ISSN 0082－4771
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

34

1983

長崎県
衛生公害研究所
昭58.12.17 衛
受付

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.

序

ここ数年来の世界的経済不況もやっと峠を越し，景気の回復も間もなく来ると期待されております．

東京都の赤字財政も，昨年は，黒字に転換し，一安心いたしました．これも都全体の一致協力のたまものと思います．鈴木都知事は二期目の発足にあたり，マイタウン東京構想を発表し，都民の期待に応える方向を示しました．行政はマイタウン構想の実現にむけて，新たな活路を得て，躍進するものと思います．

当研究所の研究も，基本的には，マイタウン建設にあたって，予想される衛生需要に応えるためのものであるべきであります．研究所の各部門では，先行的研究と称して，色々知恵をしぼり，創意工夫をねっております．

新しいマイタウン行政の中には，OA機器（オフィス・オートメイション）の取り組みが，情報公開業務にかけて取り込まれておりますが，OA機器は，一般社会では企業戦力となっており，OAなしでは企業活動も出来ないほどに，普及浸透しております．

当研究所にも，やっと中古のコンピューターが導入され，遅まきながら，データー処理や，業務改善に資したいと考えております．

それにしても，コンピューターの進歩発展は，すさまじいものがあります．当所にあります高額備品類も附属のコンピューター部分の発展のため，4・5年にして古くなってしまい，買い替えの時期が早くくるようです．市販のカメラも，自動露出は当然の機能であり，いまや自動焦点機能の時代になっておりますが，これもすべてコンピューター機能の組み込みによるものであります．

すべての業務には，経験が必要でありますが，試験検査業務には，特に経験と技術が欠くべからざるものでした．しかし，現在では，更に，最新の分析機器が欠くべからざるものになりました．経験と技術を持っていても，最新の機器を持っていなければ，他に遅れをとることは必然となってきております．幸い，当所の機器類は比較的新しく，おかげで先行的研究が出来ております．今後においても，機器類の新鮮さを維持するよう努力したいと考えております．

昭和51年地方衛生研究所設置要綱が改正され，それまでの調査研究・試験検査・研修指導の3業務に，公衆衛生情報の解析提供の業務が付加されましてから7年を経過しますが，当所では，第4の業務として東京都微生物検査情報（月報）を実現いたしましたが，組織・機能としては特に変革はございません．

なお，日本科学技術情報センター（JICST）のオンラインサービス（JOIS）により，迅速に必要な最新文献を手に入れることが出来るようになりました．これからの世の中では，情報・知識はすべての人に平等に提供されるようになっております．われわれ研究者にとって，必要なことは，知識・情報を如何に選択取り入れ，如何に解析判断するかという時代となってきております．

この年報に掲載されている論文も，出版して5ケ月もせずに世界の人達の目に止まる情報時代です．

さて，本書は，過去1年間の本所研究員の研究成果を集録したものであります．どうか，御一読いただき，忌憚のない御批判をいただければ幸いと存じます．

昭和58年12月

東京都立衛生研究所長　野　牛　　弘

生薬の品質評価に関する研究（第8報）
市場品紫根の品質
…… 安田　一郎，浜野　朋子，瀬戸　隆子，秋山　和幸…… 93

In vitro におけるパイロジエンの微量測定法に関する研究（第3報）
注射用蒸留水および生理食塩液中のパイロジェン（エンドトキシン）含量
…… 宇佐美博幸，秋山　和幸，正木　宏幸…… 98

ガスクロマトグラフィーによる化粧品中のグリコール類およびグリセリンの定量
…… 伊藤　弘一，観　　照雄，中村　義昭，鎌田　国広，吉原　武俊，原田　裕文……102

家庭用品の衛生化学的研究（第8報）
家庭用エアゾール製品中のトリクロロエチレンおよびテトラクロロエチレンの分析法について
…… 森　謙一郎，雨宮　　敬，鈴木　助治，吉原　武俊……107

家庭用品の衛生化学的研究（第9報）
繊維製品のホルムアルデヒド分析における妨害色素の活性炭素による除去について
…… 雨宮　　敬，森　謙一郎，鈴木　助治，吉原　武俊……111

家庭用品の衛生化学的研究（第10報）
布地染色用マーキングペン中のホルムアルデヒドについて
…… 鈴木　助治，雨宮　　敬，森　謙一郎，吉原　武俊……115

報文Ⅲ　食品等に関する調査研究

生カキが原因食品と推定された毒素原性大腸菌食中毒2事例の調査成績
…… 甲斐　明美，伊藤　　武，斎藤　香彦，柳川　義勢，稲葉美佐子，
高橋　正樹，松下　　秀，工藤　泰雄，坂井　千三，篠原　　楷……121

うずら卵を原因食品としたサルモネラ食中毒およびうずら卵における本菌の汚染状況
…… 伊藤　　武，高橋　正樹，斎藤　香彦，稲葉美佐子，甲斐　明美，
柳川　義勢，高野伊知郎，坂井　千三，篠原　　楷，田村　延一，
加藤　嘉市，土屋　伸久，木下　正彦，中嶋　　誠，高取　三郎，
田崎　達明……126

食品中の一般生菌数，大腸菌群および黄色ぶどう球菌数測定のための疎水性格子膜
フィルター法と従来法との比較
…… 伊藤　　武，斎藤　香彦，坂井　千三……132

東京都における水銀汚染の実態について（第10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……139

東京都における PCB 汚染の実態について（第11報）
食品中の PCB 含有量調査
…… 岸本　清子，水石　和子，竹内　正博，吉原　武俊……142

ゴミ製乳首中の第2級アミン由来の N-ニトロソアミン
…… 水石　和子，竹内　正博，吉原　武俊……146

蜂密中の残留サルファ剤検出法について
…… 竹葉　和江，神崎　政子，村上　文子，松本　昌雄……150

オイカワ（淡水魚）より同定した除草剤（Benthiocarb, CNP, Chlomethoxynil, Oxadiazon）について
…… 宮崎　奉之，山岸　達典，松本　昌雄……155

養殖魚中の残留サルファ剤簡易検出法について
…… 神崎　政子，竹葉　和江，村上　文子，丸山　　務，松本　昌雄……159

輸入発酵茶及びバナナ中の残留農薬調査
…… 永山　敏廣，田村　行弘，真木　俊夫，観　　公子，直井家壽太……165

化学物質及び自然毒による食中毒事件例（第1報）
——昭和55年～昭和57年——
…… 田村　行弘，真木　俊夫，観　　公子，永山　敏廣，直井家壽太……171

アルコール飲料中のアスベスト繊維の分析
…… 荻野　周三，小関　正道，安野　哲子，福森　信隆，伊東　昭子，遠藤　英美……178

ポリスチレン製容器包装の有機性添加剤の分析
…… 佐藤　憲一，渡辺　悠二，吉田　令子，遠藤　英美……185

市販天然調味料の品質に関する研究
…… 広門　雅子，中島　和雄，高橋　　巌，遠藤　英美，溝入　　茂……191

市販即席めん類の栄養学的考察
…… 船山　恵市，牛尾　房雄，西田　甲子，関　　博磨，道口　正雄……197

食品中の無機質に関する研究（第3報）
原子吸光法による鉄の定量について
…… 友松　俊夫，菊谷　典久，井口　正雄，道口　正雄……202

水調理による食品中ミネラルの溶出
…… 中川　順一，坂本　朋子，樋口　育子，西垣　　進，三村　秀一……206

食品中のEDTAの分析
…… 大石　充男，大西　和夫，坂井　千三……211

報文Ⅳ　生活環境に関する調査研究

大気中浮遊粉塵がトルエンの大気光化学反応におよぼす影響
…… 多田　宇宏，太田　与洋，狩野　文雄……217

一酸化炭素の塩素原子による触媒酸化反応
…… 太田　与洋，溝口　　勲……221

NO_2曝露ラットにおける酸性ムコ多糖類の生化学的及び組織化学的変化
…… 鈴木　孝人，寺田　伸枝，佐藤　　明，溝口　　勲……224

NO_2とO_3および野外環境への交互曝露のラットの肺に及ぼす影響
…… 寺田　伸枝，池田　真悟，福田　雅夫，大沢　誠喜，鈴木　孝人，溝口　　勲……237

東京における健康指標と大気汚染指標や社会指標との関連性の検討
（ノンパラメトリック法による解析）
…… 牧野　国義，溝口　　勲……247

フェノバルビタール誘導ラット，チトクローム P-450 精製標品を用いた再構成系における
2－アミノフルオレンの変異原活性化
…… 川野　澄江，中尾　順子，小嶋　昭江，鈴木　重任，鎌滝　哲也……255

東京湾産スズキに反映された環境汚染の現状
…… 瀬戸　　博，加納　堯子……260

クワガタツメダニによる虫咬症発症実験法
…… 吉川　翠，花岡　暉，山田百合子，箕形　崇史……264

殺ダニ試験（第2報）フェニトロチオン処理2ケ月後の殺ダニ紙のケナガコナダニに対する効力
…… 大野　正彦，吉川　翠……277

飲料用タンク水から検出された細菌類とその塩素，熱低抗性
…… 古畑　勝則，松本　淳彦……282

東京湾より採取した植物プランクトンと貝における生理活性物質の検索
…… 平野　幸枝，渡辺真利代，大石　真之，土屋　悦輝，西垣　進……290

水の華からの有毒 *Microcystis aeruginosa* の分離
…… 渡辺真利代，大石　真之……294

報文V　毒性に関する調査研究

オルトフェニルフェノールナトリウム（OPP–Na）投与量における代謝の相違
…… 牛山　慶子，樺島順一郎，中尾　順子……297

オルトフェニルフェノール（OPP）の生体内運命（続）
経口投与によるラット膀胱への分布，排泄
…… 市川　久次，小林　博義，中尾　順子……299

経口投与によるオルトフェニルフェノールナトリウム（OPP–Na）のラット乳汁への排泄の
可能性についての検討
…… 小林　博義，中尾　順子……302

飼料中オルトフェニルフェノールナトリウム（OPP–Na）濃度とラット肝および
腎中各種酵素活性の変動
…… 長井二三子，中尾　順子……305

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3報）
…… 樺島順一郎，市川　久次，中尾　順子……309

オルトフェニルフェノール（OPP）の *in vitro* での S–9 mix による代謝活性化と
染色体への作用発現との関連
…… 田山寿美子，神谷　信行，中尾　順子，平賀　興吾……312

オルトフェニルフェノールナトリウム（OPP–Na）の宿主経由試験
…… 藤田　博，小嶋　昭江，平賀　興吾……315

オルトフェニルフェノール（OPP）の微生物系における突然変異誘起性について
…… 小嶋　昭江，藤田　博，平賀　興吾……319

オルトフェニルフェノール（OPP）のマウスを用いた急性経口毒性試験
…… 田山　邦昭，井口　重孝，佐々木美枝子，平賀　興吾……325

オルトフェニルフェノールナトリウム（OPP–Na）によるラット肝細胞の微細構造変化
…… 福森　信隆，佐々木美枝子，平賀　興吾……329

妊娠マウスにおけるチアベンダゾール（TBZ）の吸収・分布・排泄及び胎盤通過：懸濁
媒体による違いについて
…… 米山　允子，小縣　昭夫，藤井　孝，三栗谷久敏，矢野　範男，
高橋　博，湯沢　勝広，安藤　弘，久保　喜一，長沢　明道，
中尾　順子，平賀　興吾……337

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異なった飼料で飼育された
Jcl：ICR マウスでの比較
…… 安藤　弘，久保　喜一，小縣　昭夫，佐々木美枝子，平賀　興吾……343

ICR マウスにおけるチアベンダゾール（TBZ）の優性致死試験
…… 小縣　昭夫，安藤　弘，久保　喜一，藤井　孝，佐々木美枝子，平賀　興吾……354

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）のマウス肺傷害に対するアミノ酸の効果
…… 中川　好男，中尾　順子，平賀　興吾……357

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）のマウス肺の微細構造におよぼす影響
…… 福森　信隆，川野　澄江，佐々木美枝子，平賀　興吾……360

クロム鉱さい粉じんのラットによる１カ月間持続吸入実験
吸入後終生飼育ラット諸臓器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……369

クロム鉱さい粉じんのラットによる１カ月間持続吸入実験
吸入後終生飼育ラットの臓器中金属の分析
…… 神谷　信行，坂本　義光，佐々木美枝子，平賀　興吾……379

フタル酸エステルの精巣萎縮作用：亜鉛投与の影響
…… 大石　眞之，平賀　興吾……384

プロピレングリコールの細胞遺伝学的研究
…… 吉田　誠二，佐々木美枝子，平賀　興吾……388

アセトアミノフエンの変異原活性増強作用について
…… 佐々木美枝子，平賀　興吾……392

DNA 損傷のアルカリ溶出法による検出（Ⅰ）
トリチウム水のクロマチンに対する効果
…… 金西　信次，金城　康人，渡部　真，代谷　次夫，田中　信徳……399

低角レーザー光散乱法と分子ふるい高速液体クロマトグラフィーを用いた高分子量蛋白の分子量測定法
…… 藤谷　知子，前木　吾市，中尾　順子……406

各種タンパクに結合したバナジウム
…… 藤谷　和正，中尾　順子……411

非イオン性およびイオン性界面活性剤によるアデニレートシクラーゼの可溶化
…… 中川　敦子，中尾　順子……415

実験動物各種間における血しょう，あるいは血清コレステリルエステルの脂肪酸組成の差異
…… 高橋　省，中尾　順子，平賀　興吾……418

パーソナルコンピュータを用いた毒性試験データ解析システムの開発
…… 三栗谷久敏，藤田　博，神谷　信行，中村　清純，佐々木美枝子，平賀　興吾……421

他　誌　発　表…… 431

学　会　発　表…… 435

CONTENTS

REPORTS I PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

Colonization of *Campylobacter jejuni* on Intestines of Experimentally Infected Mice, Rats and Young Chicks
..... Y. Yanagawa, T. Itoh, M. Inaba, K. Saito, M. Takahashi,S. Sakai and M. Ohashi..... 1

Experimental Gastroenteritis due to *Clostridium perfringens* in Cynomolgus Monkeys : Histopathology and Enterotoxin Production in the Intestine
..... K. Saito, T. Itoh, M. Inaba, S. Sakai, M. Takahashi and I. Yamamoto..... 8

Occurrence of *V. parahaemolyticus* Food Poisoning Outbreaks and Characterization of Isolates from Food Poisoning Cases in Tokyo (1978–1982)
..... M. Tsuno, K. Ohta, S. Yamada, S. Matsushita, K. Saitoh, T. Itoh and Y. Kudoh 15

Serodiagnosis of Schistosomiasis japonica in the Philippines by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (II)
Comparison of Results Obtained by ELISA, Stool Examination (MIFC) and Circumoval Precipitin Test (COPT)
..... I. Murata, H. Matsuda, H. Tanaka and B. L. Blas..... 20

Virological Survey of Pediatric Patients with Acute Respiratory Infection and Seven Sewage Treatment Plants in Tokyo (1982)
..... K. Yano, Y. Hayashi, K. Yabuuchi, K. Iwasaki, T. Watanabe, Y. Ishihara and S. Ohkubo..... 27

Virological Survey of Acute Conjunctivitis in Tokyo, 1982
..... Y. Hayashi, K. Yano, K. Yabuuchi, K. Iwasaki and H. Kawamoto..... 34

Incidence of HI Antibody against Rubella Virus among Inhabitants of Tokyo in 1982
..... Y. Yoshida, S. Sekine and K. Iwasaki..... 41

Comparison of Serological Tests for Detection of Antibodies to Rubella Virus
..... Y. Yoshida, S. Sekine and K. Iwasaki..... 47

Epidemiological Survey of Japanese Encephalitis in Tokyo in 1982
..... S. Sekine, Y. Yoshida, K. Yabuuchi, K. Iwasaki, T. Suzuki and I. Hatano..... 54

Prevalence of Influenza Occurred in Tokyo (Oct. 1981–Feb. 1983)
..... F. Sakai, T. Ito, K. Yamazaki and K. Iwasaki..... 60

A Series of Infection due to *Yersinia pseudotuberculosis* in Monkeys in a Zoo
..... T. Maruyama, M. Kanzaki, K. Tanabe, I. Kawasaki, H. Hiramatsu, K. Saito and M. Masui 65

Review on Simplified Identification Method for Genus *Bacillus*
..... K. Jimbo and Y. Kokubo..... 69

REPORTS II PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

Effects of Anticoagulants on the Number and Size of Blood Cells
..... K. Minowa, T. Kasahara, H. Oishi, C. Nakagawa, S. Suzuki and N. Ohkubo..... 75

Biochemical Data and Commercial Reagents
.....C. Nakagawa, T. Kasahara, H. Oishi, K. Minowa, S. Suzuki and N. Ohkubo..... 82

Determination of Corticoids in Ointments
.....S. Shigeoka, S. Uehara, N. Miyatake, T. Hagiwara and K. Akiyama..... 89

Studies on the Evaluation of Crude Drugs (VIII)
Quality of *Lithospermi Radix* on the Market
.....I. Yasuda, T. Hamano, T. Seto and K. Akiyama..... 93

Study on Microassay of Pyrogen *in vitro* (III)
Endotoxin Content in Distilled Waters and Sodium Chloride Irrigations
.....H. Usami, K. Akiyama and H. Masaki..... 98

Determination of Glycols and Glycerin in Cosmetic products by Gas Chromatography
.....K. Ito, T. Kan, Y. Nakamura, K. Kamata, T. Yoshihara and H. Harada.....102

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (VIII)
Studies on Determination of Trichloroethylene and Tetrachloroethylene in Household Aerosols
.....K. Mori, T. Amemiya, S. Suzuki and T. Yoshihara.....107

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (IX)
Removal of Color Materials Interfering on Formaldehyde Analysis for Cloth Samples with Activated Charcoal
.....T. Amemiya, K. Mori, S. Suzuki and T. Yoshihara.....111

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (X)
Formaldehyde in Commercial Oil Base and Water Base Marking Pens used for Dyeing of Cloth
.....S. Suzuki, T. Amemiya, K. Mori and T. Yoshihara.....115

REPORTS III PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

Two Outbreaks of Oyster-associated Food Poisoning Due to Enterotoxigenic *Escherichia coli* 027 : H7
..... A. Kai, T. Itoh, K. Saito, Y. Yanagawa, M. Inaba, M. Takahashi, S. Matsushita, Y. Kudoh, S. Sakai and T. Shinohara..... 121

An Outbreak due to *Salmonella typhimurium*, Biotype 17i, Associated with the Use of Raw Quail Egg and Incidence of *Salmonella* in Quail Eggs
.....T. Itoh, M. Takahashi, K. Saito, M. Inaba, A. Kai, Y. Yanagawa, I. Takano, S. Sakai, T. Shinohara, N. Tamura, K. Kato, N. Tsuchiya, M. Kinoshita, M. Nakajima, S. Takatori and T. Tazaki..... 126

Comparison of Hydrophobic Gride Membrane Filter Method and Agar Plate Counts Method for Enumeration of Standard Plate Counts, Coliform and Staphylococcus aureus in Foods
.....T. Itoh, K. Saito and S. Sakai.....132

Survey of Pollution with Mercury in Tokyo (X)
Mercury Content of Fish and Shellfish
.....H. Yamanobe, M. Takeuchi and T. Yoshihara.....139

Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (XI)
Polychlorinated Biphenyl Concentrations of Foods
.....K. Kishimoto, K. Mizuishi, M. Takeuchi and T. Yoshihara.....142

N–Nitrosamines Originated from Secondary Amines in Rubber Nipples
.....K. Mizuishi, M. Takeuchi andT. Yoshihara.....146

Detection of Residual Sulfonamides in Honey
.....K. Takeba, M. Kanzaki, F. Murakami and M. Matsumoto.....150

Identification of Herbicides (Benthiocarb, CNP, Chlomethoxynil, Oxadiazon) in Freshwater Fish, *Zacco platypus*
.....T. Miyazaki, T. Yamagishi and M. Matsumoto.....155

Simplified Detection Method for Residual Sulfonamides in Cultured Fish
.....M. Kanzaki, K. Takeba, F. Murakami, T. Maruyama and M. Matsumoto.....159

Survey of Pesticide Residues in Imported Fermented Teas and Bananas
.....T. Nagayama, Y. Tamura, T. Maki, K. Kan and Y. Naoi.....165

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toxicants in Tokyo (I) (1980–1982)
.....Y. Tamura, T. Maki, K. Kan, T. Nagayama and Y. Naoi.....171

Analysis of Asbestos Fibers in Alcohlic Beverages
.....S. Ogino, M. Koseki, T. Yasuno, N. Fukumori, A. Itoh and F. Endo.....178

Analysis of Organic Additives in Polystyrene Container–Package
.....K. Sato, Y. Watanabe, R. Yoshida and F. Endo.....185

Surveys of Quality of Commercial Natural Flavor Enhancers
.....M. Hirokado, K. Nakajima, I. Takahashi, F. Endo and S. Mizoiri.....191

Nutritional Evaluation of Commercial Precooked Noodles
.....K. Funayama, F. Ushio, K. Nishida, H. Seki and M. Doguchi.....197

Study on Minerals in Food (III)
Survey of Analytical Method on Iron by Atomic Absorption
.....T. Tomomatsu, N. Kikutani, M. Iguchi And M. Doguchi.....202

Elution of Minerals by Boiling Foodstuffs in Water
.....J. Nakagawa, T. Sakamoto, Y. HiGuchi, S. Nishigaki and S. Mimura.....206

High Performance Liquid Chromatographic Determination of EDTA in Foods
.....M. Oishi, K. Onishi and S. Sakai.....211

REPORTS IV PAPERS CONCERNING ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

Influences of Suspended Particle Matters on Atmospheric photochemical Reactions of Toluene
.....T. Tada, T. Ohta and H. Kano.....217

Chlorine Catalytic Oxidation of CO in the Gas Phase
.....T. Ohta and I. Mizoguchi.....221

Biochemical and Histochemical Changes of Acid Mucopolysaccharide in Rats Exposed to NO_2
.....T. Suzuki, N. Terada, A. Sato and I. Mizoguchi.....224

Effects of sequentially Combined Exposure to NO_2–O_3 Mixed and Urban Ambient Air on Rats Lungs
.....N. Terada, S. Ikeda, M. Fukuda, M. Ohsawa, T. Suzuki and I. Mizoguchi.....237

A Study on Relationship of Health Indices to Air Pollution and Social Indices in Tokyo (Analysis with Non–parametric Methods) ..... K. Makino and I. Mizoguchi.....247

Mutagenic Activation of 2–Aminofluorene in the Reconstitution System Utilizing Cytochrome P–450 Fractions Partially Purified from Phenobarbital–Treated Male Rats ..... S. Kawano, T. Nakao, A. Kojima, S. Suzuki and T. Kamataki.....255

Chlorinated Hydrocarbon and Other Chemical Residues in Japanese Sea Bass from Tokyo Bay ..... H. Seto and T. Kano.....260

Experimental proof of itching papules caused by *Cheyletus malaccensis* Oudemans ..... M. Yoshikawa, K. Hanaoka, Y. Yamada and T. Mikata.....264

Studies in controlling Mites (II) Effects of Two–Month Stored Fenitrothion–Treated Paper on a Cheese Mite, *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) ..... M. Ohno and M. Yoshikawa.....277

Some Heterotrophic Bacteria in Drinking Tank Water and Their Resistance for Chlorine and Heat ..... K. Furuhata and A. Matsumoto.....282

Survey on biologically active substances in phytoplankton and shellfish collected from Tokyo Bay ..... Y. Hirano, M. F. Watanabe, S. Oishi, Y. Tsuchiya and S. Nishigaki.....290

Isolation of Toxic Strains of *Microcystis aeruginosa* from Water Blooms ..... M. F. Watanabe and S. Oishi.....294

REPORTS V PAPERS CONCERNING ON TOXICOLOGY

Metabolism of o–Phenylphenol Sodium salt (OPP–Na) in Rats : Dose–response of Metabolic Profile of OPP ..... K. Ushiyama, J. Kabashima and T. NaKao.....297

Biological Fate of o–Phenylphenol (OPP) in Rats (Supplement) Distribution into and Excretion from Bladder of Rats After Oral Administration ..... H. Ichikawa, H. Kobayashi and T. Nakao.....299

Possibility of Excretion of Sodium o–Phenylphenate (OPP–Na) into Milk by Oral Administration to Mother Rat ..... H. Kobayashi and T.Nakao.....302

Changes of Enzyme Activities in Rat Urine and Tissues by Administration of Different Concentration of o–phenylphenol Sodium Salt (OPP–Na) in Diet ..... F. Nagai and T. Nakao.....305

Effect of Sodium o–Phenylphenate (OPP–Na) on Acid Phosphatase in Rat Urine (III) ..... J. Kabashima, H. Ichikawa and T. Nakao.....309

Detection of o–Phenylphenol (OPP) and the Activated Metabolites with S–9 Mix by HPLC and the Effect of These on Induction of SCE in CHO–Kl Cells ..... S. Tayama, N. Kamiya, T. Nakao and K. Hiraga.....312

Mutagenicity of Sodium o–Phenylphenate (OPP–Na) in the Host–Mediated Assay with *E. coli* and *S. typhimurium* ..... H. Fujita, A. Kojima and K. Hiraga.....315

Mutagenicity of o–Phenylphenol (OPP) in the Microbial System
.....A. Kojima, H. Fujita and K. Hiraga.....319

Acute Oral Toxicity of o–Phenylphenol (OPP) in Mice
.....K. Tayama, S. Iguchi, M. Sasaki and K. Hiraga.....325

Ultrastructural Alterations of Hepatocytes in Male Rats Fed with Sodium o–Phenylphenate (OPP–Na)
.....N. Fukumori, M. Sasaki and K. Hiraga.....329

Absorption, Distribution, Excretion and Placental transfer of Thiabendazole in Pregnant Mice : Effect of two kinds of vehicle
.....M. Yoneyama, A. Ogata, T. Fujii, H. Mikuriya, N. Yano, H. Takahashi, K. Yuzawa, H. Ando, Y. Kubo, A. Nagasawa, T. Nakao and K. Hiraga.....337

Teratological Studies of Thiabendazole (TBZ) in Mice : Compartive Teratogenicity Using Jcl : ICR Mice Fed Basal Diets Perchased from Three Different Mekers
.....H. Ando, Y. Kubo, A. Ogata, M. Sasaki and K. Hiraga.....343

Dominant Lethal Study of Thiabendazole (TBZ) in ICR Mice
.....A. Ogata, H. Ando, Y. Kubo, T. Fujii, M. Sasaki and K. Hiraga.....354

Effects of Amino Acids on Butylated Hydroxytoluene (BHT) –Induced Pulmonary Injury in Mice
.....Y. Nakagawa, T. Nakao and K. Hiraga.....357

Ultrastructural Study of Butylated Hydroxytoluene (BHT) –Induced Alterations in Mouse Lung
.....N. Fukumori, S. Kawano, M. Sasaki and K. Hiraga.....360

Inhalation Experiments of Chromite Ore Residue Dust to Rats for 1 Month–Histopathological Observation of Various Organs of rats kept for Lifespan after the periods of exposure.
.....Y. Sakamoto, N. Kamiya, T. Ikeda and K. Hiraga.....369

Inhalation Experiments of Chromite Ore Residue Dust to Rats for 1 Month–Metal Concentration in Tissue of Rats Kept for Lifespan after Exposure
.....N. Kamiya, Y. Sakamoto, M. Sasaki and K. Hiraga.....379

Testicular Atrophy Induced by Dietary Di–2–ethylhexyl Phthalate : Effect of zinc Supplement
.....S. Oishi and K. Hiraga.....384

Cytogenetic Studies of Propylene Glycol
.....S. Yoshida, M. Sasaki and K. Hiraga.....388

Promoting Effect of Acetaminophen on the Mutagenicity
.....M. Sasaki and K. Hiraga.....392

DNA Lesion Assays by Alkaline Elution (I) Effects of Tritium Water on the Chromatin
.....N. Kananishi, Y. Kinjo, M. Watanabe, T. Shiroya and N. Tanaka.....399

Molecular Weight Determination of Nonionic Detergent solubilized Membrane Proteins by Low Angle Laser Light Scattering and Gel–filtration HPLC
.....T. Fujitani, G. Maeki and T. Nakao.....406

Vanadium in Proteins
.....K. Fujitani and T. Nakao.....411

Solubilization of Adenylate Cyclase by Nonionic and Ionic Detergents
..... A. Nakagawa and T. Nakao.....415

Species Differences of Fatty Acid Composition of Plasma or Serum Cholesteryl Esters in Laboratory Animals
..... O. Takahashi, T. Nakao and K. Hiraga.....418

A Personal Computer Program for Analysis of Toxicological Study
..... H. Mikuriya, H. Fujita, N. Kamiya, K. Nakamura, M. Sasaki and K. Hiraga.....421

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS 431

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS 435

報　　文 I

感染症等に関する調査研究

REPORTS I

PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 34, 1-7, 1983

Campylobacter jejuni のマウス，ラットおよびヒヨコの腸管内定着に関する研究

柳川義勢*，伊藤　武*，稲葉美佐子*，斎藤香彦*
高橋正樹*，坂井千三*，大橋　誠*

Colonization of *Campylobacter jejuni* on Intestines of Experimentally Infected Mice, Rats and Young Chicks

YOSHITOKI YANAGAWA*, TAKESHI ITOH*, MISAKO INABA*, KAHIKO SAITO*
MASAKI TAKAHASHI*, SENZO SAKAI*, MAKOTO OHASHI*

Campylobacter jejuni strain CF256 isolated from patients in an outbreak of food poisoning were inoculated P.O. in mice, rats and young chickens, and colonization of the organism in the intestine of infected animals was observed.

When 10^9 colony forming units (CFU) of the organism was introduced to mice, they uniformly colonized in the intestine of all the animals tested for a period of up to 1 month, and 10^4 CFU or more of the organism were recovered not only from the small intestine but also from the cecum and large intestine. Persistent intestinal colonization was observed in almost all the mice inoculated with 10^4 CFU or more of the organism for a period of 7 days. Rats were also inoculated with 10^9 CFU of organism. Three days after inoculation the organism persisted in 3 out of 4 rats, but after 11 days it did in only 4 out of 8.

On the other hand, intestinal colonization of the organism in 3-day-old chicken was found to be almost the same as in the case of mice, except the colonization of the upper and middle small intestines was not consistent.

None of the infected animals died or showed any signs of illness.

Keywords : *Campylobacter jejuni*, colonization, experimental infection

緒　言

Campylobacter jejuni はヒトの下痢症の起因菌として重要な位置を占めており，サルモネラと同等あるいはそれ以上の散発症例がみられている[1,2]．また，本菌はしばしば集団食中毒の原因ともなり，著者らは1979年に最初の事例[3]を確認して以来，現在までに20事例にもおよぶ集団下痢症例を明らかにして来た[4]．

C. jejuni のヒトに対する病原性を解析するため，マウス[5-8]，ラット[6,9]，ヒヨコ[7,10,11]，イヌ[12]，サル[13]，ヒツジ[14]，ウシ[14,15]など種々の動物を用いた本菌の感染実験が行なわれ，様々な角度から解析が進められている．

著者らは，*C. jejuni* の病原性解析を目的として，マウス，ラットおよびヒヨコでの感染実験を試み，その腸管内定着性を中心に検討を行なった．

材料および方法

1　供試菌株

感染実験に用いた菌株は，著者らが集団下痢症患者のふん便から分離した *C. jejuni* CF256 株で，分離後凍結保存されたものである．

本菌を BHI ブイヨンに接種し，微好気条件下で37°C20時間，振とう培養した菌液，あるいは本菌液の遠心分離で集菌した菌を10%スキムミルクに再浮遊させたものを実験動物への投与菌液とした．

2　実験動物

マウスは3週令の ICR 系を用いた．

ラットは，F344/CuCrj と Crj : CD の両系統の3週令を使用した．

ヒヨコは白色レグホンの3日令を使用した．

3　投与方法

マウス，ラット，ヒヨコへの経口投与はすべて胃ゾン

* 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

デを用いて行なった．一部のマウスでは経口投与の他に尾静脈への接種も行なった．

4 実験動物の腸管および各臓器からの*C. jejuni*生菌数測定

腸管各部位，肝臓，脾臓，腎臓，腸間膜リンパ節を採取，秤量して生理食塩液で10%乳剤とした．本乳剤の10倍段階希釈系列をつくり，その0.1m*l*をSkirrowの血液寒天に塗沫し，42°C 48時間微好気培養した．出現した*C. jejuni*の集落を数えて各材料1g中の*C. jejuni*生菌数を算出した．なお，分離菌は抗CF256血清によるスライド凝集反応によって投与菌であることを確認した．

5 病理組織学的観察

解剖した動物から腸管各部位および肝臓，脾臓，腎臓，腸間膜リンパ節を採取し，10%の中性緩衝ホルマリン液で固定を行ない，常法に従ってパラフィン切片を作製し，ヘマトキシリン・エオジン染色を行なって光学顕微鏡で観察した．各材料の一部は，グルタールアルデヒドとオスミウム酸による二重固定を行ない，エポキシ樹脂包埋して超薄切片を作製し，電子顕微鏡(日立H500型)によって観察した．

成　績

1 マウスへの経口投与実験

C. jejuni CF256，5.8×10^9個をマウス15頭に経口投与し，経時的に腸管各部位および各臓器や血液からの菌検索を行なった成績をTable 1.に示した．投与1日後では小腸，大腸全部位より投与菌が$10^2\sim10^5$/g検出され，投与3日，5日，10日および30日後においても腸管各部位より多数の菌が検出され，投与菌が腸管内に定着したことが観察された．

肝臓，脾臓，腎臓，腸間膜リンパ節および血液の培養では，投与3日後のマウス1例の腸間膜リンパ節から投与菌が検出された以外はすべて陰性であった．

以上のごとく，成熟マウスへの*C. jejuni*経口投与により本菌が容易に腸管内に定着したので，次に投与菌量と腸管内定着との関係について検討を行なった．

Table 2.に示すごとく，10^2個投与群では，投与2日

Table 1. Recovery of the organism from organs and blood of infected mice

Days after oral administration of *C. jejuni*, CF 256	Mice No.	Recovery of the organism; Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Colon	Rectum	Liver	Spleen	Kidney	M.L.N.*	Blood
1	1	++++	+++	++++	++++	++++	++++	−	−	−	−	−
	2	++++	++++	++++	++++	++++	++++	−	−	−	−	−
	3	++++	++	+++	++++	++++	++++	−	−	−	−	−
3	4	+++	+++	+++	++++	+++	+++	−	−	−	−	−
	5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	−	−	−	+	−
	6	+++	+	+++	++++	+++	++++	−	−	−	−	−
5	7	++	+++	+++	+++	++++	++++	−	−	−	−	−
	8	++++	++	++++	++++	++++	++++	−	−	−	−	−
	9	+++	++	+++	+++	+++	+++	−	−	−	−	−
10	10	++++	+	++++	++++	++++	++++	−	−	−	−	−
	11	++++	+++	+++	++++	++++	++++	−	−	−	−	−
	12	+++	−	++	++	+	++	−	−	−	−	−
30	13	++++	+++	+++	++++	++	−	−	−	−	−	−
	14	++++	+++	+++	++++	++++	++++	−	−	−	−	−
	15	+	−	+	++++	+	+	−	−	−	−	−

Challenge : Orally with 5.8×10^9 organisms.

*M.L.N. : mesenteric lymph nodes.

− : not detected, + : under 10/g organisms, ++ : 10^2/g organisms, +++ : 10^3/g organisms, ++++ : over 10^4/g organisms.

Table 2. Recovery of the organism from intestinal tract of infected mice

Inoculum size	Number of positive mice / Total challenge mice											
	2 days after oral administration of *C. jejuni*, CF256						7 days after oral administration of *C. jejuni*, CF256					
	Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Colon	Rectum	Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Colon	Rectum
10^2	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
10^3	0/3	1/3	0/3	1/3	1/3	0/3	2/3	1/3	2/3	2/3	2/3	2/3
10^4	5/5	4/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	4/5	5/5	5/5	4/5
10^6	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
10^8	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

後において1頭の盲腸と結腸部より菌が検出されたが，投与7日後では，全例とも陰性であった．

10^3個投与群では，投与7日後においても3頭中2例から投与菌が検出され，2日後よりも良い傾向がみられた．

10^4個以上の投与では，実験マウス全例において腸管各部位より投与菌が検出された．

経口投与したすべてのマウスにおいて，下痢症状の発現など臨床的な異常は観察されなかった．

2 マウスへの静脈内接種実験

C. jejuni CF256株を尾静脈内に5.8×10^9個接種し，経時的に解剖して腸管各部位および諸臓器からの菌検索を行なった．静脈内接種においてもその観察期間中マウスに異常は認められず，死亡例もなかった．

菌投与後1日目では，肝臓，脾臓などの実質臓器，および血液から投与菌が検出された．また，腸管各部位からも10^2～10^6個/gの投与菌が検出された．3日後では，実質臓器および血液における投与菌の検出は，3例中1例の肝臓，腎臓，腸間膜リンパ節についてのみ陽性で，他の2例ではすべて陰性であった．しかしながら，腸管の各部位からは，10^3～10^6個/gの *C. jejuni* が検出された．5日後においても腸管全体に多数の菌が存在していた．(Table 3.)

3 ラットへの経口投与実験

C. jejuni CF256の8.0×10^9個をラットに経口投与し，10日間観察した．排泄便中における投与菌の推移をTable 4. に示した．菌投与後1日では全例のふん便から *C. jejuni* が検出されたが，2日後では12例中6例が陽性であった．4日後では8例中4例が陽性で10日後では8例中2例のふん便から投与菌が検出された．10日後のふん便中の菌数は1例が10^6個/gであった．

菌投与後，3日と11日目に解剖して各臓器における投与菌の分布を検討した．3日後では4例中3例の腸管各部位から菌が検出されたが，11日後では8例中4例が陽性であった．このうち1例は，腸管全部位より，1例は空腸部，回腸部，盲腸，結腸部より検出されたが，他の2例は，回腸部のみ陽性であった．(Table 5.)

血液および肝臓などの実質臓器からは投与菌が検出されなかった．

観察期間中の便性状はすべて正常であり，死亡例はみられなかった．

4 ヒヨコへの経口投与実験

C. jejuni CF256 1.3×10^9個をヒヨコ12羽に経口投与し，経日的に観察した成績をTable 6. に示した．投与後1日および3日目では，それぞれ3例中1例の腸管全部位より投与菌が検出されたが，他の2例は盲腸部と大腸部のみが陽性であった．7日後では小腸下部と盲腸，一部は大腸部から菌が検出された．

投与後20日でも3例中1例は腸管全部位より，1例は，小腸下部，盲腸および大腸部から，のこり1例は，小腸下部，盲腸から菌が検出された．20日目の盲腸部における菌量は10^4～10^6/gであった．

血液，胆汁，肝臓および脾臓からは菌は検出されなかった．

観察期間中，菌投与後4日と5日目にそれぞれ1例づつ合計2例が軟便を呈したが，下痢便を示した例や死亡例はなかった．

5 病理学的観察

各実験動物の解剖時における腸管や肝臓，脾臓など諸臓器の肉眼的観察では特に異常は認めなかった．各組織

Table 3. Recovery of the organism from organs and blood of infected mice

Days after i.v. administration of *C. jejuni*, CF 256	Mice No.	Recovery of the organism from ;										
		Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Colon	Rectum	Liver	Spleen	Kidney	M.L.N.*	Blood
	1	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	+	+	+	+
1	2	++++	++	++++	++++	++++	+++	+	+	+	−	+
	3	++++	+++	++++	++++	+++	+++	+	+	+	+	−
	4	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	−	+	+	−
3	5	+++	+++	++++	++++	++++	++++	−	−	−	−	−
	6	++++	+++	++++	++++	++++	++++	−	−	−	−	−
	7	+++	+++	++++	++++	++++	+++	−	−	−	−	−
5	8	++++	++++	++++	++++	++++	++++	−	−	−	−	−
	9	++++	+++	+++	++	++	NT	−	−	−	−	−

Challenge : intravenous injection with 5.8×10^9organisms.

*M.L.N. : mesenteric lymph nodes.

− : not detected, + : under 10/g organisms, ++ 10^2/g organisms, +++ : 10^3/g organisms, ++++ : 10^4/g organisms.

Table 4. Recovery of organism from fecal specimens of infected rats

Rat No.	Rats strain	Recovery of the organism from feces					
		Days after oral administration of *C. jejuni*, CF256					
		1	2	4	6	8	10
1	F*	++++	−	S***			
2	F	+++	−	S			
3	C**	++++	+++	S			
4	C	++++	++++	S			
5	F	++++	−	−	−	++++	++++
6	F	++++	−	++	−	−	−
7	F	++++	−	−	−	−	−
8	F	++++	−	−	−	−	−
9	C	++++	+++	+++	++	+++	+++
10	C	++++	+++	++	−	−	−
11	C	++++	++++	−	−	−	−
12	C	++++	+++	++	−	−	−

Challenge : orally with 8.0×10^9 organisms.

*F : F344/DuCrj. **C : Crj : CD. ***S : Rats were sacrificed at 3 days after challenge.

− : not detected, + : under 10/g organisms, ++ : 10^2/g organisms, +++ : 10^3/g organisms, ++++ : over 10^1/g organisms.

Table 5. Recovery of the organism from organs and blood of infected rats

Days after oral administration of *C. jejuni*, CF 256	Rats No.	Rats strain	Recovery of the organism from ; Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Colon	Liver	Spleen	Kidney	M.L.N.*	Blood
3	1	F**	−	+++	++	++++	++++	−	−	−	−	−
	2	F	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	3	C***	−	−	++++	++	++	−	−	−	−	−
	4	C	++	++++	++++	++++	++++	−	−	−	−	−
11	5	F	++++	++++	++++	++++	++++	−	−	−	−	−
	6	F	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	7	F	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	8	F	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	9	C	−	+++	++++	++	++	−	−	−	−	−
	10	C	−	−	+++	−	−	−	−	−	−	−
	11	C	−	−	++	−	−	−	−	−	−	−
	12	C	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

Challenge : orally with 8.0×10^9 organisms.

*M.L.N. : mesenteric lymph nodes. **F : F344/DuCrj. ***C : Crj : CD.

−: not detected, + : under 10/g organisms, ++ : 10^2/g organisms, +++ : 10^3/g organisms, ++++ : 10^4/g organisms.

の HE 染色標本による顕微鏡的観察においても組織学的変化はみられなかった.

Photo 1. は菌投与後 7 日目のヒヨコの盲腸部の電子顕微鏡写真である. 微絨毛間に *C. jejuni* の存在が認められたが, 病理学的変化は観察されていない.

考　　察

Butzler & Skirrow[1] は, 10日令のニワトリ胚細胞に *C. jejuni* を接種して細胞内に侵入した菌体を観察し, ヒヨコに本菌を投与した実験でも盲腸粘膜に侵入した菌を認めておることなどから, *C. jejuni* 下痢症の成因は腸管粘膜細胞内への本菌の侵入によるものと考えられる.

著者らは, マウス, ラットおよびヒヨコに *C. jejuni* を経口投与し, 本菌の病原性に関する基礎的実験を行なった結果, マウスでは腸管各部位に長期間定着することを明らかにした. またマウスへの静脈内接種においても, 血液中の菌は早期に消失するが腸管内への定着を観察した. 経口投与の場合, 投与菌量が10^2個では腸管内での定着がみられないが, 10^4個以上の投与により腸管での長期間にわたる定着が確実に認められ, 10^3個投与でも腸管内定着が起りうることを観察した.

Field ら[6] の実験では, 乳飲みマウス (Crl :

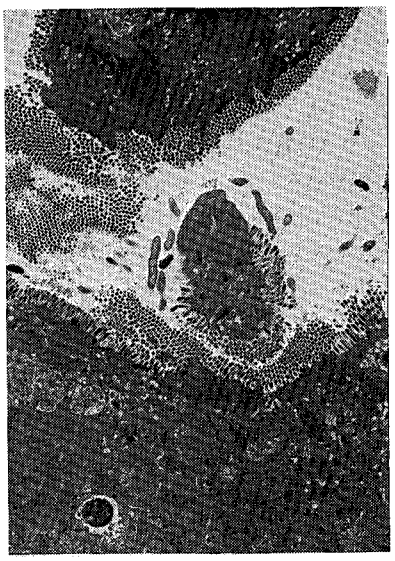


Photo. 1. Electron micrograph of young chicken caecum 7 days after oral administration with *C. jejuni*, CF 256. X 7,500

Table 6. Recovery of the organism from organs and blood of infected chicken

Days after oral administration of *C. jejuni*, CF 256	Chicken No.	Recovery of the organism from ;								
		Duodenum	Middle small intestine	Lower small intestine	Caecum	Large intestine	Liver	Spleen	Bile	Blood
1	1	+++	++++	++++	++++	++++	−	−	−	−
	2	−	−	−	++++	++++	−	−	−	−
	3	−	−	−	++++	+++	−	−	−	−
3	4	++++	++++	++++	++++	++++	−	−	−	−
	5	−	−	−	++++	+++	−	−	−	−
	6	−	−	−	++++	++	−	−	−	−
7	7	−	−	++++	++++	+++	−	−	−	−
	8	−	−	+++	+++	−	−	−	−	−
	9	−	−	−	++	−	−	−	−	−
20	10	+++	+++	++++	++++	++++	−	−	−	−
	11	−	−	++++	++++	+++	−	−	−	−
	12	−	−	+++	++++	−	−	−	−	−

Challenge : orally with 1.3×10^9organisms.

− : not detected, ++ : 10^2/g organisms, +++ : 10^3/g organisms, ++++ : 10^4/g organisms.

CFW(sw)BR系）では腸管に容易に定着できるが，成熟マウスでは菌の定着がみられないこと，また乳飲みマウスでの実験では13%が死亡したことを報告している．一方，Blaserら[8]の成績では成熟マウスでも投与菌が腸管に定着しており，著者らと同様の成績であった．*C. jejuni*のマウス腸管定着には，マウスの系統および年令が著しく影響するものと考えられる．Blaserら[8]はさらに，マウスに*C. jejuni*を経口投与した場合；投与後1時間以内に血液中に投与菌が出現するが投与後24時間ではその検出率は低くなることを報告している．今回著者らがマウスの静脈内に菌を接種した場合でも，48時間以降では血液中から菌が検出されず，血液中からの*C. jejuni*の除菌作用は比較的短時間のうちに行なわれることが示唆される．

ラットにおいては，*C. jejuni*を経口投与したにもかかわらず，マウスでの成績に比較して腸管内定着性が著しく劣っていた．Fieldら[6]の実験では，乳飲みラットやウサギにおいてもマウスの場合と同様に投与菌が腸管内に定着することを認めているが，ハムスターではほとんど定着せず，実験動物種によって本菌の腸管内定着性に差があるものと考えられる．

Ruiz–Palaciosら[10]は，*C. jejuni* 10^7個を3日令のヒヨコに経口投与した場合，その88%が下痢を発現し，体重増加が非感染群のそれに比べ明らかに低くなることを報告している．我々の実験成績では，3日令のヒヨコに10^9個の菌を投与したが，下痢症状をみることはできなかったし体重の増加も対照群と比較して顕著な差は認められなかった．しかし，投与菌は盲腸部を中心に腸管内に定着することが認められた．Manninenら[7]は3日令のヒヨコを用いて，*C. jejuni* 15菌株について感染実験を行なったが，下痢その他の異常は認められなかったと述べている．一方，Soerjadiら[11]の実験では，10^6個の*C. jejuni*投与でヒヨコに下痢の発現をみており，ヒヨコでは実験条件による影響が著しいことが推察される．著者らはその後の実験において，ヒヨコを不良な環境条件で飼育した場合，*C. jejuni*投与後4日から5日目にかけて多数死亡する例をみており，しかもそれら死亡例のほぼすべての肝臓や脾臓から投与菌を検出している．本菌の感染実験では，投与菌の培養方法や，動物の年令，系統および飼育環境などの実験条件を考慮する必要があろう．

*Campylobacter*の病原因子解析に当り，著者ら[16,17]は実験動物への感染実験と平行して培養細胞を用いて，*C. jejuni*や*C. coli*の細胞侵入性に関する実験を行なってい

る．今後本菌の実験動物での腸管内定着性と培養細胞への侵入性との関連についても検討する予定である．

結　論

Campylobacter jejuni の病原性解析を目的として，ヒト集団下痢症患者由来の *C. jejuni* CF256 株を用いて，マウス，ラット，ヒヨコへの感染実験を試み，その腸管内定着性を中心に検討した．

3週令の ICR 系マウスに10^9個を経口投与した場合，腸管全部位において10^4個/g 以上の多量の本菌が定着し，感染後30日間経過してもほとんど菌数の減少は認められなかった．

C. jejuni のマウスにおける腸管内定着は，10^4個以上の菌を経口投与することによって確実にみられるが，10^3個の経口投与では定着性が低く，10^2個投与では定着は認められなかった．

マウスに10^9個の本菌を静脈内に接種した場合でも，投与菌は腸管内に定着したが，肝臓，脾臓，腎臓，腸間膜リンパ節および血液からは比較的早期に消失した．

3週令のラットに10^9個を経口投与した場合，本菌の定着性は低く，投与後11日目において腸管内に投与菌がみられたものは，8例中4例にすぎなかった．

3日令のヒヨコに10^9個を投与した成績では，投与した12例すべてにおいて盲腸部を中心に腸管内定着が認められた．

C. jejuni の腸管内定着は動物種によって異なることが示された．

感染実験を行なったすべての動物においてそれぞれの観察期間中に下痢症状を呈したものはなく，死亡例もみられなかった．

謝　辞，本研究にあたり，電子顕微鏡試料作製ならびに観察において御指導，御援助をたまわった，国立予防衛生研究所，技術部，鈴木健之博士に深謝いたします．

文　献

1) Butzler J.P. and Skirrow M.B. : *Clin. Gastroenterol.* 8, 737, 1979
2) Blaser M.J. and Reller L.B. : *N. Engl. J. Med.* 305, 1444, 1981
3) 伊藤　武，斎藤香彦，柳川義勢，稲葉美佐子，甲斐明美，丸山　務，坂井千三，大橋　誠，岡　愛子，円城寺政子，菱沼　勉，千種操子：東京衛研年報，30－1，1，1979
4) 伊藤　武，斎藤香彦，柳川義勢，甲斐明美，高橋正樹，稲葉美佐子，高野伊知郎，坂井千三，大橋　誠：感染症誌，57，576，1983
5) Madge D.S. : *Digestion* 20, 389, 1980
6) Field L.H., Underwood J.L., Pope L.M. and Berry L.J. : *Infect. Immun.* 33, 884, 1981
7) Manninen K. I., Prescott J.F. and Dohoo I.R. : *Infect. Immun.* 38, 46, 1982
8) Blaser M.J., Duncan D.J., Warren G.H. and Wang W.L. : *Infect. Immun.* 39, 908, 1983
9) Fernandez H., Neto U.F., Fernandes F., Pedra M.A. and Trabulsi L.R. : *Infect. Immun.* 40, 429, 1983
10) Ruiz–Palacios G.M., Escamilla E. and Torres N. : *Infect. Immun.* 34, 250, 1981
11) Soerjadi A.S., Snoeyenbos G.H. and Weinack O.M. : *Avian Diseas.* 26, 520, 1982
12) Prescott J.F., Barker I.K., Manninen K.I. and Miniats O.P. : *Can. J. comp. Med.* 45, 377, 1981
13) Fitzgeorge R.B., Baskerville A. and Lander K.P. : *J. Hyg., Camb.* 86, 343, 1981
14) Firehammer B.D. and Myers L.L. : *Am. J. Vet. Res.* 42, 918, 1981
15) Al–Mashat R.R. and Taylor D.J. : *Veterinary Record*, 15, 459, 1980
16) 柳川義勢，伊藤　武，稲葉美佐子，斎藤香彦，高橋正樹，甲斐明美，坂井千三，大橋　誠，山本　実，中村明子，鈴木健之：日細菌誌，37，119，1982
17) 柳川義勢，伊藤　武，稲葉美佐子，斎藤香彦，高橋正樹，甲斐明美，坂井千三，大橋　誠，中村明子，山本　実，鈴木健之：日細菌誌，38，358，1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 34, 8-14, 1983

腸炎起病性ウエルシュ菌の腸管内におけるエントロトキシン産生と病理学的考察

斎藤香彦*, 伊藤　武*, 稲葉美佐子*, 坂井千三*,
高橋政寿**, 山本一郎**

Experimental Gastroenteritis due to *Clostridium perfringens* in Cynomolgus Monkeys : Histopathology and Enterotoxin Production in the Intestine

KAHIKO SAITO*, TAKESHI ITOH*, MISAKO INABA*, SENZO SAKAI*,
MASATOSHI TAKAHASHI** and ICHIRO YAMAMOTO**

C. perfringens gastroenteritis was reproduced experimentally in Cynomolgas monkeys by intraduodenal inoculation of 10^8 living cells of the organism known to be enterotoxigenic. The animals developed vomiting and diarrhea within 8 hours after the challenge. When diarrhea became prominent, animals were sacrificed and a fairly large number of the heat-resistant spores were recovered and enterotoxin was detected in the intestinal contents taken from upper parts of the small intestines, though increase in number of viable cells was not observed. Histopathologcal observation of the intestinal tissues taken at the same time revealed that the most conspicuous change was edema, especially in upper parts of the small intestine. Fourty eight hours after the challenge, when the animals were in a convalescent stage, the spores and the toxin disappeared from upper part of the small intestine, but they still existed in the lower parts of the small intestine, colon and rectum. Colonization and proliferation of the organism were not discernible in any part of the intestine. Namely, it was only transient. The findings obtained were explanatory of a short-lived course of *C. perfringens* food poisoning in man.

Keywords : *C. perfringens*, enterotoxin, diarrheal disease, cynomolgus monkey, histopathology

緒　言

食品中で大量に増殖した腸炎起病性ウエルシュ菌(Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A)をヒトが喫食すると下痢や腹痛などの食中毒症状がおこる．本菌による下痢症の起因物質は芽胞形成時に産生されるエントロトキシンによるものであることがヒトやサルへの投与実験からDuncanら[1], Hauschildら[2]およびStrongら[3]によって明らかにされた．著者らも本菌の精製エンテロトキシンおよび生菌でサルに投与実験を行い，本菌の下痢症はエンテロトキシンによるものであることを報告してきた[4]．ウエルシュ菌による食中毒患者の下痢発症機序については，いまだ不明な点が多く本実験ではその解明の手懸りとしてエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌をカニクイザルの十二脂腸上部に接種し，腸管内における増殖，芽胞形成，エンテロトキシンの産生量および腸管の病理組織学的所見を観察した．また，対照として精製エンテロトキシンをサルに接種し，生菌投与例と腸管の組織学的変化を検討した．

材料および方法

1. **供試菌株**：エンテロトキシン産生株としてはHobbs博士より分与された *C. perfringens* NCTC 8239株，対照のエンテロトキシン非産生株は健康者ふん便から分離した *C. perfringens* W 1395株である．

2. **投与菌の培養方法**：供試菌株はDuncan & Strong培地（DS培地）で37℃18～24時間培養後，75℃ 20分間加熱処理し芽胞形成能を高めた菌をチオグリコレート培地(TGC培地)に接種し，37℃ 8時間培養した．本菌液を再びDS培地に接種し，37℃ 5～6時間培養した培養液を10,000回転20分間遠心し沈殿した菌体をSkim-milkに浮遊させた．

3. **実験動物および投与方法**：体重1.0～1.5kgのカニクイザルを用い24時間絶食させた後に塩酸ケタミンで麻

* 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
** 北里大学衛生学部病理学教室

Tabel 1. Clinical symptoms developed by experimental monkeys

Monkey No.	Strain and amount introduced	Observation period	Symptoms
1		8 hours	Diarrhea (5−7 hrs after)
2	Toxigenic NCTC 8239 strain	8 hours	Vomiting (3 hrs after) and diarrhea (5 hrs after)
3	living cells (2.4×10^8cells)	48 hours	Diarrhea (5−7 hrs after)
4		48 hours	Diarrhea (5 hrs after)
5	Non−toxigenic W 1395 strain	8 hours	None
6	living cells (3.6×10^8 cells)	8 hours	

酔し，外科的に開腹し十二脂腸上部に供試菌の生菌および精製エンテロトキシンを接種した．なお，投与生菌数は10^8個および精製エンテロトキシンの投与量は2 mgである．

4. ウエルシュ菌生菌数および芽胞菌数の測定：腸管内容物中のウエルシュ菌数は，内容物を0.1％ペプトン加生理食塩液で10倍段階希釈し200 μg/mℓカナマイシン加CW寒天で測定した．ウエルシュ菌芽胞数は被検材料を75℃20分間加熱処理後，生菌数測定と同様に行った．

5. エンテロトキシンの測定：Uemura ら[4]の方法による逆受身血球凝集反応(RPHA)を用いた．

6. 病理組織標本の作製：腸管各部位の病理組織標本はバッファード・ホルマリンで固定し，常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色（HE染色）をほどこし顕微鏡下で観察した．

成　績

1. 臨床経過

エンテロトキシン産生株であるNCTC 8239株または非産生株のW 1395株の生菌をカニクイザルの十二指腸上部に接種した場合の臨床症状をTabel 1に示した．エンテロトキシン産生株2.4×10^8個を接種した4頭すべてになんらかの胃腸炎症状が観察された．すなわち，そのうち1頭(Monkey No.2)は3時間後に嘔吐，5時間後に下痢が認められた．他の3頭においても嘔吐の症状はみられなかったが，5～7時間後に1～3回の下痢が認められた．一方，対照として用いたエンテロトキシン非産生株であるW 1395の投与群では嘔吐，下痢などの胃腸炎症状はまったく認められなかった．

2. 腸管各部位におけるウエルシュ菌生菌数およびエンテロトキシン産生

サルにウエルシュ菌を投与後8時間と48時間後にそれぞれ2頭づつをと殺し，腸管各部位のウエルシュ菌生菌数，芽胞形成および腸管内のエンテロトキシン量を測定した．

a） ***C. perfringens*** **NCTC 8239投与群投与後8時間の所見**：エンテロトキシン産生株生菌投与群の2頭(Monkey No.1, No.2)について腸管各部位における接種菌の生菌数，芽胞数およびエンテロトキシン産生量をTable 2に示した．投与したウエルシュ菌の生菌数は腸管の各部位から検出されたがMonkey No.1, 2とも回腸部に高く10^6/gであった．芽胞数はMonkey No.1, 2, 両者とも生菌数に比して芽胞数の方がやや高く腸管の各部位から10^4～10^7/g検出されているが，両者とも回腸部位にやや多い傾向が認められた．また，腸管内でのエンテロトキシン産生についてみると腸管各部位から検出されているが，特に小腸部位の産生量が多く3～10 μg/gであった．これに比して大腸部位では0.4～1.0 μg/gの産生量であった．このことから腸管各部位の芽胞数は同程度であってもエンテロトキシン産生の場としては小腸部位がより好条件であろうと考えられる．

投与後48時間の所見：上記同様にエンテロトキシン産生株を投与後48時間でと殺したMonkeyNo.3, 4の腸管各部位の生菌数，芽胞数およびエンテロトキシン産生性をTable 3に示した．生菌数投与後8時間で，と殺したサルの場合とは，生菌数，エンテロトキシン産生量に大きな差が認められた．すなわち，小腸内の生菌数は減少し10^3/g以下であり直腸，結腸への移行がみられた．また，エンテロトキシンも小腸，大腸のいずれの部位からも検出されなかった．

b） ***C.perfringens*** **W 1395株投与群**：対照としたエンテロトキシン非産生株の*C. perfringens* W 1395株を投与し8時間後にと殺した場合の腸管各部位の生菌数およ

Tabel 2. Enumeration of viable cells and detection of the enterotoxin made on intestinal contents of monkeys, taken at 8 hrs after the inoculation of living cells of *C.perfringens* NCTC 8239 strain

Intestinal content examined	No.1			No.2		
	Viable cell, counts/g		Estimated amount of enterotoxin (μg/g, by RPHA)	Viable cell, counts/g		Estimated amount of enterotoxin (μg/g, by RPHA)
	Unheated	Heated*		Unheated	Heated*	
Duodenum	5.0×10^3	2.5×10^4	5.0	1.0×10^3	5.0×10^4	4.0
Jejunum	2.5×10^4	3.0×10^5	3.0	1.5×10^3	2.6×10^4	4.0
Ileum	6.5×10^6	4.8×10^6	8.0	4.1×10^6	4.3×10^7	10.0
Colon	1.6×10^5	1.4×10^6	1.0	2.5×10^5	5.4×10^4	0.4
Rectum	9.0×10^4	1.2×10^5	0.8	1.2×10^3	4.8×10^4	0.6

*Prior to enumeration, specimens were heated at 75 C for 20 min.

Tabel 3. Enumeration of viable cells and detection of the enterotoxin made on intestinal contens of monkeys, taken at 48 hrs after the inoculation of living cells of *C.perfringens* NCTC 8239 strain

Intestinal content examined	No.3			No.4		
	Viable cell, counts/g		Estimated amount of enterotoxin (μg/g, by RPHA)	Viable cell, counts/g		Estimated amount of enterotoxin (μg/g, by RPHA)
	Unheated	Heated*		Unheated	Heated*	
Duodenum	3.0×10^2	$<10^2$	ND**	$<10^2$	$<10^2$	ND
Jejunum	$<10^2$	3.3×10^3	ND	$<10^2$	$<10^2$	ND
Ileum	1.2×10^2	9.0×10^2	ND	1.5×10^3	2.0×10^3	ND
Colon	6.0×10^3	3.0×10^5	ND	3.6×10^5	3.0×10^6	ND
Rectum	3.0×10^6	3.6×10^6	ND	1.3×10^6	1.4×10^6	ND

*Prior to enumeration,specimens were heated at 75 C for 20 min.
**Not detected.

びエンテロトキシン産生性を Table 4に示した. Monkey No.5, 6の両者とも小腸内各部位の生菌数はエンテロトキシン産生株の場合と同様に10^4～10^6/g 検出されているが,エンテロトキシンの産生はまったく認められない. 大腸部分においては生菌数は極めて少なく，エンテロトキシンも検出されていない.

3. 病理組織学的観察

C. perfrigens NCTC 8239株を投与 8 時間後に剖検したサルでは小腸各部位は肉眼的に軽度の腫張と腸管の脆弱化が観察されたが，充血や出血などは認められなかった.病理学的には小腸各部位に著明な変化が観察された. すなわち，十二指腸，空腸，回腸の各部位の粘膜上皮の剝離，固有層の浮腫，中心乳び腔の拡張，細網細胞およびリンパ球の壊死が観察された(Photo 1)

結腸部位では軽度の上皮の剝離と固有層の浮腫がみられたにすぎなかった.

C. perfringens NCTC 8239株投与後48時間で剖検したサルでは，8時間で観察された病理所見よりも軽度ではあったが，小腸各部位および結腸の粘膜上皮の剝離および固有層の浮腫が認められた. また，回腸部では中心乳び腔の拡張も観察された.

これらの病理学的変化がエンテロトキシンの作用であることを確認するために，精製エンテロトキシン 2 mgをサルに投与し，投与後 3 時間で解剖し，同様に各腸管組織を観察した.

病理所見は*C. perfringens* NCTC 8239株の生菌投与例と極めて類似していた. すなわち，絨毛先端部の剝離，粘膜固有層の浮腫，中心乳び腔の拡張がみられ，しかも病理変化は生菌数投与の場合より，より強度であった. (Photo 2)

対照に用いたエンテロトキシン非産生株 *C. perfringens* W 1395株を投与し 8 時間後の観察ではまったく病理学的変化は認められず正常な組織像であった. (Photo 3)

考　察

ウエルシュ菌腸炎の起因物質が芽胞形成時に産生され

Table 4. Enumeration of viable cells and detection of the enterotoxin made on intestinal contents of monkeys, taken at 8 hrs after the inoculation of living cells of *C.perfringens* W 1395 strain

Intestinal content examined	No.5			No.6		
	Viable cell, counts/g		Estimated amount of enterotoxin (μg/g, by RPHA)	Viable cell, counts/g		Estimated amount of enterotoxin (μg/g, by RPHA)
	Unheated	Heated*		Unheated	Heated*	
Duodenum	1.6×10^5	2.9×10^5	ND**	1.6×10^5	7.0×10^4	ND
Jejunum	3.9×10^5	2.3×10^6	ND	9.0×10^7	2.2×10^6	ND
Ileum	1.5×10^5	4.3×10^5	ND	1.6×10^4	1.0×10^4	ND
Colon	$<10^2$	$<10^2$	ND	$<10^2$	$<10^2$	ND
Rectum	$<10^2$	$<10^2$	ND	$<10^2$	$<10^2$	ND

*Prior to enumeration, specimens were heated at 75 C for 20 min.
**Not detected.

るエンテロトキシンであることは多くの研究者によって証明されている．本毒素の下痢発症機序については病理学的あるいは細胞レベルでの検討が多く試みられている．McDonel ら[5,6,7,8]はラットやウサギの腸管内に直接エンテロトキシンを作用させて水分の分泌や Na^+, Cl^-, HCO_3^-, ブドウ糖の腸管内における経時的変化を測定し，エンテロトキシンによる下痢発現を生理学的立場から検討している．その成績では，毒素が腸粘膜に接触後15～20分の短時間ですでに水分の流出が観察され，粘膜への作用は短時間でおこることを明らかにした．また，Na^+, Cl^-の排出とブドウ糖の吸収障害が観察されている．この際，病理学的には腸管粘膜上皮とくに絨毛の剝離などの器質的な変化を報告している．

今回のカニクイザルをモデルにしたウエルシュ菌の感染実験では，生菌投与後より腸管内で芽胞が形成され，腸管腔や腸粘膜面に多量のエンテロトキシンが認められた．また，小腸，特に回腸部位に絨毛先端部上皮の剝離，粘膜固有層の浮腫，中心乳び腔の拡張が認められた．

精製エンテロトキシンを投与した場合でも生菌投与例の場合と同様な病理変化が観察されていることから，エンテロトキシンの作用によって腸管粘膜上皮に器質的障害がおこるものと考えられる．エンテロトキシン非産生株を投与した場合では腸粘膜上に特に異常が認められていない．エンテロトキシン非産生株もレシチナーゼなどの各種の代謝産物を産生するが，腸粘膜の病理学的変化はこれらの代謝産物ではみられないものと考えられる．すなわち，腸粘膜の変化は本菌の産生するエンテロトキシンの作用であると云える．

エンテロトキシンは細胞毒性をもっており，腸粘膜上皮の破壊も本作用によるものと考えられる．今回の実験では，大腸粘膜面でも同様な上皮の剝離が観察されており，本毒素の細胞毒性は特定な標的細胞でなく普偏的な作用であると考えられる．McDonel ら[9]は放射性同位元素を結合させたエンテロトキシンをウサギの腸管内に作用させ，毒素の細胞への結合を観察している．大腸粘膜上皮にも多量の毒素の吸着を認めているが，下痢の発症がみられない．病理学的変化の第1段階は毒素が腸粘膜に吸着し器質的変化を与え，次に第2段階としてのエンテロトキシンの生物学的作用が考えられる．

Skjelkvale ら[10]，Tolleshaug ら[11]はエンテロトキシンをマウスやラットに投与すると肝細胞に本毒素が吸着され，肝細胞内に Lactate dehydrogenase(LDH)の産生の増加を観察しており，今後は細胞レベルでの本毒素の作用機序の解析を進める必要があろう．

結　論

腸炎起病性ウエルシュ菌による下痢症の発症機序を解明するため，カニクイザルに実験的感染をおこさせ，腸管各部位での生菌数，芽胞数，エンテロトキシン産生および腸管の病理組織学的検討を行ない以下の成績を得た．

エンテロトキシン産生の *C. perfringens* NCTC 8239株を十二指腸上部に投与した結果，全例に投与後5～7時間で嘔吐あるいは下痢等の胃腸炎症状が認められた．

投与8時間後に2頭のサルを解剖し腸管各部位におけるウエルシュ菌生菌数，芽胞数およびエンテロトキシンの検出を行った結果，小腸，大腸の腸管各部位からウエルシュ菌が検出され，特に回腸部に高く10^6/g であった．芽胞数も回腸部にやや多い傾向が認められた．腸管内でのエンテロトキシンは小腸部位で高く3～10 μg/g であった．

投与48時間後に剖検した2頭では小腸内のウエルシュ菌生菌数や芽胞数は10^2～10^3/g と減少し大腸部から10^6/

g検出された．腸管各部位からのエンテロトキシンは検出されなかった．

病理学的所見は8時間後に剖検したサルでは小腸各部位での粘膜上皮の剝離，固有層の浮腫，中心乳び腔の拡張，細網細胞およびリンパ球の壊死など著明な病理変化が認められた．また，48時間後に剖検した例でも軽度の粘膜上皮の剝離，固有層の浮腫が認められた．

精製エンテロトキシン2 mgを投与したサルでも生菌投与サルと同様な病理学的所見が認められ，これらの組織学的変化はエンテロトキシンの作用によるものであると考えられた．なお，エンテロトキシン非産生の *C. perfriegens* W 1395株投与サルでは，腸管各部位からはウエルシュ菌が検出されたが下痢症状はなく病理学的にも何ら異常は認められなかった．

文　献

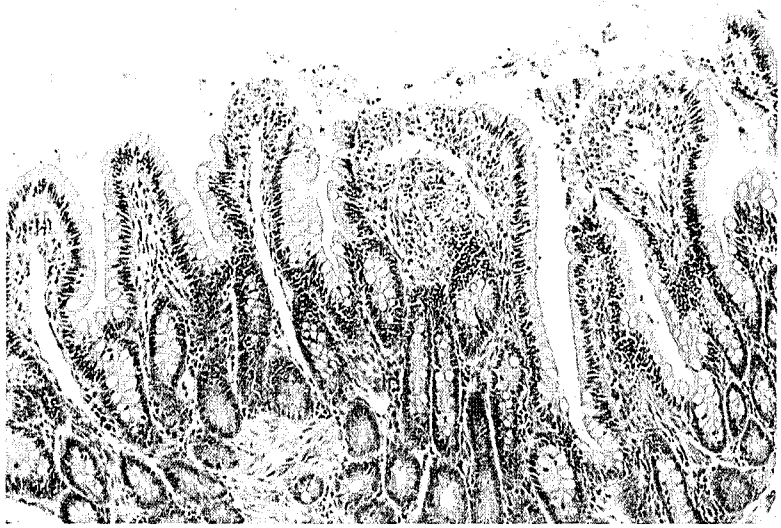
1) Duncan, C.L. and Strong, D.H. : *Infect. & Immun.*, **3**, 167, 1971
2) Hauschild, A.H.W., Walcroft, M. J. and Campbell, W. : *Can. J. Microbiol.*, **17**, 1141, 1971
3) Strong, D.H., Duncan, C.L. and Perria, G. : *Infect. & Immun.*, **3**, 171, 1971
4) Uemura, T. Sakaguchi, G. Itoh, T. Okazawa, K. and Sakai, S. : *Japan. J. Med. Sci. BioI.*, **28**, 165, 1975
5) McDonel, J.L., : *Infect. & Immun.*, **10**, 1156, 1974
6) McDonel, J.L. and Duncan, C.L., : *Infect. & Immvn.*, **12**, 1214, 1975
7) McDonel, J.L. and Duncan C.L. : *J. Infect. Dis.*, **136**, 661, 1977
8) McDonel, J.L. Chng, L.W. Pounds, J.G. and Duncan, C.L. : *Labor. Invest.*, **39**, 210, 1978
9) McDonel, J.L. and Demers, G.W. : *J. Infect, Dis.*, **145**, 490, 1982
10) Skjelkvale, R. Tolleshaug, H. and Jarmund, T. : *Acta–Path. microbiol. scand.* Sect. B., **88**, 95, 1980
11) Tolleshaug, H. Skjelkvale, R. and Berg, T. : *Infect. & Immun.*, **37**, 486, 1982

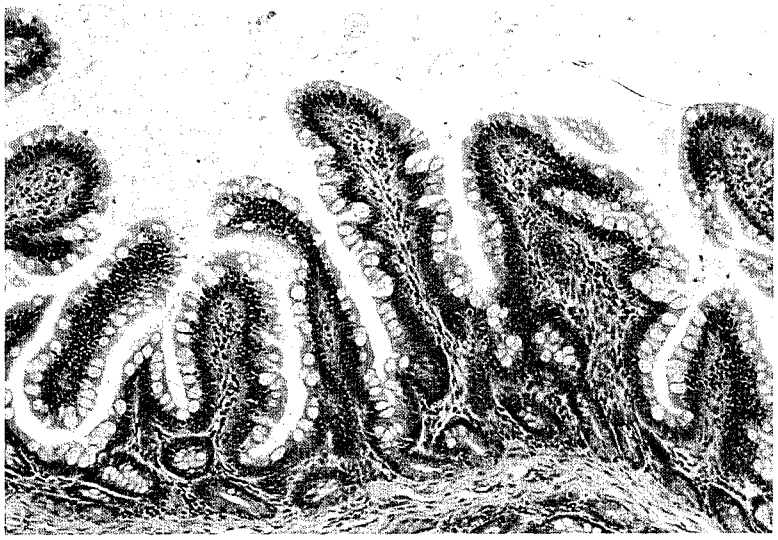
Explanation of Plates

Photo. 1. Cynomolgus monkey ileum infected with enterotoxigenic *C. perfringens* NCTC 8239 for 8 hours.

Photo. 2. Cynomolgus monkey ileum infected with 2 mg of purify enterotoxin for 3 hours.

Photo. 3. Cynomolgus monkey ileum infected with nonenterotoxigenic *C. perfringens* W 1395 for 8 hours.





東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 15-19, 1983

東京都における腸炎ビブリオ食中毒の発生状況と分離菌株の性状（1978－1982年）

津野正朗*, 太田建爾*, 山田澄夫*, 松下　秀*
斎藤香彦*, 伊藤　武*, 工藤泰雄*

Occurrence of *V. parahaemolyticus* Food Poisoning Outbreaks and Characterization of Isolates from Food Poisoning Cases in Tokyo (1978－1982)

MASAAKI TSUNO*, KENJI OHTA*, SUMIO YAMADA*
SHIGERU MATSUSHITA*, KAHIKO SAITOH*, TAKESHI ITOH*, and YASUO KUDOH*

Keywords：腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus*, 耐熱性溶血毒 KANAGAWA hemolysin

腸炎ビブリオ食中毒は，1961年，厚生省の食中毒精密統計に収録されるようになって以降これまで，依然としてわが国で発生する食中毒の重要な位置を占め，その集団発生件数もここ10数年間ほとんど減少をみていない．

この腸炎ビブリオ食中毒の疫学調査には，これまで分離株のOおよびK抗原に基づいた血清型別[1]が広く応用される一方，本菌の病原性との関連から，神奈川現象と呼ばれる特定の条件下での溶血現象，あるいはこの溶血現象にあずかる耐熱性溶血毒の産生性[2]についても併せて検討がなされるようになってきている．

著者らは，東京都内に発生した本菌食中毒の疫学調査の一環として，食中毒患者から分離された菌株を中心に1961年以降血清型別を，1963年よりは血清型別と併せて神奈川現象試験あるいは耐熱性溶血毒の産生性試験を実施し，これらが食中毒の診断や疫学の解析にきわめて有用な手段を提供することを報告してきた[3-8]．

本報では，引続き1978年から1982年の5年間における腸炎ビブリオ食中毒の発生状況と，それら各事例の患者から分離された菌株の血清型，および耐熱性溶血毒産生性について検討を加えた成績の概要について報告する．

材料および方法

供試菌株　1978年から1982年の5年間に，東京都内に発生した集団食中毒事例の患者より当研究所において分離した菌株である．各患者からの分離菌株は，1検体当り3～5個の集落について血清型別を行い，同一血清型菌だけが検出された場合は1株とし，いくつかの異なった血清型菌が同時に認められた場合は，血清型を異にするごとにそれぞれ1株として扱った．なお分離菌株の同定は善養寺ら[9]の方法に従って行なった．

血清型別法　K抗原型別には市販（デンカ生研K. K. 製）および一部は当研究所作成の診断用抗血清を，O群別は市販の診断用血清（同上）を用い，いずれも常法に従いスライド上凝集反応で行なった[10]．

供試抗血清は，K抗原は現行抗原構造表（表1）のうちK70まで，またO群はO1～O11までを用いた．なお，K69およびK70は，著者らが新K抗原型（TNK14および15）[11,12]として提案，腸炎ビブリオ血清型別委員会により承認，抗原構造表に新らたに追加されたものである．

神奈川現象（耐熱性溶血毒素産性）試験　主に5％ウサギ赤血球加変法我妻寒天培地を用いて行なった[13]．また一部の菌株については，太田ら[14]の方法に従い，5％NaCl加2％ペプトン水の振とう培養により培養沪液を調整し，逆受身血球凝集（RPHA）反応による，耐熱性溶血毒の直接検出を試みた．このRPHA反応には，抗溶血毒素特異免疫グロブリンで感作した緬羊赤血球を用い，マイクロタイター法で行なった．

結果および考察

腸炎ビブリオ食中毒の発生状況　東京都において，1978～1982年の5年間に発生した腸炎ビブリオ食中毒の年次別，月別発生状況を表2に示した．この期間における本食中毒の年間発生件数は20～46件，患者数は285～1,177名，年平均では34件，620名となっており，それ以前の5年間の平均発生数（件数42;患者数861名）に比較して，やや減少傾向にあることがうかがわれた．しかし，事件の発生規模そのものは，この10年間殆んど変ってい

* 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. Antigenic Schema of Vibrio *parahaemolyticus*

O-group	K-type
1	1, 25, 26, 32, 38, 41, 56, 58, 64, 69
2	3, 28
3	4, 5, 6, 7, 29, 30, 31, 33, 37, 43, 45, 48, 54, 57, 58, 59
4	4, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 34, 42, 49, 53, 55, 63, 67
5	15, 17, 30, 47, 60, 61, 68
6	18, 46
7	19
8	20, 21, 22, 39, 70
9	23, 44
10	24, 71
11	36, 40, 50, 51, 61
12*	19, 52, 66
13*	65

*O12 and O13 were additionally proposed as new O-antigen, however they have not yet been confirmed.

Table 2. Monthly Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* Food Poisoning

Year		Month										Total
		Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May.	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	
1978	Outbreaks	—	—	1(1)	—	—	1(1)	7	15(1)	6	—	30(3)
	Patients			36(36)			32(32)	61	171(4)	57		357(72)
1979	Outbreaks	—	—	—	—	1	2	8	19(2)	8	3	41(2)
	Patients					3	73	402	330(3)	44	195	1,047(3)
1980	Outbreaks	1(1)	—	1(1)	—	—	3	9	12	19	1	46(2)
	Patients	2(2)		4(4)			95	465	240	370	1	1,177(6)
1981	Outbreaks	—	—	—	—	—	1	11	13	7	—	32
	Patients						26	107	87	111		331
1982	Outbreaks	—	—	—	—	—	—	5	13	2	—	20
	Patients							89	193	3		285
Total	Outbreaks	1(1)	—	2(2)	—	1	7(1)	40	72(3)	42	4	169(7)
	Patients	2(2)		40(40)		3	226(32)	1,124	1,021(7)	585	196	3,197(81)

( ): imported cases

ない．一方，月別発生状況をみると，これまで報告[3-8]してきたと同様，その発生はおおむね7～9月に集中しているが，1978年には3月に1件，1980年には1月および3月にそれぞれ1件の発生例がみられた．ただ，これらはいずれも，東南アジアへの旅行中の食事あるいはそれらの地域から持ち込まれた海産物を原因として発生したもので，いわゆる輸入感染事例といえるものであった．こうした輸入事例と考えられるものは，この5年間に，これらを含め計7例（患者数81名）にのぼった．

患者由来株のK抗原型の年次別推移　1978～1982年の5年間に分離された腸炎ビブリオ1,363株のK抗原に基づく血清型別成績を表3に示した．年次により若干の差異はあるが，分離株のうち92.2～97.4%が既知のK1～K70抗原のいずれかに型別された．出現K抗原型は，1978年が20菌型，1979年が30菌型，1980年が32菌型，1981年が23菌型，また1982年が25菌型と多彩であった．また本菌の年次別主要起因菌型は，多くの場合，毎年大きな入れ替りのあることをこれまで報告[8]してきたが，この5年間の成績でも同様の傾向にあることが示された（表4）．即ち1978年は，前年の流行菌型であったK12に加え新たにK63が，1979年には前年のK63に加えK7が，主要菌型として認められた．また1980年および1981年の

Table 3. Serological Types of *Vibrio parahaemolyticus* Isolates from Food Poisoning Cases in Tokyo

K-type	1978	1979	1980	1981	1982
1	—	—	14(3.3)	—	1
3	1	1	25(5.8)	1	1
4	1	1	1	6(3.4)	2
5	—	9	—	—	2
6	—	6	24(5.6)	12(6.8)	12(7.8)
7	1	39(10.5)	4	—	1
8	26(11.2)	12(3.2)	131(30.5)	75(42.6)	15(9.8)
9	2	—	—	—	1
10	25(10.8)	3	15(3.5)	11(6.3)	—
11	11(4.7)	2	—	2	40(26.1)
12	78(33.6)	6	10	4	2
13	—	15(4.0)	14(3.3)	5(2.8)	1
15	2	2	8	—	2
17	—	1	1	1	4
18	1	5	13(3.0)	1	—
19	—	3	—	1	—
22	—	25(6.7)	2	—	—
25	—	1	—	—	—
28	—	—	1	1	1
29	1	3	10	4	1
31	1	—	1	—	—
32	1	—	2	—	1
33	1	1	1	—	—
34	—	—	1	1	—
36	—	11	12(2.7)	4	—
37	—	—	2	—	—
38	3	12(3.2)	6	5(2.8)	24(15.7)
41	—	—	1	—	—
42	—	—	—	1	2
46	—	1	1	—	2
54	1	23(6.2)	—	1	—
55	—	3	6	1	5(3.3)
56	9(3.9)	24(6.4)	5	7(4.0)	4
57	7	1	—	—	—
58	—	—	4	—	—
60	9(3.9)	—	12(2.7)	4	—
63	41(17.7)	125(33.5)	84(19.6)	15(8.5)	11(7.2)
64	—	—	2	—	1
66	—	—	2	—	—
67	—	5	3	5(2.8)	2
68	—	3	—	—	3
69	—	13(3.5)	—	—	—
70	—	5	—	—	—
ut	10(4.3)	12(3.2)	11(2.6)	8(4.5)	12(7.8)
Total	232(100)	373(100)	429(100)	176(100)	153(100)

Table 4. Yearly Change in Major Causative K Type Strains of *Vibrio parahaemolyticus* in Food Poisoning in Tokyo

Year	No. of isolates tested	Order of dominant K types				
		1st	2nd	3rd	4th	5th
1964	488	K 3(42.2)	K 9(12.7)	K 8(12.3)	K13(7.8)	K 5(7.2)
1965	608	K33(41.3)	K44(15.3)	K46(8.2)	K 3(8.1)	K12(4.9)
1966	376	K13(36.2)	K33(18.9)	K 5(9.8)	K18(3.7)	K12(3.5)
1967	559	K 7(46.7)	K38(21.6)	K33(8.6)	K 8(3.9)	K 5(2.3)
1968	505	K38(29.8)	K 7(23.0)	K11(9.7)	K 8(9.1)	K12(3.8)
1969	629	K 7(26.2)	K29(8.7)	K12(8.1)	K54(7.6)	K44(5.4)
1970	574	K 7(23.2)	K55(13.9)	K15(12.4)	K54(9.4)	K56(5.1)
1971	822	K 8(24.8)	K 4(24.0)	K56(9.2)	K11(7.9)	K54(5.8)
1972	799	K 8(14.5)	K15(12.3)	K39(9.3)	K12(9.1)	K 4(8.3)
1973	498	K33(30.9)	K12(10.6)	K 7(9.6)	K13(9.4)	K54(8.8)
1974	188	K 5(13.3)	K10(10.6)	K19(10.1)	K54(8.5)	K12(8.0)
1975	625	K60(18.9)	K13(16.5)	K15(10.6)	K10(7.2)	K54(7.2)
1976	186	K55(16.7)	K29(15.1)	K54(10.8)	K 7(7.5)	K 8(6.5)
1977	365	K12(53.4)	K55(8.5)	K19(7.7)	K15(5.2)	K 8(1.9)
1978	232	K12(33.6)	K63(17.7)	K 8(11.2)	K10(10.8)	K11(4.7)
1979	373	K63(33.5)	K 7(10.5)	K22(6.7)	K56(6.4)	K54(6.2)
1980	429	K 8(30.5)	K63(19.6)	K 3(5.8)	K 6(5.6)	K10(3.5)
1981	176	K 8(42.6)	K63(8.5)	K 6(6.8)	K10(6.3)	K56(4.0)
1982	153	K11(26.1)	K38(15.7)	K 8(9.8)	K 6(7.8)	K63(7.2)

両年は，K63の検出頻度が減少，それに代ってK 8 が主要菌型となり，1982年にはさらにK11およびK38へ，主要菌型の大きな交代が認められた．

これらの事実は，本菌が海水ビブリオの一種であり，夏の時期に陸の環境に持ち込まれても，ヒトや動物などには永く保有されることがなく，その環境に年間を通じて常在できないことを反映したものであろう．ただ，毎年なぜある特定の血清型だけが海の環境から持ち込まれるかについては，本菌の生態や疫学を理解するうえで極めて重要な課題であるが，その点についてはまだ充分明らかにされていない．

耐熱性溶血毒素産生試験　患者分離株1,363株の成績を表5に示した．年次により若干の差はあるが，これまでの成績と同様，大部分が本溶血毒産生株であった．毒素非産生株は分離株の約5％に認められたが，これらの菌株はいずれも集団食中毒患者の一部から，原因と推定された溶血毒産生の起因菌とともに随伴的に検出されたもので，その血清型も原因菌型とは異なるものであり，明らかに陰性株が原因と考えられる事例は1例も認められなかった．なお，今回の成績において，陽性株のなかには，毒素産生量が少なく我妻平板法による神奈川現象試験では陰性で，より感度の高いRPHA反応によってしか陽性を示さない株もいくつか認められた．太田ら[14]の成績によれば，神奈川現象陰性株による食中毒とされてきた事例はいずれもこうした毒素産生性の弱い株に起因することが確かめられている．従って，神奈川現象陰性とされる株が起因菌と推定されたような場合は，RPHA反応など，より感度の高い方法による分離株の毒素産生性試験の結果を待って，慎重に決定する必要があるといえよう．

Table 5. Kanagawa Hemolysin Producibility of *Vibrio parahaemolyticus* from Food Poisoning Cases in Tokyo

Year	No. of isolates tested	No. of positives (%)
1978	232	230(99.1)
1979	373	355(95.1)
1980	429	409(95.3)
1981	176	161(91.5)
1982	153	140(91.5)
Total	1,363	1,295(95.0)

結　論

1978～1982年の5年間に，東京都内において計169件（患者数3,197名）の腸炎ビブリオ食中毒の発生があった．これらの食中毒の患者から分離された腸炎ビブリオ1,363株について血清型別を行なった結果，1,310株（96.1%）がK1～K70のK抗原型のいずれかに型別された．

主要起因菌型は，1978年ではK12（33.6%）およびK63（17.7%）；1979年ではK63（33.5%）およびK7（10.5%）；1980年ではK8（30.5%）およびK63（19.6%）；1981年ではK8（42.6%）；1982年ではK11（26.1%）およびK38（15.7%）となっており，これまでに得られた成績と同様，年次による菌型の入れ替りが認められた．

分離株の耐熱性溶血毒素産生試験の結果では，1,363株中1,295株（95.0%）で陽性であり，本溶血毒産生株が病原株であることを強く支持する結果であった．

文　献

1) The Committee on the Serological Typing of *Vibrio parahaemolyticus* : Japan. J. Microbiol., **14**, 249, 1970
2) Miyamoto, Y., T. Kato, Y. Obara, S. Akiyama, K. Takizawa, and S. Yamai : J. Bacteriol., **100**, 1147, 1969
3) 善養寺　浩，坂井千三，寺山　武，工藤泰雄，一言広：日本伝染病学会誌，**37**，195，1963
4) 善養寺　浩，坂井千三，寺山　武，工藤泰雄，伊藤武，斉藤クラ，長崎　護，伊藤多美夫，畑野逸子：東京衛研年報，**15**，31，1965
5) 工藤泰雄，太田建爾，池島伸至，伊藤　武，善養寺浩：東京衛研年報，**22**，15，1971
6) 工藤泰雄，太田建爾，斎藤香彦，松下　秀，坂井千三，善養寺　浩：東京衛研年報，**26－1**，25，1975
7) Kudoh, Y., S. Sakai, H. Zen-Yoji, and R. A. Leclair : International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*, Edited by Fujino, T., G. Sakaguchi, R. Sakazaki, and Y. Takeda, 9, 1974, Saikon. Publ. Co., Tokyo
8) 工藤泰雄，津野正朗，太田建爾，松下　秀，坂井千三：東京衛研年報，**29－1**，19，1978
9) 善養寺　浩，寺山　武，工藤泰雄，太田建爾，坂井千三：日本細菌学雑誌，**26**，298，1971
10) 工藤泰雄，善養寺　浩：微生物検査，小酒井望編，225，1974，医学書院
11) 津野正朗，太田建爾，松下　秀，坂井千三：日本細菌学雑誌，**36**，475，1981
12) 伊藤　武，津野正朗，太田建爾，丸山　務，Paradee Dumrongpunth，坂井千三：日本細菌学雑誌，**36**，593，1981
13) 善養寺　浩：感染症学会雑誌，**46**，113，1972
14) 太田建爾，工藤泰雄，津野正朗，大橋　誠，善養寺浩：日本細菌学雑誌，**33**，82，1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 20-26, 1983

酵素抗体法(ELISA)による日本住血吸虫症の診断（第2報）
ELISA成績と虫卵検査(MIFC)および卵周囲沈降反応(COPT)成績の比較検討

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) (II) Comparison of Results Obtained by ELISA, Stool Examination (MIFC) and Circumoval Precipitin Test (COPT)

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

We reported in 1982 that micro-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) with peroxidase-OPD system was a useful tool for serodiagnosis of schistosomiasis japonica, and that it was applicable even in developing countries.

In the present study, the comparison was made on the examination results obtained by the ELISA and by the traditional methods : stool examination (MIFC) and circumoval precipitin test (COPT), and the following conclusion were drawn.

1) The coincident rate of positive results between ELISA and MIFC was 72.2% (57/79). On the other hand, the rate between ELISA and COPT was 92.4% (73/79).
It was considered that ELISA was as sensitive as or more so than COPT.

2) The sensitivity of ELISA was not significantly different when an egg or any of 2 kinds of adult-antigens, male or female, were used as antigen, though each antigen showed some differences in ELISA titer.

3) For further improvement in diagnosis of schistosomiasis, ELISA will provide a useful tool as well as the other diagnostic techniques such as MIFC, COPT and clinical findings.

4) The correlation between ELISA-titer and COPT-Index was computed at $r = 0.58 (P < 0.01)$, suggesting a quantitative significance of COPT.

Keywords : ELISA, Serodiagnosis of Schistosomiasis japonica, Comparison of Results, MIFC and COPT

はじめに

著者ら[1]は，第1報（1982）において，酵素抗体法(ELISA)のフィリピンに適合する反応術式について検討を行ない，Peroxidase-OPD systemによる本法は日本住血吸虫症の診断法として実用化されうると結論した．また，日本住血吸虫(*S. j*)の虫卵粗抗原を用いた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，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)の成績と本法の成績の比較分析を引き続き行なう必要があると考察した．そこで，今回は，現地で調製した*S. j*虫卵粗抗原と雌雄成虫抗原を用いたELISAによる本症患者血清の抗体検出率と，MIFC法による*S. j*虫卵検出率との関係を比較検討した．さらに，これまで抗体検出率が最も高く，しかも簡便で，すでにSchistosomiasis Control and Research Project (S.C.R.P.)の検査室で日常検査として実施されているCOPTとELISAの抗体検出率とを比較した結果，EL-

* 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
** 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

ISA は COPT を上まわる成績が得られたので報告し，これらの成績について2，3の考察を加えたい．

材料および方法

材料：患者血清および検便材料はともに S.C.R.P. の病院に来院した本症の同一患者から同一日に採取されたものである．ELISA，MIFC と COPT のいずれかの成績が得られたものは82例で，虫卵粗抗原の検討に用いられた79例と，雌雄成虫抗原の検討に用いられた63例は，これら3法すべての成績が得られたものである．また，対照血清として，マニラの San Razaro Hospital で採取した消化器系，呼吸器系または肝炎を含む感染症が疑われる患者血清65例を用いたが，これら患者については虫卵検査は行なわなかった．

方法：1．ELISA; 著者ら[1]（1982）が第1報で報告したとおり，Peroxidase-OPD system による micro-ELISA の定量法で各種抗原に対する抗体価を測定した．2．MIFC ; S.C.R.P. の発行の Technical Guide for Schistosomiasis Control in the Philippines[2] (1976)に従い，1検体1回法による虫卵検査を実施した．すなわち，MIF 液10m*l*に糞便1gを入れ均一化した後ガーゼ1枚で沪過，次いで遠心管に糞便液を移し冷蔵エチルエーテル4m*l*を加えて，ゴム栓を施し振盪混和する．1600 r.p.m. 1分間遠心沈澱を行なった後上清と糞便層を捨て，管底の全沈渣をスライドグラスにとり，カバーグラスをかけて鏡検し定性的に虫卵の有無を調べた．3．COPT ; H. Tanaka *et al*[7]（1975）の方法によった．COPT の判定は，M. Yokogawa *et al*[8]（1967）の記載どおり反応型 Type 0 ～ Type Ⅲまでの区分を行なった．Type Ⅰについては疑陽性として取り扱い ELISA の成績と比較検討した．COPT の手技は，*S.j* 実験感染マウスの腸壁より得られた凍結乾燥虫卵をツマヨウジで適量(約200個)スライドグラスにとり，パスツールピペットで被検血清を1滴々下する．次いで24×24 mm のカバーグラスの4辺に白色ワセリンを塗布して，虫卵と血清混合部分を封入する．乾燥を防ぐため湿潤箱にスライドグラスをおさめて37°C で72時間 incubation を行なった後，鏡検により反応型を判定．COPT–Index のためには，成熟虫卵50個について Type 0 ～ Type Ⅲの数をかぞえて記録した．4．各種抗原を用いた ELISA 抗体価と MIFC，COPT の成績比較：3法各々の陽性率と陰性率のほかに，COPT の Type 0 ～ Type Ⅲ別，および MIFC と COPT の成績の一致または不一致性について，ELISA を中心に種々の検討を行なった．5．COPT–Index[2]と ELISA 抗体価の相関 ; $\text{COPT–Index} = \frac{\Sigma ni}{N} \times \frac{100}{3}$（N＝実際に鏡検した成熟虫卵数，Σni＝50個の成熟虫卵のうち Type Ⅰ～ Type Ⅲまでの COPT 反応を示した虫卵数に Type Ⅰの係数1，Type Ⅱの係数2，Type Ⅲの係数3をそれぞれ掛けた総和）と ELISA 抗体価との相関について，最少二乗法により回帰直線と相関係数を求め，定量法としての意義について検討を加えた．

成　績

79例の本症患者血清の虫卵粗抗原による ELISA 抗体価別に MIFC 法による虫卵検出数（%）と COPT 反応陽性数（%）を Table 1. に示す．ELISA 抗体価1：80以上を示すもの79例中，虫卵陽性率は72.2%（57/79）であるのに対し，COPT の陽性率は92.4%（73/79）であった．COPT で反応型 Type Ⅰを示す疑陽性2.5%（2/79）を加えると，COPT による抗体検出率はほぼ ELISA の95%となる．MIFC，COPT ともに ELISA 抗体価が高い例ほど検出率が上昇する傾向があった．逆に，ELISA 抗体価の低い例では，他の2法の陰性率す

Table 1. Comparison of Results Obtained by ELISA with Egg Antigen and those Obtained by MIFC and COPT

Antigen	ELISA titer	No. of cases	MIFC +(%)	MIFC −(%)	COPT +(%)	COPT ±(%)	COPT −(%)
	2560	32	30(93.7)	2(6.3)	32(100.0)	0	0
S. japonicum	1280	13	11(84.6)	2(15.4)	13(100.0)	0	0
Egg	640	18	10(55.6)	4(44.4)	17(94.4)	1(5.6)	0
obtained	320	9	5(55.6)	4(44.4)	8(88.9)	0	1(11.1)
from Dog	160	3	1(33.3)	2(66.7)	2(66.7)	0	1(33.3)
(1：160)	80	4	0	4(100.0)	1(25.0)	1(25.0)	2(50.0)
	40	0	0	0	0	0	0
Total		79	57(72.2)	22(27.8)	73(92.4)	2(2.5)	4(5.1)

Table 2. Comparison of Results Obtained by ELISA with Adult–Female Antigen and those Obtained by MIFC and COPT

Antigen	ELISA titer	No. of cases	MIFC +(%)	MIFC −(%)	COPT +(%)	COPT ±(%)	COPT −(%)
	2560	6	6(100.0)	0	6(100.0)	0	0
S. japonicum	1280	6	5(83.3)	1(16.7)	6(100.0)	0	0
Adult–Female	640	11	9(81.8)	2(18.2)	11(100.0)	0	0
obtained	320	21	16(76.2)	5(23.8)	20(95.2)	1(4.8)	0
from Dog	160	8	5(62.5)	3(37.5)	8(100.0)	0	0
(1 : 16)	80	7	4(57.1)	3(42.9)	6(85.7)	0	1(14.3)
	40	4	3(75.0)	1(25.0)	4(100.0)	0	0
Total		63	48(76.2)	15(23.8)	61(96.8)	1(1.6)	1(1.6)

Table 3. Comparison of Results Obtained by ELISA with Adult–Male Antigen and those Obtained by MIFC and COPT

Antigen	ELISA titer	No. of cases	MIFC +(%)	MIFC −(%)	COPT +(%)	COPT ±(%)	COPT −(%)
	2560	20	14(70.0)	6(30.0)	20(100.0)	0	0
S. japonicum	1280	20	18(90.0)	2(10.0)	20(100.0)	0	0
Adult–Male	640	10	8(80.0)	2(20.0)	10(100.0)	0	0
obtained	320	7	6(85.7)	1(14.3)	7(100.0)	0	0
from Dog	160	4	1(25.0)	3(75.0)	3(75.0)	1(25.0)	0
(1 : 16)	80	1	1(100.0)	0	1(100.0)	0	0
	40	1	0	1(100.0)	0	0	1(100.0)
Total		63	48(76.2)	15(23.8)	61(96.8)	1(1.6)	1(1.6)

なわち見逃し率が高くなることが明らかとなった. 特に, 著者ら[1]が第1報でELISAの定量法の陽性と陰性の限界と定めた1：80の患者4例においては, 虫卵検査で4例とも陰性, COPTでは2例が陰性を示した.

Table 2と3は, それぞれ雌および雄の成虫抗原を用いたELISAの抗体価とMIFC, COPTの両成績を比較したものである. 雌雄両抗原を用いたELISA抗体価の分布は虫卵抗原による抗体価分布と比べ若干の差が認められた. すなわち, 雄の成虫抗原に対する抗体価は, 虫卵抗原と同様1：640より高い希釈列に偏って分布するが, 雌の成虫抗原に対する抗体価の分布は, 63例の同一患者より得られた血清にもかかわらず, 1：320と1：640をピークとする分布パターンを示している. また, 1：40のELISA抗体価を示した例は, 虫卵抗原で0, 雄の成虫抗原で1, 雌成虫抗原で4例認められ, 加えて抗体価分布が全体的に下方に偏在していることが明らかとなった. 一方, 雌雄両抗原を用いたELISAとMIFCおよびCOPTの各陽性一致率は, ともにMIFC 76.2% (48/63), COPT 96.8% (61/63) と同率を示した. これらの成績は, 雌雄両成虫抗原を用いたELISA反応の鋭敏性が, 虫卵抗原のそれより低いことを示唆しており, 雌雄成虫抗原の陽性限界は, 虫卵抗原を用いたELISAの陽性限界1：80より1管低い1：40とするのが妥当である. 3種抗原別のELISA成績とMIFCおよびCOPTの成績一致率をTotalで有意差検定を行なった結果, MIFCとCOPTはともに, 各抗原間に有意差 ($P<0.01$) が認められなかった. 一方, ELISA, MIFCおよびCOPT間には, 抗原の違いにかかわりなく, MIFCとCOPTおよびMIFCとELISA間にそれぞれ有意差 ($P<0.01$) が認められた.

Table 4. は, MIFC単独の場合とCOPT単独の反応型Type別および, MIFC・COPT 2法の組合せによる成績別にELISA抗体価の分布状況を示している. まず, MIFCの陰性率は32%に及び, しかもMIFC陽性群と陰性群ともにELISA抗体価の分布巾に2倍段階希釈で6管の巾が認められ, MIFC 1回法の本症患者

Table 4. Frequency Distribution of ELISA-titer with Egg Antigen Compared with MIFC, COPT and Combination of Both Results

Method	Division	ELISA Titer (1:)									
		<40	40	80	160	320	640	1280	2560	≧5120	Total(%)
MIFC	Positive				2	4	9	11	13	17	56/82(68.3)
	Negative			5	2	4	8	2	3		26/82(31.7)
(*Control*)*	Type-O	(51)*	(4)	(2)	(2)						(59)
MIFC	Type-I	(4)	(1)					(1)			(6)
	Type-O			2	1	1					4/80(5.0)
(*Patient*)**	Type-I			1			1				2/80(2.5)
MIFC	Type-II			1	2		5		1		9/80(11.3)
	Type-III				1	7	12	12	16	17	65/80(81.2)
Combination of											
MIFC Positive COPT Positive					2	4	10	7	17	17	57/80(71.2)
MIFC Negative COPT Positive					1	3	8	2	3		17/80(21.3)
MIFC Negative COPT Negattve				4	1	1					6/80(7.5)

Note (Control*) : Control sera were collected in Manila
(Patient**) : Patient's sera were collected in Leyte

のスクリーニング精度の低さが示されている．一方，COPTでは，反応型Type ⅡとⅢを陽性とした場合，92.5%（74/80）の抗体検出率を示し，Type Ⅰ（±）をも加えると95.0%（76/80）の検出率となる．COPTの反応型別にELISA抗体価との定量的な関係を検討すると，Type ⅠからⅡそしてⅢへと移行するに従い，高抗体価を示すものが多くなる傾向が認められた．表中(Control)*で示される数は，マニラのSan Razaro Hospitalで採取した消化器系，呼吸器系および肝炎等の感染症が疑われる患者例数を示しているが，ELISAで1：40以上，COPTの反応型Type Ⅰを示したものが認められた．但し，この者の本症罹患歴は不明である．次に患者スクリーニングの目的でMIFCとCOPTを併用した場合の検討を行なうと，MIFCとCOPTともに陰性を示した例が7.5%（6/80）でELISA抗体価が1：80～1：320と低いものに限定される傾向が認められた．

ELISA抗体価が1：640以上の高い値を示すものは，2法の組合せのどちらか一方，または両方が陽性を示す例が多く，このことから，虫卵抗原によるELISAの有用性が改めて証明された．

COPT-IndexとELISA抗体価との相関々係をTable 5. に示す．COPTは*S. j*虫卵と患者血清の間に見られる独得な抗原抗体反応による現象であって，沈降物の形状によりTypingが行なわれているが定量的意味合いは比較的薄いとされている．しかしながら，Table 4. に示した成績からやゝ定量的な傾向が示唆されたので，COPT-IndexとELISA抗体価との相関を調べてみた．標本54の分散は，COPT-Index 1.0から22.0以上まで，2倍希釈法によるELISA抗体価の最大管差6管に及んだ．表中（ ）*で示す数（マニラで採血した対照血清）と≧5120および<40の数を除いて，最少二乗法で回帰直線を求めると，$Y=-2.64+(2.51)X$となり，相関係数は$r=0.58(P<0.01)$を示した．この成績から，反応様式の異なるCOPT-IndexとELISAの定量的相関々係が成立する．

考　　察

日本住血吸虫症の診断法として繁用されているMIFCとCOPTの標準法については，S.C.R.P. のTechnical Guide for Schistosomiasis Control in the Philippines[2]（1976）に記載されている．また，COPTの有用性については1968～1976年間にCabrera. B. D. *et al*[3)-5)]（1968, 1973, 1975），Tanaka, H *et al*[6,7]（1975, 1976），Nosenãs, J. S. *et al*[8]（1975）等多くの報告があり，これら成績の要約はM. G. Yogore *et al*[11]（1978）

Table 5. Correlation of Results Between ELISA-titer with Egg Antigen and COPT–Index on 54 Patients Sera

COPT	Index	ELISA-titer (1 :)								
		<40	40	80	160	320	640	1280	2560	≧5120
$\text{COPT-Index} = \frac{\Sigma ni}{N} \times \frac{100}{3}$	0.0	(52)*	(4)	(2)	(1)					
	1.0						1			
	2.0			1						
	3.0				2		3	1		
	4.0						1	1		
	5.0					1				
	6.0						1			
	7.0						1			
	8.0					1	1			1
	9.0							1		
	10.0				1		2	1	2	1
	11.0							2		
	12.0					2		2	1	
	13.0					1		1		
	14.0					1	2			3
	15.0							2	1	3
	16.0						1		2	4
	17.0						1	1		1
	18.0								1	3
	19.0					1	1	1		1
	20.0						1		2	
	21.0									1
	22.0						1	2	2	2

Note : $Y = -2.64 + (2.51)X$

$R = 0.58 (P < 0.01)$ $n = 54$

( )* : Control sera were collected in Manila

の報告に詳述されている．COPT の鋭敏性は，臨床所見および虫卵検査等の成績と対比して，対象群，患者群および手技・判定基準の相違はあっても，ほぼ50%台から100%と報告されている．また，1961年以降，凍結乾燥虫卵が抗原として用いられるようになり，手技の簡便性とあいまって高い信頼性を得るようになって来た．一方，1972年から1980年までの間，免疫血清反応を応用した本症診断法として，補体結合反応，ゲル内沈降反応，間接蛍光抗体法および酵素抗体法など数々の試み[9]がなされて来ている．これら新たな免疫血清学的診断技術の導入に際し，成績の比較検討は，従来から行なわれている臨床所見，虫卵検査および COPT の成績を基礎に実施されている．そこで，今回著者らが行なったフィリピンにおける酵素抗体法の実用化のための検討も，MIFC および COPT との比較において実施されなくてはならない．*S.j* 虫卵粗抗原を用いた ELISA の成績が，ほぼ COPT の成績と一致し，ELISA の 1 ：80以上を陽性とした場合の定性的 COPT の一致率が92.4% (73/79) であったことは，ELISA が COPT に匹敵するかそれをやや上まわる鋭敏度を有することを意味し，既報[1]を裏付ける好ましい成績であった．また，雌雄両抗原を用いた ELISA の成績も，定性的には陽性限界をどの希釈倍数に求めるべきか検討の余地があるが，COPT との一致率には虫卵粗抗原と同等の成績が得られている．しかしながら，虫卵抗原と比較して雌雄成虫抗原による ELISA の O.D. 値は既報[1]のとおりかなり低下し，また ELISA 抗体の分布も下方に偏りが認められることが今回明らかとなったので，本症患者のスクリーニングのためには，虫卵抗原による ELISA の方が推奨される．

ELISA と MIFC の成績を比較検討すると，COPT

と比べてMIFCではELISA抗体価の高低にかかわりなく，かなりの虫卵陰性例が出現している．特に，虫卵抗原によるELISAで1：80陽性を示した患者4例が，全例MIFC陰性を示したことは，感染後日時を経ない急性期またはごく少数寄生例と思われる．また，虫卵抗原によるELISAにおいては，抗体価が低いほど虫卵の検出されにくい傾向はあるが，雌雄成虫抗原によるELISAでは同様の傾向は認められない．このことは，急性期と慢性期の確実な患者群を区分し直さない限り解釈がむずかしいが，*S.j*成熟虫体数と産卵能力の度合いが虫卵検出率に影響を与え，一方，成虫の産卵能力よりも長期にわたる患者組織内の虫卵の蓄積が，虫卵抗原によるELISA抗体価をおし上げていることが示唆される．試みにいくつかの症例について，虫卵と雌雄成虫の3種抗原に対するELISA抗体価を組み合わせて検討すると，雌雄成虫抗原に対する抗体価がともに高い例および3種抗原に対する抗体価がともに高い例では虫卵検出率が高い．一方，雌雄どちらかの成虫抗原に対する抗体価が著しく低い場合または雌雄両抗原に対する抗体価が低い虫卵抗原に対する抗体が中等度の場合，および，3種抗原に対する抗体価がともに低い例では，虫卵検出率が低い傾向が認められる．今回，著者らが虫卵と雌雄成虫抗原を別々に調製して，同時同一条件下でしかも同一血清についてELISAを実施し，それぞれの抗原の特性を明らかにしようと努めたが，この様な試みは初めてのことでもあり，今後引き続き検討を重ねる必要があろう．糞便1g中の虫卵数(EPG)とELISAおよびCOPTの抗体検出率または抗体価との関係については，*S. mansoni*患者について，G. V. Hillyer *et al*[13] (1979)，また*S. japonicum*患者についてM. G. Yogore *et al*[11,14] (1978, 1980) により報告されている．これらの文献には，EPGが高ければ高い程，COPTおよびELISAの抗体検出率または抗体価が高くなることが記載されている．今回，著者らはS.C.R.Pの病院の外来患者のみを対象に，臨床所見に基づいてELISA，MIFCおよびCOPTの比較試験を行なったが，EPGの測定を行なわなかったため，直接，過去の文献との比較はできないけれども，虫卵検出率が高くなる程，ELISA抗体価が高くなる傾向が認められたことから，G. V. Hillyer *et al*，M. G. Yogore *et al*の報告を追認したものと考察される．さらに，従来から行なわれているMIFCとCOPTの組合せにより，またCOPTの反応型TypeⅠをも陽性とすることにより，ELISAとの陽性一致率が92%から95%に向上することが明らかとなったが，なおもELISA抗体価が80～320倍と低い症例については，見逃される可能性もあるので，ELISAを日常検査法に取り入れる必要がある．

従来，COPTの定量的測定の意義は軽視されていたが，今回，COPT-IndexとELISA抗体価との関係を検討した結果，反応型（Type 0～Ⅲ）またはCOPT-Index値でELISA抗体価を推定するには不充分ながら，COPT-IndexとELISA抗体価との間に$r=0.58$（$P<0.01$）の相関係数が得られたことは興味深い．COPTの術式そのものは極めて簡単であるが，反応時間が24時間から72時間もかかり，しかもCOPT-Indexを算出するためには，1被検血清当り50個の成熟虫卵のCOPT反応を顕微境下で観察して，反応の型別をした後に計算しなければならない繁雑さがある．したがって，集団検査時においては，定性的なスクリーニング検査以外，定量的なCOPTの実用性は乏しい難点がある．逆に，ELISAは術式が複雑な割に習熟すると共同作業ができ，大量の検査を4～5時間という短時間で処理できる利点を有し，しかもマイクロプレート上での機械的血清希釈により定量的に抗体価を測定することができる．

S.C.R.P.の検査室において，虫卵検査の精度を向上させるための試みは，T. P. Pesigan *et al*[10] (1958)以来，M. G. Yogore *et al*[11] (1978)，B. L. Blas[9] (1980)らによってなされて来たが，現在，日常検査法として頻用されているのはMIFC法である．今回，著者らが行なったMIFCとCOPTの陽性一致率は78.0% (57/73)で，H. Tanaka *et al*[6] (1975)の成績，84.9% (101/119)およびJ. S. Nosenãs *et al*[12] (1975)の成績，78.5% (139/177)とほぼ同様な成績が得られている．このことから，少なくとも1975年以降のMIFCによる虫卵検出率，すなわちS.C.R.P.の虫卵検査の技術水準はほぼ一定と考えられる．したがって，今後，虫卵検査の精度をさらに向上させるためには，技術的な改良のみならず，検査技術以前の問題点，すなわち，検便材料の輸送方法および採取便が少量のために乾燥するなどサンプリングにかかわるいくつかの問題を改善する必要があろう．

結　論

Peroxidase-OPD Systemによるmicro-ELISAの成績と，従来からS.C.R.P.で日常検査法として実施されているMIFCおよびCOPTの成績を比較し次の結論を得た．

1）虫卵粗抗原を用いたELISAの定量法で1：80以上を陽性とした場合を100% (79/79)とすると，MIFCでは72.2% (57/79)，COPTでは92.4% (73/79)の陽

性一致率が得られ，本 ELISA は COPT に匹敵するか，やや上まわる鋭敏性があると考察された．2）雌雄両抗原による ELISA の鋭敏性は，虫卵粗抗原による成績と比較して有意差が認められなかった．しかし，ELISA 抗体価の分布は抗原毎に若干の差が認められ，それぞれの抗原特性の差異については，今後の研究課題とした．3）本症の診断精度をより高めるために，ELISA は MIFC，COPT および臨床所見と同様に日常検査法として採用されるべきであると考察された．

4）COPT-Index と ELISA 抗体価の相関係数 $r = 0.58$（$P < 0.01$）が得られ，COPT–Index の定量的な意味合いが明らかとなった．

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．同事業団に謝意を表するとともに，本研究に多大なご協力をいただい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. の Dr. J. S. Portillo ほか関係各位，Dr. A. T. Santos Jr.，Dr. J. S. Nosenās ほか 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，本研究の一部は第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）村田以和夫，松田　肇，田中　寛，Bayani L. Blas：東京衛研年報，33，33，1982

2）Technical Guide for Schistosomiasis Control in the Philippines : Published on behalf of the S. C. R. P. by Japan International Cooperation Agency (J.I.C.A.), 53, 1976

3）Cabrera, B. D., Garcia, E. G. and Silan, R.S. : *Acta Med. Phil.*,4, 168, 1968

4）Cabrera, M. G., Cabrera, B. D., Ordinario, E. and Leon, W. DE. : *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.*, 4, 359, 1973

5）Cabrera. B. D. : *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.* 6, 495, 1975

6）Tanaka, H., Matsuda, H., Blas, B. L. and Nosenās, J. S. : *Jap. J. Exp. Med.*, **45**, 105, 1975

7）Tanaka, H. : *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.*, 7, 176, 1976

8）Yokogawa, M., Sano, M. and Araki, K. : *Jap. J. Parasit.* : 16, 77, 1967

9）Proceedings of the Philippine–Japan Joint Conference on Shistosomiasis Research and Control : Published by J. I. C. A., Compiled by The Joint Organizing Committee of the Conference, 1980

10）T. P. Pesigan, M. Faroog, N. G. Hairston, J. J. Jaurequi, E. G. Garcia, A. T. Santos, B. C. Santos and A. A. Besa : *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 18, 375, 1958

11）M. G. Yogore, Jr. R. M. Lewert and B. L. Blas : *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub.* Hlth, 9, 344, 1978

12）J. S. Nosenās, H. Matsuda, B. L. Blas, H. Tanaka and A. T. Santos, Jr. : *Japan. J. Exp. Med.*, **45**, 367, 1975

13）G. V. Hillyer, E. R. Tiben, W. B. Knigt, I. G. De Rios and R. P. Pelley : *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28 (4), 661, 1979

14）M. G. Yogore, R. M. Lewert and B. L. Blas : 10th International Congress on Tropical Medicine and Malaria, Abstracts, 312, 1980

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 34, 27-33, 1983

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（1982年）

矢野一好*, 林志直*, 藪内清*, 岩崎謙二
渡辺悌吉**, 石原祐**, 大久保さつき**

Virological Survey of Pediatric Patients with Acute Respiratory Infection and Seven Sewage Treatment Plants in Tokyo (1982)

KAZUYOSHI YANO*, YUKINAO HAYASHI*, KIYOSHI YABUUCHI*,
KENJI IWASAKI*,TEIKICHI WATANABE**, YU ISHIHARA**
and SATSUKI OHKUBO**

Throat swab specimens taken from pediatric outpatients were investigated virologically in the 12 month period from January to December, 1982. In the same period, samples of raw sewage, primary effluent, sludge and second effluent from 7 sewage treatment plants were tested for isolation of viruses. From 313 specimens taken from patients, 54 strains of viruses were isolated. The viruses detected were mainly Adeno types 1, 2, 3, 5, Coxsackie A type 4, Coxsackie B type 3, ECHO type 11 and Influenza type B. 139 strains of viruses were isolated from 168 sewage samples, and most common viruses were Adeno type 5, Coxsackie B type 3 and ECHO type 11. It was assumed that infections with these viruses were widely spread in Tokyo in 1982.

Keywords : virological survey, acute respiratory infection, sewage

緒　言

都内において感染・流行した主なウイルスの種類を把握する目的で，毎月定期的に都内7か所の下水処理場で採取した下水，および小児科を受診した急性呼吸器疾患患児から採取した咽頭ぬぐい液からウイルス分離試験を行った．

本報は，1982年1月から12月までのウイルス分離試験成績を基に，腸管系ウイルスの疫学的考察を行うと共に，患児から分離したウイルスの病因的意義を考察した．また，過去15年間のデーターを基にコクサッキーB群ウイルスの検出周期についても解析を試みた．

材料と方法

1　咽頭ぬぐい液　1982年1月から12月の間に東京逓信病院小児科外来で，急性期患児313名から採取した．採取した検体の処理方法は，既報の通りである[1]．検体の内訳は，上気道炎（URI）141件，下気道炎（LRI）22件，発疹73件，発熱20件，下痢25件，その他32件であった．

2　下水　都市下水処理場3定点（O, S, M）と，公営団地下水処理場4定点（Tc, Tk, Tt, Sb）から，生下水，第二沈殿汚泥，二次処理水を採取した．検体の採取方法および処理法は既報の通りである[1]．

3　ウイルス分離同定試験　ウイルス分離試験に使用した細胞，動物，および同定試験の方法は，前報の通りである[2]．

結果と考察

1　患児からのウイルス分離成積

1）症状別ウイルス分離状況　供試した313件の咽頭ぬぐい液からのウイルス分離成積を症状別に表1にまとめた．合計313件中53件の検体から54株のウイルスを検出した．同一検体から2種のウイルスを分離した例は，コクサッキーA群ウイルス（CA）4型とアデノウイルス（AD）2型の1例のみであった．

URI患児141名からは，40株（28.4%）のウイルスが

* 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, Hyakuninchо 3 chome, Shinjuku–ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京逓信病院小児科

表1. 患児からの症状別ウイルス分離状況(1982年)

ウイルス種類		URI		LRI	発疹		発熱	下痢	その他	計
		ヘルパンギーナ	その他		HFMD	その他				
Coxsackie A	4型	2			2	1				5
	16				1					1
Coxsackie B	3	1	3							4
ECHO	3		1							1
	11		1					1		2
Adeno	1		1	1		2				4
	2		5			1			1	7
	3		3							3
	5		3							3
	6		1							1
	?		1							1
Influenza	B		16	1			2			19
Herpes			2							2
Mumpus						1				1
合計株数		3	37	2	3	5(4)	2	1	1	54
検体数		9	132	22	23	50	20	25	32	313
分離率%		33.3	28.0	9.1	13.0	(8.0)	10.0	4.0	3.1	17.3 (16.9)

URI：上気道炎　LRI：下気道炎　HFMD：手足口病　？：アデノウイルス1～6型以外
(　)：ウイルス分離陽性検体数

検出された．URI以外の患者172名からは14株（8.1%）しか検出されなかった．

検出ウイルスの種類は，URI患児から12種類と多種類にわたって検出された．症状と検出ウイルスの関連をみると，CAはヘルパンギーナ，手足口病（HFMD）に多く検出され，インフルエンザB型ウイルスはURIに多く検出された．この傾向は昨年まで[2]と同様であり，両ウイルスの病因的関連性が示唆された．

2）月別ウイルス分離状況　患児から検出された54株のウイルス分離状況を月別に整理して表2に示した．ウイルス分離率のピークは2月と7月にみられた(39.5%，33.3%)．1月から2月の検出ウイルスはインフルエンザウイルスが中心となり，3月から5月には全体の検出率が低下し，夏以降アデノ，コクサッキーウイルスの各型が混在して検出される傾向があった．検出ウイルスを血清型別にみると毎年変化しているが[3]，ウイルス群別の月別消長は例年の傾向と同様であった[3]．

検出ウイルスの種類を前年と比較すると，本年はCA16型があらたに検出され，CA 5型，コクサッキーB群（CB）2型，およびインフルエンザAH1，AH3が検出されなくなったことである[2]．

これらの変せんは，患児の年令構成，および免疫状態，その他の環境要因が関与していると思われるので，長期にわたって本調査を継続し究明して行きたい．

3）年令別ウイルス分離状況　患児から分離したウイルスを年令階層別に表3に示した．全分離株54株中33株が3才以下の年令階層で検出されており61%をしめた．ウイルス種類別にみると，コクサッキー，アデノ，エコーの各ウイルスは3才以下を中心にして感染・流行が起っていると推測された．一方，インフルエンザウイルスは0～3才で6株（4.1%），4～6才で6株（6.9%），7～15才で7株（8.6%）をしめており，加令と共に増加する傾向が認められた．

これらの差は，ウイルス感染によって成立する免疫力の持続性，ウイルス側の抗原変異，また感染源との接触ひん度に関連しているのではないかと考える．

2　下水からのウイルス分離成積

1）下水処理場別ウイルス分離状況　定点とした下水

表2. 小児科受診患児からの月別ウイルス分離状況(1982年)

ウイルス種類		1月	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	計
Coxsackie A	4型						1	4						5
	16								1					1
Coxsackie B	3						1	2		1				4
ECHO	3	1												1
	11									2				2
Adeno	1			1			1					2		4
	2					1	1	1		2	2			7
	3						1	1	1					3
	5						2						1	3
	6											1		1
	?									1				1
Influenza	B	3	15	1										19
Herpes									2					2
Munpus						1								1
合計株数		4	15	2	0	2	7(6)	8	4	6	2	3	1	54
検体数		20	38	20	10	21	35	24	28	30	33	30	24	313
分離率%		20.0	39.5	10.0	0.0	9.5	(17.1)	33.3	14.3	20.0	6.1	10.0	4.2	17.3(16.9)

?：アデノウイルス1～6型以外 ( )：ウイルス分離陽性検体数

処理場7か所の下水から分離したウイルスの種類を表4に示した．下水処理場ごとに検出ウイルスの種類をみると，ポリオウイルス1，2，3型とエコー11型，およびCB 3型は全処理場で検出された．しかし，CB 4およびAD各型は，処理場によって差が認められた．

従って，1982年都内において大きな感染・流行となったウイルスは，ワクチン投与の影響と考えられるポリオウイルス各型を除外すると，CB 3型とエコー11型であったことが推定された．

2）**月別ウイルス分離状況** 下水から検出したウイルスを月別に表5に示した．採取した下水168検体中80件から139株，11種類のウイルスを検出した．検出株数が多かったのは，ポリオウイルスを除くと，CB 3型が36株，次いでエコー11型が13株であり，これらのウイルスが主な感染・流行ウイルスであったことがこのデーターからも裏付けられた．

ヒト赤血球凝集試験陽性（HA＋）となった株については，現在型別未同定ではあるが，分離した細胞からみてレオウイルスと推定される．

各ウイルスの月別消長は，分離例数が少ないので単年度での評価に無理はあるが，ほぼ例年通り[3]，ポリオウ

表3. 患児からの年令別ウイルス分離状況(1982年)

ウイルス種類		年令区分（才） 0～3	4～6	7～15	計
Coxsackie A	4型	4	1		5
	16	1			1
Coxsackie B	3	3		1	4
ECHO	3	1			1
	11	1	1		2
Adeno	1	4			4
	2	5		2	7
	3	2	1		3
	5	2	1		3
	6	1			1
	?		1		1
Influenza	B	6	6	7	19
Herpes		2			2
Munpus		1			1
合計株数		33	11	10	54
検体数		145	87	81	313
分離率%		22.8	12.6	12.3	17.3

?：アデノウイルス1～6型以外

表4. 下水処理場別のウイルス分離状況(1982年)

処理場	下水種類	1月	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
O	沈殿汚泥	P1, HA AD2, 6	—	—	P2, AD5 HA	P2, 3 E11	CB3 E11	P2 CB3, 4	CB3 AD1	CB3	P3 CB3.AD2	P3 CB3	—
S	K系沈殿汚泥	HA	—	HA	—	P3	—	CB3	—	—	CB3	—	—
	S系沈殿汚泥	P2. AD5 HA	HA	—	—	P1. E11	—	CB3	—	E11	P1, 2, 3 CB3	—	P2
	S系二次処理水	—	—	—	—	—	—	—	—	—	CB3	—	—
M	沈殿汚泥	HA	AD5	P3 HA	P2	P1, 2, 3 E11	P2. CB3	—	—	CB3, 4 E11	P3 CB3, 4	—	P3 AD5
Tc	二次処理水	—	—	—	—	P1	—	—	—	—	E11	—	—
	沈殿汚泥	P2, 3	—	—	P1 HA	P1	—	CB3, 4	—	CB3	E11	—	P2
Tk	二次処理水	P3	—	HA	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	沈殿汚泥	AD1, 5 HA	—	—	P2, 3	P2. AD1 E11	—	CB3 AD5	CB3	CB3	P1, 2 CB3	—	CB3
Tt	二次処理水	—	P2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	沈殿汚泥	HA	P1, 2, 3	P1, 2, 3	P1, 2, 3 E11	P2. CB3	CB3	CB3	—	CB3	CB3 E11	—	CB3
Sb	生下水	AD5	P2	P3. AD5	P2. E11	—	—	—	CB3 AD2	CB3	CB3	—	P2
	二次処理水	—	P3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	沈殿汚泥	—	P1, 2 E11	P1, 3	P1, 2, 3	P2	CB3	P1 CB3	CB3	CB3	CB3	—	CB3

P1：ポリオウイルス1型 HA：ヒト赤血球凝集試験陽性 AD2：アデノウイルス2型 E11：エコーウイルス11型 CB3：コクサッキーB群ウイルス3型
—：ウイルス検出せず

表5. 下水からの月別ウイルス分離株数(1982年)

ウイルス種類		1月	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	計
Polio	1型	1	2	2	3	4		1			2			15
	2	2	4	1	6	5	1	1			2		3	25
	3	2	2	4	3	3					3	1	1	19
Coxsackie B	3					1	4	7	4	7	9	1	3	36
	4							2		1	1			4
Adeno	1	1				1			1					3
	2	1							1		1			3
	5	3	1	1	1			1					1	8
	6	1												1
ECHO	11		1		2	4	1			2	3			13
未同定		6	1	3	2									12
合計株数		17	11	11	17	18	6	12	6	10	21	2	8	139
陽性検体数		9	7	6	7	9	4	7	4	8	11	1	7	80
検体数		14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	168
分離率＊		64.3	50.0	42.9	50.0	64.3	28.6	50.0	28.6	57.1	78.6	7.1	50.0	47.6

＊：ウイルス分離陽性検体数/検査検体数
未同定：ヒト赤血球凝集試験陽性

イルスはワクチン投与時期に，アデノウイルスは年間を通じ，CB およびエコーは夏季に検出された．

3 ウイルス分離試験に使用した細胞別ウイルス分離状況

患児の咽頭ぬぐい液および下水からのウイルス分離試験に使用した継代細胞，および，ちのみマウスのウイルス分離成積を表6，7に示した．

咽頭ぬぐい液から検出したウイルスの種類と使用した細胞の関係をみると，CA はちのみマウスのみで，AD はHEp2細胞で，インフルエンザウイルスは MDCK 細

表6.　患児からの使用細胞別ウイルス分離状況(1982年)

ウイルス種類		継代細胞および動物						陽性
		FL	HEp2	Vero	MDCK	HEL	SM	検体数
Coxsackie A	4型						5	5
	16						1	1
Coxsackie B	3		4					4
ECHO	3	1				1		1
	11	2						2
Adeno	1	3	4			1		4
	2	3	7			1		7
	3	7	3			2		3
	5	3	3	1		2		3
	6	1	1					1
	?		1					1
Inflenza	B			6	19			19
Herpes			2					2
Munpus				1				1
合計株数		20	25	8	19	7	6	54
検体数		313	31	313	313	178	42	313
分離率%		6.4	8.0	2.6	6.1	3.9	14.3	17.3

SM：ちのみマウス　？：アデノウイルス1～6型以外

表7.　下水からの使用細胞別ウイルス分離状況(1982年)

ウイルス種類		継代細胞				陽性
		FL	HEp2	Vero#462	BGM	検体数
Polio	1型	6	3	2	9	15
	2	12	10	8	18	25
	3	8	2	7	10	19
Coxsackie B	3	28	15		11	36
	4	4			1	4
Adeno	1	1	3			3
	2	2	3			3
	5	3	7			8
	6	1	1			1
ECHO	11	13				13
未同定				12		12
合計株数		78	44	29	49	139
検体数		168	168	168	168	168
分離率%		46.4	26.2	17.3	29.2	82.7

未同定：ヒト赤血球凝集試験陽性

胞で検出できた．一方，腸管系ウイルスのみが検出された下水では，咽頭ぬぐい液の場合にみられた特色が認められなかった．このような現象は，検体中に存在するウイルス量およびウイルス種類の混在度合に起因すると考えられる．つまり，患児の検体では一つの型のウイルスが高濃度に，下水では多種類のウイルスが混在しており，それらの混在比がウイルス検出に差をもたらすことを示唆しているものと考える．このことは，細胞変性効果（CPE）の出現が，一般に患児検体で早く，同一検体から分離されるウイルスの種類が，下水ではるかに多種類であることからも裏付けられる．

4　下水から分離されるCBウイルス検出周期解析

1967年以降われわれが行ってきた下水からのウイルス検索の結果[3]，高ひん度検出ウイルスの種類が毎年変化することがわかった．この変化に周期性が認められるか否かが興味ある課題となってきた．

ウイルス検出の周期性を解析する一つの試みとして時系列の考え方を導入し，自己相関係数を指標に周期解析を行った[4]．調査期間中，比較的高ひん度に検出されたCBウイルスについて，各年次の総検出ウイルス株数にしめるCB各型の割合を算出し，基礎データーとした（表8）．

表8.　コクサッキーB群ウイルスの年次別分離率

ウイルス型	年次														
	'67	'68	'69	'70	'71	'72	'73	'74	'75	'76	'77	'78	'79	'80	'81
Coxsackie B															
1型	0.0*	7.14	67.86	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.45	14.89	0.0	0.0
2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.59	0.0	0.0	1.25	0.0	14.89	0.0	0.0	2.86	17.60
3	0.0	0.0	10.71	69.44	0.0	6.33	6.19	9.10	13.75	27.54	30.50	1.72	0.0	15.24	20.80
4	0.0	0.0	3.57	13.89	0.0	1.27	13.70	0.0	2.50	43.48	14.89	17.24	23.40	37.14	15.20
5	10.0	71.43	0.0	0.0	0.0	1.27	39.04	68.18	0.0	0.0	12.77	53.45	14.89	15.24	4.00
6	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

＊各年次のコクサッキーB群ウイルス分離株数/各年次の総ウイルス分離株数（ポリオウイルスを除く）の百分率

表9.　コクサッキーB群ウイルス検出周期解析

周期	自己相関係数				
	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5
1年	−0.02	−0.10	−0.07	0.25	−0.06
2	−0.15	−0.19	−0.35	0.12	−0.43
3	−0.13	−0.11	−0.32	0.50	−0.43
4	−0.14	0.54	0.03	0.40	0.07
5	−0.15	0.54	0.08	−0.16	0.30
6	−0.17	−0.10	0.47	0.51	0.43
7	−0.19	−0.25	0.65	0.42	−0.43
8	−0.23	−0.13	−0.44	−0.31	−0.51
9	0.01	0.70	−0.70	−0.20	−0.17
10	0.99	−0.00	−0.02	0.99	0.97
11	−0.34	−0.00	0.84	−0.32	−0.08
12	−0.58	−0.00	0.71	−0.78	0.63

CB：コクサッキーB群ウイルス

1967年から1969年3年間の検出率に対する自己相関係数を算出し表9に示した．高い相関が認められた周期（年数）をみると，CB 1，3，5型が10～11年周期（r＝0.84～0.99），同2，4型が5～6年周期（r＝0.40～0.99）であることが数量的に認められた．

奇数の型（1，3，5型）が比較的長い周期であるのに対し，偶数の型（2，4型）が短い周期であることは，これらのウイルスが引き起こす感染・流行の規模などとの関連も考えられ，今後の研究課題として注目すべき分野であると考える．

結　論

1982年1月から12月に採取した小児科受診患児の咽頭ぬぐい液，および下水処理場定点7か所から採取した下水についてウイルス分離試験を行い，以下の結果を得た．

1．小児科受診患児（急性呼吸器疾患）の検体313件中53件から54株，14種類のウイルスを分離した．冬季にはインフルエンザB型ウイルスが，夏季にはアデノ1～5型，およびコクサッキーB群3型ウイルスが主な検出ウイルスであった．

2．下水168件中80件から139株，11種類のウイルスを分離した．多くの定点で高ひん度に検出したウイルスは，エコー11型およびコクサッキーB群3型であり，両ウイルスが都内で広域的に浸いんしていたと判断した．

3．1967年から81年に検出したコクサッキーB群ウイルスの型別検出周期を時系列により解析した結果，1，3，5型は10～11年周期，2，4型は4～5年周期で感染・流行がくり返されていると推定した．

謝辞 本調査を実施するにあたり，検体採取に多大のご協力を賜った，東京都下水道局，住宅・都市整備公団の関係各位に深甚の謝意を表する．

文 献

1) 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

2) 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

3) 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

4) 藤井光昭：時系列解析，第2版，109，1977，コロナ社，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 34-40, 1983

東京都内における急性結膜炎患者からのウイルス検索（1982年）

林　志直*, 矢野一好*, 藪内　清*, 岩崎謙二*
川本尋義**

Virological Survey of Acute Conjunctivitis in Tokyo, 1982

YUKINAO HAYASHI*, KAZUYOSHI YANO*, KIYOSHI YABUUCHI*, KENJI IWASAKI*
and HIROYOSHI KAWAMOTO**

During the period from January to December in 1982, virological survey on the cause of acute conjunctivitis was performed in Tokyo. The rescue of the viruses were carried out by cultivating conjunctival swab specimens with FL, HEp2, BGM, Vero, Hela and HEL cells at 37°C. A total of 117 specimens involving 88 cases of epidemic keratoconjunctivitis (EKC), 25 cases of acute hemorrhagic conjunctivitis (AHC) and 4 cases of pharingoconjunctival fever (PCF) were studied, and adenoviruses (17 strains) and enterovirus type 70 (10 strains) were detected from 27 (23.1%) patients. In terms of isolation, a selective, enhanced sensitivity of HEp2 cells was observed for adenoviruses, and of Hela cells for enterovirus type 70.

From the results of growth experiments on enterovirus type 70, the range of permissive temperature of the current strains (T–482/82, T–671/82) was larger than the prototype J 670/71 strain. T–671/82 grew at 37°C as well as at 33°C, and was more thermostable than the prototype at the nonpermissive temperature of 39°C.

By cross neutralization tests, the current strains were neutralized by antiserum prepared against the prime strain G–2/74 as well as the prototype and the prime strain, and were neutralized by anti–prototype J 670/71 serum 4 fold lower than the prototype. It was indicated that the antigenicity of the current strains were nearly identical to the prime strain G–2/74.

Keywords : virological survey, acute conjunctivitis, adenovirus, enterovirus type 70, permissive temperature, antigenicity

緒　言

ウイルス性結膜炎の病原として，アデノウイルスが知られている．戦時の造船所における“shipyard eye”や，眼科診療所を介したアデノウイルス8型（AD 8）の流行[1]，AD 3，AD 4によるプールを介した咽頭結膜熱（PCF）の発生[2, 3]なども報告されている．近年ではAD19あるいはAD37による流行性角結膜炎（EKC）の地域流行も報告されている[4, 5]．AD以外では，1969年に西アフリカのガーナで新型の結膜炎が発生し，急性出血性結膜炎（AHC）と命名され，Kono[6]らによってエンテロウイルス70型（EV70）が病原と決定された．また1970年にはシンガポール，インドネシアで結膜炎の流行があり，Yin–Murphyは患者からEV70とは血清学的に異なるエンテロウイルスを分離し[7]，コクサッキーA群24型（CA24）変異株と同定された．

このように新しい病原の報告が相次いで行われ，全国的な感染症情報の必要性が高まってきた．その結果，厚生省の感染症サーベイランス事業が開始され，東京都においては1982年1月より行われた．著者らは感染症サーベイランスの一環として，都立病院眼科を受診した結膜炎患者を対象にウイルス検索を行い，その病原を明らかにするとともにEV70分離株の性状，抗原性についても検討を行ったので報告する．

材料と方法

ウイルス分離材料

1982年1月から12月に都立4病院の眼科を受診した結膜炎患者から結膜ぬぐい液を採取した．採取方法は感染症サーベイランス事業検査指針に準じ，検体は0.5% bovine serum albumin を加えた Veal infusion broth (Difco) に入れて−80°Cで凍結保存し，ウイルス分離直

* 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
** 岐阜県衛生研究所

前に検体処理を行った．結膜ぬぐい液を3000rpm 10分間遠心分離し，上清に ampicillin, kanamycin, streptomycin（明治製菓），amikacin（ブリストル萬有）を加えてウイルス分離材料とした．

ウイルス

増殖実験および交差中和試験にはEV70の標準株 J 670/71，変異株 G－2/74，都内の分離株 T－426/82，T－482/82，T－487/82，T－671/82 を使用した．分離株は Hela 細胞で3代継代後，実験まで－80°C に凍結保存した．

細　胞

ウイルス分離には FL，HEp2，Vero#462，BGM，Hela 細胞を使用し，一部の検体には HEL 細胞も使用した．Hela細胞には組成を変更した YLE培地を使用し，増殖液には10% Fetal calf serum(Pel–Freez)，維持液には1% FCS を加えた．その他の細胞は Eagle MEM（日水製薬）に Hela 細胞と同量の FCS を加えて増殖液，維持液とした．

EV70の増殖実験，交差中和試験には Hela 細胞，AD の同定には BGM 細胞を使用した．

ウイルス分離試験

各細胞を24穴プレート（Nunc）で培養し，一検体につき2穴を使用し，試料を0.2ml/穴ずつ接種した．分離試験は37°C，5%炭酸ガスフラン器内で行い，CPE を指標に Hela 細胞は2週間，その他の細胞は1週間観察した．CPE が確認されなかった場合は3代まで継代した．

分離株の同定

EV70の同定は，岐阜衛研で作製された抗標準株（J 670/71)ウサギ血清を使用したマイクロ中和法で行った．抗原を100 $TCID_{50}$（50% tissve culture infective dose）に調整し，transfer plate（Cooke）で抗血清と33°C 60分間反応させ，96穴プレート（Nunc）に培養した Hela 細胞に接種した．33°C 5%炭酸ガスフラン器内で培養し，5日間 CPE の出現を観察した．

AD の同定は市販の抗血清 AD 1 ～ 7（Microbiological associates），AD 8（Italdiagnostic）を使用したマイクロ中和法[9]で行った．中和試験で同定できなかった Agent は CF 試験[9]により AD と同定した．

ウイルス増殖実験

Hela 細胞を小角瓶に培養し，1 MOI（multiplicity of input）のEV 70各株を接種，33，37，39°C で30分間吸着させた．PBS（－）で3回洗浄して未吸着ウイルスを除去した後に維持液を加えて密栓し，33，37，39°C に調整した恒温水槽内で培養した．所定時間後に培養瓶を取り出し，凍結融解を3回繰り返した後の遠心上清についてウイルス感染価を測定した．

ウイルス感染価の測定

96穴プレートに Hela 細胞を培養し，検体希釈系列を0.025m*l*ずつ接種した．33°C 5%炭酸ガスフラン器内で5日間培養，観察を行い $TCID_{50}$/m*l* を求めた．

交差中和試験

岐阜衛研で調製された標準株 J 670/71，変異株 G－2/74のウサギ免疫血清を用いたマイクロ法で行った．トランスファープレート上で抗血清を2倍段階希釈し，100 $TCID_{50}$/0.025m*l* の EV 70各株を等量混和し36°C 90分間中和を行い，96穴プレートに培養した Hela 細胞に接種した．33°C 5%炭酸ガスフラン器内で5日間培養し，CPE の出現状況から中和抗体価を求めた．

結　果

1．結膜炎患者からのウイルス分離成績

ウイルスが検出された結膜炎患者の疫学調査成績を，Table 1. に示した．都立4病院の眼科を受診した117名の結膜炎患者のうち27名（23.1%）から27株のウイルスが検出された．ウイルス種類は9種と多彩であり，AD が8種類とEV 70であった．検出ウイルスのうち，最も検出頻度が高かったのはEV 70（10株）であり，次いで AD 3（6株）であった．この両ウイルスで，総分離株数の59.3%を占めた．この他にAD2，AD8 が2株ずつ，AD1，AD4，AD6，AD 未同定が1株ずつ検出された．

ウイルス分離陽性者の男女比は1：1.7で女性の方が多く，年齢は4ケ月～73才までに分布していた．ウイルス分離陽性例は2～8病日の検体に限られていた．

2．月別ウイルス分離状況

月別の検体数，ウイルス分離例数を Fig.1. に示した．検体数は7月，8月に多く，総数117件のうち52件（44.4%）がこの2ケ月間に集中していた．感染症サーベイランス情報により全国的な結膜炎患者の発生数をみても，そのピークは8月にあり，東京都の場合と一致した．検出ウイルス別にみると，EV70 は3月～9月に，AD は8月を中心に検出された．例数は少ないものの AD は1，2，11月にも検出例が認められ，ほぼ年間を通じて検出された．

3．臨床診断別のウイルス分離状況

検索症例を臨床診断別にみると，Table 2. に示したように EKC が総数117例中88例（75.2%）を占めて最も多く，AHC は25例，PCF は4例であった．EKC に比べて PCFは非常に少ないが，採取定点が眼科である

Table 1. Isolation of Adenoviruses and Enterovirus type 70 in 27 Patients with Conjunctivitis.

Patient no.	sex	Age (1)	Date of onset (2)	Date of specimen (2)	Clinical diagnosis (3)	Virus isolated
1	M	45y	1/27	1/28	A H C	AD 3
2	F	9m	2/11	2/13	P C F	AD 5
3	M	59y	U K	2/17	E K C	AD 3
4	F	45y	3/15	3/19	A H C	Entero70
5	M	2y	3/13	3/20	A H C	Entero70
6	M	27y	3/28	3/30	E K C	AD 3
7	M	35y	4/ 6	4/ 7	A H C	Entero70
8	F	63y	4/17	4/19	A H C	Entero70
9	F	43y	U K	6/ 4	A H C	Entero70
10	F	34y	6/ 5	6/11	E K C	Entero70
11	M	45y	U K	7/12	A H C	Entero70
12	M	49y	7/14	7/17	E K C	AD 1
13	F	4m	7/28	7/29	A H C	Entero70
14	F	10y	7/29	7/30	E K C	AD 4
15	M	73y	7/29	7/31	E K C	Entero70
16	F	25y	U K	8/ 3	E K C	AD 2
17	F	38y	U K	8/ 4	E K C	AD 2
18	F	63y	8/ 7	8/ 9	E K C	AD 8
19	F	11y	U K	8/10	E K C	AD (4)
20	F	14y	U K	8/10	E K C	AD 5
21	F	62y	U K	8/13	E K C	AD 8
22	F	14y	8/13	8/14	E K C	AD 3
23	F	30y	8/25	8/27	P C F	AD 3
24	M	16y	U K	8/31	E K C	AD 5
25	F	60y	9/ 9	9/11	E K C	AD 6
26	M	3y	9/22	9/24	E K C	Entero70
27	F	35y	11/11	11/13	E K C	AD 3

(1) y : years m : months

(2) Dates of onset of illness and collection of specimens are indicated as month/day in 1982. U K : unknown

(3) AHC : acute hemorrhagic conjunctivitis, PCF : pharingoconjunctival fever, EKC : epidemic keratoconjunctivitis.

(4) Identified by CF test, not typed.

事を考慮しなければならない．ウイルス分離率をEKCとAHCで比較すると，前者は17/88（19.3%）であり，後者は8/25（32.0%）となりAHCの分離率の方が約1.5倍高かった．臨床診断と検出ウイルスには強い関連が認められた．すなわち，EKC患者から検出された17株のうち14株（82.4%）はADであった．またAHC患者からは8株のウイルスが検出され，そのうち7株（87.5%）はEV70が占めた・

4．患者年齢，病日別のウイルス分離状況

患者年齢別のウイルス分離状況をTable 3. に示した．ウイルス分離率は40才代で33.3%と最も高く，次いで10代（29.4%），30代（26.3%），50才以上（24.0%）の順であった．この年齢層において検出ウイルスを比較すると，10代では5株全てがADであったのに対し，30代以上ではAD（9株），EV70（7株）がほぼ同程度に検出された．

病日別のウイルス分離状況をTable 4. に示した．病日が明らかな88症例についてみると，分離陽性例18例中14例（77.8%）は3病日以内の症例であった．分離率をみても3病日以内では25.5%，4病日以後では12.1%と

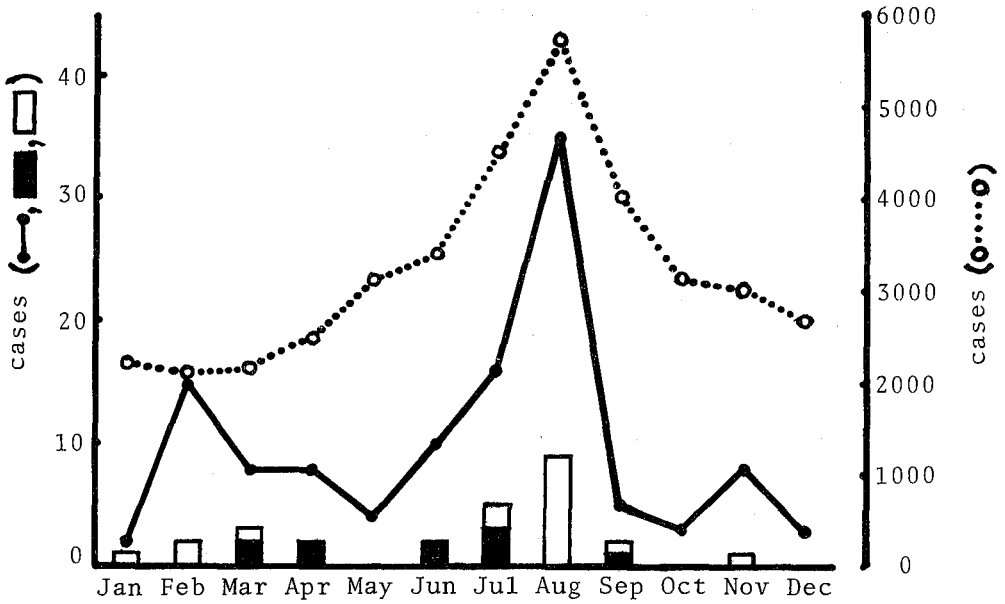


Fig.1. Monthly Distribution of Conjunctivitis Patiens Associated with Adenoviruses and Enterovirus Type 70 in Tokyo, 1982.
(●—● No. of cases, □ No. of cases with adenovirus isolated, ■No. of cases with enterovirus type 70 isolated, ○·····○ conjunctivitis patients reported in Japan)

Table 2. Frequency of Isolation of Viruses from Patients with Conjunctivitis by Clinical Diagnosis.

Clinical diagnosis	No. of cases	No. of positive cases(%)	No. of cases with: Adeno 1	2	3	4	5	6	8	NT#	Entero 70
E K C	88	17(19.3)	1	2	4	1	2	1	2	1	3
A H C	25	8(32.0)			1						7
P C F	4	2(50.0)			1		1				
Total	117	27(23.1)	1	2	6	1	3	1	2	1	10

: Identified by CF test, not typed.

Table 3. Frequency of Isolation of Viruses from Patients with Conjunctivitis by Age.

Age (years)	No. of cases	No. of positive cases(%)	No. of cases with: Adeno 1	2	3	4	5	6	8	NT#	Entero 70
< 9	27	4(14.8)					1				3
10—19	17	5(29.4)			1	1	2			1	
20—29	12	2(16.7)		1	1						
30—39	19	5(26.3)		1	2						2
40—49	15	5(33.3)	1		1						3
50—73	25	6(24.0)			1			1	2		2
Unknown	2	0(0)									

: Identified by CF test, not typed.

Table 4. Frequency of Isolation of Viruses from Patients with Conjunctivitis by Days after Onset.

Days after onset	No. of cases	No. of positive cases(%)	No. of cases with: Adeno 1	Adeno 2	Adeno 3	Adeno 4	Adeno 5	Adeno 6	Adeno 8	NT#	Entero 70
1	2	0(0)									
2	32	5(15.6)			2	1					2
3	21	9(42.9)			3		1	1	1		3
4	12	1(8.3)	1								
5 <=	21	3(14.3)									3
Unknown	29	9(31.0)		2	1		2		1	1	2

: Identified by CF test, not typed.

Table 5. Isolation of viruses from patients with conjunctivitis by tissue culture cells studied.

cells	No. of positive cases	No. of cases with: Adeno 1	Adeno 2	Adeno 3	Adeno 4	Adeno 5	Adeno 6	Adeno 8	NT#	Entero 70
F L	8	1		3	1	1		1	1	
HEp2	14		2	5	1	3	1	2		
Hela	14			1	1	1	1			10
HEL	2	1		1						

: Identified by CF test, not typed.

低下し，約2倍の差が認められた．

5．培養細胞別のウイルス分離状況

ウイルス分離陽性例を細胞別に整理し，Table 5. に示した．最も分離例数が多かったのは HEp2，Hela で14例，次いで FL（8株），HEL（2株）の順であった．エンテロウイルスに感受性である Vero#462，BGM からの検出例はなかった．ウイルス種類別にみると，各細胞の感受性は大きく異なる事が明らかになった．EV70 は10例とも Hela から検出され，その他の細胞からは検出されなかった．HEp2 は AD に感受性が高く，全 AD 検出例17例中14例（82.4%）が検出された．

6．EV70 分離株の温度性状と抗原性

分離株の各培養温度における増殖性を Table 6. に示した．33°C 培養では分離株 T－482/82，T－671/82と標準株 J 670/71は同様に高い増殖性を示した．37°C 培養では分離株は2株とも33°C 培養とほぼ同様の増殖性を示したが，標準株には低下が認められた．39°C 培養では分離株間にも差が認められた．T－482/82は全く増殖せず温度感受性であったが，T－671/82はわずかではあるが増殖する事が認められた．

J 670/71抗血清，G－2/74 抗血清を使用した交差中和試験成績を Table 7. に示した．J 670/71 抗血清では J 670/71に対する抗体価は2048であったが，分離株 T－426/82，T－482/82，T－487/82と変異株G－2/74にはいずれも512倍を示し，標準株とは4倍の差が認められた．G－2/74抗血清では株間に差はなく，いずれも1024倍であった．

Table 6. Results of Growth Test for Enterovirus Type 70 at Different Temperature.

Strain	Incubation time(hr)	Log TCID50/ml at: 33°C	37°C	39°C
J670/71	0	3.1	3.1	3.1
	12	5.1	3.85	< 1
	24	5.1	3.85	< 1
T－482/82	0	3.1	3.1	3.1
	12	5.1	4.85	< 1
	24	5.1	5.1	< 1
T－671/82	0	3.35	3.35	3.35
	12	5.6	5.6	3.1
	24	5.6	5.85	3.6

考　　察

Table 7. Cross Neutralization Test on the Current Strains of Enterovirus Type 70 against Rabbit Immune Sera on the Prototype J 670/71 and the Prime Varient G–2/74 Strains.

Strain	Challenge dose (Log TCID50/0.025ml)	NT titers against immune sera: R–S–6/J 670/71	R–21/G–2/74
T–426/82	2.0	512	1024
T–482/82	2.0	512	1024
T–487/82	2.0	512	1024
J 670/71	2.0	2048	1024
G–2/74	2.0	512	1024

ウイルス性結膜炎で原発性のものはEV70によるAHCと，ADによるEKCである[10]．AHCは1969年ガーナで大流行が発生し[6]，1970年には東南アジア[7]，1971年には日本にも伝幡した[11, 12]．以後国内に定着し流行をくり返しており[11, 13]，KonoらによりJ 670/71株が分離され，標準株となった[6]．EKCは戦時中からアメリカ西海岸の造船所における眼疾患として認識され[10]，病原としてAD 8が検出された[14]．EKCはAD 3など他の血清型でも認められ，HierholzerらはAD 19[4]，TulloらはAD 37[5]による事例を報告している．

PCFは発熱，咽頭炎と同時に，あるいは2次的に結膜炎を併うもので，年間を通じて発生するが夏季にプールを介して流行する事が多い[15]．病原はAD 3，4が良く知られている[3, 16]．またヘルペス，水痘－帯状疱疹，麻疹，風疹ウイルスの感染でも結膜炎症状を示す事が知られている[10]．今回，著者らの行った検索では検出されたADの血清型は8種類にも及んでいた．しかし，主に検出されたのはAD 3とEV70であり，中園らが報告した日本と台湾におけるウイルス性結膜炎の病原検索成績[17]と同様であった．AD未同定株は，中園らの報告と比較すればAD 19型と思われる．

ウイルス分離陽性例の年齢分布は，ADが全年齢層から検出されたのに対し，EV70は成人層からの検出例が多く，内田[12]，Fox[16]らの報告と一致した．しかし，EV70は4ケ月，2才，3才と低年齢の患者からの検出例もあり，疫学像の変化につながるのか注目して行きたい．分離陽性例の病日は3日以内の例が約80％を占めていた．全てのウイルス検索に言える事であるが，急性期に検体採取を行う事の重要性を示している．AHC患者からの分離率がEKCよりも高かったのは，AHCの潜伏期は短く症状も急激に進行するので，急性期に患者が受診し，検体採取が可能であったためであろう．

ウイルス分離において，使用する細胞のウイルス感受性は非常に重要である．今回EV70は全てHelaから分離され，他の細胞からは分離されなかった．またHelaでも継代を進めるとEV70に非感受性となる場合もあり[18]，EV70の分離を困難なものにしている．細胞の感受性からみて，結膜炎患者からの病原検索を，EV70とADに絞るとすれば，FL，HEp2，Helaだけでも充分であろう．

EV70は初めて分離されてから10年以上経過し，川本らは変異株の出現，抗原標流変異を報告している[19]．また石井らは至適増殖温度以外での増殖性の変化を認めている[20]．今回，1982年に都内で分離したEV70の温度感受性について検討を行った結果，分離株T－671/82は標準株J 670/71の非許容温度である39°Cにおいて，わずかながら増殖する事が明らかになった．AHCで麻痺を併った患者の発生から，EV70の神経毒性も指摘されており[21]，高温増殖性との関連に興味がもたれる．分離株の抗原性は松宮ら[22]，川本[23]の報告のように標準株とは差が認められ，変異株G－2/74に近い事が示された．1972年以後各地で変異株が検出され，標準株に類似した株は認められていない．EV70の抗原性状は，標準株から変異株中心へと変化しているものと思われる．

結　論

1982年1月から12月に都内の結膜炎患者117名中27名からウイルスを検出した．最も多く検出されたのはEV70（10株）で，次いでAD 3（6株）が多かった．EKC患者からはAD，AHC患者からはEV70が主として検出された．HEp2はADに対する感受性が高く，HelaはEV70に対する感受性が高かった．

EV70分離株の温度性状を調査したところ，T－671/82は標準株の非許容温度でも増殖した．分離株の抗原性は変異株G－2/74に近かった．

謝　辞　本研究にあたり御援助をたまわった都衛生局公衆衛生部防疫結核課　山口剛課長，神奈川県衛生研究

所ウイルス部　斉藤直喜先生ならびに都立病院の方々に深謝します.

（本研究の概要は日本感染症学会第57回総会1983年4月で発表した.）

文　献

1) Dawson, C. and Darrell, R. : *N.Engl.J.Med.*, **268**, 1031, 1963
2) Cockburn, T.A., Rowe, W.P. and Huebner, R.J. : *Am.J.Hyg.*, **63**, 250, 1956
3) Centers for Disease Control : *M.M.W.R.*, **27**, 49, 1978
4) Hierholzer, J.C., Guyer, B., O'Day, D. and Schaffner, W. : *N.Engl.J.Med.*, **290**, 1436, 1974
5) Tullo, A.B. and Higgins, P.G. : *Lancet*, **1**, 442, 1978
6) Kono, R., Sasagawa, A., Ishii, K., Sugiura, S., Ochi, M., Matsumiya, H., Uchida, Y., Kaneyama, K., Kaneko, M. and Sakurai, N. : *Lancet*, **1**, 1191, 1972
7) Mirkovic, R.R., Kono, R., Yin-Murphy, M., Sohier, R., Schmidt, N.J. and Melnick, J.L. : *Bull.W.H.O.*, **49**, 341, 1973
8) 川本尋義，三輪智恵子，渡辺　実，山田不二造：臨床とウイルス，**2**，43，1974
9) 井上　栄：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
10) Fenner, F. and White, D.O. : *Medical Virology*, 2nd ed., 1976, Accademic Press, New York
11) 松宮英視：臨床とウイルス，**2**，9，1974
12) 内田幸男：臨床とウイルス，**2**，14，1974
13) 桜井悠郎，西岡　計，吉川秀成，塩見俊郎，岡田尚武，丹羽得三：ウイルス，**25**，237，1975
14) Jawetz, E., Kimura, S., Nicholas, A.N., Thygeson, P. and Hanna, L. : *Science*, **122**, 1190, 1955
15) D'Angelo, L.J., Hierholzer, J.C., Keenlyside, R.A., Anderson, L.J. and Martone, W.J. : *J.Infect. Dis.*, **140**, 42, 1979
16) Fox, J.P., Hall, C.E. and Cooney, M.K. : *Am. j.Epidemiol.*, **105**, 362, 1977
17) 中園直樹，石井慶蔵，沢田春美，上野哲治，鈴木信敬，藤井伸一，藤永　恵：第30回日本ウイルス学会総会演説抄録，3024，1982
18) 南　一守，紺野謙治：臨床とウイルス，**2**，44，1974
19) 川本尋義，山田不二造：第24回日本ウイルス学会総会演説抄録，1042，1976
20) 石井慶蔵，沢田春美，中園直樹，松宮英視，多羅尾史明：第24回日本ウイルス学会総会演説抄録，1043，1976
21) Kono, R., Uchida, N., Sasagawa, A., Akao, Y., Kodama, H. and Mukoyama, J. : *Lancet*, **1**, 61, 1973
22) 松宮英視，石田たか子，多羅尾史明，石井慶蔵，沢田春美，中園直樹：第23回日本ウイルス学会総会演説抄録，3004，1975
23) 川本尋義：臨床とウイルス，**4**，191，1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 41-46, 1983

1982年東京都民の風疹 HI 抗体保有調査

吉田靖子*, 関根整治*, 岩崎謙二*

Incidence of HI Antibody against Rubella Virus among Inhabitants of Tokyo in 1982

YASUKO YOSHIDA*, SEIJI SEKINE* and KENJI IWASAKI*

Keywords：血清疫学 seroepidemiology, HI 抗体価 HI titer, 風疹ウイルス rubella virus

緒　言

風疹はぞくに「三日ばしか」と呼ばれ，通常春から初夏にかけて小児に罹患させる軽症の感染症であるが，妊娠初期の女性が罹患すると先天性の心臓疾患・難聴・白内障の障害をもった子供が生まれるので社会的に問題視されている．

最近の東京都内での風疹の大流行は1975年から1977年にみられたが[1~5]，1977年8月以降女子中学生を対象としたワクチン接種が開始されて風疹の流行は減少した．

1982年2月頃から風疹の患者発生の増加がみられ，7年ぶりに風疹流行の兆しがみられた[6]．

この流行に際して患者の血清学的検索をするとともに，健康都民における風疹に対する抗体保有状況の推移を調査したので報告する．

実験材料および方法

患者血清：1982年5月，都下離島で発生した風疹感染を凝われた不明熱性疾患々者5名のペア血清10件である．

健康都民血清：1982年3月から1983年3月にかけて，都内に居住する1か月から80才の健康者から採取した1255件の血清である．

供試血清は，試験時まで−20°のフリーザー内に凍結保存した．

HI 試験：術式は予研法（カオリン処理・ガチョウ新鮮血球）により行った[7]．HA 抗原は市販品（デンカ生研）を使用した．

酵素抗体法：Abbott 社製の Rubazyme（風疹 IgG 抗体測定用）および RubazymeM（風疹 IgM 抗体測定用）キットを用い，測定手技はキットの使用書に従い行った．同キットは，サンドイッチ法に基づいた固相酵素免疫測定法を原理としている．

検査成績および考察

不明熱性疾患々者の血清学的検索成績　1982年5月，都下離島で発生した不明熱性疾患々者5名のペア血清10件について，風疹とヘルペスについての血清学的診断を行った．その結果を表1に示した．

表1に示す No.5を除く上記4名の患者の臨床症状は，発熱・かゆみを伴う発疹（細かい紅斑全身に出現）を呈していた．患者のうち29才の男性はさらに眼球結膜の充血，頸部リンパ節腫張なども出現していた．また5才の男児は，39°の発熱で発症，2週間位37°から39°の発熱がくり返し，口角炎やアフター様口内炎が出現，肛門周囲の発赤や指先の皮がむけていた．島内には同様の症状をもつものがさらに存在しているとの医師からの報告があった．

上記の4名は風疹が疑われ，風疹に対する HI 試験を行ったところ，12才の女児のペア血清については急性期は陰性で，回復期において8倍以上の抗体上昇がみられ風疹と確認した．

残りの3名については第1回目の血清採取が9病日から21病日で行われたため，同時点の抗体価は 4×2^6 から 4×2^7 の高い価を示していた．同血清は風疹 IgG 検出型・IgM 検出型の酵素抗体法の試薬キットを用いて検索したところ，IgM 検出型においても指数 (Rubazyme M index) が1.091以上であり，風疹 IgM 抗体陽性と判定され，風疹感染が確認できた．

患者 T.T については，HI 試験・酵素抗体法で風疹については陰性であった．臨床所見にヘルペス様発疹がみられたとのことから，ヘルペスに対する補体結合試験を行ったところ，第1回・第2回の採取血清とも32倍の

* 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．不明熱性疾患々者の血清学的検索成績

患者	(性·年令)	発病月日	臨床症状	採血月日	病日	風疹抗体価 HI価 4×2ⁿのn値	風疹抗体価 酵素抗体法* G index	風疹抗体価 酵素抗体法* M index	CF価 ヘルペス
1．K.M	♀29才	57．5．2	発熱　発疹 頸部リンパ節腫張(＋)	57．5．10	9	6	1.73	2.511	16
			眼球結膜の充血(＋)	57．5．28	27	5	2.55	1.241	16
2．T.Y	♂6才	57．4．20	紅斑(かゆみ) リンパ節腫張(－)	57．5．10	21	7	3.06	1.775	<8
			3日で発疹消失	57．5．28	39	6	2.48	1.431	<8
3．M.M	♂23才	57．4．27	発熱・発疹 紅斑	57．5．10	14	7	1.77	5.862	<8
			リンパ節腫張(－)	57．5．28	32	6	2.42	4.655	<8
4．M.K	♀12才	57．5．7	発熱・発疹	57．5．8	2	<1	0.16	0.310	<8
				57．5．28	22	4	1.39	2.224	<8
5．T.T	♂5才	57．4．25	発疹・口角炎	57．5．10	16	<1	0.42	—	32
			皮疹(ヘルペス様)	57．5．28	34	<1	0.15	—	32

＊酵素抗体法：Abbott 社製
IgG 型風疹抗体検出用 EIA 試薬キット（ルバザイム） G index≧1.00を示すとき風疹 IgG 抗体陽性
IgM型風疹抗体検出用 EIA 試薬キット（ハルザイム） M index>1.090を示すとき風疹 IgM抗体陽性

表2．東京都民の風疹 HI 抗体保有状況

年令階層	採取時期	検査数	風疹 HI 抗体価（4×2ⁿのn値） <1	1	2	3	4	5	6	7	8	≧9	抗体保有率 n≧1	n≧7
0～15才	1982．5	26	16		2	1	1	1	1	2	1	1	38.5%	15.4%
	6	91	47		4	4	2	1	12	8	8	5	48.5	23.1
	7	82	40	4	3	3	2	4	8	6	10	2	51.2	22.0
	8	63	34		1	4	1		5	11	7		46.0	28.6
	9	79	56		1	2	2	1	2	3	8	4	29.1	19.0
	10	93	37	6	4	3	2	7	12	14	7	1	60.2	23.7
	11	38	27						2	5	3	1	28.9	23.7
	12	29	20			1			5	3			31.0	10.3
	1983．1	59	41		2	2		2	5	5	2		30.5	11.9
	2	37	31		1					5			16.2	13.5
	3	41	31	1	2			1	2	1	2	1	24.4	9.8
16～80才	1982．3	114	16	1	7	17	31	23	16	5			87.7	4.4
	4	119	12	4	4	27	29	25	11	5	1	1	89.9	5.9
	5	107	5	3	5	9	13	17	18	9	19	9	95.3	34.6
	6	149	19	1	7	26	26	31	22	11	4	2	87.2	11.4
	7	50	5	1	4	3	16	10	6	5			81.8	10.0
	8	14	1		1		4	4	3	1			92.8	7.1
	9	4						2	2				100.0	
	10	60	1		2	4	8	16	13	14	1	1	98.3	26.7

CF価を示し有意上昇はみられなかったが，第1回の採取が16病日であったことと5才という年令からみて高いCF価であるので，ヘルペスに罹患したものと推定した．

東京都感染症予防検討委員会がまとめた都内における感染症定点観測調査結果をみると，1981年の流行ピークは6月中旬で一定点当り週別発生数は4.6人であったが，1982年には3月中旬で6.8人になり，風疹患者の増加の傾向が注目された．流行ピークは5月中旬で13.5人に達したが，7月中旬には9.3人となりそれ以降は減少してきた．

健康都民の風疹HI抗体保有状況

1）風疹HI抗体保有状況の月別変動　1982年3月から1983年3月にかけて，新生児から80才の健康都民1255名から採取した血清について風疹HI試験を行い，抗体保有状況を調査した．その結果を表2に示した．

16才から80才の年令層においては，調査期間を通して82～98％と高いHI抗体保有率を示した．0～15才では16～60％と低く，かつ変動がみられた．また比較的最近に風疹に罹患したと疑われる高い抗体価（4×2^nのn値≧7）を示す割合は，0～15才では6月から11月に20％を上まわっていたが，16～80才では5月と10月に20％を上まわった．

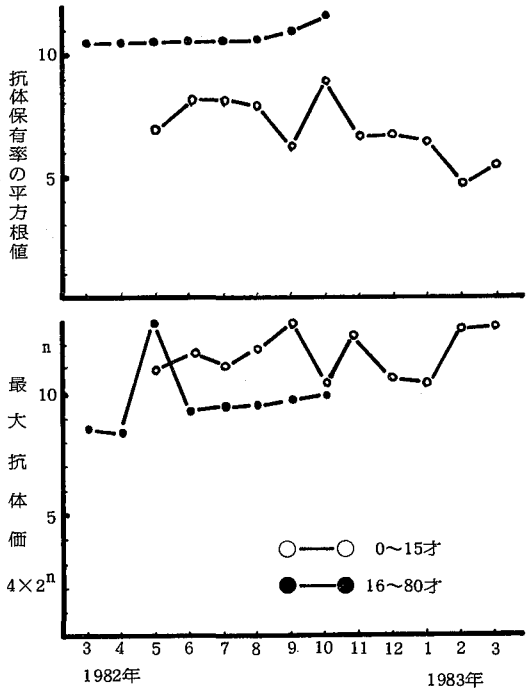


図1.　健康都民の風疹HI抗体保有状況の月別変動

抗体保有分析に，回帰分析法を応用した[8]．調査した集団の各抗体価別累積抗体保有率を求め，最小二乗法によりそれらの値とずれの少ない点を通る回帰直線を算出し，その直線の位置変化によって集団の抗体保有状況の変化を分析しようという方法である．ここでは各抗体価（x_n）に対応した累積抗体保有率の平方根値（y_n）を抗体価x_nの回帰として考えた．

グラフ上の回帰直線の位置は，Y軸（累積抗体保有率の平方根値目盛の軸）との交点（ここではHI価≧8×2^0の抗体保有率の平方根値，計算値）とX軸（HI価8×2^nのn目盛軸）との交点（ここでは保有率が0になる抗体価，計算上の最大抗体価）の2つによって規制される．

この2つの値の調査期間中の経過変せんを図1に示した．

この2つの値で各抗体価別の計算上の保有率はきまってしまうことになるので，調査集団のHI価≧8×2^0の保有率の上昇は感染流行の拡大進行また規模を，計算上の最大抗体価の大きな値出現は近い過去に新しく感染発生のあったことを示唆すると考えられる．

成人層では，HI価≧8×2^0の累積抗体保有率の平方根値は月別変動の有意な差はみとめなかったが，5月の最大抗体価の値に大きな変化がみられた．再感染によるブースター効果と考えられる．

15才以下の年令層では，HI価≧8×2^0の累積抗体保有率の平方根値は成人層よりも低く，また10月以降は下降の傾向にあった．最大抗体価は成人層より高く，月別においても変動がみられた．

2）乳幼児および学童における風疹HI抗体保有状況

今回の風疹HI抗体保有状況を調査するにあたって，従来得られなかった低年令層においても血清が採取できた．その結果を表3に示した．

乳児については月令で，1才以上は1才刻みの年令について抗体保有状況を調べた．

月令の小さい乳児においても，かなり高いHI抗体価がみとめられた．高い抗体価をもつ乳児の母親の風疹に対する抗体価を調べていないが，乳児の抗体は出生時に母親からの移行抗体としてもっていたものと示唆される．

通常，移行抗体の有効期間は出生後約6か月程度といわれているが，7か月以上の乳児においても数例ではあるが高い抗体価を保有しているものが存在した．高い抗体価をもつ乳児の風疹に罹患したか否かは不明である．

1才以上の幼児・学童についてHI価4×2^1以上の抗

表3．乳幼児および学童における風疹HI抗体保有状況

(1982.5～1982.3)

年令	検査数	風疹HI抗体価（4×2^nのnの値）											抗体保有率		平均HI価
		＜1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	≧10	n≧1	n≧7	4×2^nのnの値
1カ月	17	6		1	1	2	3	1	1	1	1		64.7%	17.6%	5.27
2	9	4			3		2						55.6		3.80
3	7			2	2	3							100.0		3.14
4	4	3			1								100.0		3.00
5	4	4											0.0		
6	5	2		2			1						60.0		3.00
7	8	6				1			1				25.0	12.5	5.50
8	7	6		1									14.3		2.00
9	8	8											0.0		
10	4	3							1				25.0	25.0	7.00
11	3	2						1					33.3		6.00
1才	121	99	3	6	5	2	1	2	1	2			18.2	2.5	3.54
2	70	52	1	3	2		1	2	5	3	1		25.7	17.3	5.44
3	61	41	1	2	3	1	1		3	7	2		32.8	19.7	5.90
4	61	42	1	1				2	6	6	3		31.1	24.6	6.95
5	55	37	1		1	1	1	2	6	3	2	1	32.7	21.8	6.61
6	39	17	3		1			5	8	5			56.4	35.9	6.00
7	25	9			1		1	4	5	3	2		64.0	40.0	6.81
8	18	10						5		2	1		44.4	16.7	6.88
9	23	7	1	2				4	4	4	1		69.6	39.1	6.13
10	22	3					2	7	9	1			86.4	45.5	6.47
11	25	7					2	7	7	2			72.0	36.0	6.50
12	21	7					1	5	1	6	1		66.7	38.1	7.07
13	3	1						1	1				66.7	33.3	6.50
14	10	3					1	3	1	2			70.0	30.0	6.57
15	8	1						3	3	1			87.5	50.0	6.70

体保有率をみると，1～5才は18.2%～32.8%，6～9才は44.4%～69.6%，10～15才は66.7%～87.5%を示した．

前回の風疹流行期前の1974・1975年に，同年令層では平均HI抗体価は4×2^0～$4\times2^{1.5}$だったが，流行後の1977年には4×2^5に上昇していた[1,3,4]．今回の1982年は，平均HI抗体価が$4\times2^{3.5}$～4×2^7とかなり高い値を示していた．高い抗体価の保有率と平均HI抗体価からみて，風疹の好発年令は4～12才と推定した．抗体保有状況からみても，これらの年令層では抗体をもっている者は高い値ばかりで，中間的な価を示すものは非常に少なかった．

3）**年令階層別の風疹HI抗体保有状況**　乳児・学童の4つの年令階層（＜1才・1～5才・6～9才・10～15才）と成人層（16～80才）の抗体保有状況を回帰分析法で解析し，その結果を図2に示した．

各年令階層の算出回帰直線は1%以下の危険率で実測データと適合した．

＜1才，16～80才の年令階層においては，調査した各HI価の保有率はすべてが回帰直線の95%信頼限界内にあった．しかし，1～5才，6～9才，10～15才においてHI価8×2^9～8×2^5の区間に直線関係が示された．これら3直線の変曲点の抗体価は8×2^5でほぼ一致していた．これらの年令階層内での風疹感染発生は，局所的であったことを示唆するものと考える．

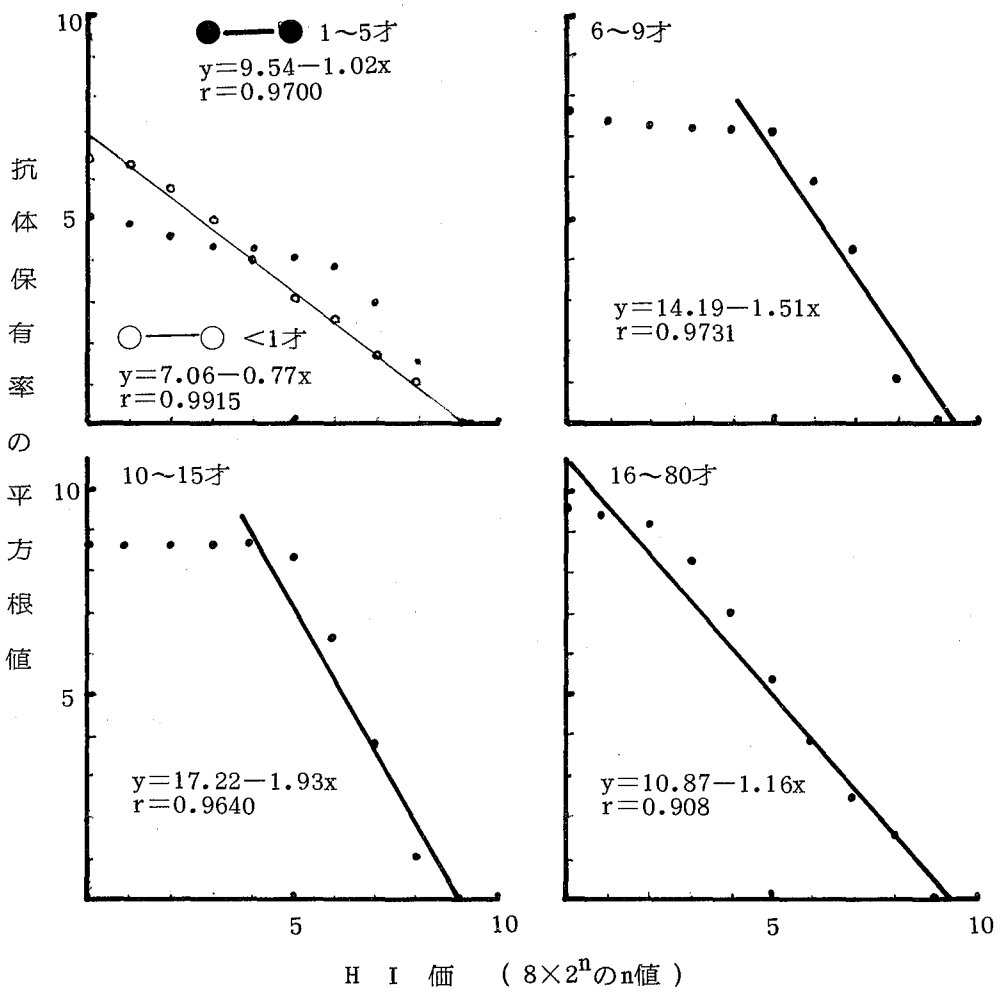


図2. 年令階層別における風疹HI抗体保有率の回帰直線

4）某高等看護学院生における風疹 HI 抗体保有状況の年次変動 当高等看護学院に入学した時に採取した血清について，風疹 HI 抗体保有状況を調査し，その結果を図3に示した．

1976・1977・1980年次の入学者の HI 価 4×2^1 以上の抗体保有率は60.8～71.8%を示していたのに対して，1981年次以降の入学者は92.4，96.8%と高く，HI 抗体保有率の上昇がみられた．

1981年次以降の入学者たちにおける HI 抗体保有率の上昇は，1977年8月から風疹感染を予防することと風疹による先天性障害児の発生を予防する目的で，女子中学生を対象に定期の予防接種が実施されてきた結果を反映しているのであろう．

平均 HI 抗体価についてみると，1977年次において4

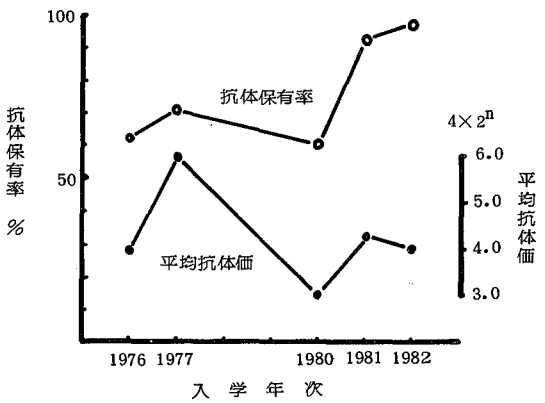


図3. 某高等看護学院の入学年次における抗体保有率と平均HI抗体価

$\times 2^{6.0}$と高く，それ以外の入学年次においては$4 \times 2^{3.0}$～$4 \times 2^{4.3}$であった．1977年次における平均HI抗体価が高かったのは，全国的に風疹が大流行した1975・1976年の後であったため，高い抗体価を保有している者が多かったためと示唆される．

結　果

1982年5月都下離島で発生した不明熱性疾患々者の血清学的検索をするとともに，1982年3月から1983年3月の健康都民における風疹に対する抗体保有状況を調査した．

1）不明熱性疾患々者5名について，風疹に対するHI試験・酵素抗体法から4名については風疹の罹患が確認された．

2）健康都民1255名における風疹HI抗体保有状況の結果から，HI価4×2^{1}以上の抗体保有率は16才以上の成人層では90.7%，1才未満は42.1%，1～5才は26.4%，6～9才は59.1%，10～15才は75.3%であった．

3）乳幼児においてもかなり高いHI抗体価がみとめられた．生後6か月以内の乳児においては，母親からの移行抗体と考える．

4）HI抗体保有状況を回帰分析法で解析すると，各年令階層における算出した回帰直線は1%以下の危険率で実測データと適合した．

5）某高等看護学院入学者の風疹HI抗体保有状況から，1981年次入学以降の学生は，1977年8月から実施されているワクチン接種の影響を受けているものと考えられた．

文　献

1）柳沢靖子，岩崎謙二，柳下徳雄：東京衛研年報，26－1，64，1975
2）柳沢靖子，藪内　清，岩崎謙二，柳下徳雄：東京都衛生局学会誌，56，66，1975
3）吉田靖子，横山庸子，岩崎謙二：東京衛研年報，27－1，63，1976
4）吉田靖子，横山庸子，岩崎謙二：東京衛研年報，28－1，49，1977
5）吉田靖子，関根整治，岩崎謙二：東京衛研年報，29－1，75，1978
6）厚生省公衆衛生局保健情報課：感染症定点観測調査成績表，1982
7）穴戸　亮：微生物検査必携ウイルス・リケッチア検査，347，1978
8）岩崎謙二：東京衛研年報，26－1，81，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 47-53, 1983

風疹の血清学的検査法についての検討

吉田靖子*, 関根整治*, 岩崎謙二*

Comparison of Serological Tests for Detection of Antibodies to Rubella Virus

YASUKO YOSHIDA*, SEIJI SEKINE* and KENJI IWASAKI*

Keywords: 風疹ウイルス rubella virus, 赤血球凝集抑制試験 hemagglutination inhibition test, 酵素抗体法 enzyme-linked immunosorbent assay, 受身凝集試験 passive hemagglutination test

緒　言

風疹ウイルスの血清学的診断法には，従来から赤血球凝集抑制試験（hemagglutination inhibition test, 以下HIと略す）による方法が用いられている．このHI法は操作が簡便で，感度がよく，再現性にすぐれているなどの利点で広く用いられているのであるが，常法ではガチョウやニワトリ一日ビナの新鮮血球を使用するために，風疹大流行時のときなどは，血球不足のため入手が困難になったり，血球の安定性に欠けるなどの問題が起きた．最近になって各種の固定化血球が市販されるようになり，これを利用することによって安定した風疹HI抗体価が測定できるか否かを明らかにするため，ガチョウ新鮮血球とニワトリ一日ビナ固定化血球を用いてHI価の比較をした．また最近開発された酵素抗体法（enzyme-linked immunosorbent assay, 以下ELISAと略す）による風疹抗体測定の有用性についても検討したので報告する．

対象と方法

対象血清：1975年から1978年にわたって経時的に採取できた10名の血清58件，1981年3月に発病した13名の患者血清25件，1982年5月に発病した4名の患者血清8件および1982年6月から10月に採取した健康都民血清258件，1982年7月に採取した健康都民血清167件を用いた．

HI試験：術式は予研法で行った[1]・HA抗原は市販品（デンカ生研）を用いた．使用したニワトリ一日ビナ固定化血球は，一日ビナ血球を一酸化炭素ガス処理後，ホルマリン固定で安定化したものである．固定化血球の浮遊液は0.3%でマイクロプレートはV型を用いた．

Passive hemagglutination (PHA) test：Abbott社製のRUBACELL Kitを使用した．被検血清10 μlを，RUBACELL II buffer (0.75 Mリン酸緩衝液) 25 μlで希釈し，25 μlのDURACYTE cells (stabilized human erythrocytes) を添加し混和後，室温に2時間静置し沈降パターンで判定した．

ELISA法：Abbott社製のIgG型風疹抗体測定用キット「Rubazyme-G」，IgM型風疹抗体測定用キット「Rubazyme-M」を使用した．測定手技はキットの使用書（図1）に従い行った．判定基準は低力価コントロールの吸光度に対する割合から下記の式により指数（Rubazyme-G-index・Rubazyme-M-index）を求め

$$\text{指数}=\frac{\text{被検血清の吸光度}}{\text{低力価コントロールの平均吸光度}}$$

結果の判定は，IgG抗体の場合はG-index 1.00未満を陰性，1.00以上を陽性とし，IgM抗体の場合はM-index 0.910未満を陰性，1.091以上を陽性，0.910～1.090を判定保留（陰性<0.910≦判定保留≦1.090<陽性）とした．

血清中のIgG吸収法：術式はAnkertらの黄色ブドウ球菌Cowan I株（以下，ブ菌と略す）のグロブリン吸収法によった[2]．

10%ブ菌液0.47 mlを洗浄のためPBSを加えかくはん後，3000 rpm 30分遠心し，その沈澱のブ菌量を0.047 gとした[3]．この沈査にカオリン処理をした血清0.2 mlを加え，室温で30分振とうし反応させた後に3000 rpm 30分遠心し，その上清をブ菌処理血清とした．

* 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 3chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

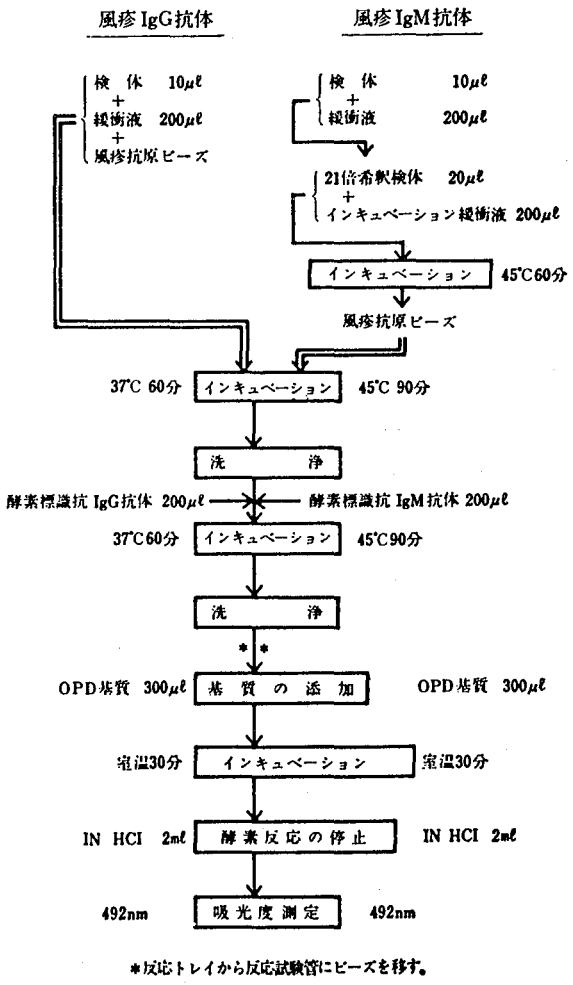


図1. RUBAZYME 測定手技

結　果

血球による HI 価の比較　1982年7月に採取した健康都民血清167件における風疹 HI 価の使用血球による比較成績を表1に示した.

両者の HI 価が等しい値を示したものは111件(66.5%), 2倍差は41件(24.6%), 4倍差は13件(7.8%), 8倍差は2件（1.2%）となっていた.

167件の血清について，ガチョウ血球を用いて得られた HI 価を X 値，一日ビナ固定化血球での HI 価を Y 値として両値の相関および回帰式を算出すると，相関係数は0.9666できわめて良好な正の相関性を示し，回帰式は $Y=0.1988+0.8983X$ となった. HI 価の高い血清では固定化血球の方が低値にでる傾向があり，HI 価が低い血清では固定化血球の方が高値を示していた.

表1. 使用血球による HI 価の比較

ガチョウ新鮮血球によるHI価 4×2^nのn値	例数	ニワトリ1日ビナ固定化血球による HI 価 4×2^nのn値								
		<1	1	2	3	4	5	6	7	8
<1	57	57								
1	2			1	1					
2	2				2					
3	3				1	1	1			
4	7				1	4	1	1		
5	24				1	3	16	2	2	
6	39					1	5	22	1	
7	30					1	5	13	9	2
8	13						1	1	9	2

相関係数　$r=0.9666^{**}$

ガチョウ血球で HI 価陰性を示した57件については，固定化血球でも全例陰性であった. 一日ビナ固定化血球が示した HI 価は，ガチョウ血球が示した値とほぼ良好に相関することからも，固定化血球の使用は十分に有用であると思われる.

HI 価と Rubazyme-G-index との相関　1982年5月から10月にかけて採取した都内に居住している2か月から78才の健康人血清258件について，HI 試験と ELISA 法（Rubazyme-G）を用いて抗体価を測定し両者を比較し，その結果を表2に示した.

HI 価が 4×2^1未満の血清では Rubazyme・IgG 抗体はすべて陰性であった. HI 価が順次高くなるに従って，表2に示すような平均 Rubazyme-G-index（以下 G-index と略す）は大きくなった.

HI 価 4×2^1以上の陽性例を示した血清の中で，G-indexが陰性を示したものが存在した. HI 価 4×2^2の8件（8/12=66.7%），4×2^3の5件（5/17=29.4%），4×2^4の4件（4/32=12.5%），4×2^6の2件（2/54=3.7%），4×2^7の1件（1/28=3.6%）が G-index が陰性であった. 特に HI 価の低値のところで，G-index が陰性を示す例が多くみられた. HI 価と G-index 両者の相関係数は0.7263と低かった.

HI 価 4×2^7で G-index が陰性を示した1つの血清は，Rubazyme-M-index（以下 M-index と略す）1.414を示し IgM 抗体陽性と判定された.

黄色ブドウ球菌吸収処理血清の HI 価と Rubazyme-M-index との相関　風疹患者30件の血清について，ブ菌処理後の HI 価と M-index の比較をし，その結果を図2に示した.

表2. 風疹 HI 抗体価と Rubazyme G–index との相関

HI 価 4×2ⁿのn値	例数	Rubazyme G–index[1] <1.0	~1.5	~1.8	~2.0	~2.3	~2.5	~3.0	>3.0	Rubazyme G–index 平均値	標準偏差	range
0	65	65								0.173	0.138	0.039~0.552
1	1		1							1.100		1.100
2	12	8	1	2	1					1.137	0.777	0.060~1.980
3	17	5	11	1						1.189	0.365	0.393~1.448
4	32	4	7	8	6	4		3		1.648	0.628	0.104~2.980
5	33		1	9	4	11	5	3		2.071	0.367	1.606~2.920
6	54	2	1	12	9	12	6	11	1	2.075	0.530	0.793~3.360
7	28	1[2]	5	1	3	9		2	7	2.277	0.860	0.879~3.680
8	7					2	4	1		2.391	0.115	2.222~2.529
9	9				2	2		3	2	2.594	0.581	1.889~3.520

1) HI 価と Rubazyme G–index との相関 $r = 0.7263^{**}$

2) Rubazyme M–index = 1.414 IgM抗体陽性

表3. 風疹患者の病日と Rubazyme G–index, Rubazyme M–index の関係

No.	急性期 病日	HI 価*	G–index	M–index	回復期 病日	HI 価	G–index	M–index
1	2	<1	0.16		7	8	1.30	3.034
2	3	3	0.42	2.620	8	8	1.55	4.827
3	3	<1	0.16		8	≧10	0.68	4.482
4	4	2	0.24	0.637	9	9	1.35	5.172
5	2	<1	0.14		7	6	1.10	5.862
6	4	3	0.06	0.876	13	6	2.03	1.135
7	3	3	0.45	1.314	13	7	1.94	1.294
8	2	3	0.21	1.075	11	7	1.77	1.434
9	10	6	2.03	0.368	19	5	2.42	0.507
10	3	4	0.69	1.235	12	7	1.77	1.334
11	6	2	0.19	0.996	15	6	1.65	1.832
12	1	2	0.21	0.976	10	5	2.03	1.892
13	9	6	1.73	2.551	27	5	2.55	1.241
14	21	7	3.06	1.775	30	6	2.48	1.431
15	14	7	1.77	5.862	32	6	2.42	4.655
16	2	<1	0.16	0.310	22	4	1.39	2.224

* HI 価 = 4×2^n の n 値

ブ菌処理後 4×2^1 未満の患者血清は，すべて M–index も陰性であった．ブ菌処理血清の HI 価が低値のところで，M–index の陰性例がみられた．HI 価 4×2^1 で 1 件（1/7 = 14.2%），4×2^3 で 2 件（2/6 = 33.3%）は M–index が陰性であった．ブ菌処理血清の HI 価が高くなるに従って，M–index も大きくなったが両者の相関係数は0.7403と低かった．しかし 1 %以下の危険率で正の相関性は示されていた．

風疹患者の Rubazyme–G–index と M–index の関係

風疹患者16名の急性期・回復期血清について，G–index と M–index について関係をみた．その結果を表3に示した．

急性期の血清のうち HI 価があるにもかかわらず，G–index が陰性を示したのは 8 件（8/12=66.7%）存在した．G–index が陰性を示した 8 件の血清における M–index についてみると，3 件は M–index 1.235,

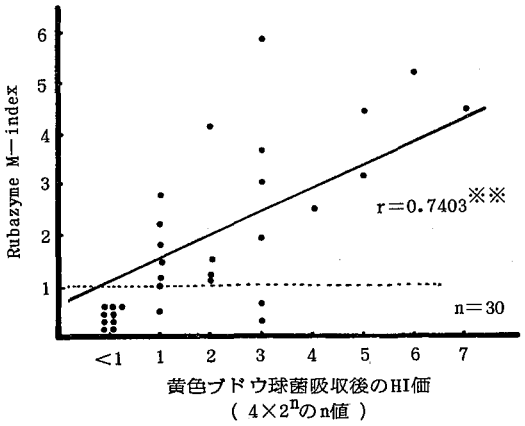


図2. 黄色ブドウ球菌Cowan I株吸収処理後血清のHI価とRubazyme M−indexの相関

1.314，2.620を示し，IgM 抗体陽性と判定された．また2件についてはIgM 抗体は陰性を示し，残りの3件は判定保留区間の M−index のため判定不能であった．

回復期血清において HI 価 4×2^{10}の高い値を示したが，G−index が陰性値を示した例もあった．

病日が7～9日の M−index は2.551～5.862の高い値がみられたが，G−index では陽性値であっても1.10～1.73と低い値であった．それ以後の病日では，M−index は低くなり，G−index と M−index の値の差は小さくなっていた．

風疹抗体価の経時的推移　1975年から1978年の間に経時的に採取した10名の血清58件について，HI 価・ブ菌処理後の HI 価・G−index ・ M−index を測定して抗体価の消長をみた．その結果を表4に示した．

表4に示した No.1～5 は臨床的に風疹と診断された者，No.6～10 は非発病者である．

風疹患者は発疹出現後7～9日で HI 価は最高値に達し，30日から約1年もそのままの高い抗体価を保有していた．ブ菌処理 HI 価は発疹出現後7～30日間は 4×2^{3}～4×2^{5}をもっていたが，その後急速に下降した．しかし約1年までも 4×2^{1}を保っていた患者も存在した．

一方，No.6～10 の非発病者においては，高い HI 価を有していたが，ブ菌処理後 HI 価は陰性であった．しかし No.8 の例では 4×2^{4}の高い値を示していた．

Rubazyme G の成績では，No.3 にみられたように HI 価 4×2^{10}以上であるのに G−index は0.68と陰性を示し，同様に No.2 においても急性期は陰性を示していた．その他の症例でも高い HI 価にくらべて，G−index は低値であった．

M−index は3～8病日位に最高値に達し，その後30日位までは高い値を示していた．

Rubazyme M で IgM 抗体を証明された5名の患者のうち4名までが1年間 IgM 抗体を有していた．2名については2年間も証明された．

表3に示した Rubazyme G と M を同時に検索した16名の患者の血清を病日別にわけて，M−index で IgM 抗体の消長をみた．その結果を表5に示した．

発疹出現後90日までは，高い M−index をもっものが存在したが，その後は低値を示した．

HI 試験・PHA 法・ELISA 法の比較　健康者64名の血清について3方法の検索を行い比較検討をした．その結果を表6に示した．

HI 価 4×2^{1}以上の抗体を示したものは，すべて PHA 法では陽性を示したが，ELISA 法（Rubazyme-G）では5件（7.8%）において陰性例を示した．PHA 法は抗体の有無のみのスクリーニングのときに用いるのには簡便である．

考　察

風疹抗体の測定は通常 HI 法が広く用いられているが，血清中のインヒビターの除去の問題，新鮮血球の有効期限の短かいこと，流行期には血球の入手困難や価格暴騰を招いたこと，また血球の質的安定性に欠けたことなどの問題点があげられた．

前回の流行期には，いくつかの市販された固定血球およびトリプシン処理をしたヒトO型血球[4,5]について検索した．市販された固定血球は，アルデヒド固定した一日ビナ血球(東芝化学工業㈱，現在デンカ生研)，NBL(日本バイオテスト研究所)からのガチョウ固定血球である．またトリプシン処理したヒトO型血球は，10%の血球浮遊液に0.25%（Difco 1:250）トリプシンを等量加え，37°1時間で処理し本試験は0.2%の濃度で使用した．結果は新鮮ガチョウ血球で行った HI 価を対照に判定すると，等しい値を示したのが50～70%であった．残りは固定血球を使用した HI 価の方が，1管（2倍差）低い傾向にあった．

固定血球は保存性がよく，長期間安定であり，一定品質の安定供給ができるので検査の標準化が十分可能であるが，Vマイクロプレートを使用するため，判定のときの像のパターンの読みに十分注意する必要がある．

新しい感染の証拠として IgM 抗体を検出する簡便な方法として，2メルカプトエタノール（2 ME）処理による抗体価の減少をみるのがある．われわれは1975年

表4. 風疹抗体測定法における比較

例* 方法** 発疹出現後の抗体価の消長									例 方法 抗体価の消長					
No.1 病日	2	7	29	176	351	712			No.6 経過日数	1	28	174	351	712
A	<1	8	8	7	5	6			A	7	8	9	9	8
B	<1	3	1	1	<1				B	1	<1	<1	<1	
C	0.16	1.32	2.29	2.61	2.52	2.48			C	2.15	2.03	1.94	2.19	1.74
D		3.034	1.465	0.948	0.637				D	0.448	0.482	0.689	0.455	
2 病日			3	8	17	164	339	712	7 経過日数	1	28	174	351	712
A	<1	<1	3	8	8	8	5	5	A	6	6	6	6	5
B	<1	<1	4	5	1	1			B	<1	<1	<1	<1	
C	0.13	0.13	0.42	1.55	1.63	2.00	2.24	1.77	C	1.92	1.56	1.52	1.44	1.87
D			2.620	4.827	4.482	1.793	1.155		D	0.372	0.224	0.258		
3 病日	3	8	30	177	352	712			8 経過日数	1	28	174	351	
A	<1	≧10	≧10	6	5	6			A	8	7	6	6	
B	<1	7	5	2	2				B	4	3	3	3	
C	0.16	0.68	2.03	1.76	1.97	1.94			C	1.77	1.87	0.71	1.55	
D		4.482	3.103	1.482	1.155	1.189			D	2.482	1.931	0.241	0.603	
4 病日	4	9	31	178	353	712			9 経過日数	1	28	174	351	712
A	2	9	9	9	9	8			A	6	6	6	7	5
B	<1	6	3	2	2				B	<1	<1	<1	<1	
C	0.24	1.35	2.55	1.87	0.91	1.94			C	2.13	1.97	2.02	2.13	
D	0.637	5.172	3.620		1.068	0.706			D					
5 病日	2	7	29	176	351	712			10 経過日数	1	28	174	351	712
A	<1	6	7	6	6	5			A	6	6	5	5	5
B	<1	3	2	1	1				B	<1	<1	<1	<1	
C	0.14	1.10	2.39	1.90	2.08	1.77			C	1.61	1.77		1.87	1.71
D		5.862	4.137	2.758	2.206	2.000			D					

＊No.1～5 風疹患者，No.6～10 非発症者

＊＊A＝ＨＩ価（予研法・4×2^nのn値），B＝黄色ブドウ球菌で吸収後のＨＩ価（4×2^nのn値）

C＝Rubazyme G–index，D＝Rubazyme M–index

表5. 風疹 IgM 抗体の消長

病日（日）	患者数	Rubazyme M−index					
		<1.090	～2.000	～3.000	～4.000	～5.000	～6.000
1～3	8	5	2	1			
4～15	18	4	6	2	1	2	3
16～30	9	1	4	1	1	2	
31～90	2				1	1	
91～180	4	1	2	1			
181～360	5	2	2	1			
730	4	2	2				

表6. HI 予研法と 2 キット（PHA 法・ELISA 法）の比較

HI 価 4×2^n の n 値	例数	PHA*	ELISA**		Rubazyme G−index range
			(−)	(+)	
		%	%	%	
0	7	(−) 7/7 =100.0	7/7 =100.0		0.062～0.206
3	6	(+) 6/6 =100.0	2/6 = 33.3	4/6 = 66.7	0.440～1.448
4	9	(+) 9/9 =100.0	1/9 = 11.1	8/9 = 88.9	0.126～1.784
5	8	(+) 8/8 =100.0		8/8 =100.0	1.401～2.205
6	15	(+)15/15=100.0	2/15=13.3	13/15= 86.7	0.142～2.257
7	9	(+) 9/9 =100.0		9/9 =100.0	1.039～2.677
8	7	(+) 7/7 =100.0		7/7 =100.0	2.095～2.897
9	3	(+) 3/3 =100.0		3/3 =100.0	1.889～2.890

* PHA 法= Passive hemagglutination test (RUBACELL : Abbott 社)

** ELISA 法= Enzyme−linked Immunosorbent assay (Rubazyme : Abbott 社)

当時，病日を追って採取した風疹患者血清を 2 ME 処理し，HI 価を測定した[6]．風疹患者血清の HI 価は早い病日であっても 2 ME 処理による顕著な抗体価の低下がみられず，各個人の病日経過と 2 ME 感受性抗体の消長との関連も明らかではなかった．風疹ウイルス感染の場合，IgM 抗体が IgG 抗体よりも優位である時期が発疹出現後数日であるため，2 ME 処理では顕著な抗体の低下がみられないと推定した．

1974年に Ankert らが黄色ブドウ球菌の菌体成分の protein A が，ヒト血清中の IgG 分子の Fc 部分と特異的に結合して不溶物を形成する現象から，protein A を含む黄色ブドウ球菌の Cowan I 株の菌体で血清中の IgG を吸収する方法を報告した[2]．吉川らはこのブ菌吸収法が有用な IgM・IgA 抗体の簡易な測定方法であると報告している[3]．

最近開発された ELISA 法は，被検血清の前処理の必要もなく，血清必要量も20 μl で IgG・IgM 抗体を分別測定できるなどの長所を有している．ELISA 法による風疹抗体価測定について検討を加えた．

風疹 HI 価と Rubazyme G−index との関係は相関係数0.7263を示した．HI 法は IgG・IgM 抗体とも反応するが，Rubazyme G は IgG 抗体のみに反応するため両値のくい違いは当然のことである．HI 価があるのに G−index が陰性値を示したものが20件（7.8%）存在した．そのうちの 1 件においては，Rubazyme M−index 1.414の陽性値を示したが，他はすべて M−index は陰性値であった．このような現象は，ELISA 法手技の不備あるいは HI 法のカオリン処理法にも問題があるものと思われる．

ブ菌処理後 HI 価と Rubazyme M−index との相関係数は，0.74であった．両法で検索した結果，風疹罹患後 1 年経過した時点でも IgM 抗体が証明された．また Rubazyme M で検索したなかでは 2 年経過した時点でも，IgM 抗体陽性を示したのが 2 名存在した．IgM 抗

体が長期にわたって残存している例があることを示唆した[7,8].

