0131eh

ISSN 0082—4771
CODEN : TRENAF

東京都立衛生研究所

研究年報

ANNUAL REPORT
OF
THE TOKYO METROPOLITAN RESEARCH
LABORATORY OF PUBLIC HEALTH

36

1985

60. 12. 21

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

序

地方自治法の一部が改正されて，東京都23区内の53東京都保健所が，23特別区の保健所として移管されたのが，昭和50年４月であり，今年でちょうど10年の歳月が経過しました．移管当時は，各特別区における試験検査の体制が充分でなかったので，各種試験検査は，従前通り，都立衛生研究所が担当しましたが，その後各区において，遂次試験検査に関する整備充実がはかられ，今日では相当部分の試験検査が，23特別区において実施されるようになりました．一方，臨床検査技師法，衛生検査技師法等にもとづく民間の登録衛生検査所も年々増加し，昭和60年度始めには，都内で約90ケ所になり，今日では，保健衛生の分野で大きな役割をはたしております．大都市においては，行政需要や，社会的需要に応えるためには，数多くの試験検査機関の参加が必要となってきておりますが，ここで最も重要な課題は，試験検査における精度の確保であります．東京都衛生局では，東京都医師会，各医科大学等の協力を得て，衛生検査所の精度管理事業をすすめておりますが，当研究所も，公的試験研究機関として，その責を担い，先導的役割をはたすべく努めているところであります．

今年は春以来，地球の裏側でジエチレングリコールの混入された，いわゆる有毒ワイン騒動が報ぜられていましたが，当研究所の生活科学部食品研究科では，日本国内への波及を予見し，いち早くその分析法の検討に着手いたしました．その結果，７月24日以来の我国での有毒ワイン騒動の中にあっても，迅速にかつ正確に，行政の需要に即応し，都民はもとより，国の期待に応えてまいりました．

これは，将来に対する適正な判断と，実行に対する決断の成果によるものであったと思います．公的試験研究機関にあっては，つねに社会的動向を的確に把握し，行政並びに社会的需要の将来を予見し，いつでも即応し得る体制を整えてゆくことが必要であると思います．そして，衛生行政が真に科学的な背景にもとづいて，理論的に，効率的に展開される基盤を提供してゆくことこそ，公的試験研究機関の重要な責務と自覚しております．

東京都立衛生研究所，研究年報第36号を発行いたします．今回は，72編の論文を報告いたします．忌憚のない御意見，御助言を賜われば幸いと存じます．

昭和60年12月

東京都立衛生研究所長　長崎　護

目　　次

報文 I　感染症等に関する調査研究

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus intermedius* および *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* の
産生するコアグラーゼの免疫学的特異性の検討
……五十嵐英夫，新垣　正夫，潮田　弘，藤川　浩，寺山　武…… 1

Campylobacter jejuni および *Campylobacter coli* の無機塩，有機酸ならびにアミノ酸の利用性について
……高橋　正樹，伊藤　武，斉藤　香彦，高野伊知郎，Viliami IKA，大橋　誠…… 8

Cytotoxin を産生する *Escherichia coli* O145：H-による集団食中毒の細菌学的・疫学的検討
……伊藤　武，甲斐　明美，斉藤　香彦，柳川　義勢，稲葉美佐子，高橋　正樹，高野伊知郎，
松下　秀，工藤　泰雄，寺山　武，大橋　誠，唐木　一守，山下　征洋，池上　重明，
佐藤　穂積，関　友次，加藤　喜市，弘岡　淑夫，山田　幸正，秋山　博，大関　哲也，
大芝　豊，山之内　淳，土谷　啓文，綱川　敏夫，田崎　達明 …… 16

1984年・小笠原諸島における広東住血線虫および広東住血線虫症に関する調査研究
……村田以和夫，近藤　聡，浦野　元幸…… 23

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（第二報）
……中村　清純，伊藤　忠彦，山崎　清，坂井冨士子，大野　正彦，薮内　清，大橋　誠…… 33

イヌにおけるレプトスピラ抗体保有調査成績
……梅木富士郎，丸山　務，神崎　政子，松本　昌雄…… 43

生食用アジの病原ビブリオ汚染調査
……平田　一郎，太田　建爾，池島　伸至，神　真知子，新井　輝義，入倉　善久，坂井　千三…… 47

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（第2報）
訪問国パターン別検査成績解析システム
……津野　正朗，工藤　泰雄，大橋　誠…… 52

東京都内における病原体検出情報のためのコンピュータ・データベース開発
……津野　正朗，工藤　泰雄，大橋　誠…… 60

神経芽細胞腫のマス・スクリーニングに関する検討（第3報）
尿中バニリルマンデル酸スポットテスト発色部の簡易円形展開による鮮明化効果
……武士俣邦雄…… 67

都立衛生研究所における神経芽細胞腫マス・スクリーニング検査の動向（昭和59年度）
……高野　弘紀，鈴木　重任，武士俣邦雄，峰岸　正子，石塚　実，村田　篤司…… 73

報文 II　医薬品等に関する調査研究

高速液体クロマトグラフィーによるイブプロフェンの定量
……鎌田　国広，萩原　輝彦，高橋美佐子，上原　真一，中山　京子，秋山　和幸…… 77

高速液体クロマトグラフィーによる鎮暈剤の定量法
……高橋美佐子，中山　京子，上原　真一，鎌田　国広，萩原　輝彦，秋山　和幸…… 82

生薬製剤の品質評価に関する研究（第２報）
高速液体クロマトグラフィーによる瀉下薬中のセンノシドＡおよびセンノシドＢの定量
……瀬戸　隆子，安田　一郎，浜野　朋子，秋山　和幸…… 87

高速液体クロマトグラフィーによる塩基性色素の分析（第２報）
香粧品中のローダミンＢの定量法について
……伊藤　弘一，観　　照雄，中村　義昭，岸本　清子，渡辺四男也…… 93

香粧品（固型化粧石けん）中のケイ光Ｘ線分析法による酸化チタンの定量法
……中村　義昭，観　　照雄，伊藤　弘一，岸本　清子，渡辺四男也…… 98

家庭用品の衛生化学的研究（第13報）
TLC，GC，NMR および FAB—MS による長鎖アルキル第四アンモニウム塩の定性分析について
……鈴木　助治，酒井　正美，池田　一夫，森　謙一郎，雨宮　　敬，渡辺四男也……101

家庭用品の衛生化学的研究（第14報）
ガスクロマトグラフィーによるヘアーリンス剤，衣料用柔軟仕上げ剤中の塩化アルキルトリメチル
および塩化ジアルキルジメチル第四アンモニウムの定量法
……酒井　正美，池田　一夫，森　謙一郎，雨宮　　敬，鈴木　助治，観　　照雄，渡辺四男也……108

家庭用品の衛生化学的研究（第15報）
ガスクロマトグラフィーによるぬれティッシュ，清浄綿および消毒綿中の塩化ベンザルコニウム
の定量法について
……鈴木　助治，酒井　正美，池田　一夫，森　謙一郎，雨宮　　敬，江波戸舉秀，渡辺四男也……115

家庭用品の衛生化学的研究（第16報）
市販衣料品中の抗菌防臭加工剤・イルガサン DP-300およびチアベンダゾールの溶出試験について
……雨宮　　敬，酒井　正美，池田　一夫，森　謙一郎，鈴木　助治，渡辺四男也……123

尿酸既知濃度血清の作成と測定例
……大石　向江，蓑輪　佳子，仲川　千種，鈴木　重任……129

同一試料による精度管理調査結果（生化学検査）の経年変化について
……仲川　千種，大石　向江，蓑輪　佳子，鈴木　重任……132

血液学的検査の精度管理調査結果について（第１報）
——保存液添加血液試料——
……蓑輪　佳子，大石　向江，仲川　千種，鈴木　重任……137

報文Ⅲ　食品等に関する調査研究

Mycotoxin 産生カビの発育と毒素産生に及ぼす各種食品保存料の影響
……諸角　　聖，和宇慶朝昭，一言　　広……143

加熱気化一金アマルガム法による母乳中の総水銀の定量
……山野辺秀夫，竹内　正博，水石　和子，江波戸舉秀，風間成孔，渡辺四男也……151

母乳中の Mg，Ca，Fe，Cu，Zn の含有量について
……江波戸舉秀，竹内　正博，水石　和子，山野辺秀夫，風間　成孔，
渡辺四男也，鵜沼　洋子，南條　静代，中沢　秀夫……155

Yersinia enterocolitica の分離方法の再検討——
CIN 培地とアルカリ処理の併用による各種材料からの分離成績
……金子　誠二，丸山　　務，神崎　政子，小久保彌太郎，神保　勝彦，松本　昌雄，竹重　都子……158

Yersinia enterocolitica 血清型 O3，生物型 3 の年次別検出状況
……丸山　務，神崎　政子……164

食品中のエリソルビン酸，Lーアスコルビン酸の同時分析法及び含有量調査
……井部　明広，斉藤　和夫，中里　光男，菊地　洋子，藤沼　賢司，二島太一郎……168

はちみつ中のフェノール分析法及びその実態調査
……小川　仁志，鈴木　二郎，落合　節子，西島　基弘，二島太一郎……174

高速液体クロマトグラフィーによる食品中のホウ素分析法
……落合　節子，小川　仁志，鈴木　二郎，西島　基弘，二島太一郎……180

保存性に関与する物質及び要因の実態調査（第 1 報）漬物類について
……上田　工，島村　保洋，石川ふさ子，二島太一郎……185

化学物質及び自然毒による食中毒事件例（第 2 報）
——昭和58年～昭和59年——
……田村　行弘，真木　俊夫，観　公子，永山　敏廣，二島太一郎……191

農作物の残留農薬の実態と動向
—1977～1984—
……田村　行弘，観　公子，永山　敏廣，真木　俊夫，二島太一郎……199

臭化メチルくん蒸米中の残留臭素量とその存在形態
……観　公子，田村　行弘，真木　俊夫，永山　敏廣，二島太一郎……206

高速液体クロマトグラフィーによる天然糊料の分析
……中島　和雄，広門　雅子，高橋　巖，植松　洋子，遠藤　英美，風間　成孔……215

テーブルオリーブ中のグルコン酸鉄の定量法
……広門　雅子，中島　和雄，高橋　巖，植松　洋子，遠藤　英美，風間　成孔……219

石綿繊維の経口摂取による生体への影響（第 1 報）
ラットにおける血液中への移行について
……荻野 周三，福森　信隆，安野　哲子，小関 正道，佐々木美枝子，遠藤　英美，風間　成孔……224

脂肪酸分析法の検討
……船山　恵市，牛尾　房雄，友松　俊夫，道口　正雄……231

プレカラム螢光体化法によるチーズ中のチラミンの分析
……菊谷　典久，山口　直子，井口　正雄，友松　俊夫，道口　正雄……236

一滴法を用いた原子吸光分析法および炎光光度法の食品への応用
……山口　直子，菊谷　典久，井口　正雄，友松　俊夫，道口　正雄……240

市販食品における天然色素の使用実態調査
……荻原　勉，天川　映子，平田　恵子，野沢　竹志，大西　和夫，坂井　千三……245

報文Ⅳ　生活環境に関する調査研究

肺胞マクロファージの貪食能と Superoxide Anion 産生能に及ぼす No_2 の影響
……鈴木　孝人，池田　真悟，加納　堯子，溝口　勲……251

NO_2 と O_3 の長期複合暴露によるラットの病理組織学的変化（第 2 報）
——肺の電子顕微鏡的観察——
……寺田　伸枝，池田　真悟，福田　雅夫，大澤　誠喜，鈴木　孝人，溝口　勲，林　豊……263

尿中ハイドロオキシプロリンの測定法の検討
……池田　眞悟，鈴木　孝人，加納　堯子，溝口　勲……277

東京における呼吸器疾患死亡時系列の検討
……牧野　国義，溝口　勲……283

ビタミンAの二酸化窒素による分解
……太田　与洋，鈴木　孝人，加納　堯子……290

都内幹線道路沿道周辺の浮遊粉塵中の多環芳香族炭化水素濃度と変異原活性について
……狩野　文雄，加納　堯子，高尾　精一，溝口　勲……293

東京湾の環境汚染モニタリング調査（第3報）
昭和58年度スズキおよびウミネコの調査結果について
……瀬戸　博，加納　堯子……300

ラット胎仔および新生仔に対するメチル水銀毒性
……関　比呂伸，加納　堯子，田村　行弘……304

実験的に皮疹を発症したダニと口器鋏角の構造
……吉川　翠，花岡　暉……308

東京のツツガムシ相（第1報）
式根島のツツガムシ病流行期（1983年秋）の鼠寄生ツツガムシ類
……大野　正彦……319

トリハロメタンの生成抑制に関する検討
——クロラミン転化処理によるTHM生成抑制——
……笹野　英雄，西垣　進……322

糞便汚染指標細菌としての大腸菌群に関する検討（第2報）
……古畑　勝則，松本　淳彦……326

報文V　毒性に関する調査研究

Light Scattering（光散乱）法による溶血検査
……市川　久次，小林　博義……335

Slc：Wistarラットの核型について
……田山寿美子，田山　邦昭，平賀　興吾……340

酵素免疫測定法における模擬実験
……深野　駿……344

キノホルムの代謝（第1報）
キノホルムの化学イオン化法によるマススペクトル
……深野　駿一，牛山　慶子，長井二三子，中川　敦子，加納　いつ，中尾　順子……349

キノホルムの肝チトクロームP-450に対する影響
……牛山　慶子，長井二三子，中川　敦子，佐藤かな子，深野　駿一，加納　いつ，中尾　順子……353

キノホルム投与によるベンツピレンおよびビフェニル水酸化酵素系の誘導
……中川　敦子，深野　駿一，長井二三子，佐藤かな子，牛山　慶子，加納　いつ，中尾　順子……356

キノホルム投与による肝薬物代謝系（アミノピリンN-デメチラーゼ，P-ニトロアニソールO-デメチラーゼ）の誘導
……長井二三子，佐藤かな子，中川　敦子，牛山　慶子，深野　駿一，加納　いつ，中尾　順子……359

キノホルム投与によるラット肝P-450および薬物代謝酵素活性の変化
……加納　いつ，牛山　慶子，長井二三子，中川　敦子，佐藤かな子，深野　駿一，中尾　順子……362

馬腎 Na, K-ATPase のモノクローナル抗体
……佐藤かな子，中尾　順子……366

妊娠マウスにおける生体高分子へのチアベンダゾール（TBZ）の不可逆結合
……米山　允子，小縣　昭夫，藤谷　知子，安藤　　弘，久保　喜一，市川　久次……370

妊娠マウス尿中のチアベンダゾール（TBZ）およびその代謝物の分析
……藤谷　知子，米山　允子，小縣　昭夫，安藤　　弘，久保　喜一，市川　久次……373

チアベンダゾール（TBZ）のラットを用いた慢性毒性試験
……林田　志信，三栗谷久敏，神谷　信行，佐々木美枝子，平賀　興吾……377

チアベンダゾール（TBZ）のマウスにおける長期投与優性致死試験
……小縣　昭夫，安藤　　弘，久保　喜一，藤井　　孝，佐々木美枝子，平賀　興吾……390

カルベンダゾール（CBZ）の細胞遺伝学的研究
……吉田　誠二，佐々木美枝子……396

オルトフェニルフェノール（OPP）によるラット腎尿細管の微細構造変化
……福森　信隆，佐々木美枝子……400

オルトフェニルフェノールナトリウム（OPP-Na）のラットを用いた慢性毒性試験ー血液検索ー
……多田　幸恵，林田　志信，井口　重孝，田山　邦昭，佐々木美枝子，平賀　興吾……409

Salmonella typhimurium TA97a，TA102を用いた酸化防止剤およびかび防止剤の変異原性試験
……藤田　　博，小嶋　昭江，佐々木美枝子，平賀　興吾……413

ブチルヒドロキシアニソール（BHA），ジブチルヒドロキシトルエン（BHT），*tert*-ブチルヒドロキノン（TBHQ）のラット肺におよぼす影響
……坂本　義光，高橋　　省……418

他誌発表 …… 429

学会発表 …… 435

CONTENTS

REPORTS I PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

Immunological Differentiation of Coagulase Produced by *Staphylococcus aureus, Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*
..... H.Igarashi, M.Shingaki, H.Ushioda, H.Fujikawa and T.Terayama 1

Utilization of Inorganic Salts, Organic Acids and Amino Acids by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*
..... M.Takahashi, T.Itoh, K.Saito, I.Takano, Viliami IKA and M.Ohashi 8

Epidemiological and Laboratory Investigation on An Outbreak of Acute Enteritis Associated with Cytotoxin-producing *Escherichia coli* O145:H-
..... T.Itoh, A.Kai, K.Saito, Y.Yanagawa, M.Inaba, M.Takahashi, I.Takano, S.Matsushita, Y.Kudoh, T.Terayama, M.Ohashi, K.Karaki, H.Yamashita, S.Ikenoue, H.Satoh, T.Seki, K.Katoh, Y.Hirooka, M.Yamada, H.Akiyama, T.Ohzeki, Y.Ohshiba, J.Yamanouchi, H.Tsuchitani, T.Tsunakawa and T.Tazaki 16

A survey on *Angiostrongylus cantonensis* and Angiostrongyliasis cantonesis in the Ogasawara Islands, 1984
..... I.Murata, S.Kondoh and M.Urano 23

