P13le

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

35

1984

長崎県
衛生公害研究所
60. 1. 14
受付

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

序

昭和24年第二次世界大戦の敗戦後の国内動乱の中で，都道府県に地方衛生研究所（以下地研）が設置されて，今年で35年を経過いたしました．各地研は，民主国家日本国の各地方の衛生行政に，科学的裏付け資料を提供し続けてきたのでありますが，現在では政令指定都市の設立した衛生研究所を合わせて，69地研が存在しております．

この69地研は，地方衛生研究所全国協議会（以下地全協）を結成し，地研間の業務連絡，調整にあたっておりますが，調査研究についても，情報交換を行っており，毎年各地研の研究課題を一冊の冊子として発行しております．この冊子を見ますと各地研の研究が旺盛であることがうかがい知れます．

これら地研は，それぞれ研究報告を年報として発行しておりますが，それを見ますと，医科大学と同じような個人研究がないわけではありませんが，その多くは，多数の人達の共同研究が主体をなしており，各地方の衛生行政の裏付けとなるデーターが多数記載されております．多数の研究者の協力と合意によって報告されたものであり，この点大学の研究報告との大きな相違点でありましょう．

また，69地研の研究報告には，共通の課題が多数見受けられます．それぞれ独立に実施されたものもあれば，追試の型でなされたものもあり，共同研究の一端をそれぞれ報告しているものもあります．

地全協は，研究報告にあたってのデーターの精度管理を全国的に実施して，各地研間のデーターの相違を極力狭め，精度の向上，技術の向上に努めております．これが完全に実施され，全国の地研の報告を集約すれば，国内衛生情況を的確にとらえることが出来ます．

地研設置より35年の間に，国内の疾病構造は極端に変化してきました．戦後に続発した伝染病，結核も，けた違いに減少しました．しかし，皆無になったわけではありません．

環境汚染による公害病の発生，食品薬品を介しての変異原性，催奇性，発癌性の問題など取り組むべき試験検査，調査研究が山積みになっております．そこで，地全協は，相互協力し合って，人手の足りないところを補い合い，かつ広い範囲の守備を分担しあうことを計画中であります．

その一端が，レファレンス業務でありますが，相互に各地研の特徴を生かして，欠点を補いあい，科学的専門的水準の維持向上に努めております．例えばウイルスについては，各地研が分担して，分担ウイルスの診断用血清を作成し，他の地研に配布するなど，現実に実施されて，非常に成果を挙げております．

地研は，相互互助，協力しあって，また国立公衆衛生院，国立予防衛生研究所，国立衛生試験所，国立栄養研究所とも連係を密にして，国外から持ち込まれる古い伝染病，新しい伝染病を防ぐとともに，現在，未来の予想される疾病や，不健康要因の発生を未然に防ぐよう努力すべきでありましょう．

この度，当研究所の過去一年間の調査研究の集大成として77編の論文を発行する運びとなりました．忌憚のない御指摘，御指導を頂ければ幸いと存じます．

昭和59年度の研究年報の発刊にあたり，日頃考えている地研連合の所信を述べ，序にかえる次第であります．

昭和59年12月

東京都立衛生研究所長　野　牛　　弘

目　　次

報文 I　感染症等に関する調査研究

コレラ菌ファージに関する研究
　カッパ型ファージおよびその他のファージ検出法の基礎的検討
……潮田　弘，五十嵐英夫，新垣　正夫，藤川　浩，寺山　武，大橋　誠…… 1

Campylobacter jejuni と *Campylobacter coli* の各種生化学的性状ならびに菌体脂肪酸組成の検討
……伊藤　武，甲斐　明美，高橋　正樹，斎藤　香彦，高野伊知郎，柳川　義勢，大橋　誠…… 8

土壌における *Clostridium perfringens* の分布と分離菌株の血清型およびエンテロトキシン
　産生性について
……稲葉美佐子，伊藤　武…… 18

パーソナルコンピュータを用いた海外旅行者下痢症の細菌検査成績処理システムの開発
……津野　正朗，工藤　泰雄，大橋　誠…… 22

センキュウ成分中の抗真菌物質について
……諸角　聖，和字慶朝昭，一言　広…… 31

スライド・ラテックス凝集反応による黄色ブドウ球菌の簡易同定
……新垣　正夫，五十嵐英夫，潮田　弘，藤川　浩，寺山　武…… 38

酵素抗体法（ELISA）による日本住血吸虫症の治療効果判定の試み（第3報）
　特に Praziquantel 投与患者から得られた血清・血漿の ELISA 抗体価の推移について
……村田以和夫，松田　肇，田中　寛，BAYANI L.BLAS…… 43

1981 年から 1983 年までの 3 年間における売春容疑者のリン菌保菌率と分離菌株の薬剤感受性
……石上　武，堀　幹郎，鈴木　重任，大橋　誠，丸山　脩，林田　陽一，斎藤　リツ…… 49

都内における腸管系ウイルスのサーベイ
　下水および患者検体からのウイルス分離成績（1983 年）
……林　志直，矢野　一好，藪内　清，渡辺　悌吉，石原　祐，大久保さつき，印鑰　史衛…… 55

伊豆七島におけるツツガ虫病の研究
　式根島を中心とした実態調査
……伊藤　忠彦，中村　清純，山崎　清，坂井冨士子，藪内　清，大橋　誠…… 61

東京都内のインフルエンザ検索成績
　（1983 年 9 月～1984 年 2 月）
……坂井冨士子，伊藤　忠彦，山崎　清，中村　清純，藪内　清…… 69

1983 年東京都における日本脳炎の疫学調査
……吉田　靖子，関根　整治，藪内　清，中嶋　誠，鈴木　輝康，秋山　陽，畑野　逸與…… 73

急性発疹性疾患患児からのウイルス検索（1979～1983）
……吉田　靖子，関根　整治，藪内　清…… 82

急性胃腸炎患児ふん便からの Rotavirus の検出（3）
……関根　整治，矢野　一好，藪内　清，渡辺　悌吉，石原　祐，大久保さつき，印鑰　史衛…… 89

神経芽細胞腫のマス・スクリーニングに関する検討（第1報）
尿中バニリルマンデル酸スポットテスト法の検討
……武士俣邦雄…… 92

神経芽細胞腫のマス・スクリーニングに関する検討（第2報）
尿中バニリルマンデル酸スポットテスト検査成績の解析
……武士俣邦雄，鈴木　重任…… 101

電子顕微鏡写真への表面現像法の応用
……前木　吾市…… 106

報文II　医薬品等に関する調査研究

イオン対高速液体クロマトグラフィーによる医薬品製剤中のベルベリンの定量
……安田　一郎，浜野　朋子，瀬戸　隆子，秋山　和幸…… 113

非ピリン系かぜ薬の定量法（第3報）
抗ヒスタミン剤
……中山　京子，高橋美佐子，岩崎由美子，秋山　和幸…… 120

ゴム製哺乳用具からの第2級アミンの溶出とN-ニトロソアミンの生成について
……水石　和子，竹内　正博，風間　成孔…… 127

家庭用品の衛生化学的研究（第11報）
高速液体クロマトグラフィーによる衣料用衛生加工剤イルガサンDP—300および
チアベンダゾール(TBZ)の定量法
……雨宮　　敬，酒井　正美，森　謙一郎，鈴木　助治，風間　成孔…… 133

家庭用品の衛生化学的研究（第12報）
ガスクロマトグラフィーによる長鎖アルキル第4級アンモニウム塩の分析法について
……鈴木　助治，酒井　正美，森　　謙一郎，雨宮　　敬，風間　成孔…… 138

高速液体クロマトグラフィーによる塩基性色素の分析
……伊藤　弘一，観　　照雄，中村　義昭，岸本　清子，風間　成孔…… 146

市販化粧石けん中のタール色素の調査報告
……中村　義昭，観　　照雄，伊藤　弘一，風間　成孔…… 152

高速液体クロマトグラフィーによる清浄綿中の塩化ベンザルコニウム定量法
……植田　忠彦，風間　成孔…… 159

報文III　食品等に関する調査研究

1981～1983年に築地中央市場へ入荷した輸入ドジョウおよび日本産淡水・汽水魚介類の寄生虫
検索成績
……村田以和夫，宮沢　貞雄，伊藤　勝男，松崎　　修，名雪　雅義…… 163

東京都におけるPCB汚染の実態について（第12報）
食品中のPCB含有量調査
……岸本　清子，竹内　正博，風間　成孔…… 175

東京都におけるPCB汚染の実態について（第13報）
東京湾産スズキおよびアサリ中の残留PCBのモニタリング
……竹内　正博，水石　和子，岸本　清子，風間　成孔…… 179

東京都における水銀汚染の実態について（第11報）
魚介類中の水銀含有量調査
……山野辺秀夫，竹内　正博，風間　成孔……184

高速液体クロマトグラフィーによる蜂密中の残留テトラサイクリン系抗生物質の簡易分析法
……竹葉　和江，神崎　政子，村上　文子，松本　昌雄……187

市販はちみつの芽胞菌汚染の実態
……小久保彌太郎，神保　勝彦，金子　誠二，松本　昌雄……192

鶏肉からの *Campylobacter jejuni* ／ *coli* の選択増菌培地について
……神保　勝彦，金子　誠二，小久保彌太郎，松本　昌雄……197

畜水産食品中の残留サルファ剤の簡易検査法の検討
……神崎　政子，竹葉　和江，村上　文子，丸山　　務，松本　昌雄……202

鶏肉中の残留クロピドールの実態調査
……堀井　昭三，山岸　達典，松本　昌雄……207

野菜，果実及びコーヒー豆中の残留農薬調査
……永山　敏廣，観　　公子，田村　行弘，真木　俊夫，二島太一郎……210

食品中の油溶性天然色素分析法
……牛山　博文，西島　基弘，安田　和男，上村　　尚，田端　節子，松本　幸子，二島太一郎……219

ガスクロマトグラフィーによる果汁飲料中のペニシリン酸およびパツリンの分析法
……小川　仁志，鈴木　二郎，落合　節子，西島　基弘，直井家壽太，二島太一郎……224

市販茶におけるグルタミン酸ナトリウム添加の実態調査
……広門　雅子，中島　和雄，高橋　　巌，植松　洋子，遠藤　英美……231

セラミック製食器から溶出する金属
……吉田　令子，渡辺　悠二，佐藤　憲一　遠藤　英美……235

日本の伝統的高蛋白食品中のリジノアラニン
……菊谷　典久，井口　正雄，友松　俊夫，道口　正雄……241

老人ホームおよび乳児院の食事の脂肪酸組成
……井口　正雄，菊谷　典久，友松　俊夫，道口　正雄，二見　大介，
米川　郁毅，鶴見田鶴子，鎌田　敏夫，窪田　英夫……245

高速液体クロマトグラフィーによる食肉中のニコチン酸及びニコチン酸アミドの分析
……大石　充男，大西　和夫，中村　　弘，坂井　千三……252

食品の製造工程における細菌汚染の検討
洋生菓子について
……神　真知子，池島　伸至，新井　輝義，入倉　善久，坂井　千三……256

報文IV　生活環境に関する調査研究

NO_2とO_3の長期複合暴露によるラットの肺の病理組織学的変化
……寺田　伸枝，池田　真悟，福田　雅夫，遠藤　圭子，大澤　誠喜，鈴木　孝人，溝口　　勲……265

肺中の Angiotensin Converting Enzyme 活性に及ぼすNO_2暴露の影響
……鈴木　孝人，寺田　伸枝，池田　真悟，大澤　誠喜，遠藤　圭子，溝口　　勲……279

ラットにおけるメトヘモグロビン形成とその還元機構に及ぼす NO_2 暴露の影響
……遠藤　圭子，鈴木　孝人，池田　真悟，溝口　　勲……289

東京都における降下煤塵量の推移
1969年から1983年まで
……大澤　誠喜，池田　真悟，福田　雅夫，牧野　国義，
関　比呂伸，太田　與洋，鈴木　孝人，溝口　　勲……296

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（第2報）
……牧野　国義，溝口　　勲……302

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
……関　比呂伸，田村　行弘，葭輪　佳子，加納　堯子……309

東京湾の環境汚染モニタリング調査（第2報）
昭和57年度スズキおよびカモメ類の調査結果について
……瀬戸　　博，加納　堯子……316

酸素存在下での1,3-ブタジエンとOHの反応
……太田　與洋，溝口　　勲……321

空調ダクト内堆積粉塵の性状について（第2報）
……佐藤　泰仁……324

特別養護老人ホームにおける疥癬症の集団発生例
……吉川　　翠，大野　正彦，斉藤　みどり，石井　孝夫，岡本　繁雄，今川　良昭，古川　　誠……329

有機リン系殺虫剤テメホス処理後のセスジユスリカ幼虫個体群の減少傾向
神田川における5年間の調査結果
……大野　正彦，清水　憲一……335

小笠原簡易水道のトリハロメタン低減化対策のための基礎的実験
……笹野　英雄，西垣　　進……339

東京都内の工場周辺井戸水の重金属汚染調査（第2報）
……平野　幸枝，高橋　保雄，土屋　悦輝，西垣　　進……346

飲料用タンク水から検出された細菌（*Pseudomonas*）の性状
……古畑　勝則，松本　淳彦……352

多摩地区地下水中の塩素系有機溶剤に関する調査
……矢口久美子，大橋　則雄，渡辺　　学，関山　　登，中村　　弘，坂井　千三……363

多摩川底質中の多環芳香族炭化水素調査
……有賀　孝成，押田　裕子，栃本　　博，中村　　弘，坂井　千三……371

平井川の水質汚濁の時間的変動と生活排水の関係
……栃本　　博，押田　裕子，有賀　孝成，池島　伸至，中村　　弘，坂井　千三……378

報文V　毒性に関する調査研究

赤血球膜ATPaseへのキノホルムの作用
……長井二三子，樺島順一郎，中川　敦子，牛山　慶子，加納　いつ，中尾　順子……385

キノホルムおよびクロロキンのアデニレートシクラーゼに対する影響
……中川　敦子，長井二三子，牛山　慶子，樺島順一郎，加納　いつ，中尾　順子……387

キノホルムによるフォスフォジエステラーゼの阻害
……牛山　慶子，樺島順一郎，長井二三子，中川　敦子，加納　いつ，中尾　順子……390

フェニルセファロースとオクチルセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーによるカルモジュリンの精製
……樺島順一郎，長井二三子，牛山　慶子，中川　敦子，加納　いつ，中尾　順子……392

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）によるマウス肺傷害の機構
……中川　好男，中尾　順子，平賀　興吾……396

オルトフェニルフェノール（OPP）のヒト由来株化細胞における突然変異原性について
……鈴木　英子，中尾　順子，平賀　興吾……399

オルトフェニルフェノール（OPP）単一経口投与によるC57 BL/6 Nマウス被毛および触毛の脱色素について
……田山　邦昭，平賀　興吾……401

オルトフェニルフェノール（OPP）のラットを用いた亜慢性毒性試験
……井口　重孝，高橋　博，藤井　孝，福森　信隆，三栗谷久敏，多田　幸恵，湯澤　勝廣，平賀　興吾……407

オルトフェニルフェノールナトリウム（OPP-Na）のラット膀胱上皮細胞の微細構造におよぼす影響
……福森　信隆，佐々木美枝子，平賀　興吾……416

オルトフェニルフェノールナトリウム（OPP-Na）投与ラットの尿検査成績
……田山　邦昭，中村　清純，神谷　信行，平賀　興吾……425

オルトフェニルフェノールナトリウム（OPP-Na）の添加飼料を与えたラットにおける宿主経由試験
……藤田　博，小嶋　昭江，佐々木美枝子，平賀　興吾……431

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2報）
腫瘍性および非腫瘍性変化について
……坂本　義光，神谷　信行，池田　虎雄，平賀　興吾……436

クロム鉱さい粉じんのラットによる21日間持続吸入実験
尿中クロムの分析
……神谷　信行，坂本　義光，佐々木美枝子，平賀　興吾……445

F 344／DuCrjラットの血液性状について
……多田　幸恵，佐々木美枝子，平賀　興吾……448

ラットの採血部位による血液性状の変動
……多田　幸恵，佐々木美枝子，平賀　興吾……454

テトラサイクリンの細胞遺伝学的研究
……吉田　誠二，佐々木美枝子，平賀　興吾……457

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（第2報）
汎用統計処理プログラム集の作成
……三栗谷久敏，藤田　博，神谷　信行，佐々木美枝子，平賀　興吾……460

他誌発表……465

学会発表……471

CONTENTS

REPORTS I PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

Studies on the Properties of Kappa Type Phage and Other Phages of *Vibrio cholerae*
..... H.Ushioda, H.Igarashi, M.Shingaki, H.Fujikawa, T.Terayama and M.Ohashi 1

Biochemical Characteristics and Cellular Fatty Acid Composition of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coji*
..... T.Itoh, A.Kai, M.Takahashi, K.Satio, I.Takano, Y.Yanagawa and M.Ohashi 8

Distribution of *Clostridium perfringens* in Soil and Enterotoxigenicity of Isolates
..... M.Inaba and T.Itoh 18

Development of a Computerized Data Base System for Processing Results of Bacteriological Examination of Overseas Travellers' Diarrhea
..... M.Tsuno, Y.Kudoh and M.Ohashi 22

An Antifungal Substance in Cnidium
..... S.Morozumi, T.wauke and H.Hitokoto 31

Simplified Identification Method of *Staphylococcus aureus* by Slide Latex Agglutination
..... M.Shingaki, H.Igarashi, H.Ushioda, H.Fujikawa and T.Terayama 38

Evaluation on Efficiency of Treatment with Praziqantel for Schistosomiasis Japonica by ELISA Titration on Pair-Sera or Plasma, Obtained from Patients in Leyte, Philippines
..... I.Murata, H.Matsuda, H.Tanaka and Bayani L.Blas 43

Studies on Gonorrhea in Tokyo: Its Prevalence in Prostitutes and Antimicrobial Agent-Susceptibility of the Causative Agent, 1981−1983
..... T.ishikami, M.Hori, S.Suzuki, M.Ohashi, O.Maruyama, Y.Hayashida and R.Saito 49

Enteric Virus Surveillance in Tokyo: Virus Isolation from Patients and Sewage Samples (1983)
..... Y.Hayashi, K.Yano, K.Yabuuchi, T.Watanabe, Y.Ishihara, S.Ohkubo and F.Inyaku 55

Studies on Tsutsugamushi Disease in Izu Islands Field Works in Shikine Island
..... T.Ito K.Nakamura, K.Yamazaki, F.Sakai, K.Yabuuchi and M.Ohashi 61

Virological Studies on Influenza Occurred in Tokyo (Spt. 1983−Feb. 1984)
..... F.Sakai, T.Ito K.Yamazaki, K.Nakamura and K.Yabuuchi 69

Epidemiological Survey of Japanese Encephalitis in Tokyo in 1983
..... Y.Yoshida, S.Sekine, K.Yabuuchi, M.Nakajima, T.Suzuki, M.Akiyama and I.Hatano 73

Incidence of Virus Isolation from Acute Exanthematous Diseases among Infants in Tokyo (1979−1983)
……Y.Yoshida, S.Sekine and K.Yabuuchi…… 82

Detection of Rotaviruses in Faeces taken from Infants with Acute Gastroenteritis (3)
……S.Sekine, K.Yano, K.Yabuuchi, T.Watanabe, Y.Ishihara, S.Okubo and F.Inyaku…… 89

Studies on Mass-screening Methods for the Neuroblastoma (I)
An Examination for Spot Test of Urinary Vanillylmandelic Acid
……K.Bushimata…… 92

Studies on Mass-screening Methods for the Neuroblastoma (II)
Analysis for Spot Test Results of Urinary Vanillylmandelic Acid
……K.Bushimata and S.Suzuki……101

Application of Compensating Development Procedure on Electron Microscopy
……G.Maeki……106

REPORTS II PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

Quantitative Determination of Berberine in Pharmaceutical Preparation by Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography
……I.Yasuda, T.Hamano, T.Seto and K.Akiyama……113

Determination of Non-pyrin Preparations for Common Cold (III)
Antihistaminics
……K.Nakayama, M.Takahashi, Y.Iwasaki and K.Akiyama……120

Migration of Secondary Amines from Rubber Nipples and Pacifiers, and Formation of Nitrosamines
……K.Mizuishi, M.Takeuchi and M.Kazama……127

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XI)
High Performance Liquid Chromatography of Irgasan DP-300 and Thiabendazole Used as Sanitary Finishing Agent in Textile Products
……T.Amemiya, M.Sakai, K.Mori, S.Suzuki and M.Kazama……133

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (X II)
Analytical Method of Some Long Chain Alkyl Quaternary Ammonium Compounds by Gas Chromatography
……S.Suzuki, M.Sakai, K.Mori, T.Amemiya and M.kazama……138

High-Performance Liquid Chromatographic analysis of basic coal-tar dyes
……K.Ito, T.Kan, Y.Nakamura, K.Kishimoto and M.Kazama……146

A Report of Investigation of Coal-Tar Dyes in Commercial Toilet Soaps
…… Y.Nakamura, T.Kan, K.Ito and M.Kazama……152

Determination of Benzalkonium Chloride in Disposable Moistened Medicated Tissue by High Performance Liquid Chromatography
……T.Ueta and M.Kazama……159

REPORTS III PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

Detection and Identification on *Gnathostoma hispidum, Paragonimus Miyazakii* and Other Helminth from the Fresh or Brackish Water Fishes and Shellfishes, arrived to Tsukiji Central Market from China, Formosa, Korea and Japan in 1981 to 1983 period
.....I.Murata, S.Miyazawa, K.Itoh, O.Matsuzaki and M.Nayuki..... 163

Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (XII) Polychlorinated Biphenyl Concentrations of Foods
.....K.Kishimoto, M.Takeuchi and M.Kazama..... 175

Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (XIII) Monitoring of Polychlorinated Biphenyls in Seabass and Short-necked Clam from Tokyo Bay
.....M.TaKeuchi, K.Mizuishi, K.Kishimoto and M. Kazama..... 179

Survey of Pollution with Mercury in Tokyo (XII) Mercury Content of Fish and Shellfish
.....H.Yamanobe, M.Takeuchi and M.Kazama..... 184

Simplified Analytical Method for Tetracyclines Residues in Honey by High Performance Liquid Chromatography
.....K.Takeba, M.Kanzaki, F.Murakami and M.Matsumoto..... 187

Prevalence of Spore-forming Bacteria in Commercial Honey
.....Y.Kokubo, K.Jinbo, S.Kaneko and M.Matsumoto..... 192

Selective Enrichment Medium for the Recovery *of Campylobacter jejuni/coli* from Chicken Meat
.....K.Jinbo, S.Kaneko, Y.Kokubo and M.Matsumoto..... 197

An Improvement of Simplified Detection Method for Residual Sulfonamides in Meat and Fish
.....M.Kanzaki, K.Takeba, F.Murakami, T.Maruyama and M.Matsumoto..... 202

Survey of Residual Clopidol in Commercial Chicken Tissues
.....S.Horii, T.Yamagishi and M.Matsumoto..... 207

Survey of Pesticide Residues in Vegetables, Fruits and Coffee Beans
.....T.Nagayama, K.Kan, Y.Tamura, T.Maki and T.Nishima..... 210

Determination of Natural Oil Soluble Dyes in Foods
..... H.Ushiyama, M.Nishijima, K.Yasuda, H.Kamimura, S. Tabata, S.Matsumoto and T.Nishima..... 219

Determination of Penicillic Acid and Patulin in Commercial Fruit Juices by Gas Liquid Chromatography
.....H.Ogawa, J.Suzuki, S.Ochiai, M.Nishijima, Y.Naoi and T.Nishima..... 224

Survey of the Intentional Addition of Monosodium Glutamate on the Green Tea Commodities
.....M.Hirokado, K.Nakajima, I.Takahashi, Y.Uematsu and F.Endo..... 231

Released Metals from Ceramic Ware in Contact with Food
……R.Yoshida, Y.Watanabe, K.Sato and F.Endo……235

Determination of Lysinoalanine in Traditional High-protein Foods of Japan
……N.Kikutani, M.Iguchi, T.Tomomatsu and M.Doguchi……241

Fatty Acid Composition of Diets Collected from the Old-Age Home and the Infant Home
……M.Iguchi, N.Kikutani, T.Tomomatsu, M.Doguchi, D.Futami, Y.Yonekawa, T.Tsurumi, T.Kamata and H.Kubota……245

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Nicotinic acid and Nicotinamide in Meats
……M.Oishi, K.Onishi, H.Nakamura and S.Sakai……252

Contamination of Microorganisms through the Manufacturing Process of Foods in the Case of Foreign-style Undried Confectioneries
……M.Jin, N.Ikejima, T.Arai, Y.Irikura and S.Sakai……256

REPORTS IV PAPERS CONCERNING ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

Pathological Changes in Lungs of Rats After Long-Term Exposure to Mixtures of Nitrogen Dioxide and Ozone
……N.Terada, S.Ikeda, M.Fukuda, K.Endo, M.Ohsawa, T.Suzuki and I.Mizoguchi……265

Effect of NO_2 Exposure on the Activity of Angiotensin Converting Enzyme in Lung
……T.Suzuki, N.Terada, S.Ikeda, M.Ohsawa, K.Endo and I.Mizoguchi……279

Effect of NO_2 Exposure on the Formation and Reduction of Methemoglobin in the Rats
……K.Endo, T.Suzuki, S.Ikeda and I.Mizoguchi……289

Changes of the Amount of Fall Dast in Tokyo Area 1969−1983
……M.Ohsawa, S.Ikeda, M.Fukuda, K.Makino, H.Seki, T.Ohta, T.Suzuki and I.Mizoguchi……296

A Study on Relationship of Health Indices to Air Pollution and Social Indices in Tokyo (II)
……K.Makino and I.Mizoguchi……302

Effect of Selenium Originating Dolphin and Sperm Whale Meat on Methylmercury Poisoning
A : Subacute Toxicity B : Reproduction Toxicity
……H.Seki, Y.Tamura, K.Minowa and T.Kano……309

Survey of Chemical Pollutants in Biota from Tokyo Bay (II)
Residue Levels in Japanese Sea Bass and Gulls in 1982
……H.Seto and T.Kano……316

Reaction of 1,3-Butadiene with OH in the Presence of Oxygen
……T.Ohta and I.Mizoguchi……321

Properties of Accumulated Dusts in Air-conditioning Duct (II)
.....Y.Sato..... 324

A Mass Outbreak and Control of Human Scabies in a Nursing Home for the Aged
.....M.Yoshikawa, M.Ohno, M.Saito, T.Ishii, S.Okamoto, Y.Imagawa and M.Furukawa..... 329

Reduction of Larval Population of *Chironomus yoshimatui* (Diptera : Chironomidae) with Temephos in the Kanda River
.....M.Ohno and K.shimizu..... 335

Fundamental Test for Control Trihalomethanes Formation in Water Supply of Ogasawara
.....H.Sasano and S.Nishigaki..... 339

Heavy Metal Pollution of Well Water in Tokyo Metropolitan Area (II)
.....Y.Hirano, Y.Takahashi, Y.Tsuchiya and S.Nishigaki..... 346

Biological Characteristics of Chlorine Resistive *Pseudomonas* Isolated Dominantly from Drinking Tank Water
.....K.Furuhata and A.Matsumoto..... 352

Survey of Chlorinated Organic Solvents in Groundwater in Tama, Tokyo
.....K.Yaguchi, N.Ohashi, S.Watanabe, N.Sekiyama, H.Nakamura and S.Sakai..... 363

Survey of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Sediment from Tama River, Tokyo
.....T.Ariga, H.Oshida, H.Tochimoto, H.Nakamura and S.Sakai..... 371

The Relation between the Change with the Passage of Time in Water Qualities of Hirai River and Domestic Sewage
.....H.Tochimoto, H.Oshida, T.Ariga, N.Ikejima, H.Nakamura and S.Sakai..... 378

REPORTS V PAPERS CONCERNING ON TOXICOLOGY

Effects of Chinoform on ATPase from Red Blood Cell Membrane
.....F.Nagai, J.Kabashima, A.Nakagawa, K.Ushiyama, I.Kano and T.Nakao..... 385

Effects of Chinoform and Chloroquine on Adenylate Cyclase
.....A.Nakagawa, F.Nagai, K.Ushiyama, J.Kabashima, I.Kano and T.Nakao..... 387

Inhibition of Phosphodiesterase Activity by Chinoform
.....K.Ushiyama, J.Kabashima, F.Nagai, A.Nakagawa, I.Kano and T.Nakao..... 390

Purification of Calmodulin by Phenyl-Sepharose and Octyl-Sepharose Affinity Chromatography
.....J.Kabashima, F.Nagai, K.Ushiyama, A.Nakagawa, I.Kano and T.Nakao..... 392

On the Mechanism of Butylated Hydroxytoluene (BHT) -Induced Pulmonary Injury in Mice
.....Y.Nakagawa, T.Nakao and K.Hiraga..... 396

Mutagenicity of Orthophenylphenol (OPP) in a Human Clonal Cell Line
H.Suzuki, T.Nakao and K.Hiraga····· 399

Depigmentation Caused by A Single Oral Administration of *o*-phenylphenol (OPP) in Ordinary and Tactile Hair of C57BL/6N Mice
K.Tayama and K.Hiraga····· 401

Subchronic Toxicity of *o*-Phenylphenol (OPP) by Food Administration to Rats
S.Iguchi, H.Takahashi, T.Fujii, N.Fukumori, H.Mikuriya, Y.Tada, K.Yuzawa and K.Hiraga····· 407

Effects of Sodium *o*-Phenylphenate (OPP-Na) on Ultrastructure of Bladder Epithelium in Rats
N.Fukumori, M.Sasaki and K.Hiraga····· 416

Urinalysis of Male F344/DuCrj Rats Fed with Sodium *o*-Phenylphenate (OPP-Na)
K.Tayama, K.Nakamura, N.Kamiya and K.Hiraga····· 425

Assay of Host-Mediated Mutagenicity by *S. typhimurium* and *E. coli* in Rats Fed Sodium *o*-Phenylphenate (OPP-Na)
H.Fujita, A.Kojima, M.Sasaki and K.Hiraga····· 431

Inhalation Experiment of Chromite Ore Residue Dust on Rats for 2 Years (II) Neoplastic and Nonneoplastic Lesions in Various Organs
Y.Sakamoto, N.Kamiya, T.Ikeda and K.Hiraga····· 436

Inhalation Experiment of Chromite Ore Residue Dust to Rats for 21 Days Analysis of Chromium in Rat Urine
N.Kamiya, Y.Sakamoto, M.Sasaki and K.Hiraga····· 445

Hematological Findings in F344/DuCrj Rats under Our Lavoratory Conditions
Y.Tada, M.Sasaki and K.Hiraga····· 448

Differences in Hematological Findings among the Blood Collected from Various Vessels of Rat
Y.Tada, M.Sasaki and K.Hiraga····· 454

Cytogenetic Studies of Tetracycline
S.Yoshida, M.Sasaki and K.Hiraga····· 457

A Personal Computer Program for Statistical Analysis of Toxicological Study (II) A General Statistics Program
H.Mikuriya, H.Fujita, N.Kamiya, M.Sasaki and K.Hiraga····· 460

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS····· 465

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS····· 471

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.*, 35, 1-7, 1984

コレラ菌ファージに関する研究
—カッパー型ファージおよびその他のファージ検出法の基礎的検討—

潮田　弘*, 五十嵐　英　夫*, 新垣　正　夫*,
藤川　浩*, 寺山　武*, 大橋　誠*

Studies on the Properties of Kappa Type phage and Other Phages of *Vibrio cholerae*

HIROSHI USHIODA*, HIDEO IGARASHI*, MASAO SHINGAKI*, HIROSHI FUJIKAWA*,
TAKESHI TERAYAMA*and MAKOTO OHASHI*

Keywords：エルトールコレラ菌 *Vibrio cholerae* biotype *eltor*, アジア型コレラ菌 *Vibrio cholerae* biotype *cholerae*, カッパー型ファージ kappa type phage

緒　言

1961年セレベス島に端を発し，東南アジア一帯の大流行を起すまでは，エルトール型コレラ菌はアジア型コレラ菌よりも病原性が弱いものと考えられてきた．しかしながら，この大流行により，その病原性が見直されてきており，細菌学的研究ならびに病原学的検討がなされてきた．武谷ら[1]はこのセレベス型エルトールコレラ菌の多数の菌株について溶原性を検討した結果，大多数の菌株がファージを放出し，このファージが狭い共通の溶菌域をもつことを明らかにした．これらのファージは同一のファージ群に属し，一括して九州大学のKをとって，Kappa型ファージと称することが提唱された[2]．大多数のエルトールコレラ菌が溶原株であり，Kappa型ファージ（以下 K-ファージと略す）を遺伝子上に組込んでいて，一定の確率でファージを放出するために，エルトールコレラ菌が存在する限り，K-ファージも存在するということが確認された．そこで，このファージを検出することはコレラ菌検索の精度を高めるとともに，より鋭敏で，短時間に結果が判明することによって患者，保菌者の早期発見が可能であることが報告された[3]．また，化学療法剤投与後のふん便などコレラ菌検出不可能と思われる材料からのK-ファージの検出はコレラ菌汚染の可能性を間接的に証明しようとするものである．1978年，東京上野の結婚式場でのコレラ患者集団発生事件に際し，コレラ菌検索と並行してK-ファージ検出法を食品原料，排・下水等に応用し，その有用性を確認した[4]．

神中ら[5]はふん便をはじめ，患者の吐物，汚水などからK-ファージを検出したが，雑菌の混在など，手技上の制約により，野外への応用ができにくい面があったため，ストレプトマイシン高度耐性（1,000 $\mu g/ml$）の指示菌を用い，手技の簡易化の試みを報告した．著者らもこの報告にもとずき，ストレプトマイシン耐性の指示菌H-218 SM^r 株の分与を受け，各種検査材料からK-ファージの検出を試みた．しかしながら，食品類，排・下水中にはストレプトマイシン耐性菌が多数存在し，これらの雑菌の発育による判定不能のものにしばしば遭遇した．

そこで，殺菌法としてクロロホルム処理法を導入するために基礎的検討を行なった．すなわち，クロロホルムに対するK-ファージおよびその他のファージの抵抗性をクロロホルム濃度，保存温度および時間の面から検討した．また，K-ファージおよびその他のファージの各種環境条件下での抵抗性を知る目的で，保存温度，凍結および凍結融解等に対する抵抗性を検討するとともに，指示菌の培養条件によってファージ感受性が異なることから，安定してファージ感受性を示す培養条件を検討した．またK-ファージ増強法の条件についても若干検討したので報告する．

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科　160　東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

材料および方法

1．供試菌株

コレラファージ用指示菌はアジア型コレラ菌でストレプトマイシン高度耐性のH 218 SM^r 株(九州大学武谷博士から分与)およびアジア型コレラ菌のTSI-4株（国立予防衛生研究所　山田博士から分与）の二株を実験に供した.

2．供試ファージ

K-ファージはエルトールコレラ菌CH 25株（防衛医科大学校　神中博士から分与）からマイトマイシンCを用い誘発して得たものを用いた．またϕ 6973 C（エルトールコレラ菌 6973株から得た K-ファージのclear mutantで予防衛生研究所　山田博士から分与）もK-ファージとして用いた．K-ファージ以外のコレラファージとしてはϕ 912 C（予研　山田博士から分与）を，また，輸入冷凍えびから著者らが検出したϕ 220 Cを用いた.

3．指示菌の溶菌域の検討

溶菌斑の形成所見，ファージに対する感受性巾の広さを検討するためにH 218 SM^r 株およびTSI-4株の4種のファージに対する感受性を比較検討した.

4．コレラファージのクロロホルム抵抗性

殺菌剤として，クロロホルムの0，1，10および50%濃度に対するコレラファージの抵抗性を5℃ならびに25℃で，1日，1週間，1ヵ月および3ヵ月後の生残率について検討した.

5．コレラファージの保存温度抵抗性

食品原料，食品，食品調理過程あるいは凍結保存中の食品中におけるコレラファージの態度を知る目的で以下の実験を行なった.

1）56℃，60℃，80℃および100℃の4段階の温度を設定し，5，10，20および30分後のそれぞれのファージ力価を測定し，コレラファージの温度に対する態度を比較検討した.

2）−20℃および−80℃でファージ液を凍結保存し，1週間後に室温で解凍して，ファージ力価を測定した．再度同一試料を−20℃，−80℃に各々凍結保存し，この操作を3回繰返し行ない，凍結融解によるファージ力価の変動を調べた.

6．指示菌の感受性と培養条件の検討

指示菌 TSI-4株の各種培養時間後のファージに対する感受性を検討した．すなわち，指示菌をファージ用アルカリペプトン水[4]で35℃，3時間，20時間，3日および10日間培養し，4種のファージに対する感受性を比較した.

7．ファージ増強法の検討

検査材料中に少量含まれるコレラファージの確実な検出を目的として，液体培養法によりファージ増強法を検討した．すなわち，指示菌 TSI-4株の35℃，20時間培養菌をファージ用アルカリペプトン水（希釈用ペプトン水は$CaCl_2$を10^{-3}Mに添加したものと無添加のものを用いた.）で100倍希釈したものとK-ファージϕ 6973 Cの10^4 pfu／ml(菌対ファージの割合を1,000：1）を混合した．混合後，液が動く程度におだやかに振とうし，1，2，3，5および24時間後にそれぞれ，クロロホルムを添加（1／10量）し，指示菌を殺菌した．それぞれの試料についてファージ力価を測定した.

成　　績

1．指示菌のファージ感受性比較

K-ファージϕCH 25，ϕ 6973 Cおよびその他のコレラファージϕ 912 Cと冷凍えび由来ファージϕ 220 Cの4種のファージに対する指示菌H218SM^{r}株およびTSI-4株の感受性を検討した成績を表1に示した.

表1．コレラファージに対する指示菌の感受性

指示菌	ファージ (1 RTD)			
	ϕCH 25	ϕ 6973 C	ϕ 912 C	ϕ 220 C
H 218 SM^r	++	++	−	++
TSI-4	++	++	++	++

H 218 SM^r 株はϕ 912 Cに対して感受性を示さなかったが，TSI-4株はϕ 912 Cによって著明に溶菌され，他のファージによっても明瞭な溶菌斑を示し，コレラファージの指示菌として適していた.

2．コレラファージのクロロホルム抵抗性

保存温度を5℃と25℃に設定し，クロロホルム濃度0，1，10および50%の4濃度について，1日，1週，1月および3月後のファージ力価を調べた成績を生残率として表2に示した．K-ファージϕCH 25では保存温度，時間を通して，クロロホルム50%濃度のものがわずかに生残率が低かったが，各濃度間に著明な差は認められなかった.

保存温度側からみた場合，5℃では3ヵ月後も1.5～6.6%の生残が認められたが，25℃では1ヵ月後にファージは認められなかった．ϕ 912 Cでは5℃，25℃とも，3ヵ月後にもクロロホルム濃度に関係なく，15～30%も生残した．ϕ 220 Cもクロロホルム濃度間で生残率に有意差なく，抵抗性を示した．一方，保存温度5℃では，3ヵ月後にも10%以上の生残が認められた

が，25℃では1ヵ月後にファージは検出されなかった．

3．コレラファージの各種温度下での生残

調理食品，食品原料あるいは冷凍魚介類におけるコレラファージの各種温度条件下での生残率を検討した．1）56°，60°，80°および100℃に5，10，20および30分間保持したときの4種のファージの生残率を検討した結果を表3に示した．出発材料ファージ力価を100として，各時間と温度毎のファージ力価を生残率（%）で表わした．その結果，80℃および100℃加温ではいずれのファージも生残しなかった．60℃では冷凍えび由来ファージφ220 Cが5分間試料に約5%生残したが，10分以後はすべて生残しなかった．これに対して，K

表2．コレラファージのクロロホルムに対する抵抗性

ファージ力価 (pfu/ml)	クロロホルム濃度 (%)	ファージ生残率(%) 保存時間および温度 1日 5℃	1日 25℃	1週 5℃	1週 25℃	1月 5℃	1月 25℃	3月 5℃	3月 25℃
φ CH 25 (1.0×10^4)	0	28.0	23.0	28.0	20.0	10.0	0	6.6	0
	1	40.0	46.0	28.0	32.0	6.0	0	4.5	0
	10	31.0	13.0	37.0	13.0	7.0	0	3.5	0
	50	15.0	30.0	28.0	5.0	6.0	0	1.5	0
φ 912 C (3.0×10^4)	0	69.3	50.7	50.0	93.3	21.3	13.3	30.7	17.3
	1	56.7	31.0	43.3	23.3	22.4	20.5	30.7	16.7
	10	58.0	40.0	100	40.0	13.3	8.7	24.7	14.7
	50	80.0	56.0	66.7	100	20.0	18.6	30.0	14.7
φ 220 C (1.8×10^5)	0	100	100	48.9	26.1	16.7	0	11.1	0
	1	100	100	100	70.0	18.0	0	11.1	0
	10	100	100	91.1	6.1	12.2	0	11.1	0
	50	100	100	100	33.3	27.8	0	11.1	0

表3．コレラファージの各種温度条件下での生残

ファージ	作用温度 (℃)	ファージ生残率(%) 作用時間(分) 0	5	10	20	30
φ CH 25	56℃	100	20.0	22.5	23.8	17.8
	60		24.3	6.0	3.1	1.9
	80		0	0	0	0
	100		0	0	0	0
φ 6973 C	56	100	100	74.6	70.3	56.5
	60		81.9	41.8	8.6	3.0
	80		0	0	0	0
	100		0	0	0	0
φ 912 C	56	100	57.8	33.2	42.8	38.4
	60		49.4	45.4	21.8	18.4
	80		0	0	0	0
	100		0	0	0	0
φ 220 C	56	100	39.4	8.3	4.2	0.4
	60		4.9	0	0	0
	80		0	0	0	0
	100		0	0	0	0

-ファージおよびφ912Cでは30分後も18.4%の生残率であった．K-ファージは温度，時間経過によって急激にファージ力価が減少するのに対して，φ912Cではかなりの抵抗性があり，徐々に力価の減少がみられた．

2）−20℃および−80℃で凍結保存した4種のファージを室温で解凍し，ファージ力価を測定した．同一試料を再度−20℃および−80℃に各々凍結保存し，1週間後にまた同じ操作を行なった．出発材料ファージの力価を100として，各試料のファージ力価を生残率(%)として表4ならびに図1に示した．−20℃凍結および凍結融解を繰返したものでは，K-ファージとその他のファージの間に著明な差が認められた．すなわち，φCH 25およびφ6973Cでは1回の凍結融解で，生残率が10%以下であり，3回の凍結融解の繰返しで，φ6973Cでは生残率0であった．

これに対して，φ912Cでは−20℃の凍結保存そして3回の凍結融解後も約40%の生残率であり，φ220Cも3回の凍結融解後，2.5%生残した．−80℃保存では，

表4．コレラファージの生残におよぼす凍結温度および凍結融解の影響

ファージ	凍結前ファージ力価 pfu/ml (%)	−20℃ 凍結融解回数 1	2	3	−80℃ 凍結融解回数 1	2	3
φCH 25	3,000 (100)	300 (10.0)	50 (1.7)	40 (1.3)	4,000 (133.3)	3,300 (110.0)	2,800 (93.3)
φ6973C	4,000 (100)	300 (7.5)	120 (3.0)	0	3,000 (75.0)	2,000 (50.0)	500 (12.5)
φ912C	3,800 (100)	1,550 (40.8)	1,000 (26.3)	1,480 (38.9)	2,060 (56.0)	2,210 (58.2)	1,020 (26.8)
φ220C	4,000 (100)	2,000 (50.0)	420 (10.5)	100 (2.5)	1,130 (28.3)	600 (15.0)	470 (11.8)

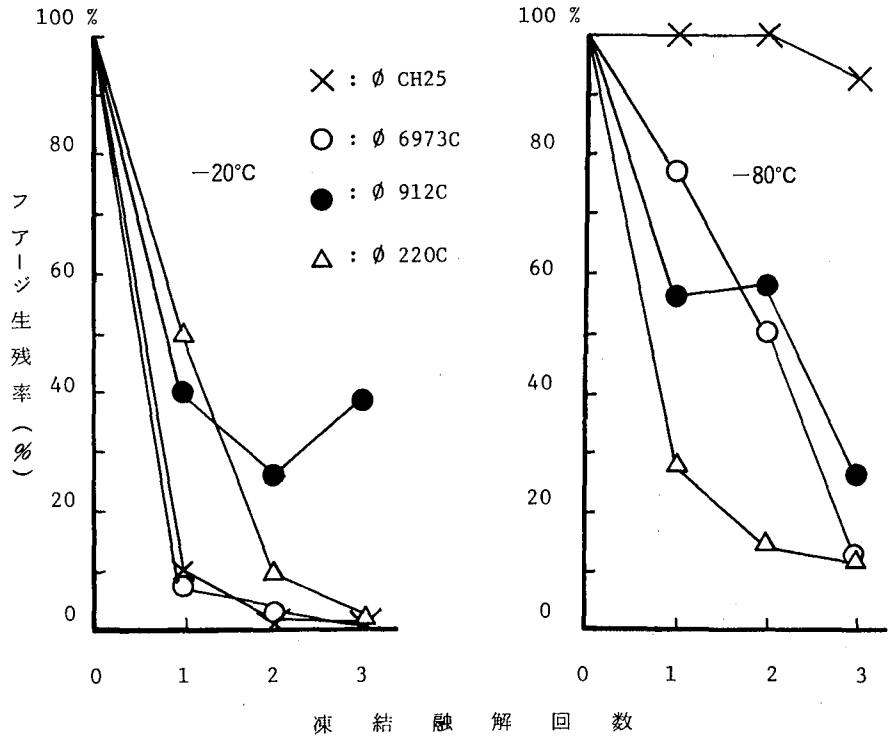


図1．コレラファージの生残におよぼす凍結温度および凍結融解の影響

表5．コレラファージ用指示菌の培養時間のファージに対する感受性への影響

ファージ	指示菌(TSI-4)培養時間 3時間	20時間	2日	5日	10日
	%	*	%	%	%
φCH 25	77.2	100	72.8	76.1	55.4
φ6973 C	95.3	100	100	83.7	72.1
φ912 C	170.4	100	60.5	62.2	28.3
φ220 C	51.5	100	106.8	81.8	37.1

*：37℃20時間培養菌でのファージプラーク数を100として，他の培養時間菌でのプラーク数をその比率で表わした。

−20℃凍結とは逆にK-ファージの方が，3回の凍結融解の繰返しに対して抵抗性を示す成績であった．−80℃の凍結では4種のファージが全て1～3回の凍結融解に生残した．図1でも明らかなように，−20℃保存ではφ912Cのみが30～40%生残するのみであったが，−80℃凍結保存では全てのファージが生残し，K-ファージのφCH 25は3回の凍結融解に対して生残率93.3%の抵抗性を示した．

4．指示菌の感受性と培養条件の検討

指示菌TSI—4株の安定し，かつ高いファージ感受性を示す条件を得るために，培養時間と4種のファージに対する感受性を検討した成績を表5に示した．通常用いられる35℃，20時間培養菌で得たファージ力価を100として，他の培養時間菌でのファージ力価を比率で表わした．K-ファージのφCH 25では，20時間培養菌が最も高い感受性を示したが，φ6973 Cでは，3時間培養菌でも，2日培養菌でもほぼ同様な感受性を示した．これに対して，φ912 Cでは3時間培養菌で最も感受性が高く，若い培養菌が適しているのに対して，2日培養菌では感受性の急激な下降が認められた．一方，冷凍えび由来φ220 Cでは，20時間培養菌も2日培養菌もファージ感受性が変らないのに対して，短時間の若い培養菌では感受性がむしろ低いという成績であった．

5．ファージ増強法の検討

検査材料中に少量存在するファージの増強をはかり，その検出率を上げるために，ファージと指示菌との混合時間ならびにCa^{++}の存在のファージ増強に対する効果を検討した成績を表6に示した．φ6973 C 10^4pfu/mlはファージの消長を観察するために稍々高い力価のものを用いた．混合時間2時間まではCa^{++}のあるなしに関係なく，ファージ力価は減少した．混合時間3時間ではCa^{++}のないものではファージが検出されず，Ca^{++}の存在するものでは，出発ファージの約100倍に増強された．さらに，混合5時間培養では，Ca^{++}の存在するものではファージ力価が2.1×10^8pfu/mlになり，約1万倍に増強された．しかし，24時間後のファージ力価は5時間のものよりも減少が認められ，Ca^{++}存在のものでも，出発材料ファージの力価の約600倍程度の増強効果であった．

表6．カッパーファージの液体増強法における指示菌とファージ試料混合後の時間およびカルシウムイオンの増強効果への影響

指示菌	ファージ力価pfu/ml	作用時間(h)	$CaCl_2$ (10^{-3}M)	ファージ力価 pfu/ml
TSI-4	φ6973 C 10^4/ml	1	+	1.0×10^3
			−	2.0×10^2
		2	+	1.0×10^2
			−	2.0×10^2
		3	+	3.0×10^6
			−	0
		5	+	2.1×10^8
			−	2.0×10^2
		24	+	5.8×10^6
			−	1.0×10^5

考　察

コレラ流行地から旅行者がもちこむコレラ菌は国内での二次感染の感染源として極めて危険な存在である．一方，大量に輸入される生鮮魚介類のコレラ菌汚染の問題があり，近年，海外渡航歴のない人々からのコレラ患者発生がしばしばみられ問題となっている．1978年東京上野の結婚式場におけるコレラ患者集団発生や1980年東京文京区でのコレラ患者発生，1983年東京足立区の工事場詰所でのコレラ患者集団発生など，これまでに都内で発生したコレラ患者集団発生事件の推定原因食品からはいずれもコレラ菌は検出されていない[6]．これは多数の雑菌の存在によって，少数存在するコレラ菌の選択・増菌が理想的にゆかなかったためと考えられるが，1978年東京上野の結婚式場でのコレラ事件では，推定原因食品の輸入冷凍えびからコレラ菌は検出されなかったが，K-ファージを検出し得た．

武谷ら[1]はエルトールコレラ菌の多くが溶原株であり，エルトールコレラ菌が存在するならばK-ファージも存在すると報告しているが，先の事件はまさにK-

ファージの存在およびその有用性を証明した[4,6]．その後の海外渡航歴のない人々からのコレラ患者集団発生事件の推定原因食品からはK-ファージも検出されていない．それには多くの理由が考えられるが，その一つには，検査材料中に存在するK-ファージが極めて少ないことや，少量存在するK-ファージを適確に増強し得ていないことが考えられる．

つぎに指示菌のファージ感受性が不安定であることがしばしばあり，指示菌の培養条件なども原因の一つと考えられる．一方，武谷ら[2]の報告および著者らの報告[4]でも述べてきたごとく，エルトールコレラ菌の溶原株にはかなりの率で非溶原株の出現があり，またコレラ流行地には溶原株の流行地，非溶原株の流行地とあり，K—ファージ検出法の応用限界のあることを報告してきた．

したがってK-ファージの検出には，この点を考慮に入れた上で，条件のよい方法で行なわれるならば，迅速かつ感度高く，信頼性の高い結果が得られるであろう．

K-ファージ検出は菌検索に先行して行なうことにより，コレラ菌検索の精度を高めるものであり，また投薬後のコレラ菌検出不可能なふん便や消毒後の汚水からもK-ファージの検出は可能であり，コレラ菌存在の間接的な証明をなしうるものである．しかしながら，武谷ら[1]のK-ファージ検出法の原法では，いくつかの問題点があった．すなわち神中ら[5]は検査材料中に存在する雑菌対策として，ストレプトマイシンによる選択法を導入し，指示菌にストレプトマイシン高度耐性菌H 218 SM^rを用いることにより野外への実用化を計ったが，著者らが実際に応用した結果では，食品，食品原料，排・下水中にはストレプトマイシン耐性菌が多数存在しており，判定不可能なものにしばしば遭遇した．

そこで，クロロホルムによる殺菌法を実用化するために，コレラファージのクロロホルム抵抗性を検討した．

その結果，供試したいずれのファージもクロロホルムに抵抗性を示し，クロロホルム殺菌法の導入を可能にした．つぎに2株の指示菌について4種のファージによりその感受性巾および溶菌所見を検討した結果，TSI—4株はファージ感受性巾があり，溶菌所見も明瞭で，かつファージ感受性が安定していることを確認した．この成績により以後のファージ検出には両指示菌を併用することとした．また，指示菌のファージ感受性が培養時間によって若干異なることを観察してきたので，幼若菌（3～4時間培養菌）から20時間，2日，5日あるいは10日培養菌について4種のファージの感受性を調べた結果，ファージによってその感受性は異なるが，総じて20時間培養菌が安定していた．コレラファージにおいては，幼若菌が必ずしも感受性が高いものではないことが明らかとなった．

また，コレラファージが各種環境下でどのような抵抗性を有するかを検討した結果，60℃5分で検出されなくなるもの，60℃30分後も生残するものなど，また−20℃では急激に力価の減少がみられるが，−80℃では数回の凍結融解に対してもほとんど力価の低下がみられず，抵抗性を示すものなど，ファージによりその性状を異にした．これらの成績はコレラ菌汚染食品あるいは食品原料等の保存条件，調理状況などの実態を考え併せると，ファージ検出率は高まるものと思われた．

ファージ検出の実際面で最も重要なことは，検査材料中に少量存在するファージを如何に検出可能な量に増強できるかである．食品汚染のエルトールコレラ菌が発育旺盛であれば，K-ファージも検出可能な量に達するであろうが[3]，多くの場合，検査材料中に含まれるファージ量は少ないために，指示菌を投入して増強を計らなければならない．今回の検討では，ファージと指示菌の混合後の培養時間で増強効果の最もよかったのは5時間であり，24時間培養では5時間で示したファージ力価の約1／100に減少した．また，Ca^{++}の存在はファージ増強に不可欠のものであることが確認された．今回実験に用いたK-ファージはある程度株化されたもので，エルトールコレラ菌から放出直後のテンペレートファージも同じ条件でよいかは，なお検討を要するところである．

今回の追究で，ファージ検出に際し，問題となる諸点を明らかにしたが，今後さらに，検査材料中に少量存在するファージの増強，濃縮等についての検討を行なう予定である．

結　論

近年，海外渡航歴のない人々からコレラ患者発生がみられ，輸入食品のコレラ菌汚染が問題となっている．

そこで，コレラ菌検索に先行してのファージ検出が間接的にコレラ菌汚染を証明できることに着目し，ファージ検出法の問題点の追究を行なうとともに，各種環境下でのコレラファージの抵抗性を検討し，つぎの結論を得た．

1．ファージ指示菌H 218 SM^r株とTSI-4株のファージ感受性を比較した結果，TSI—4株のファージ感受性巾が広く，溶菌班の形状所見も明瞭であった．

2．コレラファージのクロロホルム抵抗性を検討した結果，いずれのファージも抵抗性を示し，殺菌剤としての導入を可能にした．

3．4種のファージは80℃および100℃ではいずれも生残しなかったが，冷凍えび由来φ220 Cは60℃10分で検出されなくなった．K-ファージは60℃30分まで生残し，φ912 Cは60℃30分の加温でも18.4%が生残した．

4．−20℃の凍結と1回の凍結融解でK-ファージは生残率が10%以下に低下したが，φ912 Cおよびφ220 Cでは3回の凍結融解にも生残した．−80℃の凍結と3回の凍結融解に対して，−20℃凍結とは逆にK-ファージは生残し，φ912 Cおよびφ220 Cは低率の生残であった．

5．指示菌TSI-4株の培養時間のファージに対する感受性を検討した結果，φCH 25には35℃20時間培養菌が最も感受性が高く，φ6973 Cには3，20時間および2日培養菌とも差がなく，φ912 Cには3時間培養菌が，φ220 Cには2日培養菌が最も感受性が高かった．

6．液体培養法によるK-ファージの増強法を検討した結果，ファージと指示菌を混合培養5時間後に殺菌処置した試料のファージ力価が最も高い値を示した．

文　献

1）武谷健二，霜鳥翔一：日本医事新報，1999，27，1962

2）Takeya, K., Zinnaka, Y., Shimodori, S., Nakayama, Y., Amako, K. and Iida, K. : Proceedings of the cholera research symposium, p. 24, 1965, Honolulu, Hawaii, U S Government Printing Office, Washington, D. C.

3）Takeya, K., Shimodori, S. and Zinnaka, Y. : *J. of Bacteriol.*, 90 (3), 824, 1965

4）Ohashi, M., Terayama, T., Ushioda, H., Kudoh, Y., Tsuno, M. and Sakai, S. : *Microbiol. Immunol.*, 25 (6), 613, 1981

5）神中　寛，押方浩子，武谷健二：医学と生物学，72，220，1966

6）東京都衛生局：池之端文化センターに関連したコレラ流行調査報告書，p. 57，1980，東京都衛生局公衆衛生部防疫課，東京都立衛生研究所，東京．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 8-17, 1984

Campylobacter jejuni と *Campylobacter coli* の各種生化学的性状ならびに菌体脂肪酸組成の検討

伊藤　武*, 甲斐明美*, 高橋正樹*, 斎藤香彦*,
高野伊知郎*, 柳川義勢*, 大橋　誠*

Biochemical Characteristics and Cellular Fatty Acid Composition of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*

TAKESHI ITOH*, AKEMI KAI*, MASAKI TAKAHASHI*, KAHIKO SAITO*,
ICHIRO TAKANO*, YOSHITOKI YANAGAWA* and MAKOTO OHASHI*

A total of 407 strains of thermophilic campylobacter isolated from human specimens, swine, cattle, poultry, dogs, cats and wild birds were studied for their biochemical characteristics. Our study revealed that it was difficult to differentiate *C. jejuni* from *C. coli* by the characteristics described by Viren and Chatelain. On the other hand, we have confirmed the observation of Skirrow and Benjamin that *C.jejuni* standerd strain was hippurate hydrolysis-positive and *C. coli* standard strain was negative. We then applied hippurate hydrolysis for classification of these species, and compared their biochemical characteristics. These two species were found to be very similar except for the growth patterns on DHL and brilliant green agars, and DNA hydrolysis. Although most (72%) of *C. coli* strains grew on DHL agar, almost all the isolates (95%) of *C. jejuni* did not. Most (76%) of *C. coli* and some (28%) of *C. jejuni* strains grew on brilliant green agar (1/200,000). Forty percent of *C. jejuni* and only 5% of *C. coli* strains were positive for DNA hydorolysis.

Campylobacter isolates were also examined for their cellular fatty acid composition by gas-liquid chromatography. Cellular fatty acid composition could not be differentiated between *C. jejuni* and *C. coli*, and they were found to share the same fatty acids such as $C_{14:0}$, $C_{16:1}$, $C_{16:0}$, $C_{18:1}$ and C_{19}-cyc. However, *C. fetus* subsp. *fetus* demonstrated the fatty acid composition which was entirely different from that of *C. jejuni* or *C. coli*.

Keywords : *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, biochemical characteristics, fatty acid

緒　言

カンピロバクターは初めSmithら[1]によりウシの流産胎児より分離され，*Vibrio fetus* と命名された．その後Sebald & Véron[2]は，本菌がグラム陰性のラセン状をした微好気性細菌で，*Vibrio* 属とは生化学的性状やDNAのGC含量も異なることから新たにカンピロバクター属を創設した．現在本菌属には *C. fetus*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. sputorum* など各種の菌種が含まれるが，ヒトの下痢症の原因菌として注目されているのは *C. jejuni* と *C. coli* である．

Thermophilic campylobacter はすでに1957年にKing[3]により，25℃や37℃でよく発育する *C. fetus* とは異なり，25℃では発育せず，42℃でよく発育することが指摘されていた．また，Véron & Chatelain[4]は *C. fetus* と *C. jejuni* や *C. coli* とはナリジクス酸の感受性，ブリリアント・グリーンやTTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) に対する抵抗性が異なることを報告した．

* 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

一方，*C. jejuni* と *C. coli* の分類に関しては混乱がみられ，Smibert[5]は *C. fetus* subsp. *jejuni* と記載し，特に *C. coli* を区別しない分類を提案したが，その後 Harvey[6]，Leaper[7]，Belland ら[8]などによる DNA-DNA 相同性の実験により両者は異なった種として分けることが妥当であるとされてきた．また Skirrow & Benjamin[9]は，馬尿酸加水分解能によって，陽性株を *C. jejuni*，陰性株を *C. coli* と区別することを提案した．

著者らは，ヒトおよび動物由来の *C. jejuni* と *C. coli* の菌株を対象に，Véron & Chatelain らの提案した各種の生化学的性状，および Skirrow & Benjamin が指摘した馬尿酸加水分解性などの試験を実施し，両菌種の同定・分類に必要な試験法を再検討した．一方，本菌種は他の細菌に比べその生化学的活性が低く，従来の同定・分類法がそのまま応用できないという欠点がある．そこで化学的手法による菌体脂肪酸組成の分析についても検討したので，これらの成績について報告する．

方　法

1．供試菌株

C. jejuni は，当研究所で分離した集団および散発下痢症患者由来の 142 株，ウシ，ブタなどの家畜由来 39 株，およびニワトリ由来 47 株，イヌおよびネコ由来の 5 株，ならびに野鳥由来の 64 株の合計 297 株の新鮮分離株である．また対照として ATCC 29428 株および NCTC 11392 株を用いた（Table 1）．

C. coli は，ヒト由来の 29 株，ブタおよびウシ由来の 64 株そしてニワトリ由来の 9 株の合計 102 株の新鮮分離株である．ヒト由来株は主として散発下痢症患者および健康人から分離されたものである．対照株として，NCTC11366, NCTC11349, NCTC11350 および NCTC11353 株を用いた．

Benjamin ら[10]によって提唱されたナリジクス酸耐性の *C. laridis* は，海外旅行下痢症患者およびブタ由来の新鮮分離株の各 1 菌株である．

これらの比較のために *C. fetus* subsp. *fefus* の 8 菌株を用いた．その内訳は，ヒトやウシ由来の新鮮分離株 6 株と対照として用いた ATCC 27374 および ATCC 25936 株である．なお，上記の NCTC 11392 株は英国の Skirrow 博士（Worcester Royal Infirmary, Worcester）より，また NCTC 11366, NCTC 11349, NCTC 11350 および NCTC 11353 株は英国の Hill 博士（Central Public Health Laboratory, Colindale, London）より分与された．

2．生化学的性状試験

カタラーゼ試験は，微好気条件下で培養した普通寒天平板培養菌をスライドグラス上で 3 %H_2O_2液と反応させて行った．オキシダーゼ試験は，チトクロームディスク（栄研化学）を用いて行った．

馬尿酸加水分解試験は，Hwang & Ederer[11]の方法を改良して行った．すなわち，約 10^8個の菌体を 1 %馬尿酸ナトリウム水溶液 0.4 m*l* に浮遊させ，37℃ 2 時間反応後遠心分離した．その遠心上清に 0.1 m*l* のニンヒドリ

Table 1. *Campylobacter* strains studied

Species	Strain	Sourse					
		Human	Domestic animal	poultry	pet	Wild bird	Unkown
C. jejuni	ATCC 29428	1					
	NCTC 11392						1
	297 isolates	142	39	47	5	64	
C. coli	NCTC 11366*		1				
	NCTC 11349	1					
	NCTC 11350		1				
	NCTC 11353		1				
	102 isolates	29	64	9			
C. laridis	2 isolates	1	1				
C. fetus	ATCC 27374*		1				
subsp. *fetus*	ATCC 25936		1				
	6 isolates	2	2				2

* : Type strain

ン試薬（アセントとブタノールの等量混液にニンヒドリンを2％に溶解して調整）を加えて更に37℃2時間反応後判定した．紫色～暗紫色を呈したものを陽性，無色～淡青色のものを陰性とした．

各温度における菌の発育態度は，血液寒天平板（普通寒天にウマ脱線維血液を5％に加えて調整）に供試菌を接種して25℃，30℃，37℃，43℃および45℃で48時間微好気培養して判定した．また，各培地上での発育試験にはSS寒天，DHL寒天（日水製薬）およびマッコンキー寒天とB-CYE寒天（栄研化学）を用いた．

ナリジクス酸（Nalidixic acid, NA）感受性試験は，5％にウマ脱線維血液を加えたミューラーヒントン寒天平板（BBL）に供試菌を塗株後NAディスク（30 μg, Difco）を置いて37°C 48時間微好気培養後阻止帯形成を判定した．阻止円の直径が13mm以下のものを耐性，19mm以上のものを感受性とした．更にこのディスク法と同時に，血液を加えたミューラーヒントン寒天を用いた寒天希釈法によりナリジクス酸の最小発育阻止濃度（Minimal inhibitory concentration, MIC）も確認した．

グリシン培地での発育試験は，ブルセラ・ブロース(Gibco)にグリシンを1％加えた培地を用い，供試菌を接種した試験管に混合ガス（O_2：CO_2：N_2＝5：10：85）を噴入してゴム栓で密栓し，4日間振とう培養後本培地での発育の有無を観察した．0％NaClおよび1.0％NaCl存在下での発育態度は，無塩ペプトン水および1.0％食塩加ペプトン水に供試菌を接種後，上記のグリシンの場合と同様に微好気条件下で4日間振とう培養した．なお，1.5％および2.0％食塩に対する発育態度は，Skirrowら[12]に従って，ブルセラ寒天に各濃度の食塩を加えた寒天平板を用いて調べた．ブリリアント・グリーン，ブドウ糖，TTCおよび胆汁酸塩に対するtolerance testには，ブルセラ・ブロースに1.2％寒天を加えた基礎培地を用いた．これに各試薬を加えて寒天平板としたものを用い，供試菌接種後48時間微好気培養して判定した．硫化水素産生試験には，0.16％寒天加ブルセラ・ブロースを"Standard medium"とし，これに更に0.02％L・塩酸システィンを加えたものを"Sensitive medium"として試験管に分注した．これらの培地に被検菌を接種後，酢酸鉛を浸した濾紙を試験管内に懸垂して37℃2～4日間微好気培養後判定した．Iron mediumでの硫化水素産生試験は，1白金耳の培養菌をIron mediumに接種し，37°C 4時間培養後判定した．本培地はnutrient broth（Oxoid No.2）に0.12％の寒天と$FeSO_4 \cdot 7H_2O$, sodium metabisulphiteおよびsodium pyruvateをそれぞれ0.05％加えて調整した．DNA加水分解試験は，DNase Test Agar（栄研化学）に供試菌を接種後，48時間微好気培養し，判定は，培養寒天平板面に1N・塩酸を滴下して観察した．アルカリホスファターゼ活性は，市販の本酵素測定用キット（栄研化学）を用いた．

3．菌体脂肪酸組成の分析

菌体脂肪酸の分析はMossらの方法[13,14]に従った．ブレイン・ハート・インフュージョン寒天(Difco)平板で37°C, 48時間培養した菌体の10-20mgを0.5mlの滅菌蒸留水に懸濁し，スクリュー・キャップ付試験管に移した．3mlの水酸化ナトリウム-メタノール試薬（5％NaOH-50％メタノール水溶液）を加えて100°C, 30分加熱した．加熱後冷却した本反応液に6N・塩酸を加えてpH 2に調整し，更に3 mlの10％Boron trichloride methanol試薬（Applied Science Lab., Inc., Pennsylvania）を加え，80-85°Cの水溶中で30分間加熱した．冷却後，1mlの飽和食塩水を加え，10mlのエーテル-ヘキサン（1：1）混液で脂肪酸メチルエステルを抽出した．エーテル-ヘキサンで再度抽出してこれらを合わせ，N_2ガス下で静かに0.5mlまで濃縮した．本反応液に少量のNa_2SO_4を加えて脱水後，更に濃縮して約0.2mlとし試料とした．

脂肪酸メチルエステルは，インテグレーター（島津，C-R1A）を装着したガスクロマトグラフ（日立，GC-163）で分析し，検出はFID (Flame ionization detector)によった．カラムは2m（口径3mm）の充塡カラム（2％Silicone OV-101, 80-100 mesh Chromosorb W・AW-DMCS，ガスクロ工業）を用いた．カラム温度は140－200°Cまで2°C/minの割合で昇温した．キャリアー・ガスは，N_2を流速30ml/minで用いた．

脂肪酸メチルエステルの同定は，高純度に精製したメチルエステル・スタンダード（ガスクロ工業）を用いて，そのRetention timeの比較およびガスクロ・質量分析(Gas-mass spectrometry,日本電子，D300)によって行った．

結　果

1．標準菌株の生化学的性状

ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland)およびNCTC (National Collection of Type Culture, London, England)の標準株である*C. jejuni* 2株，*C. coli* 4株および*C. fetus* subsp. *fetus* 2株の生化学的性状をTable 2に示した．いずれの株も，オキシターゼ，カタラーゼ陽性で硝酸塩を還元し，sensitive mediumで硫化水素を産生した．Standard medi-

Table 2. Biochemical characteristics of the reference strains of *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* subsp. *fetus*

Characteristics	*C. jejuni*		*C. coli*				*C. fetus* subsp. *fetus*	
	ATCC 29428	NCTC 11392	NCTC 11366*	NCTC 11349	NCTC 11350	NCTC 11353	ATCC 27374*	ATCC 25936
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at :								
25 C	−	−	−	−	−	−	+	+
30 C	−	−	+	−	−	+	+	+
37 C	+	+	+	+	+	+	+	+
43 C	+	+	+	+	+	+	−	−
45 C	−	+	+	+	+	+	−	−
Hippurate hydrolysis	+	+	−	−	−	−	−	−
Nalidixic acid sensitivity (30μg)	S	S	S	S	S	S	R	R
Tolerance to :								
Brilliant green								
1 : 50,000	−	−	−	−	−	−	−	+
1 : 100,000	−	−	−	+	+	+	+	+
1 : 200,000	−	+	+	+	+	+	+	+
Glucose 8.0%	−	−	−	−	−	−	−	−
Glycine 1.0%	+	+	+	+	+	+	+	+
TTC (400$\mu g/ml$)	+	+	+	+	+	+	−	−
Bile salt 1.0%	−	+	−	−	−	−	+	+
〃 2.0%	−	+	−	−	−	−	+	+
NaCl (P)[a] 0%	−	−	−	−	−	−	NT	NT
〃 1.0%	+	+	+	+	+	+	NT	NT
NaCl (B)[b] 1.5%	−	+	+	+	+	+	+	+
〃 2.0%	−	−	−	−	−	−	−	+
Production of H_2S in :								
Standard medium	+	+	+	+	+	+	−	−
Sensitive medium	+	+	+	+	+	+	+	+
Iron medium	−	+	−	−	−	−	−	−
Growth on :								
SS agar	−	−	−	−	−	−	−	−
DHL agar	−	−	+	+	+	+	+	+
MacConkey agar	−	+	+	−	−	−	+	+
CYE agar	+	+	+	+	+	+	NT	NT
DNA hydrolysis	−	−	+	−	−	−	−	−
Alkaline phosphatase	+	+	+	+	−	+	−	−

a : Peptone water, b : Brucella agar, S=sensitive, R=resistant, NT : Not test, * : Type strain

um では *C. jejuni* および *C. coli* の6株は硫化水素を産生したが，*C. fetus* の2株は産生しなかった．Iron medium では Skirrow[9]の提案した Biotype 2 に該当する *C. jejuni*, NCTC 11392 株のみが硫化水素を産生した．馬尿酸加水分解陽性の *C. jejuni* と陰性の *C. coli* のいずれの株も無塩ペプトン水中では発育しないが，1％食塩加ペプトン水や1％グリシン存在下では発育した．8％ブドウ糖加寒天ではいずれの株も発育しなかった．両菌種とも 25°C では発育せず，30°C では *C. coli* の1株のみが発育し，43°C では全株が発育した．ナリジクス酸 (disc,30 μg) に対しては感受性である．TTC (400 μg/m*l*) 加寒天平板では両菌種とも発育したが，*C. fetus* の2菌株は発育しなかった．また 1.5％ NaCl 加寒天上では，*C. jejuni*, ATCC 29428 株以外の *C. jejuni*, *C. coli* および *C. fetus* の全株が発育した．

ブリリアント・グリーン（1：200,000）に対しては，*C. jejuni*, ATCC 29428 株のみが感受性であった．胆汁酸塩（1％）加寒天平板では *C. jejuni*, NCTC11392 株と *C. fetus* の2株は発育したが他の *C. jejuni* および *C. coli* 株は発育しなかった．SS 寒天平板上ではいずれの株も発育しなかった．DHL 寒天平板上では，*C. jejuni* は発育できなかったが，*C. coli* は発育した．しかし，マッコンキー平板上では *C. coli* に対する発育抑制が強く，4株中1株が発育したにすぎない．*C. fetus* は両方の平板上で発育した．CYE 寒天上では，いずれの株も発育した．

DNA 加水分解能は，*C. coli*, NCTC11366 株のみが陽性で，他は陰性であった．またアルカリホスファターゼは *C. coli*, NCTC11350 株のみが陰性で，他の株はすべて陽性であった．

2．*C. jejuni*, *C. coli* および *C. laridis* の生化学的性状の比較

新鮮分離の *C. jejuni*, 297 株，*C. coli*, 102 株，*C. laridis*, 2株および *C. fetus* subsp. *fetus*, 6株の性状を Table 3 に示した．45℃における *C. jejuni* と *C. coli* の発育態度にはほとんど差異を認めなかった．30℃の温度条件では，*C. jejuni* 297 株中3株（1.0%）が発育したにすぎなかったが，*C. coli* では 102 株中 25 株(24.5%) が発育した．

ナリジクス酸耐性の thermophilic campylobacter である *C. laridis* の2株は，30℃と 43℃，45℃で両株とも発育した．*C. jejuni* は一般にナリジクス酸感受性であるが，供試菌株 297 株中5株は耐性であった．本菌株の MIC (Minimal inhibitory concentration) は，50～100 μg/m*l* 以上であった．*C. laridis* に対するナリジクス酸の MIC は極めて高く，2菌株とも 100 μg/m*l* 以上であった．

ブリリアント・グリーン寒天平板では，*C. jejuni* は *C. coli* に比して低濃度のブリリアント・グリーンで発育の抑制を受けた．すなわち，1/200,000 の濃度で *C. coli* の 76％の株が発育したが，*C. jejuni* は 28％が発育したにすぎなかった．*C. laridis* の2株は 1/100,000 の濃度で発育した．色素に対する tolerance test としては，このほかフクシン，メチレン・ブルー，クリスタル・バイオレットなど9種類の色素についても検討したが，*C. jejuni* と *C. coli* との間に各色素に対する tolerance の差異は認められなかった．

グリシン（1％）培地では，*C. jejuni*, *C. coli* および *C. laridis* の全株が発育した．TTC（400 μg/m*l*）寒天上では，*C. coli* や *C. laridis* のほとんど全株が発育したが，*C. jejuni* では 297 株中 37 株（12.5％）は発育できなかった．

1.5％食塩を含む寒天上で，*C. jejuni* はほとんど発育せず．*C. coli* もその 11％が発育したにすぎなかった．

Stndard medium や Sensitive medium での硫化水素産生性は *C. jejuni*, *C. coli* および *C. laridis* のいずれもが陽性であった．Skirrow & Benjamin らが使用している Iron medium では *C. jejuni* の 34 株中 4 株（11.8％）が陽性であった．

SS 寒天，DHL 寒天およびマッコンキー寒天での発育状況は前記の標準菌株の場合ほぼ同じ態度を示した．すなわち，*C. jejuni* は DHL 寒天上ではほとんど発育しなかったが，*C. coli* は 72%が発育した．マッコンキー寒天では，*C. jejuni*, *C. coli* ともその 10～30％が発育し，両者に発育態度の差異は認められなかった．*C. laridis* の2株はいずれも DHL 寒天やマッコンキー寒天で発育した．胆汁酸に対する抵抗性は DHL 寒天上での成績とは異なり，*C. jejuni* は胆汁酸1％の濃度で 62％が，2％の濃度で 15％が発育したが，*C. coli* は前者の濃度で 25％，後者の濃度で 6％が発育したにすぎなかった．このことより DHL 寒天上での発育は単に胆汁酸に対する抵抗性によって規定されているのではないと考えられる．レジオネラの選択分離培地である CYE 寒天では全株が発育した．

C. jejuni と *C. coli* でアルカリホスファターゼの反応性にほとんど差はなく，それぞれ 62%, 76%が陽性であった．DNA 加水分解能は，*C. jejuni* の約 40%が，そして *C. coli* ではわずかに 5％が陽性であった．

C. fetus subsp. *fetus* 6菌株の性状は，前記の *C. fetus*

Table 3. Biochemical characteristics of *Campylobacter* isolates

Characteristics	*C. jejumi* (n=297)[c]	*C.coli* (n=102)	*C. laridis* (n=2)	*C. fetus* subsp. *fetus* (n=6)
Oxidase	+(100)[e]	+(100)	+(100)	+(100)
Catalase	+(100)	+(100)	+(100)	+(100)
Nitrate reduction	+(100)	+(100)	+(100)	+(100)
Growth at :				
25 C	−(0)	−(0)	−(0)	+(100)
30 C	−(1.0)	d (24.5)	+(100)	+(100)
37 C	+(100)	+(100)	+(100)	+(100)
43 C	+(100)	+(100)	+(100)	−(0)
45 C	d (82.4)*	d (87.5)**	+(100)	−(0)
Hippurate hydrolysis	+(100)	−(0)	−(0)	−(0)
Nalidixic acid sensitivity (30 μg)	S (98.3)	S (100)	R (0)	R (0)
Tolerance to :				
Brilliant green				
1 : 50,000	−(0)	−(0)	−(0)	d (33.3)
1 : 100,000	−(5.9)*	d (31.3)**	+(100)	+(100)
1 : 200,000	d (27.6)	d (75.5)	+(100)	+(100)
Glucose 8.0%	−(0)	−(0)	−(0)	−(0)
Glycine 1.0%	+(100)	+(100)	+(100)	+(100)
TTC (400 μg/ml)	d (87.5)	+(99.0)	+(100)	−(0)
Bile salt 1.0%	d (61.8)*	d (25.0)**	d (50.0)	+(100)
〃 2.0%	d (14.7)*	−(6.3)**	d (50.0)	+(100)
NaCl (P)[a] 0%	−(0)	−(0)	−(0)	NT
〃 1.0%	+(100)	+(100)	+(100)	NT
NaCl (B)[b] 1.5%	−(5.4)	d (11.8)	d (50.0)	d (33.3)
〃 2.0%	−(0)	−(0)	−(0)	d (16.7)
Production of H_2S in :				
Standard medium	+(100)	+(100)	+(100)	−(0)
Sensitive medium	+(100)	+(100)	+(100)	+(100)
Iron medium	d (11.8)*	−(0)**	NT	NT
Growth on :				
SS agar	−(0)*	d (18.8)**	−(0)	−(0)
DHL agar	−(5.4)	d (71.6)	+(100)	+(100)
MacConkey agar	d (29.4)*	d (12.5)**	+(100)	+(100)
CYE agar	+(100)	+(100)	+(100)	NT
DNA hydrolysis	d (40.1)	−(4.9)	−(0)	−(0)
Alkaline phosphatase	d (62.3)	d (75.5)	d (50.0)	−(0)

a : Peptone water, b : Brucella agar, c : The number of strains tested,
e : +=90−100% d=11−89%, −=0−10%, S=sensitive, R=resistant, NT=not test,
( )=positive %, * : 34 strains were tested, ** : 16 strains were tested.

ATCC27374, ATCC25936の両菌株の性状とほぼ同一であった.

3. ***C. jejuni* と *C. coli* の菌体脂肪酸パターン**

C. jejuni, CF 1株を血液寒天, ブレイン・ハート・インフュージョン(BHI)寒天, BHIブイヨンでそれぞれ37℃および42℃で培養し, その菌体脂肪酸組成を比較検討した. その成績は Table 4 に示すごとく, 本菌の主要な菌体脂肪酸は, tetradecanoic acid(14：0), hexadecenoic acid (16：1), hexadecanoice acid (16：0), octadecenoic acid (18：1) および 19-carbon-cyclopr-

Table 4. Cellullar fatty acid composition of *C. jejuni*, strain CF 1 cultured under different conditions

Media	Temperature	Fatty acid (as % of total)[a]					
		3-OH 14:0	14:0	16:1	16:0	18:1	19-cyc[b]
Blood agar	37 C	−	21	5	38	8	22
BHI agar	37 C	−	8	4	34	26	15
BHI broth	37 C	−	12	5	31	37	12
Blood agar	42 C	−	20	3	42	6	21
BHI agar	42 C	−	8	4	35	28	18
BHI broth	42 C	−	8	4	21	49	11

a : Peaks with area more than 2% are recorded.
b : cyc=cyclopropane acid.

Table 5. Cellular fatty acid composition of *C. jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* subsp. *fetus*

Species	Strain	Fatty acid (as % of total)[a]				
		14:0	16:1	16:0	18:1	19-cyc
C. jejuni						
Skirrow's biotype 1	ATCC 29428	2	2	34	33	16
	CF 1	8	4	34	26	15
	29 isolates	11± 3[b]	6± 2	42± 7	27± 8	13± 6
		(6−18)	(4−11)	(34−67)	(6−43)	(4−29)
Skirrow's biotype 2	NCTC 11392	14	8	30	12	28
	4 isolates	12± 3	5± 1	44±14	13± 5	23± 6
		(7−14)	(3−7)	(33−68)	(5−19)	(14−29)
C. coli	NCTC 11366	5	4	48	23	21
	NCTC 11349	8	6	67	17	2
	NCTC 11350	7	5	40	17	29
	NCTC 11353	9	5	46	22	18
	16 isolates	7± 3	4± 1	49±16	23±12	13± 9
		(2−12)	(Trace−6)	(33−81)	(4−44)	(2−30)
C. fetus subsp. *fetus*	ATCC 25936	15	37	27	21	−
	ATCC 27374	10	25	32	33	−
	6 isolates	12± 4	29± 5	33± 4	26± 6	−
		(8−19)	(19−36)	(29−41)	(14−31)	−

a : Peaks with area more than 2% are recorded.
b : Mean value ± standard deviasion, ( ) ; range among strains.

opane acid (19 - cyc) の5種類であった. 血液寒天で培養した場合に, BHI 寒天や BHI ブイヨンの場合と比べ, $C_{14:0}$ の含量が多く, $C_{18:1}$ の含量が少ない成績であった. しかし, 37°C と 42°C の培養温度における菌体脂肪酸には質的にも量的にもほとんど差異は認められなかった.

以下の実験では, 培地中の血液成分の影響を避けるために BHI 寒天を, また対照に *C. fetus* を用いているので供試菌の培養温度は 37℃として, 脂肪酸の分析を行った.

供試菌株 64 株の菌体脂肪酸組成を Table 5 にまとめた. また, 各菌種の代表株として *C. jejuni*, CF1, *C. coli*,

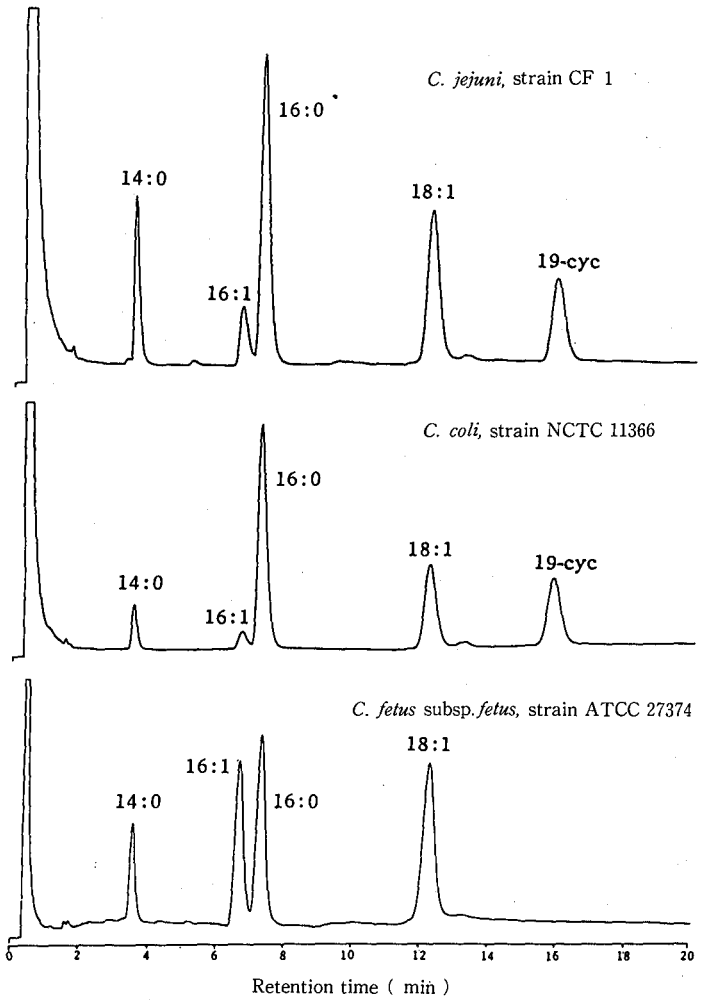


Fig. 1. Gas chromatograms of the esterified fatty acids of representative strains of *C. jejuni* (top), *C. coli* (middle) and *C. fetus* subsp. *fetus* (bottom)
Column : Glass column (3 mmϕ× 2 m) with 2 % OV-101-coated Chromosorb W・AW-DMCS (80-100 mesh).
Column temperature : 140-200°C (increased at a rate of 2 °C/min).
Carrier gas : N_2(30 m*l*/min).
Detector : Flame ionization detector.
Instrument : Hitachi GC-163.

NCTC11366 および *C. fetus* subsp. *fetus*, ATCC27374 株のガスクロマトグラムを Fig.1 に示した.

C.jejuni や *C. coli* の菌体脂肪酸としては, $C_{16:0}$ が最も多く, 次いで $C_{18:1}$, 19-cyclopropane acid, $C_{14:0}$ であり, 少量の $C_{16:1}$ が検出された. 36 株の *C. jejuni* には 26 種の異なる血清型菌が含まれているが, 基本的には全株とも同じパターンを示し, Fig. 1 に示した *C. jejuni*, CF 1 株と同様であった. *C. coli* の 20 株も異なった血清型を示す菌株であったが, 菌株間に脂肪酸パターンの差異は認められず, *C. coli*, NCTC 11366 株とそれと同様であった. Skirrow らによって提案された *C. jejuni* の生物型 1 (Iron medium で硫化水素非産生) と生物型 2 (同培地で硫化水素産生) の菌株間では菌体脂肪酸組成に差異は認められなかった.

しかし, *C. jejuni* や *C. coli* の脂肪酸パターンは *C. fetus* subsp. *fetus* のそれとは異なった. *C. fetus* subsp. *fetus* の 8 株について検討した成績では, *C. jejuni* や *C. coli* で認められた 19-carbon-cyclopropane acid が検出されなかった. また, $C_{16:0}/C_{16:1}$ の比が 2 以下であり, 同比が 5 以上である *C. jejuni* や *C. coli* とは違いが認められた.

考　　察

Véron & Chatelain は *Campylobacter* 属に含まれる *C. fetus*. *C. jejuni*, *C. coli* および *C. sputorun* の相互間の生化学的性状を検討し, それまで混乱していた本菌属の分類を明確にした. 彼らは thermophilic campylobacter をブリリアント・グリーン寒天 (1 : 100,000) および 8 %ブドウ糖加ブイヨンでの発育態度によって *C. jejuni* と *C. coli* に区別した. 一方 Skirrow & Benjamin は Véron & Chatelain の提案とは別途に馬尿酸加水分解性によって両菌種を区別できることを報告した.

今回は, ヒトや各種動物由来の thermophilic campylobacter 407 株について各種の生化学的性状を調べ, Véron & Chatelain が提案した分類基準と Skirrow & Benjamin の分類基準とを比較検討した.

C. coli の標準菌株である NCTC11366 株のブリリアント・グリーンや 8 %ブドウ糖に対しての発育態度は, *C. jejuni* の標準菌株である ATCC29428 株の場合とほとんど同一で, Véron らの示した生化学的性状により両種を鑑別することは困難であった. またこの他の *C. coli*, NCTC11349, NCTC11350, NCTC11353 株および *C. jejuni*, NCTC11392 株においてもすべて 8 %ブドウ糖加寒天上で発育せず, ブドウ糖に対する tolerance により *C. jejuni* と *C. coli* とを区別することができなかった.

一方, Skirrow らが報告したごとく, *C. coli* の標準菌株 NCTC11366 株は馬尿酸陰性であるのに対し, *C. jejuni* の標準株 ATCC29428 株は陽性であることを確認した.

馬尿酸加水分解性をキー性状として分離株を *C. jejuni* と *C. coli* に区別してその生化学的性状を比較検討した結果, 本性状以外は極めて類似していた. ただし, DHL 寒天とブリリアント・グリーン加寒天における発育態度および DNA 加水分解性において若干の違いが認められた. すなわち, *C. jejuni* は DHL 寒天上ではほとんど発育できないのに対して, *C. coli* は約 72%の菌株が発育した. またブリリアント・グリーン 1/200,000 の濃度で *C. jejuni* の多くの菌株が発育を抑制されたのに対して, *C. coli* の約 76%の菌株は抑制を受けず, その抵抗性に相違が認められた. DNA 加水分解性は, *C. jejuni* の約 40%が陽性, *C. coli* の約 5 %が陽性で, *C. jejuni* に本性状陽性株が多い傾向があった. しかし, これらの諸性状で *C. jejuni* と *C. coli* とを区別することは困難であり, 両菌種の鑑別は馬尿酸加水分解性が唯一のよりどころである. アルカリホスファターゼは, *C. jejuni* の 62%, *C. coli* の 76%が陽性であり, 両菌種に差異は認められなかった.

しかし, DHL 寒天やブリリアント・グリーン寒天上での発育態度およびアルカリホスファターゼは菌株の由来によってやや異なった態度を示した. *C. coli* の多くの菌株は DHL 寒天上で発育したが, ブタやニワトリ由来の *C. coli* はその全株が発育しなかった. また, ニワトリ由来の *C. coli* はブリリアント・グリーン寒天でも発育する菌株が少なかった. アルカリホスファターゼでは, 野鳥由来の *C. jejuni* の陽性率は 2 %と他に比べて低く, *C. coli* ではヒト由来株が低い値であった. この様にその由来による生化学的性状の差異は, 現在提案されている種々の生物型の問題と合わせて興味ある点である[12,15].

Leaper & Owen[16]も馬尿酸加水分解性により *C. jejuni* と *C. coli* に分類して, この両菌種間の諸生化学的性状を比較しているが, 本性状以外ではこの両菌種を区別できないことを報告している.

菌体脂肪酸パターンは, *C. jejuni* と *C. coli* とは同一脂肪酸が認められ, 本成績からも両者を区別できなかった. この成績は, Leaper & Owen[16]の報告した成績とほぼ一致した. しかし, Blaser ら[14]は *C. jejuni* の菌体脂肪酸として $C_{14:0}$, $C_{16:1}$, $C_{16:0}$, $C_{18:1}$ および 19-cyc の他に, 3-hydroxy-tetradecanoic acid (3-OH-$C_{14:0}$) も検出

しており，この点が今回の成績と異なった．この理由は，実験条件特にガスクロマトグラフィーの条件と供試菌体の差によるものと考えられる．

一方，*C. fetus* subsp. *fetus* の示す脂肪酸パターンは *C. jejuni* や *C. coli* のものとは異なっており，シクロプロパン酸（19-cyc）が認められないこと，および $C_{16:0}/C_{16:1}$ の比が2以下であることによりこれら両菌種から区別された．

C. laridis の菌体脂肪酸について今回は検討しなかったが，米国の Moss 博士(Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia)との共同研究の成績では，*C. laridis* の脂肪酸パターンは *C. jejuni* グループと *C. fetus* グループの中間型であった．すなわち，*C. laridis* では *C. jejuni* グループで認められた 19-cyc が検出されず *C. fetus* グループに近いが，$C_{16:0}/C_{16:1}$ の比は5以上と高く，またこの他の脂肪酸組成も *C. jejuni* と同様のものであった[17]．

カンピロバクターは生物学的活性が極めて低いため，腸内細菌の同定に常用されている生化学的性状試験を応用することが困難である．また本菌に用いられる性状試験においても，しばしば陽性・陰性の判定が難しい菌株が存在する．更に本菌の発育は他の腸内細菌に比べて遅く，同定までに日数を要する．一方，菌体脂肪酸の分析は培養菌よりその脂肪酸パターンを得るまでに数時間あれば可能であり，また *C. jejuni* や *C. coli* は他の菌種とは異なる脂肪酸組成を示すことより，本方法はカンピロバクターの同定・分類のための簡易・迅速法として有効な方法であると思われる．

結　論

ヒトや各種動物由来の thermophilic campylobacter の407株について種々の生化学的性状を調べ，Véron & Chatelain が提案した分類基準と Skirrow & Benjamin の分類基準とを比較検討した．その結果，Véron らの示した生化学的性状により *C. jejuni* と *C. coli* とを鑑別することは困難であった．一方，Skirrow らが報告したごとく，馬尿酸加水分解性をキー・性状として分離株を *C. jejuni* と *C. coli* に区別してその生化学的性状を比較検討した結果，両菌種では馬尿酸加水分解性以外の諸性状は極めて類似していた．ただし，DHL 寒天とブリリアント・グリーン加寒天における発育態度およびDNA加水分解性において若干の違いが認められた．

次に，菌体脂肪酸の分析を行った結果，*C. jejuni* や *C. coli* では $C_{14:0}$, $C_{16:1}$, $C_{16:0}$, $C_{18:1}$ および C_{19-cyc} が認められたが，両菌種間の脂肪酸パターンは同一であり，両者を区別できなかった．しかし，*C. fetus* subsp. *fetus* の示す脂肪酸パターンは *C. jejuni* や *C. coli* のものとは異なっていた．

文　献

1) Smith, T. and M.S. Taylor : *J. Exp. Med.*, 30, 299, 1919
2) Sebald, M. and M. Véron : *Ann. Inst. Pasteur*. 105, 897, 1963
3) King, E. O. : *J. Infect. Diseases*., 101, 119, 1957
4) Véron, M. and R. Chatelain : *Int. J. Syst. Bacteriol*., 23, 122, 1973
5) Smibert, R. M. : *Ann. Rev. Microbiol*., 32, 673, 1978
6) Harvey, S. M. and J. R. Greenwood : *Int. J. Syst. Bacteriol*., 30, 7, 1980
7) Leaper, S. and R. J. Owen : *FEMS Microbiology Letters*, 15, 203, 1982
8) Belland, R. J. and T. J. Trust : *J. Gen. Microbiol.*, 128, 2515, 1982
9) Skirrow, M. B. and J. Benjamin : *J. Clin. Path.*, 33, 1122, 1980
10) Benjamin, J., S. Leaper, R. J. Owen and M. B. Skirrow : *Current Microbiology*, 8, 231, 1983
11) Hwang, M. and G. M. Ederer : *J. Clin. Microbiol.*, 1, 114, 1975
12) Skirrow, M. B. and J. Benjamin : *J. Hyg., Camb.*, 85, 427, 1980
13) Moss, C. W. : *J. Chromatogr.*, 203, 337, 1981
14) Blaser, M. J., C. W. Moss and R. E. Weaver : *J. Clin. Microbiol.*, 11, 448, 1980
15) Hébert, G. A., D. G. Hollis, R. E. Weaver, M. A. Lambert, M. J. Blaser and C. W. Moss : *J. Clin. Microbiol.*, 15, 1065, 1982
16) Leaper, S. and R. J. Owen : *Current Microbiol.*, 6, 31, 1981
17) Moss, C.W.,A.Kai, M.A.Lambert and C.Patton : *J. Clin. Microbiol.*, 19, 772, 1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 18-21, 1984

土壌における *Clostridium perfringens* の分布と分離菌株の血清型およびエンテロトキシン産生性について

稲葉 美佐子*, 伊藤 武*

Distribution of *Clostridium perfringens* in Soil and Enterotoxigenicity of Isolates

MISAKO INABA* and TAKESHI ITOH*

Keywords: ウェルシュ菌 *Clostridium perfringens*, 土壌 soil, 分布 distribution, 血清型 serotype, エンテロトキシン enterotoxin, 芽胞 spore

緒　言

ウェルシュ菌による食中毒は東京都内で年間数例の発生があり，1963年～1983年の21年間で計39事例が認められている[1]．これらの事例の原因食品はブタやニワトリなどの食肉あるいは魚介類の加熱調理食品がほとんどである．このことはウェルシュ菌がウシやブタなどの動物の腸管内に高率に保菌されていることから，原因食品中のウェルシュ菌は，これらの動物に由来するものと考えられている．

一方，ウェルシュ菌は動物の腸管内の他に，土壌中にも広く分布していることから，本菌の土壌から食品への汚染も否定できない．また，魚介類から検出される本菌は海水や海底土壌に由来するものと考えられる．

今回は土壌中に分布するウェルシュ菌とヒトとの関連性を調べるために各種の土壌を対象に本菌の検索を行い，分離菌株については血清型とエンテロトキシン産生性を検討した結果，若干の知見を得たので報告する．

材料および方法

1．土壌の採取場所

1982年9月～10月に東京都内および近郊の畑（2ヵ所），河川（2ヵ所），宅地周辺（2ヵ所），林（1ヵ所）および池（1ヵ所）の計8ヵ所の採取地点について，各々5件の土壌を50～100g採取した．なお採取にあたり，表層部約10cmを除去し，その下層の土壌を採取した．

2．土壌からのウェルシュ菌分離

土壌10gに0.1%ペプトン加生理食塩水90m*l*を加え乳剤とした．本乳剤の0.1m*l*を200μg KM加卵黄CW寒天（以下KMEYCWと略す）（日水製薬）に塗沫し，37℃24時間嫌気培養した．

耐熱性芽胞形成ウェルシュ菌を検索するために，上記土壌の10倍希釈乳剤の1.0m*l*をチオグリコレート培地（栄研化学）2本に接種し，一方を100℃10分間，他方を100℃60分間加熱処理を行い，流水で急冷後37℃18～24時間培養した．この増菌培養液をKMEYCWに塗沫し，ウェルシュ菌の検索を行った．

3．土壌からのウェルシュ菌の定量培養

土壌に分布するウェルシュ菌を定量的に把握するために，土壌の10倍希釈乳剤を0.1%ペプトン加生理食塩水で10倍段階希釈し，各希釈液の0.1m*l*をKMEYCWに塗沫し，37℃24時間嫌気培養し，発育したウェルシュ菌様集落を算出した．

4．ウェルシュ菌の生化学的性状試験

分離菌株について，レシチナーゼ・インドール・牛乳凝固・ゼラチン液化・硝酸塩還元・炭水化物分解およびα抗毒素血清によるレシチナーゼ抑制の各試験を実施した．なお牛乳凝固はスキムミルク培地（Difco：リトマスミルク）を使用した．インドール，硝酸塩還元能，炭水化物分解能試験にはGAM糖分解用半流動培地（日水製薬）を基礎培地として使用し，各々常法に従って培地を作製した．α抗毒素血清によるレシチナーゼ抑制試験は，α抗毒素血清含有濾紙（日水製薬）を用いる方法によった．

5．ウェルシュ菌の血清型別

分離菌株のEYCW平板で培養した菌苔を用いて

* 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

Hobbsの血清型(1～17型：デンカ生研)および著者ら[2]がHobbsの血清型に追加したTWの血清型(1～60型)の抗血清を用いて，のせガラス凝集反応によって行った．

6．ウェルシュ菌のエンテロトキシン産生性

Cooked meat培地に保存した分離菌株をチオグリコレート培地に接種し，37℃24時間培養した．この培養液を70℃10分間または75℃20分間の加熱処理を行い，エンテロトキシン産生用の培地に接種した．エンテロトキシン産生用培地としては，DS培地[3]およびTórtoraの培地[4]を用いた．両培地で37℃16～18時間培養後の遠心上清を被検材料とした．被検材料からのエンテロトキシン検出は逆受身ラテックス凝集反応(PET-RPLA：デンカ生研)によった．すなわち被検材料を希釈液で2倍段階希釈し，V型マイクロタイター用トレイに0.025m*l*ずつ分注し，これにエンテロトキシンの抗体を感作させたラテックスを等量加え，振とう器でよく撹拌した後，室温で15～18時間反応後凝集の有無を観察した．

なお，DS培地とTórtoraの培地で培養した菌液について芽胞形成の状況を位相差顕微鏡によって観察した．

成　績

1．土壌からのウェルシュ菌検出状況

土壌からのウェルシュ菌検出状況およびウェルシュ菌数を表1に示した．採取した土壌40件中非加熱では19件(47.5%)からウェルシュ菌が検出された．100℃10分の加熱処理では7件(17.5%)，100℃60分の加熱処理ではわずか3件（7.5%）が陽性にすぎなかった．

採取地点別にみた場合，畑A，林C，宅地Eで採取した土壌では全例ともウェルシュ菌が陽性であった．畑Bの土壌からはウェルシュ菌は検出されなかった．河川Fでは，非加熱材料は陰性であったが，100℃10分の加熱処理土壌の2例から本菌が検出された．

2．土壌中のウェルシュ菌数

土壌中のウェルシュ菌数を平板法で検討した結果，表1に示すごとく，非加熱で陽性であった19例の土壌1g中1.8×10^2～4.0×10^4で平均3.6×10^3個であった．

採取地点別にみた場合，宅地Eでやゝ菌数が多い傾向であったが，全体的にはほとんど差異がみられなかった．

3．分離菌株の生化学的性状

土壌より非加熱で分離された27株，100℃10分の加熱処理で分離した13株および100℃60分の加熱処理で分離の6株の計46株について各種生化学的性状試験を行った．その成績を表2に示した．いずれの菌株もレシチナーゼを産生し，ゲラチンを液化する典型的なウェルシュ菌であった．但し非加熱の材料から分離された1菌株ならびに100℃60分加熱処理分離の1菌株は10%ゼラチン寒天ではゼラチンの液化がみられなかった．また，これらの他に土壌から分離されたレシチナーゼ陽性およびα抗毒素血清により本反応が抑制された菌株のうち2菌株はゼラチンを全く液化せず*C.paraperfringens*と考えられた．

4．分離菌株の血清型

土壌から分離したウェルシュ菌46菌株についてHobbsの血清型および著者らのTWの血清型によって型別を行った．表3に示したように，非加熱分離菌株27菌株中15株がHobbsの血清型，6菌株がTWの血清型に該当した．100℃10分加熱処理分離菌株では，13菌株がHobbsの血清型に該当した．100℃60分加熱処理材料から分離した6菌株中2株がHobbsの血清型に，また

表1．土壌からのウェルシュ菌検出状況

採取場所		ウェルシュ菌陽性数（n=5）			ウェルシュ菌生菌数／g（平均）
		非加熱	加熱処理		
			100℃10分	100℃60分	
畑	A	5	1	1	2.0×10^2～3.6×10^3 （1.1×10^3）
	B	0	0	0	0
林	C	5	0	0	4.0×10^2～4.0×10^3 （1.8×10^3）
宅地	D	2	4	2	2.0×10^2～4.0×10^3 （2.1×10^3）
	E	5	0	0	1.8×10^2～4.0×10^4 （1.6×10^4）
河川	F	0	2	0	0
	G	1	0	0	2.0×10^2 （2.0×10^2）
池	H	1	0	0	4.0×10^2 （4.0×10^2）
計		19	7	3	1.8×10^2～4.0×10^4 （3.6×10^3）

表2．土壌より分離されたウエルシュ菌の生化学的性状

性状	非加熱 (n=27) +(%)	100°C10分加熱 (n=13) +(%)	100°C60分加熱 (n=6) +(%)
運動性	0	0	0
レシチナーゼ	27(100)	13(100)	6(100)
インドール	0	0	0
牛乳凝固	27(100)	13(100)	6(100)
ゼラチン 2%	27(100)	13(100)	6(100)
10%	26(96.3)	13(100)	5(83.3)
レシチナーゼ抑制	27(100)	13(100)	6(100)
炭水化物分解			
グルコース	27(100)	13(100)	6(100)
ラクトース	27(100)	13(100)	6(100)
シュークロース	27(100)	13(100)	6(100)
マルトース	27(100)	13(100)	6(100)
サリシン	10(37.3)	2(15.4)	3(50.0)
ラフィノース	24(88.9)	12(92.3)	6(100)
イノシット	23(85.2)	6(46.2)	5(83.3)
デンプン	26(96.3)	7(53.8)	6(100)
トレハロース	23(85.2)	11(84.6)	4(66.7)

表3．土壌から分離されたウェルシュ菌の血清型

血清型		分離方法 非加熱	100°C10分	100°C60分	計
Hobbs*	2	3	2	—	5
	3	1	—	—	1
	5	6	3	1	10
	8	1	1	—	2
	9	1	1	1	3
	10	1	—	—	1
	13	—	4	—	4
	16	2	2	—	4
TW*	1	1	—	—	1
	7	—	—	2	2
	11	1	—	—	1
	18	2	—	—	2
	28	1	—	—	1
	37	1	—	—	1
	47	—	—	1	1
型別不能		6	—	1	7
計		27	13	6	46

*Hobbsの血清型，TWの血清型

3株がTWの血清型に該当した．比較的多く認められた血清型はHobbs型の5，2，13，16であった．

5．分離菌株のエンテロトキシン産生性

土壌由来の45菌株について，芽胞形成培地であるDS培地とTórtoraの培地に接種し，37℃16～18時間培養後，培養上清からエンテロトキシン産生性を検討した．表4に示したように非加熱分離株，100℃10分および60分加熱処理分離株のいずれにおいても，エンテロトキシンの産生性はすべて陰性であった．なお，この際，両培地あるいはどちらか一方の培地で芽胞が確認された菌株は14菌株(31.1%)であり，芽胞形成が極めて悪かった．

表4．土壌から分離したウェルシュ菌のエンテロトキシン産生性

由来	供試菌株	in vitroにおける芽胞形成(%)	エンテロトキシン産生性
非加熱	26	8(30.8)	0
100°C10分加熱処理	13	6(46.2)	0
100°C60分加熱処理	6	0	0
計	45	14(31.1)	0

考察

土壌中には*Clostridium*属の各種の菌が常在していることが知られている．なかでもウェルシュ菌はあらゆる地域の土壌に分布している[5]．我が国の調査でも，今村[6]は鹿児島市内の土壌ではウェルシュ菌が38%より検出され，台湾の各地の土壌では54%が本菌陽性であった．またMiwa[7]は人が生活していない南極の土壌からも31件中21件（67.7%）にウェルシュ菌を認めている．

著者らは東京都内あるいは近郊の畑・河川・池・林・宅地の土壌を対象に本菌の分布をみると同時に，分離菌株のエンテロトキシン産生性を調べ，本菌食中毒予防の観点から検討を行った．今回8ヵ所の地域の土壌を対象にした結果，7ヵ所の地域よりウェルシュ菌が検出された．本菌が検出されなかった地域は畑土であって，畑に施された化学肥料などの影響も考慮する必要があろう．河川の土壌では本菌陽性率が低かったが，これは常時水で洗い流されている砂地であった．すなわち，土壌中の本菌分布は土質による影響が大であろう[8]．土壌中のウェルシュ菌数は1 g当り10^2～10^4個であった．小西ら[5]や今村[6]の調査成績ではほとんどが100個以下であり，著者らの成績の方がやゝ高い菌量であった．Smithら[9]の

報告では土壌1g当りのウェルシュ菌量は1.1×10^2～5.7×10^4個であった.

土壌に分布するウェルシュ菌の大部分は易熱性芽胞形成ウェルシュ菌と思われた. 但し100℃10分に抵抗性のウェルシュ菌が17.5%, 100℃60分の加熱に耐える芽胞形成ウェルシュ菌が7.5%検出された. すなわち土壌中にも食中毒の原因になりやすい100℃60分の加熱に抵抗する耐熱性ウェルシュ菌が低頻度ではあるが分布していたことは注目する必要があろう.

土壌からのウェルシュ菌分離後に, レシチナーゼ陽性でα抗毒素血清によって本反応が中和されるウェルシュ菌様菌株が2菌株認められた. 本菌株はゼラチンを液化しないことから, 西田ら[10]によって明らかにされた *C. paraperfringens* であると考えられる. 土壌からのウェルシュ菌検索にはゼラチン液化性やラフィノース, イノシットなど各種の生化学的性状試験を実施する必要があろう.

土壌に分布するウェルシュ菌が食品を汚染する危険性もあり, 食中毒予防の立場から, 分離菌株の血清型とエンテロトキシン産生性を検討した. その結果, 土壌由来株の血清型はHobbsの血清型に該当するものが63%, 著者らのTWの血清型に一致するものが34.8%認められた. また, ヒトの本菌食中毒例から検出されるウェルシュ菌と同一血清型菌も多数認められるし, 健康者ふん便由来株にもみられる血清型菌も検出されており, 血清型の面からみると土壌とヒトとの密接な関連が推察される.

自然界に分布するウェルシュ菌のうち, エンテロトキシン産生株の分布は極めて低いことが知られている. 今回の土壌由来株についても全株がエンテロトキシン陰性であった. 刑部[11]は土壌由来の10菌株, 安川ら[12]は土壌由来の85菌株を対象にエンテロトキシン産生性を検討しているが, いずれもエンテロトキシン産生株を認めていない. 従って, 土壌に分布するウェルシュ菌はほとんどエンテロトキシン非産生株であると考えられる. しかしエンテロトキシンの産生性が芽胞形成と平行することから, エンテロトキシンの証明には芽胞の形成が大切である. ところが, 今回の分離菌株ではDS培地やTórtoraの培地でも芽胞形成が悪く, 供試菌株の31.1%が芽胞を形成したにすぎなかったことから, 土壌由来株のエンテロトキシン産生性はさらに, 芽胞形成を高めた方法で再検討する必要があろう.

結　論

土壌中に分布するウェルシュ菌の検索を行い, これらの分離菌株を食中毒予防の観点から血清型別およびエンテロトキシン産生性の検討を行った結果, 以下の成績を得た.

1. 土壌40件を非加熱および100℃10分, 100℃60分の加熱処理条件で分離した結果, 非加熱では19件からウェルシュ菌が検出され, その生菌数は平均3.6×10^3であった. また100℃10分では7件, 100℃60分では3件が陽性であった.

2. 土壌分離株46菌株の生化学的性状は, レシチナーゼ陽性・ゼラチン液化陽性・牛乳凝固陽性等の性状を示す典型的なウェルシュ菌であったが10%のゼラチンでは陰性株が2株認められた.

3. 分離菌株46株はHobbsの血清型に該当したものが63%で, TWの血清型では34.8%が型別された. 多くみられた血清型はHobbsの血清型5, 2, 13, 16であった.

4. 分離株のエンテロトキシン産生性をDS培地とTórtoraの培地で検討したが, 芽胞形成のみられたものは31.1%の株にすぎず, エンテロトキシンの産生は認められなかった.

文　献

1) 稲葉美佐子, 伊藤　武, 斎藤香彦, 柳川義勢, 甲斐明美, 坂井千三：感染症誌, 58, 87, 1984
2) 伊藤　武：東京衛研年報, 24, 1, 1973
3) Duncan, C. L. and Strong, D. H. : *Appl. Microbiol.*, 16, 82, 1968
4) Tórtora, J. C. O. : *Estudos sobre meios de cultivo para a esporulação de Clostridium perfringens*, 1976, Universidade Federal do Rio de Janeiro
5) 小西健一, 山岸高由, 石坂伸太郎, 坂本憲市, 桜井信也：日細誌, 36(2), 459, 1981
6) 今村禎祐：鹿児島大学医学雑誌, 15(2), 8, 1963
7) Toshio Miwa : *Japan J. Med. Sci. Biol.*, 28, 201, 1975
8) 稲葉美佐子, 伊藤　武, 坂井千三, 大橋　誠：東京衛研年報, 32－1, 12, 1981
9) Smith, L. DS., and Gardner, M. V. : *J. Bacteriol.*, 58, 407, 1949
10) 西田尚紀：日細誌, 31(6), 663, 1976
11) 刑部陽宅：食衛誌, 18(4), 375, 1977
12) 安川　章, 岡田陽一, 北瀬照代, 宮本三郎：食衛誌, 16(5), 313, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 22-30, 1984

パーソナルコンピュータを用いた海外旅行者下痢症の細菌検査成績処理システムの開発

津野正朗*, 工藤泰雄*, 大橋誠*

Development of a Computerized Data Base System for Processing Results of Bacteriological Examination of Overseas Travellers' Diarrhea

MASAAKI TSUNO*, YASUO KUDOH* and MAKOTO OHASHI*

Keywords: データベース data base, パーソナルコンピュータ personal computer, 海外旅行者下痢症 Overseas travellers' diarrhea

近年，海外旅行者の急増に伴ない，東南アジア諸国をはじめ諸外国からの渡航者によって我が国に持ち込まれる各種腸管感染症が，公衆衛生上大きな問題として注目されるようになってきた．当所の微生物部細菌第一研究科においては，防疫対策に有用な資料を得るために，1975年以後海外旅行者下痢症患者の病因検索を行なってきた．この海外旅行者検便(以下㊥と略す)の件数は，年々増加し，1980年以降は毎年2,000件を越え，また検査技術の進歩にともない検査対象病原菌も多彩化し，本業務に係わるデータ処理は繁雑となった．

そこで我々は，本業務の被検者記録，検査成績の記録，各種台帳類の作成，および集計，検索，作表等，従来手作業で行なわれてきた諸作業のコンピュータ化を試みた．このたび，その実用化をなし得たので，以下にその概要を報告する．

システムの選定

㊥検査成績処理システムの開発には，次のハードウエアを用いた．

1．パーソナルコンピュータ本体：PC−8001mk II, 32kバイト仕様
2．記憶装置：デュアル・ミニ（5インチ）・ディスクドライバー，PC−80 S 31
3．インパクト型ドットプリンタ：PC−8023−C, 縮少印字および逆転フィード機能付き
4．CRTディスプレイ：PC−8050 K, 緑色, 2000文字表示可

またディスク運用システムには，「NEC PC−8001 BASIC Ver1. 3 (copyright 1979 by Microsoft) ; Two surface version [20-Sep-1981]」を採用した．

データファイルの構成

データの記憶には，データ専用ディスク方式を採用し，運用効率を考慮して，以下のような複数のランダムデータファイルを開設した．

1．**メイン・ファイル**（ファイル名＝Maru-F）

本ファイルは，㊥検査材料および被検者等のデータを記憶するものである．本ファイルに記憶されるデータは，検査材料に添付される送付書（図1）に記載の情報から，従来の各台帳類に収録していた内容を満たすように選択した，各項目の変数名，入・出力用コードおよび桁数割当てなどは表1に示したとおりである．データファイルの作成にあたっては1検体分のデータの記憶に1セクタ(＝256バイト)を割り当てる方式がしばしば採られるが，本ファイルの作成にあたっては，1検体分に85バイトを割り当ててこれを1サブレコードとし，1セクタ当り3検体分(＝3サブレコード)を記憶するサブレコード方式を採用した．したがって，1ディスク当りの記憶容量は3,792検体分となり，現状では1年分の㊥検査データを1枚のディスク上に記憶し得る．このファイルにおけるデータ配置は図2に示したとおりである．

2．**サブ・ファイル**(ファイル名＝MF モクジおよびDC count)

上述のメイン・ファイルの他，データディスク上に，2種のサブ・ファイルが自動的に開設されるようデザ

* 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

海外旅行者健康診断材料送付書

都立衛生研究所長 殿

（　　区　　保健所）

検疫通報書番号第　　号
都立衛生研究所受付番号 第　　号

送付年月日	昭和　年　月　日	送付番号	
氏名		明大昭　年　月　日生（　才）	性別：□男. □女
住所			
材料	□ふん便・□その他＿＿＿＿・採取月日：昭和　年　月　日　時		
旅行内容	旅行先：＿＿＿＿ 出国日：昭和　年　月　日　帰国日：昭和　年　月　日 □団体：名称　名　旅行社 □グループ：名称　名　旅行社 □個人：　名　旅行社		
病歴	発病月日：昭和　年　月　日　発病場所：＿＿＿＿ 経過：＿＿＿＿ 検体採取時の症状：□有　□無 今日までにあった症状：□下痢最高1日　回（　月　日）：□軟便　□水様性、□粘血性　□腹痛、□嘔気、□嘔吐、□頭痛　□倦怠感、□発熱：最高＿＿度（　月　日）　その他：＿＿＿＿ 材料採取前受診：□有、□無　診断名：＿＿＿＿ 材料採取前抗菌剤投与：□有、□無、□不明 薬剤名＿＿＿＿　内服　月　日～　月　日まで		
その他特記事項			
検査結果	月　日		

該当事項の□にレを付し、＿＿＿に記すること。 ②

図1. 海外旅行者健康診断材料送付書式

表1．㊞検査用データへの収録項目一覧

収録項目	変数割当	データ入力・出力用コードNo.等		桁数	収録
		入・出力コードおよび実数値	例外・不明コード	割当	配置順
検体受付月日	C	月および日付の実数入力 (月数×10＋日数と自動算定)	月不明＝13 日不明＝32	4	1
検体(検査)番号	D 1	番号の実数(1～999)	(なし)	3	3
検体搬入保健所	D 3	保健所コードNo.	その他＝99	2	5
被検者の年令	D 4	満年令の実数(1～89)	1才以下＝0,90才以上＝90 その他＝91，不明＝99	2	2
被検者性別	D 5	性別コードNo. (男＝1,女＝2)	不明＝0	1	6
被検者区分	D 7	被検者区分コードNo. (下痢現症者＝1，下痢既往者＝2 健康者＝3，接触者＝4)	不明＝5	1	8
被検材料区分	D 6	被検材料コードNo. (ふん便初回＝1，2回目＝2 3回目＝3，4回目以上＝4)	ふん便以外(その他)＝5	1	7
訪問国 (1～5ヶ国)	P 1～P 5	旅行先コードNo.	6ヶ国以上＝65,ナシ＝66 不明＝99	各2	9－13
出国年	P 9	西歴年数の下2桁 (67～99)	ナシ＝0，不明＝66	2	14
出国月日	P 6	月および日付の実数入力 (月数×10＋日数，自動算定)	月不明＝13 日不明＝32	4	15
帰国月日	P 7	同　上	同　上	4	16
病日目	P 8	発病月日の実数入力 (発病月日－受付月日＋1， 自動算定)	30日以上＝31 不明＝32	2	17
下痢最高回数 (1日当たり)	Q 2	下痢回数コードNo. (1～3回＝1，4～6回＝2，7～ 9回＝3，10～15回＝4，16～20回 ＝5，21～30回＝6，30回以上＝7)	不明＝8	1	19
下痢の種類	Q 1	下痢区分コードNo. (軟便＝1，下痢有り＝2， 水様下痢＝3，粘血下痢＝4)	不明＝5	1	18
腹痛・嘔吐・嘔気	Q 3	症状の有無コードNo. (各々有り＝1)	ナシ＝0 不明＝0	1	20
発熱	Q 4	度数または発熱コードNo. (度数の記載ある場合は度数， 発熱有り(度数不明)の場合＝33.2)	ナシ＝33.1 不明＝33.3	2	21
薬剤投与 (抗菌剤,その他の薬剤)	Q 5	薬剤投与の有無コードNo. (各々．有り＝1)	ナシ＝0 不明＝0	1	22
検出病原菌株数	Q 6	菌株数の実数 (ただし，陰性＝0，6株以上＝6)		1	4
検出病原菌 (1～5)	G 1～G 5	検出菌コードNo.	ナシ＝0	各4	23～27
検出菌株番号(1～5)	H 1～H 5	菌株番号の実数	ナシ＝0	各4	28～32

Q4：入力データの下2桁のみを収録，　P 8：病日目のみを収録．

Q3：入力値コードは，腹痛有り＝1，嘔吐有り＝2，嘔気有り＝3と自動変換され，これらの和を1桁の合成コードNo.として収録する．

Q5：Q3と同様に，抗菌剤投与有り＝1，その他の薬剤投与有り＝2と変換され，1桁の合成コードとして収録する．

G1～G5およびH1～H5：Q6の数だけ入力．その他には自動的に0(ゼロ)が与えられて収録する．

d	a	b	c
C	1		C（検体受付月日）
D4	5		D4（被検者の年令）
U1	7		D1（検体番号）
			Q6（検出菌株数）
D3	11		D3（保健所コードNo.）
U2	13		（アキ）
			D5（被検者性別コードNo.）
			D6（被検材料区分コードNo.）
			D7（被検者区分コードNo.）
U4	17		P(1)（1ツ目の訪問国コードNo.）
			P(2)（2ツ目の訪問国コードNo.）
U5	21		P(3)（3ツ目の訪問国コードNo.）
			P(4)（4ツ目の訪問国コードNo.）
P5/P(5)	25		P(5)（5ツ目の訪問国コードNo.）
P9/P(9)	27		P9（出国年）
P6/P(6)	29		P6（出国月日）
P7/P(7)	33		P7（帰国月日）
P8/P(8)	37		P8（病日目）
U6	39		Q1（下痢症状）
			Q2（下痢の最高回数コードNo.）
U7	41		Q3（腹痛・嘔吐・嘔気；合成コードNo.）
			Q4（発熱；℃）
			Q5（薬剤投与；合成コードNo.）

d	a	b	c
G1/G(1)	45		G(1)（1ツ目の検出菌コードNo.）
G2/G(2)	49		G(2)（2ツ目の検出菌コードNo.）
G3/G(3)	53		G(3)（3ツ目の検出菌コードNo.）
G4/G(4)	57		G(4)（4ツ目の検出菌コードNo.）
G5/G(5)	61		G(5)（5ツ目の検出菌コードNo.）
H1/H(1)	65		H(1)（1ツ目の分類菌株No.）
H2/H(2)	69		H(2)（2ツ目の分類菌株No.）
H3/H(3)	73		H(3)（3ツ目の分類菌株No.）
H4/H(4)	77		H(4)（4ツ目の分類菌株No.）
H5/H(5)	81		H(5)（5ツ目の分類菌株No.）
	85		（アキ）

図2．メイン・データ・ファイル(Maru-F)の入力データ配置（データ・フォーマット）

a：1サブレコード中のバイト目．
b：データ入力用の変数割当て．
c：入力データの内容．
d：データ・ファイルへの入力用変数（入力データのユニット化後の変数であり，この各変数値が，数値→文字変換，すなわちブロッキング用となる．）

c および b		d	a
検査年(YE) 検査月(ME)	YE×100 +ME	CM	1 2 3 4
各月の先頭記録・No.		MB	5 6 7 8
各月の検査件数		MC	9 10 11 12
各月の陽性件数		MD	13 14 15 16
各月の1種陽性Ⓟ件数		PP (1)	17 18
〃 2 〃 〃		PP (2)	19 20
〃 3 〃 〃		PP (3)	21 22
〃 4 〃 〃		PP (4)	23 24
〃 5 〃 〃		PP (5)	25 26
各月の5種以上陽性Ⓟ件数		PP (6)	27 28
各月の1種陽性Ⓖ件数		GP (1)	29 30 31 32
〃 2 〃 〃		GP (2)	33 34 35 36
〃 3 〃 〃		GP (3)	37 38
〃 4 〃 〃		GP (4)	39 40
〃 5 〃 〃		GP (5)	41 42

c および b		d	a
各月の5種以上陽性Ⓖ件数		GP (6)	43 44
各月の1種陽性Ⓗ件数		HP (1)	55 46
〃 2 〃 〃		HP (2)	47 48
各月の3種陽性Ⓗ件数HP(3)	HP(3)×10	UH (3)	49 50
〃 4 〃 〃HP(4)	+HP(4)		
〃 5 〃 〃 HP(5)	HP(5)×10	UH (5)	51 52
各月の5種以上陽性Ⓗ件数HP(6)	+HP(6)		
各月の1種陽性Ⓒ件数		CP (1)	53 54
〃 2 〃 〃		CP (2)	55 56
各月の3種陽性Ⓒ件数CP(3)	CP(3)×10	UC (3)	57 58
〃 4 〃 〃 CP(4)	+CP(4)		
〃 5 〃 〃 CP(5)	CP(5)×10	UC (5)	59 60
各月の5種以上陽性Ⓒ件数CP(6)	+CP(6)		
各月の1種陽性⑦件数		ZP (1)	61 62
〃 2 〃 〃		ZP (2)	63 64
各月の3種陽性⑦件数ZP(3)	ZP(3)×10	UZ (3)	65 66
〃 4 〃 〃 ZP(4)	+ZP(4)		
〃 5 〃 〃 ZP(5)	ZP(5)×10	UZ (5)	67 68
各月の5種以上陽性⑦件数ZP(6)	+ZP(6)		
各月の検出菌株数		QW	69 70 71 72
各月のⓅ検査件数		PN	73 74
各月のⒸ検査件数		GN	75 76 77 78
各月のⒽ検査件数		HN	79 80
各月のⒸ検査件数		CN	81 82
各月の⑦検査件数		ZN	83 84
			85

図3．サブ・データ・ファイル(MFモクジ)への入力データ配置(データ・フォーマット)

a～d：図2に同じ．

Ⓟ：下痢現症者．Ⓖ：下痢既往者．

Ⓗ：健康者．Ⓒ：接触者．⑦：不明者．

インした．その1つ「MF モクジ」ファイルは月別の諸集計用のサブ・ファイルであり，他の1つは被検者区分別（現症者・既往者・健康者別）・検出病原菌別の分類集計用の「DC count」ファイルである．これらのファイルにおけるデータ配置は各々，図3および図4に示した．なお前者には，メイン・ファイルと同様に1セクタ当たり3サブレコードを記憶する方式を，後者には1セクタ当たり1レコードを記憶する方式を，各々採用した．

システム運用上の簡素化対策

㈱検査成績処理システムは，当該検査担当の技術者の誰によっても運用出来ることが望ましいので，システムの開発にあたっては，CRT 表示との対話形式を採用した他，次のような簡素化対策を講じた．

1．記憶データのコード番号化

データ入力の所要時間短縮および単純化を計るために，保健所名および検出菌種名をはじめとする各入力事項に個別のコード番号を与え，専ら0～9のテンキーの操作によってデータ入力が出来るようにした．データファイルへの記憶もまたこのコード番号によって行なうが，CRT 表示あるいは印字プリントは各コード番号を理解し易い表現形に変換して行なう．1例を図5に示した．

2．システムの自動起動化

システムの起動に要する手間を省くために，上述の各ハードウエアの電源配線を配電器に集中し，1個のメインスイッチのみを操作することによって，システムが自動的に起動できるようにした．

㈱検査成績処理システムの作業能力の概要

本データベース運用のためのソフトウェアは，既製の「R-DOT-1(Random Data Base Organizer Tsuno1, 1980：未発表)」を母体として開発し「MARUKAI Random Data File Controler（以下 MRFC と略称する）」と名付けた．このソフトウエアは，全て1枚の専用ディスク上に納めて自動起動化処理を施し，各作業(Activity)間の連結には，図6に示したとおり，自動連鎖（チェイン）運用方式を採用した．各 Activity の概要は次のとおりである．

Activity 1：材料送付書に記載された情報および検査成績を入力し，メインファイルに記憶させるもので，同ファイルの新規開設または既存ファイルへのデータ追加を行なう．入力データの記憶は，1検体単位で行なう．

Activity 2：メインファイル上のデータの訂正および削除を行なうもので，対象検査データ（1検体分）を

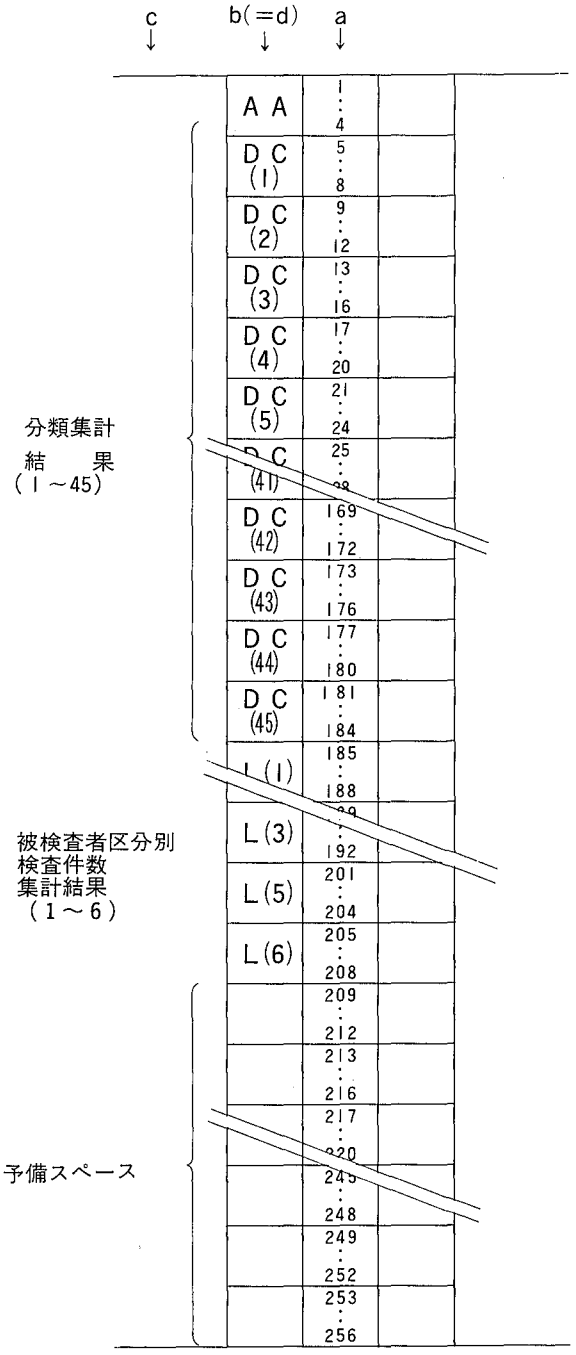


図4．サブ・データ・ファイル（DCcount）の入力データ配置（データ・フォーマット）
a～d：図2に同じ

↓a	↓b
1	V.cholerae Ogawa
2	V.cholerae Inaba
3	V.cholerae non O-1 (NAG)
4	V.mimicus
5	V.fluvialis (group F)
6	V.vulnificus (Lac+ V)
7	V.parhaemolyticus
8	
9	
10	Other Vibrio
11	Shigella dysenteriae 1
12	Shigella dysenteriae 2
13	Shigella dysenteriae 3
14	Shigella dysenteriae 4
15	Shigella dysenteriae 5
16	Shigella dysenteriae 6
17	Shigella dysenteriae 7
18	Shigella dysenteriae 8
19	Shigella dysenteriae 9
20	Shigella dysenteriae 10
21	
22	Other Shigella dysenteriae
23	Shigella flexniri 1a
24	Shigella flexniri 1b
25	Shigella flexniri 1c
26	Shigella flexniri 2a
27	Shigella flexniri 2b
28	
29	Shigella flexniri 3a
30	Shigella flexniri 3b
31	Shigella flexniri 3c
32	Shigella flexniri 4
33	Shigella flexniri 5
34	Shigella flexniri 6
35	Other Shigella flexniri
36	Shigella boydii 1
37	Shigella boydii 2
38	Shigella boydii 3
39	Shigella boydii 4
40	Shigella boydii 5
41	Shigella boydii 6
42	Shigella boydii 7
43	Shigella boydii 8
44	Shigella boydii 9
45	Shigella boydii 10
46	Shigella boydii 11
47	Shigella boydii 12
48	Shigella boydii 13
49	Shigella boydii 14
50	Shigella boydii 15
51	
52	
53	Other Shigella boydii
54	Shigella sonnei
55	
56	Salmonella typhi
57	Salmonella paratyphi A
58	Salmonella paratyphi B
59	Sallmonella group C3
60	Sallmonella group B
61	Sallmonella group C1
62	Sallmonella group C2
63	Sallmonella group D1
64	Sallmonella group D2
65	Sallmonella group E1
66	Sallmonella group E2
67	Sallmonella group E3
68	Sallmonella group E4

↓a	↓b
69	
70	
71	Sallmonella group F
72	Sallmonella group G
73	Sallmonella group H
74	Sallmonella group I
75	
76	Sallmonella group K
77	Sallmonella group L
78	
79	
80	Other Salmonella
81	EPEC(O26:K60)
82	EPEC(O44:K74)
83	EPEC(O55:K59)
84	EPEC(O86a:K61)
85	EPEC(O86:K62)
86	EPEC(O111:K58)
87	EPEC(O119:K69)
88	EPEC(O125:K70)
89	EPEC(O126:K71)
90	EPEC(O127a:K63)
91	EPEC(O128:K67)
92	EPEC(O146:K89)
93	EPEC(O142:K)
94	
95	
96	EIEC(O28ac:K73)
97	EIEC(O112ac:K66)
98	EIEC(O124:K72)
99	EIEC(O136:K78)
100	EIEC(O143:Kx1)
101	EIEC(O144:Kx2)
102	EIEC(O152)
103	EIEC(O164:K)
104	
105	
106	
107	
108	
109	
110	
111	ETEC (LT only)
112	ETEC (ST only)
113	ETEC (LT+ST)
114	ETEC (Stool direct)
115	
116	
117	
118	
119	
120	
121	Campylobacter jejuni/coli
122	
123	
124	
125	Aeromonas
126	
127	
128	
129	
130	Plesiomonas shigelloides
131	Yersinia enterocolitica
132	
133	
134	
135	

図5．検出病原菌コードNo.とその表現形

a：コードNo., b：表現形．空きNo.は予備スペース．

サブレコード番号で指定してファイルから読み出し，これをCRT表示してから目的の作業を行なう．訂正データは，これが間違いないと確認された場合にのみディスクに記憶されることになるので，本Activityは記憶データの参照用としても活用できる．

Activity 3：メインファイル上のデータ削除によって生じた余白の除去(余白づめ)，およびデータの追加挿入用スペースを設けるためのActivityである．これにより，メインファイル中の不要な余白は除去され，検査データは月・日および検査番号順に整然と配置され，末尾データのサブレコード番号と同ファイルの記憶検体数とが一致することになる．

Activity 4：データディスクのコピーすなわちバックアップ用で，オリジナルディスク上の全てのファイルデータをそっくり複写して，全く同一のデータディスクを作成するものである．

Activity 5：Activity 6, 7, 11, 14および17を実行するために必要な「MFモクジ」ファイル(月別に最初のサブレコード番号および各種集計データを記憶するサブファイル)を作成するものである．本Activityは，メインファイル上に1サブレコード以上の検査データが記憶されている場合に実行可能である．

Activity 6：データディスクに記憶された㊎検査状況を把握するためのもので，月別および被検者区分別の病原菌検出状況を随時プリントアウトできる．

Activity 7：月別㊎検査記録簿の作成用で，指定月の検査データをプリントアウトする．本Activityは自動ページ送り（1ページ当たり40検体分），タイトルの拡大印字およびページ数印字機能を備えている．1ページ当たりの所要時間は，2分35秒から2分40秒程度である．

Activity 8：データ記憶用ディスクの物理的初期化（一次的フォーマット化）処理を行なう．処理後のミニ（5インチ）ディスクは79トラックがデータ記憶用に確保される．なお，Activity 3および13の実行にも新ディスクを要するが，いずれの場合も自動的にディスクの一次的フォーマット化を行なうので，本Activityの実行は不要である．

Activity 11：月別㊎病原菌陽性者記録簿の作成用で，Activity 7に類似するが，病原菌が検出された例のみをプリントアウトする点で異なる．

Activity 12：検出菌別陽性者リストの作成を行なう．

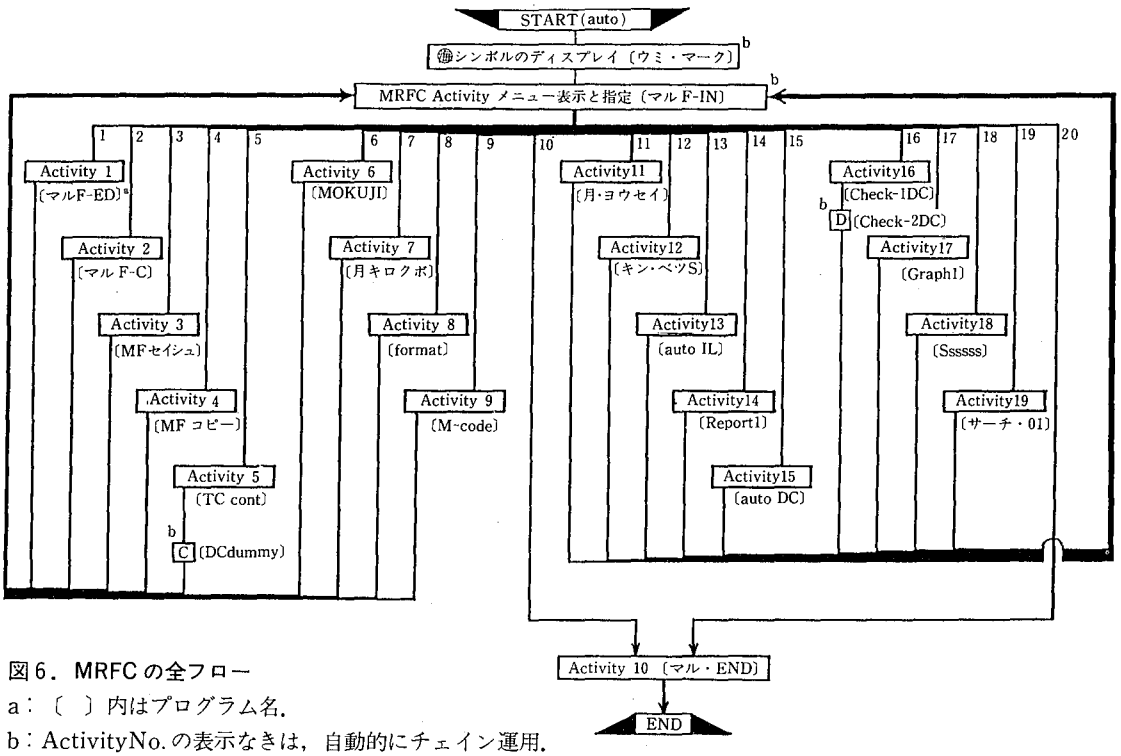


図6．MRFCの全フロー

a：〔 〕内はプログラム名．

b：ActivityNo.の表示なきは，自動的にチェイン運用．

被検者区分と検出病原菌の指定によって，組合せの異なる54通りの陽性者リストを作成できる．

Activity 13：メインファイルを参照し，新ディスク上に検出菌株用のデータファイル(9種)を開設し，分離菌株データを菌別に記憶する．この作業は自動的に行なわれ，以後の各菌株用ファイルの取り扱いは，別途開発中の分離菌株の諸性状データ処理のためのソフトウエア「IRFC(=Isolates Random Data File Controler)未発表」に受け継がれる．なお各ファイルには，メインファイルから得られる被検者および被検材料に関する情報も併せて記憶される．

Activity 14：毎月の病原菌検出状況報告用集計を行ない，その結果をプリントアウトする．

Activity 15：メインファイルの全記憶データを参照し，被検者区分別・検出病原菌別の分類集計を行い，その結果をサブファイル「DCcount」に記憶する．
本Activityによって作成されるサブファイルの構造は図7に示したとおりである．

(AP) \ PATHOGEN (PP)	1. Vibrio	2. V. parahaemo.	3. Shigella	4. Salmonella	5. EPEC	6. EIEC	7. ETEC	8. Campylo.	9. Others
0=All	1*	2	3	4	5	6	7	8	9
1=[P]	11	12	13	14	15	16	17	18	19
2=[G]	21	22	23	24	25	26	27	28	29
3=[H]	31	32	33	34	35	36	37	38	39
4=[C]	41	42	43	44	45	46	47	48	49
5=[?]	51	52	53	54	55	56	57	58	59

図7．DCcountファイルにおける被検者区分別および検出病原菌別分類集計データとレコード番号(*印)との関係
被検者区分=AP，検出病原菌区分=PPとすると，「AP×10+PP=レコード番号」の関係にある．

Activity 16：「DCcount」ファイルを参照し，被検者区分別・検出病原菌別の分類集計結果をCRT表示あるいはプリントアウトする．プリントアウト（作表）の形式は9種類設定されており，必要に応じて選択できる．

Activity 17：「MFモクジ」ファイルを参照し，検査および病原菌検出状況をグラフ化してプリントアウトする．合計16種類のグラフを得ることができる．

Activity 18：指定条件に該当する検査データの検索を行ない，これをプリントアウトする．

考　察

上述のハードウエア及びソフトウエアによって，パーソナルコンピュータを用いた㊞検査成績処理システムを開発し，1983年以後実務に活用している．我々は，上述のコンピュータ導入の成果を次のとおり評価する．

まず，従来各種台帳類作成作業に要していた手間を大巾に削減できた．

今回開発した成績処理システムの運用にあたって，最も手間がかかるのは検査データの入力作業であるが，初めてコンピュータに触れる者でも20～30分の訓練でこの作業ができるようになり，また数日間の経験により，1検体当たりの入力所要時間は1分以内になった．これにより，毎月の情報整理に要していた1人約5日の手間を，データ入力に要する時間を含めて約7時間の作業に短縮できた．

また，各種の集計資料の作成が容易になったため，行政需要に応じて，随時迅速に正確な資料を提供し得るようになった．

本システムの運用ソフトウエアは，汎用される高級言語(BASIC)によってプログラムされ，しかも自家製のソフトウエアであるために，今後の改造および応用が容易であり，大型コンピュータを利用するほどの情報量はないが情報処理を情報生産者自らが実行することがのぞまれる，検査室などの分野における情報処理システムのモデルになり得ると考える．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 31-37, 1984

センキュウ成分中の抗真菌物質について

諸角　聖*, 和宇慶朝昭*, 一言　広*

An Antifungal Substance in Cnidium

SATOSHI MOROZUMI*, TOMOAKI WAUKE* and HIROSHI HITOKOTO*

Extraction and purification of antifungal substances from powdered cnidium were carried out. A neocnidilide was obtained in the pure state, which was found to be the most active antifungal substance in cnidium.

The neocnidilid inhibited the growth and toxin production of three species of mycotoxin-producing fungi. The compound inhibited the growth of *A. versicolor* at 200μg/m*l* and *A. flavus* and *A. ochraceus* at 400μg/m*l*, respectively. It completely inhibited the toxin production by aflatoxin B_1-producing fungi at 200μg/m*l*, and partially inhibited (from 60 to 79%) the toxin production at 100μg/m*l*. However, no inhibitory effect was observed at the concentration of 50μg/m*l*.

Keywords : antifungal substance, mycotoxin-producing fungi, mycotoxin, cnidium, herbal drug

緒　言

ある種の生薬あるいは香辛料成分中に抗微生物活性を示す物質が存在することは，すでに多くの研究者により報告されている[1-14]．岡崎ら[15,16]は生薬の精油画分50種の抗菌活性について検討し，丁字油由来のeugenolおよびケイ皮油由来のcinnamaldehydeに強い抗真菌活性が存在したと報告している．

一方，著者らはすでに多数のカビ胞子による汚染が知られている植物性生薬[17-19]および香辛料[20,26]のなかから合計19種の試料を選び，それぞれ水分含量を40%に調整したのち，mycotoxin産生菌を接種し25℃で7日間培養を行った．培養終了後，各試料のmycotoxin汚染の有無を検討したところ，オウレンなど10種の試料においてはmycotoxin汚染が認められなかったばかりでなく，その成分中にmycotoxin産生菌の発育と毒素産生を阻害する物質の存在が示唆された．そこで，それらの試料の抗菌活性についてさらに検討したところ，調べた19試料のすべてに阻害活性がみられ，特にケイ皮に著明な発育阻害作用が，またセンキュウなど数種に強い毒素産生阻害作用が認められた[13]　諸角は[12]このケイ皮成分中の抗真菌物質の単離を試み，新しい抗菌物質として*o*-methoxycinnamaldehyde(以下OMCAと略)を単離した．今回著者らは，これまでの予備的検討の中で強い毒素産生阻害を有することが明らかになったセンキュウを選び，その成分中の毒素産生阻害因子の本体を明らかにする目的で活性因子の分離・精製を試み，最終標品としてneocnidilideを得たので，その成績について報告する．

材料および方法

1．センキュウ末

市販の局方センキュウ末(Cnidium officinale Makino；志平作兵衛商店，東京）を購入して使用した．

2．センキュウ中の抗真菌物質の分離，精製

センキュウ成分中の抗真菌物質はクロロホルムおよび水蒸気蒸留[22]により抽出後，カラムクロマトグラフィー（以上LCと略）および分取薄層クロマトグラフィー（以下PTLCと略)を以下の条件で行うことにより精製した．

シリカゲルLC：充塡剤；kieselgel 60(Merck, Darmstadt)15g．カラム；40cm×2cm(i.d.)ガラスカラム．溶出液；ベンゼン，クロロホルムおよびエチルエーテル各々200m*l*．

アルミナLC：充塡剤；alminum oxide（中性；Merck, Darmstadt)10g．カラム；30cm×1cm(i.d.)ガラ

* 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

スカラム．溶出液；ベンゼン　クロロホルムおよびエタノール各々150m*l*.

PTLC：PTLC用 Kieselgel 60F_{254}(Merck, Darmstadt)薄層板を用い，　Bormanの方法[23]に従って行った．

3．Gas-Mass spectrogramの条件

今回の最終画分であるTT-1, TT-2およびTT-3画分について，山岸らの方法[24]により以下の条件でGas-Mass spectrogram（以下GC-MSと略）による測定を行った．

使用機種；日立RMU-6MG（日立製作所，東京）．カラム；2m×3mm(i.d.)ガラスカラム．充塡剤；2.5% XE-60, chromosorbW-AW, DMCS, 80-100mesh．カラム温度；170℃．キャリアーガス；He 30m*l*/min．セパレーター温度；270℃．イオン化室温度；310℃．

4．Mycotoxin産生真菌

センキュウ由来の各画分のmycotoxin産生菌に対する阻害活性は，以下の4菌種のいずれかを用いて測定した．

Aflatoxin産生菌；*Aspergillus parasiticus* NRRL-3000, *A. flavus* ATCC-28539.

Ochratoxin産生菌；*A. ochraceus* stA-15（大気由来株）．

Sterigmatocystin産生菌；*A. versicolor* I-20-b（煮干し由来）．

これらの真菌はあらかじめ25℃，7日間potato dextrose寒天斜面に培養したのち，形成されたconidiaを滅菌した1%Driwel（富士写真フィルム，東京）水溶液に浮遊させ10^4/m*l*の胞子浮遊液を作製した．接種にはその0.1m*l*を用いた．

5．各画分のmycotoxin産生菌に対する発育およびmycotoxin産生阻害作用の測定

精油画分，クロロホルム画分および精製標品はメタノールに溶解したのち，それぞれ2倍あるいは10倍毎の段階希釈系列を作り，各濃度の溶液10μlを各10m*l*のlowsalt（以下SLと略）培地[25]またはyeast extract sucrose（以下YESと略）の培地[26]を入れた試験管内に添加した．また，精製過程の各画分の場合は原末2g相当量，またPTLCにより得た画分については原末4g相当をそれぞれ100μlのメタノールに溶解し，上記の培地中に添加した．これらを110℃，10分間高圧滅菌後，各菌の胞子浮遊液を接種した．培養は，aflatoxinおよびochratoxin A産生菌を接種したものでは8日間，sterigmatocystin産生菌を接種したものは12日間，それぞれ表面積が最大となるように斜めに静置し，25℃で行った．培養終了後，発育および毒素産生の有無を測定した．

6．Mycotoxin産生菌の発育度および産生毒素量の測定

被検菌の発育程度は，著者らの方法[12,13]に従い培養液からガラスフィルターを用いてろ別した菌体を50℃で48時間乾燥後，さらにシリカゲルを入れたデシケータの中で7日間乾燥させたのち重量を計量し，培地10m*l*当りの乾燥菌体重量として表示した．

Mycotoxin産生量は以下の方法で測定した．すなわち，培養終了後の培養液に5m*l*のクロロホルムを加えて抽出を行った．この操作を2度繰返して得た抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過したのち，減圧濃縮を行った．この画分を粗毒素標品として，薄層クロマトグラフィー（以下TLCと略）を用いて毒素の検出を行った．この方法をスクリーニング法として毒素の存在が認められたものについては，さらに高速液体クロマトグラフィー（以下HPLCと略）を用いて毒素産生量を測定した．

7．TLCの条件

薄層板としてKieselgel 60 (Merck, Darmstadt)プレートを80℃，2時間加熱により活性化したものを使用した．各画分の試料および標準毒素(Makor Chem. Ltd., Israel)をスポットし，aflatoxinおよびsterigmatocystin検査にはクロロホルム—アセトン（9：1）を，ochratoxin Aについてはベンゼン—メタノール(97：3)をそれぞれ展開溶媒として用いた．展開終了後，薄層板をスーパーライト(Nikko Seiki Works,東京)を用いて365nmの紫外線照射下で観察し，mycotoxinの存在の有無を調べた．Sterigmatocystinは Stack and Rodricks[27]の記載に従い，20%塩化アルミニウム—エタノール溶液を噴霧後，80℃，10分間加熱し，上記UV照射の下で判定した．

8．HPLCの条件

各毒素のHPLCによる定量は，Varian4100型高速液体クロマトグラム(Varian, Calfornia)および検出器としてJasco 100-II型（日本分光工業，東京）を用い，以下の条件で行った．すなわち，aflatoxinの定量はWalter and Pons[28]の方法に従って以下の条件で行った．

カラム；日本分光25cm×4mm(i.d.)ステンレスカラム．充塡剤；Jasco ss-05．測定波長；350nm．溶出液；水飽和クロロホルム—シクロヘキサン—アセトニトリル(25：7.5：1.0)＋エタノール1.5%．流速；1m*l*/min．

Sterigmatocystinは五十畑ら[29]の方法により定量した．

カラム；Jasco pack ss-05, 25cm×4mm(i.d.)，ステ

ンレスカラム. 測定波長；330nm. 溶出液；50%酢酸飽和クロロホルム－n-ヘキサン（1：1）. 流速；1 m*l*/min.

Ochratoxin A は Josefson and Möller[30]の方法に従って以下の条件で行った.

カラム；Jasco pack ss-05, 50cm×4 mm(i.d.), ステンレスカラム. 測定波長；332nm. 溶出液；メタノール-水(70：30), pH4.5. 流速；1 m*l*/min.

実 験 結 果

1．センキュウ成分中の抗真菌物質の精製および精製過程の各画分の aflatoxin 産生菌に対する阻害作用

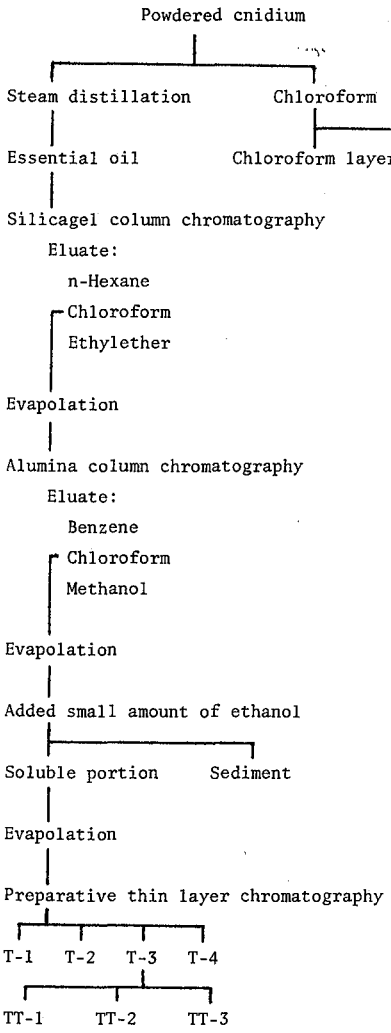


Fig. 1. Purification f Antifungal Substance from Cnidium

センキュウ末中に含まれる抗真菌物質はFig.1に示した方法により精製した. すなわち, センキュウ末1 kgに5 *l* のクロロホルムを加え室温で4時間撹拌後, ろ別した. 得られたクロロホルム抽出液を減圧濃縮し, 49.3 gのペースト状抽出物を得た. 同時に, 紛末試料1 kgを蒸留水5 *l* とともに室温で12時間水蒸気蒸留を行い, 10 gの精油画分を得た. クロロホルム抽出画分および精油画分の aflatoxin 産生菌の発育と毒素産生に対する阻害作用を検討した結果, Table 1に示したごとく両画分に明らかな阻害活性が認められた. クロロホルム抽出画分は49.3mg（原末1g相当分）/10 m*l*SL 培地で *A. parasiticus* および *A. flavus* の発育をそれぞれ39%および29%阻害し, その毒素産生を完全に阻止した. また, 精油画分は19 mg（原末1g相当分）/10 m*l*SL 培地で *A. parasiticus* および *A. flavus* の発育をそれぞれ96%および72%阻害し, 毒素産生を完全に阻止した. それ以下の濃度においてクロロホルム抽出画分は1.0mg/10m*l* で *A. flavus* の aflatoxin B_1 産生を46%阻害した. 精油画分に強い抗菌活性がみられたため, 本画分を出発材料としてその成分中の抗菌物質の単離を試みた. また, 供試した2種の aflatoxin 産生菌はいずれもクロロホルム抽出画分および精油画分に対してほぼ同程度の感受性を示したことから, 精製過程の各画分の抗菌活性は *A. flavus* のみを用いて検討した. その成績をTable 2に示した. まず始めに, 精油画分5 gを50m*l* のクロロホルムに溶解し, クロロホルム可溶画分ならびに不溶画分に分画した. 抗菌活性はクロロホルム可溶画分のみに認められたため, この画分をさらにシリカゲルカラムに負荷させたのち *n*-ヘキサン, クロロホルムおよびエチルエーテル各々200 m*l* で溶出させた. 得られた3画分のうち, aflatoxin の産生を完全に阻止したクロロホルム溶出画分を減圧濃縮し, 10 m*l* のベンゼンに再溶解した. このベンゼン溶液をさらにアルミナカラムに吸着させ, それぞれ150 m*l* のベンゼン, クロロホルムおよびエタノールで溶出を試みた. 阻害活性はこれら3画分のうちクロロホルム溶出画分のみに認められた. そこで, このクロロホルム画分を減圧濃縮後, さらにエタノール20 m*l* を加えてエタノール可溶画分と不溶画分に分画した. 抗菌活性の認められたエタノール可溶画分1 m*l* を Kieselgel GF-254 薄層板に帯状にスポットし, n－ヘキサン－エチルエーテル（8：2）を展開溶媒として用いて PTLC を行った. 展開終了後, 薄層板を365および254 nmの波長の紫外線下で観察し, 出現したスポットをそれぞれ分取後, エタノールを用いて各スポットの成分を溶離させ

Table 1. Inhibitory Effects of Chloroform Extract and Essential Oil Fraction of Cnidium on the Growth and Toxin Production of *A. parasiticus* and *A. flavus* in the Relevant Broth.

Fraction	Concentration (mg/10 m*l* of SL broth)	*A. parasiticus*		*A. flavus*	
		Mycelia	Aflatoxin B_1	Mycelia	Aflatoxin B_1
		mg/10 m*l* Inhibition (%)	μg/m*l* Inhibition (%)	mg/10 m*l* Inhibition (%)	μg/m*l* Inhibition (%)
Chloroform extract	49.3	167 (39)	0 (100)	198 (29)	0 (100)
	4.9	272 (1)	4.9 (0)	294 (0)	15.0 (0)
	0.49	275 (0)	5.2 (0)	269 (0)	24.9 (0)
Essential oil	10.0	12 (96)	0 (100)	79 (72)	0 (100)
	1.0	339 (0)	5.4 (0)	278 (0)	8.0 (46)
	0.1	285 (0)	7.1 (0)	376 (0)	14.4 (1)
Control		275 —	4.9 —	279 —	15.0 —

*Equivalent to 1 g of powdered cnidium.

4画分 (T-1～T-4) を得た．阻害活性は，これらのうちの T-2 および T-3 画分に認められた．この両画分のうちでより強い抗菌活性を示した T-3 画分を再度同様の条件で PTLC を行うことにより分画し，得た3画分(TT-1～TT-3)の阻害活性を調べた．その結果，TT-1 および TT-2 画分に阻害作用がみられ，特に TT-2 画分に強い阻害活性が認められた．

2．最終標品の同定

最終標品である TT-2 画分を GC-MS により測定した結果，*m/e*79, 80,108, 110, 137 および 194 にフラグメントを示すスペクトラム(Fig. 2)を得た．これは山岸ら[24]の報告した neocnidilide のスペクトラムと全く同一のパターンであった点から，本画分を neocnidilide と同定した．本物質は分子量 194，融点 35℃，水に難溶，種々の有機溶媒に易溶な無色針状結晶であった．一方，TT-1画分は cnidilide と同一のマススペクトラムパターンを示した点および TLC パターンが同一であった点などから cnidilide であると同定した．

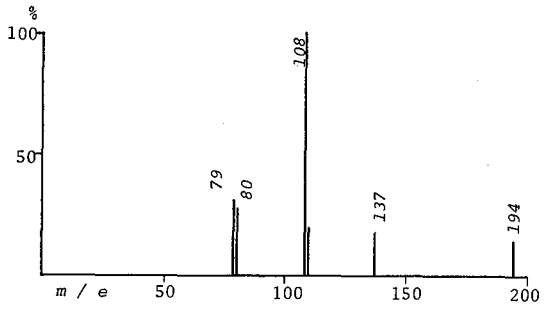


Fig. 2. Mass Spectrum of TT-2 Fraction.

3．Neocnidilide の mycotoxin 産生菌に対する抗菌作用

今回，センキュウ成分中の抗真菌物質として単離した neocnidilide の3種の mycotoxin 産生菌に対する抗菌活性を測定したところ，Table 3 に示した如く 200 μg/m*l* の濃度で *A. versicolor* の発育を，400 μg/m*l* の濃度で *A. flavus* および *A. ochraceus* の発育をそれぞれ完全に阻止した．また，各菌の毒素産生は 200 μg/m*l* において完全に阻止された．さらに，本物質は 100 μg/m*l* において aflatoxin 産生菌および sterigmatocystin 産生菌の毒素産生をそれぞれ 70 %以上阻害し，ochratoxin A 産生菌の毒素産生を 60 %阻害した．しかし，それ以下の濃度において明らかな阻害活性は認められなかった．

考　　察

センキュウの精油中には rigstilide, buthylidenphtalide, buthylphtalide, neocnidilide, cnidilide, senkyunolide などの物質の存在が報告されている[31-35]これらの phtalide 化合物は種々の薬理作用[36]を示すばかりでなく，白癬菌に対して抗菌作用[37]を示すことが知られている．著者らは先に，センキュウ粉末1 g あるいはクロロホルム抽出画分 49 mg (原末1 g 相当量) を培地 10 m*l* に添加した条件において，接種した毒性カビの毒素産生は著明に阻害されたのに対し，その発育は

Table 2. Inhibitory Effects of Various Fractions in Purification Process of Cnidium on the Growth and Aflatoxin Production of *A. flavus* in the Relevant Broth.

Fraction	*A. flavus*			
	Mycelia		Aflatoxin B_1	
	mg/10ml	Inhibition (%)	μg/ml	Inhibition (%)
Essential oil:				
Chloroform soluble fraction	0	(100)	0	(100)
Chloroform insoluble fraction	299	(0)	13.1	(19)
Silicagel column chromatography :				
Chloroform fraction	209	(29)	0	(100)
n-Hexane fraction	307	(0)	14.0	(14)
Ethyl ether fraction	286	(2)	18.8	(0)
Almina column chromatography :				
Benzene fraction	321	(0)	16.2	(0)
Chloroform fraction	178	(39)	0	(100)
Ethanol fraction	316	(0)	18.1	(0)
Preparative thin layer chromatography :				
T-1	313	(0)	17.3	(0)
T-2	280	(4)	1.6	(90)
T-3	0	(100)	0	(100)
T-4	307	(0)	15.3	(6)
TT-1	191	(35)	2.4	(85)
TT-2	0	(100)	0	(100)
TT-3	299	(0)	16.5	(0)
Control	293	—	16.2	—

Table 3. Inhibitory Effect of Neocnidilide on the Growth and Mycotoxin Production of Three Strains of Toxigenic Fungi in the Relevant Broth.

Concentration (μg/ml)	*A. flavus*				*A. ochraceus*				*A. versicolor*			
	Mycelia		Aflatoxin B_1		Mycelia		Ochratoxin A		Mycelia		Stergmatocystin	
	mg/10ml	Inhibition (%)	μg/ml	Inhibition (%)	mg/10ml	Inhibition (%)	μg/ml	Inhibition (%)	mg/10ml	Inhibition (%)	mg/ml	Inhibition (%)
400	0	(100)	0	(100)	0	(100)	0	(100)	0	(100)	0	(100)
200	71	(81)	0	(100)	66	(85)	0	(100)	0	(100)	0	(100)
100	303	(18)	4.0	(73)	416	(7)	1.0	(60)	516	(11)	3.2	(79)
50	349	(7)	15.0	(0)	463	(0)	2.5	(0)	594	(0)	15.0	(0)
25	342	(7)	15.6	(0)	460	(0)	2.5	(0)	627	(0)	15.0	(0)
Control	368	—	15.0	—	449	—	2.5	—	580	—	15.0	—

28—48％阻害されたにすぎないことを報告した[13]．今回，このセンキュウ成分中に毒性カビの mycotoxin 産生を特異的に阻害する物質が存在するのではないかと考え，その物質の単離を試みた．その結果センキュウ中の最も強い抗菌物質として単離した neocnidilide は 200 μg/ml の濃度において著明な発育阻害活性を示した．しかし，それ以下の濃度において毒素産生阻害作用のみが認められた点から，前回の実験においては用いたセンキュウ末 1 g 中に存在した neocnidilide の量は発育阻害作用を示す量，すなわち 200 μg/ml 以下であったため毒素産生阻害作用のみがみられたものと推察される．今回単離した neocnidilide は先に諸角がケイ皮より単離した *o*-methoxycinnamaldehyde[12] に比べ 1/2—1/4 程度弱い抗菌活性であった．しかし，食品添加物あるいは抗菌物質の使用に対する規制の厳しい現在，本物質は天然物由来の抗菌活性物質として，防腐，防カビあるいは mycotoxin 汚染の防除など多方面に応用しうる可能性も大きいものと考えられる．

結　論

センキュウ成分中に含まれる毒性カビの mycotoxin 産生を阻害する因子を明らかにする目的で，活性物質の単離を試み以下の結論を得た．

1．水蒸気蒸留により得た精油画分を出発材料としてカラムクロマトグラフィーおよび分取薄層クロマトグラフィー等を用いて mycotoxin 産生阻害物質の精製を行い，最終標品として neocnidilide を得た．

2．本物質は 200 μg/ml の濃度において *A. versicolor* の発育を，400 μg/ml の濃度において *A. flavus* および *A. ochraceus* の発育をそれぞれ完全に阻止した．また，各菌の毒素産生を 200 μg/ml において 100%，100 μg/ml で 60%以上阻害した．

文　献

1) Maruzzella, J. C. and Henry, P. A. : *J. Am. Pham. Assoc. Sci.* Ed., 47, 294, 1958
2) Maruzzella, J. C. and Henry, P. A. : *J. Am. Pham. Assoc. Sci.* Ed., 47, 471, 1958
3) Murdock, D. I. and Allen, W. E. : *Food Technol.*, 14, 441, 1960
4) Karishnawamy, M. A. and Rudra-Setty, T. M. : *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 32, 972, 1966
5) Frazier, W. C. : *Food Microbiology*, 2nd Ed., 1967, McGraw-Hill Book Co., New York
6) Hartung, T. E., Bullerman L. B., Arnold, R. G. and Heidelbaugh, N. D. : *J. Food Sci*, 38, 129, 1973
7) 森　一雄，沢田玄道，鍋谷　修，丸尾重昭：日本食品工業学会誌，21，285，1974
8) Bullerman, L. B. : *J. Food Sci.*, 39, 1163, 1974
9) 宮尾茂雄：食衛誌，16，412，1975
10) Bullerman, L. B., Lieu, F. Y. and Sair, S. A. : *J. Food Sci.*, 42, 1107, 1977
11) Beuchat, L. R. : *J. Food Sci.*, 41, 899. 1976
12) 諸角　聖：真菌と真菌症，19，172，1978
13) Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T., Sakai, S. and Ueno, I : *Mycopathologia,* 66, 161, 1978
14) 大本太一，加納美知子，小池一男，一言　広，諸角　聖：生薬学雑誌，35，71，1981
15) 岡崎寛蔵，大島壮一：薬学雑誌，73，690，1953
16) 岡崎寛蔵，大島壮一，河口達二，本間昭子：薬学雑誌，73，602，1953
17) 宇田川俊一，倉田　浩，法月克弘，高鳥浩介，中尾美津男，高橋恵子：マイコトキシン，3・4，35，1976
18) 西川洋一，瀬戸隆子，安田一郎，一言　広，諸角聖，坂井千三：生薬学雑誌，32，153，1978
19) Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke. T., Sakai, S., and Kurata, H. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 252, 1978
20) Julseth, R. M. and Diebel, R. H. : *J. Milk Food Technol.*, 37, 414, 1974
21) Flangan, B. and Hui, S. C. : *J. Appl. Bacteriol.*, 41, 411, 1976
22) 日本公定書協会編：日本薬局方　第10改正，1981，広川書店
23) Borman, H., Stahl, E. and Mitsuhashi, H. : *Chem. Pharm. Bull,* 15, 1606, 1976
24) 山岸　喬，金島弘恭：薬学雑誌，97，237，1977
25) Reddy, T. V., Viswanasan, L. and Venkitasubramanian : *Appl. Microbiol.*, 22, 393, 1971
26) Davis, N. D., Diener, U. L. and Eldridge, D. W. : *Appl. Microbiol.*, 14, 378, 1966
27) Stack, M. and Rodricks, J. V., : *J. Assoc. Office. Anal. Chem.*, 54, 80, 1971
28) Walter, A. P. : *J. Assoc. offic. Anal. Chem.*, 62, 586, 1979
29) 五十畑悦子，武田由比子，内山　充：食衛誌，17，392，1976
30) Josefsson, E. and Möller, T. : *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 62, 1165, 1979

31) 野口敬身：薬学雑誌, **54**, 913, 1934
32) 野口敬身：薬学雑誌, **57**, 769, 1937
33) 刈米達夫, 菅野　詢：薬学雑誌, **56**, 662, 1936
34) 刈米達夫, 杉野録郎：薬学雑誌, **57**, 668, 1936
35) 刈米達夫, 杉野録郎：薬学雑誌, **57**, 1493, 1937
36) Mitsuhashi, H. and Muramatsu. H. : *Tetrahedron,* **20**, 1971, 1964
37) Kinoshita, Y., Yamagishi, T. and Kaneshima : *5th Asian congress of pharmaceutical Associations,* 11, Taipei

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 38-42, 1984

スライド・ラテックス凝集反応による黄色ブドウ球菌の簡易同定

新垣正夫*, 五十嵐英夫*, 潮田弘*
藤川浩*, 寺山武*

Simplified Identificathon Method of *Staphylococcus aureus* by Slide Latex Agglutination

MASAO SHINGAKI*, HIDEO IGARASHI*, HIROSHI USHIODA*,
HIROSHI FUJIKAWA* and TAKESHI TERAYAMA*

In this study, reliability of the slide latex agglutination for rapid and simplified identification method of *Staphylococcus aureus* was evaluated. Of 304 food isolates of *S.aureus*, 301 (99.0%) showed positive results with the slide latex agglutination. On the other hand, all the 286 non-*S. aureus* strains from food stuff were negative on the reaction.

Colonies grown on several selective isolation media were tested with the slide latex agglutination. Of 116 of *S. aureus*, 110 (94.8%) showed positive results on the Baird-Parker medium and Vogel and Johnson agar, whereas only 54 (46.6%) of colonies grown on MSEY agar gave positive results.

However, 98 (84.5%) strains of the *S. aureus* grown on modified MSEY agar using Columbia agar as basal medium gave positive results on the reaction. From the results, it was concluded that slide latex agglutination method could be used for identification of *S. aureus* in bacterial examination of foods.

Keywords : *Staphylococcus aureus*, slide latex agglutination, Indentification, selective media, food microbiology

最近，黄色ブドウ球菌の同定法として，ヒト血漿を感作したラテックスによるスライド凝集反応が報告されている[1]．この方法は，従来行なわれているコアグラーゼ試験等に比較して簡便で迅速であるため，臨床細菌検査の分野ではすでに実用化されている．

そこで私どもは，このスライド・ラテックス凝集反応による簡易・迅速同定法を，食品からの黄色ブドウ球菌の検査に応用する目的で，コアグラーゼ試験や耐熱性DNaseの産生性などの試験法と比較してその有用性を検討すると共に，黄色ブドウ球菌の選択分離培地に発育した集落を対象にした検討を行なった．その結果，食品細菌検査の分野でもこの方法を適用できることが明らかとなったので，その成績について報告する．

材料および方法

供試菌株：今回の実験には，3％卵黄加マンニット食塩培地（MSEYと略，基礎培地日水製薬）を用いて各種市販食品から分離した *Staphylococcus aureus* 304株，およびMSEY培地でブドウ球菌様の集落を形成したコアグラーゼ陰性，カタラーゼ陽性，グラム陽性の球菌(non-*S. aureus*と略)286株を供試した．これとは別に，ウシ乳房炎由来の卵黄反応陰性 *S. aureus* 26株，食品由来の *S.* epidermidis 28株と *Micrococcus* spp.46株を対照として用いた．

生化学性状試験：

食品由来の *S.aureus* 304株と non-*S.aureus* 286株の各供試菌株について，Trypto-Soya agar（日水）に分離培養後，以下に述べる *S.aureus* の同定のための性状試験を行なった．

i)コアグラーゼ試験：ウサギ血漿を10%に加えたBrain Heart Infusion broth (BHI, Difco)を小試験管に

* 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

1 m*l* 分注し，これに被検菌の BHI, 37℃ 1夜培養菌液を 0.1 m*l* 加え，37℃で培養し，2時間，4時間，16時間後血漿の凝固を判定し，いずれの時間後でも血漿凝固を生じたものを陽性とした．

ii)**耐熱性 DNase の産生性**：Lachica[2]らによって報告されているマイクロスライド法に準じて行なった．すなわち，被検菌を BHI に接種して 37℃で1夜培養後，100℃で 15 分加熱した．デオキシリボ核酸を含んだオルトトルイジンブルー寒天3 m*l* をスライドガラス上に流して固めた寒天層に，内径約 3 mmの穴をあけ，その穴に供試検体を1滴加え，湿潤箱に入れて 37℃で反応した．2時間，4時間，24時間反応後に観察し，透明な桃色帯を形成したものを陽性とした．

iii)**マンニットの分解性**：1％にマンニットを含んだ PYP 培地（日水）を用いて行なった．

iv)**卵黄反応**：被検菌を MSEY 培地に接種し，37℃で 48 時間培養後，集落の周囲に白濁帯を生じたものを陽性とした．

v)**クランピングファクターの検出**：ヒト血漿によるスライド・コアグラーゼ試験を行ない，反応後，15 秒以内に明瞭な凝塊を生じたものを陽性とした．

ヒト血漿感作ラテックスの調製：

ポリスチレンラテッスス（以下ラテックスと略）は，武田薬品工業株式会社より分与された SDL-73（粒子径 0.35μ）を用いた．

ラテックスへのヒト血漿の感作は，EssersとRadebolt[1]の方法に準して，以下のように行なった．ラテックスは，1/20 M グリシン・HCl 緩衝液(pH8.0)で 0.25％懸濁液とした．これに同じ緩衝液で 1,000倍に希釈したヒト血漿を等量加えて混和し，56℃の恒温槽で振盪しながら 30 分反応させることによって感作した．この反応液を10,000 r.p.m. 10分遠心して感作ラテックスを集め，生理食塩液で2回洗浄した．このように感作したラテックスは，0.02％窒化ナトリウムと 0.05％ヒト血漿を含んだリン酸緩衝生理食塩液(pH7.4)に，最終濃度 0.25％溶液になるように懸濁して使用時まで4℃に保存した．

ウシフィブリノーゲン感作ラテックスの調製：

ラテックスは，1/15 M リン酸緩衝生理食塩液(pH7.3, 0.1％窒化ナトリウム)に，Bovine serum albumin を 0.001％に加えた感作用緩衝液で 0.25％懸濁液とした．これに同じ感作用緩衝液で作製したウシフイブリノーゲン 50μg/m*l* 溶液を等量加え，混和後室温で1時間反応させた．反応後，10,000 r.p.m. 10min 遠心して感作ラテックスを集め生理食塩液で2回洗浄した．このようにして感作したラテックスは，1/15 M リン酸緩衝生理食塩液に Bovine serum albumin を 0.4％に加えた反応用緩衝液で最終濃度 0.25％になるように懸濁し，使用時まで4℃に保存した．

スライド・ラテックス凝集反応の方法：

被検菌株を寒天平板に塗抹して 37℃で培養後，発育した集落の1つを白金線でとり，スライドガラス上に滴下した生理食塩液に懸濁した．生理食塩液で自然凝集が生じないことを確認した後，これに感作ラテックス液を1滴加え白金線で十分攪拌後，スライドガラスを前後に揺り動かして反応させ，1～2分以内に肉眼で明瞭な凝集を認めたものを陽性と判定した．

成　績

食品由来の *S.aureus* および non-*S.aureus* の菌株のスライド・ラテックス凝集反応と他の生化学性状：

食品由来の *S.aureus* および non-*S.aureus* について，従来から *S.aureus* の同定に用いられている各種生化学性状試験とスライド・ラテックス凝集反応を行なった成績を Table 1 に示した．*S.aureus* 304 株は，すべて卵黄反応陽性であった．しかし，コアグラーゼ，マンニット，耐熱性DNase，クランピングファクターにおいては，これらのいずれかが陰性で典型的な性状を示さない特殊な菌株が各々数株認められた．non-*S. aureus* 286 株では，マンニットの分解性において 176 株が陽性を示した．しかし他の性状はすべて陰性であった．

スライド・ラテックス凝集反応では，*S.aureus* は304株中301株（99.0％）が陽性，3株が陰性であった．non-*S. aureus* では，陽性になった菌株は1株もなく，286株すべてが陰性であった．

食品由来 *S.aureus* のスライド・ラテックス凝集反応および各種性状のパターン分類：

S. aureus 304 株の生化学性状とスライド・ラテックス凝集反応を比較した成績を Table 2に示した．*S. aureus* の鑑別性状として実施した生化学性状がすべて陽性であった 293 株（96.3％）は，スライド・ラテックス凝集反応もすべて陽性であった．またマンニット陰性の5株，コアグラーゼ陰性の2株，耐熱性 DNase 陰性の1株もスライド・ラテックス凝集反応は陽性であった．しかしクランピングファクター陰性の3株は，スライド・ラテックス凝集反応陰性であった．

選択分離培地上の集落からのスライド・ラテックス凝集反応：

*S. aureus*の選択分離培地としては，MSEY, Colombia agar（BBL）を基礎培地とした MSEY（C-MSEY と

Table 1. Slide Latex Agglutination and Biochemical Characteristics of *S.aureus* and Non-*S.aureus* strains Isolated from Foods.

Test	No. of strains tested	
	S. aureus (n=304)	Non-*S.aureus* (n=286)
Egg-yolk reaction		
Positive	304	0
Negative	0	286
Coagulase		
Positive	302	0
Negative	2	286
Mannitol		
Postive	299	176
Negative	5	110
Thermostable DNase		
Positive	303	0
Negative	1	286
Clumping factor		
Positive	301	0
Negative	3	286
Slide latex agglutination with:		
Human plasma		
Positive	301	0
Negative	3	286
Bovine fibrinogen		
Positive	301	0
Negative	3	286

略), Baird-Parker medhum(Difco), Vogel and Johnson agar（栄研）を用い，これらの培地と非選択分離培地の Trypto-Soya agar に培養した菌についてスライド・ラテックス凝集反応を比較検討した成績を Table 3に示した．食品由来の卵黄反応陽性とウシ乳房炎由来の卵黄反応陰性の *S.aureus* は，いずれも Trypto-Soya agar に培養した場合はすべてスライド・ラテックス凝集反応が陽性であったが，選択分離培地に培養した場合には，陰性となるものが認められた．特に MSEY 培養菌では，卵黄反応陽性菌 38/90 株（42.2%）および陰性菌の 16/26 株（61.5%）がスライド・ラテックス凝集反応陽性となったにすぎず，この反応が抑制されるものが多く認められた．一方，C-MSEY および Baird-Parker medium では，卵黄反応陰性菌のスライド・ラテックス凝集反応は抑制されたものは1株も認められず，卵黄反応陽性菌の1部だけが抑制されたにすぎなかった．Vogel and Johnson agar では，卵黄反応陽性菌の1/90株と陰性菌の5/26株のスライド・ラテックス凝集反応性が抑制された．Baird-Parker medium および Vogel and Johnson agar では，対照の Trypto-Soya agar と顕著な差はなく，選択分離培地でもスライド・ラテックス凝集反応が適用できることが示された．

S.epidermidis および *Micrococcus* spp. は，対照の Trypto-Soya agar および選択分離培地の MSEY や C-MSEY においても，陽性のものは1株も認められなかった．

考　察

黄色ブドウ球菌は，ヒトや動物の血漿あるいはフィブリノーゲン溶液とスライドガラス上で混合すると，凝塊を形成する．これは細胞表層に存在するクランピングファクターを検出する方法で，スライド・コアグラーゼ試験と呼ばれ，黄色ブドウ球菌を特徴ずける性状の1つと

Table 2. Correlation between Slide Latex Agglutination and Biochemical Characteristics of 304 *S.aureus* Isolated from Foods.

No. of strains	Test					Slide latex agglutination with:	
	Egg-yolk reaction	Coagulase	Thermostable DNase	Mannitol	Clumping factor	Human plasma	Bovine fibrinogen
293	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	−	+	+	+
3	+	+	+	+	−	−	−
2	+	−	+	+	+	+	+
1	+	+	−	+	+	+	+

Table 3. Slide Latex Agglutination of *S.aureus, S.epidermidis* and *Micrococcus* spp. Grown on Selective Agar Media.

Strains	No. of tested	No. of positive strains grown on individual				
		Trypto-Soya agar	MSEY*	C-MSEY**	Baird-Parker medium	Vogel and Johnson agar
S.aureus (Egg-yolk : +)	90	90	38	72	84	89
S.aureus (Egg-yolk : −)	26	26	16	26	26	21
S.epidermidis	28	0	0	0	NT***	NT
Micrococcus spp.	46	0	0	0	NT	NT

* : Mannit Solt Egg Yolk agar
** : MSEY agar with Columbia agar as basal medium
*** : Not tested

して知られている[3]. このスライド・コアグラーゼ試験を応用したEssersとRadeboldのスライド・ラテックス凝集反応は，簡便で迅速性があり，また試薬を長期間冷蔵室で保存することができる．この方法を用いてMyrickとEllner[4]は，臨床材料から分離した *S. aureus* 357株のうち351株（98.3%）が陽性であったと報告している．またDoern[5]も160株のうち159株（99.4%）が陽性であったと報告している．

私どもは，食品から分離した *S. aureus* 304株についてスライド・ラテックス凝集反応を行なった結果，そのうちの301株（99.0%）がこの方法で *S. aureus* と同定された．また *S. aureus* 以外の *Staphylococcus* spp.および *Micrococcus* spp.の286株は，すべて陰性であった．このことから，この方法の有用性を確認することができた．

S. aureus の選択分離培地に発育した集落では，グリシンでその選択性を高めているBaird-Parker mediumとVogel and Johnson agarで，スライド・ラテックス凝集反応ができることが明らかとなった．これに対して，食塩による選択性のMSEY培地では，116株中54株（46.6%）が陽性であったにすぎなかった．このためにMSEY培地の基礎培地として，栄養源の高いColumbia agarを用い改良MSEY培地(C-MSEY)を作製して行なったところ，98株（84.5%）が陽性となった．このことから，培地を改良することによって高濃度に食塩が入った培地でも，スライド・ラテックス凝集反応を用いることができることが明らかとなった．また獣医学領域や動物性の食品からしばしば検出されることが報告されている卵黄反応陰性の *S. aureus*[6]は，この改良培地で26株すべて陽性であった．このことからこの方法は，卵黄反応にかかわらず *S. aureus* を同定できることが明らかとなった．改良MSEY培地でスライド・ラテックス凝集反応ができるようになる理由として，この培地では，凝集反応にあずかる物質が多く産生されるためと推察される．

今回，血漿成分であるフィブリノーゲンを感作したラテックスを用いる方法についても検討した．その結果，血漿感作ラテックスと同様な成績が得られた．

以上のように，これまでコアグラーゼ試験等によって行なってきた *S.aureus* の同定を，スライド・ラテックス凝集反応を用いて簡便にできることが明らかとなった．特に選択分離培地に発育した集落からも行なうことができるので，食品細菌検査の分野でも充分応用することができると考えられる．

結　論

食品由来黄色ブドウ球菌の同定法として，簡易・迅速スライド・ラテックス凝集反応が有効であるかどうかを検討するとともに，本反応を食品からの検査に直接応用するために，選択分離培地上の集落の凝集性の検討を行なった．

食品から分離した *S. aureus* 304株と，non-*S. aureus* 286株についてスライド・ラテックス凝集反応を行なった結果，*S. aureus* は304株中301株（99.0%）が陽性であった．これに対し，non-*S.aureus* 286株はすべて陰

性であった．このことから，この方法の有用性を確認することができた．

選択分離培地に発育した集落においては，Baird-Parker mediumとVogel and Johnson agarでは*S.aureus* 116株中110株（94.8%）がそれぞれ陽性を示し，この方法の有用性が明らかとなった．これに対してMSEY培地では，わずかに54株(46.4%)が陽性であったにすぎなかった．しかし，Columbia agarを基礎培地とした改良MSEY培地では，98株(84.5%)が陽性となった．このことから培地を改良することによってMSEY培地でもスライド・ラテックス凝集反応を*S.aureus*の簡易・迅速同定法として適用できることが明らかとされた．

文　献

1) Essers, L., and K. Radebold : *J. Clin. Microbiol.*, 12, 641, 1989
2) Lachica, R. V. F., C. Genigeorgis, and P. D. Hoeprich : *Appl. Microbiol.*, 21, 585, 1971
3) Blobel, H., W. ScHaeg and J. Brückler : **Zbl. Bakt. 1. Abt.,** Suppl. 10, 487, 1981
4) Myrick, B. A., and P. D. Ellner : *J. Clin. Microbiol.*, 15, 275, 1982
5) Doern, G. V. : *J. Clin. Microbiol.*, 15, 416, 1982
6) Takeshige, K., Watanabe, K., Igarashi, H., Shingaki, M. and Terayama, T. : *Jpn. J. Vet. Sci.*, 45(3), 355, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 43-48, 1984

酵素抗体法（ELISA）による日本住血吸虫症の治療効果判定の試み　（第3報）
特に Praziquantel 投与患者から得られた血清・血漿の ELISA 抗体価の推移について

村　田　以和夫*, 松　田　肇**, 田　中　寛**, BAYANI L. BLAS***

Evaluation on Efficiency of Treatment with Praziquantel for Schistosomiasis japonica by ELISA Titration on Pair-Sera or Plasma, obtained from Patients in Leyte, Philippines

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

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), (Murata *et al*, 1982 and 1983) was demonstrated to be useful not only for serodiagnosis of schistosomiasis but also in evaluating therapeutic effect with Praziquantel. ELISAwith 3 kinds of antigens, prepared from male and female adult warms and eggs of *Schistosoma japonicum* were examined on total of 47 cases including 8 pair-sera and 7 pari-plasma obtained from patients with Schistosomiasis japonica in Leyte, Philippines. The results of the evaluation on efficiency of treatment by ELISA were as follows.

1) ELISA titers with adult-antigen declined markedly in the patients who had 3 to 4 month course of Praziquantel treatment. No such decrease in titer was noted when egg-antigen was used.
2) ELISA titers taken from those a month after treatement indicated that 3 kinds of antigen were maintained the same as or increased much more than those of non treatment-group.
3) ELISA antigen, prepared from adult warms of *S. japonicum* appeared to be more useful for an evaluation of treatment than that from eggs.
4) On the other hand, ELISA with egg-antigen mey be used for mass treasment with Praziquantel in comparison with optical density method as an index for evaluation.

Keywords : ELISA, efficiency of treatment with Praziquantel, Schistosomiasis japonica, pair-sera from Patients, Leyte, Philippines

はじめに

著者ら[1,2] (1982, 1983) は，「酵素抗体法(ELISA)による日本住血吸症の診断」について，すでに第1報と第2報で報告した．その中で，著者らが意図して別々に調製した日本住血吸虫(*S.j.*)の虫卵抗原および雌雄両成虫抗原の特性を明らかにすべく，引き続き検討を重ねる必要があると考察した．1979年1月より，フィリピンの Schistosomiasis Control and Research Project (S.C.R.P) は Praziquantel (EMBAY 8440, Biltricide®, Bayer) による日本住血吸症の集団治療に着手しているが，田中ら[3] (1984) は，この集団治療による本症罹患率減少効果について，次のように報告している．Layte 島 Dagami 地区の9小学校1,800名の児童を対象に，1974年以降 *S.j.* の虫卵検査と卵周囲沈降反応(C.O.P.T.)によって追跡調査を行なった結果，同地区の50*ha* の小規模環境改善ではみるべき効果はなかったが，1979年から始まった集団治療の結果，その翌年から罹患率の著るしい低下が見られたと記述している．Praziquantel による本症治療効

*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

果について評価する方法としては，臨床所見の改善，検便による虫卵の陰転およびCOPTの変化を中心とする指標が用いられているが，ELISAの成績もまた治療効果判定に具体的な指標を与えるものとして着目されている．すでに，松田ら[4] (1979) は，*S.j.*実験感染ウサギのELISA抗体を測定して，Praziquantel (100mg/kg×4回/1日)の投与により，治療後10週目以降に50%以上のOD値の減少を認め，特に成虫抗原によるELISAでは，OD値の減少が著明であったと報告している．

この松田らの報告に着目した著者らは，今回，S.C.R.P.において，Praziquantel(30 mg/kg×2回/1日)により，実際に治療した本症患者のペア血清または血漿を用いてELISA(Peroxidase-OPD system)抗体価の推移について比較検討した．その結果，従来から治療効果判定に用いられている指標に加えて，成虫抗原によるELISAが利用され得る成績が得られたので報告する．

材料および方法

1．材料：S.C.R.P.外来患者のうち，臨床所見，虫卵検査およびCOPTで本症と診断されたもので，Praziquantel投与後，適当な期間をおいて再来院した患者，計32例を対象とした．ELISA血清および血漿は，治療前と治療後のペア血清8組，(16例) とペア血漿7組 (14例)，非同一患者の治療後血清4例，血漿6例ならびに治療前血漿7例，計47例を被検体とした．また，治療前の患者群血清80例とPraziquantel治療群血清，血漿31例およびマニラで採取した非日本住血吸症の対照血清60例を任意に選び，1：80～1：320の各血清希釈段階における平均OD値を求めて，各群間のDO値の有意性の検定をWelch's t-testにより行なった．

2．方法：第1報[1]で詳述したPeroxidase-OPD syst-

Table 1 Comparison of the Average of Optical Density by ELISA with Egg-Antigen on the Groups of Sera from Patients with Schistosomiasis japonica Between Before and After-Treatment with Praziquantel.

Groups of Sera	No.of Samples	Serm Dilution	Optical Density by ELISA		
			Average	Standard Deviation	
Before Treatment	80	1 : 80	.285	.083	*
	80	1 : 160	.241	.082	
	80	1 : 320	.199	.083	
After Treatment	31	1 : 80	.136	.069	* 1
	31	1 : 160	.103	.053	
	31	1 : 320	.077	.036	
(Items)					
Cerebral Cases	12	1 : 80	.073	.029	* 2
	12	1 : 160	.055	.020	
	12	1 : 320	.047	.015	
Hepatosplenomegaly Cases	17	1 : 80	.183	.056	* 3
	17	1 : 160	.140	.042	
	17	1 : 320	.101	.030	
Unknown Cases	2				
Contrrol Sera obtained in Manila	60	1 : 80	.060	.014	* 4
	60	1 : 160	.056	.011	
	60	1 : 320	.053	.012	

Note : Welch's t-test

* : * 1 P<0.001

* : * 2 P<0.001

* : * 3 P<0.001

* : * 4 P<0.001

Control sera was obtained from San Lazaro Hospital and Beureau of Reseach and Laboratory in Manila.

emによるELISAで，*S.j.*虫卵抗原，雌および雄成虫両抗原，計3種類の抗原に対する抗体価を測定した．血清および血漿の希釈法は，0.05% Tween20, 1% Bovine serum albumine加 0.15M PBS(pH7.2)で，まず，10倍希釈を行ない，次いで2倍希釈系列で抗体価を測定した．終末点のDO値は，その都度用意した陰性対照血清数例の各希釈段階のOD値の2倍の値で陽性または陰性と判定した．

成　　績

Table 1は，各段階希釈血清の未治療群，既治療群および対照群の虫卵抗原によるELISAの平均OD値を比較したものである．未治療群のOD値は，対照群と比べ1：80で4.7倍，1：160で4.3倍，1：320で3.7倍の高値を示した．一方，治療群のOD値は，対照群と比較して1：80で2.3倍，1：160で1.8倍，1：320で1.5倍の値を示しているが，未治療群と比べると，1：80で53%，1：160で57%，1：320で61%低いOD値が得られた．これらの比較成績は，Welch's t-testで検定した結果，未治療群：治療群，未治療群：対照群との間に有意差（$P<0.001$）が認められた．この成績は，虫卵抗原によるELISAでもPraziquantelによる集団治療に際して，治療前の平均OD値を測定しておけば，治療後の平均OD値と比較して，効果判定の指標となり得ることを示唆している．治療群のうちわけは，脳症群12例，肝脾腫症群17例からなるが，脳症群と肝脾腫症群にわけても同様に平均OD値の有意差が認められた．しかしながら，脳症群のOD値は対照群のOD値と有意差が認められない程低い値であった．Fig.1は，本症同一患者血清7例の治療前と治療1ヵ月後の3種抗原に対するELISA titerを比較したものである．雄成虫抗原に対するELISA titerは治療後上昇した例が4/7（57.1%），同じ例2/7(28.6%)，低下した例1/7(14.3%)で，逆に雌成虫抗原に対するTiterの変化は，上昇例が0，同じ例が2/7(28.6%)，下降例が5/7(71.4%)であった．また，虫卵抗原によるELISAでは，Titerが上昇した例が，3/7(42.9%)，変化しない例が1/7(14.2%)および下降した例が3/7(42.9%)であった．総じて，治療後1ヵ月目に採取した同一患者血清では，治療前と比較して，ELISA titerが上昇するか停滞するものが多い成績であった．Fig.2は，非同一患者群で未治療時採取血漿7例，

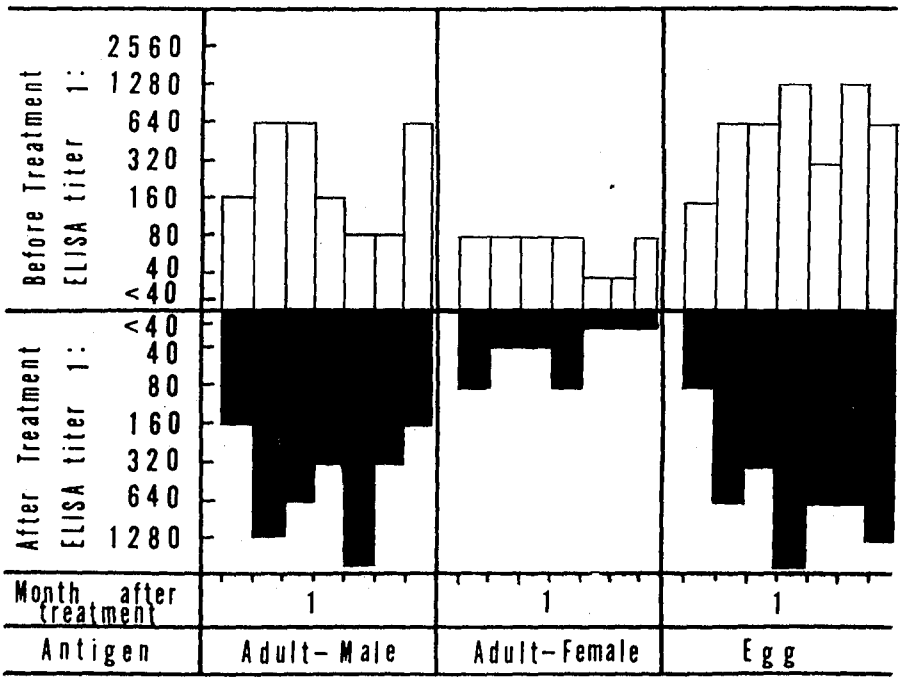


Fig. 1 Comparison of ELISA Titer Between Before and One Month After Treatment with Praziquantel on The Pair-Plasma from Same Patient infected with *S.japonicum*

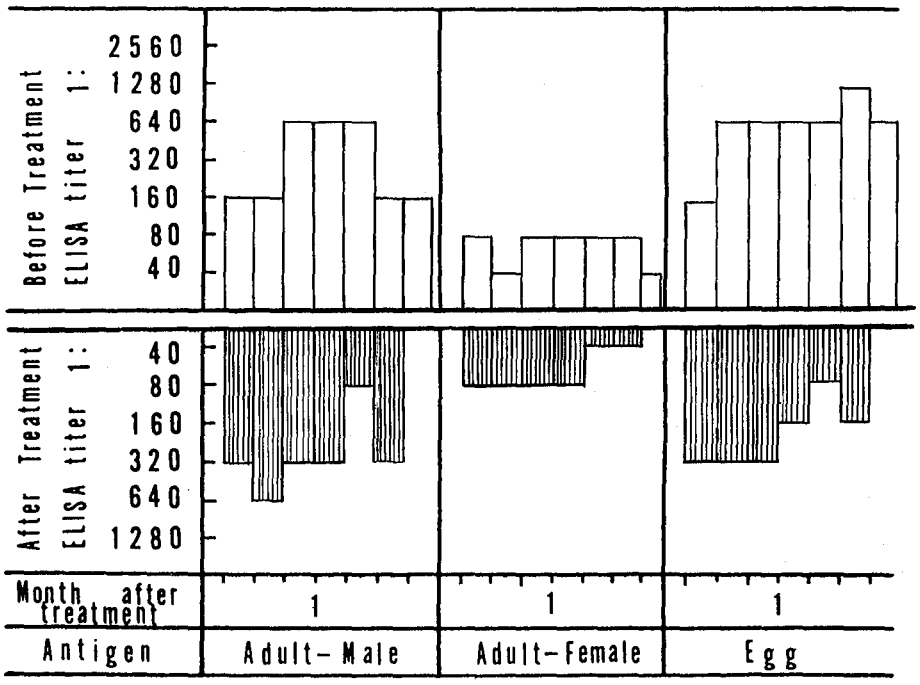


Fig. 2 Comparison of ELISA Titer Between Before Treatment and One Month After Treatment Groups on The Plasma from Patients Infected with *S.japonicum*

治療後1ヵ月目の再診時採取血漿6例のELISA titerを比較したものである．この例では，同一患者から治療前後に採取したペア血漿ではないので，ELISA titerの変化を直接比較することはできないが，群としてみると，治療1ヵ月後の採取血漿のELISA titerに顕著な変化は認められなかった．すなわち，Fig. 1で示した同一患者より治療前と治療1ヵ月後に採取したペア血清のELISA titerの消長パターンと同程度のものであった．

Fig. 3はPraziquantel投与後，3ヵ月目採取血清4例，4ヵ月目採取血清3例，5ヵ月目採取血清2例，7ヵ月目採取血清2例および12ヵ月後採取血清1例，計12例について，それぞれ治療前後のELISA titerの推移を比較したものである．前述の治療1ヵ月後に採取した血清の消長パターンとは異なり，3ヵ月以上を経過して採取した血清のELISA titerの変化は著明で，特に雌雄両成虫抗原に対する抗体価が減少し，ペア血清8組全部が1：40以下に陰転した．しかしながら，虫卵抗原に対する抗体価は，なおも1：80以上の陽性域を示すものがほとんどで，患者各人の治療効果判定用としては，虫卵抗原によるELISAは不適当であった．この成績から治療後の抗体持続期間が短かく，顕著な抗体価の減少を示す雌雄成虫抗原は，治療効果をみたうえで虫卵抗原より有利な特性をもつことが明らかとなった．

考　察

日本住血吸症の治療効果判定は，場来から臨床所見の改善，糞便検査による虫卵の消失およびCOPTの変化等を指標になされて来た．実験動物による駆虫効果判定は，剖検により成虫または発育段階の幼虫の回収法や病理学的評価によってなされるが，ヒトではこの様な方法は用いられない．そこで，免疫学的な効果判定の導入により，数値的に確かな指標を見い出す目的で，松田ら[4,6](1980, 1984)は*S.j.*感染ウサギにおけるPraziquantel治療前後の経過的ELISA抗体の消長を追跡した．その結果，Praziquantel) 100 mg/kg×4回/1日）投与後のウサギでは，10週後採取血清のELISA-OD値は投与前と比べ，虫卵抗原で52.6%成虫抗原で56%減少し，ELISA titerは治療後14週で3～4管，38週後には成虫抗原で全例が陰転すると報告している．また，虫卵抗原は感度の良さ

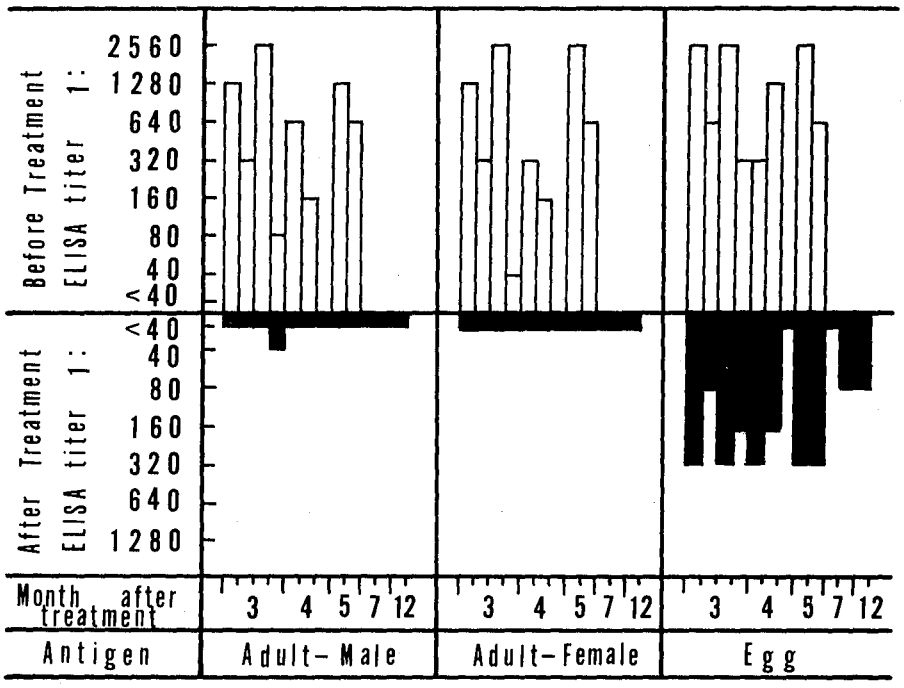


Fig. 3 Comparison of ELISA Titer Between Before and 3 to 12 Month After Treatment with Praziquantel on The Pair-Sera from Same Patients Infected with *S.japonicum*

から診断用として，また，成虫抗原は治療効果判定用に利用されうると記述している．今回，著者らが行なった実験においても，治療後3ヵ月以上経過した患者血清のELISA-titerは，成虫抗原を用いた場合に，ほとんどのものが1：40以下に陰転することを明らかにした．これら一連のELISA成績は松田ら[4,6]のウサギによる治療試験の成績をヒトの例からも追認し得たものと理解される．また，成虫抗原を用いてのELISAでも，同一集団の治療前後に得られた血清群を対象に平均OD値の推移を測定することによって，ある程度まで集団駆虫効果を推定可能との示唆が得られた．成虫抗原の方が虫卵抗原より治療効果を見るうえで有利である理由については，次にa)～c)に示す事実に照らして総合的に考察する必要がある．すなわち，a)慢性経過をたどる本症では，診療に至る期間が相当長期におよび，数年～十数年を経てやっとS.C.R.Pに来院する例がごく普通である．その間にレイテ島のような本症の高度浸淫地域では，再感染が数次におよび，また本虫卵の内臓組織内蓄積も高度に進行するものと容易に推定できる．b) Matsuda[5] *et al*(1983)の報告に記載されるように，Praziquantelの *in vitro* の殺虫効果は，成虫に著効を示すのみならず，成熟虫卵に対しても5分間で脱殻を促して殺滅することが明らかである．しかしながら，schistosomuraeのような発育段階の幼虫や，未成熟虫卵に対しては無効である．c)最近，著者が遭遇した一症例として，18歳まで山梨県に在住した女性（50歳）で子宮筋腫の摘出手術を行なったところ，卵巣の組織標本から*S.j.*虫卵を見い出した例があった．次いで直腸生検材料から同種虫卵を見い出し，この患者血清のELISA成績は，慢性症診断用に感度をあげた方法で陽性のOD値が得られた．以上の点から，Praziquantel投与前に蓄積された虫卵の抗原刺激は相当長期間すなわち著者が遭遇した症例では，32年を経てもなお持続されるようである．また，駆虫薬投与後，死滅成虫体は3ヵ月以上を経て排除されるか，あるいは抗原性が失活されるものと推定される．それゆえに，治療効果判定には，虫卵抗原よりも成虫抗原を用いたELISAの方が有用で，同一患者からの血清採取は治療前と治療後3ヵ月以上経過した2時点に行なわれることが望ましい．さらに，治療効果判定をより正確にするためには，再診までの期間内に，新たな本虫再感染を極力防止する努力をお

こたってはならない．今回，著者らが採取し得た同一患者のペア血清はきわめて少数で，今後さらに症例を増やして検討すべきと思われるが，実際には，S.C.R.P.で再診を受ける患者は少ない．症状が改善され，健康が回復するとすみやかに農作業に従事し，再感染の危険度が高い田園に復帰する者が大半で，自らの健康維持に留意しえないのがフィリピンの実情である．数少ない再診に応じ得た患者達はごく特別な境遇にあり，相当自らの健康を顧る余裕があった人々と推察される．

結　論

フィリピン，レイテ島の日本住血吸症患者に Praziquantel（30 mg/kg×2 回/1 日）を投与して，治療前の ELISA titer と治療後1ヵ月以上経過後の採取血清 20 例，血漿 27 例，計 47 例について ELISA titer の推移を検討した．

1）成虫抗原による ELISA titer の推移は，治療後3～4ヵ月以上経過した患者群血清に顕著な抗体低下を認め，ほとんどのものが陰転した．

2）治療後1ヵ月後に採取した血清の ELISA titer は，虫卵，成虫各抗原ともに，治療前と同等か上昇したものが多かった．

3）治療効果判定のためには，成虫抗原の方が虫卵抗原より有用性が高いと考察された．

4）一方，虫卵抗原による ELISA は Praziquantel による集団駆虫の効果をはかる一つの指標となりうる．

謝辞　本研究は，国際協力事業団の日本―フィリピン医療技術協力の一環としてなされたものである．本研究の機会を与えられたことに対し，同事業団に謝意を表します．

また，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. Gerundio P. Portillo ならびに Dr. Lilian C. Tormis および関係各位より多大なるご協力を得た．記して深謝の意を表明します．

文　献

1) 村田以和夫，松田　肇，田中　寛，BAYANI L. BLAS：東京衛生研年報，33，33，1982
2) 村田以和夫，松田　肇，田中　寛，BAYANI L. BLAS：東京衛生研年報，34，20，1983
3) 田中　寛，BAYANI L. BLAS，松田　肇，林　良博：寄生虫学雑誌，33（増刊号），47，1984
4) 松田　肇，中尾　稔，田中　寛，安羅岡一男：寄生虫学雑誌，29,（1），第39回日本寄生虫学会東日本支部大会特集，15，1980
5) Hajime MATSUDA, Hiroshi TANAKA, Sadao NOGAMI and Motonobu MUTO : *Japan. J. Exp. Med.*, 53,（6），271，1983
6) 松田　肇，中尾　稔，森田真奈実，田中　寛：寄生虫学雑誌，33, 3, 167, 1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 49-54, 1984

1981年から1983年までの3年間における売春容疑者のリン菌保菌率と分離菌株の薬剤感受性

石上　武*, 堀　幹郎*, 鈴木重任*, 大橋　誠*
丸山　脩**, 林田陽一**, 斎藤リツ**

Studies on Gonorrhea in Tokyo : Its Prevalence in Prostitutes and Antimicrobial Agent-Susceptibility of the Causative Agent, 1981—1983

TAKESHI ISHIKAMI*, MIKIO HORI*, SHIGETO SUZUKI*,
MAKOTO OHASHI*, OSAMU MARUYAMA**,
YOICHI HAYASHIDA**, and RITSU SAITO**

Keywords :リン疾 Gonorrhea, β-ラクタメース産生性ペニシリン耐性リン菌 Penicillinase Producing *Neisseria gonorrheae* (PPNG), 薬剤感受性 Antimicrobial Agent-Susceptibility, 街娼 Prostitute

はじめに

わが国のリン疾届け出患者数は，1977年以降増加し続け，1982年までの6年間に約2.5倍に達している[1]．しかしながら，1982年の届け出患者数は10,409名，罹患率8.8にすぎず，欧米諸国と比較すると極めて低率である．しかし，リン疾の届け出励行には問題があり，実際にはさらに多数の患者あるいは保菌者が潜在するものと考えられる．一般に性病の実態の把握は極めて困難である．

一方，1976年に英国および米国で発見されたβ-ラクタメース産生性のペニシリン耐性リン菌(PPNG)[2]はその後急速に分布を拡大し，リン疾問題の重要性に拍車をかけることとなった．すなわち，本菌は翌1977年には日本でも海外罹患例から分離され[3]，その後の報告では国内感染例からも分離されるようになり，最近ではその検出率は20%ともいわれている[4][5][6]．

このようなことから，特定集団におけるリン菌保菌率と分離菌株の薬剤感受性を調査することは，リン疾の動態を知るための一つの手段としてきわめて意義深いことと考えられる．

今回私たちは，1977年から1980年に行われた小原ら[7]の調査のあとを受け，1981年からの3年間東京都内において検挙された売春容疑者についてリン菌保菌率および分離菌の薬剤感受性を調査した．以下はその成績である．

調査対象と方法

1．調査対象

対象は1981年1月から1983年12月までの3年間に，都内で売春容疑により検挙され，性病予防法第11条の定めるところにより東京都公衆衛生部防疫結核課分室において検診を受けた女性(以下街娼という)で，1981年324(延べ387)名，1982年252(延べ289)名，1983年152(延べ168)名，計634(延べ844)名である．

2．調査方法

検体は炭抹処理綿棒を用いて採取した街娼の子宮頸管および尿道分泌物で，採取直後これを容器内に炭酸ガスを充塡したThayer-Martin培地に塗抹し密栓して37℃で前培養したものと，残りの綿棒をStuartの輸送培地に穿刺して密栓し氷室内に保存したものとを当研究所にほぼ週2回の頻度で搬入し，検査に供した．また，検査材料には街娼の氏名，年齢，住所（都内外の別）および材料採取日を記入した送付書を添付した．また，採取検体については，採取直後そのメチレンブルー単染色標本を作成し，鏡検してその結果をも送付書に記録した．

リン菌の分離は，前述のThayer-Martin培地からと，

* 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
** 東京都衛生局公衆衛生部防疫結核課

保存綿棒材料を Isovitalex*と VCN-inhivitor*添加 GC 培地**に塗抹して行った.

分離培地上に発育した疑わしい集落については，グラム染色，オキシターゼおよびカタラーゼ反応，糖分解能試験（ブドウ糖，マルトース，フラクトース，乳糖および白糖），22℃および普通寒天培地上での発育試験，硝酸塩および亜硝酸塩の還元試験，5％白糖加培地上での発育性と多糖類産生試験を行い，性状の一致したものをリン菌と同定した．同定されたリン菌については，Beta-Lactamase Detection Paper***を用いて β-ラクタメース産生能を検査した.

分離菌株の薬剤感受性は，各薬剤の最少発育阻止濃度(MIC)を測定することにより検査し，WHO の方法[8]に従って実施した．また 1981 年分離の 18 株，1982 年分離の 28 株，1983 年分離の 31 株計 77 株をその対象とした．使用薬剤は，ペニシリン(PCG と略，明治製菓)，アンピシリン（ABPC，山之内製薬)，セフロキシム（CXM，塩野義製薬)，セフォキシチン（CFX，日本メルク萬有)，ラタモキセフ(LMOX，塩野義製薬)，ゲンタマイシン(GM，塩野義製薬)，スペクチノマイシン(SPCM，日本 Upjohn)，カナマイシン(KM，明治製菓)，テトラサイクリン(TC，明治製菓)，クロラムフェニコール(CP，三共製薬)，エリスロマイシン（EM，塩野義製薬)，スルファメソキサゾール・トリメソプリム（5：1）合剤（ST，塩野義製薬)，ロサマイシン(RM，ウィンスロップラボラトリーズ)で，被検菌株に対する MIC は PCG では u/m*l* で，その他の薬剤では μg/m*l* で表わした.