風疹患者の血清学的診断にELISA法を用いる場合は，IgG・IgM両抗体を同時に検索する必要がある．特に妊婦の風疹感染診断において，IgM抗体の存在だけで感染時期の判定をするには問題がある．検索にあたっては，目的に適した各種の検査方法を組み合わせる必要がある[9~12].

文　献

1) 穴戸　亮：微生物検査必携ウイルス・リケッチア検査，347，1978
2) Ankert J., Christensen P., Kiellen L. and Kronvall G.: *J. Infect. Dis.*, **130**, 268, 1974
3) 吉川ひろみ：ウイルス，**28**（2），35，1978
4) Donald B. Nelson, Edward P. Quirin and Stanley L. Inhoren: *Applied Microbiology*, **27** (4), 767, 1974
5) K.F. Shortridge and L.Y.Hu: *Applied Microbiology*, **27**（4），653, 1974
6) 柳沢靖子，岩崎謙二，柳下徳雄：東京衛研年報，26－1，64，1975
7) 吉川ひろみ：ウイルス，**28**（2），43，1978
8) 萩原　董，荒川澄江，安藤泰彦，岩佐政子：臨床とウイルス，**11**（1），53，1983
9) Neuman P.W. and Wehen J.M.: *Journal of Clinical Microbiology*, **17**（1），28, 1983
10) Alice S. Weissfld, Warren D. Gehle and Alex C. Sonnen Wirth: *Journal of Clinical Microbiology*, **16**（1），82, 1982
11) James M. Meegan, Brigitte K. Evans and Dorothy M. Horstmann: *Journal of Clinical Microbiology*, **16**（4），644, 1982
12) Minas V. Zartarian, Gary Friedly, Ellene M. Peterson and Luis M. De La Maza: *Journal of Clinical Microbiology*, **14**（6），640, 1981

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 54-59, 1983

1982年東京都における日本脳炎疫学調査

関根整治*, 吉田靖子*, 藪内　清*, 岩崎謙二*
鈴木輝康**, 畑野逸與**

Epidemiological Survey of Japanese Encephalitis in Tokyo in 1982

SEIJI SEKINE*, YASUKO YOSHIDA*, KIYOSHI YABUUCHI*, KENJI IWASAKI*,
TERUYASU SUZUKI** and ITSUYO HATANO**

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

日本脳炎（以下日脳）患者の発生は1968年以降，年々低下している．しかし本症は高い致命率と重篤な後遺症を残すことで，現在なお重要な疾患である．1981年は都内においても真性の日脳患者の発生をみた[1]．

我々は都内における日脳の患者確認調査，感受性調査，感染源調査を実施し，過去20年間の調査成績から日脳流行の要因を解析し，流行様相の変化と日脳ウイルス散布の存在から，日脳ウイルスの監視および調査の必要性を報告してきた[2,3]．

本年も昨年にひき続き上記調査を実施したので報告する．

材料と方法

患者検体　1982年5月8日に発病した29才の男性の血清2件，リコール2件（14病日採取，24病日採取）である．

ブタ血清　都下多摩地区で飼育されたブタより採血した血清1,250件で，各月の採血数は1～6月，11～12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　1982年6月8日～10月8日に都内に居住する生後2か月～78才の健康者353名から採取した血清である．血清は都内23区を5ブロック，多摩地区を3ブロックの計8ブロックに分け，1ブロックにつき約45件の検体を採取した．

HI試験　常法に準じてマイクロタイター法により実施した[4]．抗原はJaGAr 01株，中山株を使用した．

中和試験　鶏胎児繊維芽細胞を使用したプラック減少測定法を用いた[4]．使用した抗原はJaGAr 01株である．

コガタアカイエカの捕集　1982年6～10月の間に，月2回～9回，計31回，ライトラップを使用し，既報[5]と同一地点の3か所で捕集した．

ウイルス分離試験　HI抗体価10倍以下のブタ血清，雌コガタアカイエカの吸血蚊と未吸血蚊の各プール乳剤から，乳のみマウスの脳内接種法[4]によって実施した．

検索成績および考察

疑似日脳患者の血清学的検索およびウイルス分離成績

患者は都内に住む29才の男性で5月8日の発病である．全身倦怠感，悪感，頭痛，嘔気，嘔吐，発熱（39°C）などから日本脳炎が疑われ，5月22日に入院した．病日別の血清学的検索，ウイルス分離成績を表1．2に示した．

5月22日（14病日），6月1日（24病日）に採取した血清についてポリオ1～3型，コクサッキーB群1～5型，ムンプス，エコー6型，ヘルペス，日脳の各抗原に対するCF試験を行ったが，抗体の上昇は認められなかった．また14，24病日に採取したリコール検体を乳のみマウスおよびFL，Hep 2，HEL，Vero #462，BGMの各培養細胞に接種してウイルス分離を試みたが，3代までの継代培養ではウイルスを検出することができなかった．

なお患者は入院後，経過は良好で6月21日には，症状は全て消失した．

* 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．東京都に発生した疑似日本脳炎患者の血清学的検索成績

患者氏名	年令性	採血月日	病日	HI試験			CF試験										
				日本脳炎		日本脳炎	ポリオ			コクサッキーB群					ムンプス	エコー6	ヘルペス
				中山株	JaGAr 01株		1	2	3	1	2	3	4	5			
広○○	29	57. 5. 22	14	<10	<10	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
	♀	57. 6. 1	24	<10	<10	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8

表2．東京都に発生した疑似日本脳炎患者リコールからのウィルス分離成績

患者氏名	年令性	採血月日	病日	乳のみマウス	培養細胞				
					FL	HEP#2	HEL	Vero#462	BGM
広○○	29	57. 5. 22	14	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
	♀	57. 6. 1	24	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)

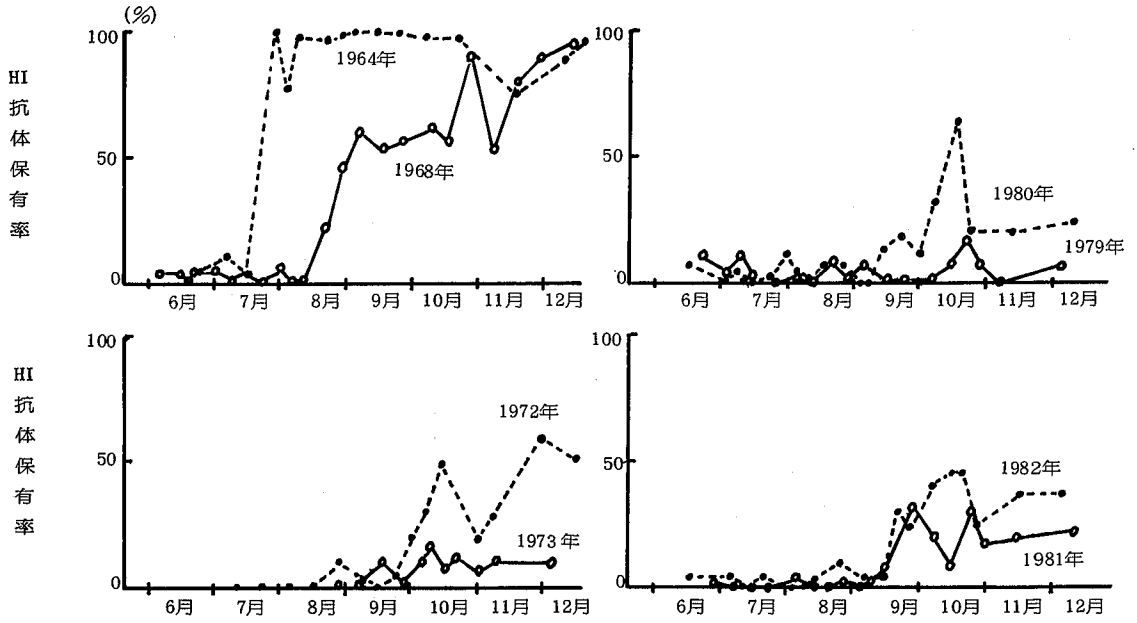


図1.　ブタ血清の日脳HI抗体保有状況

都内飼育ブタの日脳 HI 抗体保有状況　採血日別の検査成績を表3に示した．ブタの HI 抗体は8月下旬頃から抗体価の高いものが出現し始めて，12月中旬まで続き，その抗体保有率は20～40％前後であった．

2ME 感受性抗体の陽性例は，8月下旬から出現し11月迄続き，2ME 感受性抗体陽性率の最も高かったのは，10月18日に採血したブタ血清で，32％の陽性率であった．また9月に採血したブタ血清から3株の日脳ウイルスを分離した．

2ME 感受性抗体の出現時期から8月中旬ないし下旬頃から日脳ウイルスによる感染があったと推測された．我々は，既報[3]において各調査年次のブタ HI 抗体保有率（HI 価≧10）の経時変化曲線のパターンを，HI 抗体保有率の急上昇時期と到達する最高 HI 抗体保有率で比較した．その代表的パターンを図1に示した．

1982年におけるブタ血清の HI 抗体保有状況は，8月下旬より保有率が上昇し始め10月中旬の46％を最高に，その後も20～40％の保有率を示した．過去最も低率を示

表3．1982年都内飼育ブタにおける日本脳炎HI抗体保有状況

採血月日	検査数	HI抗体価(JaGAr株)											抗体保有率(%)	2EM** 感受性抗体陽性率	ウイルス分離*
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	≧5120			
82- 1-18	50	47				1	1	1					6	0%	0/47
2-15	50	45					2	1	1	1			10	0	0/45
3-15	50	44	1	1	1		3						12	0	0/44
4-19	50	47	1	1		1							6	0	0/47
5-18	50	50											0		0/50
6-14	50	48		1		1							4	0	0/48
7- 5	50	48	1			1							4	0	0/48
7-12	50	50											0		0/50
7-19	50	48	2										4	0	0/48
7-26	50	50											0		0/50
8- 2	50	50											0		0/50
8- 9	50	50											0		0/50
8-17	50	49	1										2	0	0/49
8-23	50	50											0		0/50
8-31	50	45	1			2	1			1			10	4	0/45
9- 6	50	48					1	1					4	2***	1/48
9-13	50	48						1	1				4	2***	1/48
9-20	50	35	2	1	1		3	3	4	1			30	18	0/35
9-27·29	50	38					4	3	4	1			24	4**	1/38
10- 4	50	30		1		1	2	10	3	2	1		40	18	0/30
10-12	50	27				1	5	5	10	2			46	24	0/27
10-18	50	27	1				3	3	11	5			46	32	0/27
10-25	50	38						5	4	1	2		24	6	0/38
11-15	50	31			1	1	3	9	2	3			38	12	0/31
12-13	50	31	2	2		4	3	7	1				38	0	0/31

*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った．

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

***ウイルス分離陽性例 { 1982年9月6日 (JaTan 1/82)　9月29日 (JaTan 3/82)
1982年9月13日 (JaTan 2/82)

した1973年に較べ1980年～1982年のHI抗体保有率では，若干上昇傾向が認められた．

コガタアカイエカの出現消長　調査2地点において調査期間中に，捕集されたコガタアカイエカは419匹（吸血蚊162匹，未吸血蚊257匹），その他の蚊1,253匹であった．コガタアカイエカの消長を図2に示した．

6月下旬より出現し始めた雌コガタアカイエカは，7月中旬から急上昇し8月上旬で最高となり以後減少した．1982年の採取日別，ブタ血清の日脳HI抗体保有率の消長と比較すると，HI抗体保有率のピークよりも雌コガタアカイエカの出現は，2か月早かった．

雌コガタアカイエカからのウイルス分離　雌コガタアカイエカは，吸血蚊と未吸血蚊，さらに捕集日別，捕集地別に整理し，101のプール乳剤を作成して，乳のみマウスの脳内接種法によりウイルス分離を行った．結果は全例陰性であった．

都民の血清における日脳抗体保有調査成績　1982年6月8日～10月8日に，生後2か月から78才の都内の健康者353名から採取した血清について，日脳ウイルスJaGAr 01株，中山株に対するHI抗体価とJaGAr 01株に対する中和抗体価を測定し，その結果を表4に示した．

2才以下，3～5才，6～12才，13～16才，17～30才，31～59才，60才以上の7年令区分に分け，抗体保有状況を解析した．

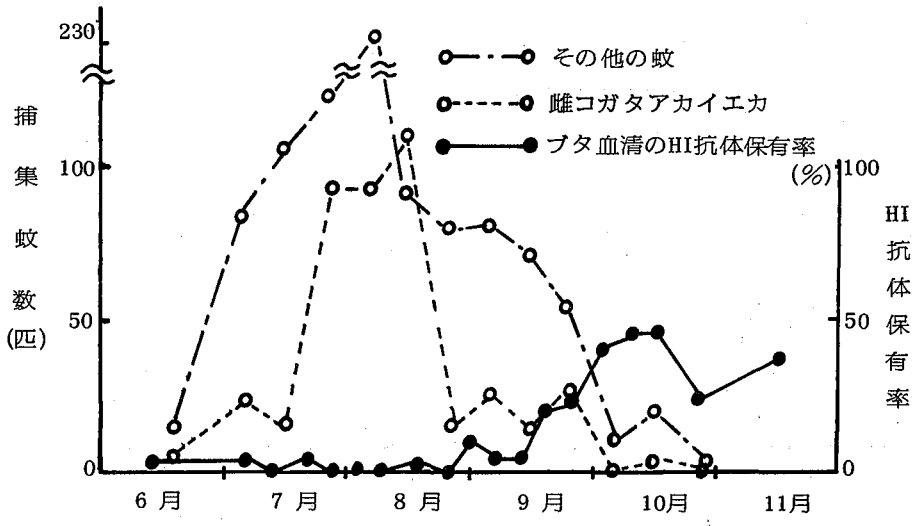


図2. 雌コガタアカイエカの出現消長とブタ血清のHI抗体保有率

表4．健康都民における日本脳炎抗体保有状況

年令階層	検査数	抗原*	HI抗体保有率 ($\geqq 5\times 2^1$)	平均HI抗体価 (5×2^n)	中和抗体保有率 ($\geqq 5\times 2^1$)	平均中和抗体価 (5×2^n)
$\leqq 2$	52	N	4/52 7.7%	1.00±0.00	39/52 75.0%	2.05±0.51
		J	4/52 7.7	1.25±0.50		
3～5	54	N	16/54 29.6	1.81±1.10	49/54 90.7	2.18±081
		J	19/54 35.2	1.95±1.08		
6～12	62	N	45/62 72.6	2.40±1.40	58/62 93.5	3.05±1.55
		J	47/62 75.8	2.49±1.41		
13～16	24	N	16/24 66.7	2.13±1.36	20/24 83.3	2.30±0.86
		J	15/24 62.5	2.67±1.54		
17～30	72	N	19/72 26.4	1.47±0.70	53/72 73.6	1.92±0.90
		J	23/72 31.9	1.48±0.79		
31～59	75	N	31/75 41.3	1.55±0.93	64/75 85.3	2.61±1.33
		J	40/75 53.3	1.93±1.16		
$\geqq 60$	9	N	7/ 9 77.8	1.43±0.79	9/ 9 100.0	2.56±0.88
		J	8/ 9 88.9	2.00±1.70		

*N：中山株，J：JaGAr01株

各年令階層によってJaGAr 01株，中山株に対するHI抗体保有率に差がみられた．すなわち2才以下では7.7%と最も低く，3～5才，6～12才と年令上昇にともないHI抗体保有率も高くなった．そして17～30才で26.4～31.9%と低下した後31～59才，60才以上となるにしたがって再び上昇した．この傾向は前年と同様の結果を示した．

同様に中和抗体価5×2^1以上の保有率をみると，全年令階層とも高率（70～100%）に保有していた．年令階層別の日脳中和抗体の保有状況を回帰分析法で検討した．（図3）

同一集団における抗体価10×2^0～10×2^7の各累積抗

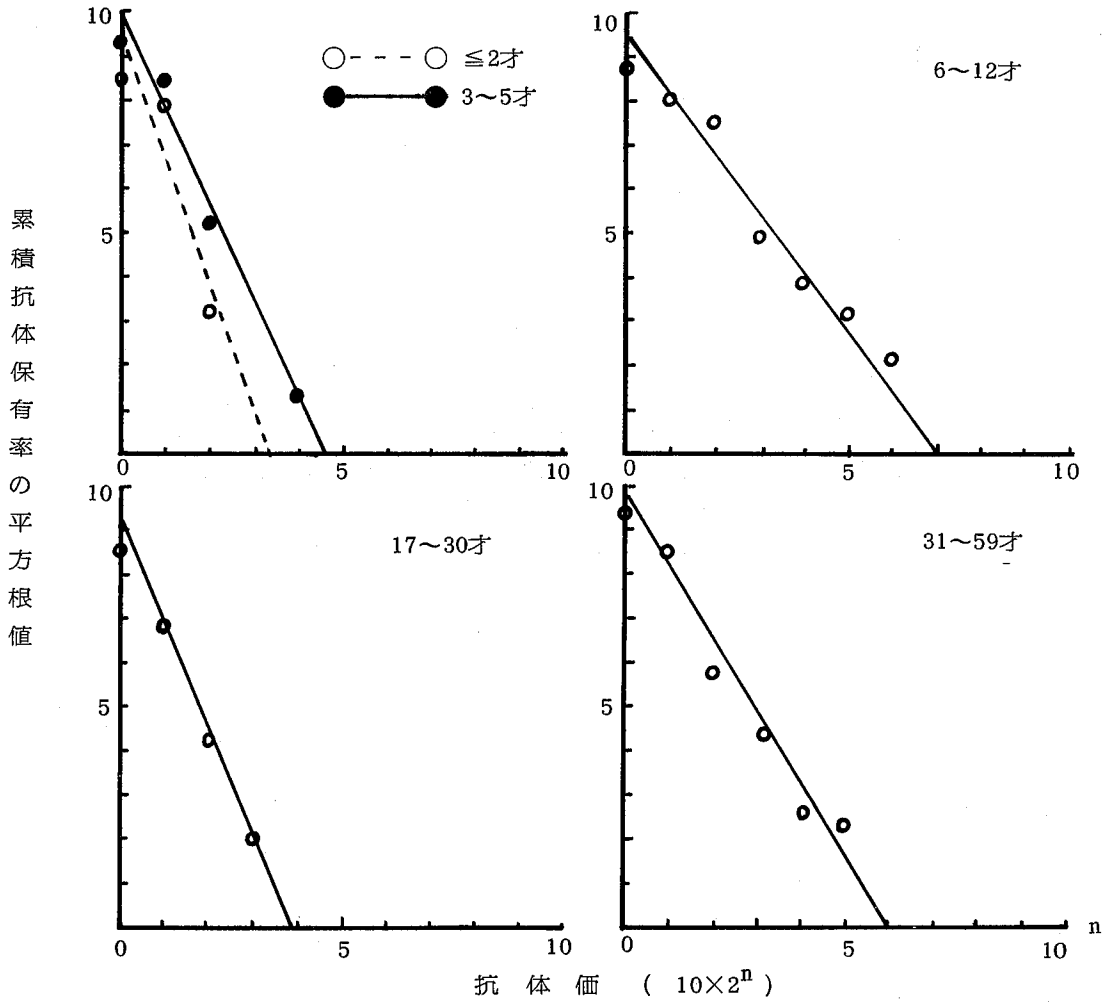


図3. 年令階層別の中和抗体保有率の回帰直線

体保有率は一つの回帰直線で表現され，異った集団との比較は回帰直線の位置の対比で検討を試みた[6]．抗体価 10×2^0 における累積抗体保有率に明らかな差が認められなかった≦2才，3～5才，6～12才，17～30才，31～59才を対比すると，5者の回帰直線は傾きに差が認められた．すなわち各年令階層において回帰直線の傾きが異なっていた．

高い抗体価をもつ6～12才では，回帰直線の傾きが最も大きくついで31～59才，3～5才，17～30才，で2才以下が最も小さかった．

結　論

1982年の東京都における日本脳炎の患者確認調査，感染源調査，および健康都民の感受性調査を行い，次の結果を得た．

1）都内に発生した日脳疑似患者の血清，リコール（14病日，24病日）の検索を行ったが日脳ウイルスの感染は否定され，また他の病因ウイルスも確定できなかった．

2）1982年1月～12月の間に採血したブタ血清のHI抗体保有状況（HI価≦10）は，8月下旬頃から高い抗体価をもつものが出始め12月中旬まで続き，その抗体保有率は20～40％前後であった．

3）コガタアカイエカの出現消長は，8月上旬で最高となり，ブタでのHI抗体保有率が最高となった10月中旬よりも2か月早かった．

4）都民の日脳 HI 抗体保有状況（HI 価 5×2^1）は年令階層によって差がみられ，2才以下が最も低くついで17～30才であり，最高は60才以上であった．

5）抗体価（5×2^1）以上の日脳中和抗体保有率は，各年令階層間に差が認められなかった．しかし抗体価別分布状況を比較すると，年令階層間に差が認められた．

≦2才，17～30才では，高い抗体価を示すものが認められなかったのに対し6～12才，31～59才では高い抗体価を示すものが比較的多かった．

文　献

1) 吉田靖子，関根整治，藪内　清，岩崎謙二，山口安夫，斉藤正度：東京衛研年報，33，66，1982
2) 吉田靖子，藪内　清，関根整治，岩崎謙二，三宅　勉，三木　博：東京衛研年報，29－1，79，1978
3) 岩崎謙二，吉田靖子，関根整治：東京衛研年報，31－1，43，1979
4) 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
5) 吉田靖子，関根整治，岩崎謙二，斉藤正度，松本栄一：東京衛研年報，31－1，29，1980
6) 岩崎謙二，吉田靖子，関根整治：東京衛研年報，26－1，81，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 60-64, 1983

東京都内のインフルエンザ検索成績
(1981年10月～1983年2月)

坂井冨士子*, 伊藤忠彦*, 山崎清*, 岩崎謙二*

Prevalence of Influenza Occurred in Tokyo
(Oct. 1981-Feb. 1983)

FUJIKO SAKAI*, TADAHIKO ITO*, KIYOSHI YAMAZAKI*
and KENJI IWASAKI*

Keywords: インフルエンザ Influenza, インフルエンザウイルス Influenza viruses, HI 抗体 HI antibodies, 血清疫学 seroepidemiology

緒　言

東京都内におけるインフルエンザ(以下「イ」と略す)は，1979年，1980年および1981年初頭には，AH 1型ウイルスによるものが主体であったが，1980年と1981年の同期には，AH 1型に加えてAH 3型とB型の発生も認められ，それまでに前例のない三重の流行であった[1]．1982年初頭には6年ぶりにB型ウイルス主体の「イ」の流行が発生し，AH 3型がいくらかこれに加った形となった．1983年初頭はAH 3型のみの流行となり，1979年初頭のAH 1型から4年ぶりに単一型の流行となった．AH 3型ウイルスは1968年に初めて出現して以来，大小幾多の抗原変異を繰り返しながら，A型亜型の中ではこれまでになくほとんど連続して15年を経た現在でもなおヒトに感染流行を起させている．本報では1981年10月から1983年2月までの「イ」の検索成績について報告する．

材料と方法

検査対象　1981年10月から1983年2月の期間に，かぜ患者の集団発生のため学級閉鎖を行った都内小，中学校のうち63集団302名（1集団約5名）および渋谷区内の数ヶ所の開業医で受診したかぜ患者40名（17名は20～75才の成人）計342名を検査対象とした．

ウイルス分離試験　急性期に採取した咽頭うがい液を検体とし，発育鶏卵およびFL，Hep 2，Vero 355，MDCKの各種培養細胞接種により行った．検査術式は既報[2~4]に従って行った．

血清学的試験　急性期および回復期に採取したペア血清を用いて補体結合反応試験（CF試験），および赤血球凝集抑制試験（HI試験）を行った．CF試験には「イ」A型，B型およびアデノウイルスのそれぞれS抗原を用いた．HI試験に用いた「イ」ウイルス抗原の株は本文中に記載する．検査術式は既報[2~4]の通りである．CF，HI試験共に回復期の抗体価が急性期の4倍以上に上昇した場合を有意上昇とみなした．

血清疫学的調査　患者検体がほとんど得られなかった青年層の「イ」の実態をは握するため都内某看護専門学校生徒110名より1981年6月と1982年6月に採取したペア血清について各型ウイルス株を用いてHI抗体価を測定した．

成績と考察

患者の病因検索　集団発生例の病因検索状況は表1に示した通りである．検索結果から1981年末から1982年初頭の集団かぜの主因は「イ」B型ウイルスであり，「イ」AH 3型ウイルスによるものは少なかったこと，1982年末から1983年初頭は「イ」AH 3型ウイルスが主因であることが認められた．また両冬期共に「イ」の流行に先行してアデノ4型ウイルスによる集団かぜの発生が認められた．「イ」の集団発生例は，2冬期共新年に入って学校の冬休みが明けてから確認されたが，それらの流行に先立って1981年12月にB型ウイルス1株，1982年12月にAH 3型ウイルス2株が散発々生例より検出された．集団発生および散発々生例342名のうがい液より「イ」AH 3型65株，同B型25株，アデノ1型1株，同4型9株のウイルスを分離した．ウイルス分離試験と血清学的試験成績の総合結果から，118名が「イ」AH 3型，88名が同B型，12名がアデノウイルス感染症と診断され

* 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, Hyakuninchо 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表1．集団かぜ病因の検索結果

発生年月旬	検索集団数	診断 インフル AH3型	診断 インフル B型	診断 アデノ	診断 不明	検索件数	ウイルス分離 インフル AH3型	ウイルス分離 インフル B型	ウイルス分離 アデノ	血清学的試験 インフル A型	血清学的試験 インフル B型	血清学的試験 アデノ
1981 10 中	1			1		5			4(4型)			4
12 上	3			1	2	15						2
中	2				2	10						
1982 1 中	7	2	7*			33	2	8		4	21	
下	15		14		1	70		8			42	
2 上	2		2			9		2			8	
3 中	1	1				7	2			2		
4 下	1	1				5	4			4		
10 中	1			1		5			5(4型)			5
12 上	1				1	5						
中	2				2	7						
1983 1 中	9	8			1	41	23			20		
下	14	14				70	20			56		
2 上	4	4				20	5			13		
計	63	30	23	3	9	302	56	18	9(4型)	99	71	11

* 2集団はAH3型と同一集団

表2．看護学院生徒110名のペア血清におけるインフルエンザH1抗体価の変動調査（採血：1981年6月・1982年6月）

抗原	抗体上昇比と例数 1/4	1/2	1	2	4	8	16	32	64	抗体陽転率≧4の上昇
AH1型										
FM 1/47	1	25	78	6						0.0%
大町 1/53	1	43	64	2						0.0
新宿 1/56		25	82	3						0.0
USSR 90/77		32	69	9						0.0
熊本 37/79	1	31	66	12						0.0
AH3型										
Bangkok 1/79		21	72	6	2	2	6		1	10.0
新潟 102/81		12	80	10	1	5		2		7.3
B型										
Singapore 222/79		5	59	12	20	11	3			30.9
東京 106/82		1	62	19	20	6	2			25.5

た．検出「イ」AH3型ウイルスは発育鶏卵の方が高率に分離出来たがB型ウイルスは発育鶏卵とMDCK細胞でほぼ同様に検出出来た．アデノウイルスはFLおよびHep2細胞で検出された．

某看護専門学校生徒におけるインフルエンザウイルスHI抗体価変動調査　生徒110名より1981年6月と1982年6月に採取したペア血清について「イ」ウイルスAH1型5株，AH3型2株およびB型2株を抗原としてHI抗体価を測定し，その変動からこの間における各型ウイルス感染状況を推測した．HI価の変動状況は表2に示した．調査期間中に同集団では30.9%にB型ウイルス感染者が，10.0%にAH3型ウイルス感染者があったことが認められたが，AH1型ウイルス感染者は1例も認められず，この成績は先に述べた学童等の集団発生

表 3. 1982年12月～1983年2月 AH3型ウイルス分離陽性者のペア血清の ＨＩ 価の変動

回　復　期

A／新 潟 102／81 (H3)

急性期 ＼ 回復期	<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	計
<1*					1**					1
1				2	1	2				5
2					3	1		1	1	6
3				1	7	8	5		3	24
4					2	6	5	1		14
5						1	2			3
6										
7										
計				3	14	18	12	2	4	53

A／東 京 1462／82(H3)

急性期 ＼ 回復期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	計
<1		1			1		1			3
1				1		2	1		2	6
2					2		2		2	6
3						8	4	1		13
4					2	7	4	1	2	16
5						2	4	2		8
6								1		1
7										
計		1		1	5	19	16	5	6	53

A／東 京 1465／82(H3)

急性期 ＼ 回復期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	計
<1				3		1	1	2		7
1			3	2	2					7
2				2	4	6	1	1		14
3				2	4	5	1		1	13
4					3	7	2			12
5										
6										
7										
計			3	9	13	19	5	3	1	53

A／Bangkok 1／79(H3)

急性期 ＼ 回復期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	計
<1		1			1		1				3
1						1	1	1	2		5
2								1	1		2
3				1		2	2	1			6
4						2	4	4			10
5						1	11	7	1	1	21
6							2	3			5
7								1			1
計		1		1	2	6	21	19	2	1	53

A／熊 本 37／79(H1)

急性期 ＼ 回復期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	計
<1		1								1
1				1						1
2			1							1
3				2	2					4
4					4					4
5						15	4			19
6							15			15
7								4	2	6
8								1	1	2
計		1	1	3	6	15	19	5	3	53

B／Singapore 222／79

急性期 ＼ 回復期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	計
<1	1									1
1		1								1
2		1	1							2
3				11	1					12
4				1	14					15
5					3	14	1			18
6						3	1			4
7										
8										
計	1	2	1	12	18	17	2			53

A／P R 8／34(H0)

急性期 ＼ 回復期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	計
<1	16	5	2	4	2		1			30
1		2	6	1	1	1				11
2			2	1	3	2				8
3			1	1		1				3
4						1				1
5										
6										
7										
計	16	7	11	7	6	5	1			53

A／N J 8／76(Hsw1)

急性期 ＼ 回復期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	計
<1	13	4									17
1		13	1	1							15
2			8	3							11
3				4	1						5
4					3						3
5						2					2
6											
7											
8											
計	13	17	9	8	4	2					53

1975年11月～1976年3月

A／東京 462F／75(H3)

急性期 ＼ 回復期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	計
<1			1	2	3	3	2			11
1			1	2	2	6	5	1	1	18
2				1	1	3	2	1		8
3						2	3			5
4							1	1		2
計			2	5	6	14	13	3	1	44

1977年12月～1978月1月

A／東京　659／77(H3)

急性期 ＼ 回復期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	計
<1					3			1			4
1				7	10	3	2				22
2				1	8	4	3			1	17
3					1	2	3	3			9
4								1			1
計				8	22	9	8	5		1	53

*：8×2^n 値

**：例　数

表4．AH 3型患者ペア血清の平均HI価

	1982年～83年の患者				1975年～76年の患者	1977年～78年の患者
	新潟102/81	東京1462/82	東京1465/82	Bangkok 1/79	東京462F/75	東京659/77
急性期	3.08*(1.01)	3.34(1.29)	2.65(1.04)	4.18(1.48)	1.73(0.94)	1.78(0.82)
回復期	5.15 (1.25)	5.62(1.35)	4.51(1.31)	6.15(1.26)	5 (1.35)	4.70(1.34)

*平均HI価 8×2^n値
( )内SD

例の検索結果と同様の傾向を示した．

AH 3型インフルエンザ患者血清のHI試験成績 1982年12月～1983年2月における「イ」AH 3型ウイルス分離陽性者のうち急性期，回復期のペア血清が得られた53例（20～56才の成人7例を含む）について，AHO型PR 8/34，AHsw 1型NJ 8/76，AH 1型熊本37/79（ワクチン株），AH 3型新潟102/81(ワクチン株)，AH 3型東京1462/82（今期分離株），AH 3型東京1465/82（今期分離株），AH 3型 Bangkok 1/79（前期ワクチン株）およびB型 Singapore 222/79（ワクチン株）の各株を用いてHI価を測定しその結果を表3に示した．又，前回および前々回のAH 3型「イ」の比較的大規模な流行であった1975年および1977年の患者（ウイルス分離陽性者それぞれ44名，53名）について当時の分離株を用いた成績も併せて示した．1975年の流行時あるいは1977年の流行時の患者では分離株を用いれば，約96%に抗体の有意上昇が認められたのに対し，今回の流行時の患者では分離株を含めた供試AH 3型4株に対し58.5～67.9%にしか抗体価の有意上昇が認められなかった．急性期に$\geqq(8 \times 2^2)$すなわち32倍以上の抗体価をもっていた例は75年，77年ではそれぞれ34.1%，50.9%であるのに対し今期は73.6～80.0%とかなり高い．表4に示した平均HI価でみてもAH 3型株に対する回復期の価は3冬期共にほとんど変らないのに対し，急性期の価は前2冬期に比して約4倍高い価を示しており，このことが上昇率が低いという結果になったのであろう．患者血清は免疫血清と異り各個人によって感染歴あるいはワクチン歴に差があるため単純に結論を出すことは出来ないが，急性期のHI価が高い例にも感染者が多いということはHI抗体価の高さが，そのまま感染防御能に比例するとは限らない場合があると云えよう．またこの成績から今回の流行株の中にはヒトに対してHI抗体を作りにくいHA抗原決定基をもつものが多くなってきていることが示唆される．

次に今回のAH 3型患者でAHO型PR 8/34株に対し抗体の有意上昇を認めた例は18例，34%（表3）で1977年の同型患者の場合の2.7%[5]よりはるかに多かった．個々にみるとPR 8株に抗体上昇を認めた例でも，回復期の価は一般にAH 3型株の方が高いが，上昇比でみると中には両者が同程度か，PR 8株の方が高い例もあった．ニワトリ免疫血清を用いた場合すでに1977年に分離したAH 3型ウイルスにおいてAHO型PR 8/34株との間に明らかな交差反応が認められているが[5]，この様な株と抗原的に類似したAH 3型ウイルスによる感染ないしはワクチン接種が繰返しなされるようになって，ヒト血清中にもPR 8株に対する抗体上昇が著明に認められるようになったものと考える．さらに今回のAH 3型患者の中でAH 1型熊本37/79株またはAHsw 1型NJ 8/76株に有意上昇した例が1例づつ認められた．AH 1型患者におけるAH 1型，AHO型およびAHsw 1型のHI抗体の関連についてはすでに報告したが[1]，今回のAH 3型患者の成績を加えると「イ」A型内の各亜型間の関係がますます複雑化してきていることがうかがわれた．なおB型株に対する有意上昇例は1例も認めなかった．

まとめ

1．患者材料の検索結果から東京都内における「イ」は，1981年末から1982年初頭にかけてはB型が主体であり，AH 3型が若干混在したことが判明し，1982年末から1983年初頭にかけてはAH 3型のみが認められた．

2．1981年6月と1982年6月に都内某看護専門学校生徒110名より採取したペア血清について「イ」各型ウイルス抗原を用いてHI試験を行った結果，30.9%にB型，10.0%にAH 3型ウイルス感染があったことが認められた．

3．1982年末から1983年初頭にかけての「イ」AH 3型患者のHI抗体上昇率は，これまでになく低率であった．

4．近年の「イ」A型患者のHI抗体変動状況からみるとA型内各亜型間の関係が複雑化していることが示唆された．

文　献

1）坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎　清，岩崎謙二：東京衛研年報，32－1，48，1981
2）矢野一好，柳沢靖子，伊藤忠彦，藪内　清，岩崎謙二：東京衛研年報，26－1，59，1975
3）岩崎謙二，藪内　清，伊藤忠彦，山崎　清：東京衛研年報，26－1，69，1975
4）岩崎謙二，伊藤忠彦，山崎　清，吉田靖子，横山庸子：東京衛研年報，27－1，58，1976
5）坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎　清，岩崎謙二：東京衛研年報，29－1，70，1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 65-68, 1983

動物園のサルに発生した*Yersinia pseudotuberculosis*による集団感染例

丸山　務*, 神崎政子*, 田辺興記**, 川崎　泉**
平松　廣**, 斉藤和夫**, 増井光子**

A Series of Infection due to *Yersinia pseudotuberculosis* in Monkeys in a Zoo

TSUTOMU MARUYAMA*, MASAKO KANZAKI*, KOKI TANABE**
IZUMI KAWASAKI**, HIROSHI HIRAMATSU**, KAZUO SAITO** and
MITSUKO MASUI**

Between September and December, 1980 all of the 3 green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) and 1 of 4 sooty mangabeys (*Cerocebus torquatus*) kept in the adjacent cage to the monkeys successively had diarrhea and 2 died. *Y. pseudotuberculosis* was detected in the lung, spleen, mesenteric lymph nodes, blood and intestinal contents of 4 monkeys either died or sacrificed after the onset. Systemic infection of *Y. pseudotuberculosis* was presumably responsible for manifestation and death of the animals.

As the above result suggested that monkey facilities in the zoo were heavily contaminated whith *Y. pseudotuberculosis*, total of 13 monkeys of 4 different species which were kept either in the same cage or adjacent cages were sacrificed. Various organs and intestinal contents as well as excretes of 23 healthy monkeys of 8 different species were examined for *Y. pseudotuberculosis*, and one sample from both the sacrificed monkeys and the healthy individuals was found positive. Bacteria isolated from the specimens of the dead, sacrificed and healthy monkeys were identical and of typical *Y. pseudotuberculosis*. All of isolates were serotype IB.

Macroscopic findings of the autopsied samples included hyperemia of the intestinal mucos membrane and significant enlargement of Peyer's pathches and the mesenteric lymph nodes. The spleen was also enlarged and there were observed numerous small tubercles which were yellowish white in color. These tubercles were histopathologically determined as granulomataus foci having a huge bacterial colony in the center.

Keywords : *Yersinia pseudotuberculosis*, monkey, infection, tubercle

緒　言

仮性結核菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) はげつ歯類動物に感染した時，結核様病変を形成することで命名された菌種であるが，時としてヒトに激烈なチフス様疾患を，また動物に対しても致死的な敗血症を起こすことで知られている．病原性のある *Yersinia* 属菌のなかでもペスト菌 (*Y. pestis*) や *Y. enterocolitica* が主にヒトに対して病原性を発揮するのに比較して本菌はヒト，動物ともに同様の起病性をもつことから人畜共通伝染病菌のなかでも最も重要な1つであるといえる．

今回，東京都内の1動物園で飼育されている複数種のサルに発生した死亡例を含む集団下痢症は，原因物質の検索の結果，仮性結核菌であることが確認された．ここでは事例の発生状況と主に細菌学的検査成績についてその概要を報告する．

事例の概要

1980年9月14日，動物園に飼育されているサバンナモンキー3匹中1匹が粘血便を混じた下痢症状を呈して発

* 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
** 東京都建設局恩賜上野動物園

症，翌15日に死亡し，続いて同じ檻の1匹も同様の症状で9月24日発症，29日に死亡した．

当時この動物園のサル舎は鉄柵と金網で仕切られて連続する7つの檻から成り，それぞれの檻に種別に1～5匹のサルが展示のため飼育されていた．サルの種類とそれぞれの飼育頭数はシロテテナガザル White-handed gibbon 2, サバンナモンキー Grass (Green) monkey 3, スーティマンガベー Sooty mangabey 4, パタスザル Patas monkey 1, フサオマキザル Tuffed capuchin 4, シシオザル Lion-tailed macaque 2, ジェフロイクモザル Geoffroy's spider monkey 5 の計7種21匹である．

2匹の死亡で残り1匹となったサバンナモンキーも続いて10月2日に発症，さらに，檻を隣接するスーティマンガベーの1匹が11月24日に発症，いずれも重度の衰弱のため直ちに殺処分とした．

死亡例と殺処分例の計4匹について細菌学的検索を進めた結果，いずれも *Y. pseudotuberculosis* が検出された．また，1匹の発症例のないフサオマキザルの檻内で採取された排泄便からも同菌が分離された．これらの成績から，サル舎全体が *Y. pseudotuberculosis* に濃厚に汚染されていることが想定されたので，本症続発を防止するため，また，ヒトへの感染予防のため外見上健康である4種13匹を殺処分とし，このサル舎を清掃した．

細菌学的検査成績

死亡した2例，発症殺処分した2例，健康個体で殺処分した13例は直ちに解剖し，肺，肝，脾，腎，腸間膜リンパ節および腸管内容物を，また採血可能であった個体は血液も検査材料として細菌学的検査を行った．発症例の症状から主として腸管系病原菌を中心に検索を実施したが，発症例4匹から採取された19検体中16のほとんどが純培養状に *Y. pseudotuberculosis* が検出され，既知病原菌はすべて陰性であった．健康個体で殺処分された13例から採取された63検体ではフサオマキザルの盲腸内容物からのみ同菌が検出された．発症殺処分例のサバンナモンキーで，殺処分時に採血された血液からも直接培養で本菌が分離され，この時の菌数は約600/m*l*であった．

Y. pseudotuberculosis はこの他にも発症個体の檻の中で採取された排泄便から1件，健康個体排泄便24検体中スーティマンガベーの1件から増菌培養で検出された．なお，サル舎近隣で捕獲されたネズミ9匹について本菌の検索を行ったがすべて陰性であった．

これら各種検体から分離された菌の計19株はすべて同一性状を示す典型的な *Y. pseudotuberculosis* で，血清型は全株がIB型であった．また，これらの分離株はVW抗原産生株であり，マウスに対する病原性は10^5個の静脈内接種で5日以内に死亡させた．抗生物質に対してはペニシリンの他ストレプトマイシン，クロラムフェニコール，テトラサイクリン，カナマイシン，サルファ剤にすべて感受性であった．

これらの性状を死亡例の脾，発症殺処分例の脾，健康個体ふん便由来の各1株を代表として Table 3. に示した．

発症サルの剖検所見

死亡または殺処分した4例の発症サルはほぼ同様の剖検所見であった．すなわち，腸管は特に回腸部分の粘膜面に充血が顕著であり，パイエル板および腸間膜リンパ

Table 1. Herd Infection of *Y. pseudotuberculosis* among Monkeys

Monkeys	Number of head	onset	death	positive *Y. pseudotuberculosis*
White-handed gibbon (*Hylobates lar*)	2	0	0	0
Green monkey (*Cercopithecus aethiops*)	3	3	2	3
Sooty mangabey (*Cercocebus torquatus*)	4	1	0	2
Patas monkey (*Erythrocebus patas*)	1	0	0	0
Tuffed capuchin (*Cebus apella*)	4	0	0	1
Lion-tailed macaque (*Macaca silenus*)	2	0	0	0
Geoffroy's spider monkey (*Ateles geoffroyi*)	5	0	0	0

Table 2. Isolation of *Y. pseudotuberculosis* from Various Specimens of Monkeys and Rats

Animals	Number of cases	Specimens	Number of tested	Number of positive
Monkey				
Diarrhea, died	2	Organs	11	8
Diarrhea, sacrificed	2	Organs	8	8
Diarrhea	4	Feces	1	1
Healthy, sacrificed	13	Organs	63	1
Healthy	23	Feces	24	1
Rat				
Sacrificed	9	Organs	40	0

Table 3. Biological Characteristics of *Y. pseudotuberculosis* Isolated from Monkeys

Characteristics	Sources(Strain) Died Spleen (80–25)	Sacrificed Spleen (80–98)	Healthy Feces (80–100)
Gram stain	−	−	−
Motility 37C	−	−	−
25C	+	+	+
Oxidase	−	−	−
H_2S	−	−	−
Indol	−	−	−
VP	−	−	−
Urease	+	+	+
Glucose/gas	+/−	+/−	+/−
Sucrose	−	−	−
Rhamnose	+	+	+
Adonitol	+	+	+
Cellobiose	−	−	−
Melibiose	+	+	+
Salicin	+	+	+
Esculin	+	+	+
Lysin	−	−	−
Ornithin	−	−	−
Serotype	IB	IB	IB
Pathogenicity			
Mouse	+	+	+
VW antigen	+	+	+

節が腫大していた．脾も1例を除いて腫大し，粟粒大から小豆大の黄白色の小結節が密発している所見が特徴であった．この小結節は肝その他の臓器にはみられなかった．その他肺に半透明化した炎症像，肝に帯黄色の腫大，腎に点状出血斑のみられる個体もあった．

脾にみられた結核様小結節は組織学的には *Y. pseudotuberculosis* と思われる巨大な菌集落を中心にもつ壊死巣の像として観察された．

考　　察

飼育サルにおける集団の仮性結核菌症はこれまでに内

外に数多くの報告がみられ[1~7]，いずれも死亡例を含むことからサルは本菌に対し高い感受性をもつものと思われる．今回の集団発生例は発症例数が4例と小規模であったが，死亡例はこれまでの報告と同様その剖検所見と細菌学的検査成績から *Y. pseudotuberculosis* の全身感染による敗血症死であることが証明された．

本事例の感染源および感染経路については疫学調査が十分でなかったために明らかにすることはできなかった．当時飼育されていた7種21匹のサルはすべて1年以上の長期間移動なしに同一施設内で飼育されていた個体であり，また本菌のサルに対する病原性から考慮してサルが本菌を長期保菌していたものがこの時期に顕在化したとするより何らかの経路で外から持ち込まれたとみるのが妥当であろう．

仮性結核菌は鳥類，哺乳動物に広く分布し[8]，わが国でも動物における保菌率はブタで2.3%，イヌ1.8%，ネコ3.2%，ネズミ1.8%であることが確認されている[9~11]．これらのうち，飼育サルの感染にキャリヤーとして役割をはたすとすればブタやイヌ，ネコよりもネズミであろう．ネズミにおける保菌は低率であるとはいえこの動物の存在は疫学的に重要である．

一方，ヒトにおける仮性結核症はわが国では1913年Saisawa[12]の先駆的な業績があった後，永い間本症の発生報告がなかったが，最近になって *Y. enterocolitica* 感染症の急増でYersinia症の関心が高まったこともあり，仮性結核症も散発例ばかりでなく，集団例も確認されるようになった[13]．これらのなかには今回サルで検出されたと同じ血清型IBによるものもあり，本血清型菌はわが国では一般的な菌型であり，ヒトと動物に共通した病原性を発揮するものと解される．

今回の事例でサルの飼育担当者や動物園職員および観客にサルから感染を受けたと思われる事例の発生は無かったが，ヒト，動物双方の本症発生を予防するためには動物における保菌や環境汚染実態を十分に把握しておく必要があろう．また，サルでは発症しないまでも排菌している期間があるので本症の発生防止には定期的な検便も有効な防疫処置である．

結　論

1980年9月から12月にかけて東京都内の1動物園で飼育されている7種21匹のサルのうち，2種4匹が重篤な下痢症状を呈し，このうち2匹が死亡した．発症サルからすべて同一性状の *Y. pseudotuberculosis* IB が検出され，本菌が原因菌と推定された．死亡サルはその剖検所見と細菌学的検索成績から本菌による敗血症死であることが証明され，腸管粘膜の充血と膜間膜リンパ節の腫大と脾に結核様結節の密発が特徴であった．

文　献

1) 片山　望，岸　浩，岡崎義三，上田武利：動物園水族館雑誌，9，1，1969
2) Bronson, R. T., May, B. D. and Ruebner, B. H. : Am. J. Pathol., 69, 289, 1972
3) Hirai, K. et al. : *Jap. J. Vet. Sci.*, 36, 351, 1974
4) Baggs, R. B. et al. : *Lab. Ani. Sci.*, 26, 1079, 1976
5) Rosenber, D. P. et al. : *J. Am. Vet. Med.*, 177, 818, 1980
6) Buhles, W. C. et al. : *J. Chin. Microbiol.*, 13, 519, 1981
7) Strickla, H. L. et al. : *Lab. Ani. Sci.*, 32, 426, 1982
8) Mair, N. S. : *Diseases Transmitted from Animals to Man*, 174, 1975, Charles C. Thomas, Illinois
9) 善養寺浩他：東京衛研年報，25，1，1974
10) Tsubokura, M. et al. : *Jap. J. Vet. Sci.*, 38, 549, 1976
11) Yanagawa, Y. and Maruyama, T. : *Microbiol. Immunol.*, 22, 643, 1978
12) Saisawa, K. : *Z. Hyg. Infekt.-Kr.*, 73, 353, 1913
13) 佐藤幸一郎：小児科臨床，34，138，1981

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 69-74, 1983

Bacillus 属の簡易同定法に関する検討

神 保 勝 彦*, 小久保 彌太郎*

Review on Simplified Identification Method for Genus *Bacillus*

KATSUHIKO JINBO*and YATARO KOKUBO*

Conventional method for identifying species of genus *Bacillus* requires complicated techniques and is not quite suitable for routine tests. Study of genus *Bacillus* in food sanitation area is therefore somewhat lagging behind that in the field of enteric bacteria.

We studied in detail properties of genus *Bacillus* in an effort to develop a simplified identification method and found out that the genus *Bacillus* could be classified into two groups according to the shape of sporangium. They were further classified in step-wise manner according to the growth in the presence of 7% saline solution and in the anaerobic environment. We found out a subsequent brief investigation of certain biological properties such as reduction of nitrate to nitrite and hydrolysis of starch would easily identify species of genus *Bacillus*.

We used this method to identify species of genus *Bacillus* detected in 114 samples of domestically produced milk powder comprising 65 samples of skimmed milk powder, 23 of whole milk powder, 20 of cream powder, 5 of modified milk powder and 1 of buttermilk powder. The result indicates that the predominant species were *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus* and *B. megaterium*.

We ascertained that the species of genus *Bacillus* identified by the present method coincide with those identified by the methods according to Azuma, Bergey's manual (8th edition) and Agriculture Handbook No. 427.

Keywords : simplified identification method, genus Bacillus, sporangium, 7% saline solution, anaerobic enviroment biological properties

はじめに

*Bacillus*属の簡易同定法は，Smith[1] および東[2,3] などにより報告されている．ところが，この両法はいずれも手技が複雑であるため，食品衛生分野では日常検査にはあまり用いられていなかった．そのため，一般食品を対象とした系統的な *Bacillus* 属汚染調査は，ほとんど試みられたことがない．*Bacillus* 属を簡易な方法で迅速に分類できれば，食品に変敗をもたらす菌種を他のものと区別し，かつそれがどの材料から混入するかを知り，それを予防あるいは抑圧に役立てることが可能である．

そこで，著者らは *Bacillus* 属の性状を詳細に調べ，簡易な方法による同定法の開発を試みた．その結果，芽胞嚢の形態により *Bacillus* 属を 2 大別した後，段階的に 7 %食塩存在下での発育能，嫌気的環境下での発育能試験の順で 2 分していき，以下，レシチナーゼの産生能，デンプン分解能および硝酸塩還元能などの 2，3 の簡易な生物性状を調べれば，*Bacillus* 属を容易に同定できることが判った．併せて，汚染菌叢の大部分が *Bacillus* 属であると云われている粉乳の *Bacillus* 属汚染調査を行ない，検出された *Bacillus* 属の種の同定を本法を用いて行なった．

材料および方法

1．供試菌株

簡易同定法の開発に供試した菌株は，*B. cereus* ATCC 19637, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. brevis* ATCC 8185 と家畜衛生試験場から分与された *B. cereus* NIAH

* 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, Tokoy, 160 Japan

345, NIAH 317, NIAH 296, *B. subtilis* NIAH 50, NIAH 122, *B. licheniformis* NIAH 215, *B. pumilus* NIAH 240, *B. polymyxa* NIAH 474, *B. alvei* NIAH 499 である．また，動物性加工食品から分離し，Bergey's manual 第8版[4] および Agriculture Handbook No. 427[5] などに準拠して同定した *B. megaterium* 5株，*B. cereus* 10株，*B. licheniformis* 5株，*B. subtilis* 10株，*B. pumilus* 4株，*B. firmus* 5株，*B. coagulans* 4株，*B. polymyxa* 3株，*B. macerans* 1株，*B. circulans* 5株，*B. stearothermophilus* 2株，*B. alvei* 2株，*B. laterosporus* 2株，*B. brevis* 1株の合計59株を併せて用い検討した．

2．性状試験

1） 芽胞嚢膨出の有無　普通寒天平板上に供試菌株を画線塗抹し，35°C で3～7日間培養後，Wirtz 法で芽胞染色を行なった．鏡検で芽胞嚢が菌体より大きいと確認された場合，膨出有りと判定した．

2） 7％食塩存在下における発育能　小試験管に分注した7％食塩加普通ブイヨン 3 m*l* に，新鮮培養菌のごく少量を接種し，35°C で7日間培養後，発育の有無により判定した．

3） 嫌気的環境下における発育能　普通寒天平板上に，新鮮培養菌のごく少量を画線塗抹し，35°C で48時間嫌気培養後，集落発生の有無で判定した．

4） 卵黄反応　2％卵黄加普通寒天平板上に，供試菌株を画線塗抹し，35°C で24～48時間培養後，集落周辺部が白濁した場合，卵黄反応陽性とした．

5） デンプン分解能　1％可溶性デンプン加普通寒天平板上に，供試菌株を画線塗抹し，35°C で24時間培養後，ルゴール氏液約2 m*l* を注加した．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と判定した．

6） 硝酸塩還元能　小試験管に分注した 0.1% KNO_3 加普通ブイヨン 3 m*l* に，供試菌株を接種し，35°C で48時間培養後，硝酸塩還元用試液AおよびBを各1 m*l* 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．赤色を示さない場合は，亜鉛末を一耳掻加え，無色のままであれば，これも陽性と判定した．

7） VP反応　小試験管に分注したVP半流動培地（栄研化学）3 m*l* に，新鮮な供試菌株を少量接種し，35°C で48時間培養後，VP反応試薬A液0.2 m*l* とB液0.1 m*l* を注加し，赤色となった場合を陽性と判定した．

8） ブドウ糖からのガス産能　小試験管に分注した0.5％ブドウ糖加アンモニウム塩半流動培地 3 m*l* に，新鮮な供試菌株を少量接種し，35°C で3～7日間培養後，気泡または亀裂が生じた場合をガス産生陽性とした．

9） インドール産生能　小試験管に分注したSIM培地（栄研化学）3 m*l* に，新鮮な供試菌株を少量接種し，35°C で24時間培養後，コバックのインドール試液数滴を滴下した．この時赤色を呈した場合陽性とした．

10） 65°C における発育能　普通寒天平板上に，新鮮な供試菌株を少量画線塗抹し，65°C で24時間培養後，集落発生の有無で判定した．

3　供試粉乳

粉乳の *Bacillus* 属汚染調査に供試したのは，すべて製造直後無菌的に採取した国内産粉乳で，脱脂粉乳65，全粉乳23，クリームパウダー20，調製粉乳5，バターミルクパウダー1の合計114検体である．

4　粉乳中からの *Bacillus* 属の分離

供試粉乳を混釈培養した標準寒天平板から，1平板当り約5個（1検体当り約10個）ずつの集落を無作為的に釣菌した．これらの菌株が，グラム陽性，有芽胞菌，カタラーゼ産生能陽性の場合 *Bacillus* 属と同定した．

実験成績

1　簡易同定法の検討

Bacillus 属の簡易同定法の開発を，供試菌株を用いて検討した結果，図1に示した方法を考案した．すなわち，芽胞嚢の膨出の有無で2大別した後，段階的に簡単な生物性状試験で2分していき，種を決定する方法である．図で明らかなように食品などから頻繁に検出される菌種の多くはⅠ群に属した．Ⅰ群の菌種の多くは7％食塩加普通ブイヨンに発育し，発育しなかったのは *B. coagulans* と1部の *B. cereus* および *B. megaterium* であった．これに対して，Ⅱ群の菌種は，ほとんどが7％食塩加普通ブイヨンに発育しなかった．嫌気的発育では，Ⅰ群の菌種は *B. cereus*, *B. licheniformis* および大部分の *B. coagulans* が発育し，Ⅱ群の菌種は *B. polymyxa*, *B. aluei*, *B. macerans* および *B. laterosporus* が発育し，*B. circulans* は菌株によって異なった．以下は，図1に示したように段階的に生物学的性状を調べれば，容易に *Bacillus* 属を分類できることが判った．

2　粉乳から分離した *Bacillus* 属への応用

国内産粉乳から分離し *Bacillus* 属として同定した728菌株の種の同定を，今回考案した方法で行ない，その結果は表1に示した．最も多かったのは *B. licheniformis* で298株，次が *B. cereus* の184株，以下 *B. subtilis* 112株，*B. polymyxa* 56株，*B. pumilus* 43株，*B. megaterium* 15株，*B. coagulans* 12株，*B. circulans* 5株，*B. stearothermophi-*

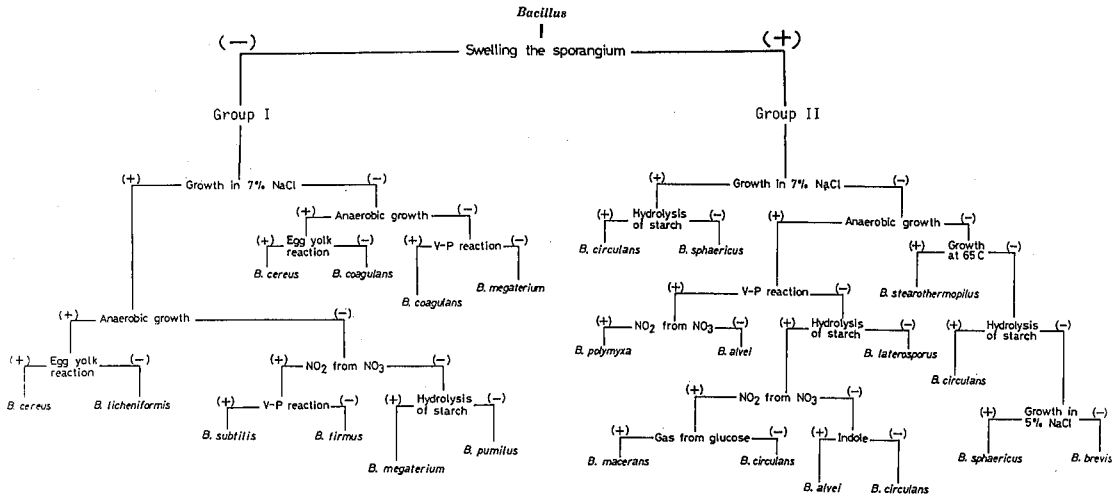


Fig. 1. Schema for Identification of Genus *Bacillus*

Table 1. Distribution of *Bacillus* Species of the 728 Strains Isolated from Milk Powder

Species	No. of specimens positives (%)
Bacillus licheniformis	298(40.9)
Bacillus cereus	184(25.3)
Bacillus subtilis	112(15.4)
Bacillus polymyxa	56(7.7)
Bacillus pumilus	43(5.9)
Bacillus megaterium	15(2.1)
Bacillus coagulans	12(1.6)
Bacillus circulans	5(0.7)
Bacillus stearothermophilus	2(0.3)
Bacillus laterosporus	1(0.1)

lus 2株，*B. laterosporus* 1株の順で同定された．これら以外の *B. macerans*, *B. alvei* および *B. brevis* などの菌種は検出されなかった．この方法で種を同定した菌種をSmith[1] および東[2, 3] などの方法で確認したところ，全ての菌株が一致した．

3 粉乳中の *Bacillus* 属の分布

粉乳の *Bacillus* 属の汚染菌種を表2に示した．最も多く検出されたのは *B. licheniformis* で114検体中50検体(43.9%)，次が *B. cereus* 34検体（29.8%）であった．また *B. subtilis*, *B. polymyxa* および *B. pumilus* もそれぞれ20%前後と比較的高い検出率を示した．これら以外の *B. megaterium* および *B. coagulans* などの菌種は，少数の検体から検出されたにすぎなかった．また粉乳の種類別の汚染菌種は，検体数がちがうことから一概に比較することはできないが，脱脂粉乳では65検体中，*B. licheniformis* が46検体（70.8%）と高率に検出され，次いで *B. cereus* が40%，*B. subtilis*, *B. pumilus* および *B. polymxa* もそれぞれ30%前後と比較的高い検出率を示した．全粉乳では，*B. cereus* が23検体中5検体（21.7%）から検出されたのが最高で，その他 *B.polymyxa*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* などが検出された．また，クリームパウダーおよびバターミルクパウダー合計21検体中からは *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* および *B. polymyxa* などがわずかに検出されたにすぎず，調製粉乳5検体からはいずれの *Bacillus* 属も検出されなかった．

考　　察

Bacillus 属の菌の検索法としての代表的なものはSmith[1] および東[2,3] などの方法である．これらの方法は芽胞嚢の型，芽胞の形態，複雑な培養性状および数多くの生物性状について実施する必要があり，同定は極めて労力を要する．すなわちSmithの方法は，多数の菌株を取扱った者に対しては合理的であるが，初心者にとっては相当に難しく，とくに，芽胞の形状，位置および芽胞壁の染色性などを判定することは困難と思われる．また，東が報告している集落および画線培養所見と生物性状パターンによる方法も，ある程度習熟したものでなければ判定し得ない部分が多く，菌種によっては複雑な操作を必要とするため，日常検査には用いにくい難

報　　文 Ⅱ

医薬品等に関する調査研究

REPORTS Ⅱ

PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 34, 75-81, 1983

各種抗凝固剤の血球数および形態におよぼす影響

蓑輪佳子*, 笠原利英**, 大石向江*, 仲川千種*
鈴木重任*, 大久保暢夫*

Effects of Anticoagulants on the Number and Size of Blood Cells

KEIKO MINOWA*, TOSHIHIDE KASAHARA**, HISAE OISHI*, CHIGUSA NAKAGAWA*, SHIGETOH SUZUKI* and NOBUO OHKUBO*

We studied the effects of anticoagulants on hematological examination of blood samples for quality control. EDTA-2K, EDTA-2Na, Anticlot/ET, Heparin were added to whole blood from normal adults, and morphological examination, RBC, WBC, Hgb, Hct, MCV, PLT, MPV and size distribution curve were observed as parameters for 5 days.

Using Heparin we noted decreased number of white blood cells and platelets, presumably because of aggregation, and the decrease of white blood cell volume in size distribution curve. During observations using any of 4 anticoagulants, RBCs were fairly constant, but crenation of the cells was found to start as early as at 6 hours. This may contribute to the increment of Hct and MCV.

Having concluded that EDTA-2K is good for anticoagulant of blood samples for quality control because WBC, RBC, and Hgb were constant for several days under these conditions, we used it in Tokyo Metropolitan Quality Control Survey of 1982.

Keywords : anticoagulants, number of blood cells, size distribution curve

緒　　言

昭和57年度東京都は，登録衛生検査所を対象として精度管理調査を実施し，その際当衛生研究所で血液検査用の試料を作成した．

血算用の血液に用いる抗凝固剤としては，EDTA塩(2Na, 2K, 3K)，二重シュウ酸塩，Anticlot/ET，ヘパリン等があり，時間の経過と共に程度は異なるが，測定値に影響を及ぼすことが知られている[1-3]．試料配布から各検査所が測定するまでには時間を要することが考えられるので試料としてはその期間の安定性が問題となる．保存液，固定液を用いることにより血球の安定性はある程度保証されるが，各種自動血球計算器による測定では，固定液の違い等により計数値に相違がみられ問題となっている．

そこで，各種抗凝固剤のうちEDTA-2K, EDTA-2Na, Anticlot/ET, ヘパリンがWBC, RBC, Hgb, Hct値さらには形態にどのような影響を及ぼすかを時間の経過と共に観察した．血球計数パラメータの中でも重要な項目である血小板数（PLT)，平均血小板容積(MPV)，血小板粒度分布についての観察も行ない，これらが今後精度管理調査項目の対象となりうるか検討を加えた．

実験方法

実験Ⅰ　成人正常者4名から採血を行ない，同一人の血液を等分し，それぞれをEDTA-2K, EDTA-2Na, Anticlot/ETあるいはヘパリンと混和した．血液1 m*l*に対してEDTA-2K1mg, EDTA-2Na1mg, Anticlot/ET0.05～0.1m*l*, ヘパリン5単位となるよう各抗凝固剤を添加した．混和直後，6時間，1日，2日，5日後にWBC, RBC, Hgb, Hct, 平均赤血球容積(MCV)を自動血球計数装置(Coulter Counter model S)で測定した．同時に血液塗抹標本を作成しMäy–Giemsa染色後血球の形態を観察した．

実験Ⅱ　成人正常者2名から採血を行ない，同一人の血

* 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
** 同生活科学部栄養研究科

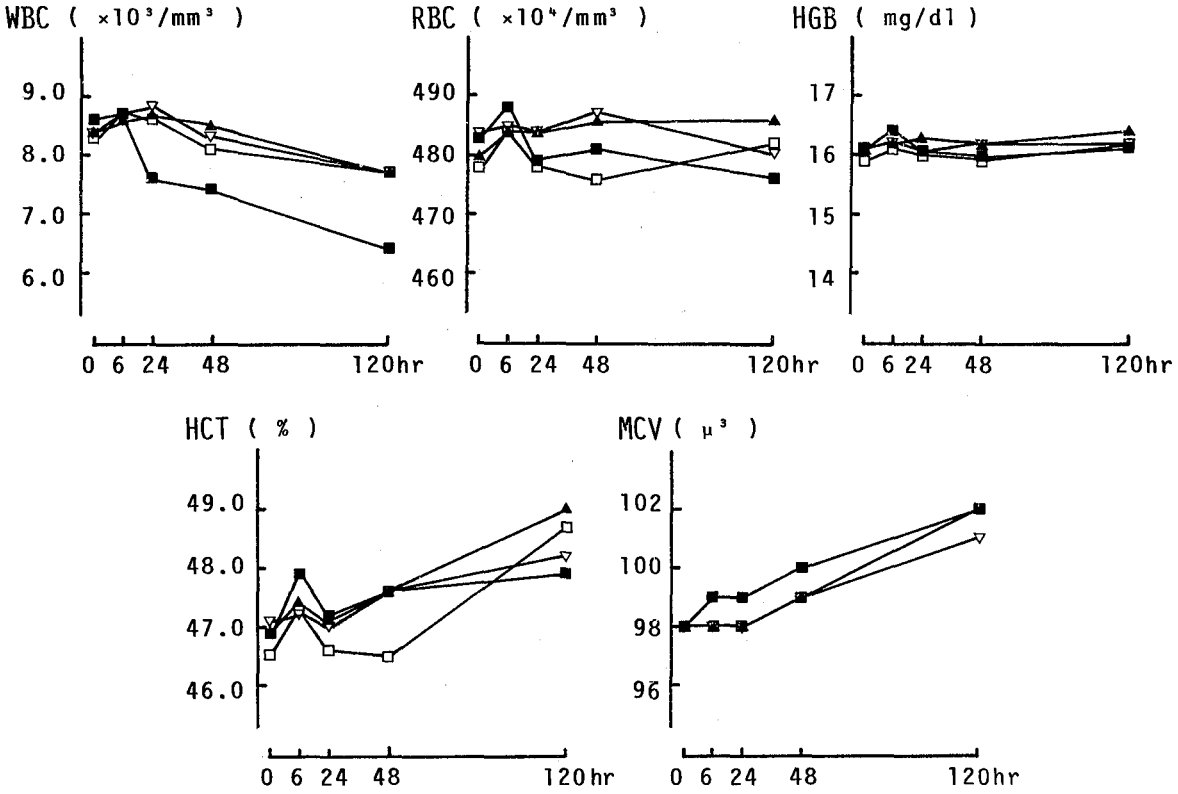


Fig.1. Effects of anticoagulants (EDTA–2K, EDTA–2Na, Anticlot/ET, Heparin) on the number of blood cells in 4°C stored blood
Each point expresses the mean of four samples

液を二等分しそれぞれを EDTA–2K あるいはヘパリンと混和した. 各抗凝固剤は実験Ⅰと同じ割合で使用した. 混和 2 時間後（0 日), 1 日, 2 日, 5 日後に WBC, RBC, Hgb, Hct, MCV, PLT, MPV, 赤血球粒度分布, 白血球粒度分布, 血小板粒度分布を自動血球計数装置(東亜 CC–800), 多項目粒度分布測定装置（東亜 PDA–410）を用いて測定した. さらに赤血球内 adenosine-5′-triphosphate (ATP), 2, 3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) 濃度を SIGMA のキット (No. 366-UV, No. 35-UV) で測定した.

実験Ⅰ, Ⅱいずれも血液は採血から各測定時まで冷蔵保存とした.

結果および考察

実験Ⅰ WBC, RBC, Hgb, Hct, MCV 値における抗凝固剤 4 種の影響を Fig. 1 に示した. WBC は 5 日間にヘパリン添加血で8600±900から6400±1000へと大幅に減少した. 他の抗凝固剤では, 5 日目で10％程度の減少を示したにすぎない. 血液塗沫標本の観察でヘパリン添加血では 1 日目より顆粒系細胞の細胞質が壊れ始め, 2 日目では顆粒系細胞のほとんどが変化していた. 他の抗凝固剤使用では 2 日目より変化が少し認められる程度である. RBC, Hgb はいずれの抗凝固剤を用いても 5 日間, ほとんど変動を示さなかった. 赤血球の形態をみると 6 時間で金米糖状赤血球 crenated cell が出現し, 2 日目からは凹円形(biconcave)から球形への変化が認められた. 5 日目では赤血球の⅓～½が crenated cell となっているのが観察されると共に, 溶血した赤血球, red cell fragments を認めた. 赤血球の形態では抗凝固剤による差は認められなかった.

赤血球中の ATP が減少することにより, 生存能は次第に低下し ATP が失われると赤血球は正常の凹円形から球形に変化しもろくなる[4] ことは周知のとうりであ

る．Fig. 2 (a) の ATP 濃度は実験Ⅱの試料について測定したものであるが，採血1日後でその濃度は約50％減少し，実験Ⅰの形態変化と対応していることが観察された．しかし，赤血球の形態は経時的に変化していくが，ATP 濃度は2日目で20～30 μmole/100ml に減少後，5日目まで変化はほとんど認められなかった．EDTA-2K とヘパリンを比較すると EDTA 添加血の方で ATP 濃度がヘパリン添加血より若干維持されている傾向にみえた．一方，Hgb と結合して酸素親和性を下げ組織への酸素の供給を容易にする2,3－DPG は，5日間ほとんど変化しなかった．Valeri, Beutler らは ACD 保存液中7日目で2,3－DPG が正常の½となる[5,6]ことを報告しているが，我々の実験では保存液の無添加状態でも変動を示さなかった．

Hct, MCV は時間と共に増加し，抗凝固剤による差もなく一様に同じ傾向を示した．明らかに採血後の貯蔵により赤血球が膨張したためと考えられ，その原因の一つに ATP 濃度の低下があげられる．Hct, MCV を一定に保つにはグルコースの添加等何らかの対処が必要であろう．

実験Ⅱ　抗凝固剤添加血2例について採血より5日後までの WBC, PLT, MPV の変化を Table 1. に，白血球，血小板の粒度分布を Fig. 3, 4 に示した．PLT は採血直後，両試料共に EDTA-2K とヘパリンで顕著な差が認められた．ヘパリンによる血小板の凝集が生じ，計数が不正確になったと考えられる．WBC では PLT と逆の結果を示し，これはヘパリン添加血の方に凝集した血小板が誤って計数され，高値を示したと考えられる．EDTA-2K 添加血の場合，採血後2日までは PLT の変動も少なかった．実験ⅠとⅡの WBC で経日変化の傾向が異なっているが，これは実験Ⅰ，Ⅱで保存条件がわずかに違っていたのか，もしくは自動血球計数器に依るものであるか今回の実験では明らかでない．

EDTA 添加血の MPV は徐々に大きくなっているがヘパリンでは逆に減少した．MPV の変動は検体によりその傾向が異なる[7]との報告もあり，抗凝固剤によるものかどうか定かではないが，血小板の凝集が影響していることは充分に考えられる．

白血球，血小板の粒度分布で EDTA-2K の影響をみるといずれの粒度分布にも著しい変化を認めなかった．

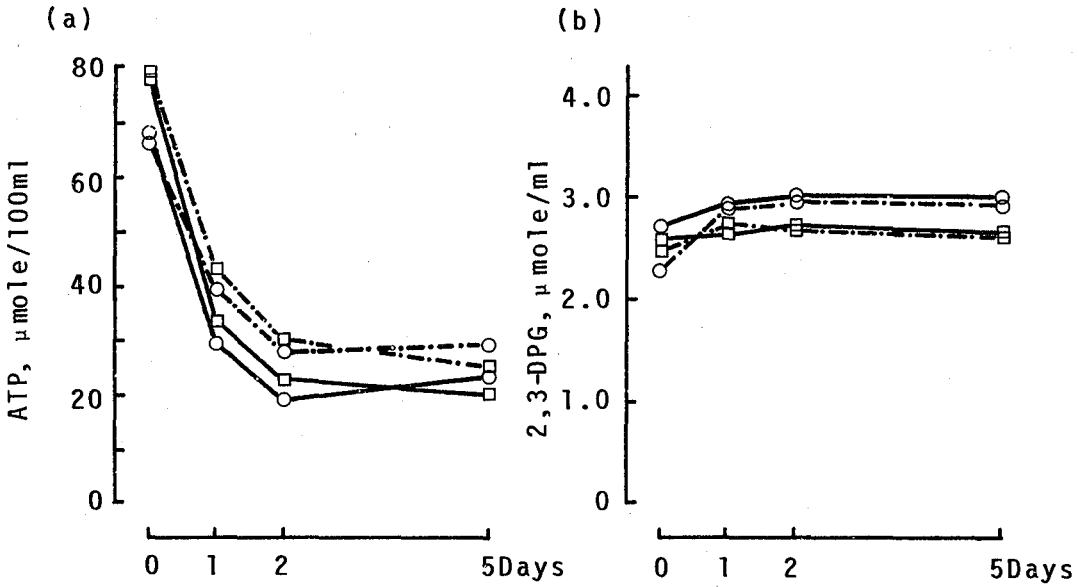


Fig.2. Changes of ATP (a) and 2,3–DPG (b) levels of 4°C stored whole blood

Heparin (Sample No. 1)
〃 (Sample No. 2)
EDTA.2K (Sample No. 1)
〃 (Sample No. 2)

Table 1. WBC, PLT, MPV on blood with addition of EDTA–2K, Heparin

Tests	Days	Sample No. 1		Sample No. 2	
		EDTA・2K	Heparin	EDTA・2K	Heparin
WBC ($\times10^3/mm^3$)	0	6.2	6.6	8.1	9.0
	1	6.6	5.6	8.4	7.0
	2	7.2	5.9	8.4	7.5
	5	7.6	6.3	8.8	8.0
PLT ($\times10^4/mm^3$)	0	24.3	2.5	25.6	9.6
	1	23.2	3.0	25.2	3.2
	2	23.2	5.6	23.9	3.9
	5	20.4	8.2	22.8	6.3
MPV (μ^3)	0	10.8	10.7	11.2	11.0
	1	11.5	10.3	11.6	11.1
	2	11.7	9.3	12.0	9.8
	5	12.5	9.4	12.5	9.8

ヘパリン添加血では1日，2日，5日目と白血球の双峰性のピークが左方へ移動していくのが認められた．さらに大部分が顆粒球から成る75～200 μ^3 にあるピークが時間と共に崩壊のためか小さくなった．血小板の粒度分布では，ヘパリンの影響がより強く現われていた．採血直後の観察ですでに5 μ^3 以下にピークをもつ異常な分布パターンを示し，この傾向は時間と共に顕著となっている．ヘパリンにより凝集し，白血球の一部へ混入する血小板もあれば崩壊のため破片となり粒度分布で5 μ^3 以下のピークに混入する血小板もあると考えられる．RBC, Hgb, Hct, MCV は実験Iと同様の結果を示した．

EDTA-2K, EDTA-2Na, Anticlot/ET, ヘパリンの中でヘパリンは WBC, PLT に対する影響が大きく，測定までに時間を要する配布試料の抗凝固剤としては不適である．EDTA-2K 添加血は，数日間ならば WBC, PLT の変動も少なく血算用配布試料として，ある程度使用可能と考えられ，本年度はこれを使用した．48施設の参加をみた昭和57年度の調査結果[8] は下記の通りである．平均値±標準偏差，変動係数の順で示した．

WBC	8.0±0.9($\times10^3/mm^3$)	11.3%
RBC	455±14($\times10^4/mm^3$)	3.1%
Hgb	15.7±0.4(g/dl)	2.5%
Hct	47.2±1.5(%)	3.2%

施設間による変動を考慮すると，配布した試料に起因すると思われる変動はほとんどなかったと言えよう．

しかし，今回の実験でどの抗凝固剤を使用しても赤血球は6時間目ぐらいから形態に変化を生じ，5日目では Hct, MCV の上昇が観察された．たとえ計数上に大きな問題はなくとも採血時と同じ状態で血液を配布し測定するのが望ましいのは当然であり，その変化を最小限に抑えることが必要であろう．これらの変化は抗凝固剤によるというよりは，むしろ赤血球の機能低下からくるものと考えられる．これを補うような保存液[4,9~11], adenine[4,12], inosine[4], phosphoenolpyruvate[13,14] などの添加が血算値測定にどのように影響を与えるか今後検討していく必要がある．

要　約

安定性が要求される精度管理調査用試料としての血液に抗凝固剤がどのように影響するか WBC, RBC, Hgb, Hct, MCV, PLT, MPV, 粒度分布さらには形態を観察することにより検討した．

成人正常者の血液に EDTA-2K, EDTA-2Na, Anticlot/ET, ヘパリンを加え5日間観察した．

ヘパリンは WBC の減少を引き起こし，粒度分布では左方への移動（体積の減少）が認められた．加えて血小板の凝集により PLT は添加直後で著しく減少した．赤血球はいずれの抗凝固剤を使用しても数の変動はなかった．形態の変化として6時間目から金米糖状赤血球 Crenated cell が現われ始め，2日目以降の Hct, MCV 上昇の一因となった．

これらの結果より，EDTA-2K 添加血では WBC, RBC, Hgb の変動が比較的少なく，精度管理調査の配布試料として使用可能とみなし本年度はこれを用いた．

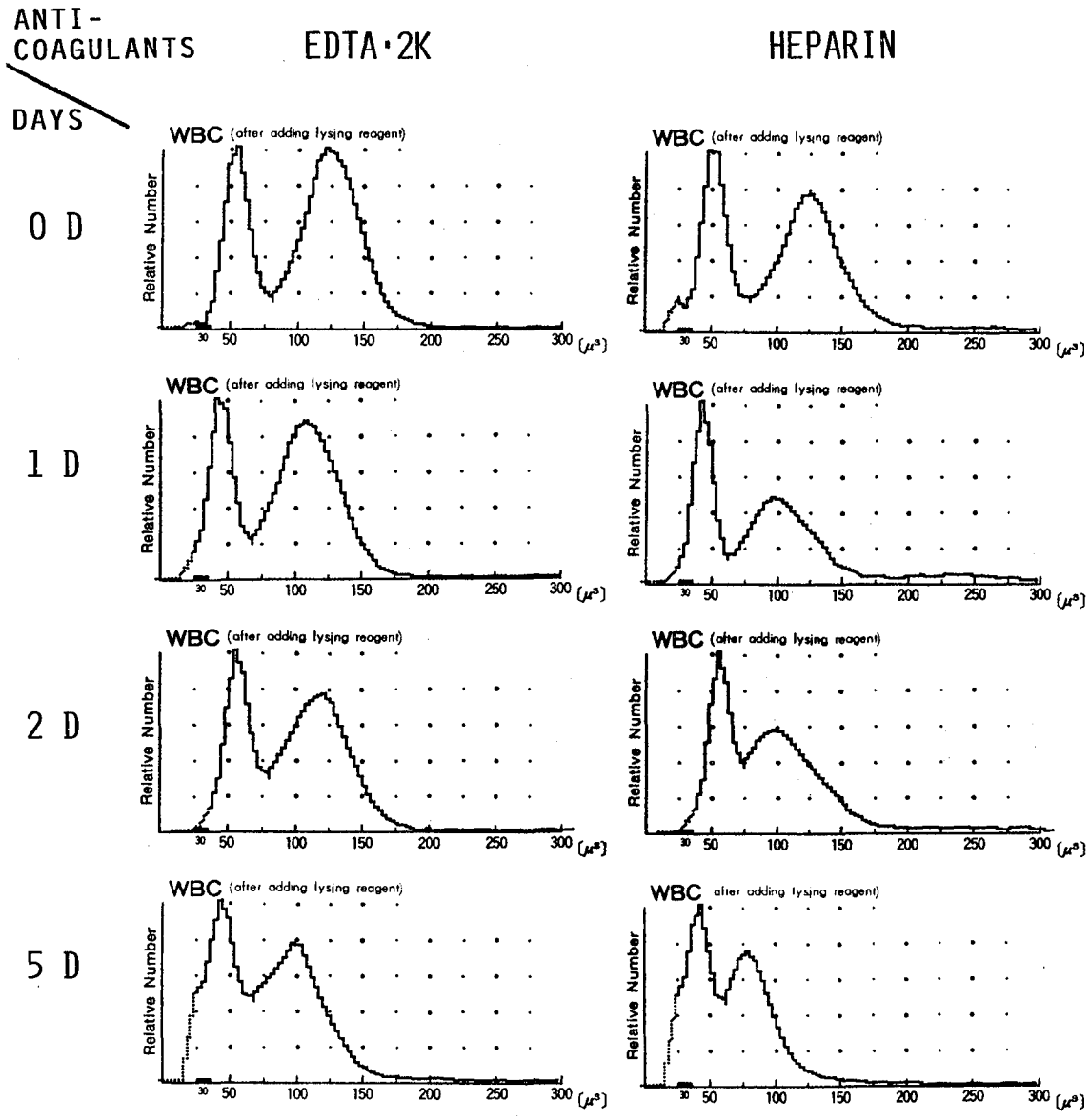


Fig. 3. Changes of WBC size distribution curve

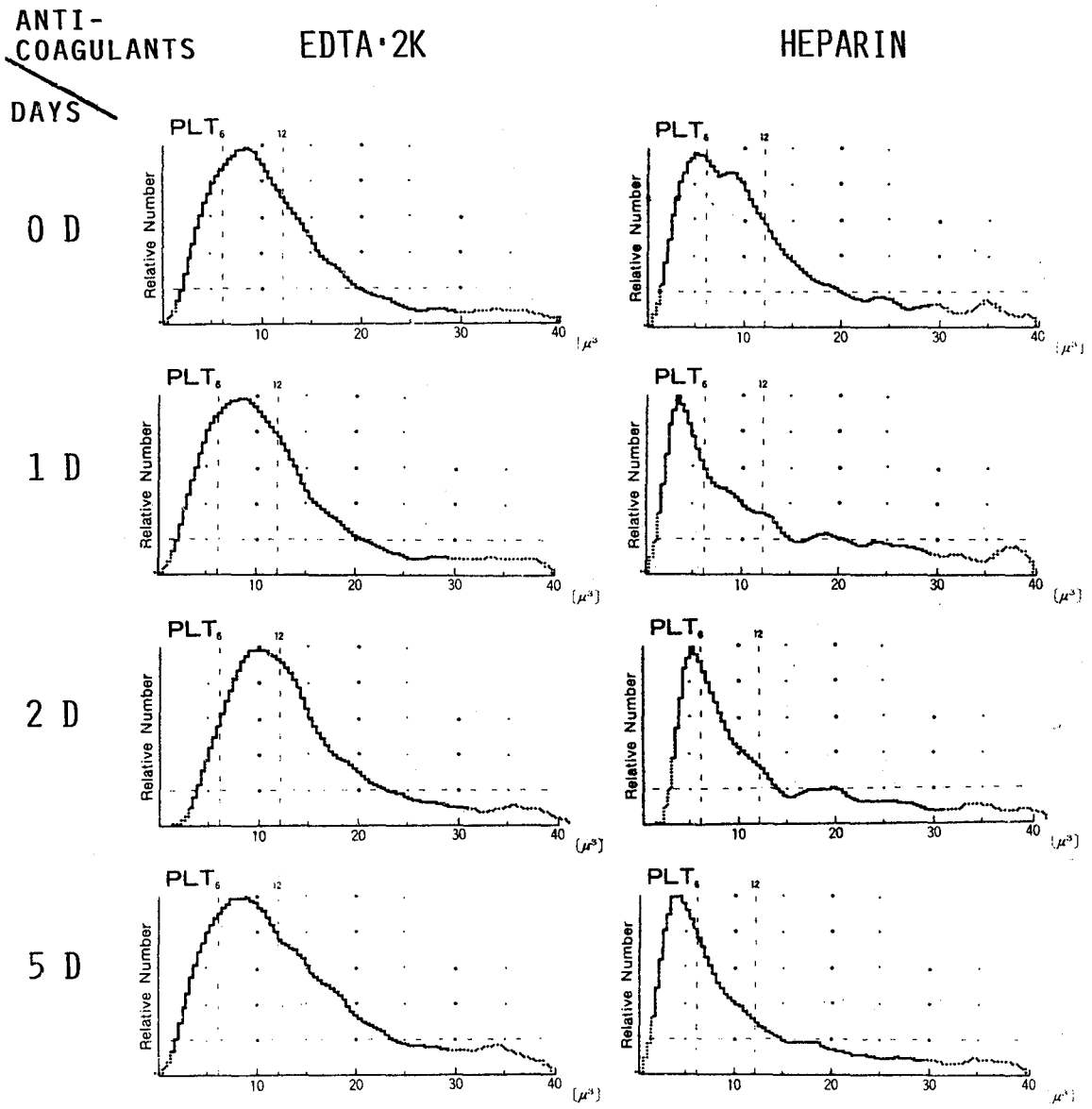


Fig. 4. Changes of PLT size distribution curve

文　献

1) 日比谷淑子, 村山範子, 小林茂樹：臨床検査, 10, 927, 1965
2) 寺田秀夫, 朝日和子, 井上暢子等：最新医学, 21, 2782, 1966
3) 三輪史朗, 寺村　公, 高橋郁子：臨床病理, 15, 376, 1967
4) 隅田幸男：日本血液学全書, 日本血液学会編, 267, 1962, 丸善株式会社
5) Beutler, E. and Wood, L. : *J. Lab. Clin. Med.*, 74, 300, 1969
6) Valeri, C. R. and Zaroulis, C. G. : *N. Engl. J. Med.*, 287, 1307, 1972
7) 岡田徳弘, 織辺紀芳, 林　則人等：*Sysmex Journal*, 5, 244, 1982
8) 昭和57年度第1回東京都衛生検査所精度管理調査結果報告書, 1983
9) Dawson, R. B., Jr. and Ellis, T. J. : *Transfusion*, 10, 113, 1970
10) Moore, G. L., Peck, C. C., Sohmer, P. R. and Zuck, T. F. : *ibid.*, 21, 135, 1981
11) Latham, J. T., JR., Bove, J. R. and Weirich, F. L. : *ibid*, 22, 158, 1982
12) Simon, E. R. : *ibid.*, 17, 317, 1977
13) Hamasaki, N., Ideguchi, H. and Ikehara, Y. : *ibid.*, 21, 391, 1981
14) Hamasaki, N., Hardjono, I. S. and Minakami, S. : *Biochem. J.*, 170, 39, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 82-88, 1983

生化学検査用試薬キットによる測定値の変動について

仲川千種*, 笠原利英**, 大石向江*
蓑輪佳子*, 鈴木重任*, 大久保暢夫*

Biochemical Data and Commercial Reagents

CHIGUSA NAKAGAWA*, TOSHIHIDE KASAHARA**, HISAE OISHI*,
KEIKO MINOWA*, SHIGETOH SUZUKI* and NOBUO OHKUBO*

We examined control sera of Tokyo Metropolitan Quality Control Survey in 1982, with Hitachi 705 Automatic Analyser and compared commercial reagents from 4 different companies. There were significant differences among them. Some data were far from evaluation criteria of JMA Quality Control Survey in 1982.

We also examined temporal changes of control sera for 8 days with reagents from 2 companies. Both reagents showed the same pattern of changes in all the items examined except for BUN.

These results suggest that biochemical data depend greatly upon the commercial reagents used, and this point should be considered in analyses of survey results.

Keywords : commercial reagents, biochemical data, quality control

緒　言

現在血清生化学検査においてさまざまな測定法，システムが普及している。方法の違う場合は検査成績にズレがあるため比較が困難である。各検査施設で統一された測定法を採用していない現状では，採用される測定法の相違が施設間における検査成績のバラツキの大きな要因となっている．また，市販試薬キットにおいて同一測定法にもかかわらずメーカーによる測定値の差が大きいことが報告された[1]．最近試薬キットが広く普及しているので問題となっている．

我々は昭和57年度東京都衛生検査所精度管理調査[2]（以下，都サーベイと略す．）で用いた試料の測定値の検討を目的とし，日立705型生化学自動分析装置用の4社の試薬キットを取り上げてメーカーによる測定値の変動の程度を調査した．

方　法

試料　オープン方式の都サーベイで使用した生化学検査用凍結乾燥血清の試料1（正常値範囲）と試料2（異常値範囲），及び各オープン試料をそれぞれ無菌的に滅菌再留水で溶解，分注し4 °Cで保存したブラインド方式用の試料を用いた．

試薬　現在市販されている日立705型生化学自動分析装置用の試薬キットのうちA，B，C，Dの4社を選択し，各社15項目の試薬キットを用いた．分析条件，標準液は各社のマニュアルに従った．項目，測定法はTable.1.に示した．

方法　日立705型生化学自動分析装置を用い，測定当日に再留水で溶解したオープン方式用試料2種類を4社の試薬キットを使用して各項目20回反復測定した．また，2種類のブラインド方式用試料の経時変化を調べるために，溶解後1，2，3，4，8日間保存した試料をA社，B社の試薬キットを使用して各項目10回，サーベイ実施と同時進行で反復測定した．同時に管理血清（セロノルム，Batch No.154とセロノルム・リビッド，Batch No.57, Nyegaard社製）を用いて測定上の日差変動のモニタリングをした．

4社における測定値間の差の検定を分散分析法で，2社における測定値間の差の検定をStudent's t-testにより行った．なお，都サーベイと同一ロットの試料を使用した昭和57年度日本医師会臨床検査精度管理調査結果[3]

* 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
** 同生活科学部栄養研究科

Table 1. Items and Methods Used on the Commercial Reagents

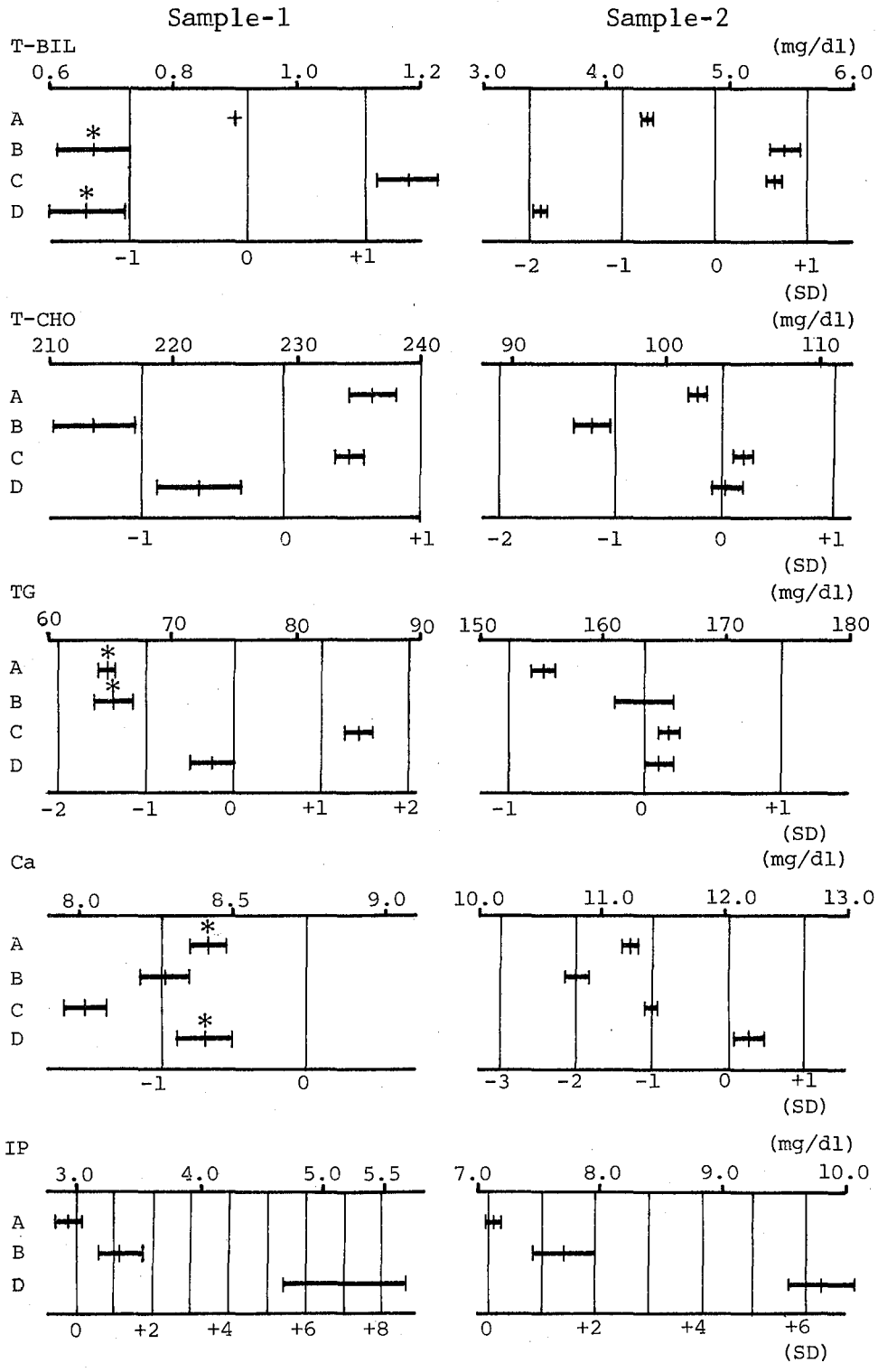
Test	A	B	C	D
Alkaline Phosphatase (ALP)	Bessey–Lowry	Bessey–Lowry	Bessey–Lowry	Bessey–Lowry
Amylase (AMY)	HX–G6PDH	caraway	GOD–POD	
Total Bilirubin (T–BIL)	Michaëlson	Jendrassik	Jendrassik	Jendrassik
Calcium (Ca)	o–CPC	o–CPC	o–CPC	o–CPC
Total Cholesterol (T–CHO)	COD–POD	COD–POD	COD–POD	COD–POD
Creatinine (CRE)	Jaffé	Jaffé	Jaffé	Jaffé
γ–Glutamyl Transpeptidase (γ–GTP)	γ–glutamyl–CPA	γ–glutamyl–p–N–E–N–HEA	γ–glutamyl–p–nitroanylide	γ–glutamyl–p–nitroanylide
Glutamate Oxaloacetate Transaminase (GOT)	Karmen	Karmen	Karmen	Karmen
Glutamate Pyruvate Transaminase (GPT)	Karmen	Karmen	Karmen	Karmen
Inorganic Phosphorus (IP)	Molybden–Blue	Molybden–Blue		Molybden–Blue
Lactate Dehydrogenase (LDH)	Wróblewski	Wróblewski	Wróblewski	Wróblewski
Triglycerides (TG)	GPO–POD	GPO–POD	GPO–POD	GPO–POD
Total protein (TP)	Biuret	Biuret	Biuret	Biuret
Uric Acid (UA)	Uricase–POD	Uricase–POD	Uricase–POD	Uricase–POD
Blood Urea Nitrogen (BUN)	Urease–Indophenol	Urease–GLDH	Urease–GLDH	Urease–GLDH

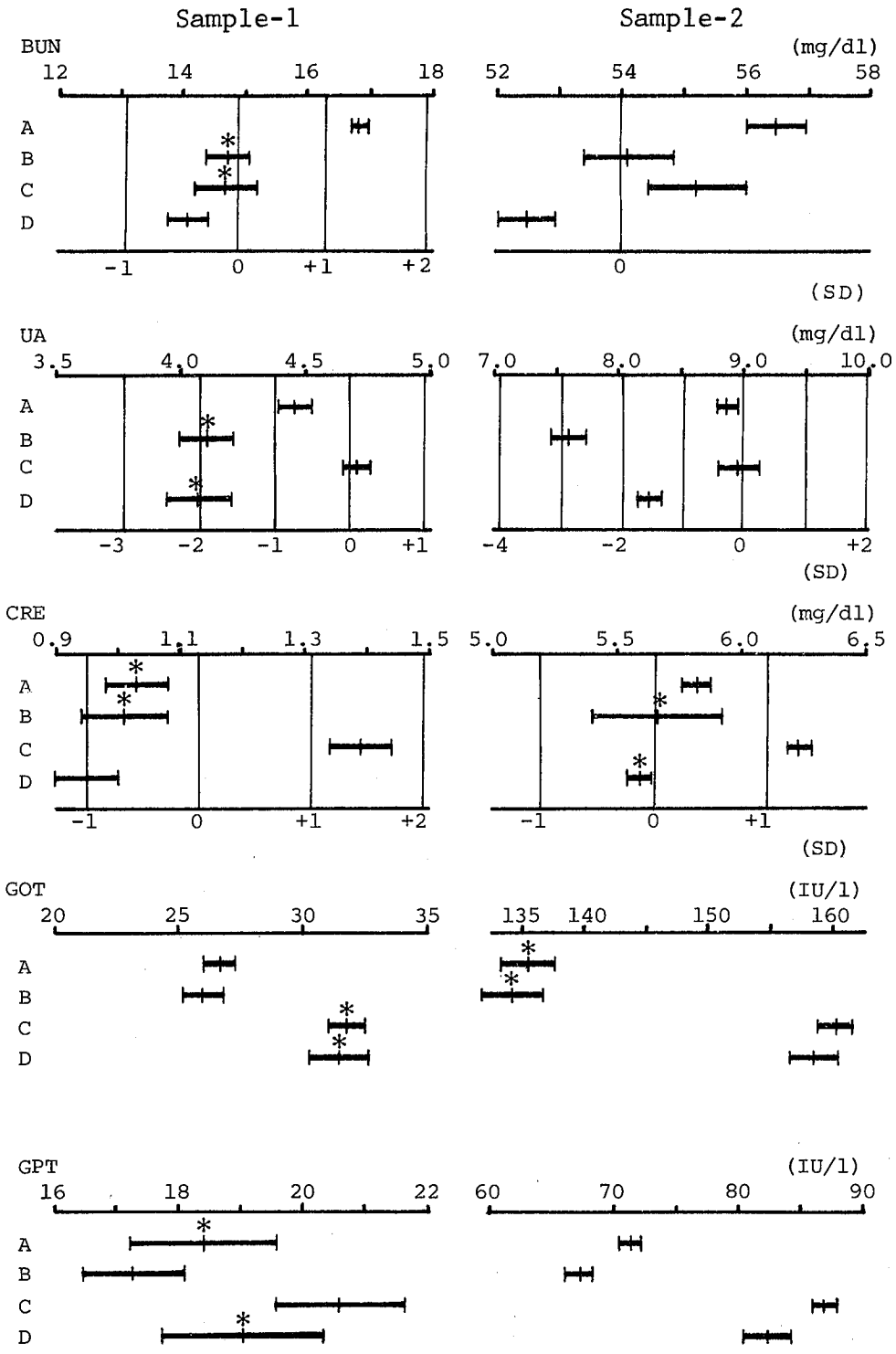
（以下，日医サーベイと略す.）の補正後の臨床化学検査の方法別平均値，標準偏差を参考とした.

結果及び考察

オープン方式用試料の反復測定の結果を日医サーベイにおける方法別平均値，標準偏差と比較し，Fig.1. に示した.

4 社の試薬キットによる測定値について分散分析を行った結果，2 試料とも14項目について0.1%の危険率で有意差が認められた．AMYについては，各社相互に換算不能な単位を用いているため比較できなかった.（Table 2.）さらに 2 社の測定値間の平均値の差の検定を行ったところ，各項目でほとんどの組合せで 5 %の危険率で有意差が認められた．有意差が認められなかった組合せは Fig.1. の＊印で示されるように14項目中試料 1 で10項目，試料 2 で 4 項目で各 1 組ずつあった．このうちＴＧ等のように試料 1 で有意差が認められなかった組合せが試料 2 では有意差が認められた場合があった．ＣＲＥ，ＧＯＴ，ＡＬＰのように有意差が認められなかった組合せが試料 1 と試料 2 で異なる場合もあった．また，Ｔ－ＢＩＬのＢ社のように，試料 1 の測定値は相対的に低目に，試料 2 では高目に出たものもあった．このように 14 項目で 4 社の測定値間に差があり，Ｔ－ＣＨＯ，


Sample-1
Sample-2
T-BIL
(mg/dl)
0.6 0.8 1.0 1.2
3.0 4.0 5.0 6.0
A
B
C
D
-1 0 +1
-2 -1 0 +1
(SD)
T-CHO
(mg/dl)
210 220 230 240
90 100 110
-1 0 +1
-2 -1 0 +1
(SD)
TG
(mg/dl)
60 70 80 90
150 160 170 180
-2 -1 0 +1 +2
-1 0 +1
(SD)
Ca
(mg/dl)
8.0 8.5 9.0
10.0 11.0 12.0 13.0
-1 0
-3 -2 -1 0 +1
(SD)
IP
(mg/dl)
3.0 4.0 5.0 5.5
7.0 8.0 9.0 10.0
0 +2 +4 +6 +8
0 +2 +4 +6
(SD)


Sample-1
Sample-2
BUN
(mg/dl)
12
14
16
18
52
54
56
58
A
B
C
D
-1
0
+1
+2
0
(SD)
UA
(mg/dl)
3.5
4.0
4.5
5.0
7.0
8.0
9.0
10.0
-3
-2
-1
0
+1
-4
-2
0
+2
(SD)
CRE
(mg/dl)
0.9
1.1
1.3
1.5
5.0
5.5
6.0
6.5
-1
0
+1
+2
(SD)
GOT
(IU/l)
20
25
30
35
135
140
150
160
GPT
(IU/l)
16
18
20
22
60
70
80
90

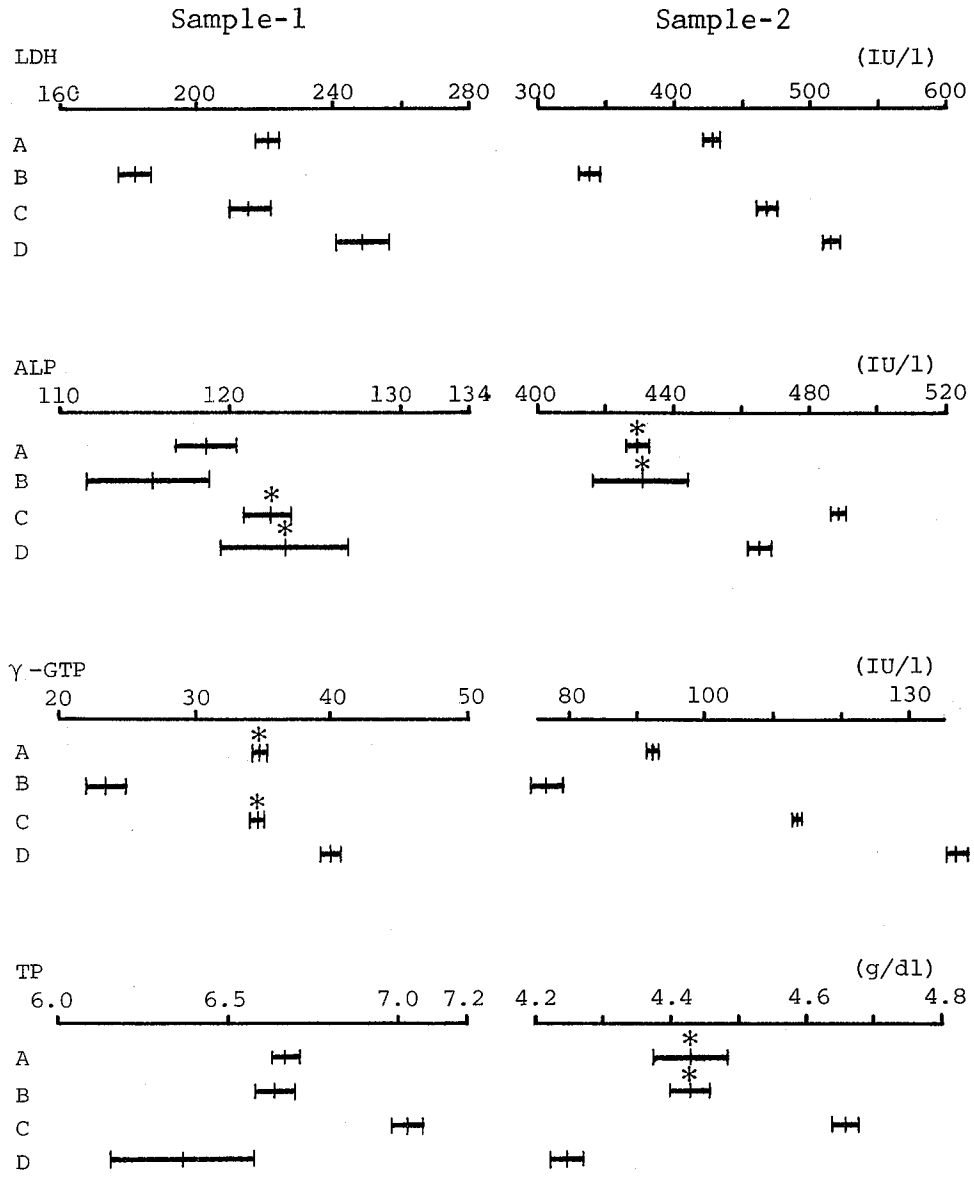


Fig.1. Biochemical Data of Survey Materials Examined by 4 Different Commercial Reagents Compared with JMA Quality Control Survey in 1982 (Mean ± SD)
* : No Significance between 2 Commercial Reagents ($P > 0.05$)

Table 2. Determination of Amylase Activity

Maker	Unit	Sample−1 Mean±SD	Sample−2 Mean±SD
A	Somogyi−U	101±3	833±7
B	Amylase−U	114±6	370±7
C	IU/ℓ	146±1	1205±6
			(N：20)

LDH を除く12項目で試料の種類によりメーカ間の測定値の差の出方が異なることが認められた．このような事が生じる原因として，標準液を用いる項目では標準液の濃度や標準物質の種類，初速度法を用いる項目では基質濃度，pH がメーカーにより異なること等が考えられる．

次に4社の試薬キットを用いた測定結果と日医サーベイの方法別平均値，標準偏差と比較した．±1SD を越えたのが，試料1ではT−BIL3社，T−CHO1社，TG2社，Ca 1社，IP2社，BUN1社，UA2社，CRE1社であった．また，試料2ではT−BIL1社，T−CHO1社，Ca 2社，IP2社，UA2社，CRE1社であった．

日医サーベイでは酵素の項目について単位が異っても比較できるように（試料2/試料1）の比の方法別平均値，標準偏差で評価を行っている[3]．この値と比較して±1SDを越えたのが，γ−GTPは3社，AMYは1社あった．TPについては日医サーベイと試料が異なるため比較できなかった．このうち±2SDを越えたのが，IPは試料1，2でD社，UAは試料1でD社，試料2でB社であった．特にIPにおいてD社は試料1，2とも＋6SDを越え，試料1で最低値を出したA社の約2倍の測定値であった．IPの成人における正常値は2.5〜4.5 mg/dl[4] である．直接法モリブデンブルー法による試料1の日医サーベイの平均値±標準偏差は3.00±0.31であるので試料1は正常検体とみなせる．ところがD社の測定値は5.16±0.50という異常値であった．しかしD社の試薬マニュアルによれば正常値を5.0〜7.0 mg/dl としている．これを基準にすればD社の測定値は正常値とみなされる．同一方法，同一単位にかかわらず正常値が異なるためにサーベイの評価基準を適応すると悪い評価を受けてしまうことは問題である．

変動係数に関しては，試料1ではT−BIL2社(8.6%, 9.0%)，AMY1社(5.6%)，CRE2社(5.4%, 6.8%)，GPT4社（4.8〜6.9%），γ−GTP1社(6.1%)，IP2社（5.4%，9.8%），試料2ではUA1社(4.5%)を除いて4%未満であった．IP1社，TP1社のみ Tonks の許容誤差範囲を越えたが精密度に関してはおおむね良好な結果を得た．

ブラインド方式用試料の経時変化については2社の試薬キットについて調査した．8日間の日差変動のモニタリングの結果では15項目で変動係数が4%以内で，測定上の日差変動の影響はほとんどないとみなせる．BUNを除く14項目では試料1，2とも2社の間で経時変化の

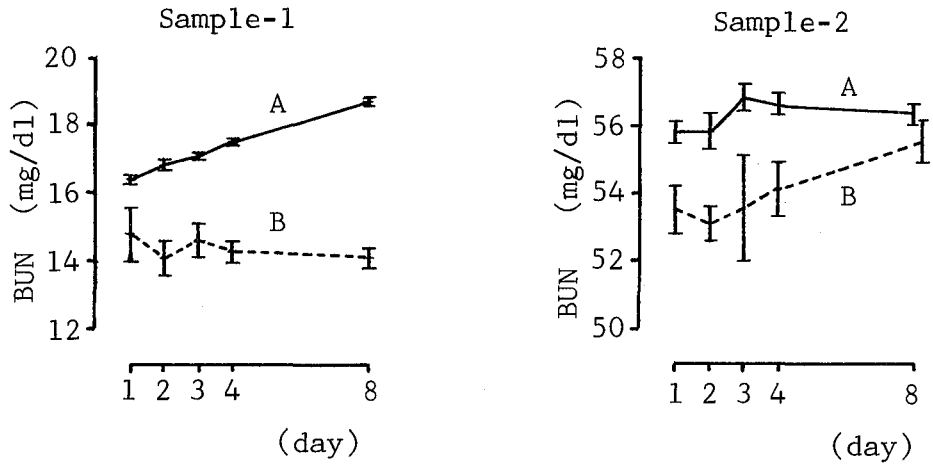


Fig.2. Change of BUN in Survey Materials Examined Commercial Reagent A and B

傾向に差が見られなかった．ＢＵＮでは，試料１についてＡ社が上昇傾向であるのに対しＢ社は変化が見られなかった．試料２では逆にＢ社が上昇傾向を示し，Ａ社は変化が認められなかった．(Fig.2.)このように，ＢＵＮの経時変化の有無の判断がつかないケースがあった．

以上の結果から，同一機器を用いた場合において試薬メーカー間に測定値の差が存在すること，測定に用いる試料によってその差の出方が異なることが明らかになった．中には日医サーベイの基準から大きく逸脱するものもあった．施設間における精度管理上，試薬キットは正確度，精密度を左右する大きな要因であることが示唆される．差の生じる原因として標準物質，反応時間，基質濃度，pH 等が考え得るが，これらのメーカー間の相違と測定値との関係の調査が今後の課題となろう．

要　　約

昭和57年度都サーベイで使用された試料の検討を生化学15項目について日立705型生化学自動分析装置用の４社の試薬キットを用いて測定した．２種類のオープン方式用試料の反復測定では，ＡＭＹを除く14項目にわたりメーカー間で測定値に有意差が認められた．試料の種類によりメーカー間の相対的な測定値の差が異なるケースもあった．また，同一試料を用いた日医サーベイの評価基準から大きく逸脱する測定値を出した試薬キットもあった．

ブラインド方式用試料の経時変化を２社の試薬キットを用いて８日間にわたり調査した．ＢＵＮの経時変化の傾向が２種類の試料ともメーカー間で異なり，他の14項目では同一の傾向を示した．

施設間における精度管理上，使用する試薬キットの違いが正確度，精密度を左右する大きな要因であることが示唆された．

文　　献

1) 北村元仕：日本臨床検査自動化学会会誌，８，39，1983
2) 東京都：昭和57年度第１回東京都衛生検査所精度管理調査結果報告書，1983
3) 日本医師会：昭和57年度（第16回）臨床検査精度管理調査結果報告書，1983
4) 金井　泉，金井正光：臨床検査法提要，第27版，Ⅶ－82，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 89-92, 1983

副腎皮質ホルモン含有軟膏の定量法

重岡捨身*, 上原眞一*, 宮武ノリエ*, 萩原輝彦*, 秋山和幸*

Determination of Corticoids in Ointments

SUTEMI SHIGEOKA*, SHINICHI UEHARA*, NORIE MIYATAKE*,
TERUHIKO HAGIWARA* and KAZUYUKI AKIYAMA*

Keywords : 副腎皮質ホルモン corticoids, 軟膏 ointments, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography, シリカゲルカラムクロマトグラフィー silicagel column chromatography, 薄層クロマトグラフィー thin-layer chromatography

緒　言

副腎皮質ホルモンを含有する軟膏は，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，薬理作用が強いため配合される含量は100g中10～100mgと少なく，従来の比色による分析法[1)~5)]では妨害も多く，選択性および定量精度には問題があった．医薬品製造承認書に記載されている試験法のほとんどは比色分析法であり，これら医薬品の品質を調べるため高速液体クロマトグラフィー（以下HPLCと略す）による方法[6)~8)]を検討したところ，軟膏中の副腎皮質ホルモンを精度よく定量することができたので報告する．また薄層クロマトグラフィー（以下TLCと略す）による予試験で，シリカゲルカラムでのクリーンアップ方法の予見ができることが分ったので，あわせて報告する．

対象とした副腎皮質ホルモンは軟膏に比較的よく使用されるプレドニゾロン（以下Pと略す），ヒドロコルチゾン（以下HCと略す），酢酸プレドニゾロン（以下P-Aceと略す），酢酸ヒドロコルチゾン（以下HC-Aceと略す），酢酸コルチゾン（以下C-Aceと略す），デキサメタゾン（以下Dと略す），酢酸デキサメタゾン（以下D-Aceと略す）の7種とした．

実験の部

1　試薬　P, HC, P-Ace, HC-Ace, C-Aceは日本薬局方標準品を，Dは日本薬局方品を，D-Aceは医薬品原体を使用した．パラオキシ安息香酸エステル類（—メチル，—エチル，—プロピル，—ブチル以下各々PHBA-Me, PHBA-Et, PHBA-Pro, PHBA-Buと略す）は日本薬局方品を用いた．カラムクロマトグラフィー用シリカゲル：ワコーゲルC－200（和光純薬）を120°，3時間活性化して用いた．TLCプレート：Kieselgel 60 F_{254} (Merck) を105°，1時間活性化して用いた．内部標準溶液：PHBAエステルのアセトン溶液（約0.05mg/ml）を用いた．その他の試薬は特級を用いた．

2　器具および装置　クロマト管：内径1cm，長さ25cmのガラスフィルター，活栓付きクロマト管．HPLC：ALTEX 110A型ポンプにREODYNE 7125型注入口，UVILOG 5 Ⅱ型検出器（応用分光）を付けたもの．超音波洗浄器：BRANSONIC 220.

3　試料溶液の調製　①油脂性軟膏：副腎皮質ホルモンとして0.1～0.5mg相当量を10mlのスピッツ型遠心沈殿管にとり，無水硫酸ナトリウム1gおよびジクロルメタン5mlを加え，ガラス棒で時々かくはんしながら超音波洗浄器に10分間かける．これを遠心分離し，上澄液をシリカゲル3gをジクロルメタンを用いて湿式法で充てんし，さらに無水硫酸ナトリウム1gを積層したカラム柱に注ぎ，残留物はジクロルメタン5mlずつで3回同様に抽出し，全抽出液をカラム柱に注ぎ入れたのち，カラム柱の上層の液がほとんどなくなるまで毎分1～2mlの流速で流す．ついで基剤を除くためジクロルメタン30mlを同様の速度で流したのち，アセトン20mlを流し，溶出液を集める．これに内部標準溶液を定容量加え，減圧で溶媒を留去し，残留物にメタノール2～3mlを加え，超音波洗浄器に5～10分かけ，必要ならば0.65～1 μmのメンブランフィルターでろ過し，試料溶液とする．②乳剤性軟膏：副腎皮質ホルモンとして0.1～0.5mg相当量をとり，飽和塩化ナトリウム溶液30mlで

* 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

Table 1. Results of TLC Rf×100

Solvents \ Samples	HC–Ace	P	P–Ace	D	D–Ace	HC	C–Ace
Ethyl acetate	48	23	44	38	55	29	49
Acetone	74	62	70	66	74	65	74

分液ロートに移し，ジクロルメタン15mlで4回抽出する．抽出液は無水硫酸ナトリウムで脱水したのち，約5mlまで減圧で濃縮する．この液を①と同様のシリカゲルカラム柱に注ぎ，容器はジクロルメタン5mlで3回洗い，全洗液をカラム柱に注ぎ入れ，以下①と同様に操作し，試料溶液とする．

4 HPLCによる定量 下記HPLC条件により，各ホルモンの内部標準物質とのピーク高さ比または面積比を求め，標準溶液（ホルモン50～250 μg/ml）から得た検量線により定量する．

HPLC条件 カラム：Hibar LiChrosorb RP–18 (7 μm) 25cm × 4 mm i,d. (Merck), 移動相：アセトニトリル・水（1：1～3：5），流速：1 ml/min，測定波長：240nm，温度：室温

実験結果および考察

1 TLCによる予試験：各ホルモンの約1 mg/mlジクロルメタン溶液をTLC板にスポットし，クロロホルムおよびジクロルメタンで約10cm展開し，風乾後UVライト（主波長254nm）を照射するとき，いずれも原点にとどまる．また市販の軟膏数種のジクロルメタン抽出液について同様に行ったところ，クロロホルム，ジクロルメタンでホルモン以外のほとんどのものが展開された．同様のプレートをアセトンおよび酢酸エチルで展開するときのRf値（×100）はTable 1のとおりとなる．この結果のRf値が最大のD–Aceおよび最小のPを指標物質として選び，シリカゲルカラムによるクリーンアップ溶媒ならびに溶出溶媒の検討を行った．

2 クリーンアップ溶媒および溶出溶媒の検討：クリーンアップ溶媒として，軟膏基剤を除く目的に合うものとして，TLCの結果からクロロホルムおよびジクロルメタンについて検討した．実験の部に記載したシリカゲルカラム柱にD–Aceの1 mg/mlジクロルメタン溶液1 mlを入れ，吸着させたのち，クロロホルムまたはジクロルメタンを流し，その10mlずつを分取し，各フラクションについてD–Aceの含量を測定し，その結果をFig. 1に示す．すなわち最も早く溶出されると考えられるD–AceでもジクロルメタンIIOmlまでは溶出せず，Rf値の最小のPでは200mlを流しても溶出しなかった．同様にPについてアセトンまたは酢酸エチルを流し，その流出液を2 mlずつ分取し，各フラクションのPの含量を測定し，その結果をFig. 2に示す．これらのことからクリーンアップ溶媒にはジクロルメタンを50～60ml，溶出溶媒にはアセトン20mlを用いることとした．以上のことから今回検討したもの以外のホルモンを含む軟膏のクリーンアップを行う場合，予試験としてTLCを行い，ジクロルメタンで展開するとき原点にとどまり，アセトンまたは酢酸エチルで展開するときRfがPとD–Aceの間に入るものの場合，同様のクリーンアップ法が使用できるものと考えられる．

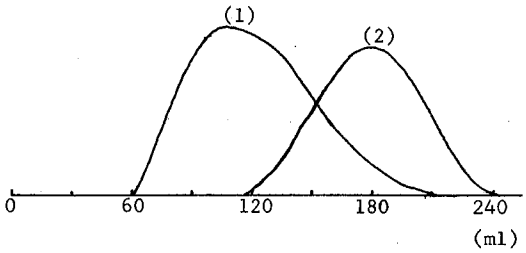


Fig.1. Elution Patterns of D–Ace using $CHCl_3$ and CH_2Cl_2
(1) $CHCl_3$ (2) CH_2Cl_2

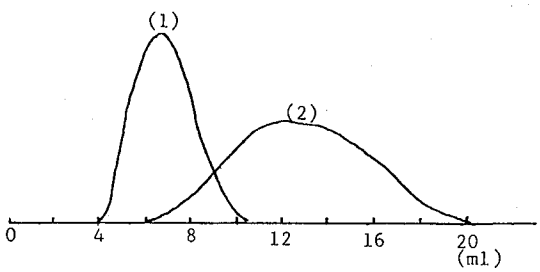


Fig.2. Elution Patterns of using Acetone and Ethyle acetate
(1) Acetone (2) Ethyle acetate

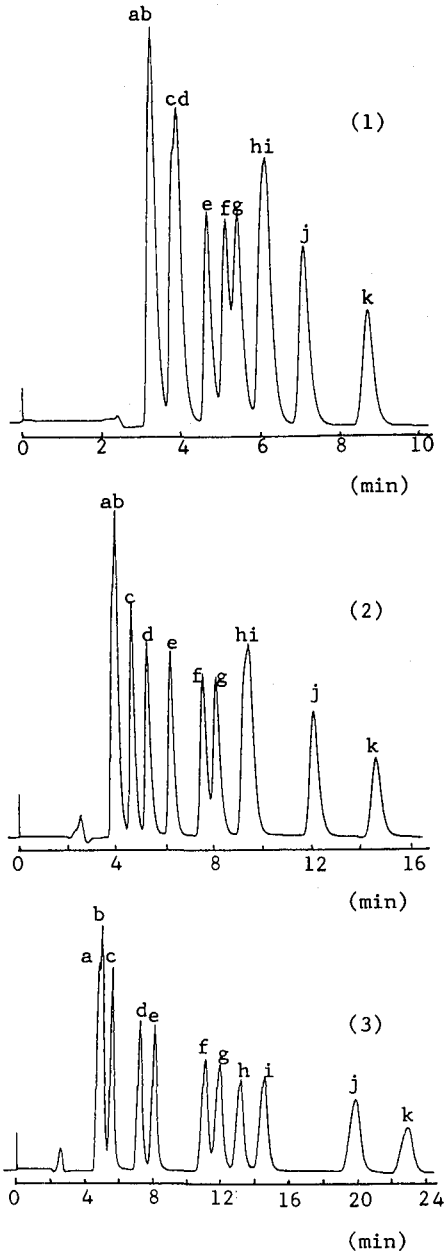


Fig.3. Liquid Chromatograms of Corticoids and PHBA esters
(1) $CH_3CN : H_2O = 1 : 1$
(2) $CH_3CN : H_2O = 3 : 4$
(3) $CH_3CN : H_2O = 3 : 5$
Peaks; a : P, b : HC, c : PHBA–Me, d : D, e : PHBA–Et, f : P–Ace g : HC–Ace, h : C–Ace, i : PHBA–Pro, j : D–Ace, k : PHBA–Bu

3 HPLC 条件の検討および内部標準物質の選択：
ホルモン類に対してよく使用される逆相系のカラムを選び[7) 8)]，移動相としてアセトニトリル・水の混合液を用い，その比を1：1から3：5まで変化させた時のクロマトグラムを Fig.3 に示す．これに示すように目的に合う適当な移動相の選択を行うことにより定量できることが分る．しかしここに示した条件では P と HC は分離しなかったが，ホルモンが2種類以上使用されている軟膏はなく，問題ないと思える．またこれらの条件に合う内部標準物質として PHBA エステル類を検討したところ，Fig.3 に示すように目的物質に応じてこれらのうちの適当なエステルを選択すればよいことが分ったため，これらを用いることとした．

添加回収試験および製剤の分析結果

ホルモンを含まない軟膏の1gに各ホルモンの 0.1mg/ml ジクロルメタン溶液を添加し，本法によって定量した結果，それぞれ定量的な回収率が得られ，精度も良好であった．(Table 2)．また応用例として市販の軟膏について行った結果を Table 3 に示す．

ま と め

HPLC を用いた軟膏中の副腎皮質ホルモンの分析法の確立を意図して，抽出，クリーンアップ，溶出操作および HPLC の測定条件について検討した結果，1)．油脂性軟膏ではジクロルメタンで直接抽出し，乳剤性軟膏では水—ジクロルメタン分配による抽出を行い，いずれもシリカゲルカラムによるクリーンアップを行い，その洗浄溶媒にはジクロルメタンが，溶出溶媒にはアセトンが最良と認められた．2)．TLC により予試験を行うことにより，クリーンアップおよび溶出条件が予見できることが分った．3)．HPLC のカラムとして Hibar LiChrosorb RP–18 が良く，移動相としてアセトニトリル・水の比を変動させることにより，内部標準物質として PHBA エステルを用いて数種のホルモンが分析できることが分った．4)．本法を市販軟膏中の副腎皮質ホルモンの定量に応用した結果，再現よく分析できることが分った．

文 献

1) 越村栄之助：衛生試験所報告，89，82，1971
2) Halver, C.V.D. : *J of the AOAC*, 57, 731, 1974
3) 中路幸男，太田美矢子，早川堯夫，川村次郎：医薬品研究，7，17，1976
4) Mader, W.J., and Buck, R.R. : *Anal. Chem.*, 24, 666, 1952
5) Umberger, E.J. : *Anal. Chem.*, 27, 768, 1955

Table 2. Recovery of Corticoids Added to Commercial Samples

Samples	Weight (g)	Runs	Constituent	Added (mg)	Recovery (%)	C. V. (%)
Oleaginous	1	3	D–Ace	0.2	98.5	1.52
Ointments	1	3	HC–Ace	0.5	98.3	1.49
	1	3	C–Ace	0.5	99.0	1.35
	1	3	P–Ace	0.5	98.8	1.44
	1	3	HC	0.5	98.3	1.50
	1	3	P	0.5	98.7	1.44
	1	3	D	0.2	98.6	1.78
Emulsified	1	3	D–Ace	0.2	98.3	2.04
Ointments	1	3	HC–Ace	0.5	98.1	2.00
	1	3	C–Ace	0.5	98.3	1.98
	1	3	P–Ace	0.5	98.0	1.98
	1	3	HC	0.5	98.1	2.03
	1	3	P	0.5	99.0	1.89
	1	3	D	0.2	97.9	2.22

Table 3. Content percent of Corticoids against Labled Statement in Commercial Ointments

Samples		P	HC	P–Ace	HC–Ace	C–Ace	D	D–Ace
Oleaginous	1	95	—	—	—	—	—	—
Ointments	2	92	—	—	—	—	—	—
	3	—	98	—	—	—	—	—
	4	—	102	—	—	—	—	—
	5	—	—	85	—	—	—	—
	6	—	—	—	101	—	—	—
	7	—	—	—	—	ND	—	—
	8	—	—	—	—	—	22	—
	9	—	—	—	—	—	—	94
Emulsified	10	71	—	—	—	—	—	—
Ointments	11	73	—	—	—	—	—	—
	12	—	97	—	—	—	—	—
	13	—	—	71	—	—	—	—
	14	—	—	73	—	—	—	—
	15	—	—	—	—	—	98	—
	16	—	—	—	—	—	—	106

ND : Non Detect

6) 鎌田国広, 山添律子, 原田裕文：衛生化学, **26**, 41, 1980
7) 重岡捨身, 宮武ノリエ, 上原眞一, 萩原輝彦, 秋山和幸, 原田裕文：東京都衛生局学会誌, **70**, 100, 1983
8) 徳永裕司, 木村俊夫, 川村次良：医薬品研究, **14**, 31, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 93-97, 1983

生薬の品質評価に関する研究（第8報）
市場品紫根の品質

安田一郎*, 浜野朋子*, 瀬戸隆子*, 秋山和幸*

Studies on the Evaluation of Crude Drugs (VIII)
Quality of *Lithospermi Radix* on the Market

ICHIRO YASUDA*, TOMOKO HAMANO*, TAKAKO SETO* and KAZUYUKI AKIYAMA*

Lithospermi Radix, (SHIKON in Japanese), is used as a raw material for the dye, the preparation "SHIUNKŌ" and other preparations. This crude drug on the market is divided into two kinds, KŌ-SHIKON and NAN-SHIKON. Nine samples each of KŌ-SHIKON and NAN-SHIKON imported from China were examined for the visible absorption spectra and for the contents of total ash, acid-insoluble ash, loss on drying, diluted ethanol extract, chloroform extract and total shikonin.

The results revealed that soils and sands were not satisfactorily removed from several samples of KŌ-SHIKON because of their high contents of acid-insoluble ash, and that the total shikonin content of NAN-SHIKON varied widely from 0.5 to 6.7 percent among different samples. The content of total shikonin in KŌ-SHIKON and NAN-SHIKON was correlative with that of chloroform extract and it was possible to estimate the total shikonin value based on the chloroform extract.

Keywords : evaluation, crude drugs, *Lithospermi Radix*, KŌ-SHIKON, NAN-SHIKON, on the market, acid-insoluble ash, total shikonin, chloroform extract

緒　言

紫根は第10改正日本薬局方（以下日局と略す）でムラサキ *Lithospermum officinale* L. *var. erythrorhizon* MAXIM の根と規定されている[1]が，中国薬局方では硬紫根（東北紫草）ならびに軟紫根（西北紫草）の2種類が記載され，前者をムラサキの根，後者を *Arnebia euchroma* JOHNST の根としている[2]．現在，本邦市場品紫根は，我国の農業事情および生薬流通事情により中国産が主となり，本邦産紫根が流通することはないといわれる．

本生薬は古くから江戸紫などの染料，あるいは紫雲膏の主原料として漢薬などに用いられてきたが，薬用としての有効成分は，シコニンならびにその脂肪酸エステルの誘導体[3-5]とされている．そこで今回市場品紫根を対象に，シコニン類の含量も含め，灰分，酸不溶性灰分，乾燥減量，希エタノールエキス，クロロホルムエキス等の試験を実施し，生薬の品質を明らかにすることとした．

実験の部

1. 実験材料および試料の調製

参考品　1982年7月茨城県谷田部町，国立衛生試験所筑波薬用植物栽培試験場で栽培中の，根の形態のやや異なる2種類のムラサキを参考品とした．これらはいずれも発芽後2年を経過したものである．ムラサキは地下部と地上部に分け，地下部を水洗後約2週間日陰で乾燥，粗切した後前報[6]と同様小型粉砕器を用い，日局に定める粗末[7]とした．

市場品　1980～1982年東京市場で，硬紫根と称されるもの9検体，軟紫根と称されるもの9検体を500～1,000 g の単位で購入した．それぞれ約500 g を粗切した後よく混和し，その約100 g を参考品と同様粗末とした．

2. 灰分，酸不溶性灰分，乾燥減量および希エタノールエキス試験法

灰分，酸不溶性灰分，乾燥減量および希エタノールエキス試験法は日局一般試験法生薬試験法[7]に従った．

3. クロロホルムエキス試験法

試料約2.3 g を精密に量り三角フラスコに入れ，クロロホルム70 ml を加え時々振り混ぜ，24時間冷浸．溶媒

* 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, 160 Japan

Table 1. Analytical Results of Total Ash, Acid-Insoluble Ash, Loss on Drying, Visible Spectrum Pattern and Content of dil EtOH Extract, Chloroform Extract and Total Shikonin in Reference Samples and Commercial Samples

		Total Ash	Acid-Insoluble Ash	Loss on Drying	Content of dil EtOH Extract	Content of Chloroform Extract	Content of Total Shikonin	Visible Spectrum Pattern
Reference*								
	1	5.1%	0.6%	7.2%	59.8%	2.1%	1.0%	A
	2	5.0	0.7	9.4	63.8	1.9	0.9	A
	$\overline{X}$	5.1	0.7	8.3	61.6	2.0	1.0	
KŌ-SHIKON								
	1	13.5	6.4	11.6	14.2	7.5	3.7	A
	2	10.3	3.5	12.0	17.0	4.6	1.8	A
	3	6.5	1.7	13.4	29.1	3.9	1.6	A
	4	8.8	2.1	11.3	11.6	5.6	2.3	A
	5	10.5	3.1	11.7	6.9	4.6	1.8	A
	6	12.6	5.2	9.5	23.6	4.6	2.4	A
	7	9.2	3.3	9.3	18.9	5.3	2.4	A
	8	11.9	4.5	9.8	13.4	6.2	2.9	A
	9	10.8	4.6	9.0	10.7	8.8	4.6	A
	$\overline{X}$	10.5	3.8	10.8	16.2	5.7	2.6	
NAN-SHIKON								
	1	9.9	1.7	12.0	5.9	4.1	1.2	B
	2	10.7	2.2	12.6	4.7	4.4	1.3	B
	3	9.4	1.4	11.8	5.0	5.2	1.8	B
	4	9.4	1.1	13.9	3.8	4.4	1.2	B
	5	14.8	5.3	12.4	8.9	7.2	3.2	A
	6	9.8	0.8	13.7	4.0	2.9	0.5	B
	7	8.1	1.3	12.0	5.0	4.1	1.3	B
	8	7.8	1.5	9.6	12.9	12.9	6.7	A
	9	10.2	2.4	12.0	7.7	4.3	1.5	B
	$\overline{X}$	10.0	2.0	12.2	6.4	5.5	2.1	

*Roots of *Lithospermum officinale* L. *var. erythrorhizon* MAXIM. which had been cultivated for 2 years at Tsukuba Experiment Station of Medicinal Plants, National Institute of Hygienic Sciences.

ろ過後フラスコおよび残留物は，ろ液が100 ml になるまでクロロホルムで洗い，次にろ液50 ml を正確にとり40°以下で溶媒を減圧留去し，さらに室温，24時間，1.0 mmHg 以下で減圧乾燥した．クロロホルムエキス量の算出は，その重量に2を乗じたものとし，また乾燥減量によって得た数値より乾燥物に換算した試料量に対し，エキス含量（%）を算出した．

4. 可視部吸収スペクトルの測定および総シコニンの定量

可視部吸収（以下 VIS と略す）スペクトルの測定および総シコニンの定量は，昨年報告した紫雲膏製剤中の総シコニンの定量[8]と同様に試験した．

試験溶液はクロロホルムエキス試験の際調製した抽出液を希釈し用いた．即ち，100 ml としたろ液2.5 ml を正確にとり，クロロホルムを加え50 ml に希釈し試験溶液とした．ただし吸光度が1.00を越える試験溶液は適宜希釈した．

5. シコニン標準品および標準溶液の調製

丸善製薬㈱製シコニン約30 mg をクロロホルム 1 ml に溶かし，ウオーターズ㈱製シリカ・カートリッジ（SEP–PAK, Part No. 51900）に負荷し，初めにクロロホルム10 ml を流出，次いでベンゼン－酢酸エチルエステル（1：1）の混液30 ml を流し，シコニンを溶出させた．溶出したシコニン画分は溶媒留去後，室温，24時間，1.0 mmHg 以下で減圧乾燥させ，シコニン標準品とした．物理定数および各種スペクトルデータは既報[8]に記載．

標準溶液の調製は標準品約25 mg を精密にとり，クロロホルム50 ml に溶かし，さらにこの2.0 ml を50 ml に希釈した．

結果および考察

1. 性状

硬紫根　市場品 9 検体は以下のような性状を示した．

やや細長い紡錘形をなし，しばしば分枝する．長さ 5～15 cm，径0.2～1.8 cm，表面は暗紫色，皮部は薄く剝離しやすく，ところどころ淡かっ色～淡紅色となる．縦溝を持つものが多く，その一部は木部まで達する．折れやすく，折面は不規則となる．周皮の外側が暗紫色であるのに対し内側は淡かっ色，木部は黄かっ色～黒かっ色を示す．

軟紫根　市場品 9 検体は以下のような性状を示した．

やや不規則にねじれた長円柱形をなし，ワラ状にほぐれたものが多い．長さ 8 ～35 cm，径 1 ～ 8 cm，表面は暗紫色，りん片状に重なった周皮は極めて剝離しやすい．全体に質は軽く，柔らかく，折れやすい．折面は不規則となり，黄かっ色を示す木部は少ない．根頭部にはしばしば黒かっ色～暗紫色の茎の残基を付着する．

2. 灰分，酸不溶性灰分および乾燥減量

参考品および市場品について分析した結果を Table 1 に掲げた．

灰分含量は，参考品では平均値$\overline{X}$＝5.1%，市場品では硬紫根$\overline{X}$＝10.5%，軟紫根$\overline{X}$＝10.0%の分析値を示した．参考品は灰分含量が低いことから無機物の含有量が少ないものと推察される．

酸不溶性灰分含量は，参考品では$\overline{X}$＝0.7%であるのに対し，市場品では硬紫根$\overline{X}$＝3.8%，軟紫根$\overline{X}$＝2.0%であり，特に硬紫根 9 検体中 4 検体は，4.5～6.4%と極めて高い測定値を示した．参考品は調製時に簡単な水洗を行ったが，高い測定値を示した市場品は生薬調製時，水洗あるいは土砂の除去作業が充分に行われなかったものと推定される．

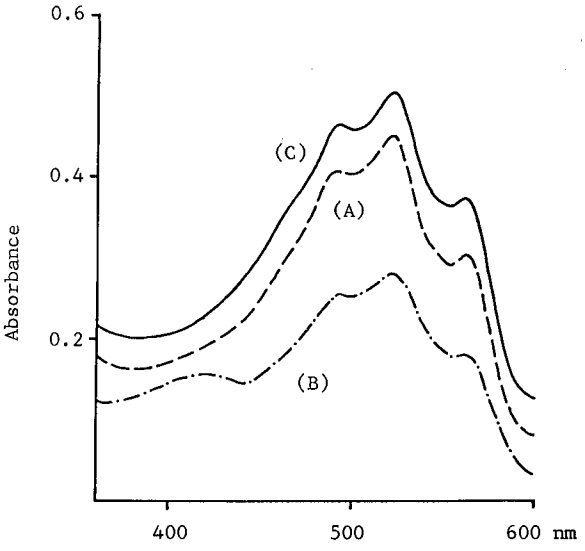


Fig.1. Visible Absorption Spectra of Type A (A), Type B (B) and Shikonin (C)

乾燥減量の分析結果は，参考品および市場品とも7.2～13.9%とほとんど変らない数値であった．

3. 可視部吸収スペクトル

それぞれの試料につき VIS スペクトルを比較したところ，参考品および市場品硬紫根 9 検体のスペクトルはいずれもシコニン標品のスペクトル（タイプA）と一致した．即ち，520 nm 付近に最大吸収，490 nm 付近および560 nm 付近に極大吸収を認めた．一方，軟紫根のうち 2 検体はタイプAの VIS スペクトルを示したが，残り 7 検体は，Fig. 1. に掲げるように，420 nm 付近にも極大吸収を認めるスペクトル（タイプB）であった．タイプAとタイプBはよく類似するスペクトルであり，またタイプBで，520 nm 付近の最大吸収が強いと，相対的に420 nm 付近の吸収が弱くなり，shoulder となってタイプAとの識別が困難となる傾向にあった．即ち，VIS スペクトルから硬紫根と軟紫根を判別することは難しい．

4. 希エタノールエキス，クロロホルムエキスおよび総シコニン含量

希エタノールエキス含量は，参考品では Table 1 に示すように$\overline{X}$＝61.6%と高い測定値を示した．またクロロホルムエキス含量は，参考品では$\overline{X}$＝2.0%，硬紫根では$\overline{X}$＝5.7%，軟紫根では$\overline{X}$＝5.5%の分析値を示した．

京極等は，軟紫根のシコニン類は硬紫根の約 3 倍量含有されていたと報告している[9]が，今回調査した18検

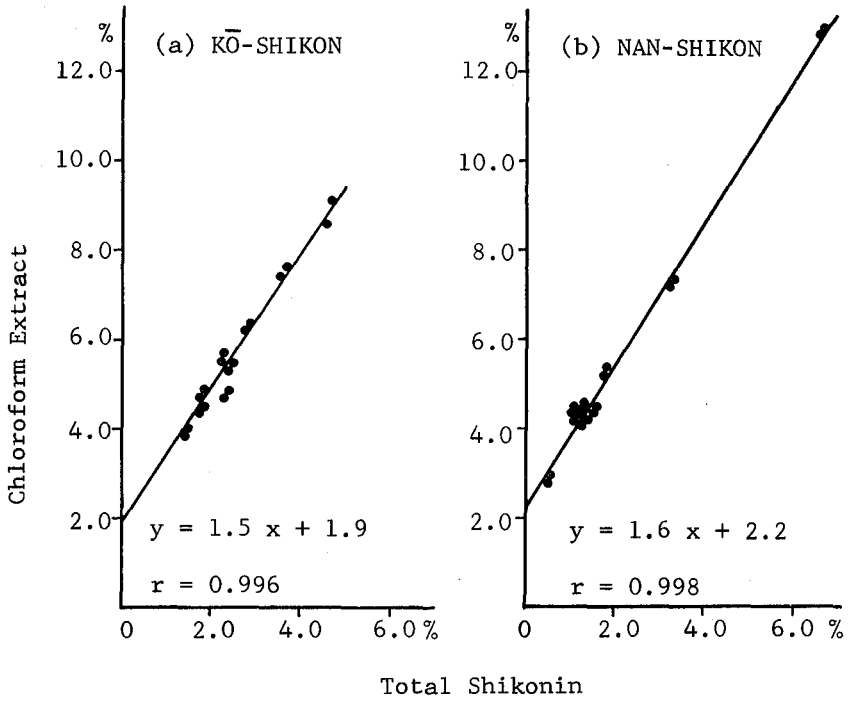


Fig. 2. Relations between Content (%) of Total Shikonin and Content (%) of Chloroform Extract in KŌ-SHIKON (a) and NAN-SHIKON (b)

体では，その総シコニン含量は，硬紫根$\overline{X}$=2.6%，軟紫根$\overline{X}$=2.1%であり，硬紫根の方がやや高い結果を示した．また硬紫根は，総シコニン含量の最小値が1.6%，最大値が4.6%であるのに対し，軟紫根は，最小値が0.5%，最大値が6.7%と，ロット間に大きなばらつきを認め，総シコニン含量の点から均一性に乏しいことが明らかとなった．なお参考品の総シコニン含量は$\overline{X}$=1.0%と低い分析値であった。

次に両エキス含量と総シコニン含量の関係について考察した．硬紫根には，総シコニン含量と希エタノールエキス含量の間に相関を認めないが，軟紫根には，危険率0.1%以下で有意な正の相関（相関係数 r = 0.932）が確認された．また総シコニン含量とクロロホルムエキス含量の間には，硬紫根ならびに軟紫根とも Fig. 2. に示すように高い相関性（r =0.996 および r =0.998）が得られた．この場合傾きは硬紫根 1.5，軟紫根 1.6とそれぞれ1.0以上の数値となったが，この理由は主に，総シコニン含量をシコニン類化合物中最も分子量の小さいシコニンに換算したことによると思われた．またそれぞれのｙ切片から，硬紫根はクロロホルムエキス中シコニン類以外の物質を1.9%程度，軟紫根は2.2%程度含有すると推察された．

結　論

市場品紫根18検体について調査した結果，現在本邦市場に流通している紫根は中国産硬紫根もしくは軟紫根と称する２種類の生薬であった．これら市場品について各種試験を行ったところ，総シコニン含量とクロロホルムエキス含量に正の相関関係を認め，クロロホルムエキス含量から総シコニン含量を推定することも可能に思われた．品質上の問題として，硬紫根は土砂等の除去が充分に行われていない懸念があり，また軟紫根は含有するシコニン類の含量がロットにより大きくばらつくことなどが明らかになった．先に著者等は紫根を主原料とした紫雲膏中の総シコニン類の定量を行い，その含量のばらつきを問題としたが，今回の分析結果から，これらのばらつきは主に原料の紫根に起因するものと考えられる．

謝辞　本研究にあたり参考品としたムラサキを快く分与された，国立衛生試験所筑波薬用植物栽培試験場生理遺伝室，室長佐竹元吉先生ならびに同スタッフの方々に深謝します．

文　献

1) 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，東京

2) 中華人民共和国衛生部薬典委員会：中華人民共和国薬典1977年版第1部，587，1978，人民衛生出版社，北京

3) 渡辺　武，後藤　実：日本東洋医学会誌，5，19，1955

4) 田中康雄，小谷　功：薬誌，92，525，1972

5) Sankawa, U., Ebizuka, Y., Miyazaki, T., Isomura, Y., Otsuka, H., Shibata, S., Inomata, M. and Fukuoka, F.: *Chem, Pharm. Bull.*, **25**, 2392, 1977

6) 安田一郎，瀬戸隆子，奥澤昌子，下平彰男，原田裕文：東京衛研年報，32−1，73，1981

7) 日本公定書協会：第10改正日本薬局方解説書，A−33，B−177，1981，広川書店，東京

8) 浜野朋子，安田一郎，瀬戸隆子，秋山和幸，原田裕文：東京衛研年報，33，95，1982

9) 京極和旭，寺山博行，館　安英，鈴木　堯，小松曼耆：生薬誌，22，24，1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 98-101, 1983

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3報）注射用蒸留水および生理食塩液中のパイロジェン（エンドトキシン）含量

宇佐美 博 幸*, 秋 山 和 幸*, 正 木 宏 幸**

Study on Microassay of Pyrogen *in vitro*(III) Endotoxin Content in Distilled Waters and Sodium Chloride Irrigations

HIROYUKI USAMI*, KAZUYUKI AKIYAMA* and HIROYUKI MASAKI**

The present study was undertaken to determine the pyrogen contamination in distilled waters for injection and sodium chloride irrigatons with synthetic chromogenic substrate(SCS)test.

SCS test conducted on 22 distilled waters for injection and 10 sodium chloride irrigations from 1981 to 1982 revealed that endotoxin content of distilled waters was ND －0.10ng/m*l* in 14(64%)and over 0.10ng/m*l* in 8, while endotoxin content of sodium chloride irrigations was ND －0.10ng/m*l* in 8 and over 0.1ng/m*l* in 1. Only 3 of distilled waters containing more than 2.4ng/m*l* failed in LAL(gel clotting)test and JP rabbit pyrogen test.

緒　　言

医薬品製造用水は，その用途により，日本薬局方およびGMP（医薬品の製造及び品質に関する基準）により厳しく規制されている。注射用蒸留水および生理食塩液は注射剤の溶解液あるいは輸液として大量に用いるので，発熱性物質試験に適合することが定められている．

しかし，発熱性物質試験は，ウサギの体温上昇度で判定するため，ウサギの感受性の個体差に左右されやすい．

発熱性物質のなかには菌体外毒素もあるが[1,2]，その多くは菌体内毒素（エンドトキシン）であると考えられている[3,4]．

著者らは，新しい発色性合成基質法がエンドトキシン検出法として，従来のウサギ発熱性物質試験およびLimulus test（ゲル化判定法）よりも高感度で定量性を有することを認めてきた[5-10]．また，ある種の菌は蒸留水中でも増殖することが知られており，貯水時の汚染も考えられるのに，注射用蒸留水および生理食塩液中の発熱性物質（エンドトキシン，LPS）に関する報告はみられない．そこでこれらの注射剤について，本法によるエンドトキシン検出を試みた．局方発熱性物質試験および従来のゲル化判定法の結果とも併わせて報告する．

実　　験

1. 器具及び装置

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°C，30分以上乾熱滅菌した．

日立320型自記分光光度計，光束巾 2 mm×光路長10mmキュベット，萱垣製ふ卵器，飯尾製EP761－2型Pyrogen test recorder を使用した．

2. 試薬及び試料

1）合成基質：Pyrodick 帝国臓器

2）Limulus lysate：検液中のエンドトキシン検出にはプレゲル（PGと略す，帝国臓器）を用いた．他にPGS（帝国臓器試作品），HSシングルテストワコー（HSと略す，和光純薬）を用いた。

3）エンドトキシン（内毒素，LPS）：*E.coli* O111：B4

4）注射用蒸留水：市販品及びメーカー試作品

5）生理食塩液：市販品及びメーカー試作品

3. 実験方法

1）合成基質法

前報の方法に従い LPS；*E.coli* O111：B4 の0.1－2.5ng/m*l*濃度の溶液を調製し，これを用いて検量線を

* 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
* 埼玉県衛生研究所食品衛生部食品微生物科

作成し，同時に操作した注射用蒸留水及び生理食塩液中のエンドトキシン含量を測定した。

2）発熱性物質試験

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，検液をウサギの体重1kg当り10m*l*を静注し，3－5時間測温して判定した。

3）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。

塩化ナトリウムの合成基質法および Limulus test に及ぼす影響

局方品の食塩を用いて1，5，10，20%の溶液にエンドトキシン，*E. coli* O111：B4（B4と略す）をそれぞれ2 ng/m*l*含有するように添加した。3種の Lysate を用いて，gel formation に及ぼす塩化ナトリウムの影響を検討した。すなわち，PG, PGS は反応後45度に傾けてゲル化を判定した。濁度を生じたものは（±）とした。HS は反応後試験管を倒立して，ゲルが落下しないものを（＋），落下するものは（－）と判定した。また合成基質法のアミダーゼ活性に及ぼす影響を検討した。

結果および考察

1. 塩化ナトリウムの合成基質法および Limulus test に及ぼす影響

各濃度の塩化ナトリウム溶液について合成基質法を適用した結果，いずれも添加量に近い結果が得られ、アミダーゼ活性に対する塩化ナトリウムの影響は殆んど認められなかった。

Limulus test（ゲル化判定法）の検出感度はそれぞれ添付のエンドトキシンに対して lysate PG を用いるとき 1 ng/m*l*, PGS ではより高感度で，HS では更に感度が高く0.01ng/m*l*とされている．エンドトキシン B4 を蒸留水に添加したとき，2ng/m*l*濃度ではすべてにゲル化が認められた．一方0.9%塩化ナトリウム溶液で HS はゲルが形成されず false negative となった．PG,PGS はゲル形成に影響がなかった．従って生理食塩液には PG を用いた．

Table 1. PYROGEN CONTAMINATION IN DISTILLED WATER FOR INJECTION

No.	Manufacturer	Chromogenic assay ng/m*l*	Gel clot	Rabbit pyrogen test J. P.
1	A	0.15	−	−
2	〃	ND	−	−
3	〃	ND	−	−
4	〃	ND	−	−
5	〃	0.12	−	−
6	〃	ND	−	−
7	B	ND	−	−
8	C	ND	−	−
9	〃	ND	−	−
10	〃	ND	−	−
11	D	0.03	−	−
12	〃	0.06	−	−
13	E	ND	−	−
14	F	ND	−	−
15	G	0.04	−	−
16	H	0.06	−	−
17	I	0.15	−	−
18	〃	0.17	−	−
19	〃	0.25	−	−
20	J	2.44	＋	＋
21	〃	5.44	＋	＋
22	〃	7.89	＋	＋

ND＜0.03

Table 2. PYROGEN CONTAMINATION IN SODIUM CHLORIDE IRRIGATION

No.	Manufacturer	Chromogenic assay ng/m*l*	Gel clot	Rabbit pyrogen test J. P.
1	A	ND	−	−
2	〃	ND	−	−
3	〃	0.23	−	−
4	B	0.04	−	−
5	C	ND	−	−
6	〃	ND	−	−
7	〃	ND	−	−
8	D	0.05	−	−
9	E	0.08	−	−

ND<0.03

2. 注射用蒸留水および生理食塩液中のエンドトキシン含量

注射用蒸留水についての試験結果をTable 1に示す．22検体のうち0.06ng/m*l*以下のものが半数以上（14検体）であったが，0.1ng/m*l*を越えるものは8例（36%）と低濃度域で比較的高率の汚染状況がみられた．今回精査はしなかったが，蒸留水の貯水時にはグラム陰性菌*Pseudomonas*類が増殖しうる場合があることが知られており，本菌自体は非病原性ではあるが，慢性病患者，重篤な基礎疾患のある患者，抗生剤や免疫抑制療法を受けている患者などに大量に曝露された場合その症状を悪化させることが報告されている[11]ので注意する必要がある．

生理食塩液のエンドトキシン汚染例は注射用蒸留水と比較すると少なく，0.1ng/m*l*を越えるものはTable 2に示すように9検体中1例にすぎなかった．Limulus test（ゲル化判定法）あるいは局方発熱性物質試験陽性のものはみられなかった．この結果は，エンドトキシンが生理食塩液中で不安定で，蒸留水と比較して，加熱処理時の半減期が著しく短いとする報告[12]とも関連すると考えられる．

製造会社別に比較すると，注射用蒸留水，生理食塩液の品質は，各社，各ロットにより異なり，B,C,EおよびF社の注射用蒸留水からはほとんど検出されなかったが，Table 1に示したように，J社の注射用蒸留水3例から高濃度の汚染を検出した。又前報[6]で輸液製剤中より高濃度汚染が検出されたI社の注射用蒸留水からは平均0.19ng/m*l*と比較的高濃度に検出された．一般的にエンドトキシン汚染は製剤の製造工程中に起る可能性あるいは原料に起因すると考えられるが，前記I社の製品の高濃度汚染は一つには注射用蒸留水そのものに起因する可能性が示唆されたものと思われる．

総　括

注射用蒸留水および生理食塩液中のエンドトキシン含量について検討し，以下の結果を得た．

1. 市販品等の注射用蒸留水，22検体中8例（36%）がエンドトキシン（*E. coli* O111 : B4）0.1ng/m*l*濃度以上の活性を示した．

2. 注射用蒸留水で2.4ng/m*l*濃度を越えた3例は，局方発熱性物質試験，ゲル化判定法ともに陽性であった．

3. 生理食塩液のエンドトキシン汚染は少なく，0.1ng/m*l*を越えるものは9検体中1例であった．

4. 注射用蒸留水で0.1ng/m*l*以上のエンドトキシンが検出された業者の輸液中の含量はやはり高く，注射用蒸留水が輸液の汚染原因の一つとなっている可能性が示唆された．

5. 塩化ナトリウムが共存すると低濃度でもlysateによっては阻害が認められたが，合成基質法には影響がなかった．

文　献

1) 五十嵐英夫，宇佐美博幸，藤川　浩，新垣正夫，潮田　弘，秋山和幸，坂井千三：日本細菌学雑誌，**38**－1，309，1983

2) 五十嵐英夫，藤川　浩，宇佐美博幸，川端俊一郎，森田隆司：第30回毒素シンポジウム講演要旨集

3) 玉熊正悦，石山　賢：エンドトキシンショック，中外医学社，1977

4) Westphal O. : Bacterial Endotoxins, The Second Carl Prausnitz Memorial Lecture, Int. Arches Allergy appl. Immun., **49**, 1, 1975

5) 宇佐美博幸，下平彰男：東京衛研年報，32－1，83，1981
6) 宇佐美博幸，秋山和幸：ibid, 33, 100, 1982
7) 宇佐美博幸，下平彰男：東京都衛生局学会誌，67，24，1981
8) 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
9) 宇佐美博幸，秋山和幸，正木宏幸：日本公衆衛生雑誌，10，362，1982
10) 宇佐美博幸，秋山和幸：日本薬剤師会第15回学術大会，講演要旨集，44，1982
11) Favero, M. S., et al : Science, 173, 836, 1973
12) 宇佐美博幸，秋山和幸：日本薬学会第103年会講演要旨集

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 102-106, 1983

ガスクロマトグラフィーによる化粧品中のグリコール類およびグリセリンの定量

伊藤弘一*, 観照雄*, 中村義昭*,
鎌田国広*, 吉原武俊*, 原田裕文*

Determination of Glycols and Glycerin in Cosmetic products by Gas Chromatography

KOICHI ITO*, TERUO KAN*, YOSHIAKI NAKAMURA*, KUNIHIRO KAMATA*,
TAKETOSHI YOSHIHARA* and HIROFUMI HARADA*

The rapid determination of propylene glycol (1,2–PG), 1,3–buthylene glycol (1,3–BG) and glycerin in cosmetic products were investigated by gas chromatographic procedures. The samples were mixed with Methanol by the ultrasonicate mixture, then the mixed materials were centrifuged. The supernatant was analyzed by gas chromatography using a TENAX GC column. As internal standard, three compounds were adopted : ethylene glycol for 1,2–PG, 1,3–propylene glycol for 1,3–BG and 1,4–buthylene glycol for glycerin.

Average recoveries of these compounds added to commercial cream were 105.8 % for 1,2–PG, 96.2 % for 1,3–BG and 102.9 % for glycerin and coefficients of variation were 0.05, 0.03 and 0.02, respectively.

This method was successfully applied to the analysis of some commercial samples (cream, milk lotion, skin lotion, shampoo).

Keywords : gas chromatography, determination, propylene glycol, 1,3–buthylene glycol, glycerin, cosmetic

緒　言

香粧品には，皮膚にうるおいと柔軟さを与え，製品の乾燥を防ぐために，種々の保湿剤が使用されている。その中で最も一般的に使用され，かつ化粧品原料基準に収載されているものに，プロピレングリコール（以下1,2－PGと略す），1,3－ブチレングリコール（以下1,3－BGと略す）のグリコール類とグリセリンがある[1),2)]．そしてこれらのグリコール類は保湿剤として使用されている他に，抗菌作用の目的としても使用されている[3)]．

また昭和55年薬事法の一部改正により，表示成分が制定されたが，プロピレングリコールもその対象品目の一つに指定されている[4)]．

これらのグリコール類およびグリセリンの同時定量法には，薄層クロマトグラフ法[5),6)]，紫外部吸収分光分析法[7),8)]，高速液体クロマトグラフ法[9-12)]，ガスクロマトグラフ法（GLC法）[13-20)]，など多くの分析法が報告されている．しかしながら，これらの報告はいずれも食品等を分析したものであり，多種類の成分の混合物である化粧品を対照としたものはない．そこで今回著者らは，化粧品および医薬部外品に処方されている1,2－PG，1,3－BGおよびグリセリンについて，GLC法により，迅速同時定量法の検討を行なったところ，精度よく定量することができたのでここに報告する．

実験方法

1. **試薬**　標準液：1,2－PG，1,3－BG（東京化成工業社製特級）グリセリン（和光純薬工業社製特級）の各々1gを精秤し，メタノールに溶解し，それぞれ10 mg/m*l*の液とする．

内部標準液：1,3－プロピレングリコール（以下1,3－PGと略す），1,4－ブチレングリコール（以下1,4－BGと略す）（東京化成工業社製特級），エチレングリコール（以下EGと略す）（和光純薬工業社製特級）の各々1gを精秤し，混和してメタノールに溶解し，10 mg/m*l*の液とする．

その他の試薬：すべて特級のものを使用する．

2. **器具および装置**　超音波発生装置：ブランソン社

* 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. Comparison of Recoveries of Glycols and glycerin added to Cream by various Extractive solvents

Solvent	Runs	Added (mg)	Recovery (%)	S. D.*	C. V.**
		Propylene glycol			
Methanol	5	20	105.80	5.25	0.05
Ethanol	5	20	87.90	5.58	0.06
Acetone	5	20	94.36	7.59	0.08
		1, 3–Buthylene glycol			
Methanol	5	20	96.19	3.02	0.03
Ethanol	5	20	74.50	5.11	0.07
Acetone	5	20	100.30	7.34	0.07
		Glycerin			
Methanol	5	40	102.89	2.10	0.02
Ethanol	5	40	96.72	6.44	0.07
Acetone	5	40	105.73	8.72	0.07

* S.D. Standard diviation

** C.V. Coefficient of variation

Weight of each trial sample was 1 g.

製ブランソニック221型

GLC 装置：島津製作所製ＧＣ－５ Ａ型水素炎イオン化検出器付（以下 GC－FID と略す）

データ処理装置：島津製作所製クロマトパックＣ－Ｒ１Ａ型

3. 試験溶液の調製 試料（クリーム，乳液，シャンプー）約1g を精秤し，メタノール25 m*l* を加え，ガラス棒で攪拌を行ないながら，25°C，５分間，超音波発生装置により抽出を行なう．メタノール抽出液を遠心分離（3500 rpm，５分間）し，上澄液に内部標準液2.5 m*l* を加え，50 m*l* 定容として，試料溶液とした．また化粧水を試料とした場合は，試料約1g を精秤し，内部標準液 2.5 m*l* を加え，メタノールにて50 m*l* 定容とし，試料溶液とした．

4. GLC 条件 カラムは充塡剤として TENAX GC を用い，Fig．1 に示した条件に従って，GLC 分析を行なった．データ処理は，データ処理装置を用いた．

実験結果および考察

1. 抽出溶媒の選択 抽出溶媒としてメタノール，エタノールおよびアセトンについて，市販のクリームを用いて，前項の２および３の方法に従って検討を行なった．その結果，Table 1 に示すように，抽出溶媒として，抽出率，精度共に良好であったメタノールを用いることとした．

2. 抽出時間の検討 抽出溶媒としてメタノール，試料には市販のクリームを用いて，前項の２および３の方法に従って，超音波発生装置による抽出時間の検討を行なった．25°C にて，０～30分を検討したところ，５～10分で抽出率はほぼ100％を示したことにより，抽出時間は５分と定めた．

3. 内部標準の検討 （Fig. 1） 前項の GLC 条件において，種々の内部標準物質について検討したところ，1,2－PGに対しては EG が，1,3－BG に対しては1,3－PG が，そしてグリセリンに対しては1, 4 －BG がそれぞれ良好なクロマトグラムを示した．そこで内部標準として，EG，1,3－PG および1, 4 －BG を使用することとした．

4. 検量線 （Fig. 2） 1,2－PG，1,3－BG およびグリセリンの各標準液をとり，1m*l* 中に1,2－PG および1,3－BG は0.5～50 mg を，グリセリンは1.0～100 mg を含むようにメタノールにて希釈する．希釈液50 m*l* に対して内部標準液2.5 m*l* を加え，その液2 u*l* を GLC に注入し，内部標準法でピーク面積比により，検量線の作成を行なった．検量線は1,2－PG および1,3－BG については，10～1,000 ppm の範囲で，グリセリンについては，20～2,000 ppm の範囲で直線関係が得られた．

5. 回収率および再現性 1,2－PG，1,3－BG およびグリセリンを含まない，市販のクリーム，乳液，化粧水およびシャンプー各々1gに，1,2－PG および1,3－BG 標準液2.0m*l*，グリセリン標準液4.0m*l* をそれぞれ

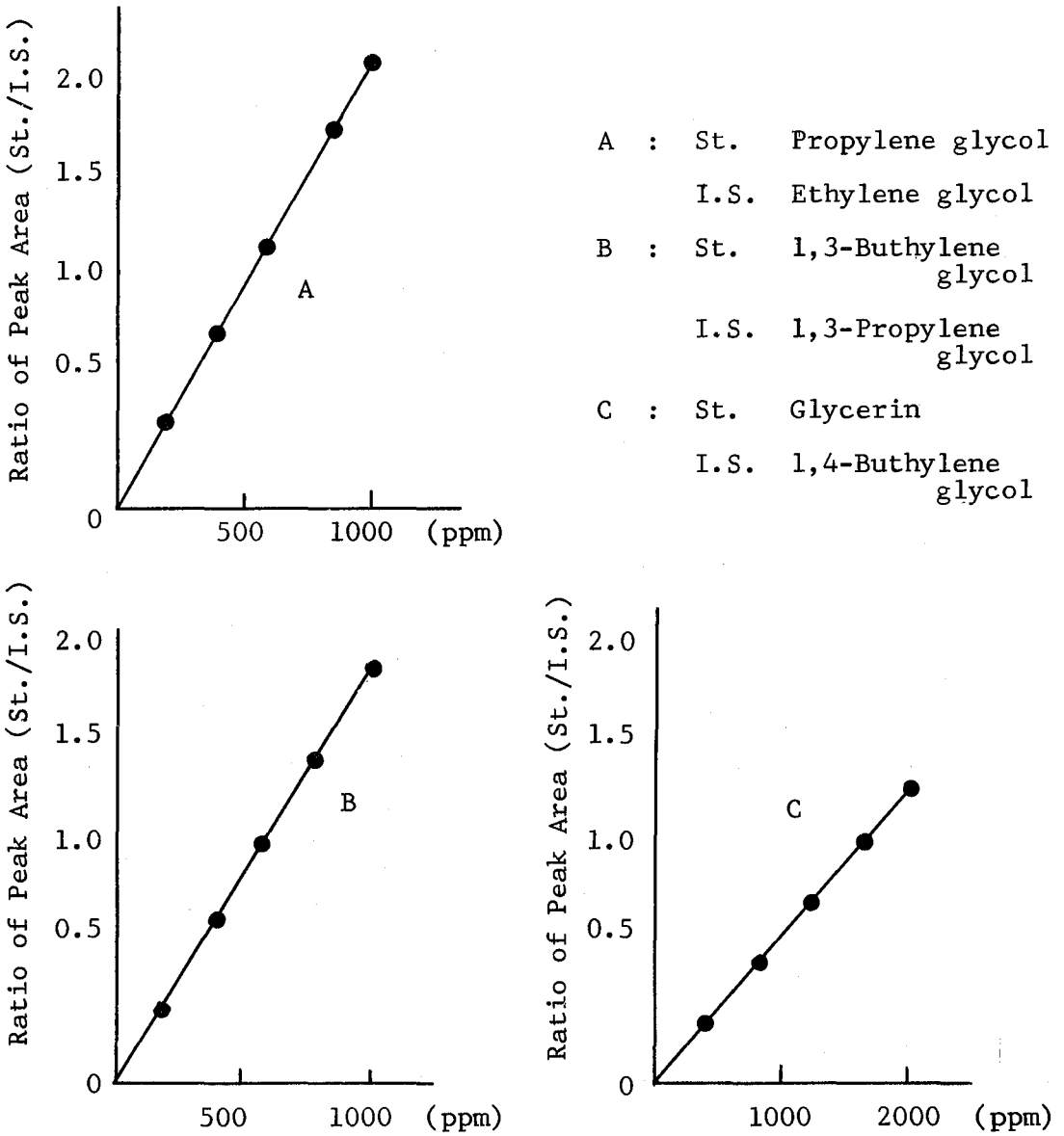


Fig.1. Calibration Curves of Propylene glycol, 1, 3-Buthylene glycol and Glycerin
Gas chromatographic condition : column, TENAX GC (60-80 mesh) 2 m x 3 mm i.d., glass tube; column temp., maintained at 140°C for 5 min. then 140°C－200°C at 5°C /min.; injection temp. 300°C; detector, FID; Carrier Gas, Nitrogen, 60ml/min.

添加し，本法による回収率を求め，その結果をTable 2に示した．いずれの試料においても満足できる回収率および再現性が得られた．

6. 市販の化粧品の分析結果 市販のクリーム40種，乳液15種，化粧水25種およびシャンプー13種について，本法を用い，1,2－PG，1,3－BG およびグリセリンの分析を行なった．その結果，全試料について本定量法を適用することができた．定量値をTable 3に示す．

結　論

GLC－FID 法を用いた化粧品中のプロピレングリ

Table 2. Recoveries of Glycols and Glycerin added to Cosmetic products

Samples	Weight (g)	Added (mg)	Recovery (%)*	S. D.**	C.V.***
Propylene glycol					
Cream	1	20	105.80	5.25	0.05
Milk lotion	1	20	98.00	2.92	0.03
Skin lotion	1	20	98.75	1.94	0.02
Shampo	1	20	100.11	2.02	0.02
1, 3–Buthylene glycol					
Cream	1	20	96.19	3.02	0.03
Milk lotion	1	20	98.00	1.00	0.01
Skin lotion	1	20	95.25	2.00	0.02
Shampoo	1	20	97.50	0	0
Glycerin					
Cream	1	40	102.89	2.10	0.02
Milk lotion	1	40	101.88	4.34	0.04
Skin lotion	1	40	97.00	2.92	0.03
Shampoo	1	40	100.00	2.24	0.02

* Average of 5 trials

** S.D. Standard diviation

*** C.V. Coefficient of variation

Table 3. Analytical Results of Glycols and Glycerin in Commercial Samples

Sample	No. of Samples	No. of Samples detected	Analytical Results (%) min–max
Propylene glycol			
Cream	40	16	1.0–20.0
Milk lotion	15	9	2.0– 5.0
Skin lotion	25	5	1.8–10.0
Shampoo	13	4	0.8– 5.0
1, 3–Buthylene glycol			
Cream	40	1	2.5
Milk lotion	15	2	2.0– 2.7
Skin lotion	25	3	0.5– 5.0
Shampoo	13	0	
Glycerin			
Cream	40	6	1.7–14.7
Milk lotion	15	8	1.8– 9.2
Skin lotion	25	14	0.4–28.0
Shampoo	13	1	7.0

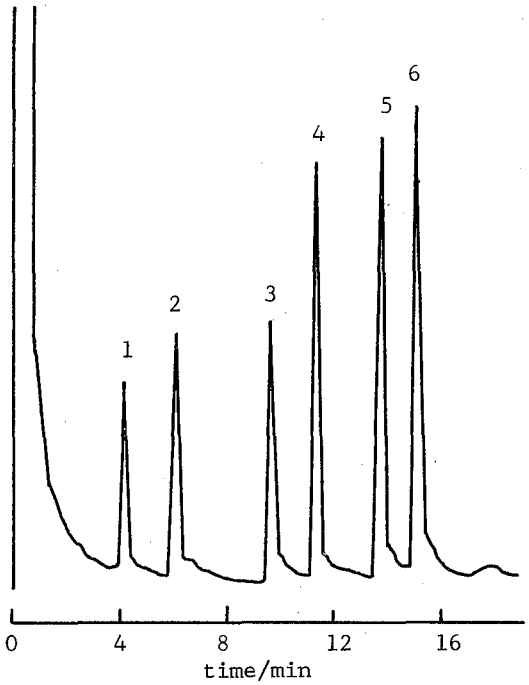


Fig.2. Gas Chromatogram of glycols and glycerin
GLC conditions are shown in Fig. 2 : Peak 1 , ethylene glycol; 2, 1,2–propylene glycol; 3, 1,3–prpylene glycol 4, 1,3–buthylene glycol; 5, 1,4–buthylene glycol; 6, glycerin

コール，1,3－ブチレングリコールおよびグリセリンの分離定量法について検討した．

その結果，1)抽出溶媒としてメタノールを用いて，超音波発生装置により5分間抽出を行なう．また，分離定量は，TENAX GCをカラム充填剤として用いたGLC－FID法により，良好な精度をもって行なうことができた．

2)本法により，市販化粧品（クリーム，乳液，化粧水，およびシャンプー）中のプロピレングリコール，1,3－ブチレングリコールおよびグリセリンの同時定量を行なったところ，迅速で良好なる精度をもって分析することができた．

文　献

1) 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，81,227，1981，薬事日報社
2) 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版追補Ⅱ注解，445，1981，薬事日報社
3) 田村健夫：香粧品科学，113，1976，日本毛髪科学協会
4) 昭和55年9月26日，官報16105，厚生省告示第167号
5) Ballarin,C, : *Pharm. Prax.*, **35**, 260, 1980
6) Srivastava, S.P., Dua, V.K. and Kumar, Anil : *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **286**, 247, 1977
7) Kalyyanaraman, S., Ramakrishna, T.V., Srinivassan, M. and Thigarajan, S. : ibid., **276**, 73, 1975
8) Srivanassan, M. and Thiagarajan, S. : ibid., **282**, 143, 1976
9) Schwarzenbach, Rolf : *J. Chromatogr.*, **140**, 304, 1977
10) Aitzetmuller, K. : ibid., **156**, 354, 1978
11) Dokladalova, J., Barton, A.Y. and Mackenzie, E.A. : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**, 664, 1980
12) Nagel, C.W., Brekke,C.J. and Leung, H.K. : *J. Food Sci.* **47**, 342, 1981
13) Martin, Gleen E., Dyer, Randolph H. and Figert, Donald M. : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **58**, 1147, 1975
14) Efstathiou, C.H. and Hadjiioannou, T.P. : *Anal. Chem.* **47**, 864, 1975
15) Hodges, K., Kester, W., Wiederrich, D. and Grover, J. : ibid., **51**, 2127, 1976
16) Di Corcia, Antonio and Samperi, Roberto : ibid., **51**, 776, 1979
17) Wachowiak Roman and Connors, Kenneth A. : ibid., **51**, 27, 1979
18) Tanaka, Kay, Hine, David G., West–Dull, Agnes and Lynn, Theodore B. : *Clin. Chem.*, **26**, 1839, 1980
19) 田中多美穂：油化学，30，51，1981
20) 梶原直子，川井英雄，細貝祐太郎：日本食品工業学会誌，28，471，1981

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 107-110, 1983

家庭用品の衛生化学的研究（第8報）
家庭用エアゾール製品中のトリクロロエチレン およびテトラクロロエチレンの分析法について

森　謙一郎*, 雨宮　敬*, 鈴木助治*, 吉原武俊*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (VIII) Studies on Determination of Trichloroethylene and Tetrachloroethylene in Household Aerosols

KENICHIRO MORI*, TAKASHI AMEMIYA*, SUKEJI SUZUKI*and TAKETOSHI YOSHIHARA*

Keywords：トリクロロエチレン trichloroethylene，テトラクロロエチレン tetrachloroethylene，エアゾール aerosols，家庭用品 household necessities

緒　言

家庭用エアゾール製品の噴射剤として，かつて使用されていた塩化ビニールモノマーは，発がん性を有することにより昭和49年使用禁止になった．トリクロロエチレン，テトラクロロエチレンは化学構造上塩化ビニールモノマーと同類の化合物であり，同様に発がん性が証明されているものである．最近これらの物質が一部の家庭用エアゾール製品に使用されていることが明らかになった．このものは沸点がそれぞれ87°，121°であるので，噴射剤としてではなく，溶剤として使用されるものであるが，エアゾール製品に配合された場合噴射剤と同様に経気道吸収される恐れがある[1]．厚生省は近々“有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律”にもとずく規制品目に両物質を追加する予定である[2]．著者らは同規制基準中の試験方法について検討を加え，多少の知見を得たので報告する．

実験方法

試料　昭和57年6月に都内で購入したスプレー剤43検体を使用した．

試薬　トリクロロエチレン標準液：和光純薬製試薬特級品を用い，ヘキサンで希釈して0.10w/v％に調製した．

テトラクロロエチレン標準液：東京化成製試薬特級品を用い，ヘキサンで希釈して0.10w/v％に調製した．

1,1,1,2－テトラクロロエタン内部標準液：東京化成製試薬特級品を用い，ヘキサンで希釈して0.12w/v％に調製した．

操作法[2]

ドラフト内において200m*l*のフラスコを氷冷しつつ，家庭用エアゾールの内容物をフラスコ内に噴出させた．ここに得た試料1.00 gをあらかじめエタノール20 m*l*を入れた100 m*l*バイエルびんに精秤し，これに1,1,1,2－テトラクロロエタン内部標準液1.0 m*l*を加え，セプタムをしめる．30°±3°の水浴中にびんの首まで浸し，ゆるやかに振り混ぜながら30分間加温する．次にこのバイエルびんのヘッドスペースガス3 μlをシリンジにとり，ガスクロマトグラフに注入する－この操作は3回くり返して行なった．また上記の操作法における試料1.00 gの代わりにトリクロロエチレン標準液またはテトラクロロエチレン標準液を各々0.5，1.0，1.5 m*l*をとり，同じ操作に従った．得られたクロマトグラムのピーク高と内部標準物質のピーク高の比をもとめ，また3回測定の平均値をもとめてそれぞれの検量線を作製し試料中の含量を求めた．

ガスクロマトグラフィーの条件はつぎのとおりである．

ガスクロマトグラフ：島津製作所製 GC－4 CM・PFE，カラム：10％シリコン DC－200/shimalite W（60～80 mesh）3 mmϕ×3 m，カラム温度：70°，注入口，検出器温度：180°，キャリアーガス：N_2，30 m*l*/min，

* 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

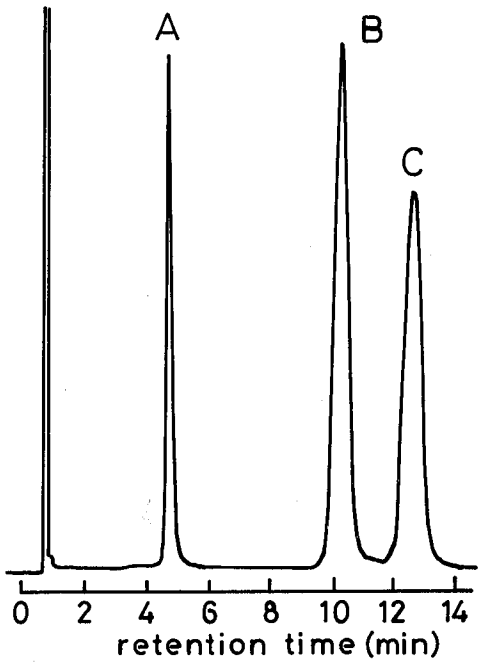


Fig. 1. Typical Gas Chromatogram of Trichloroethylene and Tetrachloroethylene
A : trichloroethylene
B : tetrachloroethylene
C : 1,1,1,2−tetrachloroethane (I. S.)