Studies on Tsutsugamushi Disease in Izu Islands Field Works in Shikine Island (II)
..... K.Nakamura, T.Itoh, K.Yamazaki, F.Sakai, M.Ohno, K.Yabuuchi and M.Ohashi 33

Study on Leptospira Antibody in Dogs
..... F.Umeki, T.Maruyama, M.Kanzaki and M.Matsumoto 43

Distribution of Pathogenic Vibrios in Horse Mackerel
..... I.Hirata, K.Ohta, N.Ikejima, M.Jin, T.Arai, Y.Irikura and S.Sakai 47

Development of a Computerized Data Base System for Processing Results of Bacteriological Examination of Overseas Travellers' Diarrhea (II)
A System for Analyzing Causative Agents by Patterns of Countries Visited
..... M.Tsuno, Y.Kudoh and M.Ohashi 52

Development of a Computerized Data Base System for Bacteriological Examination Results from Relevant Public Health Laboratories in Tokyo
..... M.Tsuno, Y.Kudoh and M.Ohashi 60

Studies on Mass-screening Methods for the Neuroblastoma (III)
Effect of Simple Radial Development in Spot Test
..... K.Bushimata 67

Mass-screening for the Neuroblastoma at the Tokyo Metropolitan Research Laboratory (1984.4—1985.3)
..... H.Takano, S.Suzuki, K.Bushimata, M.Minegishi, M.Ishizuka and T.Murata 73

REPORTS II PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

Determination of Ibuprofen in Solid Dosage Forms by High-Performance Liquid Chromatography
..... K.Kamata, T.Hagiwara, M.Takahashi, S.Uehara, K.Nakayama and K.Akiyama 77

Determination of Antiemetics by High-Performance Liquid Chromatography
..... M.Takahashi, K.Nakayama, S.Uehara, K.Kamata, T.Hagiwara and K.Akiyama 82

Studies on the Evaluation of Preparations of Crude Drugs (II)
Determination of Sennoside A and Sennoside B in Laxative Preparations by High-Performance Liquid Chromatography
..... T.Seto, I.Yasuda, T.Hamano and K.Akiyama 87

High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Basic Coal-tar Dyes (II)
Determination of Rhodamine B in Cosmetics and Toiletries
..... K.Ito, T.Kan, Y.Nakamura, K.Kishimoto and Y.Watanabe 93

Quantitative Analysis of Titanium Dioxide in Commercial Toilet Soaps by X-ray Fluorescence Spectrometry
..... Y.Nakamura, T.Kan, K.Ito, K.Kishimoto and Y.Watanabe 98

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XIII)
Qualitative Analysis of Long Chain Alkyl Quaternary Ammonium Compounds by TLC, GC, NMR and FAB-MS
..... S.Suzuki, M.Sakai, K.Ikeda, K.Mori, T.Amemiya and Y.Watanabe 101

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XIV)
Analytical Method of Alkyltrimethyl-and Dialkyldimethylammonium Chlorides in Hair Rinse and Liquid Softening Agent for Clothes by Gas Chromatography
..... M.Sakai, K.Ikeda, K.Mori, T.Amemiya, S.Suzuki, T.Kan and Y.Watanabe 108

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XV)
Analytical Method of Benzalkonium Chlorides in Disposable Wet Tissues, Skin Cleansing Cotton and Skin Disinfection Cotton by Gas Chromatography
..... S.Suzuki, M.Sakai, K.Ikeda, K.Mori, T.Amemiya, K.Ebato and Y.Watanabe 115

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XVI)
Dissolution Test of Irgasan DP—300 and Thiabendazole Used as Sanitary Finishing Agent in Commercial Textile Products
..... T.Amemiya, M.Sakai, K.Ikeda, K.Mori, S.Suzuki and Y.Watanabe 123

Estimation of Fixed Concentration of Uric Acid in Serum
..... H.Oishi, K.Minowa, C.Nakagawa and S.Suzuki 129

Interlaboratory Quality Control by Same Lot of Control Material for Three Years
..... C.Nakagawa, H.Oishi, K.Minowa and S.Suzuki 132

Interlaboratory Quality Control in Hematology (I)
—Evaluation of Preservatives in Control Material—
..... K.Minowa, H.Oishi, C.Nakagawa and S.Suzuki 137

REPORTS III PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

Effects of Preservatives on the Growth and Mycotoxin Production of Toxigenic Fungi
..... S.Morozumi, T.Wauke and H.Hitokoto 143

Determination of Total Mercury in Human Milk by Heating Vaporization-Gold Amalgamation Method
..... H.Yamanobe, M.Takeuchi, K.Mizuishi, K.Ebato, M.Kazama and Y.Watanabe 151

Mg, Ca, Fe, Cu and Zn Content in Human Milk
..... K.Ebato, M.Takeuchi, K.Mizuishi, H.Yamanobe, M.Kazama, Y.Watanabe, Y.Unuma, S.Nanjou and H.Nakazawa 155

Isolation Methods for *Yersinia enterocolitica* —Result of *Y.enterocolitica* Isolation from Various Materials by Concurrent Use of CIN Medium and Alkali Treatment
..... S.Kaneko, T.Maruyama, M.Kanzaki, Y.Kokubo, K.Jinbo, M.Matsumoto and K.Takeshige 158

Chronological Changes in Detection Ratio of *Yersinia enterocolitica* Serotype O3; Biotype 3
..... T.Maruyama and M.Kanzaki 164

Simultaneous Detection and Determination of Erythorbic Acid and L-Ascorbic Acid by Thin Layer Chromatography and High Performance Liquid Chromatography and Survey of Their Contents in Commercial Foods
..... A.Ibe, K.Saito, M.Nakazato, Y.Kikuchi, K.Fujinuma and T.Nishima 168

Gas Liquid Chromatographic Determination of Phenol in Commercial Honeys
..... H.Ogawa, J.Suzuki, S.Ochiai, M.Nishijima and T.Nishima 174

High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Boron in Foods
..... S.Ochiai, H.Ogawa, J.Suzuki, M.Nishijima and T.Nishima 180

Survey of Preservatives in Foods (I) Preservative Content of Tsukemono
..... K.Ueda, Y.Shimamura, F.Ishikawa and T.Nishima 185

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toxicants in Tokyo (II) (1983—1984)
..... Y.Tamura, T.Maki, K.Kan, T.Nagayama and T.Nishima 191

Survey and Tendency of Pesticide Residues in Crops (1977—1984)
..... Y.Tamura, K.Kan, T.Nagayama, T.Maki and T.Nishima 199

Survey of Bromide Residues and The Bromine Form in Methyl Bromide Fumigated Rices
..... K.Kan, Y.Tamura, T.Maki, T.Nagayama and T.Nishima 206

High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Natural Stabilizing and Thickening Agents
..... K.Nakajima, M.Hirokado, I.Takahashi, Y.Uematsu, F.Endo and M.Kazama 215

Method for Quantitative Determination of Ferrous Gluconate in Table Olive
..... M.Hirokado, K.Nakajima, I.Takahashi, Y.Uematsu, F.Endo and M.Kazama 219

Biological Effects of Ingested Asbestos Fibers (I)
Migration to Blood in Rats
..... S.Ogino, N.Fukumori, T.Yasuno, M.Koseki, M.Sasaki, F.Endo and M.Kazama 224

Examination of Analytical Method on Fatty Acid
..... K.Funayama, F.Ushio, T.Tomomatsu and M.Doguchi 231

High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Tyramine in Cheese by Precolumn Fluorescence Derivatization with *o*-Phthalaldehyde
..... N.Kikutani, N.Yamaguchi, M.Iguchi, T.Tomomatsu and M.Doguchi 236

Application of One-drop Method in Flame Atomic Absorption and Flame Emission Spectrophotometry to Determination of Elements in Foods
..... N.Yamaguchi, N.Kikutani, M.Iguchi, T.Tomomatsu and M.Doguchi 240

Survey of Natural Dyes in Commerical Foods
..... T.Ogiwara, E.Amakawa, K.Hirata, T.Nozawa, K.Ohnishi and S.Sakai 245

REPORTS IV PAPERS CONCERNING ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

Effects of Nitrogen Dioxide on Alveolar Macrophage Phagocytosis and Superoxide Anion Production
..... T.Suzuki, S.Ikeda, T.Kanoh and I.Mizoguchi 251

Effects of Long-Term Exposure to a Mixture of Nitrogen Dioxide and Ozone (II)
—Electron Microscopic Study of Pulmonary Alveolus—
..... N.Terada, S.Ikeda, M.Fukuda, M.Ohsawa, T.Suzuki, I.Mizoguchi and Y.Hayashi 263

Improved and Simplified Method for the Spectrophotometric Determination of Urinary Hydroxyproline
..... S.Ikeda, T.Suzuki, T.Kanoh and I.Mizoguchi 277

Time Series Study on Mortality from Respiratory Diseases in Tokyo
..... K.Makino and I.Mizoguchi 283

Decomposition of Vitamin-A with NO_2
..... T.Ohta, T.Suzuki and T.Kanoh 290

The Mutagenic Activity and the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Contents of ambient Particulate Matter collected near a Main Road in Tokyo
..... F.Kanoh, T.Kanoh, S.Takao and I.Mizoguchi 293

Survey of Chemical Pollutants in Biota from Tokyo Bay (III)
Residue Levels in Japanese Sea Bass and Gull in 1983
..... H.Seto and T.Kanoh 300

Toxicological Effects of Methylmercury on the Fetal and Neonatal Rats
..... H.Seki, T.Kanoh and Y.Tamura 304

Relation Between Feeding Apparatus in Mites and Experimentally Induced Lesions on Human Skin
..... M.Yoshikawa and K.Hanaoka 308

Trombiculid Mites of Tokyo (I)
Trombiculid Mites Found on Rats in Shikinejima Island during An Outbreak of Tsutsugamushi desease in 1983
..... M.Ohno 319

A Study on Controlling Trihalomethane Formation in Drinking Water
—Controlling Trihalomethane Formation with chlorine transformed to chloramine—
..... H.Sasano and S.Nishigaki 322

Studies on Fecal Coliforms as the Indicator Bacteria for Fecal Contamination (II)
..... K.Furuhata and A.Matsumoto 326

REPORTS V PAPERS CONCERNING ON TOXICOLOGY

Hemolysis Test by Light Scattering Method
..... H.Ichikawa and H.Kobayashi 335

Karyotype of Slc: Wistar Rats
..... S.Tayama, K.Tayama and K.Hiraga 340

Simulation of Enzyme Immunoassay
..... S.Fukano 344

Metabolism of Chinoform (I)
Chemical Ionization Mass Spectrum of Chinoform
..... S.Fukano, K.Ushiyama, F.Nagai, A.Nakagawa, I.Kano and T.Nakao 349

Effect of Chinoform on Hepatic Cytochrome P-450 Content
..... K.Ushiyama, F.Nagai, A.Nakagawa, K.Satoh, S.Fukano I.Kano and T.Nakao 353

Induction of Benzo(a)pyrene and Biphenyl Hydroxylation System by Chinoform in Mouse Liver Microsomes
..... A.Nakagawa, S.Fukano, F.Nagai, K.Satoh, K.Ushiyama, I.Kano and T.Nakao 356

Induction of Hepatic Drug Metabolizing enzymes (Aminopyrine N-demethylase and p-Nitroanisole O-demethylase) by Chinoform
..... F.Nagai, K.Satoh, A.Nakagawa, K.Ushiyama, S.Fukano, I.Kano and T.Nakao 359

Effect of Chinoform on Rat Hepatic cytochrome P-450 and Activities of Drug Metabolizing Enzymes
..... I.Kano, K.Ushiyama, F.Nagai, A.Nakagawa, K.Satoh, S.Fukano and T.Nakao 362

Monoclonal antibodies to Horse Kidney Na, K-ATPase
..... K.Satoh and T.Nakao 366

Irreversible Binding *in vivo* of Thiabendazole to Macromolecules in Pregnant Mice
..... M.Yoneyama, A.Ogata, T.Fujitani, H.Ando, Y.Kubo and H.Ichikawa 370

Analysis of Thiabendazole and its Metabolites in Urine of Pregnant Mice
..... T.Fujitani, M.Yoneyama, A.Ogata, H.Ando, Y.Kubo and H.Ichikawa 373

Chronic Toxicity on Rats Fed Thiabendazole (TBZ) for 104 Weeks
..... S.Hayashida, H.Mikuriya, N.Kamiya, M.Sasaki and K.Hiraga 377

Dominant Lethal Tests in BDF_1 Mice Fed with Thiabendazole (TBZ) in Diets for 14 Weeks
..... A.Ogata, H.Ando, Y.Kubo, T.Fujii, M.Sasaki and K.Hiraga 390

Cytogenetic Studies of Carbendazole
..... S.Yoshida and M.Sasaki 396

Ultrastructural Alterations of the Proximal Tubules induced by *o*-Phenylphenol (OPP) in the Rat Kidney
..... N.Fukumori and M.Sasaki 400

Hematological Studies of Rats Fed with Sodium *o*-Phenylphenate (OPP-Na) for 104 Weeks
..... Y.Tada, S.Hayashida, S.Iguchi, K.Tayama, M.Sasaki and K.Hiraga 409

Mutagenicity Test of Antioxidants and Fungicides with *Salmonella typhimurium* TA97a, TA102
..... H.Fujita, A.Kojima, M.Sasaki and K.Hiraga 413

Effects of Butylated Hydroxyanisole (BHA), Butylated Hydroxytoluene (BHT) and *tert*-Butylhydroquinone (TBHQ) on Rat Lung
..... Y.Sakamoto and O.Takahashi 418

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS 429

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS 435

報　　文　I

感染症等に関する調査研究

REPORTS I

PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 1-7, 1985

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus intermedius* および *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* の産生するコアグラーゼの免疫学的特異性の検討

五十嵐 英 夫*, 新 垣 正 夫*, 潮 田 弘*
藤 川 浩*, 寺 山 武*

Immunological Differentiation of Coagulase Produced by *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*

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

Immunolgical Differentiation of Coagulases Produced by *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*

We examined immunological identity of coagulases produced by *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* by neutralizing with antiserum the plasma-coagulating activity of the three *Staphylococci*. *S. intermedius* and *S. hyicus* subsp. *hyicus* examined in this study consisted of six and four strains respectively. These strains were supplied by Dr. W. E. Kloos, Department of Genetics, North Carolina State University. All the strains of *S. intermedius* and 2 of the 4 *S. hyicus* subsp. *hyicus* coagulated rabbit plasma. Coagulase typing method used for *S. aureus* was applied to the strains. Although one strain was classified as Type II, the other strains could not be identified.

This fact suggests that coagulases produced by *S. intermedius* and *S. hyicus* subsp. *hyicus* are immunologically different from that of *S. aureus*. Coagulase was purified from the strain 6317 of *S. intermedius* having relatively high coagulase activity which was used for immunizing rabbits. The coagulase was purified according to Igarashi et al. (J. Biochem., *86*, 1616, 1979) by affinity chromatography using bovine prothrombin-Sepharose 4B. Serum against the purified coagulase of *S. intermedius* strain 6317 was found to have type-specific properties. By using the coagulase anti-serum, coagulase typing was performed for 5 strains of *S. intermedius* and 2 strains of *S. hyicus* subsp. *hyicus*. As a result, this serum neutralized the coagulase from 5 strains of *S. intermedius*, but could not neutralize 2 strains of S. *hyicus* subsp. *hyicus*.

