP-Na 添加飼料摂取ラットの膀胱に腫瘍の発生を認め、OPP-Na の発癌性が示唆された。

今回、OPP および OPP-Na による長期飼育ラットの骨髓細胞の染色体分析を行なったので報告する。

材料および方法

1. 試料: OPP は、Dow Chemical Co. の Dovicide 1 (Lot No. MMO1040), OPP-Na は、Dow Chemical Co. の Dovicide A (Lot No. MMO4196A) を用いた。

2. ラットを用いた染色体試験: 4 週齢の F344/Du (Fisher) の雄ラットを日本チャールスリバー飼育所より購入、一週間の予備飼育したのち実験に供した。

飼育は温度  $25 \pm 1^\circ$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、照明午前 6 時～午後 5 時、換気毎時 10 回の飼育室にて行なった。なお、基本飼料は、日本クレア飼料製固型飼料 CE-2 とし、試験開始まで水とともに自由に与えた。

OPP および OPP-Na の両検体を基本飼料に添加し、各種濃度の検体添加飼料を作製、ラット 5 週齢時より投与、水とともに自由摂取させた。OPP 群は 13 週間後、

OPP-Na 群は 104 週間投与、その後 106 週まで基本飼料を与えた後に各群 5 匹の動物を屠殺、常法により骨髓細胞を採取し染色体標本を作製し染色体分析を行なった。分析は染色体の構造および数的異常を指標とし、分裂中期のよく拡がった細胞を検体投与群は 150～200 細胞および対照群については 200 細胞を観察した。

結 果

OPP 13 週間投与試験期間内に死亡したラットは、2.5%、1.25%、0.625% 群および対照群のいずれにおいても見られなかった。また、同時に行なった飼料摂取量の測定において 2.5% 群の OPP 摂取量は 1554 mg/kg/day、1.25% 群は 763 mg/kg/day、0.625% 群は 377 mg/kg/day であった<sup>2)</sup>。

染色体分析の結果は Table 1 に示す通りで、2.5%、1.25%、および 0.625% 群のいずれにおいても染色体の構造ならびに数的異常を伴う細胞の増加は見られなかった。また、2.5% 群に見られている polyploidy および染色体の構築性変化である sticky は、200 細胞に各一例という低頻度であった。次の 1.25% および 0.625% 群についても染色体の軽度の異常と考えられる染色分体の gap が各一例認められたのみであり、OPP の染色体に及ぼす影響は全く見られなかった。なお、今回の対照群の自然誘発異常頻度は低く (1.5%)、我々が現在までに行なってきた無処理 F344 ラットの染色体分析での異常の頻度は 0～3% であり、見られる染色体の構造およ

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Chromosome Analysis on Male Rats Fed with *o*-Phenylphenol (OPP) for 13 Weeks

| Chemical Conc. (%) | Animal No. | No. of Cells Analysed | Total Aberrations | gap |    | break |    | O <sub>t</sub> <sup>1)</sup> |
|--------------------|------------|-----------------------|-------------------|-----|----|-------|----|------------------------------|
|                    |            |                       |                   | C1  | C2 | C1    | C2 |                              |
| 2.5                | 2          | 50                    | 0                 | 0   | 0  | 0     | 0  | 0                            |
|                    | 7          | 50                    | 1                 | 0   | 0  | 0     | 0  | 1 <sup>2)</sup>              |
|                    | 12         | 50                    | 1                 | 1   | 0  | 0     | 0  | 0                            |
|                    | 18         | 50                    | 1                 | 0   | 0  | 0     | 0  | 1 <sup>3)</sup>              |
|                    | total      | 200                   | 3                 | 1   | 0  | 0     | 0  | 2                            |
| 1.25               | 1          | 50                    | 0                 | 0   | 0  | 0     | 0  | 0                            |
|                    | 6          | 50                    | 0                 | 0   | 0  | 0     | 0  | 0                            |
|                    | 17         | 50                    | 1                 | 1   | 0  | 0     | 0  | 0                            |
|                    | 32         | 50                    | 0                 | 0   | 0  | 0     | 0  | 0                            |
|                    | total      | 200                   | 1                 | 1   | 0  | 0     | 0  | 0                            |
| 0.625              | 3          | 50                    | 1                 | 1   | 0  | 0     | 0  | 0                            |
|                    | 9          | 50                    | 0                 | 0   | 0  | 0     | 0  | 0                            |
|                    | 14         | 50                    | 0                 | 0   | 0  | 0     | 0  | 0                            |
|                    | total      | 150                   | 1                 | 1   | 0  | 0     | 0  | 0                            |
| 0                  | 4          | 50                    | 1                 | 1   | 0  | 0     | 0  | 0                            |
|                    | 5          | 50                    | 1                 | 0   | 0  | 1     | 0  | 0                            |
|                    | 10         | 50                    | 0                 | 0   | 0  | 0     | 0  | 0                            |
|                    | 15         | 50                    | 1                 | 1   | 0  | 0     | 0  | 0                            |
|                    | total      | 200                   | 3                 | 2   | 0  | 1     | 0  | 0                            |

1) Other aberration 2) Polyploidy 3) Stikey

び数的異常の殆んどが gap, break ならびに polyploidy であり, バックグラウンドデータと同様であった。

次に, OPP-Na 104週間投与試験におけるラットの死亡率は, 2.0%群で80%, 0.7%群では12%であり, 殆んどが腫瘍発生による死亡であった。なお, 対照群は32%であった。OPP-Na の摂取量は2.0%群で 800mg/kg/day となり, これは OPP 520mg/kg/day に相当するものであり, 同様に 0.7%は 280mg/kg/day, OPP 182 mg/kg/day という結果であった。

染色体分析の結果は Table 2 に示す様に, 2.0%および 0.7%群のいずれにおいても染色体の構造および数的異常を伴う細胞の増加は見られなかった。先述したように, OPP の2.0%群と同様に OPP-Na の0.7%群で polyploidy が一例認められたが OPP-Na の染色体に及ぼす影響は見られなかった。なお, 対照群の頻度も我々のバックグラウンドデータと同様に低頻度であり, 加齢による染色体異常細胞の出現および増加は全く見られなかった。

これらの結果により, 本実験条件下では OPP および

OPP-Na の長期摂取による染色体異常誘発性は無いものと思える。

#### 考 察

現在行なわれている染色体試験については, 被検物質を一回もしくは数回投与する急性試験<sup>3)</sup>が繁用されているが, 医薬品や食品添加物の様に長期摂取が考えられる物質については被検物質の長期摂取動物の染色体分析も必要であると思われる。これまでに我々は, 医薬品である Acetaminophen<sup>4)</sup> およびかんきつ類の食品添加物である Thiabendazole<sup>5)</sup> などの長期動物実験の際に被検動物骨髓細胞の染色体分析を試みて来っており, いずれも良好な染色体標本を得ており, 観察も比較的容易に行なえた。特に Acetaminophen においては, 2年間という長期投与試験<sup>6)</sup>で染色体異常を伴う細胞の増加を認めており, 本試験の有用性を示唆する結果であった。

今回, これに習い, かび防止剤である OPP および OPP-Na の長期試験を行い, 染色体分析を試みたが結果は共に陰性であった。先に我々は OPP および OPP-Na の *in vitro* (CHO-K1 細胞) および *in vivo* (マウ

Table 2. Chromosome Analysis on Male Rats Fed with Sodium *o*-Phenylphenate (OPP-Na) for 104 Weeks

| Chemical Conc. (%) | Animal No. | No. of Cells Analysed | Total Aberrations | gap |    | break |    | Ot <sup>1)</sup> |
|--------------------|------------|-----------------------|-------------------|-----|----|-------|----|------------------|
|                    |            |                       |                   | C1  | C2 | C1    | C2 |                  |
| 2.0                | 6          | 50                    | 1                 | 1   | 0  | 0     | 0  | 0                |
|                    | 18         | 50                    | 0                 | 0   | 0  | 0     | 0  | 0                |
|                    | 32         | 50                    | 1                 | 0   | 0  | 1     | 0  | 0                |
|                    | 77         | 50                    | 0                 | 0   | 0  | 0     | 0  | 0                |
|                    | total      | 200                   | 2                 | 1   | 0  | 1     | 0  | 0                |
| 0.7                | 5          | 50                    | 1                 | 1   | 0  | 0     | 0  | 0                |
|                    | 9          | 50                    | 0                 | 0   | 0  | 0     | 0  | 0                |
|                    | 14         | 50                    | 2                 | 1   | 0  | 0     | 0  | 1 <sup>2)</sup>  |
|                    | 24         | 50                    | 0                 | 0   | 0  | 0     | 0  | 0                |
|                    | total      | 200                   | 3                 | 2   | 0  | 0     | 0  | 1                |
| 0                  | 1          | 50                    | 0                 | 0   | 0  | 0     | 0  | 0                |
|                    | 7          | 50                    | 1                 | 1   | 0  | 0     | 0  | 0                |
|                    | 11         | 50                    | 1                 | 0   | 0  | 1     | 0  | 0                |
|                    | 13         | 50                    | 0                 | 0   | 0  | 0     | 0  | 0                |
|                    | total      | 200                   | 2                 | 1   | 0  | 1     | 0  | 0                |

1) Other aberration 2) Polyploidy

スおよびラット) 試験<sup>7)</sup>を行い、共に陰性の報告を行なったが、最近、縄井ら<sup>8)</sup>は、CHO-K1 細胞を用いた *in vitro* 試験において OPP の比較的大量を短時間処理する方法により OPP に起因する染色体異常細胞の増加を認めた。また、同時に行なった姉妹染色分体交換試験 (Sister Chromatid Exchanges: SCEs) において SCEs の増加を認め、初めて OPP の染色体異常および SCEs 誘発性を明らかにした。このことは、従来行なわれてきた試験、つまり、検体処理後ただちに染色体分析を行なうという方法では検出し得ない物質が存在することを示すものである。これは、細胞を大量の被検物質で処理し、その後正常な培地に戻し2回目の分裂期で染色体分析を行なうという方法、つまり、SCEs 試験と同様な形式で行なう方法が一般染色体試験においても必要であることが示唆されている。この *in vitro* で陽性に検出したOPP も先述の様に、*in vivo* 試験では全く異常を示さなかった。これは、*in vivo* で染色体異常が誘発される過程は、用いた物質の吸収、生体内分布および代謝等の培養細胞とは異なる要因が関与するものと考えられ、哺乳動物では染色体の標的である DNA と反応するために十分な濃度に達しない場合もあり得るものと思える。今回は

陰性の結果であったが、長期摂取動物の染色体分析においても新たな工夫が必要であると思われる。

#### 文 献

- 1) Hiraga, K. and Fujii T.: *Food and Cosmetic Toxicology*, 19, 303-310, 1981
- 2) 中村清純, 井口重孝, 池田虎雄, 平賀興吾: 東京衛研年報, 32-2, 33, 1981
- 3) Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research: *Toxicology and Applied Pharmacology*, 22, 269, 1972
- 4) 吉田誠二, 縄井寿美子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 102, 1980
- 5) 吉田誠二, 縄井寿美子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 48, 1979
- 6) 吉田誠二: 未発表
- 7) 吉田誠二, 縄井寿美子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 30-2, 44, 1979
- 8) 縄井寿美子, 吉田誠二, 中尾順子, 平賀興吾: 日本環境変異原学会第10回研究発表会講演要旨集, 1981

## チアベンダゾール投与雌ラットにおける膀胱重量増加について

三栗谷 久 敏\*, 林 田 志 信\*, 藤 井 孝\*, 平 賀 興 吾\*

### Increase of Urinary Bladder Weight in Female F344/DuCrj Rats Fed with Thiabendazole (TBZ)

HISATOSHI MIKURIYA\*, SHINOBU HAYASHIDA\*, TAKASHI FUJII\*  
and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** チアベンダゾール thiabendazole, カビ防止剤 fungicide, 摂取試験 feeding test, 膀胱 urinary bladder, 雌ラット female F344/DuCrj rat

#### はじめに

カビ防止作用を有するチアベンダゾール(以下TBZとする)はバナナおよび柑きつ類の保存料として食品添加物に指定されている<sup>1)</sup>。当部ではこれまでラットによる急性、亜急性毒性試験などを行いその安全性を検討してきた<sup>2-11)</sup>。そのなかで、TBZ投与に関連して雌F344/DuCrjラットの膀胱に重量増加がみられ、高濃度群で粘膜上皮細胞に軽度の増殖が観察された<sup>11)</sup>。当部ではTBZと同じカビ防止剤であるオルトフェニルフェノールナトリウム(OPP-Na)にラット膀胱発ガン作用<sup>12)</sup>を認めていることから、特にこの膀胱の増殖性変化に注目した。本報告はTBZの雌F344/DuCrjラット膀胱に対する重量増加作用を確認する目的で、TBZ添加飼料を16週間摂取させた結果である。

#### 試験材料および方法

**検体:** 米国メルク社製 thiabendazole microfine MSD (Lot No. BZA-539) を日本クレア(株)粉末飼料 CE-2 (水分7.8, 粗蛋白23.6, 粗脂肪4.4, 粗繊維4.9, 粗灰分6.6, 可溶性無窒素物52.7%, 344.8Cal/100g) にそれぞれ0(対照), 0.05, 0.1, 0.2, 0.4および0.8%の濃度で添加し固型化したものを試験飼料とした。

**試験動物:** 日本チャールスリバー(株)生育のF344/DuCrjラット雌を4週令で購入し、1週間予備飼育後発育良好なものを試験に供した。

**飼育条件:** 室温 $25\pm 1^{\circ}$ , 湿度 $55\pm 5\%$ , 換気毎時10回, 照明午前6時から午後5時に制御したbarrier system飼育室において、前面および床面が網のステンレス製ケージに個別に収容、自動給水装置(細菌ろ過器経由)付ベルト式飼育架台にて飼育した。試験開始前の飼料には固

型飼料 CE-2 を用いた。

**検体投与および投与期間:** 試験は対照およびTBZ投与の2群で行うこととし、投与期間は16週間とした。対照群には全期間無添加の試験飼料を与えた。投与群には試験開始時から1週間0.05%添加飼料を与えた。その後、試験2週目から2週間は0.1%添加飼料、試験4週目から2週間は0.2%添加飼料、試験6週目から6週間は0.4%添加飼料、試験12週目から試験終了までの5週間は0.8%添加飼料を与えた。

**試験方法:** ラットは対照群、投与群とも各30匹を用い、これをランダムに飼育架台に配置した。ラットが5週令になった時点で試験飼料を水道水とともに自由に摂取させ試験を開始した。一般状態は毎日午前9~10時に観察し、体重は毎週1回測定した。投与終了後ラットを断頭し放血致死せしめ、解剖した。膀胱は注射筒を用い残留尿を除去した後、10%緩衝ホルマリン液0.5mlを注入し膨張させ内尿道口付近を結紮、固定した。膀胱は1週間固定後、正中線で2分し、粘膜面の観察および重量の測定を行った。固定後の膀胱は定法に従ってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色を行い光顕的に観察した。

なお結果の推計学的検討にあたってはStudent's *t*-testを用い危険率を5%においた。

#### 試験結果および考察

体重の推移をFig. 1に示した。投与群は試験4週から増加が鈍り始めたが、試験11週まではわずかずつ増加した。試験12週以後は減少に転じ、試験終了時まで急激な低下を続けた。試験4週以後試験終了時まで、投与群の体重は対照群に比べ有意に小さかった。体重の増加抑制

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

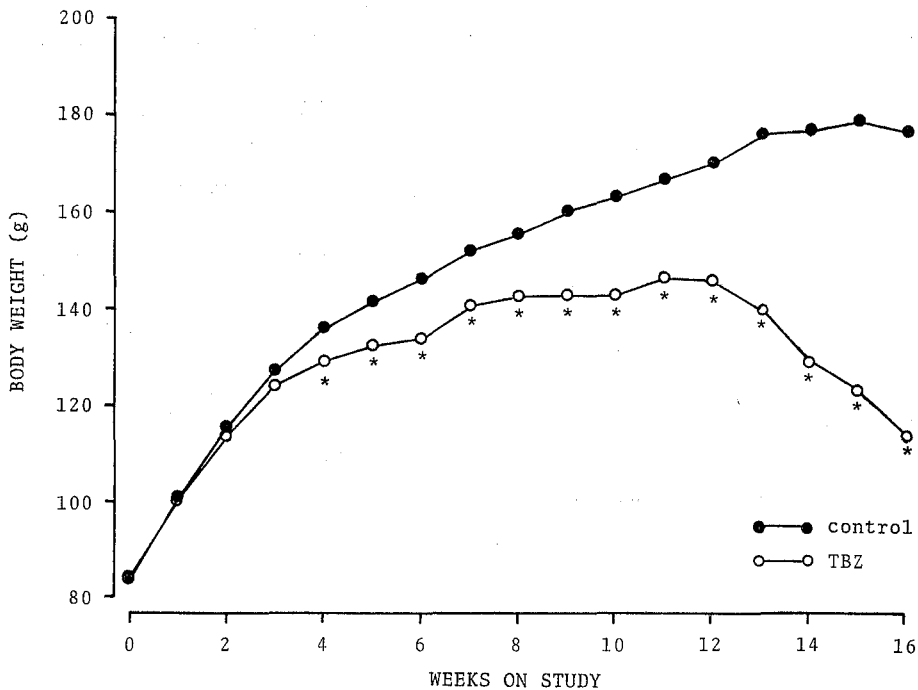


Fig. 1. Changes of Body Weight in Female F344/DuCrj Rats Fed with TBZ

\*  $P < 0.05$  in comparison with control value

Table 1. Urinary Bladder Weight in Female F344/DuCrj Rats Fed with TBZ

| Groups  | No. of rats | Body weight (g)                | Urinary bladder weight (mg) |                        |
|---------|-------------|--------------------------------|-----------------------------|------------------------|
|         |             |                                | Absolute                    | Relative <sup>1)</sup> |
| Control | 30          | 177.2 $\pm$ 11.8 <sup>2)</sup> | 94.0 $\pm$ 22.2             | 53.3 $\pm$ 13.6        |
| TBZ     | 30          | 114.0 $\pm$ 9.2*               | 109.3 $\pm$ 28.6*           | 97.0 $\pm$ 29.3*       |

1) mg/100g body weight 2) Mean  $\pm$  S. D.\*  $P < 0.05$  in comparison with control value

とともに投与群では痩せが目立ち始め、試験終了時には著明となったが、被毛の状態、行動などは対照群と大差なかった。前報<sup>10)</sup>で示したようにラットは TBZ 添加飼料の摂取を忌避する傾向がみられる。このことから今回の投与群における体重の増加抑制および減少は、摂餌拒否による飼料摂取量の低下が原因と考えられる。特に試験12週以後の急激な体重減少は、試験飼料が本試験の最高濃度 0.8% に切り換えられたため強い摂餌拒否を起したことに由来するものと思われる。

膀胱重量を Table 1 に示した。投与群では対照群に比べ絶対重量および体重比重量とも有意に大きかった。

膀胱の肉眼的および組織学的検索では対照群、投与群

とも著明な変化が認められなかった。

ラットは高濃度の TBZ 添加飼料ほど摂取を忌避する傾向が強くみられることから<sup>10)</sup>、本試験では TBZ 添加飼料を低濃度から高濃度へと切り換えながら投与した。その結果、雌 F344/DuCrj ラットの膀胱重量は TBZ 摂取により増加することを確認した。しかし今回の投与方法では亜急性毒性試験<sup>10, 11)</sup>で 0.8% 群の少数にみられた膀胱粘膜上皮細胞の増殖は認められなかった。今後投与方法を考慮し、さらに検討を加えたいと考えている。

#### 要 旨

チアベンダゾール (TBZ) の雌 F344/DuCrj ラット膀胱に対する重量増加作用を確認する目的で、TBZ 添加

飼料による16週間の飼育試験を行った。膀胱重量の増加は認められたが、肉眼的・組織学的変化は著明でなかった。

#### 文 献

- 1) 石館守三：食品添加物公定書解説書，第4版，B-625, 1979, 廣川書店
- 2) 小嶋昭江，平賀興吾：東京衛研年報，29-2, 83, 1978
- 3) 吉田誠二，益淵正典，平賀興吾：東京衛研年報，29-2, 86, 1978
- 4) 小縣昭夫，安藤 弘，久保喜一，平賀興吾：東京衛研年報，29-2, 112, 1978
- 5) 米山允子，伊川三枝子，平賀興吾：東京衛研年報，30-2, 80, 1979
- 6) 藤田 博，平賀興吾：東京衛研年報，31-2, 26, 1980
- 7) 藤田 博，平賀興吾：東京衛研年報，31-2, 29, 1980
- 8) 三栗谷久敏，林田志信，高橋 博，平賀興吾：東京衛研年報，31-2, 20, 1980
- 9) 林田志信，三栗谷久敏，平賀興吾：東京衛研年報，32-2, 1, 1981
- 10) 三栗谷久敏，林田志信，高橋 博，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，32-2, 5, 1981
- 11) 藤井 孝，福森信隆，長澤明道，三栗谷久敏，林田志信，高橋 博，矢野範男，湯澤勝廣，平賀興吾：東京衛研年報，32-2, 16, 1981
- 12) Hiraga, K. and Fujii, T.: *Fd Cosmet. Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 47, 15, 1979



チアベンダゾール (TBZ) のマウスにおける催奇形性について  
TBZ をアラビアゴム溶液に懸濁して投与した場合

小 縣 昭 夫\*, 安 藤 弘\*, 久 保 喜 一\*, 平 賀 興 吾\*

Teratological Studies of Thiabendazole (TBZ) in Mice  
Single Administration Test with TBZ Suspended in Gum Arabic Solution

AKIO OGATA\*, HIROSHI ANDO\*, YOSHIKAZU KUBO\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords** : チアベンダゾール Thiabendazol, 食品添加物 food additive, 農薬 pesticide, 駆虫薬 anthelmintic, 防かび剤 fungicide, マウス mouse, 催奇形性 teratogenicity

はじめに

我々はチアベンダゾール (TBZ, 食品添加物・保存料, 農薬・殺菌剤, 医薬品・駆虫薬, その他・防かび剤) のマウスにおける催奇形性<sup>1,2)</sup>を明らかにしてきたが, その成績はTBZをオリーブ油に懸濁経口投与して得たものである。懸濁媒体 (vehicle) により急性生物効果に相違の生ずることも考えられるので, 今回TBZをアラビアゴム溶液に懸濁経口投与した場合の奇形発生を検討した。

試験材料ならびに方法

1. 実験動物 Jcl: ICR マウス雌雄を日本クレア (株) より4週齢時に購入, 8~13週齢 (体重25.0~33.0g) に達した発育良好なものを選び試験に供した。

2. 飼育条件 温度 $25 \pm 1^\circ$ , 湿度 $55 \pm 5\%$ , 照明午前6時~午後6時, 換気毎時10回の飼育室にて日本クレア製固型飼料CE-2および水道水を自由に与え, 試験開始 (交配) 時までアルミケージ (225×325×110mm) に10匹, 交配後はプラスチックケージ (180×305×110mm) にて1匹飼いとす。ただし雄マウスは交配前1週間より1匹飼いとす。

3. 交配方法 雌雄1:1終夜同居により, 翌朝陰栓の確認されたものを妊娠動物とみなし, その日を妊娠0日とした。

4. 試料および投与方法 チアベンダゾール (TBZ) は Merck Sharp & Dohme International社製 Lot No. BZA-539, 純度98.5%を使用した。溶媒 (vehicle) は, アラビアゴム末 (岩井化学薬品 (株) 製 Lot No. 511215) を蒸留水にて溶解した0.5%溶液とし, これに懸濁して投与した。用量は, 2400mg~1157mg/10ml/kg までの間に公

比1.2で5段階を設け, 妊娠9日1回胃ゾンデにより強制経口投与した。対照群には, 0.5%アラビアゴム溶液10ml/kgを投与した。

5. 観察方法 体重測定および一般状態の観察を毎日行ない, 妊娠18日にエーテルにより麻酔屠殺し, 次の検索を行なった。

屠殺後直ちに開腹, 子宮を開き着床痕, 早・後期死亡

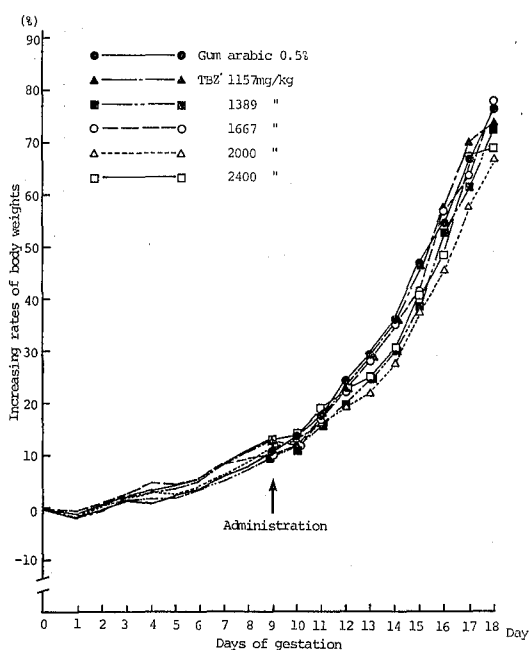


Fig. 1. Increasing rates of body weights  
Single administration test with TBZ  
suspended in Gum arabic solution

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Data from mice orally treated with thiabendazole (TBZ) on days 9 of gestation: Organ weights of mother mice

| Dose          | No. of dam | Liver<br>g<br>g/100g                           | Heart<br>mg<br>mg/100g    | Spleen<br>mg<br>mg/100g   | Kidney(L)<br>mg<br>mg/100g | Kidney(R)<br>mg<br>mg/100g |
|---------------|------------|------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| TBZ 2400mg/kg | 9          | 3.0±0.3 <sup>1)</sup><br>8.5±0.5 <sup>2)</sup> | 156.1±14.7*<br>447.9±30.2 | 129.2±20.4<br>373.2±71.1  | 254.3±27.3<br>729.0±51.3   | 269.7±25.3<br>773.9±51.1   |
| TBZ 2000mg/kg | 8          | 2.9±0.4<br>8.7±0.5                             | 149.4±11.3<br>449.6±32.3  | 129.3±54.5<br>392.0±143.0 | 232.7±30.3<br>713.1±65.1   | 242.3±27.8<br>743.6±62.5   |
| TBZ 1667mg/kg | 8          | 2.9±0.2<br>8.8±0.5                             | 152.2±11.9<br>455.4±27.4  | 127.7±45.4<br>379.3±118.8 | 239.3±27.4<br>716.9±82.1   | 254.4±27.8<br>761.5±77.4   |
| TBZ 1389mg/kg | 9          | 2.8±0.4<br>8.3±0.9                             | 142.2±9.1<br>421.0±17.0   | 115.1±11.7<br>340.8±33.1* | 234.1±22.1<br>693.7±67.9   | 243.9±22.8<br>722.7±67.3   |
| TBZ 1157mg/kg | 10         | 2.9±0.2<br>9.0±0.9                             | 145.5±9.1<br>449.9±46.3   | 118.6±23.5<br>465.6±72.9  | 233.8±32.0<br>720.3±95.8   | 256.8±23.9<br>793.4±92.0   |
| Gum arabic    | 9          | 2.9±0.3<br>8.7±0.7                             | 142.9±8.5<br>436.5±27.0   | 136.1±29.0<br>418.9±105.1 | 232.0±20.5<br>708.4±61.5   | 247.1±25.8<br>753.7±68.1   |

| Dose          | No. of dam | Lung<br>mg<br>mg/100g    | Adrenal(L)<br>mg<br>mg/100g | Adrenal(R)<br>mg<br>mg/100g | Ovary(L)<br>mg<br>mg/100g | Ovary(R)<br>mg<br>mg/100g |
|---------------|------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| TBZ 2400mg/kg | 9          | 195.9±30.0<br>561.6±71.8 | 3.9±0.3<br>11.1±0.7         | 3.6±0.2**<br>10.3±0.8       | 10.4±1.8<br>29.7±4.0      | 10.5±1.4<br>31.3±4.5      |
| TBZ 2000mg/kg | 8          | 197.5±16.1<br>606.6±32.4 | 3.4±0.4<br>10.6±1.5         | 3.0±0.7<br>9.1±2.2          | 10.8±1.8<br>33.3±4.9      | 9.6±2.6<br>28.9±6.7       |
| TBZ 1667mg/kg | 8          | 192.0±15.7<br>574.2±28.9 | 3.2±0.5<br>9.5±1.5          | 3.0±0.7<br>9.0±2.1          | 11.5±2.4<br>34.4±7.1      | 11.7±3.2<br>34.9±8.3      |
| TBZ 1389mg/kg | 9          | 195.4±12.0<br>580.0±48.2 | 3.6±0.5<br>10.6±1.5         | 3.2±0.4<br>9.6±1.5          | 11.0±0.3<br>32.6±6.2      | 10.3±1.8<br>29.5±4.7      |
| TBZ 1157mg/kg | 10         | 191.7±15.0<br>592.7±62.9 | 3.6±0.6<br>11.0±1.8         | 3.3±0.3<br>10.1±0.8         | 9.5±1.6<br>29.5±5.4       | 11.3±2.5<br>34.9±7.3      |
| Gum arabic    | 9          | 187.6±10.8<br>573.4±39.4 | 3.6±0.5<br>11.0±1.6         | 3.1±0.2<br>9.6±1.2          | 9.5±2.0<br>28.9±6.0       | 10.2±1.2<br>31.0±2.8      |

1) Mean (absolute)±S.D.

2) Mean (relative)±S.D.

\* P&lt;0.05

\*\* P&lt;0.01

胎児，生児数を数え，生児は体重測定，性の判別，外表の異常の観察を行ない，次いで母体の卵巣の黄体数を数え，主要臓器の重量測定と肉眼的異常の検索を行なった。生児は，95%エチルアルコールで固定後アリザリンレッドSで骨格染色<sup>3)</sup>を行ない骨格異常の有無を調べた。

6. 結果のまとめ方 西村の報告<sup>4)</sup>に準拠して行った。

#### 結果および考察

1. 母体の所見 1) 体重および一般状態：妊娠0日の体重を100とした体重増加率の推移は図1に示す通りで，いずれのTBZ投与群においても対照であるアラビアゴム投与群との間に推計学的有意差は認められなかった。しかし2400mgおよび2000mg投与群では投与後3・4日（妊娠12・13日）頃から体重増加が抑制される傾向が認められた。妊娠18日の屠殺時まで死亡した母体は

1667mg群1例，アラビアゴム投与群1例でいずれも投与後2日目に死亡した。この死亡した2匹はいずれも膈口よりの出血が認められ，また体重も急激に低下していることから流産と考えられた。他に行動その他の一般状態に異常を認めなかった。

2) 剖検所見および臓器重量：妊娠18日に屠殺開腹した剖検所見ではいずれの投与群にも特記する変化は認められなかった。主要臓器重量は表1に示すとおりで，最高投与の2400mg群心臓および副腎（右）が絶対重量で重く，また腎臓（左・右）重量が推計学的に有意ではなかったがやや重かった。しかし投与との関連を明確に示す変動はみられなかった。

2. 胎児に係わる所見 1) 妊娠の成立：妊娠（着床）成立を確認した母体は2400mg群9/9(100%)，2000mg群9/10(90%)，1667mg群8/9(88.9%)，1389mg群9/10

Table 2. Data from mice orally treated with thiabendazole (TBZ) on days 9 of gestation : Prenatal observation

| Doses                                      | 2400mg/kg  | 2000mg/kg | 1667mg/kg  | 1389mg/kg | 1157mg/kg | Gum arabic |
|--------------------------------------------|------------|-----------|------------|-----------|-----------|------------|
| a) Number of female mice mated             | 9          | 10        | 10         | 10        | 10        | 10         |
| b) Number of female mice died              | 0          | 0         | 1          | 0         | 0         | 1          |
| c) Number of female mice gestated          | 9          | 9         | 8          | 9         | 9         | 9          |
| d) Number of mother mice with live fetuses | 9          | 8         | 8          | 9         | 9         | 9          |
| e) Number of corpora lutea Mean±SD         | 14.3±1.5   | 14.0±2.1  | 15.5±2.2   | 14.2±1.9  | 15.0±1.9  | 14.1±1.1   |
| f) Number of implants Mean±SD              | 13.6±1.8   | 11.6±2.4  | 14.0±2.1   | 13.2±2.2  | 13.3±2.4  | 11.2±3.8   |
| g) Percent resorption of fetuses±SD#       |            |           |            |           |           |            |
| 1) early                                   | 15.5±22.9  | 13.5±16.0 | 4.7±13.3   | 8.3±8.7   | 3.8±4.7   | 5.4±11.0   |
| 2) late                                    | 2.4±3.7    | 0         | 0.8±2.2    | 0         | 0         | 1.9±3.7    |
| h) Number of live fetuses Mean±SD          | 11.1±3.5   | 10.1±3.0  | 13.1±2.2   | 12.2±2.2  | 12.8±2.1  | 10.7±3.9   |
| i) Sex ratio (M/F+M)×100±SD#               | 61.2±20.7  | 46.0±11.5 | 49.2±11.9  | 55.2±14.8 | 53.5±14.0 | 54.4±23.8  |
| j) Body weight of live fetuses Mean±SD#    |            |           |            |           |           |            |
| Male                                       | 1.32±0.14* | 1.38±0.07 | 1.31±0.10* | 1.36±0.14 | 1.39±0.09 | 1.50±0.19  |
| Female                                     | 1.29±0.10  | 1.27±0.09 | 1.27±0.06* | 1.30±0.13 | 1.35±0.11 | 1.36±0.08  |

a) Number of female mice confirmed for vaginal plug

b) Died cases up to the killed time after copulation

c) Number of female mice with implantation sites

d) Number of dam with more than one living fetus

e)—j) Calculated with the dam (d) with living fetus

g)—1) Cases showing implanted sites and amorphous germinal mass

g)—2) Cases showing the head and limbs

# Value of group was obtained by averaging the percentages of each litter

[Statistical] a)—d):  $\chi^2$  test e), f): t-test g): ranked sum test h): t-test

i): ranked sum test j): t-test

\* P&lt;0.05

Table 3. Data from mice orally treated with thiabendazole (TBZ) on days 9 of gestation : External observation

| Doses                         | 2400mg/kg | 2000mg/kg | 1667mg/kg | 1389mg/kg | 1157mg/kg | 0.5% Gum arabic |
|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| a) Number of fetuses examined | 100       | 81        | 106       | 109       | 115       | 96              |
| b) Malformation               |           |           |           |           |           |                 |
| 1) Percent malformation±SD#   | 6.5±16.6  | 2.2±4.1   | 1.7±3.2   | 1.9±3.7   | 2.2±6.7   | 2.0±3.9         |
| 2) Type & number of affected  |           |           |           |           |           |                 |
| Brachyury                     | 1         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0               |
| Cleft palate                  | 1         | 1         | 0         | 0         | 0         | 0               |
| Open eyelids                  | 2         | 1         | 2         | 2         | 3         | 2               |
| c) Other anomalies            |           |           |           |           |           |                 |
| 1) Percent anomalies±SD#      | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0               |
| 2) Type & number of affected  |           |           |           |           |           |                 |
| Club foot                     | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0               |
| Kinky tail                    | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0               |

C) Directional anomalies of tail and limbs, hematoma, edema and others

# Value of group was obtained by averaging the percentages of each litter

[Statistical analysis] b), c), ranked sum test

Table 4. Data from mice orally treated with thiabendazole (TBZ) on days 9 of gestation : Skeletal observation

| Doses                                                     | 2400mg/kg        | 2000mg/kg        | 1667mg/kg        | 1389mg/kg        | 1157mg/kg        | Gum arabic       |
|-----------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| a) Number of fetuses examined                             | 100              | 81               | 106              | 109              | 115              | 94               |
| b) Malformation                                           |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| 1) Percent malformation $\pm$ SD#                         | 20.4 $\pm$ 37.1  | 5.3 $\pm$ 11.8   | 1.3 $\pm$ 3.5    | 7.8 $\pm$ 23.3   | 3.1 $\pm$ 5.0    | 0                |
| 2) Type & number of fetuses affected                      |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| Fusion of vertebral arches                                | 11               | 3                | 0                | 1                | 2                | 0                |
| Fusion of vertebral body                                  | 5                | 1                | 1                | 0                | 1                | 0                |
| Fusion of ribs                                            | 0                | 1                | 0                | 7                | 1                | 0                |
| c) Variation                                              |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| Type & percent variation $\pm$ SD#                        |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| 1) Asymmetry of sternebrae                                | 9.9 $\pm$ 17.5   | 4.2 $\pm$ 11.8   | 8.9 $\pm$ 16.6   | 1.9 $\pm$ 3.8    | 10.1 $\pm$ 12.5  | 5.5 $\pm$ 7.5    |
| 2) Accessory of sternebrae                                | 12.2 $\pm$ 13.2  | 7.8 $\pm$ 8.7    | 7.3 $\pm$ 13.0   | 7.0 $\pm$ 12.9   | 5.7 $\pm$ 9.9    | 16.2 $\pm$ 19.1  |
| 3) Cervical rib                                           | 5.6 $\pm$ 16.7   | 7.5 $\pm$ 6.7    | 6.8 $\pm$ 6.7    | 6.4 $\pm$ 11.1   | 9.0 $\pm$ 21.9   | 15.4 $\pm$ 22.2  |
| 4) 14th rib                                               | 22.4 $\pm$ 20.8  | 16.6 $\pm$ 15.9  | 21.2 $\pm$ 21.8  | 22.5 $\pm$ 17.9  | 17.1 $\pm$ 19.3  | 36.9 $\pm$ 34.1  |
| 5) Splitting & branching of atlas & axis                  | 26.2 $\pm$ 22.6  | 13.8 $\pm$ 12.9  | 17.1 $\pm$ 14.1  | 19.9 $\pm$ 15.9  | 22.4 $\pm$ 25.6  | 26.0 $\pm$ 23.8  |
| 6) Abnormalities in number of pre-sacral vertebrae        | 4.9 $\pm$ 9.6    | 3.6 $\pm$ 7.7    | 0                | 1.1 $\pm$ 3.3    | 1.7 $\pm$ 5.1    | 0                |
| 7) Separation or defective development of sternebrae      | 10.2 $\pm$ 25.0  | 6.7 $\pm$ 12.9   | 9.6 $\pm$ 14.6   | 1.1 $\pm$ 3.3    | 5.2 $\pm$ 4.0    | 3.8 $\pm$ 6.7    |
| d) Ossification                                           |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| Mean number of ossified                                   |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| 1) fore limb phalanx $\pm$ SD [(Pro. + Mid.)/2]           |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| L                                                         | 2.71 $\pm$ 0.49  | 2.54 $\pm$ 0.55  | 2.91 $\pm$ 0.43  | 2.64 $\pm$ 0.47  | 3.03 $\pm$ 0.31  | 2.69 $\pm$ 0.57  |
| R                                                         | 2.73 $\pm$ 0.51  | 2.59 $\pm$ 0.57  | 2.93 $\pm$ 0.42  | 2.69 $\pm$ 0.47  | 3.06 $\pm$ 0.31  | 2.73 $\pm$ 0.54  |
| Mean number of ossified                                   |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| 2) hind limb phalanx $\pm$ SD [(Pro. + Mid.)/2]           |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| L                                                         | 2.43 $\pm$ 0.71  | 2.39 $\pm$ 0.61  | 2.59 $\pm$ 0.37  | 2.62 $\pm$ 0.60  | 2.74 $\pm$ 0.49  | 2.86 $\pm$ 0.69  |
| R                                                         | 2.51 $\pm$ 0.62  | 2.46 $\pm$ 0.57  | 2.67 $\pm$ 0.35  | 2.62 $\pm$ 0.59  | 2.77 $\pm$ 0.53  | 2.93 $\pm$ 0.68  |
| 3) Mean number of ossified post lumbar vertebrae $\pm$ SD | 12.67 $\pm$ 1.13 | 12.84 $\pm$ 1.13 | 13.14 $\pm$ 0.96 | 12.70 $\pm$ 1.41 | 13.02 $\pm$ 0.98 | 14.03 $\pm$ 1.66 |

c) — 1) Cases showing deviation over 1/2 of length of maximum sternal nucleus between left and right nuclei

c) — 4) Definition of lumbar rib was based on Kimmel and Wilson (Teratology, 8, 309-316, 1973)

c) — 6) Cases showing abnormality in sum of numbers of cervical, thoracic and lumbar vertebrae

d) — 3) Sum of numbers of ossified sacral and coccygeal vertebrae

# Value of group was obtained by averaging the percentages of each litter

[Statistical analysis] b) — 1) : ranked sum test c) : ranked sum test d) : t-test

(90%), 1157mg群9/10(90%), アラビアゴム群9/9(100%)で、妊娠成立した母体は2000mg群の1例(着床痕のみ)を除いてすべてに生児を認めた(表2)。