検出器：ECD ^{63}Ni，感度：10^2 MΩ，32×0.01 V

結果および考察

定性分析について

本法は微量の試料ガスを高感度検出する方法であり，電子補獲型検出器付ガスクロマトグラフィーの特異性を最大限利用したものである．Fig. 1 のガスクロマトグラムに示す様にトリクロロエチレン，テトラクロロエチレンおよび1,1,1,2−テトラクロロエタン（内部標準物質）各ピークの形状，分離度，保持時間の再現性，いずれも良好であり，エタノール，ヘキサン等 ECD に応答のない溶媒はクロマトグラム上にあらわれない．また市販の試料43検体を分析した結果からも，これら3ピークに妨害を与えるものは認められなかった．

定量分析について

再現性の検討 トリクロロエチレンまたはテトラクロロエチレンを各々0.50，1.00，1.50 mg（トリクロロエチレン標準液またはテトラクロロエチレン標準液0.5，1.0，1.5 m*l*）をとり，定量操作に順じて測定した結果を Table 1 に示した．この実験は各添加量に対しバイエルびん4本づつ用い，1びんについて5回の測定を行なったものである．この結果同一びんについての各測定値はトリクロロエチレンについては変動係数3.0～26.3%，テトラクロロエチレンについては変動係数2.6～15.3%を示した．

つぎにTable 1 に示した各濃度についてその第1びんの平均値をプロットして検量線を作成し，この検量線を基準にして，第2～第4びんの各濃度における値を測定した．これを回収率として Table 2 に示したが，トリクロロエチレンでは回収率50～122%と大きい“バラツキ”を示したのに対し，テトラクロロエチレンは比較的変動の少ない値を示した．

再現性に影響を与える諸要因について

ヘッドスペースガスの気液平衡温度：バイエルびんのインキュベーション時の温度は高い程ガスクロマトグラフィーに高感度を得たが，シリンジ採取時にシリンジ内でガスが凝縮液化を起こし，再現性を低下させる．このことにより，インキュベーション温度は室温に近い程再現性良く，また温度は正確である必要が認められた．またインキュベーション時間については30分～5時間以内で一定であり，実用上問題はなかった．

ガス採取シリンジ：液体用シリンジはガスクロマトグラフ注入時に内圧によってガス漏れの可能性があるが，一方ガスタイトシリンジの小容量のもの（10，50，100 μ*l*）は一般に摩擦等の耐久性に乏しく，シリンジによってはガスクロマトグラフへのガス注入後のエアレーションがしにくいものもあった．また注入時セプタムゴムによる針先の目づまりはかなり多くあるので，針先型を横穴式等にする必要があった．

ガスクロマットグラフィーの注入量：本試験法は注入量3 μ*l*であるが，これ以下の少注入量ではガス漏れの問題とともに“手ぎわ”の良否に由来して再現性は低下する．しかし注入量を増加した場合再現性は向上するが，試料スプレー剤の種類によってはクロマトグラム上不明物質の長時間の溶出があり，検出器の汚れ，感度低下等をひきおこし，迅速な分析ができない．

市販検体への適用

市販スプレー剤47検体につき本法を適応したところ2種の潤滑防錆剤よりテトラクロロエチレンが検出され，定量分析の結果含有量はそれぞれ0.06，0.02%であった．

ま と め

本法はヘッドスペース法を主体とする試験法であることから，極めて簡便であり，迅速な検査が可能である．

Table 1. Variation of Relative Recorder Response at Some Added Levels of Trichloroethylene and Tetrachloroethylene

Added vial bottle No.	trichloroethylene 0.50 mg R*		1.00 mg R*		1.50 mg R*	
	0.36	$\bar{R}$= 0.380	0.68	$\bar{R}$= 0.598	0.79	$\bar{R}$= 0.692
	0.42	SD= 0.046	0.72	SD= 0.117	0.71	SD= 0.072
1	0.42	CV=12.2%	0.50	CV=19.5%	0.60	CV=10.4%
	0.39		0.64		0.65	
	0.31		0.45		0.71	
	0.30	$\bar{R}$= 0.264	0.50	$\bar{R}$= 0.640	0.76	$\bar{R}$= 0.698
	0.27	SD= 0.023	0.56	SD= 0.105	0.56	SD= 0.092
2	0.24	CV= 8.9%	0.68	CV=16.4%	0.69	CV=13.1%
	0.26		0.72		0.80	
	0.25		0.74		0.68	
	0.29	$\bar{R}$= 0.282	0.73	$\bar{R}$= 0.634	0.60	$\bar{R}$= 0.632
	0.28	SD= 0.008	0.80	SD= 0.136	0.56	SD= 0.051
3	0.27	CV= 3.0%	0.64	CV=21.7%	0.65	CV= 8.0%
	0.28		0.53		0.68	
	0.29		0.47		0.67	
	0.29	$\bar{R}$= 0.278	0.50	$\bar{R}$= 0.572	0.64	$\bar{R}$= 0.666
	0.29	SD= 0.018	0.36	SD= 0.150	0.64	SD= 0.065
4	0.25	CV= 6.4%	0.59	CV=26.3%	0.59	CV= 9.8%
	0.27		0.66		0.70	
	0.29		0.75		0.76	

Added vial bottle No.	tetrachloroethylene 0.50 mg R*		1.00 mg R*		1.50 mg R*	
	0.79	$\bar{R}$= 0.832	1.53	$\bar{R}$= 1.374	2.44	$\bar{R}$= 2.204
	0.90	SD= 0.068	1.56	SD= 0.191	2.36	SD= 0.186
1	0.89	CV= 8.1%	1.27	CV=14.0%	2.02	CV= 8.5%
	0.84		1.41		2.06	
	0.74		1.10		2.14	
	0.77	$\bar{R}$= 0.740	1.16	$\bar{R}$= 1.378	2.34	$\bar{R}$= 2.052
	0.69	SD= 0.061	1.24	SD= 0.169	1.56	SD= 0.314
2	0.80	CV= 8.3%	1.44	CV=12.2%	2.04	CV=15.3%
	0.66		1.51		2.31	
	0.78		1.54		2.01	
	0.87	$\bar{R}$= 0.842	1.47	$\bar{R}$= 1.372	1.90	$\bar{R}$= 1.904
	0.85	SD= 0.022	1.57	SD= 0.155	1.81	SD= 0.062
3	0.81	CV= 2.6%	1.38	CV=11.3%	1.95	CV= 3.3%
	0.84		1.24		1.89	
	0.84		1.20		1.97	
	0.92	$\bar{R}$= 0.874	1.32	$\bar{R}$= 1.286	1.99	$\bar{R}$= 1.914
	0.90	SD= 0.063	1.05	SD= 0.140	1.71	SD= 0.116
4	0.77	CV= 7.3%	1.29	CV=10.9%	1.98	CV= 6.1%
	0.86		1.42		1.94	
	0.92		1.35		1.95	

R* = relative recorder response (internal standard : 1, 1, 1, 2–tetrachloroethane)

Table 2. Recovery of Trichloroethylene and Tetrachloroethylene

	trichloroethylene		tetrachloroethylene	
added (%)	detected (%)	recovery (%)	detected (%)	recovery (%)
0.05	0.025	50.0	0.048	96.0
	0.031	62.0	0.055	110.0
	0.031	62.0	0.058	116.0
0.10	0.122	122.0	0.096	96.0
	0.121	121.0	0.095	95.0
	0.105	105.0	0.089	89.0
0.15	0.137	91.3	0.146	97.3
	0.120	80.0	0.135	90.0
	0.129	86.0	0.136	90.7

トリクロロエチレン，テトラクロロエチレンの定性的検出に対する信頼度は高い，しかし定量分析については，ヘッドスペース法の宿命として，かなりの誤差を考慮する必要がある．したがって特に違反検体の測定にあたっては試験のくりかえし回数をふやし，変動係数を観察し，その誤差を最小限に保った良好な条件下で測定を行なう必要があると考えられる．

文　献

1) 家庭用品から発生する有機溶剤の種類とその気中濃度に関する調査研究報告書　東京都生活文化局　昭和58年1月

2) 家庭用品安全対策行政担当係長会議資料　厚生省環境衛生局家庭用品安全対策室　昭和58年3月

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 34, 111-114, 1983

家庭用品の衛生化学的研究（第9報）
繊維製品のホルムアルデヒド分析における妨害色素の活性炭素による除去について

雨宮　敬*，森　謙一郎*，鈴木助治*，吉原武俊*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (IX)
Removal of Color Materials Interfering on Formaldehyde Analysis for Cloth Samples with Activated Charcoal

TAKASHI AMEMIYA*, KENICHIRO MORI*, SUKEJI SUZUKI* and TAKETOSHI YOSHIHARA*

Keywords: ホルムアルデヒド formaldehyde, 活性炭素 activated charcoal, 脱色操作 decoloring method, 家庭用品 household necessities

緒　言

ホルムアルデヒド（HCHO）の分析法としてアセチルアセトン法（AA法）[1,2]は，感度，再現性および操作の簡便さにおいてすぐれた方法であり，現在，繊維製品中のHCHOの分析法として，「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律[3]」（以下，家庭用品規制法と略す）で公定法として採用されている．この方法は，繊維製品を40°の水で1時間抽出し，得られた試験溶液をAA法で414 nmにおける吸光度を測定するものである．われわれは日常業務として繊維製品のHCHOを分析しているが，これらのなかには下着，寝衣，手袋，乳幼児用品等，カラフルに染色されているものがあり，40°の水の抽出操作によって試験溶液が例えば赤，桃，黄，青などに着色することが認められる．乳幼児用の繊維製品の場合，家庭用品規制法ではHCHOの規制値が吸光度として0.05（HCHOとして約15 ppm）以下と定められている．そのため試験溶液が特に黄色に着色し，HCHO含量が基準値に近い時は，図1に示すようにHCHOのスペクトルの確認がかなり困難であり，AA発色溶液とブランクの吸光度の差をとって数値化するとき，真にそれがHCHOに由来するかどうか判断しがたいときがある．さらに，試験溶液の着色の度合が大きくなるほど，色素の妨害でその定量性が問題となってくる．

また，最近，著者らは市販のマーキングペンのHCHO含有量を調査し[4]，布への塗付実験を行って，HCHO溶出量を調べたが，水性ペンでは抽出液が強く着色し，公定法による測定が困難なものやスペクトルの確認が不可能なものがみられ，試験法の改良が必要とされた．

そこで，このような問題を解決するため，活性炭素を用いて着色した試験溶液の脱色操作を詳細に検討したので報告する．

実験方法

1. 試薬　HCHO：日本薬局方ホルマリン（含量37%以上），その他の実験に用いた試薬は，すべて和光純薬工業製の特級を用いた．HCHO標準液（4 μg/ml），AA試液およびその他の試液は，家庭用品規制法の「HCHO」の項に従って調製した．活性炭素：粉末（和光純薬工業）．色素：食用黄色4号（タートラジン），食用赤色2号（アマランス），食用青色2号（インジゴカルミン）

2. 装置　自記分光光度計（日立製作所製EPS-3T形）

3. 試料　繊維製品およびマーキングペンは，1982年10月に東京都内で購入したものである．繊維製品は，生後24か月までの乳幼児が着用するものである．また，マーキングペンは水性であり，黄，赤，黒，青，緑の5種の色調のもので，その本体のデザインなどから判断すると子供用である．

4. 操作法

試験溶液の調製　繊維製品：試料を細切し，その2.5 gを200 mlの共栓試験管にとり，水100 mlを加えたのち，40°（±2°）の水浴中で時々振り混ぜながら1時間抽出

* 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, Hyakuninchō 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

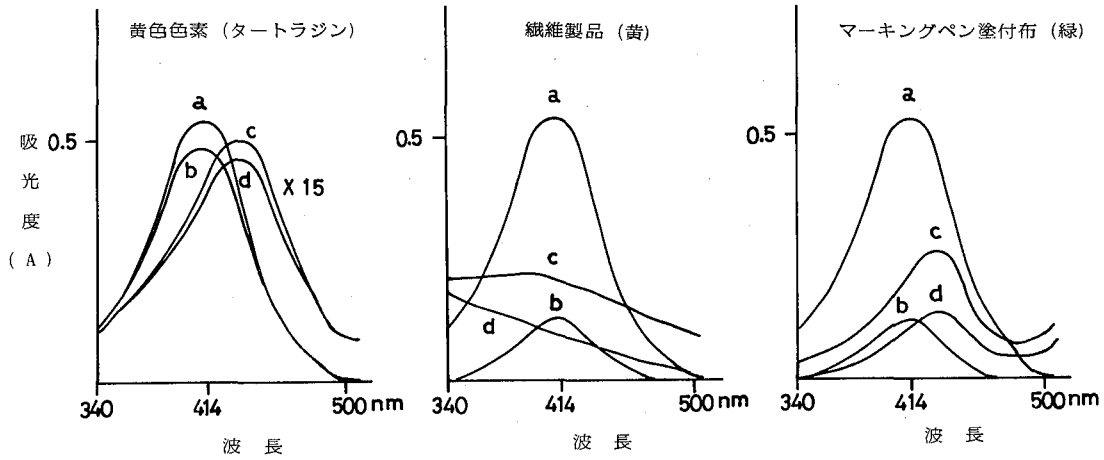


図1. 脱色操作後のAA発色スペクトル
a：HCHO 20 μg　b：脱色後　c：脱色前　d：着色ブランク

する．つぎに，この液をガラスろ過器（G 2）を用いて温時ろ過し，試験溶液とする．

マーキングペン：各色調のものを10×10 cmの大きさに切ったサラシ布地に通常の筆記状態でむらのないように塗り，1時間風乾した．風乾後，細切した試料1.0 gをとり，以下繊維製品と同様に抽出操作し，試験溶液とする．ここに得た溶液が着色し，活性炭素処理で試験溶液を調製する場合には，今回検討した脱色操作（図4）に従って行うことにする．

AA比色法　HCHOの測定は家庭用品規制法のHCHOの項に従って行う．すなわち，試験溶液5.0 mlをとり，AA試液5.0 mlを加えて振り混ぜ，40°の水浴中で30分間加温し，30分間室温で放置後，空試験溶液を対照として414 nmにおける吸光度を測定する．別にHCHO標準液5.0 mlをとり，同様に操作して吸光度を測定し，公定法に示す式から数値化して試料1 g中のHCHOの濃度を求めた．

結果および考察

AA法における試験溶液が着色している場合，色素の脱色は基本操作として活性炭素処理を中心に考えたので，その操作の条件について検討を行った．

1. バッチ法およびカラム法による活性炭素処理　まず，活性炭素のカラムクロマトグラフィーについて検討した．すなわち，活性炭素としてはクロマトグラフ用および粉末の2種類を用い，各々0.5，1.0 gを内径10または20 mmのカラム管に水を用いて充填した．これにHCHO 20 μg，黄色色素（タートラジン）5 mgを含む水溶液5 mlを添加してカラム法の適否をみたところ，粉末の活性炭素では，すぐに目詰まりをおこし操作が困難であった．また，クロマトグラフ用もHCHOを回収するのに溶出液が25 mlになるまで水を流す必要があり，いずれの場合も完全に脱色されず，溶出液が黄色を呈した．つぎに，バッチ法については，やはりカラム法の場合と同様に2種類の活性炭素を用い，HCHO 60 μg，黄色色素5 mgを含有する水溶液（HCHO濃度4 ppm）を加え，30秒間振とう，脱色，ろ過の順で操作して検討したところ，粉末の活性炭素処理の方が完全に脱色され，操作も簡便に行うことができた．この際，AA法で5 mlの試験溶液を要することを考えると，活性炭素に添加すべき試料溶液の液量は15 ml以上必要であった．また，ろ過に用いるろ紙（東洋ろ紙）は，一般用のNo 5A，5Bよりも微細沈殿物用のNo 5Cが最適であった．したがって，活性炭素処理はバッチ法で，粉末活性炭素を用い，試験溶液の液量は15 ml，ろ過に用いるろ紙はNo 5Cと設定し，以下の検討を行った．

2. 脱色に必要な活性炭素量　黄色色素（タートラジン）を用いて，この色素の脱色に必要な活性炭素の使用量を検討した結果を図2に示す．すなわち，色素15 mgに対して活性炭素0.25 g以下では脱色不能であったが，0.5 g以上では完全に脱色された．しかし，HCHOの回収性は，活性炭素を増加するに従って低下することがわかった．また，活性炭素0.5および0.75 gのHCHO回収性は，良好であり，一定していた．以上のことから必要な活性炭素量は0.5 gが適切であり，この条件下の色

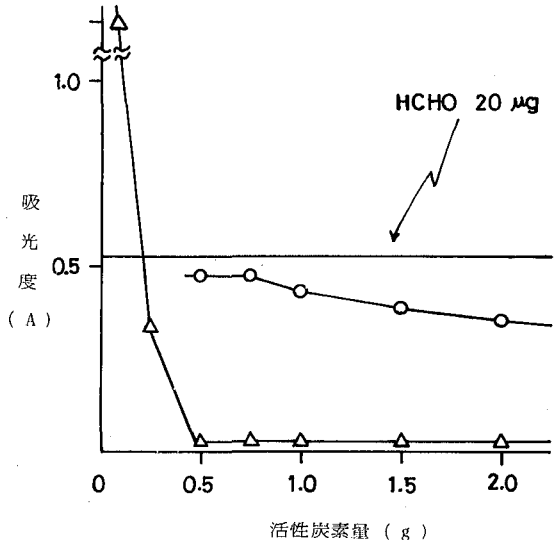


図2.　黄色色素の脱色に要する活性炭素量
活性炭素処理：バッチ法，試料溶液量：15 m*l*,
試料溶液：黄色色素（タートラジン）15mg + HCHO 60 μg,
——○——：処理後の HCHO の AA 発色,
——△——：処理後の残留色素，A：414 nm の吸光度

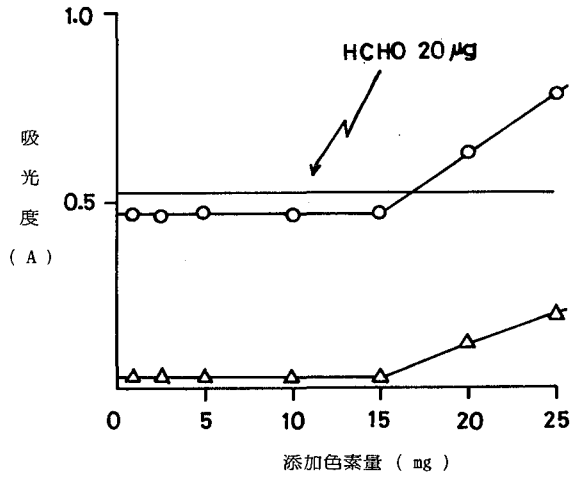


図3.　活性炭素0.5 g における黄色色素の脱色効果
活性炭素処理：バッチ法，試料溶液量：15 m*l*,
試料溶液：黄色色素（タートラジン）15 mg + HCHO 60 μg,
——○——：処理後の HCHO の AA 発色,
——△——：処理後の残留色素，A：414 nm の吸光度

素量は，通常の試験溶液の着色に比べて極めて多量であることから，実際上十分脱色できると考える．従って活性炭素量を0.5 g と設定することにした．

3. 活性炭素0.5 g における脱色効果　黄色色素（タートラジン）を用いて，これを0.5－25 mg まで添加し，活性炭素0.5 g の脱色能力をみたところ，図 3 のような結果を得た．図 3 に示すように黄色色素20 mg 以上では脱色されなかったが，15 mg 以下ならば完全に脱色され，限界は15 mg であることがわかった．やはり活性炭素 0.5 g で共存色素の除去は十分と考える．

4. 添加回収実験　今回検討した条件設定の結果から，図 4 に示すように AA 法における脱色操作を設定し，ここで，黄色色素（タートラジン），赤色色素（アマランス），青色色素（インジゴカルミン）をモデルとし，HCHO の添加回収実験を行った．すなわち，HCHO 15, 30, 60 μg のレベルに対して各色素を 5 mg ずつ含有するように試験溶液15 m*l* を調製し，図 4 の脱色操作に従って検討した．同時に HCHO 60 μg を標準として同様に操作して，公定法に従って測定値の数値化を行った．その結果，表 1 に示すように各レベルでほぼ良好な回収

試料　1.0－2.5 g
　水100 m*l*
40° 1 時間抽出
温時ろ過（G 2 フィルター）
試験溶液　15－20 m*l*
　活性炭素0.5 g
脱色，30秒間振とう
ろ過（No 5 C フィルター）
　ろ液 5 m*l* をとる
AA 法
可視部測定（414 nm）

図4.　AA 比色分析における脱色操作

率が得られ，変動係数も 5 %以下であった．この際，スペクトルから HCHO の吸収が確認できた．その例を図 1 に示す．従って，HCHO 分析に図 4 の脱色操作を組み入れても定量性はそこなわれないと考える．

表1. 添加回収実験[1]

色素[2]	HCHO 添加量 (μg)	回収率(%)[3]	変動係数(%)
黄色色素	15	91.6	1.1
黄色色素	30	90.7	3.7
黄色色素	60	90.0	1.5
赤色色素	30	91.5	3.9
青色色素	30	92.1	1.5

1) 活性炭素量：0.5 g，試験溶液：15 m*l*
2) 色素添加量： 5 mg 3) 5回繰返し実験の平均値

表2. 実際試料の HCHO 分析例

試料	溶出色素	試料量(g)	本法(ppm)	公定法[2](ppm)
マーキングペン塗付布[1]	赤	1.0	54.0	*[3]
マーキングペン塗付布[1]	青	1.0	48.0	45.7
マーキングペン塗付布[1]	青	1.0	44.0	38.9
マーキングペン塗付布[1]	緑	1.0	84.0	85.3
マーキングペン塗付布[1]	黒	1.0	32.0	26.7
マーキングペン塗付布[1]	黄	1.0	60.0	*[3]
乳幼児服	青	2.5	32.0	30.8
乳幼児服	黄	2.5	14.4	13.8
乳幼児服	黄	2.5	18.6	17.4
乳幼児服	赤	2.5	18.4	16.8

1) マーキングペンを塗付した布（10×10cm画）で，いずれも色素が強く溶出した．
2) 着色試験溶液をブランクとして，AA 発色液との吸光度の差をとり数値化した．
3) 色素の強い溶出のため，公定法では測定不能であった．

5. 実際試料への応用 本脱色操作を表2に示す乳幼児用衣服およびマーキングペン塗付試料の HCHO 分析に適用したところ，公定法では溶出色素の妨害のため測定不可能であった黄や赤のマーキングペン塗付試料でも定量することができた．また，他の塗付布においても試験溶液が強く着色したが，図1に示すように HCHO の極大吸収が確認できた．黄色に着色した乳幼児用衣服も図1に示すように微量の HCHO を確認することができた．従って本操作は，実際の試料に十分適用できると考えられる．

ま と め

今回検討した脱色操作は，活性炭素0.5 g を用い，バッチ法で処理すると簡便に妨害色素の除去ができ，HCHO の確認と定量測定に適用できることがわかった．特に公定法で測定不可能な黄色や赤色の着色のときに有効である．

謝辞 本研究を行うにあたり多大な御協力をいただいた東京都衛生局薬務部薬事衛生課家庭用品担当乙益励三郎氏ならびに大角悦子氏に深謝いたします．

文 献

1) 衛生試験法注解，664，(1980)，金原出版，東京
2) 小嶋茂雄，大場琢磨：分析化学，**24**，294，1975
3) 家庭用品規制関係実務便覧，第一法規出版，東京
4) 鈴木助治，雨宮 敬，森 謙一郎，吉原武俊：東京衛研年報，**34**，115，1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 34, 115-119, 1983

家庭用品の衛生化学的研究（第10報）
布地染色用マーキングペン中のホルムアルデヒドについて

鈴木助治*, 雨宮　敬*, 森　謙一郎*, 吉原武俊*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (X)
Formaldehyde in Commercial Oil Base and Water Base Marking Pens Used for Dyeing of Cloth

SUKEJI SUZUKI*, TAKASHI AMEMIYA*, KENICHIRO MORI* and TAKETOSHI YOSHIHARA*

Keywords : ホルムアルデヒド formaldehyde, 油性マーキングペン oil base marking pen, 水性マーキングペン water base marking pen, マーキングペン marking pen, 家庭用品 household necessities

緒　言

市販のマーキングペンは，通称「マーカー」といわれる文具類の一種であり，学校や家庭において個人が使用する日用品である．従って，有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律[1]（以下家庭用品規制法と略す）で一般消費者の生活の用に供される製品と定義されている家庭用品に属すると考える．マーキングペンの生産出荷量は非常に多く，年間約9億本といわれ，その材質上の品質などはＪＩＳ規格[2,3]によって定められている．従来，これらのものは名前書きなどの筆記用具として主に黒色インキのマーキングペンが多く用いられていたが，現在では繊維製品専用の表示にみられるように，繊維製品にサインや図画の記入にも使用されており，その利便性，用途の拡大と共に多種多様の色調のものや使用目的をもつ製品が市販されている．最近われわれはこれらの流通販売されているマーキングペンの一部のものから高濃度のホルムアルデヒド（HCHO）を検出した．家庭用品におけるHCHOの含有量の規制は，上記法律に基づき下着，寝衣，手袋などの繊維製品またはつけまつげ，かつらなどの接着剤に限って実施されているが，マーキングペンは規制の対象になっていない．

そこで，市販マーキングペンの実態調査を目的とし，145種のマーキングペンについてHCHOの含有量を測定した．また，繊維製品への利用を考慮して塗付実験を行い，HCHOの残存量の調査を行った．

実験方法

1. 試薬　HCHO：日本薬局方ホルマリン，その他の実験に供した試薬は特級を用いる．HCHO標準液（4 μg/m*l*），アセチルアセトン試液および他の試薬の調製は家庭用品規制法[1]の「ホルムアルデヒド」の項に従って行う．

2. 装置　自記分光光度計：日立製作所製ＥＰＳ－３Ｔ形

3. 試料　昭和57年6月に東京都内の文房具店より購入したマーキングペン145種，また，メーカーより提供されたマーキングペン用インキ1種，ペン先8種，吸収体7種を試料とした．

4. 試験法　HCHOの分析は主として公定法である家庭用品規制法[1]の「ホルムアルデヒド」の項に従う．

4－1　水蒸気蒸留法　145種のマーキングペンについては，ペン先を取りだすか，または容器の先端部分を切断してペン内部にあるインキが含浸した吸収体を取り出し，これを圧してガラス製サンプリングボート上にインキをしぼり0.5－2.0ｇを秤取する．また，ペン先，吸収体については，これを細切し2.0gを秤取する．これらの試料を二径フラスコに入れ，水50m*l*およびリン酸溶液3 m*l*を加えたのち，留液が190m*l*になるまで水蒸気蒸留を行い，水を加えて200m*l*とし，試験溶液とした．

4－2　溶出試験　ペン先，吸収体は細切して2.0gを秤取し，40°の水100 m*l*で1時間溶出する．これをＧ2

* 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, Hyakuninchо 3 chome, Shinjuku–ku, Tokyo, 160 Japan

表1．　市販マーキングペン中のホルムアルデヒドの検出例

試料	色調	油性・水性	用途	メーカー	HCHO 含有量[1] (ppm)
A 1	黒	油性	名前書き用	A	5090
A 2	黒	油性	名前書き用	A	4500
A 3	黒	油性	名前書き用	A	4110
A 4	黒	油性	名前書き用	A	2630
A 5	黒	油性	名前書き用	A	2010
A 6	黒	油性	布地用	A	2180
A 7	黒	油性	布地用	A	58
B 1	赤	無表示*	布地用	B	1980
B 2	黒	無表示*	布地用	B	1880
B 3	黒	無表示*	布地用	B	1380
B 4	青	無表示*	布地用	B	1600
B 5	橙	無表示*	布地用	B	926
B 6	紫	無表示*	布地用	B	1260
B 7	緑	無表示*	布地用	B	1660
B 8	黄	無表示*	布地用	B	1670
B 9	茶	無表示*	布地用	B	1790
B10	黒	無表示*	布地用	B	67
C 1	黒	油性	布地用	C	1450
C 2	黒	油性	布地用	C	1050
D 1	黒	油性	名前書き用	D	3100
D 2	黒	油性	名前書き用	D	2630
D 3	黒	油性	名前書き用	D	1500
D 4	黄，黒	水性	絵書き用	D	210
D 5	茶，青	水性	絵書き用	D	388
D 6	緑，赤	水性	絵書き用	D	412
E 1	茶	無表示	布地用	E	351
E 2	橙	無表示	布地用	E	294
E 3	茶	無表示	布地用	E	306
F 1	黒	油性	一般用	F	2080
F 2	黒	油性	一般用	F	365
G 1	黒	油性	一般用	G	424
G 2	黒	油性	名前書き用	G	68
H	黒	水性	絵書き用	H	169
I	青	油性	一般用	I	85
J 1	緑	油性	一般用	J	837
J 2	黄	油性	一般用	J	411
J 3	青	油性	一般用	J	406
J 4	青	油性	一般用	J	405
J 5	青	油性	一般用	J	120
J 6	赤	油性	一般用	J	81

1）水蒸気蒸留法で測定したインキ中の含有量を示す．

*：水溶性インキであり，水性ペンと判断する．また，これらのペンは内部に吸収体を有せず，インキそのものが内蔵されている．

表2．マーキングペン塗付布中のホルムアルデヒド残存量

試料	HCHO 残存量 (ppm) [1]	
	塗付後1時間放置	塗付後24時間放置
A 4 *	126	55
A 5	90	36
A 6 *	303	73
B 3	609	19
B4	204	56
B5	310	36
C 1 *	112	102
C 2	102	44
D 4	71	14
D 5	11	6
D 6	6	ND
E 1	64	25
E 2	33	48
E 3	39	23
F 1	149	61
G 1	12	ND
H	50	13
I	24	ND

1）データは溶出試験3回の平均値を示す．
ND：不検出
* 洗濯実験における HCHO 残存量が15 ppm 以上のものを示す．A 4 ：15 ppm，A 6 ：17 ppm，C 7 ：25 ppm

ガラスフィルターを用いてろ過し，試験溶液とした．

塗付実験 4−1の水蒸気蒸留法で HCHO を検出したマーキングペンと同種のものについて，さらし布（20×20cm 画）に筆記状態で出来る限り均一に塗付し，室温（約24°）に放置する．塗付のち1時間および24時間放置した布を2.5 g づつ3つの試料に分割，秤取し，溶出試験を行い，試験溶液を調製した．

なお，水性マーキングペンの塗付実験においては，試験溶液が強く着色するものがあり，アセチルアセトン法による定量において HCHO の極大吸収（414nm）が確認されず，測定が困難であったため，活性炭素処理[4]で脱色したのち分析を行った．

洗濯実験 塗付のち24時間放置の布を分液ロートに入れ，中性洗剤0.5 g を含む水300 m*l* の溶液を加え3分間振とう洗浄し，ついで水300 m*l* で3回振とう水洗する．布をしぼって脱水し，30−32° で1時間乾燥する．この塗付布を2.5 g づつ3つの試料に分割，秤取し，溶出試験を行い，試験溶液を調製した．

4−3 アセチルアセトンによる定量法 試験溶液5.0m*l* をとり，アセチルアセトン試液5.0m*l* を加えて振り混ぜ，40° の水浴中で30分間加温し，30分間放置後，空試験溶液を対照として414nm における極大波長で吸光度を測定する．別に HCHO 標準液5.0m*l* をとり，以下同様に操作して吸光度を測定し，公定法に示す式から数値化して試料1 g 中の HCHO の濃度を求めた．

結果および考察

1. 市販マーキングペンの HCHO 含有量

水蒸気蒸留法によって市販マーキングペン145種のインキ中の HCHO 含有量を測定したところ，全体の27％に相当する40種のペンから検出され，最高5090，最低58ppm，平均1298ppm も含有していた（表1）．

145種のマーキングペンを用途別に分類すると，布専用や名前書きなどの表示があり，布に使用可能とうたっている布地用が65種，可能性の少ない一般用が80種である．HCHO を含有するペンは布地用65種中25種40％に相当し，高い検出率を示した．そのうちの19種については，表1に示すように HCHO 含有量が1000ppm 以上と高濃度であった．これに対して一般用80種中 HCHO が検出されたペンは，15種17％にすぎず，かつその含有量も布地用よりかなり低濃度であった．従って，HCHO 含有量および検出率ともに布地用マーキングペンの方が一般用のものに比べて高い傾向がみられた．

2. 塗付布中の HCHO 残存量

HCHO 含有マーキングペンは，布地用に多いことが明らかになったが，これらを繊維製品に使用した場合，HCHO が展着，残留することが予想される．そこで，ペンを筆記状態で使用して布に塗付し，HCHOがどの程度残留するかを検討した．

表2に18種のペンについて行った塗付実験の結果を示す．塗付のち1時間放置は塗付直後の状態を示すものと考えられ，この条件では HCHO 残存量がかなり高濃度であった．現在，家庭用品規制法[1]においては，繊維製品の HCHO 規制値が24ケ月以内の乳幼児用は吸光度0.05（濃度として約15ppm）以下，その他の子供用，大人用は75ppm 以下と定められている．表2に示すように，塗付のち1時間放置では75ppm 以上の HCHO が残存しているものが9種認められ，90−609ppm，平均223ppm であった．また，15以上75ppm 以下が6種あり，24−71ppm，平均 47ppm の HCHO が残存していた．これら15種のペンのうち11種が布地用である．塗付のち24時間放置については，E 2 の1例を除くと，1時間放置

表3．マーキングペン用のペン先，吸収体中のホルムアルデヒド含有量

試料	材質		HCHO 含有量 (ppm)	
	繊維樹脂	固定用樹脂	水蒸気蒸留法	溶出試験
ペン先	ポリエステル	メラミン	14200	31
ペン先	ポリエステル	メラミン	1550	6
ペン先	アクリル	メラミン	863	22
ペン先	アクリル	メラミン	705	7
ペン先	フエルト(再利用繊維)	—	53	ND
ペン先	ポリエステル	ウレタン	ND	ND
ペン先	ポリエステル	ウレタン	ND	ND
ペン先	ナイロン	ウレタン	ND	ND
吸収体	羊毛フエルト	メラミン	35900	2540
吸収体	ポリエステル	メラミン，ウレタン	3360	7
吸収体	ナイロン	ウレタン	ND	ND
吸収体	ポリアセタール	—	ND	ND
吸収体	ポリエステル	—	ND	ND
吸収体	ポリエステル	—	ND	ND
吸収体	ポリエステル	—	ND	ND

ND：不検出

に比べて HCHO 残存量が減少し，ND–102ppm，平均34ppm であったが，C 1 の 1 種が75ppm 以上，他の11種も 15ppm 以上と HCHO が検出され，残存量はやはり布地用ペンに多いことがわかった．

なお，表 2 に示した18種のマーキングペンについて，塗付のち24時間放置してから洗濯実験を行い HCHO の残存量を調べたところ，15種は検出されなかったが，A 4，A 6，C 1 の 3 種は15，17，25ppm と規制値 15ppm を超える HCHO の残存が認められた．

以上の結果から，これらのマーキングペンを衣料品に使用した場合，実際上かなり長時間規制値を超えて HCHO が残留する可能性があり，保健衛生上の見地からみて少なからず問題があると考える．

3. HCHO の原因物質に関する考察

マーキングペンインキ中の HCHO の存在は，①ペンの材質から溶出する，②インキ自体に含有するの 2 点に起因すると考えられる．まず，①については，ペンが構造上合成樹脂製のペン先と吸収体より成り立っていることを考え，表 3 に示すようにペン先，吸収体の HCHO を分析した．水蒸気蒸留法で調べた場合，いずれも繊維固定用にメラミン樹脂を使用しているとき，高濃度の HCHO が検出された．

しかし，溶出試験では羊毛フェルトの吸収体(2540ppm)を除いてほとんど認められなかった．さらに，フエルトペンの溶剤[5]として通常用いられるヘキサン，アセトン，トルエンの等量混合溶媒で，表 3 に示す14200ppm のペン先，35900および3360ppm の吸収体を 3 時間浸漬し，この液でさらし布に塗付して30分間風乾のち，直ちに溶出試験したところ，いずれも HCHO を検出しなかった．また，実際のマーキングペン 2 種（黒，油性，一般用）において，水蒸気蒸留法で吸収体，インキいずれも検出されず，ペン先のみ1730，4430ppm の HCHO が確認されたものについて筆記状態で塗付実験を行ったが，それぞれ10，6 ppm とわずかに HCHO の溶出が認められたにすぎなかった．従って，①の材質に起因する可能性は少ないと考えられる．

つぎに，②については，表 1 に示すC 1 の原料インキ（黒，油性，HCHO 1590ppm）を検討した．すなわち，インキ（3.2g）を活性炭素のカラムクロマトグラフィーを行い，$CHCl_3$, MeOH, 水の順に流し 3 つの分画にわけた．各分画を水蒸気蒸留法で試験したところ，$CHCl_3$ 分画に3940ppm の HCHO が検出されたが，他の分画は HCHO 含有量が低かったので，この分画に HCHO の本体が存在すると推定された．このものは $CHCl_3$ に易溶，水に不溶で固形をなす．IR ($CHCl_3$), ν max 3400, 1600, 1330, 1160cm^{-1}), ^{1}H－NMR ($CDCl_3$) 〔δ 3.38 (s), 7.0～7.5 (m) ppm，日本電子社製FX－270NMR装置〕，^{13}C－NMR 〔δ 73.8 (t), 125～130ppm〕のデー

タから例えばトルエンスルホン酸アミドホルムアルデヒド樹脂[6]のようなものが推察される．つぎに，表1に示すB8（黄）は，$CHCl_3$に不溶，水に易溶であり，水性インキと判断できるもので，これについて検討した．B8インキ（2.2g）をとり，加水して活性炭素（1g）のバッチ法で処理後アセチルアセトン比色法で測定したところ，ろ液に1400ppmのHCHOが検出され，クロモトロプ酸による定性分析[7]でもHCHOの存在が認められた．

以上の結果から，マーキングペン中のHCHOは材質に由来するものでなく，インキ自体に起因すると推定される．この場合，例えばC1の油性ペンでは，「どんなものにも使用できる」とか，洗濯時などインキの脱落を防止する等の目的のため，展着剤として加工した低重合ホルムアルデヒド樹脂に原因すると思われる．また，B8の水性ペンのような場合には，防腐剤として遊離HCHOの添加が考えられる．防腐剤として用いるHCHOは，500ppm以上[7]の濃度で効果があり，表1のB1－B9のインキはHCHO含有量が926－1980ppmでその可能性が大きいと思われる．

まとめ

今回の調査によって市場で流通販売されているマーキングペンの一部に高濃度のHCHOが存在することが明らかになった．これらのマーキングペンのなかには，「無毒」，「万一，お子さまがなめても全く心配ありません」，「手や体につけてもかぶれない」の表示がなされているものがあるが，実際上，衣料品にサインや図画の記入に使用した場合にかなりのHCHO汚染が生ずるものと考えられる．塗付実験の結果から，その場合に繊維製品に相当長い時間規制値を超えてHCHOが残留すると推定される．このようなことからマーキングペンにHCHOが存在することは，保健衛生上の見地から問題があると云えよう．なお，このマーキングペンのホルムアルデヒド問題により上記の「無毒」等の表示が自粛されるにいたった．

謝辞 本研究にあたり終始御協力いただいた衛生局薬務部薬事衛生課家庭用品担当，乙益励三郎氏ならびに大角悦子氏に深謝致します．

文献

1）家庭用品規制関係実務便覧，第一法規出版，東京
2）ＪＩＳ　S6037，日本規格協会，東京
3）ＪＩＳ　S6038，日本規格協会，東京
4）雨宮　敬，森謙一郎，鈴木助治，吉原武俊：東京衛研年報，34，111，1983
5）家庭用品から発生する有機溶剤の種類とその気中濃度に関する調査研究報告書，13，1983，東京都生活文化局
6）プラスチックハンドブック，857，1973，朝倉書店
7）衛生試験法注解，682，1980，金原出版

報　　文 Ⅲ

食品等に関する調査研究

REPORTS Ⅲ

PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 121-125, 1983

生カキが原因食品と推定された毒素原性大腸菌食中毒2事例の調査成績

甲斐明美*, 伊藤武*, 斎藤香彦*, 柳川義勢*, 稲葉美佐子*,
高橋正樹*, 松下秀*, 工藤泰雄*, 坂井千三*, 篠原楷**

Two Outbreaks of Oyster-associated Food Poisoning Due to Enterotoxigenic *Escherichia coli* 027 : H7

AKEMI KAI*, TAKESHI ITOH*, KAHIKO SAITO*, YOSHITOKI YANAGAWA*,
MISAKO INABA*,
MASAKI TAKAHASHI*, SHIGERU MATSUSHITA*, YASUO KUDOH*,
SENZO SAKAI* and TADASHI SHINOHARA**

In December 1980 and January 1981, two outbreaks of oyster-associated food poisoning due to enterotoxigenic *Escherichia coli* 027 : H7 occurred in Tokyo.

In the first outbreak, 138 (41.4%) out of 333 persons between the age of 15 and 65 became ill with gastrointestinal symptoms after eating raw oysters at a restaurant. The mean incubation period was about 33.5 hours. The major symptoms observed in the patients were diarrhea (85.5%), abdominal pain (56.5%), nausea (52.2%) and chill (42.8%). Enterotoxigenic *E.coli* 027 : H7 were isolated from 24 (30.4%) of 79 fecal specimens.

In the second outbreak, 36 (57.1%) of 63 persons between the age of 19 and 40 also developed gastrointestinal symptoms after eating raw oysters at a restaurant. The mean incubation period was about 31.7 hours. The major symptoms were diarrhea (88.9%), abdominal pain (77.8%), nausea (75.0%) and vomiting (61.1%). Enterotoxigenic *E.coli* 027 : H7 were isolated from 5 (41.7%) of 12 fecal specimens of patients.

E.coli 027 : H7 organisms isolated from the two outbreaks produced heat-stable enterotoxin (ST) alone.

Keywords : Enterotoxigenic, *Escherichia coli*, Food poisoning, Oyster

緒　言

腸炎起病性大腸菌による食中毒は，1967年～1980年までの14年間に東京都内で74事例が確認されている．

これらの腸炎起病性大腸菌食中毒のうち，感染経路を特定できたのは74事例中56事例で，その77％にあたる43事例は食品に起因するものであった．原因食品としては，会社・学校・寮などで提供された給食，あるいは飲食店などでの会食料理と推定されるものが多いが，ほとんどの場合その食品の内容までは明らかにされていない．

著者らは，今回生カキを原因食品とした毒素原性大腸菌による食中毒例2事例を明らかにしたので，本例の概要を報告するとともに，カキによると推定される原因不明食中毒についても考察を加えた．

被検材料および方法

1　**被検材料**　カキによる食中毒と推定される2事例の患者ふん便および同時喫食者で非発病者のふん便，そして調理従業員のふん便を対象に菌検索を実施した．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中に入れ，直ちに当研究所に送付されたものである．

原因食品は，調査時に残品の保存がなかったので，菌検索を実施できなかった．

2　**病原菌の検索**　被検材料の直接分離培地として，

* 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

SS寒天，DHL寒天，マッコンキー寒天，TCBS寒天，ビブリオ寒天，卵黄加マンニット食塩寒天，ポリミキシン加CW寒天，スキローの血液寒天，カナマイシン加卵黄CW寒天を，増菌培地として，塩化ストロンチウム培地，2％食塩加アルカリペプトン水，エルシニア増菌用リン酸緩衝液，カンピロバクター増菌用CEM培地[1]，チオグリコレート培地を用いて，赤痢菌，サルモネラ，腸炎起病性大腸菌，エルシニア，プレシオモナス，エロモナス，ビブリオ，黄色ブドウ球菌，セレウス菌，カンピロバクターおよびウエルシュ菌などの腸炎起病性細菌を対象に検索を実施した．

大腸菌の分離・同定は，37℃，18～24時間培養したDHL寒天平板より，出現した集落を5コロニーずつ釣菌し，TSI寒天およびLIM培地を用いて予備同定試験を行い，更に詳細な生化学的性状を試験して，Cowan & Steel[2] の記載に従って同定した．分離・同定した大腸菌については，後述する方法で血清型別と毒素産生試験を行った．

3　血清型別試験　分離した大腸菌のO抗原は，市販の病原大腸菌診断用抗OK血清および抗O血清を用いて，常法に従いスライド凝集反応および試験管内凝集反応により型別した

大腸菌のH抗原型別試験には，当所で標準株を用いて自家作成したH 1～H 56の抗H血清を用いた．被検菌をクレーギー管を用いてその運動性を増強させた後，Hブイヨン（Difco）で37℃，5～6時間培養し，0.6％ホルマリン加生理食塩液を本培地に同量加えてH抗原液とした．本抗原液を用いて，試験管内凝集反応により，H抗原型を決定した．

4　大腸菌毒素産生試験　分離した大腸菌について易熱性毒素（heat-labile enterotoxin, LT）および耐熱性毒素（heat-stable enterotoxin, ST）の検査を行った．

三角コルベン（100 *ml* 用）に，Evansらのカザミノ酸と酵母を主体とした毒素産生用培地[3] 10 *ml* を分注し，本培地に供試菌を接種後，37℃で18～20時間振とう培養した．培養菌液は，12,000 r.p.m. で20分間冷却遠心し，その遠心上清をメンブランフィルター（孔径0.45 μm）でろ過・除菌して毒素検査用試料とした．LTは逆受身赤血球凝集反応法[4] により，STは乳のみマウス胃内投与法[5] により調べた．

成　　績

1　事例1の疫学・細菌学的成績

疫学調査成績：1980年12月19日～20日にかけて東京都内の某ホテルで，18グループの531名が会食を行った．そのうち，8グループの333名中138名が20日～23日にかけて食中毒症状を呈した．発病率は41.4％である（表1）．

患者の主要症状は表2に示すように，下痢（86％），腹痛（57％），嘔気（52％），悪感（43％）および嘔吐（34％）である．下痢は118名に認められ，軟便～水様便で，その回数は3回以下が60名，4～7回が31名，8回以上が14名であった．粘血便は認められていない．腹痛は下腹部痛であった．嘔吐は，47名にみられ，その回数は3回以下が31名，4～6回が6名であった．発熱は40名に認められ，38℃未満が16名，38℃以上が8名であった．

潜伏時間は図1に示すように，3～64時間で平均33.5時間のほぼ一峰性のピークを示した．予後は良く，3日以内にほぼ全員が回復した．

喫食状況調査により，食中毒の発生した8グループに共通した料理は生カキの殻付レモンカクテルであること，同一料理内容で生カキがメニューからはずされていた2グループからは発病者がいないこと，および喫食状況マスターテーブルの結果，生カキが原因食品と推定された．本生カキは，18日～19日に三重県より都内の業者を経て仕入れられ，当施設で19日と20日の両日にわたって提供されていた．

細菌学的検査成績：患者が喫食した生カキの残品はなく，病原菌の検査は実施できなかった．

患者ふん便からは，赤痢菌，サルモネラ，腸炎ビブリオ，エルシニア，カンピロバクター，ウエルシュ菌などの腸管系病原菌は検出されなかった．しかし，2～4病日の患者ふん便79件中24件（30.4％）より，ST産生性の毒素原性大腸菌027：H7が検出された．

2　事例2の疫学・細菌学的成績

疫学調査成績：1981年1月12日～16日にかけて東京都内の某レストランで会食料理を喫食したA, B, C, の3グループの63名中36名が食中毒症状を呈した．発病率は57.1％である（表1）．

Aグループは，1月12日に17名で会食したところ1月13日～14日かけて10名（58.8％）が発病した．Bグループは1月13日に11名で会食したところ14日～15日にかけて9名が，そして18日に1名が発病した．発病率は90.9％である．Cグループは1月16日に35名で会食したところ，17日～18日にかけて16名（45.7％）が発病した（図2）．

患者の主症状は表2に示すように，下痢（89％），腹痛（78％），嘔気（75％），嘔吐（61％），発熱（53％）および倦怠感（50％）である．下痢は32名に認められ，軟便～水様便で，3回以下が13名，4～6回が12名，そして10回以上の人が4名であった．粘血便は認められな

Table 1. Outlines of 2 Outbreaks Due to Enterotoxigenic *Escherichia coli* 027:H7

Outbreak	No. 1	No. 2
Date	Dec. 20–23, 1980	Jan. 12–18, 1981
Location where food eaten	Restaurant	Restaurant
Number of persons exposed	333 (8 groups)	63 (3 groups)
Number of persons ill (%)	138 (41.4%)	36 (57.1%)
Incubation period	33.5 hrs.	31.7 hrs.
Incriminated food	Raw oyster	Raw oyster
Pathogen	ETEC* 027:H7 (ST–only)**	ETEC 027:H7 (ST–only)

* Enterotoxigenic *Escherichia coli*

**They produce only heat–stable enterotoxin (ST).

Table 2. Major Symptoms of the Patients

Symptoms	Outbreak	
	No. 1	No. 2
Diarrhea	118(85.5)*	32(88.9)
Abdominal pain	78(56.5)	28(77.8)
Nausea	72(52.2)	27(75.0)
Vomiting	47(34.1)	22(61.1)
Chill	59(42.8)	13(36.1)
Fever	40(29.0)	19(52.8)
Weariness	40(29.0)	18(50.0)
Headache	20(14.5)	8(22.2)
Shiver	14(10.1)	1(2.8)
Number of subjects	138(100)	36(100)

* Number of patients (%)

かったが，36名中11名に裏急後重がみられた．嘔吐は22名に認められ，3回以下が14名，4～6回が6名，10回が1名であった．発熱は19名にみられ，38℃未満が10名，38℃～39℃が3名であった．A, B, Cの3グループともカキを喫食後4～52時間後に発病し，潜伏時間は平均31.7時間で，ほぼ一峰性のピークを示した．これら3グループの会食料理の献立はすべて共通であった．原因食品は喫食状況のマスターテーブルより，生カキのレモン添えおよび若鶏のクリーム煮が疑われたが，若鶏のクリーム煮は喫食前に加熱されており，生カキが原因食品と推定された．この生カキは1月10日，12日，14日，16日の4日間に渡って仕入れ，10日～16日にかけて古い順に逐次使用されていた．

細菌学的検査成績：食中毒の届出が発病後1週間目と遅れたため，当日提供された食品残品はなく，原因物質の追求は患者ふん便を対象にして行った．

患者ふん便から，ST産生性の毒素原性大腸菌以外の既知病原菌は検出されなかった．Bグループの患者の8病日のふん便9件中4件より毒素原性大腸菌027：H7を検出した．Aグループの患者からは，発病後10日以上経過したふん便しか得られず，9件について検索を行ったが，病原菌はすべて陰性であった．Cグループの患者の場合も検体採取が遅れ，発病後10日経過し，採取時既に回復していた患者ふん便2件中1件より，同一血清型の毒素原性大腸菌027：H7が検出された．

考　察

カキは生食される食品であるため，カキの細菌汚染についてはこれまで多くの研究者によって検討されている．岸本ら[6,7,8]は，広島県の6カ所の産地において，毎年冬期に殻付カキの細菌汚染状況を検討している．1978年12月～1980年12月までの3年間に48件の殻付カキを調べた結果，細菌数はカキ1g中800～320,000とかなりばらつきが認められている．また，大腸菌数は100g中18個以下のものから160,000のものまであり，生食用カキの成分規格に反する230以上の汚染があったものが48件中43件（89.6%）であった．石原ら[9]は，1982年2月～3月にかけて，47件の生カキを調査した．22件の生食用カキの細菌数はすべて50,000以下であったが，大腸菌数は100g中230以上のものが1件認められた．また，47件の生カキ（生食用29件，加工用18件）の病原菌検査では，ウエルシュ菌（24件，51.1%），エロモナス（16件，34.0%），ビブリオ・フルビアリス（10件，21.3%），セレウス菌（4件，8.5%）および黄色ブドウ球菌（1件，2.1%）が検出されている．著者ら[10]は1976年10月，1977年3月の間に，405件の生カキを調査した結果，229件（56.5%）から大腸菌を検出し，その

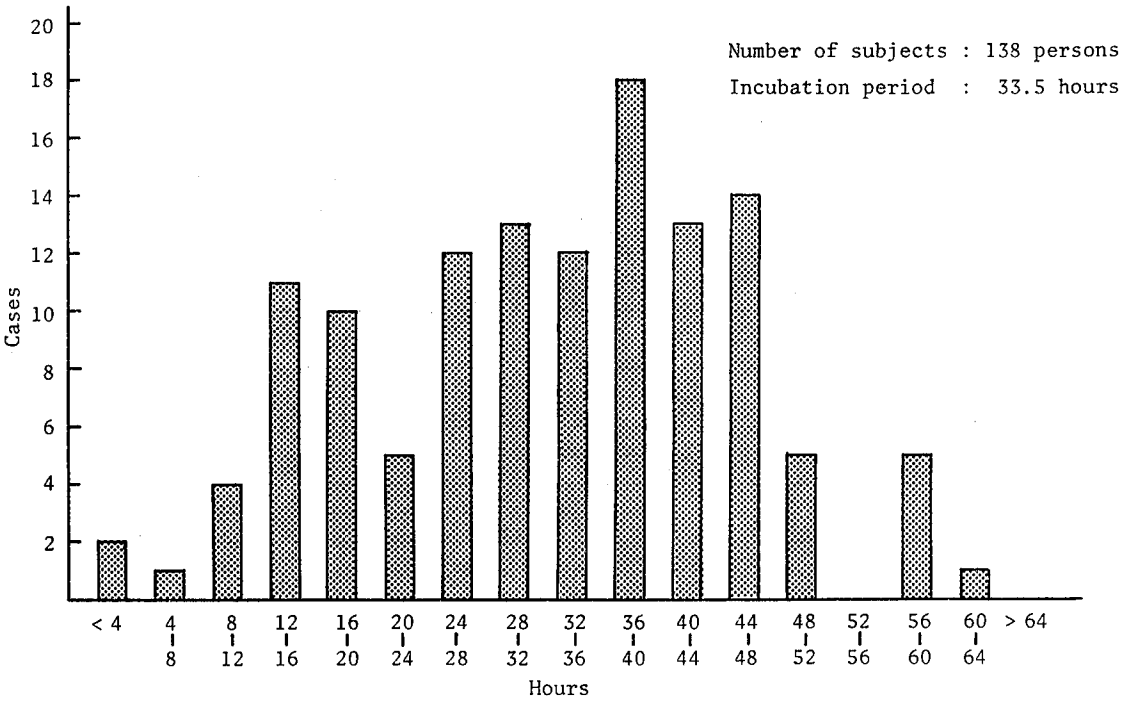


Fig.1. Incubation Period of Patients in Outbreak No.1

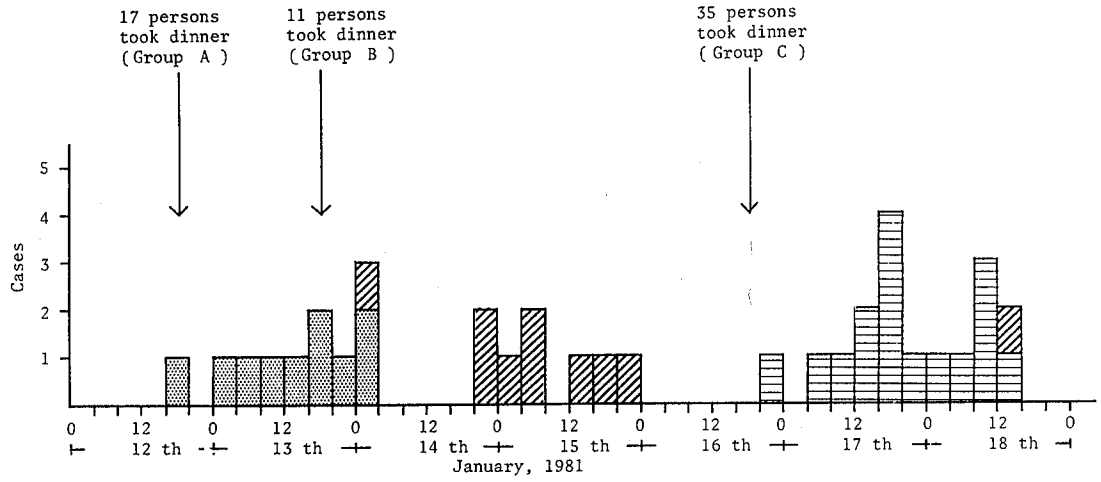


Fig.2. Date of Onset of Illness in Patients among Group A, Group B and Group C of Outbreak No.2

: Number of patients of Group A, : Number of patients of Group B,
: Number of patients of Group C,

うち4件から検出した株は毒素原性大腸菌であった．生カキは海水あるいは河川からの各種の細菌汚染を受けており，その一部には病原菌も認められ，これらの病原菌による食中毒例が憂慮されていた．今回著者らは生カキを原因にした毒素原性大腸菌による食中毒例2事例を明らかにしたように，生カキの取り扱いに際してはなお一層の監視体制の強化が示唆された．

カキは多くの場合，低温で運搬・保存されるため，カキの中で病原菌が増殖できる機会はほとんどないものと考えられる．今回の2事例の場合でもカキは低温に保存されており，喫食時の毒素原性大腸菌汚染菌数は少ないものと推定される．

これまでに東京都内で明らかにした毒素原性大腸菌による食中毒事例は31例で，そのうち10例がST産生性の大腸菌027，次いで06，0159，0148および011などが認められている．今回明らかにした毒素原性大腸菌027：H7は，わが国で検出される毒素原性大腸菌の中でも，検出頻度の高い血清型に該当するものであった．

カキによると推定される食中毒は，東京都内では1965年～1980年の16年間に186例，患者数2,537名の発生が認められている．これらの発生例は，疫学調査の結果から多くの共通点が指摘される．すなわち，(1)秋から冬にかけて発生し，特に12月から1月に多い．(2)潜伏期間は概して長く，12～18時間（平均約36時間）である．(3)主症状は嘔気，腹痛，下痢，発熱および嘔吐などであり，重症例は認められず，2～3日以内に回復する．(4)生カキや酢ガキなど生食によるものが多い．(5)カキの鮮度とは関係なく，殻付きの新鮮なものでも原因となり得る．(6)カキの産地とは関連がみられない．これらの疫学的特徴から，微生物などが関与しているものと考えられているが，現在までの検査成績では特定な病原菌やウイルスは検出されていない．

オーストラリアでは1978年6月～7月にかけて，カキによると思われる下痢症患者が2,000名認められ[11, 12]，さらに1979年においても同様な患者の発生がみられている．この場合には，患者ふん便よりNorwalk virusが証明され，さらに本ウイルスに対する血中抗体価の上昇が観察されている．また，本ウイルスより小さなParvo virus様粒子も証明され，これらのウイルスが原因であると考えられている．

今回，カキを原因とした毒素原性大腸菌による食中毒例を明らかにしたが，本病原菌がカキによる食中毒の主体をなすものとも考えられない．今後，生カキに対する食中毒の病因物質の早急な解決が望まれる．

結　論

生カキが原因食品と推定された毒素原性大腸菌食中毒2事例を明らかにした．

事例1：1980年12月19日～20日にかけて，東京都内の某ホテルのレストランで会食料理を喫食した8グループの333名中138名（発病率41.4%）が，下痢，腹痛，嘔気を主体とする食中毒症状を呈した．潜伏時間は平均33.5時間であり，生カキ（殻付レモンカクテル）が原因食品と推定された．患者ふん便79件中24件（30.4%）より，ST産生性の毒素原性大腸菌027：H7が検出された．

事例2：1981年1月12日～16日にかけて，東京都内の某レストランで会食料理を喫食した3グループの63名中36名（発病率57.1%）が，下痢，腹痛，嘔気および嘔吐を主体とする食中毒症状を呈した．潜伏時間は平均31.7時間であり，生カキ（レモン添え）が原因食品と推定された．患者ふん便12件中5件（41.7%）より，ST産生性の毒素原性大腸菌027：H7が検出された．

文　献

1) 伊藤　武，斎藤香彦：*Med. Technol.*, 10, 219, 1982
2) Cowan, S.T. : *Manual for the identification of medical bacteria*, Cambridge University Press, England, 1974
3) Evans, D.J., Evans and S.L.Gorbach : *Infect. Immunity*, 8, 725, 1973
4) 山田澄夫，松山　秀，工藤泰雄：モダンメディア，26 (11)，1，1980
5) Dean, A.G., Yi-C, Ching, R.C., Williams and L.B., Harden : *J.Infect. Dis.* 125, 407, 1972
6) 岸本敬之，得能弘志，小川博美，佐々木実己子：広島衛研業務年報，昭和53年度，59，1979
7) 得能弘志，佐々木実己子，岡本　拓，岸本敬之：広島衛研業務年報，昭和54年度，63，1980
8) 得能弘志，佐々木実己子，福田伸治，岸本敬之：広島衛研業務年報，昭和55年度，44，1981
9) 石原裕二，大谷洋一，柏原広志，伊藤　宏，：食品衛生研究，33 (1)，75，1983
10) 小久保弥太郎，松下　秀，甲斐明美，山田　満，小沼博隆：食衛誌，19 (1)，117，1978
11) Murphy, A.M., G.S., Grohmann, P.J., Christopher et al. : *Med. J. Aust.*, 2, 329, 1979
12) *Wkly. Epiden. Rec.*, W.H.O., 1980, 9, 65

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 126-131, 1983

うずら卵を原因食品としたサルモネラ食中毒およびうずら卵における本菌の汚染状況

伊藤　武*, 高橋正樹*, 斎藤香彦*, 稲葉美佐子*
甲斐明美*, 柳川義勢*, 高野伊知郎*, 坂井千三*,
篠原　楷**, 田村延一**, 加藤嘉市**, 土屋伸久**,
木下正彦***, 中嶋　誠***, 高取三郎***, 田崎達明***

An Outbreak due to *Salmonella typhimurium*, Biotype 17 i, Associated with the Use of Raw Quail Egg and Incidence of *Salmonella* in Quail Eggs

TAKESHI ITOH*, MASAKI TAKAHASHI*, KAHIKO SAITO*, MISAKO INABA*, AKEMI KAI*, YOSHITOKI YANAGAWA*, ICHIRO TAKANO*, SENZO SAKAI*, TADASHI SHINOHARA**, NOBUKAZU TAMURA**, KIICHI KATO**, NOBUHISA TSUCHIYA**, MASAHIKO KINOSHITA***, MAKOTO NAKAJIMA***, SABURO TAKATORI*** and TASTUAKI TAZAKI

Keywords: サルモネラ菌 Salmonella, 食中毒 food poisoning, うずら卵 quail egg, 養鶉場 quailery

緒　言

東京都内におけるサルモネラ食中毒は1963年以前には年間1～3事例であったが，その後急激に増加し，現在では年間10～15事例の発生が認められている．その原因食品はローストチキンなどの鶏肉料理やその他食肉の加熱調理食品が多く，次いでニワトリやブタのレバー，卵焼およびそう菜などである[1]．

1981年には12事例のサルモネラ食中毒が発生し，そのうち1事例はうずら卵によることが疫学的，細菌学的検査の結果明らかにされた．本事例はうずら卵の生食によって発生したもので，本菌感染源としてうずら卵の重要性を指摘し，その調理方法，取扱いに新たな警告を促した事例であった．

本報では本事例の概要を報告するとともに，うずら卵によるサルモネラ食中毒予防の基礎的資料を得る目的で市販うずら卵のサルモネラ汚染状況ならびに本菌のうずら卵殻通過，卵内部における増殖態度について検討したのでこれらの成積について報告する．

材料および方法

調査対象　本食中毒の原因究明のために患者ふん便8件および同時喫食者ふん便4件，原因食品を究明するために発生当日に喫食した食品の残品など15件を検査対象とした．また，本食中毒の感染源と考えられたうずら卵の出荷先や養鶉場のうずら卵ならびに市販されているうずら卵431件についても検査を行った．

サルモネラの検索・同定　直接培養にはSS寒天，DHL寒天を使用し，増菌培養にはセレナイト培地を用いた．ただしうずら卵および食品はEEM培地（日水製薬）で前培養後セレナイト培地に接種し，42℃で18～24時間増菌培養後分離培養を行った．分離菌株については善養寺，坂井の記載[2]に従って各種の生化学的性状を調べて同定した．O群型別は市販診断用血清（デンカ生研）を用いスライド凝集反応によった．H抗原の型別は自家調製[3]した抗H因子血清および市販H型別用診断血清（デンカ生研）を用い，試験管内凝集反応により実施した．H抗原の相誘導はJamsenの方法[4]に準拠し，相誘導用抗H血清を添加させたろ紙片を用いて行った．*S.typhimurium*の生物型別はDuguidらの方法[5]に従った．

成　績

1. うずら卵を原因食品としたサルモネラ食中毒の概要

* 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
*** 東京都青梅保健所

発生概要 1981年11月7日に東京都青梅市の某旅館に宿泊した12名中8名が8日の早朝より，下痢，腹痛，発熱，頭痛などの食中毒症状を呈した．共通食は11月7日の夕食および8日の朝食であったが，朝食時には既に発症者がいたことから，7日の夕食が原因であると推定された．夕食時間を基点として潜伏時間をみると平均25時間であった．患者の主要症状は表1.に示すごとくである．原因究明のため患者8名，非発症者4名を対象に細菌学的検索を行った結果，患者8名と非発症者2名から *S.typhimurium* が検出された．なお，患者1名から *Campylobacter jejuni* がサルモネラと同時に検出されている．7日の夕食には，川ます塩焼，煮物（人参，里いも），みそおでん，豆腐揚出し，酢物（しめじ，白菜），ごぼう煮（仕入品），山芋うずら（うずら卵，山芋），吸物（かまぼこ）および米飯などが提供されており，これらの食品の原料などについて菌検索を実施した結果，山芋うずらに使用したうずら卵9件中6件から患者と同一血清型である *S.typhimurium* が検出された．本菌の陽性例のうち1件は卵内部の卵黄・卵白よりサルモネラが検出されたが，他の5件は卵殻のみから検出された．以上の結果，本食中毒はうずら卵を原因とした *S.typhimurium* による食中毒であると考えられた．

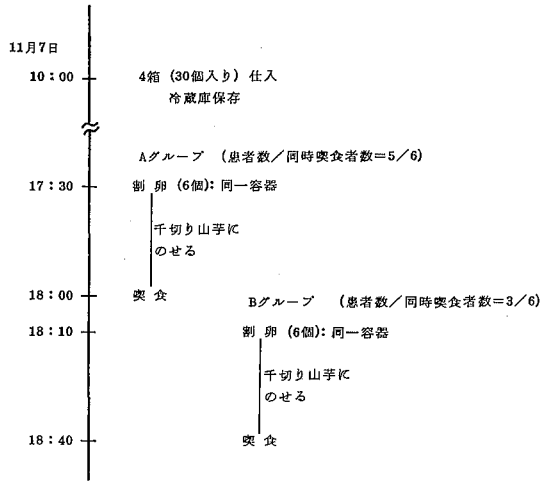


図1． “山芋うずら”の調理過程

2. 原因食品の調理過程ならびに汚染経路の追跡

山芋うずらの調理過程 原因食品の山芋うずらの調理過程を図1.に示した．この旅館では11月7日午前10：00頃1箱30個入のうずら卵4箱を仕入れ，調理まで冷蔵庫に保管していた．山芋うずらはA，Bの2回に分けて調理された．Aの場合は当日午後5時30分頃同一容器にうずら卵6個を割卵し，千切りにした山芋の上部にそれぞれ卵黄を1個ずつのせている．この調理過程は約30分で，その後直ちに喫食されている．Bの場合も同様に山芋うずらを調理後直ちに喫食されている．いずれの場合も調理から喫食まで1時間以内であることから，山芋うずらの中でサルモネラが増殖できる機会はなかったと推察された．

サルモネラの汚染経路 原因となった旅館で使用したうずら卵と同一生産者のうずら卵が隣接のA，Bの旅館にも保管されていたので，そのうずら卵について細菌学的検査を行った結果，A旅館のうずら卵21件はサルモネラ陰性であったが，B旅館（11月13日仕入）の27件中2件から *S.typhimurium* が検出された．またA旅館と同一ロット品と思われるうずら卵27件中9件からも *S.typhimurium* が検出された．さらに本うずら卵の養鶏場の新鮮な卵を調べた結果，27件中3件から *S.typhimurium* が検出された．すなわち，この養鶏場で生産されたうずら卵102件中14件（13.7%）から *S.typhimurium* が検出された．検査部位別にみると卵黄・卵白部分からのみ検出された例はなく，4件は卵殻部分

表1．“山芋うずら”を原因食品とした *S.typhimurium* による食中毒の概要

発生月日	1981年11月8日
発生場所	青梅市御岳山某旅館
同時喫食者数	12名
患者数（%）	8名(66.7)
潜伏時間	8～52時間(平均25時間)
主要症状（%）	下痢(87.5)，腹痛(87.5)，発熱(87.5)，頭痛(87.5)， 嘔吐(75.0)，吐気(37.5)，けん怠感(25.0)
原因食品	“山芋うずら”
病因物質	*S. typhimurium*

表2．感染源となったうずら卵と同一流通過程のうずら卵からのSalmonella検出状況

うずら卵の収去先	検査件数	検査部位	*S. typhimurium* 陽性件数
原因施設の旅館（11月7日仕入）	1	殻＋卵黄・卵白	1
	8	殻	4
		卵黄・卵白	1
隣接の旅館B（11月13日仕入）	27	22 殻＋卵黄・卵白	1
		5 殻	1
		卵黄・卵白	0
隣接の旅館A（11月7日仕入）	21	殻＋卵黄・卵白	0
卸問屋（11月13日収去）	27	22 殻＋卵黄・卵白	7
		5 殻	2
		卵黄・卵白	0
生産者（11月16日収去）	27	22 殻＋卵黄・卵白	2
		5 殻	1
		卵黄・卵白	0

表3．患者ふん便およびうずら卵から検出された*S. typhimurium*のDuguidによる生物型

性状	患者ふん便由来株（4菌株）	山芋うずらに使用したうずら卵由来株：（1菌株）	同一養鶉場由来のうずら卵由来株：（5菌株）
第一次試験：			
d－キシロース(B)*	－	－	－
m－イノシトール(P)	＋	＋	＋
l－ラムノース(P)	＋	＋	＋
d－酒石酸	＋	＋	＋
m－酒石酸	＋	＋	＋
第二次試験：			
フィンブリェ：			
マンノース＋	－	－	－
マンノース－	＋	＋	＋
運動性	＋	＋	＋
l－酒石酸	＋	＋	＋
d－キシロース(P)**	＋	＋	＋
トレハロース(P)	＋	＋	＋
グリセロール	＋	＋	＋
l－ラムノース(B)	＋	＋	＋
m－イノシトール(25℃)	－	－	－
ガス(グルコース)	＋	＋	＋
生物型	17i	17i	17i

* Bitter, ** Pepton

表4．市販うずら卵からのSalmonella検出状況

検査対象		検査件数	検査部位	Salmonella陽性件数	備考
うずら卵：					
養鶉場(1)	販売店舗3カ所	90	殻＋卵黄・卵白	0	
	生産者	25	殻＋卵黄・卵白	4	*S.typhimurium*(4)
		30	殻	1	*S.infantis*(1)
		5	卵黄＋卵白	0	
養鶉場(2)～(8)	販売店舗7カ所	200	殻＋卵黄・卵白	0	
計		320(100%)		5(1.6%)	

表5．Salmonellaうずら卵殻通過の検討

保存条件		保存日数 1日	3日	5日	10日
4℃ 湿度	70%	●○○○○	●●○○○	●○○○○	●○○○○
	80%	○○○○○	○○○○○	●○○○○	●●●○○
25℃ 湿度	50%	○○○○○	○○○○○	○○○○○	○○○○○
	80%	○○○○○	○○○○○	○○○○○	●○○○○

供試菌株：*S. typhimurium* 81－707株
接種菌量：10^8/卵
●：卵殻通過陽性　○：卵殻通過陰性

から，10件は卵殻と卵黄・卵白を混合したものからサルモネラが検出された．

10件のうずら卵について卵殻表面の一般生菌数を検討してみると，3件が10^4個/g，7件が10^2/g以下であった．また，大腸菌群は2件が10個/gであった．卵黄・卵白10件からは大腸菌群は検出されなかった．(表2.)

3. 本食中毒例および原因施設で使われたうずら卵と同一養鶉場で生産されたうずら卵から検出された *S.typhimurium* の Duguid による生物型

本事例の患者ふん便由来4株，山芋うずらに用いたうずら卵由来1株および原因食品に使われたうずら卵と同一の養鶉場のうずら卵由来5株の *S.typhimurium* について，Duguid らの生物型別を行った．表3.に示すように，いずれの由来株もまったく同一の生物型であった．すなわち，一次試験では Bitter のキシロースの分解性が陰性，二次試験の25℃イノシトールの分解性が陰性であることから，これらの由来株はいずれも Duguid の 17i に該当した．

4. 市販うずら卵のサルモネラ汚染状況

前述のように，原因施設で使われたうずら卵を生産した養鶉場のうずら卵がサルモネラによって高率に汚染されていることが明らかとなったので，次に市販うずら卵のサルモネラ汚染の実態を調査した．その成績を表4.に示した．養鶉場(1)のうずら卵においては，販売店舗3か所から収去したうずら卵90件は全て陰性であったが，生産者から直接収去したうずら卵25件では卵殻と卵黄・卵白を混合して検査したところ，4件から *S.typhimurium* が検出された．また，卵殻と内容物を分けて検査した5件中1件の卵殻から *S.infantis* が検出された．その他の養鶉場7か所で生産されたうずら卵200件ではいずれもサルモネラは陰性であった．以上のごとく，うずら卵のサルモネラ汚染は養鶉場によって著しい差異があることが推察された．うずら卵のサルモネラ汚染はうずらのサルモネラ保菌と密接に関連することから養鶉場(1)のうずらふん便40件について調査した結果3件（7.5%）から *S.typhimurium* が検出された．一方，うずら卵55件について卵殻表面の一般生菌数を検査した結果35件(63.6%)は10^4個/g以上の汚染がみられた．卵内部では16件に一

般生菌の汚染がみられたが大腸菌群はすべて陰性であった.

5. サルモネラのうずら卵殻通過の検討

鶏卵において卵殻表面のサルモネラが卵殻を容易に通過することが知られている. うずら卵の場合でもサルモネラの卵殻通過が観察されるものと考え, ニワトリのふん便に本事例由来の *S.typhimurium* 81－707株を混ぜ, 卵殻表面に10^8個/卵付着させた. この汚染卵を4℃と25℃の温度で湿度の異なる条件下で保存し経日的に卵殻通過を観察した. うずら卵を4℃に保存した場合, 湿度が70%では保存1日で既に卵殻内への通過が観察され, 80%では5日目に通過が観察されている. また25℃保存の場合では, 湿度50%であると保存10日目でも卵殻通過は認められなかったが80%では10日目には卵殻通過が観察された. (表5.)

6. うずら卵内におけるサルモネラの増殖態度

卵殻表面を汚染しているサルモネラは先きの成績からある条件下では卵殻内部に侵入することが明らかとなったので, 次に卵内部における増殖態度について検討した.

うずら卵殻に小孔をあけ, 卵白内に *S.typhimurium* 81－707株10^2個接種し, 4℃, 15℃, 25℃, および37℃に保存し経日的に卵内部のサルモネラ生菌数を求めた. その結果, 図2. に示したように4℃に保存した場合では, 本菌の増殖はほとんど認められなかったが, 25℃では保存1日目に10^6個/gに増殖した. また15℃, 37℃保存では2日目までは増殖が観察されなかったが, 3日後より急激な菌の増殖が観察された.

考　　察

東京都内で発生したサルモネラ食中毒の原因食品は食肉や鶏卵およびそれらの調理食品によるものが最も多く, それらの食品が本菌食中毒の感染源として極めて重要であることを報告してきた[1]. 今回報告した *S.typhimurium* による集団食中毒は旅館で提供された"山芋うずら"に使われたうずら卵が原因であることを明らかにした.

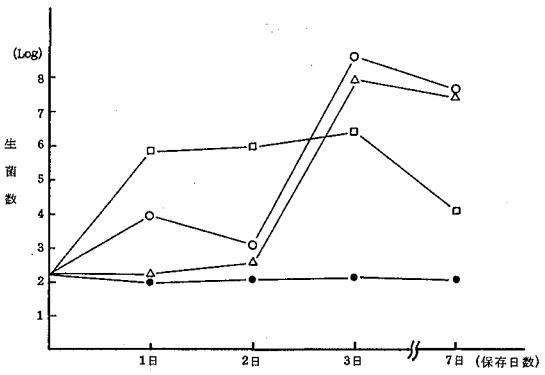


図2. うずら卵内における *S. typhimurium* の増殖態度

●——●4℃, ○——○15℃, □——□25℃, △——△37℃ 接種菌量：10^2／卵

山芋うずらを調理してから患者が喫食するまで約1時間程度放置されているにすぎず, 山芋うずらの中でサルモネラの増殖がほとんど考えられない. 大量のサルモネラがうずら卵内部を汚染していたものと思われる.

McCullough ら[6-7]の *S.newport*, *S.bareilly* および *S.anatum* による人体投与実験では10^5個以上で発病しており, 少なくともうずら卵には10^6個以上のサルモネラ汚染がみられたものと考えられる.

うずら卵内部には抗菌性のリゾチームなどが含まれているが, これはグラム陽性菌などを溶菌するが陰性菌にはほとんど作用しないため卵内部に侵入したサルモネラは充分に増殖できる. 今回の実験では, 15℃以上の温度に保存したうずら卵では保存3日でサルモネラ菌数が10^6個以上に増殖している. また Stokes ら[8]の *S.typhimurium* や *S.oranienburg*, *S.montevideo* などを用いた鶏卵の実験では29℃保存した際, 卵殻を通過したサルモネラは22日後では10^4～10^5個に増殖し, 1か月以上では10^8～10^9個に達している. 従って卵殻を通過したサルモネラがうずら卵で10^6個以上に増殖できることは充分考えられる.

市販鶏卵のサルモネラ汚染率は著者らの成績[9]では0.19%であってそれほど高いものではない. 特に最近では出荷前に卵を洗浄あるいは消毒が施されているので, 鶏卵のサルモネラ汚染はまれである. しかし, うずら卵では洗浄することによって品質が低下することから, 通常は洗浄されないので鶏卵の場合よりサルモネラ汚染率が高く, 今回の調査では1.7%である. 8か所の養鶉場のうずら卵のうち今回の成績では1か所の養鶉場のうずら卵がサルモネラ汚染を受けており, 養鶉場によって大きな差がみられる. 今回のサルモネラ食中毒の原因になったうずら卵を生産した養鶉場の場合もサルモネラ汚染が極めて高く, しかも検出されたすべての *S.typhimurium* が Duguid の生物型17iの同一型であったことは興味ある成績である. 本養鶉場では以前にうずら間に *S.typhimurium* 生物型17iによる流行が起きたことが推察される.

市販うずら卵のサルモネラ汚染はそのほとんどが卵殻表面であると思われる. ただし, 鶏卵の場合と同様にう

ずら卵でも卵殻表面のサルモネラが保存期間中に卵内部への侵入が確認されたので，卵殻表面であっても安全であるとはいえない[10]．4℃に保存したうずら卵の方が25℃保存のうずら卵よりサルモネラの卵殻通過が高く認められた．これは4℃保存の卵を室温に置いた際，温度差によって卵殻表面に水滴が付着するために卵殻からの菌の侵入が助長されたものと考えられる．Sauter[11]らの実験では卵表面のサルモネラは保存30分で既に2～12%の鶏卵内部に菌が侵入しており，かなり短時間で侵入できるものと考えられる．

鈴木ら[2]の調査では鶏卵における一般生菌数は新鮮卵では認められないが，保存期間が28日以後では10^9個になるのもまれではなく，保存期間中に卵内部に侵入して増殖したことがうかがえる．

うずら卵は鶏卵と異なり，その卵殻構造の特殊性から全く洗浄されていないため，卵殻表面のサルモネラ汚染が高いし，ある条件下では卵内部に侵入し増殖することを明らかにした．うずら卵はソバや山芋などと供に生食される機会が多く，今後も同様の食中毒発生の危険性が考えられる．

結　論

1. 1981年11月8日青梅市御岳山某旅館において発生した食中毒事件は宿泊者12名中8名（66.7%）が発症し，潜伏時間は8～52時間平均25時間であった．患者の主要症状は下痢（87.5%），腹痛（87.5%），発熱（87.5%）などであった．細菌学的検査の結果，患者8名および非発症者4名中2名のふん便ならびに推定原因食品のうち，山芋うずらに使われたうずら卵から *S.typhimurium* が検出されたので，本事件はうずら卵を原因食品としたサルモネラ食中毒であると考えられた．

2. 本事例の原因施設で使われたうずら卵を生産している養鶉場のうずら卵102件についてサルモネラの汚染状況を検討したところ14件（13.7%）から本事例由来株と同一菌型の *S.typhimurium* が検出され，本養鶉場内での広範なサルモネラ汚染が推察された．

3. その他の養鶉場8か所について生産者および市場から収去したうずら卵のうち，1か所の養鶉場のうずら卵120件中5件（4.2%）からサルモネラが検出されたが，他の7か所の養鶉場のうずら卵200件からは検出されなかった．

4. うずら卵殻表面に *S.typhimurium* 81－707株を10^8個/卵付着させ，卵殻通過を各種保存条件で検討したところ，4℃保存では湿度70%の場合，保存1日目に，また湿度80%では5日目にそれぞれ卵殻通過が観察された．25℃保存では湿度50%の場合，保存10日目でも卵殻通過は観察されなかったが，湿度80%では10日目に卵殻通過が観察された．

5. うずら卵白内に *S.typhimurium* 81－707株を10^2個/卵接種し，各種温度条件でその増殖態度を検討したところ，4℃保存ではほとんど増殖が認められなかったが，25℃保存では1日目に10^6個/gに増殖した．また15℃，37℃保存では2日目まで増殖は観察されなかったが，3日目より急激な増殖が観察された．

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，27，16，1976
2) 善養寺浩，坂井千三：腸管系病原菌の検査法，第3版，152，1979，医学書院
3) Kauffman, F : *The Bacteriology of Enterobacteriaceae*, **55**, 1966, Muksgaard, Copenhagen
4) Jameson, J.E. : *Mon. Bull. Minist. Hlth. Lab. Serv.*, **20**, 14, 1961
5) Duguid, J.P., Anderson, E.S., Alfredsson, G.A., Barker, Ruth, and Old, D.C. : *J.Med.Microbiol.*, **8**, 149, 1975
6) McCullough, N.B.and Eisele, C.W. : *J.Infect. Dis.*,**88**, 278, 1951
7) McCullough, N.B. and Eisele, C.W. : *J.Infect.Dis.*, **89**, 209, 1951
8) Stokes, J.L., Osborne, W.W. and Bayne, H.G. : *Food Res.*, **21**, 510, 1956
9) 坂井千三，伊藤　武，津野正朗，丸山　務，岡沢久美子，善養寺浩：日本食品衛生学会第25回学術講演会抄録，36，1973
10) 指原信広，水谷　宏，小沼博隆，鈴木　昭，高山澄江，今井忠平：食衛誌，20，127，1979
11) Sauter, E.A. and Petersen, C.F. : *Poultry Science* **53**, 2159, 1974
12) 鈴木　昭，小沼博隆，今井忠平，水谷　宏，指原信広：食衛誌，20，247，1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 132-138, 1983

食品中の一般生菌数，大腸菌群および黄色ぶどう球菌数測定のための疎水性格子膜フィルター法と従来法との比較

伊藤　武*，斎藤香彦*，坂井千三**

Comparison of Hydrophobic Gride Membrane Filter Method and Agar Plate Counts Method for Enumeration of Standard Plate Counts, Coliform and *Staphylococcus aureus* in Foods

TAKESHI ITOH*, KAHIKO SAITO*and SENZO SAKAI*

Keywords : 疎水性格子膜フィルター法, HGMF method, 大腸菌群, Coliform, 一般生菌数 Standard plate counts, 黄色ぶどう球菌, *Staphylococcus aureus*

緒　言

わが国では食品中の一般生菌数測定には標準寒天を用いた混釈培養が，大腸菌群の測定にはデソキシコレート寒天平板培養法や乳糖ブイヨンなどによる定量試験法が広く用いられている．最近，カナダのSharpe[1]が食品中の一般生菌数や大腸菌群の測定に従来のメンブランフィルター法を改良した疎水性格子膜フィルター法（Hydrophobic Grid Membrane Filte 法：HGMF 法）を開発した．本法は疎水性格子膜フィルターの表面に独立した集落を形成させるもので，集落数を正確・簡易に測定でき，従来の食品中の細菌数測定法よりもすぐれていることが報告されている[2~5]．

著者らはにぎりめし，サラダ，豆腐などの各種食品を対象に一般生菌数，大腸菌群および黄色ぶどう球菌の測定をHGMF 法と従来の寒天平板を用いた検査法と比較し，HGMF 法の有効性について検討した．

材料および方法

検査対象食品：黄色ぶどう球菌数の測定も検討したため，本食中毒の原因食品あるいはそれに関連する食品を対象とした．すなわち，にぎりめし17件，たまご焼4件，焼魚5件，仕出し弁当などの惣菜6件である．この他に市販の各種サラダ33件，豆腐6件計71件の食品を対象にした．

食品の乳剤および希釈：各食品を10 g 秤料し，希釈液（1％ Tween 80加0.1％ペプトン水）90 ml を加え，ストマッカー（Colworth Stomacher, Model 400）で乳剤とした．本乳剤の10倍段階希釈液を試料とした．

疎水性格子膜フィルター：疎水性格子膜フィルターは孔径0.45 μm の ISO-GRID hydrophobic grid membrane filter（ISO-GRID HGMF : QA Laboratory，グンゼ産業）を用いた．本フィルターのホルダーは4.5 μm メッシュのプレフィルターが組み込まれた ISO-GRID HGMF 専用のポリサルフォン（QA Laboratory，グンゼ産業）を使用した．

HGMF 法による菌数測定：一般生菌数，大腸菌群および黄色ぶどう球菌数の測定にはそれぞれ HGMF 法に定められた培地を使用した．

一般生菌数の場合は Standard Method Agar（トリプトン0.5％，ブドウ糖0.1％，酵母エキス0.25％，チモールブルー0.01％，寒天1.5％，pH 7.0）を用い，35°C 48時間培養後出現した淡黄色～淡澄色の集落を算定した．フィルター上に発育した白色やかび様の集落は除外した．

大腸菌群には Coliform Agar（トリプトース1.0％，プロテオーゼペプトンNo 3．0.5％，酵母エキス0.3％，Ncl 0.5％，乳糖1.25％，胆汁酸塩No 3．0.15％，アニリンブルー0.01％，寒天1.5％，pH 7.4）を用い，35°C 24時間培養後，淡黄色～青色の集落を算定した．色調が白色や茶色の集落は除外した．

黄色ぶどう球菌には Barid-Parker Agar（日水製薬）を用い，35°C 48時間培養後，黒色集落を算定し，黒色集落が黄色ぶどう球菌であることを確認するために20集

* 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

落を釣菌してコアグラーゼ試験を実施した.

フィルター上に出現したそれぞれの集落を算出し，次の式によって試料中の生菌数を計算後，希釈倍数を掛けて，食品1g中の菌数とした.

$$\text{生菌数} = N\log\frac{N}{N-X}$$

N : ISO GRID HGMF の総区画数 (1,600)

X : 数えた集落数

従来法による菌数測定：一般生菌数の場合は，標準寒天で混釈培養し，35°C 48時間培養後，出現した集落を数えた.

大腸菌群数にはデソキシコレート培地による混釈培養を行ない，35°C 24時間培養後，赤色集落を算出した.

表1. 食品の一般生菌数測定における HGMF 法と従来法との比較

被検材料	検査件数	一般生菌数 (Log 10/g)	
		HGMF法 平均値 (範囲)	従来法* 平均値 (範囲)
にぎりめし	17	7.62±1.15 (5.34—9.18)	8.17±1.22 (5.0 —9.48)
たまご焼	4	9.17±0.50 (8.99—9.69)	9.38±0.46 (8.99—9.99)
焼魚	5	8.80±0.12 (8.69—9.0)	9.58±0.26 (9.3 —9.98)
惣菜	6	7.63±1.47 (6.07—9.59)	8.38±0.97 (7.14—9.69)
サラダ	33	3.14±0.95 (1.11—5.15)	3.66±0.96 (1.3 —5.59)
豆腐	6	3.58±0.69 (2.43—4.26)	3.75±0.38 (3.3 —4.23)

*標準寒天による混釈培養

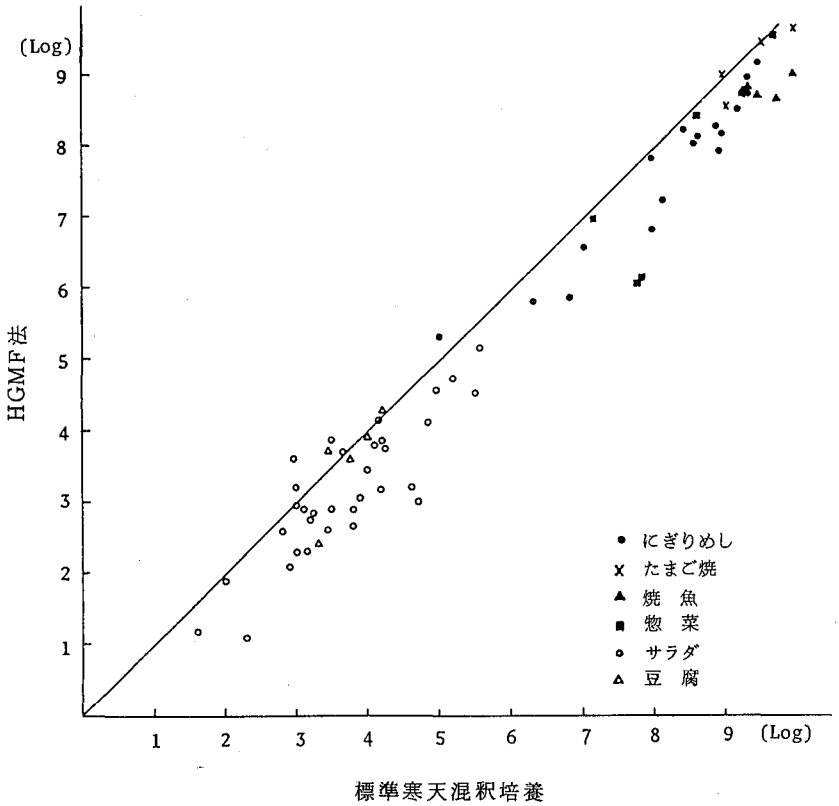


図1. 一般生菌数測定における HGMF 法と従来法との相関性

黄色ぶどう球菌の場合にはBaird Parker Agar（日水製薬）を用い，35°C 48時間培養後，卵黄反応陽性の黒色集落を算出し，コアグラーゼ試験によって黄色ぶどう球菌であることを確認した．

成　績

1. 一般生菌数の比較

にぎりめし，卵焼，サラダなど71件の食品中の一般生菌数の平均値を表1に示した．HGMF法によるおにぎり17件の一般生菌数の平均値は7.62±1.15であったが従来法では8.17±1.22であって，従来法による測定の方が菌数が多く算出された．その他の食品についても従来法の方がHGMF法よりも菌数がやや多く現われている．

両法による一般生菌数測定値の相関係数を表2に示した．焼魚以外の食品では両法の成績には高い相関性が認

表2.　食品の大腸菌群測定におけるHGMF法と従来法との比較

被検材料	検査件数	大腸菌群数 (Log 10/g)	
		HGMF法 平均値（範囲）	従来法* 平均値（範囲）
にぎりめし	17	5.34±2.13 (0 —7.61)	6.31±2.07 (2.0 —8.83)
たまご焼	4	6.28±1.01 (5.56—7.0)	7.13±0.24 (6.96—7.3)
焼魚	5	5.63±2.54 (2.77—8.11)	6.36±2.07 (4.04—8.32)
惣菜	6	3.07±2.90 (0 —7.68)	4.91±2.12 (2.87—8.73)
サラダ	33	1.35±1.06 (0 —3.15)	1.75±1.13 (0 —3.73)
豆腐	6	2.06±1.37 (0 —2.87)	1.93±1.26 (0.6 —3.56)

*デソキシコレート寒天による混釈培養

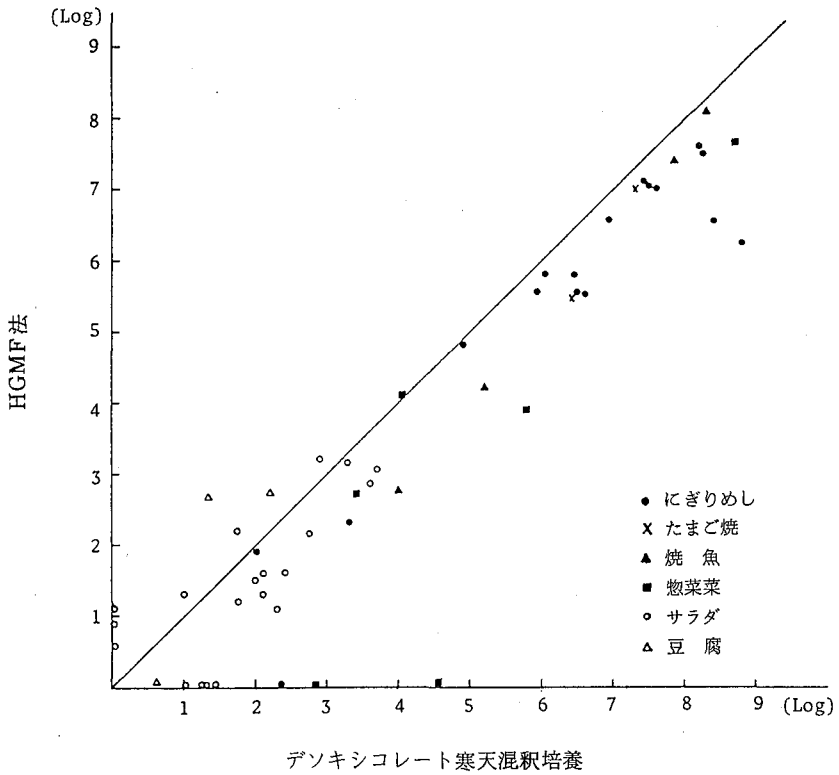


図2．　大腸菌群測定におけるHGMF法と従来法との相関性

められる．両法による相関性を図示したのが図1である．焼魚では検査件数が少ないため低い相関値であったと考えられる．

2. 大腸菌群の比較

各食品中の両法による大腸菌群の平均値を表3に示した．一般生菌数の場合と同様にデソキシコレート寒天による混釈培養法の測定値の方がHGMF法のそれより高い値が得られている．例えばにぎりめしではHGMF法では5.34±2.13，従来法では6.31±2.07であった．ただし，両法の相関係数は表2，図2に示すごとくかなり高い値が得られている．

なお，デソキシコレート寒天上で大腸菌群陽性であったが，HGMF法では大腸菌群陰性のものが8例あったので，HGMF法に使用しているColiform Agar平板での腸内細菌や*Aeromonas*属がいかなる色調の集落を形成するかを検討した．

表3に示すごとく，乳糖分解性の*E. coli*や*Citrobacter*などはあざやかな青色の集落を形成した．*Klebsiella*などは24時間培養では淡青色の集落を形成したが，2日培養では退色して白色調を示した．乳糖陽性の*Serratia*など一部の菌種は白色の色調であった．乳糖非分解の腸内細菌は白色の集落を形成した．*Aeromonas*属は乳糖分解菌であってもColiform Agar上ではほとんどが白色の集落を形成した．

3. 黄色ぶどう球菌の比較

ぶどう球菌食中毒の原因食品であったにぎりめし，たまご焼，焼魚，惣菜を対象に黄色ブドウ球菌数の測定を行った．

たまご焼，焼魚および惣菜では両法による黄色ぶどう球菌数はほぼ同値であったが，おにぎりでは著るしい差

表3. デソキシコレート寒天およびColform Agarに培養した腸内細菌ならびに*Aeromonas*属の集落の色調

菌株	乳糖分解性	供試菌株	デソキシコレート寒天	Coliform Agar	菌株	乳糖分解性	供試菌株	デソキシコレート寒天	Coliform Agar
Escherichia coli	+	2	R	B	*Escherichia coli*	−	5	−	W
Solmonella subgenus Ⅲ	+	1	R	LB	*Shigella* spp	−	4	−	W
Citrobacter amalonaticus	+	1	LR	LB	*Salmonella subgenus* Ⅰ・Ⅱ	−	5	−	W
〃 *diversus*	+	2	−	LB−W	*Edwardsiella* spp	−	2	−	W
〃 *freundii*	+	2	R	B	*Citrobacter freundii*	−	1	−	W
Klebsiella oxytoca	+	2	R	LB	*Enterobacter agglomerans*	±	1	LR	W
〃 *pneumoniae*	+	6	R	B−LB	*Hafnia alvei*	−	1	−	W
Enterobacter aerogenes	+	1	R	LB	*Serratia* spp	−	8	−	W
〃 *agglomerans*	+	1	R	B	*Proteus mirabilis*	−	2	−	Bra
〃 *cloacae*	+	1	R	B	*providencia rettgeri*	−	1	−	Bra
〃 *gergoviae*	+	1	−	W	*Morganella morganii*	−	1	−	Bra
〃 *sakazakii*	+	1	−	W	*Cedecea* spp	−	2	−	−
Serratia fonticola	+	1	R	LB	*Aeromanas* spp.	+	7	LR (6)* R (1)	W−Bra LB
〃 *odorifera*	+	1	−	W					
〃 *plymuthica*	+	1	LR	W		−	39	LR (12) R (16) −(11)	W W W
Kluyvera spp	+	1	R	B					
Rahnella spp	+	1	R	B					

R：紅〜赤．LR：うす紅．−：淡桃色．B：青〜濃青．LB：うす青．W：白．Bra：褐色．
*( )内は該当菌株数

表4. 食品の一般生菌数，大腸菌群，黄色ブドウ球菌数測定におけるHGMF法と従来法との相関関係

被検材料	検査件数	HGMF法と従来法による成績の相関係数		
		一般生菌数	大腸菌群	黄色ブドウ球菌
にぎりめし	17	0.95	0.93	0.40
たまご焼	4	0.89	1.00	0.27
焼魚	5	0.52	0.99	0.94
惣菜	6	0.88	0.82	0.35
サラダ	33	0.87	0.73	NT*
豆腐	6	0.83	0.75	NT

*NT：検討せず

が認められた．（表5，図3）

おにぎりの場合，従来法で黄色ぶどう球菌が検出されているにもかかわらずHGMF法で陰性のものが6例あったため，両者の相関係数は低かった．HGMF法で黄色ぶどう球菌が検出されなかった6例は表皮ぶどう球菌の汚染が極めて高いものであった．そのため．HGMF法で黒色集落を釣菌してもそのすべてがコアグラーゼ試験陰性のため表皮ぶどう球菌と判定された．従来の寒天平板法では集落の色調の他に卵黄反応が観察されるため，多数の表皮ぶどう球菌集落の中の数個の黄色ぶどう球菌集落でも容易に鑑別できた．

考　察

メンブランフィルターを応用した細菌数の検査は飲料水など水中の大腸菌群や一般生菌数の測定法として開発

表5.　食品の黄色ブドウ球菌数測定におけるHGMF法と従来法との比較

被検材料	検査件数	黄色ブドウ球菌数（Log 10/g）	
		HGMF法 平均値（範囲）	従来法* 平均値（範囲）
にぎりめし	17	2.43±2.92 (0 —7.34)	4.89±1.63 (1.84—8.04)
たまご焼	4	8.92±0.58 (8.17—9.41)	9.37±0.84 (8.11—9.84)
焼魚	5	8.62±0.79 (7.57—9.55)	8.47±1.15 (7.3 —9.83)
惣菜	6	7.77±0.96 (6.84—9.04)	8.18±0.84 (7.0 —8.54)

*Baird–Parker Agarによる平均培養法.

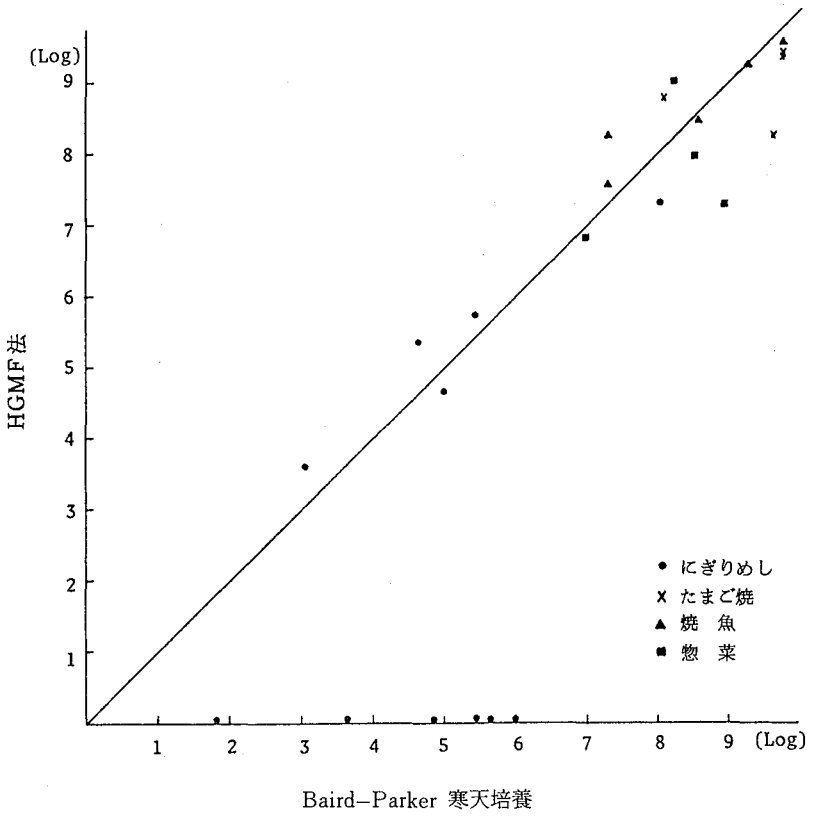


図3．　黄色ブドウ球菌数測定におけるHGMF法と従来法との相関性

されたもので，食品の細菌検査にはほとんど用いられていなかった．

Sharpe ら[1] は従来のメンブランフィルターに疎水性のパラフィンワックスを格子状に加工した特殊な疎水性格子膜メンブランフィルターを開発した．本ろ紙を用いて，*S. typhimurium* など6菌株の培養液で検討した結果，菌数が多い場合でも，正確に菌数を測定できることを報告し，また Entis ら[6] は特殊なプレフィルタを用いて食品の乳剤でもフィルターのろ過を容易にした．こうした疎水性格子膜メンブランフィルター（HGMF）とプレフィルターを用いることにより，肉類，魚，野菜などほとんどの食品の乳剤がろ過でき，これらの食品中の一般細菌数の測定に応用できることを明らかにした[7]．またアイスクリームやヨーグルト，ココアなどの食品ではトリプシン，プロテアーゼあるいはアミラーゼなどの酵素によって食品を処理すれば，本フィルターでろ過が可能となり HGMF 法はあらゆる食品の検査法に応用できることが報告された[6]．

著者らはわが国で広く実施されている寒天平板法による食品中の細菌数測定法と HGMF 法とを比較した．HGMF 法では一般生菌数測定には Standard Methed Agar，大腸菌群には Coliform Agar が用いられ，それぞれ特定な色調の集落を当該菌として算出するため，わが国で従来から用いられている標準寒天やデソキシコレート培地を用いた成績とはやや異なった成績が得られた．すなわち，標準寒天平板による一般生菌数の測定では酵母の集落も細菌の集落と区別できず，一般生菌数として算出される．HGMF 法では酵母などの集落は白色の色調を示し，細菌数から除外されるので，従来法で測定した菌数の方がHGMF 法よりやや高い値となったが，両者の検査法は極めて高い相関性を示した．

大腸菌群においても，デソキシコレート寒天上の大腸菌群は *Aeromnas* 属などの集落でも赤色集落を形成するがHGMF 法ではふん便由来の乳糖分解菌がより典型的な青色集落を形成する．従って両者を比較した場合，デソキシコレート寒天でみた方がHGMF 法よりもやや高い数値となったが，両者の検査法には高い相関性が認められた．なお，HGMF 法による大腸菌群はデソキシコレート寒天を用いる方法により正確な成績が得られるものと考えられる．

黄色ぶどう球菌に関しては，表皮ぶどう球菌の汚染が高い食品では両者の成績に不一致が認められる．卵黄反応が観察できる寒天平板法では，卵黄反応陽性の典型的集落であれば，コアグラーゼ反応を実施しなくても黄色ぶどう球菌であると判定できる．HGMF 法ではフィルター上に集落が形成されるため，卵黄反応を観察できない．表皮ぶどう球菌の汚染が高い食品中に少数の黄色ぶどう球菌が混在している場合には HGMF 法では本菌を検出することは極めて困難であった．また，HGMF 法では，黒色集落について必ずコアグラーゼ試験を実施しなければならず，検査法が煩雑となり，黄色ぶどう球菌の検査には HGMF 法は不適であると考えられる．

食品中の一般生菌数や大腸菌群の測定には HGMF 法は充分に応用できる簡易な検査法であろう．本法は食品中の酵母やサルモネラ[8] の菌数の測定にも応用され，その他腸炎ビブリオなどの病原菌の検査にも応用が可能であると考えられる[9]．

結　論

にぎりめし，サラダ，豆腐など各種食品71件を対象に一般生菌数，大腸菌群および黄色ぶどう球菌の測定を Sharpe らによって開発された HGMF 法と従来の寒天平板を用いた検査法とを比較検討した．

一般生菌数の測定では，標準寒天を用いた従来法の方が HGMF 法で得られた成績よりも菌数がやや多く現われたが，両者による検査成績には高い相関性がみられた．

大腸菌群の場合，デソキシコレート寒天による混釈培養の方が HGMF 法よりも高い値が得られたが，両者には高い相関がみられた．

黄色ぶどう球菌では，Baird Parker Agar を用いた従来法で黄色ぶどう球菌が検出されているにもかかわらず HGMF 法では陰性のものが6例あったため，両者の検査成績には相関性が低かった．

文　献

1) Sharpe, A. N. and Michaud, G. L.: *Appl Microbiol.*, **28**, 223, 1974

2) Sharpe, A. N., Diotte. M. P., Dudas, I. and Michaud. G. L.: *Appl. Environ Microbiol.*, **36**, 76, 1978

3) Sharpe. A. N., Peterkin. P. I. and Dudas, I.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 21, 1979

4) Sharpe, A. N., Peterkin, P. I. and Malik, N: *Appl Environ Microbiol.*, **38**, 431, 1979

5) Brodsky, M. H., Entis, P., Sharpe, A. N. and Jarvis, G. A.: *J. Food Port*, **45**, 292, 1982

6) Entis, P., Bordsky, M. H. and Sharpe, A.: *J. Food Prot*, **45**, 8, 1982

7) Peterkin, P. I. and Sharpe, A. N.: *Appl Environ Microbiol.*, **39**, 1138, 1980

8) Brodsky, M. H., Entis, P., Entis, M.P., Sharpe, A. N. and Jarvis, G. A., : *J. Food Prot.* **45**, 301, 1982
9) 竹田晃男, 赤羽荘資, 三輪憲永, 佐野文彦, 塩沢寛治, 浅川　豊：静岡県衛生環境センター報告, **25**, 29, 1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 139-141, 1983

東京都における水銀汚染の実態について（第10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 (X) Mercury Content of Fish and Shellfish

HIDEO YAMANOBE*, MASAHIRO TAKEUCHI*and TAKETOSHI YOSHIHARA*

Keywords : 総水銀 total mercury, メチル水銀 methyl mercury, 魚介類 fish and shellfish

緒 言

著者らは，水銀によって惹き起こされる健康障害を防ぐため，昭和48年以来，魚介類中の水銀含有量調査を実施している．本年度も東京湾内で漁獲したスズキおよび東京湾沿岸で採取したアサリを中心とし，併せて輸入魚介類，魚介類加工品についても国が定めた暫定規制値[1]（総水銀0.4ppm，メチル水銀0.3ppm）に基づいて調査を行なったので報告する．

実験方法

試料は昭和57年4月から昭和58年3月までの1年間に当科に搬入されたもので，内訳は東京湾産スズキ36検体アサリ14検体，市場外流通の輸入魚介類15種31検体およ

Table 1. Mercury Content of Muscle in Fish and Shellfish

Sample	N	T-Hg (ppm) Range	Mean
Suzuki (perch, *Latalabrax japonicus*)	36	0.05−0.26	0.14
Asari (short-neck clam, *Tapes japonica*)	14	0.00−0.01	0.01
Anago (conger, *Astroconger myriaster*)*	1		0.05
Akauo*	1		0.04
Awabimodoki (*Concholepas peruviana*)*	2		0.01
Ise-ebi (lobster)*	4	0.05−0.14	0.08
Kazunoko (hering roe)*	2	0.00−0.01	0.01
Kisu (sillago, *Sillago sihama*)*	1		0.03
Kawa-ebi*	1		0.01
Kou-ika (cuttlefish)*	3	0.03−0.08	0.06
Meaji (*Selar crumenophthalmus*)*	1		0.01
Nishin (herring, *Clupea pallasi*)*	2	0.02−0.03	0.03
Sake (salmon, *Oncorhynchus keta*)*	2	0.02−0.03	0.03
Shirauo (whitebait, *Salanx microdon*)*	1		0.02
Shishamo (*Spirinchus lanceolatas*)*	1		0.01
Suziko (salmon roe, salted)*	2		0.01
Taisho-ebi (shrimp)*	6	0.01−0.03	0.02
Zuwaikani (red crab, *Chionoecetes oplio*)*	1		0.02

* imported
N : number of samples

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

Table 2. Mercury Content of Marine Products

Sample	N	T-Hg (ppm) Range	Mean
Aji, kusaya (horse-mackerel, *Trachrus trachrus*, half dried)	1		0.08
Hoya, shiokara (*Halocynthia roretzi*, salted viscera)	1		0.01
Karei, himono (flatfish, *Limanda herzensteini*, dried)	1		0.06
Karasumi (salted, smoked roe)	1		0.01
Kastuo, namari (skip jack, *Katsuwonus pelamis*, half dried)	1		0.05
Kamaboko (fish jelly products, steamed)	6	0.00−0.09	0.02
Kanimiso	1		0.07
Kuzira, bakon (whale, bakon)	2	0.02−0.03	0.03
Mamakari, suzuke (sardine, *Sardinos melanosticta*, soaked in vinegar)	1		0.03
Mushiawabi (abalone, steamed)	1		0.00
Nijimasu, kunsei (rainbow trout, *Salmo gairdnerii irideus*, smoked)	1		0.04
Nishin, kunsei (herring, *Clupea pallasi*, smoked)	1		0.07
Sake, shiobiki (salmon, *Oncorhynchus keta, dried*)	1		0.07
Sake, kunsei (salmon, *Oncorhynchus keta*, smoked)	1		0.00
Satsuma-age (fried fish cake)	1		0.01
Shishamo-tamago (*Spirinchus lanceolatas*, roe)	1		0.01
Shishamo, himono (*Spirinchus lanceolatas*, dried)	1		0.01
Sujiko (salmon roe, salted)	1		0.01
Surume, himono (squid, *Todarades paciticus*, dried)	3	0.00−0.13	0.07
Tarako (pollack roe)	1		0.00
Urumeiwashi (round herring, *Etrumeus micropus*, dried)	2	0.06−0.08	0.07
Yatsumeunagi (lamprey, *Lampetra fluviatilis*, dried)	1		0.09

N : number of samples

び都内の小売店から入手した水産加工品31検体である．

操作および定量は前報[2,3]にしたがって行なった．

結果および考察

Table 1 に示すように，スズキ36検体について総水銀の含有量は0.05−0.26 ppm（平均0.14 ppm）であり暫定規制値を越えるものは認められなかった．なおこれらのスズキについて測定したメチル水銀の含有量は0.03−0.23 ppm（平均0.11 ppm）であり，総水銀に対するメチル水銀の比率はほぼ80％であった．これまでの調査結果から，東京湾産スズキは水銀含有量が高く，また体長と水銀含有量には正の相関性があり，大型魚の場合にはしばしば暫定規制値を越えることがあったため，東京都は体長60 cm 以上のものについて漁獲を規制している．ちなみに昭和53年度の調査[4]では48検体（内体長60 cm 以上32検体）中規制値を越えたものは14検体で，いづれも体長 60cm 以上であった．しかしながら今回調査対象となったスズキについては，体長と水銀含有量との相関性はほとんど認められなかった．すなわち対象試料36検体の体長は43.0−83.0 cm，このうち体長60 cm 未満16検体，60 cm 以上20検体で，総水銀はそれぞれ0.05−0.26 ppm（平均0.13 ppm），0.06−0.24 ppm（平均0.14 ppm），メチル水銀は0.05−0.21 ppm（平均0.11 ppm），0.05−0.23 ppm（平均0.10 ppm）であった．以上の結果から水銀含有量の低下は一時的な現象か，東京湾浄化によるものか明らかではないので引き続き調査する必要がある．

アサリについては，14検体中 7 検体が総水銀0.01 ppm 残りの 7 検体も0.01 ppm以下と極めて低い値で，前報[5]とほぼ同じ結果であった．なおアサリは昭和55年度以降東京湾水銀汚染の生物指標として特定の 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）から毎年継続採取している．

輸入魚介類では，イセエビ（lobster）から最高0.14 ppm 検出した．0.1 ppm を越えたのはこの 1 検体のみで他は全体に低い値であった．

つぎに Table 2 に魚介類を原料とした加工品の総水

銀量測定結果を示す．最も高い値を示したのはスルメ0.13 ppm，次いでカマボコ0.09 ppmであった．今回調査対象となったものは全体に低い値を示しており，0.1 ppm未満は全体の96.7%であった．

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，江波戸擧秀，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，江波戸挙秀，伊藤弘一，雨宮 敬，原田裕文，戸谷哲也：東京衛研年報，25，133，1974
4) 雨宮 敬，竹内正博，原田裕文：東京衛研年報，30－1，137，1979
5) 山野辺秀夫，竹内正博，吉原武俊：東京衛研年報，33，179，1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 142-145, 1983

東京都におけるPCB汚染の実態について（第11報）食品中のPCB含有量調査

岸本清子*, 水石和子*, 竹内正博*, 吉原武俊*

Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (XI) Polychlorinated Biphenyl Concentrations of Foods

KIYOKO KISHIMOTO*, 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

ポリ塩化ビフェニール（以下PCBと略す）はその製造および使用規制措置がとられ11年経過するが，その間に行なわれた調査によって減少傾向が認められて来た．しかし，自然界には低濃度ではあるがいまだ残留している．

著者らは都内のPCBによる汚染状況を把握し，都民の食生活における安全性を確保する目的で食肉，魚介類を中心とした食品および容器等についてその含有量を調査報告してきた[1]．本報では1982年度の結果を報告する．

実験方法

調査試料は1982年4月から1983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50種類146検体，東京湾産のアサリ14検体，スズキ35検体，輸入魚介類31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26検体，ベビーフード10検体，容器包装20検体，合計432検体である．

操作および定量は第2報[2]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る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，0.005 ppm未満は不検出とし，0.00 ppmと表わした．146検体について検査したところ，最高値はアラの1.83 ppmであり，この他にはスズキ0.59 ppm，タチウオ0.43 ppmが検出されたが，暫定規制値（遠洋沖合魚介類0.5 ppm，内海内湾魚介類3.0 ppm）を越えるものはなかった．また，0.01 ppm以上のPCBを検出したものは82検体で検出率は56.2%，平均値は0.04 ppmであり，横ばい状態が依然として続いている．

東京湾で採取したアサリ，スズキのPCB含有量をTable 2に示す．アサリは前年と同様，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，9月の3回にわたって採取した．大井で採取されたアサリは全検体からPCBが検出され，平均0.02 ppm，野島崎，三枚洲，人工渚では平均0.01 ppmであるが，千葉県側の富津では平均0.005 ppm未満となり若干低い．この東京湾沿岸の地域的な汚染傾向も前報と同様であった．

スズキは5月と9月に羽田沖，葛西沖，富津沖，木更津沖などで採取されたものについて検査したが，0.24 ppmから0.98 ppmの範囲で全検体からPCBを検出した．しかし採取場所のちがいによるPCB含有量の顕著な差は見られず，また体長別にも59 cm以下の14検体の平均が0.51 ppm，60 cm以上の21検体の平均が0.48 ppmとなり，差は認められなかった．

輸入魚介類のPCB含有量測定結果をTable 3に示す．エビ，イカを中心に31検体について検査した．このうちカナダ産のニシンが0.01 ppm，0.06 ppm，アメリカ産の筋子が0.04 ppmを示したが他からはほとんど検出されなかった．

水産加工品は魚肉練製品，魚介類の干物など30検体について調査したところ12検体からPCBが検出された．このうち高い値を示したものは，ままかりの酢漬0.46

* 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)

Sample	N	Range	Mean
Ainame (greenling, *Hexagrammos otakii*)	1		0.01
Aji (horse-mackerel, *Trachrus trachrus*)	10	0.00−0.20	0.03
Akoya-gai (*Pinctada martensii*)	1		0.00
Ara (sawedged perch, *Niphon spinosus*)	2	0.01−1.83	0.92
Ayu (ayu sweetfish, *Plecoglossus altivelis*)	3	0.00−0.03	0.01
Buri (yellow tail, *Seriola quinqueradiata*)	4	0.02−0.15	0.07
Dojo (mudfish, *Misgurunus anguillicaudatus*)	1		0.00
Ginzake (*Oncorhynchus Kisutsh*)	1		0.03
Hamo (sea eel, *Muraenesox cinereus*)	1		0.01
Hirame (flounder, *Paralichthys olivaceus*)	2	0.00−0.02	0.01
Isaki (grunt, *Parapristipoma trilineatum*)	4	0.00−0.03	0.01
Ishimochi (croaker, *Argyrosomus argentatus*)	2	0.00−0.01	0.01
Itoyori (*Nemipterus virgatus*)	2		0.00
Iwashi (sardine, *Sardinos melanosticta*)	3		0.04
Kamasu (barracuda, *Sphyraena japonicus*)	2		0.03
Kasago (scorpiofish, *Sebastiscus marmoratus*)	1		0.00
Katsuo (bonito, *Katsuwonus pelamis*)	5	0.00−0.01	0.01
Kawa-ebi	1		0.01
Kawahagi (filefish, *Stephanolepis cirrhifer*)	1		0.00
Kichiji (*Sebastolobus macrochir*)	7	0.00−0.04	0.02
King-grip (*Genypterus capensis*)	2		0.00
Kisu (sillago, *Sillago sihama*)	1		0.00
Kochi (bartail flathead, *Platycephalus indicus*)	2		0.02
Madai (sea bream, *Chrysophrys major*)	13	0.00−0.03	0.01
Madara (codfish, *Gadus macrocephalus*)	3	0.00−0.03	0.01
Magarei (flat fish, *Limanda herzensteini*)	6	0.00−0.03	0.01
Maguro (tuna, *Thunnus albacares*)	1		0.00
Managatsuo (harvest fish, *Pampus argenteus*)	4	0.00−0.01	0.01
Mebaru (gopher, *Sebastes inermis*)	5	0.00−0.03	0.01
Menuke (rockfish, *Sebastes matsubarai*)	1		0.02
Mutsu (japanese bluefish, *Scombrops boops*)	4	0.00−0.04	0.01
Namazu (catfish, *Parasilurus astus*)	1		0.11
Nijimasu (rainbow trout, *Salmo gairdnerii irideus*)	1		0.01
Nishin (herring, *Clupea pallasi*)	2		0.02
Saba (mackerel, *pneumophorus japonicus*)	6	0.01−0.13	0.06
Sanma (mackerel pike, *Cololabis saira*)	2		0.00
Sawara (spanish mackerel, *Scomberomorus niphonius*)	3	0.01−0.04	0.03
Sayori (halfbeak, *Hemirhamphus sajori*)	1		0.02
Shiira (dorado, *Coryphaena hippurus*)	1		0.01
Shimahata (*Cephalopholis igarashiensis*)	1		0.00
Suketo-dara (walleye pollack, *Theragra chalcogramma*)	2		0.00
Surume-ika (cattlefish, *Todarades pacificus*)	9	0.00−0.01	0.00
Suzuki (perch, *Lataolabrax japonicus*)	1		0.59
Tachiuo (hairtall, *Trichiurus lepturus*)	6	0.02−0.43	0.20
Takabe (*Labracoglossa argentiventris*)	3	0.00−0.01	0.01
Tobiuo (flying fish, *Prognichthys agoo*)	4		0.00
Wakasagi (pond smelt, *Hypomesus olidus*)	2	0.01−0.17	0.09
Unagi (eel, *Anguilla japonica*)	3	0.02−0.03	0.02
Urokonoto (*Notothenia squamifrons*)	1		0.00
Yoroiitachiuo (*Hoplobrotula armata*)	1		0.01
Total	146	0.00−1.83	0.04

N : number of samples

Table 2. PCB Concentrations in Fishes Collected form Tokyo Bay (ppm)

Sample	Sampling station	N	Range	Mean
Asari	Nojimazaki	3	0.00—0.01	0.01
	Ohi	3	0.01—0.03	0.02
	Sanmaizu	3	0.00—0.01	0.01
	Jinkonagisa	2		0.01
	Futtsu	3	0.00—0.01	0.00
Suzuki		35	0.24—0.98	0.49

N : number of samples

Table 3. PCB Concentrations in Marine Products, Meats and others (ppm)

Samples		N	Range	Mean
Marine product (imported)	shrimp	7		0.00
	lobster	4		0.00
	cattle fish	3		0.00
	herring	2	0.01—0.06	0.04
	salmon roe	2	0.00—0.04	0.02
	others	13	0.00—0.02	0.00
Processed marine product		30	0.00—0.46	0.04
Meat	pork	5	0.00—0.01	0.00
	pig liver	5		0.00
	beef	5	0.00—0.01	0.00
	cow liver	5	0.00—0.01	0.00
	chicken	5		0.00
	chicken liver	5		0.00
Egg	hen	16		0.00
	quail	4		0.00
Edible fat	refined lard	19	0.00—0.01	0.00
	lard	3	0.00—0.01	0.00
	tallow	4	0.00—0.03	0.01
Baby food		10		0.00
Food wrapper		20		0.00

N : number of samples

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	10	0.00—0.01	0.00		
Natural cheese	20	0.00—0.04	0.02	0.00—0.15	0.06
Process cheese	8	0.00—0.01	0.00	0.00—0.06	0.02
Condensed milk	2		0.00		0.00
Modified milk powder	10		0.00		0.00
Milk	20		0.00	0.00—0.03	0.01

N : number of samples

ppm，ニシン薫製0.32 ppm，八ッ目ウナギ0.14 ppm，かにみそ（ズワイガニ）0.11 ppmであり，その他イワシの干物，たら子などから若干検出されたが魚肉練製品，スルメイカの干物などからはほとんど検出されなかった．

乳製品のPCB含有量測定結果をTable 4に示す．チーズはナチュラルチーズ20検体中13検体からPCBが検出され，平均0.02 ppmであった．なおPCBの検出されない7検体のうち5検体はクリームチーズであった．またプロセスチーズは8検体中2検体から0.01 ppmが検出された．バターは10検体中2検体から0.01 ppm検出され，コンデンスミルク，育児用粉乳，牛乳からはPCBは検出されなかった．

肉類についてはTable 3に示すように，豚肉，豚肝，牛肉，牛肝，鶏肉，鶏肝について各5検体を検査したが，豚肉2検体，牛肉，牛肝各1検体から0.01 ppm検出された他は不検出であった．

鶏卵16検体，うずら卵4検体からはPCBは検出されなかった．

食用油脂26検体のPCB含有量を測定した．このうち合成樹脂製容器入りの精製ラードは19検体中1検体から0.01 ppm，豚脂3検体中1検体から0.01 ppm，牛脂は4検体中2検体から0.01 ppm，1検体から0.03 ppmを検出した．

ベビーフードは肉入り野菜のビン詰め，パンがゆ，ライスがゆ（フレーク状），ビスケットなど10検体について検査したがPCBは検出されなかった．

容器包装は各種合成樹脂製の調理用品，紙ナプキン，紙皿など20検体について調査したがPCBは検出されなかった．

まとめ

東京都におけるPCB汚染の状況を調査する目的で，魚介類，水産加工品，肉類，乳製品，食用油脂，ベビーフード，容器包装のPCB含有量を測定した．暫定規制値を越えるものはなく，全般的に低濃度で数年来大きな変化は認められなかった．

謝辞 本調査にご協力いただいた東京都衛生局食品監視課の方々に深謝いたします．

文献

1) 山崎清子，水石和子，竹内正博，吉原武俊：東京衛研年報，33，182－185，1982
2) 山野辺秀夫，天川映子，鈴木助治，小泉清太郎，戸谷哲也：東京衛研年報，25，119，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 146-149, 1983

ゴム製乳首中の第2級アミン由来のN−ニトロソアミン

水石和子*, 竹内正博*, 吉原武俊*

N–Nitrosamines Originated from Secondary Amines in Rubber Nipples

KAZUKO MIZUISHI*, MASAHIRO TAKEUCHI* and TAKETOSHI YOSHIHARA*

Volatile N–nitrosamines and nitrosatable amines in rubber nipples were determined by gas chromatography using a thermal energy analyzer. Five grams of samples was soaked in 100 ml buffer solution (simulate saliva) containing 200 ppm sodium nitrite for 24 hr at 40°C. The solution was divided in two portions. One part was extracted twice with 100 ml of dichloromethane after addition of 10 ml of 20% sodium hydroxide solution. The other was permitted to stand for 30 min at pH 1, and then extracted twice with 100 ml of dichloromethane after addition of 20 ml of 20% sodium hydroxide solution. Each dichlormethane phase was concentrated and submitted to gas chromatography under the following conditions: 3 m × 3mm glass column packed with 20% Versamide 900 on Chromosorb WAW (60–80 mesh) at 200°C.

N–nitrosamines were detected in samples of natural rubber and isoprene rubber ; N–nitrosodimethylamine 0 – 0.11 ppm, N–nitrosodiethylamine 0 – 0.34 ppm, N–nitrosopiperidine 0 – 0.21 ppm. These were not detected in silicone rubber. N–nitrosatable amines were detected in all the samples as the corresponding N–nitrosamines ; N–nitrosodimethylamine 0 – 19.3 ppm, N–nitrosodiethylamine 0 – 37.1 ppm, N–nitrosodipropylamine 0 – 5.4 ppm, N–nitrosopiperidine 0 – 19.8 ppm, N–nitrosodibutylamine 0 – 24.7 ppm.

Keywords : N–nitrosamine, secondary amine, rubber nipple, thermal energy analyzer, gas chromatography

緒　言

哺乳用のゴム製乳首に発ガン性物質として知られるN−ニトロソアミン（NNA）およびその前駆物質の第2級アミンが含まれていることが，Spiegelhalder[1]らによって報告されヨーロッパにおいて社会問題となった．すでに，西ドイツおよびオランダでは乳児の健康と生命の安全のために，NNAおよびアミン類に対して規制措置がとられている．我国においても，乳首中にNNAが含まれていることが確認され[2]，対応が迫られており，現在，厚生省を中心として実態調査ならびに規制措置の検討が進められている．著者らも健康を守るという都衛生行政の立場から，この問題の重要性を認識し調査を行なうことにした．

今回は，都内で市販されているゴム製乳首およびおしゃぶりについて，NNAの存在と生成に関する検討を行なったので報告する．

実　験

1　試料

1982年1月～3月中に都内のデパートおよびスーパーマーケットで市販されていた乳首，おしゃぶり計17検体を調査試料とした．

2　試薬

ⅰ）NNA標準物質として，東京化成製N−ニトロソジメチルアミン（NDMA），N−ニトロソジエチルアミン（NDEA），N−ニトロソジブチルアミン（NDBA）および関東化学製N−ニトロソ−n−ジプロピルアミン（NDPA），N−ニトロソピペリジン（NPi）を使用した．その他の溶媒，試薬は特級をそのまま使用した．

ⅱ）人工唾液の調製：炭酸水素ナトリウム4.2 g，炭酸カリウム0.2 g，塩化ナトリウム0.5 gを1 ℓの精製水に溶かした．

3　装置および測定条件

TEA–GC : Thermo Electron社製熱エネルギー分析器TEA 502に島津製ガスクロマトグラフGC–6Aを連結して使用した．GCの分離カラムは20% Versamide 900 (Chromosorb WAW, 60–80 mesh) を内径3 mm,

* 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

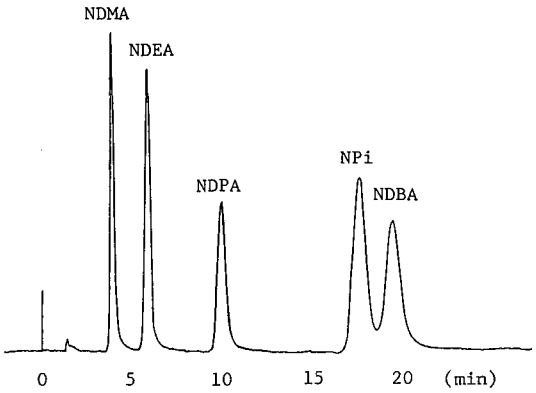


Fig.1. TEA–GC Chromatogram of N–Nitrosamines
Column : 20% Versamide 900 / Chromosorb WAW, 60–80 mesh, 3m×3mm, 200°C, Sample size : 5ul
NDMA : N–Nitrosodimethylamine, NDEA : N–Nitrosodiethylamine, NDPA : N–Nitrosodipropylamine, NPi : N–Nitrosopiperidine, N-DBA: N–Nitrosodibutylamine

長さ 3 m のガラスカラムに充てんしたものを使用した. Fig. 1 に標準の NNA について得られたクロマトグラムを示す.

4 操作法

試験溶液の調製：Fig. 2 に示すように，細切した試料 5 g を人工唾液100 mlに浸漬し，これに 1 %亜硝酸ナトリウム溶液 2 ml を加えてから40°Cで24時間溶出を行なった. 溶出液を 2 分し，半量は20%水酸化ナトリウム溶液10 ml を加えてアルカリ性とし，ジクロルメタン 100 ml で 2 回抽出を行なってから，抽出液を KD– 濃縮器で濃縮し，TEA–GC の試験溶液（1）とした. 他の半量には10%塩酸10 ml を加え室温で30分間放置後，20%水酸化ナトリウム20 ml を加えてアルカリ性にし，同様に抽出，濃縮を行なって試験溶液（2）とした.

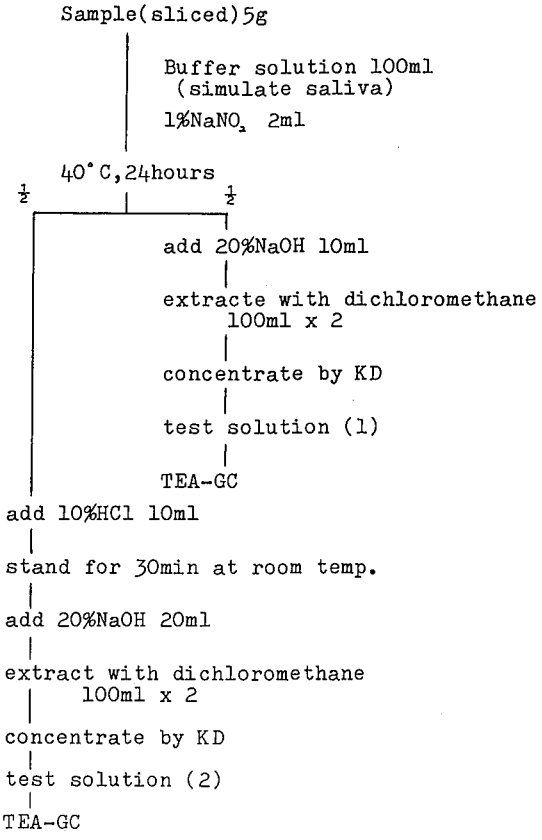


Fig.2. Analytical Method for N–Nitrosamines in Rubber Nipples and Paclfiers

結果および考察

ゴム製の乳首およびおしゃぶり等についての NNA の分析結果を Table 1 に示す.

今回調査した試料は材質が天然ラテックス製 4，合成イソプレン製 7，合成シリコーン製 4，不明 2 の17検体である. pH 8.5 において亜硝酸ナトリウム200 ppm を含む人工唾液中に溶出した NNA は，天然ラテックス製から NDEA が 0 －0.34 ppm，合成イソプレン製から NDMA が 0 －0.01 ppm，NDEA が 0 －0.03 ppm，Npi が 0 －0.21 ppm 検出された. しかし，合成シリコーン製からはいずれの NNA も検出されなかった. このようにゴムの材質の種類によって製品中から溶出する NNA の量と種類がかなり異なることがわかる. これはゴムの製造工程において添加される配合剤の違いによるものと考えられる. NNA の生成には前駆物質としての第 2 級アミンとニトロソ化剤の存在が不可欠である. ゴム製品に用いる配合剤は非常に種類が多い. この多岐にわたる各種配合剤が第 2 級アミン源として指摘できる. 例えば，Fig. 3 に示すように加硫促進剤の一種であるジチオカルバメート類やチウラムスルフィド類は第 2 級アミンと二硫化炭素の反応生成物であるので，一部が分解して種々の第 2 級アミンを生成する可能性がある.

また，ニトロソ化剤としては空気中の窒素酸化物等があり，第 2 級アミンが空気と接触することにより，更に各種添加剤の触媒作用を受け，徐々に NNA を生成するものと思われる. 以上のことはゴム製品全般についてい

Table 1. Amounts of N–Nitrosamines and Nitrosatable Compounds Migrated from Rubber Nipples and Pacifiers into Buffer Solution (Simulate Saliva)

Sample	(1) pH=8.5					(2) pH=1					Material
	NDMA	NDEA	NDPA	NPi	NDBA	NDMA	NDEA	NDPA	NPi	NDBA	
A		0.09				0.07	18.5	2.5		9.8	NR
B		0.34				0.23	7.0	0.87			NR
C						0.69	7.8				NR
D						0.24	3.5			3.0	NR
E				0.01			0.57		10.4	5.8	IR
F				0.01		0.03	2.9		7.9		IR
G						0.06	0.16		15.3	3.2	IR
H						1.3	10.4		0.20		IR
I				0.21					19.8	24.7	IR
J						0.11	0.33		6.7		IR
K	0.01	0.03				19.3	37.1	5.4			IR
L							0.56		1.7		u.k.
M						0.28	7.3				u.k.
N						0.02	0.10				Si
O						0.13	0.17				Si
P						0.14	0.08				Si
Q						0.30	0.11				Si

(expressed as ppm, rubber sample)

pH=8.5 : Buffer solution

pH=1 : Buffer solution was acidified to pH 1 and stood at room temperature for 30 min, and precursor amines were estimated as N–nitrosamines.

NR : Natural Rubber, IR : Iosprene Rubber, Si : Silicone Rubber, u.k. : unknown

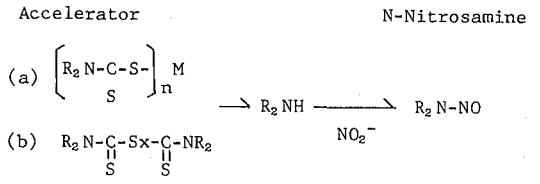


Fig.3. Types of Rubber Accelerators and Corresponding N–Nitrosamines
(a) Dithiocarbamates, M : Metal
(b) Thiuram mono– or polysulphides, x : Number

えることであるが，乳首，おしゃぶり等の場合は唾液中の亜硝酸塩がニトロソ化剤として作用する．しかしニトロソ化反応は中性およびアルカリ性の条件下ではあまり進行せず，酸性条件下で促進されることから，乳首等から第2級アミンが溶出した場合，ニトロソ化は口腔内より胃中に移行して進行するものと思われる．したがって，Table 1の（1）に示したNNAの値は溶出した第2級アミンが変化したものではなく製品の製造・保存・流通の過程に生じたNNAと考えられる．

一方，（2）は人工唾液中に溶出した第2級アミンを酸性（pH = 1）の条件下でニトロソ化を行なってから，（1）の場合と同様にしてNNAを測定し，それぞれ製品中の濃度に換算したものであり，胃内におけるニトロソ化反応のin vitroにおける結果に対応する．この場合は全製品からNNAが検出され，NDMAは0－19.3 ppm，NDEAは0－37.1 ppm，NDPAは0－5.4 ppm，NPiは0－19.8 ppm，NDBAは0－24.7 ppmであった．今回調査した試料の中では天然ラテックスおよび合成イソプレン製のものに高い値が多く，シリコーン製は一体に低い値であった．

西独では[3] 1982年1月よりゴム製乳首について規格試験法を制定し，N–ニトロソアミン規制を行なっている．（総量がpH 7で10 ppb以下，pH 1で200 ppb以下）西独の公定法の場合は，人工唾液中の亜硝酸濃度が30ppmである．著者らは，日本人の唾液中の亜硝酸濃

度が0.1－200 ppmという報告[4]に基づいて亜硝酸ナトリウムの濃度を200 ppmとした．ニトロソ化の反応は，反応液のpHと亜硝酸濃度により影響される．したがって，西独法とは分析条件が若干異るので，今回の結果に西独の規制値を直ちに適用して考察することは適当でない．亜硝酸塩濃度とN－ニトロソアミンの生成率の関係については，検討中である．

乳首からの第2級アミンの溶出は，温水洗浄によって減少することが明らかである[5]．ゴムの劣化の問題も生じることから，完全除去は不可能である．原因となる加硫促進剤の使用を避け，より安全な薬品を用いることが有効と考えられる．

（本研究の概要は衛生局学会第69回1982年11月で発表した．）

文　献

1) B, Spiegelhalder, and R, Preussmann. : Proceeding of the 7 th International Meeting on Analysis and Formation of Nitroso compounds, 講演要旨 (Tokyo), 1, 1981

2) 辰濃　隆，山田　隆，井上たき子，谷村顕雄：第18回全国衛生化学技術協議会年会，講演要旨，88，1981

3) BGBL. IS., 1945, 1981

4) Motoo Harada, Hajimu Ishiwata, Yoko Nakamura, Akio Tanimura and Morizo Ishidate : *J. Food Hyg. Soc.*, 16, 11, 1975

5) 辰濃　隆，井上たき子，山田　隆，谷村顕雄：衛生試験所報告，100，62，1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 150-154, 1983

蜂蜜中の残留サルファ剤検出法について

竹葉和江*, 神崎政子*, 村上文子*, 松本昌雄*

Detection of Residual Sulfonamides in Honey

KAZUE TAKEBA*, MASAKO KANZAKI*, FUMIKO MURAKAMI*
and MASAO MATSUMOTO*

A determination method by gas chromatography for 5 residual sulfonamides in honey was studied. Sulfonamides are widely used as an antibacterial agent for foul brood, disease of honey bee, caused by *Bacillvs larvae*. Honey extract sample was first subjected to screening test by Bratton–Marshall method, and then each sulfonamide was indentified by gas chromatography. The recovery rate of sulfonamides experimentally added to honey was 80 – 89% at 0.1 μg/g level, the coefficient of variation 7 – 12% and the detection limits ca. 0.01 – 0.20 μg/g.

When this method was applied to 79 commercialbrands of honey, sulfathiazole and sulfamonomethoxine were respectively detected in one sample each.

Keywords: honey, residual sulfonamide, antibacterial agent, foul brood, *Bacillus larvae*,

わが国で法定家畜伝染病に指定されている蜜蜂のアメリカ腐蛆病 (foul brood) は，世界各国共通にあり，*Bacillus larvae* によって引き起される蜂子の伝染病である．

この病気が発生した場合には，全焼却の処置がとられるので，養蜂業界における経済的損失は大きいと言われている．そのために蜜蜂に対し，治療あるいは予防的にサルファ剤等の薬剤投与が行なわれることから，これらの薬物が蜂蜜に残留することが懸念される．このような動物医薬品が食品へ移行し残留する問題は，最近食品衛生上重要な課題となっており，蜂蜜中の残留薬物についても検査体制の確立が強く望まれている．

現在，食品中の残留サルファ剤の検査法としては，畜産物を対象として厚生省が通知したガスクロマトグラフィー (GC) による方法（厚生省法）[1] がある．この方法は蜂蜜のような糖濃度の高い食品には，抽出の際試料が固化してしまうため，そのままでは適用できない．そこで，蜂蜜中のサルファ剤の検出法として，非特異的ではあるが簡便な方法として従来からサルファ剤の検査に用いられている Bratton–Marshall 法 (B-M法)[2)-4)]で，蜂蜜をスクリーニングした後，GC で分別定量する方法について検討した．

また，応用試験として市販の蜂蜜についても検出を試みたので，併せてこれらの結果を報告する．

実験方法

1 試薬

1）サルファ剤：sulfathiazole (STZ), sigma ; sulfamonomethoxine (SMM), 第一製薬㈱ ; sulfamerazine (SMZ), 田辺製薬㈱ ; sulfadimethoxine (SDM), 第一製薬 ; sulfaquinoxaline (SQX), マルピーメルクシャープアンドドーム㈱. 各サルファ剤の標準溶液は，それぞれ10mg を100 ml メスフラスコにとり，少量のジメチルホルムアミドに溶解し，アセトンで100ml とした（100 μg/g）．これを適宜希釈して使用した．

2）0.1%亜硝酸ナトリウム：$NaNO_2$（特級）0.1 g を蒸留水に溶解し100ml とした．

3）0.5% スルファミン酸アンモニウム：$NH_4OSO_2NH_2$（特級）0.5 g を蒸留水に溶解して100 ml とした．

4）0.1% ナフチルエチレンジアミン：$C_{10}H_7NHCH_2CH_2NH_2 \cdot 2HCl$（特級）0.1 g を蒸留水に溶解して100 ml とした．

5）1M リン酸－カリウム：KH_2PO_4（特級）136 g を蒸留水に溶解して1000 ml とした．

* 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

6）ジアゾメタンエーテル溶液：N－メチル－N－ニトロソ－P－トルエンスルホンアミド（メルク製）4.3 g をエチルエーテル26 ml に溶解し，これにあらかじめ水酸化カリウム（メルク製）1 g を蒸留水1.6 ml およびエチルアルコール5 ml に溶解したものを加え，水浴上（65°）で蒸留して，留液20 ml をとった．受器にはエチルエーテル5 ml を入れ，冷却管の先端は受器のエチルエーテルに浸し，全体を氷水中で冷却した．

このほか，酢酸エチル，アセトンおよび無水硫酸ナトリウムは，残留農薬試験用を，塩化ナトリウムは特級を使用した．

2　装置および測定条件

1）分光光度計：日立自記分光光度計 EPS－3T 形

2）GC：島津 GC－5A 型（^{63}NiECD 付）．カラム充てん剤 SiliconeOV－17＋SiliconeOV－210（1.5＋1.95）%，Uniport HP, 100－120メッシュ，3 mm × 2 m ガラスカラム．カラム温度270°，注入口温度300°，ECD 温度320°，窒素ガス流量100 ml/min.

3　試料の調製

厚生省法を，蜂蜜に適用すると無水硫酸ナトリウムによる試料の脱水と同時に均質化を行なうところで，全体が固化してしまい，それ以後の抽出操作ができなくなった．そこで，蜂蜜を直接水酸化ナトリウム溶液に溶解し，pH 調整をした後溶媒で抽出する方法を用いた．すなわち，蜂蜜30 g をとり，N/10水酸化ナトリウム20 ml を加えて溶解した．これに1M リン酸－カリウム1.3 ml と N/10塩酸数 ml で pH を8.0に調整後，200 ml 分液ロートに移し，塩化ナトリウム10 g を加えて溶解し，これに酢酸エチル50 ml を加えて振とう抽出した．この酢酸エチル層を分取し，更に一回酢酸エチル30 ml で振とう抽出し，全酢酸エチル層を合わせ，無水硫酸ナトリウムで脱水後，45°C の水浴上で減圧乾固した．この残渣にアセトン3 ml を加えて溶解し，このうち2 ml をスクリーニングとして B–M 法の試料とし，残りの1 ml を GC 用の試料とした．

4　B–M 法による測定

抽出試料のアセトン2 ml を窒素ガスで留去し，これに蒸留水3 ml と4 N 塩酸0.5 ml を加えて溶解した．これに0.1%亜硝酸ナトリウム0.3 ml を加えて混合し3分後，0.5%スルファミン酸アンモニウム0.3 ml を加え混和した．2分後に，0.1%ナフチルエチレンジアミン0.3 ml を加えて混和した．30分間放置後，空試験溶液を対照として，波長550 nm で吸光度を測定した．この反応で，発色したものについて，次の GC による測定を行なった．

5　GC による測定

抽出試料のアセトン1 ml を窒素ガスで留去し，これにジアゾメタンエーテル溶液5 ml を加え室温で30分間反応させた後，溶媒を窒素ガスで留去し，残渣にアセトン1 ml を加えて溶解したものを GC に注入した．

6　GC－質量分析計（MS）による同定

酢酸エチルで抽出濃縮した試料を，Woolley らの方法[5]に準拠して，薄層クロマトグラフィーによるクリーンアップをした後，メチル化し GC–MS による測定を行なった．

7　バイオアッセイによる確認

ペーパーディスク法[6]に準拠して行なった．すなわち，抽出濃縮した試料をアセトン1 ml に溶かしてから2等分した．一方はそのまま，もう一方は0.1%パラアミノ安息香酸（PABA）で処理してからパルプディスクに吸収させ，風乾後検出用平板におき，37°C で18時間培養して，阻止円形成の有無を観察した．検出用培地には，柴田ら[7]の報告したものを用いた．

結　　果

1　検量線

適宜希釈した各サルファ剤標準溶液を，試料と同様に抽出し，メチル化後 GC で測定し，そのピーク高から検量線を作成した．

STZ および SMZ の検量線は Fig.1 に，SMM, SDM および SQX の検量線は Fig.2 に示した．

STZ および SMZ は，GC 注入量0.1－0.5 ng の範囲で原点を通る直線であった．SMM, SDM および SQX

Tabel 1. Retention Times and Relative Retention Times of Sulfonamide Methyl Derivatives

Sulfonamide	t_R (min)	RRT
STZ	5.14	0.70
SMM	7.31	1.00
SMZ	7.38	1.01
SDM	13.39	1.83
SQX	21.30	2.91

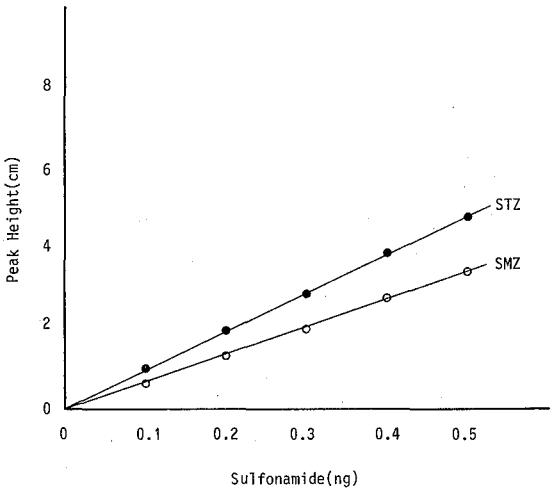


Fig.1. Calibration Curves of Sulfonamide (STZ and SMZ) Methyl Derivatives

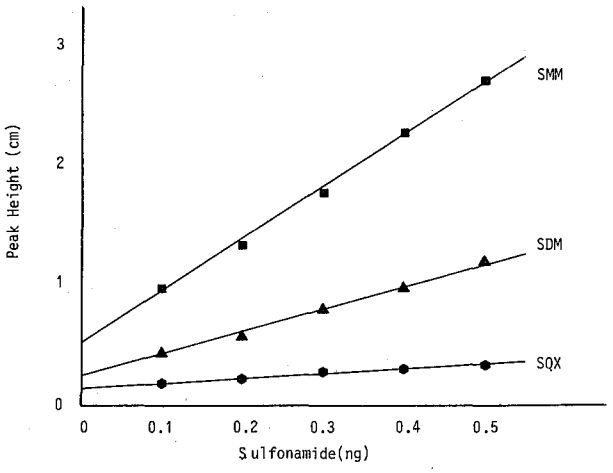


Fig.2. Calibration Curves of Sulfonamide (SMM,SDM and SQX) Methyl Derivatives

Table 2. Recovery Rate of Sulfonamides experimentally added to Honey

Sulfonamide	STZ	SMM	SMZ	SDM	SQX
Added Level (μg/10g)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Recovery Rate (%)*	83.2	81.4	80.3	88.9	89.2
Standard Deviation	7.2	10.0	5.2	6.0	8.4
Coefficient of Variation (%)	8.7	12.3	6.5	6.7	9.4

*Average of 5 Samples

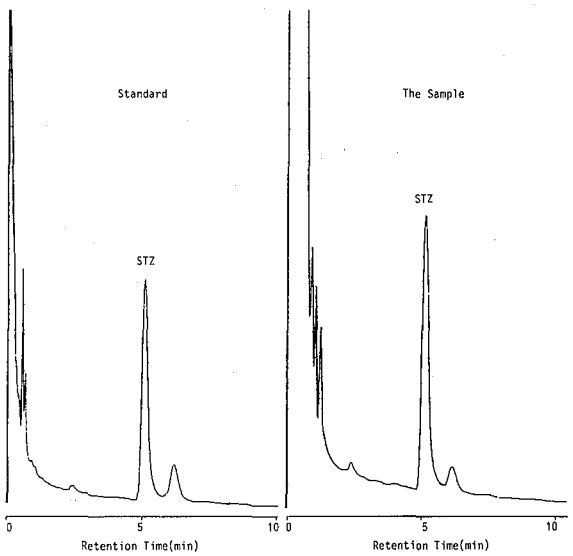


Fig.3. Gas Chromatograms of Sulfathiazole Methyl Derivative

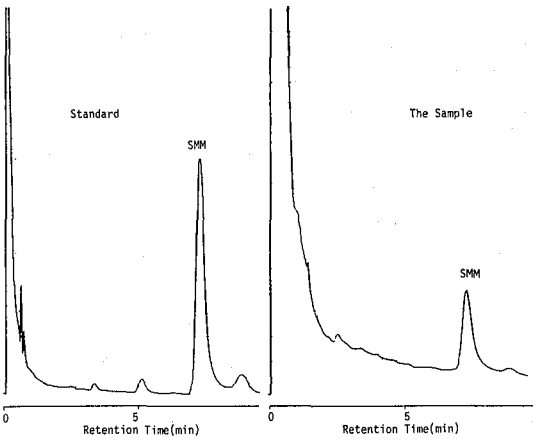


Fig.4. Gas Chromatograms of Sulfamonomethoxine Methyl Derivative

Table 3. List of the Honey Samples tested

Country	Number of Sample
Domestic	13
Imported	
U.S.A. & Canada	10
China	9
Argentine	5
Hungary	2
Spain & Mexico	2
West Germany	1
Unknown	20
Unknown	17
Total	79

は，GC注入量0.1－0.5 ngの範囲で，いずれも直線性を示したが，原点を通らなかった．

2　添加回収実験

サルファ剤を含まない蜂蜜に，STZ, SMM, SMZ, SDMおよびSQXをそれぞれ0.1 μg/gの濃度に添加し，回収実験を行なった．SMMおよびSMZは，それぞれピークが分離しないので，別々に回収実験を行なった．

Table 1に，各サルファ剤の保持時間（t_R）およびSMMに対する相対保持時間（RRT）を示した．

Table 2には，各サルファ剤の回収実験の結果を示した．

すなわち，回収率（%）と標準偏差は，STZ 83.2±7.2, SMM 81.4±10.0, SMZ 80.3±5.2, SDM 88.9±6.0およびSQX 89.2±8.4であった．変動係数（%）は，それぞれ8.7, 12.3, 6.5, 6.7および9.4であった．

また蜂蜜中のサルファ剤の検出限界は，STZ約0.01－0.02（μg/g），SMM約0.01－0.02，SMZ約0.01－0.03，SDM約0.02－0.04およびSQX約0.08－0.20であった．

3　市販蜂蜜への応用試験

この方法の応用試験として，1981－1982年の間に都内で市販されていた蜂蜜79検体について，サルファ剤の検出を試みた．検査したこれらの蜂蜜の生産国を，Table 3に示した．

検査の結果，B-M法によるスクリーニングで79検体中11検体が，サルファ剤反応陽性を示し，これらの検体についてGCで定量試験を行なったところ，最終的に2検体にSTZ 3.3（μg/g）およびSMM 7.2に相当するピークを検出した．これらのクロマトグラムを，Fig.3およびFig.4に示した．

STZおよびSMMの検出された2検体ともに，生産国は無表示であった．B-M法で類似反応を示した残りの9検体の蜂蜜は，すべて柑きつ類の花蜜の表示のものであった．

なお，検出されたSTZおよびSMMの確認のため，GC-MSによる測定を試みた．しかし，サルファ剤の絶対量が足りなかったことおよび夾雑物が完全に除去できなかったために，標準品に一致するマススペクトルは，得られなかった．

そこで，STZおよびSMMの検出された蜂蜜を化学的に抽出濃縮した試料で，バイオアッセイによる確認を試みた．その結果，2試料ともにPABA無処理では阻止円形成が認められたが，PABA処理の場合阻止円は形成されなかった．したがって，GC上のSTZおよびSMMに相当するピークは，サルファ剤であることが確認された．

考　察

動物性食品の安全性と安定生産確保を目的として，飼料安全法の制定ならびに薬事法の一部改正が行なわれ，飼料添加物の使用基準および休薬期間等が定められた．また，これにともない食品衛生法の一部改正も行なわれ，食品中の残留薬物の規制も強化されるようになった．飼料添加物の使用基準によると，牛，馬，豚，鶏，うずら，ぶり，まだい，こい，うなぎ，にじますおよびあゆと並び蜜蜂もその対象動物に指定されているが，現在蜜蜂に対しては，他の動物のように具体的な使用基準は定められていない．

また食品衛生法で，食品は抗生物質を含んではならないとされ，食肉，食鳥卵および魚介類は，抗生物質のほか化学的合成品たる抗菌性物質を含有してはならないとされているが，蜂蜜を含むその他の食品については，化学的合成品である抗菌性物質の規制は，現在のところない．

今回，蜜蜂の疾病の治療薬の中で，広汎に使用されている5種類のサルファ剤をとりあげて，蜂蜜からの検出を試みた．

検出方法は，厚生省法の抽出方法を蜂蜜にも適用できるように一部改良し，また多量の検体を能率的に処理することを目的として，GCによる測定に先立ち，抽出試料の一部を使用し，B-M法によるスクリーニングを行なった．

抗生物質あるいは抗菌性物質のスクリーニングには，

ディスク法によるバイオアッセイが一般的に用いられるが，蜂蜜の場合には蜂蜜自身に細菌の発育を抑制する因子があり[8]，バイオアッセイでは判定が困難なことがあるので，B−M 法をスクリーニングに用いた．

GC 法でサルファ剤が検出された場合，確認同定には GC−MS による測定が一般的であるが，食品中に残留する薬物は，微量でかつ検体の量も限られていることが多く，実際には絶対量不足のために，GC−MS で確認同定出来ないことがしばしばある．このような場合には，抽出濃縮試料について PABA 処理を行なって，バイオアッセイで確認することがある[9]．

この方法の応用試験として，市販の蜂蜜について検出を試みたところ，79検体中 2 検体にサルファ剤，STZ および SMM を 1 検体ずつ検出した．

STZ および SMM は，腐蛆病の予防あるいは治療に効果的な薬剤として繁用されている[10) 11)]ことなどから，蜂蜜に残留したものと考えられる．

このような動物医薬品を含んだ蜂蜜を市場から排除してゆくために，養蜂業にも動物医薬品の使用基準ならびに休薬期間を制定し，また蜂蜜への残留についても規制を加え，検査体制を強化し，監視することが必要である．

要　約

蜜蜂の腐蛆病に使用されるサルファ剤について，蜂蜜からの検出法について検討した．蜂蜜を B−M 法でスクリーニングし，次いで GC により個々のサルファ剤を分別定量した．

この方法によるサルファ剤の添加回収率は，80−89％で，変動係数は 7 −12％そして検出限界は約0.01−0.20 μg/g であった．

この方法の応用試験として，市販の蜂蜜79検体について検出を試みたところ，STZ および SMM をそれぞれ 1 検体ずつ検出した．

謝辞　検体収集にあたり，協力していただいた衛生局食品監視課の方々に深謝いたします．

文　献

1) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜産物中の残留物質検査法，第 2 集の 3，1979
2) Bratton, A.C. and Marshall, E.K. : *J. Biol. Chem.*, **128** 537, 1939
3) Phillip, W.F. and Trafton, J.E. : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **58** 44, 1975
4) Goodspeed, D.P., Simpson, R.M., Ashworth, R.B., Shafer, J.W. and Cook, H.R. : *J. Assoc. Off. Anal.* Chem., **61**, 1050, 1978
5) Woolley Jr, J.L., Murch, O. and Sigel, C. : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **61**, 545, 1978
6) 日本国際酪農連盟：第53回国際酪農連盟年次会議報告，資料18号，1969
7) 柴田元雄，重盛啓子，今村順茂：*Chemotherapy*, 22, 1424, 1974
8) 越後多嘉志：Honeybee Science, 1，49，1980
9) 松本昌雄，池部美好：食衛誌，21，446，1980
10) Shimanuki, H. : Honeybee Science, 1, 163, 1980
11) 大本健路，入岡徹生：獣畜新報，665，103，1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 155-158, 1983

オイカワ（淡水魚）より同定した除草剤 (Benthiocarb, CNP, Chlomethoxynil, Oxadiazon) について

宮崎奉之*, 山岸達典*, 松本昌雄*

Identification of Herbicides (Benthiocarb, CNP, Chlomethoxynil, Oxadiazon) in Freshwater Fish, *Zacco platypus*

TOMOYUKI MIYAZAKI*, TATSUNORI YAMAGISHI* and MASAO MATSUMOTO*

As part of a food contamination monitoring program, we conducted an investigation on herbicides detected in freshwater fish (pale chub, *Zacco platypus*) caught from a river in the agricultural area during the season when herbicides are sprayed in paddy fields. The fish extract was cleaned up through acetonitrile partitioning and by Florisil column chromatography, and then subjected to GC/MS analysis. Four herbicides, i.e. benthiocarb [carbamothioic acid, diethy S– ((4–chlorophenyl) methyl) ester], CNP [1, 3, 5,- –trichloro–2– (4–nitrophenoxy) benzene], chlomethoxynil [2, 4–dichloro–1– (3–methoxy–4–nitrophenoxy) benzene] , oxadiazon [3– (2,4– dichloro–5– (1–methoxylethoxy) phenyl) –5– (1,1– dimethylethyl) 1,3,4–oxadiazol–2 (3H) –one] , were identified. Residue concentrations of these herbicides on wet weight basis were respectively; benthiocarb, 0.5 ppm; CNP, 1.2 ppm; chlomethoxynil, 0.2 ppm; and oxadiazon, 0.01 ppm. The study suggests that herbicides entered the river from the paddy fields and accumulated in the fish.

Keywords : herbicide, identification, benthiocarb, CNP, chlomethoxynil, oxadiazon, gas chromatography/mass spectrometry

緒　言

水田除草剤の1種であるCNP〔1,3,5–trichloro–2–(4–nitrophenoxy) benzene〕が魚介類[1)2)3)6)7)]や河川水[4)5)]あるいは海水中[7)]から検出されたことから，その残留が問題になっている．これらの生物あるいは水中でのCNP濃度は5～6月に高く[7)]，それが水田に除草剤を散布する時期とちょうど一致している．つまり，魚介類中のCNP残留は散布された除草剤が水田から河川へ流れ込み，それが種々の生物中に取り込まれて残留するという汚染経路であったことが判明した．このような現象は，CNPに限らず他の除草剤においても生物中に残留する可能性を示している．そこで，今回，水田除草剤が散布されている時期に淡水魚を採取し，これを試料として除草剤の検索を試みたところ，下記の4種の除草剤が同定された．すなわち，benthiocarb〔carbamothioic acid, diethyl S–((4–chlorophenyl) methyl) ester〕, CNP, chlomethoxynil〔2,4–dichloro–1–(3–methoxy–4–nitrophenoxy) benzene〕, oxadiazon〔3–(2,4–dichloro–5–(1–methylethoxy) phenyl)–5–(1,1–dimethylethyl)–1,3,4–oxadiazol–2(3H)–one〕が確認された．この魚試料中の除草剤の濃度は湿重量当たりbenthiocarb 0.5 ppm, CNP 1.2 ppm, chlomethoxynil 0.2 ppm, oxadiazon 0.01 ppmであった．

材料および方法

1　**試料**：オイカワ（*Zacco platypus*）は1980年6月8日，思川水系の小山（栃木県）で採取したものである．

2　**試薬および標準品**：使用した溶媒は残留農薬分析用のものである．標準品のbenthiocarbはクミアイ化学より供与されたものである．CNPおよびchlomethoxynilは市販農薬製剤より抽出し，メタノールより再結晶を繰り返して得たものである．CNP：mp 108°C, Chlomethoxynil: mp 114°C. Oxadiazonは和光

* 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

純薬工業㈱よりの購入品である．

3 分離同定法：試料の魚（オイカワ，240 g）を十分に細切，ホモジナイズした後，アセトニトリル，1.2 *l* で抽出した．これを2％塩化ナトリウム溶液6 *l* 中へ投入し，ヘキサン1 *l* で2回抽出した．このヘキサン溶液を水洗（300 m*l*×2），脱水後，濃縮した．この濃縮液をヘキサンで40 m*l* とし，これをヘキサン飽和アセトニトリル40 m*l* で4回抽出した．このアセトニトリル溶液を2％塩化ナトリウム溶液500 m*l* へ投入し，ヘキサン100 m*l* で2回抽出した．このヘキサン層を水洗（100 m*l*×2），脱水後，濃縮した．この濃縮液をフロジリルカラムクロマト（Florisil, 28 g, 130°C, 15h 活性化したもの．ヘキサンで充てん）に注ぎ，最初20％ジクロルメタン・ヘキサン．200 m*l* で洗浄後，ジクロルメタン：アセトニトリル：ヘキサン（50.00：0.35：49.65）200 m*l* で溶出した．この分画を濃縮し，再びフロリジルカラムクロマト（Florisil 32 g 使用）に注ぎ，20％，30％，40％，50％ジクロルメタン・ヘキサン各200 m*l* で次々と段階的に溶出した．このうち40％ジクロルメタン・ヘキサン分画を濃縮して約0.3 m*l* とし GC/MS 測定溶液とした．

4 GC/MS 測定条件：ガスクロマトグラフ（Hewlett Packard 5710 A），マススペクトロメーター（日本電子㈱，JMS D−300），JMA 2000システムでオンラインにより測定した．カラムとして3％ OV−1を用い，カラム温度を190°C で10分間保ったのち，1分間に4 °Cの速度で230°C へ昇温したのち，この温度を保った．注入温度，250°C，He 30 m*l*/min，EI，イオン化電圧70 eV の条件で測定した．マスフラグメントグラフィーは Table 1 に示した条件で測定した．この時のイオン化電圧は20 eV で行った．

結果および考察

オイカワ（淡水魚）より得られたクロマトグラムとマススペクトルを Fig.1. に示す．

本クロマトグラム上，P−1に相当する物質は分子イオンが m/z 257（塩素1個を含む）であり，主なフラグメントイオンとして m/z 125（Cl_1），100（基準ピーク）を示した．この物質は分子イオンが奇数であることから，分子中に奇数個の窒素を含む化合物である．このマススペクトルは水田除草剤として，日本で最も多量に使用されている benthiocarb のマススペクトルと一致していることが判明した．さらに3種のカラムを用いたマスフラグメントグラフィー（Table 1）でも標準品と試料から得られたものと，そのイオン強度比および，保持時間が

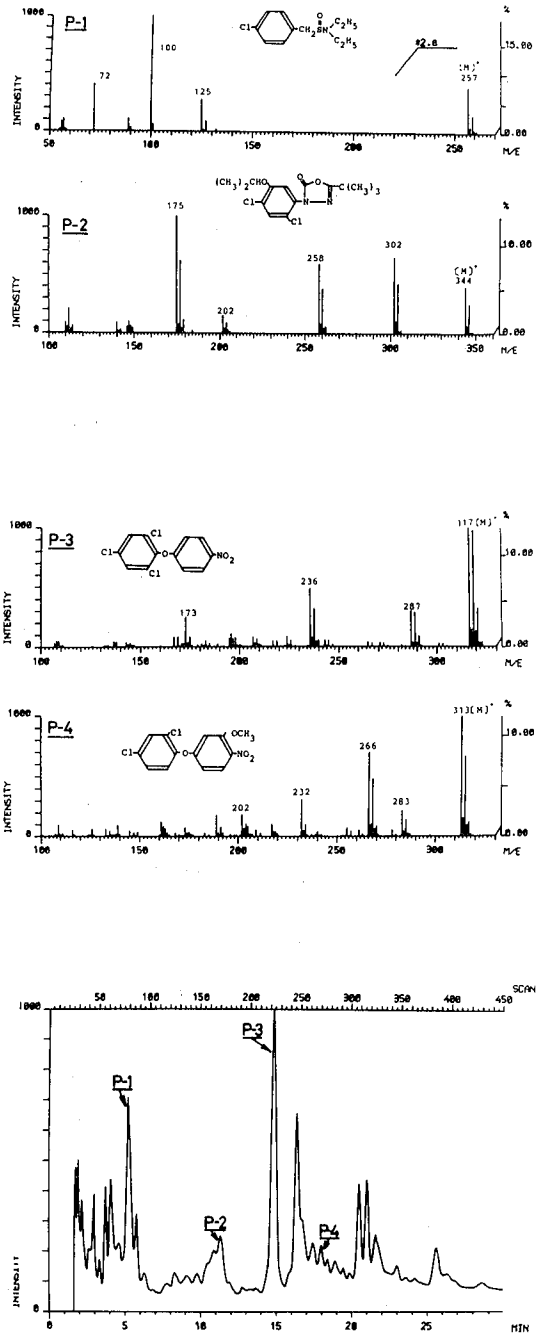


Fig.1. Reconstructed Ion Current Chromatogram and Mass Spectra Obtained from Freshwater Fish Sample

Table 1. Relative Retention Times (to Aldrine) of the Unknown Peaks Observed by Mass Fragmentography

Liquid phase		3%OV–1	3%OV–17	2%OV–210
Support		Chromosorb W AW DMCS, 80–100mesh		
Temperature (°C)				
column		220	215	200
injection & separator		250	250	250
He (ml/min)		25	25	30
Peak	(Assignment)	(relative retention time)		
P–1	(benthiocarb)	0.88	1.19	1.39
P–2	(oxadiazon)	1.65	2.17	5.08
P–3	(CNP)	2.34	3.97	6.14
P–4	(chlomethoxynil)	3.20	7.15	12.7
	aldrin	1.00	1.00	1.00
	(min)	(2.18)	(4.10)	(1.42)

* monitoring ions (m/z) : benthiocarb (257, 259), oxadiazon (302, 304, 344), CNP (287, 317, 319), chlomethoxynil (266, 313, 315), aldrin (263, 364)

一致したことからこの物質を benthiocarb と同定した．Benthiocarb は1970年代の始めに日本で開発された除草剤である．これまで benthiocarb は河川水や農業用水などから[8][9][10]検出されているが生物試料中からの検出例は[11] 極めて少ない．

P－2 に相当する物質は分子イオンが m/z 344であり，その同位体存在比から分子中に塩素を 2 個含む化合物である．標準品のマススペクトルおよび 3 種類のカラムを用いた保持時間がよく一致したことから，この化合物を oxadiazon と同定した．Oxadiazon は一年生雑草に有効で，その使用量は急増している．この除草剤は水生生物を用いたモデル実験によるとかなりの蓄積性があることが報告[12] されている．また，最近，Oxadiazon は日本の河川水中[13]や魚介類中[14]からも検出されている．

P－3 に相当する化合物は CNP であった．マススペクトルおよび保持時間が標準品と一致したことから同定した．CNP は日本で開発されたジフェニルエーテル系除草剤であり，その使用量は水田除草剤として benthiocarb をつぐ位置を占めてきた．CNP は生物濃縮されやすい[15] ため，環境生物中からの検出例が多く報告されてきた．一方，CNP のニトロ基が還元されたアミノ体が水田土壌中に残留[16] していることが確認されており，そのアミノ体がさらにアセチル化やホルミル化された物質が生物試料中から検出[17] されている．ところで，CNP 製剤中には不純物として種々のポリ塩化ダイベンゾパラダイオキシンやフラン類が存在する[18] ため，その毒性評価が問題となっている．この不純物の中でも最も含量が多い 1，3，6，8－tetrachlorodibenzo–*p*–dioxin を本試料と同じ魚から微量ではあるが検出したことについてはすでに報告[18] した．

P－4 に相当する化合物のマススペクトルは CNP と類似したスペクトルパターンを示した．分子イオンは m/z 313で，その同位体存在比から分子中に塩素を 2 個含む化合物であり，これが奇数であることから奇数個の窒素原子を含んでいることを示している．マススペクトルおよび保持時間が標準品と一致したことから，この化合物をジフェニルエーテル系除草剤の chlomethoxynil と同定した．Chlomethoxynil は CNP と同様に水田除草剤として用いられており，シジミ中から CNP と一緒に，その残留が確認[3] されている．以上のように GC/MS による検索からオイカワ中より水田除草剤として用いられている 4 種の化合物を同定した．

このオイカワ中のこれら除草剤の濃度をマスフラグメントグラフィーにより測定したところ，benthiocarb, 0.5 ppm，CNP，1.2 ppm，chlomethoxynil，0.2 ppm，oxadiazon，0.01 ppm であった．一方，日本における1979年のこれら除草剤原体の生産量は次のように報告されている：benthiocarb 9,639トン，CNP 3,789トン，chlomethoxynil 1,808トン，oxadiazon 338トン．このように 4 種の除草剤がオイカワ中から確認されたことは，他の種類の除草剤，および，それらの代謝産物や，不純物なども取り込んでいる可能性が考えられる．また，水田に除草剤を散布する時期と鮎釣などの解禁時期とが重なる点，日本から米国に輸出されたニジマスから

CNP が検出された例[2] など，食品としての観点からも問題を含んでいる．その意味から，ここで同定した除草剤も含め，現在使用されている除草剤の水生生物中での残留性，および，その汚染実態を十分に把握する必要があろう．

文　献

1) Yamagishi, T., Akiyama, K., Morita, M., Takahashi, R., and Murakami, H.：*J. Environ. Sci. Health*, **B13**, 417, 1978
2) Gretch, F. M., Barry, T. L., Petzinger, G. and Geltman, J.：*Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **23**, 165, 1979
3) 佐藤信俊，石川　潔，鈴木　滋，高槻圭悟，堺　敬一：食衛誌，**22**，50，1981
4) 高橋保雄，森田昌敏，土屋悦輝：東京衛研年報，**30**—1，224，1979
5) Suzuki, M., Yamato, Y. and Akiyama, T.：*Water Res.* **12**, 777, 1978
6) 山岸達典，秋山和幸，金子誠二，堀井昭三，宮崎奉之，森田昌敏：東京衛研年報，**30**—1，127，1979
7) 山岸達典，秋山和幸，金子誠二，堀井昭三，宮崎奉之，森田昌敏：東京衛研年報，**30**—1，123，1979
8) 板垣又丕：日本農薬学会誌，**3**，511，1978
9) Suzuki, M., Yamato, Y. and Akiyama, T.：*Water Res.* **11**, 275, 1977
10) Zatula, A. I. and Nevzorov, M. I.：*Gidronkhim Mater*, **70**, 39, 1977
11) Watanabe, S., Watanabe, S. and Ito, K.：J. *Pesticide Sci*, **8**, 47, 1983
12) Ambrosi, D., Kearney, P. C. and Macchia, J. A.：*J. Agric. Food Chem.*, **25**, 868, 1977
13) Yamato, Y. and Suzuki, M.：*Water Res.* **14**, 1435, 1980
14) Imanaka, M., Matsunaga, K., Shigeta, A. and Ishida, T.：*J. Pesticide Sci.* **6**, 413, 1981
15) Kanazawa, J., and Tomizawa, T.：*Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **7**, 397, 1978
16) Yamada, T.：*J. Pesticide Sci*, **8**, 33, 1983
17) 鈴木　滋，佐藤信俊，高槻圭悟，加茂えり子，菊地秀明，牛沢　勇，堺　敬一：食衛誌，**24**，187，1983
18) Yamagishi, T., Miyazaki, T., Akiyama, K., Morita, M., Nakagawa, J., Horii, S. and Kaneko, S.：*Chemosphere*, **10**, 1137, 1981
19) 農薬要覧：日本植物防疫協会，1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 159-164, 1983

養殖魚中の残留サルファ剤簡易検出法について

神崎政子*, 竹葉和江*, 村上文子*, 丸山　務*, 松本昌雄*

Simplified Detection Method for Residual Sulfonamides in Cultured Fish

MASAKO KANZAKI*, KAZUE TAKEBA*, FUMIKO MURAKAMI*,
TSUTOMU MARUYAMA* and MASAO MATSUMOTO*

Simple screening method (paper disk method) used for residual antibiotics using bioassay in stocks and fishery products is inferior in respect of detection limit for sulfonamides, and can detect them only when they are at high concentrations.

The disk method for concurrently detecting residual antibiotics and sulfonamides was studied, and succeeded in obtaining excellent results by using glucose–ammonium phosphate–sodium nitrate agar plate seeded with *Bacillus subtilis* ATCC 6633 spores for a test plate. A paper disk which had absorbed extract materials was attached on the test plate according to the usual method, and sulfamonomethoxine (SMM) was detected at a detection limit of 20 μg/g in fish meat. Residual sulfonamides in the muscle of cultured fish actually administered SMM were analyzed according to the present method and the conventional method; with the former, the detection was within the range of 14.5–31.8 μg/g, while the latter method failed to detect any residues. Sulfonamides were confirmed by using *p*–aminobenzoic acid, while SMM was identified by thin layer chromatography-bioautography and gas chromatography.

When this method was applied to 196 samples taken from cultured fish sold in the market, sulfonamides were not detected in any of the samples.

Keywords : residual sulfonamide, cultured fish, paper disk method, bioassay

畜水産物に残留する不明の抗菌剤を対象とする簡易検査法は，試験操作が簡易迅速でしかもできるだけ幅広く抗菌剤をスクリーニングできる方法であることが要求される．

現在，公定法として採用されているバイオアッセイによる簡易検査法[1]は，抗生物質検出を目的として開発されたもので，サルファ剤に対しては検出感度が悪く高濃度の残留がなければ検出できない．

そこで，残留抗生物質のみならず低濃度の残留サルファ剤も同時に検出する方法を考案することを目的として，簡易検出法の検討をした．その結果，柴田らの報告した glucose-ammonium phosphate-sodium nitrate agar[2]を検出用平板として用いることにより良好な成績が得られた．また，柴田らの培地を用いて市販の養殖魚についてサルファ剤の検出を試みたので，併せてこれらの結果を報告する．

実験材料および方法

1．使用菌株

Bacillus subtilis ATCC 6633（以下 ATCC 6633 と略す）

2．検出用平板培地

サルファ剤検出用平板の作成には次の 4 種類の培地を使用した．

a）Gluscose–ammonium phosphate–sodium nitrate agar（以下 GASA と略す）：柴田らが報告した[2]次の組成の合成培地である．すなわち，培地1,000 m*l*当り，グルコース7 g，リン酸一カリウム 1 g，リン酸二アンモニウム 1 g，硝酸ナトリウム0.5 g，塩化ナトリウム 5 g，硫酸マグネシウム0.4 g，寒天18 g および Reynolds' salts 溶液 1 m*l* で pH 7.0，115°C，15分間滅

* 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

菌後使用した．Reynolds' salts 溶液は，硫酸第二鉄1 g，硫酸亜鉛0.1 g，硫酸銅0.1 g および硫酸マンガン0.1 g を蒸留水で溶解し，100 m*l* とした．

b）Mueller hinton medium（以下 MH と略す）：Difco 製の次の組成の粉末培地である．すなわち，培地1,000 m*l* 当り，Bacto–casamino acid 17.5g, starch 1.5g, Bacto–agar 17g で pH 7.4, 121°C, 15分間滅菌後使用した．

c）感受性ディスク用培地'栄研'（以下 SE と略す）：栄研化学製の次の組成の粉末培地である．すなわち，培地1,000 m*l* 当り，ウシ心臓浸出液'栄研'250 g, カザミノ酸15 g, L－トリプトファン0.05 g, ブドウ糖2 g, カンテン'栄研'15 g で pH 7.4, 121°C, 15分間滅菌後使用した．

d）感性ディスク用培地－N（以下 SN と略す）：日水製薬製の次の組成の粉末培地である．すなわち，培地1,000 m*l* 当り，カザミノ酸「ニッスイ」16.5 g，牛心臓浸出液200 m*l*，デンプン（溶性）1.5 g，ブドウ糖2.0 g，L－トリプトファン0.05 g，L－シスチン0.05 g，ビオチン5 μg，カンテン15.0 g で pH 7.4, 115°C，15分間滅菌後使用した．

3．ATCC 6633 株の芽胞浮遊液の調製

畜産物中の残留物質検査法第1集[3] の記載に準じて芽胞浮遊液を調製した．

4．ディスク

東洋ろ紙製の直径10 mm のパルプディスク（Thick，吸水量約0.08 m*l*）を121°C，15分間滅菌後充分乾燥させてから使用した．

5．クエン酸・アセトン緩衝液

サルファ剤標準液の調製及び検体からのサルファ剤抽出に用いたもので，その組成は pH 5.6の1/10Mクエン酸緩衝液35：アセトン35：精製水30からなる混合液である．

6．供試サルファ剤

Sulfamonomethoxine（以下 SMM と略す），Sulfadimethoxin（以下 SDM と略す），Sulfisozole（以下 SIZ と略す）および Sulfamerazine（以下 SMZ と略す）の4種類を使用した．

7．サルファ剤標準溶液

各サルファ剤10 mg をメスフラスコにとり，少量の0.1 N・NaOH で溶解した後，クエン酸・アセトン緩衝液で10 m*l* とした（1,000 μg/m*l*）．これを希釈して標準希釈液を調製した．なお，養殖魚における SMM の検出実験の定量に用いる検量線の作成には次の標準溶液を使用した．すなわち，抗菌剤の残留していないことを確認した魚肉を用いクエン酸・アセトン緩衝液で20％の魚肉抽出液を作成し，これを用いて標準希釈液を調製した．

8．抗生物質含有感受性ディスク

各種抗生物質を含有した昭和薬品化工製の昭和Iディスクを用いた．すなわち，ディスク当り，penicillin 20 IU, oxytetracycline 200 μg, tetracycline 200 μg, chloramphenicol 100 μg, streptomycin 50 μg,kanamycin 50 μg, ertyhromycin 50 μg, gentamicin 30 μg, colistin 150 U, polymyxin B 100 U を含有した10種類の感受性ディスクを使用した．

9．供　試　魚

養殖魚における SMM 検出実験に次のニジマス，ヤマメを供した．

a）ニジマス

東京都水産試験場奥多摩分場に依頼し，飼育中の健康な平均体重139 g，1才魚のニジマス *Salmo gairdnerii* に1981年10月24日から28日迄の連続5日間，SMM のナトリウム塩を100 mg/kg/day になるよう添加した配合飼料を経口投与した．投薬終了後，経時的に各5匹ずつ計20匹を採取し，その筋肉部分を検体とした．なお，薬剤非投与群も併せて採取し，対照として用いた．飼養条件の平均水温は10.4～13.8°C であった．

b）ヤ マ メ

同試験場において発生したせっそう病に罹患した平均体重20 g，孵化後11ケ月のヤマメ *Oncorhyncus masou* に1982年8月14日から8月18日迄の連続5日間，ニジマスと同様の方法で投薬し，投薬終了後経時的に各5匹ずつを採取し，その筋肉部分を検体とした．飼養条件の平均水温は17.8～22.5°C であった．

10．パラアミノ安息香酸（以下 PABA と略す）

サルファ剤の抗菌力を中和する為に用いたもので，パラアミノ安息香酸（和光純薬）を0.1％の割で滅菌蒸留水で溶解し，使用した．

11．薄　層　板

Silicagel $60F_{254}$ (Merck) を使用した．

12．Thin layer chromatography（以下 TLC と略す）展開溶媒

a）ethyl ether

b）petroleum ether : chloroform : butyl alcohol（1：1：1）を使用した．

13．試料液の調製

検体5 g を秤取し，クエン酸・アセトン緩衝液20 m*l* を加え乳剤とした後，東洋ろ紙製 No. 5B のろ紙でろ過

したものを試料液とした.

14. バイオアッセイによる検出

サルファ剤の検出は，畜水産食品中の残留物質検査法・抽出ディスク法[1]を応用した．すなわち，あらかじめ加温溶解後55°C に保温した4種類の検出用平板作成用培地100 m*l* のそれぞれに ATCC 6633 芽胞浮遊液 1 m*l* を加え，十分かくはんした後，内径85 mm の滅菌ペトリ皿に 5 m*l* ずつ分注し，水平に保って放冷し凝固させた．サルファ剤標準液については各希釈濃度の標準希釈液を，検体については前記の試料液をディスクにそれぞれ吸収させたのち，10分間室温で風乾した．これらを上記4種類の平板上に水平に置き，4 °C で約1時間放置後，37°C で24時間培養した．培養後，出現したディスク周辺の阻止円の直径をノギスを用いて測定した.

15. サルファ剤の確認

松本らの報告[4]に従って行った．すなわち，阻止円を形成した試料10 m*l* に0.1% PABA 溶液 1 m*l* を加えて充分混和し，これらにディスクを浸した後 ATCC 6633 芽胞接種 GASA 平板上に置いた．これらを37°C で24時間培養後，阻止円形成の有無を確認した.

16. SMM の同定

TLC–bioautography で行った．すなわち，薄層板に SMM 標準液，魚肉抽出液加 SMM 標準液及び抽出試料液をそれぞれ10 μl ずつスポットし，Sigel ら[5]および Klein ら[6]が報告している2種類の展開溶媒を用い，常法に準じ展開した．展開後充分風乾したのち，ATCC 6633 芽胞接種 GASA 平板の表面に約20分間はりつけて除去し，これらを37°C，24時間培養した.

17. ガスクロマトグラフィー（以下 GC と略す）による検出

畜産物中の残留物質検査法，第2集の3[7]の記載に準じて行った.

実 験 結 果

1．サルファ剤の検出用平板

MH, SE, SN および GASA の4種類の検出用平板作成用培地に接種した ATCC 6633 に対する SMM の最小発育阻止濃度（以下 MIC と略す）を常法に準じて求め，その結果を Table 1. に示した．すなわち，SMM の MIC は GASA 平板では0.5 μg/m*l* であったのに対し，その他の平板は10～50 μg/m*l* であった．GASA 平板を用いての各種サルファ剤標準液の検量線は Fig.1 のとおりで，いずれのサルファ剤も一定濃度の範囲で阻止円直径と薬剤濃度の対数の間にほぼ直線関係が成立した．以上の結果から，GASA 平板は他の平板に比べ，サルファ剤の検出感度が高いことが明らかとなったので以後の試験に本培地を用いることとした.

2．SMM 検量線

組織内残留抗生物質を定量する際，検量線の作成は，検体と同様に処理した組織抽出液を用いて，各濃度の抗生物質を希釈調製して行うことが望ましいとされている.

そこで，サルファ剤でも同様に，SMM について魚肉抽出液加 SMM 標準希釈液を調製し，常法により検量線を作成し，Fig. 2 に示した．魚肉抽出液の添加によって SMM の抗菌力が低下し，阻止円が小さくなった．すなわち，魚肉抽出液無添加のものは0.5 μg/m*l* 以上の SMM が検出されたが，魚肉抽出液の添加によって SMM の検出感度が約1/10低下し，5 μg/m*l* 以上でな

Table 1. Effect of Agar Media on Sensitivity of *B. subtilis* ATCC 6633 to Sulfamonomethoxine

MIC (μg/m*l*)			
MH*1	SE*2	SN*3	GASA*4
50	50	10	0.5

*1 MH : Mueller hinton medium (Difco)
*2 SE : Sensitivity test agar 'Eiken' (Eiken)
*3 SN : Sensitivity disk agar–N (Nissui)
*4 GASA : Glucose–ammonium phosphate–sodium nitrate agar

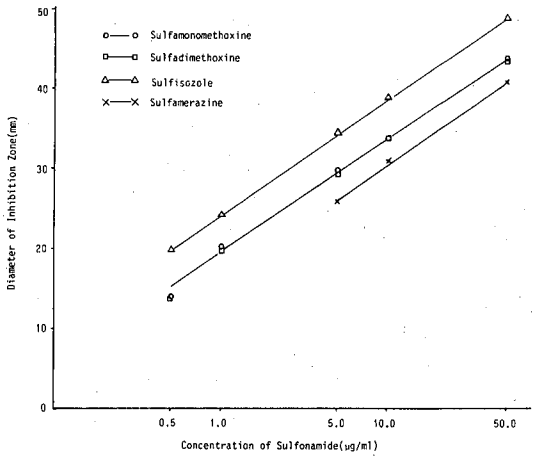


Fig.1. Calibration Curves for Sulfonamides using GASA Medium

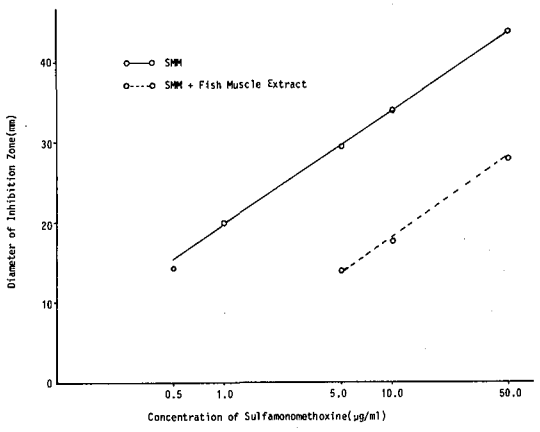


Fig.2. Calibration Curves for Sulfamonomethoxine (SMM) and SMM added to Fish Muscle Extract

ければ検出できなくなった.

3．養殖魚における SMM の検出実験

SMM を投与した養殖魚を対象に，GASA 平板を用いたバイオアッセイ並びに GC 法で SMM の検出を行い，その結果を Table 2. , Fig. 3 に示した．バイオアッセイでは投与終了後 2 日目迄の検体から14.5～31.8 μg/g の SMM が検出された．なお，検出感度20 μg/g 以下のものについては試料を 2 倍濃縮し，検出量を算出した．参考迄に MH，SE および SN の平板を併用したが，いずれの平板上のディスク周辺にも阻止円は形成されなかった．一方，GC 法では投与終了後 2 日目迄の検体から4.7～168.4 μg/g の SMM が検出された．検出値はバイオアッセイのそれより約 2 ～ 5 倍高かった.

4．サルファ剤の確認および SMM の同定

GASA 平板上のディスク周辺に阻止円を形成した試料中の抗菌剤は，いずれも PABA 処理でサルファ剤と確認された.

更にこれら試料の一部について，TLC–bioautography を行い *Rf* 値を求め，これを Table 3. に示した．すなわち抽出試料と魚肉抽出液加 SMM 標準液は，二種類の溶媒を用い TLC–bioautography を行った結果，いずれも *Rf* 値が一致したので，その薬剤は SMM と同定した.

5．GASA 平板の抗生物質検査への応用

GASA 培地が抗生物質検出用平板として応用できるかを確認するために，ATCC 6633 芽胞接種 GASA，SN および SE平板上に，各種抗生物質含有感受性ディスクを置き，37°C 24時間培養した．培養後，各感受性ディスク周辺に形成された阻止円の直径を測り，これらを Table 4. に示した．その結果，いずれの抗生物質も GASA 平板上のディスク周辺の阻止円の直径が，他の平板上のそれより大きかった.

6．市販魚の残留サルファ剤の検出

1981年11月～1983年 1 月迄に，GASA 平板を用いて市販の養殖魚196件についてサルファ剤の検出を試みたが，いずれからも検出されなかった.

考　察

サルファ剤はその経済性，有効性から畜水産業界で，家畜・養殖魚等の疾病予防・治療薬として繁用されているが，残留サルファ剤の検査法として厚生省が採用している GC 法は試験操作が煩雑で，不明抗菌剤を対象とする日常検査には不適当である．そこで，現在残留抗生物質の日常検査法として採用されている簡易検査法が，サルファ剤の検出にも応用できるように改良されるならば極めて能率的で実用的であると考える.

ところで，サルファ剤の抗菌力は培地や組織中に含まれる拮抗物質によって阻害されるので，バイオアッセイにおける組織中の残留サルファ剤の測定は抗生物質のそれに比べて正確性を期し難いといわれている[8]．そこで，従来サルファ剤検出用培地には，拮抗物質を除いたものが使用されている．今回供試した培地の中では，拮抗物質を除き，窒素源に無機化合物を用いた GASA 培地がサルファ剤の抗菌力に及ぼす影響が最も少なく，サルファ剤の検出に適していると考えられる.

一方，組織から残留サルファ剤を検出する際，蛋白が大きな障害となる．今回の実験でも，サルファ剤の抗菌力は組織抽出液によって著しく低下している．そこで組織蛋白の影響をなくすために，検体の高倍率希釈[9]，限外ろ過[10]，有機溶媒による反復抽出等の処理を行っている報告がある．しかしこれら煩雑な操作をそのまま残留抗生物質とサルファ剤の同時検出を目的とした簡易検査法へ適用することは困難で，これについては今後の検討課題とした.

実験を通じ，GASA 平板を用いることにより従来検出されなかった低濃度のサルファ剤の検出が可能となり，更に抗生物質検出にも併用できることが示唆された．但し，GASA 平板上で形成された阻止円は既知平板上で形成される阻止円に比べやゝ不鮮明である．この欠点については，TTC 試薬等を噴霧し，コントラストをよくして見やすくするのも一方法であろう.

以上のことから，従来畜水産物中の残留抗菌性物質簡

Table 2. The Levels of Sulfamonomethoxine (SMM) in the Muscles of Cultured Fishes after Oral Administration 100mg/kg per Day Successive 5 Days

Material	Method	SMM (μg/g)				
		Days after Administration				
		1	2	4	7	15
Rainbow trout	Bioassay	31.8	14.5	—	nd*2	nd
	Chemical Assay*1	168.4	45.5	—	tr*3	tr
Yamame	Bioassay	19.6	tr	nd	—	nd
	Chemical Assay	30.6	4.7	tr	—	nd

*1 Chemical assay : Gas chromatographic method
*2 nd : not detected
*3 tr : trace

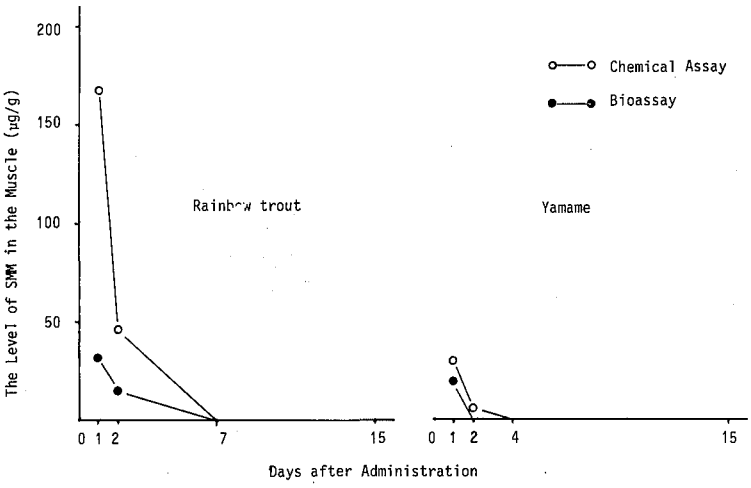


Fig. 3 The Levels of Sulfamonomethoxine(SMM) in the Muscles of Cultured Fishes after Oral Administrations 100mg/kg per Day Successive 5 Days

易検査法に使用されている ATCC 6633 接種用の感受性ディスク用培地を GASA 培地に代えることによって，抗生物質，サルファ剤の同時検出が可能であると考えられる．

なお，最近，検出用平板としてトリメトプリム添加 MH 培地を用いると，サルファ剤検出感度が高まると報告されている（赤星まゆみら，第95回日本獣医学会，1983）ので今後，更にこれについても検討する必要がある．

ま と め

1．残留抗菌性物質簡易検査に用いられる ATCC 6633 接種用の感受性ディスク用培地を，柴田らの培地

Table 3. TLC *Rf* Values of Sulfamonomethoxine (SMM) and Sample Extract

Solvent	*Rf*		
	SMM	SMM + Fish Muscle Extract	Sample Extract
A*1	0.54	0.50	0.50
B*2	0.64	0.62	0.62

*1 A : Ethyl ether
*2 B : Petroleum ether : Chloroform : Butyl alcohol (1:1:1)

Table 4. Effect of Agar Media on Sensitivity of *B. subtilis* ATCC 6633 to Antibiotics

Antibiotic	IU, U, μg/disk	Diameter of GASA*1	Inhibition SN*2	Zone (mm) SE*3
Penicillin G	20 IU	55.0	35.6	34.4
Oxytetracycline	200 μg	50.6	30.6	30.5
Tetrcycline	200 〃	50.0	32.1	32.2
Chloramphenicol	100 〃	48.0	31.0	30.5
Streptomycin	50 〃	44.0	31.0	26.4
Kanamycin	50 〃	43.2	30.0	29.0
Erythromycin	50 〃	40.8	29.5	29.0
Gentamicin	30 〃	46.0	35.0	30.3
Colistin	150 U	15.0	12.6	12.1
Polymyxin B	100 〃	17.1	15.8	15.0

*1 GASA : Glucose–ammonium phosphate–sodium nitrate agar
*2 SN : Sensitivity disk agar–N (Nissui)
*3 SE : Sensitivity test agar 'Eiken' (Eiken)

(GASA) に変えることにより，サルファ剤の検出感度が高まった．なお，GASA 培地は抗生物質の検出にも応用できることが判明した．

2．GASA，感受性ディスク用培地および MH の平板を用いて SMM 投与養殖魚から SMM の検出を試みたところ，GASA 平板を用いた場合には14.5～31.8 μg/g の SMM が検出されたが，他の平板の場合は検出されなかった．

謝辞 検体採取と資料の収集に協力いただいた衛生局食品監視課および養殖魚の投与実験を担当し，有益な助言をいただいた東京都水産試験場奥多摩分場・井上潔研究員に心から謝意を表します．

文　献

1) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜水産食品中の残留物質検査法，第1集の5，1983
2) 柴田元雄，重盛啓子，今村順茂：*Chemotherapy*, 22, 1424, 1974
3) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜産物中の残留物質検査法，第1集，1977
4) 松本昌雄，池部美好：食衛誌，21，446，1980
5) Sigel, C. W., Woolley, J. L. Jr. and Nichol, C. A. : *J. Pharm. Sci.*, 64, 973, 1975
6) Klein, H. R. and Mader, W. J. : *J. Pharm. Sci.*, 60, 448, 1971
7) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜産物中の残留物質検査法，第2集の3，1979
8) 傍士和彦：獣医畜産家のためのサルファ剤の基礎知識，1971，日本動物薬事協会，東京
9) 岡本三郎：最新医学，15，142，1960
10) 酒井克治，栩野義博，岸和田康二：最新医学，14，187，1959

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 34, 165-170, 1983

輸入発酵茶及びバナナ中の残留農薬調査

永山敏廣*, 田村行弘*, 真木俊夫*, 観　公子*, 直井家壽太*

Survey of Pesticide Residues in Imported Fermented Teas and Bananas

TOSHIHIRO NAGAYAMA*, YUKIHIRO TAMURA*, TOSHIO MAKI*, KIMIKO KAN* and YASUTA NAOI*

Keywords: 残留農薬 pesticide residues, 発酵茶 fermented teas, バナナ bananas, 浸出量 exude contents, 有機塩素系農薬 organochlorine pesticides, 有機リン系農薬 organophosphorus pesticides, アルディカーブ aldicarb, カルボフラン carbofuran, モキャップ mocap, ベノミル benomyl

緒　言

我国は，農薬に関して農薬取締法及び食品衛生法等により厳しく規制されている．食品中に残留している農薬は，1983年5月現在，食品衛生法により，米，あずき，いちご等58品目に係る25種の基準が設定されている．また，環境庁の定める農薬取締法に基づく農薬登録保留基準では1983年5月現在125農薬について設定されている．

東京都内に入荷され，市場に出まわる農産物については毎年残留農薬の実態調査を行ってきている[1~3]．しかし，輸入農産物に対しては食品衛生法により国内産の食品と同様に規制されているにすぎず，輸出国の農薬の使用実態も明らかでないことから，残留農薬の実態はほとんど把握されていない，そこで今回，輸入農産物のうち，特に近年需要の増加が著しい中国茶を中心とした発酵茶（含半発酵茶）及び四季を通じて市販されている日常的な果物であるバナナについて，残留農薬の実態調査を行い，あわせて，残留する有機塩素系農薬の茶湯中への浸出量について検討したので報告する．

実験の部

試料　市販の輸入発酵茶5種39検体（購入日：1982年6月～1983年3月）及びフィリピン産バナナ（可食部）20検体（購入日：1982年8月～同年12月）を対象とした．

調査農薬　輸入発酵茶：有機塩素系農薬〔α－, β－, γ－, δ－BHC, pp′－DDT, pp′－DDE, pp′－DDD, ディルドリン，エンドリン，ヘプタクロルエポキサイド〕，有機リン系農薬〔EPN，ジクロルボス（DDVP），ジメトエート，ダイアジノン，パラチオン，フェニトロチオン，フェンチオン（MPP），フェントエート（PAP），マラチオン〕

バナナ：有機塩素系農薬〔茶の項と同じ〕，ダイアジノン，アルディカーブ（テミック），カルボフラン，モキャップ，ジネブ（エチレンビスジチオカルバメート），チオファネートメチル，ベノミル

機器　ガスクロマトグラフ：（株）島津製作所製GC－5A（検出器ECD），同GC－4B（検出器ECD），同GC－1C（検出器FPD），同GC－R1A（検出器FTD）　分光けい光光度計：（株）日立製作所製MPF－4　自記分光光度計：（株）日立製作所製320形

分析方法　有機塩素系農薬，有機リン系農薬は昭和48年厚生省告示第2号の野菜類及び果実類の方法によった．すなわち，試料にアセトン，ヘキサンを加え抽出した後，カラムクロマトグラフィーにより精製し，有機塩素系農薬はECD検出器付，有機リン系農薬はFPD及びFTD検出器付ガスクロマトグラフにより測定した．アルディカーブはAnalytical Method for Pesticides and Plant Growth Regulators[4]による方法を改良したchart 1に従って測定した．カルボフラン，モキャップ及びチオファネートメチルはそれぞれchart 2，chart 3及びchart 4に従って測定した．ジネブ及びベノミルは残留農薬分析法[5]によるchart 5及びchart 6に従って測定した．

試料中の各農薬の最小検出量　アルディカーブ：0.01 ppm，カルボフラン：0.05 ppm，モキャップ：0.05 ppm，ジネブ：0.05 ppm，チオファネートメチル：0.01 ppm，

* 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

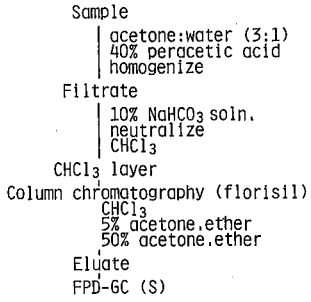


Chart 1. The Analytical Method of Aldicarb in a Banana

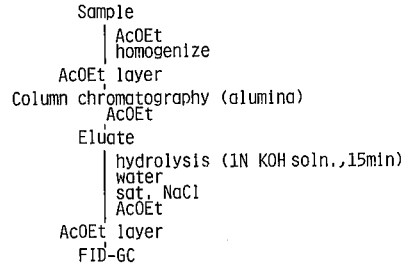


Chart 2. The Analytical Method of Carbofuran in a Banana

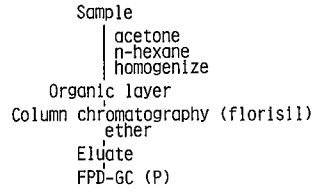


Chart 3. The Analytical Method of Mocap in a Banana

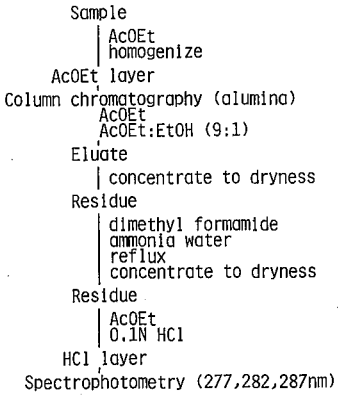


Chart 4. The Analytical Method of Thiophanatemethyl in a Banana

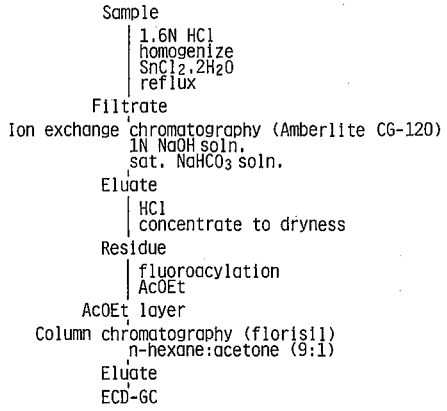


Chart 5. The Analytical Method of Zineb in a Banana

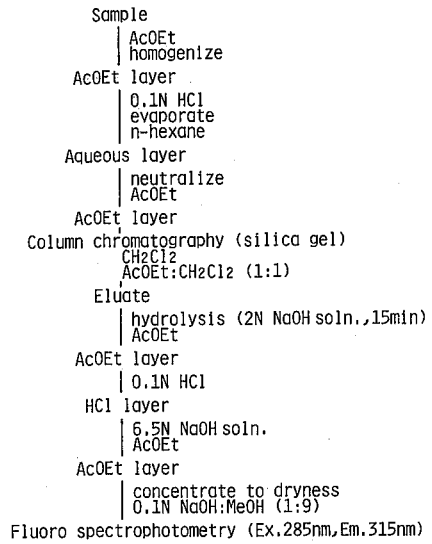


Chart 6. The Analytical Method of Benomyl in a Banana

ベノミル：0.02 ppm

ガスクロマトグラフィー用カラム充てん剤 有機塩素系農薬：3％シリコン OV−17，クロモソルブ W(AW−DMCS)，80～100 mesh，2％ DEGS ＋0.5％リン酸，クロモソルブ W(AW−DMCS)，100～120 mesh，2％シリコン DC−QF−1，クロモソルブ G(AW−DMCS)，80～100 mesh

有機リン系農薬：3％シリコン OV−101，クロモソルブ W(AW−DMCS)，80～100 mesh　2％シリコン DC−QF−1，クロモソルブ G(AW−DMCS)，80～100 mesh

アルディカーブ，モキャップ：2％ FFAP，クロモソルブ W(AW)，80～100 mesh

カルボフラン：3％シリコン OV−7，ユニポート HP，60～80 mesh

ジネブ：2％ DEGS，クロモソルブ W(AW−DMCS)，60～80 mesh　2％ DEGS ＋0.5％リン酸，クロモソルブ W(AW−DMCS)，100～120 mesh

結果及び考察

1. 輸入発酵茶

(1) 残留農薬

輸入発酵茶葉中の残留農薬を調査したところ，有機塩素系農薬はすべての茶葉から検出された．しかし，有機リン系農薬は検出されなかった．

輸入茶葉を発酵茶である紅茶5検体及びバラ紅茶1検体（計6検体），半発酵茶であるウーロン茶20検体，雲南茶8検体及びジャスミン茶5検体（計33検体）に分け，それぞれの有機塩素系農薬含有量を Table 1. に示した．総 BHC（α−, β−, γ− 及び δ−BHC の総和）はすべての検体から0.001～0.323 ppm の範囲で検出された．それぞれの平均値を比較すると，バラ及びジャスミン等の花を混和した花茶に多く検出される傾向が見られ，最も少なかった紅茶の約10倍であった．

総 BHC の検出量を産地別に分類し比較すると、中国産29検体では0.001～0.274 ppm（平均0.099 ppm）、中国・インド産1検体0.079 ppm，中国・インド・スリランカ産1検体0.323 ppm，台湾産4検体0.005～0.006 ppm（平均0.006 ppm），インド産2検体0.002，0.006 ppm（平均0.004 ppm）、スリランカ産2検体0.001，0.001 ppm（平均0.001 ppm）が検出され，中国産の茶葉中に多く検出される傾向が見られた．すなわち，中国産の茶葉及び中国産をブレンドした茶葉は，他国産の茶葉に比較し，平均で約25倍の高いレベルを示していた．また，食品衛生法における日本茶の分析法では浸出液を用い分析するため単に比較はできないが，日本茶の基準値0.2 ppmを超えるものが3検体あり，その最高値は0.323 ppm であった．

総 DDT（pp′−DDT，pp′−DDE 及び pp′−DDD の総和）は中国産29検体中29検体，中国・インド産1検体，中国・インド・スリランカ産1検体，台湾産4検体中1検体，インド及びスリランカ産各2検体中各1検体の茶葉から痕跡～0.12 ppm の範囲で検出された．しかし，日本茶の基準値0.2 ppm を超えるものはなかった．また，茶の種類及び産地の違いによる差は見られなかった．総 BHC と総 DDT との間に相関は認められなかった．

ディルドリン，エンドリン及びヘプタクロルエポキサイドはいずれも検出されなかった．

なお，日本茶の茶葉中の残留農薬は1965年に市販されていたものから，BHC（α−, γ−BHC の総和）が0.031～0.135 ppm（平均0.089 ppm）及び DDE が0.042 ppm 検出された報告[6]があるが，今回の中国産の茶葉中の残留量はこの当時の報告と同程度であった．

(2) 茶湯中への農薬の移行

茶葉はその浸出液を飲用に供するため，茶葉中に残留していた農薬がどの程度茶湯中に浸出されるかを知る必要がある．

初めに，茶葉中の農薬が茶湯中に浸出される速さについて検討した．すなわち，ウーロン茶5 g をとり熱湯（95°C）300 m*l* を加えときどき攪拌しながら経時的に茶

湯中へ浸出する農薬量を調査した．その結果，BHCのみが浸出され，pp′–DDT，pp′–DDE及びpp′–DDDはほとんど浸出されなかった．Fig. 1 に示したように，α–，β–，γ–及びδ-BHCはいずれも浸出時間5分まで浸出量の増加が見られた．それ以後の浸出量は浸出時間を長くしても増加することはなかった．

次に，茶葉に繰り返し熱湯を注ぎ，浸出する農薬の割合について検討した．すなわち，茶葉中の総BHCが0.2 ppmを超えていたウーロン茶，ジャスミン茶及びバラ紅茶各1検体各々5 gをとり，熱湯300 m*l*を加え5分間ずつ2回浸出した．その後浸出液及び茶葉中のBHC，pp′–DDT，pp′–DDE及びpp′–DDDの含有量を調査した．Fig. 2 に示したように，各BHCの浸出率は1回目で茶葉中含有量の14～25%，2回目で9～17%（残存量の11～21%）であった．このことから，茶葉中に残留したBHCは1回目の熱湯浸出で約17%が茶葉中に移行し，また，繰り返し浸出することにより茶葉中のBHCは徐々に茶湯中に移行することが分かった．バラ紅茶は他の茶と比べ約1.3倍多く浸出したが，これは茶葉の大きさが他の2種の茶葉と比較し大変小さいため浸出率が良くなったものと考えられた．

BHC異性体の違いによる浸出率の差はほとんどなく，BHC異性体中最も水に溶けやすいδ–BHC（溶解度2.13 mg/100 g）の浸出量が最も水に溶けにくいβ–BHC（溶解度0.07 mg/100 g）の浸出量より少ない傾向も見られた．これは茶葉中残留農薬の茶湯中への浸出には溶解度のみでなく，茶葉組織中での存在形態等の要因があると考えられた．pp′–DDT，pp′–DDE及びpp′–DDDはBHCと異なり，2回の熱湯浸出でも茶葉からほとんど浸出されなかった．

(3) 花茶中の残留農薬の分布

輸入発酵茶中の残留農薬を調査した結果から，花茶に多く残留している傾向が見られた．これは，花に多くの農薬が残留していることに基づくと考えられた．そこで花茶を花及び葉に分け，それぞれの残留農薬量を調査し，結果を Table 2. に示した．pp′–DDEは花中に多く検

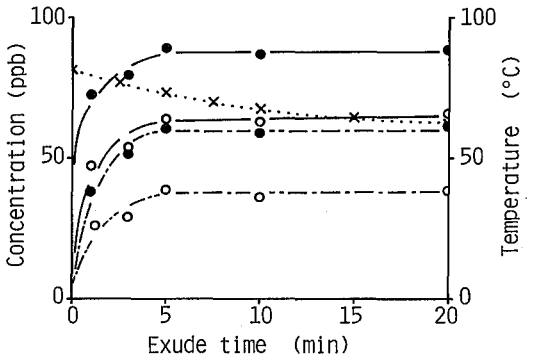


Fig. 1 The Translation of BHC Isomer into the Hot Water on Oolong Tea Leaves
●—●：α-BHC, ●–·–●：β-BHC,
○—○：γ-BHC, ○–·–○：δ-BHC,
×·····×：tea temperature

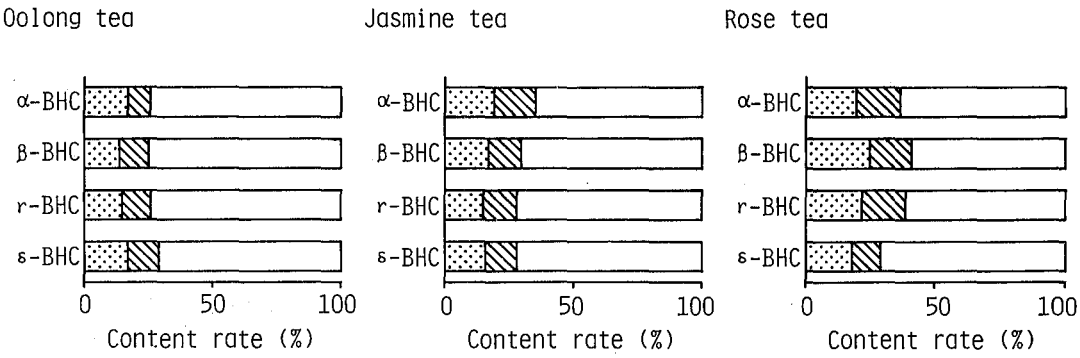


Fig. 2 Exude Contents of BHC Isomer into the Hot Water on Fermented Tea Leaves

：first exudation, ：second exudation, ：residue in leaves

Table 1. Contents of Organochlorine Pesticides in Fermented Tea Leaves

Sample		No.	Total-BHC (ppm)								Total-DDT (ppm)						
			≦0.001	≦0.01	≦0.1	≦0.2	0.2<	Min.	Max.	Ave.	≦0.01	≦0.1	≦0.2	0.2<	Min.	Max.	Ave.
Fermented tea	Black tea	5	2	2	1			0.001	0.079	0.018	3	2			nd	0.05	0.02
	Rose tea	1					1	—	—	0.323		1			—	—	0.05
Semi-fermented tea	Oolong tea	20	2	4	9	4	1	0.001	0.222	0.060	5	15			nd	0.06	0.02
	Yunnan tea	8			3	5		0.036	0.182	0.110	1	6	1		0.01	0.12	0.06
	Jasmine tea	5				4	1	0.115	0.274	0.163		5			0.02	0.03	0.02

Dieldrin, endrin and heptachlor epoxide are not detected in fermented tea leaves.
nd : not detected
Rose tea : Rose scented black tea

Table 2. Contents of Organochlorine Pesticides in Flour Added Tea Leaves

Sample	No.	Contents of flours (%)	Region	BHC (ppm)					pp'-DDT (ppm)	pp'-DDE (ppm)	pp'-DDD (ppm)	total-DDT (ppm)
				α-BHC	β-BHC	γ-BHC	δ-BHC	total				
Jasmine tea		0.26~0.77	flour	0.206[1]	0.103	0.041	0.041	0.375	0.06	0.14	nd	0.19
		(Ave. 0.41)		±0.099[2]	±0.071	±0.009	±0.020	±0.173	±0.02	±0.06		±0.08
			leaf	0.150	0.040	0.040	0.024	0.253	0.04	0.02	nd	0.05
				±0.036	±0.009	±0.010	±0.008	±0.061	±0.01	±0.01		±0.02
Rose tea	1	0.50	flour	0.080	0.081	0.043	0.044	0.248	0.05	0.15	nd	0.20
			leaf	0.198	0.071	0.064	0.073	0.406	0.07	0.02	nd	0.09

nd : not detected
1) Values indicate the average of the organochlorine pesticides contents in flour added tea leaves.
2) Values indicate the standard deviation.

Table 3. Exude Contents of Organochlorine Pesticides into the Hot Water on Flour Added Tea

Sample	No.	Region	Exude rate (%)							
			BHC					pp'-DDT	pp'-DDE	total-DDT
			α-BHC	β-BHC	γ-BHC	δ-BHC	total			
Jasmine tea	4	flour	14.4[1]	14.3	10.7	12.6	13.7	0	0	0
			±5.8[2]	±5.4	±3.7	±3.7	±2.2			
		leaf	10.7	19.7	21.2	13.4	14.0	0	0	0
			±1.7	±3.8	±3.9	±2.1	±2.2			
Rose tea	1	flour	32.5	27.2	23.3	22.7	27.4	0	0	0
		leaf	12.6	22.5	29.7	13.7	17.2	0	0	0

1) Vaclues indiate the average of the exude rate.
2) Values indicate the standard deviation.

Table 4. Contents of Pesticide Residues in Bananas

Sample	No. of sample	No. of positive	Pesticide residue (ppm)
Ordinary banana	19	1	0.003(benomyl)
Monkey banana	1	1	0.005(benomyl)

Aldicarb, carbofuran, mocap,zineb, thiophanatemethyl and organochlorine pesticides are not detected in bananas.