Thus, it has been proved that coagulases produced by *S. intermedius* is immunologically different from those from *S. aureus* and *S. hyicus* subsp. *hyicus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*, Coagulase, Coagulase typing

緒 言

ヒトやウサギ等の動物の血漿を凝固するコアグラーゼは，黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）が産生する特徴的な物質の1つで，本菌の同定のための重要な鍵であると考えられていた．Zen-Yoji ら[1]はこのコアグラーゼの抗原性の違いを利用した *S. aureus* の分類法で

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

あるコアグラーゼ型別法を考案し，現在，Ⅰ～Ⅷの8型に型別され，我が国での本菌による疾患の疫学的調査に広く応用されている．

最近のブドウ球菌の分類では，コアグラーゼを産生する菌種として，*S. aureus* 以外に *Staphylococcus intermedius* と一部の *Staplylococcus hyicus* subsp. *hyicus* が追加されている．これらの新しくコアグラーゼを産生するとされた両菌種の分布は主として動物である．これらの菌種の分類までの経緯の概要は次のとおりである．*S. intermedius* は，これまで動物由来の *S. aureus* の1つの生物型として分類されていた．1976年，Hájek[2]はこの生物型に分類されている菌株の生化学的性状，ファージに対する感受性，遺伝的性状および細胞壁の化学組成が *S. aureus* と異なることを証明し，これらの菌株を *S. aureus* から分けて独立した菌株として *Staphylococcus intermedius* と命名することを提案した．一方，1978年，Devriese ら[3]はブタ滲出性表皮炎，健康なブタ，ニワトリの鼻腔，皮膚およびウシ乳房炎から分離した菌株について，分類学的研究を行った。その結果，これらの菌株に *Staphylococcus hyicus* と命名し，この菌種に *S. hyicus* subsp. *hyicus* と *S. hyicus* subsp. *chromogenes* の2つの亜種を設定することを提案した．以上のような2つの提案によって，ブドウ球菌の分類にこれらの菌種が新たに採用されたのである．

これらの菌種の研究は，獣医細菌学領域で盛んに行われている．*S. intermedius* は健康な動物の鼻腔，皮膚，腸管内容物に広く分布し，*S. hyicus* subsp. *hyicus* は健康なブタ，ニワトリ，ウシの上部気道，外耳道，皮膚などに常在する．これらの菌種の病原性については，*S. intermedius* によるイヌの外耳炎，化膿性皮膚炎や *S. hyicus* subsp. *hyicus* によるブタ滲出性表皮炎などが知られているのみである．

日常のブドウ球菌検査において，*S. aureus* の同定には，コアグラーゼの産生の有無が重要な鑑別性状として用いられており，コアグラーゼ型別法は我が国のブドウ球食中毒の疫学的調査に，なくてはならない *S. aureus* の分類法となっているのが現状である．

しかしながら，現在まで，このようにブドウ球菌の鑑別や型別に応用されている *S. aureus* の産生するコアラグラーゼと，*S. intermedius* および *S. hyicus* subsp. hyicus が産生するコアグラーゼの異同については，全く検討されていない．そのため，ブドウ球菌の検索を日常検査としている私どもにとって，*S. intermedius* や *S. hyicus* subsp. *hyicus* が *S. aureus* と間違って同定されたりはしていないかと言う懸念があった．

そこで，私どもはこれらの問題を解決するために，*S. aureus*, *S. intermedius* および *S. hyicus* subsp. *hyicus* の産生するコアグラーゼの異同について免疫学的に検討した．さらに，これらの菌種の鑑別性状や *S. aureus* として保存されている菌株への混在についても検討したので併せて報告する．

材料および方法

供試菌株：*S. intermedius* 4177, 5018, 5066, 6131, 6317および CFDD 株；*S. hyicus* subsp. *hyicus* 393B, 3813, NCTC 10350および *S. hyicus* A_4の各菌株は，米国，ノースカロライナ州立大学の Kloos 博士より分与された．これらの菌株はすべて動物由来株で，DNA-DNA ハイブリダイゼイションで，それぞれの菌種に同定され，Phillips, Jr. & Kloos によって，発表（J. Clin. Microbiol., 14, 671, 1981）されたものである．

鑑別性状試験：コアグラーゼ産生は2.5～3m*l* ずつ分注した5％ウサギ血漿加ブレーンハートインヒュージョン（BHI）液体培地で35℃，18時間培養後の凝固の有無で判定した．耐熱性ヌクレアーゼの産生は，被検液を BHI 液体培地で35℃，18時間培養後の菌液について，Lachica ら[4]の O-トルイジン青を用いる寒天ゲル内拡散法によって行った．クランピングファクターの検出は，ヒト血漿によるスライド・コアグラーゼ試験を行い，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．溶血活性は5％ウマ血液寒天平板に培養し，コロニー周辺の溶血環の有無で判定した．プロティンAは抗ヒツジ赤血球血清を感作したヒツジ赤血球を用いる Winblad & Fricson[5]の方法で行った．抗ヒツジ赤血球血清は東京慈恵会医科大学益田昭吾教授より分与された．卵黄反応は3％卵黄加マンニット食塩寒天平板で35℃，48時間培養後のコロニー周辺に白濁帯を形成したものを陽性とした．マンニット，トレハロースおよびマルトースからの酸の産生は各々の糖を1％に PYP 基礎培地（日水製薬）に添加したものを用いた．判定はこれらの培地に被検菌を接種し，35℃，48時間培養液後に黄変したものを陽性とした．アセチルメチルカルビノール産生（VP 試験）は，VP 半流動培地（栄研化学）に35℃，48時間培養後，VP 試薬Ⅰ液とⅡ液を滴下し，赤変したものを陽性とした．

IDテスト・SP-18による同定：

ブドウ球菌簡易同定用キットである IDテスト・SP-18「ニッスイ」を用いて *S. intermedius* および *S. hyicus* subsp. *hyicus* の供試菌株の同定を行った．

Table 1. Characteristics of *S. intermedius* and *S. hicus* subsp. *hyicus* Used

Character	S. intermedius						S. hyicus			
	4177	5018	5066	6131	6317	CFDD	3813	393B	A4	NCTC 10350
Coagulase (rabbit plasma)	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−
Heat-stable nuclease	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Clumping-factor	−	+	+	+	+	+	−	−	−	−
Hemolysin (horse blood)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Protein A	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+
Egg-yolk	±	+	−	+	+	+	−	−	−	−
Acid from mannitol	−	−	−	+	−	+	−	−	−	−
Acid from trehalose	+	+	+	+	+	+	−	+	±	+
Acid from maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetoin production (VP)	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

コアグラーゼ型別：コアグラーゼ型別はUshiodaら[6]の方法によって行った．

***S. intermedius* の産生するコアグラーゼの精製および抗血清の調製**：*S. intermedius* の産生するコアグラーゼの精製およびその抗血清の調製はIgarashiら[7]の方法に準じて行った．

成　績

私どもは，新しくコアグラーゼ産生菌種として追加された *S. intermedius* や *S. hyicus* subsp. *hyicus* を検出するために，日常検査において，これらの菌種の検索を行ったり，*S. aureus* として保存している菌株の中にこれらの菌種が混在しているか否かを調べてみたが，いずれからもこれらの両菌種は見い出すことはできなかった．そのため，今回，私どもはKloos博士から *S. intermedius* や *S. hyicus* subsp. *hyicus* と明らかに同定された菌株の分与を受けて，以下の実験を実施した．

鑑別性状：

Table 1はKloos博士より分与された *S. intermedius* および *S. hyicus* subsp. *hyicus* の主な生化学的性状試験の成績を示したものである．供試した6株の *S. intermedius* および4株の *S. hyicus* subsp. *hyicus* はすべて耐熱性ヌクレアーゼ，マルトースからの酸の産生および溶血活性は陽性で，VP反応は陰性であった．コアグラーゼは，ウサギ血漿に対して，供試した6株の *S. intermedius* および *S. hyicus* subsp. *hyicus* の3813株と A_4 株が陽性であった．しかし，ウシ血漿に対しては，すべて陰性であった．

IDテスト・SP-18による同定：

ブドウ球菌簡易同定用キットIDテスト・SP-18「ニッスイ」を用いて，供試した6株の *S. intermedius* および4株の *S. hyicus* subsp. *hyicus* を同定した．その結果，*S. intermedius* 4177，5018，5066の3株はともにSP-18のコードNo.が734 553で99.5%の相対確率で *S. intermedius* と同定され，6317株のコードNo.は734 551で相対確率97.2で *S. intermedius* に同定された．6131株およびCFDD株のコードNo.はそれぞれ734 753，736 653で，ともに *S. intermedius* 68.0%，*S. aureus* 31.9%の相対確率で同定された．一方，*S. hyicus* subsp. *hyicus* 3813株のコードNo.は724 552で99.3%の確率で *S. hyicus* と同定され，393B株，A_4 株，NCTC 10350株のコードNo.は，それぞれ724 553で，ともに *S. hyicus* 53.1%，*S. intermedius* 46.7%の相対確率で同定された．以上のように，供試した菌株はすべてKloos博士によって，DNA-DNAハイブリダイゼイションで同定された菌種と一致した．

コアグラーゼ型別：

供試した *S. intermedius* およびコアグラーゼ陽性の *S. hyicus* subsp. *hyicus* について，*S. aureus* の抗コアグラーゼ血清によるコアグラーゼ型別を実施した．その結果，*S. intermedius* CFDD株のみがII型に型別されたが，それ以外はI～VIII型のコアグラーゼ抗血清では，型別不能であった．その成績をTable 2に示した．このことは，これまでの *S. aureus* のコアグラーゼと免疫学的に異なるコアグラーゼが存在する可能性を示唆するものであった．次に，*S. intermedius* の産生するコアグラーゼに対する抗血清を作製するために，CFDD株以外の *S. intermedius* の産生するコアグラーゼの精製を試みた．

S. intermedius の産生するコアグラーゼの精製：

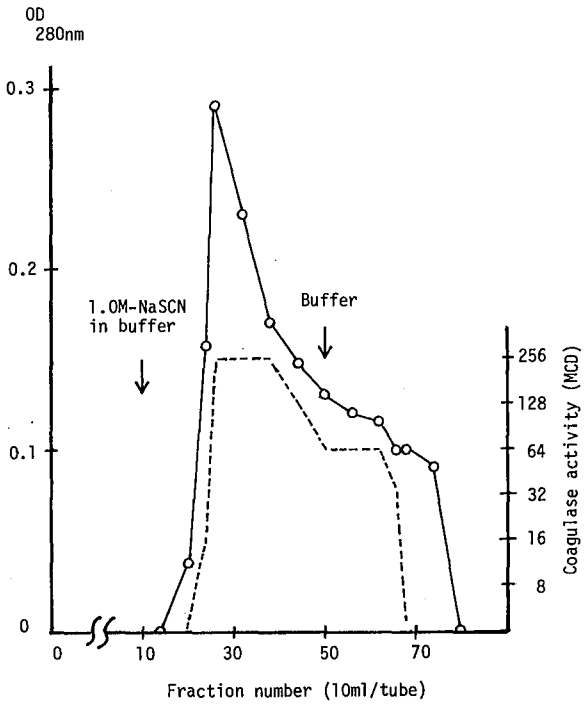


Fig. 1. Affinity Chromatography of Coagulase Produced by *S. intermedius* strain 6317 on Bovine Prothrombin-Sepharose 4B Column-size : 5×14 cm, buffer : 0.05M phosphate buffer, pH 7.4 containing 1M NaCl and 0.05 % NaN_3 flow rate : 10m*l*/min.
Sample : 9.4 1 of culture filtrate of *S. intermedius* strain 6317, containning 1M Nacl and 0.05% NaN_3, pH7.4. —○—○— : at 280 nm, ····· : coagulase activity

S. intermedius の産生するコアグラーゼを精製するために，コアグラーゼ産生の多い菌株を選択した．その結果，6317株のコアグラーゼ活性が64MCD(Minimal clotting dose)／hr で最も高い値を示したので，この菌株を *S. intermedius* のコアグラーゼ精製に供試した．

S. intermedius の産生するコアグラーゼの精製は，Igarashi らの方法に準じて行った．ジャーファーメンター（New Brunswick Scientific Co.,INC.）の14*l* ジャーに10*l* の BHI 液体培地を入れ，滅菌後 *S. intermedius* 6317株の前培養菌液10m*l* を接種した．必要に応じて消泡剤を滴下し，回転数200rpm, 10*l*/min の通気量で4時間培養し，その遠心上清をコアグラーゼ精製の出発材料とした．Fig. 1はウシ・プロトロンビン－Sepharose 4Bアフィニティーカラムからのコアグラーゼの溶出パターンを示した．コアグラーゼ活性を示すフラクションのみを集め，Sephadex G-25でゲル濾過を行い，コアグラーゼ活性を示す画分を集め，部分精製標品とした．この最終標品をウサギに免疫して，その抗血清を作製した．

S. intermedius の産生する抗コアグラーゼ血清の免疫学的特異性の検討：

前述のようにして調製した *S. intermedius* 6317株の産生するコアグラーゼおよびその抗血清の免疫学的特異性を *S. aureus* の産生するⅠ～Ⅷ型のコアグラーゼおよびそれぞれの抗血清を用いて検討した．Table 2はその成績を示したものである．表からも明らかなように，*S. intermedius* 6317株のコアグラーゼは，対応する抗血清にのみ中和され，*S. aureus* の産生するⅠ～Ⅷ型のコアグラーゼ抗血清では中和できなかった．さらに，*S. inter-*

Table 2. Specificity of Coagulase Types

Coagulase		Neutyalization of coagulases with anti-coagulase type sera								
Type	Strain	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	6317**
I	No. 104	⊕	−	−	−	−	−	−	−	−
II	St. 213	−	⊕	−	−	−	−	−	−	−
III	Newman	−	−	⊕	−	−	−	−	−	−
IV	St. 28	−	−	−	⊕	−	−	−	−	−
V	No. 55	−	−	−	−	⊕	−	−	−	−
VI	Stp. 12	−	−	−	−	−	⊕	−	−	−
VII	St. 1125	−	−	−	−	−	−	⊕	−	−
VIII	KU	−	−	−	−	−	−	−	⊕	−
	6317*	−	−	−	−	−	−	−	−	⊕

* : Coagulase produced by *S. intermedius* strain 6317
** : Antiserum against coagulase produced by *S. intermedius* strain 6317

Table 3. Coagulase Typing of *S. intermedius* and *S. hyicus* subsp. *hyicus* with Antiserum against Coagulase Produced by *S. intermedius* strain 6317

Strain	Coagulase type 6317
S. intermedius	
4177	Yes
5018	Yes
5066	Yes
6131	Yes
6317*	Yes
CFDD	(II)**
S. hyicus	
3813	No
393B	NT***
A_4	No
NCTC 10350	NT

* : Reference strain of coagulase
** : Coagulase type II
*** : Not tested

medius 6317株のコアグラーゼ抗血清は，6317株のコアグラーゼを中和するが，*S. aureus* のⅠ～Ⅷ型のコアグラーゼを中和することはできなかった．この成績のように，*S. intermedius* 6317株のコアグラーゼおよびその抗血清は，*S. aureus* のⅠ～Ⅷ型のコアグラーゼと免疫学的に異なり，さらに特異性のあることが認められた．

***S. intermedius* 6317株コアグラーゼ抗血清によるコアグラーゼ型別**：

S. intermedius 6317株のコアグラーゼ抗血清を用いて，*S. intermedius* CFDD株以外の供試菌株について型別を行った．Table 3はその成績を示したものである．表のように，CFDD株以外の供試した *S. intermedius* の産生するコアグラーゼは，6317株の抗コアグラーゼ血清で中和された．しかしながら，*S. hyicus* subsp. *hyicus* 3813株，A_4株の産生するコアグラーゼは中和できなかった．このことは，*S. intermedius* の産生するコアグラーゼと *S. hyicus* subsp. *hyicus* の産生するコアグラーゼは抗原的には異なることを示している．

考　察

近年，ブドウ球菌は，多数の菌類に分類されており，今後さらに増加する傾向がみられる．しかし，新しいブドウ球菌の分類においても，種々の動物の血漿を凝固するコアグラーゼを産生する菌種は，*S. aureus*，*S. intermedius* および *S. hyicus* subsp. *hyicus* の一部である．

今回，供試した *S. intermedius* および *S. hyicus* subsp. *hyicus* のエンテロトキシン産生性は認められなかったが，Kato ら[8]，Kaji & Kato[9]，Fukuda ら[10]は *S. intermedius* が，Adesiyun[11]は *S. hyicus* がブドウ球菌エンテロトキシンを産生することを報告しており，さらにこれらの菌種によるブドウ球菌食中毒の発生する可能性のあることを暗示している．

しかし，私どもは，これまでのブドウ球菌のコアグラーゼ型別やエンテロトキシンの研究において，ブドウ球菌エンテロトキシンを産生しておりながら，ほとんどブドウ球菌食中毒事例のないコアグラーゼⅠ型，Ⅳ型およびⅤ型の *S. aureus* が存在し，これらの型に属する *S. aureus* が自然界に広く分布していることを報告している[12-14]．前述のような理由から Kato ら[8]，Kaji & Kato[9]，Fukuda ら[10]および Adesiyun[11]らが懸念しているように，ブドウ球菌エンテロトキシン産生 *S. intermedius* や *S. hyicus* が存在するから，直ちにブドウ球菌食中毒が発生するとは，私どもは考えていない．

さらに，これらの両菌種はコアグラーゼを産生するが，そのコアグラーゼと *S. aureus* の産生するコアグラーゼとの異同についても，これまで全く明らかにされていない．そこで私どもは，今回，3菌種の産生するコアグラーゼの異同について免疫学的に証明するための実験を行った．その結果，Table 2やTable 3に示したように，*S. intermedius* の産生するコアグラーゼは，*S. aureus* のⅠ～Ⅷ型のコアグラーゼとは免疫学的に異なることが示唆された．しかし，*S. intermedius* CFDD株の産生するコアグラーゼのみがII型に型別された．*S. intermedius* の産生するコアグラーゼにII型が多いかどうかについては，今後，各種動物由来 *S. intermedius* を対象に検討してみなければわからない．またIDテスト・SP-18「ニッスイ」による同定で，このCFDD株は *S. intermedius* 68.0%，*S. aureus* 31.9%と言う結果が得られている．この成績は，CFDD株が他の菌株よりも *S. aureus* に近縁な菌株ではないかとも考えられ，今後，解明しなければならない点であると考えている．

Gugging[15]は，*S. aureus*，*S. intermedius* および *S. hyicus* subsp. *hyicus* の産生する耐熱性ヌクレアーゼを検討しており，この3菌種の産生する耐熱性ヌクレアーゼは，免疫学的に異なることを報告している．これら3者が産生する物質の作用は同じであっても，免疫学的に異なっていることを示唆するもので，私どものコアグラーゼの成績とも一致するものである．

今後，さらに種々の動物由来 *S. intermedius* の産生す

るコアグラーゼについて検討してみなければ結論することは困難であるが，これまでブドウ球菌食中毒と診断された事例から分離した *S. aureus* のほとんどすべてがコアグラーゼ型別されていることから考えると，エンテロトキシン産生 *S. intermedius* や *S. hyicus* subsp. *hyicus* によるブドウ球菌食中毒事例が発生している可能性はきわめて低い．食生活に大きな変化がない限り，今後もこれらの菌種によるブドウ球菌食中毒の発生する機会は，非常に少ないと考えられる．