2) 妊娠黄体数, 着床数, 生児数, 死亡児頻度(早・後期)および性比: 各投与群において妊娠黄体数, 着床数, 生児数および性比に推計学的有意差を示すものはなく, また用量に伴う変動傾向も認められなかった。死亡

児頻度では有意差はみられなかったが, 2400mg, 2000mg群の早期死亡がやや高い値を示した(表2)。

3) 生児体重: 2400mg群の雄, 1667mg群の雌雄が有意に小さく, 他の投与群も小さい傾向であった(表2)。

4) 生児外表奇形・異常: 外表奇形は2400mg群短尾1(母体数1/9), 口蓋裂1(1), 開眼2(2); 2000mg群口蓋裂1(1/8), 開眼1(1); 1667mg群開眼2(2/8);

1389mg群開眼2 (2/9); 1157mg群開眼3 (1/10), アラビアゴム群開眼2 (2/9) であった。オリーブ油に懸濁経口投与の場合にみられた四肢減形成の発生は全くみられなかった。表中に示した頻度は各母体単位での数値を平均して群の値としたものであるが, 1匹の胎児に2種以上の奇形を併発したものは1として数えた。アラビアゴム群と比べ, 投与群のいずれも奇形の発現数に推計学的有意性は認められなかった (表3)。

5) 骨格奇形・変異・化骨進行度: 奇形としては2400mg群椎弓癒合11例 (母体数3), 椎体癒合5 (3); 2000mg群椎弓癒合3 (1), 椎体癒合1 (1), 肋骨癒合1 (1); 1667mg群椎体癒合1 (1); 1389mg群椎弓癒合1 (1), 肋骨癒合7 (1); 1157mg群椎弓癒合2 (2), 椎体癒合1 (1), 肋骨癒合1 (1); アラビアゴム群0, 発生頻度はそれぞれ,  $20.4 \pm 37.1\%$ ,  $5.3 \pm 11.8\%$ ,  $1.3 \pm 3.5\%$ ,  $7.8 \pm 23.3\%$ ,  $3.1 \pm 5.0\%$ ,  $0\%$ で投与群に骨格癒合の出現がみられるが推計学的に有意な発現頻度とは認められなかった。

変異を有するものの出現頻度では各投与群において推計学的有意差を示すものなく, 用量に関連した変動もみられなかった。化骨進行度では有意差は認められなかったが, 後肢跖骨平均化骨数および腰椎後椎骨数で用量に依存した化骨遅延の傾向がみられた (表4)。

以上, 本試験ではオリーブ油懸濁投与で誘発された四

肢減形成奇形児は出現せず, 外表および骨格癒合奇形児の出現頻度にも推計学的有意性は認められなかった。

TBZ のオリーブ油とアラビアゴム懸濁投与による奇形発生の差は, 恐らくTBZの吸収態度とかがわっていると考えられる。この原因については別途に検索したい。

### 要 旨

チアベンダゾール(TBZ)の懸濁媒体 (vehicle) を従来のオリーブ油から0.5%アラビアゴム溶液に代えて, Jel: ICR マウスにおける催奇形作用を検索した。

投与はオリーブ油の場合と同様に妊娠9日1回, 2400mg, 2000mg, 1667mg, 1389mg, 1157 mg/kg を経口投与した。

四肢減形成奇形の発現は認められず, 骨格癒合の発生は低頻度で催奇形性を明確に出来なかった。

### 文 献

- 1) 小縣昭夫, 安藤 弘, 久保喜一, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 112, 1978
- 2) 小縣昭夫, 安藤 弘, 久保喜一, 高橋 博, 平賀興吾: 第21回日本先天異常学会講演および抄録集, 1981
- 3) Dawson, A. B.: *Stain Tech.*, 1, 123, 1927
- 4) 西村秀雄: 先天異常, 16, 175, 1976

## チアベンダゾールのマウスにおける催奇形性について ペアフィーディングテスト

小 縣 昭 夫\*, 安 藤 弘\*, 久 保 喜 一\*, 平 賀 興 吾\*

### Teratological Studies of Thiabendazole (TBZ) in Mice Pair-feeding Test

AKIO OGATA\*, HIROSHI ANDO\*, YOSHIKAZU KUBO\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** チアベンダゾール Thiabendazole, マウス mouse, 催奇形性 teratogenicity, ペアフィーディング pair-feeding

#### はじめに

我々はチアベンダゾール (以下 TBZ と略す) を妊娠マウスの臨界期に経口投与すると奇形児の発生することを報告<sup>1,2)</sup>してきた。しかし TBZ 投与は摂餌量・飲水量を低下させることが知られているので Pair-feeding test により摂餌量・飲水量低下と奇形発生との関係を調べた。

#### 試験材料ならびに方法

1. 実験動物 Jcl: ICR マウス雌雄を日本クレア (株) より 4 週齢時に購入, 8~13 週齢 (体重 24.0~32.0g) に達した発育良好なものを選び試験に供した。

2. 飼育条件 温度  $25 \pm 1^\circ$ , 湿度  $55 \pm 5\%$ , 照明午前 6 時~午後 6 時, 換気毎時 10 回の飼育室にて日本クレア (株) 製固型飼料 CE-2 および水道水を自由に与え, 試験開始 (交配) 時までアルミケージ ( $225 \times 325 \times 110$ mm) に 10 匹, 交配後はステンレス製金網ケージ ( $152 \times 210 \times 170$ mm) にて 1 匹飼いとす。

3. 交配方法 雌雄 1 : 1 終夜同居により, 翌朝陰栓の確認されたものを妊娠動物とみなし, その日を妊娠 0 日とした。

4. 試料 チアベンダゾール (TBZ) は Merck Sharp & Dohme International 社製 Lot No. BZA-539, 純度 98.5% を使用した。溶媒 (vehicle) は日本薬局方オリーブ油 (三晃製薬工業 (株) Lot No. 16H226) を用い, これに懸濁して投与した。

5. 試験方法 妊娠マウス各 10 匹に TBZ 2000mg, 1157mg, 558mg および 0mg (対照) / 10ml オリーブ油/kg を, 妊娠 9 日 1 回経口投与し, 毎日一定時刻, 摂餌量は飼料投与量と飼料残与量およびケージ受け皿への飼料コボシ量を測定, (投与量-残与量-コボシ量) により求

めた。飲水量は給水ビンを用い, (投与量(g)-残量(g)) で求めた。

Pair-feeding では 2000mg 投与での摂餌量・飲水量に対応して制限給餌・給水した群 (Z), 同様に 1157mg (Y), 558mg (X), オリーブ油 (C) および無処置 (N) の 5 群を設けた。

6. 観察方法 体重測定および一般状態の観察を毎日行ない, 妊娠 18 日にエーテルにより麻酔屠殺し, 次の検索を行なった。

屠殺後直ちに開腹, 子宮を開き着床痕, 早・後期死亡胎児, 生児数を数え, 生児は体重測定, 性の判別, 外表の異常の観察を行ない, 次いで母体の卵巣の黄体数を数え, 主要臓器の重量測定と肉眼的異常の検索を行った。

生児は, 95% エチルアルコールで固定後アリザリネッド S で骨格染色<sup>3)</sup>を行ない骨格異常の有無を調べた。

7. 結果のまとめ方 西村の報告<sup>4)</sup>に準拠して行った。

#### 結果および考察

##### I. TBZ 投与ラットの摂餌量・飲水量

結果を図 1, 2 に示した。摂餌量 (図 1) では投与後 1 日目 (妊娠 10 日) で各投与群とも用量に伴った低下を認めた。妊娠 11 日で, 1157mg, 558mg 群はオリーブ油対照群の値まで近づいたが, 2000mg 群ではまだ低値を続けた。妊娠 12 日ではいずれの投与群もオリーブ油対照群と同一の摂餌量となった。しかし 2000mg 群は妊娠 16 日以後での摂餌量が他の群程はふえず, オリーブ油対照群に比べ, その差は有意であった。飲水量でも摂餌量同様, 妊娠 10 日に各投与群とも低下をみたが, 妊娠 11 日には 2000mg 群を除いて全く回復した。2000mg 群も妊娠 12

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

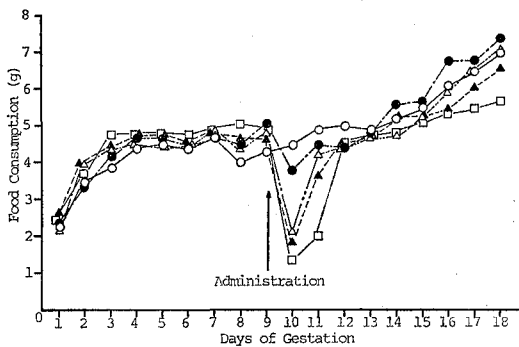


Fig. 1. Food consumption after administration of TBZ on days 9 of gestation  
 ○—: Non treatment, ●—: Olive oil,  
 △—: TBZ 558mg/kg,  
 ▲—: TBZ 1157mg/kg,  
 □—: TBZ 2000mg/kg

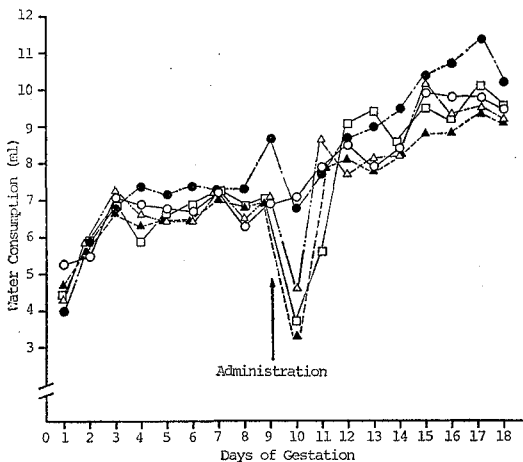


Fig. 2. Water consumption after administration of TBZ on days 9 of gestation  
 ○—: Non treatment, ●—: Olive oil,  
 △—: TBZ 558mg/kg,  
 ▲—: TBZ 1157mg/kg,  
 □—: TBZ 2000mg/kg

日には回復し、むしろ他群より多い飲水量であった。また2000mg群では摂餌量でみられた妊娠16日以後の抑制はみられず、他の投与群と変わらない飲水量であった。

## II. ペアフィーディング

1. 母体の体重および一般状態: TBZ投与後の摂餌・飲水量に従い制限給餌・給水したマウス母体の妊娠0日を100とした体重増加率の推移を図3に示した。いずれ

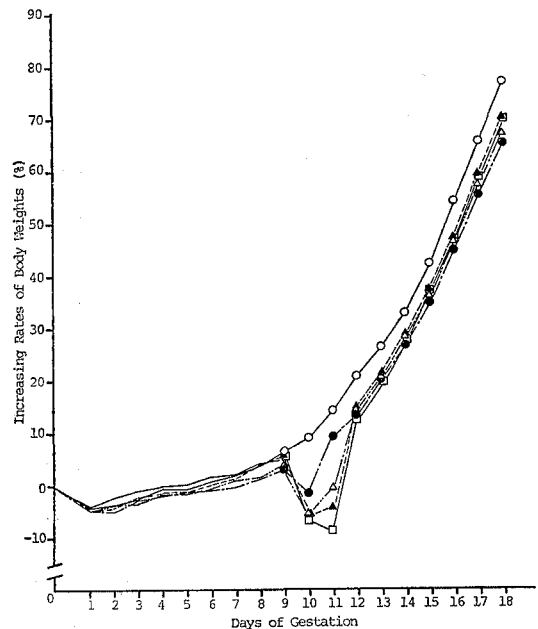


Fig. 3. Increasing rates of body weights with pair-feeding  
 ○—: Non treatment, ●—: Olive oil,  
 △—: TBZ 558mg/kg,  
 ▲—: TBZ 1157mg/kg,  
 □—: TBZ 2000mg/kg

の制限群でも制限後1・2日でTBZ投与の時よりも強い体重の低下を示したが、制限の緩るまった3日目以後は顕著な回復を示し、以後群間に差なくオリーブ油対照群と同様な増加が認められた。

2. 剖検所見および器官重量: 妊娠18日に屠殺開腹したマウスの剖検所見ではいずれの制限群にも特記する変化を認めなかった。器官重量は表1に示すとおりでC群(TBZオリーブ油対照群対応)と較べてY群(TBZ 1157mg群対応)の心臓の絶対重量およびX群(TBZ 558mg群対応)心臓が絶対重量で推計学的に有意に軽く、脾臓の体重比重量が重かった。しかしいずれの測定臓器にも制限食餌・飲水(以下制限とする)量と関連した軽重の変動はみられなかった。

3. 胎児に係わる所見 1) 妊娠の成立: 妊娠18日の屠殺開腹時に妊娠(着床)成立を確認した母体はZ群(TBZ 2000mg群対応) 11/12(91.7%), Y群 11/12(91.7%), X群 11/12(91.7%), C群 8/12(66.7%), N群(TBZ無処置対照群対応) 7/7(100%)で、妊娠成立した母体はすべてに生児を認めた(表2)。

Table 1. Organ weights of dams with pair-feeding

| Group <sup>a</sup> | No. of dam | Liver<br>g<br>g/100g                           | Heart<br>mg<br>mg/100g     | Spleen<br>mg<br>mg/100g   | Kidney(L)<br>mg<br>mg/100g | Kidney(R)<br>mg<br>mg/100g |
|--------------------|------------|------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Z                  | 11         | 3.0±0.2 <sup>1)</sup><br>8.5±0.5 <sup>2)</sup> | 148.7±10.6<br>425.1±30.2   | 141.5±33.6<br>405.3±97.0  | 244.4±21.3<br>698.0±46.8   | 253.6±17.5<br>724.5±40.0   |
| Y                  | 11         | 2.8±0.2<br>8.1±0.6                             | 138.3±13.9**<br>399.9±31.5 | 109.9±37.4<br>315.1±96.2  | 239.8±29.0<br>693.0±71.9   | 252.7±30.7<br>730.3±76.6   |
| X                  | 11         | 2.9±0.3<br>8.2±0.9                             | 142.7±10.6*<br>408.0±38.5  | 138.6±20.7<br>395.4±53.9* | 234.9±22.4<br>670.4±62.6   | 254.5±25.0<br>726.7±72.5   |
| C                  | 8          | 3.1±0.3<br>8.0±0.3                             | 155.5±9.6<br>407.0±22.1    | 124.8±21.4<br>326.6±52.5  | 249.6±16.5<br>653.5±40.3   | 262.7±25.1<br>687.4±58.2   |
| N                  | 7          | 2.9±0.4<br>8.1±1.1                             | 144.0±11.3<br>408.9±32.6   | 125.2±20.3<br>355.7±57.8  | 249.6±28.6<br>707.4±63.2   | 255.9±16.3<br>727.8±64.9   |

| Group | No. of dam | Lung<br>mg<br>mg/100g    | Adrenal(L)<br>mg<br>mg/100g | Adrenal(R)<br>mg<br>mg/100g | Ovary(L)<br>mg<br>mg/100g | Ovary(R)<br>mg<br>mg/100g |
|-------|------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Z     | 11         | 188.9±13.6<br>540.1±36.1 | 3.8±0.9<br>10.8±2.1         | 3.3±0.7<br>9.4±1.8          | 10.1±2.5<br>28.9±6.4      | 10.9±2.1<br>30.9±5.3      |
| Y     | 11         | 188.8±15.9<br>545.9±32.3 | 4.0±0.7<br>11.6±2.1         | 3.3±0.6<br>9.5±1.9          | 10.0±2.6<br>28.7±6.8      | 11.4±2.0<br>32.9±4.5      |
| X     | 11         | 194.2±9.7<br>550.2±41.8  | 3.7±0.6<br>10.7±1.8         | 3.5±0.4<br>10.0±1.4         | 11.3±2.3<br>32.4±6.2      | 10.8±2.2<br>31.0±6.5      |
| C     | 8          | 202.8±23.3<br>529.0±38.4 | 3.9±0.9<br>10.1±1.8         | 3.6±0.7<br>9.3±1.5          | 10.8±2.1<br>27.9±4.0      | 11.6±1.8<br>30.3±4.5      |
| N     | 7          | 202.7±21.6<br>574.4±47.9 | 3.8±0.3<br>10.7±0.8         | 3.0±0.7<br>8.7±2.3          | 9.9±2.6<br>27.7±5.0       | 10.9±3.7<br>30.6±8.6      |

1) Mean (absolute)±SD

2) Mean (relative)±SD

a) Z: paired TBZ 2000mg/kg

Y: paired TBZ 1157mg/kg

X: paired TBZ 558mg/kg

C: paired olive oil 10ml/kg

N: paired Non treatment

\* P&lt;0.05 \*\* P&lt;0.01

2) 妊娠黄体数, 着床痕数, 生児数, 死亡児頻度(早・後期)および性比: いずれの観察項目にも有意な, また制限と関連した変動は認められなかった。N群の早期死亡児頻度が高い値を示したが, 1例の母体で92.3%と高い死亡値が認められた結果である。

3) 生児体重: 雌雄とも群間に有意なまた制限に伴う体重の軽重を認めなかった。

4) 胎児外表奇形・異常: 奇形ではZ群開眼2(母体数1/11), Y群膈ヘルニア1(1/11), X群開眼1(1/11), C群開眼2(2/8), N群口蓋裂1(1/7)でTBZ投与にみられた四肢減形成の発生はまったくみられず, 口蓋裂等の増加もみられなかった。その他の異常としてはZ群反足1(1), Y群0, X群反足2(2), C群皮下出血1(1), N群0であった。奇形・異常とも有意な, また制限に依存した発現を認めなかった。なお表中の発現頻度は各母体毎の数値を平均して群の値としたものである

(表3)。

5) 骨格奇形・変異・化骨進行度: 奇形としてはX群に椎弓および椎体癒合がそれぞれ1例, N群肋骨癒合1例が認められたのみであった。変異を有するものの出現頻度ではY群での腰肋がC群に較べ低く推計学的に有意であったのみで, 制限に関連した変動はみられなかった。その他の観察項目ではいずれにも群間に有意差なく, 制限に関連した変動もみられなかった。化骨進行度では群間に有意差なく, 化骨遅延をうかがわせる傾向は認められなかった(表4)。

以上 TBZ オリーブ油懸濁経口投与で誘発された四肢減形成奇形児の出現および骨格癒合奇形発現頻度の増加等が, TBZ 大量投与による摂餌量および飲水量の低下に基因するか否かを確かめるためのPair-feedingを行ったが, 外表および骨格奇形に TBZ 投与でみられた奇形の出現あるいは出現頻度の増加はまったくみられず, ま



Table 2. Prenatal data from mice with pair-feeding

| Group <sup>a)</sup>                                         | Z               | Y               | X               | C               | N               |
|-------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| a) Number of female mice mated                              | 12              | 12              | 12              | 12              | 7               |
| b) Number of female mice died                               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| c) Number of female mice gestated                           | 11              | 11              | 11              | 8               | 7               |
| d) Number of mother mice with live fetuses                  | 11              | 11              | 11              | 8               | 7               |
| e) Number of corpora lutea Mean $\pm$ SD                    | 14.7 $\pm$ 2.0  | 14.9 $\pm$ 1.5  | 14.8 $\pm$ 2.0  | 15.5 $\pm$ 1.3  | 13.9 $\pm$ 1.1  |
| f) Number of implants Mean $\pm$ SD                         | 13.7 $\pm$ 2.0  | 13.4 $\pm$ 2.6  | 13.6 $\pm$ 2.8  | 14.9 $\pm$ 1.4  | 13.3 $\pm$ 0.8  |
| g) Percent resorption of fetuses Mean $\pm$ SD <sup>#</sup> |                 |                 |                 |                 |                 |
| 1) early                                                    | 7.5 $\pm$ 7.9   | 7.7 $\pm$ 6.3   | 13.8 $\pm$ 19.8 | 7.7 $\pm$ 6.9   | 14.4 $\pm$ 34.5 |
| 2) late                                                     | 0.7 $\pm$ 2.2   | 3.2 $\pm$ 5.6   | 1.7 $\pm$ 3.9   | 0               | 0               |
| h) Number of live fetuses Mean $\pm$ SD                     | 12.6 $\pm$ 2.4  | 12.3 $\pm$ 2.3  | 11.9 $\pm$ 4.1  | 13.8 $\pm$ 1.8  | 11.4 $\pm$ 4.7  |
| i) Sex ratio (M/F+M) $\times$ 100 $\pm$ SD <sup>#</sup>     | 54.1 $\pm$ 11.8 | 54.8 $\pm$ 14.0 | 55.9 $\pm$ 13.5 | 39.0 $\pm$ 18.3 | 37.1 $\pm$ 25.1 |
| j) Body weight of live fetuses Mean $\pm$ SD <sup>#</sup>   |                 |                 |                 |                 |                 |
| Male                                                        | 1.36 $\pm$ 0.12 | 1.40 $\pm$ 0.10 | 1.38 $\pm$ 0.15 | 1.39 $\pm$ 0.09 | 1.41 $\pm$ 0.09 |
| Female                                                      | 1.28 $\pm$ 0.12 | 1.34 $\pm$ 0.09 | 1.30 $\pm$ 0.13 | 1.30 $\pm$ 0.07 | 1.36 $\pm$ 0.06 |

a) Number of female mice confirmed for vaginal plug

b) Died cases up to the killed time after copulation

c) Number of female mice with implantation sites

d) Number of dam with more than one living fetus

e)—j) Calculated with the dam (d) with living fetus

g)—1) Cases showing implanted sites and amorphous germinal mass

g)—2) Cases showing the head and limbs

<sup>#</sup> Value of group was obtained by averaging the percentages of each litter[Statistical] a)—d):  $\chi^2$  test e), f): t-test g): ranked sum test h): t-test

i): ranked sum test j): t-test

① Z: paired TBZ 2000mg/kg Y: paired TBZ 1157mg/kg X: paired TBZ 558mg/kg

C: paired olive oil 10ml/kg N: paired Non treatment

Table 3. External data from mice with pair-feeding

| Group <sup>a)</sup>                           | Z             | Y             | X             | C             | N             |
|-----------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| a) Number of fetuses examined                 | 139           | 135           | 131           | 110           | 80            |
| b) Malformation                               |               |               |               |               |               |
| 1) Percent malformation $\pm$ SD <sup>#</sup> | 1.7 $\pm$ 5.5 | 0.8 $\pm$ 2.5 | 0.6 $\pm$ 1.9 | 1.7 $\pm$ 3.3 | 1.3 $\pm$ 3.4 |
| 2) Type & number of affected                  |               |               |               |               |               |
| Cleft palate                                  | 0             | 0             | 0             | 0             | 1             |
| Open eyelids                                  | 2             | 0             | 1             | 2             | 0             |
| Omphalocele                                   | 0             | 1             | 0             | 0             | 0             |
| c) Other anomalies                            |               |               |               |               |               |
| 1) Percent anomalies $\pm$ SD <sup>#</sup>    | 0.8 $\pm$ 2.5 | 0             | 1.2 $\pm$ 2.6 | 0.8 $\pm$ 2.2 | 0             |
| 2) Type & number of affected                  |               |               |               |               |               |
| Club foot                                     | 1             | 0             | 2             | 0             | 0             |
| Subcutaneous hemorrhage                       | 0             | 0             | 0             | 1             | 0             |

c) Directional anomalies of tail and limbs, hematoma, edema and others

<sup>#</sup> Value of group was obtained by averaging the percentage of each litter

[Statistical analysis] b), c): ranked sum test

① Z: paired TBZ 2000mg/kg Y: paired TBZ 1157mg/kg X: paired TBZ 558mg/kg

C: paired olive oil 10ml/kg N: paired Non treatment

Table 4. Skeletal data from mice with pair-feeding

| Group <sup>a)</sup>                                       | Z               | Y                | X               | C               | N               |
|-----------------------------------------------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| a) Number of fetuses examined                             | 139             | 135              | 131             | 110             | 80              |
| b) Malformation                                           |                 |                  |                 |                 |                 |
| 1) Percent malformation $\pm$ SD <sup>#</sup>             | 0               | 0                | 1.3 $\pm$ 4.3   | 0               | 1.0 $\pm$ 2.7   |
| 2) Type & number of fetuses affected                      |                 |                  |                 |                 |                 |
| Fusion of vertebral arches                                | 0               | 0                | 1               | 0               | 0               |
| Fusion of vertebral body                                  | 0               | 0                | 1               | 0               | 0               |
| Fusion of ribs                                            | 0               | 0                | 0               | 0               | 1               |
| c) Variation                                              |                 |                  |                 |                 |                 |
| Type & percent variation $\pm$ SD <sup>#</sup>            |                 |                  |                 |                 |                 |
| 1) Asymmetry of sternebrae                                | 3.8 $\pm$ 5.8   | 3.5 $\pm$ 5.5    | 5.5 $\pm$ 6.1   | 3.5 $\pm$ 5.1   | 4.6 $\pm$ 8.0   |
| 2) Accessory of sternebrae                                | 10.1 $\pm$ 13.9 | 7.7 $\pm$ 10.4   | 2.5 $\pm$ 6.2   | 11.8 $\pm$ 15.4 | 17.4 $\pm$ 24.1 |
| 3) Cervical rib                                           | 24.0 $\pm$ 30.0 | 12.5 $\pm$ 14.3  | 13.1 $\pm$ 9.4  | 20.3 $\pm$ 16.5 | 9.5 $\pm$ 12.8  |
| 4) 14th rib                                               | 28.6 $\pm$ 23.3 | 16.2 $\pm$ 19.5* | 20.4 $\pm$ 21.5 | 29.2 $\pm$ 13.4 | 30.8 $\pm$ 25.9 |
| 5) Splitting & branching of atlas & axis                  | 30.9 $\pm$ 20.5 | 16.8 $\pm$ 20.1  | 28.6 $\pm$ 22.7 | 26.3 $\pm$ 26.3 | 10.6 $\pm$ 17.9 |
| 6) Abnormalities in number of pre-sacral vertebrae        | 2.1 $\pm$ 7.0   | 0.8 $\pm$ 2.7    | 2.6 $\pm$ 6.6   | 0               | 0               |
| 7) Separation or defective development of sternebrae      | 5.1 $\pm$ 7.2   | 3.5 $\pm$ 5.0    | 7.6 $\pm$ 10.2  | 5.4 $\pm$ 6.2   | 15.3 $\pm$ 37.4 |
| d) Ossification                                           |                 |                  |                 |                 |                 |
| Mean number of ossified                                   |                 |                  |                 |                 |                 |
| 1) fore limb phalanx $\pm$ SD [(Pro. + Mid.)/2]           |                 |                  |                 |                 |                 |
| L                                                         | 2.8 $\pm$ 0.5   | 3.0 $\pm$ 0.3    | 2.6 $\pm$ 0.6   | 2.8 $\pm$ 0.4   | 3.2 $\pm$ 0.2   |
| R                                                         | 2.9 $\pm$ 0.5   | 3.1 $\pm$ 0.3    | 2.6 $\pm$ 0.6   | 2.8 $\pm$ 0.4   | 3.2 $\pm$ 0.2   |
| Mean number of ossified                                   |                 |                  |                 |                 |                 |
| 2) hind limb phalanx $\pm$ SD [(Pro. + Mid.)/2]           |                 |                  |                 |                 |                 |
| L                                                         | 2.5 $\pm$ 0.8   | 2.6 $\pm$ 0.4    | 2.3 $\pm$ 0.7   | 2.4 $\pm$ 0.3   | 2.6 $\pm$ 0.6   |
| R                                                         | 2.6 $\pm$ 0.9   | 2.7 $\pm$ 0.4    | 2.4 $\pm$ 0.7   | 2.4 $\pm$ 0.4   | 2.8 $\pm$ 0.5   |
| 3) Mean number of ossified post lumbar vertebrae $\pm$ SD | 12.2 $\pm$ 1.6  | 13.1 $\pm$ 1.2   | 12.1 $\pm$ 1.7  | 12.2 $\pm$ 1.2  | 13.1 $\pm$ 1.5  |

c)-1) Cases showing deviation over 1/2 of length of maximum sternal nucleus between left and right nuclei

c)-4) Definition of lumbar rib was based on Kimmel and Wilson (Teratology, 8, 309-316, 1973)

c)-6) Cases showing abnormality in sum of numbers of cervical, thoracic and lumbar vertebrae

d)-3) Sum of numbers of ossified sacral and coccygeal vertebrae

<sup>#</sup> Value of group was obtained by averaging the percentage of each litter

[Statistical analysis] b)-1): ranked sum test c): ranked sum test d): t-test \* P&lt;0.05

a) Z: paired TBZ 2000mg/kg Y: paired TBZ 1157mg/kg X: paired TBZ 558mg/kg

C: paired olive oil 10ml/kg N: paired Non treatment

た発育遅延をうかがわせる傾向も認められなかった。

今回の試験では制限直後の母体重低下は妊娠10・11日ではTBZ投与の場合より強く現われたが、TBZ 2000 mg投与でみられた妊娠13日以後の増加抑制を調整できなかった。これは、胎児死亡と関わる生児数の減少の結果と考えられる。

## 要 旨

当部で確認されたチアベンダゾール(TBZ)のマウスにおける催奇形作用が、TBZ大量投与により生じる摂餌、飲水低下による二次的作用によるものか否かを明らかにするため、Pair-feeding testを行った。

試験は妊娠9日1回経口投与で確実に四肢減形成奇形

の発現。骨格癒合その他奇形発現の増大等を示すT B Z 2000, 1157, 558mg/kg を投与し、その影響による摂餌量・飲水量の減少に基づいて行なわれた。

結果は、四肢減形奇形は発現せず、骨格癒合その他の奇形発現の増加は全く認められなかった。

#### 文 献

1) 小縣昭夫, 安藤弘, 久保喜一, 平賀興吾: 東京衛研

年報, 29-2, 112, 1978

2) 小縣昭夫, 安藤 弘, 久保喜一, 高橋 博, 平賀興吾: 第 21 回日本先天異常学会講演 および 抄録集, 1981

3) Dawson, A. B.: *Stain Tech.*, 1, 123, 1927

4) 西村秀雄: 先天異常, 16, 175, 1976

## チアベンダゾールのマウスにおける催奇形性について 妊娠7—9日投与試験

安藤 弘\*, 久保 喜一\*, 小縣 昭夫\*, 平賀 興吾\*

### Teratological Studies of Thiabendazole (TBZ) in Mice Successive Administration Test in Early Organogenesis from Days 7 through 9 of Gestation

HIROSHI ANDO\*, YOSHIKAZU KUBO\*, AKIO OGATA\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** チアベンダゾール thiabendazole, 駆虫薬 anthelmintic, 食品添加物 food additive, 農薬 pesticide, 防かび剤 fungicide, マウス mouse, 催奇形性 teratogenicity

#### はじめに

われわれはチアベンダゾール (TBZ, 食品添加物・保存料, 農薬・殺菌剤, 医薬品・駆虫薬, その他・防かび剤) のマウスにおける催奇形性を臨界期連続投与 (妊娠7~15日) 試験<sup>1)</sup>, 臨界期単一投与あるいは妊娠9日1回投与<sup>2)</sup>により明らかにしてきた。

その際, 妊娠9日1回投与 (TBZ 2,400~30 mg/kg B.W. 間に17段階用量) 試験では, 四肢減形成奇形および骨格癒合奇形を持った母体 (litter) の発現頻度と用量との間にきわめて高い相関関係が有り, 骨格癒合奇形は60 mg/kg投与群まで出現した<sup>2)</sup>。またTBZ 2,400 mg/kgを妊娠6日より15日までの各妊娠日に1回のみ経口投与した臨界期単一投与試験では投与時期による奇形の特異性が認められ, 骨格癒合奇形の発生は妊娠7, 8, 9日投与群に多かった<sup>2)</sup>。

以上の成績より, 妊娠7, 8, 9日の3日間連続投与すればより低用量で明確な骨格癒合奇形の発生を得られるのではないかと考え, 以下の試験を行った。

#### 試験材料ならびに方法

1. 実験動物 日本クレア (株) より Jcl:ICR 系マウス雌雄を各々4週齢時で購入, 8~13週齢 (体重24~34g) に達した発育良好なものを選び試験に供した。

2. 飼育条件 温度  $25 \pm 1^\circ$ , 湿度  $55 \pm 5\%$ , 照明午前6時~午後6時, 換気毎時10回の飼育室にて日本クレア (株) 製固型飼料 CE-2 および水道水を自由に与え, 試験開始 (交配) 時までアルミケージ (225×325×110 mm) で10匹, 交配後はプラスチックケージ (180×305×110 mm) にて1匹飼育とした。ただし雄マウスは交配前1週

間よりプラスチックケージで1匹飼育した。

3. 交配方法 雌雄1:1終夜同居させ, 翌朝陰栓 (プラグ) の認められたものを妊娠動物とみなし, この

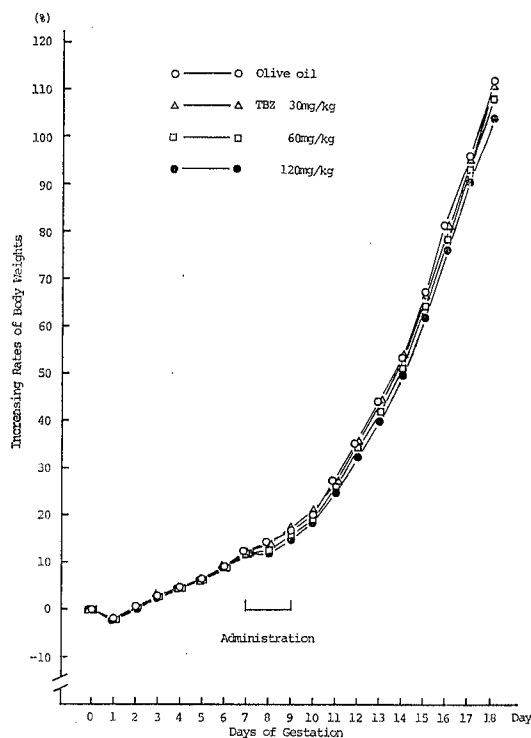


Fig. 1. Increasing Rates of Body Weights after Administration of TBZ from Days 7 through 9 of Gestation

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Data from Mice Orally Treated with Thiabendazole (TBZ) from Days 7 through 9 of Gestation : Organ Weights of Mother Mice

| Dose         | No. of dam | Liver<br>g<br>mg/100g                           | Heart<br>mg<br>mg/100g   | Spleen<br>mg<br>mg/100g   | Kidney(L)<br>mg<br>mg/100g | Kidney(R)<br>mg<br>mg/100g |
|--------------|------------|-------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| TBZ 120mg/kg | 27         | 3.0±0.4 <sup>1)</sup><br>10.3±1.1 <sup>2)</sup> | 143.1±14.4<br>499.7±44.1 | 135.8±26.1<br>477.3±84.0  | 222.6±19.7<br>777.5±62.6   | 233.6±23.7<br>815.3±70.0   |
| TBZ 60mg/kg  | 25         | 3.0±0.3<br>10.4±1.1                             | 150.1±11.4<br>524.3±37.1 | 144.0±35.2<br>502.2±115.7 | 232.6±19.3<br>813.2±72.4   | 243.5±20.8<br>851.9±80.9   |
| TBZ 30mg/kg  | 27         | 3.1±0.3<br>10.7±1.1                             | 148.9±10.4<br>518.5±48.5 | 144.3±27.5<br>503.3±105.2 | 226.8±18.7<br>788.5±69.8   | 237.0±23.3<br>827.8±80.7   |
| Olive oil    | 27         | 3.0±0.2<br>10.6±0.7                             | 145.4±9.2<br>510.5±42.9  | 151.0±51.4<br>530.9±189.9 | 228.8±20.8<br>802.2±70.9   | 238.6±21.7<br>837.2±81.7   |

| Dose         | No. of dam | Lung<br>mg<br>mg/100g    | Adrenal(L)<br>mg<br>mg/100g | Adrenal(R)<br>mg<br>mg/100g | Ovary(L)<br>mg<br>mg/100g | Ovary(R)<br>mg<br>mg/100g |
|--------------|------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| TBZ 120mg/kg | 27         | 176.1±16.9<br>615.4±58.1 | 3.7±0.6<br>13.1±2.0         | 3.4±0.7<br>11.9±2.3         | 10.1±1.9<br>35.3±6.1      | 10.9±2.0<br>38.0±6.6      |
| TBZ 60mg/kg  | 25         | 181.8±16.3<br>634.7±49.7 | 3.5±0.8<br>12.1±2.7         | 3.3±0.7<br>11.7±2.6         | 10.2±2.1<br>35.2±7.6      | 11.0±1.9<br>38.2±5.3      |
| TBZ 30mg/kg  | 27         | 183.1±13.2<br>636.9±54.0 | 3.9±0.9<br>13.3±2.8         | 3.5±0.9<br>12.1±2.7         | 10.7±2.2<br>37.1±7.3      | 10.5±2.7<br>36.5±10.2     |
| Olive oil    | 27         | 182.6±14.2<br>639.9±45.0 | 3.9±0.9<br>13.6±2.9         | 3.6±0.7<br>12.6±2.0         | 10.1±2.0<br>35.4±7.2      | 10.8±2.2<br>37.8±6.9      |

1) Mean (absolute)±SD

2) Mean (relative)±SD

日を妊娠0日とした。

4. 試料 チアベンダゾール (TBZ) は MERCK SHARP & DOHM INTERNATIONAL 社製, Lot No. BZA-539 を使用した。溶媒は日本薬局方オリーブ油 (三晃製薬㈱ Lot No. 05T921) を用いた。

5. 試料投与量の決定 当部での結果<sup>2)</sup>を参考にした。

6. 観察方法 妊娠マウスは、4群に各々30匹を無作為に割り当て、妊娠7日より9日までの間各群に各々 TBZ 120mg, 60mg, 30mg および 0mg (対照)/10ml オリーブ油/kg を胃ゾンデにより毎日1回強制経口投与した。

体重測定および一般状態の観察を毎日行い、妊娠18日にエーテル麻酔により屠殺し、次の検索を行った。

屠殺後直ちに開腹、子宮を開き着床痕、早・後期死亡胎児、生児数を数え、生児については体重測定、性の判別、外表異常の観察を行い、また母体については卵巣の黄体数を数え、重要器官の重量測定と肉眼的異常の有無を検索した。

生児は、95%エチルアルコールで固定後アリザリンレッドSで骨格染色<sup>3)</sup>を行い骨格異常の有無を調べた。

7. 結果のまとめ方 西村の報告<sup>4)</sup>に準拠して行った。

#### 結果と考察

1. 母体に係る所見 1) 体重および一般状態：妊娠0日の体重を100とした体重増加率の推移は図1に示す通りである。用量に伴う体重増加抑制を示しているが、いずれの投与群でも対照群との間に推計学的有意性は認められなかった。また一般状態についても対照群と同様でいずれの投与群にも特記する変化を認めなかった。

2) 剖検所見：妊娠18日に屠殺開腹したマウスの剖検所見では特記すべき変化を認めなかった。

3) 器官重量：表1に示す通りである。脾臓が用量相関をもって減少した。肺では対照群に比べ120mg群で、やや軽い傾向を示しているが、その他のいずれの器官重量も対照群との間に推計学的有意差は認められなかった。

2. 胎児に係る所見 1) 妊娠の成立：妊娠18日の屠殺開腹時に妊娠 (着床) 成立を確認した母体は120mg群 27/30 (90%)、60mg群 27/30 (90%)、30mg群 28/30 (93.3%)、オリーブ油 (対照群) 27/30 (90%) であり、