出され，葉中の約5～10倍であった．BHC は花及び葉中の含有量に大きな差は見られなかった．

花について熱湯による農薬の浸出率を測定し，Table 3. に示した．総 BHC はジャスミンの花で13.7±2.2%，バラの花で27.4%と花の細かいバラでやや高い浸出率を示した．これらの浸出率は葉の場合と比べ大差がなく，ほぼ同程度の結果であった．BHC異性体による浸出率の差はほとんどなかった．pp'-DDT 及びpp'-

DDE は葉と同様花からもほとんど浸出されなかった.

花茶中に含まれる花の割合が1%未満であったため, 検出された農薬はほとんどが葉に由来することが示された. しかし, 花茶中の葉は他の茶葉に比較し残留量が約2倍多い傾向が見られた. 花茶のような葉に花香を着ける場合, 生の花と製茶した葉を積層して静置した後混和し, 時間をかけてくん着するといわれている. その際に花中に残留していた農薬が葉に移行する可能性も考えられるが, さらに十分な調査が必要であろう.

2. バ ナ ナ

(1) 残留農薬

現在日本で市販されているバナナは90%以上がフィリピン産であり, キャベンディッシュ種がほとんどであるといわれている. そこで, フィリピン産バナナ20検体を対象として, 各方面からの情報を基に調査対象農薬を7種に絞り, さらに有機塩素系農薬を加えて調査を行った. 時期を夏期(8, 9月)及び冬期(11, 12月)に分けて購入し, 季節による違いについても検討した. Table 4. に結果を示したが, 1982年8月に購入したキャベンディッシュ種のいわゆる普通のバナナ及び同年9月に購入したモンキーバナナから, 2-アミノベンズイミダゾールとして検出したベノミルのみがそれぞれ0.003, 0.005 ppm 検出された. なお, 冬期に購入したバナナからは1検体も検出されなかった. ベノミルは環境庁が農薬取締法に基づき登録保留基準値として果実に対し0.7 ppm と設定している殺菌剤のひとつであり, 食品衛生法による残留基準は設定されていない普通物である. 今回の検出値は環境庁の基準値の1/100未満であり, 1日摂取許容量(ADI)が0.009 mg/kg であることを考慮しても, 喫食上問題はないと思われる.

ま と め

1982年6月から1983年3月の間に都内で販売されていた輸入発酵茶(含半発酵茶)及びフィリピン産バナナについて残留農薬の実態調査を行った.

1. 輸入発酵茶

(1) 残留農薬

BHC, pp′-DDT, pp′-DDE 及び pp′-DDD が検出され, それぞれの最高値は総 BHC 0.323ppm, 総 DDT 0.12ppm であった.

(2) 茶湯中への農薬の移行

BHC は初めの5分間は浸出時間の経過に伴い熱湯中に移行し, 5分後で茶葉中の14～25%が浸出された. しかし, その後15分間浸出しても浸出量は増加しなかった. また, 熱湯で5分間ずつ浸出を2回繰り返した場合は, 残存した BHC がさらに茶湯中に浸出することが判明した. pp′-DDT, pp′-DDE 及び pp′-DDD は20分間熱湯浸出や繰り返しの浸出においても茶湯中にほとんど浸出されなかった.

(3) 花茶中の残留農薬の分布

BHC 及び pp′-DDT は花及び葉ともに同程度の残留量であったが, pp′-DDE は花から葉の5～10倍検出された. 花の混和量は1%未満であり, 花茶で検出される残留農薬はほとんど葉に由来していた.

2. バ ナ ナ

(1) 残留農薬

20検体中夏期に購入した2検体よりベノミルが0.003, 0.005 ppm 検出された. その他の農薬(有機塩素系農薬, ダイアジノン, アルディカーブ, カルボフラン, モキャップ, ジネブ, チオファネートメチル)はいずれも検出されなかった.

謝 辞 本調査にあたり, 検体採取その他の便宜をはかっていただいた東京都衛生局食品監視課の職員各位に深謝いたします.

文 献

1) 西垣 進, 田村行弘, 鳥羽啓子ら：東京衛研年報, 23, 217, 1972
2) 小関正道, 嶋村保洋, 真木俊夫ら：*ibid.*, 31—1, 170, 1980
3) 小関正道, 田村行弘, 真木俊夫ら：*ibid.*, 32—1, 172, 1981
4) Romine R. R. : *Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators*, 10th Ed., Ed. Sherma J., Zweig G., 147, 1973, Academic Press, New York
5) 後藤真康, 加藤誠哉：残留農薬分析法, 184, 1980, ソフトサイエンス社
6) 西本孝男, 上田雅彦, 田植 栄：食衛誌, 7, 152, 1966

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 171-177, 1983

化学物質及び自然毒による食中毒事件例（第1報）
——昭和55年～昭和57年——

田村行弘*, 真木俊夫*, 観　公子*, 永山敏廣*, 直井家壽太*

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toxicants in Tokyo (I) (1980–1982)

YUKIHIRO TAMURA*, TOSHIO MAKI*, KIMIKO KAN*,
TOSHIHIRO NAGAYAMA* and YASUTA NAOI*

Keywords: 食中毒 food poisoning, 化学性食中毒 chemical food poisoning, 自然毒 naturally occurring toxicants, 流動パラフィン paraffin liquid, 農薬 pesticide, メソミル methomyl, バイケイ草 *veratrum stamineum*, ベラトルムアルカロイド veratrine alkaloids, ユウガオ *lagenaria siceraria*, ククルビタシン cucurbitacins

化学物質や自然毒による食中毒は，食中毒の統計上からみると年間数%と低い発生率である．しかしながら，その内容は多種多様にわたり，特に化学物質による場合は常識を超えるものが少なくない．例えば，いやがらせに体温計を壊して，水銀粒をカレーライス中に入れ，またみそ汁中に仕事で使うメッキ用塩化金を入れて仲間を喫食させる．あるいは飲酒ぐせの悪い夫に手を焼き，飲酒忌避剤をジュースに入れ飲ませたところ，悪酔し救急病院に担ぎ込んだものなど，故意に手近にある薬物を食品に混入し，相手を食中毒に陥らせる手口がある．

一方，外観や味などをよくする目的に使ったグルタミン酸ソーダ[1,2]やニコチン酸[3]などの食品添加物の過剰使用，あるいは，クロレラによる光過敏症[4]のように安易な加工法の改変が有害物質を作りだす結果となり，食中毒に結びついてしまった例もある．

他方，自然毒による食中毒では，自然食ブームにのって，山菜や野草つみが盛んであるが，知識が十分でないため有毒植物や毒茸を採取し，調理して食べる例が多くある．春先のギボウシの若芽と間違えるバイケイ草，秋口の茸，さらに年間を通じておこるゴボウに誤認されるヨウシュヤマゴボウやチョウセンアサガオの根による食中毒が挙げられる．また，有毒魚介類や環境の変化により毒化した貝類による食中毒もあとを断たない．

これら食中毒の原因物質の検索には，回わりの状況，分析学的手法や経験，過去の種々のデータなどが重要な役割を果している．事件の発生時は，患者も含めた回わりの者も動揺しているため，十分な情報を得ぬままに原因物質の検索に当らねばならぬ場合が多々ある．より早い解決は患者の生命を取り止め，事件の拡大防止に役立つことになる．これを満たす条件は分析の迅速性にあるが，多数の正確な情報がその手助になる．その中には過去の事件データが手掛りを与えてくれることも少なくない．しかし，大規模な事件以外はほとんど報告されないまま放置され，情報として役立っていないのが現状である．そこで，原因物質検索の一助とするために，著者らが経験した食中毒事件の概要，症状，検索法などについて報告する．なお，今回は昭和55年から57年までの3年間に都内で起こった事例を挙げ報告する．

1. 流動パラフィン入り赤まむしドリンクによる食中毒

① 事件の概要

昭和56年4月　午前0時頃　自宅近くの自動販売機から，清涼飲料水の赤まむし入りドリンク1本を購入した．帰宅後開栓し一気に飲み干したところ，ヒマシ油のような味と糊のようなドロッとした感触があり，気分が悪く，まもなく嘔吐，下痢を呈したとして保健所に届けでた．

② 食中毒の症状

患者は1名，症状は喫飲後約1.5時間頃より嘔気に始まり，嘔吐6回，さらに下痢を数回起こした．その後しばらくは気分の悪さが続いたが，1日後には回復した．

③ 試　　料

* 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

検体は，王冠付き褐色の120 m*l*入りビン中の底部に，約2 m*l*の無色の油状液体に褐色の粒状の液体が加わったものであった．またこのものはドリンク剤特有の臭いをもっていた．さらに届出者の訴え通り王冠のキャップは，かなりへこんでいた．

④ 原因物質の検索

油状の液体は炎に入れると，ロウ臭を発しながらあかい炎を上げもえ上がる．またエーテル等の有機溶剤によく溶ける．このような結果から石油系の油脂類であると推定された．そこで検体にエチルエーテルを加え，1N HC1と1N NaOHで洗浄したのち，亡硝で脱水後エーテル層を減圧下で留去した．さらに残査を少量のヘキサンに溶かし，ろ過後ヘキサンを留去した．残査は無色透明，微にロウ臭を有する液体であった．これについてGCパターン及び赤外吸収スペクトルを測定したところ，Fig. 1，2のようなスペクトルグラムが得られた．文献的検索の結果，これらは流動パラフィンと一致することが判明したことから，標準品のスペクトルグラムを作成し照合したところ，よく一致するものであった．

⑤ 汚染経路

原因物質が流動パラフィンであることから，汚染経路を調査した結果，自動販売機のある店には複写機もあり，これから出る排液中に流動パラフィンが入っていることが解った．又，排液を入れる容器として，本件のドリンク剤のビンも使われていたことから，何かの折に自動販売機中に紛れ込んだものと考えられた．

⑥ ま と め

本事件は，流動パラフィンをドリンク剤と思い込み飲んだ為に起った食中毒であった．清涼飲料水に多量の油性異物が混入した場合，口にした瞬間に異和感を認め，常識的には，飲み込むことがないと考えられる．しかし本事件により，勢いよく飲む場合，120 m*l*くらいならば，異和感に関係なく飲み込む恐れのあることを知らされて，考えを新たにした．

2. 農薬メソミル入りモチによる食中毒

① 事件の概要

昭和57年正月，家庭で焼きモチを食べたところ間もなく，吐気，嘔吐，発汗等を呈したとして保健所に届けでた．同一家庭内で自家製（千葉県の実家でついたもの）のノシモチを焼き，しょう油をつけ，日を隔てて2回にわた

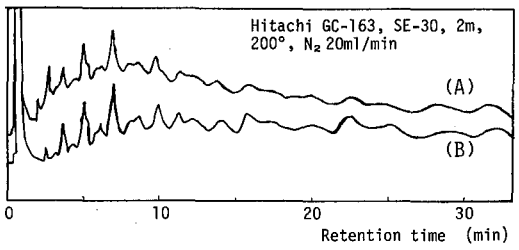


Fig.1. Gas Chromatograms of Paraffin Liquid
(A) Sample, (B) Paraffine liquid

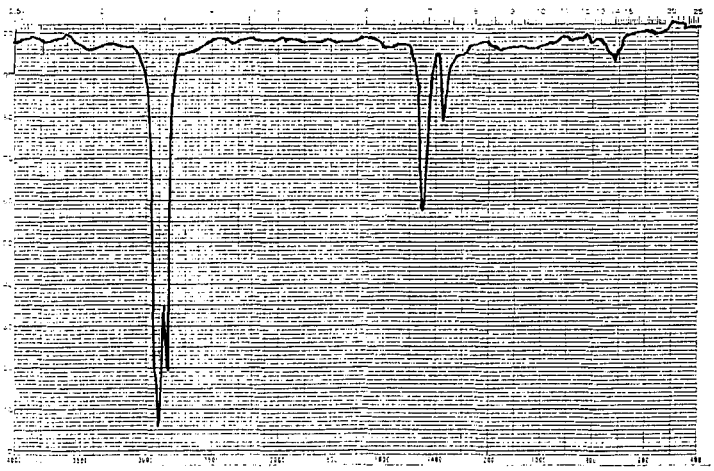


Fig.2. IR Spectra of Paraffin Liquid in a Soft Drink
Nujor method (KBr)

Table 1. 農薬中毒の事例

No.	性 別	年 令	摂取量	発症時間	症 状
1	男	57才	3 切 2 切	数 分	嘔気，激しい嘔吐，発汗，水様性下痢，めまい，酩酊感，けいれん（発熱なし）
2	女	54才	1 切 1 切	数 分	嘔気，嘔吐，発汗
3	男	26才	1 切	30 分	嘔気，嘔吐，発汗
4	男	40代	1 切	30 分	めまい，酩酊感，言語障害，発汗，嘔吐，下痢，けいれん
5	男	30代	1/4切	30 分	嘔気，嘔吐，発汗
6	男	30代	1/4切	な し	異常なし

り喫食した．初回は全員カゼ気味であったため食中毒と考えなかった．しかし，2回目にも同様の症状が発現したことからモチに疑いを持ち届けでたものである．また，このモチは届け出先でも，1/4個ずつを2名，1個を1名，計3名により喫食され，うち2名が発症し同様の症状を訴えた．

② 食中毒の症状

患者は6名中5名であり，このうち2名は2回にわたり喫食し発症している．症状はTable 1. に示したが，喫食後数分から30分に，嘔気，嘔吐，激しい発汗を呈し，多量に食べた人は酩酊感，めまい，さらに約1時間後に一過性の下痢を呈した．又，いずれも5時間くらいで回復した．特に本症状の特徴は少量食べた人でも激しい発汗が現われた点であった．

③ 試 料

検体は外観的にみて，極く普通の手作りのノシモチの切身であり，何ら異臭も認められなかった．又，喫食者もしょう油をつけ食べたためか，異味異臭を訴えるものはなかった．

④ 原因物質の検索

初めにモチのアセトン抽出物について，マウスに4.4 g/kg を経口及び腹腔内投与したところ，数分後に嘔気様症状を起こした．次いで腹部の萎縮性けいれん，四肢特に尾における伸長性けいれんと続き，呼吸麻痺を起こしながら死に至る非常に激しい症状が現われた．

モチ中の毒物を検索するために，初めに裁判化学分析の常法である液々分配による分離操作を試みた．各区分について，動物によるスクリーニングを行ったところ，特定画分に毒物が検出されることなく，いくつかの画分に分散し毒性が現われることが分った．ここで，通常の分離手順では単離できないこと，又容易にアルカリで分解し，時にイオウ臭を発することなどが分った．また，患者の症状の特徴に発汗が共通してあることから，毒物を推定すると，有機リン系及びカルバメート系農薬，PCP，ニコチン，フッ素化合物等が挙げられた．そこで，アセトン抽出物について，薄層クロマトグラフィー（TCL）やガスクロマトグラフィー（GC）などを行うこととした．

TLC において，シリカゲルF_{254}薄層板を用い，水飽和酢酸エチルで展開したところ，Rf 値0.63に強い紫外部吸収をもつスポットが単離された．この画分をかき取り，マウスに投与したところ，初期に得た結果と同一の

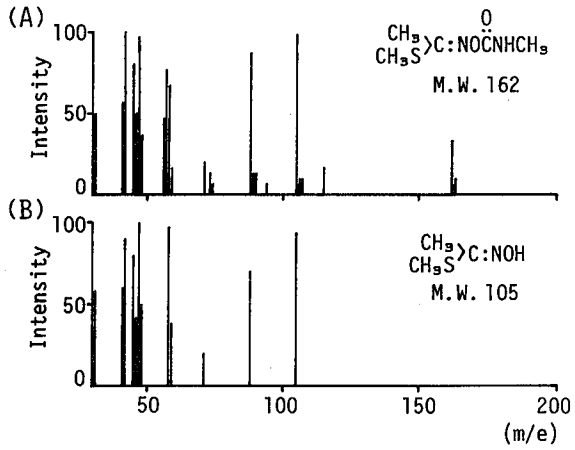


Fig.3. Mass Spectra of Methomyl in Rice Cake
(A) DI–Mass spectra of methomyl in rice cake
(B) GC–Mass spectra of methomyl after hydrolysis (methylthioacetohydroxamate) in rice cake
[2% FFAP, lm, 160°, N_2 30ml/min]

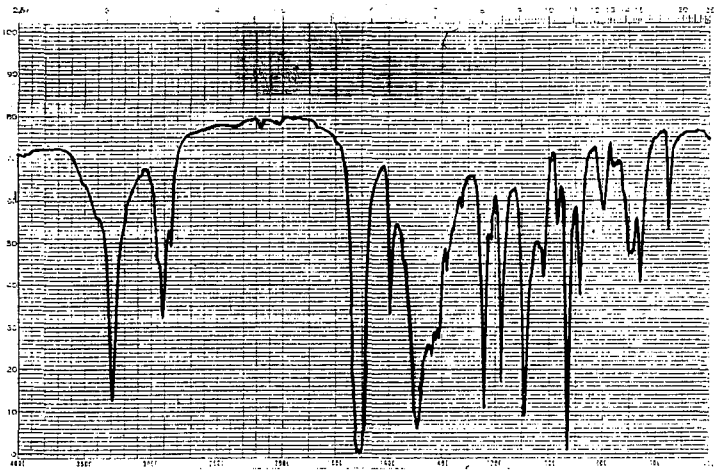


Fig.4. IR Spectra of Methomyl in Rice Cake

症状が現われた．また，この画分の融点は77～79°，直接導入法による質量分析（DI–Mass）のマススペクトルは，Fig. 3 のAに示すように，分子イオンピークm/e 163があり，また，アルカリ分解した後酢酸エチルで抽出したものは，GC–FPDで高感度にイオウ化合物と考えられるピークが検出された．これをGC–Massでマススペクトルを測定した結果，Fig. 3のBに示すようにm/e 105の分子イオンが検出された．さらに平行して行った検索結果について解析すると，カルバメート系農薬だけが原因物質に最後まで残された．

以上のデータを基にして，再び文献的検索を行ったところ，相当するものにメソミルが浮び上がった．そこで，標品の提供を農薬会社から受け，融点，混融試験，赤外吸収スペクトル，DI–Mass，アルカリ分解の後，生じるチオアセトヒドロキサム酸メチルのGC及びGC–Mass等を，比較したところよく一致する結果が得られた．また，マウスによる試験結果も症状やLD_{50}がよく一致した．

これらのことから，本事件はメソミルに起因したものと断定した．またその量について，アルカリ分解後FPD検出器付GCで定量[5,6]したところ，メソミルとして130 mg/100 g存在することが確認された．さらに，モチ表面と中身について比較したが量的な差はなく，また各切身間の差もほとんどなかった．

⑤ ま と め

本事件は，カルバメート系殺虫剤メソミル（ランネート）による食中毒であった．またモチ中の含有量は130 mg/100 gであり，メソミルの摂取量は患者のモチ摂取量から換算すると，30～270 mg/人であると推定された．さらに調査の結果，本農薬はモチ中に均一に存在している．水に対して5.6 g/100 m*l*と比較的よく溶ける．あとの調査の中でモチ米の残品がみつかり，千葉県において試験したが本農薬は検出されていない．また，2合の米に150 mgのメソミルを添加し炊飯したところ，約70%が回収され，炊飯程度の加熱温度では分解せず，安定な化合物であることが分った．これらのことから，本農薬の混入経路を推定すると，一夜モチ米を水に浸し土間に放置した際に，変質者がいたずらしたのではないかと考えられた．その後，57年11月千葉県内で本事件と同様なケースの事件が起っている．これは，本事件のモチをついた先の実家の町と近接する町で起ったものであり，何らかの関連も考えられるが判明していない．

また，57年7月の早朝，日野市内の住宅地で12羽の雀が変死するという事件があった．雀の胃腸管内容物，肝臓について試験したところ，メソミルが各々，平均9.7 ppm，1.9 ppm検出された．事件は農家でメソミルを糠に混ぜ畑へ散布したものを，雀がついばんだために，その数分後に飛来し住宅の庭先で変死したものであることが，あとの調査から明らかになった．

農薬による事件はあとを断たないが，管理法に手落ちがないか，もう一度注意を喚起する必要があるであろう．また，本事件は届け出先で残品を疑うことなく，気安く食べたために，その者も食中毒に陥ったというきわめて異例な事件であった．

3. ユウガオの実による食中毒

① 事件の概要

昭和57年8月，家族でユウガオの実の水煮を食べたところ，吐気，嘔吐，下痢等を呈したとして保健所に届けでた．このユウガオは家族で旅行した際，山梨県内の農家から購入したものである．家族のうち喫食者3名だけが発症し，その内2名は実の切身を，また1名は煮汁だけを食べている．患者はいずれも非常に苦味を感じたと訴えていた．

② 食中毒の症状

患者3名とも，喫食後20～40分に嘔気を呈し，数回嘔吐し，みぞおちに腹痛を訴えた．また，実を食べた2名は約9時間後に2～7回水様性下痢を呈している．症状は喫食量に比例し重くなり，すなわち煮汁だけ飲んだ者，3切の実を食べた者，6切の者の順に症状が強く現われた．いずれの患者も約18時間後には回復した．

③ 試　　料

検体は生の実と水煮に調理したものの2種である．生のものは楕円形で，フットボールくらいの大きさのもの1/3切である．皮は淡黄緑色で細かいうぶ毛があり，中身は白色であり，切片をかみしめると苦味を強く感じるものであった．

④ 原因物質の検索

ユウガオはウリ科植物で，その果実は丸形と長形がある．またヒョウタン形は本種の変種である[7]．前者が甘いのに対し後者は苦く苦瓢と云われている．丸形や長形のものは干瓢の原料である．ウリ科植物には苦味成分の存在が知られ，その代表的なものにククルビタシン[8,9]がある．漢方薬ではウリ科植物のテッポウウリなどを催吐剤や下剤として使用している[9]．以上のことから，ククルビタシンの検索[10]を行うことにした．

試料100 gを細切し，ソックスレー抽出器に入れ95%エタノールで22時間抽出を行う．次いでエタノールを留去し，残査にクロロホルムを加え溶かし，水洗後クロロホルムを留去する．残査を少量のクロロホルムに溶かし，シリカゲルF_{254}薄層板による薄層クロマトグラフィーを行う．展開溶媒には，(1) ジイソプロピルエーテル，アセトン（5：2），(2) ベンゼン，ジオキサン，酢酸エチル（2：1：1），(3) トリクロルエチレン，イソプロパノール（10：1）を用いた．確認にはUV254nmの照射，ヨウ素蒸気，5%塩化第二鉄・エタノール溶液，2%バニリン・リン酸・エタノール混液（1：2：8）を用いた．

以上の結果，ククルビタシンDと一致するRf値のスポットが得られた．そこで，この画分について味覚テストを行った結果，苦味が認められた．またエタノールの溶出液について，紫外部吸収スペクトルを測定したところ230 nmに強い吸収を認めるとともに，310 nmに弱い吸収帯が認められた．ククルビタシンは26種が自然界に存在することが知られている[8]．又ユウガオ属にはククルビタシンB，D，G，Hが存在すると報告[8]されている．今回の結果からは，ククルビタシンDだけ同定することができた．

⑤ ま と め

ウリ科植物にはククルビタシンが含まれていることが知られるが，本事件のような例はきわめて希れである．昭和50年9月に北海道において[12]，断定されていないがユウガオによると考えられる事件が1件発生している．通常，苦味が強いためほとんど食べられることのないものが，今回偶然にも苦味を感じながら無理して食べたために起ったと考えられる．量的な関係をつかむことができず残念であるが，キュウリなどでも苦味をもつものもあることから，中毒量を知ることは今後の課題であろう．

4. バイケイ草による食中毒

① 事件の概要

昭和57年4月及び5月に，続けて山菜による食中毒が起った．前者は大人5名がウルイ（ギボウシ，ユリ科植物）を丹沢へ採取に行き，帰宅後テンプラや塩漬にして喫食した．苦味が強いため一名は食べていない．ほかの4名が食べたところ，急性中毒の症状を呈し救急病院に担ぎ込まれたものである．後者は某電気会社社員約30名が志賀高原へ山菜取りに行き，タラの芽，ヒメタケ，カニラ（ギョウジャニンニク）などを採取し，おじやに入れなどして食べたところ，20～30分後に食中毒に見舞われたものである．

② 食中毒の症状

患者は4名と3名である．いずれも10～30分後に発症している．嘔気とともに手先や顔面などのしびれに始まり，嘔吐（激しく連続的に現われた人もいる．）めまい，脱力感を呈した．重症者は全身のけいれん，虚脱状態，意識不明に陥った．また顔面や全身にほてり，頭痛，一瞬目の前が暗くなるなどの症状を訴える人もあった．いずれの患者も翌日には回復に向った．

③ 試　　料

検体は残品が少なく，約10 cmの若芽1株と約1 cmの茎1片と両事件ともきわめて少量しか採取できなかった．いずれも茎は幾重にも茎皮が重なり合ったもので，特有の芳香をもち，外皮には細かいうぶ毛がみられた．

④ 原因物質の検索

両検体ともギボウシやギョウジャニンニクでないことが外観等から判明した．又症状等からバイケイ草の疑いがもたれたが，資料も少なく参考になるバイケイ草もないことから鑑定が困難であった．バイケイ草にはベラトルムアルカロイド[13]が含まれることから，この検索[14]を行うこととした．

試料にベンゼン35 ml，アンモニア水0.5 ml，水5 mlを加え十分にホモゲナイズする．次いでろ過し，残査は再び同様の操作をする．ろ液を合せ振とうしたのちベンゼン層を分取する．ベンゼン層に5％酢酸を加え3回抽出する．酢酸層に25％ NaOH を加えアルカリ性とし，再びベンゼンで抽出する．ベンゼン層を脱水後減圧下で濃縮する．残査をアセトンにとかしペーパークロマト（P.C）及び薄層クロマトグラフィー（TLC）を行う．なお，標品にはベラトリン（Merck 社製）を用いた．展開溶媒には，P.C. 用[15]に塩化エチレン，水，酢酸（49.5：49.5：1），TLC 用[16]にシリカゲルF_{254}—シクロヘキサン，ジエチルアミン（160：40），アビセル SF —メタノール，アンモニア水（20：1）を用いた．確認にはUV254nm，ドラーゲンドルフ試薬，30％硫酸，25％トリクロル酢酸・クロロホルム溶液を用いた．

クロマトグラフィーの結果，標品の Rf 値と一致するベラトリンが確認された．この他 Rf 値から推定し，プロトベラトリンA及びB，ベラトリジンと考えられるスポットも検出された．主な Rf 値は次のとおりである．P.C.ではプロトベラトリンA及びBが各々 Rf 値0.80，0.20，TLC–シリカゲルF_{254}では，ベラトリン及びベラトリジンが各々0.53，0.16である．

⑤ ま と め

両事件はいずれもベラトルムアルカロイドが検出されたことや，外観，味，中毒時の症状等からバイケイ草によるものと判定した．さらにその生息場所から推定するとコバイケイ草であると考えられた．

本植物による食中毒は過去10年間に統計上現われているものが4件，患者数18名である．さらに本年4月に静岡，仙台と続けて発生し，14名の患者を出している．また，バイケイ草の根は生薬で白藜蘆根（Byakurirokon）[17]と云われ，吐剤や虫歯の鎮痛剤に用いられる．過去には，英国やドイツ薬局方などにも収載され，殺虫剤[17]として使用されていた時代もあった．中毒量は不明である．

終りに，都内で発生した事件ではないが，スイセンの花による食中毒があったので簡単に記すこととする．事件は北海道で起ったが，出荷地が東京にあることから都でも検査を行った．刺身などの“つま”として八百屋の店頭にならぶ茎付スイセンの花を購入し，家族でテンプラに揚げ食べたものである．患者は4名で，喫食後20～30分に激しい嘔吐に見舞われたという食中毒事件である．スイセンはヒガンバナ科に属するため，リコリンやタテジンなどのアルカロイドを含有していることが考えられた．分析すると[18~20]花や茎からこれらアルカロイドが検出された．過去にヒガンバナの球根による食中毒事件はあるが，このような花による事件は大変めずらしいものである．事件以後，都では販売に際し，食用にしないようにという表示をするように義務づけた．

食中毒事件は，常識では判断しにくい条件下で起こることが多いが，今回報告した事例は昭和55年から57年までに都内で発生したもののうち，特殊性のある化学性および植物性食中毒各2件ずつ取りあげた．すなわち，1. 流動パラフィン入り赤まむしドリンク，2. 農薬メソミル入りモチ，3. ユウガオの実，4. バイケイ草，による食中毒事例である．

文 献

1. 西垣 進，田村行弘：食衛誌，14，611，1973
2. 西垣 進，田村行弘，山田 洋他：東京衛研年報，23，205，1971
3. 加藤 博：急性中毒，新小児医学大系 第25巻 小児中毒学（別冊），164，1980，中山書店
4. 田村行弘，真木俊夫，嶋村保洋他：食衛誌，20，173，1979
5. 環境庁告示 第23号 官報 1965，May，10
6. 後藤真康，加藤誠哉：残留農薬分析法，147，1980，ソフトサイエンス社
7. 星川清親，千原光雄：食用植物図説，55，1970，女子栄養大学出版部
8. Lavie, D. and Glotter, E. : *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, 29, 307, 1971
9. 刈米達夫：植物化学，152，1967，広川書店
10. Kupchan, S. M., Meshulam, H. and Sneden, A. T. : *Phytochem.*, 17, 767, 1978
11. Zieliński, J., Konopa, J. : *J. Chromatog.*, 36, 540, 1968
12. 厚生省大臣官房統計情報部編：食中毒統計（昭和50年度），74，1976，（財）厚生統計協会
13. 刈米達夫：植物化学，394，1967，広川書店
14. Jacobs, W. A. and Craig, L. C. : *J. Biol Chem.*, 149, 271, 1943

15. Nash, H. A. and Brooker, R. M. : *J. A. C. S.*, **75,** 1942, 1953
16. Zeitler, H. J. : *J. Chromatg.*, **18,** 180, 1965
17. 木村康一，木島正夫：薬用植物学各論，56，1967，広川書店
18. 高木修造，中村一江：武庫川女子大学紀要　自然科学篇第9集，3，1961
19. 高木修造，田村多喜子：*ibid.*, **11**, 137, 1963
20. Döpke, W. : *Archiv der Pharmazie*, **295**, 605, 1962

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 178-184, 1983

アルコール飲料中のアスベスト繊維の分析

荻野周三*, 小関正道*, 安野哲子*
福森信隆**, 伊東昭子*, 遠藤英美*

Analysis of Asbestos Fibers in Alcohlic Beverages

SHUZO OGINO*, MASAMICHI KOSEKI*, TETSUKO YASUNO*, NOBUTAKA FUKUMORI**

AKIKO ITOH* and FUSAYOSHI ENDO*

Asbestos fibers in 16 alcoholic beverages (9 brands of Japanese sake and wine, 7 of imported wine and sherry) were isolated and counted by means of a transmission electron microscope. Nine samples of beverages produced in Japan, 3 of sake were filtered with asbestos and the other materials than asbestos. The methods of filtration used for all of imported beverages were not known.

All the samples were found to contain asbestos fibers which ranged from 50,000 to 58,000,000 counts per liter. Three samples of sake filtered with asbestos contained such a large amount of fibers as to exceed 34 million counts per liter. This indicates that fibers used for the fillter aids easily pass through the filtration system into beverages. Fibers found in other samples were generally lower, 50,000 – 520,000 counts per liter. Except for about 20 μm of fibers detected in one sherry sample, the length of fibers was found to range from 0.2 to 5.0 μm.

Keywords: asbestos fiber, alcohlic beverage, transmission electron microscope

緒　言

アスベストの繊維状構造は金網などのろ材に対し架橋を形成し，プレコートを容易かつ堅固にする効果が有り[1]，この特性を利用して，長年清酒やワイン等のアルコール飲料のろ過に用いられてきた．著者らは先にアスベストをろ過助剤として使用した際の繊維構成成分ならびに不純物の製品中への溶出について検討を行い，その結果，特に食品衛生上の問題点を認めなかった[2]．そこで今回は製品中へ，繊維自体が混入する可能性を知る目的で，市販されているアルコール飲料中の繊維含有量およびその長さを測定し，若干の知見を得たので報告する．

実　験

試　料　昭和57年9月から58年4月にかけて都内の一般小売店から購入した清酒7種（A）～（G），国産ワイン2種（H），（I），輸入ワイン6種（J）～（O）および輸入シェリー酒1種（P）の計16試料を試験に供した．コントロールにはメンブランフィルターを用いてろ過した精製蒸留水（Q）を用いた．なお，清酒ならびに国産のワインについては製造業者に対し，アスベストの使用の有無に関する調査を併せて実施した．

装　置　低温灰化装置：インターナショナル・プラズマ・コーポレイション製，IPG－1001型　透過型電子顕微鏡（以下TEMと略す）：日立製作所㈱製，HU－12型

メンブランフィルターおよび試薬　セルローズ・アセテート系フィルター：富士フイルム㈱製，TM－22，孔径0.22 μm，直径47 mm（以下メンブランフィルターと略す）ポリ・テトラ・クロロエチレン系フィルター：ミリポア㈱製，フロリナートFG，孔径0.2 μm，直径47 mm（以下フロリナートフィルターと略す）精製蒸留水：蒸留水をメンブランフィルターで吸引ろ過して用いた．アセトン：和光純薬㈱製，試薬特級アセトンをフロリナートフィルターで吸引ろ過して用いた．フォルムバール：チッソ㈱製，ポリ・ビニル・フォルムバールを

* 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
** 同毒性部病理研究科

クロロホルムに溶かして0.3%と溶液した.

TEM用グリッド ベコー㈱製, 200メッシュのグリッドに常法によりフォルムバールの支持膜を張って用いた.

実験方法 1. 試料中のアスベスト繊維の捕集 試料1lをメンブランフィルターを用いて吸引ろ過し, 引き続き精製蒸留水50 mlをろ過して糖分などを洗浄, 除去したのち, フィルターをビーカー内に入れ, 60°で1時間乾燥した.

2. フィルターの灰化とTEM用試料の作成 フィルターをビーカーに入れたまま低温灰化装置のチャンバー内に移し, 出力150 Wで完全に灰化したのち, ビーカー内の残留物はアセトンを正確に1 ml加えて溶かし, 超音波を30秒間かけて分散させ, TEM用試料液とした. この試料液の5 μlをグリッド上に滴下し, 自然乾燥させた. ただし, アスベスト繊維の含有量が多く, 計数が困難な場合にはTEM用試料液の内, 50 μlをとり, アセトン1 mlを加えて希釈し, その5 μlをグリッド上に滴下した.

3. TEMによるアスベスト繊維の同定および計数 上記の2で作製したグリッドをTEMに装着し, 計25個のグリッド穴について電圧75 kV, 倍率10,000倍で, さらに倍率10倍のルーペを併用しながら, 存在するアスベスト繊維の数と長さを測定した. 試料のアスベスト繊維含有量は次の式を用いて算出した.

$$F=\frac{N\cdot A_1\cdot V_1\cdot D}{G\cdot A_2\cdot V_2\cdot M}$$

F：試料1l中のアスベスト繊維数（本/l）
N：計25個のグリッド穴から検出された繊維の総数（本）
A_1：グリッドの総面積=0.07（cm^2）
V_1：TEM用試料液の調製に用いたアセトンの量=1（ml）
D：TEM用試料液の稀釈倍率：通常は1，繊維の含有量が多い場合は21
G：観察したグリッド穴の数=25（個）
A_2：グリッド穴1個の面積=7.22×10^{-5}（cm^2）
V_2：グリッド上に滴下したTEM用試料液の量=5×10^{-3}（ml）
M：試料の採取量=1（l）

結果および考察

1. 各試料のろ過工程におけるアスベスト使用の有無に関する調査 製造業者に対し, アスベストの使用の有無を調査した結果, 清酒（A）～（C）の3試料のみがアスベストを用いて製造され, その他の試料はすべてアスベストの代わりにセルローズ・パウダーもしくはろ紙を用いてろ過, 製造されたものであることが判明した. 輸入ワインおよびシェリー酒についてはそのろ過方法を確かめることができなかった.

2. アスベスト繊維含有量 各試料のアスベスト繊維含有量について測定した結果をTable 1に示す. 繊維は5万本/l～5,799万本/lの範囲ですべての試料から検出された. 中でもアスベストをろ過に用いて製造された清酒（A）～（C）は3,421万本/l～5,799万本/lと, 他の試料に比較して著しく多いことから, 使用されたアスベスト繊維がろ材を通過し, 製品中に混入したものと考えられる. ろ過にアスベストを用いていない清酒（D）と（E), 輸入ワイン（J）～（L）および輸入シェリー酒(P)からも16万本/l～52万本/lの繊維が検出されたが, 清酒（A）～（C）に比べるとその量は1/100以下にすぎず, この結果はE.P.A.がアメリカ国内のアスベストによる汚染の可能性が無い地域の都市水道水について測定して得た値[3]とほぼ同程度であることから, 恐らく, 原料水中にもともと含まれていたものではないかと考えられる. その他の試料では繊維の含有量はさらに少なく, コントロールと大きな差は認められなかった.

猪子ら[4]は清酒, ワインおよびビールのアスベスト繊維含有量を走査型電子顕微鏡（以下SEMと略す）を用いて測定したが, それによると, 15試料中, 清酒2試料から380本/lと760本/lの繊維を検出し, またワイン1試料中に繊維の団塊を認めたほかはいずれの試料もアスベスト繊維を含有しなかったと報告している. しかしSEMはTEMに比べて微小な繊維の識別が困難であるといわれ, 特に長さが1 μm以下の繊維は, これを見落とす危険性が有るものと考えられる.

アスベスト繊維のより正確な同定を行うには制限視野電子線回折法（SAED）[5, 6]やX線マイクロアナライザー[4, 6]の利用があるが, アルコール飲料のろ過に用いられるアスベストはほとんどがクリソタイルであり, しかもクリソタイルは独特な管状構造を持っていることから著者らはTEMを用い, この形状の特徴を観察することで同定を行った（Fig. 1, 2）. しかし, 試料によっては残留灰分の付着や, 表面構造の崩壊によって識別が困難な繊維状物質が存在する例や, 含有量の多い試料では多数の繊維が凝集し, 複雑に絡み合って団塊を形成する現象も認められ（Fig. 3）, これらはいずれも計数の対象から除外した. したがって, Table 1に示

Table 1. Asbestos fibers in beverages

Sample	Source	Number of fibers in 25 grid openings	Fiber concentration in sample ($\times 10^4/l$)
Sake (A) *1	Japanese	356	5799*4
Sake (B) *1	Japanese	240	3909*4
Sake (C) *1	Japanese	210	3421*4
Sake (D) *2	Japanese	33	26
Sake (E) *2	Japanese	30	23
Sake (F) *2	Japanese	10	8
Sake (G) *2	Japanese	7	5
Wine (H) *2	Japanese	10	8
Wine (I) *2	Japanese	7	5
Wine (J)	U.S.A.	67	52
Wine (K)	U.S.A.	25	19
Wine (L)	U.S.S.R.	21	16
Wine (M)	Australian	13	10
Wine (N)	Italian	13	10
Wine (O)	French	9	7
Sherry (P)	Spanish	59	46
Control (Q) *3		5	3

*1 : Produced by filtration system using asbests.

*2 : Produced by filtration system using non-asbestos.

*3 : Distilled water which is filtrated through 0.2 μm membrane.

*4 : Dilution factor is 21.

Table 2. Distribution of fiber lengths in 25 grid openings

Sample	Source	Number of fibers				
		0.2–0.5 μm	0.5–1.0 μm	1.0–2.0 μm	2.0–5.0 μm	5.0 μm<
Sake (A) *1	Japanese	40	180	126	10	0
Sake (B) *1	Japanese	24	122	82	12	0
Sake (C) *1	Japanese	64	126	20	0	0
Sake (D) *2	Japanese	7	16	7	3	0
Sake (E) *2	Japanese	10	16	4	0	0
Sake (F) *2	Japanese	5	5	0	0	0
Sake (G) *2	Japanese	4	3	0	0	0
Wine (H) *2	Japanese	4	4	2	0	0
Wine (I) *2	Japanese	2	5	0	0	0
Wine (J)	U.S.A.	23	32	12	0	0
Wine (K)	U.S.A.	3	12	7	3	0
Wine (L)	U.S.S.R.	2	13	4	2	0
Wine (M)	Australian	6	2	3	2	0
Wine (N)	Italian	1	6	4	2	0
Wine (O)	French	2	2	5	0	0
Sherry (P)	Spanish	13	26	13	6	1
Control (Q) *3		0	2	3	0	0

*1, *2, *3 : Same as Table 1.

す繊維含有量は各試料について推定し得る最低値を意味する.

3. 検出されたアスベスト繊維の長さ 各試料から検出されたアスベスト繊維を長さについて分類した結果をTable 2に示す. 繊維の長さはシェリー酒から検出された約20 μmのもの（Fig. 4）1本を除き, いずれも5 μm以下であった. 中でも0.5～1.0 μmの長さのものが最も多く, 全体の51%を占め, 以下, 1.0～2.0 μmの26%, 0.2～0.5 μmの19%, 2.0～5.0 μmの4%の順であり, ろ過にアスベストを用いて製造された試料と用いない試料の間で長さに関する分布の割合に違いは認められなかった.

ま と め

市販アルコール飲料中に含有されるアスベスト繊維について分析を行った. 清酒やワイン等の試料をメンブランフィルターでろ過して繊維をフィルター上に捕集し, 低温灰化装置を用いて灰化したのちアセトンに懸濁させ, その一定量中に含まれる繊維の数ならびに長さをTEMによって測定した. その結果, アスベストをろ過助剤として使用し, 製造された試料からは3,421万本/l～5,799万本/lと著しく多くの繊維が検出されたことから, 繊維がろ材を通過して, 製品中へ多量に混入することが確かめられた. 検出された繊維の長さはシェリー酒中に含まれていた約20 μmのもの1本を除き, いずれも0.2～5.0 μmの範囲内であった.

文 献

1) 杉本泰治：沪過と沪過助剤, 1967, 地人書館
2) 荻野周三, 安野哲子, 小野綾子, 大畠敏子, 遠藤英美：東京衛研年報30－1, 157, 1979
3) Millette, J.R., Clark, P.J., Pansing, M.F. and Twyman, J.D. : *Environmental Health Perspectives*, **34**, 13, 1980
4) 猪子正憲, 有磯協子, 松野武雄：食衛誌, **23**, 422, 1982
5) Cunningham, H.M. and Pontefract, R.D. : *Nature*, **232**, 332, 1971
6) Beaman, D.R. and File, D.M. : *Analytical Chemistry*, **48**, 101, 1976

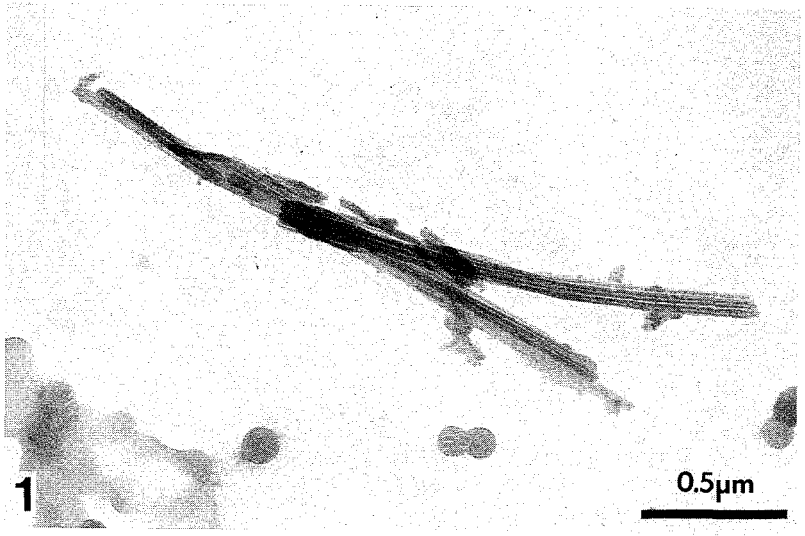
Explanation of Figures

Fig.1. Asbestos fibers isolated from Sake (A). The chrysotile asbestos fiber is obviously characterized by a central canal.

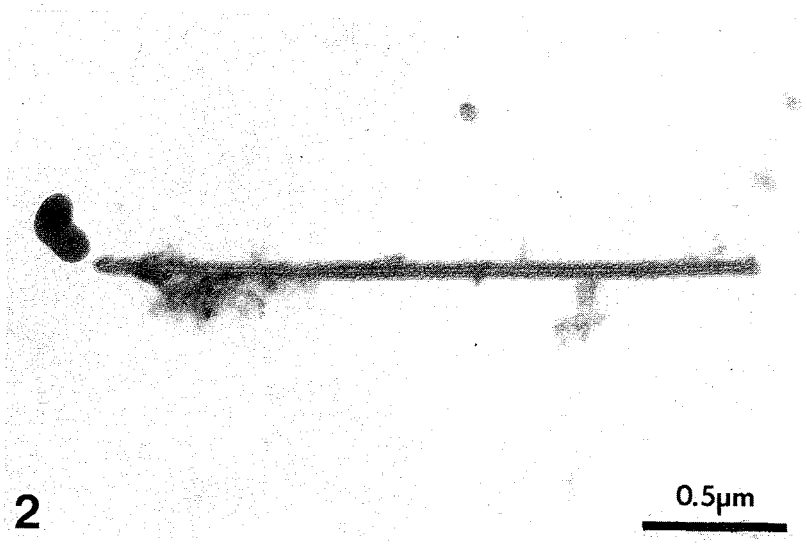
Fig.2. An asbestos fiber isolated from Wine (J).

Fig.3. A cluster of asbestos fibers observed in Sake (A).

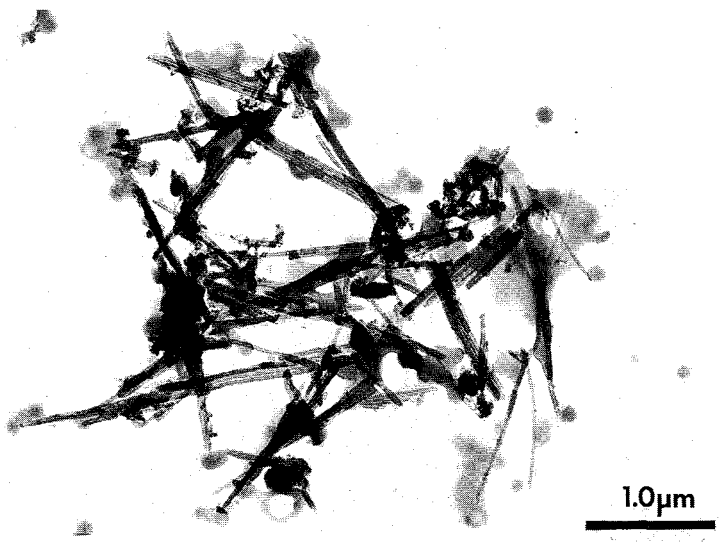
Fig. 4. The longest fiber is observed in Sherry (P).



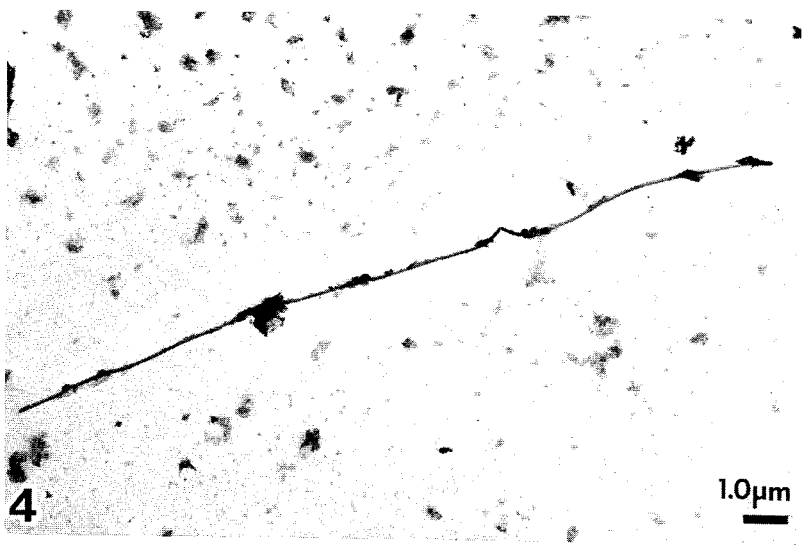
1



2



3



4

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 185-190, 1983

ポリスチレン製容器包装の有機性添加剤の分析

佐藤憲一*, 渡辺悠二*, 吉田令子*, 遠藤英美*

Analysis of Organic Additives in Polystyrene Container–Package

KENICHI SATO*, YUJI WATANABE*, REIKO YOSHIDA*
and FUSAYOSHI ENDO*

The qualitative analysis of organic additives contained in polystyrene food container–packages was examined. The additives were efficiently extracted from the crushed samples of the packages by soxhlet extractor with ethyl ether and then this extract was treated with methyl alcohol to remove low polymer. The additives were isolated by silica gel column chromatography and TCD gas chromatography from the extract and identified by infrared spectra. Ten kinds of additives (BHT, Irganox 1076, DnBP, DnOP, DEHP, DEHS, paraffin wax, palmitic acid, stearic acid, behenamide) were detected from 42 packages tested.

This result suggests that the kinds of additives actually contained in packages were limited to certain types among the compounds mentioned in the positive list published by the trade.

Keywords : organic additives, polystyrene, food container–package

はじめに

ポリスチレン（以下PSと略す）にはその性質より大別して，スチレンの単独重合体である一般用PS（GPPS : general purpuse PS）と合成ゴムを配合した乳白色の耐衝撃性PS（HIPS : high impact PS）および発泡PS（FS : foam PS）がある．透明で着色の自由なGPPSはプリン容器，砂糖つぼ，しょう油さし，スプーン，フォークなど，低温で優れた耐衝撃性をもつHIPSは乳酸菌飲料容器，冷凍食品用トレー，冷菓容器など，また断熱性・緩衝性に富むFSは熱湯用カップ，一般食品用トレーなどとして食品容器包装の分野に大量に利用されている．これら食品用PS製品における衛生上の規格[1]は材質試験としてカドミウム・鉛・揮発性物質，溶出試験として重金属・過マンガン酸カリウム消費量・蒸発残留物の6項目が定められている．また業界においても独自のポジティブリスト[2]を作成し，使用添加剤等について自主規制を行っている．しかしながらポジティブリスト収載の添加剤はその種類も多く，製品における分析法も十分確立されておらず，またメーカーに使用添加剤の表示義務もないことから，実際の食品用PS製品にどのような添加剤が使用されているか不明な点が多い．このようなことから前回ポリエチレンおよびポリプロピレン製容器包装中の有機性添加剤の分析法について報告[3]したが，今回はPS製品中の添加剤の使用実態を明らかにする目的で酸化防止剤，紫外線吸収剤，可塑剤，滑剤など多種類の添加剤を同時に分析する方法について検討を行い，良好な結果を得たので報告する．

実験方法

試薬　石油エーテル，クロロホルム，エチルエーテル，メタノール：特級品　臭化カリウム（KBr）：赤外吸収スペクトル用KBr　シリカゲル：カラムクロマトグラフィー用ワコーゲルC-200　標準添加剤：PSのポジティブリストの酸化防止剤，紫外線吸収剤，可塑剤，滑剤などのうち市販試薬として入手可能な化合物　添加剤標準液：前記化合物の各1.0%クロロホルム溶液を調製し，必要に応じて適宜希釈して使用した．

装置　粉砕器：アイカ分析用粉砕器　ガスクロマトグラフ：日立163型ガスクロマトグラフ，TCD検出器付赤外分光光度計：日本分光A-3型赤外分光光度計，ビームコンデンサー付

試料　食品用PS製品13種類（トレー，コップ，乳酸菌飲料容器，食品容器，砂糖つぼ，ウォータークーラー，

* 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

しょう油さし，ピックス，はし，スプーン，フォーク，ナイフ，マドラー）計42検体を試料とした．このうちHIPSはトレー，レジャーカップ，乳酸菌飲料容器，食品容器の4種類11検体，FSはトレーの3検体で残り28検体はGPPSであった．

試験溶液の調製 試料をドライアイス存在下，粉砕器で粉砕し，風乾後その5 gをエチルエーテル150 mlで8時間ソックスレー抽出装置により添加剤の抽出を行う．抽出液を減圧濃縮したのち，残留物を1 mlのクロロホルムに溶かし，メタノール10 mlを加えて冷凍庫に一夜放置してポリマーを析出させる．この液をメンブランフィルター（0.45 μ）を用いて吸引ろ過し，ろ液を減圧濃縮したのち，残留物にクロロホルムを加えてよく溶かし全量を1 mlとする．この液を試験溶液とした．

カラムクロマトグラフィー 内径12 mm長さ50 cmのガラスカラムに充填剤としてシリカゲルを約30 cm充填し，試験溶液を流し込み，ついで石油エーテル，クロロホルム，エチルエーテル，メタノール各10 mlづつを順次流して吸着物を溶出し，各溶出液を分取する．各分取液を減圧濃縮し，残留物にクロロホルム0.5 mlを加えカラム分取溶液とした．

ガスクロマトグラフィー（GC） 試験溶液および各カラム分取溶液についてTCD昇温GCを行い，試験溶液中の抽出成分および各カラム分取溶液におけるその分離状態をみた．さらに各カラム分取溶液について100 μlづつ計500 μlを注入し，クロマトグラムの各ピーク成分をTCD検出器の出口にガラス管（外径3 mm，内径2 mm，長さ10 cm）を挿入し凝縮捕集した．カラム：3 % Silicone E-301/Uniport HP（60/80 mesh）1 m内径8 mmの分取用ステンレスカラム カラム温度：100°～300°，20°/min 注入口温度：320° TCD温度：310° TCD current：80 mA キャリヤーガス：He 80 ml/min

赤外吸収スペクトル法（IR） 前記GCにより各カラム分取溶液のピークを凝縮捕集したガラス管をクロロホルム100 μlで洗い，凝縮成分をIR用試験溶液とし，KBrミクロ錠剤成型法により径3 mmのミクロ錠剤をつくり，ビームコンデンサーを用いてIRを測定した．

結果と考察

分析法について PSから添加剤を分離する方法[4,5]として，一般的に有機溶媒による抽出法と溶解法がある．今回抽出法としてエチルエーテルによるソックスレー抽出法と，溶解法としてPSをクロロホルムに溶解しメタノールで除ポリマーを行う方法について検討を行った．両者のGCにおけるピークパターンはほとんど同じで，添加剤の分離手段として抽出法と溶解法は定性的な面からみて大きな差は認められなかった．また溶解法は抽出法に比べ操作が繁雑で，溶媒も多量に使用するなどの点から今回はエチルエーテルによるソックスレー抽出法で行うことにした．なおエーテル抽出においてもPSは円筒ろ紙中で融解状態となっており，抽出液にポリマーが混入するためメタノールによる除ポリマー操作は必要であった．

PSから添加剤を抽出したあと，さらに各々の添加剤を分離・精製する必要があり薄層クロマトグラフィー，高速液体クロマトグラフィーなどについて検討を行ったが，スチレンオリゴマーおよびパラフィンワックスの存在が支障となり適当な条件がみい出せなかった．そこでシリカゲルを充填剤とするカラムクロマトグラフィーにより，展開溶媒を非極性のものから極性を有するものへ順次変えていく方法[6]を試みたところ，シリカゲルの充填高が径12 mm×300 mmのとき，展開溶媒として石油エーテル，クロロホルム，エチルエーテル，メタノールの各10 mlを用いると，類似構造の化合物がグループ別に分離してくることがわかった．すなわち石油エーテル区分に脂肪族炭化水素，クロロホルム区分に芳香族炭化水素，エチルエーテル区分にエステル類，脂肪族アルコール，高級脂肪酸，脂肪族アミドなど，メタノール区分により極性の強い化合物群が分離溶出してくる．シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離効果をみるために，例として図1に食品容器Bの試験溶液のガスクロマトグラム，図2，3，4，5にその石油エーテル，クロロホルム，エチルエーテル，メタノールのカラム分取溶液のガスクロマトグラムを示した．図1において重なり合ったピークが図2，3，4においてきれいなピークパターンに分離してくることが示されている．このように分離したピークとなれば，TCD-GCにより各ピークを分取単離することが容易になる．なお図2の石油エーテル区分の山形の集合ピークはIR測定の結果パラフィンワックス，図3のクロロホルム区分の各ピークは同じくスチレンオリゴマーであることが判明した．この石油エーテルおよびクロロホルム区分のピークは全検体に認められ，PSの添加剤の分離同定を困難なものにしていた．

GCの検出器として感度的には劣るが，ピークを分取する目的からTCD検出器を用いた．カラム充填剤として広範囲の化合物を検出するため無極性で最高使用温度の高いSilicone E-301を使用し，温度条件として分子

Table 1. Identified Additives

sample	anti-oxidants	plasticizer	lubricants
tray (HIPS)	A BHT Irganox1076	DnBP	PW
	B BHT Irganox1076	DnBP	PW P–acid S–acid behenamide
	C BHT Irganox1076		PW P–acid S–acid
tray	A		PW
	B		PW
	C		PW
tray (FS)	A	DnBP DEHP	PW
	B	DnBP	PW
	C	DnBP	PW P–acid S–acid
leisure cup (HIPS)	A BHT Irganox1076		PW
	B BHT	DEHS	PW P–acid S–acid
	C BHT Irganox1076		PW
leisure cup	A		PW
	B		PW
	C		PW
cup	A	DnBP	PW P–acid S–acid
	B	DnBP	PW P–acid S–acid
sour milk beverage container (HIPS)	A BHT Irganox1076	DnBP	PW P–acid S–acid
	B BHT	DnBP	PW P–acid S–acid
	C BHT	DnBP	PW P–acid S–acid
food container (HIPS)	A BHT	DnBP DnOP	PW P–acid S–acid
	B BHT	DEHS	PW P–acid S–acid
food container	A	DnBP DEHP	PW
	B	DnBP DnOP	PW P–acid S–acid
sugar pot	A	DnBP	PW P–acid S–acid
	B	DnBP	PW P–acid S–acid
water cooler	A	DnBP	PW
	B	DnBP	PW P–acid S–acid
picks	A		PW P–acid S–acid
	B BHT		PW P–acid S–acid
soy pot	A		PW P–acid S–acid
	B BHT		PW P–acid S–acid
chopsticks	A		PW
	B	DnBP	PW P–acid S–acid
spoon	A BHT Irganox1076		PW
	B	DEHP	PW P–acid S–acid
fork	A		PW P–acid S–acid
	B	DEHP	PW P–acid S–acid
knife	A	DEHP	PW P–acid S–acid
	B	DnBP	PW P–acid S–acid
muddler	A		PW P–acid S–acid
	B BHT Irganox1076	DnBP	PW P–acid S–acid

HIPS : high impact polystyrene, FP : foam polystyrene, BHT : 2, 6–di–t–butyl–4–methylphenol
Irganox1076 : n–octadecyl–3–(4′–hydroxy–3′, 5′–di–t–butylphenyl)propionate
DnBP : di–n–butyl phthalate, DnOP : di–n–octyl phthalate, DEHP : di–2–ethylhexyl phthalate
DEHS : di–2–ethylhexyl sebacate, PW : Paraffin wax, P–acid : palmitic acid, S–acid : stearic acid

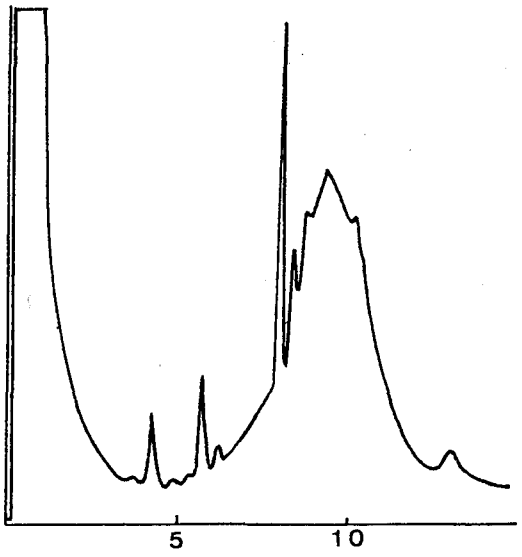


Fig.1. GC of food container B

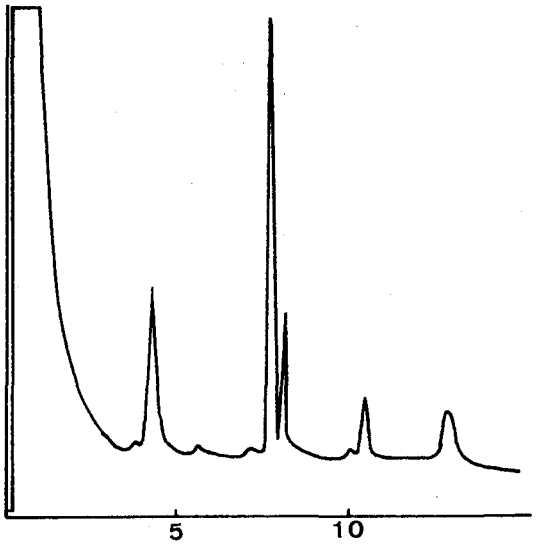


Fig.3· GC of chloroform fraction

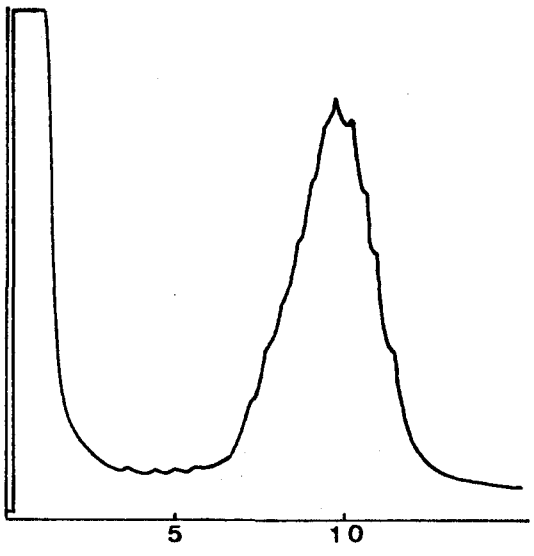


Fig.2. GC of petroleum ether fraction

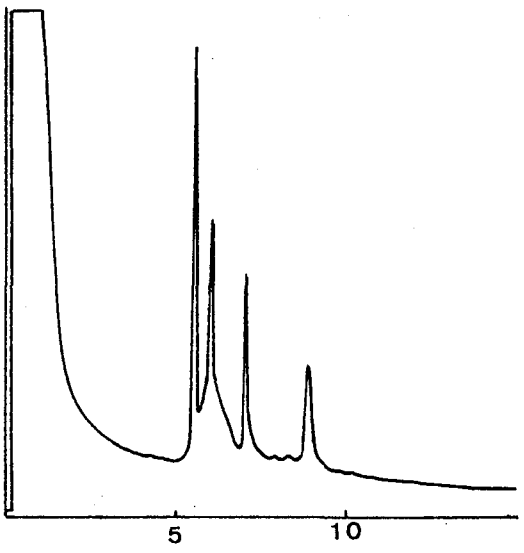


Fig.4. GC of ethyl ether fraction

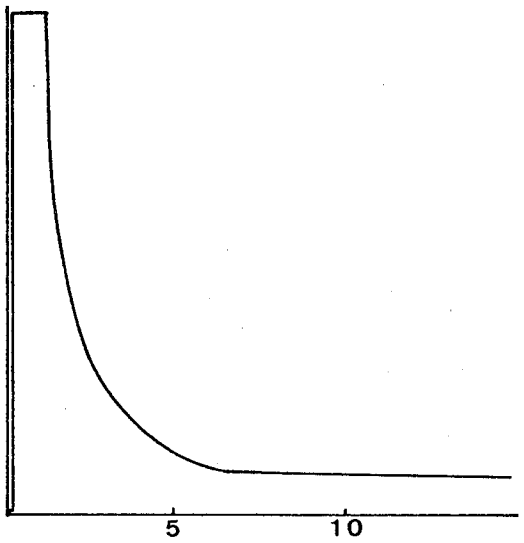


Fig.5. GC of methyl alcohol fraction

量のかなり違う添加剤を同時に分析でき，時間の短縮がはかれること，また極性があってテーリングを生じる化合物にもある程度有効であることなどから，カラム温度を100°から300°まで20°/mmの昇温分析で行うことにした．試料注入量は内径8 mmの分取用カラムの場合でも，あまり多量になるとピークが変形してくるので100 μl程度が適当であった．カラムクロマトグラフィーによるメタノール区分には極性の強い界面活性剤などの化合物の存在が予想されたが，図5のようにほとんどの検体においてピークは認められなかった．

添加剤の同定はIRによって行った．化合物の分離能力に優れたGCにより各ピークを凝縮捕集してIRを測定し，添加剤のIR標準スペクトルと比較することにより容易に同定することができた．しかしIRだけでは判別の困難な高級脂肪酸やフタル酸エステルのような同族体化合物については，GCのリテンションタイムにより同定した．また入手した添加剤の標準スペクトルに該当しない化合物の場合，ポジティブリストを参考にしながらIRスペクトルからある程度検索・推定していくことができる利点があった．なおビームコンデンサーを用いるミクロ錠剤法によるIR測定に必要な試料量は50～100 μgであった．

分析結果について 表1に42検体の分析結果を示した．検出した添加剤は全部で10種類で，効用分類別に分けてみると酸化防止剤2種類（BHT, Irganox 1076），可塑剤4種類（DnBP, DnOP, DEHP, DEHS），滑剤4種類（パラフィンワックス，パルミチン酸，ステアリン酸，ベヘン酸アミド）であった．なお紫外線吸収剤は全く検出されず，食品用容器包装材には使用されていないことがわかった[7]．

酸化防止剤を検出した検体は15/42検体（35.7%）で，BHTとIrganox1076を併用したもの8/42検体（19.0%），BHT単独のもの7/42検体（16.7%）でIrganox1076単独で使用された例はなかった．HIPSのトレー，レジャーコップ，乳酸菌飲料容器，食品容器の11検体からは全て酸化防止剤を検出しており，HIPSにおいて不飽和結合のあるゴムの添加による劣化防止のため酸化防止剤が不可欠であることが裏付けられた[8]．またHIPS以外の検体については，酸化防止剤は4/31検体（12.9%）にしか使用されていなかった．

可塑剤については25/42検体（59.5%）からDnBP, DnOP, DEHP, DEHSの4種類が検出された．可塑剤を検出した25検体のうち2種類検出したものは4/25検体（16.0%）で，単独使用が84%を占めていた．DnBPはDnOPとの併用2，DEHPとの併用2と合わせて20/25検体（80.0%）から検出され最も多用されていた．今回検出したDnBP, DnOP, DEHP, DEHSはその効用から一般には可塑剤として分類されるが，PS製品に使用される場合，添加量が少ないことおよびPSの物性から考えて可塑性の付与の役割より，成形加工性の向上を目的に使用されていると思われる．

滑剤についてはパラフィンワックスが全検体から検出されており，PS製品の成形加工上必要不可欠の添加剤であると考えられる．パルミチン酸とステアリン酸は27/42検体（64.3%）から検出され，PS製品において主要な添加剤となっている．また両者は単独で検出された例はなく，添加剤製剤として両成分を含有するものが使用されていると考えられる．なおHIPSのトレーにベヘン酸アミドを検出したが，これは1検体のみであり特殊なケースと思われる．

今回食品用PS製品42検体について添加剤の定性分析を行い酸化防止剤2種類，可塑剤4種類，滑剤4種類を検出したが，ポジティブリスト収載の酸化防止剤22品目，可塑剤18品目，滑剤20品目に比べ，実際に使用されている添加剤はかなり限られていることがわかった．今後定量法を検討したうえでその使用実態を調査して行く予定である．

ま と め

食品用PS製品中の有機性添加剤の分析法について検討を行った．

1. 抽出法は粉砕試料をエチルエーテルでソックスレー抽出し，メタノールによる除ポリマー処理を行った．

2. 分離法はシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよびTCD-GCにより行った．

3. 同定法はミクロ錠剤法によりIRによって行った．

4. PS製品13種類42検体を分析したところ計10種類（BHT, Irganox1076, DnBP, DnOP, DEHP, DEHS, パラフィンワックス，パルミチン酸，ステアリン酸，ベヘン酸アミド）の添加剤を検出し，実際に使用される添加剤はかなり限られていることがわかった．

文　献

1）昭和57年2月16日厚生省告示第20号
2）ポリオレフィン等衛生協議会編：ポリオレフィン等合成樹脂製容器包装等に関する自主規制基準
3）佐藤憲一，渡辺悠二，吉田令子，遠藤英美：東京衛研年報，32－1，177，1981
4）神原　周，遠藤鎮男編：高分子分析ハンドブック，825，1970，朝倉書店
5）後藤邦夫編：プラスチックおよびゴム用添加剤実用便覧，1062，1977，化学工業社
6）後藤邦夫編：別冊化学工業，20（1），117，1976
7）渡辺悠二，佐藤憲一，吉田令子，溝入茂，遠藤英美：東京衛研年報，29－1，218，1978
8）須本一郎：スチロール系樹脂，135，1973，日刊工業新聞社

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 34, 191-196, 1983

市販天然調味料の品質に関する研究

広門雅子*, 中島和雄*, 高橋　巌*, 遠藤英美*, 溝入　茂**

Surveys of Quality of Commercial Natural Flavor Enhancers

MASAKO HIROKADO*, KAZUO NAKAJIMA*, IWAO TAKAHASHI*,
FUSAYOSHI ENDO* and SHIGERU MIZOIRI**

Thirty-two species of commercial natural flavor enhancers, which were collected from 50 food manufacturers in Tokyo, were analyzed in respect of water, sodium chloride (NaCl), ash, free amino acids, 5′-ribonucleotides (5′-IMP, 5′-GMP), organic acids, arsenic and heavy metals for the purpose of determining these quality. The quantitative analysis methods adopted in this survey were Karl Fisher titrimetric method for water content, the Standard method of analysis for hygienic chemists for NaCl and ash, the high performance liquid chromatography for 5′-ribonucleotides and organic acids and the Japanese Standard of Food Additive's method for arsenic and heavy metals. The results were as follows : water content 2.5–92.0%; NaCl 0.9–41.3%; ash 1.2–43.2%; total amino acids 0.2–37.0%, glutamic acid (Glu) 0.06–22.7%; 5′-IMP 0–1.76% and 5′-GMP 0–0.83%. It was demonstrated that Glu or 5′-ribonucleotide (5′-IMP or 5′-GMP) is added to most of the samples. Contents of lactic acid and pyroglutamic acid did not exceed 0.04%.

With the exception of 1 sample taken from extract of Tapes philippinarum in which 3.5 ppm of arsenic was detected, levels of arsenic in all the other samples were found to be less than 1 ppm. Heavy metals in all the samples were less than 3 ppm.

Keywords : natural flavor enhancer, free amino acid, ribonucleotide, quantitative analysis

緒　言

最近，天然物し好が高まり，調味料においても，幅のある複雑な風味や，より天然物感のある香味を付与できる天然抽出型調味料が種々開発されてきている．しかしそれらの成分組成は明らかでなく，品質が不明である．

そこで，その成分組成の実態を把握する必要があると考え，昭和57年6月～12月までに東京都食品監視課より収去された天然調味料36種のうち，香辛料を除く天然旨味料32種について，水分，塩分，灰分，呈味成分，ヒ素および重金属等の分析を行い，その結果を化学調味料製剤の成分[1]や天然畜肉[2]および魚介肉エキス成分[3]と比較し，それらの品質について検討したので報告する．

実験の部

Ⅰ．試料　東京都食品監視課が昭和57年5月～12月にかけて，都内50の食品製造業者(食肉，ソース類製造業者)から収去し，当所に送付した天然調味料製剤32検体（粉末型15種，ペースト型6種，粘ちょう性液体型8種，液体型3種）を用いた．また比較のため原体メーカーからの供試品の天然魚介肉エキス5種を用いた．

Ⅱ．試薬　1．カールフィッシャー試薬：力価3.00 mg / ml 三菱化成工業製　2．脱水溶剤　ホルムアミド入りメタノール　三菱化成工業製　3．アミノ酸アナライザー用緩衝液　テクノパッファー製　4．ニンヒドリン発色試薬　和光純薬製　5．活性炭　ダルコ G－60（クロマト用，和光純薬製）1 g をエタノール－アンモニア－水混液(50：5：45)でよく洗った後，十分水洗し，110°，4時間乾燥した．6．その他の試薬　特にことわりのないかぎり，食品添加物公定書および食品衛生試験法に記載の試薬を用いた．

Ⅲ．装置　1．高速液体クロマトグラフ　ポンプ　日本分光 BIP 型，UV モニター　UVIDEC －100－Ⅱ，インテグレーター　島津クロマトパック C － R2AX

* 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
** 千代田区環境部公害対策課

2. アミノ酸アナライザー 日立835型 3. カールフィッシャー自動水分滴定装置 三菱化成 KF－01 T型

Ⅳ. 試験項目および方法

1. 水分 試料0.1～1 gを精密に秤取し，カールフィッシャー自動水分滴定装置で測定した．

2. 塩分（Nacl） 衛生試験法[4]に従った．

3. 灰分 衛生試験法[5]に従った．

4. 遊離アミノ酸 試料約5 gを精密に秤取し，5％過塩素酸溶液約50 m*l*を加えてかくはんし，一昼夜放置し，除蛋白した後，ろ紙を用いてろ過し，ろ液をアルカリでpH 2に調製した後，塩酸溶液（1→600）を加えて100 m*l*とし，これを試験溶液とした．試験溶液を各アミノ酸濃度が約10 μg/m*l*になるように塩酸溶液（1→600）で希釈調製し，これをアミノ酸アナライザーで分析し，定量した．

5. 核酸 アミノ酸の項で調製した試験溶液1 m*l*をあらかじめ用意した活性炭カラム内（内径1 cm，高さ5 cm）に注入し，核酸を吸着させ，ついで50 m*l*の蒸留水で洗った後，1.4％アンモニア水130 m*l*を通して核酸を溶出させた．この溶出液を濃縮乾固した後，核酸（5′–IMPおよび5′–GMP）の濃度がそれぞれ0.1 mg/m*l*になるように水で溶かし，これを高速液体クロマトグラフィーで下記条件下で分析した．

測定条件：カラム Nuclosil 5 NH_2 4 mm×15 cm，移動相 0.035 M KH_2PO_4（pH 4.0），流速 0.9 m*l*/min，カラム温度 室温，検出波長 UV 254 nm

6. 有機酸 核酸の場合と同様に試験溶液を作成し，高速液体クロマトグラフィーで下記条件下で分析した．

測定条件：カラム Shodex C－811，移動相 0.003 M $HClO_4$，流速 1 m*l*/min，検出波長 UV 210 nm

7. 糖類 アミノ酸の項で調製した試験溶液5 μlを，Kiezelgel薄層板上にスポットし，展開溶媒クロロホルム－メタノール－水（15：11.5：2）を用いて約10 cm展開した．風乾後，アニスアルデヒド・硫酸試液を噴霧し，120°，15分間加熱した後，スポットの呈色とRf値より糖類の確認を行った．

8. ヒ素 酸化マグネシウム添加による乾式灰化法に従って試験溶液を調製し，食品添加物公定法[6]に従って定量した．

9. 重金属 一般的な乾式灰化法により試験溶液を調製し，食品添加物公定法[7]に従って定量した．

結果および考察

水分，NaCl，灰分および呈味成分の分析結果をまとめてTable 1に示した（No 1～32は検体，a～eは供試品の天然魚介肉エキス）．

Ⅰ. 水分 水分含量は2.5～92.4％で，これを形状別にまとめると，粉末型2.5～8.1％（平均値4.3±1.7％），ペースト型16.6～28.0％（平均値23.3±4.6％），粘ちょう性液体型36.3～57.0％（平均値48.6±7.2％），液体型58.5～92.4％（平均値69.0±16.6％）であった．化学調味料製剤が粉末型のみだった[1]のに比べ，粉末から液体まで形状がさまざまであるのが特徴である．

Ⅱ. 塩分（NaCl） 塩分は塩化物をすべてNaClとして定量した値である．Table 1より，NaCl含量は1.9～41.3％で，これを形状別にまとめると，粉末型12.1～41.3％（平均値26.8±7.9％），ペースト型5.4～34.5％（平均値19.7±11.5％），粘ちょう性液体型12.0～18.4％（平均値15.1±2.4％），液体型1.9～11.9％（平均値4.9±5.0％）であり，1976年に調査した化学調味料製剤の22.2～31.6％（平均値28.0±2.6％）に比較し，粉末型はバラツキの巾が大きかった．また粘ちょう性液体型および液体型中の水分およびNaCl含量は，供試品の天然魚介肉エキスのそれ等に近似していた．

Ⅲ. 灰分 灰分はエキス成分中に存在して呈味に関係するといわれるNaCl，KCl，MgCl，$CaCl_2$，リン酸の金属塩および有機物の金属塩等を灰化して得られた無機成分である．

検体中の灰分含量は1.2～43.2％，灰分からNaClを差し引いた値（塩化物以外の無機成分）をⅠとすると，Ⅰは0.3～10.0％であった．灰分およびⅠ含量を形状別にまとめると，粉末型12.8～43.2％（平均値30.0±10.3％）および0.7～9.7％（平均値4.9±2.1％），ペースト型14.4～38.5％（平均値25.6±9.6％）および3.1～10.0％（平均値5.9±2.6％），粘ちょう性液体型16.6～20.3％（平均値18.3±1.3％）および1.7～5.2％（平均値3.2±1.3％），液体型1.2～15.0％（平均値6.2～6.3％）および0.3～3.1％（平均値1.3±1.3％）であり，Ⅰ含量はペースト型が最も多く，粉末型，粘ちょう性液体型および液体型の順に少なかった．また粘ちょう性液体型は天然魚介肉エキスと類似していた．

NaClの他の無機成分に対する倍率（NaClをⅠ値で除した値）は，粉末型約7倍，ペースト型約5倍，粘ちょう性液体型約6倍，液体型約4倍で，全体で4倍をこえたものは約7割あり，検体中の塩化物は他の無機成分に比べ圧倒的に多いことが判明した．供試品の天然魚介肉

Table 1. Analyzed Values of Water, Sodium Chloride, Ash, Amino Acids and 5′–Ribonucleotides in Commercial Natural Flavor Enhancers

	Sample No	Kind of Indication or Flavoring	Form	Water (%)	Sodium Chloride (%)	Ash (%)	Amino Acid Glu*3 (%)	Amino Acid Total (%)	5′RNA*4(5′–IMP*5,5′–GMP*6) (%)	Other Ingredient
I*1	1	Chemical Flavor	Powder	5.1	19.3	29.0	19.56	34.34	0.97(0.54, 0.43)	P
	2	〃	〃	8.1	25.8	34.4	22.72	31.14	0.96(0.50, 0.46)	M or D,P
	3	Natural Flavor	〃	3.7	41.3	43.2	7.39	28.75	N D	P
	4	〃	〃	4.6	12.1	12.8	1.81	18.91	N D	Starch
	5	Beef	〃	2.6	31.2	36.4	10.24	15.52	0.94(0.53, 0.41)	M or D,P
	6	〃	〃	4.6	32.0	36.7	10.12	11.82	1.49(0.79, 0.70)	M or D,P
	7	〃	〃	4.3	37.2	42.7	13.13	16.00	0.68(0.41, 0.27)	P
	8	〃	〃	3.4	29.9	36.3	10.31	15.28	1.00(0.56, 0.44)	P
	9	〃 , Natural Flavor	〃	2.8	24.2	29.8	9.06	11.98	0.62(0.39, 0.23)	M or D,P
	10	〃	〃	2.6	32.6	36.3	13.63	37.13	0.85(0.49, 0.36)	
	11	Pork, Natural Flavor	〃	2.5	25.1	30.8	1.29	2.40	0.36(0.22, 0.14)	M or D
	12	〃	〃	4.5	25.6	31.1	13.34	14.48	0.37(0.21, 0.16)	M or D
	13	Chickin	〃	3.7	31.3	34.4	4.89	6.72	0.20(0.12, 0.08)	Starch
	14	Short Necked Clam	〃	8.0	13.5	18.0	2.79	6.05	0.81(0.46, 0.35)	M or D, Starch
	15	Yeast	〃	4.4	20.6	25.0	8.14	13.36	0.08(N D, 0.08)	M or D,P
	16	Natural Flavor	Paste	27.6	5.4	14.4	0.67	7.75	1.76(1.76, N D)	M or D
	17	Beef	〃	19.4	34.5	38.5	6.80	11.03	1.80(0.97, 0.83)	P
	18	〃	〃	28.0	9.2	19.2	7.27	10.34	2.00(2.00, N D)	P
	19	〃	〃	16.6	33.4	37.9	6.64	10.58	1.19(0.66, 0.53)	M or D,P
	20	〃	〃	27.6	12.2	17.2	7.21	9.34	N D	M or D
	21	〃	〃	20.6	23.3	26.4	7.00	33.76	0.05(N D, 0.05)	
	22	〃	Viscous Liquid	41.0	13.8	16.6	7.61	22.36	0.11(N D, 0.11)	M or D
	23	〃	〃	54.4	16.8	18.8	4.44	6.94	0.43(0.24, 0.19)	P
	24	〃	〃	57.5	18.4	20.3	2.39	5.18	0.58(0.36, 0.22)	P
	25	〃 , Natural Flavor	〃	45.5	12.0	17.2	8.38	10.30	0.13(N D, 0.13)	M or D,P
	26	〃 ,Yeast Chemical Flavor	〃	54.7	16.1	19.3	4.38	6.79	0.74(0.58, 0.16)	M or D,P
	27	Beef	〃	54.1	18.2	19.9	2.87	6.02	0.59(0.37, 0.22)	M or D,P
	28	〃	〃	45.2	12.2	17.4	8.76	10.91	0.19(0.06, 0.13)	M or D
	29	Yeast	〃	36.3	13.5	17.1	2.02	22.62	N D	P
	30	Tayster	Liquid	56.0	1.9	2.3	0.14	0.35	N D	M or D
	31	Beef,Chickin	〃	92.4	0.9	1.2	0.06	0.20	N D	
	32	Bonito	〃	58.5	11.9	15.0	9.20	12.76	0.71(0.55, 0.16)	M or D
II*2	a	Scallop	Paste	47.9	17.3	20.2	0.30	4.01	N D	
	b	Cuttlefish	〃	25.4	11.6	15.6	0.10	1.73	N D	
	c	Mackerel	〃	33.1	6.8	9.9	0.47	9.41	0.43(0.43, N D)	
	d	Mackerel Pike	〃	31.1	8.5	10.5	0.35	9.24	0.33(0.33, N D)	
	e	Walleye pollack	Liquid	56.3	3.6	6.6	0.10	2.02	0.09(0.09, N D)	

*1 Commercial Natural Flavor Enhancer
*2 Natural Extract of Fish or Shellfish
*3 Glutamic Acid
*4 5′–Ribonucleotide
*5 Sodium 5′–Inosinate
*6 Sodium 5′–Guanylate
M or D Mono–or Di–Saccharide
P Polysaccharide
N D <0.005 %

エキスには保存の目的でNaClが添加されているが，倍率は約3倍と低いことから，検体（特に粉末型）には，さらに多量のNaClが添加されていると考える．

Ⅳ．遊離アミノ酸　アミノ酸16種について定量を行い総アミノ酸およびグルタミン酸含量をTable 1に示し，総アミノ酸に対する各アミノ酸含量の配合割合を検体ごとに算出し，帯グラフにしてFig.1およびFig. 2に示した（No 1～32は検体，a～eは供試品の天然魚介肉エキス，Fig. 1はグルタミン酸，グリシン，アラニン，バリン，メチオニン，イソロイシン，ロイシン，スレオニン，フェニルアラニン，それ等以外のアミノ酸9種の合計．Fig. 2はグルタミン酸，アスパラギン酸，スレオニン，セリン，リジン，ヒスチジン，アルギニン，プロリン，タウリン，それ等以外のアミノ酸9種の合計）．

Table 1より検体中の総アミノ酸含量は0.20～37.0%，グルタミン酸含量は0.06～22.7%であった．総アミノ酸含量を形状別にまとめると，粉末型2.40～37.13%（平均値17.59±10.19%），ペースト型7.75～33.76%（平均値13.80±8.99%），粘ちょう性液体型5.18～22.62%（平均値11.39±6.67%），液体型0.20～

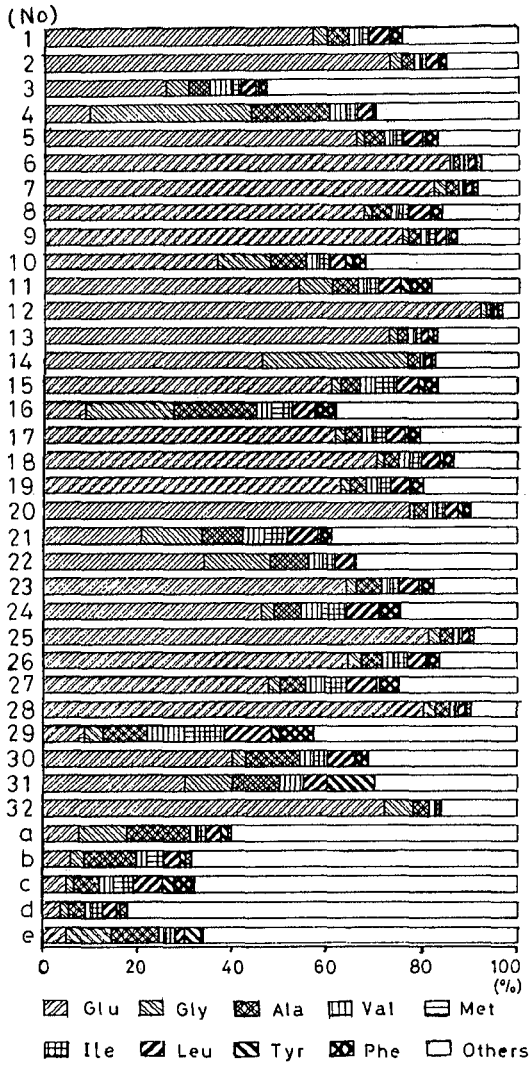


Fig.1. The Component Ratio (percentage) of Each Amino Acid to Total Amino Acids in Each Commercial Natural Flavor Enhancer

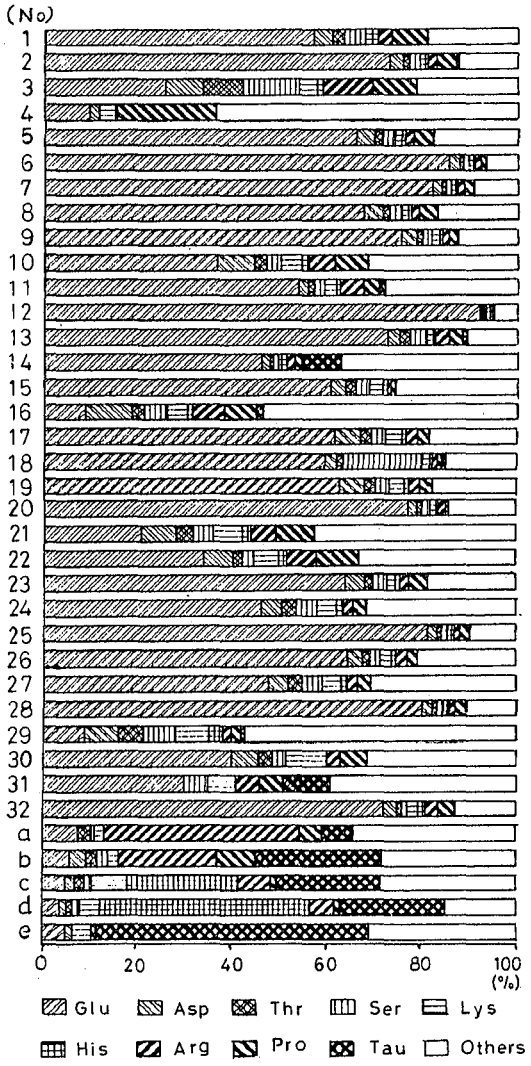


Fig.2. The Compornent Ratio (percentage) of Each Amino Acid to Total Amino Acids in Each Commercial Natural Flavor Enhancer

12.76%（平均値4.44±5.89%）であった．またグルタミン酸含量についても形状別にまとめると，粉末型9.29±6.28%，ペースト型5.93±2.36%，粘ちょう性液体型5.11±2.58%，液体型3.13±4.29%であった．天然魚介肉エキス中の総アミノ酸含量は液体型と類似していたが，グルタミン酸含量は液体型の約1/10と少なかった．Fig.1およびFig.2中のグルタミン酸含量比に着目すると，大部分の検体について，グルタミン酸の含量比率が他のアミノ酸と比較し，かなり高いことが判った．供試品の天然魚介肉エキス中のグルタミン酸含量比率は高くても7%，また小俣等[2]の畜肉エキスおよび大石[3]の魚介肉エキス中のグルタミン酸含量比率は高くとも10%であることから，10%をこえる約9割の検体には，呈味強化の目的でグルタミン酸またはそのナトリウム塩が添加されていると考えられる．化学調味料として食品添加物のグルタミン酸ナトリウムが最も多く使用されていることから，おそらくグルタミン酸ナトリウムが添加されていると考える．グルタミン酸含量比率の高い29検体のうち，No 1, 2および26についてはグルタミン酸ナトリウムの添加の表示があったが，他の26検体については添加の表示がなく，天然調味料，天然呈味料，ビーフエキス，ポークエキスおよびカツオエキスなどと天然品らしさを強調した商品名がつけられていた．

一方，タウリンは一般に牛，豚，羊中に多く[2]，プロリン，アルギニンは貝に多く[3]存在するが，食品添加物にはないことから天然物の指標となる．Fig.2から，アルギニンあるいはプロリンがすべての検体中に存在することが確認できた．またタウリンも25検体中から検出されたが，その含有率は天然畜肉エキス[2]および天然魚介肉エキスに存在する含有率（少くとも6.5%以上）よりはるかに少なかった．以上の結果は，大部分の検体中に天然物は含まれているが，ごく少量にすぎないことを示唆するものと考える．

グリシン含量比率の高い検体（No 4, 14, 16）があったが，一般に天然魚介肉エキスにはグリシン含量比率の高いものがあること，またこれらの検体はタウリン，アルギニン，プロリン等の含量比率が高いことから，天然物の他に食品添加物のグリシンが添加されているとは断定できない．

V. 核酸 アミノ酸について重要な呈味成分であるが，中でも5′-イノシン酸ナトリウム（5′-IMP）および5′-グアニル酸ナトリウム（5′-GMP）はグルタミン酸ナトリウムと相乗効果を示すといわれ，調味料中に添加されるので，今回この二種について分析し，添加の有無を検討した．

Table 1より検体中の5′-IMPおよび5′-GMP含量は，0～2.00%および0～0.83%で，形状間における含量の差は見られなかった．

Table 1中の天然魚介肉エキス（a～e）の核酸分析結果や小俣等[2]および大石[3]の報告から，天然物中の5′-IMP含量は0.65%（無水物中）以下，5′-GMP含量は0.01%（無水物中）以下，また5′-GMPの5′-IMPに対する比は1/10以下であるが，検体で5′-IMPが0.65%（無水物中）をこえたもの9検体（約3割），5′-GMPが0.01%（無水物中）をこえたもの24検体（約8割），また5′-GMPの5′-IMPに対する比が1/10をこえたもの24検体（約8割）で，大部分の検体は5′-IMPまたは5′-GMPにより添加調整されていることが判明した．また1976年に調査した化学調味料製剤中の核酸含量[1]が0.22～1.00%であったのに比べ，0%のものが6検体，1%以上のものが6検体あるなど，添加調整されているにもかかわらず，化学調味料製剤に比べ，製品間のバラツキが大きいことが判明した．

VI. 有機酸 グルタミン酸の分解物であるピログルタミン酸や乳酸が微量(0.04%以下)検出されたものがあったが，大石[2]の報告から，これらは天然物中に存在する量以下であった．またその他の有機酸類は全く検出されなかった（検出限界0.005%以下）．したがって有機酸類はグルタミン酸や核酸のように呈味増強の目的で添加されていないことが判明した．

VII. 糖類 3検体以外の他のすべての検体から糖類が検出された．単糖，二糖およびデンプン以外の多糖類が多く，デンプンが検出されたのは，わずか3検体であった．天然魚介肉エキス（a～e）から糖類は全く検出されていないことと，検体中の水分，NaClおよび呈味成分の含量合計が低いことから，糖類がかなり添加されていると考えられる．

VIII. ヒ素 アサリエキス（No 14）1検体から3.5 ppm検出された．これについての原因がアサリ由来か否かは，今後，製造所等の調査が必要である．その他は1 ppm以下で衛生的に問題はないと考えられる．

IX. 重金属 製造工程のステンレス材の腐食により，ニッケル，銅およびクロムなどの重金属の混入が考えられたので分析したが，すべて30 ppm以下で問題がなかった．

まとめ

天然調味料の品質を把握する目的で，1982年東京都内50の食品製造業者から収去した32試料につき成分分析を

行い，それらの成分の特徴と食品衛生上の問題について調査した．

1. 形状は，液体型，粘ちょう性液体型，ペースト型および粉末型の4種に分類できた．1976年に調査した化学調味料製剤が粉末型のみだったのに比べ，形態がさまざまであった．

2. 水分，NaClおよび灰分含量は，それぞれ2.5～92.4%，1.9～41.3%および1.2～43.2%であり，NaClおよび灰分は粉末型に近い程，多い傾向を示した．粘ちょう性液体型および液体型中の水分およびNaCl含量は，供試品の天然魚介肉エキスに近似していた．また塩分が他の無機成分に比べ圧倒的に多い検体が約8割もあり，これらにはNaClが添加増量されていると考えられた．

3. 総アミノ酸，グルタミン酸，5′–IMPおよび5′–GMP含量は0.20～37.0%，0.06～22.7%，0～2.00%および0～0.83%であった．総アミノ酸およびグルタミン酸含量は粉末型に近い程多い傾向を示したが，核酸は形状間に差は見られなかった．

グルタミン酸または核酸の含量が天然エキスに比較して特に多い検体が約9割もあり，これらの検体には食品添加物のグルタミン酸ナトリウムや5′–IMPおよび5′–GMPが添加されていると考えられた．おそらく天然物抽出型調味料の場合，香味は付与できても呈味力が不足するため，これらの旨味成分を添加すると考えられる．しかし検体の大部分には，添加されたと推定できるグルタミン酸ナトリウムや5′–IMPおよび5′–GMPの表示がほとんどなかった．適正な表示が望まれる．また添加調整されているにもかかわらず，化学調味料製剤に比べ各成分含量にかなりのバラツキが認められたのは，化学調味料製剤の単一的な味に対し，多様性を持たせたためだと考える．

4. 全検体から天然物の指標であるアルギニン，プロリンおよびタウリンが検出されているが，タウリン（天然物中での含有量が高い）の含量比率が低いことから，天然成分が添加されているが，少量であると考えられる．

以上より今回調査した試料は，9割以上が天然成分少量にグルタミン酸ナトリウム，核酸，NaClおよび糖類等で呈味の調整および増量された調味料であると考える．また粘ちょう性液体型および液体型の水分，NaCl，灰分およびアミノ酸含量は供試品の天然魚介肉エキスに近似していたこと，粉末型に近い程，塩分およびアミノ酸含量が多かったこと等から，粉末型ほど種々の成分で添加調整されていることが判明した．

今回，ビーフエキス入りの検体が多かったが，標準として天然畜肉エキスが入手できず，文献データをもとに比較したが，今後さらに種々の畜肉エキスを入手し，これらの分析データをもとに種類別の詳細なデータ解析を行いたい．

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) 広門雅子，宇佐美博幸，中嶋　巖，遠藤英美：東京衛研年報，27－1，185，1976
2) 小俣　靖，島崎秀雄：*New Food Industry*, 10, No 12, 13, 1968
3) 大石圭一：*New Food Industry*, 10, No 12, 1, 1968
4) 日本薬学会編：衛生試験法注解，293，1982，金原出版
5) 日本薬学会編：同上，291，1982
6) 食品添加物公定書注解編集委員会：食品添加物公定書注解，Ⅲ，1165，1974，金原出版
7) 食品添加物公定書注解編集委員会：同上，Ⅲ，1124，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 197-201, 1983

市販即席めん類の栄養学的考察

船山恵市*, 牛尾房雄*, 西田甲子*, 関　博麿*
道口正雄*

Nutritional Evaluation of Commercial Precooked Noodles

KEIICHI FUNAYAMA*, FUSAO USHIO*, KOKO NISHIDA*,
HIROMARO SEKI* and MASAO DOGUCHI*

Keywords：即席めん precooked noodle, 食塩含量 salt content, 脂質含量 lipid content, 脂肪酸組成 fatty acid composition

緒　言

市販即席めん類は，昭和33年に開発されて以来今日まで，その簡便性，経済性，保存性あるいは独特な風味のため，我々の食生活，とりわけ，簡便な昼食，間食，夜食等に広く利用されている．しかしその栄養的側面を見ると，高塩分，高脂質含有食品と言われており，栄養素のアンバランスが懸念される．そこで，都内における市販即席めん56種類について，水分，蛋白質，脂質，炭水化物，灰分，ビタミンB_1，B_2，食塩および脂肪酸組成の測定を行い，またエネルギーを算出し，その結果について栄養学的考察を加えたので報告する．

実験の部

1. **試料**　市販即席めん56種類は，昭和57年5月および10月に，都内店頭より購入した．試料を種類別に分類したものを，表1に示す．即席中華めん(ノンフライ)(以下ノンフライめんと略す) 以外は，油揚げめんおよび味付油揚げめんである．また，スナックめんは容器詰で，それ以外は袋詰のものである．使用油脂の表示別に分類したものを，表3に示す．

2. **試験項目および試験方法**

1)水分および 2)灰分は衛生試験法[1]，3)食塩はモール法[2]，4) 蛋白質はエチルエーテルによる脱脂後セミミクロケルダール法[3]，5) 脂質は酸分解法[4] を，それぞれ用いた．6) 炭水化物は試料100 g から100 g 中の水分，灰分，蛋白質，脂質含量の合計を差し引いた，いわゆる差し引き炭水化物として表わした．7) 総エネルギーは Atwater の換算係数を用いて算出した．8) ビタミンB_1はフェリシアン化カリウムによるチオクローム螢光法[5]，9) ビタミンB_2はルミフラビン螢光法[6] を，それぞれ用いた．10) 脂肪酸は Folch の方法[7] に準じて脂肪を抽出し，その加水分解およびそれに続くエステル化は，衛生試験法[8] に準じて行った．脂肪酸組成比は，ガスクロマトグラム上のピーク面積比により求めた．ガスクロマトグラフィー条件　検出器：FID，カラム：5 % Advance DS (担体 ChromosorbW, AD-DMCS 処理，80～100 mesh)，3 mmϕ×2 m，カラム温度：190°c，注入口温度：250°c，キャリアガス：N_2 50 ml/min, Sensitivity：10^2, Range：8，装置：島津7A，積分計：Varian CDS 401

なお，分析値は1食当たりの値で示した．

結果および考察

水分，蛋白質，脂質，炭水化物，灰分，食塩および1食分の重量の値を表1に，また，総エネルギーおよび総エネルギーに対する蛋白質，脂質，炭水化物のエネルギー比を表2に示す．

2種の製品群を除いた5群の製品については，1食から5 g 前後の食塩（表1）が摂取されることになり，この値は，成人に対する適正摂取目標量である10 g/日[9] の1/2に相当し，即席めん類のような軽食から摂取する量としては，過分な量と思われる．また即席中華めん(焼そば) の食塩は，平均値2.8 g と低かったが，最近流行の高級品的イメージの強いノンフライめんの食塩は，5試料の最低値5.7g，最高値6.9 g，平均値6.3 g であり，他のものよりさらに高塩分であることが認められた．このように，即席めん類が全般に高塩分であることから，最近の食塩摂取量の適正化の方向から考えると，利用者

* 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1．　即席めん類の成分分析結果　〔単位：1食当りのg〕

試料分類	水　分	蛋白質	脂　質	炭水化物	灰　分	食　塩	重　量
即席中華めん	n＝21						
	5.3±1.1*	9.4±0.8	17.7±1.9	56.1±4.5	5.7±0.7	4.97±0.71	94.2±6.2
即席和風めん	n＝4						
	13.9±9.5	10.0±1.2	17.6±1.6	67.7±6.7	6.3±1.2	5.54±0.94	115.5±18.8
即席中華めん(焼そば)	n＝4						
	8.6±4.8	9.6±0.4	20.7±3.1	62.9±3.5	3.2±0.2	2.76±0.23	105.0±5.8
スナックめん(中華風)	n＝15						
	8.2±7.3	8.5±1.3	16.6±3.6	47.0±3.7	5.2±0.9	4.44±0.87	85.5±10.9
スナックめん(和風)	n＝4						
	5.4±0.5	10.1±0.6	20.3±3.9	50.4±2.3	5.7±0.5	4.70±0.31	91.8±5.9
スナックめん(焼そば)	n＝3						
	13.4±1.6	10.3±0.6	23.6±2.9	67.7±4.5	5.0±0.3	4.44±0.16	120.0±0.0
即席中華めん	n＝5						
(ノンフライ)	13.3±1.3	10.2±1.3	8.1±2.6	65.4±6.2	7.2±0.9	6.30±0.55	104.2±5.8

*：平均値±標準偏差
n：試料数

表2．即席めん類1食分の総エネルギーおよび構成比

試料分類	総エネルギー	蛋白質	脂　質	炭水化物
	kcal	%	%	%
即席中華めん	n＝21			
	421.2±28.9*	8.9±0.6	37.7±2.8	53.3±2.9
即席和風めん	n＝4			
	469.4±39.2	8.5±0.6	33.8±2.5	57.6±2.0
即席中華めん(焼そば)	n＝4			
	476.6±13.5	8.1±0.5	39.0±4.8	52.9±4.2
スナックめん(中華風)	n＝15			
	371.4±36.8	9.2±1.7	40.0±4.6	50.9±4.2
スナックめん(和風)	n＝4			
	424.2±41.8	9.5±0.3	42.7±4.5	47.7±4.1
スナックめん(焼そば)	n＝3			
	524.6±9.4	7.8±0.4	40.5±4.2	51.6±4.3
即席中華めん(ノンフライ)	n＝5			
	375.2±20.0	10.8±1.7	18.9±6.5	70.0±6.5

*：平均値±標準偏差
n：試料数

表3．即席めん類の脂肪酸組成 〔単位：重量%〕

表示使用油脂	ミリスチン酸 C：14	パルミチン酸 C：16	ステアリン酸 C：18	オレイン酸 C：18：1	リノール酸 C：18：2	リノレン酸 C：18：3	アラキジン酸 C：20	その他
植物油脂，ラード	n＝21					(n＝17)		
	1.3±0.2*	34.0±3.4	8.5±2.2	41.6±1.6	10.9±1.8	0.6±0.3	0.3±0.1	2.6±1.3
ラード，植物油脂	n＝20					(n＝18)		
	1.4±0.1	27.4±1.5	10.4±0.9	42.4±0.4	12.4±1.4	0.8±0.1	0.3±0.1	4.9±0.6
植物油脂	n＝7					(n＝6)		
	1.0±0.0	41.1±2.6	5.9±2.8	40.0±0.8	10.0±1.1	0.4±0.2	0.4±0.0	0.8±0.4
植物油脂，牛脂	n＝2							
	1.7**	38.8	8.8	38.4	9.3	0.8	0.3	1.9
ノンフライ	n＝5							
	0.4±0.3	15.0±2.3	5.2±2.2	39.0±1.5	35.0±4.0	2.5±0.8	0.4±0.1	2.3±0.9

＊：平均値±標準偏差
＊＊：平均値
n：試料数

表4．即席めん類の飽和，不飽和脂肪酸比

表示使用油脂	飽和脂肪酸		モノ不飽和脂肪酸		ポリ不飽和脂肪酸
植物油脂・ラード	n＝21				
	1	：	0.94±0.06*	：	0.26±0.05
ラード・植物油脂	n＝20				
	1	：	1.07±0.04	：	0.33±0.05
植物油脂	n＝7				
	1	：	0.82±0.02	：	0.21±0.03
植物油脂・牛脂	n＝2				
	1	：	0.77**	：	0.21
ノンフライ	n＝5				
	1	：	1.90±0.40	：	1.85±0.48

＊：平均値±標準偏差
＊＊：平均値
n：試料数

が食塩摂取を調節できるよう，製品に対する食塩含量の表示が望まれる．

脂質含量は，ノンフライめんを除き，17～24ｇであり(表１),総エネルギーに対する脂質のエネルギー比は，34～43%であった（表２）．最近の日本人の平均的脂質摂取量が54.7ｇ[10]であること，また，日本人に適当と思われる脂質エネルギー比が，約20～30%であること[11]から考えると，即席めん類は高脂質含有食品ということができる．

欧米では以前から，脂質の摂取制限の必要性が提唱され，米国では，脂質エネルギー比を30%以下にし，そのうち飽和脂肪酸を総エネルギーの10%以下，ポリ不飽和脂肪酸を同じく10%まで，残余はモノ不飽和脂肪酸とすべきことを推奨している[12]．近年，日本でも脂質の適正摂取について論議がなされているが，飽和・不飽和脂肪酸の適正な摂取比率については，まだ確たる定説はないようである．しかし，一応飽和脂肪酸の多い動物性脂肪と，ポリ不飽和脂肪酸の多い植物性油の摂取比率を，１：２とすることが目標とされている[12]．

即席めん類の脂肪酸組成を表３に，また飽和・不飽和脂肪酸比を表４に示す．

これらの表より，植物油脂表示品，ラード・植物油脂

表5．即席めん類のビタミン含量〔1食分〕

n	ビタミンB_1	ビタミンB_2
	mg	mg
22	0.10±0.05*	0.04±0.02
4**	0.56±0.06	0.74±0.28

*：平均値±標準偏差
**：ビタミンを添加したと思われる試料
n：試料数

表示品および植物油脂・ラード表示品の3種類の中では，植物油脂表示品が飽和脂肪酸であるパルミチン酸を最も多く含んでおり，ポリ不飽和脂肪酸であるリノール酸，リノレン酸は最も少ない．ラード・植物油脂表示品では，これと比較してパルミチン酸が少なく，リノール酸，リノレン酸がやや多い傾向で，植物油脂・ラード表示品は，両者の中間値を示した．この違いは，植物油脂とラードとの混合比によるもので，混合油脂類では，植物油脂の割合が増すほどパルミチン酸が増加すること，現今の油揚げめん用油脂の大半がパーム油を含むという報告[13]および植物油脂表示品の脂肪酸組成比がパーム油の組成比[13]に類似していることから，供試の即席めん類に使用された油脂類には，保存安定性の良いパーム油が混合使用されていると推定される．パーム油は“植物脂”に分類されるので[14]，一般の“植物油”とは脂肪酸組成が異なり，飽和脂肪酸であるパルミチン酸含量が多いのが特徴である．一方ノンフライめんの場合，その脂肪酸組成は，不飽和脂肪酸含量の多い一般的な植物油に比較的類似するものであった．また，ノンフライめんの包装の表示では，植物油脂と植物油の2通りの表示が使用され，明らかに植物性油であることを強調していた．しかしこの表示は，製造会社により異なるので，消費者保護の立場から，植物油脂，植物油，植物脂，あるいはパーム油など，表示の使い分けをさらに明確にすることが望まれる．

ビタミンB_1，B_2含量を表5に示す．

分析に供した26試料のうち，明らかにビタミン添加が推測される高値を示した試料が，それぞれ4試料認められた．しかし，同一試料で両ビタミンともに高値を示した試料は，認められなかった．その他の試料のビタミンB_1，B_2含量は，エネルギー当たりの所要量[15]のそれぞれ約1/10および1/30であり，エネルギーの割にはビタミン含量が少ないと言える．

以上の結果から，ノンフライめんを除く即席めん類は，高塩分，高脂質含有食品と言える．また，1日の総エネルギーに対する各摂取栄養素エネルギー比（PFC比）の目標値とされている，蛋白質12～13%[16]，脂質20～30%[11]，炭水化物57～68%と比べ，各種スナックめんおよび即席中華めん（焼そば）では，脂質からのエネルギー比が約40%で，飽和脂肪酸含量も多い．それに比べ，ノンフライめんの脂質エネルギー比は約19%で，飽和・不飽和脂肪酸比も比較的良好であるが，食塩含量が他の種類よりも多いという欠点がある．また即席めん類はビタミン含量も少ないことから，これらを利用する場合には，卵，肉類，野菜等を加え，栄養素のバランスの改善に配慮が必要であると結論される．

要　約

昭和57年5月および10月に，都内店頭より購入した市販即席めん56種類について，蛋白質，脂質等の一般成分，ビタミンB_1，B_2，食塩および脂肪酸組成の測定を行い，またエネルギーを算出し，その結果について，栄養学的考察を加えた．

1. 食塩含量は1食当たり約5gであり，かなり高塩分であることが認められた．また，即席中華めん（焼そば）は平均2.8gと低く，ノンフライめんは平均6.3gと高い値を示した．

2. 脂質含量は，ノンフライめんを除き，1食当たり17～24g，エネルギー比は34～43%であり，高脂質含有食品であることが認められた．

3. 脂肪酸組成分析結果から，ノンフライめんでは不飽和脂肪酸含量の多い油脂が，またその他の即席めんでは飽和脂肪酸含量の多い油脂が使用されていると認められた．

4. ビタミンB_1，B_2が，明らかに添加されていると思われる数種の試料も認められたが，他の大部分の試料では，エネルギー当たりのビタミンB_1，B_2含量は，所要量のそれぞれ約1/10および1/30という低値を示した．

5. 以上の結果から，即席めん類の栄養素のバランスは，必ずしも良好とは言えず，利用に当たっては，栄養素のバランスの改善に十分な配慮が必要と思われた．

謝辞　本調査遂行にあたり，試料収集に御協力いただいた，衛生局環境衛生部食品監視課ならびに食品機動監視班各位に，深謝いたします．

（本調査の概要は，第70回東京都衛生局学会1983年5月で発表した）

文　献

1）日本薬学会編：衛生試験法注解，139，1980，金原

出版，東京
2) 同上，62，1980
3) 同上，153，1980
4) 同上，178,1980
5) 同上，211，1980
6) 同上，213，1980
7) Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S. : *J. Biol. Chem.*, 226, 497, 1957
8) 日本薬学会編：衛生試験法注解，185，1980，金原出版，東京
9) 厚生省公衆衛生局栄養課編：日本人の栄養所要量，108，1979，第一出版，東京
10) 石塚正敏：公衆衛生情報，13(1)，4，1983
11) 厚生省公衆衛生局栄養課編：日本人の栄養所要量，45，1979，第一出版，東京
12) 同上，53，1979
13) 和泉次夫，赤松和夫：New Food Industry, 21(11), 7, 1979
14) 高木 徹，印南 敏，斎藤衛郎：食の科学，No. 44，30，1978
15) 厚生省公衆衛生局栄養課編：日本人の栄養所要量，121，1979，第一出版，東京
16) 同上，82，1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 202-205, 1983

食品中の無機質に関する研究（第3報）原子吸光法による鉄の定量について

友松俊夫*, 菊谷典久*, 井口正雄*, 道口正雄*

Study on Minerals in Food (III)
Survey of Analytical Method on Iron by Atomic Absorption

TOSHIO TOMOMATSU*, NORIHISA KIKUTANI*, MASAO IGUCHI*
and MASAO DOGUCHI*

Keywords: 原子吸光 Atomic Absorption, 鉄 Iron, 調製粉乳 Modified Milk Powder, ジエチルジチオカルバミン酸 DDTC, 4－メチル－2－ペンタノン MIBK.

緒　言

栄養改善法に関する食品の表示許可が一部変更になり，妊婦用，授乳婦用ならびに乳児用調製粉乳が栄養改善法の許可対象品目となったが，これらの特殊調製粉乳のうち，乳児用粉乳は栄養成分の検査項目として鉄の定量が定められている．また，病院給食などの調理食品からの鉄摂取量が，栄養指導上必要とされる場合には，比較的食塩濃度の高い試料中に含まれる鉄の測定法が要求される．ところで，乳児用粉乳中の鉄を測定する方法としては，オルトフェナントロリンを用いる吸光光度法が採用されているが，その理由は四訂日本食品標準成分表に記載されている如く，原子吸光法に依る鉄の分析法は，妨害成分による影響などの検討が必ずしも十分ではないということであると思われる．しかし，粉乳中の他の金属の多くが原子吸光法で分析されることになっており，日常業務の処理をより迅速に遂行するためには，鉄の分析も同時に出来ることが望ましいと考える．

原子吸光法に依る鉄の分析は，衛生試験法注解にもジエチルジチオカルバミン酸を用いた溶媒抽出による方法が記載されている．即ち，食品中の鉄を原子吸光法で分析する場合には共存する多量のカルシウム，食塩あるいはリン酸塩が測定を妨害するが，目的とする金属をキレートとして溶媒抽出することによって，妨害物質を除去することが出来る．しかし，一方では溶媒燃焼による測定値の再現性の低下あるいは経時変化，さらには同時に抽出される共存イオンの影響などの問題点があり，原子吸光による鉄分析法の詳細は，各種試料について必らずしも明確に示されていない．

筆者等はこれまでに食品中の無機質に関する研究として，カリウムおよびナトリウムの分析方法の検討[1]あるいは食事からのこれら無機質の摂取量評価[2]を行い順次発表して来た．今回は特殊調製粉乳あるいは調理食品のようにリン酸あるいは食塩含有量の多い食品中の鉄の測定を目的とした分析方法の検討を行った．

実験の部

装置　原子吸光－炎光共用分光分析機 Nippon Jarrell–Ash AA 845型

試薬　ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム（以下DDTCと略す），クエン酸2アンモニウム，4－メチル－2－ペンタノン（以下MIBKと略す）および鉄（以下Feと略し，他の金属も括弧内の記号で記述するものとする），亜鉛（Zn），銅（Cu），マンガン（Mn），モリブデン（Mo），コバルト（Co），クローム（Cr）ならびにニッケル（Ni）の各金属標準液は原子吸光用を使用した．硝酸，塩酸およびアンモニア水は有害金属測定用をもちいた．

試料溶液の調製　試料のうち調製粉乳は約20 g，また調理食品ホモジネートは約50 g を正確に秤取し，Gelman の乾式灰化法[3]に準じて灰化した．但し 6 N 塩酸は1回の乾固につき 3 ml を使用し，塩酸処理後得られた灰分は0.1 N 塩酸に溶かして25 ml とした．

原子吸光測定用 MIBK 溶液の調製　試料溶液の1及至2 ml に対し，50％クエン酸2アンモニウム溶液10 ml を添加し，次いで25％アンモニア水で pH 7.0とした．この混合液に1％ DDTC溶液10 ml を加えて良く混合し，さらに MIBK 20 ml を加えて1分間激しく振り混

* 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

ぜた後静置した．MIBK 層と水層を良く分離させ，水層は捨てた．そして溶媒層はろ紙を用いてろ過し，原子吸光測定用 MIBK 溶液を得た．

原子吸光測定条件　Fe 測定用の中空陰極ランプ（浜松テレビ製）の通常使用電流は10 mA であるが，バックグラウンド自動補正のため，D_2 ランプと中空陰極ランプの強度比を 1 ： 1 にする目的で約18 mA で使用した．測定波長は248.3 nm を使い，空気およびアセチレン流量は各々毎分10 *l* および 2 *l* であった．Fe 測定値を得るにあたり，測定時間 6 秒間の平均値をとる方法を採用し，さらにこれを 4 回くり返してその平均値を求めた．

結果および考察

フレーム原子吸光においては，溶媒抽出物の分析時には測定値の再現性が低下する傾向があり，この現象はバーナー上を通過する光束の位置が関係する．そこで Fe 測定に適した高さを決めるため，分光機の目盛に従って12, 14, 16, 18および20 mm の 5 段階にバーナー高を設定し，Fe 2.5 ppm を含む MIBK 溶液を用いて，適正なバーナー位置を調べた．その結果は表 1 に示す通りである．

バーナー高が14及至16 mm の場合に最も良い感度が得られるが，再現性は劣る．一方18 mm では感度は幾分低下するが，変動係数0.02が示す通り最も再現性のある測定値が得られることが解った．以上の結果より，以後の Fe 測定はバーナー高18 mm で行うことにした．

溶媒抽出時の試料溶液の pH，Fe 50 μg を含む0.1 N 塩酸溶液の pH を5.0, 6.0, 7.0, 8.0および9.0の 5 段階に変化させて抽出を行った結果を表 2 に示す．

Fe の抽出においては，pH 8.0以上で回収率が低下する一方 pH 6.0以下では DDTC が不安定[4] になるので，Fe 抽出は pH 7.0で行うことにした．

Fe−DDTC キレートの安定性，金属− DDTC キレートの MIBK 抽出液については，その定量値が経時的に減衰し易いという報告[5] がある．Fe の場合にもその可能性があるか否かを確めるために，Fe 50, 100, 300および500 μg を含む20 ml MIBK 溶液について，30分毎に 2 時間30分の経時変化を調べた．その結果は表 3 の通

Table 1　Effect of Burner Height on Stability of Fe Values

burner height (mm)	12	14	16	18	20
peak height(mm)	61	68	68	66	60
S.D. of peak height	4.8	2.2	2.4	1.3	6.3
coefficient of variation	0.08	0.03	0.04	0.02	0.11

S.D. shows standard deviation

Table 2　Fffect of pH on Fe Extraction

pH values	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
Fe (μg) added	50	50	50	50	50
Fe (μg) found	49.0	46.3	50	37.3	3.4
Recovery (%)	98.0	92.6	100	74.6	6.8

Table 3　Peak Height of Fe–DDTC–MIBK Extracts

time (min)	0	30	60	90	120	150	coefficient of variation
Fe (μg)							
50	16	15	15	15	15	15	0.03
100	28	30	29	30	30	29	0.03
300	69	70	70	69	72	71	0.02
500	95	93	94	94	94	94	0.01

りである．

各濃度の測定値はいずれも変動係数が小さく，また経時的に増加あるいは減少の傾向を示さなかった．即ち，Fe－DDTC キレートの MIBK 溶液に関しては，斯る時間範囲内では経時変化が認められず，キレートは安定しているものと思われる．

共存金属の影響　食品中に比較的多量に存在すると思われる Zn, Cu, Mn, Mo, Co, Cr および Ni について，Fe の定量値に及ぼす影響を調べた．通常これらの金属の食品中のレベルは，Zn が Fe よりも多量に存在する場合がある他は，Fe と概ね同等か，それ以下である．故に Zn 添加量は Fe の10倍量とし，他の金属は Fe と同量を Fe 50 μg に対して添加し，Fe の回収率を求めた．その結果を表4に示す．

Table 4　Effect of Metals on Fe Measurement

Metals (μg)	Fe added (μg)	Fe found (μg)	Recovery (%)
Zn 500	50	50	100
Cu 50	50	51	102
Mn 50	50	49	98
Mo 50	50	52	104
Co 50	50	51	102
Cr 50	50	48	96
Ni 50	50	52	104
–	50	50	100

Table 5　Recovery of Fe in Food by methods of Atomic Absorption Spectrophotometry and Colorimetry with o–Phenanthroline

Food and description	spectrophotometry			colorimetry		
	Fe added (μg)	Fe found (μg)	Recovery (%)	Fe added (μg)	Fe found (μg)	Recovery (%)
Vegetables (fresh)	50	47.4	94.8	50	47.0	94.0
Meat ball (cooked)	50	50.5	101.0	50	48.0	96.0
Fish (roasted)	50	46.5	93.0	50	48.5	97.0
Milk A*	50	47.5	95.0	50	46.0	92.0
Milk B*	50	50.5	101.0	50	45.0	90.0

* modified milk powder for infants

Fe 量に対する共存金属添加量は，これらの金属が食品中に存在すると思われる比率を基に考えると，かなり高値であるが，このような混合比を用いることによって，これら金属が共存した場合の Fe 測定値に与える基本的影響を把握することが出来る．即ち，Zn は Fe の測定値にはほとんど影響しない．一方，Cu, Mo, Co および Ni は正の誤差を与え，Mn ならびに Cr は負の誤差を与える傾向がある．しかし，これらの影響は2元素間のものであり，多元素間の相対的効果について，全てのモデル実験を行うことは不可能と思われる．そこで実際に Fe の定量を行う食品について，添加回収実験を行った．

食品中の Fe の定量，調理食品として，キウリ，トマトおよびレタスの混合野菜，ミートボール，ならびに焼魚を用い，他に2種類の乳児用調製粉乳を選び，各々に Fe 50 μg を添加した．これらの試料について，無添加のものを対照として原子吸光法およびオルトフェナントロリンによる比色法[6] で Fe を測定し，両試験法の回収率を比較した．その結果は表5に示す通りである．

こゝで使用された食品のうち，混合野菜の灰化物は Ca その他の灰分を比較的多く含むもの，ミートボールおよび焼魚は食塩含有量が多く，また粉乳灰化物はリン酸塩を多く含有するという特徴がある．このような食品類に対して Fe を添加し，その回収率を求めた結果，原子吸光法では93％及至101.0％であり，平均97％標準偏差3.77であった．一方比色法では90.0及至97.0％であり平均93.8％標準偏差2.86であった．これらの成積は原子吸光法に比べて比色法の定量値がわずかに低い（$P < 0.20$ 有意）ことを示している．その原因は粉乳からの回収率が低いためである．ちなみに，粉乳以外の3食品の比較では有意差が認められなかった．オルトフェナントロリンを用いる比色法において，粉乳からの Fe 回収率が低いのは，試料灰化物のリン酸塩含有量が多いことなどによる本比色法の特徴[4] であると思われる．以上の結果より，原子吸光法による食品中の Fe は分析可能であり，現在一般に使われているオルトフェナントロリ

ンを用いた比色法と比較して,遜色ないものと思われる.

要　約

現在，食品中のFeの定量にはオルトフェナントロリンによる吸光々度法が用いられているが，日常業務迅速化のため，フレーム原子吸光による分析条件の検討を行った．また吸光々度法と原子吸光法の回収率を比較した．

1)　バーナー高18 mm，空気およびアセチレン流量は各々毎分10 l および2 l で再現性良い測定値が得られた．

2)　FeのDDTC－MIBKによる抽出は試料溶液のpHを7.0として行うのが適当と思われる．

3)　Fe－DDTCキレートのMIBK溶液は安定している．

4)　Zn以外の6種の金属はFe測定値に影響を与えた．

5)　調理食品および乳児用調製粉乳に対するFe添加回収実験により，原子吸光法では93.0%及至101.0%，平均97.0%，一方吸光々度法では90.0及至97.0%，平均93.8%の回収率が得られた．

文　献

1) 友松　俊夫,道口　正雄：東京衛研年報,28—1,186, 1977

2) 友松　俊夫，西田　甲子，道口　正雄：東京衛研年報，29—1，273，1978

3) Gelmam, A. L. ：*J. Sci.* Food Agric. **23**, 299, 1972

4) 日本薬学会編：衛生試験法注解，1980年版，7；59, 1980

5) Yanagisawa, M., Suzuki M. and Takeuchi, T. ：*Anal. Chim. Acta.*, **43**, 500, 1968

6) 小原哲二郎，鈴木　隆雄，岩尾　裕之：食品分析ハンドブック，1969年版，276，1973，建帛社，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 34, 206-210, 1983

水調理による食品中ミネラルの溶出

中川順一*, 坂本朋子*, 樋口育子*, 西垣　進*, 三村秀一*

Elution of Minerals by Boiling Foodstuffs in Water

JUNICHI NAKAGAWA*, TOMOKO SAKAMOTO*, YASUKO HIGUCHI*
SUSUMU NISHIGAKI* and SYUICHI MIMURA*

Keywords：ミネラル mineral, 硬水 hard water, 溶出 elution, 水煮 boiling in water, 食品 food

緒　言

近年，米，小麦粉などの主食的食品をはじめ，多くの食品は高度に精製され必須ミネラルが著しく損失する[1]．また，流通が一般化した冷凍食品の解凍時にも，同様にミネラルが失われる[2]．さらに，水洗い，下茹で及びあく抜きなどの調理過程でも相当量の溶出をともなう[3-8]．

一般的に栄養素としての微量元素は，ほとんど食品から充分に供給されていると考えられているが，このような事から食品中ミネラルの水による Cooking Loss を再考することにした．

水煮による食品中のミネラルの溶出は，調理用水の水質の違いによって差異が生ずる[9]と考えられるが，このことについてはほとんど知られていない．

現在，わが国では調理にほとんど水道水が使用されているが，硬度の高い地域と低い地域では総硬度で180 mg/l以上の違いがある．そこで調理用水の硬度と食品中ミネラルの溶出の関連について，超軟水である蒸留水と天然の硬水として井戸水を用いて穀類，野菜及び魚を水煮したときの必須ミネラルの溶出を比較検討した．

実験の部

1. **試料**：穀類; 精白米，乾めん（うどん）　野菜; にんじん，じゃがいも，だいこん，ほうれんそう　魚; いか，あじ

試料は全て市販品を用いた．精白米及び乾めんはそのまま，野菜は付着している泥を落すために水道水で洗ったのち，精製水ですすいだ．じゃがいもは数個皮をむき4等分したものを均一になるよう混ぜ合わせた．また，にんじんは数本，だいこんは大きめのもの1本のひげ根を除去後，厚さ約1 cm 幅にいちょう切りにし，均一な試料になるよう混ぜ合わせた．いか及びあじは皮を除去した肉部だけを試料とした．

2. **調理用水**　蒸留水はイオン交換樹脂を通して蒸留したもの，硬水としては総硬度140 mg/lの都内の井戸水を用いた．通常，都内の水道水の総硬度は40～100 mg/l程度で，わが国の水道水の総硬度は20～200 mg/lの範囲である[10]．用いた井戸水の各元素量は表1に示した．

3. **調理方法**　水煮にはパイレックスガラスビーカーを用いた．

精白米100 g に各調理用水（以下水）200 mlを加え，テフロン棒で30回かき混ぜ洗米したのち水を切った．この操作を4回くり返したのち160 mlの水で炊飯した．

乾めん約250 g を正確にはかり2 lの沸とう水に入れ，ガラス棒でかるくかくはんしながら10分間ゆでた．ゆで水を捨て水でめんを洗ったのち，ろ紙上にひろげて水を切った．

にんじん，じゃがいも及びだいこんはそれぞれ約100 g を正確にはかり，それぞれ水500 mlを用いて15分間煮たのち，ろ紙上にとり水を切った．

ほうれんそう約250 g を正確にはかり，2 lの沸とう水に入れ5分間煮たのち，ろ紙上にひろげて水を切った．

これらの試料は105°C の恒温乾燥器で乾燥したのち重量を測定した．また，一種類の試料について2～5回実験をくり返した．

4. **測定元素**　カルシウム(Ca), マグネシウム(Mg), ナトリウム（Na), カリウム（K), 鉄（Fe), 銅（Cu), マンガン（Mn）及び亜鉛（Zn）の8元素について定量した．

5. **分析方法**　乾燥試料約5 g を精秤しパイレックス

* 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 Laboratroy of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

ガラスビーカーにとり，550°C の電気炉で灰化した．灰分は10％塩酸溶液20 m*l* で温浸して溶かし，東洋ろ紙 No 7 でろ過した．またろ紙は蒸留水でよく洗い，洗液はろ液と合わせ 100m*l* にメスアップしたものを分析試料とした．

Na 及び K については炎光光度法，Ca，Mg，Fe，Cu，Mn 及び Zn については原子吸光光度法で定量した．

結果及び考察

各食品の調理前と蒸留水及び硬水で水煮したのちの元素含有量を表1に示した．また，図1には BulK 4 元素の溶出率を棒グラフで示した．

これらの結果を要約すると，Ca だけは食品の種類によって蒸留水と硬水ではその溶出パターンに違いがみられるが，Mg，Na，K，Fe，Cu，Mn 及び Zn では各食品とも蒸留水と硬水による溶出率に著しい差は認められず，20～80％の溶出がみられた．

Ca について図1にみられるように，乾めんとじゃがいもの場合蒸留水では20～80％溶出してしまうが，硬水では 6 例中 5 例は溶出がみられず硬水中の Ca を吸着して増加した．1例だけ硬水で Ca の溶出がみられたじゃがいもの例でも，その溶出率は15％であり，蒸留水の80％にくらべて損失が少ない．

また，にんじんとだいこんは水質の違いに関係なく Ca の溶出がみられるが，硬水の方が Ca の損失が少ない傾向を示した．

米は水洗後水を加えてたき上げるので，硬水を使用すると水中の各種ミネラルが加えられ，蒸留水の場合より元素量が多くなるのは当然であるが，蒸留水では 5～40％溶出するのに対して硬水では50～100％増加した．しかもこの増加量は，添加した水の160 m*l* 中の Ca 量（約 5 mg）に調理前の Ca 量を加えたものより高い値を示したものが多かった．従って，硬水では洗米中に Ca 溶出はほとんどなく，水中の Ca が米に吸着されたことになる．

いかでは蒸留水，硬水のいずれでも Ca は10～30％溶出するが，硬水の方がいくぶん溶出が多い．

また図1に示した様にあじの最初の2回の実験では硬水により Ca が増加したものと減少したものがでたので実験回数をふやしてみたが，最初2回と同様の結果であり，その原因については説明ができない．また，蒸留水の場合は Ca は 0～20％溶出した．

ついで Ca 以外の元素では，蒸留水と硬水による溶出に大きな違いがみとめられず，20～80％の損失があることがわかった．

Na については硬水の米とじゃがいも1例づつで，それぞれ45％，20％と増加を示した．このことについては米において洗米中に Na が初めの 5 分間は溶出するが，その後水中の Na を吸着し増加する[11),12)]という報告と一致した．しかし，米の他の3例では溶出傾向を示し増加しなかったが，これは洗米の時間，また水温などの微妙な要因によると考えられる．また，じゃがいもの1例についても米と同様に吸着により増加したと考えられる．

Zielhuis ら[9)]は 6 種類の硬度の異なる水道水（Ca; 17～114 mg/*l*, Mg; 2.2～19 mg/*l*）で野菜を水煮したときの Ca 及び Mg の溶出動向を調べているが，Ca は硬度が高まるにしたがいほぼ比例的に少なくなり，むしろ吸着による増加がみられている．これに反し，Mg にはこのような傾向は認められず，硬度が高くとも相当量の溶出を示している．

彼らの実験はわが国では考えられないような高 Ca 濃度の水道水も使用しているが，われわれの実験に使用した都内の井戸水（Ca; 34 mg/*l*, Mg; 16 mg/*l*）程度の硬水でも，米，にんじん及びじゃがいもに Ca の吸着がみられ，彼らの実験と同じ様な傾向であった．このことはミネラルの Cooking Loss に関しては，硬水中の Ca 濃度が大きな影響を与えているといえる．

このような実験結果から，軟水地区では単に飲料水からの Ca 摂取量が少ないばかりでなく，水調理による食品中の Ca 溶出が硬水に比べて多いため，硬水地区の人と同じものを食べたとしても Ca 摂取量が少なくなる．

また，古くから腎臓病患者の療養食は，食品を水浸，水煮などすることにより Na，K を少なくする方法が検討されている[3),13)]が，わが国の水道水は軟水で Ca 濃度は今回使用した井戸水の1/3位であり，軟水による水煮は Na，K 以外の必須元素も相当量失われるので栄養学上検討を加える必要がある．

WHO の心疾患専門委員会でも古くから心疾患死亡率が硬水地区より軟水地区の方で高いという多くの疫学的データーから，どうしてそうなるのか理由は明らかでないにせよ，水道水の過度の軟化はさけるべきである[14)]としており，今回調査した水質の違いによるミネラルの Cooking Loss という面からも適度な硬水は健康上好ましいといえる．

また，本実験では水の硬軟により，特に可溶性蛋白の溶出に差がでると考え，また併せて可溶性糖質などの溶出も考慮し，水煮前後の乾燥重量を測定した．乾重量は水煮によりほとんどの食品で減少するが，蒸留水と硬水

表1　生食品100 g を調理したのちの元素量（mg）

			Ca	Mg	Na	K	Fe	Cu	Mn	Zn
精白米	A	生	5.7	31	5.5	240	0.33	0.31	1.2	1.4
		蒸留水	3.5	3.6	4.3	76	0.28	0.18	0.39	0.62
		硬水	8.9	5.7	5.0	70	0.33	0.14	0.32	0.46
	B	生	8.7	26	3.5	390	0.07	0.23	0.87	0.70
		蒸留水	8.5	7.5	2.8	49	0.07	0.21	0.64	0.64
		硬水	14	15	5.1	240	0.05	0.29	0.86	1.0
	C	生	4.5	24	4.4	180	0.35	0.13	0.48	0.98
		蒸留水	3.8	8.0	4.1	27	0.25	0.12	0.40	0.90
		硬水	13	15	2.2	96	0.18	0.14	0.48	0.99
	D	生	4.1	19	7.3	130	0.15	0.26	0.41	1.2
		蒸留水	3.9	14	5.0	48	0.05	0.24	0.28	1.2
		硬水	8.7	12	6.6	91	0.05	0.22	0.21	1.1
乾めん	A	生	17	19	2100	70	0.31	0.12	0.34	0.37
		蒸留水	14	10	370	16	0.23	0.05	0.30	0.34
		硬水	23	14	440	32	0.24	0.05	0.32	0.35
	B	生	19	16	1800	24	0.35	0.13	0.28	0.45
		蒸留水	11	3.8	240	7.6	0.26	0.12	0.12	0.33
		硬水	21	6.8	280	17	0.18	0.10	0.07	0.16
にんじん	A	生	28	11	22	260	0.20	0.04	0.40	0.14
		蒸留水	20	8.0	14	180	0.14	0.03	0.28	0.09
		硬水	24	8.1	15	140	0.10	0.03	0.15	0.13
	B	生	22	7.9	18	340	0.20	0.04	0.10	0.13
		蒸留水	18	4.8	7.6	120	0.24	0.02	0.07	0.09
		硬水	21	5.9	4.7	93	0.20	0.02	0.08	0.08
	C	生	28	11	5.3	230	0.22	0.03	0.10	0.10
		蒸留水	26	7.9	3.1	94	0.18	0.02	0.10	0.10
		硬水	32	7.6	3.2	110	0.12	0.03	0.12	0.09
じゃがいも	A	生	6.5	18	2.2	390	0.60	0.16	0.49	0.21
		蒸留水	2.4	14	1.7	310	0.50	0.09	0.44	0.17
		硬水	5.6	17	3.2	300	0.54	0.09	0.46	0.19
	B	生	2.5	20	1.6	340	0.48	0.09	0.10	0.23
		蒸留水	1.6	15	0.83	210	0.39	0.11	0.08	0.23
		硬水	5.3	15	1.9	200	0.40	0.08	0.09	0.29
	C	生	5.5	19	6.8	210	0.59	0.08	0.22	0.27
		蒸留水	4.9	12	4.4	140	0.35	0.06	0.14	0.29
		硬水	5.8	12	4.3	130	0.33	0.04	0.12	0.34
	D	生	1.5	15	9.0	190	0.20	0.06	0.17	0.26
		蒸留水	1.2	11	4.8	66	0.17	0.06	0.10	0.20
		硬水	3.6	13	9.2	64	0.20	0.07	0.20	0.25
だいこん	A	生	23	7.4	7.7	280	0.16	0.03	0.03	0.14
		蒸留水	16	5.2	4.8	120	0.13	0.01	0.02	0.08
		硬水	21	5.8	4.6	110	0.15	0.01	0.02	0.07
	B	生	1.9	6.8	8.7	180	0.16	0.01	0.04	0.08
		蒸留水	1.4	4.9	3.1	69	0.09	0.01	0.04	0.04
		硬水	1.6	5.1	4.5	61	0.10	0.01	0.07	0.04
	C	生	30	6.8	3.1	140	0.14	0.01	0.05	0.10
		蒸留水	21	3.0	1.6	86	0.08	0.00	0.02	0.05
		硬水	20	3.6	1.6	62	0.07	0.01	0.03	0.05

continued on

			Ca	Mg	Na	K	Fe	Cu	Mn	Zn
ほうれんそう	A	生	63	73	91	530	6.3	0.11	0.53	0.74
		蒸留水	67	48	45	260	4.8	0.08	0.31	0.44
		硬水	62	37	45	220	8.3	0.05	0.45	0.35
	B	生	63	73	86	460	2.6	0.09	0.58	0.73
		蒸留水	62	44	46	220	2.1	0.07	0.37	0.48
		硬水	60	46	33	220	2.7	0.06	0.37	0.43
	C	生	74	84	78	770	2.7	0.12	0.58	0.64
		蒸留水	71	36	29	360	1.4	0.07	0.27	0.41
		硬水	74	25	18	340	1.5	0.06	0.34	0.42
	D	生	60	120	80	780	1.6	0.16	0.43	0.90
		蒸留水	57	51	22	350	0.80	0.07	0.22	0.61
		硬水	70	49	28	360	0.78	0.07	0.24	0.70
いか	A	生	10	39	150	300	0.13	0.20	0.07	1.2
		蒸留水	9.1	34	120	260	0.11	0.18	0.06	1.1
		硬水	8.9	34	120	250	0.12	0.18	0.06	1.0
	B	生	16	40	270	170	0.15	0.09	0.00	1.1
		蒸留水	15	36	210	100	0.16	0.10	0.00	1.1
		硬水	13	30	160	100	0.14	0.07	0.00	0.88
	C	生	18	45	270	52	0.20	0.17	0.02	1.1
		蒸留水	14	31	99	38	0.22	0.16	0.02	0.91
		硬水	15	31	100	28	0.19	0.16	0.02	0.97
あじ	A	生	220	32	250	330	0.89	0.16	0.03	0.83
		蒸留水	180	26	140	240	0.71	0.13	0.02	0.65
		硬水	150	26	150	260	0.72	0.15	0.02	0.44
	B	生	120	31	170	240	0.68	0.09	0.00	0.67
		蒸留水	120	26	83	190	0.70	0.09	0.00	0.58
		硬水	160	28	110	170	0.69	0.09	0.00	0.68
	C	生	27	24	170	160	1.1	0.10	0.02	1.1
		蒸留水	27	20	130	60	0.99	0.07	0.02	1.0
		硬水	23	21	130	68	1.2	0.10	0.01	1.3
	D	生	16	41	120	380	1.0	0.11	0.00	0.55
		蒸留水	12	30	65	210	0.64	0.10	0.00	0.47
		硬水	14	33	84	200	0.80	0.10	0.00	0.54
	E	生	9.2	39	140	320	0.98	0.10	0.00	0.56
		蒸留水	8.8	35	80	220	0.68	0.07	0.00	0.51
		硬水	14	35	66	220	0.86	0.09	0.00	0.42
井戸水		硬水※	3.4	1.6	1.6	0.36	0.005	0.000	0.002	0.002

註　硬水※：調理用硬水として用いた都内の井戸水

による差はみとめられなかった．実質ロスの多かった食品はにんじんとだいこんで約45%，またその他の食品ではほうれんそう約20%，あじと乾めん約15%，じゃがいもといか約10%という結果であった．

まとめ

食品の水煮，水洗によりCaは軟水に比べて硬水の方が溶出されにくく，むしろ吸着する食品もある．また，Mg，K，Na，Fe，Cu，Mn及びZnでは軟水及び硬水による違いはほとんど認められず，いずれも約20～80%の溶出がみられた．

文献

1) Masironi, R., Koirtyohann, S. R. and Pierce, J. O. : *Sci total environ.*, 7, 27, 1977
2) Hankin, J. H. : *J. Am. diet. Assoc.*, 56, 212, 1975
3) 小野房子，佐藤文代：臨床栄養，39，687，1971
4) 田代豊雄，稲荷晟子：栄養と食糧，17，102，1964
5) 泉　敬子：同上，25，573，1972

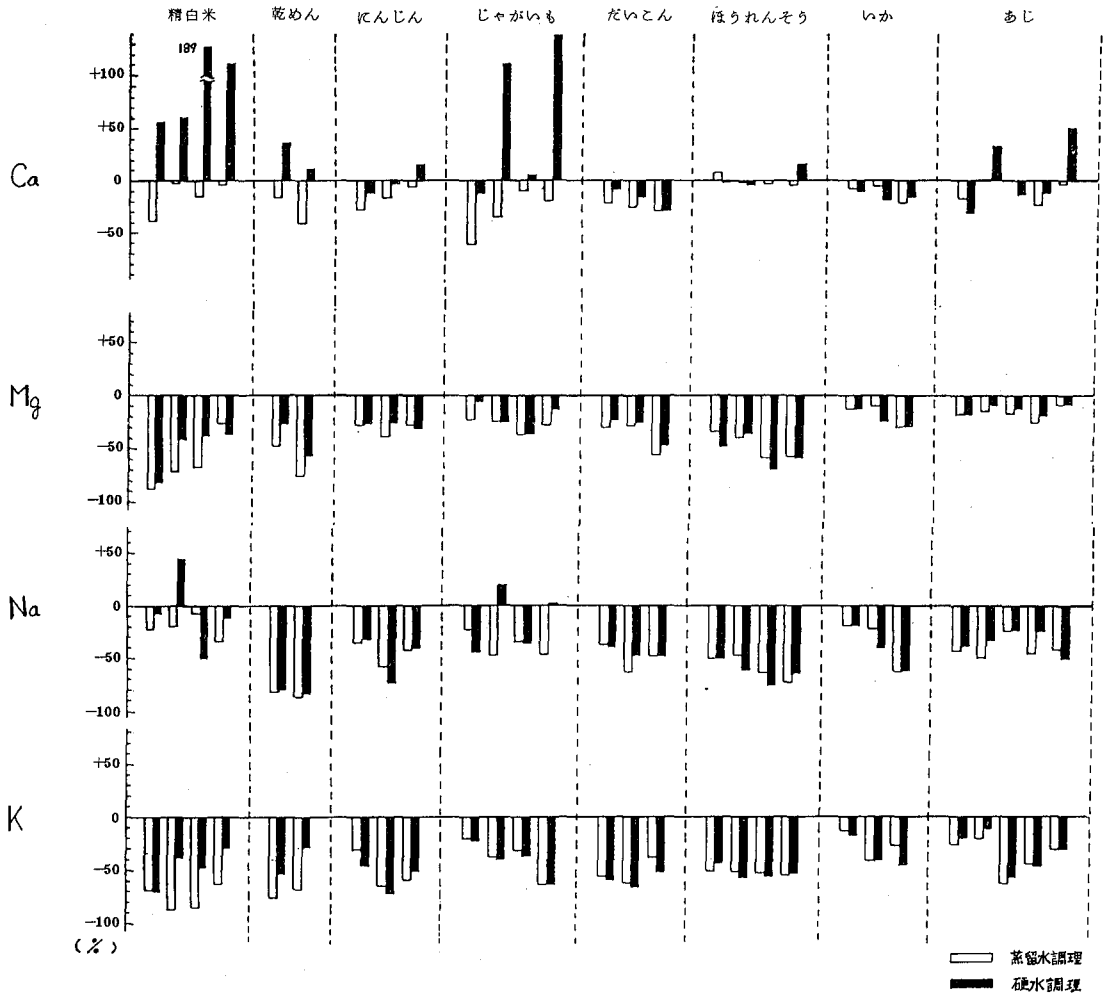


図1　蒸留水及び硬水調理による食品中からの無機成分の溶出率

6) 薬師寺幾代，香川芳子：同上，28，67，1975
7) 出雲悦子，大木和香子：調理科学，14，188，1981
8) 小川久恵，松本仲子：栄養学雑誌，40，183，1982
9) Zielhuis, R.L.and Haring, B.J.A.: *Sci total environ.*, 18, 35, 1981
10) 地方衛生研究所全国協議会編：健康と飲料水中の無機成分に関する研究，159，1982
11) 嘉納成三：農化，36，379，1963
12) 小野房子，大松孝樹：栄養学雑誌，32，19，1973
13) 大松孝樹：臨床栄養，40，493，1972
14) WHO *chronicle*: 32, 382, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 211-215, 1983

食品中のEDTAの分析

大石充男*, 大西和夫*, 坂井千三*

High Performance Liquid Chromatographic Determination of E D T A in Foods

MITSUO OISHI*, KAZUO ONISHI* and SENZO SAKAI*

A high performance liquid chromatographic method was established for the determination of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in various foods. EDTA was extracted from foods with water. The extract was poured onto DEAE–sephadex column and the column was washed with water and 0.1N HCl. In the case of canned foods, removal of tin in the water extracts was necessary before the column chromatography. Removal could be achieved by the addition of 10% $ZnSO_4$ to the extract and successive titration with 3 N and 0.3N NaOH until the solution showed slightly red colour when phenolphthalein was used as an indicator.

EDTA eluted with 0.2N HCl was converted to EDTA-Fe (III) by adding ferric chloride, and thus obtained ferric chelate of EDTA was separated on a column packed with Lichrosorb RP–18, 5 μ (4 × 300mm). The solvent was a mixture of 5 % ethanol and 95% water containing 0.01M tetrabutylammonium hydroxide, pH 4.5, and a UV detector, 255 nm, was used to identify the peaks.

Recovery of 100 ppm EDTA added to 7 specimens was 90.1–98.5%.

Keywords: EDTA, high performance liquid chromatography, foods

まえがき

エチレンジアミン四酢酸（EDTA）は，米国においてCa塩，Na塩の形で野菜の酢漬と缶詰に色と香りの安定剤として，またマヨネーズ，ドレッシングおよびソースに保存料として数十～数百 ppm の使用が許可されており[1]，現在日本でも新たに食品添加物として検討中である．食品中のEDTAの定量法として比色法[2]，ガスクロマトグラフィー法[3,4]，液体クロマトグラフィー（HPLC）法[5,6]，イソタコフォレシス法[7]などが報告されているが，これらは特異性を欠いたり，操作が繁雑で回収率が低かったり，また適用する食品が限定される場合が多い．

そこで著者らはEDTAがFe（Ⅲ）とすみやかに反応しEDTA-Fe（Ⅲ）キレートを生成することを利用し，HPLCにより食品中のEDTAの定量を行ったところ良好な結果を得たので報告する．

実験方法

1. 試料

都内で市販されているマヨネーズ，ソース，ドレッシング，マーガリンおよび輸入のマヨネーズ，ドレッシング，サンドイッチスプレッド，リマビーンズ缶詰，キドニイビーンズ缶詰を購入し試料とした．

2. 試薬

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水塩（EDTA・2Na・2H_2O）標準溶液：EDTA・2Na・2H_2O（㈱同仁化学研究所製）を水に溶解して100 μg/ml の濃度にした．

塩化第二鉄（$FeCl_3$・6H_2O）溶液：$FeCl_3$・6H_2O（関東化学㈱製試薬特級）を0.01 N 塩酸に溶解して0.01 M の濃度にした．

テトラ n-ブチルアンモニウムヒドロキサイト（TBA）溶液（10%水溶液）：東京化成工業㈱製

DEAE-セファデックスカラム：Pharmacia Fine Chemicals（社）製のDEAE-セファデックス A-25を0.5 N 酢酸溶液中で一夜放置し，中性となるまで水洗し内径2 cm，長さ30 cm のクロマト管に高さ6 cm になるように充填した．

その他の試薬は和光純薬㈱製試薬特級品を使用した．

* 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

3. 装置

高速液体クロマトグラフ：日本分光工業㈱製 TWINCLE

試料注入装置：レオダイン社製7125型

検出器：日本分光工業㈱製 UVIDEC 100型

4. 試験溶液の調製

(A) 缶詰食品以外の食品

試料10 g をブレンダーカップにとり，水40 m*l*，塩化メチレン50 m*l* を加え 2 分間ホモジナイズした後，3,000 rpm で10分間遠心分離する．水層を分取し，残渣に水40 m*l* を加え同様に抽出をくり返す．水層を合わせ水で100 m*l* とする．水層25 m*l* を DEAE－セファデックスカラム（2×6 cm）に通し，水50 m*l* 次いで0.01 N 塩酸30 m*l* を流して0.2 N 塩酸30 m*l* で EDTA を溶出する．これを減圧乾固した後0.01 M 塩化第二鉄 5 m*l* を加えて溶かし，水で10 m*l* とした後0.45 μm のミクロフィルターでろ過して試験溶液とし遮光保存した．

(B) 缶詰食品

試料10 g を用い(A)と同様にして得た水層約90 m*l* に10%硫酸亜鉛 6 m*l* とフェノールフタレイン試液 2 滴を添加し，微紅色となるまで 3 N と0.3 N の水酸化ナトリウムを加えた後，水で100 m*l* とした．次にろ紙（東洋 No. 5 A）でろ過し，ろ液25 m*l* を DEAE－セファデックスカラムに通す．以下(A)と同様に操作する．

5. 定量法

1) HPLC の測定条件

カラム：Lichrosorb RP－18，5 μ（Merck 社）4×300 mm，移動相：0.01 MTBA(pH 4.5，酢酸)－エタノール＝95：5，流速：0.8 m*l*/min，測定波長：255 nm，感度：AUFS 0.04，ガードカラム：Unisil C－18，10 μ

2) 検量線の作成

EDTA 標準液より0.05～0.5 mg をとり，0.01 M 塩化第二鉄を 5 m*l* 加えて水で10 m*l* とし，これより10 μl ずつ HPLC に注入して EDTA-Fe のピーク高より検量線を作成した．

結果と考察

1. HPLC の条件の検討

EDTA-Fe（Ⅲ）は255 nm[8] に極大吸収があるため測定波長を255 nm とした．溶離液として有機溶媒－水の種々の混合溶媒を用いて検討したが，EDTA-Fe（Ⅲ）はカラムに保持されなかったため，イオン対として TBA を用いたイオン対クロマトグラフィーを検討した．溶離液の有機溶媒としてメタノール，エタノール，アセトニトリルを用いたところ感度はエタノールが最もよく，また，カラム圧は 3 者ともほとんど変わらなかったためエタノールを使用した．エタノール濃度，pH および TBA 濃度についてクロマトグラムに与える影響を検討した．エタノールは濃度を増加させると保持容量は小さくなり感度は高くなったが，カラム圧力を考慮してエタノール濃度は 5 %とした．pH は 4 以下ではベースラインが不安定であり，5 以上では感度が悪くなった．しかし 4～4.5の範囲で保持容量，感度とも一定であった．そこで pH は4.5とした．TBA 濃度は0.01 M 以上で保持容量は一定となったので TBA 濃度は0.01 M とした．Lichrosorb RP－18の他に μ Bondapack C 18および Finepack C 18について検討したが前者は感度が悪く，後者では EDTA-Fe（Ⅲ）のピークが得られなかった．

2. 検量線，精度および検出限界

EDTA-Fe（Ⅲ）の検量線は Fig. 1 に示したように原点を通る直線性を示した．検出限界は20 ng で100 ng を10回くり返し行った変動係数は1.0%であった．

3. DEAE－セファデックスカラムによるクリーンアップ

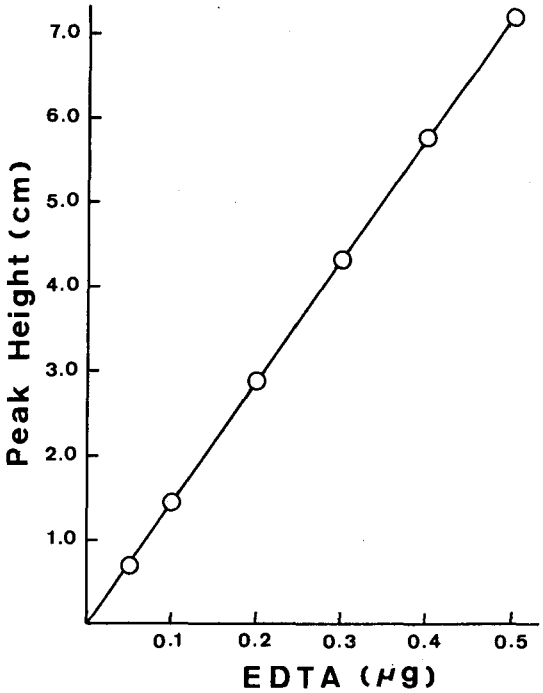


Fig.1. Calibration Curve of EDTA

ソース，ドレッシング等食品によってEDTA-Fe(Ⅲ)と重なるピークが出現し定量の妨害となる．これを除去するためカラム処理を検討した．伊藤[7]，吉川[6]らは陰イオン交換樹脂を用いてクリーンアップを行っているが著者らはカラムの前処理の容易なDEAE－セファデックスを使用した．妨害物質は水50 m*l*および0.01 N 塩酸30 m*l*を流下させることでほとんど除去され，EDTAは0.2 N 塩酸30 m*l*で完全に溶出された．

4. 妨害物質の影響

妨害物質としてアミノ酸(アラニン，アスパラギン酸，グルタミン酸，セリン，バリン，フェニルアラニン，プロリン，リジン)，有機酸（酒石酸，クエン酸，乳酸，フマル酸）および金属（Al^{3+}（$AlCl_3$），Ba^{2+}（$BaCl_2$），Ca^{2+}（$CaCl_2$），Cu^{2+}（$CuCl_2$），Mg^{2+}（$MgCl_2$），Pb^{2+}（$Pb(NO_3)_2$），Sb^{3+}（$SbCl_3$），Sn^{2+}（$SnCl_2$）の影響を検討した．EDTAに対して5倍量のアミノ酸と等量の有機酸を加えたところ，アミノ酸および有機酸はDEAE－セファデックスカラム処理によって除去され回収率およびクロマトグラムへの影響はなかった．EDTAは種々の金属とキレートを作るため，それらの影響が予想されるためEDTAに対して金属を2倍量添加したがSn（Ⅱ）以外の金属では影響はみられなかった．Sn（Ⅱ）以外の上記金属のキレートの安定度定数（logK）は7.76～18.80[9]でありEDTA-Fe（Ⅲ）キレートのそれ(25.1)よりも低い値であるため各キレートの金属がFe(Ⅲ)に容易に変換されるためと考えられる．しかし，Sn（Ⅱ）を加えると回収率が低下した．これはSn（Ⅱ）のlogKが22.1でありFe（Ⅲ）キレートのそれと近いためFe（Ⅲ）と変換しにくいことによると考えられる．またSb（Ⅲ）キレートのlogKは24.8でありFe（Ⅲ）キレートのそれと非常に近い値であるが，Sb(Ⅲ)キレートは加水分解を起しやすい[9]ため容易にFe（Ⅲ）に変換されるものと考えられる．

5. Sn（Ⅱ）の除去法

缶詰食品ではSn（Ⅱ）が溶出してくる可能性が考えられるため回収率が低くなることが予想される．そこでSn(Ⅱ)の除去法として硫酸亜鉛による処理を検討した．10%硫酸亜鉛を加えて水酸化ナトリウムによりpHを変化させてSn（Ⅱ）のEDTA回収率におよぼすpHの影響を調べた結果をFig. 2に示した．図から明らかなようにpH 7～9で回収率が良好であった．EDTA-Sn(Ⅱ)の安定な領域は酸性側であり，中性においては加水分解[9]を起こし，硫酸亜鉛と共沈するものと考えられる．なお，硫酸亜鉛は蛋白質の除去にも有効であった．キドニイビーンズ缶詰にEDTA 100 μg/gおよびSn（Ⅱ）200 μg/gを添加し4．試験溶液の調製の(B)に従って操作し回収率を調べた結果をTable 1に示した．

6. 光の影響

Feの存在で光によりEDTAの分解が起こるといわれている[10]．そこで10 ppmのEDTA-Fe（Ⅲ）標準液を自然光下で24～144時間放置し，光の影響を調べたと

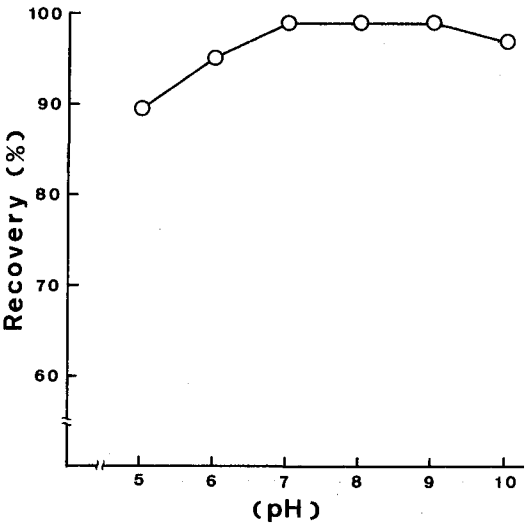


Fig.2.　Effect of pH on the recovery of EDTA

Table 1. Recovery of EDTA Added to Canned Kidny Beans

Sample (g)	Added (μg/g)	Found (μg/g)	Recovery (%)	Means (%)	C.V. (%)
10.0	100.0	92.6	92.6		
10.0	100.0	97.7	97.7		
10.0	100.0	95.9	95.9		
10.0	100.0	93.7	93.7		
10.0	100.0	97.7	97.7	95.5	2.3

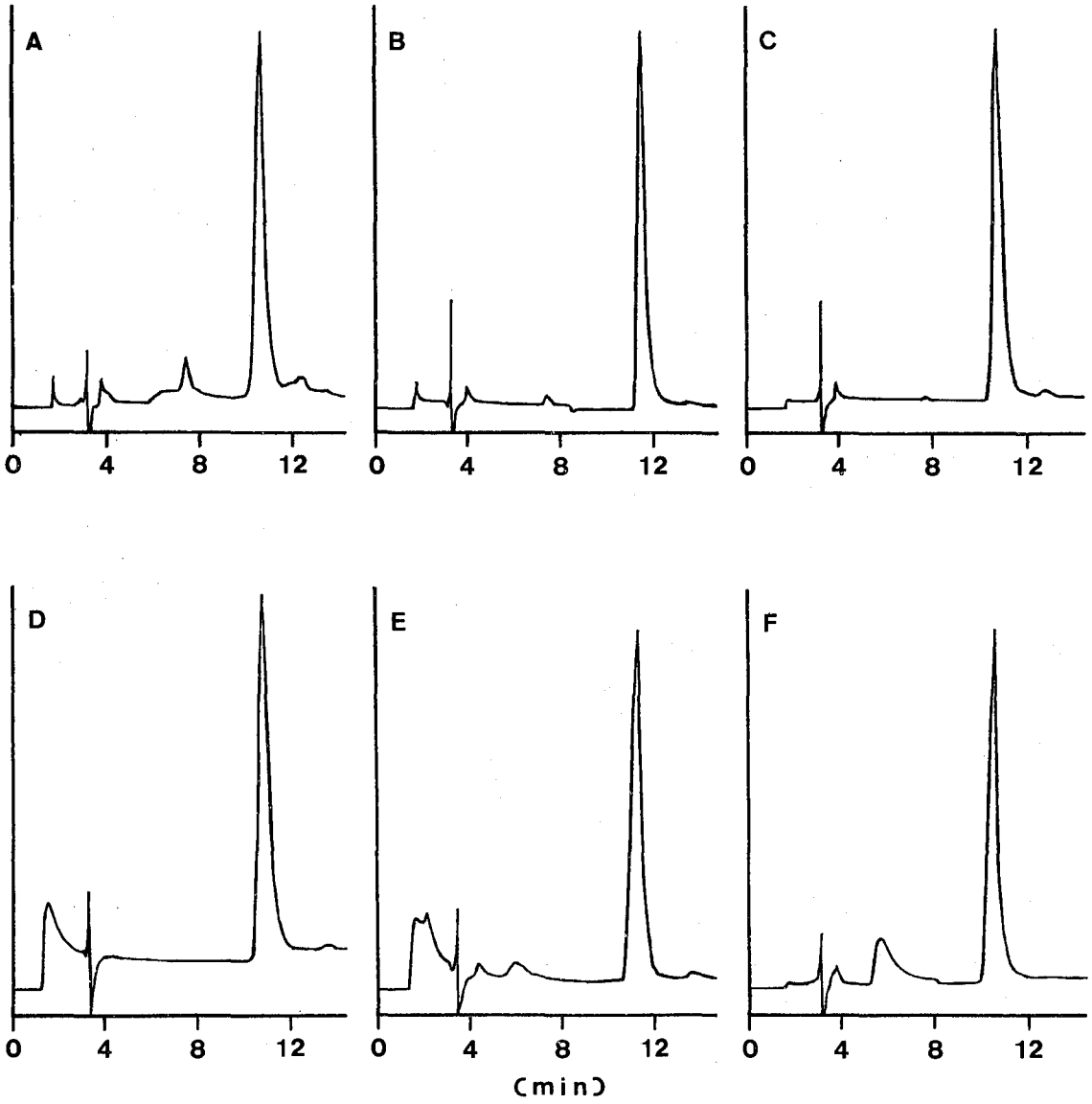


Fig.3. Liquid chromatograms of various foods spiked with 100 ppm of EDTA
A : Sauce B : Dressing C : Mayonnaise D : sandwich Spred E : Margarin F : Canned Lima Beans
Conditions : column, LiChrosorb RP-18 (4×300mm) ; solvent, 0.01 M tetrabutylammonium hydroxide and 0.04 M acetic acid (pH4.5) -ethanol (95 : 5) ; flow rate, 0.8 ml/min; detector, UV 255nm; sample size, 10 μl; sensitivity, 0.04 AUFS

ころ Table 2 に示したように時間の経過に従って分解が進むことがわかった．また10 ppm の EDTA-Fe（Ⅲ）標準液をアルミホイルで遮光し，168時間放置したものは分解されなかった．そこで試験溶液および標準液とも遮光保存することにした．

7. 添加回収実験

ソース，ドレッシング，マヨネーズ，サンドイッチスプレッド，マーガリン，リマビーンズ缶詰に EDTA 100 μg/g を添加し回収率を求めた．その結果を Table 3 に，その時得られたクロマトグラムを Fig. 3 に示した．回収率は90.1～98.5％であった．

8. 市販品への応用

市販のマヨネーズ，ドレッシング，ソースおよび輸入食品のマヨネーズ，ドレッシング，サンドイッチスプレッド，キドニイビーンズ缶詰，リマビーンズ缶詰について本法を適用した結果いずれからも EDTA は検出されなかった．

Table 2. Decomposition of EDTA-Fe（Ⅲ）by Light

Time (h)	Decomposition (%)
0	0
24	27.5
48	32.6
120	43.7
144	48.7

Table 3. Recovery of EDTA Added to Foods

Food	Added (μg/g)	Recovery* (%)	C.V. (%)
Sauce	100.0	98.5	2.0
Dressing	100.0	95.6	2.1
Mayonnaise	100.0	95.3	2.4
Sandwich Spred	100.0	91.7	1.5
Margarin	100.0	90.1	1.5
Canned Lima Beans	100.0	92.7	2.0

＊ Mean of 5 trials

まとめ

食品中のEDTA の分析法について検討した．食品中から水で抽出した EDTA を EDTA-Fe（Ⅲ）として HPLC で定量分析した．妨害物質は DEAE－セファデックスカラムを用いて除去し，回収率に影響をおよぼす Sn（Ⅱ）は硫酸亜鉛を加え水酸化ナトリウムで微アルカリ性にすることにより除去できた．ソース，ドレッシング等に添加した回収率は90.1～98.5％であった．本法を市販の食品および輸入食品に適用した結果 EDTA は検出されなかった．今後適用範囲を拡張する予定である．

文献

1) Andres, C.：*Food Process*, **42**, 70, 1981
2) Vogel, J. and Desshusses, J.：*Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **53**, 175, 1962
3) 三原 翠，天野立爾，近藤龍雄，田辺弘也：食衛誌，**11**, 88, 1970
4) Williams, D.T.：*J. of Assoc. Off. Anal. Chem.*, **57**, 1383, 1974
5) Perfetti, G.A. and Warner, C.R.：*J. of* Assoc. *Off. Anal. Chem.*, **62**, 1092, 1979
6) 吉川俊一：京都市衛研年報，**47**, 90, 1981
7) Ito, Y., Toyoda, M., Suzuki, H. and Iwaida, M.：*J. of Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**, 1219, 1980
8) 広渡和生，甲村善博，熊本和夫，服部荘寛，青島昭三：分析化学，**30**, 534, 1981
9) 上野景平：キレート滴定法，246～300，1972，南江堂
10) Cassidy, R.M., Harpur, R. and Elchuk, S.：*J. of Chromatogr.*, **190**, 188, 1980

報　　文 Ⅳ

生活環境に関する調査研究

REPORTS Ⅳ

PAPERS CONCERNING ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 217-220, 1983

大気中浮遊粉塵がトルエンの大気光化学反応におよぼす影響

多田宇宏*, 太田与洋*, 狩野文雄*

Influences of Suspended Particle Matters on Atmospheric Photochemical Reactions of Toluene

TAKAHIRO TADA*, TOMOHIRO OHTA* and HUMIO KANO*

Effect of suspended particle matters (s.p.m.) on the atmospheric photooxidation of toluene was studied. Addition of s.p.m. to the mixture of toluene/NO_2/O_2 accelerated the formation rate of benzaldehyde during the irradiation with black light blue lamps. This effect of the addition of s.p.m. appeared gradually, and decreased by repeating the same runs. It was proposed that water adsorbed on s.p.m. might work as "an accelerator" of the photochemical oxidation.

Keywords : suspended particle matters, photochemical oxidation, toluene, benzaldehyde

緒　言

従来から光化学スモッグ生成に関連した光化学反応は数多く調べられてきているが，それは気相だけを考えてのガス体相互の反応によるものである．しかし，実際の大気中には粉塵粒子など固体が存在しており，これら固体の吸着活性点のある部位が大気汚染物質などを吸着し，均一気相反応とは異なる光化学反応を生じさせる可能性は大きいと考えられる．指宿[1]はプロピレン，NO_2，空気の系に酸化亜鉛を加えての光化学反応実験を試みた．その結果，HCN，CH_3CHO，CO_2 の生成が促進されたことから酸化亜鉛に光触媒作用があることを報告している．

そこで，実際に大気中浮遊粉塵が大気中汚染物質の光化学反応に与える影響をみるために，沪紙に付着させた大気中浮遊粉塵を気相反応がよく研究されている[2-4]トルエン＋NOx＋空気＋ブラックライトブルー（以下B.L.B.と記す）の系に加えて光照射実験を行ないトルエン及び主生成物質の一つであるベンズアルデヒド濃度の時間に対する変化をみた．

実　験　法

今回の実験では，はじめFig.1のような装置Aを製作した．反応容器はパイレックスガラス（内径24 mm，長さ610 mm）で，この反応容器にトルエン，NO_2，O_2，及び粉塵付着沪紙（以下P.G.F.と記す）またはブランク沪紙（以下B.G.F.と記す）を入れ，テフロンダイヤフラムポンプ（10 *l*/min）で30分間darkで循環させた．次いで20 W－B.L.B.ランプ4本で光照射を行ない，15分ごとにサンプリングポートよりガスタイトシリンジで1 m*l*のガスを採取してガスクロマトグラフィー分析（検出器：FID，カラム：ベントン34＋シリコンDC 200，5＋5％，2 m）を行なった．

また，添加したNO_2が沪紙に吸着された結果NO_2濃度が減少する恐れがあると考えられたので，さらに容器容量が大きく，NO_2も同時に測定できる装置[5]に沪紙容器をつけたもの（Fig.2）を使用した．この装置Bは，周囲を40 W－BLBランプ4本で囲んだパイレックスガラス光化学反応容器（容量25.2 *l*）で，二次導函数分光計（YANACO UV-2）のステンレス光学吸収セル（容量7.57 *l*，長さ1 m）に接続されているものである．この装置Bにトルエン，NO_2，O_2及び沪紙を入れ30分間darkにしてテフロンダイヤフラムポンプ（10 *l*/min）で循環し，二次導函数分光計で，トルエン（266.7 nm），ベンズアルデヒド（283.7 nm），NO_2（332.5 nm）について各々( )内の波長で10分ごとに測定した．

粉塵は，GELMAN社製Glass–Fiber–Filterを用い，ハイボリウムエアサンプラーで当所屋上にて採取し，120℃で一晩乾燥させたものを使用した．

結果及び考察

粉塵のある系とない系との光化学反応の差を明らかにするため，トルエン及びこの系での主反応物質の一つで

* 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

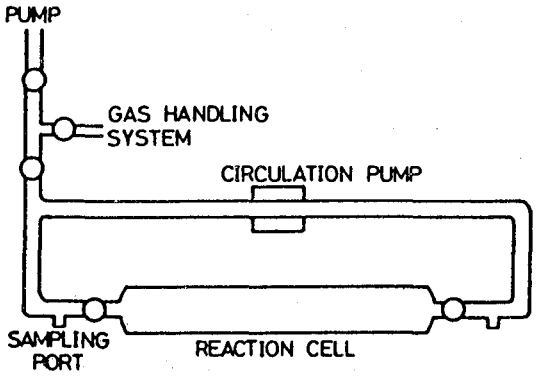


Fig.1. Diagram of Reactor A

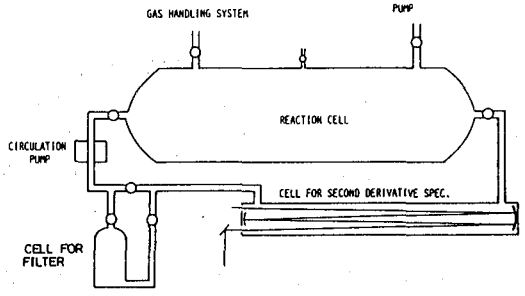


Fig.2. Diagram of Reactor B

ある[2-4]ベンズアルデヒドについて，その光照射時間に対する濃度変化を測定した．その結果 P.G.F. の系では，B.G.F. の系に比べトルエンの減少，ベンズアルデヒドの増加が著しく，光化学反応が促進されていることが認められた．ベンズアルデヒドの乾燥空気中での NO_2 による生成反応は以下の反応であると考えられている．

$$NO_2+h\nu \rightarrow NO+O$$
$$\phi\text{-}CH_3+O \rightarrow \phi\text{-}CH_2+OH$$
$$\phi\text{-}CH_3+OH \rightarrow \phi\text{-}CH_2+H_2O$$
$$\phi\text{-}CH_2+O_2 \rightarrow \phi\text{-}CH_2OO$$
$$\phi\text{-}CH_2OO+NO \rightarrow \phi\text{-}CH_2O+NO_2$$
$$\phi\text{-}CH_2O+O_2 \rightarrow \phi\text{-}CHO+HO_2$$

装置Aの系におけるベンズアルデヒドの生成量は光照射後約45分間までは直線的に増加することからトルエン濃度（183 ppm）を一定にして，NO_2 濃度を 0，85，171，255 ppm に変化させ光照射後30分のベンズアルデヒドの生成量を測定した．（Fig.3）また NO_2 濃度（169 ppm）を一定にして，トルエン濃度を 0，45，92，140，186 ppm と変化させ光照射後30分のベンズアルデヒドの生成量を測定した．（Fig.4）この結果，ベンズアルデヒドの生成量はトルエン濃度，NO_2 濃度に比例して増加することが明らかとなった．しかし，Fig.3 にみられるように NO_2 濃度 0 から85 ppm の増加は85から255 ppm までの直線的な増加に比べ，その傾きはゆるやかであった．

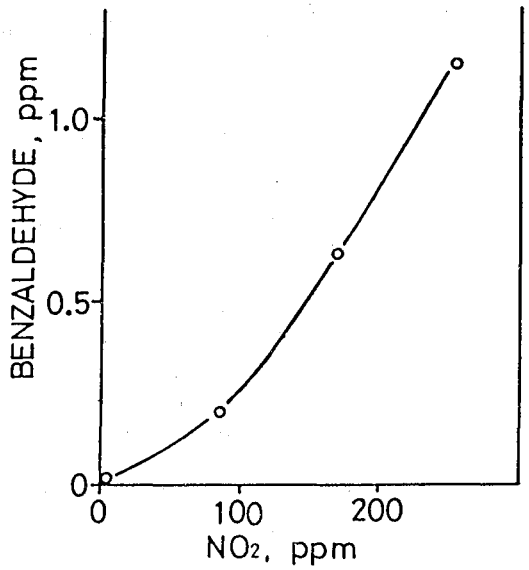


Fig.3. The Profile of Benzaldehyde Formation Rate vs. NO_2 Concentrations
$[\text{toluene}]_0 = 183$ ppm, after 30 min irradiation

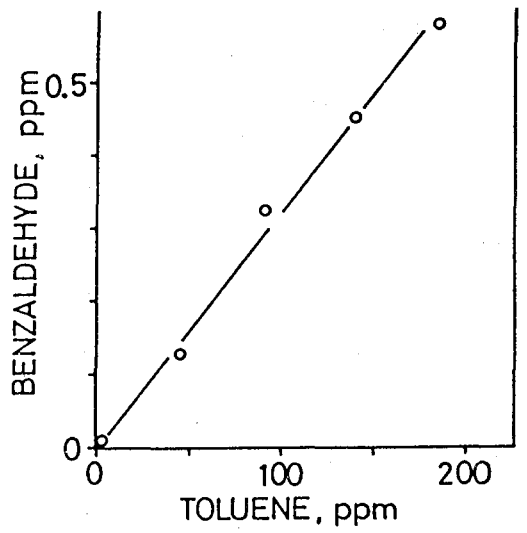


Fig.4. The Profile of Benzaldehyde Formation Rate vs. Toluene Concentrations
$[NO_2]_0 = 169$ ppm, after 30 min irradiation

このことは，装置Aの反応容器の容量が小さいため，おそらく NO_2 が沪紙に吸着され，反応容器内の実際の NO_2 濃度が低くなったためと考えられる．これは以下の装置Bでの実験（Fig.6）で粉塵付着沪紙を用いた場合に光照射前ですでに NO_2 の濃度が減少していることからも推測される．また装置Aでトルエン，NO_2，P.G.F.，光のうちいずれか一つ欠けてもベンズアルデヒドの著しい生成は生じないこと，さらに P.G.F. に直接光照射をせずに反応容器に光照射を行なえば同様な結果が得られることも確認した．

次に，NO_2，トルエン，ベンズアルデヒドを同時に測定できる Fig.2 の装置Bを使って実験を行なった．

二次導函数分光計の光照射前と光照射後100分のチャートを Fig.5 に示す．

装置Aでみられたように P.G.F.，B.G.F. のトルエンの光酸化に与える影響がこの装置Bでも同様にみられた．（Fig.6）また P.G.F. の系では B.G.F. および沪紙を入れない（以下 N.G.F. と記す）系より光照射前のトルエン及び NO_2 の減少が著しかった．

また同様の実験で沪紙容器のコックを閉じて P.G.F. と反応性ガスとの接触を絶った後もベンズアルデヒドの生成はみられたがその速度は0に近づいた．しかし，再びコックを開くと新たにベンズアルデヒドの生成が認められた．（Fig.7）

このことはベンズアルデヒドの生成の促進には，かならずしも P.G.F. と接触し続ける必要はなく，このことから以下のことが考えられる．

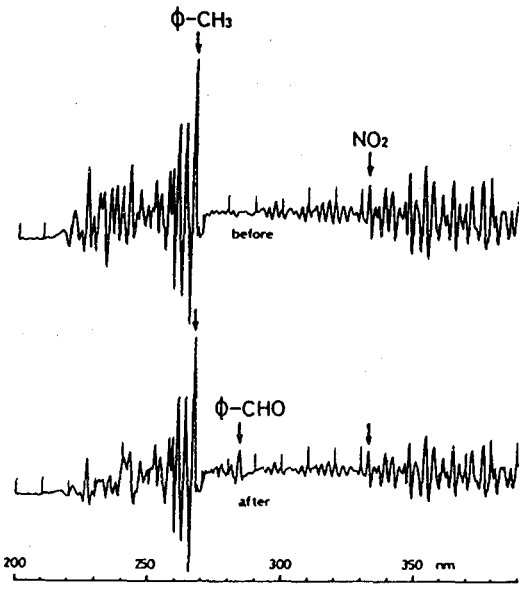


Fig.5. Second-Derivative UV Absorption Spectra Before Irradiation and After 100 min Irradiation

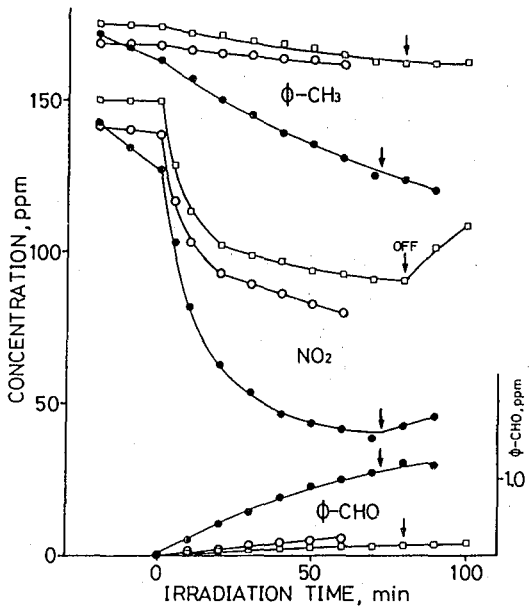


Fig.6. The Profile of Toluene, NO_2 and Benzaldehyde During Irradiation
□—□ N. G. F.
○—○ B. G. F.
●—● P. G. F.

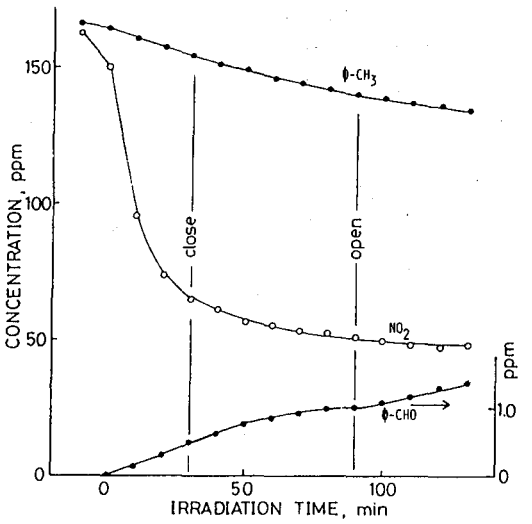


Fig.7. Effect of Cook Operation of Cell for Filter on Benzaldehyde Formation Rate

第一に，トルエン酸化を促進させるのに役立つ気体成分がP.G.F.から遊離される．

第二に，何らかの気体成分がP.G.F.から遊離され，それがNOxなどと反応してトルエン酸化を促進させる気体成分を生成する．

第三に，P.G.F.上でNOxとの反応によりトルエン酸化を促進させる気体成分が生成し，これがガス中に遊離される．

しかし，第一の理由は，系にNOxを入れないとこの現象が起らないので否定される．

そこで，第二，第三の理由として現時点でもっとも考えられやすい水の効果をみた．そこで同様な実験を数回くり返して活性が落ちたP.G.F.の系に水を加え（50 μl）トルエン酸化促進作用の回復をみた．また減圧下（0.1 torr以下）で加熱（150～200℃）したP.G.F.によるトルエン酸化促進作用も検討した．その結果，水の添加によってトルエンの酸化促進作用は回復し，反対に加熱処理した沪紙を使用した場合にはその効果は低下した．このことから次に沪紙及び粉塵に吸着される水分量について検討した．

恒量で沪紙重量は平均4.2008 g（n＝3）であり，160℃で一晩乾燥させると平均14.3 mg（n＝3）重量が減少した．ここで仮に160℃で一晩乾燥させることにより沪紙中の水分がほとんど無くなったと考えるならば，この重量の減少分は沪紙に吸着されていた水の重量と考えられる．

粉塵を採取した沪紙重量は4.4219 gで採取前重量4.2089 gを減ずると213 mgとなり，これが粉塵量となる．この粉塵付着沪紙を160℃で一晩乾燥させた重量が4.3784 gで43.5 mg減少した．43.5 mgからブランク時の水分量14.6 mgを減ずると28.9 mgとなり，これが粉塵に吸着されていた水分量と考えられる．これは粉塵量（含水）の13.6%にあたり，ブランク沪紙に吸着されている水の割合0.34%と比べかなりの量が粉塵に吸着されていることがわかる．また，一度160℃で一晩乾燥させたものをデシケーター（シリカゲル）に保存しておき，再度160℃で一晩乾燥させたらP.G.F.では21.4 mg，B.G.F.では13.3 mg減少した．これは粉塵は水を4.4%，B.G.F.は水を0.3%吸着したことになる．この結果は，粉塵の方が沪紙よりもはるかに水を吸着しやすいことを示した．

このトルエンの光酸化促進作用が水によるものと考えるならば，沪紙に吸着された水が添加されたNO_2と不均一反応を沪紙上あるいは反応容器表面で起し，光分解されやすい亜硝酸及び硝酸を生成し，さらにそれらがOHを生成してトルエンの分解を速くするものと考える．

反応式は以下の様になる．

$$H_2O\ (P.G.F.) \rightarrow H_2O$$

$$H_2O + 2NO_2 \rightarrow HONO_2 + HONO\ (het)$$

$$NO + NO_2 + H_2O \rightarrow 2HONO\qquad (het)$$

$$HONO + h\nu\ (<4000) \rightarrow OH + NO\quad 1.2\times10^{-1}/min$$

$$HONO_2 + h\nu\ (<3400) \rightarrow OH + NO_2\quad 2.1\times10^{-4}/min$$

$$\phi\text{-}CH_3 + OH \rightarrow \phi\text{-}CH_2 + H_2O$$

$$\phi\text{-}CH_2 + O_2 \rightarrow \phi\text{-}CH_2OO$$

$$\phi\text{-}CH_2OO + NO \rightarrow \phi\text{-}CH_2O + NO_2$$

$$\phi\text{-}CH_2O + O_2 \rightarrow \phi\text{-}CHO + HO_2$$

今後この不均一反応が沪紙により，あるいは吸着された捕集粒子によりどの程度影響を受けるかを明らかにする必要があるだろう．

文　献

1) Ibusuki, T.: *Chemistry Letters*, 913, 1979

2) Hoshino, M., Akimoto, H. and Okuda, M.: *Bulletin of the Chemical of Japan*, **51**, 718, 1978

3) Akimoto, H., Hoshino, M., Inoue, G. and Okuda, M.: *Bulletin of the Chemical Society of Japan*,, **51**, 2496, 1978

4) Katou, T. and Hanai, Y.: 医用マス研究会講演集 **4**, 131, 1979

5) Ohta, T. and Mizoguchi, I.: *Environmental Science and Technology*, **15**, 1229, 1981

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 221-223, 1983

一酸化炭素の塩素原子による触媒酸化反応

太田与洋*, 溝口 勲*

Chlorine Catalytic Oxidation of CO in the Gas Phase

TOMOHIRO OHTA* and ISAO MIZOGUCHI*

The mechanism of the title reaction is determined under steady state conditions by the irradiation of the mixtures of Cl_2, CO, O_2 and N_2 at 300 K with black blue fluorescence lamps using infrared spectroscopy. The pressure dependence of the ratio of formation rate of carbon dioxide to that of phosgene and other results indicated that the oxidation of CO proceeded via intermediates ClCO and ClC (O) O_2 as the termolecular process rather than the bimolecular oxidation by ClOO and/or ClO. The role of this reaction in the stratosphere is discussed and assumed to be of small significance.

Keywords : oxidation, chlorine, carbon monoxide, carbon dioxide

緒　言

大気中に二酸化炭素（CO_2）が蓄積されてくると，地熱幅射を吸収することにより地球の温度を上昇させ，人間環境・生態系に少なからず影響を与えるだろうと指摘されている[1]．この現象はグリーン・ハウス効果（温室効果）と呼ばれていて大気環境科学上の関心事のひとつとなっている．

焼燃・呼吸等による CO_2 の直接的な大気への放出の他に，大気化学的に大気中に存在する一酸化炭素（CO）の酸化反応もおこっていると考えられている．代表的なものに，OH ラジカルによる酸化反応がある[2]．しかし，成層圏でハロカーボン類が光分解を受け塩素原子（Cl）が解離されるが，この Cl が触媒的に CO を酸化する可能性があり，これに検討を加えておく必要がある．古くから，塩素分子（Cl_2）と CO と酸素を混合し，Cl_2 が吸収する波長の紫外光を照射すると，CO_2 への転換がおこることが知られている[3,4]．しかし，その反応機構は確立しておらず，従って，大気環境でどの程度の貢献をするかは推定することができない．可能な機構として次の2つが考えられている．Prinn[5] により反応(1)あるいは(2)が提案されているが，速度定数に関する報告はない．反応(3)は Spence ら[6] により提案されている．

$$ClOO + CO \rightarrow ClO + CO_2 \quad (1)$$

$$ClO + CO \rightarrow Cl + CO_2 \quad (2)$$

$$Cl + CO \rightarrow ClCO \xrightarrow[O_2]{} ClC(O)O_2 \rightarrow ClCO_2 \rightarrow Cl + CO_2 \quad (3)$$

ここでは，このいずれの機構で CO_2 が生成するのか明らかにし，実際の成層圏で，この反応の持つ意味を評価したい．

実　験

塩素ガス(藤本酸素)はイソペンタン－液体窒素スラッシュ（－160℃）のトラップを通し，凝縮物を精製して用いた．高純度の CO，O_2 と N_2 はさらに精製することなく用いた．実験装置は前述のものを用いた[7]．10 cm の光路長のパイレックス製の石英セルに Cl_2 と CO と O_2 と N_2 を混合し20 watt の BLB ランプで照射した．2つの生成物 CO_2 とホスゲン（$COCl_2$）の赤外吸収を記録し濃度を求めた．2つの生成物はともに照射50秒程度まで直線的に増加を示したので，30秒以下の照射後に生成量を測定した．

結果と考察

CO と Cl_2 と O_2 を 360 nm で照射すると一部は $COCl_2$ になり他の CO は CO_2 に酸化される．3種の反応物を全圧755 torr のもとで，一化合物ごとに濃度を変えた結果を図1～図3に示している．図1では，CO_2 と $COCl_2$ の生成比は，Cl_2 と O_2 の初期濃度を10 torr に固定しておくと，CO 濃度に依存しないことがわかる．図2では，Cl_2 と CO をそれぞれ10 torr に固定しておく

* 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

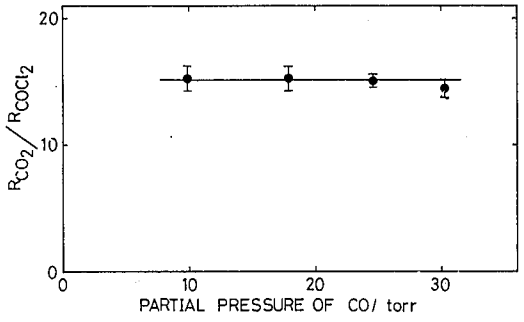


Fig.1. The function, R_{CO_2}/R_{COCl_2}, vs. partial pressure of CO in the photolysis of $Cl_2/CO/O_2/N_2$; $[Cl_2]_0=[O_2]_0=10$ and [total pressure]$_0$=755 torr.

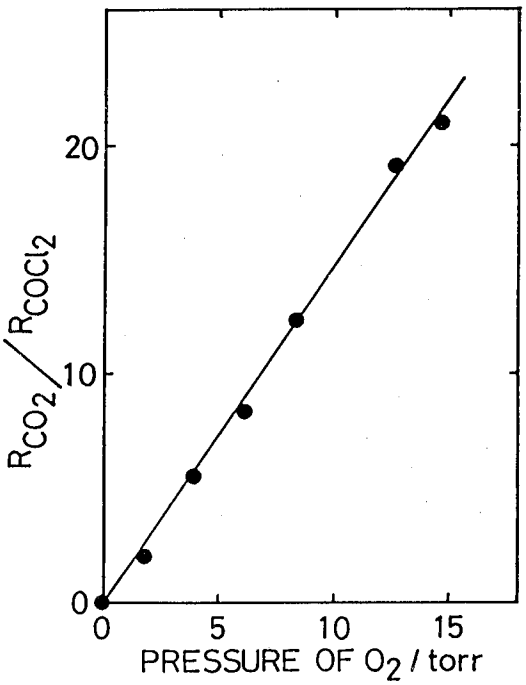


Fig.2. The function, R_{CO_2}/R_{COCl_2} vs. partial pressure of O_2 in the photolysis of $Cl_2/CO/O_2/N_2$; $[Cl_2]_0=[CO]_0=10$ and [total pressure]$_0$=755 torr.

と，O_2 の分圧が増すに従って，CO_2 と $COCl_2$ の生成比が増すことを示している．図3では，CO と O_2 を10 torr に固定しておけば，$COCl_2$ と CO_2 の生成量比は Cl_2 に比例していることを示している．従って，CO_2 と $COCl_2$ の生成速度比は次の式(4)で表わされる．

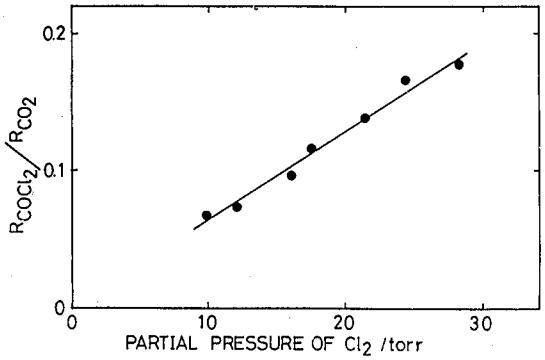


Fig.3. The function, R_{COCl_2}/R_{CO_2} vs. partial pressure of Cl_2 in the photolysis of $Cl_2/CO/O_2/N_2$; $[CO]_0=[O_2]_0=10$ and [total pressure]$_0$=755 torr.

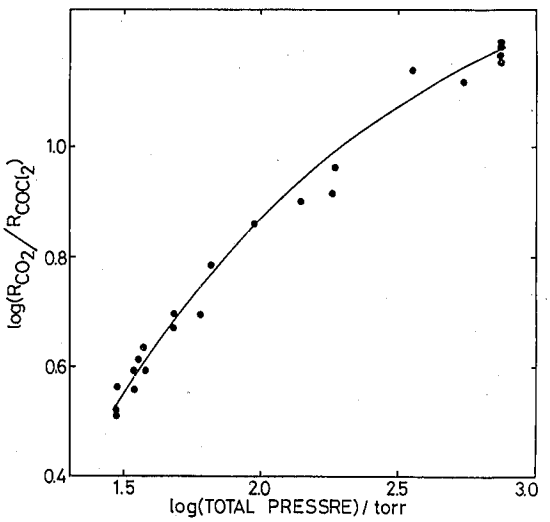


Fig.4. Pressure dependence of the function, R_{CO_2}/R_{COCl_2} in the photolysis of $Cl_2/CO/O_2/N_2$; $[Cl_2]_0=[O_2]_0=[CO]_0=10$ torr.

$$\frac{[CO_2]}{[COCl_2]}=A\frac{[O_2]_0}{[Cl_2]_0} \qquad (4)$$

ここでAは比例定数である．

図4に，Cl_2，O_2，CO をそれぞれ10 torr に固定し，添加する N_2 の量を変化させ全圧をかえた場合の CO_2 と $COCl_2$ の生成比の変化を示している．これを，横軸に全圧の逆数，縦軸に $COCl_2$ と CO_2 の生成速度比にとって，プロットをしなおすと図5の様になる．これか

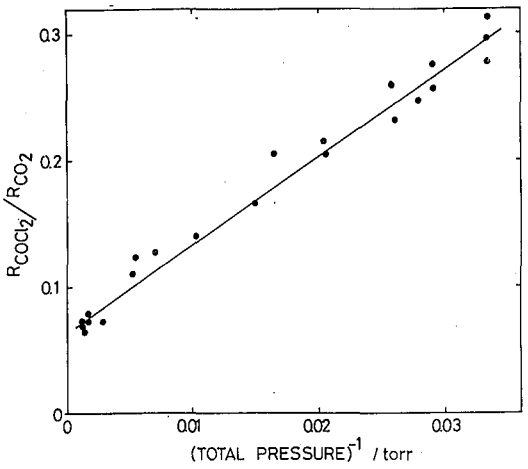


Fig. 5. The function, R_{COCl_2}/R_{CO_2} vs. inverse of total pressure in the photolysis of $Cl_2/CO/O_2/N_2$; $[Cl_2]_0 = [CO]_0 = [O_2]_0 =$ 10 torr.

ら，CO_2 と $COCl_2$ の生成比は全圧に依存していることがわかる．CO と Cl_2 から $COCl_2$ が生成する機構はこの圧力範囲では全圧に依存しない反応(5)によることがわかっている[8] ので測定された圧依存性は，CO_2 の生成機構にあると考えられる．この現象は典型的な3分子反応にみられるもので，スキーム(3)に基づく反応(6)～(8)の可能性を示唆している．

$$ClCO + Cl_2 \rightarrow COCl_2 + Cl \quad (5)$$

$$ClCO + O_2 + M \rightarrow ClC(O)O_2 + M \quad (6)$$

$$ClC(O)O_2 + ClC(O)O_2 \rightarrow 2ClCO_2 + O_2 \quad (7)$$

$$ClCO_2 \rightarrow Cl + CO_2 \quad (8)$$

また，励起中間体を考えたリンデマン機構を用いた解析結果[9] も3分子反応を支持している．そして式(5)～(8)は式(4)から得られた結果と矛盾しない．すなわち CO_2 と $COCl_2$ の生成量比は CO 濃度に依存せず，O_2 が多くなれば CO_2 が増加し，Cl_2 が多くなれば $COCl_2$ が増加する．図5にもとづいた解析結果[9] から全圧755 torr のとき，$k_5/k_6 = 55.6$torr になる．また定常状態近似をすれば，式(9)を得，図2から $k_5/k_6 = 51.0$torr，図3から，$k_5/k_6 = 48.7$ torr となる．この様に，3つの独立した反応系から得られた k_5/k_6 値が近いことはここで考えられた分子反応(3)が正しいことを示唆している．

$$\frac{R_{CO_2}}{R_{COCl_2}} = \frac{k_9[M]}{k_8[Cl_2]}[O_2] \quad (9)$$

成層圏でハロカーボンから光解離された Cl の主たる反応はオゾン層破壊の主因とされている反応(10)である[10].

$$Cl + O_3 \rightarrow ClO + O_2 \quad (10)$$

Cl と CO の低圧での結合速度定数は求められていないが，もし，$ClCO$ が生成しても，それが O_2 と反応して，励起 $ClC(O)O_2$ となり CO_2 生成の前駆体になるには，余剰のエネルギーを失活するだけの大気圧が必要になるが，その圧力が充分でないため，成層圏での Cl による CO の酸化反応は通常はおこらず，圧依存性が知られていない酸素のストリッピング反応が主として起こると考えられる．

文　献

1) Watanabe, S. and Wetherald, R. T.: *J. Atmos. Sci.* **24**, 241, 1967
2) Levey, H. II, *Science*, **173**, 141, 1971
3) Lenher, S. and Rollefson, G. K.: *J. Am. Chem. Soc.*, **52**, 500, 1930
4) Bodenstein, M., Lenher, S. and Wagner, C.: *Z. Physik. Chem.*, **B 3**, **459**, 1929
5) Prinn, P. G.: Physics and Chemistry of Upper Atmospher, ed. by McCormae, B. M., Radiel, Dordrechet, Holland, 1973
6) Spence, J. W., Edney, E. O. and Hanst, P. L.: *Chem. Phys. Lett.*, **56**, 478, 1978
7) Ohta, T. and Mizoguchi, I.: *Int. J. Chem. Kinet.*, **12**, 717, 1980
8) Burns, W. G., Darton, F. S.: *Trans. Farady Soc.*, **48**, 39, 1952
9) Ohta, T: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **56**, 869, 1983
10) Watson, R. T.: *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **6**, 871, 1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 224-236, 1983

NO_2 曝露ラットにおける酸性ムコ多糖類の生化学的及び組織化学的変化

鈴木孝人*, 寺田伸枝*, 佐藤　明**, 溝口　勲*

Biochemical and Histochemical Changes of Acid Mucopolysaccharide in Rats Exposed to NO_2

TAKAHITO SUZUKI*, NOBUE TERADA*, AKIRA SATO**
and ISAO MIZOGUCHI*

Rats were exposed to 8 ppm nitrogen dioxide (NO_2) for 1, 3, 7 and 14 days respectively. After sacrifice, the acid mucopolysaccharide (AMPS) content and the activity levels of AMPS metabolic enzymes, uridine diphosphate glucose dehydrogenase, hexose phosphate aminotransferase, hyaluronidase, β-glucuronidase and N-acetyl-β-D-glucosaminidase in the lung and liver were determined. The histochemical changes of the lung and alterations in the urinary AMPS excretion of rats caused by NO_2 were also examined.

The increase of AMPS content in the lung was observed during NO_2 exposure. On the other hand, the decrease of the content of the liver was observed at day 14 in NO_2 exposure group. Urinary AMPS excretion of rats exposed to NO_2 increased at days 1 and 3, and thereafter returned to the control level. All the enzyme activities were observed to elevate in the lung of rats exposed to NO_2 for 14 days. In the liver of rats exposed to NO_2 for 14 days, the activities of both hyaluronidase and N-acetyl-β-D-glucosaminidase were inhibited. The increase of alcian blue positive AMPS, which disappeared by *Streptomyces* hyaluronidase digestion, was found to be localized on the area between the basal membrance and connective tissue in the lung of rats exposed to NO_2 for 7 and 14 days respectively.

These results suggest that the increased AMPS in the lung of NO_2 exposure group may be hyaluronic acid, and that NO_2 disturbs AMPS metabolism of the liver.