成　績

1．検挙された街娼の年齢分布および検挙回数

調査期間中に検挙された街娼 634 名延べ 844 名の年齢は，15 歳から 67 歳までの広い範囲に及んだが，年齢構成は 3 年間を通して変らず，40 代が 34.7％と最も多く，次いで 30 代が 24.8％で，両者を合わせると全体の約 60％を占めた(図 1)．これらの検挙された街娼の 3 年間における検挙回数を年齢別に表 1 に示した．復数回検挙された街娼は，30 代および 40 代が中心で，22.2％延べ数で 41.6％を占め，最高 5 回のものが 7 名みられた.

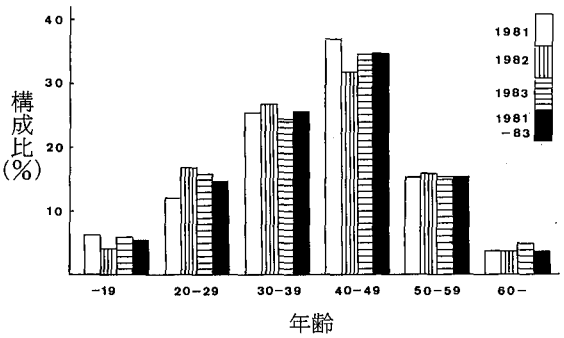


図 1．街娼の年齢構成

2．培養検査によるリン菌保菌率

1）年次別・年齢別保菌率

培養検査による年齢別リン菌保菌率を表 2 に示した．1981 年は検体数 387 中リン菌陽性数 53 で 13.7％，1982 年は 289 中 45 で 15.6％，1983 年は 168 中 32 で 19.1％であり増加傾向がみられた．年齢別保菌率を見ると 3 年間の平均では年齢による保菌率にはあまり差がなかった．被検例数の少ない 10 代と 60 代では年次別に保菌率に不規則な変動がみられたが，30 代においては，1983 年の保菌率が 1981 年および 1982 年と比較して約 2 倍の 26.8％と高率であった.

2）街娼の年次別検挙回数と培養によるリン菌陽性回数

各年次ごとの街娼の検挙回数は，いずれも最高 4 回であった．また，リン菌保有街娼は，1981 年 2 回陽性 4 名，1982 年 2 回および 3 回陽性が 1 名ずつ，1983 年 3 回陽性が 1 名であり，3 年間を通してみると 2 回陽性 10 名，3 回陽性 3 名であった（表 3)．

3）住居地別保菌率

住居地別保菌率を表 4 に示した．被検街娼は全て都内において検挙されたものであるが，都外居住者が各年 15～20％を占めた．これら都外居住者のリン菌保菌率は 3 年平均 11.4％で都内住居者の 16.5％より低率であった

表 1．検挙された街娼の年齢別検挙回数

年　齢	検挙回数					合計
	1	2	3	4	5	
～19	41	3				44
20～29	85	8	3	2	1	99
30～39	118	25	9	2	3	157
40～49	160	34	13	4	2	213
50～59	72	21	4		1	98
60～	17	3	3			23
合　計	493	94	32	8	7	634
(%)	(77.8)	(14.8)	(5.1)	(1.3)	(1.1)	(100)
のべ合計	493	188	96	32	35	844
(%)	(58.4)	(22.3)	(11.4)	(3.8)	(4.2)	(100)

* BBL Microbiology systems, Cockeysville, USA
** Difco Laboratories, Detroit, USA
*** Oxoid Limited, Basingstoke, England

が，その年次別保菌率をみると1981年4.7%，1982年13.6%，1983年21.2%と顕著な増加傾向がみられた．

4）材料採取から分離までの日数別リン菌分離率

今回の調査では，方法の項でも述べたように，Thayer-Martin培地による前培養法とStuartの輸送培地による方法とを併用し，リン菌の分離を試みた．表5に示したように，両者いずれかの方法によりリン菌が検出された率は，材料採取後分離培地への塗抹までの日数が3日までは15.4%から18.0%であったが，4日では10.2%，5日では9.7%と減少傾向がみられた．

5）塗抹標本鏡検と培養検査とにおけるリン菌陽性率の比較

防疫課分室において材料採取時に行なわれた鏡検と同材料についての培養検査とによるリン菌検索の結果を表6に示した．鏡検の結果リン菌陽性として送付された材料214件中，培養検査の成績が陽性であったものは80件（37.4%）であったが，鏡検成績陰性とされたものからも630件中50件の培養陽性例があった．全被検者数844中両検査の成績が陽性として一致したものは80(9.5%)，陰性として一致したものは580（68.7%），不一致は

表2. 培養検査による年次別・年齢別陽性率

年齢	1981年			1982年			1983年			合計		
	検体数	陽性数	陽性率(%)	検体数	陽性数	陽性率(%)	検体数	陽性数	陽性率(%)	検体数	陽性数	陽性率(%)
～19	25	5	20.0	12	1	8.1	10	2	20.0	47	8	17.0
20～29	47	7	14.9	49	8	16.3	27	3	11.1	123	18	14.6
30～39	99	14	14.1	78	10	12.8	41	11	26.8	218	35	16.1
40～49	143	15	10.5	94	14	14.9	56	8	14.3	293	37	12.6
50～59	59	11	18.6	46	8	17.4	26	6	23.1	131	25	19.1
60～	14	1	7.1	10	4	40.0	8	2	25.0	32	7	21.9
合計	387	53	13.7	289	45	15.6	168	32	19.1	844	130	15.4

表3. 検挙された街娼の年次別検挙回数と培養によるリン菌陽性回数

年	検挙回数						陽性回数			
	1	2	3	4	5	合計	1	2	3	合計
1981	272	42	9	1		324	45	4		49
1982	222	24	5	1		252	40	1	1	42
1983	140	9	2	1		152	29		1	30
1981～1983延べ	493	94	32	8	7	634	101	10	3	114

表4. 培養検査による住居地別リン菌陽性率

年	都内住居者			都外住居者			住居不定者		
	被検者数	リン菌陽性者数	陽性率(%)	被検者数	リン菌陽性者数	陽性率(%)	被検者数	リン菌陽性者数	陽性率(%)
1981	317	49	15.5	64	3	4.7	6	1	16.7
1982	237	37	15.6	44	6	13.6	8	2	25.0
1983	120	25	20.8	33	7	21.2	15	0	0
合計	674	111	16.5	141	16	11.4	29	3	10.3

184 (21.8%) であった．不一致のうち鏡検で陽性であって培養陰性のものは134 (15.9%) であり，逆のものは50 (5.9%) であった．

表5．材料採取から分離までの日数別リン菌分離率

材料採取から分離までの日数	検体数	リン菌陽性検体数	陽性率 (%)
1	318	54	17.0
2	202	31	15.4
3	156	28	18.0
4	137	14	10.2
5	31	3	9.7
合　計	844	130	15.4

2．分離菌株の薬剤感受性

1）PPNG検出率

3年間に分離したリン菌130株のうちPPNGは5株であった．年次別にみると1981年には検出されず，1982年

表6．鏡検と培養検査の比較

鏡検成績	培養検査成績		
	被検材料数	リン菌陽性数	陽性率(%)
陽性例	214	80	37.4
陰性例	630	50	7.9
合　計	844	130	15.4

表7．分離菌77株の薬剤感受性

抗菌剤名	最小発育阻止濃度											
	≦0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
PCG	2	7	12	30	10	2	4	5	2 (2)	1 (1)	2 (2)	
ABPC	7	10	24	13	13	1	3	1	3 (3)	2 (2)		
CXM	45	12 (1)	6 (3)	6 (1)	4	2	2					
CFX				11	30 (1)	22 (2)	10 (2)	4				
LMOX	21	32 (1)	14 (1)	5 (3)	3	2						
GM								31 (3)	39 (2)	7		
SPCM										15	60 (5)	2
KM										28 (2)	46 (3)	3
TC				2	6	34	20 (3)	11 (2)	4			
CP					5	7	11 (2)	26 (1)	14 (2)	4		
EM	2	10 (2)	17	25 (2)	10 (1)	8	2	3				
ST ※							11	23	22	16 (3)	5 (2)	
RM	19 (3)	42	9 (2)	3	2	2						

※　スルファメソキサゾール：トソメソプリム＝5：1　（　）内数字はPPNG数再掲

は2株, 1983年は3株であった. 検出率にすると1982年は4.4%, 1983年は9.4%となり, 明らかな増加傾向がみられた.

2) 薬剤感受性

3年間に分離したリン菌のうち77株の13薬剤に対する感受性を表7に示した. PCGのMICが1 u/ml以上の株を耐性菌とすると, その割合は77株中14株, 18.2%であった. これを年次別にみると, 1981年11.1%, 1982年17.9%, 1983年22.6%であり増加傾向がみられた. ABPCのMIC 0.5 μg/ml以上の菌株は77株中10株, 13.0%であり, やはり年次別にみて増加傾向がみとめられた. CXMのMICは≦0.015 μg/mlから1 μg/mlの間の比較的広い範囲に分布した. これに反しCFXのMICは比較的狭い範囲で0.125 μg/mlから2 μg/mlに分布した. LMOXはやや広い分布をみせたが, いずれも0.5 μg/ml以下であった. GMに対する感受性はやや低く, MICは2 μg/mlから8 μg/mlの間にあった. SPCMおよびKMに対しても同様に感受性は比較的低く8 μg/mlから32 μg/mlの間にMICが分布した. しかしこれらの3薬剤に対する感受性は比較的狭いまとまりをもった一峰性の分布であった. TCのMICは0.125 μg/mlから4 μg/ml, CPのそれは0.25 μg/mlから8 μg/ml, EMは≦0.015 μg/mlから2 μg/ml, STは1 μg/mlから16 μg/ml, RM, ≦0.015 μg/mlから0.5 μg/mlの間にあり, いずれも一峰性の分布であった.

考　察

今回3年間にわたって調査した延べ844名のリン菌保菌率は全体で15.4%であったが, 年次別には1981年13.7%, 1982年15.6%, 1983年19.1%と増加の傾向がうかがわれた. 同じく検挙された街娼を対象にした調査では, 1973年の成績を常松ら[9]は15.5%であったと報告し, 1977年から1980年にかけての期間については, 小原ら[7]の報告があり, 保菌率10.1%であった. 東京都におけるリン疾届け出数[10]をみると, 1973年1,106件, 1977年から1980年においては, 655件, 869件, 935件, 1277件であり, 1981年は1,361件, 1982年1,621件, 1983年2,016件であり, 街娼のリン菌保菌率はある程度一般市民におけるリン疾罹患率を反映していると思われる. 今回の調査でリン菌保菌率が年次毎に増加する傾向が明らかにされたが, 今後の公衆衛生問題として憂慮されるところである.

この調査期間に検挙された街娼634名延べ844名のうち複数回検挙された街娼は141名延べ351名であり, そのうち培養において複数回陽性であった街娼は13名延べ29名であった. この中には, 分離菌株の薬剤感受性の違いからみて再感染と思われる街娼もおり, 街娼がリン疾の媒介としての役割を果していることが如実にうかがわれて興味深い. また, 検体を採取してから検査室に搬入して分離培養するまでの日数が4日以上になると, 検出率が悪くなることが今回の調査で明らかにされたが, このような検体が全体の約20%を占めていたことからすると, 街娼のリン菌保菌率は実際にはさらに高いと思われる. また, リン菌の検出率は1回のみの培養より連続して培養するほうが, また直腸や他の部位の培養を併用することによりさらに高くなることはすでに報告されているところである[9)11)].

鏡検と培養検査との成績の比較においては, 鏡検陽性で培養陰性という不一致例が15.9%みられたが, これらには検査時すでに薬剤が使用されていたため検出が困難であった場合も含まれているかも知れない. しかし, 培養条件により見のがした例も含まれるはずで, 培養条件の改善により, 検出率はさらに高くなることが期待される. また, 鏡検陰性でも培養陽性のものも5.9%の頻度でみられた. このことからすると, 現在リン疾検診は主として鏡検成績をもとになされているが, 今後は培養検査も取り入れる必要があろう.

PPNGは東南アジアやアフリカにはすでに濃厚に分布することが知られているが[12)13)], 諸外国と比較するとわが国では検出されることがややおくれた. しかし, すでに風俗営業従事者からの国内感染例が報告されるようになり[4)5)], 海外から持ち帰られる以外に国内にも定着したと考えられ, 今回の成績からもわが国でもPPNGが各層に広く浸透しつつあることが確認された. 幸にしてPPNGでSPCM耐性菌はみられなかったが, SPCMはβ-ラクタメース産生菌による感染例の治療に常用される薬剤であるので, 耐性菌の出現を監視して行く必要がある. PPNGの感染例の治療にはTCも用いられるが, TCはMIC 1 μg/ml以上で無効例が30−40%あるといわれている[12)]. 今回のわれわれの調査によれば, MIC 1 μg/ml以上の菌は約45%であった.

東京都防疫結核課の性病統計資料[10]によれば, 1983年の検挙者のうち街娼を専門とするものはわずか30%にすぎず, 他に定職を持っている兼業街娼とでも称すべきものがみられるようになったという. このようなものを介しての性病の伝播に対する対策は今後ますます困難になると考えられる. しかも, 東京都における男子リン疾患者感染源調査[10]によると, この数年間街娼からの感染は数%にすぎず, トルコ嬢, ホステスからの感染が約60%

を占めていることが明らかにされている．今後の総合的な性病対策がのぞまれる．

まとめ

1981年から1983年までの3年間に都内で売春容疑で検挙された女性延べ844名のリン菌保菌率を調査した．保菌率は1981年13.7%，1982年15.6%，1983年19.1%と年次的に増加がみられた．また，PPNGは1982年以降分離されるようになり，その検出率は1982年4.4%，1983年9.4%であった．しかし，PPNGでしかもSPCM耐性株は検出されなかった．

謝辞 本研究の実施にあたり有益な御助言をいただいた神奈川県立衛生研究所細菌病理部の小原寧，山井志郎両先生，ならびに貴重な薬剤を御恵与された日本クラクソ，日本アプジョン，日本メルク萬有，塩野義製薬，ウインスロツプラボラトリーズの各社に心から感謝します．

（本研究の概要は72回東京都衛生局学会1984年5月で発表した）

文　献

1) 厚生省：伝染病統計，食中毒統計
2) Phillips, I. :β-lactamase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet*, 2. 656-657, 1976
3) 小野田洋一，三井一子，小原寧，山井志郎，宮本泰，芦沢正見：国内でのβ-lactamase産生淋菌(PPNG)の検出について *Chemotherapy*, 27, 265-268, 1979
4) 加納堯子，大久保暢夫：都民より分離したリン菌の薬剤感受性とPC耐性リン菌．東京都衛生局学会誌，66. 54～55, 1981
5) 岡崎武二郎，町田豊平，小野寺昭一：1981年に分離された淋菌の薬剤感受性およびβ-lactamase産生淋菌について．感染症学雑誌，57, 205－211, 1983
6) Shin-ichi Yoshida, Shinji Urabe and Yasuo Mizuguchi : Antibiotic sensitivity patterns of penicillinase-positive and penicillinase-negative strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Fukuoka, Japan. *Br. J. Vener. Dis.* 58. 305-307, 1982
7) 小原寧，下田裕子，新川隆康，山井志郎，水間圭裕，片庭義雄，大熊博雄：常習売春容疑者のリン菌保有率と分離菌の薬剤感受性調査成績．*V.D.*, 62 No. 1. 2. 3. 17-23, 1981
8) WHO : *Neisseria gonorrhoeae* and gonococcal infection. Report of a WHO scientific group. WHO technical report series, 616. 137-142, 1978
9) 常松之典，亀井喜代子，水間圭裕，片庭義雄，小野田洋一：街娼の淋菌感染診断についてのLC培地の評価．日本細菌学雑誌，32. 363－368, 1977
10) 東京都衛生局公衆衛生部防疫結核課：性病統計資料
11) Johnson, D. W., Holmes, K. K., Kvale, P. A., Halverson, G. W., & Hirsch, W. P. : An evaluation of gonorrhoeae case finding in the chronically infected female. *Amer. J. Epid.*, 90. 438-448, 1969
12) WHO : Wkly Epidem. Rec., 52. 357, 1977
13) WHO : Wkly Epidem. Rec., 58, 5, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 55-60, 1984

都内における腸管系ウイルスのサーベイ：下水および患者検体からのウイルス分離成績（1983年）

林　志直*, 矢野一好*, 藪内　清*, 渡辺悌吉**
石原　祐**, 大久保さつき**, 印鑰史衛**

Enteric Virus Surveillance in Tokyo : Virus Isolation from Patients and Sewage Samples (1983)

YUKINAO HAYASHI*, KAZUYOSHI YANO*, KIYOSHI YABUUCHI*
TEIKICHI WATANABE**, YU ISHIHARA**, SATSUKI OHKUBO**
and FUMIE INYAKU**

Keywords : エンテロウイルス enterovirus, 上気道疾患 upper respiratory infection, 下水 sewage, 疫学 epidemiology

緒　言

著者らはこれまで長年にわたり，都内における腸管系ウイルスの流行実態を把握するため，小児科を受診した患児および下水についてウイルス検索を行ってきた．その結果，検出されるウイルスは非常に多種類であること[1]，主に流行したウイルスには年次推移が認められること[2]を既に報告した．こうした患者および環境から検出されるウイルスの種類や流行ウイルスの年次推移を把握しておくことは，都内における今後の腸管系ウイルス感染症への対応，あるいは同ウイルスの生態学的研究に有用な資料を提供するものと思われる．

本報では1983年に行った患者と下水からのウイルス分離成績に基づき，都内で流行した腸管系ウイルスについて疫学的考察を行った．また，調査期間中に都内東村山市の小学校で上気道炎を主徴とした疾患の集団発生が報告され，この事例について行ったウイルス検査結果も併せて報告する．

材料と方法

患者材料　調査定点としたのは東京逓信病院，都立豊島，駒込，墨東，荏原病院の5ケ所である．東京逓信病院では主として上気道疾患を対象とし，1983年1～12月に同病院小児科を受診した293名の患児から咽頭ぬぐい液を採取した．都立の4病院では無菌性髄膜炎と結膜炎を対象疾患とした．同期間中に無菌性髄膜炎患者29名からは髄液を中心にふん便，咽頭ぬぐい液を，結膜炎患者65名からは結膜ぬぐい液を採取した．1983年6月に東村山市内の小学校で発生した上気道炎（URI）の集団事例では，うがい液，ふん便を被検材料とするとともに，急性期と回復期の血清を採取して血清学的診断に供した．

下水　都内3ケ所の広域下水処理場（O,S,M）と4ケ所の公営団地内下水処理場（Tc,Tk,Tt,Sb）を定点とし，調査期間中毎月1回定期的に検体を採取した．検体は活性汚泥のほかに生下水，二次処理水も一部採取した．

ウイルス分離試験　検体処理方法は既報[1,3]，矢野らの報告[4]，感染症サーベイランス検査指針[5]に準じた．ウイルス分離には各検体全てにFL，HEp 2細胞を使用した．更に咽頭ぬぐい液にはVero 355，MDCK細胞，結膜ぬぐい液にはHela，BGM，Vero #462細胞，髄液，ふん便および下水にはVero #462，BGM細胞を併用した．また無菌性髄膜炎，ヘルパンギーナ，手足口病，耳下腺炎などを呈した患者の検体は，乳のみマウス，ふ化鶏卵も使用した．分離同定の術式は既報[1]に準じた．

血清学的試験　URIの集団事例から採取した血清については，市販のアデノウイルス抗原（東芝化学）を用いて補体結合試験（CF）を行った．検査の術式は既報[6]の通りである．

* 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
** 東京逓信病院小児科

表1．小児科受診患児からの月別ウイルス分離状況(1983)

ウイルス	血清型	月別分離株数 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	計
コクサッキーA群	2									1				1
	4	1												1
	16								1					1
コクサッキーB群	4											1		1
エコー	11	1									1	1		3
	16								1					1
	18							1						1
	24									1	1	1		3
	30							1						1
アデノ	1							1				1	2	4
	3		2			2			6	1	1			12
	5			2			1	3	1					7
	6							2						2
	型別不明								1					1
インフルエンザ	AH1												7	7
	AH3	9	5											14
ヘルペス								2						2
分離陽性例数		11	7	2		2	1	10	10	3	3	4	9	62
検査例数		35	33	7	11	27	20	32	24	11	27	28	38	293

結　果

患者からのウイルス分離状況

1983年1～12月に東京逓信病院小児科を受診した急性期の患児293名から咽頭ぬぐい液を採取し，ウイルス分離を行った．その結果，表1．に示すように62名(21.2%)からウイルスが検出された．ウイルス種類別にみるとエンテロウイルス(コクサッキーA群，同B群，エコー)が9種類13株，アデノウイルスが5種類26株，インフルエンザウイルス2種類21株，ヘルペスウイルス(型別未同定) 2株であった．最も多く検出されたのはインフルエンザAH3型(Inf.AH3)であり，1～2月にかけて14株が分離された．次いでアデノウイルス3型(AD3)が8月を中心に12株分離された．AD5は6～8月を中心に，Inf.AH1は12月にそれぞれ7株ずつ分離された．1982年までの成績[2]と比較して，検出されたエコーウイルスの種類が増加しており，今まで検出例がなかったエコーウイルス16型(E16)，E18，E24，E30が今回初めて分離された．すなわち，E30は7月に熱性疾患の新生児から1例，またE16，E18，E24は7～11月にURI患児4名から分離された．

ウイルス分離に使用した各種の培養細胞と乳のみマウス，ふ化鶏卵でのウイルス分離状況を表2．に示した．コクサッキーA群2，4，16型(CA2，CA4，CA16)は乳のみマウスでしか分離されなかった．E11を始めとするECHOウイルスはFL細胞だけから分離された．ADはFL，HEp2，Vero355細胞から分離されたが，HEp2細胞の感受性が最も高かった．ADが検出された26例のうちHEp2細胞では全例が分離陽性となったが，FL細胞では10例，Vero355細胞では4例しか検出されなかった．また，Inf.AH1はMDCK細胞で分離されたが，Inf.AH3は培養細胞では分離できず，ふ化鶏卵に接種したところ14株が分離された．

表3．には都立病院を受診した無歯性髄膜炎患者29名，結膜炎患者65名，その他の疾患患者7名について行

表2.アッセイ別のウイルス分離状況

ウイルス	血清型	分離陽性例数	培養細胞 FL	HEp 2	MDCK	Vero 355	乳のみマウス	ふ化鶏卵
コクサッキーA群	2	1					1	
	4	1					1	
	16	1					1	
コクサッキーB群	4	1		1		1		
エコー	11	3	3					
	16	1	1					
	18	1	1					
	24	3	3					
	30	1	1					
アデノ	1	4	2	4				
	3	12	5	12		2		
	5	7	3	7		2		
	6	2		2				
	型別不明	1		1				
インフルエンザ	AH 1	7			7			
	AH 3	14						14
ヘルペス		2		2				

表3. 無菌性髄膜炎及び結膜炎患者からのウイルス分離状況

臨床診断	検査例	分離陽性例	エコー 17型	エコー 24	アデノ 2	アデノ 3	アデノ 4	アデノ 型未同定	ムンプス
無菌性髄膜炎	29	3	1	3					
流行性角結膜炎	53	5			2	1	1	1	
咽頭結膜熱	2								
急性出血性結膜炎	10								
その他の疾患	7	1							1

ったウイルス分離成績を示した. 無菌性髄膜炎患者3名からE24が3株, E17が1株検出された. このうち1名では, ふん便と咽頭ぬぐい液から同時にE24が分離された. 流行性角結膜炎患者5名からはAD2が2株, AD3, AD4, AD未同定株が1株ずつ分離された. その他の疾患のうち, 耳下腺炎患者の咽頭ぬぐい液からムンプスウイルスが分離された. ウイルス分離に使用した培養細胞別のウイルス分離状況は表2の成績と同様で, ADはFL, HEp2細胞から, エコーウイルスはFL細胞だけから検出された. ムンプスウイルスはVero355細胞で分離された.

下水からのウイルス分離状況

腸管系ウイルスは, 感染様式として不顕性感染を示す場合が多い. 従って腸管系ウイルスの流行を把握するには患者のみならず, 感染者から排泄されたウイルスが流入する下水からもウイルス検索を行えば効率よく調査を行うことができる. 表4.には下水からのウイルス分離成績を月別に示した. ワクチン由来と考えられるポリオウイルス1～3型を除くとコクサッキーB群4型(CB4)が30株分離され, ポリオウイルス以外の総分離株数66株のうち45.5%を占めた. 次いでAD1が10株, AD5が7株, AD2が5株の順で分離された. 今まで検出例のな

表4．下水処理場別のウイルス分離状況(1983)

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	P2	CB4 E30	—	P 2 AD5,6	—	AD1	CB4 E24	—	CB4	P2	P1,2 CB5	P2 CB4
S	K沈殿汚泥	—	—	—	P2	—	—	CB4	—	—	P2 CB4	—	CB4
	S沈殿汚泥	AD1	AD5	AD5	P2,3 AD5	CB4	—	—	ND	—	P2	P2,3	P1,2
	S二次処理水	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
M	沈殿汚泥	AD5	P3 AD5	—	P1 AD2	—	ND	—	—	E11	E11 CB4	P2 CB4	P3 CB4,AD1
Tc	二次処理水	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	P2	CB4
	沈殿汚泥	P1,2	P2,3	—	P1,2	—	—	—	—	CB4	CB4	P2 AD6	P1,2 AD1
Tk	二次処理水	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	沈殿汚泥	—	AD5	—	P1,3 AD2	P 2	CB4	—	—	CB4	P2 CB4	P2 CB4	P2 AD1
Tt	二次処理水	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	沈殿汚泥	P1,2 CB3,AD5	P1,2,3	—	P1,3 AD2	—	AD1	CB4	—	CB4	E11 CB4	CB4	—
Sb	生下水	AD1	CB3 AD2	P1	P1,3	—	AD1	CB4	—	—	CB4	AD6	CB4 AD1
	二次処理水	—	P2	—	—	E5	—	—	—	—	—	—	—
	沈殿汚泥	E30	AD2	P3	P2,3	E5	CB4	CB4	—	CB4	CB4	CB4	AD1

P2：ポリオウイルス2型，CB4：コクサッキ-B群ウイルス4型，E30：エコーウイルス30型，AD1：アデノウイルス1型，
－：ウイルス分離陰性，ND：検査せず

かったE24とE30も下水から検出され，E24は患者発生と同時期にO処理場，E30は患者からの分離より早い時期にSb, O処理場の下水から認められた．

主流行ウイルスの年次推移は既報[2]で述べたが，1982年の主流行ウイルスであるCB3は1983年2月以後は検出されず，替わって5月からはCB4が多く検出され始めた．CB4は10月に最も多く検出され，7ケ所の処理場のうち6ケ所から分離された．

上気道炎を主徴とした疾患の集団発生例

1983年6月21日に東村山市内の小学校においてURIを主徴とした疾患の集団発生の報告があり，6月22日に欠席児童が集中していた学級の児童39名からうがい液，ふん便，急性期血清を採取した．7月6日には34名から回復期血清が得られ，血清学的診断も可能となった．図1には検査対象となった学級と，同じ階にある他の学級の欠席児童数を示した．欠席児童は6月21日が最も多く，検査を行った学級では39名中15名(38.5%)が欠席していた．この学級と隣接した2学級(3, 5組)でも欠席者がやや多く，廊下を隔てた2学級(1, 2組)では少なかった．

当初はウイルス感染症とともに溶連菌感染症も疑われ，並行して検査が進められた．39名中2名からA群溶連菌が検出されたが，菌量も少なく本事例の原因とは考えられなかった．表5にはウイルス分離と血清学的試験の成績を示した．うがい液では，38名中12名の児童からAD4, 2名からAD1が検出された．ふん便については39名中21名からAD4が検出され，AD1の分離例はなかった．急性期と回復期の血清が得られた34名についてADを抗原としたCF試験を行ったところ，19名ではCF抗体が4倍以上の有意上昇を示し，5名では急性期から64倍以上の高い抗体価を示していた．以上の結果から，この集団事例はAD4によるものであることが明

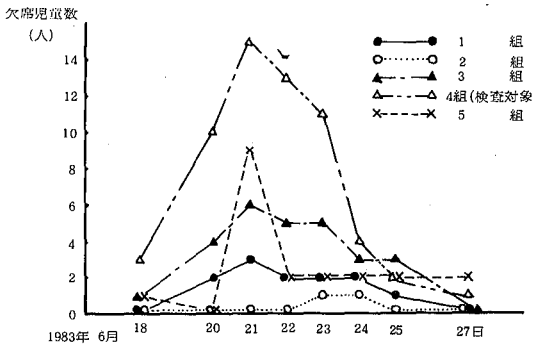


図1.上気道炎を主徴とした疾患の集団発生状況

表5.URI集団発生例のウイルス検査成績

1.ウイルス分離試験

検体	検体数	ウイルス分離株数 AD 1	AD 4
うがい液	38	2	12
ふん便	39		21

2.血清学的試験

回復期	≧128	2	1	1	4	2	1
	64	1	1			1	
	32	6	1	1		1	
CF抗体価	16	2		1			
	8		2				
	<8	6					
		<8	8	16	32	64	≧128
		急性期CF抗体価					

らかにされた.

考　察

近年，小児科受診患児から検出される腸管系ウイルスの種類は多彩であり，1977年からの検索では25種類の腸管系ウイルスが分離されている[2]. 1983年1～12月に都内のURI患児からウイルス検索を行った結果，AD3が最も多く検出された. AD3は1978年，1981年以後もURI患児から高率に検出され[2]，URIの重要な病原の一つである. 1983年に都内で広域的に流行した腸管系ウイルスを把握するため，下水からのウイルス検索を行った結果，最も多く検出されたのはCB4であった. しかし，URIと無菌性髄膜炎を対象とした検索では1名のURI患児からCB4が検出されたにとどまり，CB4感染者の多くは不顕性感染であったものと推察された.

1983年の腸管系ウイルスのサーベイで，最も注目されるのはE30, E24の検出である. 一般的にエンテロウイルスは，きわめて多彩な症状を示すことが知られているが，特に無菌性髄膜炎はエンテロウイルスによることが多い. 過去には1961年のCB5,1964年のE5,1978年のエンテロウイルス71型による大流行が報告されている[7,8]. E30も大きな流行を起こすことがあり，1968年にアメリカ西海岸の流行などが報告されている[9]. しかし，日本においては1977年までE30分離例の報告もなかった[8]. 西村ら[10]によれば，1978年に愛知県東部でE30による無菌性髄膜炎の流行が認められ，1983年になると全国的な流行となった[11~13]. 東京都においても1983年7月に，生後5日の新生児からE30が検出された. この患児の場合，発症時期からみて出産時に母親から感染した疑いが強い. 同時期に都立病院を受診した無菌性髄膜炎患者2名からE24が検出された. E24はE30と同様に近年まで検出例もなく[8]，きわめて稀な事例である. この無菌性髄膜炎患者2名の咽頭ぬぐい液，ふん便からはウイルス分離に成功したが，髄液からE24を検出することはできなかった. E24, E30ともに日本での流行はなかったため，一般住民の抗体保有状況は低く[14]，今後もこれらのウイルスが流行する危険性は非常に高いと思われる.

AD4は近年まで分離例も少なく，一般市民の間にはほとんど流行していなかった[15]. しかし1977年以後欧米でいくつかの流行があり[16,17]，国内でも分離例が増加している[18]. 1983年6月末に都内東村山市の小学校でURIを主徴とした疾患の集団発生があり，病原検索の結果AD4によるものと判明した. 同時に2名からAD1, 2名からA群溶連菌が検出されたが，これらの児童では抗体上昇が認められなかったこと，検出された菌量が少なかったことから本事例の原因とは考えられなかった. この流行の感染源は不明であるが，患児が一学級に集中していることから接触感染により流行が広がったものと思われる.

結　論

1983年1～12月に腸管系ウイルスのサーベイを行った結果，URI，無菌性髄膜炎患者からは20種類72株のウイルスが検出された. URI患者からはAD3, AD5, Inf. AH1, AH3の検出例が多く，無菌性髄膜炎患者からは今まで分離報告が少なかったE24が検出された. 1983年6月に都内の小学校で発生したURIの集団事例からはAD4が検出され，その病因と考えられた.

下水からのウイルス分離成績により，1983年に都内で

広く流行した腸管系ウイルスはCB4であることが確認された. 1982年に流行したCB3は1983年2月以後検出されず, 流行は1年間で終息したものと推察された.

謝辞 検体採取を行うに際し, 御協力いただいた都立病院関係各位, 東久留米保健所斉藤みどり所長ならびに東村山保健所関係各位に深謝します.

文　献

1) 藪内　清, 矢野一好, 柴田タツ美他：東京衛研年報, 31-1, 40, 1980
2) 矢野一好, 林　志直, 柴田タツ美他：東京衛研年報, 32-1, 32, 1981
3) 林　志直, 矢野一好, 藪内　清他：東京衛研年報, 34, 34, 1983
4) 矢野一好, 林　志直, 柴田タツ美他：第28回日本ウイルス学会総会演説抄録, 3017, 1980
5) 東京都衛生局：感染症サーベイランス調査検査指針, 1981
6) 坂井冨士子, 伊藤忠彦, 山崎　清他：東京衛研年報, 32-1, 48, 1981
7) 石井慶蔵, 中園直樹：小児科, 20, 671, 1979
8) 多ケ谷勇, 原　稔：ウイルス実験学各論, 改訂2版, 国立予防衛生研究所学友会編, 127, 1982, 丸善, 東京
9) Torphy, D. E., Ray, C. G., Thompson, R. S. and Fox, J.P.: *A. J. P. H.*, 60, 1447, 1970
10) 西村　豊, 山本崇晴, 松本延男他：感染症学雑誌臨時増刊, 58, 102, 1984
11) 野村　恒, 田中太平, 次田定幸他：感染症学雑誌臨時増刊, 58, 101, 1984
12) 市村　宏, 島瀬公一, 田村偉久夫他：感染症学雑誌臨時増刊, 58, 102, 1984
13) 柿沼民郎, 林　節, 高丸　宏他：感染症学雑誌臨時増刊, 58, 102, 1984
14) 川名林治, 松本一郎, 佐藤成大他：日本医事新報, 3097, 43, 1983
15) Brandt, C. D., Kim, H. W., Vargosko, A. J., et al.: *Am. J. Epidem.*, 90, 484, 1969
16) D'Angelo, L. J., Hierholzer, J. C., Keenlyside, R. A., et al.:*J. Inf. Dis.*, 140, 42, 1979
17) Levandowski, R. A. and Rubenis, M.: *J. Inf. Dis.*, 143, 28, 1981
18) 遠藤貞郎, 野村泰弘, 小島基義他：臨床とウイルス, 10, 71, 1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 61-68, 1984

伊豆七島におけるツツガ虫病の研究
式根島を中心とした実態調査

伊藤忠彦*, 中村清純*, 山崎　清*, 坂井冨士子*,
藪内　清*, 大橋　誠*

Studies on Tsutsugamushi Disease in Izu Islands
Field Works in Shikine Island

TADAHIKO ITO*, KIYOSUMI NAKAMURA*, KIYOSHI YAMAZAKI*,
FUJIKO SAKAI*, KIYOSHI YABUUCHI* and MAKOTO OHASHI*

Keywords: ツツガ虫病　tsutsugamushi disease, 七島熱 Shichito fever, リケッチアツツガムシ Rickettsia tsutsugamushi

はじめに

かつて1951年から1954年にかけて伊豆七島において原因不明の熱性発疹性疾患が流行し，当時東京都衛生局予防課をはじめとし諸研究機関(伝染病研究所，国立予防衛生研究所，北里研究所，都立衛生研究所等)の協力により，本疾患の疫学，臨床，病原，媒介動物の各分野にわたり病因の究明が行われた．1952年協同研究者の協議により七島熱と命名された本疾患は[1]，リケッチアに起因することが証明され，ツツガ虫病の一種であることが確認された[2,3]．七島熱は富士山麓のツツガ虫病とともに，従来，秋田，山形，新潟の一部河川流域に沿って存在した古典型ツツガ虫病と区別され，新型ツツガ虫病と呼ばれる[3]．古典型はアカツツガムシ(アカムシ)媒介性で夏季に発生するのに対して新型は，タテツツガムシあるいはフトゲツツガムシによって媒介され[1~5]，とくに七島熱は晩秋から冬に発生する．また古典型の致命率は過去には40％程度で[6,7]比較的高率であったが，七島熱の致命率は，1945年から1952年までに確実に本疾患に罹患したと診断された患者433名中死亡1名で極めて低い[1,7]．

この七島熱は，かつて大島，新島の一部，三宅島，八丈島で調査され，1951年から1955年にかけ766名(東京都衛生局衛生統計資料によると927名)の患者多発が認められた[1~3]．その後数年間少数の発生をみたが[8]，以後届出はなく終息したかに思われていた．ところが近年の全国的な増加傾向とあいまって再び流行の兆しがみえはじめた．1981年には，患者届出数は49例で全国届出数の10％以上を占めるに至った．1982年の届出数は32例で，その居住地は，大島町4，新島本村20(全例が式根島)，三宅村8であった．発生月別では，1月1例，10月3例，11月26例，12月2例であり，1981，2年とも患者居住地では式根島，月別では11月に患者発生の集中をみた．

このような状況をふまえ，1983年10月東京都衛生局では，ツツガ虫病実態調査委員会を組織し新島本村式根島を中心に実態調査を行うことになった．当衛生研究所ではその中で検査室関連の部門を担当した．本報では，1983年度に実施した野外調査の結果を報告する．

調査対象，検査材料および方法

式根島を調査対象とし，**第1回調査**(1983年11月19日～21日)と**第2回調査**(1984年2月21日～24日)の2回にわたり現地に赴き，新島本村式根島診療所を受診した患者および野鼠から検査材料を採取した．また後述の患者回復期血清は，同診療所において採取，当衛生研究所へ輸送した．図1は式根島とその周辺図である．式根島は東京から161km，下田からは45kmの位置にある周囲12km，面積3.71km²の平坦な島で，人口726人(1984年1月1日現在)，行政上は新島本村に属する．

野鼠の捕獲：野鼠は生けどり法により行った．第1回調査において，シャーマンアライブトラップ(米国シャーマン社製，S　16×5×6.5cm) 20個，金網式トラップ20個の計40個を2日間設置した．第2回調査においては，シャーマンアライブトラップ(L　23×7.6×9.2cm) 20個，金網式トラップ80個の計100個を2日間

* 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

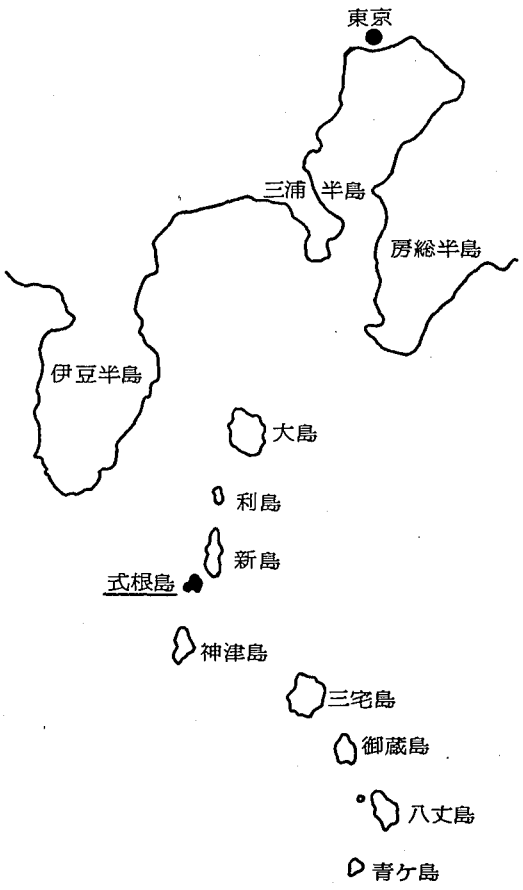


図1．式根島とその周辺図

設置した．設置場所は主に人家に隣接したネズミによる作物被害の多い甘藷畑で，巣穴近くを選んだ．

リケッチア分離試験：患者からのリケッチア分離には，七島熱と診断され治療開始前に採取した血液を，ただちに，もしくは凝固防止の措置を施し（テルモ社製ヘパリンリチウム添加真空採血管使用）2時間以内に，2～4匹のマウス腹腔内に 0.25 m*l* 宛接種した．野鼠からの分離には脾臓および肝臓の一部を被検材料とした．すなわち，クロロホルム麻酔下で採血後，脾臓と一部の肝臓を摘出し，それらを Sucrose-phosphate-glutamate (SPG)液にて約 10 %乳剤とし[9]，4匹のマウス腹腔内に 0.25 m*l* 宛接種した．継代は，接種 11 日から 17 日後にマウスを解剖し，発症の有無（リンパ節腫脹，脾腫，とくに牽糸性腹水をもって発症陽性とした）を確認の上，摘出した脾臓を SPG 液にて約 10 %乳剤（以下，脾乳剤と略す）とし数匹の次代マウス腹腔内に 0.25 m*l* 宛接種した．なお試験に使用したマウスは，5～7週令の ddY 系有毛マウスで，一部 cyclophosphamide による免疫抑制処置[10,11]を行った上で被検材料あるいは継代材料を接種した．

リケッチアの同定は，発症マウスの脾乳剤をモルモット腹腔内およびマウス皮下に接種し，3～4週後さらにそれぞれの腹腔内に追加接種して約5～8週で採血し，リケッチアツツガムシ（以下，Rt と略す）に対する補体結合抗体の存在により判定した．さらに Rt の型別は，発症マウスの腹膜塗抹標本を用いた直接蛍光抗体法によって決定した．

補体結合反応(CF)：第1回調査中の患者急性期血液以外にも，現地調査後に罹患した患者の急性期血液および全患者の回復期（急性期より約2週間後）の血液を，血清とした上郵送により入手した．第3回目の血清（約100病日）は，第2回調査中に採血した．CF は，市販抗原（デンカ生研製）を使用し，マイクロタイター法により行った．

間接蛍光抗体法(IF)：常法[9]に準拠して行った．Rt 標準株（Karp, Gilliam および Kato の3株）および今回の分離株のうち1株（Shikine S 株）をマウス線維芽細胞由来 L 929 細胞（以下，L 細胞と略す）に感染させ，Rt の充分な増殖を確認した後，感染細胞を 12 穴螢光抗体用スライド（栄研化学製）に少量スポットし，風乾ののち冷却アセトンにより 10 分間固定して，抗原スライドとした．二次抗体には，抗ヒト IgG,IgM,IgA (Hyland 社製)，IgG（Miles社製）および IgM（Miles社製）の fluorescein isothiocyanate（FITC）標識抗体を用いた．

ツツガムシの同定：Rt の分離材料として臓器を摘出した後，野鼠の両耳介部を切断し，70 %アルコールに入れ保存した試料を実験室に持ち帰り，耳介に付着しているツツガムシの個体数を調べた．また野鼠ごとに 50 個体のツツガムシを無作為にとり，同定に供した．

結　　果

患者発生状況　近年の全国および東京におけるツツガ虫病届出患者数を表1に示す．東京都における患者発生の大部分は，伊豆七島におけるもので全国の発生状況と同様増加の傾向にある．1951 年から 1955 年にかけて発生した流行で多数の患者を出した八丈島では，今回の流行に際し患者発生は認められず，1956 年から 1983 年までの間同島での届出は皆無であった．これに反し今回の流行では，新島本村式根島に患者発生が多かった．すなわち，1981 年には島しょ保健所管内患者数 48 例中式根島 21 例，1982 年は同 32 例中 20 例であった．1983 年の

表1. 年次別ツツガ虫病届出患者数

年次	1973	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83
東京	−	7	9	19	13	7	19	4	49	32	66
大島		7	9	19	5	4	11	4	16	4	29
新島					8	3	8		22※	20※	21※
神津島											1
三宅島									10	8	3
御蔵島											4
その他									1		8
全国	7	10	12	31	39	61	94	212	388	508	672

（東京都衛生年報及び厚生省防疫情報による）

※： 全例式根島

表2. 1983年ツツガ虫病月別届出患者数

月別	届出地	件数
1月	三宅村	1
5	玉川保健所	1※※
6	世田谷保健所	7※※※
10	大島町	1
11	大島町	9
	新島本村※	13
	神津島村	1
	御蔵島村	3
12	大島町	19
	新島本村※	8
	三宅村	2
	御蔵島村	1
合計		66

※： 全例式根島

※※： 57年10月山中湖にて感染と推定

※※※： 57年11～12月富士山麓にて感染と推定（自衛隊員）

届出数は表2に示したように同58例中21例であった．

第1回調査（1983年11月19日～21日） この間新島本村式根島診療所を受診した治療前の七島熱患者は3名であった．これらの患者よりRt分離材料として血液を採取した．また，金網式トラップにより2匹のドブネズミ（Rattus norvegicus）が捕獲できた．

第2回調査（1984年2月21日～23日） この期間中は式根島における患者発生は認められなかった．すでに急性期の血清の得られている七島熱患者11名から回復期血清を採取した．また野鼠は捕獲できなかった．

患者の症状 1983年11月および12月式根島診療所で七島熱と臨床診断された患者19名について，診療録と調査表によって症状を調査した．患者は男8例，女11例で年令別には，10才以下2例，11才～20才1例，21才～30才4例，31才～40才3例，41才～50才2例，51才～60才3例および61才以上4例であった．発病から初診までの日数は，1ないし16日であったが，大部分が3ないし7日であった．初診時に発熱のあったものは14例（74％）で，37°台5例，38°台6例，39°台2例，40°台1例であった．皮膚の小潰瘍，いわゆる「刺し口」の確認できたのは12例（63％）であり，その部位は頬部1，頸部2，乳房2，腋下1，肩甲1，背部1，陰のう2，上肢1，下肢1であった．リンパ節の腫脹は10例（53％）に，皮膚発疹は5例（26％）に認められた．

リケッチア分離成績 3名の患者の血液それぞれからRtが分離された．2例は接種初代のマウスから，1例は2代目のマウスから得られた．2匹のドブネズミのうち1匹の分離材料からマウス継代2代目でRt 1株が分離された．他の1匹からの材料は，3代まで盲継代したがRtは陰性であった．上記4株のRtは，人由来の1株がマウス4代で継代不能となったほかは，マウス15代～16代まで継代が可能であった．これら3株のRtは現在，L細胞により9代ないし10代継代中である．Rt陽性材料接種マウスは，接種後約7～14日で発症し，動作緩慢，立毛，腹部膨満を示したが，初代接種時にはこれらの症状は必ずしも著明ではなく，開腹し，はじめて発症を確認した例も少なくなかった．発症マウスは全例において，牽糸性の粘稠性腹水の貯留を認めた．そのほかに脾腫，リンパ節の発赤腫脹などRt感染マウスの典型的な剖検所見が認められた例が大部分であった．また，腹膜の塗抹標本で，大喰細胞の原形質内にリケッチア粒子が見られた．これらの発症マウスの脾乳剤で免疫したモルモットおよびマウスの血清のRtに対するCFが陽性を示し

たので，リケッチアはRtと同定された．さらに，分離された4株のRtのうち順調に継代可能となった3株は，直接螢光抗体法によりすべてKarp型近縁株と型別された．

血清学的検査成績 七島熱と臨床診断され，回復期血清の得られた患者12例におけるCFおよびIFによる血清学的検査成績を表3に示した．CFでは，回復期に4倍以上の抗体価の有意上昇を示した例は，Karp株抗原

表3．患者の血清学的診断

患者 No	病日	補体結合反応			間接蛍光抗体法 (IgG,IgM,IgA)		
		Karp	Gilliam	Kato	Karp	Gilliam	Kato
	4	8	<8	8	128	16	16
1	18	128	64	128	1024	512	128
	100	16	16	16	512	32	32
	8	<8	<8	<8	16	<8	<8
2	16	<8	32	<8	32	16	16
	95	<8	32	<8	32	64	<8
	6	<8	<8	<8	64	8	32
3	20	32	32	64	1024	128	256
	102	8	8	8	256	32	32
	5	<8	<8	<8	16	16	8
4※	21	<8	64	16	64	128	128
	100	8	32	8	64	64	32
	4	<8	32	<8	8	128	<8
5※	17	16	32	16	128	128	16
	94	32	64	32	1024	256	64
	8	<8	<8	<8	8	8	8
6※	22	64	32	64	512	128	64
	101	32	16	32	256	128	64
	13	32	32	64	1024	512	128
7	29	256	256	512	2048	1024	512
	104	8	32	16	512	512	128
	5	<8	<8	<8	8	<8	<8
8	19	16	256	32	128	128	64
	97	<8	32	<8	32	32	16
	3	<8	8	<8	<8	16	<8
9	17	16	32	32	512	512	64
	84	8	32	16	512	512	32
	5	<8	8	<8	<8	8	<8
10							
	97	8	64	8	64	256	32
	8	<8	8	<8	64	32	8
11							
	84	8	32	16	512	256	128
	8	<8	8	<8	8	64	<8
12	18	64	64	128	512	256	64

※ Rickettsia tsutsugamushi 分離陽性

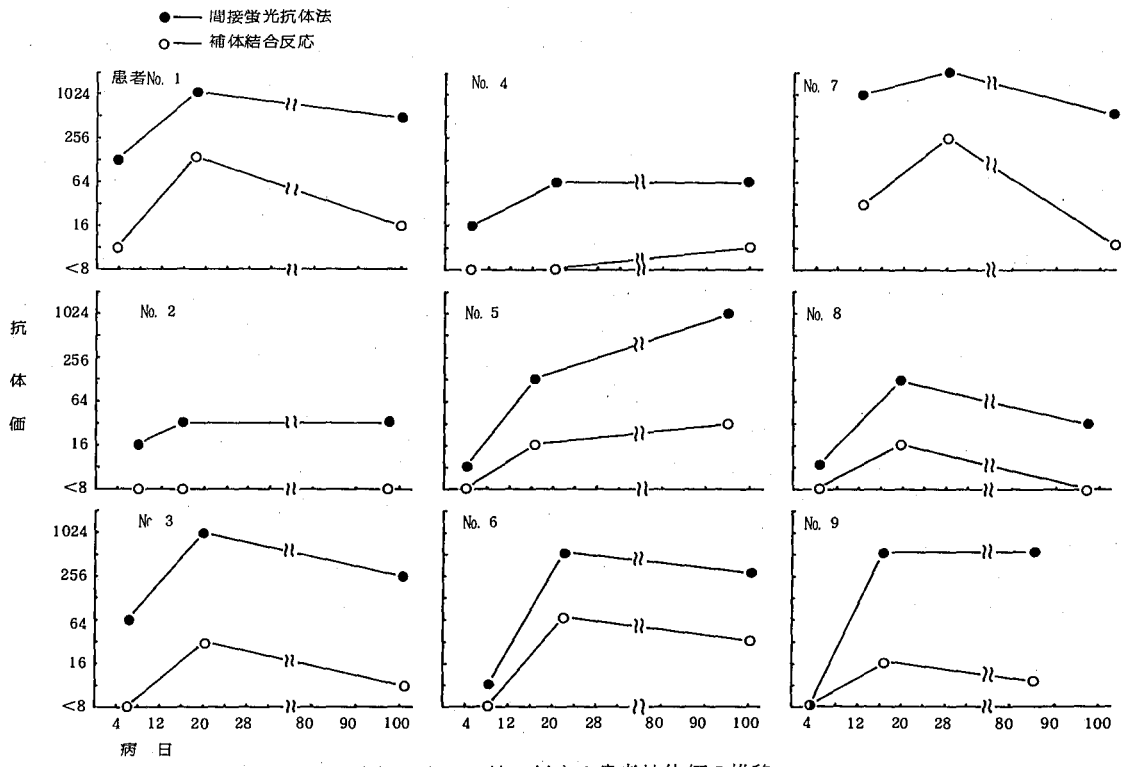


図2．Karp株に対する患者抗体価の推移

表4．分離株 Shikine S に対する患者の IF 価

患者 No.	病 日	IgG,IgM,IgA,	IgG	IgM	患者 No.	病 日	IgG,IgM,IgA,	IgG	IgM
	4	256	128	8		13	1024	512	64
1	18	1024	512	32	7	29	4096	2048	128
	100	512	256	<8		104	1024	512	<8
	8	32	8	8		5	32	16	<8
2	16	64	16	16	8	19	128	128	8
	95	64	16	<8		97	32	32	<8
	6	128	64	16		3	16	16	<8
3	20	2048	512	64	9	17	512	512	8
	102	512	512	<8		84	512	256	<8
	5	16	8	<8		5	<8	<8	<8
4 ※	21	64	32	16	10				
	100	128	64	<8		97	128	32	<8
	4	16	16	<8		8	32	32	<8
5 ※	17	256	128	<8	11				
	94	1024	512	<8		84	512	256	<8
	8	16	8	<8		8	32	16	<8
6 ※	22	1024	512	32	12	18	512	512	8
	101	1024	256	<8					

※ Rickettsia tsutsugamushi 分離陽性

に対し12例中6例に認められた．また，Karp株に対しては上昇せず，Gilliam株のみ，あるいはGilliam株およびKato株に対して抗体上昇が認められたものは6例であった．

IFでは，Karp株抗原に対して12例中10例にIF価の有意上昇が認められた．残り2例中，No.2の患者はGilliam株に対してIF価が上昇しており，No.7の患者は，第1回採取の血清が13病日のものですでに高いIF価を保有していた例である．以上CFとIFの成績を総合して，12例はすべてRt感染によるツツガ虫病（七島熱）であることが血清学的に確認された．

図2は，3回目の血清が得られた患者9名におけるKarp標準株に対するCFおよびIFの抗体推移を示したものである．No.2の患者以外はすべて回復期に抗体価上昇がみられ，第3回目採取血清（発病後約100日）は第2回採取血清と比較して，抗体価は下降傾向にあった．

分離株の1株であるShikine S株の抗原スライドを用いたIFの成績を表4に示した．また，その抗体推移のパターンを図3に示した．前述の標準株に対するIF抗体価測定では，二次血清に抗ヒト血清を用いたが，このShikine S株に対する抗体価測定にあたっては，IgGおよびIgM抗体価を区別して測定するために二次血清として抗ヒトIgGおよび抗ヒトIgMをも用いた．No.2の患者以外では，Shikine S株に対して抗体価の上昇が認められた．すべての患者においてIgG抗体価の方がIgM抗体価より高かった．また，約100日経過血清でもIgGレベルはさほど低下していないのに比べ，IgMでは全例8倍以下と低下した．一方，患者No.1，No.5，No.9のように，　4病日以内の早い病日で認められた抗体はIgG抗体であることが明らかになった．

ツツガムシの同定　2匹の野鼠の耳介に付着していたツツガムシはそれぞれ1570および1750匹であった．それぞれ50匹を同定した結果は，1匹の野鼠ではタテツツガムシ47匹，フトゲ亜群のツツガムシ3匹（キタサトツツガムシ2，フトゲツツガムシ1），他の1匹の野鼠ではすべてタテツツガムシであった．

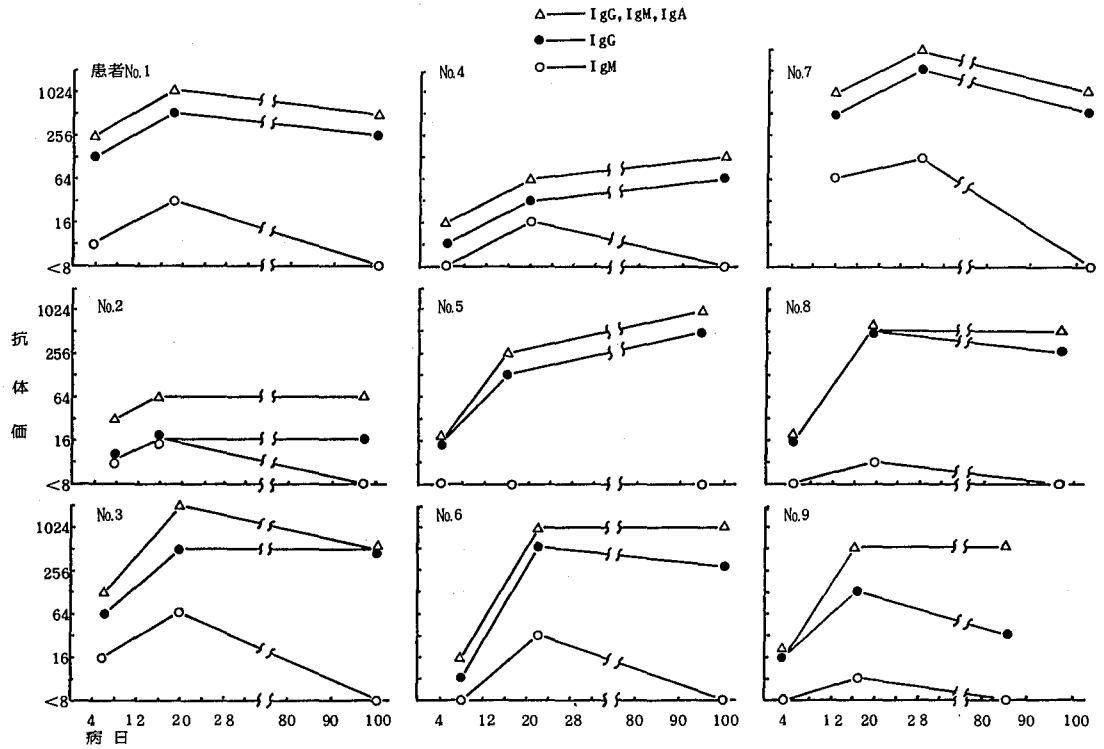


図3．分離株Shikine Sに対する患者IF価の推移

考　察

近年全国的な傾向としてツツガ虫病の多発が認められるようになり，1983年の届出患者数は672名に及んだ．また，既知の古典型あるいは新型ツツガ虫病発生地以外にも新型ツツガ虫病の発生が拡大しており，発生地域は20都府県に及んでいる[12,13]．このような増加傾向が何に起因するかという疑問に対して，須藤は[14~16]，病原体，媒介動物，宿主の三要因が複雑にからみあっているではあろうが，おそらく感染者の真の増加ではなく，Rt感染に対する特効薬であるクロラムフェニコールの使用量の減少による見かけ上の増加であろうとしている．すなわち，最近はツツガ虫病には無効のβ-ラクタム系抗生物質が好んで使用されるため，診断がつかないまま早期に治療される例が少なくなり，重症になる例が増えたとする．言いかえれば潜在患者の顕在化によると推論している．

さて七島熱の場合であるが，過去の流行経験などから医家ならびに島民の七島熱に対する意識は比較的高く，診断はそれほど困難とは考えられない．また医療機関が限定されるので，抗生物質の乱用の問題も少ないと思われる．今回の七島熱の流行は，前回のそれに比べ流行地が異なるなど，その流行様相を異にする．　すなわち現在届出患者があるのは，大島，三宅島，新島（式根島），御蔵島，神津島であるが，ここ3年程このうち特に式根島で患者多発が続いている．前回の流行で最も患者発生の多かった八丈島（患者総数927名中578名）では，現在まで患者発生が認められていない．このような現象からすると須藤の主張するような理由も考えられようが，やはり発生そのものが増加したと考えざるをえないむきもある．七島熱の流行には周期があることは従来から指摘されてきているところである[17]．村田ら[18~22]は1977年三宅島における七島熱流行に際し，野鼠よりマウス弱病原性Rt(三宅株)をヌードマウスを用いて分離しており，この弱病原性のRtが三宅島での流行の主役であると考察した．また三宅島，利島の住民では，Rtに対する抗体保有率が高く，それはこの弱病原性Rtによる不顕性感染によってもたらされた可能性が大きいとしている．しかし過去の七島熱流行では，普通のマウスを用いて患者および野鼠からRtを多数分離している実績がある[1~3]．従って伊豆七島では病原性を異にする原因リケッチアが島により，また年により優性になり，不顕性感染の多寡をもたらし流行像を支配するということがあるのかも知れない．

今回の分離リケッチア株は，結果で述べたように比較的分離率が高く，ヌードマウスを使用する必要もなかった．またこれら分離株は1株を除き，有毛マウス15代～16代まで継代可能で，現在L細胞にも培養継代中であり，川村[17]の分類に従えば，ヒトおよびマウスに対し中等度以上の病原性をもつRtといえる．今回の式根島調査で捕獲した野鼠は2匹と少なかったが，1匹よりRtを分離し，他の1匹も分離陰性ではあったが，CFでKarp株に対し128倍の高い抗体価を保有しており，同島野鼠にRtの濃厚な汚染があることが示唆された．また野鼠の耳介に吸着していたツツガムシの数が多かったことにも注目したい．ネズミはツツガムシにとってRtの供給者になりえるか否かの問題は別として，ツツガムシにとってネズミ等への吸着は幼虫から若虫になるための栄養摂取として不可欠であることがわかっており，島内の野鼠等の増減は当然ツツガムシの増減に影響を与えるものと考えられる．今回の限られた調査からは結論は得られないが，最近野鼠による甘藷畑の被害が頻発していたという．すなわち調査当時かなりの野鼠が活動していたことが推定される．今回の流行には媒介動物側の要因が相当程度に関与しているかも知れない．さらに同島の地理的条件として人家と畑地とが隣接しており，当然ヒトとツツガムシとの接触頻度は高いものと考えられる．今回の調査では未吸着のツツガムシからのリケッチア分離試験は行っていないので，Rt陽性の有毒ツツガムシの分布程度は不明であるが，野鼠よりRtを分離していることから，有毒ツツガムシはかなりの頻度で分布するのであろう．以上今回の式根島における七島熱の流行は，患者の見かけ上の増加ではないと考える．

今回の調査における式根島での患者臨床像および血清学的検査成績について考察すると，臨床像では初診時に発熱のあったものは14例(74％)で，刺し口の確認できたものは12例(63％)であった．これらを過去の流行での新井ら[23]の調査報告(八丈島，調査患者218例)と比較検討すると，過去の調査では発熱は全例に認められたが，今回は3／4程度であった．刺し口の確認できたものは，過去の調査では82.6％であり，今回の調査ではやや低率であった。発疹は，過去の調査では96.6％に見られたとあるが，今回は5例（26％）と少なかった．例数が少ないので決定的な判断は下しえないが，今回流行の七島熱は前回よりやや軽症であるかも知れない．

次に血清学的検査であるが，CFでは各型の抗原間の交差反応が強く認められた．分離RtはKarp型近縁株と同定されたにもかかわらず患者回復期血清では，半数例にKarp株抗原に対して抗体上昇が認められず，むしろGilliam株あるいはKato株に反応するものが認められ

ている．しかしこのような例の中にはKarp型近縁株を分離したNo.4の患者も含まれており，患者血清のCFの結果から流行株の型を推定することは困難であると思われる．限られた地域で異った複数の型のRtが混在すると考えるよりも，むしろCFで判読される共通抗原があるため[24]，上述のような成績が得られたと考える方が妥当であろう．

IF間接法は型間の交差反応が多いとされているが[18]，今回の成績においても著明な交差を認めた．しかしCFに比較して感度の点で勝っており，また全体的にみるとKarp株に対してのIF価上昇は，他の株に対するより著しかった．またその傾向は分離株Shikine S株に対しても同様に認められた．すなわち流行RtはKarp型近縁株であることが患者の抗体側からも判読できた．しかし分離株の詳細な性状は，さらに分離株と標準株の抗原の比較にまたなくてはならないことは言うまでもない．また早い病日でもIgG抗体が認められた患者があった．普通，感染初期に患者血清中に出現してくるのはIgM抗体であり，IgG抗体が4病日程度で，しかもIF価で128倍のものもあり，今回の感染で得た抗体とは考えがたい．すなわち過去の流行で獲得した抗体と推察されるが，本症では再感染がありうるのかどうかの問題と関係するので，観察例数を増やし慎重に判断したい．

今回の調査では普通マウスを用いてRtの分離に成功した．この分離試験に際し，一部のマウスはcyclophosphamide投与により免疫抑制処置を行ったが，無処置マウスでも初代からRtが分離できたこと，また無処置マウスでも分離Rtを継代できることから，cyclophosphamideは必ずしも必要とは思われなかった．

まとめ

1983年11月に東京都新島本村式根島診療所においてツツガムシ病(七島熱)と臨床診断された患者および同時に式根島で捕獲した野鼠についてリケッチア分離試験および血清学的試験を行って以下のような成績を得た．

1)急性期患者の血液よりマウス(ddY系5～7週令)を用いて3株のRtを分離した．

2)生けどり法により捕獲した2匹のドブネズミ(Rattus norvegicus)のうち1匹の分離材料よりRtを分離した．また他の1匹についてはRtは分離陰性であったが，血清中にRtに対する高いCF抗体価が認められた．

3)12例の患者ペア血清についてCF試験およびIF試験を行い，全例にRt抗原に対する抗体価の有意上昇が認められた．

謝辞 本研究を実施するにあたり，標準株の分与，分離株の同定，さらに種々御教示，御協力を載いた群馬衛研，氏家淳雄博士，小山孝氏，環境保健部の各位，ツツガムシの同定に御尽力載いた当所環境衛生研究科医動物室，種々御協力および御配慮を載いた都衛生局防疫結核課，島しょ保健所，新島本村役場，式根島診療所，帝京大学救命救急部の関係各位に深謝いたします．

(本研究は昭和58年度東京都衛生局「ツツガ虫病実態調査」として実施し，その概要は東京都衛生局学会第72回1984年5月および日本ウイルス学会第32回総会1984年7月で発表した．)

文　献

1) 東京都衛生局予防課編：七島熱の研究，1952，東京都刊
2) 東京都衛生局予防部編：七島熱の研究第2編，1953，東京都刊
3) 東京都衛生局予防部編：七島熱の研究第3編，1954，東京都刊
4) 浅沼　靖：第31回日本感染症学会東日本地方会総会抄録，17，1982
5) 浅沼　靖：臨床と細菌，10，174，1983
6) 佐々　学：日本医事新報，1525，71，1953
7) 佐々　学：日本伝染病学会雑誌，27，267，1953
8) 徐慶一郎：日本伝染病学会雑誌，39，347，1965
9) 医科学研究所学友会編：細菌学実習提要，1983，丸善
10) 橘宣祥ほか：感染症学雑誌，52，50，1978
11) 山本正悟ほか：臨床とウイルス，8，422，1980
12) 川村明義：日本医事新報，2986，26，1981
13) 厚生省保健情報課：日本医事新報，3134，113，1984
14) 須藤恒久：臨床と細菌，10，139，1983
15) 須藤恒久：日本医事新報，3034，43，1982
16) 須藤恒久：感染・炎症・免疫，13，1，1983
17) 川村明義：日本細菌学雑誌，34，375，1979
18) 村田道里ほか：感染症学雑誌，54，235，1980
19) 村田道里：感染症学雑誌，54，242，1980
20) 村田道里ほか：感染症学雑誌，54，279，1980
21) 宮入毅匡ほか：感染症学雑誌，54，284，1980
22) 川村明義：モダンメディア，30，310，1984
23) 新井養老：日本伝染病学会雑誌，27，280，1953
24) 氏家淳雄：モダンメディア，27，408，1981

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 69-72, 1984

東京都内のインフルエンザ検索成績
(1983年9月～1984年2月)

坂井冨士子*, 伊藤忠彦*, 山崎清*,
中村清純*, 藪内清*

Virological Studies on Influenza Occurred in Tokyo
(Spt. 1983—Feb. 1984)

FUJIKO SAKAI*, TADAHIKO ITO*, KIYOSHI YAMAZAKI*,
KIYOSUMI NAKAMURA* and KIYOSHI YABUUCHI*

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

緒言

1983年末から1984年初頭にかけての東京都内のインフルエンザ(以下「イ」と略す)は，全国各地と同様AH1型ウイルスによるものであった．東京都においては，近年1980年～1983年初頭の冬期はいずれもAH1型，A-H3型およびB型あるいはAH3型とB型[1,2]の様に一種のみの型のウイルスによるものではなく，いずれかの型が主流となってもそのほかに他の型又は亜型ウイルスによるものが混在していたが，今冬期は1979年初頭以来4年ぶりのAH1型単独のウイルスによるインフルエンザであった．本報では，1983年9月から1984年2月までの「イ」の検査成績について報告する．

材料と方法

検査対象　1983年9月から1984年2月までの期間に集団かぜのため学級閉鎖等を行った小，中学校のうち25集団(1集団約5名)126名および渋谷区の数ヶ所の開業医を受診したかぜ患者散発々生例32名（5歳～38歳で25名は15歳以下）を検査対象とした．

ウイルス分離試験　上記対象より得られた157例のうがい水をウイルス分離材料とし，発育鶏卵のほかFL, Hep 2, Vero 355およびMDCKの各培養細胞を用いて常法[3~5]に従って行った．

血清学的試験　検査対象患者のうち急性期および回復期のペア血清の得られた136例について，補体結合試験(以下CF試験と略す)および赤血球凝集抑制試験(以下HI試験と略す)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[3~5]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．

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．すなわち1983年9月～1984年2月までに搬入された25集団の検査材料について検査した結果，3集団はアデノウイルスによる感染であり，他の22集団は「イ」AH1型ウイルスによる感染であることが判明した．これらの集団のほか散発々生例については，11月に3例，12月に29例の材料を検査した結果，11月の1例はアデノウイルス感染によるものであり，12月の19例は「イ」AH1型ウイルス感染であることが判明したが，他の12例については病因を明らかにすることはできなかった．「イ」の発生時期のピークは例年1～2月であるのに，東京都においてはそのピークが12月にあったことが今冬期の「イ」の特徴としてあげられよう．特にこれまでの経験から年内に比較的発生の多かった冬は，年明けと共に急増するのが常であったが，厚生省に届出られた都内の患者発生数は，12月15,546名，1月2,987名，2月6,514名となっている．本疾患の性質上，この様な届出数は現実の患者数をはかるに下回っているものと思われるが，当研究室への患者材料搬入状況からみても発生ピークの傾向はうかがえるものと考えられる．12月に多発したにも拘らず1，2月に発生が少なかった理由は，詳しく検討していないがその一つとして，この

* 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．集団かぜ患者の病因検索状況

発生年月旬	検索集団数	診断		検索件数	ウイルス分離		CF試験	
		インフルエンザAH1型	アデノ		インフルエンザAH1型	アデノ	インフルエンザA型	アデノ
58. 9下	1		1	5				3
10下	1	1		5	1		5	
上	1		1	4				4
11中	4	3	1	20	4		15	3
下	2	2		10	3		9	
上	9	9		42	9		23	
12中	4	4		20	2		12	
59. 1下	2	2		15	3		5	
2下	1	1		5	1		3	
計	25	22	3	126	23		72	10

1，2月の降雪回数が数十年ぶりに多くそのため例年に比して湿度が高かったため，「イ」ウイルスの感染，増殖が抑制されたことによるのではないかと考えられる．

患者血清のHI試験成績 「イ」様患者ペア血清136例について，「イ」AHsw 1型NJ 8／76，AH 0型PR 8／34，AH1型新宿1／56，AH1型熊本37／79(ワクチン株)，AH1型東京1367／83(今期分離株)，AH1型東京1414／83（今期分離株），AH3型石川7／82（ワクチン株）およびB型 Singapore 222／79（ワクチン株）の8株を抗原としてHI試験を行ったところ，AH1型のいずれかの抗原にHI抗体価の有意上昇がみられたのは96例であった．一方，うがい液よりウイルスが検出されているにも拘らずHI抗体価の上昇が認められない例が2例あったが，CF抗体価はともに上昇していた．

次に「イ」AH1型ウイルス分離陽性者のうちペア血清の得られた32例について，供試8抗原に対するHI抗体価の変動を表2に示した．この表からAH1型4株について有意上昇率，$\geqq(8\times 2^{1})$の抗体保有率および平均HI価を算出すると表3の通りである．すなわち今期分離株の一つである東京1367／83株に対してHI抗体価の上昇率が最も高く，平均HI価の上昇も最も高値を示した．しかし，同じ今期分離株である東京1414／83株に対しては，あまり上昇率が高くなくまた平均HI抗体価の上昇も比較的低く，流行株は抗原的に均一ではないことが示唆された．

ワクチン株である熊本37／79株では，表2と併せ見ると明らかな様に，急性期にすでに高いHI抗体価をもっている例が多く，そのためか抗体上昇率もあまり高くない．熊本37／79株の場合，ウイルス分離時に256倍以上という高いHI抗体を持っている者が62.5％もあり，この事は流行株とワクチン株との間に抗原的に差のあることも考えられるが，分離株に対してもかなり高いHI抗体価を持っている者もあることから，一面ではワクチン接種によって得られた高いHI抗体価は必らずしも感染防御に結びつかないことがあることを示唆していると考える．今回のAH1型「イ」のもう一つの特徴として，「イ」AH1型患者血清中にHsw1型であるA／NJ 8／76株に対するHI抗体価の上昇が高頻度に認められたことである（表2）．過去1979年～1981年の「イ」AH1型患者にも年を経るにしたがって，本株に対するHI抗体価の有意上昇頻度が高くなる傾向がみられた[2)]（1979年17.5％，1980年44.9％，1981年56.6％）が，今回は65.6％とこれまでの最高であった．特に個々の例についてみると，HI抗体価そのものは供試したAH1型株のいずれかと同じかまたはそれよりも低いが，上昇比でみるとAH1型株のいずれよりも高い者が32例中5例もあった．このことは，AH1型ウイルスが分離されていなければ，ペア血清のHI試験ではAHsw1型ウイルスによる感染と血清学的に診断されてしまうことを意味する．AH0型PR 8／34株に対して有意上昇を示した例は3例あったが，AHsw1型，AH0型，AH1型およびAH3型の各亜型間の関係が近年複雑化していることはすでに述べた[1,2)]通りである．なお，今冬期の「イ」様患者ペア血清においてAH3型石川7／82株およびB型

表2．1983年～1984年インフルエンザAH1型ウイルス分離陽性者のHI試験成績

回復期

A／NJ8／76 (Hsw)

急性期	<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	計
<1*	4**6	4	1	3	1						19
1		1	2	2	1		2				8
2					1			1			2
3						2					2
4											
5							1				1
6											
7											
計	4	6	5	3	5	3	2	3	1		32

A／PR8／34 (H0)

急性期	<1	1	2	3	4	5	6	7	計
<1	7	3	1		2				13
1	1	6	1						8
2		1	1	1					3
3				2	1				3
4					4				4
5						1			1
6									
7									
計	8	10	3	3	7	1			32

A／新宿1／56 (H1)

急性期	<1	1	2	3	4	5	6	7	計
<1	1	1	3		1	1			7
1				3	5	2	3		13
2					4	2	1		7
3					1	3			4
4									
5							1		1
6									
7									
計	1	1	3	3	11	8	5		32

A／熊本37／79 (H1)

急性期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	計
<1											
1											
2							1	2		1	4
3							1				1
4						1	3	1	1	1	7
5							2	2	3	1	8
6								4	4	3	11
7									1		1
計						1	7	9	9	6	32

A／東京1367／83 (H1)

急性期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	計
<1						1	1				2
1								1	1		2
2				1		1	2	2			6
3						1	3	3	1		8
4							4	1	2		7
5							2	2	1	1	6
6									1		1
7											
計				1		3	12	9	6	1	32

A／東京1414／83 (H1)

急性期	<1	1	2	3	4	5	6	7	計
<1	1				1	2		1	5
1		1			1	2			4
2			1			1		1	3
3					1	3	3	1	8
4					1	1		4	6
5						1	2		3
6							2	1	3
7									
計	1	1	1		4	10	7	8	32

A／石川7／82 (H3)

急性期	<1	1	2	3	4	5	6	7	計
<1	1								1
1		2							2
2			1	1					2
3				1	2				3
4				1	5				6
5						3			3
6						1	4		5
7							3	7	10
計	1	2	1	3	7	4	7	7	32

B／Singapore222／79

急性期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	計
<1		1									1
1		1	1								2
2			2	1							3
3			1	6							7
4					10						10
5					3	4					7
6						1	1				2
7											
計		2	4	7	13	5	1				32

*：8×2^n 値　　**：例数

表3．インフルエンザAH1型ウイルス分離陽性者のAH1型株に対するHI抗体の変動

	新宿1/56	熊本37/79	東京1367/83	東京1414/83
急性期	78.1 *	100	93.8	84.4
	1.76(1.01) * *	4.75(1.39)	3.4 (1.30)	3.37(1.52)
回復期	96.9	100	100	96.9
	4.19(1.30)	7.38(1.13)	6.58(1.19)	5.39(1.45)
有意上昇率(%)	87.5	75.0	90.6	62.5

*：HI価≧(8×2^1)の保有率(%)

**：　〃　の平均HI価8×2^n値，(　)内SD

Singapore 222／79株に対してHI抗体価の有意上昇を認めた例は皆無であった．

まとめ

1．1983年末から1984年初頭にかけての東京都内のインフルエンザは，患者材料の検索結果からAH1型であったことが判明した．患者発生は例年と異なり12月がピークであった．

2．AH1型患者のHI抗体価をAH1型ワクチン株で測定した場合，ウイルス分離時にすでに256倍以上という高いHI抗体価をもっていた者が62.5％もあり，ワクチン接種により得られた高い抗体価が必ずしも感染防御に結びつかないものがあると考えられた．

3．今冬期のインフルエンザAH1型患者のHI抗体はAH1型株に対して上昇すると共に，AHsw1型株にも高頻度に上昇することが認められた．

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) 坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎　清，岩崎謙二：東京衛研年報，34，60，1983
3) 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
4) 岩崎謙二，藪内　清，伊藤忠彦，山崎　清：東京衛研年報，26—1，69，1975
5) 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

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 73-81, 1984

1983年東京都における日本脳炎の疫学調査

吉田靖子*, 関根整治*, 薮内清*, 中嶋誠**,
鈴木輝康**, 秋山陽**, 畑野逸與**

Epidemiological Survey of Japanese Encephalitis in Tokyo in 1983

YASUKO YOSHIDA*, SEIJI SEKINE*, KIYOSHI YABUUCHI*,
MAKOTO NAKAJIMA**, TERUYASU SUZUKI**,
MINAMI AKIYAMA**, 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

1968年以降, 都内での日本脳炎(日脳)ウイルス感染を示す真性患者の発生こそなかったが, 直接あるいは間接的に毎年日本脳炎ウイルスの存在が証明されている[1-5]. 1982年には千葉県で3名の患者発生がみられ, 1983年には千葉県在住の真性患者が都内病院に入院するなど決して日本脳炎ウイルス感染の危険性は過ぎ去ったとはいえない. われわれは, 都内における日本脳炎ウイルスの汚染状況を知る目的で, 患者確認調査・感受性調査・感染源調査を実施してきた[1-5].

今回は, 1983年における調査成績と, 過去22年間の都下飼育ブタの調査データについて, 仮説に基づいた数理論解析を行い, 日脳ウイルス感染流行拡大の経過を追求したので報告する.

材料と方法

患者検体 1983年7月11日に発病した20才の男性の病日別血清3件, リコール2件, 咽頭ぬぐい液1件, 糞便1件について, 血清学的ウイルス学的検索を試みた. また8月27日に発病した5才の男児については, 病日別血清3件について血清学的検索を試みた.

ブタ血清 1983年1月から12月までの間に, 都下多摩地区で飼育されたと場ブタから採取した血清1250件である.

健康都民血清 1983年6月13日から11月28日までの間に, 東京都内に居住する生後5ヶ月から65才の健康都民から採取した346件の血清である.

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[6]. 抗原は市販品の中山株・JaGAr 01株を用いた.

中和試験 鶏胎児繊維芽細胞上のプラック減少測定法を用い, 中和抗体価は50%プラック減少率から算定した. 使用した抗原は, JaGAr 01株である.

コガタアカイエカの捕集 1983年6月21日から10月25日までの間に, 既報の3定点[5]から31回にわたって捕集した.

ウイルス分離試験 HI抗体価10倍以下のブタ血清および雌コガタアカイエカの各材料を, 乳のみマウスの脳内に接種しウイルス分離を試みた.

理論流行経過曲線 ブタ間での日脳ウイルス感染流行拡大経過の数理論解析は, 1単位時間あたりの新感染ブタ数の比率は, 集団内の感受性ブタ数の密度と感染源ブタ数の密度とウイルス伝達係数との積に比例し, 前記の2者は流行経過を追って変化してゆくという仮定に基づいて行った[7].

回帰分析法 調査した集団の各抗体価別の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た[8]. y軸との交点である計

* 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

算上の抗体保有率の平方根値とx軸との交点からもとまる最大抗体価を求め，2者の数値から日脳中和抗体保有状況の年次推移を試みた．

結　果

疑似日脳患者の血清学的ウイルス学的検索成績 1983年は都内から2名の届出患者があった．1名は20才の男性で7月11日に発熱・けいれん・四肢筋強剛・意識障害などの臨床症状から日本脳炎が疑われた．他の1名は5才の男児で8月27日に発病し，発熱・意識不明・嘔吐・左手両足のまひ・言語不明などの症状からこれも日本脳炎が疑われた．この男児は千葉県に在住している者であったが，入院先が都内であったため都に届出がなされたものである．

両者の血清学的検索成績を表1に示した．

20才の男性については，病日別に採取した血清からは，日脳ウイルスに対するHI抗体価・CF抗体価の有意上昇は認められなかった．また同時期に採取したリコール（4・16病日）2件を乳のみマウスの脳内に接種し，ウイルス分離試験を試みたが，乳のみマウスを発症させるAgentは検出できなかった．また5病日時に採取した咽頭ぬぐい液と糞便および前記2件のリコールについて，FL・Hep2・Vero#462・BGMの各培養細胞に接種したが，ウイルスは検出されなかった．これらの成績と従来いわれている日脳流行期より早い時期での発病であることから，8月10日に転症となった．

一方，5才の男児は血清学的に日脳ウイルスに対するHI抗体価・CF抗体価の有意上昇が認められ，臨床および血清学的にも日脳真性患者と判断された．この男児は，日脳ワクチン未接種で，高い抗体価と2メルカプトエタノール（2ME）感受性抗体の出現からも日脳ウイルスの初感染であると判定した．

都下飼育ブタの日脳HI抗体保有状況 1983年1月から12月に，都下多摩地区で飼育されたと場ブタから採取した血清1250件について測定した日脳HI抗体価の検査成績を表2に示した．

1983年1月から5月におけるHI抗体保有率（12～34%）は，新感染を意味する2ME感受性抗体陽性を示すブタが存在しないことから，前年度の日脳流行の影響を受けての数値であると推定した．

1983年8月23日以降，HI抗体価の高いブタが出現し，2ME感受性抗体陽性ブタも確認され，8月下旬以降日脳ウイルスの伝播が活発化されたと推定した．

8月23日採取ブタ血清において抗体陽性例がみられてから9月20日には，ブタの日脳HI抗体保有率から日脳ウイルス汚染地区と指定される抗体保有率の目標50%をこえた．その後10月18・25日，11月15日には最高値96%まで達した．このような高い抗体保有率を示したことは東京都においては11年ぶりのことであった．また抗体保有率の上昇時点の9月6日採取ブタ血清から4株，9月20日採取ブタ血清から1株の計5株の日脳ウイルスを分離した．1983年都下飼育ブタにおける日脳感染流行は，近年になく活発であったことが，抗体保有率，2ME感受性抗体保有率およびウイルス分離数から示唆された．

表1．東京都で発生した疑似日脳患者の血清学的検索成績

患者名 性・年令	発病 月日	臨床症状	採血 月日	病日	HI抗体価* N	(N)	J	(J)	CF 抗体価
T.S		けいれん	7/14	4	<10	<10	<10	<10	<8
♂20	7/11	四肢筋強剛	7/26	16	10	<10	10	<10	<8
		意識障害	8/4	25	10	<10	10	<10	<8
		発熱・嘔吐	8/31	5	20	<10	40	<10	ND**
H.T.	8/27	意識不明 左手両足まひ	9/8	13	160	10	320	20	4
♂5		言語不明	9/17	22	160	20	160	40	8

* HI抗体価　N：中山株抗原に対するHI価
J：JaGAr 01株抗原に対するHI価
(N)：中山株抗原に対する2 ME感受性抗体価
(J)：JaGAr 01株抗原に対する2 ME感受性抗体価

** ND：血清量不足のための検査不能

表2.1983年都下飼育ブタ血清における日脳HI抗体保有状況

採血月日	検査数	HI抗体価(JaGAr 01株, 5×2^nのn値)										抗体保有率(%)	2ME感受性抗体保有率(%)	ウイルス*分離
		<1	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
83− 1−17	50	36		1	3	3	6	1				28	0	0/36
2−14.15	50	33	3	1	1	2	3	6	1			34	0	0/33
3−14	50	38			1	2	2	3	2	1	1	24	0	0/38
4−18	50	42	1	1			4		1	1		16	0	0/42
5−16.17	50	44		3	1	1	1					12	0	0/44
6−13	50	50										0		0/50
7− 4	50	45	4		1							10	0	0/45
7−11	50	50										0		0/50
7−18	50	49	1									2	0	0/49
7−25	50	50										0		0/50
8− 1	50	50										0		0/50
8− 8	50	50										0		0/50
8−17	50	50										0		0/50
8−23.24	50	48		1					1			4	2	0/48
8−30	50	43			2	1		1	1	1	1	14	12	0/43
9− 6	50	36				5	6	2	1			28	14	4/36
9−13	50	29					4	6	5	5	1	42	38	0/29
9−20	50	23	2	2	1	2	4	5	7	3	1	54	40	1/23
9−27	50	31			2	1	4	6	5	1		38	16	0/31
10− 4	50	5					4	17	15	7	2	90	8	0/ 5
10−11	50	13				2	9	9	13	4		74	12	0/13
10−18	50	2	1		1	2	11	20	12	1		96	14	0/ 2
10−25	50	2			2	2	15	21	5	3		96	20	0/ 2
11−15	50	2			4		10	25	6	2	1	96	0	0/ 2
12−12.13	50	15	3		1	4	10	14	3			70	0	0/15

*ウイルス分離はHI抗体価<10について、乳のみマウスを用いて行った。

過去22年間行ってきたブタの日脳HI抗体保有率の経過推移を代表年次について比較してみた結果を図1に示した.

過去の調査年次における経過曲線のパターンを比較するとAからDの4つに大別できた.

図1−Aは, 1962年から1967年の経過曲線で, 7月下旬から8月初旬に抗体保有率の急上昇がみられ, 8月中旬以降はほぼ100%を保っていた.

図1−Bは, 1968年・1969年の経過曲線で, 抗体保有率の急上昇はみられるが, 上昇時点が図1−Aよりも約1ヵ月遅れ, その後の抗体保有率は50〜90%の間で変動がみられた.

図1−Cは, 1970年から1972年の経過曲線で, 抗体保有率の上昇時点が図1−Bよりも約2週間遅れ, 図1−A・Bにみられたような抗体保有率の急上昇はみられない. また最高抗体保有率も50〜60%程度で, 日脳汚染地区と指定される50%の保有率に達していたとはいえ, 各時点において変動が大きく, 一過性の強いものとなっていた.

図1−Dは, 1973年から1982年の経過曲線で, 図1−Cよりも抗体保有率の上昇期が9月下旬から10月初旬とさらに遅くなり, 最高抗体保有率は50%以下であった.

1983年においては, 最近10年間にみられたパターンとは異なり, 抗体保有率の上昇時期・最高値からパターン的には図1−Bに近いものとなった.

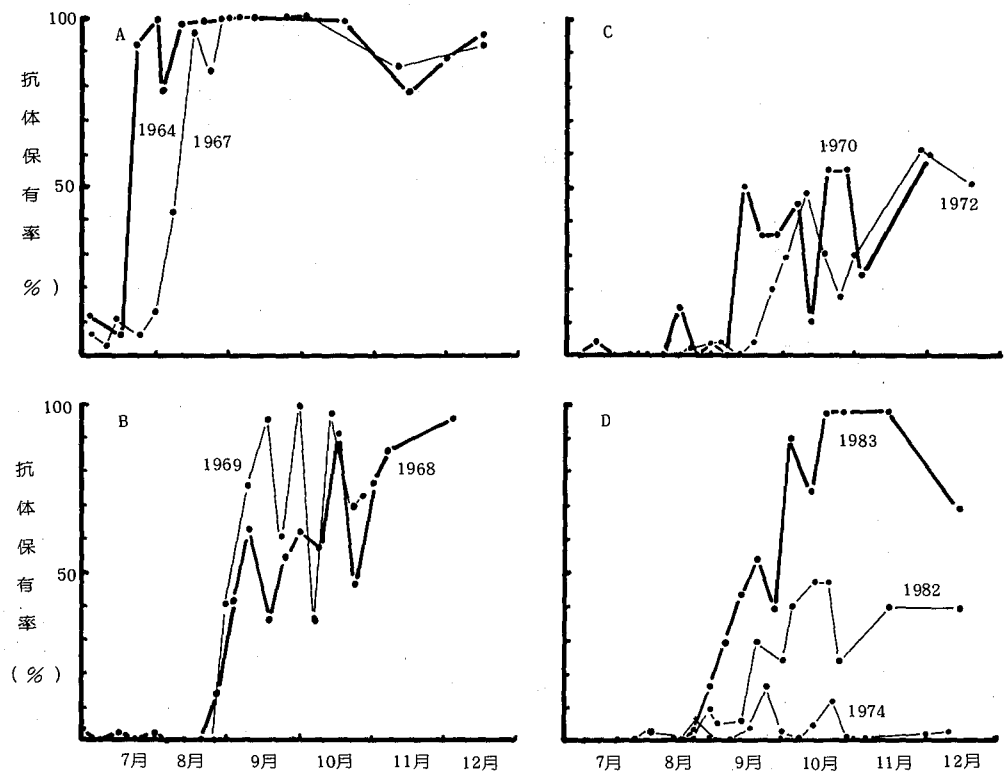


図1．都下飼育ブタの日脳HI抗体保有状況の年次推移

表3．日脳HI抗体陰性ブタ血清からのウイルス検出数

年次	ブタ血清採血月日 8月 1日〜10	8月 11〜20	8月 21〜31	9月 1〜10	9月 11〜20	9月 21〜30	10月 1〜10	10月 11〜20	10月 21〜31	計
1965	1									1
1966	1	1								2
1967	2									2
1968		1								1
1969			4	2	1					7
1970				2	2	3				7
1972					2		3		2	7
1973					1					1
1975			2			1	1*			4
1979					1					1
1980								1	1	2
1981							1			1
1982				1	1		1			3
1983				4	1					5

* コガタアカイエカから日脳ウイルス分離

表3に示した日脳HI抗体陰性ブタ血清からの日脳ウイルス分離数と検出期間をみると，図1—Aに示される年次は，8月中旬までの2週間であり，図1—Bの年次では8月中旬から9月中旬までの1ヵ月間，図1—C・Dは9月初旬から10月下旬の2ヵ月間であった．

いままでの概念からは日脳感染流行期は8月頃とされていたが，近年では9月から10月と遅くなり，またウイルス検出期間でみると日脳ウイルス高汚染率年次では2週間だったのが，低汚染率年次になるほど検出期間が長くなるという変化がみられた．

1983年においては9月初旬から中旬までの2週間のみウイルスが検出され，その後に抗体保有率が急上昇したことから，ブタの集団内においては短期間で日脳感染が拡がり，感受性となる抗体陰性のブタの存在がなくなったために，ウイルス検出期間が短かかったものと思われる．

理論経過曲線　と場ブタは通常生後5ヵ月から8ヵ月で出荷されるので，2回以上の日脳流行を経験することがないため，と場ブタにおける日脳感染流行像は，その年度の一定期間に獲得した抗体産生像（抗体保有率）をそのまま反映していると考えられる．

理論計算を行うにあたって，流行が終息するまでを一定の期間の単位で区切って処理すると便利である．ここでの流行経過単位時間は1/2週とした．流行経過中の各単位時間内に新しく感染するブタの比率（y_i）は，感染源ブタ数の密度（y_{i-1}）・感受性ブタ数の密度（$100-Y_{i-1}$）・ウイルス伝達係数（K）の積として表現した．すなわち数式 $y_i=(y_{i-1})\times(100-Y_{i-1})\times K$，$Y_{i-1}=y_0+y_1+y_2+\cdots\cdots+y_{i-1}$ で表わし，前記2者の数値は時間経過を追って変化してゆくという仮定に基づいて理論計算値を求めた[7]．

求めた理論計算値を表4・図2に示した．

7月4日から各時点（A：11月15日，B：10月18日，C：10月4日，D：9月20日，E：9月6日，F：8月23日）までの実測HI抗体保有率に適合する理論経過曲線は，ウイルス伝達係数値については0.0160～0.0165と大差はなかった．また理論計算値で求められた最高抗体保有率は68.3～72.3%と実測値よりは下まわっていたが，実測抗体保有率の上昇時点における理論経過曲線はどれもよく一致していた．このことから流行初期（F：8月23日の時点）までの実測HI抗体保有率を参考にして理論計算値を求め，流行中期から後期までの経過を予測することが可能であると推測した．

次に2ME感受性抗体陽性率と各時点の抗体陽転率の経過推移を図3に示した．

11月15日までの実測値をもとに計算した理論経過曲線の伝達係数＝0.0165から当該時点に新しく感染したブタの比率である抗体陽転率を示した．実測データにおける新感染を意味する2ME感受性抗体陽性のブタの比率の方が高率であった．各単位時間における移動小計値を求めて比較すると，4単位時間すなわち2週間の移動小計値での値が実測値に近似のものとなった．通常，2-ME感受性抗体を示すIgMは10日から2週間前後持続することを考慮すると，2週間単位の移動小計の値が一致することは納得できるものである．

10月中旬から下旬にかけての2ME感受性抗体陽性率の上昇は，距離的に離れた飼育場から飼育場への飛来する蚊による日脳ウイルスの伝播はないが，一つの飼育場内にとどまっていた蚊による日脳ウイルスの伝播はくり返しおきており，飼育地による日脳感染流行の差と説明できよう．

コガタアカイエカの消長とウイルス分離　1983年6月20日から10月25日の間に，3定点[5]にライトトラップを設置し31回にわたって蚊を捕集し，雌コガタアカイエカの消長およびウイルス分離を試みた．

同期間中捕集した雌コガタアカイエカは，433匹（吸血蚊190匹・未吸血蚊243匹）であった．その他の雌蚊は2479匹であった．各回多少の捕集数の変動はあるが，捕集開始日の6月20日から10月11日まで，雌コガタアカイエカの出現があった．

雌コガタアカイエカの吸血蚊・未吸血蚊を捕集月日，捕集地点別に101のプール材料にわけ，乳のみマウスの脳内接種によりウイルス分離を試みたが，全例陰性であった．

また同期間中，1定点のライトラップ下に，日脳抗体陰性のウサギ5羽を飼育し，日脳抗体獲得状況を調査したが，全例とも抗体は検出されなかった．

健康都民における日脳抗体保有状況　1983年6月13日から11月28日の間に生後5ヵ月から65才の都内に居住する健康者346名から採取した血清について，日脳抗体保有状況を調査した．結果を表5に示した．

JaGAr 01株抗原に対するHI抗体保有率でみると，5才以下の年令層が一番低く17.9%であり，次いで17～30才の36.5%であった．最高の73.0%を示したのは13～16才の年令層であった．中山株抗原についてのHI抗体保有率も，JaGAr 01株抗原と同様であった．

各年令階層における抗体保有率においては変動がみられたが，平均抗体価でみる限りでは顕著な差はみられなかった．

次に中和抗体保有率でみると，HI抗体保有率でみられたような保有率での差はみられず，75.7%から100.0%の範囲であった．しかし，各抗体価別の累積抗体保有率をみると，各年令階層によって異っており，5×2^1以上の抗体保有率に差はみられなかったものの，各年令階層によって抗体価別の分布に違いが生じていることがわかった．5×2^6以上での中和抗体保有率では6～12才においては15.5%みられ，その他の年令階層では0～3.8%と低くなっていた．

各抗体価別の累積抗体保有率をもふまえた回帰分析法[8]によって，1968年と最近4ヵ年の中和抗体保有状況について年令階層別の年次推移を図4に示した．

計算上の抗体保有率の平方根値と最大抗体価の年次による変動の一番小さいのは，6～12才であった．6～12才の年令階層での最大抗体価の値が1968年次より上昇しているのに対して，他の年令階層ではすべて下向き傾向になっていた．特に17～30才の階層での減少傾向が著しかった．5才以下での保有率の平方根値と最大抗体価の値の変動の大きいのは，その年令階層におけるワクチン接種者の比率の違いがでていたものと推定する．

表4 .1983年の日脳流行経過各時点のHI抗体保有率とその理論計算値

流行経過		HI抗体保有率(%)						
				理論計算値**				
単位*時間	月日	実測値	2 ME感受性	A.11月15日 K=0.0165	B.10月18日 K=0.0163	C.10月4日 K=0.0162	D.9月20日 K=0.0163	E.9月6日 K=0.0166	F.8月23日 K=0.0160
0				0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	7/4	10	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2				0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
3	7/11	0		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
4				0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01
5	7/18	2	0	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
6				0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04
7	7/25	0		0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.07
8				0.13	0.13	0.12	0.13	0.15	0.11
9	8/1	0		0.23	0.21	0.20	0.21	0.24	0.18
10				0.38	0.35	0.33	0.35	0.40	0.28
11	8/8	0		0.63	0.56	0.53	0.57	0.67	0.45
12				1.03	0.92	0.85	0.93	1.11	0.72
13	8/17	0		1.69	1.49	1.38	1.51	1.83	1.15
14				2.77	2.42	2.22	2.45	3.01	1.82
15	8/23	4	2	4.49	3.89	3.54	3.95	4.91	2.87
16				7.21	6.20	5.62	6.31	7.92	4.50
17	8/30	14	12	11.37	9.75	8.80	9.91	12.53	6.98
18				17.47	14.97	13.51	15.22	19.23	10.66
19	9/6	28	14	25.78	22.22	20.10	22.58	28.23	15.91
20				35.96	31.43	28.65	31.90	38.97	22.95
21	9/13	42	38	46.73	41.75	38.53	42.28	49.87	22.95
22				56.20	51.56	48.39	52.08	58.95	41.05
23	9/20	54	40	63.05	59.33	56.64	59.75	65.16	49.94
24				67.23	64.48	62.43	64.80	68.75	57.03
25	9/27	38	16	69.50	67.48	65.97	67.71	70.62	61.89
26				70.63	69.07	67.92	69.25	71.53	64.85
27	10/4	90	8	71.19	69.87	68.93	70.02	71.96	66.51
28				71.45	70.26	69.44	70.40	72.16	67.39
29	10/11	74	12	71.57	70.46	69.69	70.58	72.26	67.85
30				71.63	70.59	69.82	70.67	72.30	68.09
31	10/18	96	14	71.66	70.59	69.88	70.71	72.32	68.21
32				71.67	70.61	69.91	70.73	72.33	68.27
33	10/25	96	20	71.68	70.62	69.92	70.74	72.33	68.30
34				71.68	70.63	69.93	70.74	72.33	68.32
35				71.68	70.63	69.93	70.75	72.33	68.33
36				71.68	70.63	69.94	70.75	72.33	68.33
37				71.68	70.63	69.94	70.75	72.33	68.33
38				71.68	70.63	69.94	70.75	72.33	68.33
39	11/15	96	0	71.68	70.63	69.94	70.75	72.33	68.33

* 1単位時間は1/2週とした.

** 理論計算値における初期感染源(V)は0.001　A～F はそれぞれの月日までの実測値を使って算出した.

K = 伝達係数

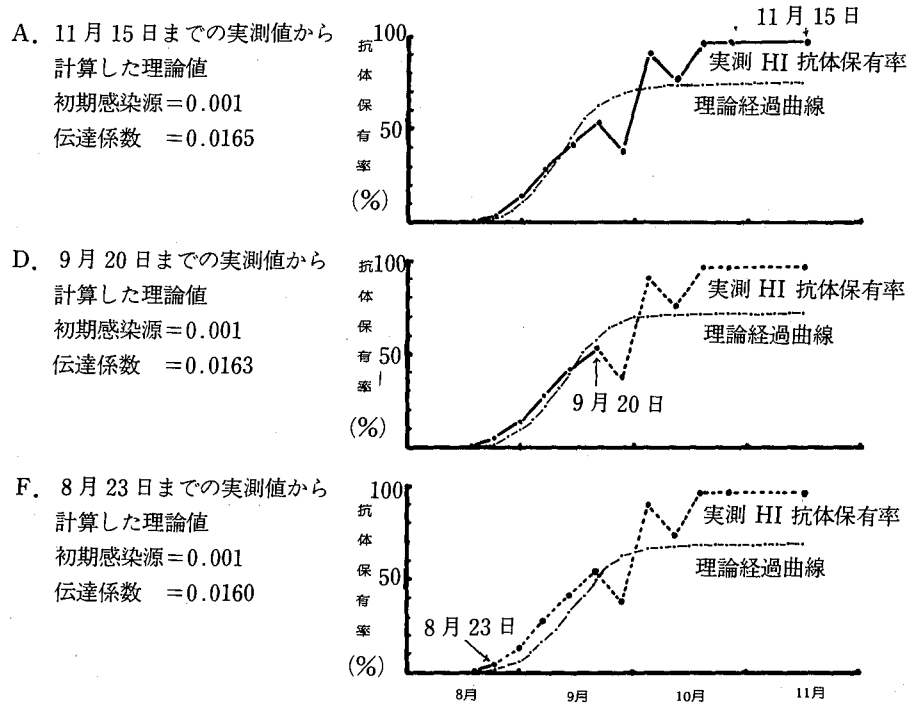


図2．都下飼育ブタの実測 HI 抗体保有率と理論経過曲線

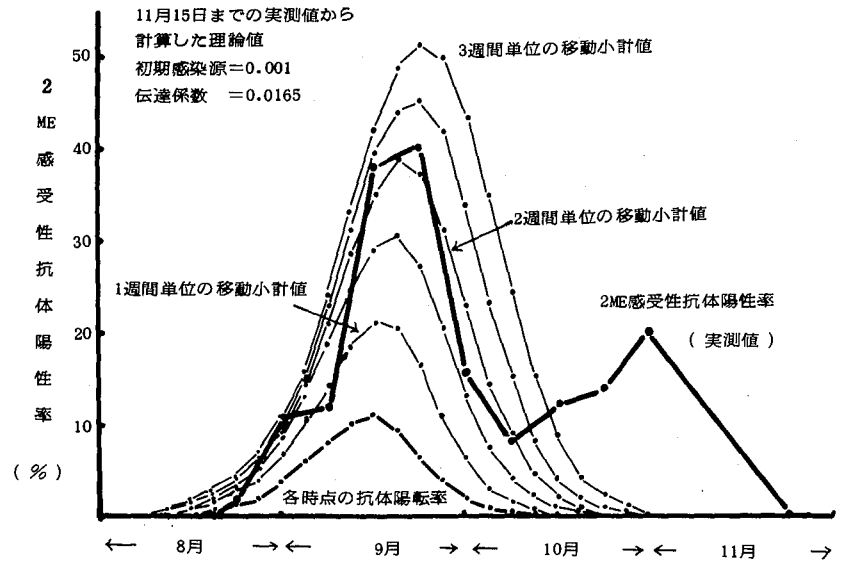


図3．2ME 感受性抗体陽性率と理論計算した各時点の抗体陽転率の経過推移

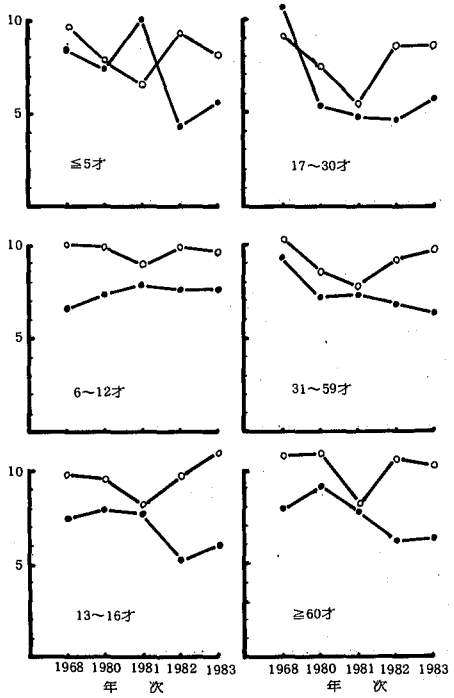


図4．年令階層別の日脳中和抗体保有状況の年次推移

考　察

日脳ウイルス感染サイクルの中で，カ→ブタ→カのサイクルが重要な位置を占めている[9,10]．調査対象としたと場ブタは生後5ヵ月から8ヵ月であるので，前年の日脳流行経験がないためブタが保有していた抗体価は当該年次において獲得したものといえる．したがって，ブタ間における日脳ウイルス流行調査は，当該地域における日脳流行の基本型を知る上で重要である．

著者らも1962年以降毎年都下飼育ブタの日脳HI抗体保有状況を調査し，ブタにおける流行が日脳患者発生に先行すること，都内での患者発生がなくなった1968年以降，ブタの抗体保有率が年々低下して近年は低値であることなどを明らかにしてきた[1~5]．しかし1983年においては11年ぶりに日脳ウイルス汚染地区と指定される50％の保有率をこえ，最大抗体保有率は96％まで達した．この値はサンプリングに起因する一過性のものではなく，10月18日から11月15日に採取したブタ血清において継続的にみられ，感染規模が大きかったことが示唆される．このようなブタでの日脳感染様相は東京都のみならず，全国規模でみられ，日脳流行予測事業の下で実施されたブタ感染調査からも，全国における感染拡大の様相がかつての日脳流行期に似てきている[11,12]．したがってコガタアカイエカの消長，ブタの抗体保有率の

表5．1983年の都民における日脳抗体保有状況

年令階層	検査数	項目*	抗体価（5×2ⁿのn値）								抗体保有率（%）(n≧1)	平均抗体価 n±SD
			<1	1	2	3	4	5	6	7		
≦5	95	N	78	11	1	4		1			17.9	1.76±1.20
		J	78	10	2	3	1				17.9	1.94±1.43
		NT	18	20	39	14	2	1		1	81.1	2.08±0.99
6～12	71	N	25	18	10	5	7	4	2		64.8	2.45±1.55
		J	24	19	7	9	5	2	4	1	66.2	2.57±0.97
		NT	8	7	18	17	7	3	8	3	88.7	3.26±1.70
13～16	26	N	8	4	7	6	1				69.2	2.22±0.87
		J	7	5	7	5	2				73.0	2.21±0.97
		NT		3	3	11	7	1	1		100.0	3.11±1.17
17～30	74	N	51	10	8	3	1	1			31.1	1.91±1.08
		J	47	11	9	5	1	1			36.5	1.96±1.05
		NT	18	4	29	18	1	3		1	75.7	2.53±1.06
31～59	72	N	38	19	12	2	1				47.2	1.47±0.74
		J	32	12	14	10	2				55.6	1.96±1.05
		NT	9	12	16	15	12	8			87.5	2.80±1.30
≧60	8	N	4	3	1						50.0	1.25±0.50
		J	3	2	2	1					62.5	1.80±0.83
		NT	1		2	3	1	1			87.5	3.14±1.06

*項目　N：中山株抗原に対するHI抗体保有状況
J：JaGAr 01株抗原に対するHI抗体保有状況
NT：JaGAr 01株抗原に対する中和抗体保有状況

推移，人における抗体保有状況および自然界における要因など今後とも厳重に監視を続ける必要があろう．

22年間の疫学的観測データから，流行拡大の強さや流行開始時の感染源の大きさなどの潜在する要因を設定した仮定式に基づいて，流行初期の実測値のみで計算した理論経過曲線の値と，全経過を通した実測値とは顕著な差はみられないことはすでに報告してきたが[3,7]，1983年においては8月23日までの実測値から求めた理論経過曲線の到達値は68％となり，近年にはなく高い抗体保有率になることを予測していた．実際の流行経過をみると，最高96％まで達し，予測した値よりもはるかに大きい値を示したが，流行中期の9月下旬頃までは計算値と実測値はよく一致していた．このことからブタでの日脳ウイルス感染流行は，流行初期の実測値で流行中期から後期の経過を予測することができると考える．

1968年以降日脳真性患者の発生は，ほとんどが近畿以西で起きていたのが，1982年には千葉県で3名，1983年には千葉県で2名，茨城県で2名の患者発生がみられた[12]．全国的に日脳ウイルスの汚染が希薄になってきて，自然感染の機会が少なくなり，低年令層では日脳の抗体維持はもっぱらワクチンによらざるをえないのだが，[13~15]そのワクチン接種をも受けない幼児童がふえてきている．日脳は高い致命率と重篤な後遺症を残す重要な疾患であるから，関東地方においても本症の患者が再び発生したということ，ブタの抗体保有率からみて流行域が拡大されたという事実から今後の監視体制を厳重にする必要があろう．

結　論

1983年の東京都における日脳ウイルスの汚染状況を知る目的で，患者確認調査，感染源調査として都下飼育ブタの抗体保有調査・コガタアカイエカの消長，感受性調査として健康都民の抗体保有調査を実施し，次の結果を得た．

1）1983年8月27日に発病した5才の男児は，血清学的検索によって真性の日脳患者であると確認された．

2）都下飼育ブタの日脳HI抗体保有率・2ME感受性抗体保有率・日脳HI抗体陰性ブタ血清からの日脳ウイルス検出数（5株）などから，近年にはなく日脳感染流行が活発であったことが示唆された．

3）ブタにおける日脳HI抗体保有率の最高値は96％を示し，東京都においてブタの日脳HI抗体保有率から日脳汚染地区と指定される抗体保有率の目標50％をこえたのは，11年ぶりのことであった．

4）日脳流行初期（8月23日まで）の実測HI抗体保有率を参考にして求めた理論計算値から，流行中期から後期までの流行経過を予測することが可能であることがわかった．

5）健康都民血清における日脳HI抗体保有調査において，17.9％から73％と年令階層間で差がみられた．

6）中和抗体保有状況でみると，10倍以上の日脳中和抗体保有率においては1968年次と各年令階層とも変動は少なかったが，各抗体価別の累積抗体保有率で比較すると6～12才を除く年令階層では年次に従って減少傾向にあった．特に17～30才の年令階層で減少傾向は著明であった．

文　献

1）藪内　清，岩崎謙二，村上　一他：東京衛研年報，20，39，1969
2）藪内　清，岩崎謙二，坂井冨士子他：東京衛研年報，21，19，1970
3）吉田靖子，藪内　清，岩崎謙二他：東京衛研年報，31—1，30，1980
4）吉田靖子，関根整治，藪内　清，岩崎謙二他：東京衛研年報，33，66，1982
5）関根整治，吉田靖子，藪内　清，岩崎謙二他：東京衛研年報，34，54，1983
6）厚生省：微生物検査必携，ウイルス・リケッチア検査，249，1978，日本公衆衛生協会，東京
7）岩崎謙二，藪内　清，吉田靖子，関根整治：東京衛研年報，33，72，1982
8）岩崎謙二：東京衛研年報，26—1，81，1975
9）Nezu, N., Murakami, H., Iwasaki, K. et al.: *Ann. Rep. Tokyo. Metro. Res. Lab. P.H.*, 15, 160, 1963
10）根津尚光他：東京衛研年報，16，52，1964
11）厚生省公衆衛生局保健情報課：全国日本脳炎情報，1983
12）厚生省公衆衛生局保健情報課：病原微生物検出情報，第50号，1984
13）武井直巳，徳本静代，瀬川和幸，寺上正人：感染症学雑誌，56，1003，1982
14）Kanemitsu, M.: *Biken J.*, 13, 313, 1970
15）Okuno, Y., et al.: *Biken J.*, 26, 25, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 82-88, 1984

急性発疹性疾患患児からのウイルス検索 (1979～1983)

吉田靖子*, 関根整治*, 藪内清*

Incidence of Virus Isolation from Acute Exanthematous Diseases among Infants in Tokyo (1979—1983)

YASUKO YOSHIDA*, SEIJI SEKINE* and KIYOSHI YABUUCHI*

Keywords：急性発疹症 acute exanthematous diseases, 腸管系ウイルス entero virus

緒　言

公衆衛生および生活環境の向上により，各種感染症の発生状況は著しく変化し，法定伝染病などは激減したが，従来あまり表在しなかったヘルパンギーナ・手足口病（H.F.M.D.）・伝染性紅斑等の発疹性疾患が乳幼児の間で流行し，社会的に問題視されるようになってきた．発疹性疾患の中には，その特有な臨床像から病因がほぼ明確にされるものもあるが，腸管系ウイルスによる臨床像は様々なものがあげられていて[1,2]，病因性の不確定のものが多い．

今回，1979年から1983年に都内定点病院の小児科を受診した発疹性疾患々児からウイルス分離を行い，都内における腸管系ウイルスによる発疹性疾患の流行実態を調査したので報告する．

材料と方法

患児材料　1979年4月から1983年12月までの5年間に，東京逓信病院小児科を受診した生後1ヵ月から15才までの急性発疹症患児279名から咽頭ぬぐい液または水泡内容液を採取し，ウイルス分離材料とした．

検体採取法および処理方法は既報に準じて行った[3]．

ウイルス分離試験　患児の咽頭ぬぐい液または水泡内容液を，生後48時間以内の乳のみマウスの皮下および腹腔内に各0.02 mlずつ接種し20日間観察した．接種後24時間以内の死亡は非特異的なものとして除外した．またFL・Hep2・Vero355・HELの各培養細胞系を用いて，CPEの出現を指標に判定した．

同定法　発症した乳のみマウスは，その極期にと殺し，皮・頭部・四肢・内臓を除去し，胴体部を細片したのちよくすりつぶしPBSで10％乳剤とした．3,000 rpm 15分遠心した上清についてダイフロン処理を2回行い，分離株の同定用抗原とした．その分離株の抗原と既知免疫腹水を用いてCF試験により同定を行った[4]．CF試験は補体の単位を50％溶血で測定するマイクロマイター法を用いた[5]．また培養細胞系でCPEを生じたものは，中和試験により同定を行った．同定の詳細は既報に準じて行った[3]．

結果と考察

急性発疹症疾患患児からのウイルス分離成績

1）年令別によるウイルス検出陽性数　ウイルス分離検索を行った279名の年令分布を表1に示した．

1才刻みの年令別によるウイルス検出陽性者数の比率をみると，1～4才において35.7％～51.5％と高かった．また年次的にみると，1979年次においてウイルス検出率が47.9％と高かった．

発疹の出現率を左右する因子は，病原体側ではウイルス型，宿主側では年令であるといわれている[2]．腸管系ウイルスによる発疹は他の非特異的ウイルス性発疹と同様年少児に多発し，出現率に著しい年令的差異がみられ，Lernerら[6]のエコー9型ウイルスの大流行時の報告では，発疹の出現率は0～4才57％，5～9才41％，10才以上6％で，ほとんど10才以下（平均年令$3\frac{4}{12}$才）に限られていた．またエコー5型[7]・25型[8]の新生児や乳幼児の施設における腸管系ウイルス感染症の集団発生では，患者の30％以上に発疹の出現をみた報告もある．

* 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

このように発疹症にはそれぞれ好発年令があり，病原の種類やそれぞれの流行により発疹の出現率が異ったり，また発疹の出現が一過性であったりするので発疹のみで鑑別診断するのは困難である．

2）臨床症状別によるウイルス検出陽性者数　患児の臨床症状別では，口内炎 14 件・ヘルパンギーナ 55 件・H.F.M.D.72 件・不明発疹 62 件・伝染性紅斑 12 件・その他 64 件であった．その他の中には上気道炎・夏かぜ・感昌性胃腸炎・川崎病・気管支炎・扁桃腺炎・感昌性下痢等の臨床症状であった．

急性発疹症患児の臨床症状別にみたウイルス検出陽性者数を表 2 に示した．

臨床症状別にみると，口内炎・ヘルパンギーナ・H.F.M.D.の患児からのウイルス検出率が 45.8％～78.5％と高かった．またその他の中では，上気道炎・夏かぜ・感昌性胃腸炎の患児からウイルスが検出された．

ヘルパンギーナ・H.F.M.D.・アフター性口内炎は，また水泡あるいは潰瘍を伴う急性扁桃咽頭炎の中に含まれ，小児においては古くから発疹と発熱を伴った急性上気道炎として知られている．夏かぜは腸管系ウイルスが主病因で，病変は全身的でウイルスは気道以外の腸管粘膜でも増殖し，皮膚や粘膜に発疹を生じ，髄膜炎をおこすこともある．

患児の中には有熱性の下痢症状を有するものがあった

表 1.年令別によるウイルス検出陽性者数

年令	年次 1979	1980	1981	1982	1983	計	陽性率 (%)
＜ 1	3/16※	5/13		3/8	0/3	11/40	27.5
1	10/17	6/14		3/11	1/14	20/56	35.7
2	13/21	2/6	0/1	1/1	1/4	17/33	51.5
3	7/13	2/7	0/1	2/3	2/4	13/28	46.5
4	9/13	2/6		0/3	1/4	12/26	46.1
5	0/7	1/5	2/5	0/4	0/1	3/22	13.6
6	3/4	2/5		1/4	0/2	6/15	40.0
7	3/7	0/4				3/11	27.3
8	2/6	1/5		0/1	0/1	3/13	23.0
9	1/1			0/5		1/6	16.7
10	0/1	0/1			0/1	0/3	
12	2/2	2/2	0/1			4/5	80.0
13		0/1				0/1	
15	0/1					0/1	
?	4/10		1/9			5/19	26.3
計	57/119	23/69	3/17	10/40	5/34	98/279	35.1
陽性率(%)	47.9	33.3	17.6	25.0	14.7		

※ 陽性者数/検査数

表 2.臨床症状別のウイルス検出陽性者数

臨床症状	年次 1979	1980	1981	1982	1983	計	(%)
口内炎	8/9	1/2		2/3		11/14	78.5
ヘルパンギーナ	19/26	11/18	1/2	2/6	1/3	34/55	61.8
H.F.M.D	17/24	8/13	1/4	4/17	3/14	33/72	45.8
不明発疹	1/11	2/19	0/1	2/14	1/17	6/62	9.7
伝染性紅斑	1/3	1/8	1/1			3/12	25.0
その他	11/46	0/9				11/64	17.2

表3. 臨床症状別にみたウイルス検出状況

年次	臨床症状	コクサッキーA群ウイルス									コクサッキーB群ウイルス					アデノウイルス						ポリオ	エコーウイルス		エンテロウイルス		?
		2	4	5	6	8	10	16	?		1	2	4	5		1	2	3	4	5	6	1	3	7	71	
1979	口内炎						6	1				2					2										
	ヘルパンギーナ			6			10		1			4	1					1									
	H.F.M.D							17			1													1			
	夏かぜ								1			1															
	発疹						2		1			2															
	上気道炎	2						1																1			
	伝染性紅斑																	1								
	胃腸型かぜ											1					1		1							1
	気管支炎							1																		
1980	口内炎							1																		
	ヘルパンギーナ	5		2	1						1											1	1			
	H.F.M.D							5	2		1								1							
	発疹															2										
	伝染性紅斑	1																								
1981	ヘルパンギーナ			1																						
	H.F.M.D							1																		
	伝染性紅斑	1																								
1982	口内炎															1								1		
	ヘルパンギーナ	2																								
	H.F.M.D	2						1																		
	発疹症	1														1	1									
1983	ヘルパンギーナ	1																								
	H.F.M.D	1						1								1										
	発疹																									1

が，特にコクサッキーウイルスによる胃腸炎やエコーウイルスによる乳幼児の下痢症の報告もある[9]．またコクサッキーウイルス感染症では，主症状ではなくとも下痢をともなったという報告は多い[10]．

3）臨床症状別によるウイルス分離状況　臨床症状別にみたウイルスの分離状況を表3に示した．

総検体数279件から114株のウイルスを分離した．分離したウイルスは，コクサッキーA群77株（2型3株，4型13株，5型6株，6型2株，8型1株，10型18株，16型27株，未同定7株），コクサッキーB群16株（1型1株，2型2株，4型11株，5型1株），アデノ14株（1型1株，2型5株，3型4株，4型2株，5型1株，6型1株），ポリオ1型1株，エコー3株（3型1株，7型2株），エンテロ71 1株を分離した．急性発疹症患児からのウイルス別分離数では，コクサッキーA群ウイルスの占める割合が67.5％と大きかった．

ヘルパンギーナの患児において，1979年はコクサッキーA群5型および10型が多く分離され，80年には同4・6・8型，82年には同4型，83年には同2型と同一症状でもウイルスの血清型が異っていた．

H.F.M.D.の患児において，コクサッキーA群16型が多く分離されたが，1982・1983年においては同4型も分離された．

1979年におけるH.F.M.D.・上気道炎患児からエコーウイルス7型が分離されているが，発疹を伴なっていない上気道炎患児から同ウイルスを多く検出しており[11]，流行がうかがわれた．また同年次は，各臨床症状にわたってコクサッキーB群4型が多く検出されていた．下水排出地域住民間に発生した腸管系ウイルスの感染流行実態調査成績より，同時期における下水検体より同ウイルスが多数分離されており，同ウイルスの感染がある程度の規模で発生していたことを報告している[12]．

表4．腸管系ウイルスと発疹性疾患との関係

ウイルス型 / 皮膚・粘膜疹の性状，または病型	ECHOウイルス																			
	1	2	3	4	5	6	7	9	11	12	13	14	16	17	18	19	22	25	30	32	33
紅斑性・斑丘疹性	+	++	+	+++	++	++	+	+++	++		+	+	+++	++	+	+	+	++	+		+
水疱性				+	+	+		+	++	+				+				+			
溢血斑または紫斑				+			+	+++	+												
蕁麻疹様									+												
血管腫様																		+		+	
粃糖疹様						+															
Stevens-Johnson 症候群						+															
手足口病						+			+												
突発性発疹症様疾患	+			+																	
発疹＋髄膜炎		+		+++		++		+++	+			+	+	+	+			+			+
発疹＋肺炎									+												
ヘルパンギーナ						+		++	+				++	++				++			
水泡性口内炎																					
急性リンパ結節性咽頭炎																					

ウイルス型 / 皮膚・粘膜疹の性状，または病型	コクサッキーウイルス																	エウインテルロス71
	A群													B群				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	16	22		1	2	3	4	5	
紅斑性・斑丘疹性		+		++	++		+		+++	++	+++			++	+	++	+	+++	
水疱性				++	++				+++	++	+++			+	+	+		+	+++
溢血斑または紫斑				+					+++						+	++	+	+	
蕁麻疹様									++		+								
血管腫様																			
粃糖疹様																			
Stevens-Johnson 症候群										+	+							+	
手足口病					+				+	+	+++			+		+			+++
突発性発疹症様疾患									+					+				++	
発疹＋髄膜炎		+							+++						+		+	+++	+++
発疹＋肺炎									++										
ヘルパンギーナ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	+++	++	+++		++	++	++	++	++	
水泡性口内炎				++	++					++	+++								+++
急性リンパ結節性咽頭炎										+									

+++多いもの(重要なウイルス型)　++ときにみられるもの　+まれなもの　（渡辺悌吉：臨床とウイルス，7.37.1979）

表5.月別にみたウイルス検出状況

年次	月	コクサッキーA群ウイルス								コクサッキーB群ウイルス				アデノウイルス						ポリオ	エコーウイルス		エンテロウイルス		?
		2	4	5	6	8	10	16	?	1	2	4	5	1	2	3	4	5	6	1	3	7	71		
1979	6						5	1	1			3				1	1								
	7			6			4	6		1		3													
	8	1					4	1				3	1			1						1			1
	9	1					1	2				1		1		1		1				1			
	10						2	4	2			1													
	11						1	3																	
	12						1	3																	
1980	4													1											
	5										1							1		1					
	6		5					1																	
	7		1		2	1		3	1		1														
	8							1													1				
	10								1																
	11								1																
	12													1											
1981	5		1						1																
	7			1																					
1982	6		1											1	1										
	7		4																						
	8							1								1									
	10														1								1		
1983	1		1																						
	5															1									
	8	1						1																	
	10																								1

アデノウイルスにおいては，各年次にわたって1型から6型が検出されていた．

同一症状を示しても，分離されるウイルスの血清型が異なったり，また同一ウイルスでも種々の形の発疹を呈するという，いわゆる新しいウイルス性発疹症は，その発疹の形態をみて明確に区別できることもなく，また原因別にみても必ずしも特有な発疹ではなく多彩な発疹型をとる．これまで非特異的急性発疹症とされ，臨床的には感冒性発疹症と診断されてきたグループの病原ウイルスの中に腸管系ウイルスがあげられ，渡辺の報告[2]によると，腸管系ウイルスと発疹性疾患との関係は表4のように示されている．

表4に示されたごとく，腸管系ウイルスの種々な型が病原もしくはその可能性のあるものとして報告されている[2]．この中には少数の散発的症例からたまたま分離あるいは感染が証明されたのみで，発疹との真の因果関係の不明なものもある．

4）月別によるウイルス分離状況　ウイルスの分離状況を月別に整理して表5に示した．

総分離ウイルス数114株のうち，7月において34株（29.8％）と一番多く分離され，次いで6月の21株（18.4％），8月の19株（16.7％），10月の13株（11.4％），9月の9株（7.9％），5月の6株（5.3％），11・12月の5株（9.4％），4・1月の1株（0.8％）であった．ウイルス性発疹症を季節的にみると，ウイルス分離数からも初夏から初秋にかけて流行し，ピークは7月にみられた．しかし1株ではあるが，1983年1月に発病したH.F.M.D.の患児からコクサッキーA群4型ウイルスが分離された．最近では，疾患の季節性が失われることもあり，ヘルパンギーナ，H.F.M.D.などの発生例が冬期にも

あることが報告されている[5].

5）**同時分離例**　同一患児検体から異ったウイルスが検出された同時分離例が，279件中14件（5.0％）みられた．表6に示したごとく，分離ウイルスの組合せは，コクサッキーA群とB群が多かった．特に1979年次において同時分離例が多くみられたが，これは分離培養法を多様化したためである．すなわち発症した乳のみマウスの胴体部の乳剤を，培養細胞のVero#462に接種したところCPEの出現がみられ，中和試験の結果，コクサッキーB群4型ウイルスと同定した．

感染症定点観測調査成績

従来，表在化していなかった疾病であるヘルパンギーナ・H.F.M.D.・伝染性紅斑・不明発疹症などの流行が近年みられるようになり，特に乳幼児間に流行が発生するところから問題視されてきた．東京都においては1977年10月より，これら感染症に対する地域的な監視体制を設け，患者の発生状況・病原体の検索などの流行の実態を早期かつ的確には握してきた．

患者定点として選定された医療機関（1979年40定点，1980・1981年46定点，1982・1983年63定点）の疾病別の患者発生数を集計すると図1のようになった．

ヘルパンギーナおよびH.F.M.D.においては，各年次とも5月から10月において患者発生数が多く，ピークは6・7月であった．一定点医療機関あたりの患者発生数／月からみて，ヘルパンギーナの方が大きな流行をくり返しているように思われた．最大値は1980年6月における26.9人であった．H.F.M.D.については同年6月において14.2人と最大値を示した．1982年の流行時には，7月のピークをすぎ秋から以後も発生が続いたことは，主因ウイルスがコクサッキーA群16型ウイルスとエンテロ71ウイルスの混合流行だったために，流行時期が長くなっていたという報告があった[13].

伝染性紅斑についてみると，1980・1981年次に流行がみられた．1980年1月から12月においては一定点医療機関あたりの患者発生数は月平均0.91人から3.69人で，さらに1981年1月から7月においては，3.08人から8.0人と患者発生数が多くなっていた．ピークは4月にみられた．その後の年次においては，0.17人から0.81人と低くなっていた．1981年の流行は全国的にみられた[13]．それまで地域的小流行をおこすにとどまっていた本疾病が，全国的な大流行をおこしたという点で特異的であった．

突発性発疹は，0才が大部分で季節的な変動は少なく，かなり一定の発生率（一定点医療機関あたりの患者発生数の月平均は2.51人から4.82人であった．）を示していたという点で特徴的である．

表6. 同時分離例

年次（年－月）	検体No.	年令	臨床症状	ウイルス分離＊ SM	SM→#Vero	Cell
1979－6	782	1	口内炎	CA 10		AD3
	794	4	口内炎	CA10	CB4	
	793	1	口内炎	CA10	CB4	
－7	837	2	H.F.M.D	CA16		CB1
	936	1	ヘルパンギーナ	CA5	CB4	
	937	7	ヘルパンギーナ	CA5	CB4	
	933	2	ヘルパンギーナ	CA10	CB4	
－8	1083	6	H.F.M.D	CA16		E7
	1086	6M	ヘルパンギーナ	CA10	CB4	
	1145	2	上気道炎	CA2	CB4	
－9	1180	3	上気道炎	CA2	CB4	
－10	1332	1	上気道炎	CA10	CB4	
1980－5	945	7M	H.F.M.D	CB2		AD5
1982－6	713	6M	急性発疹症	CA4		AD2

＊ウイルス分離　SM：乳のみマウスの皮下・腹腔内接種
SM→#Vero：乳のみマウスの胴体部の乳剤をVero #462細胞に接種
Cell：各種培養細胞に接種

結　論

1979年から1983年の5年間に採取した小児科受診患児の咽頭ぬぐい液および水泡内容液からウイルス分離を行い，次の結論を得た．

1）総検体数279件から114株のウイルスを分離し，中でもコクサッキーA群ウイルスの占める割合が67.5％と大きかった．また年令別についてみると1～4才の患児において，高率にウイルスが分離された．

2）ヘルパンギーナの患児から分離されたコクサッキーA群ウイルスは，年次によって異っていた．1979年次は同5・10型，1980年次は同4・6・8型，1981年次は同4型，1983年次は同2型とウイルス型の変遷がみられた．

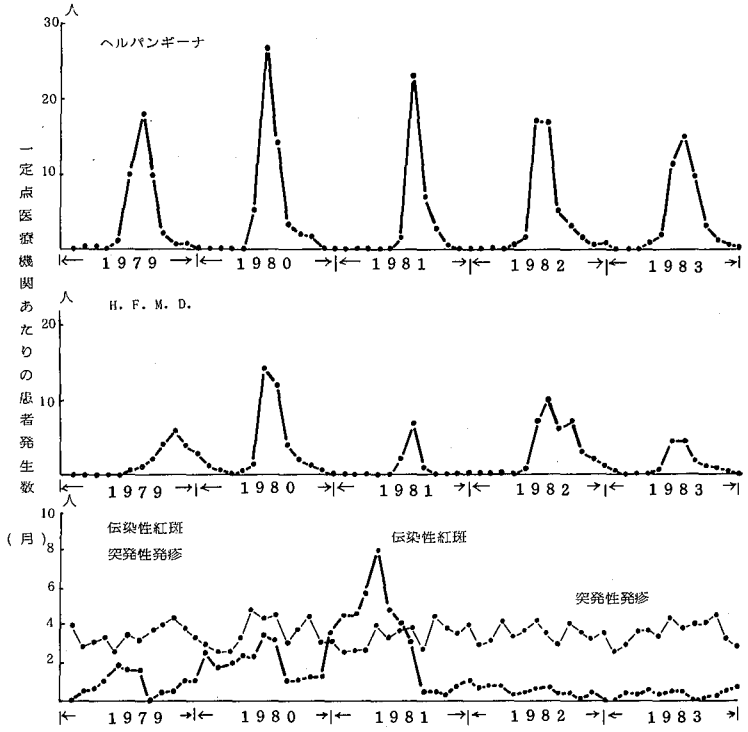


図1. 発疹性疾患の患者発生状況の年次推移

3) H.F.M.D.の患児からは，コクサッキーA群16型ウイルスが分離された．

4) 同時分離例は279件中14件（5.0％）みられ，分離ウイルスの組合せはコクサッキーA群とB群が多かった．

5) 感染症定点観測調査成績より，ヘルパンギーナ・H.F.M.D.の流行は毎年5月から10月にかけて発生していた．

6) 伝染性紅斑については，1981年次に大きな流行がみられた．また突発性発疹の患者発生については，年次的・季節的な変動は少なく一定の発生率を示しているという点で特徴的であった．

謝辞 検体採取にあたり御指導と御協力をいただいた東京逓信病院小児科部長渡辺悌吉博士に対して深甚なる謝意を表します．

文　献

1) 鈴木　仁：小児科，20，693，1979
2) 渡辺悌吉：臨床とウイルス，7，37，1979
3) 矢野一好，藪内　清，岩崎謙二他：東京衛研年報，29—1，49，1978
4) 鈴木利壽，斉藤直喜，小田和正：臨床とウイルス，11，237，1983
5) 微生物検査必携ウイルス・リケッチア検査，第2版，1978，日本公衆衛生協会，東京
6) Lerner, A.M. et al.:*New Engl. J. Med.*, 269, 678, 736, 1963
7) German, L.J. et al.:*Brit. Med.J.*, 1, 742, 1968
8) Moritsugu, Y. et al.:*Am. J.Epidem.*, 87, 599, 1968
9) 浦野　隆：臨床とウイルス，7，44，1979
10) 鈴木　栄：小児医学，5, 579, 1972
11) 藪内　清，矢野一好，林　志直，岩崎謙二他：東京衛研年報，31—1，40，1980
12) 藪内　清，矢野一好，林　志直，岩崎謙二他：東京衛研年報，31—1，36，1980
13) 木村三生夫：臨床とウイルス，11，182，1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 89-91, 1984

急性胃腸炎患児ふん便からのRota virusの検出（3）

関根整治*, 矢野一好*, 藪内清*, 渡辺悌吉**,
石原祐**, 大久保さつき**, 印鑰史衛**

Detection of Rota viruses in Faeces taken from Infants with Acute Gastroenteritis (3)

SEIJI SEKINE*, KAZUYOSHI YANO*, KIYOSHI YABUUCHI*,
TEIKICHI WATANABE**, YU ISHIHARA**
SATSUKI OKUBO** and FUMIE INYAKU**

Keywords: 急性胃腸炎 acute gastroenteritis, ロタウイルス rota virus, 酵素抗体法 enzyme linked immunosorbent assay

緒言

冬期に多発する乳幼児の非細菌性急性胃腸炎の病因としてHuman Rota virus（以下HRVと略す）が主要な役割を演じていることは，現在広く知られているところである．

我々は都内におけるHRV流行の実態をは握する目的で1979年以来，都内の一病院を定点として，急性胃腸炎患児ふん便よりHRV抗原の検出を試みている．1982年2月までの成積については既に報告した[1~3]．

本報は1982年3月から1984年3月までの検索成積である．

材料と方法

供試ふん便

急性胃腸炎症状を呈し，東京逓信病院を受診した生後10日～15才までの散発例の患児477名のふん便である．

ふん便は，採取後直ちに−20℃に凍結保存した．

ロタウイルス抗原検出法

ELISAキット（Enzyme Linked Immunosorbent Assay Kit）「Rotazyme」（ダイナボット社製）を使用した．

すなわち患児ふん便を希釈液にて1：3に希釈し，その0.2m*l*に抗SA11モルモット血清をコートしたビーズを入れ，45℃ 3時間反応させた後，ビーズを洗浄，その後酵素標識抗SA11ウサギ血清を0.2m*l*加え，45℃ 1時間反応させた．再びビーズを洗浄し酵素活性測定用基質液0.2m*l*を加え，室温15分間暗所で反応させた後判定した．

詳細は既報に記した[2]．

ウイルス分離試験

ふん便を組織培養用培養液（Eagle MEM）に入れ10%乳剤とし，凍結融解後，3,000 rpm 10分間遠心し，その上清に抗生物質を加え，FL, Hep2, Vero # 462, BGMの4種継代細胞に接種し，連日細胞変性効果（CPE）出現の有無を観察した．

結果と考察

1982年3月から1984年3月までのウイルス検出状況を月別にして表1に示した．

調査期間中に東京逓信病院小児科を受診した外来患者は1982年3月から12月までで204名，1983年1月から12月179名，1984年1月から3月までの94名で，被検査者総数は477名であった．

いずれの年次も被検査者は，冬期（12月～3月）に多く，夏期（7月～9月）には少なかった．月別のHRV抗原検出状況は，6月～8月を除く各月に検出されているが，そのほとんどは，冬期（12月～3月）で検出率は30～47%と他の検出ウイルスにくらべ高率であり，季節的に違いのあることが示された．これは従来の報告と同

* 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
** 東京逓信病院小児科

表1．1982年3月から1984年3月までのウイルスの月別検出状況

年	1982			1983			1984		
月	HRV陽性者数／検査数	陽性率（%）	その他の検出ウイルス（例数）	HRV陽性者数／検査数	陽性率（%）	その他の検出ウイルス（例数）	HRV陽性者数／検査数	陽性率（%）	その他の検出ウイルス（例数）
1	—	—	—	15／32	(46.9)		12／31	(38.7)	
2	—	—	—	12／28	(42.9)		8／27	(29.6)	
3	1／37	(3.0)	*P1(1)	6／17	(35.3)	AD5(1), P1(1)	9／36	(25.0)	
4	2／17	(11.8)		1／7	(14.3)				
5	1／25	(4.0)	P1(4), P2(4)	0／15		AD3(1)			
6	0／22		P1(2), P2(1)	0／5					
7	0／14		**P2(1), CB3(1)	0／8					
8	0／17			0／10					
9	1／7	(14.3)	***E11(1)	0／9					
10	1／16	(6.3)	E11(1)	0／8					
11	2／20	(10.0)	E11(1)	2／11	(18.1)	E11(1)			
12	3／29	(10.3)	****AD2(1), P3(1)	4／29	(13.8)	AD1(4)			

* Polio virus type 1,2,3, ** Coxsackie B virus type 3
*** Echo virus type 11 **** Adeno virus type 1,2,3,5,

様であった[4]．

また各年次における冬期のHRV抗原検出率には，違いが認められなかった．

HRV抗原検出例のうち1例は，再感染が疑われるもので，初回は生後4ヶ月，2回目は生後7ヶ月の時点であった．HRVの再感染については，しばしば起ることが報告[5]されているが，この再感染の疑われる例は同一型のHRVによるものか，異なった型によるものかは明らかにする事ができなかった．

HRV以外のウイルスとして，Coxsackie B virus 3型1例，Echo virus 11型4例，Adeno virus 1,2,3,5型が計7例，polio virus 1, 2, 3型が15例検出されているが，Echo virusなどは，Adeno virusと共に健康者からもしばしば検出されることから[6]，下痢の病因として関与していたか否かは不明である．polio virusが15例検出されたが，これはポリオワクチンの投与時期に対応していた．

陽性者の年令別検出状況を表2に示した．HRV抗原の最も陽性率の高かった年令層は，1才以下で30名，ついで1～2才28名で，HRV抗原陽性者80名のうち58名（73%）を占めHRVの好発年令は，2才以下であるとの従来の報告と一致した成績であった[7]．また年令の上昇とともにHRV抗原の陽性率は減少し，10～13才においては，各1例づつ（10%）程度であった．2才以下の多発は，離乳期以降に集中している．これは母親からの移行抗体の消失，および授乳の中止などが，本症の発病に影響があると考えられる．また血清学的には，不顕性感染を含めて，5才位までにHRVに対する累積抗体保有率が90%近くにもなっていることから，これを裏づけるような結果であった．

表2．ウイルス陽性者の年令別検出状況

年 令	被検査者数	陽性者数(%)	検出ウイルス				
			Rota virus	Polio virus	Adeno virus	Echo virus	Coxsackie B virus
＜1	118	38(32.2)	30	5	1	1	1
1－2	110	38(34.5)	28	3	4	3	
3－5	83	19(22.9)	12	5	2		
6－10	106	9(8.5)	7	2			
11－15	60	3(5.0)	3				
計	477	107(22.4)	80	15	7	4	1

HRV抗原が検出された患児の病日は，1～16日にわたっていたが，2～4病日のものが最も多かった．通常発病後3～4日をピークに7～8病日までウイルスが検出されるが，今回の調査では，16病日とウイルスの排泄期間の長いものが認められた．しかし20日以上も排泄されるという報告もありHRVの長期排泄が確認された[6]．

HRV抗原陽性者の臨床症状と便の性状

1982年3月から1984年3月までに臨床症状の調査が可能であった患児55名のうち30名（55％）に嘔吐が，ついで発熱21名（38％）で，腹痛は11名（20％）と，嘔吐が特徴づけられた．下痢はほとんどの患児に認められた．

便の性状は水様性で，白黄色を帯びていたものが多かった．下痢回数は，1日1回から15回で平均6回程度であった．これらはHRV感染症の臨床像としてすでに知られている[4,7,8]嘔吐にひきつづく水様下痢の発現，そして発熱を伴うことが多く，幼児では腹痛を訴えるという臨床症状と同様であった．

以上のようにわれわれは，1979年から都内におけるHRVによる急性胃腸炎の流行の動向を知るため，検索を続けてきたが，都内においても冬期の乳幼児急性胃腸炎の病因として，相当濃厚にHRVが関与していることが推察された．

結　論

1982年3月から1984年3月にかけて，東京逓信病院小児科を受診した生後10日から15才の急性胃腸炎患児ふん便477件についてELISA法(Rotazyme)を用いてHRV抗原の検出および臨床症状を検討した．

1．HRV抗原の検出は冬期（12月～3月）に多く30～47％の検出率であった．また各年次による違いは認められなかった．

2．HRV抗原陽性者は，2才以下がほとんどで，陽性者80名中58名（73％）であった．

3．臨床症状は，嘔吐が最も多く，ついで発熱，腹痛の順で下痢は，ほとんどの患児に認められ，水様白黄色を呈した．

4．HRV抗原が検出された患児の病日は2～4病日のものが最も多く，16病日のものが1例認められた．

文　献

1) 藪内　清，関根整治，矢野一好，岩崎謙二，鈴木雄次郎，中川　進，吉岡勇雄，浦野純子，河野弘子，渡辺悌吉：東京衛研年報，31－1，51，1980
2) 関根整治，前木吾市，矢野一好，藪内　清，岩崎謙二，浦野純子，河野弘子，渡辺悌吉：東京衛研年報，32－1，39，1981
3) 関根整治，山田澄夫，松下　秀，矢野一好，藪内　清，工藤泰雄，前木吾市，坂井千三，大橋　誠，渡辺悌吉，石原　祐，大久保さつき，浦野純子，河野弘子：東京衛研年報，33，59，1982
4) 今野多助：臨床とウイルス，8，382，1980
5) 山口英明，山内　学，花田直樹，柴田元博，西川和夫，永井　秀，森島恒雄，磯村思天，鈴木　栄：臨床とウイルス，12，87，1984
6) 矢野一好，藪内　清，柴田タツ美，岩崎謙二他：東京衛研年報，29－1，49，1978
7) 鈴木　栄：最新医学，33，1588，1978
8) 布上　薫：臨床とウイルス，9，268，1981

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 92-100, 1984

神経芽細胞腫のマス・スクリーニングに関する検討（第1報）
尿中バニリルマンデル酸スポットテスト法の検討

武士俣　邦　雄*

Studies on Mass-screenig Methods for the Neuroblastoma (I)
An Examination for Spot Test of Urinary Vanillylmandelic Acid

KUNIO BUSHIMATA*

Keywords：スポットテストの検討 examinations for spot test，尿中バニリルマンデル酸 urinary vanillyl manderic acid，検査技法 test technique

乳幼児期に発症する率が高い神経芽細胞腫は，小児固形ガンの一種であり，予後がきわめて不良であるが，早期に発見できれば，治癒させることが可能であるため，検査のすゝめが計られている[1~3]．

この神経芽細胞腫の化学的マス・スクリーニング検査は，尿中に排泄されるカテコールアミンの終末代謝産物の一つであるバニリルマンデル酸（以下VMAと略す）を，いろいろの方法を用いて検出することにもとづいて行われている[1]．なかでも一般的には，VMAとジアゾ化パラニトロアニリンを結合させて，生成するアゾVMA化合物の紫色の呈色々調および発色度合を，標準液のそれと肉眼的あるいは計器的に比較して，陰性(正常)および陽性(臨床的精密検査)あるいは疑陽性(再検査)の判定を行う方法が用いられている．なお，このジアゾ反応を利用した簡易検査法には，佐藤ら[4]が褐色細胞腫のスクリーニング方法として開発した発色試薬を噴霧する1滴法を，沢田が神経芽細胞腫のスポットテスト法として応用したものと，中田ら[5]が考案した尿が浸みているろ紙を，調合した発色試薬容器の中に瞬間的に浸漬するディップ法，の二種類がある．

この簡易的検査法には，ジアゾ化パラニトロアニリンがアルカリ性においてきわめて不安定であるために，発色試薬を調合したのち可及的速やか(遅くとも120秒以内)に化学結合反応を完了させることという条件がついている[4]．そのうえ，スポットテスト法においては，発色試薬をムラなく噴霧するという技術的な問題，あるいは尿ろ紙材料の取り扱いおよび高度の熟練を要する成績判定基準など，多くの点について検討改善の必要が認められた．

そこで著者は，尿中VMAのスポットテスト法について改良を試みたところ，いくつかの事項において効果が認められたので報告する．

実験準備

1．器具，器材および設備

1）ろ紙（東洋ろ紙No.2）　2）パスツールピペットあるいは毛細管（尿試料および標準液滴下用）　3）シリコンあるいはゴム製の乳首　4）メスコルベンおよびメスシリンダー　5）ホールピペットおよびメスピペット　6）標準溶液保存ビン　7）ビーカーおよびフタ付三角コルベン　8）クロマトグラフィー用ガラス製褐色噴霧器　9）二連球　10）5 m*l* および10m*l* 用の褐色容器付自動分注器　11）上皿天秤および精密天秤　12）ドラフトチャンバー　13）流量調節型送気ポンプ　14）ヘアードライヤー　15）ステンレス製太鋼金網　16）注射筒および注射針

2．薬品および試薬ならびに検査用ろ紙の作製

1）薬品：　a）パラニトロアニリン　b）亜硝酸ナトリウム　c）炭酸カリウムあるいは炭酸ナトリウム　d）濃塩酸　e）エチルアルコール，以上の薬品は全て試薬特級品を用いた．f）バニリルマンデル酸（シグマ社および東京化成工業社が製造した標準品を使用した．

2）検査試薬の調製[1,3,4,5]

イ）試薬A液（0.1％パラニトロアニリン水溶液）：パラニトロアニリン（特級）を1g秤量して，1,000 m*l* の計量器に移したのち，濃塩酸(特級)を20 m*l* 加えて完全に溶解させ，精製水を加えて1,000 m*l* に標量する．溶

* 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

解液は，よく混和したのち，5m*l*用の自動分注器の褐色ビンに入れ，冷蔵保存する．

ロ）試薬B液（0.2%亜硝酸ナトリウム水溶液）：亜硝酸ナトリウム(特級)を2g秤量して，1,000m*l*の計量器に移し，少量の精製水を加えて溶解したのちに，1,000m*l*に標量しよく混和する．溶解液は，5m*l*用の自動分注器の褐色ビンに入れ，冷蔵保存する．

ハ）試薬C液(10%炭酸カリウム水溶液あるいは10%炭酸ナトリウム水溶液)：炭酸カリウムまたは炭酸ナトリウム(いずれも特級)を100g秤量して，1,000m*l*の計量器に移し，少量の精製水で溶解したのちに1,000m*l*に標量し，よく混和する．溶解液は，10m*l*用の自動分注器の褐色のビンに入れ，冷蔵保存する．この水溶液は，前記した試薬AおよびBの二溶液よりも不安定であり，試薬が古くなったり液量が少くなった場合などには，アルカリ度が減少するために発色が抑制されたり色調が異ったりするので，1週間ないし10日間に一回くらいの割り合で新調することが望ましい．また，本試薬を調製直後に使用した場合にも，薬品の水和が不足しているために，発色が不完全であることがあり，できたら24時間くらい経てから検査を行う方が良い．

ニ）ペーパークロマトグラフィー用展開溶液[6]：1%炭酸カリウム水溶液あるいは1%炭酸ナトリウム水溶液の90m*l*に10m*l*のエチルアルコールを加え，10V/V%のエチルアルコール炭酸カリウム(炭酸ナトリウム)混合溶液として調整する．

3）標準溶液の調製

10mg/d*l*VMA保存用標準水溶液：VMAの標準品を正確に10.0mg秤量して，100m*l*のメスコルベンに完全に移し，少量のエチルアルコールを加えて精製水で溶解したのちに，100m*l*に標量してよく混和する．このVMA標準物質溶解液は，標準液保存褐色ビンに入れて，冷蔵保存する．この溶液は4℃で数週間安定である[7]．

4）検査用標準ろ紙の作製

前記した10mg/d*l*濃度の保存用VMA標準物質水溶液を，用に臨んで40μg/m*l*，20μg/m*l*，15μg/m*l*および10μg/m*l*などの各濃度に精製水を用いて正確に希釈し，使用する標準物質水溶液とする．この希釈VMA標準物質水溶液は不安定であり，長期間の保存には適さない．したがって標準用検査ろ紙を作製するときには，そのつど新調することが望ましい．

それぞれの濃度のVMA標準物質水溶液を，検査用のろ紙(東洋ろ紙No.2)にパスツールピペットあるいは毛細管などを用いて，個別の円になるように1滴ずつ滴下し，直射日光を避けてよく乾燥させる．このVMA標準物質スポットろ紙は，冷蔵保存すれば数ヶ月間は検査に供することができる．

5）実験用尿スポットろ紙の作製

患者尿および十数個の成人個別尿を用意し，患者以外のそれぞれの原尿4に対し，精製水あるいは10mg/d*l*の濃度のVMA標準物質水溶液を1の割合で加えた2系列の実験用尿試料(原尿を含めて三種類)を調整した．これらの各尿試料を用い，VMA標準ろ紙を作製した場合と同様の方法にもとづいて，実験用の尿スポットろ紙を作製した．

3．発色試薬の調合および検査

発色操作は，佐藤ら[4]がStudnitzの試薬を用いて，褐色細胞腫のスクリーニング方法として開発した1滴法を，沢田[1]が神経芽細胞腫のスポットテスト法として応用したところの，VMA発色定性検査方法にもとづいて行った．

すでに記したように，このVMA発色試薬はきわめて不安定であるため，検査を実施する際には，まずドラフトチャンバー内に，VMA標準物質スポットろ紙および尿試料スポットろ紙(検体)を並べる．これらの準備が整ったら，前記した試薬を用いて，発色試薬を調合する．

すなわち発色試薬は，前記した試薬A液および試薬B液ならびに試薬C液を，クロマトグラフィー用の褐色ガラス製噴霧器の中に1：1：2（A：B：C）の割合で順次に混合して調製する．この時，試薬C液の混合順序を間違えると，パラニトロアニリンのジアゾ化合物ができないので発色しなくなる．

発色試薬の調合ができたら，まず先にVMA標準ろ紙に噴霧し，発色することを確認したのちに，尿試料スポットろ紙に(検体)に噴霧することを習慣づけるとともに，120秒(2分)以内に噴霧を完了することに留意しなければならない．

なお，パラニトロアニリンは，労働基準法施行規則の別表第1の2および第4の1に掲げられている，労働大臣が指定する単体たる化学物質および化合物に該当し，中枢神経性急性刺激症状，けいれん，貧血，メトヘモグロビン血症，肝障害あるいは吸入による肺ガンなどの惹起があると云われている．したがって，パラニトロアニリンを含んだ試薬を取り扱う際には，ドラフトチャンバーを設置するなど，労働環境を整備するとともに，十分な注意と健康の管理が必要である．

4．検査成績の判定基準

沢田ら[8]によれば，乳児の一時尿中VMA濃度が20

μg/ml以上の時には明らかに陽性として判定できるのに対し，正常な乳児の一時尿中 VMA 濃度は 10 μg／ml 以下であることにもとづき，神経芽細胞腫マス・スクリーニングにおける再検査は危険率を考慮し，標準スポットろ紙の 15 μg／ml を目安として判定する．

なお，尿試料スポットろ紙を発色させた場合の基準としては，次の色調を参考にして判定を行う[8]．

1）強陽性：スポット全体が紫色を呈する．

2）陽性：スポットの辺縁が濃厚な紫色を呈する．

3）陰性：スポットの辺縁が淡い紫色を示すか，あるいは赤色，桃色，黄色，茶色などに発色している場合．

ただし，尿試料のスポットが不良であったり，中間の色調のために判定が困難な場合には，再検査を行う．また，呈色の判定を行う場合に，湿った状態で観察すると，色調が異ったり，尿スポットの辺縁が不明瞭のことがある．したがって，尿 VMA スポットテストの判定は，検体ろ紙がよく乾燥してから行うことが望ましい．

検査法の検討結果および考察

1．検査材料ろ紙の置き方に関する検討

VMA の発色に際して，標準物質および尿試料がスポットしてあるろ紙をドラフト内に並べる場合に，平板上に直接置くと，発色試薬を噴霧したときにろ紙が平板に密着し，スポットの輪郭がにじんでしまうなど，判定に支障が生じることがある．そこで著者は，目が粗い太鋼ステンレス製金網をドラフトチャンバー内に敷設することを考案し，その上にろ紙を並べて，発色試薬を噴霧してみた．その結果，ろ紙上に呈色スポットがきれいな輪郭として得られ，密着による障害は起らないことがわかった．

2．発色試薬の噴霧方法に関する検討

尿中 VMA スポットテストの発色検査のみならず，発色試薬を噴霧する時には，クロマトグラフィー用褐色ガラス製の噴霧器に，二連球を接続して，手動噴霧する方法が行われている．しかし，この場合には，試薬を霧状にするためのある程度の空気圧が必要であり，そのために相当の速さで握りをくり返すことが要求される．さらに多数の検体を一度に発色させるためには，持続力のあることが求められる．そのうえ，もし発色試薬の噴霧が平均的でないために，呈色にムラが生じたり，霧粒子が大きいために粗く発色した場合などの時には，検査の判定がしにくい．

そこで著者は，発色試薬を検査用のろ紙に均一に噴霧するための方法として，二連球の代りに流量調節型の送気ポンプを用いた噴霧機構を考案した．その発色試薬の噴霧機構を Fig. 1. に示す．

Fig. 1. で明らかなように，本機構は，クロマトグラフィー用の噴霧器と，加圧するための送気ポンプとの間に，弁（ダイアフラム）の往復振動による圧力の変動を防止するため，500ml 容量のポリエチレン製のビンを装着し，それぞれをシリコン製のチューブで連結した簡単な装置である．なお，霧の発生状態および粒子の大きさは，空気流量を調節することによって加減することができる．

この Fig. 1. に示した装置を用いて，尿スポットろ紙に発色試薬を実際に噴霧してみたところ，霧粒子が細かくかつ平均に噴きつけられるため，尿スポットの呈色状態および輪郭が明瞭であるなど，結果はきわめて良好であった．また，二連球を用いる場合よりも早く圧力が上昇して一定になるため，短時間で試薬の噴霧を終らせることができた．

これらのことから，本装置は，尿 VMA スポットテストを実施する場合に，発色試薬を安定時間内に噴霧することが可能となったばかりでなく，多くの検体を一度に発色させることができるなど，効果的かつ効率的であり，きわめて有効であると判断された．ただし，発色試薬が機械的に噴出しているので，かけ過ぎによるにじみが

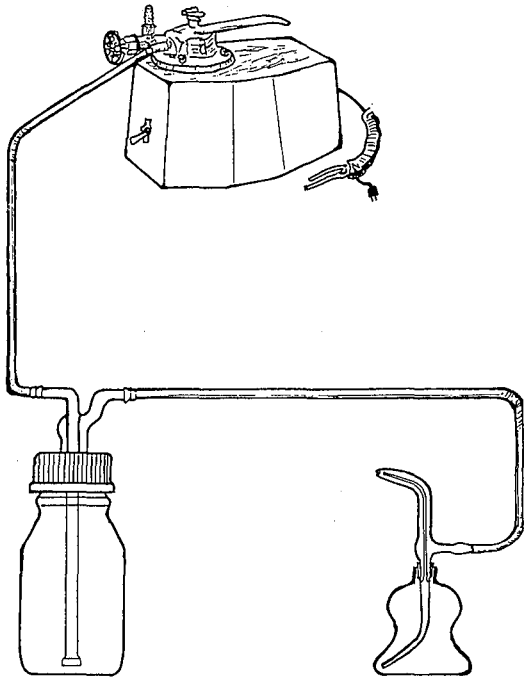


Fig. 1. Structure of spray

生じる危険があり，二連球を用いて噴霧する場合よりも噴霧器を早く移動させるように心がける必要がある．

3．呈色に及ぼす外的影響に関する検討

検査材料を作製する側の責任は別として，検査システムの流れの中(運搬段階および実験室内)において，検体を汚染して検査不能にするような事態は避けなければならない．

そこで，流れの中で検体と接触する機会が危惧されるものについて，発色に影響を及ぼすか否かを検討した．

まず，接触している時間がもっとも長い，検査依頼名簿の複写式カーボン紙の間に，検査用ろ紙を約1日挟んでおいたのちに，ろ紙に発色試薬を噴霧したところ，赤桃色に発色した．また反対に，発色試薬を噴霧して乾燥させた検査用ろ紙を，複写式カーボン紙に挟んでおいた場合も同じ傾向で発色した．このことは，郵送されてきた検体ろ紙が，直接に複写式カーボン紙に触れることのないようにするため，ろ紙は封筒から取り出さずに運搬する必要のあることを示している．

次に，細菌を取り扱うところでは，消毒のためにクレゾール石ケン液やフェノールなどをよく用いるが，それらについて発色試験を試みたところ，クレゾール石ケン液は紫色を呈し，フェノールは桃赤色に発色した．なお，これらはスポット以外のところまで広く拡散して発色し，空中拡散(環境)による汚染の危険性が高いことを示している．

さらに，ゴム製品との接触も多いと思われるので，ろ紙上に，手術用のデスポーザブル手袋および炊事用手袋，輪ゴムならびに各種のゴム栓を1日間のせて置き，発色試薬を噴霧してみた．その結果，一部のゴム栓のところは紫色に，また他のものが乗っていた所は，紫がかった赤桃色から桃色までいろいろに発色した．しかし，ゴムを含まないポリエチレンや塩化ビニール等の製品は発色しなかった．

4．検査成績判定方法に関する検討

ジアゾ反応を利用した尿中VMA発色テストの判定は，特に離乳食などを与えている場合に，発色したアゾVMA化合物が，類似色調を呈する食物の中間および終末の代謝産物のアゾ化合物で被さるなど，成績の判定を困難にしていることは事実であり，きわめて高い技術の習熟および長期の訓練を必要とする．

そこで，このことを証明するために，尿中VMAスポットテストを初めて行う30人の臨床検査技術者に，前述した実験用尿試料を用いて，検査成績を判定してもらった．その結果を Table 1．に示す．

Table 1.から明らかなように，最下欄の期待成績が疑陽性および陽性の試料を陰性として判定する傾向，あるいは陰性の尿試料にVMAの標準物質を，最終濃度が20 $\mu g/ml$ となるように添加したものを陰性として判定した技術者が多数認められ，やはり本検査の判定には熟練を要することがわかった．

そのために，大阪市神経芽細胞腫研究会の永原[6]は，ゴム栓つきの三角フラスコ内で，10V/V%のエチルアルコール1%炭酸ナトリウム混合溶液を展開溶媒として用い，尿スポットが疑陽性の検体については，上昇法におけるペーパークロマトグラフィーを行うなどの処理をして，成績の判定を行っている．しかし，この永原のペーパークロマトグラフィー処理方法には，検体ろ紙をストリップ状に切断することや，三角コルベンを展開溶媒で飽和化することおよびそれを並べて置くスペースが必要であるなど，多数の検体を処理するのに適していない面が認められた．

そこで著者は，尿スポットを発色させたのちに，円形クロマトグラフィー法[9]を応用し，注射器外筒に先端を直角にカットした細めの注射針を取りつけ，前述の展開溶媒を用いて，開放状態で妨害呈色物質を展開除去する方法を考案した．そこで，この方法にもとづいて，標準物質，患者尿および成人尿に標準物質の添加有無などの各検査ろ紙について，クロマトグラフィー効果を比較してみた．その比較写真を photo. 1.～5. に示す．

photo. 1.～5. の標準物質，患者尿ならびに標準物質添加尿の全てについて，クロマトグラフィー展開処理したものの方が，スポット辺縁に濃い紫色の線が鮮明に残っていることが認められた．

この結果，本開放系円形ペーパークロマトグラフィー法は，尿中VMAスポットテストの判定方法として，永原の密閉法よりも短時間で展開が終るうえ簡便であり，有効であることが認められた．なお，クロマト展開は，大きな尿スポットの場合には中心からではなく，スポット辺縁に近いところから展開することも可能である．

5．尿スポットろ紙のVMA発色変化について

沢田らは，尿スポットした乾燥ろ紙上におけるVMAは，本スポットテストの発色反応では20日間呈色に変りがなかったことにもとづき，多分それ以上の長期間でも同じ結果であろうと推測している．

しかし著者は，患者尿および標準物質をスポットしたろ紙を，環境による汚染を防ぐために密閉容器に入れ，室温に放置して呈色変化を観察したところ，経時的に発色が薄くなることを認めた．そこで，患者尿を6ヶ月前

Table 1. Results of beginners (%)

Sample		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Negative		16	4 (13.3)	18	5 (16.6)	15	6 (20.0)	15	4 (13.3)	18	9	18	10
(−)	*	3	13	6	17	6	16	9	15	8	17	11	19
Doubtfully Positive		1 (3.3)	5	3 (10.0)	6	3 (10.0)	2	3	4	1	3 (10.0)	4	1 (3.3)
(±)	*	2	4 (13.3)	4	3 (10.0)	2	3	2	4 (13.3)	5	4	2	4
Positive		12	13	9	13	12	17	12 (40.0)	16	10 (33.3)	16	7	13
(+)	*	21 (70.0)	11	15 (50.0)	9	13 (43.3)	9 (30.0)	13	7	12 (40.0)	7 (23.3)	14	6 (20.0)
Storongly Positive		1	8	0	6	0	5	0	6	1	2	1 (3.3)	6
(++)	*	4	2	5	1	9	2	6 (20.0)	4	5	2	3 (10.0)	1
Positive Total		13	21	9	19	12	22	12 (40.0)	22	11 (36.6)	18	8 (26.6)	19
	*	25 (83.8)	13	20 (66.6)	10	21 (70.0)	11 (36.6)	19 (63.3)	11	17 (56.6)	9 (30.0)	17 (56.6)	7 (23.3)
Result of anticipate		±	−	±	−	±	−	+	−	+	±	++	±
	*	+	±	+	±	+	+	++	±	+	+	++	+

* Lower rank : Same material as upper, but containing 20μg/ml more VMA

にスポットしたろ紙と，同じ患者尿を塩酸酸性下で冷凍保管しておいた尿のスポットろ紙を，発色させて呈色を比較した．その呈色写真を photo. 6. に示す．

photo. 6．から半年前にスポットした患者尿の呈色の方が，新しくスポットしたものより明らかに薄い紫色であることが認められる．

このことから，神経芽細胞腫の化学的マス・スクリーニング検査を，尿中 VMA のスポットテスト法にもとづいて実施する場合でも，採尿から検査までの期間を可能な限り短くしないと，偽陰性として判定を誤る恐れのあることが推察された．したがって，検査ろ紙に尿を採ってから長期間経過したような検体については，検査不適材料と判断して再検査を行うことが望ましい．

ま と め

神経芽細胞腫の化学的マス・スクリーニング法の一つである，尿中 VMA のスポットテスト法について，技術的な改善および判定ならびに発色影響に関する検討を試みたところ，つぎのような結果が得られた．

1．ドラフト内に目の粗い太鋼製ステンレス金網を敷設した上に尿および標準物質をスポットした検査材料のろ紙を並べ，その上から発色試薬を噴霧することによって，ろ紙が密着することによって起るにじみの障害を防止することが出来た．

2．発色試薬を噴霧するときに，二連球の代りに流量調節型の送気ポンプを用いて，噴霧器との間にポンプのダイヤフラムの往復振動による圧力の変動をなくするために，ポリエチレン製の容器を装着した装置を用いると，効果的であるとともに効率的であった．

3．尿をスポットした検査材料のろ紙が，検査システムの流れの中で汚染される可能性について検討したところ，一般的に知られている香料，クレゾール石ケン液およびフェノールのほかに，複写式カーボン紙および種々のゴム製品によって呈色が妨害されることが認められた．しかし，ポリエチレンや塩化ビニールなどの製品による発色妨害影響は認められなかった．

4．尿中 VMA スポットテストにおいて，検査用ろ紙を発色させたのちに，エチルアルコール1％炭酸カリウムを展開溶媒として円形クロマトグラフィーを応用し，呈色域の内側から開放系で展開したところ，検査成績の判定が容易になった．

5．患者尿および標準物質をスポットした検査用ろ紙について，室温における発色の経日的変化を観察したと

ころ，日数が経つにしたがって発色が薄くなることが認められた．

文　献

1) 沢田　淳，今宿晋作，高田　洋，乾　明彦，楠　智一：周産期医学，5，62，1975
2) 沢田　淳：小児内科，14，105，1982
3) 沢田　淳：*Medical Technology*，9，684，1981
4) 佐藤辰男，吉永　馨，石田　望：最新医学，16，371，1961
5) 中田利一，石井譲治，児玉京子，三谷一憲，土平一義，山中克巳ほか：日本公衆衛生誌，30，227，1983
6) 永原　暹：神経芽細胞腫スクリーニング，174頁，1984，母子愛育会編
7) Woiwod, A. J. and Knight R : *J. Clin. Path,* 14, 502, 1961
8) 沢田　淳：神経芽細胞腫マス・スクリーニング，134頁，1984，母子愛育会編
9) 柴田村治：ペーパークロマトグラフ法の実際，25頁，1970，共立出版KK，東京

Explanation of photographs of urinary VMA spot test

1. Effect of radial-paper chromatography
   - Photo. 1. Standard (left : 10μg／ml and right 20μg／ml)
   - photo. 2. Patient urine (raw in a left side and dilute 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 to right)
   - photo. 3, 4. Lower containing 20μg／ml more VMA than same upper
   - photo. 5. Relation of standard and urines that containing 20μg／ml more than raw urine
2. Influence by elapse of patient urine spotted filter paper on a room temperature
   - photo. 6. Left was spotted befor 6 months and right is new spot

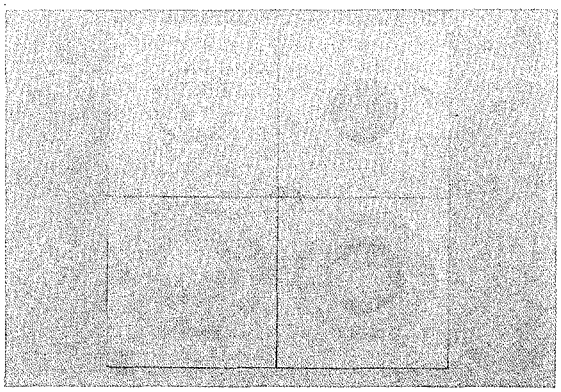


Photo. 1

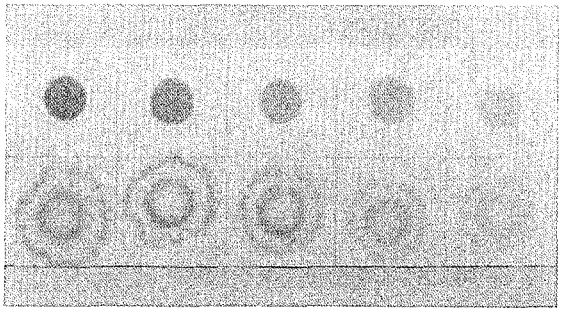


Photo. 2

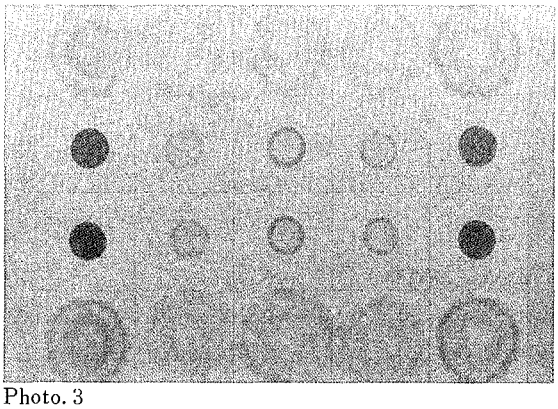


Photo. 3

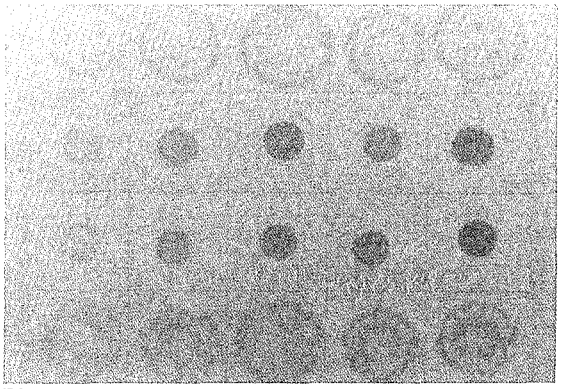


Photo. 4

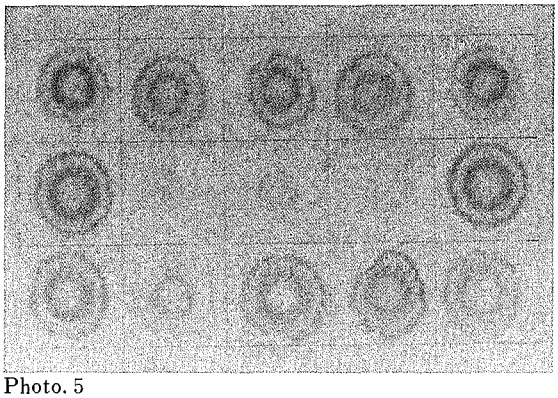


Photo. 5

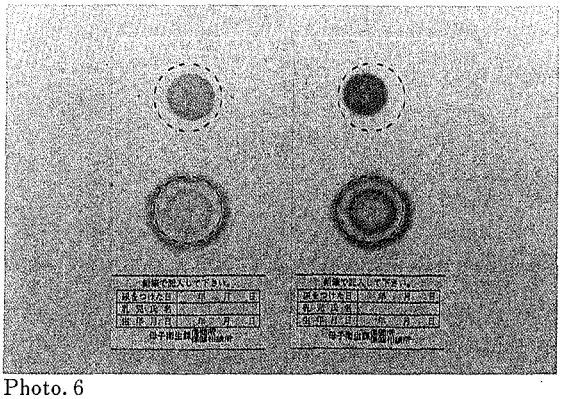


Photo. 6

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 101-105, 1984

神経芽細胞腫のマス・スクリーニングに関する検討（第2報）
尿中バニリルマンデル酸スポットテスト検査成績の解析

武士俣 邦 雄*, 鈴 木 重 任*

Studies on Mass-screening Methods for the Neuroblastoma (II)
Analysis for Spot Test Results of Urinary Vanillylmandelic Acid

KUNIO BUSHIMATA* and SHIGETOH SUZUKI*

Keywords: 検査成績の解析 analysis of results, 1滴法 spot test, 尿中バニリルマンデル酸 urinary vanillyl manderic acid, マス・スクリーニング mass-screening

小児固形ガンの一種である神経芽細胞腫の，化学的スクリーニングとしての尿検査は，わが国では十数年前から，京都府立医大の沢田[1]によって，すでに実施されていた．この神経芽細胞腫の化学的検査には，佐藤ら[2]が褐色細胞腫のスクリーニングとして行っていた尿中バニリルマンデル酸(以下VMAと略す)の定性1滴法を，簡易法として応用している．

その後，前報[5]においても記したように，尿中VMAの化学的簡易検査法は，スポット法[3]およびディップ法[4]の二法として確立された．このことにもとづいて，京都以外の，愛知，大阪，北海道，兵庫，神奈川，埼玉，和歌山などの府県市ならびに東京都の数区の自治体が，乳幼児期の小児を対象として，行政的に対応するようになった．

東京都においても，衛生局が主体となって，昭和58年10月から，所轄市町村（多摩地区および島しょ地区）の保健所管内に居住する乳幼児を対象にして，神経芽細胞腫のマス・スクリーニングを行政事業として開始した．この神経芽細胞腫マス・スクリーニング事業の検査は，尿中VMAのスポットテスト法にもとづいて実施されたが，検査材料であるろ紙の状態，あるいは検査成績の結果などについて，可能な限り詳細に解析したところ，興味ある事態が観察されるとともに，問題点のあることが認められた．

そこで著者らは，こんご同様な事業を企画し，システムを計る場合の検討資料として，十分に意義のあるものと考え，報告する．

マス・スクリーニングシステム

まず，東京都衛生局長は，昭和56年12月に神経芽細胞腫検討委員会を設置し，本腫瘍を早期に発見するための基本的考え方について諮問した．さらに，昭和58年5月2日に本委員会の報告を受け，事業の実施にむけて神経芽細胞腫検査準備委員会を発足させた．そして，検査準備委員会における協議ののち，実務者による調整会議，あるいは窓口となる保健所の担当職員に対する，医師などによる研修会を開催したのち，検査実施体制を確立させた．その体系図を Fig. 1. に示す．

Fig. 1. に示したように，神経芽細胞腫検査についてのお知らせ採尿時の注意などの文書や，検査用ろ紙および返送用封筒の交付は，乳児健康診査（3～4ヶ月児）の際に，それぞれの居住地域を管轄する保健所あるいは保健相談所の保健婦が要点を説明すると共に，母親に手渡す方法で行うことにした．そして生後6ヶ月を過ぎたら，検査用ろ紙の上に尿（オシッコ）を1滴つけて，自然に乾燥させたのち必要事項を記入し，それぞれの保健所あるいは保健相談所に郵送させ，それを検査依頼名簿とともに，衛生研究所に搬入して検査を行うことにした．

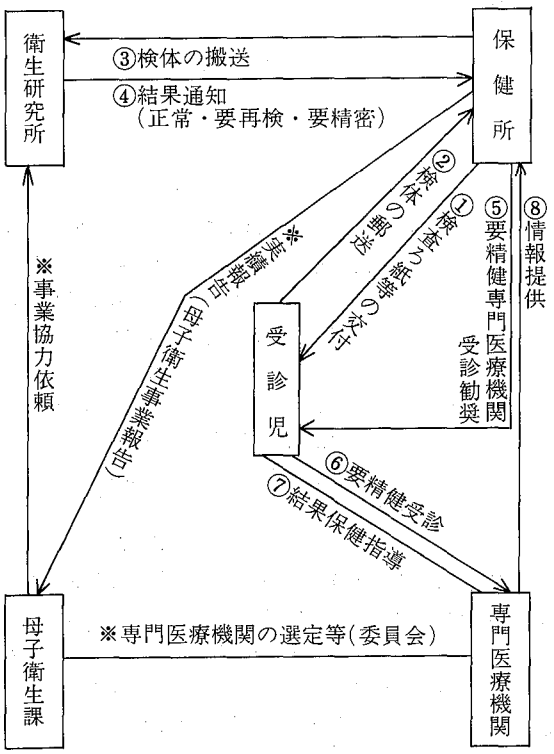
なお，検査の結果，再検査あるいは臨床的精密検査の必要が認められた場合，各保健所および保健相談所を通じて家族に知らせることとし，1.5ヶ月過ぎても通知がなければ，現在は異常がないものとして判断するようお願いした．

検査成績の解析および考察

前報[5]において述べたように，患者尿を用いて行った実

* 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

験によれば，尿スポット乾燥ろ紙上のVMAも，時間が経過するに従って変化するため，発色が悪くなることがわかっている．なおこのことは，神経芽細胞腫マス・スクリーニングとして尿中VMAの検査をスポットテスト法にもとづいて実施する場合に，検体としての尿スポットろ紙が，尿をスポットした日から実際に検査を行う時までに何日間経過しているかを調べ，検査成績判定の参考にする必要があることを示している．



（注） ①～④は、要再検の場合も同様。

Fig. 1. System of mass-screening test for the neuroblastoma of the Tokyo Metropolitan Government

そこで，神経芽細胞腫のマス・スクリーニング検査事業を開始した昭和58年10月から，昭和59年3月末日までに受け付けた9,348件の初回検査検体について，ろ紙上に尿をスポットした日から，検体ろ紙を入れた封筒を郵便ポストに投函するまでの日数を，採尿日付と消印にもとづいて調査した．その結果，約90%の人は1週間以内に郵便ポストに投函していたが，2%強の193人が10日以上も経過していることが認められた．この193人の，採尿から郵便ポストに投函するまでの経過日数と例数の内訳をTable 1. に示す．

Table 1. から明らかなように，沢田が，発色に変化がなかったことを確認している20日間以上も経過しているものが42件(0.45%)もあり，中でも約2ヶ月の長期間にわたって投函を忘れている例も認められた．

前報[5]において述べたように，検査ろ紙上にスポットした尿中VMAの発色は，経日的に薄くなることが確認されており，このように長い期間放置された検体の検査成績の信頼性はきわめて低いので，材料不適として再検査を行う必要があることが具体例として確認された．したがって，とくに弱陽性の検査成績を偽陰性として判定するような見逃しの事態を起さないためには，採尿検体ろ紙を乾燥したのちに，すみやかに投函するように指導を行うことも必要であると考えられた．

なお，検査用ろ紙の記入欄に，氏名などの記入がなかったものが25例あった．

つぎに，神経芽細胞腫のマス・スクリーニング検査を開始してから，昭和59年5月末日までに受け付けた検体の初回の検査成績を，再検査として取り扱ったものの出現状況について，保健所および保健相談所別に，月別の再検率として調査した．その結果をTable 2. に示す．

Table 2. から明らかなように，昭和58年度の東京都における神経芽細胞腫マス・スクリーニング検査としての，尿中VMAスポットテスト成績の全体としての再検率は，およそ1/4にのぼる高率の結果であった．なお，全体

Table 1. Cases taking more than ten days to mail

Days	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Number	31	29	14	21	11	16	6	7	8	4	4
Days	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Number	2	6	3	1	3		3		2	3	4
Days	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Number	4	4	1		1		2		1		
Days	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53
Number						1					1

Table 2. Reexamination ratio of urinary vanillylmandelic acid spot test

(%)

Health Center	Month						
	S58 −12	S59 1	2	3	S59 −3	4	5
1. O.m.H.C.	2.86	8.05	17.76	11.63	11.73	7.69	8.93
2. I.c.H.C.	−	8.11	34.92	27.59	26.20	28.79	17.02
3. H.j.H.C.	15.0	9.83	27.21	18.44	18.84	25.47	16.6
4. N.s.H.C.B.	−	−	35.29	86.21	67.39	15.00	17.65
5. H.n.H.C.	18.18	6.8	30.70	28.04	23.1	34.00	20.45
6. N.m.H.C.B.	11.54	14.77	34.83	46.66	31.17	34.31	18.66
7. I.g.H.C.B.	0.	18.75	27.91	37.93	27.4	40.54	18.87
8. M.d.H.C.	21.24	16.84	28.96	31.15	25.57	29.88	18.52
9. T.w.H.C.B.	10.53	10.71	19.23	27.59	17.65	25.00	9.68
10. F.c.H.C.	7.89	21.86	33.95	29.94	26.85	25.14	13.15
11. M.k.H.C.	10.00	9.56	28.57	38.67	26.19	29.77	19.49
12. T.w.H.C.	15.52	13.82	18.03	14.41	15.44	14.95	8.86
13. M.m.H.C.B.	8.00	27.27	24.49	28.57	24.14	20.51	10.0
14. A.m.H.C.B.	21.95	18.7	25.0	23.57	21.91	20.63	8.08
15. K.c.H.C.B.	12.5	8.7	13.84	27.45	16.29	28.00	14.29
16. M.f.H.C.	11.63	16.17	26.12	17.81	18.98	19.08	9.52
17. K.e.H.C.B.	46.64	13.95	35.85	26.41	28.05	10.91	7.69
18. K.i.H.C.	26.31	25.31	46.59	28.20	33.33	33.33	16.28
19. K.j.H.C.B.	33.33	29.09	19.61	45.16	34.11	42.0	28.99
20. M.n.H.C.	34.78	15.31	13.59	17.42	16.85	12.96	10.75
21. T.s.H.C.	25.49	19.69	31.49	35.42	28.63	28.98	15.86
22. K.r.H.C.	26.83	17.65	29.27	38.26	27.58	38.32	29.93
23. H.m.m.H.C.	20.59	25.94	35.57	45.57	33.20	31.62	20.78
24. H.k.m.H.C.	19.44	14.89	20.83	10.18	15.09	10.95	4.52
25. F.s.H.C.	23.81	13.33	23.07	36.71	25.33	26.19	10.42
26. T.s.H.C.	6.25	0.	37.5	28.95	28.17	30.30	8.0
All	17.99	16.17	27.46	28.53	23.8	25.53	15.53
Examination Number	906	2,598	2,626	3,218	9,348	2,605	2,723

として最も高い再検率であったのは，昭和59年3月の28.53％であるが，その後の4月および5月については，順次低下していることが認められた．また，各月を通して比較的に再検率が低い所としては，青梅保健所および東久留米保健所をあげることができる．この両保健所は，事業開始当初から尿(オシッコ)の採り方について，別刷りの説明書を添えるなど，その指導に力を入れていた．

このような東京都における尿中VMAスポットテストの再検率は，はたして高いのか否かについて検討するために，神経芽細胞腫マス・スクリーニング検査を行政的に実施している他の自治体の再検率を調べてみた．その結果をTable 3. に示す．

このTable 3. から明らかなように，他の自治体では高くとも10％前後の再検率であるのに対し，東京都において再検率が10％以下であった時は，実際に行政事業として検査を開始した昭和59年1月から5月までの間に，5月を主体として16回しかなかった．

このように，東京都における尿中VMAスポットテストの再検率が高かったのは，神経芽細胞腫を疑うようなものではなくて，検体ろ紙が不良であるために検査の

Table 3. Reexamination ratio of urinary VMA spot test in other self governing communities[6]

				fiscal year(%)
Kyoto city (spot test)	S48 (2.38)	S49 (1.23)	S50 (1.93)	S51 (2.91)
	S52 (4.74)	S53 (5.3)	S54 (11.17)	S55 (9.15)
Nagoya city (dip method)	S56 (4.2)			
Ohsaka city (spot test)	S55 (8.6)	S56 (2.6)	S57 (1.2)	
Sapporo city (HPLC method)	S56 (2.50)			
Aichi prefecture (dip method)	S56 (1.17)			
Shizuoka prefecture (?)	S56 (11.8)			
Saitama prefecture (spot test)	S56 (8.71)			

Table 4. Causes of reexamination in urinary VMA spot test (%)

	Month	S58 −12	S59 1	2	3	4	5
A	Press to Filter Paper	94(10.37)	256(9.85)	417(15.88)	531(16.5)	469(18.0)	245(9.)
B	too much Amount	32(3.53)	47(1.81)	85(3.24)	155(4.82)	113(4.34)	72(2.64)
C	no Food Control	22(2.43)	35(1.35)	49(1.87)	50(1.55)	19(0.73)	48(1.76)
D	C+A or B	7(0.77)	49(1.81)	101(3.85)	81(2.52)	13(0.5)	33(1.21)
E	Held in Diaper	9(0.99)	32(1.23)	44(1.68)	31(0.96)	30(1.15)	13(0.48)
F	Watery	−	−	14(0.53)	33(1.03)	4(0.15)	2(0.07)
G	no Urine	−	−	1(0.04)	3(0.09)	3(0.12)	2(0.07)
	Examination Number	906	2,598	2,626	3,218	2,605	2,723

成績判定ができなかったものが多くあったためである．そこで，昭和58年10月から昭和59年5月までに受け付けた尿中VMAスポットテストの初回の検査成績を，再検査として判定した成績について，その理由を詳細にしらべてみた．その結果をTable 4. に示す．

Table 4. から明らかなように，尿中VMAスポットテストの成績が，再検査として判定された最も大きな理由は，検査用ろ紙にオムツもしくは脱脂綿などを押しあてたために，6割以上が判定不能であったことによることがわかった．

このことから，各家庭において高分子吸収剤を入れた紙オムツの普及や脱脂綿の不備などが想定されるが，中には青梅保健所や東久留米保健所のように，再検率が比較的低い所もあり，実際には，採尿の仕方の指導性によるものと思われる．なぜならば，その後も特に再検率が高いような所に，神経芽細胞腫についての説明はどのようにしているか問合せたところ，案内書を単純に配布し，個々の赤ちゃんの健康診査の時に，保健婦さんが，〝説明

書に従って検査をうけて下さい〃と紹介しているとの返事があった.

また,神経芽細胞腫のマス・スクリーニング検査を開始した当初から,検体不良が多い所に対しては,検査担当の責任者が,〃ろ紙の上に尿(オシッコ)を1滴しぼり落すのであることを指導して頂きたい旨〃を各保健所および保健相談所にメモでお願いしてきた.その上,この高い再検率を低くするために,保健婦を対象とした母子保健実務研修会(昭和59年3月7日)において,神経芽細胞腫の検査材料の正しい作り方およびその不良例の実際について講習していただいた.

これらの努力が功を奏したのか,全体としての再検率は,昭和58年度の28.53%から昭和59年4月の25.53%,さらに昭和59年5月には昭和58年度のほぼ1/2にまで低下し,その後6月に入ってからは激減し,他の自治体並の1桁の再検率になってきている.

もし,このように再検率が低下してきていることが,メモによる指導や検査材料の正しい作り方および検体の良否などの講習成果であるとするならば,これから本検査の開始を検討されているところにおかれては,窓口となる保健婦さんに対して,医師が学術的に研修を行うのみでなく,検査のノウハウを心得ている検査技術者をも講師のメンバーに加えておかれることが望まれる.

なぜならば,衛生研究所においては,昭和59年度から,東京都新宿区の依頼をうけて,神経芽細胞腫マス・スクリーニング検査としての尿中VMAスポットテストを行っている.ところが,東京都の場合とは違って,現在までに受け付けた200件弱の検体の中に,検査材料が不良であったために再検査として判定したものは1例もなく,食事制限指導を求めたものが3例認められたのみである.このように検査材料が不良であることによる再検査がなかったのは,検査担当責任者が,事前に新宿区の保健婦さん方に検査材料の良否を解説し,区独自の創意工夫に参画した結果であると考えられた.また新宿区においては,検査ろ紙の記入欄に食事の項〃ミルク・母乳・離乳食〃を設け,いずれかを選択して頂き,検査成績判定の参考にしている.

なお,Table 4. から明らかなように,検体によってはオムツと一緒に挟んでいるものが認められたが,この点については,ディップ法を採用している近隣の神奈川県や都の特別区に居住する知人との情報交換などが影響しているものと推定される.

このように,単なる材料不良による再検査が,家族に大変な心配をかけていることも事実であり,それをなくすためにも検査材料を正しく作ってもらうことが,最も大切なことであろう.

さらに,Table 4. から明らかなように,食事制限が的確でなかったために,類似呈色が判定を不能にしている再検査において,本検査を開始した昭和58年10月から12月までに受け付けた検体の再検率13.42%が最も高かった.このことは,検査対象乳児が生後6ヶ月をすぎ,すでに離乳食による育児に移っているものが多かったためと考えられた.また,昭和59年5月に食事制限を求めた再検率が11.62%に上昇したのは,運動が活発になる季節となり,尿の濃度が濃くなったためと考えられる.

ま と め

東京都は,昭和58年10月から,小児固形ガンの一つである神経芽細胞腫のマス・スクリーニング検査を,尿中VMAスポットテスト法にもとづいて開始した.

さいわいにも,検査を開始した昭和58年10月から昭和59年5月末までに受け付けた約15,000件の検体の中からは,神経芽細胞腫を疑わせるようなものはなかった.しかし,尿中VMAスポットテストの再検率は,月別に全体として観察した場合において,約1/4にのぼる高率の状態であった.この再検率の高い理由について詳細に検討したところ,約6割の検体が,検査用ろ紙に直接オムツもしくは脱脂綿などを押しあてているために,検査を行っても判定ができなかったものであった.

このように検査材料の多くが不良であった理由については,窓口になっている保健婦さんの説明不足が原因しているためであり,尿(オシッコ)の正しい採り方を具体的に指導する必要のあることが認められた.

なお,単なる材料不良による再検査が,家族に子供が神経芽細胞腫なのではないかと短絡的に心配させていることも事実であり,それをなくすためにも検査材料を正しく作ってもらうことが最も大切なことであろう.

文 献

1) 沢田 淳:小児内科, 14, 1177, 1982
2) 佐藤辰男, 吉永 馨, 石田 望:最新医学, 16, 371, 1961
3) 沢田 淳, 今宿晋作, 高田 洋, 乾 明彦, 楠 智一:周産期医学, 5, 62, 1975
4) 中田利一, 平井譲治, 児玉京子, 三谷一憲, 土平一義, 山中克巳ほか:日本公衆衛生雑誌, 30, 227, 1983
5) 武士俣邦雄:東京衛研年報, 35, 92, 1984
6) 東京都神経芽細胞腫検査検討委員会資料

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 106-108, 1984

電子顕微鏡写真への表面現像法の応用

前 木 吾 市*

Application of Compensating Development Procedure on Electron Microscopy

GOICHI MAEKI*

Keywords :電子顕微鏡, 写真技術, 高解像現像法

緒　　言

1960年石井[1~3]は白黒科学写真フィルムの現像に表面現像法を用いると，解像性が著しく向上することを発表した．著者はこれを電顕写真フィルムの現像に応用し，解像性の向上と共に階調豊富な原板が得られることを確かめ1967年に報告した[4~5]．しかしながら表面現像法はデリケートなので，カットフィルムを用いる透過電顕の分野では，〝現像むら〟の発生などで実用性に乏しい難点がある．著者は攪拌，振とうおよび上下振動を組合わせた組立セットを工夫し改良に努めたが，現像むらを克服するまでに至らなかった．たまたま得られた実験結果からヒントを得て，これまでとは発想を転換し，フィルム面に現像液を爆射（ボンバード）させる方法を開発し，現像むらを解決した．表面現像法では，理論上，ハイライトとシャドウの描出に優れる特長があるので，コントラストの強い電顕のシャドウイング試料や，ネガチブ染色試料に応用して強拡大写真の作製が期待できる．カテコール表面現像法の具体的なやり方と，最近の応用例について結果を報告する．

実験材料と方法

生物試料として当所微生物部ウイルス研究科で，原因不明下痢症関係検体から超遠心精製したウイルス[6,7]，細菌第1研究科で調製したキャンピロバクター，細菌第2研究科培養の連鎖球菌，毒性研究部薬理研究科の免疫電顕試料および多摩支所衛生細菌研究室提供のプレジオモナスを用いた．

支持膜は市販カーボン単膜（応研，普通品）を主に使用し，一部に自製のマイクログリッド補強カーボン膜を用いた．シャドウイングには C_r を，ネガチブ染色には3％酢酸ウラン水溶液を用い型通り実施した．

カテコール表面現像液処方（以下 CN と略記）

CN 現像液

A液	無水亜硫酸ソーダ	5 g
	カテコール(C_6H_4-1, 2-$(OH)_2$)	10g
	蒸溜水を加えて全量	500 m*l*
B液	1％NaOH	

フジ FG フィルムに対し

A液30 m*l*, B液 30 m*l*, 水を加え 1000 m*l*, 20°C 13分

ボンバート現像のやり方

図1のように透明なアクリル板製の現像バットの内面

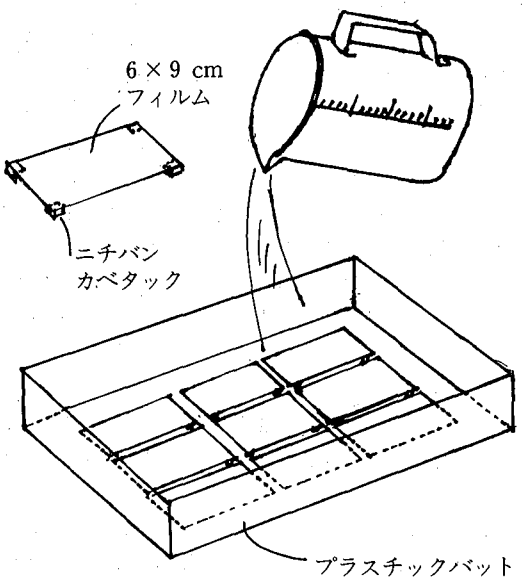


図1．ボンバード方式による表面現像法の実際

*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

に，厚みのある接着材カベタック(ニチバンKK製)の3mm角細切片を利用して，撮影済みフィルムを貼付する．上方からステンレスビーカー内のCN現像液を落下させる．バットをゆすり皿現像をゆっくり行った後，液をビーカーに戻し再び上から注ぐ．これを2分間位の間隔で繰返す．13分現像したら液を捨て，フィルムを剝がし停止液を通してから型通り定着する．ボンバード現像とは，このやり方が，電顕内で電子ビームが試料をボンバードするのになぞらえて，著者が名付けた呼び名である．

対照用現像液としてはD-19(1：1)，フィルム反転用にはD-76系を用いた．

使用電顕およびフィルム

電顕は日本電子KK製JEM-100Bを加速電圧100kVで使用した．露出計はC_dS方式なので露光量決定は難しい．CN現像の場合，D-19を標準にして50%増を目安として行った．

実験結果

写真1，2は， 血液寒天平板上のコロニーより採取した連鎖球菌のC_rシャドウイング像で，CN現像法とD-19系の，ネガから直接焼付けた比較作例である．従来のD-19現像によると写真2のように，球菌の重なった部分は黒くつぶれて，大きな塊りの輪廓が見えるにすぎない．一方CN現像法では写真1のように，球菌の重なりが判読できる階調の豊富さが特長で，しかも解像性が良いという利点がある．

写真3はキャンピロバクターのC_rシャドウイング像で，CN現像法の代表的作例である． 最初のネガをCN現像法で作り，それをD-76系現像液で反転した第2ネガからプリントしたものである．菌体のねじれ，菌体表面の微細構造そして菌端のデスクがよく見えている．菌の立体感は菌の液体培養，グルタールアルヒド主体の固定そして洗浄等一連の試料調製が適切であったために保持されたものである．但しべん毛のウエーブは失われ，この点だけは無固定の生菌の方がよく表現される傾向がある．

写真4，5，6は下痢症患者のふんべんから超遠心精製処理して得られたウィルス(34nm)のネガチブ染色像である．患者血清を用いてウィルスを凝集させたため，20数個のウィルスが塊りをなしてみられる．3枚の写真の中写真5だけがCN現像で，他はD-19現像の対照である．染色の濃く染まった部位をみると，写真4，6ではつぶれて黒々として判読できないところが，CN現像の写真5ではよく見えている．また写真5のすっきりした像もCN現像の解像性の良さをよく示している．

写真6はたまたま5枚あとに撮影された直接10万倍からのプリントである．試料がチャージアップし像流れを生じた症状で，血清成分の混入した試料などで生じ易いトラブルの代表例である．

写真7はある種の細菌の菌端から多くのべん毛が集中的に発生しているパターンのネガチブ染色像である．低倍で撮影した右下のCN現像ネガから，フジ引伸機で20倍に強拡大した作例を示す．直接6,700倍で同一フォーカスで撮影した2枚のネガを，夫々CN現像とD-19現像で処理し，20倍の拡大プリントを作り比較したところ肉眼判定でかなり明瞭な解像性の差が出たことを確かめた．対照の写真は割愛した．

写真8はブドー球菌表層の高倍率(40万倍)のネガチブ染色像を示す．ブドー球菌のプロテインAを利用して，ある種の抗原抗体反応生成物の存在を，直接，電顕視野の下で観察しようとの試みである．直接10万倍の高倍率撮影のため，支持膜はマイクログリッド補強カーボン膜を用いた．写真8はCN現像の作例で，比較のため撮影したD-19ネガからのプリントと見比べると，白く浮彫りになった斑点状構造物がよく表現されていることが判った．

考察

これまで長い間，透過電顕の分野でCN現像法が生かせなかったのは，〝フィルムを垂直に吊るし，振とう現像する〟やり方に執着したことに原因がある．自製した組立てセットも限界があると判ってきた．一方走査型電顕の分野では，ブローニー長尺フィルムを使用する関係で，専用現像タンクの改良により，現像むらは殆ど解決済みになっている．そこでカットフィルムをテープで接ぎ，長尺フィルムとした上で，市販のマグネットシートを利用してリールに巻込み現像テストを試みた．フィルムの撓み性が強いので結果は失敗となったが，この実験により，現像時にフィルムの裏側に隙をあけると効果的なことを見出した．液を落下させる方式と組合わせる現像の構想がまとまり，劇的に〝むら〟防止は解決したが，理由づけは今後の課題である．

大きな課題としてカブリの大きいことが挙げられる．本来カブリの少ないのを特長とするCN現像法であるが，フジFGタイプでは組合わせがよくないようで，かなり顕著にカブリを生ずる．CN現像液の濃度，現像時間も検討の余地があり，能率の改善も今後の課題である．

CN現像の作例で大きく目立つ点は，ハイライトおよびシャドウのディテールがよく描出されていることである．今後，益々多用されるネガチブ染色法にとって，CN

現像の果す役割は大きいと思われる.

ま と め

カテコール表面現像法(CN 現像法)の大課題であった現像むらに対し, カベタックを用いてフィルムを水平に保持し, 液を上から爆射(ボンバード)させる方法を開発し解決した.

各種細菌, ウィルスおよび免疫電顕試料の撮影に際しCN 現像法を応用し, 対照例と綿密な比較を行って, その優秀性を実証した.

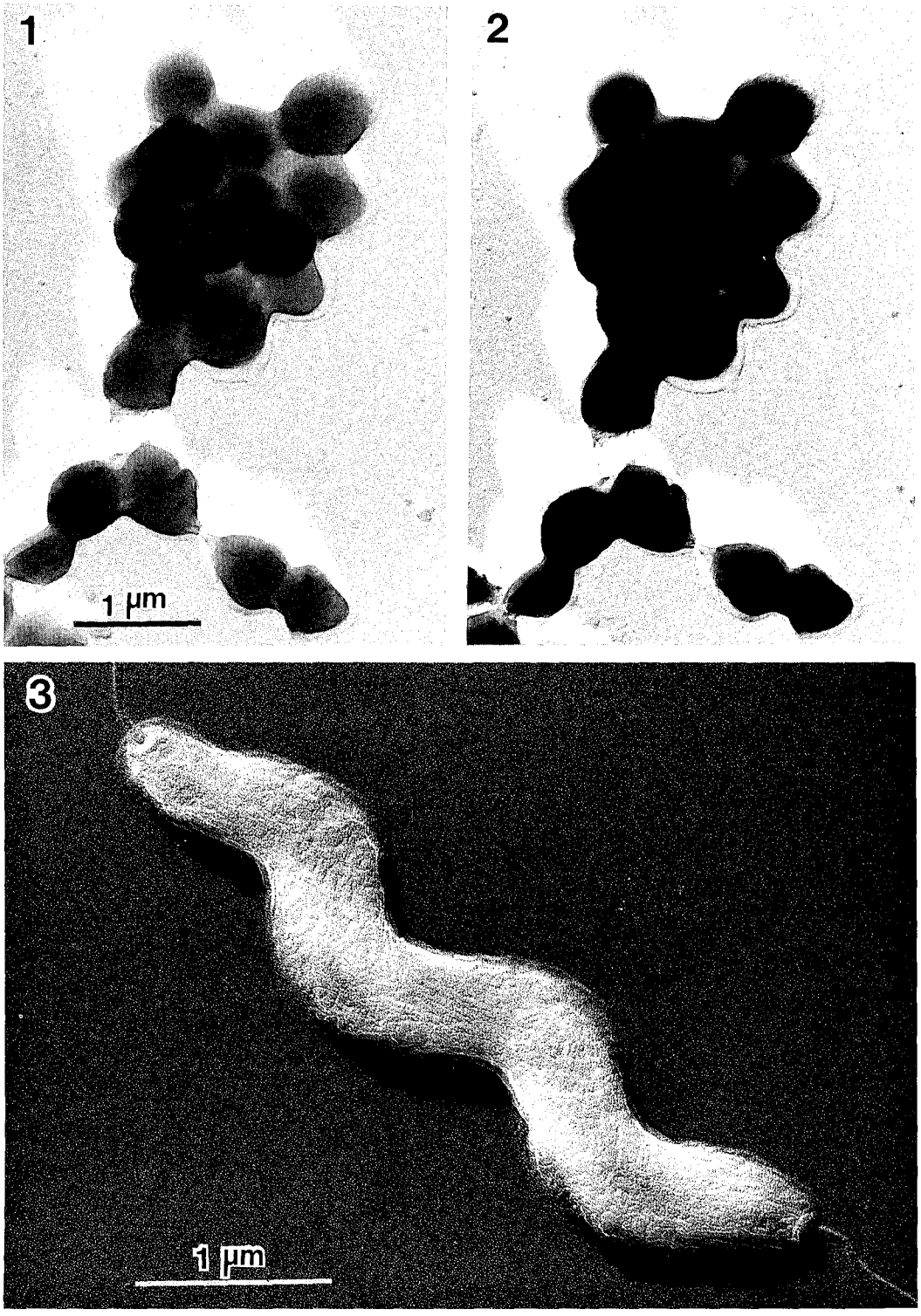
(本報告の要旨は第25回日本医学写真学会1984年6月において発表した.)

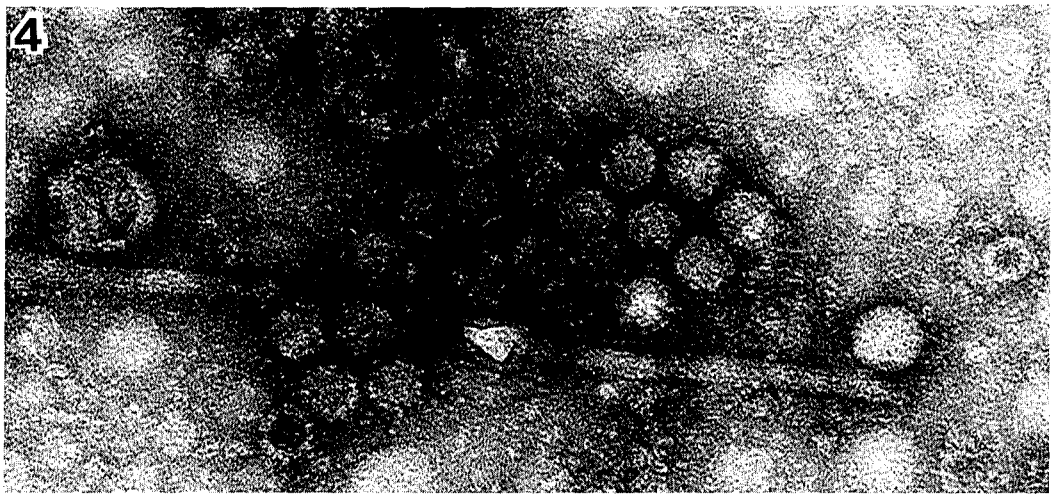
文 献

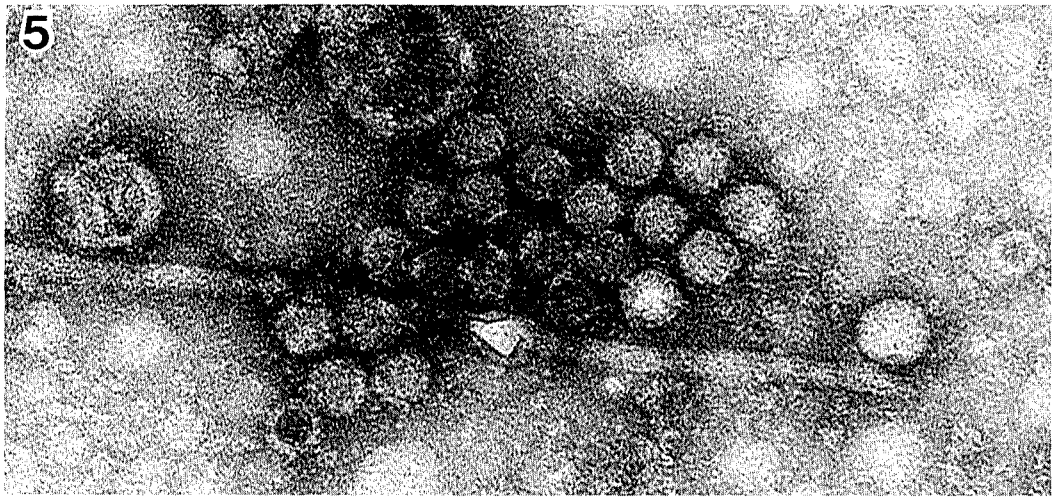
1) 石井圭一：科学と写真, 14, 2, 1960
2) 石井圭一：科学と写真, 15, 2, 1961
3) 石井圭一：化学の領域, 24, 34, 1970
4) 前木吾市：東京衛研年報, 22, 63, 1970
5) 前木吾市：東京衛研年報, 22, 67, 1970
6) 関根整治, 前木吾市, 矢野一好他：東京衛研年報, 32-1, 39, 1981
7) 関根整治, 山田澄夫, 松下 秀他：東京衛研年報, 33, 59, 1982

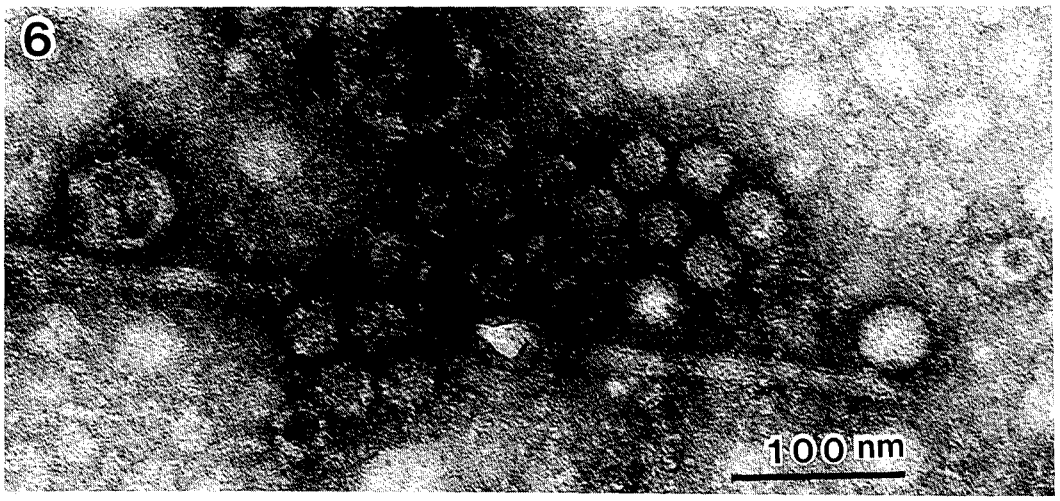
写 真 説 明

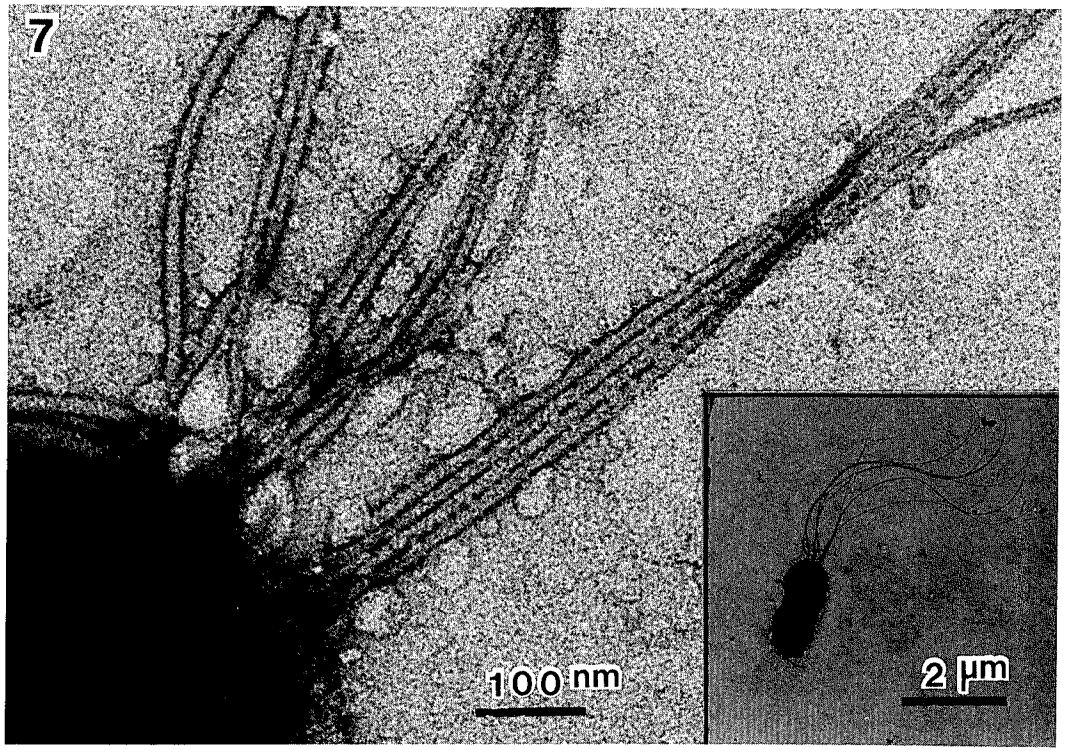
1：血液寒天平板上のコロニーからの連鎖球菌, C_rシャドウイング, CN 現像 (×19,000)
2：1に同じ, 同一視野の D-19現像による比較作例.
3：らせん菌 (キャンピロバクター) の C_rシャドウイング像, CN 現像 (×30,000)
4：下痢患者ふんべんから精製した試料中にみられたウィルス. 患者血清で凝集させたもの. D-19現像 (×230,000)
5：4に同じ. CN 現像による好調な作例.
6：4に同じ. D-19現像, チャージアップ現象で像が流れている.
7：桿菌(プレジオモナス)のネガチブ染色像. CN 現像した下方密着ネガ (×6,700) より 20倍の部分伸しをした作例. (×134,000)
8：ブドー球菌表層のネガチブ染色像. 菌の表面で免疫反応を起させた試料. CN 現像. (×400,000)

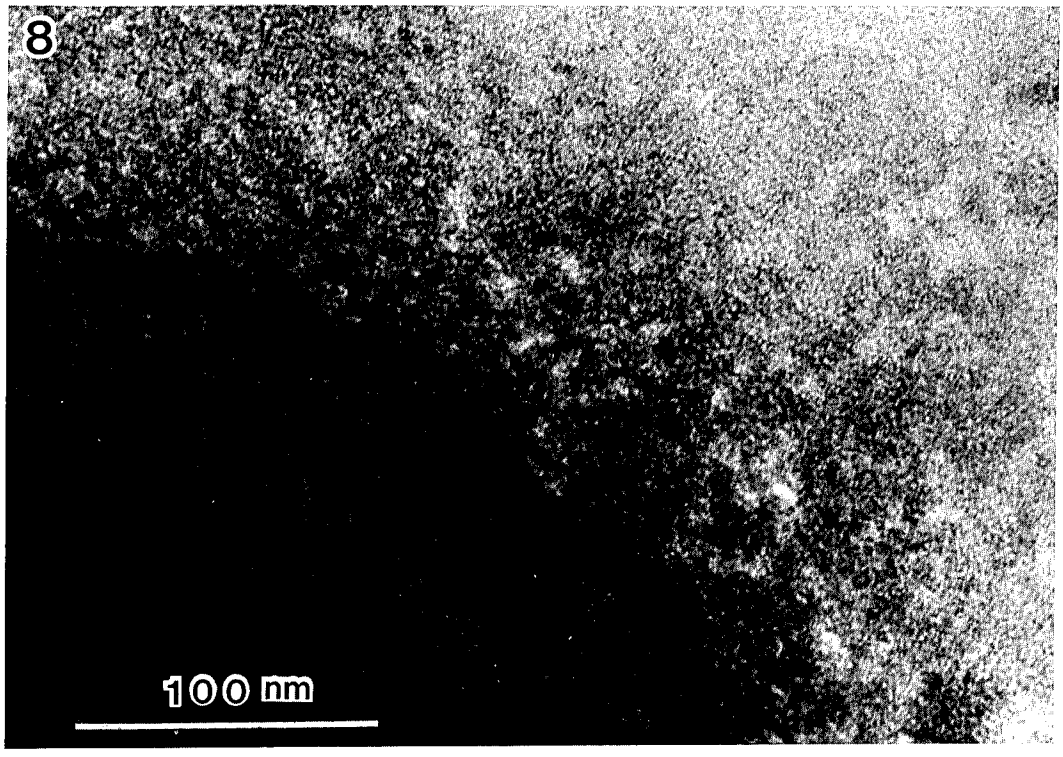

1
1 μm
2
3
1 μm


4


5


6
100 nm


7
100 nm
2 μm


8
100 nm

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.*, 35, 113-119, 1984

イオン対高速液体クロマトグラフィーによる医薬品製剤中のベルベリンの定量

安田一郎*, 浜野朋子*, 瀬戸隆子*, 秋山和幸*

Quantitative Determination of Berberine in Pharmaceutical Preparation by Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography

ICHIRO YASUDA*, TOMOKO HAMANO*, TAKAKO SETO*
and KAZUYUKI AKIYAMA*

The quantitative analysis of berberine in various pharmaceutical preparations by ion-pair high-performance liquid chromatography is described. Separation from interfering components in the preparations could be achieved within 15 minutes on a 25 cm column packed with LiChrosorb RP-18, using 50 mM sodium laury1 sulfate and 37 mM tartaric acid in 55% acetonitrile as an eluent. Detection was performed at 340 nm by an ultraviolet multiwave photometric detector. Berberine was extracted efficiently with the solvent of same composition as the mobile phase by the ultrasonic waves treatment and the extract was injected directly on the column. This method is considered to be useful for pharmaceutical analysis of berberine, berberine chloride and berberine tannate in the dry extracts of oriental pharmaceutical medicine, herb medicine, medicine for the stomach and bowels, etc.