Table 2. Data from Mice Orally Treated with Thiabendazole (TBZ) from Days 7 through 9 of Gestation : Prenatal Observation

| Doses                                          | 120mg/kg        | 60mg/kg         | 30mg/kg         | Olive oil       |
|------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| a) Number of female mice mated                 | 30              | 30              | 30              | 30              |
| b) Number of female mice died                  | 0               | 0               | 0               | 0               |
| c) Number of female mice gestated              | 27              | 27              | 28              | 27              |
| d) Number of mother mice with live fetuses     | 27              | 27              | 28              | 27              |
| e) Number of corpora lutea Mean $\pm$ SD       | 15.2 $\pm$ 1.8  | 15.3 $\pm$ 1.6  | 15.9 $\pm$ 2.1  | 14.9 $\pm$ 1.3  |
| f) Number of implants Mean $\pm$ SD            | 13.6 $\pm$ 1.7  | 13.6 $\pm$ 1.9  | 14.1 $\pm$ 2.3  | 13.7 $\pm$ 1.5  |
| g) Percent resorption of fetuses $\pm$ SD#     |                 |                 |                 |                 |
| 1) early                                       | 7.8 $\pm$ 14.0  | 5.3 $\pm$ 7.3   | 5.4 $\pm$ 9.1   | 2.8 $\pm$ 4.7   |
| 2) late                                        | 1.2 $\pm$ 3.6   | 0.9 $\pm$ 2.4   | 1.1 $\pm$ 2.7   | 0.8 $\pm$ 2.2   |
| h) Number of live fetuses Mean $\pm$ SD        | 12.3 $\pm$ 2.3  | 12.8 $\pm$ 2.2  | 13.3 $\pm$ 2.8  | 13.1 $\pm$ 1.7  |
| i) Sex ratio (M/F+M) $\times$ 100 $\pm$ SD#    | 51.4 $\pm$ 16.9 | 47.9 $\pm$ 16.0 | 50.5 $\pm$ 17.8 | 51.6 $\pm$ 16.5 |
| j) Body weights of live fetuses Mean $\pm$ SD# |                 |                 |                 |                 |
| Male                                           | 1.49 $\pm$ 0.09 | 1.47 $\pm$ 0.07 | 1.45 $\pm$ 0.10 | 1.46 $\pm$ 0.09 |
| Female                                         | 1.42 $\pm$ 0.10 | 1.40 $\pm$ 0.08 | 1.38 $\pm$ 0.09 | 1.39 $\pm$ 0.10 |

a) Number of female mice confirmed for vaginal plug

b) Died cases up to the killed time after copulation

c) Number of female mice with implantation sites

d) Number of dam with more than one living fetuse

e) — j) Calculated with the dam (d) with living fetuse

g) — 1) Cases showing implanted sites and amorphous germinal mass

g) — 2) Cases showing the head and limbs

# Value of group was obtained by averaging the percentages of each litter

[Statistical] a) — d) : X<sup>2</sup> test e), f) : t-test g) : ranked sum test h) : t-test

i) : ranked sum test j) : t-test

Table 3. Data from Mice Orally Treated with Thiabendazole (TBZ) from Days 7 through 9 of Gestation : External Observation

| Doses                             | 120mg/kg      | 60mg/kg       | 30mg/kg       | Olive oil     |
|-----------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| a) Number of fetuses examined     | 332           | 347           | 368           | 354           |
| b) Malformation                   |               |               |               |               |
| 1) Percent malformation $\pm$ SD# | 0.3 $\pm$ 1.6 | 1.5 $\pm$ 4.5 | 1.7 $\pm$ 4.5 | 0.3 $\pm$ 1.3 |
| 2) Type & number of affected      |               |               |               |               |
| Cleft palate                      | 0             | 1             | 0             | 0             |
| Open eyelids                      | 1             | 4             | 4             | 1             |
| Abdominal hernia                  | 0             | 0             | 1             | 0             |
| Anal atresia                      | 0             | 0             | 1             | 0             |
| c) Other anomalies                |               |               |               |               |
| 1) Percent anomalies $\pm$ SD#    | 0.2 $\pm$ 1.2 | 0.6 $\pm$ 2.3 | 0             | 0.5 $\pm$ 1.9 |
| 2) Type & number of affected      |               |               |               |               |
| Club foot                         | 1             | 1             | 0             | 1             |
| Kinky tail                        | 0             | 1             | 0             | 1             |

c) Directional anomalies of tail and limbs, hematoma, edema and others

# Value of group was obtained by averaging the percentages of each litter

[Statistical analysis] b), c) : ranked sum test

Table 4. Data from Mice Orally Treated with Thiabendazole (TBZ) from Days 7 through 9 of Gestation : Skeletal Observation

| Doses                                                                   | 120mg/kg        | 60mg/kg         | 30mg/kg         | Olive oil       |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| a) Number of fetuses examined                                           | 332             | 347             | 368             | 354             |
| b) Malformation                                                         |                 |                 |                 |                 |
| 1) Percent malformation $\pm$ SD#                                       | 0.3 $\pm$ 1.5   | 0               | 0.2 $\pm$ 1.2   | 0.3 $\pm$ 1.6   |
| 2) Type & number of fetuses affected                                    |                 |                 |                 |                 |
| Fusion of vertebral body                                                | 1               | 0               | 0               | 1               |
| Fusion of ribs                                                          | 1               | 0               | 1               | 0               |
| c) Variation                                                            |                 |                 |                 |                 |
| Type & percent variation $\pm$ SD#                                      |                 |                 |                 |                 |
| 1) Asymmetry of sternebrae                                              | 6.6 $\pm$ 10.3  | 10.0 $\pm$ 10.8 | 9.3 $\pm$ 10.9  | 8.5 $\pm$ 12.7  |
| 2) Accessory of sternebrae                                              | 13.9 $\pm$ 15.3 | 12.5 $\pm$ 17.9 | 13.8 $\pm$ 20.7 | 10.3 $\pm$ 13.1 |
| 3) Cervical rib                                                         | 17.7 $\pm$ 16.3 | 13.8 $\pm$ 14.7 | 14.1 $\pm$ 16.2 | 16.6 $\pm$ 17.6 |
| 4) 14th rib                                                             | 29.4 $\pm$ 26.9 | 33.3 $\pm$ 28.6 | 33.2 $\pm$ 23.8 | 24.9 $\pm$ 23.0 |
| 5) Splitting & branching of atlas & axis                                | 21.1 $\pm$ 12.2 | 20.7 $\pm$ 18.8 | 30.0 $\pm$ 23.7 | 28.5 $\pm$ 15.7 |
| 6) Abnormalities in number of pre-sacral vertebrae                      | 0               | 1.0 $\pm$ 2.8   | 2.6 $\pm$ 12.6  | 1.2 $\pm$ 4.7   |
| 7) Separation or defective development of sternebrae                    | 1.5 $\pm$ 3.8   | 0.5 $\pm$ 1.8   | 1.6 $\pm$ 4.8   | 1.9 $\pm$ 5.2   |
| d) Ossification                                                         |                 |                 |                 |                 |
| 1) Mean number of ossified fore limb phalanx $\pm$ SD [(Pro. + Mid.)/2] |                 |                 |                 |                 |
| L                                                                       | 3.0 $\pm$ 0.4   | 3.1 $\pm$ 0.4   | 3.0 $\pm$ 0.4   | 2.9 $\pm$ 0.4   |
| R                                                                       | 3.0 $\pm$ 0.5   | 3.2 $\pm$ 0.4   | 3.1 $\pm$ 0.4   | 3.0 $\pm$ 0.4   |
| 2) Mean number of ossified hind limb phalanx $\pm$ SD [(Pro. + Mid.)/2] |                 |                 |                 |                 |
| L                                                                       | 3.1 $\pm$ 0.6   | 3.2 $\pm$ 0.6   | 3.0 $\pm$ 0.5   | 3.0 $\pm$ 0.5   |
| R                                                                       | 3.1 $\pm$ 0.6   | 3.2 $\pm$ 0.6   | 3.0 $\pm$ 0.6   | 3.0 $\pm$ 0.5   |
| 3) Mean number of ossified post lumbar vertebrae $\pm$ SD               | 14.3 $\pm$ 1.5  | 14.2 $\pm$ 1.4  | 13.8 $\pm$ 1.5  | 14.4 $\pm$ 1.3  |

c)—1) Cases showing deviation over 1/2 of length of maximum sternal nucleus between left and right nuclei

c)—4) Definition of lumbar rib was based on Kimmel and Wilson (Teratology, 8, 309-316, 1973)

c)—6) Cases showing abnormality in sum of numbers of cervical, thoracic and lumbar vertebrae

d)—3) Sum of numbers of ossified sacral and coccygeal vertebrae

# Value of group was obtained by averaging the percentages of each litter

[Statistical analysis] b)—1): ranked sum test c): ranked sum test d): t-test

妊娠の成立した母体ではすべてに生児を認めた (表2)。

2) 妊娠黄体数, 着床痕数, 生児数, 死亡児頻度 (早・後期), 生児体重および性比: いずれにも対照群との間に有意差を認めなかった (表2)。

3) 生児外表奇形・異常: 奇形として120mg群で開眼1例 (母体数1), 60mg群で口蓋裂1例 (1), 開眼4例 (3), 30mg群で開眼4例 (3), 膈ヘルニア1例 (1), 肛門閉鎖1例 (1), 対照群で開眼1例 (1) を認め, 異

常としては, 120mg群で反足1例 (1), 60mg群で反足1例 (1), 曲尾1例 (1), 対照群で反足1例 (1), 曲尾1例 (1) が認められた (表3)。

表中に示した頻度 (%) は各母体単位での数値を平均して群の値としたものであるが, 1匹の胎児に2種以上の奇形を併発したものは1として数えた。

対照群に対しいずれの投与群でも奇形・異常とも, 発現数に有意差を認めなかった。

30mg 群にみられた肛門閉鎖の1例は、当部でこれまで蓄積された6,000例以上の対照胎児ではまったく観察されていない症例であり、この発生の意義については今後の検討に待たなければならない。

4) 骨格奇形・変異・化骨進行度：奇形として120mg群で椎体癒合1例、肋骨癒合1例、30mg群で肋骨癒合1例、対照群で椎体癒合1例を認め、その発現頻度は120mg群  $0.28 \pm 1.48\%$ 、60mg群  $0\%$ 、30mg群  $0.22 \pm 1.18\%$ 、対照群  $0.31 \pm 1.60\%$  で有意差はなく、また用量に関連した変動も認めなかった(表4)。

これまで当部で観察した対照胎児での骨格奇形の発生率(母体単位)は0.1%以下であるが、本試験ではたまたま対照群に1例の椎体癒合がみられ、発生率が0.3%となり、投与群とまったく差がなかった。

投与群では従来の妊娠9日投与試験の成績と大差ないかむしろ低い発生率で、3日間の連続投与による奇形発生の増加は認められなかった。この原因については今後の研究により明らかにしたい。

変異を有するものの発現頻度および化骨進行度においても有意差はなく、また用量に関連した変動をも認めなかった(表4)。

#### 要 旨

チアベンダゾール(TBZ)120mg、60mgおよび30mg/kg/dayをJcl:ICRマウスの妊娠7日から9日まで3回経口投与し、骨格癒合奇形を中心とした胎児の奇形発生を観察した。

奇形の発生は、妊娠9日1回投与の場合と比較して増加は認められなかった。

#### 文 献

- 1) 小縣昭夫, 安藤 弘, 久保喜一, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 112, 1978
- 2) 小縣昭夫, 安藤 弘, 久保喜一, 高橋 博, 平賀興吾: 第21回日本先天異常学会講演および抄録集
- 3) Dawson, A.B.: *Stain Tech.*, 1, 123, 1927
- 4) 西村秀雄: 先天異常, 16, 175, 1976



## チアベンダゾールのマウスにおける催奇形性について 生産場の異なる3つのICR系マウスによる比較

久保 喜一\*, 安藤 弘\*, 小縣 昭夫\*, 平賀 興吾\*

### Teratological Studies of Thiabendazole (TBZ) in Mice Comparative Teratogenicity Using the ICR Strain Mice Purchased from Three Different Commercial Breeders

YOSHIKAZU KUBO\*, HIROSHI ANDO\*, AKIO OGATA\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** チアベンダゾール thiabendazole, 駆虫薬 anthelmintic, 食品添加物 food additive, 農薬 pesticide, 防かび剤 fungicide, マウス mouse, 催奇形性 teratogenicity

#### はじめに

われわれはチアベンダゾール(TBZ, 食品添加物・保存料, 農薬・殺菌剤, 医薬品・駆虫薬, その他・防かび剤)の催奇形性をJcl:ICRマウスを用いて明らかにしてきたが<sup>1,2)</sup>, TBZの催奇形性を評価するためには系統差, 種差を明らかにする必要がある, その第1歩として今回3つの生産場の異なるICR系マウスを用いてTBZの催奇形性を比較した。

#### 試験材料ならびに方法

1. 実験動物 Jcl:ICRマウスを日本クレア(株), CRJ:CD-1(ICR)マウスを日本チャールス・リバー(株), Slc:ICRマウスを静岡県実験動物農業協同組合(以下各々J, C, Sと略す)から4週齢時に購入し, 8~18週齢(体重24.3~37.7g)に達した発育良好なものを選び本試験に供した。

2. 飼育条件 温度 $25\pm1^\circ$ , 湿度 $55\pm5\%$ , 照明午前6時~午後6時, 換気毎時10回の飼育室にて日本クレア(株)製固型飼料CE-2および水道水を自由に与え, 試験開始(交配)時までアルミケージ(225×325×110mm)に10匹, 交配後はプラスチックケージ(180×305×110mm)にて1匹飼いとしたり, 雄マウスは交配前1週間より1匹飼いとしたり。

3. 交配方法 雌雄1:1終夜同居により, 翌朝陰栓の確認されたものを妊娠動物とみなし, その日を妊娠0日とした。

4. 試料 チアベンダゾール(TBZ)はMERCK SHARP & DOHM INTERNATIONAL 社製 Lot

No. BZA-539, 純度98.5%を用い日本薬局方オリーブ油(三晃製薬 Lot No. 05T921)に懸濁して投与した。

5. 試料投与量 Jcl:ICRマウスで確実に四肢減形成奇形児を誘発する量<sup>2)</sup>の1,389mgおよび1,157mg/10ml/kgを用いた。

6. 観察方法 J, C, Sによる試験は並行的に行い, 試料は妊娠9日に1回経口投与とし, 対照群にはオリーブ油10ml/kgを投与した。体重測定および一般状態の観察は毎日行い, 妊娠18日にエーテルにより麻酔屠殺し, 次の検索を行った。屠殺後直ちに開腹, 子宮を開き着床痕, 早・後期死亡胎児, 生児数を数え, 生児は体重測定, 性の判別, 外表異常の観察を行い, 次いで母体の卵巣の黄体数を数え, 主要器官の重量測定と肉眼的異常の検索を行った。生児は95%エチルアルコールで固定後アリザリンレッドSで骨格染色<sup>3)</sup>を行い骨格異常の有無を観察した。

7. 結果のまとめ方 西村の報告<sup>4)</sup>に準拠して行った。

#### 結果と考察

1. 母体の所見 1) 体重および一般状態: 妊娠0日の体重を100とした体重増加率の推移は生産場別にFig. 1(J), 2(C), 3(S)に示す。各マウスとも対照群に比べ, 投与群では投与後体重低下および増加抑制がみられ, JではTBZ用量との相関が認められたが, C, Sでは1,389mg群より1,157mg群の方の抑制が強かった。また, Sの1,389mg群を除くすべてが推計学的に有意な抑制であり, Sでの抑制はJ, Cより軽度であっ

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

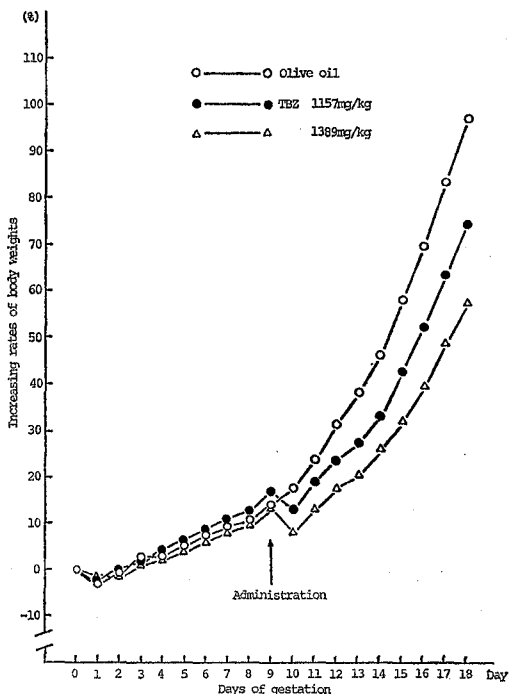


Fig. 1. Increasing Rates of Body Weights after Administration of TBZ in Jcl : ICR Mice

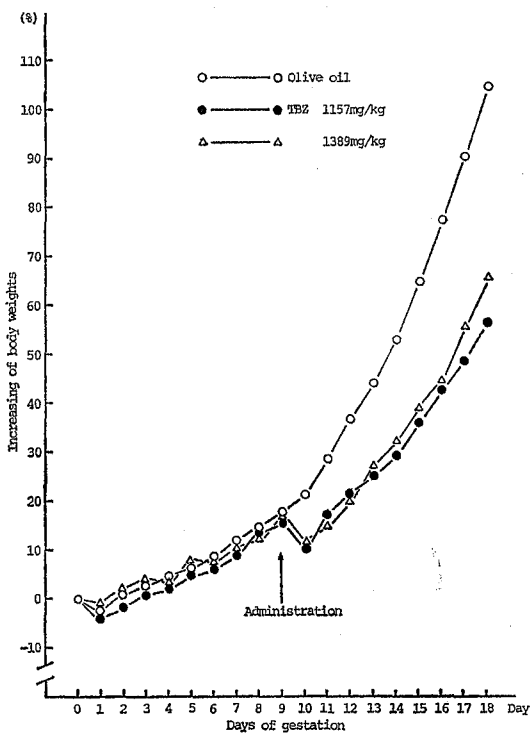


Fig. 2. Increasing Rates of Body Weights after Administration of TBZ in CRJ:CD-1 (ICR) Mice

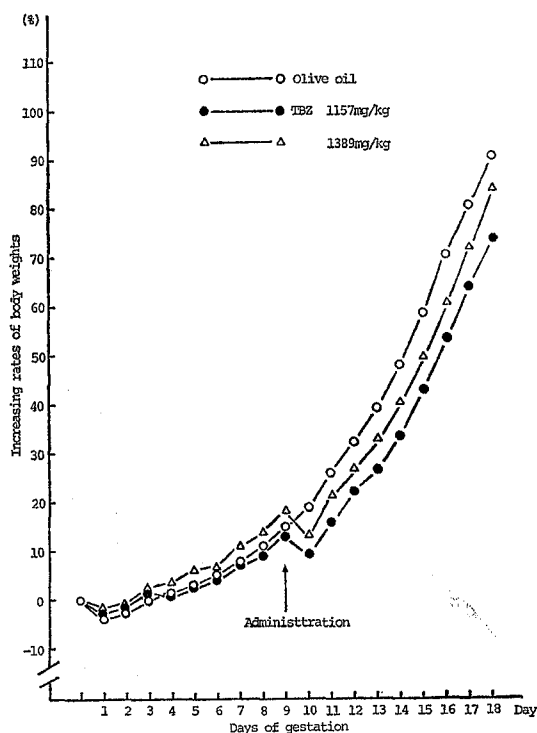


Fig. 3. Increasing Rates of Body Weights after Administration of TBZ in Slc : ICR Mice

た。

2) 剖検所見および器官重量：器官重量は Table 1 に示す通りで、J 1,389mg 群では肝臓の絶対重量および体重比重量が腎臓（右）体重比重量が対照群と較べ有意に軽く、C 1,389mg 群では肝臓と腎臓（右）の絶対重量および体重比重量がともに軽く、脾臓の体重比重量が重く、C 1,157mg 群では肝臓の体重比重量、卵巣（右）の絶対重量および体重比重量が軽く、脾臓の絶対重量および体重比重量が重かった。S 1,389mg 群では肝臓の絶対重量が軽く、心臓、腎臓（右）の絶対重量、卵巣（左）の絶対重量および体重比重量が重かった。以上 J, C, S 各マウスの重量を測定した器官中では、肝臓が用量相関をもって減少していた。この変化で J と C は類似していたが、S では低用量では対照と全く差がなかったのに対し、高用量では J および S より強い減少を示していた以外に用量と関連した増減は認められなかった。

2. 胎児に係わる所見 1) 妊娠の成立：妊娠 18 日の屠殺開腹時に妊娠（着床）成立を確認した母体は、J 1,389mg 群 14/14 (100%)、J 1,157mg 群 12/15 (80%)、J 対照群 12/14 (85.7%)、C 1,389mg 群 15/16 (93.8%)、

Table 1. Data from Mice Orally Treated with Thiabendazole (TBZ) on Days 9 of Gestation : Organ Weights of Mother Mice

| Mice | Dose          | No. of dam | Liver<br>g<br>g/100g     | Heart<br>mg<br>mg/100g                               | Spleen<br>mg<br>mg/100g     | Kidney(L)<br>mg<br>mg/100g | Kidney(R)<br>mg<br>mg/100g   |
|------|---------------|------------|--------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| J    | TBZ 1389mg/kg | 12         | 2.8±0.1**<br>8.6±0.6***  | 149.0±12.5 <sup>1)</sup><br>464.7±40.3 <sup>2)</sup> | 152.9±39.2<br>476.7±120.7   | 237.1±19.3<br>738.4±47.6   | 248.0±18.8<br>773.1±55.0*    |
|      | TBZ 1157mg/kg | 10         | 3.0±0.3<br>9.5±0.9       | 147.4±7.0<br>473.3±36.4                              | 140.9±34.7<br>448.7±93.5    | 233.8±15.8<br>749.9±52.8   | 248.4±22.3<br>795.6±60.0     |
|      | Olive oil     | 12         | 3.2±0.4<br>9.9±0.8       | 153.9±17.2<br>472.4±24.8                             | 143.0±32.7<br>437.8±85.6    | 254.1±36.0<br>779.7±72.4   | 268.2±29.7<br>823.9±52.9     |
| C    | TBZ 1389mg/kg | 12         | 2.6±0.3*<br>9.3±1.0*     | 133.1±9.9<br>479.8±45.2                              | 129.1±29.1<br>464.1±101.1*  | 210.5±20.7<br>757.7±75.4   | 215.1±19.9**<br>773.5±64.2** |
|      | TBZ 1157mg/kg | 13         | 2.7±0.3<br>9.3±1.3*      | 135.8±9.9<br>470.1±37.9                              | 138.6±31.9*<br>479.2±109.8* | 225.3±30.2<br>779.6±107.2  | 231.7±30.3<br>801.1±102.8    |
|      | Olive oil     | 15         | 2.9±0.3<br>10.1±0.9      | 134.5±15.1<br>473.9±35.3                             | 114.4±16.0<br>402.8±46.1    | 224.3±17.5<br>792.2±56.5   | 239.7±22.9<br>846.1±67.8     |
| S    | TBZ 1389mg/kg | 10         | 2.1±0.3*<br>9.6±1.0      | 147.9±11.3***<br>463.9±45.7                          | 140.6±16.2<br>439.1±41.1    | 245.2±28.8<br>770.7±112.6  | 267.9±22.1**<br>840.5±92.2   |
|      | TBZ 1157mg/kg | 12         | 2.8±0.3<br>9.2±1.2       | 139.0±14.1<br>459.2±54.2                             | 133.2±18.0<br>440.9±70.1    | 230.9±20.9<br>761.7±72.2   | 242.2±21.0<br>799.2±72.0     |
|      | Olive oil     | 18         | 2.8±0.3<br>9.2±0.8       | 134.9±9.9<br>443.6±29.1                              | 140.2±39.9<br>456.6±102.8   | 229.5±20.3<br>755.7±69.5   | 241.8±23.1<br>794.1±49.1     |
| Mice | Dose          | No. of dam | Lung<br>mg<br>mg/100g    | Adrenal(L)<br>mg<br>mg/100g                          | Adrenal(R)<br>mg<br>mg/100g | Ovary(L)<br>mg<br>mg/100g  | Ovary(R)<br>mg<br>mg/100g    |
| J    | TBZ 1389mg/kg | 12         | 199.3±12.1<br>622.3±52.0 | 3.6±0.6<br>11.1±1.4                                  | 3.3±0.6<br>10.2±2.1         | 9.7±2.6<br>30.0±7.6        | 11.0±1.4<br>34.2±4.6         |
|      | TBZ 1157mg/kg | 10         | 187.7±16.5<br>601.7±52.1 | 3.5±0.3<br>11.2±1.3                                  | 3.2±0.5<br>10.2±1.6         | 9.6±2.1<br>30.8±7.0        | 12.1±2.4<br>38.7±7.3         |
|      | Olive oil     | 12         | 194.7±15.6<br>599.4±29.7 | 3.3±0.7<br>10.2±1.7                                  | 3.0±0.4<br>9.3±1.6          | 10.3±2.4<br>31.4±5.9       | 10.7±3.2<br>33.1±10.1        |
| C    | TBZ 1389mg/kg | 12         | 178.6±12.5<br>643.4±52.8 | 3.5±0.5<br>12.6±2.5                                  | 3.0±0.3<br>10.9±1.4         | 7.8±1.5<br>28.1±4.9        | 9.2±2.8<br>33.0±10.3         |
|      | TBZ 1157mg/kg | 13         | 186.6±13.2<br>645.0±31.9 | 3.5±0.6<br>12.2±2.3                                  | 3.1±0.6<br>10.8±2.4         | 7.9±0.9<br>27.3±3.2        | 8.4±2.1*<br>29.1±6.8*        |
|      | Olive oil     | 15         | 183.1±12.9<br>647.4±52.5 | 3.3±0.6<br>11.8±2.1                                  | 3.1±0.7<br>11.1±2.5         | 7.5±1.7<br>26.6±5.8        | 10.1±1.9<br>35.7±6.1         |
| S    | TBZ 1389mg/kg | 10         | 186.3±10.8<br>582.8±32.1 | 4.0±0.9<br>12.6±2.8                                  | 3.8±0.6<br>12.0±2.4         | 11.5±1.8**<br>36.0±5.3*    | 10.2±3.4<br>31.9±10.4        |
|      | TBZ 1157mg/kg | 12         | 187.1±15.7<br>617.2±53.2 | 3.6±0.4<br>12.0±1.2                                  | 3.2±0.5<br>10.7±1.8         | 9.2±1.7<br>30.2±5.8        | 10.0±1.4<br>33.1±6.3         |
|      | Olive oil     | 18         | 176.6±15.4<br>581.7±56.3 | 3.6±0.5<br>11.9±1.7                                  | 3.3±0.7<br>10.8±2.3         | 9.1±1.9<br>30.0±7.3        | 9.8±2.2<br>32.4±7.6          |

1) Mean (absolute)±SD

2) Mean (relative)±SD

\* P&lt;0.05    \*\* P&lt;0.01    \*\*\* P&lt;0.001

C 1, 157mg群 14/17(82.4%), C 対照群 15/17(88.2%),  
S 1, 389mg群 15/16(93.8%), S 1, 157mg群 17/18(94.4  
%), S 対照群 18/18(100%) でいずれも妊娠の低下を認  
めなかった。しかし, J 1, 389mg群 2 匹, J 1, 157mg群  
2 匹, C 1, 389mg群 2 匹, S 1, 389mg群 4 匹, S 1, 157

mg 群 3 匹に全胎児死亡が認められ, S においてやや多  
いようであるが, 推計学的に有意差はなかった (Table  
2)。

2) 妊娠黄体数, 着床痕数, 生児数, 死亡児頻度 (早  
・後期) および性比: 黄体数では S 1, 389mg群が対照群

Table 4. Data from Mice Orally Treated with Thiabendazole (TBZ) on Days 9 of Gestation : Skeletal Observation

| Mice                                                      | Jcl : ICR          |                    |                 | CRJ : CD-1 (ICR)   |                    |                 | Slc : ICR          |                    |                 |
|-----------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|--------------------|--------------------|-----------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| Doses                                                     | 1389mg/kg          | 1157mg/kg          | olive oil       | 1389mg/kg          | 1157mg/kg          | olive oil       | 1389mg/kg          | 1157mg/kg          | olive oil       |
| a) Number of fetuses examined                             | 85                 | 99                 | 157             | 93                 | 67                 | 189             | 117                | 127                | 202             |
| b) Malformation                                           |                    |                    |                 |                    |                    |                 |                    |                    |                 |
| 1) Percent malformation $\pm$ SD $\#$                     | 41.7 $\pm$ 35.6*** | 42.6 $\pm$ 41.3*** | 0               | 45.5 $\pm$ 44.9*** | 44.9 $\pm$ 39.3*** | 0               | 23.5 $\pm$ 25.9*** | 32.6 $\pm$ 36.1*** | 0.9 $\pm$ 3.9   |
| 2) Type & number of fetuses affected                      |                    |                    |                 |                    |                    |                 |                    |                    |                 |
| Fusion of vertebral arches                                | 27                 | 20                 | 0               | 21                 | 15                 | 0               | 20                 | 29                 | 1               |
| Fusion of vertebral body                                  | 7                  | 11                 | 0               | 9                  | 4                  | 0               | 3                  | 11                 | 1               |
| Fusion of ribs                                            | 5                  | 9                  | 0               | 6                  | 2                  | 0               | 4                  | 9                  | 0               |
| c) Variation Type & percent variation $\pm$ SD $\#$       |                    |                    |                 |                    |                    |                 |                    |                    |                 |
| 1) Asymmetry of sternebrae                                | 12.0 $\pm$ 20.0    | 26.6 $\pm$ 21.5**  | 3.8 $\pm$ 6.5   | 19.6 $\pm$ 29.5    | 18.4 $\pm$ 32.0    | 5.6 $\pm$ 8.2   | 1.3 $\pm$ 4.0      | 23.5 $\pm$ 22.5*   | 7.7 $\pm$ 9.6   |
| 2) Accessory of sternebrae                                | 4.7 $\pm$ 9.0**    | 6.5 $\pm$ 15.6**   | 21.5 $\pm$ 27.0 | 0.6 $\pm$ 2.1      | 1.4 $\pm$ 5.0      | 3.7 $\pm$ 5.9   | 16.6 $\pm$ 13.8    | 3.5 $\pm$ 5.6      | 10.0 $\pm$ 15.0 |
| 3) Cervical rib                                           | 5.2 $\pm$ 9.9*     | 4.2 $\pm$ 11.3*    | 19.1 $\pm$ 20.6 | 10.6 $\pm$ 17.7    | 9.3 $\pm$ 15.3     | 22.9 $\pm$ 22.6 | 6.1 $\pm$ 9.7      | 9.1 $\pm$ 10.4     | 13.1 $\pm$ 20.2 |
| 4) 14th rib                                               | 17.7 $\pm$ 20.5    | 10.6 $\pm$ 16.1*   | 28.8 $\pm$ 19.6 | 4.8 $\pm$ 10.3**   | 2.8 $\pm$ 7.8***   | 22.7 $\pm$ 15.9 | 5.5 $\pm$ 6.1**    | 12.6 $\pm$ 13.4**  | 37.2 $\pm$ 23.4 |
| 5) Splitting & branching of atlas & axis                  | 12.7 $\pm$ 14.5    | 15.0 $\pm$ 12.4    | 23.8 $\pm$ 14.7 | 5.5 $\pm$ 8.8      | 3.4 $\pm$ 8.5*     | 10.4 $\pm$ 11.5 | 7.4 $\pm$ 10.8     | 4.4 $\pm$ 7.2      | 3.9 $\pm$ 6.1   |
| 6) Abnormalities in number of pre-sacral vertebrae        | 9.8 $\pm$ 17.7     | 7.8 $\pm$ 16.2     | 1.3 $\pm$ 3.0   | 10.4 $\pm$ 29.1    | 17.8 $\pm$ 29.6*   | 0               | 4.8 $\pm$ 11.9     | 3.9 $\pm$ 6.0**    | 0               |
| 7) Separation or defective development of sternebrae      | 14.8 $\pm$ 19.7*   | 16.0 $\pm$ 18.2*   | 2.2 $\pm$ 5.5   | 45.5 $\pm$ 41.0*** | 38.9 $\pm$ 42.4*   | 2.6 $\pm$ 4.7   | 17.7 $\pm$ 13.2*   | 29.3 $\pm$ 34.7*   | 5.1 $\pm$ 10.2  |
| d) Ossification                                           |                    |                    |                 |                    |                    |                 |                    |                    |                 |
| Mean number of ossified                                   |                    |                    |                 |                    |                    |                 |                    |                    |                 |
| 1) fore limb phalanx $\pm$ SD [(Pro. +Mid.)/2]            |                    |                    |                 |                    |                    |                 |                    |                    |                 |
| L                                                         | 2.8 $\pm$ 0.7      | 2.8 $\pm$ 0.7      | 3.1 $\pm$ 0.3   | 2.8 $\pm$ 0.5*     | 2.7 $\pm$ 0.7*     | 3.2 $\pm$ 0.4   | 2.9 $\pm$ 0.6      | 2.5 $\pm$ 0.8      | 2.9 $\pm$ 0.6   |
| R                                                         | 2.9 $\pm$ 0.7      | 3.0 $\pm$ 0.7      | 3.2 $\pm$ 0.2   | 2.8 $\pm$ 0.5*     | 2.9 $\pm$ 0.7      | 3.2 $\pm$ 0.4   | 2.9 $\pm$ 0.6      | 2.6 $\pm$ 0.7      | 2.9 $\pm$ 0.6   |
| Mean number of ossified                                   |                    |                    |                 |                    |                    |                 |                    |                    |                 |
| 2) hind limb phalanx $\pm$ SD [(Pro. +Mid.)/2]            |                    |                    |                 |                    |                    |                 |                    |                    |                 |
| L                                                         | 2.4 $\pm$ 0.8*     | 2.1 $\pm$ 0.9**    | 3.1 $\pm$ 0.4   | 2.1 $\pm$ 0.8***   | 2.2 $\pm$ 1.0**    | 3.2 $\pm$ 0.6   | 2.2 $\pm$ 0.5*     | 1.9 $\pm$ 0.7***   | 2.8 $\pm$ 0.6   |
| R                                                         | 2.3 $\pm$ 0.9**    | 2.4 $\pm$ 0.8**    | 3.1 $\pm$ 0.4   | 2.2 $\pm$ 0.8***   | 2.3 $\pm$ 1.1**    | 3.2 $\pm$ 0.6   | 2.4 $\pm$ 0.6*     | 2.0 $\pm$ 0.7**    | 2.9 $\pm$ 0.6   |
| 3) Mean number of ossified post lumbar vertebrae $\pm$ SD | 11.3 $\pm$ 1.0***  | 11.9 $\pm$ 1.4**   | 13.7 $\pm$ 1.0  | 10.3 $\pm$ 1.6***  | 11.0 $\pm$ 1.6**   | 12.7 $\pm$ 1.4  | 10.7 $\pm$ 1.0**   | 10.6 $\pm$ 1.5**   | 12.3 $\pm$ 1.5  |

c)—1) Cases showing deviation over 1/2 of length of maximum sternal nucleus between left and right nuclei

c)—4) Definition of lumbar rib was based on Kimmel and Wilson (Teratology, 8, 309-316, 1973)

c)—6) Cases showing abnormality in sum of numbers of cervical, thoracic and lumbar vertebrae

d)—3) Sum of numbers of ossified sacral and coccygeal vertebrae

# Value of group was obtained by averaging the numerals at the unit of each dam

[Statistical analysis] b)—1) : ranked sum test c) : ranked sum test d) : t-test

\* P&lt;0.05 \*\* P&lt;0.01 \*\*\* P&lt;0.001

た。また、J では用量と発現頻度に相関を認めたがCとSではいずれも1,157mg群の方が高い値を示した。また、Sの発現頻度はJ、Cに比べやや低いようである。(Table 3)

5) 骨格奇形・変異・化骨進行度: J, C, S各マウスの投与群に奇形の発生が高い頻度で認められ、その型とその発現頻度(%)はJ 1,389mg群で85例中椎弓癒合27, 椎体癒合11, 肋骨癒合5,  $41.7 \pm 35.6\%$ , J 1,157mg群100例中椎弓癒合20, 椎体癒合11, 肋骨癒合9,  $42.6 \pm 41.3\%$ , C1,389mg群93例中椎弓癒合21, 椎体癒合9, 肋骨癒合6,  $45.5 \pm 44.9\%$ , C1,157mg群67例中椎弓癒合15, 椎体癒合4, 肋骨癒合2,  $44.9 \pm 39.3\%$ , S 1,389mg群117例中椎弓癒合20, 椎体癒合3, 肋骨癒合4,  $23.5 \pm 25.9\%$ , S1,157mg群127例中椎弓癒合29, 椎体癒合11, 肋骨癒合9,  $32.6 \pm 36.1\%$ でJ, C, S各マウスともに各対照群と比較して推計学的有意性が認められた。しかしJ, Cマウスともに高用量と低用量との間の発現値に差なく、JとCの値は殆ど同一であった。Sでは低用量の方の発現率が高かったがJおよびCと比較すると高用量も含めて低い出現頻度であった。

変異を有するものの出現頻度はJ 1,389mg群で過剰胸骨核, 頸肋骨が低く, 胸骨核縮小・分裂が高く, J 1,157mg群過剰胸骨核, 頸肋骨, 腰肋が低く, 胸骨核不対称, 胸骨核縮小・分裂が高く, C1,389mg群で腰肋が低く, 胸骨核縮小・分裂が高く, C1,157mg群で腰肋が低く, 胸骨核不対称, 仙椎前椎骨数異常, 胸骨核縮小・分裂が高く, S1,389mg群で腰肋が低く, 胸骨核縮小・分裂が高く, S1,157mg群で腰肋が低く, 胸骨核縮小・分裂, 胸骨核不対称, 仙椎前椎骨数異常が有意に高かった。J, C, S各マウスを通じて一定の傾向ある変異の出現

は見当らなかった。

化骨進行度では前肢指骨平均化骨数で, C1,389mg群の左右, C1,157mg群左が有意に少なく, 後肢指骨平均化骨数および腰椎後椎骨数ではJ, C, Sの全投与群で有意に少なかった。用量との相関は明らかでなく, JとCでは近似の値を示したが, SはJおよびCと比べやや低い値であった。(Table 4.)

以上, 従来われわれの用いてきたJマウスにおけると同様にCおよびSマウスにおいてもTBZにより四肢減形成, 骨格奇形を生じた。しかしながら母体重, 死亡児出現頻度および奇形出現頻度よりみると, SマウスはJおよびCマウスよりTBZへの反応性は低いようである。

### 要 旨

チアベンダゾール(TBZ)の催奇形性を生産場の異なる3つのICR系マウス(Jcl:ICR, CRJ:CD-1(ICR), Slc:ICR)により比較した。TBZは妊娠9日1回, 1,389mg/kgおよび1,157mg/kg経口投与し妊娠18日の胎児の外表・骨格の奇形・異常を検索したが, 従来より用いてきたJcl:ICRマウスにおけると同様にCRJ:CD-1(ICR)およびSlc:ICRマウスにおいても四肢減形成・骨格奇形の発現を認めた。その奇形発現頻度はSlc:ICRマウスにおいてやや低かった。

### 文 献

- 1) 小縣昭夫, 安藤 弘, 久保喜一, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 112, 1978
- 2) 小縣昭夫, 安藤 弘, 久保喜一, 高橋 博, 平賀興吾: 第21回日本先天異常学会講演および抄録集
- 3) Dawson, A. B.: *Stain Tach*, 1, 123, 1927
- 4) 西村秀雄: 先天異常, 16, 175, 1976

## クロム鉱さい粉じんのラットによる2年間持続吸入実験

### (第1報) 呼吸器系の病理組織学的観察

坂本 義光\*, 神谷 信行\*, 池田 虎雄\*, 平賀 興吾\*

## Inhalation Experiment of Chromite Ore Residue Dust on Rats for 2 Years

### (I) Histopathological Observation of Respiratory System

YOSHIMITSU SAKAMOTO\*, NOBUYUKI KAMIYA\*, TORAO IKEDA\*  
and KOGO HIRAGA\*

Male F344 rats were placed in an inhalation chamber and exposed to chromite ore residue dust at concentration of 0.2mg/m<sup>3</sup> (Cr 0.2mg/m<sup>3</sup> group), 1 mg/m<sup>3</sup> (Cr 1 mg/m<sup>3</sup> group) and JIS dust No. 11 at 1 mg/m<sup>3</sup> (JIS group) for 24 hrs a day, 7 days a week, for 105 weeks.

Increasing curves of body weight in Cr 0.2mg/m<sup>3</sup> and 1 mg/m<sup>3</sup> group were similar to those of the control and JIS group. Survival rate of Cr 0.2 mg/m<sup>3</sup> and 1 mg/m<sup>3</sup> group were not significantly lower than the other group. The lung weight of dust exposed groups were higher than control. Cr 1 mg/m<sup>3</sup> group and JIS group were similar. Cr 0.2 mg/m<sup>3</sup> group was lower than the other group. In histopathological examination, nonneoplastic and neoplastic lesions related to exposed chromite ore residue dust were not observed.