Keywords : nitrogen dioxide, acid mucopolysaccharide, uridine diphosphate glucose dehydrogenase, hexose phosphate aminotransferase, hyaluronidase, β-glucuronidase, N-acetyl-β-D-glucosaminidase, rat, lung, liver

緒　言

結合組織は生体内に広範に分布し，線維芽細胞などの細胞成分と線維成分（コラーゲン，エラスチン）及びこれらをうめる無構造の基質，すなわち酸性ムコ多糖類（AMPS）などによって構成されている．AMPSの生理的役割は細胞外液の水及び電解質の調節，細菌感染に対する防禦，創傷治癒や肉芽形成への関与及びコラーゲンの生合成の調節などが知られている[1-3]．AMPSと疾病との係りは，動脈硬化症[4]，膠原病[5]，肉芽組織[6]，肝線維症[7-10]，肝硬変[11]，肺線維症[12,13]，珪肺症[14]，組織損傷後[15]などで，これらの発生時にはその部位の結合組織の異常増殖と共に，AMPS含量の増加，質的異常及び代謝異常が認められている．このことは実験的にも証明されていて，すなわち，実験的に発症させた線維症では組織内のコラーゲン形成に先行してAMPSが増加すること[16,17]，線維芽細胞の培養液中にAMPSの分解酵素であるhyaluronidaseを加えると細胞のコラーゲン線維の産生が抑制されること[18]，皮膚より抽出したコラーゲン溶液に微量のAMPSを添加すると線維が生成すること[19,20]などである．

二酸化窒素（NO_2）曝露と結合組織の関係で，肺においては電顕的，光顕的所見から，NO_2曝露をうけた肺組織に異常（肺胞壁肥厚[21,22]，肺線維症[23,24]，肺気腫[25-27]）が認められる．また，Drozdzら[28]による実験，すなわち，

* 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

モルモットに対して1.1ppmという比較的低濃度のNO_2曝露(8時間/日,180日間)の場合においても,肺のコラーゲン含量が減少し,形態学的にも肺気腫様変化が認められると報告されている.また,肺気腫患者では肺のhyaluronic acid (HA) 含量の減少[13,29,30]及びAMPSの代表的構成糖であるglucosamineとgalactosamineの比率変化[31]が生じ,更に,パパイン吸入によって作った肺気腫でもHA含量の減少が報告されている[32].また,肝臓においては,前報[33]でも報告したように肝中のAMPS代謝酵素への影響が認められる.更に,Kosmiderら[34,35]はモルモット及びラットにNO_2曝露(1 ppm NOx, 2 ppm NO_2, 180日間)の結果,尿中のAMPS含量の増加を報告している.肝臓が主要なAMPSの代謝臓器であるか否かは不明であるが,実験的肝臓障害時には肝臓のAMPS分解酵素の活性変動が認められること[36],肝臓疾患患者の尿中AMPS含量が増加する[37-39]などの報告から判断すると,肝臓中のAMPS含量及びその代謝酵素の活性変動が尿中AMPS含量と関連するのではないかと推測される.

このように,AMPSはコラーゲンの形成に重要な役割を持ち,肺気腫ではAMPSの組織変化が生じること,また,NO_2曝露によって肝臓中の酵素活性の変動及び尿中排泄量の変化も生じることを考えると,NO_2による結合組織の損傷やその治癒過程におけるAMPS代謝への影響を把握することは意義があると思える.そこで,本実験ではAMPSの合成,分解及び排泄に対するNO_2の影響を検討するために,NO_2曝露したラットの肺,肝臓,尿中含量の測定,また,肺及び肝臓のAMPS合成酵素であるuridine diphosphate glucose dehydrogenaseとhexose phosphate aminotransferase及びAMPSの分解酵素であるhyaluronidase, β-glucuronidase, N-acetyl-β-D-glucosaminidaseの活性変化を生化学的に分析し,更に,肺におけるAMPSの組織内分布,組成変化などに及ぼすNO_2の影響を組織化学的に検討した結果,肺ではAMPS代謝の亢進とその組成変化,肝臓ではAMPS代謝の抑制,更に,尿中AMPS排泄量の変化などを示す知見が得られたので報告する.

実験方法

(Ⅰ) 動物の曝露

動物は6週令のF344/DuCrjラット(日本チャールスリバー)を用い,NMF固形飼料(オリエンタル酵母社)を与え,水は自動給水器から自由摂取させた.動物を対照群とNO_2曝露群(8±0.5 ppm)に分け,温度23±1℃,湿度60±10%,換気毎時約20回,照明午前7時～午後7時に調整した曝露チャンバー(約59(W)×53(D)×40(H)cm, 約125 l, 夏目社製品)内で14日間の連続曝露を行った.NO_2濃度は窒素酸化物連続測定装置(Monitor Labs Model 8440)で測定した.

(Ⅱ) 肺及び肝臓中のAMPSの調製と分析

曝露終了後,ラットはネンブタール麻酔下で放血により屠殺した.摘出された肺と肝臓は図1に示す操作手順でAMPSの粗調製を行い,その試料を0.01 N水酸化ナトリウム溶液で溶解後,Galambos[40]のカルバゾール法でウロン酸の定量を行った.肺及び肝臓のAMPS含量は標準品として用いたグルクロン酸相当量の体重補正値として示した.

(Ⅲ) 尿中AMPS排泄量の分析

NO_2を1, 3, 7, 14日間曝露後にラットをガラス製代謝ケージ(杉山元医理器)に移し,採尿管に防腐剤として1滴のトルエンを添加してから,24時間の蓄尿を行った.採尿後,混入飼料を除くために軽く遠心して上清をとり,それを分析まで−20℃で凍結保存した.解凍後,Di-FerranteとRichの方法[41]を用いて尿中のAMPSを粗調製し,更に,Galambosの方法[40]によってウロン酸の定量を行った.尿中排泄量はグルクロン酸相当量を24時間尿あたりの体重補正値として示した.

(Ⅳ) 肺及び肝臓の酵素活性と蛋白含量の分析

摘出した肺と肝臓は0.05 Mトリス−塩酸緩衝液(pH 7.5)を9倍容加えてから,肺はUltra-Turrax型,肝臓はPotter-Elvehjem型のホモジナイザーを用いてホモジナイズ後,3460×g maxで20分間遠心し,その上清を検体として測定に供した.

uridine diphosphate glucose dehydrodenase 活性はStrominger らの方法[42]によって,基質のuridine diphosphate glucoseにNADを加えて反応させた.活性単位は生成したNADHの量(μ mole/min./g組織)で示した.

hexose phosphate aminotransferase活性はGhoshらの方法[43]に従いfructose-6-phosphateとL-glutamineを基質として反応させ,生成したglucosamine-6-phosphateをTsujiらの方法[44]によって比色定量した.活性単位は生成したglucosamine-6-phosphateの量(mg/min./g組織)で示した.

hyaluronidase活性はAronsonとDavidsonの方法[45]によってHAを基質として反応させ,遊離したN-acetylglucosamineをReissigらの方法[46]で比色定量した.活性単位は遊離したN-acetylglucosamineの量(μ mole/hr./g組織)で示した.

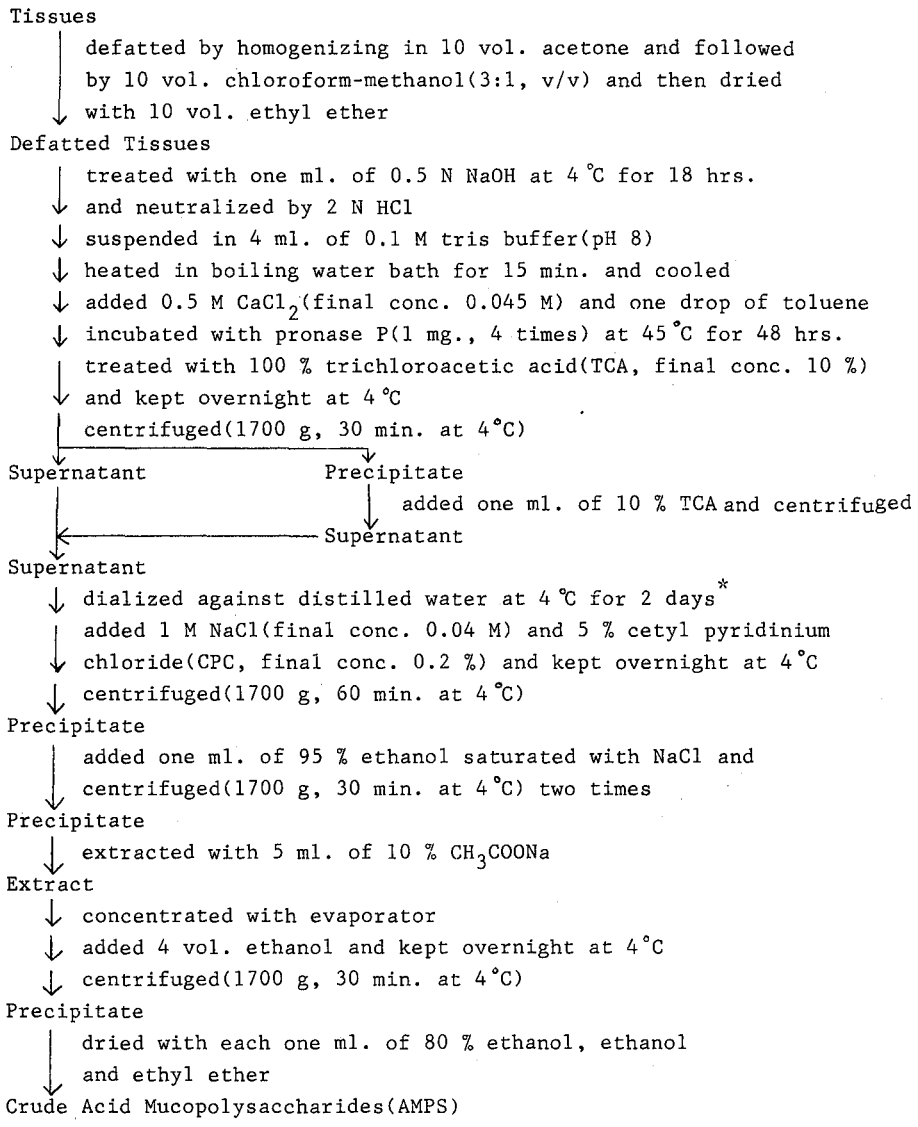


Fig.1. Preparation of Crude AMPS of Lung or Liver
* : Dialysis was conducted using cellulose tube acetylated by the method of ohkawa et al[73]

β-glucuronidase 活性は Kato らの方法[47] によって，p-nitrophenyl-β-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（μg/min./g 組織）で示した．

N-acetyl-β-D-glucosaminidase 活性は Woollen らの方法[48] によって p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-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 p-nitrophenol の量（μg/min./g 組織）で示した．

肺及び肝臓中の蛋白含量は Lowry らの方法[49] を用いた．

（V） 肺の AMPS の組織化学的検討

曝露後，ラットをネンブタール麻酔下で開胸し，気管支から 1 % cetyl pyridinium chloride（C P C）を含む 10% ホルマリン緩衝液を20 cm 水柱圧で注入後，24時間の固定をした．肺の各葉から試料を採取し，常法に従っ

て，脱水，包埋，薄切を行った．光顕観察のため，hematoxylin-eosin（HE）染色を用い，コラーゲンを染色するために Azan-Mallory（AM）染色を用い[50]，更に，AMPS の染色には alcian blue（AB）染色を用いた[51]．また，標本中の HA を選択的に消化するために，Zugibe の方法[52] に準じて hyaluronidase 消化を行った．すなわち，肺の組織標本を *Streptomyces* hyaluronidase（200 TRU/m*l*.）を含む0.1 M 塩化ナトリウム－0.02 M 酢酸緩衝液（pH 5.0）中で，37℃，15時間消化し，水洗後，1％ AB－3％酢酸溶液（pH 2.5）で染色を行って観察した．また，硫酸多糖類の染色のために pH 1.0 の AB 染色も行った．

結　　果

（I） 体重変化と組織中及び尿中の AMPS 含量の変化

体重の経時的変化は図2に示すように，対照群に比べ NO_2 曝露群は7，14日目に7％の減少が認められた（$P<0.01$）．

肺の AMPS 含量の経時的変化は図3に示した．NO_2 曝露群では対照群に比較して1日目に10％（$P<0.05$），3日目に12％（$P<0.10$），7日目に14％（$P<0.05$），14日目に27％（$P<0.01$）の増加及び増加傾向が認められた．

肝臓の AMPS 含量の分析は14日目の試料の分析のみ実施したが，図4に示すように，NO_2 曝露群では33％（$P<0.01$）もの減少が生じた．

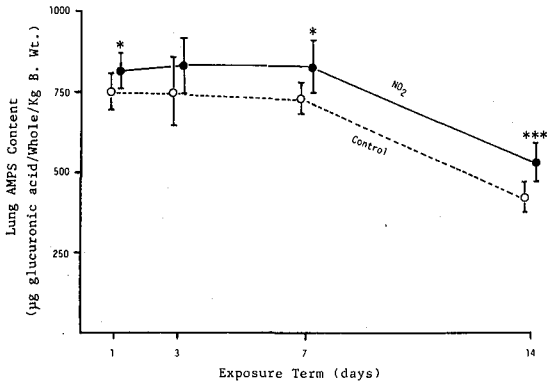


Fig.3. Changes of Lung AMPS Contents of Rats Exposed to NO_2
Each graph point shows means ± S.D. (n =10) .
*: $P<0.05$, ***: $P<0.01$

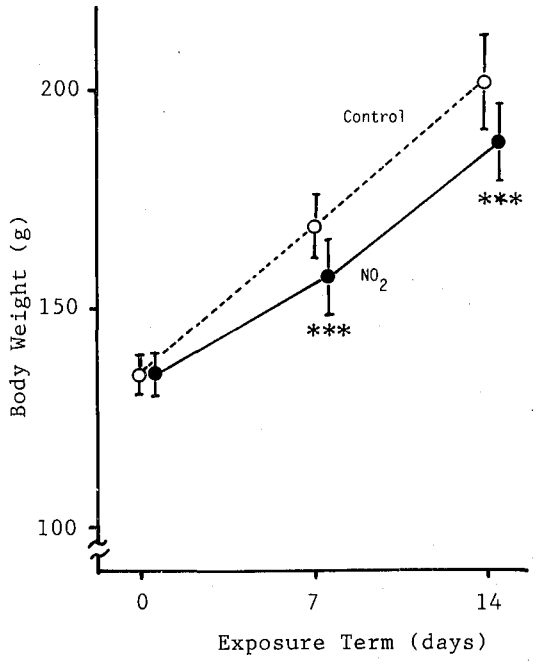


Fig.2. Changes of Body Weight of Rats Exposed to NO_2
Each graph point shows means ± S.D. (n = 20).
***: $P<0.01$

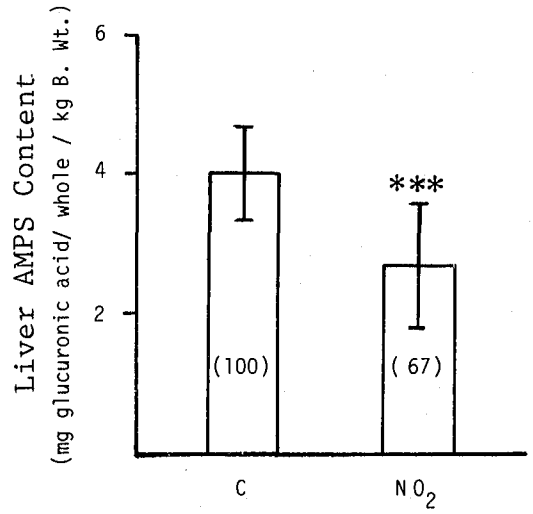


Fig.4. Changes of Liver AMPS Contents of Rats Exposed to NO_2 for 14 days
The indicated results are means ± S.D. (n =10) , and values in parentheses are percentage of control values.
***: $P<0.01$, C: Control

尿中へのAMPS排泄量はNO_2曝露群では対照群と比較して，1日目に29%（$P<0.01$），3日目に65%（$P<0.01$），7日目に14%（$P<0.10$）の増加及び増加傾向が認められたが，14日目には対照レベルに戻った（図5）.

（Ⅱ） 肺及び肝臓中の酵素活性の変化

肺と肝臓の酵素活性と蛋白含量は14日目の試料のみ分析を実施したが，肺の体重比湿重量は対照群に比べ，18%の増加，蛋白含量は24%の増加が認められたが（$P<0.01$），肝臓では体重比湿重量と蛋白含量には有意な差は認められなかった（図6）. また，各酵素活性の変化は，肺では図7に示すように，NO_2曝露群では対照群に比べて，AMPS合成系のhexose phosohate aminotransferaseは5%（$P<0.05$），uridine diphosphate glucose dehydrogenaseは18%（$P<0.02$）の活性上昇が認められ，更に，AMPS分解系のhyaluronidaseは28%（$P<0.01$），β-glucuronidaseは24%（$P<0.01$），N-acetyl-β-D-glucosaminidaseは15%（$P<0.01$）の活性上昇が生じた．しかし，肝臓では逆にhyaluronidaseが14%（$P<0.05$），N-acetyl-β-D-glucosaminidaseが15%（$P<0.01$）の活性低下がNO_2曝露群で認められ，その他の酵素では有意な変化は認められなかった（図8）.

（Ⅲ） 肺の組織化学的変化

NO_2の1と3日間曝露後のラットの肺のAMPSはAB染色の結果，結合組織におけるAMPSの存在部位及びその量は対照群と差は認められなかった．しかし，7日目の標本ではHA，シアロ粘液にのみ陽性を示すが，硫酸多糖類はほとんど染色されないpH 2.5のAB溶液で染まる物質が気管支上皮細胞下にある基底膜から結合組織にかけて増加していた（図9，10）. 更に，この7日目の標本にhyaluronidase消化試験を行ったところ，基底膜から結合組織にかけて増加していた物質はかなり消失した（図11）. また，硫酸多糖類のみ陽性を示すpH 1.0のAB染色しても，7日目の標本は基底膜と結合組織間では余り検出されなかった（図12）. 14日目ではpH 2.5のAB溶液で陽性に染色される物質は7日目の所見に比べて，基底膜から結合組織にかけて広汎にひろがるが，染色性の濃い部分と淡い部分が混在しており，染色性はむしろ低下した感を与える（図13）. 更に，コラーゲンの染色を行った結果，曝露後3日目では肺胞道壁及びその附近の肺胞壁に単核の大型の細胞が増加しており，その周囲に青染された線維が目立ちはじめ，7日目では上記の線維成分は太さ，長さ，量が増加して明確に

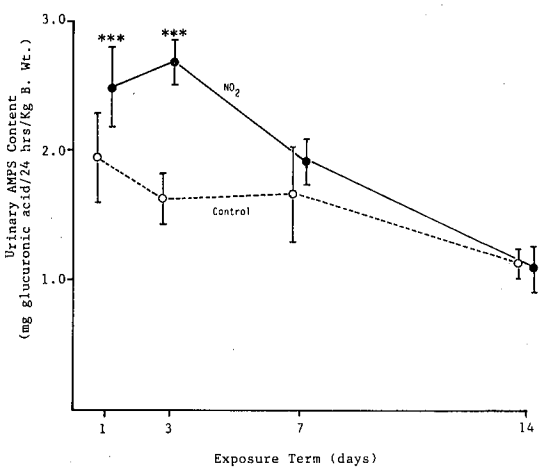


Fig. 5. Changes of Urinary AMPS Contents of Rats Exposed to NO_2
Each graph point shows means ± S.D. ($n=10$).
***: $P<0.01$

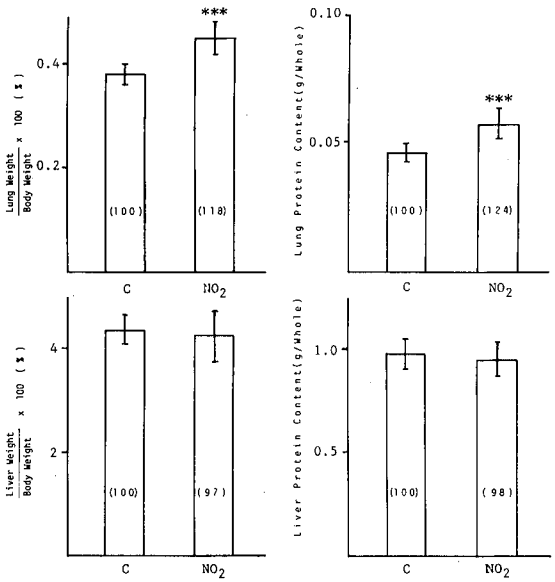


Fig. 6. Changes of Percent Values of Lung or Liver Weights to Each Body Weight and These Protein Contents on Rats Exposed to NO_2 for 14 Days
All results indicated are means ± S.D. ($n=10$), and values in parentheses are percentage of control values.
***: $P<0.01$

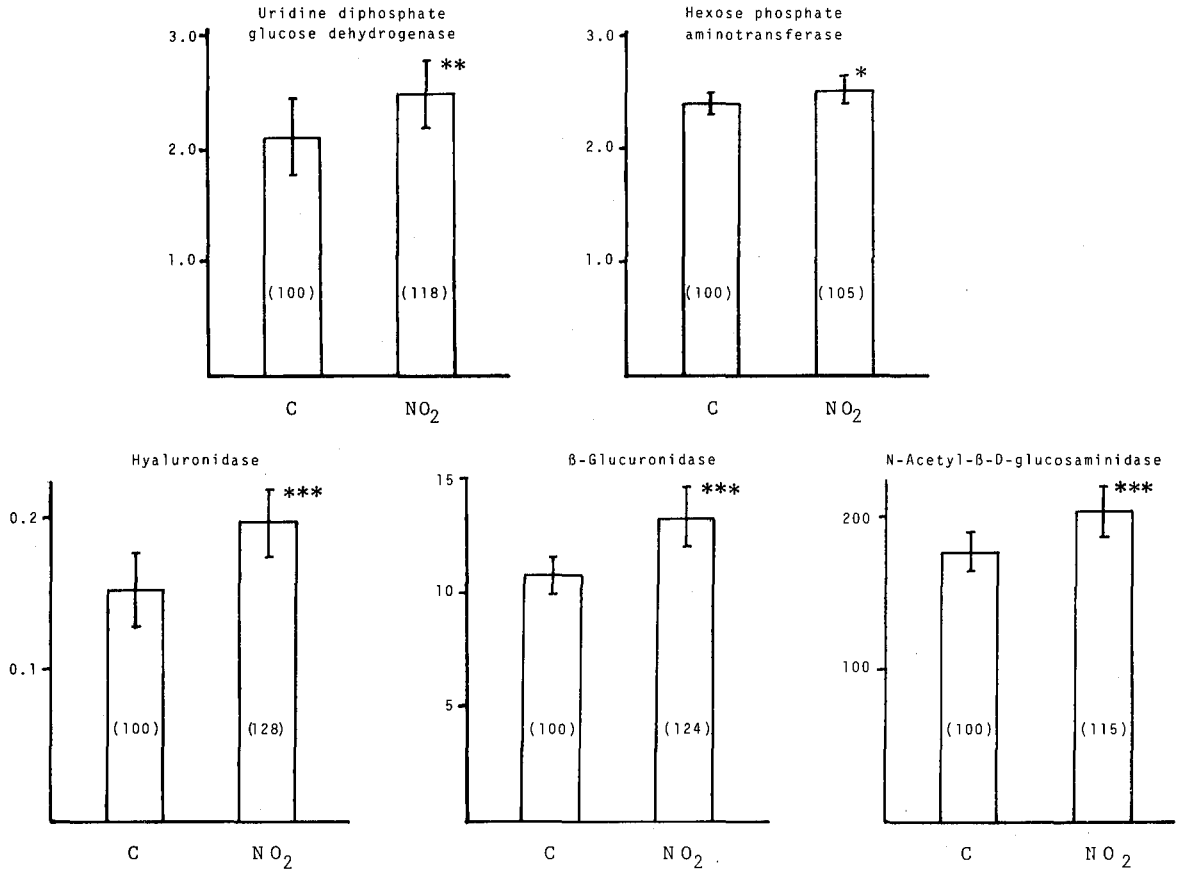


Fig.7. Changes of Various Enzyme Activities per g of Lung on Rats Exposed to NO_2 for 14 Days
All results indicated are means ± S.D. (n =10), and the activity units of these enzymes are indicated in the Text, and then values in parentheses are percentage of control values. *: P<0.05, **: P<0.02, ***: P<0.01

なり，14日目では単核の大型細胞の増加は7日目より減少傾向があるが，線維成分は7日目の所見と同様に明確であった（図14～16）.

考　察

肺における生化学的方法による分析結果及び組織化学的所見から，8 ppm の NO_2 曝露によって肺の AMPS 含量が増加することが分った．また，HA のみを分解する *Streptomyces* hyaluronidase 消化をすると，増加していた AB 染色陽性物質の減少が認められたことから判断すると，この物質は HA である可能性が強い．また，コラーゲン線維が好染する AM 染色によっても肺胞壁に青く染まった線維成分の増加が認められたことからコラーゲンの増殖も示唆された．一方，石川[53]によって，9.5 ppm NO_2 を2週間（16時間/日）曝露したラットにおける肺コラーゲン含量の増加の報告，更に，Freeman ら[54,55]によって，10～25 ppm NO_2 曝露ラットでの肺胞壁や肺胞上皮細胞の肥大，肺胞間質でのコラーゲンやエラスチンの増加の報告とも考え合わせると，このような高濃度の NO_2 曝露の場合には，肺において炎症等が生じ，更に，その修復過程でコラーゲン，エラスチン及び AMPS の生合成が亢進したために肺の結合組織の増殖が認められたものと思われる．本実験でも，この結合組織の増殖の過程の中で肺重量，肺蛋白含量の増加と AMPS の合成系酵素の活性化が生じ，また，このような生合成の亢進に伴って AMPS の分解系酵素も活性上昇が生じたものと推測される．また，AMPS が pros-

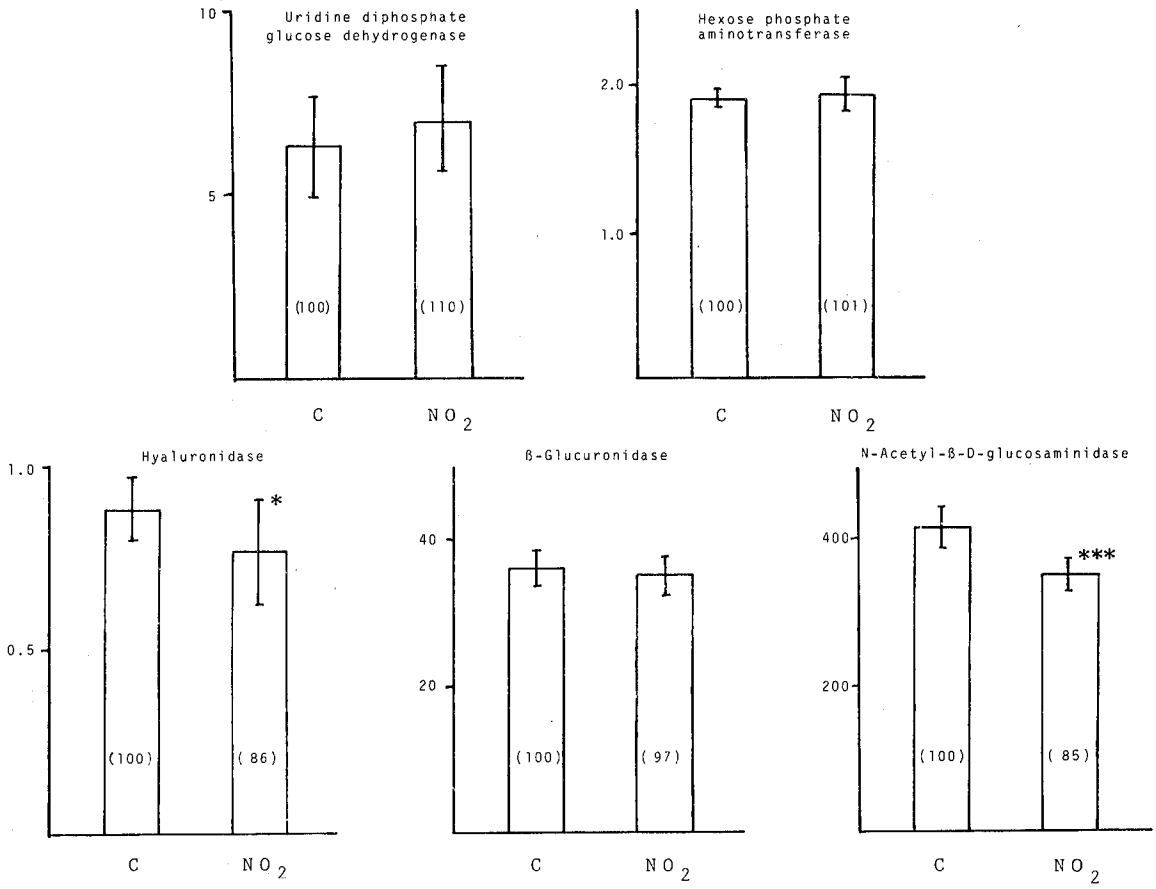


Fig.8. Changes of Various Enzyme Activities per g of Liver on Rats Exposed to NO_2 for 14 Days
All results indicated are means ± S.D. (n = 10), and the activity units of these enzymes are indicated in the Text, and then values in parentheses are percentage of control values. *: $P<0.05$, ***: $P<0.01$

taglandin (PG) や cyclic–AMP (c–AMP) によって合成能が亢進すること，すなわち，in vitro の実験ではあるがラットの培養線維芽細胞を $PGF_{2\alpha}$ で処理するとヘキソサミン及び HA の合成促進すること[56]，また，c–AMP で処理すると HA 合成酵素の活性を増強し，HA 合成を高めること[57,58] が報告されている．一方，O_3，O_2，ionizing radiation，free radical，NO_2 などによって，PG や c–AMP の肺における変動が生じること[59-65] も知られているので，肺の AMPS 含量の増加をもたらす素因の一つとして，PG や c–AMP の関与の可能性も考えられる．

NO_x が第一次標的臓器である肺以外にも影響を及ぼすことは，Goldstein ら[66] や Yoshida ら[67] の実験によって確認されている．すなわち，$^{15}NO_2$ や ^{15}NO を吸入させると，肺を経て高濃度に血液中に吸収され，各種の臓器を循環し，最後には NO_3^-，NO_2^- として尿中に排泄される．この実験結果は NO_2^- 又は NO_3^- が肝臓に対しても直接的な作用を及ぼすことを示唆している．本実験においても，NO_2^- 又は NO_3^- が肝臓に直接的に作用し肝臓の AMPS 含量の低下，AMPS 分解酵素の低下を生じさせた可能性も考えられる．また，AMPS 合成酵素である uridine diphosphate glucose dehydrogenase は SH 酵素であるので[68]，NO_2^- 又は NO_3^- の直接作用と考えた場合にはこの酵素は恐らくこれらによって失活し易いと考えられる．しかし，本実験ではこの酵素の活性阻害は認められなかったので，NO_2^- 又は NO_3^- によ

るAMPSの合成阻害とは判断しがたいと思われる．一方，Tusl ら[69] による NO_2 曝露ラットの血漿中の副腎皮質ホルモンの増加の報告と副腎皮質ホルモン投与によるコンドロイチン硫酸やヘキソサミン合成の抑制の報告[10,70,71] を合わせて考えると，高濃度の NO_2 曝露によって生じたストレスによるホルモン系の変化などを介した作用も考慮する必要があると思える．また，肝臓におけるAMPS分解酵素の活性低下は，恐らく肝臓のAMPS含量の減少と関連したものと推測される．

尿中のAMPS排泄量の曝露初期の一過性の増加は肺におけるAMPSの合成及び分解の活発化によって生じたとも考えられるが，肺のAMPS含量は，7，14日目でも対照群より高値に保たれているにもかかわらず，尿中排泄量には差が認められないことから速断は出来ない．しかし，笠原ら[72] の実験結果では，8 ppm NO_2 曝露ラットのコラーゲン代謝産物であるハイドロキシプロリンの尿中排泄量の変化は同じく3日目まで増加が認められ，24日目には対照レベルに戻るという報告から考えると，高濃度の NO_2 曝露では曝露初期において結合組織の崩壊が生じて尿中排泄量の増加をもたらすが，その修復過程では結合組織の分解は弱まるために尿中への排泄量の一過性の増加という変化としてあらわれたとも考えられる．また，NO_2 曝露によるAMPSの尿中排泄量の変化は肺だけでなく，肝臓などの他の組織の代謝変化などを合わせた結果としてあらわれると考えられるので，肝臓のAMPS含量の1，3，7日目の分析結果を待って判断したい．

今回の高濃度の NO_2 曝露実験によって，肺のAMPS代謝は活発化するが，肝臓では逆に抑制され，尿のAMPS排泄は一過性の増加を示す結果が得られた．今後は，NO_2 曝露によるAMPSの組織変化を把握するために，AMPSの分画定量を行い，組織化学的にはchondroitinaseなどによる酵素消化法を用いて分析し，この組成変化がどのように肺疾患と関連するのかを解明したい．

（本研究は昭和57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) 畑　隆一郎，永井　裕：代謝，9，858，1972
2) Dorfman, A.: *Pediatrics*, 22, 576, 1958
3) Slavkin, H.C. and Grewich, R.C.: *Extracellular Matrix Influences on Gene Expression*, Academic Press, New York (1975)
4) Willens, S.L.: *Am.J.Path.*, 27, 825, 1951
5) Bien, E.J., Ziff, M. and Bunium, J.J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 76, 649, 1951
6) 鈴木晟幹，渡辺洋望，増田　茂他：結合組織，7，241，1975
7) Lupu, N.G., Velican, C. and Velican, D.: *Acta Histochem.*, 14, 9, 1962
8) Singer, E.J., Hutterer, F., Kent, G. et al.: *A.M.A. Archiv. Pathol.*, 68, 113, 1959
9) 志水洋二：阪大医誌，10，2239，1957
10) 高橋忠雄，藤沢　洌，河村真人他：最新医学，16，1793，1961
11) 武田真知子，岡　淳子，村田克己：結合組織，10，238，1978
12) 荒井秀夫，永井宏美，横沢厚信他：結合組織，7，208，1975
13) 今野　淳：結合組織，9，92，1978
14) 久保木芳徳，山内三男，阿曽紀久子他：結合組織，10，217，1978
15) Dunphy, J.E. and Udupa, K.N.: *New England J.Med.*, 253, 847, 1955
16) 中村允人：肝臓，10，275，1969
17) Koizumi, T., Nakamura, N., and Abe, H.: *Biochim. Biophys. Acta*, 148, 749, 1967
18) Mancini, R.E., and DeLustig, E.S.: *Rev. Scargent. Biol.*, 26, 227, 1950
19) Keech, M.K.: *J.Biophys. Biochem. Cytol.*, 9, 193, 1961
20) 高松久雄，石川英一：結合組織，10，239，1978
21) Stephens, R.J., Freeman, G. and Evans, M.L.: *Arch. Intern. Med.*, 127, 873, 1971
22) 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
23) Hattori, S. and Takemura, K.: *J.Clin. Electron Microscopy*, 6, 350, 1973
24) Hine, C.H., Meyers, F.H., and Wright, R.W.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 16, 201, 1970
25) Blair, W.H., Henry, M.C. and Ehrlich, R.: *Arch. Environ. Health*, 18, 186, 1969
26) Freeman, G., Johos, L.T., Furiosi, N.J. et al.: *Arch. Environ. Health*, 29, 203, 1974
27) Gross. P., de Treville, R.T.P., Babyak, M.A. et al.: *Arch. Environ. Health*, 16, 51, 1968
28) Drozdz. M., Kucharz, E. and Szyja. J: *Environ.*

Res., 13, 369, 1977
29) Kanno, K., Arai, H., Motomiya, M. et al. : *Amer. Rev. Respir.Dis.*, 126, 797, 1982
30) 永井宏美，石川忠夫，荒井秀夫他：結合組織，10，216，1978
31) Saltzman, H.A., Schauble, M.K. and Sieker, H.O : *J.Lab. Clin. Med.*, 58, 115, 1961
32) 今野　淳，本宮雅吉，大泉耕太郎他：結合組織，11，137，1979
33) 鈴木孝人，嵯峨裕一，溝口　勲：東京衛研年報，33，331，1982
34) Kosmider, S., Luciak, M., Zajusz, K. et al. : *Patol. Polska*, 24, 107, 1973
35) Kosmider, S. : *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 50, 417, 1973
36) 岡崎　勲：肝臓，13，138，1972
37) 和田龍七：阪大医誌，11，2177，1959
38) 満谷夏樹：阪大医誌，16，281，1964
39) Kawata, H., Koizumi, T., Wada,R. et al. : *Gastroent.*, 40, 507, 1961
40) Galambos, J.T. : *Anal. Biochem.*, 19, 119, 1967
41) Di−Ferrante, N. and Rich, C. : *J.Lab. Clin. Med.*, 48, 491, 1956
42) Strominger, J.L., Maxwel, E.S. Axelrod, J. et al. : *J.Biol. Chem.*, 224, 79, 1957
43) Ghosh, S., Blumenthal, H.J. Davidson. E. et al. : *J.Biol. Chem.*, 235, 1265, 1960
44) Tsuji, A., Kinoshita, T. and Hoshino, M. : *Chem. Pharm. Bull.*, 17, 1505, 1969
45) Aronson, N.V. and Davidson, E.A. : *J.Biol. Chem.*, 243, 4494, 1968
46) Reissig, J.L. Strominger, J.L. and Leloir, L.F. : *J.Biol. Chem.*, 217, 959, 1955
47) Kato, K., Yoshida, K., Tsukamoto, H. et al. : *Chem. Pharmac. Bull.*, 8 , 239, 1960
48) Woolen, J.W., Heyworth, R. and Walker. P.G. : *Biochem. J.*, 78, 111, 1961
49) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. et al : *J. Biol. Chem.*, 193, 265,1951
50) 三友善夫，高山昇二郎：臨床検査講座12，病理学，第2版，P235，医歯薬出版，東京
51) Zugibe, F.T., Brown, K.D. and Last. J.H. : *J.Histochem. Cytochem.*, 7 , 101, 1959
52) Zugibe, F.T. : *J. Histochem. Cytochem.*, 10, 441, 1962
53) 石川隆章：東京衛研年報，33，347，1982
54) Freeman, G., Grane, S.C., Stephens, R.J. et al. : *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 98, 429, 1968
55) Freeman, G., Grane, S.C. and Furiosi, N.J. : *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 100, 662, 1968
56) 室田誠逸，安部みどり：結合組織，10，69，1978
57) Koyama, H., Tomida, M. and Ono,T. : *J.Cell. Physiol.*, 87, 189, 1976
58) Tomida, M., Koyama, H. and Ono,T. : *Biochem. J.*, 162, 539, 1977
59) Giri, S.N., Hollinger,M.A., and Schiedt, M.J. : *Environ. Res.*, 21, 467, 1980
60) Parkes, D.G. and Eling. T.E. : *Biochem. J.*, 146, 549, 1975
61) Klein, L.S., Fisher, A.B., Soltoff, S. et al. : *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 118, 622, 1978
62) Rahimtula, A. and O'Brien, P.J. : *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, 70, 893, 1976
63) 小林隆弘，森田育男，室田誠逸：第22回大気汚染学会講演集，P394，1981
64) 小林隆弘，森田育男，室田誠逸：第22回大気汚染学会講演集，P386，1981
65) 三木直正，秋山万里子，小林隆弘他：第22回大気汚染学会講演集，P395，1981
66) Goldstein, E., Peek, N.F., Parks, N.J., et al. : *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 115, 403, 1977
67) Yoshida, K., Kasama, K., Kitabatake, M., et al. : *Int, Arch. Occup. Environ. Health*, 46, 71, 1980
68) Zalitis, J., Uram, M., Bowser, A.M. et al. : *Meth. Enzymol.*, 28**B**, 430, 1972
69) Tusl, M. : *Staub−Reinhalt*, 35, 210, 1975
70) Schiller, S. and Dorfman, A. : *Endocrinology*, 60, 376, 1957
71) 森　澄子，渡辺洋望，大高裕一：結合組織，4，75，1972
72) 笠原利英，大沢誠喜，鈴木孝人他：東京衛研年報，30，195，1979
73) Ohkawa, S., Hata, R., Nagai, Y., et al. : *J.Biochem.* 72, 1495, 1972

Explanation of figures

Fig. 9. Bronchial epithelium of control rat.
Little AMPS stained with pH 2.5 alcian blue was observed in the area between basal membrance and its surrounding. connective

tissue. (400 x)

Fig.10. Bronchial epithelium of rat exposed to 8 ppm NO_2 for 7 days.
AMPS in the area between basal membrance and its surrounding connective tissue was markedly stained with pH 2.5 alcian blue as compared with Fig. 9. (400 x)

Fig.11. Same sample shown in Fig. 10.
After *Streptomyces* hyaluronidase digestion, little AMPS was stained with pH 2.5 alcian blue as compared with Fig. 10. (400 x)

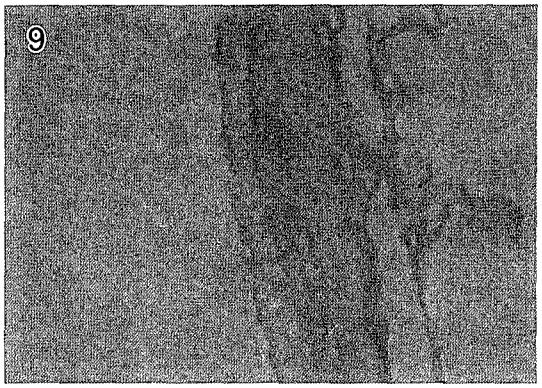
Fig.12. Same sample shown in Fig. 10.
Little AMPS stained with pH 1.0 alcian blue was detected as compared with Fig. 10. (400 x)

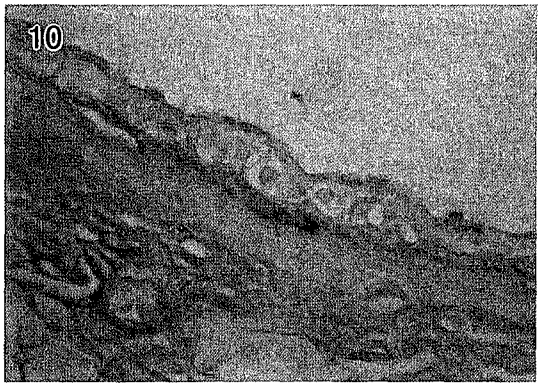
Fig.13. Bronchial epithelium of rat exposed to 8 ppm NO_2 for 14 days.
AMPS stained with pH 2.5 alcian blue was observed in the scattered area. (400 x)

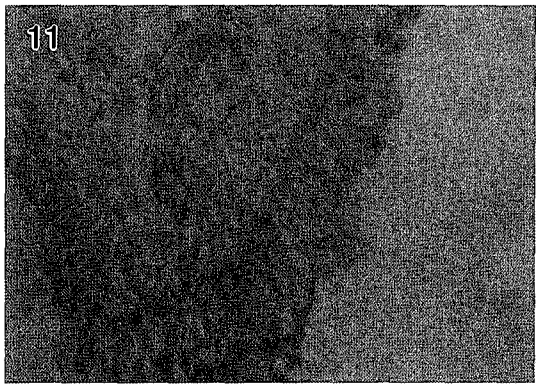
Fig.14. Walls of alveolar ducts and alveoli of control rat.
Little collagen fiber was stained with Azan–Mallory method. (400 x)

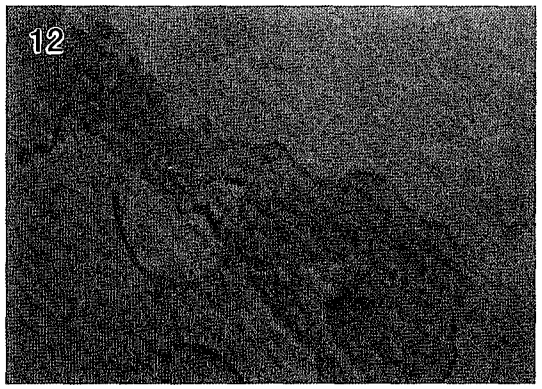
Fig.15. Walls of alveolar ducts and alveoli of rat exposed to 8 ppm NO_2 for 7 days.
Deposition of collagen fiber (blue color) was observed arround the increased mononuclear cells. (400 x)

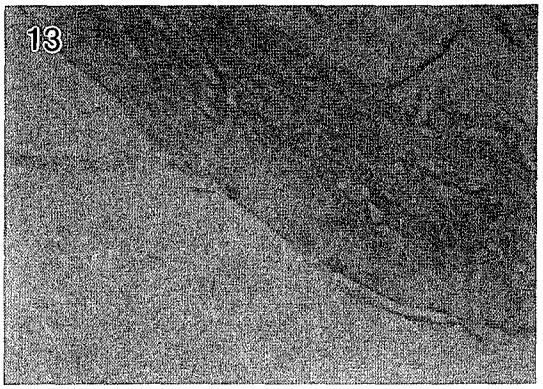
Fig.16. Walls of alveolar ducts and alveoli of rat exposed to 8 ppm NO_2 for 14 days.
Collagen fiber was obsered similarly as Fig. 15. (400 x)

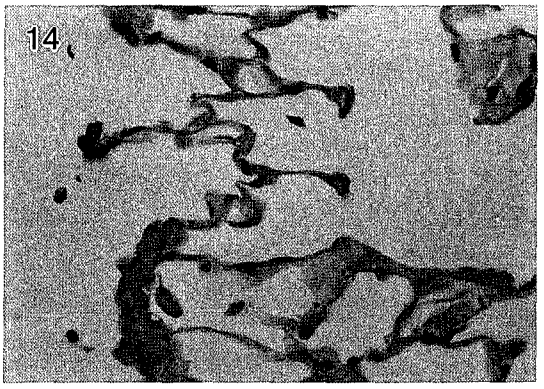

9


10


11


12


13


14

15

16

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 34, 237-246, 1983

NO_2とO_3および野外環境への交互曝露のラットの肺に及ぼす影響

寺田伸枝, 池田真悟, 福田雅夫,
大沢誠喜, 鈴木孝人, 溝口勲

Effects of sequentially Combined Exposure to NO_2–O_3 Mixed and Urban Ambient Air on Rats Lungs

NOBUE TERADA*, SHINGO IKEDA*, MASAO FUKUDA*, MASANOBU OHSAWA*,
TAKAHITO SUZUKI*, and ISAO MIZOGUCHI*

There are many pollutants in the atmosphere, and the biological importance of the individual pollutants is known only to a certain extent. In this report, we studied the biological effects of these pollutants in combination.

Rats were divided into four groups. The first group of rats was kept in a laboratory clean air unit, the second group in a laboratory clean air unit with 2 hrs exposure to the NO_2 + O_3 mixed air every day, the third in the urban ambient air, and the fourth in the same condition as the third group with 2 hrs exposure to the NO_2 + O_3 mixed air every day.

After 7 and 30 days, the lungs were examined pathologically and biochemically. Combined exposure group (urban air and NO_2 + O_3) showed most prominent changes : thickening of the walls of alveolar ducts and neighboring alveoli due to an increased number of mononuclear cells and the deposition of collagen fibers. The epithelia of the terminal airway were slightly hypertrophic. The number of Type 2 cells increased. The activities of glucose–6–phosphate dehydrogenase (G–6–PD) and NADH–diaphorase (NADH–D) increased, and alkaline phosphatase (ALP) and acid phosphatase (Ac–P) decreased.

It was suggested that some unknown pollutant or pollutants in urban air might enhance the toxicity of NO_2 and O_3 especially in the deep pulmonary tissues.

Keywords : combined exposure, urban ambient air, NO_2–O_3, rat, lung, pathologically, G–6–PD, NADH–D, ALP, Ac–P

緒　言

二酸化窒素（NO_2）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[1,2]，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と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_2の毒性に関する研究はほとんどなされていない．

著者ら[3]は，すでに低濃度領域におけるNO_2の短期および長期単独暴露実験を行い，NO_2によるラットの肺の病変は，気管支上皮細胞の肥大性変化，細胞浸潤を伴う肺胞道壁および肺胞道附近の肺胞壁の肥厚と細胞増加などが主要所見であり，これらの病変の強さの程度と暴露濃度の間に量・影響関係がみられること，また低濃度領域における病変の進行はごく緩徐であり，一旦病変が成立した後，次の段階に進むまでに，同程度の強さの病変がかなりの期間持続していることを報告した．また，NO_2と，NO_2と同様に主な大気汚染物質の1つであるオゾン（O_3）を複合した条件下に暴露されたラットの肺の病変には，NO_2およびO_3各々の単独暴露の場合と比べ，相加的作用が認められ，特に気管支・肺接合部に著しいことを報告した[4]．

本報告は，低濃度のNO_2とO_3による複合暴露に，さらに野外環境への暴露を組み合わせ，汚染成分の複合化による肺への影響について検討したものである．

* 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

方　法

Ⅰ．実験動物並びに暴露方法

5週令のF 344/DuCrj雄ラット（日本チャールス・リバー）を用い，(1)ヘパフィルター，活性炭槽を通じた室内空気に暴露した〔室内対照群），(2) NO_2 と O_3 による複合暴露を毎日行い，暴露時間外は室内対照群と同様に飼育した（NO_2 + O_3 +室内暴露群），(3)全実験期間中，当研究所内に設置した金網でおおわれた装置内で野外に飼育した（野外暴露群），(4) NO_2 と O_3 による複合暴露を毎日行い，暴露時間外は野外暴露群と同様に飼育した（NO_2 + O_3 +野外暴露群）の4群からなる暴露実験を行った（各群15匹）．動物は，全面がステンレスのケージに7～8匹づつ収容し，飼料は固型飼料（オリエンタル酵母 NMF）を，飲料水は水道水を自由に摂取させた．NO_2 と O_3 による複合暴露は，チャンバー内（内容積 0.125 m^3，換気回数15回/時）で行った．暴露した NO_2 濃度は，2.0 ppm，O_3 濃度は0.12 ppm，暴露時間は1日3時間（16：00～19：00）で，暴露実験期間は，昭和57年5月11日から6月9日までの30日間であった．チャンバー内の NO_2 と O_3 の濃度測定は，ケミルミネッセンス法により行った．野外暴露を行った当研究所の環境条件は，東京都環境保全局大気保全部によって測定されている大気汚染常時測定局測定結果を参考にした[5]．

Ⅱ．病理組織学的検索

実験開始後7，30日に各群から無作為に5匹を選び，ネンブタール腹腔内注射による深麻酔下で開胸し，気管支から2.5%氷冷グルタールアルデヒド固定液を20 cm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，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固定し，Epon包埋，薄切後，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，アザン・マロリー染色を行って観察した．

Ⅲ．生化学的検索

実験開始後30日に，1群5匹を用いて各々の肺に1/15モルリン酸緩衝液（pH 7.5）を10倍容加えて，Ultra-Turraxを用いてホモジナイズし，1700 xgで20分間遠沈した上清を検体として，glucose-6-phosphate dehydrogenase（G-6-PD）[6]，nicotinamide-adenine dinucleotide diaphorase（NADH-Diaphorase）[7]，acid phosphatase（Ac-P）並びに alkaline phosphatase（ALP）の酵素活性を測定した．なお，Ac-Pにはキット（和光純薬，P-ニトロフェニルリン酸法），ALPには，キット（第一化学薬品，kind-king変法）を用いて測定を行った．肺の蛋白含量はLowryの方法[8]を用いて測定した．

結　果

Ⅰ．環境条件

Table 1は，東京都環境保全局大気保全部により報告されている当衛生研究所の環境条件を示し，測定した汚染物質の種類，単位，1時間値の1日平均値，1日の平均値の最少値・最大値，並びに全実験期間中の最少値・最大値について記載した．また，野外の温度は平均25°C，湿度は87%であった．Table 2に，大気汚染に係る環境基準を示した．Table 1，Table 2から明らかなように，当研究所の環境は，オキシダントを除いては，環境基準を満たしており，比較的環境条件の良好な区域であるといえる．オキシダントについては，基準値（1時間値が0.06 ppm以下）をこえた日は，30日の実験期間中20日で，これは暴露実験期間が光化学スモッグの発生しやすい5月から6月であったためと考えられる．

Ⅱ．検査結果

1）体重の変化

Fig. 1に各暴露群の1週間ごとの体重の推移を示した．（室内対照群）に比べ（NO_2 + O_3 +室内暴露群）に，（野外暴露群）に比べ（NO_2 + O_3 +野外暴露群）に，体重増加率の低下がみられた．ガス暴露群は，ともに各々の対照群より体重増加率の低下がみられ，ガス暴露による影響が考えられた．また，（NO_2 + O_3 +野外暴露群）の体重増加率が最も低いが，これは，ガス暴露の影響とともに，ガス暴露を行うチャンバーから，環境条件の異なる野外へ移動した為のストレスによる影響も無視できない要因と思われる．

2）病理形態学的所見

《室内対照群》Fig. 3に（室内対照群）の30日後の末梢気管支から肺胞領域の光顕写真を示した．末梢気管支の上皮には突出した細胞が数多くみられ，また他の上皮細胞も，核が大きい．肺胞道および肺胞壁に細胞の増加はみられず，きわめて薄い構造をしていた．肺胞腔内にマクロファージはほとんど認められなかった．Fig. 4にFig. 3と同じ試料の電顕写真を示した．Ⅱ型細胞の数は少なく，間質の拡大，線維の増加も認められず，薄い均一なair-blood barrierを形成していた．

《NO_2 + O_3 +室内暴露群》暴露7日後の比較的太い気管支の上皮細胞には，肥大性変化を局所的に認めることもあるが，ごく軽度であり，（室内対照群）との違

Table 1. Air Pollutant at Exposure Site

POLLUTANT	UNIT	ARITHMETIC MEAN	DAILY MEAN MIN.	DAILY MEAN MAX.	RANGE OF EXPOSURE PERIOD MIN.	RANGE OF EXPOSURE PERIOD MAX.
NOX	ppb	43	17	100	5	244
NO	ppb	14	4	56	8	176
NO_2	ppb	29	12	51	4	84
OX	ppb	31	8	66	2	155
DUST	$\mu g/m^3$	59	29	110	6	245
SO_2	ppb	12	8	19	2	35
CO	0.1 ppm	8	4	16	1	35
THC	0.01 ppmC	225	194	292	169	398

Table 2. 大気汚染に係る環境基準

物　　質	環 境 上 の 条 件	対 象 区 域	達 成 期 間
二 酸 化 硫 黄	1時間値の1日平均値が0.04 ppm以下であり，かつ1時間値が0.1 ppm以下であること.	工業専用地域，車道その他一般公衆が通常生活していない地域又は場所以外の区域	ただちに
浮遊粒子状物質	1時間値の1日平均値が0.10 mg/m³以下であり，かつ，1時間値が0.20 mg/m³以下であること.		早 期 に
一 酸 化 炭 素	1時間値の1日平均値が10 ppm以下であり，かつ，1時間値の8時間平均値が20ppm以下であること.		早 期 に
光化学オキシダント	1時間値が0.06 ppm以下であること.		早 期 に
二 酸 化 窒 素	1時間値の1日平均値が0.04 ppmから0.06ppmまでのゾーン内又はそれ以下であること.		昭和60年

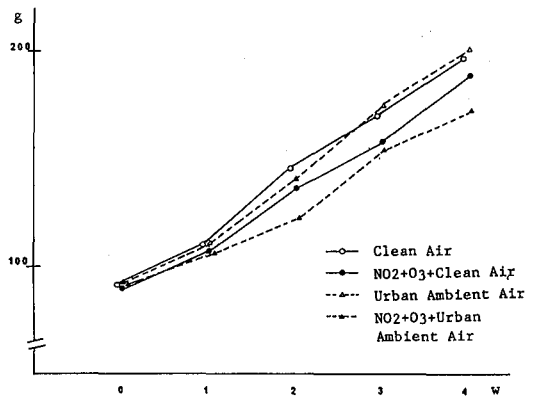


Fig.1. Changes of Body Weight

いが明らかではなかった．末梢気管支上皮細胞では，好塩基性が増し，局所的な肥大性変化がみられる場合もあった．肺胞道および肺胞道附近の肺胞壁に単核の大型の細胞の増加が局所的に認められた．（室内対照群）に比べ，肺胞腔内にマクロファージが数多くみられた．暴露30日後では，7日後にみられた変化がやや進展し，末梢気管支の上皮細胞と，肺胞領域における変化が，7日後より広汎に認められた（Fig. 5）．しかし，比較的太い気管支の変化は明らかではない．膠原線維の増加は，アザン・マロリー染色の所見からは，明らかではなく，肺胞領域における壁の局所的な肥厚は主に細胞の増加によるものと考えられる．Fig. 6は，Fig. 5と同じ試料の電顕写真で，Ⅱ型細胞のみいだされる頻度が，室内対照群より高く，またⅠ型細胞のはく離によって肺胞腔内

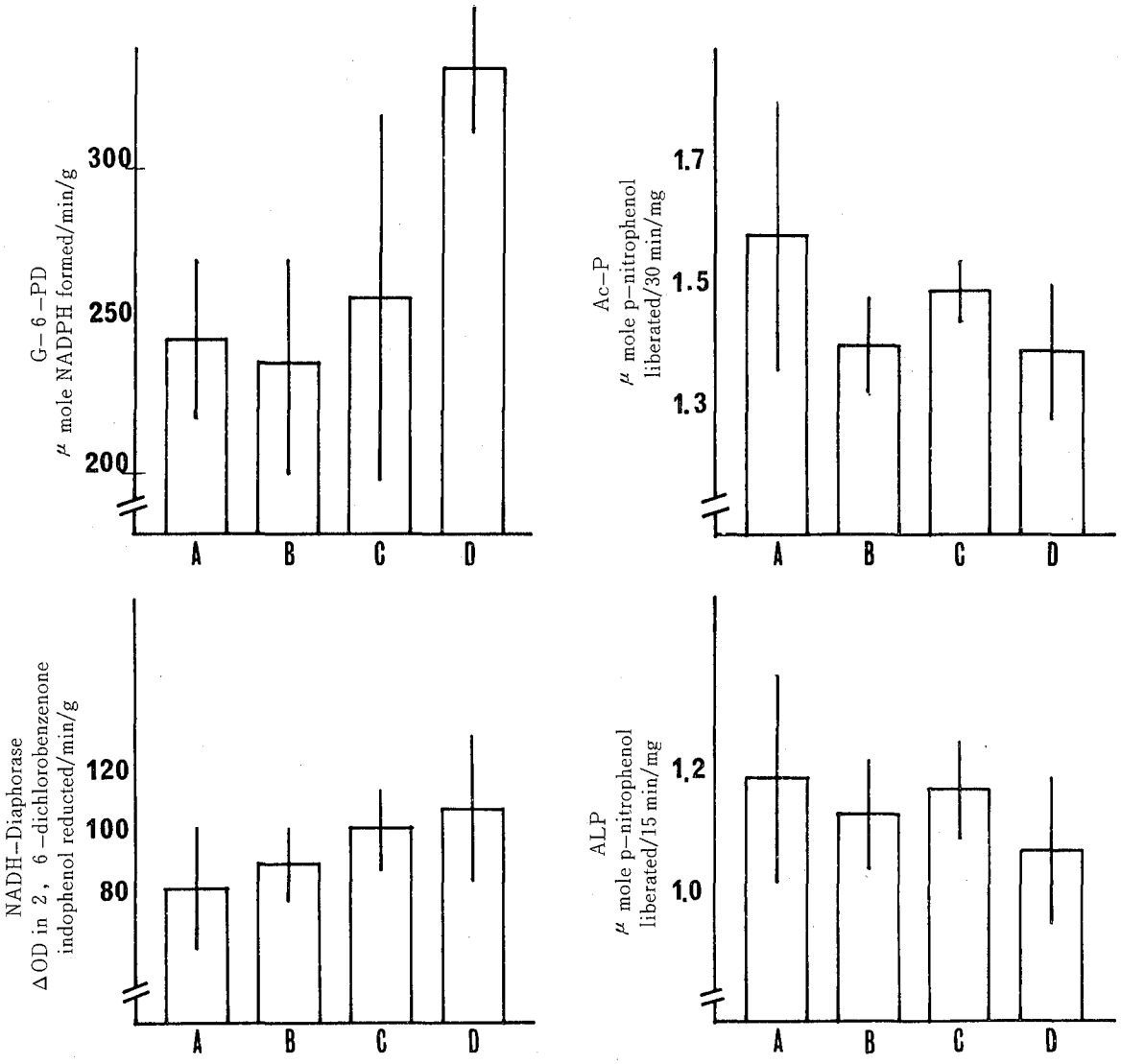


Fig.2. Changes of Various Enzyme Activities of the Lung of Rats Exposed to NO_2, O_3 and Urban Ambient air

A : Clean Air
B ; NO_2 + O_3 + Clean Air
C ; Urban Ambient Air
D ; NO_2 + O_3 + Urban Ambient Air

に露出したと思われる構造の乱れた基底膜が認められる部分もあった．間質の拡大は認められず，air-blood barriar の厚さは，(室内対照群) と同様であった．

《野外暴露群》暴露7日後では，肺胞腔内にマクロファージが増加している他は，気管支・肺胞領域に室内対照群との違いはみられなかった．30日後では，7日後と同様なマクロファージの増加に加えて，末梢気管上皮では，突出した細胞の局所的な減少が認められたが，比較的太い気管支も含めて気管支領域の変化はきわめて軽度のものであった (Fig. 7)．電顕的にも，貧食像を示す大型のマクロファージがみられたが，肺胞上皮細胞，肺胞壁には変化が認められなかった (Fig. 8)．

《NO_2 + O_3 + 野外暴露群》暴露7日後の比較的太い気管支の上皮細胞には，ごく軽度の肥大性変化がみられることもあった．末梢気管支上皮では，突出した細胞が減少し，好塩基性を増して肥大性変化を示す細胞が多

くなり，このような変化を認める気管支がほぼ全葉に存在した．肺胞道および肺胞道附近の肺胞壁に単核の大型の細胞の増加がみられ，また好中球を主体とした炎症性細胞も散在していた．肺胞腔内にはマクロファージが数多く認められた．(NO_2＋O_3＋室内暴露群）の7日後の変化に比べ，(NO_2＋O_3＋野外暴露群）の変化は，気管支末梢部から肺胞領域において強く認められた．暴露30日後では，7日後にみられた変化は進展していたが，比較的太い気管支の変化は7日後と同様であった．末梢気管支の上皮細胞では，肥大性変化が明らかとなり(Fig. 9)，肺胞道および肺胞道附近の肺胞壁における単核の大型の細胞の増加に加えて，膠原線維を主とした線維成分の増加による壁の肥厚が認められる部分もあった(Fig. 11, 12)．電顕的には，大型のラメラ体を数多く持ったⅡ型細胞が数多くみられ，また軽度に拡大した基底膜，間質によってやや厚くなった肺胞壁を認める部分もあった（Fig. 10)．

3）生化学的変化

Fig. 2 に暴露30日後の肺の G－6－PD，NADH－Diaphorase，Ac－P および ALP の各群の酵素活性を示した．

（室内対照群）と（NO_2＋O_3＋室内暴露群）を比較すると，ガス暴露群に Ac－P の減少傾向がみられた他，G－6－PD，NADH－Diaphorase，ALP に両群の違いはみられず，NO_2とO_3の複合暴露影響はほとんど認められなかった．

（室内対照群）と（野外暴露群）の比較から，野外暴露群に G－6－P，NADH－Diaphorase の上昇と，Ac－P の減少傾向がみられ，野外環境に暴露したことの影響が認められた。

（野外暴露群）と（NO_2＋O_3＋野外暴露群）の比較から，G－6－PD，NADH－Diaphorase の有意な上昇と，Ac－P，ALP の減少傾向がみられ，野外暴露による影響は，NO_2とO_3の複合暴露を組み合わせることによって強められていた．

考　察

NO_2とO_3を複合することによって，NO_2の影響は，特に気管支・肺接合部において増強され，また一旦成立した変化を，より長期にわたって持続させる作用を有することを報告した[4]．本実験の結果から，NO_2とO_3の複合暴露の肺に及ぼす影響は，野外環境への暴露を組み合せることによって，特に肺の末梢部，すなわち末梢気管支から肺胞領域において強められ，野外環境中の粉塵あるいは大気汚染ガスの影響を示唆したものと考えられる．

岡ら[9]は，都市における自動車排気ガスを主とする汚染大気のマウスに対する生体影響を，外気暴露群と外気除塵群の2群に分けて2年間観察した結果，この2群の間に顕著な違いは認められなかったことから，大気汚染質の作用は，粒子状成分よりもガス状成分のほうが大きかったことを報告している．一方，大気汚染質のガス状成分の1つとして重要なオキシダントの生体影響について Nakajima ら[10]は，マウスを1日2～3 hr，0.1～0.5 ppm のオキシダントに暴露し，比較的太い気管支の上皮細胞の配列が不規則となっているが，末梢部位の上皮細胞にはあまり変化を認めないことを報告している．本実験の結果では，太い気管支の変化はいずれの群でもごく軽度であり，変化は主に肺の深部に認められている．本実験の野外環境中のオキシダントの濃度は，平均0.03 ppm，最大値が0.15 ppm であり，太い気管支に軽度の変化しかみられなかったのは，オキシダントの濃度が低かった為かもしれない．あるいは，NO_2とO_3の複合暴露の影響を増強させる要因として，野外環境中のオキシダントが関与している可能性は少ないとも考えられる．

生化学的検索の結果，(NO_2＋O_3＋野外暴露群）では，G－6－PD はいずれの群より有意な上昇を示した．NADH－Diaphorase も（室内対照群），(NO_2＋O_3＋室内暴露群）より有意な上昇を示した．Ac－P は，（室内対照群），（野外暴露群）に比べ減少傾向が，また ALP はいずれの群よりも減少傾向にあった．以上のように(NO_2＋O_3＋野外暴露群）では，他の群より生化学的変化が顕著にみられ，NO_2とO_3の複合暴露に，野外環境への暴露を組み合わせたことの，相加的影響が認められた．病理組織学的には，(NO_2＋O_3＋野外暴露群）では，Ⅱ型細胞の増加が認められたが，Ⅱ型細胞では G－6－PD 活性が高いこと[11]，および組織の修復過程では G－6－PD 活性の上昇することが報告されており[12]，本実験の生化学的検索の結果からも，Ⅰ型細胞が損傷をうけ脱落した場合，Ⅱ型細胞の増殖によって組織の修復がなされるという[13,14] 肺胞上皮細胞の動きがある程度推定された．しかし，本実験の結果からは，変動した酵素の局在部位については明らかではない．今後，組織化学的手法を用いて肺の各部位における酵素の動きをとらえ，各汚染ガスによる作用部位の違い，経時的変化を検討することによって，NO_2を中心とした大気汚染質の複合影響をより明らかにできると考える．

（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

20, その概要は大気汚染学会第23回1982年11月で発表した.)

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) 寺田伸枝, 鈴木孝人, 大沢誠喜, 福田雅夫, 池田真悟, 溝口　勲：東京衛研年報, **33**, 337, 1982
5) 東京都環境保全局大気保全部：大気汚染常時測定局測定結果報告, 環境保全関係資料2－1大57－04
6) Langdon, R. G. : *Methods in Enzymology*, 9, 126, 1966, Academic Press, New York
7) Henny, R. Mahler : *Methods in Enzymology*, Ed. Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., 707, 1955, Academic Press, New York
8) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951
9) 岡三知夫, 山岡茂夫, 福田正則, 宮崎竹二, 中島泰知, 野上浩志, 竹本和夫, 片山博雄：大気汚染学会誌, **17**, 77, 1982
10) Nakajima, T., Kusumoto, S., Tsubota, Y., Yonekawa, E., Yoshida, R., Motomiya, K., Ito, K., Ide, G., and Otsu, H. : Osaka Prefectural Public Health Research Institute, Research Reports, Labor Hygiene Series, **10**, 35, 1972
11) Serokin, S. : *Arch. Intern. Med.*, **126**, 450, 1970
12) Beacosfield, P., and Carpi, A. :*Nature*, **201**, 825, 1964
13) Stephens, R. J., Sloan, M. F., Evans, M. J., and Freeman, G. : *Exp. Molec. Path.* **20**, 11, 1974
14) Evans, M. J., Cabral, L. J., Stephens, R. J., and Freeman, G. : *Experimental and Molecular Pathology*, **22**, 142, 1975

Explanation of figures

Fig. 3　Light micrograph of terminal airway from the control rat (100×)

Fig. 4　An electron micrograph of alveolar walls in the same rat of the fig. 3　Interstitial tissue has little fibers and air–blood barrier is very thin (1500×)

Fig. 5　30 days/exposure to a mixture of 2.0 ppm NO_2 and O_3. Slight hypertrophy in the epithelium of the terminal bronchiolar. Increased mononuclear cells in the walls of alveolar ducts and neighboring alveoli (100×)

Fig. 6　Same treatment as fig. 5. Hypertrophied Type 2 epithelia (1500×)

Fig. 7　30 days exposure to urban ambient air. Increased macrophages in the alveolar space (100×)

Fig. 8　Same treatment as fig. 7　An enlarged macrophage (1500×)

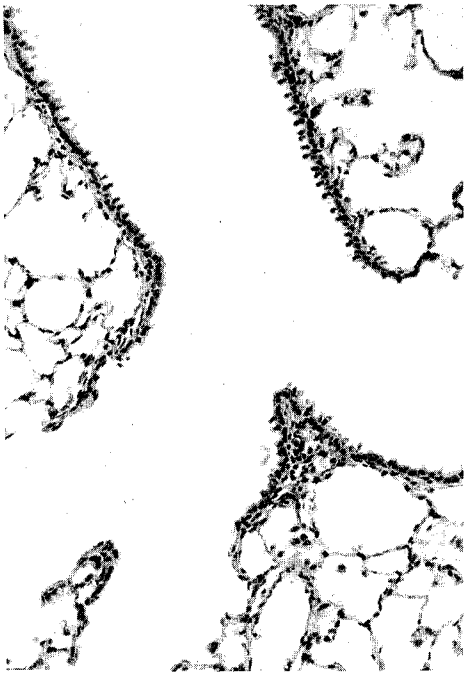
Fig. 9　Combined exposure to NO_2, O_3 and urban ambient air. Walls of alveolar ducts and neighboring alveoli were thickened with mononclear cells and deposition of connective tissue (100×)

Fig. 10　Same treatment as fig. 9. Increased and hypertrophied Type 2 cells whre obserbed (1500×)

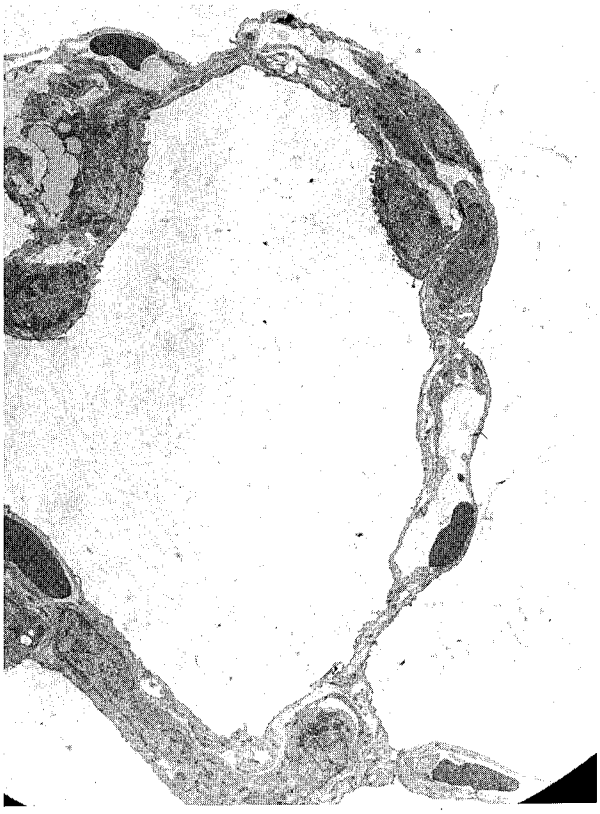
Fig. 11　Alveolar walls of the control rat stained with Azan–Mallory. Little collgen fiber were detected (400×)

Fig. 12　Same treatment as fig. 9. Deposition on connective tissue on the walls of alveoli were shown by blue color. Compare with fig. 11 (400×)

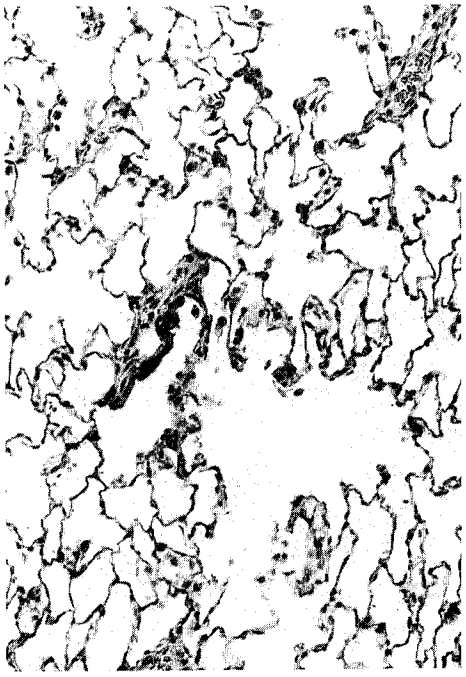
3



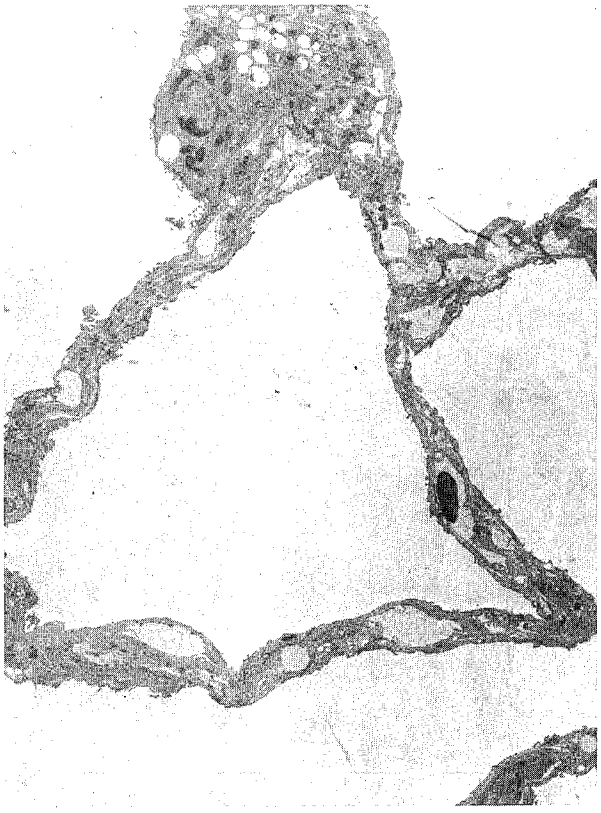
4



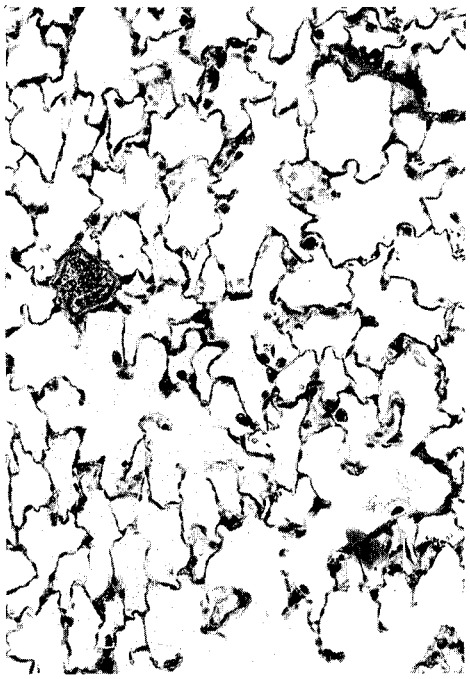
5



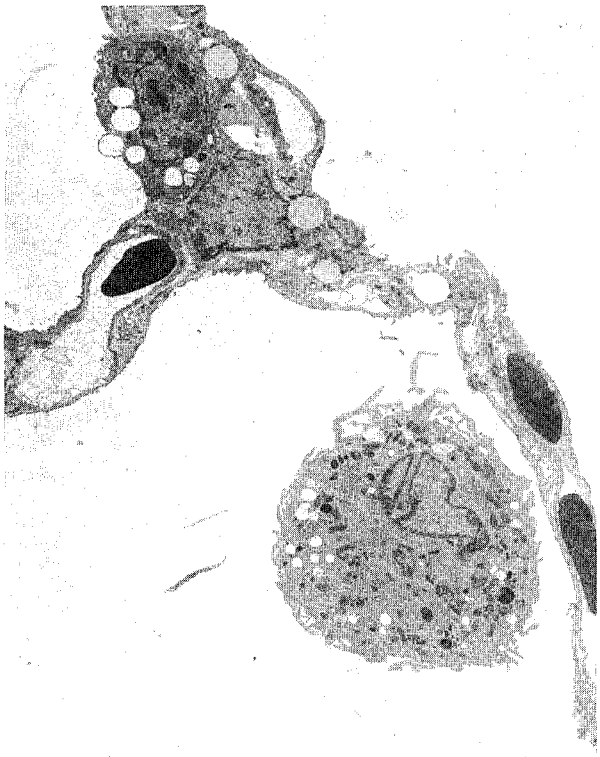
6



7



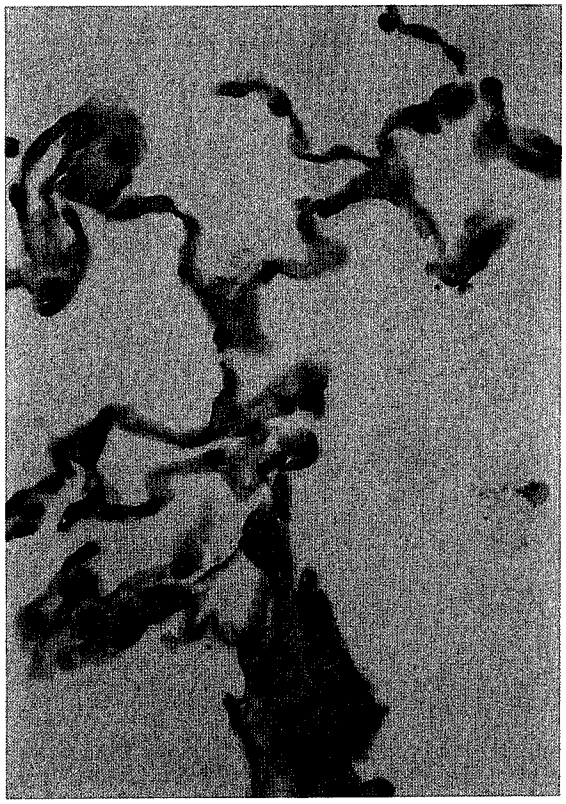
8



9

10

11



12

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 247-254, 1983

東京における健康指標と大気汚染指標や社会指標との関連性の検討
（ノンパラメトリック法による解析）

牧野国義*, 溝口　勲*

A Study on Relationship of Health Indices to Air pollution and Social Indices in Tokyo (Analysis with Non-parametric Methods)

KUNIYOSHI MAKINO* AND ISAO MIZOGUCHI*

Eight health indices as regards 7 indices of air pollution and 11 social indices were studied in Tokyo proper. These health indices were 3 concerning mortality of respiratory diseases and 5 of patients suffering from diseases caused by air pollution and pulmonary function disorders. In this study, statistical non-parametric methods such as rank correlation, Wilcoxon test, Kruskal-Wallis test are valid because each index was not distributed normally. By using these non-parametric methods, following results were obtained.

Lung cancer mortality appeared to be associated with a combined air pollution index-sulfur oxides and nitrogen dioxide. In addition, mortality due to pneumonia-bronchitis and asthma was closely and particularly associated with social indices in economical aspect such as income, number of tatami mats indicating the living space, medical assistance, livelihood assistance and so on. But the other health indices did not have significant relationship with air pollution or social indices.

Keywords : Mortality, Respiratory disease, Health index, Air pollution index, Social index, Non-parametric method

1. 緒　　言

呼吸器疾患の中で，現在最も注視を浴びている疾患は肺ガンであり，肺ガン発症の大きな要因が喫煙であることは既に周知の事実である．また，肺ガン発症は，自動車排気ガスに含まれる3-4ベンツピレンなどの多環芳香族化合物やニトロソ化合物などとも密接な関係を有することが知られている[1]．しかしながら，住民を対象とした疫学調査で，肺ガン死亡と上記の化合物との関係について解析した論文は報告されていないようである．その原因は，上記化合物の常時観測を多測定点で実施することが困難という分析技術上の問題と，住民の移動距離が大きいために，住民の暴露濃度を推定することが困難という住民の地域固定性の問題とに帰着すると考えられる．一方，持続性せき・たん，ぜんそくなどの慢性呼吸器疾患の発症の要因として，喫煙以外に大気汚染や年令などを考慮した疫学調査が多く報告されている[2-5]．しかし，これらの疾患を死因とする死亡に関する調査や研究の報告は，ベルギーのミューズバレー，イギリスのロンドンスモッグ，我が国の四日市ぜんそくなど特殊な例を見るに過ぎない．

我々は以上を考慮して，肺ガン，肺炎・気管支炎，ぜんそくを死因とする死亡率や大気汚染による健康障害認定者数，保健所が実施した肺機能調査による障害者数を健康指標とし，大気汚染や社会的要因との関連性を検討した．

健康指標や大気汚染，社会的要因からの指標の頻度分布が正規型を示すかについて，過去の知見[4]からはなはだ疑問であり，分布型の特定が困難な場合には正規化も容易でない．そこで，この研究では関連性を検討する手法として，データの分布型によらないノンパラメトリック法を採用した．

2. 方　　法

(1) 健康指標

東京都23区の死亡率の地域差を判断するためには長期間の死亡データが必要で，本研究では，東京都衛生年報昭和34年版（第12号）から昭和54年版（第31号）までに

* 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, Hyakuninchо 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 160 Japan

掲載された肺ガン，肺炎・気管支炎，ぜんそくの都内23区の地域別死亡データを死亡指標として採用した．

さらに，同じく昭和48年版(第25号)から昭和54年版(第31号）に掲載された大気汚染による健康障害認定者（年令は18才未満で，症状は気管支ぜんそく，ぜんそく性気管支炎，その他を含めた全症状)と，同じく昭和45年版(第22号）から昭和48年版（第25号）に掲載された保健所別の肺機能検査結果（拘束性および閉塞性肺機能障害者）データを健康指標に加えた．

(2) 大気汚染指標と社会指標

常時観測が行われている大気汚染物質のうち，慢性呼吸器疾患の発症に影響を及ぼすと考えられている硫黄酸化物，二酸化窒素，浮遊粉塵のデータを大気汚染指標として利用した．ただし，東京都が設置した常時観測点(一般環境大気測定局)のうち，長期間(昭和46年以降)のデータが入手できる8箇所（千代田，新宿，江東，大田，世田谷，荒川，板橋，江戸川の8区）を解析のために選択した．

なお，大気汚染指標として，上記3物質のほか，各物質濃度を平均値で割った値の和（以下平均値比和と略称する）をも指標とした．

社会指標の選定に際しては，地域住民の収入，人口動態，交通，医療，生活保護，大気関係苦情を考慮して，都内23区の以下の11指標とした．

① 所得（人口当り）
② 高額所得者数（人口当り）
③ 人口密度
④ 昼夜間人口比
⑤ 畳数（人口当り）
⑥ 乗用車登録台数（平方キロ当り）
⑦ 交通量指数
⑧ 医療施設密度
⑨ 医療扶助世帯数（世帯当り）
⑩ 生活扶助世帯数（世帯当り）
⑪ 煤煙・粉塵苦情・陳情受付数（世帯当り）

ここで，⑦の交通量指数は，各区の道路率と，区別道路面積比により無作為抽出された標本道路の平均自動車走行量との積で，11指標のうち，単位を持つ7指標については，各区の人口または世帯数か面積との比をとった．なお，③と⑥以外の指標は昭和50～52年度内の資料であり，③と⑥は昭和34～54年度の平均値のほか，時系列的変化パターン(③は順位変化，⑥は変化率の上昇，横ばい，下降）をも資料とした．

(3) 解析方法

この研究で用いた健康指標，大気汚染指標，社会指標が正規分布を示すかどうかを考えてみると，標本数23から推察されるように，標本数が少ないためにバラツキが大きく，滑らかな分布型を示さないと思われ，正規型の確認は容易でない．また，他の報告例でも，大気汚染データは対数正規に近い[6]．一般に，上記指標の分布型は正規型でないことが多く，一定の分布型を示さない．したがって正規化も容易でないので，この点を考慮すれば，分布型によらないノンパラメトリック法の手法を用いた方がより安全で，この研究では主としてノンパラメトリック法の手法を利用した．以下に具体的解析方法を示す．

1）死亡指標と主要大気汚染指標の年次推移
2）健康指標と大気汚染指標との順位相関分析
3）健康指標と社会指標との順位相関分析
4）社会指標の群化（分散分析）
5）社会指標群間における健康指標のKruskal–Wallisの検定[7]
6）大気汚染指標の2群化
7）大気汚染指標2群間における健康指標のWilcoxonの検定[8]
8）健康指標，社会指標による主成分分析

ここで，2)と3)はSpearmanの順位相関分析による．この手法は，標本数をn，対応する2変量の順位差をdi（i＝1～n）としたとき，順位相関係数 ρ が次式で与えられる．

$$\rho = 1 - 6\left(\sum_{i=1}^{n} di^2\right) / (n^3 - n)$$

この手法のみで両者の関連を推定することは情報量の損失もあり，余りに危険性が高い．そこで，標本数23の社会指標の場合に，4）で群化し，5）で群間に差が認められるかどうかKruskal–Wallisの検定を行う．

ここで，k群に群化したときの各群の標本数をni（i＝1～k）とすると，全標本数Nは，$N=\sum_{i=1}^{k} ni = 23$ で，各群の順位和をRiとすると，統計量Hは，

$$H=\frac{12}{N(N+1)}\sum_{i=1}^{k}\frac{Ri^2}{ni}-3(N+1)$$

で定義され，このHは漸近的に自由度k－1のカイ2乗分布に従う．この手法は一元配置の分散分析に対応する検定で，各群の健康指標が同一母集団であるかどうかを検定する．

また，標本数8の大気汚染指標については4）のような群化は適当でない．そこで，6）で2群に分け，7）でWilcoxonの検定を行う．Wilcoxonの検定もノンパラメトリック法の一手法で，一方の群の順位和を求め（標

本数が既知だから他方の群の順位和も決まる），その有意確率を求めることにより母集団の同一性を検定する．

さらに，ノンパラメトリック法の手法ではないが，健康指標，社会指標の全体を説明する要因の検討のために8）で主成分分析を行う．ただし，大気汚染指標については標本数が少ないため，主成分分析を利用するには適切でなく，解析できなかった．

3. 結果と考察

(1) ノンパラメトリック法の利用

目的因子群と説明因子群との関連性を検討する統計的手法として，従来各因子が正規分布をなすとの前提に立ち，パラメトリック法の相関分析，平均値の差の検定，分散分析などの手法が多く利用された．しかし，これらの手法は，原データ全てを用いることにより情報の損失を防ぐことができるという利点を有する半面，各因子が正規分布を示さない場合に（正規化が可能な場合は別として），上記手法を利用できない欠点を有する．

一方，ノンパラメトリック法は原データを用いず，順序統計量（因子の原データを大きさにより順位化したとき，この順位を順序統計量と呼ぶ）や分割表を用いるため，情報量の損失を伴うという欠点を有する．しかし，ロバスト（頑健なの意）な手法と呼ばれ，原データの分布型に関係なく利用することができる．では情報量の損失がどれくらいかと言えば，手法や標本数によって異なるが，大体10％程度である．この10％を大きいとみるか，小さいとみるかは見解の分かれるところであるが，少なくとも手法の誤用と比較すれば，ノンパラメトリック法は有効な手法であると言えよう．

この研究に用いた健康指標，社会指標の分布型を調べたところ，正規分布に近い分布型を示した指標は一つもなく，分布のピークは中央値より左にずれていた．指標の中には対数正規分布に近い分布型を示したものもあるが，同一手法で解析するためには，パラメトリック法よりもノンパラメトリック法が適当と考えられる．

(2) 健康指標と大気汚染指標

a．年次推移と順位相関

健康障害が極度に進行すると死亡に至る．したがって，健康指標のうちで死亡に関する指標が最も重大である．そこで，まず肺ガン，肺炎・気管支炎，ぜんそくを死因とする東京都区部の死亡率が，昭和35年から昭和53年までにどのように変化するかをFig. 1に示した．肺炎・気管支炎とぜんそくの場合の空白期間は，不掲載または掲載形式の変化のため資料が入手できなかったことを示す．また，昭和41年から昭和55年までの硫黄酸化物と二酸化窒素の8測定点平均値を標準偏差を付してFig. 2に示した．

肺ガン死亡が増大傾向にあること，硫黄酸化物濃度が減少傾向にあることはトレンド検定（順位相関を利用）を行うまでもなく明らかである．また，肺炎・気管支炎やぜんそく死亡の傾向は明らかでないが，二酸化窒素についてはトレンド検定を行った結果，危険率5％以下で有意に増大傾向のあることが認められた．したがって，長期の暴露を考えると，呼吸器に有害な影響を及ぼす硫黄酸化物や二酸化窒素などの大気汚染物質が呼吸器疾患死亡率に寄与することは，寄与の程度は小さいとしても充分に考えられる．

そこで，両指標間の順位相関分析を行い，Table 1に結果を示した．大気汚染指標のうち，硫黄酸化物と二酸化窒素の平均値比和が1960～78年（昭和35～53年）の肺ガン死亡と最も有意性の高い相関を示した．一方，肺炎・気管支炎やぜんそくを死因とする死亡では大気汚染指標と有意の相関を示さなかった．また，浮遊粉塵は大気汚

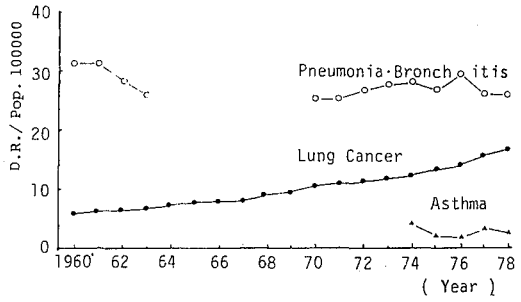


Fig.1. Transition of Mortalities from Respiratory Diseases in the Ward Area of Tokyo

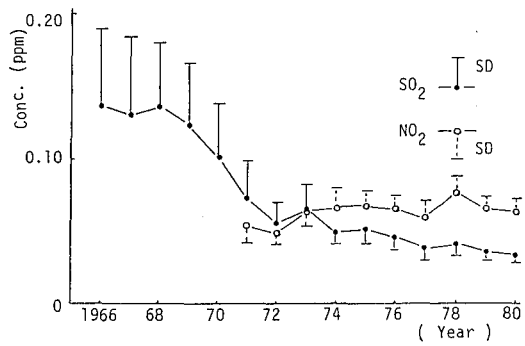


Fig.2. Transition of Annual Mean Concentration of Air Pollutants at 8 Sites in Tokyo

Table 1. Rank Correlation (1) between Health Indices and Air Pollution Indices in 8 Wards

Air pollution inex	Health index: Mortality: Lung cancer 1960-78	Lung cancer 70-78	Lung cancer 74-78	Pneumonia–bronchitis 60-78	Pneumonia–bronchitis 70-78	Pneumonia–bronchitis 74-78	Asthma 70-78	Diseases by air pollution: Asthma	Bron-chitis	Total	Pulmonary function disorder: Const-rictive	Obst-ructive
SO_x	.595	.655	.548	−.143	−.119	−.179	.095	−.286	−.167	−.300	−.048	−0.95
NO_2	.738*	.607	.548	−.333	−.333	−.321	−.381	−.595	−.238	−.381	−.786*	−.071
Dust	−.452	−.607	−.357	.381	.381	.417	.238	.500	.810	.762	−.024	.214
SO_x+NO_2	.929***	.893**	.833**	−.190	−.190	−.226	−.048	−.595	−.429	−.571	−.452	−.119
SO_x+Dust	.524	.655	.619	.024	.000	−.083	.310	−.119	−.167	−.262	.190	.190
NO_2+Dust	.405	.512	.548	−.048	−.048	−.107	.214	−.095	−.048	−.143	.310	.500
SO_x+NO_2+Dust	.548	.417	.476	−.048	.024	.060	.000	−.357	.167	−.071	−.429	−.119

*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$

Table 2. Display of Wilcoxon Test (Sum of Ranks in Higher and Lower Groups divided into by Cocentration of Air Pollution Indices)

Air pollution index	Health index: Mortality: Lung cancer 1960-78	Lung cancer 70-78	Lung cancer 74-78	Pneumonia–bronchitis 60-78	Pneumonia–bronchitis 70-78	Pneumonia–bronchitis 74-78	Asthma 74-78	Diseases by air pollution: Asthma	Bron-chitis	Total	Pulmonary function disorder: Const-rictive	Obst-ructive
SO_x	24,12#	25,11*	24,12	18,18	17,19	17,19	20,16	17,19	15,21	15,21	17,19	19,17
NO_2	25,11*	24,12	25,11*	19,17	19,17	19,17	19,17	13,23	16,20	14,22	12,24	16,20
Dust	16,20	15,21	16,30	19,17	19,17	19,17	19,17	22,14	24,12	24,12	19,17	21,15
SO_x+NO_2	25,11*	25,11*	25,11*	19,17	19,17	19,17	19,17	13,23	16,20	14,22	12,24	16,20
SO_x+Dust	24,12	25,11*	24,12	18,18	17,19	16,20	20,16	17,19	15,21	15,21	17,19	19,17
NO_2+Dust	21,15	22,14	23,13	19,17	19,17	18,18	22,14	18,18	16,20	16,17	24,12	22,14
SO_x+NO_2+Dust	22,14	21,15	21,15	17,19	18,18	18,18	18,18	15,21	19,17	17,19	16,20	15,21

Left is the sum of ranks in lower concentration group and right is the sum in the other group

* $p<0.05$

染による健康障害認定者の2症状と有意の相関を示した．ここで，肺ガンや肺炎・気管支炎の死亡を3期間に分けたのは，第1に，長期間データでは住民の居住歴が関連してくること，第2に，肺炎・気管支炎死亡の場合にはデータに空白期間があること，第3に，ぜんそく死亡データの調査期間が5年間であるので，死因間の比較のためには同一期間のデータを用いる必要があること，を考慮したからである．また，長期間（数年間）のデータを必要とする理由は，各年の区別の呼吸器疾患死亡数が少なく（東京の呼吸器疾患死亡率でも人口10万人対で40人に満たない），バラツキが大きいからである．

b．Wilcoxon の検定

大気汚染指標は標本数8であるため，これを3群以上に群化することは1群の標本数を考えれば適切でない．各指標の分布は必ずしも等数（標本数4）に2群化したわけではないが，ここでは強引に標本数4ずつに2群化

して，両群に分けられた区の健康指標が同一母集団に属するかをWilcoxonの検定を用いて検討し，Table 2に結果を示した．標本数8を標本数4ずつ2群化したとき，順位の全組合せは70で，最小の有意確率1/70=0.014となる．有意確率計算より5%以下になる組合せは2通りだけで，Table 2中*印を付した箇所はこの2通りのどちらかであることを示す．この結果でも，両群が同一母集団に属するという仮説を棄却した場合の健康指標は肺ガン死亡であり，順位相関（Table 1）同様，硫黄酸化物と二酸化窒素の平均値比和の指標との間に有意の結果を示した．肺ガンと大気汚染との因果関係については，否定的見解[9,10]と肯定的見解[11]とが報告されているが，この研究では以上のように後者を支持する結果を示した．

(3) 健康指標と社会指標

a．順位相関

健康指標と社会指標との関連性を検討するために順位相関分析を行い，結果をTable 3に示した．肺炎・気管支炎死亡やぜんそく死亡は，所得，高額所得者数，畳数，医療施設密度，医療扶助，生活扶助といった指標と危険率0.1%以下の高い相関を示した．これらの指標は医療施設密度以外いずれも地域住民の経済状態と密接に関る指標であり，両死因による死亡に経済的要因が深く関っていることを示唆した．この結果は，手法や対象範囲の広さが異なっているものの，筆者らが循環器疾患死亡について報告した結果[12]と類似している．

b．Kruskal–Wallisの検定

23区の各社会指標のデータを大きさ順に並べてみると，各データ間隔は均一でなく，疎密が生じる．そこで，

Table 3. Rank Correlation (2) between Health Indices and Social Indices in 23 Wards Health index

Social index	Code	Mortality: Lung cancer 1960-78	Lung cancer 70-78	Lung cancer 74-78	Pneumonia–bronchitis 60-78	Pneumonia–bronchitis 70-78	Pneumonia–bronchitis 74-78	Asthma 74-78	Diseases by air pollution: Asthma	Bron–chitis	Total	Pulmonary function disorder: Const–ructive	Obst–ructive
Income	IN	.213	−.239	−.363	−.804***	−.761***	−.780***	−.862***	.083	−.209	−.023	−.263	.084
Number of large–income earner	LI	.411*	.099	−.061	−.815***	−.764***	−.766***	−.835***	−.023	−.362	−.163	−.259	.125
Population density	PD	.244	.045	.018	.122	.165	.124	−.053	−.122	−.075	−.155	.001	−.195
Population ratio between day and night	DN	.578**	.378	.270	−.233	−.175	−.115	−.273	−.460*	−.519*	−.593**	.051	−.081
Number of tatami	TA	.365	−.109	−.269	−.889***	−.848***	−.866***	−.882***	.073	−.369	−.108	−.186	.174
Number of registered car	RC	−.156	−.159	−.147	.227	.219	.201	.051	.036	.210	.044	.106	−.176
Trafic index	TR	.500*	.232	.167	−.479*	−.417*	−.396	−.500*	−.232	−.444*	−.354	−.058	−.049
Density of medical facility	MF	.495*	.326	.182	−.708***	−.654***	−.596**	−.620**	−.082	−.475*	−.269	−.301	−.051
Medical assistance	MA	−.275	.085	.277	.817***	.769***	.732***	792***	−.082	.385	.133	.310	−.177
Livelihood assistance	LA	−.243	.214	.328	.819***	.770***	.752***	.763***	−.024	.452*	.200	.244	−.050
Received cases of complaints and petition on smoke·dust	SD	.178	.228	.358	.463*	.476*	.507*	.447*	−.046	−.050	−.090	.152	−.331
Health index code		HI1	HI2	HI3	HI4	HI5	HI6	HI7	HI8	HI9	HI10	HI11	HI12

Table 4. Chi-square Value by Kruskal-Wallis Test among Some Groups in Health Indices

Social index code	Groups[a]	Health index: Mortality: Lung cancer 1960-78	Lung cancer 70-78	Lung cancer 74-78	Pneumonia-bronchitis 60-78	Pneumonia-bronchitis 70-78	Pneumonia-bronchitis 74-78	Asthma 74-78	Diseases by air pollution: Asthma	Bron-chitis	Total	Pulmonary function disorder: Const-rictive	Obst-ructive
IN	3	5.90	0.50	1.52	13.85**	12.31**	13.54**	14.53**	8.56*	2.87	1.21	1.79	046
LI	3	9.14*	3.89	0.35	9.87**	7.85*	7.42*	12.44**	0.12	3.37	1.41	3.15	4.89
PD	3	0.97	0.39	1.05	0.67	0.78	0.42	0.19	0.15	0.21	0.49	3.04	3.17
PP[b]	3	14.22**	11.79**	6.09*	0.15	0.35	0.84	1.21	3.58	3.68	4.90	9.35**	2.31
TA	3	2.59	1.91	1.91	16.31**	15.70**	15.46**	14.59**	0.21	2.06	0.23	0.94	3.94
RC	3	5.72	3.93	2.72	2.46	2.50	0.55	0.12	2.69	7.39*	4.58	0.48	0.72
PC[c]	3	4.82	0.15	1.43	8.72*	7.39*	7.20*	6.35*	1.78	3.54	1.26	4.42	0.15
TR	5	10.87*	6.11	1.88	5.28	4.47	2.37	6.16	3.62	9.29	6.88	5.67	11.64*
MF	5	7.29	6.63	3.18	12.05*	9.94*	7.83	7.74	1.21	8.52	4.40	4.78	5.39
MA	4	2.40	1.88	3.47	10.72*	9.14*	7.46	9.52*	2.89	2.87	1.44	2.10	3.64
LA	4	2.86	2.12	2.45	16.64**	16.54**	15.69**	13.82**	0.33	3.51	0.63	2.12	1.27
SD	4	2.48	3.23	3.81	4.71	3.88	3.38	3.19	1.36	2.70	2.21	2.17	7.51

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, a) Degree of freedom = Groups − 1

b) PP means moving pattern of rank of PD for 20 years and the pattern is one of upper, same and down

c) PC means variation rate pattern of RC for 20 years and the pattern is as same as PP.

23のデータを群化し，各群の健康指標が同一母集団に属するかどうかを検討した．まず最適群化を行うためにデータの並びから数種の群化を行い，分散分析で最適群化を決定した．ここで，各群の標本数を原則として3以上とした．その結果，11社会指標のうち10指標については3～5群に群化することができた（いずれも危険率1％以下で有意）が，昼夜間人口比だけは1区（千代田区）が飛び離れており，また17区が非常に接近した値であったので，群化を不適とした．さらに，人口密度と乗用車登録台数の2指標については長期間のデータが得られたので，両指標の時系列的変化パターン（人口密度は順位変化，乗用車登録台数は変化率）を上昇群，横ばい群，下降群の3群とした．

以上の12社会指標（うち2指標は変化パターン）についてKruskal-Wallisの検定を行い，その結果をTable 4に示した．肺ガン死亡は人口密度の変化パターンで群化したとき有意で，3群中下降群が高順位であった．つまり，都心部や工場密集地域が高順位で，死亡との因果関係を論ずるに至らないとしても，これらの地域の大気汚染が他の地域よりも進んでいることを考えると興味深い．また，肺炎・気管支炎死亡やぜんそく死亡の場合，(3)の順位相関で有意の相関を示した社会指標と同じように有意の結果を示した．さらに，乗用車登録台数の変化パターンの群化でも有意の結果を示し，いずれの死亡も3群中下降群が高順位であった．一方，大気汚染による健康障害認定者の3指標や肺機能検査の2指標についてもいくつかの場合に有意の結果を示したが，この理由については明らかでない．

c．主成分分析

健康指標，社会指標の全体の分布を説明する要因を解析するために，パラメトリック法の主成分分析を利用し（ノンパラメトリック法にはこの種の手法がない），第1，第2主成分の因子負荷量散布図をFig. 3に示した．第2主成分までの累積寄与率は62％で，全分散に対する情報量は高いと云えよう．主成分軸が示唆する意味の推定は困難だが，肺ガン死亡と肺炎・気管支炎死亡やぜんそ

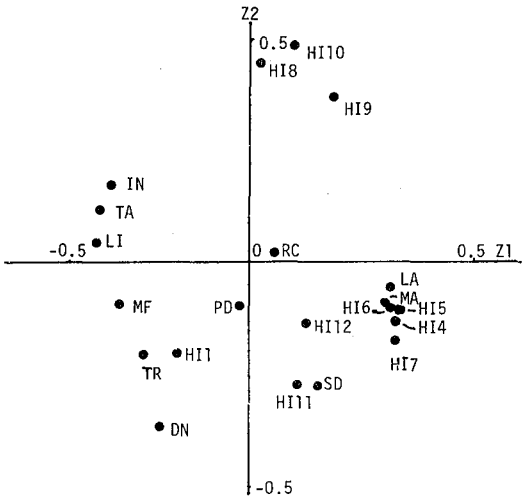


Fig.3. Distribution of Factor Loading to First (Z 1) and Second (Z 2) Principal Component
(Code Name is shown in Table 3.)

く死亡とは明らかに異なった群をなしている．肺ガン死亡は交通量指数と，肺炎・気管支炎死亡やぜんそく死亡は医療扶助，生活扶助と一群を形成し，関連指標の違いを示した．

(4) その他（喫煙影響など）

喫煙が肺ガンなどの呼吸器疾患に重大な影響を及ぼす要因であることは広く知られているので，喫煙に関する指標（量，期間）は呼吸器影響要因を検討する上で不可欠と考えられる．しかも，専売公社の資料によれば，全国の年間タバコ販売量は，昭和37年に約1,450億本であったのが，昭和40年代に急増して昭和56年には約3,080億本と倍増した．また，東京の喫煙者率は全国平均よりもかなり高く（昭和57年では男子1.2倍，女子1.6倍），それだけ呼吸器に及ぼす影響も大きい．Kleinmanら[13]や平山ら[14]の報告によれば，喫煙は呼吸器疾患以外の死因死亡にも影響を及ぼしている．このように重要な指標の喫煙をこの研究では加えることができなかった．その理由は，区の単位で地域住民の喫煙に関する指標を報告した資料がないこと（抽出した標本の報告はあるが[1]，区の代表値とするには標本数が少ない）である．したがって，今後より一層充実した呼吸器影響要因を検討するためには，喫煙に関する指標の大規模な調査の実施または該資料の入手が必要と考えられる．

この研究では健康指標として死亡指標のほかに，大気汚染による健康障害認定者3指標と肺機能検査2指標を用いた．だが，残念ながら上記5指標から得られた情報量は少ない．その原因はいくつか考えられる．例えば，死亡データはその地域における悉皆調査と云えるが，他の指標のデータは悉皆調査と云えず，悉皆調査程の精度は得られない．さらに，区別のデータを得るためにはより長期間を必要とするかもしれない．したがって，今後この指標を用いる場合には相当の吟味が必要であろう．

4. ま と め

東京都区部における呼吸器疾患死亡（肺ガン，肺炎・気管支炎，ぜんそく）や大気汚染による健康障害認定者（症状は気管支ぜんそく，ぜんそく性気管支炎，その他を含めた全症状），肺機能障害者（拘束性，閉塞性）を健康指標とし，これらと大気汚染指標（硫黄酸化物，二酸化窒素，浮遊粉塵およびこれらを組合わせた指標），社会指標（11種および変化パターン2種）との関連性をノンパラメトリック法の手法（Spearmanの順位相関，Wilcoxonの検定，Kruskal–Wallisの検定）を用いて検討した．

健康指標と大気汚染指標との順位相関および大気汚染指標を高低2群に分けたときのWilcoxonの検定の結果から，肺ガン死亡は硫黄酸化物と二酸化窒素の組合わせ指標と有意の結果を示し，大気汚染との関連性が密接であることを示唆した．

健康指標と社会指標との順位相関および社会指標の大きさで3～5群に群化したときのKruskal–Wallis検定の結果から，肺炎．気管支炎死亡やぜんそく死亡は住民の経済状態に関する指標と密接な関連性が認められた．

喫煙は呼吸器影響関連要因を検討する上で欠かせない指標であり，喫煙を含めて検討することが今後の課題として残されている．

文　献

1) Hoffman, D. and Wynder, E. L. : *Chemical Carcinogens ACS Monograph* 173, 324, 1976, American Chemical Society, Washington, D. C.
2) 安達元明：日本公衛誌，24，59，1977
3) 常俊義三，山口泰正，中山典子，上田美代子：日本公衛誌，29，293，1977
4) 牧野国義，溝口　勲：東京衛研年報，32－1，267，1981
5) Goldstein, I. F. and Dulberg, E. M. : *JAPCA*, 31, 370, 1981
6) 山本英二：応用統計学，9，169，1980
7) Kruskal, W. H. and Wallis, W. A. : *J. Am. Statist.*

Assoc., **47**, 583, 1958
8) Wilcoxon, F., Katti, S. K. and Wilcox, R. A. : *Selected Tables in Mathematical Statistics*, 171, 1970, Markham Publishing Co., Chicago
9) 竹本和夫：大気汚染研究，**10**，763，1976
10) 今井正之，吉田克己，笠間一男，北畠正義，冨田泰子：日衛誌，**35**，493，1980
11) 清水弘之，富永祐民，中川宣子，黒石哲生：大気汚染学会誌，**14**，324，1979
12) 牧野国義，溝口　勲：東京衛研年報，**33**，367，1982
13) Kleinman, J. C., Feldman, J. J. and Monk, M. A. : *AJPH*, **69**, 795, 1979
14) 平山　雄，浜野芳子：厚生の指標，**28**（4），3，1981

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 255-259, 1983

フェノバルビタール誘導ラット，チトクロームP-450精製標品を用いた再構成系における2-アミノフルオレンの変異原活性化

川野澄江*，中尾順子**，小嶋昭江***，
鈴木重任*，鎌滝哲也****

Mutagenic Activation of 2-Aminofluorene in the Reconstitution System Utilizing Cytochrome P-450 Fractions Partially Purified from Phenobarbital-Treated Male Rats

SUMIE KAWANO*, TOSHIKO NAKAO**, AKIE KOJIMA***,
SHIGETOH SUZUKI* and TETSUYA KAMATAKI****

Six microsomal cytochrome P-450 fractions were isolated from the liver of phenobarbital-treated male rats. These fractions were obtained at a high yield of 32.0%, and each contained 4–14 nmoles of cytochrome P-450/mg protein. Utilizing these fractions reconstituted with NADPH-cytochrome c reductase and lipid, mutagenic activation of 2-aminofluorene was assayed by the Ames test method using *Salmonella typ.* TA 98. 2-Aminofluorene was considerably activated by all of these cytochrome P-450 fractions, but the rate of activation was lower than those obtained by two β-naphthoflavone-inducible cytochromes P-448.

Keywords : cytochrome P-450, enzyme purification, rat liver, phenobarbital, mutagenic activation, Ames test, reconstitution system, 2-aminofluorene

癌原性物質の多くは，生体内において本来は解毒代謝に向うはずの酵素群によって，細胞内蛋白や核酸と直接反応しうる代謝活性体に変換される．従って，癌原性物質の代謝活性化機構を明らかにすることは，発癌機構の解明，ひいては生活環境中に存在する多種多様な化学物質の安全性予知・予防に大きく貢献するものと思われる．

芳香族アミン化合物は，石炭由来の製品中（液化油，タール等）に高濃度で存在するほか，有機物の燃焼過程においても発生し，その中にはAmes試験で強い変異原性が示され，動物試験において高頻度の腫瘍発生が認められた化合物も多い．中でも2-アセチルアミノフルオレン（2-AAF）については研究が進んでおり，究極変異原物質の形成には，ミクロソームの酵素によるN-水酸化反応と，細胞質の酵素によるO-アシル化またはN-脱アセチル化反応が必須とみられている[1]．このN-水酸化反応は，多数のアイソザイムの存在が知られている薬物代謝酵素（チトクロームP-450とも言われ，1種のヘムタンパク質である）によって行われ，特に，P-448型と呼ばれる3-メチルコランスレン（3-MC)[2]やPCBによって特異的に誘導される型のアイソザイムによって強く解媒される．

しかしながら奇異なことに，通常行われているAmes試験法で，PCBまたは3-MCで誘導したラットの肝S9分画を用いて活性化を行った場合にはそれほど強い変異原性が認められず，逆にフェノバルビタール（PB）で誘導した場合に強い変異原性が認められる[3,4]．われわれは，先に，PB誘導ラットの肝S9分画によって示された2-AAFの活性化が，3-MCまたはPCB誘導ラットの肝S9分画を加えることによって阻害されることを報告した[5]．

本報告では，PB誘導ラット肝S9の芳香族アミン類

* 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
** 同　毒性部薬理研究科
*** 同　毒性部病理研究科
**** 慶応義塾大学医学部薬理学教室

の代謝活性化機構について明らかにする目的で，PB誘導ラット肝ミクロソームから数種類の部分精製チトクロームP-450分画を得，NADPH-チトクロームC・リダクターゼ（fpt）およびリピッドと再構成した系で，2-AAFの脱アセチル体である2-アミノフルオレン（2-AF）の変異原活性化反応について検討を行った．

実験方法

1．動物・投与方法　5週令のSlc:SDラット雄（飼料：オリエンタル酵母㈱MNF）に1週間PB投与を行った（0.1%，飲水中）．屠殺前1晩絶食を行った．

2．肝ミクロソームの調製　断頭後，1.15% KCl溶液で潅流を行ったのち肝臓を切り出した．秤量・細切後，3倍容の同溶液でホモジナイズし，9,000×gで20分遠沈を行った．上清を105,000×gで60分遠沈し，得られた沈澱を懸濁後，再び30分遠沈を繰返した．沈澱は水に懸濁させて-80°Cで保存した．

3．P-450およびfptの精製

肝ミクロソーム（蛋白3.3 g，P-450　8,000 nmole）を0.8%コール酸ソーダ，100 mMリン酸緩衝液（K塩，pH 7.4），1 mM EDTA，1 mMジチオスレイトール（DTT），20%グリセロール存在下で1時間可溶化した（4 mg蛋白/m*l*）．105,000×g遠沈上清を*w*-amino-*n*-octyl Sepharose 4 Bカラム（3.2×37 cm）にのせ，10 mMリン酸塩（K塩，pH 7.4），0.5%コール酸ソーダ，0.1 mM EDTA，1 mM DTT，20%グリセロールからなる溶液500 m*l*で洗った．緩衝液A（上記溶液に0.2%の非イオン性界面活性剤Emulgen 911を添加）900mlおよび緩衝液B（リン酸塩濃度を200 mM，Emulgen濃度を0.5%に上げた以外は緩衝液Aと同一組成）500 m*l*で溶出を行うと，P-450は2つのピークになって溶出されてくる[6]．このピークⅠおよびⅡ（Ⅱは緩衝液Aで透析後）をそれぞれWhatman DE-52カラム（3.2×40～50 cm）にのせ，緩衝液Aおよび食塩添加の同溶液で順に溶出を行った．ピークⅠおよびⅡから溶出されたそれぞれの2つの分画をⅠa，Ⅰb，Ⅱa，Ⅱbとした．ピークⅠではカラム上になお2つの幅の広いP-450のバンドが残っている．その部分の樹脂を取出してP-450の抽出を行い，Ⅰc，Ⅰd分画とした．以上の6つのP-450分画をそれぞれヒドロキシルアパタイト・カラム（2.5×8 cm）にのせ，160 m*l*の40 mMリン酸塩（pH 7.25），0.2% Emulgen 913，20%グリセロール溶液で洗ったのち，界面活性剤を除くため120 m*l*の40 mMリン酸塩，20%グリセロール溶液で洗い，400 mMリン酸塩，20%グリセロール溶液で溶出した．各P-450分画を50 mMリン酸塩（pH 7.25），20%グリセロール溶液で1夜透析し，N_2ガス気相下，−80°Cで保存した．なお，カラム操作はすべて4°Cの低温室内で行った．

また，β-ナフトフラボン（β-NF）処理（40 mg/kg体重，4日間）ラットのDE-52カラムⅡa，Ⅱb分画から高度に精製されたP-448標品（それぞれ高スピン型，低スピン型）を得た．

また，PB投与ラットの肝臓からYasucochi & Masters[7]の方法に準じてfptの精製を行った．

4．再構成系における変異原活性の測定　用いた菌株は*Salmonella typhimurium* TA 98である．再構成系（0.5 m*l*）の組成は，dilauloyl-L-3-phosphatidylcholine 15 μg，P-450分画0.1 nmole，fpt 0.5 U，HEPES（pH 7.4）25 μmole，$MgCl_2$ 15 μmole，EDTA 50 pmole，コール酸ソーダ0.064%，2-AF 5 μg，DMSO 0.1%，NADPH 1 μmoleである．NADPH非存在下で5分間プリインキュベーションした後，NADPHおよび菌溶液0.1 m*l*を加えて15分間反応を行わせた．この反応溶液に2 m*l*のソフトアガーを加えてよく混和した後，直ちに寒天平板上に薄く広げた[8]．37°Cで2晩インキュベートした後，コロニー数を数えた．

5．その他の測定法　P-450量はOmura & Sato[9]の方法で，fpt活性はPhillips & Langdon[10]の方法で，蛋白量はLowry *et al*[11]．の方法で測定した．SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動は，Laemmli[12]の方法に従って行った．

結果と考察

1．PB誘導ラット肝からのチトクロームP-450アイソザイムの部分精製

Fig. 1に*w*-aminooctyl Sepharoseカラムおよび DE-52カラムのP-450溶出パターンを示した．最初のカラムにおける回収率は，ピークⅠ，25.2%，ピークⅡ，39.0%，全体で64.2%であった．2つのピークは，DE-52カラムでさらに6つの分画に分けられた．量的に少ないP-450が高い変異原活性化能を有している可能性が考えられたため，今回の実験ではわずかのP-450を含む溶出液も捨てないように留意した．従って，ピークⅠの各分画の回収率は，a～dの順に17.0，28.3，16.1，27.7%，ピークⅡの各分画の回収率は，a，32.0%，b，44.3%，DE-52カラム全体での回収率は82.0%で，きわめて良好であった．さらに各分画はヒドロキシルアパタイト・カラムで精製され，ミクロソーム中に存在したP-450の32.0%が回収された．

最終標品の収量，回収率，P-450の比含量，CO差ス

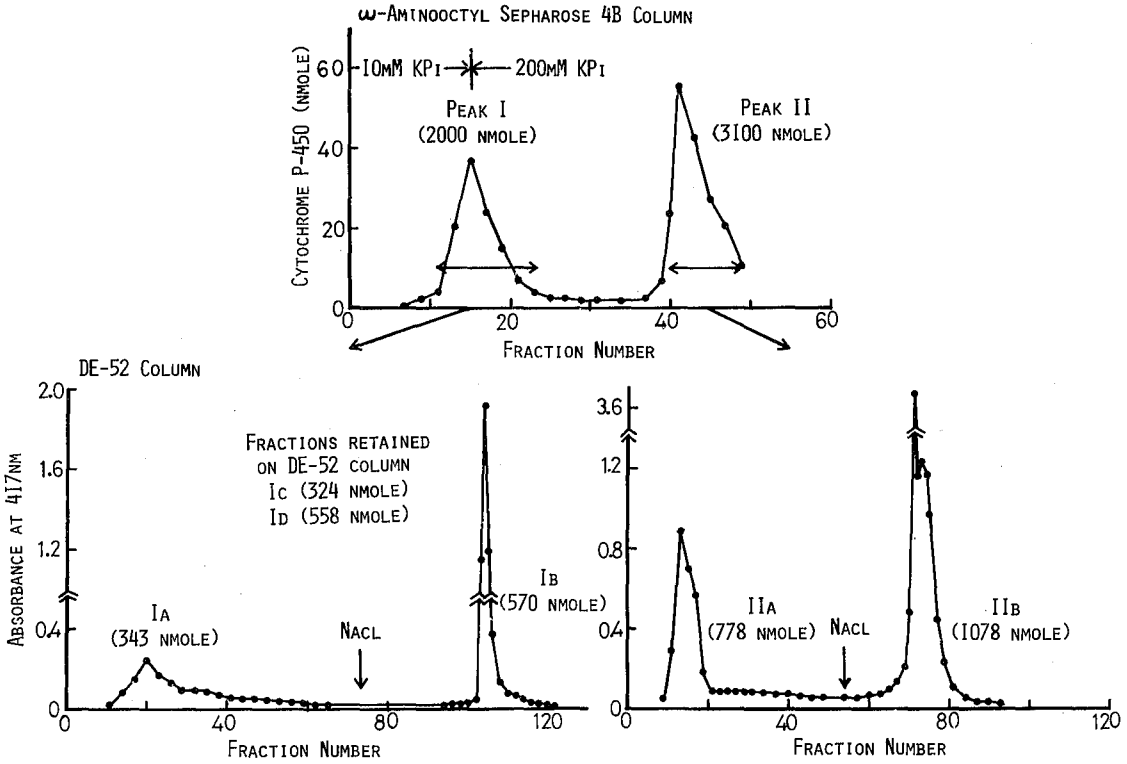


Fig.1. Elution profiles of cytochrome P-450 fractions obtained by *w*-aminooctyl Sepharose 4 B and DE-52 column chromatography.

Table 1. Recovery and properties of cytochrome P-450 fractions partially purified from phenobarbital-treated male rats.

Fraction	Yield (nmole)	Recovery (%)	Specific content (nmole/mg protein)	Peak of CO difference spectrum (nm)	Mr
Ia	268	3.37	4.16	449.7	52,000
Ib	438	5.51	7.78	450.0	51,500
Ic	227	2.85	13.97	450.1	53,500
Id	289	3.63	11.69	450.4	54,000
IIa	548	6.89	8.40	449.6	51,500
IIb	776	9.76	9.68	448.9	(52,000 53,500)

Cytochrome P-450 and protein contents of original microsomal protein preparation used for enzyme separation were 7950 nmoles and 3.3 g, respectively.

ペクトルのピークの位置，SDS電気泳動における主要バンドのみかけの分子量（Mr）を Table 1 に示した．Fig. 2 に Laemmli 法による SDS電気泳動図を示した．

West ら[13] によって精製され，後に Waxman & Walsh[14] によって2種のアイソザイムからなることが明らかにされたいわゆる PB 誘導型の P-450は，Ic および Id 分画とみられる．この分画は，電気泳動的にほぼ単一になっており，比含量が11～14と低いのはアポ酵

Table 2. Mutagenic activation of 2-aminofluorene in reconstituted cytochrome P-450 systems utilizing lipid and NADPH-cytochrome c reductase.

Source of cytochrome P-450	Cytochrome P-450 fraction	Revertants/plate		
		− NADPH(A)	+ NADPH(B)	(B)−(A)
Phenobarbital-treated rats	Ia	41	499	458
	Ib	37	301	264
	Ic	40	536	494
	Id	37	319	282
	IIa	33	378	345
	IIb	29	422	393
β-Naphthoflavone-treated rats	IIa	53	2236	2183
	IIb	51	1043	992

Mutagenesis was assayed by the Ames test method using *Salmonella typ.* TA 98.

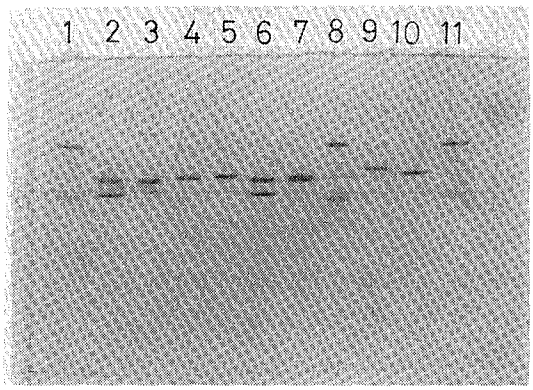


Fig.2. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of cytochrome P-450 fractions obtained from phenobarbital- and β-naphthoflavone-treated rats. Wells 1, 8 and 11 were a standard protein mixture (bovine serum albumin, Mr 68,000; catalase, Mr 60,000; glutamate dehydrogenase, Mr 53,000; ovoalbumin, Mr 43,000); wells 2-7 were Ia-Id, IIa and IIb fractions from phenobarbital-treated rats; wells 9 and 10 were β-naphthoflavone-inducible low and high spin forms of cytochrome P-448, respectively.

素に変換したためと考えられる[14].

その他の分画は，回収率を上げることを主目的とした本実験においては，電気泳動的に単一と認められる程度にまで精製することはできなかった．しかしながら，主要バンドの分子量およびCO差スペクトルのピークの波長に微妙な違いが認められることから，異なったP-450アイソザイムの存在がうかがわれる．しかも，各分画のP-450の回収率は3％から10％といずれもかなり高い．なお，これらの分画は，いずれも低スピン型の吸収スペクトルを示した．

3-MC型の誘導剤であるβ-NFを投与したラットのDE-52カラムIIa，IIb分画から，高スピン型および低スピン型のP-448を電気泳動的に単一にまで精製した．各々の分子量は54,000および56,000，CO結合差スペクトルのピークの波長は，447.1 nmおよび446.6 nm，P-450の比含量は，14.8および18.1 nmole/mg蛋白であった．

2．再構成系における2-AFの変異原活性化反応

PB処理ラットから分離された6種類のP-450分画，β-NF処理ラットから精製された2種類のP-448分画をそれぞれfptおよびリピッドと再構成し，2-AFの変異原活性化反応を *Salmonella typ.* TA 98を用いて調べた．結果をTable 2に示した．最も高い活性を示したのはβ-NF IIa分画つまり高スピン型のP-448で，次がβ-NF IIb分画つまり低スピン型のP-448であった．以上の結果からみて，3-MC誘導ラットの肝S 9分画で2-AFの活性化を行ったとき，低い突然変異誘発率しか認められない原因は，N-水酸化反応以外（例えば，生じた活性体のミクロソーム中の高分子化合物との結合等）に求める必要があると思われる．また，PB誘導ラットから得られた6種類のP-450分画のすべてが，高スピン型のP-448の12～23％，低スピン型のP-448の27～50％のかなり強い活性を示した．このような多数のP-450分画のすべて（この中には当然非誘導型のP-450も含まれていると思われる）が，かなりの程度で2-AF

の活性化を行うことから推測すると，肝臓のみならず，肺，腎臓，腸管，皮膚等，動物組織に広く分布している別種のアイソザイムによっても芳香族アミン類の変異原活性化反応が行われている可能性が考えられる．このことは，環境中に存在する化学物質による発ガンの可能性を考えた場合，重要な意味をもっているのかもしれない．

結　語

PB誘導ラットの肝ミクロソームから，*w*-aminooctyl Sepharose 4B，DE-52，ヒドロキシルアパタイト・カラムを用いて，6種類の部分精製チトクロームP-450分画を高収量（32.0%）で得た．これらのP-450分画および β-NF 誘導ラットから精製した2種類のP-448分画を，NADPH-チトクロームC・リダクターゼおよびリピッドと再構成させた系において，芳香族アミン，2-アミノフルオレンの変異原活性化反応を *Salmonella typ.* TA 98 を用いた Ames 試験法で調べた．その結果，PB誘導ラットから得られたP-450分画のすべてが，P-448には及ばないがかなり強い変異原活性化能を有することが示された．

文　献

1) 出川雅邦，橋本嘉幸：変異原と毒性，第5集，34，1979
2) Razzouk, C., Mercier, M. and Roberfroid, M. *Cancer Res.*, **40**, 3540, 1980
3) Schut, H. A. J., Wirth, J. and Thorgeirsson, S. S. : *Mol. Pharmacol.*, **14**, 682, 1978
4) Gregoire, M. B., Razzouk, C., Leonard, E. A., Mercier, M., Poncelet, F. and Roberfroid, M. : *Toxicol. Lett.*, **7**, 385, 1981
5) Kojima, A., Kawano, S. and Hiraga, K. : *Japan. J. Pharmacol.*, **30**, 421, 1980
6) Kamataki, T., Maeda, K., Yamazoe, Y., Nagai, T. and Kato, R. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 1, 1981
7) Yasukochi, Y. and Masters, B. S. S. : *J. Biol. Chem.*, **251**, 5337, 1976
8) 矢作多貴江：蛋白質・核酸・酵素，**20**，1178，1975
9) Omura, T. and Sato, R. : *J. Biol. Chem.*, **239**, 2379, 1964
10) Phillips, A. H. and Langdon, R. G. : *J. Biol. Chem.*, **251**, 5337, 1962
11) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951
12) Laemmli, U. K. : *Nature*, **227**, 680, 1970
13) West, S. B., Huang, M.-T., Miwa, G. T. and Lu, A. Y. H. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **193**, 42, 1979
14) Waxman, D. J. and Walsh, C. : *J. Biol. Chem.*, **257**, 10446, 1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 260-263, 1983

東京湾産スズキに反映された環境汚染の現状

瀬戸　博*, 加納堯子*

Chlorinated Hydrocarbon and Other Chemical Residues in Japanese Sea Bass from Tokyo Bay

HIROSHI SETO* and TAKAKO KANO*

For assessing human exposure to environmental pollutants, it is necessary to survey the levels of PCB and other pollutants in biological samples. The data reported in this paper are part of a continuing monitoring programme of environmental pollutants in biota collected from the Tokyo bay. Residual concentrations of the detected chemicals in fish (Japanese sea bass, *Lataolabrax japonicus*) on wet weight basis respectively were as follows : PCB (0.48-1.03ppm), α-BHC (0.002-0.004ppm), o,p′-DDE (nd-0.003ppm), p,p′-DDE (0.012-0.086ppm), o,p′-DDD (0.003-0.009ppm), p,p′-DDD (0.012-0.045ppm) and 1,2,4-Trichlorobenzene (0.002-0.004ppm).

Keywords : pollution, chlorinated hydrocarbon, sea bass

緒　言

環境中の化学物質の量的推移の把握は保健対策上重要である．環境庁は化学物質の環境安全性の点検の中核として環境調査[1]を昭和49年度から行っている．当衛生研究所も昭和56年度から環境庁の委託を受け，この事業に参加している．本報告は昭和56年度に調査した，東京湾産スズキ（japanese sea bass, *Lataolabrax japonicus*）中の29種類の化学物質の測定結果についてまとめたものである．

試料および分析方法

試料　昭和56年10月，富津沖で捕獲されたスズキ5尾（5検体）を試料とした．試料は捕獲後放血処置をし，分析するまで−20°C で凍結保存した．測定時，室温で解凍した魚体の体重，体長（吻部から尾部付け根まで）を測定後，三枚におろし頭，骨，皮，内臓等を除き肉部のみとした．さらに肉を細切りし，一尾ごとに均一になるように混合し100 m*l* のSPC 三角フラスコ中に20 gづつ秤量のうえ保存した．以上の操作は汚染を防ぐためにあらかじめ、n-ヘキサンで洗浄した器具を用いて行った．

分析方法　1. 水分および脂肪分：「衛生試験法注解」[2]の常圧加熱乾燥法[2a]およびエーテル抽出法[2b]をそれぞれ用いた．2. PCB，農薬等の分析：環境庁の指示する分析方法[3]を一部変更して行った．すなわち、イ. PCB の数値化は係数法[4]を採用した．ロ. BHC，DDTおよびドリン類のフロリジルカラムクロマトグラフィーは，それぞれn-ヘキサン分画（アルドリン，*o*, *p*′-DDE, *p*, *p*′-DDE, *o*, *p*′-DDT），4%エーテル分画（α-, β-, γ-BHC, *p*, *p*′-DDT, *o*, *p*′-DDD, *p*, *p*′-DDD）および15%エーテル分画（δ-BHC, ディルドリン，エンドリン）とした．なお，確認試験およびガスクロマトグラム上でピークが重なり測定不能の試料はマスフラグメントグラフィーを行った．詳細な操作法，条件等は文献(5)に報告した．

分析した化学物質の一般名および略称は次の通りである．PCB（ポリ塩化ビフェニル），PCN（ポリ塩化ナフタレン），BHC（ヘキサクロロシクロヘキサン　4種），アルドリン，ディルドリン，エンドリン，DDT（2.2−ジ（クロロフェニル）−1,1,1−トリクロロエタン　2種），DDE（1,1−ジクロロ−2,2−ビス（クロロフェニル）エチレン　2種），DDD（1,1−ジクロロ−2,2−ビス（クロロフェニル）エタン　2種），HCB（ヘキサクロロベンゼン），DnBP（ジ-n-ブチルフタレート），DEHP（ジエチルヘキシルフタレート），TBP（トリブチルフォスフェート），DCB（ジクロロベンゼン　3種），TrCB（トリクロロベンゼン　3種），TeCB（テトラクロロベンゼン　3種），PeCB（ペンタクロロベンゼン）

* 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

Table 1. Concentration of Pollutants in Sea Bass.

(ppm on wet basis)

compound	range	mean	*
PCB	0.48−1.03	0.75	5/5
PCN	nd*1	nd*1	0/5
α−BHC	0.002−0.019	0.006	5/5
β−BHC	nd	nd	0/5
γ−BHC	nd −0.004	−	4/5
δ−BHC	nd	nd	0/5
aldrin	nd	nd	0/5
dieldrin	nd −0.001	−	1/5
endrin	nd	nd	0/5
o, p′−DDT	nd	nd	0/5
p, p′−DDT	nd	nd	0/5
o, p′−DDE	nd −0.003	−	4/5
p, p′−DDE	0.012−0.086	0.043	5/5
o, p′−DDD	0.003−0.009	0.006	5/5
p, p′−DDD	0.012−0.045	0.030	5/5
DnBp	nd*2	nd*2	0/5
BEHP	nd*2	nd*2	0/5
TBP	nd*1	nd*1	0/5
o−DCB	nd*1	nd*1	0/5
m−DCB	nd*1	nd*1	0/5
p−DCB	nd*1	nd*1	0/5
1,2,3−TrCB	nd	nd	0/5
1,2,4−TrCB	0.002−0.004	0.004	5/5
1,3,5−TrCB	nd	nd	0/5
1,2,3,4−TeCB	nd	nd	0/5
1,2,3,5−TeCB	nd	nd	0/5
1,2,4,5−TeCB	nd	nd	0/5
PeCB	nd	nd	0/5
HCB	nd −0.001	−	3/5

* Numerater : Number of samples in which chemical pollutants were detected, Denominator : Number of samples tested.

nd : <0.001, *1 : <0.01, *2 : <0.1

試薬 標準物質は市販の標準品，溶剤類，無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用を用いた．フタル酸エステル類分析用溶剤は再蒸留してから使用した．他の試薬類は市販の特級品を用いた．

装置 ガスクロマトグラフ：島津 GC-5A，GC-4BM ECD (^{63}Ni, 10 mCi) 付き，GC-R1A FTD 付きを使用した．ガスクロマトグラフ質量分析計：ヒューレットパッカード HP-5710 Aに日本電子 JMS D-300 を接続したものを使用した．

結果および考察

試料に用いたスズキの体重は，1,046−1,436 g，平均1,273 g，体長は40.0−44.5 cm，平均42.6 cm，水分は72.0−74.5%，平均73.5%，脂肪分は1.4−9.6%，平均5.0%であった．

分析結果を Table 1 に示した．試料から高頻度に検出された物質は，PCB, α-BHC, γ-BHC, o, p′-DDE, p, p′-DDE, o, p′-DDD, p, p′-DDD, HCB および 1,2,4-TrCB の 9 種類である．嶋津ら[6] の統計解析によると昭

Table 2. Trends in Chlorinated Hydrocarbon Residus in Sea Bass.

(ppm on wet basis)

compound	1978*	1979*	1980*	1981
PCB	0.3	0.4	0.3	0.75
HCB	0.002	0.002	0.002	nd−0.001
α−BHC	0.006	0.002	0.005	0.006
dieldrin	0.007	0.012	0.011	nd−0.001
p, p′−DDE	0.029	0.037	0.052	0.043
p, p′−DDT	0.013	0.028	0.007	nd
1,2,4−TrCB	−	−	nd−0.001	0.004

*: data from ref. 1. −: not determined.

Table 3. Correlation Matrix.

	weight	length	fat	PCB	α−BHC	γ−BHC	p,p′−DDE	p,p′−DDD
weight	1.0000	0.6326	0.8792	0.4838	−0.2997	−0.3863	0.0888	−0.1181
length		1.0000	0.8058	0.9135	0.3459	0.3950	0.3573	0.2381
fat			1.0000	0.7336	−0.2628	−0.2088	0.2553	−0.0525
PCB				1.0000	0.2349	0.3491	0.0502	−0.0876
α−BHC					1.0000	0.9560	0.3082	0.6120
γ−BHC						1.0000	0.3591	0.5914
p,p′−DDE							1.0000	0.9087
p,p′−DDD								1.0000

和56年度のスズキ中の総DDT，総BHCおよびPCBの濃度は，いずれも，大阪湾＞東京湾＞瀬戸内海という傾向を示し，統計的に有意差があるという．

昭和53～56年度調査のスズキ（東京湾）について得られた測定値を体長補正すると，ディルドリンをはじめ総BHC，総DDTに減少傾向が認められた[7]．しかし，PCBは横ばいで，今回の測定値は平均0.75 ppm，従来の報告よりも若干高い値を示した（Table 2）．体長補正効果はスズキの場合，総BHC，総DDTでは顕著に認められるが，PCBでは明確でない[7]．しかし統計処理を試みた結果，後述するように少数例ではあるがスズキのPCB濃度は体長，体重と正の相関がある．

スズキは内湾性の魚で甲殻類・小魚・貝類などを貪食し，PCBの蓄積傾向はコノシロと並んで最も高い魚類に属する[8]．スズキの食性から考察すると他の汚染物質も同様にスズキ体内に濃縮されて存在すると考えられるので生物指標としてふさわしい魚種の一つであろう．しかし，加令と共に，スズキは大型化するために同一生物種でも個体差が認められて分析結果にばらつきが生じやすい．成魚より大きな集団で生活する若令魚層からサンプリングし5尾程度を1検体として分析すれば上記欠点を補えるものと思われる．毎回同じような集団からサンプリングできるような方策を確立することが重要である．

いずれにしても，これらの結果は現在すでに使用禁止されているPCB，BHC，DDTのような難分解性で生物蓄積性の高い物質による汚染が依然として認められることを示している．また塩素化ベンゼンの中で，1,2,4-TrCBの増加傾向が注目された．他の物質を含めて長期にわたる観察が不可欠である．

相関分析　体重，体長，脂肪分，PCB，α-BHC，γ-BHC，*p, p′*-DDE，*p, p′*-DDDの相関関係を調べるため相関係数を求めた（Table 3）．体長と体重，脂肪分，PCB濃度との間に正の高い相関があるが，他の汚染物質とはあまり高い相関はない．α-BHCとγ-BHC，*p, p′*-DDEと*p, p′*-DDDの間には共に正の高い相関がある．これらの結果は，化学的に類似する同族の物質が生態系の中で似たような挙動をしていることを示唆している．しかし

ごく少数の標本からの結果であるので今後例数を増やし汚染の要因，汚染物質の消長および相互の関係などについて検討を試みる．

謝辞 本調査のため試料採取等御尽力いただいた衛生局医療福祉部公害保健課各位に感謝いたします．

文 献

1) 環境庁編：ケミカルアセスメントアニュアルレポート（化学物質と環境）**No.1**, 1975～**No.7**, 1981
2) 日本薬学会編：衛生試験法注解，2a) 139，2b) 177，1980，金原出版
3) 環境庁編：生物指標環境汚染測定調査分析法，1978
4) 日本工業規格 JIS K 0093，1974
5) 東京都立衛生研究所：昭和56年度生物指標環境汚染測定調査報告書，1982
6) 嶋津靖彦，武田明治，広崎昭太：生物指標環境汚染測定調査（生物モニタリング）データの統計学的な解析，環境庁編，14，1983
7) ibid，12，1983
8) 山崎清子，水石和子，竹内正博，吉原武俊：東京衛研年報，33，182，1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 34, 264-276, 1983

Experimental proof of itching papules caused by *Cheyletus malaccensis* Oudemans

MIDORI YOSHIKAWA*, KIYOSHI HANAOKA**, YURIKO YAMADA***
and TAKASHI MIKATA****

It was experimentally proven that *Cheyletus malaccensis* bit the human skin and caused an itching papule when mites were individually kept in a newly developed cage which directly touched the skin for 24 hours. Itching papules 2 −20 mm in diameter appeared on the skin of volunteers of A, B and C, while no distinct papule or erythma appeared on the skin of volunteer D. The occurrence of papules to all cages attached to the skin of each volunteer excluding control was 46% (A), 33% (B) and 10% (C). However, the rate calculated for mites found alive after 24 hours attached to the human skin was 87% (A), 50% (B) and 25% (C). It was concluded that *C. malaccensis* was responsible for the recently reported itching papules and that the best method for confirming this fact was to use a flat shell button which was glued with paper on one side and then to fix the button on the skin with surgical tape covered by adhesive plaster.

Keywords : papule, pruritic dermatitis

Introduction

Since 1979, many residents of concrete apartment buildings less than three years old have been troubled with pruritic dermatitis, especially in August and September[1-2]. Cheyletids were significantly larger in number in dermatitis-troubled buildings than in buildings where there was no dermatitis, excluding buildings where sucking insects, mites, or organisms already known to bite humans were collected[3]. Therefore, cheyletids were suspected to be related to dermatitis. Field data indicated that the occurrence of dermatitis was closely related to the density of cheyletids [4], but there was no evidence that they bite humans. The present paper tries to prove that a cheyledtid mite of *Cheyletus malaccensis* Oudemans bites humans and causes itching papules, using a newly developed method.

Materials and Methods

C. malaccensis

C. malaccensis was initially isolated from rice which was used for breeding *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank). *C. malaccensis* was cultivated in a fan-shaped glass bottle, living on *T. putrescentiae* bred in mouse-lab-chow powder at 20-25°C 75-80% R.H.[5] Of these cheyletids, larvae, nymphs, males and nonpregnant females were picked up one by one with a fine brush under a microscope, and then were placed in a glass specimen bottle 8 mm in diameter and 35 mm high, closed with a cork stopper. Each bottle contained one mite, because cheyletids prey on each other. The cheyletids were deprived of food and water for 2 to 3 days at 20°C 75-80% R.H.

Mite cage

Five types of cages such as a glass tube, a teflon tube, a vinyl tube, a cardboard tube and a shell button were prepared; a glass tube 1 - 2 mm in diameter and 2 mm high, a teflon tube 2 mm in diameter and 0.7- 1 mm high, a vinyl tube 2.5 mm in diameter and 0.7- 1 mm high, a cardboard tube 1.5- 2 mm in diameter and 1 mm high and a

* 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環境衛生
*** 東京都八王子保健所衛生課環境衛生
**** 中野区北保健所衛生課環境衛生

flat shell button 6 mm in diameter and 1 mm high, with two 1 mm–diameter holes. One side of each cage was covered by a 5 –cm square of Japanese rice paper, glued with Yamato–nori paste, taking care not to get paste inside the cage. After drying the paste for a day, the cage was used for the following experiment.

Fixing mites on human skin

Each living starved mite was individually caged with a fine brush, with careful attention not to be wounded. Each mite was then checked under the microscope to make sure it was alive. The un–papered side of the cage was fixed on human skin for 24 hours so that the mite could directly touch the skin (Fig. 1).

Three methods were used for fixing the cages on skin : 1) Japanese rice paper surrounding the cage was cut in a 1.5-cm square and then fixed on the skin with adhesive plaster having a small hole for providing an air vent (Photo 1) ; 2) The Japanese rice paper was cut in a 3 -cm square and then fixed with adhesive plaster having an air vent. Then the plaster was fastened with 1 –cm–wide adhesive bands (Photo 2) ; 3) The paper was cut in a 1.5–cm square, fixed first with a few surgical tapes, and then covered with adhesive plaster having an air vent (Fig. 1).

Volunteer for the biting test

Four volunteers of A, B, C, and D who are younger than 40 years old were participated in the biting tests. Volunteer A who is a male attends a hospital to treat bronchial asthma. He tested five types of cages, three types of fixing methods and mites which were starved for 2 - 3 days. Volunteer B who is a healthy female tested three types of cages such as a glass tube, a teflon tube and a vinyl tube, fixing method of adhesive plaster and the bands (the 2 nd type of fixing) and mites which were starved for 3 days. Controls in which mites were absent were performed using a glass and a teflon tube. Volunteer C who is a healthy male tested two types of cages (vinyl and teflon), fixing method of surgical tape and adhesive plaster (the third type of fixing) and mites which were starved for 2.5 days. Controls were performed in a vinyl and a teflon tubes. Volunteer D who is a healthy female and had been breeding *C. malaccensis* for more than ten years tested three types of cages (glass, cardboard and vinyl),two types of fixing methods (the first and the third types) and mites which were starved for 2 days. Controls were performed in a glass and a vinyl tubes.

Results

After the mites were removed, A, B and C had itching papules over 1 mm in diameter found under one to ten cages in one of the tests. However, D had no papules sized over 1 mm. Changes in color, size degree of itching for A, B and C were recorded for 5 to 15 days after removal of the mites. In the record, the "first day" refers to the day the mite was removed after 24 hours exposed on human skin, and the "second day" is the next day after removal of the mite.

Volunteer A

His papules were the most severe of all the volunteers because one of them formed a vesicle (Table 1 - 3). At the morment when the mites were removed no papules were found, although the skin under or around the cages and plasters were tinged with red. Itching papules appeared under several cages after about 1.5days. The papules were largest (5 -20 mm) and their red color was clearest on the second day (Photos 3 - 7). Later the papules became small and pale, although pigmented relics were remained.

He felt itching around seven hours after the mites were fixed on his skin, but it could not be determined whether this itching was caused by mites, cages or adhesive plasters. He felt itching near the papules most severely at night on the second day after removol, and this lasted continuously until the third day and intermittently until the fourth to fifth day. No papule appeared in the controls.

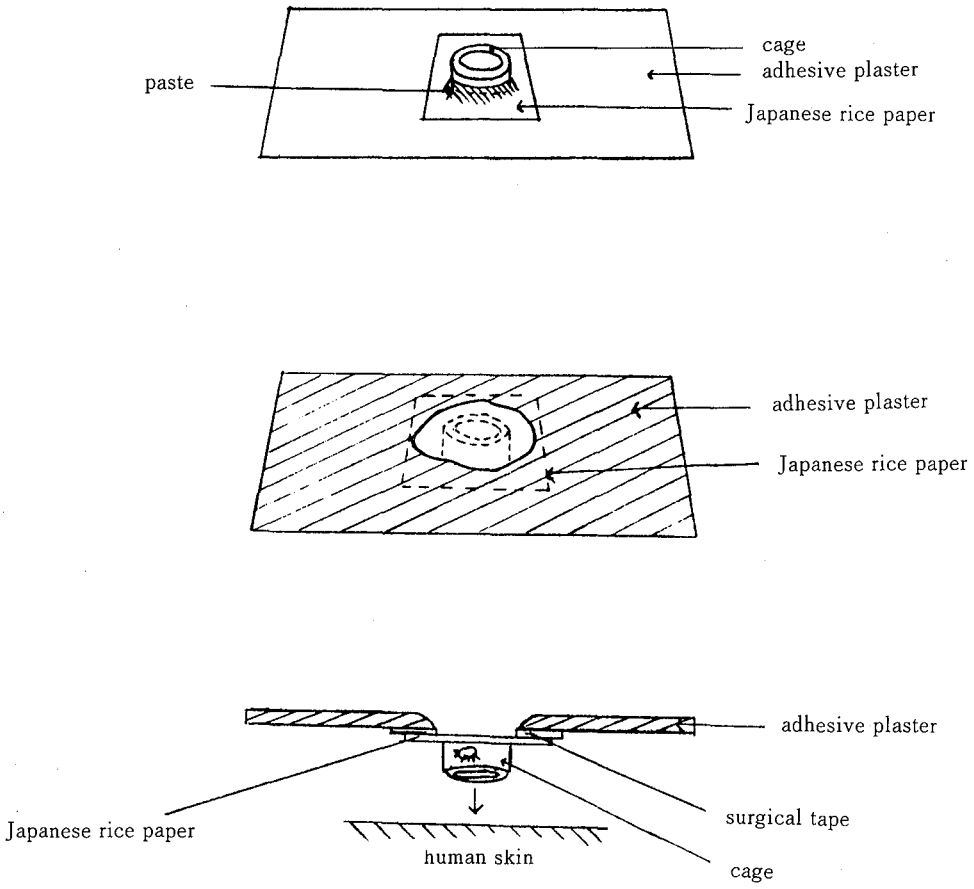


Fig.1. Fixing a cage on human skin Top : surface of cage; middle : back of cage with an air vent hole in the center; bottom : cutaway view of cage

Volunteer B

When the mites were removed from her skin after 24 hour-exposure, their condition was as follows : one living female in a teflon tube, a living male and female and one missing in three glass tubes, and three living males, one living female and one dead nymph in five vinyl tubes.

On the second day, a 5 -mm diameter papule appeared under a living female in a teflon tube and a living male in a glass tube, and a 1 -mm diameter erythma under a living male in a vinyl tube (Photos 8 - 9). The 1 -mm diameter erythma faded away on the third day, but the 5 -mm diameter papules remained as relics until the fifteenth day, gradually changing in size and color.

She felt itching beginning 30 minutes after the mites were attached, but it was not certain whether this was caused by mites. Itching began around the three of papules on the first day, it was most severe on the second day, but was intermittent on the third day. Subsequently it became weaker day by day.

The itching which she had felt faintly around the cage or adhesive plasters faded away a few hours after removal of the mites from her skin. No papules apppeared under or around the cages and adhesive plasters in the controls.

Table 1. Course of papules caused by *C. malaccensis* on skin of volunteer A in the first test

Mite & cage / Day passed					2nd				5th			10th			
Body part	Test no.	Mite sex or stage	Mite status	Type of cage	Dia.of papule (mm)	Col.	Itch	Photo no.	Dia.of papule (mm)	Col.	Itch	Dia.of papule (mm)	Col.	Itch	Photo no.
Arm inside	1	f	L	g	—	—	—		—	—	—	—	—	—	
	2	f	L	g	14	red*	felt		12	red	int. felt	10	pale	—	
	3	n	L	g	7	red	felt	3 a	5	red	int. felt	3	pale	—	4 a
	4	f	L	g	13	red	felt		13	red	int. felt	12	pale	—	
	5	m	D	g	—	—	—	3 b	—	—	—	—	—	—	
	6	n	D	g	—	—	—		—	—	—	—	—	—	
Arm outside	7	n	L	g	7	red	felt	3 C	7	red	int. felt	3	pale	—	4 b
Abdomen	8	f	L	g	—	—	—		—	—	—	—	—	—	
	9	f	L	g	10	red	felt		10	red	int. felt	8	pale	—	
	10	f	L	g	20	red	felt		15	red	int. felt	12	pale	—	
	11	n	L	g	5	red	felt	3 d	5	red	int. felt	3	pale	—	4 c
	12	m	D	g	2	red	felt		1	red	int. felt	—	—	—	
	13	n	L	g	5	red	felt		5	red	int. felt	4	pale	—	
	14	f	L	g	2	red	felt		1	red	int. felt	—	—	—	

Note 1. Mites were starved for 2 days in the first test.

Note 2. The asterisk (*) indicates that a vesicle appeared on the papule.

Note 3. Key for tables 1 to 3 is as follows :

mite stage : f : female, m : male, n : nymph

mite status : L : living, D : dead

type of cage : g : glass tube, v : vinyl tube, t : teflon tube, c : cardboard tube, b : button

others : Dia : diameter, Col. : color, int. : intermittently, slight. : slightly

Volunteer C

The condition of the mites after 24 hours on his skin were as follows : one living male, a dead larva and two missing in four vinyl tubes, and a dead male, three living nymphs and one missing in five teflon tubes.

A red rash 1 mm in diameter was found under a living nymph in a teflon tube when the mite was removed from his skin. However, he felt no itching, so this rash could not be described as a papule. After 1.5 days, the rash became more distinct and it appeared as a 5 -mm diameter itching papule on the second day (Photo 10). Later the swelling went down, but a red erythma remained until the sixth day, with the size and color nearly the same.

He felt itching 30 minutes after the mites were fixed on his skin, but it was not determined whether it was caused by the mites. At the night on the second day, he felt very severe itching on the papule. This lasted continuously until on the third day, but it occurred intermittently on the fourth and the fifth days. No papules or itching were found in the controls.

Papules caused by *C. malaccensis* varied in appearance among the volunteers, with large papules on A but only small papules on B and C. The size of high frequency was 5 to 7 mm in diameter for the three volunteers. The re-

Table 2. Course of papules caused by *C. malaccensis* on skin of volunteer A in the second test

Mite & cage / Day passed					3 rd				8 th			
Body part	Test no.	Mite sex or stage	Mite status	Type of cage	Dia.of papule (mm)	Col.	Itch	Photo no.	Dia.of papule (mm)	Col.	Itch	Photo no.
Abdomen	1	control		t	—	—	—		—	—	—	
	2	missing		t	—	—	—		—	—	—	
	3	m	D	v	—	—	—		—	—	—	
	4	missing		t	—	—	—		—	—	—	
Arm outside	5	m	D	v	—	—	—		—	—	—	
	6	control		v	—	—	—		—	—	—	
	7	m	D	v	8	red	felt	5 a	6	pale	—	5b (5th day's)
Arm inside	8	missing		v	—	—	—		—	—	—	
	9	f	D	v	—	—	—		—	—	—	

Note 1. Mites were starved for 3 days.

Note 2. Adhesive plaster and bands were used to fix cages on skin in the second test.

lationship between itching and the appearance of a papule also varied among the volunteers, with itching and papule appearing simultaneously for A, itching occurring first for B, and papule appearing first for C.

Discussion

C. malaccensis

Larvae, nymphs adult males and nonpregnant females were used for this test. Pregnant females were not active because of oviposition, while mites of other stages seeked for preys of *T. putrescentiae*, as observed with cheyletids.

The reason for starving the mites before the experiment was that unstarved mites would not attack human skin during a 24-hour period if frightened by the new environment of a cage. Therefore, each mite was starved for 2 to 3 days in order to stimulate its predation. When occurrence rate of papules on volunteer A, B and C was compared in different stages of mites the rate caused by nymphs was higher than by larva or adults (Table 4). However, the mortality during the stavation period became very high in larvae and nymphs. This might indicate that the starving period was too long for such small larvae and nymphs. But the two-day starvation period was appropriate for adults, because they attacked as frequently as mites starved for three days. Thus, adult *C. malaccensis*, except pregnant female, which was starved for two days was easy to be prepared for this test.

Table 4. Occurrence rate (%) of papules caused by different stage of *C. malaccensis* on volunteers A to C

adult	nymph	larva
39.3(11/28)	53.3(8/15)	0 (0/1)

Numerator : number of papules caused by each stage of mite

Denominator : number of cages in which stage of mite was kept

Mite cage

Among five types of cages, a flat shell button was the best because static electricity did occur and was soft and smooth on the skin and also cheap and easy to construct. Besides the occurrence rate of papules under cages of buttons was nextly high to the rate which appeared under glass tube cages (Table 5). Glass tube cages were difficult to make, and some volunteers felt itching when the edge of the tube was rough or broken. Vinyl and teflon tube cages were also easy to construct, but static electricity caused some mites to stick to surface of these tubes for most of the 24 hours. The cardboard tube cage was hard to construct, and a few mites escaped inside of the cardboard.

Table 3. Course of papules caused by *C. malaccensis* on skin of volunteer A in the third test

Mite & cage / Day passed					1st				2nd			5th			6th			
Body part	Test no.	Mite sex or stage	Mite status	Type of cage	Dia.of papule (mm)	Col.	Itch	Photo no.	Dia.of papule (mm)	Col.	Itch	Dia.of papule (mm)	Col.	Itch	Photo no.	Dia.of papule (mm)	Col.	Itch
—	1	n	D	c	—	—	—		—	—	—	—	—	—		—	—	—
Arm outside	2	n	L	c	12	red	felt	6a	12	red	felt	9	red	int. felt	7	9	red	almost no feel
	3	m	D	c	—	—	—		—	—	—	—	—	—		—	—	—
	4	missing		c	—	—	—		—	—	—	—	—	—		—	—	—
	5	control		c	—	—	—		—	—	—	—	—	—		—	—	—
	6	n	L	c	10	red	felt	6b	10	red	felt	6	red	int. felt		6	red	almost no feel
Arm inside	7	m	D	v	—	—	—		—	—	—	—	—	—		—	—	—
	8	n	D	v	—	—	—		—	—	—	—	—	—		—	—	—
	9	m	D	v	—	—	—		—	—	—	—	—	—		—	—	—
	10	control		b	—	—	—		—	—	—	—	—	—		—	—	—
	11	m	D	b	—	—	—		—	—	—	—	—	—		—	—	—
Abdomen	12	m	L	b	13	red	felt		13	red	felt	7	slight. red	int. felt		7	slight. red	almost no feel
	13	n	L	b	7	red	felt	6c	7	red	felt	9	slight. red	int. felt		9	slight. red	almost no feel
	14	n	D	b	—	—	—		—	—	—	—	—	—		—	—	—

Note 1. Mites were starved for 2 days in the third test.
Note 2. Surgical tapes and adhesive plaster were used to fix cages on skin in the third test.

Table 5. Occurrence rate (%) of papules caused by *C. malaccensis* on volunteers A to C under different type of cage

cage				
glass tube	teflon tube	vinyl tube	cardboard tube	shell button
64.7(11/17)	22.2(2/9)	11.8(2/17)	40.0(2/5)	50.0(2/4)

Numerator : number of papules appeared under each type of cage
Denominator : number of each type of cage used for the test excluding control

Table 6. Occurrence of papules experimentally caused by *Cheyletus malaccensis*

No.	Rate	volunter A	B	C	$\bar{X}$
I	Occurrence of papules caused by all mites (%)	45.5(15/33)	33.3(3/9)	10.0(1/10)	36.5
II	Occurrence of papules caused by living mites (%)	86.7(13/15)	50.0(3/6)	25.0(1/4)	68.0

I) Numerator : number of papules caused by all mites
Denominator : number of cages attached on skin excluding control
II) Numerator : number of papules caused by living mites
Denominator : number of cages in which mites are alive

Fixing a mite on human skin

Three types of fixing methods were used in order to distingish any irritation, itching or red rash caused by adhesive plaster from that caused by a mite. Itching produced by the plaster faded away on the first day at the earliest and on the second day at the lateset. Some areas under the plaster were tinged with red but the color had almost disappeared on the second day and no rash appeared. So, by the second day, any itching or red-tinged skin initially caused by the adhesive plaster could be easily distingished from itching or papules caused by mites. Among the three types of fixing methods, the one in which a 1.5-cm square of Japanese rice paper was fixed by a few surgical tapes and then covered by adhesive plaster was considered to be the best, since the area where the mite caused a papule was separated from the area of skin affected by the plaster.

Itching papule

The occurrence of papules caused by all mites, excluding control, and those caused by mites which were found alive when removed from human skin after 24 hours were calculated for the three bitten volunteers, A, B and C (Table 6). The rate caused by living mites was high and averaged 68.0%.

Under cages in which mites were dead after 24 hours, no papules were found except for two cases on volunteer A. These two mites were considered to be living when they bit him. It was assumed to be impossible for a cheyletid to cause a papule merely by touching human skin, because if this occurs, a much higher incidence of papules could be expected, not only under the living mites' cages but also under the dead ones'.

From the above considerations, *C. malaccensis* causes itching papules on human skin by biting, and the mites must be alive, movable and starved in order to cause the papules.

References

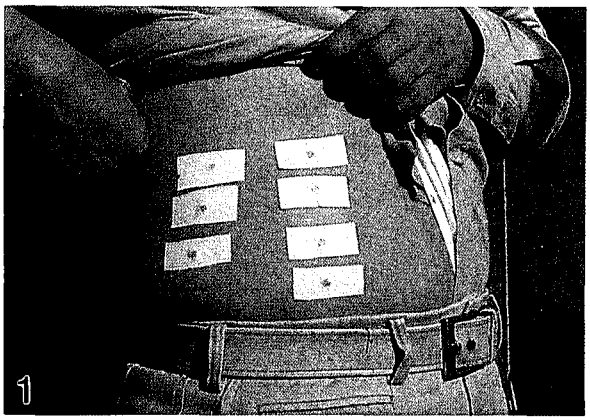
1) Yoshikawa,M : *Tokyo-to Eiken Nenpo*, 31-1, 253, 1980
2) Nagoya-city research report : *Report of research supported by Ministry of Health and Welfare subsidy for promoting scientific researches*, 1983
3) Yoshikawa, M : *J. of House and Household Insect pests*, 11, 62, 1982
4) Yoshikawa, M and K. Makino : *Pestcontrol*, 38, 1, 1982
5) Nakada, E : *Jap. J. Sanit Zool.*, 26, 151, 1975

クワガタツメダニによる虫咬症発症実験法

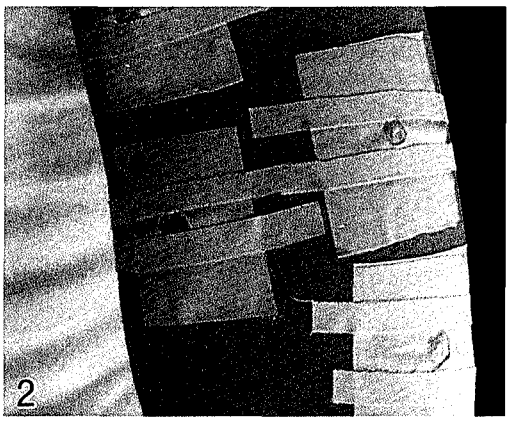
吉川 翠*, 花岡 暉**, 山田百合子***, 箕形 崇史****

新しく開発した方法を用いて，クワガタツメダニ *Cheyletus maraccensis* を人の皮膚上に24時間接触させ，掻痒性皮疹を実験的に発症させてみた。被験者A,B,Cは径2－20㎜の皮疹を生じたが，被験者Dは生じなかった。実験に使用した全ダニによる虫咬症発症率は，A：46%，B：33%，C：10%であったが，24時間後に生きていたダニによる発症率は，A：87%，B：50%，C：25%であった。以上から，クワガタツメダニは人に皮疹を起こすと結論した。また，それを証明する最良の実験方法は，2日間絶食させたダニ成虫を，片側を和紙で封じた貝製ボタンの穴に入れ，和紙の付いていない側を人の皮膚上にサージカルテープと絆創膏で固定する方法であった。

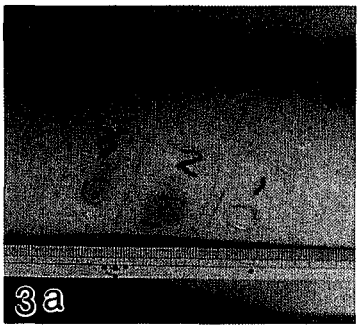
Photo 1 Mites fixed on skin of volunteer A with adhesive plaster, first test.
Photo 2 Mites fixed on skin of volunteer A with adhesive plaster and 1－cm－wide bands, second test
Photos 3 a ～ 3 d Papules appeared on the second day on volunteer A, first test.
Photos 4 a ～ 4 c Papules on the 10 th day on volunteer A, first test.
Photos 5 a ～ 5 b Papules on the third (a) and fifth (b) days on volunteer A, second test.
Photos 6 a ～ 6 c Papules on the first day on volunteer A, third test. (No.. 5 in 6 b is a control. The reddish parts on the left side of Nos. 13 and 14 in photo 6 c are relics caused in the first test.)
Photo 7 Papules on the fifth day on volunteer A, third test.
Photo 8 Papules on the third day on volunteer B.
Photo 9 Papules on the fifth day on volunteer B.
Photo 10 Papules on the second day on volunteer C. (No. 10 is a control.)



1

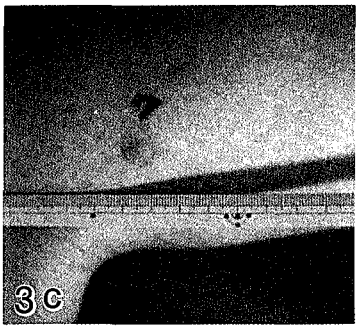


2

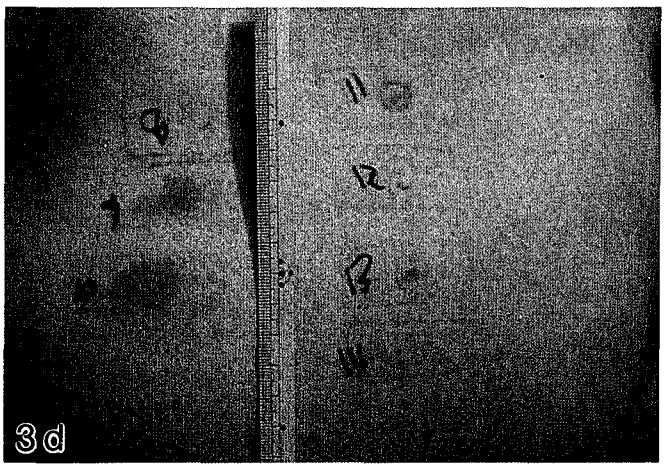


3a

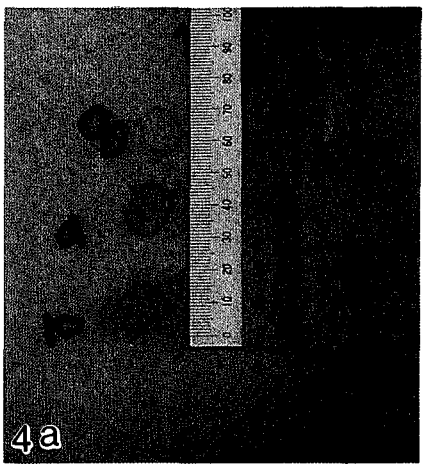
3b



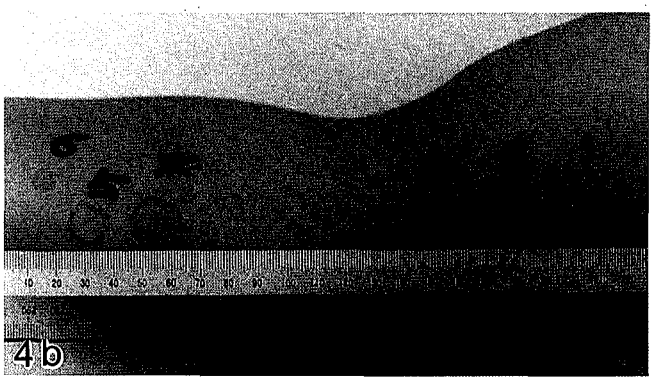
3c



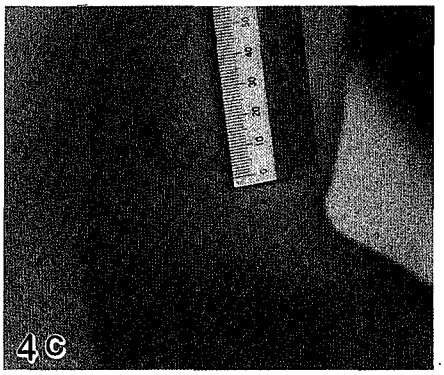
3d



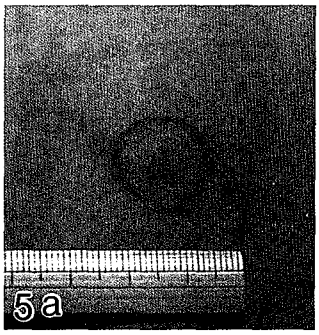
4a

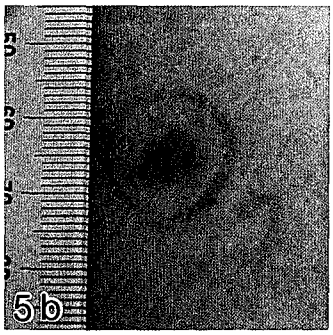


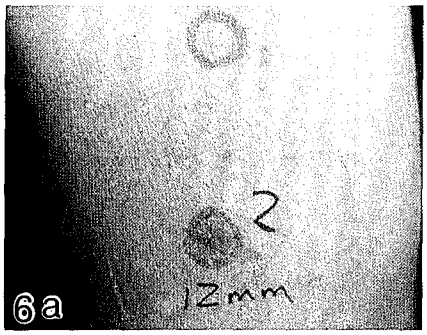
4b

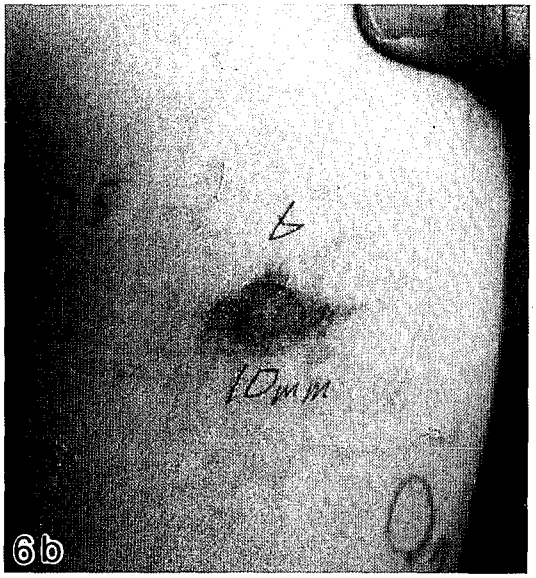


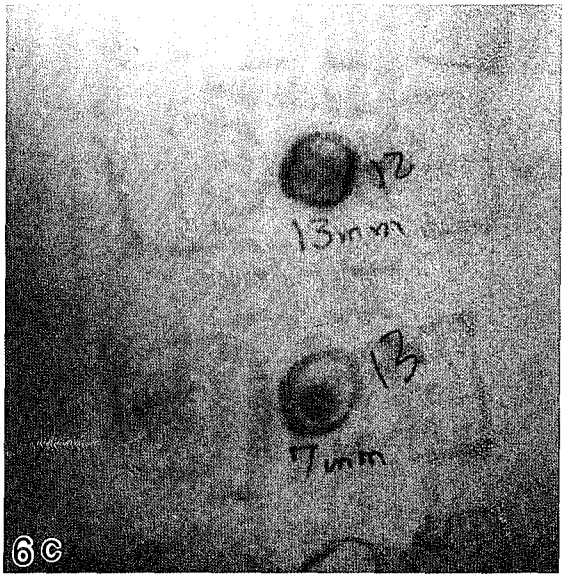
4c


5a

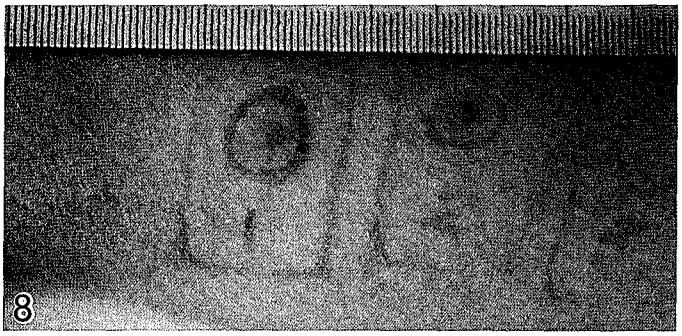

5b

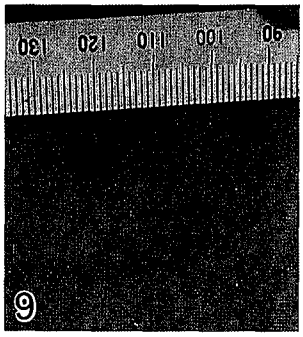

2
12mm
6a

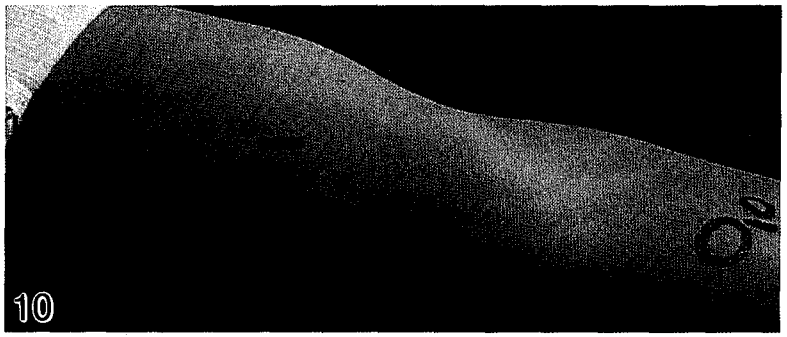

10mm
6b


12
13mm
13
17mm
6c

2
7


8


90
100
110
120
130
9


10

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 277-281, 1983

殺ダニ試験（第2報） フェニトロチオン処理2ヶ月後の殺ダニ紙のケナガコナダニに対する効力

大野正彦*, 吉川 翠*

Studies in Controlling Mites (Ⅱ)
Effects of Two-Month Stored Fenitrothion-Treated Paper on a Cheese Mite, *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank)

MASAHIKO OHNO*and MIDORI YOSHIKAWA*

A piece of paper sprayed with fenitrothion and stored in a black polyethylene bag in the dark room kept at 20°C, 60% R. H. for two months was tested whether it could control a cheese mite, *Tyrophagus putrescentiae*, and was compared with the paper examined immediately after spraying. Amount of fenitrothion which was sprayed on paper and the residual quantity of fenitrothion after paper was stored for two months were also measured. When 0.1 or 0.5 g of fenitrothion was initially sprayed on a square meter of paper, mite mortality examined on the stored paper was much lower than that on the paper used immediately. However, the mortality on the stored paper was not so much different form that on the paper used immediately when 1 g/m^{2}fenitrothion was sprayed. Besides the residual rate of the paper where 0.5 or 1.5 g/m^{2}fenitrothion was initially sprayed was about 30 or 70% respectively two months afterwards. Therefore at least 1 g/m^{2}fenitrothion was required in order to keep the high effectiveness on mite mortality even after the treated paper was stored for two months.

Keywords : mite, *Tyrophagus putrescentiae*, fenitrothion, mortality, residual rate

緒 言

前報[1]では有機リン系殺虫剤フェニトロチオンを塗布した紙（以下殺ダニ紙と称す）の、ケナガコナダニ *Tyrophagus putrescentiae*（Schrank）に対する塗布直後の効力を検討し，その結果，塗布量が1 g/m^{2}程度の殺ダニ紙はシャーレ内の効力試験でケナガコナダニに対し高い効力を示すことを報告した．しかし，殺ダニ紙が消費者の手に渡るのには少なくとも商品化後2ヶ月を要するので，塗布薬剤の性質から考えて，その間に効力の低下が予測される．そこで薬剤を塗布して2ヶ月を経過した殺ダニ紙の効力試験をケナガコナダニを用いて行ない，前報の結果と比較検討した．

材料及び方法

1．材料

1）殺ダニ効力試験試料

塗布薬剤量約2, 1, 0.5, 0.1 g/m^{2}の各殺ダニ紙及び薬剤の蒸散防止と薬効保持の目的で作成した殺ダニ紙（1 g/m^{2}の薬剤塗布面上にさらにポリビニルアルコールを塗ったバリアー1，薬剤と吸着剤を混ぜて1 g/m^{2}になるように塗ったバリアー2）の計6種類を試料に供した．なお，各供試材料の調整方法は全て前報[1]の方法に準拠した．

2）薬剤の残留量測定試料

フェニトロチオンをクラフト紙に約0.5～2 g/m^{2}の範囲で1）のバリアー処理していないものと同様に塗布し，殺ダニ紙を作成した．

供試材料1），2）は黒色ポリエチレン袋に入れ，20°C，湿度60%の恒温室の暗所に2ヶ月間保存し，以下の実験に供した．

2．実験方法

1）殺ダニ効力試験

実験には以下に述べる3種類の方法を試みた．

実験A：密閉状態でダニを殺ダニ紙に接触させる方法．

実験B：半密閉状態でダニを殺ダニ紙に接触させる方法．

* 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

実験C：密閉状態でダニと殺ダニ紙が直接接触せず，蒸散する薬剤（呼吸毒）のみがダニに影響を及ぼすようにしたもの．

各方法とも前報[1]の実験方法に準拠して行なった．

殺ダニ紙の効果はダニの死亡率で表わした．ダニを薬剤に曝せてから24時間後，実体顕微鏡下で観察し，少しでも肢を動かすものはすべて「生」とみなし，その生死を判定し，ダニの死亡率（補正死亡率）を算出した．また，シャーレ内を薬剤の塗布面及び塗布面以外の面（殺ダニ紙の塗布面の裏，シャーレの底や側面，シャーレの口を覆った和紙や四フッ化エチレン樹脂膜）に分け，判定時に各々の死亡率も算出した．

2）薬剤の残留量測定

薬剤の塗布量及びその2ヶ月後の残留量測定は，殺ダニ紙の塗布薬剤をトルエンで抽出し，KD濃縮器で濃縮後，その一部を用いてガスクロマトグラフで定量した．なお，薬剤の分析は王子製紙株式会社中央研究所の協力を得て実施した．

結　果

1．薬剤塗布2ヶ月後の殺ダニ紙の効力

3種類の実験A，B，Cにおける各塗布量ごとの薬剤の効果をTable 1に示した．ケナガコナダニの死亡率はAB間であまり差が認められず，両者はCに比べ高かった．また，3種類の実験A，B，Cいずれも薬剤の塗布量が多くなるにしたがい，その死亡率は増加する傾向を示した．

バリアー1，2の死亡率はバリアー処理を施していない同一塗布量1 g/m²の実験A，B，Cの値と比較していずれも低値を示し，薬剤の蒸散防止と薬効保持の目的から試みたバリアー処理効果は認められなかった．

塗布量0.1 g/m²の殺ダニ紙では，ダニの死亡率は3種の実験で0～26%を示し，他の薬剤塗布量の殺ダニ紙と比較して著しく低かった．

生死の判定時に，殺ダニ紙の薬剤塗布面，及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 2に示した．塗布面に存在したダニの死亡率（a），及び塗布面以外の面に存在したダニの死亡率（b）は，薬剤塗布量が多くなるにしたがい増加した．塗布量2，1 g/m²の殺ダニ紙で，ab間の死亡率に大きな差はみられなかったが，0.5 g/m²では差がみられ，さらに0.1 g/m²では高濃度塗布量の場合と同様に再びab間に差がみられなかった．バリアー1，2の実験では，a, bの

Table 1. Mortality Percentage of Cheese Mites in Three Kinds of Experiments on Fenitrothion-Treated Paper which was used after Two-Month-Storage

		2g/m²	1g/m²	0.5g/m²	0.1g/m²	barrier 1 1g/m²	barrier 2 1g/m²
A		95.8	87.1	58.6	25.9	74.6	64.9
		94.9	85.8	49.2	23.1	63.7	61.4
		87.2	79.7	40.0	20.7	52.0	58.5
	average	92.6	84.2	49.3	23.2	63.4	61.6
B		95.6	86.7	64.0	25.3	83.4	68.2
		87.9	83.2	50.8	14.1	51.4	67.3
		87.2	71.9	35.7	10.9	50.1	60.0
	ave.	90.2	80.6	50.2	16.8	61.6	65.2
C		42.9	41.7	17.3	15.5	23.3	37.5
		37.2	32.1	17.3	6.4	9.1	35.9
		30.9	26.6	13.8	0	3.9	18.7
	ave.	37.0	33.4	16.1	7.3	12.1	30.7

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 Polytetrafluoroethylene membrane, holding a fenitrothion-treated paper between them.

死亡率（平均値）はそれぞれ82.1～86.9，23.3～39.4%でab間に著しい差が認められた．この結果はバリアー処理を施していない同一塗布量1 g/m²のa，bの死亡率の結果と異にした．

2．薬剤塗布直後及び塗布2ヶ月後の殺ダニ紙の効力の比較

薬剤塗布直後及び塗布2ヶ月後のバリアー処理をしていない殺ダニ紙におけるダニの死亡率を，3種の実験，各塗布量ごとにFig. 1に示した．図から明らかなように処理後2ヶ月を経過した殺ダニ紙の効力低下の程度は各塗布量で異にした．塗布量が2，1 g/m²の殺ダニ紙では，実験A，B，Cいずれの場合も死亡率はあまり低下しなかった．死亡率の低下が著しかったのは0.1 g/m²の殺ダニ紙で，実験A，B，Cの死亡率（平均値）はそれぞれ，46.4から23.2，45.5から16.8，19.0から7.3%と低下した．また，0.5 g/m²でもかなりの低下がみられた．

バリアー1，2も前報[1]の結果と比較して，2ヶ月後の死亡率の低下がみられ、バリアー処理の効果は認められなかった．

また，前報[1]で述べたように，塗布直後の殺ダニ紙の塗布面にいるダニの死亡率は実験Aの場合，塗布量が2, 1, 0.5, 0.1 g/m²でそれぞれ98.4, 98.3, 94.7, 89.8%であった．各々の2ヶ月後の値は91.4, 92.7, 63.0, 21.0%で，塗布直後に比べ低く，特に0.5，0.1 g/m²の殺ダニ紙の著しい低下が認められた．同様のことが実験Bでも認められ，塗布量0.5，0.1 g/m²の殺ダニ紙の薬剤の接触毒としての効力は2ヶ月後に大きく低下することが認められた．

バリアー処理した殺ダニ紙でも前報[1]と比較して，2ヶ月後の塗布面にいるダニの死亡率の低下が実験A，Bでともに認められた．

3．塗布薬剤の残留性

薬剤塗布直後，及び2ヶ月後の殺ダニ紙から抽出した薬剤量と，それから算出した薬剤の残留率をTable 3に示した．塗布量が約0.5～0.6 g/m²の試料では残留率が30～38%で，約1.4～1.7 g/m²では70～81%であった．残留率は塗布量の少ない殺ダニ紙ほど低かった．

考　察

結果で述べたように，塗布量2，1 g/m²の殺ダニ紙は塗布2ヶ月後でも死亡率は，塗布直後の値と比べあまり低下せず，それに対し0.5，0.1 g/m²の殺ダニ紙では薬剤の呼吸毒（実験C），接触毒の効力両方とも低下し，死亡率の著しい低下が認められた．塗布量の少ない殺ダニ紙ほど死亡率の低下が著しかったのは，それらの殺ダニ紙の薬剤の2ヶ月後の残留量が極めて少ないためと思われる．殺ダニ紙製造2ヶ月後までその高い効力を維持するには，薬剤（フェニトロチオン）を少なくとも1 g/m²以上塗布する必要があると思われる．

しかし，たとえ薬剤を1 g/m²になるように塗布し，2ヶ月後に効力を保ってもその後の効力は比較的短期間に減衰すると思われる．すなわち，Table 3で示した塗布薬剤の2ヶ月後の残留率から，1 g/m²の残留率を60%，その2ヶ月後を30%と仮定すると，塗布4ヶ月後の薬剤量は約0.2 g/m²となり，更にその2ヶ月後には薬

Table 2. Comparison of Mortality Percentage of the Mites between on the Surface and Outside of the Surface of Two-Month Stored Fenitrothion-Treated Paper

	2g/m²		1g/m²		0.5g/m²		0.1g/m²		barrier 1 1g/m²		barrier 2 1g/m²	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
A	94.2	97.1	98.2	76.8	86.6	33.8	18.1	28.1	88.7	47.7	90.8	35.9
	93.7	96.9	89.9	84.2	67.2	37.0	26.1	20.2	71.5	36.5	88.5	31.1
	86.2	88.6	90.0	60.4	35.1	42.8	18.7	23.8	86.2	27.4	74.3	28.3
average	91.4	94.2	92.7	73.8	63.0	37.9	21.0	24.0	82.1	37.2	84.5	31.8
B	97.8	87.6	88.3	83.3	64.4	48.3	28.2	23.1	84.7	79.9	93.4	25.0
	85.0	93.8	86.4	76.7	64.3	24.7	13.6	14.6	81.1	18.4	79.5	19.1
	91.5	79.5	70.7	75.4	43.5	25.2	12.9	7.6	81.6	20.0	87.7	25.8
ave.	91.4	87.0	81.8	78.5	57.4	32.7	18.2	15.1	82.5	39.4	86.9	23.3

A, B : same as Table 1.

a : Mortality on the surface

b : Mortality outside of the surface

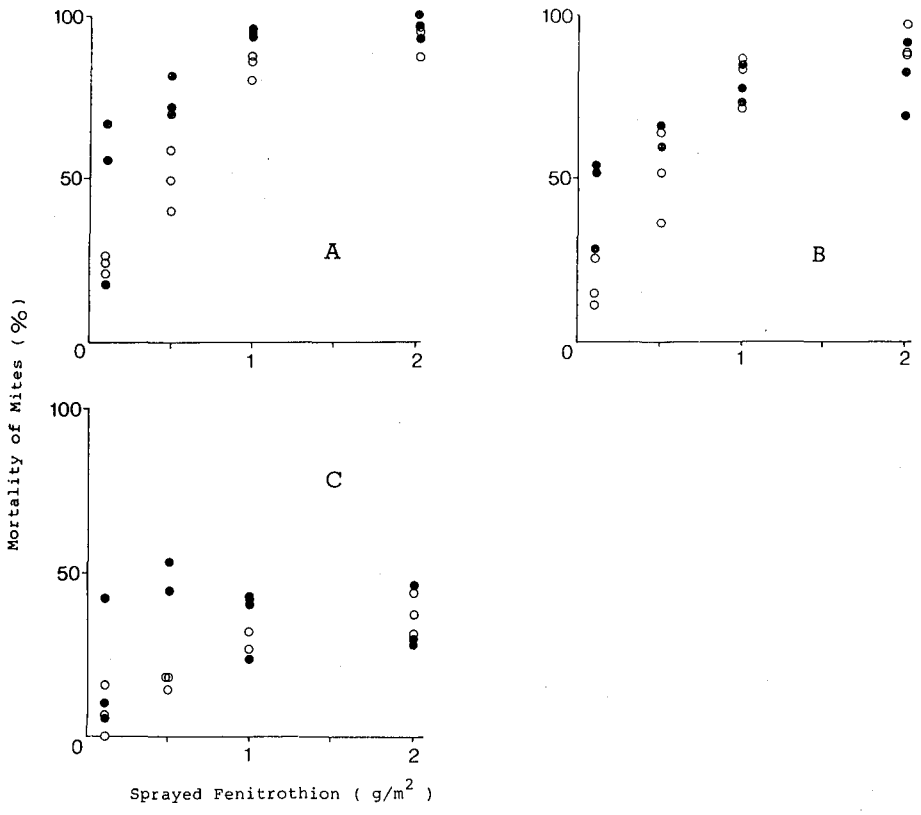


Fig.1. Correlation between Mite Mortality and Dosage of Fenitrothion
● : Mortality percentage on fenitrothion–treated paper which was used immediately after treatment
○ : Mortality percentage on fenitrothion–treated paper used after two–month–storage
A, B, C : same as Table 1.

Table 3. Correlation between Amount of Treated Fenitrothion and the Residual Quantity which was measured on the 2nd Month after Treatment

Fenitrothion –treated paper	Amount of treated fenitrothion	Amount of residual fenitrothion	Residual rate
No. 1	0.47 g/m^2	0.14 g/m^2	30 %
2	0.56	0.21	38
3	1.38	0.96	70
4	1.54	1.10	71
5	1.65	1.33	81

剤量が極めて少量になり，死亡率が大きく低下すると思われる．平社ら[2]も同様のことを報告している．彼らはシャーレ内のダニの餌料の中でケナガコナダニをフェニトロチオン処理紙を接触させ，効力の持続性を調べ，1 g/m²の処理紙の有効期間は220日であることを示した．我々の実験方法は彼らの方法と異なっていたが，ほぼ同様の有効期間であった．今回用いたバリアー処理方法は殺ダニ紙の効力持続に効果があまり認められなかったので，処理方法の改良が必要であろう．

前報[1]および今回の実験結果で塗布量1 g/m²の殺ダニ紙はケナガコナダニに対し効力を示したが，実際の家屋内での効力については不明である．白坂ら[3]はフェニトロチオンが1 g/m²になるように処理した防虫紙を畳に縫い込み，実際の家屋内で1ヶ月間，コナダニ類に対する効果を調査し，この防虫紙は極めて高い効果を示すと述べている．しかし，今回の殺ダニ紙の使用目的の1つにダニの予防があり，比較的長期にわたり使用されることが考えられる．家屋内とはいえ様々な要因が殺ダニ紙の効力に影響を及ぼし，使用する内に効力の低下が想像できる．持続性（残効性）のある殺ダニ紙をつくり，実際の畳などでその効果判定を試みたいと思う．

摘　要

1．有機リン系殺虫剤フェニトロチオンを塗布して2ヶ月経過した殺ダニ紙の，ケナガコナダニに対する効力試験を行なった．

2．前報[1]と同様，次のような3種類の実験方法を試みた．

実験A：密閉状態でダニを殺ダニ紙に接触させる方法．

実験B：半密閉状態でダニを殺ダニ紙に接触させる方法．

実験C：密閉状態でダニと殺ダニ紙が直接接触せず，蒸散する薬剤のみがダニに影響を及ぼすようにしたもの．

3．3種の実験方法ともダニの死亡率は塗布量が多くなるにつれ増加する傾向にあった．実験Cにおけるダニの死亡率は実験A，Bに比べ低かった．

4．今回の2ヶ月後の実験結果と前報[1]の結果を比較した．塗布量1 m²当り2，1 g/m²の殺ダニ紙は，塗布直後の値と比べ，2ヶ月後の死亡率はあまり低下しなかったが，0.5，0.1 g/m²の殺ダニ紙では大きく低下した．

5．塗布量（0.5～1.7 g/m²）の殺ダニ紙の薬剤の2ヶ月後の残留率を調べた．塗布量が少ない殺ダニ紙ほど残留率が低かった．

6．殺ダニ紙製造2ヶ月後までその高い効力を維持するためには，フェニトロチオンを少なくとも1 g/m²以上塗布する必要があると思われた．また，殺ダニ紙の効力を持続させる処理をする必要があると思われた．

文　献

1）大野正彦，吉川　翠：東京衛研年報，33，307，1982

2）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

3）白坂昭子，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：衛生動物，22，210，1971

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 282-289, 1983

飲料用タンク水から検出された細菌類とその塩素，熱抵抗性

古畑勝則*，松本淳彦*

Some Heterotrophic Bacteria in Drinking Tank Water, and Their Resistance for Chlorine and Heat

KATSUNORI FURUHATA* and ATSUHIKO MATSUMOTO*

Keywords：飲料用タンク水 drinking tank water，従属栄養細菌 heterotrophic bacteria，残留塩素 residual chlorine，塩素抵抗 chlorine resistance，熱抵抗 heat resistance

緒　言

近年，都市化が進み建築物の高層化に伴い，これらの建物の飲料水は受水槽および高置水槽を経由したのち給水しているが，これら給水施設の衛生管理がしばしば問題視されている．

昭和52年，水道法の一部が改正され，受水槽の有効容量が20立方メートルを越えるものについては，簡易専用水道としてその設置者に衛生的管理が義務付けられている[1]．

これに伴う追跡調査として，昭和56年に行政管理庁が10都府県のビル，マンション等，約2万箇所の給水施設について調べたところ，公的検査機関で水道法に定められている検査を受けている施設は約1万4千箇所で，受検率は66.8％と低い実態が指摘された．検査の結果，不適合とされたのは66.2％にものぼっている。なかでも残留塩素の不足により5.4％が不適合とされ，臭気，味，色，濁り等も水質基準を越え，飲料水として問題のある施設が多くみられており，厚生省に対し指導強化を求めるに至った[2]．

東京都衛生局が行った受水槽の汚染実態調査では，120箇所のうち半数以上の55％に衛生管理の不十分さが指摘され，特に槽内の清掃が行われていないなどの結果が出ている[3]．

また，神奈川県が行った受水槽および高置水槽の微生物汚染調査では，一般細菌，大腸菌群の他，カビ類，さらに藻類など様々な汚染が起っていることが報告されている[4,5]．

筆者らは以前から水道水の大腸菌群試験に際して，LB培地がガス産生をみなくても黄変または混濁し，あるいは培地表面に膜を形成する等の現象を多く経験している．これらは細菌によるものと考え，タンク水の細菌学的な現状について検討を行った．

今回は，タンク水の残留塩素濃度と細菌類の構成を調査し，これらの塩素および熱に対する抵抗性についても検討を加えた．

材料および方法

1. **材料**　昭和57年10月から58年3月にかけて，水質検査のために当研究所に提出された東京都内のビル，アパート，マンション等のタンク水300試料について検査を実施した．試料はいずれも滅菌ポリエチレン容器（100 m*l*容）に採水されたものである．

2. **方法**　1）**細菌試験**　まずこれらの試料について搬入後直ちにオルトトリジン法により残留塩素の濃度を0.1 mg/*l*単位で測定した．ついで水道法に基づく試験（一般細菌，大腸菌群）と同時に，試料10 m*l*について標準寒天培地を使用して混釈したのち，25±1 °Cで，7日間培養し集落数を求めた．さらにこれらの平板から1試料について特徴の異なる集落を10個釣菌し，（10個以下の試料は発育したすべての集落）標準寒天平板上に画線培養し独立した集落を形成させて純化した．これら純培養した細菌について，おもに“医学細菌同定の手びき”[6]，“Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8 th. ed.”[7]など[8,9]を参考に属レベルまで決定した．また，同一属のものでも，標準寒天平板上の集落の色調と生化学的性状から種レベルに区別した．

2）**塩素抵抗性試験**　(1)使用水（以下生理食塩水という）：再蒸留水に次亜塩素酸ナトリウム溶液を約10 mg/*l*加え、これを煮沸して塩素を除去した水で調製し

* 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

た生理食塩水．pHは7.2～7.4に調製した．(2)各種細菌浮遊液：各種細菌を標準寒天平板上に塗抹し，25°Cで5日間，ないしは37°Cで20時間培養したのち集菌し，生理食塩水に浮遊させた．これを3,000 rpm，10分間の遠心分離を3回行って菌体を洗浄したのち，再び生理食塩水に浮遊させた．塩酸および蒸留水で洗浄した内容300 mlコルベンに生理食塩水200 mlを入れ，常法により高圧蒸気滅菌した．これをスターラーで一定速度（240 rpm）に攪拌しておき，各種細菌浮遊液を1.0×10^5/mlになるように添加した．次に残留塩素濃度が0.1，0.5および1.0 mg/lになるように次亜塩素酸ナトリウム溶液を希釈して加えた．室温にて一定時間接触させたのち，直ちに標準寒天培地で混釈し，25°Cで7日間あるいは37°Cで24時間培養後，1 ml中の生菌数を求めた．測定値は2枚のシャーレの集落数の平均値とした．同時にオルトトリジン法により残留塩素濃度を測定した．対照として次亜塩素酸ナトリウム溶液無添加のものについて同様に行い比較した．なお，実験は各細菌について2回実施した．

3）熱抵抗性試験　滅菌済の生理食塩水入りコルベンを恒温槽中で60，80および100°Cに保った．スターラーで一定速度（240 rpm）に攪拌しつつ，各種細菌浮遊液を1.0×10^6/mlになるように添加した．一定時間経過後，塩素抵抗性試験と同様に1 ml中の生菌数を求めた．なお，対照として室温（25±1°C）で同様に行った．実験は各細菌について2回ずつ実施した．

結　果

1）試料の残留塩素濃度　300試料についての残留塩素を濃度別に表1に示した．

これによるとすべての試料は1.0 mg/l以下であり，その多くは0.3～0.7 mg/lの範囲にあった．しかし，0.1 mg/l未満のものが42試料，14.0%もあり，まったく認められないものが20試料，6.7%あった．なお，すべて遊離残留塩素の型で存在し，結合型は認められなかった．

2）細菌類の検出状況　300試料中，一般細菌（37°C，24時間培養）として検出されたものは2試料，0.7%のみで，それぞれの菌数は，21，4,600/mlであった．なお，両者とも残留塩素は認められなかった．大腸菌群はすべて不検出であった．

試料10 mlについて25°Cで7日間培養した結果を残留塩素濃度別に表1および図1に示した．

検出されたものは238試料で全体の79.3%を占め，菌数は1～51,000/10 mlであった．

これを残留塩素濃度からみると，水道法で定められている下限の0.1 mg/lより低い濃度では特に菌数が多く検出され，最高$2.0\sim5.1\times10^4$/10 mlに達している．0.1～0.2 mg/lでは$0.8\sim1.3\times10^3$/10 mlとなり，残留塩素濃度が0.3～0.7 mg/lの範囲になると$1.2\sim5.0\times10^2$/10 mlと少なくなっている．さらに0.8～0.9 mg/lでは最高でも2～3/10mlにすぎなかった．

3）分離細菌の同定と検出状況　これら検出された細菌類の同定を行い表2に示した．

その結果，主要なものは，Gram（－）桿菌3属（*Pseudomonas, Flavobacterium, Alcaligenes*），Gram（＋）桿菌2属（*Coryneforms, Bacillus*），Gram（＋）球菌1

表1．タンク水の残留塩素濃度と細菌検出状況（25°C，7日間培養）

残留塩素濃度(mg/l)	試料数	細菌検出試料数	検出率(%)	細菌数(10ml中)
0.0	20	20	100.0	16～51,000
0.05	22	22	100.0	2～20,000
0.1	11	11	100.0	5～ 800
0.2	13	13	100.0	4～ 1,300
0.3	24	23	95.8	1～ 500
0.4	45	39	86.7	1～ 600
0.5	46	37	75.5	1～ 440
0.6	40	32	80.0	1～ 340
0.7	49	30	61.2	1～ 120
0.8	15	5	33.3	1～ 3
0.9	13	6	46.2	1～ 2
1.0	2	0	0.0	
計	300	238	79.3	

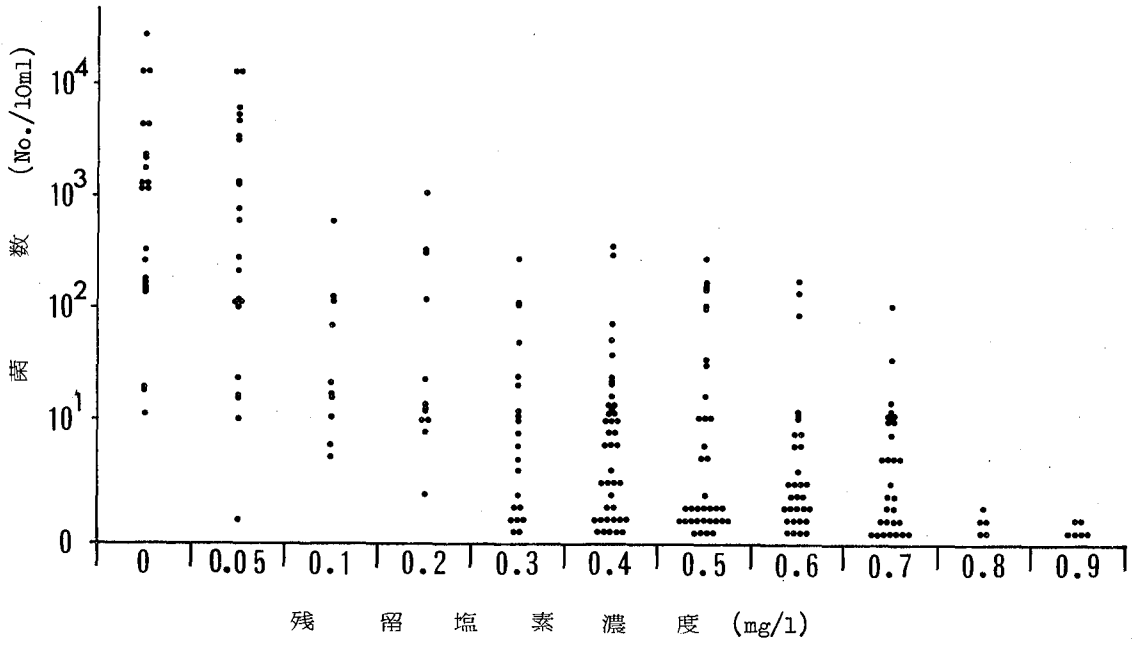


図1. タンク水の残留塩素濃度と細菌数（25°C, 7日間培養）

属（*Micrococcus*）の計6属であり，その他同定できないものも多少みられた．

Pseudomonas, *Flavobacterium*, *Coryneforms* については，種々の鑑別試験のうち，次のような性状の違いから2～3の種レベルまで分類した．

すなわち，*Pseudomonas* では桃色集落でOF試験（O）のものを（A），OF試験（－）のものを（B），および白色集落のものを（C）とした．*Flavobacterium* では黄色集落のものを（A），橙色集落のものを（B），さらに *Coryneforms* では黄色集落のものを（A），白色集落のものを（B）として細分した．

238試料中最も多く検出されたものは *Pseudomonas*（A）で，130試料，54.6%であった．ついで *Pseudomonas*（B）が69試料で29.0%，*Coryneforms*（A）が35試料，14.7%，*Flavobacterium*（A）が28試料，11.8%であった．その他，*Alcaligenes* と *Coryneforms*（B）がともに16試料で6.7%，*Flavobacterium*（B）が15試料，6.3%，*Micrococcus* が11試料，4.6%，*Bacillus* が10試料，4.2%，*Pseudomonas*（C）が6試料，2.5%であった．

表2．タンク水から分離された細菌類（25°C, 7日間培養）

Gram(－)桿菌	Gram(＋)桿菌	Gram(＋)球菌
Pseudomonas(A)	*Coryneforms*(A)	*Micrococcus* sp.
(B)	(B)	
(C)	*Bacillus* sp.	
Flavobacterium(A)		
(B)		
Alcaligenes sp.		