Keywords : ion-pair, high-performance liquid chromatography, LiChrosorb RP-18, sodium laury1 sulfate, pharmaceutical analysis, berberine, berberine chloride, berberine tannate, medicine for the stomach and bowels, herb medicine

緒　言

ベルベリンは生薬・オウレン，オウバクの有効成分であり，また塩化ベルベリンあるいはタンニン酸ベルベリンとして，整腸薬，止瀉薬などに広く配合される医薬品である．ベルベリンの定量法に関しては多くの報告[1-9]があるが，それらは主に生薬分析に関するものであり，製剤分析についてのものは少ない．そこで著者らは製剤中のベルベリンの定量法につき，高速液体クロマトグラフィー（以下 HPLC と略す）を用い，抽出条件，測定条件などの検討を行うこととした．

ベルベリンの HPLC を用いた定量法には，強酸性陽イオン交換樹脂を固定相とする方法[10]，硬質デンプンを固定相とする方法[11]以外に，ベルベリンと陰イオンのイオン対を，ポーラスポリマーあるいは C_{18} 逆相系シリカで分析する方法[12-14]が知られている．今回，製剤分析に汎用される C_{18} 逆相系シリカを固定相に，ラウリル硫酸ナトリウム（以下 SLS と略す）液を移動相に用いたイオン対クロマトによる方法を検討した．

実験の部

1．機器

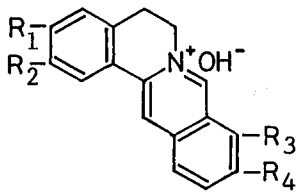
HPLC 装置：日本精密科学 NSLC-100A，波長可変紫外部吸収（以下 UV と略す）検出器付．島津フォトダイオードアレイ紫外部可視部吸収（以下 UV-VIS と略す）分光光度計検出器．超音波洗浄器：BRANSONIC 220．遠心分離機：久保田 KN-70．

2．標準物質および試料

ベルベリン（Chart 1）標品：東京化成製塩化ベルベリンを，水およびメタノールで再結晶し，日局 10 塩化ベルベリン定量法[15]に従ってその純度を測定したものを使用する．

アクリノール：岩城製薬製日局アクリノールをそのまま用いる．

* 東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科　160　東京都新宿区百人町 3−24−1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24−1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan



	R_1	R_2	R_3	R_4
Berberine (1)	$O\diagdown CH_2\diagup O$		OCH_3	OCH_3
Palmatine (2)	OCH_3	OCH_3	OCH_3	OCH_3
Coptisine (3)	$O\diagdown CH_2\diagup O$		$O\diagdown CH_2\diagup O$	
Jateorrhizine (4)	OH	OCH_3	OCH_3	OCH_3

Chart 1. Chemical Structures of Berberine, Palmatine, Coptisine and Jateorrhizine

コプチジン,ヤトロリジンおよびパルマチン(Chart 1):北里大学薬学部生薬学教室より供与されたものを使用する.

試料 *1*：健胃散剤, 1包2.0g中,シュクシャ末28mg, オウバク末80mg, カンゾウ末160mg, ガジュツ末120 mg, ダイオウ末56mg, オウレン末22mg, ケイヒ末80 mg, ボレイ末480mg, キジツ末80mg,ヨクイニン末92 mg, ユウタン2mg, リョウキョウ末40mg, チンピ末200mg, ヒシノミ80mg, エンメイソウ末80mg, ウゾクコツ末400mg, その他.

試料 *2*：胃腸内服液, 1アンプル20m*l*中, ゲンチアナ450mg, オウレン990mg, コショウ150mg, ブクリョウ150mg, アセンヤク120mg, ケイヒ1800mg, チョウジ90mgおよびアマチャ450mgを精製水で抽出した生薬抽出液16m*l*, カンゾウエキス375mg, *d*-ボルネオール3.72mg, *l*-メントール7.5mg, グリセリン360mg, その他.

試料 *3*：漢方処方（黄連解毒湯）エキス錠, 9錠中, オウレン1.5g, オウバク1.5g, オウゴン3.0gおよびサンシシ2.0gより製された水製エキス（黄連解毒湯エキス)900mg, ステアリン酸マグネシウム55mg, タルク55mg, カルボキシメチルセルロースカルシウム810 mg, デンプン270mg, メタケイ酸アルミン酸マグネシウム80mg, その他.

試料 *4*：止瀉薬,錠剤, 4錠中,塩化ベルベリン56mg, アクリノール30mg, タンニン酸アルブミン300mg, ロートエキス17mg, ビタミンB_1硝酸塩5mg, ビタミンB_2 2mg, その他.

3. 試料液の調製

試料 *1*：粉末約4gを50m*l*の共栓付き遠沈管に精密に秤る. 抽出溶媒は酒石酸37 mM, SLS 50 mMを含む55%アセトニトリル溶液とし,その40m*l*を加え,15分間超音波処理し, 遠心分離後上澄液を分別する. 残渣はさらに抽出溶媒20m*l*で同様の処理を2回繰り返す. 上澄液を集め正確に100m*l*とし, ろ紙でろ過後HPLC用の試料液とする.

試料 *2*：試料20m*l*をとり抽出溶媒を加え正確に全量100m*l*とする. これを15分間超音波処理後ろ過し, HPLC用の試料液とする.

試料 *3*：粉末約1gをとり試料 *1* に準じHPLC用試料液を調製する. ただし抽出は2回とする.

試料 *4*：粉末約250mgをとり試料 *1* に準じHPLC用試料液を調製する. ただし抽出は1回とする.

4. HPLCによる定量

ベルベリン標品を試料液の調製で用いた抽出溶媒に溶かし10～200μg/m*l*の標準系列をつくる. その3～7μ*l*をHPLCカラムに注入し, 得られたクロマトグラムのピーク高さと濃度から検量線を作成する. 試料液の注入量は5μ*l*.

HPLCカラム：LiChrosorb RP-18（Merckハイパーカラム）7μ*m*, 25cm×4cm. 移動相：酒石酸37mM, SLS 50 mMを含むアセトニトリル・水混液（55：45 v/v%), 流速1m*l*/min. 検出：UV検出器(340nm). 温度：室温

5. HPLCによる定性

ベルベリンと同様, コプチジン, ヤトロリジン, パルマチンおよびアクリノールはそれぞれ抽出溶媒に溶かし標準溶液とする. 各ピークの保持時間（以下t_Rと略す）およびUV-VISスペクトルの比較により化合物の同定を行う.

結果および考察

1. HPLC測定条件の検討

移動相の検討 赤田ら[13], Misakiら[14]によりSLSを用いるイオン対クロマトが報告されているが, 測定条件は繁雑であり, またベルベリンの分離に必要な移動相の検討がされていないなど不備な点も多い. そこで著者らは

試料 *1*～*4* につき，移動相中の SLS，酒石酸，アセトニトリルおよびメタノールの各濃度を改めて検討することとした．

まずアセトニトリル 55% と SLS 濃度 5.76 g／*l* とを一定にし，酒石酸濃度を 0～100 mM の間で 8 段階に変化させ，ベルベリンピークの挙動を調べた．その結果，酒石酸濃度が上昇するに従い，ピーク幅は狭くなり，t_R も減少するが，37 mM 以上ではピーク幅，t_R とも変化しなくなった．

次に SLS 濃度 5.76 g／*l* と酒石酸濃度 37 mM とを一定にし，アセトニトリルの濃度について検討した．試料 *1*～*3* はベルベリンのピーク付近にパルマチン，コプチジンおよびヤトロリジンの各ピークを認める．そこでアセトニトリル濃度を変化させ，これらの保持比（以下 k′と略す）を求めたところ，Fig. 1．の結果を得た．すなわち，*log* k′とアセトニトリル濃度は各ピークとも直線関係を示したが，アセトニトリル濃度 70 % ではベルベリンとパルマチンのピークが重なり，濃度が減少するに従い次第に分離してきた．しかし t_R が長くなり，かつ分離したピークの線幅は広がった．そこでアセトニトリルの濃度は 55 % が適当と考えた．

次に SLS 濃度について検討した．アセトニトリル濃度 55% と酒石酸 37 mM とを一定にし，SLS 濃度を 0～200 mM の間で添加したところ，無添加ではベルベリンのピークは出現せず，5 mM から 200 mM に段階的に濃度を上げることによって，t_R が 16.7 分から 6.7 分まで減少した．ところが SLS 200 mM 付近ではベルベリンとパルマチンのピークが充分に分離せず，定量に支障をきたした．そこでベルベリンとパルマチンの分離度（以下 Rs と略す）と SLS 濃度との関係を調べたところ，Fig. 2．に示す結果となった．通常，HPLC による定量分析には R_s 1.00 以上が必要とされており[16]，本条件下では SLS 25～75 mM を添加した場合 R_s 1.00 以上を得ることが可能であった．そして最大値は SLS 50 mM の時，R_s 1.35 となった．

最後にメタノール濃度について検討した．アセトニトリル濃度 55 % と酒石酸 37 mM と SLS 50 mM とを一定にし，移動相中のメタノール濃度を 0～15 % と段階的に変化させ，ベルベリンピークの t_R およびピーク幅，試料 *1*～*4* の妨害ピークの有無について調べたところ，メタノールの濃度による各クロマトの変化はほとんど観察されなかった．そこで今回メタノールは移動相に加えないこととした．

以上の結果より，ベルベリンを比較的短時間に効率よく分離溶出させるために，移動相は，酒石酸 37 mM，SLS 50 mM を含む 55% アセトニトリル溶液が最も良いことがわかった．なおこの時ベルベリンの t_R は 12.6 分，パルマチン，11.7 分，コプチジン，10.9 分，ヤトロリジン，8.5 分，アクリノール，11.4 分である．Fig. 3.

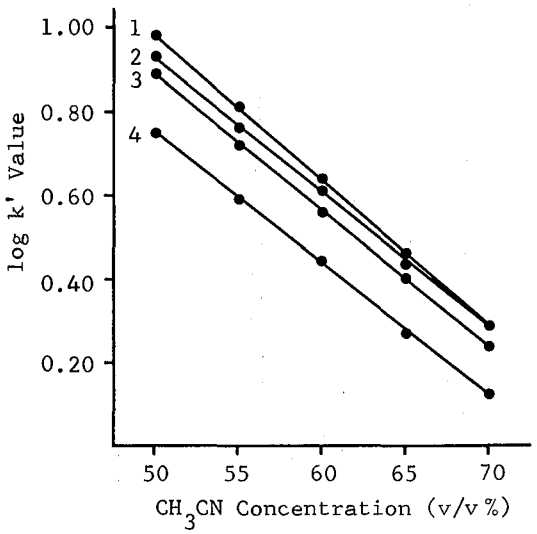


Fig. 1. Dependence of *log* k' on CH_3CN Concentration for Berberine (1), Palmatine (2), Coptisine (3) and Jateorrhizine (4) on LiChrosorb RP-18 using 20mM Sodium Lauryl Sulfate and 37mM Tartaric Acid

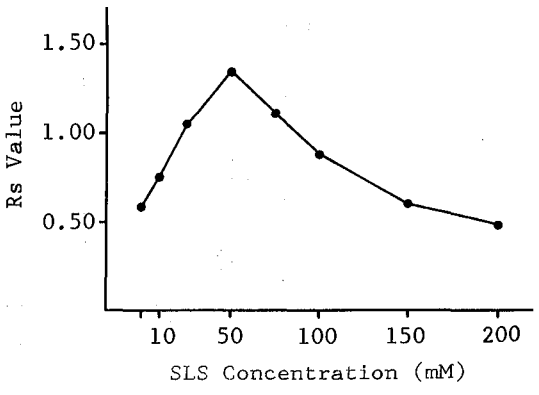


Fig. 2. Dependence of Resolution (Rs) between Berberine and Palmatine on Sodium Lauryl Sulfate (SLS) Concentration on LiChrosorb RP-18 using 55% CH_3CN contained with 37mM Tartaric Acid

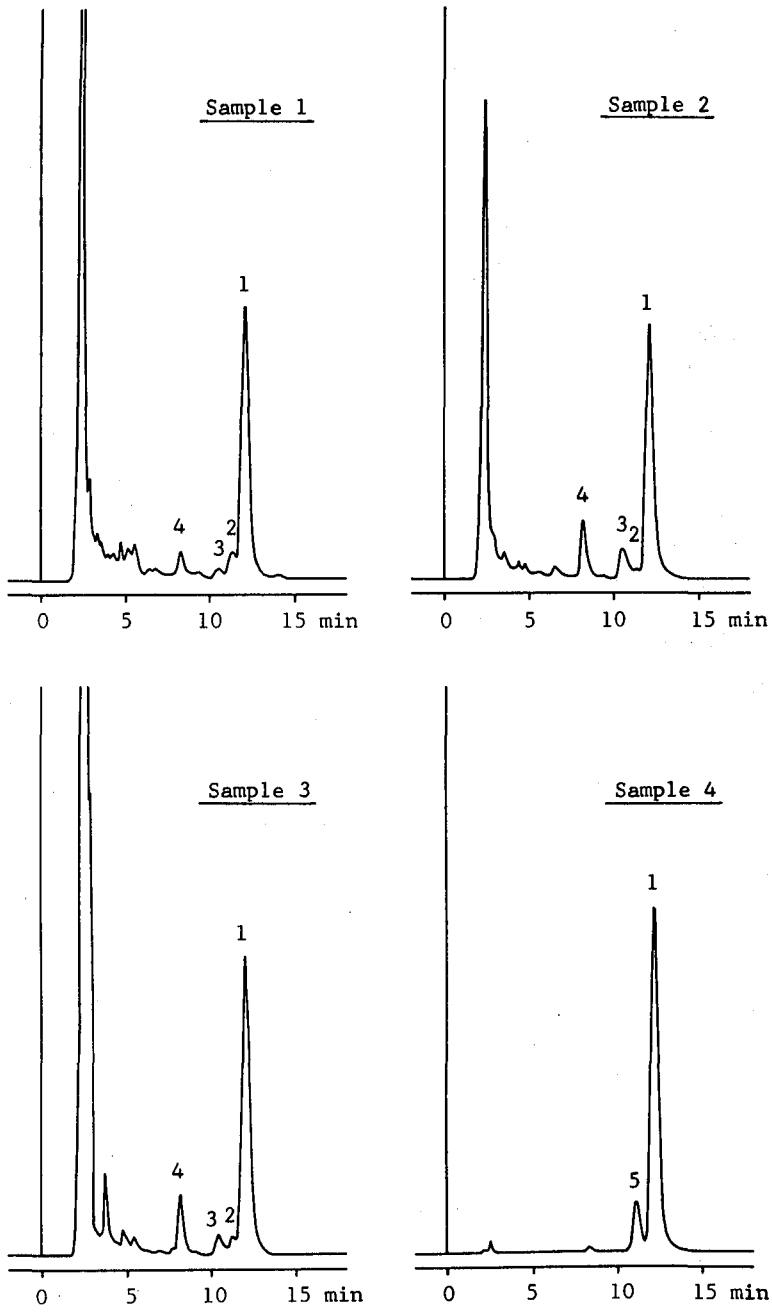


Fig. 3 . Chromatograms of Samples *1~4* by HPLC on LiChrosorb RP-18 using 50mM Sodium Lauryl Sulfate and 37mM Tartaric Acid in 55% CH_3CN as an Eluent

1 : Berberine 2 : Palmatine 3 : Coptisine 4 : Jateorrhizine 5 : Acrinol

に試料 *1*～*4* のクロマトグラムを示した.

測定波長の検討 各標品のクロマトグラムの UV-VIS スペクトルを Fig. 4. に示した. ベルベリンのスペクトルはパルマチンおよびヤトロリジンのスペクトルと一致し, 265nm, 345 nm, 420 nm に極大吸収を示す. 345 nm の吸収は 265 nm の吸収より吸光度がやや弱いが, その吸収波長の選択性を考慮し, 測定波長は 345 nm 付近と設定した. なお, 試料 *1*～*4* のベルベリンピークの UV-VIS スペクトルは, いずれも Fig. 4. に示すスペクトルと一致した. すなわち本条件下では各ピークの定量に妨害を及ぼす物質は存在しない.

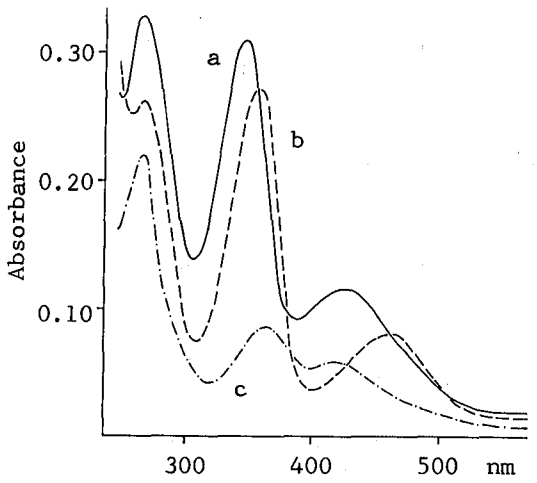


Fig. 4. Ultraviolet and Visible Absorption Spectra of Berberine (a), Palmatine (a), Coptisine (b), Jateorrhizine (a) and Arcinol (c)

2. 検量線

ベルベリン 0.04～1.40 μg の範囲で, 注入量 (μg, X) とピーク高さ (cm, Y) の間にはほぼ原点を通る良好な直線関係が認められ, 回帰直線 $Y=15.14X+0.01$ ($r=0.9999$, $n=8$) を得た.

3. 抽出条件の検討

抽出溶媒の検討 試料 *1*～*4* につき種々の溶媒による抽出効率を検討したところ, Table 1 の結果を得た. すなわち, HPLC 移動相と同じ組成の, 酒石酸 37 mM, SLS 50 mM を含む 55%アセトニトリル溶液を用いることが最も良い結果となった.

抽出時間の検討 試料 *1* を用い, 5, 10, 15, 30, 45, 60 分間超音波処理したときの抽出率 (二重測定の平均値) は, 最高値に対し 5 分間で 98.4 %, 10 分間で 99.5 %, 15 分間で最高値が得られ, それ以降増加は認められなかった.

抽出回数 試料 *1* について超音波処理を順次繰り返し, 抽出率 (二重測定の平均値) を求めたところ, 1 回で 89.6%, 2 回で 99.2%, 3 回で最高値に達した. 試料 *2* は抽出溶媒に完全に溶解し, 試料 *3* は 1 回で 98.3%, 2 回で最高値に, また試料 *4* は 1 回で定量的に抽出された (Table 2).

以上の結果から, 抽出溶媒は, ベルベリンとイオン対を形成する SLS 50 mM ならびに酒石酸 37 mM を含んだ 55%アセトニトリル溶液とし, 超音波処理時間は 15 分間, 抽出回数は試料 *1* のように生薬粉末製剤で含量の低い検体については少なくとも 3 回行うこととした.

Table 1. Effect[1] of Various Solvents on Extraction of Berberine from Samples *1*～*4*

	Sample *1*	Sample *2*	Sample *3*	Sample *4*
SLS Solution[2]	100 %	100 %	100 %	100 %
Water	1.4	52.5	63.9	84.1
Methanol	65.7	81.4	93.1	92.5
50% Methanol	25.6	73.2	78.5	90.9
Alkaline Methanol[3]	43.4	65.6	76.9	73.4
Ethanol	58.0	82.1	17.8	88.5
50% Ethanol	42.0	80.5	89.9	89.4

1) Each maximum value is indicated as 100 per cent.
2) SLS Solution is 55% CH_3CN containing 50mM sodium lauryl sulfate and 37mM tartaric acid.
3) Alkaline Methanol is the mixture of 5% ammonia water and methanol (1 : 3).

4．添加回収実験

試料*1*～*4*につき添加回収実験を行ったところ，ほぼ100%の回収率を得た．また定量精度についても充分満足できる結果であった (Table 3).

5．市販製剤中のベルベリン含量

市販製剤44検体につき今回設定した条件で分析した．製剤の抽出液を前処理することなしに直接カラムに注入したクロマトグラムは，いずれも15分以降にピークを認めず，極めて短時間で分析が可能であった．また，ベルベリンのピークを妨害するピークは出現せず，定量に支障をきたすことはなかった．

市販製剤44検体を，(A) 主として生薬粉末よりなる製剤，(B) エリキシル剤である内服液剤，(C) 漢方処方エキス製剤，(D) 塩化ベルベリンあるいはタンニ

Table 2. Effect[1] of Repeated Extraction Times with the SLS Solution[2] on Determination of Berberine in Samples *1*～*4*

Times	1	2	3	4
Sample *1*	89.6 %	99.2 %	100.0 %	100.0 %
Sample *2*[3]	100.0	—	—	—
Sample *3*	98.3	100.0	100.0	—
Sample *4*	99.9	100.0	—	—

1) Each maximum value is indicated as 100 per cent.
2) The SLS Solution is 55% CH_3CN containing 50mM sodium lauryl sulfate and 37mM tartaric acid.
3) Sample *2* was dissolved completely in the SLS Solution.

Table 3. Recoveries of Berberine Chloride added to Samples *1*～*4*

	Runs	Added	Recovery	CV
Sample *1* (4.0 g)	5	10 mg	96.65 %	1.28 %
Sample *2* (20 m*l*)	5	10	99.89	1.18
Sample *3* (1.0 g)	5	10	98.85	2.29
Sample *4* (500 mg)	5	25	99.69	2.50

Table 4. Analytical Results[1] of Berberine Chloride[2] in 44 Commercial Preparations

Group	A[3]	B[4]	C[5]	D[6]
(Number)	(12)	(10)	(13)	(9)
Max.	91.76	30.69	56.21	292.23
Min.	2.52	6.86	2.49	92.32
Mean	38.80	16.26	28.07	205.07

1) The content of berberine chloride in the administration dose per day is indicated as mg.
2) The contents of berberine and berberine tannate are evaluated as one of berberine chloride.
3) This group's preparations are mainly made of powdered crude drugs.
4) This group's preparations are the elixirs of liquid medicine for oral use.
5) This group's preparations are the dry extracts of oriental pharmaceutical medicine.
6) This group's preparations are compounded with berberine chloride or berberine tannate.

ン酸ベルベリンの配合された製剤，の4グループに分け，Aグループは試料*1*，Bグループは試料*2*，Cグループは試料*3*，Dグループは試料　に準じ，試料液を調製し分析したところ，Table 4の結果を得た．定量値は薬剤の1日投与量中のベルベリン含量を塩化ベルベリンに換算したものである．これらのグループのなかではDグループが他のグループに比べ極めて高い数値を示した．

結　論

イオン対クロマトによる製剤中のベルベリンの定量法を検討した．固定相はLiChrosorb RP-18，検出はUV 340 nmとし，移動相は酒石酸酸性下，アセトニトリル濃度55%，SLS 50mMを添加したものが，他成分との分離上最適な溶媒と結論づけられた．製剤からの抽出には移動相と同一組成の溶媒を用い，超音波処理により極めて短時間で抽出可能であった．本法は種々の医薬品製剤中のベルベリンの一斉分析法として充分適用できると考える．

謝辞　本研究にあたり標準物質コプチジン，ヤトロリジンおよびパルマチンを快く提供された，北里大学薬学部生薬学教室　古谷力教授ならびに同スタッフの諸先生に深謝致します．

文　献

1) 山口一孝，太幡利一，伊東　宏：薬誌，73，1189，1953
2) 黒野吾市，小倉紀代，佐々木敬祐：薬誌，85，262，1965
3) 木村康一，野呂征男，半田清作：生薬誌，26，141，1972
4) 武良哲雄，富永敏夫：生薬誌，27，63，135，1973
5) 沢田徳之助，山原条二，森岡恵美子：生薬誌，27，106，1973
6) 海東常敏，富岡　勇，相楽和彦，伊藤裕二：分析化学，22，1175，1973
7) 野口　衛，持田研秀：生薬誌，30，47，1976
8) 橋本康平，安藤敬子，水野瑞夫：生薬誌，30，127，1976
9) 山岸　喬，森　三佐雄：北海道立衛生研究所報告，28，18，1978
10) 赤田良信，棚瀬弥一郎：薬誌，97，940，1977
11) 石川　治，橋本　勉，中嶋暉躬，田中　治，糸川秀治：薬誌，98，976，1978
12) 西本和光：現代東洋医学2(2)，54，1981
13) 赤田良信，河野貞子，棚瀬弥一郎：薬誌，100，766，1980
14) Misaki, T., Sagara, K., Ojima, M., Kakizawa, S., Oshima, T., Yoshizawa, H: *Chem. Pham. Bull.*, 30, 354, 1982
15) 日本公定書協会編：第10改正日本薬局方解説書 C-338, 1981, 広川書店，東京
16) J. J. カークランド編，平田義正，鴈野重威監訳：高速液体クロマトグラフィー，9，1972，講談社，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 120-126, 1984

非ピリン系かぜ薬の定量法（第3報）
抗ヒスタミン剤

中 山 京 子*, 高 橋 美佐子*, 岩 崎 由美子*, 秋 山 和 幸*

Determination of Non-pyrin Preparations for Common Cold (III)
Antihistaminics

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

Keywords：非ピリン系かぜ薬 non-pyrin preparations for common cold, 抗ヒスタミン剤 antihistaminics, H_1-遮断薬 H_1-blockers, ガスクロマトグラフィー gas chromatography, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography, 比色定量 colorimetry, 非水滴定 nonaqueous titration, 塩酸ジフェンヒドラミン diphenhydramine hydrochloride, マレイン酸クロルフェニラミン chlorpheniramine maleate

はじめに

非ピリン系かぜ薬の定量法[1-3]の一環として，今回は抗ヒスタミン薬，H_1－遮断薬として代表的な塩酸ジフェンヒドラミン（以下DHと略す）とマレイン酸クロルフェニラミン（以下CPと略す）について定量法の検討を行った．DHは抗ヒスタミンの先駆として，わが国にも早くから紹介され最も通常用いられる抗ヒスタミン薬の一つであるが，配合変化の多い薬品のため単一製剤かサリチル酸，タンニン酸塩として配合されている．また8－クロルテオフィリンとの複合体ジメンヒドリナートとして鎮暈薬に用いられている．CPは抗ヒスタミン薬中，最も作用が強く副作用の少ないものの一つであり，総合感冒剤，特に持続性製剤に用いられ，また点眼薬，点鼻薬など多くの製剤に配合されている．定量法として日局ではDH，CPとも過塩素酸で非水滴定[4]により定量している．

混合製剤は厚生省の例示試験方法[5]により，比色定量法についてはDHはブロムフェノールブルー法，2.4－ジニトロフェニルヒドラジン法，CPは臭化シアン法，塩化シアン法により定量される場合が多い．しかしそれぞれの呈色反応は選択性が少なく，他の配合薬品との分離などに繁雑な操作を必要とする．また高速液体クロマトグラフィー（以下HLCと略す）は生薬主剤のかぜ薬など配合薬品により繁雑な前操作を必要とする．そこでわれわれは，簡単な操作で定量の特異性や精度の向上が期待でき，かつ同時定量が可能なガスクロマトグラフィー（以下GCと略す）による定量法を検討した．本法はDHおよびCPを遊離塩基型として分離測定する方法で，従来の試験法と比較検討を行った結果，良い成績が得られたので報告する．

実験の部

使用機器 GC：日立163型ガスクロマトグラフ，積算機：島津クロマトパックRIA，HLC：日立635型高速液体クロマトグラフ，UVディテクター：日本精密NS-310A，UVモニター：島津ボシュロム分光光度計スペクトロニック70 UV．

標準品 CP，DH：日局の医薬品を用い，いずれも乾燥し定量するとき99.0%以上を含有するもの．内部標準物質（以下I.S.と略す）：日局収載品または和光純薬試薬特級を用いた．

試料 医薬品製剤は行政検体として衛生局薬務部より送付された日局製剤，総合感冒剤，生薬を主剤とするかぜ薬，持続性鼻炎用カプセル製剤その他を用いた．その剤型が錠剤，カプセル剤（内容物のみ），分包剤（内容物のみ）の場合はそれぞれ10個以上をとり，その平均重量を算出し，乳鉢でよく研和して均質な粉末とし，シロップ剤はそのまま，あるいは水で希釈して試料とした．

試薬，試液 特に本文に記載のないものは日局または

* 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

日局により調製したもの，および和光純薬試薬特級を用いた．

GCによる定量法

I．CPの定量法

1．総合感冒剤

1) **内部標準溶液の調製** フタル酸ジ-n-ブチル100mgをとりクロロホルム100m*l*に溶かし，これを内部標準溶液とする．

2) **標準溶液の調製** CP標準品を105°で3時間乾燥し，その約80mgを精密に量り，水を加えて溶かし，正確に100m*l*とする．これを標準原液とする．この液2m*l*を正確に量り，共栓遠心沈殿管に入れ，これに水3m*l*，アンモニア試液5m*l*およびヘキサン25m*l*を正確に加えて15分間激しく振り混ぜた後，2分間遠心分離し，上澄液15m*l*を正確にナス型フラスコにとり，ロータリエバポレーターを用いて40°以下で溶媒を留去する．残留物はデシケーター（シリカゲル）で乾燥し，これに内部標準溶液1m*l*を正確に加えて溶かし標準溶液とする．

3) **試料溶液の調製** CP約1.6mgに対応する試料を精密に量り，共栓遠心沈殿管に入れ，水5m*l*を加えて試料を分散させた後，アンモニア試液5m*l*およびヘキサン‥‥以下標準溶液と同様に操作し試料溶液とする．

シロップ剤は水で適量にした後，塩化ナトリウム5g，アンモニア試液5m*l*およびヘキサン‥‥以下同様に操作し試料溶液とする．

4) **測定** 標準溶液および試料溶液をそれぞれ2μlとり日局10一般試験法第6項「ガスクロマトグラフ法」の内部標準法およびピーク面積法に従い次の条件により測定する．分離用カラム：10%F-50／ChromosorbW(AW-DMCS) 60～80 meshを内径3mm×長さ2.0mのガラスカラムに充てんして用いる．検出器：水素炎イオン検出器，温度：カラム(C.T.)220°，注入口(I.T.)250°，感度：16×10^2，キャリヤーガス：N_2 40m*l*／min.

2．持続性製剤（顆粒）

1) **内部標準溶液の調製** I.—1.と同じものを用いる．

2) **標準溶液の調製** I.—1.に用いた標準原液2m*l*を正確に量り分液漏斗に入れ，水48m*l*，強アンモニア水5m*l*を加え，ヘキサン50m*l*ずつで4回抽出する．ヘキサン層は順次無水硫酸ナトリウムを用いて脱水，ろ過する．全ヘキサン抽出液を合わせロータリエバポレーターを用いて低温（40°以下）で溶媒を留去する．‥‥以下 I.—1.の標準溶液の調製と同様に操作し標準溶液とする．

3) **試料溶液の調製** CP約8mgに対応する試料を精密に量りガラスまたはメノー乳鉢に入れ，水少量を加えて練りつぶし，水200m*l*を適量ずつ用いて乳鉢中の残留物を洗いつつ250m*l*のメスフラスコに移す．メスフラスコを65～75°の水浴中でときどき振り混ぜながら1時間温浸し，冷後水を加えて正確に250m*l*とする．この液をろ過し，はじめのろ液10m*l*を捨て，つぎのろ液50m*l*を正確に量り分液漏斗に入れ，強アンモニア水5m*l*を加え，ヘキサン50m*l*ずつで4回抽出する．‥‥以下標準溶液と同様に操作し試料溶液とする．

4) **測定** I.—1.と同様に操作し測定する．

II．DHの定量法

1) **内部標準溶液の調製** フタル酸ジ-n-ブチル50mgをとりクロロホルム100m*l*に溶かし，これを内部標準溶液とする．

2) **標準溶液の調製** DH標準品を105°で3時間乾燥し，その約125mgを精密に量り，水を加えて溶かし，正確に50m*l*とする．この液5m*l*を正確に量り，共栓遠心沈殿管に入れ，これにアンモニア試液5m*l*および内部標準溶液25m*l*を正確に加えて15分間激しく振り混ぜた後，2分間遠心分離し，クロロホルム層を分取する．クロロホルム抽出液は無水硫酸ナトリウムを用いて脱水し，標準溶液とする．

3) **試料溶液の調製** DH約12.5mgに対応する試料を精密に量り，共栓遠心沈殿管に入れ，これに水5m*l*を加えて試料を分散させた後，アンモニア試液5m*l*および内部標準溶液25m*l*を正確に加えて‥‥以下標準溶液と同様に操作し試料溶液とする．

4) **測定** 標準溶液および試料溶液をそれぞれ2μlとりI.—1.と同一条件で測定する．

実験結果および考察

定量法I.—1.による市販製剤のガスクロマトグラムをFig.1.，定量法IIによる市販製剤のガスクロマトグラムをFig. 2.，またかぜ薬の標準混合溶液のガスクロマトグラムをFig.3.に示す．いずれも良好な分離が得られた．

I．充てん剤，分析条件の検討

定量法の製剤への応用を検討するために，通常かぜ薬に配合されている医薬品を用いモデル処方，および標準溶液の混合溶液を作り，次の充てん剤について至適カラム温度，キャリヤーガス（N_2）流量，保持時間などを検討した結果，次のとおりである．

1．CP，DHとも測定可能なもの

分離用カラム：10% F-50／ChromosorbW (AW-DMCS) 60～80 mesh 内径3mm×長さ2.0m,C.T.220°,

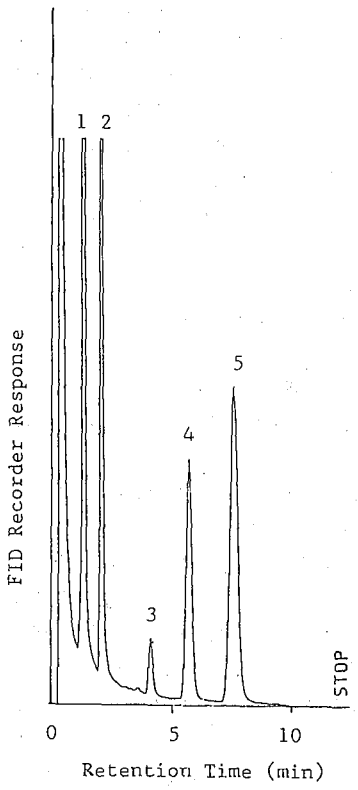


Fig.1. Gaschromatogram of Pharmaceutical Preparation.

Peak
1 : dl-Metylephedrine
2 : Ethenzamide
3 : Caffeine
4 : Di-n-butyl Phthalate (I.S.)
5 : Chlorpheniramine

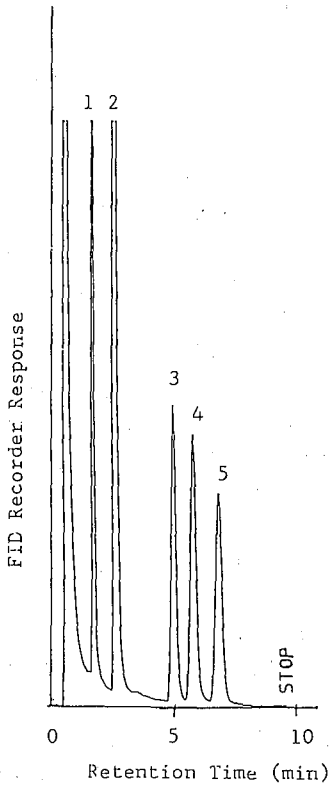


Fig.2. Gaschromatogram of Pharmaceutical Preparation.

Peak
1 : dl-Metylephedrine
2 : Ethenzamide
3 : Caffeine
4 : Diphenhydramine
5 : Di-n-butyl Phthalate (I.S.)

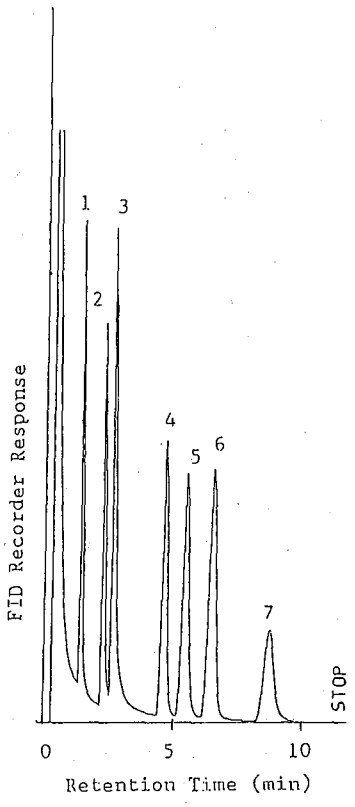


Fig.3. Gaschromatogram of Standard Mixture.

Peak
1 : dl-Metylephedrine (0.5μg)
2 : Ethenzamide (0.5μg)
3 : Acetaminophen (1.0μg)
4 : Caffeine (1.0μg)
5 : Diphenhydramine (0.5μg)
6 : Di-n-butyl Phthalate (I.S.; 0.5μg)
7 : Chlorpheniramine (0.5μg)

I.T.250°, $N_2$50 ml／min, 感度16×10^2以上の条件で測定した保持時間(分)は次のとおりである．dl－メチルエフェドリン1.1, エテンザミド1.9, ベンゾフェノン(I.S.)2.1, アセトアミノフェン 2.3, カフェイン 4.1, ノスカピン 4.4, DH 4.8, アミノピリン(I.S.)5.5, フタル酸ジ-n-ブチル(I.S.)5.7, CP 7.5これら10種は完全に分離する．

2. CP のみ測定可能なもの

分離用カラム：5 %SF-96+0.2%versamide 900／GaschromQ(AW-DMCS) 60～80 mesh 内径3 mm×長さ 1.0 m, C.T.200°, I.T.240°, $N_2$50ml／min. 感度 16×10^2, この条件ではDHとカフェインの分離が不十分なので，カフェインの配合されていない製剤で測定可能である．ノスカピンとフタル酸ジ-n-ブチルのピークは重なるため別のI.S.を選択する．

3. DH のみ測定可能なもの

分離用カラム：5%QF1+0.1%poly-A-103／GaschromQ80～100mesh 内径3 mm×長さ1.0 m, C.T.190°, I.T.240°, $N_2$50ml／min., 感度32×10^2, この条件ではCPとエテンザミドの分離が不十分なので，エテンザミドの配合されていない製剤で測定可能である．アセトアミノフェンの保持時間は10.6分と遅くなり，ピークはブ

ロードである．分離用カラム：5% SE-30／Chromosorb W (AW-DMCS) 80～100 mesh 内径3 mm×長さ2.0m, C.T.180°, I.T.240°, $N_2$50ml／min., 感度32×10², この条件ではCPは検出されないがI.T.を270°にすると検出できる．

4. その他

分離用カラム： 2 %OV-17／ChromosorbW(AW-DMCS)60～80 mesh 内径3 mm×長さ 2.0 m, C.T.200°, I.T.220°, この条件ではエテンザミド，フェナセチン，カフェイン，アミノピリン(I.S.)は検出されない．他の試料も分離が不十分である．

分離用カラム： 1.5% OV-1／ShimaliteW(AW-DMCS)80～100 mesh 内径3 mm×長さ2.0m, C.T.200°, I.T.220°, では，アセトアミノフェンが検出されず，他の成分も分離が不十分である．

II. I.S.の検討

ベンゾフェノン，アミノピリンおよびフタル酸ジ－n－ブチルを用い上記の分離用カラムで検討を行った結果，10%F-50／ChromosorbW(AW-DMCS)と 5 % QF 1+0.1 poly-A-103／GaschromQは，すべてのI.S.が用いられる．5 %SF-96+0.2%versamide 900／GaschromQ(AW-DMCS)はベンゾフェノンとエテンザミドの分離が不十分である．

以上の結果より，これらの充てん剤の中で10%F-50／ChromosorbW(AW-DMCS)60～80 mesh 内径3 mm×長さ 2.0 m, C.T.210～220°, I.T.240～250°, $N_2$40～50 ml／min.の条件で測定するとき，成分の分離，保持時間が定量分析に適しているものと考えられた，またI.S.は今回のGC条件ではフタル酸ジ-n-ブチルが適当と思われる．しかし配合薬品により，適宜アミノピリン，ベンゾフェノン，フェナントレン，フルオランテン，n－ドコサンを用いる．

III. 抽出操作，溶媒の検討

1. CP モデル処方および市販製剤について抽出溶媒をヘキサン，クロロホルムおよびエタノールを用いて定量法I.—1.に従って，10%F-50／ChromosorbW-(AW-DMCS)‥‥，および5 %SF-96+0.2%versamide-900／GaschromQ(AW-DMCS)‥‥について検討を行った結果，主成分のモデル処方ではいずれも抽出率はほぼ100%である．市販製剤ではヘキサンで抽出した場合，CPを目的とした定量ではCPに対しては十分な溶解性を示すが他成分の溶解性は低く，例えばノスカピンが配合されている製剤でもその溶解性が低いため妨害がなく良好なピークが得られる．しかしアスピリンアルミニウム，地竜エキス散およびd－ボルネオールの配合された混合製剤ではCPの抽出率が悪かった．ヘキサンに特に溶解性の高い物質が配合されているときは，妨害される場合もある．

クロロホルムによる抽出率は上記の製剤でも非常に良好で，モデル処方では分離も良く最も良好なガスクロマトグラムが得られたが，他成分の溶解性も高いため配合薬品によりCPやI.S.に影響してピークもブロードになり妨害する．エタノールはCPの抽出率が悪く，他の抽出成分が妨害する．抽出方法としては直接内部標準溶液を用いて抽出する方法が誤差も少なく良い方法であるが，製剤中のCPの配合量が少量なので秤取する試料量が多くなるため上記の方法では抽出率，およびI.S.との対応量に問題があり適当ではない．また1錠（個，包，ml）のCP含量の多少により，抽出溶媒のヘキサンおよび内部漂準溶液の量を加減することにより，多種多様な製剤に配合されているCPの定量ができるのでI法を採用した．

2. 持続性製剤中のCP 製剤中の多くは定量法I—1.で良好な結果が得られた．しかし持続性を維持するため安定剤，結合剤，被覆剤を工夫して用いているため抽出率が約50%のものもあり，水でねりつぶしたとき約60%で，良好な結果が得られたのは更に水で温浸する操作を加えたI.—2.による方法であった．

3. DH 市販製剤は簡単な配合処方のものが多く直接エタノール，クロロホルムで抽出し定量できるものもある．しかし抽出率を上げ，配合分量の大きいアセトアミノフェンなどをのぞくためアルカリ性にして抽出した．また内部標準溶液で直接抽出して行った結果，満足する成績が得られた．

4. その他 アルカリ試薬としてアンモニア試液，アンモニア・塩化アンモニウム緩衝液，水酸化ナトリウム試液を用いて行ったが定量結果に差はなかった．ただし持続性製剤には強アンモニア水を用いた．また賦形薬としてメタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどが使われている場合は試料を0.1 N HClで抽出，一定量にした後，その一部をとりI.—1.に従って定量する方法が抽出率が上り良い結果が得られた．

また最近多く市販されてきた製剤として，軟カプセル剤がある．この製剤は製造直後は妨害物質が認められないが，3年以上経過したものは妨害物質が出るものもある．またカプセル中にCPが溶けこむおそれもあるのでカプセルそのままを加温溶解し，酸，アルカリ処理により妨害物質をのぞき，抽出する．

IV. 検量線および再現性

CP, DH のそれぞれ標準品を用い濃度の標準溶液系列を作り，定量法 I.—1., II.にそれぞれ従って操作を行い，I.S.に対するピーク面積比 (x) を求めて検量線を作製するとき，検量線の回帰直線の式は CP (y, mg)：$y=1.739x+0.002$, $r=1.000$. DH (y, mg)：$y=2.294x+0.000$, $r=1.000$である．この式からわかるように2成分ともほぼ原点を通る直線となった．定量法 I.－1.および II.ではフタル酸ジ-n-ブチル(I.S.)に対する比率が CP, DH いずれも 0.5—2.0 の範囲で，装置の設定感度を切り変えずに精度よく測定できた．また再現精度 (C.V,n=3) は CP：0.41 %, DH：0.21 %である．

V. 他の配合成分の影響について

モデル処方およびモデル処方より CP, DH を除いた合成試料について I.S.を加えないで定量法に従い試験した結果，各被検成分および I.S.の保持時間に対応する位置に測定の障害となるピークを認めなかった．また上記合成試料に被検成分を添加した試料につき同様に操作した結果，回収率はいずれも 98.0%以上であり，他の共存成分などによる影響は認められなかった．今回試料とした製剤には以下のような成分が配合されていた．かぜ薬にはアスピリン，アスピリンアルミニウム，アセトアミノフェン，ブセチン，エテンザミド，ノスカピン，dl-塩酸メチルエフェドリン，リン酸ジヒドロコデイン，臭化水素酸デキストロメトルファン，クエン酸カルベタペンタン，ヒベンズ酸チペピジン，グアヤコールスルホン酸カリウム，グリセリンモノグアヤコールエーテル，カフェイン．持続性製剤には塩酸フェニルプロパノールアミン，塩酸フェニレフリン．生薬を含有するかぜ薬にはカッコン，ケイヒ，シャクヤク，カンゾウ，地竜，ショウキョウ，セネガ，タイソウ，マオウ，ベラドンナエキス．ビタミンはチアミン，リボフラビン，アスコルビン酸，ヘスペリジン，ニコチン酸アミドが配合されていた．

これらは GC の結果，通常用いられる配合量では，それぞれの目的成分の定量には直接影響しないことがわかった．

VI. 他の試験法との比較検討

市販製剤中の CP および DH について日局，厚生省の例示試験方法[5]による比色法，HLC 法と今回検討した GC 法の比較を Table 1 および2に示す．比色による CP および DH のそれぞれの呈色反応機構を chart 1に示した．

非水滴定法は抽出液が濁ったものもあり指示薬法のため若干高い値になったと考えられる．CP の臭化シアン法は CP 構造中のピリジン環を臭化シアンで開裂させたのち，アニリンでカップリングさせて生じた呈色を測定する方法である．この比色法の問題点として，試薬の臭化シアンの猛毒性と繁雑な操作，またピリジン環を有す

Table 1 .Comparison of Analytical Methods for Determining CP in Pharmaceutical Preparations.

Sample No.	Colorimetry	GC	HLC
1	91.59	92.13	
2	95.22	95.25	
3	96.35	97.81	
4	101.23	100.85	
5	99.99	101.12	
6	95.58	98.60	
7	103.71	103.50	
8	102.36	102.25	102.40
9	97.52	100.15	99.62
10	105.90	108.10	104.55

Each values are expressed as ratio (%) to labeled amount.

Table 2 .Comparison of Analytical Methods for Determining DH in Pharmaceutical Preparations.

Sample No.	Titration	Colorimetry	GC	HLC
1	96.87		95.68	
2	101.82		96.20	
3	108.43		102.19	
4		98.59	98.82	
5		96.18	97.23	
6		96.82	96.25	
7		103.72	105.60	102.18
8			107.10	104.77

Each values are expressed as ratio (%) to labeled amount.

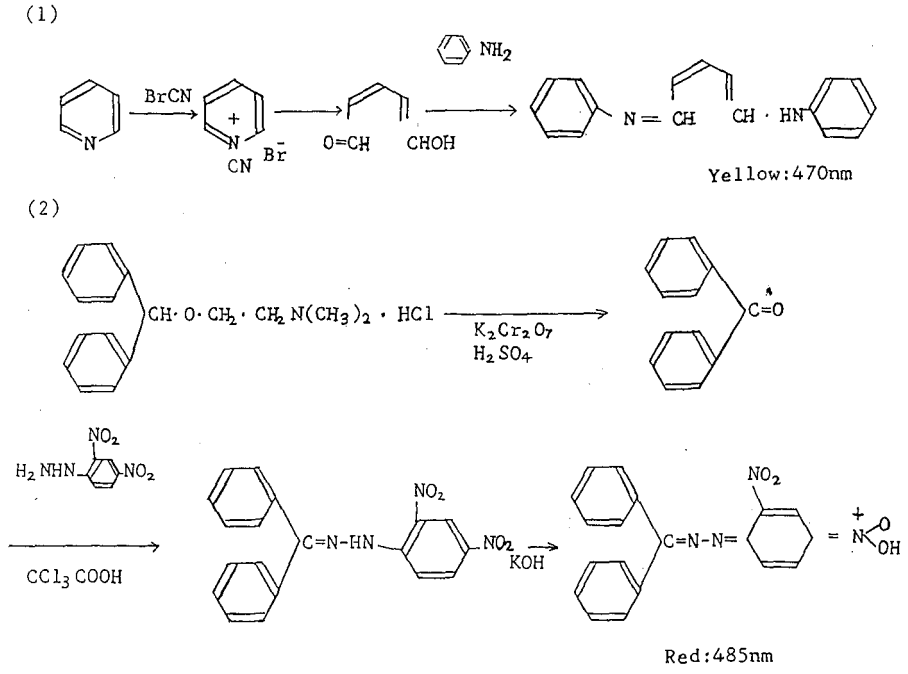


Chart 1　(1) Chlorpheniramine Maleate (Cyanogen Bromide Method)
(2) Diphenhydramine Hydrochloride (2.4−Dinitrophenylhydrazine Method)

るもの，例えば抗ヒスタミン剤のマレイン酸カルビノキサミン，塩酸トリプロリジン，塩酸トンジルアミンおよびニコチン酸アミドが妨害することである．DHの2.4－ジニトロフェニルヒドラジン法は酸化剤でDHを分解してベンゾフェノンとし，ヒドラゾン生成により定量する方法で抗ヒスタミン剤のトンジルアミン，アリメマジン，またアセトアミノフェン，フェナセチンなどが妨害する．HLC法[8]は薬局製剤，点眼剤および点鼻薬など簡単な製剤にはそのまま又は溶媒抽出する簡易な操作で定量できる利点もある．しかし同じ分離用カラム，溶離液を使用しても前回ピークが分離していたものが今回は重なる場合があり，再現性の確保にはGC以上に多くの要因の管理が必要である．また持続性製剤，糖分を含む内服液，生薬成分を含む製剤では前操作の検討も必要となる．以上のように他の試験法は繁雑な操作や妨害成分がある．そこで簡便で迅速かつ精度の高い試験法を確立するためにGC法を選択し，従来の試験法と本法とを比較検討した結果，測定値には差が認められず（$P<0.05$）また測定精度についても規格定量試験として十分信頼できるものと考えられる．

ま と め

かぜ薬の成分の定量法として，従来個々の比色定量法が用いられてきたが，抗ヒスタミン剤として配合されているCPとDHについて簡単な抽出操作で定量の特異性や精度の向上が期待でき，かつ同時定量が可能なGCによる定量法を検討した．その結果，CP，DHいずれもフタル酸ジ-n-ブチル（I. S.），充てん剤10%F-50／ChromosorbW(AW-DMCS)60～80 meshを用いたGC法により迅速かつ精度よく定量することができた．この定量結果は従来の試験法と比較しても差がなく，一斉収去による行政検体の試験法として十分に適用できる．

また配合薬品により定量に障害がある場合は，抽出溶媒，内部標準物質を選択して行うことで適用できるものと考えられる．

文　献

1) 中山京子，高橋美佐子，下平彰男：東京衛研年報32－1，71，1980
2) 中山京子，高橋美佐子，岩崎由美子：東京衛研年報32－1，69，1981
3) 中山京子，高橋美佐子，岩崎由美子，秋山和幸：東

京衛研年報 33, 85, 1982.
4) 日本公定書協会：第十改正　日本薬局方解説書
5) 日本公定書協会編：かぜ薬，解熱鎮痛薬の試験法 1980, 薬業時報社
6) 横田洋一，杉本義則：富山薬事研究所所報(1981. 4～1983. 3) 昭和 56・57 年度合併号, 101
7) 立沢政義, 橋場茂子, 江島　昭：衛生化学, 23, 282, 1977
8) Honigberg, I. L., Stewart, J. T. and Smith, A. P.: *J. Pharm. Sci.*, 63, 766, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 127-132, 1984

ゴム製哺乳用具からの第2級アミンの溶出とN—ニトロソアミンの生成について

水石和子*, 竹内正博*, 風間成孔*

Migration of Secondary Amines from Rubber Nipples and Pacifiers, and Formation of Nitrosamines

KAZUKO MIZUISHI*, MASAHIRO TAKEUCHI* and MASAYOSHI KAZAMA*

Migration test of secondary amines (*sec*-amines) and nitrosamines (NNAs) from rubber nipples and pacifiers was performed according to the German regulation procedure. Rubber nipple samples were soaked in simulate saliva solutions containing sodium nitrite for 24 hr at 40°. Secondary amines migrated into the solutions were dimethylamine (0.50−29 ppm), diethylamine (0.7−330 ppm), di-n-propylamine (0.1−1.8ppm), di-n-butylamine (0.10−93ppm) and piperidine (0.40−19ppm), and NNAs were *N*-nitrosodimethylamine (4.0−15ppm) and *N*-nitrosodiethylamine (13−24 ppb). When the solutions were acidified (pH 1) and incubated at room temperature for 30 min, NNAs were formed corresponding to the *sec*-amines migrated. The levels of NNAs formed were *N*-nitrosodimethylamine, 5.0−75 ppb; *N*-nitrosodiethylamine, 7.5−1300 ppb; *N*-nitrosodipropylamine, 110−400 ppb. The ratios of NNAs formed to the *sec*-amines migrated into the solutions were higer than those to the standard *sec*-amines added.

Keywords : *N*-nitrosamine, secondary amine, rubber nipple, pacifier, thermal energy analyzer, gas-chromatography,

緒　言

ゴム製の哺乳用乳首に加硫促進剤由来の*n*—ニトロソアミン(NNA)およびその前駆物質が含まれていることは，既にヨーロッパ，アメリカで乳児の生命と健康を脅かす問題として取り上げられている[1]．西独では[2]，1982年1月からゴム製哺乳用乳首について溶出規制を行なっており，NNAの溶出量をpH 7で10 ppb以下，pH 1で200 ppb以下と定めている．一方，アメリカではFDAが[3]乳首に含まれるNNAを市販品は1984年1月から，病院用は同3月から60 ppb以下に，さらに1985年1月からは全て10 ppb以下とするいわゆるNNAの材質規制を発表した．

これら両国の規制を考慮して，わが国でも厚生省を中心に規制措置の検討が進められている．現在のところ，西独方式の溶出規制とするか，アメリカ方式の材質規制とするのか明らかでないが，いずれにしても試験法の整備，確立が急がれるところである．著者らは[4]これまで溶出試験について検討してきたが，今回は特に西独の規格試験法に基づいてゴム製哺乳用乳首の溶出試験を行なった．また同時に第2級アミンのニトロソ化率について検討し，若干の知見を得たので報告する．

実　験

1　試料

1983年6月−8月および1984年3月の2回に渡って，都内のデパートおよびスーパーマーケットで購入した乳首およびおしゃぶり20検体を試料とした．

2　試薬

i）NNA標準溶液：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-*n*-ブチルアミン(NDBA)，関東化学製*N*-ニトロソジ-*n*-プロピルアミン(NDPA)，*N*-ニトロソピペリジン(NPi)およびSIGMA社製*N*-ニトロソモルフォリンを特級ジクロルメタンに溶かして使用した．第2級アミン標準溶液：関東化学製ジメチル

* 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

アミン(DMA), ジエチルアミン(DEA), 和光純薬製ジ-*n*-プロピルアミン(DPA), ジ-*n*-ブチルアミン(DBA), ピペリジン(Pi)および東京化成製モルフォリン(Mor)を蒸留水に溶かして使用した. 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 および亜硝酸ナトリウム 30 mg を 1 *l* の蒸留水に溶かした.

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 TEA502 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, 長さ 3 m のガラスカラムに充てんしたものを使用した.

FTD-GC：島津製 GC-7A に FTD を取りつけたものを使用した. カラムは Amipack 124 (80—100 mesh)を内径 3.2 mm, 長さ 2.1 m のガラスカラムに充てんしたものを使用した.

Fig 1, 2 に標準の NNA および第 2 級アミンについて得られたクロマトグラムを示す.

4 操作法

i) 溶出試験：試料 10 g を細切 (5 mm角)し, 亜硝酸ナトリウム 30 ppm を含む人工唾液 50 m*l* に 40°で 24 時間浸漬した. 浸漬液すなわち溶出液 20 m*l* についてジクロルメタン 30 m*l* で 3 回抽出を行い, 抽出液を KD 濃縮器で濃縮し, 濃縮液を試験溶液(A)とした. 他の 20 m*l* には, 1 N 塩酸 4 m*l* を加え pH 1 とし室温で 30 分間放置後, 1 N 水酸化ナトリウム 4 m*l* を加えて中和した. ジクロルメタン 30 m*l* で 3 回抽出し, 抽出液を濃縮し, 濃縮液を試験溶液(B)とした. 試験溶液(A), (B)につい

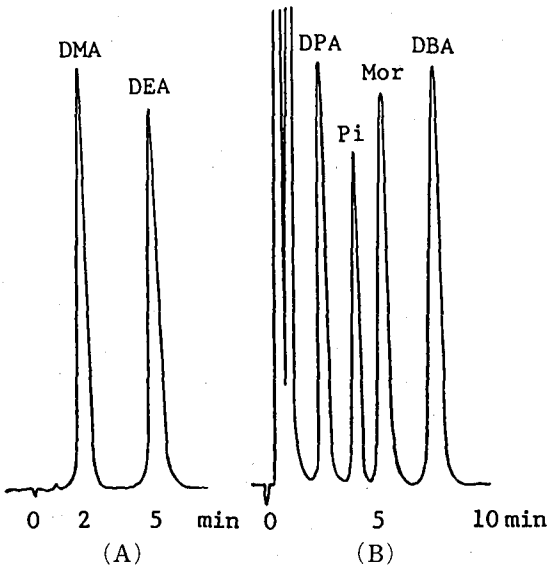


Fig. 1. FTD—GC Chromatograms of *sec*-Amines
Column : Amipack 124 (80—100mesh) 2.1m×3.2mm i.d. Temp.; A, 80°C (DMA, DEA) B, 160°C (DPA, Mor, Pi, DBA)
Detecter : Flame Thermionic Detector
DMA : Dimethylamine
DEA : Diethylamine
DPA : Dinpropylamine
Mor : Morpholine
Pi : Piperidine
DBA : di-n-butylamine

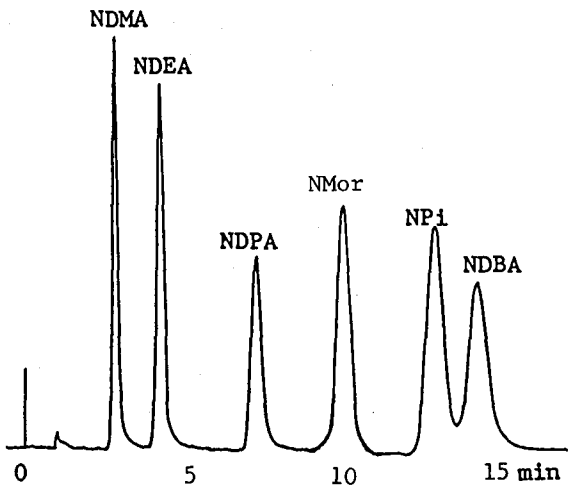


Fig. 2. TEA—GC Chromatograms of Nitrosamines
Column : 20% Versamide 900/Chromosorb WAW (60—80mesh) 3 m× 3 mm i.d., Temp.; 200°C
Detecter : Thermal Energy Analyzer
NDMA : N-Nitrosodimethylamine
NDEA : N-Nitrosodiethylamine
NDPA : N-Nitrosodi-n-propylamine
NMor : N-Nitrosomorpholine
NPi : N-Nitrosopiperidine
NDBA : N-Nitrosodi-n-butylamine

てTEA-GCでニトロソアミンを測定した．残りの溶出液についてFTD-GCで第2級アミンを測定した．(Fig. 3)

ii）標準第2級アミンのニトロソ化：人工唾液20 m*l*にDMA, DEA, DPA, Pi, Mor各100 μg(200 ppm溶液0.5 m*l*)または各1000 μg (2000 ppm溶液0.5 m*l*)を添加し，1 N塩酸4 m*l*でpH 1としてから室温で30分間放置後，生成したNNAをi)に準じて定量した．

結果および考察

i）標準第2級アミンのニトロソ化率：Table 1に示すように各100 μgの標準第2級アミンを添加した場合はNDBAのみの生成が認められ，他のNNAの生成は認められなかった．各1000 μg添加の場合はNDBAおよびNDPAの生成が認められたが，アミン量に対する生成NNAの割合(ニトロソ率)は100 μgの場合と比べてかなり低い値となった．

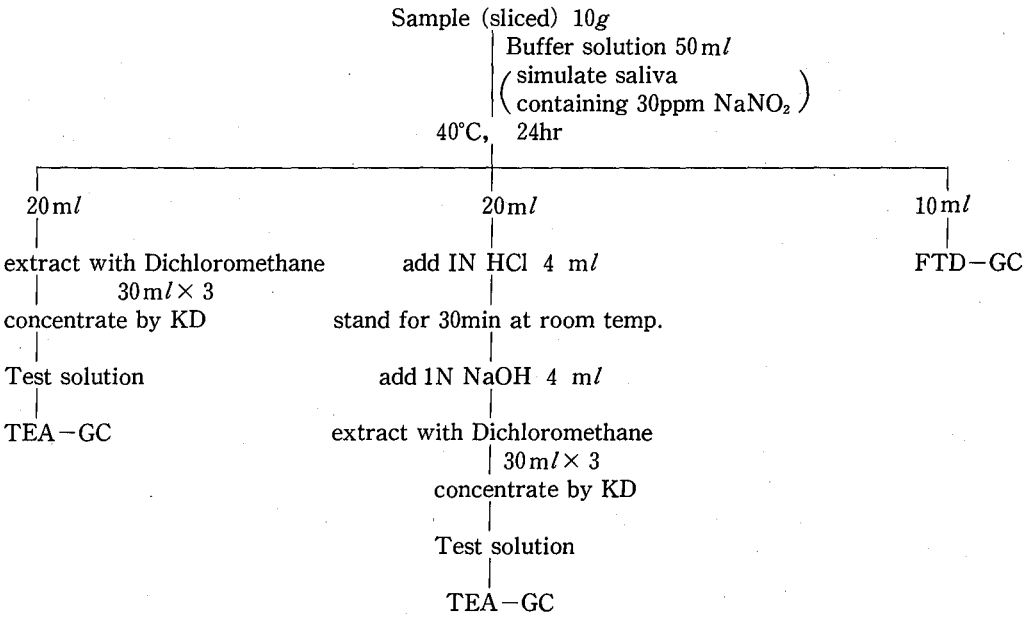


Fig. 3 .Analytical Method for *sec*-Amines and Nitrosamines in Rubber Nipples and Pacifiers

Table 1. Yield of Nitrosamines Formed from Standard *sec*-Amines at pH 1

Amines (Added)[1]	Yield of Nitrosamines (%)		X (cv%)[2]
100μg	NDBA[3]	0.19 −0.44	0.33(27.3)
1000μg	NDPA[4]	0.008−0.02	0.013(30.8)
	NDBA[4]	0.064−0.10	0.075(16.0)

1) Amines added were DMA, DEA, DPA, DBA, Pi and Mor. (Each 100μg or 1000μg)
2) n= 5
3) Only NDBA was formed, the other nitrosamines were not formed.
4) NDPA and NDBA were formed.

Mirvishらによれば[5,6]亜硝酸ナトリウムによる第2級アミンのニトロソ化反応の速度は，pHによって大きく影響されpH 3付近が最高となる．したがって，胃内のpHを想定した本条件下におけるニトロソ化反応は，極めて低い収率でしか進行せず，そのため繰り返し実験のバラツキも非常に大きくなっている．

ii）乳首から溶出した第2級アミンのニトロソ化率：Table 2に示すように，第2級アミンを溶出する乳首A, B, C, Dの4種についてニトロソ化率を検討した．同一試料について5回溶出試験を行ったところ，DMA, DEA, DBA, Piが平均5.5−138 ppm(試料当りの濃度)溶出し，それらの変動係数は4.5−13%であった．また，それぞれのアミン溶出液についてpH 1でニトロソ化反応を行ったときに生成するNNAは平均18−504 ppb（試料当りの濃度）であり，変動係数は20−66%とかなり大きくなった．溶出アミン量に対する生成NNA量の比すなわち生成率は平均0.1−1.0%で，変動係数は22−63%とかなり大きい値であった．以上のことから，溶出液中でのニトロソ化率は標準の第2級アミンの場合より高く，またNNAの生成のバラツキが大きく，同一試料でもニトロソ化にかなり変動がみられることがわかった．

iii）溶出液中のニトロソ化促進因子の有無：溶出液中でのNNAの生成率が標準アミンの場合より高いことは，溶出液中にニトロソ化を促進する因子が存在するか，あるいは他の生成要因が考えられる．ニトロソ化促進因子が存在するとすれば，溶出液に標準のアミンを添加した場合，生成NNAの増加が考えられる．そこで，Table 3に示すようにDMA, DEA, DPA, DBAを溶出する乳首E, F, Gの3種の溶出液に，それぞれの第2級アミンを100 μgおよび1000 μg添加した．その結果，添加量と増加した生成NNA量の比すなわち生成率は100 μg添加の時は0.01−0.8%，1000 μg添加の時は0.002−0.05%と，無添加の時の0.04−75%に比較して著しく低かった．このことから，添加した第2級アミンはほとんどニトロソ化されず，従って溶出液中には遊離の第2級アミンのニトロソ化を促進する因子は存在していないことが考えられ，溶出液中でのNNA生成には，他の要因が関与していることが推定された．

iv）市販品についての実態調査：市販の天然ゴム製，イソプレンゴム製乳首各々10種について溶出試験を行い，溶出アミンおよび生成NNA量を測定した．結果をTable 4，5に示す．溶出アミンは，共にDMA, DEA DPA, DBA, Piの5種類で，NNAは天然ゴム製からはNDMA(4-15ppb), NDEA(13-24ppb)，イソプレゴム製からはNDMA(6.9-14ppb)が溶出した．酸性条件下では溶出アミンに対するNNAが生成した．この時の生成率（生成NNA量／溶出アミン量）は天然ゴム製ではNDMAが0.04−1.4%，NDEAが0.12−1.8%，NDPAが6.1−80%，NDBAが2.0−17%で，イソプレンゴム製ではNDMAが0.16−1.2%，NDEAが0.15−2.2%，NPiが1.2−2.6%であった．天然ゴム製の溶出液におけるNDPA, NDBAの生成率が特に高い値であった．

結　語

ゴム製乳首からニトロソアミンが検出される原因は，

Table 2 .Amounts of *sec*- Amines Migrated from Nipples and Nitrosamines Formed

Sample	Amine	ppm Range	x̄	cv(%)	Nitrosamine	ppb Range	x̄	cv(%)	Nitrosamine/Amine % Range	x̄	cv(%)
A	DMA	48− 58	51	8.8	NDMA	310−500	406	20	0.54−1.0	0.8	24
B	DMA	100−140	124	12	NDMA	53−180	115	41	0.04−0.13	0.1	33
	DMA	120−160	138	13	NDEA	110−350	266	37	0.07−0.30	0.2	42
	DMA	85−110	100	11	NDBA	340−770	504	32	0.31−0.90	0.5	45
C	DEA	5.2−6.2	5.5	8.6	NDEA	4− 33	18	66	0.08−0.56	0.3	63
	Pi	23−26	24	4.5	NPi	87−180	109	36	0.32−0.75	0.5	38
D	DBA	43−50	48	6	NDBA	320−600	470	21	0.70−1.20	1.0	22

n=5

Table 3 . Ratio of Nitrosamines Formed to Standard *sec*-Amines Added

Sample	Amine (Found)		N−NO (Yield)		Amine 100 μg (Added) N−NO (Yield)		Amine 1000 μg (Added) N−NO (Yield)	
		μg	(a) μg	$\frac{(a)}{Amine}$ (%)	(b) μg	$\frac{(b)-(a)}{100}$ (%)	(c) μg	$\frac{(c)-(a)}{1000}$ (%)
E	DEA	19	2.6	14	3.4	0.8	3.1	0.05
	DPA	3.5	0.8	24	1.0	0.2	1.1	0.03
	DBA	120	2.1	1.8	2.6	0.5	2.6	0.05
F	DMA	28	0.01	0.04	0.02	0.01	0.05	0.004
	DEA	9.2	0.08	0.8	0.1	0.02	0.1	0.002
G	DPA	0.4	0.32	75	0.35	0.03	0.64	0.03

Table 4 . Amounts of *sec*- Amines, Nitrosamines and Nitrosatable Compounds Migrated from Natural Rubber Nipples and Pacifiers into Buffer Solution (Simulate Saliva)

Sample	Amine ppm					Nitrosamine ppb					
						pH=8.5		pH=1			
	DMA	DEA	DPA	DBA	Pi	NDMA	NDEA	NDMA	NDEA	NDPA	NDBA
1	1.8	4.6		1.9		5.2 (0.29)		25 (1.4)	7.5 (0.16)		320 (17)
2	0.50	33	1.8	93					260 (0.79)	110 (6.1)	
3	4.4	330	0.40	25			24 (0.01)		400 (0.12)	160 (40)	510 (2.0)
4	1.3	93	1.8	59					1300 (1.4)	400 (22)	
5	14	4.6	0.10	1.7	0.70			5.0 (0.04)	38 (0.83)		
6	4.8	38		3.6		15 (0.31)		18 (0.38)			
7	4.1	8.3		0.80							
8	5.3	12				8.6 (0.16)	13 (0.11)	14 (0.26)	39 (0.33)		
9	7.7	9.4				4.0 (0.05)	15 (0.16)	49 (0.64)	170 (1.8)		
10	29	35	0.20	0.10	0.90			75 (0.26)	370 (1.1)	160 (80)	
Range	0.50～ 29	4.6～ 330	0.10～ 1.8	0.10～ 93	0.70～ 0.90	4.0～ 15 (0.05～ 0.31)	13～ 24 (0.01～ 0.16)	5.0～ 75 (0.04～ 1.4)	7.5～ 1300 (0.12～ 1.8)	110～ 400 (6.1～ 80)	320～ 510 (2.0～ 17)

(in brackets, $\frac{Nitrosamine}{Amine}$ %)

Table 5 . Amounts *sec-* Amines, Nitrosamines and Nitrosatable Compounds Migrated from Isoprene Rubber Nipples and Pacifiers into Buffer Solution (Simulate Saliva)

Sample	Amine				ppm	Nitrosoamine			ppb
						pH=8.5	pH=1		
	DMA	DEA	DPA	DBA	Pi	NDMA	NDMA	NDEA	NPi
1	3.6	8.8					16 (0.44)	22 (0.25)	
2	2.8	8.4				7.6 (0.27)	33 (1.2)		
3	5.3	12				6.9 (0.13)	20 (0.38)	51 (0.43)	
4	19	10			0.4		31 (0.16)	45 (0.45)	
5	9.8	0.7	0.2	0.4	0.8				
6	4.1	7.7				14 (0.34)	35 (0.85)	170 (2.2)	
7	2.9			1.9	19		8 (0.28)		230 (1.2)
8	2.9	6.0				11 (0.38)	33 (1.1)	110 (1.8)	
9	5.5	13	1.3	5.7	2.3			20 (0.15)	60 (2.6)
10	5.5	2.5			1.3				
Range	2.8～ 19	0.7～ 13	0.2～ 1.3	0.4～ 5.7	0.4～ 19	6.9～ 14 (0.13～ 0.38)	8～ 35 (0.16～ 1.2)	20～ 170 (0.15～ 2.2)	60～ 230 (1.2～ 2.6)

(in brackets, $\frac{\text{Nitrosamine}}{\text{Amine}}$%)

カルバメート系およびチウラム系の加硫促進剤といわれている．これらの加硫促進剤が加硫時あるいは成形時に分解して第2級アミンを生成する．この第2級アミンがニトロソアミンの前駆物質と考えられてきた[7]．しかし，今回の検討の結果，乳首から溶出した第2級アミンのニトロソ化率は，標準アミンの場合よりかなり高い値を示した．このことから，加硫促進剤が分解して生じた遊離の第2級アミンが単純にニトロソ化されるのではなく，ニトロソアミンを生成する他の反応経路がある可能性が推測された．これについては，今後の検討課題と考える．

（本研究の概要は第47回食品衛生学会1984年5月で発表した．）

文　献

1) Spiegelhalder, B. and Preusmann, R. : Proceeding of the 7th International Meeting on Analysis and Formation of Nitroso Compounds, p.231 Tokyo, 1981
2) BGBL. IS., 1945, 1981
3) Food Drug Cosmetic Law Reports : 43, 446-43, 467, 1984
4) 水石和子，竹内正博，吉原武俊：東京衛研年報，34, 146, 1983
5) Mirvish, S., et al. : *J.Natl. Cancer Inst.*, 44, 633, 1970
6) Mirvish, S. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 31, 325, 1975
7) 辰野　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.*, 35, 133-137, 1984

家庭用品の衛生化学的研究（第11報）
高速液体クロマトグラフィーによる衣料用衛生加工剤 イルガサンDP-300およびチアベンダゾールの定量法

雨宮　敬*, 酒井正美*, 森　謙一郎*,
鈴木助治*, 風間成孔*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XI)
High Performance Liquid Chromatography of Irgasan DP-300 and Thiabendazole Used as Sanitary Finishing Agent in Textile Products

TAKASHI AMEMIYA*, MASAMI SAKAI*, KENICHIRO MORI*,
SUKEJI SUZUKI* and MASAYOSHI KAZAMA*

A method for determination of thiabendazole and Irgasan DP-300 (triclosan) used as a sanitary finishing agent in textile goods by high performance liquid chromatography on an octadecyl-silica (Finepak SIL C18) column was developed. The recommended conditions for the separation were as follows; column size, 4.6mm i. d. × 250mm; mobile phase, 0.05M ammonium carbonate solution: methanol 25:75; flow rate, 1.0m*l*/min; UV detector, 282nm. Under these conditions, thiabendazole and Irgasan DP-300 were efficiently separated. Seventeen commercial textile samples labeled as sanitarily processed were analysed for these compounds; thiabendazole was detected in 2 samples (275,385ppm), and Irgasan DP-300 in 10 samples (101-1050ppm).

Keywords: thiabendazole, Irgasan DP-300, high performance liquid chromatography, sanitary finishing agent, textile product, household necessity

緒　言

最近，くつ下，下着，寝衣，スポーツウエア等の衣料品やカーテン，カーペット等のインテリア製品に「抗菌，防臭加工」，あるいは「衛生加工」と表示されたものが多くみられるようになってきた．「抗菌，防臭加工」，「衛生加工」は，くつ下等の臭いの発生原因である微生物の繁殖を押えるために施される加工技術である．これらの加工剤として，Fig. 1 に示すようなチアベンダゾール(TBZ)，イルガサン DP-300(トリクロサン，DP-300)が用いられている[1]．

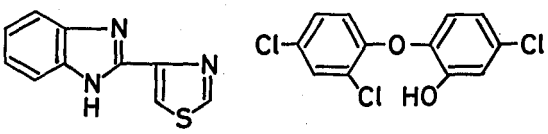


Fig. 1 .Sanitary Finishing Agent

TBZは，主にオレンジ，グレープフルーツ等に防ばい剤として[2]，また DP-300 は，一部の化粧品に殺菌剤として用いられている[3]．最近では，その抗菌，殺菌性から種々の繊維製品にも利用されている．そのため繊維製品に含有される TBZ および DP-300 の分析法を確立し，市販品を調査することが早急に望まれる．しかし，TBZ および DP-300 の分析報告例は，食品[4,5]あるいは化粧品[6,7]についてなされてはいるものの，繊維製品ではみられない．

そこで，今回著者らは，高速液体クロマトグラフィー

* 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

(HPLC)を用いてTBZおよびDP-300を同時に分析する方法を確立することを意図して検討し，市販品についても測定を行い，若干の知見が得られたので報告する．

実験方法

1 試薬 TBZ・DP-300混合標準溶液：TBZ（東京化成工業製）100mgおよびイルガサンDP-300(Ciba-Geigy社製)500mgを精秤し，メタノールに溶かして全量50m*l*とする．この溶液を必要に応じてメタノールで希釈して用いる．シリカゲル60(70—230メッシュ)：Merck社製，セライト：和光純薬工業(Johns-Marville製)，その他の試薬はすべて特級を用いた．

2 装置 高速液体クロマトグラフ：日本分光工業製TWINCLE，カラム：日本分光工業製Finepak SIL C18，検出器：島津製作所製紫外可視分光光度計検出器SPD-1，分光光度計：島津製作所製島津マルチパーパス自記分光光度計MPS-2000

3 試料 昭和58年11月に都内において，「抗菌，防臭加工」あるいは「衛生加工」等の表示のある繊維製品を購入し，試料とした．

4 試験溶液の調製 試料1.0gを細切し，100m*l*ナス型フラスコにとり，メタノール50m*l*を加え，30分間加熱還流し，つぎにガラスろ過器(G2)で温時ろ過する．さらに約40°でロータリーエバポレーターでメタノールを留去し，ついで残留物をメタノール5m*l*に溶かして，セライト1.0gを加え，よく混和し，再度ロータリーエバポレーターでメタノールを完全に除去する．つぎに内径8mm，長さ300mmのカラム管にシリカゲル3gをヘキサンに懸濁させ充塡し，長さ90mmのカラムをつくる．前記のセライトをめのう乳鉢で均一に混ぜ合せ，シリカゲルカラムの上端に積層させる．ヘキサン50m*l*を流してパラフィン類のような脂溶性物質を除去し，さらに酢酸エチル—メタノール混液(80：20)50m*l*でTBZおよびDP-300を溶離させ，約40°でロータリーエバポレーターで濃縮乾固する．これにメタノール5m*l*を加え，HPLC分析用の試験溶液とする．

5 HPLCによる定量 TBZ・DP-300混合標準溶液をメタノールで希釈して下記の分析条件に従って操作し，検量線(Fig. 5)を作成する．試験溶液についても同様に操作し，ピーク高からTBZおよびDP-300の含有量を求めた．

HPLC分析条件 カラム：Finepak SIL C18（10μm，4.6mm i.d.×250mm），溶離液：メタノール：0.05M炭酸アンモニウム(75：25)，流量：1.0m*l*／min，波長：282nm，注入量：5μl

結果および考察

1 試験溶液調製の検討

1—1 繊維製品からの抽出について DP-300は殆んどの有機溶媒に可溶であるが，TBZはメタノール，エタノール等わずかの溶媒にしか溶解しないので抽出溶媒としてメタノールを用いた．また抽出時間については，TBZおよびDP-300を含有しない繊維製品(サラシ布)にTBZ 80μg，DP-300 400μgを添加し，抽出時間を10，20，30，40，50および60分間と変えて，試験溶液調製，HPLC分析条件の項に従って操作した．その結果，20分でほぼ完全に抽出され，30分以後は一定であった．したがって抽出時間を30分とした．

1—2 クリーンアップについて 今回用いた試料のなかには，メタノール抽出後，濃縮操作を行うとかなりの残渣がみられるものがあり，試験溶液の調製に際し，メタノールに不溶物を生ずる場合がある．これらは無極性の炭化水素例えばパラフィン類等が考えられ，逆相系カラムに保持され，影響を与えるので除去しなければならない．そこで，シリカゲルカラムクロマトグラフィーでクリーンアップするため，まずヘキサン50m*l*を流して捨て去り，つぎに溶離液として①酢酸エチル，②酢酸エチル・メタノール（95：5），③酢酸エチル・メタノール(90：10)，④酢酸エチル・メタノール(80：20)および⑤酢酸エチル・メタノール(70：30)を用い，それぞれ50m*l*でTBZおよびDP-300を溶離し，HPLC分析条件に従い操作した結果をFig. 2に示す．その結果，①，②および③の溶離液では，DP-300はほぼ完全にシリカゲルカラムから溶離できたが，TBZにおいては80—90%程度しか溶離しなかった．これに対して④および⑤では，

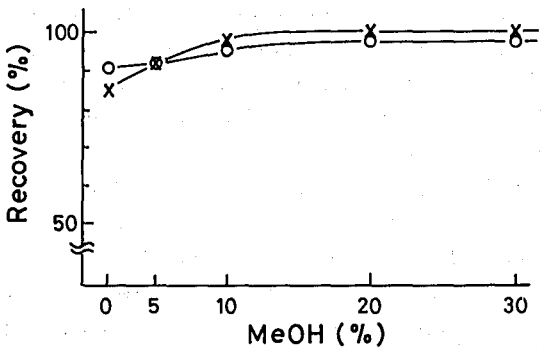


Fig. 2. Effect of MeOH Content in Eluent on Silicagel Column Chromatography
—○—：DP-300, —X—：TBZ

両者とも95%前後回収することができ，良好な結果が得られた．以上のことからシリカゲルカラムクロマトグラフィーに用いる溶離液は，酢酸エチル：メタノール(80：20)とした．さらに，TBZおよびDP-300の溶離に要する液量について確認した．すなわち5 m*l*ずつのフラクションで計50m*l*までとり，HPLC分析条件に従って操作したところ，両者とも5番目のフラクション(25m*l*)に殆んど溶離してくることがわかった．このことからカラムクロマトグラフィーによる溶離を完全に行うため，溶離液の液量を50 m*l*とした．

2　HPLC測定条件の検討

2－1　**紫外部吸収スペクトル**　TBZおよびDP-300をそれぞれメタノールに溶解し，紫外部における吸収をみたところ，TBZの極大吸収波長は299 nm，DP-300は282 nmであった．測定波長299 nmでは，DP-300の感度はTBZに比して悪く，TBZのそれの約1/5程度であった．したがってHPLC分析時におけるDP-300の感度をあげるため分析波長を282 nmとした．

2－2　**移動相溶媒の検討**　カラム充填剤としてFinepak SIL C18を用いたとき，TBZとDP-300の相互分離を達成するため移動相溶媒について検討した．溶媒として中性のメタノール－水，酸性のメタノール－水－酢酸，さらに塩基性のメタノール－水－トリエチルアミンまたは炭酸アンモニウムの混合溶媒系を用いた．まずメタノール－水系では，水の含有量を10，20，30%と増加させたところ，DP-300は検出されたものの，TBZが溶出されず，同時分析されなかった．また，Fig.3に示すようにメタノール－水に0.5%酢酸および0.1%ヘプタンスルホン酸ナトリウムを含む酸性溶離溶媒は，DP-300，TBZの順にピークが出現して一応両者の分離が成り立ったが，TBZのピークが広がり実用的でなかった．つぎにトリエチルアミンを含有する塩基性溶離溶媒を試みたところ，Fig.3のb)に示すようにTBZの溶出が極めてはやいことがわかった．しかし，この場合もTBZのピークがかなりテーリングしていた．TBZの溶出に対して塩基性溶離溶媒が有効であることがわかったので，炭酸アンモニウムを含有する溶媒系を検討したところ，Fig.3のc)に示すようにTBZとDP-300の良好な分離が得られた．そこで，この塩基性溶離溶媒系を移動相として用いたときの分離について詳細に調べるため，Fig.4に示すように0.05 M炭酸アンモニウム溶液－メタノールの混合比を変えて両物質のピークの分離度(R_s)およびキャパシティーファクター(k')を求めた．TBZは0.05 M炭酸アンモニウムの混合比を増加させてもk'は比較的変動がなく，溶出がはやいことがわかった．これに対してDP-300のk'は，ほぼ0.05 M炭酸アンモニウムの含有量に比例して大きくなり，両者の分離がよくなっていることがわかった．このことは単純に水含有量の増大に基因すると考えられるが，いずれにしてもR_sが比例的に増大することが明らかになった．しかし，0.05 M炭酸アンモニ

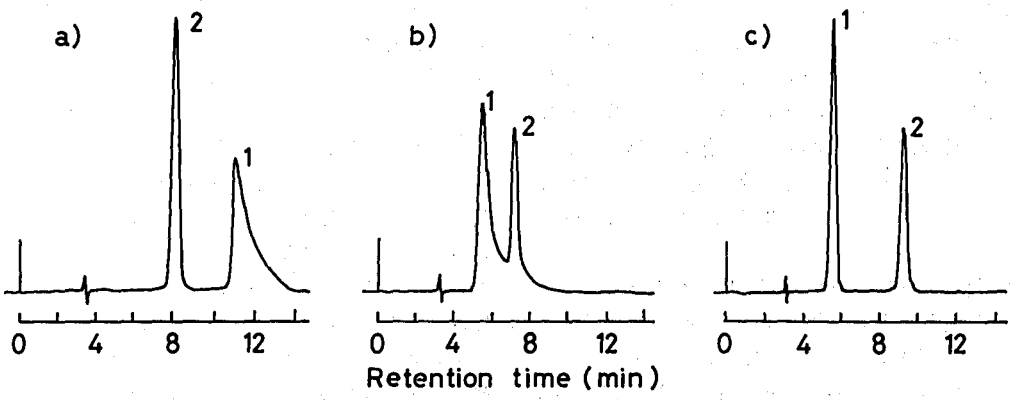


Fig. 3 . Typical High Performance Liquid Chromatograms of TBZ and DP－300
Column : Finepak SIL C18, 10 μm, 4.6mm i.d.×250mm, Flow rate : 1m*l*/min, Detector : UV 282nm, Mobile phase : a) ; 10%H_2O－MeOH contained 0.5% AcOH and 0.1%$C_7H_{15}SO_3Na$ (pH4.0), b) ; MeOH:0.002M $(Et)_3N$＝80 : 20 (pH8.9), c) ; MeOH : 0.05M$(NH_4)_2CO_3$＝75 : 25 (pH9.2), Peaks : 1 TBZ, 2 DP－300.

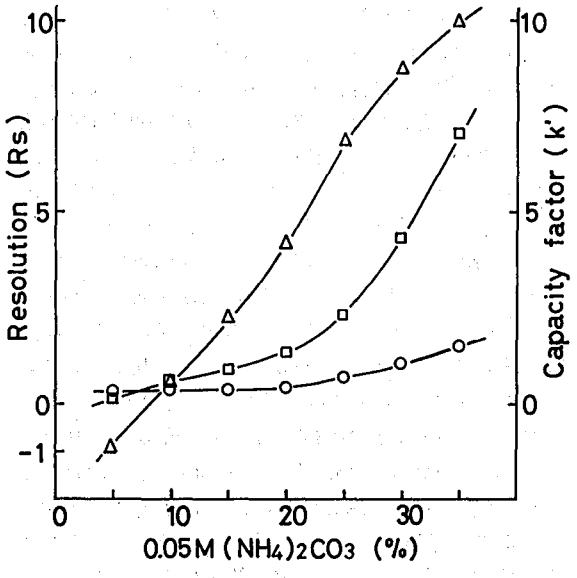


Fig. 4. Effect of 0.05M $(NH_4)_2CO_3$ Content in Mobile Phase on the Capacity Factor (k′) and Resolution (Rs) of TBZ and DP-300
HPLC conditions were the same as those in Fig. 3. −○− : k′ for TBZ, −□− : k′ for DP−300, −△− : Rs

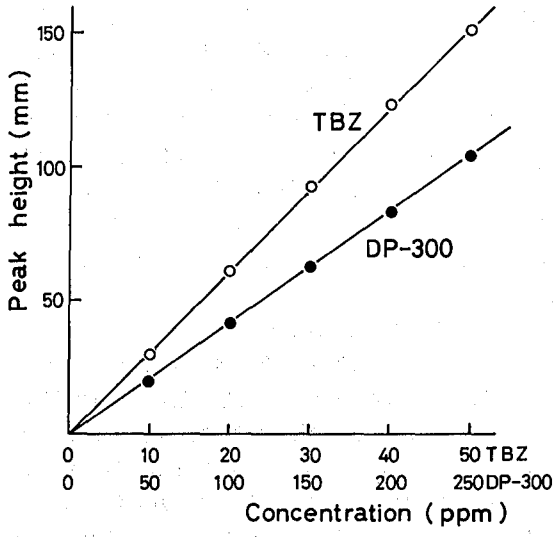


Fig. 5. Calibration Curves for TBZ and DP−300

ウムの含有量が30%以上は，DP-300のk′が大きくなり，ピークのブロード化が顕著である．またR_S>1.5の15%含有量では両者のピークのk′が小さすぎる．したがって，R_Sが大きく，かつDP-300のk′が適正な溶媒混合比は，0.05 M炭酸アンモニウムの含有量が25%のときである．以上の結果から移動相溶離溶媒として0.05 M炭酸アンモニウム：メタノール25：75を用いることにした．

3 検量線の作成 TBZ・DP-300混合標準溶液をメタノールで希釈し，TBZ／DP-300 10／50, 20／100, 30／150, 40／200および50／250ppmの標準系列をつくり，それぞれ5 μlをHPLC分析条件に従って操作し，得られたクロマトグラムのピーク高から検量線を作成した．Fig. 5に示すように両者とも良好な直線性が得られた．

4 妨害物質について 本法を用いて分析を行う際，TBZおよびDP-300以外の抗菌，殺菌剤の使用が予想されるので，これらの化合物がTBZ（保持時間t_R, 5.10 min）およびDP-300 (9.20 min) のピークに妨害するかどうかを検討した．そこで，HPLCに直接下記の化合物を注入してt_Rの観察を行った．これらは3,5,4′−トリブロムサリチルアニリド(3.20 min)，ペンタクロロフェノール(3.24)，3′, 4′, 5−トリクロロサリチルアニリド(3.34)，*p*−ヒドロキシ安息香酸メチル，エチルおよび*n*−プロピル(3.64, 4.06, 4.66)，*p*−クロロ−*m*−クレゾール (5.06)，ジクロロフェン (5.28)，*p*−ヒドロキシ安息香酸*n*−ブチル(5.38)，3−メチル−4−イソプロピルフェノール(5.76)，*p*−クロロ−*m*−キシレノール (6.06)，チモール (6.20)，ヘキサクロロフェン (6.28)，イルガサンCF_3 (11.16)，3,4,4′−トリクロロカルバニリド (11.38) の溶出順であった．この移動相条件では，ビチオノールのピークは広がり，また塩化ベンザルコニウム塩と塩化ベンゼトニウム塩は溶出しない．以上の結果よりDP-300のピークに妨害するものはみられなかったが，TBZに対しては，*p*−クロロ−*n*−クレゾール，ジクロロフェン，*p*−ヒドロキシ安息香酸*n*−ブチルが接近しているので，それらが含有している可能性がある場合には，試験溶液について紫外部吸収等の測定を行って確認する必要がある．

5 添加回収実験 TBZおよびDP-300を含有しない繊維製品（サラシ布）1.0 gにTBZ／DP-300を20／100 μg, 60／300 μgおよび100／500 μgをそれぞれ添加し，試験溶液調製およびHPLC分析条件に従って操

Table 1. Recoveries of TBZ and DP-300 from Cotton Fabrics[a)]

Sample	Sample weight (g)	TBZ			DP-300		
		Added (μg)	Recovery (%)	CV (%)	Added (μg)	Recovery (%)	CV (%)
Cotton	1.0	20	97.1	2.0	100	99.1	1.0
fabrics	1.0	60	93.5	3.0	300	95.3	2.0
(bleached)	1.0	100	94.2	1.6	500	95.2	1.8

a) average value in triplicate

Table 2. Analytical Results of TBZ and DP-300 from Commercial Textile Products

Sample	TBZ (ppm)	DP−300 (ppm)
Socks	385	N.D.
Socks	N.D.	950
Socks	N.D.	620
Socks	N.D.	250
Socks	N.D.	1050
Socks	N.D.	N.D.
Under wear	N.D.	1020
Under wear	N.D.	550
Shirts	N.D.	110
Pillow case	N.D.	580
Foot cloth	275	101
Foot cloth	N.D.	N.D.
Toilet stool cover	N.D.	370
Carpet	N.D.	N.D.
Carpet	N.D.	N.D.
Pajama	N.D.	N.D.
Dish cloth	N.D.	N.D.

ND : not detected

作し，その結果をTable 1に示す．回収率はTBZが94.2—97.1%(変動係数1.6—3.0%)，DP-300は95.2—99.1%（1.0—2.0%）といずれも良好であった．

6 市販繊維製品の分析結果 9種17検体の市販製品について分析を行った結果をTable 2に示す．検体のうちわけは，くつ下6，下着2，寝具2，カーペット2，くつの中じき2，フキン，パジャマ，トイレット用便座カバーの各1検体である．Table 2に示すように，17検体中TBZは2検体，DP-300は10検体に認められた．TBZはくつ下より385ppm，くつの中じきより275ppmが検出され，またDP-300はくつ下の4検体より250—1050ppm，平均718ppm，下着2検体より550, 1020ppm，シーツおよび枕カバーより110, 580ppm，くつの中じき1検体より101ppm，便座カバーより370ppmが検出された．今回，分析した市販製品においては，DP-300の使用が多いことがわかった．なお，両者とも検出されなかった製品については，その他の衛生加工剤として銅化合物[1)]や有機シリコン第四級アンモニウム塩[8)]の使用が考えられる．

ま と め

1 高速液体クロマトグラフィーを用いて繊維製品中の衛生加工剤チアベンダゾールおよびイルガサンDP-300の同時定量法を設定した．

2 分析用カラム充填剤はFinepak SIL C 18，移動相溶離溶媒はメタノール：0.05 M炭酸アンモニウム(75：25)を用いたところ，TBZおよびDP-300のピークは良好な分離を示した．

3 くつ下，下着，寝具等の市販繊維製品17検体について分析を行ったところ，TBZは2検体（275ppm, 385ppm）およびDP-300は10検体（101—1050ppm）から検出された．

謝辞 本研究を行うにあたり，御便宜，御協力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浅井 葵氏ならびに大角悦子氏に深謝いたします．

文 献

1) 技術と人間 Jun., 96, 1983
2) 衛生試験法注解，308，1980 金原出版
3) 香粧品科学，191，1976 日本毛髪科学協会
4) 安田和男，西島基弘，冠 政光：東京衛研年報，33, 191, 1982
5) 井部明広，西島基弘，冠 政光：東京衛研年報，33, 198, 1982
6) 風間成孔，中村義昭，原田裕文：東京衛研年報，31—1, 91, 1980
7) 松島 肇，桜井信太：日衛誌，38－1，418，1983
8) 鈴木助治，酒井正美，森 謙一郎，雨宮 敬，風間成孔：東京衛研年報，35，136，1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 138-145, 1984

家庭用品の衛生化学的研究（第12報）
ガスクロマトグラフィーによる長鎖アルキル第四級アンモニウム塩の分析法について

鈴木助治*, 酒井正美*, 森　謙一郎*, 雨宮　敬*, 風間成孔*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XII)
Analytical Method of Some Long Chain Alkyl Quaternary Ammoniun Compounds by Gas Chromatography

SUKEJI SUZUKI*, MASAMI SAKAI*, KENICHIRO MORI*,
TAKASHI AMEMIYA* and MASAYOSHI KAZAMA*

A new method for determination of long chain alkyl quaternary ammonium compounds was developed. It consists of chemical derivatization which converted their non-volatile compounds into the volatile *n*-1-olefine suitable to gas chromatography. The ammonium compounds were decomposed to the corresponding *n*-1-olefine with *tert*-BuOK in benzene-dimethylsulfoxide (8:2) under refluxing for 30 min. The reaction mixture was washed twice with 5% HCl solution, once with 10% NaCl solution, evaporated and dried under reduced pressure. The residues were dissolved in hexane and then the formed *n*-1-olefine was measured by gas chromatograph equipped with a flame ionization detector on 5% SE-30 column. This method was successfully applied to determination of dimethyltrimethoxysilylpropyloctadecylammonium chloride used as sanitary finishing agent in commercial textile products. The method may be used as an expedient analytical procedure for a great variety of quaternary ammonium compounds in textile goods, cosmetics and other household products.

Keywords : quaternary ammonium compound, gas chromatography, sanitary finishing agent, texitile product

緒　言

長鎖アルキル第四級アンモニウム塩は，広範な用途をもつ陽イオン界面活性剤であり，家庭用品や医療品に使われている．例えば塩化ベンザルコニウム塩（4e, 4f）は，手指，皮膚や器具の消毒薬として用いられたり，防腐剤として医療用清浄綿や衛生ティッシュにも使用されている．また，トリメチルアルキル第四級アンモニウム塩（4a～4d）は，頭髪の柔軟剤として化粧品のヘアーリンス製剤に含まれている．さらに，繊維製品の帯電防止剤や柔軟剤（4a～4d, 4g）として仕上加工にも使われている．

最近，繊維製品に衛生加工剤として有機シリコン系第四級アンモニウム塩（4h）が加工されたものが多く市販されている．これは抗菌防臭を目的としてくつ下，タオル，寝衣，スポーツウェアなど各種の衣料品に加工処理されたものであり，一種の有機シリル化剤である4hがセルローズ繊維の表面に化学結合し展着したものである．われわれは，このような衛生加工剤について①市販の繊維製品にどの程度使われているかその実態が不明である．②繊維に化学結合しているので，これを何らかの形で切断する必要があり，③従って通常の分析法を適用しても直接分析することは困難である等の理由から分析法の開発を目的として検討を行ってきた．

現在までに長鎖アルキル第四級アンモニウム塩の分析法は，比色法[1-3]，滴定法[4-6]，高速液体クロマトグラフィー法[7-9]，ガスクロマトグラフィー法[10-13]など多くの報告がなされている．これらを直接繊維中の4hの分析に適用することは困難であるが，繊維からの切断を考え

* 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

ると熱分解法[11,12]が有望である．しかし，この方法も試料を試験管やアンプル中に封入して加熱処理するなど不利な点を有するため，この点も含めて種々検討の結果，ベンゼン中カリウム *tert*－ブトキシドを塩基として緩和な条件で反応させると，4 hのオクタデシル基に由来する1－オクタデセンの生成が認められ，分析に応用できることがわかった．そこで，この分解反応を長鎖アルキル第四級アンモニウム塩に適用したところ，一般的な分析法として成立することが認められたので報告する．

実験の部

1．試薬 塩化トリメチルアルキル第四級アンモニウム塩(ドデシル4 a，テトラデシル4 b，ヘキサデシル4 c，オクタデシル4 d)，塩化ベンザルコニウム塩(テトラデシル4 e，ヘキサデシル4 f)，塩化ジメチルジオクタデシル第四級アンモニウム塩(4 g)（東京化成工業製），塩化ジメチルトリメトキシシリルプロピルオクタデシル第四級アンモニウム塩（4 h）（DOW CORNING 5700®，42%メタノール溶液を濃縮乾固したもの，ダウコーニング社製），1－ドデセン，1－テトラデセン，1－ヘキサデセン，1－オクタデセン，カリウム *tert*－ブトキシド（*tert*－BuOK)（和光純薬工業製），重クロロホルム(99.7%，Merck)，その他の試薬はすべて特級を用いた．

第四級アンモニウム塩標準溶液：4 a～4 hの100 mgをそれぞれ精秤し，ジメチルスルホキシド(DMSO) 20m*l*に加温して溶かし，ベンゼン(Bz)を加えて100m*l*とした．これをBz—DMSO（8：2）の混合溶媒で希釈して100 ppm溶液を調製し標準溶液とした．

2．装置 水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ(FID-GC)：島津製作所製GC-4CM・PFE型，ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)：島津製作所製LKB-9000型，核磁気共鳴装置（^{1}Hおよび^{13}C-NMR)：日本電子製JEOL FX-270型，^{1}H269.65MHz，^{13}C67.8 MHz．

3．試験溶液の調製 100m*l*のナス形フラスコに第四級アンモニウム塩の一定量（1 mg以下）をとり，これに *tert*-BuOK 100 mg，Bz-DMSO（8：2）の混合溶媒25 m*l*を加え，還流冷却器を付して30分間加熱還流する．冷後，反応溶液を綿栓ろ過して100m*l*の分液ロートに移し，フラスコはBz 5 m*l*で2回洗って合する．このBz層を5%塩酸20m*l*で2回，ついで10%食塩水10m*l*で1回それぞれ15秒間振とう洗浄する．Bz層を100m*l*のナス形フラスコに分取し，ロータリーエバポレータを用いて40°でBzを留去し蒸発乾固する．ヘキサン2m*l*を加えて残留物を溶かしGC用試験溶液とする．

繊維製品の4 h分析用試験溶液の調製 昭和58年9月～12月に購入した市販製品および実験加工布については，試料0.2 gを100 m*l*のナス形フラスコに秤取し，これに *tert*-BuOK 200 mg，Bz-DMSO（8：2）の混合溶媒25m*l*を加え，以下前記の方法に従って操作し，ヘキサン5 m*l*を加えて残留物を溶かしGC用試験溶液とする．

実験加工布 綿100%の布地をDOW CORNING 5700®（42% 4h含有メタノール溶液）のパンフレットに記載された方法に準拠して作製した．すなわち，綿布地5 gを100m*l*のビーカにとり，これにDOW CORING 5700® 0.5m*l*（約200mg）を浴比1：10になるように調製した希釈水溶液50m*l*を加え，室温に30分間放置した．この布を取り出してよくしぼり，風乾後40°で30分間乾燥したのち，温度を100°まで徐々に昇温させてから30分間放置した．放冷後，加工布の重量を測定した．反応残液および加工に用いたのと同量のDOW CORNING 5700®について，その中の4 hを分析法に従ってそれぞれ測定し，加工布の加工量を求めた[14]．

4．分析操作 各第四級アンモニウム塩標準溶液より4 a～4 hをそれぞれ80，160，240，320，400 μgとり，以下試験溶液の調製の項に従って操作し，40，80，120，160，200ppmの濃度系列をつくり，これらと試験溶液の5 μlをGCに注入する．下記のGC測定条件に従って測定し，得られたピーク高より検量線を作成して試験溶液中の第四級アンモニウム塩の濃度を求める．

FID-GC測定条件：カラム5% SE-30 (Chromosorb WAW-DMCS, 80～100mesh)，内径3 mm×長さ2 m，注入口温度；250°，カラム温度；120°～200°，キャリアガス；N_2 40m*l*／min，H_2 0.7kg／cm^3，air 1 kg／cm^3

TLC：シリカゲル60F_{254}(Merck)，0.25mm，展開溶媒；ヘキサン，RP-18F_{254}S(Merck)，0.25 mm，展開溶媒；メタノール，発色；20%硫酸を用いて加熱した．

GC-MS測定条件：10%OV-1(Chromosorb WAW-DMCS, 80～100mesh)，内径3 mm×長さ1 m，カラム温度；110°～180，キャリアガス；N_2 30m*l*／min．

NMR：試料を重クロロホルムに溶かし，綿栓ろ過後，内径5 mmのサンプル管に入れて測定した．テトラメチルシランを基準物質にして化学シフト（δppm）を示した．

実験結果および考察

1．熱分解反応の検討

宇野ら[11]は，塩化ベンザルコニウム塩の熱分解において，長鎖アルキル基に対応する *n*－1－オレフィンの生成を確認している．この分解は第四級アンモニウム塩のオニウム構造に特有な反応と考えられるから，*n*－1－

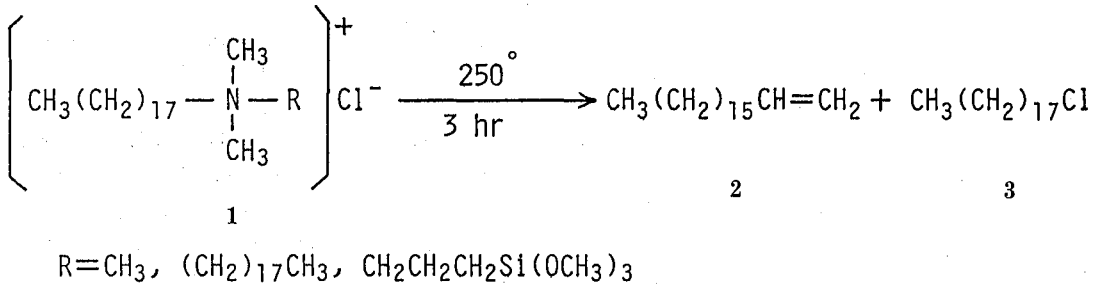


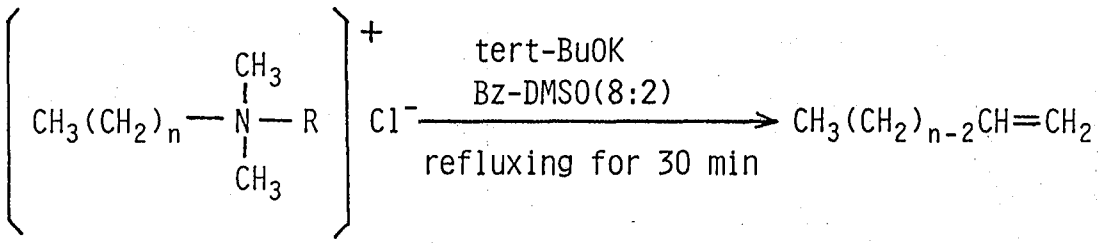
Chart 1

Table 1. NMR Spectral Data of Pyrolysis Products (**2** and **3**)

		2	**3**
^{1}H−NMR ($CDCl_3$)	δppm	0.88 (3H, t, J=6.6Hz) 1.1 − 1.5 (28H) 2.0 (2H, m, J=6.6Hz) 4.95 (2H, m), 5.80 (1H, m)	0.88 (3H, t, J=6.6Hz) 1.1−1.5 (30H) 1.77 (2H, m, J=6.6Hz) 3.53 (2H, t, J=6.6Hz)
^{13}C−NMR ($CDCl_3$)	δppm	14.2 (q), 22.7 (t), 29.0 (t) 29.2 (t), 29.4 (t), 29.6 (t) 29.7 (t)×8, 32.0 (t), 33.8 (t) 114.1 (t), 139.3 (d)	14.2 (q), 22.7 (t), 26.9 (t) 28.9 (t), 29.4 (t), 29.5 (t) 29.6 (t), 29.7 (t)×8, 32.7 (t) 32.9 (t), 45.2 (t)

オレフィンの生成が定量的にゆくならば，分析法として成立するはずである．そこで，まず長鎖アルキル基に着目して第四級アンモニウム塩の熱分解について検討した．Chart 1に示すような長鎖アルキル基の炭素数が18であるオクタデシル基とRがメチル基，オクタデシル基またはトリメトキシシリルプロピル基を有する第四級アンモニウム塩1について，ガラス封管中で250°，3時間加熱処理した．反応物をヘキサンに溶かしてTLC(シリカゲル60 F_{254},溶媒；ヘキサン)を行ったところ，いずれも *Rf* 値0.88と0.75の2つのスポットが観察された．そこで，それらをシリカゲルクロマトグラフィー（シリカゲル60, Merck, 内径10mm×長さ10cm, 溶媒；ヘキサン)に付し化合物2と3を得た．Table 1のNMRデータより，2は^{1}H-NMR；δ 4.95 (2 H,m)，5.80 (IH,m) ppm, ^{13}C-NMR；δ114.1(t), 139.3(d)ppmに一置換二重結合のシグナルが認められるが，これに対して3はこれらのシグナルが観測されず，かわりにδ 3.53(2 H,t,J=6.6Hz)，δ 45.2(t)ppmと比較的低磁場に1個のメチレン基の存在が確認され，また，MSはそれぞれm/e 252(M^+), 288(M^+)を示すことから，2は1−オクタデセン，3は1−塩化オクタデカンと推定された．従って，第四級アンモニウム塩は，熱分解により明らかに宇野ら[11]の結果と相異して *n*−1−オレフィン以外に塩基アルキルを生成することがわかった．なお，長鎖アルキル基の炭素数が16である塩化ベルザルコニウム塩においても同様の結果を得ている．このような封入管中の熱分解では，例えば塩素アニオンによる置換反応と脱離反応が同時におこると考えられ，選択的に *n*−1−オレフィンを得ることができない．一般に塩化アルキルはナトリウムメトキシドやナトリウムエトキシド等の塩基によりオレフィンを生ずることが知られている．このことから3についてBz中 *tert*-BuOK の存在下加熱すると，容易に2に変換することができた．そこで，今度は第四級アンモニウム塩1から直接2への誘導を試みた．BzまたはBz-DMSO中 *tert*-BuOK と加熱処理したところ，3は生成せず，主として2のみが得られることがわかった．そこで，他の長鎖アルキル第四級アンモニウム塩においても，このような *n*−1−オレフィンを生成する脱離反応が一般的に成立するかどうかを検討した．

2. *tert*-BuOK存在下の分解反応の検討 Chart 2に示す長鎖アルキル第四級アンモニウム塩4において，Table 2に示すようなRおよびnを有する化合物について，Bz-DMSO(8:2)中 *tert*-BuOK の存在下加熱還流すると，いずれも容易に *n*−1−オレフィン5が生成してくる．TLC (RP-18F_{254}S, 溶媒；メタノール) の *Rf* 値およびGC-MSの観察 (Table 2)，また別に^{1}H-NMR



4 5

Chart 2

Table 2. Formation of *n*-1-Olefine from Some Quaternary Ammonium Compounds

Quaternary ammounium compd.			*n*-1-olefine	*n*−1−olefine	
4	R	n	TLC(*Rf*-value)[1]	GC-MS(M^+,m/e)[2]	**5**
4a	CH_3	11	0.36	168	1-dodecene
4b	CH_3	13	0.30	196	1-tetradecene
4c	CH_3	15	0.23	224	1-hexadecene
4d	CH_3	17	0.16	252	1-octadecene
4e	$CH_2C_6H_5$	13	0.30	196	1-tetradecene
4f	$CH_2C_6H_5$	15	0.23	224	1-hexadecene
4g	$(CH_2)_{17}CH_3$	17	0.16	252	1-octadecene
4h	$CH_2CH_2CH_2Si(OCH_3)_3$	17	0.16	252	1-octadecene

1) Pre-coated RP-18 $F_{254}S$ (Merck), solvent : MeOH, spray reagent : 20% H_2SO_4 (with heating)
2) 10% OV-1, 3mmϕ×1 m, N_2 30 m*l*/min, 70eV

の測定結果より，Rがメチル基の塩化トリメチルアルキル第四級アンモニウム塩4 a, 4 b, 4 c, 4 d, からアルキル基に対応する1−ドデセン，1−テトラデセン，1−ヘキサデセン，1−オクタデセンの生成を確認した．また，Rがベンジル基の塩化ベンザルコニウム塩4 e, 4 fからやはり1−テトラデセン，1−ヘキサデセンが生成し，さらにRがオクタデシル基の塩化ジメチルジオクタデシル第四級アンモニウム塩4 gとRがトリメトキシシリルプロピル基の塩化ジメチルオクタデシル第四級アンモニウム塩4 hからもそれぞれ1−オクタデセンの生成が認められた．従って，いずれのタイプの第四級アンモニウム塩においても，優先的に親水基が脱離してアルキル基に対応する*n*−1−オレフィンが生成すると考えられる．この脱離反応は，前述の封入管中の熱分解と異なり，溶液中で極めて容易に進行し，選択的に*n*−1−オレフィンを与える．そこで，つぎに分析条件の検討を行った．

3．分析条件の検討　*tert*-BuOKの添加量　4 a〜4 dの各1 mgに対してFig. 1に示すように*tert*-BuOKの添加量を5〜120mgと増加して反応させ，それぞれ1−ドデセン，1−テトラデセン，1−ヘキサデセン，1−オクタデセンの生成をFID-GCのピーク面積で観察したところ，約60mg以上の添加量で*n*−1−オレフィンの生成率が一定となった．従って，*tert*-BuOKの添加量を100mgに設定した．

反応溶媒　溶媒としてBz-DMSOの混合溶媒について検討を行った．すなわち，4 a〜4 dの各1 mgに*tert*-BuOKを100mg加え，溶媒25m*l*中のDMSOの濃度をFig.2に示すように0〜30%と増加して反応させたところ，DMSOの濃度が10%以上で*n*−1−オレフィンの生成率が一定となった．そこで，反応溶媒としてBz-DMSO(8：2)を用いた．このような効果は，DMSOがKカチオンを溶媒和し，その結果*tert*-BuOアニオンが活性化されオレフィンの生成が増加したものと考えられる．なお，メタノール，エタノール，水，アセトン，クロロホルム等の溶媒は，この反応を阻害するので，分析の際これらの溶媒の混入をさける必要がある．

反応時間　4 a〜4 dの各1 mgに対して*tert*-BuOK

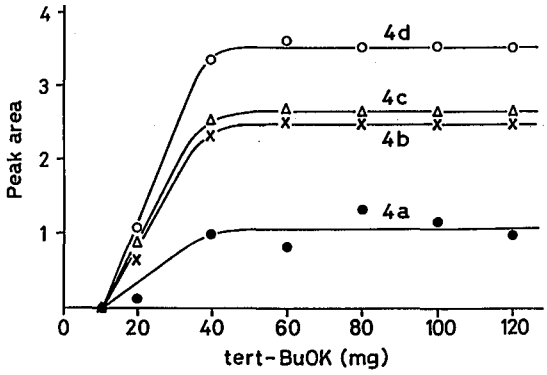


Fig.1 Effect of Amount of *tert*-BuOK on the Formation of *n*− 1 −Olefine from Trimethyl alkyl quaternarary ammouium Compounds (**4 a, 4 b, 4 c** and **4 d**)
GC conditions were the same as those in Fig.4.

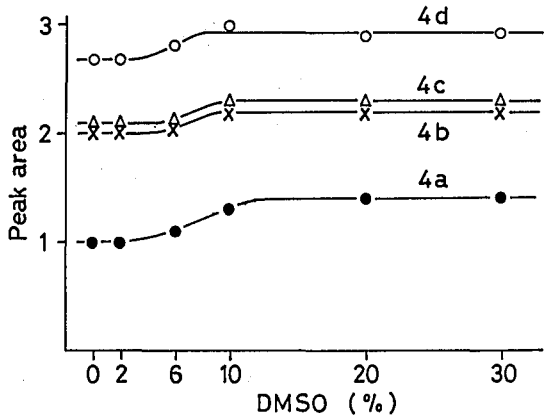


Fig.2 Effect of DMSO Concentrations on the Formation of *n*−1− Olefine from Trimethyl alkyl quaternary ammonium Compounds (**4 a, 4 b, 4 c** and **4 d**)
GC conditions were the same as those in Fig.4.

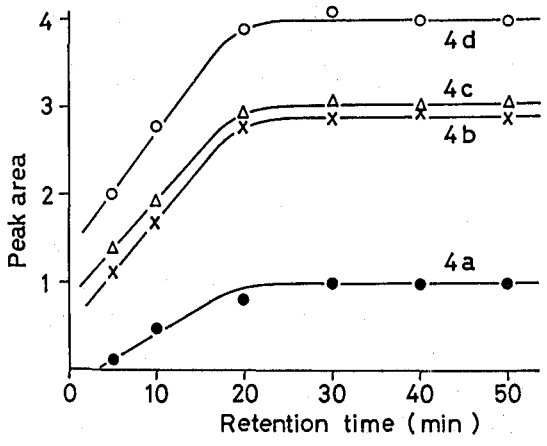


Fig.3 Effect of Reaction time on the Formation of *n*− 1 −Olefine from Trimethyl alkyl quaternary ammonium Compounds (**4 a, 4 b, 4 c** and **4 d**)
GC conditions were the same as those in Fig.4.

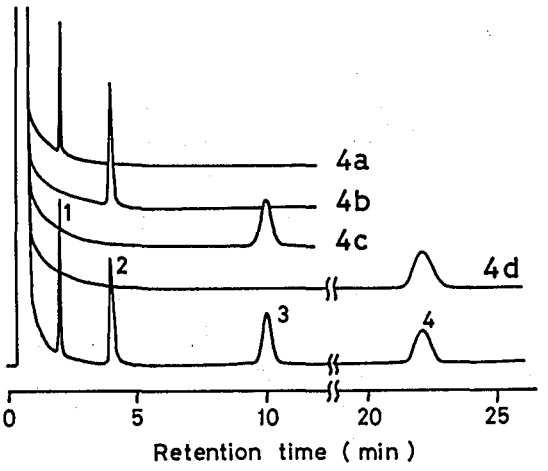


Fig.4 Typical Gas Chromatograms of *n*−1− Olefine formed from Quaternary Ammonium Compounds(**4a, 4b , 4 ,c** and **4d**)
Conditions : 5%SE−30/Chromosorb WAW − DMGS (80 − 100 mesh), 3 mmϕ × 2 m, column temp.160°
Peaks : 1 ; 1−dodecene,
2 ; 1−tetradecene,
3 ; 1−hexadecene,
4 ; 1−octadecene

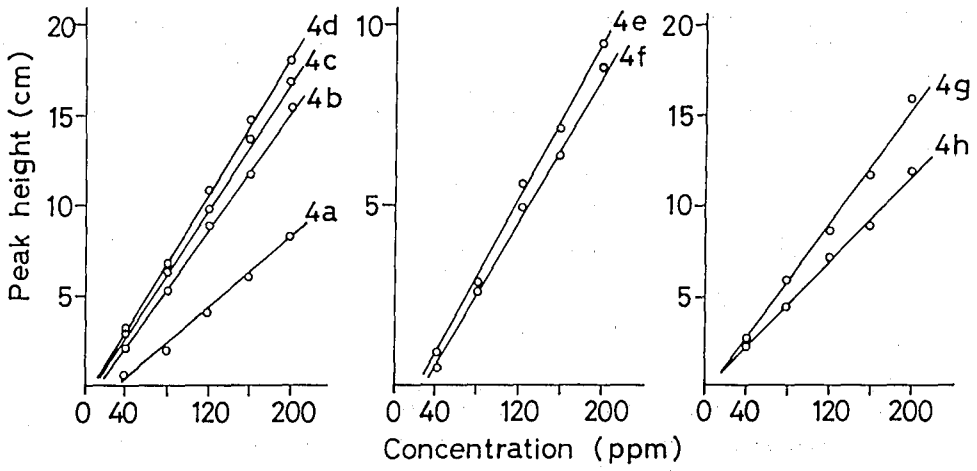


Fig.5 Calibration Curves for Quaternary Ammonium Compounds
Column temp. : **4 a** ; 120°, **4 b, 4 e** ; 155°, **4 c, 4 f** ; 180°, **4 d, 4 g, 4 h** ; 200°, Range : **4 e, 4 f** ; $10^2\times2$, **4 g, 4 h** ; $10^2\times4$, **4 a, 4 b, 4 c, 4 d** ; $10^2\times8$,
Other conditions of GC were the same as those in Fig. 4.

100mg, Bz-DMSO(8：2)25m*l* を加え，Fig. 3 に示すように還流時間を 5 ～50分間と変えて反応させたところ，約20分間以上の加熱還流を行えばよいことがわかった．従って，還流時間を30分間行うことにした．

4．分析法および検量線 以上の分析条件の検討結果から分析法を「実験の部 3 および 4」に示すように設定した．そのときの代表的なガスクロマトグラムを Fig.4 に示す．カラム温度 160°で塩化トリメチルアルキル第四級アンモニウム塩 4 a, 4 b, 4 c, 4 d は，それぞれ 1－ドデセン，1－テトラデセン，1－ヘキサデセン，1－オクタデセンに相当するピークが得られ，この反応によって特に妨害するピークはみられなかった．検量線は 4 a～4 h の各第四級アンモニウム塩について，「実験の部 4」の分析操作に従って作成した．Fig.5 に示すように *n*－1－オレフィンの保持時間が約 5 分になるようにカラム温度を 120°, 155°, 180°, 200°に設定して測定したところ，検量線は40～200ppm の濃度範囲でいずれも良好な直線性を示した．従って，本分析法により長鎖アルキル第四級アンモニウム塩の同族体の定量分析が可能である．

5．繊維製品中の有機シリコン系第四級アンモニウム塩 4 h の分析例 4 h はセルローズ繊維の水酸基とシリエーテル結合した化学結合型の第四級アンモニウム塩であるから，直接繊維を *tert*-BuOK で処理してオクタデシル基を切断し，生成した 1－オクタデセンを測定して 4 h の分析を行った．本分析法の適用に当っては，検討の結果，細切した試料 0.2 g に対して *tert*-BuOK を同量添加し，また繊維製品中の 4 h の含有量を考慮して試験溶液を 5 m*l* に調製した．4 h の添加回収実験を行ったところ，Table 3 に示すように綿布地に単純に 200～800 μg 添加したときの回収率は，85.8～91.4 %であり，その再現性も良好であった．また，DOW CORNING 5700® のパンフレットに記載された方法に従い，「実験の部 3」に示すように 4 h を展着した実験加工布を作製し，これからの回収率をみたところ，91.3 %でほぼ定量的に適用できることがわかった．そこで，「衛生加工」や「抗菌防臭加工」の表示がなされている市販の繊維製品について 4 h の含有量を測定した (Table 4)．その結果，22 検体中 5 検体より 4 h が検出され，その含有量は 0.10～0.74 %であった．なお，残りの繊維製品については，第四級アンモニウム塩以外の衛生加工剤としてチアベンダゾールやイルガサン DP-300 などが使用されており，その分析結果は，すでに前報[15]に報告してある．

Table 3. Recoveries of Silicone Quaternary Ammonium Chloride (**4h**) from Cotton Fabrics

Sample	Added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)	CV (%)
Cotton fabrics (diaper)	200 [1]	180, 180, 188	91.4	2.2
	400	342, 350, 337	85.8	1.6
	600	529, 543, 540	89.6	1.2
	800	713, 711, 705	88.6	0.5
Processed Cotton fabric (diaper)	1584 [2]	1516, 1446, 1375,	91.3	4.0

1) Known amount of **4h** added to 0.2*g* of the untreated cotton fabrics

2) Calculated concentration of **4h** in 0.2*g* of the cotton fabric treated with the proposed manner of pamphlet information (DOW CORNING)

Table 4. Analyzed Cases of Silicone Quotenary Ammonium (**4h**) in Commercial Cotton Fabrics

Sample	Material	Content (%)
Towel	Cotton 100%	0.32
Dish cloth	Cotton 100%	0.26
Dish cloth	Cotton 100%	0.10
Socks	Cotton 100%	0.74
Pajamas	Cotton 70% Polyester30%	0.18

結　論

塩化長鎖アルキル第4級アンモニウム塩は，ガラス封管中で熱分解すると$n-1$－オレフィンと塩化アルキルが生成するのに対し，塩基として *tert*-BuOK を用いて加熱還流すると選択的に$n-1$－オレフィンが生成することがわかった．この分解反応により第四級アンモニウム塩の簡便な分析法を確立した．本法は長鎖アルキル基にもとずく同族体分析が可能であり，特に置換基にベンジル基のような発色団を有せず，高速液体クロマトグラフィーが適用できないときに有効である．応用例で示したように繊維製品中に化学結合した有機シリコン系第四級アンモニウム塩の分析においては，直接アルキル基を切断でき，実用的な方法である．また，清浄綿や衛生ティッシュの抗菌剤である塩化ベンザルコニウム塩，ヘアーリンス製剤や繊維製品の柔軟剤，帯電防止剤であるトリメチルまたはジメチル長鎖アルキル第四級アンモニウム塩の分析に適用できると考える．

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，浅井　葵ならびに大角悦子氏に深謝致します．

文　献

1) M. E. Auerbach, *Anal. Chem.*, 15, 492, 1943
2) C. W. Ballard, J. Isaacs, and P. G. W. Scott. *J. Pharm. Pharmacol.*, 6, 671, 1954
3) 1. g. Chatton, and K. O. Okamura, *J.Pharm. Sci.*, 62, 1328, 1973
4) St. J. H. Blakeley, and V. J. Zatka, *Anal. Chim. Acta*, 74, 139, 1975
5) L. D. Metcalfe, R. J. Martin, and A. A. Schmitz *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 43, 355, 1966
6) E.R.Brown, *J.Pharm. Pharmacol.*, 15,379, 1963
7) R. C. Meyer *J. Pharm. Sci.*, 69, 1148, 1980
8) J. Crommen, *J. Chromatogr.*, 193, 225, 1980
9) K. Nakamura, Y. Morikawa, I. Matsumoto, *J.Am. Oil Chem. Soc.*, 58, 72, 1981
10) I. D. Metcalfe, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 40,25, 1963
11) 宇野豊三，宮嶋孝一郎，中川照真，分析化学：15, 384, 1960

12) E. C. Jennings, and H. Mitchner, *J. Pharm. Sci.*, **56**, 1590, 1967
13) S.L.Abidi, *J. Chromatogr.*, **200**, 266, 1980
14) 鹿庭正昭，小嶋茂雄，中村晃忠，佐藤洋子：衛生化学，**25**，80，1979
15) 雨宮　敬，酒井正美，森謙一郎，鈴木助治，風間成孔：東京衛研年報，**35**，131，1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 146-151, 1984

高速液体クロマトグラフィーによる塩基性色素の分析

伊藤弘一*, 観照雄*, 中村義昭*,
岸本清子*, 風間成孔*

High-Performance Liquid Chromatographic analysis of basic coal-tar dyes

KOICHI ITO*, TERUO KAN*, YOSHIAKI NAKAMURA*,
KIYOKO KISHIMOTO* and MASAYOSHI KAZAMA*

Separation and determination of basic coal-tar dyes (C. I. No. 45170, 42500, 42000, 42555 and 41000) have been studied by high-performance liquid chromatography (HPLC). The combined use HPLC and spectrophotometry in visible ranges (420, 500 and 600 nm) enabled detection of these compounds selectively. As the high affinity of imminium cations for active sites of the stationary phase caused difficulties for reversed-phase HPLC with pure solvents, organic electrolytes were added to the mobile phase to facilitate elution of the dyes. Effects of chromatographic variable factors on the dye retentivity were investigated. The retention time decreased with increasing concentration of added ionic reagent. Satisfactory results were obtained by using naphthalenesulfonic acid as the ionic reagent.

The investigated methods were suitable for the quantitative analysis of Rhodamine B (D&C Red No.19). Plots of peak area vs. amount of Rhodamine B showed linearity from 0 to 5 ppm by the injection volume of 5 microliters. Recoveries of Rhodamine B added to skin lotions ranged from 81.3 to 91.6%. It was detected from commercial skin lotions by 0.029 ppm to 0.144 ppm.

Keywords : High-Performance Liquid Chromatography, determination, basic coal-tar dyes, cosmetic

緒　言

化粧品等に使用できるタール色素は昭和41年の厚生省令第30号，昭和42年の厚生省令第30号および昭和47年の厚生省令第55号により規定されている．そして，これらの色素の中で許可されている塩基性タール色素は，ローダミンB（赤色213号，D&C Red No.19）のみである．

近年，化粧品等の輸入増加に伴ない，国内法に適合しない製品が増加の傾向にある．そこで，これらの化粧品等にローダミンB以外の塩基性タール色素が使用されている危険性があるため，著者らは，代表的な塩基性タール色素である塩基性フクシン，マラカイトグリーン，クリスタルバイオレット，オーラミンおよびローダミンBの分析法について検討を行なった．

従来，色素の分析法には，ペーパークロマトグラフ法(PC)[1]，薄層クロマトグラフ法(TLC)[1]，および高速液体クロマトグラフ法(HPLC)[2-4]があるが，今回逆相分配型カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより，上記色素の分析を行なった．また，検討を行なった分析法により市販化粧水中のローダミンBの定量を行なったところ，良好な結果が得られたので報告する．

実験方法

1. 試薬　標準色素：本実験に使用した標準色素は，Table 1に示したが，ローダミンBは化粧品用の認定をうけた市販品を，塩基性フクシンおよびクリスタルバイオレットはイーストマン・コダック社製特級品を，その他の色素は東京化成工業社製特級品をそれぞれ用いた．なお，以下ローダミンBはRH-Bと，塩基性フクシンはB-Fと，クリスタルバイオレットはCVと，マラカイトグリーンはMGと，オーラミンはAUとそれぞれ略す．色素標準液：上記各色素10mgを精秤し，メタノールに溶解し，それぞれ100 μg／mlとする．

* 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 .Standard Dyes used in the Study

Type	Common Name	Colour Index No.	λmax. (nm)
Xanthene	Rhodamine B (D & C Red No.19)	45170	553
Triphenylmethane	Fuchsine	42500	545
	Malachite Green	42000	618
	Crystal Violet	42555	591
Diphenylmethane	Auramine	41000	432

ナフタレンスホン酸：東京化成工業社製の α-ナフタレンスルホン酸（以下 NSA と略す）特級品を用いた．
その他の試薬：すべて特級品を用いた．

2．器具および装置 高速液体クロマトグラフ：日本分光社製 TRIROTAR-II
検出器：日本分光社製紫外・可視分光光度計 UVIDEC 100 II
カラム：日本分光社製 FINEPAK 10C18(4.6mm i.d. ×250mm)
自記分光光度計：日立製作所社製 日立 323 型
データ処理装置：島津製作所社製クロマトパック C-RI-A 型

3．試験溶液の調製 市販化粧水 100 g をとり，ロータリーエバポレーターを用いて約 10m*l*に濃縮する．濃縮後メタノールを加えて正確に 10m*l*とした後，ミリポアフィルターを用いてロ過して得たロ液を試験溶液とした．

4．高速液体クロマトグラフ法（以下 HPLC と略す）による定性および定量 各色素標準溶液および試験溶液のそれぞれ 5 μ*l* について HPLC を行ない，得られたピークの保持時間を比較して定性を行なう．また，ロダミン B 標準溶液を希釈して 0.5～5.0 μg／m*l* の標準系列をつくり，定性の場合と同一条件で HPLC を行ない，得られたクロマトグラムのピーク面積と濃度から検量線を作成する．ついで試験溶液 5 μ*l* について同様に HPLC を行ない，得られたクロマトグラムよりローダミン B のピーク面を測定し，検量線より濃度を求め，試料中の含有料を算出する．

HPLC の測定条件―カラム：FINEPAK 10C18, (4.6 mm i.d.×250mm)，移動相：アセトニトリル／水 (85 : 15), 0.025M NSA, 0.025M過塩素酸含有，流速：1 m*l* ／min，検出器：可視部吸光検出器（波長420nm, 500 nm, 600nm, レンジ0.02AUFS)，温度：室温

実験および考察

I．塩基性タール色素の分析

1．HPLC の移動相についての検討 従来，水溶性色素の分析においては，イオン交換系のカラム[2]又は無機塩を使用した逆相分配系のカラム[4]を用いた HPLC により分析が行なわれてきた．今回著者らは，移動相にカウンターイオンとして NSA を加えたイオン対クロマトグラフ法を用いて塩基性タール色素の分析法を検討した．Fig.1 に示すように，過塩素酸濃度およびアセトニトリル濃度を一定とし，NSA 濃度を変化させて各色素の保持比（キャパシティーファクター，k'）を測定した．その結果 NSA 濃度が増加するに従い，k'の値は小さくなり 25 mM 以上でほぼ一定となった．Fig.2 には，アセトニトリルの濃度を一定としておき，1，5，10，25 およ

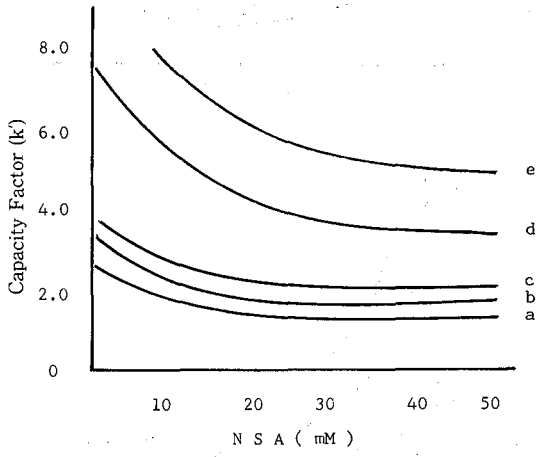


Fig. 1. Capacity factor, K', as a function of the Naphthalenesulfonic acid (NSA) concentration in the presence of 0.01 M $HClO_4$
Mobile phase : acetonitrile－water (90 : 10). Flow-rate 1 m*l*/min.
Curves a : Fuchsine, b : Auramine, c : Rhodamine B d : Malachite Green, e : Crystal Violet

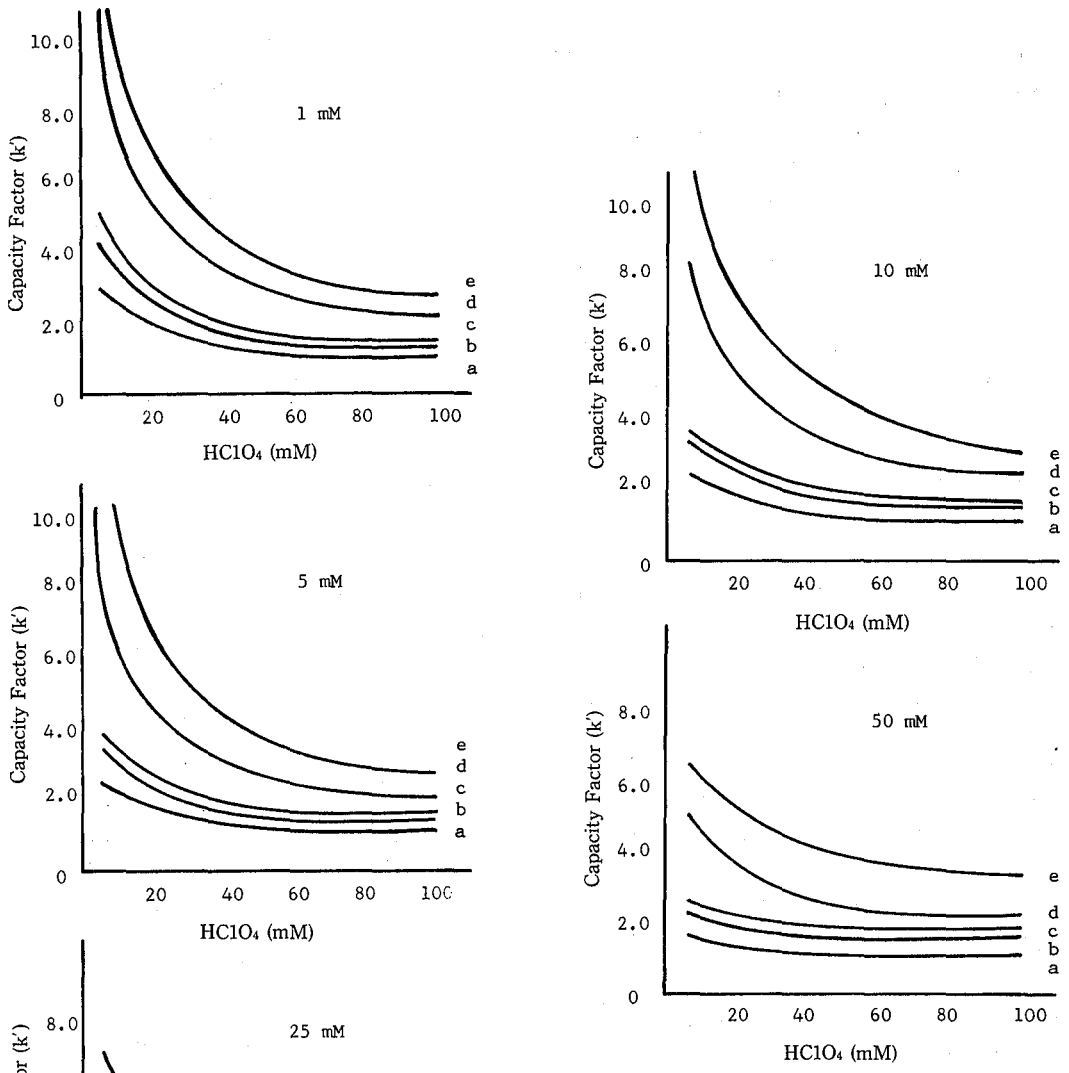


Fig. 2. Capacity factor, k', as a function of the Perchloric acid ($HClO_4$) concentration in the presence of various concentrations of NSA. Other HPLC conditions as in Fig. 1. Curves a : Fuchsine, b : Auramine, c : Rhodamine B, d : Malachite Green, e : Crystal Violet

び 50 mM の各 NSA 濃度において，過塩素酸濃度を変化させた場合の k′を示した．各色素の k′の過塩素酸濃度による変動は，低 NSA 濃度において顕著にあらわれ，高濃度においては，k′は過塩素酸濃度に依存せずほぼ一定となった．また，Fig.3 は NSA および過塩素酸の濃度を一定として，アセトニトリルの濃度を変化させた時の k′を示した．アセトニトリルの濃度を増加させるに従い，k′は小さくなり，各色素間の k′のひらきも小さくなった．

Fig.1, 2および3により，トリフェニルメタン系の色素であるCVおよびMGのk′は，NSAおよび過塩酸濃度に依存した．一方，キサンテン系の色素であるRH-Bおよびジフェニルメタン系の色素であるAUは比較的依存しなかった．しかしトリフェニルメタン系の色素であるB-Fのk′は，CVおよびMGとは反し，NSAおよび過塩素酸濃度に依存しなかった．以上の結果より分析時間および各色素の分離を考慮して，HPLCの移動相溶媒には85%アセトニトリル／水，0.025 M NSA，0.025 M過塩素酸混液を用いることとした．

2．各色素のクロマトグラム 検出波長420，500および600 nmを用いて前項のHPLCの測定条件に従って操作して得た各色素の標準クロマトグラムをFig.4に示した．420，500および600 nmの検出波長を用いて測定することにより，各色素を感度よりく測定することができた．

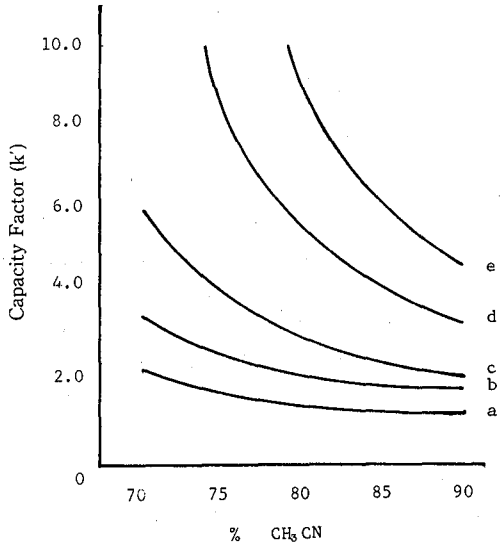


Fig. 3. Effect of the mobile phase solvent composition on k′ in the binary ($0.025M\ HClO_4 + 0.025M$ NSA) electrolyte system.
Other HPLC conditions : same as shown in Fig. 1 .
Curves a : Fuchsine, b : Auramine, c : Rhodamine B, d : Malachite Green, e : Crystal Violet

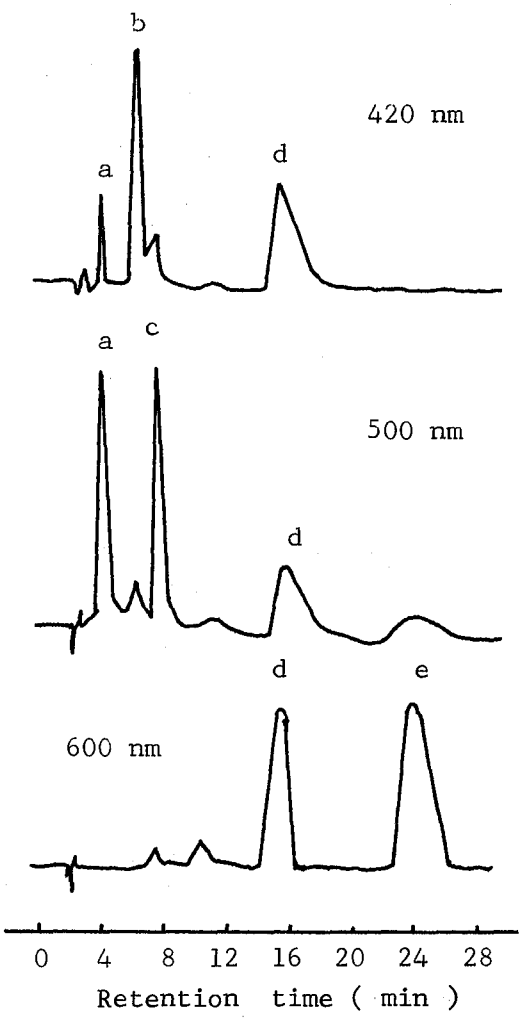


Fig. 4. HPLC seperation of Basic coal tar dyes
HPLC conditions : column : FINEPAK 10C18 (4.6mm i.d.×250 mm) mobile phase : acetonitrile-water (85 : 15) containing 0.025 M Perchloric acid and 0.025 M Naphthalensulfonic acid, flow rate : 1 m*l*/min, detecter : Vis. 420, 500 , 600 nm
Peaks : a : Fuchsine, b : Auramine, c :Rhodamine B, d : Malachite Green, e : Crystal Violet

Table 2. Recovery Test of Rhodamine B from Skin Lotion

Run	Added (ppm)	Found (ppm)	Recovery (%)
1	1.00	0.836	83.6
2	1.00	0.883	88.3
3	1.00	0.916	91.6
4	1.00	0.813	81.3
5	1.00	0.823	82.3
6	1.00	0.872	87.2

C.V.(%)=4.65 $\bar{X}$=85.71

Table 3. Analytical Results of Rhodamine B in commercial Skin Lotions

Samples	Analytical Results(ppm)
A	0.095
B	0.144
C	0.091
D	0.126
E	0.029

II. ローダミンBの定量

1．ローダミンBの吸収スペクトル　メタノールを溶媒に用いてRH-Bの吸収スペクトルを測定した．その結果535 nmに吸収極大波長を示したので，検出波長を535 nmに設定した．

2．検量線　RH-Bの標準溶液をメタノールで希釈し，0～5 ppmの標準系列を作製し，各溶液5 μl を前記のHPLCの測定条件に従って操作を行ない，得られたクロマトグラムよりピーク面積を測定して検量線を作成したところ，0.02 AUFSで0～5 ppm（0～5 μg）の範囲で原点を通る直線関係が成り立つことが認められた．また検出限界は0.005 AUFSで，2 S／Nとすると0.005 ppmであった．

3．市販化粧水における添加回収実験および分析結果　RH-Bを含まない化粧水10 gに，RH-Bを10 μg 添加し，回収率を求め，結果をTable 2に示した．6回の平均回収率は85.71%で，変動係数は4.65%であった．また，Fig.5はRH-Bが配合してある市販化粧水のクロマトグラムを示した．RH-B付近には妨害ピークが認められず，他の成分との良好な分離を示した．そしてTable 3に市販化粧水6種についてRH-Bの分離結果を示した．

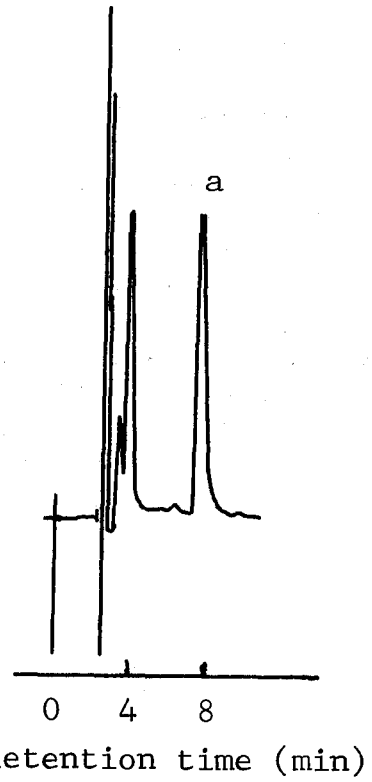


Fig. 5. High Performance Liquid Chromatogram of Commercial Skin Lotion
operating conditions are the same as described in the legend of Fig. 4 .
Peak a : Rhodamine B

結　論

逆相分配カラムを使用して，イオン対クロマトグラフ法を用いたHPLCにより，塩基性フクシン，オーラミン，ローダミンB，マラカイトグリーンおよびクリスタルバイオレットの分離分析法を検討すると共に，市販化粧水に配合されているローダミンBの定量を行なった．

その結果，1) HPLCの移動相には，0.025 Mナフタレンスルホン酸および0.025 M過塩素酸含有の85%アセトニトリル／水を使用したところ，各色素が良好に分離した．

2)トリフェニルメタン系のマラカイトグリーンおよびクリスタルバイオレットのk′は，カウンターイオンとして使用したNSAおよび過塩素酸濃度に依存しているが，同系の色素である塩基性フクシンのk′にはほとんど

依存が認められなかった.

3)本法により,市販化粧水に対するローダミンBの添加回収実験を行なった結果,平均回収率は85.71%で,変動係数は4.65%であった.またクロマトグラムにおいて,市販化粧水中の他の成分の妨害なしに分析を行なうことができた.

文 献

1) 日本薬学会編:衛生試験法注解, 697, 1980 金原出版
2) 大西重樹, 西島 靖, 木嶋敬二, 狩野静雄, 外村正治:分析化学, 25, 353, 1976
3) 大西重樹, 西島靖, 木嶋敬二, 狩野静雄:分析化学, 26, 814, 1977
4) 野田明男, 錦 節子:食衛誌, 18, 321, 1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 152-158, 1984

市販化粧石けん中のタール色素の調査報告

中村義昭*, 観照雄*, 伊藤弘一*, 風間成孔*

A Report of Investigation of Coal-Tar Dyes in Commercial Toilet Soaps

YOSHIAKI NAKAMURA, TERUO KAN, KOICHI ITO and MASAYOSHI KAZAMA

Analysis of cosmetic coal-tar dyes in 48 samples of commercial toilet soap purchased in Tokyo was carried out according to the following procedure; the samples were dissolved in water, treated with hydrochloric acid, and extracted with organic solvent or cleaned up by DEAE-Sephadex column chromatography. Dyes separated from the soap were identified by thin layer chromatography.

As a result of the analysis, a total of 26 coal-tar dyes in 6 different colors were detected in 48 samples. Dyes contained in 11 samples, including 5 of foreign origins, were different from those indicated on the packages of the soap.

It was found that coal-tar dyes used mainly for samples were Red-213 (Rhodamine B), Yellow-203 (Quinoline Yellow WS), Red-226 (Helindone pink CN) and Blue-404 (Phthalocyanine Blue), but Red-219 (Brilliant Lake Red R) and Yellow-204 (Quinoline Yellow SS) were not detected in all the samples.

Keywords : toilet soap, coal-tar dyes, analysis, Red-213, Yellow-203, Red-226, Blue-404

緒　言

現在香粧品に使用されている色素は，人体に対する安全性等の観点から使用を許可された色素で，薬事法によって定められている法定色素[1]である．また昭和55年9月の薬事法の改正に伴なって法定色素など98品目を配合する香粧品はその成分の名称を容器等に表示する義務が公布[2]されたため，医薬品等に使用することができるタール色素を定める省令（昭和41年厚生省令第30号）別表第1，別表第2および別表第3に掲げた法定色素83品目については同表に定めている品目の名称で表示することになった．

香粧品中の法定色素を系統的に分離分析する方法は日本薬学会編衛生試験法香粧品試験法有機性着色料[3]に記載されているが，適用できる香粧品は口紅，ファンデーション，ポマード，化粧水などであって，固型化粧石けんには，適用することが困難であった．そこで今回固型石けんのうち特に脂肪酸塩を素地とするものについて前処理として酸処理とDEAE-セファデックスを用いるカラムクロマト法等を行い，同定法としてTLC法を用いたタール色素の分離同定法を検討した．さらに外国で製造された輸入石けんを含めた市販石けんに，その試験法を用いて，使用されているタール色素が，容器等に表示されたタール色素と同一であるかどうかの調査を行なった．また皮膚障害等で問題になっていると報告[4-7]されている赤色219号および黄色204号の使用状況などについても調査を行なったので合せて報告する．

実験の部

試料　東京都内で昭和56年から59年までの間に薬局・化粧品店・薬店・デパートで購入した固型化粧石けん48検体を試料とした．これらの試料はすべて色素表示されたものであり，34検体は国産品で，医薬部外品5検体，透明な石けん7検体である．また14検体は外国産でありこのうち医薬部外品2検体，透明な石けん3検体であり，国別ではアメリカ産5検体，西ドイツ産4検体，スイス産1検体，イギリス産3検体およびイタリア産1検体である．

* 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

試薬 1)タール色素（以下色素と略す）標準品 国立衛生試験所標準品および市販の色素を，薄層クロマトグラフィー等で分取，精製して用いた．Table 1. にこれらの色素名と別名，Color Index 番号（C.I.No.）を示した．

2)色素標準溶液 衛生試験法香粧品試験法に準じて調製した．

3)薄層 シリカゲル（メルク社製，Kiselgel 60，5×10 cm,10×20 cm,0.25 mm），セルロース（メルク社製，10×20 cm,0.1 mm）

4)展開溶媒 ⓐ*n*-ブタノール・エタノール・0.5 N 酢酸（6:2:3），ⓑ*n*-ブタノール・エタノール・0.5 N アンモニア水（6:2:3），ⓒクロロホルム・ベンゼン（7:3）

5)硫酸・酢酸混合溶液：硫酸・酢酸・水（4:9:1）

6)DEAE・Sephadex DEAESephadexA-25 100g を 0.5N アンモニア水 1 *l* 中に 1 日放置し，フェノールフタレインで赤色を呈さなくなるまでイオン交換水で洗浄する．次に 0.5N 酢酸 1 *l* 中にこの樹脂を入れ更に 1 日放置し，イオン交換水でよく洗浄したものを用いた．

7)DEAE・Sephadex カラム 上記の樹脂を底部に少量の脱脂綿をつめた内径 2.5 cm，長さ 20 cmの活せん付カラムクロマト管に，カラムの高さが約 5 cmになるように入れる．

8)溶離溶液 ⓐエタノール・水・塩酸（50：10：1），ⓑエタノール・水・塩酸（50：10：3），ⓒエタノール・水・塩酸（50：10：6），ⓓ10％塩酸

9)石けん用素地 化粧品原料基準の規格に適合したもの．

Table 1. Standard Coal-Tar Dyes used on The Examination

No.	Color No. (Japan)	Common name	C.I.No.	No.	Color No. (Japan)	Common name	C.I.No.
1	Red-102	New Coccine	16255	18	Blue-205	Alfazurine FC	42090
2	Red-106	Acid Red	45100	19	Violet-401	Alizurol Purple	60730
3	Red-202	Lithol Rubine BCA	15850	20	Red-221	Toluidine Red	12120
4	Red-213	Rhodamine B	45170	21	Red-225	Sudan III	26100
5	Red-219	Brilliant Lake Red R	15800	22	Red-228	Parmatone Red	12085
6	Red-227	Fast Acid Magenta	17200	23	Red-404	Brilliant Fast Scarlet	12315
7	Red-401	Violamine R	45190	24	Orange-203	Parmanent Orange	12075
8	Red-504	Ponceau SX	14700	25	Orange-204	Benzidine Orange G	21110
9	Orange-205	Orange II	15510	26	Yellow-204	Quinoline Yellow SS	47000
10	Yellow-4	Tartrazine	19140	27	Yellow-401	Hanza Yellow	11680
11	Yellow-202(1)	Uranine	45350	28	Yellow-404	Yellow AB	11380
12	Yellow-203	Quinoline Yellow WS	47005	29	Green-202	Quinizarin Green SS	61565
13	Yellow-403(1)	Naphtol Yellow S	10316	30	Blue-403	Sudan Blue B	—
14	Yellow-406	Metanil Yellow	13065	31	Red-226	Helindone Pink CN	73360
15	Green-201	Alizarine Cyanine Green F	61570	32	Yellow-205	Benzidine Yellow G	21090
16	Green-204	Pyranine Conc	59040	33	Blue-204	Carbanthrene Blue	69825
17	Blue-1	Brilliant Blue FCF	42090	34	Blue-404	Phtalocyanine Blue	74160

C.I.No. : Color index number

装置 1)紫外線検出器 ミツミ紫外線検出器 TYPE SJ−1031（波長254nm, 365nm）

2)分光光度計 日立自記分光光度計323型

3)蛍光X線分析装置 理学電機工業製0600ウルトラトレースシステム

試験溶液の調製法 試料5～20gをビーカーにとり，水100m*l*を加えたのち，約50°cの水浴中でときどき混ぜながら1時間加温する．温時，塩酸5m*l*を加え，ガラス棒でよくかき混ぜる．冷後ろ紙(No.2)を用いてろ過する．ろ紙上の残留物は少量の水で洗う．得られたろ液は希塩酸に可溶な色素を含むから松本[8]らの方法に準じて分離分析し，試験溶液を調製する．また残留物は油溶性色素を含むから，衛生試験法香粧品試験法有機性着色料[3]に準じて分離分析し，同様に試験溶液を調製する．以上の固型化粧石けん中の色素分離操作をChart 1. に示す．

確認方法 上記の試験法に従って得た試験溶液を薄層クロマトグラフ法（以下TLC法と略す），可視部吸収スペクトル法（以下Vis.と略す），蛍光X線分析法を用い色素標準品と比較して色素の確認を行った．すなわちTable 1. に示すようにNo.1赤色102号からNo.19紫色401号までの色素については，シリカゲル薄層およびセルロース薄層を用い，展開溶媒に@，ⓑを用いるTLC法で，またNo.20赤色221号からNo.30青色403号までの色素については，シリカゲル薄層を用い，展開溶媒にⓒを用いるTLC法で確認した．さらにNo.33青色204号およびNo.34青色404号はα-クロルナフタリンに溶解させVis.と蛍光X線分析を用いて確認した．なお蛍光を有する色素については紫外線照射下で確認した．

実験結果および考察

1．色素の分離 香粧品中の色素を分離する方法としては，毛糸染色法[3]，溶媒分離法[3]および吸着カラムクロマトグラフ法[9]などがあるので，これらの方法を固型化粧石けんに適用した．その結果，色素の確認をTLCで行う場合，過剰に共存する石けん成分の脂肪酸塩を妨害しない程度まで除去することができなかった．そこでこの脂肪酸塩を除去する目的で，試料に水を加え，50℃の水浴中で1時間加温し，温時，塩酸5m*l*を加え，凝固物を生成させ，冷後ろ紙を用いてろ過を行い，ろ液と残留物について検査したところ，石けん成分の妨害が少なくなった．そこで，法定色素を系統的に分析することを目的として，Table 1. に示す標準色素33種類を，色素を含有しない石けん用素地にそれぞれ添加して添加回収試験を行った．石けん用素地5gを乳鉢にとり，エタノール20m*l*を加えて乳棒を用いて混和したのち，各色素の溶液を加えて均一になるまでさらに混合する．エタノールが揮散し，ほぼ固形になるまで放置したのち以下Chart 1. に準じて検査したところ，Chart 1. の各分画の色素どおりに添加した色素を検出することができた．ただし，No.1赤色102号からNo.30青色403号の色素については1mg／m*l*の溶液0.1m*l*を，No.31赤色226号からNo.34青色404号の色素については不溶性のため約1mgの粉末を直接添加した．

2．市販品分析結果 48検体の試料について色素の測定を行い，その結果をTable 2. に示す．これによると今回検出した色素は6色26種類で，その内訳は赤色9種類，黄色7種類，青色5種類，緑色2種類，だいだい色2種類，紫色1種類である．固型石けんの着色料は色が6色と多色であり，また今回測定した26種類は，法定色素83種類の31.3%という広範囲な使用実態であった．

1)赤色色素 本報の固型化粧石けんのうち26検体に使用されていた赤色色素は赤色213号（9検体），226号（7），401号（5），106号（2），504号（2），202号（2），221号，227号，404号(各1)であった．また試料番号6，9，31，34の検体は，2種類の赤色色素を配合していることが判定できた．ところで高橋らがリール黒皮症等の皮膚障害の原因物質の1つであろうと報告[4-6]している赤色219号は，今回の対象試料からは検出されなかった．

2)黄色色素 48検体中26検体に使用されていた黄色色素は，黄色203号(10検体)，4号(5)，406号(5)，401号（3），205号（3），202号の(1)（1）であり，試料番号30，33の検体は黄色色素を3種類配合していた．またC.D.Calnan[7]によって皮膚アレルギーを起こすと報告されている黄色204号は，今回の対象試料からは検出されなかったが，黄色204号が混入することで問題にされている[10]黄色203号は，今回最も使用頻度の高かった色素であった．

3)青色色素 48検体中14検体に使用されていた青色色素は，青色404号(8検体)，204号(2)，403号(2)，205号，1号(各1)であった．なお今回青色202号，203号および204号は標準色素がないので分析対照色素からは省略した．

4)緑色，だいだい色および紫色色素 緑色は7検体に使用され，種類は201号（5検体），204号（2）の2種類であった．だいだい色は3検体に使用され，種類は205号（2），204号（1）の2種類であった．また紫色は2検体に使用され，種類は401号（2）の1種類であった．

Chart1. Analysis of Coal-tar Dyes in Soap

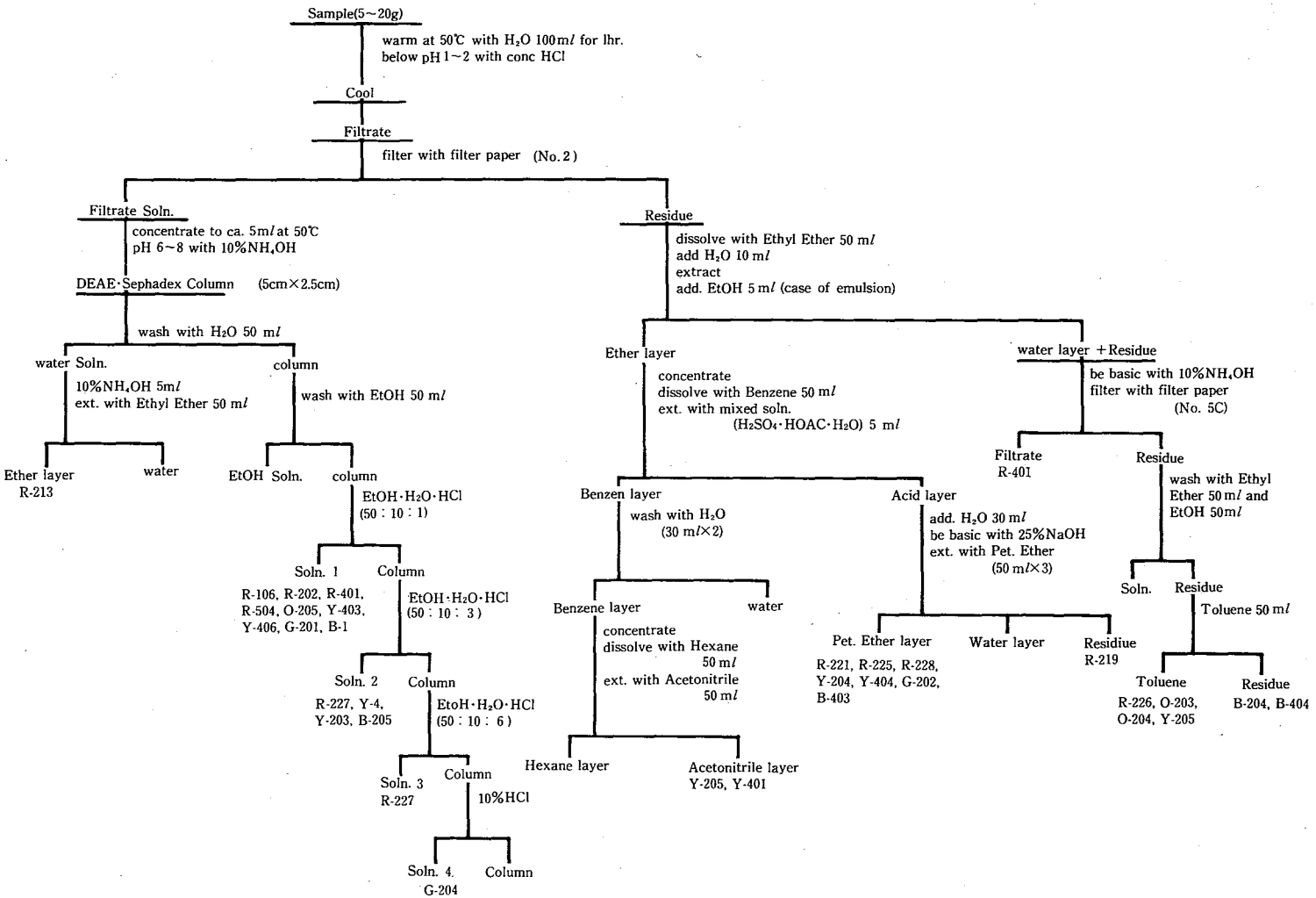


Table 2. Results of Examination

Sample No.	Sample Name	Maker	State	Kind of Soap	Sample Color	Content (g)	Coal-tar dyes detected from Samples					
							Red	Orange	Yellow	Green	Blue	Violet
1	T.J.	Y.Z.			Blue	80					403	
2	T.C.	〃			Pink	80	504					
3	Y.P.	〃		Med.	Brown	70	504					
4	Y.S.	〃			Brown	55	401			201		
5	V.A.	〃		Trs.	Green	100			4	204	403	
6	V.H.	〃		Trs.	Red	100	227,401					
7	V.O.	〃		Trs.	Yellow	100			4			
8	S.K.B.	H		Trs.	Blue	15			4		205	
9	S.K.P.	〃		Trs.	Pink	15	106,401					
10	S.S.P.	P.S.			Pink	75	213					
11	M.S.	〃			Violet	65	226				404	
12	M.S.4	P.G.		Med.	Orange	85	202		404			
13	M.S.8	〃		Med.	Orange	85	202		203			
14	A.R.	M		Med.	Red Brown	85	106		4	201		
15	H.S.	Z		Med.	Yellow	70			406			
16	V.B.	A			Blue	85					404	
17	V.R.	〃			Blue	125					404	
18	I.S.	I		Trs.	Brown	90	detect 401 indicate (401)	205	N.D. (203)		N.D. (1)	
19	P.Q.	S.C.		Trs.	Green	100			403	201		
20	N.I.	N			Brown	120	detect 401 indicate (102)		406 (202-(1),203)	(201)		
21	K.G.	K			Green	100	404		205		404	
22	K.H.	〃			Yellow	105	213		205			
23	S.V.	S			Pink	85	213					
24	V.R.	Y.O.			Pink	90	221				204	
25	V.M.	〃			Blue	90					204	401
26	V.O.	〃			Yellow	90			401			
27	N.C.	N.S.			Pink	80	213					
28	K.D.	K.S.			Yellow	80	213		406			
29	P.Y.	S.K.			Yellow	50	226		205			
30	M.O.	O.O.			Orange	20	detect 213 indicate (213)	204 (203)	202,203,403 (403)			
31	M.R.	〃			Red	20	detect 213,226,N.D. indicate (213) (401)		203 (203)			
32	M.B.	〃			Blue	20			203		404	
33	M.Y.	〃			Yellow	20	detect indicate		4,203,406 (203,406)	201 (201)		
34	M.V.	〃			Violet	20	detect 213,226 indicate (213)			201		401 (401)
35	H.S.	P	U.S.A.		Green	103			203			
36	J.P.	A.D.	〃	Med.Trs.	Orange	92		205				
37	I.D.	J.C.	〃	Med.	Green	140			203		1	
38	P.S.	〃	〃		Green	135	detect indicate		203 (203)		[+]	
39	O.E.	W	〃	Trs.	Brown	93.5				204		
40	V.P.	〃	W.Ger.		Yellow	125			203			
41	V.L.	〃	〃		Green	125	detect indicate		403 (403)		N.D.,[+] (403)	
42	P.R.	〃	〃		Violet	100	detect 213,N.D. indicate (401)				404 (404)	
43	P.S.	〃	〃		Green	100	detect indicate		203 (203)		N.D.,[+] (403)	
44	L.G.	Y.T.	Swit.	Trs.	Green	90	detect indicate		N.D. (203)	[+]		
45	Y.H.	O	Eng.		Pink	75	226		401			
46	Y.R.	〃	〃		Pink	75	226					
47	Y.V.	〃	〃		Violet	75	226				404	
48	A.H.	I	Ital.		Green	130			401		404	
					total sample number		26	3	26	7+1	14+3	2

(State) W.Ger. : West Germany, Swit. : Switzer land, Eng. : England, Ital. : Italy
(Kind of Soap) Med. : Medicate soap, Trs. : Transparent soap

5)透明石けんについて　48検体のうち10検体が透明石けんであり，これら検体には赤色は3種類(106号，227号，401号)，黄色は2種類(4号，403号)，青色は2種類(205号，403号)，だいだい色は1種類(205号)，緑色は2種類(201号，204号)の計10種類の色素が使われており，今回検査した検体の中で使用頻度の多かった黄色203号(10検体)，赤色213号(9)，赤色226号(7)および青色404号(8)は透明石けんには使用されていなかった．このことから透明石けんでは一般に酸性および油溶性の染料といわれる色素は使用されるが，赤色226号および青色404号のような顔料といわれる色素は使用されていないことが判明した．また赤色213号および黄色203号が使用されなかった理由としては，透明石けんの製品化にこれらの色素は不向きなのではないかと考えられる．

6)色素の表示について　化粧石けんには国産品のものと輸入品のものがあり，どちらも薬事法の規制をうけるため，薬事法によって指定された成分の名称を容器等に表示することになる．とこで試料に表示された色素名と今回分析して得た色素との比較を行なった．

その結果表示と異なる違反品は48検体のうち国産品34検体に6検体(18%)，輸入品14検体に5検体(36%)であった．つぎにその違反品をTable 2. の番号順に報告する．

①試料18(I.S.)　表示が赤色401号，黄色203号，青色1号の3種類の色素で，このうち赤色401号は確認できたが，黄色203号，青色1号は検出できなかった．まただいだい色205号が表示外の色素として検出した．

②試料20(N.I.)　表示が赤色102号，黄色202号の(1)，黄色203号，緑色201号の4種類の色素であったが，これらの色素は検出できなかった．また赤色401号および黄色406号が表示外の色素として検出した．

③試料30(M.O.)　表示が赤色213号，だいだい色203号，黄色403号の3種類の色素であったが，このうち赤色213号，黄色403号は確認できたが，だいだい色203号は検出できなかった．また，だいだい色204号，黄色202号，黄色203号の3種類の色素を検出した．

④試料31(M.R.)　表示が赤色213号，赤色401号，黄色203号の3種類の色素であったが，このうち赤色213号，黄色203号は確認できたが，赤色401号は検出できなかった．また，赤色226号が表示外の色素として検出した．

⑤試料33(M.Y.)　表示が黄色203号，黄色406号，緑色201号の3種類の色素で，これらの色素は確認できたが，別に黄色4号を表示外の色素として検出した．

⑥試料34(M.V.)　表示が赤色213号，紫色401号の2種類の色素で，これらの色素は確認できたが，別に赤色226号，緑色201号の2種類の色素を表示外の色素として検出した．

⑦試料38(P.S.)　試料の色が緑色をしており，表示してある色素は黄色203号の1種類であり，この黄色203号は確認できた．しかしこのほかに青緑色の法定外の色素を検出した．

⑧試料41(V.L.)　表示が黄色403号，青色403号の2種類の色素で，このうち黄色403号は確認できた．しかし青色403号は検出できず，別に青緑色の法定外の色素を検出した．

⑨試料42(P.R.)　表示が赤色401号，青色404号の2種類の色素で，そのうち青色404号は確認できた．しかし赤色401号は検出できなかった．また赤色213号を表示外の色素として検出した．

⑩試料43(P.S.)　表示が黄色203号，青色403号の2種類の色素で，このうち黄色203号は確認できたが，青色403号は検出できず，別に青緑色の法定外の色素を検出した．

⑪試料44(L.G.)　表示が黄色203号であったが，この色素は検出できなかった．なおこの検体からは緑色の色素が検出された．

7)不明の色素について　試料38, 41, 43では青緑色の色素が検出されたが，これら青緑色の色素はChart 1. の青色204号，青色404号などと同じ分画の所で検出する．しかし青色204号，青色404号と異なり α-クロルナフタリンに溶解せず，また他の有機溶媒や水にも溶解しなかった．さらにこれを蛍光X線にて測定したところ，〔Ge-Target,35KV,35mA,測定300秒〕8.04KeVで銅を，また〔Ti-Target, 40KV, 60mA, 測定300秒〕2.62KeVで塩素を確認した．これらのことからこの青緑色の色素は，小西ら[11]の述べている青色404号の誘導体の1種ではないかと推定した．

試料44(L.G.)では緑色の色素を検出したが，これはChart 1. においてSoln. 1の分画の所で検出され，これは天然色素ではないかと考えられる．

ま と め

1．固型化粧石けん中のタール色素は前処理として，試料を水に溶解後，塩酸処理し，DEAE-セファデックスカラム，溶媒抽出などのクリーンアップを併用すると，TLC法によって系統的にタール色素を分離同定できる．しかし赤色204号，赤色205号などの顔料の検査を行な

うにはこの方法だけでは不充分な点もあるので，今後改良を行い，また定量を目的とした分析法の検討も行うつもりである．

2．市販固型化粧石けん48検体に使用されていたタール色素は6色26種類であった．

3．市販品48検体（国産品34検体，輸入品14検体）について検査した結果，表示違反の検体は11検体（国産品6検体，輸入品5検体）であった．

文　献

1) 昭和41年8月31日厚生省令第30号〝医薬品等に使用することができるタール色素を定める省令〟改正昭和47年12月13日厚生省令第55号
2) 昭和55年9月26日厚生省告示第167号〝薬事法の規定に基づき，成分の名称を記載しなければならない医薬部外品及び化粧品の成分を指定する件〟
3) 日本薬学会編：衛生試験法注解，697，1980，金原出版
4) 高橋洋子，須貝哲郎，高木　喬：臨床皮膚科，30，873，1976
5) 中部パッチテスト研究班：皮膚，21，205，1979
6) T. Kozuka, M. Tashiro, S. Sano *et al.*：*Contact Dermatitis,* 5，297，1979
7) C. D. Calnan：*Contact Dermatitis,* 2，160，1976
8) 松本勲，高柴和子，本間康子：衛生化学，18，278，1972
9) Y.Yanuka, Y. Shalon, E. Weissenberg *et al.* *Analyst,* 88，872，1963
10) 沓名　裕，小松一男，松岡昌弘他：*J.S.C.C.J,* 16，50，1982
11) 小西謙三，黒木宣彦：合成染料の化学，376，1978，槇書店

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 159-162, 1984

高速液体クロマトグラフィーによる清浄綿中の塩化ベンザルコニウム定量法

植田忠彦*, 風間成孔*

Determination of Benzalkonium Chloride in Disposable Moistened Medicated Tissue by High Performance Liquid Chromatography

TADAHIKO UETA* and MASAYOSHI KAZAMA*

A useful high performance liquid chromatographic analysis of benzalkonium chloride in disposable moistened medicated cotton was presented. In this technique a reversed phase microcyano column, a 258 nm ultraviolet absorbance detector and a 60% acetonitrile containing 0.05M of sodium acetate as mobile phase were used.

Benzalkonium chloride in disposable moistened medicated cotton was satisfactorily eluted with 50% methanol containing 0.05N of hydrochloric acid. Included homologs were measured in terms of a total amount of benzalkonium chloride. In this method the recovery and coefficient variation were 93.5% and 1.2% (n= 5) respectively.

Keywords: benzalkonium chloride, homolog, disposable moistened medicated tissue, high performance liquid chromatography, nuclear magnetic resonance

はじめに

市販の清浄綿に配合される殺菌剤はグルコン酸クロルヘキシジン(CHG), 塩化ベンザルコニウム(BC), 塩化ベンゼトニウム(BZ)等である. 著者らはさきに, これらの殺菌剤のうち, CHGの高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析法について報告[1]したが, 今回, BCのHPLCによる分析法について検討を行なった.

現在用いられているBCにはアルキル基の炭素数の異なる数個の同族体よりなる混合体と単一体の二種類があり, 医薬品等の分析においてはこれらを色素を用いてイオン対形成後, 抽出し比色定量[2]する方法が用いられているが, 近年, HPLCによる同族体の分別定量法[3-5]も報告されている.

一方, 清浄綿中のBCについても紫外部吸収スペクトル法(UV法)による確認試験を行なったのち, 比色定量する方法が用いられているが, このUV法はバックグラウンドが高くなるため確認が困難となる場合がある.

そこで, 清浄綿中の塩化ベンザルコニウムの抽出法, 核磁気共鳴スペクトル法(NMR)による確認法ならびにHPLCによる同族体のトータル定量法について検討を行なったので報告する.

実験方法

試料 市販清浄綿：昭和58年12月入手した製品を用いた. 自家製清浄綿：製造基準[6]にほぼ準じ, 50m*l*ビーカー中に日本薬局方脱脂綿1.7gをとり, 0.01%BC溶液8m*l*および水2m*l*を加え, アルミホイルでビーカーを覆ったのち, オートクレーブ中で120°, 30分加熱滅菌処理したものを用いた.

試薬 0.01%BC溶液：東京化成製BCを水に溶かして0.01%溶液を調製した. BC標準溶液：日本油脂製BC(含有量99.2%)100.0mgを精秤し水を加えて正確に100m*l*とした. 移動相：酢酸ナトリウム4.1gを水400m*l*に溶かしたのち, アセトニトリル(0.45μmメンブランフィルターろ過)を加えて1*l*とし, 酢酸溶液を用いてpH6.0に調整した. 抽出溶液：0.1N塩酸溶液およびメタノール(0.45μmメンブランフィルターろ過)を等量混合した. オレンジII溶液：Merck社製Orange II(C.I. No.15510) 0.1gに水を加えて100m*l*とした. その他使用した試薬類は全て特級である.

装置 高速液体クロマトグラフ：協和精密製 ポンプ

*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

(NSP-5DX型)，検出器 (NS-310A型) NMR：日本電子工学製 FX-270 自記分光々度計：日立製作所製323型

操作法 試験溶液の調製：清浄綿を受け器を付けたG-3ガラスフィルター中に移し，抽出溶液15～20m*l*を加え，ガラス棒を用いて抽し洗いしたのち，アスピレーターで吸引ろ過する．この押し洗い操作を4回くり返す．このとき，清浄綿の容器内も十分に洗い込む．ろ液をロータリーエバポレーターを用いて，突沸に注意しながら50°の水溶上で濃縮乾固したのち，残渣を水2m*l*に溶かし，試験溶液とする．NMR確認法：試料2袋より同様にして抽出したのち，濃縮乾固し，$CDCl_3$に溶解してNMRの測定を行なう．化学シフト(δppm)はテトラメチルシランを基準物質として求める．

定量法 BC標準溶液を希釈して100,200,400,800 μg／m*l*の各溶液を調製し，その10 μlを注入して得たピーク面積より検量線を作成する．つぎに試験溶液を同様にして測定し，試料中のBC含有量を求める．HPLCの測定条件はつぎのとおりである．カラム：Nucleosil CN 10μm(Nargel社製)ϕ4×250mm，移動相：0.05 M酢酸ナトリウム含有60% アセトニトリル (pH=6.0)，流量：1.0m*l*/min，測定波長：258nm，感度：0.05 AUFS

結果および考察

1． **HPLC測定条件** 現在使用されているBCにはアルキル基炭素数の異なる数種の同族体からなる混合体と単一体の二種類があり，Meyer[3]はμBondapak CN (Waters社製)カラム，佐藤[4,5]はNucleosil 5C_{18} (M. Nagel社製)カラムを各々用いてHPLCによる同族体の分離分析を行なっている．しかし，現在用いられている方法は第4級アンモニウム塩に共通した色素を用いるイオン対抽出比色法[2]であり，トータル定量法である．そこで今回，HPLCを用いて同族体を分離することなくトータルBCとして定量する方法について検討した． (1) 移動相：カラムはテーリングの少ないNucleosil CNを用いることとし，アルキル基の炭素数14と16の同族体を用いてHPLCクロマトグラム上単一ピークとして溶出する条件を検討したところ，Fig.1に示すように移動相としてはpH6.0に調整した0.05M酢酸ナトリウム含有60%アセトニトリル溶液が適当であった．(2) 測定波長：BCは254，258，263.5および270nmに紫外部吸収極大値を持つため，測定波長として最大感度を示した258nmを用いた．この測定波長でのC_{14}およびC_{16}同族体の吸光度はほぼ等しい値を示した． (3) 検量線：以上の方法に従い，BC標準溶液を用いて100 μg／m*l*～800 μg／m*l*濃度の溶液を作成しその10 μlを注入し，ピーク面積により検量線を作成したところ良好な直線性を示した．

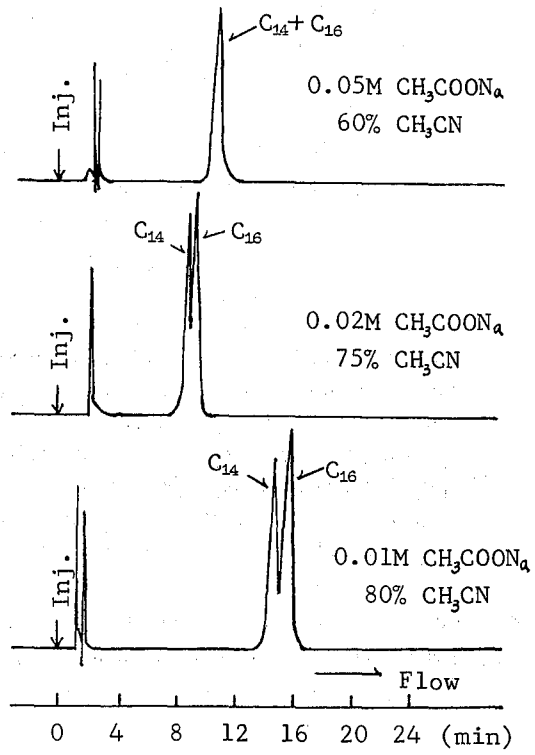


Fig. 1. Chromatograms of C_{14} and C_{16} Alkylbenzyldimethylammonium Chloride with each Mobile Phase From 60% to 80% Acetonitrile Containing Sodium Acetate

2． **抽出溶液** 脱脂綿の吸着性のためBCはメタノール，アセトニトリルまたは水との混合溶液では抽出率が低い．従って抽出溶液として塩酸を含有するメタノール溶液およびアセトニトリル溶液について，自家製清浄綿を用いてBC抽出量の比較を行なったところ，メタノール含量が50～70%において良好な抽出率が得られた．そこで50%メタノール溶液について更に塩酸の最適含有量を求めたところ，Table 1.に示すように塩酸濃度が0.05 N以上で一定の抽出率が得られた．

3． **滅菌処理に対するBCの安定性** 製品の製造に当り，殺菌剤を含浸させた清浄綿はオートクレーブにより通常120°，30分間加熱滅菌処理される．そこでこの操作によるBCの安定性について調べたところ，Table 2.

Table 1. Recovery of Benzalkonium Chloride Extracted from Disposable Moistened Medicated Tissue with solvents

HCl (N)	Added (μg)	Detected (μg)	Recovery (%)
0.001	788	540	68.5
0.005	788	645	81.9
0.01	788	708	89.8
0.05	788	737	93.5
0.1	788	737	93.5

Normality of hydrochloric acid in 50% methanol
Autoclaving condition : 120°, 30 min.

Table 2. Relation of the Autoclaving Time at 120°on the Recovery of Benzalkonium Chloride from Disposable Moistened Medicated Tissue

Time (min)	Added (μg)	Detected (μg)	Recovery(%) (n=5)
0	788	755	95.8
30	788	737	93.5
60	788	737	93.5
90	788	730	92.6
120	788	713	90.5

に示すように60分間の加熱まではほぼ安定であり，その後は暫減する傾向を示した．従って，一般的に製造過程での滅菌処理によるBCの分解はないものと考えられる．今回の試験で加熱処理しない綿よりの回収率は95.8%であるのに対し加熱処理した場合93.5%と若干低い値を示す．これは自家製清浄綿は滅菌処理に際して密封されていないために一部蒸散したものと考えられる．本法における自家製清浄綿によるBCの回収率は93.5%，変動係数は1.2%(n=5)であった．

4. **確認法** (1) UV法 清浄綿中に用いられている第4級アンモニウム塩系殺菌剤にはBCおよびBZがあるがこの確認法としてUV法[2]が用いられている．

BCおよびBZの吸収極大は254, 258, 263.5, 270nmにおいては重なり，一方，BZは276, 282nmにも吸収極大を持つ．従って，妨害物等が共存しない試料においてはこれらの吸収極大および吸収パターンより同定可能である．しかし，清浄綿抽出液はバックグラウンドが高くなる傾向があり，吸収パターンが不明確となるため同定が困難となる． (2) NMR法 試料2袋より抽出した検液について^{1}H- NMRおよび^{13}C- NMRを測定したところ，^{1}H- NMRの場合，妨害物のため確認法として用いることができなかった．一方，^{13}C- NMRはδ:14.1(q), 22.7(t), 22.8(t), 26.4(t), 29.3(t), 29.5(t), 29.7(t), 31.9(t), 50.1(q), 63.1(t), 67.4(t), 128.0(s), 129.0(d), 130.4(d), 133.3(d) ppmのシグナルが認められ，塩化ベンザルコニウムの同定が可能であった．

5. **定量結果** C_{14}およびC_{16}同族体混合体および市販の清浄綿についてHPLCによる定量結果と従来から用いられているオレンジIIを用いる比色定量法による結果を比較したところ，C_{14}, C_{16}各200 μgの等量混合体の場合，いずれの定量値も400 μgと良く一致した．一方，清浄綿の場合，1袋中のHPLC定量値が855 μgと比色定量値の840 μgに対し約2%高い値となったが，BCのトータル定量法として使用することが可能である．

ま と め

HPLCによるアルキル基の炭素数が異なる同族体を含有する塩化ベンザルコニウムの定量法を検討したところ，次の結果が得られた．

(1) C_{14}およびC_{16}同族体の各々を分別定量した値と単一ピークによる定量値はほぼ一致した．この時の本法の検出限界は0.5 μgであった．

(2) ^{13}C- NMRにより，清浄綿より抽出した塩化ベンザルコニウムの同定が可能であった．

(3) 市販清浄綿中の塩化ベンザルコニウム含有量は800～855 μg／1袋であった．

文 献

1) 森 謙一郎，植田忠彦，西田茂一，吉原武俊：東京衛研年報，32-1, 107, 1981
2) 日本公定書協会：第10改正日本薬局方解説書，C-343, 1981
3) Meyer, R. C. : *J. Pharm. Sci.*, 69, 1148, 1980
4) 佐藤仁尤，本橋晴美，三輪 昭：日本薬学会第103年会講演要旨集 525, 1983
5) 佐藤仁尤，本橋晴美，三輪 昭：日本薬学会第104年会講演要旨集 568, 1984
6) 医薬部外品「清浄綿」製造承認申請要項，日本清浄綿工業会，1980

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 163-174, 1984

1981～1983年に築地中央市場へ入荷した輸入ドジョウおよび日本産淡水・汽水魚介類の寄生虫検索成績

村田以和夫*, 宮沢貞雄*, 伊藤勝男**, 松崎修**, 名雪雅義**

Detection and Identification on *Gnathostoma hispidum, Paragonimus miyazakii* and Other Helminth from the Fresh or Brackish Water Fishes and Shellfishes, arrived to Tsukiji Central Market from China, Formosa, Korea and Japan in 1981 to 1983 period

IWAO MURATA*, SADAO MIYAZAWA*, KATSUO ITOH**, OSAMU MATSUZAKI** and MASAYOSHI NAYUKI**

Keywords: 顎口虫 *Gnathostoma hispidum*, 宮崎肺吸虫 *Paragonimus miyazakii*, アニサキス *Anisakidae* larvae, 魚介類 fish and shellfish, 築地中央市場 Tsukiji Central Market, 1981～1983

はじめに

魚介類を生食または加熱不充分な状態で食べることによる各種人体寄生例は，近年増加傾向にある．これら食品媒介寄生虫のうち，サワガニ *Potamon dehaani* を中間宿主とする宮崎肺吸虫 *Paragonimus miyazakii*, サクラマス, *Oncorhynchus masou* を中間宿主とする広節裂頭条虫 *Diphyllobothrium latum* および，スケトウダラ *Theraga chalcogramma* やスルメイカ *Todarodes pacificus* 等を中間宿主とするアニサキス幼虫 *Anisakidae* larvae,また，輸入ドジョウ *Misgurnus sp.* を中間宿主とする顎口虫 *Gnathostoma sp.* などに関して多くの報告[1-33]がなされている．著者ら[1-2] (1978, 1982) は，すでに東京築地中央市場に入荷したサクラマスの広節裂頭条虫 plerocercoid の検索成績および輸入ドジョウの検索成績について報告している．その後も引き続き，これら魚介類をつうじて人体に感染する寄生虫の検索を行なって来たので，主として **A** 顎口虫，**B** 宮崎肺吸虫，**C** 広節裂頭条虫，**D** アニサキス，**E** 横川吸虫 *Metagonims yokogawai* など感染幼虫の寄生状況について報告し，それらの症例報告について，2・3の文献的考察を行なってみたい．

材料および方法

1　**材料**：1981年10月から1983年10月までの2年間に，築地中央市場に入荷したドジョウ，中国産436尾，韓国産170尾，台湾産25尾，日本産114尾，計745尾および，同期間に入荷したワカサギ *Hypomesusolidus* 9尾，養殖アユ *Plecoglossus altivelis* 14尾，養殖ニジマス *Salmo gairdnerii* 154尾，養殖ヤマメ *Oncorhynchus masou var. ishikawae* 50尾，サワガニ408匹，総計1,380個体について，それぞれ人体寄生性の寄生虫検索を行なった．2　**方法**：ドジョウは背開きとし背骨を除き，皮，筋肉，内臓に分けてガラス板圧平法により実体顕微鏡下で顎口虫の第3期幼虫を検索した．1983年9月に購入した中国蘇州産ドジョウ4kg（約600尾）については，内臓だけを取り出してガラス板圧平法と人工胃液消化法の2法により幼虫を検出した．同様に，ワカサギ，アユ，ニジマス，ヤマメについても包丁で適当な厚さに細切してガラス板圧平法で幼虫の検索を行なった．サワガニは甲をはがして軟部組織をガラス板にとり，圧平して実体顕微鏡下で肺吸虫のメタセルカリア(MC)を検索した．各種幼虫の実験動物への感染性を調べ，成虫を得て種の同定を行なうため，顎口虫はラット3匹に

*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
** 東京都衛生局市場衛生検査所

第3前期幼虫を8隻（実体顕微鏡下で尖刃メスを用いての摘出群），44隻，44隻(人工胃液消化法による摘出群)を群別に，ゲラチンカプセルにつめ経口投与し，3ケ月後に第3後期幼虫の回収を行なった．ラットを解剖して，各軀幹筋を胸腹壁，横隔膜，前肢・背側筋，後肢・腰側筋およびその他に大別し幼虫の回収数を比較した．また計24隻の第3後期幼虫をラット筋肉にはさんでネコに与え，成虫の回収を試みた．サワガニより得られた肺吸虫のMCは，別のネコ1匹，ラット1匹にそれぞれ20個ずつ経口投与して3か月後の剖検により成虫を回収した．回収された成虫は生検の後圧平標本とし，カルミン染色を施し形態学的検索を行なった．またネコの肺の虫嚢液中に産出された虫卵およびラットからの虫卵の形態を観察，計測して同定の一助とした．一方，養殖アユ，ニジマス，ヤマメからは，全く幼虫が検出されなかったため，またワカサギより得られたアニサキス亜科幼虫は標本としたため，感染実験を行うことができなかった．各種の寄生虫検索成績は，極力産地別に集計したが，サンプリングの問題もあり季節変動を見るに至らなかった．

成　績

A 1) 輸入ドジョウと日本産ドジョウの顎口虫検索成績：表1に示すとおり，顎口虫第3前期幼虫は，中国蘇州産ドジョウより1982年9月に28尾中3尾から計10隻検出され，同年4月出荷地不明の中国産ドジョウ10尾中2尾から4隻，また前年5月にも中国蘇州産ドジョウ31尾中1尾から1隻を計3回検出している．しかし，韓国産，台湾産および日本産ドジョウからは，本虫の幼虫はまったく検出されなかった．顎口虫以外の寄生虫は，表2に示されるように，鉤頭虫 *Acanthocephala*（綱）*Neoechinorhynchida*（目），旋尾線虫 *Spirurata*（綱）*Agamospirura*（目）および吸虫類 *Trematoda*（綱）の各種MCを多数検出した．これら虫体を各々10隻ずつ，マウス4匹，ラット8匹，ハムスター4匹，およびニワトリ1羽に経口投与したが4か月後の剖検で，いずれも成虫を得ることができなかった．**2)中国産ドジョウから得られた顎口虫第3前期幼虫の形態とラットに対する感染性**：脱嚢後の第3期幼虫2虫体の形態的特徴を**写真1**に示す．体長700 μ 前後，体幅約150 μ，頭球長60 μ，頭球幅75 μ，食道長320 μ，頸嚢長約200 μ と赤羽[3]ら（1982)の計測値すなわち，21虫の平均で，体長613 μ，体幅93 μ，頭球長44 μ，頭球幅63 μ，食道長243 μ，頸嚢長163 μ，および吉村[4]ら(1984)らの計測値，体長586.4 μ，体幅73.8 μ，頭球長30.2 μ 頭球幅60.5 μ，食道長242.8 μ と比較してやゝ大型であった．しかし，同時に吉村[4](1984）らが見出した大型幼虫の計測値すなわち，体長1.868 μ，体幅150.9 μ，頭球長59.3 μ，頭球幅113.5 μ，食道長503.2 μ のものと比べるとはるかに小型のものであった．著者らの計測方法は，生標本を写真撮影して，同倍率で撮影した対物ミクロメーターの目盛りにより計測したもので，赤羽[3]ら，吉村[4]らのホルマリン固定標本の平均計測法とは方法が異なる．2虫体の頭球鉤数は第1列～第4列までそれぞれ，34－36，35－38，36－39，42－43，と赤羽ら，吉村[4]らの鉤数よりやゝ少ない．**写真2**に見られるように，これら顎口虫第3前期幼虫の頭球鉤の型は鋭いフック状を呈している．ラットへの顎口虫第3前期幼虫の感染と第3後期幼虫の回収成績を表

表1　輸入ドジョウと日本産ドジョウの顎口虫第3前期幼虫の検索成績（1981～1983）

産地		検査数	顎口虫第3前期幼虫 寄生数（%）	虫体数	編差（1尾平均）
中国	南京	260	0/260	0	
	蘇州	101	4/101 (3.9)	11	1～8 (3.6)
	不明	75	2/ 75 (2.6)	4	1～3 (2.0)
韓国	全羅南道	30	0/ 30	0	
	ソウル	30	0/ 30	0	
	不明	110	0/110	0	
台湾	不明	25	0/ 25	0	
日本	新潟	29	0/ 29	0	
	静岡	30	0/ 30	0	
	秋田	32	0/ 32	0	
	茨城	23	0/ 23	0	
計		745	6/745 (0.8)	15	
中国	蘇州	約600尾 4kg		130（1kg当り32.5）	

表2 輸入ドジョウと日本産ドジョウの各種寄生虫検索成績（1981～1983）

産地		検査数	ドジョウの寄生数（%）		
			鉤頭虫類※1)	旋尾線虫類※2)	吸虫類MC※3)
中国	南京	260	52/260 (20.0)	24/260 (9.2)	158/260 (60.8)
	蘇州	101	55/101 (54.5)	48/101 (47.5)	36/101 (35.6)
	不明	75	21/ 75 (28.0)	13/ 75 (17.3)	13/ 75 (17.3)
韓国	全羅南道	30	0	0	5/ 30 (16.7)
	ソウル	30	0	0	0
	不明	110	14/110 (12.7)	0	9/110 (8.2)
台湾	不明	25	5/25 (20.0)	3/ 25 (12.0)	14/ 25 (56.0)
日本	新潟	29	1/ 29 (3.4)	5/ 29 (17.2)	0
	静岡	30	2/ 30 (6.7)	6/ 30 (20.0)	3/ 30 (10.0)
	秋田	32	0	6/ 32 (18.8)	0
	茨城	23	0	0	0
計		745	150/745 (20.1)	105/745 (14.1)	238/745 (31.9)

注） ※ 1）*Acanthocephola*（綱） *Neoechinorhynchida*（目）
2）*Spirurata*（綱） *Agamospirur*（目）
3）*Metacercariae, Trematoda*（綱）

表3 顎口虫第3後期幼虫のラット軀幹筋部位別回収数(%)

第3後期幼虫の摘出法		ガラス板圧平法	人工胃液消化法	
ラット No.		I	II	III
第3前期幼虫の感染数		8	44	44
第3後期幼虫の回収数(%)		5/8 (62.5)	8/44 (18.2)	11/44 (25.0)
回収部位	前肢・背側軀幹筋	2/5 (40.0)	4/8 (50.0)	6/11 (54.5)
	後肢・腰側軀幹筋	2/5 (40.0)	2/8 (25.0)	3/11 (27.3)
	胸腹壁筋・横隔膜	1/5 (20.0)	2/8 (25.0)	0/11
	頭尾ほか軀幹筋	—	—	2/11 (18.2)

3に示す．1982年9月，中国蘇州産ドジョウから，ガラス板圧平法で見い出された本幼虫8隻と，次いで大量購入した同産地ドジョウの内臓の人工胃液消化法によって集めた本幼虫88隻を2分して，計3匹のラットにそれぞれ経口投与した．3か月後の剖検で，それぞれのラット軀幹筋の各部から第3後期顎口虫の幼虫を回収した．回収率（数）を比較すると，ガラス板圧平法は62.5%（5／8）人工胃液消化法は，それぞれ18.2%（8／44），25.0%（11／44）の回収率を示し，回収部位は前後肢軀幹筋からの全幼虫回収数24隻のうち19隻と79.1%に達した．第3後期幼虫はラット筋肉内に約1.1×0.9 mmの被嚢に包まれていた．脱嚢幼虫の体長は3 mm前後，体幅0.35mm，頭球長約0.12mm，頭球幅0.2mmと赤羽[3]らの計測値とほぼ一致した．（**写真4**）頭球鉤の数は第1列から第4列まで39, 40, 42, 38, で，その形態は第3前期幼虫の鋭いフォクを欠くものが多く（**写真5**），大小不整形で鉤列をやや離れて配列するものがあり，また，ラセン状の頭球鉤の配列は，Svasti Daengsvang[5] (SEAMIC, 1980)記載の *Gnathostoma hispidum*, advanced third-stage larva の形態写真と近似している．これらラットから得られた第3後期幼虫計23隻をラットの筋肉に包んで，ネコに経口投与して，糞便中の虫卵検査を適宜行なって来たが，6ケ月後の今日に至るも未だに虫卵の排出を見ていない．

表4 サワガニの産地別肺吸虫メタセルカリア寄生状況（1982年9月）

産地		分布河川	検査数	MC検出数（%） 編差(1個当り平均寄生数)		
				P.miyazakii	*P.sadoensis*	*Macrorchis sp.*
長崎県	湯江		28	2/28 (7.1) 1～20 (10.5)	0	11/28 (39.3) 2～52 (14.3)
愛知県	鳳来町	宇連川	56	9/56 (16.1) 1～41 (6.8)	1/56 (1.8) ＞100	3/56 (5.4) 1～3 (1.7)
	南鳳来町	〃	30	0	0	1/30 (3.3) 24 (24.0)
静岡県	浜松市	天龍川 大田川	28	3～28 (10.7) 1～3 (2.0)	0	0
〃	引佐町	都田川	98	1/98 (0.1) 2 (2.0)	0	5/98 (5.1) 2～27 (11.4)
〃	金谷町	大井川	48	7/48 (14.6) 1～7 (2.7)	0	1/48 (2.1) 1 (1.0)
〃	川根町	〃	44	11/44 (25.0) 1～5 (2.3)	0	0
〃	静岡市	安阿川	52	0	0	0
〃	沼津市	狩野川	24	0	0	0
	計		408	33/408 (8.1)	1/408(0.2)	27/408(6.6)

B1) サワガニの産地別肺吸虫MC寄生状況：表4に示すように，長崎県湯江産のサワガニ28個中2個（7.1%）から，肺吸虫MCをそれぞれ1，20個検出した．愛知県鳳来町産のサワガニ50個中9個（16.1%）から，MC寄生数1～41個（平均6.8個）の本虫幼虫が見出された．また，静岡県の各地から入荷したサワガニについては，大井川以西の各水系産サワガニから，最低で同県引産町産0.1%(1/98)，最高同川根町産25.0%(11/44)のものに本虫MCが検出された．しかしながら，静岡市と沼津市から入荷したサワガニからは，まったく肺吸虫のMCが見い出されなかった．本虫MCの陽性サワガニ1個あたり寄生数は，静岡産が1～7個（平均2個）と少ないのに対し，長崎県産のものは，1～20個（平均10.6個），愛知県産のもの1～41個（平均6.8個）と多数寄生の傾向が認められた． **2)サワガニから得た肺吸虫MCのラットおよびネコに対する感染性と回収した成虫の形態**：本虫のMC各20個ずつをラットとネコ各1匹に経口投与して3か月後に剖検したところ表5に示すように，ラットの肺虫嚢2個から4隻およびネコの肺虫嚢4個から8隻の成虫を回収した．**写真6と7**はラットとネコの肺虫嚢(A)と脱嚢後の成虫(B)を，**写真8**は虫嚢液中に見出された肺吸虫卵を示す．回収された成虫の圧平染色標本(**写真9**)では体長が約6mm，体幅3mm前後と小形であったが単生皮棘を有し，卵巣の分岐は比較的複雑で宮崎肺吸虫の鑑別点とされている形態学的特徴[6]を備えている．虫卵の形態も75×45 μ 前後，卵殻の厚さがほぼ均一で，ウェステルマン肺吸虫卵のようには，卵殻に著明な肥厚が認められない点で，区別される．また，虫卵の最大幅部も中央にあり，これらの諸特徴から宮崎肺吸虫と同定された．また，同時にサワガニから，人体寄生例のない *Paragonims sadoensis* と *Macrorchis sp.* のMCもいくつか検出されたが，同定は省略した．

表5 サワガニから見出された宮崎肺吸虫MCのラットとネコに対する感染成績

実験動物	感染MC数	経過月数	虫嚢数	回収成虫数(%)
ラット	20	3	2	4 (20)
ネコ	20	3	4	8 (40)

C 日本産淡水魚類の産地別寄生虫検索成績：人体寄生の症例報告のある横川吸虫のMC，広節裂頭条虫Plerocercoidの寄生状況について，主として養殖のアユ，ニジマス，ヤマメの検索を産地別に行なった．表6に示されるように，静岡・和歌山・茨城県産のアユ，長野・東京多摩地区産のニジマスおよび東京多摩地区産のヤマメ，計226尾からは，まったく目的の寄生虫を見い出し得なかった．

しかし，天然ものの北海道産のワカサギ3尾中2尾か

表6 日本産淡・汽水魚類の寄生虫検索成績（1983）

検査材料	産地	検査数	検査目的虫体	検出数(%)	備考
ワカサギ	北海道	3	*Anisakis*亜科幼虫	2/3(66.6)2～5(平均3.5隻)	天然
			裂頭条虫 Plerocercoid	0	
	茨城県	6	〃	0	〃
			〃	0	
アユ	静岡県	10	横川吸虫	0	養殖
	和歌山県	10	〃	0	〃
	茨城県	2	〃	0	〃
ニジマス	長野県	14	広節裂頭条虫Plerocercoid	0	養殖（仕入先） 〃 長野・明石町
	東京・五日市町	30	〃	0	〃 〃・穂高町
	〃・日の出町	30	〃	0	〃 八王子市
	〃・桧原町	60	〃	0	〃 奥多摩
	〃・桧原町	20	〃	0	〃 八王子市
ヤマメ	東京・桧原町	20	〃	0	〃 青梅市
	〃・五日市町	30	〃	0	〃 五日市町
計		235			

ら，それぞれ2隻と5隻のアニサキス亜科幼虫を見出し，形態を調べた結果，被鞘穿刺および尾端小棘は認められず，胃部盲嚢と腸盲嚢とがほぼ等しい長さを示し，本虫を，小山ら[7]（1969）記載の *Contracaecum* 属Type cの幼虫と同定した．本調査期間中に立川市で生ザケのマリネ（酢漬け）を食した婦人が急激な胃痛と嘔吐にみまわれ，近くの病院で診療を受ける症例があり，残りのマリネを調べたところ1隻の幼線虫が見い出された．本幼線虫の形態は，体長20mm×体幅1.0mmの淡褐色の色調で，生理食塩水で洗うと淡白色透明に退色し，検査時にはまだ活動性を有していた．**写真10と11**のように，頭端に被鞘穿刺および尾端は鈍円で鋭い小棘を有しており，食道部より胃部がやゝ膨太し胃盲嚢，腸盲嚢を形成せず腸に接続するなど，小山ら[7]記載の *Anisakidae Anisakis* I型幼虫の形態学的特徴を有しており，胃内視鏡検査を受けるよう指示した．この症例は当衛研で扱った初の症例である．

考察

A. 顎口虫（症）に関する報告は，古く，小宮[8]（1952）の綜説によると，田村ら（1919），森下ら（1923）により，中国揚子江地方の邦人寄生例の報告以来，「クインケ型浮腫」として知られており，雷魚の生食による有棘顎口虫（症）の研究が行なわれて来たと記述されている．戦後，わが国の顎口虫症に関する研究は，1950年代に盛んとなり，宮崎ら[9,10]（1953）の有棘顎口虫 *G. spinigerum* の分布とライヒイにおける幼虫の発見，イノシシにおけるドロレス顎口虫 *G. doloresi* の自然感染，加藤[11]（1953）のイタチに寄生する日本顎口虫，*G. nipponicum*，および大鶴ら[12,13,14]（1956，1957，1958），横川ら[15]（1959），高山ら[16]（1959）によって多くの報告がなされて来た．その後，顎口虫に関する話題は1975年ごろまで久しくとぎれていたが，中国との国交回復（1975～6年頃）により，大阪の商社員が中国を訪れ，多くの「クインケ型」浮腫の発症をみたことが端緒となって以来，再び顎口虫症に対する関心が高まりつつあり，いくつかの報告がなされている．荒木[17]（1984）は1980年から1982年までの3年8か月の間に発生した顎口虫症の各県別分布をまとめ

府県名	計	男	女
群馬	1	1	0
茨城	1	1	0
東京	2	2	0
神奈川	2	2	0
京都	7	6	1
奈良	7	7	0
大阪	3	3	0
兵庫	2	2	0
岡山	3	2	1
広島	5	4	1
鳥取	3	2	1
島根	2	2	0
高知	1	1	0
福岡	7	7	0
沖縄	1	1	0
総計	47	43	4

（19歳～54歳）55年1月～57年9月

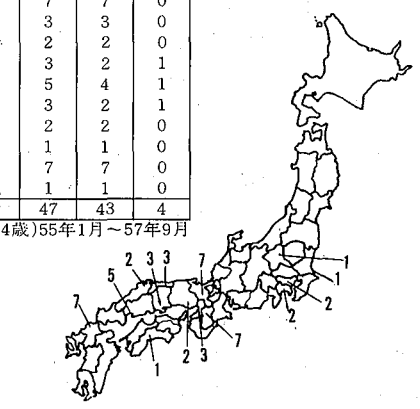


図1 最近の顎口虫症患者分布：47症例
（1980年1月～1982年9月：荒木原図
文献17）

(図1), 合計47例を把握したと報告している. また最近では, 従来からの感染源としての雷魚は食生活になじまなくなって来ており, 逆に, 中国・台湾・韓国産ドジョウの「おどり食い」と呼ばれる奇異な生食が流行し, 本症の新たな感染源となっていることを記述している. 赤羽ら[3] (1982) は, これら輸入ドジョウから見い出される顎口虫の幼虫は, 従来からわが国で見い出されて来た有棘・ドロレス・日本顎口虫の第3期幼虫より極めて小型で, ラットへの感染を経由して, ミニブタに感染させたところ成虫と虫卵を得て, 本虫を剛棘顎口虫 *Gnathostoma hispidum* と同定した. 今回, 著者らが中国蘇州産ドジョウから見出した顎口虫の第3前期幼虫およびラットへの感染実験で得られた第3後期幼虫の形態的特徴は, ほぼ赤羽ら[3]の成績と一致しており, ネコへの感染実験で6か月を経てもなお虫卵の排出を確認していないことから, 有棘顎口虫ではなくブタを終宿主とする剛棘顎口虫と推定される. さらに, 吉村ら[4] (1984) も輸入ドジョウからの顎口虫の検索を行ない, 1982～1983年の11月から9月までの間, 総重量143.6 kgのドジョウから小型幼虫6,579隻, 大型幼虫40隻を検出した. ドジョウ1 kg当りの検出幼虫数は, 月別に差があり11月154.4と最も多く, 次いで4月54.8, 5月45.3, 全平均1 kg当り46.1隻を記載している. 今回, 著者らは1983年の9月に1回だけドジョウ4 kgを購入して調べた結果, 合計130隻の幼虫を検出した. この32.5隻／kgの成績は, 吉村らの9月の成績すなわち23隻／kgをを上まわる成績である. このことから, 金沢市に入荷するドジョウと東京都に入荷するものの顎口虫汚染の度あいは, ほとんど変らないものと推察される. 最近の顎口虫症の報告数は関東地方6例, 関西地方19例と関東が関西の約1／3と少ないが, このことは「関西人はゲテモノ嗜好が強い」といわれていることと関係するのではないかと思われる. ラットへの第3前期幼虫の感染性は, 赤羽ら[3,18] (1983, a,b)は2度の実験でそれぞれ, 34.7%(33／96, ラット5匹) と58.9% (53／90, ラット3匹) の第3後期幼虫を回収しているが, いずれも人工消化法で幼虫を集めたものである., 著者らは, 第3前期幼虫の集め方の違いによる感染性の差を見るため, ガラス板圧平法と人工胃液消化法を比較して, 前者は62.5%(5／8), 後者は21.6% (19／88) と差が認められた. このことは, 大量ドジョウの処理に要する時間を考慮して, 約半分量のドジョウを1夜氷室保存したためか, あるいは4時間の消化時間のため幼虫の活力に悪影響を及ぼしたものと思われる.