**Keywords:** Chromite ore residue dust, rats, two years inhalation, histopathological changes

### 緒 言

クロム鉱さい粉じんの経気道摂取による生体への影響を観察する目的で吸入実験装置<sup>1)</sup>を用いたラットによる1, 3か月間吸入実験および1か月間吸入後終生飼育実験を行ないその結果はすでに報告<sup>2-5)</sup>した。前実験において、鉱さい粉じんを曝露したラットでは、体重の増加抑制、また組織学的には気管粘膜上皮での細胞高の増加、肺での粉じんを貪食した大食細胞の腫大および崩壊、肺胞上皮の剥離、肺胞内における崩壊残渣の蓄積などの変化が観察された<sup>2,3)</sup>。これらの変化は曝露を中止することにより、軽減、回復する性質のものであったが、ひきつづき終生飼育したラットでは、気管支末端の気道内や周辺の肺胞内に大単核細胞や多核巨細胞の結節状の集簇が認められた<sup>5)</sup>。今回は前実験で観察された変化、腫瘍の発生の有無、低濃度で長期間吸入された粉じん粒子の挙動などに注目して行なった2年間に亘る昼夜連続吸入実験の結果について報告する。本報ではそのうち体重、生存率、肺重量、および呼吸系にみられた組織変化について述べる。

実験は、実験室内空気のみを通したチャンバー内飼育

の対照群の他に、鉱さいによる変化をより明確にするために比較対照として関東ローーム粉体を曝露した群を設定して行なった。

### 実験材料および方法

**動物** F344-DuCrj, 雄ラット, 4週令を日本チャールスリバーより購入し, 1週間予備飼育した後, 実験に用いた。曝露開始時の体重は82~83gであった。

**粉体** クロム鉱さい粉じんは鉱さい塊を前報<sup>2)</sup>で示した方法で粉碎, 分篩して調製した。比較対照として用いた関東ローーム粉体は日本粉体工業協会よりJIS Z 8901試験用粉体11種を入手した。原粉体の比重は鉱さい2.79, 関東ローーム2.97であり, 平均粒径は各々3.3, 1.79μであった<sup>2)</sup>。各粉体の化学的性状は前報<sup>3)</sup>に示したとおりである。そのうち粉体の組成はTable 1に示すように鉱さいではCaが最も多く, またCrは水溶性クロムが1.2%, 不溶性のものが1.6%の割合で含まれている。関東ローームではSiが最も多くCrは当部の原子吸光分析では検出限界(0.02ppm)以下であった。

**吸入実験** 実験は1群20匹として, クロム鉱さい粉じん1mg/m<sup>3</sup>(鉱さい1mg/m<sup>3</sup>群), 0.2mg/m<sup>3</sup>(鉱さい0.2

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Composition of Dust

| Chromite ore residue |           | JIS Dust No. 11 |       |
|----------------------|-----------|-----------------|-------|
|                      | (%)       |                 | (%)   |
| Ca                   | 21.2      | Si              | 16-19 |
| Fe                   | 6.1       | Fe              | 12-16 |
| Cr                   | 2.8(1.2)* | Al              | 14-17 |
| Si                   | 2.4       | Mg              | 2-4   |
| Al                   | 1.8       | Ca              | 0-2   |
| Na                   | 0.4       | Ti              | 0-2   |
| Ni                   | 0.3       | Cr              | ND    |
| Mn Ti Zn Sr          | <0.1      |                 |       |

( )\*: Water soluble Cr

Table 2. Particle Size Distributions of Aerosol in Inhalation Chamber

| Sampler Stage | Diameter $\mu$ | Chromite ore residue dust |                    | JIS Dust No. 11    |
|---------------|----------------|---------------------------|--------------------|--------------------|
|               |                | 0.2mg/m <sup>3</sup>      | 1mg/m <sup>3</sup> | 1mg/m <sup>3</sup> |
|               |                | weight percent            |                    |                    |
| 0             | >11.0          | 0                         | 0                  | 1.0                |
| 1             | 11.0 - 7.0     | 0                         | 0.4                | 1.0                |
| 2             | 7.0 - 4.7      | 2.0                       | 2.8                | 5.2                |
| 3             | 4.7 - 3.3      | 9.3                       | 15.9               | 18.7               |
| 4             | 3.3 - 2.1      | 31.2                      | 35.9               | 35.7               |
| 5             | 2.1 - 1.1      | 42.7                      | 31.7               | 28.6               |
| 6             | 1.1 - 0.65     | 13.8                      | 11.7               | 8.9                |
| 7             | 0.65 - 0.43    | 0                         | 1.6                | 0.1                |
| 8*            | 0.43 >         | 0                         | 0                  | 0                  |

\*: Filter

mg/m<sup>3</sup>群) および関東ローム粉体 1mg/m<sup>3</sup> (JIS 粉体群) の粉じん曝露群と、実験室内空気のみを対照群の4群を設定し、昼夜連続で105週間行なった。実験に用いた装置の詳細は前報<sup>1)</sup>にゆずる。

実験期間中の各群の粉じん濃度は、設定濃度に対して±10%以内の変動幅で保たれていた。また粉じんの粒度分布はTable 1に示したように、各群とも4.7 $\mu$ 以下の粒子が90%、また2 $\mu$ 以下は鉍さい0.2mg/m<sup>3</sup>群で56.5%、1mg/m<sup>3</sup>群で45%、JIS粉体群では37.6%の割合で存在していた。

実験期間中、動物は吸入チャンパー内の2個のステンレス製金網ケージ (w 34.5×l 50×h 21cm) に等分して収容し、日本クレア製固型飼料CE-2およびチャンパー内自動給水ノズルにより水道水を自由に摂取させた。チャンパー内飼育条件は、換気回数12~14回/時で、温

度23~25℃、湿度40~50%であった。また照明時間は実験室内と同様、午前6時より午後6時までとした。

体重は曝露開始後64週目までは2週間に1回の割合で、その後は毎週1回測定した。一般症状の観察は毎回の体重測定時、および毎日チャンパー前面のガラス窓より行なった。

実験終了後、動物は大腿部動静脈の切断により放血屠殺した。また曝露期間中瀕死の状態になったラットについても同じ方法で屠殺した。なお本実験では曝露開始後55週目に鉍さい0.2mg/m<sup>3</sup>群で装置の事故により4匹死亡した。そのため他の群も各2匹ずつ屠殺し、これらを1年目観察例とした。なお鉍さい0.2mg/m<sup>3</sup>群では、事故によりすべてのラットが軽度な体重の減少を示したが早期に回復し、またその後の生育状態も良好であったので実験を続けた。

**組織標本の作製** 解剖の際肺は気管に接続させたまま摘出し、結紮した気管より緩衝ホルマリンを10~12cm水柱の圧で注入、再膨張させた後、各葉を肺門部で離断し、固定液に漬けた。左葉は組織全体の最大断面が出るように縦断し、右葉は各葉のほぼ中央部で横断し各部分の切片を作製した。鼻腔は固定後、脱灰し、頭部長軸に直角に全体を3~4mmの厚さに横断し、各細切片より標本を作製した。気管は、喉頭部より縦隔部までを甲状腺を含め2~3mmの厚さに輪切りにし、各細切片より標本を作製した。染色はHE染色の他、必要に応じてアザン、鍍銀染色を行なった。なお放血屠殺の際流出した血液について血液学的検査を行ない、また塗抹標本を作製し、組織学的検索の参考にした。

## 結 果

**体重および一般症状** Fig. 1に各群の体重増加曲線を示した。図中の値は各体重測定時の生存例の平均値を示した。鉍さい1mg/m<sup>3</sup>および0.2mg/m<sup>3</sup>群の増加推移の傾向は、曝露期間を通して対照群、JIS粉体群と同様で、特に変化はなかった。またこの間鉍さい群のラットに特徴的な症状もみられなかった。

**生存率** 対照、JIS粉体、鉍さい1mg/m<sup>3</sup>群では、1年目屠殺例を除いた18匹について、鉍さい0.2mg/m<sup>3</sup>群では事故死亡例を除いた16匹のラットについて生存率を求めた。鉍さい1mg/m<sup>3</sup>群では曝露終了時まで全例が生存していた。その他の群の生存率は対照群10/18 (55%)、JIS粉体群13/18 (72%)、鉍さい0.2mg/m<sup>3</sup>群12/16 (75%)であった。各群の途中死亡例のうち瀕死屠殺例は各々4, 2, 2例であった。Fig. 2に各群の生存曲線を示した。鉍さい1mg/m<sup>3</sup>群を除いた各粉じん曝露群の死

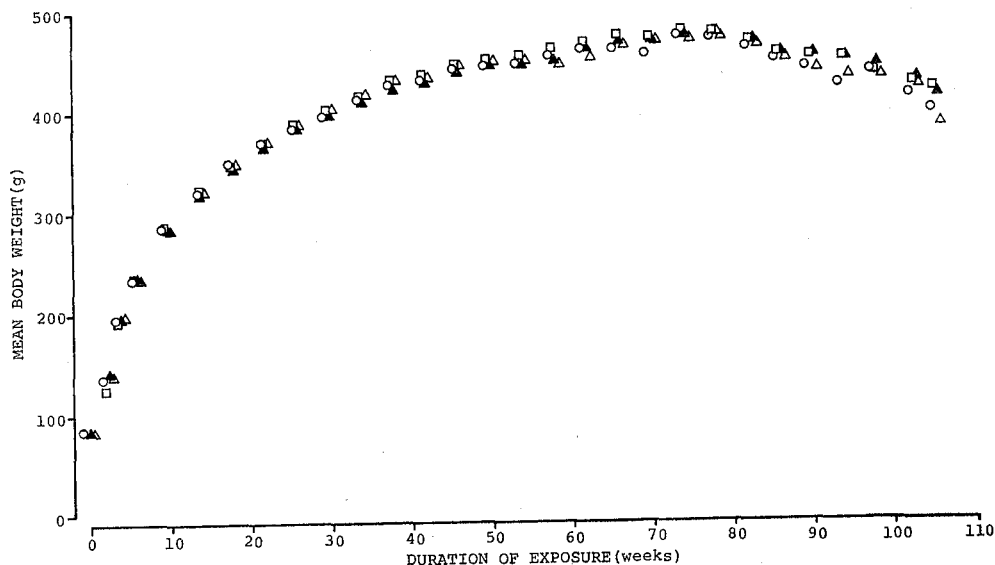


Fig. 1. Growth Curves of Rats exposed to JIS Dust No.11 and Chromite Ore Residue Dust for 105 Weeks (○) Control, (□) JIS dust No.11:  $1\text{mg}/\text{m}^3$ , (▲) Chromite ore residue dust:  $1\text{mg}/\text{m}^3$ , (△) Chromite ore residue dust:  $0.2\text{mg}/\text{m}^3$

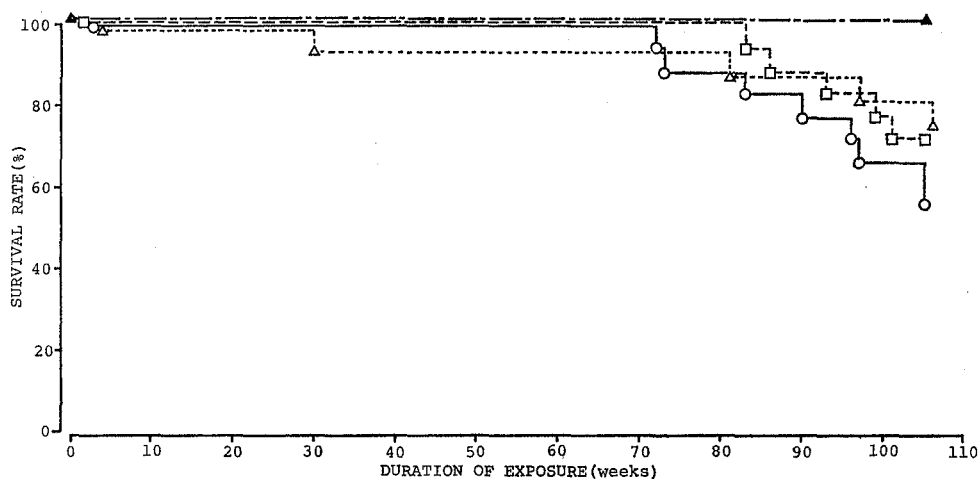


Fig. 2. Survival Curves of Rats exposed to JIS Dust No.11 and Chromite Ore Residue Dust for 105 Weeks (○—○) Control, (□---□) JIS dust No.11:  $1\text{mg}/\text{m}^3$ , (▲----▲) Chromite ore residue dust:  $1\text{mg}/\text{m}^3$ , (△.....△) Chromite ore residue dust:  $0.2\text{mg}/\text{m}^3$

亡経過の推移は対照群と比べ特に変化はなかった。

**肺重量** Table 2 に曝露終了時生存していたラットの肺重量を示した。各粉じん曝露群で対照群に比べ有意に大きな値を示した。また JIS 粉体群と比べ、鉍さい  $1\text{mg}/\text{m}^3$  群では差がなかったが、 $0.2\text{mg}/\text{m}^3$  群は有意に小さかった。

**病理組織学的観察** 本報では対照群、鉍さい  $1\text{mg}/\text{m}^3$  群、JIS 粉体群の1年目屠殺例を除いた18例および鉍さい  $0.2\text{mg}/\text{m}^3$  群の事故死亡例を除いた16例の呼吸器系の組織変化について

**肺**：本実験では、鉍さい粉じん曝露によって肺に悪性腫瘍の発生はみられなかった。以下各群に見られた非腫



Table 3. Lung Weight of Rats exposed to JIS Dust No. 11 and Chromite Ore Residue Dust for 105 Weeks

| Group           | Conc. of aerosol<br>mg/m <sup>3</sup> | No. of rats | Lung weights<br>mg |
|-----------------|---------------------------------------|-------------|--------------------|
| Control         | —                                     | 10          | 1445±192           |
| JIS Dust No. 11 | 1                                     | 13          | 2158±405*          |
| Chromite ore    | { 0.2                                 | 13          | 1824±403*†         |
| residue dust    |                                       | 16          | 1987±499*          |

Each values represent the mean±SD

Statistical significance: \*P&lt;0.05 vs Control,

†P&lt;0.05 vs JIS dust No. 11

瘍性変化についてのべる。Table 3 に各群にみられた変化およびその発生例数を示した。鉍さい 1mg/m<sup>3</sup> 群で多くみられた変化は肺胞における細胞の増生 (Alveolar hyperplasia) であったが、他の群にも共通して認められた変化であった。主に組織の辺縁部に限局性にみられ、この部分では、通常の肺胞上皮細胞より大形の細胞が肺胞壁面を被うように配列していた。細胞の増生傾向は、肺胞壁に一層に配列し、肺胞構造が明瞭に認められる状態のものから、増生している細胞の密度が増し、部分的に乳頭状や管状に配列したり、島状に集簇し同時に肺胞内への大食細胞の集簇によって、その部位が無気肺様になっている状態もみられ、以上の変化が段階的にみら

れる例も多かった (photo 1)。また細胞の増生に伴った線維の増生は部分的に軽度な例がみられる程度であった。いずれも周辺の組織への圧排性や正常構造を破壊しての増生態度は見られなかった。増生している細胞は立方状または円柱状で、好塩基性の強い核をもち、細胞質はヘマトキシリンにやや濃染するものからエオジン淡染のものまであり、多くは微細な泡沫状であった。全体的に核・細胞質比は大きかった。以上の様な変化は、鉍さい 1mg/m<sup>3</sup>群で10例、0.2mg/m<sup>3</sup>群で2例、JIS 粉体群で8例、対照群で1例に見られた。また以上の変化を示す部位に扁平上皮化生がみられる例が鉍さい 1mg/m<sup>3</sup> 群に1例、分裂像の多い例が鉍さい 1mg/m<sup>3</sup>群と JIS 粉体群に各1例、細胞質に大きな空胞が存在する細胞が多くみられる例が、鉍さい 1 mg/m<sup>3</sup> 群に2例、0.2mg/m<sup>3</sup> 群に1例、JIS 粉体群に2例見られた。鉍さい 1mg/m<sup>3</sup> 群と JIS 群では、鉍さい群の扁平上皮化生を除いて、変化の発生率、増生の態度や程度に顕著な差は認められなかった。

鉍さい 1mg/m<sup>3</sup>群の1例に見られた大単核細胞の結節状の集簇 (Nodular aggregation of large mononuclear cells) は肺胞内に多核巨細胞の混在した集簇巣が1か所に見られる軽度な変化であった。同様な変化は対照群と鉍さい 0.2mg/m<sup>3</sup> 群にもみられ、これらの群での程度の方が強かった。集簇巣は気管支末端の気道内や周辺の肺胞内に散在性にみられ、気道を塞いでいるものも見られ

Table 4. Histopathological Findings of Lung

| Group                                                | Control | JIS dust No. 11    | Chromite ore residue dust |                    |
|------------------------------------------------------|---------|--------------------|---------------------------|--------------------|
| Concentration of dust                                | —       | 1mg/m <sup>3</sup> | 0.2mg/m <sup>3</sup>      | 1mg/m <sup>3</sup> |
| Number of rats observed                              | 18      | 18                 | 16                        | 18                 |
| Increase of cell height in epithelium of bronchioles | 3       | 1                  | 1                         | 1                  |
| Increase of number in goblet cells of bronchioles    | 2       | 0                  | 1                         | 0                  |
| Focal hemorrhage                                     | 3       | 3                  | 0                         | 0                  |
| Alveolar edema                                       | 1       | 0                  | 1                         | 1                  |
| Alveolar hyperplasia                                 | 1       | 8                  | 2                         | 10                 |
| Focal alveolar and interstitial inflammation         | 0       | 13                 | 0                         | 0                  |
| Interstitial pneumonia                               | 0       | 0                  | 0                         | 1                  |
| Perivascular cell aggregation                        | 0       | 0                  | 11                        | 0                  |
| Nodular aggregation of large mononuclear cells       | 3       | 0                  | 1                         | 1                  |
| Giant cells                                          | 3       | 1                  | 1                         | 1                  |
| Debris in alveoli                                    | 0       | 18                 | 0                         | 0                  |
| Calcification of artery wall                         | 5       | 6                  | 4                         | 5                  |
| Mononuclear cell leukemic infiltration               | 3       | 1                  | 1                         | 1                  |
| Metastatic tumors                                    | 1       | 1                  | 0                         | 0                  |

た、多形核白血球の存在も多く、Table 3 に示した様な細気管支粘膜上皮の変化も伴っていた。0.2mg/m<sup>3</sup> 群の1例には出血がみられた。鉍さい1mg/m<sup>3</sup>群では以上示した変化の存在しない部位では粉じん粒子を貪食した大食細胞の存在する肺泡で軽度な上皮の腫大がみられる他は、正常組織とかわりなかった (Photo 2)。

鉍さい0.2mg/m<sup>3</sup>群のみに血管周囲の細胞集簇 (Perivascular cell aggregation) が見られた。観察された11例すべてが終了時屠殺例であった。この変化はリンパ球と思われる単核細胞や形質細胞が血管周囲に集簇しているもので、程度の強い例では、周辺の肺胞壁へも浸潤し、肺胞内には、これらの細胞に混じって大食細胞や多形核白血球の存在もみられた。気管支粘膜の変化はなかった。

JIS 粉体群にのみ見られた変化は巣状の炎症 (Focal alveolar interstitial inflammation) であった。この変化は数個の肺泡を単位として各葉で散在性にみられた。肺胞内には粉じん粒子の少ない泡沫状または風船状の細胞が存在し、肺胞壁では上皮細胞の腫大、線維化や多形核白血球の浸潤もみられた。また一部の肺胞壁では細胞成分が少なく菲薄になっていた。細気管支上皮の変化は少なかった。JIS 群ではこの他全例に粉じん粒子の混在したエオジン淡染のタンパク様物質が蓄積している肺泡が、ややびまん性にみられた。

以上示した各群の変化の他に単核球白血病細胞の浸潤が対照群に3例、各粉じん曝露群に1例ずつ見られた。また各群で腫瘍の発生はなかったが、対照群に甲状腺癌の転移が1例、JIS 粉体群に細網肉腫の転移が1例みられた。

鼻腔および気管：対照群と鉍さい0.2mg/m<sup>3</sup>群での肺の大単核細胞の集簇巣の形成が顕著な各1例で、鼻腔および気管粘膜上皮の細胞高の増加がみられた。さらに気管では気管腺の増加を伴ない、鼻腔内には分泌物とともに、多形核白血球の混在した細胞等の崩壊残渣が多かった。鉍さい1mg/m<sup>3</sup>群の鼻腔および気管には特に変化はなかった。

粉じん粒子の存在：各粉じん曝露において肺内に吸入された粉じん粒子は大食細胞に貪食された状態で肺胞内に存在している他、肺内リンパ組織や気管支および血管周囲の結合組織内、さらに縦隔部リンパ節中にも JIS 群や鉍さい1mg/m<sup>3</sup>群では大量に存在していた。また JIS 群では肺胞内で粉じんを大量に貪食した大食細胞の崩壊により放出された粒子も肺胞内に多かった。各群とも大食細胞の存在する肺泡ではややびまん性に上皮細胞の軽

度な腫大がみられ、その程度は JIS 群が強かった。粉じんの存在するいずれの部位にも線維の増生はみられなかった。また肺泡の細胞増生を示した部位には、粉じんを貪食した大食細胞の存在は特に多くはなかった。

### 考 察

クロム酸塩の製造にたずさわる作業者に肺ガンが多く発生し、クロムがその原因と考えられているが、クロム鉄鉱石から、最終生成物であるクロム酸塩や重クロム酸塩および鉍さいを含め、製造工程中のどの物質が原因物質であるかは確認されていない<sup>6,7)</sup>。クロムによる腫瘍の発生を観察する目的で種々のクロム化合物について吸入曝露実験<sup>8,9)</sup>が行なわれているが、いずれも肺がんの発生はなく、また腺腫は生じるが、発生率は対照に比べ特に多くはなかった。鉍さいのみを扱った実験は過去に例を見ないが、本実験において鉍さい粉じんによる腫瘍の発生はなかった。

鉍さい粉じんを曝露したラットでみられた非腫瘍性の変化は、いずれも自然発生病変として現われるもので、クロム鉍さいに特徴的な変化ではなかった。このうち肺胞における細胞増生は JIS 群にも見られ、粉じんの種類には関係なく、その濃度に比例した発生を示したものと思われた。Pour<sup>10)</sup>らはラットの非腫瘍性変化のひとつとして Bronchiolo-alveolar adenomatosis をあげている。彼らによれば、この変化は肺の辺縁に主に見られ、纖毛細胞やムチン産生細胞が増生し、その部分は被覆されないとしている。分裂像や扁平上皮化生も見られることがあるが、基本的には肺胞の正常構造を破壊することなく、それに従って増生し、周辺の組織への圧排性もないことから腫瘍性変化と区別している。本実験でみられた変化も同様な変化であると思われる。Innes<sup>11)</sup>は、この変化が自然発生病変として、特に老令ラットに見られるとしており、Coleman<sup>12)</sup>も、F344ラットで、24か月令以上のものに4%の発生率で生じることを報告している。前報<sup>5)</sup>で示した鉍さい粉じん1か月間吸入後終生飼育実験においては、発生例数は少なかったが、対照、粉じん曝露群に関係なく120週令以上のラットで認められた。またこの病変は、クロム化合物<sup>9)</sup>、ニッケル<sup>13)</sup>、ガラス線維<sup>14)</sup>などの種々の粉じんを長期間曝露したラットやモルモットに高い発生率で生じることが知られている。増生している細胞の起源については、肺胞上皮細胞または細気管支粘膜上皮細胞と考えられているが<sup>15)</sup>、いずれにしろ粉じん曝露によって生じたこの病変は、自然発生病変として老令ラットに見られる変化と同様な増殖性の変化が、粉じんに対する反応として、より

強く発現したものと思われる。

血管周囲の細胞の集簇は、慢性肺炎の初期像として知られており、F344 ラットにおいても加齢に伴ない高い発生率を示している<sup>11,12)</sup>。Gross<sup>16)</sup> は種々の粉じんに対する反応としてこの変化が現われることを報告しているが、本実験では粉じん濃度に比例した発現をみないことから、鉍さい粉じんによるものではないと考えた。

大単核細胞の結節状の集簇は前実験<sup>5)</sup> において高濃度の鉍さい粉じんを1か月間曝露後終生飼育したラットにおいて多く認められた変化であった、また Steffee<sup>9)</sup> もクロム化合物を長期間曝露したラットで同様な変化と思われる肉芽腫の形成を観察しており、クロムに対する緩やかな炎症反応であるとしている。本実験において、この変化に注目したが、むしろ対照群に多く、他の刺激によって生じた偶発的な変化と考えた。

粉じん曝露群における肺重量の増加は、前実験<sup>2,3)</sup> においても認められ、主として吸入された粉じんに対する反応性の変化である肺胞上皮細胞の腫大を反映したものであった。その際高濃度の鉍さい曝露群では、同濃度の関東ローム粉体曝露群に比べ肺重量の増加の程度が大きいことから、肺胞上皮細胞の腫大に加えて、この群で顕著であった肺胞腔内へのタンパク様物質の蓄積も反映されているものと考えられた。本実験でみられた肺の重量増加は、特に鉍さい 1mg/m<sup>3</sup> 群と JIS 粉体群では、一部には肺胞における細胞増生またはその傾向を反映していると考えられるが、根本的には、肺胞上皮細胞の腫大が大きく反映されているものと思われる。また関東ローム粉体曝露群では鉍さい群に比べ肺胞内へのタンパク様物質の蓄積や、線維化を伴う巣状炎症が多くみられたが、両群の肺重量に差が生じるような程度ではなかったものと考えられる。

#### ま と め

クロム鉍さい粉じんを0.2, および 1mg/m<sup>3</sup> の濃度で、ラットに 105 週間昼夜連続で曝露し、クロム鉍さい粉じんの低濃度、長期間の吸入曝露による生体への影響を観察した。得られた結果のうち体重、生存率、肺重量、呼吸器系の組織変化について示した。実験では粉じんに対する肺の反応を比較する目的で JIS 粉体 (関東ローム) の 1mg/m<sup>3</sup> 曝露群を設定した。

体重の増加推移は鉍さい粉じん曝露群の2群とも、対照群、JIS 粉体群と比べ変化はみられなかった。生存率は対照群 55%, JIS 粉体群 72%, 鉍さい 0.2mg/m<sup>3</sup> 群 75%で、鉍さい 1mg/m<sup>3</sup> 群では曝露期間中の死亡例はなかった。肺重量は各粉じん曝露群で対照に比べ大きく、

JIS 粉体群に比べ、鉍さい 1 mg/m<sup>3</sup> 群は差がなかったが、0.2mg/m<sup>3</sup> 群では小さかった。鉍さい群にみられた肺の組織変化はいずれも自然発生病変としてみられる変化であった。このうち肺胞における細胞増生は鉍さい 1mg/m<sup>3</sup> 群と JIS 粉体群に多くみられた。これは長期間に亘って吸入された粉じんに対する反応として、自然発生的に生じる増殖性の変化と同様な変化が、より強く発現したものと考えられた、鼻腔および気管にも鉍さいによる変化はみられなかった。また呼吸器系の腫瘍の発生もなかった。

#### 文 献

- 1) 坂本義光, 調 武久, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 135, 1977
- 2) 坂本義光, 神谷信行, 伊川三枝子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 142, 1977
- 3) 坂本義光, 神谷信行, 池田虎雄, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 33, 1980
- 4) 坂本義光, 神谷信行, 池田虎雄, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 43, 1980
- 5) 坂本義光, 神谷信行, 池田虎雄, 平賀興吾: 東京衛研年報, 32-2, 97, 1981
- 6) Mancuso, T.F. and Hueper, W.C.: *Industr. Med. Surg.* 20, 358, 1951
- 7) 木村正己, 小野 哲, 和田 攻訳: 環境汚染物の生体への影響, 48, 1977
- 8) Baetjer, A.M., Lowney, J.F., Steffee, H. and Budacz, V.: *Arch. Indust. Health*, 20, 124, 1959
- 9) Steffee, H. and Baetjer, A.M.: *Arch. Environ. Health*, 11, 66, 1965
- 10) Pour, P., Stanton, M.F., Kuscher, M., Laskin, S. and Shabad, L.M.: *Pathology of tumours in laboratory animals*, Ed. Turusov, V.S., 1, 1976, International agency for research on cancer, Lyon
- 11) Innens, J.R.M., Garner, F.M. and Stookey, J.L.: *Pathology of laboratory rats and mice*, Eds. Cotchin, E and Roe, F.J.C., 229, 1967, Blackwell Scientific, Oxford
- 12) Coleman, G.L., Barthold, S.W., Osbaldiston, G.W., Foster, S.J. and Jonas, A.M.: *J. Gerontology*, 32, 258, 1977
- 13) Hueper, W.C.: *Arch. Path.*, 65, 600, 1958
- 14) Schepers, G.W.H., Arbor, A., Durkan, T.M.,

Delahant, A.B., Redlin, A.J., Schmidt, J.G.,  
Creedon, F.T., Jacobson, J.W. and Bailey, D.  
A. : *Arch. Indust. Health*, 18, 34, 1958

- 15) Stookey, J.L. and Moe, J.B. : *Pathology of laboratory animals*, Eds. Benirschke, K., Garner, F.M. and Jones, T.C., 1, 108, 1978, Springer-Verlag, New York

- 16) Gross, P., Westrick, M.L. and Mcnerney, J.  
M. : *Arch. Path.*, 68, 252, 1959

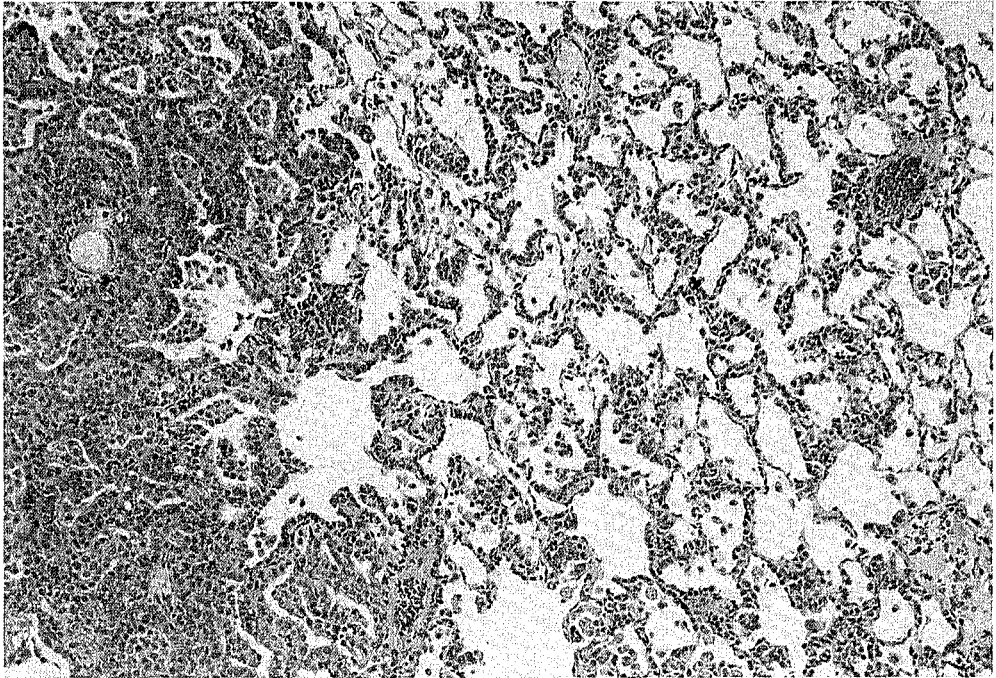
#### Explanation of plates

Photomicrographs were prepared from section stained with hematoxylin and eosin.

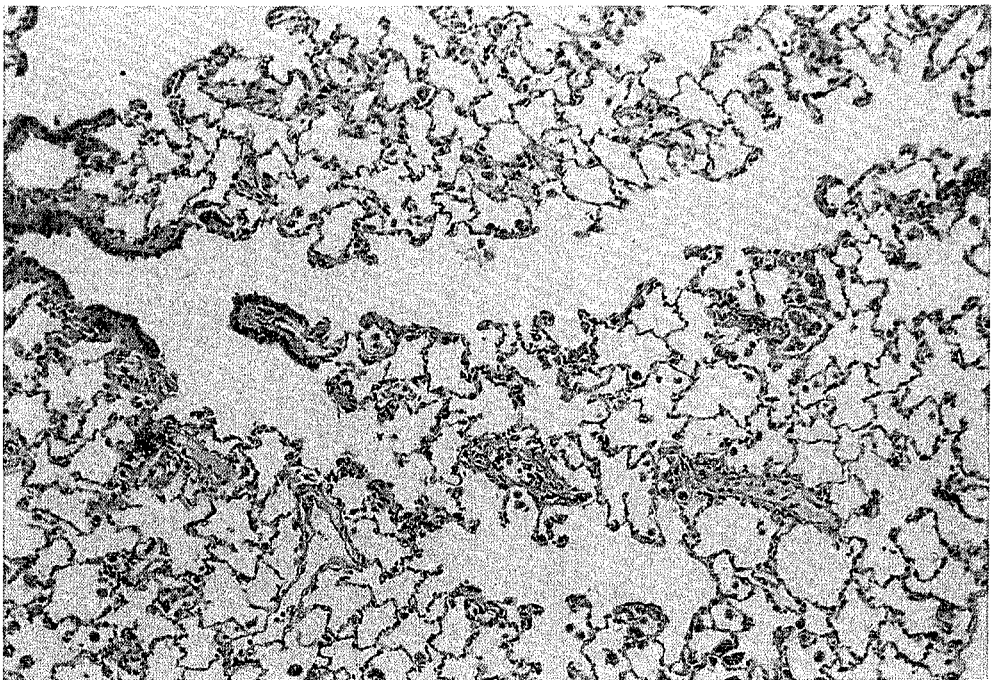
Photo 1. Alveolar hyperplasia in the rat exposed to chromite ore residue dust for 105 weeks.

( $\times 100$ )

Photo 2. Field without alveolar hyperplasia of same section as in Photo 1. ( $\times 100$ )



1



2

## クロム鉱さい水浸出液の皮膚累積刺激性 (第2報)

### 長期塗布による家兎耳介への影響

福 森 信 隆\*, 樺 島 順一郎\*\*, 井 口 重 孝\*, 平 賀 興 吾\*

## Cumulative Skin Irritation Test by Water Extract of Chromite Ore Residue (II) Long-Term Application on Rabbit Auricula

NOBUTAKA FUKUMORI\*, JUNICHIRO KABASHIMA\*\*, SHIGETAKA IGUCHI\*  
and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** クロム 鉱さい水浸出液 water extract of chromite ore residue, 皮膚累積刺激性試験 cumulative skin irritation test, 家兎耳介 rabbit auricula

### 緒 言

クロムによる障害はこれまでに皮膚、粘膜の炎症、気管支炎、肺癌など職業面からの報告がなされ産業衛生の分野で関心が持たれていた<sup>1)</sup>。一方 1975年東京都に埋め立てられた六価クロムを含むクロム鉱さいが不完全な埋め立て処理であったため露出し住民に悪影響を及ぼす危険が生じ、新たに環境汚染の立場からクロムの生体への作用を検討する必要性が起こった。既にこれらの露出部から採取したクロム鉱さい水浸出液で家兎の眼粘膜および背部皮膚の一次刺激性試験を行い中等度の刺激性を認め<sup>2,3)</sup>、また 短期の累積塗布試験で皮膚反応の強さと臓器内のクロム蓄積量が相関していることを報告した<sup>4)</sup>。さらに生活用水でクロムの低濃度の汚染が長期間に渡ると皮膚炎が多発するという疫学的調査<sup>5)</sup>からも、今回皮膚刺激性を検索する目的でクロム鉱さい水浸出液の長期塗布による累積刺激性試験を実施した。

### 実験材料および方法

**検体** 江東区大島9丁目の地下鉄工事現場から採取し当所水質研究科で調整された1,000ppmの六価クロムを含むクロム鉱さい水浸出液 pH12.8を蒸留水で等量に希釈したものを500ppmクロム鉱さい液 (pH12.7, 500ppm 鉱さい群と略す) とし、ソーダ石灰水浸出液および蒸留水で希釈し pHを12.7に調整した100ppmの六価クロムを含むクロム鉱さい水浸出液を100ppmクロム鉱さい液 (100ppm 鉱さい群と略す) とした。対照にはクロム酸ナトリウム (特級、和光純薬) をソーダ石灰水浸出液および蒸留水で pHを12.7に調整し六価クロム濃度が500ppm

となるように溶解させた液をクロム対照液 (クロム対照群と略す) として、また物理的刺激をも考慮して蒸留水 (対照群と略す) を用いた。検体は塗布期間中適時クロム濃度の測定を原子吸光分析法で行い変化のないことを確認した。

**動物** 体重2.5kg前後の白色在来種雄性家兎 (日本動物) を用い、室温  $23 \pm 1^{\circ}$ 、湿度  $50 \pm 5\%$  の環境下で1日100gに制限給餌された飼育用固型飼料 (日本クレア, CR-1) および自由に与えられた飲水により家兎専用飼育室にてステンレス製ケージ内で個別飼育を行った。

**試験法** 本試験の実施前に予備塗布を行った。1,000ppmクロム鉱さい液の塗布で皮膚に発赤のみられる動物が塗布部を擦過する動作を行うこと、さらにクロム鉱さいが埋め立てられた地面で雨水に浸出してくる濃度が200~300ppmであること<sup>6)</sup>とを考慮に入れ最高濃度を500ppmと定めた。また対照群にははじめソーダ石灰水浸出液 (pH12.7) を用いたが皮膚の変化が認められなかったことから単なる物理的刺激を考慮し蒸留水を使用した。動物は馴化後、500ppm 鉱さい群18匹、対照群、100ppm 鉱さい群、クロム対照群各9匹を用い家兎の左耳介背部に柔軟な刷毛を用いて検体を塗布した。塗布量は約  $20\text{cm}^2$  に流れ落ちない程度に約  $0.8\text{ml}$  とし、未処置の右耳介を各動物の対照として比較した。塗布は隔日あるいは2日間隔で週3回一定時に行い46ヶ月間継続し主に耳介の皮膚変化を観察した。検査は次の項目について実施し、なお塗布後30ヶ月で採血により血液性状、免疫学的検査を行い全身への影響を調べた。

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

\*\* 同毒性部薬理研究科

**一般状態** 家兎の行動、外観、摂餌状態などを観察の対象とした。

**皮膚反応** 塗布部位の局所反応について紅斑、浮腫を中心に皮膚表面の性状、発毛状態、血管の変化などを肉眼的に観察した。

**体重** 月1回、一定時に測定を行った。

**血液学的検査** 塗布後30ヶ月で耳静脈より採血し、白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度を Coulter Counter Model-S を用いて測定した。

**臨床生化学的検査** 塗布後30ヶ月で採血を行い血清を分離後、総蛋白 (Buret 法)、グルコース (グルコースオキシターゼ法)、尿素窒素 (ウレアーゼインドフェノール法)、総コレステロール (Lieberman-Burchard法)、グルタミン酸ピルビン酸アミノ基転位酵素 (Reitman-Frankel 変法)、アルカリフォスファターゼ (Kind-King 変法)、コリンエステラーゼ (4pH 法) を日立自動分析装置 (M-400) を用いて測定した。

**免疫電気泳動法** 塗布後30ヶ月の血液から血清を分離し  $1\mu\text{l}$  をとり寒天板の抗原孔に注入した。Gelman の泳動槽を用い泳動電流5mA、泳動時間2時間で泳動操作を行い、その後抗血清を入れる溝に家兎抗血清(miles)を20  $\mu\text{l}$  注入した。湿潤槽で20時間放置した後 amido schwarz 10B の色素を用いて泳動線を染色した。

**感作性試験** 塗布後30ヶ月で500ppm 鉍さい群5匹、対照群、クロム対照群各3匹を用いてアレルギーの検出を行った。家兎の背部を剃毛し500ppm、100ppm、45ppm、20ppmの4段階の六価クロム濃度で閉塞パッチによる貼付試験、皮内注射によるツベルクリン型反応およびPCA反応を実施した。

**剖検、組織学的検査** 死亡動物および生存動物については最終塗布の翌日に解剖し肉眼的所見を調べた。また塗布した耳介部はホルマリン固定後常法によりH・E染色を施し組織学的検索を行った。

#### 実験結果

**一般状態** 塗布後1ヶ月頃まで刷毛で塗布した直後、対照群も含む全群で前肢を用い耳介を擦過する動作が観察されたが漸次少なくなる傾向を示し以後時折散見する程度であった。これらの動作は500ppm 鉍さい群、クロム対照群で幾分多くみられた。途中死亡動物のうち対照群1例、100ppm 鉍さい群1例、500ppm 鉍さい群5例は死亡前に体位の保持が困難となり横臥し、摂餌量の減少する状態が続きる痩を呈する動物がみられ、これらの

多くは下痢便を伴っていた。生存動物では特に症状の著しい変化は認められなかった。

**皮膚反応** 全期間を通して500ppm 鉍さい群、クロム対照群の耳介塗布部の被毛が淡黄色を呈したが、100ppm 鉍さい群では明らかでなかった。皮膚反応は500ppm 鉍さい群、クロム対照群で塗布後2ヶ月頃まで軽度な紅斑、落屑、脱毛を呈する動物がみられたがいずれも短期間で回復し、その後皮膚表面の著しい変化は認められなかった。100ppm 鉍さい群は対照群に比べて変化がみられず、また右側耳介の未処置部との比較でも皮膚反応の差異は認められなかった。(Photo 1, 2)。

**体重** 体重増加曲線は死亡前に顕著な体重減少がみられた動物の体重を除去して平均体重で示した (Fig. 1)。体重は塗布後15ヶ月頃まで増加がみられ、以後増減を繰り返しながら緩やかな増加を示した。塗布終了時の体重は対照群  $4.14 \pm 0.35\text{kg}$ 、100ppm 鉍さい群  $3.91 \pm 0.28\text{kg}$ 、500ppm 鉍さい群  $3.86 \pm 0.40\text{kg}$ 、クロム対照群  $3.71 \pm 0.55\text{kg}$  であった。また全期間を通して対照群と有意差を認めなかった。