次に，コアグラーゼを産生する *S. aureus* と *S. intermedius* および *S. hyicus* subsp. *hyicus* を分類するための鑑別性状としては，文献的にマルトースからの酸の産生性や VP 試験が有効であるとされてきた．しかしながら，*S. intermedius* および *S. hyicus* subsp. *hyicus* は，マルトースからの酸の産生性は陰性でなければならないところ，今回の実験では，すべて陽性であった．VP 試験では，対照とした *S. aureus* は陽性であったが，*S. intermedius* や *S. hyicus* subsp. *hyicus* はすべて陰性であった．この VP 試験の成績は，これまで報告されている成績と一致した．ID テスト・SP-18のブドウ球菌同定キットでの VP 試験では，両菌種はともに VP 試験陰性であった．これに対して，マルトースからの酸の産生性は，*S. hyicus* subsp. *hyicus* のみが陰性で，*S. intermedius* が陽性であった．このように，マルトースから好気的な条件下での酸の産生性を調べる方法には，問題があるように思われる．以上のようなことから考えて，*S. aureus* と *S. intermedius* および *S. hyicus* subsp. *hyicus* を分類する，簡単で精度の高い方法は VP 試験であると思われる．

私どもは，ブドウ球菌食中毒の検査材料，一般市販食品および乳・食肉製品から分離・同定された保存菌株それぞれ200株，200株および177株の合計577株について，マルトースからの酸の産生試験および VP 試験の 2 つの鑑別性状について調べてみた．その結果，供試した全菌株は VP 試験およびマルトースからの酸の産生試験が共に陽性であった．このことは，私どもが *S. aureus* として保存している菌株の中に，*S. intermedius* や *S. hyicus* subsp. *hyicus* が混在していないことを示すものである．

現在，種々の動物由来の *S. intermedius* の分与を受けて，これらの菌株の産生するコアグラーゼの免疫学的特異性の検討を行っている．これらの成績については，別の機会に報告する予定であるが，今回の実験で証明したイヌ由来の *S. intermedius* 6317株の産生するコアグラーゼ以外に，免疫学的に異なるものが，イヌ以外の動物由来の *S. intermedius* の菌株に存在していることを確認している．Kawano ら[16]は，*S. intermedius* を 4 群のファージ型に分類しており，そのファージ型と *S. intermedius* が分離された動物種との間に強い関連性があることを報告しており，*S. intermedius* のコアグラーゼ型にも，そのような傾向がありそうである．

また，種々の動物由来の *S. aureus* が産生するコアグラーゼの中にも，私どもが現在使用している Ⅰ～Ⅷ型のコアグラーゼ抗血清で型別できないものがある．これらの型別できない *S. aureus* のコアグラーゼに対して，*S. intermedius* のコアグラーゼ抗血清で中和しても中和できない．このことは，動物由来 *S. aureus* の菌株の中にも Ⅰ～Ⅷ型コアグラーゼ血清で，中和できない新しい型のコアグラーゼが存在する可能性も考えられるので，今後，動物由来 *S. aureus*，*S. intermedius* および *S. hyicus* subsp. *hyicus* の産生するコアグラーゼについて，免疫学的な異同について検討をするとともに，血漿凝固の作用機序の異同についても検討する必要があろうと考えている．

結　論

近年，ブドウ球菌の分類において，コアグラーゼを産生する菌種として，*S. aureus*，*S. intermedius* および *S. hyicus* subsp. *hyicus* の 3 菌種がある．これら 3 菌種の産生するコアグラーゼの異同について検討した結果，*S. intermedius* 6317株の産生するコアグラーゼは，*S. aureus* や *S. hyicus* subsp. *hyicus* の産生するコアグラーゼと免疫学的に異なることが証明された．

コアグラーゼ産生ブドウ球菌である *S. aureus* と *S. intermedius* および *S. hyicus* subsp. *hyicus* を鑑別するための生化学的性状としては，VP 試験が簡易で，精度の高い鑑別性状であることが確認された．

各種検査材料から分離・同定された *S. aureus* に *S. intermedius* や *S. hyicus* subsp. *hyicus* が混在しているか否かについて，VP 試験とマルトースからの酸の産生試験の 2 つの鑑別性状を用いて，総数577株の各種由来 *S. aureus* について検討した結果，供試した全菌株が両性状とも陽性であった．このことは，私どもがこれまで，*S. aureus* と同定した菌株の中に，*S. intermedius* や *S. hyicus* subsp. *hyicus* が混在している可能性を否定した．

今回供試した 6 株の *S. intermedius* および 4 株の *S. hyicus* subsp. *hyicus* について，ブドウ球菌同定キット「ID-テスト・SP-18」を用いて同定を行ったところ，供試した全菌株が DNA-DNA ハイブリダイゼイションで同定された菌種に一致した．しかし，一部の菌株では，同定されたが，二つの菌種にまたがるような性状を示す

ものもあった.

謝 辞 本研究にあたり *Staphylococus intermedius* および *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* の貴重な菌株を御分与下さいました，米国，ノースカロライナ州立大学遺伝学部 Kloos 博士，並びに抗ヒツジ赤血球血清を御分与下さいました，東京慈恵会医科大学細菌学教室益田昭吾教授に深謝いたします。

（本研究の概要は日本食品衛生学会第45回学術講演会昭和58年5月で発表した.）

文 献

1) Zen-Yoji, H., Terayama, T. and Benoki, M.: *Japan. J. Microb.*, 5, 237, 1961
2) Hájek, V.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 26, 401, 1976
3) Devriese, L. A., Hájek, V., Oeding. P. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 28, 482, 1978
4) Lachica, R. V. F., Genigeorgis, C. and Hoeprich, P. D.: *Appl. Microbiol.*, 21, 585, 1971
5) Winblad, S. and Ericson, C.: *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B* 81, 150, 1973
6) Ushioda, H., Terayama, T., Sakai, S., *et al.*: *Zbl. Bakt. Suppl.* 10, 77, 1981
7) Igarashi, H., Morita, T. and Iwanaga, S.: *J. Biochem.*, 86, 1615, 1979
8) Kato, E., Kaji, Y. and Kaneko, K.: *Amer. J. Vet. Res.*, 39, 1771, 1978
9) Kaji, Y. and Kato, E.: *Jpn. J. Vet. Res.*, 28, 86, 1980
10) Fukuda, S., Tokuno, H., Ogawa, H., *et al*: *Zbl. Bakt. Hyg.* A 258, 360, 1984
11) Adesiyun, A. A.: *Vet. Microbiol.*, 9, 487, 1984
12) 善養寺 浩, 寺山 武, 潮田 弘他：食衛誌, 12, 311, 1971
13) 善養寺 浩, 寺山 武, 潮田 弘他：食衛誌, 12, 501, 1971
14) 寺山 武, 五十嵐英夫, 潮田 弘他：食衛誌, 13, 549, 1972
15) Gudding, R.: *J. Clin. Microbiol.*, 18, 1098, 1983
16) Kawano, J., Shimizu, A., Kimura, S., et al: *Zbl. Bakt. Hyg.*, I. Abt. Orig. A 253, 321, 1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 8-15, 1985

Campylobacter jejuni および *Campylobacter coli* の無機塩，有機酸ならびにアミノ酸の利用性について

高橋正樹*，伊藤　武*，斉藤香彦*，高野伊知郎*，
Viliami IKA**，大橋　誠*

Utilization of Inorganic Salts, Organic Acids and Amino Acids by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*

MASAKI TAKAHASHI*, TAKESHI ITOH*, KAHIKO SAITO*, ICHIRO TAKANO*,
VILIAMI IKA**and MAKOTO OHASHI*

Utilization of inorganic salts, organic acids and amino acids for the growth of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* was investigated under microaerophilic condition.

C. jejuni and *C. coli* could grow best in the presence of 0.08 M inorganic salts (NaCl, KCl, $MgCl_2$, $SrCl_2$), but not in their absence. As 0.16 M sucrose also supported the best growth of these organisms, it was suspected that the growth of *C. jejuni* and *C. coli* was dependent on osmolarity. It was interesting to note that in the presence of high concentration (0.4M) sucrose, *C. jejuni* could grow, but not *C. coli*.

C. jejuni and *C. coli* could utilize fumarate, lactate, malate, pyruvate and succinate among 11 organic acids tested as suitable energy source. On the other hand, among 17 amino acids, asparagine, aspartic acid, glutamic acid, proline and serine were served as energy source of these organisms. The results suggest that *C. jejuni* and *C. coli* obtain energy for the growth from the tricarboxylic acid cycle intermediates and compounds which could be easily introduced into this cycle.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, utilization, inorganic salt, organic acid, amino acid

緒　言

ヒト下痢症の原因菌として注目されている *Campylobacter jejuni* や *Campylobacter coli*[1-3]はサルモネラや腸炎ビブリオなどの従来の腸管系病原菌とは異なった発育態度や栄養要求が指摘されている．すなわち，本菌は好気および嫌気条件では発育せず，5～10%の低酸素条件下で発育する微好気性細菌であり[4-5]，この性質は本菌のエネルギー代謝に関与する酵素系がiron-sulfur-proteinを含むために，高濃度の酸素存在下ではauto-oxidationによる不活化を受け易く，また発育に必要なエネルギーの獲得方法が発酵ではなく酸化形式に限られているためであろうと考えられている[6-7]．しかも多くの細菌が炭水化物を分解・利用しているのに本菌は炭水化物を全く利用できないので[4-5]，本菌はアミノ酸や有機酸などから発育に必要なエネルギーを得ているものと考えられる．

ところが，アミノ酸や有機酸の利用性に関しては家畜の流産菌として知られている *Campylobacter fetus* についてAlexander[8]，Kiggins & Plastridge[9]，Lecce[10]，Zemjanis[11]，Smibert[12]らにより検討されたが，*C. jejuni* と *C. coli* の両菌種を対象にした栄養要求性の研究はほとんどみられない．

現在，著者らは *C. jejuni* や *C. coli* による食中毒の予防対策を講ずる上に必要な基礎的資料として，本菌の自然環境下での生存・増殖性あるいは自然界での本菌の分布調査を進めている．これまでに，生存性では *C. coli* は

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** Pathology Depertment, Vaiola Hospital, Tonga

C.jejuni に比して種々の環境条件下での抵抗性が弱く，またその分布においては，*C.jejuni* が家畜，家禽，野鳥などの腸管内に広く分布しているのに対して，*C.coli* はそのほとんどがブタ腸管内に限局して分布していることを明らかにしてきた[13-14]．

これらのことはその一因として，*C.jejuni* と *C.coli* における栄養要求性や増殖条件が異なるためと考える．

本報では，その手始めとして，*C.jejuni* と *C.coli* の栄養要求性について無機塩，有機酸ならびにアミノ酸を対象に検討したのでその成績について述べる．

材料および方法

供試菌株 本実験に供試した *C.jejuni* は東京都内で発生した集団下痢症由来の CF256株および散発下痢症由来の HP1475株であり，*C.coli* は散発下痢症由来の HP1451株，HP1488株を用いた．対照としては *C.fetus* subsp.*fetus* ATCC 27374および Harvey 博士より分与された C-4株を供試した．

培　地 無機塩利用性試験の基礎培地には無塩ペプトン水（ポリペプトン：大五栄養化学K.K. 1%，pH7.2）を用いた．検討した無機塩は塩化ナトリウム，塩化カリウム，塩化マグネシウム，塩化ストロンチウム(いずれも和光純薬 K.K.)の4種である．基礎培地にそれぞれの無機塩を所定の濃度に添加し，中試験管に 5 m*l* ずつ分注後 121℃15分間高圧滅菌した．

アミノ酸および有機酸利用性試験の基礎培地はペプトン水（ポリペプトン：0.2%，塩化ナトリウム：0.5%，pH7.2)を用いた．基礎培地には各種アミノ酸および有機酸をそれぞれ最終濃度0.05M に添加し，中試験管に 5 m*l* ずつ分注後115℃10分間高圧滅菌した．

供試したアミノ酸は，*l*—アラニン(和光)，*l*—アルギニン一塩酸塩(和光)，*l*—アスパラギン一水化物(和光)，*l*—アスパラギン酸カリウム塩(Sigma)，*l*—システイン塩酸塩（和光)，グリシン（和光)，グルタミン酸一ナトリウム塩(和光)，*l*—ヒスチジン(和光)，*l*—ロイシン(和光)，*l*—リジン一塩酸塩(和光)，*l*—メチオニン(和光)，*l*—オルニチン塩酸塩（和光)，*l*—フェニルアラニン（和光)，*l*—プロリン(和光)，*l*—セリン(和光)，*l*—スレオニン(和光)，*l*—バリン(和光)である．有機酸としては，酢酸ナトリウム，無水(和光)，クエン酸ナトリウム二水塩（和光)，蟻酸ナトリウム（関東化学)，フマル酸ナトリウム（和光)，乳酸ナトリウム（和光)，*l*—リンゴ酸ナトリウム（和光)，マレイン酸二ナトリウム塩，無水（和光)，粘液酸(関東化学)，ピルビン酸ナトリウム(和光)，コハク酸ナトリウム（和光)，酒石酸ナトリウム（和光）を用いた．

培養法 供試した *C.jejuni* および *C.coli* の各純培養菌を中試験管に 5 m*l* 分注した Brain Heart Infusion ブイヨン（BHI broth,Difco）に接種し，微好気用混合ガス（O_2 5%，$CO_2$10%，$N_2$85%）を噴入後ゴム栓を施した．接種菌液は37℃48時間培養して得た菌体を生理食塩水で3回洗浄し，生理食塩水に10^9個/m*l* になるよう浮遊させて調製した．この菌液を各試験用培地に0.05m*l* 接種し微好気ガスを噴入した後密栓して37℃48時間振盪培養を行った．菌の発育は分光光度計（島津ディジタルビーム分光光度計，UV—210，波長660nm）を用いて比濁度法によって測定した．

なお，アミノ酸の利用性については BHI broth 培養上清中のアミノ酸消費量からも検討を行った．すなわち，BHI broth で48時間培養した菌液を13,000rpm30分間遠心した後，この上清をミリポアフィルター（孔径，0.45 μ)で除菌した．さらに上清中の蛋白質を除くために，上清と等量の2%スルホサルチル酸を加え良く混和後室温で30分間反応させ，3,000rpm15分間遠心してその上清を被験液とした．測定はアミノ酸分析計(835形日立アミノ酸分析計）を用いて本菌未接種の BHI broth を対照に行った．

成　績

無機塩の利用性 *C.jejuni* および *C.coli* は1%ペプトン水のみでは全く発育できなかったが，無機塩の塩化ナトリウム，塩化カリウム，塩化マグネシウムおよび塩化ストロンチウムを添加することにより発育が認められた．

両菌種の各菌株とも，Fig.1.に示したごとく塩化ナトリウムおよび塩化カリウムの濃度が0.08M で最も顕著な発育を示し，それ以上濃度が高くなるにつれてその発育は抑制され，塩濃度0.4M ではほとんどの菌株の発育が完全に抑制された．一方，塩化マグネシウムおよび塩化ストロンチウムにおいても塩濃度0.08M で顕著な発育を示したが，両無機塩では0.24M で発育抑制が認められた．

これらの成績から，*C.jejuni* および *C.coli* は好塩性を有することを明らかにした．次に，その好塩性が Na^+，K^+，Mg^{2+}および Sr^{2+}イオンの必要性によるのか，あるいは無機塩の添加に伴なう浸透圧の増加に基づくかを明らかにするために，無機塩の代りに非電解質の蔗糖を用いて同様の検討を行った．その結果，Fig.2.に示したごとく，本菌は蔗糖存在下でも発育が可能であった．その至適発育濃度は0.16M であり，この値は塩化ナトリウム