B. わが国にはウェステマン肺吸虫 *Paragonimus westermani* と宮崎肺吸虫 *P. miyazakii* の2種が人体寄生の肺吸虫として知られ, 秋田から九州に至る各県に分布している. 野田[19] (1982) は, これら肺吸虫に関する最近の話題として地理的分布を, また影井[20] (1983) は宮崎肺吸虫症のわが国の分布を図2にまとめている.

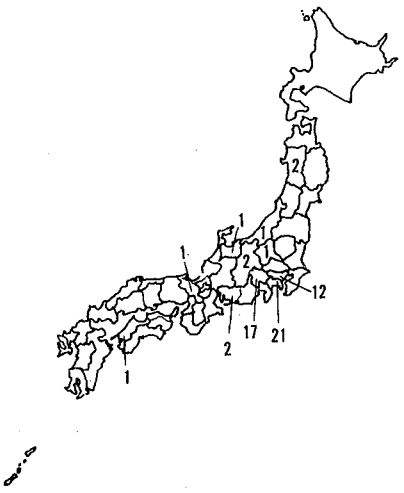


図2 最近の宮崎肺吸虫症患者分布：61症例
(1971～1982：影井原図 文献20)

1970年以前には, ウェステルマン肺吸虫の人体感染例のみが知られていたが, 1971年末ごろから神奈川・東京・山梨など各県で, 気胸および滲出性胸膜炎を主徴とする宮崎肺吸虫症の患者発生が, 横川ら[21] (1974) と林ら[22] (1974) によってあいついで報告されるようになった. 横川ら[23] (1974) の報告で本症と診断されたもの10例および本症が疑われるもの19例が報告され, 詳細な臨床所見および免疫血清学的所見が明らかとなるにつれて, 全国各地の症例数は1982年までの医学中央誌の統計で, 合計75例に達している. この75症例のうち51例が関東地方に集中 (東京12例, 神奈川21例, 山梨17例, 群馬1例) している原因については, 患者からの聞き取り調査により, 静岡県大井川流域のサワガニが, 関東各地の市場を通じて飲食店等に大量に出まわり, ある高級料理店では生のまゝ食卓に供されることを林ら[21]が指摘している. また, 1973年に林ら[21]が行なった調査報告によると, 横浜市で市販されるサワガニを産地別に調べたところ, 静岡県川根町産のサワガニに *P. miyazakii* のMCが非常に高率に認められ, 次いで, この地域を調査して, 大井川西側の沢でMC寄生率が44%台から25%台

の高寄生率を示す地域をつきとめた．以後この地方の調査が集中的に行なわれ，伊藤ら[24]（1975）は，静岡県内の各河川・水系別に調査して，都田川のサワガニの *P. miyazakii* MC 寄生率は 4～6.9％，天龍川上流のものは 7.7％～6.6％，大田川水系のもの 12～22％，および大井川下流域 8 地点のものは 2.9～88.1％を示したが，これら水系の東に位置する瀬戸川，安部川，興津川，富士川，青野川，河津川産の各サワガニからは *P. miyazakii* の MC を全く見い出すことができなかったと報告している．著者らの今回行なった静岡県各産地別サワガニ調査の成績も，伊藤ら，林らの成績を追認する結果となり，しかも当時から約 10 年を経た現在も，大井川流域から入荷するサワガニの *P. miyazakii* MC 寄生率，すなわち人体感染の危険性はほとんど変化がないことを示している．また，長崎県産および愛知県産のサワガニも東京に入荷しており，それぞれ，7.1％～16.1％の MC 寄生率を示しているので，静岡県産のものと同様に十分な注意をはらう必要があろう．今回，著者らは各地より入荷したサワガニから見い出された肺吸虫の MC の混合して，20 個ずつラットとネコ各 1 匹に経口投与したところ，それぞれ 4 隻と 8 隻の成虫を回収した．回収された成虫および虫卵の形態は，すべて，*P. miyazakii* の形態的特徴を示し，ウェステルマン肺吸虫はまったく見出されなかった．長崎県の上田川流域の調査で片峰ら[35]（1962），また，愛知県鳳来地方の調査で正垣ら[36]（1976）はすでにサワガニから本虫 MC を見出しており，今回著者らが行なった調査成績は新たな分布地域を示すものではない，しかしながら，本虫の全国的分布状況が明らかになりつゝある現在，サワガニの入荷状況を適切には握して，随時本虫 MC の寄生状態を調査することにより新たな分布地域が見出される可能性もあろう．C.養殖魚の寄生虫汚染の状況については，主として，アユを中間宿主とする横川吸虫とマス類を中間宿主とする広節裂頭条提に関心が向けられている．影井ら[25]（1968）は，日本産アユの横川吸虫 MC の寄生状況を調査して，全国 66 河川のうち，本虫 MC が全く見出されなかった河川は 11（16％）しかなく，本虫の分布はかなり広範なものと報告している．また，影井ら[26]（1974）は養殖アユについて，琵琶湖産稚魚を 3 ケ月間養殖して築地市場に出荷するアユを調べた結果，3～9 月期のアユの MC の寄生率は 8.7～56.9％に達したが，12 月採取の雅魚を養殖したものでは，全く MC が見い出されなかったと報じている．今回，著者らが行なった調査例は少数でもあり，また，雅魚の入荷先が明らかではないが，7 月に調べた 22 尾のアユからは，全く MC が検出されなかった．この雅魚は逆算すると，3 月～4 月に採取されたものと推定されるが，赤羽ら[27]（1980）の調査結果では，月別の琵琶湖産雅アユの MC 寄生率は，3～6 月期には 0％，7 月期が 30％台，8 月期 70％台と次第に上昇するとの報告もあるので，今後，時期をずらして再度調査する必要があろう．一方，マス類の広節裂頭条虫の幼虫の寄生状況については，著者ら[1]（1978）がすでに報告したように，過去十数年間大きな変動が見られず，ほぼ 30％前後と推定される．今回著者らは，初めての試みとして，養殖ニジマス，ヤマメの調査を行なったが，本虫の Plerocercoid はまったく見い出されなかった．過去に何回かニジマスとヤマメの本虫 Plerocercoid の検索成績が報告されており，影井[28,29]（1980, 1982）の要約によると，いずれも，検出されなかったと報じられている．同様に，木村ら[30]（1975）の北海道道東地区の調査でも本幼虫をまったく見い出していない，その理由として，降海・帰川型のサクラマスとは異なり陸封型のヤマメとニジマスは，本虫の第 1 中間宿主であるケンミジンコおよびこれを食した小魚との接触チャンスが少ない点が考えられる．さて，広節裂頭条虫症のわが国における患者発

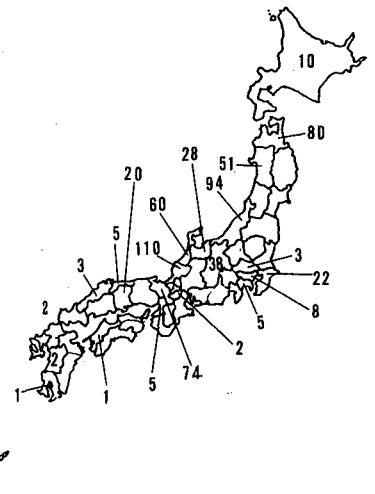


図 3　最近の広節裂頭条虫症患者分布：586例
（1960～1980：条虫症研究班，影井原図　文献29）

生状況は影井らによって，図 3 にまとめられている．1960～1980 年の患者発生数は全国で 586 例に及び，特に日本海沿岸に多発している．このうち，東京の 8 例をはじめとして関東地方の発生数は 38 例と全国発生数の約 6％をしめている．一方，横川吸虫症については，影井ら[31]（1973）が，全国各河川住民の保卵調査で，中国，

四国，九州では10％以上の保卵率を示すほか，アユのMC数と虫卵陽性率との間に明らかな相関が見られたと報じているが，1980年代以後，本症の全国調査は行なわれていない．しかしながら，最近の日本寄生虫予防協会の統計[37]によると，本虫卵検出率は過去5年間ほぼ横ばいで全国平均が，0.25～0.57％前後と，他の蟯虫を除く蠕虫卵検出率を上まわる傾向が認められる．次に，今回の調査で著者らがたまたま北海道産ワカサギを検索したところ，*Contracaecum* Type C幼虫を見い出し，また，急性アニサキス症の原因食とみられる生ザケのマリネから *Anisakis* I型幼虫を見い出したので，わが国のアニサキス症の発生状況について触れてみたい．小山ら[33]

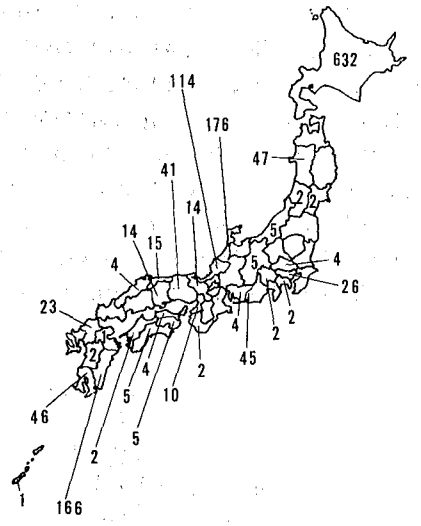


図4　人アニサキス症の全国アンケート調査成績：1424症例
（1960～1981：小山原図を一部改変　文献34）
注）*Anisakis*, *Terranova* またはどちらかの症例

(1982) は本症の全国アンケート調査成績を図4にまとめ，過去20年間に関東地方30例をはじめ全国で1,424の症例があったと報告している．今回，著者らが遭遇した症例は，追加報告すべき初めての症例であり，生ザケのマリネといういわば，調理品を介して感染し，食酢中ですら，検査時まで本アニサキス幼虫が生存したことは特筆される．*Anisakis* 亜科幼虫のうち，人体寄生例のあるものは *Anisakis* と *Terranova* のみであって，今回ワカサギより見い出された *Contracaecum* による症例はないが，汽水域の湖沼に棲息する魚類に本虫が見出されたことにより，近縁種のAnisakis幼虫が汽水域の魚類をも汚染している可能性が強い．現在，ワカサギの近縁種であるチカ *Hypomesus japonicus*，シシャモ *Sprinchus lanceolatas*，キュウリウオ *Osmerus dentex* 等からは *Diphyllobothrium* 属の幼虫が見い出された報告[32,33] (1979) もある．また，イワシ類を対象に大複殖門条虫 *Diplogonoporus grandis* plerocercoidの検索の必要性や，ボラやハゼ科の汽水魚からの有害異形吸虫 *Heterophyes heterophys nocens* のMC検索の必要性がさけばれている．したがって，今回の築地中央市場に入荷した各種魚介類の寄生虫検索を端緒として，今後も引き続き寄生虫学的検索を積み重ね，食品衛生学的監視体制をさらに補強してゆくべきと考える．

ま と め

1981～1983年の2年間に，築地中央市場に入荷した中国産ドジョウおよび日本産魚介類の寄生虫検索を行ない，中国産ドジョウからは剛棘顎口虫 *Gnathostoma hispidum* の第3期幼虫を，またさらに，日本各地から入荷したサワガニから宮崎肺吸虫 *Paragonimus miyazakii* のMCを多数見い出した．これら見い出された幼虫を実験動物に投与して，成虫および虫卵を回収し，また成長段階の幼虫を得て形態学的特徴から種の同定を行なった．加えて，静岡県大井川流域のサワガニのMC寄生率は10年前と変らないことを明らかにした．試みに北海道産のワカサギを調べたところ，アニサキス亜科幼虫 *Contracaecum* Type Cを見出し，汽水魚のアニサキス汚染の可能性を示唆した．特筆される症例として，立川市のアニサキス症1例を追加し，原因食として考えられる生ザケのマリネから見い出された幼虫を *Anisakis* I型と同定した．養殖アユからは横川吸虫 *Metagonimus yokogavai* のMCがまったく見出されず，また東京多摩地区の養殖マスとヤマメには，広節裂頭条虫のPlerocercoidがまったく検出されなかった．これら人体症例のある各種寄生虫検索成績について，全国の症例分布を中心に，文献的考察を述べた．

謝辞　本研究にあたり材料の入手と輸送にご協力をいただいた，衛生局公衆衛生部食品衛生課，五日市保健所および市場衛生検査所の関係各位に深謝します．

（本研究は昭和57～59年度当所課題研究と実施したもので，木研究の一部は東京都衛生局学会昭和57年10月で発表した．）

文　献

1) 村田以和夫，大久保暢夫，山田　満，金井日出夫：東京衛研年報，29－1，95,1978
2) 村田以和夫，宮沢貞雄，寺山　武，伊藤勝男，松崎

修, 名雪雅義, 山崎英也：東京都衛生局学会誌, No 69, 64,1982
3) 赤羽啓栄, 岩田久寿郎, 宮崎一郎：寄生虫学雑誌, 31, (6), 507,1982
4) 吉村裕之, 近藤力王至, 大西義博, 赤尾信明, 高倉吉正：食品衛生研究, 34(4), 87,1984
5) Daengsvang, Svasti : *A monograph on the Genus Gnathostoma & Gnathostomiasis in Thailand,* SEAMIC, Southeast Asian Medical Information Center, Tokyo, 1980
6) 富村 保, 森鼻迪夫, 森時弘敬, 野村紘一, 来原兄忠, 志野晟生, 竹山晃市：寄生虫学雑誌, 13,(3),243, 1964
7) 小山 力, 小林昭夫, 熊田三由, 小宮義孝, 大島智夫, 影井 昇, 石井俊雄, 町田昌昭：寄生虫学雑誌, 18,(5),466,1969
8) 小宮義孝：日本医事新報, 1480,31－3003,1952(昭.27)
昇) 宮崎一郎, 加茂 甫, 菊地 正：日本医事新報, 1543,33－4497,1953 (昭.27)
10) 宮崎一郎, 石井洋一, 磯部親則：医学と生物学, 29,(2),65,1953 (昭,28)
11) 加藤和一郎：医学と生物学, 26,(4),165,1953(昭.28)
12) 大鶴正満, 片桐正三：医学と生物学, 38,(5),140, 1956 (昭.31)
13) 大鶴正満, 片桐正三, 浅利 譲, 田中 宏：医学と生物学, 43,(2),42,1957 (昭.32)
14) 大鶴正満, 片桐正三：寄生虫雑誌, 7, (6),644,1958
15) 横川宗雄, 吉村裕之, 鈴木重一：寄生虫学雑誌, 8, (1),22,1959
16) 高山四郎, 白川 充, 平野 宏, ：寄生虫学雑誌, 8, (5),829,1959
17) 荒木恒治：*Medical Technology*, 12,(2),132,1984
18) 赤羽啓栄, 真子俊博, 岩田久寿郎, 宮崎一郎：寄生虫学雑誌, 32,(5),459,1983
19) 野田亮二：モダンメディア, 28,(9),444,1982
20) 影井 昇：*Medical Tribune*, P27, 8月11日,1983
21) 横川宗雄, 荒木国興, 斉藤祺一, 百瀬達也, 木村 満, 鈴木昭次：寄生虫学雑誌, 23, (増刊号), 59,1974
22) 林 滋生, 山本 久, 菅沼洋達, 元吉清子, 秋山雅晴：寄生虫学雑誌, 23, (増刊号), 60,1974
23) 横川宗雄, 荒木国興, 斉藤祺一, 百瀬達也, 木村 満, 鈴木昭次, 千葉直彦, 久津見晴彦, 薬袋 忠：寄生虫学雑誌, 23,(4),167,1974
24) 伊藤二郎, 望月 久：寄生虫学雑誌, 24,(4),241, 1975
25) 影井 昇, 大島智夫：寄生虫学雑誌, 17,(6),461, 1968
26) 影井 昇, 木畑美智江, 平山淡二：公衆衛生院研究報告, 23,(4),1974
27) 赤羽啓栄, 小島荘明, 内川公人, 横川宗雄, 畑 英一, 草野文嗣, 西田清信：29,(3),189,1980
28) 影井 昇：モダンメディア, 26,(7),1980
29) 影井 昇：モダンメディア, 28,(10),1982
30) 木村卓郎：全国食品衛生監視員研修会研究発表抄録 174,1975 (昭.50) 10月
31) 影井 昇, 木畑美知江：寄生虫学雑誌, 22,(4),218, 1973
32) 堀田猛雄, 千葉賢保, 長谷川英男, 関川弘雄, 大鶴正満：寄生虫学雑誌, 27,(4),357,1978
33) 堀田猛雄, 千葉賢保, 長谷川英男, 関川弘雄, 大鶴正満：寄生虫学雑誌, 28, (増刊号), 46,1979
34) 小山 力, 荒木 潤, 町田昌昭, 唐沢洋一：モダンメディア 28,(9),12,1982
35) 片峰大助, 本村主生, 今井淳一：第15回日本寄生虫学会南日本支部大会講演要旨 12,1962
36) 正垣幸男, 堀江邦夫, 伊藤玲子：第32回日本寄生虫学会西日本支部大会記事 26, 2 (補) 32,1977
37) 予防医学ジャーナル 資料号 No.167,58, (昭. 50. 8.15) 財団法人予防医学中央会・日本寄生虫予防会

写真説明

1 中国蘇州産ドジョウより見い出された*Gnathostoma hipidum*第3前期幼虫（×100で撮影，スケール100 μ）

2 同上　頭球および頭球鉤の拡大（×400で撮影，スケール20 μ）

3 ドジョウ内臓に被嚢する *Gnathostoma hispidum* 第3前期幼虫（×100で撮影，スケール100 μ）

4 脱嚢した*Gnathostoma hispidum*第3後期幼虫（×50で撮影，スケール0.5mm）

5 *Gnathostoma hispidum*第3後期幼虫の頭球部および食道，頚嚢部の拡大（×100で撮影，スケール0.2 mm）

6 *Paragonimus miyazdkii* 感染ラットの肺虫嚢Aおよび脱嚢後の成虫B

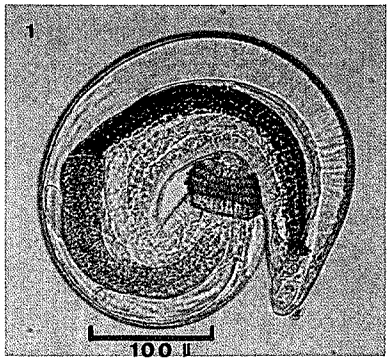
7 *Paragonimus miyazakii* 感染ネコの肺虫嚢A矢印

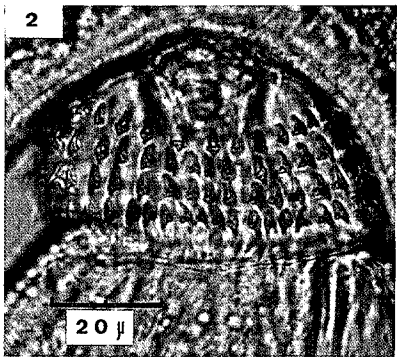
8 虫嚢内に排卵された*Paragonimus miyazakii* の虫卵（×400で撮影，スケール50 μ）

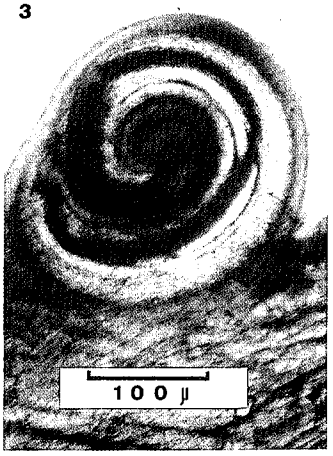
9 *Paragonimus miyazakii*成虫圧平標本，カルミン染色Bioleit封入（スケール：2mm）

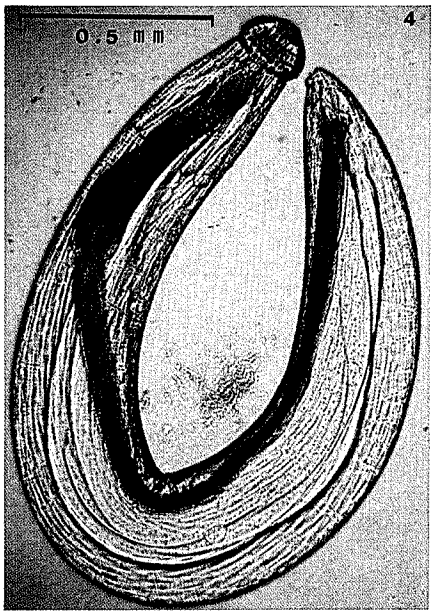
10 *Anisakis* I 型幼虫の頭部拡大，被鞘穿刺a，ホルマリン固定

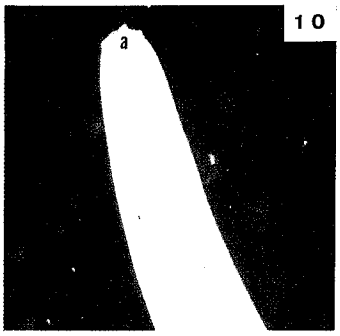
11 *Ansakis* I 型幼虫の尾部拡大，鈍円，小棘b，ホルマリン固定

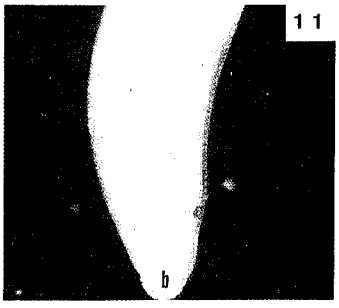

1
100 μ


2
20 μ

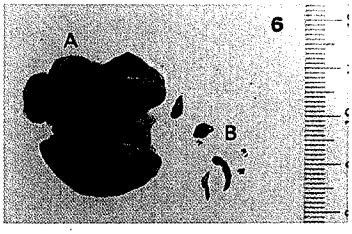

3
100 μ

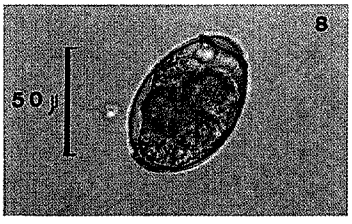

0.5 mm
4

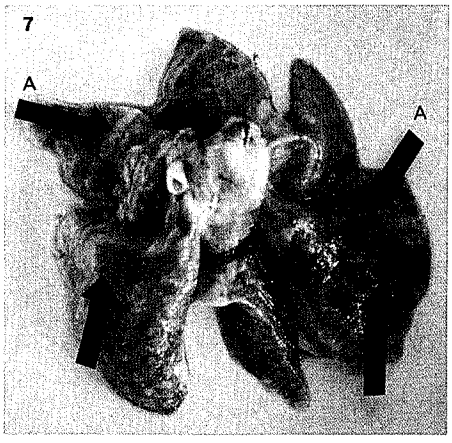

10
a

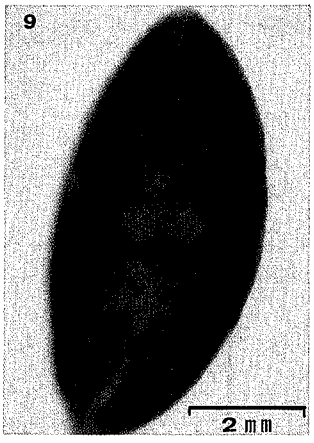

11
b

5
0.2 mm


6
A
B


8
50 μ


7
A
A


9
2 mm

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 175-178, 1984

東京都における PCB 汚染の実態について（第 12 報）
食品中の PCB 含有量調査

岸本清子*, 竹内正博*, 風間成孔*

Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (XII)
Polychlorinated Biphenyl Concentrations of Foods

KIYOKO KISHIMOTO*, MASAHIRO TAKEUCHI* and MASAYOSHI KAZAMA*

Keywords : ポリ塩化ビフェニール Polychlorinated Biphenyls, 汚染 pollution, 食品 foods

著者らはポリ塩化ビフェニール（以下 PCB と略す）による汚染状況を把握する目的で，都内に流通する魚介類を中心とした食品等の PCB 含有量を調査してきた[1]．本報では 1983 年度の結果を報告する．

実験方法

調査試料は 1983 年 4 月から 1984 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市場入荷魚介類 51 種類 151 検飢，東京湾産の魚介類 5 種類 80 検体，市場外流通の輸入魚介類 30 検体，水産加工品 40 検体，食肉 6 種類 30 検体，卵 2 種類 20 検体，乳製品 6 種類 50 検体，ベビーフード 20 検体，食用油脂 3 種類 20 検体，健康食品 16 検体，容器包装 20 検体，合計 477 検体である．

定量は厚生省環境衛生局 PCB 分析研究班による統一分析法[2]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行なった．

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．151 検体について検査したところ，最高値はタチウオの 0.61 ppm で，以下比較的高濃度に検出されたものはコノシロ 0.59 ppm，スズキ 0.55 ppm であった．またこれらの魚種の平均値はそれぞれ 0.29 ppm,0.29 ppm,0.17 ppm であり，他の魚種に比べてかなり高濃度であるが，暫定規制値（遠洋沖合魚介類 0.5 ppm,内海内湾魚介類 3.0 ppm）を越えるものはなかった．市場入荷魚介類全体の平均値は 0.04 ppm であり前年とほぼ同様の結果であった．また，0.01 ppm 以上の PCB を検出したものは 151 検体中 96 検体で検出率は 63.6 %であった．本調査の初期すなわち PCB の製造および規制措置がとられた 1972 年から 2 ～ 3 年間 PCB 濃度は減少傾向を示したが，それ以降ほとんど経年変化が認められず今日に至っているものと考えられ，魚介類に関してはいまだに低濃度ではあるが汚染が続いていることになる．

東京湾産魚介類の PCB 含有量を Table 2 に示す．スズキは全長 45 cm から 87 cm にわたる 60 検体について検査したところ，0.04 ppm から 3.13 ppm の範囲で全検体から平均 0.71 ppm の PCB が検出され，Table 1 に示した市場入荷のスズキと比較してかなり高い値を示している．ボラ，コノシロ，ハゼについても全検体から PCB が検出され，ボラ，コノシロの濃度は前述の市場入荷の同魚種よりも若干高くなっており，東京湾は依然として他の海域より PCB 汚染の度合が高いことが推察される．アサリは大井埠頭(大井)，神奈川県野島公園(野島)，葛西沖三枚洲(三枚洲)，富津市富津公園(富津)の 4 地点で 5 月，7 月，9 月の 3 回にわたって採取した．大井，三枚洲で採取されたアサリは全検体から PCB が検出され，それぞれ平均 0.02 ppm，0.01 ppm を示した．野島および富津では各 1 検体から 0.01 ppm を検出し，平均 0.00 ppm であった．大井の汚染度が高いという傾向も例年と同様であった．

輸入魚介類等の PCB 含有量を Table 3 に示す．エビ，イカなど 30 検体について検査した．このうち，スウェーデン産のカズノコが最高値 0.08 ppm を示し，カナダ産のニシンが 0.04, 0.05 ppm，ノルウェー産のシシャモが 0.05 ppm を示した．この他アナゴ，ロコ貝，サケなどからはほとんど検出されなかった．

* 東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科　160 東京都新宿区百人町 3 －24－ 1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Concentrations of PCB in Fishes (ppm on wet basis)

Samples	N	Range	Mean
Ainame (greenling, *Hexagrammos otakii*)	1		0.02
Aji (horse-mackerel, *Trachrus trachrus*)	6	0.00—0.04	0.01
Akayagara (flute mouth, *Fistularia petimba*)	1		0.00
Anago (conger eel, *Astroconger myriaster*)	1		0.17
Ara (sawedged perch, *Niphon spinosus*)	1		0.01
Ayu (ayu sweetfish, *Plecoglossus altivelis*)	3	0.00—0.07	0.03
Bora (grey mullet, *Mugil cephalus*)	5	0.01—0.12	0.05
Buri (yellow tail, *Seriola quinqueradiata*)	1		0.09
Dojo (mudfish, *Misgurunus anguillicaudatus*)	1		0.00
Hamo (sea eel, *Muraenesox cinereus*)	1		0.04
Himeji (goatfish, *Upeneus bensasi*)	1		0.00
Hirame (flounder, *Paralichthys olivaceus*)	1		0.02
Houbou (gurnard, *Chelidonichthys kumn*)	1		0.00
Isaki (grunt, *Parapristipoma trilineatum*)	4	0.00—0.01	0.01
Iwashi (sardine, *Sardinos melanosticta*)	8	0.01—0.30	0.07
Kamasu (barracuda, *Sphyraena japonicus*)	3	0.01—0.13	0.06
Kasago (scorpiofish, *Sebastiscus marmoratus*)	1		0.00
Katsuo (bonito, *Katsuwonus pelamis*)	5	0.00—0.04	0.01
Kawayatsume (*Entospherus japonicus*)	2	0.11—0.13	0.12
Kichiji (*Sebastolobus macrochir*)	6	0.01—0.05	0.02
Kinmedai (alfoncino, *Beryx splendens*)	5	0.03—0.19	0.08
Kisu (sillago, *Sillago sihama*)	1		0.01
Koi (carp, *Cyprinus carpio*)	1		0.00
Konoshiro (gizzard shad, *Clupanodon punctatus*)	4	0.13—0.59	0.29
Kuroajimodoki (*Formio niger*)	1		0.00
Madai (sea bream, *Chrysophrys major*)	17	0.00—0.03	0.00
Madara (codfish, *Gadus macrocephalus*)	6	0.00—0.02	0.01
Magarei (flat fish, *Limanda herzensteini*)	3	0.01—0.02	0.01
Maguro (tuna, *Thunnus albacares*)	2	0.01—0.03	0.02
Managatsuo (harvest fish, *Pampus argenteus*)	3	0.00—0.06	0.02
Mebaru (gopher, *Sebastes inermis*)	5	0.00—0.03	0.01
Menuke (rockfish, *Sebastes matsubarai*)	2	0.04—0.08	0.06
Mishimaokoze (star-gazer, *Uranoscopus japonicus*)	1		0.01
Mutsu (japanese bluefish, *Scombrops boops*)	1		0.01
Namako (sea cucumber, *Stichopus japonicus*)	2		0.00
Nijimasu (rainbow trout, *Salmo gairdnerii irideus*)	2		0.00
Nishin (herring, *Clupea pallasi*)	4	0.01—0.06	0.04
Onaga (*Alopias pelagicus*)	1		0.01
Oniokoze (devil stinger, *Inimicus japonicus*)	1		0.00
Saba (mackerel, *Pneumotophorus japonicus*)	6	0.01—0.07	0.03
Sanma (mackerel pike, *Cololabis saira*)	4	0.00—0.13	0.05
Shiira (dorado, *Coryphaena hippurus*)	1		0.01
Silver	1		0.00
Suma (little tuna, *Euthynnus affinis*)	1		0.14
Surume-ika (cattlefish, *Todarades pacificus*)	6	0.00—0.01	0.00
Suzuki (perch, *Lataolabrax japonicus*)	4	0.03—0.55	0.17
Tachiuo (hairtail, *Trichiurus lepturus*)	4	0.06—0.61	0.29
Takabe (*Labracoglossa argentiventris*)	1		0.02
Tobiuo (flying fish, *Prognichthys agoo*)	3		0.00
Wakasagi (pond smelt, *Hypomesus olidus*)	1		0.01
Total	151	0.00—0.61	0.04

N : number of samples

Table 2. PCB Concentrations in Fishes Collected from Tokyo Bay (ppm)

Samples	Sampling station	N	Range	Mean
Perch		60	0.04—3.13	0.71
Grey mullet		4	0.12—0.28	0.23
Gizzard shad		3	0.31—0.64	0.51
Goby		1		0.23
Short-necked clam	Ohi	3	0.01—0.03	0.02
	Nojima	3	0.00—0.01	0.00
	Sanmaizu	3		0.01
	Futtsu	3	0.00—0.01	0.00

N : number of samples

Table 3. PCB Concentrations in Marine Products, Meats and others (ppm)

Samples		N	Range	Mean
Marin product (imported)				
	shrimp	8	0.00—0.01	0.00
	cattle fish	2		0.00
	herring	2	0.04—0.05	0.05
	hering roe	2	0.00—0.08	0.04
	shishamo smelt	1		0.05
	others	15	0.00—0.01	0.00
Processed marine product		40	0.00—2.93	0.14
Meat	pork	5		0.00
	pig liver	5		0.00
	beef	5		0.00
	cow liver	5		0.00
	chicken	5	0.00—0.01	0.00
	chicken liver	5	0.00—0.01	0.00
Egg	hen	19	0.00—0.01	0.00
	quail	1		0.00
Edible fat	refined lard	11		0.00
	lard	4		0.00
	tallow	5	0.00—0.01	0.00
Health food	animal oil	7	0.00—0.16	0.04
	vegetable oil	9		0.00
Baby food		20		0.00
Food wrapper		20		0.00

N : number of samples

水産加工品 40 検体について検査した結果，最高値はボラの卵巣から作られたカラスミの 2.93 ppm であり，この他アン肝水煮缶詰 1.32 ppm，ままかり酢漬 0.43 ppm，ニシン油漬 0.28 ppm，トド肉缶詰 0.11 ppm が高い値を示しているが魚肉練製品，魚介類の干物などは低濃度であった．

肉類は豚肉，豚肝，牛肉，牛肝，鶏肉，鶏肝の各 5 検体について検査したが，鶏肉，鶏肝各 1 検体から 0.01

ppmを検出した他は不検出であった.

鶏卵19検体，うずら卵1検体については鶏卵1検体から0.01 ppm検出されたが，他からは検出されなかった.

食用油脂はプラスチック容器入りの精製ラード11検体，豚脂4検体，牛脂5検体のPCB含有量を測定したが，牛脂1検体から0.01 ppmを検出した他は不検出であった.

いわゆる健康食品として最近市場に出回っている食用油のカプセル製品等16検体のPCB含有量を調査した. 深海鮫の抽出エキス等動物性油7検体中2検体から0.16 ppm，0.11ppmが検出されたが，植物性すなわち小麦や玄米の胚芽油など9検体からはPCBは検出されなかった.

ベビーフード20検体からはPCBは検出されなかった. 内訳はビスケット，大豆調整紛末，肉入り野菜のビン詰めなどである.

容器包装は紙ナプキン，紙皿，各種合成樹脂製のラップ，調理器具など20検体について調査したがPCBは検出されなかった.

乳製品のPCB含有量測定結果をTable 4に示す. バターは5検体中3検体からPCBを検出し，平均0.01 ppmであった. チーズはナチュラルチーズ11検体中7検体から，プロセスチーズは1検体からPCBが検出され，平均0.03 ppmであった. コンデンスミルクは3検体中1検体から0.01 ppm検出され，ヨーグルト，育児用粉乳，牛乳からはPCBは検出されなかった.

Table 4. PCB Concentrations in Dairy Products (ppm)

Samples	N	Range	Mean
Butter	5	0.00—0.03	0.01
Cheese	12	0.00—0.13	0.03
Condensed milk	3	0.00—0.01	0.00
Yoghurt	1		0.00
Modified milk powder	10		0.00
Milk	19		0.00

N : number of samples

まとめ

1983年度の東京都におけるPCB汚染状況を調査する目的で魚介類，水産加工品，肉類，食用油脂，ベビーフード，容器包装，乳製品のPCB含有量を測定した. いずれも暫定規制値を越えるものはなく，前年度の調査結果と比較しても有意差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) 岸本清子，水石和子，竹内正博，吉原武俊：東京衛研年報，34,142−145,1983
2) 厚生省環境衛生局PCB分析研究班：分析方法に関する研究（1972年1月）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 179-183, 1984

東京都におけるPCB汚染の実態について（第13報）
東京湾産スズキおよびアサリ中の残留PCBのモニタリング

竹内　正博*, 水石　和子*, 岸本　清子*, 風間　成孔*

Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (XIII)
Monitoring of Polychlorinated Biphenyls in Seabass and Short- necked Clam from Tokyo Bay

MASAHIRO TAKEUCHI*, KAZUKO MIZUISHI*, KIYOKO KISHIMOTO* and MASAYOSHI KAZAMA*

In order to monitor the pollution of Tokyo Bay, polychlorinated biphenyls (PCB) remaining in seabass and short- necked clam were determined by ECD gas chromatography. Seabasses have been collected in Tokyo Bay from May to October in 1976, 1982 and 1983, while short-necked clams have been collected at the fixed sampling points: Ohi, Sanmaizu, Zinko- nagisa, Kanazawa- hakkei and Futtsu from May to September during 1979−1983.

It is recognized that the PCB content of seabasses and short-necked clams tended to decrease significantly until about 1980, increase slightly in 1981, and decrease again in the last two years. The degree of the pollution by the points was that it was the highest at Ohi, and the lowest at Futtsu. This tendency is in accord with that of the pollution of Tokyo Bay with heavy metals.

Keywords: Polychlorinated Biphenyls, Tokyo Bay, Fish and Shellfish, Seabass, Short- necked Clam, Monitoring.

緒　　言

1972年（昭和47年）ポリ塩化ビフェニール(PCB)による汚染防止対策として，製造が停止され使用が大巾に制限されると同時に，食品に対する暫定規制措置[1]が取られてから，すでに10年以上が経過した．しかし，当初の予想通り環境中には未だに相当量の残留が認められ，魚介類をはじめとする多くの食品を汚染している[2]．

著者らはPCB汚染が社会問題化し，その対応策が行政上の課題として検討され始めた1971年当時から一貫して，食品衛生および環境汚染監視の立場から魚介類を中心に汚染調査を行っており，毎年その実態について報告してきた[3]．本報では，これまでに調査した東京湾産のスズキおよびアサリに焦点を当て，東京湾のPCB汚染について最近の推移を考察した．

調 査 方 法

1．試料

本調査において対象としたスズキは東京湾の葛西沖から羽田沖にかけての海域，すなわち湾奥部で1976年，1982年および1983年の3年間にわたって，毎年5月から10月にかけて採取した．採取後，体長(頭の先端から尾ビレの付け根まで）および体重を測定してから三枚におろし，筋肉部についてホモジナイザーで均一化したものを試料とした．試料は−20℃で冷凍保存した．スズキ*(Lateolabrax japonicus)*はスズキ目，スズキ科に属する大型魚で日本各地の沿岸，東シナ海，台湾などに分布しており，内湾の急深な岩礁地帯に棲息し，外海に面した湾口部で11月から2月にかけて産卵する．魚令によって異なるが，夏場には湾内沿岸部や汽水域に入り，時に

* 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, Shinjukuku, Tokyo, 160 Japan

は淡水域に上っていくものもある．当然成長過程において外海へ出ていく場合もあるが，ほとんどの時期を湾内およびその周辺で過すので，湾内で採取したものは同一母集団に属するものとみなした[4]．

アサリについては採取地として神奈川県金沢八景（野島公園），大井阜頭(京浜島)，葛西沖三枚洲，葛西沖人工渚，千葉県富津（富津公園）の5定点を設定し，1979年から1983年の5年間にわたって，毎年5月から10月にかけて3～4回約1kgずつ採取した．調査開始当初は上記5定点以外に千葉中央港，木更津等にも採取地を設定していたが，途中護岸工事，埋立て等の理由により採取不能となったため，5定点についてのみ継続調査を行った．各定点の位置を Fig. 1. に示す．アサリは採取後3％食塩水に浸して一夜砂出しを行ってから可食部を取り出し，十分水切りしてからホモジナイザーで均一化した．これをスズキの場合と同様，−20℃で冷凍保存した．

2. 分析法

冷凍保存した試料を解凍し，スズキの場合は10g，アサリの場合は30gをサンプリングし，アルカリ分解法[5]によって試験溶液を調製した．PCBの定量はECDガスクロマトグラフィーによって行ない，数値化は衛生試験法に定められた係数法[6]に従った．

スズキおよびアサリの代表的なガスクロマトグラムを Fig. 2 に示す．また，それぞれのガスクロマトグラムのピーク高から係数法によって求めたPCB組成比を Table 1 に示す．

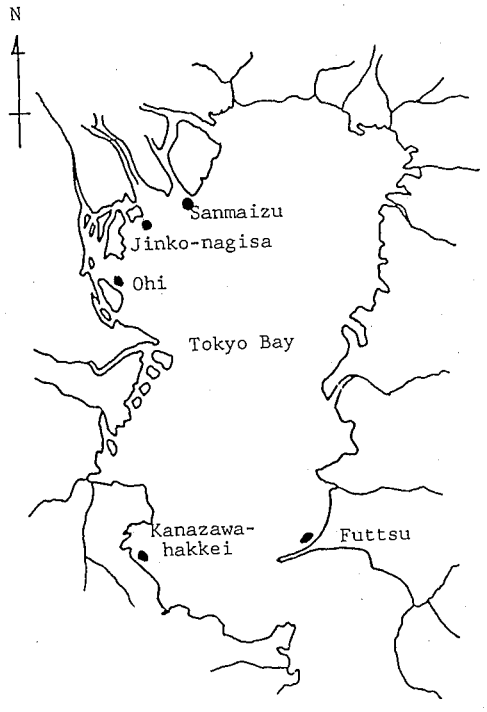


Fig. 1. Sampling Points of Short-necked Clam

結果および考察

1. スズキについて

1) 体長と体重の相関性：体長と体重の対数プロットを Fig. 3 に示す．この場合の回帰直線は $\log Y = 2.703 \log X - 1.359$ によって表わされるので，おおむね体重は体長の3乗に比例するといえる．このような相関性は理論的予想と一致しており，本調査におけるスズキの

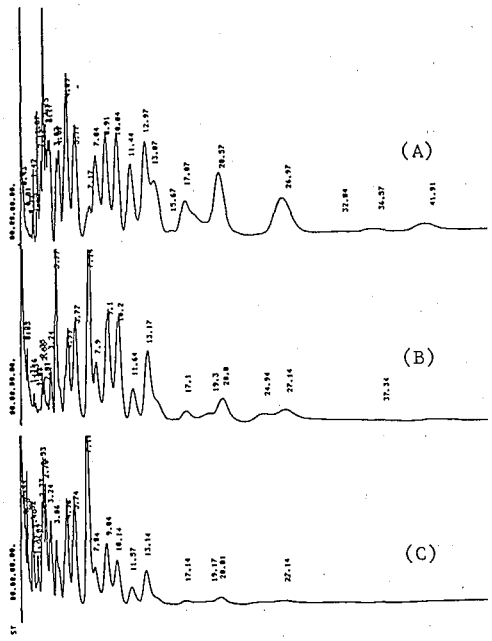


Fig. 2. Gas Chromatograms of Standard and Samples
(A) : KC-300, KC-400, KC-500, KC-600 (1:1:1:1) ; 5ng,
(B) : Seabass,
(C) : Short-necked Clam,
Column : 1.5% Silicone OV-17＋1.95% Silicone DC QF-1, 3.2mm×1.0m,
Temp. : Column ; 200°C, ECD ; 280°C

Table 1. PCB Content of Samples Classified with the Number of Chlorine Atoms(%)

Samples	No. of Cl								Total
	2	3	4	5	6	7	8	9	
Seabass	0.1	1.7	30.6	45.7	17.0	4.1	0.2	0	99.4
Short-necked Clam	4.9	21.6	39.1	20.0	12.2	2.1	0	0	99.9

採取が統計的に正しく行なわれている，具体的にいえば試料が産卵あるいはエサ不足等の体重を減少させる因子の影響を受けていないことを示す傍証と考えることができる．

2) 体長と PCB 含有量の相関性：'76年，'82年および'83年産のスズキについて，体長と PCB 含有量の関係を Fig. 4 に示す．各年度の相関係数 r は 0.526, −0.114, 0.415であり，それぞれ対応する r (12 : 0.05)＝0.532, r (35 ; 0.05)＝0.275, r (35 ; 0.01)＝0.418よりいずれも小さく，帰無仮説H0 ; 母相関係数 $\rho=0$ を棄却することができない．したがって，スズキの体長と PCB 含有量との間には"真に相関関係があるとはいえない"という結果になった．このような検定結果に対する理由として，加令，季節，棲息場所によって複雑に変化する食性が考えられるが，スズキの習性については不明な部分

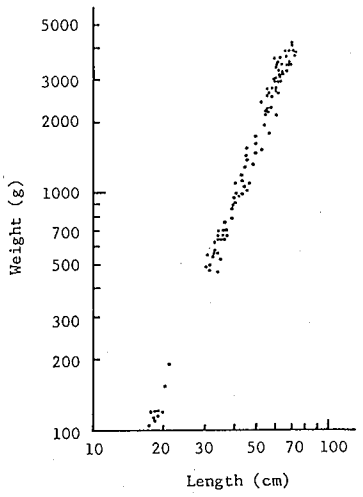


Fig. 3. Correlation between Body Length and Weight of Seabass

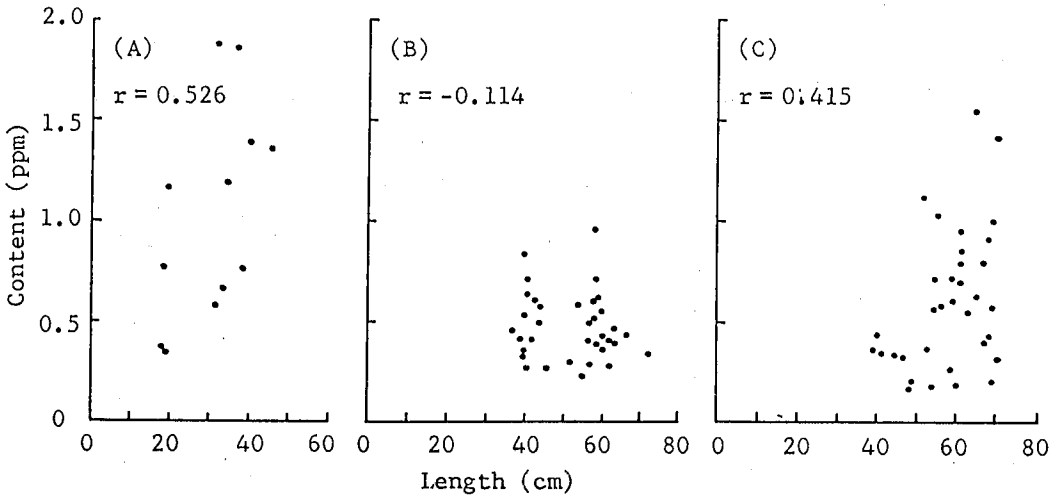


Fig. 4. Correlation between Body Length and PCB Content of Seabass
(A): 1976, (B): 1982, (C):1983

が多いので，ここでは一応体長と PCB 含有量には相関性が無いものとみなした．ただし，瀬戸ら[7]の調査のように同一時期に，同一場所でかつ魚令を揃えてサンプリングした場合には，体長と PCB 含有量には相関があるとも考えられる．

3) PCB 含有量の経年推移：'76年から'83年までの PCB 含有量の推移を Fig. 5 に示す．ただし，'78年から'81年は環境庁の調査結果[8]を引用した．先に述べたように，スズキの体長と PCB 含有量には相関性は無いことから，含有量を体長補正することなく各年度の平均値を単純に比較することによって，経年推移をたどることができるものと考えられる．

そこで著者らが調査した'76年，'82年および'83年の値について検定を行ったところ，'76年は'82年および'83年より有意に高いことが有意水準1％で認められた．しかし，'82年と'83年間には有意差は認められなかった．したがって，'82年および'83年のスズキの PCB 含有量は'76年当時より確実に低下したといえる．これを環境庁の調査結果と合せて考察すると，'76年から'80年頃まで低減化傾向を示してきた PCB 含有量が'81年に若干増加し，その後'82年，'83年と再び低下傾向を示しつつ現在に至っているものと推定される．

2. アサリについて

1) 採取地の汚染度：'79年5月から'83年9月までの5年間にわたるアサリの PCB 含有量を Table 2 に示す．アサリの PCB 含有量がそれぞれの定点の汚染度を反映しているという前提の下に，5年間の平均値 $\bar{x}$ を t 検定すると，有意水準5％で大井が他の4定点より高く，また富津が他の4定点より低いことが認められた．三枚洲，人工渚，金沢八景の3定点間には有意差は認められなかった．これらのことから，東京湾の PCB 汚染度は大井付近が最も高く，ついで人工渚，三枚洲，金沢八景の3定点付近が続き，富津付近が最も低いといえる．これらの傾向は，立川ら[9,10]が 1972 年に底質について行った東京湾の PCB 汚染調査の結果と一致しており，また堀井ら[11]および安野ら[12]が東京湾のアサリと底質について調査した重金属汚染の傾向とも一致している．

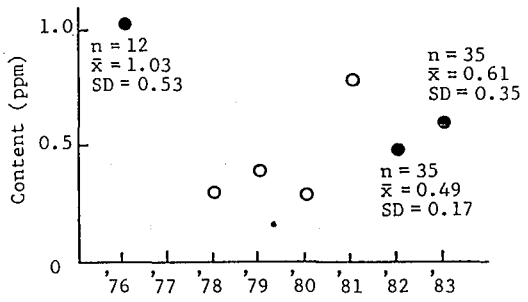


Fig. 5. Annual Change in PCB Content of Seabass
The data during '78－'81 were quoted from ref. 8.

Table 2. PCB Content of Short-necked Clam Collected at Each Point (ppb)

Points	'79				'80			'81			'82			'83			$\bar{x}$
	5	6	7	8	5	7	9	5	7	9	5	7	9	5	7	9	(SD)
Ohi	20	22	16	20	10	20	10	24 38	20	60	23	9	28	13	26	9	20.76
		(19.5)				(13.3)			(35.0)			(20.0)			(16.0)		(8.42)
Jinko-nagisa	—	4	4	10	4	10	10	13	4	—	8	5	—	—	—	8	7.40
		(6.0)				(8.0)			(8.5)			(6.5)			(8.0)		(1.08)
Sanmaizu	10	2	2	10	10	10	10	11	6	6	14	5	12	10	5	—	8.30
		(6.0)				(10.0)			(7.7)			(10.3)			(7.5)		(1.82)
Kanazawa-hakkei	10	3	10	4	4	10	10	6	2	10	5	4	10	10	4	4	6.62
		(6.8)				(8.0)			(6.0)			(6.3)			(6.0)		(0.84)
Futtsu	10	1	5	4	4	4	4	3	1	9	2	1	10	4	2	8	4.46
		(5.0)				(4.0)			(4.3)			(4.3)			(4.7)		(0.39)

Values in brackets: Annual average, $\bar{x}$: Average during '79—'83

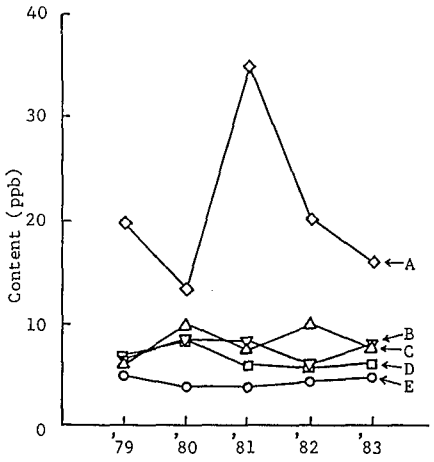


Fig. 6. Annual Change in PCB Content of Short-necked Clam at Each Sampling Point
A: Ohi, B: Jinko-nagisa, C: Sanmaizu, D: Kanazawa-hakkei, E: Futtsu

このように東京湾の汚染に著しい地域差が見られることは，これまでも指摘されているように沿岸地域の産業活動および経済活動の反映としてとらえることができるが，外海から湾内に入り込み，さらに湾内を廻流する潮流の影響も無視できない．すなわち，東京湾における潮の流れが，伊豆半島および房総半島の沖合を北上する黒潮の影響を受けて，富津，木更津から房総半島側を通って東京側に至り，三浦半島に向う左廻りの回路を取っていることは，東京湾汚染の地域格差と密接に関連しているものと推定される．

2) 採取地別汚染度の経年推移：各定点別の含有量の経年推移を Fig. 6 に示す．5 定点のうち大井を除く 4 定点には各年度間の有意差は認められず，経年的な変動は無いといえる．これに対し，大井については'81 年がかなり高くなっており，'79 年に比べて有意水準 10%ではあるが高いことが認められた．n = 3 ～ 4 程度のフィールドの試料に対し，たとえ 10%の有意水準にせよ有意差が認められたことは注目すべきである．

これらのことから，人工渚，三枚洲，金沢八景，富津の 4 定点の PCB 汚染は'79年から'83 年まで横ばい状態が続いているが，大井については'80年頃まで低下傾向を示していた PCB 汚染が'81年に増加し，以後'82年，'83年と再び低下し現在に至っているものと推察される．これは先にスズキについて推定された傾向と一致している．

結　語

以上，スズキおよびアサリについて得られた結果を総合的に判断すると，東京湾の PCB 汚染は'81年に若干増加したといえる．この原因については明らかでなく，新たに PCB が湾内に排出された可能性も否定はできないが，厳しい規制措置が取られている現状では非常に考えにくい．そこで著者らは可能性の高い原因として，外海から湾内に流れ込む潮流の影響を推定している．遠州灘沖に冷水塊ができると，それまで日本列島に沿って進行していた黒潮は冷水塊を迂回するため，一旦進路を南に取りそれから再び U ターンするという．したがって，黒潮の流れは東京湾を直撃することになり，その結果として湾内のクリーンアップが行なわれるので，東京湾の汚染は PCB に限らず気候的要因による黒潮の進路の影響を受けることになる．このことはあくまで推定の域を出ないが，遠州灘沖の冷水塊は 1970 年代後半から多発しているので，今後はこのような観点からも継続調査し，考察していく予定である．

文　献

1) 食品衛生法，食品に残留する PCB の規制について，昭和 47 年 8 月 24 日，環食第 442 号
2) 例えば，磯野直秀：化学物質と人間，1975，中央公論社，東京
3) 岸本清子，水石和子，竹内正博，吉原武俊：東京衛研年報，34，142，1983
4) 内田　亨，久米又三，宮地伝三郎編：原色現代科学大事典，5，121，1986，学研，東京
5) 日本薬学会編：衛生試験法注解，437，1980，金原出版，東京
6) 日本薬学会編：同上，85，1980
7) 瀬戸　博，加納堯子：東京衛研年報，34，260，1983
8) 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 8，1982
9) 立川　涼，脇本忠明，薬師寺　積，渡辺　功：昭和 47 年度日本海洋学会春季大会，1972
10) 山縣　登，大喜多敏一編：環境汚染分析法，No 9 (PCB) 124，大日本図書，東京
11) 堀井昭三，山岸達典，宮崎奉之，金子誠二，村上一：東京衛研年報，31－1，156，1980
13) 安野哲子，荻野周三，小野綾子，大畠敏子，遠藤英美：同上，31－1，185，1980

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 184-186, 1984

東京都における水銀汚染の実態について（第11報）
魚介類中の水銀含有量調査

山野辺 秀 夫*, 竹 内 正 博*, 風 間 成 孔*

Survey of Pollution with Mercury in Tokyo (XI)
Mercury Content of Fish and Shellfish

HIDEO YAMANOBE*, MASAHIRO TAKEUCHI* and MASAYOSHI KAZAMA*

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，国が定めた暫定規制値[1](総水銀0.4ppm，メチル水銀0.3ppm)に基づき，昭和48年度より魚介類の水銀含有量調査を行ってきた．本年度は東京都が独自に出荷地自主規制の対象としている，東京湾産のスズキを中心として調査を行った．また，これとは別に輸入魚介類および水産加工品についても調査を実施したので併せて結果を報告する．

実 験 方 法

試料は，昭和58年4月から昭和59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60検体，コノシロ3検体，ボラ4検体，ハゼ1検体，アサリ12検体，市場外流通の輸入魚介類16種30検体および水産加工品25検体である．

操作および定量は前報[2,3]にしたがって行った．

結果および考察

魚介類の測定結果をTable 1に示す．スズキの水銀含有量は総水銀0.07－0.49ppm(平均0.16ppm)，メチル水銀0.03－0.40ppm(平均0.12ppm)であった．このうち暫定規則値を越えたものは2検体で，それぞれ総水銀0.43ppm(メチル水銀0.40ppm)および総水銀0.49ppm(メチル水銀0.40ppm)であった．東京湾産のスズキは体長と総水銀との間に正の相関性が高いことから，体長60cm以上の大型魚について魚獲が規制されている．規制値を越えたこの2検体は体長がそれぞれ70cm，71cmの大型魚であった．ちなみに今回調査した60検体中60cm以上の大型魚は43検体で全体の71.7%であるが，今回のデータについて体長と総水銀との相関係数をもとめたところ，$r=0.51 \mid r(60,\ 0.01)=0.3248 \mid$ であり相関性が極めて高いことがわかった．

アサリについては，12検体中4検体から0.01ppmの総水銀を検出し，残り8検体も0.01ppm以下と極めて低い値で前報[4]とほぼ同じ結果であった．アサリは東京湾の特定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)において昭和55年から東京湾の環境汚染をモニタリングするための生物指標として採取してきたが，本年度からは葛西沖人工渚での採取が不可能となったため残り4地点についての結果である．

輸入魚介類では，総水銀で最も高い値を検出したのはアナゴの0.09ppm(メチル水銀0.07ppm)であった．しかし今回の調査では全体に低い値であった．

Table 2に水産加工品の結果を示した．総水銀で高い値を示したのは，鯛しぐれ0.24ppm，アンキモ(アンコウの肝)0.22ppmであり，メチル水銀はそれぞれ0.20ppm，0.14ppmであった．他に高い値を示したのは海獣であるアザラシの味噌煮やトドの大和煮からで，それぞれ総水銀0.28ppm，0.23ppm，メチル水銀0.17ppm，0.19ppmを検出した．

海獣は海の食物連鎖の最高位の1つに位置しているためこのような結果になったと考えられる．

謝辞　本調査を行うにあたり御協力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

* 東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科　160　東京都新宿区百人町 3－24－1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Mercury Content of Muscle in Fish and Shellfish

Sample	N	T-Hg (ppm)		Me-Hg (ppm)	
		Range	Mean	Range	Mean
Bora (grey mullet, *Mugil cephalus*)	4	0.00-0.02	0.01	0.00-0.01	0.00
Haze (goby, *Acanthogobius flavimanus*)	1		0.01		0.00
Konoshiro (gizzard shad, *Clupanodon punctatus*)	3	0.03-0.05	0.04	0.01-0.03	0.02
Suzuki (perch, *Lataolabrax japonica*)	60	0.07-0.49	0.16	0.03-0.40	0.12
Asari (short-necked clam, *Tapes japonica*)	12	0.00-0.01	0.00		0.00
Akauo (pacific ocean perch, *Sebastes alutus*) *	2	0.04-0.06	0.05	0.01-0.04	0.03
Anago (conger, *Astroconger myrister*) *	2	0.05-0.09	0.07	0.04-0.07	0.06
Awabimodoki (*Concholepas peruviana*) *	2		0.00		0.00
Guitakku *	1		0.00		0.00
Kisu (sillago, *Sillago sihama*) *	1		0.06		0.03
Kou-ika (cuttlefish) *	2	0.02-0.05	0.04	0.01-0.03	0.02
Kondu (sea tangle) *	1		0.00		0.00
Kazunoko (herring roe, salted) *	1		0.00		0.00
Madai (*Pagru pagrus*)*	1		0.02		0.01
Meaji (*Selar crumenophthalmus*) *	1		0.01		0.00
Nishin (herring, *Clupea pallasi*) *	2	0.01-0.03	0.02	0.00-0.02	0.01
Sake (salmon, *Oncorhynchus keta*) *	2	0.01-0.02	0.02	0.00-0.01	0.01
Shirouo (*Neosalanx tangkahkeii taihuensis*) *	1		0.01		0.00
Shishamo (*Spirinchus lanceolatas*) *	1		0.00		0.00
Suziko (salmon roe, salted) *	2		0.00		0.00
Taisho-ebi (shrimp) *	8	0.00-0.08	0.03	0.00-0.07	0.02

* imported

N : number of samples T-Hg : total mercury Me-Hg : methyl mercury

Table 2. Mercury Content of Marine Products

Sample	N	T-Hg (ppm)		Me-Hg (ppm)	
		Range	Mean	Range	Mean
Ankimo (angler liver, canned goods)	1		0.22		0.14
Ayu, kanroni (ayu sweetfish, purchased cooked)	1		0.03		0.03
Gori, ameni (purchased cooked)	1		0.01		0.00
Himegai, himono (dried shellfish)	1		0.07		0.00
Hishiko, aburazuke (anchovy, canned goods)	1		0.03		0.02
Kamaboko(fish jelly products, steamed)	12	0.00-0.06	0.03	0.00-0.05	0.02
Karasumi (salted, smoked roe)	1		0.00		0.00
Mamakari, suzuke (sardine, soaked in vineger)	1		0.03		0.02
Mentaiko (pollack roe, soaked in red pepper)	1		0.01		0.00
Mushi-anago (conger, steamed)	1		0.08		0.08
Shichimi-fugu (swellfish, soaked in red pepper)	1		0.03		0.02
Taishigure (sea bream, purchased cooked)	1		0.24		0.20
Azarashi, misoni (seal, canned goods)	1		0.28		0.17
Todo, yamatoni (sea lion, canned goods)	1		0.23		0.19

N : number of samples T-Hg : total mercury Me-Hg : methyl mercury

48年8月6日
2) 伊藤弘一，竹内正博，江波戸舉秀，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，江波戸舉秀，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) 山野辺秀夫，竹内正博，吉原武俊：東京衛研年報，34,139,1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 187-191, 1984

高速液体クロマトグラフィーによる蜂密中の残留テトラサイクリン系抗生物質の簡易分析法

竹葉和江*, 神崎政子*, 村上文子*, 松本昌雄*

Simplified Analytical Method for Tetracyclines Residues in Honey by High Performance Liquid Chromatography

KAZUE TAKEBA*, MASAKO KANZAKI*, FUMIKO MURAKAMI* and MASAO MATSUMOTO*

A simple and rapid high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the analysis of tetracycline (TC), oxytetracycline (OTC) and chlortetracycline (CTC) in honey was studied.

Tetracyclines (TCs) in the N/10 HCl extract from honey were cleaned up by used of a SEP-PAK C_{18} cartrige.

HPLC employed reversed phase LiChrosorb RP-8 column with acetonitrile/0.1M citric acid (25/75) mobile phase and detection at 355nm.

The recoveries of TC, OTC and CTC added to honey at levels 1.0-5.0μg/g were 88.6(%), 94.0 and 89.6 respectively The limits of detection of TC, OTC and CTC were ca. 0.1-0.3 (μg/g), 0.1-0.3 and 0.5-1.0 respectively. The presence of TCs in honey was confirmed by thin layer chromatography.

In a survey of commercial honey, CTC was detected at 0.7μg/g in one fiftieths samples.

Keywords : honey, tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline, high performance liquid chromatography, SEP-PAK C_{18} cartridge

現在，わが国における蜂蜜の年間消費量は，4万トンで，その約80%が中国，アルゼンチン，ソ連，ハンガリー，アメリカおよびニュージランド等世界各地で生産された蜂蜜で，わが国の市場の大部分が占められている．

わが国で家畜伝染病に指定されているミツバチのアメリカ腐蛆病は，世界各地で発生する病気で，流行すれば被害が大きいといわれている．この病気の予防や治療には，サルファ剤やテトラサイクリン系抗生物質(TCs)が有効で，砂糖水，蜂蜜および花粉などに添加して投与されている[1-2]．

これらの薬物は蜂蜜に移行し残留する恐れがあり，食品衛生法により食品への残留が規制されている．しかし現在，これらの薬物の簡易な分析法がなく，その開発が急がれている．

著者らは前報で[3]，蜂蜜中に残留するサルファ剤の検出方法を検討するとともに，市販蜂蜜から2種類のサルファ剤を検出した成績について報告した．一方，TCsの公的検査法には，畜水産食品を対象にしたバィオアッセイ[4]があるが，この方法は多数の検体処理に時間がかかり，また蜂蜜自身が抗微生物活性物質を含んでいるので，[5]蜂蜜中の残留物質検出には，バィオアッセイ以外の方法も必要である．

今回，蜂蜜中に残留するTCsについて簡易，迅速な検出方法として，高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析法の検討を行なうとともに，市販蜂蜜についても実態調査をしたので，これらの結果を報告する．

実験方法

1．試薬

1）標準溶液：塩酸テトラサイクリン(TC)，塩酸オキシテトラサイクリン(OTC)およびクロルテトラサイクリン(CTC)(いずれもsigma社製)をそれぞれ10mgはかり，N/10NHCl 0.5m*l*加え，さらにメタノールを加えて10

* 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

mlとした．これらを適宜希釈したものを標準溶液とし，用時調製した．

2）SEP- PAK C_{18}カートリッジ(SEP- PAK): Waters Associates(U.S.A.) 使用前にメタノール 5 ml，水 5 ml ついで飽和 EDTA-2Na 溶液 5 ml の順に湿潤洗浄処理した．

3）薄層クロマトグラフ(TLC)：シリカゲル 60 (Merck 社製)，20×20cm，0.25mm．使用前に飽和EDTA- 2 Na 溶液で予備展開し，風乾後 110 C，30 分間加熱した．セルロース（Merck 社製），20×20 cm，0.1mm．

4）展開溶媒：シリカゲルプレートには，*n*- ブタノール／メタノール／5 %クエン酸(3／2／1)，セルロースプレートには，水を飽和させた *n*-ブタノールを使用した．

5）発色試薬[6]：a 0.2M 塩化マグネシウム／エタノール(1／1)．b トリエタノールアミン／メタノール(1／9)

その他の試薬は，すべて市販特級品を使用した．

2．装置

1) 日立 HPLC 633-0300．検出器は，島津紫外可視分光光度計 SPD-1 島津フォトダイオードアレイ紫外可視分光光度計 SPD-M1A を使用した．

2）ポンプ：PERISTA MINI PUMP SJ- 1215（アト一社製）．SEP-PAK の洗浄および試験溶液の調製等に使用した．

3．分析操作

1）試験溶液の調製試験溶液は，chart 1 に示した方法で調製した．すなわち，蜂蜜 5 g をビーカーにはかり，これに N/10HCl 10ml加えて溶解し，注射器でSEP-PAK を通過させた．この SEP - PAK を水 10 ml で洗浄した後，メタノールで TCs を溶出した．初流の水溶液 0.6 ml を捨て，次のメタノール溶出液を正確に 1 ml 分取した．これを HPLC および TLC 用試験溶液とした．なお，SEP - PAK を通過させる各溶液の流速は，約 1.5 ml／min で行なった．

2） HPLC の分析条件

固定相には LiChrosorb RP-8, 5μm, 4×250mm を用い，移動相にはアセトニトリル／0.1 M クエン酸（25／75)[7] を 170～180 kg／cm^2 で流した．

アカシア，レンゲ，クローバーおよびミカンの 4 種類の蜂蜜の試験溶液を HPLC に注入し，各蜂蜜成分由来のピークの保持時間および 200～600 nm 間の吸収波長を測定し，TCs の至適分析波長を調べた．

検量線は，適宜希釈した標準溶液を 5 μl HPLC に注入し，ピーク高から直線範囲を求めた．

蜂蜜試料溶液は，HPLC に 5 μl ずつ注入した．

3） TLC による TCs の確認

蜂蜜中の TC_s の確認方法として，シリカゲルプレートならびにセルロースプレートを用いる方法を検討した．

微量の TCs を含む試験溶液を 20 μl 各プレートにスポットし，約10cm展開後風乾し，発色試薬 a を噴霧して 5 分後，b を噴霧し紫外線(3650Å)下で観察した．シリカゲルプレートには 6 種類，セルロースプレートには 2 種類の展開溶媒について調べた．

実験結果および考察

1．分析波長の選択

4 種類の蜂蜜試験溶液について，三次元のクロマトグラムを測定したところ，成分由来ピークは花蜜により異なるが，いずれも 200～400 nm の範囲内にあり，これらのピークの保持時間は 10 分以内であった．

TCs は，270 および 360～375 nm の 2 ケ所に吸収を持ち，OTC は 16 分，TC は 21 分および CTC は 45 分で溶出する．したがって，TCs は蜂蜜成分由来のピークと保持時間の差で分離できることがわかった．

なお，分析波長は夾雑ピークの少ない 355 nm を選んだ．

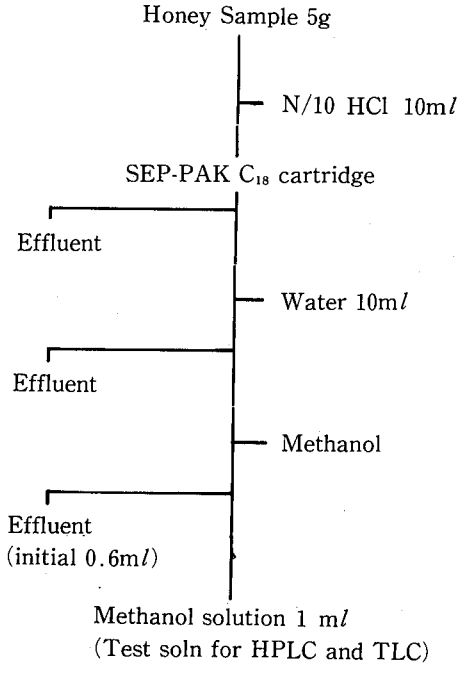


Chart 1. Analytical Procedure for Tetracyclines in Honey

2．検量線

Fig. 1 および Fig. 2 に示したように，OTC と TC は注入量 10～50 ng の範囲で，CTC は 50～250 ng の範囲でいずれも原点を通る直線であった．Fig. 3 に TCs のクロマトグラムを示した．

3． TCs の SEP- PAK からの溶出

TCs は二価金属イオンとキレート化合物を作り，不溶性となる性質があるので，使用器具や試薬等は酸や EDTA の処理をして，キレート化を防ぐことが行なわれている[8-12]．そこで，SEP-PAK についても EDTA 処理濃度を調べた．すなわち，SEP- PAK をメタノールおよび水で湿潤させた後，各濃度の EDTA-2 Na 溶液 5 m*l* で処理し，それぞれ 10 μg/m*l* の TCS 標準溶液を用いて溶出率を調べた．

Table 1 に示したように，TCs 溶出率は飽和溶液で処理したものが最も高く，いずれも 95%以上であった．したがって，SEP-PAK を処理する EDTA-2 Na 濃度は，飽和溶液を用いることにした．

また，SEP- PAK から TCs の溶出にはメタノールを使用し，TCs の溶出分画を調べた．メタノールを溶出しはじめて初流 0.6 m*l* は水溶液である．この部分は除き最初のメタノール 1m*l* 中に 100%溶出することがわかった．

4． TCs の添加回収実験

4 検体の蜂蜜に OTC と TC は 1.0 μg/g，CTC は 5.0 μg/g の濃度に添加して回収実験を行ない，その結果を Table 2 に示した．すなわち，回収率（%）と標準偏差は，TC 88.6±4.8，OTC 94.0±3.3 および CTC 89.6±4.2 で，変動係数(%)はそれぞれ 5.4，3.5 および 4.7 であった．

なお，岡らが水産食品中の TCs の抽出に McIlvaine 緩衝液（pH4.0）を使用した方法を報告しているが，[13] Table 2 から明らかのように，HCl で溶解した方が平均値で 15 %高い回収率を示した．

Table 1. Effect of EDTA Concentration for pretreating SEP-PAK on the Recovery of Tetracyclines

EDTA (mol/L)	Recovery (%)		
	OTC	TC	CTC
nontreated	82.4	81.9	86.8
0.1	89.6	84.7	89.3
0.2	89.6	89.1	88.6
saturated	95.1	94.9	95.5

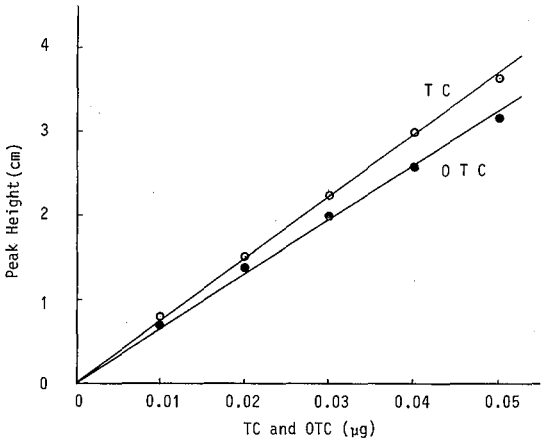


Fig. 1. Calibration Curves of Tetracyclines

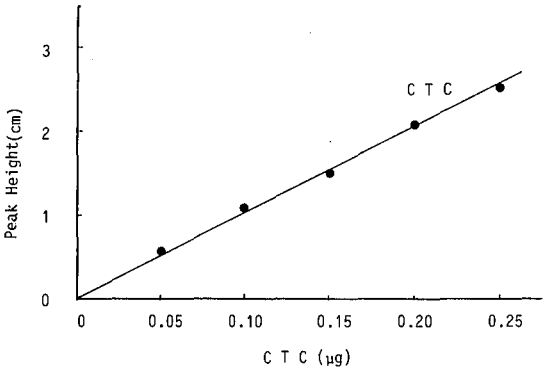


Fig. 2. Calibration Curve of Tetracycline

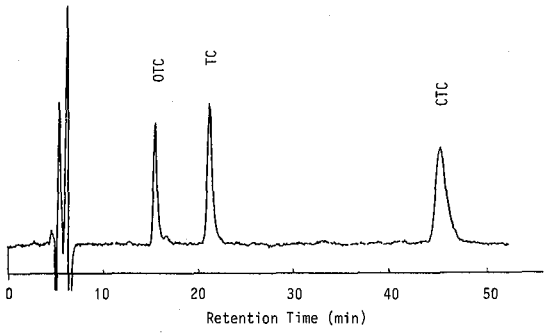


Fig. 3. High Performance Liquid Chromatogram of Tetracyclines

この分析条件における蜂蜜中のTCsの検出限界(μg/g)は，OTCとTCは約0.1～0.3，CTCは0.5～1.0であった．

わが国の食品衛生法では，食品は抗生物質を含有してはならないと無残留の規制がされている．このような許容限界のない場合の残留分析法に要求される検出限界は，0.05～0.10μg/gのレベルであると言われている[14~15]．OTCとTCの検出限界は，ほぼこの条件を満足しているが，CTCはHPLCでの保持時間が遅いために，やや検出限界が悪く0.5～1.0μg/gであった．

5．TLCによるTCsの確認

HPLCで検出されたTCsの確認同定には，新しくHPLCの検出器として開発されたフォトダイオードアレイ検出器による三次元のスペクトル測定が有効であるが，今回の目的には現在のところ感度不足で適用できない．そこで，TLCによる確認方法を検討し，その結果をTable 3に示した．

蜂蜜試料中には成分由来の蛍光物質が含まれているものがあり，これらの成分とTCsとを分離する展開溶媒が必要である．シリカゲルプレートの場合，McIlvaine緩衝液飽和のメチルエチルケトン[4]，*n*-ブタノール／酢酸／水（10／1／2）[16]，*n*-ブタノール／メタノール／5％クエン酸（1／1／1）[17]およびクロロホルム／メタノール／5％EDTA（65／20／5）の下層[13]の展開溶媒では，この分離が不十分であった．n-ブタノール／メタノール／水（4／1／2）[4]および*n*-ブタノール／メタノール／5％クエン酸（3／2／1）展開溶媒ではこの分離が出来TCsのスポットの拡散が小さく，見やすいのは*n*-ブタノール／メタノール／5％クエン酸の場合であった．したがって，シリカゲルプレートにはこの展開溶媒を使用することにした．

セルロースプレートでは，TCsのスポットのまとまりは，シリカゲルプレートの場合と同様に*n*-ブタノール／メタノール／5％クエン酸（3／2／1）がよかったが，水飽和の*n*-ブタノール[18]の方がOTC，TCとCTCとの分離がよいことから，この展開溶媒を使用することにした．

なお，TLCにおけるTCsの検出限界は，シリカゲルプレート，セルロースプレートともに約0.01～0.03μgであった．

Table 2. Recovery and Reproducibility of Tetracyclines experimentally added to Honey

Tetracyclines	Added amount (μg/g)	Recovery rate (%)	CV (%)
OTC			
A*1	1.0	94.0*3 ± 3.3	3.5
B*2	1.0	80.1 ± 1.9	2.4
TC			
A	1.0	88.6 ± 4.8	5.4
B	1.0	77.8 ± 5.4	6.9
CTC			
A	5.0	89.6 ± 4.2	4.7
B	5.0	74.2 ± 6.5	8.8

* 1 N/10 HCl
* 2 McIlvaine buffer solution(pH4.0)
* 3 Average of 4 samples

Table 3. *Rf* Values of Tetracyclines on Silicagel and Cellulose TLC

Tetracyclines	Silicagel						Cellulose	
	a*1	b*2	c*3	d*4	e*5	f*6	f	g*7
OTC	0.1	0.2	0.1	0.6	0.1	0.2	0.7	0.3
TC	0.1	0.2	0.1	0.6	0.1	0.2	0.7	0.3
CTC	0	0.3	0.1	0.6	0.1	0.2	0.7	0.5

* 1 Methylethyl ketone saturated McIlvaine buffer solution(pH4.0)
* 2 *n*-Butanol/Methanol/Water(4/1/2)
* 3 *n*-Butanol/Acetic acid/Water(10/1/2)
* 4 *n*-Butanol/Methanol/5%Citric acid(1/1/1)
* 5 Chloroform/Methanol/5%EDTA(65/20/5)lower layer
* 6 *n*-Butanol/Methanol/5%Citric acid(3/2/1)
* 7 *n*-Buthanol saturated with Water

6．市販蜂蜜への応用試験

1983年4～7月に都内で販売されていた蜂蜜50検体について，TCsの残留実態調査を行なった．これらの蜂蜜の原産国をTable 4に示した．50検体中原産国不明の1検体にCTCが検出され，定量値は0.7μg/gであった．

Table 4. List of the Honey Samples tested

Country	Number of Sample
Domestic	10
Imported	
U. S. A.	4
Canada	1
Argentine	2
Hungary	3
France	1
China	8
Unknown	12
Unknown	9
Total	50

ま と め

蜂蜜に残留するTCsのHPLCによる分析法について検討し，次の結果を得た．

1．蜂蜜中のTCsは，N/10 HClで溶解し，SEP-PAKに吸着させた後，メタノールで溶出したものをHPLCで分析した．

2．HPLCの分析条件は，固定相にLiChrosorb RP-8を用い，移動相はアセトニトリル／0.1Mクエン酸(25／75)を使用し，波長は355 nmで行なった．

3．本法によるTCsの回収率(%)は，TC 88.6，OTC 94.0およびCTC 89.6であった．蜂蜜中のTCsの検出限界(μg/g)は，TCとOTCが約0.1～0.3，CTCが約0.5～1.0であった．

TCsの確認方法として，シリカゲルプレートおよびセルロースプレートによるTLCを検討した．

4．本法で市販蜂蜜50検体についてTCsの検出を試みたところ，CTCが1検体検出され，定量値は0.7μg/gであった．

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に深謝します．

文 献

1) Shimanuki, H.: Honeybee Science, 1, 163, 1980
2) Gilliam, M. and Argauer, R. J.: Honeybee Science, 3, 55, 1982
3) 竹葉和江，神崎政子，村上文子，松本昌雄：東京衛研年報，34，150，1983
4) 厚生省環境衛生部乳肉衛生課：畜水産食品中の残留物質検査法，第1集の3，1981
5) 越後多嘉志：Homeybee Science, 1, 49, 1980
6) Szabó, A., Nagy, M. K. and Tömörkeny, E.: *J. Chromatogr.* 151, 256, 1978
7) 中村 純，岡田一次：第27回日本応用動物昆虫学会，1983
8) Albert, A.: *Nature,* 177, 433, 1956
9) 大田 稔：分析化学，14，945，1965
10) 大田 稔：分析化学，15，169，1966
11) 豊島昭二，西本行雄：薬学雑誌，85，235，317，322，327，1965
12) 西本行雄，土田悦男，豊島昭二：薬学雑誌，86，199，1966
13) 岡 尚男，宇野圭一，原田建一，鈴木真言：薬学雑誌，103，531，1983
14) 吐山豊秋：畜産の研究，36，121，1982
15) 内山 充：畜産の研究，36，133，1982
16) 丹野憲二，岡崎真紀子，斉藤文一，内部博泰：食衛誌，23，259，1982
17) 一盛和世： Honeybee Science, 3, 9, 1982
18) Ryan, J. J. and Dupont, J. A.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 57, 828, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 192-196, 1984

市販はちみつの芽胞菌汚染の実態

小久保 彌太郎*, 神 保 勝 彦*, 金 子 誠 二*, 松 本 昌 雄*

Prevalence of Spore-forming Bacteria in Commercial Honey

YATARO KOKUBO*, KATSUHIKO JINBO*, SEIJI KANEKO*
and MASAO MATSUMOTO*

A total of 71 commercial honey samples consisting of 18 domestic products, 48 imported from foreign countries (e. g. USA, Argentina, China) and 5 unknown origin was obtained from honey processing plants and retailers in Tokyo, and subjected for the presence of *Bacillus* and *Clostridium* spores. Enumeration of bacterial counts in the specimens, both unheated and heated at 75℃ for 10 minutes, was made by incubation at 30℃ for 3 days under the aerobic and anaerobic conditions using the pour plate method with TEP agar (EIKEN).

Of the specimens tested, 67 (94.4%) were found to be contaminated with 10^1-10^2/g level of spores. Most of sporulating organisms were facultative *Bacillus*; *B. cereus* was most predominantly isolated, followed by *B. coagulans, B. megaterium, B. alvei* and others, totalling 12 species. *Clostridium* spores were detected from 56 specimens (78.9%), 6 of which were found to be contaminated with *C. perfringens,* while non- specimens were contaminated with *C. botulinum.*

B. cereus, C. perfringens and *C. botulinum* spores were experimentally inoculated into honey samples in the amount of 10^4-10^6/g level and the samples were kept at 25℃ for 4 months during which period the spore counts scarcely changed.

Keywords: commercial honey, *Bacillus, Clostridium,* spores

わが国のはちみつ消費量は，健康食品ブームの中で着実に増加しており，最近の年間消費量は約 30,000 トンと推定されている．このうち，ほゞ75%が中国，アルゼンチン，ソ連，アメリカなどからの輸入品である[1]．

はちみつは栄養価の高いアルカリ性食品で，しかも吸収され易いところから，特に乳幼児，老人，病人などに適した天然の甘味料として広く使用されている．一方，衛生細菌学的にみると，70～80%の高い糖濃度と有機酸の存在に基づく低い pH のために微生物は生存し難く，一部のかびや酵母の存在が報告[2]されているものの，一般的には問題の少ない食品と考えられてきた．しかし最近になって，はちみつが乳幼児のボツリヌス症の原因食品として注目されるようになり[3]，アメリカなどでは市販はちみつからボツリヌス菌芽胞の分離例も報告[4~6]されるようになった．

著者らは，当科に搬入された市販はちみつについてボツリヌス菌の検出を試みたところ，本菌は検出できなかったが，各種の *Bacillus* や *Clostridium* 属芽胞の存在する事実が認められたので，今回これら芽胞の衛生細菌学的意義を明らかにする目的で，市販はちみつを対象に芽胞の汚染実態調査を実施した．さらに，実験的にはちみつ中の芽胞の消長についても若干の検討を行ったので，これらの成績についてもあわせて報告する．

材料および方法

1．調査材料　1982 年 6 月から 1983 年 4 月の間に，東京都内で採取された市販はちみつ計 71 例である．これらの産地の内訳は，国内産 18 例，アメリカ，アルゼンチン，中国，メキシコなどからの外国産 48 例，産地不明 5 例で，ほゞ半数にアカシア，レンゲ，みかん，クローバーなどの花みつの種類が表示されていた．

* 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

2．菌数の測定 はちみつ 10 g を滅菌大試験管に無菌的に秤り取り，滅菌 0.1%ペプトン水 20 m*l* を加えて 3 倍希釈後 2 等分し，一部はそのまま，他は75℃で10分間加熱したものを試料液とした．各試料液およびそれらの 10 倍段階希釈液 1 m*l* ずつを滅菌深型プラスチックシャーレ（日水製薬）に分注後，これに予め50℃に保持した TEP 寒天（栄研化学）15 m*l* を注いで混釈した．寒天が固化後，再び平板上に TEP 寒天を薄く重層した．これらの混釈平板を各試料について 2 組みずつ作成し，1 組みは好気的に，他の 1 組みはフォーマ社の嫌気チャンバー内で，いずれも 30℃で 3 日間培養後に出現した集落を数えて，はちみつ 1 g 当りの菌数を算定した．

3．*Bacillus* および *Clostridium* 属の分離と同定 いずれも，加熱材料の菌数測定後の平板から菌株を分離し，それらを対象に同定を行った．すなわち，*Bacillus* 属は好気性培養後の寒天平板上の集落を 1 検体当り 3～5 個ずつ無作為に釣菌し，各分離株がグラム陽性，カタラーゼ産生の有芽胞菌であることを確認した．これら菌株は著者らの分類法[7]に準拠して種を同定した．

Clostridium 属は嫌気性培養後の寒天平板上から分離した集落について，偏性嫌気性の有芽胞菌であることを確認した．分離した菌株は，著者らが先きに報告[8]した分類法に基づいて，ゼラチン液化能，芽胞位置，ブドウ糖分解能，卵黄反応および菌形の 5 性状により 9 群に群別した．

4．ボツリヌス菌の検出 はちみつ 10 g を 9 倍量のフルード・チオグリコレート培地(Difco)に接種して，30℃で 5 日間培養後 3,000 rpm で 30 分間遠心分離した．遠沈々渣をさらに 0.1%可溶性でん粉加クックドミート培地(Difco)中で 30℃で 3 日間培養後遠心分離し，その上清を 0.5 m*l* ずつ 4 週令の ddy 系マウス腹腔内に接種した．マウスは 4 日間観察して，死亡したものについて菌の分離を試みた．

調 査 成 績

1．菌数の分布 71 例のはちみつについて，無加熱および 75℃で 10 分間加熱後の試料からそれぞれ検出された好気性および嫌気性培養菌数の分布状況を Fig.1 に示した．

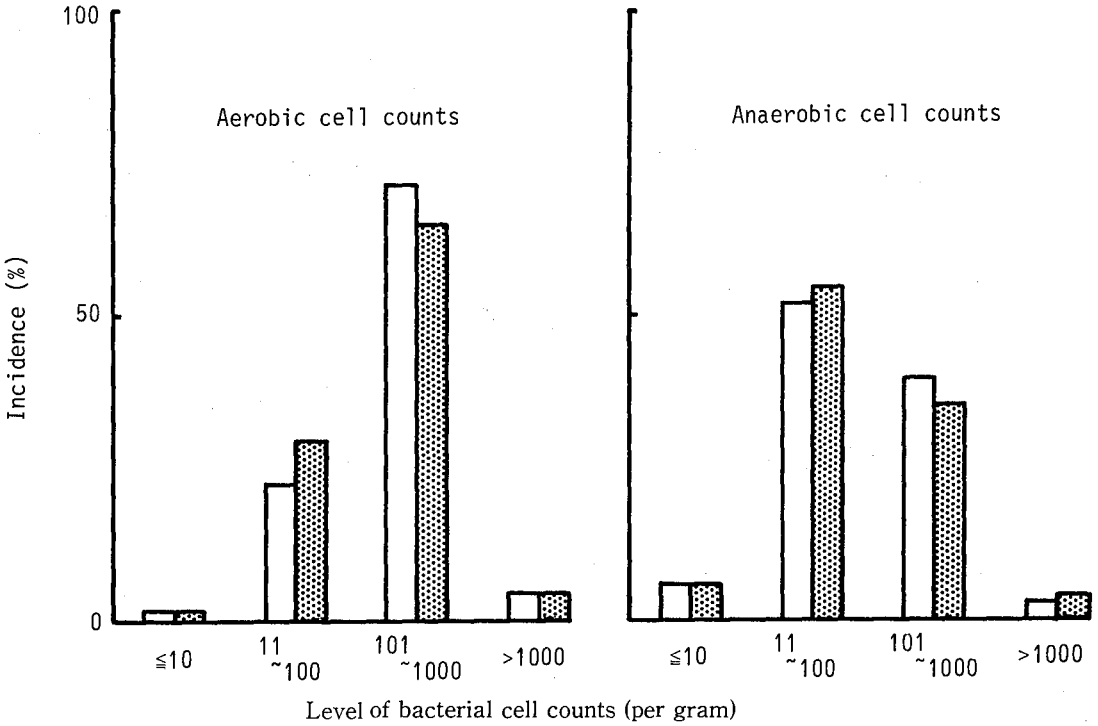


Fig. 1. Incidence of Aerobic and Anaerobic Cell Counts on 71 Commercial Honey Samples.

non heating　heating at 75°C for 10 min.

好気性培養菌数についてみると，無加熱の方が加熱後のものに比較して，菌数の高いものが若干多かった．しかし，菌数の差があまり認められなかったことは，検出菌の大部分が *Bacillus* 属芽胞であることを示していた．*Bacillus* 属芽胞はすべてのはちみつから検出され，その菌数は，71例中67例(94.4%)が 10^1～10^2／gレベルで，このうち 10^2レベルのものが65～70%を占めていた．

一方，嫌気性培養菌数は好気性培養菌数同様に加熱の有無による差はあまり認められなかった．その菌数も，90%以上が 10^1～10^2／gレベルであったが，10^2／gレベルのものは40%以下と好気性培養菌数よりも若干低い傾向を示した．さらに，検出菌の大半が *Bacillus* 属で，*Clostridium* 属は71例中56例（78.9%）から検出されたにとどまった．

なお，産地による菌数の分布状況の違いは認められなかった．

2．*Bacillus*および*Clostridium*属芽胞の種類 はちみつから分離同定された *Bacillus* 属計326株の菌種構成をTable 1に示した．表から明らかなように，分離株は12菌種に分別され，このうちセレウス菌が111株(34.1%)と最も多く，次いで*B. coagulans* 60株(18.4%)，*B. megaterium* 33株(10.1%)の順で，他の菌種はいずれも10%以下であった．なお，ヨーロッパ腐疽病の起因菌の *B. alvei* が31株（9.5%）に認められた．また，これら菌種の分布状況を検体数についてみると，セレウス菌と *B. coagulans* は半数以上，*B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. alvei* がほぼ1/3のはちみつから分離された．

Table 2は，56例のはちみつから分離された *Clostridium* 属計119株を群別した成績を示したものである．すなわち，VII群が43株(36.1%)と最も多く，次いでV群29株(24.4%)，IV群25株(21.0%)の順で，これら3群で80%以上を占めていた．しかし，これら菌株について，さらにBergey's Manual[9]やVPI Manual[10]による同定を試みたが，ほとんど同定不能であった．なお，II群からはウェルシュ菌が2株同定されたが，ボツ

Table 1. Distribution of Species of *Bacillus* Spores Obtained from Commercial Honey Samples.

Species	No. of isolates (%)	No. of samples (%)
B. cereus	111 (34.1)	46 (64.8)
B. coagulans	60 (18.4)	41 (57.7)
B. megaterium	33 (10.1)	26 (36.6)
B. pumilus	31 (9.5)	25 (35.2)
B. alvei	31 (9.5)	23 (32.4)
B. licheniformis	22 (6.7)	16 (22.5)
B. subtilis	12 (3.7)	11 (15.5)
B. sphearicus	10 (3.1)	8 (11.3)
B. brevis	9 (2.8)	5 (7.0)
B. circulans	4 (1.2)	3 (4.2)
B. stearothermophilus	2 (0.6)	2 (2.8)
B. firmus	1 (0.3)	1 (1.4)
Total	326 (100)	71

Table 2. Grouping of *Clostridium* Spores Obtained from Commercial Honey Samples.

Group	Biochemical characteristics				No. of isolates (%)
	Gelatin liquefaction	Spore location	Glucose fermentation	Egg yolk reaction	
I	+	Terminal	+	+	2 (1.7)
II	+	Subterminal	+	+	8 (6.7)
III	+	Subterminal	+	−	8 (6.7)
IV	+	Subterminal	−	+	25 (21.0)
V	−	Terminal	+	+	29 (24.4)
VI	−	Terminal	−	+	0
VII	−	Subterminal	+	+	43 (36.1)
VIII	−	Subterminal	−	+	2 (1.7)
IX	(Spherical or flexous rods)				2 (1.7)
Total					119 (100)

Table 3. Changes of Spore Counts of *B. cereus*, *C. perfringens* and *C. botulinun* in Honey Stored at 25℃.

Strain	Spore counts/g before storage	Spore counts/g after storage for			
		1 month	2 months	3 months	4 months
B. cereus ATCC19637	8.6×10^5	4.2×10^5	5.2×10^5	4.4×10^5	2.8×10^5
C. perfringens NCTC-8238	1.2×10^6	1.6×10^6	1.8×10^6	1.6×10^6	1.6×10^6
C. botulinum 62A (type A)	5.6×10^6	3.8×10^6	3.0×10^6	2.4×10^6	3.2×10^6
C. botulinum OKRA (type B)	8.0×10^4	1.2×10^5	4.0×10^4	6.0×10^4	4.2×10^4
C. botulinum IWANAI (type E)	3.4×10^4	1.8×10^4	2.0×10^4	1.4×10^4	1.8×10^4

リヌス菌は認められなかった.

ボツリヌス菌は，本菌の検出を目的とした検査でも全例陰性であった．しかし，この検査でウェルシュ菌が先きの2株とは別の4例から検出された.

3．各種芽胞のはちみつ中における消長 はちみつ汚染芽胞として，衛生細菌学上重要と思われるセレウス菌，ウェルシュ菌，ボツリヌス菌の芽胞について，はちみつ中における消長を調べた．すなわち，これら芽胞の存在しない pH 3.7，水分活性0.73のはちみつ中に供試芽胞を 10^4～10^6／g レベルに接種後25℃に保存した．その後，1カ月毎に4カ月まで各芽胞の検出菌数の経時的消長を調べ，その成績を Table 3 に示した．この結果，いずれの供試芽胞も保存4カ月後においても，当初とほとんど同じ検出菌数レベルであることが認められた.

考　察

はちみつは，植物の分泌する糖分がみつばちにより巣の中に集められて変化したものである．それが作られる環境から考えると，細菌汚染の機会は多い．しかし，はちみつが直接原因になったと思われる事故例は，乳幼児ボツリヌス症以外にほとんど見当らない．これは，はちみつが水分活性0.54～0.75，pH 3.2～4.2という特性のために，ほとんどの細菌が発育はもちろんのこと生残もできないことに基づいていると思われる．このことを裏付ける報告として，Ruiz-Argeuso ら[11]は花みつがみつばちにより集められて熟成する過程では *Gluconobacter* や *Lactobacillus* が主要菌叢として認められるが，これらの菌種も熟成が進行して水分が減少するにつれて死滅したと述べている.

今回の調査で，はちみつ中には 10^1～10^2／g レベルの細菌が常在し，そのほとんどが *Bacillus* または *Clostridium* 属の芽胞であり，一般の栄養形の細菌の存在は認められなかった．芽胞の由来については，みつばちが花みつを求めて飛び廻るうちに，植物や土壌に分布する芽胞が趾などに附着し，これがはちみつ中に混入したものと思われる．また，みつばちの消化管内菌叢として *Bacillus* 属が常在する事実も報告[12]されており，当然これらからも由来すると考えられる.

芽胞の種類についてみると，嫌気性培養で検出された菌の大半が好気性でも発育したことから，通性嫌気性の *Bacillus* 属が主体であることは明らかである．なかでも，セレウス菌の検出率が最も高かったことは，本菌種がすべて食中毒原性を有するか否かについて未だ不明な点が多く残されているとはいえ注目すべきことである．また，ヨーロッパ腐疽病の起因菌である．*B. alvei* が産地の別なく調査したほぼ1/3のはちみつから検出されたことは，養ほう産業上問題となる点である.

一方，ほぼ80％のはちみつから検出された *Clostridium* 属芽胞は，その生物学的性状パターンからみて，かなり多種類の菌種から構成されていると推測される．このうち，衛生細菌学上問題になるような菌種はウェルシュ菌だけであり，ボツリヌス菌は認められなかった．しかし，実験的にボツリヌス菌芽胞を接種した糖液を飼料としてみつばちに与えた場合，その芽胞がはちみつ中に取り込まれたという報告[13]もあり，ボツリヌス菌常在地帯で生産されたはちみつ中には，その芽胞の存在する危険性が示唆されている．特に，わが国では消費されるは

ちみつの大半が輸入品であり，その中には乳幼児ボツリヌス症の報告が多いアメリカ産のものも多く含まれていることから，輸入はちみつに対する十分な監視が必要と思われる．

はちみつ中の芽胞接種試験の成績では，当初の芽胞菌数と比較して4カ月後も検出菌数の減少がみられなかったことから，かなり長期間生残できることを示していた．このことから，病原性あるいは腐敗活性のある芽胞菌が混入しているはちみつでは，甘味料として希釈して使用された場合，芽胞が発芽増殖して食品の安全性や品質を損う恐れもある．反面，そのままの状態では芽胞が発芽し増殖することはない．しかも，その菌数も 10^1～10^2／gレベル程度と低かったことと考えあわせて，はちみつが直ちに危害性のある食品とはいい難い．しかし，はちみつ中の芽胞の混入を防ぐことは不可能であるので，その使用に当っては，常に芽胞の存在を認識しておくことが必要と考えられる．

要　約

都内で採取された国内産18例，外国産48例，産地不明5例計71例の市販はちみつについて，*Bacillus* および *Clostridium* 属芽胞の汚染実態調査を行った．

この結果，産地の別なく調査した約95%のはちみつから 10^1～10^2／gレベルの芽胞が検出され，その大半が通性嫌気性の *Bacillus* 属であった．本菌属中セレウス菌が最も多く，次いで *B. coagulans, B. megaterium, B. alvei* など12菌種が同定された．一方，*Clostridium* 属芽胞も56例(78.9%)から検出され，この中にはウェルシュ菌が認められたが，ボツリヌス菌は全例陰性であった．

また，実験的にセレウス菌，ウェルシュ菌およびボツリヌス菌の芽胞をはちみつ中に接種して25℃に保存したところ，いずれの菌種も4カ月間当初とほとんど同じ芽胞数が検出された．

謝辞　本研究のために，ボツリヌス菌の菌株を分与して下さった大阪府立大学農学部獣医学科の阪口玄二教授に深く感謝致します．

(本研究の概要は，第86回日本獣医学会　帯広　1983年8月で発表した．)

文　献

1) 井上敦夫：ミツバチ科学，1(1)，75，1980
2) 山崎幹夫，堀江義一，宇田川俊一，越後多嘉志，君政子：食衛誌，16(1)，1，1975
3) 阪口玄二：モダンメディア，26 (5)，254，1980
4) Sugiyama, H., Mills, D. C. and Kuo, L- J. C.: *J. Food Protect.*, 41(11), 848, 1978
5) Midura, T. F., Snowden, S., Wood, R. M. and Arnon, S. S.: *J. Clin. Microbiol.*, 9(2), 282, 1978
6) Kautter, D. A., Lilly, Jr. T., Solomon, H. M. and Lynt, R. K.: *J. Food Protect.*, 45(11), 1028, 1982
7) 神保勝彦，小久保彌太郎：東京衛研年報，34，69，1983
8) 小久保彌太郎，神保勝彦，村上文子，村上　一：東京衛研年報，33，155，1982
9) Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E,: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology,* 8 th ed. 529, 1974, Williams & Wilkins, Baltimore
10) Holdeman, L. V., Cato, E. P. and Moore, W. E.: *Anaerobe Laboratory Manual,* 4th ed. 1977, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blackbury, Virginia
11) Ruiz- Argueso, T. and Rodriguez- Navarro, A.: *Appl. Microbiol.* 30(6), 893, 1975
12) Gilliam, M. and Valentine, D. K.: *J. Invert. Pathol.*, 28, 275, 1976
13) Huhtanen, C. N., Knox, D. and Shimanuki, H.: *J. Food Protect.*, 44(11), 812, 1981

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 197-201, 1984

鶏肉からの *Campylobacter jejuni／coli* の選択増菌培地について

神保勝彦*, 金子誠二*, 小久保彌太郎*,
松本昌雄*

Selective Enrichment Medium for the Recovery of *Campylobacter jejuni／coli* from Chicken Meat

KATSUHIKO JINBO*, SEIJI KANEKO*, YATARO KOKUBO*
and MASAO MATSUMOTO*

A blood-free selective enrichment medium, Brucella-FBP-AM broth, was improved for recovery of *Campylobacter* in chicken meat. The modified B-FBP-AM consisted of blucella broth supplemented with 0.15% agar, 0.1% $FeSO_4 7H_2O$, 0.1% sodium metabisulfite, 0.1% sodium pyruvate, vancomycin (20 mg／L), trimethoprim (10 mg／L), polymyxin B sulfate (5,000 IU／L), amphotericine B (2 mg／L) and cephalothin (15 mg／L). The brucella broth and agar were mixed, brought to a boil and autoclaved at 121℃ for 15 minutes. Supplements were filter-sterilized and added to the medium after it had been cooled to 50℃.

The effectiveness of this medium was compared with that of the original B-FBP-AM borth and Campylobacter enrichment medium (CEM) reported by Ito et al for the isolation of *C.jejuni／coli* from chicken meat on the market. Modified B-FBP-AM showed the best result with *Campylobacter* detected from 12 out of 35 speciments followed by CEM (9 specimens). *Campylobacter* was detected from 7 specimens with B-FBP-AM.

Keywords : *Campylobacter jejuni／coli*, Selective enrichment medium, Modified B-FBP-AM

緒　言

1981年3月厚生省[1]は，*Campylobacter jejuni* などの8菌種を新しい食中毒菌として指定した．しかし，厚生省通達によるカンピロバクターの検査法は，臨床細菌学的見地から考案されたものであるため，食肉などの食品の日常検査に用いる方法としては必らずしも適しているとは言えない．特に従来から採用されている選択増菌培地は，糞便を対象として開発されたものなので，食品検査に用いた場合はその選択性に問題があり，また，これら選択増菌培地はいずれも多量の馬あるいは羊の脱繊血液を使用しているため，コストが高く，しかも安定した供給の面でも難点がある．これらのことから，食品におけるカンピロバクター検査法，とくに選択増菌培地の改良が望まれていた．最近，Ehlers[2]らは血液の代りにグロスサプリメント[3]を用いた選択増菌培地 Brucella－FBP-AM-Broth（以下 B-FBP-AM）を開発し，牛乳やナチュラルチーズなどに応用し良好な成績を得ている．しかし，この培地では細菌汚染が著しい食肉から少数のカンピロバクターを選択的に検出することは困難な場合がある．そこで，食肉中の少数のカンピロバクターを選択的に増殖させる目的で B-FBP-AM 中のグロスサプリメントおよび抗生物質を増量し，従来から用いられている選択増菌培地と比較検討した．

材料および方法

1．供試菌株

供試した *C. jejuni* の菌株は，当研究所細菌第一研究科より分与された集団下痢症由来 CF 256（血清型 TCK 7）と食肉由来の血清型の異なる4菌株（同 TCK 4,13,20,

* 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

UT) の計5菌株である.

2．選択増菌培地

供試した選択増菌培地は下記の3種類の培地である.

1) **B-FBP-AM**[2] ブルセラブロース(BBL) 1,000 m*l* に寒天 1.5 g を加え，121°C で 15 分間高圧滅菌後，50°C に保持して，これに，ろ過滅菌した硫酸第一鉄 0.5 g，メタ重亜硫酸ナトリウム 0.5 g およびピルビン酸ナトリウム0.5gと Vancomycin 10 mg, Trimethoprim 5 mg, Polymyxin B 2,500 IU, Amphotericin B 5 mg, Cephalothin 15mgを加えたものである.

2) **改良 B-FBP-AM** 食肉中の少数のカンピロバクターをより確実に検出し，本菌以外の細菌の発育をより抑制するために，B-FBP-AM 組成中のグロスサプリメントおよび Vancomycin, Trimethoprim, Polymyxin Bをそれぞれ2倍量にした．すなわち，ブルセラブロース(BBL) 1,000 m*l* に寒天 1.5 g を加え，121°C で 15 分間高圧滅菌後，50°C に保持して，これに，ろ過滅菌した硫酸第一鉄 1 g，メタ重亜硫酸ナトリウム 1 g およびピルビン酸ナトリウム 1 g と Vancomycin 20mg, Trimethoprim 10mg, Polymyxin B 5,000 IU, Amphotericin B 2mg, Cephalothin 15mg を加えたものである.

3) **CEM**[4] **(Campylobacter emrichment medium)** 普通ブイヨン1,000m*l*を121°C で15分間高圧滅菌し室温まで冷却し，これに，馬脱繊維血液70m*l*, Vancomycin 20 mg, Trimethoprim 50 mg, Polymyxin B 5,000 IU を加えたものである.

以上の3種類の培地は中試験管に無菌的に10 m*l*ずつ分注した．なお，対照培地として B-FBP-AM から抗生物質を除いた培地を用いた.

3．選択増菌培地の発育比較試験

供試菌株を対照培地に接種し，混合ガス (O_2 5 %, $CO_2$10%, $N_2$85%)を置換した嫌気ジャーの中で 42°C, 24 時間微好気培養した菌液 1 m*l* を各選択増菌培地に接種し，42°C, 24 時間微好気培養にした後，10 倍段階希釈して，その 0.1 m*l* ずつを Skirrow 平板培地へ塗抹し，42°C, 48 時間微好気培養した．出現したカンピロバクターの集落数を数えて比較検討した.

4．供試鶏肉

都内の小売店から採取した鶏肉 18，鶏肝臓 11，鶏皮 6 の計 35 検体を応用試験に用いた.

5．鶏肉からのカンピロバクター検出

鶏肉 10 g に滅菌生理食塩水 90 m*l* を加えて，30 秒間ストマッカーで均一化し，その 1 m*l* ずつを各選択増菌培地に接種し，42°C, 24 時間微好気培養した．各 0.1 m*l* を Skirrow 平板培地へ塗抹し，42°C, 48 時間微好気培養後，疑わしい集落を釣菌し，形態学的および生化学的性状を調べてカンピロバクターの同定を行った.

試 験 成 績

1．改良 B-FBP-AM におけるカンピロバクターの発育態度

改良 B-FBP-AM は予備試験から，食肉中の少数のカンピロバクターを選択的に増殖させることが予想されたので，食品由来株 No 80 と集団下痢症由来株 CF 256 を用いて発育試験を行い，B-FBP-AM および CEM と比較した．その結果を Fig. 1 に示した.

3種類の培地における食品由来株No80の増殖は,対照培地 (B-FBP-AM から抗生物質を除いた培地) に比してかなり遅れることが判明した．すなわち，接種菌量が 1 m*l* 当り 10 個以下と少ない場合，24 時間培養後の B-FBP-AM の菌数は 10^5レベルで対照培地より 1 オーダ,

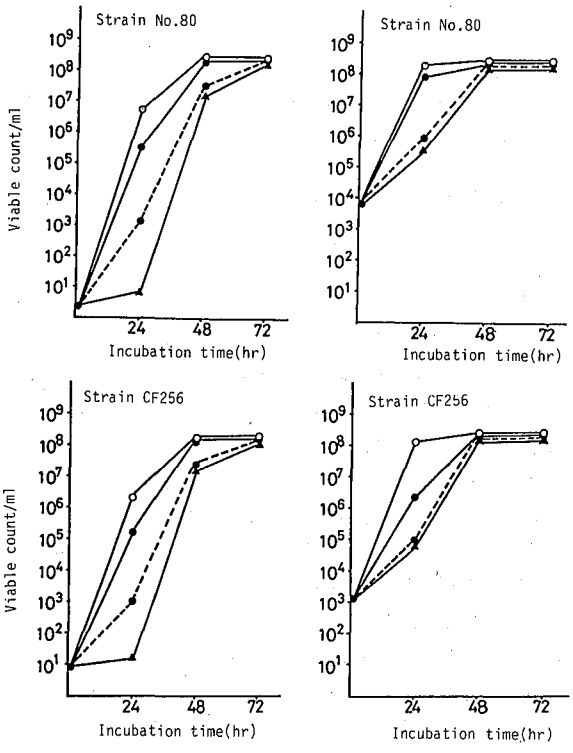


Fig. 1 Growth of *C. jejuni* by selective enrichment media
○—○ B-FBP(Control); ●—● B-FBP-AM; ●--● Modified B-FBP-AM; ▲—▲ CEM

改良 B-FBP-AM の菌数は 10^3レベルと 3 オーダ低く，CEM ではほとんど増殖が見られなかった．48 時間培養後には B-FBP-AM の菌数は対照培地と同じ 10^8レベルに達し，改良 B-FBP-AM および CEM でも急速な増殖が見られ，それぞれ 10^7レベルに達した．一方，1 m*l* 当り 10^4個接種した場合は，B-FBP-AM では対照培地と同様の増殖傾向を示した．しかし，改良 B-FBP-AM および CEM では増殖が遅れる傾向が見られた． 24 時間培養では両培地ともに 10^5レベルまで増殖したが 3 オーダ一低く，48 時間培養後に対照培地と同じ 10^8レベルに達した．また，集団下痢症由来株 CF256 も同様の増殖傾向を示した．

次に，鶏肉にカンピロバクターを添加した試料を 3 種類の選択培地に接種した場合の本菌の増殖を調べ，その結果を Fig. 2 に示した．培地に鶏肉が混入すると，カンピロバクターの増殖は純培養菌だけを接種した場合よりも速やかであった．すなわち，鶏肉 1 g 当り食肉由来株

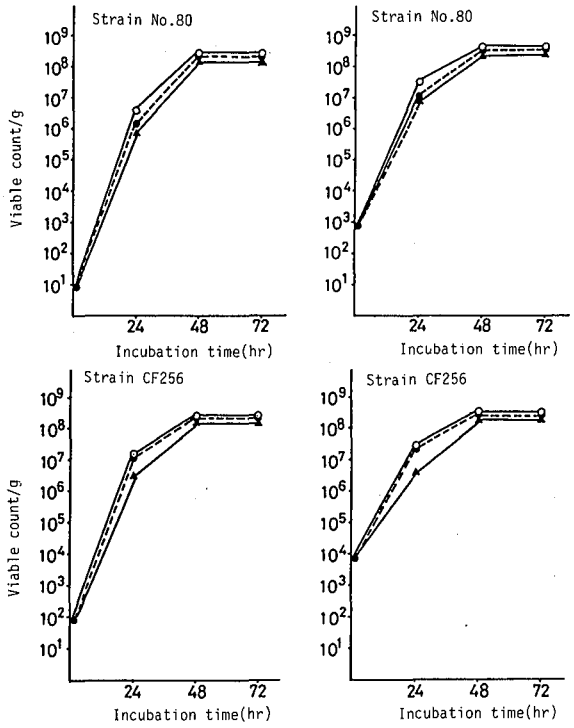


Fig. 2 Growth of *C. jejuni* from inoculated chicken meat by selective enrichment media
○—○ B-FBP-AM; ●—● Modified B-FBP-AM; ▲---▲ CEM

No 80 を 10 個接種した試料を各培地で培養すると，24 時間培養で B-FBP-AM および改良 B-FBP-AM のカンピロバクター菌数は 10^6レベル，CEM もほぼ 10^6レベルまで増殖した．一方，10^3個接種した試料でもカンピロバクターの増殖は著しく，24時間培養で 3 種類の培地ともに 10^7レベルまで増殖した．集団下痢症由来株 CF 256 でも同様の増殖傾向を示した．

2．改良 B-FBP-AM におけるカンピロバクター回収成績

鶏肉 100 g 当り 10^2～10^5個供試菌を接種した試料を対象にして，3 種類の培地によるカンピロバクターの回収試験を MPN 法で行い，その成績を Table 1 に示した．10^4, 10^5接種した試料では 3 種類の培地の測定値に差は認められなかった．10^2, 10^3 接種試料では B-FBP-AM で接種菌量より 1 オーダ低い値を示したのに対し，改良 B-FBP-AM と CEM からは接種菌量とほぼ同じ値が得られた．なお，B-FBP-AM ではカンピロバクター以外の細菌の発育が相当認められたのに対し，改良 B-FBP-AM および CEM からはカンピロバクターが純培養状に検出された．

3．改良 B-FBP-AM における市販鶏肉からのカンピロバクターの検出

カンピロバクターの汚染が最も高いとされている鶏肉およびその内臓などを対象にして，カンピロバクターの検出を 3 種類の培地で行い，その成績を Table 2 に示した．最も多くカンピロバクターを検出したのは改良 B-FBP-AM で増菌した場合で，35 検体中 12 検体から検出した．以下 CEM では 9 検体，B-FBP-AM では 7 検体から検出した．なお，Skirrow 平板培地へ直接塗抹した場合は 3 検体からカンピロバクターが検出された．

考　察

カンピロバクターは *Vibrio fetus* と呼ばれ古くから家畜の流産や下痢の原因菌として良く知られていた．ところが，1973 年 Butzuler[5]がある種のカンピロバクターがヒトの下痢症の原因となることを報告するに及んでから，食品衛生学上注目を集めるようになった．そして，1977 年 Skirrow[6]が選択分離培地を開発したことにより，本菌の研究が急速に発展した．これは本菌への関心が高まったこととあわせて検査技術の進歩，検査器材の改良などに負うことが大である．しかし，カンピロバクターの選択増菌および選択分離培地は，これまでに糞便を対象として開発されたために，食品等の食品検査用培地としてはその選択性が強く，必らずしも十分であるとは思われない．また，多量の馬あるいは羊などの脱繊維

Table 1. Recovery of *C. jejuni* from Experimentaly Inoculated Chicken Meat, Liver or Skin by Selective Enrichment Media

Materials	Strains	Inoculum size (cells/100g)	No. of *C. jejuni* cells/100g recovered by		
			B-FBP-AM	Modified B-FBP-AM	CEM
Meat	C 59(TCK 4)	2.8×10^3	9.3×10^2	1.1×10^3	1.1×10^3
Meat	C 59(TCK 4)	2.8×10^5	1.4×10^5	1.4×10^5	1.1×10^5
Liver	C 96(TCK 13)	1.1×10^2	3.6×10^1	2.3×10^2	9.1×10^1
Liver	C 96(TCK 13)	1.1×10^4	4.6×10^3	1.1×10^4	1.1×10^4
Liver	C 80(TCK 20)	5.1×10^2	2.3×10^1	4.3×10^2	4.3×10^2
Liver	C 80(TCK 20)	5.1×10^5	1.1×10^5	4.6×10^5	4.6×10^5
Skin	C 95(TCK UT)	3.7×10^2	3.6×10^1	2.3×10^2	3.6×10^1
Skin	C 95(TCK UT)	3.7×10^4	1.1×10^4	1.4×10^4	1.4×10^4

Table 2. Recovery of *C. jejuni* from Market Meat, Liver or Skin by Selective Enrichment Media

No.	Specimen	Selective Enrichment Media			No.	Specimen	Selective Enrichment Media		
		Modified B-FBP-AM	B-FBP-AM	CEM			Modified B-FBP-AM	B-FBP-AM	CEM
1	Meat	−	−	−	19	Liver	+	+	+
2	〃	+	−	+	20	〃	−	−	−
3	〃	−	−	−	21	〃	−	−	−
4	〃	+	−	−	22	〃	+	+	+
5	〃	−	−	−	23	〃	+	−	+
6	〃	−	−	−	24	〃	−	−	−
7	〃	+	+	+	25	〃	−	−	+
8	〃	−	−	−	26	〃	−	−	−
9	〃	−	−	−	27	〃	+	−	−
10	〃	−	−	−	28	〃	−	−	−
11	〃	−	−	−	29	〃	−	−	−
12	〃	+	+	−	30	Skin	+	+	+
13	〃	+	+	+	31	〃	−	−	−
14	〃	−	−	−	32	〃	−	−	−
15	〃	−	−	−	33	〃	+	+	−
16	〃	−	−	−	34	〃	−	−	−
17	〃	+	−	+	35	〃	−	−	−
18	〃	−	−	−		Total	12	7	9

血液を使用するため，コストが高く日常検査に用いる培地としては実用的でない．すなわち，食品から本菌を検出する場合，食品は糞便と異なりカンピロバクターの汚染菌数は少くかつ損傷を受けたカンピロバクターも含まれていることを考慮して，検査を実施しなければならない．したがって，試料を選択性の強い分離培地へ直接塗抹するような検査法はできる限り避け，少量あるいは損傷カンピロバクターが増殖できる増菌培地で培養した後，選択分離培地で確認する方法を用いる必要がある．そこで，これらの点を考慮して今回著者らが改良した

B-FBP-AMは，食肉中の少数のカンピロバクターを確実に増殖させるようにグロスサプリメントを増し，一方，本菌以外の細菌の発育をより強く抑制させるために抗生物質を増した培地である．この改良 B-FBP-AM で増菌する方法は，鶏肉からのカンピロバクター回収率が最も良く，市販鶏肉からの検出率も高いことが判明した．
純培養菌単独の場合と培養菌接種鶏肉における本菌の増殖の差は，鶏肉中の蛋白質や脂肪などの存在の有無により，Vancomycin などの抗生物質の抗菌作用が異なるためと考えられる．

本培地には，血液の代りにカンピロバクターの発育促進物質[3,7]として報告されている硫酸第一鉄，メタ重亜硫酸ナトリウムおよびピルビン酸ナトリウムを用いたこと，さらにピルビン酸ナトリウムは損傷したカンピロバクターの修復物質あるいは修復促進物質として作用していると考えられることから，血液が含まれていない培地でもカンピロバクターを十分に増殖させることができるものと思われる．

これらのことから，今回著者らが改良した B-FBP-AM で選択増菌培養する方法は，食肉のカンピロバクター検査法として十分利用価値があり，実用性に富むものと考えられる．

要　約

鶏肉を対象に，血液を用いないカンピロバクターの選択増菌培地の検討を食肉由来株と集団下痢症由来株を用いて行った．その結果，Ehlers らの B-FBP-AM を今回著者らが改良した培地が，従来から報告されている，B-FBP-AM および CEM などより選択性が優れ，カンピロバクターの検出率も高かった．

改良 B-FBP-AM の組成は，ブルセラブロース 1,000 m*l* に寒天 1.5 g，硫酸第一鉄 1 g，メタ重亜硫酸ナトリウム 1 g，ピルビン酸ナトリウム 1 g，Vancomycin 20 mg，Trimethoprim 10 mg，Polymyxin B 5,000 IU，Amphotericin B 2 mg, Cephalotgin 15 mgを加えたものである．

市販鶏肉からのカンピロバクターの検出を改良 B-FBP-AM，B-FBP-AM および CEM を用いて行った結果，改良 B-FBP-AM で増菌した場合に 35 検体中 12 検体からと最も多く検出され，CEM では 9 検体，B-FBP-AM では 7 検体から検出された．

文　献

1) 厚生省通達（環食第 59 号）：食品衛生研究，32：481, 1982
2) J. G. Ehlers, M. Chapparo-Serrano, R. L. Richter and C. Vanderzant: *J. Food Protection.*, 45, 1018, 1982
3) H. A. George, P. S. Hoffman, R. M. Smibert and N. R. Krieg: *J. Clinical Microbiolgy*: 8., 36, 1978
4) 高橋正樹，斉藤香彦，柳川義勢，伊藤　武，坂井千三，大橋　誠：感染症誌，56, 92, 1982
5) J. P. Butzler, P. Dekeyser, M. Detrain and F. Dehaen: *J. Paediat:* 82, 493, 1973
6) M. B. Skirrow: Brit. Med. J. 2．9，1977
7) C. D. Ribeiro and T. H. Price: *J. Hyg. camb*: 92, 45, 1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 202-206, 1984

畜水産食品中の残留サルファ剤の簡易検査法の検討

神崎政子*, 竹葉和江*, 村上文子*,
丸山務*, 松本昌雄*

An Improvement of Simplified Detection Method for Residual Sulfonamides in Meat and Fish

MASAKO KANZAKI*, KAZUE TAKEBA*, FUMIKO MURAKAMI*,
TSUTOMU MARUYAMA*and MASAO MATSUMOTO*

A simple screening method using bioassay (paper disk method) prescribed in standard method for residual antibacterial agents was studied in order to facilitate detecting residual sulfonamides in meat and fish.

As detection sensitivity of sulfonamides varies depending on the medium used, efforts to improve the detection medium were made. The plate prepared by the following showed a favorable result: Trimethoprim was added to Sensitivity disk agar-N (Nissui) in the amount of 0.075μg per 1m$l$of the medium. Spore suspension of ATCC 6633 strain of *Bacillus subtilis* was used as test strain to prepare the plate. With this medium, the detection limit of sulfonamides (sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, sulfisozole) was improved to 0.5μg/ml, which is approximately 40 times better compared to the result obtained before the addition of trimethoprim.

When the above mentioned 3 types of sulfonamides were experimentally added to fish meat and pork and the present medium was used for detection, the recovery rate of these sulfonamides was between 74 and 84%. When used to detect antibacterial agents other than sulfonamides, the present medium showed similar result to that obtained by the conventional ones, giving clearer boundary of inhibition zone in the detection limit level of these antibacterial agents.

Keywords : paper disk method, bioassay, residual antibacterial agent,sulfonamide, trimethoprim

厚生省は昭和52年に抗生物質の残留する食肉をと畜検査の段階で排除するために,「技肉の抗菌性物質簡易検査法」[1]を公定法として示した. その後, 食肉の安全確保の観点から上記方法が市販食肉にも応用できるよう抽出ディスク法が追加され, 昭和58年「食肉の抗菌性物質簡易検査法」[2]に改訂された. しかし, 本法は抗生物質検出を目的として開発されたもので, 従来より動物用医薬品や飼料添加物として汎用されているサルファ剤については検出感度は悪く, その改良が望まれている.

一方, 養殖魚にも抗菌性物質が多用されているが, それらの簡易検査法は示されていないのが現状である.

そこで我々は, 食肉および魚肉などのいわゆる畜水産食品中に残留する抗生物質およびサルファ剤を含めた合成抗菌剤を検出する簡易検査法を確立するために検討を重ねてきた.

一般にバイオアッセイによるサルファ剤の検出感度は培地中の有機成分によって著しく影響されることから, ミューラヒントン培地が推奨されている. しかし, 我々の成績では, ミューラヒントン培地より感性ディスク用培地－N(日水)の方がサルファ剤に対する検出感度が優れていることを確認している[3]. 最近, トリメトプリムを検出用培地に添加するとサルファ剤の検出感度が高まる

* 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

ことが報告されている[4]. そこで, サルファ剤との併用で相乗作用を発揮するトリメトプリムを感性ディスク用培地－Nに添加した試作培地を用いて, 食肉および魚肉中のサルファ剤の検出を試みた.

実験材料および方法

1, 供試菌株

Bacillus subtilis ATCC6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus stearothermophilus var. B. calidolactis* C-953, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* NIHJ, NIHJ株のテトラサイクリン耐性の変異株および *Bacillus cereus var. mycoides* ATCC 11778の計7株である.

2. 使用培地

菌株保存培地には市販の普通寒天培地を, 増殖用培地には感受性測定用ブイヨン（日水）を用いた. 抗菌性物質検出用培地としては, 感性ディスク用培地－N（日水, 以下SNと略す）およびSN培地にトリメトプリムを添加して試作した培地（以下SN-Tと略す）を使用した. *B. stearothermophilus* にはIDF標準法[5]に示されているそれぞれの保存用, 増殖用, 検出用培地を使用した.

3. ディスク

東洋ろ紙製の直径10mm, 厚さ1.5mm, (吸水量約0.08 m*l*)のパルプディスクを121℃, 15分間高圧減菌後, 充分乾燥させてから使用した.

4. 供試抗菌性物質

スルファモノメトキシン (SMM), スルファジメトキシン (SDM), スルフイソゾール (SIZ), テトラサイクリン(TC), オキシテトラサイクリン(OTC), クロルテトラサイクリン (CTC), ベンジルペニシリン (PC-G), アンピシリン(ABPC), カナマイシン(KM), ストレプトマイシン (SM), スピラマイシン (SPM), クロラムフェニコール(CP), フラゾリドン(FZ), ニフルスチレン酸ナトリウム(NFS-Na), オキソリン酸(OA), ナリジクス酸 (NA) の計16種類を使用した. これらは予研常用標準品または製薬会社より分与された純品である.

5. 抽出液

食肉および魚肉中の抗菌性物質を検出するために用いた抽出液は,「簡易検査法」[2]に示されているクエン酸・アセトン緩衝液を使用した.

6. 試験菌の芽胞浮遊液の調製

B. subtilis および *B. cereus* の芽胞浮遊液の調製は「畜産物中の残留物質検査法第1集」[1]の記載に準じた.

7. 抗菌性物質の検出方法

試験菌液および抗菌性物質検出用平板の調製は公定法[1,2,5]に準じて行った. ただし, SN-T平板は55℃に保温したSN培地に, 赤星ら[4]の報告に従ってトリメトプリムを培地1 m*l* あたり0.075 μg添加したのち, 菌液または芽胞浮遊液の所定量を混和して調製した. 抗菌性物質の標準希釈液については0.08 m*l* を, 抗菌性物質添加試料についてはクエン酸・アセトン緩衝液による抽出液の0.08 m*l* をそれぞれピペットを用いてディスクに滴下したのち, 10分間風乾した. 次にこれらを検出用平板上におき, 4℃で1時間放置後, 37℃で24時間培養した. ただし, *B. stearothermophilus* を用いた場合は55℃で培養した. 培養後, ディスク周辺の阻止円の形成の有無ならびに直径の大きさを測定した.

実 験 結 果

1. 抗菌性物質に対する試験菌株の感受性

Table 1. Sensitivity of Test Organinsms to Antibacterial Agents

Antibacterial agent	Detection limit (μg/m*l*)						
	Test organism						
	B. subtilis	*M. luteus*	*B. stearo-thermophilus*	*S. aureus*	*E. coli*	*E. coli** TC res.	*B. cereus*
SMM	20	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
SDM	20	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
SIZ	20	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
OTC	1	5	0.1	1	10	10	0.1
ABPC	0.05	0.05	0.05	0.1	0.5	5	50
CP	10	5	0.5	50	5	50	5
FZ	0.5	>1,000	10	100	100	500	5
NFS-Na	0.1	100	0.5	50	10	50	0.5
OA	0.5	500	10		0.1	0.1	5
NA	10	>1,000	50	500	5	5	

**E. coli* TC res. : *E. coli* NIHJ TC resitance strain

養殖魚に汎用されている10種類の抗菌性物質に対する供試菌株7種の感受性を公定法[1,2,5]で定められている培地を用いて調べ，その成績をTable 1に示した．サルファ剤に対して感受性を示した菌株は，*B. subtilis* のみで，本菌は供試サルファ剤20 μg/ml で発育を阻止された．それ以外の菌株は，いずれも1,000 μg/ml でも発育が抑制されなかった．それに対し，サルファ剤以外の抗菌性物質は，「簡易検査法」[2]に示されている使用菌株の *B. subtilis* または *M. luteus* のいずれかを用いれば，OTCは1 μg/ml まで，CPは5 μg/ml まで，ABPCは0.05 μg/ml まで，FZは0.5 μg/ml まで，NFS-Naは0.1 μg/ml まで，OAは0.5 μg/ml まで，NAは10 μg/ml までそれぞれ感受性を示した．

2．トリメトプリム添加培地の抗菌性物質検出感度

トリメトプリム添加培地によるサルファ剤およびその他の抗菌性物質の検出感度はTable 2に示した．すなわち，試験菌を *B. subtilis* とするトリメトプリム無添加のSN平板では，サルファ剤の検出限界が20 μg/ml であるのに対し，トリメトプリム添加のSN-T平板では0.5 μg/ml と検出感度が上昇した．また，TC, CTCでも同様に1から0.5 μg/ml に，NFS-Naでも0.1から0.05 μg/ml にそれぞれ検出感度が高まった．他の抗菌性物質では，トリメトプリム添加による検出感度の上昇はみられなかったが，検出限界レベルでの阻止円直径はより大きく，しかも鮮明になる傾向を示した．

一方，*M. luteus* を試験菌とするSN-T平板でのPC-G, ABPC, CP, SPMの検出限界はTable 3に示した．SN-T, SN平板ともに検出感度は同じであったが，前者で形成される阻止円の方がより鮮明であった．

3．食肉および魚肉への抗菌性物質の添加回収実験

前項の実験成績から検出用培地としてのSN-T平板の有効性を認めたので，この培地を使用して実際に魚肉5種および豚肉に抗菌性物質を添加し，それらから回収を試みると同時に，SN平板を用いた従来法との比較を行い，その成績をTable 4に示した．検出限界レベルの2倍濃度のサルファ剤（SMM, SDM, SIZ）を，それぞれ魚肉および豚肉に添加し回収実験を行ったところ，SN-T平板では74～84％の回収率を示した．一方，SN平板ではいずれも阻止円が形成されずサルファ剤は検出

Table 2. Effect of Agar Media on Detecion of Antibacterial Agents by *B. subtilis* ATCC 6633

Antibacterial agent	Detection limit (μg,IU／ml) Medium	
	SN*1	SN-T*2
SMM	20	0.5
SDM	20	0.5
SIZ	20	0.5
TC	1	0.5
OTC	1	1
CTC	1	0.5
PC-G	0.05	0.05
ABPC	0.05	0.05
KM	5	5
SM	5	5
SPM	10	10
CP	10	10
FZ	0.5	0.5
NFS-Na	0.1	0.05
OA	0.5	0.5
NA	10	10

*1 SN:Sensitivity disk agar-N(Nissui)
*2 SN-T:Trimethoprim-sensitivity disk agar-N

Table 3. Effect of Agar Media on Detection of Antibacterial Agents by *M. luteus*

Antibacterial agent	Detection limit (μg,IU／ml)		Diameter of inhibition zone (mm)	
	SN*1	SN-T*2	SN	SN-T
PC-G	0.05	0.05	11.8	12.1
ABPC	0.05	0.05	15.0	15.7
CP	5	5	11.8	12.5
SPM	1	1	11.3	13.1

*1 SN:Sensitivity disk agar-N (Nissui)
*2 SN-T:Trimethoprim-sensitivity disk agar-N

Table 4. Recovery of Antibacterial Agents from Fish Meat and Pork using Sensitivity Disk Agar-N and Trimethoprim-Sensitivity Disk Agar-N seeded with *B. subtilis* spores

Antibacterial agent	Amount added (μg/g)		Recovery rate (%) Yellow tail (Hamachi)	Rainbow trout (Nizimasu)	Sweet fish (Ayu)	Carp	Eel	Pork
SMM	4	a*1	78	80	78	78	78	80
		b*2	nd*3	nd	nd	nd	nd	nd
SDM	4	a	84	84	82	83	84	82
		b	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SIZ	4	a	82	80	78	78	80	74
		b	nd	nd	nd	nd	nd	nd
OTC	8	a	100	100	100	100	100	100
		b	100	100	100	100	100	100
ABPC	0.4	a	80	NT*4	NT	NT	NT	NT
		b	82	NT	NT	NT	NT	NT
CP	80	a	88	88	88	88	88	86
		b	90	90	86	86	90	86
FZ	4	a	86	90	84	80	86	80
		b	86	90	82	80	86	80

*1 a:by Sensitivity disk agar-N (Nissui)
*2 b:by Trimethoprim sensitivity disk agar-N
*3 nd:not detected
*4 NT:not tested

できなかった. サルファ剤以外の抗菌性物質の回収率は, SN-T, SN いずれの平板においても 80～100 %で, 両者間に差は認められなかった. なお, 供試した魚種あるいは魚肉と食肉との違いによる回収率の差異も認められなかった.

考　察

トリメトプリムはサルファ剤と相乗作用がみられる抗菌性物質で, ST 合剤として臨床的にその効果がよく知られている[6]. トリメトプリム添加 SN 培地 (SN-T) でのサルファ剤の検出感度が無添加 SN 培地に比べて上昇したことは, トリメトプリム添加によってサルファ剤の抗菌作用が増強されたものと思われる.

サルファ剤以外の抗菌性物質を *B. subtilis, M. luteus* を試験菌として検出する場合, このような培地へのトリメトプリム添加は検出結果に支障をきたすことなく, むしろ検出限界レベルでの阻止円を鮮明にし, 判定しやすくなることが明らかとなった. このように SN-T 平板の方が SN 平板より阻止円直径が大きくなるのは, 培地中のトリメトプリムが試験菌の芽胞の発芽や菌の増殖を抑制するためにおこる現象と推定される. その結果, 培養時間は従来の 18 時間より 20～24 時間に延長した方が阻止円がより鮮明となり判定しやすい. 判定所要時間は従来法よりやや長くなるが, この程度の時間の延長は日常の検査に支障がないと思われる.

今回の添加回収実験は「食肉の抗菌性物質簡易検査法」[2]の魚肉への応用という目的から, 水産用の主要抗菌性物質 7 種およびそれら薬剤の使用対象魚種[7]のハマチ, ニジマス, アユ, コイ, ウナギの魚肉を用いて行った. その結果, 魚肉における各抗菌性物質の回収率は食肉における場合と同程度であったことから, 従来の抽出法が魚肉にも適用できるものと考えられる. また, SN-T 培地は, 食肉, 魚肉中に残留する低濃度のサルファ剤およびその他の抗菌性物質をも検出できるので, 従来法の検出用培地に比べてより有効な培地と思われる.

結　論

「食肉の抗菌性物質簡易検査法」を魚肉にも応用し, またサルファ剤の検出方法についても検討を加えたところ, 以下の成績を得た.

1. 感性ディスク用培地—N にトリメトプリムを培地 1 m*l* あたり 0.075 μg 添加し, 試験菌株として *B. subtilis*

ATCC 6633 を用いて調製した平板では，サルファ剤(スルファモノメトキシン，スルファジメトキシン，スルフイソゾール）の検出限界はトリメトプリム無添加の場合に比べ約 40 倍向上し，0.5 μg/ml まで検出可能であった．

2．魚肉および豚肉にサルファ剤を添加しそれらの回収実験を試みたところ，トリメトプリム添加感性ディスク用培地—N の平板を用いた時の回収率は 74～84 %であったのに対し，トリメトプリム無添加同培地の平板ではサルファ剤を検出できなかった．

3．トリメトプリム添加感性ディスク用培地—N はサルファ剤以外の抗菌性物質検出にも有効であった．

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 1 集，1977
2）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
3）神崎政子，竹葉和江，村上文子，丸山　務，松本昌雄：東京衛研年報，34，159，1983
4）赤星まゆみ，近藤房生，徳富剛二郎：第 95 回日本獣医学会，講演要旨，184，1983
5）IDF Sessions in Moscow, V-Doc 86 (1968)
6）五島瑳智子，金子康子，原田公子，桑原章吾：*Chemotherapy,* 21, 77, 1973
7）水産庁：水産用医薬品使用指針 1, 1980

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 207-209, 1984

鶏肉中の残留クロピドールの実態調査

堀井昭三*, 山岸達典*, 松本昌雄*

Survey of Residual Clopidol in Commercial Chicken Tissues

SHOZO HORII*, TATSUNORI YAMAGISHI* and MASAO MATSUMOTO*

Residual clopidol in commercial chicken tissues was surveyed in Tokyo from 1980 to 1983 by means of gas chromatography(GC). The compounds were detected in commercial chicken tissues at levels of 0.01 to 3.51 ppm in 14 samples out of 153. The detected substance was identified as clopidol methyl ester (3,5-dichloro-4-methoxy-2,6-lutidine) by means of GC-mass spectrometry.

Keywords : clopidol, chicken tissue, gas chromatography-mass spectrometry

緒　言

合成抗菌剤クロピドール（3,5-ジクロロ-2,6-ジメチル-4-ピリジノール）は，鶏のコクシジウム症を予防する目的で，飼料に80～250ppm添加することが，「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律」で認められている．さらに同法では，採卵鶏には，ふ化後10週以内，ブロイラーにはと殺1週前までの使用が許可されている．この法律が遵守されれば，市販の鶏肉中にクロピドールは残留しないと考えられているが，近年クロピドールの残留例が報告[1~4]されて，食品衛生上問題となっている．そこで著者らは，都内で市販されている鶏肉中のクロピドールの残留実態を把握する目的で調査を行なった．

実験方法

1　試料　1980年から1983年にかけて，食品監視課が都内の食肉処理業者から収去した鶏の筋肉（67），肝臓（53），筋胃（砂ぎも，28）および卵巣（5）計153検体を試験に供した．

2　試薬および標準品

クロピドール：Dow Chemical社製，分析用標準品

メタノール：関東化学㈱製，残留農薬分析用

ハイフロースーパーセル：John-Maville社製

陰イオン交換樹脂：Dow Chemical社製，Dowex 1-X 8（100～200 mesh）Cl型

ジアゾメタンエーテル溶液：ニトロソメチル尿素より生成した．

その他の試薬：市販特級品

3　装置

ホモジナイザー：IKA WERK社製，ウルトラトラックス

ガスクロマトグラフ（GC）：㈱日立製作所製，163型電子捕獲型検出器（ECD）付

ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）：GC部 Hewlett Packard(HP) 社製5710 A型，MS部日本電子㈱社製D－300（JMS2000システム付）

4　測定条件　充てん剤　3％ OV-1，3％ OV-17，5％ OV-101，Uniport HP　100～200 mesh，2 m（日立），1.8 m（HP），カラム温度150～160°，注入口，検出器，セパレーター温度250°，N_2 40～60 m*l*/min(日立)，He 30 m*l*/min（HP），マスフラグメントグラフィー（MF）m/z 205，イオン化電圧70 eV，20 eV（MF）

5　試料の調製　畜産物中の残留物質検査法[5]に準じて行なった（Chart 1）

結果および考察

クロピドールの分析に関する報告[1~8]は多数あるが，著者らはメチル化後ECD-GCで分析する方法[3~5,7,8]に準じて行ない，その概要をChart 1に示した．　GCで検出された試料のうち，0.5 ppm以上の検体は質量スペクトル（Fig. 1，2）を測定し，0.5 ppm未満の検体はマスフラグメントグラフィー m/z 205（Fig. 3）を行うことにより，それぞれメチルクロピドールであることを確認した．本分析法における検出限界は0.01ppmである．

* 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

Sample (20g)
| homogenize with MeOH and Hyflo Super-Cel
Filtrate
| make up to 100 m*l* with MeOH
Filtrate (20 m*l*)
|
Alumina column chromatography
|
Anion exchange column chromatography
| (Dowex 1-X8)
| elute with 0.1%AcOH-MeOH
| make up to 25 m*l* with MeOH
Eluate (1m*l*)
| evapoorate to dryness
Residue
| react with diazomethane at room temperature for 30 min
| evaporate to dryness
Residue
| dissolve in 5 m*l* of 0.002N NaOH
| extract with 1 m*l* hexane
n-Hexane layer
|
ECD-GC

Chart 1. Analytical Method for Clopidol in Chicken Tissues

Table 1に示したように，1980年から1983年の4年間に都内で市販された鶏肉および鶏の臓器計153検体を分析したところ，14検体(検出率9%)から0.01～3.51 ppmの範囲でクロピドールが検出された．各臓器別にみると筋肉4/67(6%)，肝臓7/53(13%)，筋胃2/28(7%)および卵巣1/5(20%)であった．調査年度により対象臓器や検体数が若干異なっているが筋肉と筋胃に比べ肝臓と卵巣はクロピドールの検出率が高い傾向を示した．なお同様な結果を今中ら[1]も報告している．今回の調査で最高3.51 ppmのクロピドールが肝臓から検出されたが，クロピドールの1日許容摂取量(ADI)が2.5 mg[4]であることから，ADI値に達するにはこの肝臓を1日に712 g摂取しなければならない．一方，厚生省の国民栄養の現状[9]によれば1982年の日本人1人当りの1日の肉類摂取量70.8 gのうち鶏肉は16.5 gにしかすぎず鶏の肝臓をこのように多量に摂取することはありえず，今回調査した鶏の臓器中に残留する濃度のクロピドールが健康を損う危険性はないと考えられる．

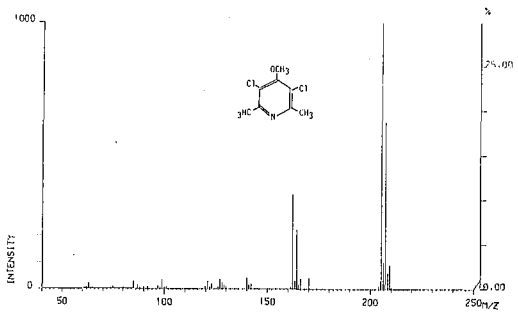


Fig. 1. Mass Spectrum of Clopidol Methyl Ester (3,5-dichloro-4-methoxy-2, 6-lutidine)

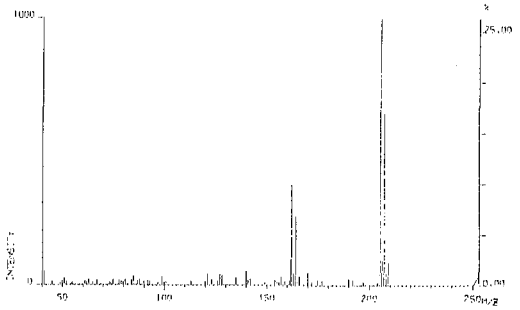


Fig. 2. Mass Spectrum of the Extract from Chicken Tissue

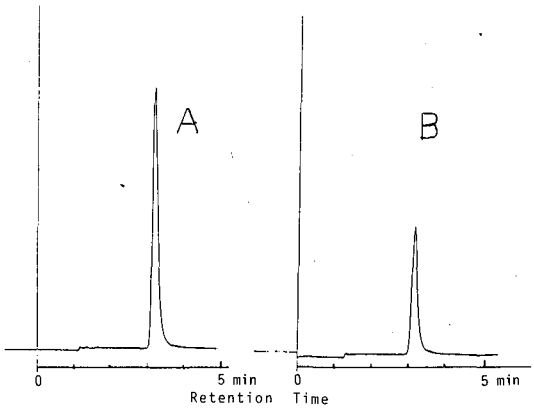


Fig. 3. Mass Fragmentogram of Clopidol Methyl Ester (A) and the Extract from Chiken Tissue (B) (m/z 205)

Table 1. Concentrations of Clopidole in Chicken Tissues

Year	Tissues	No. of Samples	Detected Numbers (%)	Concentrations
1980	Muscle	17	4(24)	0.02, 0.10, 0.17, 0.21
	Liver	8	1(13)	0.66
	Gizzard	4	0	
1981	Liver	9	2(22)	0.14, 3.51
	Gizzard	5	0	
	Ovary	5	1(20)	0.04
1982	Muscle	34	0	
	Liver	14	3(21)	0.01, 0.10, 0.30
	Gizzard	12	1 (8)	0.01
1983	Muscle	16	0	
	Liver	22	1 (5)	0.01
	Gizzard	7	1(14)	0.63
	Total	153	14 (9)	

クロピドールが鶏肉や鶏の臓器中に残留したことは，食品衛生上無視出来ない問題であり，飼料添加物の使用基準が遵守されなかったことに起因していると考えられる．そこで今後も監視指導を強化するとともに鶏肉等のクロピドール汚染調査を広く実施する必要がある．

要　約

1　1980年から1983年の期間に，都内の市販鶏肉および臓器計153検体について，残留クロピドールの調査を行なった結果，14検体から0.01～3.51 ppmの範囲でクロピドールが検出された，臓器別にみると肝臓，卵巣が筋肉，筋胃に比べ高い検出率を示した．

2　GCで検出されたクロピドールについてはGC－MSによる確認を行なった．

謝辞　本調査にあたり試料入手にご尽力下さいました東京都衛生局食品監視課の皆様に深謝いたします．

文　献

1) 今中雅章，松永和義，斉藤直己，石田立夫：岡山環境保健センター年報，6，133，1982
2) 大塚公人，堀部京子，杉谷　哲，山田不二造：食衛誌，22，462，1981
3) 大森　茂，中島純夫，細木睦子ら：食衛誌，21，113，1980
4) 星野庸二，能勢憲英，赤木洋勝，高畠英伍：衛生化学，26，186，1980
5) 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2，39，1978
6) Mtema,C.A., Nakazawa,H. and Takabatake,E.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67, 334, 1984
7) Bjerke, E.L. and Herman, J.L.: *ibid.*, 57, 914, 1974
8) Suzuki,E., Matsuda,M., Monose,A. and Namekata,M.: *ibid.*, 63, 1211, 1980
9) 厚生省公衆衛生局栄養課：昭和59年版　国民栄養の現状，1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 210-218, 1984

野菜，果実及びコーヒー豆中の残留農薬調査

永山敏廣*，観公子*，田村行弘*
真木俊夫*，二島太一郎*

Survey of Pesticide Residues in Vegetables, Fruits and Coffee Beans

TOSHIHIRO NAGAYAMA*, KIMIKO KAN*, YUKIHIRO TAMURA*,
TOSHIO MAKI*and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords : 残留農薬 pesticide residues，野菜 vegetables，果実 fruits，コーヒー豆 coffee beans，有機塩素系農薬 organochlorine pesticides，有機リン系農薬 organophosphorus pesticides，クロロタロニル chlorothalonil(TPN)，キャプタン captan，調理 cooking，安定性 stability

緒　言

農薬の残留については，食品衛生法により穀類，豆類，野菜類，果実類等に係る残留基準が設けられ，厳しく規制されている．著者らはこれら残留基準の設定された農薬について，農作物等を対象に毎年実態調査を行っている[1~3]．

近年，野菜類等は大規模な施設により栽培されている．施設栽培は露地栽培に比較して高温，多湿な環境の下で行われるため，病虫害の発生しやすい状態になっている．そこで，多量の農薬が散布され，しかも施設内は密閉状態であるため，使用された農薬が大気中等へ拡散することなく施設内に長期間残留する[4,5]．また，種々の病虫害の発生に備えて，残留基準のない農薬も多種類使用されている．このような栽培実態の中で，特に残留基準の設定されていない農薬の残留調査はほとんど報告されていない．そこで，東京都内に入荷される野菜及び果実類を対象に，有機塩素系農薬，有機リン系農薬等残留基準のある農薬と共に，残留基準のないイソキサチオン，CYP等の有機リン系農薬，クロロタロニル(TPN)，PCNB，クロルピクリン，D-D，メソミル等の繁用されている農薬について，残留の実態を調査した．併せて，検出された農薬の一部を対象に，熱に対する安定性及び調理による影響について検討を加えた．

また，前年度[6]に引き続き，輸入農産物のひとつであるコーヒー豆について，残留農薬の調査を行ったので併せて報告する．

実験の部

1．**試料**　1983年4月から1984年3月にかけて東京都内に入荷した野菜・果実類130検体及びコーヒー豆44検体（生豆20検体，焙煎豆13検体，インスタントコーヒー11検体）の計174検体を対象とした．

2．**調査農薬名**　野菜・果実類：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〕9種，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（MEP），フェンチオン（MPP），フェントエート(PAP)，マラチオン，クロルピリホス，クロルフェンビンホス(CVP)，ホサロン，サリチオン，ジクロフェンチオン(ECP)，テトラクロルビンホス(CVMP)，チオメトン，エチルチオメトン（ジスルホトン），クロルピリホスメチル，シアノホス(CYAP)，ホルモチオン，メチダチオン（DMTP），EPBP，エチオン，イソキサチオン，シアノフェンホス(CYP)，プロチオホス，アセフェート〕27種，クロロタロニル（TPN），キャプタン，カプタホール，PCNB，クロルピクリン，D-D，メソミル　総計43種

コーヒー豆：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〕10種，有機リン系農薬〔EPN，DDVP，ジメトエート，ダイアジノン，パラチオン，MEP，MPP，PAP，マラチオン〕9種　総計19種

* 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

3．機器 ガスクロマトグラフ：㈱島津製作所製 GC-4B（検出器 ECD），同 GC-5A（検出器 ECD, FPD），同 GC-9A（検出器 ECD, FPD, FTD），同 GC-R1A（検出器FTD）

4．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準じた．また，キャプタン及びカプタホールは，昭和48年厚生省告示第332号の野菜類及び果実類の方法に従いクリーンアップした．アセフェート，TPN，PCNB，クロルピクリン，D-D及びメソミルは，残留農薬分析法[7]に従った．

5．試料中の各農薬の検出限界 有機リン系農薬：各々0.01ppm，TPN：0.001ppm，キャプタン：0.005ppm，カプタホール：0.01ppm，PCNB：0.001ppm，クロルピクリン：0.001 ppm，D-D：0.01 ppm，メソミル：0.05 ppm

6．ガスクロマトグラフィー用カラム充てん剤 アセフェート：2％レオプレックス400〔クロモソルブW(AW-DMCS)，80/100 mesh〕．

TPN：5％シリコン OV-1〔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〕，10％シリコン DC-200〔ガスクロームQ，80/100 mesh〕．

キャプタン，カプタホール：3％シリコン OV-17〔クロモソルブW（AW-DMCS)，80/100 mesh〕．

PCNB：2％ DEGS〔クロモソルブW(AW-DMCS)，60/80 mesh〕．

クロルピクリン：2％シリコン DC-QF-1〔クロモソルブG（AW-DMCS)，80/100 mesh〕．

以上の他は各分析法記載のものを用いた．

結果及び考察

1．野菜・果実類

(1) 残留農薬

野菜及び果実類96検体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7検体（検出率，7.3％）から 0.001～0.002 ppm 検出され，主に α-BHC として存在していた．また，ディルドリンはかぶの根1検体から 0.006 ppm，その葉

Table 1. Contents of Organochlorine Pesticides in Vegetables and Fruits

Sample	No. of sample	No. of positive	Organochlorine pesticides[1] (ppm)
Spinach	17	1	0.001 (total-BHC)
Chinese cabbage [Komatsuna]	12	0	ND[2]
Crown daisy [Shungiku]	7	0	ND
Cabbage	15	0	ND
White rape [Hakusai]	10	0	ND
Lettuce	2	1	0.002 (total-BHC)
Cucumber	6	1	0.002 (total-BHC)
Pimiento	2	0	ND
Turnip (root)	4	2	0.001 (total-BHC), 0.006 (dieldrin)
Turnip (leaf)	4	2	0.001 (total-BHC), 0.005 (dieldrin)
Apple	1	0	ND
Strawberry	3	0	ND
Mandarin orange	1	0	ND
Summer orange (peel)	6	2	0.001 (total-BHC), 0.001 (total-BHC)
Summer orange (flesh)	6	0	ND
Total	96	9	0.001-0.002(total-BHC), 0.005-0.006(dieldrin)

1) Total-BHC(α-, β-, γ-, δ-BHC), total-DDT (pp'-DDT, pp'-DDE, pp'-DDD), dieldrin and endrin are investigated.

2) ND：not detected.

Table 2. Contents of Organophosphorus Pesticides and Chlorothalonil in Vegetables and Fruits

SamPle	No. of samPle	Organophosphorus pesticides[1]		TPN		Reference
		No. of positive	Detectable residue (ppm)	No. of positive	Detectable residue (ppm)	
Spinach	18	3	0.03(EPN), 0.01(fenitrothion), 0.07(CYP),	0	ND[2]	
Chinese cabbage	13	3	0.30(EPN), 0.02(diazinon), 11(isoxathion),	0	ND	disulfoton sulfone 0.25ppm (for disulfoton)
Crown daisy	7	2	0.11(malathion), 0.08(CYP)	0	ND	
Cabbage	18	0	ND	0	ND	
White rape	13	0	ND	0	ND	
Lettuce	2	1	0.72(prothiofos)	0	ND	
Cucumber	10	1	0.05(EPN)	1	0.039	
Pimiento	3	2	0.41(phosalone), 1.0(prothiofos)	0	ND	
Eggplant	2	0	ND	1	0.001	
Tomato	4	1	0.05(EPN), 0.02(DMTP)	1	0.022	
Carrot	1	0	ND	0	ND	
Radish (root and leaf)	2,1	0	ND	0	ND	
Turnip (root and leaf)	4,4	0	ND	0	ND	
Japanese pear	4	2	0.01(fenitrothion), 0.07(fenitrothion)	1	0.003	
Apple	1	0	ND	0	ND	
Strawberry	3	0	ND	0	ND	
Grape	2	1	Tr[3](fenitrothion)	1	0.004	
Mandarin orange	2	0	ND	0	ND	
Summer orange (peel and flesh)	6,6	0	ND	0	ND	
Hassaku (peel and flesh)	1,1	0	ND	0	ND	
Iyokan (peel and flesh)	1,1	0	ND	0	ND	
Total	130	16	0.03～0.30(EPN), 0.02(diazinon), Tr～0.07(fenitrothion), 0.11(malathion), 0.41(phosalone), 0.02(DMTP), 11(isoxathion), 0.07～0.08(CYP), 0.72～1.0(prothiofos)	5	0.001～0.039	

1) EPN, DDVP, dimethoate, diazinon, parathion, MEP, MPP, PAP, malathion, chlorpyrifos, CVP, phosalone, salithion, ECP, CVMP, thiometon, disulfoton, chlorpyrifosmethyl, CYAP, formothion, DMTP, EPBP, ethion, isoxathion, CYP and prothiofos are investigated.

2) ND : not detected

3) Tr : below 0.01ppm

から 0.005 ppm 検出された.

BHC, ディルドリン等のいわゆる有機塩素系農薬は, 1971 年にその使用が禁止された. 1980 年以降, これら有機塩素系農薬の残留量は減少する傾向が見られ, 検出率も 10 %以下と低くなっている.

野菜及び果実類 130 検体の有機リン系農薬及び TPN 含有量を, Table 2 に示した. 有機リン系農薬のうち, 残留基準のあるものは 11 検体 (検出率, 8.5 %) から検出された. EPN はほうれん草から 0.03 ppm, 小松菜から 0.30 ppm, きゅうりから 0.05 ppm, トマトから 0.05 ppm の 4 検体から検出された. また, フェニトロチオンはほうれん草から 0.01 ppm, 梨から 0.01, 0.07 ppm 検出された. さらに, ダイアジノンは小松菜から 0.02ppm, ホサロンはピーマンから 0.41 ppm, マラチオンは春菊から 0.11 ppm 検出された. これらの結果は, 食品衛生法の残留基準値を大きく下回る値であった. しかし, EPN がほうれん草から, マラチオンが春菊から検出されたことは, 農薬取締法第 12 条 6 項による農薬安全使用基準上注目すべき問題である. すなわち, 農作物によっては容易に農薬の残留する恐れがあることから, 一部の農薬は対象作物が限定されている. 従って, これらの結果は, 使用上に問題のあることを示唆している. 今後, 農薬使用者に対する十分な指導が望まれる.

環境庁の定めた登録保留基準のある農薬では, イソキサチオンがほうれん草から 11 ppm と, 基準値 0.1 ppm の 100 倍を超える値を検出した. また, CYP もほうれん草から 0.07 ppm, 春菊から 0.08 ppm 検出され, いずれも基準値 0.05 ppm を超えていた. これらイソキサチオン及び CYP は, 1981 年度の調査でも小松菜からそれぞれ 12 ppm, 0.8 ppm 検出され[8], 残留性の大きい傾向が見られた.

イソキサチオンは幅広い殺虫スペクトルを有するため, 種々の作物に使用され, また, 植物及び土壌中で比較的安定な殺虫剤である[9]. 一方 CYP は EPN に代わる農薬として開発された殺虫剤であり, EPN と同様, 比較的残留性がある. 今回イソキサチオン及び CYP を検出したほうれん草等は, 直接あるいは近隣の作物等に散布後, 直ちに収穫したものと思われ, 出荷時期における農薬散布にはより一層の注意を払う必要がある.

その他, 基準値は設定されていないが, プロチオホスがレタスから 0.72 ppm, ピーマンから 1.0 ppm 検出された. プロチオホスは 1981 年度の調査でほうれん草, 白菜及びピーマンから 0.3~1.9 ppm 検出され[8], 残留性の大きいことが示唆された. 従って, 今後とも残留実態の調査が必要であると考える.

また, ダイアジノン 0.02 ppm を検出した小松菜から, ジスルホトンスルホンが 0.25 ppm (エチルチオメトンとして)検出された. ジスルホトンスルホンは土壌中[10,11]あるいは植物体内[12]でエチルチオメトンが酸化されて生成する代謝物であり, 残留基準値及び登録保留基準値は設定されていない. しかし, ジスルホトンスルホンの殺虫力はエチルチオメトンより大きいと言われており[11,13], 登録保留基準値 0.1 ppm のエチルチオメトンと同様, その残留には留意する必要があると思われる.

TPN はきゅうり, トマト等 130 検体中, 9 月に入手した 5 検体から 0.001 ~ 0.039 ppm 検出され, 検出率は 6.9%であった. いずれも登録保留基準値1.0ppmを超えるものはなかった. また, 検出率は 1979 年度の 51 %[2]を大きく下回った.

その他, 有機リン系殺虫剤のひとつであるアセフェート, 低毒性の殺菌剤であるキャプタン, カプタホール, PCNB 及びその不純物として含まれているヘキサクロロベンゼン(HCB), くん蒸剤であるクロルピクリン, 線殺虫剤である D-D, カーバメート系殺虫剤であるメソミルについて調査した結果を, Table 3 に示した. 著者らの過去の調査において検出した例のないキャプタンが, 1984 年 3 月に入手したトマトから 0.02 ppm 検出された. この残留量は残留基準値 5.0 ppm の 1 /250 であり, 食品衛生上問題はない値である. しかし, キャプタンは作物に散布されてからも分解が速く, 残留性はほとんどないと考えられている. 今回の結果は, 施設栽培等で収穫直前まで使用され, 揮散・分解等をあまり受けることなく出荷されたものであり, 散布から出荷までの使用期間を守らなかったことにより生じたものと考えられる.

その他, 白菜 2 検体から PCNB がそれぞれ 0.001 ppm 検出され, また, 同検体から PCNB の不純物である HCB が, それぞれ 0.001 ppm 未満検出された.

(2) イソキサチオンの調理等における安定性

1983 年 4 月に入手したほうれん草 1 検体から, 登録保留基準値を大きく超える 11 ppm のイソキサチオンが検出された. そこで, イソキサチオンの熱に対する安定性, 沸騰水及び油中での安定性について検討した. さらに, 冷凍保存しておいたイソキサチオンの残留していたほうれん草を用いて, ゆでる, 炒める等の調理をした場合の消長について併せて検討を加えた.

イソキサチオン 100 μg を 10 ml の共栓試験管に分取し, 栓をした後, 100, 120, 150, 180°の油浴中及び 230°の電気炉中で 2, 5, 10, 20 分間加熱し, それぞれの残

Table 3. Contents of Various Pesticides in Vegetabies and Fruits

Sample	Acephate			Captan			Captafol			PCNB			HCB			Chloropicrin			D-D			Methomyl		
	S	P	D	S	P	D	S	P	D	S	P	D	S	P	D	S	P	D	S	P	D	S	P	D
Spinach	5	0	ND[1)]	3	0	ND	3	0	ND	5	1	Tr[3)]	5	2	Tr[3)], Tr	5	0	ND	3	0	ND	3	0	ND
Chinese cabbage	7	1	Tr[2)]	4	0	ND	4	0	ND	6	1	Tr	6	0	ND	7	0	ND	5	0	ND	3	0	ND
Crown daisy	2	0	ND	2	0	ND	2	0	ND	2	0	ND	2	0	ND	2	0	ND	2	0	ND	—	—	—
Cabbage	7	0	ND	3	0	ND	3	0	ND	5	0	ND	5	0	ND	7	0	ND	5	0	ND	5	0	ND
White rape	7	0	ND	7	0	ND	7	0	ND	7	2	0.001, 0.001	7	2	Tr, Tr	7	0	ND	7	0	ND	3	0	ND
Lettuce	2	0	ND	—	—	—	—	—	—	2	0	ND	2	0	ND	2	0	ND	—	—	—	2	0	ND
Cucumber	6	0	ND	2	0	ND	2	0	ND	4	0	ND	4	1	Tr	6	0	ND	4	0	ND	6	0	ND
Pimiento	1	0	ND	1	0	ND	1	0	ND	1	0	ND	1	0	ND	1	0	ND	1	0	ND	1	0	ND
Eggplant	2	0	ND	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	0	ND	2	0	ND	2	0	ND
Tomato	4	0	ND	1	1	0.02	1	0	ND	1	0	ND	1	0	ND	4	0	ND	4	0	ND	4	0	ND
Carrot	1	0	ND	1	0	ND	1	0	ND	1	0	ND	1	0	ND	1	0	ND	1	0	ND	1	0	ND
Radish (root and leaf)	2,1	0	ND	2,1	0	ND	2,1	0	ND	2,1	0	ND	2,1	0	ND	2,1	0	ND	2,1	0	ND	2,1	0	ND
Japanese pear	4	0	ND	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	0	ND	4	0	ND	4	0	ND
Apple	1	0	ND	1	0	ND	1	0	ND	1	0	ND	1	0	ND	1	0	ND	1	0	ND	—	—	—
Strawberry	2	0	ND	—	—	—	—	—	—	2	1	Tr	2	0	ND	2	0	ND	—	—	—	2	0	ND
Grape	2	0	ND	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	0	ND	2	0	ND	2	0	ND
Mandarin orange	2	0	ND	2	0	ND	2	0	ND	2	0	ND	2	0	ND	2	0	ND	2	0	ND	1	0	ND
Hassaku (peel and flesh)	1,1	0	ND	1,1	0	ND	1,1	0	ND	1,1	0	ND	1,1	0	ND	1,1	0	ND	1,1	0	ND	1,1	0	ND
Iyokan (peel and flesh)	1,1	0	ND	1,1	0	ND	1,1	0	ND	1,1	0	ND	1,1	0	ND	1,1	0	ND	1,1	0	ND	1,1	0	ND
Total	62	1	Tr	34	1	0.02	34	0	ND	46	5	Tr~0.001	46	5	Tr	62	0	ND	50	0	ND	46	0	ND

S : number of sample, P : number of positive, D : detectable residue (ppm)

1) ND : not detected 2) Tr : below 0.01ppm 3) Tr : below 0.001ppm

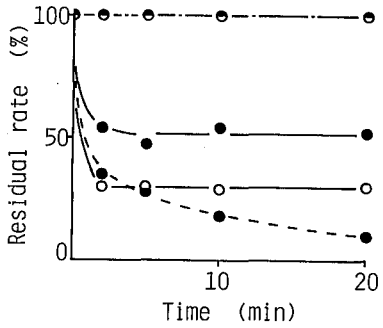


Fig. 1 Stability of Isoxathion by Heating
●—●, 100℃; ○---○, 120℃;
●—●, 150℃; ○—○, 180℃;
●---●, 230℃

留量を調査し，その結果を Fig. 1 に示した．イソキサチオンは 150°以上で急速に分解，減少する傾向が見られた．しかし，20 分の加熱でも，150°では約 50 %，180°では約 30 %，230°では約 10 %が残存しており，熱に対し比較的安定であることが判明した．また，野菜をゆでる，あるいは炒める場合，多量の水あるいは油を使用するため，水及び油を加えたときのイソキサチオンの安定性についても検討し，それらの結果を Fig. 2，3 に示した．熱水及び 1 %塩化ナトリウム溶液中でわずかに減少する，傾向が見られたが，油中では 180°20 分の加熱でもほとんど減少せず，より安定であった．

次いで，イソキサチオンを 11 ppm 検出したほうれん草 10 g を用い，沸騰水 50 m*l* を加え 2，5，10 分間ゆでた場合と，大豆油 0.3 m*l* で 2，5 分間炒めた場合のイソキサチオンの消長を Fig. 4 に示した．ゆでた場合，イソキサチオンは 50～70 %がほうれん草中に残存しており，ゆで汁中へは 3 ～ 7 %ほど移行していた．また，炒めた場合も，油中で加熱した場合と同様，高温での処理にもかかわらず残存量が多かった．通常の調理時間と考えられる 5 分間ゆでる，あるいは 2 分間炒める場合の可食部分の残存率はそれぞれ 68, 97 %であり，ほうれん草に残留していたイソキサチオンの大部分はそのまま喫食されてしまうものと考えられる．

イソキサチオンの LD_{50} 値は経口-マウス 98mg/kg，経口-ラット 112 mg/kg であり[14]，今回の残留量では喫食上問題はないと考える．しかし，野菜中の農薬残留をより低くするために，尚一層の使用者への使用時期及び使用法の指導が望まれる．また，今後とも残留実態調査等が必要であると考える．

(3) CYP の調理等における安定性

イソキサチオンと同様，登録保留基準値を超えたCYPに

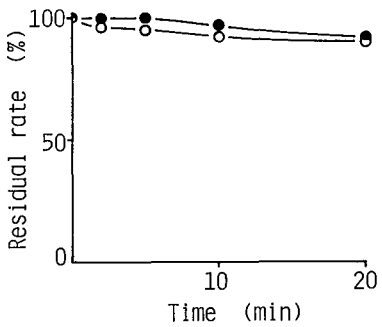


Fig. 2 Stability of Isoxathion in Boiling Water
●—●, distilled water;
○—○, 1% NaCl soln.

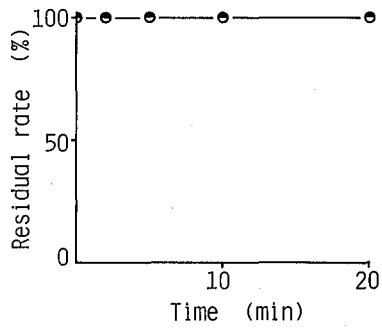


Fig. 3 Stability of Isoxathion with Oil by Heating
●—●, 150℃; ○—○, 180℃

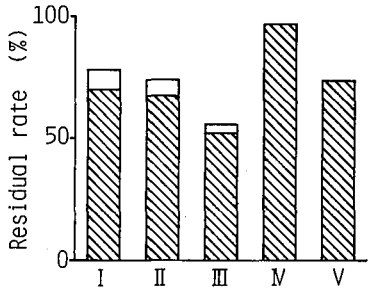


Fig. 4 Effect of Cooking on Disappearance of Isoxathion in Spinach
I, boiled for 2min; II, boiled for 5min;
III, boiled for 10min; IV, frizzled for 2min;
V, frizzled for 5min.
▨, spinach; □, boiled water

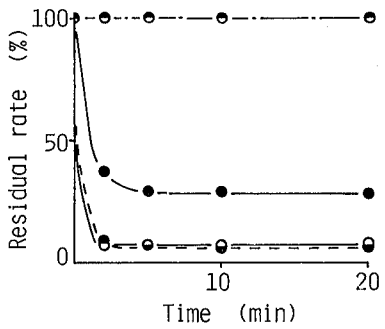


Fig. 5 Stability of CYP by Heating
●---●, 100℃; O---O, 120℃;
●——●, 150℃; O——O, 180℃;
●---●, 230℃

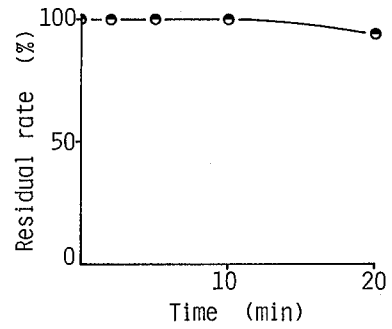


Fig. 6 Stability of CYP in Boiling Water
●——●, distilled water;
O——O, 1% NaCl soln.

ついて，1984年3月に入手したほうれん草を用いて検討した．

CYP 100 μg を 10 ml の共栓試験管に分取し，イソキサチオンの場合と同様，加熱処理した．Fig. 5 に示したように，150°以上で加熱した場合急激に減少し，イソキサチオンよりやや分解しやすい傾向が見られた．しかし，水，1%塩化ナトリウム溶液及び油の存在下で処理した場合では，Fig. 6，7 に示したように，ほとんど減少せず，かなり安定であることが判明した．

また，通常の調理時間と考えられる5分間ゆで，あるいは2分間炒めた場合の残存率は，Fig. 8 に示したように，可食部分でそれぞれ 62，79%であり，イソキサチオンの場合と同様，大部分はそのまま喫食されるものと考えられた．しかし，CYP の LD_{50}値は経口-マウス 44 mg/kg，経口-ラット 79 mg/kg であり[14]，また，1日摂取許容量（ADI）も 0.0026 mg/kg であることから，喫食上問題はないと考えられる．

CYP は 150，180°での乾熱処理により速やかにオキソン体に変わるが，ほうれん草中の CYP はゆでる，あるいは炒めることによってはオキソン体はほとんど生成されることがなく，かなり高温にならない限りオキソン体はできないものと推測された．

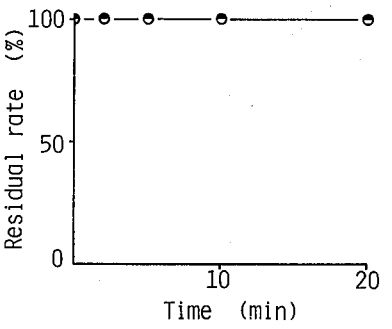


Fig. 7 Stablility of CYP with Oil by Heating
●——●, 150℃; O——O, 180℃

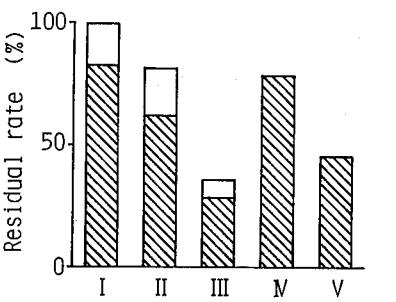


Fig. 8 Effect of Cooking on Disappearance of CYP in Spinach
I, boiled for 2min; II, boiled for 5min;
III, boiled for 10min; IV, frizzled for 2min;
V, frizzled for 5min.
▨, spinach; □, boiled water

2．コーヒー豆中の残留農薬

ブラジル，コロンビア，メキシコ等18ケ国産のアラビカ及びロブスタ種のコーヒー豆を対象として，焙煎前の生豆20検体，焙煎豆13検体及びインスタントコーヒー11検体について調査し，結果を Table 4 に示した．

有機塩素系農薬のうち，総 BHC が生豆20検体中4検体から 0.003～0.014 ppm 検出された．このうちインド産2検体及びコートジボアール産の1検体はいずれも

Table 4. Contents of Organochlorine and Organophosphorus Pesticides in Coffee Beans and Instant Coffee

Sample	No. of sample	No. of positive	Organochlorine pesticides[1] B H C (ppm) α-BHC	β-BHC	γ-BHC	δ-BHC	total-BHC	Others (ppm)	Organophosphorus pesticides[2] No. of positive	Malathion (ppm)	Others (ppm)
Green	20	4	ND[3] ~0.014 (0.008)[4]	ND	ND ~0.003 (0.002)	ND	0.003 ~0.014 (0.010)	ND	1	0.04	ND
Roast	13	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND
Instant	11	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND
Total	44	4	ND ~0.014 (0.008)	ND	ND ~0.003 (0.002)	ND	0.003 ~0.014 (0.010)	ND	1	0.04	ND

1) Total-BHC(α-,β-,γ-,δ-BHC), total-DDT(pp'-DDT, pp'-DDE, pp'-DDD), dieldrin, endrin and heptachlor epoxide are investigated.
2) EPN, DDVP, dimethoate, diazinon, parathion, MEP, MPP, PAP and malathion are investigated.
3) ND: not detected
4) Values in parentheses indicate the average of the contents in the positive.

α-BHCがほとんどであったが，イエメン産のものはγ-BHCのみが0.003 ppm検出されており，過去にリンデンが主体に使用されていたものと思われる．これらの値は1982年度に調査した発酵茶[6]と比較すると低く，検出率も低い傾向が見られた．また，これらの結果を1968年から1977年におけるFDAの調査結果[15]と比較すると，検出率及び検出量のいずれも低く，残留農薬は大幅に減少する傾向が見られた．コーヒー豆は種実類のひとつであり，茶葉より表面積が小さく，また，核の皮を除去した種子を用いることから，直接農薬が付着することはない．また，吸収，蓄積性あるいは散布量も異なることなどから，残留量が少ないものと考えられる．

有機リン系農薬は，ブラジル産の生豆1検体からマラチオンが0.04 ppm検出された．この値は野菜等の残留基準値の1/10以下である．有機リン系農薬は，その多くが野菜等の表面に付着し，その後クチクラ層に溶け込むが，内部に浸透する量は少ないと考えられている[4]．コーヒー豆は果肉に包まれた種子を取り出したものであり，有機リン系農薬が栽培中に浸透して残留する可能性は少ない．従って，採取し脱殻後に，または保管中に汚染されたものと推察される．

以上の有機塩素系及び有機リン系農薬は，いずれも生豆のみから検出され，焙煎した豆及びインスタントコーヒーからは検出されなかった．コーヒー豆は190～230°の高温で6～15分位焙煎されるため，生豆中に残留していた農薬は揮散または分解され，焙煎後には著しく減少し，検出されなくなるものと考えられる．

今回の結果は限られた国のものについて行ったものであり，検体数も少ないが，生豆における残留量も少なく，コーヒー豆の残留については，焙煎豆を飲用に供するため，食品衛生上問題はないと思われる．

ま と め

1983年4月から1984年3月までに都内に入荷した野菜・果実類及び輸入コーヒー豆について，残留農薬の実態調査を行った．

1．野菜・果実類

(1) 残留農薬

有機塩素系農薬は96検体中総BHCが7検体から0.001～0.002 ppm，ディルドリンが同一のかぶの根及び葉から0.006，0.005 ppm検出された．

有機リン系農薬はEPN，ダイアジノン，フェニトロチオン，マラチオン，ホサロン，DMTP，イソキサチオン，CYP及びプロチオホスが16検体から検出された．残留基準値を超えるものはなかったが，イソキサチオン及びCYPを検出したほうれん草及び春菊の3検体はいずれも登録保留基準値を超えていた．また，農薬取締法によ

り使用の禁止されているほうれん草からEPNが，春菊からマラチオンが検出され，農薬の使用方法に問題のあることが示唆された．さらに，エチルチオメトンの酸化物であるジスルホトンスルホンが小松菜から0.25 ppm検出された．

その他，TPNが5検体から0.001～0.039 ppm，キャプタンが1検体から0.02 ppm検出されたが，いずれも登録保留基準値を超えてはいなかった．

(2) **イソキサチオン及びCYPの調理等における安定性**

イソキサチオン及びCYPは150°以上の乾熱状態で速やかに分解されるが，油中では安定であった．ほうれん草を用いてゆでる，炒める等の調理を行ったところ，イソキサチオンで50％以上，CYPで30％以上が残存した．

2．コーヒー豆中の残留農薬

生豆20検体中4検体から総BHC 0.003～0.014 ppm，1検体からマラチオン0.04ppmが検出された．いずれも焙煎により著しく減少し，残存する農薬はなかった．

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並びにプロチオホスの標品を譲渡していただいた日本特殊農薬高瀬　巌部長に深謝いたします．

文　献

1) 西垣　進，田村行弘，鳥羽啓子他：東京衛研年報，23，217，1972
2) 小関正道，嶋村保洋，真木俊夫他：*ibid.*，31-1，170，1980
3) 小関正道，田村行弘，真木俊夫他：*ibid.*，32-1，172，1981
4) 後藤真康：植物防疫，32，95，1978
5) 藤本雄一，中村広明：農薬検査所報告，16，39，1976
6) 永山敏廣，田村行弘，真木俊夫他：東京衛研年報，34，165，1983
7) 後藤真康，加藤誠哉：残留農薬分析法，1980，ソフトサイエンス社
8) 小関正道，田村行弘，真木俊夫他：日本農薬学会第7回講演　要旨集，230，1982
9) 中村利家，山岡　剛，斉戸　猛：防虫科学，42，32，1977
10) 高瀬　巌，津田秀子，吉本佳文：応動昆，15，63，1971
11) 高瀬　巌，中村秀子：農化，48，27，1974
12) 高瀬　巌，津田秀子：応動昆，16，32，1972
13) 奥井誠一，秋山知子：食衛誌，6，364，1965
14) Lewis R.J., Tatken R.L. : *Registry of Toxic Effects of Chemical Substances* II, 1979 Ed., 1980, U.S. Department of Health and Human Services
15) Food Chemical News, Feb., 6, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 219-223, 1984

食品中の油溶性天然色素分析法

牛山博文*, 西島基弘*, 安田和男*
上村尚*, 田端節子*, 松本幸子*
二島太一郎*

Determination of Natural Oil Soluble Dyes in Foods

HIROFUMI USHIYAMA*, MOTOHIRO NISHIJIMA*, KAZUO YASUDA*,
HISASHI KAMIMURA*, SETSUKO TABATA*, SACHIKO MATSUMOTO*
and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords: 油溶性天然色素 natural oil soluble dyes, β-カロチン β-carotene, ビキシン bixin, カプサンチン capsanthin, クルクミン curcumin, クロロフィル chlorophyll, ノルビキシン norbixin, 銅クロロフィリンナトリウム sodium copper chlorophyllin, 鉄クロロフィリンナトリウム sodium iron chlorophllin, 銅クロロフィル copper chlorophyll

はじめに

油溶性のタール色素は食品衛生法で許可されていないことから，油脂あるいは油脂を多く含む食品には，油溶性天然色素が使用されている可能性がある．また，消費者は食品添加物を使用しない加工食品を好む傾向にあることや，天然色素を使用した場合，表示を必要としないことなどから，天然色素の使用は増加する傾向にあるといえる．

食品中の天然色素の分析法は，衛生試験法[1]の他に，陰イオン交換樹脂[2]を用いる方法，セライト[3]を用いる方法等がある．これらは対象色素が限定されていること，食品によってはクリーンアップが充分でなく，判定に困難を伴う等，難点を有する．そこで今回，油溶性天然色素及び天然色素に関連ある誘導体を対象とし，市販の大部分を占めると考えられる，β-カロチン，ビキシン（油溶性アナトー），カプサンチン（パプリカ抽出物），クルクミン（ウコン抽出物），クロロフィル及び，ビキシンの誘導体であるノルビキシンの塩類（水溶性アナトー），クロロフィルの誘導体である銅クロロフィル，銅クロロフィリンナトリウム及び鉄クロロフィリンナトリウムについて，系統的分析法を検討し，実用上使用できる方法を作成したので報告する．

実験方法

1．試料，試薬及び装置

1）試料

今回対象とした色素を使用する可能性のある次の市販加工食品を対象とした．

(1)油脂（バター，マーガリン等）
(2)菓子（クッキー，あられ，キャンディー等）
(3)清涼飲料水
(4)アイスクリーム，氷菓
(5)調味料，香辛料
(6)麺
(7)佃煮，惣菜
(8)漬物等野菜加工品

2）試薬

(1)標準色素：β-カロチンは和光純薬工業㈱製試薬特級，カプサンチンは㈱アイゼン製（商品名：カプロチンL），ビキシンは東京化成工業㈱製，ノルビキシンは三栄化学工業㈱製（商品名：粉末オレンジNo.1），クルクミン及び銅クロロフィリンナトリウムは関東化学㈱製，クロロフィル，銅クロロフィル及び鉄クロロフィリンナトリウムは日本葉緑素㈱製を使用した．

(2)水酸化カリウム溶液：水酸化カリウム9 gを水で溶解し，10 m*l*とした．

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

(3)シリカゲルカラム：内径1.5 cmのガラスカラム管に，シリカゲル（Kieselgel 60 Merck社製）6 gを，ヘキサン・クロロホルム（9：1）混液で湿式充てんしたものを用いた．

(4)薄層クロマトグラフィー用プレート：DC-Ferting Platten Kieselgel(Merck社製)20cm×20cmを用いた．

(5)展開溶媒：①ヘキサン・ベンゼン・酢酸（6：3：1）混液及び，②n-ブタノール・メチルエチルケトン・10％アンモニア水（3：2：2）混液を用いた．

その他の試薬は市販特級品を用いた．

3）装置

(1)ホモゲナイザー：日本精機工業㈱製　NISSEI AM-3

(2)遠心分離機：久保田製作所㈱製　電気遠心沈殿機K-80

(3)紫外線照射装置：Ultra-Violet社　TL-33

2．試験溶液の調製

試料は着色の程度により5～20gを秤取し，必要に応じ水を加えてホモゲナイズした．0.5％水酸化ナトリウムを加えて弱アルカリ性とした後，酢酸エチルを加えて振りまぜ抽出した．この際エマルジョンを生じた場合は遠心分離し酢酸エチル層を分取した．酢酸エチル層は水洗し，無水硫酸ナトリウムで脱水後減圧下で濃縮乾固した．残留物はクロロホルム5 m*l*に溶解し，ヘキサン45 m*l*を加え混和し，あらかじめ作製したシリカゲルカラムに負荷した．ヘキサン・クロロホルム（9：1）混液200 m*l*を流した後，メチルエチルケトン・メタノール（3：2）混液30 m*l*を流した．

ヘキサン・クロロホルム画分が着色した場合，減圧下で濃縮乾固した．残留物が油脂をほとんど含まない場合は，アセトンを加え溶解し試験溶液Iとした．油脂を多く含む場合は，エタノール30 m*l*，水酸化カリウム溶液3 m*l*を加えて，沸騰水浴中で30分間還流し，けん化を行った．不けん化物を石油エーテルで抽出し，水洗後無水硫酸ナトリウムで脱水し，減圧下で濃縮乾固した．残留物はアセトンで溶解し試験溶液Iとした．

メチルエチルケトン・メタノール画分が着色した場合は，減圧下で濃縮乾固し，残留物をアセトンで溶解し試験溶液IIとした．

一方，酢酸エチル抽出後の水層は，5％塩酸を加え弱酸性としエーテルで抽出した．なお試料がチューインガムの場合，ガムベースが妨害となるため，水層をクロロホルムで洗浄後弱酸性とし，エーテルで抽出した．エーテル層は水洗後無水硫酸ナトリウムで脱水し，口紙ろ過後，ろ液を減圧下で濃縮乾固した．残留物をアセトンで溶解し試験溶液IIIとした．

3．薄層クロマトグラフィーによる分離と定性

各試験溶液をシリカゲル薄層板に塗布し，試験溶液I及びIIは展開溶媒①，試験溶液IIIは展開溶媒②を用い，それぞれ約15cm展開し，得られたスポットと，同時に展開した標準物質のスポットを，自然光下及び紫外線照射下で観察し，類似したRfを示すスポットについて色調及びけい光の色を比較して判定した．

結果及び考察

1．シリカゲルカラムクロマトグラフィー

今回対象とした色素のうち，弱アルカリ性下で酢酸エチルに抽出される色素について，同時に抽出される油脂との分離を目的として，シリカゲルカラムクロマトグラフィーを検討した．

あらかじめ作製したシリカゲルカラムに，β-カロチン，ビキシン，カプサンチン，クルクミン，クロロフィル及び銅クロロフィルをそれぞれ負荷し，ヘキサン及びヘキサン・クロロホルム（9：1）混液を流したところ，いずれの溶媒でもβ-カロチンのみが溶離し，他の色素はカラムに保持された．β-カロチンの溶離パターンは試料により異なるため，種々検討したところ，共存する油脂の量により影響を受けることがわかった．すなわち，ヘキサンを用いた場合は，β-カロチンの溶出は，多量の油脂が共存する場合は比較的早く溶出する傾向が見られるが，油脂が共存しない場合は200 m*l*流しても完全には溶出しないことがわかった．しかし，ヘキサン・クロロホルム（9：1）混液を用いた場合は，油脂を全く含まない場合でも約110 m*l*で溶出することがわかった．そこで以後の実験は，油脂の量に比較的影響されにくい，ヘキサン・クロロホルム（9：1）混液を用いることにした．

ヘキサン・クロロホルム（9：1）混液を用いて，β-カロチンを溶出するのに必要な溶媒量と油脂の量との関係を図1に示した．ヘキサン・クロロホルム混液の必要量は110 m*l*であるが，β-カロチンの量により挙動が若干異なることや，カラムに吸着されている他の色素に対し，油脂が薄層クロマトグラフィーで妨害物質となるため，その除去も兼ねて，ヘキサン・クロロホルム混液は200 m*l*流すことにした．

β-カロチン溶出後のカラムに，メチルエチルケトン・メタノール（3：2）混液を流した場合の，色素の溶出パターンを図2に示した．シリカゲルカラムにヘキサン・クロロホルム（9：1）混液を200 m*l*流して洗浄し

た後，メチルエチルケトン・メタノール（3：2）混液を流し，カプサンチン，ビキシン，クルクミン，クロロフィル及び銅クロロフィルの溶出パターンをみたところ，いずれもほぼ同様の傾向を示し，25 m*l* 程度で溶出することがわかった．そこでメチルエチルケトン・メタノール（3：2）混液は 30 m*l* を用いて溶離することにした．

2．薄層クロマトグラフィー

試験溶液Ⅰ，Ⅱ及びⅢについてシリカゲルプレートを用い，展開溶媒①及び②で展開したところ，スポットのまとまり及び相互分離の点で良好な結果が得られた．

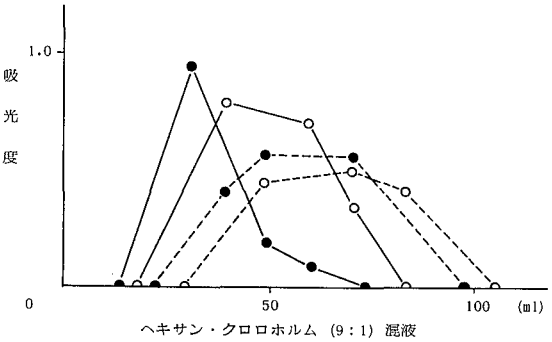


図1．シリカゲルカラムからの β-カロチンの溶出パターン
油脂：サラダ油　●—● 2 g,　○—○ 1 g,
●---● 0.5g,　○---○ 無添加

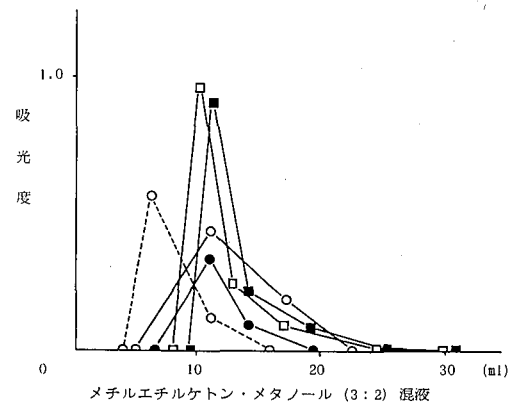


図2．シリカゲルカラムからの色素の溶出パターン
○—○ カプサンチン，　○---○ クルクミン，
●—● ビキシン　■—■ クロロフィル，
□—□ 銅クロロフィル

試験溶液ⅠとⅡに分画される色素を展開溶媒①で展開したときのクロマトグラムを図3に示した．なお，現在油溶性タール色素は，食品に添加することが許可されていないが，本法を適用すると試験溶液Ⅰに分画されるため，過去に食品衛生法で許可されたことのある，オイルエローAB，オイルエローOB．オレンジSS，及びオイルレッドXOについて，それぞれのRfを求めたところ，これら油溶性タール色素は，β-カロチン及びその他の油溶性天然色素とRfが異なることから，充分に区別することができた．β-カロチン，カプサンチン，ビキシン，クルクミン，クロロフィル及び銅クロロフィルはいずれもRfが異なり分離確認ができた．クロロフィルと銅クロロフィルは，Rfが近似しているが，色調が異なる他に，紫外線照射により，クロロフィルは赤色のけい光を示し，銅クロロフィルはけい光を示さないことから，両者は充分区別が可能であった．

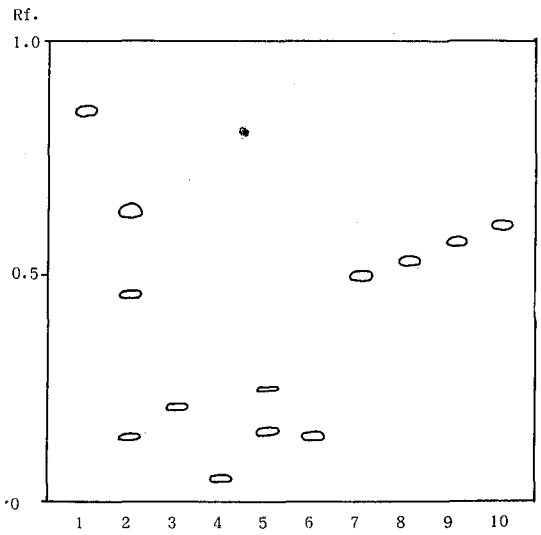


図3．画分Ⅰ及びⅡに分画される色素の薄層クロマトグラム
薄層：Kieselgel 60(Merk)，展開溶媒：ヘキサン・ベンゼン・酢酸（6：3：1）混液，色素：1．β-カロチン，2．カプサンチン（パプリカ抽出物），3．ビキシン（油溶性アナトー），4．クロクミン（ウコン抽出物），5．クロロフィル，6．銅クロロフィル，7．オイルエローAB，8．オイルエローOB，9．オイルオレンジSS，10．オイルレッドXO

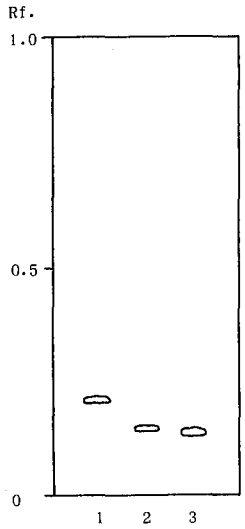


図4．画分IIIに分画される色素の薄層クロマトグラム
薄層：Kieselgel 60(Merch)，展開溶媒：n-ブタノール・メチルエチルケトン・10%アンモニア水(3：2：2)混液，色素：1．ノルビキシン（水溶性アナトー），2．銅クロロフィリンナトリウム，3．鉄クロロフィリンナトリウム

試験溶液IIIに分画される色素を展開溶媒②で展開したときのクロマトグラムを図4に示した．銅クロロフィリンナトリウムと鉄クロロフィリンナトリウムは，Rfが近似しているが，色調の違いや，紫外線照射下において，鉄クロロフィリンナトリウムは赤色のけい光を示し，銅クロロフィリンナトリウムはけい光を示さないことから判別できた．

3．市販品への応用

市販の油脂等126検体について，本法を適用した結果を表1に示した．

カロチンはバター，マーガリン等の油脂12検体中8件，クラッカー，ビスケット等の菓子19検体中5件，その他アイスクリーム等から検出し，今回対象とした126検体中23検体から検出した．また種類別でも，油脂の他に，油脂をまったく含まない清涼飲料水をはじめ，広範囲の食品から検出した．これは食品に添加した場合，安定性が良く，比較的安価である他，消費者に対しプロビタミンAとしての栄養学的に良い物質が添加されているという，イメージ効果をねらったことも考えられる．

表1．市販品中の油溶性天然色素の調査結果

試　料	検体数	色　素	検出数
油　脂	12	カロチン	8
		ビキシン	2
菓　子	19	カロチン	5
		カプサンチン	1
		クルクミン	1
		銅クロロフィル	1
		鉄クロロフィリンNa	1
		ノルビキシン	1
清涼飲料水	15	カロチン	3
アイスクリーム・氷菓	7	カロチン	3
調味料・香辛料	9	カロチン	3
		クルクミン	7
み　そ	25	ノルビキシン	2
麺	3	カロチン	1
佃煮・惣菜	13	カプサンチン	3
漬物・野菜加工品	23	カプサンチン	1
		クルクミン	1
		銅クロロフィル	3

バター，アイスクリームからカロチンを検出した例や，唐辛子の入っている加工食品からカプサンチンを検出した例は，原料本来のもっている色素と同じ色素を添加し，そのものらしさを強調していると思われる例が見られた．また，練り辛子から，その原料であるマスタードシードの色に類似したクルクミンを検出したように，原料本来の色調を補う目的で，同様の色調をもつ色素を添加していると思われる例が見られた．これらは，天然色素がより自然な色調を得るために用いられている，代表的な例であるといえる．

ま と め

食品中の油溶性天然色素及びその関連化合物の系統的分析法を検討した．

試料を水酸化ナトリウムで弱アルカリ性とした後，酢酸エチルを用いて抽出し，シリカゲルカラムクロマトグラフィーで，ヘキサン・クロロホルム混液で溶出する画分を試験溶液Iとし，次いでメチルエチルケトン・メタノール混液で溶出する画分を試験溶液IIとした．一方酢酸エチルで抽出後の溶液を弱酸性とし，エーテルで抽出される画分を試験溶液IIIとした．

試験溶液I及びIIは展開溶媒①，試験溶液IIIは展開溶

媒②でそれぞれ約15㎝展開し，室内光及び紫外線照射下で，同時に展開した標準品と比較し確認した．

試験溶液Ⅰにはβ-カロチン，試験溶液Ⅱにはカプサンチン，ビキシン，クルクミン，クロロフィル及び銅クロロフィル，試験溶液Ⅲにはノルビキシン，銅クロロフィリンナトリウム及び鉄クロロフィリンナトリウムが存在した．これらはシリカゲル薄層クロマトグラフィーにより，いずれも良好に分離確認することができた．

本法を市販の加工食品に適用したところ，126検体中45検体から，今回対象とした色素を検出した．特にカロチンは広範囲の食品から検出し，清涼飲料水等油脂をまったく含まない食品にも添加されている例が見られた．

天然色素の使用方法は，原料本来の持つ色素，あるいは類似した色素を添加し，本来その食品が持つであろう色調を得るために使われている例が多く見られた．

文　献

1) 日本薬学会編，衛生試験法・注解，374—381，1980 金原出版
2) 伊藤誉志男，外海泰秀，三ツ橋幸正，浜野　孝，松木幸夫，加藤太郎，藤原孝行，小川俊次郎，豊田正武，慶田雅洋：分析化学，32，47，1983
3) 伊藤誉志男，小川俊次郎，峯　孝則，田嶋克彦，伊藤青史，中西　弘，小原一雄，外海泰秀，慶田雅洋：分析化学，32，55，1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 224-230, 1984

ガスクロマトグラフィーによる果汁飲料中のペニシリン酸およびパツリンの分析法

小川仁志*, 鈴木二郎*, 落合節子*, 西島基弘*
直井家壽太*, 二島太一郎*

Determination of Penicillic Acid and Patulin in Commercial Fruit Juices by Gas Liquid Chromatography

HITOSHI OGAWA*, JIRO SUZUKI*, SETSUKO OCHIAI*, MOTOHIRO NISHIJIMA*, YASUTA NAOI* and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords : ペニシリン酸 penicillic acid, パツリン patulin, ガスクロマトグラフィー gas liquid chromatography, カラムクロマトグラフィー column chromatography, シリル化 silylation, 果汁類 fruit jujces

緒　言

ペニシリン酸およびパツリンは，*Aspergillus* 属および *Penicillium* 属の両菌属によって産生されるマイコトキシンである[1]．これらはDNAやRNAの合成，蛋白質の合成を阻害する[2]他，変異原性[3~5]や発癌性[6]があることも報告されている．

パツリンは，ヨーロッパで腐敗したりんごおよびりんご果汁から検出されていることから，食品衛生上の有害性物質として注目されている．しかし，日本においては果汁中におけるこれらマイコトキシンの汚染実態調査の報告例は見あたらない．そこで，汚染調査を行うに先立ち，分析法を検討することとした．

ペニシリン酸およびパツリンの分析法は，種々報告されているが，その多くはそれぞれのマイコトキシンを単独で分析する方法[8~15]である．しかし，著者らは，ペニシリン酸およびパツリンは，*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属のような常在菌によって産生されることや，両者を同時に産生する菌[7]も報告されていることから，これら両トキシンを同時に分析することとした．そこで，従来報告されているガスクロマトグラフィーによる両者の分離定量を試みたが，ペニシリン酸あるいはパツリンの保持時間付近に妨害ピークが認められ，使用することが困難であった．そこで前処理およびガスクロマトグラフィーの条件を種々検討し，果汁中のペニシリン酸およびパツリンの分析に，実用上使用できる結果を得たので報告する．

実験方法

1．試料

市販のりんご，みかん，ぶどう，レモン，グレープフルーツ，パインアップルの果汁缶詰，ビン詰および紙パック入を購入して実験に供した．

2．試薬

1）ペニシリン酸およびパツリン標準溶液：ペニシリン酸（和光純薬工業㈱製）10 mg およびパツリン（Makor Chemicals 社製）5 mg を，それぞれベンゼン—アセトニトリル（98：2）混液に溶解して，0.1 mg/m*l* になるように調製した．

2）内部標準溶液：特級のベンゾフェノン（和光純薬工業㈱製および n-ヘプタデカンを，それぞれクロロホルムに溶解して 0.1 mg/m*l* になるように調製した．

3）酢酸エチル：和光純薬工業㈱製の残留農薬試験用を使用した．

4）クロロホルム：安定剤として加えてあるエタノールを除去するため，特級のクロロホルム（和光純薬工業㈱製）を十分に水洗し，無水硫酸ナトリウムで脱水，乾燥ろ紙でろ過後，蒸留して用いた．

5）塩化ナトリウムおよび無水硫酸ナトリウム：塩化ナトリウム（局方）および無水硫酸ナトリウム（PCB分析用，関東化学㈱製）は，それぞれ 600℃の電気炉で 24 時間の加熱処理したものを用いた．

6）トリメチルシリル化剤：トリメチルクロルシラン

* 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

—ヘキサメチルジシラザン—クロロホルム(1：3：5)混液を用いた.

7) カラムクロマト用シリカゲル：キーゼルゲル60 (70～230 mesh, Merck 社製) は，110℃，2時間活性化して用いた.

8)クリーンアップ用カラム:内径1.5 cm, 長さ50 cmのクロマト管に，約⅓の高さになるまでクロロホルムを加え，ついで無水硫酸ナトリウム5 g，シリカゲル10 g，および無水硫酸ナトリウム5 g を順次積層させた．次いで，クロロホルム—メタノール (97：3) 混液50 m*l* で洗浄し，クロロホルム約50 m*l* を用いて溶媒を置換後，使用した.

9) ガスクロ用充てん剤：5％OV-17, Chromosorb W (AW, DMCS)80～100 mesh ; 5％SE-30, Gaschrom Q, 80～100 mesh

10) その他の試薬は，市販特級品を用いた.

3．装置

ガスクロマトグラフ：GC-5A型(FID付), ㈱島津製作所製

4．試験溶液の調製

試料50 g を分液ロートに秤取し，塩化ナトリウム20 g，水50 m*l* およびヘキサン100 m*l* を加えて振とうした後，ヘキサン層を除去した．エマルジョンを生じた場合は，この部分を分取し，水約30 m*l* を加え振とう後，得られた水層を先の水層に合わせた．水層に塩化ナトリウム30 g を加え，酢酸エチル50 m*l* で20分間激しく振とうし酢酸エチル層を分取した．水層はさらに酢酸エチルを加え同様の操作を2回行い，酢酸エチル層を合わせた.

酢酸エチル層は，3％炭酸水素ナトリウム溶液25 m*l* で3回抽出し，水層を合わせた．水層は希塩酸(1→2)でpH 3に調整し，酢酸エチル50 m*l* で3回抽出し，酢酸エチル層を合わせた．この酢酸エチル層は無水硫酸ナトリウムで脱水後，グラスウールでろ過し，ろ液は減圧下で濃縮乾固した．残留物はクロロホルム約10 m*l* に溶解し，ペニシリン酸用クリーンアップ溶液とした.

一方，3％炭酸水素ナトリウム溶液で抽出後の酢酸エチル層は，無水硫酸ナトリウムで脱水し，ペニシリン酸と同様に処理し，パツリン用クリーンアップ溶液とした.

ペニシリン酸およびパツリン用クリーンアップ溶液をそれぞれのカラムに通した後，クロロホルム100 m*l* を通して洗浄し，クロロホルム—メタノール (97：3) 混液150 m*l* を用いて，ペニシリン酸およびパツリンを溶出させた．溶出液を減圧下濃縮乾固し，ただちにトリメチルシリル化剤0.5 m*l* を加えて密栓し，室温で30分間放置した．シリル化後，内部標準溶液0.5 m*l* を加えて混和し，遠心分離して上澄を試験溶液とした.(Scheme 1)

なお，同時にペニシリン酸およびパツリン標準溶液のそれぞれ1，3，5 m*l* を10 m*l* 共栓試験管に分取し溶媒を留去後，それぞれをシリル化して，検量線を作成した.

5．ガスクロマトグラフ測定条件：カラム管3 mm×2 m，ガラス製；5％OV-17, Chromosorb W (AW, DMCS) 80～100 mesh, カラム温度：160℃，キャリヤガス流量：60 m*l*/min

5％SE-30, Gaschrom Q, 80～100 mesh, カラム温度：180℃，キャリヤガス流量：30 m*l*/min

注入口および検出器温度：230°C，感度：10^3MΩ × 0.08V，注入量：2 μl.

結果および考察

試験法の作成にあたり，試薬類中の妨害物の除去法，クリーンアップ法，ガスクロ用充てん剤の選択，試料中の妨害物質について検討した.

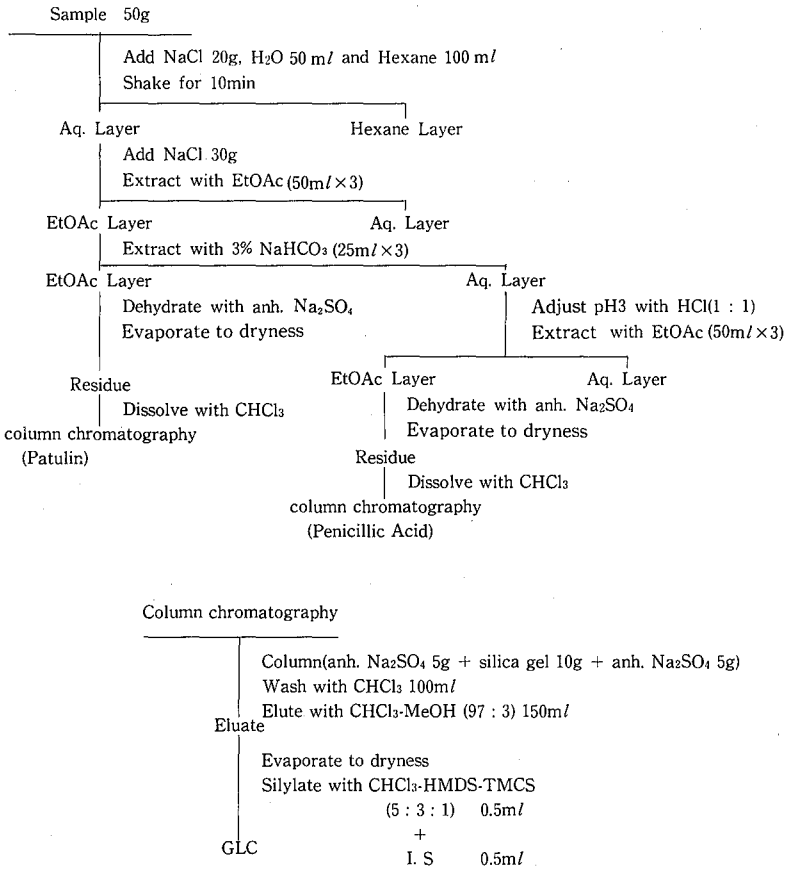
1) 試薬

(1) カラムクロマトグラフィーに使用するクロロホルム

ペニシリン酸およびパツリンは，カラムの洗浄に使用するクロロホルムのロットによって，回収率にバラツキが認められた．そこで種々検討したところその原因として，市販クロロホルムに安定剤として添加されているエタノールの影響であることが推察された．そこでエタノールを除去したクロロホルムに，エタノール量を変化させて添加し，クロロホルム中のエタノール含量が，カラム中でのトキシンの挙動に与える影響をみたところ，2.5％を超えると，共にカラムから溶出することが判った．このことから以後の実験に使用するクロロホルムは，水で十分に洗ってエタノールを除去し，無水硫酸ナトリウムで脱水したものを，乾燥ろ紙でろ過後，蒸留して用いることとした.