**血液学的検査** 塗布後30ヶ月で対照群に比べ鉍さい群、クロム対照群とも各項目にわたり有意差の認められる変動はなかった (Table 1)。

**臨床生化学的検査** 対照群に比べ鉍さい群、クロム対照群とも各項目にわたり有意差の認められる変動はなかった (Table 2)。

**免疫電気泳動法** 抗原抗体反応によりトランスフェリンを含む数本の泳動線が確認されたがいずれも対照群に比べ鉍さい群、クロム対照群とも泳動線の変化は認められなかった。

**感作性試験** 貼付試験、ツベルクリン型反応の各濃度で対照群に比べ鉍さい群、クロム対照群とも反応の差異が認められなかった。またPCA反応でも色素の局在が認められず全例で陰性であった。

**剖検、組織学的検査** 途中死亡は対照群3例、100ppm 鉍さい群6例、500ppm 鉍さい群11例、クロム対照群4例認められ Fig. 1 に生存率、死亡時期を示した。死亡は塗布後17ヶ月からみられ対照群に比べ鉍さい群、クロム対照群で死亡時期が早く生存率も低かった。これらの死亡動物の剖検で運動障害がみられ横臥姿勢を呈した動物も含め股関節部の関節靱帯の伸展、垂脱臼、腱の硬直、関節周囲の出血などみられた例は対照群1例、100ppm 鉍さい群3例、500ppm 鉍さい群6例に認められた。また下痢、腸管粘膜部の出血、胃内点状出血、被毛による腸管閉塞などの胃腸障害が認められた例は対照群2例、

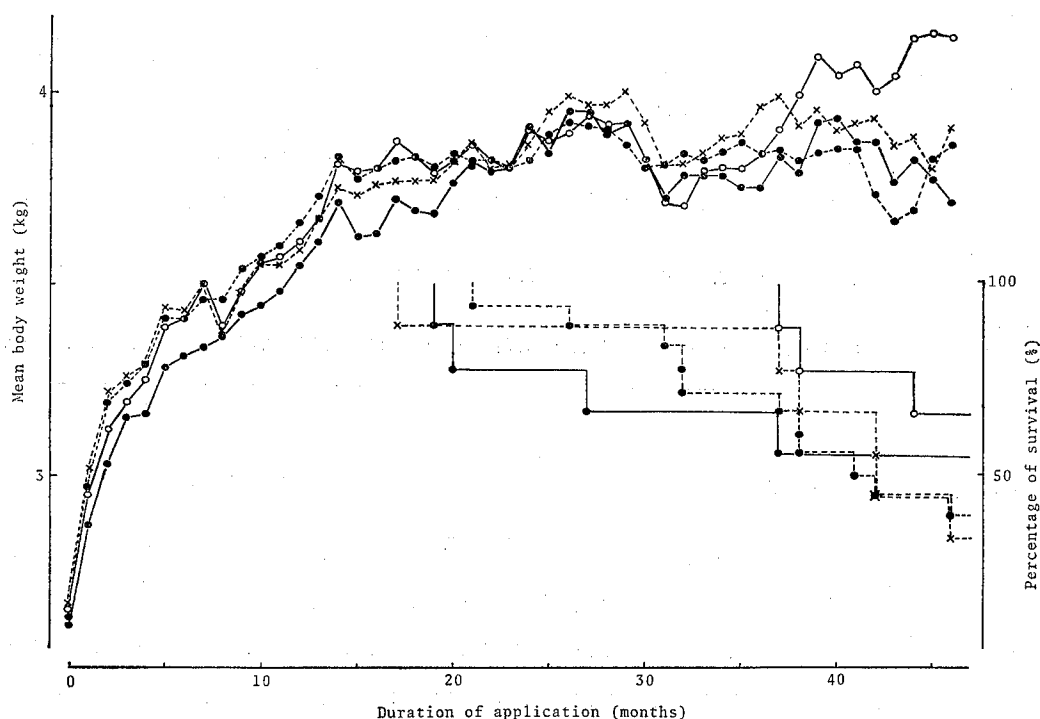


Fig. 1. Changes of Mean Body Weights and Survival Rate in Rabbits Applied with Chromite Ore Residue

—○—: Control, ...x...: 100ppm Cr Chromite ore residue, ...●...: 500ppm Cr Chromite ore residue, —●—: 500ppm Cr Sodium chromate

100ppm鉍さい群 3 例, 500ppm鉍さい群 3 例, クロム対照群 2 例にみられた。その他頭蓋骨内脳膜下に 8~10 mm の血塊がみられた例が 500ppm 鉍さい群で 2 例, 肺に膿泡が形成され気管支内に白色膿を貯留した例が 500ppm 鉍さい群で 1 例, 胆嚢が肥大し胆汁が透明となり全身に黄疸症状を呈した例が 100ppm 鉍さい群で 1 例認められた。生存動物では著明な変化がみられず多量の脂肪層を認めるに過ぎなかった。腎臓では表面の凹凸, 白色の壊死巣, 水腎症, 不明瞭な皮髄境界などの変化が死亡例, 生存例を含めて対照群 2 例, 100ppm 鉍さい群 5 例, 500ppm 鉍さい群 4 例, クロム対照群で 3 例認められた。

耳介塗布部の組織学的検索は皮膚の個体差が大きいため塗布部の左耳介と未処置の右耳介とを比べさらに各群間で比較を行った。いずれの群も対照群と比較して著変がなく, 500ppm 鉍さい群, クロム対照群では全体的に軽度な表皮有棘層の肥厚, 真皮での細胞浸潤, 線維芽細胞の増加が散見されたが過角化, 血管の増生は著しくな

く, 細胞間の離開, 壊死像はみられなかった(Photo 5)。表皮有棘層の肥厚が著明な部では軽度な核の膨化, 基底細胞の分裂を伴った増生が観察された (Photo 3)。100ppm 鉍さい群ではこれらの変化が 500ppm 鉍さい群に比べ若干軽度であったものの散見され, 対照群では未処置部との差は認められなかった。

#### 考 察

累積刺激性試験は刺激性の弱い物質が繰り返しの刺激で蓄積されることにより生じた毒性を検出する目的で行われ, 特に金属などの蓄積しやすい物質の検索に適している。六価クロムは皮膚で含硫アミノ酸により還元され三価クロムの状態で蛋白と結合しているといわれることから<sup>7)</sup>, 皮膚での蓄積が考えられる。クロムによる皮膚炎, 潰瘍などの皮膚障害は職業上の長期曝露で多くみられ反復された刺激に起因すると推察される。これらのことから今回行った累積刺激性試験では比較的一次刺激性の少ない濃度を設定し長期間の塗布を行った。一方,



Table 1. Changes of Blood Components in Rabbits after Application of Chromite Ore Residue for 30 Months

| Group                          | No. of rabbits | WBC<br>( $\times 10^3$ )      | RBC<br>( $\times 10^6$ ) | Hgb<br>(gm)      | Hct<br>(%)       | MCV<br>( $\mu^3$ ) | MCH<br>( $\mu\mu\text{g}$ ) | MCHC<br>(%)      |
|--------------------------------|----------------|-------------------------------|--------------------------|------------------|------------------|--------------------|-----------------------------|------------------|
| Control                        | 9              | 8.09 $\pm$ 2.24 <sup>a)</sup> | 6.23 $\pm$ 0.59          | 13.09 $\pm$ 1.32 | 38.79 $\pm$ 3.45 | 63.22 $\pm$ 4.08   | 21.40 $\pm$ 2.04            | 33.78 $\pm$ 1.44 |
| 100ppm Cr Chromite ore residue | 8              | 7.23 $\pm$ 2.61               | 6.11 $\pm$ 0.56          | 13.15 $\pm$ 1.55 | 38.31 $\pm$ 3.99 | 63.38 $\pm$ 2.44   | 21.69 $\pm$ 1.12            | 34.19 $\pm$ 0.61 |
| 500ppm Cr Chromite ore residue | 15             | 7.13 $\pm$ 3.00               | 6.22 $\pm$ 0.45          | 13.49 $\pm$ 1.78 | 39.21 $\pm$ 3.98 | 63.73 $\pm$ 2.52   | 21.86 $\pm$ 1.50            | 34.23 $\pm$ 1.46 |
| 500ppm Cr Sodium chromate      | 6              | 8.03 $\pm$ 2.25               | 6.40 $\pm$ 0.41          | 13.90 $\pm$ 1.09 | 40.20 $\pm$ 2.88 | 63.67 $\pm$ 3.67   | 22.00 $\pm$ 1.37            | 34.50 $\pm$ 0.51 |

a) mean $\pm$ SD

Table 2. Serum Biochemical Changes in Rabbits after Application of Chromite Ore Residue for 30 Months

| Group                          | No. of rabbits | TP<br>(g/dl)                  | Glu<br>(mg/dl)     | UN<br>(mg/dl)    | Cho<br>(mg/dl)    | GPT<br>(K. U.)    | Al-P<br>(mIU)     | ChE<br>( $\Delta\text{pH}$ ) |
|--------------------------------|----------------|-------------------------------|--------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------------|
| Control                        | 8              | 6.85 $\pm$ 0.67 <sup>a)</sup> | 114.63 $\pm$ 13.93 | 21.75 $\pm$ 4.36 | 26.50 $\pm$ 8.24  | 37.88 $\pm$ 15.32 | 29.29 $\pm$ 23.52 | 0.19 $\pm$ 0.04              |
| 100ppm Cr Chromite ore residue | 8              | 6.64 $\pm$ 0.54               | 115.25 $\pm$ 13.62 | 19.63 $\pm$ 3.06 | 21.13 $\pm$ 6.26  | 35.63 $\pm$ 8.01  | 26.63 $\pm$ 13.55 | 0.20 $\pm$ 0.02              |
| 500ppm Cr Chromite ore residue | 15             | 6.73 $\pm$ 0.35               | 121.73 $\pm$ 27.28 | 20.47 $\pm$ 3.88 | 29.93 $\pm$ 14.61 | 46.07 $\pm$ 19.82 | 18.46 $\pm$ 13.89 | 0.18 $\pm$ 0.04              |
| 500ppm Cr Sodium chromate      | 6              | 6.63 $\pm$ 0.32               | 129.33 $\pm$ 16.30 | 21.33 $\pm$ 2.87 | 21.67 $\pm$ 6.12  | 47.83 $\pm$ 24.99 | 22.48 $\pm$ 15.17 | 0.22 $\pm$ 0.03              |

a) mean $\pm$ SD

1915年山極、市川らが家兎の耳介にタールを塗布し癌の発生を成功せしめたことに鑑みて刺激性とともに腫瘍の発生を調べるため家兎の耳介を用いた。さらに耳介は剃毛する必要がないため他の物理的刺激が比較的少なく累積塗布に適している。

皮膚反応は鉍さい群、クロム対照群とも全期間を通して丘疹、潰瘍、浮腫などの顕著な変化が認められなかった。塗布後2ヶ月まで500ppm 鉍さい群、クロム対照群で紅斑、落屑、脱毛を断続的に認める動物がみられたが、その後それらの変化は消失傾向を示した。反応が軽減されたことは繰り返しの累積刺激により皮膚の強化や皮膚の適応が起こったためと考えられる。塗布に用いた六価クロムの100ppmおよび500ppmの鉍さい液濃度は環境中の溜り水の最高濃度が200~300ppmであること<sup>6)</sup>と先に行った1,000ppm 鉍さい液では一次刺激が強くあらわれることから濃度を設定した。しかしこれらの低濃

度でもアレルギーが誘発されることが考えられ、塗布後30ヶ月で種々の感作性試験を行ったが反応はみられなかった。この時行ったPCA反応は即時型アレルギーを検索する方法で先にモルモットを用いた方法<sup>9)</sup>でも検出されなかったことから即時型アレルギーの可能性は少ないと考えられる。また貼付試験、ツベルクリン型の反応で対照群との反応の差が明らかでなかったことと塗布による皮膚反応が強くあらわれなかったのは免疫電気泳動法で泳動線に差異が認められなかったことから脱感作されたためと推察されるが明らかでない。従って職業上あるいは環境中で発症する皮膚炎は著者らが以前に確認した<sup>9)</sup>遅延型アレルギーであり接触性皮膚炎と考えられる。塗布終了後の組織学的検索で表皮有棘層の肥厚や真皮での細胞浸潤、線維芽細胞の増加が認められたが血管の増生が顕著でなく皮膚反応で発赤が確認されなかったことから炎症に至る変化ではないと示唆される。さらに

クロムは感作によらず直接的な腐蝕作用で皮膚の深部におよぶ小円錐状の潰瘍を形成するという報告<sup>10,11)</sup>があるが累積塗布ではみられなかった。このような強力な直接作用はクロム濃度と接触時間が関係していると思われ、週3回の塗布では曝露時間が少ないため起こらなかったと考えられる。クロムの排泄が比較的によいこと<sup>12)</sup>や塗布部での乾燥が速やかであることもクロムの腐蝕作用がみられなかった理由と考えられる。

クロム鉍さい水浸出液の全身に対する影響は、全期間を通して体重増加で有意差がみられず、塗布後30ヶ月で行った血液学的、臨床生化学的検査でも差異を認めなかったことから作用が少ないと考えられる。しかし途中死亡例が鉍さい群、クロム対照群で多く死亡時期が早いことなどからクロムの影響が考えられるが、途中死亡の剖検で運動器障害、消化器障害が多数みられ必ずしもクロムとの関係は明らかでなかった。また腎臓の変化はクロムの塗布群でみられたが500ppm濃度で例数が少なく対照群でも同様な変化がみられたことからクロムに起因していると思われなかった。

#### 結 語

クロム鉍さい水浸出液による皮膚累積刺激性を検討する目的で週3回、46ヶ月間にわたり家兎耳介に累積塗布を行った。500ppmの六価クロムを含む鉍さい水浸出液(pH12.7)およびクロム対照液(500ppmの六価クロムを含むクロム酸ナトリウム液, pH12.7)で塗布の初期に紅斑、落屑、脱毛が観察され、組織学的検索で表皮の軽度な肥厚、真皮での細胞浸潤、線維芽細胞の増加がみられたが顕著な皮膚変化や全身への影響は認められず、また100ppmの六価クロムを含む鉍さい水浸出液(pH12.7)の作用もほとんどみられなかった。このことは累積塗布により皮膚の強化、適応が生じたためと示唆される。

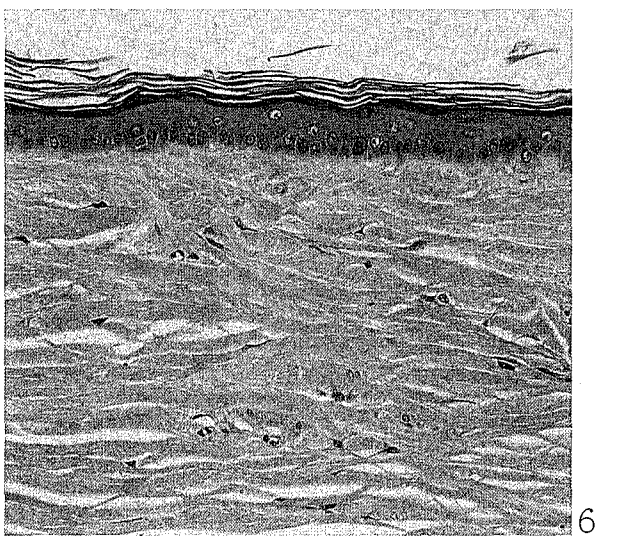
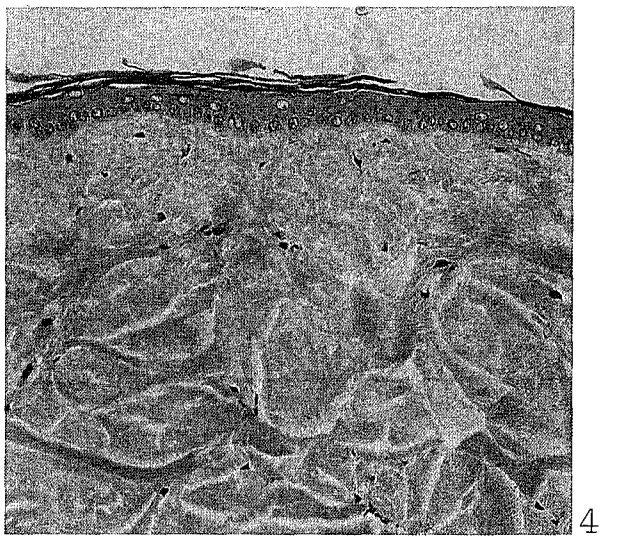
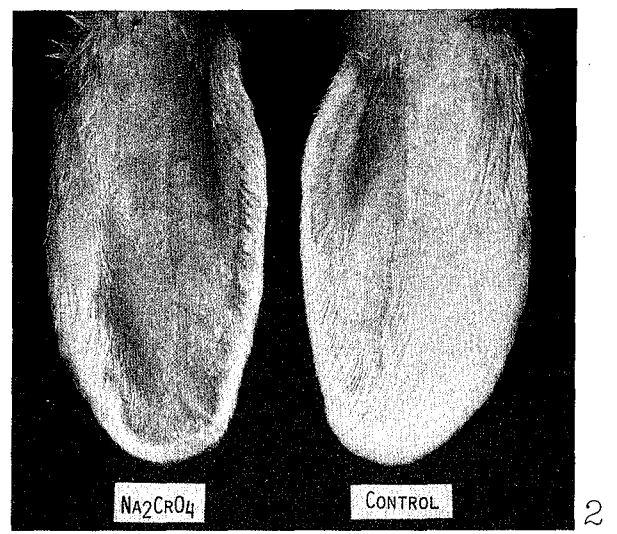
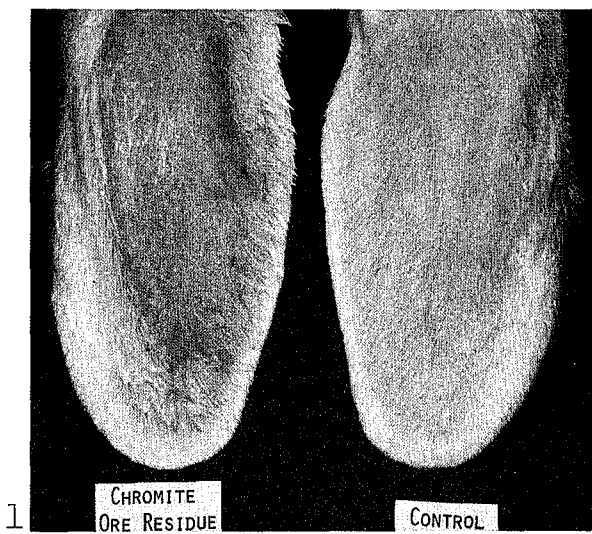
謝辞 本研究にあたりクロム鉍さい水浸出液の検体を提供された水質研究科の諸氏ならびに御助言をいただきました当部の佐々木美枝子氏に感謝致します。

#### 文 献

- 1) 渡部真也, 福地保馬: 科学, 45, 688, 1975
- 2) 藤井 孝, 坂本義光, 福森信隆, 阿部幸恵, 中村 弘, 大橋則雄, 平賀興吾: 東京衛研年報, 27-2, 124, 1976
- 3) 阿部幸恵, 藤井 孝, 坂本義光, 福森信隆, 中村 弘, 大橋則雄, 平賀興吾: 東京衛研年報, 27-2, 129, 1976
- 4) 福森信隆, 樺島順一郎, 井口重孝, 平賀興吾: 東京衛研年報, 28-2, 129, 1977
- 5) 寺島長剛, 中川文一, 鎌田昭二郎, 西田美穂: 日本公衛誌, 27, 21, 1980
- 6) 水質研究科: 私信
- 7) Samitz, M. H. and Katz, S.: *J. Invest. Derm.*, 43, 35, 1964
- 8) 福森信隆, 樺島順一郎, 井口重孝, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 81, 1978
- 9) 福森信隆, 井口重孝, 樺島順一郎, 平賀興吾: 東京衛研年報, 29-2, 73, 1978
- 10) Browning, E.: *Toxicity of Industrial Metals*, 2nd Ed., 123, 1969, Butterworths, London
- 11) Samitz, M. H. and Epstein, E.: *Arch. Enviro. Health.*, 5, 463, 1962
- 12) 長井二三子, 金西信次, 原 しげ子, 樺島順一郎, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 27-2, 56, 1976

#### Explanation of Photographs

- Photo 1. A pair of rabbit auricula applied with chromite ore residue (500ppmCr) for 46 months
- Photo 2. A pair of rabbit auricula applied with sodium chromate (500ppm Cr) for 46 months
- Photo 3. A remarkable portion of acanthosis in epidermis of rabbit auricula after application with chromite ore residue (500ppm Cr) for 46 months. Hypertrophy of epidermal cells and infiltration in cutis are seen. H-E stain  $\times 200$
- Photo 4. Epidermis and cutis of non-applied auricula in the same rabbit as photo 3. H-E stain  $\times 200$
- Photo 5. A portion of slight thickening in epidermis and increased fibroblast in cutis of rabbit auricula after application with sodium chromate (500ppm Cr) for 46 months. H-E stain  $\times 200$
- Photo 6. Epidermis and cutis of non-applied auricula in the same rabbit as photo 5. H-E stain  $\times 200$



## Effects of Dietary Exposure to Di-2-ethylhexyl Phthalate on Steroid Metabolism in Male Rats

SHINSHI OISHI\* and KOGO HIRAGA\*

The effect of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on metabolism of testosterone has been studied. Hepatic and testicular postmitochondrial fractions were prepared from rats exposed to 0 or 2% of DEHP in the diet for a week. Metabolites of testosterone were identified and quantified utilizing thin-layer chromatography and gas-liquid chromatography. Several identified metabolites of testosterone and cytochrome P-450 concentration in hepatic postmitochondrial fraction were increased by pretreatment with DEHP. These results suggest that effects of DEHP on the testosterone concentrations in the serum and testis may be due, at least in part, to accelerated metabolism of steroid sex hormones.

**Keywords :** di-2-ethylhexyl phthalate, testosterone metabolism, cytochrome P-450

### Introduction

Phthalic acid esters (PAEs) are used as plasticizers for a wide range of synthetic polymers. PAEs have been found to have extremely low acute toxicity in rodent species<sup>1-3</sup>. However, the administration of several PAEs to rats has been shown to cause testicular atrophy<sup>4-8</sup>. Additionally following the administration of several PAEs and their monoesters, main metabolic intermediates of PAEs, results in testicular atrophy; the concentration of testosterone in the testis is increased whereas that in serum is decreased or unchanged<sup>9,10</sup>. Despite of the apparent frequency with which chemically induced testicular lesions have been encountered, little information is available concerning either morphological and biochemical characteristics of mechanisms underlying their production.

Although a relationship among the high testosterone concentration in the testis, the low concentration in the serum and testicular atrophy in rats exposed to PAEs remains unresolved, possible mechanisms may be explained as follows: (a) an increase of testosterone production in the testis; (b) an increase of its catabolism in the liver, and/or, (c) a decrease of its release from the testis as the result of vascular lesions in the testis as seen after cadmium administration<sup>11</sup>.

In the present study, changes in testosterone metabolism in the liver of rats after treatment of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) which is one of the most extensively used plasticizers in polyvinyl chloride manufacture and known to be widely distributed in the environment<sup>12,13</sup> are reported.

### Materials and Methods

**Chemicals.** DEHP was purchased from Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd., Tokyo and its chemical purity was found to be greater than 98% by gas-liquid chromatography. The following chemicals obtained from commercial sources were used in this study: 17 $\beta$ -hydroxyandrost-4-en-3-one (testosterone), 3 $\beta$ -hydroxyandrost-5-en-17-one (dehydroepiandrosterone), 3 $\beta$ -hydroxypregn-5-en-20-one (pregnenolone), pregn-4-ene-3, 20-dione (progesterone) and dichloromethane (Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd., Tokyo), 5 $\alpha$ -androst-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol, 5 $\beta$ -androst-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol, 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -androst-17-one (etiocholanolone), androst-4-ene-3, 17-dione (androstenedione), 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androst-17-one, NADP, NADPH, glucose-6-phosphate and tris (hydroxymethyl)-aminomethane (Sigma chemicals Co., St. Louis, MO), glucose-6-phosphate dehydrogenase

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

(Boehringer Mannheim BmbH), and silica gel 60F<sub>254</sub> (E. Merck, Darmstadt).

**Animals, Diets and Treatments.** JCL: Wistar male rats were purchased from Clea Japan Inc., Tokyo and were maintained in stainless steel cages (3 rats/cage) and acclimated to a controlled environment. The rats, weighing about 140g (6weeks old), were fed a diet containing 0 or 2% of DEHP mixed in a ground Clea rat chow (CE-2) for a week and were allowed free access to food water. The total intake of DEHP calculated from food consumption was  $2.16 \pm 0.56$ g.

After one week of treatment, the rats were killed by decapitation and the liver and testis were removed and weighed immediately. The liver or testis were then homogenized (Potter-Elvehjem homogenizer with a Teflon pestle) in a 5 vol of ice-cold 0.25M sucrose tris-HCl buffer (pH, 7.4; 0.01M). The homogenates were centrifuged at 10,000g for 20min to obtain the postmitochondrial supernatants.

**Incubation, Assay and Analysis.** Testosterone dissolved in chloroform-methanol were transferred into incubation tubes, into which 2 drops of polyethylene glycol per tube were added. Shortly before the incubation, the solvent was removed under nitrogen gas stream<sup>14)</sup>.

Testosterone metabolism was determined in 2ml of a reaction mixture containing 140μM testosterone, 100μM NADP, 100μM NADPH, 1mM EDTA, 8.2mM glucose-6-phosphate, 3 units glucose-6-phosphate dehydrogenase, 250mM sucrose, 10mM tris-HCl (pH7.4) and 1mg postmitochondrial protein. The reaction mixture was incubated for 0–30min at 37°C.

Blanks were determined by mixing the reaction mixtures with dichloromethane at 0 time or incubating the media in the absence of steroid precursor.

Immediately after the incubation, reactions were arrested by addition of 7 ml of dichloromethane and the mixtures were vigorously shaken for extraction. Purification procedures of metabolites were carried out as previously described<sup>15)</sup>. Purified steroids were quantified by gas-liquid chromatography directly or as trimethyl silyl ethers<sup>16)</sup>. Gas-liquid chromatography conditions were as follows: column, 2% XE-60 on Uniport HP; detector, FID; detector temp., 300°C; column temp., 193°C for testosterone, androsterone, etiocholanolone, dehydroepiandrosterone and 5α-androstan-3α, 17β-diol, 200°C for 5β-androstan-3α, 17β-diol, 220°C for androstenedione and progesterone.

Protein concentration was determined by the method of Lowry *et al*<sup>17)</sup> using bovine serum albumin as a standard. Cytochrome P-450 concentration was determined by the method of Omura and Sato<sup>18)</sup>.

**Statistical methods.** Whenever possible, values are presented as mean ± SE of determinations. Significance of difference between means was checked by Student's *t*-test<sup>19)</sup>. The 5% level of probability was used as the criterion of significance.

### Results

Testosterone concentration in the testis of DEHP-treated rats was  $0.12 \pm 0.025$ μg/g and that of the control was  $0.056 \pm 0.0016$ .

Body weight gain of DEHP-treated rats was depressed the first 2 days and at the end of experiment, the mean body weight of DEHP-treated rats was significantly lower than that of the control (Table 1). Table 1 also shows that the liver weight was increased and the testicular weight was decreased significantly in DEHP-treated rats.

Concentrations of cytochrome P-450 in postmitochondrial fractions of the liver and testis are shown in Table 2. Cytochrome P-450 concentration in DEHP-treated rats was increased in liver whereas that in the testis was not altered.

Changes in testosterone to several metabolites by hepatic postmitochondrial fraction from rats exposed to DEHP are shown in Fig. 1. Identified main metabolites of testosterone in the fraction were 5α- and 5β-androstan-3α, 17β-diol, 3 species of 17-ketosteroids and androstenedione. All metabolites determined were

Table 1. Effect of DEHP on the Body and Relative Organ Weights of Male Rats

|         | Body Weight(g) | Liver*      | Testes*      |
|---------|----------------|-------------|--------------|
| Control | 189±2.90       | 4.70±0.084  | 1.01±0.0013  |
| DEHP    | 169±4.94**     | 7.31±0.17** | 0.80±0.051** |

Values are the mean±SE for 6 rats.

\*Values of organ weights are the relative weights, expressed per 100g of body weight

\*\*Significantly different from control;  $p<0.05$ .

Table 2. Effect of DEHP on the Cytochrome P-450 Concentrations in the Postmitochondrial Fractions of the Liver and Testis

|         | Liver      | Testis         |
|---------|------------|----------------|
| Control | 0.54±0.032 | 0.0075±0.00083 |
| DEHP    | 1.25±0.65* | 0.0062±0.00086 |

Values are expressed as n mole/mg protein and are the mean±SE for 5 animals.

\*Significantly different from control;  $p<0.05$ .

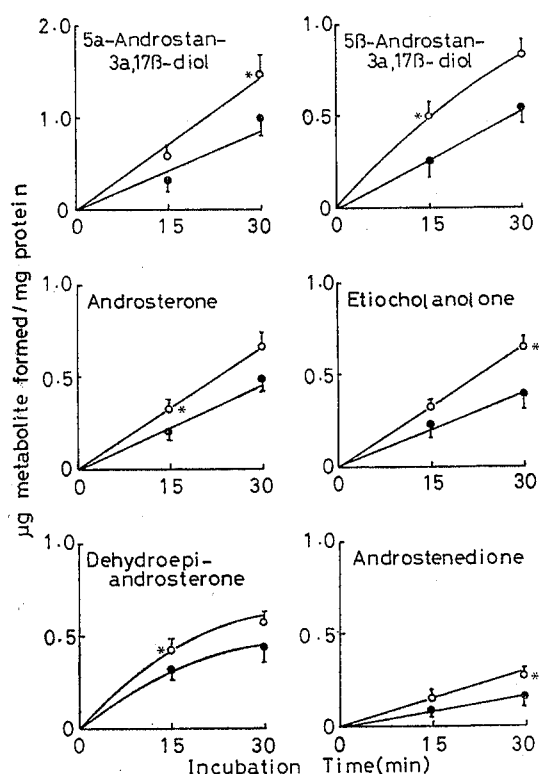


Fig. 1. Effect of DEHP on time dependent metabolism of testosterone in vitro. Hepatic postmitochondrial fractions were prepared from rats fed diet containing 0% (●—●) or 2% (○—○). Values are the mean±SE for 5 animals and that marked with an asterisk differs significantly from the control values:  $p<0.05$ .

increased in DEHP-treated rats. Furthermore several unidentified metabolites were also increased in DEHP-treated rats.

### Discussion

It has been reported that population density in a cage alters toxicity of chemicals in several species<sup>20)</sup>. We have reported that very severe testicular atrophy was induced in singly housed rats exposed to DEHP<sup>9)</sup>, whereas in the present experiment when rats were housed in groups, the degree of testicular atrophy developed and testicular testosterone concentration were less following exposure to DEHP. Liver weight changes were not affected by the type of housing.

Similarities between drug metabolism and biotransformation of steroids, and the importance of cytochrome P-450 in these processes are well known. Induction of monooxygenases by compounds such as phenobarbital and polychlorinated biphenyls has resulted in accelerated metabolism of steroid hormones *in vivo* and *in vitro*<sup>21-27)</sup>. The concentration of cytochrome P-450 or monooxygenases in hepatic postmitochondrial fraction of DEHP-treated rats was significantly increased. Similar results using microsomal fraction of rats have been reported<sup>28,29)</sup> except for a reported of Zuccato *et al*<sup>30)</sup>.

All determined metabolites of testosterone were increased in rats fed diet containing 2% of DEHP.

Similar result was shown in experiment using whole liver homogenate of rats treated with DEHP (Oishi and Hiraga, unpublished results). On the other hand, steroidogenesis in the liver has been shown to be inhibited by DEHP-treated<sup>81,82</sup>. Cholesterol synthesis from acetic acid does not depend on cytochrome P-450<sup>83</sup>, therefore steroid metabolism may be accelerated by increased of drug metabolizing system induced by DEHP whereas steroidogenesis is inhibited by DEHP directly or indirectly.

From the facts described above, we may conclude that hormonal changes in serum and testis are the results of accelerated steroid metabolism in the liver. This form of testicular toxicity is developmental and may be not seen in sexually matured rats similarly exposed. However, the cause or mechanism of testicular atrophy and hormonal changes induced by DEHP treatment has yet to be sufficiently clarified.

#### References

- 1) Calley, D. and Autian, J.: *J. Pharm. Sci.*, **55**, 158, 1966
- 2) Patty, E. A.: *Industrial Hygiene and Toxicology*, Vol. II, 1967, Interscience, New York
- 3) Singh, A.R., Lawrence, W.H. and Autian, J.: *J. Pharm. Sci.*, **61**, 51, 1972
- 4) Oishi, S. and Hiraga, K.: *Tokyo Eiken Nenpo*, **26**, 131, 1975
- 5) Gray, T.J.B., Butterworth, K.R., Gaut, I.F., Grasso, P. and Gangolli, S.D.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, **15**, 389, 1977
- 6) Cater, B.R., Cook, M.W., Gangolli, S.D. and Grasso, P.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **41**, 609, 1977
- 7) Foster, P.M.D., Thomas, L.V., Cook, M.W. and Gangolli, S.D.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **54**, 392, 1980
- 8) Foster, P.M.D., Lake, B.G., Thomas, L.V., Cook, M.W. and Gangolli, S.D.: *Chem. Biol. Interaction*, **34**, 233, 1981
- 9) Oishi, S. and Hiraga, K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **53**, 35, 1980
- 10) Oishi, S. and Hiraga, K.: *Toxicology*, **15**, 197, 1980
- 11) Niemi, M. and Korman, M.: *Acta Path. Microbiol. Scandinav.*, **63**, 513, 1965
- 12) Hites, R.A.: *J. Chromatogr.*, **11**, 570, 1973
- 13) Giam, C.S., Chan, H.S. and Neff, G.S.: *Anal. Chem.*, **47**, 2319, 1975
- 14) Inano, H., Machino, A., Tamaoki, B. and Tsubura, Y.: *Endocrinology*, **83**, 659, 1968
- 15) Oishi, S. and Hiraga, K.: *Tokyo Eiken Nenpo*, **26**, 127, 1975
- 16) N. Ikekawa: *Rinsho Kagaku Bunseki*, Vol. IV, Eds., Miwa, M., Kitamura, M. and Saito, M., **25**, 1969, Tokyo Kagaku Dojin, Tokyo
- 17) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.C. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951
- 18) Omura, T. and Sato, R.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370, 1964
- 19) Snedecor, G.W. and Cochran, W.G.: *Statistical Methods*, 6th ed., 1967, Iowa State Univ. Press, Ames.
- 20) Hunri, H.: *Method in Toxicology*, Ed. Paget, G.E., **11**, 1973, Nankodo Co., Ltd., Tokyo and Blackwell Scientific Publishers, Oxford and Edingburgh
- 21) Conney, A.H., Jacobson, M., Levin, W., Schneidman, K. and Kuntzman, R.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **154**, 310, 1966
- 22) Conney, A.H.: *Pharmacol. Rev.*, **19**, 317, 1967
- 23) Levin, W., Welch, R.M. and Conney, A.H.: *Steroids*, **13**, 155, 1969
- 24) Levin, W., Welch, R.M. and Conney, A.H.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **159**, 362, 1968
- 25) Nowicki, H.G. and Norman, A.W.: *Steroids*, **19**, 85, 1972
- 26) Orberg, J. and Ingvast, C.: *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **41**, 11, 1977

- 27) Derr, S.K. : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 19, 729, 1978
- 28) Fukuhara, M. and Takabatake, M. : *J. Toxicol. Sci.*, 2, 11, 1977
- 29) Lake, B.G., Gangolli, S.D., Grasso, P. and Lloyd, A.D. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 32, 355, 1975
- 30) Zucucci, E., Cantoni, R., Bidoli, F., Rizzardini, M., Sanona, M., Marcunni, F. and Missini, E. : *Toxicol. Lett.*, 6, 51, 1980
- 31) Bell, F.P., Patt, C.S. and Gillies, P.J. : *Lipid*, 13, 673, 1978
- 32) Bell, F.P. : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 24, 54, 1980
- 33) Dempsy, M.E. : *Ann. Rev. Biochem.*, 43, 967, 1974

### フタル酸エステルของステロイド代謝におよぼす影響

大 石 眞 之\*, 平 賀 興 吾\*

ジ-2-エチルヘキシルフタレート (DEHP) のテストステロン代謝におよぼす影響を雄ラットを用いて検討した。ラットに DEHP 2% 添加飼料を1週間摂取させた後、断頭屠殺し、肝ポストミトコンドリアフラクションを得た。テストステロンをポストミトコンドリアフラクションとともにインキュベートした後、代謝産物を薄層

クロマトグラフィおよびガスクロマトグラフィにより分離定量した。数種の同定された代謝物は DEHP 投与群で有意に増加していた。またポストミトコンドリアフラクションのチトクローム P-450 濃度も DEHP 群で増加した。



## 雄性ラットにおけるリン酸エステル類の比較毒性

大石 向江\*, 大石 眞之\*, 平賀 興 吾\*

### Comparative Toxicity of Phosphoric Acid Esters in Male Rats

HISAE OISHI\*, SHINSHI OISHI\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** リン酸エステル phosphoric acid, 比較毒性 comparative toxicity, 雄性ラット male rat, リン酸トリメチル trimethyl phosphate, リン酸トリエチル triethyl phosphate, リン酸トリ-*n*-ブチル tri-*n*-butyl phosphate, リン酸トリオクチル trioctyl phosphate, リン酸トリクレジル tricresyl phosphate

#### 緒 言

溶剤, 難燃剤および可塑剤などとして広く使われている有機リン酸エステル化合物は一般に有機リン系殺虫剤より毒性の低いことが知られている。しかし, リン酸トリ-*o*-クレジルはひよこやヒトに対して遅延性神経毒効果をもつ<sup>1,2)</sup>。リン酸トリメチルはげっ歯類に不妊作用をおよぼし<sup>3)</sup>, 細菌やショウジョウバエに突然変異をおこす<sup>4)</sup>ことが報告されている。更に, リン酸トリメチル, トリエチルおよびトリブチルは静脈注射により雌性ラットに麻酔効果をもつ<sup>5)</sup>。

今回の実験はリン酸トリメチル, リン酸トリエチル, リン酸トリ-*n*-ブチル, リン酸トリオクチルおよびリン酸トリクレジルの雄性ラットに対する影響を調べることを目的として行なわれた。

#### 実験材料ならびに実験方法

1. 実験動物 4週齢のJcl:Wistar系SPF雄性ラット(日本クレア株式会社)を環境馴化のため一週間予備飼育し, 以下の実験に用いた。動物は一般動物飼育室(室温25±1℃, 湿度55±5%, 照明11時間)にてステレンススチールケージに2匹ずつ入れて飼育した。

2. 試料 リン酸トリメチル(以下TMPと略す; Lot No. FBI 01), リン酸トリエチル(TEP; Lot No. APO 1), リン酸トリ-*n*-ブチル(TBP; Lot No. ARO 1)およびリン酸トリクレジルの混合物(TCP; Lot No. APO 1)は東京化成工業株式会社より, またリン酸トリオクチル(TOP; Lot No. LPK 1314)は和光純薬工業株式会社より入手した。

3. 投与方法および期間 各試料をラット飼育用粉末飼料(クレアCE-2)に0%(対照群)または0.5%の割合で添加し, 固形化して9週間自由摂取させた。飲水

も自由にさせた。

#### 4. 検索方法

- a. 体重を毎日測定した。
- b. 9週経過後, エーテル麻酔下ラットの腹部大静脈より採血し, 血清とクエン酸添加による血漿を分離した。動物を脱血屠殺後解剖し, 肝臓, 腎臓, 脾臓および精巣の重量を測定した。肝臓, 腎臓および脾臓は病理組織学的観察を行なった。
- c. 血液学的検査 プロトロンビン時間およびカオリン加部分トロンボプラスチン時間(カオリン-PTT)を測定した。白血球数, 赤血球数, ヘモグロビン量, ヘマトクリット値および平均赤血球容積をコールターカウンターモデルS(Coulter Electronics Inc., Hialeah, FL.)にて測定した。
- d. 血清生化学的検査 総タンパク質量, 尿素窒素量, コレステロール量, グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)活性, グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)活性およびアルカリ性ホスファターゼ(ALP)活性は従来の方法により測定した<sup>6)</sup>。コリンエステラーゼ(ChE)活性はGarryおよびRouth<sup>7)</sup>の方法で測定した。総胆汁酸量は臨床検査用キット(Neo-Sterognost-3α, 第一化学薬品株式会社)を用いて測定した。ナトリウム量およびカリウム量の測定は炎光光度計で行なった。
- e. 統計分析はStudentの*t*検定に従って行なった。