これらを残留塩素濃度からみると，*Pseudomonas* は0～0.9 mg/*l* までの広範囲に渡って検出されており，ことに0.3～0.7 mg/*l* で高頻度に出現している．*Coryneforms* は0.7 mg/*l* 以下で，しかも0.4～0.7 mg/*l* の濃度範囲に多く検出される傾向がみられた．*Flavobacterium*, *Alcaligenes* は残留塩素が存在しない試料中から比較的多く検出された．*Micrococcus* は0.6 mg/*l* 以下の濃度の試料中から検出された．*Bacillus* は0.3～0.7 mg/*l* の範囲のみから検出された．

次に1試料から検出される細菌類の構成を検討してみた．菌数が2/10 m*l* 以上検出された210試料についてみると，1種類のみの菌属が検出された試料は129で最も多く61.4%であった．そのうちでも *Pseudomonas* によるものが100試料，77.5%を占めた．ついで *Coryneforms* が18試料，14.0%，*Flavobacterium* が7試料，5.4%であった．*Pseudomonas* と *Coryneforms* は0.1～0.8 mg/*l* の広

表3．残留塩素濃度別細菌類の検出状況

残留塩素濃度(mg/l)	0.0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	計
細菌検出試料数	20	22	11	13	23	39	37	32	30	5	6	238
Pseudomonas(A)	5	10	6	8	14	18	23	23	19	2	2	130
(B)	2	7	4	4	8	18	12	8	6	0	0	69
(C)	1	2	1	0	1	0	0	1	0	0	0	6
Flavobacterium(A)	11	6	1	1	2	3	2	0	2	0	0	28
(B)	6	5	0	1	1	1	0	1	0	0	0	15
Alcaligenes sp.	8	3	1	2	0	1	0	1	0	0	0	16
Coryneforms(A)	2	3	1	3	2	5	11	2	4	1	1	35
(B)	1	1	1	0	0	2	4	2	4	1	0	16
Bacillus sp.	0	0	0	0	1	2	0	2	5	0	0	10
Micrococcus sp.	2	1	0	0	2	1	4	1	0	0	0	11
未同定	4	6	1	1	4	2	5	4	4	2	5	38

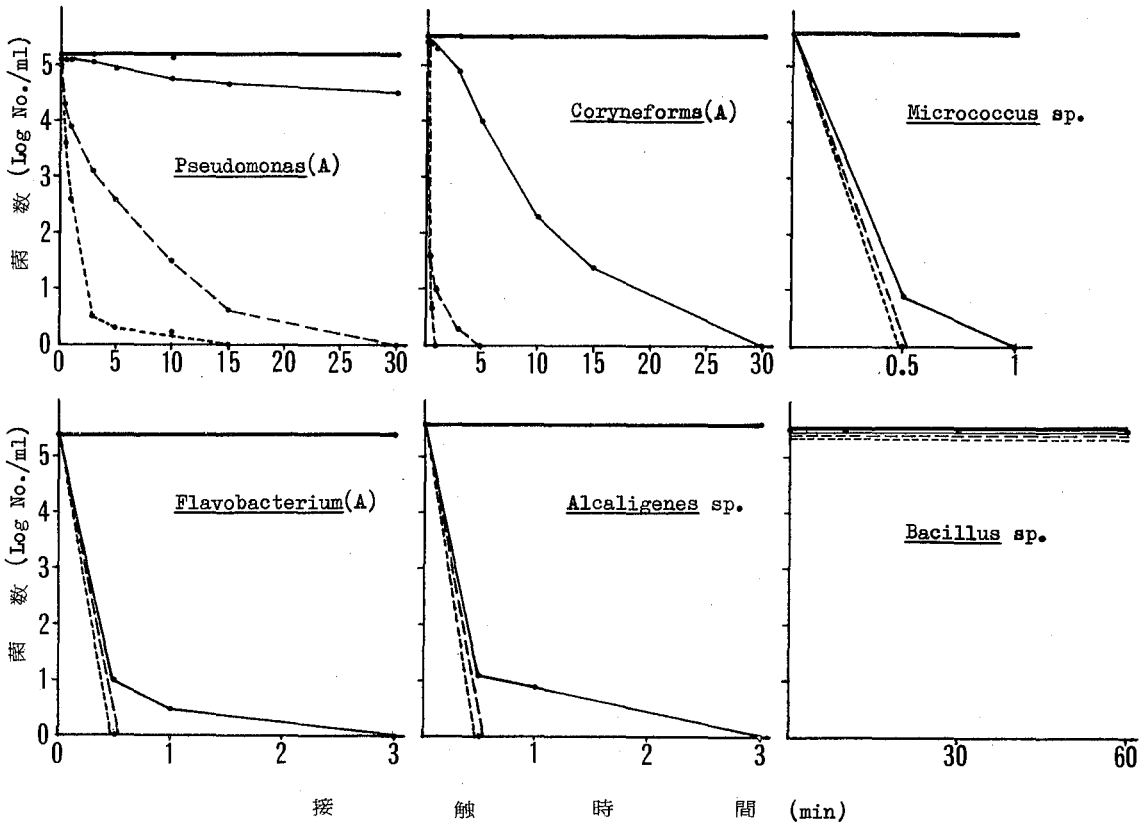


図2.　各細菌の塩素抵抗性

塩素濃度
——— 0.1 mg/l　- - - - - 0.5 mg/l　····· 1.0 mg/l　——— 対　照（無添加）

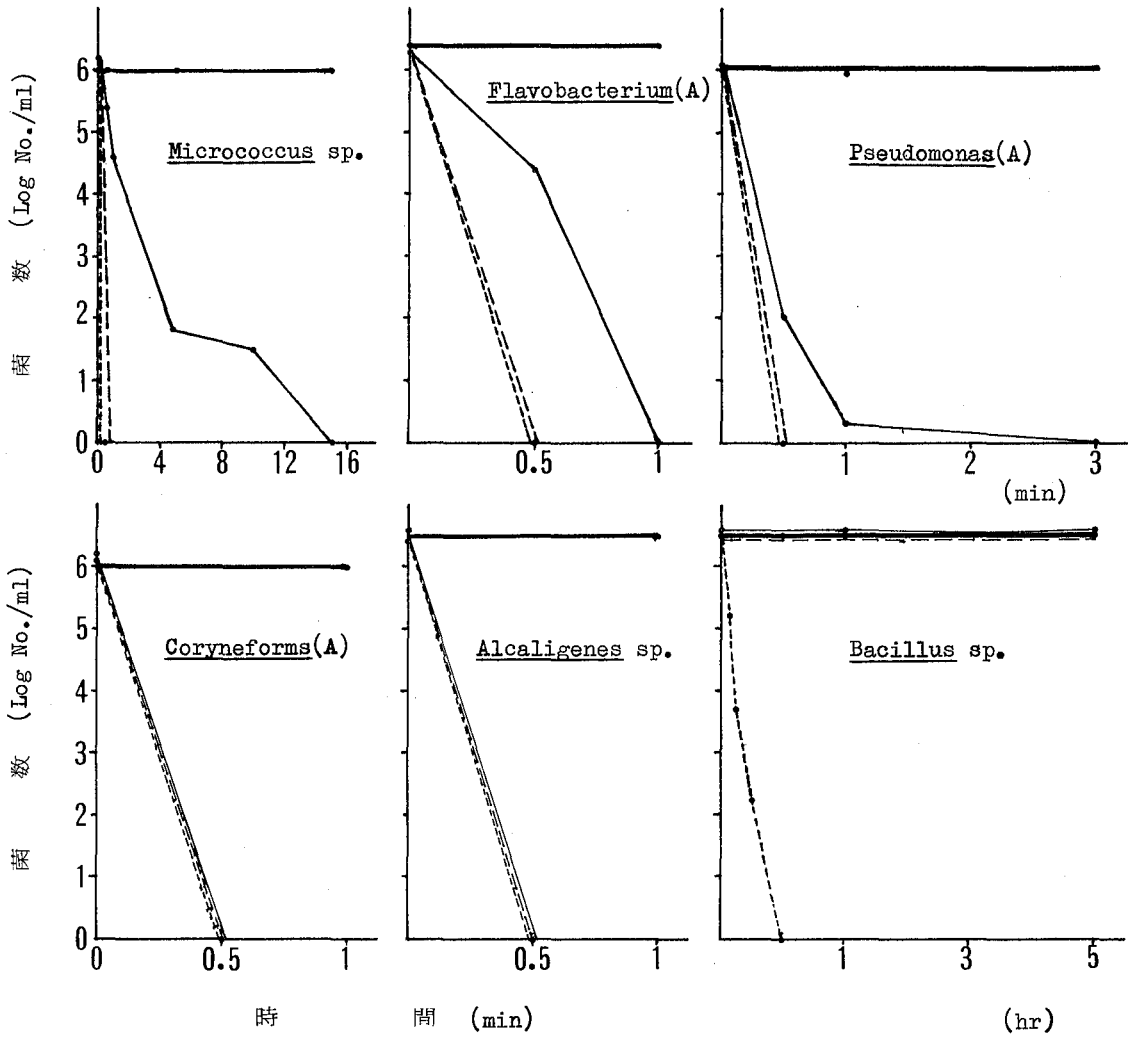


図3. 各細菌の熱抵抗性

範囲で単独に検出されたが，*Flavobacterium* は0.1 mg/*l* 未満で高頻度に認められた．

2種類の菌属が検出された試料は64で30.5％であった．このうち *Pseudomonas* と *Coryneforms* が共存していたものは26試料，40.6％であり，0.1～0.7 mg/*l* の範囲で検出された．ついで *Pseudomonas* と *Flavobacterium* が9試料で0.4 mg/*l* 以下に多く，*Flavobacterium* と *Alcaligenes* は7試料で0.2 mg/*l* 以下に多くみられた．その他，*Pseudomonas* と *Micrococcus*，あるいは *Pseudomonas* と *Bacillus* などの共存であった．

さらに3種類の菌属が同時に検出された試料は16と少なく7.6％にすぎなかった．これらは，*Pseudomonas*, *Coryneforms*, *Micrococcus* と *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* の混在が大半を占め，前者では0.3～0.6 mg/*l* の範囲で検出されたのに対し，後者は0.1 mg/*l* 未満で多く検出される傾向があった．

4種類の菌属が混在していたのは，残留塩素不含の1試料のみで，*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus* が共存していた．なお，5種類以上が混在していた試料はなかった．

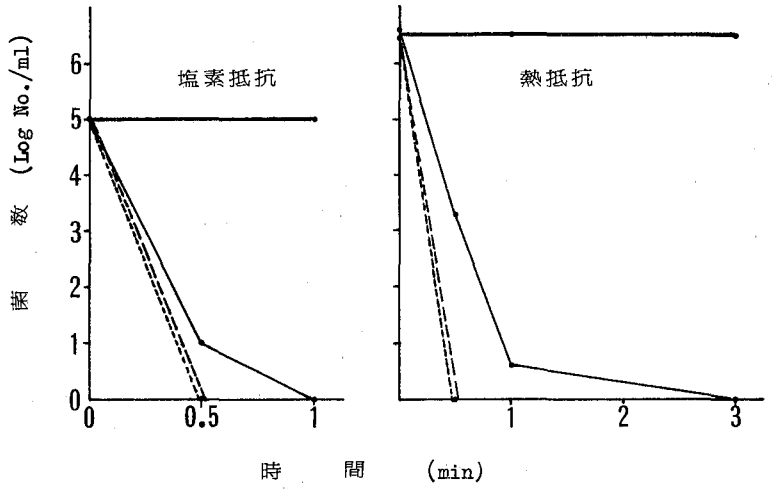


図4. 大腸菌（*E.coli* I）の塩素・熱抵抗性
——— 0.1 mg/*l* および60°C　- - - - - 0.5 mg/*l* および80°C　····· 1.0 mg/*l* および100°C　——— 対照（無添加および室温）

4) 塩素抵抗性 分離された6種（*Pseudomonas*（A），*Coryneforms*（A），*Flavobacterium*（A），*Alcaligenes* sp.，*Micrococcus* sp.，*Bacillus* sp.）の細菌について実施した．また，腸内細菌として井戸水から分離した糞便性大腸菌（*Escherichia coli* I）を比較のために用いた．

添加した塩素は細菌浮遊液を加えるとおよそ0.05 mg/*l* 消費されたが，30分間の試験中はすべて残存していた．

結果は図2および図4に示した．

Pseudomonas（A）については，添加塩素濃度が0.1 mg/*l* の場合，5分後までほとんど菌数の変化はみられず，15分後でも5.6×10^4/m*l*，30分後でも3.3×10^4/m*l* 生存しており，その死滅率はわずかに25.4%にすぎない．0.5 mg/*l* に濃度を上げると，1分後で6.7×10^3/m*l*，5分後で3.6×10^2/m*l*，10分後で3.3×10/m*l* となり，30分接触後に死滅した．さらに濃度を上げて1.0 mg/*l* では，1分後で5.2×10^2/m*l*，5分後で2/m*l* となり，死滅までには15分の接触時間を要した．

次に *Coryneforms*（A）は，0.1 mg/*l* の場合，3分後までほとんど菌数の変化はなく，5分後で1.1×10^4/m*l*，10分後で1.8×10^2/m*l*，15分後に2.7×10/m*l* となり，30分接触後に死滅した．0.5 mg/*l* の場合は，1分後で1.2×10/m*l* となり，5分後には死滅した．1.0 mg/*l* の場合は，30秒で5/m*l* となり，1分後には死滅した．

Flavobacterium（A），*Alcaligenes* sp.，*Micrococcus* sp. については，0.1 mg/*l* の場合で3～5分後，0.5 mg/*l* の場合で1分以内，1.0 mg/*l* では30秒以内に死滅した．

Bacillus sp. は芽胞形成菌で抵抗性の強いものといわれており，最高実験濃度の1.0 mg/*l* でも60分の接触時間後も菌数に変化はみられなかった．

なお，比較として用いた *E.coli* は，0.1 mg/*l* の低濃度塩素では30秒後に9/m*l* 生存していたが，1分後には死滅した．0.5 mg/*l* になると30秒後には1/m*l* と急減し，1分後には死滅した．1.0 mg/*l* では30秒以内に死滅した．

Bacillus sp. は例外であるが，広範囲の塩素濃度の試料から最も頻繁に検出された *Pseudomonas*（A）は抵抗性が最も強く，添加塩素濃度0.5 mg/*l* の場合で比較すると，10^5/m*l* の菌数が死滅するまでにそれぞれ，*Pseudomonas*（A）では30分，*Coryneforms*（A）は5分，*Flavobacterium*（A），*Alcaligenes* sp.，*E.coli* は1分，*Micrococcus* sp. は30秒を要した．

5) 熱抵抗性 塩素抵抗性試験と同様の菌株を用いて行った．

その結果は図3および図4に示した通りである．

熱に対しては60°C の実験温度の場合で比較すると，*Bacillus* sp. を除き，*Micrococcus* sp. が最も強く，1分後で4.1×10^4/m*l*，5分後で6.5×10/m*l* となり，15分経過後に死滅した．ついで *Pseudomonas*（A）であるが，30秒後には10^6/m*l* から10^2/m*l* に減少し，3分後には死滅した．*Flavobacterium*（A）は，30秒後では2.6×10^4/m*l* であるが，1分後には死滅した．*Coryneforms*（A），

Alcaligenes sp. は30秒で死滅した.

なお, 80°C, 100°C ではすべて30秒以内に死滅した.

しかし, *Bacillus* sp. は, 60°C, 80°C では5時間後でも菌数の変化はなく, 100°C に温度を上げても死滅するまでには30分を必要とした.

比較試験菌の *E.coli* は, 60°C, 30秒で 2.1×10^3/m*l*, 1分で4/m*l*となり, 3分後には死滅した. 80°C, 100°C では30秒以内に死滅した.

考　察

飲料用タンク水300試料について実施した細菌学的調査の結果, 水道法に基づく試験では一般細菌（37°C, 24時間培養）としてわずかに2試料から検出されたのみで, 大腸菌群はすべて不検出であった. しかし, これらの残留塩素が存在しているタンク水中にも種々の細菌（25°C, 7日間培養）が多数生存していることが判明した. これらの細菌は, *Pseudomonas, Coryneforms, Flavobacterium, Alcaligenes, Bacillus, Micrococcus* などであった. これらの類縁菌は自然水[9,10], 下水[11,12], 土壌中[13]等に広く分布しているものであり, 何らかの経路で多くのタンク水中に侵入しているものと考えられる.

先に示した行政管理庁の調査結果で, 不適合のおもな理由は, 受水槽の衛生管理, とくにふたが十分にしまっていなかったり, 防虫網が破れていたため, 雨水や虫が入る恐れのあるものが大半を占めている. 受水槽はおもに地下に設置されているため, ふたのしめ方が不十分であったり, 亀裂が入っているなど不備な点があると, 雨水, 地下水, 下水, あるいは油類等が侵入する危険性がある. 高置水槽でも雨水の他, 昆虫類, 枯葉などが入る可能性があり, 様々な原因で汚染を受けていると考えられる.

参考のため東京都23区内の10数箇所の直結水道水について同様の試験を行ったところ, 残留塩素濃度はタンク水と差はなく, 0.6～0.8 mg/*l*であったが, 細菌類はまったく検出されなかった. この事から, 水道水が受水槽および高置水槽を経由することにより, 前述したような何らかの汚染の機会を受けていることは確かである.

水道水の衛生的管理で欠くことのできないことは塩素による消毒である. ところが給水施設の管理が不十分なために残留塩素不足がしばしば指摘される. 今回は依頼検体についてのみ調査したため, 現場の状態は明らかではないが, 水道法に定められている0.1 mg/*l*以上の塩素濃度が保持されていないものが14.0%もあった. これらはタンクの清掃が不十分であったり, 水の循環が悪かったり, 給水施設の老朽化, 等の原因が考慮される.

残留塩素が存在しており, 一般細菌, 大腸菌群が不検出のタンク水にも多数の細菌が生存している. 飲料水中にみられる耐塩素性の微生物として, ウイルス, 原虫嚢子などがある. このように現在の大腸菌群を用いた糞便汚染指標で安全性を保証するには問題があるとの指摘もある[14,15].

近年, 日和見感染あるいは菌交代症として, *Pseudomonas aeruginosa* をはじめとするブドウ糖非発酵 Gram 陰性桿菌が臨床的にも注目されている[16]. *Flavobacterium meningosepticum* は, 明らかに新生児化膿性髄膜炎の原因菌の一つとされている[17]. また, Culp, Angermann, Buchanan らは, *Pseudomonas aeruginosa, P. acidovorans, Flavobacterium, Achromobacter* は潜在的に病原性のあることを示唆している[18].

これら種々の細菌がタンク水から検出されることは, 受水槽および高置水槽が汚染されていることを意味していると考えられ, これら給水施設の衛生的維持管理について, 管理者に啓もうしたい.

通常の水道水に使用されている塩素濃度ではかなり抵抗性を示した細菌類, ことに *Pseudomonas, Coryneforms* でも80°C に加熱すれば30秒で死滅するので熱に対しては非常に弱い.

既述したようにタンク水中には糸状菌や藻類などの発生事例も報告されているが, 今回は細菌学的視野からのみ検討を行った.

受水槽および高置水槽の材質には, コンクリート製, 鋼製, 木製, および FRP（Fiberglass Reinforced Plastics）製, 等があるが, 中でも FRP 製は鋼製などと比較して, 軽量で成形が容易であり, 断熱性がすぐれているなどの点から最近急激に普及している. しかし, FRP 製の受水槽, 高置水槽は光が透過するため藻類が発生しやすく, 水質への二次汚染が懸念されている. 実際, 屋外に設置された受水槽, 高置水槽では約30%に藻類の発生を認めているという報告もある.

今後さらに東京都内の FRP 製タンクを中心に, 微生物汚染の現状を調査したい考えである.

要　約

今回, 300箇所の飲料用タンク水について細菌学的検討を行ない, 次のような結果を得た.

1. 残留塩素は0～1.0 mg/*l*の濃度範囲にあり, 水道法に定められている0.1 mg/*l*に達していないものが42試料, 14.0%あった.

2. 残留塩素が含まれていない2試料のみから一般細菌（37°C, 24時間培養）が検出されたが, 大腸菌群は

すべて不検出であった.

3. 残留塩素が0.1 mg/l以上存在していても，25°C，7日間の培養では，65.3%のタンク水から細菌が検出され，最高で1.3×10^3/10 ml の菌数であった.

4. 検出されたおもな細菌は *Pseudomonas* であり，0.9 mg/l 以下の残留塩素濃度の試料から広範囲に検出された．その他，*Coryneforms*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Bacillus* が検出された.

5. 検出された各細菌の塩素に対する抵抗性は，*Bacillus* を除き，*Pseudomonas* が最も強く，0.1 mg/l の場合は30分後でもほとんど死滅しなかった．0.5 mg/l では30分，1.0 mg/l では15分接触しないと死滅しなかった．ついで *Coryneforms* で，0.1 mg/l で30分，0.5 mg/l で5分，1.0 mg/l で1分を要した．その他の細菌は0.1 mg/l で3分以内に死滅した.

6. 熱に対する抵抗性は，*Bacillus* を除き *Micrococcus* が最も強く，他の細菌が60°C，3分以内に死滅したのに対して，本菌のみは15分を要した.

7. 塩素に対してかなり抵抗性を示した *Pseudomonas*, *Coryneforms* も熱に対しては容易に死滅した.

文　献

1) 日本水道協会：水道維持管理指針，251，1982
2) 朝日新聞，1982年5月30日
3) 東京都水道局：水道ニュース，1979年3月
4) 高橋孝則，尾上洋一，森　實：日本水処理生物学会誌，別巻1，18，1981
5) 綿貫知彦，木村憲司：日本水処理生物学会誌，別巻1，17，1981
6) Cowan, S.T., 坂崎利一訳：医学細菌同定の手びき，第2版，1974，近代出版，東京
7) Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. : *Bergey's Manual of Determinative Bacterology*, 8 th. ed., 1974, The Williams and Wilkins Co., Baltimore
8) 藪内英子：ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌，1977，医学書院，東京
9) 前田秋一：陸水学雑誌，41，163，1980
10) 上野英世：メディアサークル，13，405，1968
11) Wheater, D.W.F., Mara, D.D., Luzan Jawad and Oragui, J. : *Water Research*, 14, 713, 1980
12) Ir.H.W. van Gils, 須藤隆一監訳：活性汚泥の細菌学，第2版，1974，産業用水調査会，東京
13) 須藤隆一，都留信也，中山大樹：環境と微生物，都留信也編，123，1979，共立出版，東京
14) Mahdy, M.S. : *Jour. A.W.W.A.*, 71, 445, 1979
15) Craun, G.F. and Gunn, R.A. : *Jour. A.W.W.A.*, 71, 422, 1979
16) 本間　遜，藪内英子，桑原省二ら：緑膿菌とその感染症，1975，文光堂，東京
17) 藪内英子，伊藤富由，谷村英紀，宮島純子：日細誌，31，435，1976
18) Carberry, J.B. and Stapleford, L.R. : *Jour. A.W.W.A.*, 71, 213, 1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 290-293, 1983

東京湾より採取した植物プランクトンと貝における生理活性物質の検策

平野幸枝*, 渡辺真利代*, 大石真之**, 土屋悦輝*, 西垣　進*

Survey on Biologically Active Substances in Phytoplankton and Shellfish Collected from Tokyo Bay

YUKIE HIRANO*, MARIYO F.WATANABE*, SHINSHI OISHI**,
YOSHITERU TSUCHIYA* and SUSUMU NISHIGAKI*

Bioassays were conducted to survey phytoplankton in red tide condition and shellfish for biologically active substances. The samples were collected from Tokyo Bay and their components were partitioned with diethyl ether and water. Lethal toxicity, hemolysis and hemagglutinating activity were examined for water and ether soluble fractions. Lethal toxicities to mouse and fish were found in water soluble fractions of phytoplankton, but not in ether soluble ones. No death occurred in mice injected with both fractions of shellfish. However, hemagglutinating activities and ichthyotoxicities were found in almost all fractions of shellfish. The fractions with high hemagglutinating activity also had high ichthyotoxicity. Both fractions of shellfish collected in July showed higher ichthyotoxicities and hemagglutinating activities than in September. The number of shellfish samples with hemolysis was smaller than those with hemagglutinating activity and ichthyotoxicity. More hemolytic activities were found in ether soluble fractions than in water soluble ones.

緒　言

海水の富栄養化に伴い，東京湾では近年赤潮の発生が慢性化している[1]．赤潮プランクトンの中には有毒種があり，そのため貝類が毒化することは広く知られている[2]．東京湾でも有毒種とされている渦鞭毛藻類[3]の *Prorocentrum minimum*, *Gymnodinium spp.* をはじめ *Gonyaulax sp.*, *Noctiluca milaris* が出現している[1]．Gonyanlax 属は麻ひ性貝毒を産生し．貝類の毒化はほぼ全国にわたっている[4]．最近では東北地方でホタテガイ，アカザラガイ，ムラサキイガイ，マガキなどの二枚貝が毒化されたという報告がある[5]．また一方 *Dinophysis* 属が産出する Okadaic acid によりおこされる下痢性貝毒は，麻ひ性貝毒より症状は軽いが東北地方を中心に広くおこっている[6]．

東京湾でもこのようなプランクトンと同種のものが出現していることから，東京湾に出現する鞭毛藻の毒の有無，および貝の毒化状況について調査した．

材料と方法

1. **試料の採取**　採取地点を図1に示した．

1980年6月24日および9月3日に赤潮状態となった st. 6 と st. 35 の表面水を採取し，円筒ろ紙で濃縮したものを赤潮プランクトン試料とした．凍結乾燥後－20°C で保存した．

貝類については1982年7月から9月までの期間，東京湾沿岸の神奈川県金沢八景または金沢文庫（A）大井埠頭京浜島（B）三枚州（C－1）および人工渚（C－2）富津（D）の4地点からアサリ（*Tapes japonica*）ムラサキイガイ（*Mytilus edulis*）マガキ（*Crassortrea gigas*）シオフキ（*Maetra veneriformis*）サルボウガイ（*Scapharca subcrenata*）カガミガイ（*Dosinia japonica*）バカガイ（*Mactra sulcataria*）マテガイ（*Solen strictus*）[7]を採取した．むき身にし－20°C で保存した．ムラサキイガイの一部については毒性が高いとされている中腸腺の部分を集めて試験に供した．

2. **試料の調製**　安元らの方法[8]を参考にし，試料の3倍量の80％メタノールを加え，ホモジナイザーで磨砕後60°C で20分温浸し一夜静置後遠心分離し，残渣は熱メタノールで2回洗った．メタノールを留去後，その残渣に水を加えて分液ロートに移し，ジエチルエーテルを加え振盪分配を行った．水層をさらに2回ジエチル

* 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
** 同毒性部薬理研究科

エーテルで抽出し，エーテル可溶性画分，水溶性画分を得た．各画分は溶媒を留去後，貝については残渣を原試料5gが1m*l*に相当するよう1%tween溶液に懸濁し，試料溶液を得た．プランクトンの水溶性画分はSephadex G−10のカラム（1.7×42）を通し脱塩を行い，さらに透析膜を使って1時間透析を行った．st.35で採取したプランクトン試料のカラム溶出液は280 nmにおけるタンパク吸収より4つのピークが得られたので4つの画分に分けた．9月3日st.6プランクトン試料は乾燥試料0.9gが1m*l*に相当する濃度，他の2つのプランクトン試料は乾燥試料2.5gが1m*l*に相当する濃度に1% tween溶液に懸濁した．

3. **生物試験** マウスに対する毒性については ddY 系マウス（体重19−20g）に各試料溶液1m*l*を腹腔内投与し，10分後および24時間後の生死を調べた．魚毒性については200 m*l*の飼育水の入ったビーカーにヒメダカ（体長1.5 cm 前後）を5匹ずつ入れ，試料溶液を1m*l*添加し，48時間後の死亡率をみた．死亡した場合添加量を減らし，死亡しない場合にはさらに増して毒性の強さの度合を調べた．血球凝集試験は2%赤血球懸濁液を用い，直接赤血球凝集反応[9]を行った．37°Cで1時間放置後，結果を判定した．溶血試験は溶血力定量法[10]に基づいて行った．試験液は試料溶液の10%0.85%塩化

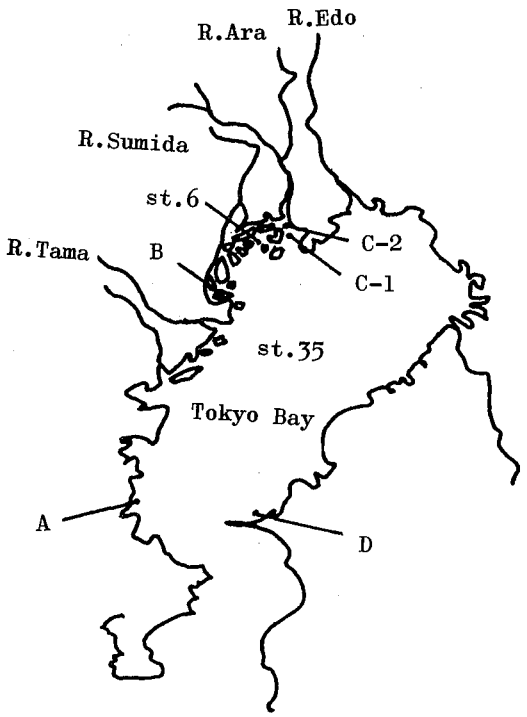


図1. 東京湾における試料採取地点

表1．赤潮プランクトン抽出液の血液に対する反応，マウス，メダカに対する毒性

採取地点	採取月日	画分	血球凝集性*1 ウサギ	血球凝集性*1 ラット	溶血性*2	マウスに対する毒性	魚毒性	プランクトン優占種*4
st. 6	'80.6.24	エーテル	2^2	2^2	+	0/2*3	0/5	Olisthodiscus sp. micro flagellata *5
		水	−	2^2	−	2/2	4/4	
	9. 3	エーテル	2^2	2^2	+	0/2	0/4	Prorocentrum triestinum Thalassiosira spp. micro flagellata
		水	2^1	2^2	−	0/2	4/4	
st. 35	'80.9. 3	エーテル	2^2	2^2	+	0/2	1/5	Thalassiosira ssp.
		水−1	2^2	2^1	−	0/2	0/5	
		水−2	−	2^0	−	2/2	3/5	
		水−3	2^2	2^1	−	0/2	0/5	
		水−4	2^2	2^1	−	0/2	0/5	

*1 −は凝集がおこらなかったことを示し，2^2は試料の4倍希釈まで凝集をおこしたことを示す

*2 +は溶血がおこった場合，±は一部溶血がおこった場合，−は溶血がおこらなかった場合を示す

*3 死亡数/試験匹数

*4 1）より転載

*5 種不明の微細鞭毛藻の総称

表2．貝の抽出液の血液に対する反応，マウス，メダカに対する毒性

種類	採取月日	採取場所	画分	血球凝集性 ヒツジ	ウサギ	ラット	溶血性	マウスに対する毒性	魚毒性 1 ml	0.5	0.2	0.1
ムラサキガイ	'82.8.19	金沢文庫	エーテル	2^9	$>2^{11}$	2^{10}	+	0/2	5/5		5/5	4/5
（中腸腺）			水	2^{11}	2^8	2^7	+	0/2	5/5	5/5	4/5	
	9. 1	大井埠頭	エーテル	2^9	2^{10}	2^8	+	0/2	5/5	5/5	5/5	0/5
（ 〃 ）			水	2^6	2^7	2^9	+	0/2	5/5	5/5	2/5	
	9. 2	三枚州	エーテル	2^5	2^6	2^4	+	0/2	5/5	4/5	1/5	
（むき身）			水	2^3	2^3	2	+	0/2	2/5			
マガキ	7.21	三枚州	エーテル	2	2^3	2	−	0/2	1/5			
			水	$>2^{11}$	L *	$>2^{11}$	+	0/2	5/5		4/5	1/5
	7.21	人工渚	エーテル	2^3	2^6	2^3	+	0/2	5/5	3/5		
			水	$>2^{11}$	L	$>2^{10}$	+	0/2	5/5		3/5	
	8.19	金沢文庫	エーテル	2^5	2^6	2^6	+	0/2	5/5	5/5	0/5	
			水	2^7	2^5	2^7	+	0/2	5/5	5/5	2/5	
	9. 1	大井埠頭	エーテル	2^4	2^7	2^5	+	0/2	5/5	1/5		
			水	−	−	−	−	0/2	0/5			
	9. 2	三枚州	エーテル	2	2^2	2^3	+	0/2	5/5	2/5		
			水	2^2	2^7	2^5	+	0/2	0/5			
	9. 2	人工渚	エーテル	2^5	2^8	2^7	+	0/2	2/5			
			水	−	−	2	−	0/2	5/5			
アサリ	7.21	三枚州	エーテル	2^6	2^7	2^7	+	0/2	5/5		1/5	
			水	2^2	2^5	2^5	−	0/2	5/5	5/5	4/5	0/5
	7.21	人工渚	エーテル	2^{10}	2^6	2^7	+	0/2	5/5	5/5	0/5	
			水	2^6	2^3	2^5	+	0/2	5/5	5/5	4/5	0/5
	8.19	金沢文庫	エーテル	2^8	2^7	2^9	+	0/2	5/5	5/5	0/5	
			水	−	−	−	−	0/2	5/5	5/5	0/5	
	9. 1	大井埠頭	エーテル	2^5	2^6	2^4	+	0/2	5/5	4/5	1/5	
			水	−	−	−	−	0/2	0/5			
	9. 2	三枚州	エーテル	2^4	2^7	2^4	+	0/2	5/5	0/5		
			水	2^5	2^4	2^3	+	0/2	2/5			
	9. 7	富津	エーテル	2^6	2^8	2^9	+	0/2	5/5	3/5		
			水	−	−	−	±	0/2	5/5			
シオフキ	7.21	三枚州	エーテル	2^4	2^7	2^4	+	0/2	5/5	5/5	0/5	
			水	2^{10}	L	$>2^{11}$	+	0/2	5/5		2/5	
	7.21	人工渚	エーテル	2^6	2^3	2^4	+	0/2	5/5	5/5	1/5	
			水	$>2^{11}$	2^7	2^{10}	+	0/2	5/5		4/5	0/5
バカガイ	7.21	三枚州	エーテル	2^4	2^6	2^4	+	0/2	5/5	5/5	4/5	
			水	2^7	2^9	2^5	+	0/2	5/5	3/5		
カガミガイ	7.21	三枚州	エーテル	2^5	2^6	2^6	+	0/2	5/5	5/5	0/5	
			水	2^5	$>2^{11}$	2^4	−	0/2	5/5	5/5	2/5	
サルボウガイ	7.21	三枚州	エーテル	2^3	2^6	2^4	+	0/2	5/5	0/5		
			水	2^5	2^8	2^6	+	0/2	5/5		1/5	
マテガイ	9. 2	三枚州	エーテル	−	−	−	−	0/2	0/5			
			水	2^4	2^5	2^5	+	0/2	4/5	1/5		

* L は溶血をおこし凝集がみられなかったことを示す

ナトリウム溶液とした.

結果および考察

(1) 表1に赤潮プランクトンの結果を示した. エーテル可溶性画分はすべて溶血をおこしたが, どの画分も強い血球凝集活性はみられなかった. 6月24日 st. 6 の水溶性画分と9月3日 st. 35 の水溶液画分－2はマウスを1分前後で死亡させた. 魚毒性はこの2つの画分および9月3日 st. 6 水溶性画分でみられ, 6月24日, 9月3日 st. 6 のどちらも添加後24時間では0/4, 9月3日 st. 35 水溶性画分－2では2/5であり, 毒性発現に時間がかかった.

6月24日 st. 6 プランクトン優先種である *Olisthodiscus sp.* は渦鞭毛藻に近い種であり, 9月3日 st. 6 のプランクトン優先種である *Prorocentrum sp.* は渦鞭毛藻である[1]. どちらの属も魚貝類へい死の原因種の1つである[6]. これらの水溶性画分でマウスに対する毒性や魚毒性がみられた. 安元らは *Prorocentrum. lima* や *P. concavum* の脂溶性画分でマウス・メダカに対する毒性がみられたと報告している[8]. 水溶性画分については毒性がみられず, 我々の水溶性画分の毒性を示す物質とは異なると考えられる. また, 9月3日 st. 35のプランクトン優先種である *Thalassosira spp.* はケイ藻であるが, しばしば赤潮を形成する[1]. 今回の調査では水溶性画分でマウスとメダカに対する毒性が認められた. 一般的にケイ藻は毒性があるという報告がなく, 今回も優先種ではあるが量は少ないとされている[1]. 他の地点で鞭毛藻が現われており, 優先種ではない他の鞭毛プランクトンの混在とも考えられる.

(2) 表2に貝の抽出液の試験結果を示した. どの画分でもマウスは死亡せず, 試料溶液の毒性値は0.2 MU/g 以下で表され, まひ性貝毒, 下痢性貝毒を持たないと考えられる. しかし血球凝集性, 魚毒性は強く現われ, それらに相関関係が認められた. ($r \fallingdotseq 0.48, n=42, p<0.01$) プランクトンでは溶血性はエーテル可溶性画分でのみみられたが貝については水溶性画分でもみられた. 表2より, 8月9月にそれぞれの生物試験にほとんど反応を示さない画分がみられ, 三枚州, 人工渚のアサリ・マガキを比較すると7月より9月の試料に毒性や活性の低下が認められる. 赤潮は水温の上昇, 日射量の増加より, 発生回数・延日数とも6月が最大で5・7月がこれに続く[1]. 今回我々が得た貝の毒性や活性の季節的変動はこのような環境因子の影響とも考えられる. また岩壁などに固着生活する種のムラサキイガイで魚毒性が強く現われたが, 同様の種であるマガキと地播きの種であるアサリ・シオフキとは毒性に差がみられなかった.

(3) プランクトンと貝の毒化については, 赤潮プランクトンの水溶性画分でマウス・メダカに対する毒性がみられ, エーテル画分で溶血性がみられたのに対し, 貝の抽出液ではマウスに対する毒性はみられず, 血球凝集性・魚毒性が強く現れ, 生物活性の現れ方に相違がみられた. また, st. 6 のプランクトン抽出液の生物活性の現れ方は6月と9月で変化がみられないが, マガキとアサリの抽出液の生物活性の現れ方は7月より9月で活性の低下がみられ, 6・7月に多く発生する赤潮などの外的影響があると考えられる. 一般的に貝における生理活性物質の由来について ①食物連鎖によるプランクトンの影響 ②生育環境における化学物質の影響 ③生体内で合成されるものが考えられる. 今後赤潮プランクトンなどの環境因子と貝の毒化について, 魚毒性を有する物質面などから調査を行うとともに溶血性, 血球凝集性の in vivo でのマウスに対する影響についても検討していく必要があると考えている.

謝辞 本調査の試料採取にあたり, 東京都環境保全局水質保全部水質監視課, 衛生局環境衛生部食品監視課のご協力に感謝いたします.

文 献

1) 東京都環境保全局水質保全部：昭和55年度東京都内湾赤潮調査報告書, 1982
2) 橋本芳郎：魚貝類の毒, 1979, 学会出版センター
3) 安達六郎：昭和53年度プランクトンの毒性に関する研究（農林水産業特別試験研究費補助金による研究報告書）香川大学農学部
4) 安元 健：食品衛生研究, 30, 55, 1980
5) Oshima. K., Yasumoto. T., Kodama. M., Ogata. T., Fukuyo. Y. and Kotaki. Y.：*Bull. Japan. Soc. Sci Fish.* 48, 525, 1982
6) 山口勝巳, 安元 健ら：有毒プランクトン—発生, 作用機構, 毒成分, 日本水産学会編, 1982, 恒星社厚生閣
7) 吉良哲明：原色日本貝類図鑑, 1982, 保育社
8) Nakagima. I., Oshima. Y. and Yasumoto. T.：*Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 47, 1029, 1981
9) 大野眞介：免疫化学, 医化学実験法講座, 石川俊介編, 172, 1972, 中山書店
10) 伏谷伸宏：天然有機化合物実験法—生理活性物質の抽出と分離, 名取信栄, 池川信夫, 鈴木真言編, 553, 1977, 講談社サイエンティフィク

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 294-295, 1983

水の華からの有毒 *Microcystis aeruginosa* の分離

渡 辺 真利代*, 大 石 真 之**

Isolation of Toxic Strains of *Microcystis aeruginosa* from Water Blooms

MARIYO F. WATANABE* and SHINSHI OISHI**

Keywords: 分離 isolation, ミクロシスティス *Microcystis aeruginosa*, 毒性 toxicity, 培養 culture

緒　　言

富栄養化の進んだ湖沼，ダム湖などにおいては，水界の呈色を引起すほどの植物プランクトンの異常な増殖，すなわち“水の華”の出現がしばしば観察される．この“水の華”を作る藍藻の中に動物の斃死をおこす物質が含まれており，諸外国では，有用家畜動物に対する被害が報告されている[1-3]．我国の場合，飲料水源となる湖沼などで有毒種である“水の華”が出現し飲料水の安全性の面から憂慮されている．有毒藍藻のなかで *Microcystis aeruginosa* は最も普遍的にかつ長期的に出現する種類である．我々が東京及び近辺の湖沼，ダム湖，池などから採取した *M. aeruginosa* の水抽出液をマウスに腹腔内投与した結果では，50％の試料に致死毒性を確認した[4]．この毒性がみられた水界では，経年的に毒性が維持される傾向にあり[5]，毒性の有無が何によるのか明らかにするため有毒株の分離を実施した．

材料と方法

分離は顕微鏡下でガラスキャピラリーを用いて群体を採取し，滅菌水で2～3回洗浄した後[6]，試験管中で培養した．2～3ケ月後，生育した試験管の中から *M. aeruginosa* 以外の藻種の混在のないものについて，更に継代培養を重ね混在藻種のないことを確認した．本培養は25°C，2,000 lux の連続照射下で10 *l* の培地を含むガラスビンを静置し行った．培地は市村[6] の用いている MA 培地を使用した．その組成は以下の通りである．$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$：50 mg，KNO_3：100 mg，$NaNO_3$：50 mg，Na_2SO_4：40 mg，$MgCl_2 \cdot 6H_2O$：50 mg，β－グリセロリン酸ナトリウム：100 mg，Na_2 EDTA：5 mg，$FeCl_3 \cdot 6H_2O$：0.5 mg，$MnCl_2 \cdot 4H_2O$：5 mg，$ZnCl_2$：0.5 mg，$CoCl_2 \cdot 6H_2O$：5 mg，$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$：0.8 mg，H_3BO_3：20 mg，Bicine：500 mg，蒸留水：1 *l*, pH 8.6.

細胞は3～4週間培養し対数増殖期の終期から定常期にあるものを回収し，凍結乾燥後冷凍保存した．

毒性テストに際しては，細胞を蒸留水中で磨砕し，1夜5 °C に放置後，16,000 rpm，20′で遠心して上清を得た．上清を0.2 m*l* 又は0.4 m*l* マウスに腹腔内投与しその死亡率をみた．

結果及び考察

表1には皇居濠群より分離した *M. aeruginosa* の水抽出液をマウスに腹腔内投与した時の死亡率（死亡個体数/投与個体数）を示した．この表では投与量をもとの藻体の乾燥重量に換算した．1匹あたり10 mg の投与量は，藻体330～440 mg/マウス体重1 kg に相当する．濠水から分離した17株の中では，唯一つ M 108で毒性が確認されたにすぎない．この株も一匹あたり10 mg の投与量では致死効果はみられない．

表2には諏訪湖から分離したもの（M 200番台），都内の公園池から分離したもの（M 501），*Microcystis* の他の2種（霞ケ浦より分離）の毒性テストの結果を示した．諏訪湖から分離した13株のうち M 203，204，228，230の4株に毒性がみられた．濠から分離したものに比べ，諏訪湖のほうが有毒株の割合が高くなっているが，Gorham の報告[7]（19株のうち8株が有毒）より割合が低くなっている．マウスはいずれも接種後1～2時間で死亡しており，野外の藻体を接取した場合[8] と同様に肝臓のうっ血が顕著であった．有毒株のうち M 228の毒性は特に強く，培養条件によって異るものの，最も強い場合には LD_{50} ip 5.82 mg/kg[9] の値を得ている．この値は野外の藻体試料で推定されるものよりはるかに毒性

* 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, Shinijuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 同毒性部薬理研究科

Table 1. Toxicity of *M. aeruginosa* Isolated from the Moats around the Imperial Palace

Strain No.	Dose mg/mouse	Mortality
M 102	15	0/2
103	20	0/2
104	20	0/2
106	15	0/2
107	20	0/5
108	20	5/5
121	10	0/5
122	20	0/2
123	10	0/5
124	20	0/2
125	20	0/5
126	20	0/2
129	10	0/5
130	20	0/2
131	10	0/5
132	20	0/2
M 601	20	0/2

Table 2. Toxicity of *M. aeruginosa* and Two Other *Microcystis* Species Isolated from Some Lakes and a Pond

Strain No.	Dose mg/mouse	Mortality
M 201	20	0/2
202	10	0/5
203	12	3/5
204	20	2/2
206	20	0/2
207	20	0/5
208	20	0/2
223	20	0/2
226	20	0/2
227	10	0/5
228	10	2/2
229	10	0/2
230	10	5/5
M. C.	20	0/2
M 501	20	0/2
* *M. elabens*	20	0/2
* *M. flos-aquae*	20	0/2

* Isolated by T. Ichimura (Tokyo Univ.)

が強く，また Eloff and Westhuizen の培養試料[10] よりも強いものであった．

我々が行った分離は群体ごと採取する方法によるものであったが，培養を重ねていくうちほとんど単細胞の状態となり，群体は全く観察されなくなっている．従って周囲のゼラチン膜と細胞との関係など分離初期に保持していた形態学的な特徴は失われており，光学顕微鏡下で有毒株と無毒株に相異点を見出すことは困難である．この点については，今後生理生化学的手法により解明する必要があるだろう．

文　献

1) Schwimmer, M. and Schwimmer, D. : *Algae, Man and Environments*, Ed, Jackson, D., 270, 1968, Syracuse, New York
2) Gentile, J. : *Microbial Toxins* 7, Eds. Kadis, S., Ciegler, A. and Ajl, S., 27, 1971, Academic Press, New York
3) May, V. : *The Water Environments*, Ed. Carmichael, W.W., 124, 1982, Plenum Press, New York
4) Watnabe, M.F. and Oishi, S. : *Jap. J. Limnol.* 41, 5, 1980
5) 渡辺真利代，大石真之：東京衛研年報，31－1，273, 1981
6) 市村輝宣：藻類研究法，西沢一俊，千原光雄編，294, 1979，共立出版
7) Gorham, P.R. : *AJPH*, 52, 2100, 1962
8) Watanabe, M.F., Oishi, S. and Nakao, T. : *Verh. Internat. Verein Limnol.*, 21, 1441, 1981
9) Watanabe, M.F. and Oishi, S. : Bull. *Japan. Soc. Fish.* 49, 1983, 印刷中
10) 渡辺真利代，大石真之：有毒プランクトン，日本水産学会編，123, 1982
11) Eloff, J.N. and Van Der Westhuizen, A.J. : *The Water Environments*, Ed. Carmichael, W.W. 343, 1982

報　　文 V

毒性に関する調査研究

REPORTS V

PAPERS CONCERNING ON TOXICOLOGY

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 297-298, 1983

オルトフェニルフェノールナトリウム (OPP—Na) 投与量における代謝の相違

牛山慶子*, 樺島順一郎*, 中尾順子*

Metabolism of *o*–Phenylphenol sodium salt (OPP–Na) in Rats : Dose–Response of Metabolic Profile of OPP

KEIKO USHIYAMA*, JUNICHIRO KABASHIMA* and TOSHIKO NAKAO*

Keywords : オルトフェニルフェノール o–phenylphenol, フェニルハイドロキノン phenylhydroquinone, ラット rats

オルトフェニルフェノールナトリウム(OPP–Na)は，防かび剤として，柑橘類に使用されている．OPP–Naの安全性の評価は各方面から検討されているが，Hiragaらは2％ OPP–Naを添加した飼料を投与したラットより膀胱ガンの発生を報告した[1]．

筆者らは，OPPの代謝について発ガン機構の解明のため調査している．その結果，尿中代謝物は，OPPグルクロン酸抱合体とフェニルハイドロキノン（PHQ）グルクロン酸抱合体と，わずかではあるがそれぞれの硫酸抱合体であることを確認した[2]．

今回は，投与した飼料中のOPP–Na濃度が，尿中代謝物の濃度にどのように影響を与えるかを検討した．

実験材料および方法

動物：F344/DuCrjラットのオス（日本チャールズリバー社）を4週令で購入し，5週令より実験を開始した．飼育条件は，樺島ら[3]が報告した方法によった．

投与方法：飼料CE–2にOPP–Na(Dow Chemical社製)をそれぞれ，0％，0.25％，0.5％，1.0％，2.0％添加したものを固型化し，自由摂取させた．

採尿方法：代謝ケージには，3匹ずつ入れ，1群3組を使った．採尿は毎日行ない，その他は樺島らの報告[3]と同様である．

測定方法[2]：OPP, PHQは高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で測定した．尿を0.5m*l*とり，0.2M酢酸バッファーpH4.5 1m*l*, Sulfatase（β–グルクロニダーゼを含む，シグマ製)100unitsを入れ，37°C，1晩インキュベートし，抱合をはずした．塩酸酸性とし，内部標準4-ブロモジフェニル（関東化学）を加え，酢酸エチル2m*l*で2回抽出し，5％炭酸水素ナトリウム水溶液で洗い，有機層をHPLCの試料とした．HPLCの条件は，カラムMicropak MCH–10(4mm×30cm)，移動相・メタノール1m*l*/min., 測定波長・300nmで行なった．

グルクロン酸濃度は，試料（尿を希釈したもの）0.2m*l*に硫酸1.5m*l*，2％カルバゾール・エタノール溶液100μ*l*を混和し，100°Cで20分間加熱し，放冷後，540nmで測定した．値はすべて，コントロール群の値をブランクとして差し引いた．

実験結果と考察

尿中OPP濃度は（図1），2.0％投与では2日目で37mMになり，その後低下して12日目では30mMで，ほぼ一定となった．1.0％投与では，1日目は4mMであったが，2日目からは17mMであった．0.5％，0.25％投与では，1日目は，ほとんど検出されず，12日目ではそれぞれ，3mM，6mMであった．トキシコカイネティクスによると初期の排泄のカーブにみられる変動の大きさは，体内からの排泄速度に依存している[4]．

尿中PHQ濃度（図2）の変化の傾向も，OPPの場合と同じ傾向であった．排泄の波が小さいことは，PHQの排泄されにくさを示すと考えられる．2.0％投与では，30mMが最大で，その後低下して12日目では，20mMになった．1.0％，0.5％，0.25％投与では，1日目は，ほとんど検出されないが，12日目ではそれぞれ，7mM，4mM，3mMであった．

尿中グルクロン酸濃度（図3）の変化は，OPP・PHQ濃度と同じ傾向を示しているが，1.0％投与では1日目から10mM検出されだ．

図4は，投与2日目の尿中OPP，PHQ，グルクロン

* 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

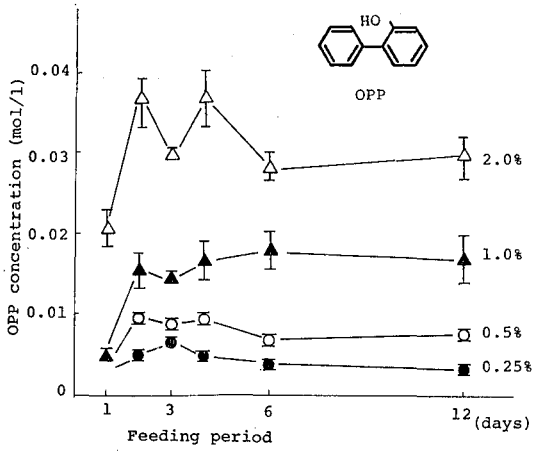


図1　OPP–Na の飼料中濃度と投与日数の尿中OPP濃度との関係

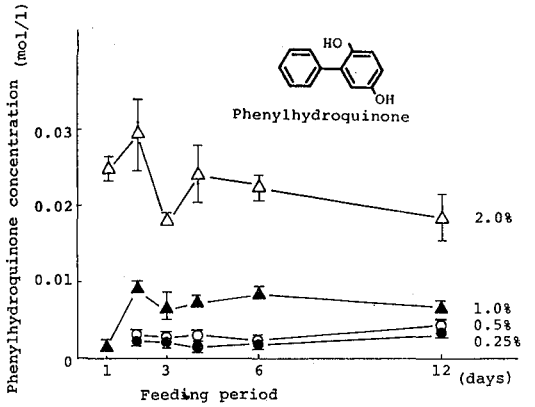


図2　OPP–Na の飼料中濃度と投与日数の尿中フェニルハイドロキノン濃度の関係

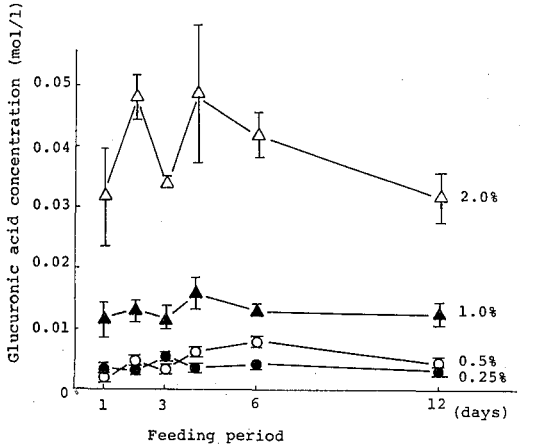


図3　OPP–Na の飼料中濃度と投与日数の尿中グルクロン酸濃度の関係

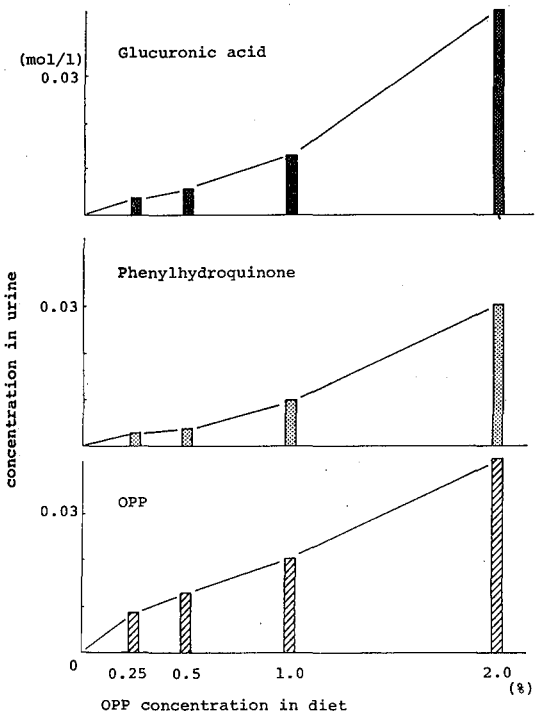


図4　尿中OPP, PHQ, グルクロン酸濃度と飼料中OPP–Na 濃度の関係（投与2日目）

酸濃度を投与飼料 OPP–Na 濃度にあわせてみたものである．OPP 排泄濃度は，投与飼料濃度にほぼ比例し増加がみられるが，PHQ，グルクロン酸では，2.0%での上昇の度合が大きい．これは，2.0% OPP 投与により体内での代謝回転が増大していることを示すものと考えられる．また，Hiraga らが報告した[1] OPP–Na の膀胱ガンの発生率は，2.0%が著しく上昇することと一致している．

文　献

1) Hiraga, K. and Fujii, T. : *Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 303, 1981
2) 牛山慶子，樺島順一郎，中尾順子：東京衛研年報 33, 455, 1982
3) 樺島順一郎，中尾順子：東京衛研年報　32－2，61, 1981
4) Hodgson, E. and Guthrie, F.E. : *Introduction to Biochemical Toxicology*, 53, 1980, Blackwell Scientific Publications,

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 299-301, 1983

オルトフェニルフェノール (OPP) の生体内運命 (続)
経口投与によるラット膀胱への分布，排泄

市川久次*，小林博義*，中尾順子*

Biological Fate of *o*-Phenylphenol (OPP) in Rats (Supplement)
Distribution into and Excretion from Bladder of Rats 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）は柑橘類の防黴剤として使用されている．その安全性については膀胱腫瘍の発生が報告[1]され疑問視されている．著者ら[2]はOPPの安全性の検討の一環としてo-〔U-^{14}C〕phenylphenol（OPP-^{14}C）をラットに経口投与し，OPPの生体内運命を検討し前報[2]に報告した．しかし，その中で膀胱への分布，排泄についてはデータのバラツキが大きく再検討の必要性を強調した．本報告は，OPPの膀胱に対する催腫瘍性を考慮し，バラツキをより少なくするために放射能測定用サンプルの調製法ならびに放射能測定条件を検討した後，OPP-^{14}Cをラットに経口投与し膀胱の分布，排泄を再検討したので報告する．なお，同時に肝臓について前報同様処理し，比較検討した．

実験材料ならびに方法

1. 使用動物

前報[2]と同様のものを実験に供した．

2. 試料ならびに試薬

前報[2]と同様のものを実験に供した．

3. 投与方法ならびに期間

OPP-^{14}Cはオリブ油（局方）に溶かし（9.7 μci/0.5m*l*），ラット一匹当り0.5m*l*（投与後30分処理群は4匹，1時間処理群は7匹，3時間，6時間，12時間，24時間，72時間処理群各3匹）を胃ゾンデを用いて経口投与した．OPP-^{14}Cの投与は1回とし，投与後経時的に屠殺(断頭)処理した．ラットは投与前16時間は除餌した．

4. 放射能の測定法

i) 測定用サンプルの調製法

本報告の目的とする臓器である膀胱の組織は平滑筋により構成されているため非常に堅く，ポリトロンホモジナイザーで磨粋しても，羽毛状になるだけで均一な組織懸濁液とならなかった．このことが前報において指摘されたデータのバラツキの大きな原因と考えられたので，膀胱全体をそのまま溶解し，放射能を測定する方法を考案した，すなわち，ラットより摘出，水洗後，水分を沪紙で除去した膀胱（100mg，70mg）をレギュラーのカウンテングバイアルに入れ細切した後，組織溶解剤としてSoluene-350 2.0m*l*を加え密栓して50°Cで一夜放置溶解させ，室温に冷後Dimilume-30を15m*l*加え室温で一夜放置安定化させた．

ii) 測定条件の設定

一般に，液体シンチレーションカウンターを使用し，本報告の如く多量の組織溶解剤を使用し多量の生体試料中の放射能を測定するにあたっては，生体試料が出すspurious counts（偽計数）の除去に留意する必要があるといわれている．本実験においては実験方法4(i)の方法により調製した測定用サンプル（非放射性）を用いて，液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製，LS-355）のA，Bチャンネルに可変のディスクリミネータを使用しウィンドウの巾を変化させ，Cチャンネルは参考のため固定（fullcarbone）して測定し，膀胱によるspurious counts（偽計数）を除去できる条件を求めた．なお他の条件はすべて前報[2]と同じにした．

iii) 放射能の測定

膀胱中の放射能の測定は，求めた条件（実験結果の項で述べる）にて前報同様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，

* 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

前報のデータと比較検討するために肝臓についても前報同様の方法条件で測定し，結果は補正して表示した（投与量が前報[2] 11.7 μci/Rat，本実験9.7 μci/Rat であったので，前報[2] の結果と比較検討するため本実験の値を1,2倍し補正して表わした）．

実験結果

1. 膀胱の液体シンチレーションカウンターに測定条件

データは示さなかったが，コールドの膀胱にもかかわらず，測定用サンプル調製後常法によりCチャンネル（full carbone）にて測定したところ352（100mg），152 cpm（70mg）という高い値を示した（通常バックグランドは約30cpm）．このうち高い値を示したサンプルについて調製してから13日後に測定したところ160cpm の高いカウントを示した．次にこのサンプルを用いてBチャンネルのウインドウの上限を650に設定し（full carbone のウインドウの上限は650），下限を0より順次50づつ上昇させて測定し検討したところ，Fig 1．に示した如くウインドウの下限が上昇するにつれて膀胱のカウントは減少し，下限のディスクリミネータが200以上ではほぼ一定値を示した（バックグランドとほぼ同じ）．この結果より，ウインドウの下限のディスクリミネータを200に設定することにより膀胱より出る spurious counts（偽計数）を除去できることが明らかとなった．次にこの条件（200～650）をBチャンネルに設定し，Aチャンネルには spurious counts（偽計数）を計数できる条件（0～200），Cチャンネルは full carbone を測定できる条件を設定し，新たに113mg，110mgの膀胱について，A，B，Cチャンネルの条件を使用して測定し，その経時変化を検討したところ Fig2．にした結果を得た．すなわちCチャンネル（full carbone）のカウントはAチャンネル（0～200）のカウントにほぼ等しく経時的に減少した（22日後においてもバックグランドにはならなかった）．Bチャンネル（200～650）においてはサンプル調製1日後よりそのカウントはバックグランドとほぼ同じであった．以上の結果より，本実験で得たBチャンネル（200～650）の条件を用いて測定すれば サンプルを調製した翌日に測定しても spurious counts（偽計数）を除去して測定できることが明らかとなった．

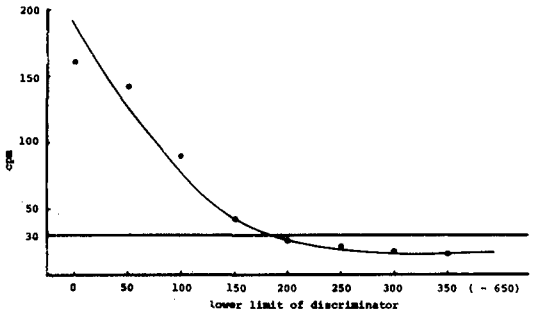


Fig. 1. The Relationship between the Surious Counts of Bladder and Lower Limit of Discriminator of Window.

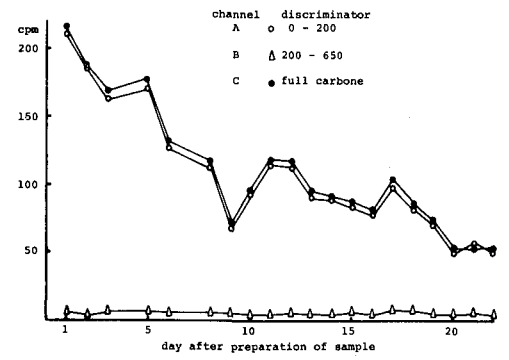


Fig. 2. Changes of the Spurious Counts of Bladder with Time

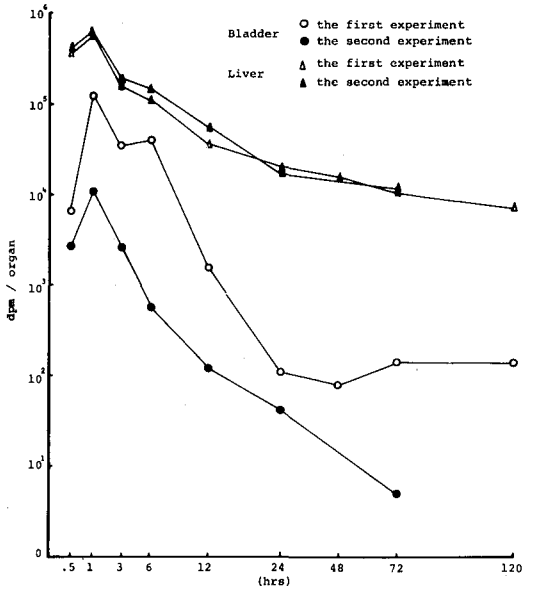


Fig. 3. Changes in Organ Level of Radioactivity with Time After Oral Dose of OPP—^{14}C Values of the second experiment were calculated to compare with the first experiment.

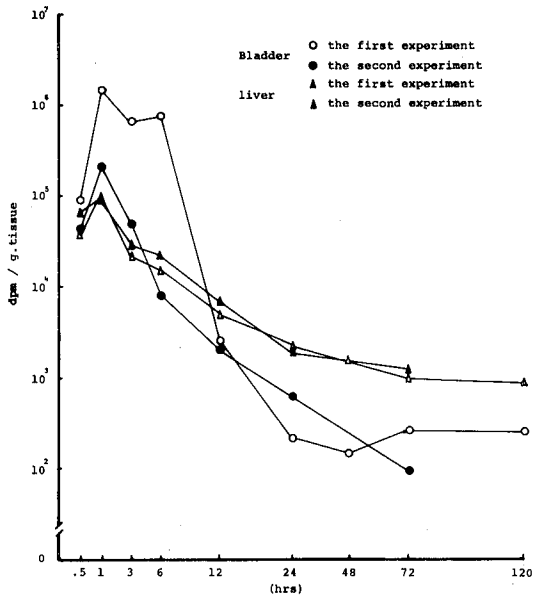


Fig. 4. Changes in Tissue Level of Radioactivity with Time After Oral Dose of OPP-^{14}C Values of the second experiment were calculated to compare with the first experiment.

2. 膀胱への分布，排泄

実験方法4で述べた方法ならびに実験結果1で述べた方法，条件を用いて，前報[2]と同様OPP-^{14}Cをラットに経口投与し経時的に処理し，膀胱中の分布ならびに排泄を，同時に前報同様処理した肝臓と比較検討したところ，Fig. 3., 4. に示した如く，投与後1時間で最高値に達し以後急激に減少し投与24時間以後はほぼ一定値を示し，分布，排泄の経時的変化については前報[2]と同様の結果を得た．また臓器当り，臓器湿重量g当りの値も前報[2]と同様で本実験の再現性は良好であった．

考　　察

前報[2]において指摘された膀胱のバラツキの原因が放射能測定用サンプルの調製過程にあったので（組織が堅く磨粋により均一にならない），それをより少なくするために膀胱全体を溶解し測定する試みを行ったがspurious counts（偽計数）が13日後にもかなり測定された．このspurious counts（偽計数）は一般に生体試料をアルカリ性にて測定すると計数され，その光子のエネルギーは低エネルギー領域に属するといわれている．そこで，この影響を除去するためにディスクリミネーターを操作し下限を順次上昇させ検討した結果Fig1., 2. に示した如く，チャンネルのウインドウを200～650に設定し測定すればspurious counts（偽計数）をほぼ完全に除くことができた．本条件は，他の臓器の測定においてもかなり応用できるものと考えられる．

次に，本実験において得た方法ならびに条件についての結果に基づいて前報[2]同様OPP-^{14}Cをラットに経口投与し経時的にその膀胱への分布ならびに排泄を，同時に肝臓についても前報同様処理補正し比較検討を行ったところFig3., 4. に示した如く，OPP-^{14}Cの膀胱への分布，排泄は速く，投与1時間で最高に達し（かなりの個体差があったが投与後30分と1時間の値の間には危険率7.2%で有意差があった），以後急激な減少を示し，前報[2]の結果を再確認した．なお，臓器当り，臓器湿重量g当りの放射能は前報[2]と同様の値を示し本実験の再現性は高いものと考えられる．さらに，膀胱への取込みは個体間でかなりの差が認められた．この点については今後機会があったら検討してみたいと考えている．

結　　論

1. 液体シンチレーションカウンターを使用し，膀胱全体を溶解，測定する方法，条件を確立した（ウインドウのディスクリミネータを下限200上限650に設定）

2. 1の実験方法・測定条件を用いてOPP-^{14}Cをラットに経口投与した後，経時的に膀胱への分布，排泄を検討した結果，前報[2]同様投与後1時間で最高に達し以後急激に減少し，蓄積性の小さい結果を得た．

文　　献

1) Hiraga, K. and Fujii, T : Food and Cosmetic Toxicology, 19, 303, 1981

2) 市川久次，小林博義，中尾順子：東京衛研年報，33, 451, 1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 302-304, 1983

経口投与によるオルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) のラット乳汁への排泄の可能性についての検討

小林博義* 中尾順子*

Possibility of Excretion of Sodium *o*-Phenylphenate (OPP-Na) into milk by Oral Admimistration to Mother Rat

HIROYOSHI KOBAYASHI* and TOSHIKO NAKAO*

Keywords: 乳汁 Milk　オルトフェニルフェノールナトリウム *o*-Phenylphenol Sodium Salt　幼若ラット Infant and Young Rat

緒　言

オルトフェニルフェノール（以下 OPP）は柑橘類の防カビ剤として許可され用いられている．以来本物質の安全性に関する種々の研究が当部においても行なわれている[1-5]．先に OPP-Na の癌原性試験で雄ラット膀胱腫瘍発生が報告されており，さらに体内分布[7]，排泄，酵素[8]への作用，代謝推移等に[10,11]ついて報告されている．

幼若期は代謝および各種器管機能が未発育の段階にあり，本物質の毒性に関しては，成熟期に比較し特に考慮しなければならない．今回 OPP-Na 添加飼料を分娩直後の母ラットに与え，仔が自力で摂餌する前の生後14日目の幼若ラットの胃内乳汁中に OPP-Na が存在するか否かを検討したので報告する．

実験材料ならびに方法

飼料：添加飼料は OPP-Na（東京化成工業株式会社，Lot ALOI）を２％の割合で日本クレア㈱製粉末飼料（CE-2）に添加後固型乾燥したものを投与群飼料とした．

動物：動物は自家繁殖した Wistar-SLC 系ラットを兄妹交配して得た母と仔を用いた．供試動物は，１母体当り，８～10匹の仔を出産したものを用いた．動物は，室温25°±1°，湿度55％，照明時間午前６時より午後５時を条件とした飼育室にて，生後14日目（出産日を０日とした）まで母ラットとともに，プラスチックケージ，カンナクズ（滅菌）床敷，水はフィルター処理のものをビンにより自由給水で飼育した．OPP-Na 添加飼料を分娩直後より母ネズミに投与し，母と仔の体重（仔は雌雄の区別なく）測定，症状観察を行い，飼料摂取量はコボシたものも含む量として測定した．仔ラットが自力で飼を摂取する前の出生14日目に仔胃内乳汁を胃に入ったまま噴門および幽門部にて切断摘出し，サランラップにつつみ，アルミホイルでまいて，－80°フリーザーに保存した．乳汁を実験に用いる時は胃をハサミで切り乳汁を取り出し秤量した．乳汁採取と同時に母と仔の血清生化学的検査[9]と器管重量（心臓，肝臓，腎臓，脾臓）の測定を行なった．

乳汁：乳汁は秤量後100mg を共栓試験管に入れ永水中に保った．0.2M 酢酸緩衝液（PH4.5）0.5m*l* と β－グルクロニダーゼ（シグマ Lot62F07871）50μ*l* を入れよく混和し，37°60分インキユベイション後ベンゼン（和光純薬特級 Lot ALP0996）0.5m*l* を加え，振倒混和後2000rpm 2分遠心して，ベンゼン層をマイクロシリンジ（日本クロマト工業株式会社 Lot2933087）で５μ*l* を分析に供した[10]．

スポット毎にベンゼンでシリンヂを洗條し，洗條時ベンゼンもスポットして汚染のないことを確認した．

薄層クロマトグラフィによる分析　プレート（メルク Art5715 Lot2463647）は乾燥機で120°60分処理し，自然冷却後用いた．スポット終了後メチルアルコール：ベンゼン（５：95）溶媒（メチルアルコール：和光純薬特級 Lot ALP1014，ベンゼン：和光純薬特級 Lot ALP0996）で展開しドラフト内で溶媒を稀散させた後ギブス試薬（ジブロムキノンクロルイミド：和光純薬特級 CEE9774）0.3％エタノール溶液により処理した．

尿　母ラットおよび仔ラットの尿は，断頭採血直後膀胱を摘出し，共栓試験管に尿を採取後－80°にて保存し

* 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

た．使用時氷冷下に溶解後0.5m*l*とり乳汁と同様の処理をした．乳汁，尿以外は次の通りである．

飼料：飼料は，乳鉢で磨砕し100mgを乳汁と同一処理

OPP標品：OPP標品10mgとメチルアルコール1m*l*，ベンゼン0.5m*l*を混和して用いた．

フェニールヒドロキノン（PHQ, OPPの代謝物）：PHQ 10mgにベンゼン0.5m*l*を加え用いた．

血清：血清0.5m*l*を乳汁と同一処理

肝臓：肝臓は生理食塩水5m*l*と肝臓500mgをガラス製ホモジナイザーで氷水中でホモジナイズしその0.5m*l*をとり乳汁と同一処理．

これらとは別に，乳汁800mgを8m*l*ベンゼン，再蒸留水1m*l*と混和し，1500rpm 10分遠心後上清5m*l*を0.5m*l*まで濃縮処理したもの，乳汁100mgを1N，NaOHまたは1/10N NaOHで37°17～20時間インキュベーション，ベンゼン抽出または，1N，HclでPH 8にしてベンゼン抽出しスポットした．同時にガスクログラフィ検出に供した試料をスポットした．

本法の検出限界検出のためOPP量10mg/m*l*の試料から倍々稀釈により0.01953mg/m*l*までを10段階に分けて分析した．

結　果

飼料摂取量：対照群母ラットは総量として（14日間）206g/100g B.W.,OPP-Na群は207g/100g B.W.（OPP-Na摂取量として4g/100g B.W）．

体重，症状観察：母仔とも体重増加率および症状の変化は，始め投与群母体重に抑制傾向がみられたが，対照群，OPP-Na投与群ともほとんど差はなく，14日目に対照群（平均）体重224g（6匹）およびOPP-Na群体重222g（6匹）であった．仔体重増加率は実験開始体重を100として対照群で348%，OPP-Na群で361%であった．

血清生化学検査：対照群とOPP-Na群とでほとんど差はみられなかった．

器管重量：母ラット肝臓体重比重量は対照群で4.48g±0.118($\bar{X}$±SD) OPP-Na群で5.22g±0.342であった．腎臓（左）対照群で348.58mg±20.475（右）339.47mg±16.626 OPP-Na群（左）361.24mg±22.800（右）362.06mg±16.157で他の母仔臓器では両群の差はほとんどみられなかった．

乳汁：生後14日目の仔ラット胃内乳汁量は胃に入ったままの状態で，対照群，OPP-Na群とも250～300mg/1仔ラット当りで両群間の乳汁重量，色調等の差はみられなかった．

薄層クロマトグラフィでのOPPならびに代謝産物の検出結果はFig 1に示した．本法では，仔ラット胃内乳汁中OPPおよびOPP代謝物の存在を確認出来なかった．

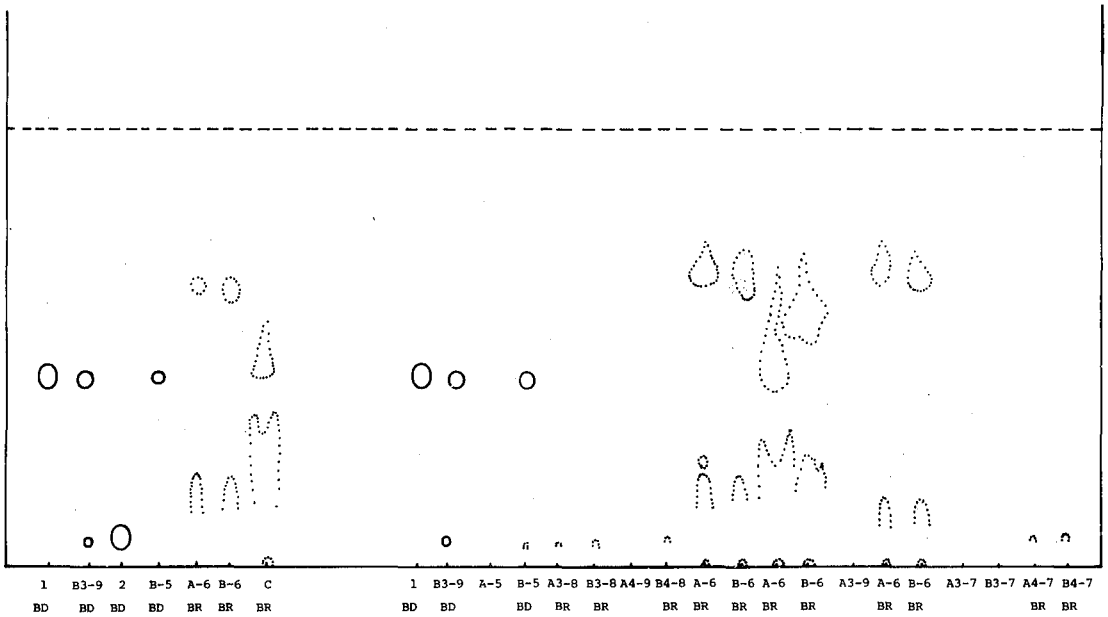
考　察

母ラットが飼料より摂取したOPP-Na量は約4g/100g B.Wであるが，飼料の摂取量は対照群と差はなく，栄養学的な差は，体重増加値等より両群とも差はないものと思われる．仔の体重変化，症状とも両群間で差はなく，亜急性毒性実験での投与群にみられる体重抑制[4]，飼料摂取量減少の報告にくらべ軽微な差と思われる．母ラット肝臓，腎臓の体重比重量増加傾向は亜急性実験[4]と類似した変化を示した．仔ラットの心臓，腎臓が体重比重量で小さい値の傾向を示したが，肝臓の重量変化は認められなかった．血清生化学的変化は亜急性毒性と比較して，母仔ともに対照群との差はみられずOPP-Naの全身への作用は軽微なものと思われる．

薄層クロマトグラフィはギブス試薬処理後OPPとPHQは直ちに青く発色[10,12]しすぐ判定出来るが，図1に示した点線部位に処理後20～24時間後にあらわれる発色があるため，発色色調，Rf位置による判定も24時間とした．乳汁，血清，仔の肝臓にOPP，PHQと明らかに色調，Rf値とも異なった発色がみられる．さらに同一OPP-Na群乳汁のガスクロマトグラフィ分析結果では，OPP，PHQとも乳汁中にほとんど認められない．市川らによるとOPPの多くは主に尿より排泄され，代謝速度も早いと報告[7]しているが，本実験で母ラット尿以外にOPP，PHQの存在が認められなかった．特に母仔とも，肝臓には認められず，また仔の尿にも認められなかった．同時に行なったOPP-Na投与群仔の胃内ミルクのNaOH処理，ベンゼン抽出したものでもOPP，PHQ存在確認出来なかった．乳汁にOPP標品を混和したものでは，定位置，定色にスポットがみられた．検出限界測定は標品を段階的希釈展開した結果検出限界判定可能濃度は1.56μg/5μ*l*であった．このことから，OPP-Naを母ネズミに投与した時，仔の胃内乳汁中のOPPは現在用いている方法では検出できなかった．真に乳汁中にOPPが分泌されないのか，あるいは検出限界以下であるかは放射性同位示素ラベルOPPを用いての実験により明らかにしたい．現在計画中である．

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) 田山邦昭，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，31-2，



上段　検体　A 対照群　B OPP^{-Na}投与群　C ガスクロマトグラフィ検体試料　1 OPP 標品　2 PHQ　3 母ラット
4 仔ラット　5 飼料　6 仔ミルク　7 肝臓　8 血清　9 尿
下段　色調　B 青　BR　褐色　D 濃い　1 うすい
プレート　シリカゲル
展開容媒　メタノール，ベンゼン 5：9 5
発色　0.3%ジブロムキノンクロルイミド・エタノール：溶液（ギブス試薬）噴霧
OPP は青色の発色

図 1　OPP の薄層クロマトグラフィー

1, 1980
3) 井口重孝, 田山邦昭, 平賀興吾：東京衛研年報, 30-2, 67, 1979
4) 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
5) 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
6) Hiraga.,K and Fujii. T.：Ed Cosmet Toxicol., 19, 303, 1981
7) 市川久次, 小林博義, 中尾順子：東京衛研年報, 33-2, 451, 1982
8) 長井二三子，中尾順子：東京衛研年報，32-2，57，1981
9) 中川好夫，福田向江，紫　英子，平賀興吾：東京衛研年報，25，599，1974
10) 牛山慶子，樺島順一郎，中尾順子：東京衛研年報，32-2，51，1981
11) 牛山慶子，樺島順一郎，中尾順子：東京衛研年報，33-2，455，1982
12) 船久保英一：有機化合物確認法　養賢堂14，1967

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 305-308, 1983

飼料中オルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) 濃度とラット肝および腎中各種酵素活性の変動

長井 二三子*, 中尾 順子*

Changes of Enzyme Activities in Rat Urine and Tissues by Administration of Different Concentration of *o*-Phenylphenol Sodium Salt (OPP-Na) in Diet

FUMIKO NAGAI* and TOSHIKO NAKAO*

Keyword: オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, ラット rat, γ-グルタミルトランスペプチダーゼ γ-glutamyltamyltranspeptidase, アルカリフォスファターゼ alkaline phosphatase, グリコース6リン酸脱水素酵素 glucose-6-phosphate dehydrogenase

緒　言

オルトフェニルフェノール（OPP）は輸入柑橘類の防カビ剤として広く使用されている．当毒性部においては平賀らが，OPP-Naの長期投与がぼうこうガンを発生させることを報告[1]し，その発生機構の解明についても種々の検討がなされている[2-13]．著者らはOPP-Naの影響について主として尿中に出現する細胞膜酵素および腎，肝中の酵素活性およびグルタチオン含量について調べてきた[4, 7]．今回は飼料中のOPP-Naの濃度を変化させて，尿中のγ－グルタミルトランスペプチダーゼ（γ-GTP）活性，アルカリフォスファターゼ活性への影響および肝，腎への影響についてγ-GTP，グリコース6リン酸脱水素酵素（G6PDH）などの活性の変化をみることによって検討した．

方　法

4週令のフィッシャー（F334/DuCrj）雄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，各群9匹ずつに区別けし，日本クレア製飼料（CE 12）にOPP-Na（Dow Chemical社製）をそれぞれ，0%，0.25%，0.5%，1.0%，2.0%に添加し，固型化し，自由摂取させ，その間尿を採取した．飼育および採尿に関する詳細は樺島ら[13]および牛山ら[16]が報告した．γ-GTP活性，アルカリフオスファターゼ活性，グルタチオン含量の測定方法については既報[4]のとうりである．G6PDH活性は，肝および腎のホモジネートの40,000 rpm，60分間遠心した上清を酵素標品として，37°Cインキュベート中のNADPHの生成速度を，Varian社，Cary 17分光光度計を用いて340 nmの吸光度により測定した[14]．

尿はBeckman 40 Aローターを用いて4℃，40,000 rpm，60分間遠心し，沈殿を水にけんだくし，さらに4℃，40,000 rpm，60分間遠心して洗浄した沈殿についてγ-GTPおよびアルカリフォスファターゼ活性を測定した．

OPP-Na含有飼料で5週間飼育したラットを断頭屠殺し，肝および腎を取り出し，0°Cの0.9% NaClで灌流後，各群の臓器をそれぞれ合わせ，4倍量の0°C，1.15% KClを加え，前者はテフロンホモゲナイザー，後者はポリトロンを用いて均質化し，−80°Cに保存し，種々の実験に用いた．タンパク質の定量はLowry法に従った[15]．

結果ならびに考察

ラット尿中のγ-GTPおよびアルカリフォスファターゼ活性は尿を4℃，40,000 rm，60分間遠心した沈殿に95%以上回収されたので今回の実験では尿中のγ-GTP活性およびアルカリフォスファターゼ活性はこの沈殿を用いて測定し，タンパク当りの比活性を図1および図2に示した．

ラット尿のγ-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いる．図1に示したように対照群ラットにおいて，2週間の飼育期間中，γ-GTPの比活性が上昇傾向を示したことは，腎尿細管に高い密度で分布すると言われているγ-GTPの活性が成長に伴って上昇したことを反映したものと考えられる．アル

* 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

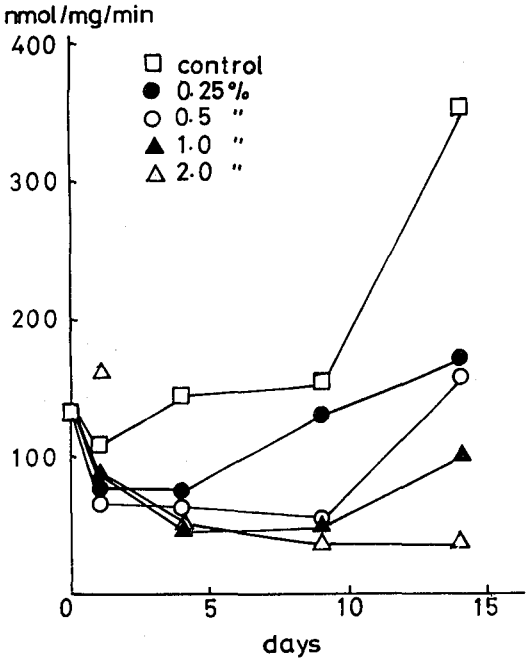


図1. 飼料中 OPP-Na 濃度によるラット尿中 γ-GTP 活性の変化
測定方法は本文中に示した．縦軸は γ-GTP 活性，横軸は投与日数を示す．

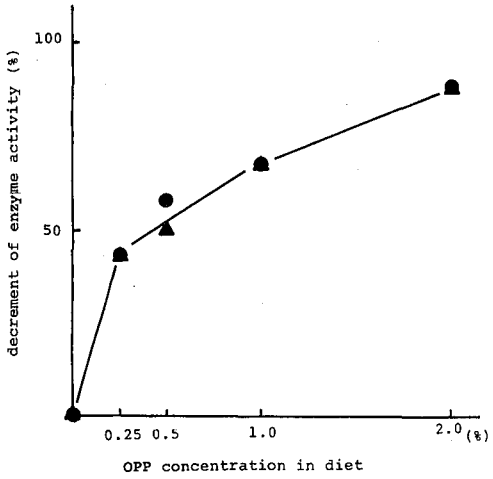


図3. OPP-Na 投与開始 2 週間目のラット尿中 γ-GTP およびアルカリフォスファターゼ活性と飼料中 OPP-Na 濃度との関係，
縦軸は活性の減少率，横軸は飼料中の OPP-Na 濃度
●：γ-GTP，▲：アルカリフォスファターゼ

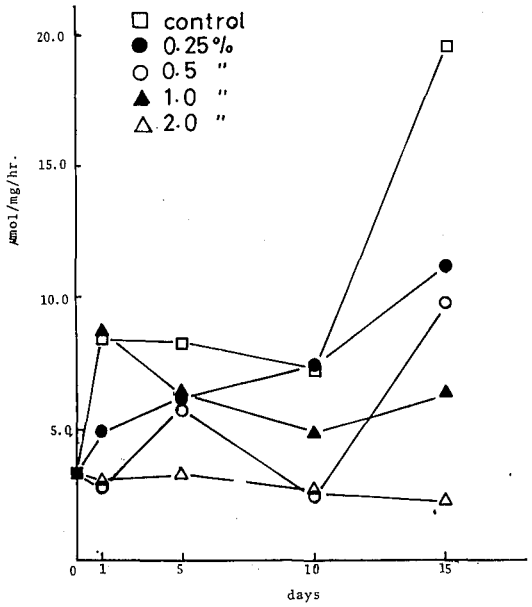


図2. 飼料中 OPP-Na 濃度によるラット尿中アルカリフォスファターゼ活性の変化
測定法は本文中に示した．縦軸はアルカリフォスファターゼ活性，横軸は投与日数を示す．

カリフォスファターゼ活性も同じ傾向にあったが，γ-GTP の場合と同じことが考えられる．

OPP-Na 投与ラットの成長はほぼ対照ラットと同傾向にあったが，尿中の γ-GTP 活性は各飼料中濃度ともに，投与開始一日目で低下し，その後は 2 週間の投与期間中，飼料中濃度に従って上昇率が低下し，2 %においては活性の上昇傾向は見られなかった（図 1）．アルカリフォスファターゼ活性についても図 2 に示したとうり γ-GTP 活性とほぼ同じ傾向を示した．さらに図 3 に OPP-Na 投与 2 週間目の γ-GTP およびアルカリフォスファターゼ活性と飼料中 OPP-Na の濃度との関係を示した．γ-GTP とアルカリフォスファターゼの活性は各 OPP-Na 濃度ともほぼ同率の低下であった．これらの結果は γ-GTP およびアルカリフォスファターゼが，高密度に存在するといわれている腎尿細管が飼料中の OPP-Na の含有量に従って障害を受けていることを示唆しているものと考えられる．投与開始 5 週間の腎ホモジネートを用いて γ-GTP 活性を測定したが，各濃度ともコントロールとの差を見い出せなかった．これについては今回の投与期間が 5 週間であり前回の20週間に比べて短期間のため，障害が軽度であったためと考

表1. 対照群ラット尿中γ－GTP 活性へのOPP－Naラット尿の影響

	透透したコントロールラット尿	2％ OPP-Na 投与未透析尿	γ-GTP 活性(％)
1	＋	－	100
2	＋	＋	100
3	－	＋	0

＋は添加，－は未添加を表わす
透析した対照群ラット尿に10倍量の2％ OPP-Na 投与未透析ラット尿を加えて37°C 1時間インキュベーションし，40,000 rpm，45分間遠心し，沈殿の γ-GTP 活性を測定した．OPP-Na 投与尿を加えなかったときの活性を100％としてあらわした．加えた OPP-Na 投与ラット尿中の OPP および OPP 代謝物の濃度はあわせて30 mMである．

表2. 飼料中 OPP-Na 濃度によるラット肝 γ-GTP 活性，G 6 PDH 活性およびグルタチオン含量の変化

飼料 OPP-Na 濃　度	γ-GTP nmol/liver(g)/min	G 6 PDH μmol/liver(g)/min	グルタチオン μmol/liver(g)[a)]
Control	110.0	0.904	3.54±0.32
0.25％	102.0	0.899	4.40±0.32
0.5％	110.0	0.825	4.07±0.47
1.0％	167.0	0.889	4.19±0.38
2.0％	415.0	1.667	3.10±0.03

測定法は本文中に示した．
γ-GTP，G 6 PDH 活性は3回の測定値の代表例を示し，グルタチオンについては3回の測定値の平均値を示した．
a) 平均値±標準偏差

えられる．

また表1に示したように2％ OPP-Na 投与尿によって対照群のラットの尿中 γ-GTP 活性は阻害されなかった．従って OPP-Na 投与ラット尿中の γ-GTP 活性の低下は OPP および OPP の代謝物による阻害ではないと考えられる．

2％ OPP-Na 投与肝の γ-GTP 活性，G 6 PDH 活性，グルタチオン含量が，対照肝に比べ有意な差を示すことは既に報告[4, 17]した．今回は飼料中 OPP-Na 濃度との関係を調べたが，1％ OPP-Na 投与肝の γ-GTP 活性がやや上昇傾向にあるものの，G 6 PDH 活性，グルタチオン含量については2％投与においてのみ変化した（表2）．肝ガン発生時に上昇するといわれている γ-GTP および G 6 PDH 活性が2％ OPP-Na 投与によって顕著に上昇したことは興味深い．

要　約

1. ラット尿中の γ-GTP およびアルカリフォスファターゼ活性は成長にともなって上昇したが，OPP-Na 投与はラット尿中の γ-GTP およびアルカリフォスファターゼ活性の成長にともなう上昇率を飼料中の OPP-Na の濃度にしたがって減少させた．さらにこの二種の酵素活性の低下率は同程度であった．

2. 対照群ラット尿中の γ-GTP 活性は2％ OPP-Na 投与ラット尿によって阻害されなかった．OPP-Na 投与ラット尿中の γ-GTP 活性が低下したのは，OPP あるいは OPP の代謝物による阻害ではないと考えられた．

3. 肝 γ-GTP および G 6 PDH 活性は2％ OPP-Na 投与ラットにおいてのみ顕著な上昇を示した．

文　献

1) Hiraga, K. and 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) 市川久次，小林博義，中尾順子：東京衛研年報，33，451，1982

6) 牛山慶子, 樺島順一郎, 中尾順子：東京衛研年報, 33, 455, 1982
7) 長井二三子, 中尾順子：東京衛研年報, 33, 458, 1982
8) 樺島順一郎, 中尾順子：東京衛研年報, 33, 462, 1982
9) 小林博義, 樺島順一郎, 中尾順子：東京衛研年報, 33, 467, 1982
10) 藤谷和正, 牛山慶子, 中尾順子：東京衛研年報, 33, 470, 1982
11) 中川敦子, 中尾順子：東京衛研年報, 33, 476, 1982
12) 大野知子, 長井二三子, 中尾順子：東京衛研年報, 33, 477, 1982
13) 樺島順一郎, 中尾順子：東京衛研年報, 32－2, 61, 1981
14) Kojima, S, Hama, Y. and Kubodera, A：*Toxcol. Appl. Pharmacol.*, 60, 26, 1981
15) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
16) 牛山慶子, 樺島順一郎, 中尾順子：東京衛研年報, 34, 297, 1983
17) Nagai, F. and Nakao. T., 投稿中

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 309-311, 1983

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3報）

樺島順一郎*, 市川久次*, 中尾順子*

Effect of Sodium *o*-Phenylphenate (OPP–Na) on Acid Phosphatase in Rat Urine (III)

JUNICHIRO KABASHIMA*, HISATSUGU ICHIKAWA* 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*-phenylphanate, ラット尿中 rat urine

緒　言

これまでに我々は，腎障害や膀胱腫瘍の発生が[1]報告されている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％添加飼料をラットに投与し，ラットの尿の尿試験紙による検査，尿中酸性フォスファターゼ（以下AcP と略す）の活性の変動，および OPP-Na 投与ラットの尿には，AcP 活性阻害作用があることなどを報告した[3]．今回は，OPP-Na の投与によって腎臓や膀胱での障害が強く現われる雄ラットについて，OPP-Na の添加濃度を数段階とり，2週間の尿検査と AcP 活性の変動を測定した．また動物は同一条件で飼育を続け，実験開始後1カ月で屠殺し，臓器を生化学試験に供した．

実験材料および方法

1. 実験動物，飼育条件，投与方法，採尿方法，測定方法　前報[2,3]に準じて行った．すなわち，動物は F334/Ducrj ラット雄を4週令で日本チャールスリバーより購入し，5日間の予備飼育の後，一群を9匹とし，採尿は3匹ずつをまとめて行った．飼料は対照群には固型飼料 CE-2 を，投与群には CE-2 に OPP-Na (Dow Chemical 社製) をそれぞれ，0.25％，0.5％，1.0％，2.0％となるように添加して自由に摂取させた．

2. 尿中 AcP 活性の測定　測定方法は前報[2,3]に準じて Fiscke-SabbaRow の方法[4]によって行った．なだしタンパク量の多いサンプル，臓器 homogenate や抽出液については以下の方法によった．酵素反応の停止に基質衝液と同容量の10％ TCA を加え，反応停止後2,800 rpm で5分間遠心し，上澄5 m*l* を分取し，Fiscke-SabbaRow の方法[4]で遊離リン酸を定量した．タンパクの定量は Lowry の方法[5]によった．

3. 臓器 homogenate および抽出液の調製　臓器は投与濃度ごとにまとめて−80°で保存したものを使用した．

i）腎臓は4倍量の等張 KCl 溶液（1.14％ KCl）を加えてホモジナイズし，homogenate は Beckman model L 8 −55型超遠心機で60 Ti ローターを用いて37,000 rpm で1時間遠心した上澄を抽出液とした．

ii）前立線は9倍量の水を加えてホモジナイズしたのち，30.000 rpm で60分間遠心して得られた上澄を ice bath 中で0.1 N 酢酸を加えて pH 5.5に調整し，8,000 rpm で15分間遠心し上澄を回収した．この上澄に，冷却下で硫安を100 m*l* に66 g の割合で，攪拌しながら少量ずつ加えた．生じた沈殿を8,000 rpm で.5分間遠心して集め，少量の水に溶かした．これをビスキングチューブに入れ低温室で水に対して一夜透析し，透析外液は一度交換した．これを，8,000 rpm で15分間遠心した上澄を粗酵素液として用いた．

4. Separaphore 電気泳動　電気泳動は Gelman (U.S.A.) のモデル 51156で Separaphore Ⅲを用いて行った．泳動用緩衝液は pH 8.6 の 20 mMTris, 20 mMBoric acid 溶液を用いて，200 V, 1 hr, 5.6 cm 当り1 mAで泳動した．泳動後，0.02 MMgCl^2 を含む180 mM 酢酸緩衝液 pH 5.5に Naphthol AS-MX を0.16 mg/m*l* の割合で溶かし，さらに First Blue B. B. を飽和させ，これに浸した Separax をガラス板の上に乗せた泳動後の Separaphore の上に積層してビニール袋に入れ37°で30分間から60分間 incubation して活性染色を行った．泳動には，前回の実験で得られた保存中の透

* 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

析尿も使用し，腎臓や前立線の AcP と比較検討を行った．

実験結果と考察

尿検査　結果は示していないが，対照群では pH が 6 より少し高いものが多く，高濃度の投与群では pH が 7 より少し高いものが多かった．また他の投与群では pH が 6 から，7 前後まででばらつきがあった．タンパクは投与群の方が高い傾向があるが差はあまり大きくなかった．また今回の投与実験では，投与開始後 2 週間の間では潜血反応陽性のものが現われず，前報[2] とは異った結果であった．

尿中 AcP 活性　Fig. 1 に示したように，1％投与群と 2％投与群では，投与開始直後から活性の著明な低下が認められたが，2％投与群よりは 1％投与群の方が活性が高かった．また0.5％投与群では，投与開始直後に一時的な低下が認められたが，その後は対照群と相似の変動を示し，0.25％投与群では，活性は対照群より低いが対照群と相似の変動を示した．尿中 AcP 活性は投与群の飼料中の OPP-Na 濃度が高いほど活性が低い傾向にあった．また投与開始14日目の尿で対照群の尿の AcP 活性を100％としたときの，各飼料濃度での投与ラットの尿中 AcP 活性の阻害％を示したが，飼料中の OPP-Na 濃度と明らかな相関性が認められた（Fig. 2）また γ-GTP についても同様の結果が長井[5] らによって報告されている．

前立線および腎臓の AcP 活性　Table 1 に前立線の粗製酵素と腎臓の homogenate の AcP 活性を示した．いずれの臓器の AcP にも活性に OPP-Na の投与による差を認めなかった．また腎 homogenate の37,000 rpm 1 時間遠心後の上澄の AcP 活性も測定したが，上澄には homogenate の活性の1/2から2/3があるだけで差は認められなかった．

Separaphore 電気泳動　電気泳動には，前回の実験で得られた 2％ OPP-Na 投与群ラットおろび対照群

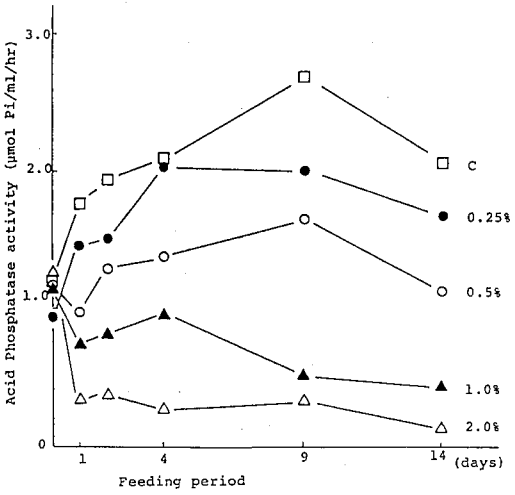


Fig.1. Changes of Urinary Acid Phosphatase Activity with Feeding Time and Concentration of OPP-Na in diets

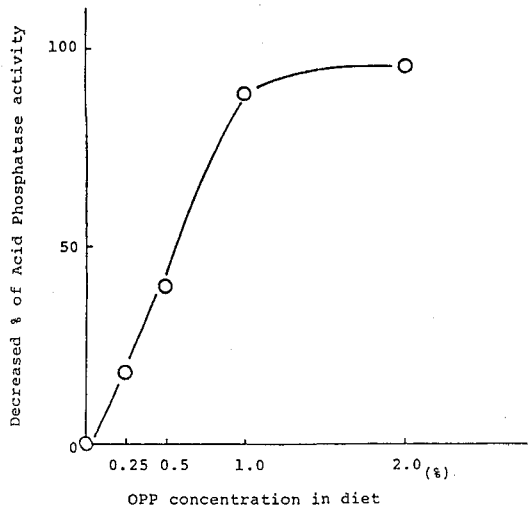


Fig.2. Relationship between Decrease in Urinaly Acid Phosphatase and Concentration of OPP-Na in diets

Table1. Acid Phosphatase Activity (μmol Pi/mgprotein/hr)

	control	0.25% OPP-Na	0.5% OPP-Na	1.0% OPP-Na	2.0% OPP-Na
Prostate*	2.56				2.84
Kidney homogenate	1.54	1.89	2.75	1.18	2.63

* crude enzyme fraction (see methods)

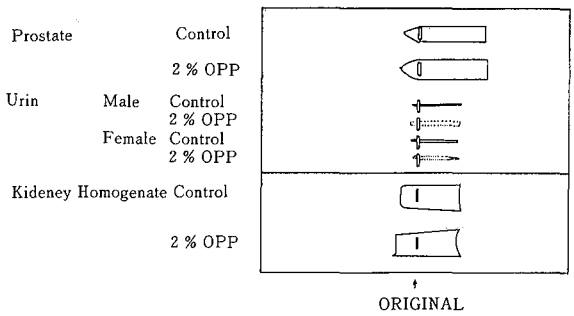


Fig. 3 Cellulose Acetate Membrane Electrophoretic Characterization of Various Acid Phosphatase;the substrate was Naphthol AS–MX and the dye coupler, First Blue B. B.

ラット雌雄の保存透析尿，前立線の粗製酵素液と腎臓のhomogenateを使用し比較検討を行った．Fig. 3に示したように尿中のAcP活性は2％投与群では雌雄ともに大部分が消失してはいるが，雌雄ともに対照群と投与群のパターンがほとんど同じであった．腎homogenateと前立線粗製酵素のいずれでも，対照群と2％OPP-Na投与群の間には活性のパターンに差が認められなかった．尿中AcP活性のパターンは腎臓AcP活性のパターンとほとんど同じであり，前立線AcP活性のパターンとは一部が重なった型であった．

ま と め

OPP-Naの添加濃度を数段階とり，雄ラットに投与し，尿中，腎臓，前立線のAcP活性について検討したところ，つぎの結果が得られた．

1. 尿中AcP活性は添加飼料のOPP-Na濃度と逆相関性があり，高濃度では活性が消失するが，低濃度ほど活性が残存する．

2. 前立線および腎臓中のAcP活性については，添加飼料の濃度差による活性の変化は認められなかった．

3. Seporaphore電気泳動によって，尿中のAcPは，雌雄ともに同じ活性のパターンを示し，前立線のAcPとはパターンが異なることから，前立線由来ではないと思われる．また腎臓のAcP活性のパターンとは，ほぼ一致することから，尿中AcPの由来は腎臓由である可能性がかなり高いと考えられるが今後引続きさらに検討する．

文 献

1) Hiraga, K., and Fujii, T. : *Fd and Cosmetic 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) 樺島順一郎，中尾順子：東京衛研年報，33，462，1982
4) Fiscke, C. H. and SabbaRow, Y. H. *J. Biol. Chem.* 66, 375, 1925
5) Lowry, O. H., Rosenbroung, N. J., Farr, A. L., and Randoll, B. J. : *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
6) 長井二三子，中尾順子：東京衛研年報，34，305，1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 312-314, 1983

オルトフェニルフェノール (OPP) の *in vitro* でのS-9 Mixによる代謝活性化と染色体への作用発現との関連

田山寿美子*, 神谷信行*, 中尾順子*, 平賀興吾*

Detection of *o*-Phenylphenol (OPP) and the Activated Metabolites with S-9 Mix by HPLC and the Effect of These on Induction of SCE in CHO-K1 Cells

SUMIKO TAYAMA*, NOBUYUKI KAMIYA*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

Keywords: オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, CHO-K 1 細胞 CHO-K 1 cell line, S-9 mix, 姉妹染色分体交換 sister chromatid exchange (SCE), 高速液体クロマトグラフィー HPLC

はじめに

柑きつ類の防かび剤として使用が許可されている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) は, 先にラット膀胱に腫瘍を誘発することが報告[1-2]されているが, その変異原性は微生物で一部認められている[3-4]にすぎない. また最近のReitzら[5]のそれらについてのいくつかの試験でも, 変異原性およびDNAへの作用は認められていない.

われわれはこれまで, OPPがCHO-K 1 細胞に染色体異常および姉妹染色分体交換 (SCE) を誘発することを認め報告した[6]. そしてさらに, OPP およびOPP-Naを投与したラットでその比較的多くの量が抱合体となったフェニルハイドロキノン (PHQ) として尿中に排出される[5,7-9]ところから, その代謝の過程でOPP 以外により強力な変異原活性のある物質が生成されている可能性もあると考え, 薬物代謝酵素の異なるとされる3種のS-9 mixを用いて, 上述と同様染色体への作用を調べた[6,10]. 結果はいずれもS-9 mix無添加の場合とほぼ同程度の染色体異常およびSCE誘発を認めたが, この結果を判断する上で, S-9 mix添加により *in vitro* で実際にどの程度のOPPが変換し, またOPP以外にどのような物質がどれ位生成しているのかを把むことが必要であると考えられた. そこで今回われわれは, OPPにPCB誘導のS-9 mixを加え3時間処理をした後の培養液を高速液体クロマトグラフィーを用いて直接測ることにより, OPPの実際の代謝状況を捉えるとともにそのSCEを調べ, OPP以外の変異原性活性のある物質の生成について検討を加えることとした.

材料および方法

1. 試薬 *o*-phenylphenol (OPP) Zone Refined: 東京化成工業, cyclophosphamide (CP): ICN Pharmaceuticals. Inc., phenylhydroquinone (PHQ): 東京化成工業, 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, F-12培養液: 日水製薬, 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-K 1 株を, 10%仔牛血清添加のHamのF-12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および薬物の調製および処理 S-9は矢作[11]の方法に基づき, われわれが先に述べた[12]ように作成し, −80°で保存しておいたPCB誘導のものを用いた. S-9 mixは使用時にNatarajanら[13]の方法に従い調製した. 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%となる用量で細胞に添加して用いた. 培養ビンあたり細胞を約3.5×10^5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5 m*l*およびS-9 mixあるいは培養液0.25 m*l*を加え3時間培養した. 培養終了後, その培養液を氷中に置いた試験管に取り, HPLC分析用試料液とした. この後細胞を培養液5 m*l*で洗い, 培養ビンをアルミホイルで被ってBudR 0.5 μg/m*l*を加えた培養液10 m*l*でさらに27時間培養を続けた、またHPLC分析には, 細胞を加えずにOPPとS-9 mixで同様に反応させた場合についても試み, これもただちに氷冷して試料液とした.

* 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

4. 標本作成および観察 培養終了2時間前にコルセミド0.1 μg/ml を加え，分裂中期細胞を集めた．常法[14]に従い低張，固定操作を行い標本を作成し，先に報告[15]した方法により姉妹染色分体分染を行った．観察は30個の分裂中期細胞について行い，その各々の細胞の SCE 数を記録し，Wilcoxon の順位和検定を施した．

5. HPLC による分析 装置は島津製作所 LC－3A を用い，試料液はそのままその10 μl を HPLC にかけた．HPLC の分析条件は神谷ら[16]の報告に従った．濃度の算出は，得られたクロマトグラムの高さを測り，各々の標準液により作成した検量線を用いて求めた．

結果および考察

Table 1 に HPLC で測定した培養液中の OPP および PHQ 量と SCE 頻度とを示す．SCE はS-9 mix 添加，無添加とも OPP 100および150 μg/ml で有意に増加し，それぞれの対照を引いたその誘発 SCE は，150 μg/ml で両者ともおよそ3とほぼ等しい値であった．陽性対照として用いた代謝により変異原活性を示す CP は，S-9 mix により SCE を約20と増加させ，使用した S-9 mixが充分に薬物代謝酵素を有していることを示した．3時間処理後の培養液は，OPP のみを処理したものではそのクロマトグラムには OPP 以外のピークは示されなかったが，S-9 mixを加えたものでは PHQ のピークおよび他の1つの微小なピークが認められ，またその OPP 量は各 dose とも OPP のみを処理したものに比べ減少していた．PHQの生成量は OPP dose 25 μg から 150 μg/ml の間で10 μg/ml 前後の値を取り，OPP の dose に伴うその増加は見られなかった．これらのことは Table 2 に示した細胞を加えていない OPP と S-9 mixとの反応結果でも同様であった．また各 dose 毎の OPP に対する PHQ の割合は，Table 1，2において，25 μg/ml でやや差が見られたものの他ではほとんど一致していた．

以上の結果から，CHO－K1細胞はほとんど OPP を変換する能力のないこと，S-9 mix添加は CP については SCE を増加させて充分に変異原活性のある物質を生成させているが，OPP では *in vivo* で見られたように PHQ を生成はするが，その量は OPP 25 μg/ml 以上ではおよそ10 μg/ml 前後とほぼ一定であり，一定量の S-9 下では OPP 量が増加しても一定量の PHQ しか生成せず，またそれらの抱合体量は極めてわずかであるということが推測される．*in vitro* で S-9 mix を添加して行われる代謝活性化試験では，使用する S-9 mix の量的問題などから，このように被検薬物の種類によっては，

Table 1. Frequencies of SCEs per Cell after Treatment by OPP with or without S-9 mix for 3 h at 37° and Measurement of OPP or PHQ (Metabolite of OPP) in the Treated Solution by HPLC

Chemicals	Dose (μg/ml)	SCEs/cell[1] (Mean ± S.E)	Measurement by HPLC OPP (μg/ml)	PHQ (μg/ml)	PHQ/OPP×100 (%)
	0	5.46±0.39			
	25	5.06±0.28	17.0		
OPP	50	5.33±0.39	29.5		
	100	7.43±0.49	58.0		
	150	8.53±0.47	92.0		
	0	6.00±0.31			
	25	6.40±0.37	10.0	7.7	77
OPP-S[2]	50	5.90±0.45	23.0	11.0	48
	100	7.63±0.38[a]	43.5	8.6	20
	150	9.10±0.50[b]	84.0	12.9	15
CP-S	5	19.87±0.84[a]			

1) For each dose 30 metaphases were scored.
2) Addition of S-9 mix
a) Wilcoxon test $p<0.01$
b) Wilcoxon test $p<0.001$

Table 2. Measurement of OPP and PHQ (Metabolite of OPP) after Incubation with OPP and S-9 mix for 3 h at 37° by HPLC

Dose of OPP (μg/ml)	Measurement by HPLC OPP (μg/ml)	PHQ	PHQ/OPP×100 (%)
25	9.5	9.8	103
50	23.0	11.0	48
100	66.5	13.5	20
150	84.0	13.5	16

その代謝的変換の量に限度が生じ，*in vivo* でのそれを正しく反映させることは難しい場合がある．なおS-9 mixの添加によりPHQ以外に示された微小なピークについては，これまでの報告[9, 17]などから2，4，あるいは2，4′-dihydroxybiphenylであるかとも考えられる．OPPはHPLC測定の実質濃度58 μg/ml で有意にSCEを増やし，またS-9 mix添加でのOPP 43.5 μg/ml，PHQ 8.6 g/ml でも同様に有意に上げるが，これがOPPのみの作用によるものか否かは本実験のみからでは明らかではなく，OPPの代謝中間物質あるいはPHQの変異原性の有無についてはさらに今後検討していかねばならない．

ところでOPPの最終代謝物質であるPHQについては，*in vitro* でのその毒性および変異原性は調べられてはいる[6, 18]が，この薬物と培養後の培養液は暗赤色化しており，これをHPLCにかけるとPHQ以外に多くのピークが現われ，他の物質の生成が認められた．PHQは水溶液中では極めて不安定であり，このような試験ではPHQそのものの毒性および変異原性は正確には反映できない．ところがPHQをS-9 mixを加えた培養液に添加すると，ある濃度までは培養液の色調も変化せず，HPLC分析でも他のピークは現われて来ない[19]．S-9 mix添加によりなぜ比較的安定になるのかは不明であるが，今後この点を利用してその毒性および変異原性についても調べていきたい．

要　旨

S-9 mix添加試験は，生体内での薬物代謝を反映する *in vitro* での試験法として変異原性試験などに広く用いられている．われわれも生体内でその一部が抱合体となったPHQとして排出される柑きつ類の防かび剤OPPについて，その代謝過程での変異原性物質の生成を調べようとこれまで実験を重ねて来たが，S-9 mix無添加での結果と大きな差は見られず，この条件でOPP以外の変異原性物質の存在を明らかにすることはできなかった．そこで今回OPPにPCB誘導したS-9 mixを添加して，高速液体クロマトグラフィーにより代謝の状況を調べ，同時にそのSCEを数えたところ，OPP 25 μg から150 μg/ml までそのPHQの生成量はおよそ10 μg/ml 前後とほぼ一定であり，S-9 mix添加，無添加とも100 μg/ml から有意に誘発が見られたSCEとその代謝との関連は明確ではなかった．

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) Reitz, R. H., Fox, T. R, Quast, J. F.：*Chem. Biol. Interactions*, 43, 99, 1983
6) 縄井寿美子，吉田誠二，中尾順子，平賀興吾：第10回日本環境変異原研究会講演要旨集，82，1981
7) 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，58－8，737，1981
8) 牛山慶子，樺島順一郎，中尾順子：東京衛研年報，33，455，1982
9) Meyer, T. and Scheline, R. R.：*Acta pharmacol. et toxicol.*, 39, 419, 1976
10) 縄井寿美子，吉田誠二，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，33，480，1982
11) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，20，1178，1975
12) 縄井寿美子，吉田誠二，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，32－2，103，1981
13) Natarajan, A. T., Tates, A. D. and Van Bull, P. P. W.：*Mutation Res.*, 37, 83, 1976
14) 吉田誠二，益淵正典，縄井寿美子，平賀興吾：東京衛研年報，26－2，166，1975
15) 縄井寿美子，吉田誠二，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，29－2，167，1978
16) 神谷信行，平賀興吾：東京衛研年報，33，561，1982
17) Halpaap, K., Horning, M. G. and Horning, E. C.：*Journal of chromatography*, 166, 479, 1978
18) 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
19) 田山寿美子：未発表

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 34, 315-318, 1983

オルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) の宿主経由試験

藤田　博*, 小嶋昭江*, 平賀興吾*

Mutagenicity of Sodium *o*-Phenylphenate (OPP-Na) in the Host-Mediated Assay with *E. coli* and *S. typhimurium*

HIROSHI FUJITA*, AKIE KOJIMA* and KOGO HIRAGA*

Keywords: オルトフェニルフェノールナトリウム sodium *o*-phenylphenate, 宿主経由試験 host-mediated assay, 変異原性 mutagenicity

かんきつ類のかび防止剤であるオルトフェニルフェノールナトリウム（以下，OPP-Naと略す）の安全性について当毒性部では種々の検討[1~7]を加えてきた．その結果，縄井ら[6]は，培養細胞に姉妹染色分体交換および染色体異常を誘発することを報告し，平賀ら[7]は，ラットの長期投与試験において膀胱腫瘍が発生したことから発がん性があることを報告した．

in vivo での薬物代謝を加味した変異原性試験の一種に宿主経由試験[8~10]がある．これは化学物質を投与した動物（宿主）の体内にインディケータである微生物あるいは細胞を投与し，一定時間後，回収した微生物あるいは細胞の突然変異体の増加を見る方法である．

今回，OPP-Naの安全性評価の一環として，インディケータに大腸菌およびサルモネラ菌を，動物にはOPP-Naの発がん性を認めたF 344ラットを用いた宿主経由試験を行ったので報告する．

実験方法と材料

試料　OPP-Na（ダウ・ケミカル社製，Dowicide A, Lot No. MM 01074）および陽性対照にはストレプトゾトシン（以下，SZNと略す，シグマ社製，Lot No. 116 C-0-360）を用いた．

動物　F 344/DuCrj 雄ラット（日本チャールス・リバー社）を4週令で購入し，1週間の予備飼育後の5週令（平均体重90 g）を用いた．OPP-Naの経口投与の場合は，前日の17時から絶食させた．

菌株　*Escherichia coli* WP 2 (trp^-, HCR^-)[11] および *Salmonella typhimurium* TA 100 (*hisG*$^-$, *bio*$^-$, *uvrB*$^-$, *gal*$^-$, *rfa*$^-$, pKM 101)[12] をブロス（栄研化学社製）にて一夜培養した．この菌液を遠心（3,000 r.p.m×10 min）し，1/5量の新しいブロスに懸濁した．

宿主経由試験　OPP-Naは蒸留水あるいは生理食塩水に溶解し，750 mg/kg および1,500 mg/kg を投与した．投与は胃ゾンデによる経口投与（2 m*l*/100 g・体重）および筋肉注射（0.2 m*l*/100 g・体重を両足に分注）の2経路を行った．OPP-Na投与2時間後に菌液3 m*l*を腹腔投与した．陽性対照のSZNは，菌液投与時に筋肉注射投与（1 mg/ラット）を行った，菌液投与2.5時間後に断頭し，腹部の皮膚をはがした．腹筋部に小穴を開け，プラスチック製小チューブをさしこみ，中に溜る菌液を胃ゾンデを用いて回収した．この方法により投与菌液の50～70%が回収される．

回収菌液の復帰変異体数および生菌数を計測した．WP 2の場合は，復帰変異体数を求めるために回収菌液0.5 m*l*に軟寒天（寒天0.8%，NaCl 0.8%）2 m*l*を加え，最少グルコース寒天培地[13]に重層した．生菌数を求めるために10^{-4}，10^{-6}希釈液0.1 m*l*にトリプトファン溶液（0.5 mM）を1/10量加えた軟寒天を加え，最少グルコース寒天培地に重層した．なお復帰変異体数は2枚，生菌数は各3枚のプレートを用いた．TA 100の場合は，復帰変異体数はビオチン溶液（0.5 mM）を1/10量加えた軟寒天を用い，生菌数はヒスチジン・ビオチン溶液（各0.5 mM）を1/10量加えた軟寒天を用いた．37°Cで48時間培養後，生じたコロニーを計数し，回収菌液1 m*l*中の生菌数および復帰変異体数を求め，10^8・生菌数あたりの復帰変異体数を算出した．

結果と考察

E. coli WP 2を用いた経口投与での予備試験において，0 mg/kgの復帰変異体数が0.91/10^8・生菌数に対し

* 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. *E. coli* WP 2 および *S. typhimurium* TA 100を用いた OPP–Na の宿主経由試験

菌株	投与経路	投与量（mg/kg）	復帰変異体数 (/ml)	×10^8生菌数 (/ml)	復帰変異体数 /10^8生菌数	平均± S.D.
WP 2	経口	0	14	18.7	0.75	
			8	6.8	1.18	0.97±0.30
		750	60	40.4	1.49	
			12	19.4	0.62	
			20	18.8	1.06	1.06±0.44
		1500	24	24.0	1.00	
			38	17.6	2.16	
			38	26.6	1.43	1.53±0.59
		SZN[1)]	2176	18.4	118	
	筋肉	0	17	18.6	0.91	
			9	7.9	1.14	1.03±0.16
		750	21	23.1	0.91	
			6	14.8	0.41	
			5	12.4	0.44	
			6	4.9	1.22	0.74±0.40
		1500	25	23.3	1.07	
			18	36.3	0.50	
			134	102.0	1.31	
			26	21.5	1.21	1.02±0.36
		SZN[1)]	36	0.2	180	
TA 100	経口	0	1846	58.4	31.61	
			1596	59.3	26.91	
			1486	67.3	22.08	26.87±4.77
		750	2182	62.1	35.14	
			1818	63.7	28.54	
			1822	63.9	28.51	30.73±3.82
		1500	2164	82.9	26.10	
			2172	79.6	27.29	
			2362	103.0	22.93	25.44±2.25
		SZN[1)]	11166	5.6	1994	
	筋肉	0	314	15.2	20.67	
			269	10.9	24.68	22.68±2.87
		750	532	30.3	17.56	
			441	26.1	16.90	
			471	16.4	28.72	21.06±6.64
		1500	685	34.9	19.63	
			500	21.5	23.26	
			838	45.1	18.58	20.49±2.46
		SZN[1)]	350	0.06	5800	

1) ストレプトゾトシン　筋肉注射，1 mg/ラット

て OPP–Na 250 mg/kg 投与群では1.23および500 mg/kg では0.87であり，増加は示さなかった．OPP–Na の F 344雄ラット（8週令）に対する LD_{50}値は約1,000 mg/kg であり，1,450 mg/kg 投与群には6時間以内の死亡例がある[3]ことから，今回の試験では，高濃度の750 mg/kg および試験時間内生存の限界に近い1,500 mg/kg に投与量を設定した．

表1に示したように，陽性対照の SZN は，WP 2 あるいは *S. typhimurium* TA 100に対して著しい復帰変異体数の増加を示したが，OPP–Na の750 mg/kg および1,500 mg/kg 投与群では，投与経路にかかわらず復帰変異体数の増加は見られなかった．従って用いた検出系において OPP–Na の変異原性は陰性であると考えられる．宿主経由試験には様々な検出系が開発[9,10]されていることから，今後 OPP–Na の投与方法，インディケータの変更なども含め検出系の検討を行いたい．

市川ら[14]は，放射性オルトフェニルフェノール（以下，OPP と略す）の経口投与における吸収排泄の実験より，投与後30分で血中，各臓器の放射能が最高に達し，尿中の放射能は投与後6時間で最高となり，OPP の吸収排泄が比較的速いことを示した．今回の OPP–Na の試験においては，投与2時間までに経口投与群では茶褐色の尿を排泄し，筋肉注射群では赤茶色の沈殿物を含む尿を排泄していた．このことから，Na 塩においても吸収排泄がすみやかに進んでいることがうかがわれる．大槻ら[5]の報告では，OPP–Na 300 mg/kg の経口投与後，24時間以内に26％が尿中に排泄される．

OPP あるいは OPP–Na は，飼料添加による F 344 ラットの長期投与試験において膀胱腫瘍が発生し，発がん性があることが報告[7,15]され，培養細胞の高濃度，短時間処理において姉妹染色分体交換および染色体異常を誘発することが報告[6,16]された．一方，細菌を用いた突然変異誘発試験では，一部の弱い変異原性の報告[17,18]を除いて陰性の報告[19–22]が多い．また今回の宿主経由試験においても陰性であった．Ames ら[23,24]の報告によれば，サルモネラ菌 TA 系を用いた突然変異誘発試験において発がん性を有する175の化学物質のうち約10％に変異原性が検出されておらず，また Legator ら[10]は，様々な宿主経由試験においても125の発がん物質のうち約30％に変異原性が検出されないと報告している．検出されない原因は化学物質によって様々であるが，OPP あるいは OPP–Na も発がん性を有するにもかかわらず，細菌に対する変異原性が検出されないか非常にされにくい化学物質の一例であると考えられる．

OPP あるいは OPP–Na の変異原性は，細菌を用いた試験系において陰性であった．これは用いられた試験系においては変異原性を有する代謝物質が生成していない可能性が残るが，F 344ラットに見られた膀胱発がんには，変異原性が原因とはならない機構が関係しているのかもしれない．この問題を明らかにするために当毒性部において様々な実験が行われている．最近 Reitz ら[25]は，ラット，マウスを用い *in vivo* における OPP–Na の作用を検討した結果，DNA 損傷は起さないが，膀胱の細胞分裂を増加させることによりがんの発生をうながすという仮説を提出している．発がんの機構の解明が進められつつある OPP あるいは OPP–Na は，新しい発がん機構の研究の発展をもたらす興味ある化学物質であるのかもしれない．

要　約

オルトフェニルフェノールナトリウムの宿主経由試験を行った．インディケータに *E. coli* WP 2 および *S. typhimurium* TA 100を用い，動物は F 344ラット雄を用いた．750mg/kg および1,500mg/kg の経口投与あるいは筋肉注射において復帰変異体数は増加しなかった．

文　献

1）小縣昭夫，安藤　弘，久保喜一：東京衛研年報，29－2，89，1978
2）吉田誠二，縄井寿美子，平賀興吾：東京衛研年報，30－2，44，1979
3）田山邦昭，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，30－2，57，1979
4）井口重孝，田山邦昭，平賀興吾：東京衛研年報，30－2，67，1979
5）大槻慶子，樺島順一郎，中尾順子：東京衛研年報，32－2，51，1981
6）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
7）Hiraga, K. and Fujii, T.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 303, 1981
8）Gabridge, M.G. and Legator, M.S: *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 130, 831, 1969
9）Mohn, G.R.: *Arch. Toxicol.* 38, 109, 1977
10）Legator, M.S., Bueding, E. and Batzinger, R: *Mutation Res.*, 98, 319, 1982
11）Bridges, B.A., Dennis, R.E. and Munson, R.J.: *Genetics*, 57, 897, 1967
12）McCann, J., Spingarn, N.E., Kobori, J. and Ames, B.N.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72, 979, 1975

13) 藤田　博，小嶋昭江，平賀興吾：東京衛研年報，28－2，53，1977
14) 市川久次，小林博義，中尾順子：東京衛研年報，33，451，1982
15) 藤井　孝，平賀興吾：第41回日本癌学会総会記事，41，1982
16) 縄井寿美子，吉田誠二，中尾順子：東京衛研年報，33，480，1982
17) 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
18) 花田信次郎：名市大医誌，28，983，1977
19) 小嶋昭江，平賀興吾：東京衛研年報，29－2，83，1978
20) 藤田　博，平賀興吾：東京衛研年報，31－2，29，1980
21) 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
22) Reitz, R.H., Fox, T.R. and Quast, J.F. : *Chem.-Biol. Interactions*, **43**, 99, 1983
23) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B.N. : *Proc. Nat. Acad. Sci.* **72**, 5135, 1975
24) McCann, J. and Ames, B.N. : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **73**, 950, 1976
25) Reitz, R.H., Schumann, A.M. and Watanabe, P.G. : *Basic Life Science*, **21**, 425, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 319-324, 1983

オルトフェニルフェノール(OPP)の微生物系における突然変異誘起性について

小嶋昭江*, 藤田　博*, 平賀興吾*

Mutagenicity of *o*-Phenylphenol (OPP) in the Microbial System

AKIE KOJIMA*, HIROSHI FUJITA* and KOGO HIRAGA*

Keywords : オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, 突然変異誘起性 mutagenicity

はじめに

かんきつ類のかび防止剤として使用されているオルトフェニルフェノール（OPP）の安全性については，当毒性部においていろいろな面から検討を加えてきた[1-6]．その一環として，われわれは微生物を用いて他のかび防止剤とともにOPPおよびOPP-ナトリウム(OPP-Na)の突然変異誘起性の検出を試みた[7]．*Bacillus subtilis* H 17 A, M 45 T による rec assay と *Escherichia coli* B/r WP 2 および *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 98による mutation test を行ったが，OPPおよびOPP-Naは他のかび防止剤と同様，陰性の結果であった．微生物を用いたOPPの突然変異誘起性については，陽性であるとの報告[8,9]もあるが，われわれの結果を含め陰性の報告[10-13]が多い．

その後，当毒性部においてOPP[14]あるいはOPP-Na[15]が長期投与により，ラットの膀胱に腫瘍を誘発することが明らかにされた．また，縄井らは高濃度のOPPが姉妹染色分体交換（SCE）および染色体異常を誘発することを報告している[16]．そこで，微生物による試験系においてもOPPの突然変異誘起性が検出される可能性があると考え，試験菌株および代謝活性化に用いる肝ホモジネートの9,000×g上清（S-9）の種類を増してmutation testを行い，再度OPPの突然変異誘起性について検討したので報告する．

実験材料および方法

試料　オルトフェニルフェノール(OPP, 東京化成製, Lot No. FB-104)をジメチルスルホキサイド（DMSO, 吸収スペクトル用, 和光純薬製）に溶解して用いた．

用量　前回[7]はOPP 1, 10, 100 μg および 1 mg/プレートで mutation test を行ったが，1 mg/プレートでは致死性が強くあらわれ，復帰コロニーは得られなかった．縄井ら[16]によるOPPのSCEおよび染色体異常の誘発が高濃度の狭い範囲でのみ起っていることを考え，今回のOPPの用量は50, 100, 200 μg および致死性がわずかに観察される300 μg/プレートに設定した．

試験菌株　1) *Escherichia coli* B/r WP 2 (*trp*$^-$, HCR$^-$)[17]　2) *Salmonella typhimurium* TA 1535 (*hisG*$^-$, *gal*$^-$, *bio*$^-$, *uvrB*$^-$, *rfa*$^-$), TA 1537 (*hisC*$^-$, *gal*$^-$, *bio*$^-$, *uvrB*$^-$, *rfa*$^-$), TA 1538 (*hisD*$^-$, *gal*$^-$, *bio*$^-$, *uvrB*$^-$, *rfa*$^-$), TA 100 (*hisG*$^-$, *gal*$^-$, *bio*$^-$, *uvrB*$^-$, *rfa*$^-$, pKM 101), TA 98 (*hisD*$^-$, *gal*$^-$, *bio*$^-$, *uvrB*$^-$, *rfa*$^-$, pKM 101)[18-20]

S-9 および S-9 Mix の調製　Jcl : SD ラット，F 344/DuCrj ラットおよびC 57 BL/ 6 NCrj マウス（いずれも5週令雄）を用いた．矢作の方法[21]に基ずき，フェノバルビタール（PB），ポリ塩化ビフェニール（PCB, アロクロール1254）または3-メチルコランスレン（MC）を投与後，肝臓あるいは腎臓を採取してS-9を調製した．

S-9 Mixの調製は同じく矢作の方法[21]によって行った．Amesら[22]はS-9 Mix中のS-9をPB誘導S-9の場合，150 μl/プレート，PCB誘導S-9の場合，50 μl/プレートで mutation test を行っているが，S-9あるいはNADPHの量を増すことにより復帰コロニー数が増加する場合があるので[21,23,24]，S-9の量を50～250 μl/プレート，NADPH（オリエンタル酵母製）の量を2～8 μmole/プレートとした．

Mutation test　TA株についてはAmesの変法[21,25]により行った．WP 2の場合はソフトアガーに，トリプトファンの0.5mM溶液を加え，TA株の場合と同様に，最少グルコース寒天培地に重層した．プレート数は一濃

* 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．OPPのmutation test（S-9無添加）

OPP (μg)	*S. typhimurium*					*E.coli* WP 2
	TA 1535	TA 1537	TA 1538	TA 100	TA 98	
0	14	10	23	196	28	40
50	16	9	24	179	30	—
100	15	10	20	212	32	37
200	14	9	21	151	24	36
300	1	1	11	30	11	9
陽性対照	2209[a)]	67[b)]	5138[c)]	669[d)]	219[d)]	845[e)]

a）N-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン　10μg/プレート
b）9-アミノアクリジン　10μg/プレート
c）2-ニトロフルオレン　5μg/プレート
d）フリルフラマイド　0.1μg/プレート
e）フリルフラマイド　0.5μg/プレート

度3枚とした．S-9は特に示さない場合，Jcl:SDラットの肝臓のS-9を使用した．

結果および考察

表1に代謝活性化を行わない場合の，TA株およびWP 2によるmutation testの結果を示した．

50～300μg/プレートのOPPを作用させた場合，コントロールに比較して復帰コロニー数の増加は認められなかった．OPP 200μg/プレート以上で致死性が観察された．

Halpaap-Woodら[26]はS-9によるOPPの代謝が，ラットとマウスで，あるいは誘導剤によって異なることを報告している．そこでマウスとラットの誘導剤の異なるS-9を使用してmutation testを行った．

表2にSDラットの肝臓のS-9を代謝活性化に用い，S-9とNADPHの量を3段階に変化させてmutation testを行った結果を示した．いずれの場合にも復帰コロニー数の増加は見られなかった．

次にTA 100，TA 98を用いてC57BL/6Nマウスの肝臓のS-9を使用してmutation testを行った結果（表3），陽性の結果は得られなかった．

平賀ら[15]はOPP-Naの発がん試験において，4％OPP-Na添加飼料投与群の腎臓の損傷が大きく，膀胱の腫瘍の発生率が1，2％投与群に比較して低かったと報告している．OPPによる発がんに腎臓における代謝が関与している可能性を考え，OPPあるいはOPP-Naにより膀胱発がんを認めたF 344ラットの腎臓，および肝臓のS-9を代謝活性化に用いてmutation testを行ったが，陽性の結果は得られなかった．（表4）

長尾らは，トリプトファンの熱分解産物であるノルハルマンが突然変異誘起性を増強させ[27]，また，アニリンやオルトトルイジンなどある種の芳香族アミンはノルハルマンの存在下においてのみ，突然変異を誘発すること[28]を報告しているので，ノルハルマンの効果を調べる実験を行った．菌株としてTA 100およびTA 98，代謝活性化にPBまたはPCBで誘導したSDラットのS-9（10，50，150μl/プレート）を用いたOPPの実験系に50～500μgのノルハルマン（DMSOに溶解）を加えたが，復帰コロニー数の増加は認められなかった．さらに，PCBあるいはMCで誘導した動物のチトクロームP-448を特異的に阻害するα-ナフトフラボン（10^{-6}～10^{-3} M）およびエポキサイドヒドラターゼの阻害剤であるシクロヘキセンオキサイド（10^{-7}～10^{-3} M）を添加した実験を行ったが同様に効果をおよぼさなかった．

微生物によるOPPの突然変異誘起性については，花田[8]および西岡ら[9]による陽性の報告があるが，河内[10]，白須[11,12]およびReitzら[13]は陰性であると報告しており，われわれの前回の実験でも陽性の結果を得られなかった．今回，試験菌株を増し，種々のS-9を用いてmutation testを行ったが結果は全て陰性であった．

OPPが微生物の試験系においてS-9無添加の条件で突然変異誘起性を示さず，SCEおよび染色体異常を誘発するのは，OPPがSCEおよび染色体異常誘発の実験系で用いられる哺乳類の細胞で代謝を受けているのかもしれない．同試験系にS-9を添加してもSCEおよび染色体異常が増強されず[29]，また，微生物による試験系で高濃度のOPPに種々のS-9を作用させても，復帰コロニー数の増加を認めることができなかったことか

表2－1 SDラットの S-9 を用いた OPP の mutation test

TA 1535

OPP (μg)	NADPH (μmole)	PB S-9 (μl)			PCB S-9 (μl)		
		50	150	250	50	150	250
0	2	7	13	18	11	14	18
100		10	11	20	9	16	15
200		10	17	15	9	15	20
300		9	13	11	10	13	18
0	4	9	11	20	11	19	20
100		12	10	18	10	11	18
200		11	10	13	10	13	22
300		8	9	14	6	13	16
0	8	8	16	16	10	13	18
100		9	18	17	10	16	18
200		8	18	18	10	11	18
300		6	12	15	5	11	15
陽性対照	2	—	92[a]	—	268[a]	—	—

TA 1537

OPP (μg)	NADPH (μmole)	PB S-9 (μl)			PCB S-9 (μl)		
		50	150	250	50	150	250
0	2	23	24	26	15	16	25
100		19	16	24	15	21	23
200		18	18	24	12	21	20
300		6	13	19	9	18	22
0	4	19	23	25	14	23	21
100		20	17	23	17	18	22
200		19	22	22	13	18	22
300		5	14	15	7	16	25
0	8	24	28	26	15	22	27
100		16	23	26	13	24	26
200		25	23	20	15	22	24
300		7	16	20	8	22	22
陽性対照	2	397[a]	—	—	146[b]	—	—

TA 1538

OPP (μg)	NADPH (μmole)	PB S-9 (μl)			PCB S-9 (μl)		
		50	150	250	50	150	250
0	2	31	37	31	36	36	34
100		32	34	28	37	39	41
200		31	34	36	29	45	36
300		28	32	32	29	30	44
0	4	23	31	29	29	43	29
100		18	21	32	35	48	34
200		25	19	29	36	37	38
300		25	24	23	30	36	33
0	8	27	31	24	35	40	42
100		30	30	28	40	37	34
200		23	31	26	35	37	40
300		25	23	12	35	43	32
陽性対照	2	—	8715[c]	—	82[b]	—	—

表2－2　SDラットの S-9 を用いた OPP の mutation test

TA 100

OPP (μg)	NADPH (μmole)	PB S-9 (μl)			PCB S-9 (μl)		
		50	150	250	50	150	250
0	2	160	191	192	201	178	179
100		189	183	188	208	185	189
200		190	181	193	172	184	186
300		146	163	170	152	165	159
0	4	175	192	195	178	193	177
100		180	182	193	223	207	217
200		189	200	202	181	164	165
300		140	169	165	170	165	171
0	8	182	193	181	164	194	166
100		202	173	178	152	185	224
200		182	208	189	175	175	204
300		183	189	180	163	168	169
陽性対照	2	—	3906[c]	—	812[b]	—	—

TA 98

OPP (μg)	NADPH (μmole)	PB S-9 (μl)			PCB S-9 (μl)		
		50	150	250	50	150	250
0	2	42	35	38	52	56	43
100		36	39	48	53	57	42
200		41	34	46	53	49	48
300		38	35	29	51	54	46
0	4	32	43	33	63	65	48
100		42	39	38	58	51	58
200		33	25	39	50	52	46
300		31	33	42	55	52	50
0	8	40	44	31	64	71	62
100		41	40	33	60	52	53
200		35	33	36	64	53	61
300		33	42	42	75	62	52
陽性対照	2	—	6771[c]	—	292[b]	—	—

E. coli B/r WP 2

OPP (μg)	NADPH (μmole)	PB S-9 (μl)			PCB S-9 (μl)		
		50	150	250	50	150	250
0	2	35	36	30	50	51	52
100		29	34	33	43	46	49
200		25	29	26	40	39	53
300		25	26	20	36	44	35
0	4	34	40	34	54	52	49
100		29	34	35	44	51	54
200		33	29	28	41	42	56
300		34	28	27	33	41	46
0	8	39	43	38	41	54	53
100		33	35	27	43	53	50
200		31	32	36	45	46	40
300		23	24	23	37	45	38
陽性対照	2	87[a]	—	—	861[a]	—	—

a）2-アミノアントラセン　10 μg/プレート　　b）ベンツ(*a*)ピレン　5 μg/プレート
c）2-アセチルアミノフルオン　10 μg/プレート

表3．C 57 BL/ 6 N マウスの S-9を用いた OPP の mutation test

A. TA 100

OPP (μg)	PB S-9		PCB S-9		MC S-9
	50 μl	150 μl	50 μl	150 μl	50 μl
0	126	93	125	94	146
50	141	122	123	115	156
100	119	115	121	118	146
200	116	116	112	121	125
300	67	38	54	47	56
陽性対照	4065[a)]	3992[a)]	982[b)]	939[b)]	1986[b)]

B. TA 98

OPP (μg)	PB S-9		PCB S-9		MC S-9
	50 μl	150 μl	50 μl	150 μl	50 μl
0	40	42	39	33	41
50	37	35	40	37	39
100	33	42	43	46	52
200	43	40	41	42	47
300	14	24	18	35	20
陽性対照	10575[a)]	10508[a)]	481[b)]	840[b)]	554[b)]

a）2-アセチルアミノフルオレン 10 μg/プレート　b）ベンツ(*a*)ピレン 5 μg/プレート

表4．F 344ラットの S-9を用いた OPP の mutation test

A. TA 100

OPP (μg)	PB S-9 (μl)			PCB S-9 (μl)		
	肝 臓		腎臓	肝 臓		腎臓
	50	150	150	50	150	150
0	200	224	201	187	194	211
100	206	225	210	219	141	181
200	183	203	176	172	182	176
300	154	183	123	132	191	90
陽性対照	—	4839[a)]	348[b)]	901[c)]	—	968[b)]

B. TA 98

OPP (μg)	PB S-9 (μl)			PCB S-9 (μl)		
	肝 臓		腎臓	肝 臓		腎臓
	50	150	150	50	150	150
0	41	49	65	53	46	52
100	41	46	46	56	48	53
200	41	45	50	52	48	53
300	31	38	37	41	47	56
陽性対照	7046[a)]	9183[a)]	303[b)]	461[c)]	305[c)]	2001[b)]

a）2-アセチルアミノフルオレン 10 μg/プレート　b）2-アミノアントラセン 10 μg/プレート
c）ベンツ(*a*)ピレン 5 μg/プレート

ら，*in vitro* におけるS-9の作用では，突然変異を誘発する代謝物は生成されないのかもしれない．これらの結果から，発がん性の実験と微生物による mutation test の結果の相違は，*in vivo* と *in vitro* の代謝の違いを反映している可能性が考えられる．これに対し，最近 Reitz ら[30] は，OPP が DNA に傷害を与えずに細胞の増殖をうながすことによってがんを誘発するという仮説を述べており，OPP が突然変異によらないでがんを誘発する可能性も考えられる．

要　約

Salmonella typhimurium TA 1535, TA 1537, TA 1538, TA 100, TA 98 および *Escherichia coli* B/r WP 2 を用いて，オルトフェニルフェノールの突然変異誘起性について検討を行った．S-9 無添加の場合においても，マウスおよびラットの S-9 を加えた場合においても復帰コロニー数は増加せず，オルトフェニルフェノールによる突然変異誘起性は認められなかった．

文　献

1) 吉田誠二，益渕正典，平賀興吾：東京衛研年報，29-2，86，1978
2) 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
3) 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
4) 井口重孝，田山邦昭，平賀興吾：東京衛研年報，30-2，67，1979
5) 田山邦昭，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，31-2，1，1980
6) 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
7) 小嶋昭江，平賀興吾：東京衛研年報，29-2，83，1978
8) 花田信次郎：栄養と食糧，29-1，66，1976
9) 西岡　一，小笠原一美：日本環境変異原研究会第6回発表会抄録集，45，1977
10) 河内　卓：遺伝変異原物質を主とする発癌物質スクリーニングの技術開発，厚生省がん研究助成金による研究報告，1975
11) 白須泰彦，寺森昭二，森谷正明，手塚英夫：第5回毒作用研究会抄録集，1-26，1978
12) 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
13) Reitz, R.H., Fox, T.R., Quast, J.F., Hermann, E.A. and Watanabe, P.G. : *Chem. Biol. Interactions*, **43**, 99, 1983
14) Hiraga, K. and Fujii, T. : *Fd Cosmet. Toxicol.*, **19**, 303, 1981
15) 藤井　孝，平賀興吾：第41回日本癌学会総会記事，41，1982
16) 縄井寿美子，吉田誠二，中尾順子：第10回日本環境変異原学会講演要旨集，82，1981
17) Bridges, B.A., Dennis, R.E. and Munson, R.J. : *Genetics*, **57**, 897, 1967
18) Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. and Lee, F.D. : *Proc. Nat. Acad. Sci, USA*, **70**, 2281, 1973
19) Ames, B.N., Lee, F.D. and Durston, W.E. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 782, 1973
20) McCann, J.. Spingarn, N.E., Kobori, J. and Ames, B.N. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 979, 1975
21) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，**20**，1178，1975
22) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. : *Mutation Res.*, **31**, 347, 1975
23) Hutton, J.J., Meier, J. and Hackney, C. : *Mutation Res.*, **66**, 75, 1979
24) Saccone, G.T.P. and Pariza, M.W. : *Mutation. Res.*, **88**, 135, 1981
25) 小嶋昭江，藤田　博，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，56，1977
26) Halpaap-Wood, K., Horning, E.C. and Horning, M.G. : *Drug. Metab. Dispos.*, **9**, 103, 1981
27) Nagao, M., Yahagi, T., Kawachi, T. : *Proc. Jpn. Acad.*, **53**, 95, 1977
28) Nagao, M., Yahagi, T., Honda, M. : *Proc. Jpn. Acad.*, **53**, SerB, 34, 1977
29) 縄井寿美子，吉田誠二，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，**33**，480，1982
30) Reitz, R.H., Schumann, A.M., Watanabe, P.G. and Gehring, P.J. : *Bacic Life Science*, **21**, 425, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 325-328, 1983

オルトフェニルフェノール(OPP)のマウスを用いた急性経口毒性試験

田山邦昭*, 井口重孝*, 佐々木美枝子*, 平賀興吾*

Acute Oral Toxicity of *o*-Phenylphenol (OPP) in Mice

KUNIAKI TAYAMA*, SHIGETAKA IGUCHI*,
MIEKO SASAKI* and KOGO HIRAGA*

Keywords: オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, 防かび剤 fungicide, マウス mouse, 急性毒性 acute toxicity

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)は我国でかんきつ類の防かび剤として使用許可されている[1]. 当部ではそれらの安全性を種々の方面より検討しているが, 急性毒性についてはラットでの成績をすでに本年報[2,3]で報告した. 今回はOPPのマウスにおける急性毒性試験結果を報告する. なおOPP-Naのマウスにおける急性毒性については, 当部小縣ら[4]が報告している.

材料ならびに方法

検体 OPPは東京化成㈱製(Lot No. APO 1, 純度98%以上)を用い, 投与容量がすべて10ml/kgとなるように日本薬局方オリブ油に溶解調製して使用した.

動物 Jcl:ICRマウス雌雄を日本クレア㈱より4週令時に購入, 8週令時に発育良好なものを試験に供した.

飼育条件 室温25±1°, 湿度55±5%, 照明午前6時~午後5時, 換気毎時10回の飼育室内で, モミ材のチップを床敷に用いたプラスチックケージ(W 175×L 245×H 125mm)に1匹飼いとし, 日本クレア㈱製固型飼料CE-2および水道水を自由に与えた.

投与方法および観察 検体投与前日に各濃度群(以下群とする)の体重にかたよりがないように動物を10匹ずつに群分けし, その日の午後5時に除餌し, 水のみを与え, 投与日の午前10時に体重測定後胃ゾンデにて強制経口投与を行った. 検体投与量はTable 1に示すように予備試験の結果を参考として, 雌雄共に1000~7594mg/kgの間に公比1.5の6段階をとり, 別に溶媒対照を置いた. 5063mg/kg群と7594mg/kg群では室温で結晶が析出したため加温溶解して行った. 投与後3時間目より餌を与えた. 症状および生死の観察は24時間目までは1ないし2時間毎に, 2日目以降14日目までは朝夕2回行い, 死亡例は直ちに剖検を行った. 体重は毎日午前10時前後に測定した.

LD_{50}は14日間の死亡率からBlissのprobit法[5]により算出した. 計算の処理に当っては当部コンピューター・プログラムを使用した.

結果

予備試験および本試験の投与日の体重, 死亡数および死亡時期をTable 1に示した. 死亡開始は雌雄共に投与後30分以内に起こり, 大半が24時間以内に死亡した. 動物は投与直後より自発運動が低下し, 鎮静状態になり, 外部刺激に対する反応も鈍くなった. 重篤となった例は四肢を伸ばした腹臥姿勢をとり, 呼吸数が減少し死亡した. この他数例で眼の白色変化, 流涙, 下痢様便等が認められた. 眼の白色変化はおよそ投与後3時間目以降2日目までの間で, 動物が瀕死状態になった頃に現われ, この変化の発現した動物は全例死亡した(Table 1 *印). また生存中この変化が確認できなかった例でも, 眼が白色化したものを剖検時に認めた(Table 1 ○印). 2日目以降ではまだ数例に自発運動の強度の低下がみられたが, ほとんどの例は元気を回復していた.

体重もFig. 1に示したように一部の高濃度群の動物を除き2日目から回復に向った. 死亡例の剖検所見では雌雄差, 投与量に明らかな関連はみられなかった. 肉眼的検索結果の主なものは, 投与直後の初期の死亡例の胃では, 前胃で顕著にみられた壁の菲薄化, 腺胃における皺襞の消失, 潰瘍等および一部の例で認められたガスの貯留であった. 腸では死亡時期の経過に伴う赤褐色~暗

* 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. Mortality of Mice Receiving a Single Oral Dose of OPP

Range-Finding Test

Sex	Dose (mg/kg)	Initial body weight[1] (g)	Mortality[2]	Time of death after dosing (hr)
Male	1000	36.4±0.8	0/4	—
	2000	32.5±1.4	1/4	<24
	4000	32.4±2.6	1/4	<24
	8000	33.2±0.9	4/4	< 1
Female	1000	29.6±1.3	0/4	—
	2000	25.7±1.1	0/4	—
	4000	25.5±1.3	0/4	—
	8000	24.5±1.4	2/4	< 2

Full Scale Test

Sex	Dose (mg/kg)	Initial body weight[1] (g)	Mortality[2]	Time course of number of dead mice after dosing 0 3 6 9 12 15 18 21 24 1 2 3 4 5 6 13 14(day) (hr)
Male	0[3]	36.2±2.0	0/10	
	1000	36.3±2.4	0/10	
	1500	36.4±2.0	0/10	
	2250	35.9±3.2	2/10	12hr: 1, 5day: 1
	3375	36.2±1.9	4/10	3hr: 2, 6hr: 1, 24hr: 1*
	5063	36.3±2.0	8/10	3hr: 3°, 6hr: 2°, 18hr: 2*
	7594	36.3±2.2	10/10	3hr: 6°, 21hr: 1, 2day: 2°, 4day: 1
Female	0[3]	29.2±1.5	0/10	
	1000	28.9±1.8	0/10	
	1500	29.3±2.0	0/10	
	2250	28.2±1.8	3/10	3hr: 2°, 6hr: 1
	3375	28.9±1.7	7/10	3hr: 1°, 6hr: 1*, 12hr: 1, 15hr: 1*, 18hr: 2, 24hr: 1
	5063	28.9±1.7	8/10	3hr: 4°°, 6hr: 2*, 18hr: 1*, 21hr: 1*
	7594	29.1±1.8	9/10	3hr: 8°, 21hr: 1

1) overnight fasted mice, mean ± SD. 2) No. of deaths/No. dosed. 3) control : olive oil 10 m*l*/kg.
*: Mice showed white eyes before death. ○ : Mice showed white eyes after death.

赤色の色調変化，腸管の拡張およびガスの貯留であった．投与後数時間以上経過した例では上記胃腸管の変化の他に，副腎の腫大，膀胱における貯留尿の暗灰色～暗赤色の色調変化と，一部潜血反応の陽性例がみられた．また腎では皮髄境界部や乳頭部が暗赤色を呈し，腎静脈の血管拡張も認められた．

本試験で得られたOPP経口投与でのマウスにおけるLD_{50}およびその95%信頼限界はFig. 2に示したように雄3499（2854－4315）mg/kg，雌3152（2414－3999）mg/kgであった．

考　察

OPPをオリブ油に溶解し，Jcl : ICRマウスに経口投与し，急性毒性を検討した．LD_{50}とその95%信頼限界は雄3499（2854－4315）mg/kg，雌3152（2414－3999）mg/kgであり雌雄で近い値となった．小縣ら[4]が水に溶解したOPP-Naを2社製品について同系マウスに行った急性経口毒性でのLD_{50}は，各々雄1018mg/kg，857mg/kg，雌683mg/kg，812mg/kgであった．一方，前報[2,3]のラットにおける急性経口毒性においては，これは上述のマウスの試験と各々同一溶媒を用いているが，そのLD_{50}はOPPでは雄2600mg/kg，雌2850mg/kg，

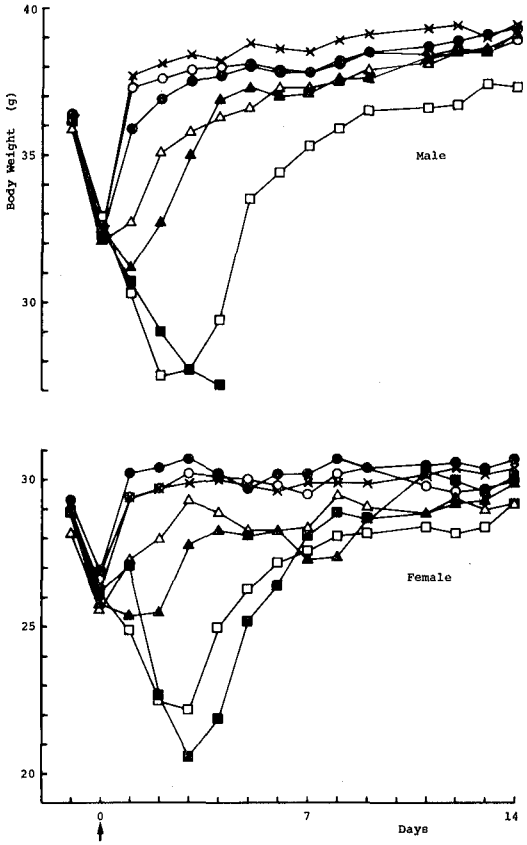


Fig.1. Mean Body Weights of Mice Given a Single Oral Dose of OPP : 0 (control:×) ; 1000 (○) ; 1500 (●) ; 2250 (△) ; 3375 (▲) ; 5063 (□) ; or 7594 (■) mg/kg. Arrow indicates the day of administration.

OPP–Na では 2 回試行した試験で雄1096mg/kg, 1049mg/kg であるが，雌では 2 回とも用量－反応関係が得られず，算出できなかった．以上より OPP と OPP–Na 各々の LD_{50} は雌雄およびこれら 2 種動物で近似しており，OPP は OPP–Na より 3～4 倍高い値であった．OPP–Na で特徴的であった症状は，マウス，ラット共に腺胃部の粘膜が全体に暗赤色調としてみられた顕著な出血，および投与後数日以降に雌ラットで主に発生した胃腸管麻痺に起因すると考えられるガス膨満である．馬渕ら[6] はパラ安息香酸ブチル（PHBB）とその水酸化ナトリウム水溶液（PHBB–Na とする，pH 11.3）でのラットにおける急性経口毒性で，LD_{50} が PHBB より PHBB–Na において低く，PHBB–Na に顕著な腺胃部での出血を認めている，そしてさらに他の 2，3 の比較実験からこれらの違いは PHBB–Na が単にアルカリとして作用するのではなく，PHBB の作用で胃での滞留時間が長くなり，それにアルカリとしての作用が強化されたものであると推測している．OPP および OPP–Na でも，投与に用いた OPP–Na は pH 12.5前後と強アルカリであり，OPP–Na で示されたより強い毒性および胃での出血は上述の PHBB と PHBB–Na との関係によく似ている．従って OPP と OPP–Na に認められた毒性の相違も同様のことが影響していると考えられた．

一般症状としてはこれら一連の試験で OPP，OPP–Na 共に自発運動の低下や鎮静，流涙等が主であった．今回の試験ではその他特異なものとして眼の白色変化が認められた．これは小縣らも観察しているが，それはおもに LD_{50} 付近の投与量で，投与後 3 時間以降で瀕死状態になったものに多く発現し，また生存中は観察されず死亡後に認められた例もあった．死亡後の観察例は死後変化でみられる白色化より強度であり，比較的初期の死亡例に多く認められたことから，生存中はまだこのような変化に至らず死亡後に発現したと推測された．これらの原因として薬物作用による角膜や水晶体の混濁および薬物の角膜への沈着等が考えられる[7]，一般にフェノール類は細胞のタンパク質を変性させ凝結させる作用[8] があることが知られ，ナフタレンの代謝物である 1，2－ジハイドロオキシナフタレンや 1，2－ナフトキノン，また 2，4－ジニトロフェノール等が水晶体に混濁を起こす物質として知られている[7-9]．今回の OPP および OPP–Na もフェノール類であることから，同様の作用によるものであるか，OPP あるいはフェニルハイドロキノン等の OPP 代謝物[10,11] について今後さらに検討する必要があると考える．

要　旨

オルトフェニルフェノール（OPP）をオリブ油に溶解，Jcl : ICR マウス雌雄（8 週令，一夜絶食）に経口投与し，急性毒性を14日間観察した．主な症状は自発運動の低下，鎮静で，死亡は大半が24時間以内に起こり，胃腸管の拡張，副腎の腫大等がみられた．その他特異なものとして眼の白色変化が観察された．LD_{50}（14日間）は雄3499mg/kg，雌3152mg/kg であった．

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）田山邦昭，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，30－2，57，1979

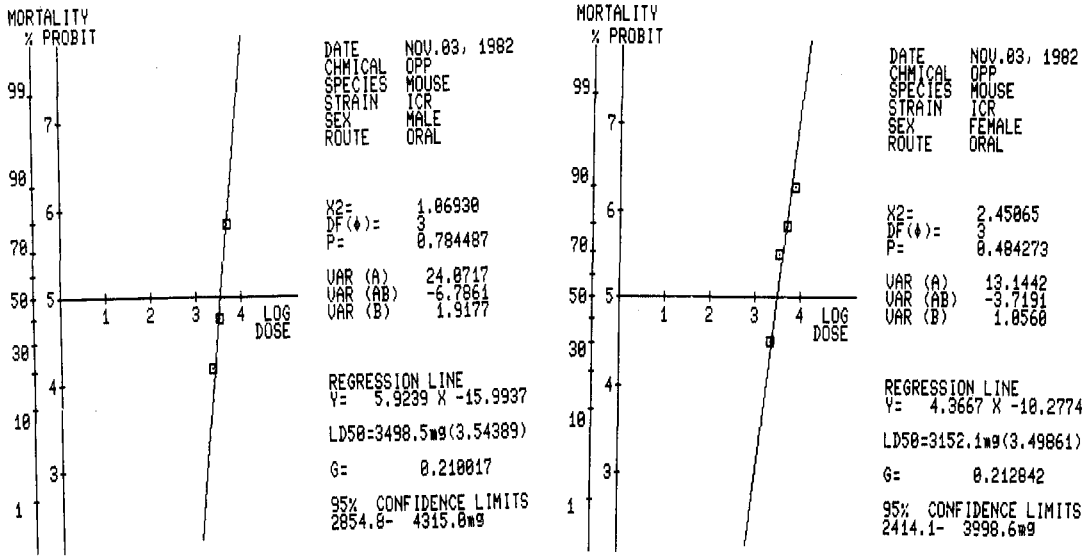


Fig.2. Acute Oral Toxicity of OPP in Mice
LD50 and 95% confidence limites calculated by computer using a program for the probit method in Bliss (1938).

3) 田山邦昭，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，31－2，1，1980

4) 小縣昭夫，安藤　弘，久保喜一，平賀興吾：東京衛研年報，30－2，54，1979

5) Bliss, C.I. : *Quart. J. Pharm. and Pharmacol.*, 11, 192, 1938

6) 馬渕依子，川野澄江，藤田　博，水尾昭江，樺島順一郎，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，26－2，103，1975

7) 高橋日出彦：続・くすりの毒性，1，1976，南江堂

8) 山村秀夫監訳：中毒ハンドブック，401，1979，広川書店

9) 浦口健二，上野芳夫，粗谷　豊，北川晴雄，酒井文徳編集：トキシコロジー，382，1978，地人書館

10) Meyer, T. and Scheline, R.R. : *Acta pharmacol. et. toxicol.*, 39, 419, 1976

11) Reitz R.H., Fox T.R., Quest J.F., Hermann E.A. and P.G. Watanabe : *Chem.–Biol. Interactions*, 43, 99, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 329-336, 1983

オルトフェニルフェノールナトリウム（OPP—Na）によるラット肝細胞の微細構造変化

福森信隆*, 佐々木美枝子*, 平賀興吾*

Ultrastructural Alterations of Hepatocytes in Male Rats Fed with Sodium *o*—Phenylphenate (OPP—Na)

NOBUTAKA FUKUMORI*, MIEKO SASAKI* and KOGO HIRAGA*

Ultrastructural alterations of hepatocytes in the male F344/DuCrj rats fed the diet containing 2% sodium *o*—phenylphenate (OPP—Na) for four weeks were investigated electron microscopically using the thin section technique. In the hepatocytes of rats fed OPP—Na for a week, considerable proliferation of SER, elongated mitochondria and well—developed nucli were observed. RER membrane had a tendency to disappear accompanying the detachment of ribosome from the surface of RER. These changes were observed during the whole experimental periods. The main changes after two and/or three weeks' feeding were formation of anomalous vacuoles containing myelin figures, decrease of glycogen particles, appearance of mitochondria surrounded by RER and irregular nuclear membrane. After four weeks' feeding, proliferation of SER became prominent and formed vesicular network. Deformation of mitochondria showing a high electron density and the increased number of lysosomes were also observed. These changes of organella induced by OPP—Na up to four weeks suggest the adaptive and sometimes exhaustive changes caused by the continuous proliferation of SER.

Keywords : sodium *o*—phenylphenate, ultrastructural alteration, rat hepatocytes

緒　言

オルトフェニルフェノールナトリウム（OPP—Na）は主に輸入柑きつ類の防ばい剤として使用されている．肝臓は外来化学物質の代謝を行っている重要な場であることから，肝細胞内の形態的変化を把握することは肝機能の反映と解され毒性学的意義が大きい．電顕的にはRobenekらはオルトフェニルフェノール（OPP）の高用量の1回投与で核の不整形，核小体の増加，小胞体の増殖などを観察しているが[1] 連続摂取での報告はみられない．

今回，OPP—Naを4週間の期間で連続経口摂取させた時の肝細胞の微細構造におよぼす影響について電子顕微鏡を用いて経時的に観察を行った．

実験方法

動物は4週令のF344/DuCrj雄性ラット（日本チャールスリバー）を室温25±1°，湿度50±5％の環境下で飼育し，1週間馴化飼育を行ったのち，体重90 g前後の5週令動物を1群3匹として屠殺の各週ごとに4群設定した．検体としてOPP—NaはDowicide A（ダウケミカル，Lot No MM01044）を飼育用粉末飼料（日本クレア，CE—2）に2％の割合で[2,3] 混和させ固定化したものを用い，対照群には飼育用固型飼料（日本クレア，CE—2）を与え，水とともに自由に摂取させた．摂取期間は4週間とし各週ごとに動物を放血屠殺し肝臓を生理食塩水で灌流させた後すみやかに冷固定液中で肝方形葉の一定部位を細切して試料とした．電顕用試料は冷3％パラホルムアルデヒド（0.1Mリン酸緩衝液，pH7.4）で前固定を行い，一晩緩衝液で洗浄後1％オスミウム酸（0.1Mリン酸緩衝液，pH7.4）を用い，1.5時間の後固定を実施した．エタノール脱水後 *n*—ブチルグリシジルエーテルで置換し，定法に従ってEpon樹脂に包埋した．はじめ厚さ約1 μm の準超薄切片を得てトルイジン青で染色し光顕的に観察を行った後，超ミクロトームで超薄切片を作製して酢酸ウラン・クエン酸鉛二重染色を施し，日立HU—12A透過型電子顕微鏡にて検鏡した．

* 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

実験結果

光顕的所見 全体的に投与後4週まで顕著な病的変化はみられず，肝小葉中心帯，中間帯，周辺帯での限局性変化も認められなかった．投与後1週では胞体内で軽度の空胞形成，核，核小体の膨化が観察され，これらの変化は4週まで継続した．投与後2週では，細胞内に好塩基性顆粒が散見され4週まで漸次増加する傾向を示した．投与後3週では肥大した核とともに核萎縮を呈する暗調細胞がグリソン鞘周囲に若干多く出現した．投与後4週では，核，核小体の大きさは3週までとほぼ同様で分裂像の増加を認めないが，顆粒成分の増加に伴い核周囲の細胞質の明調化が鮮明に認められた．

電顕的所見 投与後1週では核，核小体の良好な発達がみられ核周囲で滑面小胞体（SER）の軽度ないし中等度の増殖が認められた．粗面小胞体（RER）は層状構築が乱れ ribosome を脱落して短小化や消失傾向を示した．SER の増殖した部の glycogen 顆粒は減少し，糸粒体は膨化あるいは巨大長形化を呈するものが多かった．また microbody は増加傾向を示した（Fig. 2）．投与後2週では SER の増殖は比較的軽度であったが，RER は ribosome を離脱させ消失傾向がみられた．核の多くは肥大して核小体の nucleolonema が網状の明瞭化を示したが，一部では核膜の消失を呈した．一方，SER の増殖領域では円形あるいは長形の小空胞の増加が顕著であり，内部に多層のミエリン様構築を形成する小空胞が観察された．これらの小空胞は一層の限界膜で囲まれ，空胞内部に細線維状の微小顆粒を封入し近接する正常形態の SER と連接する像がみられた．糸粒状は cristae の軽度な膨化が長形，円形ともに認められ基質の電子密度が若干高かった（Fig. 3, 4）．投与後3週では SER の増殖は細胞間で増殖の程度に若干の差がみられるが増殖の著しい細胞の glycogen 顆粒は消失していた．SER 由来と思われる小空胞は時折散見されミエリン様構築を形成する小空胞もみられた．糸粒体は膨化，長形化を呈し一部に膜の消失がみられたが，崩壊像は認められなかった．また糸粒体の周囲を残存する RER が取り囲む囲繞像が多くみられた．肥大した核は核小体が明瞭となり chromatin が分散し部分的な消失を伴った鋸刃状の不整な核膜を持つ核が観察された（Fig. 5, 6）．投与後4週では糸粒体の変形がみられ，電子密度の高い長形化した糸粒体は馬蹄形，くびれ像を呈したが，cristae の拡張は認められなかった．SER の増殖が顕著な細胞では少数の glycogen 顆粒は存在するものの小空胞が散見され内部に膜様構造物を封入していた．一部の細胞では小空胞の形成部で高い電子密度を持つ細胞小器官の壊死巣がみられ周囲では vesicle 状，tuble 状 SER の著しい増殖，糸粒体膜の消失を認めた．RER から離脱した ribosome は消失することなく polysome を形成し RER の消失部に存在したが SER の顕著な部ではほとんど認められなかった．その他，lysosome の増加，RER の消失，小脂肪滴の増加を認め，また核，核小体は良好な発達をするものと不整な核膜を持ち電子密度の高い萎縮像を呈するものがみられた．Golgi 装置，毛細胆管の著変は特に認められなかった（Fig. 7, 8）．対照群は軽度の SER の増殖，核膜の消失，糸粒体の高電子密度などわずかに認める細胞がみられたが，いずれの週においても投与群の変化とは著しく異なっていた．

考　察

外来異物の侵襲に対して肝臓は様々な形態変化を生じ，その様相から肝機能の状態を推察することが可能である．従って微細構造の変化を経時的に観察することは細胞への影響を把握する重要な手段である．特に肝臓は糖質，脂質，蛋白質，ホルモンの代謝および胆汁の排泄などの機能とともに化学物質の解毒を行っており，細胞内の小器官が個々の機能的役割を果たしていることから，微細構造の一連の変化の動向を検索することは細胞毒性の検出に寄与するところが大きいと思われる．

OPP–Na の経口摂取による主変化は SER の増殖，小空胞の形成，核，核小体の肥大であった．SER の増殖は投与後1週ですでに認められ比較的軽度であったが投与後4週では著しく増殖した細胞が散見された．しかしこの変化は急激な増殖ではなく，細胞により増殖の程度に差異が認められることから SER の薬物代謝にもとずく機能的変化と考えられる．BHT などの脂溶性物質では顕著な SER の増殖をみるが[4,5] OPP–Na では量的に増殖が少なく経時的な増殖の程度においても著しい変化の差はみられなかった．おそらく今回行った経口摂取では薬物代謝能への負荷が少なく SER の機能が保持されていると思われる．また，SER の増殖に伴って近傍の glycogen 顆粒の減少がみられ，このことは RER を消失して SER を形成させるために glycogen 顆粒がエネルギー源として供給されるといわれているが[6] 必ずしも明らかではない．2–*me*–DAB は glycogen 顆粒の増加が伴った SER の増殖を誘発すること[7] と考えあわせると興味深い．フェノバルビタールは他の小器官にあまり変化を与えず，SER の適応性増殖を起こすことが知られており[8]，このような状態では glycogen 顆粒が減少して RER の末端部が膨化，滑面化して SER を形

成することから[9] OPP–Na でみられた SER の増殖と glycogen 顆粒の減少を伴った RER 膜の消失は代謝を行うための適応変化と考えられる.

投与後2週で限界膜に囲まれた小空胞の形成が散見され, その内部に細顆粒状構造物の封入がみられたが, 正常像の SER でも槽内に同様な構造を持つことからこれらの小空胞は SER が著しく拡張したものと思われる. OPP で Robenek らが行った1回投与の実験でも SER の増殖とともに小空胞の形成を報告していることから[1] 極めて初期に出現する変化と考えられる. 小空胞の形成が多い細胞では内部にミエリン様構築を認めるが層状形態は不均一であり chloroquine[10] や DH 剤[11] でみられる多層構造のミエリン像の脂質蓄積症とは異なると思われる. それらのミエリン様構造物は小空胞化した SER に代謝の亢進による細胞内の残遺物が集積して形成されたものと推察される. このことは貪食作用を持つ lysosome が増加傾向を示すことからも示唆される.

糸粒体の変化は投与後1週で巨大長形化が多くみられ漸次 cristae の拡張, RER の取り囲み, 電子密度の高い馬蹄形を呈したが, 崩壊像はほとんどみられなかった. 従ってこれらの形態変化は薬物の投与初期で普遍的に観察される膨化, 長形化[12] を経て糸粒体で生産されるエネルギーの供与を目的とした RER の取り囲み像であろうと推察され, いずれも機能的変形であろうと考えられる. しかし SER の増殖の顕著な細胞では他の小器官の減少とともに糸粒体の膜の消失が認められることから障害へ移行する可能性も考慮される.

核, 核小体の良好な発達は全期間において認められ投与初期では nucleolonema が明瞭であることから活発な機能活動がなされていると思われる. 核の肥大は薬物代謝, 分裂などの細胞の機能亢進時に多くみられ, また癌化する初期の細胞でも認められるが, 癌に移行する細胞は顕著な核膜の変形, 陥入を伴っていることから[13], これらの変化は核の機能的肥大と考えられるがさらに長期間の観察が必要であろう.

投与後4週の SER の増殖が顕著な細胞でみられた電子密度の高い暗調な小器官の壊死巣は小空胞の限界膜の破片を内包しており, これまで述べた糸粒体, 核, RER の変化などから考察すると SER の増殖により他の小器官の分布が減少して細胞の機能を維持することが困難となった疲憊性の変化であると考えられる.

Freeze fracture 法を用いた Robenek らは OPP で毛細胆管の拡張, microvilli の減少を認めたが[1], 今回の実験では明らかでなかった. 投与方法の差や脂溶性である OPP との相違が考慮されるが今後の検討を要するであろう.

文　献

1) Robenek, H., Meiss, R., Themann, H. and Himmels, S. : *Expl. Cell. Biol.*, **48**, 404, 1980
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) Lane, B. P. and Lieber, C. S. : *Lab. Invest.*, **16**, 342, 1967
5) 福森信隆, 平賀興吾：東京衛研年報, 31－2, 67, 1980
6) Jones, A. L. and Fawcett, D. W. : *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 215, 1966
7) Lafontaine, J. G. and Allard, C. : *J. Cell. Biol.*, **22**, 143, 1964
8) Burger, P. C. and Herdson, P. B. : *Am. J. Path.*, **48**, 793, 1966
9) Yamamoto, T. : *Symp. Cell. Biol.*, **21**, 87, 1970
10) Hruban, Z., Slesers, A. and Hopkins, E.: *Lab. Invest.*, **27**, 62, 1972
11) Yamamoto, A. et al : *J. Biochem.*, **69**, 613, 1971
12) Suzuki, I.: *J. Clin. Electron Microscopy*, **2**, 170, 1969
13) 鵜沼直雄：生体の科学, 33, 2, 1982

Explanation of Figures

Fig.1. Hepatocyte of the normal rat liver. Rough endoplasmic reticulum (RER) showing lamellar structure, vesicular smooth endoplasmic reticulum (SER), glycogen particles (G 1) and mitochondria (M) are seen. X13600

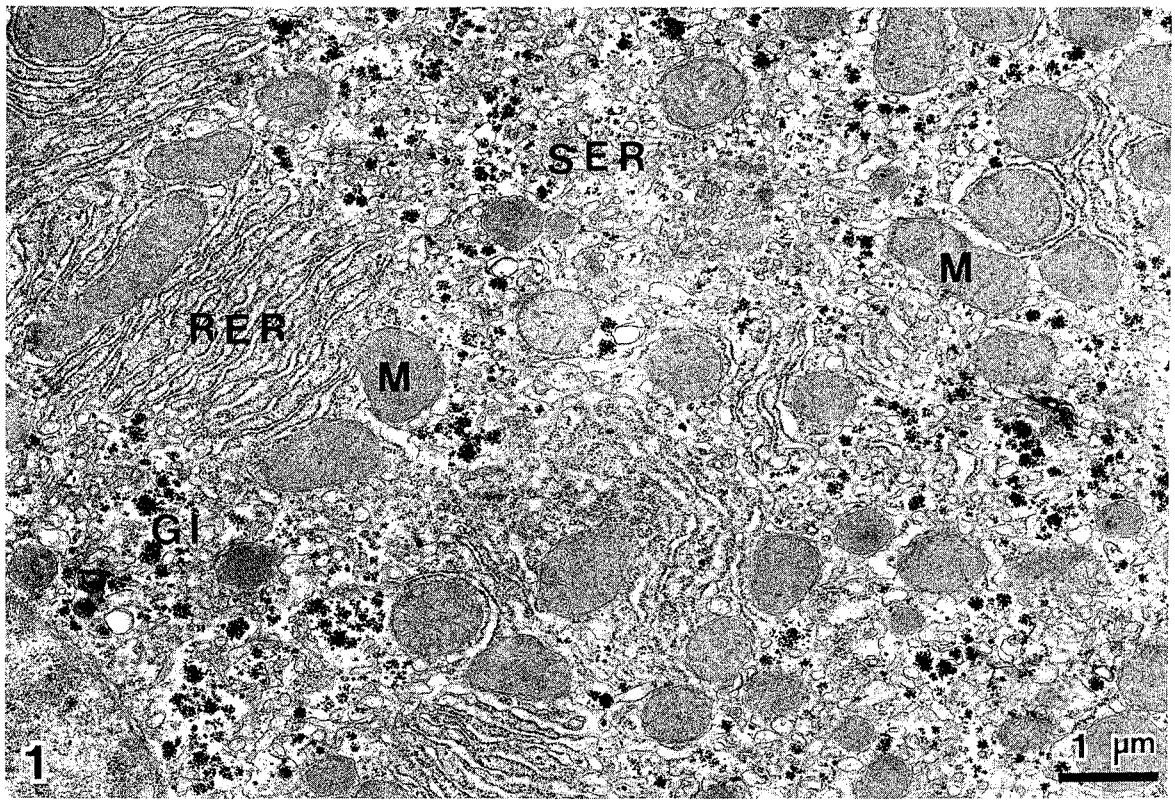
Fig.2. Hepatocyte from the rat fed with 2% OPP–Na for a week. Hepatic cell contains considerable proliferation of SER and elongated large mitochondria (M). Nucleus (N) and nucleolus (N 1) show well–developed forms. X18200

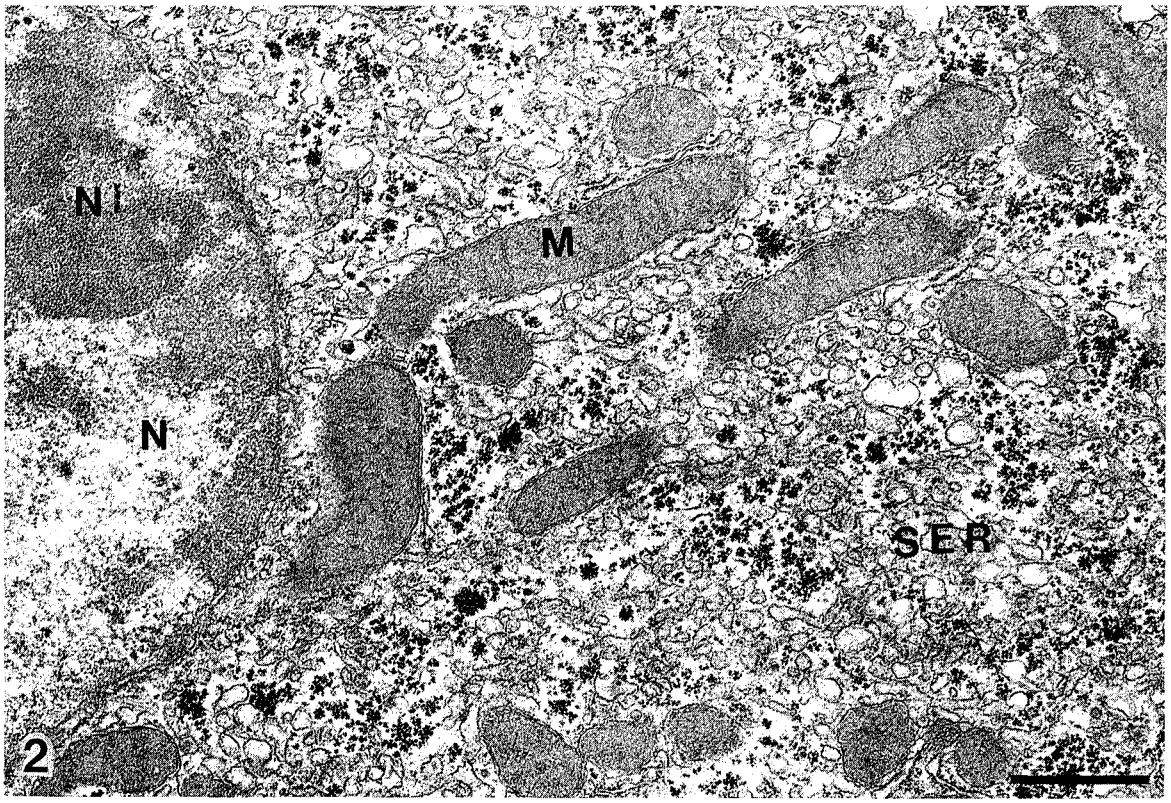
Fig.3, 4. Hepatocyte from the rat fed with 2% OPP–Na for two weeks. Elongated and anomalous vacuoles (V) in the hepatic cytoplasm are often seen. Several vacuoles contain myelin figures (Mf). A number of RER detach ribosomes from endoplasmic reticulum membrane

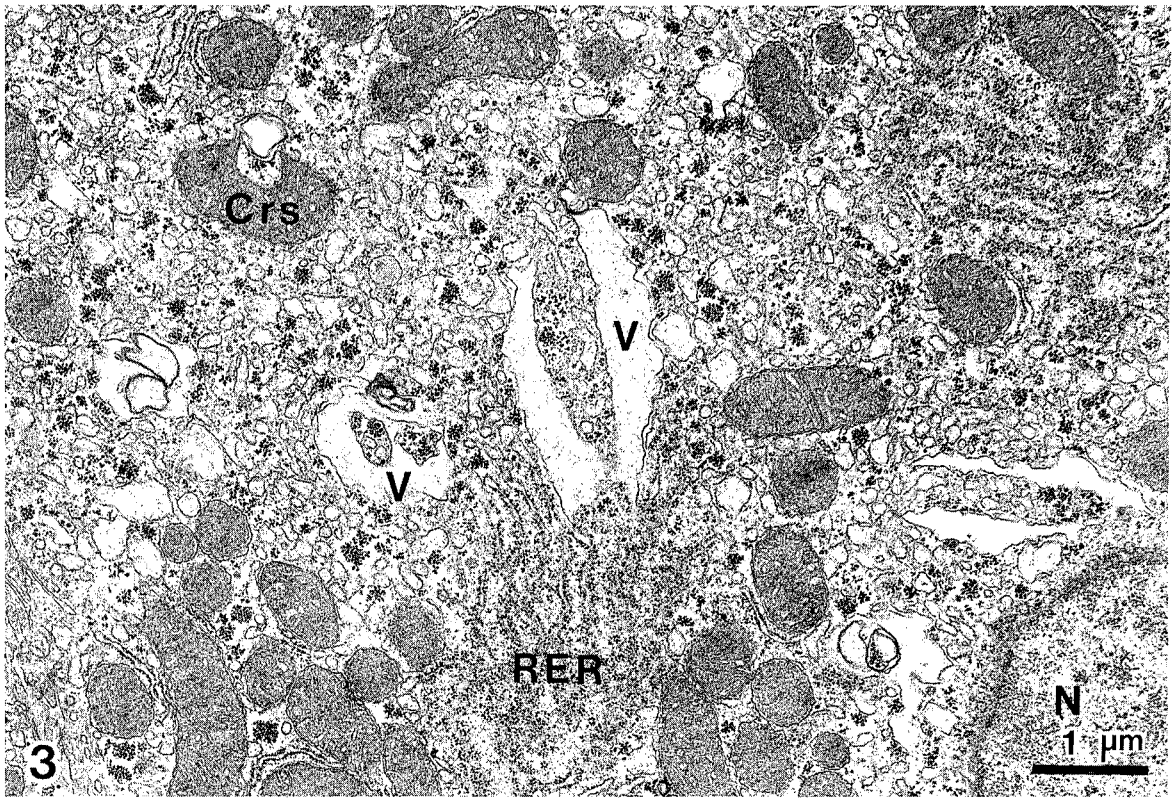
and tend to disappear. Cristae mitochondriales (Crs) are swollen slightly. Fig. 3 X14400, Fig. 4 X13500

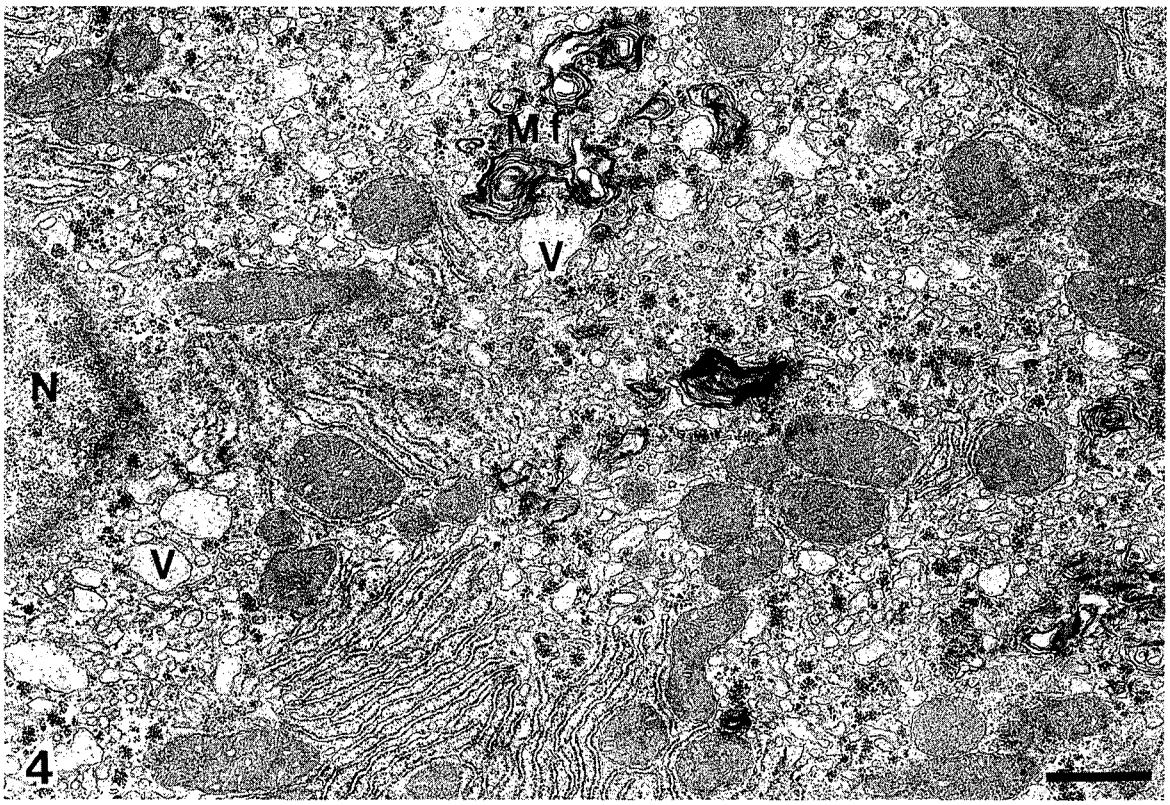
Fig.5, 6. Hepatocyte from the rat fed with 2 % OPP–Na for three weeks. Mitochondria (M) surrounding by RER appear in slight proliferated SER area. The dilatations of SER cisternae containing myelin figures (Mf) are seen in Fig. 5 . Nuclear membrane (Nm) shows irregular shape. Glycogen particles in Fig. 6 are more decreased in amount than in the normal. Fig. 5 X17500, Fig. 6 X11000

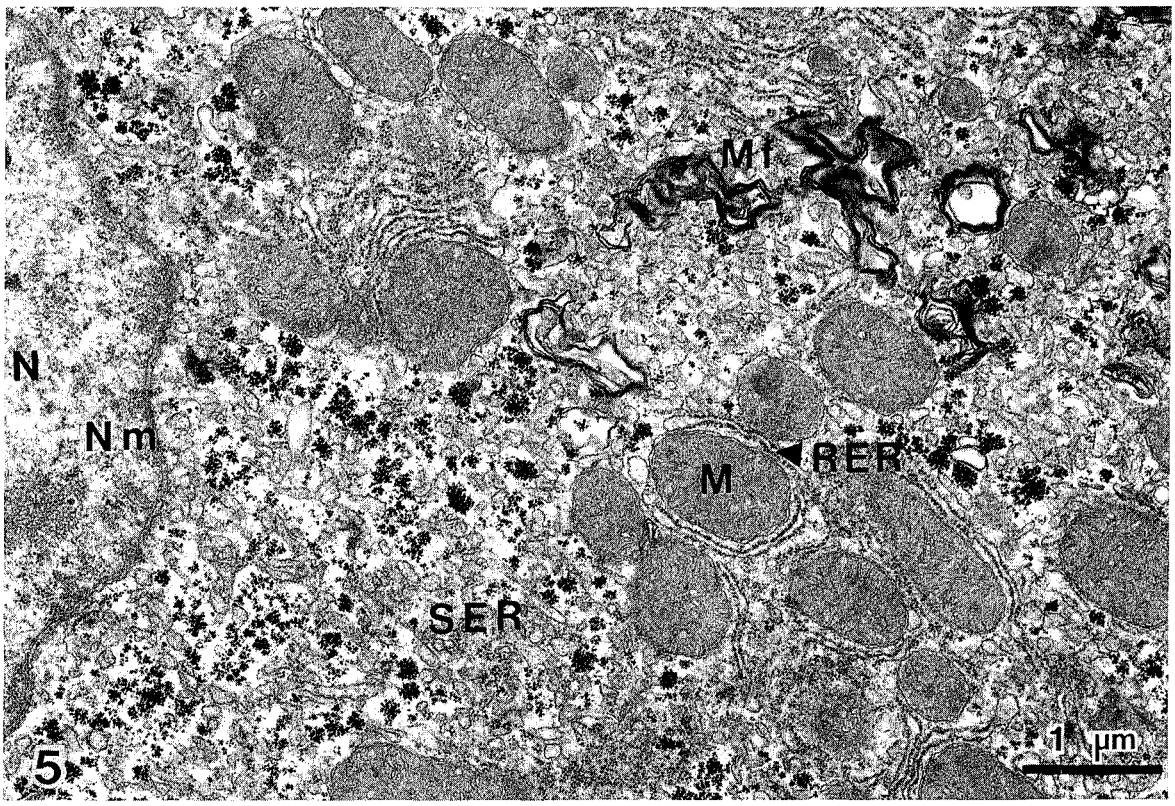
Fig.7, 8. Hepatocyte from the rat fed with 2 % OPP–Na for four weeks. The deformations of horse–shoe shaped and elongated mitochondria (M) showing high electron density are observed frequently in Fig. 7 . The proliferation of vesicular and tubular SER in the glycogen area is prominent. Necrotic changes of organelles containing vacuolar membrane and disappearance of mitochondrial membrane are also seen. Fig. 7 X13900, Fig. 8 X14500

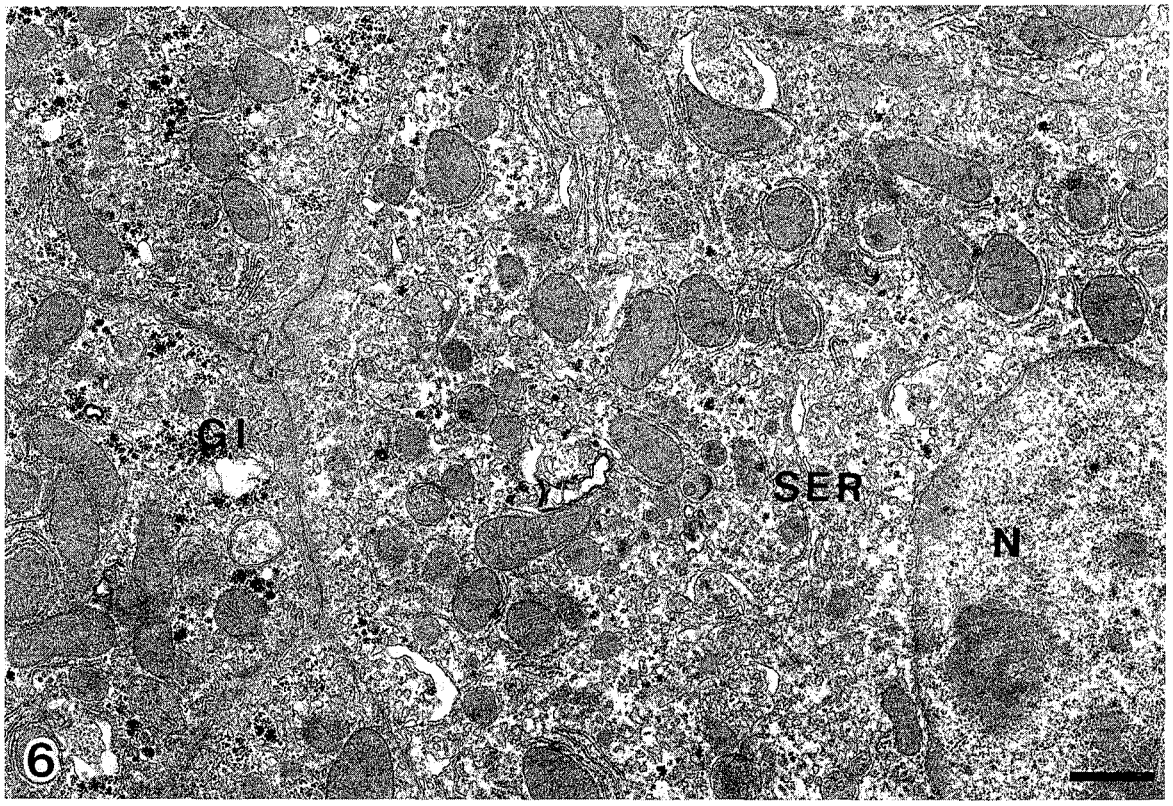

SER
M
RER
M
Gl
1
1 µm

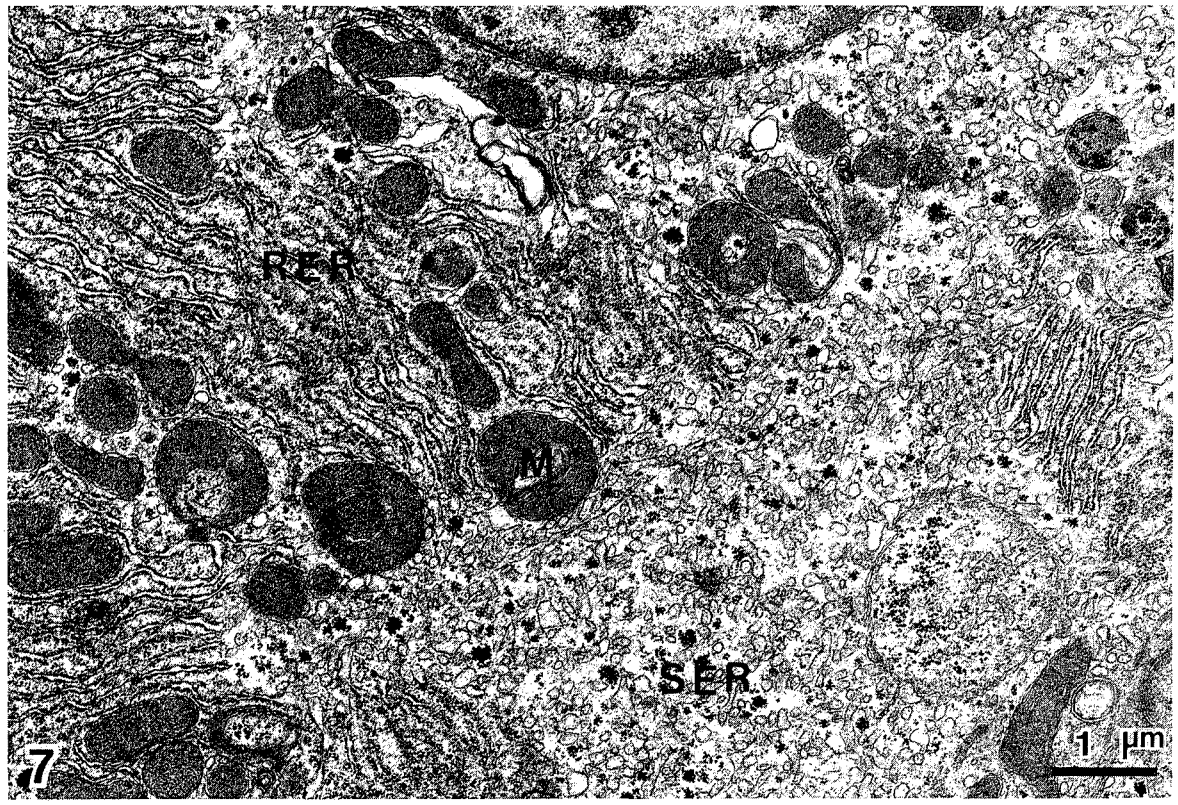

Nl
M
N
SER
2


Crs
V
V
RER
N
1 µm
3

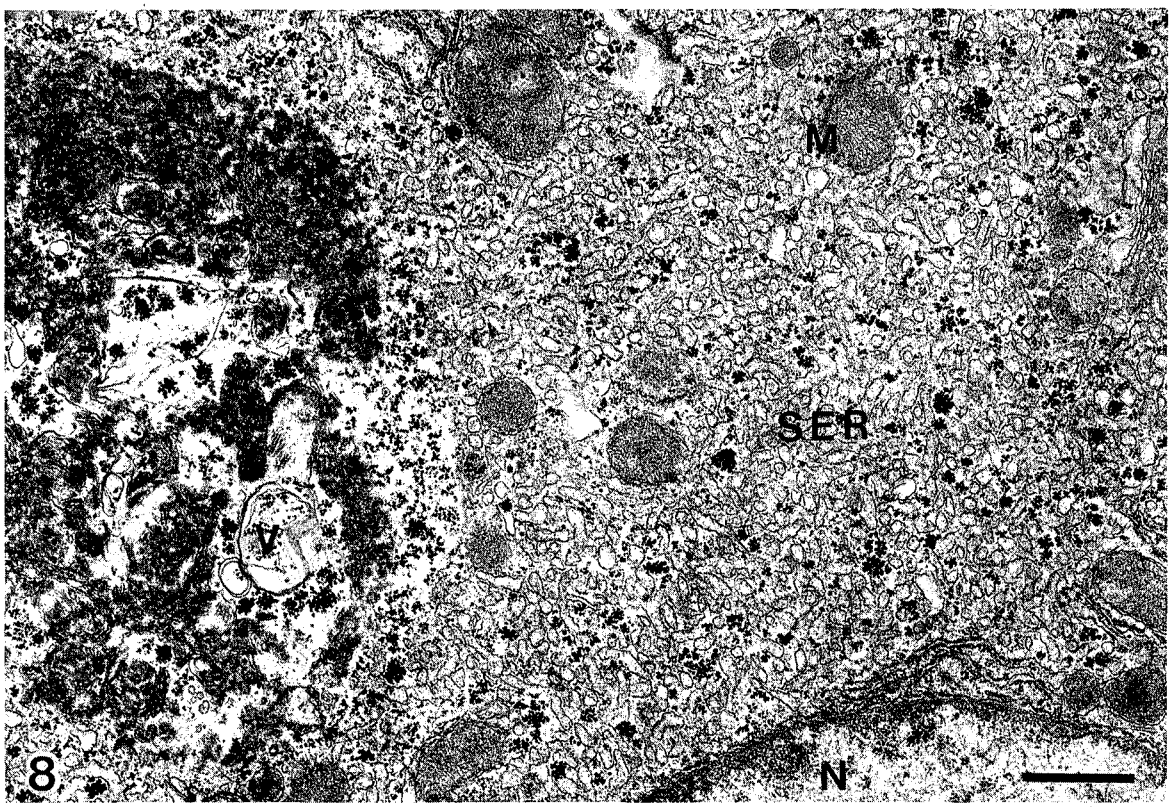

Mf
V
N
V
4


Mi
N
Nm
M
RER
SER
1 μm
5


Gl
SER
N
6



7



8

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 337-342, 1983

妊娠マウスにおけるチアベンダゾール（TBZ）の吸収・分布・排泄及び胎盤通過：懸濁媒体による違いについて

米山允子，小縣昭夫，藤井　孝，三栗谷久敏，矢野範男，
高橋　博，湯沢勝広，安藤　弘，久保喜一，長沢明道，
中尾順子，平賀興吾

Absorption, Distribution, Excretion and Placental transfer of Thiabendazole in Pregnant Mice : Effect of two kinds of vehicle

MASAKO YONEYAMA*, AKIO OGATA*, TAKASHI FUJII*, HISATOSHI MIKURIYA*, NORIO YANO*, HIROSHI TAKAHASHI*, KATSUHIRO YUZAWA*, HIROSHI ANDO*, YOSHIKAZU KUBO*, AKIMICHI NAGASAWA*, TOSHIKO NAKAO*and KOGO HIRAGA*

Keywords : 催奇性物質 Teratologen, 吸収 absorption, 分布 distribution, 排池 excretion, 胎盤通過 placental transfer, オリーブオイル olive oil, アラビアゴム Gum Arabic, 妊娠マウス pregnant mice

諸　論

食品添加物 Thiabendazole〔2-（4'- thiazolyl）benzimidazole〕（以下 TBZ と略す）は，かんきつ類，バナナの防カビ剤として許可され，又，家畜の駆虫剤としても広く使用されている．小縣らは[1-3]，マウスを用いた催奇形性試験でオリーブオイルに懸濁した TBZ 及びアラビアゴムに懸濁した TBZ を妊娠9日目のマウスに1回経口投与した場合，オリーブオイルに懸濁した TBZ が60－2,400 mg/kg で胎児奇形を示し，アラビアゴム懸濁 TBZ を同様に投与した試験（1,157－2,400mg/kg）では，外表奇形の発現はなく骨格癒合のわずかな増加傾向を示したことを報告している．今回，我々は，両懸濁液の催奇形性頻度の差が TBZ の生体への吸収量及び胎盤通過量の差ではないかと推測し，妊娠マウスを用いオリーブオイル及びアラビアゴムに懸濁した^{14}C－TBZ の吸収・分布・排池・胎盤通過を比較検討したので報告する．

実験材料と方法

（実験動物）　JCL：ICR マウス雌雄を日本クレア K.K より4週令時に購入し，8週令に達した発育良好なものを選び交配させた．交配方法は，雌雄1：1終夜同居により翌朝，膣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．妊娠9日目と16日目のマウスが実験に使用された．

（試薬）〔U-^{14}C〕- TBZ（Specific activity 4.68 m Ci/mmole）は，New England Nuclear から購入した．純度は，TLC 上で99％であった．^{14}C－TBZ とキャリアーとして催奇形を発現する量の TBZ をオリーブオイル及び0.5％アラビアゴム水溶液に懸濁し，1 μ Ci/40mg TBZ/mouse になるように調整した．

（臓器内分布と排泄）　上記，^{14}C－TBZ 懸濁液を各々，妊娠9日目のマウスに1回経口投与し，投与後，0.5，1，3，6，12，24，72，168時間目にエーテル麻酔下で心臓穿刺により血液を採取し，遠沈後，血漿を分離した．摘出臓器は，脳，肺，心，肝，腎，脾，脂肪，胃，小腸，盲腸，受胎産物，子宮，卵巣である．投与後，6，12，24，72，168時間目の動物は，個別に代謝ケージに入れ飼育した．168時間目の動物からは経時的に尿糞を採取した．動物数は，1群5匹とした．

（胎仔内移行）　^{14}C－TBZ 懸濁液を各々妊娠16日目のマウスに1回経口投与し，投与後，0.5，1，3時間目にエーテル麻酔下で心臓穿刺により血液を採取し，遠沈後，血漿を分離した．他に胎仔を摘出した．

（放射能の測定）　血液は，10 μl を soluene 350＋isopropanol（1＋1）0.5 ml に溶解させ，30％H_2O_2 0.2 ml を加え脱色し，Insta-Gel（Packard 社製）に溶解させた．血漿は，30 μl を Aquasol Ⅱ（NEN 社製）に溶解させた．脳，肺，心，肝，腎，胃，小腸，胎仔は，10％ホモジネイト液とし，一定量を Aquasol Ⅱ に溶解させた．脂肪は，石油エーテルでホモジナイズし，トルエン

* 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, 190 Japan

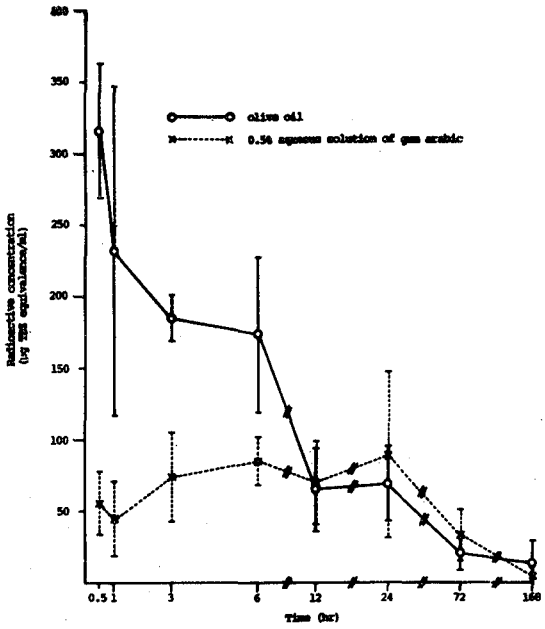


Fig.1. Radioactive concentration in blood after oral administration of ^{14}C–TBZ suspended in olive oil or 0.5% aqueous solution of gum arabic in mice on day 9 of gestation Plotted values are reprepented as mean ± S.D. of 5 mice per time point.