(2) ガスクロマトグラム上で妨害を与える試薬類

本法はガスクロマトグラフの感度を高めて測定するため，ガスクロマトグラム上のペニシリン酸およびパツリンのピークに，妨害ピークがしばしば認められた．そこでその原因について検討したところ，酢酸エチル(特級)無水硫酸ナトリウム(PCB分析用)，塩化ナトリウム(局方) およびろ紙が影響していることが判った．そこで抽出溶媒として残留農薬試験用の酢酸エチルを用い，無水硫酸ナトリウム(PCB分析用)および塩化ナトリウム(局



Scheme 1. Analytical Method for Penicillic Acid and Patulin in Fruit Juices

方）は，いずれも 600℃で 24 時間の加熱処理を行い，妨害を除去できた．また，ろ過はグラスウールを用いることによって，いずれも解決できた．

2）ヘキサンによる妨害物質の除去

果汁を酢酸エチルで抽出した場合，溶媒留去後の残渣が多く，そのままシリカゲルカラムに負荷すると，カラム上部に不溶物が積層し，操作が困難となった．これら不溶物の多くは，精油成分や，カロチノイド系の天然色素等と推察された．そこで，ペニシリン酸およびパツリンは，ヘキサンに溶解しないことから，予めヘキサンを用いて，可溶物を除去した後，酢酸エチルで抽出することとした．なお，試料により有機層と水層の中間に，エマルジョンを生じた場合は，その部分を分取し，水を加えて振とう，二層に分離し水層に合わせた．

3）炭酸水素ナトリウム溶液の濃度

酢酸エチル層からペニシリン酸を抽出する際の，炭酸水素ナトリウム溶液の必要濃度を検討した．

酢酸エチル 150 ml にペニシリン酸 25 μg およびパツリン 50 μg を添加し，炭酸水素ナトリウム濃度によるペニシリン酸の抽出率および酢酸エチル層中のパツリンの残存量を調査した．抽出に用いる炭酸水素ナトリウム溶液量は 30 ml とし，10 分間振とうし，3 回の抽出を行なった結果，ペニシリン酸は炭酸水素ナトリウムの濃度が 0.5 %以上では，98 %以上の抽出率を認めた．また，酢酸エチル層に残存するパツリンは，5 %以下の炭酸水素ナトリウムの濃度では，特に減少する傾向は認められなかった．これらのことから，炭酸水素ナトリウム溶液の濃度は 3 %とした．

4）ペニシリン酸抽出時の pH の影響

炭酸水素ナトリウム溶液中のペニシリン酸を，酢酸エチルで抽出する際の至適 pH を検討した．3 %炭酸水素ナトリウム溶液 100 ml にペニシリン酸を 25 μg 添加

し，希塩酸を加えてpH 1～6に調整して，それぞれ酢酸エチル50 m*l*で3回抽出した結果をFig. 1に示した．pH 2～4で98％以上の回収率が認められたため，以後の実験において，pH 3に調整することとした．

5）シリカゲルクロマトグラフィー

ペニシリン酸25 μgおよびパツリン50 μgをそれぞれ，予め調製したシリカゲルカラムに負荷した後，クロロホルム100 m*l*を通し，ついでクロロホルム－メタノール(97：3)混液を用い，1分間4 m*l*の流速で溶離した場合の溶離パターンをFig. 2に示した．パツリンは90 m*l*，ペニシリン酸は100 m*l*でほぼ溶出することが判った．そこで以後の実験において溶離液の量は，いずれも150 m*l*とした．

6）ガスクロ充てん剤の検討

充てん剤として5％OV-1，Chromosorb W (AW, DMCS) 60～80mesh；5% SE-30, Gaschrom Q, 80～100mesh；3% QF-1, Chromosorb W (AW, DMCS) 60～80mesh；5% OV-17, Chromosorb W (AW, DMCS)80～100meshおよび10%Thermon-1000, Chromosorb W (AW, DMCS)80～100meshを用いて，妨害ピークとの分離，ピークの形および感度の点から検討した．これらのカラムのうち5％OV-17および5％SE-30がテーリングも少なく，感度よく検出できることから，この2種の充てん剤を用いることとした．

そこで，これら2種の充てん剤について，各試料中の妨害物および内部標準物質の検討を行った．

果汁中のペニシリン酸およびパツリンを同時分析するため，鈴木(敏)[16]らの穀類中のペニシリン酸とパツリンの同時分析法を果汁類に応用したが，特にパインアップル果汁では，ガスクロマトグラム上のペニシリン酸およびパツリンの保持時間の位置に妨害が認められ，適用できなかった．パインアップル果汁について本法を用いて，分析した場合のガスクロマトグラムをFig. 3およびFig. 4に示した．充てん剤としてOV-17を使用した場合は，ペニシリン酸，パツリンおよび内部標準として使用したベンゾフェノンの位置に，特に妨害ピークは見られず良好な結果が得られた．みかん，レモン，およびグレープフルーツの各果汁についても，パインアップル果汁と同様良好な結果が得られた．

ぶどう果汁抽出物の場合，パツリンについてはFig. 5で示す通り5％OV-17カラムによって良好な結果が得られた．ペニシリン酸については，Fig. 6－(I)に示した通り，ペニシリン酸のピークの近傍に妨害ピークを認めた．そこで5％SE-30カラムで分析したところFig. 6－(II)で示す通り分析可能となった．また，SE-30を用いた時には，ベンゾフェノンの保持時間と同様の位置にピークが出現し，これを内部標準として用いることはできなかった．そこで種々検討したところヘプタデカンが適していることから，以後，SE-30を使用する場合の内部標準は，ヘプタデカンを使用することとした．

りんご果汁抽出物のクロマトグラムをFig. 7およびFig. 8に示した．ペニシリン酸はOV-17により分析可能であったが，パツリンはOV-17を使用すると妨害ピークを与えることから，SE-30を用いる必要があった．

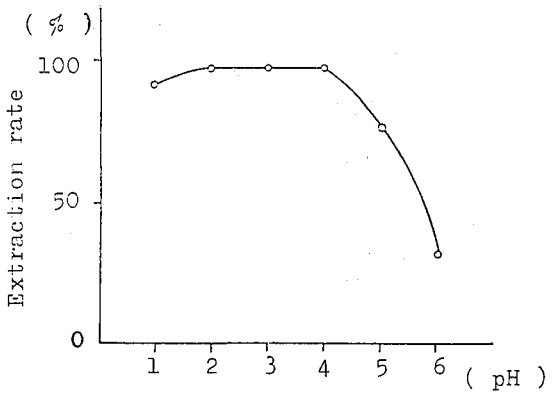


Fig. 1. Effect of pH on the Extraction of Penicillic Acid

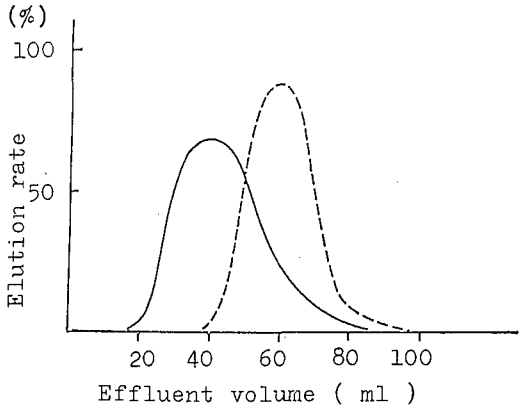


Fig. 2. Elution Pattern of Patulin and Penicillic Acid with $CHCl_3$-MeOH (97:3) on Silica Gel Column

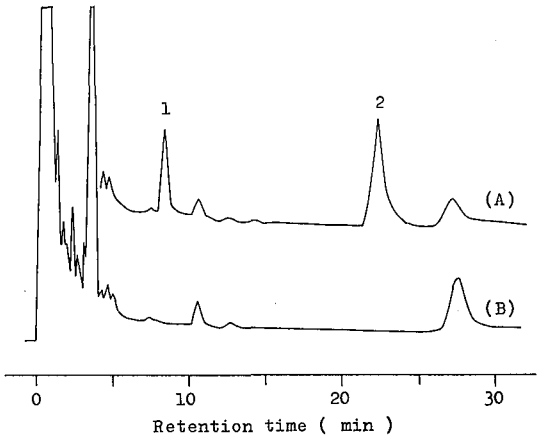


Fig. 3. Gas Chromatogram of TMS-Derivative of Pineapple Juice Extract
Column 5% OV-17
(A) TMS-Pineapple Juice Extract Spiked with Penicillic Acid
(B) TMS-Pineapple Juice Extract
Peaks:1: TMS-Penicillic Acid
2: Benzophenone (Internal Standard)

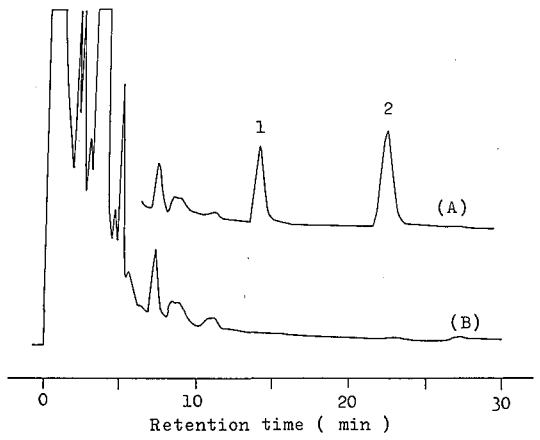


Fig. 4. Gas Chromatogram of TMS-Derivative of Pineapple Juice Extract
Column 5 % OV-17
(A) TMS-Pineapple Juice Extract Spiked with Patulin
(B) TMS-Pineapple Juice Extract
Peaks; 1: TMS-Patulin
2: Benzophenone (Internal Standard)

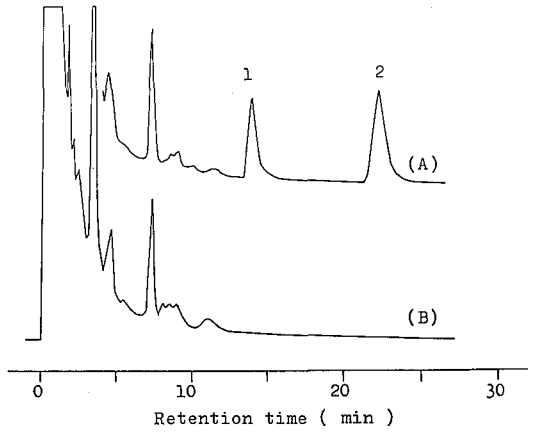


Fig. 5. Gas Chromatogram of TMS-Derivative of Grape Juice Extract
Column 5% OV-17
(A) TMS-Grape Juice Extract Spiked with Patulin
(B) Peaks; 1: TMS-Patulin
2: Benzophenone (Internal Standard)

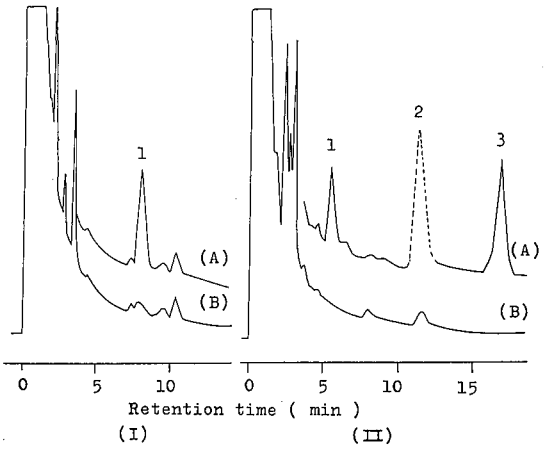


Fig. 6. Gas Chromatogram of TMS-Derivative of Grape Juice Extract
(I) Column 5% OV-17
(II) Column 5% SE-30
(A) TMS-Grape Juice Extract Spiked with Penicillic Acid
(B) TMS-Grape Juice Extract
Peaks; 1: TMS-Penicillic Acid
2: Benzophenone (Internal Standard)
3: Heptadecane (Internal Standard)

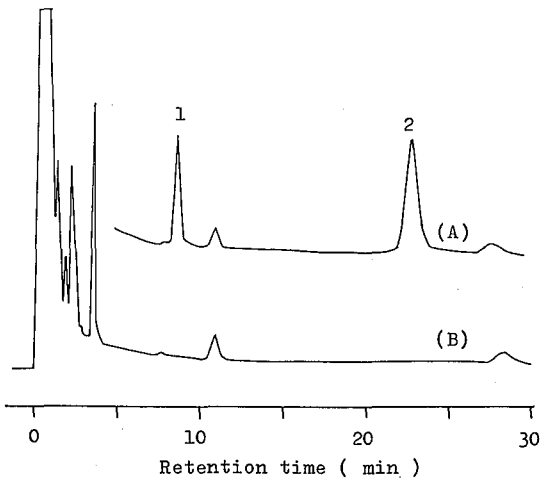


Fig. 7. Gas Chromatogram of TMS-Derivative of Apple Juice Extract
Column 5% OV-17
(A) TMS-Apple Juice Extract Spiked with Penicillic Acid
(B) TMS-Apple Juice Extract
Peaks; 1: TMS-Penicillic Acid
2: Benzophenone (Internal Standard)

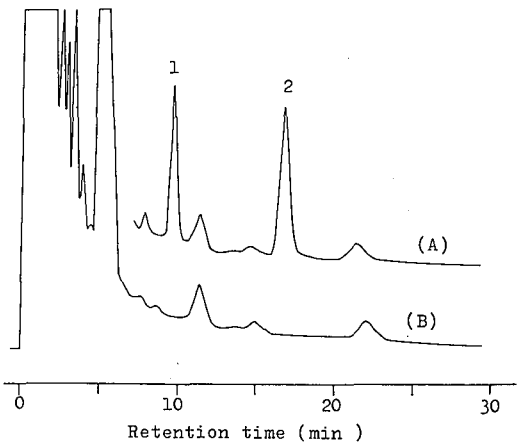


Fig. 8. Gas Chromatogram of TMS-Derivatve of Apple Juice Extract
Column 5 % SE-30
(A) TMS-Apple Juice Extract Spiked with Patulin
(B) TMS-Apple Juice Extract
Peaks; 1: TMS-Patulin
2: Heptadecane (Internal Standard)

以上のことから，ぶどう果汁中のペニシリン酸およびりんご果汁中のペニシリン酸およびりんご果汁中のパツリンの試験を行う場合は，SE-30 を使用し，内部標準物質としてヘプタデカンを用いることとしたが，その他の果汁は，OV-17 を使用し，内部標準物質としてベンゾフェノンを用いることとした．

7）シリル化

シリル化誘導体は，水分によって加水分解を受けやすいので，通常シリル化に際して試料中の水分を十分に除去しておくことが望ましいとされている．このため標準溶液および精製試料溶液の溶媒を留去し得られた標準物質および試料抽出物は，硫酸あるいは五酸化リン等のデシケーター中に保存後，シリル化を行ったところ，いずれも再現性が認められなかった．そこで両トキシンの標準溶液につき，溶媒を留去後の放置時間を変えてシリル化を行ったところ，最も再現性があり高いシリル化率を得るためには，溶媒を留去した直後にシリル化する必要があることが判った．この原因について現在検討中であるが，シリル化は溶媒を減圧下で留去後，ただちに行うこととした．

8）添加回収実験

各果汁にペニシリン酸が 0.5 ppmおよびパツリンが 1 ppmになるように添加した時の回収率を Table 1 に示した．それぞれの果汁により回収率に若干の違いがみられたが，ぶどう果汁中のペニシリン酸が 64 %以外は，いずれも 70～90 %の範囲にあった．

9）市販品への応用

本法を用い市販のりんご果汁 5 検体，みかん果汁 15 検体，レモン果汁 5 検体，グレープフルーツ果汁 5 検体，パインアップル果汁 5 検体およびぶどう果汁15検体，計50検体について調査したところ，いずれからもペニシ

Table 1. Recoveries of Penicillic Acid and Patulin Added to Fruit Juices

Sample	Recovery (%)	
	Penicillic acid	Patulin
Apple Juice	88	70
Orange Juice	74	79
Grape Juice	64	78
Lemon Juice	90	72
Pineapple Juice	76	76
Grapefruit Juice	74	78

リン酸およびパツリンは検出されず，かつ，これらのピークの付近に妨害ピークは認められなかった．

要　約

果汁類中のペニシリン酸およびパツリンの，FIDガスクロマトグラフィーによる分析法を検討した．試料からの抽出は，ヘキサンで妨害物を除去後，酢酸エチルで抽出し，3％炭酸水素ナトリウム溶液でペニシリン酸およびパツリンを分離し，それぞれをシリカゲルカラムでクリーンアップ後，トリメチルシリル化し，ガスクロ用試験溶液とした．ガスクロマトグラフィー用充てん剤は，OV-17が分離能，感度の面で優れ，比較的短時間で分析できた．しかし，ぶどう果汁中のペニシリン酸およびりんご果汁中のパツリンについては，妨害ピークが認められるため，これらについてはSE-30を用いたところ良好な結果を得た．りんご，みかん，レモン，グレープフルーツ，パインアップルおよびぶどうの各果汁にペニシリン酸およびパツリンを添加し，回収率を調べたところ64～90％であった．確認限度は，それぞれの検体についてペニシリン酸0.1 ppm，パツリン0.2 ppmであった．

本法を用い市販の果汁類―りんご，みかん，レモン，グレープフルーツ，パインアップルおよびぶどう等―50検体について試験を行ったが，ペニシリン酸およびパツリンは，いずれも検出されなかった．

文　献

1) Shibata,S., Natori,S. and Udagawa,S. : "*List of Fungal Products*", 1964, Univ. of Tokyo Press, Tokyo
2) Enomoto,M. and Saito,M. : *Ann. Rev. Microbiol.*, 26, 279 1972
3) Ciegler,A., Detroy, R.W. and Lillehoj, E.B. : *Microbial toxins.* **Vol.VI,** 409, 1971, Academic Press New York
4) Dichens,F. and Jones,H.E.H. : *Brit.J.Cancer,* 15, 85,1961
5) Mayer,V.W. and Legator,M.S. : J.Agr.Food Chem., 17, 454, 1969
6) Stoot,V.W. and Bullerman,L.B. : *J.Milk Food Technol.*, 38, 695, 1975
7) Olivigni,F.J. and Bullerman,L.B. : *Appl. Microbiol.*, 35, 435, 1978
8) Harwig,J. and Scott, P.M. : *Appl. Microbiol.*, 21, 1011, 1971
9) Harwig,J. and Scott,P.M. : *Can. Inst. Food Sci. Technol.J.*, 6, 22, 1971
10) Scott,P.M. and Somers,E. : *J. Agr. Food Chem.*, 16, 483, 1968
11) Ciegler,A. and Kurtzman,C.P. : *J.Chromatogr.*, 51, 22, 1971
12) *Pohland,A.E., Sander,K. and Thorpe,C.W. : J. Assoc. Offic. Anal Chem.*, 53, 692, 1970
13) Ware,G.M., Thorpe,C.W. and Pohland,A.E. : *J. Assoc. Offic. Anal Chem.*, 57, 1111, 1974
14) 鈴木　隆，武田明治，田辺弘也：食衛誌，12，489，1971
15) 鈴木　隆，武田明治，田辺弘也：食衛誌，12，495，1971
16) 鈴木敏正，藤本義典，渡辺昭宣他：食衛誌，15，280，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 231-234, 1984

市販茶におけるグルタミン酸ナトリウム添加の実態調査

広門雅子*, 中島和雄*, 高橋巌*
植松洋子*, 遠藤英美*

Survey of the Intentional Addition of Monosodium Glutamate on the Green Tea Commodities

MASAKO HIROKADO*, KAZUO NAKAJIMA*, IWAO TAKAHASHI*,
YOKO UEMATSU*and FUSAYOSHI ENDO*

Monosodium glutamate (MSG) and theanine in 40 samples of green tea purchased from the market in Tokyo in 1983 were determined by high-speed amino acid analyzer in order to survey the intentional addition of MSG to the commercial green tea. They were determined also in the granular substances taken from 4 samples indicated as containing "Kokeicha"(solid tea) on their packages.

Estimation of natural contents of glutamic acid and theanine was made on 31 samples of green tea to which MSG was not added.

Out of 40 samples tested, 9 showed apparently higher contents of MSG than its natural content. They were therefore judged as the one in which MSG was added intentionally. The granular substances were shown to contain 2.10 to 13.21% of MSG, as high as 5 to 30 times the natural content, though theanine content in these samples was not so high as the natural content. As the granular substances were found in all of the 9 samples described above, it was assumed that the teas with high MSG content were attributable to the addition of "Kokeicha".

Keywords : monosodium glutamate, green tea, theanine, high-speed amino acid analyzer, addition.

緒　言

最近，市販茶の中で不自然にうまいものがあるという．本来，お茶のうま味は茶葉に含まれるアミノ酸，特にテアニンが関与している[1~5]と言われるが，合成品のテアニンは現在製造されていないため，うま味増強の目的で安価なグルタミン酸ナトリウム（MSG）が添加されることが考えられる．

現在お茶の品質や表示の規格基準は不十分で，MSGが添加されたとしても表示の義務はなく，野放しの状態である．そこで市販茶におけるMSGの添加の実態を調査する目的で，1983年に都内の販売店から購入した茶40種および〝固型茶入り〟の表示のある茶より摘出した粒状物質4種中のMSGおよびテアニン含量をアミノ酸アナライザーで分析した．

一方，MSGの添加されていない茶31種中の天然グルタミン酸とテアニン含量を定量し，グルタミン酸の分析値から玉露，煎茶および番茶ごとの $\bar{X}+3\sigma$（$\bar{X}$：MSGとしての含量平均値　σ：標準偏差）を求め，この値をもとに，市販茶にMSGが添加されているかどうかを推定したのでその結果を報告する．

実験の部

I．試料　1．市販茶　新宿区消費者の会で都内の販売店から購入した通常よく飲まれていると考えられる100 g当り200~800円のお茶40種（玉露の茎茶2種，煎茶32種，番茶4種，ほうじ茶2種）．**2．固型茶**　新宿区消費者の会の会員の手で，"固型茶入り"の表示のある市販茶より選別したもの4種．**3．標本茶**　静岡の茶問屋でグルタミン酸ナトリウムが添加されていないことを確

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科　160　東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Contents of Monosodium Glutamate and Theanine in Cmmercial Green Teas and Judgement of Addition of Monosodium Glutamate to Commercial Green Teas.

Sample No.	Kind of Tea	Price per 100g	Content(%) MSG *1	Content(%) Thea *2	Indication of Additive	Judgement *3
1	Gyokuro Kukicha	700	0.52	1.68		
2	〃	500	0.93	0.41		+
3	Sencha	133	0.14	0.19		
4	〃	500	0.15	0.20		
5	〃	180	0.15	0.22		
6	〃	360	0.17	0.28		
7	〃	270	0.14	0.29		
8	〃	300	0.34	0.32		
9	〃	300	0.17	0.33		
10	〃	125	0.18	0.35		
11	〃	250	0.19	0.35		
12	〃	300	0.17	0.39		
13	〃	400	0.32	0.40		
14	〃	200	0.16	0.43		
15	〃	250	0.19	0.44		
16	〃	300	0.18	0.44		
17	〃	200	0.18	0.50		
18	〃	400	0.18	0.54		
19	〃	500	0.19	0.83		
20	〃	400	0.23	0.84		
21	〃	500	0.21	0.85		
22	〃	300	0.31	0.92		
23	Sencha	500	0.24	0.99		
24	〃	475	0.24	1.01		
25	〃		0.28	1.06		
26	〃	700	0.27	1.11		
27	Kukicha	500	0.66	0.42		+
28	Sencha	520	1.42	0.51	Amino Acid	+
29	〃	800	0.91	0.60	Amino Acid	+
30	〃	600	0.43	0.66		+
31	〃	720	1.12	0.82	Kokeicha	+
32	〃	556	0.69	1.01	Maccha	+
33	〃	400	1.12	1.28	Kokeicha	+
34	〃		1.09	1.34	Kokeicha Maccha	+
35	Bancha	267	0.08	0.19		
36	〃	150	0.20	0.46		
37	〃	109	0.22	0.56		
38	〃	300	0.21	0.79		
39	Houjicha	300	0.01	0.02		
40	〃	150	0.02	0.02		
41	Kokeicha		2.10	0.67		
42	〃		7.90	0.39		
43	〃		11.06	0.19		
44	〃		13.21	0.29		

*1 Monosodium Glutamate *2 Theanine

*3 +: Content of MSG are more than 0.86% for Gyokuro, 0.41% for Sencha and 0.25% for Bancha, Respectively

認して購入した茶31種(玉露10種，煎茶12種，番茶9種)．なお静岡県では条例で製茶への添加物の混入を禁止している．

II. **試薬** 1．アミノ酸アナライザー用緩衝液 テクノバッファー製 2．ニンヒドリン発色試薬 和光純薬製 3．その他の試薬 特にことわりのないかぎり，JIS規格特級品を用いた．

III. **装置** 1．アミノ酸アナライザー 日立835型 2．小型粉砕器 協立理工製 SK-M 2型

IV. **操作法** 市販茶および標本茶は，小型粉砕器で約15秒間粉砕した後，100°，5時間乾燥し，その約1 gを300 m*l*の三角フラスコに正確にはかりとり，水約150 m*l*を加えて沸湯水浴上で約30分間加熱した．室温まで放冷した後，ろ紙を用いてろ過し，塩酸溶液(1→600)を加えて200 m*l*としこれを試料液とした．固型茶は，100°，5時間乾燥した後，約0.1 gを正確にはかり，市販茶と同様に操作した後，塩酸溶液(1→600)で全量200 m*l*としこれを試料液とした．各試料液をグルタミン酸およびテアニンの濃度が約10 μg/m*l*となるように塩酸溶液(1→600)で希釈調製し，アミノ酸アナライザーで定量した．

結果および考察

市販茶および固型茶中のMSGおよびテアニンの分析結果をTable 1に示し，標本茶中のMSGおよびテアニンの分析値とその分析値から求めた平均値($\bar{X}$)，標準偏差(σ)および$\bar{X}+3\sigma$値をTable 2に示した．

I．標本茶の天然グルタミン酸含量の平均値と標準偏差を用いる異常値の検定

茶葉中の天然グルタミン酸含量は，正規分布を示すと考えられるので，$\bar{X}\pm n\sigma$の範囲に入る確率は，$n=2$のとき95.4%，$n=3$のとき99.73%である．採取場所，収獲時期および天候等種々の要因によるばらつき[6]を考慮して，$n=3$とすると，$\bar{X}+3\sigma$以上の値が出現する確率(範囲外確率)は0.13%であり，天然においてはほとんどこの値はとりえないと考えられるので，検体中のMSG含量が$\bar{X}+3\sigma$以上のとき，異常値すなわち人工的に添加されたものとみなすことにした．

Table 2より標本茶のMSGの$\bar{X}+3\sigma$は，玉露0.86%，煎茶0.41%および番茶0.25%である．これらの値をもとに，各々の検体について検討した結果，玉露で

Table 2. Contents of Monosodium Glutamate and Theanine be in Nature in the Green Teas

Kind of Tea	Kind of Amino Acid	Numer of Samples	Range (%)	Mean($\overline{X}$) (%)	σ (%)	$\overline{X}+3\sigma$ (%)
Gyokuro	MSG *1	10	0.29−0.72	0.41	0.1	0.86
〃	Theanine	〃	1.59−2.53	2.00	0.3	3.08
Sencha	MSG	12	0.17−0.35	0.26	0.0	0.41
〃	Theanine	〃	0.61−2.05	1.22	0.4	2.45
Bancha	MSG	9	0.10−0.20	0.16	0.0	0.25
〃	Theanine	〃	0.22−0.72	0.45	0.1	0.96

* 1 Monosodium Glutamate

0.86％をこえたものは，No.2の1検体，煎茶で0.41％をこえたものは，No.27～34の8検体，番茶で0.25％をこえたものはなかった．従ってMSGが添加されていると推定された市販茶は9検体（約23％）で，そのうちアミノ酸入りの表示のあったものはわずかに2検体（No.28～29）で，固型茶入りおよび抹茶入り等の表示のあったもの4検体（No.31～34），全く表示のないものが3検体（No.1, 27, 30）あった．なお検体のうち，No.27の茎茶は煎茶，No.39～40のほうじ茶は番茶として検討した．固型茶（No.41～44）のMSG含量は2.10～13.21％と標本茶に比べ5～30倍と異常に高かった．テアニン少量とクロロフィルを含み丸状に成型されていることから，固型茶はMSGと茶くずを糊料等で固めたMSG製剤であると考えられる．MSGの添加が推定された9検体すべてから，会員の手で固型茶と推定される粒状物質が確認されていることから，MSGはすべて固型茶の形で添加されることが示唆された．

今回判定の基準として，$\overline{X}+3\sigma$を用いたので，MSGの添加が推定された茶は9検体であったが，MSG含量の少ない固型茶を粉砕して少量添加されている場合には，$\overline{X}+3\sigma$以下の値もとり得ると考えられる．従って実際添加されている茶は9検体より多いことが考えられる．

II. MSGの添加と価格との関係

Table 2より標本茶のテアニン含量は，玉露1.59～2.53％，煎茶0.61～2.05％および番茶0.22～0.72％であり，高級な茶程テアニン含量が高い．そこで市販茶についてテアニン含量が高い程100g当りの価格が高いと言えるかどうかの相関を調べたところ，1％の危険率で相関が認められた．MSGの添加が推定された茶（No.27～34）のテアニン含量は0.42～1.34％であり，検体の中では，煎茶としてやや上級に属する．そこで無添加茶のうちテアニン含量が0.42％以上のもの（No.14～26）を対象にし，添加群の価格が無添加群の価格より高いと言えるかどうかを検討した．両者の100g当りの価格をTable 1より抽出し，それぞれの価格の平均値を求めたところ，添加群は585.1円，無添加群は393.8円であり平均価格では添加群の方が高かった．そこで平均値の差の検定を行ったところ，5％の危険率で有意差が認められた．従ってMSGを添加したと推定される茶の価格は高いと言える．

まとめ

市販茶におけるMSGの添加の実態を把握する目的で，1983年に都内の販売店から購入した茶40種および〝固型茶入〟の表示のある茶から選別した粒状物質4種中のMSGおよびテアニン含量をアミノ酸アナライザーで定量した．一方，MSGの添加されていない茶31種中の天然グルタミン酸およびテアニン含量を定量し，グルタミン酸の分析値から，玉露，煎茶および番茶ごとに$\overline{X}+3\sigma$を求め，この値をもとに市販茶にMSGが添加されているかどうかを推定した．すなわち検体の分析値が$\overline{X}+3\sigma$（玉露0.86％，煎茶0.41％，番茶0.25％）以上のとき，MSGが人工的に添加されたものとみなした．

玉露1検体および煎茶8検体が基準値より高い値を示し，これら9検体にMSGの添加が推定された．粒状物質中のテアニン含量は煎茶とほぼ同様であったが，MSG含量が標本茶の5～30倍と異常に高く，MSG製剤であることが考えられた．MSG添加が推定された9検体のうち，アミノ酸入りの表示があったのは2検体のみで，他は固型茶入り，抹茶入り等のあいまいな表示の

もの4検体および表示のないもの3検体あったが，これらすべてから粒状物質が検出されていることからMSGはすべて〝固型茶〟の形で添加されているのではないかと考えられた．またMSG添加が推定されたお茶の価格は，同品質の無添加のお茶に比べ高いことが判った．安いMSGを添加し，品質を良く見せかけ高く販売していることが推察された．MSGが添加された高い茶を望む人もいるかも知れないが，一般には，天然本来の旨い茶を望むと考える．購入者が選択できるよう〝グルタミン酸ナトリウム添加〟という明確な表示を義務づけることが望まれる．

謝辞 本調査に当り，試料収集にご尽力下さいました新宿区役所区民部商工課消費経済係の方々ならびに新宿区消費者の会の方々に深謝いたします．

文　献

1) 朝日新聞社学芸部編：お茶のすべて，150，1958，淡交新社
2) 静岡県茶業会議所編：新茶業全書，390，1966，静岡県茶業会議所
3) 加藤司郎，鈴木忠直：日本食品工業学会誌，18，8388，1971
4) 中川致之：食品工業学会誌，16，252，1969
5) 中川致之；石間純男：茶技研，34，41，1971
6) 阿南豊正；中川致之：農芸化学，48，2，91，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 235-240, 1984

セラミック製食器から溶出する金属

吉田令子*, 渡辺悠二*, 佐藤憲一*
遠藤英美*

Released Metals from Ceramic Ware in Contact with Food

REIKO YOSHIDA, YUJI WATANABE, KENICHI SATO
and FUSAYOSHI ENDO

30 metal samples released from 60 ceramic wares used for serving foods were examined. The amount of release was determined by ICP-AES, AAS and fluorid electrode. Although 22 metals were detected, the concentration of released metals was not significant enough to affect health except for lead and cadmium. The concentration of lead and cadmium in 5 and 1 samples respectively (wares used for Chinese dishes) exceeded the criteria for the International Organization for Standardization.

Keywords : ceramic ware, metal, lead, cadmium, release, food, ICP-AES

緒　言

陶磁器，ほうろう，ガラスなどのセラミック製品は，古くから我々人類がなじんできた優れた食器である．なかでも陶磁器製食器は多くの場合，高温(1000℃以上)で焼成を行なったものの表面に上絵具でいろいろな色彩模様を施こした後，約800℃で焼成し製品となる[1]．この上絵具は色基(耐熱性の金属酸化物を組みあわせ高温で反応させた顔料)とフラックスとよばれる媒熔剤(酸化鉛の多いホウケイ酸ガラス)からなっている．上絵具が焼きつけられると媒熔剤はしだいに熔けあってガラス層を形成し，その中に色基を包みこみ表面の釉(うわぐすり)に熔けこんで絵具を固着させる．しかし陶磁器は酸に接触すると侵されて上絵具中の鉛が溶け出したり，はなはだしい場合には絵具自身が分解することがある[2]．1983年中国景徳鎮産の中華食器から多量の鉛(現行法の条件，室温10分間放置で最高28 ppm)が溶出し話題となった．最近我国では焼成技術などの進歩により，このようなことはまれである．しかし現在の我国における陶磁器食器に関する法的規制[3]は1959年に従来のものを一部改正し制定されたものであり，溶出時間，鉛規制値とも諸外国や国際規格 the International Organization for Standardization[4,5,6] (以下ISOと略す)に比較してかなりゆるいものであり，このことは以前から指摘されていた．

またこの他上絵具の色基には種々の金属が使用されており鉛同様溶出する可能性があるが，鉛，ヒ素，カドミウム以外は報告が少ない．そこで我々は市販の陶磁器，ほうろう，ガラス製品60検体から現行法，ISO法の条件に従って溶出させた試料液について，30種の金属を高感度で多元素同時定量のできる誘導結合プラズマ発光分光分析装置 Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy(以下ICP-AESと略す)を用いて測定した．

実験の部

1．**試料**　デパート，スーパー，小売店などから収去した食器60種（陶磁器48，ほうろう2，ガラス10)

2．**装置**　1）ICP-AES：Jobin Yvon社 JY 48 P型，附属モノクロメーター　HRS-2型（焦点距離600 mm)　2）フッ素イオン電極：ORION Res. Inc. 94－09型，比較電極 94－01型，フッ素イオンメーター Digital Ionalyzer model 801型　3）原子吸光分析装置：日本ジャーレル・アッシュ AA-1-MARK II型

* 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

3．試薬，試液 リチウム（以下 Li と略す），ナトリウム（Na），カリウム（K），銅（Cu），ベリリウム（Be），マグネシウム（Mg），カルシウム（Ca），ストロンチウム（Sr），バリウム（Ba），亜鉛（Zn），カドミウム（Cd），アルミニウム（Al），ケイ素（Si），チタン（Ti），スズ（Sn），鉛（Pb），バナジウム（V），ヒ素（As），アンチモン（Sb），ビスマス（Bi），クロム（Cr），モリブデン（Mo），マンガン（Mn），フッ素（F），鉄（Fe），コバルト（Co），ニッケル（Ni），ホウ素（B），タングステン（W）各 1000 ppm 標準液（和光純薬），4％酢酸水溶液

4．分析方法 1） **試験溶液の調製** 陶磁器，ほうろう製品については試料に 4％酢酸を満たして 10 分間（現行法）および 24 時間（ISO 法），室温で放置したものを試験溶液とした．ガラス製品については現行法に準じ 4％酢酸を満たして 30 分間 60℃で放置したものを試験溶液とした．

2） **金属類の定量** 試験溶液を水浴上で適宜濃縮し一定量としたものを，ICP-AES を用い以下の条件で定量を行なった．

Incident power : 1.35KW ; Coolant gas : 17 *l*/min 2.1 kg/cm^2 ; Nebulizer gas : 0.45 *l*/min 2.1 kg/cm^2 ; Observation height : 16 mm above Coil ; 波長，検出限度は表 1．のとうりである．

F については F イオン電極を用いて行なった．（検出限度 0.01 ppm）

Li, Na, K, As, Bi, Mo については原子吸光法により行なった．（検出限度 Li, Na, K, As 0.01ppm, Bi, Mo 0.1ppm）

表1． 各元素の波長と検出限度

元素	波長 nm	検出限度 ppm	元素	波長 nm	検出限度 ppm
Cu	324.8	0.01	Sn	189.9	0.05
* Be	234.9	0.01	Pb	220.4	0.01
Mg	279.6	0.01	* V	292.4	0.01
Ca	422.6	0.01	Sb	217.5	0.09
Sr	407.7	0.01	Cr	267.7	0.01
Ba	455.4	0.01	Se	196.0	0.04
Zn	213.8×2		Mn	257.6	0.01
		0.01	Fe	259.9	0.01
Cd	226.5	0.01	Co	238.9	0.01
Al	308.2	0.03	Ni	231.6	0.01
Si	288.1	0.30	* B	249.7	0.01
Ti	334.9	0.20	* W	207.9	0.06

＊はモノクロメーター使用

結果と考察

表 2，3，4に定量結果を示した．現行法では陶磁器，ほうろう，ガラス製品のいずれも全検体適合であった．またこの条件では Pb, As 以外の金属の溶出もほとんどが 1 ppm 以下と少なかった．分析した金属のうち Li, Na, K, Mg, Ca, Zn, Al, Si, Ti, Sn, Pb, As, Sb は主に釉薬，その他は顔料の原料である[7]．素地の主原料は Si, Al で K, Na, Mg, Ca, Fe が数％含まれている[1]が，じょうぶな釉面におおわれているため素地からの溶出は少ない．本実験では表面のき裂を通して素地中の Ca が塩となり析出した例が 1 検体（コーヒーカップ）みられた．この検体は Ca が 30 ppm と非常に大きい溶出量を示した．またうけ皿 2 検体は Na, K, Mg, Ca, Sn, Cr, Se が多量に溶出していたが，これは焼成温度が低い不良品であった．ほうろうは陶磁器に比べて Na, K, Al, Si, B の溶出が多く，F も 0.2 ppm 検出されたものがあった．ほうろうは素地が鉄であるため，焼成時間が陶磁器は数時間であるのに対して数分間と極めて短かい．したがってこれに適した前記金属の酸化物を原料としたほうろう用釉薬（フリット）が使用されており[1]，これらが溶出されやすいと考えられる．

ISO には入ってないが現在我国で規制されている As は全検体から検出されなかった．As はほうろうの下釉以外にはほとんど用いられない[7]ので当然の結果といえる．

Pb の規制値は現行法では陶磁器，ほうろう約 10～20 ppm，ガラス 2 ppm であるが限度をこえたものはなかった．しかし ISO では 5 ppm（容量 1.1 *l* 未満，深さ 25 mm 以上のもの）であり，これをこえるものは 5 検体（10.4％）あった．1 ppm 未満のものは 10 分間放置（現行法）45検体（93.8％），24時間放置（ISO 法）36検体（75.0％）であり，小付け皿を除き中華料理用食器以外のものはすべてこの範囲であった．Cd は我国の規格には入ってないが ISO では 0.5 ppm と規制されており中華料理用食器 1 検体（2.1％）が不適であったが，その他は 24 時間放置で 3 検体に 1 ppm 未満の検出があるのみであった．また絵具中の硫化カドミウムは光酸化により抽出溶媒中の溶存酸素と反応して易溶性の硫酸カドミウムに変化する[8]．このため ISO では試験面を遮光して行なうように規定しているが本実験では遮光を行なわなかったので，実際にはさらに少ない数値であるかもしれない．

その他の金属については前記不良 2 検体と釉薬の異

表2．陶磁器，ほうろう製品から溶出した金属(10分間放置)

—：検出限度以下　　単位：ppm

品名＼元素	Li	Na	K	Cu	Be	Mg	Ca	Sr	Ba	Zn	Cd	Al	Si	Ti	Sn	Pb	V	As	Sb	Bi	Cr	Mo	Se	Mn	F	Fe	Co	Ni	B	W
中華どんぶり	0.02	0.20	—	—	—	0.08	0.11	—	—	0.22	—	0.20	—	—	0.11	2.72	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	0.01	—	0.12	—
〃	—	0.02	—	—	—	0.01	0.08	—	—	0.01	—	0.11	—	—	—	0.24	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	0.11	—
〃	—	0.07	0.45	—	—	0.32	0.15	—	—	0.05	—	0.41	—	—	0.18	0.23	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.19	—
〃	—	0.02	—	—	—	0.02	0.09	—	—	0.03	—	0.06	—	—	—	0.21	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	0.04	—
〃	—	0.03	—	—	—	0.01	0.06	—	—	0.03	—	0.05	—	—	—	0.03	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.06	—
〃	—	0.08	—	—	—	0.10	0.14	—	—	0.07	—	0.28	—	—	0.10	0.88	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.07	—
〃	—	0.08	—	—	—	0.05	0.09	—	—	0.02	—	0.05	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	0.03	—
〃	—	0.23	—	—	—	0.09	0.11	—	—	0.12	—	0.11	—	—	0.05	0.03	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	0.02	—	0.03	—
〃	—	0.36	—	—	—	0.14	0.11	—	—	0.09	—	0.19	—	—	0.06	0.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.10	—
〃	—	0.03	—	—	—	0.05	0.11	—	—	0.02	—	0.08	—	—	—	0.16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	0.05	—
〃	—	0.20	—	0.09	—	0.23	0.48	—	0.01	—	0.12	0.21	—	—	—	1.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.03	—	—	0.07	—
中華皿	—	0.02	—	—	—	0.32	0.14	—	—	0.27	—	0.21	0.3	—	0.17	0.23	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.15	—
〃	—	0.03	—	—	—	0.02	0.17	—	—	0.05	—	0.14	—	—	—	0.10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	0.02	—	0.04	—
〃	—	0.19	—	—	—	0.09	0.12	—	—	0.10	—	0.13	—	—	0.07	0.05	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.02	—
中華うけ皿	—	1.60	0.48	—	—	0.15	0.12	—	—	1.53	—	0.12	0.4	—	—	0.07	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	0.26	—	0.07	—
和風どんぶり	—	—	—	—	—	0.25	0.56	—	—	0.03	—	—	—	—	0.08	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	0.02	—	
〃	—	0.02	—	—	—	0.01	0.05	—	—	—	—	0.03	—	—	—	0.01	—	—	—	—	0.02	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—
〃	—	0.03	—	—	—	0.05	0.07	—	—	0.02	—	0.08	—	—	—	0.06	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	0.01	—	0.04	—
そば用どんぶり	—	5.00	1.32	—	—	0.02	0.06	—	—	0.02	—	0.04	—	—	—	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.06	—
深　鉢	—	0.08	—	—	—	0.02	0.10	—	—	0.24	—	0.08	—	—	0.05	0.15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.06	—
グラタン皿	—	0.27	0.25	—	—	0.02	0.14	—	—	0.15	—	0.10	—	—	—	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.13	—
〃	—	0.03	—	—	—	0.12	0.40	—	—	0.02	—	0.06	—	—	—	0.03	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.03	—	—	0.04	—
〃	—	0.10	—	—	—	0.01	0.05	—	—	0.03	—	0.05	—	—	—	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.05	—
中皿(オーブン用)	—	0.07	—	—	—	0.01	0.06	—	—	0.03	—	0.05	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	0.04	—
スープ皿	—	—	—	—	—	0.01	0.13	—	—	0.03	—	0.10	—	—	0.07	0.14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	0.31	—
〃(パール仕上げ)	—	0.02	—	—	—	0.04	0.06	—	—	0.03	—	0.04	—	—	—	0.08	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.04	—
洋　皿	—	0.02	—	—	—	—	0.14	—	—	—	—	0.05	—	—	—	0.04	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.03	—
洋風平皿	—	—	—	—	—	0.02	0.13	—	—	0.06	—	0.11	—	—	0.05	0.02	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	0.03	—	—		—
洋　皿	—	0.07	0.15	—	—	0.04	0.18	—	—	0.05	—	0.11	—	—	0.06	0.04	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.05	—	—	0.08	—
ケーキ皿	—	0.03	—	—	—	0.03	0.12	—	—	0.02	—	0.11	—	—	—	0.05	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	0.10	—
洋　皿	—	0.26	0.20	0.01	—	0.03	0.50	—	0.07	0.06	—	0.33	—	—	0.13	1.32	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.32	—
洋風小皿	—	0.12	0.20	—	—	0.02	0.16	—	—	0.06	—	0.13	—	—	0.19	0.07	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	0.17	—
〃 中皿	—	0.11	—	—	—	0.04	0.15	—	—	0.05	—	0.09	—	—	—	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.13	—
和風平皿	—	0.47	0.25	—	—	0.01	0.08	—	—	0.12	—	0.05	—	—	—	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.24	—
〃 小皿	—	—	—	—	—	0.01	0.05	—	—	0.08	—	0.04	—	—	—	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	0.04	—
〃 中皿	—	—	—	—	—	0.01	0.05	—	—	0.03	—	0.05	—	—	—	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	0.03	—
小皿	—	0.18	—	—	—	0.12	0.26	—	—	0.08	—	0.20	—	—	—	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.03	—	—	0.27	—
〃	—	0.17	—	—	—	0.02	0.17	—	—	0.03	—	0.12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.05	—
小付け皿	—	0.11	—	0.01	—	0.08	0.56	—	0.01	0.40	—	0.30	—	—	0.19	0.73	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.05	0.02	—	0.31	—
小物鉢	—	—	—	—	—	0.08	0.10	—	—	0.51	—	0.10	—	—	0.05	0.11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	0.08	—	0.07	—
〃	—	0.04	—	—	—	0.02	0.10	—	—	0.10	—	0.09	—	—	0.11	0.04	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	0.21	—
小　鉢	—	0.11	—	—	—	0.02	0.10	—	—	0.28	—	0.09	—	—	0.07	0.03	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	0.04	—	0.16	—
〃	—	0.11	0.25	—	—	0.02	0.09	—	—	0.03	—	0.06	—	—	—	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	0.05	—
コーヒーカップ	—	—	—	—	—	—	0.04	—	0.02	0.02	—	0.03	—	—	0.04	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.04	—
マグカップ	—	0.11	—	—	—	0.02	0.08	—	—	0.02	—	0.08	—	—	—	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.05	—
モーニングカップ	—	0.03	—	—	—	0.01	0.07	—	—	0.14	—	0.05	—	—	—	0.10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	0.06	—
いちご型うけ皿				—		0.04	0.30	—	—	0.16	—	—	—	—	—	—			—		—		—	—	0.01	—	—		
かき型うけ皿			5.00	—		0.21	0.30	—	—	0.11	—	0.33	—	—	—	—		—	—		—		—	—	0.03	—	—		
ほうろうカップ	0.09	1.15	0.72	—	—	0.11	0.10	—	0.02	0.17	—	2.21	1.1	—	0.08	0.06	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.05	—	—	0.95	—
〃	0.02	0.40	0.20	—	—	0.04	0.12	—	—	0.11	—	0.40	0.3	—	0.05	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.03	—	—	0.32	—

表3．陶磁器，ほうろう製品から溶出した金属(24時間放置)

—：検出限度以下　　単位：ppm

品名＼元素	Li	Na	K	Cu	Be	Mg	Ca	Sr	Ba	Zn	Cd	Al	Si	Ti	Sn	Pb	V	As	Sb	Bi	Cr	Mo	Se	Mn	F	Fe	Co	Ni	B	W
中華どんぶり	0.11	1.15	0.40	—	—	0.18	0.28	—	—	0.77	—	1.60	0.5	—	0.43	17.10	—	—	—	—	0.02	—	—	—	—	0.08	0.16	—	1.16	—
〃	0.02	0.06	0.15	—	—	0.07	0.34	—	—	0.08	—	0.76	0.3	—	—	2.74	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.05	0.02	—	0.44	—
〃	—	0.16	0.65	—	—	0.54	0.30	—	—	0.11	—	0.81	0.4	—	0.32	1.05	—	—	—	—	—	—	0.04	—	—	0.04	—	—	0.31	—
〃	0.02	0.08	0.10	—	—	0.05	0.20	—	—	0.58	—	0.45	—	—	—	5.91	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.04	0.18	—	0.28	—
〃	—	0.05	—	—	—	0.01	0.17	—	—	0.10	—	0.14	—	—	—	0.63	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	0.11	—
〃	0.03	0.16	0.15	—	—	0.50	0.39	—	—	0.76	—	1.61	0.5	—	0.36	8.29	—	—	—	—	0.01	—	0.04	—	—	0.06	0.06	—	0.67	—
〃	—	0.21	—	—	—	0.07	0.14	—	—	0.04	—	0.07	—	—	0.05	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	0.04	—
〃	—	0.43	—	—	—	0.12	0.19	—	—	0.62	—	0.18	—	—	0.09	0.21	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	0.09	—	0.05	—
〃	0.01	0.64	0.25	—	—	0.26	0.41	—	—	0.86	—	1.74	0.4	—	0.44	8.33	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.09	—	—	0.50	—
〃	0.03	0.05	—	—	—	0.08	0.22	—	—	0.10	—	0.18	—	—	—	0.58	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.10	—
〃	—	0.76	—	0.15	—	0.30	0.70	—	0.01	—	1.16	0.42	0.5	—	—	2.50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.06	0.09	—	0.22	—
中華皿	0.02	0.13	—	—	—	0.53	0.37	—	—	2.43	0.03	1.00	0.7	—	0.49	5.40	—	—	—	—	—	—	0.05	—	—	0.07	0.16	—	0.56	—
〃	0.02	0.07	0.07	0.02	—	0.05	0.41	—	0.02	1.28	—	0.52	—	—	—	3.34	—	—	—	—	0.01	—	—	—	—	0.04	0.36	0.01	0.17	—
〃	—	0.31	—	—	—	0.18	0.25	—	—	0.79	—	0.31	—	—	0.15	0.49	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.05	—	—	0.04	—
中華うけ皿	—	4.40	0.74	—	—	0.19	0.20	—	—	6.63	—	0.19	0.4	—	—	0.20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	0.91	—	0.12	—
和風どんぶり	—	—	—	—	—	0.34	1.21	—	—	0.06	—	0.05	—	—	0.14	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.04	—
〃	—	0.04	—	—	—	0.03	0.14	—	—	—	—	0.06	—	—	—	0.03	—	—	—	—	0.02	—	—	—	—	0.01	—	—	0.40	—
〃	0.02	0.06	—	—	—	0.05	0.16	—	—	0.20	—	0.21	—	—	—	0.63	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.04	0.04	—	0.10	—
そば用どんぶり	—	5.06	1.32	—	—	0.03	0.12	—	—	0.04	—	0.09	—	—	—	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.15	—
深　鉢	0.01	0.12	—	—	—	0.04	0.17	—	—	0.37	—	0.18	—	—	0.09	0.82	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.04	—	—	0.14	—
グラタン皿	—			—	—	0.16	0.23	—	—	0.24	—	0.24	—	—	0.13	0.07	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.05	—	—	0.21	—
〃	0.06	0.10	0.11	0.01	—	0.40	7.91	—	0.02	0.12	—	0.99	1.4	—	0.06	0.09	—	—	—	—	—	—	0.06	—	—	0.14	0.01	—	0.06	—
〃	—	0.17	—	—	—	0.01	0.11	—	—	0.08	—	0.10	—	—	—	0.03	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.09	—
中皿(オーブン用)	—	0.14	—	—	—	0.02	0.14	—	—	0.08	—	0.10	—	—	—	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.07	—
スープ皿	—	0.12	—	—	—	0.03	0.48	—	—	0.06	—	0.16	—	—	0.14	0.19	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.43	—
〃 (パール仕上げ)	0.01	0.05	0.05	0.02	—	0.05	0.24	—	—	0.38	—	0.36	—	—	—	2.25	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.03	0.09	—	0.14	—
洋　皿	—	0.04	—	0.01	—	0.01	0.28	—	—	0.02	—	0.13	—	—	—	0.21	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.09	—
洋風平皿	—	—	—	—	—	0.04	0.22	—	—	0.14	—	0.17	—	—	0.12	0.04	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	0.04	—	—	0.12	—
洋　皿	—	0.14	0.30	—	—	0.07	0.32	—	—	0.13	—	0.19	—	—	0.13	0.16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.03	—	—		—
ケーキ皿	—	0.10	0.04	0.02	—	0.16	0.41	—	—	0.20	—	0.47	—	—	—	0.54	—	—	—	—	0.01	—	—	—	—	0.06	0.04	0.01	0.15	—
洋　皿	0.03	0.59	0.40	0.01	—	0.06	1.06	—	0.17	0.10	—	0.68	—	—	0.26	3.01	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.04	—	—	0.66	—
洋風小皿	—	0.43	0.40	—	—	0.04	0.37	—	—	0.12	—	0.32	—	—	0.19	0.21	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.03	—	—	0.43	—
〃 中皿	—	0.18	—	—	—	0.12	0.31	—	—	0.15	—	0.28	—	—	0.11	0.48	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.04	—	—	0.22	—
和風平皿	—			—	—	0.07	0.15	—	—	0.16	—	0.15	—	—	0.12	0.06	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.67	—
〃 小皿	—	—	—	—	—	0.02	0.12	—	—	0.20	—	0.08	—	—	—	0.04	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.07	—
〃 中皿	—	—	—	—	—	0.02	0.13	—	—	0.05	—	0.15	—	—	—	0.04	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.06	—
小皿	—	0.36	—	—	—	0.14	0.39	—	—	0.12	—	0.30	—	—	—	0.03	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.04	—	—	0.35	—
〃	—	0.29	—	—	—	0.04	0.29	—	—	0.09	—	0.25	—	—	—	0.03	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	0.14	—
小付け皿	0.19	0.25	—	0.03	—	0.13	0.78	—	0.01	6.68	—	0.82	0.7	—	0.35	3.63	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	0.13	0.28	0.03	0.50	—
小物鉢	0.02	—	—	—	—	0.12	0.17	—	—	3.30	—	0.17	0.4	—	0.11	0.38	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.03	0.41	—	0.20	—
〃	—	0.08	—	—	—	0.04	0.19	—	—	0.13	—	0.18	—	—	0.14	0.08	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.31	—
小　鉢	—	0.22	—	—	—	0.04	0.20	—	0.01	0.95	—	0.17	—	—	0.14	0.15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	0.14	—	0.30	—
〃	—	0.21	0.35	—	—	0.07	0.19	—	—	0.07	—	0.14	—	—	—	0.07	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.03	—	—	0.09	—
コーヒーカップ	0.02	0.10	0.15	—	0.01	0.11	30.1	—	0.22	0.10	—	0.20	—	—	0.62	0.04	—	—	—	—	0.01	—	—	—	—	0.01	—	—	0.30	—
マグカップ	—	0.21	—	—	—	0.05	0.28	—	—	0.06	—	0.34	—	—	0.08	0.03	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	0.10	—
モーニングカップ	—	0.08	—	—	—	0.02	0.18	—	—	0.17	—	0.15	—	—	—	0.35	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	—	0.15	—
いちご型うけ皿				0.01		3.28	10.1	0.03	—	0.76	0.06	0.95		—	12.7	0.36			—		0.16		1.84	0.03		0.07	0.03	—		
かき型うけ皿		16.0	65.0	—		177.0	26.8	0.02	—	0.50	0.05	1.30	—	—	13.3	0.38		—	—		0.21	—	1.97	0.04		0.09	0.05	—		
ほうろうカップ	0.24	3.85	4.12	—	0.01	0.34	0.34	—	0.07	0.57	—	5.59	3.9	—	0.30	0.08	—	—	—	—	—	—	0.04	—	0.20	0.19	—	—	3.60	—
〃	0.16	6.00	2.30	—	0.02	0.34	0.40	—	0.04	0.60	—	2.79	2.6	—	0.26	0.05	—	—	—	—	—	—	0.06	0.01	—	0.27	0.01	0.02	2.96	—

表4．ガラス製品から溶出した金属

—：検出限度以下　単位：ppm

品名＼元素	Li	Na	K	Cu	Be	Mg	Ca	Sr	Ba	Zn	Cd	Al	Si	Ti	Sn	Pb	V	As	Sb	Bi	Cr	Mo	Se	Mn	F	Fe	Co	Ni	B	W
イタリーグラス(赤)	—	0.03	—	0.02	—	—	0.07	—	—	0.03	—	0.03	—	—	—	0.04	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	0.01	—	0.09	—
〃 (青)	—	0.06	—	0.02	—	—	0.18	—	—	0.04	—	0.11	—	—	—	0.08	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01	0.03	—	0.18	—
〃 (緑)	—	0.14	—	0.02	—	—	0.25	—	0.03	0.07	—	0.14	—	—	—	0.13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	0.03	—	0.16	—
コップ	—	0.04	0.08	0.01	—	—	0.14	—	—	0.01	—	0.06	0.1	—	—	0.53	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—	0.14	—
〃 (黄)	—	0.08	—	0.05	—	0.02	0.68	—	0.02	0.15	—	0.26	—	—	—	0.10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	0.03	—	0.05	—
〃 (うす茶色)	—	0.08	—	—	—	—	0.16	—	—	—	—	0.09	—	—	—	0.04	—	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	—	—	0.08	—
強化タンブラー	—	1.90	0.03	0.01	—	—	0.49	—	0.03	0.08	—	0.28	—	—	—	0.06	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	0.02	—	0.85	—
サーバー	—	0.04	—	—	—	—	0.08	—	—	0.02	—	0.06	0.1	—	—	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.05	—
フリーザーポット	—	0.02	—	—	—	—	0.05	—	—	0.01	—	0.03	0.1	—	—	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.03	—
小鉢	—	0.04	—	—	—	—	0.10	—	—	0.02	—	0.06	—	—	—	0.03	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.05	—

なるほうろう製品を除いて述べる．Ti, Sb, Bi, Mo, F, Wは全検体から検出されなかった．しかしこれらの金属は他に比較して検出感度が低いので微量溶出している可能性はある．Be, Sr, V, Se, Cr, Mn, Niは0.1 ppm以下の溶出がみられた．Mn, Vは生体の必須金属であり[9,10]，Se, Cr, Niは食物中に存在する量より少なく[10,11,12]，Srは毒性が弱い[13]ので問題はない．Beは人体や食物にほとんど存在しない金属で発ガン性があるといわれ[14]，0.01～0.02 ppmと微量ではあったが溶出することは好ましくない．Li, Cu, Ba, Sn, Fe, Coは1 ppm以下の溶出がみられた．Cu, Fe, Coは生体の必須金属であり，Li, Baは食物からそれぞれ2 mg/day, 1.3mg/day摂取されている[14]．Snも食品中に存在する程度の量であった[14]．Na, K, Mg, Ca, Zn, Al; Si, Bは1 ppm以上の溶出がみられた．特にNa, Ca, Znはそれぞれ最高溶出量5.0, 7.9, 6.6 ppmを検出した．これらはいずれも釉薬に多く用いられ，酸により釉面が侵されて溶出する可能性が高いものである．しかしNa, K, Mg, Ca, Znは生体の必須金属であり[14]この程度の溶出量は問題ない．Bは植物に必須で野菜に多く含まれる[14]．SiはSiO_2として溶出すると考えられ消化も吸収もされない．Alも食品中に存在する程度の量であった[14]．

以上述べたようにPb, Cdを除く他の金属は生体に影響をおよぼすと考えられるほどの量は検出されなかった．しかし毒物学的に意味のある金属は微量でも溶出しないよう製造に注意することが望ましい．

またISOに規定されているPb, Cdで不適となったものはすべて中華料理用食器であり，他の金属類の溶出も多かった．これは鮮やかな模様を施こすため色数が多く，値段も安いところから十分な焼成が行なわれていないものと考えられた．

まとめ

陶磁器，ほうろう，ガラスは我国の規格でPb, Asが，ISOでPb, Cdが規制されている．Asは全検体から検出されず現行法，ISO法ともに問題がなかったが，Pb, Cdは現行法では適合，ISO法ではそれぞれ10％，2％が不適となり我国の規格がかなりゆるいものであることを示していた．不適となったものはすべて中華料理用食器であり焼成温度が低いことが原因と考えられる．その他の金属については22種を検出したが，その溶出量は生体に影響をおよぼすと考えられるほどの量ではなかった．しかし釉薬中に過量使用されたり，焼成温度が低かったり，酸性の食品と長時間接触するなどの条件がそろうと溶出の可能性があるので注意を要するだろう．

文　献

1) 窯業工学ハンドブック，新版，窯業協会編，1063, 1971，技報堂
2) 本荘義郎：食品衛生研究，27，533，1977
3) 厚生省告示 20 号　官報　1982，2，16
4) ISO 6486/1, 6486/2, 1981, the International Organization for Standardization
5) *ibid* TC107/SC6N, 1982
6) *ibid* 7086/1, 7086/2, 1982
7) 素木洋一：釉とその顔料，1970，技報堂
8) Krinitz, B and Holak, W : *J. of The AOAC*, 59, 158, 1976
9) 環境汚染物質の生体への影響　マンガン・アスベスト，1版，National research council 編，1977, 東京化学同人
10) *ibid* クロム・バナジウム
11) *ibid* セレン
12) *ibid* ニッケル
13) 山田幸孝：食品中の微量元素，2版，45, 1970, 日本食品衛生協会
14) Venugopal, B. and Luckey, T. D. : *Metal Toxicity in Mamals* · 2, 1978, Plenum Press, New York

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 241-244, 1984

日本の伝統的高蛋白食品中のリジノアラニン

菊谷典久*, 井口正雄*, 友松俊夫*
道口正雄*

Determination of Lysinoalanine in Traditional High-protein Foods of Japan

NORIHISA KIKUTANI*, MASAO IGUCHI*, TOSHIO TOMOMATSU*
and MASAO DOGUGHI*

Lysinoalanine (LAL), N^{ε}-(DL-2-amino-2-carboxyethyl)-L-lysine is currently of considerable interest because of its nephrotoxic properties in rats. This amino acid is found to be formed during alkaline treatment or heat treatment of edible proteins. This study was undertaken to present some information on the contents of LAL in traditional high-protein foods of Japan. LAL was determined in four kinds of foods such as Congealed curd, Yuba made from soybean protein, Fu prepared from wheat gluten and dried strip of Skipjack by hydrolyzing and subjecting them to an amino acid analyzer. No LAL was detected in Congealed curd. Yuba, Fu and dried strip of Skipjack were shown to contain 60-80μg LAL/g protein, 0-60μg/g protein and 260-450μg/g protein respectively.

Keywords : lysinoalanine, nephrotoxic properties, high-protein food

緒　言

リジノアラニン〔N^{ε}-(DL-2-amino-2-carboxyethyl)-L-lysine〕（以下LALと略す）は，1964年Bohak[1]，Patchornikら[2]により，アルカリ処理リボヌクレアーゼの酸加水分解過程において初めて見出された非通常型アミノ酸であり，天然物としては，微生物由来のペプチドであるCinnamycinやDuramycinの構成アミノ酸として存在することが知られている．

LALの生成メカニズムに関しては，タンパク質中のリジン残基のε位のアミノ基が，アルカリ条件下，β脱離反応によってシスチンあるいはセリン残基から生じたデヒドロアラニン残基の二重結合と反応して生ずると考えられている[1]．(Fig. 1)

食品工業においては，各種タンパク質の可溶化，単離あるいは起泡性の改良などのために，アルカリ処理が繁用されているところから，食品タンパク質とLALとの関連について関心が持たれた．

1969年De Grootら[3]は，カゼイン，大豆タンパク等のアリカリ処理によるLALの生成を認め，同時にこれ

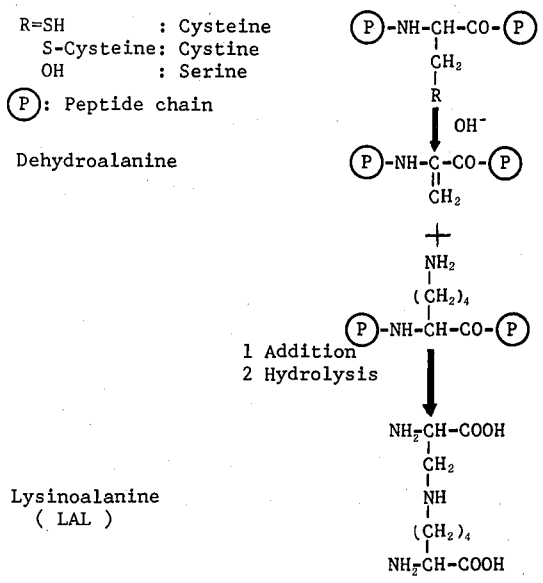


Fig. 1. Formation of LAL through the Mechanism of β-Elimination-Addition Reaction

* 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

らを飼料としてラットの生育を調べた実験において，タンパク利用効率が低下することを報告している．

また，Woodard ら[4]は，アルカリ処理に起因する大豆タンパク中の LAL が，ラットの腎障害－腎管細胞の肥大化（Renal Cytomegalia）を招くことを見出し，LAL の生成が単に栄養価低下にとどまらず，生体にとって有害作用を及ぼす可能性があることを示した．

LAL の生成条件についても種々の検討がなされ，非アルカリ環境下にあっても，加熱により容易に LAL が生成すること，しかもそれが家庭内調理時の加熱程度で十分であることが示され[5]，改めて LAL が多種多様な食品に含まれ得ることが認識された．

従来，我々は加工過程によって生じる食品の栄養価低下および安全性の検討を行ってきたが，今回，以上述べたような種々の作用を示す LAL に注目し，日本古来の伝統的大豆タンパク食品である凍り豆腐，干し湯葉，同じく小麦タンパク食品である焼き麸，そして伝統的水産加工品である鰹節について，含有量の分析を行った．以下，これらの結果を報告する．

実験方法

1．試料

下記の品目について分析を行った．なお，全品とも都内において市販されているものである．

凍り豆腐：A社（長野市），B社（飯田市），C社（和歌山県伊那郡）の製品．

干し湯葉：D社（京都市），E社（台東区）の製品．

焼き麸：F社（茨城県結城郡），G社（金沢市），H社（所沢市）の製品．

鰹　節：I社（中央区），J社（名古屋市）の製品．

2．試薬

LAL 標準品：Finley らの方法[6]により合成を行ったものを使用した．

試料の加水分解には，精密分析用定沸点塩酸（和光純薬 K. K.）を用いた．アミノ酸自動分析用緩衝液は，テクノバッファー RH シリーズ（Techno Chemical Corp.）を用いたが，一部自製の緩衝液については，和光純薬 K. K. 製のアミノ酸自動分析用試薬を用いた．また，他の試薬については，すべて試薬特級品を使用した．

3．LAL の分析

試料調製：各試料は，ミキサーにより細砕し，均質な粉末とした後，加水分解に供した．加水分解は，含有タンパク質約 25 mg に相当する量を秤取し，6 N-塩酸を加え，アルミブロックヒータを用いて 110℃，24 時間行った．6 N-塩酸の量は，上記タンパク量の 200 倍とした．なお加水分解中の酸化等の副反応を防ぐため，試料はロータリー真空ポンプ，ドライアイス・エタノール冷却トラップを用いて脱気，封管後に加熱した．加水分解終了後，試料溶液はろ過し，ロータリーエバポレータにて蒸発乾固した．そしてアミノ酸分析直前に 0.02 N－塩酸にて溶解し，LAL 分析試料溶液とした．

アミノ酸分析：日立 835 形高速アミノ酸分析計を使用した．分析条件は以下のとおりである．カラム：4.0×150 (mm)，使用温度 58℃，アンモニアフィルターカラム併用．使用樹脂：日立カスタムイオン交換樹脂# 2619．溶出緩衝液：テクノバッファー RH-1～4，およびクエン酸－クエン酸ナトリウム緩衝液 (0.35 M-Na, pH 6.2)．

フェニルアラニンとヒスチジンとの溶出間隔を広くし，その間に LAL を溶出させる目的で，上記緩衝液系を使用した．また通常型アミノ酸は，LAL に比して極めて高濃度に存在するため，試料の分析にあたり，ニンヒドリンは LAL 溶出時間に合わせて反応させた．

4．タンパク量の測定

各試料について，セミミクロケルダール法[7]により総窒素を測定し，窒素係数を 6.25 としてタンパク量を求めた．

結果および考察

加水分解試料のクロマトグラムの一例を，Fig. 2 に示す．(I社鰹節)．左端はフェニルアラニンピークであり，右端はヒスチジンピークである．ニンヒドリンポンプはフェニルアラニンの溶出終了直前に入力し，ヒスチジン溶出中に切断している．この区間においては，LAL 以外

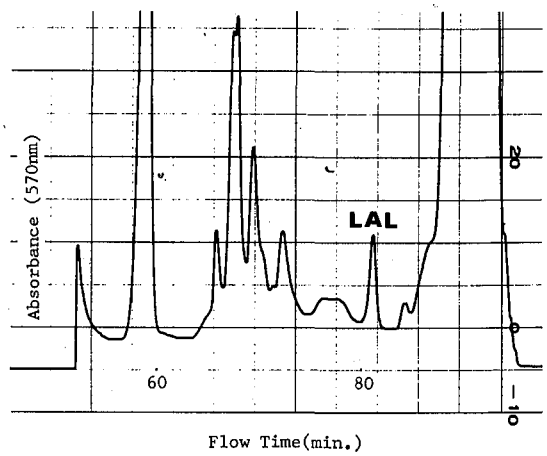


Fig. 2. Amino Acid Chromatogram of Hydrolyzed Sample

のピークも数多く見られ，いわゆる22種の通常アミノ酸以外のアミノ酸，アミノ糖類の存在がうかがわれる．

Table 1 に各製品の LAL 含有量を示す．大豆タンパク食品では，凍り豆腐3種については，いずれも LAL は検出せず，干し湯葉に 60, 80 μg/g·タンパクの LAL をみとめた．(なお，今回の実験における LAL の検出限界は，10 μg/g·タンパクである．) 凍り豆腐，干し湯葉とも大豆を水漬し，磨砕，加熱して得られる豆乳を主原料としている．凍り豆腐は，豆乳に塩化カルシウム等を添加して凝固させ，凍結，解氷，脱水，乾燥という過程を経て作られる．一方，干し湯葉は，豆乳を加熱して表面に出来る薄膜を乾燥させたものである．このため，干し湯葉では加熱過程が重なり，LAL の生成が促進されるものと考えられる．なお，市販の大豆タンパク (Soya protein isolate) 中の LAL については，Sternberg ら[5]は，0～370 μg/g·タンパク，Finley ら[8]は 270 μg/g·タンパクという結果を報告している．

Table 1. Results of LAL Assays in Traditional Foods of Japan

Product	Manufacturer	μgLAL/g sample	μgLAL/g protein
Congealed curd (Kōri-dōfu)	A, B, C	0	0
Yuba, dried	D	40	60
	E	50	80
Fu, baked	F, G	0	0
	H	20	60
Dried strip of Skipjack (Katsuobushi)	I	410	450
	J	230	260

焼き麸については，H社製「かたやき麸」に LAL 60 μg/g·タンパクを検出した．麸はコムギグルテンが主成分である．まずコムギ粉の生地からグルテンとデンプンとを分離する．この時に得られる湿グルテンが生麸であり，焼き麸は，このグルテンに合せ粉と称するコムギ粉，モチ粉，膨剤などを混合し，混捏分割，成型，焙焼したものである．今回取り上げた焼き麸では，F, G 両社の製品については外観はほぼ白色で，焙焼の程度も軽いことがうかがわれたが，「かたやき麸」については，褐色の焦げ目が随所に見られ，加熱条件が前二者に比べて厳しいことが推察された．焼き麸における LAL の生成は，焙焼の程度と関係すると考えられる．

鰹節については，260, 450 μg/g·タンパクの LAL を検出した．鰹節の製造過程では，煮熟，くん乾等の加熱操作が何回かある．また，今回の試料は，不活性ガスを充てんした気密袋入りの削り節であり，このような製品では鰹節を蒸気加熱して湿気を与え，軟化させ，削り機で薄片にして熱風乾燥することが，しばしば行われている．そのため，比較的高いレベルの LAL の生成となったと考えられる．なお，水産加工品中の LAL 含量については，缶詰めイワシで 270 μg/g·タンパクという報告がある[9]．

製品加工前の原材料中のリジンの何%が，最終製品時にリジノアラニンに変換しているかを，「日本食品アミノ酸組成表」をもとに試算したものが，Table. 2 である．湯葉ではダイズ，麸ではコムギ粉，鰹節では鰹肉中のリジン量を原リジン量として計算した．変換率は0.05～0.35%となった．ちなみに Sternberg ら[5]の卵白での実験について同様の計算を行うと，0.13%(3分間茹でる)～1.0% (150°Cで30分間焼く)となった．

Table 2. Conversion Rate of Original Lysine into LAL

Product	Lys moiety of LAL μg/g protein	Original Lys* μg/g protein	Conversion rate %
Yuba (D)	38	75,000	0.05
(E)	50	(Soybeans)	0.07
Fu (H)	38	23,000 (Flour)	0.17
Dried strip of Skipjack (I)	280	80,000	0.35
(J)	160	(Skipjack, raw)	0.20

*「日本食品アミノ酸組成表」(昭和41年4月，科学技術庁資源調査会編)による．
Lys : Lysine

今回対象とした伝統的食品類は，保存性を高めるため水分含量を低くする工夫をしている．その方法として，凍結乾燥を利用した凍り豆腐では，LALは検出されず，加熱処理したものではLALの生成がみとめられた．また近年，ニワトリヒナに筋胃潰瘍を起こさせる物質であるジゼロシン（gizzerosine）が，魚粉の加熱処理中にヒスチジンとリジンより生成する可能性のあること[10]も指摘されており，食品タンパクの熱処理変化については，より一層の検討が必要であろう．

（本研究は昭和58年度当研究所調査研究課題「加工過程によって生じる食品の栄養価低下に関する研究」として実施したものである．）

文　献

1) Bohak, Z. : *J. Biol. Chem.*, **239**, 2878, 1964
2) Patchornik, A. : *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1860, 1964
3) De Groot, A. P. and Slump, P. : *J. Nutrition*, **98**, 45, 1969
4) Woodard, J. C. and Short, D. D. : *J. Nutrition*, **103**, 569, 1973
5) Sternberg, M., Kim, C. Y. and Schwende, F. J. : *Science*, **190**, 992, 1975
6) Finley, J. W. and Snow, J. T. : *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 1421, 1977
7) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，153, 1980, 金原出版
8) Finley, J. W., Snow, J . T. and Johnston, P.H. : *J. Food Sci.*, **43**, 619, 1978
9) Raymond, M. L. : *J. Food Sci.*, **45**, 56, 1980
10) Okazaki, T., Noguchi, T., Igarashi, Y., Sakagami, Y., Seto, H., Mori, K., Naito, H., Masumura, T. and Sugawara, M. : *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2949, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 245-251, 1984

老人ホームおよび乳児院の食事の脂肪酸組成

井口正雄*, 菊谷典久*, 友松俊夫*, 道口正雄*
二見大介**, 米川郁毅**, 鶴見田鶴子***
鎌田敏夫****, 窪田英夫*****

Fatty Acid Composition of Diets Collected from the Old-Age Home and the Infant Home

MASAO IGUCHI*, NORIHISA KIKUTANI*, TOSHIO TOMOMATSU*, MASAO DOGUCHI*
DAISUKE FUTAMI**, YUKI YONEKAWA**, TAZUKO TSURUMI***
TOSHIO KAMATA**** and HIDEO KUBOTA*****

Fatty acids composition of dietary lipids was determined for 3 days for the old-age home and the infant home in Tokyo.

Fatty acids found predominantly in the samples obtained from the old-age home and the infant home were fatty acids of $C_{16:0}$, $C_{18:1}$ and $C_{18:2}$ and those of $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ and $C_{18:1}$ respectively.

The ratio of saturated fatty acids, mono-unsaturated fatty acids and poly-unsaturated fatty acids averaged approximately 1:0.9:1.6 in the diets from the old-age home and 1:0.6:0.5 from the infant home.

poly-unsaturated fatty acids constituted 44% of total dietary fatty acids in the diets from the old-age home and 23% in the diets from the infant home.

Keywords : fatty acid composition, lipids, diets

緒　言

国民栄養調査によれば，エネルギー摂取量に占める脂肪のエネルギーの比率は，依然として増加傾向にあると報告されている[1]．また日本人の血清コレステロール値はすでに欧米人の水準に達しているといわれ[2]，血中脂質濃度の上昇に伴い，心臓疾患，動脈血栓症の主因であるアテローム性動脈硬化症の発生，進行が危惧される．その発生の頻度や程度は，食事から摂取する脂質の不飽和脂肪酸あるいはポリエン酸の相対比に影響されるといわれている[3]．また近年，プロスタグランジンのコレステロール輸送あるいは代謝に関与する機能が究明されるに従い，その前駆体としての不飽和脂肪酸の役割の重要性が認識されてきている．アテローム性動脈硬化症の長期にわたる予防という観点から，また必須脂肪酸の要求量確保という点から，献立作製においては食事中の脂質の種類に留意する必要がある．

従来，食品素材個々についての脂肪酸組成の検討はなされているが，献立を作製し実際に調理した食事を実測して検討した報告は少ない．そこで我々は，施設の食事を試料として脂肪酸組成の分析を行い，若干の知見を得たので報告する．

試料および実験方法

1．**試料**　都内のA老人ホーム（特別養護老人ホーム）およびB乳児院（私立）において，それぞれ老人および乳幼児に供された3日間の朝食，昼食および夕食を陰膳方式により採取し，計18食を試料とした．

* 東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都衛生局公衆衛生部保健栄養課
*** 東京都立川保健所国立保健相談所
**** 東京都立八王子小児病院
***** 東京都衛生局公衆衛生部

2．脂肪酸組成の分析　前報[4]と同様な操作で分析を行った．試料をミキサーで均一なペースト状とした後，AOAC法の残留農薬分析法[5]に準じて脂質を抽出した．脂質の一部を常法[6]によりけん化後，脂肪酸を抽出し，三フッ化ホウ素—メタノール法[7]により脂肪酸メチルエステルを調製しガスクロマトグラフィーにより分析を行った．測定はインテグレーターを使用し面積百分率法によった．ガスクロマトグラフィーの分析は次の条件で行った．カラム：3 mm I. D.×3 mガラスカラム，充てん剤：5％ Shinchrom E-71, Shimalite (Aw)80-100 mesh, カラム温度：220℃，検出器温度：250℃，試料注入口温度：250℃，キャリヤーガス流量(N_2)：40 ml/min，水素ガス流量：40 ml/min，空気流量：1 l/min，試料注入量：2～5 μl，検出器：水素炎イオン化型，装置：日立163型ガスクロマトグラフ，インテグレーター(島津ITG-2A型)．また試薬は前報[4]と同等のものを使用した．

結果および考察

1．老人ホームの食事　3日間の食事について，それぞれの献立内容を表1に示した．また食品成分表から求めた一般成分値およびエネルギー(Atwater係数による)を合わせて示した．これらの食事は1人1日あたり1500～1600 kcalのエネルギーが摂取されるように調製されたものである．ちなみに，この値は日本人の栄養所要量[8]では70才代（女）の普通労作における所要量にあたる．また食事別の脂肪酸組成分析の結果を表2に示した．

脂肪酸組成分析の結果，ほとんどの食事に共通して，$C_{16:0}$，$C_{18:1}$および$C_{18:2}$が主要成分であった．これら三成分が，それぞれの食事に占める割合は53.8～83.8％（平均72.5％）であった．特異的生理作用のある脂肪酸として，$C_{20:1}$はラットによる長期摂取試験では心臓に壊死，線維症を起すという報告[9]があるが，分析した食事の9食中，8食に検出された．これは國崎ら[10]が病院給食について分析を行い1週間の食事のほとんどに検出したという結果と一致している．また$C_{22:1}$はナタネ油に多く含まれ，実験動物に多量投与で成長不良，心臓，副腎，肝臓に病変を起すといわれている[11]が，9食中7食に検出された．$C_{20:4}$は必須脂肪酸として重要であり，一般の食品中ではアラキドン酸とされているが，魚油から検出される$C_{20:4}$はアラキドン酸のみではなく，半分以上は8，11，14，17-eicosatetraenoic acidであるという報告[12]がある．今回分析した食事中の$C_{20:4}$は魚由来の脂肪が多いことから，大部分は8，11，14，17-eicosatetraennoic acidと考えられる．$C_{20:5}$は近年，血栓症に対する効果があることからEPA (eicosapentaenoic acid)として注目されている．クロマトグラム上では，$C_{22:0}$と一部ピークが重なり，ピークの大きいものでは同定が困難な場合もあったが，$C_{22:0}$の食品中の存在量は一般的に少ないことから$C_{20:5}$がほとんどであるとして差しつかえないものと思われる．$C_{22:6}$は$C_{20:5}$と共に，ラットの血清コレステロール低下作用が認められている．I日の夕食では$C_{20:5}$，$C_{22:6}$はそれぞれ5.1％，8.8％と他の食事に比べ高い値を示した．献立に魚が多く使用されたことを反映したものであろう．

食事中の脂肪の栄養評価をする場合，エネルギー源としての量的な面と生理作用に関する質的な面がある．後者を表す指標として米国の食事目標（改訂2版[13]）による飽和脂肪酸（S），一価不飽和脂肪酸（M）および多価不飽和脂肪酸（P）の比（以下SMP比と略す）がある．すなわち食事から摂る総エネルギーの30％以下を脂肪に依存するようにし，そのうちSを10％以下，Pを同じく10％，残余をMとすべきであるとしている．つまりS：M：Pを1：1：1に近づけるようにするということである．また日本においては脂肪摂取量を考慮して不飽和脂肪酸（以下unsatと略す）とSの比を2：1とすることを目標とするが，少なくとも1：1より低下させないことが望ましい[14]としている．また兼松ら[15]はマーガリンの脂肪の評価にP/S値を指標として用い，0.7以上が望ましいとしている．そこで，これらの指標をそれぞれの食事について算出し(表2)検討を行った．

unsat/s値は，いずれの食事も1以上であり，その範囲は1.5～5.0であった．4以上を示した食事はI日の昼食(以下I-昼のように表わす)，II-昼であり，これらの食事はいずれも$C_{18:2}$がそれぞれ43.1％および48.8％と他の食事に比べ高く，また$C_{16:0}$はそれぞれ12.4％，11.0％と逆に低い値を示した．いずれの食事も調理に用いた植物油が反映したものであろう．P/S値はIII-昼を除いていずれも0.7以上であり，その範囲は0.5～3.4であった．III-昼は9食中唯一の畜肉を献立に用いた食事であり，一価不飽和脂肪酸含量の高い獣脂を反映したものであろう．このSMP比は1：1：0.5と他の食事に比べPが低い値を示した．

池畑ら[16]は日本人の平均的献立を作製し，これについて脂肪酸組成分析を行い1日あたりのP含量の平均値30％を得ている．今回の分析結果から3日間の食事のSMP比の平均値を求めると1：0.9：1.6であり，また1日あたりの平均P含量は44％であった．これらの値

表1　老人ホーム食事の献立内容

	献立	(g)	献立	(g)	献立	(g)
	朝食		昼食		夕食	
I日	米麦飯 米	50	米飯 米	70	米飯 米	70
	麦	25	かきあげ エビ	30	スープ あこうだい	40
	みそ汁 ジャガイモ	30	グリーンピース	10	ネギ	10
	わかめ	1	卵	5	あじ	70
	みそ	20	小麦粉	10	生姜	3
	サケ缶 サケ缶	30	油	10	煮物 ナス	50
	おろし 大根	30	大根	30	いんげん	30
	漬物 キャベツ	25	きんぴら ニンジン	20	油	3
	牛乳	200	ごぼう	20	漬物 キュウリ	25
			油	3		
			ひたし 小松菜	60	フルーツ モモ	150
			油揚	3		
			漬物 キャベツ	25		
	エネルギー (kcal)	501		549		541
	たんぱく質 (g)	22.2		17.1		27.2
	脂質 (〃)	11.1		16.1		11.6
	糖質 (〃)	77.9		82.1		80.4
II日	米麦飯 米	50	米飯 米	70	米飯 米	70
	麦	25	魚甘酢 すずき	70	スープ ベーコン	10
	みそ汁 もやし	30	小麦粉	5	ジャガイモ	100
	油揚	2	油	7	キャベツ	40
	みそ	20	ケチャップ	5	ニンジン	20
	煮付 カボチャ	80	オクラ	10	めざし	40
	漬物 ナス	25	煮物 いんげん	40	炒め煮 ナス	80
	牛乳	200	油揚	5	油	3
			しいたけ	2	煮豆 ウズラ豆	30
			和え物 小松菜	50	フルーツ もも	150
	エネルギー (kcal)	496		465		677
	たんぱく質 (g)	17.5		22.6		20.3
	脂質 (〃)	10.4		11.8		17.5
	糖質 (〃)	83.6		69.5		108.4
III日	米麦飯 米	50	米飯 米	70	米飯 米	70
	麦	25	焼肉 豚肉	60	焼魚 サケ	70
	みそ汁 豆腐	50	シシトウ	10	大根	30
	わかめ	1	ごま和え ほうれんそう	60	炒めもの たかな	20
	みそ	20	ごま	3	油	2
	混布巻	20	煮物 しいたけ	3	卵とじ 高野豆腐	5
	漬物 ナス	25	ごぼう	30	ニンジン	20
	牛乳	200	漬物 キュウリ	25	きぬさや	20
			フルーツ スイカ	200	卵	30
	エネルギー (kcal)	kcal 461		528		474
	たんぱく質 (g)	17.2		22.5		29.0
	脂質 (〃)	5.6		10.7		11.8
	糖質 (〃)	121.6		88.2		60.9

表2. 老人ホーム食事の脂肪酸組成

	I 日			II 日			III 日		
fatty acid	朝	昼	夕	朝	昼	夕	朝	昼	夕
									(%)
14：0	3.5	0.2	4.9	0.4	0.8	2.3	0.9	1.2	7.0
16：0	16.7	12.4	22.2	12.4	11.0	23.6	23.0	23.4	18.9
18：0	4.4	3.9	5.5	3.2	3.9	10.0	5.7	14.3	5.9
18：1	14.7	22.6	15.3	32.9	26.0	28.8	14.9	37.5	23.6
18：2	27.8	48.8	15.8	37.7	43.1	25.4	34.6	18.4	21.3
18：3	5.2	7.7	2.8	9.3	7.8	3.8	5.4	1.8	3.0
20：0		0.3	0.1	0.5	0.4	0.1	0.4	0.3	
20：1	6.5	1.3	4.1	0.4	1.0	0.4		0.7	3.0
20：2			0.1		tr				0.2
20：3			0.2		0.2	0.2		0.3	
20：4	0.5	0.2	1.5	0.3	0.4	0.6	0.1	0.2	1.2
20：5+22：0	3.1	0.6	5.1	0.2	0.9	0.8			2.8
22：1	9.1	0.6	4.9	0.5	0.4	tr			2.5
22：6	2.9	0.5	8.8		1.7	0.9			2.5
others	5.7	0.9	8.7	2.1	2.1	3.2	15.0	1.9	8.1
unsat/sat	2.7	4.9	1.6	4.9	5.0	1.7	1.8	1.5	1.8
PUFA/sat	1.48	3.40	0.88	2.87	3.29	0.85	1.34	0.52	0.88
S：M：P(S=1)									
M	0.9	1.4	0.6	2.0	1.7	0.8	0.5	1.0	0.8
P	1.6	3.4	0.8	2.9	3.4	0.9	1.3	0.5	1.0

S, sat: saturated fatty acid, unsat: unsaturated fatty acid,
P, PUFA: poly-unsaturated fatty acid, M: mono-unsaturated fatty acid
tr: <0.1 %

から，今回分析を実施した食事は脂肪摂取に関する限り，多価不飽和脂肪酸含量も高く良好な食事であるといえる．一方池畑ら[16]も指摘しているように，多価不飽和脂肪酸の摂取量の増大に比例してビタミンE不足が生じる危険性が高くなることを考慮しなければならない．今回我々はビタミンEの分析をしていないので，この点については今後検討すべき課題としたい．

2．乳児院の食事 3日間の食事について，それぞれの献立内容を表3に示した．また食品成分表から求めた一般成分値およびエネルギー（Atwater係数による）を合わせて示した．脂肪酸組成の分析結果および指標の値を表4に示した．

脂肪酸組成については，それぞれの食事に共通して$C_{16:0}$，$C_{18:0}$の飽和脂肪酸および$C_{18:1}$が主要成分であった．これら三成分がそれぞれの食事に占める割合は43.4％～78.2％であった．個々の脂肪酸についてみると，$C_{20:1}$は痕跡程度のものを除いて9食中5食に，また$C_{22:1}$は4食に検出された．$C_{20:4}$は全ての食事に検出された．$C_{20:5}$および$C_{22:6}$はいずれも含量が低いか，あるいは全く検出されなかった．

unsat/S値は0.7～1.3の範囲にあり，1未満の食事は9食中，4食であり，これらは，いずれも$C_{16:0}$のみで30.9％～39.6％を占め，他の食事に比べ高い値を示した．またP/S値は0.16～0.67であり，いずれも指標の基準0.7に満たなかった．SMP比については，Mは0.5～0.8，Pは0.2～0.7の範囲であり，いずれも1未満であった．3日間の食事についてのSMP比の平均値は1：0.6：0.5であり，これは目標値の約½であった．また1日あたりの平均P含量は23％であり，池畑ら[16]の日本人の平均献立のP含量を下回っていた．老人ホームの食事に比べ，食事全体を通じて飽和脂肪酸含量が高い傾向を示した．

一方，これらの食事の1日あたり脂肪エネルギー比を求めると，それぞれ36.2％，44.1％および29.6％，平

表3. 乳児院食事の献立内容

	朝食 献立	((g)	昼食 献立	(g)	夕食 献立	(g)
I日	サケまぜごはん		にぎりめし		冷しそば	
	米	40	米	40	そば	35
	サケ	10	たらこ	5	揚玉	10
	マーガリン	3	こんぶ	5	きゅうり	10
	みそ汁		のり		チェリー	5
	玉ネギ	10	肉巻き		肉詰	
	わかめ	5	豚肉	20	ピーマン	15
	みそ	12	さつまいも	30	豚挽肉	20
	フルーツ		バター	1	玉ネギ	6
	バナナ	50	油		卵	2
	牛乳	100	ウインナソテー		油	2
	おやつ		ウインナ	20	キャベツ甘酢	
	牛乳	100	油	1	キャベツ	20
			カボチャグラッセ		ハム	15
			カボチャ	25	パイン	15
			バター	2	ニンジン	5
			きゅうりスティック		フルーツ	
			きゅうり	25	スイカ	60
			フルーツ		夜食	
			グレープフルーツ	50	クッキー	
			牛乳	100	バター	8
			おやつ		卵黄	4
			菓子	20	小麦粉	20
			牛乳	100	レーズン	3
	エネルギー(kcal)	362		596		560
	たんぱく質(g)	13.0		18.3		12.9
	脂肪(g)	10.4		25.2		25.1
	糖質(g)	53.7		74.1		68.5
II日	ひじきごはん		菓子パン	60	米飯	40
	米	40	カニ玉		マーボ豆腐	
	ひじき	3	カニ	15	豚挽肉	10
	鶏挽肉	10	卵	40	ネギ	10
	油揚	3	ネギ	5	ニンジン	3
	油	5	片栗粉	2	油	2
	みそ汁		サラダ		きゅうり	15
	キャベツ	15	きゅうり	10	ハム	10
	ナルト	10	春雨	3	サラダ	
	みそ	12	レタス	10	卵	7
	フルーツ		ハム	10	キャベツ	15
	リンゴ	40	マヨネーズ	3	ワンタンスープ	
	牛乳	100	ポテト炒め		ワンタン皮	10
	おやつ		じゃがいも	30	豚挽肉	5
	牛乳	100	玉ネギ	15	ネギ	5
			バター	3	ほうれんそう	5
			スープ		フルーツ	
			豚肉	10	スイカ	60
			キャベツ	10	夜食	
			グレープフルーツ	50	チーズ	20
			おやつ			
			牛乳	100		
			菓子	20		
	エネルギー(kcal)	379		559		422
	たんぱく質(g)	14.1		20.0		16.0
	脂肪(g)	13.9		21.9		37.8
	糖質(g)	49.7		71.3		51.8
III日	納豆ごはん		サンドイッチ		うどん	
	米	40	パン	60	乾めん	20
	納豆	5	生クリーム	10	ニンジン	10
	卵	10	くり	10	豚肉	10
	みそ汁		ジャム	3	玉ネギ	10
	ナス	20	マーガリン	3	いんげん	5
	わかめ	10	卵	5	魚マリネ	
	みそ	12	マヨネーズ		アジ	30
	フルーツ		肉炒め		小麦粉	5
	メロン	50	牛肉	30	油揚	2
	牛乳	100	玉ネギ	10	きゅうり	15
	おやつ		コーン	10	トマト	20
	牛乳	100	いんげん	5	玉ネギ	5
			油	2	ラディッシュ	10
			チーズポテト		油	1
			ジャガイモ	30		
			バター	5		
			野菜マリネ			
			レタス	15		
			きゅうり	15		
			トマト	20		
			油	1		
			スープ			
			そうめん	10		
			ナルト	10		
			アイスクリーム			
			おやつ	30		
			クラッカー	20		
			フルーツケーキ			
			カスタードクリーム	10		
			もも	10		
			パイン	10		
			オレンジ	10		
			牛乳	100		
	エネルギー (kcal)	323		727		339
	たんぱく質(g)	12.8		24.7		13.9
	脂肪(g)	9.0		24.4		12.6
	糖質(g)	47.0		103.9		43.1

表4. 乳児院食事の脂肪酸組成

	I 日			II 日			III 日		
fatty acid	朝	昼	夕	朝	昼	夕	朝	昼	夕
									(%)
14：0	13.2	5.2	4.0	9.4	4.8	5.6	10.2	3.3	14.9
16：0	30.9	27.8	28.6	31.4	26.4	25.1	33.0	39.6	17.7
18：0	12.0	13.4	10.6	12.8	10.0	12.6	13.9	11.5	5.5
18：1	25.9	37.0	31.6	28.7	33.4	27.5	27.4	24.4	20.2
18：2	7.1	8.7	18.0	11.7	16.4	22.9	9.6	8.7	16.9
18：3	1.4	1.2	1.7	1.5	3.0	2.9	1.4	1.1	3.9
20：0	tr	0.4	tr	0.2	0.4	0.4	0.2		0.5
20：1	2.4	1.1	tr	0.2	0.7	0.1	tr		tr
20：2	tr	tr			tr	0.1	0.1		
20：3	tr	0.1			tr	0.1	tr		
20：4	0.2	0.3	2.8	0.2	1.4	0.2	0.3	8.0	5.2
20：5＋22：0	0.8	0.5		0.1	0.4	0.2	0.1		1.5
22：1	1.4	0.3			0.4				1.4
22：6		0.3	tr				0.1		
others	4.6	3.3	2.4	3.8	2.5	2.4	3.6	3.3	12.4
unsat/sat	0.7	1.0	1.3	0.8	1.3	1.2	0.7	0.8	1.2
PUFA/sat	0.16	0.22	0.52	0.25	0.50	0.59	0.20	0.33	0.67
S：M：P(S=1)									
M	0.5	0.8	0.7	0.5	0.8	0.6	0.5	0.5	0.5
P	0.2	0.2	0.5	0.2	0.5	0.6	0.2	0.3	0.7

S, sat: saturated fatty acid, unsat: unsaturated fatty acid,
P, PUFA: poly-unsaturated fatty acid, M: mono-unsaturated fatty acid
tr: <0.1 %

均36.6％であり，これは栄養所要量の1～2才児の摂取基準を上回る値であった．

乳幼児期は成長期であることから，エネルギーデンシティの高い脂肪の供給を必要とするが，アテローム性動脈硬化症の長期にわたる予防についても注意を配る必要があり，そのためには脂肪酸要求を満たす多価不飽和脂肪酸に富んだ適当な脂肪源を用いる必要があるとされている[17]．今回の食事は施設という種々の制約下での献立作製によるものであることを考慮しなければならないが，SMP比，日本人の栄養所要量[14]において目標とする摂取比率に達していない食事が多くみられた．脂肪摂取に関する限りでは，改善の余地のある食事であるといえよう．栄養上の欠陥は成長期に最も影響が大きいことから，乳幼児の食事内容は十分に検討されるべきであろう．

文　献

1) 厚生省公衆衛生局栄養課編：国民栄養の現状（昭和59年版），32，1984，第一出版
2) 香川靖雄，西村薫子，佐藤準子他：栄養学雑誌，38，283，1980
3) 金田尚志：人間の栄養における食用油脂の役割，40，1980，医歯薬出版
4) 井口正雄，菊谷典久，友松俊夫，道口正雄他：東京衛研年報，33，246，1982
5) Official methods of the A. O. A. C., 12th Ed., Ed. William Horwitz,523,1975,Association of Official Analytical Chemists, Whashington
6) 日本薬学会編：衛生試験法注解，113，1973，金原出版
7) 日本油化学協会：基準油脂分析試験法，2．4．20．2-77，1977
8) 厚生省公衆衛生局栄養課編：昭和54年改定日本人の栄養所要量：45，1979，第一出版
9) Vles, R. O. :The Role of Fats in Human Nutri-

tion, 433, 1975, Academic Press (London)
10) 國崎直道, 鷹田 馨, 白野洋子他：栄養と食糧, 37, 86, 1984
11) 金田尚志：人間の栄養における食用油脂の役割, 53, 1980, 医歯薬出版
12) 板橋 豊, 高木 徹：油化学, 29, 855, 1980
13) Select Comittee on Nutrition and Human Needs United States Senate:Dietary Goals for the United States, 2nd Ed., 1977, U. S. Government Printing Office, Whashington
14) 厚生省公衆衛生局栄養課編：昭和54年改定日本人の栄養所要量, 53, 1979, 第一出版
15) 兼松 弘, 木下葉子, 丸山武紀, 新谷 勛：栄養と食糧, 33, 423, 1980
16) 池畑秀夫, 田中東子, 上嶋千鶴子：ビタミン, 38, 253, 1968
17) 金田尚志：人間の栄養における食用油脂の役割, 36, 1980, 医歯薬出版

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 252-255, 1984

高速液体クロマトグラフィーによる食肉中のニコチン酸及びニコチン酸アミドの分析

大石充男*, 大西和夫*, 中村弘*, 坂井千三*

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Nicotinic acid and Nicotinamide in Meats

MITSUO OISHI*, KAZUO ONISHI*, HIROSHI NAKAMURA*and SENZO SAKAI*

Keywords: ニコチン酸 nicotinic acid, ニコチン酸アミド nicotinamide, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography, 食肉 meat, アルミナカラムクロマトグラフィー alumina column chromatography

まえがき

ニコチン酸（NA）及びニコチン酸アミド（NAA）は食品添加物として種々の食品にビタミン強化剤として使用されている[1]. また, 両添加物は最近まで食肉製品の発色剤である亜硝酸の代替品として用いられていたが, 過量のNAを使用した肉を摂食し一過性の食中毒を起した事例が報告されるなど, 食品衛生上の問題となっていた. 昭和57年にNA及びNAAは食肉並びに鮮魚介類（鯨肉を含む）に使用することが禁止された[2]. それらに関連して食品中におけるNA及びNAAの自然含有量を正確に把握することが必要となってきた.

食品中のNA及びNAAの分析法としては比色法[3], 微生物定量法[4], ガスクロマトグラフィー法[5], 液体クロマトグラフィー（HPLC）法[6~9]などが開発されている. しかしNA, NAAの分離分析, 操作の簡易, 迅速を考慮するとHPLC法が最も適当な方法と思われる. HPLC法によるNA, NAAの分離分析にはイオンペア試薬を用いる方法[7,8]が報告されているが, 本法は食品中の共存物質の妨害による定量上の問題がある.

そこで著者らはこれら妨害物質の除去法並びにNA, NAAをHPLCで分離分析する改良法を検討した. さらに, その改良法で牛肉及び豚肉における部位別のNA及びNAAの含有量を調査したのでそれらの成績を併せて報告する.

実験方法

1. 試料 都内の食肉処理場, 小売店及びスーパーより入手した各部位別牛肉45検体及び豚肉44検体を用いた.

2. 試薬 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

アルミナカラム：カラムクロマトグラフィー用中性アルミナ（Woelm社製）8 gをメタノールに懸濁させて内径2 cm, 長さ30 cmのクロマト管に充塡しメタノール20 m*l*で洗浄した.

標準溶液：NA及びNAA（和光純薬特級品）を水に溶かし100 μg/m*l*の濃度にした.

その他の試薬はすべて特級品を用いた.

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 III型

4. 試験溶液の調製 細切した試料10 gをブレンダーカップにとり, メタノール50 m*l*を加え2分間ホモジナイズした後, 抽出液を減圧ろ過した. 残査をメタノールで洗いこの洗液を先のろ液とあわせてメタノールで100 m*l*とし, この50 m*l*をアルミナカラムに通し, さらにメタノール40 m*l*で溶出した. この溶出液を50°で2～3 m*l*まで減圧濃縮したのち, 5％メタノールを加えて20 m*l*としNAAの試験溶液とした. また, 先のアルミナカラムに0.1 M炭酸水素ナトリウム50 m*l*を流し, 最初の5 m*l*はすて, 次の40 m*l*をNAの試験溶液とした. 各試験溶液は0.8 μmのミクロフィルターでろ過して用いた.

5. HPLCの測定条件 カラム：Lichrosorb RP-18,

* 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

5 μm (Merck 社) 4×300 mm, 移動相：0.1 M 酢酸ナトリウム-0.01 M TBA 溶液(pH 5, 酢酸)：メタノール=10：2, 流速：0.6 m*l*/min, 測定波長：261 nm, 感度：0.04 AUFS, ガードカラム：Unisil C-18, 10 μm, 注入量：10 μ*l*

結果と考察

1．分析法の検討

1) 抽出及び HPLC 条件 試料からの抽出溶媒は抽出率, カラムクロマト処理を考慮してメタノールを用いた. HPLC 条件は種々検討した結果 NA, NAA の分離, 感度の点ですぐれた ODS 系カラムを用いイオンペア試薬による HPLC 法[8]を用いることとした.

2) クリーンアップの検討 牛もも肉から NA, NAA をメタノールで抽出し, 抽出液をそのまま本法の HPLC 条件で測定すると Fig. 1 A に示すように妨害物質のため NAA の定量が不可能である. そこでアルミナカラムを用いるクリーンアップ法を検討した. しかし, HPLC 測定時の妨害となる共存物質を分離し NA 及び NAA を同時に溶出する溶媒に適当なものがないので NA, NAA をそれぞれ別々に溶離する方法を検討した.

(1) NAA アルミナカラムからの NAA の溶出溶媒としてメタノール, エタノール, 酢酸エチルについて検討したところメタノールによる溶出率が最良であった. Fig. 2 にメタノールを用いた溶出パターンを示す. NAA はメタノール 28 m*l* までに完全に溶出されたが確実性を考慮し 40 m*l* で溶出することとした. Fig. 1 B に牛もも肉のメタノール抽出液をアルミナカラム処理した後のクロマトグラムを示す.

(2) NA NA の溶出溶媒として炭酸ナトリウム, 炭酸水素ナトリウム, 水酸化ナトリウム, 塩酸, 硫酸の各 0.1 M の水溶液について検討した. その結果酸性溶液より塩基性溶液の方が溶出率が良好であった. 各塩基性溶液はいずれも同様の溶出率を示したが炭酸水素ナトリウムは他の 2 者より HPLC の測定時における妨害ピークが少ないためこれを用いた. 炭酸水素ナトリウム濃度は次のようにして決定した. 各アルミナカラムに NA の 1 mg を入れ 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 及び 0.3 M の各炭酸水素ナトリウム溶液 50 m*l* を流したところ 0.1 M 以上

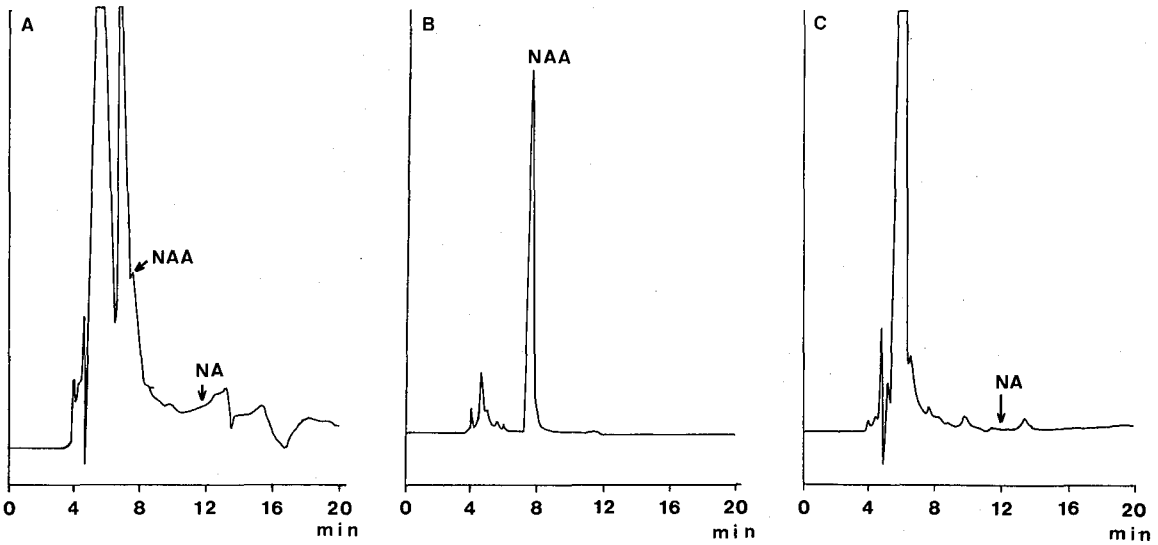


Fig. 1. Liquid chromatograms of beef extract
(A), before the alumina treatment
(B)(C), after the alumina treatment
Beef extract was adsorbed on the alumina column and was eluted with methanol(B) and then with 0.1M $NaHCO_3$(C)
Conditions: column, LiChrosorb RP-18(4×300mm); solvent, methanol-acetate buffer(pH5) containing 0.1M sodium acetate and 0.01M tetrabutylammonium hydroxide(2:10); flow rate, 0.6 m*l*/min; detector, UV 261nm; sample size, 10μ*l*; sensitivity, 0.04AUFS

で良好な回収率を得ることができた. Fig. 3 に NA の溶出パターンを示す. NA は 0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶液 28 m*l* で完全に溶出した. また, HPLC の試験溶液のメタノール含量が 10 %以上になると HPLC の感度が悪くなるため 0.1 M 炭酸水素ナトリウムで溶出する時, 最初の 5 m*l* をすて次の 40 m*l* を用いた. Fig. 1 C は牛もも肉のメタノール抽出液をアルミナカラム処理した後の 0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶出液のクロマトグラムである.

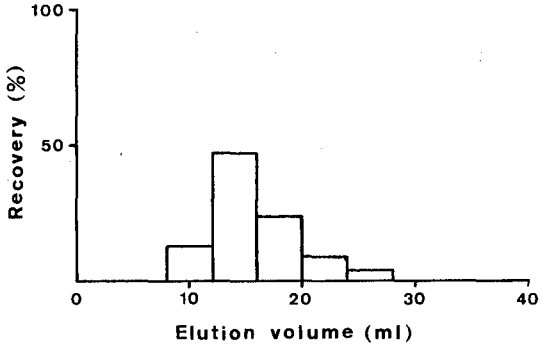


Fig. 2. Elution pattern of NAA from alumina column with methanol

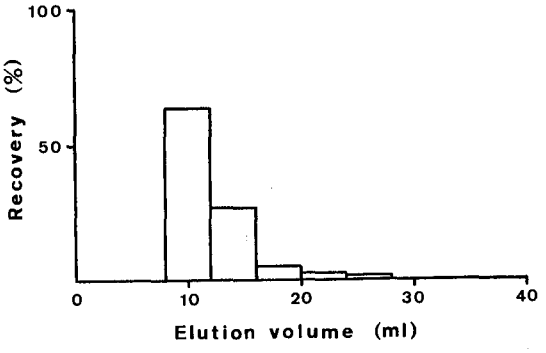


Fig. 3. Elution pattern of NA from alumina column with 0.1M $NaHCO_3$

(3) **検量線及び定量限界** NA, NAA の検量線は 10～200 ng の範囲で直線性を示した. 本法による定量限界は NA が 1 mg %, NAA が 0.5 mg %であった.

(4) **添加回収実験** 牛もも肉及び豚もも肉に NA, NAA 各 5.0 mg %の濃度で添加した時の平均回収率と変動係数を Table 1 に示した. NA, NAA いずれも 90 %以上で良好な回収率を得た. また, 変動係数は 4 %以下であった.

2. 食肉中の NA, NAA の含有量 牛肉及び豚肉の NA, NAA の含有量について部位別(かた肉, かたロース肉, もも肉, ロース肉, ばら肉, 肝臓, 心臓) に分析した結果を Table 2 に示した. NAA は牛肉及び豚肉とも全ての部位から検出された. 牛肉の NAA の含有量は平均値で高い順に肝臓, 心臓, もも肉, ロース肉, かたロース肉, かた肉, ばら肉であった. 豚肉では肝臓, もも肉, 心臓, ロース肉, ばら肉, かたロース肉, かた肉の順であった. 牛肉及び豚肉ともいずれの場合も肝臓に多く, それぞれ 10.8～12.4 mg %, 9.8～11.8 mg %であった. また, 牛心臓では 5.8～10.5 mg %であったが他の部位では牛肉で 1.7～5.8 mg %, 豚肉では 3.5～7.6 mg %であった. 一方 NA は牛肝臓の一部で 1.3 mg %検出されたのを除いて他の全てが本法の定量限界以下であった. したがって食肉から NA が多量に認められる場合は人為的に添加されたものと考えられる. 本調査による試料のうち牛ロース肉に NA を 34.3 mg %検出されたものがあったがこれは明らかに人為添加があったものと思われる.

Table 1. Recovery of NAA and NA Added to Round and Ham

Sample	Added (mg%)	NAA		NA	
		Recovery* (%)	CV (%)	Recovery* (%)	CV (%)
Round	5.0	99.1	3.3	92.2	1.9
Ham	5.0	97.0	3.2	96.4	0.9

*: mean of 5 trials
CV: coefficient of variation

Table 2. Content of NAA and NA in Beef and Pork

	N	NAA		NA	
		Range(mg %)	Mean(mg %)±SD	Range(mg %)	Mean(mg %)±SD
Beef					
Chuck	5	2.0~ 5.2	3.7±1.2		ND
Chuck loin	5	2.9~ 4.3	3.8±0.6		ND
Round	9	3.6~ 6.1	4.6±0.9		ND
Loin	8	2.5~ 5.8	4.2±1.1	ND~34.3	4.3±12.1
Plate	8	1.7~ 4.7	3.3±0.9		ND
Liver	5	10.8~12.4	11.6±0.6	ND~ 1.3	0.3± 0.5
Heart	5	5.8~10.5	8.4±2.4		ND
Pork					
Picnic shoulder	5	3.5~ 5.9	5.0±1.0		ND
Boston butt	5	4.8~ 6.1	5.5±0.5		ND
Ham	9	4.4~ 7.6	6.2±1.0		ND
Loin	10	3.6~ 7.2	5.6±1.3		ND
Belly	5	5.1~ 6.7	5.6±0.7		ND
Liver	5	9.8~11.8	10.5±0.8		ND
Heart	5	5.3~ 7.2	6.0±0.8		ND

N : number of samples
SD: standard deviation
ND: NA,<1.0mg%

まとめ

HPLCによる食肉中のNA及びNAAの分析法の検討を行った．定量の妨害となる共存物質の除去はアルミナカラムを用いるクリーンアップ法が有効であった．本法による牛もも肉及び豚もも肉への添加回収実験ではすべて90%以上の回収率であり変動係数も4%以下であった．また，定量限界はNAが1.0 mg%，NAAが0.5 mg%であった．牛肉及び豚肉について部位別にNA及びNAA含有量を調査したところすべての検体よりNAAが1.7~12.4mg%検出された．しかし，NAは牛肝臓の一部に1.3 mg%検出されただけであった．

謝辞 本研究にあたり試料収集に御協力いただいた東京都衛生局食品監視課ならびに立川食肉センターの方々に深謝いたします．

文 献

1) 石館守三監修：第四版食品添加物公定書解説書，B-708，1979，広川書店
2) 昭和57年2月27日厚生省告示環食第52号
3) 日本薬学会編：衛生試験法注解，215，1980，金原出版
4) 日本薬学会編：衛生試験法注解，223，1980，金原出版
5) 宮野啓一，今井田雅示：大阪府立公衆衛生研究所研究報告食品衛生編，13，37，1982
6) Williams, R. C., Baker, D. R. and Schmit, J. A.: *J. of Chromatogr. Sci.*, 11, 618, 1973
7) 北田善三，井上雅成，玉瀬喜久雄，芋生真子，蓮池秋一，佐々木美智子：栄養と食糧，35，121，1982
8) 吉田宏三，山本行隆，藤原光雄：食衛試，23，428，1982
9) 藤田忠雄，神戸 保，大柴恵一，佐々木清司：生活衛生，27，30，1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 256-264 1984

食品の製造工程における細菌汚染の検討
洋生菓子について

神　真知子*, 池島伸至*, 新井輝義*
入倉善久*, 坂井千三*

Contamination of Microorganisms through the Manufacturing Process of Foods in the Case of Foreign-style Undried Confectioneries

MACHIKO JIN*, NOBUYUKI IKEJIMA*, TERUYOSHI ARAI*,
YOSHIHISA IRIKURA* and SENZO SAKAI*

Keywords: 洋生菓子 foreign-style undried confectionery, 製造工程 manufacturing process, 汚染源 contamination sources, 細菌叢 microflora, 衛生管理 sanitation control

緒　言

細菌学的立場からみた食品の安全性の確保および品質管理上の指標として大腸菌群および一般生菌数の測定が広く実施されている．しかし，その対象は端的にいって食品の流通過程における一点をとらえた検査の場合が多い．

食品の細菌汚染防止対策を考える場合，それぞれの食品の特性を配慮して原料から製品，さらに消費までの一貫した汚染経過を明らかにしておくことが理想的といえよう．

しかし，実際には前述の汚染経過を追うことは極めて困難である．そこで著者らは食品の細菌汚染経過のなかで最も重要と考えられる製造工程を取り上げ，これまでに細菌汚染頻度が高いゆでめんおよび魚介類のねり製品であるつみれについて検討してきた．

今回は，食中毒事例[1]もあり，また一般に広く流通している洋生菓子を対象にその製造工程における細菌の汚染経過ならびに，製品の保存等について検討を加えたのでその成績を報告する．

実験材料および方法

洋生菓子　1979～1983年の5年間に東京都下多摩地区で製造販売されていた洋生菓子732件を対象に，採取前の保管温度および時間を調査すると共に，細菌学的検査を実施した．

製造工程の調査対象　製造工程の汚染源調査には，多摩地区に存在する洋生菓子製造工場2社（以下A工場およびB工場と称する）を選び，それぞれの工場の製造機械および器具類，施設，作業員の手指の拭き取り，ならびに洋生菓子の原材料，中間製品，製品等を対象とした．

機械器具類，施設，従業員手指については定法[2]に準じ，約100 cm²を拭き取ったものを，その他の材料はそれぞれ適当量を採取した．

細菌学的検査　採取した各種材料は定法[3]に従って，生菌数，大腸菌群数，黄色ブドウ球菌数，サルモネラおよびセレウス菌数を測定した．なお，生菌数は好気条件下で20℃，3日間および35℃，2日間の培養により求めた．

保存試験　保存試験に供試した洋生菓子は，前述のAおよびB工場の製品を用いた．製品を滅菌eva樹脂袋に採取し，直ちに実験室に持ち帰り，10℃および20℃の恒温器内に保存し経日的に細菌検査に供した．細菌検査項目および方法は前記のとおりである．なお，恒温器内の温度管理には，12打点式自記温度記録計（タカラサーミスタ，R 117-3145，TXA-36）を用いた．

菌株の分離および同定　各試料の生菌数測定を行った標準寒天平板から試料1件につき約20集落ずつを無作為に釣菌し，これらの菌株について，Vanderzantら[4]の分類法およびBergey's Manual[5]に従って菌属の同定を行った．

結　果

市販洋生菓子の販売状況および衛生

細菌学的検査対象として採取された市販洋生菓子の保

* 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

管温度および製造後経過時間を Table 1 および 2 に示した．保管温度は Table 1 に示すごとく，明らかな例だけでもその約 78％は 6～15℃で保管されていた．また Table 2 に示すように保管時間は製造後 24 時間以内のものが 90％以上であった．

次に生菌数の分布を Table 3 に示した．生菌数は 10^3～10^4/g を中心に分布していたが，10^5/g 以上が 247 件（34％）で，うち 10^7/g を超えるものは 39 件（5％）あった．1982 年の収集検体の生菌数と保管温度および保管時間のそれぞれの関係を Table 4 および 5 に示した．Table 4 に示すように，保管温度が 10℃以下でも生菌数が 10^5/g を超えるものが 22 件（29％）あった．また保管時間と生菌数についてみると，製造直後の製品 18 検体中 13 検体（72％）は 10^5/g を超え，うち 2 検体は 10^7/g であった．

過去 5 年間に取り扱った検体の大腸菌群汚染率は約 64％であり，その菌数は＜10/g，10^1/g および 10^2/g を中心に分布していた．なお，大腸菌群数が 10^2/g を超えるものは約 26％あった．

黄色ブドウ球菌が検出されたものは 732 件中 9 件で，その菌数は 10^2/g が 8 件，10^3/g が 1 件であった．黄色ブドウ球菌陽性の洋生菓子の内訳はシュークリーム 4 件，ショートケーキ 3 件，エクレア 1 件，レモンケーキ 1 件で，それらの保管温度，保管時間および生菌数はばらつきがみられ，特徴は認められなかった．

洋生菓子製造工程の細菌汚染状況

生クリームを使用する洋生菓子の製造工程は，Fig. 1 および 2 に示すように，スポンジケーキ台を焼き上げる焼成工程，ホイップクリームを調製する非加熱の工程およびその後スポンジケーキ台にホイップクリーム等を飾り付ける仕上げ工程の 3 工程から成っている．

スポンジ焼成工程では，A工場およびB工場共焼き上

Table 1. Storage temperature of foreign-style undried confectioneries

Storage temperature(℃)	1979	1980	1981	1982	1983	Total(%)
— 0	0	3	4	0	0	7 (1.1)
1— 5	6	9	17	4	5	41 (6.7)
6—10	53	46	114	40	30	283 (46.6)
11—15	50	43	57	21	21	192 (31.6)
16—20	3	1	2	9	2	17 (2.8)
Room temp.	3	21	33	5	7	69 (11.3)
Total	115	123	227	79	65	607 (100)

Table 2. Hours until examination of foreign-style undried confectioneries

Hours until examination	1979	1980	1981	1982	1983	Total(%)
—0	27	43	59	18	52	199 (27.2)
1 —1 2	70	41	102	23	45	281 (38.4)
1 3 —2 4	22	28	59	24	55	188 (25.7)
2 5 —4 8	2	5	10	9	10	36 (4.9)
4 9 —	0	5	4	0	0	9 (1.2)
Unknown	0	1	10	3	5	19 (2.6)
Total	121	123	244	77	167	732 (100)

Table 3. Viable count in foreign-style undried confectioneries

Viable count/g	1979	1980	1981	1982	1983	Total(%)
Less than 10^3	29	18	47	6	33	133 (18.1)
10^3 —	31	30	61	14	36	172 (23.5)
10^4 —	31	27	63	18	41	180 (24.6)
10^5 —	24	21	44	19	32	140 (19.1)
10^6 —	3	16	20	14	15	68 (9.3)
10^7 and over	3	11	9	6	10	39 (5.4)

Table 4. Viable count and storage temperature until examination (1982)

Strorage temp.(℃)	Viable count/g							
	Less than 10^2	10^2—	10^3—	10^4—	10^5—	10^6—	10^7—	10^8—
1— 5		2		2				
6—10		3	6	9	10	10	1	1
11—15		1	5	5	5	1	4	
16—20			2	1	2	2		
Room temp.			1	1	2	1		

Table 5. Viable count and hours until examination (1982)

Hours	Viable count/g							
	Less than 10^2	10^2—	10^3—	10^4—	10^5—	10^6—	10^7—	10^8—
0			3	2	8	3	2	
1—12		3	2	10	3	4	1	
13—24		1	7	5	3	5	2	1
25—48		1	2		5	1		
Unknown		1	1		1			

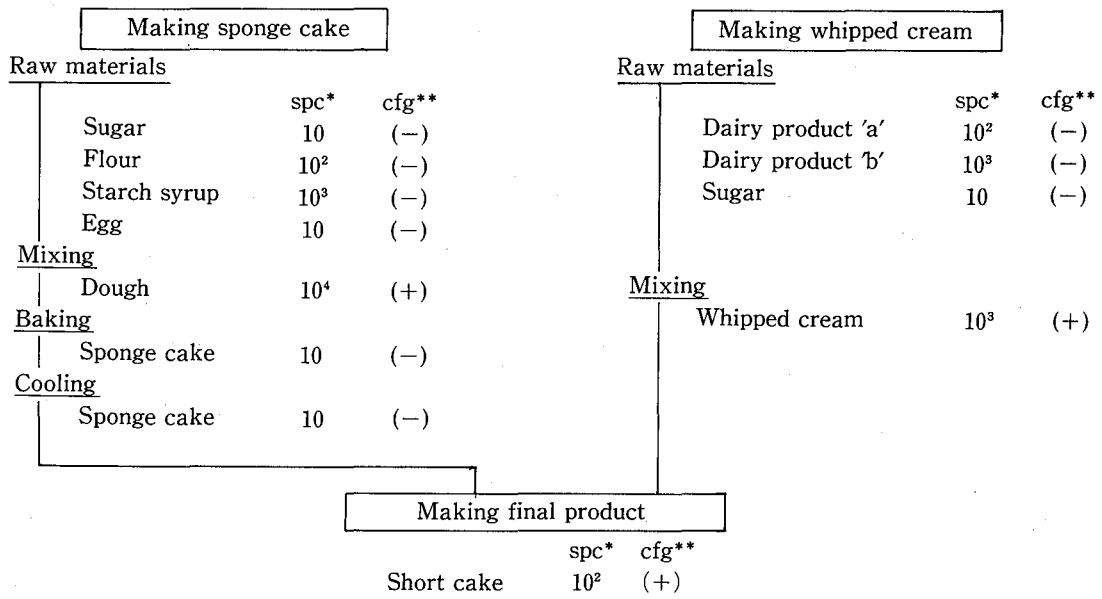


Fig. 1. Process of making raw cream short cake at confectionery A
*: Standard plate counting per gram
**: Number of coliform groups per gram

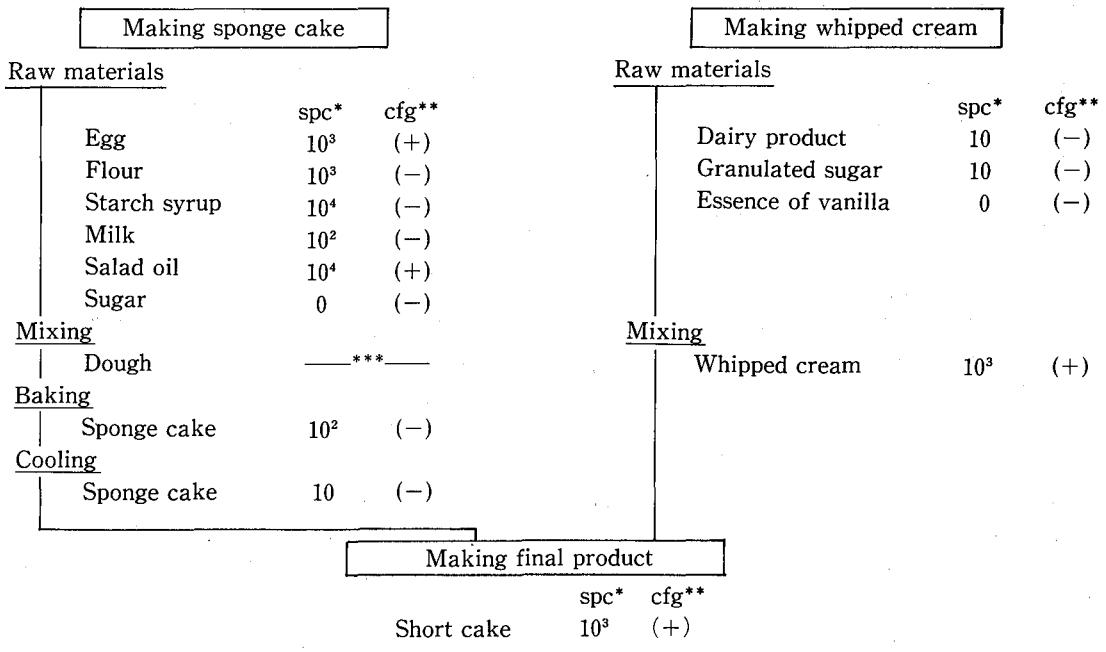


Fig. 2. Process of making raw cream short cake at confectionery B
*: Standard plate counting per gram
**: Number of coliform groups per gram
——***——: Not examined

がったスポンジケーキ台の生菌数は 10^1/g で大腸菌群および黄色ブドウ球菌は陰性であった．

ホイップクリーム調製工程および仕上げ工程の場合は，A工場とB工場とでは若干の差が認められた．すなわち，A工場の場合は，ホイップクリームの原料として乳等を主原料とする食品（乳主原と略す）を2種類使用しており，生菌数はそれぞれ 10^2/g, 10^3/g のオーダーであったが，大腸菌群および黄色ブドウ球菌は陰性であった．また，調製されたホイップクリームについては生菌数が 10^3/g で大腸菌群陽性，黄色ブドウ球菌は陰性であった．なお，このホイップクリームを用いて調製された製品は生菌数が 10^2/g で大腸菌群陽性であったが，黄色ブドウ球菌は陰性であった．

B工場の場合は，成分規格のある乳製品を使用しており，その生菌数は 10^1/g であったが，大腸菌群および黄色ブドウ球菌は共に陰性であった．しかし，調製後のホイップクリームは生菌数が 10^3/g オーダー認められ，大腸菌群も陽性であった．また，これらを使用してでき上がった製品は前述の調製後のホイップクリームと同様の結果であった．

次に，これらの工程で使用される器具類および施設の一拭き取り当りの成績のうち，細菌汚染度の高かったものは，A工場では生菌数が 10^4および大腸菌群陽性のボール，生菌数が 10^5，大腸菌群陽性のゴムベラおよび生菌数が 10^5であったが大腸菌群陰性の絞り袋であった．さらに施設の水道栓の生菌数が 10^7で大腸菌群陽性，洗浄済み器具類をのせるステンレス製棚の生菌数が 10^6～10^7で大腸菌群も陽性であった．従業員の作業中の手指の生菌数は 10^2～10^5で7人中2人は大腸菌群陽性であった．

B工場の場合は，ホイップクリームの調製に使用されるミキシングボールの生菌数が 10^3で大腸菌群陽性，ゴムベラは生菌数が 10^6，大腸菌群陽性，絞り袋は生菌数が 10^5，大腸菌群陽性，飾り付けが終了した後で使用されるスポンジ分割器の生菌数が 10^4，大腸菌群陽性であった．また，施設の水道栓と湯沸器の水栓の生菌数はいずれも 10^5認められ，大腸菌群も陽性であった．飾り付け用作業台の生菌数は 10^5であったが，大腸菌群は陰性であった．さらにミキサー変速機レバーの生菌数は 10^4，大腸菌群陽性であった．

一方，従業員5名の作業中の手指の生菌数は 10^4～10^5で1名は大腸菌群陽性であった．なお，今回調査に供されたA，B両工場より採取された検体から黄色ブドウ球菌は検出されなかった．

洋生菓子の保存試験における生菌数と細菌叢の変化

一般に食料品は製造されてから消費者に渡るまで，かなりの時間が経過している．これは洋生菓子においても例外ではない．そこで，この経過時間すなわち製造後店頭等に保管されている間に，製造過程で汚染した細菌が，どのように増加していくかを検討した．

AおよびB工場より，それぞれ生クリームを用いた洋生菓子とカスタードクリームを用いた洋生菓子を採取し，10℃および20℃の温度条件下に保存して生菌数と細菌叢の変化を検討した．その結果は Fig. 3，4に示すごとく，20℃で保存された場合，両工場由来の2製品はいずれも生菌数の増加が著明であった．すなわち生クリームを用いた洋生菓子では，A工場由来のものが，製造後24時間以内に，10^2/g から 10^4/g に，2日間の保存で 10^8/g に達した．B工場由来のものは，24時間以内に 10^3/g から 10^7/g に達した．

また，カスタードクリームを用いた製品での生菌数の変化は，生クリームを用いた洋生菓子の成績と，ほぼ同様の傾向であった．

一方，10℃で保存した場合の生菌数は，2日間の保存まではすべての製品とも 10^4/g 以下であった．しかしながら保存期間が長くなるにしたがって，生菌数は増加し，6日以降では全て 10^6/g に達した．

次に，20℃に保存した場合の細菌叢の変化を検討した成績を Fig. 3および4に示した．

Fig. 3は，生クリームを用いた製品についての成績で，製造直後のA工場由来品では Yeast が，また，B工場由来品では，*Streptococcus* が主体であった．B工場由来品ではその後も一貫して *Streptococcus* が優勢であったのに対し，A工場由来品の場合は，時間の経過と共に優勢菌の変遷が認められた．保存24時間後にはすでに Yeast は急激に減少し，それに代わって *Enterobacter* および *Bacillus* が優勢となった．保存2日後では，*Enterobacter* が増加し，それ以降は *Streptococcus*, *Micrococcus* 以外のグラム陽性球菌が優勢となった．

Fig. 4は，カスタードクリームを使用した製品の細菌叢の経時変化で，A工場の製造直後の製品における細菌叢は，Yeast および *Bacillus* が主体であった．しかしながら，24時間以降では *Enterobacter* が急激に増殖し，その後腐敗するまで同菌属が優勢であった．またB工場の製造直後の製品では Yeast が上位を占め，保存24時間後では Yeast に加え *Streptococcus* も優勢となり，それ以降では Yeast は減少し，腐敗するまで *Streptococcus*

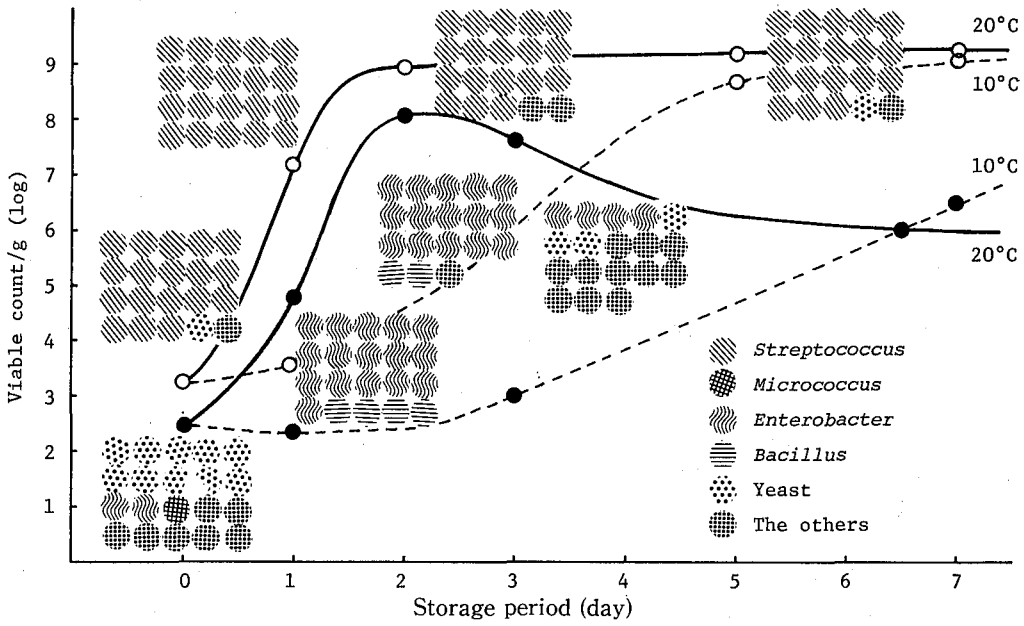


Fig. 3. Time course of viable count/g on raw cream short cakes stored at 10° and 20°C and change of microflora at 20°C
●——● Confectionery A, ○——○ Confectionery B

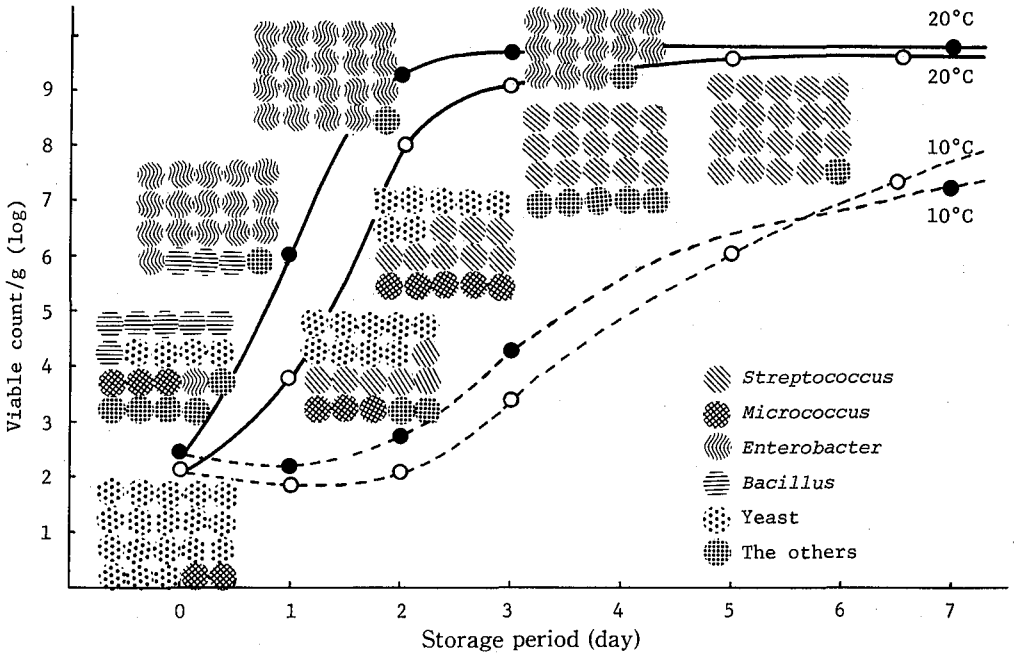


Fig. 4. Time course of viable count/g on custard cream foreigh-style undried confectioneries at 10° and 20°C and change of microflora at 20°C
●——● Confectionery A, ○——○ Confectionery B

が優勢を示した.

考　察

食品の媒介する細菌性疾患の発生を防止するための一貫した食品の衛生管理を進めようとする場合，それぞれの対象食品について，原料から製品に至るまでの細菌の汚染源および汚染経路を十分に把握しておくことが大切である.

我々はすでに市販流通食品のなかで，細菌汚染度が高いか，あるいは汚染の機会が高いと推測される食品を対象に特に製造工程における細菌汚染を検討し，その予防対策等を指摘してきた[6,7].

本報では製品の細菌汚染度の比較的高いと指摘されている洋生菓子を取り上げ，流通過程における保管温度と時間，さらに2つの洋生菓子製造工場をモデルとして，製造工程における細菌汚染の実態を追求した.

その結果から，いくつかの汚染源が明らかにされたが，特にA工場の場合は，既に原料の乳主原の生菌数が 10^2～10^3であって，この汚染がそのまま製品につながっていることが判明した．したがって，原料の細菌汚染対策が重要であり，この点についてはすでに金子ら[8]も同様な指摘をしている.

なお，使用器具類の細菌汚染の影響については，B工場の場合に顕著にみられた．すなわち，ホイップクリームの原料である生クリームはいずれも生菌数 10^1/g のオーダー，大腸菌群陰性であるのに，加工されたホイップクリームは生菌数が 10^3/g オーダーに増加し，大腸菌群も陽性となった．このホイップクリームの汚染度はそのまま製品の汚染度を決定している．したがって，製品の細菌汚染を減少させるには，ホイップクリーム調製工程で直接使用される器具類の衛生状態の改善が必要である．また，飾り付け工程で使用される絞り袋，スポンジ分割器，施設の水道栓，ステンレス製棚および作業従事者の手指の汚れについても同様に衛生管理を必要とする．以上の諸点について確実に管理が実施されれば，B工場で製造されるショートケーキの予想される細菌汚染度は生菌数 10^1/g のオーダー，大腸菌群陰性となるであろう.

本食品は，無菌的でない原料生クリームを非加熱のまま加工し，製品の成分とすること，また使用器具類や作業従事者の手指の細菌汚染を完全に排除することが非常に難しい現状であることから，ある程度の細菌汚染は避けられない．また，本食品は成分上，栄養価に富み，細菌にとっては絶好の増殖の場となる．ところで洋生菓子の場合，今回の調査成績から明らかな様に，保存時間が25時間を越える場合や，保管温度については16～20℃や室温の場合がみられ，製品の生菌数は製造直後であっても 10^5/g を超える場合が半数を超えている.

今回の保存実験の結果では，生クリームおよびカスタードクリームを成分とする洋生菓子は，いずれも20℃で保存した場合，生菌数の増加はわずか12時間で約10倍，18時間で100～1,000倍であって，10℃で保存した場合は，たとえ48時間後でもほとんどそのままの菌数であった．20℃で保存した場合には，細菌の増殖に伴ない，短時間のうちに優勢菌の遷移がみられた．A工場の製品では品目が異なっていても *Enterobacter* が，B工場のカスタードクリームを成分とする洋生菓子では *Streptococcus* がそれぞれ対数増殖期において優勢を示している．これらの菌数はB工場の生クリームを成分とするショートケーキの例を除いて3例とも，製造直後の製品では汚染菌のごく一部であった．したがって洋生菓子の汚染度はけっして高くはないが，食中毒を起す黄色ブドウ球菌の汚染は，保管の仕方によっては増殖し，優勢菌となり得ることが十分に予測される.

以上，洋生菓子を対象に原料，製造工程および製品の保管における細菌汚染の問題点について触れ，また同時に本食品の衛生管理の方法についても述べてきた．しかし，この方法論を実践に移すには，製造者個々の衛生思想の高揚，衛生管理体制の組立て，衛生管理者の養成，作業従事者の教育等を速やかに実施していくことが望まれる.

ま と め

1．東京都下多摩地区内の洋生菓子製造販売店の市販製品732件を対象に保管温度および保管時間を調査し，併せて細菌学的検討を加えた.

市販製品の保管温度状況は製品の約46％が6～10℃に，約31％が11～15℃に保管されていた．また保管時間は90％以上のものが製造後24時間以内であった．これらの生菌数は 10^3～10^4/g を中心に分布しており，10^5/g を超えるものが約34％であった．また，大腸菌群陽性率は約64％と高く，黄色ブドウ球菌陽性率は1.2％であった.

2．洋生菓子製造の2工場を対象に製造工程上における細菌汚染状況を検討した結果，次の点が明らかになった.

1) 非加熱のまま使用される原料の生クリームに 10^2～10^3/g の生菌数の存在はまれでなく，そのまま製品の汚染源となっている.

2) 製造工程で使用される施設，器具類のなかで汚染頻度の高いものは，AおよびB工場とも水道栓，ゴムベ

ラおよび絞り袋であった.

3) 作業者の手指の生菌数は 10^2～10^5で12人中3人は大腸菌群陽性であった.

謝辞 本調査研究を進めるにあたり御協力下さった立川保健所衛生課の各係員に深謝いたします.

(本研究は昭和57年度および58年度当研究所調査研究課題「洋菓子製造時における細菌汚染と汚染菌の動態について」として実施したものである.)

文 献

1) 食中毒統計表, 1976～1983, 東京都衛生局環境衛生部
2) 食品の衛生微生物検査, 倉田 浩, 坂井千三編, 84, 1983, 講談社
3) 食品衛生検査指針Ⅰ, 103, 1974, 日本食品衛生協会
4) Vanderzant, C. and Nickelson, R.: *J. Milk and Food Tech.*, 32, 357, 1969
5) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8 th ed., 1974, Williams & Wilkins, Baltimore
6) 新井輝義, 池島伸至, 神真知子, 入倉善久, 古幡幸子, 松本昌雄: 東京衛研年報, 32-1, 143, 1981
7) 新井輝義, 池島伸至, 神真知子, 入倉善久, 古幡幸子, 松本昌雄: 東京衛研年報, 33, 170, 1982
8) 金子精一: ニューフードインダストリー, 15, 69, 1973

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.*, 35, 265-278, 1984

NO_2とO_3の長期複合暴露によるラットの肺の病理組織学的変化

寺田伸枝*, 池田真悟*, 福田雅夫*, 遠藤圭子*
大澤誠喜*, 鈴木孝人*, 溝口勲*

Pathological Changes in Lungs of Rats After Long-Term Exposure to Mixtures of Nitrogen Dioxide and Ozone

NOBUE TERADA*, SHINGO IKEDA*, MASAO FUKUDA*, KEIKO ENDO*
MASANOBU OHSAWA*, TAKAHITO SUZUKI*and ISAO MIZOGUCHI*

The pulmonary response of rats exposed to 0.15 ppm nitrogen dioxide (NO_2), 0.1 ppm ozone (O_3) and mixtures of 0.1 ppm O_3 and 0.15, 0.3 ppm NO_2 respectively was observed after the continuous exposure for 1, 3, 6, 12 and 18 months by light and electron microscopy.

Rats exposed to O_3 showed slight hypertrophy and injury of cilia in the walls of alveolar ducts and neighboring alveoli. These changes almost disappeared after 6-month exposure. After exposure to O_3 for 12 months, a significant hypertrophy in the epithelium of the bronchiole was observed again. After 18 months, however, no histological changes were detected.

There were some differences observed in the changes caused by the exposure to single O_3 and to the mixture of NO_2 and O_3. The lesions of the pulmonary tissues by the combined exposure were more persistent than those by the single exposure. After exposure for 18 months, hypertrophy and increase of Type II cells and loose contact of capillary endothelial cells with basement membrane were observed. Siderophile cells were also detected in the alveolar space and the walls of alveoli.

Keywords : pathological changes, lungs, rats, long-term exposure, NO_2, O_3, mixtures, hypertrophy, capillary erdothelial cells, siderophile cells.

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，暴露量と病変の進展を長期間にわたって系統的に検討した実験は稀である．また，他の大気汚染成分との共存下におけるNO_2の毒性に関する研究は，Freemanら[3]，Yokoyamaら[4]の報告等少数のみである．

NO_2の生体影響を評価するには，種々の条件下におけるNO_2の最少有効濃度を決定するに必要な濃度範囲および暴露期間を取扱った実験，並びに生化学的・生理学的・組織学的な検討，更にこれらの結果を相互に関連づけ得る系統的な研究が必要と考える．

著者らは，以上のような観点から，低濃度領域におけるNO_2の短期・長期暴露実験，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）を複合した暴露実験を実施してきた[5,6]．

本報告は，O_3と複合するNO_2濃度を，その影響が光学顕微鏡（光顕）下で検出し得る濃度，すなわち最少有効濃度限界まで下げた長期複合暴露実験を行い，その結果得られたラットの肺の病理組織学的変化について検討したものである．

方　法

5週令のF 344/DuCrj雄ラット（日本チャールス・リバー）を用いて，0.1 ppm O_3に単独暴露した群，0.15, 0.3ppmのNO_2に各々0.1ppmのO_3を複合して暴露し

* 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

た2群，0.15ppmのNO_2に単独暴露した群，および対照群の5群にわけ，1，3，6，12，18ヶ月間の連続暴露を行った．O_3は1日8時間(8：00—16：00)，NO_2は終日暴露で，暴露実験に用いられた吸入装置および実験条件は前報と同様である[7]．動物は，全面がステンレスのケージに10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．

病理学的検索用の試料は，各群100匹の中から無作為に4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注入し，再拡張固定を行った．再拡張固定した左肺中央部から2片の水平断切片を採取し，透過型電子顕微鏡（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で二重固定をし，Epon包埋，薄切，錯酸鉛・ウラニル重染色を行って観察した（日本電子KK製 JEM-100 Bを用いて鏡検)．光顕用試料は，上記の他に肺の各葉から採取し，パラフィン包埋切片を作成し，ヘマトキシリン・エオジン染色（H·E染色）およびベルリン青による鉄染色を行って観察した．

結　　果

I．0.15 ppm NO_2単独暴露群

実験期間中，いずれの時期においても光顕所見では対照群との差違が認められない．また，鉄反応陽性の細胞も認められない（Fig. 1，2，3，4)．

II．0.1 ppm O_3単独暴露群

1）1ヶ月暴露群　　気管支系の変化は全体的に軽度であり，中等大気管支では，上皮細胞の局所的な肥大が認められ，末梢気管支では通常みられる突出した細胞が減少する傾向にある．肺胞領域では，肺胞壁の不規則な幅の増加と，単核の大型の細胞の増多が認められる（Fig. 5，6)，

2）3ヶ月暴露群　　1ヶ月暴露群に比べ，気管支系における諸変化には進展が認められる．すなわち中等大気管支上皮細胞の局所的な肥大と，核の配列の不整，さらに末梢気管支では突出した細胞の減少に加えて，上皮細胞の肥大が認められる．これらの諸変化は，肺のほぼ全域に拡がっている．肺胞領域では，びまん性に細胞の増多がみられるが，その程度は，1ヶ月暴露群より軽く，肺胞壁の肥厚も軽度且つ散在である（Fig.7，8)．

3）6ヶ月暴露群　　3ヶ月暴露群にみられた中等大気管支上皮細胞の肥大性変化，および肺胞領域における細胞の増多，並びに肺胞壁の肥厚はほとんど認められず，末梢気管支の上皮細胞の軽微な肥大性変化のみが少部分に認められる程度である（Fig.9，10)．

4）12ヶ月暴露群　　中等大および末梢気管支の上皮細胞の肥大性変化が認められ，これらの気管支系の変化は，3ヶ月暴露群よりやや強い傾向にある．しかし，1，3ヶ月暴露群に認められた肺胞領域における細胞の増多と肺胞壁の肥厚は明らかではない（Fig.11，12)．

5）18ヶ月暴露群　　12ヶ月暴露群に認められた気管支系の変化は軽度になり，肺胞領域における変化も明らかではない（Fig.13，14)．

電顕所見では，I型細胞の障害，II型細胞の増加，肺胞壁の毛細血管内細胞の変化等は明らかではない（Fig. 25)．

ベルリン青による鉄反応を行ったところ，18ヶ月暴露群では，きわめて弱い陽性を示す細胞が，肺胞腔内に少数認められる（Fig.27)．

III．0.3 ppm NO_2と 0.1 ppm O_3による複合暴露群

1）1ヶ月暴露群　　気管支系の変化は，O_3単独暴露群より軽度である．末梢気管支では突出した細胞の減少と，軽度の肥大性変化が認められる．肺胞領域における細胞の増多がびまん性に認められ，その程度はO_3単独暴露群と同様である（Fig.15，16)．

2）3ヶ月暴露群　　1ヶ月群に比べ，気管支系における諸変化はやや進展し，中等大および末梢気管支の局所的な肥大性変化が認められる．しかし，これらの変化は，O_3単独暴露群の場合より弱い．肺胞領域の細胞の増多は，1ヶ月暴露群より減少しているが，肺胞壁の幅の増している部分も認められる（Fig.17，18)．

3）6ヶ月暴露群　　3ヶ月暴露群に認められた諸変化は，O_3単独暴露群の場合と同様に，消失する傾向にある（Fig. 19，20)．

4）12ヶ月暴露群　　中等大および末梢気管支の上皮細胞の肥大が局所的に認められ，これらの変化は3ヶ月群より強いが，O_3単独暴露群より弱い傾向にある．肺胞領域における変化は明らかではない（Fig.21，22)．

5）18ヶ月暴露群　　12ヶ月群で認められた，気管支系における上皮の肥大性変化は，18ヶ月群においても同程度の強さで認められる（Fig.23，24)．

電顕所見では，腫大し，数も増加したII型細胞が認められる．また肺胞壁の毛細血管においては，内皮細胞と基底膜との密な結合が失われ，両者の間に空隙様の部分を生じている．この所見は，血液の液体成分の基底膜側への漏出を示唆するが，それに対応した内皮細胞自体の変化は未だ明らかではない（Fig.26)．

ベルリン青による鉄反応を行ったところ，18ヶ月暴露

群では，血鉄細胞の出現が目立ち，これらは肺胞腔内と肺胞壁の内面に存在し，さらに一部は間質内に認められる（Fig.28）．

IV. 0.15 ppm NO_2と 0.1 ppm O_3による複合暴露群

1）1，3ヶ月暴露群　気管支系における上皮の変化はごく軽微であり，光顕所見では対照群との差が明らかではない．肺胞領域における肺胞壁の肥厚が局所的に認められ，また細胞の増多が，軽度ながらびまん性に認められる．

2）6ヶ月暴露群　気管支系，肺胞領域とも他の暴露群と同様に，変化は明らかではない．

3）12ヶ月暴露群　気管支上皮細胞に軽度な肥大性変化が認められる．3ヶ月暴露群よりは強い変化であるがO_3単独暴露群，0.3 ppm NO_2と 0.1 ppm O_3による複合暴露群のいずれの群よりも弱い変化である．

4）18ヶ月暴露群　12ヶ月群に認められた気管支上皮の変化は，末梢気管支においてほぼ同程度の強さでみられる．しかし，0.3 ppm の NO_2を複合した群に比べると，弱い変化である．

鉄反応を行ったところ，血鉄細胞が肺胞腔内に少数認められる．

考　察

本実験で，0.15 ppm NO_2の単独暴露による変化は，実験期間中，いずれの時期においても，光顕所見では明確ではなかった．このことは，前報において，NO_2による光顕的な形態学的変化の認められる最少有効濃度限界は，0.3—0.5 ppm とした著者らの結果[5]を裏づけるものである．

0.1 ppm のO_3単独暴露による変化としては，暴露3ヶ月群では，気管支上皮細胞の肥大性変化と，肺胞領域における細胞の増多がみられ，暴露6ヶ月群では，これらの変化は明らかではないが，暴露12ヶ月群では，再び気管支系の変化が出現し，暴露18ヶ月群では，対照群との間に差違が認められなかった．低濃度のO_3による長期暴露実験の報告は少なく，またそのほとんどがO_3による一過性の変化に関するものである[8]．本実験では，低濃度のO_3により，18ヶ月の暴露期間中に軽度の病変の出現と消失がくり返されること，また肺胞領域における細胞の増多は，気管支系における変化と異なり，暴露の初期にのみ顕著であることが認められた．すでに報告したように，低濃度のNO_2暴露の場合，まず初期反応が認められた後，微弱な変化が長期にわたって持続し，時間の経過とともに，定型的な，より進展した病変が成立する[5]．このことから，低濃度のNO_2およびO_3の生体に及ぼす影響には，その主たる作用部位の他，病変の推移においても差違があると考えられた．

NO_2とO_3による複合暴露群では，暴露12ヶ月後までは，O_3単独暴露群とほぼ同様の病変の推移が認められた．すなわち，暴露3ヶ月後までは，気管支上皮細胞の肥大性変化と肺胞領域における細胞の増多が認められたが，暴露6ヶ月後には，これらの変化は消失する傾向がみられ，暴露12ヶ月後には，再び気管支系を中心とした病変が成立していた．暴露18ヶ月後では，O_3単独暴露群と異なり，気管支上皮細胞における肥大性変化が12ヶ月後とほぼ同程度の強さで認められた．また，肺胞領域においても，電顕所見では，毛細血管の変化が認められたが，この変化は，血管透過性のこう進を生じる可能性を示唆しており，光顕所見で認められた肺胞壁の肥厚と関連すると考えられた．

低濃度のNO_2による定型的な病変として，気管支上皮細胞の軽度の肥大性変化があげられ，肺胞領域の変化は光顕所見では確定し難いこと，暴露12ヶ月後の病変は，3ヶ月後の場合よりむしろ弱いことを報告した[5]．一方，O_3はNO_2より毒性が強く，NO_2よりさらに肺の深部まで侵すこと等[3,6]が報告されている．このことから，本実験の複合暴露群の12ヶ月後までの病変には，O_3の関与するところが大きいと考えられる．

また，複合暴露18ヶ月後に認められた気管支および肺胞領における変化は，暴露12ヶ月までの変化が主にO_3によって引き起こされた可能性の強いことから，0.3 ppm という低濃度のNO_2を複合したことによって，O_3による病変の増強あるいは修復の遅延が生じたとも考え得る．しかし，0.4 ppm のNO_2単独暴露の場合，18ヶ月で軽微な，27ヶ月で軽度の定型的病変を認め，電顕所見での平均肺胞壁厚は，18ヶ月から上昇傾向を示すことが報告されている[9]．また，著者らが先に行ったNO_2の単独暴露実験の鉄反応では，暴露12ヶ月まではいずれの群とも陰性であったが，18ヶ月の1 ppm 暴露群に顕著に認められ，0.3 ppm 暴露群では，陰性であった[5]．この鉄反応陽性の血鉄細胞は，肺胞毛細血管の血流障害等による赤血球の崩壊を示唆していると考えられた．これらのことから，低濃度のNO_2単独暴露によっても暴露期間の延長に伴って病変が進展し，肺胞領域にも変化の生じることは明らかである．本実験においては，血鉄細胞は，暴露12ヶ月後までは，いずれの群とも陰性であったが，18ヶ月後に，複合暴露群では肺胞腔内と肺胞壁の内面に多数認め，O_3単独暴露群では，きわめて微弱に，NO_2単独暴露群では陰性であった．以上のことから，微弱なが

ら進行していた0.3 ppmという低い濃度のNO_2の影響が，O_3を複合することによって強められ，暴露18ヶ月後に至ってはじめて表われてきたとも考えられる．

短期複合暴露実験では，複合群と単独群の影響の違いは，暴露30日後より明らかになったが[6]，本実験においては，暴露18ヶ月後に認められた．このことは，低濃度暴露による気管支系および肺胞領域における病変の畜積性，加令による反応性の違いが[10,11,12]関連すると思われ，この2つの観点からさらに検討を要する問題である．

暴露12ヶ月までの複合群と単独群の病変の強さを比較すると，気管支および肺胞領域のいずれの部位においても，O_3単独群の方が，複合暴露群より強く認められた．しかし，前報で，複合したNO_2濃度の高い暴露実験においては，複合暴露群の方がO_3単独暴露群より気管支系における変化はいずれの時期においても強く認められたこと，および肺胞領域における変化は，単独暴露群より弱い時期のあることを報告した[6]．これらの結果から考察すると，汚染ガスを複合することが必ずしも肺の各部位の病変を増強するわけではないこと，また，病変の強さは，各汚染ガスの作用部位の違い，暴露期間，また複合する各汚染ガスの濃度と比率，複合したガスの相互反応によって生じる成分等に依存するものと考える．

（本研究は昭和58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，その概要は大気汚染学会第24回1983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 Furioshi, N. J.: *Exp. Mol. Pathol.*, 14, 1, 1971
3) Freeman, G. M Juhos, L. T., Furioshi, N. J., Mussenden, R., Stephens, R. J. and Evans, M. J.: *Arch. Environ. Health,* 29, 203, 1974
4) Yokoyama, E., Ichikawa, I. and Kawai, K.: *Nitrogen Oxides and Their Effects on Health,* Ed. Lee. S. D., Ann Arbor Science, 217, 1980
5) 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
6) 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
7) 福田雅夫，狩野文雄，寺田伸枝，溝口　勲：東京衛研年報，30-1，189，1979
8) Freeman, G., Stephens, R. J. et al.: *Arch. Environ. Health.* 26, 209, 1973
9) 竹中参二ら：国立公害研究所研究報告，15，171，1980
10) Kyono, H. and Kawai, K.: *Ind Health,* 20, 73, 1982
11) Cabral-Anderson, L. J., Evans, M. J. and Freeman, G.: *Exp. Mol. Pathol.*, 27, 353, 1977
12) Evans, M. J., Cabral-Anderson, L. J. and Freeman, G.: *Exp. Mol. Pathol.*, 27, 366, 1977

Explanation of figures

Fig. 1　Light micrograph of bronchial epithelium of the control rat (× 400).

Fig. 2　Light micrograph of terminal airway from the control rat (×100).

Fig. 3　Exposure to 0.15ppm NO_2 for 3 months. No definite change (×400).

Fig. 4　Same treatment as Fig. 3. No remarkable alteration (×100).

Fig. 5　Exposure to 0.1ppm O_3 for 1 month. Loss or shortenin of cilia and hypertrophy of bronchial epithelium (×400).

Fig. 6　Same treatment as Fig. 5. Slight hypertrophy in the epithelium of terminal airway. Increased mononuclear cells in the walls of alveolar ducts and neighboring alveoli (×100).

Fig. 7　Bronchial epithelium after 3 months of exposure to 0.1ppm O_3. Cilia injuly and hypertrophy of bronchial epithelium (×100)

Fig. 8　Same treatment as Fig. 7. The cellularity and thickening of the alveolar ducts and alveoli (×100).

Fig. 9　6 months exposure to 0.1ppm O_3. Bronchial epithelium seemed almost normal (× 400).

Fig. 10　Same treatment as Fig. 9. Slight hypertrophy in the epithelium of terminal airway partially (×100).

Fig. 11　12 months exposure to 0.1ppm O_3. Hypertophy in the bronchial epitheljum. Changes are more markedly than that shown in Fig.5 (×100).

Fig. 12　Same treatment as Fig. 11. Slight hypertrophy in the epithelium of terminal airway.

The cellularity and thickening in the walls of alveolar ducts and alveoli are not clear (×100).

Fig. 13 18 months exposure to 0.1ppm O_3. Bronchial epithelium seemed almost normal (×100).

Fig. 14 Same treatment as Fig. 13. No definite change (×100).

Fig. 15,16 Exposure to a mixture of 0.3ppm NO_2 and 0.1ppm O_3 for 1 month. Silght hypertrophy of bronchial epithelium. Changes are milder than that shown in Fig. 5(×400). The walls of alveolar ducts and neigh boring alveoli increased cellularity (×100).

Fig. 17,18 3 months exposure to a mixture. Hypertrophy in the epithelium of bronchial epithelium in part (×400). The walls of alveoli increased cellularity and thickening spora dically (×100).

Fig. 19,20 6 months exposure to a mixture. The epithelium seemed almost normal (×400, × 100).

Fig. 21,22 12 months exposure to a mixture. Hypertrophy in the epithelium in part(×100).

Fig. 23,24 18 months exposure to a mixture. The pulmonary lesions persist. Compare with Fig. 13 and 14 (×100).

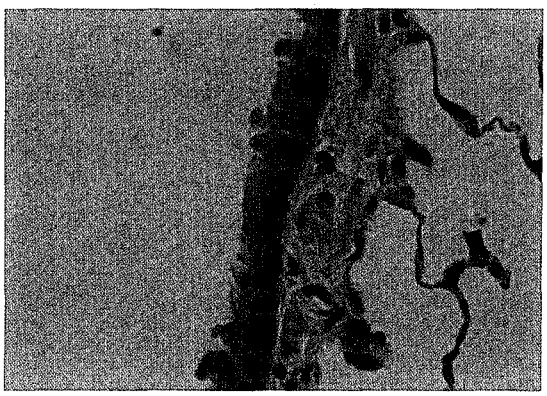
Fig. 25 Electron micrograph of alveoli after 18 months of exposure to 0.1ppm O_3. No definite change (×1500).

Fig. 26 Electron micrograph of alveoli after 18 months of exposure to mixture. Hypertrophy and increase of Type II cells. Loose contact of capillary endothelial cells with basement membrane were observed (× 1500).

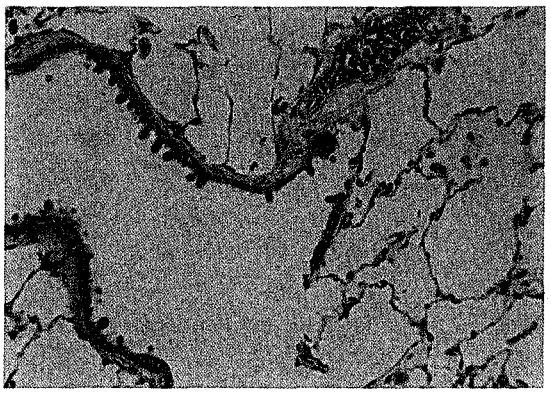
Fig. 27 Alveolar walls after 18 months of exposure to 0.1ppm O_3. Little positive cells were detected (×100).

Fig. 28 Light micrograph of alveoli after 18 months of exposure to a mixture. Siderophile cells were shown by blue stained with Berlin blue in the alveolar space and the walls of alveoli (×400).

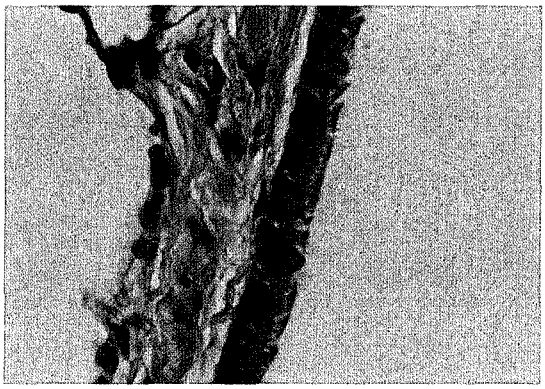
1



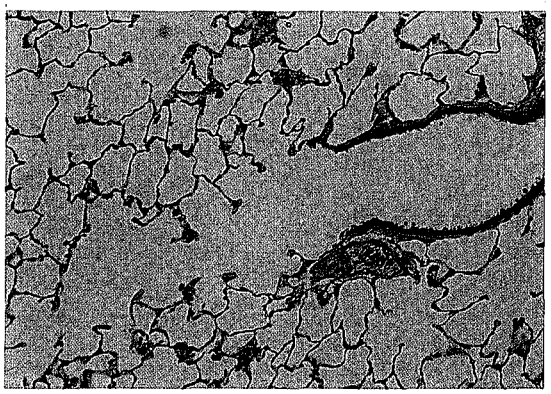
2



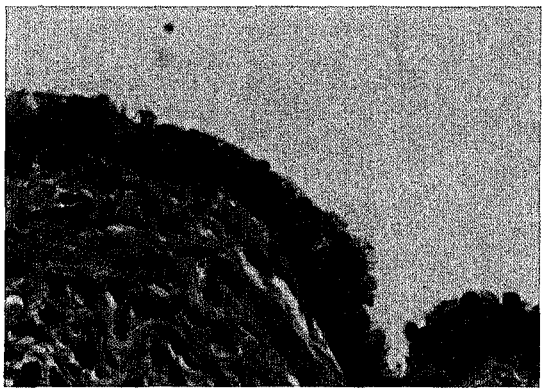
3



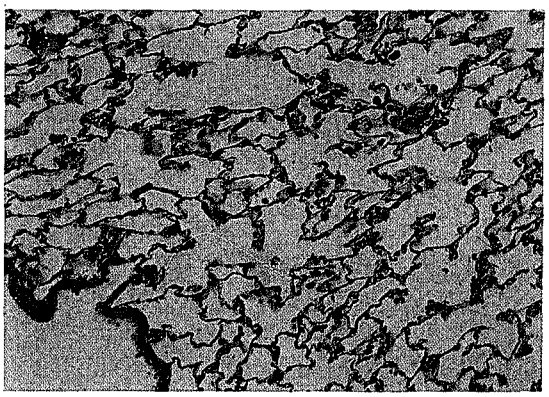
4



5

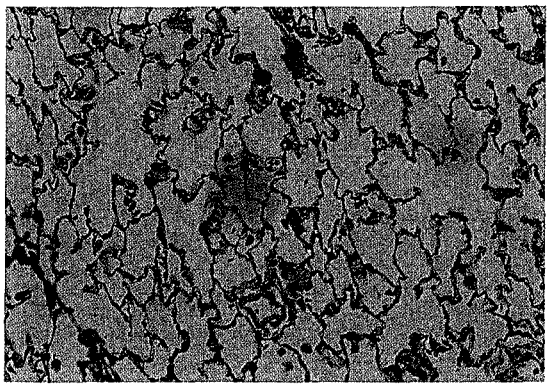


6



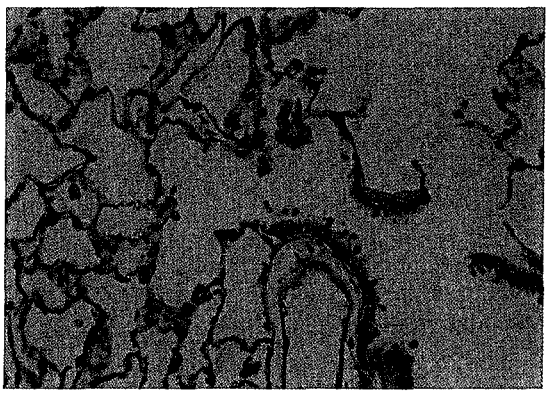
7

8

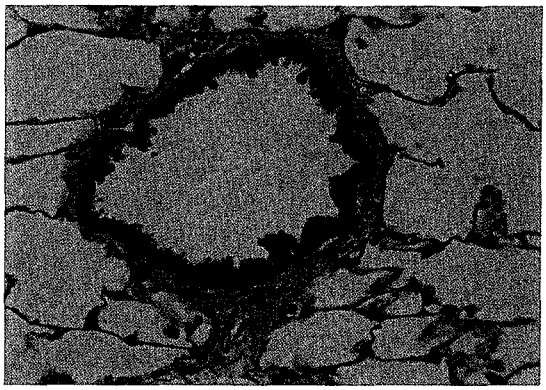


9

10

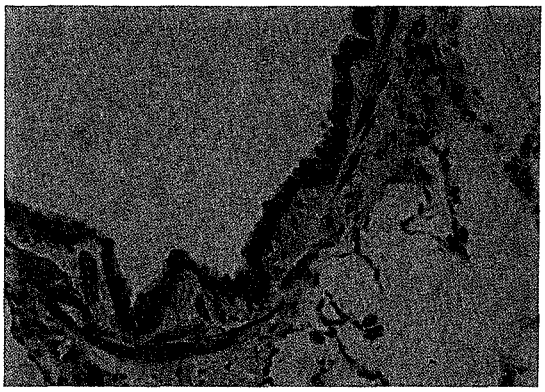


11



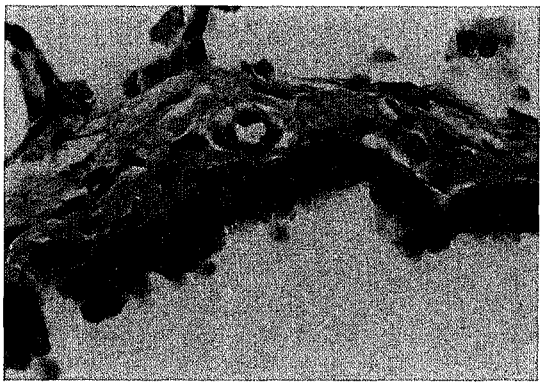
12

13

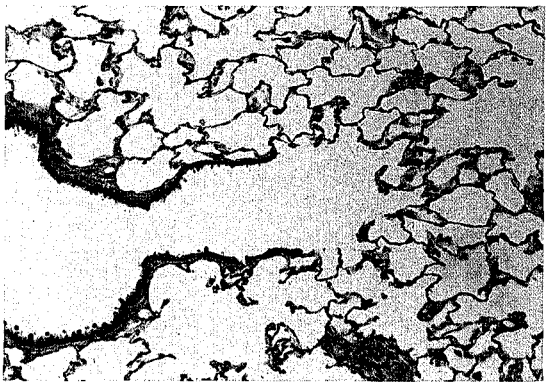


14

15



16

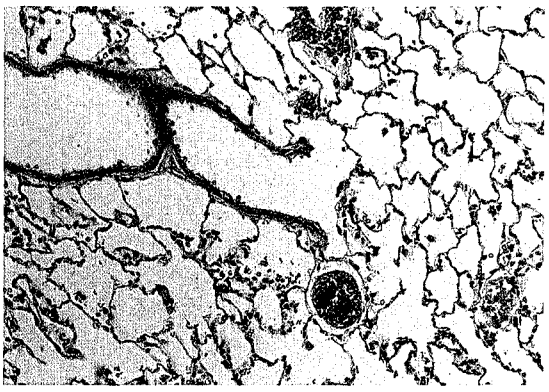


17

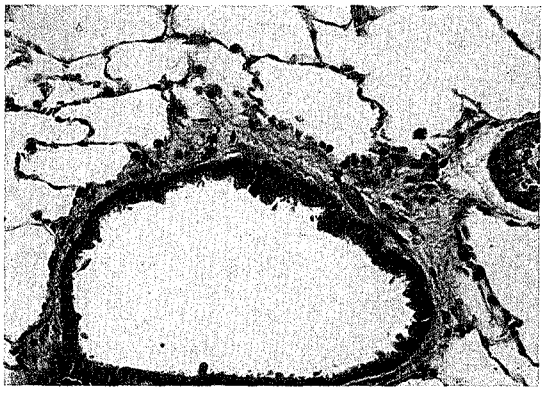
18

19

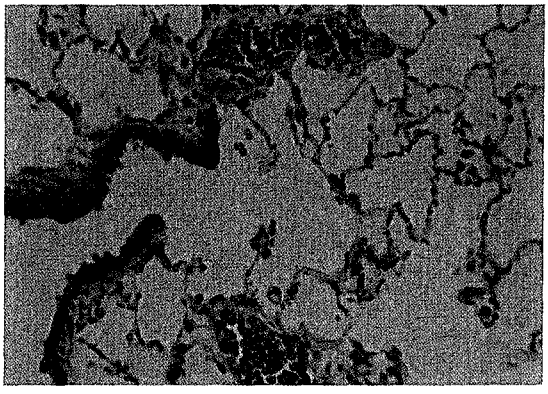
20



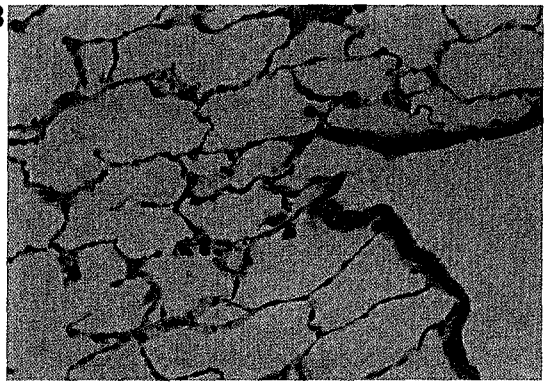
21



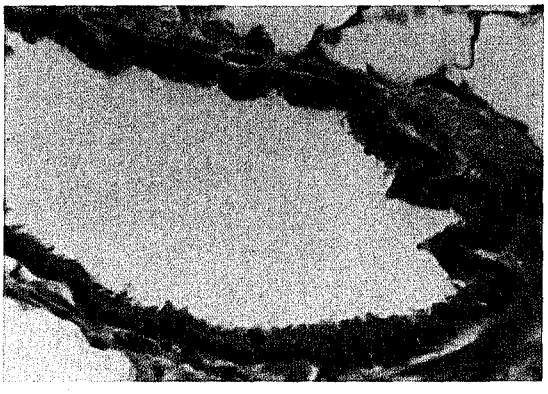
22



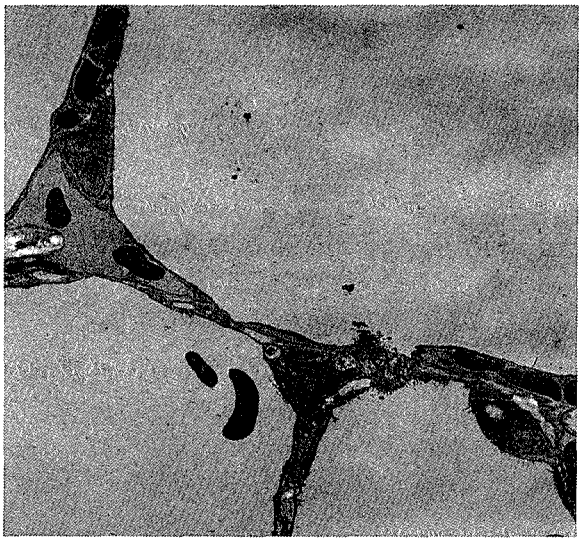
23



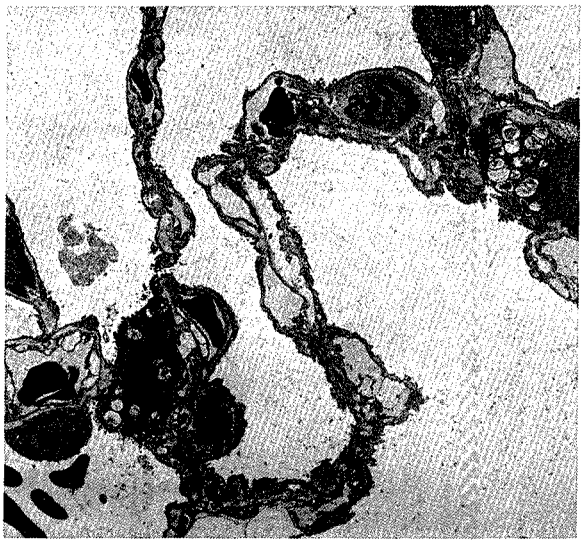
24



25

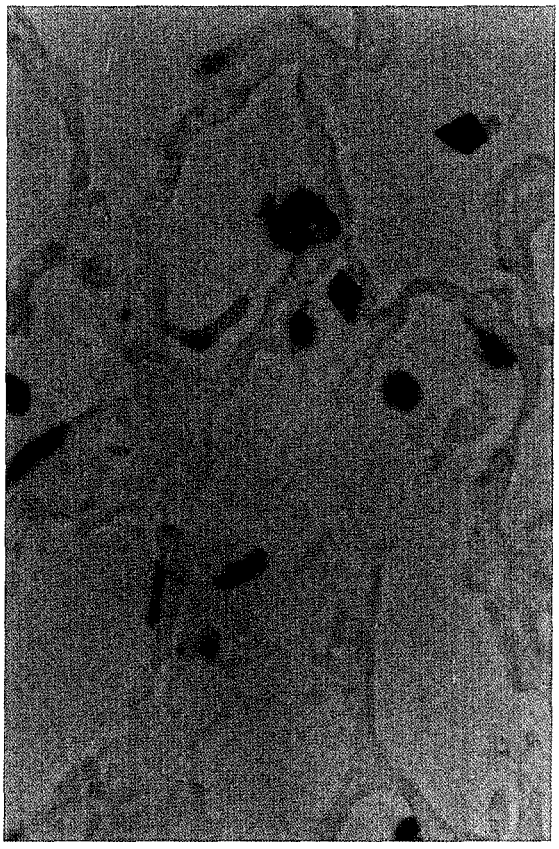


26



27

28



東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 279-288, 1984

肺中の Angiotensin Converting Enzyme 活性に及ぼす NO_2 暴露の影響

鈴木孝人*, 寺田伸枝*, 池田真悟*
大澤誠喜*, 遠藤圭子*, 溝口勲*

Effect of NO_2 Exposure on the Activity of Angiotensin Converting Enzyme in Lung

TAKAHITO SUZUKI*, NOBUE TERADA*, SHINGO IKEDA*
MASANOBU OHSAWA*, KEIKO ENDO* and ISAO MIZOGUCHI*

Rats were exposed to 8 ppm nitrogen dioxide (NO_2) for 1, 2 and 4 weeks. The activity levels of angiotensin converting enzyme (ACE) in the lung, the supernatant of broncho-alveolar lavage fluid (BALF), BALF cells and the serum were determined. The lactate dehydrogenase (LDH) activities in BALF supernatant and BALF cells, the albumin content in BALF supernatant and the histopathological change of the lung were also examined.

The increase of activity levels of ACE in the lung and BALF supernatant was observed during NO_2 exposure. ACE activity in BALF cells reduced at 1 and 2 weeks, and it returned to the control level at 4 weeks. Both the ACE activity in the serum and albumin content in BALF supernatant remained unchanged. LDH activity in BALF supernatant increased and that in BALF cells fell during NO_2 exposure. The number of BALF cells increased during NO_2 exposure. Histopathological changes observed in NO_2-exposed rats after 2 and 4 weeks of exposure were following: thickening of the walls of the alveolar ducts and neighboring alveoli due to an increased number of mononuclear cells; deposition of collagen fibers stained by the Azan-Mallory method; and increase in the number of monocyte appeared to be alveolar macrophage in alveolar space.

These results suggest the following: NO_2 exposure enhanced conversion of angiotensin in the lung; the increased ACE activity in BALF supernatant is not due to the enhancement of capillary permeability but due to the destruction of alveolar macrophage; and the functional disorder of alveolar macrophage is responsible for the decreased activities of ACE and LDH in BALF cells.

Keywords: nitrogen dioxide, rat, lung, broncho-alveolar lavage fluid, alveolar macrophage, serum, angiotensin converting enzyme, lactate dehydrogenase, albumin

緒　言

NO_2の暴露により，肺の上皮細胞の傷害[1-8]や間質の線維化[9-13]などの形態学的変化が生じることは数多く報告されている．血管内皮細胞に対する影響については，河野と林[13]がラットに 20 ppm NO_2を 20 時間暴露または 0.5 ppm NO_2を 2 ヶ月間暴露後に，肺の血管内皮細胞に大小多数の pinocytotic vesicle が出現することを電顕的に確認しており，同じく，Guidotti[14]がビーグル犬に 37 ppm NO_2を 4 時間暴露後，血管内皮細胞内には pinocytotic vesicle の増加と血管内皮細胞の拡張を計測形態学的方法によって確認した報告のみしか見当らない．また，生化学的には，Sherwin と Richters[15]によって，暴露前に ^3H で標識した血清を静脈注射したマウスに 4～7 ppm NO_2を 14 日間または 8 ppm NO_2を 9 日間暴露後，その気管支—肺胞洗浄液(broncho-alveolar lavage fluid, BALF) 中の ^3Hをカウントしたところ，そのカウント数が上昇することが報告されている．彼等はこのことから肺毛細管の透過性亢進と血管内皮細胞の傷害

* 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

が生ずることを示唆している．更に，寺田ら[16]はラットに1 ppm NO_2を12ヶ月間暴露したところ，肺の間質内及び肺胞腔内にヘモグロビンのヘム鉄由来と考えられるベルリンブルー鉄染色による陽性部分の増加を認めている．しかし，血管内皮細胞に及ぼすNO_2の作用の解明はいまだ不充分であると思われる．そこで，本研究では，動物種によって多少分布は異っているが共通して肺組織中に強い活性を有し[17]，更に，肺では血管内皮細胞の膜表面に局在することが分っている[18,19]Angiotensin Converting Enzyme (ACE) を指標としてNO_2の血管内皮細胞に及ぼす影響を検討してみた．

ACEは10個のアミノ酸残基よりなる不活性型のアンジオテンシン (AT)—IのC末端よりhistidyl-L-leucineのdipeptideを加水分解し，活性型で血管収縮作用の強いAT-IIに変換する．更に，降圧作用を有するブラディキニンをも分解して不活性化しており，血管収縮や血圧調節においてACEは重要な役割を果している[20,21]．また，生体内ではAT—IからAT—IIへの変換も行っている主な組織は肺であることも判明している[22]．ACEと肺疾患との関係では，著しい線維化が生じるサルコイドーシスにおいて特に注目されており，この患者の血清中及びBALF中のACE活性は高値を示している[23-30]．また，硅肺症[27,28]，慢性ベリリウム症[26,27]でも血清中のACE活性は上昇することも知られている．更に，動物実験ではブレオマイシンを気管内に投与され著しい線維化を生じたラットにおいて，血清中及びBALF中のACE活性の上昇と肺組織中のACE活性の低下が報告されている[31]．これらの点から，現在では線維化を判断する指標の一つとしてACEの活性測定の有効性が認められている．また，最近では喫煙者においてもBALF中の肺胞マクロファージ (AM) のACE活性が上昇することが確認されている[32,33]．

本研究では，8 ppm NO_2に4週間に渡って暴露したラットにおいて，生化学的には肺組織中，血清中，BALFの上清中及び細胞中のACEの活性測定を行うと共に，形態学的には肺胞領域における変化を検討し，また，コラーゲンの染色も行って間質における線維化についても検討した．その結果，肺組織中，BALFの上清中及び細胞中のACE活性の変化とBALF中の細胞の機能低下を示唆する所見と上皮細胞の肥大性変化，肺胞壁の肥厚，コラーゲンの増加及び肺胞腔内でのAMの増加を示す所見が得られたので報告する．

実験方法

(I) 動物の暴露

動物は5週令の雄のF 344/DuCrjラット（日本チャールスリバー社）を用いて，NO_2暴露群（8 ±0.5 ppm）と対照群（空気暴露）に分け，暴露は既報[34]の装置及び条件によって，1，2及び4週間に渡って実施した．

(II) 生化学的検討

a）検体の調製

ラットは1，2及び4週目に各群8匹ずゝチャンバーより取り出し，ネンブタール麻酔下で腹部大静脈より採血後，放血により屠殺した．血液を4℃，1200×g maxで10分間遠心して血清を分離した．肺を生理食塩水で灌流後に摘出し，エラスター針をとりつけた気管にプラスチック製の注射筒で1回あたり6 m*l*の生食水を注入した．その後，肺を注意してもみながら軽く吸引して，AMなどの単球の吸着を防ぐためにシリコン処理をした試験管内にBALFを採取した．尚，この肺洗浄は3回くりかえした．更に，洗浄後の肺に0.25モルの庶糖溶液（0.05モルトリス塩酸緩衝液pH7.8，30ミリモル塩化カルシウム溶液及び5ミリモル 酢酸マグネシウム溶液を含む）を9倍容加えてからUltra-Turrax (Janke & Kunkel社製，TP 18/10 S 2型）を用いてホモジナイズ後，ACEは細胞膜と結合しているので，ACEを解離させるために，超音波破粋機（Branson社製，185型）で50 W，60秒間処理し，ついで，界面活性剤のNoidet P—40 (Shell Chemical社製）を最終濃度が0.5％になるように加えて冷蔵庫内で30分間スターラーで攪拌後，4℃，16500×*g* maxで60分間遠心し，その上清を検体とした．また，シリコン処理試験管内のBALFを4℃，300×*g* maxで10分間遠心し，その上清を4℃でセントリフロー（amicon社製，CF 50 A型）を用いて約1/10に濃縮し，その濃縮液を検体とした．更に，細胞を含有する沈査部分は生食水で2回洗浄後，0.5 m*l*の生食水に再浮遊させ，その一部分を希釈し，計算盤(Burker-Turk社製）を用いて総細胞数を顕微鏡によってカウントした．残りの細胞浮遊液を上記の超音波破粋機で30 W，30秒間処理後，4℃，300×*g* maxで10分間遠心し，その上清をBALF中の細胞における検体とした．尚，これらの検体は−20℃で保存し，7日間以内に分析を行った．

b）酵素活性とアルブミン含量の分析

ACE活性はKasaharaとAshihara[35]の方法に基づくキット（富士レビオ社製，ACEカラー）を用いて測定した．このキットの測定原理は，まず基質であるp-hydroxybenzoyl-glycyl-L-histidyl-L-leucineをACEで分解する．この分解産物に順次hippuricase，4-aminoantipyrine，sodium periodateを作用させて出現する

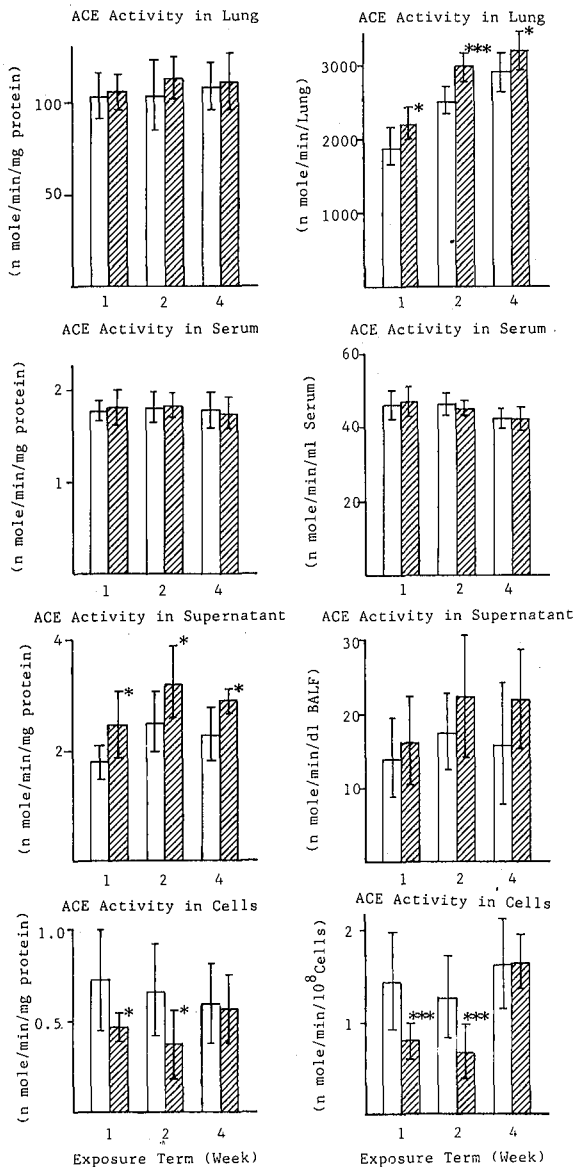


Fig. 1. Changes of Angiotension Converting Enzyme (ACE) Activities in the Lung, the Serum, the Supernatant of Broncho-Alveolar Lavage Fluid (BALF) and the BALF Cells on Rats Exposed to NO_2.

□, Control Rats; ▨, NO_2 Exposed Rats. All results indicated are means± S. D. (n=8), and the activity units of ACE are indicated in the Text. ＊:P<0.05, ＊＊:P<0.02, ＊＊＊:P<0.01

quinoneimine 色素を 505 nm で比色定量する方法である．従って，ACE の活性単位は 37℃で 1 分間当りに生成する quinoneimine 色素の n mole 数で示した．また，NO_2の暴露により AM などの単球の破壊や機能変化などが生じることが予想される．そこで，単球の可溶性画分に含まれている lactate dehydrogenase (LDH) を指標として BALF の上清中及び細胞中の LDH 活性を Wróblewski ら[36]の方法に基づいたキット (UV 法, boehringer-mannheim 社製) を用いて測定し，NO_2による単球の破壊に伴う BALF の上清中への酵素の移行及び単球内の酵素活性に及ぼす影響についても検討した．更に，NO_2暴露により血管透過性の亢進が起こることも考えられる．血液中の蛋白質で分子量 (66,000) の小さいアルブミン (Alb)[37]を血管透過性亢進の有無を示す一つの指標として測定した．また，Alb は肺組織中では合成されないことが知られており，BALF 中の蛋白量の変化などを検討する場合は指標として Alb を用いることが多い[38-40]．Alb 含量はブロムクレゾールグリーン法[41]に基づくキット (第一化学社製，オートセラAlb) を用いて測定した．また蛋白含量は Lowry の方法[42]を用いて分析した．

(III) 形態学的検討

ラットは 1，2 及び 4 週目に各群 4 匹ずつを屠殺し形態学的検討を行った．尚，肺組織の固定法及び染色法は既報[34]のごとく実施した．

実験結果

(I) 生化学的変化と BALF 中の細胞数の変動

肺の ACE 活性は比活性では NO_2群と対照群との間には有意な変化は認められないが，肺における総 ACE 活性 (比活性×総蛋白量) では対照群と比べて NO_2群では暴露期間中有意な上昇が認められた(図 1)．また，肺の蛋白含量は 1 週目と 4 週目に有意な増加が認められ，2 週目では増加傾向を示した (図 2)．尚，血清の ACE 活性は比活性及び m*l* 当りの活性でも暴露期間中両群間には有意な変化は認められなかった(図 1)．BALF の上清では，暴露期間中に NO_2群の ACE の比活性は有意な上昇を示したが，d*l* 当りの活性では NO_2群は増加傾向が認められた(図 1)．また，上清中の Alb 含量は暴露期間中両群間では有意な差は認められなかった(図 3)．尚，上清中の LDH 活性は 2 週目と 4 週目の NO_2群で有意な上昇が認められた(図 4)．BALF の細胞では 1 週目と 2 週目に ACE の比活性は NO_2群で有意な低下を示したが，4 週目では対照レベルにまで戻り，また，10^8個の細胞当りの ACE 活性も同様に 1 週目と 2 週目で NO_2

群は有意な低下を示し，4週目でも対照レベルに戻った（図1）．更に，10^8個の細胞当りのLDH活性も1週目と2週目でNO_2群で著しい活性低下を示し，4週目ではやゝ回復するが暴露期間中を通してNO_2群では有意な低下が認められた（図4）．尚，BALF中の細胞数は1週目と2週目のNO_2群では，BALFのml当りで約2×10^5個の有意な増加が認められ，4週目では5×10^5の有意な増加が認められた（図5）．

(II) 形態学的変化

図6～13に示すように，1週目では中等度の気管支の上皮細胞は軽度の肥大性変化を示し，線毛の損傷を伴っていた．細気管支の上皮細胞も軽度の肥大性変化が認められた．肺胞道壁及びその付近の肺胞壁は大型の単核細胞の増加によって肥厚していた．アザン・マロリー染色によるコラーゲンの増加は明確ではなかった．また，肺胞腔に泡沫状のAMと思われる細胞が対照群よりやゝ頻繁に認められた．2週目では1週目に比べ気管支上皮の肥大性変化が著しくなった．肺胞道壁及びその付近の肺胞壁は単核の細胞が増多し，アザン・マロリー染色によって青染されるコラーゲンで肥厚していた．また，泡沫状のAMと思われる細胞が肺胞腔内及び肺胞壁に付着して存在していた．4週目では気管支上皮の肥大性変

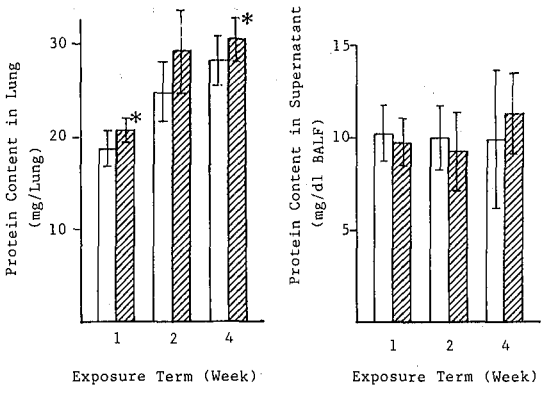


Fig. 2. Changes of Protein Contents in the Lung and the Supernatant of BALF on Rats Exposed to NO_2.

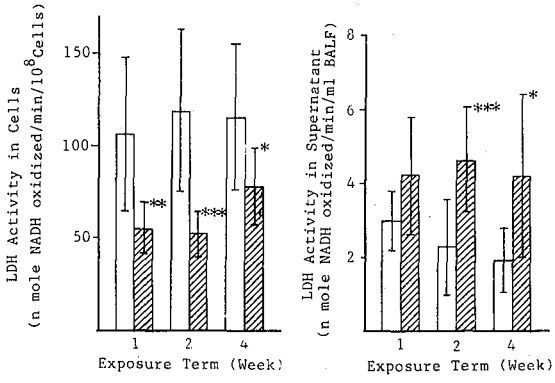


Fig. 4. Changes of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activities in the Cells and the Supernatant of BALF on Rats Exposed to NO_2.

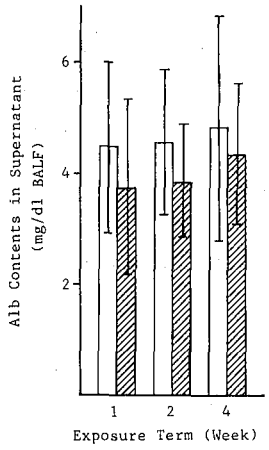


Fig. 3. Changes of Albumin Contents in the Supernatant of BALF on Rats Exposed to NO_2.

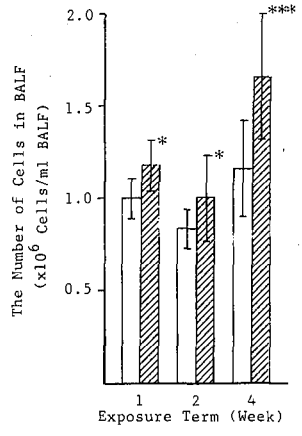


Fig. 5. Changes of the Number of Cells in BALF on Rats Exposed to NO_2.

化は2週目より更に著しくなり，不規則な魂状の膨隆を示し，多層化した部分も認められた．肺胞道壁及びその付近の肺胞壁はコラーゲンによって軽度の肥厚が認められるが1週目及び2週目に比べ肥厚の程度は弱かった．肺胞腔内には1週目及び2週目に比べAMと思われる細胞が多く認められ，その大部分は小型で細胞質が好塩基性に染まる成熟型と思われる細胞であった．

考　察

NO_2暴露によって肺組織中の総ACE活性が上昇した原因は，局ら[43]が30 ppm NO_2を3時間暴露したラットにおいて動脈血圧の低下が生じることの報告から考えると，NO_2暴露によって生じた血圧低下を強い昇圧作用を有するAT—IIを生成して血圧調節を行う必要性が生じたためと思われる．尚，NO_2群では肺の蛋白含量の増加と総ACE活性の上昇という結果から，ACEの生合成が促進された可能性が考えられる．また，RobertsonとKhairallah[44]はAT—IIが内皮細胞の核にも作用してDNAやRNA合成を促進することを示唆する報告をしているが，この結果もACE合成に関連しているのかも知れない．一方，NO_2暴露により血管透過性亢進が生じて肺組織中のACE活性が上昇することも考えられる．しかし，BALFの上清中のAlb含量は両群間で変化がないこと，Albの分子量(66000)と比べてラットのACEの分子量は270,000と大きく血管透過がしにくいこと[45]，また，ACEの比活性は肺では血清より30倍高値であることが報告されている[17]．本研究でも同じく肺では血清より約50倍程高いACEの比活性を示したので，NO_2群での肺におけるACEの上昇分（約500 n mole/min）を血清の比活性（約2 n mole/min/mg蛋白）で除すると，約250 mgの蛋白量が肺において増加しなければならないが，実際の肺における総蛋白含量は20～30 mg程度にすぎず，また，光顕的観察ではあるが，間質や細胞膜などに水腫様変化が認められないことから，肺組織中のACEは少くとも血清からのACEの移行によって活性上昇したのではないと思われる．河野と林[13]及びGuidotti[14]がNO_2を暴露した動物で肺の血管内皮細胞に大小多数のpinocytotic vesicleを認めており，一方，Robertson と Khairallah[44]は^3Hまたは^{14}CでラベルされたAT—IIをラットに注入すると，動脈の内皮細胞にpinocytotic vesicleの数の増加と大きさの拡大が認められることを報告している．これは本研究でもNO_2の暴露によって肺のACE活性の上昇が認められることから，血管内皮細胞におけるAT—IからAT—IIへの変換が活発化し，AT—IIの濃度の増加によってpinocytotic vesicleの増加が生じた可能性も考えられる．

血液中におけるAT—IIの量は，①アンジオテンシノーゲンの量，②それを分解してAT—Iを生成するレニンの分泌量，③AT—IをAT—IIに変換するACE活性，，④AT—IIを分解するアンジオテンシナーゼ活性などの諸因子によって制禦されており，また，アンジオテンシノーゲンは血液中の副腎皮質ホルモンの濃度によって増減することも知られている[46]．また，NgとVane[22,47]及びVane[48]によれば，in vivoではAT—IからAT—IIへの変換は，主に肺の血管内皮によって行われ，血液中のACEによって変換される速度は肺に比べて著しく遅いことが報告されている．血液中のACEは恐らく血管内皮から遊出されたものであろう．一方，Tusl[49]によると，NO_2を暴露したラットでは血漿中に副腎皮質ホルモンの増加が認められることが報告されているが，この報告から考えると，血液中のアンジオテンシノーゲンの濃度が増加する可能性が考えられ，従ってAT—Iの濃度も増加する可能性があり，このことも肺におけるACE活性の上昇をもたらす一因となっているのかも知れない．一方，サルコイドーシスの患者に副腎皮質ホルモンを投与することによって血清中のACE活性の著明な低下が生じることが知られており[26,28]，副腎皮質ホルモンによりACEの血液中への遊出に対して何らかの調節が行われている可能性が考えられる．

BALFの上清中のACE活性の上昇の原因は肺胞腔内にAMと思われる単球の増加，BALF中の単球の明らかな増加更に上清中のLDH活性の上昇という結果から考えると，NO_2の暴露によりAMなどの単球が肺胞腔内へと移行し，更に，そこで単球が破壊され，その結果として上清中のACEの活性上昇が生じたと考えられる．また，上清中の蛋白量及びAlb含量は対照群と比べ変化が認められないことから，血管透過性亢進によるACE活性の上昇ではないと思われる．

BALFの細胞中のACE活性は，比活性と10^8個当りの細胞において，暴露開始1週目と2週目にNO_2群に低下が認められたが，このことはLDH活性の細胞中における低下の結果と合せて考えてみると，AMなどの細胞における機能低下がNO_2の暴露により生じたものと思われる．また，佐々木[50]も10 ppm NO_2を2週間に渡って暴露したラットのBALFを採取し，そのBALF中の細胞を4日間培養し，培養液中に浸出したACE活性を測定している．その結果，暴露開始24時間後に採取した細胞ではやゝ上昇を示すが，暴露開始3日目及び7日目に採取した細胞ではACE活性の著しい低下が認めら

れ，その後除々に回復することが認められており，NO_2暴露によるAMなどの細胞の機能低下が考えられる．一方，4週目におけるNO_2群のACE活性の回復は，4週目のNO_2群で著しい細胞数の増加と形態学的には小型の細胞が増加するという所見から考えると，若くて機能が健全な細胞の出現によりACE活性が回復されたものと思われる．しかし，NO_2の曝露によるAMなどの細胞における機能低下は気管支—肺胞系における感染防禦機構に重大な影響を及ぼす可能性が強いものと思われる．

本研究における8 ppm NO_2で4週間という暴露条件では，形態学的には間質における線維化が認められたが，血管内皮細胞に対するNO_2の影響については電顕的検索を行っていないので判断することはできない．しかし，Hugod[51]によって，5 ppm NOを2週間暴露されたウサギでの電顕的検索では，血管内皮細胞の接合部の離開と内皮細胞と基底膜の間に水腫が認められることが報告されている．更に，一般的にはNOの作用はNO_2に比べて弱いと考えられていたことから推測すると，NO_2の暴露によっても血管内皮細胞に対して傷害を及ぼす可能性が強いと思われる．また，生化学的には，本研究において肺組織中のACE活性の上昇が認められたこと，ACEが肺においては血管内皮細胞の細胞膜に局在していること[18,19]などを考えると，NO_2の暴露は血管内皮細胞におけるACEの合成を促進した可能性が考えられる．更に，ACE活性の上昇によってAT—IIが増加することも予測され，また，AT—IIの投与によって血管内皮細胞の接合部の離開が生ずるという報告[52]もあるので，血管内皮細胞に対するNO_2の影響については今後も検討する必要があると思われる．

（本研究は昭和58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) Evans, M.J., Stephens, R.J. and Freeman, G : *Arch. Intern. Med.*, 128, 57, 1971
2) Yuen, T.G.H. and Sherwin, R.P. : *Arch. Environ. Health*, 22, 178, 1971
3) Evans, M.J., Stephens, R.J., Cabral, L.J., *et al.* : *Arch. Environ. Health*, 24, 180, 1972
4) Sherwin, R.P., Dibble, J. and Weiner, J. : *Arch. Environ. Health*, 24, 43, 1972
5) Stephens, R.J., Freeman, G. and Evans, M.J. : *Arch. Environ. Health*, 24, 160, 1972
6) Evans, M.J., Cabral, L.J., Stephens, R.J., *et al.* : *Am. J. Pathol.*, 70, 175, 1973
7) Evans, M.J., Cabral, L.C., Stephens, R.J., *et al.* : *Exp. Mol. Pathol.*, 22, 142, 1975
8) Evans, M.J., Dekker, N.P., Cabral-Anderson, L. J., *et al.* : *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 118, 787, 1978
9) Freeman, G., Grane, S.C. and Furiosi, N.J. : *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 100, 662, 1968
10) Freeman, G., Grane, S.C., Stephens, R.J., *et al.* : *Arch. Environ. Health*, 18, 609, 1969
11) Hine, C.H., Meyers, F.H. and Wright, R.W. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 16, 201, 1970
12) Hattori, S. and Takemura, K. : *J. Clin. Electron. Microscopy*, 6, 350, 1973
13) 河野俊彦，林　豊：大気汚染学会誌，16, 313, 1981
14) Guidotti, T.L. : *Exp. Mol. Pathol.*, 33, 90, 1980
15) Sherwin, R.P. and Richters, V. : *Arch. Intern. Med.*, 128, 61, 1971
16) 寺田伸枝，池田真悟，福田雅夫他：東京衛研年報，35, 262, 1984
17) Cushman, D.W. and Cheung, H.S. : *Bioch. Biophys. Acta*, 250, 261, 1971
18) Ryan, J.W., Ryan, U.S., Schultz, D.R., *et al.* : *Biochem. J.*, 146, 497, 1975
19) Caldwell, P.R.B., Seegal, B.C., Hsu, K.C., *et al.* : *Science*, 191, 1050, 1976
20) Yang, H.Y.T., Erdös, E.G, and Levin, Y. : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 177, 291, 1971
21) Soffer, R.L. : *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 73, 1976
22) Ng, K.K.F. and Vane, J.R. : *Nature*, 218, 144, 1968
23) Lieberman, J. : *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 109, 743, 1974
24) Silverstein, E., Friedland, J., Lyons, H.A., *et al.* : *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 278, 498, 1976
25) 上田英之助，西村一孝，加藤市次郎他：日胸疾会誌，16, 94, 1978
26) Lieberman, J., Nosal, A., Schlessner, L.A., *et al.* : *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 120, 329, 1979
27) 三上理一郎，古屋　堯，山本正彦他：日本医事新報，No. 2903, 23,昭和54年
28) 四元秀毅，北村　諭，小坂樹徳他：日胸疾会誌，18, 34, 1980
29) Perrin-Fayolle, M., Pacheco, Y., Harf, R., *et al.* : *Thorax*, 34, 790, 1981
30) Mordelet-Dambrine, M.S., Stanislas-Leguern, G.

M., Huchon, G.J., *et al.*: *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 126, 472, 1982
31) Newman, R.A., Kimberly, P.J., Stewart, J.A., *et al.*: *Cancer Res.*, 40, 3621, 1980
32) Hinman, L.M., Stevens, C.A., Matthay, R.A., *et al.*: *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 117, **(supple)**, 67, 1978
33) Hinman, L.M., Stevens, C.A. Matthay, R.A., *et al.*: *Science*, 205, 202, 1979
34) 鈴木孝人, 寺田伸枝, 溝口 勲他：東京衛研年報, 34, 224, 1983
35) Kasahara, Y. and Ashihara, Y.: *Clin. Chem.*, 27, 1922, 1981
36) Wróblewski, F. and LaDue, J.S.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 90, 210, 1955
37) 生化学データーブック〔I〕, 第1版日本生化学会編, 129頁, 1979年, 東京化学同人, 東京
38) Keimowitz, R.I.: *J. Lad. Clin. Med.*, 63, 54, 1964
39) Reynolds, H.Y., Fulmer, J.D., Kazmierowski, J. A., *el al.*: *J. Clin. Invest.*, 59, 165, 1977
40) Low, R.B., Davis, G.S. and Giancola, M.S.: *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 118, 863, 1978
41) Doumas, B.T., Watson, W.A. and Biggs, H.G.: *Clin. Chim. Acta*, 31, 87, 1971
42) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., *et al.*: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
43) 局 博一, 鈴木 明, 市瀬孝道他：国立公害研究所研究報告, 第15号, 7, 1980
44) Robertson, A.L. Jr. and Khairallah, P.A.: *Science*, 172, 1138, 1971
45) Lanzillo, J.J. and Fanburg, B.L.: *J. Biol. Chem.*, 249, 2312, 1974
46) 池田正春, 荒川規矩男：ホルモンと臨床, 23, (増刊号), 162, 1975
47) Ng, K.K.F. and Vane, J.R.: *Nature*, 216, 762, 1967
48) Vane, J.R.: *Br. J. Pharmacol.*, 35, 209, 1969
49) Tusl, M.: *Staub-Reinhalt*, 35, 210, 1975
50) 佐々木憲二：未発表
51) Hugod, C.: *Arch. Environ. Health*, 34, 12, 1979
52) Constantinides, P. and Robinson, M.: *Arch. Path.*, 88, 106, 1969

Explanation of figures

Fig. 6 Light micrograph of terminal airway from the control rat. (100x)

Fig. 7 Same sample shown in Fig. 6.
Little collagen fiber was stained with Azan-Mallory method. (100x)

Fig. 8 Terminal airway of rat exposed to 8 ppm NO_2 for one week. (100x)
Walls of alveolar ducts and neighboring alveoli were thicked with mononuclear cells.

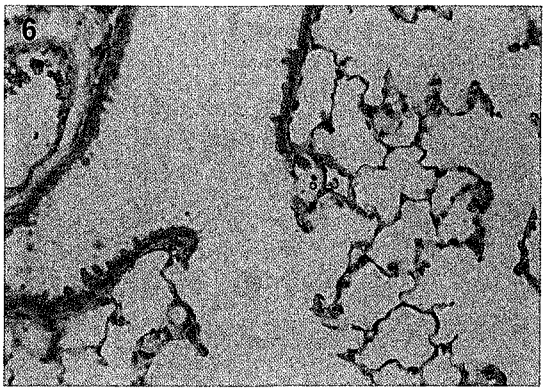
Fig. 9 Same sample shown in Fig. 8.
Collagen fiber stained with Azan-Mallory method increased. (100x)

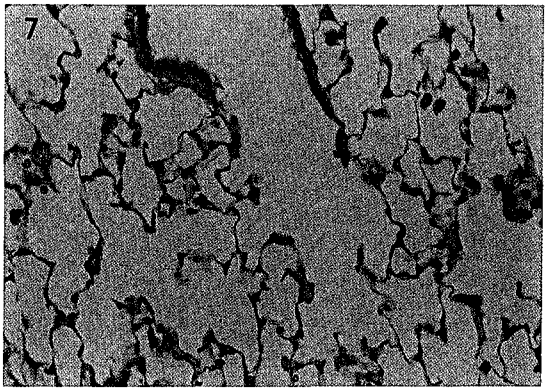
Fig. 10 Terminal airway of rat exposed to 8 ppm NO_2 for two weeks. (100x)
Walls of alveolar ducts and neighboring alveoli were thicked with momonuclear cells.

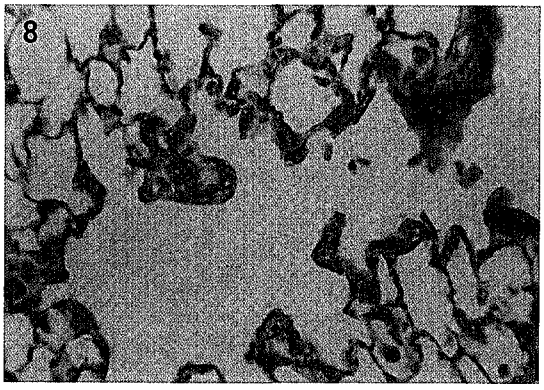
Fig. 11 Same sample shown in Fig. 10.
Foamy alveolar macrophage increased in alveolar space. (100x)

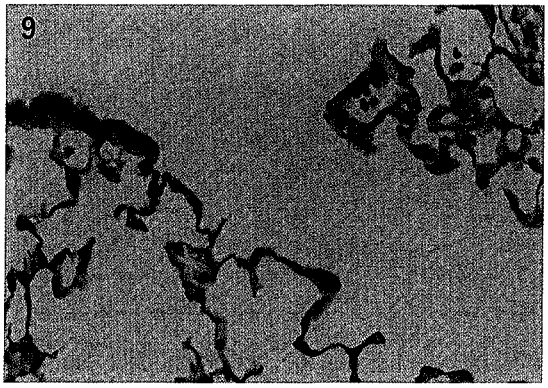
Fig. 12 Terminal airway of rat exposed to 8 ppm NO_2 for four weeks. (100x)
Thickening of walls of alveolar increased compared to Fig. 10.

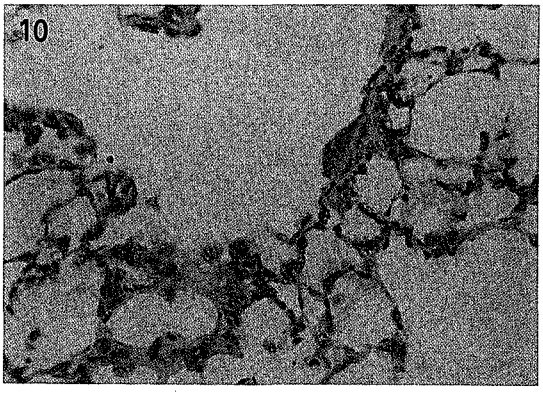
Fig. 13 Same sample shown in Fig. 12.
Extremely hypertrophy in the epithelium of terminal airway and deposition of collagen fiber in the walls of alveolar ducts were shown. (100x)

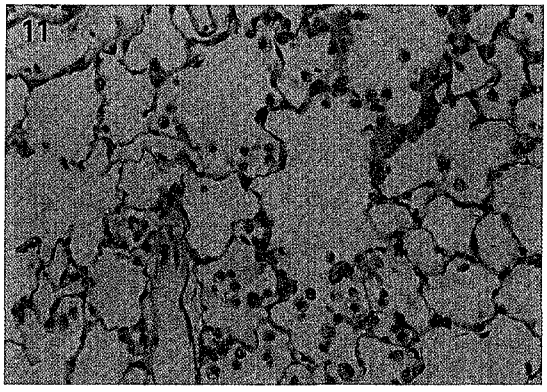

6

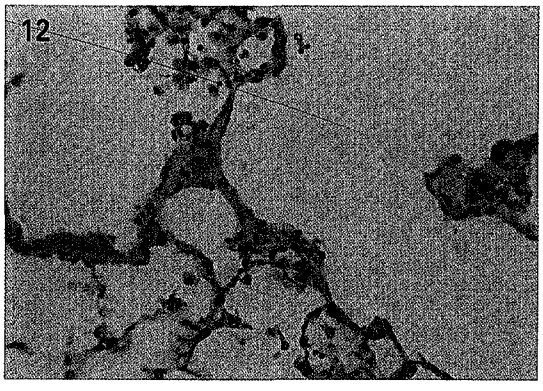

7


8


9


10


11


12

13

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 289-295, 1984

ラットにおけるメトヘモグロビン形成とその還元機構に及ぼす NO_2 暴露の影響

遠藤圭子*, 鈴木孝人*, 池田真悟*, 溝口勲*

Effect of NO_2 Exposure on tne Formation and Reduction of Methemoglobin in the Rats

KEIKO ENDO*, TAKAHITO SUZUKI*, SHINGO IKEDA* and ISAO MIZOGUCHI*

The methemoglobin (met-Hb) content in blood of rats exposed to 5 or 8 ppm nitrogen dioxide (NO_2) for 1, 3, 5 and 7 days was determined. As the reductive factors of met-Hb, NADH diaphorase activity in blood and the contents of ascorbate, glutathione and glucose in plasma or blood of each rat were also examined.

In the rats exposed to 5 ppm NO_2, the increases of the met-Hb content and NADH diaphorase activity were observed throughout the exposure period as compared to those in control rats exposed to air. No change in the ascorbate content was observed. The positive correlation between the met-Hb content and NADH diaphorase activity in the treated rats was observed. On the other hand, in the rats exposed to 8 ppm NO_2, the met-Hb content increased only at 7 days and the ascorbate content increased at 1, 3, 5 and 7 days, but the negative correlalion between the met-Hb and ascorbate content was observed. NADH diaphorase activity in the 8 ppm group, radically increased at 3 and 5 days, though the correlatlon on the met-Hb reduction by NADH diaphorase was not significant, The glutathione level in the blood remained unchanged in the 5 ppm group, but those in the 8 ppm group decreased at 1 and 3 days. The decrease in the glucose level was observed throughout 8 ppm NO_2, exposure periodr, but the glucose level in the 5 ppm group decreased only at 1 day. The correlation between the glutathione or glucose level and the met-Hb content was not significant.

These results suggest that 5 ppm NO_2 exposure caused the formation of met-Hb which could be reduced mainly by NADH diaphorase, and the met-Hb formation in the 8 ppm group could be suppressed mainly by ascorbate and NADH diaphorase.

Keywords : nitrogen dioxide, rat, methemoglobin, NADH diaphorase, ascorbate, glutathione, glucose

緒　言

二酸化窒素(NO_2)の暴露によってヘモグロビン(Hb)のヘム鉄が Fe(II)から Fe(III)へと酸化され，メトヘモグロビン(met-Hb)が形成されることは古くから知られていた．Hb の酸素運搬はヘムが2価の状態で行われているので，それが3価になると Hb は酸素運搬能力を失ってしまう．

NO_2による met-Hb 生成の報告は in vitro における実験が多く，また，in vivo の実験でも 10～1000 ppm という高濃度暴露による報告が多かった[1-5]．最近 Case[6]らはマウスに 6 ppm の NO_2 を 16 時間暴露後，electron paramagnetic resonance (EPR)スペクトルの分析によって met-Hb の増加を確認している．この暴露濃度は現在までの報告例のうち，in vivo での NO_2単独の暴露実

* 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

験で, met-Hb 増加をもたらす最小濃度のようである. しかし, これ以下の濃度の in vivo における NO_2 暴露によって met-Hb の増加は生じないのだろうか. 更に, 我々は, 低濃度の NO_2 によっていったんは met-Hb が形成されるが, 直ちに met-Hb の還元機構が活性化されるため, met-Hb の増加が抑制される可能性を予想した. しかし, met-Hb の還元機構に対する NO_2 の影響について検討している報告例は見あたらない. そこで, 本研究では, 労働衛生上で勧告されている NO_2 の許容濃度でもある 5 ppm と, met-Hb が確実に生じると思える 8 ppm の NO_2 を 7 日間ラットに暴露し, met-Hb 形成の確認と met-Hb 還元機構に及ぼす NO_2 の影響について検討を試みた.

met-Hb の還元機構については先天性 met-Hb 血症の患者血について良く研究されており, 次の様な還元機構が示されている. ①NADH diaphorase 及び NADPH 依存 met-Hb 還元酵素などによる還元作用, ②アスコルビン酸(AA), 還元型グルタチオン(GSH), NADH NADPH などのそれ自身が還元剤で直接に met-Hb を還元するもの, ③赤血球内でグルコース(Glu), 乳酸, キシリトールなどが基質として代謝され, その過程で NADH や NADPH の産生を介して還元するもの, ④ビタミン K などによる他の基質と共存することによって met-Hb の還元に促進的に働くものなどが報告されている[7-11]. 更に, Scott[12]らによってそれらの met-Hb 還元機構の強さが比較されているが, その寄与の程度は NADH diaphorase (73%), AA (12%), GSH(9 %), NADPH 依存 met-Hb 還元酵素(6 %)と考えられている. また, 先天性met-Hb血症ではNADH diaphorase が欠除していること, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) 欠損患者では NADPH の産生が悪いにもかかわらず met-Hb 血症を起こさないこと[13], また, 乳酸は赤血球内で代謝され NADH を産生するが, この乳酸添加によっても先天性 met-Hb 血症では met-Hb の還元がほとんど認められないことなど[14], これらの結果はいずれも NADH diaphorase が met-Hb 還元で果す役割が大きいことを示している.