#### 結 果

解剖時の体重と臓器重量を表1に示す。TMPおよびTBP投与群の体重は対照群より有意に軽かった。TEP, TBPおよびTCP投与ラットの肝臓とTMP投与群の腎臓は絶対および相対重量とも有意に重かった。

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表 1. TMP, TEP, TBP, TOP または TCP を投与したラットの体重および臓器重量

|                 | 対 照 群       | TMP           | TEP          | TBP          | TOP         | TCP          |
|-----------------|-------------|---------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| 体重 (g)          | 446.2±10.7  | 392.5±3.9***  | 455.0±7.1    | 397.3±8.4**  | 456.3±8.8   | 426.5±20.1   |
| 臓器重量 (g)        |             |               |              |              |             |              |
| 肝 臓             | 18.9±0.78   | 17.3±0.76     | 23.6±0.44*** | 22.0 ±0.66*  | 21.7±1.00   | 22.0±0.72*   |
| 腎 臓             | 3.36±0.11   | 3.73±0.051**  | 3.88±0.13*   | 3.24±0.089   | 3.79±0.15   | 3.42±0.13    |
| 脾 臓             | 0.89±0.026  | 0.85±0.044    | 1.07±0.051** | 0.73±0.050** | 0.93±0.033  | 0.83±0.023   |
| 精 巢             | 3.69±0.051  | 3.01±0.19***  | 3.97±0.088*  | 3.62±0.087   | 3.55±0.29   | 3.67±0.072   |
| 臓器重量 (g)/体重100g |             |               |              |              |             |              |
| 肝 臓             | 4.20±0.10   | 4.42±0.18     | 5.19±0.10*** | 5.54±0.14*** | 4.75±0.16** | 5.20±0.19*** |
| 腎 臓             | 0.75±0.017  | 0.95±0.017*** | 0.85±0.021   | 0.82±0.021*  | 0.83±0.017* | 0.81±0.018   |
| 脾 臓             | 0.20±0.0060 | 0.22±0.011    | 0.24±0.012*  | 0.18±0.012   | 0.20±0.0056 | 0.20±0.0053  |
| 精 巢             | 0.83±0.017  | 0.77±0.051    | 0.87±0.017   | 0.91±0.029*  | 0.78±0.071  | 0.87±0.038   |

値は対照群: 18匹, TBP および TCP 群: 8匹, TMP, TEP および TOP 群: 6匹のラットの平均±標準誤差を示す。星印は対照群との統計学的有意差を示す。

\*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$ , \*\*\*:  $P<0.001$

表 2. TMP, TEP, TBP, TOP または TCP を投与したラットの血液学的検査の結果

|                                    | 対 照 群      | TMP         | TEP       | TBP       | TOP       | TCP        |
|------------------------------------|------------|-------------|-----------|-----------|-----------|------------|
| 白血球数 ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) | 7.57±0.38  | 8.27±1.45   | 7.76±0.26 | 7.58±0.48 | 7.05±0.99 | 8.31±0.47  |
| 赤血球数 ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ ) | 6.94±0.072 | 6.63±0.076* | 6.79±0.16 | 6.78±0.13 | 6.98±0.19 | 7.16±0.12  |
| ヘモグロビン量 (g/dl)                     | 13.3±0.12  | 12.7±0.13*  | 13.1±0.19 | 13.0±0.25 | 13.2±0.28 | 13.4±0.22  |
| ヘマトクリット値 (%)                       | 36.6±0.40  | 35.8±0.65   | 36.3±0.38 | 36.2±1.00 | 36.0±0.83 | 36.8±0.70  |
| 平均赤血球容積 ( $\mu^3$ )                | 53.4±0.41  | 54.8±0.70   | 54.2±0.86 | 54.1±1.43 | 52.2±0.31 | 51.8±0.45* |

値は対照群: 18匹, TBP および TCP 群: 8匹, TMP および TOP 群: 6匹, TEP 群: 5匹のラットの平均±標準誤差を示す。星印は対照群との統計学的有意差を示す。

\*:  $P<0.05$

TMP 投与ラットの精巢の絶対重量は有意に減少し、TEP 投与群では有意に増加した。

血液学的検査の結果を表 2 に示す。TMP 投与群の赤血球数およびヘモグロビン量と TCP 投与ラットの平均赤血球容積は対照群に比較して有意に減少した。

血清成分分析とプロトロンビン時間およびカオリン-PTTの結果を表 3 に示す。TCP 群の総タンパク質量、TBP および TCP 群の尿素窒素量、TCP 群のコレステロール量、TOP 群の胆汁酸量およびカリウム量は対照群より有意に増加していた。TMP 群のプロトロンビン時間は有意に短かく、また TMP 群のカオリン-PTTは有意に長かった。

血清中の酵素活性値を表 4 に示す。TMP 群の GOT および GPT 活性は有意に低かったが TCP 群の GPT 活性は有意に高かった。

病理組織学的観察からは全投与群のラットに肝臓の細

胞質の軽度の空胞変性、多核細胞の増加および細胞の肥大などがみられた。

## 考 察

今回行なった数種のリン酸エステル類の比較実験で、TMP および TBP 投与ラットの体重が有意に低下した。Deichman と Witherup<sup>8)</sup>は致死量以下の TMP を慢性的にラットに経口投与した場合に、今回の実験と同様の体重の低下があったことを報告している。今回の実験では用いたリン酸エステル類のほとんどがいくつかの臓器重量を変化させたが、中でも TMP 投与群の精巢重量は有意に低下した。TMP はいくつかの動物種に不妊効果をもつ<sup>9)</sup>ことが報告されているが、今回の実験でも精子形成の阻害されていることが示唆された。

多くの有機リン酸化合物は ChE 活性を阻害することがよく知られている。TEP は *in vitro* でラット脳の ChE 活性を軽度阻害する<sup>10)</sup>し、TBP は *in vitro* でヒ

表 3. 雄性ラットの血清成分, プロトロンビン時間およびカオリン-PTT におよぼす TMP, TEP, TBP, TOP または TCP の影響

|                   | 対 照 群         | TMP           | TEP          | TBP            | TOP          | TCP           |
|-------------------|---------------|---------------|--------------|----------------|--------------|---------------|
| 総タンパク質量 (g/dl)    | 7.1±0.2(16)   | 6.9±0.2(6)    | 6.4±0.5(4)   | 7.0±0.4(8)     | 7.5±0.2(6)   | 8.2±0.3(8)**  |
| 尿素窒素量 (mg/dl)     | 30.6±0.74(16) | 32.8±3.3(6)   | 32.8±1.3(4)  | 35.5±1.0(8)*** | 32.0±0.68(6) | 34.8±1.5(8)*  |
| コレステロール量 (mg/dl)  | 99±3.2(16)    | 111±5.6(6)    | 109±4.5(4)   | 111±4.2(8)     | 96±3.3(6)    | 126±7.3(8)*** |
| トリグリセライド量 (mg/dl) | 116±12.8(16)  | 107±17.0(6)   | 137±16.5(4)  | 82±11.3(8)     | 134±19.1(6)  | 111±19.4(8)   |
| 胆汁酸量 (μmol/l)     | 29.2±3.0(16)  | 40.1±8.7(6)   | 32.7±5.9(4)  | 28.0±2.7(8)    | 41.4±3.8(6)* | 40.5±4.1(8)*  |
| ナトリウム量 (mEq/l)    | 133±2.2(16)   | 136±2.0(6)    | 137±2.5(4)   | 134±1.2(8)     | 134±1.9(6)   | 134±2.5(8)    |
| カリウム量 (mEq/l)     | 8.3±0.5(16)   | 8.4±0.9(6)    | 8.3±0.3(4)   | 7.3±0.4(8)     | 10.2±0.5(6)* | 9.4±0.9(8)    |
| プロトロンビン時間 (秒)     | 20.1±0.54(18) | 17.6±0.40(6)* | 20.8±1.70(6) | 21.7±0.43(8)   | 21.0±0.44(6) | 19.9±0.53(8)  |
| カオリン-PTT (秒)      | 37.4±1.2(17)  | 43.2±1.0(6)*  | 42.9±2.7(6)  | 38.3±2.2(8)    | 40.0±2.0(6)  | 37.8±1.7(8)   |

値は平均±標準誤差を示す。カッコ内の数字は動物数を表わす。星印は対照群との統計学的有意差を示す。

\*: P<0.05, \*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0.001

表 4. TMP, TEP, TBP, TOP または TCP を投与した雄性ラットの血清中酵素活性値

|                            | 対 照 群          | TMP           | TEP           | TBP           | TOP           | TCP           |
|----------------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| GOT (Karmen units)         | 79±4.9(16)     | 59±2.9(6)**   | 72±5.9(4)     | 68±3.2(8)     | 98±8.0(6)     | 88±6.7(8)     |
| GPT (Karmen units)         | 32±1.8(15)     | 25±1.4(6)*    | 29±1.9(4)     | 33±1.5(8)     | 39±4.4(6)     | 41±3.7(8)*    |
| AlP (King-Armstrong units) | 25±2.2(16)     | 19±1.9(6)     | 21±2.0(4)     | 23±2.1(8)     | 25±3.8(6)     | 22±2.7(8)     |
| ChE (μMSH/min)             | 0.71±0.046(16) | 0.90±0.108(6) | 0.73±0.099(4) | 0.65±0.070(8) | 0.70±0.082(6) | 0.65±0.033(8) |

値は平均±標準誤差を示す。カッコ内の数字は動物数を表わす。

星印は対照群との統計学的有意差を示す。

\*: P<0.05, \*\*: P<0.01

トの赤血球 ChE に対して同じように作用する<sup>11)</sup>ことが報告されている。そしてリン酸トリ-*o*-クレジルはひよこに遅延性神経毒性を有し<sup>1)</sup>，“偽”ChE 活性を阻害するであろう<sup>10)</sup>ことが報告されている。しかしながら、今回の実験ではどの試料でも *in vivo* で ChE 活性は阻害されなかった。この結果は実験方法、動物種、年齢、性等の差によると思われる。

今回の実験では肝臓に対して弱い影響が共通してみられた以外に、実験に用いたリン酸エステル類に著しい差異はみられなかった。しかしながら、安全性確認のため

には催奇形性、変異原性および発癌性の研究を更に進める必要があると思われる。

謝辞 プロトロンビン時間およびカオリン-PTT測定に御協力いただいた高橋 省氏と組織切片作成に携わって下さった湯沢勝広氏に謝意を表します。

#### 要 旨

雄性 Jcl: Wistar ラットに TMP, TEP, TBP, TOP および TCP を 0 または 0.5% の割合に混合した飼料を 9 週間自由摂取させた。TMP および TBP を投与したラットの体重は有意に減少した。試料混合の飼料を摂取

したラットでは臓器重量, 血液および血清成分値に何らかの影響がみられたが, これらの試料については著しい毒作用はみられなかった。

#### 文 献

- 1) Baron, R.L., Benett, D.R. and Casida, J.E. : *Brit. J. Pharmacol. Chemother.*, 18, 465, 1962
- 2) Smith, M.I., Elvove, E., Valaer, P.J., Frazier, W.H. and Mallory, G.E. : *Publ. Health Rep. Washington*, 45, 1703, 1930
- 3) Jackson, H. and Jones, A.R. : *Nature*, 220, 591, 1968
- 4) Hanna, P.J. and Dyer, K.F. : *Mutation Res.*, 28, 405, 1975
- 5) Vandekar, M. : *Nature*, 179, 154, 1957
- 6) Oishi, S., Oishi, H. and Hiraga, K. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 47, 15, 1979
- 7) Garry, P.J. and Routh, J.I. : *Clin. Chem.*, 11, 91, 1965
- 8) Deichman, Wm. B. and Witherup, S. : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 88, 338, 1946
- 9) Conner, T.H. : *Mutation Res.*, 65, 121, 1979
- 10) Sandmeyer, E.E. and Kirwin, C.J. Jr. : *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*, 3rd Ed., Ed. Clayton, G.D. and Clayton, F.E., 2359, vol. 2A, 1981, John Wiley and Sons, New York
- 11) Sabine, J.C. and Hayes, F.N. : *Arch. Ind. Hyg. Occup. Med.*, 6, 174, 1952

種々の食品添加物, 合成洗剤 (LAS) のチャイニーズハムスター V79 細胞を用いた  
metabolic cooperation への阻害効果について

米山允子\*, 中尾順子\*, 平賀興吾\*

Effect of Various Food Additives and Linear Alkylbenzene Sulfonate  
on Metabolic Cooperation in Chinese Hamster Cells

MASAKO YONEYAMA\*, TOSHIKO NAKAO\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords** : 代謝協同 Metabolic cooperation, 発癌促進物質 Tumor promoter, チャイニーズハムスター細胞 Chinese hamster cells, 食品添加物 Food additives (OPP, PHQ, TBZ, DHA, BHT, BHA, PG), 合成洗剤 Linear alkylbenzen sulfate

緒 論

Berenhlum ら<sup>1,2)</sup> によって提起された発癌の2段階説 (initiation と promotion) が一般に認められて以来, initiation の研究と共に promoter 作用機構の研究が数多くなされ, 更に promoter (発癌促進物質) 検出法が動物を用い長期にわたる時間と経費のかかることから in vitro における簡便な promoter assay の方法が望まれて来た. Yotti および Trosko<sup>3)</sup> らは, promoter として認められている phorbol-12-myristate-13-acetate (TPA) が動物培養細胞間における metabolic cooperation を阻害することを示し, TPA が細胞間の communication を遮断することにより悪性細胞の増殖をうながすことを示唆した. 一方, Fitzgerald<sup>4,5)</sup> は, <sup>3</sup>H-hypoxanthine あるいは <sup>3</sup>H-uridine でラベルした mouse epidermal cells と mouse fibroblast cells あるいは 3T3 cells をおのの同一培地中で培養することにより放射性物質の mouse fibroblast cells あるいは 3T3 cells への移行を示し, 更に TPA がその移行を阻害することを示した. Trosko<sup>6)</sup> らは, 膀胱癌の promoter といわれているサッカリンが TPA と同じように細胞間の communication を阻害することを報告している. 梅田<sup>7)</sup> は, 既知の promoter を含む種々の化学物質の metabolic cooperation の阻害を検討し, concanavalin A, lithocholic acid, chaetoglobosin A が強く阻害することを示した. 同様に, 倉田<sup>8)</sup> は有機塩素系殺虫剤が metabolic cooperation を阻害することから有機塩素系殺虫剤が initiator であるよりむしろ promoter ではないかと推測している. 我々は, 合成洗剤として使用されている LAS および各種の

食品添加物, OPP, OPPの代謝物である PHQ, TBZ, DHA, BHT, BHA, PG の安全性を検討するため, V79 チャイニーズハムスター細胞を用い細胞間 metabolic cooperation に及ぼすこれら物質の阻害効果を検討したので報告する.

実験材料および方法

(材料) 細胞は, 横浜市立大学医学部梅田誠助教授より分与された V79 細胞 (チャイニーズハムスター肺由来株化細胞) の野性株 (V79<sup>S</sup>) と 6TG 耐性株 (V79<sup>R</sup>) を用いた. 培養液は, 5% 牛胎児血清 (GIBCO), ビルビン酸塩, アミノ酸を含む MEM (GIBCO, F11) を用いた. 細胞は, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養し培養器具は径60mmの NUNC プラスチックディッシュを用いた.

(試験化合物) TPA (p-8139) は Sigma から購入した. 試験に供した食品添加物, 合成洗剤は次のものである. o-phenylphenol (OPP) (東京化成 K・K), phenylhydroquinone (PHQ) (東京化成 K・K), thiabendazole (TBZ) (東京化成 K・K), dehydroacetic acid sodium salt (DHA) (和光純薬工業 K・K), butylated hydroxytoluene (BHT) (和光純薬工業 K・K), butylated hydroxyanisole (BHA) (和光純薬工業 K・K), propylene glycol (PG) (和光純薬工業 K・K), Linear alkylbenzene sulfonate (LAS) (花王アトラス K・K),

P.G, LAS は培養液中に混和し, TPA および他の物質は dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解させてから培養液中に混和した. DMSO の培養液中における濃度は 1% 以下になるようにした.

(方法) promoter 活性検出法は, Yotti, 梅田<sup>3,6)</sup>

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

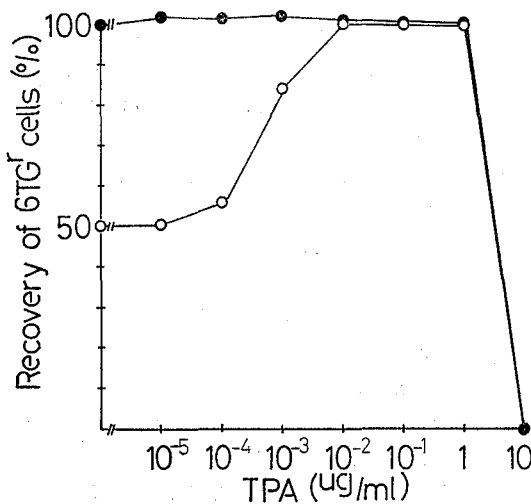


Fig. 1. Effects of various concentrations of TPA on the recovery of 6-TG<sup>r</sup> cells under the condition of metabolic cooperation.

○ recovery with 6TG<sup>s</sup> cells  
● recovery without 6TG<sup>s</sup> cells

の法に従った。200個のV79<sup>R</sup>細胞と $1 \times 10^5$  V79<sup>S</sup>細胞を同一ディッシュに同時に播種し、1中夜培養後、6-thio-guanine (6TG) (7.5 μg/ml) を全ディッシュに添加し、試験化合物、promoter 陽性対照としてのTPAをディッシュに各々混和した。3日間培養後、培養液は6TG (7.5 μg/ml) 添加培養液に変え試験物質およびTPAを除き、更に4日間培養した。4日間中、6TGの活性を保持するため培養液を1回新鮮な6TG添加培養液と交換した。培養後、生存した細胞は、95% ethanol で固定し、ギムザ染色液で染色後、コロニー数を数えた。なお、試験化合物、TPAの細胞毒性を検討するため対照に200個の6TG<sup>r</sup>細胞を上記と同じ方法で培養した。データは、対照にとった6TG<sup>r</sup>細胞のplating efficiencyに対する6TG<sup>s</sup>細胞と混合培養して生存した6TG<sup>r</sup>細胞のコロニー数の割合として表わした。

#### 結果と考察

食品添加物および合成洗剤LASの6TG<sup>s</sup>細胞と6TG<sup>r</sup>細胞間のmetabolic cooperationにおける阻害効果を調べた。TPAは、陽性のpromoterでありその作用は、DNA, RNA合成の促進<sup>9)</sup>、ポリアミン合成調節因子であるオルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)活性の誘導<sup>10)</sup>、細胞膜透過の変更<sup>11)</sup>等と多くの研究報告がある。

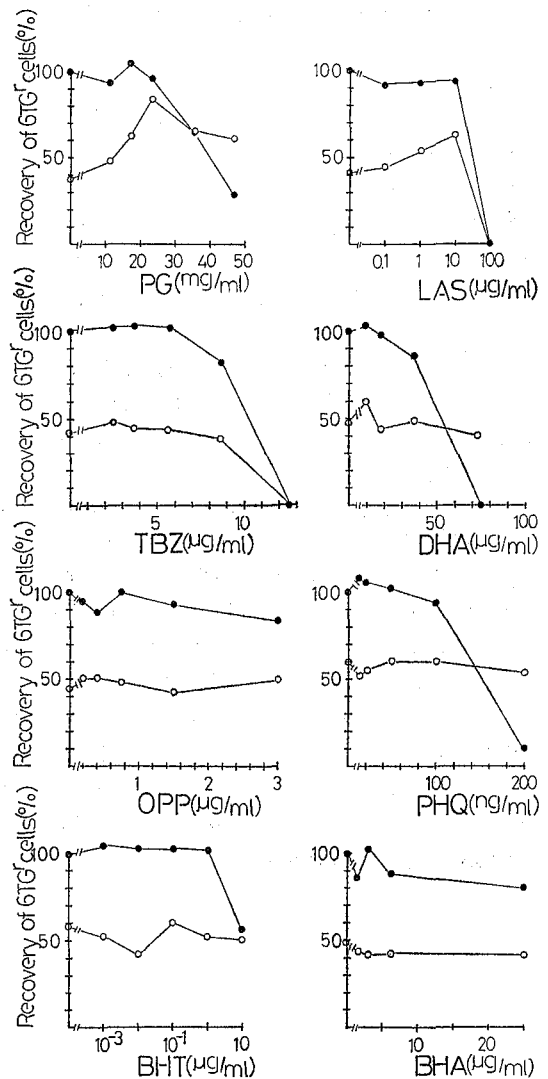


Fig. 2. Effects of various food additives and linear alkylbenzenesulfonate on the recovery of 6-TG<sup>r</sup> cells under the condition of metabolic cooperation.

○ recovery with 6TG<sup>s</sup> cells;  
● recovery without 6TG<sup>s</sup> cells.

TPAの阻害効果についてはFig. 1に示した。TPAを混和しない条件下では6TG<sup>r</sup>細胞の生存率は50%であったがTPAを混和すると $10^{-4}$  μg/ml~ $10^{-2}$  μg/mlの濃度で6TG<sup>r</sup>細胞生存率の増加を示し、 $10^{-2}$  μg/ml~1 μg/mlでは100%であった。つまり、6TG<sup>s</sup>細胞と6TG<sup>r</sup>細胞を混合培養することにより細胞間のmetabolic cooperationを通して生じる6TG<sup>r</sup>細胞の6TGに対す

る感受性の獲得を TPA が  $10^{-2}\mu\text{g/ml} \sim 1\mu\text{g/ml}$  の濃度で阻害した結果, 6TG 添加培養液中での 6TG<sup>r</sup> 細胞の生存を許した. 食品添加物, LAS の結果は, Fig. 2 に示した. TBZ, DHA, OPP, PHQ, BHT, BHA は, metabolic cooperation 阻害を示さず, PG, LAS には阻害が認められた. PG は,  $11.7\text{mg/ml}$  から直線的な 6TG<sup>r</sup> 細胞の生存率の増加を示し,  $23.4\text{mg/ml}$  では 82% の 6TG<sup>r</sup> 細胞の生存率を示した. LAS は,  $0.1\mu\text{g/ml} \sim 10\mu\text{g/ml}$  の濃度範囲で 6TG<sup>r</sup> 細胞の生存率の増加,  $10\mu\text{g/ml}$  では, 対照群が 42% に対し, 62% の生存率であった. TPA と比較すると PG は, 非常に高い濃度で細胞間の metabolic cooperation を阻害し, LAS では, 6TG<sup>r</sup> 細胞の生存率が対照群に比べて 1.4 倍の増加を示すことからいづれも弱い阻害作用であると考えられる. PG は, 安全な溶剤とされているが, 逆に毒性に関する文献も少なくない. 人間の皮膚におけるアレルギー作用<sup>12)</sup>, in vitro での染色体異常<sup>13)</sup>, in vivo での染色体異常<sup>14)</sup> などがある. 浜田ら<sup>15)</sup> は, PG が子やぎの rumen papillary の発育を増大させることを報告している. その理由として, PG が細胞膜に浸透し細胞の分化の過程に影響を及ぼすことを述べている. これらの実験報告と metabolic cooperation 阻害効果を考え合せると PG は, 弱い promoter 作用があると推測される. 今後, 動物を用いて PG や LAS の promoter 作用を確認することが残された課題であろう.

## 文 献

- 1) Berenblum, I. : *Cancer Res*, 1, 44-48, 1941
- 2) Berenblum, I. : *Cancer Res*, 1, 807-814, 1941
- 3) Yotti, C. C. Chang, J. E. Trosko : *Science* 206, 1089-1091, 1979
- 4) Fitzgerald, D. J. and Munay, A. W. : *B. B. R. C*, 91, 395-401, 1979
- 5) Fitzgerald, D. J. and Munay, A. W. : *Cancer Res*, 40, 2935-2937, 1980
- 6) Trosko, J. E. : *Nature*, 285, 109-110, 1980
- 7) Umeda, M., Noda, K. and Ono, T. : *Gann*, 71, 614-620, 1980
- 8) Kurata, M., Hirose, K. and Umeda, M. : *Gann*, 73, 217-221, 1982
- 9) Raineri, R. : *Cancer Res*, 37, 4584-4589, 1977
- 10) O'Brien : *Cancer Res*, 35, 1662-1670, 1975
- 11) Wenner, C. E. : *Carcinogenesis*, 2, 363-378, 1979, Raven Press, New York
- 12) Fisher, A. A. : *Arch. Dermatol*, 115, 1451, 1979
- 13) Ishidate : Annual Report of the Cancer Research Ministry of Health and Welfare, 804, 1978
- 14) Razui, R. : *Arogya*, 5(1), 60-2, 1979
- 15) Hamada, T. : *Experientia*, 37, 579-580, 1981

## チャイニーズハムスター培養細胞によるプロモーター物質の検出

佐々木 美枝子\*, 中 尾 順 子\*, 平 賀 興 吾\*

### *In vitro* Assay of Tumor Promoter by the Inhibition of Metabolic Cooperation in Cultured Chinese Hamster V79 Cells

MIEKO SASAKI\*, TOSHIKO NAKAO\* and KOGO HIRAGA\*

Biological and biochemical properties of the tumor promoter, TPA (12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate), have been reported by a number of researchers in the recent years. The elimination of cell-to-cell metabolic cooperation is one of such cytological activities of TPA and has been described by Yotti et al. in 1979. A good correlation between this action and promoter activity *in vivo* was shown in the experiments in which the effect of TPA and its derivatives as well as other promoter substances on the metabolic cooperation *in vitro* were compared with their promoter activity *in vivo*. The screening assay of tumor promoter *in vitro* is very important because the detection requires a short time, low cost and small space.

We examined the effect of 5 chemicals on the metabolic cooperation in cultured Chinese hamster V79 (wild-type) cells and its 6TG-resistant mutant, V79 (T2-14) cells. Chemicals examined were acetaminophen (AAP), phenacetin (APT), *o*-phenylphenol (OPP), *o*-phenylphenol sodium salt (S-OPP) and phenylhydroquinone (PHQ). AAP and APT are suspected to act in the process of mutagenicity and clastogenicity from our previous experiments, and OPP and S-OPP are reported to be tumorigenic in F344 rats, and PHQ is one of the main metabolites of OPP in rats.

The recovery of 6TG-resistant cells was enhanced when V79 (T2-14) cells were cocultivated with V79 (wild-type) cells and treated with AAP, similar to TPA-treatment, and it was also enhanced but weakly by the treatment of APT. All the substances which inhibit the metabolic cooperation may not exhibit tumor promoting activity, but AAP is probably a promoter for the carcinogen or mutagen. OPP, S-OPP and PHQ had no inhibitory effect on metabolic cooperation, thus these three chemicals were not considered to be promoters in this assay system.

**Keywords :** Metabolic cooperation, Tumor promoter, *In vitro* system, 6TG-resistant Chinese hamster cells

## 緒 言

発癌の過程が initiation と promotion の二つの過程から成るという発癌二段階説 (two-phase theory of carcinogenesis) は初め Berenblum によりマウス皮膚の化学発癌実験系で示された<sup>1)</sup>。すなわち、単独では発癌をおこせないような少量 (subcarcinogenic) の発癌物質 (=initiator) をマウス皮膚に塗布したのちクロトン油をくりかえし塗布すると高率に皮膚癌の発生がみられる。クロトン油は単独では全く発癌作用はない。クロトン油のように、発癌物質によって initiate された細胞が発癌の過程に promote するような物質を発癌プロモ

ーターと呼ぶ。クロトン油中のプロモーター物質はのちに TPA (12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate) であることが示された<sup>2)</sup>。

実験皮膚発癌で提唱されたこの発癌二段階説は、近年、他の臓器の発癌においても証明されるようになった。たとえば、肝癌におけるフェノバルビタール<sup>3)</sup>、膀胱癌におけるサッカリン<sup>4)</sup>、大腸癌における胆汁酸<sup>5)</sup>などがそれぞれ臓器特異性のあるプロモーターとして認められている。

動物実験における各種プロモーター物質の発見と同時に、プロモーターの細胞に対する作用も TPA を中心に

\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan



研究され、プロモーター物質は生物学的にも生化学的にも多様な作用をもつことが明らかにされてきている<sup>9)</sup>。また、*in vivo*における発癌促進のみならず、プロモーター物質は*in vitro*の実験系においても細胞の癌化(transformation)<sup>7)</sup>や突然変異(mutation)<sup>8)</sup>を促進することが示され、*in vitro*の発癌においても initiation phase と promotion phase が存在することが明らかになった。プロモーター物質の細胞に対する作用を利用して*in vitro*の実験系でプロモーターを検出する方法もいろいろと試みられている<sup>9,10)</sup>。

このような*in vitro*実験系のなかで、プロモーター物質が細胞間の代謝協同(metabolic cooperation)を阻害する作用のあることは、初め Yotti ら<sup>10)</sup>により報告され、*in vivo*の実験系でのプロモーター作用と*in vitro*でのこの活性がよく一致することは Umeda ら<sup>11)</sup>によっても確認されている。

我々は、変異原性および発癌試験に用いているいくつかの化学物質について、チャイニーズハムスター由来の培養細胞である V79 細胞の 6-thioguanine 抵抗性の変異株(T2-14)と野生型細胞 V79 (wild) との代謝協同による 6-thioguanine 抵抗性の喪失がこれらの物質により阻害されるか否かを調べたので報告する。

#### 材料・方法

**細胞および培養方法：**チャイニーズハムスター肺由来の培養細胞である V79 細胞の、野生型 V79 (wild) および 6-thioguanine 抵抗性変異株 6TGR V79 (T2-14) を用いた。これらの細胞は、横浜市立大学医学部組織培養室梅田誠教授より分与されたもので、プロモーターの*in vitro*検出系としてすでに報告されている<sup>11-13)</sup>。細胞はアミノ酸およびビルビン酸ナトリウムを強化した MEM (GIBCO, F-11) に 5% 濃度に牛胎児血清を添加した培養液で培養した。6TGR 細胞の検出には、上記培養液に 6-thioguanine (6TG) を 5 $\mu$ g/ml となるように加えた培養液を用いた。細胞の継代維持にはガラス製の培養瓶を用い、実験にはマルチディッシュ (24 wells, multidish, NUNC) を用いた。

**被検物質：**被検物質としては、アセトアミノフェン (acetaminophen, 厚生省がん研究班試料として国立衛試より分与された精製試料, 以下 AAP と記す), アセトフェネチジン (フェナセチン) (acetophenetidine, 和光純薬 019-00412, APT と記す), オルトフェニルフェノール (*o*-phenylphenol, 東京化成 TCI-UP P346, OPP), オルトフェニルフェノールナトリウム (*o*-phenylphenol sodium salt, 東京化成 TCI-CPP202, S-OPP), フェ

ニルヒドロキノン (phenylhydroquinone, 東京化成 TCI-GRD584, PHQ) を用いた。AAP および APT は、変異原性および染色体異常誘発性が問題となっている鎮痛解熱剤であり<sup>14,15)</sup>、OPP, S-OPP はラットに長期投与した場合に膀胱腫瘍の発生が報告されており<sup>16)</sup>、また、PHQ はこの代謝産物である。陽性対照としては、代謝協同阻害効果のあることが知られている発癌プロモーターである TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, SIGMA P8139) を用いた。各物質は、S-OPP を除きすべて DMSO (dimethylsulfoxide) に溶解し、DMSO 濃度が 10 $\mu$ l/ml となるように希釈して培養に加えた。S-OPP は水に溶解して同様に処置した。

**代謝協同阻害の検定：**細胞間代謝協同の阻害効果を見るためには、野生型 V79 (wild) 細胞と 6TGR V79 (T2-14) 細胞とを混合培養し、6TG 感受性である 6TGS V79 (wild) 細胞との代謝協同によって 6TGR が 6TGS に戻る過程に各被検物質を添加して、この作用を阻害する効果を調べた。すなわち、NUNC-multidish 2 プレートに 1 被検物質にあて、1つのプレートには 1 ウェルあたり 50 個の 6TGR V79 (T2-14) 細胞のみを播種し、培養開始 1 日後に 6TG (5 $\mu$ g/ml) を含み各濃度の被検物質を添加した培養液に交換して培養を続け、各物質の V79 (T2-14) 細胞に対する毒性をコロニー形成率を指標として調べた。また別のプレートには 50 個の 6TGR V79 (T2-14) 細胞と 1 $\times$ 10<sup>4</sup> 個の 6TGS V79 (wild) 細胞とを混合培養し、上述したように 6TG と被検物質を加えて培養を続けた。この細胞混合比は、NUNC multidish での培養条件下で、ほぼ 50% の 6TGR 細胞が 6TGS になりうる割合であることは予備実験で確認している。6TG 添加培養液は 3 日目ごとに交換し、1 週間後にコロニーを固定染色して、生じた 6TGR コロニー数を数えた。各プレートは 4 ウェルを 1 群として、5 処置群および 1 溶媒対照群を設けた。コロニー数は 4 ウェルの平均値をとり、対照群に対する百分率であらわした。

#### 結 果

各被検物質の V79 (T2-14) 細胞に対する細胞毒性および V79 (T2-14) 細胞と V79 (wild) 細胞との代謝協同阻害効果を検定した結果を図に示す。

陽性対照である TPA は、10 および 100 ng/ml 処置群でわずかに細胞毒性を示すが、6TGR 細胞と 6TGS 細胞を混合培養すると、TPA 無添加でははじめに加えた 6TGR 細胞の 50% が生存する条件で、TPA を添加した場合には投与量に一致した 6TGR 細胞コロニー数の増加

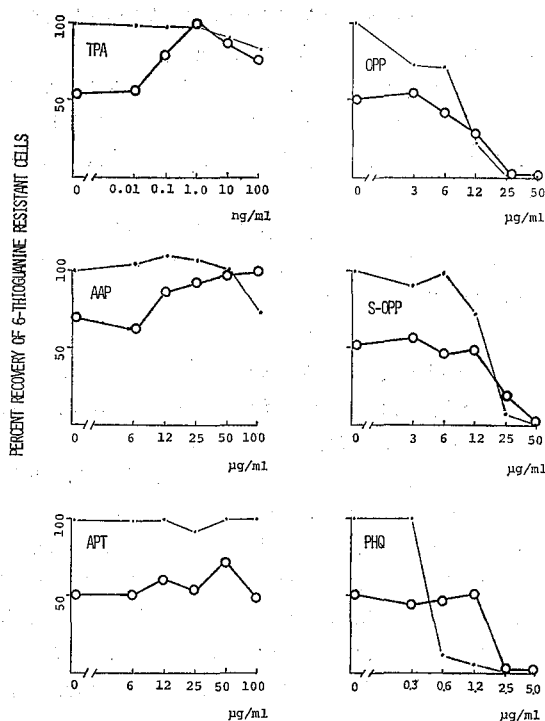


Figure: Effect of TPA, AAP, APT, OPP, S-OPP and PHQ on the metabolic cooperation in Chinese hamster V79 cells. 50 V79 (T2-14) cells (6TG-resistant cells) were cocultivated with  $1 \times 10^4$  V79 (wild-type) cells (6TG-sensitive cells) in NUNC multi-dishes. After the cultivation for 1 day in normal growth medium, the medium was removed and replaced with 6TG-containing medium, and chemicals were added to the culture. The recovery of 6TG-resistant colonies was counted after 1 week. The recovery of 6TG-resistant cells in the culture of T2-14 cells only (●—●) and in the mixed culture of T2-14 and wild-type cells (○—○).