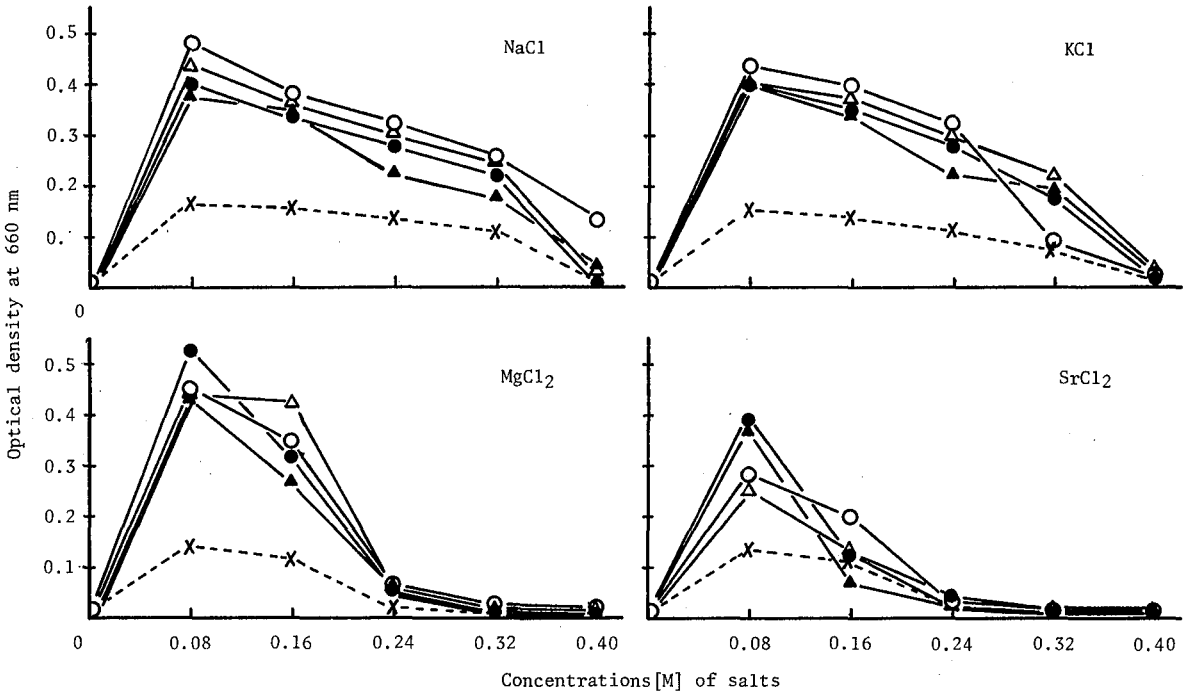


Fig. 1. Effect of Inorganic Salts on the Growth of *C. jejuni* and *C. coli*
○ : *C. jejuni* (CF256), △ : *C. jejuni* (HP1475), ● : *C. coli* (HP1451), ▲ : *C. coli* (HP1488),
× : *C. fetus* subsp. *fetus* (C-4) Basal medium : 1.0% peptone water (pH 7.2)

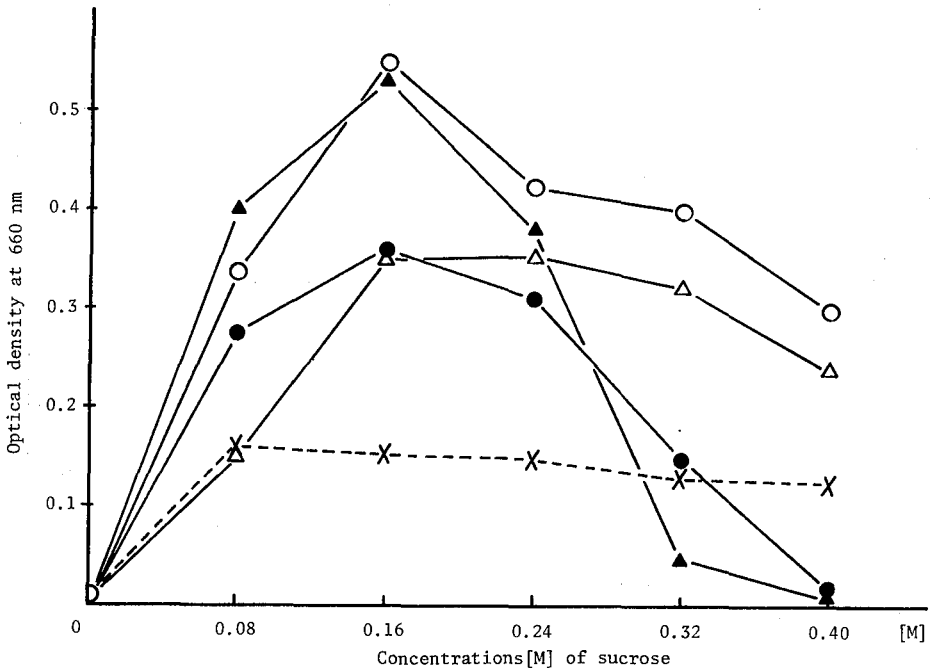


Fig. 2. Effect of Sucrose on the Growth *C. jejuni* and *C. coli*
○ : *C. jejuni* (CF256), △ : *C. jejuni* (HP1475), ● : *C. coli* (HP1451),
▲ : *C. coli* (HP1488), × : *C. fetus* subsp. *fetus* (C-4)

および塩化カリウムの至適濃度（0.08M）の2倍であった．蔗糖濃度0.16Mの浸透圧濃度は塩化ナトリウムおよび塩化カリウムの0.08Mにほぼ相当していることから *C. jejuni* や *C. coli* の発育は浸透圧にも依存していると考える．また Fig.2. で明らかのように，蔗糖濃度が0.4Mでは *C. jejuni* の発育は多少抑制される程度であるが，*C. coli* はこの濃度でほとんど発育できなかった．この点をさらに確認するために，散発下痢症由来の *C. jejuni* および *C. coli* それぞれ10菌株を用いて，蔗糖濃度0.4～0.6Mにおける発育態度を比較検討した．その結果，10菌株の *C. jejuni* は0.55Mでもすべて発育したが，*C. coli* は10菌株とも発育が抑制された．すなわち，*C. jejuni* と *C. coli* は浸透圧に対して抵抗性が異なるものと考えられる．なお，*C. fetus* subsp. *fetus* は発育濃度はやや低かったものの各無機塩に対して *C. jejuni* および *C. coli* と同様の発育態度を示した．

蔗糖に対しては0.4Mでも *C. jejuni* と同様に発育が認められ浸透圧に抵抗性を示した．

有機酸の利用性　有機酸利用性試験は塩化ナトリウムを最適な濃度である0.5%（≒0.08M）添加したペプトン水を基礎培地に用いた．Table 1.に示したごとく，*C. jejuni* および *C. coli* はフマル酸，乳酸，リンゴ酸，ピルビン酸，コハク酸を利用したが，酢酸，クエン酸，酒石酸は利用しなかった．これに対して，*C. fetus* subsp. *fetus* はリンゴ酸，コハク酸を利用し，2菌株中1菌株はフマル酸の利用性も示した．しかし，2菌株とも乳酸，ピル

Table 1. Stimulatory Effect of Various Organic Acids on the Growth of *C. jejuni* and *C. coli*

Organic acids	Turbidity (660 nm)					
	C. jejuni		*C. coli*		*C. fetus* subsp. *fetus*	
	CF256	HP1475	HP1451	HP1488	ATCC 27374	C-4
Acetate	−*	−	−	−	−	−
Citrate	−	−	−	−	−	−
Formate	−	−	−	±	−	−
Fumarate	+	±	+	+	+	−
Lactate	+	±	+++	++	−	−
Malate	+	++	+	+	+	±
Maleate	−	−	−	−	±	−
Mucate	−	−	−	−	−	−
Pyruvate	+	−	+++	+	−	−
Succinate	+	+	++	++	+	+
Tartrate	−	−	−	−	−	−

*−：<0.05 O.D.，±：0.05-0.1 O.D.，+：0.1-0.2 O.D.，++：0.2-0.3 O.D.，+++：>0.3 O.D.

Table 2. Stimulatory Effect of Various Amino Acids on the Growth of *C. jejuni* and *C. coli*

Amino acids	Turbidity (660 nm)					
	C. jejuni		*C. coli*		*C. fetus* subsp. *fetus*	
	CF256	HP1475	HP1451	HP1488	ATCC 27374	C-4
Asparagine	±*	±	+	±	++	−
Aspartic acid	−	+	−	±	+	−
Glutamic acid	+	++	+++	+++	++	±
Proline	+	+	±	+++	++	+
Serine	±	±	−	++	−	−
Other amino acids (12)**	−	−	−	−	−	−

*　−：<0.05 O.D.，±：0.05-0.1 O.D.，+：0.1-0.2 O.D.，++：0.2-0.3 O.D.，+++：>0.3 O.D.

** Alanine, Arginine, Cystein, Glycine, Histidine, Leucine, Lysine, Methionine, Ornithine, Phenylalanine, Threonine, Valine

ビン酸は利用しなかった.

アミノ酸の利用性 有機酸利用性試験と同一の基礎培地を用いて，17種類のアミノ酸についてその利用性を検討した.（Table 2.）*C.jejuni*，*C.coli* および *C.fetus* subsp. *fetus* の3菌種によるアミノ酸利用性には顕著な差異は認められなかった．利用されたアミノ酸はアスパラギン，アスパラギン酸，グルタミン酸，プロリンおよびセリンで，このうちグルタミン酸とプロリンは供試菌株すべてが利用性陽性であった．アスパラギン，アスパラギン酸およびセリンでは供試菌株により利用性陰性の場合もあり，菌株による差異が示唆された．その他アラニン，アルギニン，システイン，グリシン，ヒスチジン，ロイシン，リジン，メチオニン，オルニチン，フェニルアラニン，スレオニンおよびバリンの12種のアミノ酸は *C.jejuni*，*C.coli* および *C.fetus* subsp. *fetus* とも全く利用しなかった.

上記の成績はアミノ酸の利用性を本菌の発育促進効果を指標として検討したものであるが，この方法では把握できないアミノ酸の利用性も考えられる．そこで，この点を明らかにするために，培地中のアミノ酸消費量を測定する方法によっても検討を加えた.

本実験では先の実験の基礎培地に用いたポリペプトンよりも数多くのアミノ酸を含有する培地を用いた方が，その利用性をより詳細に把握できると考えたのでここではBHI brothを用いた．培養液中のアミノ酸消費量はアミノ酸分析計により培地中に残存したアミノ酸量より換算した．Table 3.に各アミノ酸の消費量を%で示し，Fig.3.にはアミノ酸分析計で測定したチャートの差異のある部分のみを示した．またプロリンについては異なる波長（440nm）で測定するため本チャートでは省略した.

上記の発育濁度で検討した成績と同様にアスパラギン，アスパラギン酸，グルタミン酸，プロリンおよびセリンの5種類のアミノ酸を消費した．特にアスパラギンとアスパラギン酸，セリンではそのすべてないしほとんどが消費された．グルタミン酸とプロリンは *C.jejuni* と比して *C.coli* に消費量の高い傾向が認められた．*C.fetus* subsp. *fetus* は *C.jejuni* と *C.coli* とほぼ同様の成績を示したが，セリンに関してはその消費量が極めて少なかった。またグルタミン酸，プロリンにおいては菌株によって消費量に差異のある傾向が認められた.

考　察

Campylobacter 属は炭水化物を酸化的にも発酵的にも全く利用しないことから，アミノ酸や有機酸より発育に必要なエネルギーを得ていると推察されていた[8]．すでに1957年，Alexander[8]は基礎培地にHeart Infusionブイヨンを用いて，*C.fetus* を対象にTCA cycle系の有機酸を中心に検討を加えており，フマル酸，乳酸，リンゴ酸，コハク酸およびピルビン酸の利用性が高いことを報告している．著者らは *C.jejuni* と *C.coli* の有機酸の利用性をペプトン水を基礎培地にして検討したところ，*C.jejuni* と *C.coli* の両菌種とも有機酸利用性は同じ態度を示した．両菌種はAlexanderの成績と同一の有機酸を利用しているが，*C.fetus* subsp. *fetus* では乳酸やピルビン酸を利用しなかった．このことは菌株による差異も考慮しなければならないのでさらに多数の菌株について検討する必要があろう．一方，Alexanderは前述の発育試験とは別に，基質に濃厚菌液を接種しマノメーター法で酸

Table 3. Utilization of amino acids by *C. jejuni* and *C. coli* growing in BHI broth

Amino acids	Consumption (%) of amino acids					
	C. jejuni		*C. coli*		*C. fetus* subsp. *fetus*	
	CF256	HP1475	HP1451	HP1488	ATCC 27374	C-4
Asparagine	100.0*	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Aspartic acid	95.8	93.7	94.8	93.7	93.7	89.3
Glutamic acid	32.7	16.6	40.1	46.5	61.8	97.2
Proline	21.1	7.9	50.0	63.2	76.3	13.2
Serine	96.7	96.7	97.8	96.7	10.0	12.2
Other amino acids(12)**	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

* Determined by amino acid autoanalyzer

** See Table 2.

Incubation time 2 days

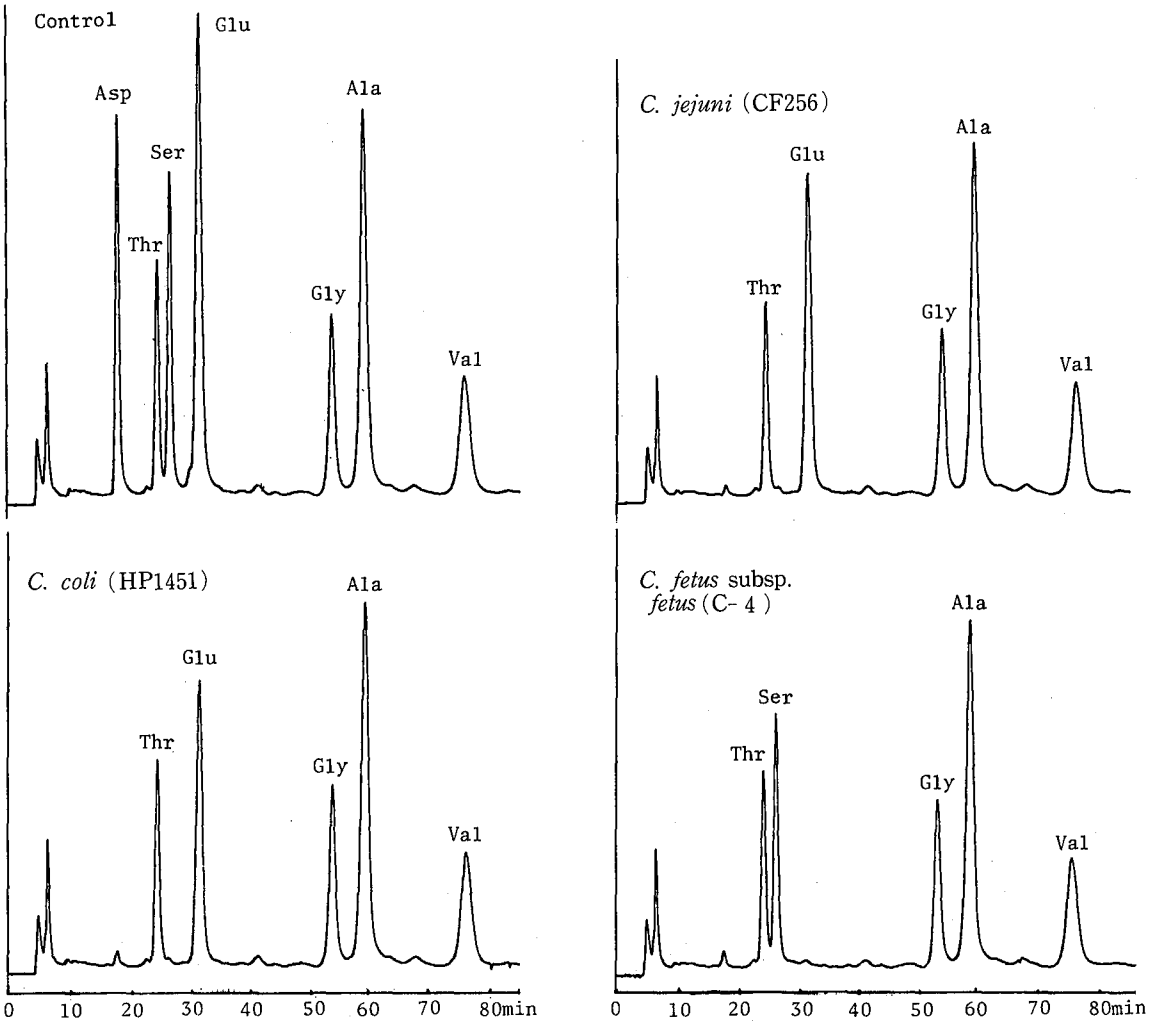


Fig. 3. Residual Amino Acids Pattern Accoding to Growth of *C. jejuni, C. coli* and *C. fetus* subsp. *fetus* in BHI Broth
Asp : Aspartic acid, Thr : Threonine, Ser : Serine, Glu : Glutamic acid, Gly : Glycine, Ala : Alanine, Val : Valine

素消費量から基質の利用性を検討している.

発育試験法では利用されなかったイソクエン酸も本法では利用されることを示しており, またKiggins & Plastridge[9]らも濃厚菌液の抽出液と基質との反応によってクエン酸, シスアコニット酸, イソクエン酸の利用性を認めている. これらの成績より, *C. jejuni* と *C. coli* においても *C. fetus* と同様にその発育には細胞壁を通過し得るTCA cycle系の中間代謝物質あるいはその系に入り易い有機酸が利用されるものと考えられる.

Alexander[8], Zemjanis ら[11]の *C. fetus* を対象にアミノ酸の利用性を検討した成績ではアスパラギン, アスパラギン酸, グルタミン酸, セリンおよびプロリンの利用性が示されている. またKiggins & Plastridge[9]の基質に濃厚菌液を接種して検討した成績でも同様のアミノ酸の利用性が示されているが, これらのアミノ酸の他にシステインの利用性も認められている. 著者らが検討した *C. jejuni* と *C. coli* のアミノ酸利用性ではアスパラギン, アスパラギン酸, グルタミン酸, プロリンおよびセリンが利用されている. この成績はAlexanderらが検討した *C. fetus* による成績とほぼ同一であって, *C. jejuni*

および *C.coli* においても有機酸の場合と同様に代謝系に入り易いアミノ酸が利用されることを示唆するものであろう.