そこで, 本研究では NO_2 暴露ラットの血液中の met-Hb 含量と NADH diaphorase 活性, AA 含量, GSH 含量, Glu 含量を測定したところ, met-Hb の増加が認められ, またその増加に伴って, 主として NADH diaphorase と還元型 AA による還元機構の亢進を示唆する知見が得られたので報告する.

実験方法

動物は 5 週令の雄の F344／DuCrj ラット (日本チャールスリバー社) を用いて, 対照群 (Air 群) と NO_2 暴露群 (5 ±0.5 ppm 群, 8 ±0.5 ppm 群) に分けた. 暴露は既報[15]の装置及び条件で行った.

NO_2 を 1, 3, 5, 7 日間連続暴露後にラットをチャンバーより取り出し, ネンブタール麻酔下で採血を行った. 血液の一部はそのまま met-Hb 含量, NADH diaphorase 活性及び GSH 含量の測定に供し, 残りの血液は 800×g max で 15 分間遠心し, 得られた血漿は AA と Glu の含量の測定に用いた. met-Hb は採血から 3 時間以内に分析を行ったが, NADH diaphorase は試料を 4 ℃に保存し翌日中に分析した. AA, Glu 及び GSH については分析するまで−80℃に保存した.

分析方法については, met-Hb 含量は Evelyn と Malloy の方法[16]を用いて分析し, NADH diaphorase 活性は Scott らの方法[17,18]を改変した三輪の方法[19]を用いた. AA 含量は岡村の方法[20]により分析し, GSH 含量については Ellman の方法[21]を用いた. Glu 含量はオートセラ Glu 用キット (第一化学薬品) を用いて auto-analyzer によって分析した.

実験結果

体重は対照群と比較して, 5 ppm 群及び 8 ppm 群とも有意な変化は認められなかった.

I) 5 ppm NO_2 暴露群における変化 (図 1)

met-Hb 含量は暴露開始 1 日後から有意な増加が認められ, その増加は 5 日後にピークに達し, 7 日後には 1 日後のレベルまで戻った. NADH diaphorase 活性も 1 日後から 7 日後まで有意な上昇が認められ, その経時的変化は met-Hb の変化パターンと平行していた. 総 AA 含量は 3 日後と 5 日後に増加傾向($P<0.10$)を示したが, 還元型 AA 含量には有意な変化はなく, 酸化型アスコルビン酸(dehydroascorbic acid, DHA)含量が 3 日後と 5 日後に有意な増加が認められた. GSH 含量は有意な変化は認められなかった. Glu 含量は 1 日後に有意な減少が認められ, それ以降は減少傾向($P<0.10$) が認められた.

II) 8 ppm NO_2 暴露群における変化 (図 2)

met-Hb 含量は暴露開始 7 日後のみに有意な増加が認められた. NADH diaphorase 活性は 3 日後に著しい活性上昇を示し, 以後, 活性は対照群と比べ有意な上昇を保持していたが 7 日後までに漸減していった. 総 AA 含量は 1 日後と 5 日後に有意な増加が認められたが, 7 日後では逆に有意な減少を示し, 還元型 AA 含量も総 AA 含量の変化と同様のパターンで変化しており, 1 日後と

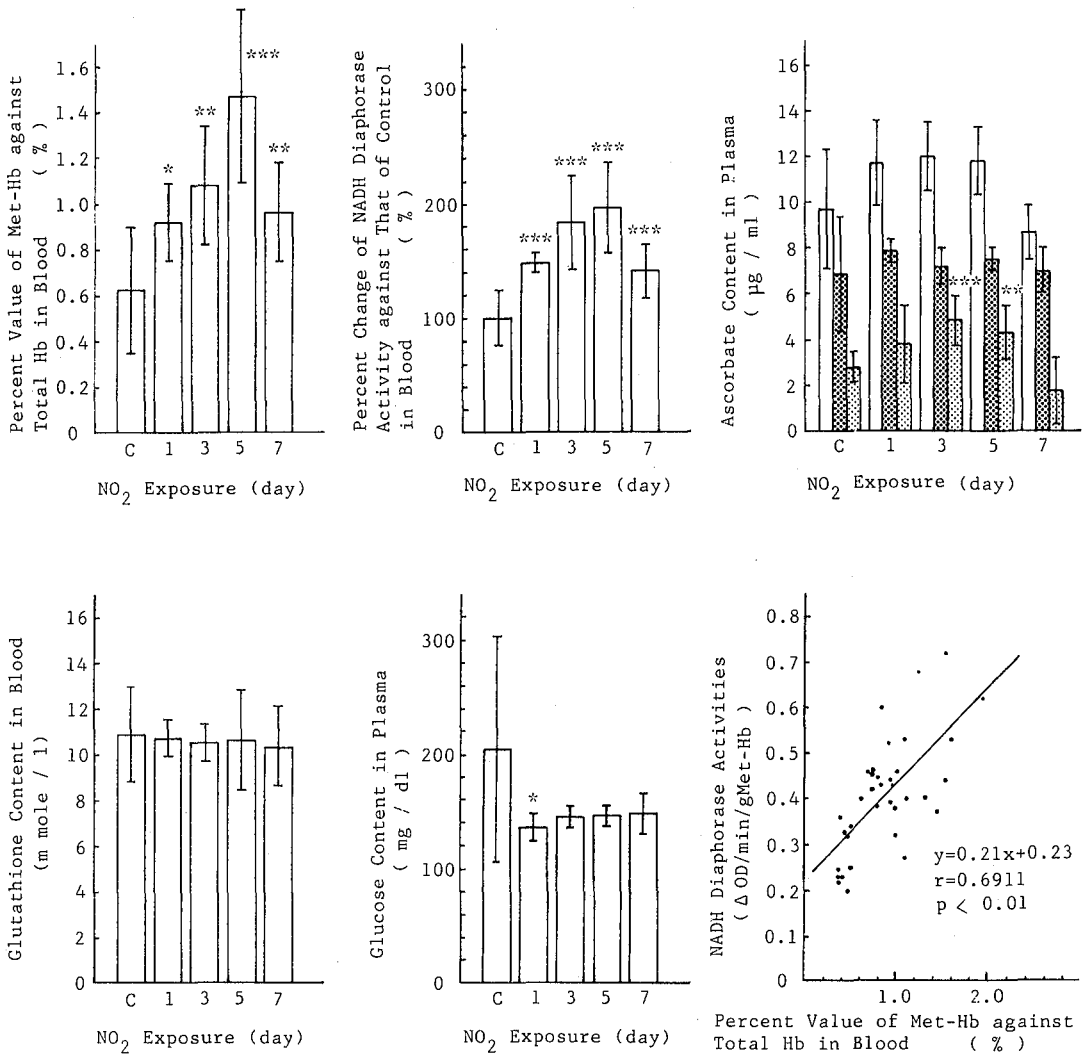


Fig. 1. Biochemical Changes and Correlation between Methemoglobin Contents and NADH Diaphorase Activities on the Blood of Rats Exposed to 5 ppm NO_2.
Eleven rats as control were exposed to air for 7 days and eight rats of each NO_2 group were exposed to 5 ppm NO_2 for 1, 3, 5 and 7 days respectively. All results indicated are mean±S. D.

□: Total Ascorbate, ▩: Ascorbic Acid,
▨: Dehydroascorbic Acid (DHA),
*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$

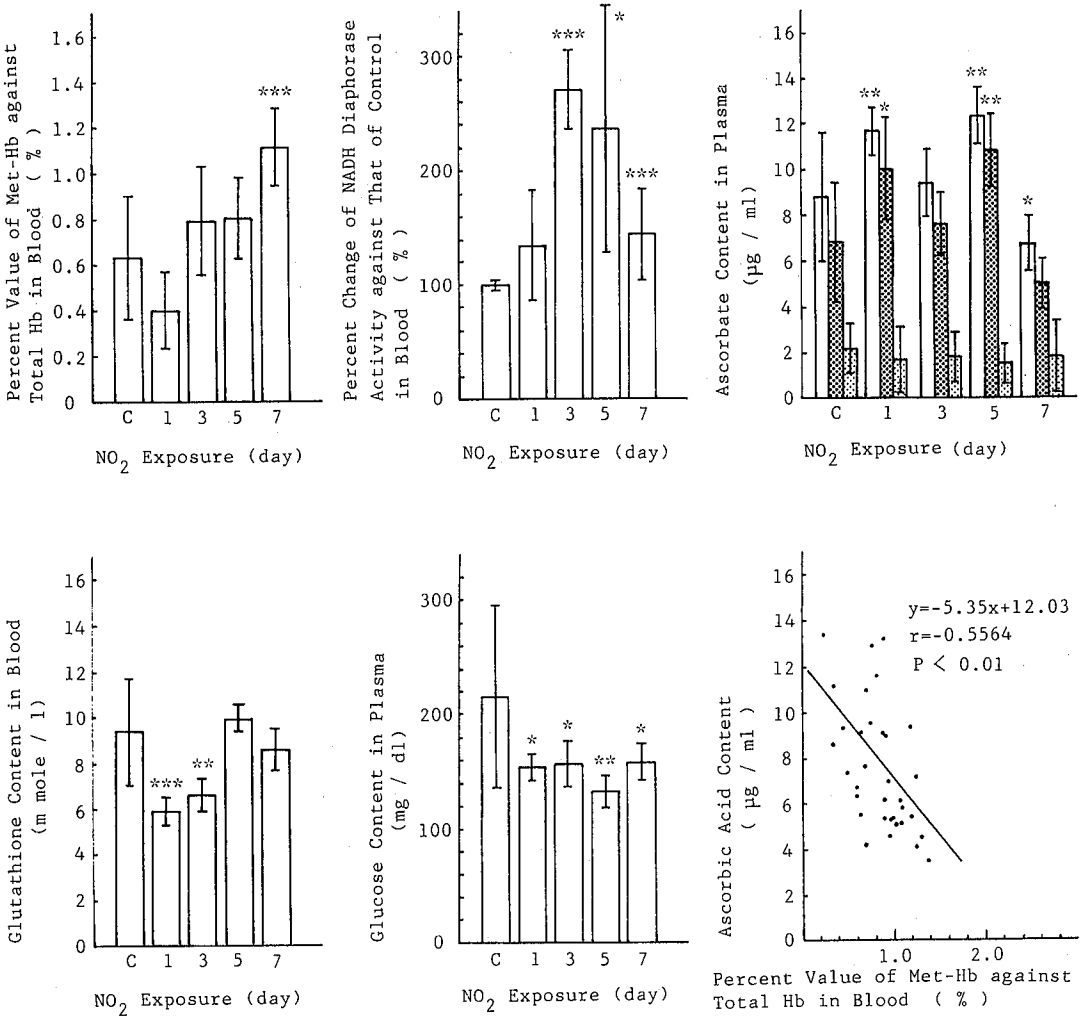


Fig. 2. Biochemical Changes and Correlation between Methemoglobin Contents and Ascorbic Acid Contents on Blood of Rats Exposed to 8 ppm NO_2.
Eleven rats as control were exposed to air for 7 days and eight rats of each NO_2 group were exposed to 8 ppm NO_2 for 1, 3, 5 and 7 days respectively. All results indicated are mean±S. D.

□: Total Ascorbate, ▩: Ascorbic Acid,
▨: Dehydroascorbic Acid (DHA),
*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$

5日後には有意な増加が認められ，7日後には減少傾向($P<0.10$)が認められた。しかし，DHA含量には有意な変化は認められなかった．GSH含量は1日後と3日後に有意な減少が認められ，それ以後は対照群のレベルに戻った．Glu含量は1日後から7日後まで有意な減少が認められた．

考　察

5 ppmのNO_2を暴露した場合，血液中のmet-Hb含量とNADH diaphorase活性は類似のパターンで増加が認められ，この両者の相関関係は図1で明らかなように，有意な正の相関関係が認められた．このことから，NADH diaphoraseの活性上昇は，NO_2の暴露によって増加したmet-Hbを還元する必要性から惹起されたものと思われる．また，暴露開始3日後と5日後の総AA含量の増加傾向及びDHA含量の有意な増加の結果から，NO_2の暴露により増加したmet-Hbを還元するために，他の組織より血液中へ若干の還元型AAの補給が行われ，更にそれが直接的にmet-Hb還元に働いたためにDHAに変換し，DHAの含量増加が生じた可能性が考えられる．しかし，吸入されたNO_2は血液中においてNO^-_2及びNO^-_3として存在することが知られているので[22,23]，これらのイオンによって直接AAが酸化されることも考えられるので即断はできない．NO_2の暴露により血球内でのGlu消費が亢進することは既に知られていたが[24]，本実験でも減少又は減少傾向が認められた．また，5 ppmNO_2の暴露によって増加したmet-Hbに対して，met-Hb含量と還元又は総AA含量との間には有意な相関関係は見られないが，met-Hb含量とNADH diaphorase活性と相関関係が明らかなので，主としてNADH diaphoraseによる生体側の還元機構の亢進が行われたものと推測される．

8 ppmのNO_2を暴露した場合，予想に反して暴露開始7日後のみにmet-Hb含量の有意な増加が認められた．一方，NADH diaphorase活性は図2に示すように，3日後には270％と著しい活性上昇を示し，その後，5日後には238％，7日後には144％と漸減してはいるが有意な活性上昇は認められる．更に，DHA含量と総AA含量も1日後と5日後に有意な増加を示しており，met-Hb含量と還元型AA含量の関係は図2に示すように負の相関関係が認められた．これらのことから考えると，暴露開始1日後から5日後までのmet-Hb含量の増加が抑制されたのは，還元型AA含量の増加及びNADH diaphorase活性の上昇によるものと思われる．また7日後におけるmet-Hb含量の有意な増加は，NADH diaphorase活性が3日後を最高として7日後まで徐徐に減少していること，および総AA含量も7日後に減少が認められることから，NO_2の暴露により生成したmet-Hbに対する還元力が弱まったためと思われる．また8 ppmNO_2暴露でも，暴露開始1日後よりGlu含量の減少が認められたが，このことはGluの解糖系における代謝が活発化したことを示している．解糖系ではEmbden-Meyerhof経路においてNADHを生成し，ペントースリン酸経路ではNADPHを生成するが，赤血球の解糖は正常状態ではほとんどペントースリン酸経路を利用しないこと[25]，また，G-6-PD欠損症では一般に，met-Hbの出現が認められないことが報告されている[13]．本実験でも，Glu含量とNADH diaphoraseとの間に負の相関関係($r=-0.3324$, $P<0.05$)が認められた．このことは，met-Hb還元がGluの消費に伴ったNADPHによる直接的還元やNADPH依存met-Hb還元酵素の活性化による還元と考えるよりは，Gluの代謝により生成したNADHがNADH diaphoraseを活性化しておこるものと考える方が自然であろう．

GSHは赤血球において大部分は還元型で存在し，細胞内の酸化還元に重要な役割を果している[26,27]．また，GSHが非酵素的にmet-Hbを還元することは以前より知られているが[7]，in vivoにおける働きについてはmet-Hbの還元に有効であるという報告[28]と有効とは言いがたいという報告[29]があり，現在のところ明確ではない．本実験の8 ppmNO_2暴露では1日後と3日後のGSH含量とmet-Hb含量との間には負の相関関係($r=-0.6333$, $P<0.05$)が認められたので，GSHがmet-Hbの還元に働き酸化型グルタチオン(GSSG)に変化したとも考えられるが，NO_2の暴露によっても血液中のGSHの減少が生じることも報告[30]されており，met-Hbの還元のためにGSH含量が減少したとは即断は出来ない．また，GSHの暴露開始5日後と7日後の回復は恐らく血液中のglutathione reductaseなどの働きによって回復したものと思われる．

低濃度の複合大気汚染物質暴露の野外調査において，met-Hb形成に関する二，三の報告がなされている．Ayres[31]らによるニューヨーク市の道路公団のトンネル作業者についての報告で，トンネル内で0.07 ppmNO_2（1時間最高値0.32ppm），1.31 ppm NO（1時間最高値5.81 ppm）の濃度で暴露された労働者の血液中にmet-Hbの増加が認められている．Caseら[6]もトンネルから採取したガス(0.3 ppm NO_2, 3 ppm NO)をヒトに3時間暴露した場合，met-Hbの増加を報告している．更

にPetrとSchmidt[32]はチェコスロバキアのある都市内の汚染地区（約0.01～0.035 ppmNOx）と非汚染地区(NOx濃度は痕跡程度）の比較では汚染地区の学童においてmet-Hb含量が高いことを報告している．この様に低濃度のNOxに暴露された場合でも，血液中のmet-Hbの増加が報告されているが，met-Hbの形成は医薬品や食物及び飲料水中の硝酸塩等によっても生じるので[13]，ヒトの場合にはこれらの大気汚染濃度とmet-Hb形成とを単純に関連づけることは難しいと思われる．例えば，Woebkenberg[33]らの報告では工場地区（約0.0289ppmNO_2）と非工場地区（約0.0135ppmNO_2）との比較では非工場地区の住民の方が有意にmet-Hb値が高く出ており，著者らは飲料水中のNO_3レベルが非工場地区で高いためこのような結果になったと述べている．一方，動物実験においては，Case[6]らはトンネル採取ガス(0. 3ppmNO_2, 3ppmNO)をウサギに暴露した時にもmet-Hbが増加したと報告している．織田[34]らもマウスに1.8 ppmNO_2と9.5 ppmNOを暴露した時にmet-Hbの増加を認めており，更に野上[35]らもマウスに1.0～1.5ppmNO_2と10ppmNOの暴露によってmet-Hbの増加を確認している．このように比較的低濃度のNO_2と若干高いNOの複合暴露によってもmet-Hbが形成される．また，NOの暴露によって形成されたNO-Hbが酸素またはNO_3との反応によってNO-Hbがmet-Hbに変化することも報告されている[6]ので，単にこれらのNO_2の濃度レベルでmet-Hbの増加が生じるか否かは不明であると思われる．

本実験では5 ppm及び8 ppmのNO_2の単独暴露によってmet-Hb形成がおこること，また，それに伴ってmet-Hbの還元機構が活発化することが確認された．今後はより低濃度のNO_2の暴露の場合におけるmet-Hb形成の有無及びその還元機構に対する影響を検討することが必要と思われる．

（本研究は昭和58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) MacQuiddy, E. L., La Towsky, L. W., Tollman, J. P. and Finlayson, A. I. : *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, **23**, 134, 1941
2) Toothill, C. : *Brit. J. Anaesth.*, **39**, 405, 1967
3) Ehrman, R. A., Treshow, M. and Lytle I. M., : *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **33**, 751, 1972
4) McCord, C. P., Harrold, G. C. and Meek, S. F. : *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, **23**, 200, 1941
5) Malatinsky, J., Kadlic, T. and Kovacik, V. : *Anesth. Analg.*, **52**(1), 94, 1973
6) Case, G. D., Dixon, J. S. and Schooley, J. C. : *Environ. Res.*, **20**, 43, 1979
7) Morrison, D. B. and Williams, E. F. Jr. : *Science*, **87**, 15, 1938
8) 浅倉稔生，水上茂樹，吉川春寿，金沢康徳，中尾喜久，入沢和世，三輪史朗：生化学，**36**, 64, 1964
9) Harley, J. D. and Robin, H. : *Nature*, **193**, 478, 1962
10) Harley, J. D. and Robin, H. : *Nature*, **198**, 397, 1963
11) 竹下正純，米山良昌：医学のあゆみ，**102**, 581, 1977
12) Scott, E. M., Duncan, I. W. and Ekstrand, V. : *Fed. Proc.*, **22**, 467, 1963
13) 浅倉稔生，吉川春寿：蛋白質　核酸　酵素，**10**, 1, 1965
14) Gibson, Q. H. : *Biochem. J.*, **42**, 13, 1948
15) 鈴木孝人，寺田伸枝，佐藤 明，溝口 勲：東京衛研年報，**34**, 224, 1983
16) Evelyn, K. A. and Malloy, H. T. : *J. Biol. Chem.*, **126**, 655, 1938
17) Scott, E. M. : *J. Clin. Invest.*, **39**, 1176, 1960
18) Scott, E. M., Duncan, I. W. and Ekstrand, V. : *J. Biol. Chem.*, **240**, 481, 1965
19) 三輪史朗：臨床検査，**15**（臨時増刊），1289, 1971
20) 岡村正人：ビタミン，**56**, 425, 1982
21) Ellman, G. L. : Arch. *Biochem. Biophys.*, **82**, 70, 1959
22) Goldstein, E. : *Amer. Rev. Respir. Dis.*, **115**, 403, 1977
23) 織田 肇，永沢節子，局 博一，鈴木 明：国立公害研究所研究報告，**31**, 45, 1981
24) Cassan, S. M., Gross, B. and Simmons, D. H. : *Environ. Res.*, **12**, 174, 1976
25) Brin, M. and Yonemoto, R. H. : *J. Biol. Chem.*, **230**, 307, 1958
26) Kay, W. W. and Murrfitt, K. C. : *Biochem. J.*, **74**, 203, 1960
27) Srivastava, S. K. and Beutler, E. : *Analyt. Biochem.*, **25**, 70, 1968
28) Strömme, J. H. and Eldjarn, L. : *Biochem. J.*, **84**, 406, 1962

29) Allen, D. W. and Jandl, J. H. : *J. Clin. Invest.*, 40, 454, 1961
30) 河田明治：国立公害研究所研究報告, 15, 259, 1980
31) Ayres, S. M., Evans, R., Licht, D., Griesbach, J., Reimold, F., Ferrand, E. F. and Criscitiello, A. : *Arch. Environ. Health,* 27, 168, 1973
32) Petr, B. and Schmidt, P. : *Hyg. Sanit. :* 31, 111, 1966
33) Woebkenberg, N. R., Mostardi, R. A., Ely, D. L. and Worstell, D. : *Environ. Res.*, 26, 347, 1981
34) 織田 肇, 野上浩志, 楠本繁子, 中島泰知：大気汚染研究, 9 (第 15 回大気汚染研究全国協議会大会号), 336, 1974
35) 野上浩志, 織田 肇, 楠本繁子, 米川恵都子, 坪田康子, 中島泰知：大気汚染研究, 9 (第 15 回大気汚染研究全国協議会大会号), 337, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 296-301, 1984

東京都における降下煤塵量の推移 1969年から1983年まで

大澤誠喜*, 池田真悟*, 福田雅夫*, 牧野国義*
関　比呂伸*, 太田與洋*, 鈴木孝人*, 溝口　勲*

Changes of the Amount of Fall Dast in Tokyo Area 1969−1983

MASANOBU OHSAWA*, SHINGO IKEDA*, MASAO FUKUDA*,
KUNIYOSHI MAKINO*, HIRONOBU SEKI*, TOMOHIRO OHTA*,
TAKAHITO SUZUKI* and ISAO MIZOGUCHI*

Changes in the amount of fallen dust in Tokyo area were investigated for the past 15 years. The amount decreased gradually with years. The average value for the last 5 years was less than half the amount of 15 years ago.

The seasonal changes of the fallen dust remained unchanged for the 15 years.

The amount of fallen dust was affected by weather conditions such as the wind speed and precipitation. The insoluble fraction of fallen dust increased as the wind speed increased. On the other hand, the soluble fraction of fallen dust increased with precipitation.

The amount of fallen dust in commercial or industrial area were more than that in residential areas.

Keywords: amount of fall dust, seasonal alteration, insoluble fraction, soluble fraction, commercial area, industrial area, residental area, Tokyo.

緒　言

大気汚染は，1960年代後半から1970年代にかけての危機的状況はすぎたとは云え，今なお各都市における共通の課題である．

東京都においても都民の健康保持，増進をはかるため，種々の大気汚染調査がなされている．なかでも降下煤塵量の測定は，大気汚染調査の基本的な測定方法の一つとして諸外国では古くから行なわれており，当衛生研究所でも，1954年より測定を開始し，以来，現在まで継続測定を行っている．これらの調査結果は，今までに斉藤ら[1~8]，脇坂ら[9~11]，中野ら[12]，佐藤ら[13]によって，その一部が報告されている．

今回は，1969年から1983年までの15年間のデータをもとに，東京都における降下煤塵量の推移と，その季節変動，ならびに地域用途別の降下煤塵量，およびこれらと気象因子(風速，降雨量)との関係について検討した．

測定地点および測定方法

降下煤塵の測定地点は図−1に示した．測定地点数は，東京都区部24地点，多摩地区3地点，および伊豆大島1地点を含め計28測定地点である．測定器は主として保健所，区役所，学校などの公共建造物の屋上に設置した．なお，測定地を地域用途別に区分して，その降下煤塵量を比較検討する目的から，東京都統計年鑑[14]に準じて各測定地点を商業地区：千代田区（麹町保健所，東京都がん検診センター），中央区(都立築地産院)，台東区(台東区役所環境部)，工業地区：墨田区（墨田区役所向島支所)，江東区（江東都税事務所)，荒川区（荒川科学館)，大田区(糀谷保健所)，品川区(品川区立戸越小学校)，住居地区：目黒区（目黒区福祉センター)，世田谷区（都立母子保健院)，杉並区(杉並西保健所)，中野区(中野図書

* 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

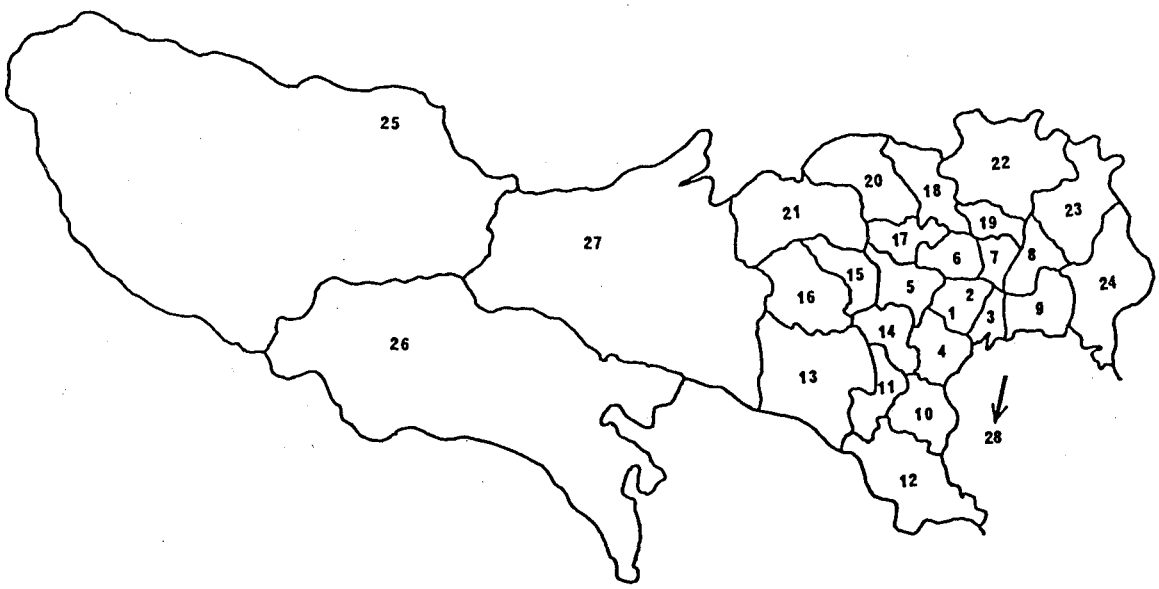


Fig. 1　Sampling Point

1. Chiyoda-ku-1
2. Chiyoda-ku-2
3. Chuo-ku
4. Minato-ku
5. Shinjuku-ku
6. Bunkyo-ku
7. Taito-ku
8. Sumida-ku
9. Koto-ku
10. Shinagawa-ku
11. Meguro-ku
12. Ohta-ku
13. Setagaya-ku
14. Shibuya-ku
15. Nakano-ku
16. Suginami-ku
17. Toshima-ku
18. Kita-ku
19. Arakawa-ku
20. Itabashi-ku
21. Nerima-ku
22. Adachi-ku
23. Katsushika-ku
24. Edogawa-ku
25. Oume-shi
26. Hachioji-shi
27. Tachikawa-shi
28. Ohshima

館)，練馬区(練馬保健所)，および郊外地区：青梅市(青梅保健所) に区分した．その他の測定地点は，地域用途別が明確でない混在地域のため省いた．

降下煤塵量の測定は，衛生試験法[15]に準じた．すなわち，簡易式降下煤塵計を，クーリングタワーなど降下煤塵量に直接影響を与えない場所に概ね1ケ月間放置し，回収後，東洋 No. 5_A ろ紙を用い残渣とろ液に分けた．残渣は 90℃で恒量になるまで乾燥，秤量し不溶性成分とした．ろ液は湯浴上で蒸発乾固し，乾燥，恒量化した後秤量，可溶性成分とした．降下煤塵量は，1㎢当り 30 日間の降下煤塵量に換算して表示した．

結　　果

1．東京都における降下煤塵量(年平均値)の推移を図－2に示した．降下煤塵総量は 1970 年から 1972 年にかけて，17.2 ton／㎢／月から 11.6 ton／㎢／月と急激に減少(32.6％)し，1974 年から 10.0 ton／㎢／月以下を示した．最近5年間の平均測定値は 7.0 ton／㎢／月から 8.0 ton／㎢／月であった．

可溶性成分量は 1969 年から 1972 年の間に 6.9 ton／㎢／月から 4.2 ton／㎢／月と緩やかな減少を示した以外は，1972 年以降 4.0 ton／㎢／月から 3.0 ton／㎢／月でほとんど増減しなかった．

不溶性成分量は，降下煤塵総量の年次推移と類似した傾向を示し，同じく 1970 年から 1972 年にかけて 10.9 ton／㎢／月から 7.2 ton／㎢／月と急激に減少した．このことから降下煤塵量は不溶性成分の増減に依存する傾

向が認められた.

2. 降下煤塵量の季節変動を検討するために, 過去15年間の各月別の平均値を図－3に示した. グラフで明らかなように, 降下煤塵総量は, 3月から4月と, 11月にピークがみられ, 6月から10月の間では大きな変動を示さなかった. 不溶性成分は総量と類似した変動を示したが, 可溶性成分は四季を問わずほゞ一定した値を示した.

降下煤塵量の変動は気象的要素に依存性が強いことから, 1969年から1983年の間の東京都統計年鑑より気象因子(風速, 降雨量)を参照して, 降下煤塵量との間の関係を検討した. 月別平均風速は, 3月から4月の間にピークがみられ各々3.8 m／s, 3.9 m／sの風速であった. 又, 8月にも3.5 m／sの風が吹いた (図－4).

月別平均降雨量は, 6月から7月, 9月から10月にかけてピークが認められ, 各々149 mm, 143 mm, 203 mm, および181 mmの降雨量であった (図－5).

気象因子と降下煤塵量の関係は, その相関係数を表－1に示した. 表から明らかなように, 降下煤塵総量, および不溶性成分量と平均風速との間, 可溶性成分量と降雨量との間で, 一部の測定年に正の相関がみられた.

3. 地域用途別における降下煤塵総量, 不溶性成分量, および可溶性成分量を図－6, 図－7, および図－8に示した. 降下煤塵総量は, 測定期間中, 商業地区＞工業地区＞住居地区＞郊外地区の順位で多く, 1972年以降は図-2の降下煤塵総量のパターンと大同小異で, 1970年から1972年の間の変化も, ほゞ同等の減少率が認め

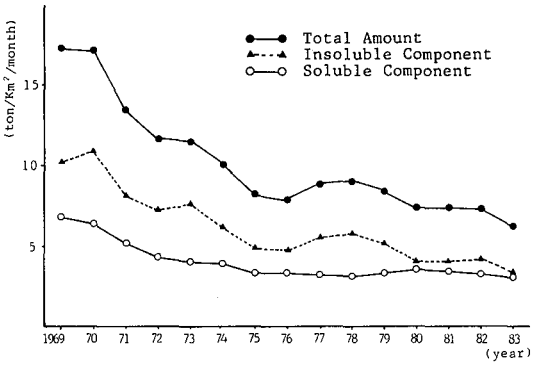


Fig. 2 Annual Changes of the Amount of Fall Dust in Tokyo Area

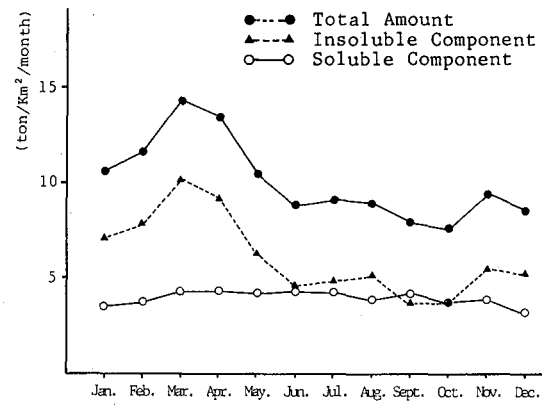


Fig. 3 Seasonal Changes of the Amount of Fall Dust in Tokyo Area

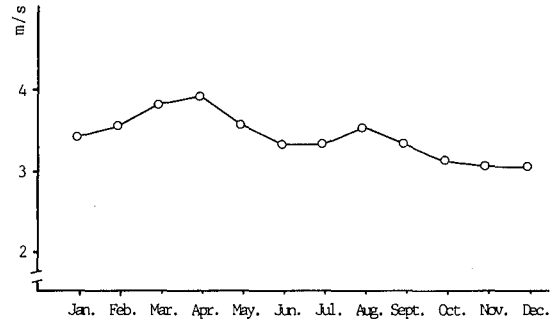


Fig. 4 Monthly Changes of Average Wind Speed in Tokyo Area 1969 to 1982
Average wind speed is computed from total wind speed for 24 hours

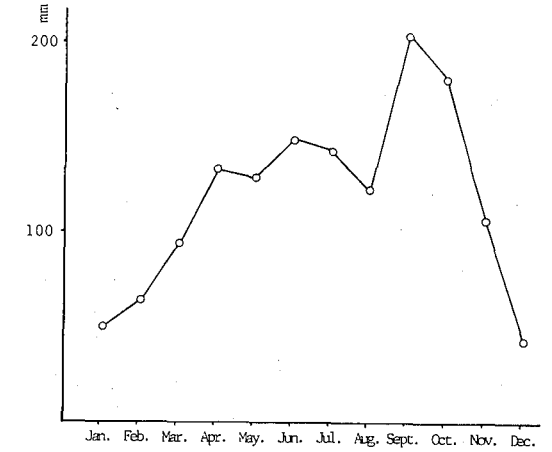


Fig. 5 Monthly Changes of Average Precipitation in Tokyo Area 1969 to 1982

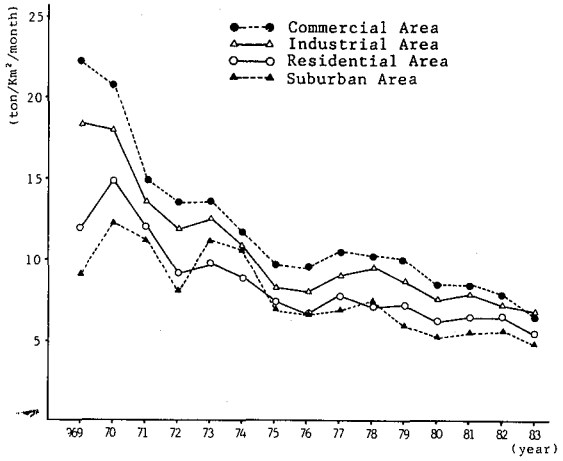


Fig. 6 Annual Changes of the Amount of Fall Dust by District and Kind in Tokyo Area

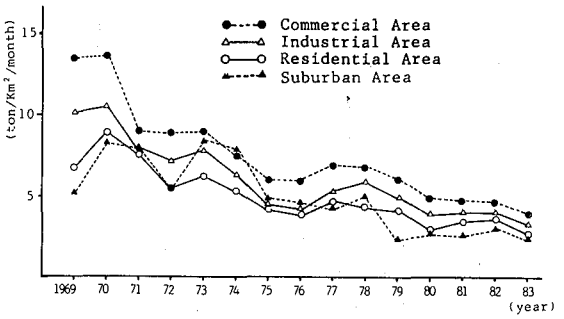


Fig. 7 Annual Changes of the Insoluble Fraction of Fall Dust by District and Kind in Tokyo Area

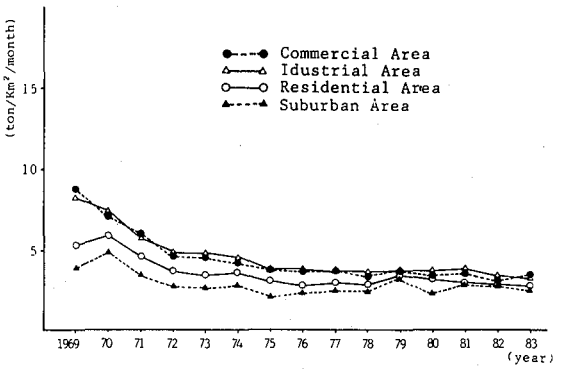


Fig. 8 Annual Changes of the soluble Fraction of Fall Dust by District and Kind in Tokyo Area

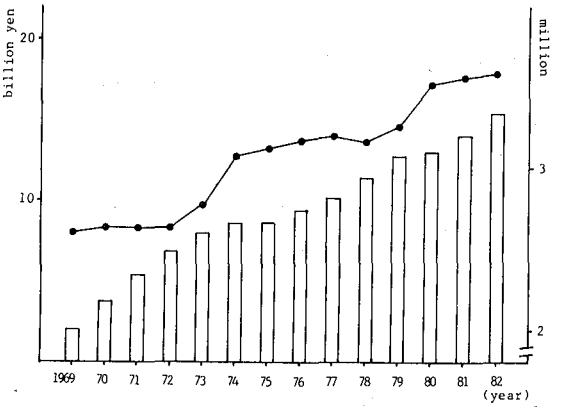


Fig. 9 Annual Changes of the Value of Shipments and the Registered Motor Vehicle in Tokyo Area
●——● : Value of Shipments
□ : Registered Motor Vehicle

Table. 1. Correlation Cofficient between the Amount of Fall Dust and Average Wind Speed or Average Precipitation

	Year	Total Amount	Insoluble Component	Soluble Component
Average Wind Speed	1969	0.619*	0.555	0.367
	1970	0.592*	0.639*	0.110
	1971	0.594*	0.633*	0.186
	1972	0.574	0.558	-0.128
	1973	0.482	0.502	0.090
	1974	0.541	0.598*	0.046
	1975	0.485	0.428	0.220
	1976	0.303	0.267	0.182
	1977	0.639*	0.696*	-0.038
	1978	0.267	0.298	-0.047
	1979	0.878**	0.889**	0.206
	1980	0.646*	0.757**	-0.516
	1981	0.480	0.695*	-0.339
	1982	0.158	0.604*	-0.229
Average Precipitation	1969	-0.260	-0.364	0.343
	1970	-0.319	-0.499	0.463
	1971	-0.114	-0.371	0.595*
	1972	0.153	0.435	0.626*
	1973	0.056	-0.581	0.531
	1974	-0.171	-0.120	0.600*
	1975	-0.222	-0.460	0.570
	1976	-0.133	-0.623	0.308
	1977	-0.082	-0.293	0.652*
	1978	-0.116	-0.331	0.661*
	1979	-0.170	-0.331	0.769**
	1980	-0.303	-0.451	0.562
	1981	0.284	-0.469	0.285
	1982	-0.214	-0.404	0.553

* : $P<0.05$, ** : $P<0.01$, $n=12$

られた．すなわち，商業地区 33.2％，工業地区 34.0％，住居地区 38.5％，および郊外地区 33.6％であった．しかし，1969 年から 1970 年にかけては，降下煤塵総量と，各地域用途別総量との間で異った傾向を示した．
すなわち，商業，工業両地区はやゝ減少傾向が認められたが，住居，郊外両地区では反対に増加傾向を示した．

不溶性成分量は，1 項で記述したように，各用途別地域の降下煤塵総量の推移とほゞ類似したパターンを示した．

可溶性成分量は，商業，工業両地区において過去 15 年間，ほゞ同量を示し，1969 年から 1972 年にかけ，商業地区で 8.7 ton／㎢／月から 4.5 ton／㎢／月，工業地区で 8.2 ton／㎢／月から 4.8 ton／㎢／月と両地区共 50％近く減少したが，以後，大きな増減はみられなかった．住居地区，および郊外地区は，1970 年の各々5.8 ton／㎢／月，4.8 ton／㎢／月をピークにして，以後減少しつづけ，1983 年には各々3.0 ton／㎢／月以内であった．

考　察

東京都統計年鑑を参照し，東京都内の産業活動の現状をみると，先づ，自動車の保有台数は，1969 年に 200 万台に達し，1981 年には 320 万台を突破しており，更に増加している（図－9）．又，工業品生産に伴なう製造品出荷額を，卸売物価指数で補正したものを示したが（図－9），1969 年から 1972 年の間の製造品出荷額には，ほとんど変動はないが，1973 年以降，年々増加している．このように，自動車保有台数の増加，および産業活動の発展にもかかわらず，東京都の降下煤塵量は年々減少している．降下煤塵量の減少は，石炭から石油への移行，規制による工場煤煙排出の改善，自動車排ガスの規制，道路の舗装化，農耕地の宅地化，などの理由により，煤塵，および土砂の舞上りなどが減少したことに由来するものと思われる．以上のように，東京都における降下煤塵量は減少したが，地域用途別にみた降下煤塵量は，住居地区，および郊外地区に比べ，商業地区，および工業地区の方が多かった．これは，工場などの産業活動からの排出による差と推測した．しかし，年々，各地区間の測定値は接近しつゝあり，特に，最近 5 年間では，その差約 1.0 ton／㎢／月前後を示した．このことは，都内の工業活動が減少しつつあり，住居地区が郊外地区へ拡大したこと，および住居地区が商業地区へ変換しつつあることを示したものと思われる．

降下煤塵量の季節変動については，脇坂ら[10]の報告とほとんど変化がない．乾燥期に属する 3 月，4 月に降下煤塵量が増加するのは，「春一番」などの強風により，地上の堆積物が舞上げられたり，大陸から偏西風に運ばれた黄砂などが降下してくるため，不溶性成分として捕集され増加するものと推測される．同様に，結果の 3 で示した，1969 年から 1970 年の住居，郊外両地区の降下煤塵量の増加は，同年の風速との相関（表－1）からも推測されるように，3 月から 4 月の強風による，これら地区の土砂の舞上りによる増加と考えられた．但し，これら地区の絶対値は，工業，商業地区と比較して小であったため，同年間の年平均値への影響は少なかったものと思われた．なお，6 月から 10 月にかけて，比較的降雨量が多く，8 月，9 月には台風などの強風が吹くが，湿度が高いため，風による堆積物の舞上り方は少ないものと思われる．

結　語

1969 年から 1983 年までの降下煤塵量の動向は大要次の如くである．

1）降下煤塵量は年々減少し，最近 5 年間の平均値は，7.3 ton／㎢／月であり，15 年前のそれと比較して½以下である．又，降下煤塵総量は，不溶性成分の量の多少に依存しており，可溶性成分の量はあまり変動がなかった．

2）地域用途別における降下煤塵量は，住居地区を 1.0 とし比較した場合，商業地区は 1.4，工業地区 1.3 であり，住居地区より高い値を示している．

3）季節変動については，3 月，4 月の季節風に依存した増加が認められ，15 年前のパターンと量的に減少しただけで変化していない．

4）降下煤塵量は，気象因子，すなわち風速と降雨量に左右され，風速が強い場合は不溶性成分が多く，降雨量が多い場合は可溶性成分が多くなる．

文　献

1）斉藤　功，両角　清，小林正武，中山袈裟典，大坪正一：東京衛研年報，6，51，1954
2）斉藤　功，両角　清，小林正武，中山袈裟典：東京衛研年報，7，30，1955
3）斉藤　功，両角　清，小林正武：東京衛研年報，8，35，1956
4）斉藤　功，小林正武，斉藤喜佐夫，鈴木堯子：東京衛研年報，9，59，1957
5）斉藤　功，小林正武，中山袈裟典，斉藤喜佐夫，鈴木堯子：東京衛研年報，10，45，1958
6）斉藤　功，両角　清，小林正武，中山袈裟典，鈴木堯子：東京衛研年報，11，60，1959
7）斉藤　功，両角　清，小林正武，中山袈裟典，鈴木

報　　文　III

食品等に関する調査研究

REPORTS III

PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

堯子：東京衛研年報，12，71，1960
8) 斉藤 功，両角 清，小林正武，中山袈裟典，加納堯子，中野欣嗣，瀬戸孝博，林 貞雄，青木 実：東京衛研年報，13，55，1961
9) 脇坂一郎，両角 清，小林正武，中山袈裟典，加納堯子，中野欣嗣，瀬戸孝博，林 貞雄，青木 実：東京衛研年報，14，62，1962
10) 脇坂一郎，瀬戸孝博，両角 清，小林正武，中野欣嗣，中山袈裟典，加納堯子：東京衛研年報，15，66，1963
11) 脇坂一郎，両角 清，小林正武，中野欣嗣，瀬戸孝博，中山袈裟典：東京衛研年報，16，72，1964
12) 中野欣嗣，瀬戸孝博，山崎爽治，泉川碩雄：東京衛研年報，18，121，1966
13) 佐藤泰仁，牧野国義，狩野文雄，大澤誠喜，福田雅夫，多田宇宏，青木 実，溝口 勲，野牛 弘：東京衛研年報，26－1，265，1975
14) 東京都総務局統計部編：東京都統計年鑑，1969～1982
15) 日本薬学会編：衛生試験法注解，7，1980，金原出版，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 302-308, 1984

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（第2報）

牧野国義*, 溝口　勲*

A Study on Relationship of Health Indices to Air Pollution and Social Indices in Tokyo (II)

KUNIYOSHI MAKINO* and ISAO MIZOGUCHI*

It is our concern to examine environmental factors which increase respiratory disease mortality in Tokyo. In this study, the relationship of the three mortality rates of lung cancer, pneumonia-bronchitis and asthma as the health indices with concentration levels of the five air pollutants, or with the eleven social indices were studied in Metropolitan Tokyo as a sequel to the previous study. This study employed the three mortality rates in two age groups for each sex in 1979-81, the air pollution indices in 1974-78 and the social indices in 1975-77. The following findings were obtained with non-parametric statistical analysis.

Lung cancer mortality has not showed any significant correlation with any of the five air pollution indices and the five combined air pollution indices, whereas asthma mortality in the older female group related significantly with sulfur dioxide, dust-fall and air particulates. In addition, lung cancer mortality showed a significant negative correlation with the number of tatami-mats in the house which relates to the living standard, but not with social indices which related to air pollution.

On the other hand, it was estimated by means of principal component analysis that the axes of the first and the second principal components indicated the living standard and industrial activities, and that lung cancer had association with air pollution.

The twenty-three wards of Tokyo were divided into four area groups by analyzing the principal component scores. The results of comparison among the mortality rates in the four area groups statistically confirmed that pneumonia-bronchitis was the cause of death which made the most significant difference among the four groups.

Keywords: Mortality, Respiratory disease, Health index, Air pollution index, Social index, Non-parametric test

緒　言

我が国では，昭和56年以来悪性新生物（癌）が死因順位の第1位を占め，今後もその座を揺るがさぬ勢いを示している．癌死亡のうちで最も死亡率の高い部位別死因は胃癌で，第2位が肺癌という順位が昭和40年以来の傾向である．胃癌の訂正死亡率は近年減少傾向にある（昭和50年に人口10万人対で59.3であったのが，昭和56年には48.7）のに対し，肺癌訂正死亡率は依然増加傾向を示しており（昭和50年に17.7が昭和56年には21.6），両部位の死亡率は接近しつつある．因みに，アメリカでは既に男の肺癌死亡率が胃癌死亡率を上回っており，日本でも将来的に逆転することがあるかもしれない．さ

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 160 Japan

らに，肺癌死亡は都市部で多いことが知られており[1,2]，都民の健康の保持，増進に科学的側面から寄与せんとする我々にとって，肺癌の疫学は重要な研究課題の一つである．また，肺癌と同じく呼吸器疾患である肺炎・気管支炎の昭和56年の死因順位は第4位で，近年の死亡率推移は横這い状態である．一方，喘息は死亡率の低い死因ではあるが，大気汚染の悪化した地域では気管支喘息の多発が認められる通り[3]，大気汚染の人体影響を検討する際には不可欠の疾患，死亡である．我々は以上を考慮して，上記呼吸器系の3死因について，東京都区部における昭和35～53年，昭和45～53年，昭和49～53年の死亡と大気汚染指標，社会指標との関連性を前報[4]で報告した．前報では，肺癌死亡は複合大気汚染指標や大気汚染または産業活動に関連する社会指標と有意の相関関係を有し，肺炎・気管支炎や喘息の死亡は生活水準に関連する社会指標と有意の相関関係を有するとの結果が得られた．しかしながら，前報では年令や性別について，分類資料が得られなかったために検討することができなかった．本報では昭和54～56年の上記3死因死亡資料により，性別，年令層別（15～64，65～才）に大気汚染指標，社会指標との関連性を検討した．

方　法

(1) 健康指標

昭和54～56年の東京都23区における肺癌（肺及び気管支の悪性新生物），肺炎・気管支炎，喘息を死因とする性別，年令層―生産者年令層（15～64才），高年令層（65～才）―別の訂正死亡率を健康指標とした．なお，前報で健康指標に加えた大気汚染による健康障害認定者や肺機能検査結果については，いくつかのバイアスによる偏りが認められ，指標性に乏しいことから，本報ではこれらを除外した．

(2) 大気汚染指標と社会指標

大気汚染物質のうち呼吸器に有害影響を及ぼすと考えられる硫黄酸化物，二酸化窒素，浮遊粒子状物質（以上環境保全局設置の常時測定点で自動分析器により観測）および降下煤塵，亜硫酸ガス（以上衛研設置の観測点で毎月手分析により観測）を大気汚染指標とし，調査期間は，前者3物質について，19測定点（同局の都内の全一般環境測定点）で，1日1測定点の結果が得られる昭和50～53年，後者2物質について，健康指標の期間前5年（昭和49～53年）とした．さらに，複合汚染指標として，5物質それぞれを19または23区の平均値で割った値を前者3物質間，後者2物質間で各組み合わせ毎に和をとり，5指標（3物質間の組み合わせが4，2物質間の組み合わせが1）を作成した．

社会指標は，健康指標が昭和54～56年の期間であるので，前報と同じく昭和50～52年に得られた所得，高額所得者数，畳数，医療扶助世帯数，生活扶助世帯数（以上人口当り），乗用車登録台数（平方キロ当り），煤煙・粉塵苦情・陳情受付数（世帯当り，以下煤煙・粉塵苦情と略す），人口密度，交通量指数，医療施設密度の11指標とした．

(3) 解析方法

健康指標や大気汚染指標，社会指標の地理的頻度分布が必ずしも正規分布を示さないとの理由により，本報も前報同様に分布型によらないノンパラメトリック手法を利用した．正規分布を示さない場合でも，粗に近似する場合には，ロバストネスの性質[5]によりパラメトリック手法の利用が可能である．前報の場合，分布型の問題以外に，健康指標と他の指標との時間的矛盾（健康指標の期間の方が他の指標の期間よりも古い）を含んでいたため，ノンパラメトリック手法に頼らざるを得なかった．本報ではこの時間的矛盾はないが，前報と結果を比較するためにノンパラメトリック手法を利用した．

解析手順として，まず性別，年令層別の健康指標と大気汚染指標，社会指標との関連性を順位相関分析を用いて検討する．さらに，前報で認められた各死因と地域性の特徴を本報でも得られるかどうか主成分分析を用いて検討する．そして，社会指標を用いて主成分得点を算出し，得点分布が23区を群化する場合に，つまり，社会経済的要因によって23区がいくつかの群に分けられた場合に，健康指標が群間で差があるかどうかKruskal-Wallis検定により解析し，各群の死亡を比較検討する．

結果と考察

(1) 健康指標と大気汚染指標

年令層，性別で分けた12健康指標と5複合汚染指標を含む10大気汚染指標との順位相関分析結果をTable 1に示した．それによると，昭和54～56年の肺癌死亡は，性別，年令層別のいずれの健康指標とも有意の相関を示さず，硫黄酸化物と二酸化窒素からなる複合汚染指標などと有意の相関を示した前報の結果と異なった．また，高年令層（65～才）の男の肺炎・気管支炎死亡は，亜硫酸ガス(SO_2)や亜硫酸ガスと降下煤塵からなる複合汚染指標(DS)と有意の相関を示した．喘息死亡では，生産者年令層（15～64才）の男の場合に亜硫酸ガスや上記の複合汚染指標DSと，高年令層の男の場合にはこのDSのみとの間に，女の場合には，浮遊粒子状物質(AP)やこれと硫黄酸化物からなる複合汚染指標(SA)，降下煤塵(DF)，亜

Table 1. Rank Correlation (1) between Health Indices and Air Pollution Indices

Cause of death	Lung cancer				Pneumonia-bronchitis				Asthma			
Age	15-64		65-		15-64		65-		15-64		65-	
Sex	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
Air pollution index (n=19)												
SOx	-.107	-.142	.288	.177	.154	.139	.312	.151	-.007	.226	.139	.332
NO2	-.082	-.219	.088	-.105	-.342	.200	-.163	.068	-.249	-.033	-.002	-.132
AP[a]	.446	-.121	-.012	-.246	.282	-.086	.349	.437	.179	.093	.447	.649**
SN[b]	-.182	-.204	.293	.100	-.035	.198	.112	.130	-.079	.130	.126	200
SA[b]	.205	-.153	.086	-.019	.267	.077	.435	.372	.095	.261	.319	.572*
NA[b]	.100	-.144	274	-.139	-.156	.125	.118	.340	-.160	-.061	.272	.286
SNA[b]	.067	-.135	376	005	.079	.147	.319	.316	.002	.139	.316	.442
(n=23)												
DF[c]	.210	.202	.385	.175	.006	.191	.367	.244	.295	.132	.202	.508*
SO2	.110	-.133	.063	.393	.307	.098	.490*	.259	.502*	-.019	.366	.447*
DS[b]	.141	.043	.297	.404	.246	.240	.596**	.308	.525*	.177	.420*	.483

a: AP=Air particulates

b: Combined air pollution index, sum of ratios (a pollutant conc./the pollutant mean conc)

c: DF= Dust-fall

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$

硫酸ガス，その複合汚染指標 DS との間に有意の，いずれも正の相関関係が認められた．一般に，女は男に比べて移動距離が小さく，喫煙率も低いことから，健康の地域指標性に関して，妨害要因が男よりも小さく，指標性が高い．高年令層の女の喘息死亡がスモッグに関係の深い物質の指標と有意の正相関を示したことは，過去のロンドンスモッグ事件とは過剰死亡の規模などから比較にならないにせよ，スモッグの人体影響が依然として存在していることが推察された．なお，硫黄酸化物と亜硫酸ガスの分析結果が必ずしも一致しなかったが，これは主として両物質の測定方法，観測点が異なったことに起因すると思われる．

(2) 健康指標と社会指標

12 健康指標と 11 種の社会指標との順位相関分析結果を Table 2 に示した．肺癌死亡では，生産者年令層（15～64才）の男の場合に，高額所得者数(LI)，畳数(TA)，乗用車登録台数(RC)，医療施設密度(MF)と負の，煤煙・粉塵苦情(SD)と正の有意の相関が認められ，高年令層（65～才）で男の場合には畳数と，女の場合に昼夜間人口比(DN)，乗用車登録台数と有意の相関を示した．このうち，性別間，年令層別間で男の畳数だけが符号を含めて共通した有意の相関であった．前報と比較すると，高年令層の女の場合に頻似したが，全体的には，畳数や高額所得者数と負相関を示すなど，生活水準に関連する指標との関係が強まったように推察され，前報とはかなり異なった結果を示した．肺癌死亡率が年々上昇していることを考えると．この結果は，大気汚染や産業活動に関係する要因の影響力が減少したと考えるよりも別の要因，例えば喫煙，の影響がより強まったと考える方が妥当と思われる．またその要因として，喫煙以外の要因の報告例—大気中，地中の放射性元素[6]があり，その究明は今後に残された課題である．また，肺炎・気管支炎や喘息の死亡については，前報同様に，生活水準に関連する指標の所得(IN)，畳数，医療扶助(MA)，生活扶助(LA)などと有意の相関が認められた．

(3) 健康指標，大気汚染指標，社会指標間の関係

健康指標と大気汚染指標や社会指標との関連性を(1)，(2)で検討したが，大気汚染指標と社会指標の中には独立した指標ばかりでなく，密接な相互関係を有する指標もあることが考えられる．そこで，主成分分析を利用して

Table 2. Rank Correlation (2) between Health Indices and Social Indices

	Cause of death											
	Lang cancer				Pneumonla-bronchitis				Asthma			
Age	15-64		65-		15-64		65-		15-64		65-	
Social index / Sex	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
Income (IN)	-.316	-.150	-.240	-.066	-.539**	-.197	-.447*	-.374	-.542**	-.124	-.427*	-.465*
NO. of large income earners (LI)	-.482*	-.315	-.342	.180	-.627**	-.033	-.419*	-.415*	-.445*	-.327	-.438*	-.446*
Population density (PD)	-.393	.153	-.205	-.189	.014	.064	-.447*	-.551**	-.304	-.237	-.314	-.220
Population ratio:day vs night(DN)	-.306	-.188	.109	.493*	-.186	.280	.053	-.249	-.089	.149	-.066	-.036
No. of tatami-mats (TA)	-.485*	-.182	-.409*	.080	-.581**	-.237	-.568**	-.518*	-.552**	-.191	-.390	-.595**
Traffic index (TI)	-.304	-.200	-.055	.188	-.303	.240	-.138	-.298	-.153	-.022	-.143	-.141
No. of registered cars (RC)	-.417*	-.259	-.098	.459*	-.322	.333	-.120	-.339	-.107	-.075	-.170	-.017
Medical facllity (MF)	-.500*	-.135	-.210	.300	-.514*	.141	-.317	-.519*	-.437*	-.144	-.430*	-.211
Medical assistence (MA)	.227	.061	.299	-.224	-.653***	.227	.493*	.424*	.384	.154	.407	.454*
Livlihood assistance (LA)	.204	-.003	.295	-.123	.622**	.210	.447*	.331	.430*	.059	.387	.446*
Received cases of complaints on smoke-dust (SD)	.457*	.041	.154	.149	.182	-.063	.539**	.608**	.620**	.204	.545**	.572**

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

全指標間の関連性を検討した．第1，2主成分の因子負荷量散布図をFig. 1に示す（累積寄与率は62.6％）．ここで，環境保全局常時測定点からの大気汚染指標は標本数が19のため，主成分分析で用いる変量数は論理的に18以下に留める必要がある．そこで，健康指標は，12指標のうち高年令層（65～才）の6指標，大気汚染指標は，硫黄酸化物，二酸化窒素と降下煤塵の3指標，社会指標は，11指標のうち所得と関係の深い高額所得者数と医療扶助と関係の深い生活扶助の2指標を除いた9指標の計18指標とした．なお，Fig. 1中のL-のLは肺癌，P-のPは肺炎・気管支炎，A-のAは喘息で，-Mの Mは男，-Fの Fは女で，つまり，L-Mは男の肺癌を示す．第1主成分では，負方向に所得(IN)，畳数(TA)，正方向に医療扶助(MA)があることから，生活水準を表わす軸であること，第2主成分では，正方向に昼夜間人口比(DN)，乗用車登録台数(RC)，交通量指数(TR)があることから，産業活動の活発さを表わす軸であることが推定された．この推定結果は前報の結果とよく一致している．Fig. 1によると，6健康指標のうち女の肺癌(L-F)を除く5指標が右上（第1，2主成分とも正）に分布した．つまり，5指標の死亡は低生活水準で産業活動の活発な地域で多発することが推察される．また，3大気汚染指標は上部（第2主成分が正）に分布し，女の肺癌も大気汚染指標の間に分布した．つまり，3指標の大気汚染物質は産業活動が活発な地域で相対的に高い濃度を示し，女の肺癌死亡はこの地域で多発することが推察される．肺癌死亡率は男の方が断然高い（約3倍）ことを考えると，有意の相関を示した前報の結果と比較して，有意でなかった今回の結果から肺癌死亡への大気汚染の影響は相対的にせよ確かに減少したとの印象を受け，相関分析結果（Table 1）それを裏付けている．しかしながら，上記の女の肺癌死亡の分布に示されたように，肺癌死亡は大気汚染に無関係との答を引き出すことは出来ないと考えられる．これは，肺癌死亡への大気汚染の影響が0より大きいと述べたSpeizerの意見[2]と一致する．前にも述べたように，肺癌死亡の要因は喫煙や大気汚染以外に存在すると考えられる．Wynderらは，生活様式も肺癌発症に重要な役割を果たすと述べており[7]，大気汚染の影響を明らかにするためには一般生活環境内で何が肺癌発症に寄与するか，指標化，数値化が困難な要素を含めて追究する必要がある．

(4) 分割された区域間の健康指標の比較

社会経済的特徴は23区間で異なり，その共通性，相違性によりいくつかの群に分けられると考えられる．11社会指標を用いた主成分分析の第1，2主成分の因子得点分布によると，23区は4群の区域に分けることができ，その区域をFig. 2のように地図に示した．地図中の数字は各区域（実線で区分）の分類番号で，1は都心部商業

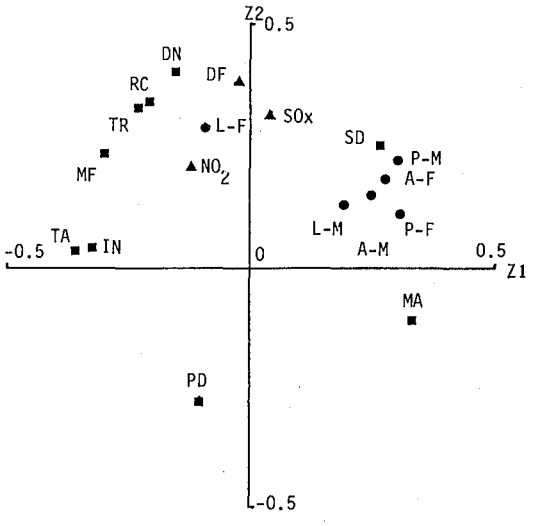


Fig. 1 Distribution of Factor Loadings to First(ZI) and Second(Z2) Principal Component

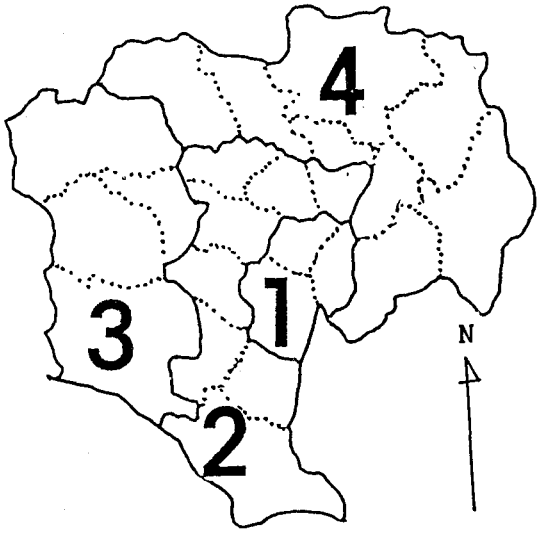


Fig. 2 Map of The Ku-Area of Tokyo and The Four Area Groups divided by analyzing Principal Component Scores

Table 3. Kruskal-Wallis Test among The Four Area Groups divided by analyzing Principal Component Scores

	Cause of death					
	Lung cancer		Pneumonia-bronchitis		Asthma	
Age	15—64	65—	15—64	65—	15—64	65—
Sex						
Male	8.515*	2.382	7.820*	9.950*	4.139	10.446*
Female	2.057	5.431	0.909	11.841**	7.402	6.791

* : $P<0.05$, ** : $P<0.01$, *** : $P<0.001$

地域，2は商業地域，3は住宅地域，4は商工業地域のように概ね表現することができるだろう．各区域の区の数は，分類番号順に3，8，4，8で，等分割されていないが，上記の統計手法利用の結果であるので已むを得ない．この区域の4群間で健康指標の要素（死因，年令層，性）別にKruskal-Wallis検定を行い，その結果をTable 3.に示した．地域差が最も顕著に現われた死因は肺炎・気管支炎で，男は両年令層で有意で，女も高年令層(65～才)で有意性の高い結果を示した．また，肺癌死亡は生産者年令層（15～64才）の男の場合に，喘息死亡は高年令層の男の場合に地域差が有意であった．有意の結果が得られた健康指標の死亡率順位を検討すると，肺癌死亡の場合（男，生産者年令層）では，分類番号1の区域が最も死亡率が高く，肺炎・気管支炎の場合（男，両年令層と女，高年令層）や喘息の場合（男，高年令層）の死亡率は分類番号4の区域が最も高かった（2位以下の順位は健康指標により異なった)．このうち喘息死亡については，4の区域が商工業地域であることを考慮すると，かつて不良の労働環境下で有害物質に暴露され，高年令になってその影響が生じたことが高死亡率の一因となったように推察される．また，肺癌死亡については，上記の場合のほか，有意差は認められなかったが，高年令層では男女とも1の区域の死亡率が最高であり，この地域が古くから硫黄酸化物などの高汚染地域であったことを考え併せると，大気汚染の肺癌死亡への影響の傍証のように思われる．

ま と め

本報では東京都区部における昭和54～56年の肺癌，肺炎・気管支炎，喘息を死因とする性別，年令層別(15～64才，65～才）の訂正死亡率を健康指標として，前報（健康指標は昭和35～53年，45～53年，49～53年の同死因訂正死亡率）に続いて，大気汚染指標や社会指標との関連性をノンパラメトリック手法により検討し，以下の知見を得た．

順位相関分析結果によると，肺癌死亡については，性別，年令層別の健康指標は，5複合汚染指標を含めた10大気汚染指標のどの指標とも有意の相関を示さなかった．調査期間の古い前報では硫黄酸化物と二酸化窒素からなる複合汚染指標などと有意の相関関係が認められたので，大気汚染の肺癌死亡への影響は相対的に弱まったかのように思われた．一方，喘息死亡については，地域指標性が男よりも高い女の高年令層が亜硫酸ガス，降下煤塵，浮遊粒子状物質などと有意の相関を示したので，この死因は量的（死亡数）には少ないとしても，スモッグの影響をなお継続して受けているように推察された．

肺癌死亡と社会指標との順位相関分析で，両年令層の男は生活水準に関連する指標の畳数と有意の負相関を示し，大気汚染に関連する指標（交通量指数など）とは有意の相関を示さず，上記の関連する指標との有意性が逆の結果の前報と異なった．一方，肺炎・気管支炎や喘息の死亡については，前報同様に所得，畳数，医療扶助など生活水準に関連する指標との間に有意の相関関係が認められた．

健康指標，大気汚染指標，社会指標を用いた主成分分析により，第1主成分軸は生活水準を表わし，第2主成分軸は産業活動の活発さを表わすとの前報同様の推定結果を得た．しかし，男の肺癌死亡は肺炎・気管支炎や喘息の死亡の健康指標の一群と近接した点で前報と異なったが，女の肺癌死亡は硫黄酸化物や二酸化窒素に近接し，大気汚染の肺癌死亡への影響が残存することを示唆するように思われた．

23区の社会経済的特徴の違いから因子得点分布により群化された4群間で，性別，年令層別の健康指標を比較したところ，3死因の中では肺炎・気管支炎が最も地

域差を生じる死因であった.喘息死亡では男の高年令層の場合に有意で，商工業地域の死亡率が最高であったことから，過去の労働環境における有害物質暴露が一因となっているように推察された．また，4群中で以前より硫黄酸化物などの高汚染地域での肺癌死亡率が高いことから，大気汚染の肺癌死亡への影響は，統計的有意性が得られないとしても軽視されてはならないと推察された．

文　献

1) Ford, A. B. and Biarik, O. : *Arch. of Environ. Health,* 35, 350, 1980
2) Speizer, F. E. : *Environ. Health Perspective,* 47, 33, 1983
3) 今井正之，吉田克己，笠間一男，北畠正義，冨田泰子：大気汚染学会誌，13，305，1978
4) 牧野国義，溝口　勲：東京衛研年報，34，143，1983
5) Bailey, N. T. J. : *Statistical Methods in Biology*, 219, 1959, English Univ. Press, London
6) Simpson, S. G. : *Arch. of Environ. Health,* 38, 268, 1983
7) Wynder, E. L. and Gori, G. B. : *J. Nati. Cancer Inst,* 58, 825, 1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 309-315, 1984

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

関 比呂伸*，田 村 行 弘**，蓑 輪 佳 子***，加 納 堯 子*

Effect of Selenium Originating Dolphin and Sperm Whale Meat on Methylmercury Poisoning A : Subacute Toxicity B : Reproduction Toxicity

HIRONOBU SEKI*, YUKIHIRO TAMURA**, KEIKO MINOWA***
and TAKAKO KANOH*

Effectiveness of selenium naturally originating from dolphin and sperm whale was compared to that of selenium in selenite with respect to protection against the subacute (A) and reproduction (B) toxicity of methylmercury.

Wistar strain rats, A) male, 4-weeks old, B) female, 10-weeks old, were fed seven experimental diets for A) 11 weeks, B) 6 weeks to weaning. Experimental diets were those which contained or did not contain 20 ppm methylmercury chloride (MMC) and dolphin, whale meat and sodium selenite, all three containing selenium.

Toxicological effects of MMC were observed on A) body weight, manifestation of neurological signs, and mortality B) body weight, number of dead pups, number of neonates and lactating index being takes as parameters.

Regardless of its origin selenium showed protective effects, but selenium in dolphin meat showed the least effect. We discussed "Biological Availability", inactive form of selenium in dolphin, or still another factor which explains lessening of protective action.

Keywords : methylmercury toxicity, dolphin, sperm whale, subacute toxicity, reproduction toxicity

緒 言

1972年 Ganther 等は[1]，マグロ肉中に存在するセレンをメチル水銀毒性を軽減する因子の一つとして指摘し，また，同時に亜セレン酸も減毒因子であると報告した．以来，この事実は多くの研究者[2~11]によって確認されている．

メチル水銀毒性に係る野外調査に，マグロ漁船員やマグロ卸問屋[12]，缶詰工場従業員[13]，ペルー漁村部落[14]等の魚多食者住民を対象とした報告がある．これらの調査報告によると，対象者の血液・毛髪中の水銀レベルは高いにもかかわらず，メチル水銀中毒症状は認められていない．すなわち，メチル水銀を比較的高濃度に含有する海産魚には同時にセレンが含有されているので[15]，主にセレンの作用でメチル水銀毒性が軽減されたものと考えられている．セレンのこの役割を証明する動物実験として，ウズラ[1,6]・ラット[7,17]・ネコ[16]にマグロ，ネコ[18]にアザラシ，ラット[19,20]にカジキ，ラット[21]にクジラ，ラット[21]にメヌケおよびラットに魚肉蛋白濃縮物[4]等を含む実験飼料を投与した報告がある．その結果，セレンはメチル水銀毒性に対して保護的に働くことが示された．

また，セレンの保護作用には，その由来によって効果に差異があることが知られている[22,23]．すなわち，セレン

* 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
** 同生活科学部食品研究科
*** 同微生物部細菌第二研究科

欠乏症のニワトリヒナを用いた実験で，動物由来のセレンは，植物由来セレン，あるいはセレン無機化合物よりも，その予防効果が劣ると報告された．Cantor 等は，このようなセレンの有効性の違いを“ “Biological Availability”と表現ししいるが，メチル水銀の毒性に対するセレンの減毒作用についても同様な観察がなされている[21,24]．

マグロと同様にメチル水銀を含有する海産魚を喫食する人々，特に魚類を蛋白源としてこれらを常食している日本人にとっては，これらの食品の安全性を確認するのは重要な問題点と考える．

今回，海産動物肉由来セレン源に，イルカ，マッコウクジラ肉を使用した群と亜セレン酸を添加した群とを比較して，これらがメチル水銀毒性に対してどのような保護作用を示すか A：亜急性毒性，B：次世代への影響について調べた．

方法・材料

ウィスター系ラット（日本クレア K. K.），実験 A は4週令の雄(体重 98± 6 g)，1群 15 匹，実験 B は 10 週令の雌（体重 233±14 g），1群 11 匹とし，いずれも実験開始前に1週間予備飼育し順化させた．両実験とも表1に示したように7種類の実験飼料群とした．基本飼料は，日本クレア CA-1 成分より魚粉，小麦，フスマを除き，コーン，カゼイン，凍結乾燥イルカ(*Tursiops truncatus*・*Pseudorca crassidens*)，同クジラ(*Physeter Catodon*)肉を加えた．

Table 1. Methylmercury and Selenium Concentrations in Experimental Diets

Group	Me-Hg[1] (ppm)	Se (ppm)	Protein sources
A	—	1.3[2]	Dolphin(10%) +Casein(15%)
B	20	1.3[2]	Dolphin(10%) +Casein(15%)
C	—	1.3[2]	Whale(25%)
D	20	1.3[2]	Whale(25%)
E	—	0.1[3]	Casein(25%)
F	20	0.1[3]	Casein(25%)
G	20	1.3[4]	Casein(25%)

1) Added as methylmercury chloride
2) Selenium originates from dolphin or whale meat
3) Concentration of selenium in the basal diet
4) Added as sodium selenite

これらイルカ，クジラ肉の総水銀は，各々43.1±2.7 ppm, 7.1±0.2ppm，メチル水銀は8.5±0.3ppm，5.9 ±0.4ppm，セレンは12.7±1.5ppm，4.9±0.3ppmであった．

なお，実験飼料にはメチル水銀を，塩化メチル水銀として20 ppm（B D, F, Gの4群飼料），セレンを1.3ppm となるようにイルカ肉，クジラ肉を用いて調整し，G 群に亜セレン酸を加えた．

これらの実験飼料を，実験 A は 11 週間，実験 B は交配時より出産後3週間まで自由摂取させ，飲料水は水道水を与えた．

パラメーターは，実験 A：体重と飼料・水の消費料は週2回測定，およびラットのメチル水銀中毒に特有な神経症状である尾の旋回現象[25,26]，後肢の交差・マヒ[27,28]を指標として週3回観察した．また，4週目に1群5匹ずつ腹部大静脈より採血し，脳・肝・腎を摘出し，総水銀・メチル水銀・セレンの分析用サンプルとした．実験 B：交配期間は1週間とし同週令の雌雄を一つがいにし，膣栓確認日を妊娠 O-Day とした．体重は週1回測定し，妊娠率(出産率)，出産仔数，出産仔体重，離乳仔体重，離乳率，着床数，出産時死亡数等を観察した．

結　果

実験 A(亜急性毒性)：図1に示したように，体重の変化は，メチル水銀が添加されていない A, C, E の3群においてほゞ同様な増加曲線を示した．しかし，メチル水銀

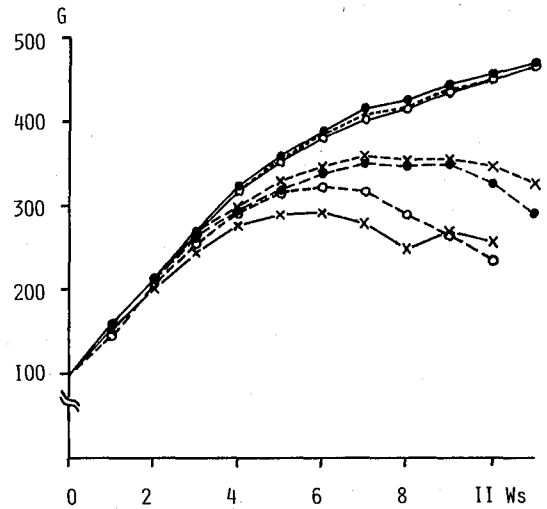


Fig. 1. Chronological Change of Body Weight

添加の4群は，成長抑制または体重減少を示した．これらの群の体重曲線における最大値を比較すると，F：292±41g(42日目)，B：323±41g(42日目)，D：352±25g(53日目)，G：363±26g(53日目)の順序であった．

神経症状の発現の推移は，図2と3に示した．尾の旋回現象は，F, B, D, Gの順序に遅れて発現し，平均発症日数では，F：39.9±5.6，B：44.7±3.6，D：60±4.2，G：67.1±7.4日で各群間互いに有意差が認められた．また，50%発症日は，F：37，B：42，D：58，G：70日となり，セレン添加により発症が遅れた．0一日から50%発症時までのエサの総摂取量は，F：640g，B：840g，D：1100g，G：1450gであり，発症日の遅れは，摂取量の増加を示しセレンの保護効果の程度を表わしていた．後肢の交差・マヒは，尾の旋回と同様にF, B, D, Gの順序で発現した．死亡率(図4)は，実験期間中，G群は0%，D群20%，BとF群は100%であった．

実験B(繁殖毒性)：図5の体重増加において，増加率の高い群はメチル水銀無添加のA, C, E群であり，続いてメチル水銀添加群でD, G, F, Bの順であった．表2に示したように，妊娠率ではB群が91%と低いが他の6群は100%を示した．また，出産率ではF群が有意に低く，その原因は流産によるものであった．出産11日後の出産平均仔数(死亡を含む)は，メチル水銀無添加のA, C, E群と添加のD, G群では，それぞれに10匹以上であるのに対して，B群は5.8匹と有意に少かった．また，出

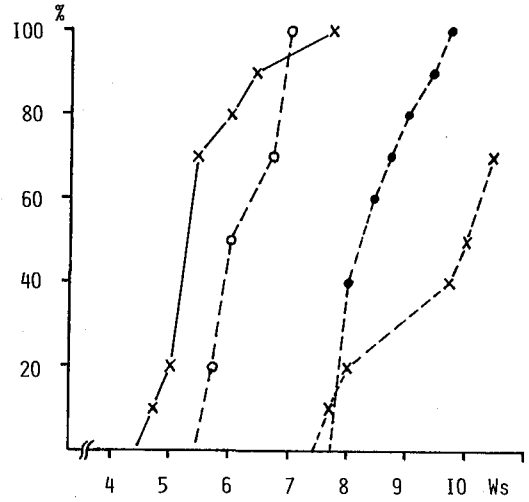


Fig. 2. Chronological Change of Tail Rotation
○---○ B ×——× F
●---● D ×---× G

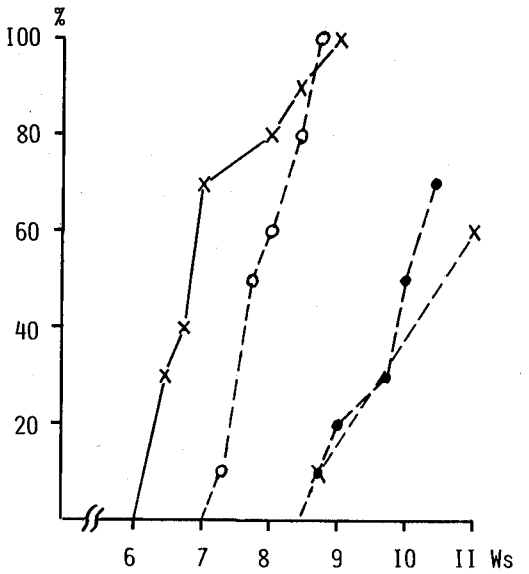


Fig. 3. Chronological Change of Cross and/or Paralysis
○---○ B ×——× F
●---● D ×---× G

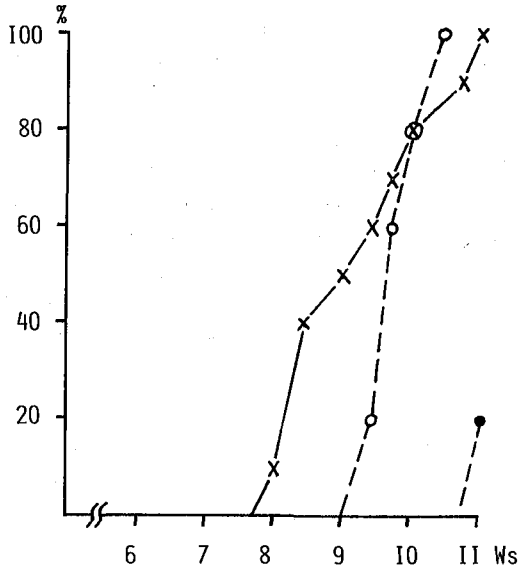


Fig. 4. Chronological Change of Mortality
○---○ B ×——× F
●---● D

Table 2. Reproduction Data

	Group						
	A	B	C	D	E	F	G
Gestation index (%)	82	100	82	91	82	64	82
Abortion (%)	18	0	18	9	18	36	18
Fertility index (%)	100	91	100	100	100	100	100
Total No. of pups delivered	123	58	126	119	123	63	106
Mean No. of pups delivered	13.7±2.3	5.8±5.0	14.0±2.0	11.9±2.7	13.7±2.5	9.0±3.4	11.8±2.1
Mean body weight of pups delivered (g)	5.9±0.7	5.3±0.6	6.1±0.7	5.3±0.9	6.0±0.8	5.0±0.7	5.7±0.8
Mean No. of pups weaned	12.8±1.6	8	12.6±2.8	7.7±4.4	11.7±3.1	1	9.0±2.7
Mean body weight of weaned (g)	37.4±6.5	32.0±2.6	36.2±5.9	36.1±9.6	37.5±6.4	23.8	32.3±5.5
Lactating index (%)	94.3	13.8	89.7	45.4	85.4	1.6	59.4
Mortality at birth (No. of death/No. of implantaion)	7.5	86.3	8.8	32.0	7.8	56.7	25.2
Mortality at weaning (No. of death/No. of implantation)	12.8	93.2	16.9	63.3	18.6	98.9	50.4

産時の死亡数は，B：42，C：2，D：19，E：4，F：24，G：11匹で，胎生期におけるメチル水銀毒性の影響を示唆していた．さらに，新生仔の死産および出産後1日の間に死亡し，母親に食べられた可能性がある仔数（その形跡が確認された）を考慮して，着床数からみた死亡数および死亡率を計算すると，B群101匹86％，F群51匹57％，D群48匹32％，G群32匹25％で，A，C，Eの3群は9％以下であった．

考　察

実験A(亜急性毒性)：我々は，いくつかの実験から，実際に海産魚，海産動物肉中に含まれているレベルのセレンが，中毒症状を示す高濃度のメチル水銀の毒性に対して保護効果を働くことを確認してきた[17,20,21]．あわせて，セレンの由来により，その有効性が異なることも観察した．今回，イルカ・クジラ肉由来の飼料を用いた実験においても同様な結果が示された．すなわち，亜急性毒性に対して，イルカ肉・クジラ肉および亜セレン酸添加群には，減毒効果が認められた．その効果の違いは，神経症状の発現において明瞭で，イルカ肉群はセレン無添加のF群と比較すると実験前期まで効果的であったが，実験後期にF群と同程度の影響を受けていた．このように，イルカ肉由来セレンの効果がクジラ肉由来セレンよりも劣ることは，イルカ肉中のセレンの活性が何らかの形で不活化されていると考えられる．永沼は[29]，いくつかの研究報告より，生体内において無機水銀とセレンは高分子量複合体を形成しており，これらは遊離しにくいことを示唆している．今回使用したイルカ肉中には，クジラ肉よりも約35倍の無機水銀が存在していることから，セレンの作用が抑制されているものと考えられる．また，近年，Cappon等は野菜[30]・魚肉[31~33]・動物肉[34]・臓器中[34]の水銀・セレンの化学形を分別定量しており，イルカ肉の場合[31]，II＋IVとVI価セレンの含量は約1対1の割合で存在していると報告している．また，小宮等[24]は，メチル水銀の急性毒性に対する各種セレン化合物の減毒効果を調べており，セレン酸より亜セレン酸の方が体重増加において効果的であることを示している．これらにより，化学型の相違が減毒効果の違いとして現われたとも考えられる．

実験B(繁殖毒性)：F群が示した種々の結果は，我々の過去のデーター[35]から20ppmのメチル水銀は出産可能な濃度であるが，しかし，新生仔の離乳不可能な濃度でもあったことから十分に予想されることである．

ラットの妊娠期間中の母親の体重増加へのメチル水銀の影響についての研究は少く，森山[36]の報告のみであるが，この報告によるとメチル水銀が微量（0.2 mg／kg／日）の場合はほとんど正常群と同じ増体量であるが，中等量投与群（0.5mg／kg／日）において初めて増体量が抑制されることを観察している．投与方法が著者等の実験

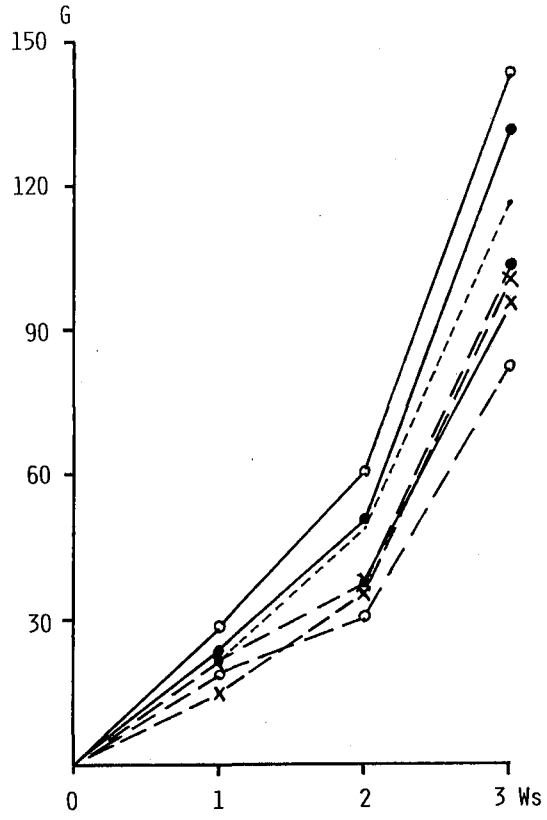


Fig. 5. Chronological Change of Weight Gain

○——○ A ------ E
○---○ B ×——× F
●——● C ×---× G
●---● D

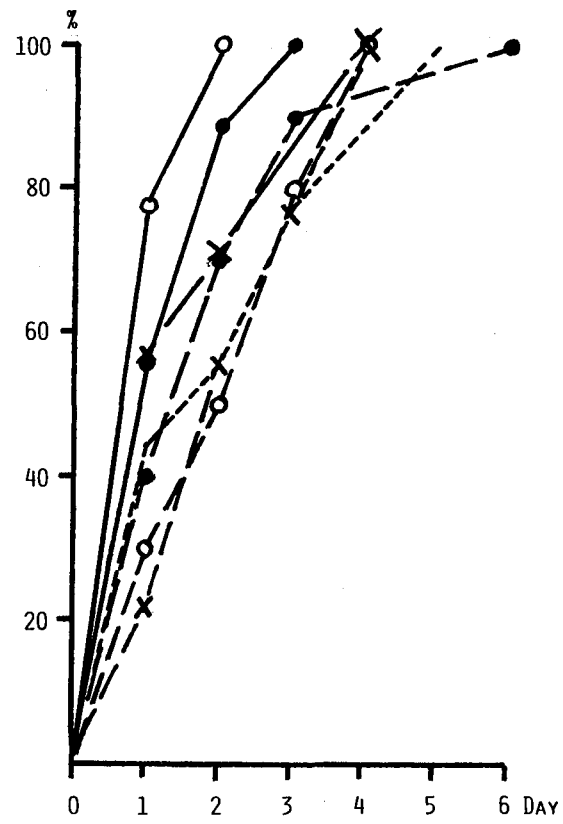


Fig. 6. Chronological Change of the Cumulative Fertility Index

○——○ A ------ E
○---○ B ×——× F
●——● C ×---× G
●---● D

方法と異なるので比較は難しいが，今回は森山の中等量投与量以上に相当すると思われる．図5に示したように，メチル水銀投与群は体重増加が抑制されていた．なお，図5に示した体重の測定は交配開始時を基点としているため，妊娠日の遅れによる影響を考慮しなかったので，経日的累積妊娠率を図6にまとめ考察した．その結果，メチル水銀投与群は，A, C群より妊娠日が遅れたが，E群と同じ集団に位置しており，また，妊娠日別に各群の体重増加を比較した時，やはりメチル水銀投与群は，妊娠による増体量が抑制されてる傾向が認められた．このことから，メチル水銀は，妊娠ラットの体重増加に影響を与えているものと考えられ，森山の報告[36]と同様の結果であった．また，Nobunaga 等[37]は，同様に，妊娠マウスの体重増加を，メチル水銀が抑制することを観察している．そして，セレンを同時投与した時，低濃度では体重増加への効果は認められないが，高濃度で対照群と同様の増体が示された．我々のラットの実験では，セレンの効果は明らかでない．

一方，信永等[38]は，マウスに交配前30日間，妊娠18日目までメチル水銀8ppm単独およびセレン3ppm同時投与した場合の繁殖影響を観察しているが，セレンの濃度が高いためセレンの効果は，保護作用よりむしろメチル水銀毒性を高めた結果を報告している．また，Lee 等[39]は，セレンはメチル水銀の母親に対する毒性や奇型発生を強めているとしている．さらに，加須屋[40]が，細胞毒性影響で観察したように，セレンの保護効果は適量の範囲内に限られることを示唆している．我々が用いた1.3ppm セレンのレベルは，メチル水銀の繁殖毒性に対して保護的に働

いており，しかも，それら由来セレンによる効果の違いも亜急性毒性と同様に観察することができた．

新生仔の離乳率は，メチル水銀単独群よりもセレン同時投与群の方が高いことを示した．これは，飯島等[41]や田村等[42]が，メチル水銀と亜セレン酸を同時に投与した場合には，セレンが胎仔に多く移行するとしていることから，移行したセレンが，生存率を高めたものと思われる．しかしながら，イルカ群が低い離乳率を示したことは，一つには，セレンが胎盤およびミルクに移行し難いことが考えられる．このことに関しては，前記の永沼の無機水銀とセレンは遊離しにくい複合体を形成するという報告[29]，さらに，Parizek 等が無機水銀と亜セレン酸を同時投与した場合は，単独投与群と比較して両元素の新生仔移行は減少するとの報告[43,44]からも推測される．また，たとえセレンが移行しているとしてもセレンの保護作用が低下している場合が考えられる．しかしながら，新生仔死亡数が多いことより，イルカ肉中に存在するセレン以外の因子の影響も十分に考え得るので，今後，さらに検討する必要がある．

要　約

イルカ肉，クジラ肉由来セレンが，メチル水銀の亜急性毒性および繁殖毒性に対して，どのような保護効果を示すか亜セレン酸ナトリウムのセレンと比較して，その有効性を検討した．

ウィスター系ラット，実験A)雄4週令，B)雌10週令に，実験飼料の蛋白源としてイルカ肉，クジラ肉，カゼインを用い，塩化メチル水銀(20ppm)添加群と無添加の6群と，カゼインに塩化メチル水銀と亜セレン酸ナトリウム(1.3ppm)添加の合計7群を用いた．これらを，A)11週間，B)妊娠から離乳まで約6週間にわたって自由摂取させた．

パラメーターとしてのA)体重増加，神経症状の発現，死亡率，B)体重増加，出産仔数，死亡仔数，離乳率等にメチル水銀の毒性影響が認められ，イルカ，クジラ肉および亜セレン酸由来セレンの減毒効果が観察された．しかし，イルカ肉由来セレンは，クジラ肉由来のセレンに比べてより弱い効果を示した．これらの結果は，イルカ肉由来セレンの“Biological Availability”が低いためか，あるいは，イルカ肉中の無機水銀がセレン活性を弱めているのか，また，他の因子の存在が示唆された．

(本研究は，昭和56年度当研究所調査研究課題「重金属汚染の生体影響に関する研究」として実施し，その概要は日本公衆衛生学会第41回総会1982年10月で発表した．)

文　献

1) Ganther, H. E., Goudie, C., Sunde, M. L. et al.: *Science,* 175, 1122, 1972
2) Iwata, H., Okamoto, H. and Ohsawa, Y.: *Res. Commun. Pathol. Pharmacol.,* 5, 673, 1973
3) Potter, S. and Matrone, G.: *J. Nutr.,* 104, 638, 1974
4) Stillings, B. R., Lagally, H., Bauersfeld, P. and Soares, J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 30, 243, 1974
5) Stoewsand, G. S., Bache, C. A. and Lisk, D. J.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.,* 11, 152, 1974
6) Ganther, H. E. and Sunde, M. L.: *J. Food Sci.,* 39, 1, 1974
7) 上田喜一，山中すみへ，河合正計，東条憲一：医学と生物学，90，15，1975
8) Johnson, S. L. and Pond, W. G.: *Nutr. Rep. Int.,* 9, 135, 1974
9) Welsh, S. O. and Soares, J. H.: *ibid.,* 13, 43, 1976
10) El-Begearmi, M. M., Sunde, M. L. and Ganther, H. E.: *Poultry Sci.,* 56, 313, 1977
11) Stoewsand, G. S., Anderson, J. L., Gutenman, W. H. and Lisk, D. J.: *Nutr. Rep. Int.,* 15, 81, 1977
12) 東京都衛生局：環境保健レポート，22，41，1973
13) Marsh, D. O., Turner, M. D., Smith, J. C., Wun-Choi, J. and Clarkson, T. W.: 1974, *Proc. 1st Int. Congr. on Mercury,* Barcelona, 2, 235
14) Turner, M. D., Marsh, D. O., Smith, J. C., et al.: *Arch. Environ. Health,* 35, 367, 1980
15) 西垣　進，田村行弘，真木俊夫他：東京衛研年報，25，235，1974
16) 白水美智子，山口誠哉，賀来俊輔：産業医学，18，123，1976
17) Ohi, G., Nishigaki, S., Seki, H., et al.: *Environ. Res.,* 12, 49, 1976
18) Eaton, R. D. P., Secord, D. C. and Hewitt, P.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 55, 514, 1980
19) Friedman, M. A., Eaton, L. R. and Carter, W. H.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.,* 19, 436, 1978
20) 西垣 進，田村行弘，真木俊夫他：昭和52年度水銀の生体影響に関する研究結果等告書，1，1978，東京都衛生局
21) Ohi, G., Nishigaki, S., Seki, H., et al.: *Food Cosmtics Toxicol.,* 18, 139, 1980

22) Cantor, A. H., Scott, M. L. and Noguchi, T. : *J. Nutr.*, 105, 96, 1975
23) Cantor, A. H., Langevin, M. L., Noguchi, T. and Scott, M. L. : *ibid.*, 105, 106, 1975
24) 小宮和英, 大高順子, 河内佐十, 桜井 弘：衛生化学, 24, 163, 1978
25) 関比呂伸, 今野ヒロ子, 蓑輪佳子他：東京衛研年報, 27, 295, 1976
26) Ohi, G., Nishigaki, S., Seki, H., et al.: *Environ., Res.*, 16, 353, 1978
27) 武内忠男, 神原 武, 森川信博他：熊本医学会雑誌, 34, 521, 1960
28) 瀬辺恵鎧, 伊津野吉亮：日新医学, 49, 607, 1962
29) 永沼 章：衛生化学, 29, 173, 1983
30) Cappon, C. J. : *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 10, 673, 1981
31) Cappon. C. J. and Smith, J. C. : *ibid.*, 10, 305, 1981
32) Cappon, C. J. and Smith, J. C. : *J. Analylical Toxicol.*, 6 , 10, 1982
33) Cappon, C. J. and Smith, J. C. : *J. Appl. Toxicol.*, 2 , 181, 1982
34) Cappon, C. J. and Smith, J. C. : *J. Analytical Toxicol.*, 5, 90, 1981
35) 関比呂伸, 蓑輪佳子：未発表資料
36) 森山弘之：熊本医学会雑誌, 41, 506, 1967
37) Nobunaga, T., Satoh, H. and Suzuki, T.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 47, 79, 1979
38) 信永利馬, 佐藤 洋, 大和田一雄, 鈴木継美：水銀とセレン, 第1版, 鈴木継美, 大井 玄, 井村伸正, 235, 1977, 篠原出版K.K., 東京
39) Lee, M., Chan, K. K-S., Sairenji, E. and Niikuni, T. : *Environ. Res.*, 19, 39, 1979
40) 加須屋実：水銀とセレン, 第1版, 鈴木継美, 大井玄, 井村伸正, 205, 1977, 篠原出版 K. K., 東京
41) Iijima, S., Tohyama, C., Lu, C-C. and Matsumoto, N.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 44, 143, 1978
42) 田村行弘, 大井 玄, 真木俊夫他：東京衛研年報, 27, 179, 1976
43) Parizek, J., Babicky, A., Ostadalova. I., Kalouskova, J. and Pavlik, L. : *Radiation Biol. of the Fetal and Juvenile Mammal*, Ed. Sikov, M. R. and Mahlum, D. D., 137, 1969, USAEC, Oak Ridge, Tenn.
44) Parizek, J., Ostadalova, I., Kalouskova, J.,et al.: *J. Reprod. Fert.*, 25, 157, 1971

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 316-320, 1984

東京湾の環境汚染モニタリング調査（第2報）
昭和57年度スズキおよびカモメ類の調査結果について

瀬戸　博*, 加納堯子*

Survey of Chemical Pollutants in Biota from Tokyo Bay (II)
Residue Levels in Japanese Sea Bass and Gulls in 1982

HIROSHI SETO* and TAKAKO KANO*

As a part of continuing monitoring programme of environmental pollution, the levels of chemical residues in Japanese sea bass (*Lataolabrax japonicus*) and gulls (A: *Larus crassirostris* Vieillot, B: *Larus ribibundus sibiricus* Buturlin, C: *Larus argentatus vegae* Palman) collected from Tokyo Bay were determined. Residual concentrations of detected chemicals in the fish muscle on wet weight basis were as follows: PCB (0.23-0.37 ppm), α-BHC (0.003-0.004 ppm), dieldrin (0.004-0.005 ppm), p, p'-DDT (0.002-0.003 ppm), o, p'-DDE (0.001-0.002 ppm), p, p'-DDE (0.009-0.023 ppm), p, p'-DDD (0.007-0.010 ppm), heptachlorepoxide (0.002-0.003 ppm) and HCB (0.001 ppm). Levels of some pollutants in the gulls were higher than those in the sea bass: e. g. in gull A. PCB (2.9-8.9 ppm), β- BHC (0.007-0.012 ppm), dieldrin (0.057-0.124 ppm), p, p'-DDE (0.46-1.1 ppm), heptachlorepoxide (0.020-0.047 ppm) and HCB (0.015-0.024 ppm).

Keywords: pollution, chlorinated hydrocarbon, sea bass, gull

前報[1]では，東京湾由来スズキ(*Lataolabrax japonicus*)について29種類の化学物質濃度を測定し，PCB, BHC, DDT等の残留が依然として認められることを報告した．またスズキの習性から，スズキはその棲息する周辺水域の化学物質汚染，特に難分解性で生物濃縮性のある物質汚染の動態を知る有用な指標のひとつであることを述べた．

一方，環境庁が実施した鳥類を対象とした化学物質検索調査[2]で鳥類組織中の化学物質の分析値は魚類のそれと比較して著しく相違することが明示された．このことから昭和57年度の環境庁委託生物指標環境汚染測定調査には東京湾のカモメ類が分析対象として加えられた．

本報告は，その測定結果である．

試料および分析方法

試料　スズキは昭和57年9月，千葉県富津沖で捕獲された25尾を5尾づつまとめ5検体とした．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，内臓等を除いた可食部のみとした．さらに肉をミンチにかけ均一になるよう混合し，ガラス容器に分け秤量の上，分析時まで保存した．

カモメ類は昭和57年8月から11月にかけて羽田付近で捕獲された．種，性およびおよその年令の鑑定は，応用生物(株)に依頼した．胸筋を取り出し，種または性別に区分して3～5羽分を各1検体とした．

試料の概要は，Table 1，2に示した．Table 2中　Aはウミネコ(*Larus crassirostris* Vieillot)，Bはユリカモメ(*Larus ribibundus sibiricus* Buturlin)，Cはセグロカモメ(*Larus argentatus vegae* Palman)である．

分析方法　1．水分および脂肪分：環境庁の指示に従い分析方法[3]のうち水分は常圧加熱乾燥法，脂肪分はクロロホルム・メタノール抽出法をそれぞれ用いた．2．PCB，有機塩素系農薬，フタル酸エステル等の分析：同じく環境庁の指示する分析方法に準じて行った．すなわちPCB，農薬，フタル酸エステル等は系統分析法[3]塩素化ベ

* 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. Constitution of the Sample (Sea Bass) and Water and Fat Contents of the Muscle.

(n= 5)

group no.	body weight (g)	length* (cm)	water (%)	fat (%)
1	412±12	30.6±0.5	74.7	4.2
2	371±73	29.2±1.1	76.0	4.5
3	327±55	27.8±1.6	74.0	5.0
4	315±99	27.4±2.9	76.4	4.0
5	346±35	28.4±1.5	77.5	3.9
mean	354.2	28.7	76.3	4.3

*: not include the part of tail fin.

Table 2. Constitution of the Sample (Gulls) and Water and Fat Contents of the Muscle.

( )=n

Gull	age	sex	body weight (g)	wing lenght (cm)	water (%)	fat (%)
A-1	adult	female	501±54 (5)	33.4±1.6 (5)	68.9	6.4
A-2	adult	male	616±43 (5)	35.7±2.5 (5)	70.1	7.1
A-3	adult	male	615±60 (5)	37.3±0.3 (4)	69.4	6.9
A-4	adult	female	516±18 (5)	36.7±1.5 (4)	69.3	8.5
mean			562.0	35.8	69.4	7.2
B	—	—	296±57 (5)	29.9±0.8 (5)	67.3	7.8
C	—	—	1158±399 (3)	42.4±2.3 (3)	68.1	7.8

Gull A:Black-Tailed Gull, Gull B:Kamchatkan Black-Headed Gull, Gull C: Vega Herring Gull.

ンゼン類は水蒸気蒸留法[4]により行った.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の場合はマスフラグメントグラフィーを行った. なお詳細な操作法, 条件は報告書[5]に記載した.

分析した化学物質は前報の29種類の他, ヘプタクロル, ヘプタクロルエポキシド(HCE)の2種を加えた計31種類である.

なお試薬および装置は前報と同様のものを使用した.

結果および考察

スズキについて スズキ可食部の化学物質濃度をTable 3に示す. 前回は大型のスズキを1尾ごとに分析したためその測定値は個体差が大きかった. しかし, 化学物質濃度と体長との間には相関が認められた. 今回は比較的小型のスズキを多数捕獲し, 同等の大きさのもの5尾を1グループにし分析を試みた. その結果, 各グループの間にあまり差は認められなかった.

試料から検出された物質はPCB, α-BHC,ディルドリン, p,p'-DDT, o,p'-DDE, p,p'-DDE, p,p'-DDD,ヘプタクロルエポキシドおよびヘキサクロルベンゼンである. 前回, 高頻度(平均0.004 ppm)に検出された1, 2, 4-トリクロルベンゼンは今回は検出されなかった.

一方, ヘプタクロルは検出されなかったが, ヘプタクロルエポシキドはいずれのグループ試料からも検出された.環境庁の水質調査[6]によると底質からのヘプタクロルの検出率は魚類より高いが, 逆にヘプタクロルエポキシドでは魚類が高いという結果が報告されている. これらのことはSalourinら[7]の言うようにヘプタクロルが生体内で速やかに代謝されることを示唆している.

スズキの残留有機塩素化合物の年次推移をみると, Table 4に示すようにPCB, α-BHCはほぼ横ばい,

Table 3. Concentrations of Pollutants in Muscle Tissue of Sea Bass.

(ppm on wet basis)

compound	range	mean	*
PCB	0.23—0.37	0.31	5/5
PCN	nd*1	nd	0/5
α-BHC	0.003—0.004	0.004	5/5
β-BHC	nd	nd	0/5
γ-BHC	nd	nd	0/5
δ-BHC	nd	nd	0/5
aldrin	nd	nd	0/5
dieldrin	0.004—0.005	0.004	5/5
endrin	nd	nd	0/5
o,p'-DDT	nd	nd	0/5
p,p'-DDT	0.002—0.003	0.002	5/5
o,p'-DDE	0.001—0.002	0.001	5/5
p,p'-DDE	0.009—0.022	0.014	5/5
o,p'-DDD	nd	nd	0/5
p,p'-DDD	0.007—0.010	0.008	5/5
heptachlor	nd	nd	0/5
HCE	0.002—0.003	0.002	5/5
DnBP	nd*2	nd	0/5
DEHP	nd*2	nd	0/5
TBP	nd*1	nd	0/5
o-DCB	nd*1	nd	0/5
m-DCB	nd*1	nd	0/5
p-DCB	nd*1	nd	0/5
1,2,3-TrCB	nd	nd	0/5
1,2,4-TrCB	nd	nd	0/5
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		2/5

Numerater : Number of samples in which chemical pollutants were detected. Denominator: Number of samples tested. nd:<0.001, *1 : <0.01, *2 : <0.1

Table 4. Trends in Chlorinated Hydrocarbon Residues in Sea Bass Collected from Tokyo Bay.

compound	1978*	1979*	1980*	1981*	1982
PCB	0.3	0.4	0.3	0.75	0.31
HCB	0.002	0.002	0.002	nd — 0.001	nd — 0.001
α-BHC	0.006	0.002	0.005	0.006	0.004
dieldrin	0.007	0.012	0.011	nd — 0.001	0.004
p,p'-DDE	0.029	0.037	0.052	0.043	0.014
p,p'-DDT	0.013	0.028	0.007	nd	0.002
1,2,4-TrCB	—	—	nd — 0.001	0.004	nd

*: data from ref.8 . — : not determined.

ディルドリンおよびDDT類の漸減傾向がうかがわれる．しかし，まだサンプル数が少なく，これらの結果の判断には今後の調査が必要と思われる．

カモメ類について Table 5にカモメ類の胸筋中の化学物質濃度を示す．検出頻度の高い物質はPCB, β-BHC, ディルドリン, *o,p'*-DDT, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, ヘプタクロルエポキシド, *o*-ジクロルベンゼンおよびヘキサクロルベンゼンであった．

スズキに比較して有機塩素化合物の高い蓄積性を示し，特にPCB,ディルドリン，ヘプタクロルエポキシド，ヘキサクロルベンゼンにおいて著しい．一方，スズキで高頻度に検出された α-BHCは不検出で，β体のみが検出された．また，総DDTに占める各DDT類の割合すなわち構成比に注目すると *p, p'*- DDEの割合はウミネコ99.7％に対しスズキ56％でウミネコが著しく高い．これらのことからカモメ類は代謝機能を異にするのかも知

Table 5. Concentrations of Pollutants in Muscle Tissue of Gulls.

(ppm on wet basis)

compound	Gull A range	Gull A mean	*	Gull B	Gull C
PCB	2.9—8.9	6.5	4/4	1.4	2.3
PCN	nd*1	nd	0/4	nd	nd
α-BHC	nd	nd	0/4	nd	nd
β-BHC	0.007—0.012	0.010	4/4	0.012	0.008
γ-BHC	nd	nd	0/4	nd	nd
δ-BHC	nd	nd	0/4	nd	nd
aldrin	nd	nd	0/4	nd	nd
dieldrin	0.057—0.124	0.085	4/4	0.018	0.040
endrin	nd	nd	0/4	nd	nd
o,p'-DDT	nd—0.001		3/4	nd	nd
p,p'-DDT	nd	nd	0/4	0.002	0.008
o,p'-DDT	0.001	0.001	4/4	nd	nd
p,p'-DDE	0.46—1.1	0.79	4/4	0.23	0.42
o,p'-DDD	nd	nd	0/4	nd	nd
p,p'-DDD	0.001	0.001	4/4	0.002	0.005
heptachlor	nd	nd	0/4	nd	nd
HCE	0.020—0.047	0.038	4/4	0.011	0.012
DnBP	nd*2	nd	0/4	nd	nd
DEHP	nd*2	nd	0/4	nd	nd
TBP	nd*1	nd	0/4	nd	nd
o-DCB	0.01	0.01	4/4	nd*1	0.01
m-DCB	nd*1	nd	0/4	nd	nd
p-DCB	nd*1	nd	0/4	nd	nd
1,2,3-TrCB	nd	nd	0/4	nd	nd
1,2,4,-TrCB	nd	nd	0/4	nd	nd
1,3,5-TrCB	nd	nd	0/4	nd	nd
1,2,3,4,-TeCB	nd	nd	0/4	nd	nd
1,2,3,5,-TeCB	nd	nd	0/4	nd	nd
1,2,4,5-TeCB	nd	nd	0/4	nd	nd
PeCB	nd	nd	0/4	nd	nd
HCB	0.015—0.024	0.020	4/4	0.010	0.018

Gull A: Black-Tailed Gull, Gull B: kamchatkan Black-Headed Gull, Gull C: Vega Herring Gull.
*Numerater: Number of samples in which chemical pollutants were detected. Denominator: Number of samples tested. nd : <0.001, *1 : <0.01, *2 : <0.1

れない.

今回の調査からカモメ類の化学物質汚染程度は概してウミネコ>セグロカモメ>ユリカモメという傾向が見られる. しかし, これらのカモメの移動範囲および東京湾での滞在期間が異なり, 単純に比較できない. 今回の捕獲時期から推察すると冬鳥であるユリカモメ, セグロカモメは日本に渡来したばかりで東京湾の汚染状態を反映しているとは言い難い. 捕獲時期と化学物質濃度との関係は調査する必要がある.

カモメ類は魚類と比較して, 有機塩素化合物の高い生物濃縮性を有し, またBHCおよびDDT類等でスズキと異なる蓄積のパターンを示すことから環境汚染物質の汚染レベルの把握および生体における残留性の指標生物として有用であると考えられる.

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) 瀬戸　博, 加納堯子：東京衛研年報, 34, 260, 1983
2) 環境庁編：難分解性化学物質検索調査, 1982
3) 環境庁編：生物試料中化学物質系統分析法, 1982
4) 環境庁編：生物試料中の化学物質分析法, 1981
5) 東京都立衛生研究所：昭和57年度生物指標環境汚染測定調査報告書, 1983
6) 環境庁編：化学物質と環境 No. 9, 1983
7) Sabourin, T. D., Stickle, W. B., Michot, T. C. *et al.* : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 32, 460, 1984
8) 環境庁編：化学物質と環境 No. 1, 1975～No. 8, 1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 321-323, 1984

酸素存在下での1,3−ブタジエンとOHの反応

太田與洋*, 溝口　勲*

Reaction of 1,3-Butadiene with OH in the Presence of Oxygen

TOMOHIRO OHTA*, and ISAO MIZOGUCHI*

Reactions of hydroxyl radicls with 1, 3-butadiene in the presence of oxygen were studied in the gas phase. Hydrogen peroxide and methyl nitrite were used as OH sources. Furan was detected besides acryldehyde by gas chromatographic analysis. Approximate yields of furan were sensitive to the conditioning of the reactor surface but insensitive to OH sources, the surface material of reaction vessel or the surface to volume ratios of the reactors.

Keywords: OH, butadiene, furan

緒　言

共役2重結合化合物は高分子材料などに広く使用されている．また，イソプレンを骨格とするテルペンと総称される共役二重結合化合物は植物から生成放出されている．汚染大気中に，これらの共役二重結合化合物が存在するとき，最終的に生成物は何であり，それらはどの程度の収率を持つかは，興味深いことがらである．

窒素酸化物と炭化水素類に汚染された空気が太陽光照射を受けたとき，主として，炭化水素類を分解するものはハイドロキシルラジカル(OH)であると考えられている[1]．ここでは，共役二重結合化合物として，最も簡単な構造をもつ，1，3−ブタジエンを選び，OHとの反応を酸素存在下で，調べた．その結果，従来の酸素存在下での二重結合とOHの反応から予測できない，新しい生成物が認められた．それの収率を求めると同時に，生成機構について推察し，さらにそれらの人体に与える影響について述べる．

実　験

2つのOHのソースを用いた．H_2O_2の254 nm，亜硝酸メチル(CH_3ONO)の360 nmにおける光照射である．内容積約180ml（内径4cm．長さ15cm）の石英セルに過酸化水素（90％，H_2O_2）か，亜硝酸メチルを1 torr以下になる様に入れ，次に酸素で希釈した，1,3−ブタジエンを導入し，さらに窒素あるいは酸素を1気圧まで入れた．10分程，反応容器を静置したのちに，次に，H_2O_2の系は殺菌灯，亜硝酸メチルの系はブラックブルーランプで照射した．それぞれの系で，光照射前後の1,3−ブタジエンと反応生成物をFID付きガスクロで分析した．145℃でPORAPAK T，1m-ステンレスカラムを用いた．低圧下の実験では，全圧を2.4 torr程にして，光反応を行なった後に，窒素で一気圧にして，ガスクロ分析を行なった．

ガラスビーズをつめて，液体酸素浴にひたしたガラス管に，何回かの実験の生成物を通過させ，生成物を捕集した．捕集後の生成物をGC - MSで同定した．別に，ガスクロのTCD検出器のシグナルを見ながら生成物を分離捕集し，赤外スペクトルを得た．標準物質と生成物のガスクロの保持時間，赤外，マススペクトルはともに，よく一致した．他に，重酸素($^{18}O_2$)を用いて，同様の実験を行ない，生成物は，上記のガラスビーズ入りガラス管に捕集し，マススペクトルを得た．生成物中の重酸素含有率を対応するピークの強度比から求めた．

硝酸メチルは，亜硝酸ナトリウムのメタノール溶液に，硫酸を滴下して，合成し，液体窒素温度で真空にして，保存した．1,3−ブタジエンは高千穂化学，重酸素($^{18}O_2$，98.6％）は，メルク・フロスト・カナダから入手した．

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

質量分析器で，純度のチェックをした．不純物は，$^{18}O^{16}O$であった．

結果と考察

このガスクロ条件下で，同定された生成物はアクリルアルデヒド（アクロレイン）とフランであった．反応物と生成物の典型的なガスクロマトグラムを図1に示す．1,3−ペンタジエンを用いて，同様の反応を行なわせるとアセトアルデヒド，アクリルアルデヒド，クロトンアルデヒドの他に，2−メチルフランが生成物として同定された．1,3−ブタジエンの消費量に対するアクリルアルデヒド(C_2H_2CHO)とフラン(C_4H_4O)の収率の初期条件に対する依存性を知るために，初期条件を種々変えて，何回かの実験を行なった．結果は表1に示す．全圧P_tが760torrである場合は，フラン，アクリルアルデヒドの収率は，照射時間に依存せず，反応物の1,3−ブタジエン，過酸化水素，酸素の分圧にも依存しない．しかし，Run-11，12にみられる様に，全圧が2.4 torrになると，フランの収率が3～4割増加し，アクロレインが同程度減少することがわかる．別に，亜硝酸メチルをOHのソースとして用いた場合も，ほぼ同じ収率を示し，ソースには依存しないことがわかった．他に，表面積と体積の比が10倍程度異なる反応容器を用いて，同様の実験を行なっても収率には著じるしい変化はみられなかった．通常の酸素−16の代わりに，重酸素−18を用いて生成物の質量分析を行なった結果を表2に示す．これによると，全フラン中の約4割程は重酸素を含んでいた．

酸素存在下で，1,3−ブタジエンとOHの反応から，アクリルアルデヒドを生成することは，以下の通常のオレフィンとの反応から類推することができる[1]．

$$C=C-C=C+OH\rightarrow C(OH)-C-C=C\xrightarrow{O_2}CH_2O+C_2H_3CHO$$

$$\longrightarrow \text{unspecified products}$$

フラン(C_4H_4O)は1,3−ブタジエン(C_4H_6)に比べて，水素が2個少なくなっていること，重酸素を用いた実験で，約4割近くの酸素が，重酸素にラベルされたこと，また，低圧になれば，フランの収率が増加したことなどから，OHの二重結合への付加を経ることは考えられず，OHにより端末のビニル水素が引き抜かれて，酸素分子が結合し，一酸化窒素(NO)などとの反応により，($O-CH=CH-CH=CH_2\longleftrightarrow O=CH-CH=CH-CH_2$)が生成し，フラン環を生成するものと考えられる．

フランとアクリルアルデヒドの収率は低く，失なわれた，1,3−ブタジエンの35％程度を説明するだけである．亜硝酸メチルを用いて，反応系中にNOを生成させると，アクリルアルデヒドの収率が増加するが，なお，50％程度の消失を説明できるだけである．生成物の多くは高沸点の有機エアロゾルといわれるものに変化しているのであろうと考えられる．

フランは低級エーテルと同様に麻酔作用を有するが，ラットに対する致死濃度はLC30400ppmであり，毒性はそれほど著じるしいとはいえない[2]．アクリルアルデヒドは眼に灼熱的に，また口腔，鼻粘膜にも刺激を与える[2]．もし局所的にせよ，汚染大気中に，これらの反応性の高い共役二重結合化合物が大量に放出されると，不飽和アルデヒドの生成の可能性が生じてくる．

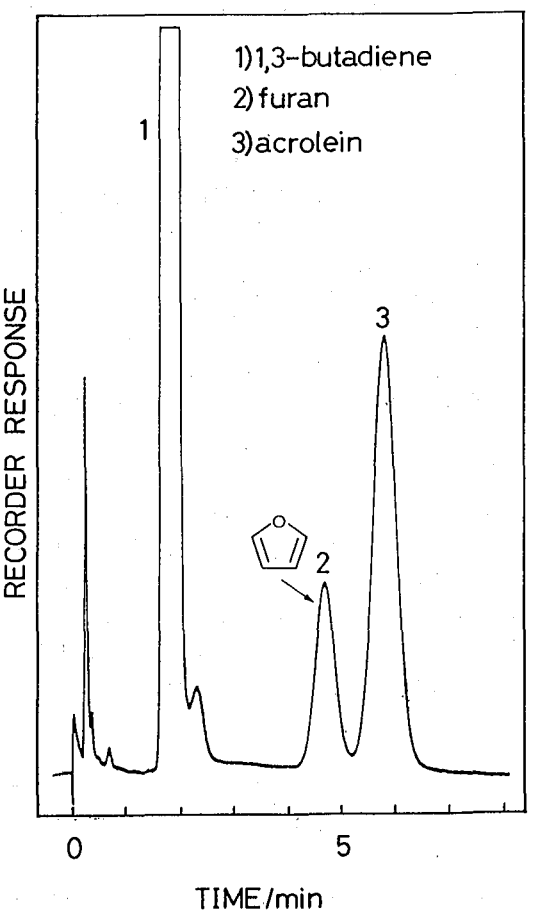


図1．H_2O_2 [1.0torr]/1,3-butadiene [0.4torr]/O_2 [760torr]，の光分解生成物のガス・クロマトグラム

表1．異なる初期条件下での，H_2O_2/1.3-butadiene/O_2の光分解生成物の収率

Run	Irrad[a] Time	Reactants, Torr C_4H_6	H_2O_2	O_2	Added Gas	Pt Torr	Products yield, % C_4H_4O	C_2H_3CHO
1	1.5	.407	1.0	1.1	-	760	5.55	25.2
2	1.5	.409	1.0	1.1	-	760	6.18	27.8
3	1.5	.361	1.0	759	-	760	6.59	23.4
4	1.5	.368	1.0	759	-	760	6.68	24.4
5	3.0	1.38	1.0	758	-	760	6.50	23.2
6	3.0	1.39	1.0	758	-	760	6.96	23.5
7	1.5	.404	1.0	1.1	Al[b],.341	760	7.19	-
8	1.5	.401	1.0	1.1	Al,.341	760	7.40	-
9	3.0	.381	.48	1.1	-	760	7.53	29.6
10	3.5	.399	.47	1.1	-	760	7.62	27.9
11	1.5	.306	1.0	1.1	-	2.4	10.5	20.6
12	1.5	.314	1.0	1.1	-	2.4	11.4	21.1

[a]minutes

[b]Acrolein

表2．1,3-butadiene/H_2O_2/$^{18}O_2$/N_2の光分解生成物の同位体分析

Run	Irrad Time,min	Reactants, Torr C_4H_6	H_2O_2	$^{18}O_2$	Added Gas	^{18}O-Products ratio, %[a] C_4H_4O	C_2H_3CHO
1	27	.217	1.4	9.6	-	32	78
2	25	.180	0.9	>9.0	-	38	83
3	15	1.06	1.0	>8.2	-	37	90
4	20	1.08	1.0	8.0	NO,.262	44	49

[a] [^{18}O-Product]／([^{18}O-Product]＋[^{16}O-Product])×100

文　献

1) R. A. Atkinson, K. R. Darnall, A. L. Loloyd, A. M. Winer, and J. N. pitts, Jr., Adv. Photochem., 11, 375, 1979

2) 堀口　博：公害と毒・危険物（有機編）568, 1971 三共出版

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 324-328, 1984

空調ダクト内堆積粉塵の性状について（第2報）

佐 藤 泰 仁

Properties of Accumulated Dusts in Air-conditioning Duct (II)

YASUHITO SATO*

Dust accumulated in air conditioning ducts was examined in six buildings which were not included in the previous investigation.

In qualitative analysis, 17 elements (Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn and Pb) were detected in the dust samples. Quantitative analysis was performed for 5 elements including Fe and Zn. Furthermore polycyclic aromatic hydrocarbons extracted from tar in the dust were qualitatively analyzed. The value of benzo(a) pyrene in the ducts was about 25 times greater than that of airborne particles.

Benzo(a) pyrene may have accumulated in the ducts over a long period.

Keywords : components analysis, accumulated-dust, air-con duct, Benzo(a) pyrene

はじめに

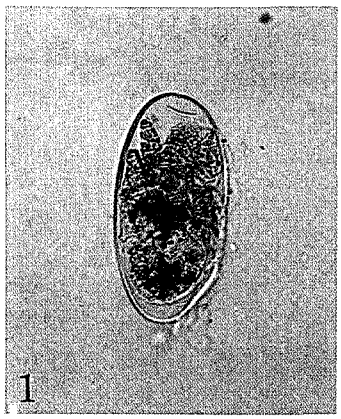
ビル環境等において，室内に空気を送りこんでいるダクトの中は長い間の空気の流入により堆積した粉塵等が生じており，これらの性状については先に報告[1]を行なっているが，今回も前報にひきつづき6つのビルのダクト内堆積粉塵を試料として同様な検討を行なうとともに，新らたに一部元素の定量を行なった．また試料タール分に含まれている発ガン性の最も強いと言われているベンゾ(a)パイレンなどの多環芳香族炭化水素についても分析を行ない，いくつかの知見を得たので報告する．

試料の採取及び分析方法

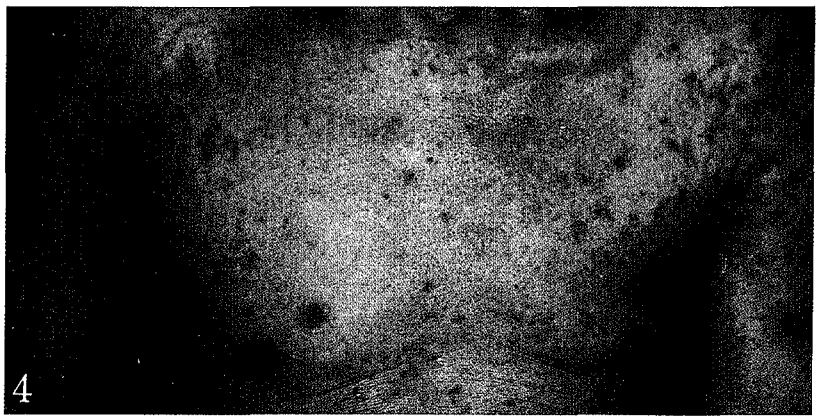
試料の採取方法については前報[1]と全く同じである．元素の組成分析にはエネルギー分散型蛍光X線分析装置（㈱理学電機工業製，ウルトラトレースシステム0600型にデータ処理システム7077型を組みあわせたもの）を使用した．本装置は少量の試料でも迅速に定性が行なえる利点をもっている．すなわち各元素の励起効率を高めてエネルギー分布を得やすくするために2次ターゲット方式を用いている．そのため2次ターゲットの選定が必要であること，また真空雰囲気中の方が効率がよい元素もあるなどのために分析条件を次のように設定した．すなわちMg, Alの確認のためにはSiを2次ターゲットにして真空中で行なうこと，以下Si, P, SにはCl（真空）を，Cl, K, CaにはTiを，Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, CuにはGeを，Zu, PbにはMoを用いて行なった．定性分析としては試料を両側よりはさんだマイラー膜をスライドマウントに装着して行ない，定量分析としては一定量の試料を蒸留水で10～100倍に希釈後，メンブランフィルターで濾過し，そのフィルター上の粉塵について行ない，予め標準添加法により求めておいた検量線から算出した．

また元素の状態分析にはX線回折装置（㈱理学電機製，ガイガーフレックスRAD-II Aにデータ処理装置RAX-10を組みあわせたもの）を用い，蛍光X線と同様試験ふるい400 mesh以下の試料をAl製試料ホルダーにつめ，回転試料台に装着して分析を行なった．物質の同定についてはRAX-10並びに㈱理学電機分析センターのRAX-12を用い，検索されたデータをASTMカードにより再確認する方法によった．試料中の有機成分，無機成分，タール分の分析については前報[1]と同じである．更に多環芳香族炭化水素（以下PAHs）の分析についてはいくつかの方法があるが，今回は昭和58年5月に

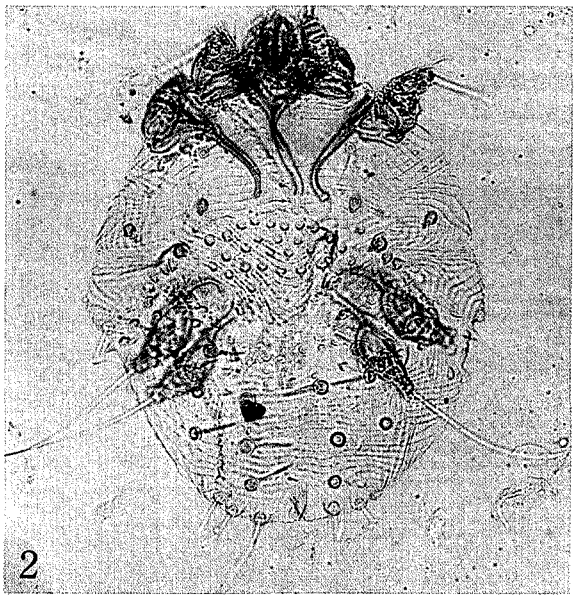
* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan



1

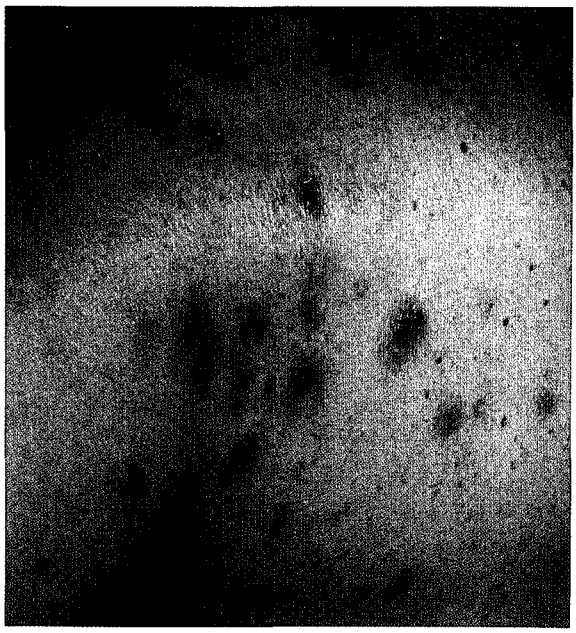


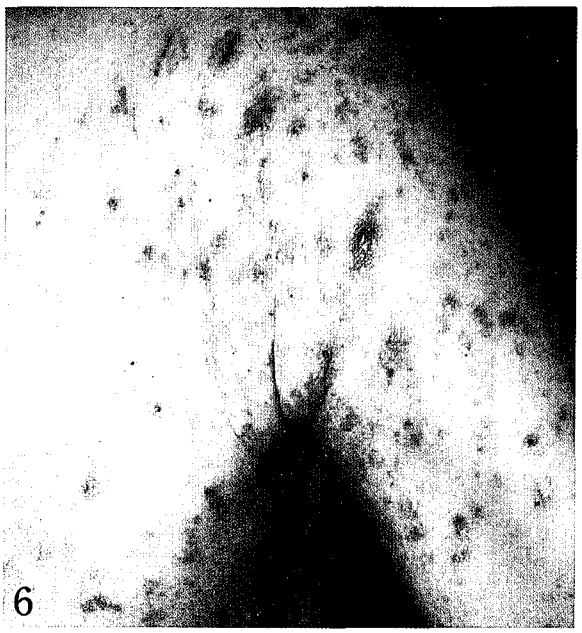
4



2

5





6

べてのビルより検出された．次に検出された元素のうちFe, Cu, Mn, Pb, Zuについて定量を行ない，その結果をTable 3に示した．これらの元素は前報の結果から，試料中の含有濃度が高いと推測されたが，Table 3に示すように特にFeおよびZnが多量に検出された．

Feについては1g中に28～430mg(平均値で136mg)が含まれており，Znは87～430mg(平均値で228mg)が含まれている．これらの元素の由来を考えてみると，大気中浮遊粉塵にも多く含まれている成分でもあることから，空調器よりの取入外気からの流入，あるいは空調器本体並びに濾材からの剝離等，さらにダクト素材の腐食によるものなどが，長い年月蓄積され高濃度になっているものと考える．

次にX線回折分析の結果をまとめてみたのがTable 4である．表中○印のものが同定された結晶構造であるが，その中で◉印のものが一番強度の大きいことを示している．そしてそれらは α-SiO_2 (α－石英)，$CaSO_4 \cdot 2H_2O$ (石膏)，$CaCO_3$ (方解石) であり前回の結果をもあわせてみてみると，これらの結晶構造が堆積塵中に占める代表的な3つの成分であると言えそうである．

さらに前回の試料すべてから検出同定された$NaAlSi_3O_8$ (曹長石) については今回2つのビルからしか同定されなかったが，この成分についても比較的多くのビルの堆積塵中に含まれているものと考える．またその他の結晶構造としてはPを含むものがみられ，$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ が2つのビルより同定された．尚，回折チャート及び検索データ例としてFig, 1にBビルのものを，Fig. 2にEビルのものを示した．

次にダクト内粉塵の無機成分 (灰分)，有機成分 (熱灼減量) 及びタール分の割合をみたのがTable 5である．それぞれのビル毎にみると若干異なった割合であるが，6つのビルの平均値でみる限り，無機成分と有機成分が6：4，タール分が8.1％と先の報告[1]と大差がない．このことから堆積塵の性状は無機性のものが多いと言えそうである．また，前回もみられたことであるが，無機成分と有機成分がほぼ等しい試料では，その中に含まれているタール成分が多いという結果がみられ，今回タール含有量が最高で14.7％ (Eビル) であった．この値は堆積塵中のタール発生源を喫煙のみと考えると，タバコ10本分のタール量に相当するわけで，前回も含めて12ビルの中で喫煙量 (率) が高いビルと考えられるが，各ビルの喫煙率などを調査していないので，残念ながら推測にすぎない．

今回，新らたにタール分中のB(a)Pなどの PAHs 濃度について分析を行なった．当初，先に述べた5成分の他に大気環境でもよく測定されているベンゾ(ghi)ピレンの分析も予定したが，使用したカラム及び条件でのB(ghi)Pと1, 2, 5, 6-DiBA の分離が悪く測定出来ず，5成分のみ粉塵1g当りのmgとしてTable 6に示した．6

Table 3. Concentration of each elements in dust

(mg/g)

	Fe	Cu	Mn	Pb	Zn
A	70.4	0.45	1.19	5.62	431
B	91.5	0.49	1.25	4.90	393
C	156	0.64	1.18	2.37	219
D	27.7	0.54	0.47	1.13	11.6
E	42.9	0.39	0.44	2.75	227
F	430	0.41	1.25	0.88	87.3

Table 4. Identified crystal structure in dust

structure(mineral name) \ building		A	B	C	D	E	F
α-SiO_2	(α-Quartz)	◉	◉	○	○	◉	○
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	(Gypsum)	○	○	◉	◉	○	○
$CaCO_3$	(Calcite)	○	○	○	○	○	◉
$NaAlSi_3O_8$	(Albite)	○		○			
$Na_2Ca(HPO_2)_2$	(——)		○			○	
$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	(Brushite)					○	○
$Mg_2Al_4Si_5O_{18}$	(Cordierite)		○				
$AlPO_4 \cdot Ca_{1.5}H_2O$	(——)		○				

◉····Most Intensity

Table 5. Ratio of each components in dust

	Inorganic Component %	Organic Component %	Tar Component %
A	62	38	5.3
B	56	44	8.7
C	59	41	5.2
D	68	32	8.2
E	50	50	14.7
F	62	38	6.4

環境庁がまとめた報告書[2]中の河川水中のPAHsの分析に準據して行なった．すなわち，ソックスレー抽出により生じたタール分を秤量後，ベンゼン溶媒中に溶かし，それをフィルター（東洋濾紙No.5A）で濾過を行なった．その濾液をKD濃縮器で濃縮後，N_2ガスを吹きつけて乾固し，n-ヘキサン1mlを加えた．次にその濃縮液を無水硫酸ナトリウム2 gを層積したシリカゲルカラム（活性度I, 1×15 cm）に入れ，その上部よりn-ヘキサン350mlを流し，初めの90mlを除去した後，次の90～350mlをKD濃縮器で約3～5 mlとなるまで濃縮し，再びN_2ガスにより乾固し，今度はアセトン1mlを加え，このアセトン可溶液を高速液体クロマトグラフィー（以下HPLC)用試料とした．定量については各々の物質の標準液による検量線と，それぞれの液体クロマトグラフ上のピーク高より求めた．さらに物質の同定については，標準液と試料成分との蛍光のSpectral Identificationを行ない確認した．なお今回測定したPAHsはベンゾ(e)パイレン（以下B(e)P），ベンゾ(b)フルオランテン（以下B(b)Fth），ベンゾ(k)フルオランテン(以下B(k)Fth），ベンゾ(a)パイレン(以下B(a)P），及びインディノ（1，2，3－cd）パイレン（以下I(1，2，3－cd)P)の5成分である．今回行なった各々の分析条件はTable 1 (a), (b)に示す通りである．また対象となったビルの規模をTable 2に示したが，築後20年前後から30年を超えたものであり前回よりもやゝ古いビルであった．またビルの使用状況についてはE, Fビルが専用ビルであるほかは雑居ビルであった．

Table 1. (a) Analytical conditions

X-ray fluorescent spectrometer

Target	Mo
Secondary target	Ge， Mo
Voltage (kV)	40
Current (mA)	25， 60
Time (sec)	200， 300
Detecter	Si(Li)

X-ray diffractometer

Target	Cu
Voltage (kV)	50
Current (mA)	40
Divergency (°)	1
Receiving Slit (mm)	0.3
Step width (°)	0.02
Present time (sec)	0.4
Angle zoom	2
Smothing	7
Peak search	4 , 20
Monochrometer	Graphite
Detecter	SC

測定結果及び考察

今回のED型蛍光X線分析の結果，6つの試料より同定された元素は，先の報告[1]でも検出された14種を含む17種類であった．すなわち原子番号の小さい方から列記するとMg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn及びPbである．今回用いた装置は各元素が励起しやすいターゲット（2次）を選択できるので，微量成分でも同定可能であり，前報と比べてP, Mn, Niが新らたに検出された．しかしP, V,及びCrについては検出されないビルがあったが，その他の元素についてはす

Table 1. (b) Analytical conditions

High pressure liquid chromatography

Column	Perkin-elmer PAH/10, 0.26×25cm	
Mobile phase	CH_3CN : H_2O = 8 : 2	
Flow rate	1 ml／min	
Wave length		
	emission(nm)	excitation(nm)
B(e)P	378	288
B(b)Fth	420	350
B(k)Fth	409	363
B(a)P	409	363
I(1,2,3-cd)P	503	360
Detecter	Fluorescent spectrometer HITACHI MPF-4	

Table 2. Scale of each building

Building	Year of construction	Area (m^2)
A	1963	106004
B	1952	48200
C	1963	3500
D	1966	30339
E	1964	13000
F	1966	8000

した．6つのビルの各成分の平均濃度は，B(e)Pが0.86 mg／g, B(b)Fthが0.89mg／g, B(k)Fthが0.37mg／g, B(a)Pが0.20mg／gおよびI(1，2，3-cd)Pが0.93mg／gで，各ビル毎のバラツキはあるものの，B(e)P, B(b)Fth, I(1，2，3-cd)Pの成分は，B(a)P濃度よりも相対的に高い濃度であった．また，発ガン性が高いと言われるB(a)Pについてみると，タール分が一番多かったEビルは0.36mg／gであったが，しかしB(a)P濃度が一番多かったのはBビルであった．(タール分8.7%，B(a)P濃度0.52mg／g)当初，タール分が多いところすなわちB(a)P濃度の高いところであろうと考えていたが，実際にはDビルのような結果（タール分8.2%，B(a)P濃度0.03 mg／g)もあることから両者の関係は明らかではなかった．室内粉塵並びに堆積粉塵中のPAHs濃度について検討した報告は少ないので，大気浮遊粉塵中のPAHs濃度[3]と比較をすると，B(a)Pは東京の56年度の年平均値が約20 μg／gであることから，今回の濃度は平均でも10倍，最高では25倍もの量が含まれていることになる．B(k)Pについて同じく年平均値と比較すると約27倍も高い値を示した．

昨年の夏，当科において事務専用ビルの空調機室及び事務室内の浮遊粉塵を各系統別（外気，給気，還気）に採取して試料のPAHs濃度の調査を行なった．その結果[4]ではB(a)P及びB(k)P濃度は，還気中濃度が給気中の濃度の約3倍高く測定されている．この結果は，還気中の各PAHs比は外気中のそれと異なり，室内の給気中の各PAHs比と同一パターンを示したこと，当ビルの還気は全く外気を遮断した空調器洗浄と室内給気のみをくり返す再循環方式であったこと等から，この還気中のPAHs濃度の多くは喫煙によるものと判断された．したがって空調ダクト内に堆積している粉塵中にも高濃度のPAHs濃度が分析されたことは，長期間にわたり主として室内の喫煙に由来するPAHsが堆積塵中に濃縮されたものではないかと考察した．

Table 6. Concentration of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in dust

(mg/g)

	B(e)P	B(b)Fth	B(k)Fth	B(a)P	I(1,2,3-cd)P
A	0.80	0.91	0.37	0.13	0.60
B	2.00	1.63	0.81	0.52	2.48
C	0.14	0.23	0.06	0.05	0.19
D	0.10	0.12	0.04	0.03	0.08
E	1.76	2.00	0.73	0.36	1.93
F	0.38	0.47	0.19	0.08	0.31

まとめ

今回の調査の結果の大要は以下の如くであった．

1) 空調ダクト内粉塵より検出された元素としては，Mg, Al,など17種であり，先の報告に比べNi, Mn, Pが新らたに検出された．
2) 検出された元素のうち，Fe, Cu, Mn, Pb, Znについて定量を行なったところ，ビルによってのバラツキがあるが，平均濃度としてはFeが136mg／g，Cuが0.49mg／g，Mnが0.96mg／g，Pbが2.94mg／g，Znが228mg／gとなり，Fe及びZnが多かった．
3) 粉塵中の結晶構造は前報と同様に，α-SiO_2，$CaSO_4 \cdot 2H_2O$及び$CaCO_3$が主流3物質であると判断された．
4) 粉塵の組成比（無機成分：有機成分）並びにタール分量は平均値で6：4及び8.1%と先の報告と大差がなかった．
5) タールに含まれているB(a)Pなど5つのPAHsについて分析を行なったところ，B(a)P濃度は大気中浮遊粉塵中の20～25倍の高濃度であった．このことは室内で発生する喫煙由来のものが，再循環空調により濃縮されて生じたものと考察した．

謝辞 今回の調査試料については，㈱東亜管財，江口 弘氏に御協力をいただいたことを記して深謝いたします．

（本研究は昭和58年度当研究所調査研究課題「大気中の浮遊粉塵に関する調査研究」の一部として実施し，概要は日本公衆衛生学会第43回大会1984年11月で発表した．）

文献

1) 佐藤泰仁：東京衛研年報，33，352—355，1982
2) 環境庁環境保健部保健調査室：57年度化学物質分析法開発調査報告書，27—33，1983.5
3) 東京都公害研究所：浮遊粒子状物質等測定データ集，1983.3
4) 東京都立衛生研究所：室内浮遊粉塵の質に関する調査結果（未発表資料）

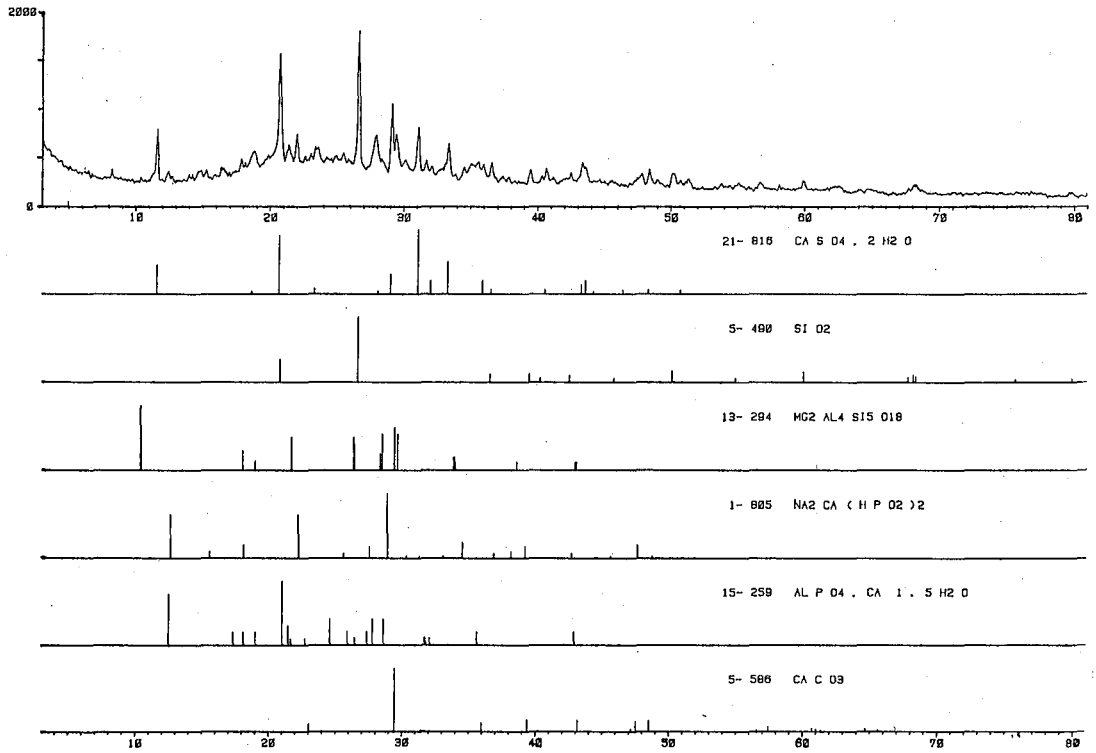


Fig. 1. Scan and search match data of a dust sample at B building

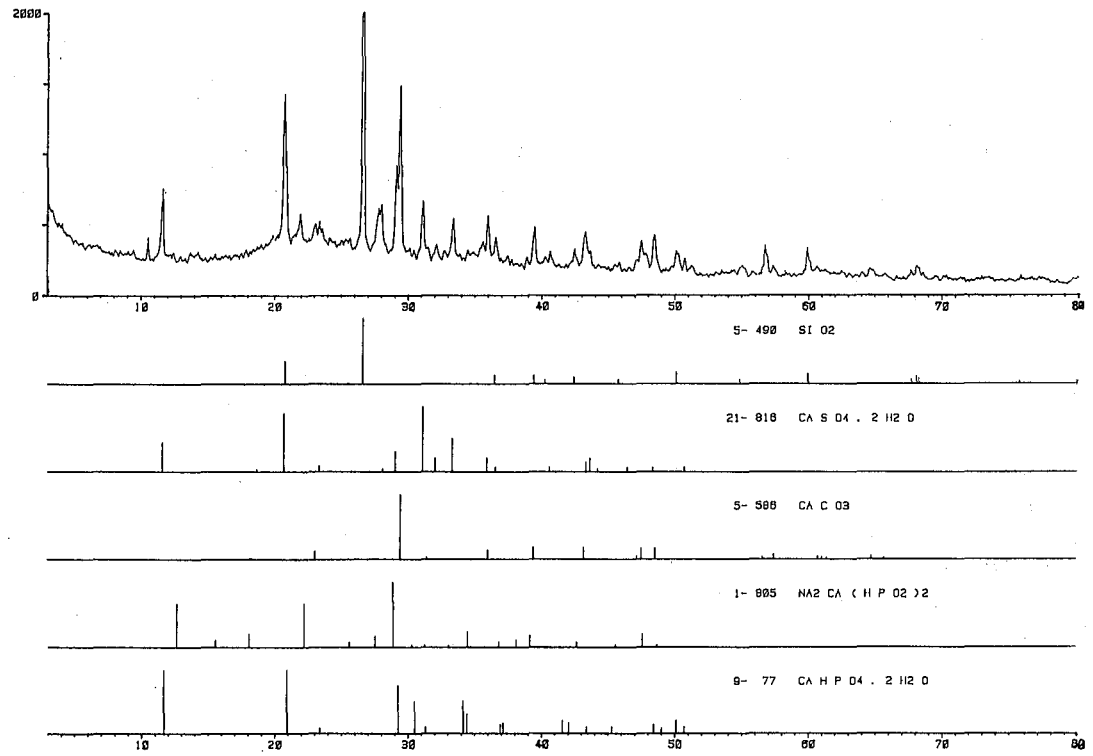


Fig. 2. Scan and search match data of a dust sample at E building

of about 100 of the 150 aged residents and 27 of the 55 staff members. The pruritic eruption was supposed to be human scabies at the first investigation because of such typical symptoms as multiple cases in the immediate environment, nocturnal itching, and characteristic distribution of papules.

June 16th: Using a vacuum cleaner, dust samples were collected from bed-sheets and underclothes which had been used for 3-4 days by 4 infested aged residents. Since two dermatologists could not extract any *Sarcoptes scabiei* from patients' skin using a skin scraping technique and since most papules were already scratched, the plastic box method and centrifuge floatation method were thought to be usefull to collect the mites. The latter method, in which the mites are extracted from dust samples, was judged to be the best in this case.

June 17th: The health centre asked the home to mix precipitated sulfur and water in a bath tub in order to penetrate into the sarcoptic mite burrows in patients' skin.

June 18th: Several mites of *Sarcoptes scabiei* were extracted from dust samples collected from patients' bed-sheets and underclothes (Table 1), and the pruritic eruption was diagnosed as human scabies. To treat the scabies and prevent spreading of the disease inside and outside the home, the health centre gave the following instructions:

a) Apply smithrin ointment containg 0. 2% phenothrin to diseased areas of patients.
b) After touching patients, have staff members wash with a 50% alcohol solution.
c) Change patients' bed-sheets, pillows, other bedclothes, and underclothes daily.
d) Dry patients' bedclothes and underclothes by heating to over 80℃, when washed in the home.
e) Keep leased bed-sheets, diapers, and other cloth materials used by patients separate from those used by uninfested residents, and have them thoroughly sterilized by the leasing companies.
f) Spray organophosphorus insecticide over the entire floor space.

In addition, the nursing home asked that all residents remain at home and have no contact with their family members or friends until all patients are cured. Aerosol insecticide was sprayed around the beds and floor, starting on this day.

June 23rd: Application of smithrin ointment to diseased areas of the patients and a weekly record of the number of patients and level of disease were begun (Table 2) .

July 13th: A nursing home resident believed to have introduced scabies to the home was diagnosed as having Norwegian scabies, which is characterised by a crusted dermatitis with minimal pruritus that is only occasionally severe. Treatment with 1% r-BHC ointment on July 13, 14, 23, and 24 produced a rapid cure.

July 21st: A mixed emulsion of smithion and DDVP was sprayed on the entire floor space of the building.

July 23rd: All of the futons and mattresses used by the patients were heated to 90-100℃ for 2 hours using a heating machine.

Table 1. *Sarcoptes scabiei* collected from bed-sheets and underclothes of 4 aged patients.

Patient	A	B	C	D
mite	female 3 nymph 1	female 1 egg 2	female 1	male 2 female 9 nymph 56 egg 61

note : No lavae were found in this case.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 329-334, 1984

A Mass Outbreak and Control of Human Scabies in a Nursing Home for the Aged

MIDORI YOSHIKAWA*, MASAHIKO OHNO*, MIDORI SAITO**, TAKAO ISHII**, SHIGEO OKAMOTO**, YOSHIAKI IMAGAWA**and MAKOTO FURUKAWA***

A mass outbreak of human scabies occurring in a nuring home for the aged was diagnosed using a centrifuge floatation method, in which sarcoptic mites were extracted from dust samples collected from bed-sheets and underclothes. Both mites parasitized on patients' skin and mites that dropped on beds and floor were simultaneously controlled. Smithrin oitment was used to treat patients. To control the dropped mites, clothing and mattresses were heated to 80℃ with a heater, and the organophosphorus insecticide was sprayed on the entire floor space of the building.

Keywords : human scabies, excoriation

Introduction

Cases of scabies have increased recently because of frequent transmission from foreign countries[1~2]. Once human scabies is introduced to a mass living space such as a domitory, a hospital, or a nursing home, it rapidly spreads throughout the whole group[3]. Thus an accurate diagnosis technique and an appropriate method of treatment are required. However, most dermatologists know only the skin scraping technique for diagnosing *Sarcoptes scabiei* (which causes human scabies), and most treat only the patients. But *Sarcoptes scabiei* larvae and nymphs often are scratched off or drop from a patient' s skin, and males, females, and eggs have been found on beds or floors[4~5]and sarcoptic mites may survive on bed-sheets or floors for some period[6].

We investigated a case of human scabies in a nursing home for the aged, in which one third of the residents are bedridden. Our purpose of this study is to research: l) whether a centrifuge floatation method can be used to find *Sarcoptes scabiei* dropped on bed-sheets or underclothes, and 2) whether simultaneous control of sarcoptic mites parasitized on patients and mites dropped on bedclothes, underclothes, and floor can shorten the period of infestation.

The Progess of a Case of Human Scabies

Pruritic eruptions which broke out in October 1982 in the nursing home in Tokyo were diagnosed as pruritus senilis by a staff dermatologist. In addition, a famous university hospital was consulted and misdiagnosed the disease. During misdiagnosis, the patients suffered and the disease spread until the home asked the Higashikurume Health Centre to study the problem on lst June 1983. The progress of the case and control procedures are presented below.

June lst: The home requested that the health centre investigate the dermatitis.

June 13th: The papules were spread on wrists, elbows, penis and scrotum, buttocks, axillae, and backs

* 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 Laboratoy of Public Health
24—1, Hakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都東久留米保健所衛生課
*** 東京都府中保健所衛生課

Table 2. Course of treatment

date	days after treatment	levels of disease				total
		heavily infested (many rashes)	mildly infested (over10rashes)	lightly infested (5 -10rashes)	very lightly infested (1-5 rashes)	
June 29	6 *	8 **	0 **	19 **	58 **	85 **
Jul. 6	13	2	7	17	40	66
Jul. 12	19	0	1	4	40	45
Jul. 19	26	0	0	1	6	7
Jul. 26	33	0	0	0	9	9
Aug. 2	40	0	0	0	1	1
Aug. 9	47	0	0	0	2	2
Aug. 16	54	0	0	0	0	0

* accumulated days

** number of patients

August 16th: All scabies patients were cured and any sarcoptic mites were not collected from bed-sheets and underclothes of the patients.

Discussion

The diagnosis of scabies is confirmed by the presence of the mites. Without finding evidence of the mite, a clinical diagnosis is presumptive only. A mite can be found by careful selection of the test site on a patient when the skin scraping technigue is used. The most important rule for this technique is to avoid excoriated lesions, because the mite is usually removed when the skin is scratched[5]. However, most of lesions were already excoriated when we started investigaton of this case on 13th June. In this instance the centrifuge floatation method was judged to be best, because the piecies of skin scratched off by the patients had fallen on bed-sheets.

One or more adult mites were collected from the bed-sheets and underclothes of 4 patients (Table 2), and most of the adult mites were females. Using the skin scraping technique, Mellanby reported that the female parasite rate for a single patient was 1—5 mites in 51. 5% of 886 cases of human scabies[6]. Our rate for females collected from one patient, using the centrifuge floatation method, was as large as Mellanby's rate. Thus the centrifuge floatation method is useful for collecting *S. scabiei* if a patient does not change his bed-sheets or underclothes for at least 3—4 days.

Recent research on scabies in Japan indicated that infestation among family members, among watch men or other workers who used the same room or bed in turn, and among patients in hospitals was caused not only by touching scabies patients but also by using beds or living together in the same room[7~8]. Thus one can easily become infested with scabies through the dropped mites. Actually, Mellanby noted that the mite can survive for 2—3 days after removal from the human dody[6], while Blood et al mentioned that the mite can live at least 2—3 weeks without being parasitic on a human body[9]. From these data, we decided to change patients' bedclothes and underclothes daily and to heat the cloth to 80℃, because *S. scabiei* is killed by exposure to 50℃ for 10 minutes[6]. We also recommended to killing the dropped mites by spraying insecticide on the entire floor space and by heating futons and mattresses until the middle part of them is kept to over 50℃ for 30 minutes.

This simultaneous treatment, in which sarcoptic mites parasitized on human skin and the mites dropped from the skin on clothes, beds, and floor were simultaneously controlled, shortened the period for

recovering from the disease. In another nursing home where patients were treated by ointment and precipitated sulfur solution only, human scabies remained troublesome after 5 months[10~11].

Acknowledgement: Thanks go to the pharmaceutical division of Sumitomo Chemical Co., Ltd. for providing smithrin for the patients.

References

1) Furukawa, M. and Okamoto, S. : *J. of the Toyaku,* 6, 19, 1984
2) Masaki, Y. : *The Asahi Shinbun,* Feb. 13, 1981
3) Yoshikawa, M. : *Tokyo-to Eiken Nenpo,* 32-1, 59, 1981
4) Oshima, S. : *Modern media,* 26, 343, 1980
5) Muller, G. H. : in *Scabies and Pediculosis*, lst Ed., Ed. Orkin, M., 99, 1977, J. B. Lippincott Comp., Philadelphia
6) Mellanby, K. : Ditto (starting page: 9)
7) Oshima, S. and Hashiguchi, J. : *Jap. J. Sanit. Zool.,* 31, 137, 1980
8) Otaki, N., Takeuchi, E., Hirose, I., Katsumata, M. and Oshima, S. : *Jap. J. Sanit. Zool.,* 32, 72, 1981
9) Blood, D. C. and Henderson, J. A. : *Veterinary Medicine*, 3rd Ed., 659, 1968, Williams and Wilkins, Baltimore
10) Personal communication
11) Inoue, T., Matsuyama, K., Shioya H. and Sawaura S. : *Annual Report of Arashiyamago,* 2, 24, 1980

特別養護老人ホームにおける疥癬症の集団発生例

吉川　翠*，大野正彦*，斉藤みどり**，石井孝夫**，
岡本繁雄**，今川良昭**，古川　誠***

寝たきり老人が⅓を占める特別養護老人ホームで集団発生した疥癬症を調査した．昭和57年10月頃から発生したこの疥癬症を担当皮膚科医が老人性皮膚掻痒症と診断したために，適正な措置が施されなかった．昭和58年6月に我々が調査を開始した時には被害は拡大しており，老人のほとんどに発症がみられた。

我々は4人の老人のシーツと下着の塵を掃除機で集め，塵からヒゼンダニを検出したので，この皮膚炎を疥癬症と判定した．疥癬症患者には0.2%スミスリン軟膏を塗布した．さらに，患者の皮膚から落ちたヒゼンダニによって被害が拡大するのを防ぐために，患者のシーツと下着類を毎日取り替え，蒲団やマットレスと同様に80℃以上で加熱し，床面には有機リン系殺虫剤を散布した．

人の皮膚に寄生したヒゼンダニと，人の皮膚から落ちたヒゼンダニを同時期に駆除したので，集団発生していた疥癬症は駆除開始後54日目に完治し，その後再発生はしなかった．

Photo 1 A sarcoptic mite egg. An egg contains a devloping embryo.
Photo 2 A sarcoptic female mite.
Photo 3 Scabies. Excoriations and eczematized papules on shoulder of patient A.
Photo 4 Scabies on upper torso of patient D.
Photo 5 Scabies. Excoriation on thigh of patient D.
Photo 6 Scabies on shoulder of patient D.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 335-338, 1984

有機リン系殺虫剤テメホス処理後のセスジユスリカ幼虫個体群の減少傾向. 神田川における5年間の調査結果

大野正彦*, 清水憲一**

Reduction of Larval Population of *Chironomus yoshimatsui* (Diptera : Chironomidae) with Temephos in the Kanda River

MASAHIKO OHNO* and KEN-ICHI SHIMIZU**

Since 1977, midge larvae in the Kanda River have been controlled by application of an organophosphorus insecticide, temephos. Spraying was conducted about 10 times a year, with each application continuing for about an hour to provide the target concentration of 1-2 $mg \cdot l^{-1}$. From 1977 through 1981, the effectiveness of temephos against the larvae was studied in terms of the change in the larval population. The larvae count was made at stations located 100-1400 meters downstream of the application point. Most larvae disappeared within 3 days of each application. The reduction rate was high after the treatments, and there were no significant differences between the years and the seasons. The result may be due to the following facts : some larvae were killed by the insecticide and the others drifted to the region with unsuitable environment characterized by stagnant water and anaerobic mud at bottom. It is concluded that the temephos application was effective for controlling the midge larvae in the Kanda River.

Keywords : chironomid, larval population, temephos, organophosphorus insecticide, application

緒　言

都内の神田川沿いの各区はセスジユスリカ（ヨシマツユスリカ）*Chironomus yoshimatsui* の大量発生を防ぐため，1977年以降，有機リン系殺虫剤テメホス（アベイト）水和剤を河川に散布している[1]．我々はテメホス散布開始時からその駆除効果について調査を続けており，ユスリカ幼虫の薬剤感受性[2]，幼虫及び成虫の個体数の季節的変動[3]，薬剤散布により流出する幼虫のその後の生死[3]などを報じてきた．今回，テメホスがセスジユスリカ幼虫個体群を減少させる効果について，1977～81年の調査結果を基に検討したので報告する．

調査方法

薬剤散布地点と散布方法

Table 1で示したように，各年により散布場所が若干変わった．この調査を行なった5年間のテメホス散布濃度は，0.9～2.0 $mg \cdot l^{-1}$で，ドリップ方式で水和剤を河川（流速約1 $m \cdot sec^{-1}$）に約1時間散布していた．なお，薬剤の散布地点，後述の幼虫採集地点の位置は前報[3]と同一である．

幼虫の採集

77～79年は駒塚橋100 m下流で幼虫の採集を行なった．79年末に前述の調査地点で河川工事が始まったので，80，81年にはその300 m下流の大滝橋附近に調査地点を移した．採集方法は前報[3]の通りで，駒塚橋附近では深度の異なった2種の河床の底泥を，大滝橋附近では護岸補強の蒲団篭に付いた泥を集め，泥の体積当りの幼虫数を算定した．薬剤散布直前に幼虫を採集し，散布後1週間に渡り個体数の減りかたを調べた．

結果及び考察

薬剤散布直前の幼虫の個体数を100として散布後の変化をFig.1, 2に示した．散布1日後の個体数は散布前の半数程度になった．散布から2，3日たつと大部分の幼虫が調査地点から消失した．

散布回数が重なるにつれて幼虫が減りにくくなるとい

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　160　東京都新宿区百人町 3－24－1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都文京区役所

Table 1. Applications of Temephos Wettable Powder in the Kanda River from 1977 through 1981.

Date	Application point	Target concentration	Exposure time	Sampling station	Distance between application point and sampling station
May'77～Aug.'79	Komazuka Br.	0.9～2.0mg·1^{-1}	about an hour	100m-point downstream from Komazuka Br.	100m
Sept.～Nov.'79	Omokage Br.	1.3～1.7	ditto	100m-point downstream from Komazuka Br.	900
July～Aug.'80	Takada Br.	1.5～1.6	ditto	Ohtaki Br.	1400
Sept.'80～Nov.'81	Omokage Br.	1.4～1.9	ditto	Ohtaki Br.	1100

うことはなかった．また，減少の度合は，季節，及び散布濃度による明瞭なちがいが認められなかった．テメホスが1～2 mg·1^{-1}になるように河川に1時間程度散布すれば，その場から大多数の幼虫をほぼ確実に無くすことができた．

我々は前報[2]で，神田川の幼虫は，薬剤散布をしていない善福寺川のものに比べ，テメホスに対し感受性が低く，3.6 mg·1^{-1}の薬剤に1時間接触されると，その半数はその後正常な活動ができず，巣を造れないと推定した．また，薬剤散布後，苦悶状態で流出する幼虫を採集して薬剤の入ってない河川水で飼育すると，中には蘇生するものもあると述べた[3]．以上のことから，神田川に生息する幼虫は薬剤（0.9～2.0 mg·1^{-1}）に1時間程度暴露されただけでは，その後すべて死ぬとは思われない．しかし，神田川では幸い，大滝橋から1600m下流の白鳥橋以降は，善福寺川耕整橋附近の水域[4]のように水が停滞し，硫化水素臭のする汚泥（表面からすぐ下は酸欠状態）が堆積し，セスジユスリカ幼虫はほとんど生息せず[5]，成虫があまり認められていない．テメホスに対する感受性は低下しているものの，散布すれば大量の幼虫が流出し，生息が適当と思えない場所へ流れ込み，そこでは水が停滞するため，幼虫は長期にわたり薬剤にさらされることが予想される．テメホスの散布が殺虫効果とともに，幼虫を下流へ流出させる効果により幼虫個体群を大幅に減らしているといえる．

ところで，我々は前報[3]で，神田川の幼虫は薬剤散布をしてもすぐに元の高密度の状態に戻ること，薬剤感受性が低下していることなどから，この散布方法でユスリカの大量発生を防除できるか疑問であると述べた．しかし，テメホスを散布するようになり住民の苦情がめっきり減った（Fig. 3）．テメホスの散布により幼虫を減らし，そのことで成虫の発生を抑えていると思われる．テメホス散布が，苦情の少なくなった要因の1つと考えられる．この散布方法は問題があるものの，神田川のセスジユスリカの大量発生の防除に効果を発揮しているといえよう．

摘　要

1．テメホス水和剤がセスジユスリカ幼虫の個体数を減らす効果について，1977年から81年にかけて神田川で各散布時に調査した．

2．テメホスを散布すると幼虫は大幅に減少した．その減少の度合は散布年，季節に明瞭なちがいは認められなかった．

3．テメホスの散布が幼虫を殺す効果とともに，幼虫を生息に向かない場所へ流す効果により，その個体数を減らし，住民の苦情を少なくしていると思われた．

謝辞　調査に多大な御協力をいただいた文京区役所環境部環境課の皆様に深甚の謝意を表します．

文　献

1）清水憲一：生活と環境，23(4)，25，1978
2）大野正彦，岡本　寛：東京衛研年報，31—1，261，1980
3）大野正彦，清水憲一：東京衛研年報，33，314，1982
4）大野正彦：日生態会誌，34，101，1984
5）清水憲一：未発表

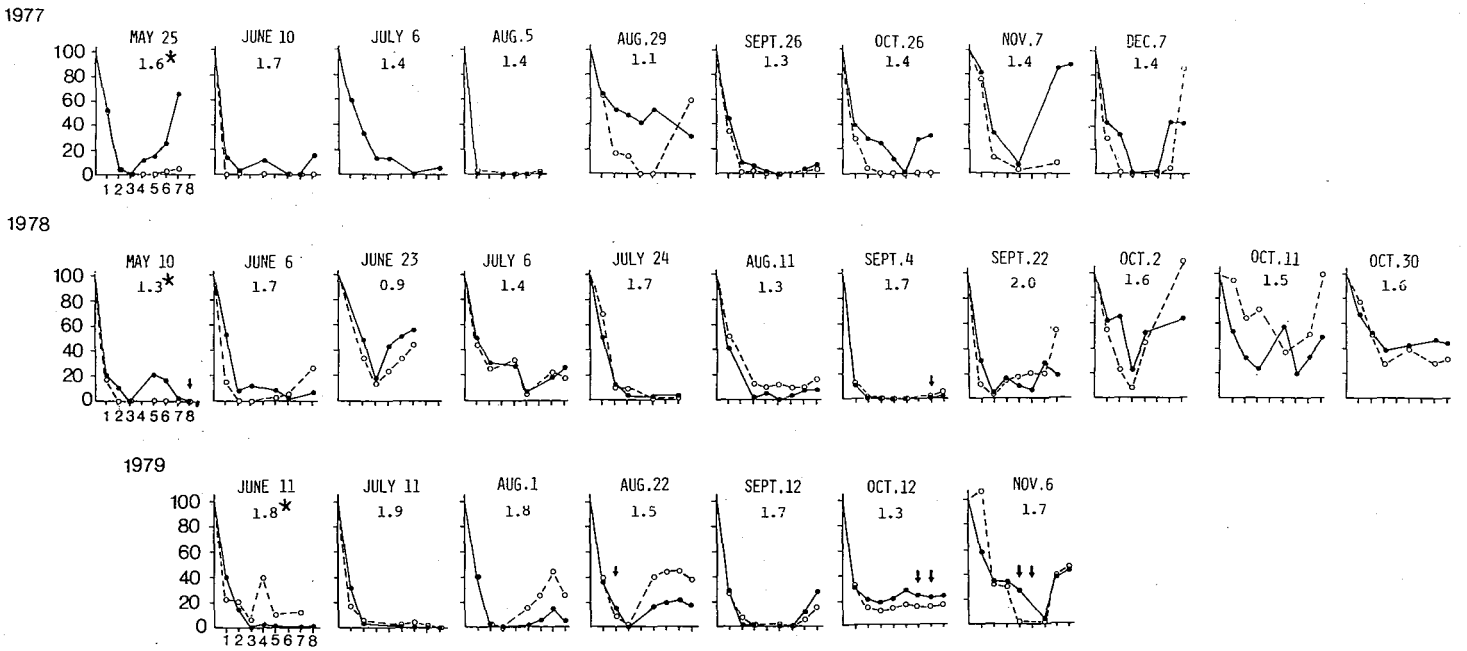


Fig. 1. Changes in the Number of Larvae of *Ch. yoshimatsui* per Volume of Mud after the Temephos Applications at Komazuka Bridge Station in the Kanda River, 1977-79.

The Number of the Larvae Sampled just before the Each Application are transformed into 100.

Solid Circle : No. of the Larvae Sampled at the Shallow River Bed
Open Circle : No. of the Larvae Sampled at the Deep River Bed
Asterisked Numeral : Target Concentration of Temephos ($mg \cdot l^{-1}$)
Arrow : Flood of the River

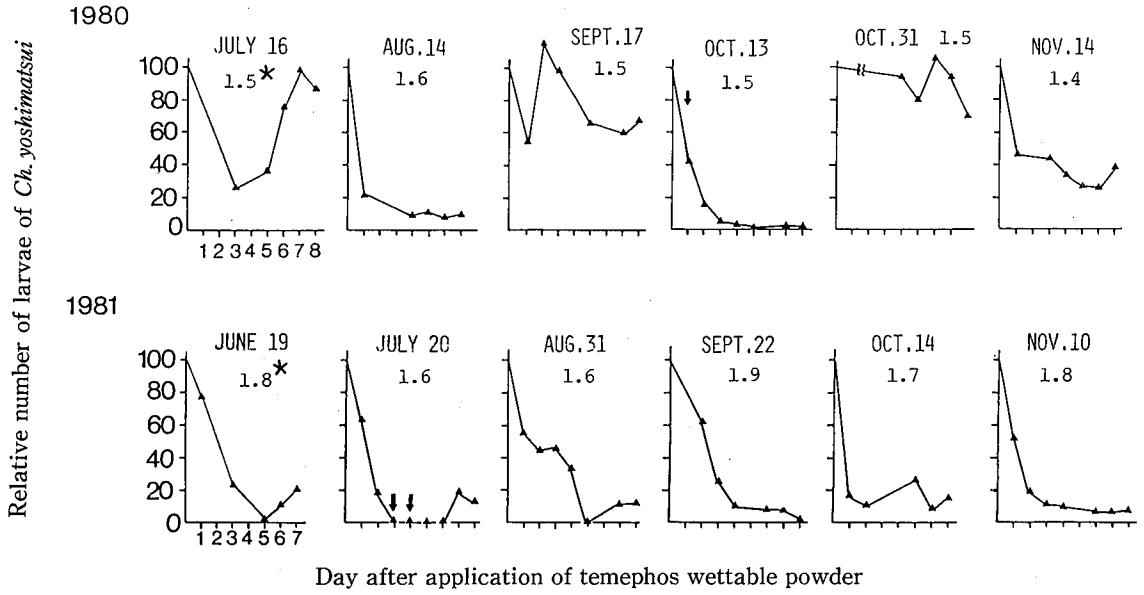


Fig. 2. Changes in the Number of the Larvae after the Applications at Ohtaki Bridge Station in the Kanda River,1980-1981. The Larvae were sampled at the Mud Deposited along the River Wall.

Asterisk and Arrow : same as in Fig. 1.

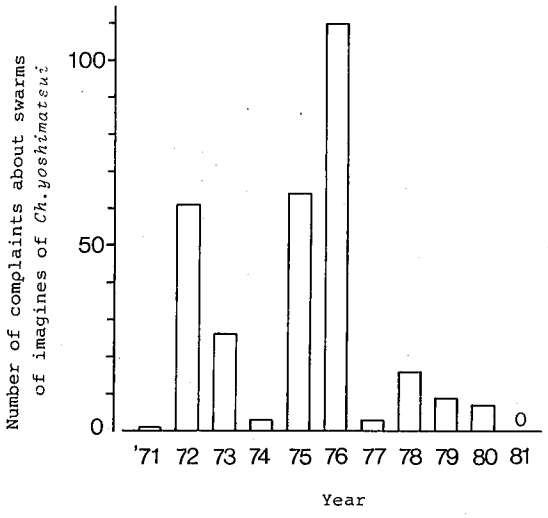


Fig. 3. Transition of Number of Complaints of Inhabitants about Swarms of Imagines of *Ch.yoshimatsui* in the Area of Bunkyo-ku.

Temephos Wettable Powder was often applied into the River for about an Hour with the Target Concentrations of 0.9~2.0 $mg \cdot l^{-1}$ since 1977. Emulsifiable Fenthion was applied 12~14 Times a Year for Ten Minutes with the Target Concentrations of 1 $mg \cdot l^{-1}$ from 1974 through 1976.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 339-345, 1984

小笠原簡易水道のトリハロメタン低減化対策のための基礎的実験

笹野英雄*, 西垣　進*

Fundamental Test for Control Trihalomethanes Formation in Water Supply of Ogasawara

HIDEO SASANO* and SUSUMU NISHIGAKI*

Keywords : トリハロメタン Trihalomethane, 前駆物質 Precursor, 活性炭 Activated carbon, 小笠原 Ogasawara, クロリネーション Chlorination, 水道 Water supply

はじめに

小笠原諸島は，東京から南へ約1,000kmの太平洋上に散在するが，このうち人が居住しているのは，父島（約1,500人），母島（約400人）の二島のみである．島の気候は温暖で，気温の変化が少なく，主島である父島の年間平均気温は23℃（夏期27℃，冬期18.6℃），年間降雨量は東京とほぼ同じ約1,300mmである．この小笠原の水道水源は主としてダム貯留水を利用しているが，ダム区域にはラテライト系赤色土壌が分布している上に周辺には亜熱帯性植物が繁茂し，トリハロメタン（以下THMと略す）の主な前駆物質[1]であるフミン質の供給源となっている．このため原水の水質は，色度，濁度，過マンガン酸カリウム消費量が高く，鉄，マンガンを多量に含んでおり，これに対処するために従来から前塩素，凝集沈でん，中塩素，急速ろ過による浄水処理が行なわれている．このような背景から，我々は以前から東京都の行政区画である小笠原村営簡易水道についてTHMの調査を行なっていたが，昭和56年3月5日付で厚生省よりTHMに関する暫定制御目標値0.1mg／l（年間平均値）が通知されたのを期に，THM低減化のための基礎的実験を開始した．

THM低減化実験計画の策定

実験計画を策定するにあたり，先ず小笠原村の水道原水の水質を既存のデータより整理し，水質特性の把握を行なった．その結果を表1，2に示す．

ここにみられるようにダム水の水質は，内地ダム水にくらべ，色度，過マンガン酸カリウム消費量，鉄，塩素イオン濃度が1桁高く，硬度成分はマグネシウムの寄与が大きい特性があり，スコールの過多等により水質変動も大きい．一般的に色度への関与因子は，フミン質，鉄とされているが，小笠原の場合は鉄の濃度からみて色度成分の大部分はフミン質に由来しているものと推定される．

また，井戸水の水質は，ダム水にくらべ，硬度，塩素イオン，蒸発残留物等の海水由来成分が高い．

ダム水，井戸水いずれの水質も塩素イオンや硬度が高いことから，古い海成堆積層地質や海からの送風塩の影響を受けていると考えられる．

次に浄水工程の各時点で採取した水の生成量や，配水池から管末給水栓までの各地点のTHM含有量についての実態調査を行なった．その結果は表3，4に示す通りでTHMは浄水場を出てから給水栓に至る間に増加する割合の大きいことが明らかになった．

しかし，管末給水栓まで塩素の残留が水道法で規定されているため当区間におけるTHM経時増加を防止することは困難であるので，浄水場内での前駆物質の除去に重点を置き，粉末活性炭処理[3]，凝集沈でん処理[4]，さらに塩素注入点の変更[5]（前塩素を中塩素に変更する）を中心に検討を行なうことにした．

実験－1　粉末活性炭，凝集剤による処理の検討

1）使用薬品

①粉末活性炭：A, B, C,Dの市販品4種

②凝集剤：10％PAC（ポリ塩化アルミニウム）

2）実験用原水

父島時雨ダム水（PH値7.1，濁度1，色度30，過マンガン酸カリウム消費量17.8 mg／l）

* 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

表1 ダム水の水質[2]（昭和50～58年）

項目	ダム名		試料数	最大値	最小値	平均値	標準偏差	変動係数
色度	時雨	父島	16	150	38	73.3	29.1	0.39
	連珠		14	120	30	69.3	23.7	0.34
	境浦		14	200	22	57.4	43.6	0.76
	小曲		18	160	25	69.8	34.7	0.50
	大谷	母島	7	100	50	75.0	17.1	0.23
	乳房		13	70	25	42.2	11.2	0.26
過マンガン酸カリウム消費量 (mg／l)	時雨	父島	16	44.2	2.8	19.8	12.1	0.61
	連珠		14	44.2	2.8	21.5	11.1	0.51
	境浦		14	26.9	2.6	15.4	8.3	0.54
	小曲		18	41.0	2.8	19.2	9.9	0.51
	大谷	母島	7	88.0	14.2	42.0	27.3	0.65
	乳房		13	104.0	4.0	24.5	24.4	0.99
鉄 (mg／l)	時雨	父島	16	4.40	0.76	1.95	0.94	0.49
	連珠		14	4.40	0 30	1.51	1.11	0.74
	境浦		14	4.80	0.32	4.48	1.24	0.92
	小曲		18	4.90	0.08	1.37	1.50	1.08
	大谷	母島	7	2.40	0.30	1.41	0.74	0.52
	乳房		13	3.37	0.07	0.63	0.82	1.30
塩素イオン (mg／l) ( ) 内は蒸発残留物 (mg／l)	時雨	父島	16	95.7(333)	2.8(234)	19.8(287)	12.1	0.61
	連珠		14	106.0(430)	46.1(252)	75.2(307)	15.6	0.21
	境浦		14	113.0(349)	45.4(76)	80.1(251)	23.8	0.30
	小曲		18	120.0(448)	10.5(304)	76.6(348)	24.8	0.32
	大谷	母島	7	94.9(436)	51.6(221)	72.3(293)	15.6	0.21
	乳房		13	70.2 (268)	51.6(119)	60.1(235)	7.7	0.13
硬度 ( ) 内はカルシウム硬度 (mg／l)	時雨	父島	16	60(20)	24(6)	49(14)	9.2(3.5)	0.19(0.24)
	連珠		14	140(78)	24(6)	77(41)	26.8(17.7)	0.35(0.43)
	境浦		14	154(60)	30(12)	65(25)	28.7(11.3)	0.44(1.46)
	小曲		18	198(109)	58(21)	129(57)	33.7(20.9)	0.26(0.29)
	大谷	母島	7	128(95)	50(28)	85(60)	24.9(22.4)	0.29(0.37)
	乳房		13	86(42)	44(32)	70(36)	13.5(3.5)	0.19(0.10)

表2 井戸水の水質[2]（昭和50～58年）

項目	井戸名		試料数	最大値	最小値	平均値	標準偏差	変動係数
色度	沖村1号	母島	14	20	0	5	5.3	1.06
	沖村2号		14	30	0	11	9.5	0.85
	沖村3号		11	20	0	7	7.4	1.09
	奥村	父島	15	22	0	8	5.4	0.66
過マンガン酸カリウム消費量 (mg／l)	沖村1号	母島	14	5.0	0.7	2.4	1.0	0.43
	沖村2号		14	80.0	1.5	9.5	19.9	2.09
	沖村3号		11	96.0	0 9	11.5	26.8	2.32
	奥村	父島	15	15.2	1.8	4.3	3.2	0.76
鉄 (mg／l)	沖村1号	母島	14	1.70	0.00	0.31	0.43	1.40
	沖村2号		14	5.60	0.00	0.88	1.48	1.67
	沖村3号		11	6.60	0.00	1.23	2.39	1.95
	奥村	父島	15	0.30	0.02	0.09	0.08	0.88
塩素イオン (mg／l) ( ) 内は蒸発残留物 (mg／l)	沖村1号	母島	14	167.0(721)	82.5(332)	142.5(570)	20.4(－)	0.14(－)
	沖村2号		14	180.0(558)	107.0(425)	137.8(521)	18.5(－)	0.13(－)
	沖村3号		11	146.0(643)	88.4(467)	118.1(580)	17.2(－)	0.14(－)
	奥村	父島	15	492.0(1481)	116.0(535)	231.5(797)	88.5(－)	0.38(－)
硬度 ( ) 内はカルシウム硬度 (mg／l)	沖村1号	母島	14	320(182)	216(120)	264(148)	35.7(20.8)	0.13(0.14)
	沖村2号		14	258(150)	126(58)	203(94)	31.0(19.8)	0.15(0.21)
	沖村3号		11	290(170)	202(88)	239(115)	30.2(29.2)	0.13(0.25)
	奥村	父島	15	460(291)	118(60)	307(169)	111.6(52.7)	0.36(0.31)

3）THM測定法

ヘッドスペース法（厚生省法）[3]

4）実験方法

原水1 l に乾燥重量当り1,000mg／l 活性炭スラリー液を10mg／l，25mg／l，50mg／lの3段階に添加し，ジャーテスターで60 r.p.m，25℃，30分撹拌する．1時間静置後ろ紙5 Aでろ過したろ液200ml をとり，（活性炭単独処理水）のTHM生成量を測定する．残りの静置上澄液500m l をとり，PAC100mg／l を添加し，ジャーテスターで60 r.p.m,25℃，30分撹拌し，1時間静置後その上澄液200ml をとり，（活性炭処理＋PAC処理水）のTHM生成量を測定する．

結果は表5に示す通りである．

原水のTHM生成能が295mg／l，色度が30度のものをTHM濃度100mg／以下，色度5度以下にするには，50mg／l濃度の活性炭で処理後さらに100mg／l濃度のPACで凝集沈でんさせることにより可能であることが判明した．

表3 父島簡易水道トリハロメタン生成実態調査[2)]

調査個所 / 調査項目	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9	No. 10
	扇浦浄水場原水	フロック形成池入口水	フロック形成池出口水	1号沈でん池水	1号ろ過機流入水(未ろ水)	1号ろ過機流出水(ろ水)	奥村配水池流出水	給水栓水 A	給水栓水 B	給水栓水 C
トリハロメタン生成量 (mg/l)	0.000	0.017	0.042	0.051	0.068	0.081	0.100	0.147	0.147	0.147
	0.017	0.025	0.009	0.017	0.013	0.019	0.047	0.000	0.000	
滞流時間 (合計38時間10分)	原水 → 混和池(前塩素) 10分 → フロック形成池 1時間 → 沈でん池 3時間30分 → ろ過ポンプ井(中塩素) 10分 → ろ過機 10分 → 送水ポンプ井(浄水池) 1時間40分 → 送水管 40分 → 配水池 30時間 → 配水管給水栓 50分									

表4 母島簡易水道トリハロメタン生成実態調査[2)]

調査個所 / 調査項目	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9	No. 10
	沖村浄水場原水	フロック形成池入口水(撹拌槽中途)	フロック形成池出口水(同左出口)	沈でん池出口水	ろ過機流入水(未ろ過水)	浄水池流出水(ろ過水)	沖村配水池流出水	給水栓水 D	給水栓水 E	給水栓水 F
トリハロメタン生成量 (mg/l)	0.000	0.035	0.035	0.052	0.059	0.065	0.085	0.116	0.116	0.109
	0.035	0.000	0.017	0.007	0.006	0.020	0.031	0.000		
滞流時間 (合計約32～37時間)	原水 → 撹拌槽・沈でん槽 1時間10分 → ろ過槽 15分 → 浄水池 2～6時間 → 配水池 29時間 → 配水管給水管									

表5 粉末活性炭処理(上段)・粉末活性炭→PAC処理によるTHM生成量低減率

粉末活性炭の種類	添加量* (mg/l)	処理法 C:活性炭単独使用	THM生成能試験・有効塩素濃度(ppm)		色度	THM生成量(μg/l)及びTHM低減率(%)									
			添加量	24時間後残留濃度		総THM	低減%	$CHCl_3$	低減%	$CHCl_2Br$	低減%	$CHClBr_2$	低減%	$CHBr_3$	低減%
	0	C+PAC: C処理後PAC使用	8	3	30	295		82		93		100		20	
A	10	C	6	3	20	199	32.5	54	34.1	64	31.2	76	24	7	65
		C+PAC			20	101	65.8	29	64.6	39	58.1	28	72	7	65
	25	C	6	4	12	194	34.2	49	40.2	64	31.2	76	24	7	65
		C±PAC			12	96	67.5	24	70.3	39	58.1	28	72	7	65
	50	C	6	4	5	119	59.7	18	78.0	38	59.1	58	42	7	65
		C+PAC			5	80	72.9	15	81.7	32	65.6	28	72	7	65
B	10	C	6	3	20	201	31.9	55	32.9	65	30.1	76	24	7	65
		C+PAC			18	102	65.4	30	63.4	39	58.1	28	72	7	65
	25	C	6	3	12	198	32.9	52	36.6	65	30.1	76	24	7	65
		C+PAC			12	100	66.1	28	65.8	39	58.1	28	72	7	65
	50	C	6	4	5	138	52.9	24	70.7	55	40.9	76	24	7	65
		C+PAC			5	89	70.5	19	76.8	37	60.2	28	72	7	65
C	10	C	6	3	15	190	35.6	49	40.2	60	35.5	76	24	7	65
		C+PAC			15	98	66.8	24	70.3	41	55.9	28	72	7	65
	25	C	6	4	8	166	43.7	31	62.2	54	41.9	76	24	7	65
		C+PAC			8	79	73.2	14	82.9	32	65.6	28	72	7	65
	50	C	6	4	5	116	60.7	12	85.4	35	62.4	64	36	7	65
		C+PAC			4	40	86.4	6	92.7	17	81.7	12	88	7	65
C	10	C	6	3	17	217	26.4	69	28.0	65	30.1	78	22	7	65
		C+PAC			17	129	56.3	46	43.9	46	50.5	32	68	7	65
	25	C	6	3	12	192	34.9	46	43.9	65	30.1	76	24	7	65
		C+PAC			12	87	70.5	20	75.6	34	63.4	28	72	7	65
	50	C	6	3	5	98	66.8	17	79.3	36	61.3	40	60	7	65
		C+PAC			5	77	73.9	14	82.9	30	67.7	28	72	7	65

実験－2　通気攪拌による粉末活性炭の吸着効果の検討

1）使用薬品

①粉末活性炭(A),② 10％ PAC,③ PH 調整用炭酸ナトリウム

2）実験用原水

父島浄水場原水

3）THM 測定法

ヘッドスペース法（厚生省法）

4）実験方法

No. 1　原水（1 l）
$\xrightarrow[PH=6.9]{+Cl_2 8ppm}$ 25°C, 24時間静置⟶THM生成能測定

No. 2　原水（1 l）
$\xrightarrow[PH=6.3に調整]{*+PAC150mg/l}$ ジャーテスターで60r.p.m 1分100r.p.m 10分後静置10分⟶上澄液 $\xrightarrow{+Cl_2 4ppm}$ 25°C, 24時間静置⟶THM生成能測定

No. 3 ～No. 8　原水（1 l）
$\xrightarrow[曝気量0.2l/min, 5l/min, 30分間]{+活性炭50, 100, 150mg/l}$ 以下No. 2 の * 後操作に同じ

結果は表 6 に示す通りである。

No. 1 は原水自体の生成能である．この 236 $\mu g/l$ は昭和 58 年 6 月～59 年 4 月間に測定した原水生成能（n＝10）結果の最小 138～最大 342 $\mu g/l$,平均値 221 $\mu g/l$ からみて小笠原における平均的な生成能とみなすことが出来る．No. 2 は原水を150mg／lPAC のみで処理した上澄液の THM 生成能である．$CHCl_3$ と $CHCl_2Br$ の減少が著しく，PAC 処理のみで 72.9％の低減効果が得られている．No. 3，4 は原水に粉末活性炭を 50mg／l 添加し，通気量 0.2 l／min, 5 l／min,で 30 分間通気攪拌後に 150mg／lPAC で処理した上澄液の THM 生成能である．活性炭添加により低減効果はあがっているが，通気量の大小による吸着効果に有意差は認められなかった．低減率は約 85％であった．No. 5，6 は活性炭濃度を 100 mg／l に増量した時のTHM生成量である．活性炭濃度

表 6　粉末活性炭処理による THM 低減対策上の曝気効果の検討

試料＼項目		トリハロメタン濃度（$\mu g/l$）					THM	色度	過マンガン酸カリウム消費量(mg/l)	TOC
		総トリハロメタン	クロロホルム	ブロモジクロロメタン	ジブロモクロロメタン	ブロモホルム	低減率%	濃度		(mg/l)
NO1 扇浦浄水場原水（生成能）		236 (242)	150 (154)	60 (52)	20 (25)	6 (5)	0 (0)	60(75) 4(4)	19.0 (19.5)	8.53
NO2 原水PAC処理液		64 (72)	18 (36)	12 (18)	22 (13)	12 (5)	72.9 (70.2)	0(1) 0(0)	1.9 (2.5)	2.24
NO3 活性炭 50mg/l	曝気量 0.2l/min	34 30分－(74)	13 (38)	5 (18)	10 (13)	6 (5)	85.6 (69.4)	0(0) 0(0)	1.1 (1.7)	2.05
NO4 活性炭 50mg/l	曝気量 5l/min	35 90分－(57)	13 (32)	4 (12)	10 (8)	8 (5)	85.2 (76.4)	0(0) 0(0)	1.1 (1.7)	1.93
NO5 活性炭 100mg/l	曝気量 0.2l/min	31 30分－(57)	13 (32)	4 (12)	7 (8)	7 (5)	86.7 (76.4)	0(0) 0(0)	1.1 (1.7)	2.26
NO6 活性炭 100mg/l	曝気量 5l/min	31 90分－(57)	13 (32)	4 (12)	7 (8)	7 (5)	86.7 (76.4)	0(0) 0(0)	1.1 (1.7)	2.04
NO7 活性炭 150mg/l	曝気量 0.2l/min	24	13	3	5	3	89.8	0(0) 0(0)	1.1 (1.7)	1.31
NO8 活性炭 150mg/l	曝気量 5l/min	24	13	3	5	3	89.8	0(0) 0(0)	1.1 (1.7)	1.81

※（ ）は粉末活性炭添加時にガラス棒でゆるく10回（1 lビーカー）撹拌した時のデータ．
30分－(74)は，粉末活性炭添加後30分間静置し，PAC150mg/lで処理した上澄液のTHM量．

50mg／lとくらべ，低減率に差は認められていない．通気量の違いによる効果も同様であった．No. 7，8は活性炭濃度をさらに150mg／lに増量した時のTHM生成量である．50mg／l, 100mg／lにくらべ$CHCl_3$の低減率は変らないが，$CHClBr_2$，$CHBr_3$特に$CHBr_3$の低減効果が大きく，低減率も約90％と大きな効果が得られている．

実験－3　中塩素処理とPAC凝集時PH値の引下げによるTHM低減効果の検討

前塩素処理によりTHMが大量に生成されること，および高PH値でTHMの生成が促進される[5]ことから，低PHにおける凝集沈でんと中塩素処理に変更したときのTHM低減効果の検討を行なった．その結果は図1の通りである．

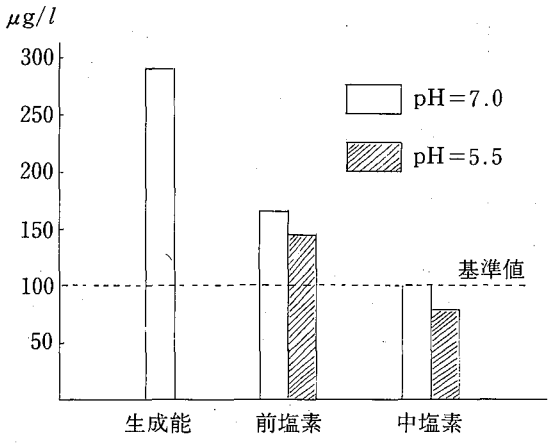


図1．塩素注入点の変更と低pH値によるTHM生成量

PAC 120mg／l(PH≒7.0)で中塩素処理（4 ppm)した時の低減率は40.8％，PH 5.5におとしてPAC 120 mg／lで中塩素処理（4 ppm）した時の低減率は50.3％でPH引下げによる低減効果が認められた．

ま と め

本実験の結果から，小笠原村簡易水道のTHM低減化のための浄水処理方法は，原水に粉末活性炭スラリー液100mg／lを注入後0.2 l／min程度の水中通気で30分間攪拌し，その上澄液にPH 6.5附近(PH 5.5では水質基準不適合のため）でPACを100～150mg／l注入して凝集沈でんさせ，さらにその上澄液を4 ppm程度の中塩素処理することにより，THM濃度を制御目標値の0.1 mg／l以下にすることが可能であるとの結論が得られた．

謝辞　本実験にあたり，試料提供その他の便宜をはかっていただいた東京都衛生局水道課，小笠原村役場水道建設課の職員各位に深謝いたします。

文　献

1) Rook, J. J.: Water Treatment and Examination, 23, 234, 1974
2) 芳賀秀寿，三村秀一，西垣　進，黒瀬博行，笹野英雄：水道公論，19，6，53，1983
3) 日本水道協会：トリハロメタン対策について，1981
4) 相沢貴子，真柄泰基：水質汚濁研究，3，14，39，1980
5) 丹保憲二編著：水道とトリハロメタン，238，1983
6) 梶野勝司：水道協会雑誌，51，7 (574)，33，1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 346-351, 1984

東京都内の工場周辺井戸水の重金属汚染調査（第2報）

平野幸枝*, 高橋保雄*, 土屋悦輝*, 西垣　進*

Heavy Metal Pollution of Well Water in Tokyo Metropolitan Area (II)

YUKIE HIRANO*, YASUO TAKAHASHI*, YOSHITERU TSUCHIYA* and SUSUMU NISHIGAKI*

Keywords : Heavy Metal Pollution, Well Water, Industrial Area, Tokyo Metropolitan Area

はじめに

東京都のプロジェクト（公害防衛10ヶ年計画）の一環として，昭和46年度から58年度まで，主としてメッキ工場周辺井戸水の重金属汚染調査を実施してきた．調査開始時とは違い，昭和57年度には都内の水道普及率は99.9％に達しており[1]，飲料水として常用している井戸は少なくなってきている．しかし，近年，災害時の飲料水として井戸水が見直されてきており，一方10年前に比べ下水道増設など環境変化もあり，井戸水の汚染傾向を把握しておくことは必要と考えられる．調査前半の昭和46—50年については前報[2]に報告してあるが，有害な物質を含む工場排水で一度汚染された地区は，毎年同一成分が検出されており，長期間継続する傾向がみられた．昭和57年度から2年間は工場由来の金属以外に，有害金属であるヒ素，水銀，ならびに水道法水質基準項目にある鉄，マンガンを追加した．本報は後半の昭和51—58年の8年間の調査結果についてまとめてある．

調査及び実験方法

試料の採取は都内の工場（主としてメッキ）周辺約100 m以内（100 m以内に井戸がなかったり顕著な汚染が見られる地域は約300 m以内）の井戸を対象に行なった．

調査項目は，シアン，六価クロム，銅，亜鉛，ニッケル，鉛，カドミウム，鉄，マンガン，ヒ素，水銀，ABS（陰イオン活性剤）の12項目で，以下の方法により検査した．

①シアン：ピリジン—ピラゾロン法[3]

②六価クロム：ジフェニルカルバジド法[4]

③銅，亜鉛：直接原子吸光光度法（検体を塩酸でpH 2に調整）

④ニッケル，鉛，カドミウム，鉄，マンガン：フレームレス原子吸光光度法（ただしニッケル，鉛，カドミウムは昭和56年度まではDDTC-MIBK抽出原子吸光光度法により，また鉄，マンガンについては0.3 mg/l以上の場合，直接原子吸光光度法またはo-フェナントロリン法により測定した．）

⑤水銀，ヒ素：還元気化原子吸光光度法[4),5]

⑥ABS：メチレンブルー法[4]

装置として原子吸光光度計は，日本ジャーレルアッシュAA-875型，およびバリアンAA-875型，フレームレス原子化装置はバリアンCRA-90,還元気化装置はバリアンモデル65型，分光光度計は日立320型を使用した．

資料の解析法

前報と同様，表1にまとめた調査結果に基づき，各保健所管内の重金属などによる総合汚染度を比較する方法として，表2に示したように項目別汚染度を係数化した後，計算例に従って汚染評価数値を求めた．ただし一保健所管内の井戸数が10本未満の所は地域代表値とするには数が少ないので，本比較から除外した．また汚染源とみなされる工場で使用していない金属はすべてその周辺の井戸水から検出しないという前提条件で処理した．例えば表2に示す計算例の志村保健所の場合，銅は169件調査したが，全検体数は444件であり444－169＝275件の検体については，その周辺の工場で銅を使用していないため，検査していないが，銅は検出しないことにして計算した．また，前報と比較するため項目をシアン，六価クロム，銅，亜鉛，ニッケル，鉛，カドミウムに限

* 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

表１－１　東京都内の工場周辺井戸水の検査結果

保健所＼項目	シアン (mg/l)						六価クロム (mg/l)						銅 (mg/l)					
	件数	マイナス	～0.005	～0.01	～0.02	以上	件数	マイナス	～0.025	～0.05	～0.1	以上	件数	マイナス	～0.5	～1.0	～2.0	以上
城東	24	20	3	1			24	24					3	2	1			
小岩	31	31					31	31					25	25				
江戸川	15	13	2				18	17	1				3	3				
足立	130	122	2	6			130	130					120	120				
千住	109	98	10	1			109	109					80	80				
滝野川	64	62	2				64	63	1				35	34	1			
王子	98	98					98	95	1		1	1	70	70				
赤羽	90	61	23			6	89	63	12	5	3	6	65	64	1			
板橋(板橋東)	79	64	9	1	1	4	74	63				11	25	25				
志村	444	201	106	32	31	74	444	225	75	28	24	92	169	167	2			
赤塚(板橋西)	136	128	3	3		2	133	115	8	5	1	4	96	88	8			
練馬	42	41	1				38	38					21	20	1			
石神井	37	34	3				34	34					37	30	7			
池袋							8	8					8	8				
中野北	116	97	10	3	2	4	111	111					116	113	3			
中野	40	39	1				40	23	3	1	4	9	32	32				
杉並東	152	142	7	2		1	142	140	2				116	110	6			
杉並西	173	165	5	3			173	173					139	139				
杉並南(高井戸)	252	219	16	2	2	13	233	230	3				154	144	10			
梅ヶ丘	97	95	2				89	89					84	83	1			
世田谷	111	107	4				106	102	3			1	75	75				
砧	14	14					14	14					14	14				
玉川	137	134	2			1	144	142		1		1	99	96	3			
目黒	113	111	1	1			112	109	3				104	94	10			
碑文谷	65	62	3				65	64				1	70	70				
雪谷	14	2	9	2		1	12	12					9	9				
蒲田	15	7	6			2	10	10					5	5				
荏原	143	136	4	2	1		144	144					138	136	1			1
品川	114	95	18		1		104	85	7	1	1	10	85	83	2			
合計	2855	2398	252	59	38	108	2793	2463	119	41	34	136	1997	1939	57			1

保健所＼項目	亜鉛 (mg/l)						ニッケル (mg/l)						鉛 (mg/l)					
	件数	マイナス	～0.5	～1.0	～2.0	以上	件数	マイナス	～0.05	～0.1	～0.2	以上	件数	マイナス	～0.05	～0.1	～0.2	以上
城東	3	2	1				3	3					3	2	1			
小岩	25	25					25	23	2				20	20				
江戸川	3	2	1				3	3					3	3				
足立	120	100	16	2		2	40	36	4				40	38	1			1
千住	70	65	5				20	19	1				109	108	1			
滝野川	35	33	1	1			32	27	5				31	30	1			
王子	67	51	14	2			24	21	3				35	32	2	1		
赤羽	75	64	10	1			25	24	1				25	25				
板橋(板橋東)	25	25					25	24			1		25	23	2			
志村	196	178	18				110	103	7				97	96	1			
赤塚(板橋西)	106	76	30				34	24	4		4	2	44	44				
練馬	26	25	1				15	15					12	12				
石神井	28	21	7				14	14					14	14				
池袋	8	6	2										8	7	1			
中野北	116	87	28			1	113	101	11	1			84	81	3			
中野	27	27					29	19	10				25	24	1			
杉並東	125	109	15	1			109	97	12				67	67				
杉並西	123	103	18		2		153	134	19				138	134	4			
杉並南(高井戸)	154	148	4	1	1		140	133	7				136	136				
梅ヶ丘	84	74	9	1			89	79	10				54	43	5	4	1	1
世田谷	75	57	14			4	67	55	12				52	49	3			
砧	11	6	5				14	10	3	1			14	14				
玉川	81	64	17				91	68	18	3		2	82	79	3			
目黒	106	86	17	3			76	70	6				48	47	1			
碑文谷	70	51	14			5	70	52	10	5	2	1	35	33	2			
雪谷	9	7	1			1	12	10	2				3	3				
蒲田	5	5					5	4	1				5	5				
荏原	144	128	14	1	1		134	123	9			2	87	85	2			
品川	76	66	9			1	80	74	5	1			47	45	2			
合計	1993	1690	272	13	4	14	1552	1365	162	11	7	7	1343	1299	36	5	1	2

備考：マイナスとはシアンの場合＜0.002mg/ l 、六価クロムの場合＜0.005mg/ l 、銅・亜鉛の場合＜0.1mg/ l 、鉛・ニッケルの場合＜0.01mg/ l である．

表1－2　東京都内の工場周辺井戸水の検査結果

保健所＼項目	カドミウム (mg/l) 件数	マイナス	～0.005	～0.01	～0.02	以上	水銀 (mg/l) 件数	マイナス	鉄 (mg/l) 件数	マイナス	～0.15	～0.3	～0.6	以上	マンガン (mg/l) 件数	マイナス	～0.15	～0.3	～0.6	以上	ヒ素 (mg/l) 件数	マイナス	～0.025	～0.05	～0.1	以上	ABS (mg/l) 件数	マイナス	～0.25	～0.5	～1.0	以上
城東	3	2	1																								19	15	3	1		
小岩	16	16					4	4	4	3				1	4	0	1	1	2		4	2	1			1	31	15	15	1		
江戸川	3	3																									18	11	7			
足立	40	39				1	90	90													90	85	4	1			130	118	12			
千住	109	108	1																								109	94	14		1	
滝野川	31	31					9	9	4	3	1				6	6					6	6					64	62		1	1	
王子	35	35					20	20	9	5	3	1			9	5	1		3		19	19					98	81	17			
赤羽	25	24	1				11	11	10	10					11	11					11	11					89	79	9	1		
板橋(板橋東)	25	25					17	17	17	11		3	2	1	17	14	3				17	17					74	71	3			
志村	97	97					57	57	50	37	10	2	1		50	49	1				50	50					444	426	16		2	
赤塚(板橋西)	54	54					10	10	10	7	3				10	10					10	10					133	131	2			
練馬	13	13					2	2	3	1	2				2	2					2	2					42	41	1			
石神井	14	14					9	9	9	7	2				9	9					9	9					37	36	1			
池袋																																
中野北	84	83	1				29	29	29	18	6	2	2	1	29	28	1				29	29					116	111	4	1		
中野	25	25					15	15	10	7	2			1	10	7	2		1		15	15					40	35	5			
杉並東	67	67					33	33	12	5	6	1			12	9	2	1			12	12					150	125	25			
杉並西	118	118					59	59	13	10	3				13	12	1				59	59					173	167	5	1		
杉並南(高井戸)	130	130					46	46	46	32	10	2	2		46	41	3	1	1		46	46					233	225	8			
梅ケ丘	54	54					15	15	15	10	2	2	1		15	15					15	15					87	84	1	2		
世田谷	52	49	1	2			12	12	12	6	2	3	1		12	11				1	12	12					110	105	5			
砧	9	9					8	8	4	1	1	1	1		4	3	1				4	4					14	14				
玉川	70	70					12	12	12	4	5	3			12	11				1	30	30					137	132	5			
目黒	48	48					13	13	6	3	3				6	5	1				6	6					113	110	3			
碑文谷	35	33		2			6	6	6	4	1	1			6	5	1				6	6					70	65	5			
雪谷	3	3					2	2	2	1	1				2	1	1				2	2					9	8				1
蒲田	5	4	1																								10	7	3			
荏原	80	79		1			24	24	24	15	6	2	1		24	22	1	1			24	24					144	140	4			
品川	42	41	1				1	1	1	1					1	1					1	1					114	105	4	1	2	2
合計	1287	1274	7	5	1		504	504	308	201	69	23	11	4	310	277	20	4	7	2	479	472	5	1	1		2808	2613	177	9	6	3

備考：マイナスとはカドミウムの場合＜0.001mg/l、水銀の場合＜0.0005mg/l、鉄・マンガンの場合＜0.03mg/l、ヒ素の場合＜0.005mg/l、ABSの場合＜0.05mg/lである．

表2　重金属の検出濃度と係数

区　分	係数	シアン	六価クロム	銅，亜鉛	ニッケル*，鉛	カドミウム
検出されず	0	0.002mg/l未満	0.005mg/l未満	0.1mg/l未満	0.01mg/l未満	0.001mg/l未満
～水質基準値×1/2以下	1	0.005mg/l以下	0.025mg/l以下	0.5mg/l以下	0.05mg/l以下	0.005mg/l以下
～水質基準値×1　以下	2	0.01 mg/l以下	0.05 mg/l以下	1.0mg/l以下	0.10mg/l以下	0.01 mg/l以下
～水質基準値×2　以下	4	0.02 mg/l以下	0.10 mg/l以下	2.0mg/l以下	0.20mg/l以下	0.02 mg/l以下
～以上	8	0.02mg/lより大	0.10mg/lより大	2.0mg/lより大	0.20mg/lより大	0.02mg/lより大

＊ ニッケルは毒性が低く，水質基準も設定されていないがシアン，六価クロムとともに工場で使用される頻度が大きいので，基準を鉛と同じ0.1mg/lに設定した．

計算例：志村保健所（表1の数値より）

シアン $(1\times\frac{106}{444}+2\times\frac{32}{444}+4\times\frac{31}{444}+8\times\frac{74}{444})\times100\fallingdotseq200$

六価クロム $(1\times\frac{75}{444}+2\times\frac{28}{444}+4\times\frac{24}{444}+8\times\frac{92}{444})\times100\fallingdotseq217$

銅 $(1\times\frac{2}{444})\times100\fallingdotseq0$

亜鉛 $(1\times\frac{18}{444})\times100\fallingdotseq4$

ニッケル $(1\times\frac{7}{444})\times100\fallingdotseq2$

鉛 $(1\times\frac{1}{444})\times100\fallingdotseq0$

カドミウムは0

よって200+217+4+2＝423が志村保健所管内の重金属汚染の程度を示す総合評価数値である．

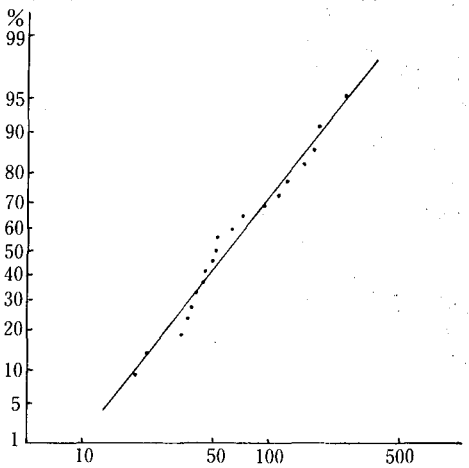


図1．保健所別工場周辺井戸水の金属汚染総合評価数値の累積度数分布

定した．

ここで求めた各項目別汚染評価数値を合計した汚染総合評価数値を横軸に，累積百分率を縦軸にとり，対数確率紙にプロットしたところ図1のような直線が得られた．従って各地域毎の評価数値の分布は対数正規型とみなしてさしつかえないと考えられる．そこでこの図より累積百分率の20，40，60，80％値に対応する汚染総合評価数値29，49，78，130が求められる．この評価数値の29未満を1点，49未満を2点，78未満を3点，130未満を4点，130以上を5点として評価ランクを定めた．従って評価ランクの点数の高いほど汚染度が高いことになり，この評価ランクマップを作成し図2に示した．

結果及び考察

1）各項目別に汚染地区を見ると，シアン汚染が明白に認められる井戸がある地区には志村，赤羽，板橋，杉並南，中野北保健所管内がある．また，六価クロムは中野，志村，板橋，赤羽，品川保健所管内，銅は石神井保健所管内，亜鉛は碑文谷，世田谷，中野北保健所管内，ニッケルは碑文谷，赤塚，中野保健所管内，鉛は梅ヶ丘保健所管内である．カドミウムは全地域とも汚染が認められなかった．これらの汚染源の大部分がメッキ工場と推定される．しかし，赤羽保健所管内の汚染源は印刷工場であった．

2）明白に汚染の認められる井戸のある保健所管内は評価ランクの点数も一般に高い．評価ランク5点の中でも志村，赤羽，板橋保健所はシアンと六価クロム，中野保健所は六価クロム，碑文谷保健所は亜鉛とニッケルにより顕著な汚染を示している．

3）前報と比較するとほぼ同じ傾向で志村，赤羽，碑文谷保健所は評価ランク5点である．中野，板橋保健所の

表3　保健所別工場周辺井戸水の総合評価数値(及び評価ランク)一覧表

保健所（区）	各種汚染因子の評価数値							総合評価数値	評価ランク
	シアン	六価クロム	銅	亜鉛	ニッケル	鉛	カドミウム		
足　立（足立）	11	0	0	28	3	7	3	52	3
千　住（〃）	11	0	0	5	1	1	1	19	1
滝野川（北）	3	2	2	5	8	2	0	22	1
王　子（〃）	0	13	0	18	3	4	0	38	2
赤　羽（〃）	79	91	1	13	1	0	1	186	5
板　橋（板橋）	59	111	0	0	5	3	0	178	5
志　村（〃）	200	217	0	4	2	0	0	423	5
赤　塚（〃）	18	40	6	22	26	0	0	112	4
練　馬（練馬）	2	0	2	2	0	0	0	6	1
石神井（〃）	8	0	19	19	0	0	0	46	2
中野北（中野）	48	0	3	31	11	3	1	97	4
中　野（〃）	3	233	0	0	25	3	0	264	5
杉並東（杉並）	13	1	4	11	8	0	0	37	2
杉並西（〃）	6	0	0	15	11	2	0	34	2
杉並南（〃）	52	1	4	4	3	0	0	64	3
梅ヶ丘（世田谷）	2	0	1	11	10	26	0	50	3
世田谷（〃）	3	10	0	41	11	3	5	73	3
玉　川（〃）	7	8	2	12	22	2	0	53	3
目　黒（目黒）	3	3	9	20	5	1	0	41	2
碑文谷（〃）	4	11	0	77	51	3	6	152	5
荏　原（品川）	8	0	3	14	17	1	1	44	2
品　川（〃）	19	82	2	15	6	2	1	127	4

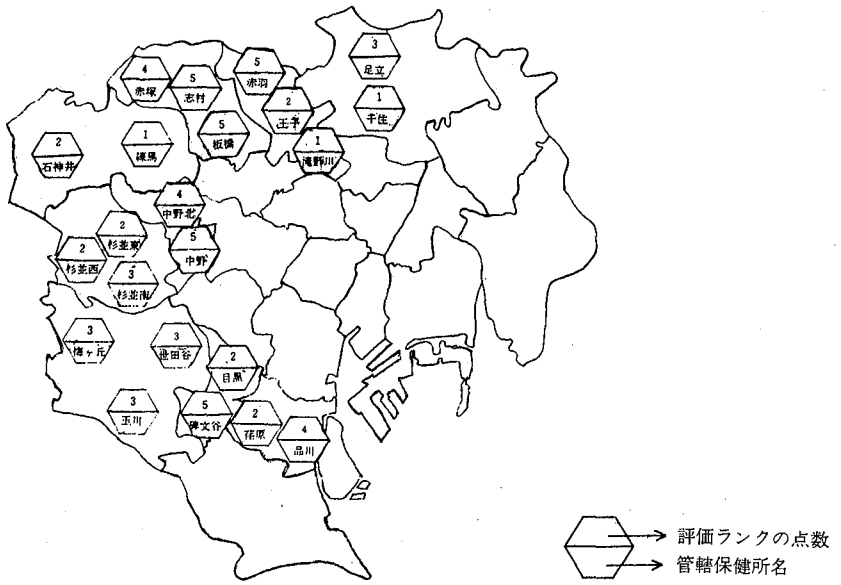


図2．保健所別工場周辺井戸水の金属汚染評価ランク

場合，クロムによる汚染が継続しているため，評価ランクの点数が高くなった．

4）シアンが検出された457件のうち，41％が同時に六価クロムが検出された．またシアンと同時にABS,ニッケル，鉄，亜鉛が検出され，その率はそれぞれ7，5，3，6％であった．クロムは自然水中に含まれていることはほとんどない[7]ので，高濃度が継続して検出される場合工場排水による汚染と思われる．動物に慢性中毒を起こすには六価クロムの飲料水中濃度は 5 mg／l 以上が必要であるとされ，経口摂取に対する安全域はかなり広いものと考えられるが，人為的な汚染に対する監視はひき続いて行なわれるべきである．ニッケルも同様に河川水中の濃度は低く[8]，今回検出されたものについてはほとんど工場排水由来と思われる．ニッケルは低毒性で経口的に摂取しても吸収されにくくほとんど排泄される[6]ので今回検出された濃度では健康に対する害は特に考慮する必要はないと考える．しかし工場排水による地下水汚染の一つの指標として測定することは適当であると思われる．

5）昭年57年度末の東京都区部の下水道普及率は78％[9]であり今回の調査で汚染の著しい北区，板橋区，中野区では99.8％，88％，100％であった．従って工場排水のほとんどは，処理後公共下水道に放流されているものと思われる．しかし汚染が下水道完備以前に起ったものが継続しているか，下水道や貯留槽等から漏洩したものかわからないが．下水道が普及しても汚染が減少していないことがわかる．

ま と め

工場周辺の井戸水の重金属等による汚染度を各保健所管内別に汚染総合評価数値より5つの評価ランクに分けた．最も汚染度の高い評価ランク5点の地区のうち，志村，赤羽および碑文谷の各保健所管内は前報(昭和46年—50年)においても顕著な汚染を示していた．また中野および板橋の各保健所管内は，六価クロムによる汚染が継続しているため，評価ランクの点数が高くなった．このように一度汚染された地区は毎年ほぼ同一成分が検出されており，浅層地下水の重金属汚染は局地的で長期間継続していることが観察された．実際には飲料水として使用されている井戸は少ないとはいえ，緊急時の飲料水として，また地下水汚染を考える立場から定期的な調査が今後とも必要と考える．

謝辞 検体の採取にご協力下さった各保健所の環境衛生課の方々に感謝いたします。

文 献

1) 東京都編：第34回東京都統計年鑑 昭和57年，1982
2) 高橋保雄他：東京衛研年報，26— 1， 323，1975
3) 小島貞男，三村秀一，菅野明男：上水，井戸水の分析 1974，講談社
4) 厚生省環境衛生局水道環境部編：上水試験法，1978，日本水道協会
5) 小野研一，菊地秀明，堺 敬一：宮城衛研年報56，81，1981
6) 日本化学会訳編：微量元素一栄養と毒性—173，1975，丸善
7) 小島貞男，相澤金吾：新水質の常識 60，1977，日本水道新聞社
8) 山県 登：微量元素一環境科学特論— 174，1977，産業図書
9) 東京都下水道局編：東京都下水道局報 22 (12)，1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 352-362, 1984

飲料用タンク水から検出された細菌(*Pseudomonas*)の性状

古畑勝則*, 松本淳彦*

Biological Characteristics of Chlorine Resistive *Pseudomonas* Isolated Dominantly from Drinking Tank Water

KATSUNORI FURUHATA* and ATSUHIKO MATSUMOTO*

Keywords : 生物学的性状 biological characteristics, 耐塩素性シュードモナス chlorine resistive *Pseudomonas*, 飲料用タンク水 drinking tank water

緒　言

近年，ビル，マンション等の高層建築物の急増に伴い，給水用の受水槽，高置水槽が多く設置されているが，なかには水道法やビル管理法（通称）の規制を受けない，有効容量が20立方メートル以下の小規模給水施設がかなり存在すると思われる．しかし，その数は不明であるのが現状であり，これらを含めた受水槽等の衛生的維持管理がしばしば指摘されているなかで[1,2]，昨年，小規模給水施設の指導要綱が出された．

以前，筆者らがタンク水300試料について検査を行ったところ，細菌学的に水道法水質基準に適合し，かつ残留塩素が0.1～1.0 mg／l 存在している場合でも，およそ80%から様々な細菌類が検出され，その菌数は最高1.3×10^2／mlであった．また残留塩素が認められないものでは，さらに1オーダー多く検出された．これらのなかで検出率の高い細菌は耐塩素性の *Pseudomonas* 属であった[3]．

このような細菌類は管理の不充分な給水施設に入り込み，受水槽，高置水槽または配水管中で生存し続け，あるいは増殖している場合もあると考えられる．しかし，タンク水中での消長やその性状についてはほとんど知られていない．これは，本菌が従来の水道法による細菌試験では検出されない細菌類であるため，衛生学的に問題視されなかったためと思われる．

Pseudomonas 属には300近い種があるにもかかわらず，性状が明確に記載されているものは30種余に過ぎない[4]．病原性を有する *P. aeruginosa* をはじめとする菌種については，その同定基準が確立されているが，その他に関してはほとんど研究がなされていない．

そこで今回は，残留塩素が存在するタンク水から優占的に検出されたこれら *Pseudomonas* の性状を知るために，臨床由来および廃水由来の *P. aeruginosa* の性状について比較を行うとともに，Bergey's manual（第8版）[4] に記載されている *Pseudomonas* 属29種の性状とを比較した．さらに，本菌の種々水中における増殖傾向について検討を行った．

材料および方法

1．性状試験　水質検査のために当所に持ち込まれたタンク水より分離した *Pseudomonas* の中から，無作為に選択した30株と，臨床由来 *P. aeruginosa*（分与株），廃水由来 *P. aeruginosa* 各5株の計40株について，種々検査法[5-7]に準拠して次の性状試験を行った．

1）標準寒天培地上での集落の形態　2）グラム染色（Hucker の変法）による菌体と，鞭毛染色（Leifson 法）による鞭毛の観察　3）硫化水素産生，IPA 反応，インドール産生，VP 反応，色素産生，オキシダーゼ，カタラーゼ，アシルアミダーゼ，アミノ酸脱炭酸，グルコン酸酸化，硝酸塩還元，加水分解，有機酸利用，溶血性　4）糖類分解（21種類）　5）温度（4，25，37，41℃），pH（5，7，9），塩化ナトリウム濃度（0，3，5%）における発育　6）抗菌性物質に対する感受性（10系統25種類，3濃度法，トリディスク'栄研'使用）

2．水中での *Pseudomonas* の消長　タンク水由来 *Pseudomonas* sp.と臨床由来 *P. aeruginosa* 各1株について，水温25℃，pH 7.5に調整した蒸留水および脱塩素水道水（以下水道水と記す）中で1日おきに1週間消長

* 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

を比較観察した．次に，*Pseudomonas* sp.について，温度（5，10，15，20，25，30，35，40℃），pH（2，4，5，6，7，8，9），塩化ナトリウム濃度（0，0.5，1.0，1.5，2.0，3.0％）の各条件に設定した水道水中で，1，3，5，7日後に消長をみた．さらに，水質の異なるタンク水50試料，井戸水10試料，河川水10試料中で，一定温度25℃の条件下で1週間その増殖傾向をみた．

方法は，容量300 m*l*のコルベンに各試料水200 m*l*を入れ，常法により高圧蒸気滅菌した後，細菌浮遊液を10^2／m*l*になるように添加し，一定時間経過後，その生菌数を既報[3]と同様に測定した．なお，別に用意した試水で実験開始時のpHを測定した．

結　果

1．性状　タンク水由来の*Pseudomonas* sp.と臨床由来および廃水由来の*P. aeruginosa*について，その性状を比較すると以下のようであった．

1）*Pseudomonas* sp.と*P. aeruginosa*の標準寒天培地上における25℃，5日間の培養後の集落形態を写真1に示した．*P. aeruginosa*は直径およそ5mmの不正円形，不均質，平面的集落であり，緑色，褐色，乳白色を呈した．これは，蒸留水や液体培地中で均一な浮遊液になりにくいR型であった．これに対して*Pseudomonas* sp.は直径約1 mmで，*P. aeruginose*の1／5の大きさであり，正円形，均質，隆起，湿潤性で淡桃色の集落を形成した．これを釣菌して蒸留水や液体培地に浮遊させると容易に均一となった（S型）．

これらの集落についてグラム染色を行い，写真2に示した．また，鞭毛染色の結果を写真3に示した．両者ともグラム陰性の桿菌であり，極単毛を有していた．しかし，菌体の大きさを比較すると*P. aeruginosa*が1.7～3.3×0.5～0.8 μmであるのに対し，*Pseudomonas* sp.はおよそ2倍の3.3～8.3×1.7～2.2 μmで，明らかに後者の方が大きかった．

2）生化学的，生理学的性状を表1および2に示した．*P. aeruginosa*のそれは多数の書物に記載されているとおりであったが，主要な点を記すと，KingAおよびB培地に発育してその特徴的な水溶性の色素を産生した．オキシダーゼ，カタラーゼ，アシルアミダーゼ，アルギニン水解，グルコン酸酸化，硝酸塩からのガス産生，加水分解（尿素，ゼラチン，ツイン80）が陽性であり，クエン酸塩とマロン酸塩を利用した．また，リボース，アラビノース，キシロース，グルコース，フルクトース，マンノース，ガラクトース，マンニットの8種類の糖類を分解した．MacConkey寒天培地とNAC寒天培地にも良好に発育した．さらに，25，37，41℃，pH 5，7，9，塩化ナトリウム濃度0，3％でそれぞれ発育した．

一方，*Pseudomonas* sp.は，KingA培地には発育せず，KingB培地に発育して淡桃色の色素（非水溶性）を産生した．オキシダーゼ，カタラーゼは同様に陽性であったが，アシルアミダーゼ，アルギニン水解，グルコン酸酸化，硝酸塩からのガス産生と加水分解は陰性であった．クエン酸塩はシモンズの培地では利用しないが，クリステンゼンの培地では利用した．糖類ではアラビノースとガラクトースのみを分解した．MacConkey寒天培地とNAC寒天培地，41℃，塩化ナトリウム3，5％含有条件ではまったく発育を示さなかった．

このように，両者はかなりの項目で性状が異なっていることがわかった．

3）10系統25種類の抗菌性物質に対する感受性を表3に示した．*P. aeruginosa*は，ゲンタマイシン，ジベカシン，コリスチン，ポリミキシンBに対し全株とも(卄)の感受性を示したが，カナマイシン，テトラサイクリン，ドキシサイクリン，カルベニシリンに対しては菌株により異なり（－）から（卄）であった．その他の抗菌性物質に対してはほぼ全株とも（－）であった．

Pseudomonas sp.について同条件で試験を行ったところ，テトラサイクリン，ドキシサイクリン，カナマイシン，ゲンタマイシン，ジベカシン，ジョサマイシンに対し，ほぼ全株とも（卄）の感受性を示し，エリスロマイシン，ロイコマイシンに対しては（卄）の感受性を示した．ペニシリン，ジクロキサシリン，アミノベンジルペニシリン，カルベニシリン，アモキシシリン，セファロシン，セファレキシン，セファゾリン，セファピリン，クロラムフェニコール，チアンフェニコールに対しては，菌株により異なり（－）から（卄）であった．リンコマイシン，クリンダマイシン，コリスチン，ポリミキシンB，ナリジクス酸，サルファ剤には全株とも（－）であった．

Pseudomonas sp.は*P. aeruginosa*と同様にテトラサイクリン系，アミノグリコシド系の抗菌性物質に対しては感受性が強く，リンコマイシン系に対しては抵抗性を示した．しかし，コリスチンとポリミキシンBに対しては*P. aeruginosa*と明らかに異なり抵抗性があった．

以上のように，*Pseudomonas* sp.を*P. aeruginosa*と比較すると，集落の性状，菌体の大きさ，生化学的，生理学的性状，さらに抗菌性物質感受性において相違点が多く認められた．

表1．供試菌株の性状

性状試験項目＼供試菌		*Pseudomonas* sp.	*Pseudomonas aeruginosa*	
		タンク水由来（30株）	臨床由来（5株）	廃水由来（5株）
集落		S型	R型	
集落の色（標準寒天培地）		淡桃	緑・白・褐	
グラム染色		(−) 桿菌	(−) 桿菌	
菌体の大きさ(μm)		3.3—8.3X1.7—2.2	1.7—3.3X0.5—0.8	
鞭毛		極単毛	極単毛	
TSI寒天培地				
斜面		0	0	0
高層		0	0	0
硫化水素		0	0	0
SIM培地				
硫化水素		0	0	0
インドール		0	0	0
運動性		30	5	5
IPA		0	0	0
VP反応		0	0	0
色素産生				
King A培地		0	5	5
King B培地		29	5	5
カタラーゼ		30	5	5
オキシダーゼ		30	5	5
アシルアミダーゼ		0	5	5
Møller培地				
L−アルギニン		0	5	5
L−リジン		0	0	0
L−オルニチン		1	0	0
グルコン酸酸化		0	5	5
硝酸塩還元		0	0	0
ガス産性		0	5	3
加水分解				
尿素（クリステンゼン）		6	5	5
デンプン		0	0	0
ゼラチン		0	3	4
ツイン80		0	5	5
DNA		0	0	0
クエン酸培地				
シモンズ		1	5	5
クリステンゼン		29	5	5
マロン酸		30	5	5
ジョルダン培地		0	0	0
溶血性		0	0	0
温度	4℃	0	0	0
	25℃	30	5	5
	37℃	27	5	5
	41℃	0	5	5
pH	5.0	29	5	5
	7.0	30	5	5
	9.0	20	5	5
NaCl	0%	30	5	5
	3%	0	5	5
	5%	0	0	0
マッコンキー寒天培地		0	5	5
NAC寒天培地		0	5	5

数字は陽性菌株数を示す

表2．*Pseudomonas* の糖類分解

糖　類	*Pseudomonas* sp.	*Pseudomonas aeruginosa*	
	タンク水由来（30株）	臨床由来（5株）	廃水由来（5株）
D-リボース	0	5	5
D-アラビノース	30	5	4
D-キシロース	6	5	4
L-ラムノース	0	0	0
D-グルコース	5	5	5
D-フルクトース	1	5	5
D-マンノース	0	5	4
D-ガラクトース	28	5	4
シュクロース	0	0	0
D-ラクトース	0	0	0
マルトース	0	0	0
トレハロース	0	0	0
D-セロビオース	0	0	0
D-ラフィノース	0	0	0
デキストリン	0	0	0
イヌリン	0	0	0
アドニット	0	0	0
D-マンニット	0	5	5
ズルシット	0	0	0
サリシン	0	0	0
イノシット	0	0	0

数字は陽性菌株数を示す

2．水中での*Pseudomonas* sp.および*P. aeruginosa*の消長

1）蒸留水および水道水中での消長　タンク水から多く検出された *Pseudomonas* sp.が，蒸留水および水道水中でも増殖するものかを確かめるため，本菌を添加して菌数変化をみた．図1に示すとおり，比較菌として使用した *P. aeruginosa* は，蒸留水中では1日後にすでに検出されなくなり，水道水中では1週間経過してもほとんど菌数に変化はみられなかった．しかし，*Pseudomonas* sp.は蒸留水でも水道水でも増殖でき，1週間後には 10^2／m*l* の菌数が 10^5／m*l* となった．両水中での増殖傾向を比較すると，水道水の方がやや良好であり，最大菌数に達する時間も早かった．

このように *P. aeruginosa* が増殖できない水中（水質は表4に示す）でも *Pseudomonas* sp.は充分に増殖することがわかったため，条件を変えて実験を行い，本菌の増殖至適水質について検討を進めた．

2）水道水中での各条件における *Pseudomonas* sp. の消長　水温を最低5℃から5℃間隔で40℃まで8条件に設定して，本菌の増殖至適温度を調べた．図2に示すように，5℃と10℃では1週間後も菌数にほとんど変化はなく増殖はみられなかった．15℃と35℃では徐々に増殖したが，その増殖速度は遅く1週間後も 10^4／m*l* であった．20℃，25℃，30℃の場合には増殖が良好で，いずれも1週間後には $1.5\sim3.0\times10^5$／m*l* となった．なかでも30℃の条件下では増殖速度が早く，3日後にはすでに 1.6×10^5／m*l* に達し，これは1週間経過してもほとんど同様であった．25℃条件下では30℃の場合に比べて増殖速度はやや遅いが，1週間後の増殖菌数は最も多く 3.0×10^5／m*l* となった．実験最高温度の40℃では増殖せずに減少し，5日後には検出されなくなった．

次にpHを変えた場合の増殖傾向を図3に示した．pH 4.0以下ではまったく増殖しなかった．pH 5.0から9.0の範囲ではほぼ同様な増殖傾向を示し，1週間後には $2.6\sim4.1\times10^5$／m*l* となった．このように本菌はpH 7.0±2.0の広いpH域で増殖が可能であることが

表3．*Pseudomonas* の抗菌性物質に対する感受性

抗菌性物質	*Pseudomonas* sp.	*Pseudomonas aeruginosa*	
	タンク水由来（30株）	臨床由来（5株）	廃水由来（5株）
ペニシリン系			
ペニシリン	(−) 8 (+)22	(−) 5	(−) 5
ジクロキサシリン	(−)25 (+) 5	(−) 5	(−) 5
アミノベンジル−PC	(−) 1 (+)17 (++)12	(−) 5	(−) 4 (+) 1
カルベニシリン	(−) 1 (+) 4 (++)25	(+) 1(++) 3(+++) 1	(++) 5
アモキシシリン	(−) 1 (+) 6 (++)13	(−) 5	(−) 4 (++) 1
マクロライド系			
エリスロマイシン	(++)23 (+++) 7	(−) 4 (++) 1	(−) 5
ロイコマイシン	(+) 1(++)24(+++) 5	(−) 5	(−) 4 (++) 1
ジョサマイシン	(++) 2 (+++)28	(−) 5	(−) 5
リンコマイシン系			
リンコマイシン	(−)30	(−) 5	(−) 5
クリンダマイシン	(−)30	(−) 5	(−) 5
クロラムフェニコール系			
クロラムフェニコール	(−)13 (+)13 (++) 4	(−) 5	(−) 5
チアンフェニコール	(−) 4 (+)25 (++) 1	(−) 5	(−) 5
テトラサイクリン系			
テトラサイクリン	(+++)30	(++) 2 (+++) 3	(++) 3 (+++) 2
ドキシサイクリン	(++) 1 (+++)29	(−) 1 (+) 2 (++) 2	(+) 5
アミノグリコシド系			
カナマイシン	(+++)30	(+) 1(++) 3(+++) 1	(+) 2(++) 2(+++) 1
ゲンタマイシン	(++) 3 (+++)27	(+++) 5	(+++) 5
ジベカシン	(+++)30	(+++) 5	(+++) 5
セファロスポリン系			
セファロシン	(−) 1 (+) 9 (++)18 (+++) 2	(−) 5	(−) 5
セファレキシン	(−) 1 (+) 2 (++)23 (+++) 4	(−) 5	(−) 5
セファゾリン	(−)29 (+) 1	(−) 5	(−) 5
セファピリン	(−)12 (+)15 (++) 3	(−) 5	(−) 5
コリスチン	(−)28 (+) 2	(+++) 5	(+++) 5
ポリミキシンB	(−)30	(+++) 5	(+++) 5
ナリジクス酸	(−)30	(−) 5	(−) 5
スルフイソキサゾール	(−)29 (+) 1	(−) 5	(−) 5

(−)抵抗性，(+)比較的抵抗性，(++)比較的感受性，(+++)きわめて感受性

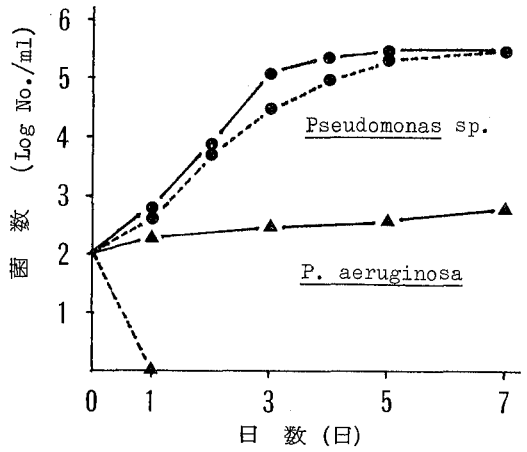


図1. 蒸留水と水道水中における *Pseudomonas* sp. および *P. aeruginosa* の消長(水温25℃, pH7.5)
·····蒸留水 ———水道水

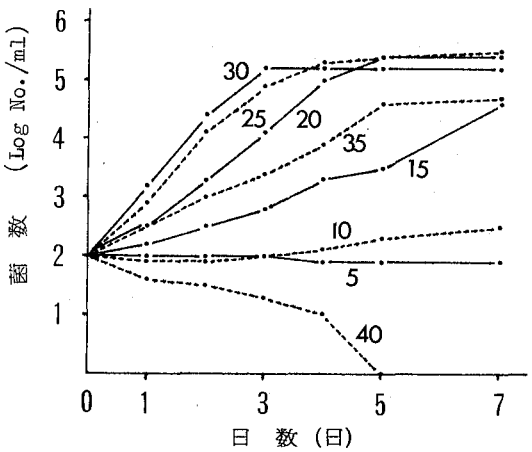


図2. 水道水中での各温度条件(℃)による *Pseudomonas* sp .の消長(pH 7.5)

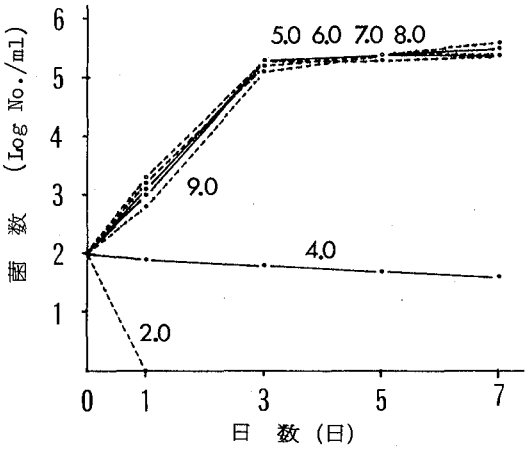


図3. 水道水中での各pH条件による *Pseudomonas* sp .の消長(水温25℃)

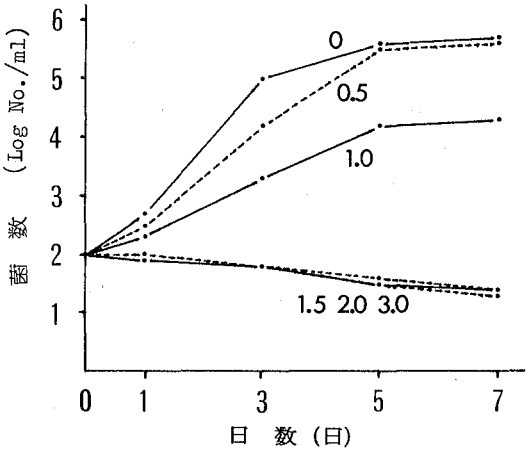


図4. 水道水中での各NaCl濃度(%)による *Pseudomonas* sp.の消長(水温25℃, pH7.5)

わかった.