が認められ、6TG<sup>R</sup>細胞の6TG<sup>S</sup>細胞への変換がTPAによって阻害されたことを示している。TPAの代謝協同阻害効果は1ng/mlで十分に示されている。

AAP, APTに関しては、V79細胞に対してこの処置量ではほとんど毒性は認められない。6TG<sup>R</sup>細胞と6TG<sup>S</sup>細胞の混合培養では、AAPに投与量に一致した6TG<sup>R</sup>コロニーの増加がみられる。APTでは、50µg/mlでわずかに6TG<sup>R</sup>細胞が増加している。この結果から、AAPにはTPAと同じく代謝協同阻害効果のあることが示されたが、APTに関しては、弱い活性があるのか、

あるいは実験誤差範囲内の値であるか、はっきりしない。この点を明らかにするために再度実験をくりかえしたが、APTに関してはいつも同様のパターンが得られた。さらに検討が必要と思われる。

OPP, S-OPP, PHQに関しては、図に示すように代謝協同阻害効果は認められない。これらの物質を投与した細胞では、混合培養での6TG<sup>R</sup>細胞のコロニー数は対照値以上には増加せず、細胞毒性の増加とともに6TG<sup>R</sup>コロニー数も減少している。PHQはこれらの物質のうちで最も細胞毒性が強く、またそのパターンも特殊である。0.3µg/ml処置では全ての細胞が生存でき、0.6µg/mlでは細胞生存率は10%近くまで低下し、細胞に対する投与可能な許容範囲がきわめて狭い。また6TG<sup>R</sup>細胞の生存率が10%あるいはそれ以下になった段階でも(0.6および1.2µg/ml)、6TG<sup>R</sup>と6TG<sup>S</sup>細胞の混合培養では、PHQ無処置対照群と同じく50%の6TG<sup>R</sup>細胞の生存が認められる。この現象は、PHQに関してはくりかえし実験でも常に認められ、またS-OPPにもわずかながらこの傾向がみられる。この結果は、単に細胞の絶対数に依存する細胞毒性の修飾であるのか、あるいはPHQ処置により6TG<sup>S</sup>細胞があらたに6TG<sup>R</sup>細胞に変異したためであるか、これらの実験のみからは判断できなかった。

## 考 察

アセトアミノフェンに代謝協同阻害活性のあること、および強力な変異原物質であるMNNGの活性をさらに増強させる作用のみられることはすでに報告した<sup>15,17</sup>。アセトアミノフェンが発癌あるいは変異原物質に対するプロモーターであるのか、あるいはプロモーター作用とは別のメカニズムでこのような活性を示すのか、この点に関しては現在、実験系を検討中である。例えば、アルキル化剤以外の変異原活性をアセトアミノフェンがやはり増強するのか、あるいは、プロモーター活性の阻害物質である抗炎症性ステロイドによってアセトアミノフェンの活性は抑制されるのか、等について実験をすすめているが、まだはっきりした結論は得られていない。

フェナセチンにみられる弱い活性は、実験条件下でフェナセチンの一部が代謝されてアセトアミノフェンに変化しているためかも知れない。アニリン系鎮痛解熱剤であるアセトアミノフェン、フェナセチン、アセトアニリドの代謝協同阻害効果を比較すると、活性はこの順序でさがり、アセトアニリドにはほとんど活性が認められなかった。また、変異原増強効果にも同じ傾向がみられた(未発表)。これは、これら三物質の化学構造を考える

と、ベンゼン核の4位の基の存在が活性に関係していることを示唆しているが確証はない。アセトアミノフェンは長期(24時間)曝露でCHO-K1細胞に染色体異常を誘発するが、フェナセチン、アセトアニリドにはこの活性はみられない<sup>18)</sup>。しかしながらIshidateらはCHL細胞を用いてフェナセチンに染色体異常誘発能のあることを報告している<sup>14)</sup>。アニリン系薬剤のこのような活性の差が、細胞系のちがいによる代謝機構の差に関係している可能性はあるが、さらに検討が必要である。

オルトフェニルフェノールとそのナトリウム塩、およびその代謝産物であるフェニルヒドロキノンに関してはこの実験系では代謝協同阻害効果は全く認められなかった。OPPは近年ラットに膀胱腫瘍を発生させることが示され<sup>16)</sup>、またPHQはOPPを投与されたラットの尿中に多量に存在することが報告されているが<sup>19)</sup>、この実験系でみるかぎり、これらの化学物質は発癌プロモーターではないと思われる。同様の結果は米山ら<sup>20)</sup>によってもOPP、S-OPP、PHQに関して得られており、またS-OPPに関しては、Nodaら<sup>12)</sup>も代謝協同阻害効果のないことを報告している。

フェニルヒドロキノンの特異な反応パターンは、PHQに変異原性のあることを示唆したが、チャイニーズハムスター培養細胞CHO-K1細胞を用い、ウバイン抵抗性細胞を指標とした変異原検定ではPHQに変異原性は認められなかった(未発表)。しかしながら染色体異常誘発に関しては、強い活性は認められないものの、染色体に対する何らかの効果を示唆することが報告されており<sup>21)</sup>、*in vivo*でのtargetと思われる膀胱上皮細胞を用いた実験系などでさらに検討が必要と思われる。またこれらの物質が発癌のイニシエーターとなりうるかという点に関しては、CHO-K1細胞を用い、TPAをプロモーターとした*in vitro*での予備試験ではOPP、S-OPP、PHQにイニシエーター活性は認められなかったが、細胞系やプロモーターの検討がさらに必要であり、*in vitro*発癌であるtransformationに関する実験系の導入が必須と思われる。

### 結 論

アセトアミノフェン、フェナセチン、オルトフェニルフェノール、オルトフェニルフェノールナトリウム、フェニルヒドロキノンについて、TPAを陽性対照として代謝協同阻害活性による*in vitro*でのプロモーターの検出を行ない、つぎの結果を得た。

1) アセトアミノフェンには、TPAと同様、代謝協同阻害活性が認められた。

2) フェナセチンにもごく弱い活性が認められたが、確認にはさらに検討が必要と思われる。

3) オルトフェニルフェノールとそのナトリウム塩およびフェニルヒドロキノンには活性は全く認められず、この検定系でみるかぎりでは、これらの物質は発癌プロモーターである可能性はすくない。

謝辞 本研究にあたり細胞の分与および有益な助言をいただいた横浜市立大学医学部組織培養室梅田誠助教に深く感謝いたします。

### 参考文献

- 1) Berenblum, I.: *Cancer Res.*, 1, 44, 1941
- 2) Bush, H.: *Methods in Cancer Research*, Vol. 6, 439 pp., 1971, Academic Press.
- 3) Peraino, C., Fry, R. J. M., Staffelde, E., Christopher, J. P.: *Cancer Res.*, 35, 2884, 1975
- 4) Hicks, P. M., Wakefield, J. St. J., Chowaniec, J.: *Chem-Biol. Interaction*, 11, 225, 1975
- 5) Reddy, B. S., Watanabe, K., Weisburger, J. H., Wynder, E.: *Cancer Res.*, 37, 3238, 1977
- 6) 粕壁 隆, 穂積本男: 変異原と毒性, 4 (1), 31, 1969
- 7) Mondal, S., Brankow, D. W., Heiderberger, C.: *Cancer Res.*, 36, 2254, 1976
- 8) Lankas, G. R. Jr., Baxter, C. S., Christian, R. T.: *Mutation Res.*, 45, 153, 1977
- 9) 藤木博太: 変異原と毒性, 4(1), 58, 1969
- 10) Yotti, L. P., Chang, C. C., Trosko, J. E.: *Science*, 206, 1089, 1979
- 11) Umeda, M., Noda, K., Ono, T.: *Gann*, 71, 614, 1980
- 12) Noda, K., Umeda, M., Ono, T.: *Gann*, 72, 772, 1981
- 13) Kurata, M., Hirose, K., Umeda, M.: *Gann*, 73, 217, 1982
- 14) Ishidate, M. Jr., Odashima, S.: *Mutation Res.*, 48, 337, 1977
- 15) 佐々木美枝子, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報 31-2, 99, 1980
- 16) Hiraga, K., Fujii, T.: *Food and Cosmetic Toxicology*, 19, 303, 1981
- 17) 佐々木美枝子, 吉田誠二, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 32-2, 97, 1981
- 18) 吉田誠二, 縄井寿美子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 31-2, 102, 1980

19) 牛山慶子, 樺島順一郎, 中尾順子: 東京衛研年報,  
33, 455, 1982

33, 544, 1982

20) 米山允子, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報,

21) 吉田誠二, 佐々木美枝子, 中尾順子, 平賀興吾: 東京衛研年報, 32-2, 111, 1981

## F344/DuCrj ラットの寿命について

高橋 博\*, 井口 重孝\*, 田山 邦昭\*,  
池田 虎雄\*, 林田 志信\*, 平賀 興吾\*

### Lifespan in F344/DuCrj Rats under Our Laboratory Conditions

HIROSHI TAKAHASHI\*, SHIGETAKA IGUCHI\*, KUNIAKI TAYAMA\*,  
TORAO IKEDA\*, SHINOBU HAYASHIDA\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords :** F344/DuCrj ラット F344/DuCrj rat, 寿命 lifespan, 死亡率 Mortality

当部では F344/DuCrj ラットを各種毒性試験に用いているが、一方これらの試験成績より同ラットの生理・病理を導き、毒性試験の計画・結果の評価の基礎資料とするように努めている。

前報<sup>1,2)</sup>では F344/DuCrj ラットの体重・飼料摂取量・化学物質添加飼料中の化学物質摂取量等につき報告した。

今回 F344/DuCrj ラットを終生飼育する機会を得たので寿命・生存期間、死亡率について報告する。

試験動物の寿命、死亡率は毒性指標として重要であるが、これらは動物の疾病・飼育環境一室温、湿度、空気の清浄度、飼育ケージの形状、大きさ、収容頭数、照明時間、騒音、飼料、水質、処置等々により影響されるといわれている。われわれの飼育条件下での寿命、死亡率を明らかにしておく必要がある。

#### 使用動物および飼育・観察条件

**F344/DuCrj ラット:** 日本チャールス・リバー飼育生の雄30匹(1978年5月30日~6月1日生れ)、雌120匹(1978年8月1日~3日生れ)を4週齢で購入、同一飼育室において限定した実験者により飼育管理した。

**飼育・観察条件:** 温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気毎時10回(効率99.9% HEPA フィルター経由全新鮮空気)、照明午前6時から午後5時までの barrier system 飼育室で前面および床面が網のステンレス製(W22×D20×H16cm) ケージでラットを個別に収容し、ベルト式飼育架台に配置、飼料は日本クレア(株) CE-2 固型飼料(粗蛋白24.5%、粗脂肪4.5%、粗繊維4.0%、粗灰分6.6%、可溶性無窒素物52.4%、水分8.0%)、水は自動給水装置により細菌ろ過器経由水道水を飼料とともに自由摂取させた。照明時ケージ内照度は60ルクス以内、騒音は

安静時50ホン以下、飼育架台ベルトは6時間毎に3分間自動洗滌運転、ケージ交換は2週間に1回とした。

一般状態を朝夕2回観察、頻死動物も屠殺せずすべて自然死させた。

なお寿命・生存期間(Lifespan)は死亡時週齢(Age)に1を加えた週数とした。

#### 観察結果と考察

各週における累積死亡数および平均生存期間を Table 1 に、累積死亡曲線を Fig. 1 に、130週を中心とした4半期毎の死亡数ヒストグラムを Fig. 2 に示した。

雄ラットでは71週齢時に初めて死亡がみられ、第2例は100週齢時、第3例は110週齢時であった。最終死亡は156週齢時であり、平均生存期間 $\pm$ SD(週)は $130.03 \pm 17.16$ であった。

雌ラットの初発死亡は86週齢時に2例みられ、第3例は89週齢時であった。最終死亡は171週齢時であり、平均生存期間 $\pm$ SD(週)は $130.83 \pm 19.30$ であった。

平均生存期間は雌雄ラットとも130週(2年6カ月)前後であったが、死亡率曲線 Fig. 1 は雄ラットの方が雌ラットより勾配が急であった。

平均生存期間の130週を中心とした4半期(13週)毎の死亡数ヒストグラム Fig. 2 をみると、特に、比較例数の多い雌ラットでは左右対称的な死亡発生となっており、Fig. 1 に示すように雌雄ラット共に130週を中心として全く対称的な死亡率のS字曲線を描くことが出来た。

この曲線は近交系 F344/DuCrj ラットの感染症その他特殊な疾病の発生なく安定した飼育環境下に寿命を全うしたことを示しているように思われる。

#### ま と め

われわれの飼育条件下における近交系 F344/DuCrj ラ

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

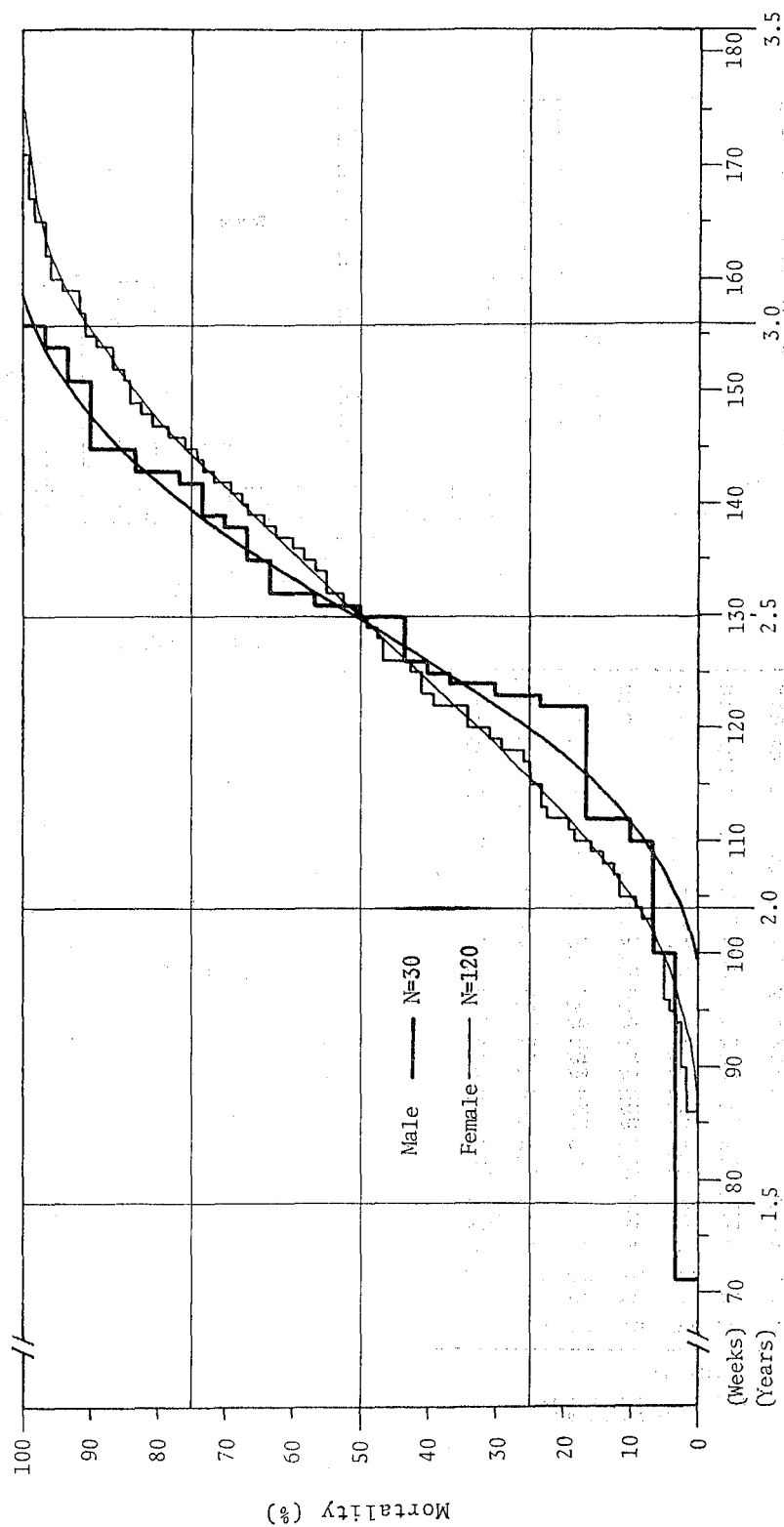


Fig. 1. Mortality Curves in F344/DuCrj Rats

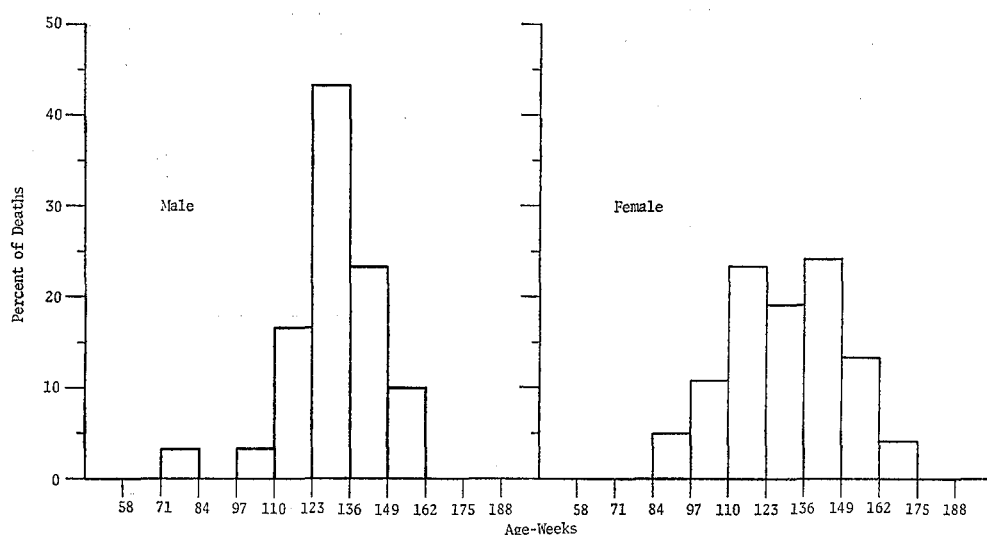


Fig. 2. Histogram of Deaths in F344/DuCrj Rats

Table 1. Mortality in F344/DuCrj Rats

|   |         |       |       |       |       |         |       |       |
|---|---------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|
|   | 70      | 71    | 72    | 73    | 74    | 75      | 76    | 77    |
| A | 0/ 30   | 1/ 1/ | 1/ 1/ | 1/ 1/ | 1/ 1/ | 1/ 1/   | 1/ 1/ | 1/ 1/ |
| M | 0/120   | 0/    | 0/    | 0/    | 0/    | 0/      | 0/    | 0/    |
| F |         |       |       |       |       |         |       |       |
|   | 78      | 79    | 80    | 81    | 82    | 83      | 84    | 85    |
| M | 1/ 30   | 1/ 1/ | 1/ 1/ | 1/ 1/ | 1/ 1/ | 1/ 1/   | 1/ 1/ | 1/ 1/ |
| F | 0/120   | 0/    | 0/    | 0/    | 0/    | 0/      | 0/    | 0/    |
|   | 86      | 87    | 88    | 89    | 90    | 91      | 92    | 93    |
| M | 1/ 30   | 1/ 1/ | 1/ 1/ | 1/ 1/ | 1/ 1/ | 1/ 1/   | 1/ 1/ | 1/ 1/ |
| F | 2/120   | 2/    | 2/    | 3/    | 3/    | 3/      | 3/    | 3/    |
|   | 94      | 95    | 96    | 97    | 98    | 99      | 100   | 101   |
| M | 1/ 30   | 1/ 1/ | 1/ 1/ | 1/ 1/ | 1/ 1/ | 1/ 1/   | 2/ 2/ | 2/ 2/ |
| F | 4/120   | 5/    | 6/    | 6/    | 6/    | 6/      | 8/    | 8/    |
|   | 102     | 103   | 104   | 105   | 106   | 107     | 108   | 109   |
| M | 2/ 30   | 2/    | 2/    | 2/    | 2/    | 2/      | 2/    | 2/    |
| F | 8/120   | 10/   | 11/   | 14/   | 14/   | 15/     | 17/   | 19/   |
|   | 110     | 111   | 112   | 113   | 114   | 115     | 116   | 117   |
| M | 3/ 30   | 3/    | 5/    | 5/    | 5/    | 5/      | 5/    | 5/    |
| F | 22/120  | 23/   | 27/   | 28/   | 28/   | 30/     | 30/   | 31/   |
|   | 118     | 119   | 120   | 121   | 122   | 123     | 124   | 125   |
| M | 5/ 30   | 5/    | 5/    | 5/    | 7/    | 9/      | 11/   | 12/   |
| F | 35/120  | 37/   | 41/   | 41/   | 47/   | 49/     | 49/   | 51/   |
|   | 126     | 127   | 128   | 129   | 130   | 131     | 132   | 133   |
| M | 13/ 30  | 13/   | 13/   | 13/   | 15/   | 17/     | 19/   | 19/   |
| F | 56/120  | 56/   | 57/   | 59/   | 61/   | 63/     | 66/   | 66/   |
|   | 134     | 135   | 136   | 137   | 138   | 139     | 140   | 141   |
| M | 19/ 30  | 20/   | 20/   | 20/   | 21/   | 22/     | 22/   | 22/   |
| F | 68/120  | 70/   | 72/   | 75/   | 77/   | 80/     | 81/   | 83/   |
|   | 142     | 143   | 144   | 145   | 146   | 147     | 148   | 149   |
| M | 23/ 30  | 25/   | 25/   | 27/   | 27/   | 27/     | 27/   | 27/   |
| F | 86/120  | 88/   | 89/   | 91/   | 94/   | 97/     | 99/   | 101/  |
|   | 150     | 151   | 152   | 153   | 154   | 155     | 156   | 157   |
| M | 27/ 30  | 28/   | 28/   | 28/   | 29/   | 29/     | 30/   | 30/   |
| F | 101/120 | 102/  | 104/  | 104/  | 107/  | 109/    | 109/  | 110/  |
|   | 158     | 159   | 160   | 161   | 162   | 163     | 164   | 165   |
| M |         |       |       |       |       |         |       |       |
| F | 110/120 | 113/  | 115/  | 115/  | 116/  | 116/    | 116/  | 118/  |
|   | 166     | 167   | 168   | 169   | 170   | 171     |       |       |
| M |         |       |       |       |       |         |       |       |
| F | 118/120 | 119/  | 119/  | 119/  | 119/  | 120/120 |       |       |

A:Age(Weeks) M:Male F:Female

Mean Life Span±SD(Weeks) Male 130.03±17.16  
Female 130.83±19.30

ット雌雄の寿命—生存期間, 死亡率を観察し次の結果を得た.

|        | No. of Rats | Age (weeks) |               |     | Maximum Survival |
|--------|-------------|-------------|---------------|-----|------------------|
|        |             | 25%         | Mortality 50% | 75% |                  |
| Male   | 30          | 120         | 130           | 140 | 156              |
| Female | 120         | 115         | 130           | 145 | 171              |

## 文 献

- 1) 高橋 博, 井口重孝, 平賀興吾: 東京衛研年報, 32-2, 121, 1981
- 2) 井口重孝, 高橋 博, 平賀興吾: 東京衛研年報, 32-2, 115, 1981

## F344/DuCrj ラットにおける飼料中化学物質添加濃度と 化学物質摂取量の関係について (続報)

井 口 重 孝\*, 高 橋 博\*, 平 賀 興 吾\*

### Relation of Part per Million in Diet to Milligram per Kilogram Body Weight per Day in F344/DuCrj Rat

SHIGETAKA IGUCHI\*, HIROSHI TAKAHASHI\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords :** F344ラット F344 rat, 飼料摂取 food intake

毒性試験では化学物質(検体)を飼料に添加して試験動物に投与する一摂取せしめる一法が多く用いられる。この際、化学物質添加濃度、投与期間と化学物質摂取量との関係を知ることが必要である。

前報<sup>1)</sup>では F344/DuCrj ラットについて、5週齢から化学物質添加飼料を与えた飼育試験例より添加濃度、飼育期間と化学物質摂取量の関係を求め報告した。

今回は、同ラットの無添加飼料摂取量にもとづき5, 6, 7および8週齢より化学物質添加飼料を与え始めた場合を設定し、夫々における化学物質添加濃度、摂取期間と化学物質摂取量の関係を算出した。

#### 実験材料ならびに方法

##### F344 ラット

日本チャールス・リバー(株)生育の近交系 F344/DuCrj ラット雌雄を4週齢で購入、1週間の予備飼育後発育良好と認められたものを使用した。

##### 飼料

日本クレア(株)のCE-2固型飼料

##### 使用動物数

A群25匹, B群50匹

##### 飼育条件

温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 湿度 $55 \pm 5\%$ , 換気毎時10回, 照明午前6時から午後5時までの barrier system 飼育室において、前面および床面が網のステンレス製ケージ(間口 $22 \times$ 奥行き $20 \times$ 高さ $16\text{cm}$ )に個別に収容、自動給水装置(細菌ろ過器経由水道水)付ベルト式飼育架台にランダムに配置し、CE-2飼料とともに水道水(細菌ろ過器経由)を自由に与えた。

##### 飼料摂取量の測定

飼料投与量、摂餌後の残余量およびケージ受皿への飼料コボシ量を測定し、(投与量-残余量-コボシ量)/測定日数により1日摂取量( $\text{g/rat/day}$ および $\text{g/kg. B. W. /day}$ )を求めた。

##### 化学物質摂取量の算定

2つ(AおよびB)の飼料摂取量に添加濃度(10,000 ppmとする)を乗じて求めた。

(1)化学物質摂取総量(T)は、今回算定した1日摂取量を次の測定時まで利用して期間内の総摂取量を算出した。(2)1日平均摂取量(M)は期間内の総摂取量(T)を期間の日数で除した。(3)化学物質/ $\text{mg/kg/day}$ を摂取するに必要な飼料中化学物質添加濃度 ppm (C)は飼料中化学物質濃度 ppm を1日平均摂取量(M)で除した。(4)飼料中化学物質濃度が1ppmのときの化学物質摂取量  $\text{mg/kg. B. W. /day}$  (D)は1を(C)で除して求めた。

##### 結果と考察

表1, 2, 3および4に化学物質添加飼料投与開始の5, 6, 7および8週齢時から4週間(1ヵ月), 13週間(3ヵ月), 26週間(6ヵ月), 39週間(9ヵ月), 52週間(1年), 65週間(1年3ヵ月), 78週間(1年6ヵ月), 91週間(1年9ヵ月)および104週間(2年)におけるT, M, CおよびDを示した。

試験期間の長さや実験開始時のラット週齢が増すことによりMおよびD値は小さくなり、C値が大きくなるのが観察された。

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan



表 1. 5 週齡時投与開始からの化学物質総摂取量

| 試 験 期 間<br>(*<br>ラット週齡) |                 | 雄      |        | 平 均   | 雌      |        | 平 均   |
|-------------------------|-----------------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|
|                         |                 | A      | B      |       | A      | B      |       |
| 5 *<br>8                | T <sup>1)</sup> | 26747  | 28686  |       | 27797  | 27111  |       |
|                         | M <sup>2)</sup> | 955.3  | 1024.5 |       | 992.8  | 968.3  |       |
|                         | C <sup>3)</sup> | 10.5   | 9.8    | 10.2  | 10.1   | 10.3   | 10.2  |
|                         | D <sup>4)</sup> | 0.095  | 0.102  | 0.099 | 0.099  | 0.097  | 0.098 |
| 5<br>17                 | T               | 62279  | 64001  |       | 67900  | 64372  |       |
|                         | M               | 684.4  | 703.3  |       | 746.2  | 707.4  |       |
|                         | C               | 14.6   | 14.2   | 14.4  | 13.4   | 14.1   | 13.8  |
|                         | D               | 0.068  | 0.070  | 0.069 | 0.075  | 0.071  | 0.073 |
| 5<br>30                 | T               | 100436 | 102508 |       | 115031 | 111244 |       |
|                         | M               | 551.8  | 563.2  |       | 632.0  | 611.2  |       |
|                         | C               | 18.1   | 17.8   | 18.0  | 15.8   | 16.4   | 16.1  |
|                         | D               | 0.055  | 0.056  | 0.056 | 0.063  | 0.061  | 0.062 |
| 5<br>43                 | T               | 134386 | 138453 |       | 157745 | 157339 |       |
|                         | M               | 492.3  | 507.2  |       | 577.8  | 576.3  |       |
|                         | C               | 20.3   | 19.7   | 20.0  | 17.3   | 17.4   | 17.4  |
|                         | D               | 0.049  | 0.051  | 0.050 | 0.058  | 0.057  | 0.058 |
| 5<br>56                 | T               | 167650 | 175735 |       | 201229 | 204309 |       |
|                         | M               | 460.6  | 482.8  |       | 552.8  | 561.3  |       |
|                         | C               | 21.7   | 20.7   | 21.2  | 18.1   | 17.8   | 18.0  |
|                         | D               | 0.046  | 0.048  | 0.047 | 0.055  | 0.056  | 0.056 |
| 5<br>69                 | T               | 200011 | 213451 |       | 243201 | 250313 |       |
|                         | M               | 439.6  | 469.1  |       | 534.5  | 550.1  |       |
|                         | C               | 22.7   | 21.3   | 22.0  | 18.7   | 18.2   | 18.5  |
|                         | D               | 0.044  | 0.047  | 0.046 | 0.053  | 0.055  | 0.054 |
| 5<br>82                 | T               | 229670 | 248535 |       | 280791 | 293125 |       |
|                         | M               | 420.6  | 455.2  |       | 514.3  | 536.9  |       |
|                         | C               | 23.8   | 22.0   | 22.9  | 19.4   | 18.6   | 19.0  |
|                         | D               | 0.042  | 0.045  | 0.044 | 0.052  | 0.054  | 0.053 |
| 5<br>95                 | T               | 257817 | 280567 |       | 315119 | 332885 |       |
|                         | M               | 404.7  | 440.5  |       | 494.7  | 522.6  |       |
|                         | C               | 24.7   | 22.7   | 23.7  | 20.2   | 19.1   | 19.7  |
|                         | D               | 0.040  | 0.044  | 0.042 | 0.050  | 0.052  | 0.051 |
| 5<br>108                | T               | 287770 | 315651 |       | 348733 | 374619 |       |
|                         | M               | 395.3  | 433.6  |       | 479.0  | 514.6  |       |
|                         | C               | 25.3   | 23.1   | 24.2  | 20.9   | 19.4   | 20.2  |
|                         | D               | 0.040  | 0.043  | 0.042 | 0.048  | 0.052  | 0.050 |

1) T=Total mg/kg. B.W.

2) M=mg/kg. B.W./Day

3) C=1mg/kg. B.W./Day equals in ppm of diet

4) D=1ppm in food equals in mg/kg. B.W./Day

表 2. 6 週齡時投与開始からの化学物質総摂取量

| 試 験 期 間<br>(* ラット週齡) |                 | 雄      |        | 平 均   | 雌      |        | 平 均   |
|----------------------|-----------------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|
|                      |                 | A      | B      |       | A      | B      |       |
| 6<br> <br>9          | T <sup>1)</sup> | 25074  | 24689  |       | 25802  | 23611  |       |
|                      | M <sup>2)</sup> | 895.5  | 881.8  |       | 921.5  | 843.3  |       |
|                      | C <sup>3)</sup> | 11.2   | 11.3   | 11.3  | 10.9   | 11.9   | 11.4  |
|                      | D <sup>4)</sup> | 0.089  | 0.088  | 0.089 | 0.092  | 0.084  | 0.088 |
| 6<br> <br>18         | T               | 58282  | 58387  |       | 64267  | 60326  |       |
|                      | M               | 640.5  | 641.6  |       | 706.2  | 662.9  |       |
|                      | C               | 15.6   | 15.6   | 15.6  | 14.2   | 15.1   | 14.7  |
|                      | D               | 0.064  | 0.064  | 0.064 | 0.070  | 0.066  | 0.068 |
| 6<br> <br>31         | T               | 95865  | 96516  |       | 110852 | 107149 |       |
|                      | M               | 526.7  | 530.5  |       | 609.1  | 588.7  |       |
|                      | C               | 19.0   | 18.9   | 19.0  | 16.4   | 17.0   | 16.7  |
|                      | D               | 0.053  | 0.053  | 0.053 | 0.061  | 0.059  | 0.060 |
| 6<br> <br>44         | T               | 129780 | 132461 |       | 153405 | 153118 |       |
|                      | M               | 475.4  | 485.2  |       | 561.9  | 560.9  |       |
|                      | C               | 21.0   | 20.6   | 20.8  | 17.8   | 17.8   | 17.8  |
|                      | D               | 0.048  | 0.049  | 0.049 | 0.056  | 0.056  | 0.056 |
| 6<br> <br>57         | T               | 163002 | 169827 |       | 197204 | 200214 |       |
|                      | M               | 447.8  | 466.6  |       | 541.8  | 550.0  |       |
|                      | C               | 22.3   | 21.4   | 21.9  | 18.5   | 18.2   | 18.4  |
|                      | D               | 0.045  | 0.047  | 0.046 | 0.054  | 0.055  | 0.055 |
| 6<br> <br>70         | T               | 195230 | 207529 |       | 238861 | 246190 |       |
|                      | M               | 429.1  | 456.1  |       | 525.0  | 541.1  |       |
|                      | C               | 23.3   | 21.9   | 22.6  | 19.0   | 18.5   | 18.8  |
|                      | D               | 0.043  | 0.046  | 0.045 | 0.053  | 0.054  | 0.054 |
| 6<br> <br>83         | T               | 224546 | 242168 |       | 275954 | 288596 |       |
|                      | M               | 411.3  | 443.5  |       | 505.4  | 528.6  |       |
|                      | C               | 24.3   | 22.5   | 23.4  | 19.8   | 18.9   | 19.4  |
|                      | D               | 0.041  | 0.044  | 0.043 | 0.051  | 0.053  | 0.052 |
| 6<br> <br>96         | T               | 252980 | 274309 |       | 310485 | 328286 |       |
|                      | M               | 397.1  | 430.6  |       | 487.4  | 515.4  |       |
|                      | C               | 25.2   | 23.2   | 24.2  | 20.5   | 19.4   | 20.0  |
|                      | D               | 0.040  | 0.043  | 0.042 | 0.049  | 0.052  | 0.051 |
| 6<br> <br>109        | T               | 282968 | 309701 |       | 343693 | 370293 |       |
|                      | M               | 388.7  | 425.4  |       | 472.1  | 508.6  |       |
|                      | C               | 25.7   | 23.5   | 24.6  | 21.2   | 19.7   | 20.5  |
|                      | D               | 0.039  | 0.043  | 0.042 | 0.047  | 0.051  | 0.049 |

1) T=Total mg/kg. B.W.

2) M=mg/kg. B.W./Day

3) C=1mg/kg. B.W./Day equals in ppm of diet

4) D=1ppm in food equals in mg/kg. B.W./Day

表 3. 7 週齡時投与開始からの化学物質総摂取量

| 試 験 期 間<br>(* ラット週齡) |                 | 雄      |        | 平 均   | 雌      |        | 平 均   |
|----------------------|-----------------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|
|                      |                 | A      | B      |       | A      | B      |       |
| 7<br> <br>10         | T <sup>1)</sup> | 21882  | 21630  |       | 23443  | 20895  |       |
|                      | M <sup>2)</sup> | 781.5  | 772.5  |       | 837.3  | 746.3  |       |
|                      | C <sup>3)</sup> | 12.8   | 12.9   | 12.9  | 11.9   | 13.4   | 12.7  |
|                      | D <sup>4)</sup> | 0.078  | 0.078  | 0.078 | 0.084  | 0.075  | 0.080 |
| 7<br> <br>19         | T               | 57057  | 54047  |       | 60802  | 56721  |       |
|                      | M               | 627.0  | 593.9  |       | 668.2  | 623.3  |       |
|                      | C               | 15.9   | 16.8   | 16.4  | 15.0   | 16.0   | 15.5  |
|                      | D               | 0.063  | 0.060  | 0.062 | 0.067  | 0.063  | 0.065 |
| 7<br> <br>32         | T               | 94066  | 91728  |       | 106841 | 103509 |       |
|                      | M               | 516.8  | 504.0  |       | 587.0  | 568.7  |       |
|                      | C               | 19.3   | 19.8   | 19.6  | 17.0   | 17.6   | 17.3  |
|                      | D               | 0.052  | 0.051  | 0.052 | 0.059  | 0.057  | 0.058 |
| 7<br> <br>45         | T               | 127876 | 127743 |       | 149317 | 149338 |       |
|                      | M               | 468.4  | 467.9  |       | 546.9  | 547.0  |       |
|                      | C               | 21.3   | 21.4   | 21.4  | 18.3   | 18.3   | 18.3  |
|                      | D               | 0.047  | 0.047  | 0.047 | 0.055  | 0.055  | 0.055 |
| 7<br> <br>58         | T               | 161126 | 165193 |       | 193347 | 196560 |       |
|                      | M               | 442.7  | 453.8  |       | 531.2  | 540.0  |       |
|                      | C               | 22.6   | 22.0   | 22.3  | 18.8   | 18.5   | 18.7  |
|                      | D               | 0.044  | 0.045  | 0.045 | 0.053  | 0.054  | 0.054 |
| 7<br> <br>71         | T               | 193221 | 202741 |       | 234689 | 242347 |       |
|                      | M               | 424.7  | 445.6  |       | 515.8  | 532.6  |       |
|                      | C               | 23.5   | 22.4   | 23.0  | 19.4   | 18.8   | 19.1  |
|                      | D               | 0.043  | 0.045  | 0.044 | 0.052  | 0.053  | 0.053 |
| 7<br> <br>84         | T               | 222194 | 237069 |       | 271285 | 284508 |       |
|                      | M               | 406.9  | 434.2  |       | 496.9  | 521.1  |       |
|                      | C               | 24.6   | 23.0   | 23.8  | 20.1   | 19.2   | 19.7  |
|                      | D               | 0.041  | 0.043  | 0.042 | 0.050  | 0.052  | 0.051 |
| 7<br> <br>97         | T               | 250691 | 269325 |       | 305676 | 324128 |       |
|                      | M               | 393.5  | 422.8  |       | 479.9  | 508.8  |       |
|                      | C               | 25.4   | 23.7   | 24.6  | 20.8   | 19.7   | 20.3  |
|                      | D               | 0.039  | 0.042  | 0.041 | 0.048  | 0.051  | 0.050 |
| 7<br> <br>110        | T               | 280938 | 304934 |       | 338821 | 366408 |       |
|                      | M               | 385.9  | 418.9  |       | 465.4  | 503.3  |       |
|                      | C               | 25.9   | 23.9   | 24.9  | 21.5   | 19.9   | 20.7  |
|                      | D               | 0.039  | 0.042  | 0.041 | 0.047  | 0.050  | 0.049 |

1) T=Total mg/kg. B.W.

2) M=mg/kg. B.W./Day

3) C=1mg/kg. B.W./Day equals in ppm of diet

4) D=1ppm in food equals in mg/kg. B.W./Day

表 4. 8 週齡時投与開始からの化学物質総摂取量

| 試 験 期 間<br>(* ラット週齡) |                 | 雄      |        | 平 均   | 雌      |        | 平 均   |
|----------------------|-----------------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|
|                      |                 | A      | B      |       | A      | B      |       |
| 8 *<br>11            | T <sup>1)</sup> | 19950  | 19222  |       | 21084  | 19348  |       |
|                      | M <sup>2)</sup> | 712.5  | 686.5  |       | 753.0  | 691.0  |       |
|                      | C <sup>3)</sup> | 14.0   | 14.6   | 14.3  | 13.3   | 14.5   | 13.9  |
|                      | D <sup>4)</sup> | 0.071  | 0.068  | 0.070 | 0.075  | 0.069  | 0.072 |
| 8<br>20              | T               | 55832  | 50400  |       | 57337  | 54250  |       |
|                      | M               | 613.5  | 553.8  |       | 630.1  | 596.2  |       |
|                      | C               | 16.3   | 18.1   | 17.2  | 15.9   | 16.8   | 16.4  |
|                      | D               | 0.061  | 0.055  | 0.058 | 0.063  | 0.060  | 0.062 |
| 8<br>33              | T               | 92281  | 87738  |       | 102732 | 100912 |       |
|                      | M               | 507.0  | 482.1  |       | 564.5  | 554.5  |       |
|                      | C               | 19.7   | 20.7   | 20.2  | 17.7   | 18.0   | 17.9  |
|                      | D               | 0.051  | 0.048  | 0.050 | 0.056  | 0.056  | 0.056 |
| 8<br>46              | T               | 125972 | 123823 |       | 145131 | 146601 |       |
|                      | M               | 461.4  | 453.6  |       | 531.6  | 537.0  |       |
|                      | C               | 21.7   | 22.0   | 21.9  | 18.8   | 18.6   | 18.7  |
|                      | D               | 0.046  | 0.045  | 0.046 | 0.053  | 0.054  | 0.054 |
| 8<br>59              | T               | 159250 | 161329 |       | 189392 | 194054 |       |
|                      | M               | 437.5  | 443.2  |       | 520.3  | 533.1  |       |
|                      | C               | 22.9   | 22.6   | 22.8  | 19.2   | 18.8   | 19.0  |
|                      | D               | 0.044  | 0.044  | 0.044 | 0.052  | 0.053  | 0.053 |
| 8<br>72              | T               | 191212 | 198751 |       | 230419 | 239547 |       |
|                      | M               | 420.2  | 436.8  |       | 506.4  | 526.5  |       |
|                      | C               | 23.8   | 22.9   | 23.4  | 19.7   | 19.0   | 19.4  |
|                      | D               | 0.042  | 0.044  | 0.043 | 0.051  | 0.053  | 0.052 |
| 8<br>85              | T               | 219884 | 232771 |       | 266420 | 281463 |       |
|                      | M               | 402.7  | 426.3  |       | 487.9  | 515.5  |       |
|                      | C               | 24.8   | 23.5   | 24.2  | 20.5   | 19.4   | 20.0  |
|                      | D               | 0.040  | 0.043  | 0.042 | 0.049  | 0.052  | 0.051 |
| 8<br>98              | T               | 248444 | 265139 |       | 300769 | 321013 |       |
|                      | M               | 390.0  | 416.2  |       | 472.2  | 503.9  |       |
|                      | C               | 25.6   | 24.0   | 24.8  | 21.2   | 19.8   | 20.5  |
|                      | D               | 0.039  | 0.042  | 0.041 | 0.047  | 0.051  | 0.049 |
| 8<br>111             | T               | 278950 | 300965 |       | 333851 | 363566 |       |
|                      | M               | 383.2  | 413.4  |       | 458.6  | 499.4  |       |
|                      | C               | 26.1   | 24.2   | 25.2  | 21.8   | 20.0   | 20.9  |
|                      | D               | 0.038  | 0.041  | 0.040 | 0.046  | 0.050  | 0.048 |

1) T=Total mg/kg. B.W.