シンチレーターに溶解させた．脾，盲腸，受胎産物，子宮は soluene 350に溶解し，シンチレーターとして Dimilume–30（Packard 社製）を用いた．尿は，一定量を Aquasol Ⅱに溶解させた．糞は，乾燥後，粉砕し一定量をサンプルオキシダイザー（Beckman 社製）で燃焼させ発する$^{14}CO_2$を Carbosorb（Packard 社製）に吸収させ，Pharmaflow Ⅴ（Packard 社製）に混和させた．回収率は，肝のサンプルを用い液体シンチレーションカウンターで測定した値を100%とし補正した．（回収率99%）放射能活性は，液体シンチレーションカウンター（Beckman 社製）を用いて測定した．

結果と考察

オリーブオイルに懸濁した TBZ（TBZ–O）とアラビアゴムに懸濁した TBZ（TBZ–G）を各々経口投与した妊娠9日目マウスの吸収・臓器内分布・排泄及び TBZ の胎盤通過性を検討するために妊娠16日目マウスの胎仔への移行を比較検討した．

（血中濃度） Fig. 1. に示すように TBZ–O は，投与後，30分で最高濃度316 μg/m*l* を示し，投与した放射能に対する分布率は，2.1%であった．（Table 2）その後，12時間まですみやかに減少し168時間では最高濃度の約4%に減少し分布率も0.1%に減少した．TBZ–G は，TBZ–O に比べ吸収量が低く投与後，30分では56 μg/m*l* を示し，分布率も0.4%であり TBZ–O の約17%の濃度であった．TBZ–O が顕著な血中消失曲線を示し，投与後，1～12時間の血中濃度から求められた半減期は6.0 hr であったのに対し，TBZ–G は，投与後，24時間まで大きな変動は認められなかった．しかし，168時間には，投与後，30分の7%に減少し，分布率（Table 4）は0.03%に減少した．投与後，30分以内に TBZ–O が最高濃度を示し，分布率も高ったことは，懸濁液をオリーブオイルとした場合，消化管からの吸収は極めて高いものと考えられる．

（臓器内濃度） TBZ–O の臓器内濃度は，Table 1，分布率は，Table 2 に示した．血中濃度と同様にいづれの臓器も投与後，30分で最高濃度を示し，その後，胃を除く他の臓器は，12時間まですみやかに減少し12～168時間までの消失カーブはゆるやかであった．168時間の血液，脳，肺，心，腎に痕跡程度の放射能活性を認め，分布率は，血液の0.03%，肝の0.02%を除けば0.01%以下であった．TBZ–G については Table 3，Table 4 に示した．投与後，30分—24時間まで胃，小腸，盲腸を除いた臓器内濃度は，ほぼ変らなかったが168時間では肺に痕跡程度の放射活性を認めた他は，認められず分布率も0.01%以下であった．分布濃度も血液と同様 TBZ–O に比べ低かった．小羊を用いた TBZ の吸収・分布・排池の実験では，肝，腎，肺，大腸，小腸，筋に投与後，8日目で放射能活性の痕跡を認め，30日では放射能活性を検出することはできなかった[4]．他の動物（羊，ブタ，子牛）でも同じ報告[5]があり，168時間の脳，肺，心，腎のわずかな残留については更に長期にわたって検討する必要がある．臓器内への移行性は，投与後，30分で血中濃度より高い値を示すものが TBZ–O では，肺，心，肝，腎，脂肪，卵巣，TBZ–G では，肺，肝，腎，卵巣にみられ，肝，腎では約2倍（TBZ–O），約3倍（TBZ–G）の値を示していることから高いものと考えられる．各臓器における減少が血中の減少と同じ傾向を示し局在性は認められなかった．

（尿．糞への排泄） Table 5 に示した．TBZ–O では，投与後，2日目まで投与量の約94%が尿糞へ排泄され，その中，尿への約73%，糞へは約21%が排泄された．7日までの排泄率は97%であった．TBZ–G では，投与後，3日目まで投与量の78%が排泄され，尿への約60%，糞への18%，7日までの排泄率は，79%であった．これら

Table 1. Tissue distribution of radioactivity after oral administration of ^{14}C-TBZ suspended in olive in mice on day 9 of gestation

Tissue	Tissue concentration (μg TBZ equivalence/g Tissue)							
	0.5hr	1 hr	3 hr	6 hr	12hr	24hr	72hr	168hr
Blood	316± 47	232±115	185± 16	173± 54	65± 29	69± 26	20±11	13±16
Plasma	302± 58	199± 87	156± 30	139± 55	25± 14	26± 18	1± 1	N.D.
Brain	231± 49	145± 52	97± 16	86± 22	33± 10	32± 8	23± 4	22± 3
Lung	422±139	224± 88	186± 48	201± 27	81± 36	79± 27	38± 7	29± 7
Heart	333± 39	218± 92	151± 34	145± 36	62± 16	61± 24	74±45	25± 2
Liver	661± 82	526±196	373± 51	423± 93	148± 42	117± 40	34±15	4± 5
Kidney-R	786±160	519±127	448±129	602±310	163± 66	129± 44	18±12	2± 2
Kidney-L	774±181	550±156	491±136	512±371	158± 53	148± 45	46±11	24± 4
Spleen	278± 34	170± 83	113± 19	131± 48	29± 17	40± 16	22±18	5± 1
Fat	380± 73	292±164	153± 45	159± 95	24± 17	20± 12	6± 5	3± 1
Stomach	1807±719	1242±450	1006±460	1308±484	1307±608	1713±482	53±58	2± 2
Intestine	807±221	342±197	519±282	395±161	145± 60	89± 59	81±45	23± 4
Ceacum	222± 48	180±111	123± 24	206±138	117± 67	83± 37	16± 7	5± 1
Conceptus	240± 37	166± 68	121± 18	125± 36	37± 18	36± 20	6± 1	−
Uterus	317±126	255±228	132± 22	156± 33	39± 16	41± 20	7± 2	2± 1
Ovary	380±169	228±139	163± 66	163± 48	77± 29	47± 23	12±10	9± 2

Data are expressed as mean ± S.D. of 5 mice.
N. D. : not detectable

Table 2. Percent distribution of radioactivity after oral administration of ^{14}C-TBZ suspended in olive oil in mice on day 9 of gestation.

Tissue	% of dose							
	0.5hr	1 hr	3 hr	6 hr	12hr	24hr	72hr	168hr
Blood	2.17±0.35*	1.62±0.77	1.32±0.19	1.19±0.40	0.46±0.21	0.43±0.17	0.13±0.07	0.10±0.11
Brain	0.29±0.07	0.18±0.06	0.12±0.01	0.10±0.02	0.03±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01
Lung	0.19±0.07	0.09±0.03	0.07±0.01	0.09±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01	<0.01	<0.01
Heart	0.11±0.01	0.07±0.03	0.04±0.01	0.04±0.01	<0.01	<0.01	0.02±0.01	<0.01
Liver	3.14±0.30	2.46±0.95	1.89±0.36	2.01±0.06	0.73±0.23	0.53±0.15	0.17±0.06	0.01±0.02
Kidney-R	0.42±0.07	0.26±0.05	0.25±0.08	0.29±0.17	0.07±0.03	0.06±0.02	<0.01	<0.01
Kidney-L	0.39±0.08	0.27±0.07	0.26±0.08	0.22±0.17	0.07±0.02	0.06±0.01	<0.01	<0.01
Spleen	0.15±0.03	0.08±0.04	0.06±0.02	0.06±0.03	0.01±0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Fat	0.16±0.07	0.15±0.13	0.07±0.02	0.06±0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Stomach	1.15±0.36	0.80±0.28	0.65±0.32	0.83±0.31	0.84±0.37	1.04±0.30	0.02±0.03	<0.01
Intestine	0.32±0.14	0.13±0.11	0.26±0.18	0.25±0.13	0.06±0.03	0.04±0.03	0.02±0.01	<0.01
Ceacum	0.07±0.01	0.05±0.02	0.04±0.01	0.07±0.06	0.04±0.03	0.02±0.01	<0.01	<0.01
Conceptus	0.34±0.04	0.22±0.08	0.19±0.02	0.19±0.09	0.06±0.03	0.06±0.02	0.03±0.01	−
Uterus	0.22±0.08	0.18±0.14	0.01±0.01	0.10±0.03	0.02±0.01	0.02±0.01	<0.01	<0.01
Ovary	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

Data are expressed as mean ± S.D. of 5 mice.
*Blood volume is assumed to be 7.8% of body weight

Table 3. Tissue distribution of radioactivity after oral administration of ^{14}C-TBZ suspended in 0.5% aqueous solution of gum arabic in mice on day 9 of gestation

	Tissue concentration (μg TBZ equivalence/g Tissue)							
Tissue	0.5hr	1 hr	3 hr	6 hr	12hr	24hr	72hr	168hr
Blood	56± 22	45± 26	74± 31	85± 17	70± 29	89± 58	33±18	4±5
Plasma	35± 23	40± 35	52± 23	55± 11	39± 21	36± 46	1± 1	N.D.
Brain	35± 10	24± 13	52± 26	41± 15	23± 13	15± 21	N.D.	N.D.
Lung	103± 48	202± 93	111± 30	102± 19	63± 20	82± 48	35± 3	26±3
Heart	56± 15	50± 18	84± 27	91± 46	49± 21	39± 27	7± 4	N.D.
Liver	161± 65	165± 70	265± 90	194± 56	160± 33	141± 93	26± 7	4±3
Kidney-R	171± 42	131± 84	198± 80	191± 27	198± 79	208±188	15± 5	3±2
Kidney-L	156± 27	143± 73	184± 86	180± 32	189± 79	210±204	14± 6	3±2
Spleen	42± 15	38± 18	51± 19	53± 11	40± 15	37± 35	9± 3	5±1
Fat	56± 20	41± 21	30± 10	34± 9	16± 6	30±11	1± 1	1±1
Stomach	1354±247	1928±757	1757±1124	854± 86	646±245	433±222	5± 3	N.D.
Intestine	266±115	422±222	699± 378	391±195	194±110	122± 69	4± 6	N.D.
Ceacum	41± 9	60± 38	68± 32	144±116	166± 75	113± 61	8± 2	2±1
Conceptus	38± 13	38± 18	48± 17	54± 10	35± 11	38± 43	4± 1	—
Uterus	40± 8	42± 24	52± 19	57± 10	41± 14	49± 37	7± 2	2±1
Ovary	71± 55	57± 38	58± 24	77± 51	49± 17	36± 43	14±14	4±2

Data are expressed as mean ± S.D. of 5 mice.
N.D. : not detectable

Table 4. Percent distribution of radioactivity after oral administration of ^{14}C-TBZ suspended in 0.5% aqueous solution of gum arabic in mice on day 9 of gestation

	% of dose							
Tissue	0.5hr	1 hr	3 hr	6 hr	12hr	24hr	72hr	168hr
Blood	0.40±0.16*	0.31±0.18	0.52±0.21	0.61±0.14	0.49±0.20	0.62±0.40	0.24±0.13	0.03±0.04
Brain	0.04±0.01	0.03±0.01	0.06±0.03	0.05±0.01	0.02±0.01	0.01±0.02	N.D.	N.D.
Lung	0.04±0.02	0.09±0.05	0.04±0.01	0.04±0.01	0.02±0.01	0.03±0.02	<0.01	<0.01
Heart	<0.01	<0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	<0.01	<0.01	<0.01	N.D.
Liver	0.90±0.38	0.86±0.37	1.43±0.51	0.95±0.25	0.77±0.18	0.69±0.44	0.17±0.06	0.02±0.01
Kidney-R	0.09±0.03	0.06±0.04	0.10±0.04	0.09±0.01	0.09±0.04	0.10±0.01	<0.01	<0.01
Kidney-L	0.08±0.02	0.06±0.03	0.09±0.04	0.08±0.01	0.08±0.04	0.09±0.10	<0.01	<0.01
Spleen	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	<0.01	<0.01
Fat	0.02±0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Stomach	0.49±0.16	0.75±0.43	0.67±0.46	0.32±0.03	0.23±0.10	0.15±0.07	<0.01	N.D.
Intestine	0.19±0.17	0.28±0.14	0.52±0.19	0.30±0.15	0.15±0.11	0.09±0.05	<0.01	N.D.
Ceacum	<0.01	0.01±0.02	0.02±0.01	0.05±0.04	0.05±0.02	0.03±0.02	<0.01	<0.01
Conceptus	0.05±0.02	0.07±0.06	0.07±0.02	0.09±0.02	0.05±0.02	0.06±0.06	0.03±0.02	—
Uterus	0.02±0.01	0.02±0.01	0.03±0.01	0.04±0.01	0.02±0.01	0.03±0.03	<0.01	<0.01
Ovary	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

Data are expressed as mean ± S.D. of 5 mice.
N.D. : not detectable
*Blood volume is assumed to be 7.8% of body weight

Table 5. Excretion of total radioactivity in urine and feces after oral administration of ^{14}C-TBZ suspended in olive oil or 0.5% aqueous solution of gum arabic in mice on day 9 of gestation

	% of dose			
	Olive oil		Gum arabic	
Day	urine	feces	urine	feces
0 − 1	51.38±5.67	12.87±6.33	37.53±6.78	7.60±7.80
2	21.94±7.73	8.38±1.66	17.08±4.85	8.51±3.40
3	1.10±0.97	2.08±2.54	5.21±5.78	2.23±1.80
4	0.12±0.04	0.11±0.05	0.22±0.11	0.49±0.57
5	0.07±0.03	0.07±0.02	0.09±0.03	0.07±0.03
6	0.04±0.01	0.04±0.01	0.06±0.03	0.05±0.01
7	0.04±0.01	0.04±0.02	0.02±0.02	0.18±0.24

Data are expressed as mean ±S.D. of 5 mice.

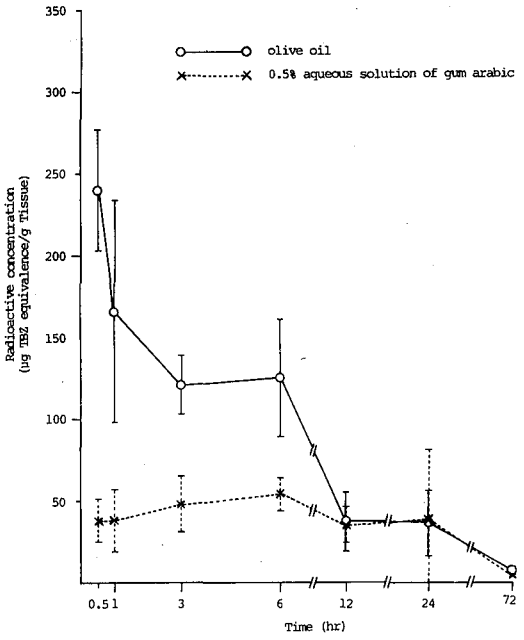


Fig.2. Radioactive concentration in conceptus after oral administration of ^{14}C-TBZ suspended in olive oil or 0.5% aqueous solution of gum arabic in mice on day 9 of gestation.
Plotted values are represented as mean ± S.D. of 5 mice per time point

のデータは，TBZの吸収と排泄が非常にはやいことを示し，血中の消失と相関関係を示している．更に，Tocco[4]らのTBZをゼラチンカプセルに封入し，子羊に経口投与し，48時間までの排泄率，尿へは73～77%，糞へは，13～16%のデータと一致している．

（受胎産物内濃度と胎仔内移行） Fig. 2に示すように受胎産物内濃度は，血中濃度と同様の傾向を示している．投与後，30分までのTBZ−Oの濃度は，240 μg/gを示し，その後，12時間まですみやかに減少し，72時間には最高濃度の2.5%，6 μg/g，分布率は，0.03%（Table 2）であった．TBZ−Gは，TBZ−Oに比べ低く，投与後30分では，TBZ−Oの約15%である38 μg/gを示し，24時間までは変動はみられなかったが72時間には，30分の10%，4 μg/gに減少し，分布率は0.03%（Table 4）であった．妊娠9日目マウスから摘出した受胎産物は，胎盤，胎仔，羊膜，羊水を含み受胎産物内の放射能濃度により胎盤通過の有無を検討することはできない．妊娠16日マウスより摘出した胎仔・母体血液中の放射能濃度をTable 6に示した．TBZ−O，TBZ−Gいづれも胎仔へ移行し，TBZ−Oにおける胎仔内濃度は，投与後，30分，1～3時間で113～170 μg/g，TBZ−Gは，46～73 μg/gでTBZ−OはTBZ−Gの約2.3～2.6倍の値を示している．母体血中濃度は，30分，1時間でTBZ−Oが433～503 μg/ml，TBZ−Gが261～270 μg/gでTBZ−Oが1.6～1.8倍の値を示している．3時間では，両者に差はみられなかった．マウスにおける薬物の胎盤通過量が妊娠の時期によって異なる[6]ことから妊娠9日目マウスに妊娠16日目マウスの胎仔への移行量を直接あてはめることはできないがTBZが胎盤を通過することは予測できる．器官形成期に投与したTBZ−OとTBZ−Gの投与初期における受胎産物内濃度差がTBZ−Oの催奇形発現を裏付ける一因と考えられる．

（本研究の概要は日本先天異常学会第23大会1983年7月で発表した．）

文 献

1) 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抄録集，1981

Table 6. Radioactive concentration in maternal blood and fetus after oral administration of ^{14}C–TBZ suspended in olive oil or 0.5% aqueous solution of gum arabic in mice on day 16 of gestation

	Tissue concentration (μg TBZ equiralence/g tissue)					
		Olive oil			Gum arabic	
Tissue	0.5hr	1.0hr	3.0hr	0.5hr	1.0hr	3.0hr
Blood	433.14±30.15*	503.08±82.63	261.48±58.08	261.48±58.08	270.18±40.30	257.71±11.67
Fetus	155.53±50.16	170.19± 9.46	113.54±38.83	71.41±18.97	73.55±14.65	46.60± 8.99

Data are expressed as mean ±S.D. of 5 mice.
*Blood volume is assumed to be 7.8% of body weight

2) 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
3) 小縣昭夫, 安藤 弘, 久保喜一, 平賀興吾：東京衛研年報, 33, 495, 1982
4) Tocco, J. D. : Journal of Medical Chemistry, 7, 399, 1964
5) Tocco, J. D., Egerlon, R. J., Bowers, W., Christenzen, V. W. and Rosenblum, C. : The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 140, 263, 1965
6) Stevens, W. M. and Harbison, D. R. : Teratology, 9, 317, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 343-353, 1983

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 異なった飼料で飼育されたJcl：ICRマウスでの比較

安藤　弘*，久保喜一*，小縣昭夫*，佐々木美枝子*，平賀興吾*

Teratological Studies of Thiabendazole (TBZ) in Mice : Compartive Teratogenicity Using Jcl : ICR Mice Fed Basal Diets Perchased from Three Different Mekers

HIROSHI ANDO*, YOSHIKAZU KUBO*, AKIO OGATA*, MIEKO SASAKI* 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

さきに，われわれは防かび剤チアベンダゾール（TBZ）の経口催奇形性作用を，オリーブ油にTBZを懸濁して投与したICRマウスにおいて見出した．この際TBZをアラビアゴム溶液に懸濁してICRマウスに経口投与しても催奇形作用は観察されなかった[1]．このことは懸濁媒体により，薬物の消化管からの吸収速度に相違のあることを示しているようである．

すなわちTBZの催奇形性には，その吸収速度が関係するらしいこと，マウスの飼育に用いている飼料の違いによりTBZの活性が左右されることが予想された．

そこで，今回はマウスの摂取する飼料がTBZの催奇形作用にどのように影響するかを観察することを企図した．

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系マウスを4週齢時で購入，8～18週齢（体重26～40 g）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±1°，湿度55±5％，照明午前6時～午後6時，換気毎時10回（HEPAフィルター経由）の飼育室にて，各々雄20匹，雌100匹にA社製実験飼料（以下Aと略す），B社製実験飼料（B）およびC社製実験飼料（C）を別々に与え，水道水と共に自由摂取させた．飼料A，B，C，はいずれも一般に用いられている飼育あるいは繁殖用の飼料で，滅菌のための特別な処理（高温・高圧，あるいは放射線照射など）は行っていない．動物は試験開始（交配）時までアルミケージ（225×325×110 mm，杉材チップ床敷）に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　各飼料別ごとに雌雄1：1終夜同居により，翌朝膣栓の認められたものを妊娠動物とみなし，この日を妊娠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，オリーブ油（日本薬局方，東豊薬品（株）社製，Lot No. 05 T 921）に懸濁して用いた．

5. 試料投与量および投与方法　TBZ 1,000 mg，500 mg，250 mgおよび0 mg（対照）/10 m*l*オリーブ油/kgを妊娠9日に1回強制経口投与した．

6. 観察方法　A，B，Cによる試験は並行的に行い，各飼料により飼育し，得られた妊娠マウスは各々4群に無作為に割り当てた．

体重測定および一般状態の観察を毎日行い，妊娠18日にエーテル麻酔下に屠殺し，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[2]を行い骨格異常の有無を調べた．

7. 結果のまとめ　西村の報告[3]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

* 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

の体重を100とした体重増加率の推移を飼料別に Fig. 1（A），2（B），3（C）に示す．飼料B，Cの1,000 mg 群およびCの500 mg 群で投与日以降屠殺時まで対照群に較べ有意な体重増加抑制を認め，特にCではTBZ用量に伴う体重増加抑制が認められた．

一般状態の観察ではAの250 mg 群およびCの1,000 mg に各々1例，投与後屠殺時までの死亡を認めた．

2）器官重量および剖検所見：器官重量は Table 1. に示す通りでAでは1,000 mg 群，肝臓の絶対重量が対照群に較べ有意に軽く，500 mg 群の脾臓と腎臓（左）の絶対重量および体重比重量が対照群に較べ有意に軽く，Bでは1,000mg 群，肝臓の絶対重量および体重比重量が対照群に較べ有意に軽く，Cでは1,000 mg 群，肝臓の体重比重量が対照群に較べ有意に軽かった．

またCでは肝臓重量，腎臓重量がAおよびBのそれに較べ絶対重量および体重比重量で対照群，投与群とも有意に軽であった．

重要器官の肉眼的所見ではA，B，Cとも投与群に対照群と較べ特記する変化を認めなかった．

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Aでは1,000 mg 群16/18（88.9%），500 mg 群16/18（88.9%），250 mg 群17/17（100%）および対照群15/17（88.2%），Bでは1,000mg 群18/19（94.7%），500 mg 群18/18（100%），250 mg 群18/18（100%）および対照群17/18（94.4%），Cでは1,000 mg 群12/16（75.0%），500 mg 群16/17（94.1%），250 mg 群15/16（93.8%）および対照群15/15（100%）で，Cの1,000 mg 群で妊娠率の低下を認めたが，推計学的に有意ではなかった．また，Aの1,000 mg 群に2例，500 mg 群に1例，全胎児死亡を認めたが，推計学的に有意ではなかった．（Table 2. ～4.）

2）妊娠黄体数，着床痕数，生児数，死亡児頻度（早・後期）：黄体数ではCの1,000 mg 群が対照群に較べ有意に少ない，着床痕数ではAの500 mg 群が有意に多い値を示した．死亡児頻度ではAの500 mg 群と250 mg 群が有意に低く，Bの1,000 mg 群およびCの1,000 mg 群と500 mg 群が有意に高かった．またCでは用量に関連した増加を認めた．なお Table 2.（A）の死亡児頻度

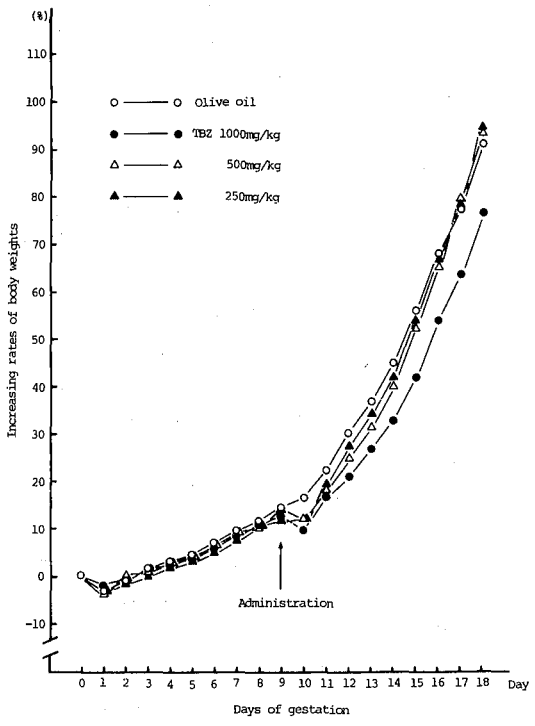


Fig.1. Increasing Rates of Body Weights after Administration of TBZ in Jcl : ICR Mice Fed Basal Diet (A)

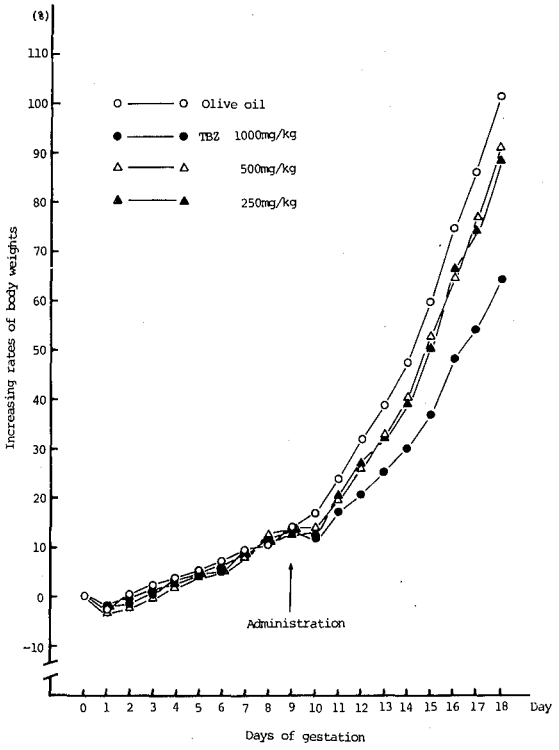


Fig.2. Increasing Rates of Body Weights after Administration of TBZ in Jcl : ICR Mice Fed Basal Diet (B)

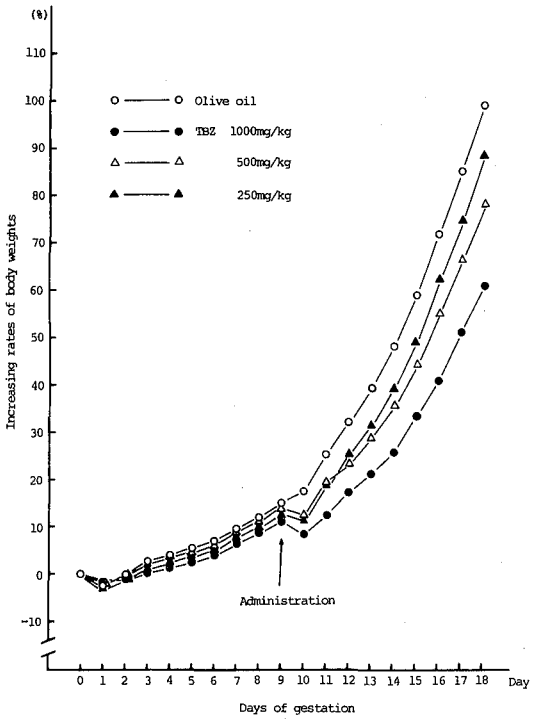


Fig.3. Increasing Rates of Body Weights after Administration of TBZ in Jcl : ICR Mice Fed Basal Diet (C)

には100%死亡胎児は含んでいないがそれを含めた早期死亡胎児頻度の値は1,000 mg 群で27.7±39.3%，500 mg 群で9.1±24.6%となり，1,000 mg 群は有意な増加とはならなかったが500 mg 群は対照群に較べ有意に低かった．今回Aで認められた対照群の10.8%という値は我々の実験室での過去に蓄積された値（5.0%前後）に較べ高いものであった．

3）生児体重および性比：生児体重は1,000 mg 群でA，B，Cの雌雄に，500 mg 群でA，Bの雌雄およびCの雌に，250 mg 群でA，Bの雄がそれぞれ対照群に較べ有意に小さく，Aの雌雄とBの雌に TBZ 用量に関連した体重の減少を認めた．またCの対照群はAのそれに較べ有意に小であった．

性比ではA，B，C共に TBZ 用量に関連した意味のある変動は認めなかった．

4）生児外表奇形・異常：奇形としてAの1,000 mg 群四肢減形成6例（母体数4），無尾および短尾1（1），開眼1（1），500 mg 群口蓋裂1（1），開眼2（1），250 mg 群口蓋裂3（2），開眼5（3），外脳1（1），対照群開眼2（1），Bの1,000 mg 群四肢減形成13（8），無尾および短尾5（2），多指1（1），肛門閉鎖1（1），口蓋裂2（2），500 mg 群開眼4（3），250 mg 群開眼1（1），対照群開眼1（1），Cの1,000 mg 群四肢減形成20（6），無尾および短尾7（2），多指1（1），肛門閉鎖1（1），口蓋裂4（1），開眼1（1），外脳3（2），500 mg 群四肢減形成1（1），開眼3（3），250 mg 群口蓋裂1（1），対照群開眼1（1）をそれぞれ認め，異常としてはAの500 mg 群反足1（1），対照群反足1（1），Bの1,000 mg 群反足1（1），曲尾2（2），250 mg 群反足2（2），対照群反足2（2），Cの1,000 mg 群曲尾12（3）がそれぞれ認められた（Table 2.～4.）．

Table 中に示した頻度（%）は各母体（Litter）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．それぞれの対照群に対してB，Cの1,000 mg 群での奇形児およびCの1,000 mg 群でのその他の異常胎児の発現頻度が推計学的に有意であった．また推計学的に有意ではなかったが，1,000 mg 群のBとCでは奇形児頻度がAに較べ高い値を示し，それは奇形児を有する母体数の頻度についてもいえた．

5）骨格奇形・変異・化骨進行度：Table 5. 6. 7. に示す通りでA，B，C各マウスの高濃度群に奇形の発生が高い頻度で認められ，その型と発現頻度（%）はA 1,000 mg 群で159例中椎弓癒合41，椎体癒合17，肋骨癒合6，橈骨欠損1，尺骨欠損2，32.9±31.9%，B 1,000 mg 群で158例中椎弓癒合32，椎体癒合14，肋骨癒合3，上腕骨と橈骨癒合1，尺骨欠損1，37.9±42.9%，500 mg 群で248例中椎弓癒合14，椎体癒合2，肋骨癒合3，6.2±8.7%，250 mg 群で229例中椎弓癒合7，椎体癒合1，肋骨癒合5，3.8±8.3%，C1,000 mg 群で110例中椎弓癒合31，椎体癒合17，肋骨癒合4，橈骨欠損1，尺骨欠損5，33.3±34.6%，500 mg 群で182例中椎弓癒合41，椎体癒合22，肋骨癒合12，27.0±33.2%で，それぞれ対照群と較べ推計学的に有意であった．また Table には示していないがAの1,000 mg 群で上腕骨と橈骨癒合2，上腕骨と尺骨癒合1，Bの1,000 mg 群で橈骨欠損3，脛骨欠損1，Cの1,000 mg 群で上腕骨と前腕骨癒合2，大腿骨欠損1，腓骨欠損3を認めた．奇形児を有した母体の頻度は，Aの1,000 mg 群78.6%（11/14），500 mg 群40.0%（6/15），250 mg 群29.4%（5/17），対照群13.3%（2/15），Bの1,000 mg 群66.7%（12/18），500 mg 群38.9%（7/18），250 mg 群27.8%（5/18），対照群5.9%（1/17），Cの1,000 mg 群66.7%（8/12），

Table 1. Data from Mice Fed Basal Diets (A, B and C) and Orally Treated with Thiabendazole (TBZ) on Day 9 of Gestation : Organ Weights of Mother Mice

Basal diets	Doses TBZ mg/kg	Number of dams	Liver g g/100g	Lung mg mg/100g	Heart mg mg/100g	Spleen mg mg/100g	Kidney(L) mg mg/100g	Kidney(R) mg mg/100g	Adrenal(L) mg mg/100g	Adrenal(R) mg mg/100g	Ovary(L) mg mg/100g	Ovary(R) mg mg/100g
A	1000mg/kg	14	3.0±0.2***	196.3±20.2[1]	149.4±15.7	138.3± 39.1	247.9± 21.0	252.9± 22.2	3.8±0.7	3.4±0.8	10.2± 2.2	11.3± 2.9
			9.4±0.9	605.6±68.3[2]	458.8±24.8	427.5±128.4	765.1± 73.7	780.3± 73.1	11.6±2.0	10.4±2.1	31.4± 5.8	34.8± 8.7
	500mg/kg	15	3.2±0.3	185.3±17.6	156.4±12.2	120.6± 23.8*	239.5± 24.0*	259.5± 28.1	3.8±0.8	3.8±0.9	9.3± 1.7	10.0± 2.8
			9.5±1.0	553.5±57.4	467.0±38.6	359.9± 74.0**	714.1± 65.1**	774.3± 82.3	11.4±2.6	11.5±3.0	27.7± 5.8	29.8± 7.5
	250mg/kg	17	3.2±0.3	186.5±15.1	156.2±14.2	135.6± 21.1	250.2± 21.2	255.4± 24.3	3.7±0.7	3.6±1.1	9.4± 3.2	11.2± 3.0
			9.8±0.9	571.9±31.5	480.2±48.6	417.9± 75.0	767.9± 53.1	784.8± 75.1	11.3±2.5	10.9±3.3	28.8± 9.4	34.4± 9.8
	Olive oil	15	3.1±0.3	184.5±12.7	148.8±19.3	150.8± 40.1	255.1± 15.3	265.8± 17.3	3.8±0.7	3.4±0.8	8.8± 2.8	11.2± 2.5
			9.5±1.1	572.4±39.0	462.2±62.0	469.1±129.2	791.6± 52.6	825.7± 69.5	11.7±2.1	10.5±2.6	27.4± 8.2	34.9± 7.7
B	1000mg/kg	18	3.0±0.3*	195.8±22.9	153.1±14.5	154.9± 60.4	261.1± 28.1	273.4± 25.0	4.3±0.8	3.8±0.9	9.2± 2.7	9.4± 2.7
			9.2±1.0*	602.6±60.2	471.5±40.1	476.0±177.6	803.5± 78.2	842.0± 68.6	13.1±2.3	11.7±3.0	28.3± 9.0	29.0± 8.3
	500mg/kg	18	3.3±0.4	199.8±20.8	155.5±15.6	129.4± 32.9	265.2± 31.9	275.6± 33.4	4.2±0.7	3.8±0.7	8.9± 3.5	9.9± 3.7
			9.8±1.2	601.1±62.3	467.1±39.5	387.4± 84.9	795.8± 75.9	827.6± 87.8	12.6±2.1	11.4±1.9	26.9±10.5	30.3±12.1
	250mg/kg	18	3.3±0.4	188.7±12.7	152.4±12.6	140.5± 35.9	268.2± 32.2	279.9± 30.9	4.0±0.8	3.8±0.7	9.7± 1.6	11.1± 2.8
			10.1±1.5	574.3±45.3	464.1±45.4	427.3±106.6	817.3±112.2	852.5±106.2	12.2±2.2	11.4±2.0	29.6± 4.9	33.8± 8.5
	Olive oil	17	3.3±0.4	189.0±19.9	158.2±18.0	138.8± 30.5	268.4± 25.2	286.2± 28.3	4.1±1.0	3.6±0.8	8.9± 2.3	10.5± 2.8
			10.0±1.0	579.2±45.7	484.3±31.9	425.7± 89.0	827.7± 68.0	877.1± 62.9	12.4±2.5	11.1±2.4	27.2± 6.4	32.5± 9.0
C	1000mg/kg	12	2.6±0.2	186.0±17.3	152.7±15.9	127.9± 21.0	215.7± 23.5	227.3± 24.1	4.0±0.8	3.8±1.2	8.6± 3.3	9.2± 3.8
			8.1±0.7*	572.0±51.1	469.0±41.0	393.1± 65.9	664.7± 81.4	698.4± 63.3	12.4±2.8	11.8±4.0	26.6±10.3	28.6±12.5
	500mg/kg	15	2.7±0.3	194.1±15.9	152.5±12.8	125.9± 21.3	217.3± 21.5	226.4± 22.4	4.0±0.9	3.3±0.9	8.5± 2.5	11.1± 3.3
			8.5±1.3	594.7±53.7	468.1±53.2	387.6± 78.5	666.5± 77.5	693.5± 72.5	12.3±3.7	10.3±3.1	25.9± 7.3	34.1± 9.8
	250mg/kg	15	2.6±0.3	181.3±14.6	146.2±17.2	136.8± 51.3	210.6± 25.9	222.1± 22.8	3.6±0.6	3.3±1.1	8.5± 2.5	9.9± 2.4
			8.5±0.8	584.9±30.5	472.6±56.3	436.9±140.6	678.6± 64.3	716.1± 56.6	11.8±2.4	10.7±3.2	27.2± 7.3	32.1± 7.8
	Olive oil	15	2.8±0.3	190.2±16.4	154.5±11.2	128.6± 23.1	221.6± 14.5	229.2± 16.4	3.9±1.2	3.2±0.6	9.3± 3.1	11.1± 2.5
			9.0±1.0	603.4±46.8	490.8±38.1	408.2± 72.7	704.7± 62.1	728.2± 58.6	12.6±4.0	10.1±1.9	29.1± 8.1	35.1± 0.7

1) Mean (absolute) ± SD
2) Mean (relative) ± SD
[Statistical analysis] t-test * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

Table 2. Data from Mice Fed Basal Diet (A) and Orally Treated with Thiabendazole (TBZ) on Day 9 of Gestation : Prenatal and External Observation

Doses	1000mg/kg	500mg/kg	250mg/kg	olive oil
Prenatal observation				
a) Number of female mice mated	18	18	18	17
b) Number of female mice died	0	0	1	0
c) Number of female mice gestated	16	16	17	15
d) Number of mother mice with live fetuses	14	15	17	15
e) Number of corpora lutea Mean ± SD	16.6± 1.7	17.0± 2.0	15.8± 3.3	15.9± 2.9
f) Number of implants Mean ± SD	14.2± 2.5	15.5± 1.9*	14.1± 2.7	12.9± 3.7
g) Percent resorption of fetuses ± SD#				
1) early	17.4±29.3	3.0± 4.2**	3.4± 5.2**	10.8± 8.3
2) late	1.6± 3.3	1.3± 2.7	1.9± 4.5	0
h) Number of live fetuses Mean ± SD	11.4± 4.4	14.7± 2.0*	13.4± 2.8	11.7± 3.9
i) Sex ratio (M/M+F) ×100±SD#	52.1±21.3	54.9±12.8	48.0±19.0	47.9±20.0
j) Body weights of live fetuses Mean ± SD#				
Male	1.33±0.10***	1.39±0.09**	1.43±0.11**	1.55±0.12
Female	1.26±0.08***	1.32±0.06***	1.36±0.12	1.45±0.08
External observation				
k) Number of fetuses examined	159	221	228	176
l) Malformation				
1) Percent malformation ± SD#	10.9±26.4	1.3± 3.9	3.9± 7.5	0.7± 2.9
2) Type & number of affected				
Reduction deformity of limbs	6	0	0	0
Non or short tail	1	0	0	0
Exencephalia	0	0	1	0
Cleft palate	0	1	3	0
Open eyelids	1	2	5	2
m) Other anomalies				
1) Percent anomalies ± SD#	0	0.8± 3.2	0	0.6± 2.3
2) Type & number of affected				
Club foot	0	1	0	1

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 dams with more than one living fetus. e)− j) Calculated with the dam (d) with living fetuses. g)−1) Cases showing implanted sites and amorphous germinal mass. g)−2) Cases showing the head and limbs. m) Directional anomalies of tail and limbs, hematoma, edema and others.

Value of group was obtained by averaging the numerals at the unit of each litter

[Statistical analysis] a)− d) : X^2−test e), f) : t−test g) : ranked sum test h) : t−test i) : ranked sum test j) : t−test l), m) : ranked sum test

* $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$

Table 3. Data from Mice Fed Basal Diet (B) and Orally Treated with Thiabendazole (TBZ) on Day 9 of Gestation : Prenatal and External Observation

Doses	1000mg/kg	500mg/kg	250mg/kg	olive oil
Prenatal observation				
a) Number of female mice mated	19	18	18	18
b) Number of female mice died	0	0	0	0
c) Number of female mice gestated	18	18	18	17
d) Number of mother mice with live fetuses	18	18	18	17
e) Number of corpora lutea Mean ± SD	16.6± 1.7	16.2± 2.1	16.2± 3.0	16.7± 2.3
f) Number of implants Mean ± SD	14.4± 3.7	14.9± 2.9	13.8± 4.3	15.3± 2.5
g) Percent resorption of fetuses ± SD#				
1) early	39.4±33.6***	5.0± 5.0	7.8±13.7	4.1± 5.7
2) late	0.9± 2.1	1.9± 3.2	3.2± 5.0	2.5± 4.3
h) Number of live fetuses Mean ± SD	8.8± 5.7***	13.8± 2.4	12.7± 4.5	14.4± 3.0
i) Sex ratio (M/M+F) ×100±SD#	50.3±26.8	46.3± 8.9	48.2±14.9	47.4±14.1
j) Body weights of live fetuses Mean ± SD#				
Male	1.29±0.10***	1.40±0.10*	1.36±0.07**	1.48±0.11
Female	1.24±0.12***	1.33±0.10*	1.35±0.16	1.40±0.12
External observation				
k) Number of fetuses examined	158	248	229	245
l) Malformation				
1) Percent malformation ± SD#	26.4±36.0**	1.5± 3.6	0.3± 1.5	0.4± 1.6
2) Type & number of affected				
Reduction deformity of limbs	13	0	0	0
Non or short tail	5	0	0	0
Poly-dactylia	1	0	0	0
Anal atresia	1	0	0	0
Cleft palate	2	0	0	0
Open eyelids	0	4	1	1
m) Other anomalies				
1) Percent anomalies ± SD#	1.5± 3.5	0	0.8± 2.4	0.8± 2.1
2) Type & number of affected				
Club foot	1	0	2	2
Kinky tail	2	0	0	0

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 dams with more than one living fetus. e) – j) Calculated with the dam (d) with living fetuses. g)–1) Cases showing implanted sites and amophous germinal mass. g)–2) Cases showing the head and lims. m) Directional anomalies of tail and limbs, hematoma, edema and others.

Value of group was obtained by averaging the numerals at the unit of each litter

[Statistical analysis] a)–d) : X^2–test e), f) : t–test g) : ranked sum test h) : t–test i) : ranked sum test j) : t–test l), m) : ranked sum test

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Table 4. Data from Mice Fed Basal Diet (C) and Orally Treated with Thiabendazole (TBZ) on Day 9 of Gestation : Prenatal and External Observation

Doses	1000mg/kg	500mg/kg	250mg/kg	olive oil
Prenatal observation				
a) Number of female mice mated	17	17	16	15
b) Number of female mice died	1	0	0	0
c) Number of female mice gestated	12	16	15	15
d) Number of mother mice with live fetuses	12	16	15	15
e) Number of corpora lutea Mean ± SD	14.7± 2.3*	16.3± 2.5	15.1± 2.4	16.9± 3.0
f) Number of implants Mean ± SD	13.5± 1.9	13.3± 3.7	13.3± 3.1	14.7± 2.1
g) Percent resorption of fetuses ± SD#				
1) early	31.3±24.2***	13.2± 9.6*	8.5±12.7	5.3± 6.1
2) late	1.3± 3.1	1.2± 3.4	1.0± 2.7	1.8± 3.0
h) Number of live fetuses Mean ± SD	9.2± 3.7***	11.5± 3.5	12.3± 3.7	13.7± 2.3
i) Sex ratio (M/M+F) ×100±SD#	49.1±25.3	50.4±12.6	45.7±23.1	51.8±13.8
j) Body weights of live fetuses Mean ± SD#				
Male	1.28±0.13**	1.37±0.14	1.35±0.10	1.44±0.10
Female	1.22±0.14**	1.30±0.12*	1.43±0.13	1.39±0.11
External observation				
k) Number of fetuses examined	110	182	184	205
l) Malformation				
1) Percent malformation ± SD#	25.6±29.4***	2.2± 4.0	0.4± 1.7	0.6± 2.1
2) Type & number of affected				
Reduction deformity of limbs	20	1	0	0
Non or short tail	7	0	0	0
Anal atresia	1	0	0	0
Poly-dactylia	1	0	0	0
Exencephalia	3	0	0	0
Cleft palate	4	0	1	0
Open eyelids	1	3	0	1
m) Other anomalies				
1) Percent anomalies ± SD#	10.2±21.4*	0	0	0
2) Type & number of affected				
Kinky tail	12	0	0	0

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 dams with more than one living fetus. e)− j) Calculated with the dam (d) with living fetuses. g)−1) Cases showing implanted sites and amorphous germinal mass. g)−2) Cases showing the head and limbs. m) Directional anomalies of tail and limbs, hematoma, edema and others.

Value of group was obtained by averaging the numerals at the unit of each litter

[Statistical analysis] a)− d) : X^2−test e), f) : t−test g) : ranked sum test h) : t−test i) : ranked sum test j) : t−test l), m) : ranked sum test

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Table 5. Data from Mice Fed Basal Diet (A) and Orally Treated with Thiabendazole (TBZ) on Day 9 of Gestation : Skeletal Observation

Doses	1000mg/kg	500mg/kg	250mg/kg	olive oil
a) Number of fetuses examined	159	221	228	176
b) Malformation				
1) Percent malformation ± SD#	32.9±31.9***	9.7±20.6	9.7±22.2	1.0± 2.6
2) Type & number of fetuses affected				
Fusion of vertebral arches	41	20	13	1
Fusion of vertebral body	17	10	6	0
Fusion of ribs	6	4	8	1
Lack of radius	1	0	0	0
Lack of ulna	2	0	0	0
c) Variation				
Type & percent variation ± SD#				
1) Asymmetry of sternebrae	11.2±10.1	16.0±14.0	15.4±11.6	11.5±14.1
2) Accessory of sternebrae	6.0±11.9	4.5± 4.0	8.8±13.7	6.5± 8.1
3) Cervical rib	6.9±13.2	8.1± 5.3	18.7±26.0	10.3±12.3
4) 14th rib	17.7±23.4	6.9±11.4**	13.8±13.9*	34.2±25.8
5) Splitting & branching of atlas & axis	24.9±28.9	19.1±19.7	29.3±26.6	24.3±21.6
6) Abnomalities in number of pre–sacral vertebrae	14.9±28.9	1.9± 7.4	5.8± 9.0	1.1± 2.8
7) Separation or defective development of sternebrae	5.1± 9.1	4.0± 6.7	5.6± 8.8	1.7± 5.3
d) Ossification#				
1) Mean number of ossified fore limb phalanx ± SD [(Pro. + Mid.)/2]				
L	2.9± 0.4	3.0± 0.4	2.9± 0.5	2.8± 0.4
R	3.0± 0.4	3.0± 0.4	3.0± 0.5	2.9± 0.5
2) Mean number of ossified hind limb phalanx ± SD [(Pro. + Mid.)/2]				
L	2.2± 0.8**	2.7± 0.4*	2.7± 0.5*	3.1± 0.7
R	2.5± 0.5**	2.7± 0.4*	2.7± 0.5*	3.2± 0.6
3) Mean number of ossified post lumber vertebrae ± SD	11.7± 1.3***	12.7± 1.1**	12.9± 1.4**	14.5± 1.7

c)−1) Cases showing deviation over 1/2 of length of maximum sternal nucleous between left and right nuclei. c)−4) Definition of lumber 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 lumber vertebrae.
d)−3) Sum of numbers of ossificated sacral and coccygeal vertebrae.
Value of group was obtained by averaging the value of each litter
[Statistical analysis] b)−1) : ranked sum test c) : ranked sum test d) : t−test
* $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$

500 mg 群50.0% (8/16), 250 mg 群26.7% (4/15), 対照群6.7% (1/15) でA, B, C, の1,000 mg 群および B, Cの500 mg 群が各対照群に較べ推計学的に有意な増加であった. またA, B, Cとも奇形児頻度および奇形児を有した母体の頻度に TBZ 用量に関連した増加を認めた.

変異を有するものの発現頻度はそれぞれの対照群に較べAで500 mg 群と250 mg 群の腰肋が有意に低く, Bで

Table 6. Data from Mice Fed Basal Diet (B) and Orally Treated with Thiabendazole (TBZ) on Day 9 of Gestation : Skeletal Observation

Doses	1000mg/kg	500mg/kg	250mg/kg	olive oil
a) Number of fetuses examined	158	248	229	245
b) Malformation				
1) Percent malformation ± SD#	37.9±42.9***	6.2± 8.7**	3.8± 8.3*	0.4± 1.7
2) Type & number of fetuses affected				
Fusion of vertebral arches	32	14	7	1
Fusion of vertebral body	14	2	1	0
Fusion of ribs	3	3	5	0
Fusion of humerus & radius	1	0	0	0
Lack of radius	1	0	0	0
c) Variation				
Type & percent variation ± SD#				
1) Asymmetry of sternebrae	27.0±27.4	9.4± 8.9	12.2± 9.5	10.0± 8.8
2) Accessory of sternebrae	2.7± 5.3	5.0± 9.4	8.7±24.2	6.4± 8.9
3) Cervical rib	18.2±27.2	9.3±12.0	17.1±16.6	20.3±23.8
4) 14th rib	13.6±20.6	14.1±16.9	27.0±31.4	15.4±19.4
5) Splitting & branching of atlas & axis	12.3±15.2	17.4±13.6	20.6±22.2	13.7±12.8
6) Abnomalities in number of pre–sacral vertebrae	19.4±31.8*	3.7±11.9	0.7± 2.9	0.7± 2.0
7) Separation or defective development of sternebrae	19.0±27.6	3.6± 6.5	4.7± 6.6	4.6± 6.4
d) Ossification#				
1) Mean number of ossified fore limb phalanx ± SD [(Pro. + Mid.)/2]				
L	2.9± 0.7*	3.4± 0.3	3.0± 0.3*	3.4±0.4
R	3.0± 0.7*	3.5± 0.3	3.1± 0.4*	3.5± 0.4
2) Mean number of ossified hind limb phalanx ± SD [(Pro. + Mid.)/2]				
L	2.2± 0.5***	3.0± 0.6	2.7± 0.6*	3.1± 0.6
R	2.5± 0.7*	3.1± 0.6	2.7± 0.6*	3.2± 0.6
3) Mean number of ossified post lumber vertebrae ± SD	11.9± 1.1*	13.2± 1.4	12.8± 1.8	13.1± 1.5

c)−1) Cases showing deviation over 1/2 of length of maximum sternal nucleous between left and right nuclei. c)−4) Definition of lumber 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 lumber vertebrae.
d)−3) Sum of numbers of ossificated sacral and coccygeal vertebrae.
Value of group was obtained by averaging the value of each litter
[Statistical analysis] b)−1) : ranked sum test c) : ranked sum test d) : t−test
* $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$

1,000 mg 群の仙椎前椎骨数異常が有意に高く，Cで1,000 mg 群の仙椎前椎骨数異常，胸骨核縮小・分裂が有意に高く，500 mg 群の胸骨核不対称，仙椎前椎骨数異常，胸骨核縮小・分裂が有意に高く，250 mg 群の胸骨核縮小・分裂が有意に高かった（Table 5.～7.）．またCの仙椎前椎骨数異常，胸骨核縮小・分裂，第1・2頸椎の分裂・分岐ではTBZ用量に関連した増加がみられた．

Table 7. Data from Mice Fed Basal Diet (C) and Orally Treated with Thiabendazole (TBZ) on Day 9 of Gesnation : Skeletal Observation

Doses	1000mg/kg	500mg/kg	250mg/kg	olive oil
a) Number of fetuses examined	110	182	184	206
b) Malformation				
1) Percent malformation ± SD#	33.3±34.6***	27.0±33.2*	9.2±17.7	0.4± 1.4
2) Type & number of fetuses affected				
Fusion of vertebral arches	31	41	15	0
Fusion of vertebral body	17	22	15	1
Fusion of ribs	4	12	5	0
Lack of radius	1	0	0	0
Lack of ulna	5	0	0	0
c) Variation				
Type & percent variation ± SD#				
1) Asymmetry of sternebrae	25.0±26.6	21.4±14.3**	5.9± 5.4	6.1± 6.7
2) Accessory of sternebrae	5.6± 9.4	11.1±18.0	8.1±10.3	8.1± 9.3
3) Cervical rib	15.5±28.6	16.3±15.5	11.5±17.0	16.0±13.5
4) 14th rib	11.4±17.8	16.8±18.7	27.5±25.7	17.2±24.2
5) Splitting & branching of atlas & axis	24.1±24.5	19.6±15.7	17.0±15.8	16.4±13.8
6) Abnormalities in number of pre-sacral vertebrae	20.8±30.9**	5.8± 8.6**	5.0±14.8	0
7) Separation or defective development of sternebrae	13.5±15.8***	8.9±15.4*	4.9± 7.6*	0.5± 2.0
d) Ossification#				
1) Mean number of ossified fore limb phalanx ± SD [(Pro. + Mid.)/2]				
L	2.8± 0.5	3.0± 0.5	3.1± 0.5	3.0± 0.5
R	2.9± 0.4	3.1± 0.5	3.1± 0.5	3.0± 0.5
2) Mean number of ossified hind limb phalanx ± SD [(Pro. + Mid.)/2]				
L	2.1± 0.7**	2.7± 0.7	2.8± 0.7	3.0± 0.6
R	2.2± 0.5**	2.8± 0.7	2.8± 0.8	3.0± 0.6
3) Mean number of ossified post lumber vertebrae SD	11.4± 1.3**	12.9± 1.7	13.4± 1.9	13.3± 1.6

c)−1) Cases showing deviation over 1/2 of length of maximum sternal nucleous between left and right nuclei. c)−4) Definition of lumber 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 lumber vertebrae.
d)−3) Sum of numbers of ossificated sacral and coccygeal vertebrae.
Value of group was obtained by averaging the value of each litter
[Statistical analysis] b)−1) : ranked sum test c) : ranked sum test d) : t−test
* $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$

化骨進行度では前肢指骨平均化骨数でBの1,000 mg群，250 mg群の左右が有意に少なく，後肢指骨平均化骨数でAの1,000 mg群，500 mg群，250 mg群，Bの1,000 mg群，250 mg群，Cの1,000 mg群でそれぞれ左右が有意に少なく，腰椎後椎骨平均化骨数ではAの1,000 mg群，500 mg群，250 mg群，Bの1,000 mg群，Cの1,000 mg群がそれぞれ有意に少なかった（Table 5.～7.）.

またCの後肢指骨平均化骨数ではTBZの用量に関連した減少を認めた.

以上，本試験ではA，B，C 3つの飼料を別々に摂取させてTBZを投与したJcl : ICRマウスにおける催奇形作用の比較を行った．B，CのTBZ 1,000 mg/kg投与群では，Aのそれに較べ有意性はないが高い頻度で外表奇形児の発現を認め，また500 mg群ではA，Bに出現しなかった四肢減形成奇形児がCでは1例であるがみられた.

骨格奇形ではA，B，Cとも1,000 mg群に同程度の高い値を示したが，Cでは500 mg群でもA，Bのそれに較べるとはるかに高い発現頻度であった.

しかし飼料A，B，Cはいずれも一般に用いられている飼料であり，その成分に大差はない．一般成分としては，水分7～8％，粗蛋白質21～28％，粗脂肪4～6％，粗線維3～5％，粗灰分6～8％，可溶性無窒素物50～60％が含まれており，100 gあたりのカロリーは345～376である．三飼料とも必須アミノ酸が適当量含まれているが，飼料Cのみアスパラギン酸，グルタミン酸，セリン，プロリン，アラニンが検出されていない．ビタミンについては，飼料B，CにはビタミンKが添加されており，また無機成分については，飼料BにAlおよびSiO_2が加えられていること以外に顕著な差はない．これら飼料成分の含有量の差が各試験結果の有意差となってあらわれたのかもしれないが，ひとつひとつの原因となる物質が何であるかは，分析された成分以外にもこれらを構成する原料の種類やその加工方法などについても考慮しなければならず，この実験のみでは解明できなかった.

要　旨

チアベンダゾール（TBZ）の催奇形性を3つの異った飼料で飼育したJcl : ICRマウスにより比較した．TBZは妊娠9日1回，1,000 mg，500 mg，250 mg/kgを経口投与し妊娠18日の胎児の外表・骨格の奇形・異常を検索した.

飼料A，B，Cとも四肢減形成奇形・骨格奇形の出現を認めたが，特にCでは体重増加率，死亡児頻度，化骨進行度，骨格変異等にTBZ用量に伴う増減が認められ，A，Bに較べTBZの影響が強いように考えられた.

文　献

1) 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学術集会記録，先天異常，21，315，1981

2) Dawson, A. B. : *Stain Tech.*, 1, 123, 1927

3) 西村秀雄：先天異常，16，175，1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 354-356, 1983

ICRマウスにおけるチアベンダゾール（TBZ）の優性致死試験

小縣昭夫*, 安藤　弘*, 久保喜一*
藤井　孝*, 佐々木美枝子*, 平賀興吾*

Dominant Lethal Study of Thiabendazole (TBZ) in ICR Mice

AKIO OGATA*, HIROSHI ANDO*, YOSHIKAZU KUBO*
TAKASHI FUJII*, MIEKO SASAKI* and KOGO HIRAGA*

Keywords: チアベンダゾール thiabendazole, 食品添加物 food additive, 殺虫剤 pesticide, 駆虫薬 anthelmintic, 防かび剤 fungicide, マウス mouse, 優性致死 dominant lethal

はじめに

防かび剤，チアベンダゾール（TBZ）の優性致死作用については，寺本ら[1]が，マウスにTBZ200mgおよび600mg/kg/dayを5％アラビアゴム溶液に懸濁，5日連続経口投与した優性致死試験で陰性の結果を報告している．我々はマウスを用いたTBZの催奇形性試験で，TBZをオリーブ油に懸濁，妊娠マウスに経口投与した時，有意に奇形児の発現することを認めたが，TBZを0.5％アラビアゴム水溶液に懸濁，妊娠マウスに経口投与した試験では奇形児出現は陰性であることを報告[2]した．この投与溶液の違いが優性致死試験においても考えられたため，今回，TBZをオリーブ油に懸濁し，1回投与ではあるが寺本らが用いた量より大量の投与群を設け，優性致死試験を行なったので，その結果を報告する．

試験材料ならびに方法

1. 実験動物：Jcl：ICRマウス（日本クレア㈱）を用いた．雄は4週齢時に購入，8週齢に達した発育良好なものを試験に供した．雌は雄の購入時および3週間後の2回に分けて4週齢で購入，8週齢より交配に用いた．従って雌の交配時週齢は8～10週齢となる．

2. 飼育条件：温度25±1°，湿度55±5％，照明午前6時～午後6時，換気毎時10回（HEPAフイルター経由）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，杉材チップ床敷）に10匹，交配後はプラスチックケージ（180×325×110mm）にて1匹飼いとした．

3. 交配方法：雌雄1：1を4日間同居させ，その間毎朝膣栓の確認を行なった．膣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．また4日間膣栓の確認されなかった動物は，交配最終日後プラスチックケージに1匹飼いとし，解剖日に屠殺剖検し，妊娠の有無を確めた．この交配は6回（週）にわたってくり返し行なった．

4. 試料：チアベンダゾール（TBZ）はMerck Sharp & Dohme International製Lot No. BZA-539，純度98.5％を使用した．TBZはオリーブ油（日本薬局方，東豊薬品㈱Lot No. 05T921）に懸濁し投与した．

5. 投与量および投与方法：投与量の決定には，投与翌日の雄の交尾が可能な量を最高用量とした．雄マウス各20匹にTBZ 1000mg，500mg，250mgおよび0mg（対照）/10m*l*オリーブ油/kgを第1回（週）目の交配前日1回経口投与した．また精巣の病理組織学的検索に供する別の雄マウス各30匹にTBZ 1000mg，250mgおよび0mg/10m*l*オリーブ油/kgを同日に1回経口投与した．

6. 観察方法：妊娠12，13の母獣を頸椎脱臼により屠殺開腹し，卵巣と子宮を摘出した．卵巣については黄体数を，子宮については着床数，生存胎児数，早・後期死胚数を調べ，常法[3-5]に従い統計処理した．病理組織学的検索に供する雄マウスは，投与後の各交配時と一致して，夫々5匹ずつ屠殺を行ない，精巣を摘出し，重量測定後，中性緩衝ホルマリンにて固定した．固定後定法に従ってパラフィン切片を作製，ヘマトキシリン・エオジン重染色を施し鏡検した．

* 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

Table 1. Data from female mice mated with male mice dosed orally with thiabendazole

	TBZ mg/kg	No. of male mice uttlized for mating	No. of female mice mated	No. of pregnant mice	No. of corpora lutea Mean±SD	No. of implants Mean±SD	No. of pre-implants loss Mean±SD	No. of live fetuses Mean±SD	No. of late embryo death Mean±SD	No. of early embryo death Mean±SD	Induced dominant lethality(%)* J	J′
	1000	19[1]	18	14	17.0±2.3	16.1±2.0	0.8±1.0	15.9±2.2	0.1±0.4	0.1±0.3	2.1	−6.1
1	500	20	20	20	15.7±2.0	14.2±2.5	1.6±2.2	13.5±2.9	0.4±0.5	0.4±0.7	−6.8	−2.2
W	250	20	20	19	17.0±2.1	15.5±2.1	1.5±2.0	14.9±2.2	0.3±0.5	0.3±0.7	−12.7	−3.5
	Cont.	20	20	18	15.9±1.9	15.1±1.7	0.9±1.3	14.0±1.7	0.6±0.7	0.4±0.8	0	0
	1000	19[1]	19	18	16.5±2.1	15.6±2.2	0.9±1.3	14.6±2.4	0.6±0.8	0.4±0.5	−3.7	2.2
2	500	20	20	19	15.3±2.0	13.9±2.7	1.4±1.9	13.2±3.3	0.4±0.8	0.4±0.6	5.6	1.0
W	250	20	20	19	16.5±2.7	14.9±3.2	1.6±1.8	14.4±3.3	0.4±0.8	0.2±0.4	−2.6	−0.8
	Cont.	20	20	19	16.3±2.3	14.6±2.9	1.7±2.2	14.0±3.3	0.5±1.4	0.2±0.4	0	0
	1000	19[1]	19	18	16.6±2.0	14.8±3.7	1.8±2.9	14.2±4.0	0.4±0.6	0.2±0.7	5.5	−1.3
3	500	20	20	20	16.5±2.5	15.1±2.3	1.4±1.5	14.5±2.5	0.3±0.4	0.4±0.7	−1.8	−1.4
W	250	20	20	20	15.8±3.8	14.2±4.3	1.7±2.1	13.3±4.3	0.5±0.8	0.4±0.7	6.3	0.7
	Cont.	20	20	20	16.5±1.9	15.0±2.1	1.5±2.0	14.2±2.3	0.6±0.7	0.3±0.6	0	0
	1000	19[1]	18	17	16.2±2.1	14.1±4.5	2.1±3.1	13.3±4.7	0.2±0.4	0.6±1.1	11.9	0.9
4	500	20	20	17	17.5±3.1	15.4±2.9	2.1±2.1	14.6±2.8	0.4±0.6	0.4±0.8	12.6	−0.1
W	250	20	20	16	17.3±2.2	16.8±2.1	0.4±0.6	16.1±2.1	0.5±0.6	0.3±0.4	9.8	−0.6
	Cont.	20	20	19	16.2±1.7	15.8±1.7	0.4±0.9	15.0±1.6	0.4±0.6	0.4±0.7	0	0
	1000	19[1]	19	17	15.5±1.5	14.6±1.8	0.9±1.3	14.1±2.0	0.1±0.3	0.5±0.7	6.5	−0.6
5	500	20	20	19	16.2±2.2	15.4±2.2	0.7±1.3	14.5±2.6	0.3±0.6	0.6±0.7	−2.6	1.3
W	250	20	20	20	15.8±1.6	15.2±1.4	0.6±1.3	14.6±1.6	0.3±0.4	0.4±0.6	−8.2	−0.4
	Cont.	20	20	19	16.3±1.7	14.8±2.5	1.4±2.4	14.2±2.4	0.3±0.5	0.4±0.5	0	0
	1000	19[1]	19	18	16.9±1.8	16.1±1.7	0.8±1.0	15.3±1.8	0.6±0.8	0.2±0.4	0.5	0
6	500	20	20	19	17.4±3.0	15.1±3.8	2.3±3.1	14.3±3.9	0.4±0.6	0.4±1.2	6.9	1.0
W	250	20	20	20	16.3±1.8	14.9±2.5	1.5±2.0	14.5±2.6	0.1±0.3	0.3±0.6	0.7	−2.0
	Cont.	20	20	20	16.3±1.7	15.3±2.3	1.0±1.4	14.6±2.3	0.5±0.7	0.2±0.5	0	0

1) one male mouse died before first mating

*J=[1−(No. of live fetuses/mouse mated)(treatment)/(No. of live fetuses/mouse mated)(control)]×100

J′=[1−(No. of live fetuses/total implants)(treatment)/(No. of live fetuses/total implants)(control)]×100

結果および考察

結果を表1に示した．TBZ 1000mg/kg 投与群で，投与翌日の交配前1例に死亡を認めた．第1週および第4週交配の1000mg投与群に夫々1例，同居4日の間に交配しない雄が認められた以外は，すべての動物が4日の間に交配した．第1週に交配しなかった雄マウス1例は第2週以後では交配が成立し，交配した雌の黄体数，着床数，生児数および早・後期死胚数は同処理群内で顕著な変動はみられなかった．しかし第4週に交配が成立しなかった雄マウスは，他の週では交配はしたものの，5回交配した雌のすべてに着床を認めなかった．1000mg投与群の第1週および250mg投与群の第4週に妊娠を認めない雌が多かったが推計学的有意性はなかった．その他のすべての群の交配数および妊娠数で，処置群と対照群との間に差を認めなかった．黄体数，着床数，未着床数，生存胎児数では，処置群に対照群と較べ，推計学的に有意な増減はみられなかったが，第4週1000mgおよび500mg 群の着床数および未着床数でやや減および増，1000mg群生存胎児数でやや減の値を示した．優性致死現象の重要な指標となる早期死胚数では，対照群に較べ，処置群での有意なまた用量に関連した増加はみられなかった．しかし Röhrborn の提示[3] した2式（J および J′（表1注））で誘発優性致死率を求めたところ，第4週の1000mg および500mg 投与群の J 値がやや高い値（夫々11.9%，12.6%）を示し，TBZ 処置群での末受精卵あるいは未着床卵増加の傾向がうかがわれた．

病理組織学的検索に供した雄マウスの処置群での精巣重量では，対照群と較べ有意な変動はみられなかった．精巣の病理組織学的検索では，精細胞の変化が局所性に認められた．変化は精母細胞では細胞質がエオジン好染性を増し，空胞がみられ，核は不整な円形，長円形，腎形となり，均質無構造で濃染していた．精娘ないし精子細胞ではエオジン好染細胞質と濃染核とが認められた．これらの変化は精巣の縦断面で観察したもので，対照群，250mg 群でも全視野で1～3個の精細管にみられたが，1000mg 群では変化を示す細胞数および精細管数が増加していた．1000mg 群は第1～3，第5，6週では極く軽度な増加であったが，第4週では全視野中7～13個の精細管で変化がみられ，多核巨細胞化した精細胞も散見されるなどの像を呈した．1000mg 群の精巣での組織学的変化は，精細胞の軽度な退行性変性であり，とくに第4週では巨細胞が出現しており，変化が精巣の萎縮へ向うことを示唆したものと考えられる．

TBZ と同じ benzimidazole 化合物の1つである benomyl の200mg および400mg/kg/day をコーンオイルに懸濁し，雄ラットに10日間経口投与した時の生殖機構に対する影響を調べた実験で，精子数の減少，精巣の損傷を認めた Carter ら[6] の報告を考慮すると，本試験でみられた第4週での誘発優性致死率の値には，見かけ上の優性致死作用も考えられるため，今後さらに検討を加え，TBZ の優性致死作用の有無を明らかにしたい．

要　旨

チアベンダゾール（TBZ）をオリーブ油に懸濁，1回経口投与での Jcl：ICR マウスに対する優性致死誘発性を検討した．交配率，妊娠率，黄体数，着床数，未着床数，生存胎児数，早・後期死胚数のいずれにも有意な減少あるいは増加がみられなかった．しかし，第4週での誘発優性致死率が，未受精卵および未着床卵の増加をうかがわせるやや大きい値を示し，同時に検索した精巣の病理組織学的所見でも，精細胞の軽度な退行性変性を示しているなどの点から，この時期について改めて検討する必要があると考えられた．

文　献

1) 寺本昭二，白須泰彦，森谷正明，寺塚英夫：第5回毒作用研究会発表抄録集，1978
2) 小縣昭夫，安藤　弘，久保喜一，高橋　博，平賀興吾：先天異常　21，315，1981
3) Röhrborn，G：*Chemical Mutagenesis in Mammals and Man*, ed. by Vogel, F. and G. Röhrborn, Chapt. 4，148，1970 Spring-Verlag，Berlin
4) 田島弥太郎，吉田俊秀，賀田恒夫編：化学物質の突然変異検出法，講談社サイエンティフィク，1973
5) 高野喜一，菊池康基，飯島貞二，土川　清：薬物の特殊毒性－1，胎児毒性と遺伝毒性：南江堂，1975
6) Carter，S. D.，Laskey，J. W.：*Toxicology Letters*, 11，87，1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 357-359, 1983

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）のマウス肺傷害に対するアミノ酸の効果

中川好男*, 中尾順子*, 平賀興吾*

Effects of Amino Acids on Butylated Hydroxytoluene (BHT) —Induced Pulmonary Injury in Mice

YOSHIO NAKAGAWA*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

Keywords: ジブチルヒドロキシトルエン butylated hydroxytoluene, マウス mouse, 肺傷害 pulmonary injury, アミノ酸 amino acids

ジブチルヒドロキシトルエン（3.5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene：BHT）は加工食品及び石油製品等の酸化防止剤として広く利用されている．低濃度のBHTはマウスに対して特異的な組織傷害や異常を生じさせなかった[1]．しかし短期多量投与のBHTはマウス肺に対して組織の肥大や増殖を伴った傷害を惹起させた[2,3]．この発現機序は今だ明らかにされていないが，その原因のひとつとしてBHTの代謝活性中間体と組織成分との相互作用が推察されている．

一方，著者らはこれまでにBHTの毒性研究の一環として，ラット肝におけるこの化合物の存在様式，特に生体内高分子との相互作用について検討してきた[4-12]．その結果を要約すると，(1)BHTはミクロゾームのチトクロムP-450系のモノオキシゲナーゼにより酸化され活性中間体（BHT-キノンメチドあるいはBHT-アルコール等）を生成し，(2)これら中間体のトルエンメチル基がタンパク質システィン残基のSH基と特異的に共有結合することを明らかにした．また，この結合はシスティンやグルタチオン等のチオール化合物により著しく抑制されることが*in vitro*の実験から明らかになった[6]．

以上の知見及び結果をもとに，著者らはマウスにおけるBHT毒性の修正を試みた．つまりここではBHTの肺傷害（特に肺重量の増加）に対する各種アミノ酸の抑制効果を検討した．

実験材料と方法

試薬　BHTとL-アミノ酸は東京化成工業㈱製，還元型グルタチオンはシグマケミカル社製を用いた．

動物と処置　4週令の雄性BALB/c系マウスを日本チャールズリバー㈱から入手した．マウスはベータチップ（堅木性，ノースイースタン社製）を床敷にしたプラスチック製の箱で入手直後から実験終了まで一貫して飼育した．3週間の予備飼育後，L-アミノ酸あるいはグルタチオンを1％添加したCE-2飼料（日本クレア㈱製）はBHT投与3日前から投与5日後までマウスに自由に与えた．トウモロコシ油に溶かしたBHT（200mg/kg，0.1ml/20g体重）は1日1回，4日間継続してマウスの腹腔内に注射した．そして最終投与の1日後にマウスを断首し，全肺を秤量した．なお，BHTによるマウスの肺傷害は組織の肥大を伴うという事実[2,3]から，肺重量の増加を傷害の指標とした．

結果と考察

Malkinson[13]はBHTで惹起されるマウスの肺傷害がcedar terpen（飼育箱の床敷に用いるチップに由来する揮発性物質）で著しく抑制されることを報告した．そこで今回の実験では全期間を通じてこの物質が少ないベーターチップの床敷でマウスを飼育した．

Table 1はBHTによるマウス肺重量の増加に及ぼすアミノ酸あるいはグルタチオンの影響を示す．ここで用いたアミノ酸はシステインを除きすべて任意に選び，また，BHTの投与量は以前の報告[14]から肺重量を増加させるのに必要な量：200mg/kgと設定した．システインとグルタチオンはBHTによる肺重量の増加を有意に抑えた．しかしほかのアミノ酸ではこのような効果はほとんど認められなかった．グルタチオンの効果はシステインのそれに比べて小さかった．この理由として(1)細胞内への吸収がグルタチオンで低く[15]，また，(2)グルタチオンが血流中で水解をうけやすい[16]ことなどが考えられる．なお，すべてのマウスの成長率は実験期間を通して

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

Table 1. Effect of amino acids and glutathione on BHT-induced pulmonary enlargement in mice.

Treatment	Relative lung wt (mg/100g body wt)	% of BHT-treated mice†
Untreated	637± 64*	55
BHT	1149± 52	100†
BHT+Alanine	1034± 77	90
+Arginine	1163± 37	101
+Cysteine	673± 90*	59
+Glutamic acid	1027±221	89
+Methionine	1108±148	96
+Phenylalanine	1149±255	100
+Tryptophan	1481± 86	129
+Glutathione	853± 75*	74

After feeding 1 % amino acids or glutathione-supplemented diet for 3 days, BHT (200 mg/kg) was given by ip injection each day for 4 days accompanied with the supplemented diets; corresponding control (untreated) mice received a equivalent volume of corn oil.
Each value represents the mean ± S. D. from five individual animals.
(*) significantly different from mice which received BHT alone ($p<0.01$).

ほとんど同じであった．以上示したようにTable 1の結果はSH化合物がBHTによるマウス肺傷害を抑制することを示唆している．

著者らはBHTの活性中間体がタンパク質システイン残基のSH基に特異的に結合することを以前の実験で認めた[10,12]．さらにこのタンパク質とBHT代謝物の結合はシステインやグルタチオン等のチオール化合物により抑制できることを報告した[6]．一方，Kehrer と Witschi[17] はBHTによる肺傷害が薬物代謝阻害剤でほぼ完全に阻止され，またこれと並行して組織高分子へのBHTの結合量が著しく減少したことを報告している．さらにMalkinson[13] はチトクロムP-450レベルが極めて低い幼若マウスではBHTによる肺傷害が起こりにくいことを認めている．これらの事実から，肺高分子へ結合するBHT代謝物が飼料に添加したシステインやグルタチオンにより捕獲され，その解毒を通してBHTの肺傷害が抑制されたものと推察する．

要　旨

BHT（200mg/kg，1日1回4日間腹腔内注射）によるマウス肺重量の増加は，飼料に添加した1％システインあるいはグルタチオンにより有意に抑制することができた．

文　献

1) Shirai, T., Hagiwara, A., Kurata, Y., Shibata, M. and Ito, N.：*Fd Chem. Toxic.*, **20**, 861, 1982
2) Mario, A. A. and Mitchell, J. T.：*Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **140**, 122, 1972
3) Saheb, W. and Witschi, H.：*Toxic. appl. Pharmac.*, **33**, 309, 1975
4) Nakagawa, Y., Ikawa, M. and Hiraga, K.：*Chem. pharm. Bull.*, **26**, 374, 1978
5) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T.：*Chem. pharm. Bull.*, **27**, 442, 1979
6) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T.：*Chem. pharm. Bull.*, **27**, 480, 1979
7) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T.：*J. pharm. Dyn.*, **3**, 314, 1980
8) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T.：*Biochem. Pharmacol.*, **29**, 1304, 1980
9) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T.：*Biochem. Pharmacol.*, **30**, 3132, 1981
10) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T.：*Biochem. Pharmacol.*, **30**, 887, 1981
11) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T.：*J. Pharm. Dyn.*, **4**, 823, 1981
12) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T.：*Biochem. Pharmacol.*, **32**, 1417, 1983
13) Malkinson, A. M.：*Toxic. appl. Pharmac.*, **49**, 551, 1979
14) Mizutani, T., Ishida, I., Yamamoto, K. and Tajima,

K. : *Toxic. appl. Pharmac.*, **62**, 273, 1982
15) Hahn, R., Wendel, A. and Flohe, L. : *Biochim. biophys.* Acta, **639**, 324, 1978
16) Takeishi, N., Higashi, T., Naruse, A., Nakashima, K., Shiozaki, H. and Sakamoto, Y. : *J. Biochem.* **82**, 117, 1977
17) Kehrer, J. P. and Witschi, H. : *Toxic. appl. Pharmac.*, **53**, 333, 1980

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 360-368, 1983

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）のマウス肺の微細構造におよぼす影響

福森信隆*, 川野澄江**, 佐々木美枝子*, 平賀興吾*

Ultrastructural Study of Butylated Hydroxytoluene (BHT) – Induced Alterations in Mouse Lung

NOBUTAKA FUKUMORI*, SUMIE KAWANO**, MIEKO SASAKI* and KOGO HIRAGA*

Effect of butylated hydroxytoluene (BHT) on the ultrastructure of the lungs was examined electron micro scopically using 2 strains of mice: DBA/ 2 N and BALB/cAnN. In the previous study, it was reported that LD50 value for the DBA/ 2 N strain was over 10 times lower than that for the BALB/cAnN strain and hemorrhage in the lungs was observed upon autopsy. Both strains of mice were given 500mg/kg BHT dissolved in corn oil by a single i. p. injection, and all the animals were sacrificed on the 4th day after injection. The main changes in alveoli of both strains were disruption and swelling of type I cells, naked basement membrane, appearance of bazard cells similar to type II cells, increase in number of macrophages, proliferation of type II cells and interstitial cells. The fine structural changes of alveoli were more marked in DBA/ 2 N mice, especially vacuolated and thinned capillary endothelium injury. However, these structural changes on the lungs in the different strains of BHT-treated mice were not so remarkable in comparison with the difference of lethal effect seen in both strains.

Keywords : butylated hydroxytoluene, ultrastructural alteration, alveolar cells, DBA/ 2 N and BALB/cAnN mice

緒　言

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）は抗酸化剤，安定化剤として食品および工業製品等の酸化を防止する目的で使用されている．肺障害に関してはじめ Marino と Mitchell によりマウス肺胞壁の肥厚，浮腫，出血が認められ[1]，肺重量の増加に伴う DNA の合成促進が報告されている[2]．また微細構造の変化は初期にⅠ型上皮細胞の変性，壊死が起こり，その後Ⅱ型上皮細胞，間質細胞の増殖による肝胞壁の肥厚が観察された[3,4]．一方，川野らは BHT 投与によりマウスの種々の系統で LD50 値の差異を認め特に DBA/ 2 N 系で 138mg/kg BALB/cAnN 系で1739mg/kg と LD50値の差異は著しく，投与後 4 日から 6 日にかけて死亡することを報告した[5]．

今回，BHT 投与による肺の微細構造におよぼす変化を観察するとともに，LD50値の差異がみられた DBA/ 2 N系と BALB/cAnN 系マウスの微細構造での変化の差異について電顕的観察を行い比較検討した．

実験方法

動物は DBA/ 2 N 系と BALB/cAnN 系の雄性マウス（日本チャールスリバー）を各系の投与群，対照群に 1 群 3 匹として使用し，室温25± 1 °，湿度50± 5 %，照明時間12時間の環境下で Beta Chip 床のプラスチックケージを用い，飼育用飼料（日本クレア，CE- 2 ）および水を自由に摂取させ飼育した．実験は 4 週令のマウスを 4 週間予備飼育した後 8 週令で使用し，コーン油で溶解した BHT（東京化成）を DBA/2N 系，BALB/cAnN 系にそれぞれ500mg/kg の割合で腹腔内投与を行った．なお対照群はコーン油単独で同様な処置を行った．投与期間は 4 日間とし屠殺後冷 3 %パラホルムアルデヒド（0.1M リン酸緩衝液，pH7.4）で気管より肺の拡張固定を実施した．肺の一定部位を細切後氷室内で緩衝液を用いて洗浄し 1 %オスミウム酸（0.1M リン酸緩衝液，pH7.4）で1.5時間の後固定を行いエタノール脱水後，定法に従って Epon 樹脂に包埋した．電顕用試料から厚さ約 1 μm の準超薄切片を作製してトルイ

* 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
** 同環境保健部環境衛生研究科

ジン青で染色し光顕的観察を行った後，超薄切片を作製して酢酸ウラン・クエン酸鉛二重染色を施し，日立HU-12A透過型電子顕微鏡にて主に肺胞領域を検鏡した．

実験結果

DBA/2N系 光顕的所見では，肺胞壁の胞厚が著しく，正常構築でみられる網状な均一薄層の肺胞壁は認められなかった．肺胞腔は融合し，肥厚の顕著な肺胞では狭窄がみられた．肥厚はⅡ型上皮，間質細胞の増生を伴った腫大および肺胞腔を取り囲む上皮細胞の腫大に起因していた．さらにⅡ型上皮は核，核小体の良好な発達を示し小空胞の軽度な増加が認められた．肺胞腔では大食細胞が増加し毛細血管での赤血球の残留が多くみられた．その他，線維性結合組織の増生，小血管の著変は認められなかった．

電顕的所見では，肺胞腔を取り囲むⅠ型上皮が腫大し水腫様膨化を呈し顕著な部では空胞形成が認められた（Fig. 2）．さらに変性したⅠ型上皮は崩壊して基底膜から剝離脱落し肺胞腔内に小胞状あるいは線維状の上皮細胞の debris を形成した．その部の多くはⅠ型上皮を欠失して基底膜が露出し不明瞭な構造を呈した．全体的に肺胞腔を被うⅠ型上皮は減少傾向を示し，均一な薄層はほとんどみられなかった．一方，細胞小器官に富み microvilli を持つⅡ型上皮は大型化し核の良好な発達がみられ，一部ミエリン封入体とは異なる小空胞の形成が観察された．肺胞腔内の離脱したⅠ型上皮の接着部位ではⅡ型上皮の類似細胞の増生が認められた．この細胞はⅡ型上皮と連続がみられ扁平化して ribosome に富み，ミエリン封入体，microvilli が一般のⅡ型上皮に比べ減少し糸粒体などの小器官も少なく，基底膜に隣接して突出構造を持ちながら肺胞腔を被っていた（Fig. 4）．毛細血管内皮細胞の変化は，菲薄化し細胞質内に小空胞の形成を認めたが脱落像は少なかった（Fig. 3）．基底膜の構造が不明瞭でⅠ型上皮を剝離し内皮細胞の菲薄した部では，肺胞壁，毛細血管壁の崩壊が時折観察された．肺胞壁の肥厚は肺胞腔内へのⅠ型上皮の水腫様変化，Ⅱ型上皮類似細胞の増生が主であったが，Ⅱ型上皮の大型化した肺胞壁では間質細胞の増生，肥大がみられた．また肺胞隔壁の結合織域で膠原線維の軽度な増生が認められ，その間で淡明な電子密度を示す水腫様変性により膨化，拡張した線維部がみられた（Fig. 3）．肺胞壁の肥厚は肺胞腔の狭窄を伴うが肺胞隔壁の離断による拡大した部もみられ，blood air barrier の量的減少傾向にあった．肺胞腔内の大食細胞は変性剝離したⅠ型上皮細胞片を貪食し電子密度の高い顆粒を含んでいた．

BALB/cAnN系 光顕的所見では，DBA/2N系同様に肺胞壁の肥厚がみられたがその程度は若干軽減しており，部分的に肺胞壁の菲薄化が認められる部では，肺胞腔の融合，拡張を呈した．肺胞壁の網状の接合部で多くみられるⅡ型上皮細胞は大型腫大化して増生傾向を示し，また間質細胞も増加，腫大が認められた．肺胞腔内の大食細胞は大型増生し肺胞壁の近接部で散見された．

電顕的所見では，Ⅰ型上皮の脱落がみられ肺胞腔側の基底膜に沿って微細顆粒を含み粗面小胞体，糸粒体が散在する明調な細胞がみられた．これらの細胞では少数の短突起が表面で観察された．また肺胞腔内では大型の大食細胞は損傷を受けたⅠ型上皮への接近がみられ（Fig. 6），上皮細胞の損傷が著しい部では多くの細胞残渣を肺胞腔で認めた（Fig. 8）．Ⅰ型上皮の変化は DBA/2N系とほぼ同程度であったが，肺胞腔を取り囲むⅡ型上皮に類似した細胞の出現はやや減少していた．肥厚部のⅡ型上皮は核の肥大を伴った細胞の大型化がみられ，空胞形成，microvilli の減少を示した．また間質細胞は増生がみられ空胞化とともに細胞質内の脂肪滴の増加を認めた（Fig. 8）．肺胞隔壁の結合組織は軽度な増加を認め，その内部の線維間で水腫様の変化が観察された（Fig. 7）．毛細血管の内皮細胞の菲薄化，変性は DBA/2N系に比べやや軽度であった．

考察

BHT はマウス肺に対して肺重量の増加を伴った障害を惹起せしめ出血死が起こることから，死亡前の肺の微細構造の変化を2系統間で比較した．DBA/2N系とBALB/cAnN系のマウスでは LD50値に10倍以上の差がみられ投与後4日から6日にかけて出血死することから[5]，この2系統では肺胞領域に対して BHT の作用が異なることが考えられるため出血を未だ認めない投与4日間の動物で両系の LD50値のほぼ中間量にあたる500mg/kg を投与した．

BHT による反応は両系とも認められ顕著な系統差がみられなかった．肺胞壁の肥厚は，Ⅰ型肺胞上皮の水腫様膨化，Ⅱ型肺胞上皮の大型化した増生，間質細胞の増生，結合織域での水腫様変化，基底膜に接するⅡ型上皮類似細胞の増生など種々の変化が原因と考えられ，2系を比べると若干 DBA/2N系での変化が強いと思われた．また毛細血管では内皮細胞の菲薄化，空胞形成などの変化が DBA/2N系で若干強い感を呈したが著しい差異は確認できなかった．平井らは Swiss-Webster 系マウスで BHT の肺胞細胞の電顕的変化を経時的に観察

したところ，Ⅰ型上皮の空胞化，細胞膜の断裂が比較的初期に起こり変性した細胞の崩壊，肺胞腔への脱落は3日までに認められ，4日以後Ⅱ型上皮，間質細胞の増殖による肺胞壁の肥厚を報告した[3,6]．今回行った実験では4日目でもⅠ型上皮の腫大膨化を認めており，Ⅰ型上皮の剝離，脱落像とともに混在することからⅠ型上皮の脱落の移行過程と考えられる．これらの変化は系統間で同様相を呈し顕著な差異がみられず，BHT 肺障害に対する初期の共通した変化であると考察される．

Ⅰ型上皮とは異なり肺胞腔内で基底膜を被うⅡ型上皮に連続した細胞は平井らも同様に観察しており，この細胞は離脱した基底膜面を扁平状のⅡ型上皮が被いⅠ型上皮への修復過程の変化像とみなされ，投与後およそ9日で正常像に回復するという報告がみられる[3]．今回認められた ribosome に富んだ短小な microvilli を持ちミエリン封入体の減数したⅡ型上皮類似細胞は，扁平化傾向を呈し，肺胞腔内の多くで散見されたことからⅠ型上皮への修復移行像と考えられる．この修復部の基底膜は明瞭な構築を保持していた．またこの細胞は Adamson らのいう giant epithelial cell と同一なものであると思われる[4]．しかし Swiss–Webster 系でみられたⅡ型上皮の多数の分裂像は明らかでなく，Ⅱ型上皮の大型化，核の良好な発達にとどまった．Ⅱ型上皮は間質細胞とともに増生することから機能が活発に亢進していると思われる．

毛細血管内皮細胞は胞体内での空胞化がみられ，空胞の大きい部では著しく菲薄化し基底膜の露出像，毛細血管の崩壊が観察された．これらの形態学的変化は肺胞腔内への出血を誘発すると推察されることから，BALB/cAnN 系に比較して DBA/2N 系で若干変化が強く認められたことと LD50値の差異とは何らかの関連が示唆される．またマウスでは明らかでないが，BHT が血液凝固を阻害するという[7] 生化学的な考慮からも肺胞での出血が考えられ，出血による肺機能の保持が困難となり致死に至る一要因と思われる．SO_2の吸入で肺胞毛細血管は早期より変化が出現し内皮細胞の細胞内水腫および水腫空胞が形成され基底膜の膨化，不鮮明化，血管周囲の浮腫を起こし毛細血管の消失に至ることから[8]，内皮細胞に対する変化は BHT 投与時と類似していると思われる．

肺重量は湿重量，乾燥重量とも増加を認める報告がみられ[9]，形態学的変化と比較して考察すると，水腫性の膨化とともに細胞の増殖による肺胞壁の肥厚つまり細胞数の増大が肺重量増加へ関与していると考えられる．

結　語

BHT に対する LD50値の異なる DBA/2N 系と BALB/cAnN 系のマウスを用いて肺胞領域への影響について電顕的観察を行った．Ⅰ型上皮細胞は水腫様膨化を呈し，剝離部では基底膜が露出した．また狭窄した肺胞腔では大食細胞の増生がみられ，Ⅰ型上皮細胞の修復移行像とも思われるⅡ型上皮類似細胞が出現し基底膜を被った．Ⅱ型上皮細胞，間質細胞は増生，大型化して，結合織域での水腫様変化とともに肺胞壁の肥厚を形成した．毛細血管内皮細胞は菲薄化，小空胞の形成を認めた．これらの形態変化は2系統で顕著な差異がみられず共通した変化と思われるが，全体的に DBA/2N 系の障害が若干強く認められた．また毛細血管壁の変性による出血が肺機能の保持を困難とならしめ致死に至る一要因と考えられるが，BHT の代謝などの差も系統差の大きな要因になると思われる．

文　献

1) Marino, A. A. and Mitchell, J. T.：*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **140**, 122, 1972
2) Witschi, H. and Saheb, w.：*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **147**, 690, 1974
3) Hirai, K., Witschi, H. and Cote, M. G.：*Exp. Mol. Pathol.*, **27**, 295, 1977
4) Adamson, I. Y. R., Bowden, D. H., Cote, M. G. and Witschi, H.: *Lab. Invest.*, **36**, 26, 1977
5) Kawano, S., Nakao, T. and Hiraga, K.：*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **61**, 475, 1981
6) 平井圭一，Witschi, H. and Cote, M. G.：第33回日本電子顕微鏡学会大会（福岡），1977
7) Takahashi, O. and Hiraga, K.：*Fd Cosmet. Toxicol.*, **16**, 475, 1978
8) Hayashi, K.：*J. Clin. Electron Microscopy*, **4**, 883, 1971
9) Mizutani, T., Ishida, I., Yamamoto, K. and Tajima, K.：*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **62**, 273, 1982

Explanation of Figures

Fig. 1. A normal lung from the DBA/2N strain mouse. Type I (I) and type II (II) alveolar epithelial cells are seen in clear alveolus (AI). Type I cell covered alveolar besement membrane has thin layer and interstitial cell (Int) among epithelial cells is observed. Capillary lumen (C) x5300

Fig. 2. A portion of alveolar cells from the DBA/ 2 N mouse administered with 500mg/kg BHT. Swelling and disruption of type I epithelial cells (I) and vacuolization of endothelium (End) in capillary lumen (arrows) are seen. x5100

Fig. 3. A portion of alveolar cells from the DBA/ 2 N mouse after BHT injection. Vacuolated and thinned capillary endothelium (arrows) accompanying severe edema in pericapillary are seen. Type II cell (II) shows active size. x5000

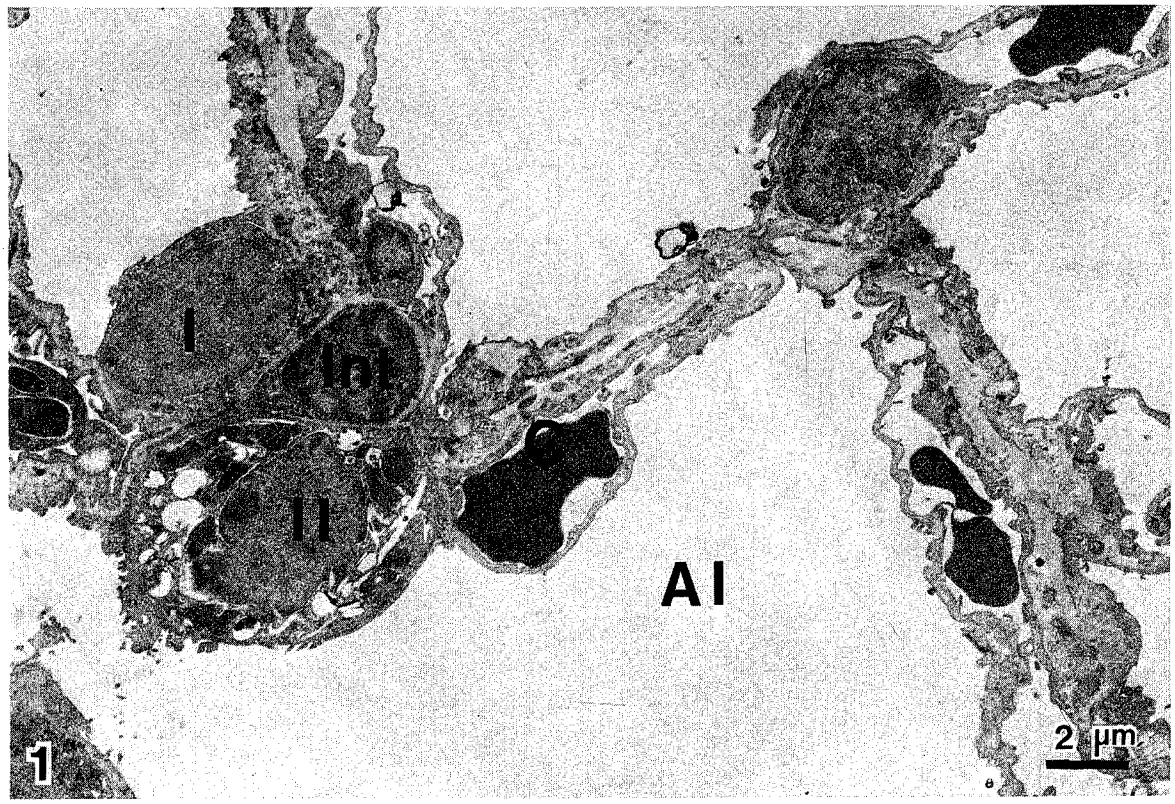
Fig. 4. A portion of alveolar cells from the DBA/ 2 N mouse after BHT injection. The bazard cells resembled to type II cells (II) cover the alveolar surface (arrows). The alveolus seems to have narrow space. x6000

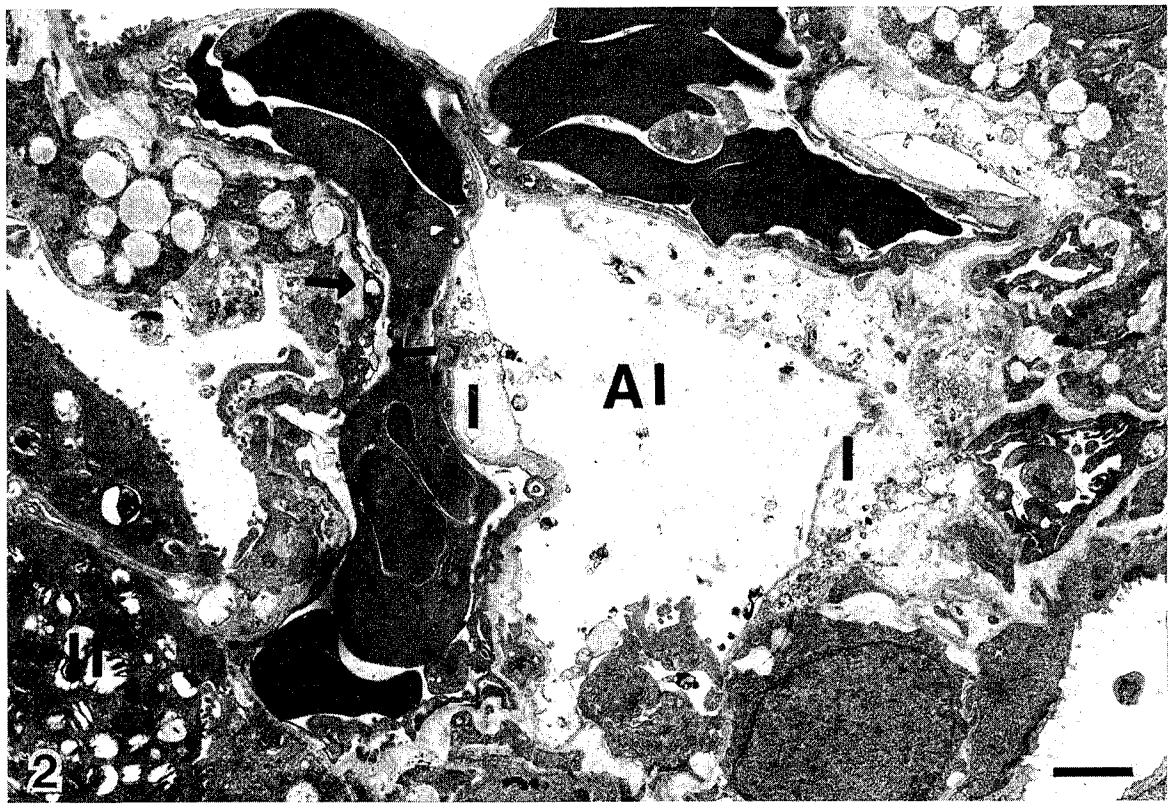
Fig. 5. A normal lung from the BALB/cAnN strain mouse. x5600

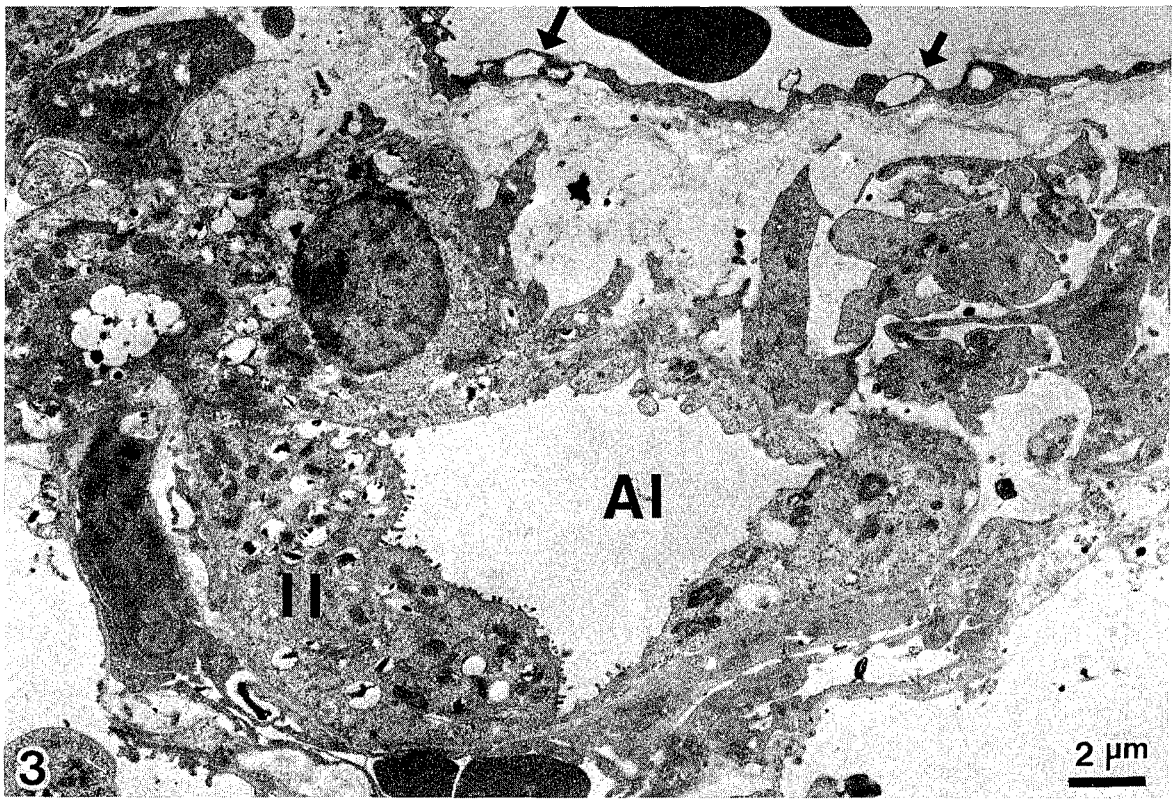
Fig. 6. A portion of alveolar cells from the BALB/cAnN mouse administered with 500mg/kg BHT. The macrophage (Ma) becomes large in size and adjacent to injurious type I cell in alveolar air space. x4800

Fig. 7. A portion of alveolar cells from the BALB/cAnN mouse after BHT injection. The alveolar wall is thickened by edematization. The basement membrane in alveolus is denuded partly (arrow). X5200

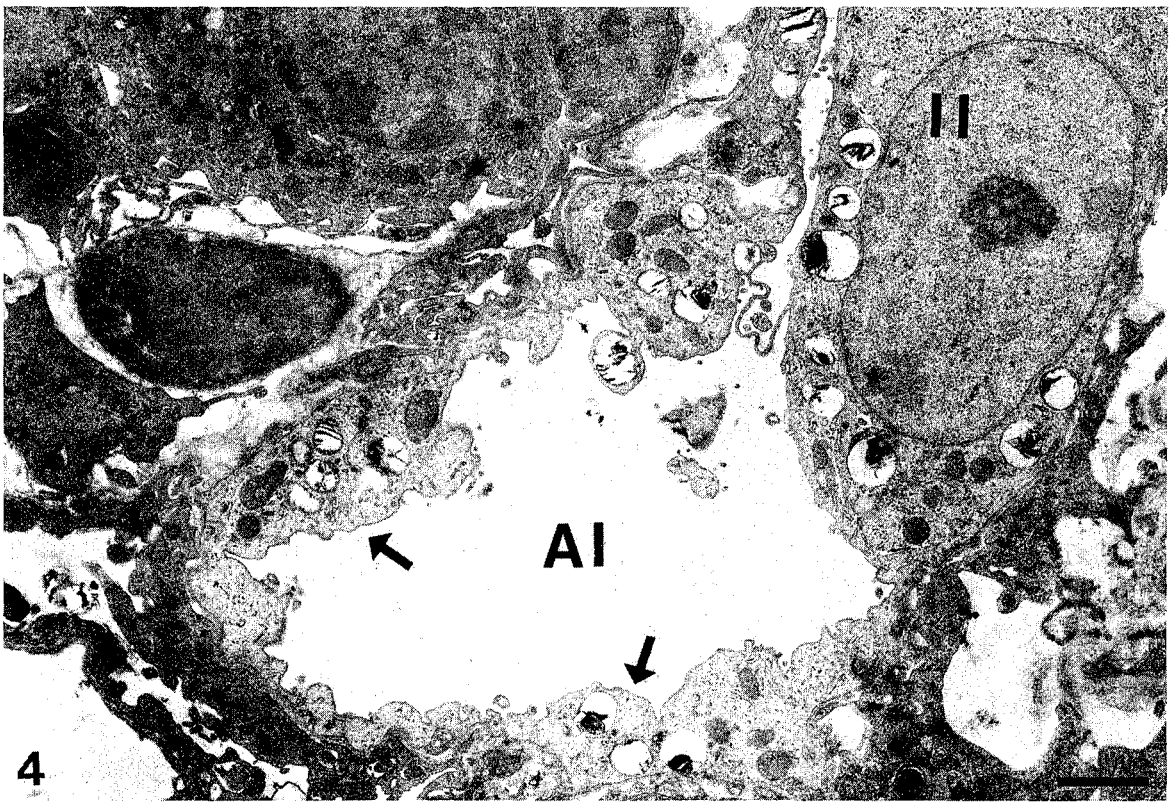
Fig. 8. A portion of alveolar cells from the BALB/cAnN mouse after BHT injection. Many debris are attached to damaged epithelial cells. A number of lipid droplets are observed. x5300


I
Int
II
AI
2 µm
1

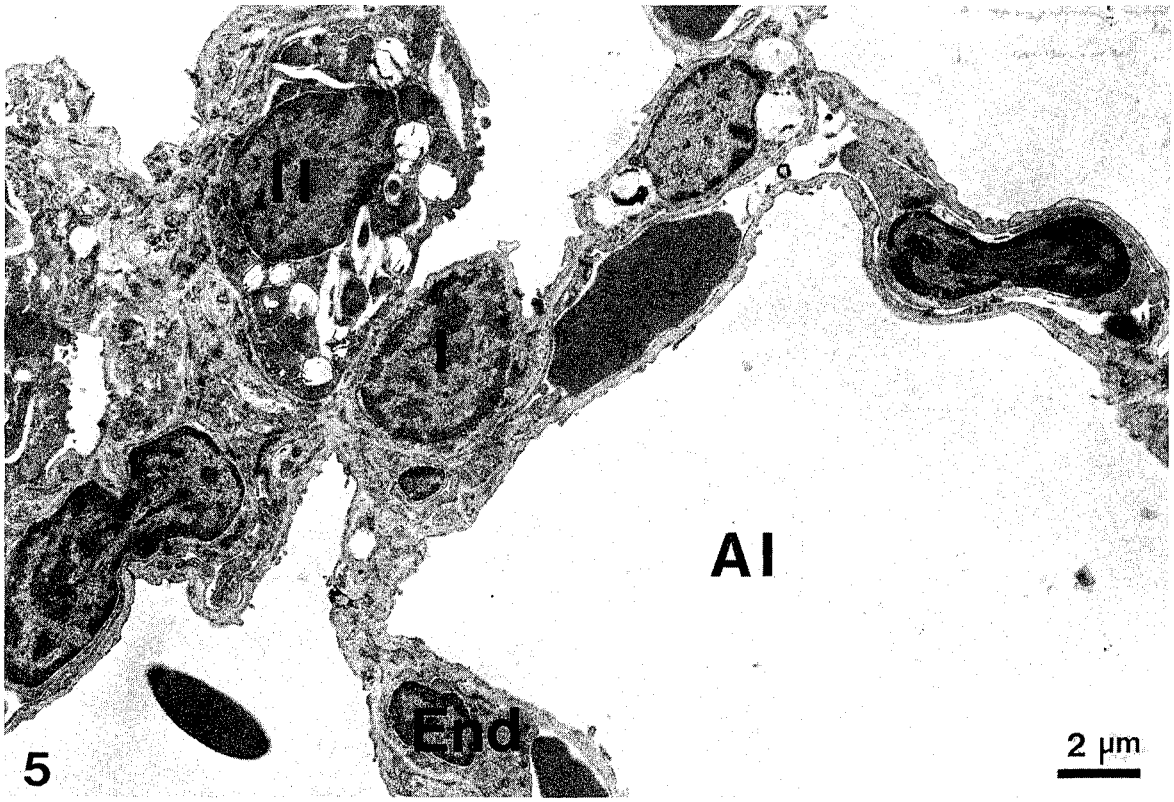

I
AI
I
II
2



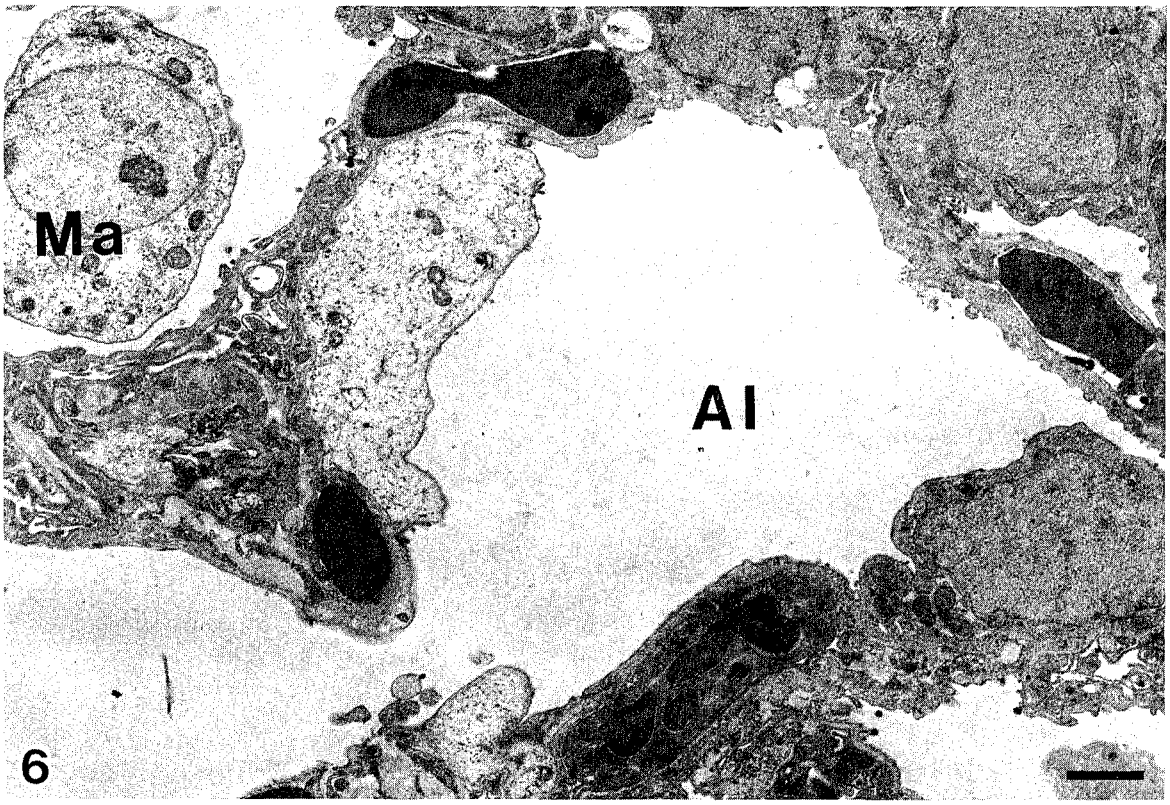
3



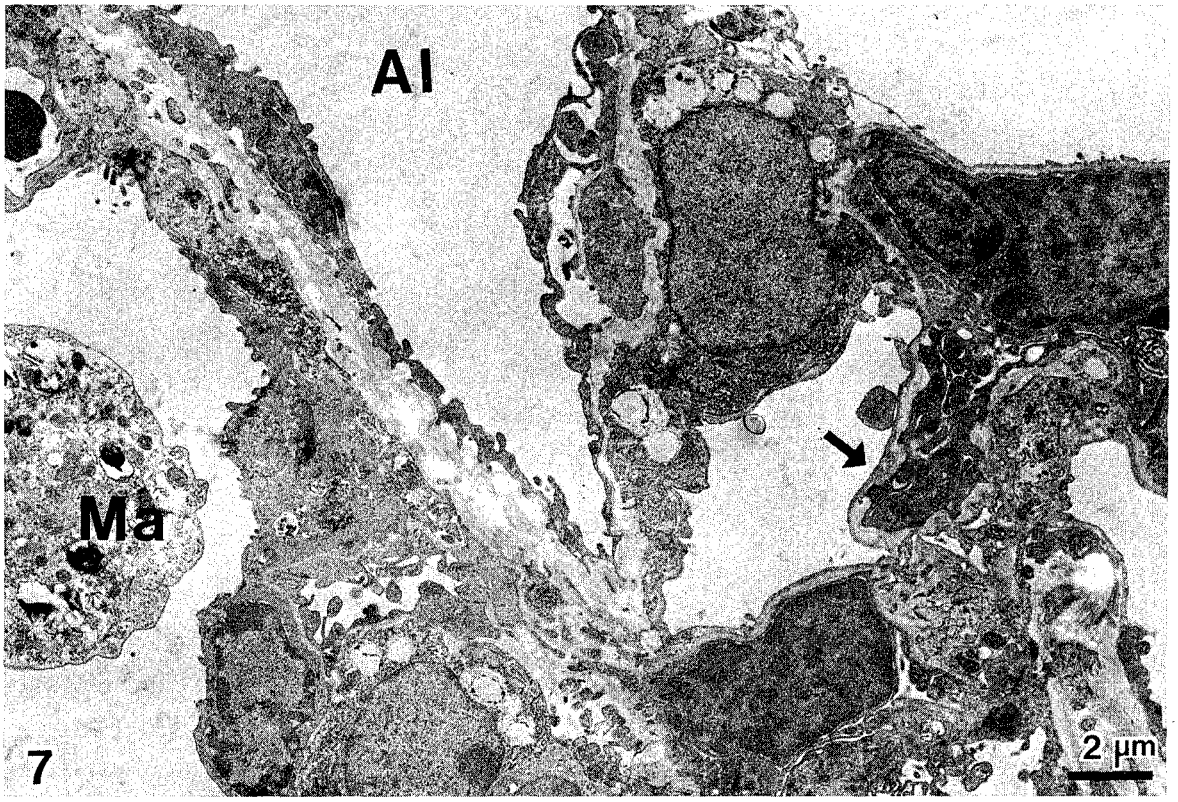
4

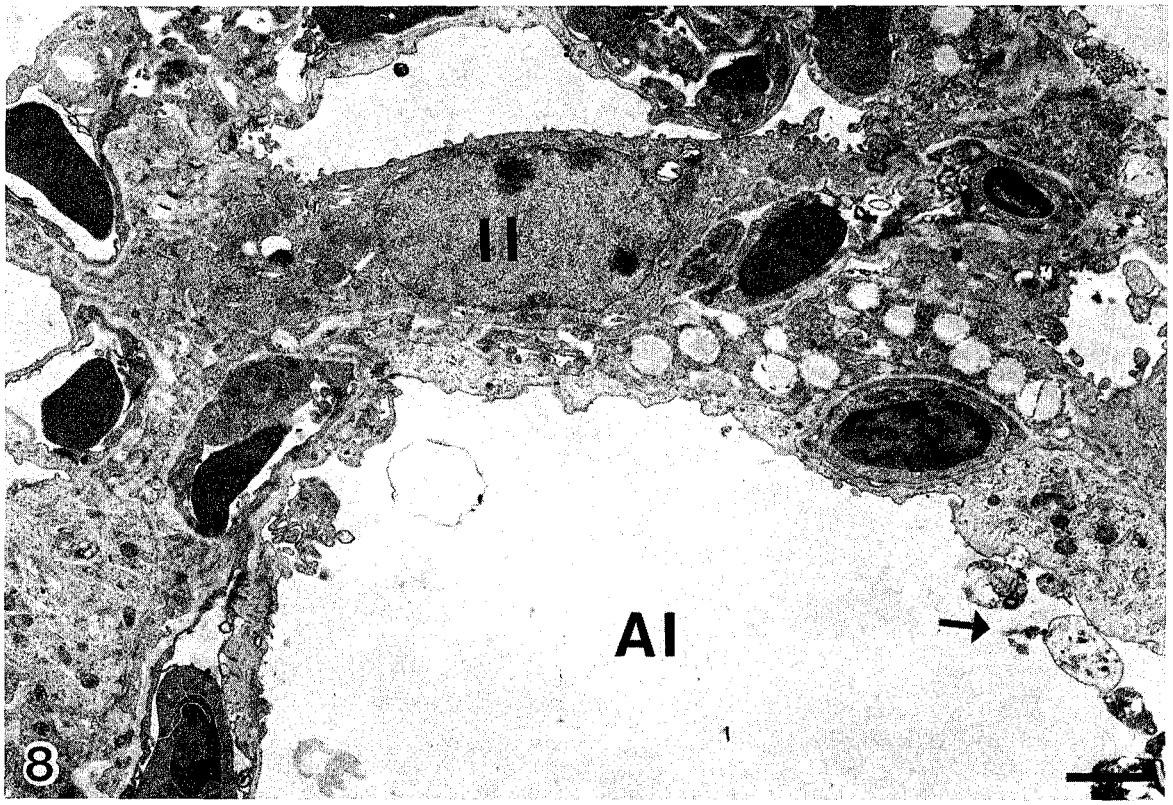


5



6


Al
Ma
2 µm
7


II
Al
8

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 369-378, 1983

クロム鉱さい粉じんのラットによる1カ月間持続吸入実験 吸入後終生飼育ラット諸臓器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 Experiments of Chromite Ore Residue Dust to Rats for 1 Month–Histopathological Observation of Various Organs of Rats Kept for Lifespan after the Periods of Exposure

YOSHIMITSU SAKAMOTO*, NOBUYUKI KAMIYA*, TORAO IKEDA* and KOGO HIRAGA*

Slc–Wistar rats (5 weeks old) were exposed to chromite ore residue dust at a concentration of 20 mg/m^3 for 30 days. After exposure, the animals were transferred to the barrier–room and kept under observation until they died or became moribund. Histological changes caused by chromite ore residue dust in various organs except respiratory system in these animals were observed and compared with those of control and JIS dust group.

Prepeutial gland adenoma was found in only the chromite ore residue dust–group, but the incidence of this tumor was not significantly different from control group. Interstitial cell tumor of testis, adrenal pheochromocytoma and mononuclear cell leukemia were observed at high incidence in common with all of groups. The incidences of each type of tumor in chromite ore residue dust–group were not different from those of the other two groups. Malignant solid tumors were observed in control and JIS dust group, but not in chromite ore residue dust–group. Many kinds of nonneoplasticlesions, so called spontaneous lesions in aged rats, were seen in various organs of animals in the groups, and their incidence and severity in the chromite ore residue dust–group were not different from those of the other two groups.

In this study neoplastic and nonneoplastic lesions suspected to have been caused by exposure to chromite ore residue dust were not observed.

Keywords : chromite ore residue dust, rat, inhalation toxicity, histological changes, observation for lifespan

緒　　言

クロム鉱さい粉じんを20 mg/m^{3}の濃度で30日間吸入曝露したラットを，曝露終了後バリヤー動物室に移して飼育をつづけ，経気道により摂取されたクロム鉱さい粉じんの生体への影響を終生に亘って観察した．得られた結果のうち，体重増加推移，生存率，呼吸器系の病理組織学的観察結果については，既に報告したとおりである[1,2]．本報ではひきつづき終生飼育したラットの呼吸器系以外の諸臓器に見られた腫瘍性変化および非腫瘍性変化について述べる．

実験材料および方法

動物はSlc–Wistar，雄ラット，5週令を用いた．吸入実験は鉱さい粉じんおよび比較対照としてJIS試験用粉体11種（関東ローム）の20 mg/m^{3}曝露群と，実験室内空気のみの対照群の3群を設定し，粉じん吸入実験装置[3]によって行なった．曝露開始時のラット数は各群20匹であった．曝露期間は昼夜連続で30日間とした．

実験に用いたクロム鉱さい粉じんのクロム含量は，水溶性クロムが1.2%，水不溶性クロムが1.6%であった．鉱さい粉じんとJIS粉体の調製法，化学的性状，吸入チャンバー内飼育条件および粉じん粒度分布については前報[1,2]に示したので省略する．

曝露終了後，曝露終了時および終了後1年目屠殺例を除いた各群15匹のラットをバリヤー動物室に移し，動物

* 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, Shijuku–ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Summary of Neoplastic Lesions

Group	Control	JIS Dust	Chromite ore residue dust
No. of rats observed	14	15	15
No. of rats with tumor (s)	14	15	15
No. of rats with malignant tumor (s)	10	6	5*
No. of rats with malignant tumor apart form mononuclear cell leukemia	5	3	0*
HEMATOPOIETIC AND LYMPHATIC SYSTEM			
Mononuclear cell leukemia	5	3	5
Malignant lymphoma	1	1	—
PANCREAS			
Islet cell adenoma	2	3	2
Achinar cell adenoma	—	1	—
PITUITARY			
Adenoma	1	2	3
ADRENAL GLAND			
Cortical cell carcinoma	—	2	—
Pheochromocytoma	5	8	5
Thyroid			
Adenoma	1	1	—
Adenocarcinoma	1	—	—
TESTIS			
Interstitial cell adenoma	13	15	14
PREPEUTIAL GLAND			
Adenoma	—	—	2
Papilloma	—	—	1
SKIN			
Papillloma	—	—	1
Trichoepithelioma	—	—	1
SUBCUTIS			
Fibroma	3	2	—
Fibrosarcoma	1	—	—
Hemangioma	—	—	1
MAMMARY GLAND			
Adenoma	1	1	1
Adenofibroma	1	—	—
ZYMBAL'S GLAND			
Adenoma	1	—	—
ABDOMINAL CAVITY / PERITONEUM			
Mesothelioma	2	—	—
Malignant fibrous histiocytoma	1	—	—
Hemangioma	—	1	—
Lipoma	—	—	1
BRAIN			
Astrocytoma	—	1	—

Statistical significance : *$p<0.05$ vs Control (Fischer exact test)

Table 2. Relationship between Aging of rats and Incidence of Mononuclear cell leukemia and Pheochromocytoma

Group	Control		JIS Dust		Chromite ore residue dust	
Age in weeks	72 −104	105 −132	84 −104	105 −132	85 −104	105 −133
No. of rats[a)]	3	11	5	10	6	9
Mononuclear cell leukemia	2(66)[b)]	3(27)	2(40)	1(10)	3(50)	2(22)
Pheochromocytoma	−	5(45)	−	8(80)	−	5(55)

a) Number of rats died and moribund sacrificed
b) ( ) : %value

が死亡または瀕死状態になるまで飼育をつづけた．瀕死状態の動物は大腿部動静脈の切開によって放血屠殺した．この際流出する血液を採取し塗沫標本を作製した．

本実験では死体発見例は各群15例中，対照群7例，JIS粉体群5例，鉱さい群1例でありその他は瀕死屠殺例であった．動物の平均寿命は対照群112週(72−132週)，JIS粉体群110週（84−132週），鉱さい群112週（85−133週）であった．

剖検後，摘出した臓器は10%緩衝ホルマリンで固定し，常法により組織標本を作製した．組織学的な観察にはHE染色を主体にし，必要に応じて，アザン，鍍銀（渡辺変法），脂肪染色（ズダンB），von Kossa，ベルリン青等の諸染色を行なった．検索した臓器は，肝，腎，心，脾，大動脈，胃，小・大腸，膵，唾液腺，膀胱，精巣，前立腺，下垂体，甲状腺，副甲状腺，副腎，脳，脊髄，大腿骨，骨格筋，皮フおよび付属器である．なお，対照群の1例はカニバリズムのため観察例数から除外した．

結　果

腫瘍性変化：Table 1に各群で見られた腫瘍の種類およびその腫瘍を有するラット数を示した．各群とも全例に腫瘍の発生が見られた．このうち1例当り2種類以上の腫瘍を有するラットの割合は対照群12/14例（腫瘍を有するラット数/観察例数：以下同じ），JIS粉体群14/15例，鉱さい群14/15例であった．悪性腫瘍を有するラット数は対照群10/14，JIS粉体群6/15，鉱さい群5/15例であった．鉱さい群では悪性腫瘍はすべて白血病であり，対照群，JIS粉体群に見られたような白血病以外の悪性腫瘍の発現はなかった．

鉱さい群にのみ見られた腫瘍は，包皮腺腺腫（Photo 1）が2/15例，包皮腺開口部付近に生じた乳頭腫，耳介表皮の乳頭腫，皮下血管腫，腹腔内脂肪細胞腫が各々1例であった．

対照群およびJIS粉体群に共通して多発した腫瘍は，精巣間質細胞腫（Photo 2），副腎褐色細胞腫（Photo 3），白血病（Photo 4, 5）であった．いずれも各群間で発現率に差はなかった．白血病はF 344ラットおよびSlc−Wistarラットで多発することが知られているいわゆるmononuclear cell leukemiaであった[4, 5, 6]．発現率の高かった白血病と副腎褐色細胞腫について，ラットを生存期間が2年（104週令）までのものと，2年以上（105週令以上）のものに分け，各生存期間での発現率を比較した．Table 2に示すように白血病は各生存期間でその発現が見られたが，副腎褐色細胞腫は2年以上生存したラットに発現し晩発性であった．各腫瘍の生存期間に伴う発現のしかたは各群で同様であって，鉱さい群に特徴的な傾向はみられなかった．

非腫瘍性変化：各臓器に見られた病変の種類と，その病変のみられたラット数をTable 3, 4に示した．Tableに示すように対照群およびJIS粉体群に比べ，鉱さい群で，膵臓ラ氏島細胞の増生（Photo 6）がやや多くみられたが，その発現率に有意な差はみられなかった．鉱さい群にみられた変化のうち対照群とJIS群に共通して多発した病変は，脾臓の腫大，髄外造血，ヘモジデリン沈着症，局所性の線維化，肝臓の細胆管の増生，脂肪変性，局所性の類洞の小のう胞状拡張，膵臓腺房細胞の萎縮，胃腺基底部の拡張，慢性腎障害，精巣の精細管萎縮および石灰沈着，前立腺腺腔内の小結石，前立腺炎などであった．いずれもこれらの病変の発現率には，対照群およびJIS粉体群の間に有意な差はなかった．

脾，肝，腎にみられた病変について，生存期間と，そ

Table 3. Summary of Nonneoplastic Lesion

Group	Control	JIS Dust	Chromite ore residue dust
No. of rats observed	14	15	15
BONE MARROW			
Decreasing of hematopietic tissue	2	5	4
SPLEEN			
Enlargement	7	5	9
Extramedullary hematopoiesis	7	7	9
Hemosiderosis	6	6	5
Focal fibrosis	5	4	5
Congestion	3	1	3
Atrophy of white pulpe	2	1	2
HEART			
Myocardial degeneration and/or fibrosis	12	11	12
Myocardial calcification	2	5	2
Thrombosis	2	2	1
AORTA			
Medial calcification	2	6	2
LIVER			
Bile duct hyperplasia and fibrosis	8	8	7
Focal cystic sinusoidal dilatation	7	6	5
Fatty degeneration	6	6	5
Focal necrosis	2	—	2
PANCREAS			
Atrophy of acinar cell	6	4	9
Islet cell hyperplasia	2	—	5
Diffuse vacuolation of acinar cell	3	3	2
STOMACH			
Dilatation of gastric gland at basal portion	7	10	12
Calcification of mucosal lamina propria and muscular layer	2	6	2
Ulcer : forestomach	2	1	1
glandular stomach	1	—	—
Erosion of forestomach	2	—	1
PITUITALY			
Hyperplasia	3	1	2
THYROID			
C–cell hyperplasia	—	2	2
PRATHYROID			
Hyperplasia	2	6	2

continued on

の発現率および程度との関係を Table 5, 6, 7 に示した・慢性腎障害（Photo 7）は加令に伴って生じるラットの特徴的な病変として他の報告[5, 7]に記載されているものと同様な変化で，その程度の分類もそれらの報告にならった．Table に示した変化のうち肝臓の胆管増生（Photo 8）は，その発現率は各群で同様であるが，鉱

Table 4. Summary of Nonneoplastic Lesions (continued)

Group	Control	JIS Dust	Chromite ore residue dust
No. of rats observed	14	15	15
ADRENAL GLAND			
Vacuolation in cortical cell			
diffuse	6	2	2
focal	2	4	3
Dilatation of sinusoid	1	1	3
Nodular hyperplasia of cortical cell	1	—	—
Hyperplasia of medullary cell	3	2	4
KIDNEY			
Chronic nephropathy	14	14	14
Pyeronephritis	—	1	1
Infarct	1	—	—
URINALY BLADDER			
Inflammation	2	—	—
Inflammation with hyperplasia of epithelium	—	3	2
TESTIS			
Atrophy of seminiferous tubule	14	15	15
Calcification in seminiferous tubule	9	9	8
Interstitial cell hyperplasia	1	—	1
PROSTATE GLAND			
Basophilic concretion in acinar lumen	14	12	14
Suppurative prostatitis	4	6	5
Interstitial prostatitis	1	3	2
PREPEUTIAL GLAND			
Inflammation	5	6	3
BRAIN, SPINAL CORD			
Hemorrhage	4	3	3
SKIN			
Epidermal inclusion cyst	2	—	1
Bone			
Osteoporosis	2	6	1
MUSCLE			
Focal calcification	1	4	—

さい群で，程度の強い例が他の群に比べ少なかった．また慢性腎障害は各群とも，生存期間が2年までのラットですでに全例に発現し，その程度は生存期間に伴い強くなる傾向を示していたが，鉱さい群では生存期間が2年までのラットにも程度の強い例がやや多かった．Tableに示した脾臓および肝臓のその他の変化には，発生率や程度に各群で差はなかった．

各群に共通して多発した，脾，肝，腎臓以外の臓器における病変についても，各生存期間における発現率や程度には，鉱さい群に特徴的な傾向はなかった．

Table 3，4に示した変化のうち，心筋，大動脈，胃，骨格筋での石灰沈着および副甲状腺の肥大，骨吸収亢進はすべて腎障害の重症例に見られた変化であった．脳および脊髄の出血はいずれも白血病を有するラットでみられた変化であった．Tableには示さなかったが，顎下腺では腺房細胞の核の大小不整，核濃染，二核細胞の存在，

Table 5. Relationship between Aging of Rats and Incidence of Splenic Lesions

Group		Control		JIS Dust		Chromite ore residue dust	
Age in weeks		72 −104	105 −132	84 −104	105 −132	85 −104	105 −133
No. of rats[a]		3	11	5	10	6	9
Extramedullary hematopoiesis	−[b]	1(33)[c]	6(54)	3(60)	4(40)	3(50)	3(33)
	+	1(33)	2(18)	2(40)	4(40)	1(16)	4(44)
	++	1(33)	2(18)	−	2(20)	1(16)	2(22)
	+++	−	1(9)	−	−	1(16)	−
Hemosiderosis	−	2(66)	6(54)	4(80)	5(50)	5(83)	5(55)
	+	−	3(27)	−	4(40)	−	2(22)
	++	1(33)	2(18)	1(20)	1(10)	−	2(22)
	+++	−	−	−	−	1(16)	−

a) Number of rats died and moribund sacrificed

b) Grade of changes : −None, + Slight, ++ Moderate, +++ Marked

c) ( ) : % values

Table 6. Relationship between Aging of Rats and Incidence of Hepatic Lesions

Group		Control		JIS Dust		Chromite ore residue dust	
Age in weeks		72 −104	105 −132	84 −104	105 −132	85 −104	105 −133
No. of rats[a]		3	11	5	10	6	9
Bile duct proliferation							
	−[b]	1(33)[c]	5(45)	2(40)	5(50)	3(50)	5(55)
	+	1(33)	3(27)	1(20)	2(20)	3(50)	4(44)
	++	1(33)	2(18)	2(40)	2(20)	−	−
	+++	−	1(9)	−	1(10)	−	−
Cystic sinusoidal dilatation	−	3(100)	2(18)	3(60)	2(20)	5(83)	3(33)
	+	−	5(45)	2(40)	5(50)	1(16)	5(55)
	++	−	2(18)	−	3(30)	−	−
	+++	−	2(18)	−	−	−	1(11)
Fatty degeneration							
	−	1(33)	6(54)	3(60)	6(60)	5(83)	5(55)
	+	1(33)	3(27)	1(20)	−	−	2(22)
	++	1(33)	1(9)	1(20)	3(30)	−	2(22)
	+++	−	1(9)	−	1(10)	1(16)	1(11)

a) : Number of rats died and moribund sacrificed

b) Grade of changes : −None, + Slight, ++ Moderate, +++ Marked

c) ( ) : % values

Table 7. Relationship between Aging of Rats and Incidence of Chronic Nephropathy

Group		Control		JIS Dust		Chromite ore residue dust	
Age in weeks		72 −104	105 −132	84 −104	105 −132	85 −104	105 −133
No. of rats[a]		3	11	5	10	6	9
Chronic nephropathy	−[b]	−	−	−	−	−	−
	+	3(100)[c]	1(9)	4(80)	2(20)	2(33)	1(11)
	++	−	6(54)	−	3(30)	3(50)	3(33)
	+++	−	4(36)	1(20)	5(50)	1(16)	5(55)

a) Number of rats died and moribund sacrificed
b) Grade of changes : −None, + Slight, ++ Moderate, +++ Marked
c) ( ) : % values

耳下腺では腺房細胞の萎縮，脂肪沈着，炎症が，各群に共通してみられた．以上の変化の発生率や程度には，鉱さい群に特徴的な傾向はなかった．

考　察

クロム鉱さい粉じんを1カ月間曝露した後バリヤー飼育室で終生飼育したラット諸臓器の病理組織学的観察を行なった．腫瘍性変化のうち包皮腺腫瘍が鉱さい群にのみ発現した．この腫瘍はいわゆる自然発生腫瘍として，F 344，および Slc−Wistar ラットで約10％の発現率で生じることが知られている[5, 6]．本実験での観察例も，とくに鉱さい粉じんによるものではないと考えた．各群に共通して，精巣間質細胞腫，副腎褐色細胞腫，白血病が多発した．これらの腫瘍を含め，本実験で鉱さい群および他の群で観察された腫瘍はいずれも自然発生腫瘍として知られているものであった[5−8]．それらの発現率や発現時期にはとくに鉱さい群に特徴的な傾向がないことから，腫瘍の発現に関して，鉱さい粉じんの各臓器への影響はないものと思われた．また白血病以外の悪性腫瘍が鉱さい群で見られなかったが，これがクロム鉱さいのどのような影響によるものかはわからなかった．

非腫瘍性病変についても鉱さい群に特徴的な変化はなく，ほとんどが各群に共通したものであった．このうち鉱さい群では，膵臓のラ氏島増生，肝臓の胆管増生，慢性腎障害などの発現率や程度に他の群とやや異なった傾向がみられた．とくに腎の病変に関しては，クロム化合物が尿細管の障害をおこすことが知られており[9, 10]，鉱さい中のクロムの影響の可能性も考えられる．しかし本実験では粉じん濃度が1段階であること，観察例数が少ないなどの理由から，以上の変化が鉱さいによるものかどうかは明らかにできなかった．この点については，現在観察を行なっている2年間吸入実験の結果とあわせて検討し明確にしたい．

文　献

1) 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
2) 坂本義光，神谷信行，池田虎雄，平賀興吾：東京衛研年報，32-2，76，1982
3) 坂本義光，調　武久，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，135，1977
4) Davy, F. R. and Moloney, W. G. : *Lab. Invest.*, 23, 327, 1970
5) Coleman, G. L., Barthold, S. W., Osbaldiston, G. W., Foster, S. J. and Jonas, A. M. : *J. Gerontology*, 32, 258, 1977
6) 藤井　孝，多田幸恵，長澤明道，三栗谷久敏，矢野範男，湯沢勝広，平賀興吾：東京衛研年報，33，413，1982
7) 村岡義博，伊藤真喜子，前田ユミノ，林　裕造：*Exp. Animal.*, 26, 1, 1977
8)) 西部忠幸：奈医誌，27，1，1976
9) Hunter, W. C. and Roberts, J. M. : *Am. J. Path.*, 9, 133, 1933
10) Simonds, J. P. and Helper, D. E. : *Arch Path.* 39, 103, 1945

Explanation of Plates

Photo 1.　Prepeutial gland adenoma in rat lived

for 92 weeks (101 weeks old) after exposure to chromite ore residue dust. H & E, O.M. x 200

Photo 2. Interstitial cell tumors in testis of control rat lived for 111 weeks (120 weeks old) after periods of exposure. H & E. O.M. x 200

Photo 3. Pheochromocytoma in adrenal of rat lived for 90 weeks (99 weeks old) after exposure to JIS Dust No. 11. H & E, O.M. x 200

Photo 4. Mononuclear cell leukemic infiltration in spleen of rat lived for 118 weeks (127 weeks old) after exposure to chromite ore residue dust. H & E, O.M. x 400

Photo 5. Mononuclear cell leukemic infiltration in peripheral blood of same rat in photo 4. May–Grunwald–Giemsa stain, O. M. x 400

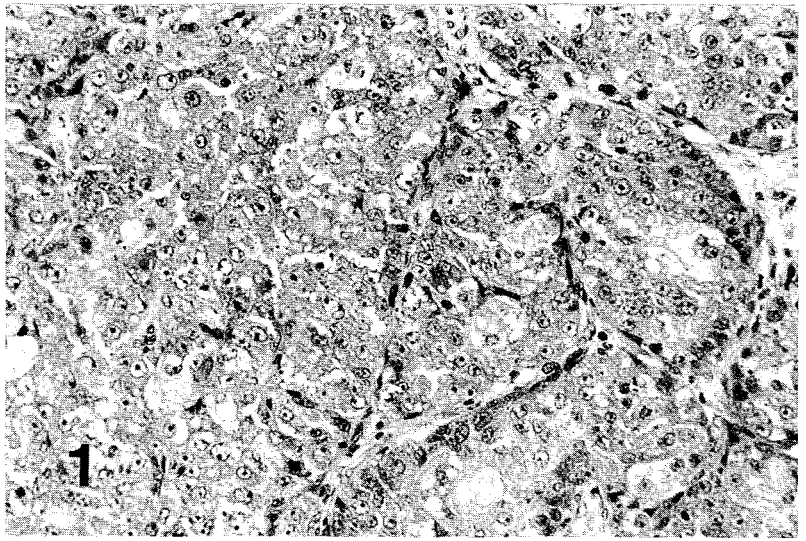
Photo 6. Islet cell hyperplasia in pancreas of rat lived for 86 weeks (97 weeks old) after exposure to chromite ore residue dust. H & E, O.M. x 200

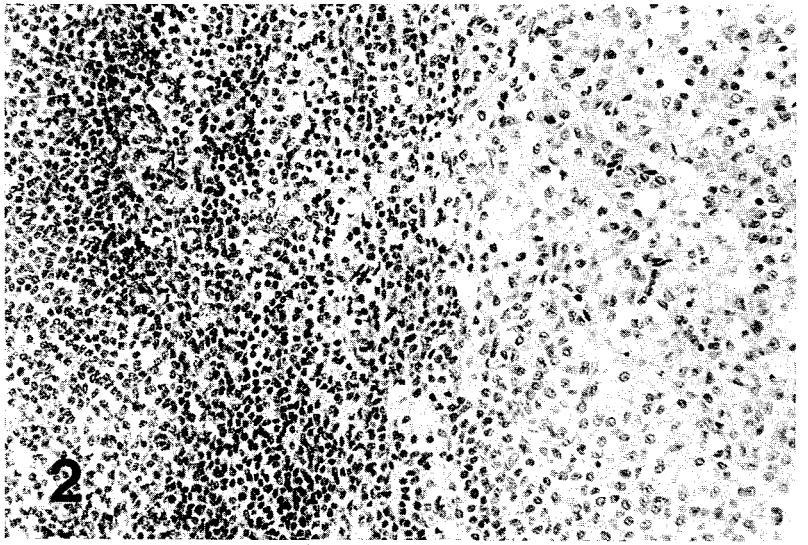
Photo 7. Marked nephropathy in rat lived for 116 weeks (125 weeks old) after exposure to chromite ore residue dust. H & E, O.M. x 100

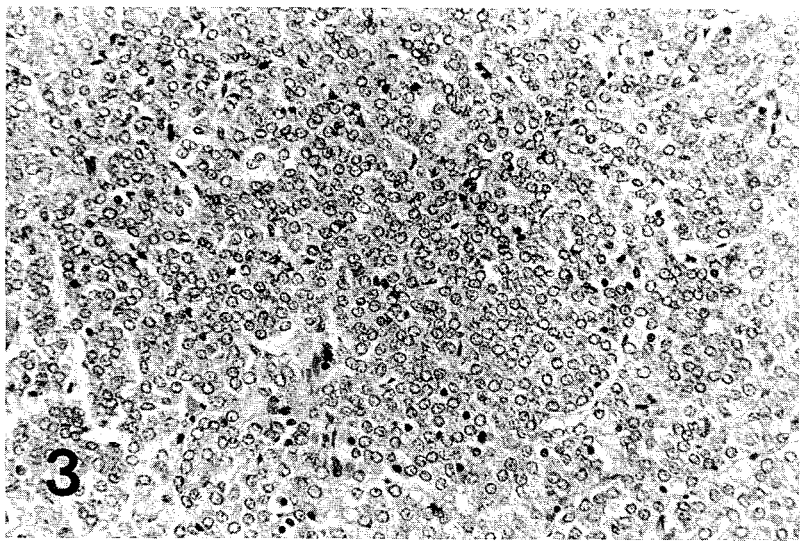
Photo 8. Bile ducts hyperplasia and mononuclear cell infiltration in liver of control rat lived for 97 weeks (106 weeks old) after period of exposure.

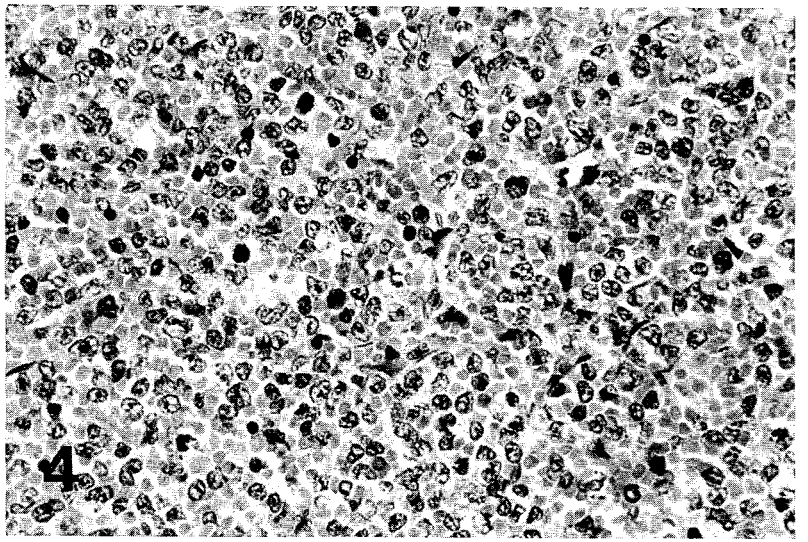
H&E : Hematoxylin and eosin staining

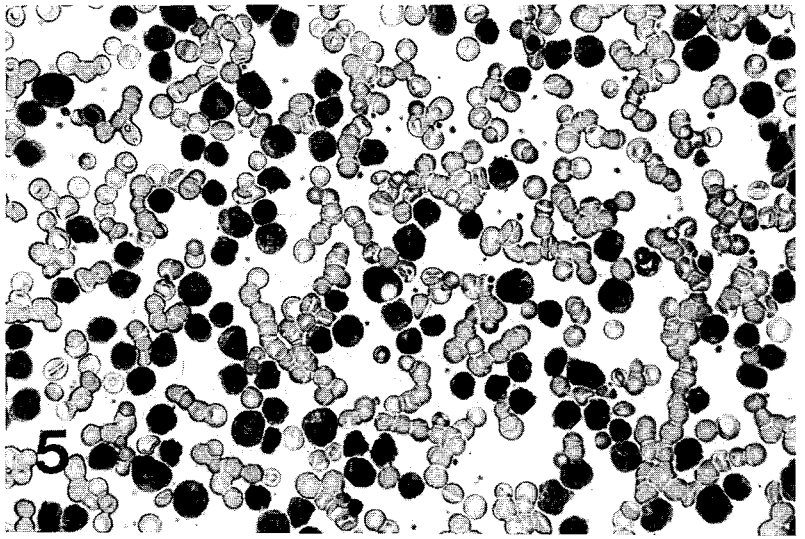
O.M. : Original magnification

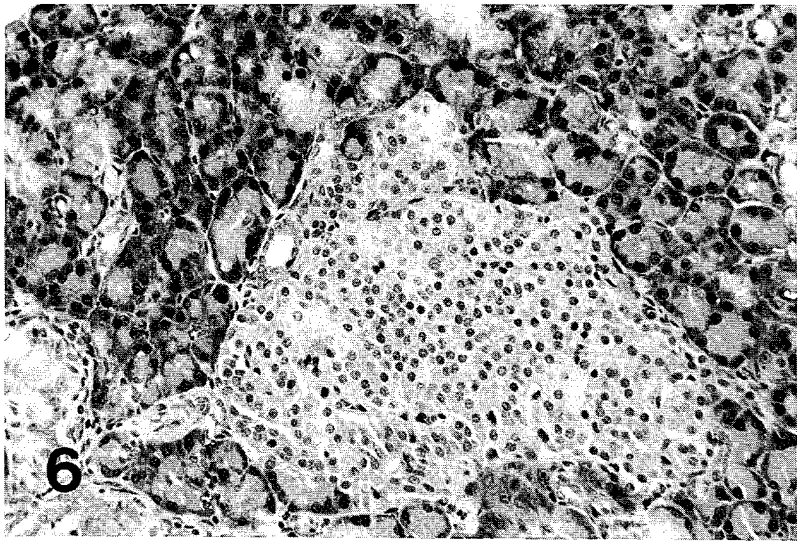

1


2

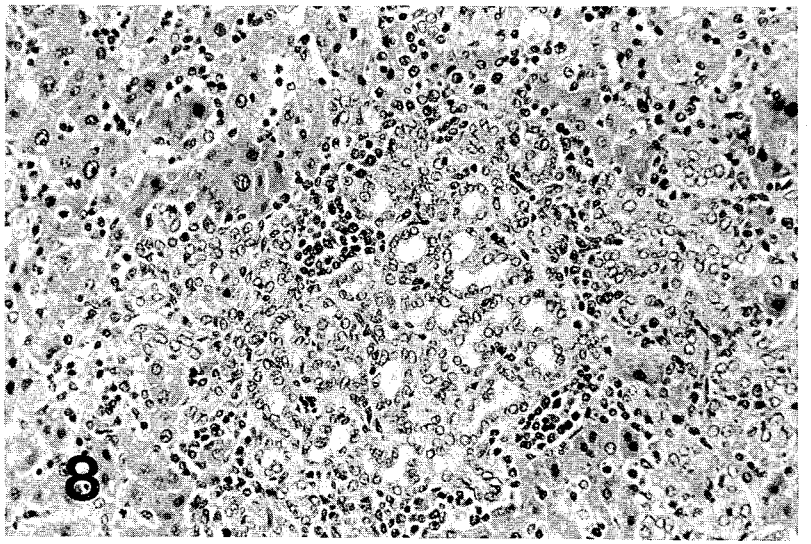

3


4


5


6

7


8

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 379-383, 1983

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 吸入後終生飼育ラットの臓器中金属の分析

神谷信行*, 坂本義光*, 佐々木美枝子*, 平賀興吾*

Inhalation Experiments of Chromite Ore Residue Dust to Rats for 1 Month– Metal Concentration in Tissue of Rats kept for Lifespan after Exposure

NOBUYUKI KAMIYA*, YOSHIMITSU SAKAMOTO*, MIEKO SASAKI* and KOGO HIRAGA*

Keywords：クロム鉱さい粉じん chromite ore residue dust, ラット rat, 吸入毒性 inhalation toxicity, 金属の分析 analysis of metals

緒　言

クロム鉱さい粉じんを1か月間吸入曝露したラットを曝露終了後バリア動物室に移して飼育を続け，鉱さいの生体への影響について終生にわたって観察を行った．そのうち一般症状，病理学的観察の結果についてはすでに報告した[1~3]．本報では曝露終了後1年間（53週）にわたる肺，肝臓，腎臓，脾臓，血液中のクロム濃度の推移および主な鉱さい成分元素であるアルミニウム，カルシウム，マンガン，ニッケル，ストロンチウム，チタン，鉄，亜鉛の肺における濃度の推移について述べる．

実験材料および方法

動物　Slc–wistar ラットの雄を4週令で購入し，1週間予備飼育をした後実験に用いた．曝露開始時の平均体重は110 g であった．

粉体　クロム鉱さい粉じんは鉱さい塊をボールミル（Alfrad Fritsch Co.）で約8時間粉砕，分篩して調製した．

粉体の組成は Table 1 に示すようにカルシウムが最も多く，クロムは水可溶性のものが1.2%，不溶性のものが1.6%の割合であった．

吸入実験　既報[4]の粉じん吸入実験装置により，クロム鉱さい粉じん濃度は 20 mg/m^{3}で，吸入期間は昼夜連続で1か月（30日）とした．また実験室内空気のみの対照群を設定した．

実験期間中の粉じん濃度は，設定濃度に対して±10%以内の変動幅に保たれていた．また粉じんの粒度分布は4.7μ以上が15%，4.6~2.1μが50%，2.0μ以下が35%の割合であった．吸入チャンバー内飼育条件は，温度25~26°，湿度50~60%，換気回数9~10 RPH で，照明時間は6時~18時とした．

曝露終了後動物はバリア動物室へ移して飼育した．吸入曝露およびバリア内飼育期間中，飼料は CE-2（日本クレア），飲料水は水道水をそれぞれ自由に摂取させた．

動物は曝露終了時および終了後1か月（4週），3か月（13週），6か月（26週）目に各6例を，1年目（53週）に3例を大腿部動静脈の切断により採血し，屠殺後，肺，肝臓，腎臓，脾臓の各臓器を摘出，秤量後これら臓器および血液中のクロム濃度を原子吸光法で測定した．特に肺については，アルミニウム，カルシウム，マンガン，ニッケル，ストロンチウム，チタン，鉄，亜鉛の濃度を ICP 発光分光分析法で測定した．

分析方法　摘出臓器および血液は洗浄済ビーカー[5]に入れ，ホットプレート上約90°で乾燥，放冷後硝酸を加えて1日放置したのち，硝酸，過酸化水素水で分解した．

分解終了後さらに加熱して乾固し，0.1 N 硝酸で一定量として試験溶液とした．別に試薬のみを用いて同様に操作した空試験溶液を調製した．原子吸光法，ICP 発光分光分析法による測定条件はそれぞれ Table 2，Table 3 に示した．

結果と考察

臓器中クロム濃度の変化　Fig.1，Table 4 に臓器および血液中のクロム濃度の経時的変化を湿重量あたり肺は μg/g，肝臓，腎臓，脾臓，血液は ng/g で示した．肺，

* 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

肝臓，腎臓の各臓器（脾臓を除く）および血液中のクロム濃度の変化は曝露終了時からの期間にともなって減少傾向を示した．肺は直接曝露を受けるため他の臓器と比較して非常に高い値を示し，曝露終了時で85.8 μg/g，終了後1か月目59.8 μg/g，3か月目44.0 μg/gで，1年目には25.2 μg/gと減少したが，なお曝露終了時の30%が残留していた．肺以外の臓器では腎臓が終了時857 n/gと最も高い値を示したが，1か月目で終了時の40%にあたる347 ng/gに減少し，3か月目244 ng/g，6か月目160 ng/g，1年目99.0 ng/gで終了時の11%が残留していた．肝臓は終了時44.3 ng/g，1か月目25.6 ng/g，3か月目16.4 ng/g，6か月目12.6 ng/g，1年目10.5 ng/gで6か月目で対照群との差がなくなった．血液では終了時70.2 ng/g，1か月目38.5 ng/g，3か月目9.1 ng/g，6か月目8.6 ng/g，1年目8.5 ng/gで3か月目で対照群との差がなくなった．一方脾臓は終了時379 ng/g，1か月目497 ng/g，3か月目485 ng/gと増加し，その後6か月目178 ng/g，1年目63.0 ng/gと減少し，クロム濃度の変化は他の臓器と異なる傾向を示した．また1年目の残留量は終了時の14%，最も高い値となった1か月目の11%であった．

このように経気道摂取されたクロムは曝露終了時，肺，

Table 1. Composition of Chromite Ore Residue Dust

	(%)
Ca	21.2
Fe	6.1
Cr	2.8(1.2)*
Si	2.4
Al	1.8
Na	0.4
Ni	0.3
Mn	0.08
Ti	0.04
Zn	0.03
Sr	0.005

( ) *: Water soluble Cr

Atomic Absorption Spectrophotometry

Table 3. Analytical condition for Metal by Inductively coupled Plasma–Atomic Emission Spectrophotometery

Instrument	JOVIN–YVON JY-48P
Wavelength (nm)	Ni 231.6 Mn 257.6 Fe 259.9 Al 308.2 Ti 334.9 Sr 407.7 Ca 422.6 Zn 427.8*
	*2nd Line
Incident Power	1.3 Kw
Reflect Power	0 Kw
Coolant Gas	15 l/min.
Plasma Gas	0.6 l/min.
Nebulizer Gas	0.5 l/min.
Observation Hight	16 mm above the load coil

Table 2. Analytical Condition for Chromium by Atomic Absorption Spectrophotometry

Instrument	PERKIN–ELMER AA-4000 Graphite Furnace HGA-400 Auto Sampler AS-40		
Instrumental Parameters			
Wavelength	357.9 nm		
Spectral Bandwidth	0.7 nm		
Light Source	Hollow Cathode Lamp		
Lamp Current	10 mA		
Background Correction	D_2 lamp		
HGA Parameters			
Step	DRY	CHAR	ATOM
Temp.	100 110	1100	2300
Ramp (sec.)	15 15	20	0
Hold (sec.)	15 5	25	6
Gas Flow (ml/min.)	300 300	300	60

腎臓，脾臓，血液，肝臓の順に高い値を示し，1年目には肺で30%，腎臓，脾臓で11%が残留したが，肝臓，血液では対照群との差はなくクロムの蓄積性は認められなかった．特に肺は1年目で対照群の1500倍の値を示し，鉱さい中のクロムは比較的長い間肺内にとどまっている性質があると考えられる．鉱さい中のクロム化合物はおもに酸化第二クロムである[6]が，この生物学的半減期は200日以上といわれている[7]．脾臓でのクロム濃度の変化は特徴的で，曝露終了後も増加したのち，3か月目以降減少した．これは赤血球にとりこまれたクロムが，血球が脾臓で破壊されることにより一時的に増加，蓄積するためと考えられる．

肺における鉱さい成分元素の変化 Fig. 2, Table 5 に肺での各元素濃度の経時的変化を湿重量あたり μg/g で示した．カルシウム，ストロンチウム，アルミニウムは曝露終了後すみやかに減少し，カルシウム，ストロンチウムは3か月目で，アルミニウムは1年目で対照群と差がなくなった．特にカルシウムは終了後1か月目で終了時の14%にまで減少した．マンガン，ニッケルも同様に終了後すみやかに減少したが，1年目でも対照群と比較してマンガンは2.0倍，ニッケルは4.6倍であった．またニッケルはカルシウムと似た変化を示し，終了後1か月目で終了時の21%，3か月目で6%にまで減少した．鉄，チタンは終了後ゆるやかに減少し，1年目でも対照群と比較して鉄は2.0倍，チタンは41倍で，残留量は終了時のそれぞれ40%，49%であった．これらの金属はクロムと同様に排泄される割合が少なかった．亜鉛は終了

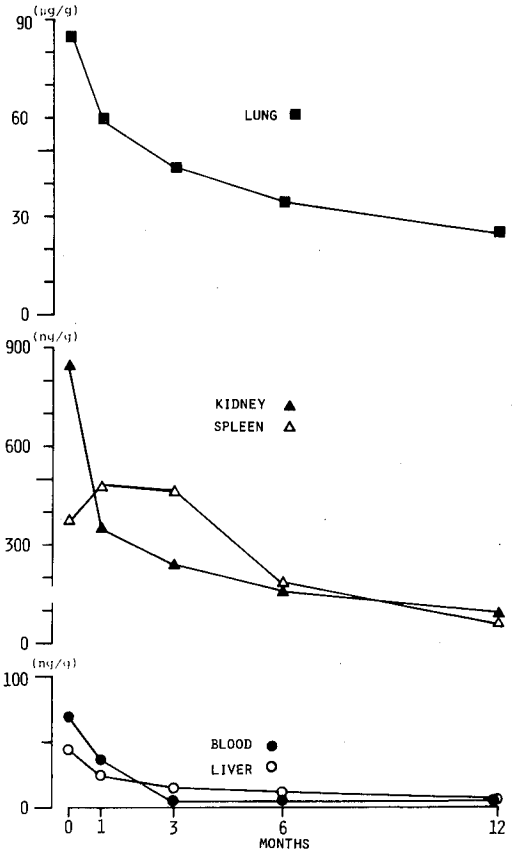


Fig.1. Chromium Concentraion in Lung, kidney, Spleen, Blood and Liver after 1 Month Exposure of Chromite Ore Residue dust

Table 4. Chromium Concentration in Lung, Liver, Kidney, Spleen and Blood after 1 Month Exposure of Chromite Ore Residue Dust

Tissue＼Month	0	1	3	6	12
Lung	85.8±17.7*[a]	59.8±15.6*	44.0±8.9*	34.7±7.6*	25.2±5.3*
	0.013±0.003[b]	0.013±0.004	0.018±0.004	0.017±0.003	0.016±0.004
Liver	44.3±19.8*	25.6±11.9*	19.4±5.8*	12.6±4.9	10.5±3.2
	5.6±2.6	4.5±3.6	6.7±3.5	9.2±4.5	10.9±4.2
Kidney	857±80*	347±78*	244±46*	160±25*	99±23*
	10.4±9.8	12.7±4.3	9.7±5.0	11.4±3.9	12.2±4.5
Spleen	379±76*	497±53*	485±74*	178±45*	63±20*
	9.7±11.3	13.0±9.5	14.3±11.4	10.4±7.4	10.1±9.7
Blood	70.2±14.2*	38.5±8.2*	9.1±4.8	8.6±3.0	8.5±2.7
	5.6±2.6	7.5±3.4	7.7±4.2	7.9±3.3	8.2±4.1

mean ± SD (ng/g < Lung μg/g >), a) chromite ore residue dust group, b) control, *P < 0.05

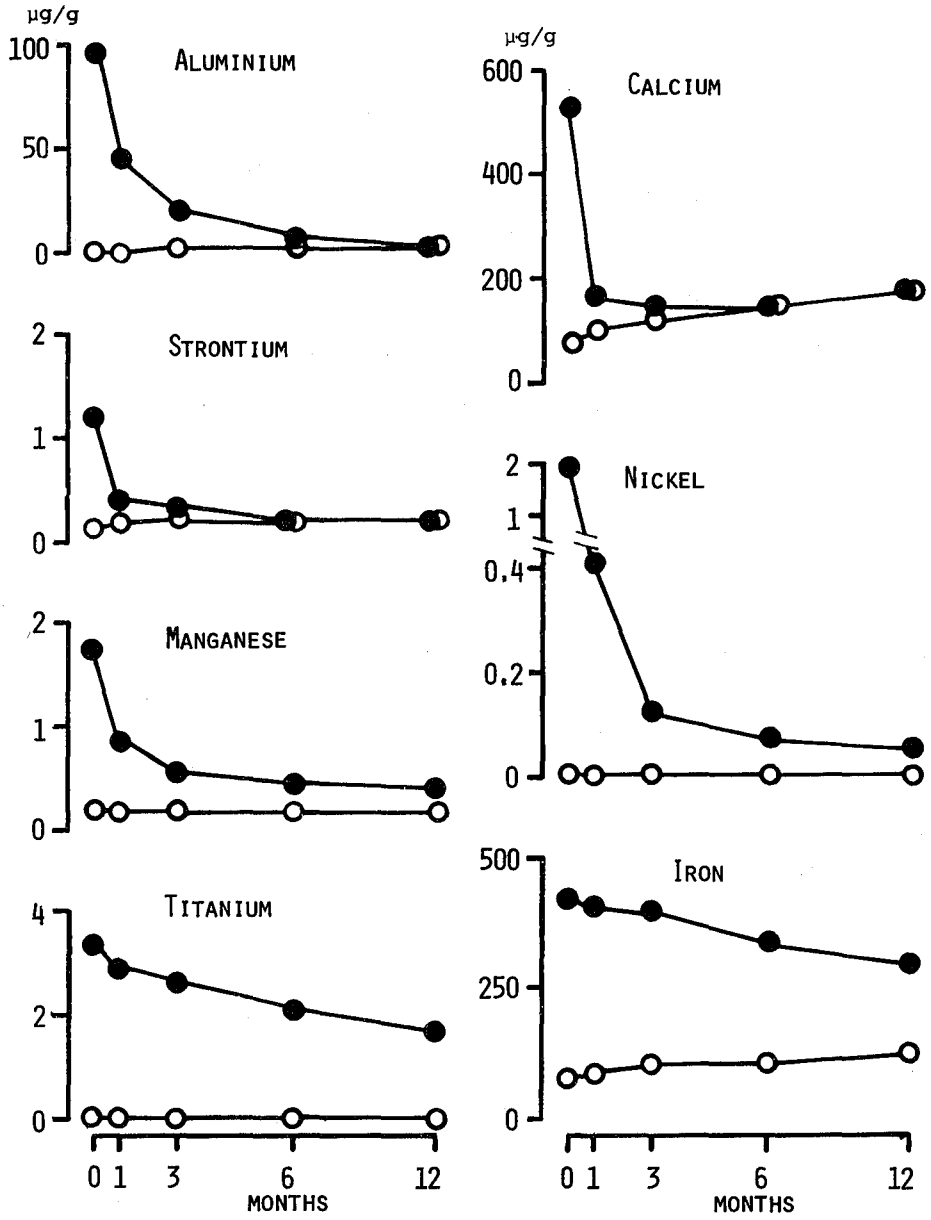


Fig.2. Aluminium, Calcium, Iron, Manganese, Nickel, Strontium and Titanium Concentration in Lung after 1 Month Exposure of Chromite Ore Residue Dust
(○—○) Control, (●—●) Chromite ore residue dust group

時および1年目までの全期間を通じて，曝露群と対照群との差はなかった．

このようにカルシウム，ストロンチウム，アルミニウム，マンガン，ニッケルは早期に肺から排泄されるのに比べ，鉄，チタン，クロムは排泄される割合が遅く，1年目でもなお残留する性質を示した．肺に吸入された粉じんは可溶性のものは血液へ移行し早期に肺から排泄され，不溶性のものは大食細胞に貪食されたり，リンパ系への移行により除去される[8]．鉱さいの各成分は主に酸化物として存在する[6]が，これらの溶解度などの化学的性質には差があり，肺からの排泄される割合が異なっているものと考えられる．

Table 5. Aluminium, Calcium, Strontium, Nickel, Manganese, Iron, Titanium and Zinc Concentration in Lung after 1 Month Exposure of Chromite ore Residue Dust

Element＼Month	0	1	3	6	12
Al	97.5±8.2*[a]	45.2±2.5*	21.9±4.3*	7.8±2.2*	2.3±1.9
	0.8±0.2[b]	1.6±0.4	2.8±0.8	2.8±0.9	2.6±1.2
Ca	528±62*	173±9*	154±9	147±7	176±10
	77±11	103±8	139±12	150±8	172±9
Sr	1.19±0.15*	0.39±0.01*	0.27±0.02	0.22±0.02	0.21±0.07
	0.17±0.03	0.22±0.03	0.25±0.03	0.24±0.03	0.23±0.05
Ni	1950±132*	427±74*	128±17*	76±8*	57±8*
	11.2±2.4	10.9±3.4	9.9±2.7	12.1±4.3	12.5±2.2
Mn	1.73±0.11*	0.85±0.4*	0.54±0.02*	0.46±0.02*	0.41±0.05*
	0.18±0.03	0.20±0.02	0.18±0.02	0.19±0.03	0.21±0.04
Fe	420±26*	407±34*	397±13*	342±29*	261±39*
	84±9	86±11	114±9	112±7	129±15
Ti	3.34±0.35*	2.94±0.16*	2.55±0.24*	2.12±0.26*	1.64±0.22*
	0.06±0.01	0.08±0.01	0.06±0.02	0.04±0.01	0.04±0.05
Zn	15.8±0.8	15.8±0.6	16.6±0.4	17.1±1.1	17.3±1.9
	15.9±0.9	16.9±0.8	16.1±0.4	16.4±0.9	16.9±1.5

mean ± SD (μg/g), a) chromite ore residue dust group, b) control, *$P < 0.05$

ま と め

クロム鉱さい粉じん20 mg/m^{3}の濃度で1か月間吸入曝露したラットにおける，曝露中止後の鉱さいの影響を観察するため，曝露終了時，終了後1か月目，3か月目，6か月目，1年目における臓器，血液中のクロムの経時的変化および肺での鉱さい成分元素の経時的変化について検討した．

クロム濃度は肺，腎臓，肝臓，血液で曝露終了時より期間の経過とともに減少したが，脾臓は終了後も増加を続け，3か月目より減少した．また肺は1年目で30%，腎臓，脾臓は11%がなお残留していた．肝臓は6か月目，血液は3か月目で対照群との差がなくなった．

肺におけるカルシウム，ストロンチウム，アルミニウム，マンガン，ニッケルは曝露終了後すみやかに減少し，カルシウム，ストロンチウム，アルミニウムは対照群との差がなくなったが，マンガン，ニッケルは1年目でなお対照群より大きい値を示した．鉄，チタンは終了後ゆるやかな減少を示し，1年目でそれぞれ40%，49%が残留し，クロムと類似の経時変化を示して，肺への蓄積性が示唆された．亜鉛は全期間を通じて対照群と差がなかった．

文 献

1) 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
2) 坂本義光，神谷信行，池田虎雄，平賀興吾：東京衛研年報，32－2，77，1981
3) 坂本義光，神谷信行，池田虎雄，平賀興吾：東京衛研年報，34,369，1983
4) 坂本義光，調 武久，平賀興吾：東京衛研年報，28－2，135，1977
5) 神谷信行，坂本義光，伊川三枝子，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，29－2，64，1978
6) 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
7) Morrow, P. E., Gibb, F. R., Davies, H. and Fisher, M. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **12**, 372, 1968
8) Hatch, T. F. and Gross, P. : *Pulmonary Deposition and Retention of Inhaled Aerosols*, 87, 1964, Academic Press, New York

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 384-387, 1983

フタル酸エステルの精巣萎縮作用：亜鉛投与の影響

大石眞之*, 平賀興吾*

Testicular Atrophy Induced by Dietary Di - 2 - ethylhexyl Phthalate : Effect of Zinc Supplement

SHINSHI OISHI* and KOGO HIRAGA*

Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP 2% in diet) administered for 7 days to young male rats was found to cause testicular atrophy and loss of testicular zinc. This testicular atrophy could not be prevented by coadministration of zinc. The zinc concentration in the testis did not elevate by zinc supplement despite an increase in zinc concentration in the liver and serum. The result suggests that the toxic effect of DEHP on the testis may not be due to interference of gastrointestinal absorption of zinc.

Keywords : testicular atrophy, di- 2 -ethylhexyl phthalate, zinc supplment, gastrointestinal absorption of zinc

フタル酸エステルはプラスチック製品の可塑剤として広く用いられ，日本における1980年度の総生産量は約35万トンである．フタル酸エステルの生体影響については最近いくつかの総説が書かれている[1-3]．フタル酸エステルは輸血を受けた患者の血漿，脾，肝，肺，体脂肪および胃腸管から高濃度に検出されている[4-7]．更に医療的あるいは職業的なフタル酸エステル暴露を受けていない人の腎からも検出されており[8]，フタル酸エステルによる人体の高度の汚染が懸念されている．

フタル酸エステルの毒性に関する最近の興味の中心は1つは発癌性についてであり，もう1つは雄性性殖器官に対するものである[9]．最も多く使われているフタル酸エステルであるジー2ーエチルヘキシルフタレート（DEHP）は，飼料に混合して投与した場合，ラットの精巣に高度な萎縮をもたらすことが報告されている[10,11]．また数種のアルキルフタレートは精巣中亜鉛の減少をともなう精巣の萎縮を生じる[12-15]．Caterらはジ-n-ブチルフタレート（DBP）およびそのモノエステルは精巣中亜鉛濃度の減少とともに亜鉛の尿中排泄の増加を報告している[16]．Fosterらはジ-n-ペンチルフタレート（DPP）投与後の精巣の組織化学的研究により，いかなる形態学的変化よりも早く，精細胞のゴルジ領域の亜鉛の減少が生じることを報告している[17]．

亜鉛の欠乏が精巣萎縮を生じることはよく知られており[18-22]，またカドミウムやマンガンのように精巣中の亜鉛代謝に影響する物質も精巣萎縮を生じる[23,24]．これらの萎縮は亜鉛の投与により回復可能である[23-25]．

我々はDEHPの経口投与により生じたラットの精巣萎縮は，亜鉛の投与では回復しないことを既に報告した[26]．今回は飼料に混合して摂取させたDEHPにより生じた精巣萎縮が亜鉛の投与で回復するか否かについて検討した．

材料および方法

Wistar系雄ラットを実験前1週間代謝ケージに個別飼育し実験環境の馴化を行った．飼料および飲水は全実験期間中自由に摂取させた．

実験1. 体重109±1.1gの雄ラットを4群（1群7匹）に分け，第1群はクレアCE-2飼料を摂取させ，0.2m*l*の生理食塩水を毎日腹腔投与した（Control–saline–ip群）．第2群は2％のDEHPを含むCE-2を摂取させ，0.2m*l*の生理的食塩水を毎日腹腔投与した（DEHP-saline-ip群）．第3群はCE-2を摂取させ0.2m*l*の硫酸亜鉛溶液（亜鉛として7 mg/kg/day）を毎日腹腔投与した（Control-Zn-ip群）．第4群は2％のDEHPを含むCE-2を摂取させ，0.2m*l*の硫酸亜鉛溶液を毎日腹腔内に投与した（DEHP-Zn-ip群）．7日間連続投与後，最終投与の24時間後に断頭により屠殺，採血し，精巣および肝重量を測定した．血清および組織は分析まで－30°Cに保存した．

実験2. 体重147±1.0gの雄ラットを4群に分け，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. Effect of DEHP and Zinc ip on Relative Testicular and Liver Weight*

Groups	Testis	Liver
Control-saline-ip	100	100
DEHP-saline-ip	72±4.5**	160±3.8**
Control-Zn-ip	121±2.9**	96±2.0
DEHP-Zn-ip	67±4.5**,***	170±4.3**,***

* Values are percentages of control-saline-ip and means±SE for 7 animals

** Significantly Different from control-saline-ip, $p<0.05$.

*** Significantly different from control-Zn-ip, $p<0.05$.

Table 2. The Effect of DEHP and Zinc ip on Concentration and Content in the Testis, Liver and Serum of Rats*

Group	Testes	Liver	Serum
Concentration (μg/g or μg/m*l*)			
Control-saline-ip	16.3±0.15	21.6±0.20	1.25±0.09
DEHP-saline-ip	14.2±0.23**	18.2±0.20**	1.07±0.014**
Control-Zn-ip	16.5±0.30	54.8±2.06**	2.07±0.55**
DEHP-Zn-ip	14.3±0.35**	38.5±1.18**,***	1.82±0.013**,**
Content (μg/tissue)			
Control-saline-ip	24.5±1.59	184±3.86	
DEHP-saline-ip	14.1±1.68**	237±15.4**	
Control-Zn-ip	26.2±1.75	405±35.7**	
DEHP-Zn-ip	11.7±1.09**,***	458±28.2**	

* Values are means±SE for 7 animals.

** Significantly different from cotrol-saline-ip, $p<0.05$.

*** Significantly different from control-Zn-ip, $p<0.05$.

Table 3. The Effect of DEHP and Zinc Supplemented Diet on Testicular and Liver Weights of Rats*

Group	Testes	Liver
Control-fd	100	100
DEHP-fd	74±7.6**	162±3.5**
Control-Zn-fd	101±4.9	97±0.94
DEHP-Zn-fd	79±5.4**,***	170±5.4**,***

*Values are percentages of control-fd and means±SD for 5 animals.

** Significantly different from control-fd, $p<0.05$.

*** Significantly different from control-Zn-fd, $p<0.05$.

群各5匹とした．第1群はCE-2飼料を摂取させた（Control-fd群）．第2群は2％のDEHPを含むCE-2を摂取させた（DEHP-fd群）．第3群は硫酸亜鉛添加CE-2（亜鉛として400ppm）を摂取させた（Control-Zn-fd群）．第4群は2％のDEHPを含む亜鉛添加CE-2を摂取させた．1週間後ラットを断頭により屠殺，採血，精巣および肝重量を測定した．血清および組織は分析まで−30°Cで保存した．

実験1および2のラットの体重，飼料摂取量，尿量，尿中亜鉛量，糞量，糞中亜鉛量を毎日測定した．

組織および血清の亜鉛は前報に従って分析した[14]．

各データはSheffé の分散分析またはStutent *t*-testにより検定を行った．

Table 4. The Effect of DEHP and Zinc Supplemented Diet on the Testicular and Liver Zinc Content*

Group	Testis (μg/testis)	Liver (μg/Liver)	Serum (μg/ml)
Control-fd	35.9±2.04	219±12.3	1.09±0.012
DEHP-fd	27.1±3.13**	248±18.8	0.96±0.020
Control-Zn-fd	37.5±2.27	216±12.4	1.65±0.26**
DEHP-Zn-fd	29.3±2.41***	270±11.0**,***	1.42±0.035**,***

* Values are means±SE for 5 rats.

** Significantly different from control-fd, $p<0.05$.

*** Significantly different from control-Zn-fd, $p<0.05$.

結　果

実験1. 飼料摂取量より計算したDEHPの1日平均摂取量はDEHP-saline-ip群で2.23g/kg/day，DEHP-Zn-ip群で2.03g/kg/dayであった．

精巣および肝重量をTable 1に示した．DEHP-saline-ip群およびDEHP-Zn-ip群ともそれぞれControl-saline-ip群，Control-Zn-ip群より精巣重量の減少，肝重量の増加がみられた．一方Control-Zn-ip群の精巣重量はControl-saline-ip群に比較して増加していた．

DEHPおよび亜鉛投与と精巣および肝の亜鉛濃度および含量に与える影響をTable 2に示した．DEHP-saline-ip群では精巣中亜鉛の濃度および含量の減少がみられた．またDEHP-Zn-ip群の精巣中亜鉛の濃度および含量はDEHP-saline-ip群との間に差はみられなかったが，肝の亜鉛濃度および含量はDEHP-Zn-ip群は，Control-saline-ip群に比べて有意に高かった．

実験2. 飼料摂取量より計算したDEHPの1日平均摂取量はDEHP-fd群で1.94g/kg/day，DEHP-Zn-fd群で1.77g/kg/dayであった．又亜鉛の1日平均摂取量はDEHP-Zn-fd群で35.4mg/kg/dayであった．

精巣および肝重量をTable 3に示した．DEHP-fd群，DEHP-Zn-fd群とも精巣重量の減少，肝重量の増加がみられた．

精巣および肝の亜鉛含量および血清中亜鉛濃度をTable 4に示した．DEHP-fd群，DEHP-Zn-fd群とも含量の減少が精巣においてみられたが，DEHP-Zn-fd群の血清亜鉛濃度はControl-fd群，DEHP-fd群に比べて有意に高かった．

考　察

人を含めた数種の生物の雄性性成熟に対する亜鉛の重要性は既によく知られている[27,28]．亜鉛は精細管の精巣上皮細胞の維持に不可欠であり，亜鉛の食飼性の欠乏は，人および実験動物で精巣萎縮をもたらす[19,29,30]．人における実験的亜鉛欠乏は精子減少症および精巣機能の低下を示し，これらの症状は食事中の亜鉛を補促することで回復できる[31]．

今回の実験では，DEHPは精巣の萎縮と精巣中亜鉛含量の減少が示された．しかし亜鉛の静注あるいは食飼中への添加によっても，精巣中亜鉛の増加がDEHP-Zn-ip，DEHP-Zn-fd群のみならず，Control群においてもみられなかった．これらの結果は，硫酸亜鉛投与後のメタロチオネイン量が，膵，肝，小腸および腎では用量依存的に増加したが，精巣では増加しなかった報告[32]に一致しているものと考えられる．

精巣の亜鉛が亜鉛投与によっても上昇しないにもかかわらず，肝および血清の亜鉛がDEHP-Zn-fd群で上昇したことは，DEHPが腸管からの亜鉛吸収を阻害するために精巣中亜鉛の減少をもたらし，精巣の萎縮を生じるという考え[33]を否定している．

Fosterら[12,13]およびCaterら[16]はDBPあるいはDPP投与により精巣中亜鉛濃度の減少とともに尿中亜鉛の増加を報告しているが，今回の実験では尿中亜鉛の増加はみられず糞中亜鉛でもControl群対DEHP群で差はみられなかった．経口あるいは静注された亜鉛は95%以上糞から排泄されるとされている．それゆえDEHPと同時投与されたZnの尿中排泄の増加は，精巣亜鉛の減少の直接の反映ではなく，全身亜鉛代謝の変化の結果と考えられる．

フタル酸エステルの精巣萎縮作用の機構はまだ不明であるが，1つはカドミウム投与時にみられるような精巣血管の傷害[34]による精巣中亜鉛の減少あるいは視床下部－下垂体－性腺系の傷害が考えられる．

文　献

1) Thomas, J.A., Darvy, T.D., Wallin, R.F., Garvin, R.J. and Martis L.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 45,

1, 1978.
2) Thomas, J.A. and Northup, S.J. : *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, 141. 1982.
3) Lawrence, W.H. and Tuell, S.F. : *Cli. Toxicol.*, 15, 447, 1979.
4) Jaeger, R.J. and Rubin, R.J. : *Science*, 170, 560, 1970.
5) Jaeger, R.J. and Rubin, R.J. : *New Engl. J. Med.*, 287, 1114, 1972.
6) Jaeger, R.J. and Rubin, R.J. : *Environ. Health Perspect.*, 3, 95, 1972.
7) Hillman, L.S., Goodwin, S.L. and Sherman, W.R. : *New Engl. J. Med.* 292, 381, 1975.
8) Overturf, M.L., Drihert, R.E., Liehr, J.G., Kiekendall, W.H. and Caprioli, R.M. : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 22, 536, 1979.
9) Shaffer, C.B., Carpenter, C.P. and Smith, H.F., Jr. : *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, 27, 130, 1945.
10) 大石眞之, 平賀興吾：東京衛研年報, 26－2, 131, 1975
11) Gray, T.J.B., Butterworth, K.R., Gaut, I.F., Grasso, G.P. and Gangolli, S.D. : *Fd. Cosmet. Toxicol.* 15, 389, 1977.
12) Foster, P.M.D., Thomas, L.V., Cook, M.W. and Gangolli, S.D. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 54, 392, 1980.
13) Foster, P.M.D., Lake, B.G., Thomas, L.V., Cook, M.W. and Gangolli, S.D. : *Chem.–Biol. Interactions*, 34, 233, 1981.
14) Oishi, S. and Hiraga, K. : *Toxicol Appl. Pharmacol.* 53, 35, 1980.
15) Oishi, S. and Hiraga, K. : *Toxicology*, 15, 197, 1980.
16) Cater, B.R., Cook, M.W., Gangolli, S.D. and Grasso, P. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 41, 609, 1977.
17) Foster, P.M.D., Foster, J.R., Cook, M.W., Thomas, L.V. and Gangolli S.D. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 63, 120, 1982.
18) Millar, M.J., Fischer, M.I., Elcoate, P.V. and Mawson, C.A. : *Canada. J. Biochem. Physiol.*, 36, 557, 1958.
19) Millar, M.J., Elcoate, P.V., Fischer, M.I. and Mawson, C.A. : *Canada. J. Biochem. Physiol.*, 38, 1457, 1960.
20) Prasad, A.S. : *Zinc Metabolism*, 250, 1966, Thomas, Springfield.
21) Prasad, A.S. : *Am. J. Dis. Child.*, 130, 359, 1976.
22) Underwood, E.J. and Somers, M. : *Aust. J. Agr. Res.*, 20, 889, 1969.
23) Parizek, J. : *J. Endocr.*, 15, 56, 1957.
24) Chandra, S.V., Saxena, D.K. and Mason, M.Z. : *Ind. Health.* 13, 51, 1975.
25) Gunn, S.A., Gould, T.C. and Anderson, W.A.D. : *Arch Pathol.*, 71, 274, 1961.
26) Oishi, S. and Hiraga, K. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, in press.
27) Sandstead, H.H., Prasad, A.S., Schulert, A.R., Fraid, Z., Maile, A. Bassilly, S. and Darvy, W.J. : *Am. J. Clin. Nutr.*, 20, 422, 1967.
28) Underwood, E.J. *Trace Element in Human Nutrition*, 3 rd ed., 208, 1971.
29) Elcoate, D.V., Fischer, M.I., Mason, C.A. and Millar, M.J. : *J. Physiol.*, 129, 53p, 1955.
30) Gunn, S.A. and Gould, T.C. : *Cadmium and Other Mineral Elements in the Testis*, Johnson, A.D., Gomes, W.R. and Vandemark, N.L., Vol 3, 377, Academic Press, New York and London.
31) Abbasi, A.A., Prasad, A.S., Rabbani, P. and DuMocuhelle, E. : *J. Lab Clin. Med.*, 96, 544, 1980.
32) Onosaka, S. and Cherian, M.G. : *Toxicology*, 23, 11, 1982.
33) Curto, K.A. and Thomas J.A. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 62, 121, 1982.
34) Niemi, M. and Kormano, M. : *Acta. Pathol. Scandinavica*, 63, 513, 1965.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 388-391, 1983

プロピレングリコールの細胞遺伝学的研究

吉田誠二*, 佐々木美枝子*, 平賀興吾*

Cytogenetic Studies of Propylene Glycol

SEIJI YOSHIDA*, MIEKO SASAKI* and KOGO HIRAGA*

Keywords: プロピレングリコール Propylene Glycol, 染色体分析 Chromosome Analysis, マウス Mouse

緒　言

変異原性試験は体細胞もしくは生殖細胞のDNA傷害を検知するために行われるものであり，ここで生じた体細胞突然変異は人への種々の機能傷害を予知するものであり特に発ガンを予測する一つの材料にもなる．同様に，生殖細胞に生じた突然変異は繁殖能力の欠如および次世代への影響として胎児の発育不良など種々の傷害を誘起する一因になる．

現在，哺乳動物を用いる変異原試験は生じる突然変異の型により数種類の検出方法があるが，その中で体細胞染色体異常を指標とする *in vivo* 染色体試験が他の方法に比べ比較的容易であり，かつ用いる動物数も他の試験に要する数の1/5～1/10という利点があり盛んに行われている．

この *in vivo* 染色体試験を用い現在，合成着香料，合成着色料および合成保存量など各種食品添加物の溶媒として用いられているプロピレングリコール[1] の変異原試験を行ったので報告する．

材料および方法

1. **試験物質**：Propylene Glycol（以下P.Gと略す）は和光純薬工業社製でLot No. TSE 4109のものを用いた．

2. ***in vivo* 染色体試験**（1）：日本クレア株式会社育生のICRマウス雄を5週令で購入し8週令の時点で以下の実験に供した．P.Gを蒸留水で溶解し80%P.G溶液を作製した．投与容量は20m*l*, 10m*l* および5 m*l*/kgとし，胃ゾンデにより経口投与を行った．なお，陽性対照には既知変異原物質であるBusulfanを用いた．Busulfanを Dimethylsulfoxide に溶解し種々の濃度段階を作製し腹腔内投与を行った．また，陰性対照は無処理とした．P.G投与後24ないし48時間目に各群3匹の動物を放血により屠殺後常法により骨髄細胞を採取し染色体標本を作製しギムザ染色を行い分裂中期のよく拡がった細胞について染色体分析を行った．なお，陽性対照のBusulfanは投与後24時間目のみとし，一群2匹を用いた．染色体標本の作製は上記同様に行った．

3. ***in vivo* 染色体試験**（2）：日本クレア株式会社育生のICRマウス雄を5週令で購入し，8週令の時点で以下の実験に供した．P.Gを水道水で溶解し20%，10%および5%濃度のP.G溶液を作製した．この各種濃度のP.G溶液を吸水瓶に分注し，日本クレア株式会社製固型飼料CE－2とともに自由に与えた．投与後1週間ないし2週間目に各群3匹の動物を放血により屠殺後常法により骨髄細胞を採取し染色体標本を作製した．標本の染色および分析は前述の試験（1）と同様に行った．

結果および考察

***in vivo* 染色体試験**（1）：各動物より50個の分裂中期細胞を観察した結果をTable 1に示す．

24時間処理におけるP.Gの20m*l*, 10m*l* および5 m*l*/kg群の染色体異常細胞の頻度は無処理の陰性対照の頻度と同程度であった．また，Tableには示していないが，陰性対照も含めて染色体の数的異常は全く見られなかった．また，48時間処理においても24時間処理同様に陰性対照との差は見られなかった．一方，現在までに我々が行って来た無処理ICRマウスの染色体分析のバックグラウンドではExchangeおよびRing chromosomeは全く見られていない．このことにより，P.G 20m*l*/kg群の24および48時間処理でExchangeおよびRing chromosomeが各1例ずつ観察されており，P.Gの作用による誘起と思える．次に陽性対照として用いたBusulfanの染色体分析の結果をTable 2に示す．

既報[2] 通りに染色体の構造異常，特に切断型の異常

* 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 Laboratoly of Public Health
24－1, Hyakuninchо 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Frequency of Chromosome Aberrations Induced by Propylene Glycol – Oral Administration

Duration of Treatment (h)	Treatment Dose (ml/kg)	Animal No.	No.of Cells Observed	Total Aberrations	gap		break		Ex[1]	Ri[2]
					C1	C2	C1	C2		
24	20	1	50	3	1	0	2	0	0	0
		2	50	1	0	0	0	0	1	0
		3	50	2	0	0	1	0	0	1
		Total	150	6	1	0	3	0	1	1
	10	1	50	1	1	0	0	0	0	0
		2	50	1	0	0	1	0	0	0
		3	50	1	0	0	1	0	0	0
		Total	150	3	1	0	2	0	0	0
	5	1	50	0	0	0	0	0	0	0
		2	50	2	2	0	0	0	0	0
		3	50	1	1	0	0	0	0	0
		Total	150	3	3	0	0	0	0	0
	0	1	50	0	0	0	0	0	0	0
		2	50	2	1	0	1	0	0	0
		3	50	2	1	0	1	0	0	0
		Total	150	4	2	0	2	0	0	0
48	20	1	50	1	1	0	0	0	0	0
		2	50	2	0	0	2	0	0	0
		3	50	2	0	0	0	0	1	1
		Total	150	5	1	0	2	0	1	1
	10	1	50	2	2	0	0	0	0	0
		2	50	1	1	0	0	0	0	0
		3	50	2	0	0	2	0	0	0
		Total	150	5	3	0	2	0	0	0
	5	1	50	1	1	0	0	0	0	0
		2	50	0	0	0	0	0	0	0
		3	50	1	1	0	0	0	0	0
		Total	150	2	2	0	0	0	0	0
	0	1	50	1	1	0	0	0	0	0
		2	50	1	1	0	0	0	0	0
		3	50	1	0	0	1	0	0	0
		Total	150	3	2	0	1	0	0	0

1) Exchange 2) Ring chromosome

が高頻度で見られた.

***in vivo* 染色体試験**（2）：次に，P.G を飲水により投与した結果を Table 3 に示す.

1週間投与における20，10および5％の濃度群のいづれも染色体異常細胞の頻度の増加は見られなかった．また，2週間投与においても1週間投与群の頻度と同様であり，先述の1回経口投与に見られた Exchange および Ring chromosome は1例も見られなかった.

プロピレングリコールは FAO/WHO 専門委員会により1日許容摂取量を20～60mg/kg とされており，現在種々の食品添加物に用いられている[1]．この物質の毒性に関するデータは Ruddick の報告[3] に集約されており，

Table 2. Frequency of Chromosome Aberrations Induced by Busultan

Treatment Dose (mg/kg)	Animal No.	No.of Cells Observed	Total Aberrations	gap		break		Ex	Af[1]	MA[2]
				C 1	C 2	C 1	C 2			
100	1	50	24	21	0	12	0	1	8	1
	2	50	36	12	1	19	0	0	3	1
	Total	100	60	33	1	21	0	1	11	2
50	1	50	19	24	0	9	0	0	4	0
	2	50	23	21	0	3	0	1	1	0
	Total	100	42	55	0	12	0	1	5	0
25	1	50	15	14	0	3	0	0	0	0
	2	50	25	18	0	5	0	0	2	0
	Total	100	40	32	0	8	0	0	2	0

1) Acentric fragment 2) Maltiple Aberrations

Table 3. Frequency of Chromosome Aberrations Induced by Propylene Glycol – Drink

Duration of Treatment (w)	Treatment Dose (%)	Animal No.	No.of Cells Observed	Total Aberrations	gap		break		Ot
					C 1	C 2	C 1	C 2	
1	20	1	50	3	2	0	1	0	0
		2	50	2	2	0	0	0	0
		3	50	2	2	0	1	0	0
		Total	150	7	6	0	2	0	0
	10	1	50	2	2	0	0	0	1[1]
		2	50	1	0	0	1	0	0
		3	50	2	2	0	0	0	0
		Total	150	5	4	0	1	0	1
	5	1	50	0	0	0	0	0	0
		2	50	2	2	0	0	0	0
		3	50	3	2	0	1	0	0
		Total	150	5	4	0	1	0	0
	0	1	50	2	2	0	0	0	0
		2	50	1	0	0	1	0	0
		3	50	2	2	0	0	0	0
		Total	150	5	4	0	1	0	0
2	20	1	50	3	1	0	2	0	0
		2	50	1	1	0	0	0	0
		3	50	2	0	1	1	0	0
		Total	150	6	2	1	3	0	0
	10	1	50	2	2	0	0	0	0
		2	50	2	1	0	1	0	0
		3	50	1	0	0	1	0	0
		Total	150	5	3	0	2	0	0
	5	1	50	2	1	0	1	0	0
		2	50	1	0	0	1	0	0
		3	50	1	0	0	1	0	0
		Total	150	4	1	0	3	0	0
	0	1	50	1	1	0	0	0	0
		2	50	1	1	0	0	0	0
		3	50	0	0	0	0	0	0
		Total	150	2	2	0	0	0	0

1) Stickness

その中で経口投与および腹腔内投与によるLD 50値はマウスにおいて23.9ml/kg (Laug)[4], および10.9ml/kg (Davis and Jenner)[5] であり, 長期投与試験として10%P.Gを24週間摂取させたラットの心, 腎および脾臓には病理学的変化は見られていない (Seidenfeld and Hanzlik)[6]. また, 体重の増加に与える影響も見られていない (Weatherby and Haag)[7]. この様にP.Gは安全な溶媒として認められているがその反面, 人への接触性アレルギー誘発など毒性に関する報告[8]も少なくない. 一方, P.Gの変異原性に関しては先の一般毒性のデータ蓄積に比し少ない. その中で矢作ら[9]はバクテリアを用いた変異原試験で陰性の結果を報告しているが石館ら[9]の行った *in vitro* 染色体試験では陽性であった.