塩化ナトリウムの影響については図4に示したが, その含有濃度によって著しく異なっている. 0%と0.5%の低濃度では増殖が良好であり, 1週間後には10^5/ml となった. 1.0%では増殖はしたがその速度は遅く, 1週間後でも10^4/mlにすぎなかった. しかし, 1.5%では増殖はみられずにむしろ減少傾向を示し, 1.5%以上の高濃度の塩化ナトリウムは, 本菌の増殖に対して阻害的に作用することが判明した.

3) タンク水, 井戸水, 河川水中での *Pseudomonas* sp.の増殖比較　表4に示す水質の異なるタンク水, 井戸水, 河川水のそれぞれ50, 10, 10試料に *Pseudomonas* sp.を添加し, 水質のいかなる因子が本菌の増殖に影響を及ぼすかを検討した. 水温は25℃に保持した. その結果の平均値を図5に示した. タンク水中での増殖は非常に良好で, その94%の試水において, 初期添加菌数10^2/

ml が1週間後には $10^5/ml$ 以上に達した．井戸水では，タンク水に比べその増殖速度は遅いが $10^5/ml$ になった．なかには増殖不良な2試料があり，1週間後も菌数の変化がみられなかった．河川水中での増殖は，その速度がさらに遅く，1週間後でも $10^4/ml$ にとどまった．なかには減少傾向を示すものが2試料あり，2～3日後には検出されなくなった．

これら増殖傾向が異なる三種類の水質を比較してみると，タンク水の水質は，塩素イオン 5.7～58.7 mg／l，平均 25.6 mg／l，有機物等 0.7～11.5 mg／l，平均 2.0 mg／l，硝酸性，亜硝酸性窒素 0.1～12.0 mg／l，平均 2.3 mg／l，硬度 10～125 mg／l，平均 88 mg／l，蒸発残留物 65～251 mg／l，平均 180 mg／l の濃度であった．井戸水は，塩素イオンが平均 153 mg／l とやや高く，タンク水のおよそ6倍である．硬度，蒸発残留物はそれぞれ 256 mg／l，523 mg／l でおよそ3倍であった．河川水の水質は，塩素イオンが平均 1,610 mg／l でタンク水のおよそ63倍にも及び，最高では 7,800 mg／l であった．有機物等は 22.6 mg／l でおよそ10倍であり，硬度，蒸発残留物は 403 mg／l，950 mg／l とおよそ5倍であった．添加した *Pseudomonas* sp.が2～3日後に死滅してしまった河川水2試料の水質をみると，特に塩素イオンが著しく多いことであり，その値は 7,800 mg／l，6,500 mg／l であった．このことは，先に述べた高濃度の塩化ナトリウムが本菌の増殖に対し阻害的に作用することを裏付けている．

タンク水，井戸水，河川水という大まかな三つの水質レベルを設定して *Pseudomonas* sp.の増殖傾向を検討したが，不良な水質ほど増殖が悪いことが言える．水中での最大増殖菌数は $10^5/ml$ オーダーに達することが判明したが，タンク水のような水質が，むしろ本菌にとって増殖条件が良いことがわかった．

考　察

既報[3]でも記述したように，*Pseudomonas* sp.は残留塩素が存在しないものから 0.7 mg／l の広い塩素濃度のタ

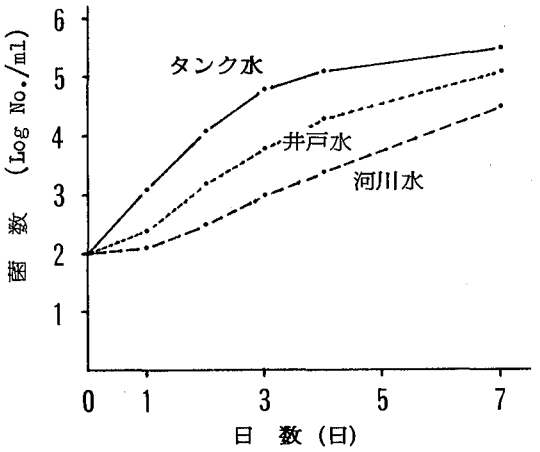


図5．タンク水，井戸水および河川水中での *Pseudomonas* sp.の増殖変化（水温 25°C）
各曲線はタンク水 50 試料，井戸水 10 試料，河川水 10 試料のそれぞれの平均値で示した．

表4．*Pseudomonas* sp.の増殖試験に使用した各試料水の水質

水　質	蒸留水（1試料）	水道水（1試料）	タンク水（50試料）	井戸水（10試料）	河川水（10試料）
塩素イオン（mg/l）	0.2	31.9	5.7—58.7(25.6)	35.1—310(153.0)	139—7,800(1,609)
有機物等（mg/l）（過マンガン酸カリウム消費量）	3.2	2.9	0.7—11.5 (2.0)	0.9— 4.8(2.4)	12.9— 37.0(22.6)
硬度　（mg/l）（カルシウム，マグネシウム等）	0	78	10— 125 (88.0)	188— 460(255.9)	192— 595(403.4)
蒸発残留物（mg/l）	13	196	65— 251(179.7)	237 898(523.0)	558—1,370(945.8)
硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素（mg/l）	0.0	2.1	0.1—12.0 (2.3)	0.4— 3.5 (2.0)	0.1— 0.2 (0.2)
pH	5.1	6.9	6.4— 8.0 (6.9)	6.8— 8.1 (7.2)	7.1— 8.1 (7.5)

（ ）内の値は平均値

ンク水中に生存し，残留塩素濃度が高い水中からむしろ優占的に検出された．そして残留塩素が少ないか，存在しない水中に多くみられた *Flavobacterium* や *Alcaligenes* に比べて，耐塩素性が強いことも実験的に証明された．0.1 mg／l 以上の残留塩素があれば本菌は増殖できないが，長く生存可能である．一方，給水施設の衛生管理のずさんや長時間の水の停留によって残留塩素が消失したタンク水中での挙動に関して問題点が残されていた．そこで，これら *Pseudomonas* sp.の性状と水中における消長について，種々の考察を行ったものである．

Pseudomonas sp.の性状について，実際に同条件で試験した *P. aeruginosa* のそれと比較し，また，〝ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌〟[5]に記載されている *Pseudomonas* 属の，ヒトの病気の原因となったり，臨床材料からしばしば検出される 15 菌種とを比較したが，産生する色素，アルギニン水解，グルコン酸酸化，加水分解（ゼラチン，ツイン 80），糖類分解（リボース，マンノース，トレハロース），MacConkey 寒天培地上での発育，41℃発育等の点で相違していた．また，Bergey's manual(第 8 版)[4]に記載されている *Pseudomonas* 属 29 種の性状とも比較したが，集落の性状，鞭毛の数，加水分解（デンプン，ゼラチン），糖類分解（アラビノース，シュクロース，セロビオース）等の点で異なっていた．

このように，タンク水から分離された *Pseudomonas* sp.の性状と一致する菌種は認められず，種まで決定するには至らなかった．したがって現時点では，本菌は *Pseudomonas* 属のなかでも，数多い構成菌種の一つということにとどまったが，今後の研究が必要と思われる．

しかるに，直結水では検出されなかったこのような *Pseudomonas* sp.は，残留塩素が存在しないタンク水で充分に増殖可能である．先の行政機関の調査によれば[2]，5.4％の給水施設で残留塩素が検出されておらず，筆者らの調査でも 0.1 mg／l 未満のタンク水が 14％みられた[3]．したがってこれら衛生管理面，特に残留塩素の保持点検は充分留意することが重要である．

受水槽，高置水槽を経由した水道水中に，*Pseudomonas* をはじめ，多くのグラム陰性桿菌が多数認められることについての衛生学的問題は，さらに今後の研究に待たれるところが多い．一方では，グラム陰性桿菌とエンドトキシン（菌体内毒素）に関する報告がみられる[8,9]．水中のエンドトキシン，特に水道水については本間の報告があり[10]，6.50～7.85 ng／ml 量を検出している．Luzio らも 800 μg／ml 量ものエンドトキシンを検出したと報告している[11]．これについて丹羽ら[12]は，消化系の吸収異常や網内系の機能低下，アレルギー症を伴う乳幼児などでは，エンドトキシンの影響が現われると危惧している．給水施設を経由した水道水についての報告は知る限りではないが，このようにグラム陰性桿菌が多数存在すれば，エンドトキシン量が増加することも予想される．したがって，今後，この点について調査を行う予定である．

要　約

今回，タンク水から分離した *Pseudomonas* の性状および水中での消長について検討を行い，以下のようなことがわかった．

1．標準寒天培地上での 25℃，5 日間培養後の本菌の集落の形態は S 型（正円形，均等，隆起，湿潤性）で，淡桃色を呈し，その直径はおよそ 1 mmであった．

本菌はグラム陰性の桿菌で極単毛の鞭毛を有し，大きさは 3.3～8.3×1.7～2.2 μm であった．

オキシダーゼ，カタラーゼは陽性であったが，アシルアミダーゼ，アミノ酸脱炭酸，グルコン酸酸化，硝酸塩還元，加水分解は陰性であった．また，糖類ではアラビノースとガラクトースのみを分解した．さらに，MacConkey 寒天培地と NAC 寒天培地には発育せず，41℃，塩化ナトリウム 3％の条件でも発育しなかった．また，テトラサイクリン系，アミノグリコシド系の抗菌性物質に対しては感受性が強く，リンコマイシン系，コリスチン，ポリミキシン B には抵抗性を示した．

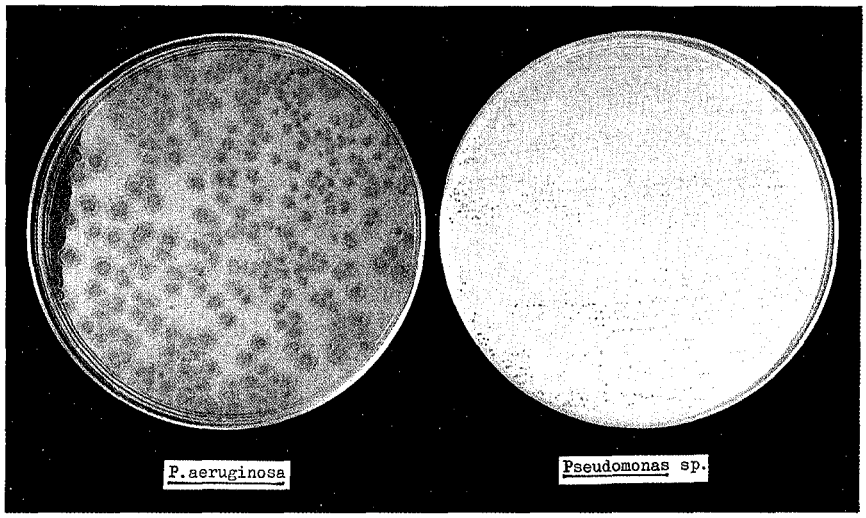
2．本菌はタンク水中で良好に増殖し，なかでも，25℃，pH 7.0±2.0，塩化ナトリウム不含の条件が適しており，その最大菌数はおよそ 10^5／ml になった．

謝辞　臨床由来 *P. aeruginosa* 株を分与された，総合相模更生病院，永峰あや子技師に深謝します．

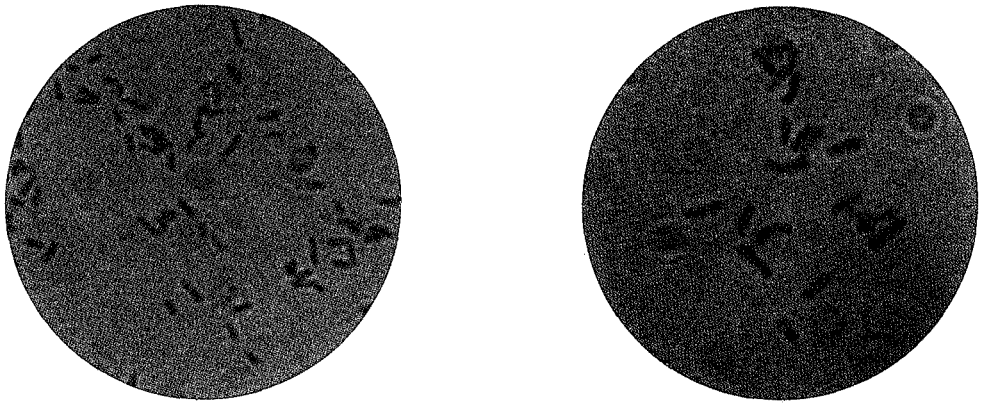
文　献

1) 西沢　伝：生活と環境，24，30，1980
2) 朝日新聞，1982 年 5 月 30 日
3) 古畑勝則，松本淳彦：東京衛研年報，34，282，1983
4) Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th. ed., 1974, The Williams and Wilkins Co., Baltimore
5) 薮内英子：ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌，1977，医学書院，東京
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) 医科学研究所学友会：細菌学実習提要，改訂 5 版，1976，丸善，東京

8) 神尾好是：化学と生物，11，746，1973
9) 井関尚栄ら：細菌内毒素，本間　遜ら編，1974，講談社サイエンティフィク，東京
10) 本間玲子：モダンメディア，29，18，1983
11) Di Luzio, N. R. and Friedmann, T. J. : *Nature*, 244, 49, 1973,
12) 丹羽　允，平松　卓，和栗　修：モダンメディア，20，11，1974

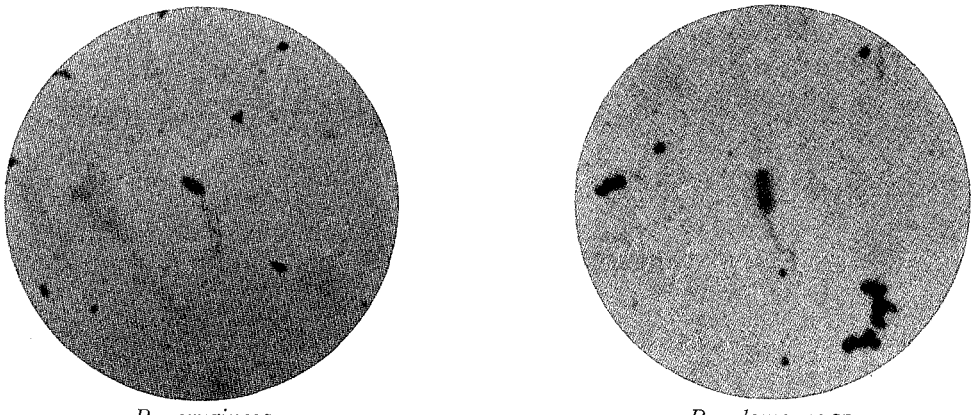


1.集落の性状(標準寒天培地，25℃，5日間培養)



P. aeruginosa　　*Pseudomonas* sp.

2.グラム染色(Huckerの変法)　5μm



P. aeruginosa　　*Pseudomonas* sp.

3.鞭毛染色(Leifson法)　5μm

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 363-370, 1984

多摩地区地下水中の塩素系有機溶剤に関する調査

矢口久美子*, 大橋則雄*, 渡辺学*, 関山登*,
中村弘*, 坂井千三*

Survey of Chlorinated Organic Solvents in Groundwater in Tama, Tokyo

KUMIKO YAGUCHI*, NORIO OHASHI*, SATORU WATANABE*, NOBORU SEKIYAMA*,
HIROSHI NAKAMURA* and SENZO SAKAI*

Keywords: 地下水 groundwater, 塩素系有機溶剤 chlorinated organic solvent, 汚染 contamination
多摩地区 Tama district, クラスター分析 cluster analysis

緒　言

近年，地下水の汚染物質として金属洗浄および溶剤などに広く使用されているトリクロロエチレンなどの塩素系有機溶剤が注目されている[1]．

1982年にWHOは飲料水中の各種有機物質汚染に対する安全性のガイドライン値[2]を示し，また1984年2月には厚生省からトリクロロエチレン，テトラクロロエチレン，1,1,1−トリクロロエタンの3物質についての水道水中の暫定基準[3]が提示された．

東京都においては，多摩地区の場合，飲料水供給の原水として地下水への依存率が極めて高い．

そこで筆者らは，多摩地区の飲料水の安全性確保の基礎資料を得るため，同地区の井戸水を対象に上記3物質および *cis*−1,2−ジクロロエチレンに関する汚染調査を行い，その特徴などについて検討した．

調査方法

1．調査対象井戸

1982～1983年に当所で取り扱った検体のうち多摩地区の448か所の井戸を調査対象とした．採水および測定は両年度共に9月から12月にわたって行った．対象井戸は専用水道や市水道の水源井戸が211か所，会社，学校，個人等の井戸が237か所である．

調査対象井戸の取水帯水層の深さを表1に示す．多摩地区の浅井戸はほとんどが深さ20m以内であること[4]，また深井戸では最上部のストレーナーが50mより深い箇所に設けられているものが多いことから，取水層の深さを20m以下，21～50m，51m以上に分類した．なお20m以下の井戸を浅井戸とし，51m以上の井戸は深井戸，21～50mの井戸はどちらに相当するか判断できなかったので不明とした．

2．採水方法

採水はトリハロメタン測定用の試料の採水方法に準じて行った[5]．

3．分析方法

1）**装置**　ガスクロマトグラフ：島津GC 7 A ECD (^{63}Ni 10mCi)および日立GC 163型FID　インテグレーター：島津クロマトパックC-R1A　恒温槽：小松エレクトレニクスCTE-220および東京理化サーミスタウォーターバスSB-55型

2）**標準物質**　水質試験用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−トリクロロエタンの1,000mg／*l*各標準液（和光純薬工業）並びに上記3物質および *cis*−1,2−ジクロロエチレンの各1,000mg／*l* 混合標準液（関東化学，特注品）上記標準物質を残留農薬試験用メタノール（和光純薬工業）で適宜希釈して使用した．

3）**分析操作**　分析は各溶剤の濃度の高いものは次に示すECD法，低いものはFID法により行った．

ECD法[5]：試料50m*l*を容量68m*l*の褐色バイアル瓶に入れ，テフロンシート，シリコンゴム栓およびアルミシールで固定する．20℃の恒温水槽に1時間静置後，気相をガスタイトシリンジで100μl採取し，GC-ECDにより分析した．

GCの分析条件：カラム　20％ SiliconeDC550

* 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

Chromosorb W AW 80／100 メッシュ 3m×3mm ガラスカラム，カラム温度 90℃，注入口温度 250℃，キャリアガス流量 50 m*l*／min

FID 法[6]：上記 ECD 法と同様にバイアル瓶に試料 50 m*l* を封入する．50°C 恒温水槽に 1 時間静置後，気相を 2.5 m*l* 採取し，GC-FID で分析した．

GC の分析条件：カラム 20 % TCP Chromosorb W AW DMCS 80／100 メッシュまたは 20 % DC−550+20 % SF−96（2 + 8）Chromosorb W AW DMCS 60／80 メッシュ 3m×3mm ガラスカラム，カラム温度 80℃，注入口温度 140℃

表 1．調査対象井戸の取水帯水層の深さ

調査井戸	調査件数	取水帯水層の深さ（m）		
		20以下	21～50	51以上
水道の水源井戸	211	12	19	180
会社，学校，個人の井戸	237	169	14	54
計	448	181	33	234

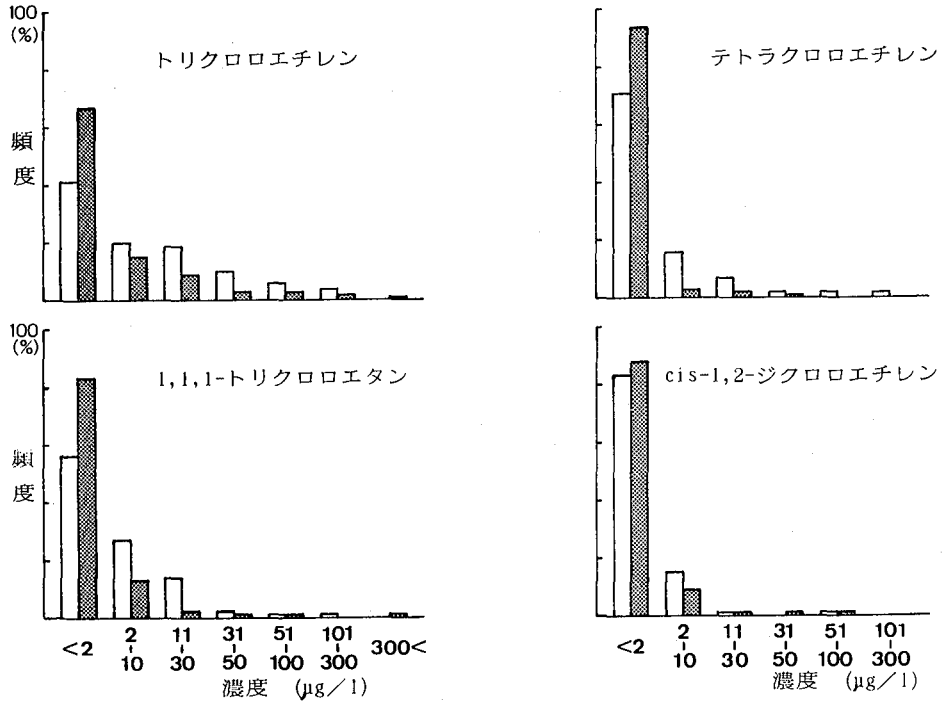
結果および考察

1．塩素系有機溶剤の濃度分布

浅井戸，深井戸別にまとめた各溶剤の濃度分布を図 1 に示す．各溶剤の検出率は浅井戸ではトリクロロエチレンが 1 番高く 59 %，次いで 1,1,1−トリクロロエタン 44 %，テトラクロロエチレン 29 %，*cis*−1,2−ジクロロエチレン 17 %の順であった．深井戸においてもトリクロロエチレンが最も高い検出率で 33 %，次いで 1,1,1−トリクロロエタン 17 %，*cis*−1,2−ジクロロエチレン 12 %，テトラクロロエチレン 6 %の順であった．いずれの溶剤においても浅井戸の方が高い検出率を示した．

今回調査対象とした井戸水の中で水道水の暫定基準値，すなわちトリクロロエチレン 30 μg／*l*，テトラクロロエチレン 10 μg／*l*，および 1,1,1−トリクロロエタン 300 μg／l を越えたものは，浅井戸ではトリクロロエチレン 20 %，テトラクロロエチレン 13 %，深井戸ではそれぞれ 9 %および 3 %であった．1,1,1−トリクロロエタンは深井戸に 1 例みられた．

次に，専用水道や市水道の水源井戸として利用している井戸とそれ以外の井戸にわけて，浅井戸，深井戸別に



□浅井戸 （N＝181，ただしcis-1, 2-ジクロロエチレンについてはN＝156）
▨深井戸 （N＝234，ただしcis-1, 2-ジクロロエチレンについてはN＝101）

図 1．浅井戸および深井戸の塩素系有機溶剤汚染の濃度分布

各溶剤の検出率を比較検討した．表2に示すように4溶剤共，水道の水源井戸の方が低い検出率を示した．その主因は，水道の水源井戸が住宅地に多いこと，しかしそれ以外の井戸の場合は金属製品や機械部品を取り扱う工場周辺の井戸が72％を占めている点などの採水場所の環境の違いによるものと考える．

2．塩素系有機溶剤による汚染と工場およびクリーニング店との関連

トリクロロエチレンおよび1,1,1−トリクロロエタンの用途は主に金属，機械部品等の脱脂洗浄用であり，テトラクロロエチレンは年間出荷量の約45％がクリーニング用[1]である．したがってこれらの工場や店の分布と塩素系有機溶剤の濃度分布との関係をある一地区について検討した．トリクロロエチレン濃度と工場の分布を図2に示すが工場との関連は明確ではない．しかし工場の少ない地区ではトリクロロエチレンが検出された井戸は少ない．

1,1,1−トリクロロエタンと工場の分布を比較した場合，トリクロロエチレンより濃度は低いが，分布は類似しており工場との関連性もトリクロロエチレンと同様の事が考えられる．

またテトラクロロエチレンについてはクリーニング店の多い地区の井戸から検出される傾向が認められたが，その関連は明確ではない．

cis−1,2−ジクロロエチレンについては，カフェイン，香料等天然物の低温抽出剤などに用いられているが[1]，検出率および検出量も他の3溶剤に比較すると少ない．微生物の存在により，テトラクロロエチレンやトリクロロエチレンが*cis*−1,2−ジクロロエチレンに変化したという報告[7]もあり，汚染機構が他の3溶剤と異なることも考えられる．

3．塩素系有機溶剤による汚染の特徴

塩素系有機溶剤の汚染の特徴を把握するために次の解析を行った．

1）**各塩素系有機溶剤の同時検出の頻度と相関**　塩素系有機溶剤が検出される井戸では，1種類の溶剤が検出されるより2種類以上が同時に検出される場合が多い．その点を明らかにするために1982年に調査した工場周辺の井戸のうち各溶剤のいずれかが検出された井戸を対象に，同時に検出される溶剤の種類と組み合わせおよびその頻度を検討した．その結果は図3に示すように2種類以上の溶剤が検出される場合が対象井戸の83％を占めた．また3種類，4種類の溶剤が検出された場合も含

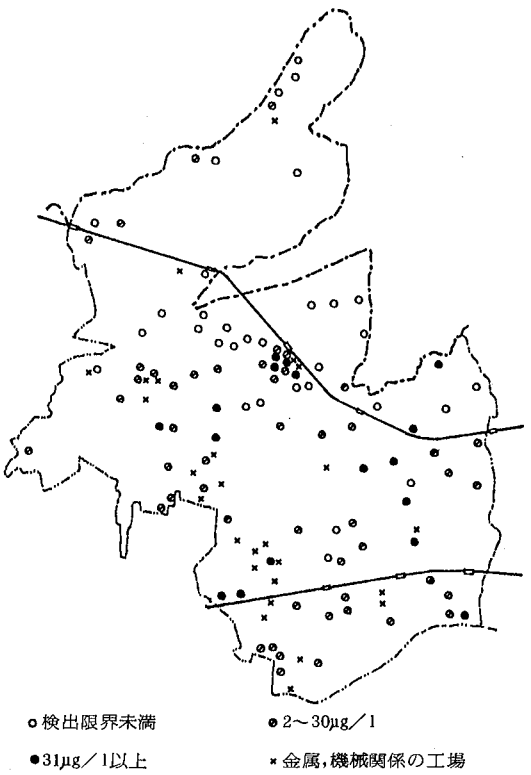


図2．トリクロロエチレンの検出と工場の分布

表2．用途別に分類した井戸における塩素系有機溶剤の検出率

調査井戸		調査件数( )*	塩素系有機溶剤（%）			
			トリクロロエチレン	テトラクロロエチレン	1,1,1-トリクロロエタン	*cis*-1,2-ジクロロエチレン
水道の水源井戸	浅井戸	12 (5)	50	8	25	0
	深井戸	180 (61)	26	5	13	3
会社・学校・個人の井戸	浅井戸	169 (151)	59	31	54	17
	深井戸	54 (40)	57	7	28	25

( )*：*cis*-1,2-ジクロロエチレンを調査した井戸の件数

めて，トリクロロエチレンと1,1,1−トリクロロエタンが共に検出された井戸が多く66％であった．

次に同時に検出される溶剤間の関連性を検討するために相関分析を行った．その対象はある一つの工場周辺の井戸群で，相関を求める2種類の溶剤が同時に検出される井戸が5か所以上あるものについて行った．その結果を表3に示す．A地区のトリクロロエチレンと1,1,1−トリクロロエタンについてのみ相関関係が認められ，他の地域では認められなかった．

このように限られた狭い地域をとってみても，一地域を除いてそれぞれの溶剤間に関連性が認められないことは，汚染源の多様性を示すものと考える．

2）塩素系有機溶剤についてのクラスター分析 工場周辺の井戸水を対象に，トリクロロエチレン，テトラクロロエチレン，1,1,1−トリクロロエタンの3溶剤の汚染を総合的にとらえ，各井戸ごとの類似性を調べるために，次の手法によってクラスター分析を試みた．

類似尺度としては次式(1)に示すユークリッド距離を用いた．

(1) $\sum_{i=1}^{n} (x_{\alpha i} - x_{\beta i})^2$

ただし，iは1つの塩素系有機溶剤を，α，βは井戸を示す．

クラスター分析の手法はLanceとWilliams[8]によって提案され，Wishart[9]によって補足された組み合わせ的手法の中で，最も分類感度の高い最長距離法を用いた．最長距離法はf−クラスターとg−クラスターとの距離をd_{gf}とすれば次の式(2)に従ってクラスター間の融合がなされる．

(2) $d_{gf} = 1/2\ d_{fh} + 1/2\ d_{fl} + 1/2\ |d_{fh} - d_{fl}|$

$$= \begin{cases} d_{fh}, & d_{fh} \geqq d_{fl} \text{のとき} \\ d_{fl}, & d_{fh} < d_{fl} \text{のとき} \end{cases}$$

ただしd_{fh}，d_{fl}はh−クラスターとl−クラスターが結合してg−クラスターができるとき，g−クラスターに属しないf−クラスターとh，l−クラスターとの距離を示す．なおこの手法による分析はMiyai *et al.*[10]のプログラムを用いた．

図4にはクラスター分析のデンドログラムを，表4には分類されたグループの特徴を示す．この結果によるとA$_4$グループやCグループに分類されたD3地域がテトラクロロエチレンの高濃度汚染地域としてまとまりを示したが，全般的には各グループに採水地域のまとまりはなく，地域別の特徴は認められなかった．

4．深井戸における塩素系有機溶剤の垂直分布と汚染機構

高濃度のトリクロロエチレン，1,1,1−トリクロロエタンおよび*cis*−1,2−ジクロロエチレンが検出された2本の深井戸を対象に，これらの溶剤の垂直分布を調査した．

井戸の概要と採水箇所を図5に示す．1号井戸と3号井戸との距離は約80 mあり，地形は平たんである．図5の地層断面図より1号井戸と3号井戸の第1ストレーナーおよび第2ストレーナーの存在する帯水層はそれぞれ同じであると推定される．

採水方法は井戸のケーシングの直径が1号井戸15 cm，3号井戸20cmと狭い上に，約100mの深層の採水も

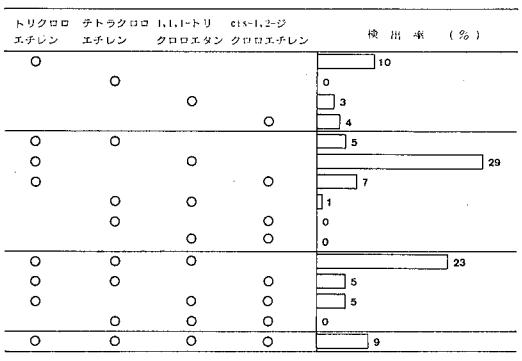


図3．同時に検出された塩素系有機溶剤の組み合わせとその頻度

表3．同時に検出された塩素系有機溶剤の相関関係

調査地域	C_2HCl_3と$C_2H_3Cl_3$ 相関係数	N	C_2HCl_3とC_2Cl_4 相関係数	N	C_2Cl_4と$C_2H_3Cl_3$ 相関係数	N
A	0.83**	12	0.26	10[a)]		
B	0.22	11				
C	0.47	5	0.34	11[b)]		
D	0.40	11				
E	0.49	9	0.46	9		
F	−0.30	6				
G	−0.07	21	−0.26	18	0.05	10

**：$P<0.01$

a)：AおよびB地域から選んだ対象井戸数

b)：CおよびD地域から選んだ対象井戸数

行うため，既製の採水器を利用できないので人見らが考案した採水器[11]を用いて行なった．

1号井戸においては表5に示すように，ポンプ引き上げ直後と2日経過後のトリクロロエチレン濃度を比較すると第1ストレーナー部は37 μg／l→2 μg／lに，第2ストレーナー部は3 μg／l→検出限界未満に減少した．深井戸のような多層採水井戸では，揚水が行われない静止状態の時でも採水層からの流入があり，水圧の高い帯水層から低い帯水層への流れが生じているといわれている．[12]それらの理由から1号井戸の汚染水は，ポンプ引き上げ後に新しくケーシング内に汚染されていない水が流入し，入れ替わったものと思われる．これらのことから同井戸の第1ストレーナー部の帯水層の水は汚染されていてもわずかであり，第2ストレーナー部の帯水層は汚染されていないと推定された．またポンプ引き上げ直後の第1ストレーナー部のpHや硝酸性窒素および塩素イオン濃度が浅層地下水と類似の値を示していることから揚水時に認められた汚染は汚染された地下水がケーシング内に吸引された結果によるものと考えられる．それに加えてほとんどの深井戸ではケーシングと掘削孔壁との間に砂利が充てんされているため，1号井戸においても浅層地下水は，この砂利層を経て第1ストレーナーからケーシング内に取り込まれたと推定される．

次に3号井戸の場合は表6に示すように，pHが第1ストレーナーより上層では6.8で，浅層地下水と類似の値を示し，第2ストレーナーより深い層では7.5前後であることから，第2ストレーナー部の帯水層は被圧地下水であると思われる．硝酸性窒素や塩素イオン濃度は，すべての採水箇所においてほぼ等しい値であったが，1号井戸と比較すると高濃度であり浅層地下水の混入が考

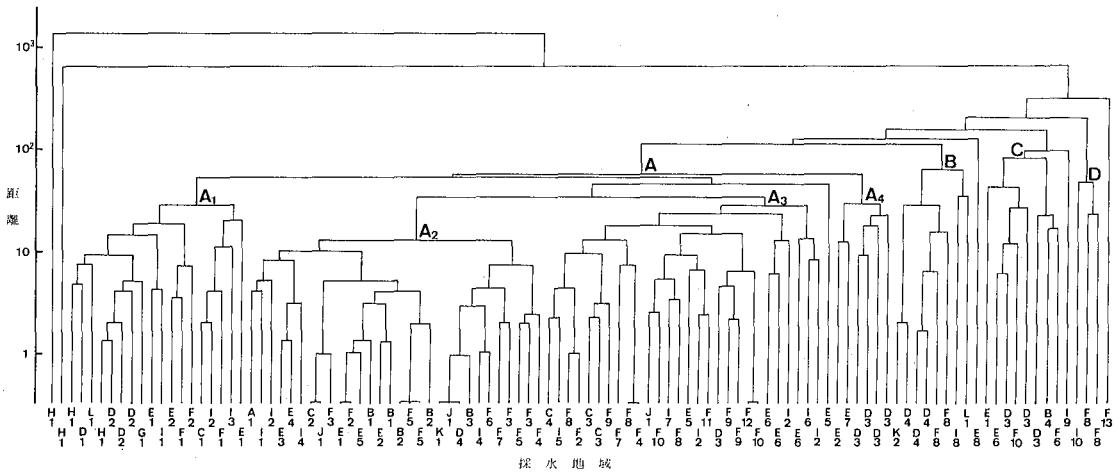


図4．塩素系有機溶剤におけるクラスター分析のデンドログラム

表4．クラスター分析による各グループの特徴

グループ	特　徴	塩素系有機溶剤 (μg/l)		
		トリクロロエチレン	テトラクロロエチレン	1,1,1-トリクロロエタン
A1	トリクロロエチレンの中等度汚染地域	30～50	10以下	2～20
A2	低濃度汚染地域Ⅰ	10以下	5以下	5以下
A3	低濃度汚染地域Ⅱ	10～25	15以下	5～25
A4	テトラクロロエチレンの高濃度汚染地域Ⅰ		20～35	
B	トリクロロエチレンの高濃度汚染地域Ⅰ	50～100	10以下	
C	テトラクロロエチレンの高濃度汚染地域Ⅱ		50～125	
D	トリクロロエチレンの高濃度汚染地域Ⅱ	100～150	5以下	35以下

えられる．またトリクロロエチレンなどの溶剤の濃度は第1ストレーナーより浅い層では高く，第2ストレーナーより深い層では低くなっている．以上の結果より第1ストレーナーの設けられている帯水層では浅層から直接の水補給があると考えられる．そして第2ストレーナー，第3ストレーナー部の帯水層においても直接ではないが漏水が生じていると推定される．また第1ストレーナー部の塩素系有機溶剤の濃度はポンプ引き上げ直後および静止後もほぼ等しいことから，3号井戸では1号井戸のように多量の揚水によって汚染水を引き込んでいるのではなく，この第1ストレーナーの設けられている帯水層自体が汚染されていると考えられる．

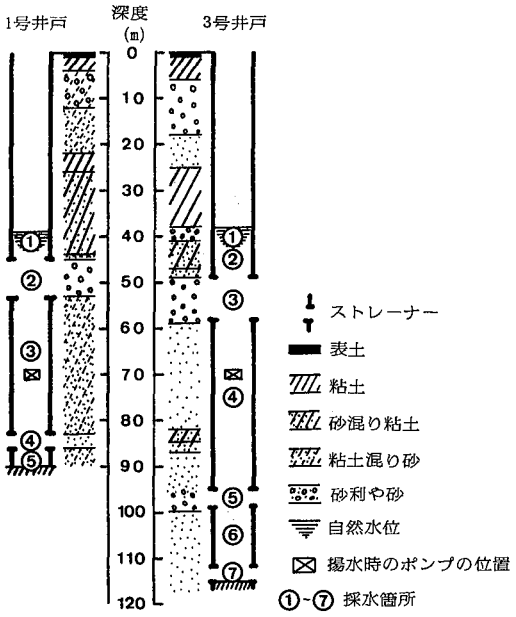


図5．深井戸の断面図と採水箇所

以上の調査結果から，深井戸の汚染機構にはストレーナーが設けられている帯水層が汚染されている場合と，異なった場所にある汚染水を多量の揚水によって井戸内に引き込んでいる場合とがあることが確認された．

ま と め

1982～1983年に多摩地区の井戸448か所を対象に塩素系有機溶剤による汚染調査を行い，次の成績を得た．

1．トリクロロエチレン等塩素系有機溶剤による汚染は浅井戸においては広範囲に及んでいることが判明し，一部では高濃度の汚染も認められた．各溶剤の検出率は浅井戸ではトリクロロエチレン59％，1,1,1－トリクロロエタン44％，テトラクロロエチレン29％，*cis*－1,2－ジクロロエチレン17％の順であった．深井戸ではトリクロロエチレン33％，1,1,1－トリクロロエタン12％，*cis*－1,2－ジクロロエチレン12％，テトラクロロエチレン6％であった．

表5．1号井戸における深度別水質

項目	ポンプ引き上げ後の経過日	採水箇所 (m) 表層 (40)	第1ストレーナー (50)	中間層 (65)	第2ストレーナー (85)	底層 (87)
pH	当日	6.8	6.6	6.6	6.7	6.7
	1日	7.0	7.0	7.1	7.3	7.0
	2日	7.1	7.2	7.1	7.2	7.1
硝酸性窒素 (mg/*l*)	当日	2.4	3.6	2.2	1.6	0.4
	1日	1.1	1.9	0.3	0.1	0.1
	2日	0.4	1.9	0.4	0.4	0.1
塩素イオン (mg/*l*)	当日	9.0	15.8	12.4	9.0	4.8
	1日	7.7	10.5	5.6	3.5	3.5
	2日	6.3	8.4	4.9	4.2	3.5
トリクロロエチレン (μg/*l*)	当日	47	37	33	ND	3
	1日	20	3	ND	ND	ND
	2日	9	2	ND	ND	ND

ND：2μg/*l*未満

表6．3号井戸における深度別水質

項目	ポンプ引き上げ後の経過日	採水箇所 (m) 表層 (39)	第1中間層 (45)	第1ストレーナー (54)	第2中間層 (75)	第2ストレーナー (97)	第3中間層 (105)	第3ストレーナー (113)
pH	当日	6.8		6.8		7.1	7.3	
	1日	6.8	6.8	6.8	7.6	7.9	7.8	7.5
	3日	6.8	6.8	6.8	7.0	7.5	7.6	7.6
硝酸性窒素	当日	5.7		5.8		5.0	4.7	
(mg/l)	1日	5.7	6.0	5.6	4.7	4.5	4.5	4.6
	3日	5.4	5.7	5.8	5.3	4.4	4.5	4.4
塩素イオン	当日	17.6		17.6		16.2	16.9	
(mg/l)	1日	17.2	15.8	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5
	3日	17.6	17.6	17.6	16.9	16.9	16.9	16.9
トリクロロ	当日	360		380		160	120	
エチレン	1日	350	460	390	58	33	38	72
(μg/l)	3日	430	410	400	290	68	74	70
1,1,1-トリ	当日	68		69		26	23	
クロロエタン	1日	67	88	70	9	5	9	13
(μg/l)	3日	77	71	68	46	10	12	11
cis-1,2-ジクロ	当日	10		9		2	4	
ロエチレン	1日	7	12	9	ND	ND	ND	ND
(μg/l)	3日	13	9	9	5	ND	3	ND

ND：2 μg/l未満

2．深井戸，浅井戸共に複数の塩素系有機溶剤が検出される場合が多く，なかでもトリクロロエチレンと1,1,1—トリクロロエタンが同時に認められる場合が，いずれかの溶剤が検出される井戸の65％を占めていた．

3．トリクロロエチレン，テトラクロロエチレン，1,1,1—トリクロロエタンについてのクラスター分析の結果，地域別の汚染の特徴は認められなかった．

4．深井戸の汚染は垂直分布調査より，取水帯水層自体が汚染されている場合と多量の揚水により取水帯水層以外の汚染水を取り込んでいる場合とがあることが判明した．

謝辞 本調査にあたりクラスター分析の御指導をいただいた日本工業大学の西田英郎助教授および宮井正弥講師，深井戸の垂直分布調査に協力して下さった府中保健所衛生課の方々に心から謝意を表します。

文　献

1) 杉戸大作：水道協会雑誌，589，53，1983
2) H. Galal Gorchev and G. Ozolins : *WHO Guidelines for Drinking Water Quality,* 1982, World Health Organization
3) 厚生省環境衛生局水道環境部長通知，昭和59年2月18日付環水第15号
4) 木村康夫，三村秀一，藤沢正吉，樋口育子，渡辺悠二：東京衛研年報，19，141，1967
5) 厚生省環境衛生局水道環境部水道整備課長通知，昭和56年3月25日付環水第47号
6) 大橋則雄，矢口久美子，関山　登，藤沢正吉，渡辺学，中村　弘，松本昌雄：東京衛研年報，33，280，1982
7) Frances, P., Paul, R. W. and Jack, D. : *Jour.*

AWWA,76 (2), 56, 1984
8) Lance, G. M. and Williams, W. T. : *Computer Journal*, 9, 373, 1967
9) Wishart, D. C. : *Biometrics*, 25, 165, 1969
10) Miyai M. and Nishida H. : *IIS Tech. Rep, Soka Univ.*, 10, 1981
11) 人見達雄：環境衛生情報, 7 (4), 6, 1983
12) 村下敏夫：改著　地下水学要論, 第2版, 145, 1976 昭晃堂

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 371-377, 1984

多摩川底質中の多環芳香族炭化水素調査

有賀孝成*, 押田裕子*, 栃本博*, 中村弘*, 坂井千三*

Survey of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Sediment from Tama River, Tokyo

TAKANARI ARIGA*, HIROKO OSHIDA*, HIROSHI TOCHIMOTO*, HIROSHI NAKAMURA* and SENZO SAKAI*

The levels of 6 polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) including fluoranthene, benzo (*b*) fluoranthene, benzo (*k*) fluoranthene, benzo (*a*) pyrene, benzo (*ghi*) perylene and indeno (1,2,3-*cd*) pyrene were investigated in sediments collected at 17 different sampling sites of the Tama River which flows through Tokyo on February 1983.

The analytical method of PAHs was as follows : Sediment samples were subjected to freeze-drying and the Soxhlet extraction. After clean-up with florisil column chromatography, PAHs were determined quantitatively by reverse-phase liquid chromatography and fluorescence detection.

The sum of 6PAHs (Total PAH) were distributed from 65.4 to 143ng／g(average 96.1ng／g)in 6 upper stream area, 140 to 298ng／g (average 214ng／g) in 7 middle stream area and 446 ng／g at Tamagawaō-hashi, 1,200 ng／g at Rokugō-bashi, 550ng／g at Daishi-bashi in lower stream points.

Significant positive correlations were found statistically for the sediments containing more than 200ng／g as Total PAH among benzo (*a*) pyrene, a strong carcinogen, several heavy metals (Cu, Cd, Pb, Fe, Ni, Zn) and ignition loss.

Keywords : environmental survey, polynuclear aromatic hydrocarbons, benzo (*a*) pyrene, sediment, Tama River, correlation, heavy metal, ignition loss

緒　言

わが国における主要公共用水域の水質汚濁は，排水規制の強化あるいは下水道の整備等を反映して，年々改善されてきたが，最近では横ばいに推移している[1]．東京都の主要河川の一つである多摩川でも同様な傾向がみられ，環境基準の達成率をみると，中流部では依然として低く，25～67％程度(昭和57年度)にとどまっている[2]．このような河川の慢性的な水質汚濁は，そこに生息する動植物を汚染するばかりでなく，周辺の土壌や生物類までも汚染し，さらに，汚染物質によっては食物連鎖等による人への影響も考えられる．

多環芳香族炭化水素(PAH)は主に，石油，石炭および木材等の有機物質の熱分解あるいは不完全燃焼によって生成されるため，広く環境中に分布している．また，benzo (*a*) pyrene 等，ある種の PAH は強い発がん性を有することから，環境汚染物質あるいは環境汚染の指標物質として注目されている．

PAH は工場排水，家庭排水あるいは都市下水等の各種排水から比較的高い濃度で検出されているが[3,4]，これらの排水が主な汚染源となっている河川水中の PAH 濃度は数 ng／*l* 以下とかなり低いレベルである[5]．これは，河川に流入した PAH の多くが水中浮遊物質に吸着され，河川底質に移行し，蓄積しているためと考えられる．従って，河川底質中の PAH の実態を調査することは，河川およびその周辺の環境汚染を知る手がかりとして，また，水生生物に対する PAH の影響を調べる上で有用であると考える．

そこで，著者らはまず，河川底質中の PAH の分析法

* 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

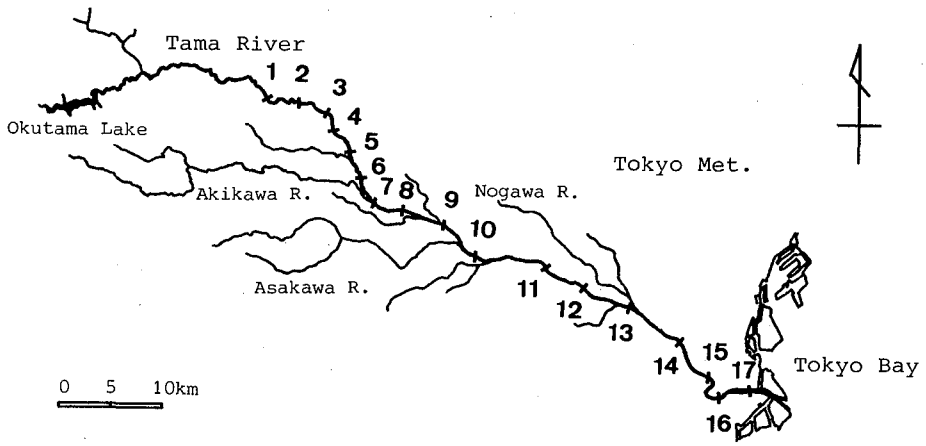


Fig. 1. Map of Sediment Sampling Sites in Tama River

を検討し，さらに，東京都の水道原水の約20％を占める等，都民の生活と深いかかわりをもつ多摩川を対象として，底質中のPAHの分布を調査し，若干の知見を得たので報告する．

実験方法

1．試料の採取

底質試料は1983年2月7日から15日までの間に，Fig. 1に示した多摩川の和田橋から大師橋までの17地点の表層部から，エックマン・バージ式採泥器またはスコップを用いて，約2kgずつを採取した．なお，調査地点の川幅が広く，底質の性状が異なると思われた地点では2～3箇所から採取し，合計31件の底質を実験に供した．

2．試料の調製

採取した底質は遠心分離（3,000 rpm, 10分間）して大部分の水分を除いた後，ガラスシャーレに移し，凍結乾燥した．乾燥後の底質は32mesh（0.5mm）の篩を通して粒度をそろえて試料とした．

3．試薬

1）PAH混合標準溶液：fluoranthene (Fl), benzo (*a*) pyrene (B*a*P),（以上，和光純薬），benzo (*ghi*) pervlene (B*ghi*P), benzo (*k*) fluoranthene (B*k*F), benzo (*b*) fluoranthene (B*b*F),（以上，Aldrich Chemical）およびindeno（1，2，3－*cd*）Pyrene (IP),（関東化学）をベンゼン（nanograde, Mallinkrodt）で溶解し，それぞれの濃度が0.5 μg／m*l*となるような混合溶液を調製した．なお，添加回収実験用のPAH混合標準溶液はアセトニトリルを用いて調製した．

2）フロリジルカラム：フロリジル（60—100 mesh, Floridin）を140°，4時間活性化した後，デシケーター中で放冷し，水を2 V／W％の割合で加えてよく振り混ぜ，その10gをガラスカラム（内径1.0cm，長さ30cm）にベンゼンを用いて湿式充てんし，ベンゼン50 m*l*で洗浄した．

3）硝酸および塩酸は精密分析用（和光純薬）を用い，その他の試薬で特にメーカー名，品質を記載してないものはいずれも試薬特級品（和光純薬）を用いた．

4．装置

1）高速液体クロマトグラフ：日本分光TWINCLE型

2）蛍光検出器：日本分光FP-550A型

3）原子吸光光度計：IL Video22型

5．PAHの分析法

1）試験溶液の調製：試料5～20 gを取り，ベンゼンを用いて3時間，ソックスレー抽出を行った．抽出液はKD濃縮器を用いて約1 m*l*まで濃縮した後，その全量をあらかじめ調製したフロリジルカラムに入れ，ベンゼン60 m*l*で溶出した（流速2 m*l*／min）．溶出液は再びKD濃縮器を用いて1 m*l*以下となるまで濃縮し，ベンゼンで正確に1.0 m*l*としたものを試験溶液とした．

2）高速液体クロマトグラフによる定量：試験溶液の5 μ*l*を下記の条件下で注入し，得られたピーク高さから絶対検量線法により定量した．

カラム：0.26×25cm, HC-ODS, 10 μm (Perkin Elmer)

(1) Fl, B*b*F, B*k*F, B*a*PおよびB*ghi*Pの測定；移動層：アセトニトリル—水(80：20)，流速：1.0 m*l*／min,

励起波長：360 nm，蛍光波長：430 nm

(2) IPの測定；移動層：100％アセトニトリル，流速：0.5m*l*／min，励起波長：360nm，蛍光波長：500 nm

6．重金属の分析

試料2～5 gをビーカーに取り，硝酸および30％過酸化水素水により分解した後，0.5 N塩酸溶液とし，鉄(Fe)，マンガン(Mn)，亜鉛(Zn)，銅(Cu)，ニッケル(Ni)および鉛(Pb)はフレーム原子吸光法，カドミウム(Cd)はフレームレス原子吸光法で測定した[6]．

7．強熱減量の測定

試料10 gをビーカーに取り，電気炉を用いて600°，2時間強熱して減量を求めた[7]．

結果および考察

1．PAHの分析法の検討

底質試料からのPAHの抽出法としては，底質をアルカリ分解した後，液々分配法によりヘキサン等で抽出する方法[8,9]および底質を30～45°程度で乾燥した後，有機溶剤でソックスレー抽出[10]あるいは超音波によって抽出する方法[11]等が報告されている．これらの方法のうち，ソックスレー抽出法は操作が簡単であるが，比較的長時間を要する．これはPAHが油溶性であるため，試料の水分含量が抽出効率に影響していることが考えられる．そこで，底質を凍結乾燥して水分を完全に除去した後，ベンゼンを用いてソックスレー抽出する方法を検討した．その結果，6種のPAHはいずれも1時間以内に抽出されることが判明した．

一方，PAHのクリーンアップ法としては，薄層クロマトグラフィー法[11]，ゲルクロマトグラフィー法[12]およびカラムクロマトグラフィー法[9]等について種々検討されている．著者らは下水・再利用水中のPAHの分析[3]で用いた2％含水フロリジルカラムと溶出液として抽出溶剤と同じベンゼンを用いる簡便な方法を底質試料に試みた結果，この方法は底質試料についてもPAHのクリーンアップ法として十分利用できることが確認された．

添加回収試験は試料10 gにPAH混合標準溶液1.0 m*l*および水12 m*l*を加え，凍結乾燥した後，本法により回収率を求めた．その結果はTable 1に示すとおり，それぞれのPAHの回収率は3回の平均で91～98％，変動係数は1.3～5.2％と良好であった．

2．多摩川底質中のPAH

多摩川底質中のPAHの分析結果をTable 2に示した．

今回対象とした6種のPAHはすべての試料から検出され，その濃度は2.6～405 ng／gの範囲であった．そのうち，発がん性の強いBaPは4.2～206 ng／g（平均値51.2 ng／g）の範囲であった．この濃度は東京湾底質の表層部（36.0～91.4 ng／g）[13]，大阪湾底質（100～320 ng／g）[8]，浜名湖底質（2.9～255 ng／g）[9]あるいは相模川河口域底質（27～200 ng／g）[14]等とほぼ同レベルであった．

Table 1. Recoveries of PAHs from Sediment Samples

Compound*1	Recovery(%)*2	C.V.*3
Fluoranthene	94.6	5.2
Benzo(*b*)fluoranthene	92.9	1.7
Benzo(*k*)fluoranthene	98.4	1.3
Benzo(*a*)pyrene	90.9	4.8
Benzo(*ghi*)perylene	96.9	4.8
Indeno (1,2,3-*cd*)pyrene	94.7	4.3

*1 Spiked at 50ng/g each
*2 Average of three measurement
*3 Coefficient of variation

6種のPAH濃度の合計（総PAH濃度）は51.2～1,350 ng／gの広い範囲で分布していた．しかし，各試料中の6種のPAHの濃度比率はすべての試料で同じ傾向を示し，F1が最も高く，総PAHに占める割合は29.9～49.8％（平均36.9％）であった．この傾向は先に報告[3]した下水処理場の流入水あるいは業務用ビルの排水でもみられたが，F1の割合は平均でそれぞれ，53％および60％であった．このように，底質中での総PAHに対するF1の割合はこれらの排水と比較して低い傾向がみられた．このことは，松島らの報告[15,16]と軌を一にするものであり，相対的に分子量の小さいPAH程水中での浮遊物質への濃縮率が小さく，また，底質中では分解等による消失率が大きいためと考えられた．

次に，総PAH濃度を採取地点別の平均値で示すと，和田橋から拝島橋までの上流部では，特に高い値を示した多摩橋（346 ng／g）を除くと65.4～143 ng／g（平均96.1 ng／g）の範囲であった．これに対して，多摩大橋から丸子橋までの中流部では140～298 ng／g（平均214 ng／g）の範囲で，上流部より約2倍高い値であった．また，下流部の多摩川大橋および大師橋では上流部の5倍程度高く，それぞれ，446 ng／gおよび550 ng／gで，最も高い値を示した地点は下流部の六郷橋で，1,200 ng／gであった．このように，総PAH濃度は上流から下流に

Table 2. Concentration of PAHs in Tama River Sediments

Sampling Sites[*1] No.	Name	Remarks	PAH (ng/g, dry weight basis) Fl	*B(b)*F	B(*k*)F	B(*a*)P	B(*ghi*)P	IP	T-PAH[*2]
1	Wada-bashi	R[*3]	21.9	7.9	3.9	11.4	11.0	9.3	65.4
2	Chōfu-bashi	L[*4]	50.7	15.9	8.8	21.9	26.5	19.0	143
3	Tamagawa-bashi	L	38.5	12.0	6.2	15.2	16.0	12.8	101
4	Hamura-seki	C[*5]	35.8	11.7	6.5	13.5	17.0	12.6	97.1
5	Tama-bashi	C	107	46.4	22.6	54.1	63.2	52.6	346
6	Mutumi-bashi	L	27.7	9.1	4.5	11.4	11.5	8.8	73.0
7	Haijima-bashi	L	23.0	6.6	3.4	5.1	9.0	7.5	54.6
		R	52.0	18.7	9.4	17.0	24.0	20.0	141
8	Tamaō-hashi	L	133	49.5	28.8	72.0	64.0	62.1	409
		R	25.5	5.5	2.6	4.2	7.0	6.4	51.2
9	Hino-bashi	L	119	35.8	16.8	36.9	38.2	36.4	283
		C	70.6	19.2	11.1	21.1	26.0	24.3	172
		R	55.1	18.9	10.0	17.7	22.9	22.1	147
10	Sekido-bashi	L	72.6	21.6	12.9	33.9	31.9	24.4	197
11	Tamagawara-bashi	L	98.1	38.7	20.8	50.8	49.0	40.7	298
12	Tamasuidō-bashi	L	141	41.1	25.5	51.3	58.3	53.6	371
		C	45.9	13.3	8.5	11.9	21.9	17.1	119
		R	55.1	16.1	9.8	15.3	21.9	20.0	138
13	Futago-bashi	L	80.6	29.8	15.3	36.5	35.5	27.6	225
14	Maruko-bashi	L	90.2	27.9	14.6	33.7	35.9	29.4	222
		C	33.9	12.1	6.6	17.8	15.6	14.3	100
		R	35.6	12.7	6.6	14.4	15.6	14.5	99.4
15	Tamagawaō-hashi	L	185	48.5	26.6	63.8	64.3	53.7	442
		C	234	77.6	39.0	100	92.9	70.7	614
		R	90.7	44.2	18.2	46.1	46.4	35.4	281
16	Rokugō-bashi	L	371	122	60.6	147	142	122	965
		C	405	216	86.5	206	235	205	1,350
		R	405	183	84.6	195	227	180	1,270
17	Daishi-bashi	L	174	79.2	39.9	88.8	77.3	59.3	519
		C	200	119	38.7	86.5	69.7	59.6	574
		R	200	87.1	38.2	86.2	80.3	66.0	558

[*1] References to the Figure 1.
[*2] Total of 6PAHs
[*3] Right bottom of the river
[*4] Left bottom of the river
[*5] Center bottom of the river

向けて高くなる傾向を示したが，上，中流部では比較的ゆるやかに推移し，多摩川大橋より下流で急激に高くなっていた．なお，上流部の多摩橋で高い値を示した原因は，この地点が羽村取水場と平井川および秋川の合流点との間に位置するため，流量が比較的少なく，川幅も狭いことから，附近に流入している排水の影響を強く受けているためと思われる．

底質中のPAH濃度の分布を河川水のBOD値[2]と比較してみると，BOD値は羽村堰までの上流では0.8～1.0mg／*l*程度であるが，羽村堰より下流では各種排水の流入が多くなるため，拝島橋から二子橋附近までは3.5～5.2mg／*l*と高く，羽村堰を境とした顕著な差がみら

Table 3. Concentration of Heavy Metals and Ignition Loss in Tama River Sediments

Sampling Sites*1		Heavy Metal (μg/g, dry weight basis)							
No.	Remarks	Fe(%)	Mn	Zn	Cu	Ni	Pb	Cd(ng/g)	I.L.(%)*2
1	R*3	2.48	521	65.3	21.0	19.0	11.6	62.5	2.55
2	L*4	2.65	635	70.7	32.5	21.8	13.3	57.4	2.92
3	L	2.42	525	65.8	25.1	19.3	12.4	56.3	2.57
4	C*5	2.68	615	68.9	21.9	20.4	13.3	40.7	2.58
5	C	2.79	413	280	57.1	56.1	31.5	105	5.29
6	L	2.26	445	67.9	19.8	20.1	11.2	49.6	2.29
7	L	2.08	405	58.5	16.5	16.3	9.5	30.1	2.20
	R	2.24	594	85.6	22.6	17.8	12.9	53.5	3.10
8	L	2.29	332	156	33.7	20.6	19.5	107	4.24
	R	2.52	634	69.8	13.6	20.1	8.0	31.2	4.82
9	L	2.18	374	102	25.5	19.2	14.3	75.6	3.83
	C	2.05	374	104	21.1	19.2	14.5	35.1	3.80
	R	1.99	409	52.9	19.6	17.0	12.0	41.3	3.41
10	L	1.79	311	83.0	22.0	16.6	11.8	49.5	1.98
11	L	1.98	352	93.8	24.8	16.9	15.5	82.0	2.83
12	L	2.16	434	88.1	32.0	16.0	15.9	84.2	3.44
	C	1.80	502	72.9	21.9	15.7	10.9	49.1	2.73
	R	1.84	539	73.3	18.8	15.2	12.3	64.1	2.36
13	L	1.85	302	110	22.2	14.6	14.2	50.7	2.89
14	L	1.94	302	106	26.5	17.2	13.0	46.3	3.19
	C	1.67	225	60.0	16.6	14.8	7.9	51.6	1.91
	R	1.79	228	64.4	19.7	13.7	9.6	27.6	2.27
15	L	2.45	428	108	36.0	23.3	20.6	106	4.37
	C	2.71	322	114	41.5	21.0	19.9	191	5.42
	R	2.37	358	110	36.2	23.5	18.0	143	4.05
16	L	4.38	364	195	75.0	26.3	58.0	376	6.46
	C	4.57	355	297	126	32.7	51.3	609	13.9
	R	4.23	521	239	102	36.9	39.8	426	14.1
17	L	2.25	287	129	50.7	31.0	31.2	295	5.10
	C	3.05	400	140	53.5	22.8	22.8	250	6.25
	R	2.56	332	137	47.8	27.2	29.5	224	5.32

*1 References to the Figure 1.
*2 Ignition Loss
*3 Right bottom of the river
*4 Left bottom of the river
*5 Center bottom of the river

れる．これに対して，底質中のPAH濃度も羽村堰より下流の多摩橋で高い値を示し，多摩大橋からは高い値が継続している．また，二子橋より下流のBOD値は第3京浜多摩川橋（6.6mg／l）をピークとし，ここから大師橋(2.6mg／l)まで直線的に減少している．これは，河口附近が感潮河川となっているためと思われるが，底質中のPAH濃度は六郷橋で際立った高い値を示した．このように，多摩川底質中のPAHの濃度分布は下流の感潮部を除き，河川水のBOD値の分布と近似した傾向が認められた．

Table 4. Coefficient of Correlation Between Benzo(*a*)pyrene and Five Different PAHs, Heavy Metals and Ignition Loss in Tama River Sediments

Compound	Total of 6 PAHs <200ng/g (n=15)	Total of 6 PAHs >200ng/g (n=12)
Fluoranthene	0.825**	0.905**
Benzo(*b*)fluoranthene	0.860**	0.858**
Benzo(*k*)fluoranthene	0.861**	0.980**
Benzo(*ghi*)perylene	0.882**	0.974**
Indeno (1,2,3-*cd*)pyrene	0.852**	0.934**
Fe	−0.294	0.766**
Mn	−0.320	−0.087
Zn	0.439	0.612*
Cu	0.496	0.862**
Ni	−0.063	0.677*
Pb	0.467	0.803**
Cd	0.302	0.854**
Ignition Loss	−0.274	0.873**

Site number 5 and 16 were excluded from the statistical analysis

** Significant difference at $p<0.01$

* Significant difference at $p<0.05$

3．各 PAH の相互の関係および PAH と重金属との関係

底質中の重金属および強熱減量の分析結果を Table 3 に示した．

河川底質は種々の汚染物質を含有するが，各 PAH の相互の関係あるいは PAH と他の汚染物質との関係を調査することは，河川底質中の PAH の汚染源あるいは河川における PAH の挙動を推察する上で重要であると思われる．そこで，PAH の他に 7 種の重金属および強熱減量を測定し，PAH との相関関係を調査した．

多摩川底質中の総 PAH 濃度は前述のごとく，上流部では 100 ng／g 程度，中流部では 200 ng／g 程度であり，河川水の BOD 値もこの附近で急激に変化していることから，総 PAH 濃度 200 ng／g 以上の群と 200 ng／g 未満の群に 2 分し，それぞれについて相関係数を求めた．なお，多摩橋および六郷橋の 2 地点の成積は統計処理から除いた．Table 4 に B*a*P についての結果を示した．

B*a*P は総 PAH 濃度にかかわらず他の 5 種の PAH すなわち，Fl, B*b*F, B*k*F, B*ghi*P および IP のいずれとも危険率 1％で有意の相関を示した．しかし，B*a*P と重金属との相関は総PAH濃度によって大きく異なった．すなわち，総 PAH 濃度が 200 ng／g 以上の群では B*a*P は Cu, Cd, Pb および Fe と危険率 1％で，Ni および Zn と危険率 5％で有意の相関を示した．これに対して，総 PAH 濃度が 200 ng／g 未満の群では B*a*P はいずれの重金属とも有意の相関を示さなかった．また，B*a*P と強熱減量との相関も総 PAH 濃度が 200 ng／g 以上の群では有意の相関を示したが，総 PAH 濃度が 200 ng／g 未満の群では認められなかった．

このことは，総 PAH 濃度が 200 ng／g 以上の底質では各 PAH と Cu, Cd, Pb および Fe 等の重金属および強熱減量で示される種々の有機物質との比率がほぼ一定していることを示している．河川底質中の有機物質は，総 PAH 濃度と F1 との割合から推察したと同様，物質によってそれぞれ，蓄積および分解の比率が異なると思われるが，底質中での存在比がほぼ一定していたことは，汚染源でのこれらの組成が類似しているためと考えられる．また，前述のとおり，底質中の PAH 濃度は上，中流部で河川水の BOD 値と近似した動きを示し，排水の影響を強く受けたと思われる多摩橋では，PAH 濃度と共にこれらの重金属濃度および強熱減量も高い値を示している．これらのことから，多摩川底質中の PAH の主な汚染源は，工場排水，生活排水あるいは都市下水等の各種排水であると考えられた．

底質中での PAH と重金属との関係については，Kawakami ら[17]が大阪湾底質で B*a*P と Cd, Cu および Pb との間に有意の相関を認め，Matsushima[18]も平潟湾底質で B*a*P と Pb, Hg, Cd, Cu および Zn との間に有意の相関を示したことを報告している．一方，PAH と各種重金属との相関は臨海工業地帯を抱合する大都市の大気中浮遊粒子でも認められており，松下ら[19]は川崎市の大気で B*a*P と Pb, Cd および V との間に有意の相関を認め，冨田[20]は大阪市大気中で B*a*P と Cd, Fe, Pb, Cr および Ni との間に有意の相関を認めている．今回の調査で，多摩川底質でも総 PAH 濃度が 200 ng／g 以上の群では，これら湾内底質および大気中浮遊粒子とほぼ同様な傾向を示した．このことは，河川底質中の PAH の汚染源が湾内底質のそれと共通したものがあり，大気中浮遊粒子もその主要な汚染源の一つであると考えられる．そして，流域に降下する大気中浮遊粒子は雨水あるいは都市下水等を介して河川に流入していると考えられた．

ま と め

底質中のPAHの分析法を検討し，多摩川の17地点から採取した底質中のPAH濃度，重金属濃度および強熱減量を調査し，次の結果を得た，

1）底質中のPAHは試料を凍結乾燥した後，ベンゼンを用いてソックスレー抽出し，2％含水フロリジカルカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップ後，高速液体クロマトグラフィー—蛍光光度法により定量した．本法による6種のPAHの添加回収率は91～98％，変動係数は1.3～5.2％と良好であった．

2）多摩川底質からは対象とした6種のPAHがすべての試料から検出され，総PAH濃度は51.2～1,350 ng／g（平均値337 ng／g）の範囲であった．また，強い発がん性をもつBaPは4.2～206 ng／g（平均値51.2 ng／g）の範囲であった．

3）総PAHの濃度分布は上流から下流に向って高くなる傾向がみられたが，上流部では約100 ng／g，中流部では約200 ng／gであったのに対して，下流部の多摩川大橋および大師橋ではそれぞれ，446 ng／gおよび550 ng／gと高く，最高値は六郷橋の1,200 ng／gであった．

4）試料中の6種のPAHの濃度比率はすべての試料で同じ傾向を示し，相互に高い相関が認められた．また，各PAHと7種の重金属および強熱減量との相関関係を調査した結果，BaPは総PAH濃度が200 ng／g以上の群で，Cu, Cd, Pb, Fe, NiおよびZn等の重金属および強熱減量との間に有意の相関が認められた．

文　献

1）環境庁企画調整局企画調整課編：環境白書（昭和58年版），211，1983

2）東京都水質保全局水質保全部：昭和57年度公共用水域水質測定結果概要，1983

3）有賀孝成，押田裕子，栃本　博，中村　弘，松本昌雄：東京衛研年報，33，293，1982

4）Harrison, R. M., Perry, R. and Wellings, R. A.: *Water Res.*, 9, 331, 1975

5）森田昌敏，三村秀一：東京衛研年報，28—1，248，1977

6）日本薬学会編：衛生試験法・注解，401，1980

7）環境庁水質保全局水質管理課編：底質調査方法とその解説，9，1977

8）Obana, H., Hori, S. and Kashimoto, T.: *Bull. Envirom. Contam. Toxicol.*, 26, 613, 1981

9）富田　勲，斉藤慎一，中村清治，村山佳寿子：衛生化学，23，200，1977

10）Matsushima, H. and Hanya, T.: *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1633, 1979

11）森　康明，内藤昭治，松下秀鶴：衛生化学，26，294，1980

12）沼田　一：衛生化学，24，327，1978

13）松島　肇：醫学と生物學，103，267，1981

14）森　康明，長谷川一夫，節田節子，内藤昭治：神奈川県衛生研究所研究報告，11，45，1981

15）Matsushima, H.: *Jap. J. Limnol.*, 40, 74, 1979

16）松島　肇：醫学と生物學，103，273，1981

17）Kawakami, Y. and Nishimura, H.: *J. Oceanogr. Soc. Jpn.*, 32, 175, 1976

18）Matsushima, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1447, 1979

19）松下秀鶴，林　久緒，永田正信，大塚富士雄：大気汚染学会誌，15，45，1980

20）冨田絹子：大気汚染研究，10，742，1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 378-384, 1984

平井川の水質汚濁の時間的変動と生活排水の関係

栃本　博*, 押田裕子*, 有賀孝成*,
池島伸至*, 中村　弘*, 坂井千三*

The Relation between the Change with the Passage of Time in Water Qualities of Hirai River and Domestic Sewage

HIROSHI TOCHIMOTO*, HIROKO OSHIDA*, TAKANARI ARIGA*
NOBUYUKI IKEJIMA*, HIROSHI NAKAMURA* and SENZO SAKAI*

Keywords : 水質汚濁 water pollution, 時間的変動 a change with the passage of time, 生活排水 domestic sewage, 中小河川 town stream, 平井川 Hirai River, 流量 flux

緒　言

公共用水域における河川の水質汚濁は，近年工場排水の規制，下水道の整備等により全般的には改善傾向にあるものの，都市近郊の中小河川においては，むしろ汚濁が進行している現況にある[1-3]．これは，流域の人口増加にともなう未処理の生活雑排水およびし尿浄化槽放流水が主要因である．

中小河川の生活排水による汚濁については，従来主に生活排水が多量に流入する排水路に近い都市河川について，同一地点でも時刻によって水質が大きく変動することから1日における時間的変動の調査が行われてきた[4-10]．しかし，現在問題となっている比較的生活排水の流入量の少ないと考えられる都市近郊の中小河川においても，河川水質の時間的変動が予想される．

そこでわれわれは，水質汚濁防止対策の基礎資料とするため，流域の人口が毎年増加し，今後の汚濁の進行が予想され，東京都の水道原水の1つでもある多摩川支流平井川の一地点を取り上げて，1日における水質の時間的変動を調査し，生活排水が河川水質に及ぼす影響を検討した結果，若干の知見を得たので報告する．

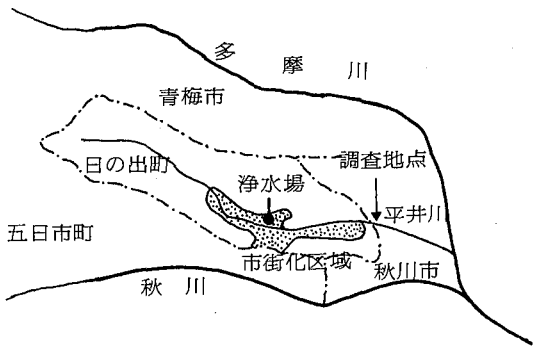


図1　平井川流域の概略

調査対象と方法

1．平井川流域および調査地点

図1に平井川流域および調査地点を示した．平井川は，東京都西部の日の出町西北部に源を発し，町を縦断し，秋川市の北部を経て多摩川に合流する長さ16.5 km，流域面積約38 km²の小河川である．上流は山間部であり，中流から下流にかけて北部は丘陵で，南部は台地となっている．今回は，調査地点として多摩川合流点から4.5 km上流で，日の出町全域が流域となる日の出橋を選んだ．

日の出町は，面積28.18 km²，人口約14,000人(昭和56年現在)で，人口の約90％が調査地点の上流5 km以内の山間部を除いた平井川流域に集中している．町には大きな工場はみられず，汚濁負荷の大部分を生活排水で占めている．表1に日の出町の生活排水の処理形態を人口比で示した．これによると平井川に直接流入すると予想される生活排水は，雑排水とし尿浄化槽処理水に分けられ，雑排水は未処理43％，浄化槽処理18％で，し尿処理水は，合併処理18％，単独処理4％である．これらの人口比と雑排水原単位42 g／人・日[11]，合併浄化槽処理水BOD 20 mg／l，300 l／人・日，し尿浄化槽処理水BOD 90 mg／l，60 l／人・日としてBOD排出負荷量の割合を概算すると，未処理の雑排水が93％，浄化槽処理水が7

* 東京都立衛生研究所多摩支所　190　東京都立川市柴崎町3－16－25
* Tama Branch Laboratory, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 16－25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan

表1．日の出町における排水処理形態

雑排水		人口比(%)
未処理河川放流		43
吸い込み		34
浄化槽処理	河川放流	18
	吸い込み	5
合　計		100

(1981年　日の出町衛生課資料)

し　尿		人口比(%)
汲み取り		70
合併処理	河川放流	18
	吸い込み	5
単独処理	河川放流	4
	吸い込み	3
合　計		100

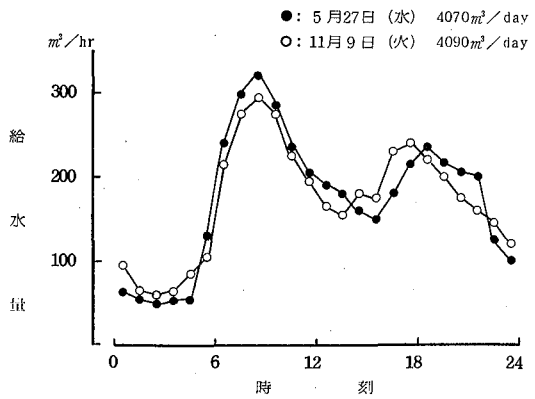


図2　日の出町の水道給水量の時間的変動
(1981年 日の出町水道課資料)

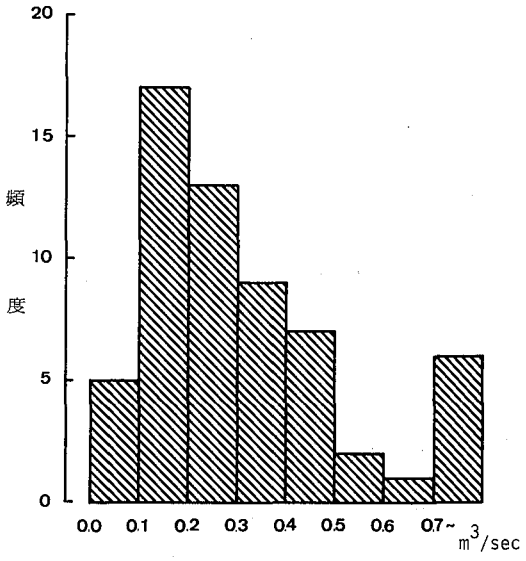


図3　日の出橋における流量の頻度分布
(1977～1981)

%を占める．

参考までに，図2に日の出町の1時間毎の水道給水量の変動を示した．1日の給水量および時間毎の給水量は，5月と11月ではほとんど違いはみられず，給水量の最も多くなる時間帯は7～11時で，16～20時にもピークがみられ，0～5時に最も少なくなり，1日の生活のパターンを示している．そして，それぞれの時間帯の生活用水は，比較的短時間に排水となり[12,13]，平井川に流入すると考えられる．

2．調査方法および検査項目

図3に，日の出橋における毎月1回の河川水質測定時（採水時刻午後0時）の過去5年間における河川流量の頻度分布を示した．これによると頻度の高い流量は，0.1～0.4 m³／secで，中央値は0.26 m³／secである．そこで今回は，比較的流量の多い時と少い時を選んで2回調査を行った．調査の日時は，第1回：昭和56年5月26日（火曜日，天気：前々日晴れ，前日夜雨のち晴れ，当日晴れ），第2回：同年12月8日（火曜日，天気：前々日，前日，当日晴れ），それぞれ午前6時から翌日の午前6時までで，採水は一時間毎に25回行った．

流量(電気流速計)，水温および溶存酸素(溶存酸素計)の測定は，採水地点で行ない，下記に示す項目は，すみやかに実験室に持ち帰り，常法により測定した．

濁度(比濁法)，PH値，COD(過マンガン酸カリウム・酸性直火5分法)，BOD(ウィンクラー・アジ化ナトリウム変法)，アンモニア性窒素（ネスラー法），亜硝酸性窒素（α—ナフチルアミン法），硝酸性窒素（サリチル酸ナトリウム法)，電気伝導率，塩素イオン(硝酸第二水銀法)，リン酸イオン(モリブデンブルー法)，ABS(メチレンブルー法)，大腸菌群，および一般細菌数．

結果および考察

1．第1回調査における水質の時間的変動

図4に第1回調査の水質の時間的変動を示した．まず流量は0.304～0.398 m³／secで，調査開始時刻よりやや

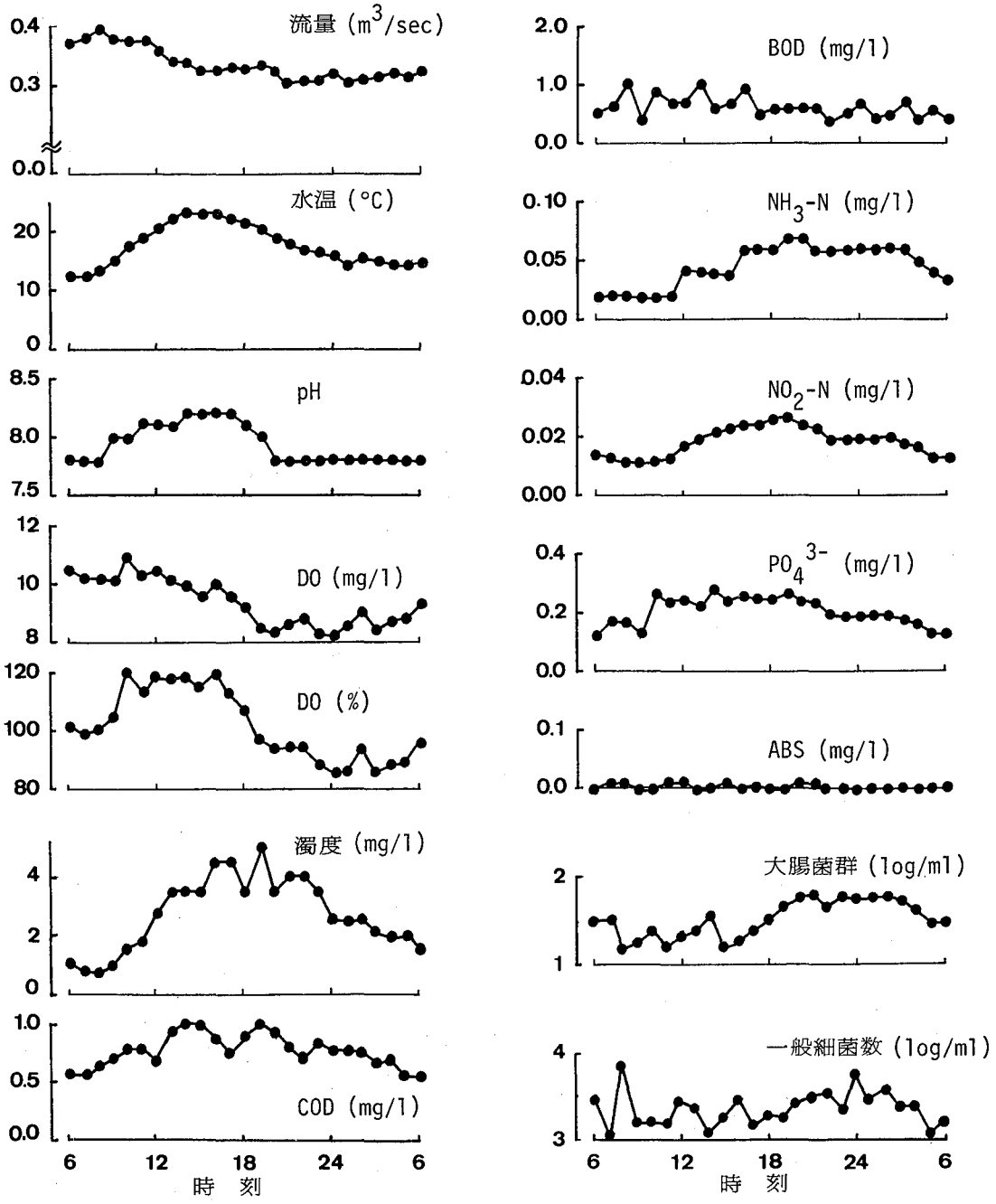


図4 第1回調査における水質の時間的変動

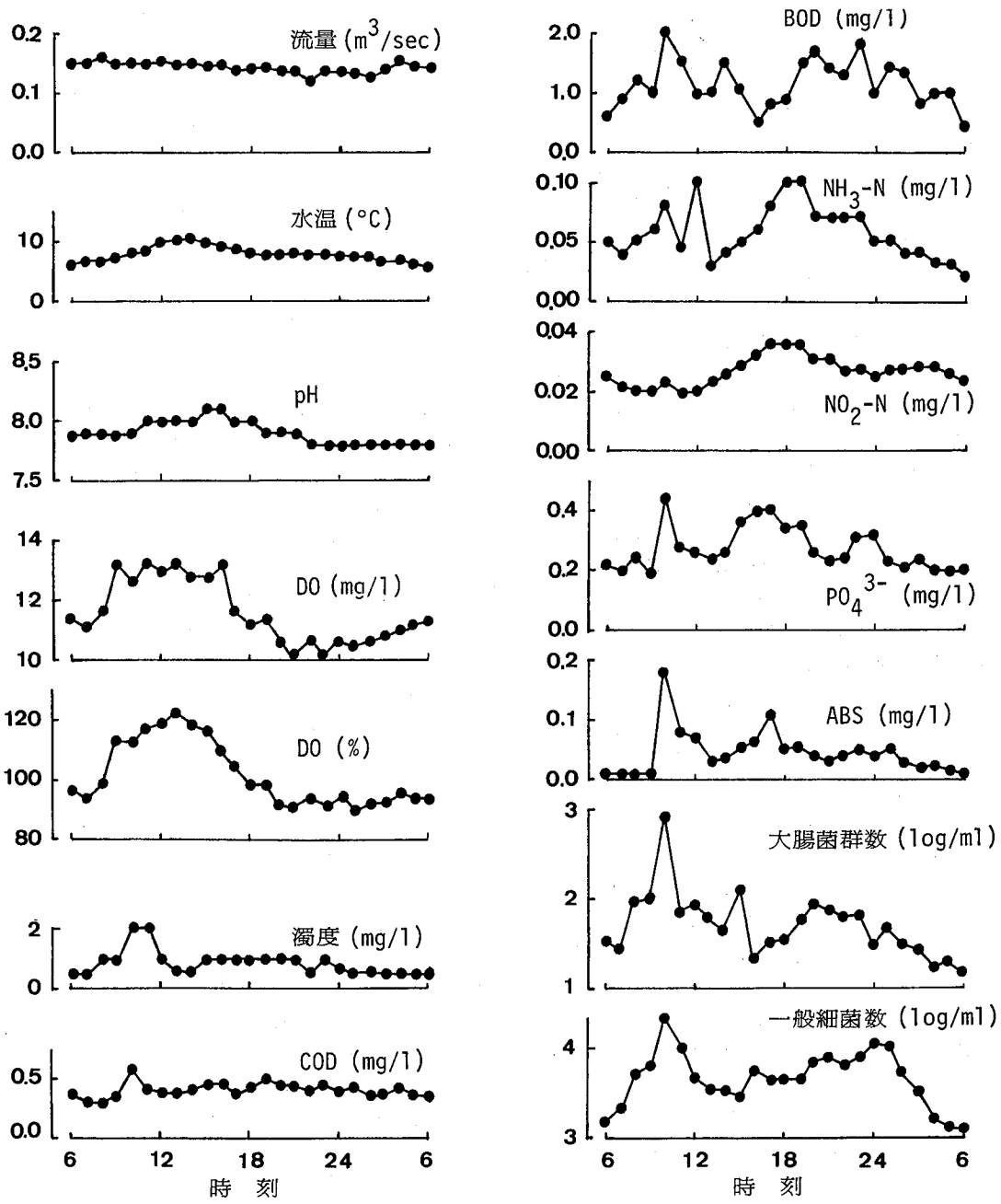


図5 第2回調査における水質の時間的変動

減少傾向がみられたが，図2の1日の水道給水量の変動から推定される生活排水による流量の変動はみられなかった．水温は1日にわたるゆるやかな変動がみられ，15時頃最高値を6時頃最低値を示した．PH値は日中高い傾向がみられ，15時頃最高値を示した．溶存酸素も日中高い傾向がみられ，これを酸素飽和百分率で表わすと変動が明確となり，日中は過飽和状態で，夜間は90％程度に減少した．これらの項目における日中の上昇は，藻類の光合成に起因していると考えられる．

生活排水の流入の影響を直接示す項目では，特に濁度が顕著な変動を示し，COD，アンモニア性窒素および亜硝酸性窒素も類似した変動がみられた．これらの項目は，10～12時頃から徐々に増加し始め夕刻頃最高値となり，その後，翌朝6時頃まで徐々に減少している．リン酸イオンは日中高い傾向が，大腸菌群，一般細菌数は夜間高い傾向が認められた．これらの項目にみられた変動は，ピークの形状が幅広く，長時間にわたっており，図3に示した水道給水量の最大ピークから数時間から十数時間遅れていることから，広範囲の市街化区域からの生活排水の影響が考えられた．しかし，BOD, ABSは濃度が低く，明らかな変動はみられなかった．図に示さなかったが硝酸性窒素，電気伝導率および塩素イオンも明らかな変動はみられず，それぞれ1.6～2.3 mg／l，223～247 μS／cm，7.1～8.4 mg／lであった．

2．第2回調査における水質の時間的変動

第2回調査の水質の時間的変動を図5に示した．流量は0.122～0.159 m³／secで，生活排水の流入による明らかな変動はみられなかった．この流量は図3の流量の頻度分布から，比較的少ない流量にあたる．水温は1日にわたるゆるやかな変動がみられ，14時頃最高値を6時頃最低値を示した．PH値も日中高い傾向が認められ，15時頃最高値を示した．溶存酸素も日中高く，酸素飽和百分率は日中過飽和状態で夜間90％程度であった．これらの項目の変動は，ほとんど第1回調査と同じであった．

生活排水の流入の影響を直接示す項目，すなわちBOD，アンモニア性窒素，亜硝酸性窒素，リン酸イオン，ABS，大腸菌群および一般細菌数はそれぞれ経時的に類似する顕著な変動を示した．これらの項目は亜硝酸性窒素を除いて，10時頃鋭いピークが一致してみられ最高値を示し，また，夕刻から夜間にも比較的ゆるやかなピークがみられ，その時間帯は，アンモニア性窒素，亜硝酸性窒素は19時頃，BOD，大腸菌群は20時頃，一般細菌数は24時頃で，その後各項目とも翌朝の5時頃まで徐々に減少する傾向がみられた．しかし，濁度およびCODは10時頃小さなピークがみられたのみであった．10時頃これらの項目にみられた変動は，図2の水道給水量のピークの時間帯とほとんど一致していることから，調査地点に比較的近い地域の生活排水の影響が考えられた．また，夕刻から夜間にみられた変動は，ピークの巾が広く，長時間にわたっており，水道給水量の最大のピークより数時間から十数時間遅れているので広範囲の市街化区域からの生活排水の影響が推定された．亜硝酸性窒素の場合は10時頃にピークはみられなかったが，これは生活排水中における亜硝酸性窒素の濃度が低く，アンモニア性窒素が徐々に亜硝酸性窒素に変化するためと考える．硝酸性窒素，電気伝導率および塩素イオンは，明らかな変動はみられず，それぞれ2.3～2.8 mg／l，229～241 μS／cm，7.7～9.4 mg／lであった．

3．第1回および2回の調査結果の比較

今回の調査時の流量は2回とも生活排水によると思われる変動がほとんどみられなかった．しかし，多摩川支流の野川[5,11]，南浅川[6]等の都市中小河川の1日の流量の場合は，顕著な変動が報告され，最低流量と最高流量の比が，2倍近くあるいはそれ以上で，生活排水の流入量の多いことが示されている．そこで参考のために今回の調査時における1日の河川流量に対する河川へ直接流入が予想される生活排水の割合を，日の出町における排水処理形態別の人口と未処理の雑排水（240 l／人・日），合併浄化槽処理水（300 l／人・日），し尿浄化槽処理水（60 l／人・日）から概算すると，第1回の調査時7.7％および第2回が18％であった．

一方，PH値，溶存酸素および酸素飽和百分率は，第1回と2回とも同様な変動を示しているが，日照時間の関係から第2回の方が，変動する時間帯がせまい．汚濁の進んでいる都市中小河川におけるこれらの項目の変動についての報告によると，日中の上昇は同様にみられるが，夜間溶存酸素（酸素飽和百分率）の大幅な減少があり，[5,6]酸素飽和百分率は20％くらいまで低下している．今回の調査結果では夜間90％程度に低下するのみで，酸素の減少率は比較的少ないことから，平井川はそれほど汚濁が進んでいないと考えられる．

生活排水の影響を直接示す項目のうち，濁度およびCODは，第1回の調査で広範囲の生活排水による顕著な変動がみられたのに対して，第2回は調査地点に近い地域の生活排水によると推定される小さなピークがみられたのみであった．BODおよびABSは第2回の調査のみ明確な変動がみられ，広範囲および近い地域の生活排水の影響が認められた．アンモニア性窒素，亜硝酸性窒素，

リン酸イオン，大腸菌群および一般細菌数は，第1回に比べ第2回の方が顕著な変動が認められ，第1回にみられなかった近い地域の生活排水の影響もみられた．

前述のごとく第1回と2回の調査結果が異なった理由は種々考えられるが，流量の違いが主要因と推定される[14]．すなわち，第1回の調査で変動が顕著であった濁度とCODは懸濁物質と関係し[11]，流量がある程度以上ある場合，河川に流入した生活排水中の懸濁物質は下流に流される．しかし，流量が少なくなると沈澱しやすくなり，濃度が低く変動もわずかしかみられなかったと考えられる．

一方，第2回の方が変動が顕著であったBOD，アンモニア性窒素，亜硝酸性窒素，リン酸イオンおよびABSは，いずれも溶解性であるため流量が少ない場合に濃度が高く変動が顕著で，流量が多くなると希釈，拡散作用も大きくなり，変動がそれほどみられなかったものと思われる．

大腸菌群，一般細菌数も溶解性物質と似た変動を示したが，その理由として，これらは比較的浮遊しやすい状態にあることが考えられる．

生活排水の流入量の多い都市中小河川においても水質の変動は，流量に大きく影響されることが予測される．通常，都市中小河川では比較的早く降雨時の流量から無降雨時の流量にもどり，無降雨時には流量のほとんどが生活排水で占められるため，通常の流量の範囲での水質変動の相違はそれほどみられないと考えられる．今回の調査結果のように通常の流量の範囲において認められた水質の時間的変動の相違は，生活排水の流入量が比較的少ない都市近郊の中小河川の水質汚濁の実態を示すものと考えられる．したがって，このような都市近郊の中小河川の水質汚濁を的確には握するためには，流量，採水地点および時間等を十分考慮した水質調査を行う必要がある．

結　論

都市近郊の中小河川の水質汚濁を検討するため，多摩川支流平井川の一地点を取り上げて，1日における河川水質の時間的変動の調査を1981年5月と12月に行い，次の成績を得た．

1．生活排水の流入量が少なく，それほど汚濁が進んでいないと考えられる河川でも，多くの項目に時間的変動がみられ，広範囲の生活排水の影響を受けていることが判明した．

2．河川の水質の時間的変動は，流量によって異なり，比較的流量の多い場合には，不溶性の汚濁物質に関連する濁度，CODの変動が顕著にみられ，流量の少ない場合には，BOD，アンモニア性窒素，ABS等の溶解性汚濁物質および大腸菌群，一般細菌数の変動が認められた．

謝辞　本調査を実施するにあたり，採水と貴重な資料を提供下さった日の出町衛生課の方々に深謝いたします．
（本研究の概要は，第71回東京都衛生局学会1983年10月で発表した．）

文　献

1) 山村勝美：水質汚濁研究，7，77，1984
2) 環境庁：環境白書，211，1983，大蔵省印刷局，東京
3) 須藤隆一：用水と廃水，25，365，1983
4) 田中良春，小倉紀雄：用水と廃水，20，1168，1978
5) 曽田京三，安藤晴夫，若林明子他：東京都公害研年報，127，1981
6) 小倉紀雄：陸水誌，41（3），138，1980
7) 小林節子，鎗田　巧，小倉久子他：公害と対策，14，46，1979
8) 小林節子，鎗田　巧，小倉久子他：公害と対策，14，203，1979
9) 小池順一，山田健二郎，林　幸子他：第17回水質汚濁学会講演集，163，1983
10) 古賀雅隆，浦野紘平，斉藤晶明：第17回水質汚濁学会講演集，173，1983
11) 市川　新：都市河川の環境科学，1980，培風館，東京
12) 長沢幹雄，寺口　瑋：水処理技術，17，427，1976
13) 平岡正勝，村上忠弘，山本　功：水処理技術，16，851，1975
14) 和田安彦：水質汚濁研究，4，9，1981

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.*, 35, 385-386, 1984

赤血球膜 ATPase へのキノホルムの作用

長井 二三子, 樺島 順一郎, 中川 敦子, 牛山 慶子,
加納 いつ, 中尾 順子

Effects of Chinoform on ATPase from Red Blood Cell Membrane

FUMIKO NAGAI*, JUNICHIRO KABASHIMA*, ATSUKO NAKAGAWA*,
KEIKO USHIYAMA*, ITSU KANO* and TOSHIKO NAKAO*

Keywords: キノホルム chinoform, 赤血球膜 red blood cell membrane, カルモジュリン Calmodulin, Ca^{2+}-ATPase, Na,K-ATPase

緒　言

キノホルムは腸疾患の治療薬として大量に使用されていたが，スモン(亜急性脊髄神経末梢神経病)の原因物質であることが判明し，昭和45年製造販売停止措置がとられ，現在では使用されていない．しかしスモン発症の分子的機序についてはいまだ解明されていない．そこで赤血球膜を用いて細胞膜へのキノホルムの作用について検討することを試みた．赤血球膜に存在する Ca^{2+}-ATPase は Ca^{2+} ポンプとして細胞内の Ca^{2+} レベルおよびATPレベルを調節するが，また細胞内に広く存在する Ca^{2+}-調節たんぱく質のカルモジュリンによって活性化されることも知られている[1,2]．この Ca^{2+}-ATPase に対するキノホルムの作用について検討した．また赤血球の Na, K-ATPase についても調べたので併せて報告する．

方　法

キノホルムは順天堂大学眼科学教室より供与されたものを用いた．人赤血球は日赤血液センターより供与された採血後3～14日の Packed Cell に調製したものを使用した．

Ca^{2+}-ATPase測定に用いた赤血球膜は Jarret らの方法[3]に従い，0.9% NaCl で洗浄した赤血球を20倍量の1mM EDTA, 28mM TrisHCl (PH7.4) を用いて溶血させる方法で調製した．Na, K-ATPase 測定に用いた赤血球膜標品は20倍量の10mM Tris HCl (PH7.4) を用いて溶血させて調製した[4]．

Ca^{2+}-ATPaseの測定　3mM ATP, 5mM $MgCl_2$, 140mM NaCl, 14mM KCl, 0.1mM ウアバイン, 0.5 mM EDTA, 0.8mM $CaCl_2$, 30mMイミダゾールHCl (PH7.4) にたんぱく質として100～200 μg の膜標品，2～5 μg のカルモジュリンおよびジメチルスルフォキサイド (DMSO) に溶解したキノホルムを25 μl 加えて合わせて0.5 ml の容量にし，37°C, 45分間反応した．40%トリクロロ酢酸0.1 ml を加えて反応を停止させたあと，3,000rpm10分間遠心し，上清について Fiske and Subbarow法[5]により遊離した無機リン酸を測定した．なお除たんぱく操作の際にキノホルムはほぼ無機リン酸測定を妨害しない程度に除去できる．また DMSO は酵素反応液中に5%含まれるが，この濃度では無機リン酸の測定には影響しなかった．

Na, K-ATPase 活性の測定は中尾らの方法[6]に従った．

たんぱく質の測定は Lowry 法[7]により行った．

結　果

図1に Ca^{2+}-ATPaseに対するキノホルムの作用を示した．

カルモジュリン無添加の反応系では 10^{-4}M より低濃度のキノホルムは Ca^{2+}-ATPase活性にまったく影響をせず，10^{-3}Mのキノホルムでは約60%に，10^{-2}Mでは約20%にまで活性が低下した．

著者らの用いた赤血球膜 Ca^{2+}-ATPase 標品はカルモジュリンを添加するとカルモジュリン無添加に対してその活性は130～160%にまで上昇するが，カルモジュリン添加反応液中でのキノホルムはカリモジュリン無添加の場合とは異なり，10^{-7}～5×10^{-6}M の低濃度域において弱い阻害作用を示した．また 10^{-5}～10^{-4}M においては対照に比べて活性化の傾向がみられた．2×10^{-4}M 以上

* 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

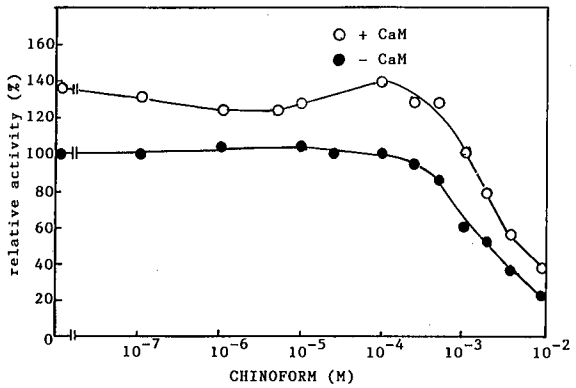


図1．赤血球膜Ca-ATPaseへのキノホルムの作用
測定法は本文中に示した．

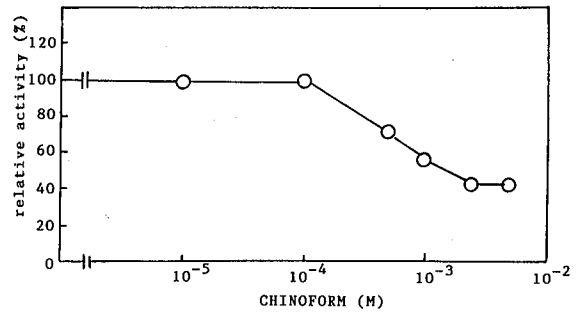


図2．赤血球膜 Na, K-ATPaseへのキノホルムの作用
ウアバイン(0.1mM)感受性 ATPase を Na, K-ATPase とした．

ではカルモジュリン無添加の場合とほぼ同じ傾向の阻害作用を示した．0.8mM $CaCl_2$ を除去した反応系でキノホルムの作用を調べたが，この条件下ではATPase活性が低くキノホルムの影響は顕著には見られなかった．

Na, K-ATPaseへのキノホルムの作用を図2に示した．10^{-4}M以下のキノホルムは Na, K-ATPase 活性にほとんど影響を示さず，10^{-3}Mのキノホルムで約50％に活性が低下した．さらに2.5×10^{-3}Mで約40％にまで低下したが，これ以上キノホルム濃度を増しても活性の阻害は増加しなかった．

考　察

カルモジュリンを加えない条件での赤血球膜 Ca^{2+}-ATPase活性およびNa, K-ATPase活性に対するキノホルムの作用は比較的高濃度でのみ現われ，特異的な作用と考えることはできなかった．しかしカルモジュリンを添加した場合には Ca^{2+}-ATPaseは10^{-7}～5×10^{-6}Mのキノホルムで阻害され，10^{-5}M～10^{-4}Mで活性化された．

赤血球膜の Ca^{2+}-ATPaseは Ca^{2+} ポンプとして細胞内の Ca^{2+} レベルの調節を行っているが，カルモジュリンとの親和性が高く，その解離恒数は3×10^{-9}M程度[8]であり，生理的条件下でカリモジュリンは Ca^{2+} ポンプの調節にかかわっていると考えられている．この Ca^{2+}-ATPaseに対する低濃度のキノホルムの阻害作用は，Ca^{2+}-カルモジュリンへの特異的な作用とも考えられる．しかしキノホルムは非常に水に難溶性であるため，水溶液中での酵素反応系においてその有効濃度を正確に出すことは困難であると考えられる．今後は測定方法などをさらに改良して作用機序の解明を試みる予定である．

まとめ

1．キノホルムは赤血球膜 Ca^{2+}-ATPaseのカルモジュリンによって活性化された部分を比較的低濃度（10^{-7}～5×10^{-6}M）で阻害した．

2．Na, K-ATPaseに対してはキノホルムは特異的と考えられる作用は見いだせなかった．

文　献

1) Gopinath, R. M. and Vicenzi, F. F. : *Biochem. Biophis. Res. Commn.* 77, 1203, 1977
2) Jarret, H. W. and Penniston, J. T. : *Biochem. Biophis Res. Commn.*77, 1210, 1977
3) Jarret, H. W. and Penniston, J. T. : *Biochim. Biophys. Acta* 448, 314, 1976
4) Jinbu, Y., Sato. S., Nakao. M., and Tsukita. S. : *Exp. Cell Res.* 151, 160, 1984
5) Fiske, C. H. and SubbaRow, Y. : *J. Biol. Chem.* 66, 375, 1925
6) Nakao, T., Nakao, M., Mizuno, N., Komatsu, Y. and Fujita M. : *J. Biochem.*,73, 609, 1973
7) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Rendall, B.J, : *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
8) Raess, B. V. and Vincenzi, F. F. : *Mol. Pharmacol.* 18, 253, 1980

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 387-389, 1984

キノホルムおよびクロロキンのアデニレートシクラーゼに対する影響

中川敦子*, 長井二三子*, 牛山慶子*
樺島順一郎*, 加納いつ*, 中尾順子*

Effects of Chinoform and Chloroquine on Adenylate Cyclase

ATSUKO NAKAGAWA*, FUMIKO NAGAI*, KEIKO USHIYAMA*
JUNICHIRO KABASHIMA*, ITSU KANO*
and TOSHIKO NAKAO*

Keywords: キノホルム chinoform, クロロキン chloroquine, カルモジュリン calmodulin, アデニレートシクラーゼ adenylate cyclase

緒　言

キノホルムおよびクロロキンはそれぞれ整腸剤，抗マラリア剤として使用されてきたが，長期間大量投与することによりスモン[1]やクロロキン網膜症[2]をひき起した．その発症機作は明らかではないがクロロキンについては赤血球膜の形態変化を起こし，Ca-Mg ATP ase などカルモジュリン(CaM)が関与する反応を阻害する[3]ことが報告されている．また両物質とも抗原虫作用・神経系に作用を示し構造的にもキノリン環を有する点で共通している．

アデニレートシクラーゼ(AC)は細胞内メッセンジャーである c-AMP 量の調節および刺激伝達作用に関与する．また Ca-Mg ATP ase と同じく CaM 依存性の活性化反応を示すことから AC に対するキノホルムおよびクロロキンの作用が症状発現の機構に関係する可能性を考慮し両物質の AC におよぼす影響を観察した．

実験方法

試薬：キノホルムは順天堂大学医学部眼科学教室より提供されたものを使用した．クロロキンはシグマ社のクロロキンりん酸塩を Bio-Rad AG1-X8 でクロロキンアセテートにして使用した．クロルプロマジン塩酸塩，CaM, c-AMP はシグマ社，ATP はシグマ社の Grade I, [α-^{32}P]-ATP はラジオケミカルセンター製を使用した．オクタエチレングリコールドデシルエーテル($C_{12}E_8$)は日光ケミカル社，コール酸は日水製薬のものを精製して使用した．

AC の調製：wister 系雄ラットの大脳より 1 % $C_{12}E_8$ で可溶化したものを $C_{12}E_8$－AC 標品[4]とした．膜結合 AC 標品，コール酸可溶化 AC 標品は既報の方法[5,6]により，睾丸の可溶性 AC 標品は Neer 等の方法[7]に従って調製した．

AC 活性の測定：AC 活性の測定は Salomon 等の方法[8]に従った．タンパク定量は BSA を標準として Lowry 法[9]および Bradford 法[10]で行った．

実験結果および考察

CaM の作用には Ca^{++} の存在が必須である．1mM EGTA の添加により酵素に混在する Ca^{++} を除去した時の活性を CaM 非感受性 AC 活性，EGTA 無添加時の活性から CaM 非感受性活性を除いた活性を CaM 感受性 AC 活性と考えた．AC 標品中には CaM, Ca^{++} が種々の割合で混在すると思われるので，各種 AC 標品における 1mM EGTA 添加時の活性を測定し表 1 に示した．CaM 非感受性 AC が最も少ない $C_{12}E_8$-AC 標品を以後の実験に使用した．なおこの酵素の比活性は 8 nmole c-AMP/mg prot/10 分であった．

キノホルムによる AC 活性への影響を図 1 に示した．キノホルムは水難溶性のためジメチルスルフオキサイド(DMSO)に溶かして用い，反応溶液中の DMSO 濃度

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

表1 各種AC標品に対するEGTAの影響

酵素標品	EGTA添加時の活性 (%)
膜結合AC	174
$C_{12}E_8$-AC	17.0
睾丸の可溶性AC	37.7
コール酸可溶化AC	76.1

各酵素標品のEGTA無添加時の活性に対する1 mM EGTA添加時の活性を%を表わした.

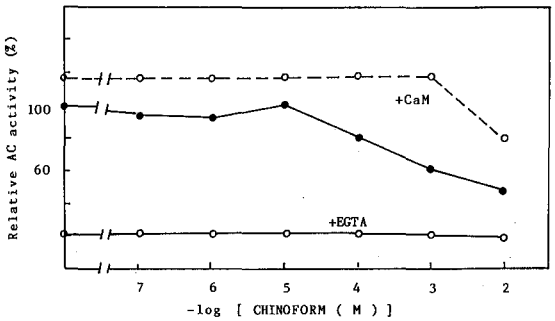


図1 キノホルムによるAC活性の阻害
●—●はCaM無添加時, ○—○は反応液中に1 mM EGTAを添加した時の活性, ○···○は反応液中に410 unit CaMを添加した時の活性を表わす.

は10%とした. この条件でAC活性は約150%に増強されるが, EGTAおよびCaMの作用には影響がみられなかった. キノホルムによるCaM感受性ACの阻害は10^{-4}M以上の濃度でみられ, 半阻害濃度は10^{-3}Mであった. 一方, CaM非感受性ACは殆んど阻害されなかった. また410 unitのCaMの添加によりキノホルムの阻害は軽減した.

図2にクロロキンのAC活性におよぼす影響を示した. キノホルムと同様の傾向を示し, CaM感受性ACに対するクロロキンの半阻害濃度は10^{-3}Mで, CaM非感受性ACに対しては6×10^{-3}Mでも25%しか阻害されなかった.

クロルプロマジンは, CaM感受性ACにおけるCaM作用の拮抗阻害剤[1]である. 図3にクロルプロマジンによるAC活性への影響を示した. キノホルム・クロロキンと同様に10^{-3}Mクロルプロマジンの添加によりCa^{++}感受性ACだけが阻害された. クロロキンがCaM依存性

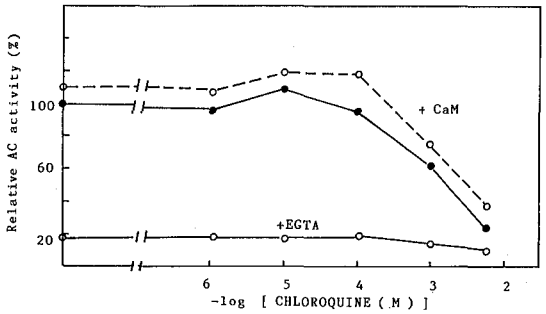


図2 クロロキンによるAC活性の阻害
●—●はCaM無添加時, ○—○は反応液中に1 mM EGTAを添加した時の活性, ○···○は反応液中に410 unit CaMを添加した時の活性を表わす.

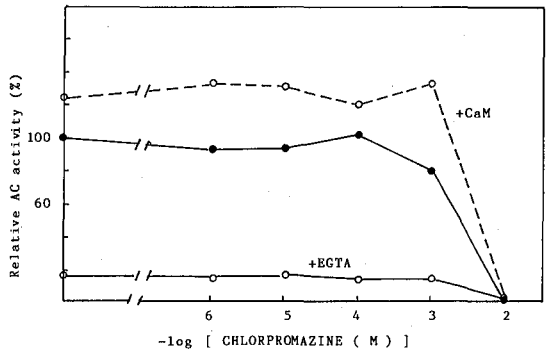


図3 クロルプロマジンによるAC活性の阻害
●—●はCaM無添加時, ○—○は反応液中に1 mM EGTAを添加した時の活性, ○···○は反応液中に410 unit CaMを添加した時の活性を表わす.

Ca-Mg ATP aseの拮抗阻害剤[2]であること, キノホルムおよびクロロキンがクロルプロマジンと同程度の阻害反応を示したことから, 両物質はCaM感受性ACを拮抗に近い形で阻害している可能性が考えられる. しかし両物質によるCaM感受性ACの半阻害濃度は1 mMと高く, ACに特異的に作用し症状発現の原因となるとは考えにくい. 本実験では酵素標品中のCa^{++}を除去した活性をCaM感受性活性とみなしたがCa^{++}の作用全てがCaMを介しているとは限らない. 更にCaMを除去した酵素標品で試みればよりはっきりした結果が得られると思われる.

文 献

1) 高須俊明：薬物と感覚障害, 中島章, 秋吉正豊, 347,

1980,ソフトサイエンス社
2) 中島章：薬物と感覚障害，中島章，秋吉正豊，424, 1980，ソフトサイエンス社
3) 長井二三子，樺島順一郎，中川敦子，牛山慶子，加納いつ，中尾順子：東京衛研年報，　，　，1984
4) 中川敦子，中尾順子：東京衛研年報，30-2, 136, 1979
5) 中川敦子，中尾順子：東京衛研年報，29-2, 151, 1978
6) 中川敦子，中尾順子：東京衛研年報，34, 415, 1983
7) Neer, E.J. : *J. Biol. Chem.*, **253**, 5808, 1978
8) Salomon, Y., Londos, C. and Rodbell, M. : *Anal. Biophys.*, **58**, 541, 1974
9) Lowry, O.H., Rosebrough, N.Y., Farr, A.L. and Randoll B.J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951
10) Bradford, M.M. : *Anal. Biochem.*, **72**, 248, 1976
11) Brostrom, M.A., Brostrom, C.O. and Wolff, D.J. : *Arch. Biochem. Biophys.* **191**, 341, 1978
12) 長井二三子，中尾順子：未発表

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 390-391, 1984

キノホルムによるフォスフォジエステラーゼの阻害

牛山慶子*, 樺島順一郎*, 長井二三子*
中山敦子*, 加納いつ*, 中尾順子*

Inhibition of phosphodiesterase Activity by Chinoform

KEIKO USHIYAMA*, JUNICHIRO KABASHIMA*, FUMIKO NAGAI*
ATSUKO NAKAGAWA*, ITSU KANO* and TOSHIKO NAKAO*

Keywords：キノホルム chinoform, クロロキン chloroquine, フォスフォジエステラーゼ phosphodiesterase

キノホルムは，スモンの原因物質といわれているが，どのようなメカニズムで発症するか，また体内でどのように代謝を受けるかは，まだ明らかではない．キノホルムと類似構造の抗菌剤クロロキンは，網膜症が問題になり，赤血球膜の Na,K-ATPase, Ca,Mg-ATPase の活性におよぼす影響が報告されている[1]．一方，フォスフォジエステラーゼは，cAMP を 5′-AMP にまで分解する酵素であり，cAMP はホルモン作用のメッセンジャーであるといわれている．フォスフォジエステラーゼに影響を与える物質は，cAMP を介してホルモン作用に影響し，生理機能の変化をもたらすものと推定される．そこでこの酵素活性に対するキノホルム，クロロキンの影響を調べた．また，この酵素はカルモデュリン・Ca^{2+}存在下で，活性化されるので[2]，この活性化に対する両薬物の影響も検討した．

酵素標品

フォスフォジエステラーゼは，牛の脳より調製した．24g の牛の脳を再蒸留水で6倍のホモジネートとし，二重のガーゼでろ過後，10,000 r.p.m., 30分，4℃で遠心後，上清を取り，酢酸で p.H.5.9 に調製した[3]．たんぱく濃度は Lowry の方法[4]で測定し，2.75 mg/ml であった．

5′-ヌクレオチダーゼは，Sigma社の Crotal us atrox venom 由来のものを用いた．

試　料

キノホルムは，順天堂大学医学部眼科学教室より提供されたものを用いた．水に不溶性のため DMSO に溶解した．

クロロキンは，Sigma 社のリン酸クロロキンを Bio-rad 社の AG1-X8 を用いて酢酸塩にして使用した．

サイクリック AMP(cAMP)は，Sigma 社の Adenosine 3′・5′-cyclic monophosphate を用いた。

カルモデュリンは，Sigma 社の Bovine brain 由来，3′・5′-cyclic nucleotide phosphodiesterase activator を用いた．

酵素活性測定方法

Sharma の方法[5]に従い2段酵素反応で行なった．反応混液は，Tris-HCl (pH7.5) 40mM, $MgCl_2$ 5mM,イミダゾール4mM, $CaCl_2$ 80μM, 2－メルカプトエタノール 1mM, フォスフォジエステラーゼ 20 μl を入れ全量 0.5 ml とし，cAMP 400 μmoles を加えて反応を開始し，30℃，20分間インキュベートした．これを 110℃，3分間加熱し，5′—ヌクレオチダーゼ 2.5 units を加え，30℃，30分間インキュベートした．40％ TCA 100 μl を加え反応を停止し，3000 r.p.m.,15分間遠心分離し，上清 0.4 ml をとり，遊離したりん酸を Fiske-Subbarow の方法[6]で測定した．キノホルムのコントロールには，同量 DMSO を加えた．

カルモデュリンでの活性化に対する阻害を調べるために，反応混液にカルモデュリンを加えて活性を測定したが，活性化はきわめて少なかった．これは，測定に用いた酵素標品に微量のカルモデュリンが含まれているためであると考えられる．従って，カルモデュリンの作用発現には，Ca イオンの存在が必須であるので，GEDTA で Ca^{2+}をマスクし，カルモデュリン無添加の対照系とした．

* 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

結果と考察

GEDTA で Ca^{2+} をキレートした，カルモデュリンの働かない系では，キノホルム，クロロキンともに阻害を示さなかった．（図1，図2）カルモデュリン-Ca^{2+} で活性化された系では，キノホルムは，10^{-5}M で阻害がはじまり，半阻害濃度は，5×10^{-5}M 付近であった．クロロキンの阻害は，5×10^{-4}M まで認められず，6×10^{-3}M でも，70%の活性があった．なお，薬物を添加しないときの活性 0.180 μmol/mg protein/min を 100 %とした．クロロキンは，フォスフォジエステラーゼ活性にあまり影響をおよぼさないと思われた．フォスフォジエステラーゼのカルモデュリンによる活性化を阻害する代表的薬物であるクロルプロマジンの半阻害濃度は，3.6×10^{-5}M であり[7]，キノホルムの半阻害濃度はこれに近い．従って，キノホルムは，カルモデュリン・Ca^{2+} の作用を抑制し，カルモデュリン・Ca^{2+} の作用を介した細胞膜機能にも影響すると考えられる．

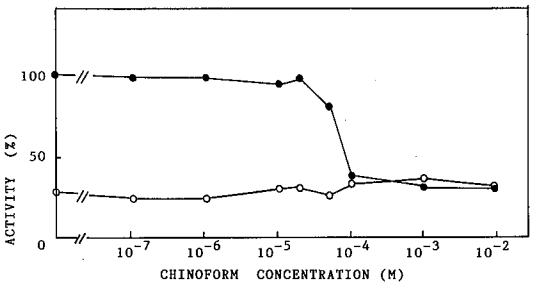


図1．キノホルムによるフォスフォジエステラーゼ活性の阻害　—●—：−GEDTA　—○—：+GEDTA

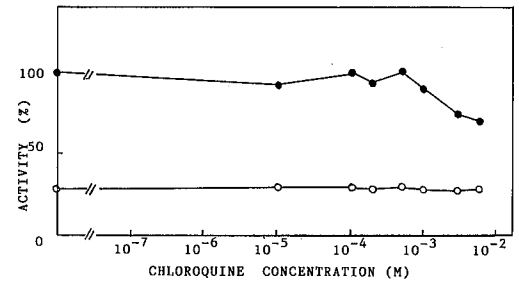


図2．クロロキンによるフォスフォジエステラーゼ活性の阻害　—●—：−GEDTA　—○—：+GEDTA

文　献

1) 村山季美枝，進藤典子，中島　章：昭和53年度　厚生省委託研究「医薬品の視覚障害に関する研究」P. 9 1979
2) Sharma, R.K., Wang, T.H., Wirch, E. and Wang, J.H. : *J. Biol. Chem.*, **225**, 5916, 1980
3) Cheung, W.Y. and Lin, Y.M. : *Methods Enzymol.* **38**, 223, 1974
4) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Rendall, B.J. : *J. Biol. Chem.* **193**, 265, 1951
5) Sharma, R.K. and Wang, J.H. : *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **10**, 187
6) Fiske, C.H. and Subbarow, Y. : *J. Biol. Chem* **66**, 375, 1925
7) Nelson, G.A. Andrews, M.L. and Karnovsky, M. J. : *J. Cell Biol.* **96**, 730, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 392-395, 1984

フェニルセファロースとオクチルセファロースを用いたアフィニティクロマトグラフィによるカルモジュリンの精製

樺島順一郎*, 長井二三子*, 牛山慶子*, 中川敦子*
加納いつ*, 中尾順子*

Purification of Calmodulin by Phenyl-Sepharose and Octyl-Sepharose Affinity Chromatograph

JUNICHIRO KABASHIMA*, FUMIKO NAGAI*, KEIKO USHIYAMA*
ASTUKO NAKAGAWA*, ITSU KANO* and TOSHIKO NAKAO*

Keywords：カルモジュリン calmodulin, 赤血球膜 erythrocyte membrane, Ca-ATPase, adenylate cyclase

緒　言

生体は細胞内外の Ca^{2+} 濃度の落差を重要な情報の一つとし，Ca^{2+} は生命現象の調節の多くに関与している．カルモジュリンは，Ca^{2+} 調節に重要な役割[1]をはたし，酵素活性の調節，タンパクのリン酸化，分泌等に深く関っている．このため種々の薬物，食品添加物，環境汚染物質等の生体への影響を検討する場合には，カルモジュリンの関与に無視できないものがある．我々は，下痢症の治療薬として大量に使用されたが，スモンの原因物質であるため，現在は製造販売が停止されているキノホルムの作用機序解明のため，Ca-ATPase や adenylate cyclase に対するキノホルムの作用と Ca^{2+} 調節タンパクであるカルモジュリンの相関等について検討し，長井，中川らが報告[2,3]している．カルモジュリンの精製法については，Gopalakrishna[4] らによってアフィニティークロマトグラフィーによる簡便な方法が報告されている．我々は，この方法に従って，オクチルセファロースとフェニルセファロースの両者を用いてカルモジュリンの精製を行った．精製したカルモジュリンについて，SDS ポリアクリルアミド電気泳動と赤血球膜の Ca-ATPase 活性に対する影響を比較検討し，両者に若干の差異が認められたので報告する．

実験材料および方法

牛脳は芝浦の食肉業者より購入し，フェニルセファロースとオクチルセファロースはファルマシア社より購入した．赤血球は日赤血液センターより供与された．

1）カルモジュリンの精製　Buffer A；1mM EDTA, 1mM 2-メルカプトエタノール，0.5 mM フェニルスルフォニルフルオライド，50 mM Tris-HCl（pH 7.5）Buffer①；1mM 2-メルカプトエタノール，0.1 mM $CaCl_2$，50 mM Tris-HCl(pH 7.5)，Buffer②；Buffer①に0.5M NaClを加えた，Buffer③；1 mM 2-メルカプトエタノール，1 mM EGTA，50 mM Tris-HCl（pH 7.5）．精製は Gopalakrishna らの方法[4]に準じて行った．−80°に凍結保存した牛脳 300 g に Buffer A 600 m*l* を加えワーリングブレンダーでホモジナイズし，15000×g 30分の遠心を行い，上澄を得，沈殿はさらに Buffer A 600 m*l* を加え，ホモジナイズし，同様の抽出操作を行った．得られた上澄は，ガーゼでろ過し，5 mM $CaCl_2$ 溶液としたものを全量，オクチルセファロース又はフェニルセファロースのカラムに吸着させ，Buffer①と Buffer②で順次洗い，Buffer③で溶出した．280 nm での吸収がある単一のピークをカルモジュリンとして回収した．タンパクの測定は，Lowry の方法[5]と Bradford の方法[6]によった．

2）赤血球膜の調製　Ca-ATPase の測定に用いた赤血球膜は Jarret らの方法[7]によって調製した．血液を packed cell にし，5−10 倍量の 0.9 % NaCl で 3 回洗浄し，20倍量の 1 mM EDTA，10 mM Tris-HCl(pH 7.4)で溶血させ，同じ Buffer で 3 回洗浄し，沈澱を

* 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

10 mM Tris-HCl に懸濁したものを使用した．タンパクの測定は Lowry 法[5]によった．

3） Ca-ATPase活性の測定 3mM ATP, 5mM $MgCl_2$, 140 mM NaCl, 14 mM KCl, 0.1 mM ウアバイン, 0.5 mM EDTA にカルモジュリン（0－1000ng）と赤血球膜 10 μl（50—70 μg）を加えて 0.5 mlの容量とし，45分間反応させた．反応の停止には40%トリクロロ酢酸 0.1 ml を加えた．停止後 3000 rpm 10 分間の遠心を行ない，上澄について Fiske-SubbaRow の方法[8]によって遊離リン酸を定量した．

4） SDS ポリアクリルアミド電気泳動は Laemmli の方法[9]に従って行ない，15 %のゲルを用いた．

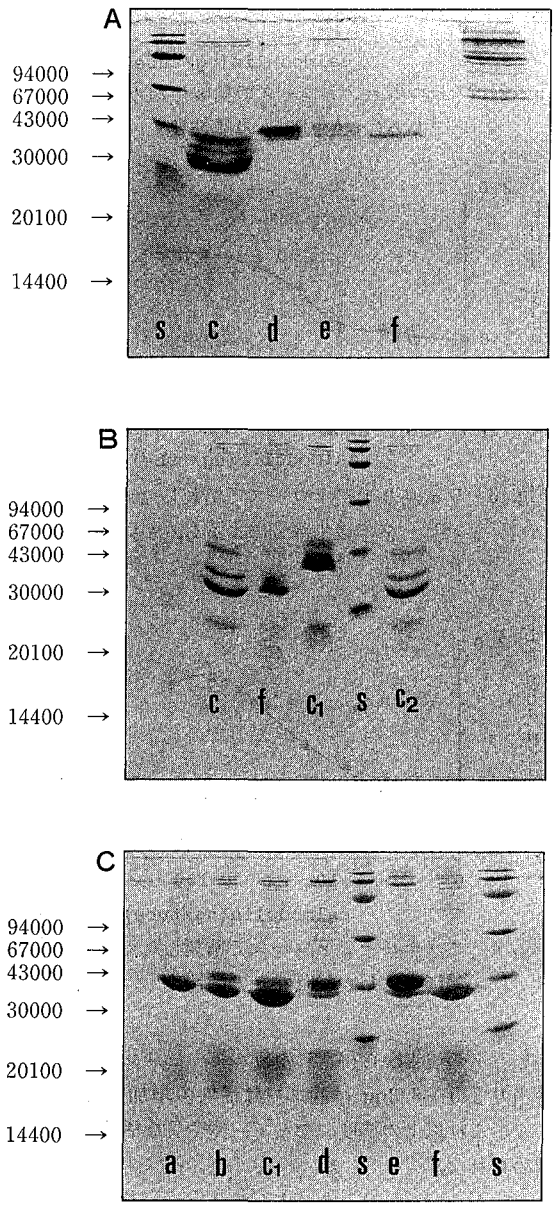


Fig. 1 オクチルセファロースとフェニルセファロースで精製したカルモジュリンの電気泳動（Laemmli）

s ; standard

c ; フェニルセファロースで精製したカルモジュリンの前半部分

d ; フェニルセファロースで精製したカルモジュリンの後半部分

e ; オクチルセファロースで精製したカルモジュリン

f ; オクチルセファロースに未吸着の残ったカルモジュリンをフェニルセファロースで精製したカルモジュリン

c_1 ; c +40mM EGTA 1 μl

c_2 ; c +40mM $CaCl_2$ 1 μl

C ：泳動 Buffer は 2 mM EGTA, Sample中に40mM EGTA 1μl を含む

a ; 一度フェニルセファロースに吸着させた後，残ったカルモジュリンを再度フェニルセファロースで精製

b ; フェニルセファロースで精製したカルモジュリン

実験結果と考察

カルモジュリンの収量は，フェニルセファロースを用いた場合に 16−33 mg/kg 脳，オクチルセファロースを用いた場合には 3 − 4 mg/kg 脳であった．

SDS ポリアクリルアミド電気泳動は Fig. 1 に示した．Fig. 1-A の c は，フェニルセファロースから溶出した一つのピークを前後に二分割したピークの前半で，標準タンパクの分子量 14400 から 20100 の間に 4 つのバンドがあり，ピークの後半は d に示されるように，分子量 20100 付近の二つのバンドがある．またフェニルセファロースの一つのピーク全体のバンドは f の形と同様な分子量 20100 付近の二つのバンドとなった．オクチルセファロースで得られたものも e に示されるように分子量 20100 付近に二つのバンドがある． Fig. 1-B は，電気泳動パターンに対する Ca^{2+} の影響を考え，フェニルセファロースで得られたサンプルに EGTA を加えた c_1 と $CaCl_2$ を加えた c_2 の比較である．$CaCl_2$ の添加ではバンドのパターンに変化が認められないが EGTA の添加によって，四つのバンドが分子量 20100 付近の二つのバンドへの移行が認められた．また f は，オクチルセファロースカラムでカルモジュリンを得た後の未吸着部分からのフェニルセファロースカラムで得たカルモジュリンの電気泳動パターンである．Fig. 1-C はクロマトグラフィで得られたサンプルに 40 mM EGTA 1 μl を添加して電気泳動を行ったもので，カルモジュリンと考えられるバンドは，分子量 20100 付近の二つのバンドとして認められる．オクチルセファロースと，フェニルセファロースの一つのピークの後半部分で得られたサンプルのバンド d と e は，分子量（約 21600）の大きい方のバンドが濃く，フェニルセファロースで得られたバンド b は分子量（約 19300）の小さい方のバンドが濃く，一度フェニルセファロースカラムに吸着させ，吸着しなかった分について再度フェニルセファロースカラムに吸着させてカルモジュリンを回収したもの a は，分子量 20100 以下の単一のバンドとなった．Fig. 2，3，4 は，赤血球膜の Ca-ATPase 活性に与えるカルモジュリンの影響を示した．オクチルセファロースとフェニルセファロースのいずれの方法で精製したカルモジュリンでも，試験管当りのタンパク量として約 100 ng を加えたときに活性が最大となり，これ以上では活性の低下が認められる．またフェニルセファロースで得られたカルモジュリンでは，カルモジュリンの添加量に対する活性の増加は，低濃度からゆるやかに増加していく．これに対しオクチルセファロースで得られたカルモジュリンとフェニルセファロース

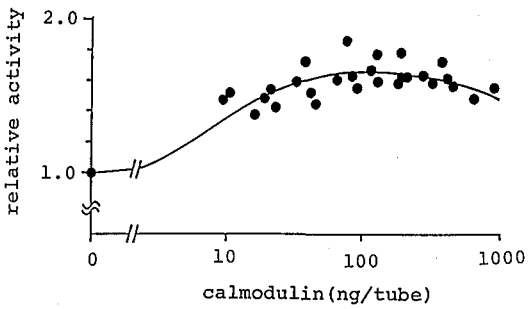


Fig. 2 フェニルセファロースで精製したカルモジュリンによる Ca-ATPase の活性化

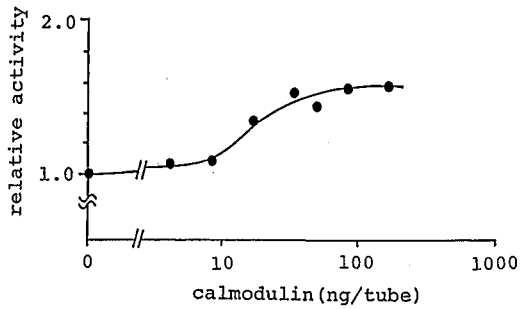


Fig. 3 フェニルセファロースで精製したカルモジュリンピークの後半部分による Ca-ATPase の活性化

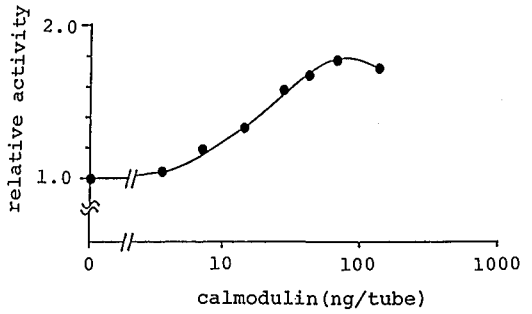


Fig. 4 オクチルセファロースで精製したカルモジュリンによる Ca-ATPase の活性化

のピークの後半から得られたカルモジュリンでは，試験管当り 3.5〜8.3ng 付近までは活性の増加がほとんどなく，これ以上の濃度になって，やや急な活性の増大が認められた．

ま と め

1) 牛脳のカルモジュリン含量は脳 1 kg 当り約 560 mg[1]であり，EGTA を用いてのホモジネートの遠心上

澄に抽出される量は脳 1 kg 当り 300～400 mg[10]である. Gopalakrishna らによるフェニルセファロースを用いた場合の回収量は 160－180 mg/kg 脳[4]であったが, 我々の場合には, フェニルセファロースを用いた場合に 16－33 mg/kg 脳, オクチルセファロースを用いた場合には 3 － 4 mg/kg 脳と非常な低収率であった.

2) カルモジュリンの分子量は, 約16700 で一次構造の決定[1]もされている. またカルモジュリンには EGTA 処理で抽出できない tightly bound 型が存在[10]するが, これは detergent 処理によって可溶化すれば, 可溶分画のカルモジュリンと変わらない[1]ことが示されている. 一般にカルモジュリンの電気泳動を行なう場合には, 泳動 Buffer を 1mM EGTA にすれば単一のバンドになる[4]. サンプルに EGTA を添加して泳動した今回の結果は, カルモジュリンと推察されるバンドは, 分子量 20100 付近の二つのバンドとなり, 使用したカラムの違いにより Ca-ATP ase 活性に対する差も認められた. また結果は示していないが, 市販のカルモジュリンに 40 mM EGTA を加え, 泳動用 Buffer を 2mM EGTA にしたときのカルモジュリンのバンドは, 分子量の小さい方のバンドと一致した. これらのことから分子量の大きい方のバンドは,「カルモジュリンに何かが結合した状態である」か, また「カルモジュリン様の他のタンパクである」かのいずれかであると推察されるが, 今後さらに検討を加えたい.

文　献

1) 垣内史朗：代謝, 17-8, 1201, 1980
2) 長井二三子, 樺島順一郎, 中川敦子, 牛山慶子, 加納いつ, 中尾順子：東京衛研年報, 35, 378, 1984
3) 中川敦子, 長井二三子, 牛山慶子, 樺島順一郎, 加納いつ, 中尾順子：東京衛研年報, 35, 380, 1984
4) Gopalakrishna, R. and Anderson, W.B. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104-2, 830, 1982
5) Lowry, O.H., Rosenbroung, N.J., Farr, A.L. and Randoll, B.J. : *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
6) Bradford, M.M. : *Anal. Biochem.*, 72, 248, 1976
7) Jarret, H.W. and Penniston, J.T. : *Biochem. Biophys. Acta.*, 448, 314, 1976
8) Fiscke, C.H. and SubbaRow, Y.H. : *J. Biol. Chem.* 66, 375, 1925
9) Laemmli, U.K., *Nature*, 227, 680, 1970
10) Teshima, Y. and Kakiuchi, S. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 93, 850, 1980

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 396-398, 1984

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）によるマウス肺傷害の機構

中川好男*, 中尾順子*, 平賀興吾*

On The Mechanism of 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, ツェーデル油 cedar oil

ジブチルヒドロキシトルエン（3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene：BHT）は加工食品及びプラスチック等の石油製品の酸化防止剤として広く利用されて来た．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はマウスの肺に対して上皮細胞の壊死及び組織の肥大，増殖を伴った傷害を惹起させた[2,3]．このような組織学的変代と並行してBHTは肺細胞のDNA合成を高め，RNA量，蛋白質量及び間質細胞や結合組織に由来するコラーゲン量を著しく増加させた[3-5]．BHT肺毒性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この化合物の代謝（活性）中間体と肺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，ラット及びマウス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た[6-15]．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)これらの中間体のトルエンメチル基がタンパク質システイン残基のSH基と特異的に共有結合した．また，こ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で著しく抑制された[8]．さらに著者らはBHTによるマウス肺傷害がこれらのチオール化合物で改善できることを明らかにした[16]．またこれとは別にMarkinson[17]はcedar terpene類がこの傷害を顕著に抑えることを報告している．そこで以上の知見及び結果をもとに，著者らはBHTによるマウス肺傷害の機序を明らかにする目的から，今回，ツェーデル油による肺傷害の抑制を試みた．

実験材料と方法

試薬　BHTは東京化成工業㈱製，ツェーデル油（cedar wood oil）は半井化学薬品㈱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，一群のマウスを5匹とした．マウスはベーターチップ（ノースイースタン社製）を床敷にしたアルミニウム製の箱で入手直後から実験終了時まで一貫して飼育した．3週間の予備飼育後，コーン油で希釈したツェーデル油（～400mg/kg, 0.1m*l*/20g体重）をマウス腹腔内に注射し，その2時間後にコーン油に溶かしたBHT（300 mg/kg, 0.1 m*l*/20 g体重）を再度腹腔内に注射した．対照群及びツェーデル油対照群のマウスは処置群と同時点にコーン油あるいはツェーデル油を注射した．投与4日後，マウスはエーテル麻酔下で断首し，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，今回は肺重量の増加を傷害の指標とした．

結果と考察

Fig. 1はBHTの肺重量増加に及ぼすツェーデル油の影響を示す．300 mg/kg用量のBHT（以前の実験から肺を肥大させるのに充分な量[16]）をマウス腹腔内に1回注射すると，4日後の肺比重量は対照群の約2.1倍に増

* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　160 東京都新宿区百人町 3－24－1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

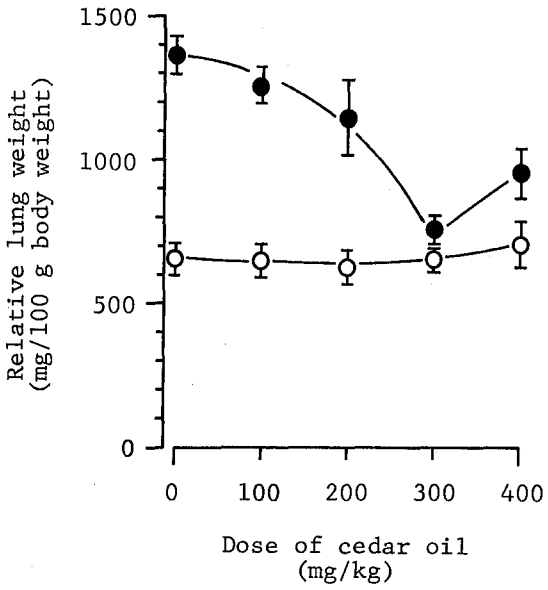


Fig. 1. Effect of Cedar Oil on BHT-induced Pulmonary Enlargement in Mice.
Mice were injected ip with 300 mg/kg BHT 2 hr after ip injection of cedar oil diluted with corn oil; corresponding control received a equivalent volume of corn oil or cedar oil, and lung weights were measured four days later. The closed circles represent the relative lung weight of mice given BHT and cedar oil, and the opened circles represent the control mice. Each value represents the means ± S.D. from five individual animals.

加した．しかしあらかじめツェーデル油をマウスに注射しておくと，その投与量に依存して BHT による肺重量増加は抑制された．特に 300 mg/kg 量のツェーデル油では，これと等量の BHT による肺重量増加を著しく抑えた．なお Fig. 1 には示していないが，このような関係は肺の絶対重量でも並行して認められ，また BHT による体重あるいは成長率の減小(約10%)も 300 mg/kg量のツェーデル油で対照群のレベルに回復した．

BHT で惹起されるマウス肺傷害が cedar terpene 類の前処置で抑制されることを Markinson[17]は報告している．この Terpene 類による BHT 毒性の抑制機序は明らかにされていないが，これまでの報告から terpene が薬物代謝系に作用し[18]，BHT の代謝活性化を抑制[17,19]させることが推察されている．

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 基に共有結合することを以前の実験で認めた[12,14]．さらにこのタンパク質と BHT 代謝物と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認め[8]，この結果にもとずいた *in vivo* の実験からチオール化合物がマウスの BHT 肺傷害を抑えることができることを報告した[16]．一方，Kehrer と Witschi[19]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．また，Malkinson[17]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．これらの知見は BHT による肺傷害がこの化合物の代謝物と深く係わっていることを示している．

今回の結果は，ツェーデル油が BHT によるマウス肺傷害を抑制できることを示している．今後ツェーデル油による肺毒性抑制の機序を，BHT 代謝物と肺高分子との相互作用の面から検討したい．

要　旨

BHT (300 mg/kg, 1回腹腔内注射) によるマウス肺重量の増加はツェーデル油 (～400 mg/kg 1回腹腔内注射) 前処置で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) Marino, A.A. and Mitchell, J.T. : *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **140**, 122, 1972
3) Saheb, W. and Witschi, *Toxic. appl. Pharmac.*, **33**, 309, 1975
4) Kehrer, J.P., Pearlman, R and Smith, M.R. : *Toxicol.*, **28**, 235, 1983
5) Hirai, K., Yamauchi, M., Witschi, H and Côté. M.G. : *Exp. Mol. Pathol.*, **39**, 129, 1983
6) Nakagawa, Y., Ikawa, M. and Hiraga, K. : *Chem. pharm. Bull.*, **26**, 374, 1978
7) Nakagawa, Y., Hiraga, K and Suga, T. : *Chem. pharm. Bull.*, **27**, 442, 1979
8) Nakagawa, Y., Hiraga, K and Suga, T. : *Chem. pharm. Bull.*, **27**, 480, 1979
9) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga,T. : *J. pharm. Dyn.*, **3**, 314, 1980
10) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T. : *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 1304, 1980

11) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T.: *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 3132, 1981
12) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T.: *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 887, 1981
13) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T. : *J. pharm. Dyn.*, **4**, 823, 1981
14) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T.: *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 1417, 1983
15) Nakagawa, Y., Tayama, K., Nakao, T. and Hiraga, K. : *Biochem. Pharmacol.* **33**, 2669, 1984
16) Nakagawa, Y., Nakao. T and Hiraga, K. : *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **34**, 357, 1983
17) Malkinson, A.M. : *Toxic. appl. Pharmac.*, **49**, 551, 1979
18) Vesell, E.S. : *Science*, **157**, 1057, 1967
19) 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.*, 35, 399-400, 1984

オルトフェニルフェノール(OPP)のヒト由来株化細胞における突然変異原性について

鈴木英子*, 中尾順子*, 平賀興吾*

Mutagenicity of Orthophenylphenol (OPP) in a Human Clonal Cell Line

HIDEKO SUZUKI*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

Keywords: オルトフェニルフェノール Orthophenylphenol, ウアバイン Ouabain, 突然変異原性 mutagenicity

緒　言

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，かんきつ類のかび防止剤をはじめ，殺菌剤として幅広く使用されている．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，小縣らは，マウスを用いた催奇形成試験，ならびに優性致死試験において陰性であることを報告した[1,2]．微生物を用いたいくつかの突然変異原性試験でも変異原性は認められなかった[3,4,5]．一方，平賀らは，OPP-Naは，ラット膀胱に腫瘍を発生することを報告した[6]．今回，我々は，紫外線(UV)に感受性が高く，修復能力の低い，ヒト胎児由来株化細胞，RSa[7]，を用いて，OPPの突然変異原性試験を行った．RSa細胞にOPPを処理すると，ウアバイン耐性化変異細胞の数が増大したことより，OPPの処理は，ヒト細胞における突然変異を誘発したことを報告する．

実験材料および方法

細胞および培養　ヒト胎児由来株化細胞，RSa[7]，を用いた．細胞は，10％牛胎児血清 (FCS) を含むEagles' minimum essential medium (MEM) (GIBCO) を用い，37℃，5％ CO_2条件下で培養した．細胞毒性 (生存率) および突然変異原性の測定の場合は，培養液中のFCS濃度を15％にした．

試料　OPP(東京化成工業)，ouabain(Oua) (Sigma) を用いた．OPPは，氷冷した99.5％エタノールに溶解した後，MEMで希釈し，0.5％以下のエタノール溶液とした．OuaはPBSに溶解した後，ミリポアフィルターでろ過滅菌した．陽性対照には，紫外線 (UV) を用いた．

突然変異原性試験　8×10^5個の細胞を10 mlの正常培地の入った10 cm径シャーレに播種した．24時間培養後，培地を除いて，OPPを加え，37℃の炭酸ガス培養器中で24時間処理した．UV照射は，通常の殺菌灯(15 W) をセットした暗箱を用いて行った．変異原処理後，正常培養液中で48時間培養した後，0.25％トリプシンを用いて細胞を培養面より剥離して，生存率と突然変異原性の測定のため，再播種した．生存率の検出のためには，2×10^3個の細胞を10 mlの正常培地の入った10 cm径シャーレに播種した．10日間培養した後，0.2％ (W/V) メチレンブルーを含んだ30％メタノール溶液で固定，染色し，コロニー数を数えた．この場合，1群5枚のシャーレを用いた．突然変異細胞検出のためには，5×10^4個の細胞を10 mlの10^{-7}M Oua含有培地の入った10 cm径シャーレに再播種し，選択培養を行った．7日後に培養液を交換し，14日後に，コロニーを固定，染色し，Oua耐性 (Oua^r) 細胞のコロニー数を数えた．この場合は，1群6枚のシャーレを用いた．生存率および突然変異率は次式により求めた．

$$\text{生存率}=\frac{\text{正常培養液でのコロニー数}}{\text{播種した細胞数}}$$

$$\text{突然変異率}=\frac{\text{選択培養液でのコロニー数}}{\text{播種した細胞数}}\div\text{生存率}$$

結果および考察

Table 1に示すようにOPPを処理したRSa細胞の生存率は，OPPの量の増加にともなって低下したが，突

* 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

Table1. Mutagenicity of OPP in RSa cells

Treatment		Survivours[a]	Resistants[b]	Mutation freq.[c]
OPP (μg/ml)	0	153± 8	0.5±0.3	1.5
	15	135±17	17.6±1.4	52.2
	20	124± 8	22.0±1.8	70.8
	25	66± 7	17.3±1.4	105.0
	30	43± 4	15.8±1.0	147.3
UV (J/m^2)	9	46± 5	6.8±1.0	59.4

[a]Number of surviving colonies per dish (2×10^3 cells), mean ± S.E.
[b]Number of Oua^r colonies per dish (5×10^4 cells), mean ± S.E.
[c]Mutation frequencies per 10^4 surviving cells.

然変異率（生存細胞10^4あたりのOua^{r}細胞の数）は，controlに比べ有意に増加し，OPPの量の増加にともなって増加した．OPP 30 μg/mlの処理では，突然変異頻度は，controlの約100倍に増加した．

陽性対照として用いたUV (9 J/m^2)を照射したRSa細胞での突然変異率は，59.4であった．この場合の生存率とほとんど同じ生存率を示すOPPの量（30 μg/ml）を処理した場合の突然変異率と比較すると，OPP処理群は，147.3で，UV処理群よりかなり高い突然変異を誘発する．以上の結果は，OPPはUVより強力な突然変異原物質であることを示唆する．

今回，我々は，紫外線に感受性が高く，DNAの修復能力の低い，ヒト胎児由来株化細胞，RSa，を用いてOPPの突然変異原性試験を行い，陽性の結果をえた．RSa細胞のUV高感受性は，DNAの修復能力の低いことが原因であると示唆されている[8]．しかし，現在，RSa細胞が，なぜOPPによって，Oua^{r}細胞へと誘発されやすいか不明である．大腸菌において，UVに感受性が高く，DNAの除去修復能力が欠如している株では，UV等の変異原によってDNAが損傷を受けると，誤りを起こしやすい修復機構（error-prone repair）が誘導されることによって突然変異が誘発されることが報告されている[9]．UVに高感受性のRSa細胞は，DNAの修復合成能力が低いので，OPPやUVがRSa細胞のDNAに損傷を与えるとすれば，そのDNAの変化が，error-prone repairを誘導し，突然変異を導くのかもしれない．

OPPがDNAに結合し[10]，又，OPPの代謝物であるフェニルヒドロキノンが，チャイニーズハムスター，CHO-K1細胞で，わずかに染色体異常を誘発することが示唆されている[11]．さらにOPPのDNAへの作用を検討する必要がある．

文　献

1) 小縣昭夫他：東京衛研年報，29-2, 89, 1978
2) 小縣昭夫他：東京衛研年報，29-2, 99, 1978
3) 小嶋昭江，平賀興吾：東京衛研年報，29-2, 83, 1978
4) 藤田博，小嶋昭江，平賀興吾：東京衛研年報，34, 315, 1983
5) 小嶋昭江，藤田博，平賀興吾：東京衛研年報，34, 319, 1983
6) Hiraga, K., Fujii, T.: *Food and Cosmetic Toxicology*, 19, 303, 1981
7) Suzuki, N., Fuse, A.: *Mutation Res.*, 84, 133, 1981
8) Suzuki, N.: *Mutation Res.*, 125, 55, 1984
9) Witkin, E.M.: *Bact. Rev.*, 40, 869, 1976
10) 牛山慶子他：生化学，55, 527, 1983
11) 吉田誠二他：東京衛研年報，32-2, 111, 1981

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 401-406, 1984

オルトフェニルフェノール（OPP）単一経口投与によるC57BL／6Nマウス被毛および触毛の脱色素について

田山邦昭*, 平賀興吾*

Depigmentation Caused by A Single Oral Administration of *o*-Phenylphenol (OPP) in Ordinary and Tactile Hair of C57BL/6N Mice

KUNIAKI TAYAMA* and KOGO HIRAGA*

A single dose of *o*-phenylphenol (OPP) at levels of 1000-4000 mg/kg body weight was administered perorally to both sexes of 8-week-old C57BL/6N mice. Lethal effect was found at the doses over 2000 mg/kg body weight. Within 2 weeks, depigmentation in the tactile hair was observed in the survivors of both sexes, and that in the ordinary hair was observed in the female mice, but not males. Another experiment was conducted using only the male mice. Administration of OPP at a dose of 1000 mg/kg body weight was performed in the 13 and 15-week-old male mice. Depigmentation was observed in both the ordinary and tactile hair of these animals. Lack of depigmentating action on the ordinary hair in 8 week-old male mice seems to be attributable to the fact that the stage of hair growth is at the resting phase. In this study, it was shown that OPP can cause depigmentation of ordinary and tactile hair in C57BL/6N mice with a single oral administration.

Keywords: *o*-phenylphenol, fungicide, depigmentation, melanocytotoxicity, hair, vibrissae, hair-cycle, mouse

いくつかのフェノール類やカテコール類には人や動物の皮膚や毛を脱色素する作用があることが知られている[1-8]. かんきつ類の防カビ剤として使用されているオルトフェニルフェノール（以下OPPとする）にもC57BL/6Nマウスへの強制あるいは添加飼料投与により黒色被毛を褪色させる作用があることをすでに報告した[9].

これまでの有色マウスを用いた脱色素作用の実験では，皮膚あるいは被毛の有色化に働くL-β-3, 4-dihydroxyphenylalanine(dopa)陽性メラノサイトすなわち活性化メラノサイトは成熟マウスでは毛球内でみられ[10]，表皮には蹠，耳介，尾などの特定部位しか認められないことから[11]，主に被毛での観察が行われてきた[3-9]．その投与経路は塗布[3,4]，皮下注射[5,6]，経口[7-9]等で，経口でも数週間の比較的長期にわたる投与である．1回経口投与による脱色作用の発現や，触毛（別名ヒゲ）における脱色素の発生はまだ報告されていない．

今回，OPPのC57BL/6Nマウスを用いた急性試験（range-finding test）で，単一経口投与により被毛および触毛に褪色を観察し，またそれを確認するために行った試験でも同様の結果を得たので報告する．なお動物は8週齢の雌雄および13，15週齢の雄マウスを用いた．

実験材料ならびに方法

検　体：OPPは東京化成㈱製（Lot No. AP 01，純度98％以上）を用い，投与容量がすべて10 m*l*/kg b.w.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．

実験動物および飼育環境：C57BL/6Nマウス雌雄を日本チャールス・リバー㈱より4週齢で購入した．マウスは温度25±1°，湿度55±5％，換気毎時10回，照明午前6時～午後6時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 125 mm）に個別飼いにした．飼料は日本クレア㈱固型飼料

* 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

CE-2，水は水道水を用い，共に自由摂取とした．なお投与前日午後5時より除餌（飲水は自由）し，検体投与後3時間目より餌を与えた．

投与方法および観察　8週（57日）齢の一夜絶食マウス雌雄にOPPを1000～4000 mg/kg b.w.の投与量で胃ゾンデにて強制経口投与し，対照には溶媒を与えた．また別に，一夜絶食の8週(57日)齢の雌雄および13週(92日）齢，15週（106日）齢の雄マウスにも1000 mg/kg b.w.の投与量で同様に投与した．投与後8時間目まで1時間ごとに，それ以降は1日1回2週間，生死，症状および外観について観察した．褪色した被毛および触毛はビオライト（㈱高研）で封入し，光顕的に観察した．結果の判定は投与後15日目に被毛および触毛について肉眼的に対照群と差異がみられなかったマウスを－，それ以外の褪色を示したマウスを＋とした．

結果および考察

OPP投与マウスの死亡率，死亡時期および被毛や触毛の脱色素の発現率をTable 1に示した．投与後の主な症状は自発運動の低下，鎮静で，死亡は2000 mg/kg b.w.以上の投与量で24時間以内にみられた．脱色素は投与後9日目頃より明瞭化した．8週齢雌，および雄のみを用いた13，15週齢では，被毛，触毛共に褪色がみられたが，8週齢の雄では2回の実験でも，褪色は触毛のみで被毛には観察されなかった．この脱色素の発現は，触毛では雌雄およびいずれの週令も全例みられるのに対し，被毛ではバラツキがみられた．褪色部位は被毛では背部，腹部，頭部等に小斑状あるいは帯状にみられ，触毛では数本の上唇毛，眼窩上毛におよそ2～4 mmの幅でみられた（Photo 1, 2）．被毛および触毛の光顕的観察では，毛幹部で，溶媒対照群は両毛共に色素顆粒が一様に分布しているが，OPP投与群の褪色のみられた被毛では部分的に色素顆粒が消失し，触毛では髄質部を残して色素顆粒が消失しており，髄質部も消失している例もみられた（Photo 3～5）．

フェノール類等の脱色素の作用機序は不明な点も多いが，メラニン合成に関与する細胞すなわちメラノサイトの選択的破壊やメラニン生成の生化学的阻害等が考えられている[1,2]．OPP投与により褪色した被毛では，毛周期

Table 1. Incidence of Depigmentation of Hair in C57BL/6N Mice Given A Single Oral Dose of OPP

sex	Dose (mg/kg)	Initial body weight (g)	Mortality	Time of death after dosing (hr)	Depigmentation of hair Ordinary	tactile
8-week-old						
	0[1]	18.5±1.08[2]	0/4[3]	—	0/4[4]	0/4[4]
	1000	19.1±1.19	0/4	—	0/4	4/4
Male	2000	18.3±0.56	1/4	2－3	0/3	3/3
	3000	18.0±0.60	2/4	1－2	0/2	2/2
	4000	18.9±0.52	3/4	＜1	0/1	1/1
	0[1]	15.9±0.82	0/4	—	0/4	0/4
	1000	16.7±0.39	0/4	—	3/4	4/4
Female	2000	15.8±0.60	1/4	1－2	3/3	3/3
	3000	15.5±0.84	2/4	＜24	2/2	2/2
	4000	16.0±0.90	4/4	＜24	—	—
Male	1000	18.1±0.66	0/10	—	0/10	10/10
Female	1000	15.6±0.85	0/10	—	8/10	10/10
13-week-old						
Male	1000	21.6±1.56	0/10	—	5/10	10/10
15-week-old						
Male	1000	24.0±1.51	0/10	—	10/10	10/10

1) control：olive oil 10ml/kg b.w. 2) body weight of overnight fasted mice at the beginning of administration, mean ±SD. 3) No. of deaths/No. of dosed. 4) No. of mice showing depigmentation of hair /No. of survivors.

が成長期にあたる部位の毛球内に dopa 陽性メラノサイトの減少がみられることから[12]，今回の脱色素作用発現も，他のフェノール類によるものと同様の機序で，OPP あるいはその代謝物が毛球メラノサイトに作用したためと考えられる．今回，触毛の褪色は雌雄共にすべての週齢で認められたのに対し，被毛ではその発現は 8 週齢の雄では認められなかった．また毛の成長期にみられる皮膚の黒色調，すなわち毛球メラノサイトが活性化していることを示す変化も，8 週齢雄マウスにはほとんど認められなかった．一般に 6～9 週齢のマウスは，その被毛の毛周期が休止期にあるとされている．また有色マウスの触毛では常時メラノサイトの活性があるのに対し，被毛では毛周期とメラノサイトの活性が同調しており，休止期にはその活性が失われている[10]．以上のことから，8 週齢雄マウスで 2 回の実験とも同様の結果であった被毛での脱色素作用の欠落は，この時期に雄マウスの被毛の毛周期が休止期にあって，その毛球メラノサイトが被検物質の作用をまぬがれてしまうためと考えられた．

経口投与により発現した脱色素は排泄された尿の付着による経皮的作用も考えられるため，尿が体表に触れないよう強制的に固定した動物への OPP 投与，および尿の塗布実験も現在進めており，今後さらに OPP およびその関連物質の脱色素作用について *in vivo* および *in vitro* の両面から明らかにして行きたいと考える．

文　献

1) Marks, R. and Christophers, E. : *The Epidermis in Disease,* 451, 1981, M T P Press, Lancaster
2) Bleehen, S.S., Pathak, M.A., Hori, Y. and Fitzpatrick, T.B. : *J. Invest. Dermatol.,* **50**, 103, 1968
3) Wohlrab, W. und Zaumseil, R.-P. : *Dermatologische Monatsschrift Bd.,* 162, 980, 1976
4) Shelley, W.B. : *British J. of Dermatol.*, 90, 169, 1974
5) Frenk, E. and OTT, F. : *J. Invest. Dermatol.*, **56**, 287, 1971
6) Denton, C.R., Lerner, A.B. and Fitzpatrick, T. B. : *J. Invest. Dermatol.*, **18**, 119, 1952
7) Hara, I. and Nakajima, T. : *Proc. 16th Int. Congr. Occup. Health,* Tokyo, 635, 1969
8) Ito, K., Nishitani, K. and Hara, I. : *Bull. Pharm. Res. Inst.*, **76**, 5, 1968
9) 田山邦昭，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，32-2, 40, 1981
10) Fitzpatrick, T.B., Brunet, P. and Kukita, A. : *The Biology of Hair Growth,* 255, 1958, Academic Press, New York
11) Gerson, D.E. and Szabo, G. : *Am. J. Phys. Antrop.,* **31**, 363, 1969
12) 田山邦昭，平賀興吾：未発表

Explanation of Plates

Photo 1. C 57 BL/6 N female mouse showing depigmentation of ordinary hair by gavage of OPP 1000 mg/kg b.w..

Photo 2. C 57 BL/6 N female mouse showing depigmentation of tactile hair (mystacial and superciliary) by gavage of OPP 1000 mg/kg b.w.. Arrow indicate the depigmentating points.

Photo 3. Decrease of melanin granule in the hair of a mouse shown in Photo 1. ×100.

Photo 4. Decrease of melanin granule in the hair of a mouse shown in Photo 2. ×400.

Photo 5. Control tactile hair (mystacial) of C 57 BL/6 N female mouse. ×400.

1

2

3

4

5

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 407-415, 1984

オルトフェニルフェノール（OPP）のラットを用いた亜慢性毒性試験

井口重孝*, 高橋博*, 藤井孝*, 福森信隆*
三栗谷久敏*, 多田幸恵*, 湯澤勝廣*, 平賀興吾*

Subchronic Toxicity of *o*-Phenylphenol (OPP) by Food Administration to Rats

SHIGETAKA IGUCHI*, HIROSHI TAKAHASHI*, TAKASHI FUGII*
NOBUTAKA FUKUMORI*, HISATOSHI MIKURIYA*, YUKIE TADA*
KATUHIRO YUZAWA* and KOGO HIRAGA*

Keywords：オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, 悪慢性毒性 subchronic toxicity, ラット rat, 食品添加物 food additive, 防ばい剤 fungicide

防ばい剤，オルトフェニルフェノール（OPP）はそのナトリウム塩（OPP-Na）とともに1977年食品添加物に指定され，かんきつ類への使用が許可された．当時OPPの安全性については，Hodgeら(1952)[1]の詳細な毒性試験の報告があり，ラットにおける無作用量は100 mg/kg/dayとされた．一方OPP-Naについて，その毒性に関する資料はほとんどなかったことから，当部ではOPP-Naの毒性について各方面より検索し，1981年にはOPP-NaのF344/DuCrjラットにおける膀胱がん誘発について報告[2]した．

Hodgeら(1952)[1]は，ラットを用いたOPPの慢性毒性試験のなかで膀胱がんの発生を認めていないが，OPP-Naでの発がんが確実である以上，当部の試験条件下におけるOPPによる発がんの可能性は高いと考えられる．そこでOPPのがん原性試験を企図し，まず，試験に用いる最高投与量の設定を目的として，F344/DuCrjラットを用い13週間の亜慢性毒性試験を行った．

試験材料ならびに方法

検体： オルトフェニルフェノール（OPP）はDow Chemical Co., MI, U.S.A.のDowicide 1(Lot No. MM 01040, 純度98％以上）を使用した．

試験動物： 日本チャールスリーバー㈱社生育のF344/DuCrjラット雌雄を4週齢にて購入，1週間の予備飼育後5週齢時より試験に供した．飼育室：バリア飼育室R2，温度25±1℃，湿度50—60％，換気効率99.9％のHEPAフィルター経由オールフレッシュ空気毎時10回，照明 午前6時から午後5時まで．飼育ケージ：前面および床面が網のステンレス製，縦22，横20，高さ16 cmの個別飼育ケージを用いベルト式飼育架台に懸架． 飼料：基本飼料として日本クレア㈱CE—2固型飼料を用い，給餌ホッパーにより自由に与えた． 飲料水：細菌ろ過器経由水道水を自動給水装置により自由に与えた．なお摂水量測定時には細菌ろ過器経由水道水を給水ビン（日本クレア㈱，ポリカーボネート製CM-200）により与えた．

検体投与法： 検体を基本飼料に添加して動物に自由に摂取させる飼育試験法とした．検体の飼料添加濃度は，OPP-Naの亜急性毒性試験[3]のそれに倣り，分子量当量により換算して2.5％(OPP-Na 4％に対応)，1.25％，0.625％，0.313％，0.156％および0％（Control）とした．検体添加飼料の作成法は既報[3]の通りであり，添加検体は飼料中で所定の濃度であった[4]．

使用動物数は，雌雄各群夫々10匹を基本とし，それに1～2匹（サテライト群）を追加した．動物は雌雄別体重別に6匹ずつの層をつくり，架台に横に配置し，各層の動物に各投与をランダムに割り当てた．追加動物は各層外の架台にランダムに配置し，ランダムに投与を割り当てた．

投与期間は13週間とし，投与は動物の5週齢時より開始した．

観察： 動物の一般状態は毎日午前9—10時に観察し，生死は午前・午後2回調べた．体重，摂餌量および

* 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

摂水量を毎週各群10匹の基本動物について測定した．これらの測定方法は既法[3]の通りである．

実験9週目と13週目に尿検査を行った．動物を補捉の際に放出する尿について，Labstix—II試験紙(Miles-Sankyo Co, LTD.) を用い PH，蛋白，グリコース，ケント体および潜血を測定した．

飼育試験終了後血液学的検査，血清生化学的検査，解剖・肉眼的観察，主要器官重量測定，主要臓器・組織の病理組織学的検索を行った．

解剖時には動物を，無麻酔下に断頭し，放血致死せしめた．放血時血液学的検査用血液として，EDTA—2 K処理小試験に 0.5 m*l* 程度の血液を採取，また，血清生化学的検査用血液として，無処理遠心管に 5 m*l* 程度の血液を採取した．

血液学的検査用血液では，塗抹標本を作製するとともに，Coulter Counter Model S (Coulter Electric Co., LTD, U.S.A.)により赤血球数 (RBC)，ヘモグロビン量 (Hgb)，ヘマトクリット (Hct)，平均赤血球溶積 (MCV)，平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)，平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)，白血球数 (WBC) の測定をした．塗沫標本は May-Grünwald-Giemsa 染色後光顕的に観察し白血球百分比(好中球(Neutro)，リンパ球 (Lympho)，単球 (Mono)，好酸球 (Eosino))を求めた．血清生化学的検査用血液では血清を分離[3]後，日立自動分析装置 M—400(日立製作所)でトランスアミラーゼ活性 (GOT, GPT)，アルカルホスファターゼ活性 (Alp)，総タンパク量(TP)，尿素窒素量(UN)，グルコース量 (Glu)，総コレステロール量 (Cho)を測定した．

解剖・肉眼的観察後，主要器官，組織を摘出し，脳，心臓，肝臓，脾臓，胸腺，腎臓，副腎，精巣/卵巣，前立腺/子宮の湿重量を，膀胱は10％中性緩衝ホルマリン注入—結紮—ホルマリン固定後1週間目の重量をそれぞれ測定した．重量測定器官およびその他の摘出器官・組織は10％中性緩衝ホルマリン液で固定後，定法により組織標本を作製，光顕により病理組織学的検索を行った．途中死亡例も同様に処理し鏡検した．

結果の平均値の差の検定 (t-test) では有意水準を5％ (P=0.05) とした．

試験結果と考察

一般状態： 行動等に特に変化を認めなかったが，2.5％群雌雄では初期において飼料のコボシが多く，全試験期間を通じて〝痩せ〟が認められた．2.5％群雄では試験4日目に2例が，雌では8日目に1例が痩せを伴って死亡した．

体重： Fig.1(雄), 2(雌)に体重増加の推移を示した．対照群と比較して雄 2.5％群および 1.25％群，雌 2.5％群は全期間を通じて有意に小さく，雌1.25％群は試験8週まで有意に小さかった．0.625％群，0.313％群，0.156％群では雌雄とも対照群と有意な差は認められなかった．対照群の体重に対する投与群の体重増加抑制率(％)〔=(投与群の体重増加率/対照群の体重増加率)×100〕はFig. 3，4(抑制を－，促進を＋で示した．) に示すように雄では2.5％群と1.25％群で10％以上の抑制値を示し，雌では 2.5％群のみ 10％以上の値で，1.25％群は 10％以内の値にとどまった．すなわち最高の抑制率は雄 2.5％群1週 35％，1.25％群9週 14％，雌 2.5％群1週 31％，1.25％群5週 7.5％であった．

摂餌量： Table 1に摂餌量の推移を記載した．雄2.5％群の摂餌量 (絶対量) は，対照群と比較し全期間を通じて少なかった．体重比摂餌量は対照群のそれと比較して試験0週 (第1週) で極めて少なかったが1週以降では逆に有意に多いか，多い傾向がみられた．雌では摂取量は試験8週まで有意に少なく以後も少ない傾向であった．体重比摂取量は雄の場合と同一の傾向であった．1.25％群では雌雄とも対照群と比較して摂取量はやや少なく，体重比摂取量は有意に多いか，多い傾向を示した．他の投与群では 0.313％群雄で対照群に較べ摂取量および体重比摂取量が有意に多いか，多い傾向を示した以外特に注目すべき変化はみられなかった．これらの摂餌量は前述の体重の推移によく反映しているようである．しかし，高濃度群では摂餌効率 (単位期間の体重増加量 g/摂餌量 g)がやや低下しており，OPP 添加飼料摂取ラットの体重増加抑制は OPP の味，刺激性等による摂餌量の減少 (摂餌忌避) によるだけではないようである．0.313％群雄の摂餌量が多かったことは用量相関性のないことより偶発的増多と考えられる．

OPP 摂取量： 摂餌量より求めた OPP 摂取量を Table 1 の下段に示した．体重 kg，1日当り OPP 摂取量 (mg/kg/day)は雄および雌で 0.156 ％群 182，202，0.313％群 391，411，0.625％群 761，803，1.25％群 1669，1650，2.5％群 2798，3014 であった．

摂水量： Table 2 に摂水量の推移を示した．摂取量 (絶対量) は 1.25％および 2.5％群で実験0週に少なかったのを除きいずれの投与群も対照群の摂取量と大差を示さなかった．従って体重の軽かった 1.25％群および 2.5％群では体重比摂取量は有意に多いか，多い傾向を示した．摂水量は一般に摂餌量に連動して増減するが，2.5％群雌雄では摂餌量に対し摂水量がやゝ多い傾向が

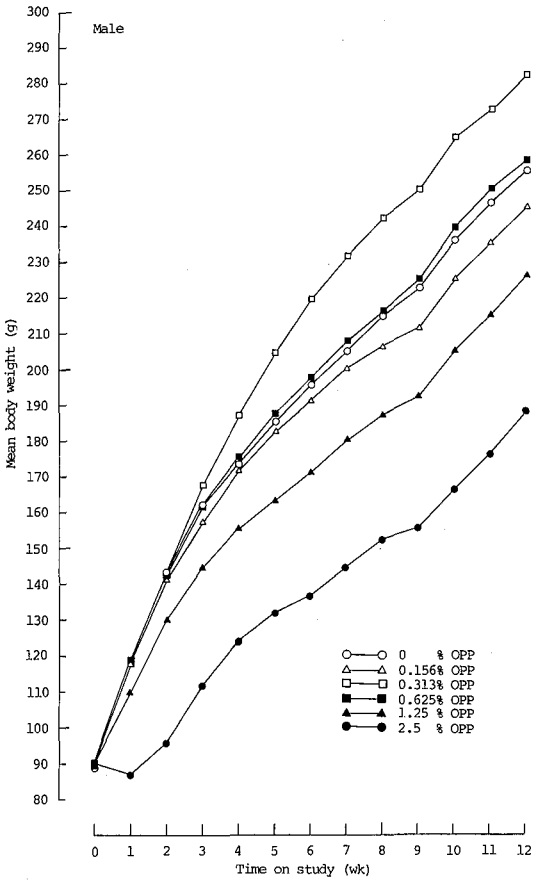


Fig. 1 Growth Curve

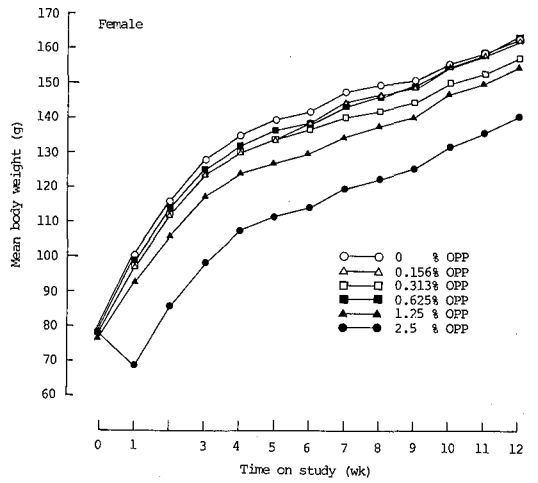


Fig. 2 Growth Curve

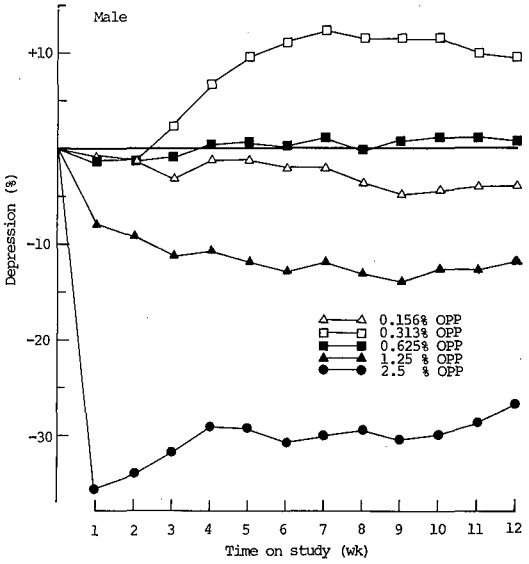


Fig. 3 Changes of Degree for Depression in Body Weight Gain of Dosed Groups

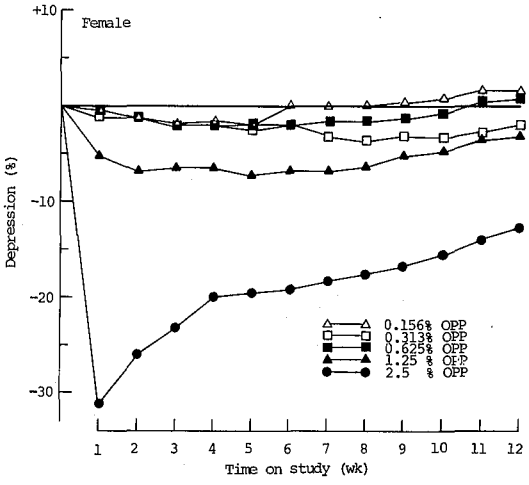


Fig. 4 Changes of Degree for Depression in Body Weight Gain of Dosed Groups

みられる. OPP 排泄のために水の要求が高まっているのかもしれない.

尿検査成績： Table 3 に成績を示した. 目立った変化は 2.5 %群雌雄の pH の低下と 1.25 %群および 2.5 %群雄において潜血例がみられたことである. pH の低下は OPP が弱酸性物質であることによると思われる. 潜血は次に述べる腎障害とかかわりがあるものかもしれない.