2) M=mg/kg. B.W./Day

3) C=1mg/kg. B.W./Day equals in ppm of diet

4) D=1ppm in food equals in mg/kg. B.W./Day

## ま と め

化学物質 1mg/kg/day 摂取に必要な添加濃度 ppm を求め、次の結果を得た。

F 344 ラット雌雄における化学物質添加飼料投与時の

## 試 験 開 始 時 週 齢

| 試 験 期 間       | 雄    |      |      |      | 雌    |      |      |      |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|               | 5    | 6    | 7    | 8    | 5    | 6    | 7    | 8    |
| 4 週間 (1 ヶ月)   | 10.0 | 11.5 | 13.0 | 14.0 | 10.0 | 11.5 | 13.0 | 14.0 |
| 13 " (3 " )   | 14.0 | 15.5 | 16.5 | 17.0 | 14.0 | 14.5 | 15.5 | 16.5 |
| 26 " (6 " )   | 18.0 | 19.0 | 19.5 | 20.0 | 16.0 | 16.5 | 17.5 | 18.0 |
| 39 " (9 " )   | 20.0 | 21.0 | 21.5 | 22.0 | 17.5 | 18.0 | 18.5 | 18.5 |
| 52 " (12 " )  | 21.0 | 22.0 | 22.5 | 23.0 | 18.0 | 18.5 | 18.5 | 19.0 |
| 65 " (15 " )  | 22.0 | 22.5 | 23.0 | 23.5 | 18.5 | 19.0 | 19.0 | 19.5 |
| 78 " (18 " )  | 23.0 | 23.5 | 24.0 | 24.0 | 19.0 | 19.5 | 19.5 | 20.0 |
| 91 " (21 " )  | 23.5 | 24.0 | 24.5 | 25.0 | 19.5 | 20.0 | 20.5 | 20.5 |
| 104 " (24 " ) | 24.0 | 24.5 | 25.0 | 25.0 | 20.0 | 20.5 | 20.5 | 21.0 |

## 文 献

- 1) 井口重孝ら：東京衛研年報，32-2，115，1981

# 試験飼料中の被験物質濃度の均一性について

神谷 信行\*, 平賀 興吾\*

## Uniformity of Test Article Concentrations in Pellet Diet used Feeding Study

NOBUYUKI KAMIYA\* and KOGO HIRAGA\*

**Keywords:** チアベンダゾール thiabendazole, オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, 試験物質 test article, 飼料 diet, 均一性 uniformity, 分析 analysis

### 緒 言

毒性試験においては、試験物質を飼料に添加して投与することが多い。この際飼料に添加された試験物質が正確な濃度で、均一に分布していなくてはならない。今回は当部において試験を行っているチアベンダゾール (TBZ), オルトフェニルフェノール (OPP) およびそのナトリウム塩 (OPP-Na) を添加したペレット飼料について、それぞれ試験物質の均一性を検討した。また飼料中の TBZ の分析法の検討もあわせて行った。

### 実験材料および方法

**試薬** OPP は東京化成工業の超高純度試薬を、TBZ は Merck Sharp & Dhome International の microfine MSD を、メタノールと酢酸エチルは関東化学の高速液体クロマトグラフ用を、ジメチルホルムアミド (DMF) は E. Merck の UVASOL をそれぞれ用いた。

**試料** マウス・ラット用粉末飼料 CE-2 (日本クレア) に OPP 1.25%, OPP-Na 1.0%, TBZ 0.2% となるよう図 1 に示した工程でそれぞれを添加し、ペレットとしたものを試料とした。この際、特に混合物の均一性に留意し、乳鉢を用いて試験物質と CE-2 を混和し、目的濃度の約 10 倍の濃度のプレミックスを作製した後、図 1 の工程へ移った。試料は図 2 に示したように、1 箱 (約 20kg) あたり上層、中層、下層各 6 か所、合計 18 か所よりペレットを各 1 個ずつ採取し、それぞれを乳鉢で均一に粉碎した。

### 分析方法

OPP および OPP-Na: 溝入りの方法<sup>1)</sup>に従った。粉碎した試料 1~2g を精秤し、メタノール 50ml を加えてときどきふりまぜながら 24 時間放置、ろ過、残渣をさらにメタノール 30ml を用いて同様に操作した後、ろ液を合せ、メタノールで一定量として、高速液体クロマトグ

ラフィー (HPLC) で測定した。

TBZ: 飼料中の TBZ を簡便で精度よく分析する方法がないため検討した結果、以下の方法を用いた。粉碎した試料 2g を精秤し、DMF・水混液 (1:1) 50ml を加え、ときどきふりまぜながら 2 日間放置、ろ過、残渣はさらに DMF・水混液 30ml を加えて同様に操作、抽出した後、ろ液を合せ、DMF・水混液で一定量として、HPLC で測定した。HPLC の測定条件は表 1 に示した。

### 基礎飼料 (CE-2) の計量

試験物資 (試験物質を含むプレミックス) との混合  
 毎分 28~34 回転のミキサーで約 15 分間  
 成 型 直径 1.2cm, 長さ 2cm, 重量 3g 前後  
 2~3 秒間蒸気を加えローラーで加圧して  
 カットする (加圧押し出し式)  
 乾燥・冷却  
 100° で約 1 時間乾燥後、送風冷却機で常温  
 まで冷却する。  
 梱包・出荷

図 1. 試験物質添加飼料の製造工程

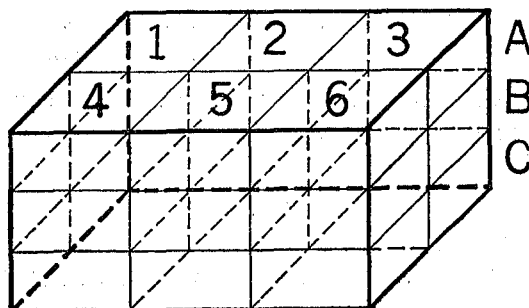


図 2. 試料のサンプリング部位

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表 1. HPLC による OPP, OPP-Na および TBZ の分析条件

|     | OPP/OPP-Na                      | TBZ                                                  |
|-----|---------------------------------|------------------------------------------------------|
| カラム | Wakogel LC•ODS-10H<br>4.6×250mm | ZORBAX TMS<br>4.6×300mm                              |
| 移動相 | メタノール 70<br>水 30                | メタノール 45<br>0.01M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 55 |
| 流速  | 1ml/min                         | 1.2ml/min                                            |
| 検出器 | 254nm                           | 300nm                                                |
| 注入量 | 10 $\mu$ l                      | 10 $\mu$ l                                           |
| 装置  | 島津製作所 LC-3A                     |                                                      |

表 2. ペレット飼料中の OPP, OPP-Na および TBZ の分析結果 (%)

|         | OPP<br>(1.25%) | OPP-Na<br>(1.0%) | TBZ<br>(0.2%) |
|---------|----------------|------------------|---------------|
| A1      | 1.25           | 1.01             | 0.21          |
| A2      | 1.24           | 0.96             | 0.22          |
| A3      | 1.22           | 0.93             | 0.21          |
| A4      | 1.23           | 0.98             | 0.24          |
| A5      | 1.27           | 0.95             | 0.20          |
| A6      | 1.25           | 1.04             | 0.20          |
| B1      | 1.21           | 1.00             | 0.19          |
| B2      | 1.25           | 1.00             | 0.19          |
| B3      | 1.25           | 1.01             | 0.21          |
| B4      | 1.20           | 0.98             | 0.18          |
| B5      | 1.24           | 1.02             | 0.20          |
| B6      | 1.26           | 1.02             | 0.20          |
| C1      | 1.25           | 1.01             | 0.21          |
| C2      | 1.22           | 0.97             | 0.21          |
| C3      | 1.30           | 1.00             | 0.20          |
| C4      | 1.25           | 1.02             | 0.17          |
| C5      | 1.24           | 1.01             | 0.19          |
| C6      | 1.23           | 0.99             | 0.23          |
| 平均値±SD  | 1.24±0.02      | 0.99±0.03        | 0.20±0.01     |
| 変動係数(%) | 1.8            | 2.8              | 5.8           |

## 結果と考察

## TBZ の分析法の検討

抽出溶媒：柑きつ類からの TBZ の抽出によく用いられる酢酸エチル、TBZ の溶解度が大きい DMF および DMF・水混液 (1:1) のそれぞれの溶媒について抽出率を検討したところ、酢酸エチルで30.0%, DMF で51.7%, DMF・水混液で98.8%を示した。

HPLC-カラム:Wakogel LC•ODSとZORBAX TMS

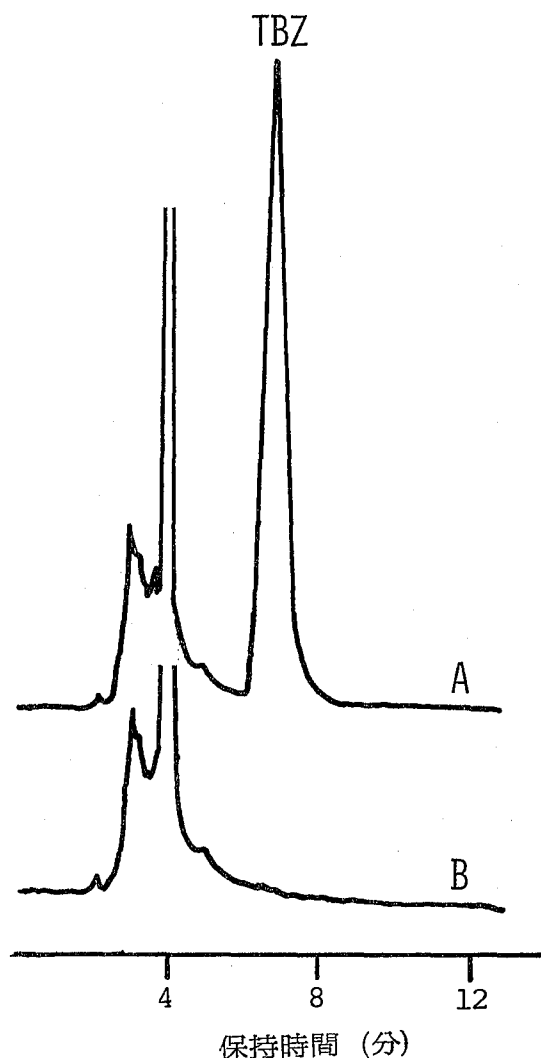


図 3. TBZ 添加飼料より抽出した TBZ の HPLC クロマトグラム

A : TBZ 添加飼料 (TBZ 0.4 $\mu$ g)  
B : CE-2 飼料

を比較検討したところ、Wakogel LC•ODS はテーリングを示し、ZORBAX TMS は図3に示したように、妨害ピーク、テーリングともに認められず、感度も良好であった。

検量線：10, 20, 30, 40, 50 $\mu$ g/ml となるように TBZ を DMF・水混液に溶かして標準系列をつくり、各溶液 10 $\mu$ l を表1の測定条件に従って操作し、検量線を作成したところ、図4に示したとおり良好な直線性を示した。

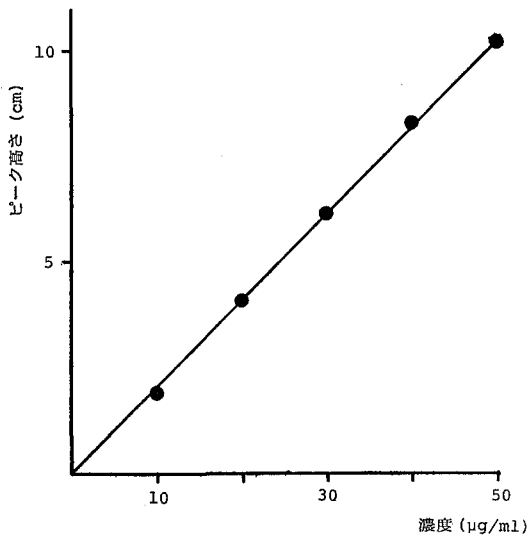


図 4. TBZ の HPLC 分析による検量線

添加回収実験：CE-2 の粉末 10g に TBZ 10, 20, 40 mg を添加し、前述の分析方法に従って回収実験を行ったところ、回収率は98～100%と良好な結果が得られた。

以上のような結果から、TBZ の分析法は DMF・水混液 (1:1) を抽出溶媒とし、測定には HPLC (カラム・ZORBAX TMS) を用いることとした。この方法は

Szalkowski<sup>2)</sup> や Jeffus<sup>3)</sup> が報告した操作の複雑な比色法に比べて簡便で、飼料中の TBZ の分析法として充分に適用できるものと思われる。

#### 試料の分析結果

添加飼料中の OPP, OPP-Na および TBZ の分析結果を表 2 に示した。OPP は 1.25% の添加に対し、平均 1.24%, OPP-Na は 1.0% に対して 0.99%, TBZ は 0.2% に対して 0.20% であった。また各ペレット間の添加物質の分析値の変動係数は OPP で 1.8%, OPP-Na で 2.8%, TBZ で 5.8% と、添加濃度が低くなるにしたがってやや大きくなるものの非常に良好な結果を示した。特に試験物質の飼料への添加濃度が 1% 以下になると、図 1 に示した工程の混合操作のみでは均一に飼料に混合することはむずかしい<sup>4)</sup> ため、低濃度の添加飼料を作製する際は、じゅうぶんな注意が必要である。

**謝辞** 本研究にあたり、HPLC 分析に御助言いただきました(社)日本食品衛生協会の二宮隆博氏に感謝の意を表します。

#### 文 献

- 1) 溝入 茂, 広門雅子, 中島和雄, 中嶋 巖, 遠藤英美: 東京衛研年報, 32-2, 28, 1981
- 2) Szalkowski, C.R.: JAOAC., 49, 312, 1966
- 3) Jeffus, M.T.: JAOAC., 54, 1003, 1971
- 4) 岩田健治: 私信



他 誌 発 表

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1981. 7—1982. 6)

## 農産物および加工食品中の臭素含有量

上村 尚, 西島基弘, 永山敏廣, 安田和男, 斉藤和夫, 井部明広, 牛山博文, 渡辺美智子, 直井家壽太: 食品衛生学雑誌, 22(6), 539, 1981

## Fusarium 属の産生するマイコトキシンの同時分析法

上村 尚: マイコトキシン, 13, 27, 1981

## 市販コーンフラワーにおける Aflatoxin 及び Citrinin 汚染について

中里光男, 冠 政光, 中沢久美子, 菊地洋子, 藤沼賢司, 斉藤和夫, 西島基弘, 直井家壽太, 一言 広, 諸角聖, 和字慶朝昭, 坂井千三: 食衛誌, 23(1), 59, 1982

## 香辛料中のエトキシキン分析法

藤沼賢司, 冠 政光, 中沢久美子, 中里光男, 有賀孝成, 直井家壽太: 食衛誌, 23(1), 67, 1982

## パン中の臭素酸分析法

永山敏廣, 西島基弘, 上村 尚, 安田和男, 斉藤和夫, 井部明広, 牛山博文, 直井家壽太: 食品衛生学雑誌, 23(3), 253, 1982

## Strain Differences in Butylated Hydroxytoluene-Induced Peaths in Male Mice

S. Kawano, T. Nakao and K. Hiraga: Toxicol. Appl. Pharmacol., 61, 475, 1981

## Thermal Decomposition Rate Constant of Peroxybenzoyl Nitrate in the Gas Phase

T. Ohta and I. Mizoguchi: Environ. Sci. Technol., 15, 1229, 1981

## Lead Pollution in Tokyo-The Pigeon Reflects Its Amelioration

Gen Ohi, Hironobu Seki, Keiko Minowa, Masanobu Ohsawa, Isao Mizoguchi and Fumio Sugimori: Environmental Research, 26(1), 125-129, 1981

## Gas-Phase Chlorine-Initiated Photooxidation of Methanol and Isopropanol

T. Ohta, H. Bandoh and H. Akimoto: Int. J. Chemical Kinetics, 14, 173, 1982

## 食品取扱いの者のサルモネラ保菌状況 (1978~1980夏期の調査成績)

楠 淳, 西條頼広, 松本昌雄: 感染症学会雑誌, 56(4), 349, 1982

## Haemorrhagic Toxicosis in Rats Given Butylated Hydroxytoluene

O. Takahashi and K. Hiraga: Acta pharmacol. et toxicol., 49(1), 14, 1981

## Inhibition of Phylloquinone Epoxide-Dependent Carboxylation of Microsomal Proteins from Rat Liver by 2, 6-Di-tert-butyl-4-methylene-2, 5-cyclohexadienone

O. Takahashi and K. Hiraga: Fd Cosmet. Toxicol., 19(6), 701, 1981

## Effect of Butylated Hydroxytoluene on the Lipid Composition of Rat Liver

O. Takahashi and K. Hiraga: Toxicology, 22(2), 161, 1981

On the Mechanism of Binding of  $^{14}\text{C}$ -Labeled Butylated Hydroxytoluene to Ribonucleic Acid *in Vivo*

Yoshio Nakagawa, Kogo Hiraga and Tetsuya Suga: Biochem. Pharmacol., 30, 3132, 1981

## Effects of Butylated Hydroxytoluene (BHT) on the Level of Glutathione and the Activity of Glutathione-S-transferase in Rat Liver

Yoshio Nakagawa, Kogo Hiraga and Tetsuya Suga: J. Pharm. Dyn., 4, 823, 1981

## Constancy of cell volume during shape change of erythrocytes induced by increasing ATP content

Makoto Nakao, Kumiko Hoshino and Toshiko Nakao: Journal of Bienergetics and Biomembrane, 13, 5/6, 1981

## Further investigation on ATP metabolism and cell membrane integrity

M. Nakao, T. Nakao, T. Nakayama and M. Dogen: Acta biol. med. germ., BAND 40, Site 10003,

1981

**Posttransfusion Viability of Rabbit ERYTHROCYTES Preserved in a Medium Containing Inosine, Adenine, and Isoosmotic Sucrose**

Toshiko Nakao, Fumiko Nagai and Makoto Nakao: Vox Sang. 42, 217, 1982.

**Induction of Tumours of the Urinary System in F344 Rats by Dietary Administration of Sodium o-Phenylphenate**

K. Hiraga and T. Fujii: Food and Cosmetic Toxicology, 19(3), 303, 1981.

**総説・解説**

**グループ F (EF-6) ビブリオの細菌学及びその下痢症について**

工藤泰雄, 津野正朗: モダンメディア, 27(7), 348, 1981

**輸入感染性下痢症の問題**

大橋 誠: 検疫衛生情報, 第1号, 16, 1982

**簡易・迅速なブドウ球菌エンテロトキシンの検出法**

五十嵐英夫, 新垣正夫: メディヤサークル, 27(2), 72, 1982

**スパイラル・プレーティング・システムによる細菌数測定について**

五十嵐英夫: メディヤサークル, 27(2), 98, 1982

**食品衛生微生物研究会 第2回学術講演会 シンポジウム C 「食品のカビ汚染を考える」を顧みて**

一言 広: メディヤサークル, 27(3), 176, 1982

**パップ剤の品質管理**

風間成孔: 日本病院薬剤師会誌, 18(2), 125, 1982

**有機塩素系化合物の魚介類への汚染 (特に CNP と Chlordane を中心に)**

山岸達典: 生態化学, 4(2), 11, 1981

**人畜共通伝染病としてのエルシニア症**

丸山 務: 日本獣医師会雑誌, 35(1), 1, 1982

**どこまでのゴミを捕えられるか. 家庭用クリーナの捕集性の実験**

佐藤泰仁: ビルメンテナンス, 17(6), 30, 1982

**ICP-AES の適用の現状と将来への展望—医学, 生物学**

二島太郎: 日本分光学会 (17回夏期セミナー), 60, 1981

**コレラ菌由来伝達性 R プラスミド**

加納堯子: 発酵と工業 (アミノ酸, 核酸特集), 40(4), 4, 1982

**ペニシリン耐性りん菌の出現**

加納堯子: 化学と生物, 20(6), 350, 1982

**水道水中のトリハロメタン**

笹野英雄, 西垣 進: 都薬雑誌, 3(5), 19, 1981

**水に関する法規 (基準) について**

笹野英雄: フレグランスジャーナル, 51, 19, 1981

**飲料水の安全性 (I)**

三村秀一: 都薬雑誌, 3(6), 11, 1981

**飲料水の安全性 (II)**

三村秀一: 都薬雑誌, 3(7), 19, 1981

**水とにおい**

松本淳彦: 自然科学と博物館, 49(2), 31, 1982

**著 書**

**Outlining the inception and progress of SEAMIC Data Exchange Project and the proposition of reference laboratories for a more effective implementation**

Makoto Ohashi: In Gastrointestinal Infections in Southeast Asia (IV), Proceedings of the 8th SEAMIC Seminar, p.152, SEAMIC/IMFJ, Tokyo, 1982

**Current status of gastrointestinal infections in**

**Japan**

Yasuo Kudoh and Makoto Ohashi: In Gastrointestinal Infections in Southeast Asia (IV), Proceedings of the 8th SEAMIC Seminar, p.15, SEAMIC/IMFJ, Tokyo, 1982

**Laboratory diagnosis and epidemiological survey of enterotoxigenic *Escherichia coli* enteritis**

Yasuo Kudoh: In Gastrointestinal Infections in Southeast Asia (IV), Proceedings of the 8th SEAMIC Seminar, p.87, SEAMIC/IMFJ, Tokyo, 1982

***Campylobacter* enteritis**

Makoto Ohashi: In Gastrointestinal Infections in Southeast Asia (IV), Proceedings of the 8th SEAMIC Seminar, p.111, SEAMIC/IMFJ, Tokyo, 1982

**Blood Clotting-Staphylocoagulase**

Morita, T., Igarashi, H. and Iwanaga, S. : In Lorand, L. (ed), Methods in enzymology, 80, 311, 1982, Academic Press Inc., New York, U.S.A.

**環境汚染物質とモニタリング**

山岸達典：公害保健講演集（衛生局医療福祉部公害保健課），1981

**地震時における地下水の水質変化に関する調査研究（その2）**

樋口育子，坂本朋子，中川順一，西垣 進，三村秀一：東京都防災会議（東京都総務局災害対策部企画課），1982

# 学 会 发 表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1981. 7—1982. 6)

伊藤 武, 甲斐明美, 高橋正樹, 斎藤香彦, 柳川義勢  
稲葉美佐子, 坂井千三, 大橋 誠: *Campylobacter jejuni/coli* の菌体脂肪酸組成および DNA-GC 含量について

第55回日本細菌学会総会 (1982. 4)

大橋 誠, 寺山 武, 潮田 弘, 工藤泰雄, 津野正朗  
松下 秀, 太田建爾, 坂井千三, Orasa Suthieukul: コ  
レラ菌の溶原性に関する研究

第55回日本細菌学会総会 (1982. 4)

山田澄夫, 津野正朗, 松下 秀, 太田建爾, 工藤泰雄  
坂井千三, 大橋 誠: 東京都における輸入感染性腸炎の  
細菌学的検討 (1978~1981)—その1 病原菌の検出状況

第56回日本感染症学会総会 (1982. 4)

松下 秀, 山田澄夫, 津野正朗, 太田建爾, 工藤泰雄  
坂井千三, 大橋 誠: 近年分離されたヒト由来 *V. chol-*  
*erae* の薬剤耐性

第56回日本感染症学会総会 (1982. 4)

工藤泰雄, 山田澄夫, 松下 秀, 津野正朗, 太田建爾  
坂井千三, 大橋 誠: 東京都における輸入感染性腸炎の  
細菌学的検討 (1978~1981)—その2 検出病原菌の特徴

第56回日本感染症学会総会 (1982. 4)

潮田 弘, 辻明良, 小川正俊, 五島瑳智子, 柴田 実  
寺山 武, 坂井千三, 大久保暢夫, 深見トシエ: 尿路感  
染症および健康人尿由来コアグラゼ陰性ブドウ球菌の  
生化学的性状, 薬剤感受性ならびにファージ感受性

第55回日本感染症学会総会 (1982. 4)

太田建爾, 松下 秀, 津野正朗, 関根整治, 藪内 清  
山田澄夫, 工藤泰雄, 坂井千三, 大橋 誠: タイ国チャ  
ンタブリ県における下痢症の病原について (1980年の調  
査成績)

第56回日本感染症学会総会 (1982. 4)

斎藤香彦, 伊藤 武, 柳川義勢, 高橋正樹, 高野伊知  
郎, 稲葉美佐子, 甲斐明美, 坂井千三, 大橋 誠, 佐久  
一枝, 佐藤磨人, 鴻巣晶子, 深見トシエ, 入野泰一:  
*Campylobacter jejuni* の血清型別および下痢症患者由  
来株の血清型別状況

第56回日本感染症学会総会 (1982. 4)

伊藤 武, 柳川義勢, 斎藤香彦, 稲葉美佐子, 甲斐明  
美, 高橋正樹, 坂井千三, 大橋 誠: *Campylobacter jejuni/coli* の病原性に関する研究 —マウス, ラットお  
よびヒヨコに対する感染実験—

第56回日本感染症学会総会 (1982. 4)

高橋正樹, 斎藤香彦, 柳川義勢, 伊藤 武, 坂井千三  
大橋 誠: 各種材料からの *Campylobacter jejuni/coli*  
検出のための増菌培地の検討

第56回日本感染症学会総会 (1982. 4)

諸角 聖, 一言 広, 和宇慶朝昭, 坂井千三: 真菌の  
発育および毒素産生に及ぼす各種食品保存料の阻害効果

第43回日本食品衛生学会 (1982. 5)

石山和敏, 市瀬正之, 天野祐次, 小野川尊, 平石 浩  
寺山 武: 都内健康者から分離された *Salmonella* とそ  
の陽性者から分離した *Enterobacteriaceae* の抗生剤  
感受性および R plasmid 相互関係の検討

第30回日本感染症学会東日本地方会総会 (1981. 10)

柴田 実, 飯塚純子, 安部昭子, 大久保暢夫, 寺山武  
大橋 誠, 林 隼, 小泉 修, 山口 剛: 都内小児にお  
けるジフテリアおよび百日咳抗体分布

第67回東京都衛生局学会 (1981. 10)

田中 寛, 松田 肇, 林 良博, Nosenäs, J. S., Blas,  
B. L., 石下真道, 神谷晴夫, 村田以和夫: レイテ島ガ  
ミ地区における日本住血吸虫年間罹患率による対策の評  
価

第51回日本寄生虫学会大会 (1982. 4)

柏木義勝, 近藤治美, 大久保暢夫, 寺山 武: 1980~  
1981年分離A群溶連菌の薬剤感受性と菌型について

第56回日本感染症学会総会 (1982. 4)

田口文章, 梶岡実雄, 宮村達男, 岩崎謙二, 矢野一好  
吉田靖子: JCウイルスの血清疫学

第29回日本ウイルス学会総会 (1981. 10)

岩崎謙二, 藪内 清, 吉田靖子, 関根整治: 東京都下  
飼育ブタ間の日脳ウイルス感染調査

第46回麻布獣医学会 (1981. 11)

岩崎謙二: 都市における日本脳炎の流行予測

第14回日本都市医学会総会 (1981. 11)

矢野一好, 林 志直, 柴田タツ美, 蔽内 清, 岩崎謙二: 下水汚泥からのウイルス溶出処理による腸管系ウイルスの検出—ホウ酸緩衝液およびビーフェキスの効果—  
第56回日本感染症学会総会 (1982. 4)

林 志直, 矢野一好, 柴田タツ美, 蔽内 清, 岩崎謙二, 浦野純子, 河野弘子, 渡辺悌吉: 東京都内の急性呼吸器疾患児および下水からのウイルス検索 (1981年)  
第56回日本感染症学会総会 (1982. 4)

関根整治, 山田澄夫, 矢野一好, 蔽内 清, 工藤泰雄, 坂井千三, 大橋 誠: 東京都内における急性胃腸炎患児のウイルス学的細菌学的検索成績  
第56回日本感染症学会総会 (1982. 4)

岩崎謙二, 吉田靖子, 関根整治, 福山正文, 上村知雄: 東京および近郊住民の日脳ウイルス抗体保有調査  
第56回日本感染症学会総会 (1982. 4)

吉田靖子, 関根整治, 蔽内 清, 岩崎謙二: 日脳流行の予測に関する研究  
第56回日本感染症学会総会 (1982. 4)

奥本千代美, 長嶋真知子, 寺島 潔, 萩原輝彦, 吉原武俊, 秋山和幸: 繊維製品のホルムアルデヒド移染調査  
第18回全国衛生化学技術協会 (1981. 10)

秋山和幸, 長嶋真知子, 奥本千代美, 寺島 潔, 萩原輝彦: メッキ廃水中のシアンの微量拡散, 電極法によるスクリーニング  
第18回全国衛生化学技術協議会 (1981. 10)

安田一郎, 瀬戸隆子, 秋山和幸: 市場品生薬の品質—甘草, 山椒, 細辛—  
第18回全国衛生化学技術協議会 (1981. 10)

安田一郎, 竹谷孝一, 糸川秀治: 辛味成分による市場品細辛の品質評価  
日本生薬学会第28回年会 (1981. 10)

瀬戸隆子, 岩崎由美子, 安田一郎, 奥澤昌子, 下平彰男: 市販桃核承気湯製剤中のセンノサイドAの定量  
第67回東京都衛生局学会 (1981. 11)

宇佐美博幸, 下平彰男: In Vitro におけるパイロジエン (エンドトキシン) の微量測定法について

第67回東京都衛生局学会 (1981. 11)

上原眞一, 宮武ノリエ, 重岡捨身, 風間成孔, 秋山和幸: 市販軟膏及び坐剤中のプレドニゾロンの安定性について

日本薬学会第102年会 (1982. 4)

萩原輝彦, 寺島 潔, 奥本千代美, 長嶋真知子, 秋山和幸: 高速液体クロマトグラフィーによる羊毛繊維中のDTTBの定量法

日本薬学会第102年会 (1982. 4)

安田一郎, 秋山和幸, 竹谷孝一, 糸川秀治, 森 式能, 鈴木幸子, 小林正夫, 田中孝治: 辛味性不飽和脂肪酸アミドによるサンショウ属植物のケモタキソノミー  
日本薬学会第102年会 (1982. 4)

宇佐美博幸, 秋山和幸: パイロジェン (LPS) の微量測定 合成基質-HPLC 法  
日本薬学会102年会 (1982. 4)

寺島 潔, 萩原輝彦, 奥本千代美, 長嶋真知子, 吉原武俊, 秋山和幸: 市販羊毛製品中の有機塩素系防虫剤の定量  
第68回東京都衛生局学会 (1982. 5)

高橋美佐子, 中山京子, 岩崎由美子, 秋山和幸: 非ピリン系かぜ薬のガスクロマトグラフィーによる定量法  
第68回東京都衛生局学会 (1982. 5)

竹内正博, 水石和子, 吉原武俊, 原田裕文: ECD-GCによる化粧品中のN-ニトロソジェタノールアミンの分析  
第30回日本分析化学会 (1981. 10)

江波戸舉秀, 神谷信行, 二島太一郎: 毛髪中元素の魚介類多食者と対照者の比較  
第40回日本公衆衛生学会 (1981. 10)

舘 照雄, 伊藤弘一, 中村義昭, 鎌田国広, 吉原武俊, 原田裕文: 化粧品中の特殊成分試験法の設定に関する研究 (XI) GC-MS 法による酢酸 dl- $\alpha$ -トコフェロールの分離定量

日本薬学会第102年会 (1982. 4)

鎌田国広, 伊藤弘一, 中村義昭, 舘 照雄, 吉原武俊

原田裕文：化粧品中の特殊成分試験法の設定に関する研究 (XII) HPLC による副腎皮質ホルモンの分離定量  
日本薬学会第102年会 (1982. 4)

Yataro Kokubo: Problems on the assessment of sanitary quality of cured and smoked pork hams  
The 8th International Symposium of the World Association of Veterinary Food Hygienists (1981. 8, Ireland)

神保勝彦, 小久保彌太郎, 村上 一, 山田 満：粉乳中の *Bacillus* 属の検出  
第42回日本食品衛生学会 (1981. 11)

小久保彌太郎, 神保勝彦, 村上文子, 村上 一：砂糖, でん粉, 香辛料などの芽胞菌による汚染実態調査  
第42回日本食品衛生学会 (1981. 11)

庭山邦子, 村上 一, 篠原 楷, 山岸 宏, 加藤喜市, 田村延一：鶏卵および卵製品から分離した黄色ブドウ球菌の性状について  
第67回東京都衛生局学会 (1981. 11)

庭山邦子：*Bacillus cereus* のうち L 抗原産生株について  
第102年会日本薬学会 (1982. 4)

丸山 務, 神崎政子, 村上 一：*Pasteurella multocida* の選択的分離法について  
第93回日本獣医学会 (1982. 4)

宇佐見俊彦, 丸山 務, 神崎政子, 村上 一：人畜共通伝染病に関する研究 (I), ネコにおける *P. multocida* の保菌実態  
第93回日本獣医学会 (1982. 4)

庭山邦子, 村上 一, 篠原楷, 加藤喜市, 田村延一：国内産冷凍液卵より分離した黄色ブドウ球菌の性状について  
第68回東京都衛生局学会 (1982. 5)

宮崎奉之, 堀井昭三, 金子誠二, 山岸達典：Technical Chlordane より分離した  $C_{10}$  化合物について  
第43回日本食品衛生学会 (1982. 5)

小関正道, 田村行弘, 真木俊夫, 舘 公子, 直井家壽

太：農産物中の残留農薬実態調査  
第7回日本農薬学会 (1982. 3)

永山敏廣, 西島基弘, 安田和男, 斉藤和夫, 上村 尚, 井部明広, 牛山博文, 渡辺美智子, 直井家壽太：食品中の安息香酸含有量および前駆物質について  
第43回日本食品衛生学会 (1982. 5)

上村 尚, 西島基弘, 安田和男, 斉藤和夫, 井部明広, 永山敏廣, 牛山博文, 直井家壽太：食品中のマイコトキシンに関する研究 (第27報) *Rhizopus* sp. による *Zearalenone* の新代謝物への変換およびその化学構造について  
第43回日本食品衛生学会 (1982. 5)

斉藤和夫, 西島基弘, 安田和男, 上村 尚, 井部明広, 永山敏廣, 牛山博文, 直井家壽太：食品中のマイコトキシンに関する研究-XXV 穀類, 種実類中のアフラトキシン及びその関連化合物の汚染調査  
第43回日本食品衛生学会 (1982. 5)

井部明広, 西島基弘, 安田和夫, 斉藤和夫, 上村 尚, 永山敏廣, 牛山博文, 直井家壽太：食品中のマイコトキシンに関する研究-XXVI オクラトキシン分析法および汚染調査  
第43回日本食品衛生学会 (1982. 5)

Shuzo Ogino, Tetsuko Yasuno, Ayako Ono, Toshiko Ohata, Fusayoshi Endo and Koshi Haraguchi: Separation and Determination of Condensed Phosphates by HPLC-ICP-AES

9th International Conference on Atomic Spectroscopy and XXII Colloquium Spectroscopicum Internationale (1981. 9)

牛尾房雄, 大石真之, 船山恵市, 道口正雄：PCTの体内変化  
第40回日本公衆衛生学会 (1981. 10)

牛尾房雄, 船山恵市, 西田甲子, 関 博磨, 道口正雄, 坂上正人：スナック菓子類の栄養学的考察  
第68回東京都衛生局学会 (1982. 5)

Taichiro Nishima, Kiyohide Ebato, Shuzo Ogino, Nobuyuki Kamiya, Junichi Nakagawa, Hiroshi



Yagyu and Koushi Caraguchi: **Study on Interference and Concentration of Elements in Human Blood by ICP-AES**

9th International Conference on Atomic Spectroscopy (1981. 9)

畑野逸与, 江波戸舉秀, 塩原正一, 佐藤林正, 今堀彰  
福島一郎, 二島太一郎: 高校生の頭髮中 Cd, Pb, Cr お  
よび Mg 濃度の地域差

第40回日本公衆衛生学会 (1981. 10)

寺田伸枝, 鈴木孝人, 大沢誠喜, 福田雅夫, 狩野文雄  
笠原利英, 溝口 勲, 河合清之: 二酸化窒素長期暴露ラ  
ットに及ぼす病理組織学的影響

第22回大気汚染学会 (1981. 10)

鈴木孝人, 大沢誠喜, 狩野文雄, 福田雅夫, 笠原利英  
寺田伸枝, 溝口 勲: 二酸化窒素長期暴露ラットに及ぼ  
す生化学的影響

第22回大気汚染学会 (1981. 10)

瀬戸 博, 奥田泰資, 武末知行, 池村 紘: ヌクレオ  
シド類の負イオン化学イオン化マスペクトル

日本化学会 (1981. 10)

牧野国義, 溝口 勲: 東京都における4年間の呼吸器  
症状調査における2, 3の特徴

第22回大気汚染学会 (1981. 10)

太田与洋, 坂東 博, 秋元 肇: NO<sub>x</sub> 共存下でのメ  
タノール, イソプロパノールの光酸化反応

第22回大気汚染学会 (1981. 10)

太田与洋, 溝口 勲: Co の塩素原子による触媒酸化  
反応

第22回大気汚染学会 (1981. 10)

太田与洋, 坂東 博, 秋元 肇: メタノール・イソプ  
ロパノールラジカルと酸素分子との反応

第16回高速反応討論会 (1981. 12)

太田与洋, 溝口 勲: ペンタジェンとOHラジカルの  
反応

日本化学会第45春季年会 (1982. 4)

荒川泰昭, 山崎信行, 藤田俊一, 荻原和子, 二島太一  
郎: 有機スズ暴露による胸腺中金属の動態

第52回日本衛生学会 (1982. 4)

荻原和子, 千葉百子, 二島太一郎, 稲葉 裕, 菊池正  
一: Sn 投与ウサギにおける数種必須元素の動態

第52回日本衛生学会 (1982. 4)

T. Ohta and I. Mizoguchi: **Reactivity of C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>  
diolefins for OH addition reactions**

International Symposium on Chemical Kinetics Re-  
lated to Atmospheric Chemistry (1982. 6)

川野澄江, 中尾順子, 平賀興吾: ジブチルヒドロキシ  
トルエン (BHT) による肺障害, 致死作用とマウスの系  
統

第8回日本毒科学会 (1982. 6)

渡辺真利代, 大石真之: 藍藻 *Microcystis aeruginosa*  
の毒物質

昭和56年度日本水産学会秋季大会 (1981. 10)

土屋悦輝, 松本淳彦, 岡本敏彦: 水生微生物が水域環  
境に及ぼす影響 —かび臭発生物質を中心として—

第8回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウ  
ム (1981. 10)

高橋保雄, 藤田 博, 関比呂伸, 土屋悦輝, 三村秀一  
森田昌敏, 大井 玄: 水道水中の中性有機物質における  
Capillary column GC-MS, 突然変異誘起試験及び致死  
毒性試験

第40回日本公衆衛生学会 (1981. 10)

松本淳彦, 土屋悦輝: 藻類とトリハロメタン

第18回日本水処理生物学会 (1981. 11)

岡本 寛, 土屋悦輝, 竹下隆三: 水中の含窒素縮合芳  
香族炭化水素 (Azaarenes) の分析法

第102回日本薬学会 (1982. 4)

渡辺真利代, 大石真之: 藍藻の毒

昭和57年度日本水産学会春季大会 (1982. 4)

大橋則雄, 矢口久美子, 関山 登, 藤沢正吉, 松本昌  
雄: GC-FID 法による井水中の塩素化炭化水素の分析  
第40回日本公衆衛生学会総会 (1981. 10)

平田恵子, 荻原勉, 天川映子, 大西和夫, 松本昌雄:

## 「カニ風かまぼこ」中の天然色素の検出

第42回日本食品衛生学会 (1981. 11)

O. Takahashi and K. Hiraga: **Hemorrhagic Toxicosis Rats Given Butylated Hydroxytoluene**

Eighth International Congress of Pharmacology (1981. 7)

Oishi Shinshi and Hiraga Kogo: **Distribution and excretion of di-2-ethylhexyl phthalate in the rat**

8th International Congress of Pharmacology (1981. 7)

Makoto Nakao, Toshiko Nakao, Tomoko Oono, Yoshihiro Fukushima, Yukichi Hara and Masako Arai: **High performance Gel Chromatography of Horse Kidney Na, K-ATPase**

Third International Congress on Na, K-ATPase (1981. 8, Yale Univ. USA)

## 中尾順子, 大槻慶子, 樺島順一郎, 平賀興吾: 長期間投与による OPP の代謝

第54回日本生化学会大会 (1981. 9)

## 中川敦子, 樺島順一郎, 中尾順子: OPP 長期投与ラットにおける cyclic nucleotide と adenylate cyclase 活性の変化

第54回日本生化学会大会 (1981. 9)

## 長井二三子, 樺島順一郎, 中尾順子: OPP-Na 長期投与ラットの尿中および臓器中酵素活性の変動

第54回日本生化学会大会 (1981. 9)

中尾順子, 大野知子, 荒居正子, 中尾真, 神部芳則: **Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase の活性最小単位**

第54回日本生化学会大会 (1981. 9)

## 市川久次, 小林博義, 中尾順子, 中川茂男: 幼若ラットの CPC 高張瞬時溶血についての検討

第54回日本生化学会大会 (1981. 9)

N. Kananishi, Y. Kinjo and M. Watanabe: **Alkaline elution assay coupled with microfluorometry and electron microscopy in the condensed or extended chromatin**

Third International Conference on Environmental Mutagens (1981. 9, Tokyo)

## 金西信次, 金城康人, 渡部 真, 代谷次夫: 細胞性細菌の放射線抵抗性 (IX) DNA 鎖切断と再結合のアルカリ溶出法による定量

日本放射線影響学会第24回大会 (1981. 9)

## 渡部 真, 金城康人, 金西信次: 染色体突然変異のレオロジー VIII, 高次構造の連続性とその非破壊検査法

日本放射線影響学会第24回大会 (1981. 9)

## 金城康人, 渡部 真, 金西信次: 照射クロマチンの解きほぐし電顕解析II, 照射クロマチン断片のメンブランフィルター流出分画による定量

日本放射線影響学会第24回大会 (1981. 9)

## 高橋 省, 平賀興吾: 四つのビスフェノール型酸化防止剤のラット肝臓脂質含量におよぼす影響

日本薬理学会第65回関東部会 (1981. 10)

## 大石真之, 平賀興吾: フタル酸モノエステル類のラット精巣萎縮作用

第55回日本薬理学会総会 (1982. 3)

## 高橋 省, 平賀興吾: ジブチルヒドロキシルエンのラット肝臓脂質組成におよぼす影響

第55回日本薬理学会総会 (1982. 3)

## 大石真之, 平賀興吾: フタル酸モノエステル類のラット血清脂質組成に与える影響

第66回日本薬理学会関東部会 (1982. 6)

## 高橋 省, 平賀興吾: ジブチルヒドロキシルエンのラット血小板および血漿脂質組成におよぼす影響

日本薬理学会第66回関東部会 (1982. 6)

## 小縣昭夫, 安藤 弘, 久保喜一, 高橋博, 平賀興吾: チアベンダゾール (TBZ) のマウスにおける催奇形性について

第21回日本先天異常学会総会 (1982. 7)

## 藤井 孝, 平賀興吾: オルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) によるラット尿路系臓器腫瘍の発生について

第40回日本癌学会総会 (1981. 10)

## 神谷信行, 坂本義光, 平賀興吾: クロム鉱さい粉じんのラットによる1か月間持続吸入実験——吸入終了後の粉じん成分金属の体内挙動——

日本薬学会第102年会 (1982. 4)

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

平 賀 興 吾 (委員長)

中 田 和 男

工 藤 泰 雄

藪 内 清

秋 山 和 幸

吉 原 武 俊

山 岸 達 典

道 口 正 雄

石 川 隆 章

西 垣 進

松 本 昌 雄

昭和57年12月6日 発行

規格表 第2類  
印刷番号(57)530  
刊行物番号(H)24

東京都立衛生研究所研究年報第33号

編 集 行 : 東京都立衛生研究所

〒160 東京都新宿区百人町3-24-1

電話 03(363)3231(代)

印刷所 : 大東印刷工業株式会社

〒131 東京都墨田区向島3-33-5

電話 03(625)7481(代)