今回の我々の結果ではマウスに1回経口投与した20ml/kg群の24および48時間処理でExchangeおよびRing chromosomeの様な転座型染色体が各1例づつ認められたが染色体異常細胞の頻度としては低く, P.Gの体細胞染色体への影響は認め難い. しかし, 先述の様に転座型染色体の出現はP.Gの大量投与において染色体異常を誘発する可能性を示唆する結果であり, 本来, *in vitro* 試験は処理物質の直接影響を観察出来るという利点があるが *in vivo* 試験では投与した物質の代謝, 吸収および *in vivo* 染色体の指標である骨髄細胞に充分な量の物質が到達しているかどうか等のさまざまな問題点がある. これらを考えると, 吸収の早い腹腔内投与および静脈内注射等の投与経路の選択, ないし, ラット, チャイニーズハムスターなどの動物種の選択が重要な問題となる. 今後, さらに検討を加えプロピレングリコールの染色体異常誘発性の有無を検索していく.

文　献

1) 第三版食品添加物公定書注解, 金原出版
2) Leonard, A. and E.D. Leonard : *Mut. Res.*, 56, 329, 1978
3) Ruddic, J.A. : *Toxicolo. Appl. Pharmacolo.*, 21, 102, 1978
4) Laug, E.P. : *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, 21, 173, 1939
5) Davis, D.J. and P.M. Jenner : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1, 576, 1959
6) Seidenfeld, M.A. and P.J. Hanzlok : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 44, 1932
7) Weatherby, J.H. and H.B. Haag : *J. Amer. Pharma. Ass.*, 27, 466, 1938
8) Alexander, A. et al. : *Arch. Dermatol.*, 115, 1979
9) Annual Report of the Cancer Research Ministry of Health and Welfare, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 392-398, 1983

アセトアミノフェンの変異原活性増強作用について

佐々木 美枝子*, 平 賀 興 吾*

Promoting Effect of Acetaminophen on the Mutagenicity

MIEKO SASAKI*and KOGO HIRAGA*

As reported previously, acetaminophen, an analgesic and antipyretic drug, has an additional effect on the mutagenicity and clastogenicity of MNNG in CHO–Kl cells and inhibits the metabolic cooperation in V79 cells.

An effect of acetaminophen on the U. V.–induced mutagenicity was examined *in vitro* in cultured Chinese hamster ovary cells, CHO–Kl cells. U. V., a well–known mutagen, did induce significantly ouabain–resistant mutant cells in CHO–Kl cells in a dose–responsive manner. Acetaminophen enhanced the effect of U. V. when it was added to the culture of U. V.–irradiated cells at the expression time of mutation. This effect of acetaminophen was dependent upon the concentration of acetaminophen added when the fluence of U. V. was constant, and it also depended on the doses of U. V. when cells were treated with a constant concentration of acetaminophen after the irradiation. The cytotoxicity of U. V.–irradiated CHO–Kl cells was also increased by the treatment of acetaminophen, but the intensity was not so marked as caffeine.

It is suggested that acetaminophen promotes the appearance of mutated cells initiated by mutagens. It is also suspected that acetaminophen may be a promoter of carcinogenicity.

The mechanism of action of acetaminophen, especially its effect of DNA–repair, will be studied in future.

Keywords: Promoting effect, U. V.–induced mutagenicity, Acetaminophen

緒　　言

アニリン系鎮痛解熱剤であるアセトアミノフェンおよびフェナセチンは比較的副作用の少ない医薬品として感冒薬などに広く用いられてきた．しかしながら近年フェナセチンに関して発癌性[1]，発癌プロモーター活性[2]，および染色体異常誘発性[3] 等が報告され，濫用が慎まれるようになってきた．アセトアミノフェンも，培養細胞に長時間作用させると染色体異常を誘発し，またチャイニーズハムスターやマウスの骨髄細胞にも異常染色体をもつ細胞が出現することが動物実験で示された[4]．これらの結果からアセトアミノフェンの変異原性が疑われたが，培養細胞を用いた試験では細胞の突然変異を増加させる作用はアセトアミノフェン単独では認められなかった．ところが変異原物質として知られているアルキル化剤である N–methyl–N′–nitro–N–nitrosoguanidine（MNNG）とアセトアミノフェンを細胞に同時に作用させると，MNNG による変異が増強されることがわかった[5]．この作用は変異原で処理された細胞に，いわゆる突然変異発現時間（mutation expression time）にアセトアミノフェンを作用させると最も効果的に示された．

一方，発癌プロモーターの *in vitro* での検出方法として Trosko らによって報告された V79細胞の代謝協同阻害効果[6] について調べたところ，アセトアミノフェンは，既知の発癌プロモーターである 12–O–tetradecanoyl phorbol–13–acetate（TPA）とよく似た活性を示した[7]．

今回我々は，紫外線によって誘発される突然変異に対するアセトアミノフェンの効果について CHO–K1細胞を用いて検討した．CHO–K 1細胞に紫外線を照射すると突然変異細胞であるウアバイン耐性細胞が照射線量に応じて誘発されるが，アセトアミノフェンを紫外線照射後に添加するとウアバイン耐性細胞数は有意に増加し，

* 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

増加率は添加したアセトアミノフェンの量と相関があった．すなわちアセトアミノフェンには，アルキル化剤であるMNNGに対する相乗作用と同様，紫外線の変異原活性に対しても促進効果があることが認められた．本報では紫外線の突然変異誘発性に対するアセトアミノフェンの作用について述べるとともに，アセトアミノフェンの活性のメカニズムについても考察を加えたい．

材料・方法

変異原性の検討には当研究部において継代維持されているCHO-K1細胞（チャイニーズハムスター卵巣由来株化細胞）を用いた．細胞は10%仔牛血清を含むHam F-12培養液（ニッスイ）で培養した．

紫外線（UV）照射および突然変異細胞の検出：CHO-K1細胞 5～10×10^5を 4 mlの培養液を入れたプラスチック製シャーレ（NUNC, 150288, 60 mm ×15 mm）に播種し，37°C，5 %CO_2細胞培養器中で一夜培養したのちUV照射を行なった．照射時には培養液を吸引除去したのちに滅菌PBSで細胞を洗い，新たに1 mlのPBSを入れた．PBS中で照射を行なったのは細胞の乾燥を防ぐためである．UV照射装置は通常の殺菌灯（15W，励起波長2537Å）をセットした暗箱を用いた．あらかじめ紫外線線量計によって実験条件（光源から細胞までの距離を35 cmとした）におけるUV線量を測定し，これが2 J/m^2/secであることを確かめた．線量の調節は細胞に対するUV照射時間を変えることによって行なった．用いた実験条件では照射時間は3～10秒であり，この時間の長短による細胞への影響は無視できると思われる．照射後ただちに0.25%トリプシンを用いて細胞を培養面より剝離して浮遊細胞液とし，細胞数を数えたのち，新たに用意した4 mlの新鮮培養液入りのシャーレに再播種した．再播種した細胞数は，細胞毒性（コロニー形成率）の検出のためには200，500あるいは1000細胞/シャーレ，突然変異細胞の検出のためには1×10^6細胞/シャーレとした．UV照射の細胞への直接の作用を調べるためには細胞を再播種せずに照射後新鮮な培養液中で培養し，再播種した場合と比較した．アセトアミノフェンなど被験物質による処理は細胞を再播種したのちに行なった．ウアバイン耐性突然変異細胞を検出するために1×10^6細胞を再播種した培養に培養2日目にウアバイン（SIGMA，O-3125，以下Ouaと略す）を1 mMになるように加え，途中1～2度培養液を交換して14日間培養した．14日目にコロニーを固定染色し，Oua耐性細胞によるコロニー数を数えた．コロニー形成率をみるために200，500および1000細胞をまいたシャーレは被験物質処理のみを行い，1週間正常培養液で培養後コロニーを数えた．実験はいずれも1群5～10シャーレを用いて行ない，コロニー数はこれらの平均値を求めた．コロニー形成率および突然変異率は次式により求めた．

$$\text{コロニー形成率}=\frac{\text{正常培養液でのコロニー数}}{\text{播種した細胞数}}$$

$$\text{突然変異率}=\frac{\text{選択培養液でのコロニー数}}{\text{播種した細胞数}}\div\text{コロニー形成率}$$

本実験に用いた被験物質は次の通りである．これらは水溶性のものはPBSに，そうでないものはDMSOに溶解し，培養中に10 μlを添加した．

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と略す），フェナセチン（Acetophenetidine，和光019－00412），アセトアニリド（Acetanilide，和光011－0025），TPA（12－0－ Tetradecanoylphorbol －13－acetate, SIGMA P－8139），カフェイン（Caffeine anhyd., 和光034－06782），サッカリン（食添用サッカリン，育和化学工業），BHT（Butylhydroxytoluene，東京化成 TCI-EP D228）．

結果および考察

CHO-K1細胞のUV感受性を調べるために，UV線量と照射細胞のコロニー形成率（plating efficiencyとして表わした）との関係をみた（Fig. 1）．UV8J/m^2までは細胞毒性はほとんどみられず，UV照射した細胞も非照射細胞とほゞ同率のコロニーを形成した．UV線量を12，16，20J/m^2と増すとそれに応じてコロニー形成率が低下し，高線量ではコロニーの形も小さくなった．UV照射後にAAP（アセトアミノフェン）25 μg/mlあるいはTPA 100 mg/mlを添加した場合には，12J/m^2照射ではコントロールと差がみられなかったが，UV線量が増すと添加群の方がより強い毒性を示した．この結果からUV線量8～12J/m^2が相乗効果をみるために適当な線量であると考え，UV 10J/m^2を照射したCHO-K1細胞でのウアバイン耐性（Oua^R）細胞の出現にAAPおよびTPAがどのように作用するかを調べた．Table 1. に示すように，AAP 25 μg/mlをUV照射した細胞に作用させるとCHO-K1細胞の突然変異率（生存細胞10^6あたりのOua^R細胞の数）は約4倍に増加した．これはAAPをUV照射直後に添加しても，24時間正常培養液で培養後に添加しても差はなかった．TPA 100 ng/mlの添加ではOua^R細胞の増加はみられなかった．これら

の結果から，細胞毒性の弱い比較的低線量の UV 照射による変異の発現が AAP によって促進されることが示唆された．

UV 照射と変異原との関係はカフェインを用いた報告が多い．カフェインは細菌を用いた研究では DNA のフレイムシフト型の変異を誘発することが知られているが[8]，細胞を用いた実験でも核酸レベルの作用が比較的よく研究されている物質である．一般にカフェインは，UV による細胞致死効果を増強させる作用があり，突然変異の誘発は促進しないという報告が多い[9,10]．AAP はカフェインとは逆に，UV の細胞致死効果にはあまり影響をあたえず，突然変異の誘導の方向に作用するらしく思われる．Fig. 2. に AAP 25 μg/m*l* 添加によるコロニー形成率の変化を UV8, 12, 16, 20 J/m^{2}照射細胞について検討した結果を示す．AはUV 照射した細胞をそのまゝ正常培養液中で培養した場合のコロニー形成率で，Bは照射細胞を再幡種した場合のコロニー形成率である．ともに UV 線量の増加にともなってコロニー形成率は低下し，また AAP 25 μg/m*l* の添加によりさらに細胞毒性が増している．AAP 添加による細胞致死の増加はカフェインほど顕著ではないが，UV 線量が高い場合（16および20 J/m^2）コントロールとの差がひらく傾向であるので，これより高い線量を用いた場合には AAP にも細胞致死効果をより顕著に増強する作用がみられるかもしれない．再幡種の場合，特に高線量でコロニー形成がおちるのは，UV 照射によって損傷をうけた細胞が再幡種の操作によって死滅するのに対し，再幡種しない培養ではこのような細胞も修復される可能性があるためと思われる．

UV 照射細胞の突然変異発現率と UV 線量との関係を Fig. 3 に示す．これは何回かに分けて行なった実験の結果をまとめてプロットしたものである．突然変異細胞である Oua^{R}細胞は UV 線量の増加にともなって増加し，AAP 25 μg/m*l* の添加によってさらに増強された．アセトアミノフェンの作用は UV 線量に関係なく一律に突然変異を増加させるものであると思われるが，この点についてはさらに検討が必要である．

UV 線量を一定にすると，AAP によって増強させられる突然変異率は添加する AAP の量に依存して増加した．Fig. 4 に，UV 10 J/m^{2}を照射した細胞に種々の濃

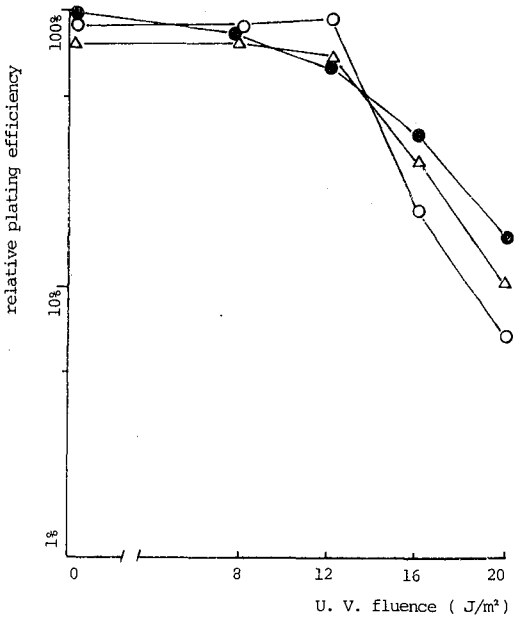


Fig.1 Effect of Acetaminophen and TPA on the UV-induced Cytotoxicity

AAP 25 μg/m*l* ○—○
TPA 100 ng/m*l* △—△
untreated control ●—●

Table 1 Effect of Acetaminophen and TPA on the U.V.-induced Mutagenicity

treatment	survival*1	OUA^R/dish	OUA^R/10^6 (MF)
no	40.2%	8.17±2.8	20.3± 6.9
AAP 25 μg*2	26.5%	23.4±7.7	88.5±29.1
TPA 100 ng*2	36.6%	8.79±3.1	24.1± 8.6
AAP 25 μg*3		23.0±4.6	87.0±17.2
TPA 100 ng*3		9.44+3.2	25.8+ 8.6

*1 survivals of replated cells

*2 Cells irradiated with U.V. (10 J/m^2) were replated and treated with AAP (25 μg/m*l*) or TPA (100 ng/m*l*) just after the irradiation.

*3 AAP or TPA was added on the 2 nd day of cultivation.

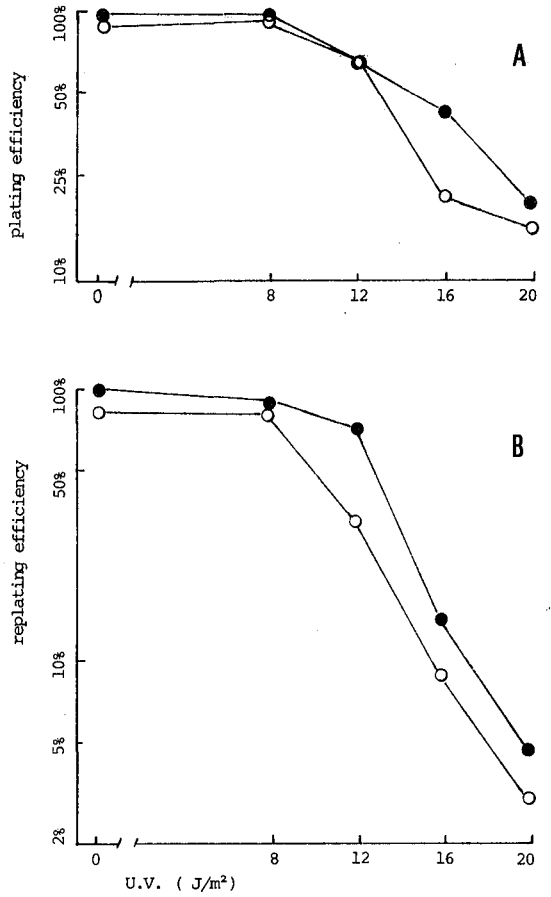


Fig.2 Effect of Acetaminophen on the UV-induced Cytotoxicity

AAP 25 μg/ml ○—○
untreated control ●—●

度の AAP を作用させ，AAP 濃度と Oua^R細胞出現率（変異率）との関係を示した．細胞毒性を示す plating efficiency は，AAP 非添加の場合を100として，各添加濃度における値はこれに対する相対値として求めた．AAP 添加量の増加にともなって細胞生存率は減少し，10^6生存細胞あたりの Oua^R 細胞の数（突然変異率）は増加した．Fig. 3 および 4 に示した結果から，AAP による UV 照射細胞の突然変異の増強効果は，AAP 量を一定にした場合には UV 線量に依存し，UV 線量が一定の場合には AAP 濃度に依って変ることがわかる．すなわち AAP には UV によって誘発される突然変異の発現を増強させる効果のあることがわかった．

Table 2. に，いくつかの化学物質の UV 誘発突然変

Fig.3 Effect of Acetaminophen on the UV-induced Mutagenicity

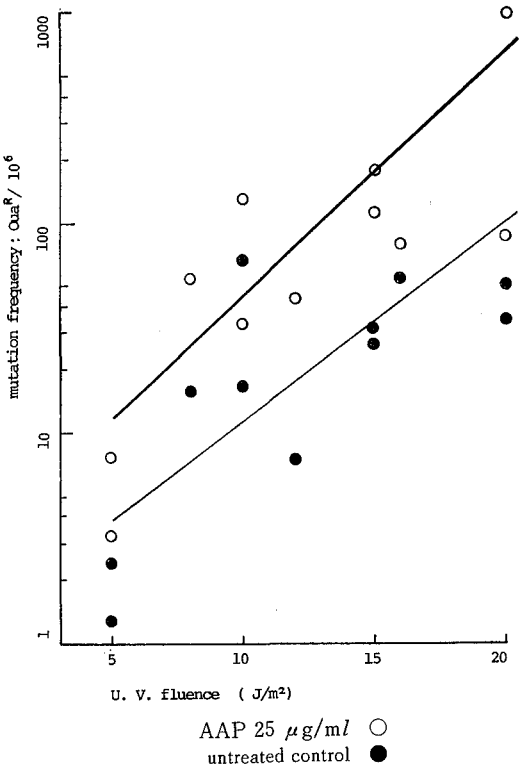
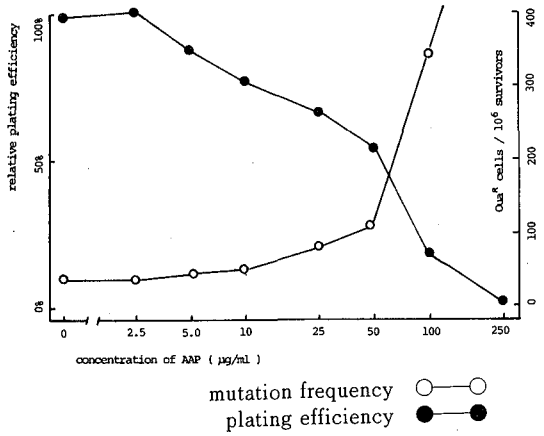


Fig.4 Effect of Acetaminophen on the UV-induced Mutagenicity



異に対する効果を比較した実験の結果を示す．これらの物質はいづれも発癌プロモーター，またはその疑いがもたれているものである．フェナセチン，アセトアニリド

Table 2 Effects of Some Chemicals on the U.V.–induced Mutagenicity

treatment		survival	OUA^R/dish	$OUA^R/10^6$ (MF)
no		54.5%	15.8±4.7	29.1± 8.6
Acetaminophen	50 μg	27.5	35.1±7.9	127.6±28.8
Phenacetin	50 μg	52.0	21.7±6.0	41.7±11.6
Acetanilide	50 μg	47.0	18.5±4.3	39.3± 9.2
Caffeine	1 mM	33.6	9.8±3.8	29.2±11.2
Saccharin	100 μg	52.3	16.6±6.8	31.7±11.2
BHT	100 μg	29.6	10.8±2.3	36.3± 7.8
TPA	100 ng	34.8	13.8±6.0	39.6±17.3

CHO–Kl cells irradiated with U.V. (10 J/m^2) were replated and treated with chemicals just after the irradiation.

はアセトアミノフェンの同族体であり，フェナセチンには発癌性もしくは発癌プロモーター活性が示唆されている[1,2]．カフェインは前述したようにUVによる変異を修飾する作用があり[9,10]，サッカリンは膀胱発癌のプロモーターとされている[11]．BHTにはプロモーター作用と抗プロモー作用がともに知られているが，最近BHAの発癌作用との関連から注目されている物質である．TPAはよく知られた皮膚発癌プロモーターである．

実験はUV 10 J/m^{2}を照射したCHO–K1細胞を用いて行ない，前述したように，照射直後に各被験物質を培養に加え，コロニー形成率およびOua^R細胞の出現による突然変異率を調べた．各物質の濃度は細胞毒性があまり強くなくしかも生物活性があるとされている濃度を選んだ．表に示すように，アセトアミノフェン以外には明らかな変異増強効果を示した物質はなかった．各物質について濃度，作用時間などを検討しなければこれらの物質には変異増強活性はないと結論することはできないが，少くともここに示した実験条件下では，AAPのみにUVによって誘発される突然変異を増強する作用があると思われる．

マウスの実験皮膚癌でクロトン油にプロモーター活性が認められ[12]，発癌二段階説が説えられて以来，発癌プロモーターに関しては莫大な数の報告がなされている．TPAに関しては，それがクロトン油中の活性物質であり，化学発癌剤による皮膚発癌を強力にプロモートすること[13]，*in vitro*でも細胞の発癌物質によるトランスフォーメーションに対するプロモーターになりうることが確認されているが[14]，変異原活性すなわち突然変異の発現に対しても促進効果があるという報告は少ない．Lankas[15]は培養細胞（V79細胞）にMNNGなどの変異原物質を作用させ，24時間正常培養液で培養したのちにTPAで処理するとOua^R細胞の誘発が増強されることを報告しているが，これは変異原物質によってイニシエートされた突然変異がその形質発現の過程でTPAによってプロモートされたことを示している．AAPにMNNGの活性に対する相乗効果のあることは既に報告したが[5]，AAPのこの作用も変異発現時間（mutation expression time）に細胞をAAPで処理した場合に最も有効に示される．Fig. 5に示したのは，CHO–K1細胞を用いてMNNG処理とAAP処理の時間的関係を検討

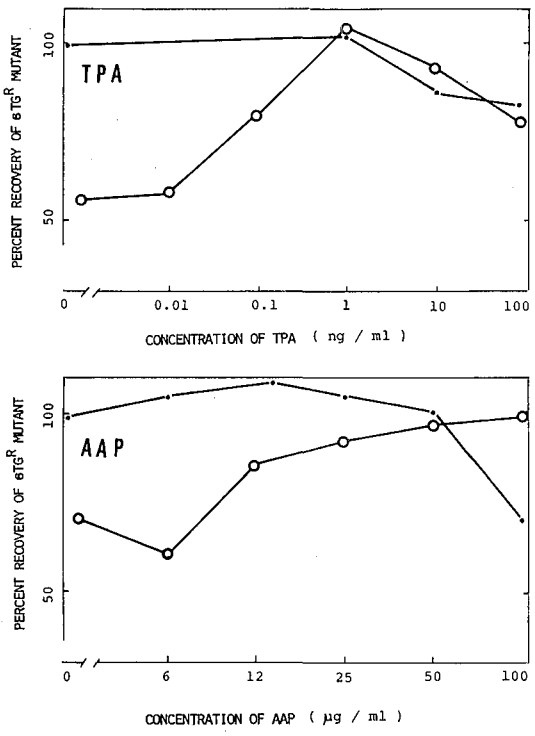
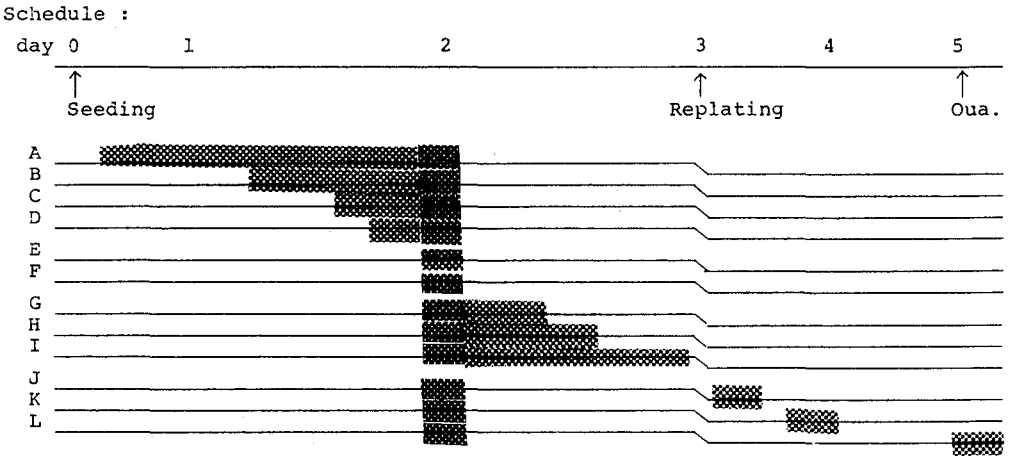


Fig.5 Inhibition of Metabolic Cooperation by TPA and AAP

Effect of Acetaminophen on Ouabain Resistance of CHO-K1 Cells by MNNG



A,B,C,D : Cells were treated with AAP, just before MNNG-treatment for 24, 6, 4 or 2 hr.
E : Cells were treated with AAP and MNNG, simultaneously.
F : Cells were treated with MNNG alone.
G,H,I : Cells were treated with AAP, just after MNNG-treatment for 4, 6 or 24 hr.
J,K,L : Cells were treated with AAP for 2 hr, immediately after replating(J), or 6 hr(K) or 48 hr(L) after replating.

Treatment of MNNG (0.5 μg/ml) for 2 hr.
Treatment of AAP (100 μg/ml)

Result :

	P.E.	Oua^r/dish	M.F.
A	17.4%	71.5	411 (6.5)
B	34.1	73.0	214 (3.4)
C	32.2	35.2	109 (1.7)
D	24.9	23.3	94 (1.5)
E	34.1	34.0	100 (1.6)
F	40.0	25.0	63 (1.0)
G	6.6	7.0	104 (1.7)
H	10.6	30.1	284 (4.5)
I	8.9	36.9	417 (6.6)
J	11.2	89.9	800 (12.6)
K	14.8	75.3	500 (7.9)
L	10.2	18.0	177 (2.8)

P.E. : Plating Efficiency at the time of replating
Oua^r/dish : Mean numbers of Ouabain-resistant colony per dish. (10^6 cells were replated per dish)
M.F. : Mutation Frequency per 10^6 survivor (Relative M.F.)

Fig.6 Effect of Acetaminophen on Ouabain Resistance of CHO-K1 Cells by MNNG

した実験の結果であるが，MNNG を作用させた細胞を24時間正常培養液で培養したのちに AAP 処理を行なうと（図の J）突然変異率が有意に増加した．UV 照射においても，照射直後あるいは24時間後に AAP を作用させると Oua^R細胞の有意な増加がみられること（Table 1.）からも，AAP は，化学物質あるいは UV によって

誘発された突然変異が固定され形質発現される過程に何らかの働きをするものと思われる．変異原によって損傷されたDNAが修復される過程でAAPがこれを阻害したり誤まらせたりする可能性が考えられるが，この点についてはさらに詳細な検討が必要である．

アセトアミノフェンにはV79細胞を用いた実験により細胞間代謝協同を阻害する作用があることは既に報告した[7]．この作用に関してはアセトアミノフェンは発癌プロモーターであるTPAとよく似た反応のパターンを示した（Fig. 6）．これはV79細胞の6–thioguanine感受性野生型細胞（6 TG^S細胞）と6–thioguanine耐性の変異細胞（6 TG^R細胞）との代謝協同（metabolic cooperation）を *in vitro* でみる実験で，6 TG^S細胞と6 TG^R細胞を一緒に培養すると両者の細胞間代謝協同（intercellular metabolic cooperation）により6 TG^R細胞が野生型の6 TG^S細胞に戻る現象をみるものである．TPAなどの発癌プロモーターはこの代謝協同を阻害する効果があり[6]，プロモーター物質のスクリーニング法の一つとして，プロモーター活性とこの作用との関連がいくつかの物質について報告されている[16-20]．アセトアミノフェンが発癌プロモーターとしての活性をもつか否かは，動物を用いた実験発癌におけるAAPの効果や，*in vitro* の発癌とされている細胞の形質転換（transformation）に対する効果を検討しなければ結論は得られない．最近発癌プロモーターに関する知見が次々と発見され，新しいプロモーター物質もいくつか見出されているが[21-24]，アセトアミノフェンの化学的および生物学的性質とこれらの物質のそれとの共通性はあまりないようである．しかしながら，アセトアミノフェンがUVによる変異とアルキル化剤による変異に対しともに促進的に働き，また代謝協同阻害効果を示すことから考察すると，培養細胞および動物の骨髄細胞に染色体異常を誘発することとも考え合わせ，アセトアミノフェンにDNAあるいはその関連物質に対する活性があることを否定できない．アセトアミノフェンは細胞遺伝学的に興味ある物質であり，核酸をはじめとする細胞内構成成分に対する作用をさらに検索してその活性の本態を明らかにしてゆきたい．

（本研究の概要は日本環境変異原学会第11回大会1982年10月で発表した）．

文　献

1) Isaka, H., Hoshi,H., Otsuji, A., Koike, M., Nagai, Y., Koura, M., Sugiyasu, K. and Kanabayashi, T. : *Gann*, **70**, 29, 1979
2) Nakanishi, K., Fukushima, S., Shibata, M., Shirai, T., Ogiso, T. and Ito, N. : *Gann*, **69**, 395, 1978
3) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. : *Mutation Res.*, **48**, 337, 1977
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) 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
6) Yotti, L. P., Chang, C. C. and Trosko, J. E. : *Science*, **206**, 1089, 1979
7) 佐々木美枝子，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，**33**，547，1982
8) Clarke, C. H. and Wada, M. J. : *Mutation Res.*, **28**, 123, 1975
9) Van Zeeland, A. A. : *Mutation Res.*, **50**, 145, 1978
10) Tatsumi, M. and Fujiwara, Y., : *Gann*, **69**, 727, 1978
11) Kakizoe, T., Komatsu, H., Niijima, T., Kawachi, T. and Sugimura, T. : *Cancer Res.*, **41**, 4702, 1981
12) Berenblum, I. : *Cancer Res.*, **1**, 44, 1941
13) Bush, H. : *Methods in Cancer Research*, Vol. 6, 439pp, 1971, Academic Press.
14) Mondal, S., Brankow, D. W. and Heiderberger, C. : *Cancer Res.*, **36**, 2254, 1976
15) Lankas, G. R. Jr., Baxter, C. S. and Christian, R. T. : *Mutation Res.*, **45**, 153, 1977
16) Trosko, J. E., Dawson, B., Yotti, L. P. and Chang, C. C. : *Nature*, **285**, 109, 1980
17) Umeda, M., Noda, K. and Ono, T. : *Gann*, **71**, 614, 1980
18) Noda, K., Umeda, M. and Ono, T. : *Gann*, **72**, 772, 1981
19) Kurata, M., Hirose, K. and Umeda, M. : *Gann*, **73**, 217, 1982
20) Jone, C. M., Trosko, J. E., Chang, C. C., Fujiki, H. and Sugimura, T. : *Gann*, **73**, 874, 1982
21) Slaga, T. J., Klein–Szanto, A. J. P., Triplett, L. L. and Yotti, L. P. : *Science*, **213**, 1023, 1981
22) Hirakawa, T. and Kakunaga, T. : *Science*, **216**, 527, 1982
23) Fujiki, H., Sugamura, M., Nakayasu, M., Hoshino, H., Moore, R. E. and Sugimura, T. : *Gann*, **73**, 495, 1982
24) Kakizoe, T., Komatsu, H., Honma, Y., Niijima, T. and Sugimura, T. : *Gann*, **73**, 870, 1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 399-405, 1983

DNA損傷のアルカリ溶出法による検出(I)トリチウム水のクロマチンに対する効果

金西信次*, 金城康人**, 渡部　真**, 代谷次夫***
田中信徳****

DNA Lesion Assays by Alkaline Elution (I)
Effects of Tritium Water on the Chromatin

NOBUJI KANANISHI*, YASUHITO KINJO**, MAKOTO WATANABE**
TUGIO SHIROYA***, NOBUNORI TANAKA****

Keywords: DNA 損傷 DNA lesion, アルカリ溶出法 alkaline elution; トリチウム水 tritium water, クロマチン chromatin, 生物学的効果比 RBE, L5178Y 細胞 L5178Y cell, ウニ精子 sea urchin sperm

目　的

真核細胞における化学物質による突然変異誘発機構を調べるうえで，細胞核内ならびに細胞質内の基本構造をなす超微細網目構造の内部に化学物質がどのように侵入し，どれくらい取込まれ，どの程度留保され，DNA分子ないしはクロマチン高次構造にどのような損傷をどれだけ与えるのかを明らかにしておくことが必要である[1-2].

今回我々は増殖中の哺乳動物培養細胞とともに，高度に凝縮したクロマチン構造をもち，細胞質の関与ないしはクロマチン高次構造の変形および損傷修復が少ないと考えられる精子を対比させた．また突然変異誘発性化学物質の1つのモデルとしてトリチウム水（HTO）を取込ませ，^{60}Co γ 線の作用と比較するために，初期損傷としてのDNA単鎖切断を高感度で検出しうるアルカリ溶出法[3]の導入と改良を試みた．簡便にして汎用性の広い本法は今後もin vivoを含めた他の生物試料ならびに化学物質に応用することが可能である．

材料および方法

トリチウム水による曝露実験には通常のトレーサー実験の10^3～10^4倍という極めて高い放射能の使用であるため，我々の実験室において実験することは不可能であり，東京大学アイソトープセンター内の生物実験用トリチウム安全クリーン・キャビネットを借用した．なお，実験は綿密な作業手順を予め計画するとともに，事前にコールド・ランにより技術的に習熟して，出来るだけ手早く，可能なかぎり開放系を少なくするように心懸けた．そのためにホットの作業に2名，コールドに1名の計3名の連係によって実験をおこなった．

材料：マウス白血病リンパ細胞L5178Y（放射線医学総合研究所渡部郁雄博士より分与された）．ウニ精子パフンウニ *Hemicentrotus pulcherrimus*（東京大学理学部代谷次夫助教授，秋元義弘氏より分与された）．

試料：トリチウム水（1－5 Ci/m*l*, RCC, 1 Ci/m*l* NEN), Fischer培地（GIBCO), 馬血清（Flow Laboratories), N-lauroylsarcosin sodium salt（Sarkosylと略す，東京化成工業), 3-5 diamino benzoic acid（DABAと略す，半井薬品), albumin (Sigma), DNA（calf thymus highly palymerized, Sigma), シンチレーターACS Ⅱ（Amersham), diphenylamine（和光純薬), catalase (Sigma), trichrol acetic acid（TCAと略す，Sigma）

トリチウム水の開封と配分：トリチウム水の実験は他の実験と異なり，安全取扱上トリチウム水の開封と配分に最も気を配らなければならず，クリーン・キャビネットの内部に別系統で排気捕集するインナー・ボックスをセットし，その中でおこなった．ウニ精子の曝露実験のためには比放射能1.85×10^{11} Bq（約5 Ci/m*l*のトリチウム水32 μ*l*に蒸留水160 μ*l*を加えて希釈，2倍濃度人工海水20 μ*l*の入っているVバイアル7本に分注し，

* 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, Hyakuninchо 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都立アイソトープ総合研究所
*** 東京大学理学部放射線生物
**** 帝京大学

培養細胞L5178Yの実験のためには血清を加えない，Fischer培地にトリチウム水20～40 μlを加えて640 μl又は340 μlに希釈し，それぞれ使用時まで冷凍保存した．この中から希釈毎に20 μlをとり500倍づつ2回希釈し，液体シンチレーション・カウンターで測定し，吸収線量の算出に用いた．

ウニ精子のトリチウム水曝露：ウニは14－15℃の海水中で飼育し，使用の前日0.5M塩化カリウムを用いて放精させたものを希釈し，Coulter Counter ZB型で細胞数を測定し，3～5 $\times 10^7$細胞/mlに調製した．また光学顕微鏡によりほとんどの精子が活発に運動していることを確認した．精子懸濁液70 μlをVバイアル中のトリチウム水に混合，氷冷下1～3時間培養した．20 μlのトリチウム水は6.82×10^8 Bq（18.4mci）で，全量110 μlに希釈されるので^{3}Hの最終比放射能は6.2×10^9Bq/gで吸収線量は20.17Gy/hrとなる．ウニ精子の電離放射線によるDNA鎖切断は哺乳動物細胞に較べ極めて抵抗性であるため使用する^{3}H量は大きなものとなる．総量を減らすために試料量を出来るだけ少なくした．

培養細胞L5178Yのトリチウム水曝露：L5178Y細胞は10％馬血清添加Fischerの培地で培養．1～3 $\times 10^5$細胞/mlに増殖中の細胞を血球計算盤にて細胞数を測定し，1 $\times 10^6$細胞を1000 rpm，5分間の遠心で集め，0.4 mlとする．これにトリチウム水100 μlを加え氷冷下10～80分間培養した．比放射能2.0～2.9×10^9 Bq/g．吸収線量0.108～0.158 Gy/min.

γ線照射：東京都立アイソトープ総合研究所γルームにおいて^{60}Coのγ線を氷冷下，トリチウム水の場合とほぼ同じ線量率と線量を照射した．

アルカリ溶出法：Kohnらの方法[3-4]を一部改良しておこなった．γ線照射したものについては通常の実験室で，トリチウム水処理したものについてはクリーン・キャビネットの中で，フィルターホルダーに注射筒，millipor filter BSタイプ，径25 mm，孔径2 μmを装着，内径1 mmのシリコンチューブをペリススポンプを通してフラクション・コレクターに接続した装置一式をセットした，フラクション・コレクターは塩ビ板で覆い別系統排気捕集した．トリチウム水処理ないしはγ線照射したウニ精子あるいは細胞は，海水またはFischer培地を満したフィルターホルダーに注射筒を通して導き，海水ないしはFischer培地5 mlで洗浄，4.5 ml細胞溶解液（0.2％ sarkosyl, 0.02 M EDTA, 2 M NaCl, pH 10.2）を0.3 ml/minの速度で溶出．3 mlの洗浄液（0.02 M EDTA，pH 10.2）を0.3 ml/minで溶出，次いで10 mlまたは15 mlのアルカリ溶出液（0.02 M EDTA，ウニ精子は0.075 M TEAH でpH 12.5，培養細胞L5178Yは0.06 M TEAH でpH 12.3）を0.1 ml/minの速度でDNAを溶出させ，1 mlづつフラクション・コレクターで分画した．トリチウム水処理したものについて細胞懸濁液，第1の洗浄液，細胞溶解液および第2洗浄液の一部約13 mlづつはまとめて高レベル放射性廃液として密栓保管，後に放射能を測定し，酸性にしてガラスアンプルに封入，保管廃棄物とした．

DNAの分離，微量蛍光定量：Parodiら[4]，小野ら[5]の方法を一部改良しておこなった．フラクション・コレクターでの各分画は氷冷し，0.5 mg/mlのアルブミン50 μl, 100％ TCA 100 μlを添加，沈殿させ，1晩冷蔵保管．翌日沈殿を3200 rpm，15分冷却遠心して分離．それぞれ0.5 mlづつの5％冷TCA，エタール性0.1M酢酸カリウム，100％エタノールを用いて沈殿を洗浄．トリチウム水処理のものについては最終のエタノール洗浄液の^{3}Hを測定し，管理区域外への搬出可能なレベルか否かをチェックした．次いで60℃で30分間乾燥，1晩放置，

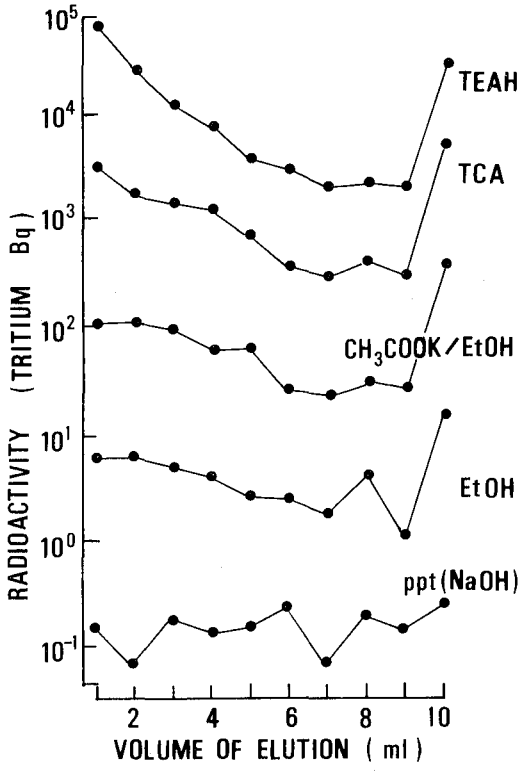


Fig1. Radioactivity in alkaline elution and DNA isolation after tritium water exposure.

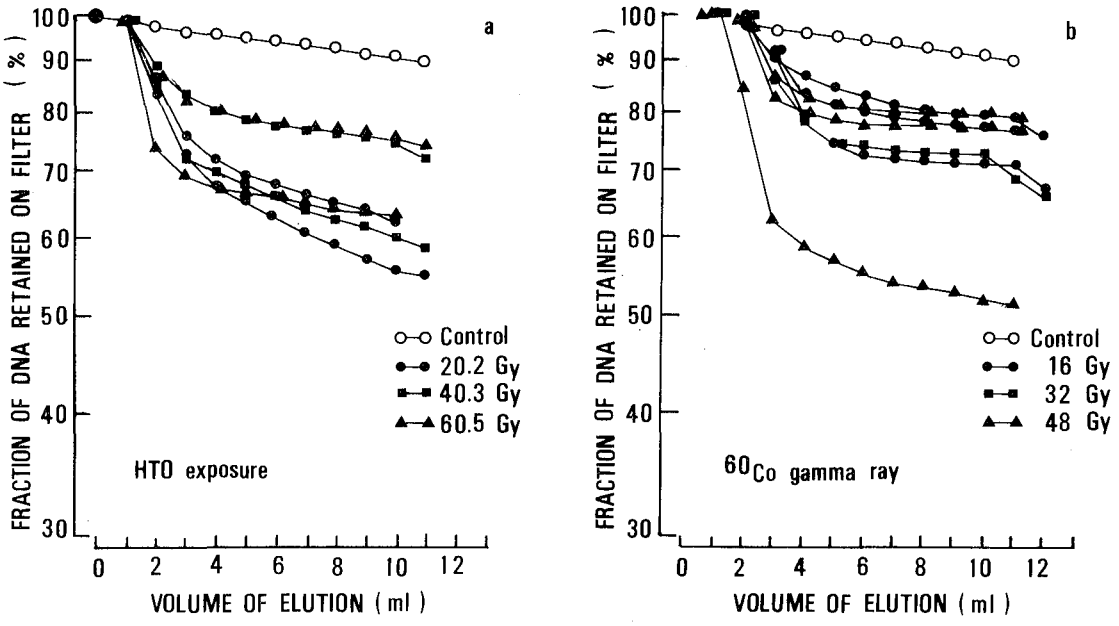


Fig. 2. A dose response relation on alkaline elution in sea urchin sperms exposed to HTO comparing with ^{60}Co gamma irradiation.

40% DABA 20 μl を加えて60℃で30分間加熱. 0.6 N PCA 0.5 ml を加え, 405 nm 励起, 500 nm の蛍光を日立蛍光分光々度計 MPF-4 で測定した. 溶出曲線はフィルター上に乗せた細胞数から DNA 量を計算してそれを100%とし, 各分画の流出 DNA 量の割合を差引くことによって作成した.

DABA による DNA の検量線：標準 DNA は 1 N NH_4OH に溶かし, 0.02～5 μg の DNA を分画による蛍光定量と同じ方法で測定することによって, DNA 量と蛍光強度との間に直線の検量線が得られた. 我々は 0.02 μg の DNA 量も充分測定可能である.

細胞内 DNA 全量の測定：Schmidt-Thannhauser-Schneider の水野による変法[6] によって DNA を分離し, Burton の変法[7] のジフェニルアミンによって定量した. バフンウニの精子の DNA 量, 1.67×10^{-6} μg/精子. L 5178Y 細胞の DNA 量, 9.52×10^{-6} μg/細胞.

結　果

トリチウム水実験の過程における^{3}H量の測定：我々は今回の実験を始める前に小量のトリチウム水10^5 Bq (10 μCi) 以下を用いていくつかの実験をしており[8], その経験よりこの実験における各段階での残留放射能について予測出来た. しかし10^9 Bq (20－30 mCi) のオーダーに10^5 Bq のオーダーで得られた予測が使えるかどうかは不明であった. また蛍光測光は管理区域外でおこなうという制約のため, エタノール抽出後の沈殿の残留放射能が搬出可能なレベルであるか否かがこの実験の成否にかかっていた. アルカリ溶出法の各フラクション分画について^{3}H量を液体シンチレーション・カウンター (Packrd) で測定し, 図1にその結果を示した. 即ち DNA 溶出画分の^{3}H量は処理^{3}H量の10^{-3}－10^{-4}で, 最初の洗浄・細胞溶解液等の画分に大部分の^{3}Hが移行した (図中 TEAH の溶出曲線). その後の TCA, エタノール性酢酸カリウム液, エタール各0.5 ml による洗浄操作1回毎に^{3}H量は1/20～1/50になり, 最終段階では10^{-1} Bq のレベルに減少した. なお最終段階は沈殿を 1 N NaOH に溶解させて測定した. この実験においてトリチウム水処理後最初の洗浄液は 2 ml であった. TEAH による DNA 溶出画分の^{3}H量を更に減少させるため, この洗浄液を 5 ml とすることによって^{3}H量を1桁下げることが出来, エタノール抽出液の^{3}H量も1桁下げることが出来た. 以後の実験はこのエタノール抽出液の^{3}H量を測定することによって, 各画分最終沈殿物の^{3}H量とし全て10^{-1} Bq のオーダーであった.

ウニ精子における DNA 単鎖切断の測定：図2 a はトリチウム水に曝露し, アルカリ溶出法によりウニ精子の DNA 単鎖切断を調べたものである. 白丸印は無処理ウニ精子で, DNA のほとんどはフィルター上に残り, 溶出しない. トリチウム水処理は1, 2, 3時間おこなった.

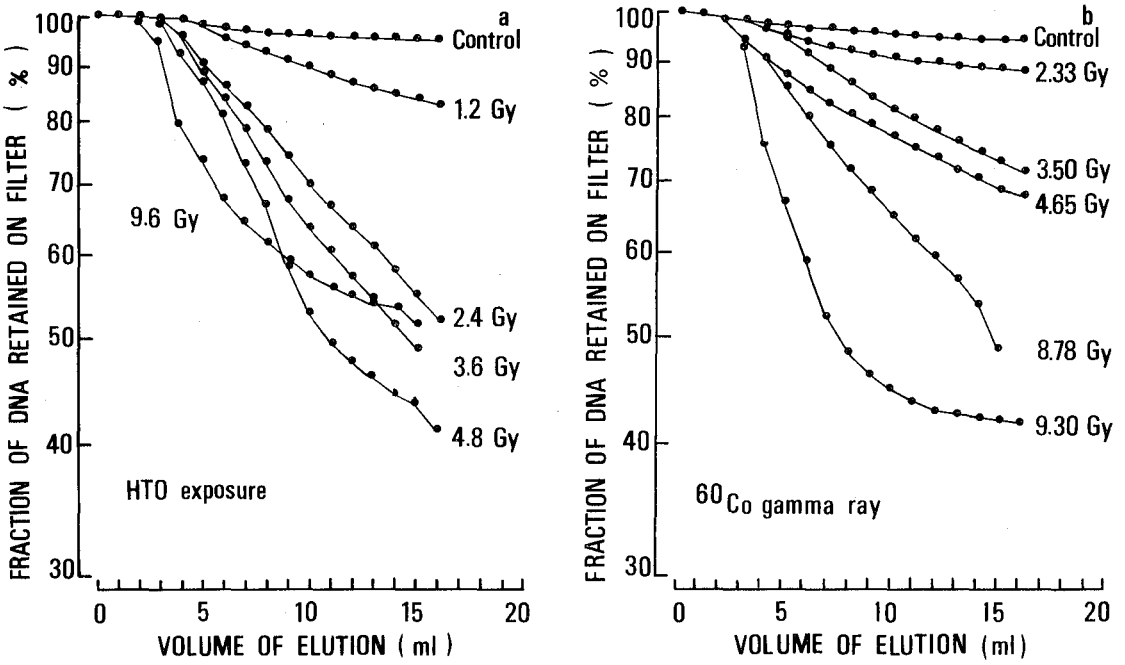


Fig. 3. A dose response relation on alkaline elution in L5178Y cells exposed to HTO comparing with ^{60}Co gamma irradiation.

吸収線量はそれぞれ20, 40, 60 Gy であり，各線量2回づつの実験をおこなった．無処理精子のアルカリ溶出曲線に比較して，トリチウム水処理精子の場合は溶出DNAの明らかな増加が認められた．しかしながら20－60 Gy のトリチウム水処理アルカリ溶出曲線の間に顕著な差は見られず，線量とDNA単鎖切断量との間の関係は明らかではなかった．また溶出曲線は初め急速に溶出し，後に緩慢に溶出する2相性を示した．図2 bは^{60}Co γ 線によってウニ精子を照射した場合で，吸収線量は16, 32, 48 Gy，線量率は16 Gy/hr である．各線量3回づつの実験をおこなった．トリチウム水処理の場合と同様に，無処理のアルカリ溶出曲線に比較して明らかな溶出の増加が認められたが，線量とDNA単鎖切断量との間の関係は明らかでなかった．

L5178Y細胞におけるDNA単鎖切断の測定：L5178Y細胞のトリチウム水処理後，アルカリ溶出法によりDNA単鎖切断を調べたものを図3 aに示す．処理時間は10～80分間で，吸収線量は1.2～9.6 Gy である．片対数グラフにプロットした溶出曲線は低線量で直線であり，わずか1.2 Gy のトリチウム水処理においても対照との間に差がある．高線量では初め急速に，後に緩やかに溶出し，二相性を示す．溶出曲線の勾配は線量の増加とともに大きくなる．図3 bは2.3～9.3 Gy の^{60}Co γ 線を照射したL5178Y細胞のアルカリ溶出曲線である．線量率はトリチウム水処理の場合に近似させて0.116 Gy/min である．トリチウム水処理の場合と同様に低線量では直線性，高線量では2相性の溶出曲線を示し，線量の増加とともに勾配も大きくなる．

生物学的効果比（RBE Relative Biological Effectiveness）について：L5178Y細胞について図3ならびに繰返しおこなわれた γ 線照射実験より，線量と溶出曲線によるDNA単鎖切断の程度との関係を求めて図4に示した．すなわち溶出曲線の勾配を最小2乗法により求めた．2相性の曲線については初期勾配を同様に求めてプロットした．横軸には吸収線量，縦軸には勾配を示した．黒丸印は^{60}Co の γ 線で，これらの点から最小2乗法によって求めたのが図の下の直線で，その勾配は0.113 ($y=0.113^x$) であり相関係数は0.90であった．トリチウム水の場合は白丸印で示した曲線となった．9.6 Gy の処理によって得られた値を除いて，コントロールと1.2～4.8 Gy のトリチウム水処理によって得られた値より最小2乗法によって得られた勾配は0.241 ($y=0.241^x$) で相関係数は0.98であった．この勾配の γ 線に対するトリチウム水の比0.241/0.113は2.13であった．

トリチウム水処理の繰り返し実験：L5178Y細胞を用いて，トリチウム水処理・アルカリ溶出実験を繰り返し

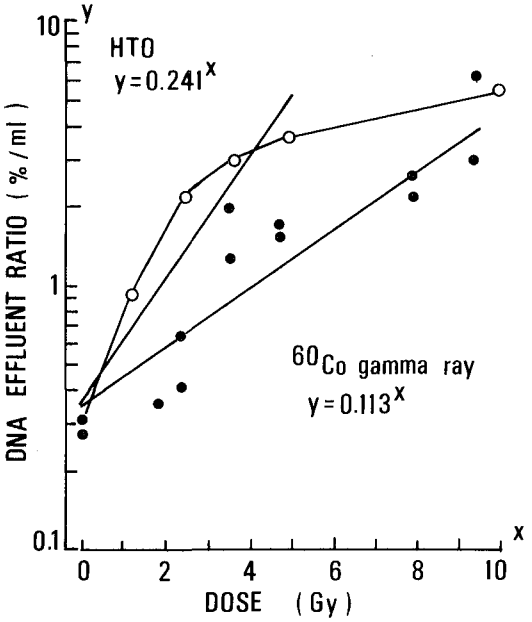


Fig. 4. The RBE on the induction of single-strand breaks in L5178Y cells exposed to HTO. The RBE is 2.13

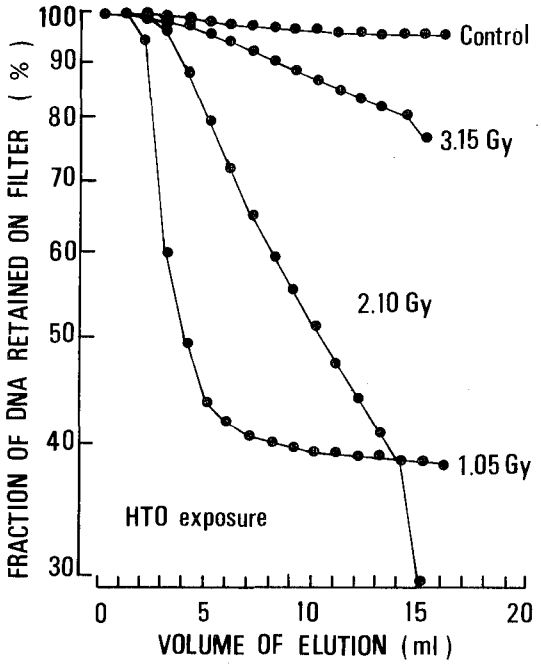


Fig. 5. A dose response relation on alkaline elution in L5178Y cells exposed to HTO.

おこなった．図5は線量1.05～3.15 Gy，10－30分処理したものである．図3 aと異なってわずか1.05 Gy 10分処理で大きな溶出を示し，2相性となった．2.10 Gy，3.15 Gyと線量が大きくなると勾配が小さくなった．この時使用したトリチウム水は希釈に用いたFischer培地に含まれるpH指示薬が酸性を示すように変色した．L5178Y細胞の第1回目の実験と大きく異なるこのようなデーターが得られた理由の一つとして，トリチウム水に含まれる不純物を挙げることが出来ると考え，新たに開封したNEN社のトリチウム水を用いて実験を繰り返した．第3回目の実験と溶出曲線の勾配は異なるが，同じ傾向を示した．図6にアルカリ溶出曲線の勾配と線量から得られた点をプロットした．実線と破線は図4のγ線とトリチウム水でのデーターであり，△印は第2回目，▲印は第3回目の実験から得られたものである．

カタラーゼ前処理トリチウム水による曝露：トリチウム水に含まれる不純物の一つとして過酸化水素が考えられる．過酸化水素の処理によってDNAの単鎖切断が生じることはアルカリ溶出法によって容易に検出することが出来る[9),16)]．我々はL5178Y細胞に0℃ 0.1 μg/ml 10－30分の過酸化水素処理し，アルカリ溶出DNAの顕著な増加を認めた．またこの過酸化水素は0℃10分間のカタラーゼ処理で不活性化されることを認めた[9)]．我々はトリチウム水のカタラーゼ処理を含む実験をおこなった．トリチウム水は新しく購入，開封されたものである．結果は図6に示した．▼印は50 u (50 μl) のカタラーゼで0℃，10分間トリチウム水を前処理し，そのトリチウム水によりL5178Y細胞を1.58，3.17，6.34 Gy，10，20，30分間処理したアルカリ溶出曲線から得たものである．▽印はカタラーゼを含まないFischer培地で同様に処理したものである．

考　察

我々は10^5 Bq以下のトリチウム水を使って，既に若干の実験をおこなっており[8)]，その経験より今回の実験における各段階での残留放射能を予測して，^{3}H量測定の実験をおこなった(図1)．その結果10^5 Bqのオーダーの実験と10^9 Bqのオーダーの実験における残留^{3}H量とは平行関係にあり，高放射能時の空気中へのトリチウム水の揮散に留意すれば同様な実験操作が可能であることが判った．即ち10－13 mlのろ過洗浄により10^{-3}－10^{-4}にすることが出来る．0.5 mlづつの遠心分離操作によりトリチウム水は1/20－1/50に洗い出すことが出来る．

ウニ精子のクロマチンは高度に凝縮しており，哺乳動物培養細胞のG_1，S，G_2期のみならず，クロマチンが

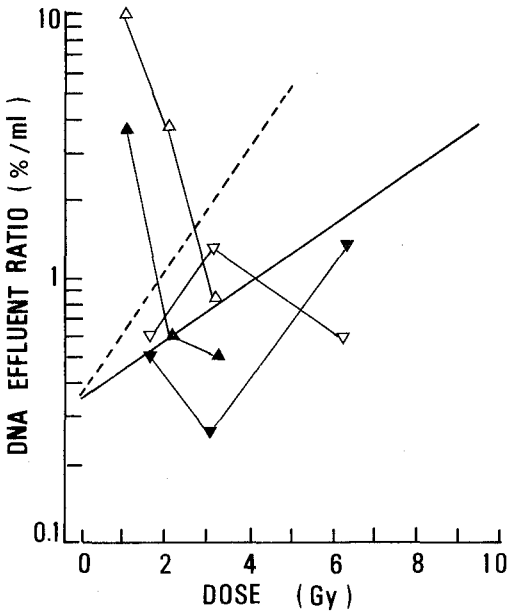


Fig. 6. A dose response relation on alkaline elution in L5178Y cells exposed to HTO. —: Co-60 gamma ray and ····: HTO in fig 4. △: 2nd, ▲: 3rd and ▽, ▼: 4th experiments of HTO exposure. ▽: preincubated without catalase, ▼: preincubated with catalase.

凝縮した状態にあるM期とも異っている．また原始的な真核細胞で分散したクロマチンの細胞性粘菌 *Distyosteliun discoideum* とも異っている．それはこれらの細胞がpH 12.3で二重鎖DNAは単鎖DNAに解離するがウニ精子のDNAはpH 12.5以上にならなければ，単鎖DNAに解離しない[11-12]．なお哺乳動物細胞でのアルカリ溶出法はpH 12.1～12.3でおこなっており[3-4) 10]，pH 12.8では非処理DNAのアルカリ溶出（低分子化）が生じる[11-15]．またVinogradら[17]はpH 9.6ではDNAは二重鎖であるがpH 11.6以上で単鎖に解離すると報告している．我々はウニ精子に軟X線を0～37.5 Gy照射，pH 12.5でアルカリ溶出をおこなうことによって線量相関があることを見い出している[11-12]．しかし今回の実験においてはトリチウム水処理，^{60}Co γ 線照射とも全て対照より多くのアルカリ溶出DNAを認めているにもかかわらず，線量相関が得られなかった（図2参照）．この事についていくつかの理由が考えられるが，その一つは我々はウニ精子は成熟分化した均一な細胞集団であると考えて使用したが，実際は放精後精子の成熟が進行し，放精後氷冷下において時間とともにDNA単鎖切断がおこりにくくなる可能性がある[18]．軟X線照射は放精後直ちに照射したが，トリチウム水，^{60}Co－γ 線照射は実験室が離れているため前日に放精した精子を使用した．他の可能性として軟X線照射は15分以内の短時間照射であったが，トリチウム水，^{60}Co γ 線は1－3時間の照射であった．これらの事から高度に凝縮したクロマチン構造による保護効果，分子間架橋形成，修復効果，照射によるクロマチン構造の変化などが考えられるので，今後さらに検討しなければならない．

L 5178 Y細胞のアルカリ溶出曲線はトリチウム水，^{60}Co γ 線ともに低線量照射で片対数グラフ上直線を示し，その勾配は線量と相関がある（図3，4）．高線量照射では2相性のカーブを示す．これはウニ精子の場合と同様に照射による架橋形成，クロマチン構造の変化，そしてDNAの溶出にともなうメンブランフィルター上のDNA量の不足等が考えられるが今後検討していかなければならない．

トリチウム水の生物効果を正しく評価するために，その効果が既知の標準となるX線又はγ線の効果と比較しRBEを求めなければならない．トリチウム水の吸収線量の算出には液体シンチレーション・カウンターで測定した値により細胞処理時の比放射能を算出し，吸収線量に換算するもので，トリチウム水は処理液全体に均一に存在しているものと仮定した．生体内における水の存在比を0.7[19]あるいは0.8[20]として計算すべきであるとされているが，我々の用いた材料はウニ精子とともにリンパ球由来L5178Y細胞も細胞質が少なく，これらの特殊性を考慮すると実際に水分含量を測定しないで，この数値を算入することには疑問があったので，あえて算入しなかった．また松平ら[20]はトリチウム水の10%が1時間で器壁への吸着等によって減少するとしているが，我々は短時間処理も含んでいるのでこの因子も算入しなかった．

いくつかの生物でトリチウム水のRBEは1より大きく，1－3という値が示されており[19-21]，我々がL5178Y細胞を用いて第1回目の値が2.13で，比較的近似した値を示した．水分含量を0.8とするとRBEは3.0となる．

トリチウム水処理・アルカリ溶出実験を繰り返しておこなったが，第1回目の実験によって我々は一応RBEを求める事が出来た．しかし第2回，第3回の実験は線量相関が逆になってしまい（図5，6），RBEを求める事は出来ない．10分間処理(1.05 Gyと1.08 Gy)によって極めて多くのDNA溶出が起った．これは^{3}H β 線のみの効果とするのは困難であり，トリチウム水の希釈時に培地のpHが変化したことにより，不純物の存在が考

えられた．水への β 線照射によるラジカル生成が知られている．しかしラジカルの寿命は短かく，多量に蓄積することは考え難い．ラジカルと共に H_2O_2，H_2，O_2 が生成するとされている．この中でDNA損傷を最も大きく引き起すのは過酸化水素である．今1 Ciのトリチウム水が1 Ci/mlの比放射能で1年間保管されたとする．^3H β 線による過酸化水素のG値が γ 線のG値と等しく0.70であるとし，^3H β 線の平均エネルギーは5.87 KeVで全て水に吸収される．更に過酸化水素が安定で分解されず全て蓄積されると仮定すると8.08×10^{-2} Mの H_2O_2 が生成される．これは1.45 mg/mlに相当し，我々がおこなったL5178Y細胞処理時まで希釈しても18 μg/mlの濃度である．我々は0.1 μg/ml10分間の過酸化水素処理でもアルカリ溶出法によってDNA単鎖切断を検出しており[9]，トリチウム水の中に過酸化水素が多量に存在する可能性がある．しかし処理時間が長くかるにつれて溶出曲線の勾配が少なくなることは説明できない．一つの可能性としてトリチウム水の10分間処理は希釈して直ちにおこなったが，20，30分処理は一旦凍結して2日後に融解処理実験をおこなっているので，このことが原因であるかもしれないので今後検討していかなければならない．又カタラーゼの前処理をおこなったが，このトリチウム水中に過酸化水素の蓄積がなかったためか第2，3回目のようなデーターは得られず，カタラーゼの効果も不明であった．トリチウム水は小分けした時点での放射能は判明するが，製造されてからの時間を知る事は困難であった．

ま と め

トリチウム水を化学物質の1つのモデルとしてDNA単鎖切断を調べた．クロマチン構造の相違は初期損傷としてのDNA単鎖切断に影響し，凝縮した構造のウニ精子は切断されにくい．ウニ精子でトリチウム水，^{60}Co γ 線共に線量効果関係は得られなかった．マウス白血病細胞L5178Yでは線量効果関係が得られ，そのRBEは2.13であった．トリチウム水はロットによってその効果が異なり，トリチウム水の放射線分解による不純物の存在が示唆された．

謝　辞

トリチウム曝露実験において施設の使用を許可し，使用についての多大な助言と協力をいただいた東京大学アイソトープセンターの森川尚威先生，野川憲夫先生，大野先生，ならびにウニを分与くださいました東京大学理学部動物学教室の秋元義弘氏に感謝いたします．

文　献

1) 渡部　真：生体の科学，33，10，1982
2) 渡部　真：体細胞遺伝学，55，1981，理工学社
3) Kohn, K.W., Friedman, C.A., Ewig, R.A.G., Iqbal, Z.M. : *Biochemistry*, 13, 4134, 1974
4) Parodi, S, Taningher,M., Santi,L., Cavanna,M., Sciaba,L., Maura,A., Brambilla,G. : *Mutation Res.*, 54, 39, 1978
5) Ono,T., Okada,S. : J.*Radat.Res.*, 14, 204, 1973
6) 水野重樹：核酸の一般的分離・定量法，19，1969，東京大学出版会
7) Burton,K. : *Biochemistry J.*, 62, 315, 1956
8) 田中信徳，金西信次，渡部　真，金城康人，宝月大輔：トリチウム水の生物（人体）影響に関する研究資料，91，1981，文部省総合研究班
9) 金西信次：未発表
10) Bradley. M.O., Erickson, L.C., Kohn, K.W. : *Mutation Res.*, 37, 279, 1976
11) Kananishi,N., Kinjo,Y., Watanabe,M. : 3*rd International Conference on Enviromental Mutagens*, 91,
12) Kananishi,N., Watanabe,M., Kinjo,Y., Shiroya,T. : *J.Radat. Res.*, 23, 72, 1982
13) Fornance,A.J., Kohn,K.W. : *Bioch. Biophs. Acta* 435, 95, 1976
14) Kohn,K.W. : *Cancer Res.* 37, 1450, 1977
15) Iqbel,Z., Kohn,K.W., Ewig,R.A.G., Fornace,A.J. : *Cancer Res.*, 36, 3834, 1976
16) Bradley,M.O., Kohn,K.W. : *Nucleic Acid Res.*, 7 , 793, 1979
17) Vinograd,J., Lebowitz,J., Radloff,R., Watson,R., Laipis,P. : *Proc.N.A.S.* USA, 5 , 1104, 1965
18) 金西信次：未発表
19) Dobson,L., Kwan,T.C. : *Radation Res.*, 66, 615, 1976
20) 松平寛通，上野照子，吉野育子：トリチウム水の生物（人体）影響に関する研究資料，47，1981，文部省総合研究班
21) 山口武雄，江口清美：放射線科学，23，27，1980

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 406-410, 1983

低角レーザー光散乱法と分子ふるい高速液体クロマトグラフィーを用いた高分子量蛋白の分子量測定法

藤谷知子*, 前木吾市**, 中尾順子*

Molecular Weight Determination of Nonionic Detergent solubilized Membrane Proteins by Low Angle Laser Light Scattering and Gel-filtration HPLC

TOMOKO FUJITANI*, GOICHI MAEKI** and TOSHIKO NAKAO*

Keywords : Na, K-ATPase, 分子量測定 Molecular Weight Determination, 光散乱 Light Scattering, 分子ふるい高速液体クロマトグラフィー Gel-filtration HPLC

はじめに

馬腎から精製したNa, K-ATPaseを非イオン性界面活性剤オクタエチレングリコールドデシルエーテル（以下，$C_{12}E_8$と略す）で可溶化し，$C_{12}E_8$を含む溶出液で分子ふるい高速液体クロマトグラフィー（以下，高速液クロ）を行った時，酵素活性のあるピークが3つある溶出パターンが得られる．また，溶出液にNa^+を含むかK^+を含むかで溶出パターンが異なる事がわかっている[1)-4)]．この事は，細胞膜に存在して細胞内外のNa^+，K^+やある種のアミノ酸の能動透過にかかわる機能を持つ本酵素が親和性の高いイオン（Na^+, K^+）によってコンフォメーションをかえる事との関連において興味深い．本報告において，高速液クロと光散乱法の組合せ[5)]を用いて，これらのピークの分子量測定を試みた．その結果は，溶出液中に存在するNa^+およびK^+イオンによりそれぞれモノマー，トリマー，ヘキサマーの関係を示し，各ピークの電子顕微鏡像もこの所見に一致した．

試薬・材料

N-tris (Hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid（以下，Tes），Tris (Hydroxymethyl) aminomethane(以下, Tris), 牛血清アルブミン(以下, BSA), サイログロブリンはSigma社製．$C_{12}E_8$（オクタエチレングリコールドデシルエーテル：Nikkol）は日光ケミカル社製を*n*-ヘキサンから再結晶して用いた．塩化ナトリウム，塩化カリウムは和光純薬製特級を用いた．

分子ふるい高速液体クロマトグラフィーには東洋ソーダ工業のG4000SWカラムを用いた．

実験に用いた水は石英二段蒸留装置で再蒸留して得た．

実験方法

精製Na, K-ATPase[6) 7)]を，8.5% Sucrose，20 mM Histidine-HCl pH 7.2中，1～2 mg/m*l*の濃度で，蛋白と$C_{12}E_8$の比が0.7～1になるように$C_{12}E_8$を加え，15℃，15分間インキュベーションした後，Beckman L5-75型超遠心機で75 Tiローターを用いて60,000 rpm（320,000 xg）60分間遠心し，上清を可溶化Na, K-ATPaseとした．比活性は，1 mg，1分あたり25～35 μ mole ATP分解で，高速液クロには1回70～140 μgを使用した．

高速液クロ溶離液は，0.1 M Tes-Tris，pH 6.8，0.01% $C_{12}E_8$に，25 mMNaClか10 mMKClを加えて，ポアサイズ0.3 μのメンブレンフィルター（東洋沪紙）で吸引沪過した後，超音波水浴中で吸引脱気して用いた．

カラムは溶離液であらかじめ飽和させたものに一定量のサンプルを加えて，Varian 4100型ポンプで流速30 m*l*/hrとして溶出し，検出器として，低角レーザー光散乱光度計（以下，光散乱計）及び示差屈折計はそれぞれ東洋ソーダ工業のLS-8とRI-8を用いた．

電子顕微鏡は，日本電子JEM-100B (100 kV)を用い，3%ウラニルアセテートによる陰染色で観察した．直接撮影倍率10万倍を基準とした．

結果と考察

可溶化Na, K-ATPaseの溶出パターンの一例を図1に示す．Aは25 mMNa^+を含む溶出液で，Bは10

* 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
** 同生活科学部乳肉衛生研究科

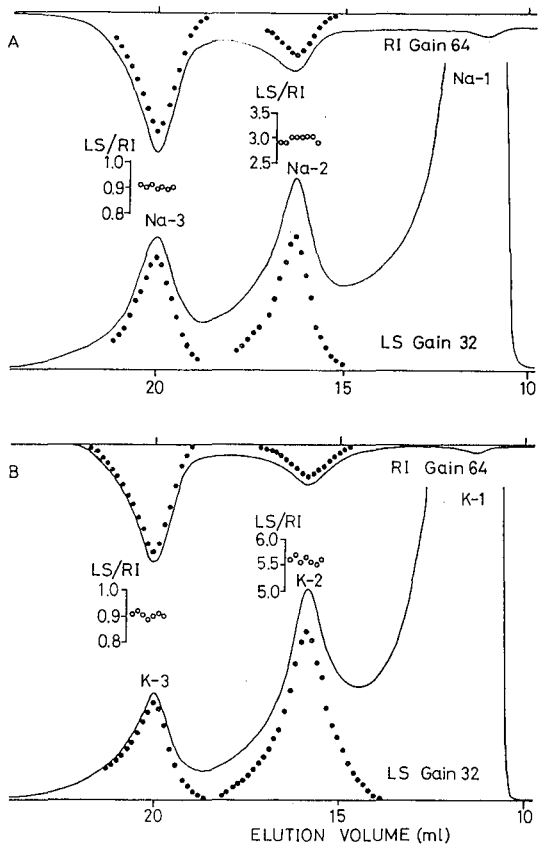


図1 可溶化 Na, K–ATPase の溶出パターン
A は Na^+ を含む溶離液，B は K^+ を含む溶離液による溶出パターン（—）と補正値（●）．図中の LS/RI の数値は，光散乱計（LS）と示差屈折計（RI）のチャート上の出力の高さの比である．

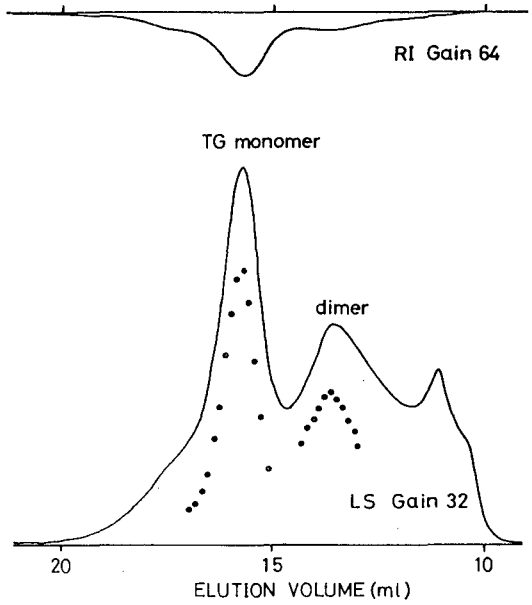


図2 標準蛋白サイログロブリンの溶出パターン
—溶出パターン，●補正値．
TG はサイログロブリン．

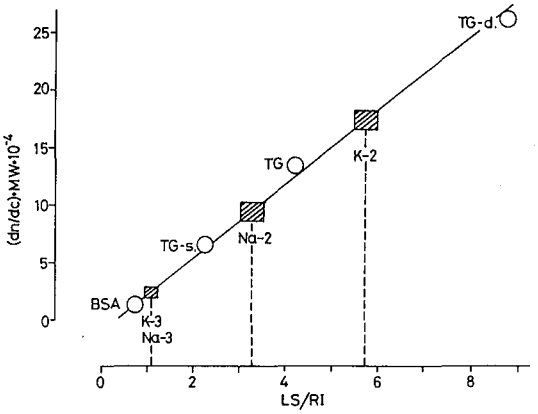


図3 標準蛋白による検量線
TG–d. はサイログロブリン・ダイマー．
TG はサイログロブリン．
TG–s. はサイログロブリン・サブユニット．
BSA は牛血清アルブミン．

mMK^+ を含む溶出液で行った場合である．前者で溶出されるピークを溶出の早い順に Na-1，Na-2，Na-3 とし，後者で溶出されるピークを同じく K-1，K-2，K-3 とすると，Na-2，Na-3 及び K-2，K-3 に蛋白と酵素活性がある．また，Na-1 と K-1，Na-3 と K-3 はそれぞれ同じ位置に溶出されるが，Na-2 は K-2 よりもやや溶出がおそく，分子量が異なる事がわかる．チャート上の光散乱計の出力の高さを LS，示差屈折計の高さを RI とする．さらに，ピークのテーリングによって生じる重復部分を補正して，LS と RI の比をとると，Na-3 と K-3 を 1 としたとき，相対的に Na-2 は約 3 倍，K-2 は約 6 倍の値を示す．

分子量標準蛋白として用いたサイログロブリンの溶出パターンを図2に示す．検出器の感度等の条件はすべて図1と同じである．光散乱計による測定は，装置定数が変化するので，その都度サイログロブリンを用いて LS 値の校正を行った．

図3に，このようにして測定した LS/RI 値と蛋白分

表1 LS/RI値と分子量

	LS/RI	分子量·(du/dc)·10^{-4}	du/dc	分 子 量
標準蛋白				
サイログロブリン			0.1949[a]	
ダイマー	8.75 (n=3)	25.92		133 $\times 10^4$
モノマー	4.2 (n=3)	13.04		66.9
サブユニット	2.25 (n=3)	6.5		33.5
アポフェリチン	4.3			44
カタラーゼ	2.85	4.4	(0.19)[b]	23.2
アルドラーゼ	1.63	2.47	(0.19)[b]	13
BSA	0.79	1.27	0.19[a]	6.7
可溶化 Na, K–ATPase				
K-2	5.75 (n=7)	17.5	(0.18)[b]	97.2
K-3	1.1 (n=7)	2.6	(0.17)[b]	15.3
Na-2	3.3 (n=5)	9.5	(0.18)[b]	52.7
Na-3	1.1	2.6	(0.17)[b]	15.3

a)文献値b)推定値

子量との関係を示した．LS/RIを横軸に，分子量とdn/dcの積をたて軸にとり，サイログロブリン・ダイマー，サイログロブリン，サイログロブリン・サブユニット及びBSAで検量線を得る．図1を含む数回の実験から得た各ピークのLS/RIの平均値から，それぞれの推定分子量が求められる．ここに用いた数値と，その他の蛋白のLS/RI値，dn/dc文献値と推定値，分子量等を表1に示した．dn/dc文献値は本報告の条件に近いものを選んだ．Na, K–ATPaseは膜蛋白であり，可溶化しても脂質や$C_{12}E_8$がついていると考えられるので，K-2，Na-2はdn/dcを0.18と推定，K-3とNa-3は紫外部吸収が相対的に低いのでさらに蛋白組成が低いと考えられるので0.17と推定した．dn/dcを直接測定したものについてはすでに報告した[8]．K-3，Na-3の推定分子量15.3万は，Na, K–ATPaseのαサブユニット約10万と，βサブユニット約4万との和に近く，データは示していないが（α β）構造を持つ事がSDS-ポリアクリルアミド電気泳動で証明された．また，（α β）をモノマーとして考えると，Na-2はその約3倍の分子量を持つトリマー，K-2はその6倍の分子量のヘキサマーの状態にあると思われる．

写真1にNa-3，写真2にNa-2の電子顕微鏡像を示す．Na-3は直径約40～50 Å，Na-2は約100 Åであり，Na-3が白く丸い形であるのに対してNa-3はその丸い単位が3つずつ集まっているように見え，分子量推定値と考え合わせればトリマーであると思われる．

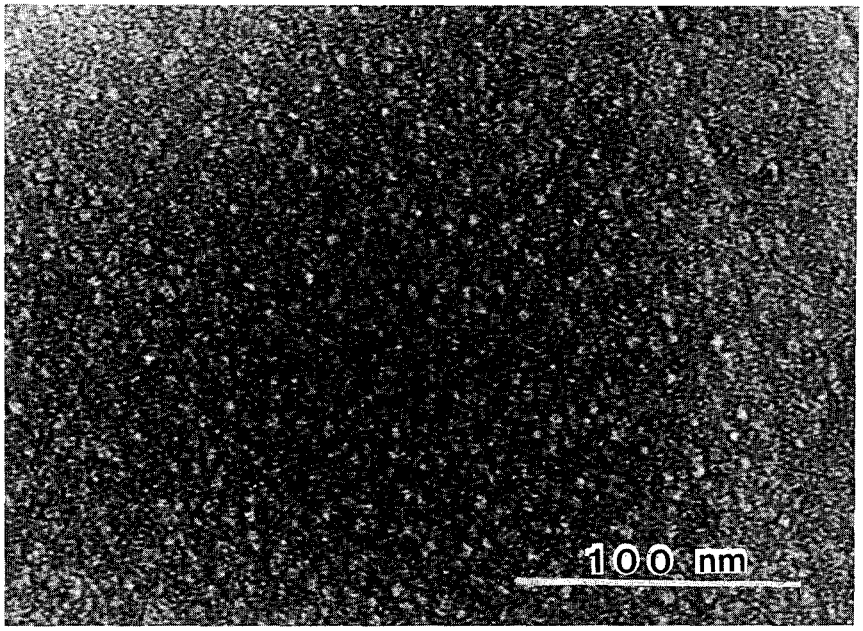
以上のように，$C_{12}E_8$可溶化Na, K–ATPaseは，酵素活性のある状態で，3種の分子構造を持ち，しかもNa^+中とK^+中で異なる会合をしている事が示された．

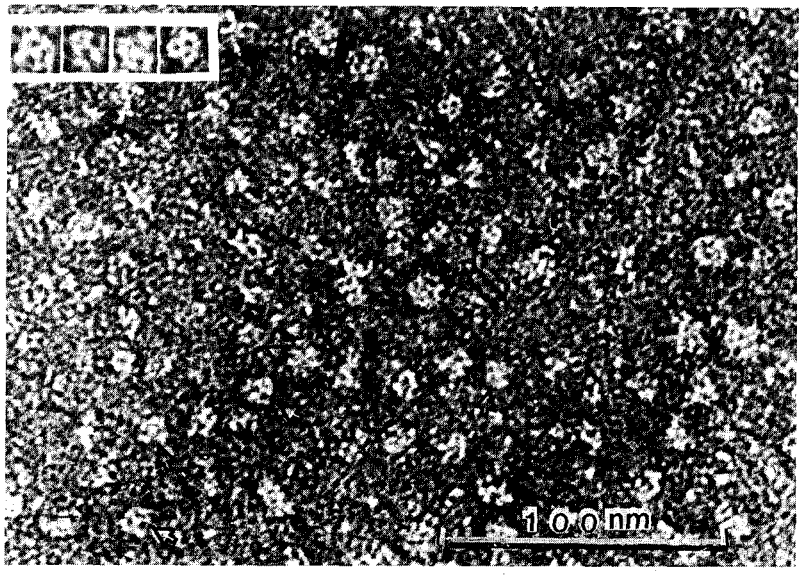
まとめ

低角レーザー光散乱光度計と分子ふるい高速液体クロマトグラフィーの組み合わせで，$C_{12}E_8$可溶化Na, K–ATPaseの分子量を測定した．酵素活性を有するピークの推定分子量が1：3：6の比率になり，各々モノマー，トリマー，ヘキサマーと考えられ，電子顕微鏡による知見も一致した結果を示した．

文 献

1) 中尾順子，中尾 真，藤井芳美：生化学，51－8，692，1979
2) 中尾順子，中尾 真：生化学，52－8，561，1980
3) 中尾順子，大野知子，荒居正子，中尾 真：生化学，53－8，837，1981
4) 中尾順子，大野知子，佐藤かな子，中尾 真：生化学，54－8，951，1982
5) Takagi,T., Miyake,J., & Nashima,T.: *Biochim. Biophys. Acta*, 626, 5, 1980
6) 長井二三子，厚井麻里，中尾順子：東京衛研年報，26－2，143，1975
7) 大野知子，長井二三子，中尾順子：東京衛研年報，33，477，1982
8) Nakao,T. *et al*: B.B.R.C., *in the press*


100 nm


100 nm

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 34, 411-414, 1983

各種タンパクに結合したバナジウム

藤谷和正*, 中尾順子*

Vanadium in Proteins

KAZUMASA FUJITANI* and TOSHIKO NAKAO*

Keywords : バナジウム vanadium, タンパク proteins, 牛血清アルブミン bovine serum albumin, Na, K–ATPase

緒　言

バナジウムは各種動植物中に存在し，ホヤ[1]，ベニテングタケ[2]に多量に含まれ，ヒト臓器中にも存在し[3]，ラット[4]，やヒヨコ[5]にとって必須元素である．工業的には鉄鋼，チタン合金の製造，化学反応の触媒として用いられ，また石炭・石油中にも存在するので，石炭・石油工業の発展に伴って大気中に放出され，産業的曝露も報告されている[6]．

最近の知見では，5価のバナジウム（Vanadate）が，動物体内で重大な働きをする細胞酵素である sodium and potassium ion–dependent adenosine triphosphatase（以下 Na, K–ATPase と略す.）の強力な阻害剤であるということが多数報告されている[7][8]．

Na, K–ATPase の ATP 分解反応系にウシ血清アルブミン（以下 BSA と略す.）を一定量加えると酵素の活性が高まるが，高濃度では活性阻害が生じる[9]．

そこで，BSA による Na, K–ATPase に対する効果が，BSA に含まれているバナジウムに起因するのではないかと考え，BSA，その他の血漿タンパク，卵白アルブミン並びに数種の哺乳動物の血清あるいは血漿，血餅，全血について，バナジウム含有量をフレームレス原子吸光法により測定した．また，バナジウムおよび BSA による Na, K–ATPase 活性への効果も検討した．

実　験

バナジウム測定用試料　ラットの成獣・仔の血清，血餅，ウサギの血清・血餅・全血，ヒトの血清・血餅.全血，ウシ胎仔血清，仔ウシ血清，ウシ血漿，イヌ血清・血漿，ヒツジ血漿，ウマ血清ならびに市販の精製タンパク，BSA; BSA FractionV; γ–Globulin, Bovine Fr Ⅱ; Fibrinogen, Bovine Fr I; Albumin, Egg; Albumin, Rat Fr. Vを湿式灰化した．

灰化条件　生標本は0.3～4.3g，精製タンパクは0.2～0.5g を試験管に入れ，和光純薬工業㈱の有害金属測定用の硝酸300 μl× 3 ～38倍量，過塩素酸100 μl× 1 ～12倍量を数回に分けて加えながら，100～360°C で13～51時間，アルミまたはステンレスブロックを乗せたホットプレート上で湿式灰化および乾固した．これに 1 %（w/v）硝酸 1 ml を加えて良く混合し，原子吸光測定用灰化試料とした．

原子吸光条件　Perkin–Elmer 社製原子吸光光度計 AAS4000および無炎原子化装置 HGA–400を用い，表1の条件で測定した．なお試料は 1 %（w/v）硝酸溶液を再留水またはバナジウム標準溶液と等量希釈して用いた．

標準溶液は関東化学㈱のもの（NH_4VO_3, 1000 μgV/ml）を再留水で希釈して用いた．

酵素活性の測定　中尾らの方法[10]に準拠し，Buffer Mixture（100mM Imidazole–HCl pH7.2, 280mM NaCl, 28mM KCl, 10mM $MgCl_2$, 0.5mM EDTA–Tris）250 μl, 5 mM Ouabain または再留水 50 μl, BSA 水溶液（0～2820 μgBSA/10 μl）10 μl, NH_4VO_3 水溶液（0～30ngV/30 μl）30 μl, 再留水 60 μl の混合液に酵素（Na, K–ATPase, 長井らの方法[11] 並びに Jørgensen らの方法[12]を改良した大野らの方法[13]により精製した，比活性 406 μmole Pi/mg/hr）を，希釈し 4 μg protein を含む酵素液として50 μl 加え，pre–incubation 37°C, 15min の後，30mM ATP50 μl を加え（合計0.5ml），incubation 37°C, 15min で反応させ，次に BSA が一定濃度になるように差の BSA を加え，10%（w/v）TCA 0.5ml でタンパクを沈降させ，遠心上清 0.5ml を分取し

* 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 Laboratry of Public Health
24–1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku–ku, Tokyo, 160 Japan

表1　フレームレス原子吸光条件

機種　Perkin–Elmer AAS–4000
　　HGA–400
波長　318.4nm　　帯域幅　0.7nm
光源　Hollow Cathode Lamp　(Vanadium)
電流値　15mA
バックグラウンド補正　D_2　Lamp
グラファイトチューブ　Pyro Type
試料量　20 μl
拡大　　×2.5

step	1	2	3	4
Temp (°C)	120	500	1500	2700
Ramp (sec)	5	5	5	1
Hold (sec)	20	10	20	6
Ar (m*l*/min)	300	300	300	50

た．これを Fiske–SubbaRow 法[14] のリン酸測定に供した．試薬ブランクとして，反応液中に Ouabain, BSA, NH_4VO_3，酵素を含まないものを pre–incubation し，以下同様に処理した．なお，BSA は Sigma A–4378, Lot. 42F–9410を用いた．

結果および考察

バナジウム濃度　哺乳動物の血清・血漿・血餅・全血を湿式灰化し，1％（w/v）硝酸 1 m*l* に溶かした灰化試料をフレームス原子吸光法で測定したところ，表2のように，その全てについて検出限界（4.8ng/m*l* 灰化液）以下であった．

市販の精製タンパク中のバナジウム濃度は表3のようになり，BSA に高濃度に含まれていることがわかった．

検出限界以下の灰化試料を等容量の標準溶液に添加しても，再留水を添加したものに比べてバナジウムの吸収

表2　生標本中のバナジウム濃度

			灰化に供した重量(g)	例　数	バナジウム
ラット*1	成　獣	血　清	0.3～3.6	8	検出限界以下*6
	16～43w	血　餅	0.6～4.3	8	
	仔	血　清	0.3～1.4	集合11	
	2～4w	血　餅	0.3～2.0	集合10	
家　兎		血　清	1.1～1.9	3	
		血　餅	2.0～2.5	2	
		全　血	2.2	1	
ヒ　ト		血　清	1.1～1.6	2	
		血　餅	1.8	1	
		全　血	1.8	1	
ウ　シ	胎仔	血　清*2	2.0	1	
仔ウシ		血　清	1.4～2.1*3	2	
ウ　シ		血　漿	1.3	1	
イ　ヌ		血　清	1.4	1	
イ　ヌ		血　漿	1.6	1	
ヒツジ		血　漿	1.4	1	
ウ　マ		血　清	1.5*4～1.6*5	2	

＊1　SLCウイスター静岡系
＊2　Gibco Laboratories　MYO–CLONE Lot. 20K 6320
＊3　Flow Laboratories　Cat. No. 29–131–54, Lot. 29131812
＊4　Flow Laboratories　Donor Horse Serum Cat. No. 29-211-49, Lot. 不明
＊5　同上　Lot. 292-11118
＊6　検出限界　4.8ngV/m*l* 灰化液

表3 精製タンパク中のバナジウム濃度

Proteins (0.2g)	μg Vanadium/g Protein
BSA crystallized and Lyophilized	7.86
Sigma A4378	8.02
Lot. 119C−9325	
〃	3.80
	4.01
Lot. 42F−9410	3.85
BSA crystallized	19.6
Schwarz/Mann 809217	18.4
Lot. DZ−3149	
BSA Fraction V	10.2
Sigma A4503	10.2
Lot. 35C−0013	10.0
(0.5g)	9.66
γ−Globulin, Bovine Fr. Ⅱ	N. D. *,**
Nutritional Biochemical	N. D. *,**
Lot. 5162	N. D. *,**
Fibrinogen, Bovine Fr. Ⅰ	0.318
Cytrated Type Ⅰ	0.287
Sigma F4000 Lot. 115C−0162	
Albumin, Egg	0.0236**
Sigma A5503	0.0230**
Lot. 93C−8060	
Albumin, Rat Fr. V	0.294
Sigma A6272	0.272
Lot. 112F−9379	

*N. D. 検出限界以下

** 灰化後1％（w/v）硝酸0.5m*l*を加えて原子吸光測定用灰化試料とした.（他は1m*l*）

- 検出限界 0.2gの試料から得られた0.5m*l*の灰化試料を$\frac{1}{2}$の濃度に希釈して測定した場合 0.012μg V/g sample （4.8ng V/m*l*灰化試料）
- 検出感度 チャートの1％が6ng/m*l*（拡大2.5倍のとき）
- 測定値は添加法により同一試料について，4回繰返し測定して求めた値
- 回収率 99.8±5.0％（n=4）

の減少は見られなかったので，測定を妨害する物の共存によるのではないと考えられる.

バナジウムおよびBSAのNa, K—ATPase活性への影響

図1に示す如く，BSAは60ng/0.5m*l*前後の時，活性を上昇させるが，高濃度では阻害している.

また図2でバナジウム（V^{+5}, Vanadate）は，高濃度になるにつれ活性を阻害し，30ng/0.5m*l*では72％の阻害を示した．これらの結果から，BSAそのものは活性を上昇させる要素と考えられるが，その中に存在しているバナジウムのために高濃度では活性阻害が起こっていると見ることができる.

ま と め

各種哺乳動物の血清・血漿・血餅・全血ならびに市販の血漿および鶏卵の精製タンパクについて，バナジウム濃度をフレームレス原子吸光法で測定した．前者については全て検出限界以下であり，後者，特にBSAには高濃度に含まれていた.

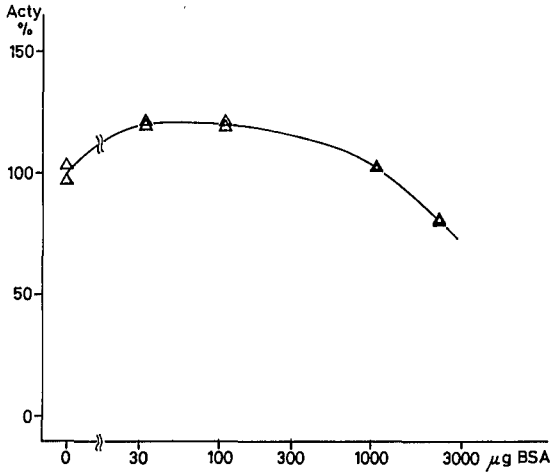


図1　反応液(0.5m*l*)中 BSA 濃度とNa, K–ATPase 活性
反応液に BSA を含まない時の活性値を100%とした.

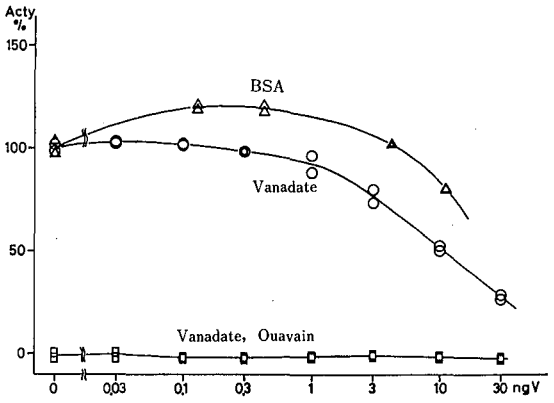


図2　反応液（0.5m*l*）中バナジウム濃度とNa, K–ATPase 活性
反応液に BSA および Vanadate を含まない時の活性値を100%とした.

BSA による Na, K–ATPase の活性化および活性阻害は，含まれているバナジウムと関連があるように考えられる．今後，更に検討したい.

文　献

1) Peterson, P. J. : *Sci. Prog.* 59, 505－526, 1971
2) Betrand, D. : *Bull. Amer. Musem Nat. Hist.*, 94, 403－455 (1950)
3) Tipton, I. H., Schroeder, H. A., Perry H. M., Jr. and Cook, M. J. : *Health Phys.*, 11, 403－451, 1965
4) Schwartz, K. and Milne, D. B. : *Science*, 174, 426－428, 1971
5) Hopkins, L. L., Jr. and Mohr, H. E. : *Newer Trace Elements in Nutrition.* Ed. Mertz and Cornatzer, 195, 1971, Marcel Dekker, New York
6) 和田　攻，小野　哲，木村正己訳：環境汚染物質の生体への影響2　クロム・バナジウム，第1版，204, 1977，東京化学同人
7) Josephson, L. and Cantley, L. C., Jr. : *Biochem.*, 16, 4572, 1977
8) Cantley, L. C., Jr. and Aisen, P. : *J. Biol. Chem.*, 254, 1781, 1979
9) 中尾順子ら：未発表
10) Nakao, T., Nakao, M., Mizuno, N., Komatsu Y. and Fujita, M. : *J. Biochem.*, 73, 609, 1973
11) 長井二三子，厚井麻里，中尾順子：東京衛研年報，26－2，143, 1975
12) Jørgensen, R. T. : *Methods in Enzymology*, 32, Ed. Fleischer, S. and Packer, L. 285, 1974, Academic Press, New York
13) 大野知子，長井二三子，中尾順子：東京衛研年報，33, 477, 1982
14) Fiske, C. and SubbaRow, Y. H. : *J. Biol. Chem.*, 66, 375, 1925

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 415-417, 1983

非イオン性およびイオン性界面活性剤によるアデニレートシクラーゼの可溶化

中川敦子*, 中尾順子*

Solubilization of Adenylate Cyclase by Nonionic and Ionic Detergents

ATSUKO NAKAGAWA* and TOSHIKO NAKAO*

Keywords：アデニレートシクラーゼ adenylate cyclase，オクタエチレングリコールドデシルエーテル octaethyleneglycol dodecyl ether，コール酸 cholic acid

緒　言

Adenylate Cyclase（AC）は解媒 unit，調節 unit および受容体 unit より成る膜結合タンパクでその精製には可溶化が必須である．性質の異なる界面活性剤により異なる性質の可溶化酵素標品が得られることが予想されるので，非イオン性界面活性剤であるオクタエチレングリコールドデシルエーテル（$C_{12}E_8$）と陰イオン性界面活性剤であるコール酸を用いて膜結合 AC を可溶化した．各可溶化 AC の賦活剤に対する反応性のちがいと更に硫安分画あるいはゲル沪過で分画した酵素タンパクの組成を電気泳動で観察した．

実験方法

試薬　ATP はシグマ社の Grade Ⅰ，C-AMP，DTT はシグマ社，[α-^{32}P]-ATP はラジオケミカルセンター，フォルスコリンはカルビオケム社，NH_4VO_3は和光純薬，コール酸は日水製薬のもので精製したものを使用した．ホスファチジルコリンはシグマ社のものをN_2ガス下でアセトンで洗い，$C_{12}E_8$は日光ケミカル社のものをn-ヘキサンから精製して使用した．

AC の調製　Rat 脳の膜酵素標品（Memb-Enz）および$C_{12}E_8$可溶化酵素標品（$C_{12}E_8$-Enz）は既報の方法[1,2]で調製した．コール酸可溶化酵素標品（Chol-Enz）は Strittmatter 等の方法[3] による preparation A を使用した．用いた各標品の比活性はそれぞれ1.6－2.5，5.7－7.6および0.19－1.2 nmole C-AMP/mg prot/10min であった．精製の目的で$C_{12}E_8$-Enzは26％飽和硫安で沈でんさせ比活性を2倍に上昇させた画分を，Chol-Enz はStrittmatter 等の方法[3] により触媒 unit に富む分画を得た．

AC 活性の測定　AC 活性の測定は Salomon 等の方法[4] に従った．タンパクの測定は BSA を標準にして Lowry[5] および Bradford[6] の方法で行った．

Sepharose CL－6 B によるゲルクロマトグラフィ　カラムは2.5×100cm のものを用い Strittmatter 等の方法[3] を改変して行った．流速は25ml/hr で 2.4ml/fraction ずつ分画し，各 fraction に等量の飽和硫安を加えて25000r.p.m.，45min 遠沈（Beckman，40Aロータ）した沈でんを 0.2ml の 7 mg/ml ホスファチジルコリン，0.1％ $C_{12}E_8$，0.2M Sucrose，50mM Tris-HCl (pH7.7)，15mM $MgCl_2$，1 mM DTT に suspend し，AC 活性の測定を行った．

SDS ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）　7.5％ゲルを用い Fairbanks 等の方法[7] に従った．

実験結果および考察

NaF および NH_4VO_3（V^{5+}）は AC の調節 unit を介し AC 活性を調節する賦活剤である．各酵素標品に対するこれら賦活剤の影響を図1および図2に示した．$C_{12}E_8$-Enz および Chol-Enz とも両賦活剤による活性化作用はみられず，$C_{12}E_8$-Enz では減少の傾向がみられた．

フォルスコリンは触媒 unit に直接作用する賦活剤であり，Mn^{++}も Rat 精巣可溶性 AC やネズミの S49 lymphoma cyc^- 細胞の AC など，調節 unit が欠損した AC の賦活剤である．AC 活性に対する両賦活剤の影響を図3および図4に示した．Chol-Enz はこれら賦活剤による活性化が著しく酵素標品中で触媒 unit として存在していることが示唆された．Mn^{++}およびフォルスコリンを同時に添加した時には $C_{12}E_8$-Enz の活性上昇が2倍であるのに対し，Chol-Enz ではおよそ100倍と賦活剤による相乗作用がみられた．Chol-Enz を精製する

* 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

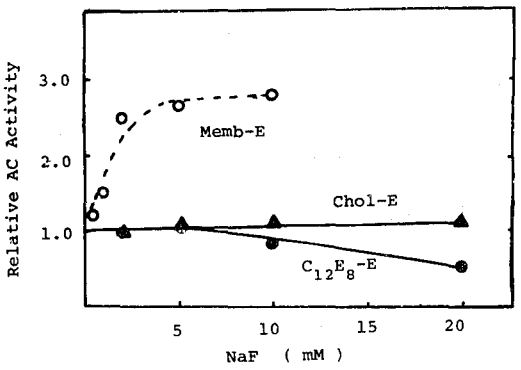


図1. 各種AC標品におよぼすNaFの影響

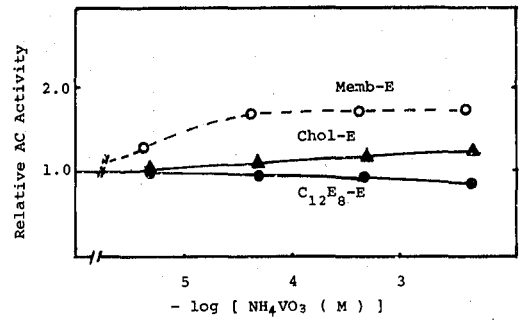


図2. 各種AC標品におよぼすNH_4VO_3の影響

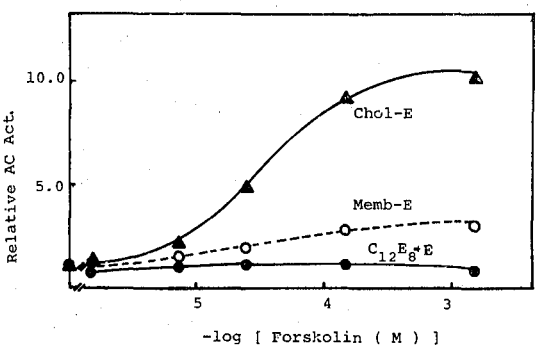


図3. 各種AC標品におよぼすフォルスコリンの影響

ためにSepharose CL−6Bカラムで分画する（図5）とVoとfraction No.90を中心にAC活性が検出された．Mn^{++}およびフォルスコリン添加による活性化の程度は図6に示すようにfraction No. 88が最も高く触媒 unit に富む分画であることが示唆された．ゲル沪過後の賦活剤による活性化はChol−Enz（図4）に比べて低下していた．Chol−Enzは$C_{12}E_8$−Enzに比べて保存に対する

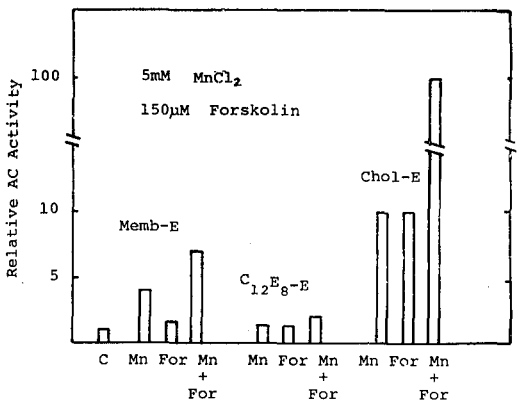


図4. 各種AC標品におよぼすフォルスコリンおよび$MnCl_2$の影響
いずれの賦活剤も添加しない時の活性（C）を1.0とした相対活性で表わした．

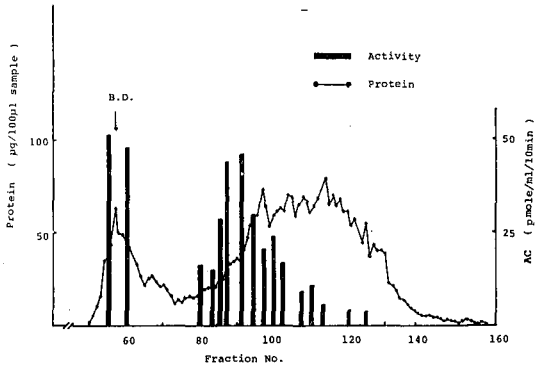


図5. Chol−Enzのゲルクロマトグラフィ
Sepharose CL−6Bのカラム（2.5×100cm）を用いStrittmatter等の方法[3]で分画した．流速25ml/hr，2.4ml/fractionで分画した．
AC活性の測定は反応液中に150μMフォルスコリン，5 mM $MnCl_2$を添加して行った．

安定性が低いが，ゲル沪過で分画したAC標品は−80°C 1日間の保存で5％の活性しか保持されない．ゲル沪過中に生ずるACの失活が賦活剤に対する感受性にも影響をおよぼしているかもしれない．精製をすすめるうえでは酵素の安定性の保持を検討することが必須であると思われた．

各種AC標品のSDS電気泳動パターンを図7に示した．$C_{12}E_8$−Enzを更に硫安分画したAC標品（図7−7，8），ゲル沪過で得た触媒 unit に富む分画（図7−4，5，）とも分子量10万，5万，4万付近に比較的強い共通な band が検出されたが，硫安分画ACでは更に15万付近にゲル沪過後の標品では7.5万および7万付近に強

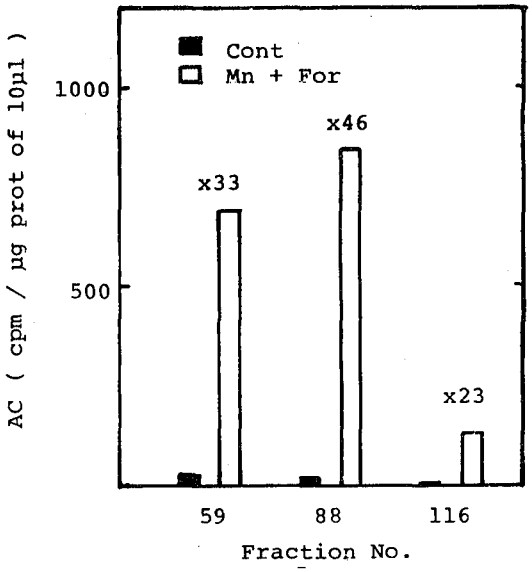


図6. ゲル沪過したACのMnおよびフォルスコリンによる活性化
AC活性測定に使用した$MnCl_2$およびフォルスコリンの濃度はそれぞれ5 mMおよび150 μMである.
図中の数字は賦活剤添加時の活性を無添加時の活性に対する倍率として表わした.

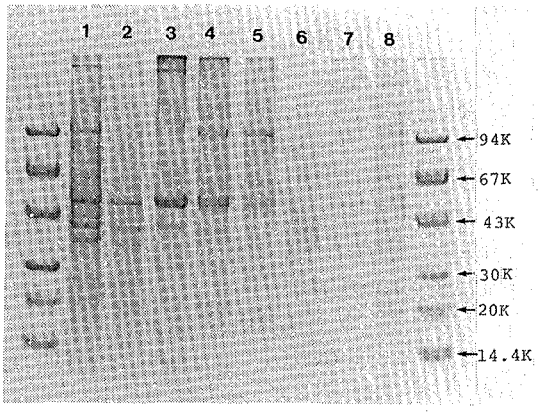


図7. 各AC標品のSDS電気泳動
1：$C_{12}E_8$–Enz, 2：Chol–Enz, 3：frac. No 59, 4：frac. No 85, 5：frac. No. 90, 6：frac. No. 116, 7, 8：$C_{12}E_8$–Enzを硫安分画した標品, 両端は分子量既知の標準タンパクを泳動した.

いbandが検出され両可溶化酵素標品のタンパク組成には差がみられた. このタンパク組成の差と賦活剤に対する反応性および保存に対する安定性の差などの関係については今後検討する予定である.

要　約

1) Rat脳より可溶化した$C_{12}E_8$–Enzおよび Chol–Enzはいずれも NaFおよびV^{5+}により賦活化されなかった.

2) Chol–Enzおよびゲル沪過で得たACはMn^{++}およびフォルスコリン存在下で著しい活性化を示し, 触媒unitに富む標品であることが示唆された.

3) $C_{12}E_8$–Enzを硫安分画した標品とChol–Enzをゲル沪過した標品のSDS–PAGEによるタンパクのパターンに差がみられた.

文　献

1) 中川敦子, 中尾順子：東京衛研年報, 29－2, 151, 1978
2) 中川敦子, 中尾順子：東京衛研年報, 30－2, 136, 1979
3) Strittmatter, S. and Neer, E. J.：*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77, 6344, 1980
4) Salomon, Y., Londos, C. and Rodbell, M.：*Anal. Biochem.*, 58, 541, 1974
5) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.：*J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
6) Bradford, M. M.：*Anal. Biochem.*, 72, 248, 1976
7) Fairbanks, G., Steck, T. S. and Wallach, D. F. H.：*Biochemistry*, 10, 2606, 1971
8) Seamon, K. B., Padgett, W. and Daly, J. W.：*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 78, 3363, 1981
9) Seamon, K. B. and Daly, J. W.：*J. Biol. Chem.*, 256, 9799, 1981
10) Braun, T. and Dods, R. F.：*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 72, 1097, 1975
11) Neer, E. J.：*J. Biol. Chem.*, 253, 5808, 1978
12) Somkuti, S. G., Hildebrandt, J. D., Herberg, J. T. and Iyenger, R.：*J. Biol. Chem.* 257, 6387, 1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 418-420, 1983

実験動物各種間における血しょう，あるいは血清コレステリルエステルの脂肪酸組成の差異

高橋　省*，中尾順子*，平賀興吾*

Species Differences of Fatty Acid Composition of Plasma or Serum Cholesteryl Esters in Laboratory Animals

OSAMU TAKAHASHI*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

Fatty acid composition of plasma or serum cholesteryl esters was determined in humans, maccaca monkeys, calves, beagle dogs, rabbits, guinea pigs, rats, hamsters, mice, chicks and Japanese quail. Species differences were observed among those animals. Especially in rats and mice, arachidonic acid was abundunt, which was different from plasma cholesteryl esters of other species.

Keywords: fatty acid composition, plasma, cholesteryl esters, human, monkey, dog, rabbit, rat, mouse, chick

緒　言

食品添加物や農薬などの環境汚染化学物質の毒性研究において，病理組織学的毒性発現に先行して，動物の肝臓や血しょう中のトリグリセリド，コレステロールなど脂質関連物質がかなり変動することが知られている[1, 2]．また，肝臓脂質の脂肪酸組成の変化についてはある程度知られているが，血しょう中のコレステリルエステルの脂肪酸組成の変化については検討されていなかった．

我々は酸化防止剤の毒性研究において，ラットの臓器，血しょうの脂質組成，脂肪酸組成への影響についても検討し報告した[3, 4]．その結果，脂質組成，脂肪酸組成には，種特異性，臓器特異性が存在し，また，それらの組成とくに脂肪酸組成は，酸化防止剤の投与に対し鋭敏に変化することが観察された．

そのうち，血清コレステリルエステルの脂肪酸組成は，ラットの場合，ヒトとはまったく異なるという結果も得られた．そこで，ラット以外にも動物の種類をふやし，血清あるいは血しょうコレステリルエステルの脂肪酸組成を比較し，毒性研究上の基礎データを得たいと考えた．

本報告はその結果をまとめたものである．

材料と方法

血しょうあるいは血清　正常および高脂血症ヒト血清，および体重，行動観察などから一般的に正常と認められるアカゲザル，ウシ，イヌ，ウサギ，モルモット，ラット，ハムスター，マウス，ニワトリ，ニホンウズラの血しょうあるいは血清を使用した．これらの血しょう，血清は，ヒト，ウシなどの場合はプールしたもの，ラット，イヌなどについてはそれぞれ3匹から採取した．それらについては表1に付記してある．

分析法　血しょうあるいは血清から20倍容のクロロホルムーメタノール（2：1）により，Folch らの方法[5]に従い脂質を抽出した。抽出物は窒素気流下で乾固後，上記抽出溶媒の少量に溶解し，薄層クロマトグラフィーによる分離に用いた．各脂質分画はシリカゲル60ガラスプレート（E. Merck 社製，西ドイツ）上において，n－ヘキサンージエチルエーテルー酢酸（80：20：1）により，展開分離した[6]．コレステリルエステル分画をかきとり，クロロホルムーメタノール（2：1）で抽出し，乾固後，0.2 N（*m*－トリフルオロメチルフェニル）トリメチルアンモニウムヒドロキシドーメタノールによりメチル基転移反応を行い[7]，ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸メチルの分析を行った．ガスクロマトグラフィーは水素炎イオン化検出器のついた Shimadzu GC–4BM あるいは GC–9A により行った．カラムは15％ポリ（ジエチレングリコールサクシネート）をコートしたクロモソルブ W を充てんしたガラスカラム（2 m× 3 mm 内径）あるいはユニゾール3,000をコートしたユニポート C を充てんしたガラスカラム（3 m× 3 mm 内径）を使用した．それぞれの脂肪酸メチルエステルは標準物質の保持時間と比較して同定した．

* 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

Table 1. Fatty Acid Composition of Plasma or Serum Cholesteryl Esters

	16：0[a]	16：1	16：2	18：0	18：1	18：2	UK[b]	18：3	20：2	20：3	20：4
Human (N) [c,d]	12.7	3.6	—[e]	0.3	27.7	51.4	—	0.4	0.4	0.2	3.4
Human (HL) [f,d]	24.9	0.6	—	6.8	30.5	30.5	1.0	1.3	—	—	0.8
Monkey[g]	13.2	3.5	—	2.0	18.0	57.1	—	2.8	—	0.6	2.8
Calf[d]	4.3	0.6	—	0.2	6.5	83.0	—	4.3	—	0.7	0.6
Dog[g]	7.9	1.8	—	1.8	15.0	59.9	—	1.8	—	0.7	11.3
Rabbit[d]	24.3	1.0	0.4	2.6	34.0	33.0	—	2.4	—	0.9	0.6
Guinea pig[d]	19.6	1.9	0.1	1.3	12.0	59.0	—	2.4	—	1.1	2.7
Rat[g]	19.9	5.4	0.4	3.3	14.1	20.9	—	—	—	2.1	33.9
Hamster[d]	9.2	1.5	0.2	2.1	38.8	45.1	—	1.0	—	0.5	1.6
Mouse[d]	7.9	2.8	0.2	1.0	14.8	54.9	—	0.6	—	0.7	17.0
Chick[g]	13.7	4.5	0.2	1.9	36.3	38.7	—	0.8	0.5	1.5	2.0
Japanese quail[g]	23.5	2.9	—	3.4	44.5	25.7	—	—	—	—	—

[a] Abreviations: 16:0 = palmitic acid; 16:1 = palmitoleic acid; 16:2 = hexadecadienoic acid; 18:0 = stearic acid; 18:1 = oleic acid; 18:2 = linoleic acid; 18:3 = linolenic acid; 20:2 = eicosadienoic acid; 20:3 = eicosatrienoic acid; 20:4 ≒ arachidonic acid.
[b] UK = unknown. [c] Normal. [d] Pooled serum. [e] Trace. [f] Hyperlipidemia. [g] Data are means of 3 animals.

結果と考察

血しょうあるいは血清コレステリルエステル中の脂肪酸組成は表1に示したように，リノール酸（18：2）を50%以上含有する動物は，正常ヒト，アカゲザル，ウシ，イヌ，モルモット，マウスであり，約30%以下の含有率である動物は，高脂血症ヒト，ウサギ，ラット，ニホンウズラであった．オレイン酸（18：1）は，ウシ以外のすべての種で12から44%という含有率を示した．

ほかの動物とは異なる脂肪酸組成比を示したものはラットであり，約1/3をアラキドン酸（20：4）が占め，他の多くの動物の0.6～1.6%をいちじるしく上回っている．マウス，イヌにおけるアラキドン酸含有率はそれぞれ，17，11%であり，ラットほどではないがかなり高値を示している．

とり類2種はオレイン酸含有率が高く，ニホンウズラではオレイン酸のほうがリノール酸より高値を示している．また，ニワトリではオレイン酸とリノール酸の割合はおおむね等しい．ほ乳類では，ウサギ，ハムスターでオレイン酸含有率が高い．

ヒトの高脂血症患者の脂肪酸組成は，正常のものにくらべて，パルミチン酸（16：0），ステアリン酸（18：0）が高く，リノール酸が低くなっており，全般的にみて，飽和脂肪酸の増加，不飽和脂肪酸の減少がみとめられる．

ウサギ，モルモット，ニホンウズラではパルミチン酸（16：0）含有率が高い．とくにウサギのパルミチン酸：オレイン酸：リノール酸比はヒトの高脂血症患者の比に酷似している．

サルにおける脂肪酸組成は，ヒトの正常血清の組成とほぼ等しい．

ラット血清コレステリルエステルの脂肪酸組成は，りん脂質，トリグリセリドの脂肪組成とともに，酸化防止剤の投与により変化した[9]．とくにアラキドン酸は対照群の1/2に減少している．また，それらの脂肪酸組成はフタル酸エステルの投与によっても変化することが報告されている[10]．この場合のコレステリルエステルの脂肪酸組成の変化は，リノール酸が減少してオレイン酸が増加する．

表1のごとく高脂血症などヒトの病気に伴う変化と，実験動物における変化がどのように対応するかは明らかではなく，今後の研究課題のひとつである．ある種の化学物質を数種の動物に投与し，その血しょう中の脂肪酸組成の変化と病理学的変化との関連について検討し，毒性学的意義を明らかにしたい．

要　約

血しょうあるいは血清コレステリルエステルの脂肪酸組成を，ヒト，アカゲザル，ウシ，イヌ，ウサギ，モルモット，ラット，ハムスター，マウス，ニワトリ，ニホンウズラについて調べた．リノール酸を50%以上含有する動物は，正常ヒト，サル，ウシ，イヌ，モルモット，マウスであり，約30%以下の含有率である動物は，高脂血症

ヒト，ウサギ，ラット，ニホンウズラであった．ラット，マウス，イヌにおいては，ほかの種にくらべ，アラキドン酸を高い割合で有していた．以上の結果は，血しょうあるいは血清コレステリルエステルの脂肪酸組成には動物種差が存在することを示している．

文　献

1) Branen, A. L.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **52**, 59, 1975
2) Pascal, G.: *Med. Nutr.*, **14**, 37, 1978
3) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Toxicology Lett.*, **8**, 77, 1981
4) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Toxicology*, **22**, 161, 1981
5) Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H.: *J. Biol. Chem.*, **226**, 497, 1957
6) 高橋　省：東京衛研年報，**25**，647，1974
7) McCreary, D. K., Kossa, W. C., Ramachandran, S. and Kurtz, R. R.: *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 329, 1978
8) Myant, N. B.: *The Biology of Cholesterol and Related Steroids*, 505, 1981
9) Takahashi, O. and Hiraga, K.: *Fd Chem Toxicol.*, in press
10) Oishi, S. and Hiraga, K.: *Toxicology Lett.*, **14**, 79, 1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 421-429, 1983

パーソナルコンピュータを用いた毒性試験データ解析システムの開発

三栗谷 久 敏*, 藤 田 博*, 神 谷 信 行*,
中 村 清 純**, 佐々木 美枝子*, 平 賀 興 吾*

A Personal Computer Program for Analysis of Toxicological Study

HISATOSHI MIKURIYA*, HIROSHI FUJITA*, NOBUYUKI KAMIYA*,
KIYOSUMI NAKAMURA**, MIEKO SASAKI* and KOGO HIRAGA*

Keywords: 毒性試験 toxicity test, パーソナルコンピュータ personal computer

緒 言

我々の行っている食品添加物，環境汚染物質などについての毒性試験は，その投与期間から急性，亜慢性および慢性毒性試験に大別される．亜慢性，慢性毒性試験は，数百匹の動物を用い，被験物質は3～8濃度段階（主に飼料添加），期間は3ケ月から3年におよぶものである．このような毒性試験においては，それぞれの動物から全期間にわたる体重測定値，摂餌量，飲水量，死亡あるいは解剖時の各種検査測定値など多量の情報が得られる．これら情報の蓄積，保存，解析を高い信頼性を持ち，迅速に処理するためにはコンピュータが必要不可欠である．

当毒性部においては，1973年に HITACHI HIMECS－001（現システム）を導入し，各種計測機器をオンラインで接続したシステムを開発[1]した．これまでにジブチルヒドロキシトルエン[2,3]，直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム[4,5]，オルトフェニルフェノール[6,7]，オルトフェニルフェノールナトリウム[8]およびチアベンダゾール[9]など多くの毒性試験に活用してきた．しかし現システムは記憶容量が不足していること，プログラムが固定化されていることから一般研究者がプログラムの開発改良を行うことが困難である．データはカセットテープ保存によるため，その入出力に時間を要する．またプログラム開発ができないため，このデータは他の解析に利用できない．これらの問題点を解決し，今後より多様化するであろう毒性試験に対応するため新毒性試験システムの導入が強く望まれる．

コンピュータの発達，普及により，パーソナルコンピュータと呼ばれる機種の高性能化，低価格化が進み，実験研究への利用の道が開かれつつある．これらの機種の中には記憶容量が大きく，データの蓄積，保存能力にすぐれ，プログラム開発が容易なOS（オペレーティングシステム）を採用しているものが多い．そこで当部における現システムの補助として，さらに新毒性試験システム導入に向けてのプログラム開発上のシュミレーションおよび毒性試験におけるパーソナルコンピュータ利用の可能性を検討するために，SEIKO 7500（本システム）を導入し，毒性試験データ解析システムの開発を行った．これまでにいくつかのプログラムが製作でき，一応システムとして稼動するようになったのでここに報告する．なお本システムは改良開発を続行中であるため中間報告とする．

システムの概要

1．使用機器について

本システムにおける機器の構成を図1に示した．SEIKO 7500は本体（CPU），CRTディスプレイ，キーボードおよびミニフロッピーディスク・ドライブが一体となっており，①IPL（Initial Program Loader）キーによりプログラムのロード，実行がワンタッチで行える．②本体に独立したプログラムを複数個記憶でき，プログラム間や既製のサブルーチンとの結合ができる．③外部配列の処理が内部配列と同様にできる，などの機能を有する．仕様は，CPU：JOB i8085A I/O i8085A, ROM：44 KB, RAM：48 KB, 使用言語：SEIKO スーパー BASIC, CRT：12インチグリーン，キーボード：JIS配列5段シフト・キーボードおよびミニフロッピー

* 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
** 同微生物部ウィルス研究科

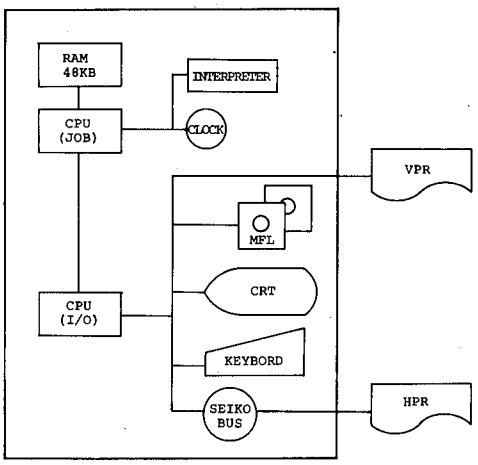


図 1. 機器の構成

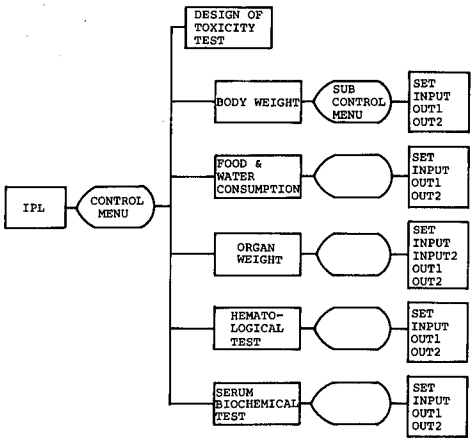


図 2. 毒性試験データ解析システムのプログラム構成

```
*** TOXICICOLOGICAL STUDY ***    83, 6, 15
   1. DESIGN OF TOXICITY TEST
   2. BODY WEIGHT
   3. FOOD & WATER CONSUMPTION
   4. ORGAN WEIGHT
   5. HEMATOLOGICAL TEST
   6. SERUM BIOCHEMICAL TEST

ｼｮﾘ NO.     INPUT                    ( END -- 0 )
```

図 3. CRT 画面の CONTROL MENU

ディスク・ドライブ：両面倍密 2 台（296 KB × 2）から成る．

周辺機器として，演算結果などの報告書作成はグラフィックプリンタ SEIKO 9515(132ケタ, 150字/秒, ドットマトリックス）を用いている．CRT 画面のコピーはビデオプリンタ SEIKO 7545（画面/13.5秒）を用いている．

2．プログラム開発方針

プログラムの開発は以下に述べる点を考慮し行った．

(1)動物に一連の通し番号（Sequential number，以下 SEQ NO とする）を付け，各種データは全て SEQ NO によって管理する．

(2)全てのプログラムは IPL によってロードされるコントロールメニューで管理し，実行にあたっては CRT 画面表示との対話形式とする．

(3)入力は誤入力防止のため原則としてテンキーのみの使用とする．

(4)操作中の誤入力チェックを厳重に行い，再入力をうながす．

(5)欠測値および棄却処理などの操作が容易であること．

(6)各測定・検査データはミニフロッピーディスク（以下 MFD とする）にファイルする．

(7)統計解析は基礎統計量を求め，平均値の差の検定（t −検定）[10] を行う．検定の結果で有意なものは報告書作成の際〔*〕にて表示する．ただし分散比が大きく有意な時は Aspin−Welch の補正[10] を行う．

(8)各測定・検査のデータ，統計量，検定結果をまとめた報告書および統計解析結果のみの総括表（Table）を作成する．

(9)必要に応じて各測定・検査データのグラフ化を行う．

3．プログラムの概要

プログラムの概要を述べるにあたり，はじめに一般的な毒性試験についてその概略を説明する．慢性毒性試験を例にとると，実験動物としては通常ラットやマウスが数百匹程度用いられる．試験開始にあたって動物は，被験物質を与えない対照群と数濃度段階の投与群に割り付けられる．試験開始後は毎週 1 ～ 2 回の体重測定，毎週あるいは定期的な摂餌量，飲水量の測定が 2 ～ 3 年にわたって行われる．試験終了時には動物を解剖し，摘出した心臓，肝臓などの臓器は秤量される．また採取した血液は血液学的，血清生化学的に分析される．このような測定・検査の結果は詳細に検討の上，最終的に病理検査

結果などと合せて毒性について解析が行われる．

本システムはこのような毒性試験の流れにできるだけ沿う構成とした．図2は本システムの概要を示したものである．システム全体はコントロールプログラムによって管理されており，始動の際IPLキーを押すことによりCRT上にメニューが表示される（図3）．これによって必要なプログラムを選択する．以下各プログラムの役割について述べる．

(1)**Design of toxicity test**　毒性試験の全体的なデザインを登録する．また以下の(2)~(6)におけるデータ処理にあたって，SEQ NOの管理を行う．試験期間中の死亡動物あるいは投与に関連なく異常の発生した動物は，入力，演算，出力から除外するようにファイル処理を行う．その場合既測定データは，ファイルにそのまま保存される．

(2)**Body weight**　体重測定データの処理を行う．

(3)**Food and water consumption**　摂餌量，飲水量，薬物摂取量，食餌効率を求め，それらのデータ処理を行う．

(4)**Organ weight**　臓器重量測定データの処理を行う．

(5)**Hematological test**　Coulter Counter Model Sによって分析された血液学的検査データの処理を行う．

(6)**Serum biochemical test**　オートマチックアナライザーHITACHI 705によって分析された血清生化学的検査データの処理を行う．

(2)~(6)の各プログラムは図2に示すように4～5のサブルーチンで構成されている．①**SET**：データ処理に必要な事項を登録し，ファイルの初期化を行う．②**INPUT**：SEQ NO順にデータを入力する．また入力直後のデータの追加・訂正，データをファイルした後の追加・訂正を行う．なお(4)のプログラムではデータをファイルした後の追加・訂正を**INPUT 2**で行う．③**OUT 1**：入力データの統計量計算，t-検定および報告書の作成を行う．④**OUT 2**：統計解析結果のみの総括表を作成する．これらはサブコントロールプログラムでCRT上に表示されるメニューより必要に応じて選択する．

4．出力例

(1)**Design of toxicity test**　SEQ NO，群数，群名を登録することによって，システムにファイルされている乱数表を用い，群分け，ランダム化ブロック配置法によるケージ配列を行う．図4はケージ配列を示し，4ケタの数字はSEQ NOを，太字の数字は群NO.を表わす．

(2)**Body weight**　図5はAbsolute body weight, Relative body weightの報告書作成例を示す．群数は横8群が可能であり，それ以上の場合は二段，三段，……表示になる．群数に制限はない．Relative body weightの基準となる測定回（測定日）は**SET**で登録されており，測定日ごとの入力は不要である．ISは対照群に対する投与群の体重増加・抑制率を表わす．F値横の( )内はAspin–Welch補正したt–検定の自由度を示す．t値の〔*〕は検定の結果が有意であることを表わし，*は5％，**は1％，***は0.1％の危険率を示す．この表示は各プログラムとも共通である．なおt–検定の対照群となる群は任意に指定可能で，他のプログラムでも同様である．

平均体重の推移を表示した総括表の作表例を図6に示す．各測定回（測定日）とも上行は平均値，( )内は例数，下行は標準偏差を表わす．出力させる測定回数は任意に指定できる．

(3)**Food and water consumption**　給餌量，残餌量，こぼし量から摂餌量を，給水量，残水量から飲水量を算出し，さらに摂餌量と投与薬物濃度から薬物摂取量を求める．これらから動物体重1 kg当りの量も求める．摂餌量と体重の増減から食餌効率を求める（図7）．以上の測定は1ケージ1匹飼いを基本としているが，1ケージ数匹飼いの場合にも対応可能である．また被験物質は2種以上可能である．F値下の〔*〕はAspin–Welchの補正を意味する．入力に関しては給餌量，給水量測定日と残餌量，こぼし量，残水量測定日とに分けることが可能である．

図8は総括表の作表例である．出力させる測定項目は任意に選択できる．

(4)**Organ weight**　測定臓器名は**SET**で登録される．**INPUT**ではSEQ NOごとに，登録されている臓器名が全て表示され，それに従ってデータを入力する．報告書は群ごとにAbsolute organ weightおよびRelative organ weightから成っている（図9）．

図10は総括表の作表例である．各臓器とも上段はAbsolute organ weight，下段はRelative organ weightを表わす．

(5)**Hematological test**　Coulter Counter Model Sによって分析された白血球数（WBC），赤血球数（RBC），ヘモグロビン（Hgb），平均赤血球容積（MCV）を入力し，計算によってヘマトクリット（Hct），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）を求める（図11）．

図12は総括表の作表例である．

(6)**Serum biochemical test**　**INPUT**で入力可能測定

```
        1    CONTROL
        2    TEST 1
        3    TEST 2
        4    TEST 3
        5    TEST 4
        6    TEST 5

SIDE    1

 1  2  3  4  5  6  7  8  9  10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------
****  5001  5009  5017  5025  5033  5041  5049  5057  5065  5073  5081  5089  5097  5105  5113  5121  5129  5137  ****
        5     6     3     4     1     3     4     5     6     5     6     1     2     1     4     5     4     3
   ****  5005  5013  5021  5029  5037  5045  5053  5061  5069  5077  5085  5093  5101  5109  5117  5125  5133  5141  ****
           1     4     2     2     5     6     2     3     1     2     3     4     5     6     3     1     6     2
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------
****  5002  5010  5018  5026  5034  5042  5050  5058  5066  5074  5082  5090  5098  5106  5114  5122  5130  5138  ****
        3     5     4     6     5     3     3     2     4     4     6     5     6     3     4     4     6     5
   ****  5006  5014  5022  5030  5038  5046  5054  5062  5070  5078  5086  5094  5102  5110  5118  5126  5134  5142  ****
           6     1     2     2     4     1     5     6     1     3     1     2     1     2     5     2     1     3
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------
****  5003  5011  5019  5027  5035  5043  5051  5059  5067  5075  5083  5091  5099  5107  5115  5123  5131  5139  ****
        2     3     1     5     6     3     5     3     2     5     3     1     2     3     6     6     4     1
   ****  5007  5015  5023  5031  5039  5047  5055  5063  5071  5079  5087  5095  5103  5111  5119  5127  5135  5143  ****
           4     6     5     2     1     4     4     6     1     2     6     4     5     4     1     5     2     3
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------
****  5004  5012  5020  5028  5036  5044  5052  5060  5068  5076  5084  5092  5100  5108  5116  5124  5132  5140  ****
        3     6     4     6     1     3     4     5     1     4     2     5     5     3     6     6     3     4
   ****  5008  5016  5024  5032  5040  5048  5056  5064  5072  5080  5088  5096  5104  5112  5120  5128  5136  5144  ****
           2     1     5     2     5     4     2     3     6     6     1     3     4     2     1     2     1     5
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------
```

図 4. ランダム化ブロック配置法によるケージ配列の出力例

**** ABSOLUTE BODY WEIGHT ****

ｼﾊﾞ ｯｹﾝﾒｲ ---- TEST　　ｾｲﾍﾞﾂ --- MALE　　ﾌｧｲﾙ NO.--- 1
ｿｸﾃｲ ｶｲｽｳ --- 2　　ｿｸﾃｲﾋﾞ --- 83. 6. 6　　ｿｸﾃｲ ｼｬ --- MIKURIYA

NO	SEQ	CONTROL	SEQ	TEST 1	SEQ	TEST 2	SEQ	TEST 3	SEQ	TEST 4	SEQ	TEST 5	SEQ	TEST 6	SEQ	TEST 7
1	7010	136	7013	123	7006	127	7003	122	7001	130	7014	141	7002	135	7007	143
2	7011	130	7016	149	7008	138	7004	129	7022	128	7017	145	7005	133	7012	136
3	7024	137	7018	132	7027	135	7009	132	7023	122	7019	141	7015	119	7021	120
4	7025	139	7031	135	7029	133	7030	119	7032	131	7020	130	7028	125	7026	132
5	7034	133	7037	140	7033	126	7035	124	7044	126	7039	142	7041	137	7054	126
6	7040	131	7042	132	7036	130	7038	115	7046	130	7045	132	7048	131	7055	138
7	7051	129	7043	141	7047	137	7056	133	7049	136	7050	133	7058	123	7061	143
8	7053	140	7052	138	7062	130	7057	114	7059	140	7060	128	7063	125	7064	145
9	7065	131	7073	134	7069	134	7068	113	7067	122	7079	137	7066	127	7074	128
10	7078	130	7076	126	7070	133	7075	121	7072	133	7080	130	7071	125	7077	135
N		10		10		10		10		10		10		10		10
M		133.6		135.0		132.3		122.2		129.8		135.9		128.0		134.6
V		16.81		56.25		16.00		53.29		32.49		36.00		33.64		67.24
SD		4.1		7.5		4.0		7.3		5.7		6.0		5.8		8.2
SE		1.3		2.4		1.3		2.3		1.8		1.9		1.8		2.6
F				3.35		1.05		3.17		1.93		2.14		2.00		4.00
t				0.518		0.718		4.306***		1.711		1.001		2.493*		0.345

**** RELATIVE BODY WEIGHT ****

NO	SEQ	CONTROL	SEQ	TEST 1	SEQ	TEST 2	SEQ	TEST 3	SEQ	TEST 4	SEQ	TEST 5	SEQ	TEST 6	SEQ	TEST 7
1	7010	130	7013	109	7006	122	7003	114	7001	118	7014	131	7002	136	7007	138
2	7011	129	7016	145	7008	138	7004	133	7022	119	7017	128	7005	115	7012	137
3	7024	138	7018	131	7027	125	7009	120	7023	109	7019	129	7015	110	7021	110
4	7025	129	7031	130	7029	122	7030	109	7032	131	7020	133	7028	124	7026	128
5	7034	137	7037	128	7033	113	7035	117	7044	125	7039	131	7041	122	7054	129
6	7040	127	7042	127	7036	127	7038	108	7046	126	7045	120	7048	122	7055	133
7	7051	113	7043	140	7047	129	7056	130	7049	119	7050	125	7058	121	7061	134
8	7053	127	7052	142	7062	120	7057	109	7059	123	7060	127	7063	116	7064	138
9	7065	118	7073	121	7069	125	7068	110	7067	116	7079	132	7066	120	7074	117
10	7078	117	7076	125	7070	132	7075	119	7072	132	7080	129	7071	130	7077	116
N		10		10		10		10		10		10		10		10
M		126.5		129.8		125.3		116.9		121.8		128.5		121.6		128.0
V		67.24		114.49		47.61		77.44		49.00		14.44		54.76		104.04
SD		8.2		10.7		6.9		8.8		7.0		3.8		7.4		10.2
SE		2.6		3.4		2.2		2.8		2.2		1.2		2.3		3.2
F				1.70		1.41		1.15		1.37		4.66*(13)		1.23		1.55
t				0.774		0.354		2.524*		1.379		0.700		1.403		0.362
IS		100.0		102.6		99.1		92.4		96.3		101.6		96.1		101.2

< ｷｼﾞｭﾝﾋ ﾊ 1 ｶｲﾒ ﾃﾞｽ >

図 5. 体重データの出力例

ｸﾞﾝﾒｲ	CONTROL	TEST 1	TEST 2	TEST 3	TEST 4	TEST 5	TEST 6	TEST 7
1	105.9(10)	104.4(10)	105.7(10)	104.7(10)	106.8(10)	105.8(10)	105.5(10)	105.4(10)
83. 5.30	5.8	5.1	3.9	3.8	5.5	4.7	6.1	5.2
2	133.6(10)	135.0(10)	132.3(10)	122.2(10)	129.8(10)	135.9(10)	128.0(10)	134.6(10)
83. 6. 6	4.1	7.5	4.0	7.3***	5.7	6.0	5.8 *	8.2
3	144.6(10)	143.7(10)	141.0(10)	132.3(10)	137.5(10)	145.1(10)	136.5(10)	144.9(10)
83. 6.13	3.7	9.2	4.7	7.8***	8.3 *	6.9	9.8 *	8.1
4	153.8(10)	151.1(10)	142.6(10)	149.9(10)	146.9(10)	149.5(10)	140.6(10)	153.6(10)
83. 6.20	4.0	6.0	8.1**	7.8	9.8	6.2	6.2***	7.4
5	161.7(10)	157.8(10)	152.9(10)	162.5(10)	158.1(10)	156.3(10)	155.0(10)	158.8(10)
83. 6.27	8.1	8.1	8.4 *	6.8	9.6	6.6	6.2	7.4
	MEAN ± SD							

図 6. 体重データ（総括表）の出力例

**** FOOD & WATER CONSUMPTION ****

ｼﾞｯｯｹﾝﾒｲ・・ TEST　　ｾｲﾍﾞﾂ・・ MALE　　ﾌｧｲﾙ NO.・・ 2

ｿｸﾃｲｶｲｽｳ・・ 1　　ｾｯﾄﾋﾞ・・ 83 5 30　　ﾊｽﾞｼﾋﾞ・・ 6 2　　ｿｸﾃｲｼｬ・・ MIKURIYA

ｸﾞﾝ NO. 5　　ｸﾞﾝﾒｲ TEST 4

SEQ	BODY-W(g)	FOOD(g)	FOOD-g/kg	WATR(g)	WATR-g/kg	CHE(mg)	CHEmg/kg	TOTL-D(g)	REMN-D(g)	DROP-D(g)	TOTL-W(g)	REMN-W(g)	END-BW(g)	FOODg/g
1 7001	110	12.5	113.6	16.3	148.5	100.0	909	545.0	507.0	0.2	350.0	301.0	130	22.9
2 7022	108	10.2	94.4	15.3	142.0	81.6	756	540.0	509.0	0.1	354.0	308.0	128	28.0
3 7023	112	11.6	103.9	13.3	119.0	93.1	831	546.0	511.0	0.0	358.0	318.0	122	12.3
4 7032	100	11.4	114.3	16.7	166.7	91.5	915	545.0	510.0	0.2	358.0	308.0	131	38.7
5 7044	101	11.5	113.5	19.3	191.4	91.7	908	545.0	510.0	0.2	359.0	301.0	126	31.1
6 7046	103	11.5	112.0	18.0	174.8	92.3	896	546.0	510.0	0.5	359.0	305.0	130	33.4
7 7049	114	12.6	110.5	18.7	163.7	100.8	884	549.0	510.0	0.4	351.0	295.0	136	24.9
8 7059	114	11.4	100.0	17.7	155.0	91.2	800	541.0	506.0	0.3	354.0	301.0	140	32.6
9 7067	105	11.1	105.7	21.7	206.3	88.8	846	542.0	508.0	0.2	352.0	287.0	122	21.9
10 7072	101	11.8	116.5	17.0	168.3	94.1	932	545.0	509.0	0.2	352.0	301.0	133	38.9
N	10	10	10	10	10	10	10			10			10	10
MEAN	106.8	11.6	108.4	17.4	163.6	92.5	867.7			0.2			129.8	28.5
VAL	30.25	0.49	51.84	5.29	610.09	29.16	3294.76			0.01			32.49	67.24
SD	5.5	0.7	7.2	2.3	24.7	5.4	57.4			0.1			5.7	8.2
SE	1.7	0.2	2.3	0.7	7.8	1.7	18.1			0.0			1.8	2.6
F	1.11	11.76 *	11.20 *	4.00	2.81					25.00 *			1.93	1.05
t	0.356	2.530 *	2.540 *	0.061	0.007					2.481 *			1.711	0.296

図 7. 摂餌量，飲水量および薬物摂取量データの出力例

	ｸﾞﾝﾒｲ	CONTROL	TEST 1	TEST 2	TEST 3	TEST 4	TEST 5	TEST 6	TEST 7
83. 5.30	FOOD	13.6(10)	13.2(10)	12.6(10)	13.4(10)	11.6(10)	12.5(10)	13.9(10)	12.6(10)
		2.4	1.7	1.3	1.9	0.7 *	1.8	2.7	1.5
	FOOD-/KG	128.6(10)	125.9(10)	119.1(10)	127.6(10)	108.4(10)	118.0(10)	132.8(10)	119.5(10)
		24.1	14.3	11.6	18.1	7.2 *	16.0	29.8	17.2
	WATER	17.3(10)	16.5(10)	18.2(10)	18.8(10)	17.4(10)	16.3(10)	17.3(10)	17.4(10)
		4.6	1.8	7.1	3.5	2.3	2.5	5.2	3.5
	WATER-/KG	163.5(10)	158.4(10)	173.5(10)	179.4(10)	163.6(10)	154.7(10)	166.1(10)	166.1(10)
		41.4	18.7	69.6	31.7	24.7	23.9	56.9	35.8
	CHEMICAL	0.0(10)	13.2(10)	25.2(10)	53.4(10)	92.5(10)	199.7(10)	445.9(10)	802.8(10)
			1.7	2.5	7.5	5.4	28.3	86.7	95.1
	CHEM-/KG	0.0(10)	125.9(10)	238.2(10)	510.6(10)	867.7(10)	1887.5(10)	4248.9(10)	7645.3(10)
			14.3	23.2	72.5	57.4	255.7	951.9	1101.9
	DROP	0.6(10)	0.5(10)	0.4(10)	0.5(10)	0.2(10)	0.9(10)	0.7(10)	0.5(10)
		0.5	0.6	0.4	0.5	0.1 *	1.0	0.7	0.5
	FD EFFECT	29.6(10)	34.2(10)	30.7(10)	18.5(10)	28.5(10)	35.0(10)	23.1(10)	34.1(10)
		8.4	12.8	9.2	8.2**	8.2	6.6	6.1	13.9

図 8. 摂餌量，飲水量および薬物摂取量データ（総括表）の出力例

GROUP NO. 2 DOSE TEST 1 MALE < ABSOLUTE WEIGHT > TEST 10 - MAY - 1983

.. P 1 ..

	SEQ	B.W. g	BRAIN mg	HEART mg	LUNG mg	LIVER g	SPLEEN mg	KIDNY-R mg	KIDNY-L mg	ADRNL-R mg	ADRNL-L mg	TESTS-R mg	TESTS-L mg	BLADDER mg	PROSTAT mg
1	7013	340	2130	1035	1013	10.50	708	1345	1418	18.4	22.4	1453	1578	202	248
2	7016	381	2139	990	1064	12.95	607	1184	1239	20.4	24.9	1832	1554	254	298
3	7018	357	2086	1066	994	11.05	749	1332	1303	17.2	20.4	1394	1455	421	352
4	7031	358	2115	916	1003	10.56	650	1145	1196	26.1	35.2	1353	1371	352	262
5	7037	389	2184	1027	1052	13.52	598	1319	1329	22.4	25.2	1608	1679	217	329
6	7042	321	2034	888	911	11.98	590	1232	1291	21.4	21.6	1474	1509	264	306
7	7043	398	2126	955	1057	13.21	646	1297	1284	17.8	19.9	1705	1773	366	237
8	7052	418	2165	1058	1109	15.59	659	1392	1390	21.4	23.0	1675	1641	205	233
9	7073	382	2131	995	1055	13.11	625	1321	1349	21.4	22.8	1564	1634	244	304
10	7076	365	2112	930	1013	10.91	635	1210	1187	22.2	23.9	1462	1463	307	330
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	MEAN	370.9	2122	986	1027	12.34	647	1278	1299	20.9	23.9	1552	1566	283	290
	SD	28.6	41	62	54	1.64	50	80	77	2.6	4.3	152	120	75	42
	F	1.67	1.37	1.37	1.32	4.25 *	15.52 *	1.23	1.40	1.61	2.05	3.20	2.51	39.06 *	1.10
	t	2.931 **	0.939	2.404 *	3.077 **	1.616	1.618	1.910	1.167	0.376	0.362	0.636	0.084	6.037 ***	0.260

GROUP NO. 2 DOSE TEST 1 MALE < RELATIVE WEIGHT > TEST 10 - MAY - 1983

.. P 1 ..

	SEQ	B.W.	BRAIN	HEART	LUNG	LIVER	SPLEEN	KIDNY-R	KIDNY-L	ADRNL-R	ADRNL-L	TESTS-R	TESTS-L	BLADDER	PROSTAT
1	7013	340	626	304	298	3.09	208	396	417	5.4	6.6	427	464	59	73
2	7016	381	561	260	279	3.40	159	311	325	5.4	6.5	481	408	67	78
3	7018	357	584	299	278	3.10	210	373	365	4.8	5.7	390	408	118	99
4	7031	358	591	256	280	2.95	182	320	334	7.3	9.8	378	383	98	73
5	7037	389	561	264	270	3.48	154	339	342	5.8	6.5	413	432	56	85
6	7042	321	634	277	284	3.73	184	384	402	6.7	6.7	459	470	82	95
7	7043	398	534	240	266	3.32	162	326	323	4.5	5.0	428	445	92	60
8	7052	418	518	253	265	3.73	158	333	333	5.1	5.5	401	393	49	56
9	7073	382	558	260	276	3.43	164	346	353	5.6	6.0	409	428	64	80
10	7076	365	579	255	278	2.99	174	332	325	6.1	6.5	401	401	84	90
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	MEAN	370.9	575	267	277	3.32	176	346	352	5.7	6.5	419	423	77	79
	SD	28.6	37	21	10	0.28	20	29	33	0.9	1.3	31	30	22	14
	F	1.67	2.38	5.44 *	2.04	9.88 *	4.41 *	4.98 *	3.77	1.65	3.45	5.69 *	2.15	30.25 *	1.36
	t	2.931 **	3.800 **	1.107	0.777	0.719	0.612	4.437 ***	3.493 **	1.109	1.499	2.446 *	2.019	6.081 ***	1.372

図 9. 臓器重量データの出力例

	CONTROL	TEST 1	TEST 2	TEST 3	TEST 4	TEST 5	TEST 6	TEST 7
B.W.	404.4 (10)	370.9 (10)	393.4 (10)	346.5 (10)	325.4 (9)	340.0 (7)	408.2 (10)	381.3 (9)
g	22.1	28.6 **	26.6	23.6 ***	46.6 ***	23.5 ***	23.8	29.3
BRAIN	2106 (10)	2122 (10)	2103 (10)	2098 (10)	2100 (9)	2111 (7)	2106 (10)	2120 (9)
mg	35	41	56	33	50	45	35	43
	522	575	536	608	660	623	518	559
	24	37 **	26	39 ***	119 **	40 ***	28	38 *
HEART	1048 (10)	986 (10)	1021 (10)	966 (10)	994 (9)	968 (7)	1036 (10)	975 (9)
mg	53	62 *	70	87 *	64	68 *	65	56 **
	259	267	260	279	316	285	254	256
	9	21	12	13 ***	85	12 ***	9	10
LUNG	1107 (10)	1027 (10)	1055 (10)	1137 (10)	1088 (9)	1131 (7)	1127 (10)	1041 (9)
mg	62	54 **	58	59	55	83	44	61 *
	274	277	269	329	341	333	277	274
	7	10	13	25 ***	55 **	22 ***	10	7
LIVER	14.26 (10)	12.34 (10)	12.87 (10)	13.97 (10)	12.04 (9)	13.13 (7)	13.62 (10)	12.86 (9)
g	3.38	1.64	0.77	1.16	2.92	1.27	1.26	1.59
	3.53	3.32	3.28	4.04	3.64	3.87	3.33	3.37
	0.88	0.28	0.17	0.24	0.56	0.36	0.17	0.29
SPLEEN	751 (10)	647 (10)	661 (10)	540 (10)	528 (9)	606 (7)	699 (10)	639 (9)
mg	197	50	62	104 **	64 **	66	67	38
	185	176	168	156	166	178	171	168
	42	20	12	29	36	10	11	12
KIDNY-R	1211 (9)	1278 (10)	1274 (10)	1259 (10)	1238 (9)	1185 (7)	1239 (10)	1298 (9)
mg	72	80	69	66	95	77	93	86 *
	301	346	324	365	387	349	303	341
	13	29 ***	12 ***	32 ***	51 ***	13 ***	12	19 ***
KIDNY-L	1255 (10)	1299 (10)	1264 (10)	1270 (10)	1230 (9)	1215 (7)	1259 (10)	1303 (9)
mg	91	77	76	103	80	99	94	75
	311	352	322	367	384	358	308	343
	17	33 **	13	27 ***	53 **	18 ***	14	24 **

図10. 臓器重量データ（総括表）の出力例

*** HEMATOLOGICAL TEST (BLOOD CELL COUNT) ***

ｼﾞｯｹﾝﾒｲ ---- TEST　　ｾｲﾍﾞﾂ --- MALE　　ﾌｧｲﾙ NO.--- 5

ｿｸﾃｲﾋﾞ --- 83. 6. 1　　ｿｸﾃｲ ｼｬ --- MIKURIYA

ｸﾞﾝNO.---- 3　　ｸﾞﾝﾒｲ ---- TEST 2

NO	SEQ	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC
1	7006	9.1	6.54	14.2	34.7	53	21.7	41.0
2	7008	6.3	8.42	18.2	38.7	46	21.6	47.0
3	7027	3.2	5.69	14.3	27.9	49	25.1	51.3
4	7029	2.3	4.36	10.5	24.2	53	23.0	43.4
5	7033	32.1	1.62	7.3	9.4	58	45.1	77.7
6	7036	6.4	7.65	18.6	37.5	49	24.3	49.6
7	7047	5.9	6.10	13.9	31.7	52	22.8	43.8
8	7062	6.1	4.25	11.3	22.1	52	26.6	51.1
9	7069	4.3	5.01	12.6	25.6	51	25.1	49.3
10	7070	7.2	5.26	12.9	26.3	50	24.5	49.0
	N	10	10	10	10	10	10	10
	M	8.3	5.51	13.4	27.8	51.3	26.0	50.3
	V	73.96	3.6100	11.56	73.96	10.24	47.61	104.04
	SD	8.6	1.90	3.4	8.6	3.2	6.9	10.2
	SE	2.7	0.60	1.1	2.7	1.0	2.2	3.2
	F	10.94*(11)	1.19	1.47	1.39	1.31	8.27*(11)	6.19*(12)
	t	0.986	1.964	1.795	2.131*	0.744	1.342	1.410

図11. 血液学的検査データの出力例

ｸﾞﾝﾒｲ ﾋｷｽｳ	CONTROL (10)	TEST 1 (10)	TEST 2 (10)	TEST 3 (10)	TEST 4 (10)	TEST 5 (10)	TEST 6 (10)	TEST 7 (10)
WBC	5.5	6.1	8.3	6.3	6.6	6.9	7.6	4.9
	2.6	1.6	8.6	2.9	3.5	1.7	3.3	1.4
RBC	7.11	6.57	5.51	7.20	6.85	6.33	6.80	7.27
	1.74	0.80	1.90	1.83	1.68	1.21	2.72	1.51
HGB	15.9	16.1	13.4	16.0	15.1	16.0	15.7	16.8
	2.8	1.8	3.4	3.4	3.3	2.0	4.2	2.0
HCT	35.4	33.0	27.8	35.6	32.0	31.6	33.6	35.7
	7.3	3.0	8.6*	7.9	9.9	5.6	12.7	6.9
MCV	50.3	50.5	51.3	49.9	47.2	50.0	50.4	49.2
	2.8	2.0	3.2	2.3	10.7	1.6	3.1	1.7
MCH	22.9	24.6	26.0	22.5	22.6	25.6	25.6	23.7
	2.4	2.0	6.9	2.1	2.9	2.5*	7.6	3.3
MCHC	45.4	48.7	50.3	45.2	44.7	51.2	50.3	48.1
	4.1	3.7	10.2	3.9	5.6	4.9*	11.2	6.7
	MEAN ± SD							

図12. 血液学的検査データ（総括表）の出力例

*** SERUM BIOCHEMICAL TEST ***

ｼﾞｯｹﾝﾒｲ ---- TEST　　ｾｲﾍﾞﾂ --- MALE　　ﾌｧｲﾙ NO.--- 6

ｿｸﾃｲﾋﾞ --- 83. 6.15　　ｿｸﾃｲ ｼｬ --- MIKURIYA

ｸﾞﾝNO.---- 4　　ｸﾞﾝﾒｲ ---- TEST 3

NO	SEQ	GOT	GPT	ALP	GLU	CHE	UN	TP	ALB	NA	K
1	7003	137	75	14	163	41.8	13.0	9.6	5.0	149	7.8
2	7004	127	90	17	148	42.5	18.0	7.0	4.2	149	6.7
3	7009	113	79	20	160	49.5	22.0	8.1	7.5	145	7.7
4	7030	135	47	25	145	36.2	10.0	10.0	3.2	154	11.0
5	7035	152	67	30	130	48.2	18.0	9.5	2.1	154	6.5
6	7038	125	65	29	175	43.1	13.0	15.2	5.6	142	6.5
7	7056	142	82	26	178	42.2	22.0	11.2	3.9	153	6.6
8	7057	145	58	46	173	38.2	26.0	7.7	4.1	157	7.1
9	7068	119	66	19	170	38.9	28.0	8.4	4.4	152	6.1
10	7075	153	92	39	161	37.2	17.0	6.9	1.5	142	6.4
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	M	134.8	72.1	26.5	160.3	41.78	18.70	9.36	4.15	149.7	7.24
	V	184.96	201.64	100.00	234.09	19.6249	33.6400	6.1009	2.9241	28.09	2.0449
	SD	13.6	14.2	10.0	15.3	4.43	5.80	2.47	1.71	5.3	1.43
	SE	4.3	4.5	3.2	4.8	1.40	1.80	0.78	0.54	1.7	0.45
	F	1.62	1.24	6.25*12	1.19	1.44	1.59	3.25	8.69*11	1.28	8.52*11
	t	2.673*	0.908	0.499	2.485*	1.448	0.171	0.907	2.995*	0.316	0.502

図13. 血清生化学的検査データの出力例

ｸﾞﾙｰﾌﾟﾒｲ	CONTROL	TEST 1	TEST 2	TEST 3	TEST 4	TEST 5	TEST 6	TEST 7
GOT	116.2 (10) 17.3	116.7 (10) 17.0	136.7 (10) 24.9	134.8 (10) 13.6*	119.3 (10) 16.0	116.2 (10) 14.6	116.9 (10) 25.1	115.6 (10) 14.8
GPT	66.0 (10) 15.8	71.4 (10) 13.5	66.3 (10) 15.8	72.1 (10) 14.2	62.9 (10) 13.9	69.4 (10) 13.6	63.3 (10) 17.0	60.8 (10) 15.8
ALP	28.2 (10) 4.0	29.6 (10) 4.2	27.1 (10) 4.6	26.5 (10) 10.0	26.8 (10) 6.1	29.0 (10) 6.0	34.9 (10) 10.6	30.9 (10) 5.3
GLU	142.5 (10) 16.7	150.2 (10) 18.0	149.6 (10) 17.4	160.3 (10) 15.3*	154.0 (10) 18.5	153.7 (10) 24.9	144.7 (10) 16.3	152.0 (10) 14.8
CHE	44.95(10) 5.32	45.71(10) 4.10	43.99(10) 4.99	41.78(10) 4.43	44.48(10) 5.70	47.22(10) 6.73	45.06(10) 6.46	44.54(10) 6.07
UN	19.1 (10) 4.6	22.2 (10) 3.7	21.1 (10) 4.6	18.7 (10) 5.8	21.0 (10) 3.1	22.1 (10) 5.0	23.7 (10) 3.8*	18.8 (10) 5.0
TP	8.55(10) 1.37	8.96(10) 1.60	9.78(10) 1.25	9.36(10) 2.47	9.69(10) 1.21	8.23(10) 1.45	8.92(10) 1.40	9.02(10) 1.56
ALB	5.86(10) 0.58	5.66(10) 0.70	5.53(10) 0.68	4.15(10) 1.71*	5.62(10) 0.60	5.66(10) 0.77	4.32(10) 1.87*	5.45(10) 0.69
NA	150.5 (10) 6.0	150.7 (10) 5.2	147.5 (10) 4.6	149.7 (10) 5.3	152.2 (10) 4.6	151.3 (10) 5.3	147.7 (10) 6.2	146.6 (10) 5.3
K	7.00(10) 0.49	6.91(10) 0.80	7.07(10) 0.73	7.24(10) 1.43	6.96(10) 0.74	6.72(10) 0.73	6.83(10) 0.86	6.82(10) 0.67

図14. 血清生化学的検査データ（総括表）の出力例

項目（28項目）のリストが表示され，その中から入力すべき項目を選択する．入力時にはSEQ NOごとに，選択された項目が表示され，それに従って各項目のデータを入力する．報告書は図13，14（総括表）に示す．

開発システムの効果と問題点

パーソナルコンピュータを用いて毒性試験データ解析システムの開発を行った結果，いくつかの効果と問題点が明らかとなった．

①パーソナルコンピュータ用ソフトウエアで多用されている対話形式を採用した．これはシステム利用者がコンピュータに対する深い知識を必要とせずに利用することを可能にした．特に本システムでは，入力時に入力データの正誤をプログラム上でチェックし，誤入力の時には再入力をうながす作業を極力付加することによってプログラムのエラーストップをさけるようにした．

②MFDによるデータの蓄積・保存は，データの入出力時間を現システムのテープに比べてかなり短縮した．特にSEIKO 7500に設置されたMFDドライブは，本体記憶の内部配列同様に外部配列を作り使用できるという大きな特長を有する．このためプログラム開発を非常に容易にし，データの再利用も簡単にできる．

③プログラム言語はBASICを用いた．これは比較的簡便な言語でパーソナルコンピュータ用OSとして広く採用されており，一般研究者によるプログラム開発を可能にした．また，BASICインタプリタは一方で計算スピードが比較的遅いという欠点を有するが，他方プログラムの改良が容易であるという利点でもある．従って本システムで規定した毒性試験の形式にそわない新しい試みの試験に対しても必要に応じた改変が可能である．

④データ入力はキーボードから行う．毒性試験においてはデータ数が非常に多いことから誤入力が起る可能性がある．本システムでの対応としては入力中，入力後および出力後の3段階でデータ訂正が可能である．また入力直後に入力データの出力を行い，データの照合を義務づけることにより誤りをなくすようマニュアルで決められている．将来的には計測機器とパーソナルコンピュータの接続を検討する必要がある．

⑤パーソナルコンピュータのMFD中のデータは，そのままでは機種間で互換性がないと言われている．従って本システムで蓄積したデータは他機種での利用ができない可能性が高い．このことは今後の大きな問題点として残されており，互換性のあるフロッピーディスク（8インチ，IBM型）の採用を検討しなくてはならない．

新毒性試験システムの展望

今後の新毒性試験システム導入へ向けての基本的方針として，研究者がプログラム開発可能であることを前提に使用言語はBASICかFORTRANが良いと思われる．ただし互換性が高いこと，演算速度の点からインプリタではなくコンパイラが望ましい．外部記憶装置としては利用の簡便さ，入出力速度，保管の点からフロッピーディスクが妥当であると思われる．ただし，他機種とのデータの互換性を考慮する必要があろう．またキーボードからのデータ入力は誤入力の原因となり易いことから考えて，計測機器とのオンライン化が望ましい．以上の点を満たす新毒性試験システムとしては，現システムのような完全集中オンラインシステムではなく，パーソナ

ルコンピュータの利点を生かしたものが考えられる．すなわち計測機器とパーソナルコンピュータを接続し，データをフロッピーディスク（あるいはモデムカプラ）を媒体として中央処理装置に移し処理するようなシステムが有効であると考えられる．

またソフトウェアの面からは，単に毒性試験データの処理のみならず，動物の飼育管理，飼育器具・器材の管理などにも対処できるようなシステムにすべきであろう．

結　語

パーソナルコンピュータを用いて毒性試験データ解析システムの開発を行った．このシステムは動物のSEQ NO登録，ケージ配列の決定，体重，摂餌量，飲水量などの測定データ処理および解剖時の臓器重量，血液学的検査，血清生化学的検査データの処理を行うものである．パーソナルコンピュータ導入の結果は，一般研究者によるプログラムの開発を可能とし，対話形式の採用により操作も容易にした．またMFDの使用はデータの蓄積・保存，再利用に有効であった．キーボードからのデータ入力において，起り易い誤入力に対応した処置の必要が認められた．

文　献

1) 中川好男，福田向江，市川久次：東京衛研年報，25，517，1974
2) 市川久次，小林博義，中川好男：東京衛研年報，26-2，1，1975
3) 市川久次，小林博義，中川好男：東京衛研年報，28-2，1，1977
4) 米山允子，馬渕依子，伊川三枝子：東京衛研年報，27-2，105，1976
5) 米山允子，益淵正典，大石真之：東京衛研年報，28-2，73，1977
6) 中村清純，井口重孝，池田虎雄：東京衛研年報，32-2，33，1981
7) 中村清純，池田虎雄，井口重孝：東京衛研年報，33，434，1982
8) 井口重孝，田山邦昭，平賀興吾：東京衛研年報，30-2，67，1979
9) 三栗谷久敏，林田志信，高橋　博：東京衛研年報，30-2，5，1980
10) Snedecor, G. W. and Cochran, W. G.：統計的方法，第6版，87，1972，岩波書店

他 誌 発 表

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1982. 7—1983. 6)

原 著 論 文

Chemically defined medium for high yields of sterigmatocystin

H. Hitokoto, S. Morozumi, T. Wauke, S. Sakai and S. Yoshikawa : Mycopathologia, 78, 99, 1982

食品の真菌汚染をめぐる諸問題

一言 広：マイコトキシン，16, 8, 1982

Serological comparison of two collections of Vibrio cholerae non 01

Don J. Brenney, Betty R. Davis, Yasuo Kudoh, Makoto Ohashi, Riichi Sakazaki, Toshio Shimada, and Harry L. Smith, Jr. : J. Clin. Microbiol, 16, 319, 1982

Effect of Highly Purified Coagulase and Culture Filtrate on Virulence and Immunity of a Coagulase—Negative Mutant of Staphylococcus aureus BB

Noriko Hasegawa, Isumu Kondo, Sadayori Hoshina, Kosei Kurosaka and Hideo Igarashi : Infect Immun, 39 (3), 1236, 1983

ブドウ球菌の増殖とエンテロトキシン産生に及ぼす水分活性の影響

五十嵐英夫，新垣正夫：メディヤサークル，27 (6), 343, 1982

ステリグマトシスチン高産生用合成培地 SSP (sucrose salt phenylalanine) 培地

一言 広，諸角 聖，和宇慶朝昭：メディヤサークル，27 (11), 582, 1982

スタフィロコアグラーゼによるヒトプロトロンビンの活性化機作

森田隆司，川畑俊一郎，五十嵐英夫，岩永貞昭：臨床病理（臨時増刊）特集第50号，127, 1982

毒素性ショック症候群（Toxin—Shock Syndrome）と黄色ブドウ球菌

五十嵐英夫：モダンメディア，29 (5), 262, 1983

グラム陽性球菌の鑑別，同定法

潮田 弘：都臨技会誌，11 (2), 20, 1983

Toxicity of Several Phosphoric Acid Esters in Rats

Hisae Oishi, Shinshi Oishi and Kogo Hiraga : Toxicol. Lett., 13, 29, 1982

Tissue Distribution and Elimination of Chlorinated Naphthalenes in Mice

Hisae Oishi and Shinshi Oishi : Toxicol. Lett., 15, 119, 1983

Chronological Relationship between Neurological Signs and Electrophysiological Changes in Rats with Methylmercury Poisoning—Special Reference to Selenium Protection

Tomoyo Miyama, Keiko Minowa, Hironobu Seki, Yukihiro Tamura, Isao Mizoguchi, Gen Ohi and Tsuguyoshi Suzuki : Arch Toxicol., 52, 173, 1983

Longitudinal Study on Schistosoma japonicum Infection in the Philippines 3. Incidence and Environmental Modification at Dagami, Leyte

Hiroshi Tanaka, Bayani L. Blas, Julian S. Noseñas, Hajime Matsuda, Masamichi Ishige, Haruo Kamiya, Iwao Murata, Yoshihiro Hayasi and Alfredo T. Santos, Jr. : Japa. J. Exp. Med., 53 (2), 87, 1983

大学病院排水からのウイルス分離

原 稔，小松俊彦，長谷川斐子，岩崎謙二，長橋 捷，藤田俊一，大井 玄，白須賀公平，内田清二郎：臨床とウイルス，10 (4), 323, 1982

高速液体クロマトグラフィーによる羊毛繊維中の防虫加工剤 4,6-Dichloro-7-(2,4,5-trichlorophenoxy)-2-trifluoromethylbenzimidazole (DTTB) の定量法

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，28 (3), 155, 1982

めっき廃水中のシアンの微量拡散ーイオン電極法によるスクリーニング

秋山和幸，長嶋真知子，奥本千代美，寺島 潔，萩原輝彦：分析化学，31, 402, 1982

Distribution of Unsaturated Aliphatic Acid Amides in Japanese *Zanthoxylum* Species

Ichiro Yasuda, Koichi Takeya and Hideji Itokawa : Phytochemistry, 21 (6), 1295, 1982

辛味成分および精油成分による本邦市場の中国産山椒の品質評価

安田一郎, 竹谷孝一, 糸川秀治：生薬学雑誌, 36 (4), 301, 1982

第十改正日本薬局方収載製剤「複方サリチル酸メチル精」の定性，定量について

原田裕文，風間成孔，寺島　潔，高橋利恵子：医薬品研究，14 (3)，411，1983

第十改正日本薬局方収載製剤「複方ビタミンB散」の定量法

原田裕文，重岡捨身：医薬品研究，14 (3)，433，1983

各種の水における発熱性物質の分布

正木宏幸，宇佐美博幸，徳丸雅一，岩崎久夫：日本獣医師会誌，36 (6)，325，1983

Isolation and serotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* in human in Japan

Misao Tsubokura, Koichi Otsuki, Yoshihiro Kawaoka and Tsutomu Maruyama : Euro. J. Clin. Microbiol. 1 (6), 396, 1982

The role of virulence antigens (VW) in the protection of mice against *Yersinia pestis* infection

Akira Wake, Tsutomu Maruyama, Kazunori Akiyama and Makoto Yamamoto : Curr. Microbiol. 8 (1), 73, 1983

Synthetic Musk Residues in Biota and Water from Tama River and Tokyo Bay (Japan)

Tatsunori Yamagishi, Tomoyuki Miyazaki, Shozo Horii and Kazuyuki Akiyama : *Arch. Environ, Contam. Toxicol.* 12, 83, 1983

Residues of the Synergist S—421 in Human Milk Collected from the Tokyo Metropolitan Area

Tomoyuki Miyazaki : *Bull. Environ, Contam. Toxicol.* 29, 566, 1982

高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中の副腎皮質ホルモンの定量法

鎌田国広，観　照雄，吉原武俊，原田裕文：衛生化学，28 (6)，341，1982

アナログ変換による定周波パルス型電子捕獲検出器の応答の直線化と昇温分析への応用

竹内正博：分析化学，31 (9)，T70，1982

塩化メチル水銀・亜セレン酸ナトリウム同時投与のマウス免疫応答におよぼす影響

林　　修，二島太一郎，千葉百子，菊池正一，関　比呂伸：日衛誌，37 (5)，804，1982

抗条虫剤としての硫酸 Paromomycin の作用機序に関する基礎的研究

影井　昇，林　滋生，加藤桂子，梅木富士郎：The Japanese Journal of Antibiotics. 36 (3)，573，1983

パン製造工程中の臭素酸カリウムの挙動

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，永山美智子，直井家壽太：食品衛生学雑誌，23 (6)，451，1982

Annealing Effect on Migration of Acrylonitrile Monomer from Styrene—Acrylonitrile Copolymer

Hirohisa Yoshida, Reiko Yoshida and Yasuji Kobayashi : 繊維学会誌，38 (11)，T－457，1982

Polychlorinated Terphenyls (PCT) の蓄積および代謝（第1報）

マウスにおける脂肪組織および肝臓中残留 PCT のベンゼン骨格異性体比

牛尾房雄，大石真之，船山恵市，道口正雄：衛生化学，28 (6)，325，1982

Reaction of Malonaldehyde with Nucleic Acid. 1. Formation of Fluorescent Pyrimido [*1,2a*] purin—10 *(3H)*—one Nucleosides

H. Seto, T. Okuda, T. Takesue and T. Ikemura : Bull. Chem. Soc. Jpn., 56, 1799, 1983

Mechanism of Chlorine Catalytic Oxidation of CO in the Gas phase

T. Ohta : Bull. Chem. Soc. Jpn., 56, 869, 1983

Rate Constants for the Reactions of Diolefins with OH Radicals in the Gas phase. Estimate of the Rate Constants from Those for Monoolefins

T. Ohta : J. Phys. Chem., 83, 1209, 1983

Separation of Azaarenes by Polyamide Thin—Layer Chromatography and The Relationship between their Basicity and RF Values

Yutaka Okamoto, Yoshiteru Tsuchiya, Ryota Shinohara and Ryūzo Takeshita : J. Chromato, 254, 35, 1983

Determination of Trace Azaarenes in Water by Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry

Ryota Shinohara, Azuma Kido, Yutaka Okamoto and Ryuzo Takeshita : J. Chromato, 256, 81, 1983

Distribution and Elimination of Di—2—Ethylhexyl Phthalate (DEHP) and Mono—2—Ethylhexyl Phthalate (MEHP) After a Single Oral Administration of DEHP in Rats

Shinshi Oishi and Kogo Hiraga : Arch. Toxicol., 51, 149—155, 1982

Effects of Monoesters of o—Phthalic Acid on Serum Lipid Composition of Rats

Shinshi Oishi and Kogo Hiraga : Toxicol. Lett., 14, 79—84, 1982

Alteration of Carcium Transport by Tumor Promoters, 12—o—Tetradecanoyl Phorbol—13—Acetate and p, p′—Dichlorodiphenyltrichloroethane, in The Chinese Hamster V79 Cell Line

B. V. Madhukar, M. Yoneyama, F. Matsumura, J.E. Trosko and G. Tsushimoto : Cancer Letters, 18, 251—259, 1983

On the Mechanism of Covalent Binding of Butylated Hydroxytoluene to Microsomal Protein

Yoshio Nakagawa, Kogo Hiraga and Tetsuya Suga : Biochem. Pharmacol., 32 (8), 1417, 1983

Vitamin K Content of Liver and Feces from Vitamin K—Deficient and Butylated Hydroxytoluene (BHT)—Treated Male Rats

H. Suzuki, T. Nakao and K. Hiraga : Toxicol. Appl. Pharmacol., 67, 152—155, 1983

Monomeric and Trimeric Structures of Active Na^+, K^+—ATPase in $C_{12}E_8$ Solution

Toshiko Nakao, Tomoko Ohno, Makoto Nakao, Goichi Maeki, Sachiko Tsukita and Harunori Ishikawa : Biochem. Biophys. Res. Commun. 113, 361—367, 1983

Isoosmotic Sucrose, Adenine, Inosine media for Preservation of Blood

M. Nakao, T. Nakao, Y. Komatsu, K. Sano and S. Sasakawa : Biomed. Biochim. Acta 42, 527—535, 1983

「かに風かまぼこ」中の天然色素の検出

平田恵子，荻原　勉，天川映子，大西和夫：食品衛生学雑誌，24 (1)，1，1983

食品添加物の1日摂取量調査に関する研究

大西和夫，松本昌雄，荻原　勉，天川映子，田口信夫，大石充男，平田恵子，野沢竹志，榎田隆一：厚生省食品添加物摂取量調査研究班，1983（分担研究）

酵素法による生あん中のシアン配糖体（シアン化水素として）の分析法及び実態調査

有賀孝成，冠　政光，中里光男，藤沼賢司，西島基弘，直井家壽太：食品衛生学雑誌，24 (3)，289，1983

総説・解説

同定の簡易化の現状と問題点—腸内細菌—**Comparison of API 20E, Minitek Ⅱ, Micro ID, Enterotube Ⅱ, ID test EB 20, Biotest No. 1 and Pile Tube No. 1 for Identification of Enterobacteriaceae**

伊藤　武：モダンメディア，28 (11)，32，1982

薬剤師のための衛生微生物学 (11)—最近話題になっている食中毒—

伊藤　武：薬局，34 (5)，641，1983

薬剤師のための衛生微生物学，７．病原大腸菌感染症
工藤泰雄：薬局，34（２）211，1983

新たに認識された食中毒原因菌の検査法
伊藤　武，斎藤香彦，柳川義勢：臨床検査，27(６)，602，1983

カンピロバクター食中毒とその予防
伊藤　武：食品衛生，316，55，1983

パップ剤の有効性と安全性
風間成孔：日本病院薬剤師会雑誌，19（４），31，1983

薬剤師のための衛生微生物学（５），人畜共通伝染病各論
丸山　務：薬局，33（11），1421，1982

イヌ，ネコの咬・掻傷に起因するヒトのパスツレラ症
丸山　務，景森令克：日獣会誌，35（11），621，1982

国際食品微生物規格委員会（ICMSF）とBryan（CDC）らの危険度数値分類の考え方――Bryan博士の考え方
小久保彌太郎：メディヤサークル，28（２），79，1983

食品添加物について語る
遠藤英美：食品化学，73，1983

汚染指標菌と安全指標菌
加納堯子：洗濯の科学，27（４），14，1982

著　　書

人畜共通伝染病
村上　一，勝部泰次，影井　昇，丸山　務 編集：近代出版，東京，1982

看護学大辞典　第二版
丸山　務（分担執筆）：メディカルフレンド社，東京，1982

生活関連化学物質の安全性評価（GRAS REVIEW（Ⅰ））
遠藤英美，広門雅子，安野哲子，中嶋　巌，中島和雄，荻野周三，溝入　茂 他翻訳：化学工業日報社，1982

有毒プランクトン
渡辺真利代，大石真之：恒星社厚生閣，1982

食品の衛生微生物検査
坂井千三 他：講談社，1983

学 会 発 表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1982. 7—1983. 6)

伊藤　武，斎藤香彦，高橋正樹，坂井千三：**Campylobacter jejuni の食品中における発育態度　1）生肉中における本菌の生存**
第3回食品衛生微生物研究会（1982.11）

高橋正樹，伊藤　武，斎藤香彦，甲斐明美，稲葉美佐子，柳川義勢，高野伊知郎，坂井千三，條原　楷，田村延一，加藤喜市，土屋伸久，木下正彦，中嶋　誠，高取三郎，田崎達明：**うずら卵を原因食品としたサルモネラ食中毒およびうずら卵における本菌の汚染状況**
第3回食品衛生微生物研究会（1982.11）

潮田　弘，五十嵐英夫，新垣正夫，藤川　浩，池島伸至，坂井千三：**各種市販乾燥・粉末食品の細菌学的検討**
第3回食品衛生微生物研究会（1982.11）

五十嵐英夫：**容量制御方式による分取用クロマトグラフィーの自動化の試み**
第3回液体クロマトグラフィー討論会（1982.10）

五十嵐英夫，藤川　浩，新垣正夫，潮田　弘，坂井千三：**毒素性ショック症候群（Toxic—Shock Syndrome）患者由来黄色ブドウ球菌の産生する毒素（Enterotoxin F）の精製について**
第27回ブドウ球菌研究会（1982.11）

五十嵐英夫，藤川　浩，宇佐美博幸，新垣正夫，潮田弘，秋山和幸，坂井千三：**毒素性ショック症候群（Toxic—Shock Syndrome）患者由来ブドウ球菌の産生する毒素（Enterotoxin F）の諸性状について**
第27回ブドウ球菌研究会（1982.11）

Masaaki Tsuno, Kenji Ohta, Shigeru Matsushita, Sumio Yamada, Yasuo Kudoh, Senzo Sakai, Makoto Ohashi, D. Bhanthunkosol and R. Pan-Urai : **Etiological Survey on Diseaseas in a Rural Area in Thailand, Chanthaburi**
The 18th Joint Conference US-Japan Cooperative Medical Science Program Cholera Panel (1982.11)

Shigeru Matsushita, Kenji Ohta, Sumio Yamada, Masaaki Tsuno, Yasuo Kudoh, Senzo Sakai and Makoto Ohashi : **Antibiotic Resistance of Vibrio cholerae Recently Isolated from Human Sources in Japan and Other Countries**
The 18th Joint Conference US-Japan Cooperative Medical Science Program Cholera Panel (1982.11)

Yasuo Kudoh, Shigeru Matsushita, Sumio Yamada, Kenji Ohta, Masaaki Tsuno, Senzo Sakai and Makoto Ohashi : **Simplification of Methodology for Detecting Escherichia coli Entero toxins**
The 18th Joint Conference US-Japan Cooperative Medical Science Program Cholera Panel (1982.11)

竹重都子，向島　雄，露崎国夫，山口武一，宇仁田久文，吉田義夫，伊藤　武，斎藤香彦，足立卓治，渡辺賢哉：**家畜における Campylobacter jejuni の保菌状況とその分離株の性状に関する研究　2．家畜の盲腸内容物および枝肉からの本菌の分離成績**
第95回日本獣医学会（1983. 4）

福山正文，上村知雄，斎藤香彦，高橋正樹，高野伊知郎，伊藤　武，村田元秀，光崎研一，伊藤宗徳，原　元宣，清水武彦，田淵　清，渡部　孝：**Thermophilic campylobacter の生態学的研究　4．野鳥における本菌の分布**
第95回日本獣医学会（1983. 4）

工藤泰雄：**コレラ類似菌による下痢症**
第95回日本獣医学会（1983. 4.）

伊藤　武，斎藤香彦，柳川義勢，稲葉美佐子，甲斐明美，高橋正樹，高野伊知郎，坂井千三，大橋　誠：**東京都内で発生した15事例の Campylobacter jejuni による集団下痢症の疫学的，細菌学的特徴について**
第57回日本感染症学会総会（1983. 4）

高橋正樹，伊藤　武，斎藤香彦，高野伊知郎，甲斐明美，柳川義勢，稲葉美佐子，坂井千三，大橋　誠：**ヒト，家畜，家禽，ペットおよび野鳥由来の Thermophilic campylobacter の生化学的諸性状ならびに薬剤感受性について**
第57回日本感染症学会総会（1983. 4）

斎藤香彦，伊藤　武，高橋正樹，柳川義勢，坂井千三，大橋　誠：**Campylobacter jejuni の血清学的研究—特に Lauwers, Penner, Lior, Rogol, Kosunen および**

Jones の各血清型と著者らの血液との関連
第57回日本感染症学会総会（1983. 4）

河島尚志，小西佐知子，松延正之，露木和光，武隈孝治，神田　誠，佐藤徳枝，牛尾正孝，本多輝男，金　兌貞，大角勝彦，野田周一，坂井千三，伊藤　武，斎藤香彦：**Campylobacter jejuni の臨床分離株の MIC 近似値と血液型**
第57回日本感染症学会総会（1983. 4）

稲葉美佐子，伊藤　武，斎藤香彦，甲斐明美，柳川義勢，高橋正樹，高野伊知郎，坂井千三：**過去7年間に東京都内で発生した B. cereus による嘔吐型食中毒の疫学的，細菌学的検討**
第57回日本感染症学会総会（1983. 4）

津野正朗，太田建爾，松下　秀，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検索成績について**
第57回日本感染症学会総会（1983. 4）

松下　秀，工藤泰雄，坂井千三，大橋　誠：**毒素原性大腸菌の簡易検出法とその本菌下痢症診断への応用**
第56回日本細菌学会総会（1983. 4）

伊藤輝代，横田　健，松下　秀，太田建爾，大橋　誠：**コレラ菌の毒素産生と cAMP**
第56回日本細菌学会総会（1983. 4）

五十嵐英夫，藤川　浩，新垣正夫，潮田　弘，坂井千三，川畑俊一郎，森田隆司：**Toxin Shock Syndrome 患者由来黄色ブドウ球菌の産生する毒素（エンテロトキシン F）の精製およびその性状**
第56回日本細菌学会総会（1983. 4）

五十嵐英夫，藤川　浩，新垣正夫，潮田　弘，坂井千三：**ブドウ球菌，エンテロトキシン A～F 産生菌の分布および正常人における各型エンテロトキシンの抗体**
第56回日本細菌学会総会（1983. 4）

五十嵐英夫，宇佐美博幸，藤川　浩，新垣正夫，潮田　弘，秋山和幸，坂井千三：**“ブドウ球菌エンテロトキシン F”のウサギに対する発熱活性および LPS 致死活性の増強作用**
第56回日本細菌学会総会（1983. 4）

伊藤　武，斎藤香彦，高橋正樹，坂井千三：**Thermophilic campylobacter の発育態度および各種環境条件下における生存について**
第56回日本細菌学会総会（1983. 4）

柳川義勢，伊藤　武，稲葉美佐子，斎藤香彦，高橋正樹，甲斐明美，坂井千三，大橋　誠，中村明子，山本　実，鈴木健之：**Thermophilic campylobacter の病原性に関する研究　2）各種由来菌株の培養細胞に対する感染性**
第56回日本細菌学会総会（1983. 4）

山田澄夫，津野正朗，太田建爾，松下　秀，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**
第57回日本感染症学会総会（1983. 4）

松下　秀，山田澄夫，太田建爾，津野正朗，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に分離された主要病原菌の薬剤感受性について**
第57回日本感染症学会総会（1983. 4）

工藤泰雄：**輸入感染性腸炎の実態とその疫学について**
第70回東京都衛生局学会（1983. 5）

新垣正夫，五十嵐英夫，潮田　弘，藤川　浩：**スライドラテックス凝集反応による黄色ブドウ球菌の同定とその応用**
第45回日本食品衛生学会（1983. 5）

五十嵐英夫，新垣正夫，潮田　弘，藤川　浩：**Staphylococcus intermedius および Staphylococcus hyicus subsp. hyicus のエンテロトキシン産生性とコアグラーゼ型について**
第45回日本食品衛生学会（1983. 5）

伊藤　武，斎藤香彦，高橋正樹，坂井千三：**食品中における Thermophilic campylobacter の生存および発育態度について**
第45回日本食品衛生学会（1983. 5）

稲葉美佐子，伊藤　武，坂井千三：**各種食肉および魚肉中における腸炎起病性ウェルシュ菌の発育およびエンテロトキシン産生性**
第45回日本食品衛生学会（1983. 5）

和宇慶朝昭，諸角　聖，一言　広：**本邦食品の糸状菌汚染に関する研究，つけ物について**
第45回日本食品衛生学会（1983. 5）

高野伊知郎，伊藤　武，斎藤香彦，柳川義勢，高橋正樹，稲葉美佐子，甲斐明美，坂井千三，大橋　誠，当真隆則，杉本　清，佐久一枝，野村勝美，山本宣和，正司　房，深見トシエ，鴻巣晶子，山崎　清：**ヒト下痢症から検出された Campylobacter jejuni および Campylobacter coli の血清型別について**
第70回東京都衛生局学会（1983. 5）

柏木義勝，近藤治美，大久保暢夫，寺山　武：**1980～1981年分離の 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）

村田以和夫，松田　肇，田中　寛，Bayani L. Blas：**酵素抗体法（ELISA）による日本住血吸虫症の治療効果判定，特に Praziquantel 投与患者より得られたペア血清・血漿の ELISA 抗体価の推移**
第52回日本寄生虫学会大会（1983. 4）

仲川千種，蓑輪佳子，関　比呂伸，鈴木重任，大石真之，井村伸正，仁科甫啓，大井　玄：**家兎のカドミウム暴露による貧血について**
第41回日本公衆衛生学会総会（1982.10）

山本俊一，小林之誠，鈴木重任，武長脩行，深山智代，甲斐一郎，中川正宣，小山玉野，大井　玄：**老人ボケ生成に及ぼす主体的環境的因子の影響（1）杉並区調査と東京都調査**
第41回日本公衆衛生学会総会（1982.10）

山本俊一，小林之誠，鈴木重任，武長脩行，深山智代，甲斐一郎，中川正宣，小山玉野，大井　玄：**老人ボケ生成に及ぼす主体的環境的因子の影響（2）知力低下と異常精神症状発現**
第41回日本公衆衛生学会総会（1982.10）

坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎　清，岩崎謙二：**1981年秋～1982年春における東京都内のインフルエンザ流行**
第30回日本ウイルス学会総会（1982.11）

林　志直，矢野一好，柴田タツ美，薮内　清，岩崎謙二，山口　剛：**東京都内における結膜炎患者からのウイルス検索**
第57回日本感染症学会総会（1983. 4）

矢野一好，林　志直，柴田タツ美，薮内　清，岩崎謙二：**都市下水からのウイルス検索**
第3回麻布環境科学研究会（1983. 6）

林　志直，矢野一好，柴田タツ美，薮内　清，岩崎謙二：**還境水からのウイルス回収実験**
第3回麻布環境科学研究会（1983. 6）

瀬戸隆子，岩崎由美子，安田一郎，浜野朋子，秋山和幸：**市販桃核承気湯製剤中のセンサノイド A の含量について**
第11回生薬分析討論会（1982. 8）

原田裕文，安田一郎，瀬戸隆子，浜野朋子，秋山和幸：**漢方処方製剤中のグリチルリチン酸含有量**
第19回全国衛生化学技術協議会（1982. 9）

安田一郎，秋山和幸，竹谷孝一，糸川秀治：**不飽和脂肪酸アミドの辛味活性について**
日本生薬学会第29年会（1982. 9）

宇佐美博幸，秋山和幸：**発熱性物質（パイロジェン）試験の進歩と応用について**
日本薬剤師会第15回学術大会（1982. 9）

宇佐美博幸，秋山和幸，正木宏幸：**注射剤中の発熱性物質（エンドトキシン）の微量測定　SCS—HPLC 法について**
第41回日本公衆衛生学会総会（1982.10）

樫本　隆，河村太郎，中川友夫，原田裕文，松下秀鶴：**ベンゾ〔α〕ピレン**
日本薬学会第103年会（1983. 4）

原田裕文，木嶋敬二，岩倉良平，沢村邦夫，西島　靖，

能崎章輔，平松　功，広田　博，藤山喜雄：**香粧品試験法—1**
日本薬学会第103年会（1983. 4）

原田裕文，木嶋敬二，岩倉良平，沢村邦夫，西島　靖，能崎章輔，平松　功，広田　博，藤山喜雄：**香粧品試験法—2**
日本薬学会第103年会（1983. 4）

寺島　潔，高橋利恵子，安田一郎，風間成孔：**医薬品製剤の試験法に関する研究　局方製剤中の微量カプサイシノイドの定量**
日本薬学会第103年会（1983. 4）

宇佐美博幸，秋山和幸：**発熱性物質（エンドトキシン）の加熱処理，MW照射および超音波照射による消長**
日本薬学会第103年会（1983. 4）

奥本千代美，長嶋真知子，溝入　茂，風間成孔，秋山和幸：**めっき廃水中シアン化合物のフローインジェクション分析**
日本薬学会第103年会（1983. 4）

重岡捨身，宮武ノリエ，上原真一，萩原輝彦，秋山和幸，原田裕文：**ヒドロコルチゾン・ジフェンヒドラミン軟膏の定量法**
第70回東京都衛生局学会（1983. 5）

竹内正博：**アナログ変換した定周波パルス型ECDの応答特性について**
第31回日本分析化学会（1982. 9）

水石和子，竹内正博，吉原武俊：**哺乳用乳首からのN—ニトロソアミンの生成について**
第69回東京都衛生局学会（1982.11）

山野辺秀夫，江波戸挙秀，竹内正博，吉原武俊，原田裕文：**毛髪中の元素濃度におよぼす処理剤の影響について**
第19回全国衛生化学技術協議会（1982. 9）

観　照雄，伊藤弘一，中村義昭，鎌田国広，吉原武俊，原田裕文：**ガスクロマトグラフ法による化粧品中の高級アルコール，エステル類およびスクワランの同定**
日本薬学会第103年会（1983. 4）

丸山　務，神崎政子，宇佐見俊彦，水谷浩志：***Pasteurella multocida*のための選択分離培地について**
第94回日本獣医学会（1982.10）

水谷浩志，丸山　務，神崎政子，坂井千三，伊藤　武：**東京都内のイヌにおける*Campylobacter jejuni*の保菌実態**
第69回東京都衛生局学会（1982.11）

丸山　務：**行政的に新たに指定された食中毒菌，エルシニア・エンテロコリティカ**
第3回食品衛生微生物研究会（1982.11）

高橋敏雄，山口武一，鈴木輝康，丸山　務，神崎政子：**豚の関節及びリンパ節病変部からの豚丹毒菌の分離と血清型別**
第95回日本獣医学会（1983. 4）

高橋敏雄，丸山　務，神崎政子，山口武一，鈴木輝康：**豚の関節及びリンパ節病変部由来豚丹毒菌の病原性**
第95回日本獣医学会（1983. 4）

宇佐見俊彦，丸山　務，神崎政子，松本昌雄：**人畜共通伝染病の疫学に関する研究(2)，イヌにおける*Pasteurella multocida*の保菌実態と分離菌株の生物性状について**
第95回日本獣医学会（1983. 4）

小久保彌太郎：**新しい食品衛生微生物規格基準の進路を求めて——Bryan博士の考え方**
第3回食品衛生微生物研究会（1982.11）

宮崎奉之，山岸達典，松本昌雄：**Technical chlordane成分と生物中に残留するChlordane成分との相関について**
第45回日本食品衛生学会（1983. 5）

二島太一郎，藤谷和正，野牛　弘，森本敬三，羽里幸彦：**各種元素のヒト胎盤透過性について**
第41回日本公衆衛生学会（1982.10）

堀井昭三，宮崎奉之，山岸達典，鈴木輝康：**異臭牛肉**

中の原因物質の同定
第44回日本食品衛生学会（1982.11）

白坂昭治，寺西　永，辨野義己，梅木富士郎，東　量三：ニワトリおよびウシの臨床材料から分離された**Clostridium septicum**の性状
第94回日本獣医学会（1982.10）

白坂昭治，梅木富士郎：ニワトリおよびウシの臨床材料から分離された**Clostridium septicum**の薬剤感受性
第10回家畜の耐生菌研究会（1983. 4）

安田和男，西島基弘，斉藤和夫，上村　尚，井部明広，永山敏廣，牛山博文，直井家壽太：いわゆる健康食品の衛生学的調査　茶葉類について
第19回全国衛生化学技術協議会（1982. 9）

安田和男，西島基弘，上村　尚，牛山博文，田端節子，松本幸子，斉藤和夫，井部明広，永山敏廣，直井家壽太：いわゆる健康食品の衛生学的調査（第3報）　茶葉類及び高麗人参製品
第45回日本食品衛生学会（1983. 5）

牛山博文，西島基弘，安田和男，上村　尚，田端節子，松本幸子，直井家壽太：食品中の銅クロロフィル及び銅クロロフィリンナトリウム分析法
第45回日本食品衛生学会（1983. 5）

上村　尚，西島基弘，安田和男，牛山博文，田端節子，松本幸子，直井家壽太：食品中のマイコトキシンに関する研究（第28報）　**Popcorn**の**Deoxynivalenol**自然汚染例
第45回日本食品衛生学会（1983. 5）

中里光男，斉藤和夫，菊地洋子，井部明広，藤沼賢司，西島基弘，直井家壽太，諸角　聖，和宇慶朝昭，一言広：食品中のマイコトキシンに関する研究（第29報）各種糸状菌による**Aflatoxin** B_1から**Aflatoxicol**への変換について
第45回日本食品衛生学会（1983. 5）

関　博麿，大西和夫，道口正雄：グリシンおよび乳糖がラットのカルシウムおよびリン出納におよぼす影響　その1
第37回日本栄養・食糧学会総会（1983. 5）

船山恵市，牛尾房雄，西田甲子，関　博麿，道口正雄，坂上正人：市販即席めん類の栄養学的考察
第70回東京都衛生局学会（1983. 5）

佐藤泰仁：空調ダクト内堆積粉じんの性状
第41回日本公衆衛生学会（1982.10）

関　比呂伸，田村行弘，蓑輪佳子，鈴木重任，溝口　勲，大井　玄：メチル水銀毒性に対するイルカ，鯨肉由来セレンの効果，A）亜急性毒性実験　B）世代実験
第41回日本公衆衛生学会（1982.10）

牧野国義，溝口　勲：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
第41回日本公衆衛生学会（1982.10）

牧野国義，溝口　勲：東京の呼吸器系死因死亡と大気汚染の20年間の推移
第23回大気汚染学会（1982.11）

鈴木孝人，大沢誠喜，福田雅夫，池田真悟，寺田伸枝，溝口　勲：NO_2とO_3によるムコ多糖代謝に及ぼす影響
第23回大気汚染学会（1982.11）

寺田伸枝，鈴木孝人，大沢誠喜，福田雅夫，池田真悟，溝口　勲：低濃度NO_2とO_3の複合曝露によるラットの肺の病理形態学的変化
第23回大気汚染学会（1982.11）

寺田伸枝，鈴木孝人，大沢誠喜，福田雅夫，池田真悟，溝口　勲：NO_2とO_3及び野外曝露によるラットの肺の病理形態学的変化
第23回大気汚染学会（1982.11）

太田与洋，溝口　勲：ジオレフィンと**OH**ラジカルの反応速度定数とそれの加成性（その1）
第23回大気汚染学会（1982.11）

太田与洋，溝口　勲：ジオレフィンと**OH**ラジカルの反応速度定数とそれの加成性（その2）
第23回大気汚染学会（1982.11）

多田宇宏，太田与洋，狩野文雄：トルエンの NO_2 による光酸化反応に与える捕集粒子の影響
第23回大気汚染学会（1982. 11）

太田与洋，溝口　勲：**OH** と共役二重結合化合物との反応
日本化学会第47春季年会（1983. 4）

高橋保雄，斉藤庄次，笹野英雄，西垣　進，三村秀一，森田昌敏：**CCE** 法より観察した水道水中の中性有機ハロゲン化合物（低沸点化合物を除く）
第41回日本公衆衛生学会（1982. 10）

松本淳彦，土屋悦輝：藻類とトリハロメタン（Ⅱ）
第19回日本水処理生物学会（1982. 11）

渡辺真利代，大石眞之：藍藻 ***Microcystis aeruginosa*** の毒―培養条件下での毒性―
昭和58年度日本水産学会春季大会（1983. 4）

平野幸枝，渡辺真利代，大石眞之，西垣　進：藍藻 ***Microcystis aerginosa*** からの凝集素
昭和58年度日本水産学会春季大会（1983. 4）

中川敦子，中尾順子：二種の異なる界面活性剤によるアデニレートシクラーゼの可溶化とその性質
第55回日本生化学会大会（1982. 10）

大石眞之，平賀興吾：ジー２－エチルヘキシルフタレートのラット血清，肝および精巣脂質組成におよぼす影響
第56回日本薬理学会総会（1983. 3）

高橋　省，平賀興吾：ジブチルヒドロキシトルエンとその関連化合物の代謝
第56回日本薬理学会総会（1983. 3）

中尾順子，大野知子，佐藤かな子，中尾　真：低角レーザー光散乱計と **G4000SW** による Na^+，K^+－ATPase の分子量
第55回日本生化学会大会（1982. 10）

牛山慶子，藤谷和正，長井二三子，樺島順一郎，市川久次，中尾順子：**OPP** 投与による肝薬物代謝系の誘導
第55回日本生化学会大会（1982. 10）

加納いつ，鈴木明身，山川民夫：マウス肝の **GM3** に作用するモノオキシゲナーゼ
第55回日本生化学会大会（1982. 10）

坂本義光，神谷信行，平賀興吾：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９回日本毒科学会学術年会（1982. 7）

藤井　孝，平賀興吾：オルトフェニルフェノール（**OPP**）によるラット膀胱腫瘍の発生について
第41回日本癌学会総会（1982. 8）

佐々木美枝子，吉田誠二，平賀興吾：アセトアミノフェンの変異原増強作用について――紫外線の変異原性におよぼす効果
第11回日本環境変異原学会（1982. 10）

田山邦昭，藤井　孝，平賀興吾：**F344/DuCrj** と **S1c : Wistar** ラットとの比較
第３回 Fischer ラット研究会（1983. 5）

坂井千三：最近の細菌性食中毒の動向と問題点
第57年度日本獣医公衆衛生学会総会（特別講演）（1983. 1）

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
鈴　木　重　任
薮　内　　清
秋　山　和　幸
吉　原　武　俊
松　本　昌　雄
山　岸　達　典
道　口　正　雄
西　垣　　進

昭和58年12月1日　発行

規格表　第2類
印刷番号（58）538
刊行物番号（H）24

東京都立衛生研究所研究年報第34号

編集
発行　：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)