アミノ酸利用性については発育試験の他に BHI broth 中のアミノ酸消費量をアミノ酸分析計で測定した. 発育試験では, *C.jejuni* および *C.coli* はアスパラギン, アスパラギン酸およびセリンの利用性は顕著ではなかった. しかし37℃ 2 日間培養した BHI broth 中の消費量からみるとアスパラギン, アスパラギン酸は 3 菌種ともほとんど消費したのに対して, セリンは *C.jejuni* と *C.coli* は極めて良く消費しているが, *C.fetus* subsp.*fetus* はほとんど消費しなかった.

これらのことから, アミノ酸の豊富な培養条件下ではその利用性に異なる代謝過程が働いていることが示唆される. また, セリンにおいては菌種間のアミノ酸利用性の差異を示しているものと考える。

C.jejuni や *C.coli* は塩化ナトリウムなどの無機塩を含まない培地では発育しないが, それらを一定濃度含む培地では発育することから本菌は好塩性を有し, しかも蔗糖の添加によっても同様の発育を示したことからその好塩性は浸透圧に基づくことが示唆された. Doyle ら[15] も *C.jejuni* を対象に塩化ナトリウムの各種濃度における発育態度を検討し, その至適発育濃度は本報の成績と一致した0.5%(≒0.08M)であることを報告しているが, それが浸透圧に基づくことは明らかにしていない.

C.coli は *C.jejuni* と比し高い蔗糖濃度で発育できないので両菌種間には浸透圧に対する抵抗性に差異があると考えられる. このことは, 伊藤ら[13]が指摘しているように, 食品中や河川水などの種々の環境条件下において, *C.coli* が *C.jejuni* と比し生残期間の短かいことの一因となっているものと考える.

細菌による物質の利用性を検討するには化学的合成培地を用いる方がより確実な成績が得られるものと考える.

合成培地については *C.fetus* についての報告があるが[12,16-17], いずれも種々のアミノ酸, 有機酸, 無機塩, ビタミン, ヌクレオチドなどが含まれ極めて複雑な組成となっている。そこで簡易な組成の合成培地を考案するために, 本実験で利用性を示したアミノ酸, 有機酸および無機塩を用いて検討を行っている. これまでのところ, それらの組み合わせだけでは *C.jejuni* と *C.coli* の発育は認められないが, チオ硫酸ナトリウムを添加するとアミノ酸および無機塩からなる簡易な組成の培地でも本菌が発育することを確認している. ただし, その発育態度についてみると, *C.coli* は *C.jejuni* と比し極めて顕著な発育を示している. このことは *C.coli* が栄養要求性における発育条件に適応性が高いことによるのか, あるいは *C.jejuni* には他の発育因子の存在を必要とすることが考えられ, さらに検討を進めている.

結　論

C.jejuni および *C.coli* によるアミノ酸, 有機酸および無機塩の利用性について検討したところ, 以下の成績を得た.

無機塩の利用性：*C.jejuni* および *C.coli* は 1 %ペプトン水のみでは発育できないが, 本培地に無機塩を添加することにより発育が認められ好塩性を有することを明らかにした. 塩化ナトリウム, 塩化カリウム, 塩化マグネシウムおよび塩化ストロンチウムの至適発育濃度は 0.08M であり, このうち塩化ナトリウムと塩化カリウムでは塩濃度0.4M において, 本菌の発育が抑制された. これに対して塩化マグネシウム, 塩化ストロンチウムでは 0.24M ですでに発育の抑制が認められた.

無機塩の代りに蔗糖を用いても同様の発育を示したことから本菌の好塩性は透浸圧に基づくことが明らかとなった. また, 蔗糖濃度0.55M では *C.jejuni* は発育するが *C.coli* は発育を示さなかったので, 両菌種間には浸透圧に対する抵抗性に差異のあることが示唆された.

有機酸およびアミノ酸の利用性：基礎培地にペプトン水を用いて11種類の有機酸についてその利用性を検討したところ, *C.jejuni* および *C.coli* はフマル酸, 乳酸, リンゴ酸, ピルビン酸ならびにコハク酸を利用したが, これに対して酢酸, クエン酸, 蟻酸, マレイン酸, 粘液酸および酒石酸は利用しなかった.

アミノ酸では17種類のうち利用性を示したのはアスパラギン, アスパラギン酸, グルタミン酸, プロリン, セリンの 5 種類でその他のアラニン, アルギニン, システイン, グリシン, ヒスチジン, ロイシン, リジン, メチオニン, オルニチン, フェニルアラニン, スレオニンおよびバリンの12種類は利用性されなかった. これらの成績から, 本菌においては有機酸, アミノ酸の中でも TCA cycle 系の中間代謝物質もしくはこの系に入り易いアミノ酸の利用性が高いことが示唆された. しかし, *C.jejuni* と *C.coli* の両菌種間にはそれらの利用性において差異は認められなかった.

文　献

1) Butzler, J.P.& Skirrow, M.B.: *Clin.Gastroenterol.*, 737, 1979, W.B.Saunder, London
2) 深見トシエ, 鴻巣晶子, 彦坂恵子, 柏真知子, 右田

琢生, 西川慶繁, 村田三紗子, 今川八束, 斉藤 誠：感染症誌, 58, 613, 1984
3) 伊藤 武, 斉藤香彦, 柳川義勢, 甲斐明美, 高橋正樹, 稲葉美佐子, 高野伊知郎, 坂井千三, 大橋 誠：感染症誌, 57, 576, 1983
4) Véron, M. and Chatelain, R.：*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 23, 122, 1973
5) Smibert, R.M.：*Ann. Rev. Microbiol.*, 32, 674, 1978
6) Harvey, S. and Lascelles, J.：*J. Bacteriol.*, 144, 917, 1980
7) Carlone, G.M. and Lascelles, J.：*J. Bacteriol.*, 152, 306, 1982
8) Alexander, J.K.：*J. Bacteriol.*, 74, 168, 1957
9) Kiggins, E.M. and Plastridge, W.N.：*J. Bacteriol.*, 75, 205, 1958
10) Lecce, J.G.：*J. Bacteriol.*, 76, 312, 1958
11) Zemjanis, R. and Hoyt, H.H.：*Am. J. Vet. Res.*, 21, 1109, 1960
12) Smibert, R.M.：*J. Bacteriol.*, 85, 394, 1963
13) 伊藤 武, 斉藤香彦, 高橋正樹, 坂井千三：日本細菌学雑誌, 38, 337, 1983
14) Itoh, T., Saito, K., Yanagawa, Y., Sakai, S. & Ohashi, M.：*Campylobacter*, 5, 1982, MTP press, Lancaster
15) Doyle, M.P. and Roman, D.J.：*Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 561, 1982
16) Fletcher, R.D. and Plastridge, W.N.：*J. Bacteriol.*, 85, 992, 1963
17) Tritz, G.J. and Ogg, J.E.：*Am. J. Vet. Res.*, 28, 115, 1967

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 16-22, 1985

Cytotoxin を産生する *Escherichia coli* O145:H－による集団食中毒の細菌学的・疫学的検討

伊藤　武*, 甲斐明美*, 斉藤香彦*, 柳川義勢*, 稲葉美佐子*, 高橋正樹*, 高野伊知郎*, 松下　秀*, 工藤泰雄*, 寺山　武*, 大橋誠*, 唐木一守**, 山下征洋**, 池上重明**, 佐藤穂積**, 関　友次**, 加藤喜市**, 弘岡淑夫**, 山田幸正**, 秋山　博**, 大関哲也**, 大芝　豊**, 山之内　淳***, 土谷啓文***, 綱川敏夫***, 田崎達明***

Epidemiological and Laboratory Investigation on An Outbreak of Acute Enteritis Associated with Cytotoxin-producing *Escherichia coli* O145:H－

TAKESHI ITOH*, AKEMI KAI*, KAHIKO SAITO*, YOSHITOKI YANAGAWA*, MISAKO INABA*, MASAKI TAKAHASHI*, ICHIRO TAKANO*, SHIGERU MATSUSHITA*, YASUO KUDOH*, TAKESHI TERAYAMA*, MAKOTO OHASHI*, KAZUMORI KARAKI**, HIROYUKI YAMASHITA**, SHIGEAKI IKENOUE**, HOZUMI SATOH**, TOMOTSUGU SEKI**, KIICHI KATOH**, YOSHIO HIROOKA**, MASAYUKI YAMADA**, HIROSHI AKIYAMA**, TETSUYA OHZEKI**, YUTAKA OHSHIBA**, JUN YAMANOUCHI***, HIROHUMI TSUCHITANI***, TOSHIO TSUNAKAWA***, TATSUAKI TAZAKI***

An outbreak of acute enteritis due to *Escherichia coli* O145:H－ involving a total of 100 (9.8%) out of 1,023 students occurred at an elementary school in Tokyo during the period from May 30 through june 7, 1984.

The major clinical symptoms observed among the patients were abdominal pain (94%), diarrhea (80%), fever (30%), headache (22%), nausea (14%) and vomiting (12%). *E. coli* O145:H－ organism was isolated in the state of pure culture on DHL agar plate from fecal specimens of 78 (82.1%) out of 95 patients. The detection rate of the organgsm from asymptomatic students and teaching staffs of the school was 50.7%. These results strongly indicated the organism to be the cause of illness. The food responsible to the outbreak of the disease could not be pointed out epidemiologically.

The isolates were not able to produce either heat-labile (LT) or heat-stable enterotoxin (ST) in vitro, and gave no positive reaction to Serény's test. However, their culture filtrate from BHI broth caused the fluid accumlation in ligated segments of rabbit ileum, and was lethal for mice. The culture filtrate also caused degenerative changes of Vero, FL and EHp-2 cells, but did not affect HeLa, Y-1 or CHO cells. It was assumed that the cytotoxity in the culture filtrate of *E. coli* O145:H－may have been a factor to cause diarrhea.

Keywords: *Escherichia coli*, cytotoxin, diarrhea, outbreak, enteritis

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都小平保健所
*** 東京都衛生局環境衛生部食品衛生課

緒　言

大腸菌が下痢症の原因菌となることは古くから知られていたが，最近本菌の感染機序に関する研究の進展により，腸炎起病性大腸菌は，腸管毒素を産生する毒素原性大腸菌（ETEC），組織侵入性大腸菌（EIEC）および腸管病原性大腸菌（EPEC）の3つのカテゴリーに区別されている[1]。東京都内で発生した大腸菌食中毒では毒素原性大腸菌による例が多数認められることを工藤ら[2]は明らかにしている。1984年に東京都内で発生した事件でも，4例が毒素原性大腸菌，1例が腸管病原性大腸菌によるものであった。

この他に，1例は現在までに下痢症起因菌として報告されていない新しい血清型の大腸菌O145:H－によるものと推定された。本食中毒の原因と推定した*E. coli* O145:H－は，易熱性毒素（LT）や耐熱性毒素（ST）を産生しないことより毒素原性大腸菌に該当せず，また組織侵入性も認められなかった。しかし，本菌はO'Brienら[3,4]が報告している*E. coli* O26，O103あるいはO157が産生するShiga-like toxinに類似した生物活性を示した。すなわち，*E. coli* O145:H－の培養上清にはVero細胞などに対する細胞毒性やマウス致死毒性，およびウサギ結紮腸管ループ反応が認められるなどの興味ある知見が得られた。

本報では，本菌による集団食中毒例の発生状況と細菌学的検査成績についてその詳細を報告する。

被検材料および方法

1．被検材料

発病初期の学童ふん便95件，非発症学童ふん便995件および教職員ふん便44件の合計1,039件を採取し，原因物質の検査に供した。また，原因食品や汚染経路を検討するために6月4日，5日に給食に供した検食8検体，給食施設の調理器具・器材の拭取り35件，水道水14件および地中の水道管配管部付近の泥土2件を採取した。

2．腸炎起病性病原菌の検索方法

赤痢菌，サルモネラ，腸炎ビブリオおよびその他の病原ビブリオ，腸炎起病性大腸菌，カンピロバクター，ウェルシュ菌，エロモナス，プレジオモナス，セレウス，黄色ブドウ球菌などの病原菌を対象に，SS寒天，DHL寒天，ビブリオ寒天，TCBS寒天，卵黄加マンニット食塩寒天，MYP寒天，カナマイシン加CW寒天，スキローの血液寒天の各分離用培地，および塩化ストロンチウム培地，アルカリペプトン水，3％食塩加ペプトン水，TGC培地，CEM培地などの増菌培地を用いた。なお，大腸菌の検索はDHL寒天平板を用いて行い，1件につき5集落をTSI寒天およびLIM培地に培養して一次確認培養を行った。その同定はCowanら[5]およびEdwardら[6]の記載に従った。

3．大腸菌の血清型別

大腸菌の血清型別は，普通寒天斜面培養菌を用いて市販の病原大腸菌診断用血清（デンカ生研）および著者らが作成したO1～O171の抗O因子血清を用いたスライド凝集反応により行った。またO抗原の確認は定量凝集反応によった。

4．薬剤感受性試験

分離菌株の薬剤感受性は，Ampicillin，Chloramphenicol，Tetracycline，Streptomycin，Kanamycin，ST合剤（Sulfamethoxazole＋Trimethoprim）の6剤について，Müller-Hinton寒天を用いた寒天平板希釈法によった。最小発育阻止濃度（Minimal inhibitory concentration）は，試験菌を10^6個/m*l*に調整した菌液を薬剤含有寒天平板上に1スポット接種し，37℃，18～20時間培養後，その発育の有無により求めた。

5．大腸菌のエンテロトキシンならびにその他の生物活性試験

1）LTおよびST産生試験：松下ら[7]の記載に従い，CAYE-2培地で37℃，1日間培養した培養上清について検討した。LT産生試験はCHO細胞法および逆受身ラテックス凝集反応（RPLA：デンカ生研）で，ST試験は乳飲みマウス法によった。

2）組織侵入性試験：Pennassay寒天平板37℃1日培養菌を用いて，モルモット眼接種法により行った[8]。

3）腸管結紮ループ試験：Deら[9]の方法に従い，ウサギ腸管ループを用いて行った。試験菌をBrain heart infusion（BHI）で37℃，20～24時間振とう培養後遠心によって集めた菌体，およびその遠心上清をメンブランフィルター（0.45μm）でろ過したもの，そして本ろ液を60℃，30分および80℃，10分加熱処理したものをそれぞれ試験に供した。本試料をウサギの小腸部に0.5m*l*接種後，4時間，8時間，16時間後に開腹して浸出液量を測定した。

4）マウス致死試験：上記培養ろ液の0.1m*l*をマウス尾静脈に，あるいは0.5m*l*を腹腔内に投与し，マウスの死亡の有無を観察した。

5）皮膚毛細血管透過性（PF）試験：上記培養ろ液について常法によりモルモットを用いて，その0.05m*l*を皮内に接種した。4時間および20時間後にそれぞれエバンス・ブルーを静脈内に投与し，出現した青色斑の反応の有無を観察した。

6) **培養細胞に対する形態変化試験**：FL, HEp-2, BGM, MDCK, Vero, HeLa, CHO, Y-1, GMC, E6, L929の各培養細胞に，試験菌のBHIブイヨン，37℃ 20～24時間培養した遠心上清をろ過滅菌後接種し，37℃の炭酸ガスふらん器中で培養した．接種後1日，2日，3日後に各細胞の形態変化を観察した．

成　績

1．発生状況

1984年5月30日～6月7日にかけて東京都内の某小学校において学童1,023名中100名（発病率9.8%）が急性胃腸炎症状を呈した．

日別の患者発生状況を，Fig. 1に示した．5月30日に1名の初発患者がみられ，以降漸次増加し6月4日に32名の患者発生をみ，これをピークにして以降減少し，6月7日に3名の発生で本流行は終息した．9日間にわたる長期間の流行であったが，一峰性の発生状況から単一暴露による流行と推定された．

患者は1年生から6年生までの全学年に認められた．発病率は，1年生 13.0%，2年生 13.3%，3年生 11.3%，4年生 8.5%，5年生 4.7%，6年生 6.4%と低学年ほど高い傾向であったが，特定のクラスに片寄る傾向は認められなかった．また，保健所の調査では教職員の間に発病者はみられなかった．

患者の主症状はTable 1に示したように，腹痛(94%)，下痢(80%)，発熱(30%)であった．便性状は，29名(48%)が水様便，18名（30%）が粘液便，11名（18%）が血便，2名（3%）が軟便であった．1日の下痢の回数は，調査し得た63名中，1～3回が26名，4～6回が21名，7回以上が16名であった．発熱のあった30名中20名は37.0～37.7℃とそれ程高いものではなかった。39℃以上の高熱者はわずか2名に過ぎなかった．患者100名中，85名が受診し，内3名が入院した．予後は良好であり，死亡者は認められなかった．

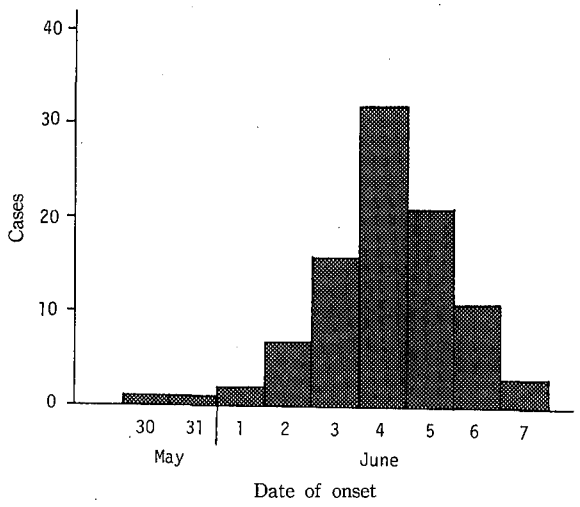


Fig. 1. Date of Onset of Illness in Patients

2．原因食品

近隣の家庭や学校から類似の患者発生を認めないことより，当小学校の所在する地域での流行ではなく，小学校での給食が原因と推定された．本小学校では栄養士1名，調理従事者6名が，月曜日から金曜日まで学校給食を用意していた．患者発生がみられた3日前の5月27日（日曜日）に運動会が開催され，翌28日（月曜日）が代休であったため，26日の土曜日から28日までは給食を提供していなかった．疫学調査や後述する細菌学的検査成績からは原因食品を明確にすることができなかった．