Table 1. Food Intake

Wk on study	No. of rats	Dietary level of OPP(%) 0	0.125	0.313	0.625	1.25	2.5
		10	10	10	10	10	10
Male							
0		8.6± 0.9 [1] (96.6± 8.1)[2]	9.0± 0.6 (101.4± 5.2)	10.0± 0.7* (111.6± 6.2)*	9.3± 0.8 (103.2± 8.0)	7.9± 0.6* (88.6± 6.8)*	1.5± 0.7*(8)[3] (16.4± 8.4)*
1		11.8± 0.8 (99.8± 2.9)	11.6± 3.8 (98.4± 3.8)	12.4± 0.8 (105.5± 3.0)*	12.3± 0.9 (104.1± 5.1)*	11.7± 0.8 (106.6± 6.2)*	8.7± 1.2*(8) (113.2±14.4)*
2		11.2± 1.0 (78.0± 6.1)	11.3± 0.9 (80.0± 5.3)	11.3± 2.3 (78.9±15.3)*	11.5± 1.0 (80.4± 4.9)	10.8± 1.4 (83.0± 9.4)	8.2± 0.8*(8) (86.5± 5.3)*
3		10.7± 2.0 (65.7±11.7)	11.3± 1.1 (71.7± 3.8)	12.8± 1.8* (75.9± 5.5)*	11.8± 0.9 (72.5± 4.3)	11.0± 1.1 (76.1± 7.1)*	8.3± 1.1*(8) (73.8± 5.4)*
4		11.7± 1.7 (67.0± 5.0)	12.2± 1.6 (71,0± 6.7)	13.7± 2.0* (72.9± 5.1)*	12.4± 1.4 (70.7± 4.8)	10.5± 1.1 (67.4± 5.2)	8.6± 2.0*(8) (69.1± 8.0)
5		10.0± 1.9 (53.8± 5.7)	10.2± 2.0 (55.1± 5.7)	12.8± 3.0* (61.7± 8.5)*	11.1± 2.2 (58.7± 2.3)	9.7± 1.8 (59.3± 6.7)	7.3± 2.0*(8) (54.7± 7.7)
6		11.3± 1.8 (57.6± 3.6)	11.0± 2.0 (56.8± 4.9)	13.2± 2.4 (59.8± 3.1)	11.7± 2.0 (58.8± 4.9)	10.3± 1.9 (59.6± 5.0)	8.3± 2.6*(8) (59.9± 6.5)
7		10.4± 2.1 (50.5± 6.1)	9.7± 2.5 (47.9± 6.7)	12.7± 2.2* (56.4± 3.0)	11.0± 2.4 (52.2± 7.7)	9.3± 2.4 (51.0± 7.5)	7.4± 3.0*(8) (49.9± 8.7)
8		11.0± 2.0 (51.2± 5.0)	10.6± 2.4 (51.0± 5.7)	13.3± 2.5* (54.6± 2.6)	11.7± 2.1 (54.0± 4.9)	10.4± 2.3 (54.8± 4.9)	7.9± 3.2*(8) (50.4± 7.1)
9		10.7± 2.0 (47.9± 4.0)	10.1± 2.3 (47.2± 5.7)	12.5± 2.7 (49.4± 3.5)	10.9± 1.8 (47.9± 3.9)	9.5± 2.2 (49.1± 3.5)	7.6± 3.1*(8) (47.7± 6.6)
10		12.4± 2.5 (52.2± 3.8)	11.7± 2.3 (51.7± 3.9)	14.2± 2.2 (53.4± 3.1)	13.0± 1.8 (53.9± 2.9)	11.3± 2.7 (54.4± 5.2)	9.2± 2.8*(8) (54.6± 4.9)
11		12.5± 2.4 (50.4± 3.6)	11.5± 2.0 (48.3± 3.3)	14.0± 2.2 (51.0± 2.8)	12.7± 1.4 (50.5± 2.4)	11.0± 3.2 (50.1± 8.8)	9.2± 2.2*(8) (52.2± 3.4)
12		12.7± 2.0 (49.4± 3.7)	11.2± 1.8 (45.3± 3.0)*	13,3± 2.0 (47.0± 1.9)	12.2± 1.9 (47.0± 3.8)	10.9± 2.0 (47.8± 2.6)	9.3± 2.7*(8) (48.8± 4.4)
Total intake of OPP(mg/rat)			1540	3635	6621	11742	16127
Dairy intake of OPP(mg/kg/day)			182	391	761	1669	2798
Female							
0		7.4± 0.5 (95.8± 4.1)	7.7± 0.6 (101.2± 2.0)*	8.5± 0.6 (111.5± 6.2)*	7.5± 0.7 (97.3± 9.3)	7.0± 1.5 (91.7±20.0)	1.5± 0.9*(8) (20.2±12.0)*
1		10.6± 0.6 (106.1± 5.3)	9.5± 4.8 (97.4±19.3)	10.1± 0.9 (104.2± 8.2)	10.4± 0.6 (105.6± 4.5)	9.8± 3.0 (105.3±32.3)	8.0± 0.8*(9) (117.4±11.2)*
2		9.7± 0.8 (83.5± 5.2)	9.8± 1.1 (87.2± 8.0)	9.7± 1.2 (85.9±10.1)	9.5± 0.5 (84.0± 4.0)	9.8± 0.9 (93,3±12.7)*	7.4± 0.7*(9) (87.5± 6.4)
3		9.8± 0.9 (76.7± 6.5)	9.4± 0.9 (76.4± 5.1)	9.9± 0.6 (80.1± 3.9)	9.6± 1.1 (76.5± 6.3)	9.4± 0.9 (80.0± 6.8)	7.5± 0.8*(9) (76.0± 6.5)
4		10.6± 1.7 (8) (77.3±11.5)	9.7± 2.0 (7) (75.8±12.8)	9.8± 1.4 (8) (74.9± 7.6)	9.9± 1.2 (7) (75.1± 7.3)	9.7± 1.5 (8) (76.7± 9.9)	8.1± 1.8*(7) (76.1± 6.8)
5		8.4± 1.2 (60.4± 6.4)	8.7± 1.5 (64.5± 7.2)	8.3± 1.3 (62.2± 6.5)	8.7± 1.1 (63.6± 6.3)	8.2± 1.3 (64.7± 7.1)	6.9± 0.8*(9) (62.1± 5.2)
6		8.9± 1.2 (62.5± 6.5)	9.0± 1.4 (64.5± 6.5)	8.5± 1.3 (61.6± 5.0)	8.4± 1.3 (60.4± 6.6)	8.1± 1.8 (62.2± 8.1)	7.3± 1.2*(9) (63.3± 7.0)
7		8.0± 1.2 (54.1± 7.1)	8.2± 1.9 (56.3±10.7)	7.6± 1.4 (53.7± 7.5)	7.8± 1.3 (53.7± 5.8)	7.7± 1.5 (57.0± 6.2)	6.5± 1.2*(9) (54.0± 6.0)
8		9.0± 1.3 (59.9± 7.5)	9.0± 1.6 (61.5± 8.0)	9.2± 1.6 (64.4± 7.4)	9.0± 1.5 (61.0± 6.2)	8.6± 1.5 (62.6± 4.3)	7.5± 1.5*(9) (60.9± 7.5)
9		8.3± 1.2 (54.6± 5.6)	8.5± 1.4 (56.6± 4.6)	8.2± 1.2 (56.9± 3.9)	8.3± 1.2 (55.6± 5.2)	8.2± 1.4 (58.1± 3.9)	7.3± 1.5 (9) (57.9± 6.9)
10		8.7± 1.3 (55.1± 6.1)	9.2± 1.6 (59.0± 4.5)	8.9± 1.2 (59.0± 4.2)	9.0± 1.2 (58.4± 4.2)	8.8± 1.4 (59.7± 4.7)	7.8± 1.4 (9) (58.7± 5.3)
11		8.7± 1.6 (54.2± 7.4)	9.3±. 1.3 (58.5± 3.9)	8.6± 0.8 (56.7± 3.6)	9.0± 1.2 (56.8± 5.5)	8.6± 1.5 (57.3± 7.1)	7.8± 1.7 (9) (57.1± 8.5)
12		8.2± 1.5 (49.9± 6.4)	8.5± 1.4 (52.0± 5.3)	8.0± 1.2 (51.1± 4.9)	8.5± 1.1 (52.2± 4.1)	8.5± 1.2 (55.0± 5.5)	7.4± 1.5 (9) (52.3± 6.9)
Total intake of OPP(mg/rat)			1269	2521	5053	9834	15940
Dairy intake of OPP(mg/kg/day)			202	411	803	1650	3014

1) Absolute weight, Mean±SD (g/ray/day) 2) Relative weight, Mean± SD (g/kg/day) 3) No. of rats
* Significantly different from control group at $P<0.05$

Table 2. Water Intake

Wk on study	No. of rats	Dietary level of OPP(%) 0	0.125	0.313	0.625	1.25	2.5
		10	10	10	10	10	10
Male							
0		16.5± 1.9 [1] (185.4±16.7)[2]	16.4± 1.0 (184.5± 9.4)	16.3± 1.1 (182.3±10.5)	17.0± 1.5 (189.7±14.6)	14.8± 0.4* (166.0± 8.4)*	7.7± 0.5* (8)[3] (86.7±16.3)*
1		16.2± 1.2 (136.8± 6.0)	16.5± 1.4 (140.1±10.2)	16.8± 1.3 (142.3± 6.6)	18.0± 1.6* (152.1±10.7)*	16.9± 0.9 (154.2± 6.6)*	15.9± 3.4 (8) (211.1±26.3)*
2		16.6± 1.7 (115.5± 7.7)	16.7± 1.1 (117.9± 5.1)	15.6± 5.6 (109.1±37.9)	17.6± 1.6 (122.7± 8.4)	16.6± 2.1 (127.0±13.5)*	14.5± 1.9* (8) (152.9±26.3)*
3		14.7± 3.7 (90.4±21.6)	17.3± 4.3 (111.7±37.0)	17.3± 2.2 (103.2± 7.4)	17.7± 1.3* (109.5± 7.0)*	16.2± 1.5 (112.4±11.5)*	15.4± 3.9 (8) (137.8±31.9)*
4		14.7± 2.0 (84.4± 7.7)	15.3± 1.6 (89.1± 7.3)	17.4± 2.7* (92.8± 6.3)*	17.8± 1.9* (101.0± 7.4)*	15.0± 1.1 (96.5± 8.1)*	13.7± 3.1 (8) (110.5±24.1)*
5		16.4± 2.3 (88.4± 5.7)	15.3± 2.5 (83.4± 7.0)	18.9± 3.6 (91.8± 6.2)	17.3± 3.1 (91.9±11.7)	15.5± 2.4 (94.7±12.3)	14.0± 5.1 (8) (105.4±27.2)
6		14.8± 2.7 (7) (74.4± 3.5)	14.3± 2.6 (9) (73.6± 6.0)	16.4± 3.0 (8) (76.6± 5.2)	16.1± 2.8 (9) (81.8± 7.5)*	14.8± 2.1 (7) (84.6± 4.4)*	16.9± 8.0 (4) (105.9±28.3)*
7		15.9± 4.0 (77.3±18.3)	14.7± 5.5 (72.0±17.6)	17.6± 3.0 (75.6± 4.2)	16.0± 2.9 (76.4± 8.1)	14.5± 2.5 (80.2± 7.3)	15.4± 6.2 (8) (104.3±21.1)*
8		16.7± 2.7 (77.5± 4.7)	16.0± 3.3 (77.1± 9.1)	19.1± 3.4 (78.4± 4.1)	17.9± 2.6 (82.7± 5.8)*	16.3± 2.3 (87.5± 8.5)*	17.5± 7.0 (8) (113.3±23.1)*
9		15.8± 3.6 (70.1± 7.0)	14.7± 3.0 (69.0± 5.6)	17.3± 3.1 (68.9± 3.0)	16.5± 2.3 (73.0± 5.4)	14.6± 3.3 (75,3± 7.1)	15.9± 4.4 (7) (109.5±23.2)*
10		16.8± 3.8 (70.7± 6.8)	15.4± 3.2 (68.0± 5.4)	18.6± 3.1 (69.8± 3.9)	17.9± 2.9 (74.3± 5.4)	16.0± 4.0 (76.7± 7.9)	17.8± 5.3 (7) (114.1±26.3)*
11		16.4± 3.8 (65.9± 6.3)	14.6± 3.0 (61.5± 5.6)	18.1± 3.0 (65.9± 3.9)	17.3± 2.7 (68.5± 5.3)	15.8± 3.5 (72.9± 4.1)*	17.9± 5.3 (7) (107.1±33.2)*
12		18.9± 2.6 (73.6± 2.9)	16.2± 2.5* (65.5± 4.7)*	19.9± 2.2 (70.8± 5.8)	19.0± 2.9 (73.1± 6.1)	17.6± 3.7 (77.6± 7.9)	21.4± 5.2 (7) (119.6±18.1)*
Female							
0		15.6± 1.4 (201.1±16.4)	15.1± 1.2 (198.2±12.6)	15.4± 1.3 (202.3±15.7)	15.6± 1.4 (202.5±16.4)	13.5± 1.9* (177.3±25.2)*	7.2± 1.0* (93.0±14.9)*
1		16.1± 1.2 (160.4± 9.9)	15.2± 1.9 (156.3±19.6)	15.2± 1.0 (156.3± 9.8)	15.7± 0.9 (158.7± 6.9)	14.4± 5.1 (154.5±53.6)	14.8± 2.1 (9) (216.6±62.8)*
2		15.6± 1.3 (134.7±10.6)	14.8± 1,5 (132.3±12.1)	15.6± 2.1 (138.6±18.4)	15.9± 0.5 (139.8± 6.8)	16.0± 1.6 (152.8±21.4)*	14.3± 2.9 (9) (168.5±62.0)*
3		15.5± 2.0 (120.6±13.5)	14.3± 1.9 (115.9±12.9)	15.1± 1.5 (122.7±11.7)	15.2± 1.2 (122.0± 8.3)	14.9± 1.9 (126.9±12.0)	13.9± 2.5 (9) (141.3±22.4)*
4		14.1± 1.8 (8) (104.1±11.5)	12.8± 2.1 (7) (99.7±13.6)	14.2± 2.7 (8) (108.0±16.1)	14.4± 1.4 (7) (109.4±11.2)	14.5± 1.8 (8) (115.6±12.3)	13.0± 2.2 (7) (121.8±20.2)
5		13.6± 2.5 (97.3±14.7)(8)	14.0± 2.1 (104.2± 8.6)(9)	14.1± 2.2 (105.2±11.2)(9)	14.5± 2.8 (106.7±12.7)(8)	14.4± 2.8 (113.6±15.5)	12.9± 2.1 (9) (116.4±18.9)*
6		13.6± 2.4 (8) (93.2±14.3)	13.5± 2.1 (9) (96.9±10.8)	12.9± 2.1 (9) (93.6± 7.5)	13.7± 2.4 (9) (98.5±15,3)	12.8± 2.9 (98.1±13.4)	13.2± 2.7 (9) (115.6±22.6)*
7		10.9± 4.6 (73.4±29.3)	12.4± 2.7 (85.0±12.8)	12.6± 2.6 (89.6±13.5)	13.4± 2.9 (92.5±16.4)	13.0± 3.2 (95.5±16.0)	13.4± 3.7 (9) (112.3±29.1)*
8		12.7± 2.5 (84.6±14.2)	13.8± 2.8 (94.0±16.4)	14.4± 2.2 (101.5±11.6)*	14.6± 2.9 (99.4±13.6)*	14.4± 3.5 (103.9±16.4)*	14.7± 3.5 (9) (119.7±21.1)*
9		12.7± 2.8 (83.6±15.9)	13.2± 1.8 (89.2±11.0)	13.1± 2.9 (90.0±10.3)	13.4± 2.9 (89.9±14.0)	13.7± 2.6 (97.5±11.0)*	15.4± 4.1 (9) (122.3±26.6)*
10		13.2± 3.0 (83.8±16.0)	14.0± 2.4 (90.2± 9.2)	13.5± 2.8 (89.6±10.4)	14.6± 3.2 (93.6±14.7)	14.1± 3.0 (95.8±15.0)	15.3± 2.4 (8) (117.0±15.4)*
11		13.3± 3.1 (83.3±17.5)	13.1± 2.1 (82.5± 8.6)	12.7± 1,9 (83.2± 6.1)	13.8± 2.9 (86.6±14.7)	14.0± 2.9 (92.9±14.5)	16.7± 4.1 (9) (121.9±24.1)*
12		14.1± 3.0 (86.2±15.3)	15.3± 3.5 (94.6±19.8)	14.4± 2.2 (91.5± 8.9)	15.8± 4.2 (96.1±22.0)	15.7± 2.8 (101.6±15.0)*	18.6± 3.6* (9) (132.3±22.9)*

1) Absolute weight, Mean± SD (g/rat/day) 2) Relative weight, Mean± SD (g/kg/day) 3) No. of rats
* Significantly different from control group at $P<0.05$

Table 3. Urinalysis

Dietary level of OPP(%)	No. of rats	pH 6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	Protein[3] −	±	+	++	+++	++++	Glucose −	±	+	++	Ketons −	+	++	Blood −	+	++	+++
Male																							
I[1] 0	10	3	2	4	1	0	0	0	4	4	2	0	10	0	0	0	10	0	0	10	0	0	0
0.156	9	1	2	6	0	0	0	1	4	3	1	0	9	0	0	0	9	0	0	9	0	0	0
0.313	10	4	1	5	0	0	0	1	3	5	1	0	10	0	0	0	10	0	0	10	0	0	0
0.625	8	2	1	4	1	0	0	0	3	5	0	0	8	0	0	0	8	0	0	8	0	0	0
1.25	9	3	2	3	0	1	0	0	7	1	1	0	9	0	0	0	9	0	0	9	0	0	0
2.5	6	6	0	0	0	0	0	1	5	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	5	0	0	1
II[2] 0	8	2	3	3	0	0	0	0	3	5	0	0	8	0	0	0	8	0	0	8	0	0	0
0.156	7	3	1	2	1	0	0	0	2	4	1	0	7	0	0	0	7	0	0	7	0	0	0
0.313	10	4	2	4	0	0	0	0	5	5	0	0	10	0	0	0	10	0	0	10	0	0	0
0.625	9	1	2	6	0	0	0	0	3	5	1	0	9	0	0	0	9	0	0	9	0	0	0
1.25	8	2	0	4	1	1	0	0	5	3	0	0	8	0	0	0	8	0	0	7	0	1	0
2.5	8	5	1	2	0	0	0	2	6	0	0	0	8	0	0	0	8	0	0	7	0	1	0
Female																							
I 0	9	5	1	3	0	0	0	1	6	2	0	0	9	0	0	0	9	0	0	9	0	0	0
0.156	10	5	4	1	0	0	0	1	3	5	1	0	10	0	0	0	10	0	0	10	0	0	0
0.313	10	4	1	5	0	0	0	1	8	1	0	0	10	0	0	0	10	0	0	10	0	0	0
0.625	10	3	1	5	1	0	0	2	6	2	0	0	10	0	0	0	10	0	0	10	0	0	0
1.25	10	6	3	0	1	0	0	0	2	7	1	0	10	0	0	0	10	0	0	10	0	0	0
2.5	9	9	0	0	0	0	0	0	2	5	2	0	9	0	0	0	9	0	0	9	0	0	0
II 0	10	3	0	6	1	0	0	1	3	6	0	0	10	0	0	0	10	0	0	10	0	0	0
0.156	10	4	1	4	0	1	0	0	5	5	0	0	10	0	0	0	10	0	0	10	0	0	0
0.313	10	4	2	3	0	1	0	1	8	1	0	0	10	0	0	0	10	0	0	10	0	0	0
0.625	10	2	2	6	0	0	0	2	7	1	0	0	10	0	0	0	10	0	0	10	0	0	0
1.25	10	3	4	3	0	0	0	3	5	2	0	0	10	0	0	0	10	0	0	10	0	0	0
2.5	9	8	1	0	0	0	0	2	3	4	0	0	9	0	0	0	9	0	0	9	0	0	0

1) Examination at wk 9 2) Examination at wk 13
3) − : Negative, ± : Trace, + : 30mg/d*l*, ++ : 100mg/d*l*, +++ : 300mg/d*l*, ++++ : >1000mg/d*l*
− : Negative, ± : Trace, + : Small, ++ : Moderate, +++ : Large
Test tapes® Labstix-II (Ames Division, Miles -Sankyo Co.,LTD.) were used for the examination

血液学的検査成績： Table 4に成績を示した．雄では2.5％群でRBC, Hgb, MCHC，雌では1.25％群および2.5％群のHgb, MCHが対照群とくらべ有意に低く，雌雄とも高濃度投与群に軽度の貧血傾向がみられた．

血清生化学検査成績： Table 5に成績を示した．用量と関連した変化は認められなかった．

器官重量： Table 6に成績を示した．絶対重量と体重比重量，また体重と器官重量との関係における器官特性を考慮して，重量変化に用量相関性があるとみられたのは雌雄の肝臓および腎臓重量の増加で，雄では肝臓および腎臓とも0.313％群以上で，雌では肝臓で1.25％群以上で，腎臓で2.5％群に増加がみられた．肝臓重量の増加はその組織障害が少ないことより代謝酵素誘導と関係が考えられ，腎臓重量の増加は腎臓の組織障害と関連するものと考えられる．

膀胱重量は，1.25％群雄で絶対重量および体重比重量

Table 4. Hematology

Dietary level of OPP(%)	No. of rats	RBC ($\times10^6$/mm^3)	Hgb (g/dl)	Hct (%)	MCV (μ^3)	MCH ($\mu\mu$g)	MCHC (%)	WBC ($\times10^3$/mm^3)	Differential count of leucocytes (%) Neutro	Lympho	Mono	Eosino
Male		0										
0	12	8.78±0.37[1]	17.7±0.4	44.4±2.0	51.2±1.1	20.3±0.8	39.9±1.4	8.31±1.97	14.7±5.6	83.4±5.6	1.1±1.2	0.6±1.2
0.156	11	8.81±0.51	17.8±0.5	45.1±2.1	51.6±1.2	20.3±0.9	39.4±1.5	8.03±0.87	16.3±5.9	82.1±6.6	0.9±0.9	0.5±0.6
0.313	11	8.94±0.51	17.7±0.8	45.3±1.9	50.8±0.9	19.9±0.6	39.1±0.9	8.21±1.59	14.5±4.5	84.5±4.6	0.1±0.4	0.7±1.0
0.625	11	8.63±0.46	17.5±0.6	43.8±1.4	51.2±1.1	20.3±0.7	39.9±0.8	8.42±1.55	15.0±4.4	83.0±5.1	0.7±1.0	1.1±1.0
1.25	12	8.50±0.42	17.1±0.9	43.5±2.2	51.8±1.0	20.3±0.7	39.4±1.3	7.89±1.93	12.7±4.5	85.4±4.9	0.6±0.7	1.1±1.2
2.5	8	8.33±0.47*	16.5±0.9*	43.4±3.0	52.4±2.6	19.9±0.5	38.1±2.1*	7.53±1.65	12.0±5.2	86.0±6.2	0.5±0.5	1.2±1.2
Female												
0	11	8.72±0.45	17.7±0.9	46.6±3.0	54.1±1.3	20.4±0.2	38.1±1.2	7.33±1.31	14.1±4.0	84.8±4.6	0.1±0.4	0.8±0.9
0.156	11	8.87±0.50	17.8±0.8	46.9±3.4	54.0±1.3	20.2±0.5	38.2±1.8	8.87±0.50	14.3±5.8	84.3±5.5	0.9±0.9*	0.3±0.5
0.313	12	8.73±0.53	17.7±0.9	46.3±2.9	54.2±1.2	20.3±0.6	38.3±1.6	8.73±0.53	13.5±6.8	85.0±6.9	0.7±1.0	0.6±0.8
0.625	11	8.73±0.50	17.5±0.5	46.4±2.6	53.8±1.2	20.1±0.7	37.8±1.5	8.73±0.50	11.0±3.8	88.0±4.2	0.0±0.3	0.8±1.3
1.25	12	8.56±0.46	17.0±0.8*	45.5±2.5	53.8±1.3	19.9±0.4*	37.4±1.2	8.56±0.46	11.8±5.8	87.0±6.0	0.5±0.6	0.5±0.5
2.5	12	8.55±0.57	16.7±0.9*	44.6±3.0	52.9±1.0*	19.7±0.6*	37.6±1.6	8.55±0.57	11.6±7.1	86 6±7.7	1.1±1.0	0.5±0.5

1) Mean±SD
* Significantly different from control group at $P<0.05$

Table 5. Blood Chemistry

Dietary level of OPP(%)	No. of rats	GOT (KU/ml)	GPT (KU/ml)	Alp (KAU/dl)	TP (g/dl)	Glu (mg/dl)	UN (mg/dl)	Cho (mg/dl)
Male								
0	10	113.7±14.6[1]	45.4± 6.9	13.4±1.0	6.6±0.2	145.0± 4.3	20.2±0.9	48.4±2.0
0.125	10	124.1±21.2	53.0±12.3	15.6±4.4	7.2±1.1	145.0±14.9	22.5±3.6	50.9±4.7
0.313	10	118.8±18.0	50.4±13.2	15.1±3.4	7.5±1.4	149.5±22.1	22.6±4.1	48.8±4.5
0.625	10	120.5±21.6	45.1±10.4	14.8±3.8	7.1±1.3	150.3±23.0	21.1±4.0	47.7±3.8
1.25	10	118.0±19.9	43.3± 2.2	15.0±3.3	6.8±0.9	144.2±11.9	20.7±2.7	47.6±3.1
2.5	8	128.0±12.9	49.4±20.4	19.2±7.0	7.3±1.5	151.0±18.3	24.0±5.3	55.1±7.2
Female								
0	10	136.2±24.9	46.6±15.2	14.2±4.6	6.9±0.9	145.5±13.4	20.2±3.6	52.3±4.2
0.125	10	121.8±15.8	41.8± 7.7	14.7±3.3	6.7±1.2	151.5±17.6	20.3±3.2	51.2±4.5
0.313	10	132.3±17.9	44.3±10.9	15.4±3.1	6.7±1.2	146.5±16.1	20.6±3.9	47.7±5.3*
0.625	10	136.7±25.8	43.9± 9.6	16.7±3.8	7.0±1.0	152.3±18.7	22.4±3.8	51.7±6.5
1.25	10	121.2±25.0	39.5±10.1	14.7±4.2	7.1±1.0	141.2± 6.3	20.7±2.6	51.6±3.7
2.5	9	120.2±22.0	35.0± 6.5	15.5±3.3	7.0±1.3	136.7± 6.7	22.8±4.3	55.8±4.4

1) Mean±SD
* Significantly different from control group at $P<0.05$

ともに，2.5％群のそれよりも大きい値を示した．2.5％群では体重比重量のみが有意な値であった．この成績は，膀胱粘膜の増殖性変化における用量関係と符合するものである．

肉眼的観察・病理組織学的観察成績： 試験途中死亡の2.5％群雄2例，雌1例はいずれも試験開始2週間以内の死亡で痩せが目立ち，解剖時に胃内容物は認められず，また腸管内にも極く少量の内容物がみられたのみであった．組織学的には胃・腸をはじめ他の器官でも顕著な変化は観察されなかった．

試験終了時の解剖・肉眼的観察では，腎臓の表面に水胞状隆起が，0.156％群雄1例，2.5％雄12例に認められた．その他認めるべき変化は観察されなかった．固定後の観察では1.25％群雄の膀胱粘膜に結節状の小隆起がみられる例があった．

病理組織学的観察でOPPの摂取に関連してみられた変化は腎臓の炎症性変化と膀胱粘膜の増殖性変化で，これについては別に報告[5]したが，腎臓の変化は2.5％群雌雄に，膀胱の変化は1.25％群雄において顕著であった．その他の器官・組織では特記すべき変化を認めなか

Table 6. Organ Weights

Dietary level of OPP(%)	No. of rats	Body weight(g)	Brain (mg)	Heart. (mg)	Liver (g)	Spleen (mg)	Thymus (mg)	Kidney R (mg)	Kidney L (mg)	Adrenal R (mg)	Adrenal L (mg)	Testis /Overy R (mg)	Testis /Overy L (mg)	Prostate /Uterus (mg)	Bladder[3] (mg)
Male															
0	12	254.0[1] ±37.7	1913[1] ± 46	743 ±108	8.75 ±1.98	533 ±49	190 ±16	891 ±144	887 ±139	17.1 ±2.2	18.9 ±2.5	1341 ± 94	1383 ± 99	184 ± 67	95.2 ± 8.7 (11) [4]
			766[2] ± 96	293 ± 11	3.41 ±0.29	212 ±15	76 ± 9	351 ± 19	349 ± 17	6.8 ±0.6	7.5 ±0.6	534 ± 50	551 ± 54	71 ± 16	37.1 ± 5.5
0.156	11	252.0 ±28.3	1910 ± 38 (10)	722 ±107	8.59 ±1.56	511 ±54	163* ±16 (10)	881 ± 97	874 ±102	16.8 ±1.8 (10)	18.6 ±2.2 (10)	1311 ± 97	1353 ± 90	182 ± 76	92.5 ± 9.5
			759 ± 76	286 ± 21	3.39 ±0.28	203 ±12	67* ± 9	350 ± 12	347 ± 13	6.8 ±0.8	7.5 ±1.1	523 ± 31	540 ± 33	70 ± 27	37.2 ± 6.3
0.313	11	285.3* ±32.9	1929 ± 45	814 ± 93	10.43* ±1.38	571 ±45	202 ±32	989 ±109	1010* ±118	18.5 ±2.5	20.6 ±2.5	1372 ± 53 (9)	1410 ± 54 (9)	254* ± 74	95.1 ±11.8
			683* ± 68	286 ± 11	3.65* ±0.14	201 ±11	71 ± 8	347 ± 16	354 ± 14	6.5 ±0.9	7.3 ±0.9	484* ± 47	498* ± 50	88* ± 19	33.4 ± 2.5
0.625	11	264.3 ±23.0	1935 ± 57	768 ± 96	9.70 ±1.41	556 ±48	174* ±13	967 ± 91	965 ± 86	19.2* ±1.8	20.6 ±3.2	1359 ± 85 (10)	1411 ± 62 (10)	229 ± 77	103.6 ±12.2
			736 ± 53	290 ± 14	3.66* ±0.27	211 ±17	66* ± 7	366* ± 12	366* ± 16	7.3* ±0.5	7.8 ±1.0	509 ± 23	530 ± 28	85 ± 24	39.5 ± 5.7
1.25	12	240.8 ±37.9	1909 ± 58	695 ±102	9.23 ±2.19	505 ±69	173* ±15	893 ±145	903 ±139	16.5 ±3.9	18.8 ±3.3	1328 ±131	1366 ±129	181 ± 80	133.1* ±24.5
			810 ±117	289 ± 13	3.79* ±0.40	211 ±10	73 ±12	371* ± 14	**376*** ± 11	6.8 ±1,1	7.8 ±1.0	557 ± 44	574 ± 51	73 ± 25	55.4* ± 6.1
2.5	8	198.8* ±36.8	1817* ± 75	589* ±111	8.26 ±2.43	457* ±67	144* ±15	829 ±125 (7)	778 ±126 (7)	14.5* ±1.7 (7)	16.5 ±2.8 (7)	1232 ±156	1269 ±168	136 ± 88	97.6 ±20.2
			935* ±132	297 ± 28	4.09* ±0.43	231* ±18	75 ±14	438* ± 48	409* ± 23	7.7* ±0.7	8.8 ±1.7	626* ± 51	645* ± 55	64 ± 31	59.3* ± 7.0
Female															
0	11	163.7 ±10.8	1790 ± 34	521 ± 28	5.04 ±0.26 (10)	390 ±26	165 ±12	629 ± 21 (10)	626 ± 22 (10)	20.2 ±1.7 (10)	23.1 ±2.4 (10)	25.6 ±4.9	24.4 ±6.5	345 ±109	85.5 ±18.6
			1097 ± 72	319 ± 7	3.04 ±0.15	238 ± 9	101 ± 7	379 ± 22	377 ± 22	12.2 ±1.1	13.9 ±1.3	15.6 ±2.7	14.8 ±3.6	210 ± 66	52.2 ±11.1
0.156	11	163.4 ±14.4	1785 ± 51	516 ± 41	4.99 ±0.58	389 ±12 (9)	174 ±14	603 ± 41	616 ± 55	20.9 ±3.7	23.9 ±3.8	27.7 ±5.7	27.7 ±6.2	392 ±113	78.9 ± 7.3 (9)
			1099 ± 86	316 ± 8	3.05 ±0.16	242 ±13	107 ± 8	370 ± 17	377 ± 16	12.8 ±1.8	14.7 ±2.1	16.9 ±2.6	16.9 ±3.3	239 ± 65	48.0 ± 7.0
0.313	12	160.4 ±14.7	1802 ± 42	506 ± 45	4.99 ±0.50	386 ±22	177 ±16	608 ± 48	610 ± 44	21.4 ±3.5	22.3 ±4.7	24.2 ±6.8	25.6 ±4.9	377 ±118	76.9 ± 6.3 (10)
			1130 ± 82	316 ± 17	3.11 ±0.13	241 ±13	111* ±12	380 ± 24	381 ± 20	13.3 ±1.7	13.8 ±2.2	15.0 ±3.4	15.9 ±2.1	233 ± 63	47.4 ± 4.3
0.625	11	163.2 ±11.3	1781 ± 50	497 ± 42	5.07 ±0.62	384 ±27	180* ±12	604 ± 35	615 ± 53	20.1 ±3.9	22.4 ±5.0	26.2 ±6.1	23.3 ±4.7	327 ±136 (10)	79.6 ± 2.6 (7)
			1095 ± 57	305* ± 16	3.10 ±0.20	236 ±17	111* ±11	370 ± 13	376 ± 14	12.2 ±1.8	13.7 ±2.5	15.9 ±3.1	14.2 ±2.4	199 ± 74	48.8 ± 4.3
1.25	12	156.2 ±12.8	1782 ± 32	492 ± 41	5.36 ±0.63	357* ±37	161 ±16 (10)	601 ± 56	607 ± 49	18.5 ±3.0	20.5 ±3.2	25.3 ±4.6 (11)	26.0 ±3.7 (11)	310 ±115	85.6 ± 8.4 (11)
			1147 ± 80	315 ± 19	3.42* ±0.17	229 ±17	102 ± 9	385 ± 19	389 ± 15	11.8 ±1.3	13.1 ±1.7	16.1 ±2.3	16.5 ±1.8	196 ± 62	54.8 ± 3.3
2.5	11	145.5* ±12.9	1777 ± 30 (10)	475* ± 20 (9)	5.90* ±0.91	358* ±23 (10)	150* ±11 (10)	632 ± 61	620 ± 46	19.4 ±2.0	21.0 ±2.4	22.2 ±4.6	23.5 ±5.5	266 ±101	86.0 ±11.0 (8)
			1199* ± 59	317 ± 10	4.04* ±0.32	241 ±10	101 ±10	436* ± 40	428* ± 37	13.4* ±1.1	14.5 ±1.6	15.3 ±2.8	16.0 ±3.1	180 ± 62	58.9 ± 4.8

1) Mean(Absolute)±SD 2) Mean(Relative)±SD(/100g Body Weight) 3) Weighed after fixation 4) No. of the organs
* Significantly different from control group at $<$P 0.05

った.

がん原性試験における投与量の設定： 化学物質のがん原性試験指針の多くは[6], 3カ月程度の悪慢性試験の結果から，対照群と比較し10％程度の体重減少にとどまり，中毒による死亡例がなく，かつ一般状態に著しい変化を示さない最大量を推定し，がん原性試験の最高用量とすることを示している.

本試験で2.5％群では死亡例もあり，体重抑制，腎臓の障害も顧著であった. 1.25％群雄は体重抑制は最高14％で膀胱を除きその他に顕著な障害はなかった. 雌は体重抑制最大7.5％で，その他に顕著な障害はなかった. 雄の体重抑制は最高14％で指針の10％を若干越えるが，膀胱粘膜で既に増殖性変化が観察され，また，OPP-Naにおいて膀胱発がんの最高発現率を示した2.0％群に対応することを考慮して，がん原試験に用いる最高用量は雌雄とも1.25％とすべきであると考える.

ま と め

1. 食品添加物･保存料（防ばい剤）オルトフェニルフェノール(OPP)の0.156, 0.313, 0.625, 1.25および2.5％添加飼料によるF 344/DuCrjラット雌雄の13週間にわたる飼育実験を行い，OPPのがん原性試験における最高用量を求めた.

2. この間のOPP 1日体重kg当り平均摂取量mgは，0.156％群雄182，雌202，0.312％群雄391，雌411，0.625％群雄761，雌803，1.25％群雄1669，雌1650，2.5％群雄2798，雌3014であった.

3. 0.156％群，0.313％群および0.625％群雌雄では全観察項目において顕著な変化は認められなかった.

4. 1.25％群では摂餌量はやゝ少く，体重増加は抑制され，その最大抑制率は雄14％，雌7％で，雌雄肝臓重量増加，雌腎臓重量の増加，雄膀胱重量の増加と組織学的に粘膜の増殖性変化が認められた.

5. 2.5％群では摂餌量は少く，体重増加は顕著に抑制され，途中死亡例がみられた. 尿のpHは低下し，潜血発現例あり，血液学的には貧血がみられた. 肝臓および腎臓重量は増加し，腎臓では炎症性変化が顕著であった.

6. 以上の成績を考察し，OPPのがん原性試験における最高投与量（飼料への添加濃度）は雌雄ともに1.25％が適当と判断した.

文 献

1) Hodge, H.C., Maynard, E.A., Blanchet, H.J.Jr, Spencer, H.C., and Rowe, V.K. : *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 104, 202, 1952
2) Hiraga, K. and Fujii, T. : *Fd Cosmet. Toxicol.* 19, 303, 1981
3) 井口重孝，田山邦昭，平賀興吾：東京衛研年報, 30-2, 67, 1979
4) 溝入 茂，広門雅子，中島和雄，中嶋 巌，遠藤英美：東京衛研年報，32-2, 28, 1981
5) Hiraga, K. and Fujii, T. : *Fd Chem. Toxic.*印刷中
6) Sontay, J.M., Page, N.P. and Saffiotti, U. : Guidelines for carcinogen bioassay in small rodentsn (NCI-CG-TR-I). DHEW Publication No. (NIH) 76-801

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 416-424, 1984

オルトフェニルフェノールナトリウム（OPP-Na）のラット膀胱上皮細胞の微細構造におよぼす影響

福森信隆*, 佐々木美枝子*, 平賀興吾*

Effects of Sodium *o*-Phenylphenate (OPP-Na) on Ultrastructure of Bladder Epithelium in Rats

NOBUTAKA FUKUMORI*, MIEKO SASAKI* and KOGO HIRAGA*

Ultrastructural changes induced by sodium *o*-phenylphenate (OPP-Na) in the urinary bladder epithelium of male F344/DuCrj rats were examined by transmission electron microscopy. Animals were fed the experimental diet containing OPP-Na (2 % in diet) for 4 wks, and samples of the bladder were prepared once a week. The superficial cells with projection of small sharp-formed microvilli appeared, and the fusiform vesicles decreased in these cells. The nuclei became enlarged moderately accompanying the well-development of nucleoli and the proliferation of nucleolonema. The cell layers in the transitional epithelium increased progressively and the length of superficial cells became also longer. After 4 wks feeding, the increase of dark-stained cells and a few mitoses of cells were often observed. OPP-Na has been reported to cause the bladder cell tumor in F344 rats. It was suggested that these changes which came out earlier than progression of tumor are the prodromes of OPP-Na-induced bladder tumor.

Keywords: sodium *o*-phenylphenate, ultrastructural alteration, bladder epithelium, rat

緒　言

オルトフェニルフェノールナトリウム（OPP-Na）は柑きつ類の保存の目的で防ばい剤として使用されている．近年，当部で行ったOPP-Naの経口摂取試験で膀胱腫瘍の発生がみられ，2％濃度で雄ラットに多発することが報告された[1]．腫瘍の発生は比較的早期から認められ，13週間摂取で乳頭腫，移行上皮癌が確認された．

このような観点から，OPP-Naによる膀胱粘膜上皮の癌化への移行過程を初期の形態的変化として把握する目的で，OPP-Naを連続経口摂取させた時の移行上皮細胞の微細構造に対する影響について透過型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）を用い1週間馴化飼育した後，異常の認められない動物を5週令より実験に供した．飼育条件は室温25±1°，湿度50±5％，照明時間12時間の環境下で，ステンレスケージに1群3匹ずつ収容した．検体は，OPP-Na（ダウケミカル，Dowicide A, Lot No. MM 01044）を飼育用粉末飼料（日本クレア，CE-2）に2%の割合で混合させ，固型化したものをろ過水道水とともに自由に摂取させた．なお対照群は飼育用固型飼料（日本クレア，CE-2）を同様に与えた．摂取期間は4週間とし，4群設定した動物は各週ごとに放血屠殺を行った．膀胱は尿道より注射筒を用いて生理食塩水で腔内を洗浄して，OPP-Na 摂取開始後1，2週では0.3 m*l*，3，4週では0.4 m*l*の3％パラホルムアルデヒド前固定液（0.1 Mリン酸緩衝液，pH 7.4）を注入し，一定の膨化状態を保持させるため尿道部の結紮を行った．一晩氷室内で固定液中に放置後，尿道部より頂部に向って切開し，膀胱底部の一定部位から3ヶ所の細切片を切り出し電顕用試料とした．さらに0.1Mリン酸緩衝液で洗浄後，1％オスミウム酸（0.1Mリン酸緩衝液，pH7.4）を用い，1.5時間の後固定を行った．その後定法に従い，エタノール脱水を行い，*n*-ブチルグリシジルエーテルで置換しEpon樹脂に包埋した．包埋した試料から厚さ約1 μm のトル

* 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

イジン青で染色した準超薄切片を作製し，光顕的観察を行った後，Porter-Blum MT-2型ミクロトームで超薄切片を得，酢酸ウラン・クエン酸鉛二重染色を施して日立 HU-12 A 型電子顕微鏡にて検鏡した．

実験結果

光顕的所見 対照群は実験期間を通して変化がみられず，2～4層の移行上皮層で腔側が被われ，核，核小体の肥大，暗調細胞の増加などは認められなかった．投与群においては投与後1週では，細胞層は3～5層となり，1例に暗調細胞の増加がみられ，核，核小体では軽度な発達を示したが核分裂像はみられなかった．投与後2週の細胞層は3～5層で1週目と大差を認めないが暗調細胞の増加がみられた．核，核小体の発達は良好で肥大傾向を示し，3例中2例に少数ではあるが基底細胞層で核分裂像が認められた．投与後3週での移行上皮層の変化は，2週とほぼ同程度を示した．投与後4週では，細胞層は3～8層の層厚となり限局性に多層化した上皮細胞を認める部もみられ，それらの多くは過染性を示す暗調細胞の増加を伴っていた．核の肥大は顕著で，核小体の増大，chromatin の分散，増加を示し，粘膜固有層に接する基底細胞層で核分裂像が散見された．これらの変化は，細胞層の多層化した部で特に著しかった．なお，上皮細胞下の筋層，漿膜での変化は明らかでなかった．

電顕的所見 超薄切片像で観察すると，対照群の正常細胞では腔側に存在する表層細胞はやや大型化し表面に細胞の不規則な突出がみられた．細胞は相互に突起を出し junctional complex により結合され，desmosome が時折みられた．細胞質内には fusiform vesicle が大小不同の大きさで散在しており，細線維の網工を呈する tonofilament, mitochondria, Golgi 装置などが観察された（Fig. 1）．投与後1週では，対照群と大差がみられないが，一部腔側の表層細胞面に少数の短小な microvilli がみられる細胞を認め，その細胞では fusiform vesicle が減少する傾向を示した（Fig. 2）．核，核小体は軽度に肥大し nucleolonema の発達がみられたが，tonofilament の増減は明らかでなかった．投与後2，3週では，表層細胞の microvilli が全例に軽度ではあるが増加がみられ，細胞間の間隙が入り組み細胞の背高が高くなる傾向を示した（Fig. 3，4，5）．細胞質内の fusiform vesicle は減少を呈したが，tonofilament には変化がみられなかった．核，核小体はさらに肥大し nucleolonema が明瞭な網工を呈した（Fig. 3）．最表層部でみられた暗調細胞は萎縮傾向があり，organelles の構築が不明瞭で不整な核膜を持つ核濃縮がみられ壊死像を認めた．投与後4週の表層細胞での microvilli は2，3週に比べ増加し，全体的に伸長しているが，細胞により若干の程度の差が認められた．Microvilli の多い細胞では fusiform vesicle の減少が著しく，消失も認められた．多層部の上皮細胞では間隙の離開がみられ，junctional complex の突起で接合された像がみられ（Fig. 7），また腔側の表層部では，暗調細胞も認められた（Fig. 6）．核，核小体の肥大は継続しており，nucleolonema の増殖が著しく（Fig. 6，7），分裂像をも観察された（Fig. 8）．細胞の背高は対照群が比較的扁平な形を呈するのに比較して高く伸長し（Fig. 6），また隣接細胞の接着部での infolding された嵌入の長さが増加する傾向を示した．他の organelles の変動は著変が認められなかったが，mitochondria は投与群の表層細胞に幾分多くみられる傾向を示した．

考　察

膀胱が癌化する過程は様々な段階を経るが[2]，今回行った検索では癌原物質に暴露されてから極めて初期に進行する微細構造の変化を電顕的観察によりとらえた．2% OPP-Na の摂取で腫瘍が多発することから[1]濃度を2%に設定して粘膜上皮の初期変化の過程を経時的に観察したところ，投与後2週頃から表層細胞の変化が認められた．

移行上皮細胞の層厚は投与後3週まで対照群と比較して若干増加している部がみられたが著しい差異がなく，一方4週では，細胞の多層化が顕著な肥厚部をも認めた．4週でみられた多層化は，*N*-butyl-*N*(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) などの膀胱発癌の際，投与後約6週で細胞層が5～7層にびまん性の増生を認める単純性過形成期の変化[2]に近似することから過形成の初期であると考えられ，今後さらに細胞層の増生が形成されると思われる．

細胞増殖を行う核分裂は，結合組織に接する基底細胞側で少数ではあるが投与後2週から散見された．一般に移行上皮細胞では細胞分裂像を認めることが困難であるが[3]，今回投与群で観察されたことは細胞増殖がかなり早い時期から促進されていると考えられる．さらに投与後1週より観察された核の肥大，核小体の増大，nucleolonema の増加，分散は4週まで漸次増強されて継続していたことと関連して，核への OPP-Na の強い作用が示唆される．先に検索した肝細胞に対する OPP-Na の影響では，投与後1週より核，核小体の肥大傾向および摂取期間中の肥大の持続は認められたが，肝細胞での細胞分裂像はみられなかった[4]．いずれも核の活発な機能亢進を意味するが，膀胱の粘膜上皮と肝細胞とでは細胞分裂の有

無から考慮して作用の相違が考えられるが明らかでない.

表層細胞でみられた過染性を示す暗調細胞は，対照群ではほとんど認められないが投与群で増加しており，核，細胞質の変化から壊死過程の像と思われる．細胞の背高は対照群が比較的扁平な形状を呈するのに比べ，投与群の特に多層化した部では背高が高く伸長し，隣接細胞との嵌入が深くなっていることから粘膜上皮細胞の離脱が起こりにくい状態であると考えられる.

表層細胞層の腔側に接する細胞面は，正常細胞においても平面な構築ではなく凹凸の突出がみられるが，投与群では先端が鋭角を呈する microvilli の出現が観察された．投与後1週の形態は一部の細胞で少数ではあるが短小形を示し，2週頃からは背高が伸長してびまん性にみられ，以後増加する傾向が認められた．腔側の表層細胞を走査型電子顕微鏡で観察すると，正常細胞では通常六角の多角形の境界を持ち表面が microridge と呼ばれる皺壁から形成されている[3,5]のに対して，投与群でみられた microvilli の増加は，癌化する移行過程で皺壁の離断が行われ，その離断部が microvilli となり突起すると解される．癌化の過程では，はじめ短小同長の microvilli が出現し漸次増加して，以後腫瘍細胞では大小不整の microvilli が表面に密在する．不整な microvilli が明瞭に確認されるのは，約8週前後の乳頭状あるいは結節状過形成の時期といわれている[2]．さらに *N*-methyl-*N*-nitrosourea で発生する乳頭腫においても，表層細胞の腔側に著しい microvilli の増加を認めている[6]．Microvilli の出現は移行上皮細胞の腫瘍化への進行に不可欠な現象である．今回の観察で投与後早期から microvilli の出現を認めたことは，腫瘍細胞に比べて顕著な密在が認められず，また投与後2，3週では不完全な三角状を呈する microvilli が多かったことなどから，以後 OPP-Na の投与の継続により一層密に伸長した microvilli が増加すると思われる.

細胞質の fusiform vesicle は膜構造を持ち腔側の表面と連続することから，細胞膜の嵌入が分岐されたため空胞として観察される．投与群では microvilli の増加に伴ってこれらの空胞が減少することから，microridge の離断による細胞膜の一連の変化に関連した現象と考えられる．また tonofilament の変動は全期間を通して明らかでなかった．腫瘍細胞では，fusiform vesicle の減少および tonofilament の増加[6,7]や減少[2]がみられることから，今回観察した4週までの期間で tonofilament の増減が明らかでなかったことは，未だ腫瘍化に至らない状態と思われる.

移行上皮癌は，明細胞，暗細胞を構成して，核の異型性，分裂像とともに多数の不整な microvilli を持ち，それらが相互に組みあって発育し，fusiform vesicle の減少，消失を特徴とする[8]．今回の観察は，癌化する過程の極めて初期の変化であり，主に核，microvilli, fusiform vesicle, tonofilament の腫瘍細胞の特徴に着目して行ったところ，表層細胞の腔側面での変化が投与後早期から出現することがわかった．これらの変化は，膀胱移行上皮の細胞層の増生と細胞分裂があまり多くないことから過形成の初期の段階と考えられるが，微細構造の変化は明らかに正常細胞とは異なり，microvilli の増加，fusiform vesicle の減少などの変化した状態が更に継続して腫瘍化への進行を示唆すると考えられる.

文　献

1) Hiraga, K. and Fujii, T.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 303, 1981
2) 伊東信行，荒井昌之：癌の科学，4，387，1979，南江堂
3) 瀬口春道：電子顕微鏡，17，92，1982
4) 福森信隆，佐々木美枝子，平賀興吾：東京衛研年報，34，329，1983
5) Severs, N. J. and Hicks, R. M.: *J. Ultrastruct. Res.*, 69, 279, 1979
6) Tannenbaum, M., Tannenbaum, S., Richelo, B. N. and Trown, P. W.: *Scanning Electron Microscopy*, 3, 673, 1979
7) 畠山　茂：細胞組織図譜IV，160，1971，医学書院
8) Arai, M., Kani, T., Sugihara, S., Matsumura, K., Miyata, Y. and Ito, N.: *GANN*, 65, 529, 1974

Explanation of Figures

Fig.1. A superficial cell (S) of the normal bladder epithelium from the male F344 rat. The various forms of protrusion on the surface of large cell and numerous fusiform vesicles (V) in the cytoplasm are seen. The junctional complex (arrow) between the cells was made up by complicated membrane. × 8900

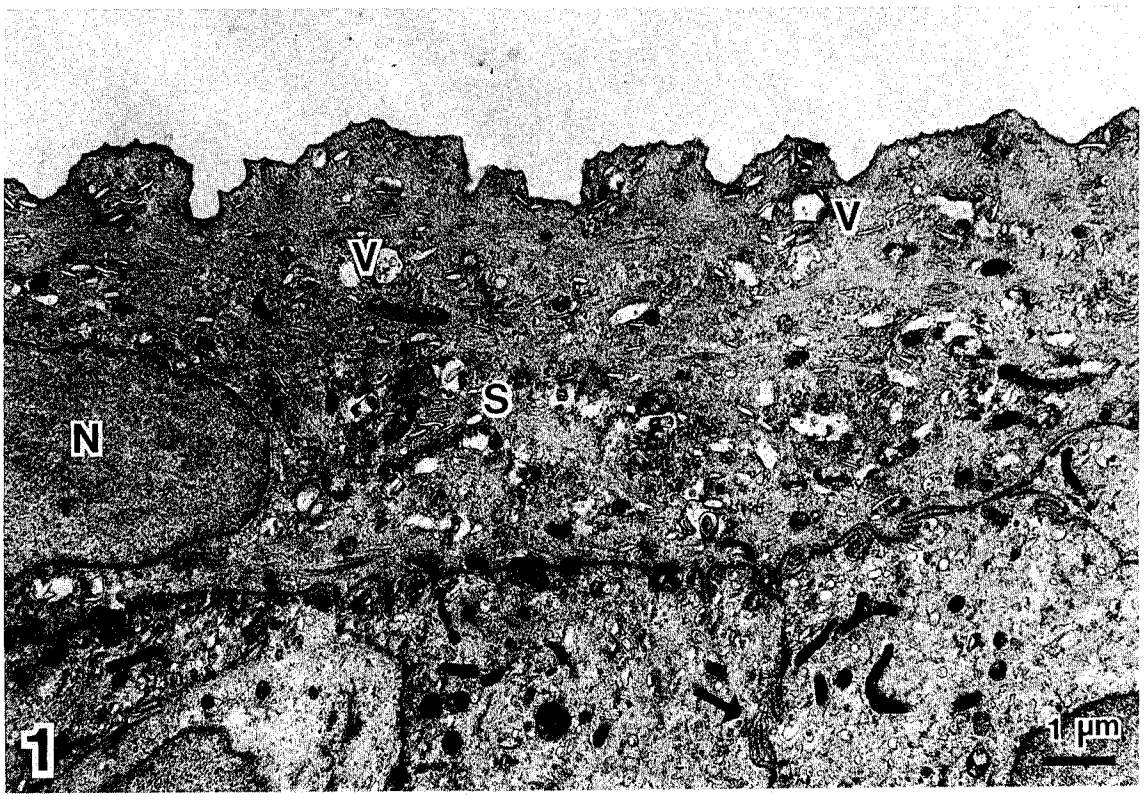
Fig.2. A portion of the superficial cells from the rat fed with 2 % OPP-Na for a week. The surface cells are covered with small microvilli (arrows) slightly accompanying the decrease of fusiform vesicles (V). × 9600

Fig.3, 4. A portion of the superficial cells from the

rat fed with 2% OPP-Na for two weeks. There is further increase and elongation of microvilli on the surface into the lumen. Fig.3 ×7800 Fig.4 ×7800

Fig.5. A portion of the superficial cell from the rat fed with 2% OPP-Na for three weeks. A sharp-pointed microvilli, enlargement of nucleus (N) and slight increase of mitochondria(M) are observed. × 7700

Fig.6, 7, 8. A portion of the epithelial cells from the rat fed with 2% OPP-Na for four weeks. The dark cell(DC) is seen among the superficial cells, and then the length of cells seems to become longer(Fig.6). The cellular surface detached from other cells are observed at the part of numerous layers(Fig.7). The well-development of nucleolonema (Fig.6. 7) and the telophase of mitosis(Fig.8) in the epithelium are also shown. Fig.6 × 7000, Fig.7 × 5200 Fig.8 ×6900


V
V
S
N
1 µm
1

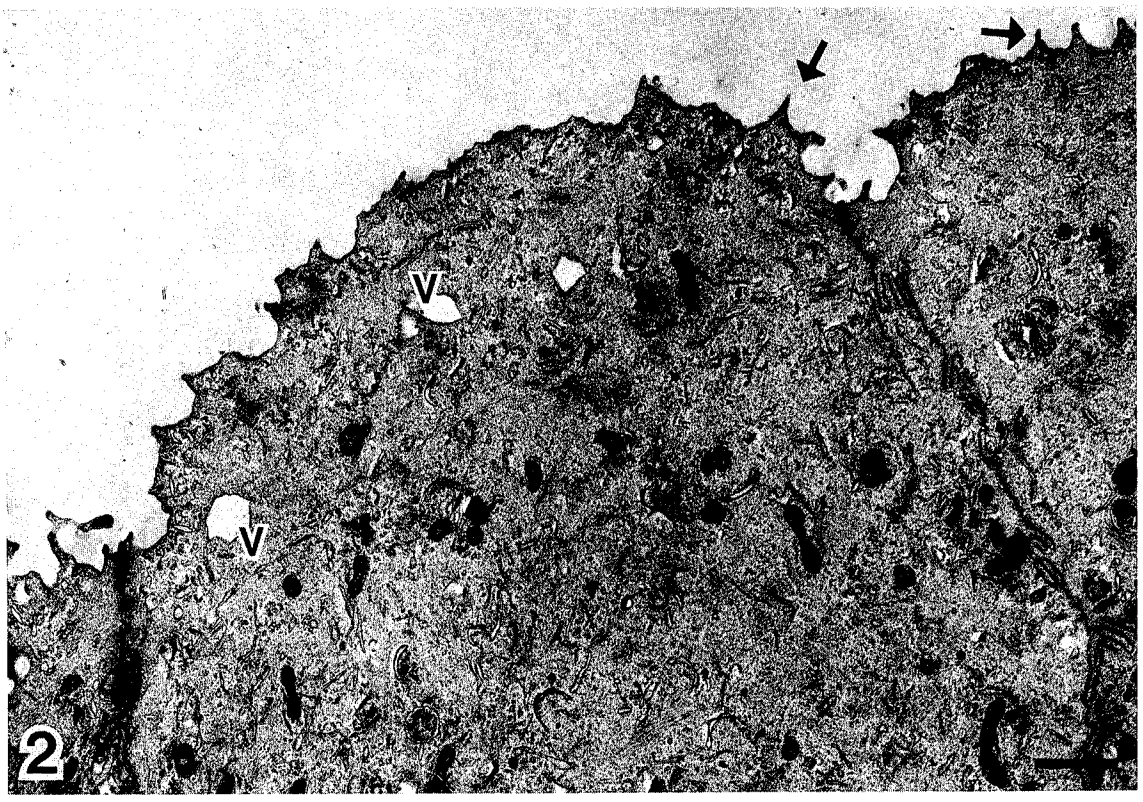

V
V
2

Table 1. Urinalysis

Week on study	Dietary level of OPP-Na(%)	No. of rats	pH					Protein[1]						Glucose[2]		Ketones[2]		Blood[2]				Stone[3]	
			6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	−	±	+	++	+++	++++	−	±	−	+	−	+	++	+++	−	+
0[a]	0	6	2	3	1	0	0	0	0	2	4	0	0	6	0	6	0	6	0	0	0	6	0
	2	16	7	7	2	0	0	0	2	7	7	0	0	16	0	16	0	16	0	0	0	16	0
1	0	5	1	3	1	0	0	0	0	3	1	1	0	5	0	5	0	5	0	0	0	5	0
	2	17	0	2	7	7	1	0	2	11	4	0	0	17	0	17	0	17	0	0	0	17	0
2	0	6	1	2	2	1	0	0	0	3	3	0	0	6	0	6	0	6	0	0	0	6	0
	2	17	0	2	7	7	1	0	5	12	0	0	0	17	0	17	0	17	0	0	0	17	0
3	0	6	1	2	1	2	0	0	0	3	3	0	0	6	0	6	0	6	0	0	0	6	0
	2	19	1	2	2	11	3	0	5	8	5	1	0	19	0	19	0	19	0	0	0	19	0
4	0	4	1	3	0	0	0	0	1	2	1	0	0	4	0	4	0	4	0	0	0	4	0
	2	18	1	1	4	9	3	0	3	10	4	1	0	18	0	18	0	18	0	0	0	18	0
5	0	6	1	3	0	2	0	0	1	2	3	0	0	6	0	6	0	6	0	0	0	6	0
	2	15	1	1	3	7	3	0	2	8	5	0	0	15	0	15	0	15	0	0	0	15	0
6	0	5	0	2	0	3	0	0	0	1	2	2	0	5	0	5	0	5	0	0	0	5	0
	2	20	0	1	5	9	5	0	3	6	7	4	0	20	0	20	0	17	0	1	2	20	0
7	0	6	1	2	1	2	0	0	0	2	3	1	0	6	0	6	0	6	0	0	0	6	0
	2	22	1	2	3	10	6	0	1	9	7	5	0	22	0	22	0	20	1	0	1	22	0
8	0	6	1	2	1	1	1	0	0	1	3	2	0	6	0	6	0	6	0	0	0	6	0
	2	12	1	1	4	3	3	0	1	5	5	1	0	12	0	12	0	12	0	0	0	12	0
9	0	5	0	2	2	1	0	0	0	2	3	0	0	5	0	5	0	5	0	0	0	5	0
	2	9	2	1	4	1	1	0	1	3	4	1	0	9	0	9	0	9	0	0	0	9	0
10	0	3	0	2	1	0	0	0	0	1	2	0	0	3	0	3	0	3	0	0	0	3	0
	2	15	1	2	7	4	1	0	0	2	12	1	0	15	0	15	0	12	2	1	0	15	0
11	0	5	0	1	4	0	0	0	0	1	2	2	0	5	0	5	0	5	0	0	0	5	0
	2	16	0	4	6	5	1	0	0	5	9	2	0	16	0	16	0	12	3	1	0	15	1
13	0	5	0	2	3	0	0	0	0	0	3	2	0	5	0	5	0	5	0	0	0	5	0
	2	11	0	1	9	1	0	0	0	0	5	6	0	11	0	10	1	7	2	2	0	11	0
15	0	6	1	3	2	0	0	0	0	0	5	1	0	6	0	6	0	6	0	0	0	6	0
	2	13	1	5	3	3	1	0	0	1	8	4	0	13	0	13	0	8	3	2	0	13	0
17	0	5	1	2	2	0	0	0	0	0	3	2	0	5	0	5	0	5	0	0	0	5	0
	2	10	1	3	6	0	0	0	0	4	3	3	0	10	0	10	0	3	2	3	2	10	0
24	0	5	3	2	0	0	0	0	0	0	4	1	0	5	0	5	0	5	0	0	0	5	0
	2	13	1	4	6	2	0	0	0	6	6	1	0	13	0	13	0	6	4	2	1	3	10
30	0	4	2	2	0	0	0	0	0	0	2	2	0	4	0	4	0	4	0	0	0	4	0
	2	14	1	3	10	0	0	0	0	2	6	6	0	14	0	13	1	7	2	2	3	4	10
35	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	4	0	4	0	4	0	0	0	4	0
	2	8	1	3	2	2	0	0	0	3	4	1	0	8	0	8	0	6	2	0	0	1	7
52	0	5	4	1	0	0	0	0	0	0	0	3	2	5	0	5	0	5	0	0	0	5	0
	2	25	1	6	11	5	2	0	0	5	16	4	0	24	1	24	1	14	3	3	5	5	20

1) − : negative, ± : trace, + : 30mg/d*l*, ++ : 100mg/d*l*, +++ : 300mg/d*l*, ++++ : >1000mg/d*l*.

2) − : negative, ± : trace, + : small, ++ : moderate, +++ : large. 3) macroscopically examination.

a) examination before the beginning of administration.

Labstix®-II (Ames Division, Miles-Sankyo Co., LTD.) of reagent strips was used for the assessment of pH, protein, glucose, ketones and blood in urine.

結果および考察

強制採尿法による尿検査成績を Table 1, 2 に示した．投与群と対照群との間に特に相違がみられたのは pH，潜血および結石であり，対照群では pH は 7 前後を示し，潜血および結石は認められなかった．また蛋白量は投与群でわずかに低下傾向がみられ，ブドウ糖，ケトン体は両群ともほとんど陰性であった．この他，投与群では強制採尿法で尿が出にくくなり，1 回の採尿量も少ない傾向がみられた．また尿の色調は投与初期より薄い傾向がみられたが，24 週以降には赤褐色あるいは乳白色の尿もみられるようになった．

OPP-Na 投与により，**pH** は上昇傾向を示し，pH メーターによる測定値ではどの週も対照群より高く，ある個体では最高値 8.2 を示した．**潜血**は 6 週目より陽性例がみられ，10 週以降では全ての週で認められた．**結石**は 11 週目に 1 例みられ，その後は 24 週以降全ての週で多発した．1 回の採尿でラット当り数個～数十個の石が含まれており，大きさは 24 週～35 週目では大部分が直径 1 mm 以下で(Photo 1)，52 週では直径 2 mm 程度のものもみられた．それらの割面には年輪様の模様が認められた(Photo 2)．ケイ光 X 線分析法による結石の成分元素は多いものから Ca, P, Na, Mg, S, Fe, Al の順に検出された．潜血および結石は，投与群全ての個体が少なくとも 1 回は観察期間中陽性を示したが，その陽性は持続的でなく測定週ごとに結果が異なった．なおベルト上に自然排尿した尿でも潜血は 6 週目からみられ，それ以降の全測定週で検出された．また 44 週以降には粘調な暗赤色の血尿（以下肉眼的血尿とする）が観察されるようになり，その後日時の経過とともに例数が増加した．この症状を示したラットは次第に眼球の赤色が薄れ，貧血様となり，死亡し，その剖検例には全例膀胱腫瘍が確認された．

Table 2. The pH of urine

Week on study	Dietary level of OPP-Na(%)	No. of rats	pH (range)
0[a)]	0	6	6.7±0.18[b)](6.5-7.0)
	2	15	6.7±0.33 (6.0-7.2)
1	0	5	6.6±0.17 (6.4-6.8)
	2	12	7.3±0.28 (7.0-7.9)
2	0	6	7.0±0.28 (6.7-7.5)
	2	9	7.4±0.20 (7.1-7.6)
3	0	6	7.0±0.48 (6.4-7.7)
	2	15	7.6±0.28 (7.2-8.2)
4	0	4	7.3±0.28 (6.4-7.4)
	2	15	7.4±0.34 (7.0-8.2)
5	0	4	7.2±0.29 (7.0-7.6)
	2	11	7.5±0.31 (7.1-8.0)
6	0	3	7.4±0.40 (7.0-7.8)
	2	10	7.6±0.31 (7.3-8.0)
7	0	4	7.3±0.28 (6.9-7.5)
	2	18	7.6±0.33 (6.8-8.0)

a) examination before the beginning of administration.
b) mean ± SD.
A pH meter was used for determination on pH of urine.

これまで，同じ強制採尿法により OPP および OPP-Na 投与ラットの尿検査が行われている[4-6]．OPP-Na 13 週試験[4]では pH の上昇はみられたが，潜血および結石は観察されなかった．また OPP 13 週試験[5]では 8 週，12週の時点で pH の低下，潜血を認めているが，結石はみられず，結石は OPP 91 週試験[6]で，30 週，90 週の時点で認めている．一方，剖検例で膀胱表面の観察が行われており，結石は OPP 13 週投与で少数例しか確認されていない[3]．

OPP-Na 投与によりみられた尿の pH の上昇は検体のアルカリ性に基づくものであると考えられる．潜血は今回，6 週以降に投与群の全例にみられたが，その発現は散発的であり，13 週の時点では，その発現率も低いことから，OPP-Na13週試験[4]で潜血が観察されなかったことは，1 回の測定による偶然的な相違によるものと考えられる．この潜血については，腎の障害が早期にみられることから，腎に由来していると考えられ，44 週以降にみられた肉眼的血尿については膀胱腫瘍の増殖時期と比較的一致していることから膀胱に由来していると推測される．

結石が膀胱腫瘍を誘発し得ることは良く知られているが[7]，OPP および OPP-Na 投与後13週以内に認められた結石は，今回OPP-Na投与による検査では，11週目で 1 例であった．これまでの OPP および OPP-Na の 13 週試験[4,5]の尿検査では結石は認められていない．また OPP 13 週投与での膀胱表面の観察[3]でも結石はわずかしか確認されていない．ところが，OPPおよびOPP-Na 投与後13週で OPP-Na では膀胱癌[2]，OPP では乳頭腫や過形成[3]の発生を認めている．一方，田北[8]はジフェニルの Wistar ラットへの 2 年間投与で高率に結石を認

めているが，膀胱癌の発生はみていない．以上のことからOPPおよびOPP-Naにより発生する膀胱結石とOPPおよびOPP-Naの膀胱癌誘発との間に強い因果関係はないように思われる．発癌の起こる13週よりも前に，尿中に常在するリン酸アンモニウム・マグネシウム等の無機結晶成分の増減あるいは肉眼的に観察されない微小結石の有無等についてさらに検討する必要があるように思われた．

文　献

1) 石館守三監修：食品添加物公定書・解説書，B-158，1979，広川書店
2) Hiraga, K. and Fujii, T. : *Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 303, 1981
3) Hiraga, K. and Fujii, T. ; *Fd Chem. Toxic.,in press*
4) 井口重孝，田山邦昭，平賀興吾：東京衛研年報，30-2，67，1979
5) 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
6) 中村清純，池田虎雄，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，33，434，1982
7) Chapman, W. H., Kirchheim, D. and McRoberts, J. W. : *Cancer Res.*,33, 1225, 1973
8) 田北雅夫：奈医誌，34，565，1983

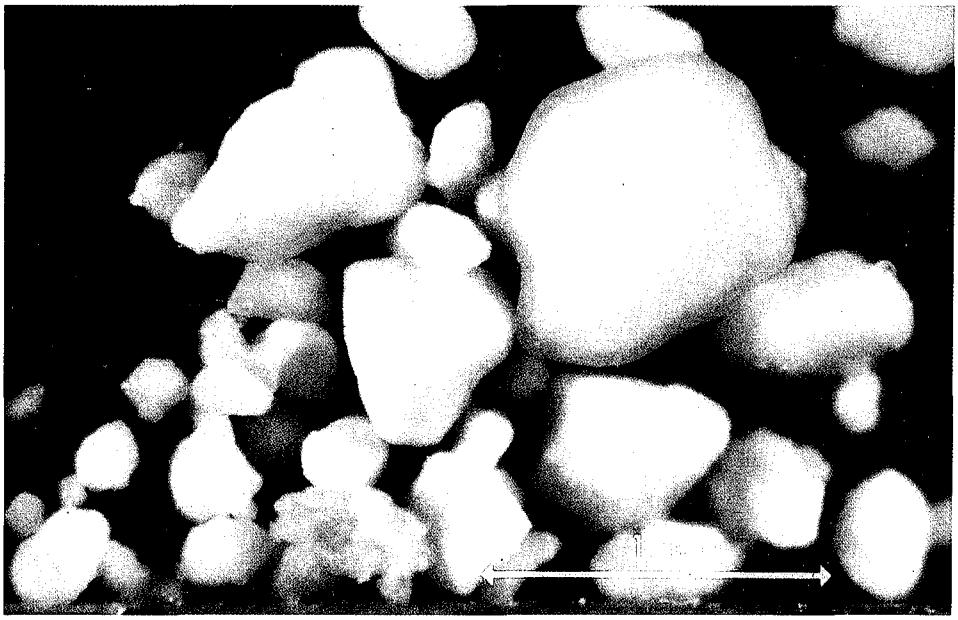


Photo 1. Micro calculi in urine of a male F344/DuCrj rats fed diet containing 2% OPP-Na for 23 wks.

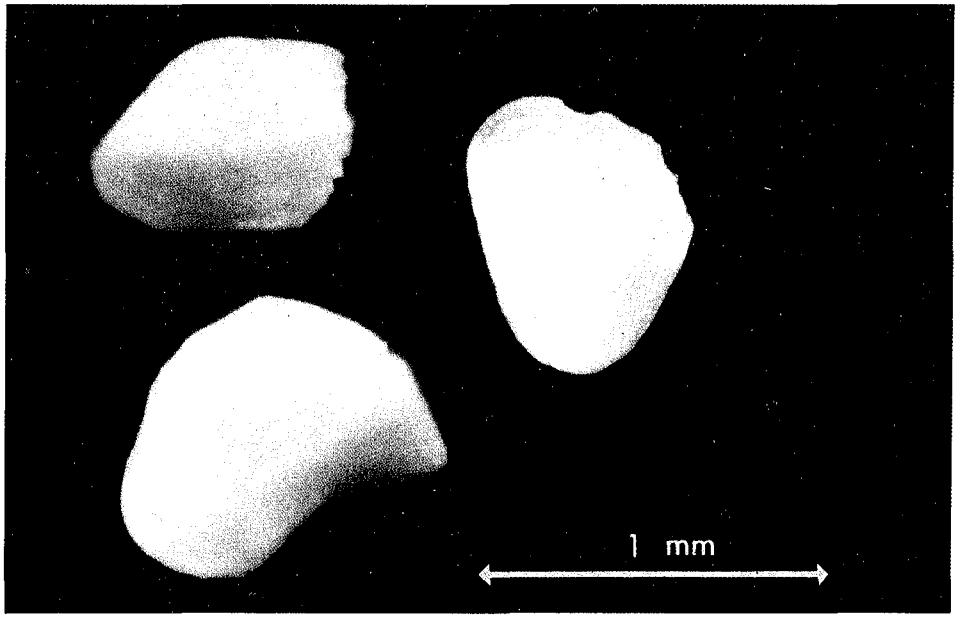


Photo 2. Cut-surface of a calculus.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 431-435, 1984

オルトフェニルフェノールナトリウム(OPP—Na)の添加飼料を与えたラットにおける宿主経由試験

藤田　博*, 小嶋昭江*, 佐々木美枝子*, 平賀興吾*

Assay of Host-Mediated Mutagenicity by *S. typhimurium* and *E. coil* in Rats Fed Sodium *o*-Phenylphenate (OPP-Na)

HIROSHI FUJITA*, AKIE KOJIMA*, MIEKO SASAKI* 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として使用許可されているオルトフェニルフェノール(以下OPPと略す)およびそのNa塩(以下OPP−Naと略す)の安全性については，当部において種々の検討が行われている[1~9]．OPPあるいはOPP−Naは，ラットを用いた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認められた[8,9]．またOPPは，培養細胞に姉妹染色分体交換(SCE)および染色体異常を誘発することが報告されている[6,7]．一方，バクテリアを用いた突然変異誘起試験の結果については，一部の弱い変異原性陽性の報告[10,11]はあるが，われわれの結果を含めて陰性の報告[12~16]が多い．

OPPおよびOPP−Naは，発がん性が認められるにもかかわらず，バクテリアに対する変異原性が検出されないか非常にされにくい．*in vitro* の試験系では，変異原性を有する代謝物質が生成していない可能性が考えられることから，われわれは，*in vivo* における代謝を加味した宿主経由試験[17,18]を行ってきた．前報[19]に，最高1500 mg/kgのOPP−Naを経口投与あるいは筋肉注射したF344ラットとインディケータとして大腸菌WP2[20]あるいはサルモネラ菌TA100[21]を用いて宿主経由試験を行った結果が陰性であったことを報告した．前報のような一回投与では，十分な量の代謝物質が生成していない可能性が考えられることから，今回は，腫瘍の発生した状態に近い添加飼料を与えたラットでの宿主経由試験を試みることにした．F344ラットを用い腫瘍が最も多く発生したOPP−Na 2%添加飼料を与え，インディケータとしてサルモネラ菌TA98[21]，TA100および大腸菌WP2を用いた宿主経由試験の結果について報告する．

材料および方法

試料　OPP−Na投与群にはOPP−Na(ダウ・ケミカル社製，Dowicide A, Lot No. MM8208017B)を飼育用粉末飼料(日本クレア製，CE−2)に2%の割合で混和し固形化したものを，対照群には無添加のCE−2を水とともに自由に摂取させた．

動物　F344/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週令から添加飼料を与えた．投与期間は3，7および14日間とした．

菌株　*Salmonella typhimurium* TA98(*hisC*$^-$, *bio*$^-$, *uvrB*$^-$, *gal*$^-$, *rfa*$^-$, pKM101)[21], TA100(*hisG*$^-$, *bio*$^-$, *uvrB*$^-$, *gal*$^-$, *rfa*$^-$, pKM101)[21]および *Escherichia coli* WP2(*trp*$^-$, HCR$^-$)[20]を用いた．これらの菌をブロス(栄研化学社製)で一夜培養した．この培養菌液を遠心(3,000 r.p.m.×10 min)し，1/5量の新しいブロスに懸濁し用いた．

宿主経由試験　対照群あるいはOPP−Na投与群のラットの腹腔に調製菌液3 m*l*を投与した．菌液投与後2.5〜3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込み，中に溜る菌液を胃ゾンデを用い回収した．回収菌液中の復帰変異体数および生存菌数は，前報[18]に述べた方法により求め，10^8・生存菌数あたりの復帰変異体数を算出した．対照群とOPP−Na投与群の比較には，Mann−WhitneyのU-検定[22]を用いた．

* 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

結果と考察

OPP－Na 2 %添加飼料を与えることにより摂取されたOPP－Naの量を表1に示した．投与期間中のOPP－Na総摂取量は，3日投与群で約500 mg，7日投与群で約1,500 mgおよび14日投与群で約3,400 mgであった．また1日あたりの平均摂取量は，1,600～2,200 mg/kgであり，これはHiragaら[8]による長期投与試験において，最も多くの腫瘍が発生したOPP－Na 2 %投与群の値よりやや多かった．

宿主経由試験の結果を表2に示した．TA98，TA100およびWP2を用い，OPP－Naを3，7および14日間投与して行った試験において，対照群とOPP－Na投与群の間には，10^8・生存菌数あたりの復帰変異体数に有意な差は見られなかった．なお，TA100を用いた場合に，各投与期間の間で値が大きく変動した．これはTA100の投与菌液培養中に生じた自然復帰変異の頻度の違いが原因であろうと考えられる．

表1. 宿主経由試験におけるOPP－Na摂取量

菌株	投与日数		
	3	7	14
TA98	506 [1]	1494	3458
	(1637)[2]	(1965)	(2033)
TA100	666	1534	3404
WP2	486	1384	3310
	(1807)	(2091)	(2193)

1) mg/rat　2) mg/kg/day

表2. OPP－Na添加飼料を与えたラットとTA98，TA100およびWP2を用いた宿主経由試験

菌株	投与日数	OPP－Na	復帰変異体数 (/m*l*)	生存菌数 (10^8/m*l*)	復帰変異体数 /10^8生存菌数	平均±S.D.
TA98	3	－	17	0.61	27.87	
			30	1.33	22.56	
			29	1.01	28.71	26.38±3.33
		＋	37	2.26	16.37	
			47	2.65	17.74	
			27	1.14	23.68	19.26±3.89
	7	－	20	2.05	9.76	
			35	3.31	10.57	
			39	3.11	12.54	
			17	1.74	9.77	
			31	2.95	10.51	10.63±1.14
		＋	22	1.16	18.97	
			37	2.38	15.55	
			38	3.49	10.89	
			14	2.96	4.73	
			25	2.33	10.73	12.17±5.40
	14	－	67	4.14	16.18	
			20	3.24	6.17	
			13	1.50	8.67	
			9	2.64	3.41	
			28	4.16	6.73	8.23±4.83
		＋	16	2.20	7.27	
			13	1.18	11.02	
			20	2.81	7.12	
			15	1.09	13.76	
			13	1.83	7.10	9.25±3.02

次頁へつづく

表2. つづき

菌株	投与日数	OPP−Na	復帰変異体数 (/ml)	生存菌数 (10^8/ml)	復帰変異体数 /10^8生存菌数	平均±S.D.
TA100	3	−	579	39.57	14.63	
			456	27.20	16.76	
			772	48.20	16.02	
			563	31.73	17.74	16.29±1.31
		+	621	42.93	14.47	
			331	15.63	21.18	
			627	51.33	12.22	
			611	38.20	15.99	
			592	37.10	15.96	15.96±3.30
	7	−	3,502	27.77	126.11	
			3,343	38.90	85.94	
			4,423	32.60	135.67	115.91±26.39
		+	5,278	63.27	83.42	
			3,734	31.87	117.16	
			3,364	27.00	124.59	
			4,205	32.90	127.81	113.25±20.38
	14	−	2,866	46.90	61.11	
			3,065	56.00	54.73	
			2,073	31.80	65.19	
			2,933	57.00	51.46	
			4,098	85.50	47.93	56.08±7.03
		+	3,383	65.47	51.67	
			2,828	49.00	57.71	
			3,669	57.83	63.44	
			3,915	73.47	53.29	56.53±5.27
WP2	3	−	4	5.60	0.71	
			5	3.57	1.40	
			9	6.84	1.32	
			3	8.02	0.37	0.95±0.49
		+	14	17.06	0.82	
			35	32.96	1.06	
			3	3.38	0.89	0.92±0.12
	7	−	5	1.60	3.13	
			2	2.20	0.91	
			3	1.97	1.52	1.85±1.15
		+	3	2.08	1.44	
			5	5.19	0.96	
			3	3.85	0.78	
			3	2.93	1.02	
			4	3.76	1.06	1.05±0.24
	14	−	49	21.63	2.27	
			4	2.33	1.72	
			7	4.59	1.53	
			9	4.85	1.86	1.85±0.31
		+	16	9.36	1.71	
			4	3.57	1.12	
			2	2.50	0.80	
			48	19.53	2.46	1.52±0.73

in vitro の突然変異誘起試験が陰性であることから，*in vivo* の代謝によって生成する代謝物質の変異原性を検索するために宿主経由試験を行ってきた．前報[18]に，最高 1,500 mg/kg の経口投与あるいは筋肉注射によって行った宿主経由試験は，陰性であったことを報告した．前報の一回投与では，十分な量の代謝物質が生成していない可能性を考慮し，発がん性を認めた状態に近い添加飼料を与えたラットを用いた宿主経由試験を行ったが，本試験においても陰性の結果であった．OPP－Na の代謝については，牛山ら[5]が排泄について検討し，主たる尿中代謝物は，グルクロン酸抱合した OPP およびフェニルハイドロキノン（以下 PHQ と略す）であることを報告している．しかし，この PHQ については，TA98 および TA100 を用いた *in vitro* の突然変異誘起試験において変異原性は認められない(未発表データ)．OPP あるいは OPP－Na の変異原性が宿主経由試験においても検出されないのは，変異原性を有する代謝物質が存在するとしても，その量が少かったり，腹腔におけるバクテリアとの接触時間が少いために検出できないか，あるいは膀胱腫瘍の発生という点から考えて膀胱においてのみ生成する可能性がなお残るが，むしろ，多くの *in vitro* の陰性の報告も考えあわせると，用いているバクテリアに感受性がないことが原因ではないかと考えられる．

Ames ら[23]は，サルモネラ菌 TA 系を用いた突然変異誘起試験において，175 の発がん物質のうち 10 %に変異原性が検出されないことを報告している．最近 Ames ら[24~26]は，これまでの菌株では検出できなかった発がん物質(特に過酸化物)の変異原性を検出することができる菌株を開発し，テスト菌として加えることを提案している．しかし，バクテリアの系だけでは，全ての発がん物質の変異原性を検出できない可能性が高いことから，培養細胞などを用いた系の中からバクテリアの系を補う *in vitro* の短期試験系を選定する作業が世界的に推進されている[27]．OPP あるいは OPP－Na も，発がん性が認められ，培養細胞に SCE を誘起するにもかかわらず，バクテリアに対する突然変異の誘起が検出されない注目すべき発がん物質の一例であろう．OPP あるいは OPP－Na による発がんの機構については，当部においても検討が進められつつある．

要　旨

オルトフェニルフェノール 2 %添加飼料を与えた F344 雄ラットとインディケータに *S. typhimurium* TA98, TA100 および *E. coli* WP2 を用いた宿主経由試験を行った．投与期間が 3，7 および 14 日間の試験において，OPP－Na 投与群の復帰変異体数は，対照群に対して増加しなかった．

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) 牛山慶子，樺島順一郎，中尾順子：東京衛研年報，34，297，1983
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) 縄井寿美子，吉田誠二，中尾順子：東京衛研年報，33，480，1982
8) Hiraga, K. and Fujii, T.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 303, 1981
9) 藤井　孝，平賀興吾：第 41 回日本癌学会総会記事，41，1982
10) 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
11) 花田信次郎：名市大医誌，28，983，1977
12) 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
13) 藤田　博，平賀興吾：東京衛研年報，31-2，29，1980
14) 小嶋昭江，平賀興吾：東京衛研年報，29-2，83，1978
15) 小嶋昭江，藤田　博，平賀興吾：東京衛研年報，34，319，1983
16) Reitz, R. H., Fox, T. R. and Quast, J. F.: *Chem.-Biol. Interactions*, 43, 99, 1983
17) Mohn, G. R.: *Arch. Toxicol.*, 38, 109, 1977
18) Legator, M. S., Bueding, E. and Batzinger, R.: *Mutation Res.*, 98, 319, 1982
19) 藤田　博，小嶋昭江，平賀興吾：東京衛研年報，34，315，1983
20) Bridges, B. A., Dennis, R. E. and Munson, R. J.: *Genetics*, 57, 897, 1967
21) McCann, J., Spingarn, N. E., Kobori, J. and Ames, B. N.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72, 979, 1975
22) 石居　進：生物統計学入門，109，1975，培風館
23) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B. N.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72, 5135, 1975

24) Levin, D. E., Hollstein, M. and Ames, B. N. : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 79, 7445, 1982
25) Levin, D. E., Yamasaki, E. and Ames, B. N. : *Mutation Res.*, 94, 315, 1982
26) Maron, D. M. and Ames, B. N. : *Mutation Res.*, 113, 173, 1983
27) 石館 基：変異原と毒性, 5, 588, 1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 436-442, 1984

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2報）
腫瘍性および非腫瘍性変化について

坂本義光*, 神谷信行*, 池田虎雄*, 平賀興吾*

Inhalation Experiment of Chromite Ore Residue Dust on Rats for 2 Years (II)
Neoplastic and Nonneoplastic Lesions in Various Organs

YOSHIMITSU SAKAMOTO*, NOBUYUKI KAMIYA*
TORAO IKEDA*and KOGO HIRAGA*

A long term inhalation toxicity of chromite ore residue dust on male F344/Ducrj rats was studied. Animals were placed in an inhalation chamber and exposed to chromite ore residue dust at concentrations of 0.2 and 1 mg/m^3 and JIS dust for industrial testing No. 11 at 1 mg/m^3 for 24 hours a day, 7days a week, for 105 weeks, In these animals, histological changes caused by chromite ore residue dust were observed in various organs except the respiratory system previously reported.

Many types of neoplastic and nonneoplastic changes, so called spontaneous lesions in aged rat, were observed common to animals of all the groups. The incidence and severity of these lesions in chromite ore residue dust groups were similar to those of control and JIS dust group. In this study, neoplastic and nonneoplastic lesions suspected to have been caused by chromite ore residue dust were not observed.

Keywords : chromite ore residue dust, rat, 2 years inhalation, histopathological changes

緒　　言

クロム鉱さい粉じんを0.2および1 mg/m^{3}の濃度で2年間昼夜連続でラットに吸入暴露し，経気道摂取による鉱さい粉じんの生体への影響を観察した．得られた結果のうち，体重，生存率，呼吸器系の病理組織学的観察結果についてはすでに報告したとおりである[1]．本報ではひきつづき呼吸器系を除いた諸臓器にみられた腫瘍性および非腫瘍性変化について述べる．実験は実験室内空気のみを通したチャンバー内飼育の対照群の他，比較対照としてJIS試験用粉体11種（関東ローム）を暴露した群を設定して行った．

実験材料および方法

動物　F344/DuCrj，雄ラット4週令を日本チャールスリバーより購入し，1週間予備飼育した後に吸入実験に用いた．実験開始時の体重は82～83 g であった．

粉体　クロム鉱さい粉じんとJIS粉体の調製法，物理化学的性状および組成についての詳細は前報[1]に述べたが，そのうちクロム鉱さいに含まれるクロム濃度は水溶性クロムが1.2％，水不溶性クロムが1.6％の割合であった．またJIS粉体ではケイ素が最も多く含まれ，クロムは当部の原子吸光分析結果では検出限界（0.02 ppm）以下であった．

吸入実験　実験では1群20匹としてクロム鉱さい粉じんの0.2，1 mg/m^{3}およびJIS粉体1 mg/m^{3}の粉じん暴露群と，実験室内空気のみの対照群の4群を設定し昼夜連続で105週間行った．なお実験に用いた吸入チャンバー等，装置の詳細は前報[2]に示したとおりである．実験期間中のチャンバー内飼育条件および粉じん粒度分布も前報に示したので本報では省略する．

実験終了後，動物は大腿部動静脈の切断により放血屠殺した．実験に用いた各群20匹のうち2例（鉱さい0.2 mg/m^{3}群では4例）は，暴露開始後55週目に1年目観察例としたため，105週間吸入実験からは除いた．

組織標本の作製　剖検後摘出した臓器は10％緩衝ホ

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

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（ズダンB）染色を行った．検索した組織は，肝，腎，心，脾，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，皮膚，包皮腺，乳腺である．

結　果

前報[1]に示したように，本実験では1年目観察例を除いた各群18例（鉱さい0.2 mg/m³群では16例）の暴露終了時の生存例数は，対照群10/18，JIS粉体群13/18，鉱さい0.2 mg/m³群12/16および1 mg/m³群の全例であった．本報ではこれらの105週間暴露終了時の生存例で得られた結果について述べる．

腫瘍性変化　Table 1に各群のラットに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．各群のすべてのラットはなんらかの腫瘍の発生がみられた．このうち同時に2種類以上の腫瘍を有するものは，対照群8/10（腫瘍を有するラット数/観察例数：以下同じ）(80％)，JIS群5/13(38％)，鉱さい0.2 mg/m³群7/12（58％），1 mg/m³群10/18（55％）であった．また悪性腫瘍を有するラットの割合は対照群2/10（20％），鉱さい1 mg/m³群1/18 (5.5％) でJIS群および鉱さい0.2 mg/m³群ではその発生を見なかった．鉱さい暴露群にのみ見られた腫瘍は，0.2 mg/m³群の副甲状腺腫と毛のう上皮腫の各1例であった．その他の鉱さい群に見られた腫瘍はすべて対照群およびJIS粉体群に共通して見られたものであった．それらのうちで特に多発した腫瘍は，精巣の間質細胞腫（Photo 1）で鉱さい0.2 mg/m³群で全例に，1 mg/m³群では17/18例（94％）に見られた．その他下垂体腺腫（Photo 2），皮下線維腫（Photo 3），膵臓のラ氏島腺腫および外分泌腺腫，副腎髄質細胞腫，甲状腺C細胞腺腫および濾胞上皮腺腫，包皮腺腫，単核球白血病，中皮腫などが見られた．下垂体腺腫はすべて色素嫌性細胞であった．これらの腫瘍はいずれもF344ラットの自然発生腫瘍としてすでに報告されているものと同様のものであった[3~5]．このうち精巣の間質細胞腫はF344ラットで特徴的に多く，また下垂体，副腎髄質および甲状腺の腫瘍や単核球白血病なども比較的多く発生することが知られている．本実験において見られたこれらの腫瘍の鉱さい群での発生例数はいずれも対照群やJIS群のそれと比較して顕著な差はなかった．

非腫瘍性変化　各臓器にみられた病変の種類と，その病変のみられたラット数をTable 2，3に示した．Tableに見られるように，鉱さい暴露群にのみ発生した変化はなかった．このうち心筋の変性および線維化，肝の胆管増生，局所性ののう胞状の類洞拡張，局所性の肝細胞変性，肉芽腫，膵臓の腺房萎縮，副腎皮質の局所性空胞化，慢性腎障害，精巣の精細管の萎縮，包皮腺炎症などが，鉱さい0.2および1 mg/m³群ともに多くみられた．いずれもこれらの病変のみられたラット数は，対照群およびJIS群のそれに比べ顕著な差はなかった．またこれらの病変は，前述した腫瘍性変化と同様，F344ラット[3,4]や他の系のラット[6,7]で加令に伴なって生じる，いわゆる自然発生病変として報告されているものと同様の変化であった．

クロムの影響の有無を観察する目的で，特に多く見られた肝および腎の病変について個々のラットでの程度の強さを各群で比較し，結果をTable 4，5に示した．肝の胆管増生（Photo 4）は増生している胆管の構造が正常と同様なもの，基底膜の肥厚や周辺に線維の増生をみるものさらに胆管部分がほとんど線維で置換されたものなど，種々の状態の変化が見られたが，各群で一定の傾向はなかった．変化の程度が顕著な例では，増生している胆管が隣接する小葉のそれと連絡して見える状態のものも多くなっていた．局所性の類洞の拡張（Photo 5）は，類洞が大小さまざまの大きさののう胞状に拡張したもので，この部分では組織が網目状になっていた．周辺には圧ぺんされたり，壊死した肝細胞も多くみられた．局所性の肝細胞変性は小葉の一部分の肝細胞の形態が変化しているもので，その部分が，細胞質辺縁がヘマトキシリンで濃染した，正常より小形の肝細胞から構成されているものと，腫大し，細胞質が細顆粒状または細かい泡沫状で明るくみえる肝細胞から成っているものとみられた．いずれも大きさは小葉より小さく，また周辺への圧排性も軽度であった．これらはSquireら[8]により報告されているFoci of cellular alterationのうち，前者はBasophilic foci（Photo 6），後者はclear cell fociに相当するものであった．肉芽腫（Photo 7）は直径10～100 μ大の大きさにエオジン淡染のわずかな細胞質を有する細胞が小葉内に結節状に集ったものである．細胞の形は，円，長円，紡錘形あるいは線維状で，それらが不規則に，または同心円状に配列していた．Tableに示した変化の程度は，胆管増生と類洞拡張に関しては変化を示す部位の大きさと存在数の多少により，局所性変性と肉芽腫に関してはその存在数の多少によって分類した．Table 5に示したように，以上の肝の変化の程度の現われ方には，鉱さい群に特徴的な傾向はみられなかっ

Table 1. Summary of Neoplastic Lesions

Group	Control	JIS dust No.11	Chromite ore residue dust	
Concentration of aerosol	—	1mg/m^3	0.2mg/m^3	1mg/m^3
No. of rats observed	10	13	12	18
No. of rats with tumor(s)	10	13	12	18
No. of rats with more than 2 tumors	8	5	7	10
No. of rats with malignant tumor	2	0	0	1
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
Mononuclear cell leukemia	1[a)]	0	0	1
PANCERAS				
Islet cell adenoma	1	2	2	2
Excrine gland adenoma	1	0	1	0
PITUITARY				
Adenoma	2	1	2	4
ADRENAL GLAND				
Pheochromocytoma	4	3	1	2
THYROID				
C-cell adenoma	1	2	2	2
Folicular cell adenoma	1	0	0	1
PARATHYROID				
Adenoma	0	0	1	0
TESTIS				
Interstitial cell adenoma	10	13	12	17
PREPEUTIAL GLAND				
Adenoma	2	1	2	0
SKIN				
Tricoepithelioma	0	0	1	0
Sebaceous adenoma	0	1	0	0
SUBCUTIS				
Fibroma	2	2	1	3
MAMMARY GLAND				
Adenocarcinoma	1	0	0	0
ABDOMINAL CAVITY/PERITONEUM				
Mesothelioma	2	0	0	1

a) Number of rats with tumor

た．腎の病変は皮髄境界部尿細管のエオジン円柱，皮髄部の基底膜の肥厚や上皮の変性を示す尿細管の存在，ボーマンのうの肥厚，糸球体の萎縮を伴なったボーマンのうの拡張，膨化した糸球体のボーマンのうへのゆ着などが様々な程度で混在してみられる変化である（Photo 8）．この病変はF 344やその他の系のラットで加令に伴い生じる特徴的な病変として報告されているものと同様の変化であった[3,4,6]．ここでは慢性腎障害とし，その程度のつけ方はColemanら[3]のそれにならった．Table 6に示したように，変化の程度には，鉱さい群に特徴的な傾向はみられなかった．

本実験でみられた種々の変化のうち，精細管の萎縮は

Table 2. Summary of Nonneoplastic Lesions

Group	Control	JIS dust No.11	Chromite ore resideu dust	
Concentration of aerosol	—	1mg/m³	0.2mg/m³	1mg/m³
No. of rats observed	10	13	12	18
BONE MARROW				
Decreasing of hematopoietic tissue	1	1	0	0
Mononuclear cell leukemic infiltration	1	0	0	1
SPLEEN				
Enlargement	0	0	0	2
Congestion	1	0	3	1
Extramedullary hematopoiesis	2	1	1	1
Focal fibrosis	0	1	0	1
Mononuclear cell leukemic infiltration	0	0	0	1
HEART				
Myocardial degeneration and/or fibrosis	4	4	5	6
LIVER				
Bile duct proliferation	10	13	12	18
Focal cystic delatation of sinusoid	5	9	5	7
Fatty degeneration	2	2	1	2
Foci of cellular alteration:				
Bosophilic foci	7	10	12	14
Clear cell foci	4	5	4	6
Granuloma	8	9	11	16
Focal necrosis	0	1	0	0
Mononuclear cell leukemic infiltration	1	0	0	1
PANCREAS				
Atrophy of acinar cell	7	8	4	6
Glandular hyperplasia	1	0	1	0
Islet cell hyperplasia	2	1	1	3
PITUITARY				
Hyperplasia	2	0	1	4
Cyst	4	1	3	3
THYROID				
C-cell hyperplasia	0	0	0	2
PARATHYROID				
Hyperplasia	0	1	0	0

a) Number of rats with lesion

continued on

Table 3. Summary of Nonneoplastic Lesions(continued)

Group	Control	JIS dust No.11	Chromite ore residue dust	
Concentration of aerosol	—	1mg/m^3	0.2mg/m^3	1mg/m^3
No. of rats observed	10	13	12	18
ADENAL GLAND				
Focal vacuolation of cortical cell	3[a)]	3	4	5
Cystic dilatation of sinusoid	1	1	3	2
Medullary hyperplasia	1	2	2	1
KIDNEY				
Chronic nephropathy	10	13	12	18
TESTIS				
Atrophy of seminiferous tubule	10	13	12	18
PROSTATE GLAND				
Inflammation	0	1	1	2
PREPEUTIAL GLAND				
Inflammation	5	5	6	6
SKIN				
Epidermal inclusion cyst	1	1	1	1

a) Number of rats with lesion

Table 4. Severity of Hepatic Lesions

Group		Control	JIS dust No.11	Chromite ore residue dust	
Concentration of aerosol		—	1mg/m^3	0.2mg/m^3	1mg/m^3
No. of rats observed		10	13	12	18
Bile duct proliferation	None	0	0	0	0
	Slight	7	4	5	6
	Moderate	3	8	6	9
	Marked	0	1	1	3
Focal cystic delatation of sinusoid	None	5	4	7	11
	Slight	2	3	5	4
	Moderate	2	5	0	3
	Marked	1	1	0	0
Basophilic foci	None	2	3	0	4
	Slight	7	9	10	13
	Moderate	1	1	2	1
Clear cell foci	None	6	8	4	9
	Slight	4	5	4	6
Granuloma	None	1	2	1	2
	Slight	5	7	8	11
	Moderate	3	2	2	4
	Marked	1	0	1	1

Table. 5. Severity of Chronic Nephropaty

Group	Conc. of aerosol mg/m³	No. of rats observed	Grades of nephropathy				
			I	II	III	IV	End stage
Control	—	10	0	5	4	1	0
JIS dust No.11	1.0	13	2	6	5	0	0
Chromite ore	0.2	12	0	5	7	0	0
residue dust	1.0	18	2	9	7	0	0

すべてのラットで見られた変化であったが，多発した間質細胞腫によって影響されているため程度の比較はできなかった．このうち鉱さい 1 mg/m³では間質細胞腫の発生は見なかった例が1例あったが，このラットでは，両側の精巣の萎縮が顕著であった．その他，脾，膵，下垂体，甲状腺，副腎，前立腺，皮膚にも Table に示した種々の変化がみられたが，いずれも発現例数は低く，鉱さい群に特徴的なものではなかった．消化器系および中枢神経系の各臓器には，各群で特に変化はみられなかった．

考　　察

クロム鉱さい粉じんを 0.2 および 1 mg/m³の濃度で，105 週間暴露したラットの呼吸器系以外の臓器に見られた腫瘍性および非腫瘍性変化は，いずれも加令に伴って生じる，いわゆる自然発生病変として知られているものであった．種々のクロム化合物の諸臓器に対する作用について報告した例は多いが，そのうち Nettesheim ら[9]は，$CaCrO_4$の粉体を吸入暴露したマウスで，腎，脾の萎縮性の変化，消化管の潰瘍などが生じることを報告している．また高濃度の3価のクロム化合物を暴露したラットでも肝および腎に萎縮性の変化がおこることも知られている[10]．皮下および腹腔内注射など経気道以外の経路で投与されたクロム化合物では，ラット腎の尿細管の壊死[11,12]，ウサギの肝，腎および脳で組織の変性，壊死を伴う変化[13,14]，精細管内の精子の消失[10]など種々の障害作用が知られている．しかし長期間飼育したラットでは，加令に伴って，各臓器に種々の病変が生じ，特に肝，腎，精巣ではそれが顕著である．そのため本実験のような長期にわたる実験においては，他の報告にあるようなクロムによる変化を，自然発生病変と区別し，検出するのは難しいと思われる．

すでに報告したクロム鉱さい 20 mg/m³，1か月間暴露後終生飼育実験[15]において，観察された病変はいずれも本実験と同様のものであったが，それらのうち鉱さい暴露群では，腎障害，胆管増生，膵臓のラ氏島増生の発現のしかたに対照群とは異なった傾向が見られた．クロム鉱さいの臓器への作用が，その後の自然発生病変の発現に影響した可能性も考えられ，本実験においてもその点に注目した．多発した肝および腎の変化について，その程度のあらわれ方を他の群と比較したが，鉱さい群に特徴的な傾向は認められなかった．Steffee ら[16]はクロム鉱さいと6価のクロム化合物の混合物を CrO_3 として 3～4 mg/m³の濃度で間欠，長期暴露したラットで肺以外の臓器にも種々の変化を観察しているが，それらはクロムによるものではなかったとしている．本実験においては，粉じん濃度も低く，したがってクロム濃度も Steffee ら[16]の実験と比べても極めて低いものであり，105 週間の暴露によって摂取されたクロムは諸臓器に対して，腫瘍性および非腫瘍性変化をひきおこす可能性はないものと考えた．

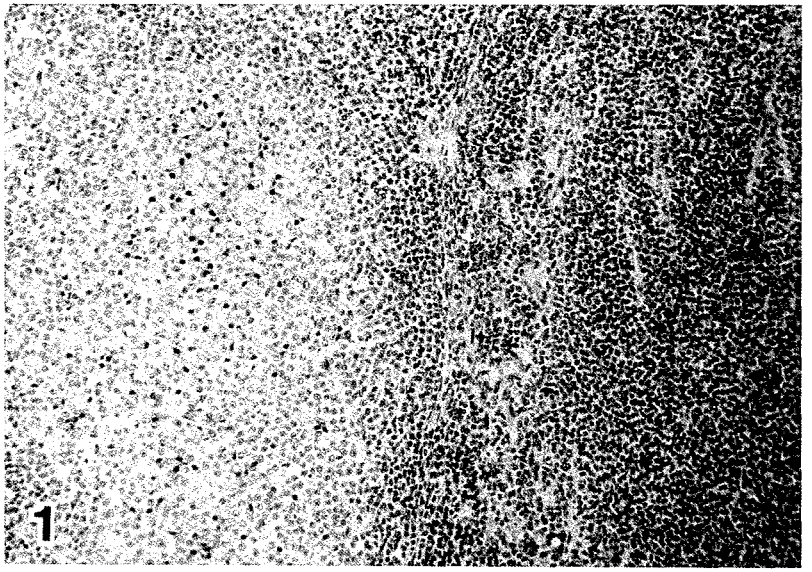
文　　献

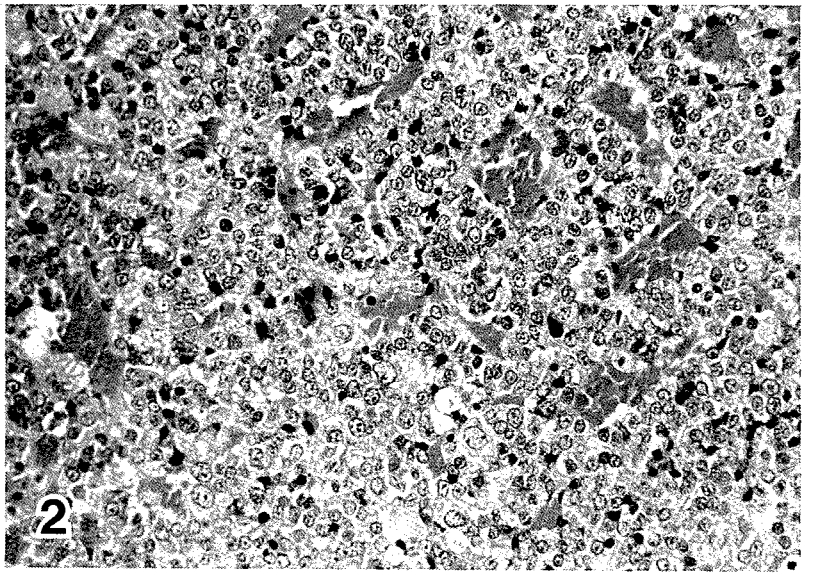
1) 坂本義光，神谷信行，池田虎雄，平賀興吾：東京衛研年報，33，518，1982
2) 坂本義光，調　武久，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，135，1977
3) Coleman, G. L. Balthold, S. W., Osbaldiston, G. W., Foster, S. J. and Jonas, A. M. : *J. Gerontology,* 32, 258, 1977
4) Goodman, D. G., Ward, J. M., Squire, R. A., Chu, K. C. and Linhart, M. S. : *Toxical. Appl. Pharmacol.,* 48, 237, 1979
5) Maekawa, A. et. al. : *Gann,* 74, 365, 1983
6) 村岡義博，伊藤真喜子，前田ユミノ，林　裕造：*Exp. Animal,* 26, 1, 1977

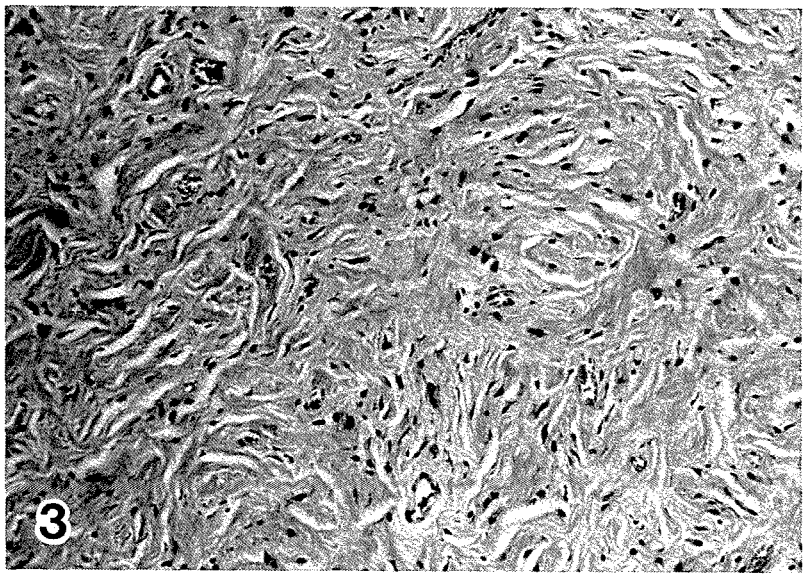
7) 西部忠幸：奈医誌, 27, 1, 1976
8) Squire, R. A. and Levitt, M. H. : *Cancer Res.*,35, 324, 1975
9) Nettesheim, P., Hanna, M. G., Doherty, D. G., Newell, R. F. and Hellman, A. : *J. Natl. Cancer Inst.*,47, 1129, 1971
10) Tandon, S. K. : *Biological and Environmental Aspects of Chromium*,209–219, 1982, Elsevier Biomedical press, Netherland
11) Baines, A. D. : *Am. J. Pathol.*47, 851, 1965
12) Biber, T. U. L., Mylle, M., Baines, A. D., Gottschalk, C. W., Oliver, J. R. and MacDowell, M. C. : *Am. J. Med.* 44, 664, 1968
13) Mathur, A. K., Chandra, S. V. and Tandon, S. K. : *Toxicology*, 8, 53, 1977
14) Tandon, S. K., Saxena, D. K., Gaur, J. S. and Chandra, S. V. : *Environ. Res.*,15, 90, 1978
15) 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
16) Steffee, C. H. and Baetjer, A. M. : *Arch. Environ. Health*,11, 66, 1965

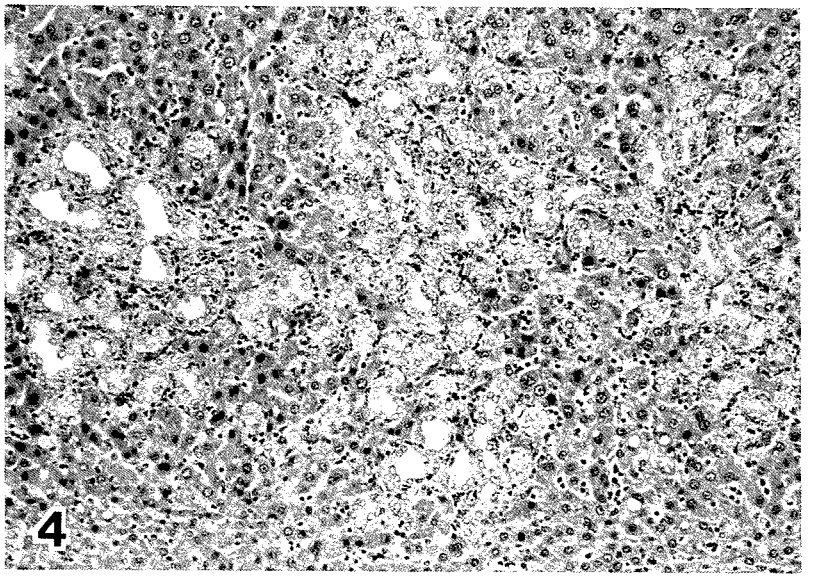
Explanation of plates

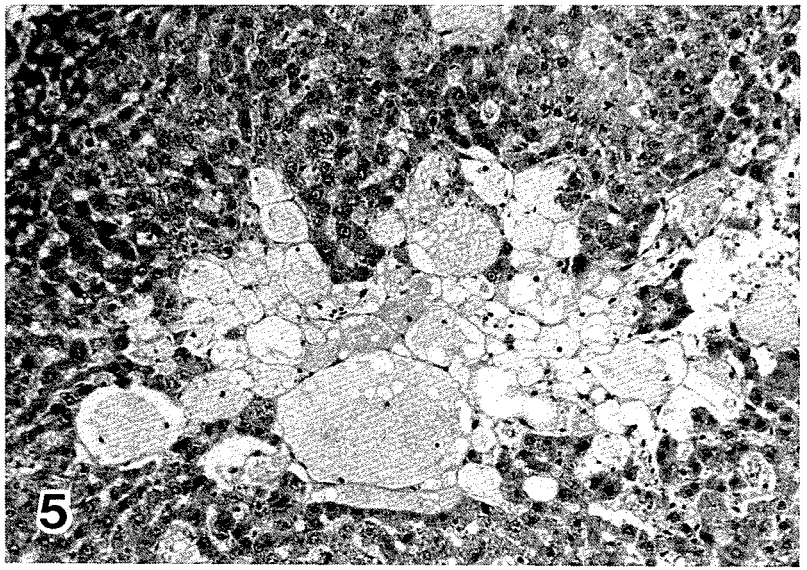
Photo 1-5: Photo of organs from the rats exposed to chromite ore residue dust at 1 mg/m^3 for 105 weeks.
Photo 1. Interstitial cell tumor of testis. H&E × 100
Photo 2. Adenoma of pituitary gland. H&E ×200
Photo 3. Fibroma in subcutis. H&E ×100
Photo 4. Bile duct proliferation in liver. H&E ×100
Photo 5. Focal cystic delatation of sinusoid in liver H&E ×100
Photo 6, 7: Photo of organ from the rats exposed to chromite ore residue dust at 0.2 mg /m^3
Photo 6. Basophilic foci in liver. H&E ×100
Photo 7. Granuloma in liver. H&E ×100
Photo 8. Chronic nephropathy in control rat. H&E ×100

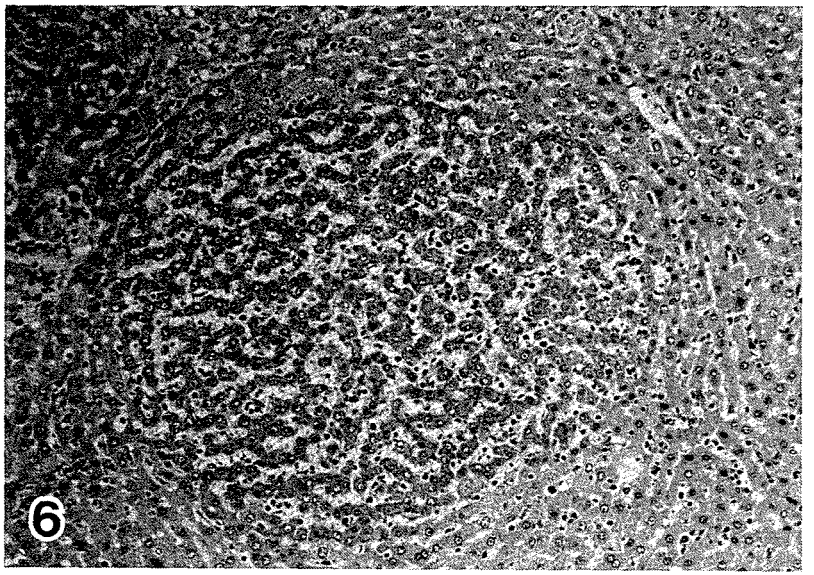

1

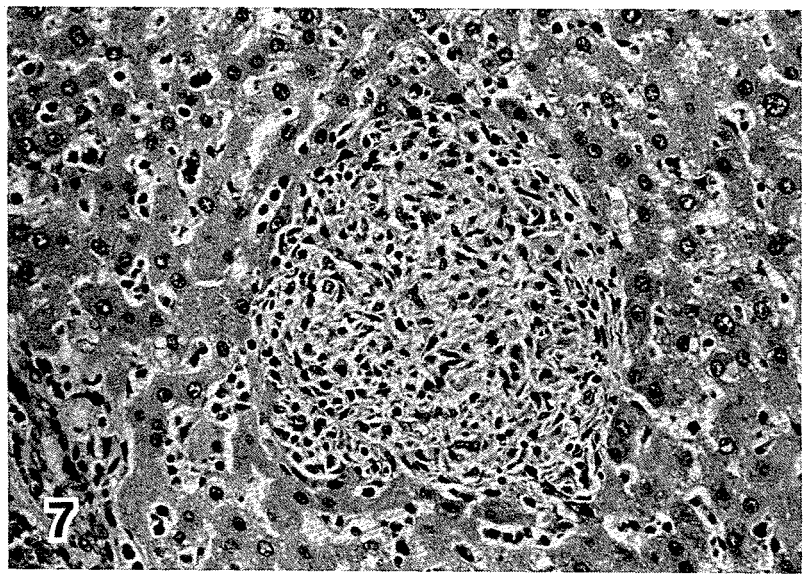

2


3


4


5


6


7

8

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 445-447, 1984

クロム鉱さい粉じんのラットによる21日間持続吸入実験 尿中クロムの分析

神谷信行*, 坂本義光*, 佐々木美枝子*, 平賀興吾*

Inhalation Experiment of Chromite Ore Residue Dust to Rats for 21 Days Anaysis of Chromium in Rat Urine

NOBUYUKH KAMIYA*, YOSHIMITSU SAKAMOTO*, MIEKO SASAKI* and KOGO HIRAGA*

Keyword: クロム鉱さい粉じん chromite ore residue dust, 吸入毒性 inhalation toxicity, ラット rat, 尿中クロム濃度 chromium concentration in urine

緒　言

クロム鉱さい粉じんの経気道摂取による生体への影響を観察する目的で，前回までに著者らはラットを用いて昼夜連続でクロム鉱さい粉じん7日間，1か月間，3か月間の期間暴露し，ラット臓器および血液中のクロム濃度を調べすでに報告した[1~4]．今回はラットに21日間クロム鉱さい粉じんを持続吸入させ，尿中クロム濃度の変化を観察した結果を報告する．

実験材料および方法

動物　F344/DuCrjラットの雄を4週令で購入し，1週間予備飼育した後実験に用いた．暴露開始時の平均体重は83g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，分篩して調整した．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%，水不溶性のものが1.6%の割合であった．

実験　既報[5]の粉じん吸入装置により，クロム鉱さい粉じん濃度は1 mg/m³および0.1 mg/m³で，吸入期間は昼夜連続で21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．粉じんの粒径分布はTable 2に示した．

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，照明時間は午前6時から午後6時までに調整，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．

尿は暴露開始直前および開始後3日，7日，14日，21日目にラットの腰部を刺激して排尿させた新鮮尿を採尿し，ただちに尿中クロム濃度を原子吸光法で測定した．

測定条件は前報[4]にほぼ準じたが，尿中クロムを分解することなく直接定量する場合，有機物や塩類が測定に影響をおよぼす．特に共存する塩化ナトリウムによるバックグラウンド吸収が大きいことはよく知られている[6]．

そこで乾燥，灰化のそれぞれの過程は塩化ナトリウムによるバックグラウンド吸収を除くため，塩化ナトリウムが気化する温度よりやや高い1200°とし，時間は昇温，保持ともに40秒とした．なお本法による回収率は90.2%であった（Table 3）．

結果と考察

Fig. 1およびTable 4に尿中クロム濃度の経時的変化を示した．1 mg/m³暴露群では暴露開始後3日目，7日目と有意に増加し，その後14日目，21日目と一定のレベルで推移した．0.1 mg/m³暴露群は1 mg/m³暴露群と同様の傾向を示し，暴露開始後3日目，7日目と増加したが，7日目以降は14日目，21日目とほぼ一定の値を示した．対照群の尿中クロム濃度は暴露期間を通じて暴露開始前と変らず一定の値を示した．

生体に摂取されたクロムは主に尿と糞に排泄されるが，特に経気道摂取の場合は尿への排泄が主要な経路である．そこですでに報告した腎臓および血液中クロムの濃度[1~3]と比較すると，1 mg/m³暴露実験の腎臓組織中

* 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

のクロム濃度については7日目で31.4 ng/g, 28日目では70.7 ng/gとなり，3か月目には155.5 ng/g(ただし7日目は計算値）に増加し，尿中クロムの推移とは異なり，経時的な蓄積傾向がみられた．しかし血中クロム濃度は尿中クロムと同様の経時的変化を示して暴露開始後7日目でほぼ一定となり，濃度も28日目で16.6 ng/g, 3か月目で15.6 ng/gと尿中クロム濃度とほぼ同一の値を示した．

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 2. Particle Size Distribution in Inhalation Chamber

Sampler Stage	Diameter μm	Weight percent 0.1mg/m³	1mg/m³
0	>11.0	0	0
1	11.0 − 7.0	0	0.4
2	7.0 − 4.7	2.0	2.8
3	4.7 − 3.3	9.3	15.9
4	3.3 − 2.1	31.2	35.9
5	2.1 − 1.1	42.7	31.7
6	1.1 − 0.65	13.8	11.7
7	0.65− 0.43	0	1.6
8*	0.43>	0	0

8*：Filter

Table 3. Analytical condition for Chromium by Atomic Absorption Spectrophotometry

Instrument			
PERKIN-ELMER AA-4000			
Graphite Furnace HGA-400			
Instrumental Parameters			
Wavelength	357.9nm		
Spectral Bandwidth	0.7nm		
Light Source	Hollow Cathode Lamp		
Lamp Current	10mA		
Background Correction	W Lamp		
HGA Parameters			
Step	DRY	CHAR	ATOM
Temp	110	1200	2300
Ramp(sec)	50	40	0
Hold(sec)	10	40	6
Gas Flow(m*l*/min)	300	300	60

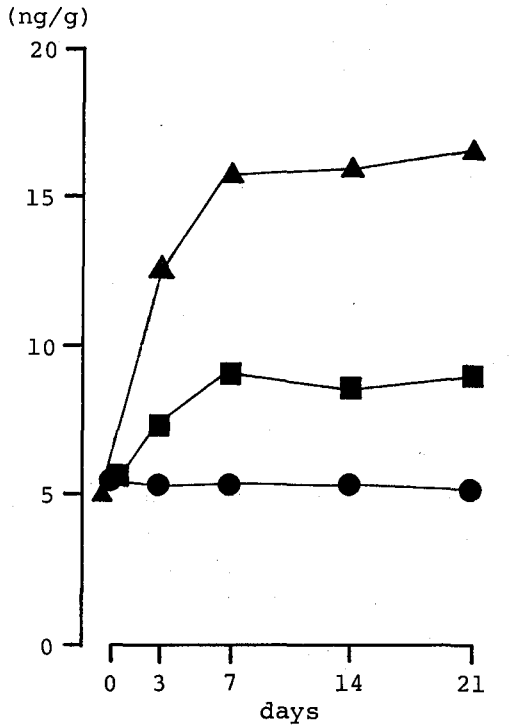


Fig. 1. Chromium Concentration in Urine of the Rats exposed to Chromite Ore Residue Dust at 1mg/m³ and 0.1mg/m³ for 21 Days
●—● Control,
■—■ 0.1mg/m³ group,
▲—▲ 1mg/m³ group,

Table 4. Chromium Concentration in Urine of the Rats exposed to Chromite Ore Residue Dust at 1mg/m³ and 0.1mg/m³ for 21 days

group\day	0	3	7	14	21
Control	5.48±3.91(7)	5.44±1.08(8)	5.42±1.07(9)	5.39±1.32(9)	5.22±0.94(9)
0.1mg/m³	5.66±3.01(8)	7.39±1.42(7)	9.08±2.36(7)	8.76±1.87(9)	9.04±1.92(10)
1mg/m³	5.08±2.51(8)	12.7±2.97(8)	15.8±3.61(8)	16.0±3.93(9)	16.6±4.15(9)

mean±SD(ng/m*l*), ( )=No. of rats examined

犬を用いた実験で，血中のクロムは糸球体でろ過され，その63％が尿細管で再吸収されるという報告[7]があり，ラットについても同様に糸球体でろ過された血中クロムはその一部が尿細管で再吸収され，腎臓に蓄積されるものと思われる．

ま と め

クロム鉱さい粉じんの経気道摂取による生体におよぼす影響を調べる目的で，粉じん濃度0.1 mg/m³および1 mg/m³で吸入チャンバー内のラットに21日間昼夜連続で暴露し，暴露開始前，開始後3日目，7日目，14日目，21日目における尿中クロムの経時的変化について検討を加えると同時に尿中クロムを高温炉原子吸光法で測定するための測定条件の検討を行った．

測定条件については，乾燥過程における試料の突沸を防ぐため昇温時間を50秒に設定，共存する塩化ナトリウムの影響を除くため，灰化過程で温度を1200℃に，昇温，保持の時間をそれぞれに40秒に設定することにより尿中クロムを精度よく測定することができた．

尿中クロム度は0.1 mg/m³,1 mg/m³の両暴露群ともに暴露開始後3日目，7日目と増加したが，その後14日目，21日目は7日目とほぼ同じ値を示し，腎臓とは異なる経時変化であったが，血液とは同様の変化を示した．

文 献

1) 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
2) 神谷信行，坂本義光，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，31-2，51，1980
3) 神谷信行，坂本義光，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，32-2，85，1981
4) 神谷信行，坂本義光，佐々木美枝子，平賀興吾：東京衛研年報，34，379，1983
5) 坂本義光，調 武久，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，135，1977
6) 安田誠二，垣山仁夫：分析化学，24，377，1975
7) Collins, R. J., Fromm, P. O., and Collings, W. D.: *Amer. J. Physiol.*,201, 795, 1961

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 448-453, 1984

F344/DuCrj ラットの血液性状について

多田幸恵*, 佐々木美枝子*, 平賀興吾*

Hematological Findings in F344/DuCrj Rats under Our Lavoratory Conditions

YUKIE TADA*, MIEKO SASAKI* and KOGO HIRAGA*

Keywords: F 344/DuCrj Rat, Hematological Findings

緒　言

当部では1977年以来，亜急性および慢性毒性試験にF344/DuCrjラット（以下F344ラットと略す）を用いている．F344ラットの血液性状を従来使用したJcl：Wistarラット[1]，Jcl：SDラット[2,3]およびすでに検討されている他種のラット[4]と比較した際，F344ラットの赤血球値が幾分高い印象を受けた．そこで今回F344ラットの血液性状を詳細に知るため，同一ラットより経時的に採血し血球数の測定および形態系の検索を試みた．その際，バリア飼育と一般飼育，集団飼育と個別飼育および雄と雌とにおける比較を行った．

実験方法

実験動物：日本チャールスリバー㈱生育のF344/DuCrjラットを生後4週齢で購入，1群10匹として雄のバリア動物室飼育群（以下バリア飼育雄群とする），一般動物室飼育群（一般飼育雄群），雌のバリア動物室飼育群（バリア飼育雌群），一般動物室飼育群（一般飼育雌群），また集団飼育と個別飼育による相違を検討するため，バリア動物室に雄の個別飼育群（バリア個別飼育雄群）を設けた．バリア飼育室，一般飼育室とも室温25±1°，湿度50～60％，照明12 h，換気回数毎時10回の環境条件で，ベルト式飼育架台に設置した前・底面が網のステンレスケージ（幅28×奥行40×高17 cm）にラットを各5匹入れ，飼育用固型飼料CE-2（水分8％，粗蛋白質24.5％，粗脂肪4.5％，粗線維4％，粗灰分6.6％，可溶性無窒素物52.4％，348.1 Cal/100g）および細菌ろ過器を経由した水道水を自由に摂取させ飼育した．個別飼育群は前・底面が網のステンレスケージ（幅22×奥行20×高16 cm）に各1匹入れ同様に飼育した．体重測定は週一度，午前9：00～10：00に行った．

採血：5，7，9，11，13，15，19，23，27週齢時の午前9：30～11：30に，プラスチック製ホルダーにラットを入れ尾を微温湯で温め，鋭利なカミソリを軽くあてた[5]．尾静脈より湧出する血液を，EDTA-2Kを分注し蒸発乾固させた小試験管に採取した．

検索：白血球数（WBC），赤血球数（RBC），ヘモグロビン量（Hb），ヘマトクリット（Ht），平均赤血球容積（MCV），平均赤血球ヘモグロビン量（MCH），平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）をCoulter Counter Model S（Coulter Electric INC）を用いて測定した．また血液塗抹標本を作製し，May-Grünwald Giemsa染色後光顕的に観察した．結果はStudentのt検定により危険率5％で推計学的に検討した．

実験結果

体重の推移をFig.1，血球数の経時的な推移をFig.2，血球数の測定結果をTable 1，白血球百分比をTable 2に示した．

体重：バリア飼育雄群，バリア個別飼育雄群，一般飼育雄群は同様の体重増加を示し，バリア飼育と一般飼育，集団飼育と個別飼育における差はみられなかった．雌においてもバリア飼育群，一般飼育群は同様の体重増加を示した．

血球数および形態学的な検索　バリア飼育と一般飼育，集団飼育と個別飼育における差はみられなかった．以下に経時的な推移を項目ごとに述べる．

WBCは測定時により群間に有意差がみられたが，週齢に伴なった増加ないし減少傾向はみられなかった．雌雄差が13週より認められ，バリア飼育のラットでは13，15，19，23週齢時に，一般飼育のラットでは13，15，19，23，27週齢時に雄の方が高値を示した（$P<0.05$）．

* 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

RBCは5週齢時雄6.71～6.86(×10^6/mm^3), 雌6.71～7.24で11週まで急な増加がみられた. 以後19週までややゆるやかな増加になり雄8.68～8.90, 雌8.00～8.10となった. 以降ほぼ一定の値を示し27週でやや減少した. 5週齢時との比較では9週より各群で有意差が認められた($P<0.05$). 雌雄差が13週より認められ雄の方が高値を示した. 差は19週まで増し, 以降0.7×10^6/mm^3前後の差で平行的に推移した.

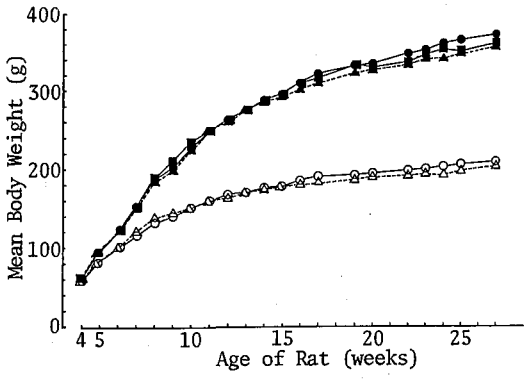


Fig. 1. Changes of Body Weight in F344/DuCrj Rats
Male ●—: Barrier. ■—: Barrier (Individually), ▲┈┈: Conventional,
Female ○—: Barrier,
△┈┈: Conventional

Hbは雄, 雌ともに19週までゆるやかに増加し, 16.9～17.2g/dlとなり以降ほぼ一定の値を示した. 5週齢時との比較では9週より各群で有意差が認められた($P<0.05$).

Htは19週までゆるやかに増加し, 雄43.7～45.2%, 雌43.2～43.7%となり以降ほぼ一定の値を示した.

以上のようにRBCの増加に伴ないHb, Htにおいても増加が認められた. 増加の割合が, RBCに比較しHb, Htで軽度であるのは, 以下に示すMCVの減少によりHb, Htの全体量が著変していないためである.

MCVは5週齢時雄58.5～59.0(μ^3), 雌57.6～58.0で13週まで減少し, 雄50.7～51.7, 雌54.2～54.7となり以降ほぼ一定の値を示した. 5週齢時との比較では7週より各群で有意差が認められた($P<0.05$). 雌雄差が9週より認められ雌の方が高値を示した. 差は15週まで増し以降4μ^3前後の差で平行的に推移した.

MCHは15週までゆるやかに減少し, 雄19.4～19.5 $\mu\mu$g, 雌20.9～21.1 $\mu\mu$gとなり以降ほぼ一定の値を示した. 5週齢時との比較では11週齢より各群で有意差

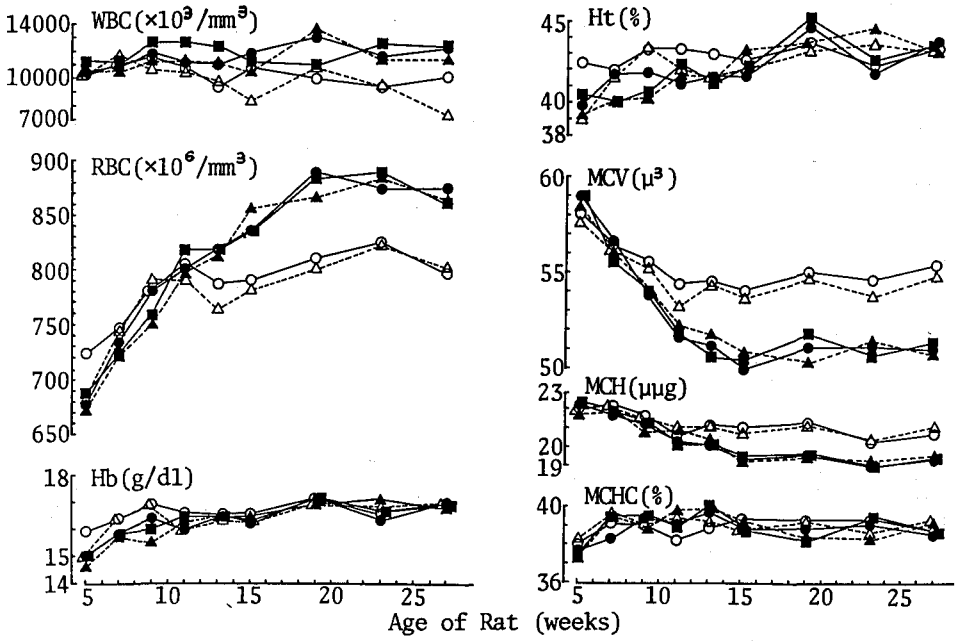


Fig. 2. Changes of Hematological Values with the Grouth of F344/DuCrj Rats
Male ●—: Barrier, ■—: Barrier (Individually), ▲┈┈: Conventional
Female ○—: Barrier, △┈┈: Conventional

Table 1. Hematological Values in F344/DuCrj Rats[1] (Means and 1 SD)

Age of Rat (Weeks)	Sex	Condition of Housing	No. of[2] Rats	WBC $\times 10^3/mm^3$	RBC $\times 10^6/mm^3$	Hb g/dl	Ht %	MCV μ^3	MCH $\mu\mu g$	MCHC %
5	M	Barrier	9	10.4±1.7	6.77±0.30	15.0±0.6	39.9±1.9	59.0±0.8	22.1±0.2	37.6±0.7
		Barrier(I)[3]	8	11.2±2.0	6.86±0.26	15.1±0.5	40.5±1.5	59.0±0.5	22.2±0.2	37.5±0.3
		Conventional	10	10.4±1.4	6.71±0.22	14.6±0.5	39.2±1.1	58.5±0.7$^+$	21.8±0.3*	37.2±0.7$^+$
	F	Barrier	9	10.3±1.3	7.24±0.24*$^+$	15.9±0.7*$^+$	42.0±1.5	58.0±0.7*	22.0±0.5	38.0±0.9
		Conventional	10	10.3±1.0	6.81±0.20	14.9±0.3	39.0±1.0	57.6±0.5	21.9±0.5	38.3±0.6
7	M	Barrier	10	10.8±0.8	7.34±0.28	15.8±0.5	41.7±1.6	56.6±0.6	21.6±0.3	38.3±0.8
		Barrier(I)	9	11.6±0.8*	7.23±0.34	15.8±0.7	40.0±1.5	55.4±0.7*	21.9±0.4	39.5±0.7*
		Conventional	10	10.4±1.0	7.22±0.34	15.7±0.5$^+$	40.0±1.9	55.7±0.6*	21.8±0.4	39.3±1.0*
	F	Barrier	10	11.0±1.1	7.47±0.36	16.4±0.6*	42.0±1.6	56.3±0.6	22.0±0.5	39.1±1.0
		Conventional	9	11.7±1.1	7.44±0.30	16.4±0.6	41.6±1.5	56.0±0.7	22.1±0.4	39.6±0.8
9	M	Barrier	10	11.9±0.9	7.82±0.27	16.4±0.4	41.8±1.7	53.8±0.7	21.1±0.5	39.4±1.1
		Barrier(I)	10	12.6±0.8	7.58±0.20*	16.0±0.4*	40.0±1.2	53.9±0.7	21.2±0.2	39.5±0.7
		Conventional	8	11.2±0.6	7.50±0.24*$^+$	15.5±0.4*$^+$	40.2±1.3*$^+$	53.8±0.3$^+$	20.8±0.4$^+$	38.8±0.9
	F	Barrier	9	11.5±0.9	7.82±0.26	16.9±0.4	43.3±1.3	55.6±0.7*	21.6±0.4	39.0±0.8
		Conventional	8	10.6±1.9	7.91±0.28	16.9±0.6	43.4±1.7	55.2±0.7	21.4±0.1	39.0±0.4
11	M	Barrier	10	11.1±0.7	8.02±0.28	16.1±0.6	41.2±1.5	51.6±0.6	20.3±0.4	39.3±0.9
		Barrier(I)	10	12.7±1.8*	8.18±0.30	16.4±0.4	42.4±1.6	51.9±0.7	20.1±0.4	39.0±1.0
		Conventional	8	11.2±0.2	7.95±0.30	16.3±0.4	41.2±1.4	52.1±0.6$^+$	20.7±0.4	39.7±0.9
	F	Barrier	10	10.8±1.0	8.03±0.30	16.6±0.5*	43.4±1.4*$^+$	54.3±0.4*$^+$	20.7±0.4*	38.2±0.8*$^+$
		Conventional	10	10.3±1.2	7.86±0.24	16.3±0.4	41.7±1.3	53.3±0.4	20.9±0.2	39.3±0.5
13	M	Barrier	9	11.0±1.0	8.19±0.31	16.5±0.3	41.7±1.7	51.2±0.4	20.2±0.8	39.7±1.6
		Barrier(I)	10	12.4±0.7*	8.19±0.22	16.5±0.4	41.3±1.2	50.7±0.6	20.2±0.2	40.0±0.7
		Conventional	9	11.2±1.0$^+$	8.12±0.30$^+$	16.5±0.6	41.6±1.5	51.7±0.9$^+$	20.4±0.4$^+$	39.9±0.6
	F	Barrier	10	9.4±1.0*	7.87±0.17*$^+$	16.6±0.3	43.0±1.6	54.7±1.5*	21.2±0.3*	38.8±1.3
		Conventional	10	9.7±0.9	7.64±0.28	16.4±0.7	41.7±1.8	54.2±0.4	21.2±0.2	39.3±0.4

continued on

Table 1. Hematological Values in F344/DuCrj Rats[1] (Means and 1 SD) (Continued)

15	M	Barrier	9	11.9±0.9	8.37±0.30	16.2±0.3	41.7±1.6	50.0±0.5	19.4±0.3	38.9±0.8
		Barrier(I)	10	11.2±1.0	8.37±0.24	16.3±0.4	42.1±1.3	50.5±0.5*	19.5±0.2	38.8±0.5
		Conventional	10	10.4±0.9*+	8.56±2.56+	16.5±0.4	43.2±1.5	50.8±0.7*+	19.4±0.3+	38.3±0.4+
	F	Barrier	9	10.8±1.1*+	7.90±0.13*	16.6±0.4*	42.5±0.7	54.0±0.5*	21.1±0.2*	39.2±0.5
		Conventional	10	8.4±0.9	7.82±0.27	16.3±0.5	42.0±1.3	53.8±0.4	20.9±0.3	38.8±0.5
19	M	Barrier	10	13.0±1.1	8.90±0.32	17.2±0.3	44.6±1.8	51.2±0.4	19.5±0.3	38.8±0.9
		Barrier(I)	10	10.9±0.8*	8.86±0.24	17.2±0.4	45.2±1.1	51.7±0.6	19.5±0.3	38.1±0.6
		Conventional	8	13.6±2.3+	8.68±0.18+	16.9±0.4	43.7±0.8	50.3±0.7*+	19.4±0.4+	38.6±0.3
	F	Barrier	10	10.0±1.6*	8.10±0.23*	17.2±0.4	43.7±1.2	55.0±0 *	21.3±0.2*	39.4±0.3*
		Conventional	10	10.8±1.6	8.00±0.30	16.9±0.4	43.2±1.7	54.7±0.4	21.2±0.6	39.3±1.2
23	M	Barrier	9	11.7±1.5	8.77±0.23	16.4±0.5	41.9±1.0	51.1±0.6	19.0±0.6	39.1±0.4
		Barrier(I)	10	12.4±1.3	8.91±0.42	16.7±0.4	42.4±1.8	50.9±0.5	19.0±0.9	39.4±1.7
		Conventional	10	11.3±1.7+	8.85±0.21+	17.1±0.6*	44.5±0.9*	51.3±0.6+	19.4±0.6+	38.3±1.0
	F	Barrier	9	9.3±1.6*	8.23±0.26*	16.6±0.1	42.1±1.5+	54.6±0.5*+	20.3±0.6*+	39.4±1.4
		Conventional	9	9.4±0.8	8.21±0.19	16.8±0.4	43.7±1.1	53.8±0.3	20.5±0.1	38.7±0.7
27	M	Barrier	10	12.2±1.4	8.75±0.23	17.0±0.2	43.8±1.0	51.0±0.6	19.4±0.3	38.7±0.6
		Barrier(I)	10	12.3±1.0	8.63±0.35	16.9±0.3	43.5±1.6	51.4±0.6	19.6±0.5	38.7±0.9
		Conventional	9	11.3±3.3+	8.65±0.28+	16.8±0.7	43.1±1.5	50.8±0.7+	19.6±0.7+	39.1±1.1
	F	Barrier	9	10.1±3.5	7.98±0.26*	16.9±0.4	43.4±1.4	55.4±0.5*+	20.9±0.8*	38.8±1.1
		Conventional	8	7.3±1.5	8.03±0.31	16.9±0.4	43.1±2.1	54.5±0.9	21.1±0.4	39.2±1.2

1) Blood were collected from tail vein without anesthesia, 2) Number of Examined Rats, 3) (I) : Individually

* : $P<0.05$ in comparison with value of male rats in barrier system

+ : $P<0.05$ in comparison with value of female rats in conventional system

Table 2. Differential Leukocyte Distribution in F344/DuCrj Rats[1] (Means and 1 SD)

Age of Rat (Weeks)	Sex	Condition of Housing	No. of[2] Rats	Percentages of Neutrophils	Lymphocytes	Monocytes	Eosinophils	Age of Rat (Weeks)	No. of Rats	Percentages of Neutrophils	Lymphocytes	Monocytes	Eosinophils
5	M	Barrier	9	9.5±3.7	90.1±4.0	0.3±0.5	0.1±0.3	15	9	18.6±6.6	79.0±6.3	0.9±0.9	2.0±2.1
		Barrier(I)[3]	8	9.4±3.2	89.8±4.0	0.7±0.7	0.6±1.0		10	16.9±3.4	83.0±4.4	1.0±0.8	1.1±1.1
		Conventional	10	13.0±7.0	86.2±7.9	0.5±0.7	0.3±0.7		10	13.7±3.8	84.6±4.2*	0.8±1.0	1.0±1.5
	F	Barrier	9	8.8±2.6	89.9±3.4	0.9±1.0	0.4±0.7		9	15.7±3.9	83.1±4.2	0.5±0.7	0.7±0.7
		Conventional	10	11.0±3.5	88.1±3.9	0.1±0.3	0.8±1.1		10	17.2±3.9	81.3±4.6	0.4±0.5	1.1±0.9
7	M	Barrier	10	13.7±3.3	85.6±3.4	0.5±0.7	0.2±0.4	19	10	17.1±5.1	80.5±4.9	1.2±1.1	1.2±0.6
		Barrier(I)	9	11.6±4.7	87.0±5.3	0.7±0.9	0.8±1.1		10	19.4±6.3	78.6±7.0	1.1±1.0	0.9±1.1
		Conventional	10	9.9±5.7	89.5±6.1	0.1±0.3	0.5±0.7		8	21.5±4.0	77.6±4.3	0.1±0.4*	0.8±0.7
	F	Barrier	10	12.0±5.3	87.1±5.6	0.4±0.7	0.5±0.5		10	18.2±5.5	80.7±5.7	0.2±0.4*	0.9±1.3
		Conventional	9	12.8±3.9	86.7±4.1	0.1±0.3	0.4±0.5		10	17.8±6.0	81.0±5.4	0.6±0.7	0.6±0.7
9	M	Barrier	10	11.5±4.3	87.3±4.3	0.4±0.7	0.8±0.8	23	9	17.9±6.8	80.3±7.2	0.8±1.3	1.0±0.9
		Barrier(I)	10	15.1±4.7	83.5±5.8	0.5±0.5	0.9±1.1		10	19.3±6.2	79.2±6.0	1.0±1.2	0.5±0.5
		Conventional	8	14.3±4.2	85.9±3.4	0 ±0	0.4±0.7		10	17.5±6.2	80.8±6.4	0.8±0.6	0.9±1.3
	F	Barrier	9	11.9±3.4	87.4±3.4+	0.3±0.5	0.3±0.7		9	17.0±5.4	81.8±5.8	0.4±0.7	0.8±0.8
		Conventional	8	20.1±5.9*	78.5±5.9*	0.3±0.7	1.1±0.8		9	15.0±5.0	83.7±5.3	0.4±0.7	0.9±0.9
11	M	Barrier	10	15.7±7.0	84.3±7.1	0.2±0.4	0.8±0.8	27	10	20.2±9.1	77.6±9.7	0.8±1.0	1.4±1.6
		Barrier(I)	10	16.3±5.7	80.6±6.5	0.9±1.3	1.2±1.0		10	24.0±5.9	74.8±6.3	0.9±0.9	1.5±1.5
		Conventional	8	17.8±5.9	81.1±6.5	0.4±1.1	0.8±0.7		9	18.6±3.7	79.6±3.9	0.8±0.6	1.0±1.2
	F	Barrier	10	14.1±3.7+	85.2±4.1+	0.1±0.3	0.6±0.7		9	21.0±8.4	76.9±8.5	0.6±0.7	1.6±1.0
		Conventional	10	22.5±5.5*	76.4±5.3*	0.3±0.5	0.8±0.5		8	18.1±7.9	80.3±8.5	0.9±0.7	0.6±0.8
13	M	Barrier	9	15.0±4.9	83.0±5.0	0.6±0.7	1.4±1.1						
		Barrier(I)	10	15.8±3.1	82.1±3.0	1.0±1.1	1.1±1.0						
		Conventional	9	17.4±4.6	80.6±5.2	0.9±1.1	1.1±1.5						
	F	Barrier	10	19.4±3.8*	80.1±5.8	0.6±0.5	0.9±0.7						
		Conventional	10	17.4±3.8	80.8±3.7	0.7±0.9	1.1±0.9						

1) Blood were collected from tail vein without anesthesia, 2) Number of Examined Rats, 3) (I) : Individually

* : $P<0.05$ in comparison with value of male rats in barrier system

\+ : $P<0.05$ in comparison with value of female rats in conventional system

が認められた(P<0.05). 雌雄差が11週より認められ雌の方が高値を示した.

MCHCは7週まで増加し以降多少の増減はあるがほぼ一定の値を示した.

白血球百分比では好中球の比率が週齢とともに増加し, 5週で雄9.5~13.0%, 雌8.8~11.0%であったのが, 27週では雄18.6~24.0%, 雌18.1~21.0%となった. リンパ球の比率は相対的に減少し5週で雄86.2~90.1%, 雌88.1~89.9%が, 27週で雄74.8~79.6%, 雌76.9~80.3%となった.

赤血球および白血球の形態には経時的な変化はみられなかった.

考　察

ラットの血液性状は系統による差異があまりないとされており, KozmaらはLong-Evansラットについての検討で, 週齢, 性による差はほとんどないとしている[6]. 今回のF344ラットの検討においてはRBC, Hb, MCV, MCHで明らかな週齢による変化がみられ, RBC, MCV, MCH, においては雌雄差が認められた. 雌雄差が認められた時期はRBCが13週以降, MCVが9週以降, MCHが11週以降で, ラットの成熟期にほぼ一致あるいはそれより数週遅れてであった. ヒトでは成熟期に認められたRBC, Hbにおける性差が女性の閉経期以後消滅するとされており, ラットでみられたRBC, MCV, MCHの差が今後どのような動向を示すか興味深い.

Burns[7], 遠藤ら[8]は無菌環境下のラットと一般飼育環境下のラットを比較し血液性状に有意差はないとしており, 今回の検討においても差はみられなかった.

F344ラットのRBCは19週まで増加し, 雄8.68~8.90×10^6/mm^3, 雌8.00~8.10×10^6/mm^3となり以降多少の増減はあるがほぼ一定の値を示した. 当部で以前行ったWistarラット, SDラットを用いた試験の対照群のRBCは, Wistarラット(44週)[1]雄5.7±0.14×10^6/mm^3・雌5.6±0.16×10^6/mm^3, SDラット(30週)[2] 雄7.59±0.17×10^6/mm^3・雌6.41±0.17×10^6/mm^3, SDラット(57週)[2] 雄6.99±0.45×10^6/mm^3・雌6.72±0.31×10^6/mm^3などである. これら二試験での血球値は断頭時流出した血液を採取して得たものである. 断頭採血による血球数は若干低値を示すとの報告があるが[9], 今回のF344ラットの血球値とWistarラット, SDラットとの間には雄で1.00~3.00×10^6/mm^3, 雌で1.50×10^6/mm^3前後の差があり, 採血条件の相違を考慮してもF344ラットのRBCは幾分高値を示すと思われた.

WBCの測定で雄10.4~13.6×10^3/mm^3, 雌7.3~11.7×10^3/mm^3の値を得た. 著者らは頸静脈血, 大腿動・静脈血, 尾静脈血の血液性状を比較し, RBC, Hb, Ht, MCV, MCH, MCHCでは採血部位による差がみられないが, 尾静脈血でのWBCは高値を示すとの知見を得ている[10]. 今回の結果を解釈する際尾静脈血で測定したという点を考慮する必要があると思われる.

まとめ

F344/DuCrjラットの血液性状を知るため, 同一ラットより経時的に採血し検索を試みた.

RBC, Hbは19週, MCHCは7週まで増加し以降多少の増減はあるがほぼ一定の値を示した. MCV, MCHは15週まで減少し以降ほぼ一定の値を示した. WBC, RBCでは13週, MCVでは9週, MCHでは11週より雌雄差が認められた. 白血球百分比では好中球の比率が週齢に伴ない増加し, リンパ球の比率は減少した. 雌雄差は認められなかった.

バリア飼育と一般飼育, 集団飼育と個別飼育の比較では血液性状に差は認められなかった.

文　献

1) 米山充子, 馬渕依子, 伊川三枝子：東京衛研年報, 27-2, 105, 1976
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) Mitruka, B. M., Rawnsley, H. M. : *Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals and Normal Humans*, 2nd Edi., 1981, Masson Publishing, USA
5) 関　正利, 平嶋邦猛, 小林好作：実験動物の血液学, 331, 1981, ソフトサイエンス社
6) Kozma, C. K., Weisboth, S. H., Stratman, S. L. and Conejeros, M. : *Lab. Anim. Care.*, 19, 746, 1969
7) Burns, K. F., Timmons, E. H. and Poiley, S. M.: *Lab. Anim. Sci.*, 21, 415, 1971
8) 遠藤信夫, 小林富士男, 藤井　治, 名古屋隆生, 白鳥陽子：実験動物, 20, 7, 1971
9) 市川久次, 中川好男, 小林博義：東京衛研年報, 26-2, 207, 1975
10) 多田幸恵, 佐々木美枝子, 平賀興吾：東京衛研年報, 35, 454, 1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 454-456, 1984

ラットの採血部位による血液性状の変動

多田幸恵*, 佐々木美枝子*, 平賀興吾*

Differences in Hematological Findings among the Blood Collected from Various Vessels of Rat

YUKIE TADA*, MIEKO SASAKI* and KOGO HIRAGA*

Keywords: Rat, Hematological Findings, Various Vessels

緒　言

毒性試験における血液検索の際，採血時の動物の状態および採血法は血液性状に種々の影響を与える[1~4]．採血部位が血液性状に影響を与えることも従来から知られており，マウスではすでに検討されている[5,6]．当部で亜急性・慢性毒性試験を行う場合ラットを用いることが多いが，ラットでのこの種の検討は少ないようである．また試験途中での血液性状のチェックは試験結果を判断する際重要な指針を与えると思われるが，途中採血に適する部位での血液性状の検討は見受けられない．そこで今回，無麻酔下での繰り返し採血が可能な尾静脈，頸静脈および当部で試験の際用いる大腿動・静脈の三ヶ所における血液性状の比較検討を行った．

実験方法

実験動物　日本チャールスリバー㈱生育の F344/Du-Crj ラットを 4 週齢で購入，一般動物室（室温 25±1°，湿度 50～60％，照明 12 h，換気回数毎時 10 回）で前・底面が鋼のステンレスケージに 5 匹ずつ入れ，飼育用固型飼料（日本クレア・CE-2）および細菌ろ過器を経由した水道水を自由に摂取させ飼育した．経時的に血液性状の観察[7]を行った後の 35 週齢の雄（体重 377.7±19.5 g），34 週齢の雌（207.6±8.2 g）各 10 匹を実験に用いた．

採血法　同一ラットの尾静脈，頸静脈，大腿動・静脈よりそれぞれ採血するため，ラットを背位に固定し，①尾を微温湯で温め鋭利なカミソリを軽くあて湧出する血液を採取[7]，②皮膚を切開することなく，右側外頸静脈より 1 m*l* のニプロディスポーザブルシリンジ（25 G）を用いて採血，③大腿部の皮膚を切開し，大腿動脈および大腿静脈をメスで切開し流出する血液を採取した．尾静脈採血より，大腿動・静脈採血までに要する時間は 10 分間以内とした．抗凝固剤は EDTA-2 K を小試験管に分注し蒸発乾固させて用いた．

血液学的検索　白血球数（WBC），赤血球数（RBC），ヘモグロビン量（Hb），ヘマトクリット（Ht），平均赤血球容積（MCV），平均赤血球ヘモグロビン量（MCH），平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）の測定を Coulter Counter Model S（Coulter Electric INC）を用いて行った．また血液塗抹標本を作製し，May-Grünwald Giemsa 染色した後，光顕的に観察した．結果は Student の t 検定により危険率 5％で推計学的に検討した．

結果および考察

頸静脈，大腿動・静脈，尾静脈における血球数の測定結果を Table 1，白血球百分比を Table 2 に示した．

RBC, Hb, Ht, MCV, MCH, MCHC では雄・雌共に尾静脈血での値が頸静脈血，大腿動・静脈血での値よりわずかに高かったが有意差は認められなかった．WBC は雄，雌とも尾静脈血での値が他の部位での値より有意に高く，雌では特に顕著であった．

光顕的観察の結果，赤血球および白血球形態には部位による差がみられなかった．白血球百分比では雄の尾静脈血で好中球の有意な減少，リンパ球の有意な増加がみられ，雌では部位による差がみられなかった．

DDN 系マウスにおける検討で，蒲地らは尾尖血での値は他の部位の値よりやや高値を示すが，有意差は認められないとし[6]，榊らは眼穿刺法と断尾法を比較し，後者での RBC, WBC, Hb, Ht は高値を示すと報告している[5]．今回の検討では WBC でのみ有意差がみられ，他項目では有意差がみられなかった．従来より身体の末梢部

* 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. Hematological Values in the Blood Collected from Various Vessels (Means and 1 SD)

Sex	Vessel[1)]	No. of Rats	WBC $\times10^3/mm^3$	RBC $\times10^6/mm^3$	Hb g/dl	Ht %	MCV μ^3	MCH $\mu\mu g$	MCHC %
M	Jugular	10	4.9±0.4	8.72±0.28	17.0±0.1	43.7±1.3	51.0±0.5	19.0±0.5	39.0±1.0
	Femoral	10	5.4±0.6	8.72±0.08	16.9±0.2	43.3±0.7	50.4±0.5	19.3±0.1	38.9±0.5
	Tail	10	8.5±0.9*	9.00±0.14	17.3±0.1	45.2±0.8	51.1±0.6	19.3±0.1	38.2±0.4
F	Jugular	9	4.1±0.8	8.11±0.25	16.9±0.2	43.2±1.6	54.1±0.6	20.9±0.5	39.1±1.3
	Femoral	9	4.1±0.5	7.82±0.17	16.4±0.2	41.6±0.9	54.4±0.7	21.0±0.5	39.4±1.0
	Tail	8	9.2±1.2*	8.15±0.22	17.1±0.3	43.9±0.7	54.8±1.0	21.0±0.3	38.9±0.5

1) Vessel of Blood collecting Jugular : Jugular vein, Femoral : Femoral vein and Femoral artery, Tail : Tail vein, * : $P<0.05$ in comparison with value in Jugular vein.

Table 2. Differential Leukocyte Distribution in the Blood Collected from Various Vessels (Means and 1 SD)

Sex	Vessel[1)]	No. of Rats	Percentages of Neutrophils	Lymphocytes	Monocytes	Eosinophils
M	Jugular	10	23.4±5.9	74.6±7.2	0.4±0.7	1.5±1.1
	Femoral	10	23.2±7.7	76.0±7.5	0.2±0.4	0.6±0.8*
	Tail	10	15.4±5.6*	83.2±5.6*	0.7±0.9	0.6±0.5*
F	Jugular	9	16.4±3.8	82.2±3.7	0.6±0.5	0.7±0.7
	Femoral	9	14.7±6.1	84.4±6.0	0.4±0.5	0.4±0.7
	Tail	8	13.9±1.9	84.3±2.2	0.9±1.7	1.0±1.3

1) Vessel of Blood collecting Jugular : Jugular vein, Femoral : Femoral vein and Femoral artery, Tail : Tail vein, * : $P<0.05$ in comparison with value in Jugular vein.

では，血液のうっ滞により血球成分値が高くなるとされているが，今回の検討により赤血球値は採血部位による影響をほとんど受けないものと考えられた．

尾静脈採血では，ラットの固定法，採血法（カミソリをあてる，断尾法，注射筒を用いるなど）の相違により血液性状がかなり影響されるが，一定の規準で行った場合尾静脈血の性状は安定している[7]．採血の際ラットに与える苦痛が少ない点を考慮すると，繰り返し採血部位として尾静脈は最適であろうと思われた．

ま と め

F344/DuCrj ラットを用いて，採血部位による血液性状の変動を観察した．

雄，雌とも頸静脈血，大腿動・静脈血に比較し尾静脈血で WBC の有意な増加が認められた．RBC, Hb, Ht, MCV, MCH, MCHC では採血部位による差が認められなかった．

文 献

1) Brown, H. E. and Dougherty, T. F. : *Endocrinol.*, 59, 365, 1956
2) Edozien, J. C. and Switzer, B. R. : *J. Nutr.*, 107, 1016, 1977
3) Penny, R. H. C., Carlisle, C. H., Davidson, H. A. and Gray, E. M. : *Br. Vet. J.*, 126, 383, 1970
4) Burns, K. F., Timmons, E. H. and Poiley, S. M. :

Lab. *Anim. Sci.*, 21, 415, 1971
5) 榊　馨, 田中享一, 平沢　登：実験動物, 10, 14, 1961
6) 蒲地康郎ら：九州血液研究同好会誌, 15, 95, 1965
7) 関　正利, 平嶋邦猛, 小林好作：実験動物の血液学, 331, 1981, ソフトサイエンス社
8) 多田幸恵, 佐々木美枝子, 平賀興吾：東京衛研年報, 35, 448, 1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 457-459, 1984

テトラサイクリン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 Tetracycline

SEIJI YOSHIDA*, MIEKO SASAKI* and KOGO HIRAGA*

Keywords : Tetracycline, Chromosome Analysis, Chinese hamster

緒　言

Tetracyclineは*streptmyces aureofaciens*より分離された抗菌物質[1]であり，その抗菌スペクトルはグラム陽性菌，グラム陰性菌，リケッチア　スピロヘータ及び原虫類までと幅広く，臨床に盛んに用いられているが，その毒性に関する報告[2-5]も多い．また，変異原性についての報告も多く，サルモネラ菌を用いた変異原性試験[6]，培養細胞による薬剤耐性試験及び染色体試験等[7-9]の*in vitro*試験では，いずれも陽性の結果が示されている．

一方，微生物を用いる変異原性試験は哺乳動物の系には見られない多くの利点を持つが，哺乳動物で突然変異が誘発される過程には被検物質の吸収，生体内分布及び代謝等の複雑な要因が関係し，これらの作用を受ける．とりわけ，細菌による変異原性試験ではTetracyclineの様な抗菌製剤においては殆んどの場合抗菌力を示さない低濃度でないと試験が行えず評価に値する結果を得ることは不可能と思える．これらの事を考え，今回チャイニーズハムスターにおけるTetracyclineの*in vivo*染色体異常誘発の有無を3種の投与方法を用いて調べた．

材料および方法

1. 試験物質：Tetracycline Hydrochloride（以下T. Cと略す）はSIGMA社製でLot No. 102F−0041のものを用いた．

2. *in vivo*染色体試験(1)：当部で繁殖・育生したチャイニーズハムスター雌を12週令の時点で以下の実験に供した．T. Cを0.9％NaCl液で溶解し種々濃度のT. C溶液を作製した．投与容量は10 m*l*/kgとし胃ゾンデによる経口投与及び腹腔内注射を行った．なお，陰性対照は0.9％NaCl液のみを上記同様に投与したものとした．T. C投与後，経口投与群は24，48及び72時間目，腹腔内投与群は24及び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．

3. *in vivo*染色体試験(2)：当部で繁殖・育成したチャイニーズハムスター雌を10週令の時点で以下の実験に供した．T. Cを水道水で溶解し5％及び1％濃度のT. C溶液を作製した．このT. C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．なお，陰性対照は水道水のみを与えたものとした．投与後3日，7日及び14日目に各群2匹の動物を放血により屠殺後常法により染色体標本を作製した．染色及び染色体分析は前述の試験(1)と同様に行った．

結果および考察

***in vivo*染色体試験(1)**：T. Cを経口投与した結果をTable 1に示す．

24時間処理におけるT. C 1500 mg/kg投与群では染色体異常細胞の増加は見られなかったが500 mg/kg投与群で異常細胞の増加が観察された．48時間処理において1500 mg/kg投与群の染色体異常細胞が陰性対照に比し有意な増加を示した．この投与群で誘発された異常細胞の殆んどがChromatid typeのgapであった．500 mg/kg投与群では24時間処理における1500 mg/kg投与群の誘発頻度と同程度であり異常細胞の増加は認められなかった．72時間目においては1500及び500 mg/kgのいずれの投与群とも陰性対照に比し有意な増加を示した．一方，染色体の数的異常は24，48及び72時間処理におけるT. C及び陰性対照のいずれにおいても検出されなかった．

次にT. Cを腹腔内投与した結果をTable 2に示す．

* 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. Frequency of Chromosome Aberrations Induced by Tetracycline-Oral Administration

Duration of treatment(hr.)	Chemical conc. (mg/kg)	No. of cells analysed	Total aberrations	gap C1	gap C2	break C1	break C2	Ot.
24	1500	135	5	3	0	2	0	0
	500	200	10	10	0	0	0	0
	100	200	2	2	0	0	0	0
	0	100	2	2	0	0	0	0
48	1500	200	14	12	1	1	0	0
	500	150	6	5	0	1	0	0
	100	100	1	1	0	0	0	0
	0	100	1	1	0	0	0	0
72	1500	200	13	12	0	2	0	0
	500	200	12	11	0	2	0	0
	100	100	1	0	0	1	0	0

Table 2. Frequency of Chromosome Aberrations Induced by Tetracycline-i.p, Administration

Duration of treatment(hr.)	Chemical conc. (mg/kg)	No. of cells analysed	Total aberrations	gap C1	gap C2	break C1	break C2	Ot.
24	750	120	16	9	0	7	0	1[1]
	375	150	6	7	0	0	0	0
	0	100	2	2	0	0	0	0
48	750	150	11	8	1	1	0	1[2]
	375	110	4	4	0	0	0	0
	0	100	1	1	0	0	0	0

1) Polyploidy 2) Pulverization

24時間処理における T. C 750 mg/kg 群の異常誘発頻度が 13.3％と本実験中で最高の値を示した．誘発された異常細胞は，先述の経口投与群では gap が主であったが腹腔内投与では Chromatid type の break の出現が観察された．また，染色体の倍数性変異である Polyploidy が一例ではあるが観察された．48時間処理においても 750 mg/kg 投与群が 24 時間処理における同用量に比べ異常細胞の頻度は低いが，やはり増加を示した．

Table 3. Frequency of Chromosome Aberrations Induced by Tetracycline-Drink

Duration of treatment(day)	Chemical conc. (%)	No. of cells analysed	Total aberrations	gap C1	gap C2	break C1	break C2	Ot.
3	5	200	14	11	0	3	0	0
	1	200	6	6	0	0	0	0
	0	100	1	1	0	0	0	0
7	5	200	12	8	0	4	0	0
	1	150	4	3	0	1	0	0
	0	100	0	0	0	0	0	0
14	5	N.D						
	1	164	12	9	0	2	0	1[1]
	0	100	2	1	0	1	0	0

1) Exchange

また，一例ではあるが染色体の重度の異常である Pulverization が観察された．

***in vivo* 染色体試験(2)**：次に，T. C を飲料水にて投与した結果を Table 3 に示す．

T. C 3日処理群において，5％群で gap を主とする異常細胞の増加が観察された．同様な結果が T. C 7日処理群においても認められた．T. C 14日処理群においては，3日及び7日処理群では異常細胞の増加が全く認められなかった1％群においても染色体異常細胞の増加を認めた．また，本報の Table には示していないが，1％濃度を 14 日処理した後に水道水に戻し，21 日目に染色体分析を行った結果においても gap を主とする 7％の異常細胞が検出されており，T. C により一度誘発された異常細胞は消失することなく分裂を行っているものと思える．さらに我々は T. C の飲料水による投与を前記の1％と 0.5％の低濃度で 14 日間行い染色体分析を行った．その結果，1％群での異常細胞の増加が観察され再現性を認めた．しかし，低濃度の 0.5％群では異常細胞の増加は全く見られなかった．

今回，T. C を急性経口投与，急性腹腔投与及び飲料水による長期連続投与の3種の投与方法を用い，その染色体異常誘発性の有無をチャイニーズハムスターで検討した．その結果，いずれの投与方法においても染色体異常誘発性を認めた．中でも腹腔内投与の 24 時間処理においての染色体異常誘発頻度が 13.3％と本実験中最も高

い値を示した．また，上記投与による染色体異常誘発性に大きな差異が無いことは，T. Cの各投与方法における吸収が非常に良好であるとともに，*in vivo* 染色体の指標である骨髄細胞に充分な量のT. Cが到達していることを示唆するものであった．

今回，我々の行った*in vivo*染色体試験でT. Cの染色体異常誘発性を認めるとともに，緒言で述べた *in vitro* 変異原性試験の報告を併せて考えると，T. Cは極めて危険な変異原物質であると推測される．

文　献

1) 第二版岩波生物学辞典，岩波書店
2) De jonge, H. R., : *Biochemical Pharmacology,* 22, 2659, 1973
3) Greenberger, N. J., : *Nature,* 214, 702, 1967
4) Carter, M. P. : *Brit. Med. J.,* 11, 407, 1962
5) Ling, V. and Morin, C. L. : *Biochim. Biophys. Acta.*, 249, 252, 1971
6) Mccan, J., Yamasaki, E. and Ames, B. N. : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72, 5135, 1975
7) Bhattacharjee, B. S. : *Mut. Res.*, 101, 329, 1982
8) Tsutsui, T., Umeda, M. and Maizumi, H. : *Mut. Res.*, 40, 261, 1976
9) Bhattacharjee, B. S. , Pal, B. and Bhaumic, G. : *Mut. Res.*, 135, 211, 1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 35, 460-464, 1984

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（第2報）
汎用統計処理プログラム集の作成

三栗谷 久 敏*, 藤 田 博*, 神 谷 信 行*
佐々木 美枝子*, 平 賀 興 吾*

A Personal Computer Program for Statistical Analysis of Toxicological Study (II)
A General Statistics Program

HISATOSHI MIKURIYA*, HIROSHI FUJITA*, NOBUYUKI KAMIYA*
MIEKO SASAKI* and KOGO HIRAGA*

Keywords：統計解析 statistical analysis, 毒性試験 toxicity test, パーソナルコンピュータ personal computer

はじめに

当部では一般毒性試験（急性，亜慢性，慢性試験など）および催奇形性，変異原性，発がん性試験など，いわゆる特殊毒性試験，さらに薬物代謝や毒性発現機序の解明など種々の試験，研究が行われており，それぞれの試験，研究に応じたデータの統計学的解析が要求される．これらの要求に答えるために，著者らはパーソナルコンピュータによる毒性試験データ解析システムの開発を進めている．それらの内容の一部である一般毒性試験用データ解析プログラム（TOXI−STUDY）については，前報[1]に報告した．

今回，種々の試験データに応じた統計学的手法（24種類）が系統的に使用でき，かつTOXI−STUDYのデータも統計解析できる汎用統計処理プログラム集（TOXI−STAT）の作成を行ったのでその概要について報告する．

TOXI−STATの概要

1．使用機種

SEIKO 7500パーソナルコンピュータを使用した．機器構成については前報[1]にて詳細に述べた．

2．使用言語

SEIKOスーパーBASIC（ROM 44KB）を用いた．

3．プログラムの作成方針

本プログラムの作成は以下に述べる方針に従って行った．

(1)全ての演算処理は，IPL（Initial Program Loader）によって実行されるメインプログラムで管理し，入力，演算，出力およびファイル処理などのプログラムはサブプログラム化すること．

(2)データの変数名および入出力ルーチンを可能な限り共通化し，一度入力したデータは必要に応じて各種の統計処理ができること．

(3)演算ルーチンをサブプログラム化し，新しい統計処理プログラムの追加を容易にすること．

(4)データはミニフロッピーディスク（MFD）にファイルできること．

(5) TOXI−STUDYのファイルデータを統計処理できること（図1）．

4．プログラムの概要

プログラムの構成を図2に示した．メインプログラムの実行により表示されるメニューから，データの種別，入力方法，各種演算およびファイル処理などを選択する．指定した作業に必要なサブプログラムがロードされ，統計処理が行われる．サブプログラムは現在35本から成る．

以下，主な機能について述べる．

(1)統計学的手法の選択

MAIN MENU（図3）によりデータの種別を指定し，さらにデータの種別ごとのTEST MENUから適切な統計学的手法を選択する．現在選択可能な統計学的手法を表1に示した．

* 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

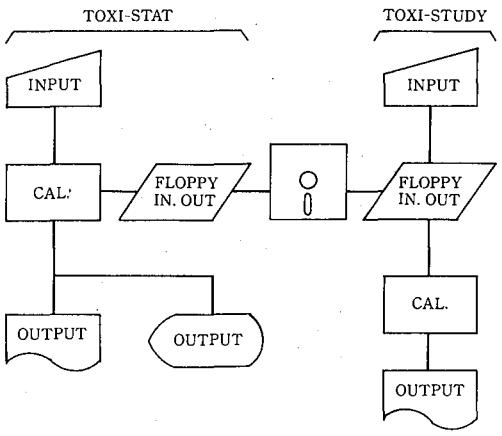


図1. 毒性試験データ解析システムのプログラム構成

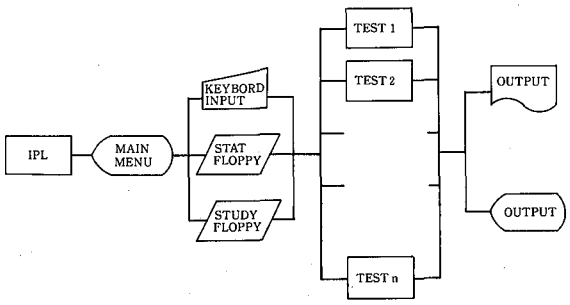


図2. TOXI−STATのプログラム構成

```
***  STAT MAIN MENU  ***

   1.  X^2  ｶﾝｹｲ
   2.  ｼﾞｭﾝｲﾌ  ｶﾝｹｲ
   3.  ﾍｲｷﾝﾁ  ｶﾝｹｲ
   4.  ｿｳｶﾝ  ｶﾝｹｲ
   5.  ｿﾉﾀ

  33.  STAT FLOPPY
  55.  TOXI STUDY FLOPPY

ｼｮﾘ NO.   INPUT   1   ( END = 999 )
```

図3.画面のMAIN MENU

(2)データ入力

INPUT MENU(図4)の4つの方法から選択できる. ①**KEY BOARD**：キーボードからのデータ入力. ②**RAM**：一度入力し，コンピュータ本体内に記憶されているデータの再演算. ③**STAT FLOPPY**：TOXI−STAT用MFDにファイルされているデータの演算. ④**TOXI STUDY FLOPPY**：TOXI−STUDY ファイルデータの演算.

(3)ファイル処理

MAIN MENUまたはINPUT MENUにおいてSTAT FLOPPYを指定することにより，FILE COMMAND MENU（図5）が表示される. このメニ

表1. TOXI-STATに収納されている統計学的手法

類 別 変 数
1. χ^2-検定（2×2, Yatesの補正）
2. Fisherの直接確率検定
3. χ^2-検定（R×C）
4. 割合についての傾向の検定（TREND）
5. 正規性の検定
順 位 変 数
1. Wilcoxonの順位和検定
2. Mann-WhitneyのU検定
3. Kruskal-Wallisの検定
間隔・比率変数
1. 基礎統計量（平均，標準偏差，標準誤差）
2. t-検定（平均，分散未知）
3. t-検定（平均，分散既知）
4. Bartlettの検定
5. 一元分散分析
6. Dunnettの検定（CSD法）
7. Duncanの検定（WSD法）
8. Schefféの検定
9. Smirnov-Grubbsの棄却検定
10. Dixonの棄却検定
11. ヒストグラム
相 関 ・ 回 帰
1. 直線回帰
2. 曲線回帰
3. 高次回帰
そ の 他
1. LD50値の算出(Ⅰ), (Ⅱ), (Ⅲ)
2. 乱数発生および無作為抽出法

```
*** INPUT MENU ***

EXECUTE.  KEY BOARD
     22.  RAM
     33.  STAT FLOPPY
     55.  TOXI STUDY FLOPPY
     88.  TEST MENU

ｼｮﾘ NO.  INPUT  22    ( END=999 )
```

図 4. 画面の INPUT MENU

```
*** FILE COMMAND MENU ***

   1.  LOAD (CAL)
   2.  MERGE (CAL)
   3.  CORRECT
   4.  PRINT (DATA OUT)
   5.  ERASE
   6.  CATALOG

  66.  INPUT MENU
  88.  TEST MENU

  ｼｮﾘ NO. INPUT     2    ( END=999)
```

図 5. 画面の FILE COMMAND MENU

ューにはファイル処理を行うための次のようなコマンドを用意した. ① **LOAD (CAL)**：ファイルされているデータをロードし，演算する. ② **MERGE (CAL)**：2つ以上のファイルデータを1つの順序づけられたファイルに組み合わせる作業をし，演算する. ③ **CORRECT**：ファイルされているデータの訂正をする. ④ **PRINT (DATA OUT)**：ファイルされているデータを出力する. ⑤ **ERASE**：指定したファイルを消去する. ⑥ **CATALOG**：MFD 内のファイル情報を全て出力する.

(4)データのファイル化

データは演算終了後表示される **SAVE** コマンドによりファイルすることができる.

```
***   TOXI STUDY MENU   ***

   1. BODY WEIGHT
   2. FOOD & WATER CONSUMPTION
   3. ORGAN WEIGHT
   4. HEMATOLOGICAL DATA
   5. SERUM BIOCHEMICAL DATA

  66. INPUT MENU
  88. TEST MENU
  99. MAIN MENU

ｼｮﾘ NO.  INPUT    1    (END=999)
```

図 6. 画面の TOXI STUDY MENU

1984. 6.12

4. BARTLETT'S TEST

	CONTROL	TEST1	TEST2	TEST3
1	136	127	122	135
2	130	138	129	133
3	137	135	132	119
4	139	133	119	125
5	133	126	124	137
6	131	130	115	131
7	129	137	133	123
8	140	130	114	125
9	131	134	113	127
10	130	133	121	125

X^2 = 4.41345 (DF= 3) P>0.05, NOT SIGNIFICANT

5. ONE-WAY ANALYSIS OF VARIANCE

	SS	DF	MS	FCAL
A	792.9	3	264.3	8.90***
R(A)	1068.1	36	29.7	
AR	1861.0	39		

TWO SIDE --- * : P=0.05 , ** : P=0.01 & *** : P=0.001

6. DUNNETT'S TEST

N	10	10	10	10
M	133.6	132.3	122.2	128.0
SD	4.06	4.00	7.28	5.75
SE	1.28	1.27	2.30	1.82
T'		0.53	4.68 **	2.30
5%		2.44	2.44	2.44
1%		3.09	3.09	3.09

TWO SIDE --- * : P=0.05 & ** : P=0.01

図 7. TOXI−STAT を用いた統計処理の例

(5) **TOXI−STUDY ファイルデータの統計処理**

MAIN MENU または INPUT MENU において TOXI STUDY FLOPPY を指定することにより，TOXI STUDY MENU（図6）が表示される．統計処理を行うデータの種類を選択すると，TOXI−STAT に TOXI−STUDY ファイルデータが入力される(図1)．

(6)出力

演算結果は全てプリンターへの出力とした(図7)．ただし，相関・回帰のグラフなどはディスプレイ表示も同時に行う．

5．適用例

TOXI−STAT を用いた統計処理の例を図7に示した．動物実験などで投与各群の平均値を対照群のそれと比較する際は，データ入力後，まず Bartlett 検定法[2]を用いて分散の検定を行う．有意ならば Kruskal−Wallis 検定法[2]を，有意でなければ一元分散分析[2]を行う．本例は分散が有意でないため一元分散分析を行った．この分析で有意が認められたため，さらに Dunnett 検定法[3]を用い対照群と投与各群の平均値を比較した．〔*〕印のついた群は対照群の値に比べ有意な差があることを示している．

この一連の処理において，データの入力は Bartlett 法による検定の際一度行っただけである．このように TOXI−STAT において，一度入力したデータは各種の統計処理を行うことができる．

おわりに

試験データの解析のため，試験データに応じた統計学的手法が系統的に使用できる汎用統計処理プログラム集（TOXI−STAT）を作成した．

(1)一度入力したデータは必要に応じて各種の統計処理ができる．

(2)新しい統計処理プログラムの追加が容易である．

(3)入力データをファイル保存することができる．

(4) TOXI−STUDY のファイルデータを統計処理することができる．

今後 TOXI−STAT を種々の試験データの解析に活用させるとともに，より一層の充実を図りたいと考えている．

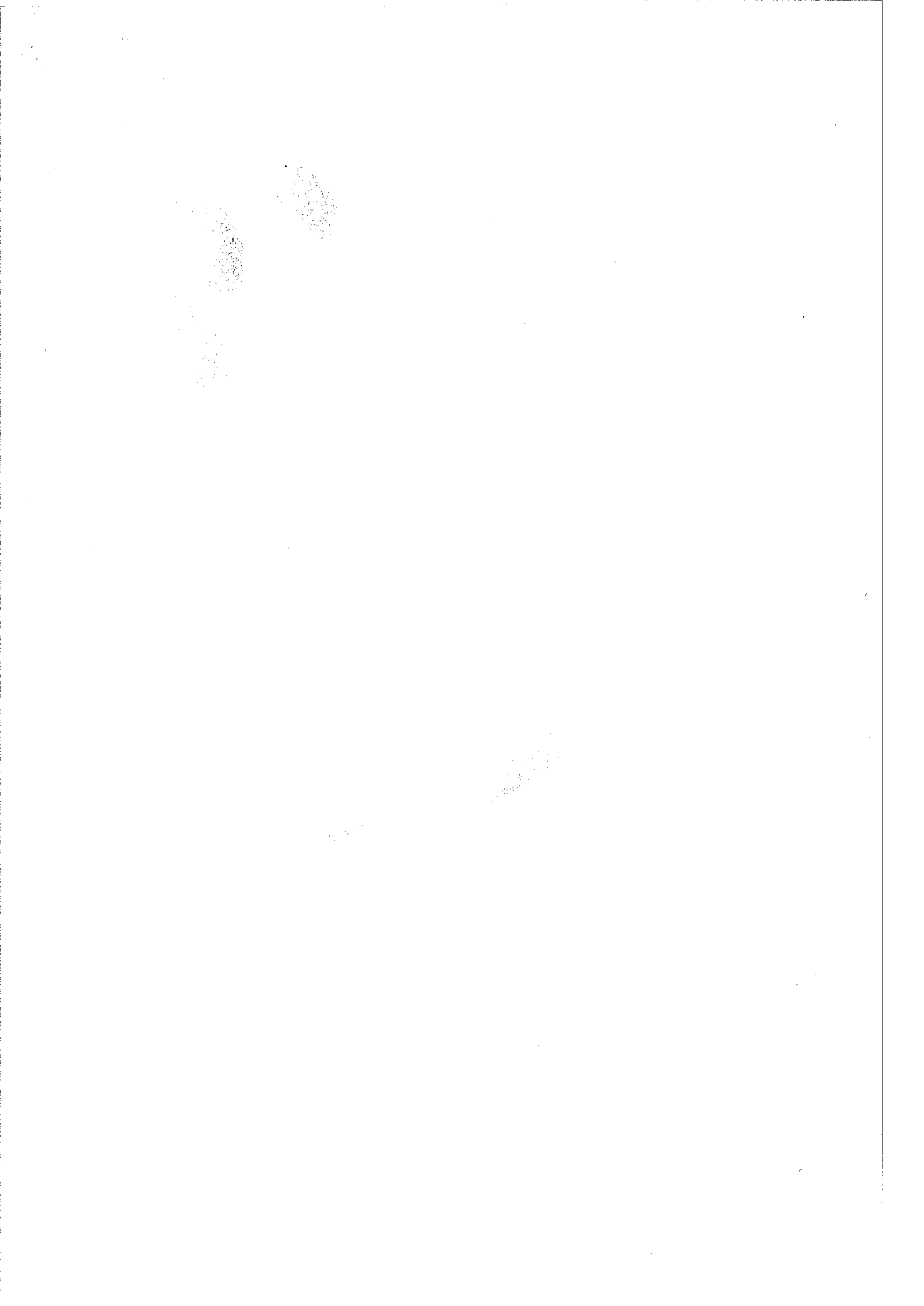
文　献

1) 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：東京衛研年報，34，421，1983
2) 石居　進：生物統計学入門，1975，培風館
3) Dunnett, C. W.: *Biometrics,* 20, 482, 1964

他 誌 発 表

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1983. 7—1984. 6)



原著論文

Enterotoxin producibility and some biological features of O-1 and nonO-1 *Vibrio cholerae* isolates

Yasuo kudoh, Shigeru Matsushita, Sumio Yamada, Masaaki Tsuno, Kenji Ohta, Senzo Sakai and Makoto Ohashi: Proceeding of the 16th Joint conf., U.S-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel. [Eds] S. Kuwahara &Y.Zinnaka. 214 Toho Univ., Tokyo, 1981

Enteropathogenicity of some biological fetures of group F (EF-6) Vibrio isolates

Yasuo Kudoh, Masaaki Tsuno, Shigeru Matsushita, Sumio Yamada, Kenji Ohta, Senzo Sakai and Makoto Ohashi : Advances in Research on cholera and related diarrheas, [Eds] S. Kuwahara & N.F. Pierce. 75, Martinus Nijhoff Publ., Boston, 1983

Lysogenicity of *Vibrio cholerae*

Makoto Ohashi, Takeshi Terayama, Hiroshi Ushioda, Yasuo Kudoh, Masaaki Tsuno, Shigeru Matsushita, Kenji Ohta, Senzo Sakai and Orasa Suthienkul: Advances in Research on cholera and related diarrheas, [Eds] S.Kuwahara & N.F. Pierce. 113, Martinus Nijhoff Publ., Boston, 1983

1979～1981年間に東京都で発生した *Campylobacter jejuni* による15事例の集団下痢症に関する調査

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：感染症学雑誌，57(7)，576，1983

Purification and characterization of *Staphylococcus aureus* FRI 1169 and 587 Toxic shock syndrome enterotoxins

Hideo Igarashi, Hiroshi Fujikawa, Hiroyuki Usami, Shunichiro kawabata and Takeshi Morita: Infection and Immunity 44(1), 175, 1984

Distribution of mycotoxin producing fungi in marketing foods in Japan

H.Hitokoto, S.Morozumi, T.wauke and H.kurata: Toxigenic Fungi-Their Toxins and Health Hazard. 15, KODANSHA／EISEVIER, 1984

Isoprenoid quinone content and cellular fatty acid composition of *campylobacter* species

C.Wayne Moss, Akemi Kai, Mary Ann Lambert and Charlotte Patton: J.Clin, Microbiol. 19(6), 772, 1984

愛がん用イヌからのカンピロバクター検出状況および分離菌株の血清型

伊藤　武，斎藤香彦，高橋正樹，柳川義勢，高野伊知郎，坂井千三，福山正文，上村知雄：感染症学雑誌，58(5)，393，1984

発癌性および非発癌性メチル置換ベンツ〔c〕アクリジン類の簡易な精製法

鎌田国広，本橋　登：薬学雑誌，103(7)，795，1983

Flow Injection Analysis of Cyanide in Waste Water from Metal Plating Processes

C.Okumoto, M.Nagashima, S.Mizoiri, M.Kazama and K. Akiyama : Eisei Kagaku, 30(1), 7, 1984

High Performance Thin Layer Chromatography-Densitometric Method for Content Uniformity Test of Lanatoside C Tablets

T.Hagiwara, S.Shigeoka, S.Uehara, N.Miyatake and K.Akiyama : HRC & CC, 7(3), 161, 1984

日本薬局方安息香酸エストラジオール注射液の定量法

原田裕文，鎌田国広：医薬品研究，15(3)，477，1984

日本薬局方ヒドロコルチゾン・ジフェンヒドラミン軟膏の定量法

原田裕文，重岡捨身，宮武ノリエ，秋山和幸：医薬品研究，15(3)，481，1984

ガスクロマトグラフィーによる乳製品中の第三級ブチルヒドロキノン（TBHQ）の分析法

竹葉和江，松本昌雄：衛生化学，29(5)，329，1983

Residues of 4-Chloro-1-(2, 4-dichlorophenoxy)-2-methoxy-benzene (triclosan methyl) in Aquatic Biota

Tomoyuki Miyazaki, Tatsunori Yamagishi and Masao Matsumoto: Bull. Contam. Toxicol., 32, 227, 1984

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

白坂昭治，梅木富士郎：家畜抗菌剤研究会報，5，9，1984

Antibiotic Susceptibility of *Clostridium septicum* Isolated from Chickens and Cattle

Shoji Shirasaka, and Fujio Umeki: The Japanese Journal of Veterinary Science, 46(3), 397, 1984

Serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Strains Isolated from Slaughter Pigs Affected with Chromic Erysipelas

Toshio Takahashi, Takuo Sawada, Masami Takagi, Kenji Seto, Masako Kanzaki and Tsutomu Maruyama：日本獣医学雑誌, 46(2), 149, 1984

Antibiotic Resistance of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Isolated from Pigs with Chronic Swine Erysipelas

Toshio Takahashi, Takuo Sawada, Kenichi Ohmae, Nobuyuki Terakado, Masatake Muramatsu, Kenji Seto, Tsutomu Maruyama and Masako Kanzaki : Antimicrob. Agents Chemother., 25(3), 385, 1984

穀類およびその加工品のオクラトキシン汚染

中里光男：マイコトキシン，18，6，1983

果実及び果実加工品中の安息香酸

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，24(4)，416，1983

穀類，種実類及びその加工品中の Aflatoxin 及び Aflatoxicol 試験法

斉藤和夫，西島基弘，安田和男，上村　尚，井部明広，永山敏廣，牛山博文，直井家壽太：食品衛生学雑誌，25(2)，112，1984

市販ピスタチオナッツ，コーン及びコーンフラワーの Aflatoxin 及び Aflatoxicol 汚染調査

斉藤和夫，西島基弘，安田和男，上村　尚，井部明広，永山敏廣，牛山博文，直井家壽太：食品衛生学雑誌，25(3)，241，1984

食糧と栄養一食塩摂取について

西田甲子：都薬雑誌，6(4)，45，1984

食糧と栄養一無機質(I)

関　博麿：都薬雑誌，6(5)，47，1984

食糧と栄養一無機質(II)

関　博麿：都薬雑誌，6(6)，53，1984

Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry of Nucleosides

Hiroshi Seto, Taisuke Okuda, Tomoyuki Takesue and Tadashi Ikemura : Mass Spectroscopy, 31, 197, 1983

日本人の安息香酸，デヒドロ酢酸，プロピオン酸およびそれらの塩類ならびにパラオキシ安息香酸エステル類などの各種保存料の1日摂取量について

豊田正武，伊藤誉志男，一色賢司，大西和夫，加藤文夫，神蔵美枝子，白石美子，原田行雄，深澤喜延，横山　剛，米田孟弘，慶田雅洋：日本栄養・食糧学会誌，36(6)，467—480，1983

日本人の亜硫酸およびその塩類（漂白剤）の1日摂取量について

豊田正武，伊藤誉志男，一色賢司，大西和夫，加藤文夫，神蔵美枝子，白石美子，原田行雄，深澤喜延，横山　剛，米田孟弘，慶田雅洋：日本栄養・食糧学会誌，36(6)，481—488，1983

マーケットバスケット方式による日本人の各種食品添加物の1日摂取量の推定

豊田正武，伊藤誉志男，一色賢司，大西和夫，加藤

文夫，神蔵美枝子，白石美子，原田行雄，深澤喜延，横山　剛，米田孟弘，平山佳伸，山本芳子，藤井正美，慶田雅洋：日本栄養・食糧学会誌，36(6)，489—497，1983

黄色ブドウ球菌の増殖とエントロトキシン産生に及ぼす混合培養菌の影響について

池亀公和，持永泰輔，寺田　厚，上村昌弘，友栗徹士，内田和夫，五十嵐英夫，潮田　弘，坂井千三：食品と微生物，1(2)，130，1984

女子急性単純性膀胱炎における抗菌剤治療後の再燃・再感染に関する研究，二重盲検法による Cinoxacin の dose response の検討（第二報）

熊本悦明，西尾　彰，坂井千三他：CHEMOTHERAPY，31(6)，646—656，1983

Testicular Atrophy Induced by Di-2-ethylhexyl Phthalate: Effect of zinc Supplement

Shinshi Oishi and Kogo Hiraga: Toxicol. Appl. Pharmacol. 70(1)，43—48，1983

The role of 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylene-2,5-cyclohexadienone (BHT quinone methide) in the metabolism of butylated hydroxytoluene

Osamu Takahashi and Kogo Hiraga: Fd Chem. Toxicol., 21, 279, 1983

Metabolic studies in the rat with 2,4,6-tri-t-butyl-phenol: a haemorrhagic antioxidant structurally related to butylated hydroxytoluene

Osamu Takahashi and Kogo Hiraga: Xenobiotica, 13, 319, 1983

Effects of dietary butylated hydroxytoluene on functional and biochemical properties of platelets and plasma preceding the occurrence of haemorrhage in rats

Osamu Takahashi and Kogo Hiraga: Fd Chem. Toxicol., 22, 97, 1984

Testicular Atrophy Induced by Di-2-ethylhexyl phthalate: Effects of Vitamin A and Zinc Concentrations in the Testis, Liver and Serum

Shinshi Oishi：Toxicol Lett., 20(1)，75—78，1984

Altered leveles of cyclic nucleotides in F344 rats fed sodium o-phenylphenate

A.Nakagawa, T.Nakao and M.Nakao: Fd Chem. Toxic, 22, 217, 1984

Changes in enzyme activities in the urine and tissues of rats fed sodium o-phenylphenate

F.Nagai and T.Nakao: Fd Chem. Toxic, 22, 361, 1984

Additional effect of acetaminophen on the mutagenicity and clastogenicity of N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine in cultured Chinese hamster CHO-Kl cells

Mieko Sasaki, Seiji Yoshida and Kogo Hiraga: *Mutation Research,* 122, 362—372, 1983

総説・解説

細菌性腸管感染症制圧における国際協力の実例

大橋　誠：第21回日本医学会総会誌，2946，1983

Laboratory-assisted investigation of Food-and water-borne disease outbreaks

Makoto Ohashi: Disease surveillance in primary health care proceeding of the 10th SEAMIC Seminor Edited by J.C. Azurin Southeast Asian Medical Information Center, Tokyo, 129, 1983

Contribution of SEAMIC data-exchange project on diarrheal disease control

Makoto Ohashi: Disease Surveillance in primary health care proceeding of the 10th SEAMIC Seminor. Edited by J.C. Azurin Southeast Asian Medical Information Center, Tokyo, 139, 1983

ブドウ球菌の TSS 毒素の化学

五十嵐英夫，藤川　浩，宇佐美博幸，川畑俊一郎，森田隆司：臨床と細菌，10(3)，27，1983

Toxic-shock syndrome と "toxic-shock 毒素" 産生黄色ブドウ球菌
五十嵐英夫，藤川　浩：Medical Technology, 12(5), 387, 1983

薬剤師のための衛生微生物学 10 ブドウ球菌食中毒
寺山　武：薬局，34(4)，503，1983

Salmonella paratyphi B と Salmonella java の同定上の問題に関する検討
稲葉恵子，天野裕次，市瀬正之，小林淑子，黒沢大介，岡本美恵子，松江隆之，小野川尊，寺山　武：予防医学ジャーナル，177，32，1983

サルモネラ B 群が検出されたとき
伊藤　武：Medical Technology, 11(13), 1315, 1983

細菌性食中毒
坂井千三，伊藤　武：臨床検査，27(11)，1311，1983

ブドウ球菌食中毒を最初に報告した M.A. Barber 博士の論文の全貌
寺山　武：メディアサークル，29(3)，98，1984

毒素原性大腸菌の簡易同定法
松下　秀，工藤泰雄：モダンメディア，30，80，1984

カンピロバクター感染症に関する研究の動向，第2回カンピロバクター国際会議について
伊藤　武：モダンメディア，30(3)，156，1984

新しい腸炎起因ビブリオ
工藤泰雄：メディカルコーナー，第67集，6，1984

TCBS'寒天培地で黄色集落が認められたとき
工藤泰雄：Medical Technology, 12(2), 174, 1984

わが国でヒト，動物，食品および環境から検出されるサルモネラの血清型
伊藤　武：医学のあゆみ，129(5)，338，1984

カンピロバクター食中毒の疫学とその周辺
伊藤　武：Progress in medicine, 4(6), 1211, 1984

家禽と Campylobacter について
伊藤　武，坂井千三：鶏病研究会報，20(1)，2，1984

パイロジェンの試験法と除去対策
宇佐美博幸：製薬工場，4(4)，28，1984

医薬品血中濃度モニタリングの手引き〈6〉分析機器の概要　ガスクロマトグラフィー
風間成孔：月刊薬事，25(11)，2231，1983

衛生的なおしぼりを提供するために，一貸おしぼり取扱い基準の作成経過とその内容紹介—
加納堯子：洗濯の科学，28(3)，16，1983

淋菌感染症（淋疾）の流行と淋菌—最近の動向と知見について—
加納堯子：都薬雑誌，16(3)，5，1984

感染性腸炎—最近の傾向と問題点
坂井千三，村田三紗子他：臨床検査，27(6)，660—670，1983

細菌性食中毒
坂井千三，伊藤　武：臨床検査，27(11)，1311—1322，1983

薬剤師のための衛生微生物学(17)—経口伝染病—
坂井千三，太田建爾：薬局，34(11)，1521，1983

薬剤師のための衛生微生物学(18)—サルモネラ食中毒—
坂井千三：薬局，34(12)，1659，1983

薬剤師のための衛生微生物学(19)—腸炎ビブリオ食中毒—
坂井千三，太田建爾：薬局，35(2)，559，1984

腸内細菌科に属する主な病原菌の同定に用いられる鑑別培地の判定法
太田建爾：検査と技術，12(4)，351，1984

著書

食中毒II
伊藤　武，坂井千三他：中央法規出版，1983

微生物同定法
伊藤　武 他：衛生技術会，1983

乳製品試験法・注解
松本昌雄（分担執筆）：金原出版，1984

食品衛生事典
松本昌雄，丸山　務，小久保彌太郎(分担執筆)：中央法規出版，1984

食品衛生における微生物制御の基本的考え方
小久保彌太郎(分担執筆)：日本食品衛生協会，1984

食中毒II
丸山　務（分担執筆）：中央法規出版，1983

Survey for Mycotoxins in Commercial Foods
Motohiro Nishijima : Toxigenic Fungi (Proceeding), 172, Kodansha, 1983

A highly toxic strain of blue-green alga *Microcystis aeruginosa* from Lake Suwa
Mariyo F. Watanabe and Shinshi Oishi : Bull. Japan. Soc. Fish, 49(11), 1759, 1983

地震時における地下水の水質変化に関する調査研究（その4）
樋口育子，坂本朋子，中川順一，西垣　進：昭和58年度地震予知に関する調査研究報告書（東京都総務局災害対策部企画課），191，1984，3

食中毒II　—新たに認定された食中毒菌—
坂井千三他：中央法規出版，1983

腸管感染症
坂井千三，寺山　武他：医典社，1984

学 会 発 表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1983. 7—1984. 6)

五十嵐英夫，藤川　浩，宇佐美博幸，川畑俊一郎，森田隆司：**Toxic-Shock Syndrome 患者由来黄色ブドウ球菌の産生する毒素(エントロトキシン F)の精製およびその性状**

第 30 回毒素シンポジウム（1983. 7）

川畑俊一郎，森田隆司，岩永貞昭，五十嵐英夫：**ヒトプロスロンビン(HP)とスタフィロコアグラーゼ(SC)複合体の相互作用部位について**

第 56 回日本生化学会（1983. 9）

T. Itoh, K. Saito, Y. Yanagawa, M. Takahashi, A. Kai, M. Inaba, I. Takano, M. Ohashi : **Serotyping scheme for *Campylobacter jejuni* and typing results on the iso lates of various origins**

Second International Workshop on Campylobacter Infections (1983. 9)

H.Hitokoto, S.Morozumi, T.Wauke and H.kurata : **Distribution of mycotoxin-producing fungi in marketing foods in Japan**

3rd International Mycological Congress (1983. 9)

Y.Kudoh, S.Matsushita, S.Yamada, M.Tsuno and M.Ohashi : **A simplified method for detecting enterotoxigenic *E. coli* and its application**

The 17 th Meeting of the Joint US-Japan Toxic Microorganisms Panel, US-Japan Cooperative Program on Development and Utilization of Natural Resources (1983. 9).

M.Ohashi: **Current Status of bacterial foodborne diseases in Tokyo and problems involved**

The 17th UJNR (1983. 9)

K.Ohta, S.Yamada, S.Matsushita, M.Tsuno, Y. Kudoh and M.Ohashi : **A considerration on pathogenicity of Various Spesies of *Vibrio***

The 17th UJNR (1983. 9)

T.Terayama, T.Itoh, K.Saito, Y.Yanagawa, M. Inaba, A.Kai, M.Takahashi, I.Takano, H.Igarashi, H.Ushioda, M.shingaki, H.Fujikawa and S.Sakai: ***Bacillus cereus* food poisoning in Tokyo and contamination of foods with the Organism**

The 17th UJNR (1983. 9)

S.Sakai, T.Itoh and M.Inaba: **Growth, sporulation and enterotoxin production of *Clostridium perfringens* in meats**

The 17th UJNR (1983. 9)

T.Itoh, K.Saito, M.Takahashi, Y.Yanagawa, A. Kai, I.Takano, M.Inaba, S.Sakai and M.Ohashi: **Bacteriological aspects of Campylobacter enteritis in Tokyo**

The 17th UJNR (1983. 9)

H.Igarashi, M.Shingaki, H.Fujikawa, H.UShioda and T.Terayama: **Direct detection of Staphylococcal enterotoxin from food stuffs and its application to diagnosis of Staphylococcal food poisoning**

The 17th UJNR (1983. 9)

潮田　弘，辻　明良，小川正俊，五島瑳智子，寺山武，坂井千三：**臨床材料および健康人由来コアグラーゼ陰性ブドウ球菌の正常マウスならびに実験的白血球減少症マウスによる菌力比較**

第 28 回ブドウ球菌研究会（1983. 10）

M.Ohashi, Y.Kudoh, S.Yamada and S.Matsushita: **CHO-cell elongation in the absence of cyclic AMP elevation by Vibrio species**

The 19th Joint Conference Cholera, U.S-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel (1983. 10)

T.Ito, T.Yokota, S.Kuwahara, S.Matsushita, K. Ohta and M.Ohashi : **Production of skin permeability increasing factors by CAMP-deficient mutants of *V.cholerae***

The 19th Joint Conference Cholera, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel (1983. 10)

潮田　弘, 五十嵐英夫, 新垣正夫, 藤川　浩, 寺山　武, 坂井千三, 大橋　誠：**輸入冷凍魚介類のビブリオ汚染**
第 17 回腸炎ビブリオシンポジウム（1983. 11）

津野正朗, 太田建爾, 山田澄夫, 工藤泰雄, 坂井千三, 大橋　誠：**過去 10 年間に分離された腸炎ビブリオの K 抗原推移と神奈川溶血毒産生性**
第 17 回腸炎ビブリオシンポジウム（1983. 11）

山田澄夫, 松下　秀, 太田建爾, 工藤泰雄, 坂井千三, 大橋　誠：***Vibrio fluvialis* の病原因子について**
第 17 回腸炎ビブリオシンポジウム（1983. 11）

伊藤　武：**新たに追加指定された食中毒菌の系統的検査法の解説, カンピロバクターについて**
第 4 回食品衛生微生物研究会（1983. 11）

大橋　誠：**微生物の産生する活性物質研究の現状, エントロトキシン研究の現状**
第 50 回日本細菌学会関東支部総会（1983. 11）

五十嵐英夫, 新垣正夫, 藤川　浩, 潮田　弘, 寺山　武, 赤嶺郁子, 河内菜穂子, 善養寺　浩：**各種臨床検査材料由来黄色ブドウ球菌の Toxic shock 毒素およびエンテロトキシンの産生性とコアグラーゼ型**
第 32 回日本感染症学会東日本地方会総会(1983. 11)

五十嵐英夫, 新垣正夫, 潮田　弘, 藤川　浩, 河野潤一, 清水　晃：***Staphylococcus intermedius* の産生するコアグラーゼの免疫学的検討**
第 50 回日本細菌学会関東支部総会（1983. 11）

川畑俊一郎, 森田隆司, 岩永貞昭, 五十嵐英夫：**ヒトプロスロンビン (HP) とスタフィロコアグラーゼ (SC) 複合体の相互作用部位について**
第 6 回日本血栓止血学会（1983. 12）

M.Ohashi : **The role of laboratory services in control of diarrheal Diseases**
Intercountry Workshop on Strengthening of Epidemiological Surveillance, W.H.O（1984. 2）

C.Wayne Moss, A.Kai, C.Patton and M.A.Lambert : **Cellular fatty acid composition and isoprenoid quinone content of *Campylobacter***
84th Annual Meeting of the American Society for Microbiology（1984. 3）

伊藤　武, 斎藤香彦, 高橋正樹, 高野伊知郎, 福山正文, 原　元宣, 上村知雄：**Thermophilic campylobacter の生態学的研究, 5)養鶏場内の環境における本菌の汚染状況**
第 97 回日本獣医学会（1984. 4）

福山正文, 上村知雄, 村田乏秀, 岩崎研一, 田渕　清, 伊藤　武：***Aeromonas* 属の生態学的研究, 河川および淡水魚における本菌の分布と分離菌株の生化学的性状について**
第 97 回日本獣医学会（1984. 4）

五十嵐英夫：**Toxic-shock syndrome（基礎）**
第 58 回日本感染症学会総会（1984. 4）

赤嶺郁子, 河内菜穂子, 善養寺　浩, 五十嵐英夫, 新垣正夫, 藤川　浩, 潮田　弘, 寺山　武：**各種臨床検査材料由来黄色ブドウ球菌の薬剤感受性—特に Toxic-shock 毒素産生菌株について**
第 58 回日本感染症学会総会（1984. 4）

松下　秀, 山田澄夫, 工藤泰雄, 大橋　誠：**毒素原性大腸菌下痢症の迅速診断について**
第 58 回日本感染症学会総会（1984. 4）

工藤泰雄, 津野正朗, 山田澄夫, 松下　秀, 楠　淳, 大橋　誠：**輸入感染性腸炎患者からの *Vibrio fluvialis* の検出状況と分離菌株の性状**
第 58 回日本感染症学会総会（1984. 4）

伊藤　武, 高橋正樹, 斎藤香彦, 大橋　誠：***Campylobacter jejuni* および *Campylobacter coli* の増菌培地に関する検討, 2)CEM 培地とその他 5 種類の増菌培地との比較**
第 58 回日本感染症学会総会（1984. 4）

高橋正樹, 伊藤　武, 斎藤香彦, 高野伊知郎, Viliami Ika, 大橋　誠：***Campylobacter jejuni* および *C.coli***

の無機塩類，有機酸，アミノ酸に対する利用性について
第58回日本感染症学会総会（1984. 4）

高野伊知郎，斎藤香彦，高橋正樹，柳川義勢，伊藤武，大橋　誠：***Campylobacter jejuni*および*Campylobacter coli*の血清型別に関する研究，4）*C.coli*の血清型**
第58回日本感染症学会総会（1984. 4）

稲葉美佐子，伊藤　武，斎藤香彦，柳川義勢，甲斐明美，坂井千三：**東京都で発生したウエルシュ菌食中毒の疫学的特徴および分離菌株の血清型とエンテロトキシン産生性について**
第58回日本感染症学会総会（1984. 4）

新垣正夫，五十嵐英夫，潮田　弘，藤川　浩，寺山武：**黄色ブドウ球菌の迅速同定に用いられているラテックスおよび血球スライド凝集反応の評価**
第47回日本食品衛生学会（1984. 5）

諸角　聖，和宇慶朝昭，一言　広：**毒素産生カビの発育と毒素産生に及ぼす天然甘味料の影響**
第47回日本食品衛生学会（1984. 5）

H.Igarashi：**Properties of TST purified from *S. aureus* serains FRI-1169 and 587**
Toxic Shock Syndrome Symposium（1984. 5）

H.Igarashi, M.Shingaki, H.Fujikawa, H.Ushioda and T.Terayama：**Detection of staphylococcal enterotoxins in food poisoning outbreaks by Reserved passive latex agglutination**
V. International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections（1984. 6）

H.Igarashi, H.Fujikawa, H.Usami, S.Kawabata and T.Morita：**Purification and characterization of an enterotoxin from *Staphylococcus aureus* associated with Toxic-shock syndrome**
V. International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections（1984. 6）

H.Igarashi, M.Shingaki, H.Ushioda, H.Fujikawa, T.Terayama, J.Kawano, A.shimizu：**Immnological differentiation of staphylocoagulase produced by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius***
V. International Symposium on Staphylococci and Stapylococcal Infections（1984. 6）

田中秀治，中江純夫，和田貴子，前村　達，松田博青，善養寺　浩，五十嵐英夫，赤嶺郁子：**TSS (Toxic-shock Syndrome)に類似した黄色ブドウ球菌性敗血症の3例**
第17回救急医学関東地方会（1984. 6）

甲斐一郎，山本俊一，大井　玄，武長脩行，山崎信行，原　実，鈴木重任，深山智代，市川伸一，小林之誠：**ぼけ老人と異常精神症状(1)環境評価の方法**
第42回日本公衆衛生学会総会（1983. 11）

鈴木重任，山本俊一，大井　玄，甲斐一郎，武長脩行，山崎信行，原　実，深山智代，市川伸一，小林之誠：**ぼけ老人と異常精神症状(2)異常精神症状と人間関係**
第42回日本公衆衛生学会総会（1983. 11）

鈴木重任，山本俊一，大井　玄，甲斐一郎，山崎信行，深山智代，名嘉幸一，當山富士子，原　実：**沖縄県一農村における健診受診老人にみられる知力低下**
第54回日本衛生学会総会（1984. 4）

武長脩行，甲斐一郎，鈴木重任，大井　玄：**神経芽細胞腫スクリーニングの費用便益分析**
第54回日本衛生学会総会（1984. 4）

村田以和夫，川中正憲，鈴木了司：**東京近郊で発生した水田皮膚炎の発生状況とセルカリアを抗原とする間接蛍光抗体法（IFA）による血清診断**
第53回日本寄生虫学会大会「水田皮膚炎の現況と対策」シンポジウム（1984. 4）

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：**生化学検査用試薬キットによる測定値の変動について**

第72回東京都衛生局学会（1984．5）

石上　武，堀　幹郎，鈴木重任，大橋　誠，丸山　脩，林田陽一，斉藤リツ：**1981年から3年間における売春容疑者のリン菌保有率と分離菌株の薬剤感受性成績**
第72回東京都衛生局学会（1984．5）

鈴木重任，武長脩行，甲斐一郎，大井　玄：**神経芽細胞腫マス・スクリーニングの費用便益分析**
第7回がん疫学研究会（1984．6）

大井　玄，甲斐一郎，武長脩行，鈴木重任：**費用便益に関する問題点**
第7回がん疫学研究会（1984．6）

小松俊彦，志賀定祠，伊藤忠彦他：**腎症候性出血熱ウイルスの血清疫学的研究**
第31回日本ウイルス学会総会（1983．10）

林　志直，矢野一好，藪内　清，岩崎謙二，川本尋義：**エンテロウイルス70型分離株（1982年・東京）の性状**
第31回日本ウイルス学会総会（1983．10）

岩崎謙二，坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎　清：**1982～83年冬期のAH 3型インフルエンザウイルス分離株のHA抗原分析**
第31回日本ウイルス学会総会（1983．10）

武内安恵，薩田清明，岩崎謙二他：**1982年12月から1983年3月までの流行から分離されたインフルエンザH_3N_0型ウイルスの抗原分析及びウイルス分離された罹患者血清の抗体上昇について**
第31回日本ウイルス学会総会（1983．10）

梶山純一，斉藤みどり，関谷行子，岩崎謙二他：**東村山保健所管内の一小学校に発生したアデノウイルス感染症について**
第71回東京都衛生局学会（1983．11）

渡辺悌吉，石原　祐，岩崎謙二他：**急性気道感染症を中心とした症例からのウイルス分離成績（続報）**
第14回日本小児ウイルス病研究会（1983．12）

伊藤忠彦，坂井冨士子，山崎　清，中村清純，藪内清，大橋　誠，大野正彦，吉川　翠他：**最近の伊豆七島におけるツツガ虫病（七島熱）の調査研究．第一報式根島を中心とした実態調査**
第72回東京都衛生局学会（1984．5）

秋山和幸：**測定者側における精度管理の実際について**
第20回全国衛生化学技術協議会年会（1983．9）

萩原輝彦，上原真一，重岡捨身，宮武ノリエ，秋山和幸：**蛍光試薬としてオキシ塩化ジルコニウムを用いるラナトシドCの定量について**
第20回全国衛生化学技術協議会年会（1983．9）

安田一郎，秋山和幸，佐竹元吉，糸川秀治：**胡椒類生薬の品質評価**
日本生薬学会第30回年会（1983．10）

風間成孔，寺島　潔，安田一郎，高橋利恵子，秋山和幸：**市場品蕃椒の品質評価**
日本生薬学会第30回年会（1983．10）

小林正夫，森　式能，安田一郎，秋山和幸：**オオバナオケラの栽培と成分**
日本生薬学会第30回年会（1983．10）

浜野朋子，安田一郎，瀬戸隆子，秋山和幸：**市販紫雲膏製剤中のシコニン類含量―その変動と原因**
第27回日本薬学会関東支部大会（1983．11）

上原真一，萩原輝彦，宮武ノリエ，重岡捨身，秋山和幸：**ガスクロマトグラフィーによる医薬品中のトラネキサム酸の定量**
日本薬学会第104年会（1984．3）

鎌田国広，本橋　登：**メチル置換ベンツ〔C〕アクリジン類の高速液体クロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィーによる分析**
日本薬学会第104年会（1984．3）

正木宏幸，徳丸雅一，岩崎久夫，宇佐美博幸：**雨水，河川水における発熱性物質および細菌数の比較**

第97回日本獣医学会（1984．4）

鈴木助治，森謙一郎，雨宮　敬，水石和子，吉原武俊：**繊維製品の衛生加工剤・有機シリコン第4級アンモニウム塩の分析法について**
日本薬学会第104年会（1984．3）

水石和子，竹内正博，江波戸挙秀，山野辺秀夫，岸本清子，山添律子，風間成孔：**ゴム製哺乳用具および玩具等からの第2級アミンの溶出とN-ニトロソアミンの生成について**
第47回日本食品衛生学会（1984．5）

竹内正博，水石和子，江波戸挙秀，山野辺秀夫，岸本清子，山添律子，風間成孔：**東京湾産スズキおよびアサリに見られるPCB汚染の動向**
第47回日本食品衛生学会（1984．5）

小久保彌太郎，神保勝彦，金子誠二，松本昌雄：**市販はちみつの芽胞菌汚染の実態**
第96回日本獣医学会（1983．8）

金子誠二，神保勝彦，小久保彌太郎，丸山　務，松本昌雄：***Yersinia enterocolitica*の分離方法の再検討　I.CIN培地の選択性とアルカリ処理効果**
第96回日本獣医学会（1983．8）

神保勝彦，金子誠二，小久保彌太郎，丸山　務，松本昌雄：**食肉からの*Campylobacter jejuni／coli*の選択増菌培地について**
第46回日本食品衛生学会（1983．10）

今野純夫，旅田一衛，武政二郎，吉田幸紀，藤野訓男，重久　保，尾上洋一，徳丸雅一，小久保彌太郎，品川邦汎，小沼博隆，倉田　浩：**食品および食肉製品中の黄色ブドウ球菌の汚染実態と分離菌株のエンテロトキシン産生について**
第46回日本食品衛生学会（1983．10）

尾上洋一，旅田一衛，武政二郎，吉田幸紀，藤野訓男，今野純夫，重久　保，徳丸雅一，小久保彌太郎，品川邦汎，小沼博隆，倉田　浩：**食肉および食肉製品から分離したセレウス菌の性状，型別および下痢原性毒について**
第46回日本食品衛生学会（1983．10）

小久保彌太郎：**食品の微生物学的基準をめぐる諸問題，基本構想へのアプローチ：検査対象微生物およびそれらの菌数限度について**
第4回食品微生物研究会（1983．11）

金子誠二，神保勝彦，小久保彌太郎，丸山　務，松本昌雄：**淡水養殖魚における*Plesiomonas*および*Aeromonas*属の汚染状況**
第4回食品微生物研究会（1983．11）

神保勝彦，金子誠二，小久保彌太郎，丸山　務，松本昌雄，太田建爾，坂井千三：**淡水養殖魚におけるビブリオ汚染**
第17回腸炎ビブリオシンポジウム（1983．11）

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（その2）**
第47回日本食品衛生学会（1984．5）

川本英一，加藤美智子，佐藤恵美，丸山　務：***Pasteurella multocida*の輸送培地の検討**
第18回実験動物学会（1983．8）

丸山　務，神崎政子，金子誠二，松本昌雄，竹重都子：***Yersinia enterocolitica*の分離方法の再検討**
第96回日本獣医学会（1983．8）

川本英一，丸山　務：**実験用ウサギにおける*Pasteurella multocida*の保菌実態と分離菌株の性状について**
第96回日本獣医学会（1983．8）

高橋敏雄，沢田拓士，大前憲一，寺門誠致，村松昌武，瀬戸健次，丸山　務，神崎政子：**と場豚の病変部由来豚丹毒菌の薬剤感受性**
第96回日本獣医学会（1983．8）

加藤行男，伊藤仁子，久保倉洋子，小川益男，丸山務：**野鳥及び野生のニホンカモシカにおけるYersinia**

属の保有状況

第 96 回日本獣医学会（1983. 8）

田中まゆみ，中村政幸，伊藤　治，加藤行男，久保倉洋子，丸山　務，小川益男：***Yersinia enterocolitica*** **からのプラスミドの検出とプラスミド保有株の病原性について**

第 96 回日本獣医学会（1983. 8）

竹重都子，酒井保宏，露崎国夫，向島　雄，吉田義夫，丸山　務：**と畜場における豚枝肉のエルシニア菌汚染実態**

第 97 回日本獣医学会（1984. 4）

M.Nishijima：**Survey for Mycotoxins of Commercial Foods**

Third International Mycological Congress（1983. 9）

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

第 20 回全国衛生化学技術協議会（1983. 9）

中里光男：**穀類およびその加工品のオクラトキシン汚染**

第 18 回マイコトキシン研究会（1983. 9）

井部明広，斉藤和夫，中里光男，菊地洋子，藤沼賢司，直井家壽太：**食品中のアスパルテーム分析法**

第 46 回日本食品衛生学会（1983. 10）

田村行弘，真木俊夫，観　公子，永山敏廣，直井家壽太：魚肉中ワックスエステルの定性および定量法

第 46 回日本食品衛生学会（1983. 10）

永山敏廣，田村行弘，真木俊夫，観　公子，直井家壽太：**魚介類における不揮発性腐敗アミン類の消長**

第 46 回日本食品衛生学会（1983. 10）

上村　尚：**トリコテセンに関するシンポジウム　汚染実態調査及び汚染粒の出現率**

第 19 回マイコトキシン研究会（1984. 1）

上村　尚，西島基弘，安田和男，牛山博文，田端節子，松本幸子，二島太一郎：**アフラトキシンの簡易分析法**

第 47 回日本食品衛生学会（1984. 5）

安田和男，西島基弘，上村　尚，牛山博文，田端節子，松本幸子，二島太一郎：**いわゆる健康食品の衛生学的調査（第 4 報）　高麗人参製品中のサポニン含有量**

第 47 回日本食品衛生学会（1984. 5）

島村保洋，上田　工，石川ふさ子，西島基弘，二島太一郎：**食品中のアジピン酸の分析法**

第 47 回日本食品衛生学会（1984. 5）

上村　尚，西島基弘，田端節子，安田和男，牛山博文，松本幸子，二島太一郎：**市販食品のアフラトキシンの汚染調査及び調理加工による消長**

第 47 回日本食品衛生学会（1984. 5）

中里光男，斉藤和夫，菊地洋子，井部明広，藤沼賢司，直井家壽太，二島太一郎：**食品，農産物中のオクラトキシン A，B 及びシトリニンの同時分析法**

第 47 回日本食品衛生学会（1984. 5）

藤沼賢司，斉藤和夫，中里光男，菊地洋子，井部明広，二島太一郎：**食品中のステビオサイド及びレバウディオサイド A の分析法**

第 47 回日本食品衛生学会（1984. 5）

関　博麿，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（第 2 報）**

第 38 回日本栄養食糧学会総会（1984. 5）

寺田伸枝，池田真悟，福田雅夫，大沢誠喜，遠藤圭子，鈴木孝人，溝口　勲，林　豊：**低濃度 NO_2 と O_3 の長期複合暴露によるラットの肺の病理組織学的変化**

第 24 回大気汚染学会（1983. 11）

鈴木孝人，寺田伸枝，大沢誠喜，池田真悟，福田雅夫，遠藤圭子，溝口　勲：**酸性ムコ多糖代謝に及ぼす NO_2 暴露の影響，(II)肺と肝における生化学的，組織化学的検索**

第 24 回大気汚染学会（1983. 11）

狩野文雄：**東京都における降下煤塵と浮遊粉塵の変異原活性**
第 24 回大気汚染学会（1983. 11）

牧野国義：**東京における呼吸器疾患死亡と大気汚染，社会指標との関連性**
第 24 回大気汚染学会（1983. 11）

渡辺真利代，大石眞之：**有毒 *Microcystis aeruginosa* の培養条件下での毒素の産生について**
第 48 回日本陸水学会（1983. 9）

笹野英雄，横山英世，有賀　徹，西川滇八：**飲料水の水質と人の健康との関連（第 1 報）水道水に由来する有害元素に関する調査**
第 42 回日本公衆衛生学会（1983. 11）

高橋保雄，斉藤庄次，笹野英雄，西垣　進，三村秀一，森田昌敏：**水道水中の有機塩素農薬**
第 42 回日本公衆衛生学会（1983. 11）

S. Sakai：**Growth, Sporulation and Enterotoxin Production of *Clostridium Perfringens in* Meats**
The 17th Meeting of the Joint US-Japan Toxic Microorganisms Panel, US-Japan Cooperative Program on Development and Utilization oF Natural Resources, Bacterial session I. Bacterial Diarrheas (1983. 9)

K. Ohta：**A Consideration on Pathogenicity of Various Species of *Vibrio***
The 17th Meeting of the Joint US-Japan Toxic Microoganisms Panel, US-Japan Cooperative Program on Development and Utilization of Natural Resources, Bacterial Session I. Bacterial Diarrheas (1983. 9)

栃本　博，押田裕子，有賀孝成，池島伸至，中村　弘，池田徹行，北島康生：**平井川の水質汚濁の時間的変動と生活排水の関係**
第 71 回東京都衛生局学会（1983. 10）

能勢征子，萩原久美子，坂井千三：**腸炎ビブリオの酸性下における生存率に及ぼす食塩濃度と有機酸の影響**
第 47 回日本食品衛生学会（1984. 5）

坂井千三：**大規模食中毒の起因菌とその疫学**
昭和 59 年度食品衛生特殊技術講習会（1984. 6）

中川好男，中尾順子，平賀興吾，須賀哲弥：**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システインの効果**
日本薬学会第 104 年会（1984. 3）

高橋　省，平賀興吾：**ラットとマウスに対するアスピリンの出血毒性の差異**
第 57 回日本薬理学会総会（1984. 3）

大石眞之，平賀興吾：**フタル酸エステルの精巣萎縮作用：亜鉛投与の影響**
第 57 回日本薬理学会総会（1984. 3）

佐藤かな子，藤谷知子，田中建志，真崎知生，浦山修，中尾順子，中尾　真：**馬腎 Na^+, K^+－ATP ase のモノクロナール抗体**
第 56 回日本生化学会総会（1984. 9）

浦山　修，長宗秀明，中尾　真，杉山博之，佐藤かな子，中尾順子：**腎 Na, K－ATP ase に対するモノクロナール抗体**
第 56 回日本生化学会総会（1984. 9）

藤谷知子，中尾順子，佐藤かな子，浦山　修，加納いつ，中尾　真：**腎 Na^+, K^+－ATP ase のオリゴメリゼーションについて**
第 56 回日本生化学会総会（1984. 9）

市川久次，小林博義，中尾順子，植田忠彦，中川茂男：**幼若ラットの CPC 高張部瞬時容血についての検討（第 2 報）**
第 56 回日本生化学会総会（1984. 9）

川野澄江，中尾順子，鎌滝哲也：**フェノバルビタール，β－ナフトフラボン処理ラットから精製したチト**

クローム P-450 による変異原活性化および不活性化反応

第 56 回日本生化学会総会（1984. 9）

牛山慶子，樺島順一郎，長井二三子，市川久次，加納いつ，中尾順子：肝ミクロソーム存在下における〔^{14}C〕OPP と胸線 DNA の反応

第 56 回日本生化学会総会（1984. 9）

小縣昭夫，米山允子，藤井　隆，平賀興吾：チアベンダゾールの妊娠マウスでの吸収，分布，排泄：懸濁媒体による差異

第 23 回日本先天異常学会学術集会（1983. 7）

佐々木美枝子，平賀興吾：発癌プロモーター(TPA)の in vitro 抗体産生抑制効果について

第 42 回日本癌学会総会（1983. 10）

佐々木美枝子，平賀興吾：プロモーター物質の免疫活性について

第 12 回日本環境変異原学会大会（1983. 10）

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

溝口　勲（委員長）
稲熊明孝
工藤泰雄
鈴木重任
秋山和幸
渡辺四男也
山岸達典
友松俊夫
加納堯子
佐々木美枝子
中村　弘

昭和59年12月3日　発行

規格表　第2類
印刷番号（59）584
刊行物番号（H）24

東京都立衛生研究所研究年報第35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：高田印刷株式会社
〒171 東京都豊島区高田3—33—6
電話 03(984) 5411(代)