当小学校では，飲料水に給水配管が本管に直結された水道水を用いていた．地中配管は末端給水栓までの距離が長く，複雑に迂回して老朽化していた．そのため，水系感染も考慮したが，後述する飲料水の細菌学的検査からは本流行例と飲料水の関連を明確にすることはできなかった．

3．病原菌の検索

1) ふん便からの病原菌検索

発病者ふん便95件および非発病者ふん便944件の合計1,039件を対象に病原菌の検索を行った．その結果，赤痢菌やサルモネラ，カンピロバクターをはじめとして，その他本集団例と関連づけられるような既知病原菌は検出

Table 1. Main Clinical Symptoms of the Patients Involved in the Outbreak

Symptoms	No. of cases(%)
Abdominal pain	94(94)
Diarrhea	80(80)
3 times or less per day	26
4-6 times	21
7 times or more	16
Unknown	17
Fever	30(30)
37.0-37.9℃	20
38.0-38.9℃	6
39.0℃ or higher	2
Unknown	2
Headache	22(22)
Nausea	14(14)
Vomiting	12(12)

Number of patients : 100

Table 2. Results of Bacteriological Examination of the Fecal Specimens

Subject	No. of persons examined	No. of positives for *E. coli* O 145 : H-	Note
Students : Ill	95	78 (82.1%)	
Not ill	900	469 (52.1%)	*C. jejuni* (1) *Salmonella* (1)
Staff members : Not ill	44	12 (27.3%)	
Total	1,039	559 (53.8%)	

されなかった．また，ロタウィルスなどの病原ウィルスも陰性であった．しかし，発病者ふん便95件中78件(82%)から同一性状を示す大腸菌がDHL寒天平板上に純培養状に検出された．本菌は従来までに下痢症の原因菌としての報告例がまったくない新しい血清型の*E. coli* O145:H－と同定された．Table 2に示すごとく，学童のうち非発病者のふん便900件中469件（52%）からも患者と同一の*E. coli*O145:H－が検出され，また発病者のみられなかった教職員ふん便44件中12件（27%）からも同一血清型菌が検出された．このことより，本小学校で提供した食品あるいは飲料水のいずれかが*E. coli* O145:H－で高範囲に汚染されていたものと考えられた．

検出した*E. coli* O145:H－が原因と推定されたので，発病者の腸管内での本菌の増殖を推定するためにふん便中の当該菌の菌数を測定した．3～4病日のふん便10件について検討したところ，ふん便1·g当たり10^5～10^9個，平均3.0×10^8個の*E. coli* O145:H－が検出された．

2) 食品，飲料水および調理器具・器材からの病原菌検出

本集団例の保健所への届けが6月5日であったため，調査を実施した時点では6月4日と6月5日の給食の検食が保管されていたに過ぎなかった．両日の食品8件からは*E. coli* O145:H－ならびにその他の病原菌はまったく検出されなかった．

従業員の手指や調理器具・器材の拭き取り35件からも*E. coli* O145:H－は検出されなかった．

6月5日に当小学校の調理室ならびに3階水飲み場で採取した飲料水の細菌学的検査では，一般生菌や大腸菌群はいずれも陰性で，該菌の汚染も認められなかった．なお，両飲料水の残留塩素は0.2ppmと低い値であった．

当学校の水道水の配管が複雑であったこと，および5月29日の休校日に水道の漏水工事が実施されていたので，6月12日再度確認のため飲料水を6件採取し，検査を行った．この飲料水からも一般生菌や大腸菌および*E. coli* O145:H－は検出されなかった．ただし，本飲料水

Table 3. Biochemical Characteristics of *E. coli* O145:H－Isolates

Test or substrate	Isolates		E1385(3)*
Indole	+	(10/10)**	+
Voges-Proskauer	−	(0/10)	−
H_2S (TSI)	−	(0/10)	−
Nitrate reduction	+	(10/10)	+
Urease, Christensen's	−	(0/10)	−
Citrate, Simmons'	−	(0/10)	−
Citrate, Christensen's	$+^2$	(10/10)	$+^2$
Acetate	+	(10/10)	$+^3$
Malonate	−	(0/10)	−
Gelatin	−	(0/10)	−
Lysine decarboxylase	+	(10/10)	+
Ornithine decarboxylase	−	(0/10)	−
Arginine dihydrolase	−	(0/10)	−
Glucose／gas	+/+	(10/10)	+/+
Lactose	+	(10/10)	+
Sucrose	−	(0/10)	−
Mannitol	+	(10/10)	+
Dulcitol	−	(0/10)	−
Xylose	+	(10/10)	+
Adonitol	−	(0/10)	−
Rhamnose	+	(10/10)	+
Inositol	−	(0/10)	−
Raffinose	−	(0/10)	−
Salicin	−	(0/10)	−
Sorbitol	+	(10/10)	+
Sorbose	−	(0/10)	−
Maltose	+	(10/10)	+
KCN	−	(0/10)	−
Cytochrome oxidase	−	(0/10)	−
Motility (37℃)	−	(0/10)	−
Haemolysis	−	(0/10)	−

*, Test strain for *E. coli* O145 antigen; **, +=positive after 1 day, $+^2$=positive after 2 days, $+^3$=positive after 3 days, −=negative after 14 days
( )=the number of positive strains/No. tested

Table 4. Biological Assay for *E. coli* O145:H−Isolates

Test	Culture filtrate	
	Reaction	No. of positives / No. of strains tested
Enterotoxic activity		
Rabbit ligated ileal loop	+	5/ 5
PF(Guinea pig skin)	−	0/ 5
CHO cells	−	0/10
RPLA(anti-CT)	−	0/10
Infant mouse(intragastric)	−	0/10
Serény's test(Guinea pig eye)	−	0/10
Lethality(Mouse, i.v. or i.p.)	+	10/10
Cytotoxicity*	+	10/10
Hemolysis		
Horse blood agar	−	0/10
Sheep blood agar	−	0/10
Protease(Skim milk agar)	−	0/10

* Cytotoxic to ; FL, HEp-2, BGM, MDCK and Vero cells

の残留塩素はオルトトリジン法では検出されなかった．水道の漏水工事を行った部位の地中配管部より病原菌が侵入した可能性も推定されたので，6月18日に配管部付近の泥土7件を採取して検査を行った．しかし，本土壌からも *E. coli* O145:H−は検出されなかった．

4．*E. coli* O145:H−株の生化学的性状

患者ふん便から検出された *E. coli* O145 該当の10菌株の詳細な生化学的性状を Table 3 に示した．分離株は乳糖分解，白糖非分解，インドール陽性，リジン陽性，VP 反応陰性の典型的な大腸菌であった．ただし，運動性は陰性であった．本分離株は，*E. coli* O145 のリファレンス株とまったく同一の生化学的性状を示した．

5．*E. coli* O145:H−株の薬剤感受性

上記の生化学的性状を検討した10菌株について各種薬剤の感受性を調べた．供試菌株10菌株は，Ampicillin, Chloramphenicol, Tetracycline, Streptomycin, Kanamycin に対する MIC が100μg/ml 以上であり，上記5剤に対して耐性であった．10菌株の ST 合剤（sulfamethoxazole＋Trimethoprim）に対する MIC はすべて3.12μg/ml であった．すなわち，本食中毒例より分離した *E. coli* O145:H−はそれぞれ同一生化学的性状を示すとともに，同一の薬剤感受性パターンを示した．

6．*E. coli* O145:H−株の生物学的活性

患者由来の *E. coli* O145:H−株を用いてその生物学的活性を検討した成績を Table 4 にまとめた．分離菌株10菌株について従来から知られている LT および ST を検討した結果，両毒素とも陰性であった．また，モルモットによる Serény 試験やモルモット皮膚毛細血管透過性試験も陰性であった．

馬血液寒天や羊血液寒天での溶血能は認められなかったし，牛乳寒天でのプロテアーゼの産生もなかった．

しかし，2菌株の BHI ブイヨン培養菌あるいはその培養上清をウサギ腸管結紮ループ試験に供した結果，いずれの菌株でも液体貯留が惹起された．培養上清では，4時間後ですでに陽性となり，その液体貯留量は平均1.2±0.4ml/cm であった．

本培養上清をマウス尾静脈あるいは腹腔内に接種したところ，マウスは3～4日後に死亡した．このマウス致死毒性は BHI ブイヨン培養上清の256倍希釈液にまで認められた．本上清を60℃，30分処理してもマウス致死活性は失活しなかったが，80℃，10分の処理では失活した．

本培養上清を FL, HEp-2, Vero などの培養細胞に接種し，37℃ 1～3日間培養した結果，FL, HEp-2, BGM, MDCK, Vero 細胞では細胞の膨化や球形化などの形態変化や細胞破壊が認められた．しかし，HeLa, CHO, Y-1, GMC, E6, L929 などの培養細胞では変化がなかった．

写真1には培養上清を接種後3日間培養した Vero 細胞を示した．対照の未接種の細胞に比べて培養上清を接種した Vero 細胞では形態変化が著明に認められた．

考　察

著者らは同一集団下痢症の患者ふん便より，同一性状・同一血清型の大腸菌が高頻度に検出され，しかもふん便中への該菌の排菌量が多い場合には，その菌が毒素

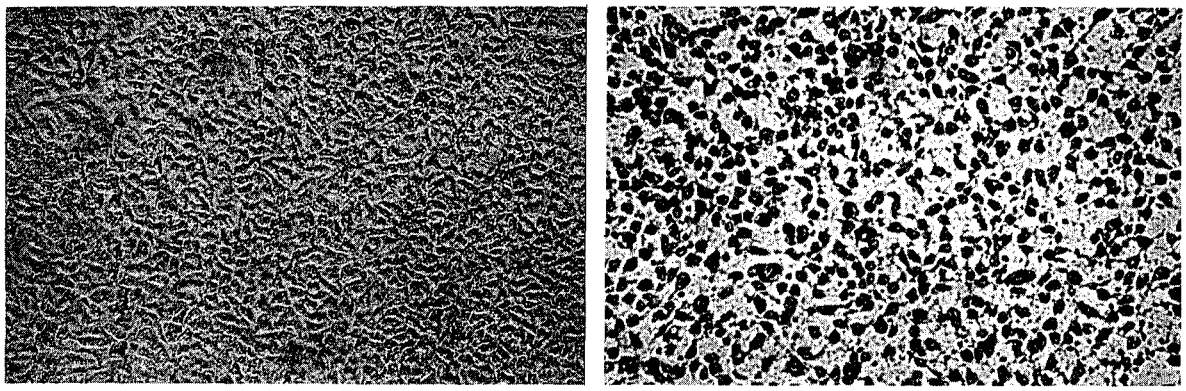


Photo.1. Cytotoxicity on Vero Monolayers, 3 Days
Left : medium control, Right : with filtrate.

原性大腸菌や組織侵入性大腸菌および腸管病原性大腸菌に該当しなくても，一応その集団下痢症の原因菌であると推定している．今回経験した小学校での集団例でも患者ふん便の82%から同一性状・同一血清型の *E.coli* O145:H－を検出し，ふん便中への排菌量もふん便1g当たり10^8個と多量であったところから，本菌を本集団例の原因菌と推定した．本血清型大腸菌は過去に下痢症の起因菌としての報告例のない新しい血清型であった．

本菌はLTやSTの毒素非産生であったが，病原因子と推定される細胞毒性や，マウス致死毒性およびウサギ腸管試験で陽性反応を示したことにより，本集団例の病原菌であることが確認できたものと考える．

本集団例では，患者のみならず非発病の学童や教職員からも同一血清型の *E.coli* O145:H－が高率に検出されていることから，原因食品としては当小学校で提供した給食あるいは飲料水が最も疑われた．しかし保健所の積極的な疫学調査，あるいは細菌学的検索にもかかわらず，原因食品を明確にできなかった．

Konowalchuk[10]は，1977年に下痢症患者から分離した *E.coli* がVero細胞に対して大腸菌の易熱性毒素（LT）とは異なる細胞毒性を示す毒素（Vero toxin）を産生することを報告した．Vero toxinを産生する大腸菌は，その後Scotlandら[11]，Gonzalezら[12]，Mahammadら[13]によっても確認され，現在ではEPECのうちO18, O26, O111, O126, O128などの血清型菌に本毒素を産生する株が認められている．また，Vero toxinを産生する大腸菌の中にはO68やO138など従来の腸管病原性大腸菌には含まれない血清型菌も認められている．

今回の集団例から検出した *E.coli* O145:H－もY-1細胞やCHO細胞には形態的変化をおこさないが，Vero細胞には細胞毒性を示し，Konowalchukらが指摘したVero toxinに類似する毒素を産生するものと考えられた．

一方，O'Brienら[3,4]は下痢患者から検出された *E.coli* O26やO103あるいはO157はHeLa細胞に対する毒性のほかに，マウスに対して致死活性を示すことを認めた．このマウス致死活性は，*Shigella dysenteriae* type 1が産生するShiga toxinに対する抗毒素血清，すなわち抗Shiga toxin血清によって中和されることをみいだした．そして抗Shiga toxinによって中和されるマウス致死活性が下痢の起因物質と考え，本毒性をShiga-like toxinと称した．わが国においても野田ら[14]は，*E.coli* O157:H7の産生する細胞毒は抗Shiga toxin血清によってその生物活性が中和されることを報告している．

著者らが検出した *E.coli* O145:H－の産生する毒素はVoro細胞などに細胞毒性を示すばかりでなく，マウス致死活性を示し，O'Brienらの指摘するShiga-like toxinに類似した．しかし，東京大学医学部研究所の竹田美文博士より分与された抗Shiga toxin血清や抗Shiga-like toxin血清（*E.coli* O157:H7の産生する細胞毒に対する抗血清）によって，*E.coli* O145:H－の産生するマウス致死活性が中和されなかったことにより，これらの毒素とは免疫学的に少し異なっているものと推定された．現在，本菌の産生する毒素を抽出・精製するとともに，Shiga toxinあるいはShiga-like toxinとの異同について検討を進めている．

結　論

1984年5月30日～6月7日にかけて東京都内の某小学校において学童1,023名中100名（発病率9.8%）が急性胃腸炎症状を訴える集団事件が発生した．

患者の主症状は腹痛(94%)，下痢(80%)，発熱(30%)であった．

ふん便を中心とした細菌学的検索の結果，患者ふん便95件中78件（82%），非発病者のうち学童のふん便900件中469件（52%），教職員ふん便44件中12件(27%) から同一の性状を示す *E. coli* O145:H－が検出され，本菌が原因菌と推定された．しかし，疫学調査や細菌学的検査成績から原因食品を明確にすることはできなかった．

E. coli O145:H－は現在までに下痢症の起因菌としての報告例のない新しい血清型菌である．本菌は，LTやSTの両毒素非産生で，組織侵入性も陰性であった．しかし，本菌培養上清はFL，HEp-2，Vero細胞などに対して細胞毒性を示し，マウス致死活性およびウサギ腸管ループ試験で陽性反応を示した．

文　献

1）坂崎利一：食中毒，**148**，1981，中央法規，東京

2）工藤泰雄：モダンメディア，**27**，299，1981

3）O'Brien, A.D. et al.：*J. Infect. Dis.* **146**, 763, 1982

4）O'Brien, A.D. et al.：*Lancet*, I, 702, 1983

5）Cowan S.T.：*Manual for the identification of medical bacteria*, 2nd Ed., 1974, Cambridge University press, England

6）Edwards, P.R. and Ewing, W.H.：*Identification of Enterobacteriaceae*, 3rd Ed., 67, 1972, Burgess publishing company, Minneapolis

7）松下　秀，工藤泰雄：モダンメディア，**30**，80，1984

8）Serény, B.：*Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 4, 367, 1956

9）De, S.N. and D.N. Chatterje：*J. Pathol. Bacteriol.*, **66**, 559, 1953

10）Konowalchuk, J., J.I.Speirs, and S.Stavric：*Infect. Immun.*, **18**, 775, 1977

11）Scotland, S.M., N.P.Day and B.Rowe：FEMS *Microbiol. Lett.* 7, 15, 1980

12）Gonzalez, E.A. and J.Blanco：FEMS *Microbiol. Lett.*, **26**, 127, 1985

13）Mohammad, A. et al.：FEMS *Microbiol. Lett.* **26**, 281, 1985

14）Noda, M. et al.：*The 20th joint conference US-Japan cooperative medical science program cholera panel*, 67, 1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 23-32, 1985

1984年・小笠原諸島における広東住血線虫および広東住血線虫症に関する調査研究

村田以和夫*, 近藤　聡**, 浦野元幸**

A survey on *Angiostrongylus cantonensis* and Angiostrongyliasis cantonensis in the Ogasawara Islands, 1984

IWAO MURATA*, SATOSHI KONDOH** and MOTOYUKI URANO**

Keywords：広東住血線虫 *Angiostrongylus cantonensis*, アフリカマイマイ *Achantina fulica*, 第3期幼虫の感染率 Infection rate of third-stage larvae, 小笠原諸島 Ogasawara Islands, 1984

はじめに

著者ら[1](1975)は，約10年前の1974年6月に小笠原父島住民の広東住血線虫感染症の疫学調査を行ない，調査対象の54名に全く本症既応が疑われないことを報告した．これに先がけ，佐々ら[2](1969)，堀ら[3,4](1973, 1974)は，東京都衛生局の依頼により，それぞれ「小笠原諸島公衆衛生調査報告」および「父島・母島における広東住血線虫の調査研究」を報告している．これらの報告によると，小笠原諸島には広東住血線虫 *Angiostrongylus cantonensis* の中間宿主であるアフリカマイマイ *Achatina fulica* が広く分布棲息し，クマネズミ *Rattus rattus* を終宿主として本虫の生活環が成立している．また，本虫第3期幼虫の寄生率は父島で22.2% (88/397)，母島で6.4%(11/171)と高率であったと記述されている．しかしながら1974年以降，これ程大規模な現地調査は行なわれていない．この間，安次嶺ら[5] (1977)，仲本ら[6] (1977) が，沖縄の本症6例について発表するなど，各地で計17例が報告[9]されている．本虫の高度浸淫地として重視される小笠原におけるその後の本虫浸淫状況，および島民の本症既応等について調査することは，初回調査後十余年を経過した今日有意義と思われる．今回たまたま，小笠原村の成人病検診に付随して，血液と血清を採取する機会に恵まれ，あわせてアンケート調査も実施し得たので，それらの成績について報告し，二三の考察を加えた．

材料および方法

1．アフリカマイマイの広東住血線虫第3期幼虫感染率の調査：1984年3月（マイマイ休眠期）と7月（同活動期）の2回にわたり，小笠原父島の5地区すなわち，大村3か所，清瀬5か所，奥村3か所，小湊2か所，扇浦および境浦各1か所，計6地区15か所の採取定点よりアフリカマイマイを採取した．採取貝は定点別に，それぞれ貝殻を除き，1個ずつ包丁で細切してプラスチック製カップに入れ，人工胃液(蒸留水1 *l*,塩酸7 m*l*, ペプシン1 gの混液）の約2容と混和して37℃ 4時間消化した．消化後，よくかく拌混和して，ガーゼ1枚をロート状に張り，ガーゼの一部を生理食塩液に浸漬した容器に移し1夜放置した．翌朝，本虫第3期幼虫は容器底の生理食塩水中に移行するので，コマゴメピペットで上清を捨て，沈渣中の幼虫を実体顕微鏡下で観察し，1個体毎に寄生数をカウントした．加えて，7月には母島3地区4か所で採取した貝についても，同様に処理して本虫第3期幼虫の寄生率を調べた．また小笠原諸島の居住区と非居住区，および貝の休眠期と活動期の本虫浸淫度に差が認められるかどうかを検討した．**2．本虫第3期幼虫のラットに対する感染実験**：3月，検査済みの第3期幼虫が50隻に達し次第，11匹のラットに経口投与したが，不満足な成績であったため，7月には二見台団地の庭で採取したマイマイ50個をひき肉機でひいて，大型ビーカーを用いて大量消化後，所定の第3期幼虫遊出法でその日のうちに幼虫を集め，6週令のWister系ラット9匹に1匹当りおおむね50～100隻となるよう経口投与した．**3．在家性捕獲ネズミの本成虫寄生状況調査**：市販のネズミトリおよびチユークリンを協力者に配布し，捕

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第2研究科　160 東京都新宿区百人町3—24—1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratry of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 島しょ保健所小笠原出張所

獲時点で保健所まで持参してもらい剖検に供した．捕獲数は7月調査期間中にクマネズミ5匹，オガサワラハツカネズミ *Mus musculus* 11匹，帰京後捕獲された数は，それぞれ1匹および5匹で，合計22匹を被検体とした．剖検は，エーテル麻酔後，胸部切開して心臓と肺臓を同時に摘出した．次いで，注意深く肺動脈を切開して成虫を摘出し，雌雄の総計を記録した．一部は，摘出心肺をホルマリン固定して送付されたものを被検体とした．捕獲ネズミはすべて居住地域のもので，非居住地域，野外での捕獲数は0であった．**4．成人病検診受診者に対するアンケート調査**：アンケート調査対象者は，163名の受診者中，主としてアフリカマイマイ試食経験のある者，および駆除作業に従事経験のある者，ならびにマイマイを素手で取り扱う事の多い農業従事者32名である．7月には，好酸球数高値者11名に再アンケートを行ない，試食回数，調理法，アレルギー症の既応について回答を求めた．再回答に応じた者4名については，消化器系寄生虫の有無を調べるため，検便による虫卵検査を実施した．**5．血液塗抹標本による好酸球数増多症の検査**：成人病検診時採血に応じた受診者163名の血液塗抹標本を作成，メタノール固定後ギムザ染色を行なって当所に持ち帰った．白血球数200個中の好酸球数の比を算出，正常値範囲を0.2～6.8%，技術的誤差範囲を正常値の5%と見込んで上限（7.14）と下限値（0.19）を設定した．本検査を抗 *Angiostrongylus cantonensis* 抗体測定の前段マススクリーニングとして実施した．**6．抗体測定**：既報の[1]とおり，Ouchterony 法を実施し，試みに本虫第3期幼虫を抗原とする蛍光抗体法（IFA）および，成虫粗抗原を用いた酵素抗体法（ELISA）を好酸球数高値血清11例，東京在住の健康者プール血清1例について実施したが，対照血清と比較して有意差が認められなかった．本症患者の陽性対照血清の入手も含めて，検査法の改良，特異抗原の精製等今後の課題とした．

成　績

1984年3月の調査時は気温も低く，前年11月以降はマイマイの休眠期に当り，全ての貝は石垣のすき間および枯葉や植込みの根元の土中にあって，貝殻開口部に粘液硬化性の蓋を作って休眠している．そのため貝の採取は枯葉や土を除かなければならない．表1にはこうして採取したマイマイ計224個体について地区別に本第3期幼虫の寄生率を示した．大村，清瀬，奥村地区は，以前と比べ開発がかなり進んだ居住地域であるが，小湊，扇浦，境浦の非居住地域と比較して，居住地域の平均寄生率は，奥村の両墓地を除いて50.8%（60/118）と両墓地を含む

表1　小笠原・父島の休眠期アフリカマイマイの広東住血線虫第3期幼虫地区別寄生状況（1984年3月）

地区名	マイマイ採取場所	寄生数／検査貝数(%)	地区別寄生状況(%)	1971・1972年6～7月調査※ 地区別寄生状況(%)
大村	海上自衛隊裏山	2／10 (20.0)	13／ 30 (43.3)	27／124 (21.8)
	小学校前民家の庭	7／10 (70.0)		
	教会前の植え込み	4／10 (40.0)		
清瀬	二見台団地の裏庭	7／11 (63.6)	33／ 58 (56.9)	調査せず
	保健所・診療所庭	8／ 8 (100.0)		
	清瀬公園の植え込み	12／19 (63.2)		
	清瀬トンネル周辺	3／10 (30.0)		
	水産センター前	3／10 (30.0)		
奥村	村民会館・保育園	14／30 (46.7)	15／ 45 (33.3)	10／ 84 (11.9)
	かん臨丸墓地入口	1／ 5 (20.0)		
	海軍墓地周辺	0／10 (0.0)		
小湊	時雨ダム周辺	6／19 (31.6)	10／ 45 (22.2)	20／ 60 (33.3)※
	小湊海岸	4／26 (15.4)		22／ 79 (27.9)
扇浦	扇浦海岸	7／20 (35.0)	7／ 20 (35.0)	9／ 50 (18.0)
境浦	境浦海岸	11／26 (42.3)	11／ 26 (42.3)	調査せず
合計	父島全域		89／224 (39.7)	88／397 (22.2)

※堀栄太郎ほか：寄生虫学雑誌，22，6，1973より引用
注）時雨ダム・小曲ダム周辺を含めて，小曲地区としたかは不明

非居住地域の平均寄生率27.4%（29/106）を約2倍上まわっていた．1971年と1972年の6～7月（活動期）に行なった堀ら[3]の成績では，居住地域で17.8%，非居住地域で26.9%と今3月の成績とは逆の関係となっている．また，父島全域の本虫寄生率は，39.7%と12～13年前の堀らの成績（22.2%）を17.5%も上まわるものであった．この居住地域対非居住地域の寄生率が逆転する原因については季節変動によるものなのか否かを調査するために，マイマイ活動期に当る7月，再度調査を実施した．3月と同一場所で採取した貝の寄生率を地区別に示したのが表2である．3月の調査成績と同様に，奥村の両墓地を非居住地域に含めると，居住地域の本虫寄生率は30.0%(48/160)，非居住地域の寄生率は40.8%(49/120)と10.8%居住地域を上まわり，堀ら[3]の7月（活動期）の調査結果とほぼ一致した．今回7月の父島全域の本幼虫寄生率は，34.6%（97/280）を示し，12～13年前の堀らの成績22.2%を12.4%も上まわることが明らかとなった．3月と7月，2回とも父島全域の本虫寄生率が堀らの成績より十数パーセント上まわる結果が得られたことは，前回調査から12～13年を経た今日，本虫の浸淫度が高まっていることを示すものである．一方，現地では母島のアフリカマイマイ棲息状況が10年前と比べ急激な増加傾向にあるといわれている．本幼虫の寄生率もまた，表3に示されるように急激な上昇傾向を示している．今

表2　小笠原・父島の活動期アフリカマイマイの広東住血線虫第3期幼虫地区別寄生状況（1984年7月）

地区名	マイマイ採取場所	寄生数／検査貝数(%)	地区別寄生状況(%)	1971・1972年6～7月調査※ 地区別寄生率
大村	海上自衛隊裏山	2／20 (10.0)	8／60 (13.3)	21.8%
	小学校前民家の庭	2／20 (10.0)		
	教会前の植え込み	4／20 (20.0)		
清瀬	二見台団地の裏庭	9／20 (45.0)	30／80 (37.5)	調査せず
	保健所・診療所庭	11／20 (55.0)		
	清瀬公園の植え込み	8／20 (40.0)		
	清瀬トンネル周辺			
	水産センター前	2／20 (10.0)		
奥村	村民会館・保育園	10／20 (50.0)	23／60 (38.3)	11.9%
	かん臨丸墓地入口	10／20 (50.0)		
	海軍墓地周辺	3／20 (15.0)		
小湊	時雨ダム周辺	7／20 (35.0)	12／40 (30.0)	33.3%
	小湊海岸	5／20 (25.0)		27.9%
扇浦	扇浦海岸	10／20 (50.0)	10／20 (50.0)	18.0%
境浦	境浦海岸	14／20 (70.0)	14／20 (70.0)	調査せず
合計	父島全域		97／280 (34.6)	22.2%

※堀栄太郎ほか：寄生虫学雑誌，22，6，1973より引用

表3　小笠原・母島の活動期アフリカマイマイの広東住血線虫第3期幼虫地区別寄生状況（1984年7月）

地区名	マイマイ採取場所	寄生数／検査貝数	地区別寄生状況(%)	1973年6月調査※ 地区別寄生状況(%)
沖村	住宅地域・飲食店庭	6／12	10／26 (38.4)	11／171 (6.4)
	住宅地域・村民会館	4／14		
母島南	農地・船見台	2／10	13／30 (43.3)	調査せず
母島北	農地・評議平	11／20		
合計	母島全域	23／56	(41.1)	11／171 (6.4)

※堀栄太郎ほか：寄生虫雑誌，22，3，1974より引用

7月の調査成績は，母島全域で41.1% (23/56) の寄生率を示したのに対し，11年前の堀らの成績では6.4% (11/171)の本幼虫寄生率を示したにすぎない．11年前，明らかに父島より母島のほうが低率であった本幼虫寄生率が，ここ10年の間に，父島より高率となったことは特筆される．また父島と同様に7月の活動期にあっては，母島でも非居住地域の寄生率がやや居住地域の寄生率を上まわる傾向が認められる．

表4は，父島における在家性捕獲ネズミの本虫成虫の寄生状況を示したものである．ネズミ捕獲カゴ，パチンコ，チュークリン（誘引接着剤塗布ボール紙）で捕獲されたネズミは計22匹で，クマネズミ6匹中2匹(33.3%)の肺動脈から本成虫が合計73隻見出された．

チュークリンで比較的良く捕獲されるオガサワラハツカネズミからは全く本成虫を見出すことができなかった．堀らの捕獲ネズミの調査でも，クマネズミの7.5% (6/80)から本虫が見出されているが，今回の調査と同様，他のネズミからは本虫が見出されていない．本虫がクマネズミの2/6から比較的容易に見出され，また1匹当りの寄生数もそれぞれ，44，29隻と多くの成虫が摘出されたことは，クマネズミに対する本虫の浸淫度もかなり高まっていることを示唆している．

表5はアフリカマイマイより人工胃液消化法で得られた第3期幼虫のラットに対する感染性の差異を示している．貝を1個1個処理して，鏡検により寄生数を数え，

表4　小笠原・父島における在家性捕獲ネズミの広東住血線虫寄生状況(1984年7月～1985年3月)

種　類	捕獲匹数	陽性数 (%)	検出虫体数 ♂	♀	計
クマネズミ	6	2(33.3)	20 17	24 12	44 29
オガサワラハツカネズミ	16	0	0	0	0
計	22	2(9.1)	37	36	73

50隻集めたところでラットに経口投与した場合，投与までかなりの長時間を要し，結果的に第3期幼虫の活動性が低下して，感染率や成熟率が著しく低下することが明らかとなった．約50個の貝をひき肉機で一度にひいて，短時間消化によって収集した第3期幼虫は，活発な動きを示すとともに100%の感染性を示し，ラットに対し致死的に作用した．今回は，およそ50～100隻の幼虫を投与したが，感染虫数を30隻程度におさえた方が，完全成熟虫体を得るには良い．成虫回収数は平均1匹当り36.2隻で50隻±10隻投与したとして約72%の回収率であった．3月に投与した感染ラットの剖検時肺病変は，微小な出血点または出血斑が全例に認められたが，個別消化法で集めた第3期幼虫から成熟虫体に発育し得たのはたった1隻しかなかった．7月に行なった感染実験では，感染後3か月頃から肺，気管，鼻腔出血による死亡例があい次ぎ，(**写真1**)剖検して成虫の回収を行なったが，3か月目の回収虫体は生殖器が未成熟であった．4か月，5か月目の回収虫体は**写真2**と3のように完全成熟虫体である．雌虫体断端より遊出した本虫第1期幼虫および未成熟虫卵を**写真4～6**に示す．また，アフリカマイマイより人工胃液消化法で得られた本虫第3期幼虫を**写真7**と8に示す．

表6は，父島住民のアフリカマイマイ試食経験の有無に関するアンケート調査成績である．血液像検査により好酸球数カウントを実施した者163名中，マイマイとの接触頻度が高い者39名にアンケート調査を行った結果，回答者39名中，試食経験有りと回答した者は32名(82.1%)で成人病検診受診者の19.6% (32/163) を占めている．これらの成績は前回著者らが行なった調査対象54名中，試食または貝の素手による駆除経験者がわずか数名であったことと比較して，著しい増加傾向を示唆するものである．試食回数については，10～20回も食べたことがあると回答したものが2名あり，不明と答えている2名についても相当高頻度に食べていることがうかがわれる．好酸球数がやや高い者は6.7% (11/163) 認められたが，好酸球数高値者中のマイマイ試食経験者数は36.4%

表5　アフリカマイマイより人工胃液消化法で得られた広東住血線虫第3期幼虫のラットに対する感染実験成績

処理方法	感染虫数／1匹	感染ラット数	成虫回収匹数	回収虫体数	備　考
個別消化法	50	11	1／11(9.1%)	1	5か月生存・剖検
50個同時消化法	50～100	9	9／ 9(100%) 注) 未成熟虫体を含む	326	3か月死亡・剖検：3匹 4か月死亡・剖検：3匹 5か月生存・剖検：3匹

表6　1984年小笠原村父島々民のアフリカマイマイ試食経験の有無に関するアンケート調査成績
（調査対象：163名）

	回答者No.	年令	性	在島年数	職業	試食経験	試食回数	好酸球数	備考
好酸球数正常値群	1	29	男	2	農業	有	1	正常値範囲	0.2~6.8%,平均3.0%
	2	55	女	3	主婦・畑作	〃	1～2	〃	幼少時・沖縄
	3	32	男	6	事務	〃	1	〃	
	4	37	〃	8	〃	〃	1	〃	
	5	29	〃	6	〃	〃	3	〃	
	6	55	〃	15	〃	〃	1	〃	
	7	42	〃	14	農業センター	〃	2	〃	
	8	52	〃	33	農業	〃	不明	〃	
	9	71	〃	38	〃	〃	2	〃	
	10	45	〃	15	〃	〃	1	〃	
	11	55	〃	23	〃	〃	不明	〃	
	12	48	〃	13	その他	〃	1	〃	
	13	31	〃	2	事務	〃	1	〃	
	14	30	〃	6	〃	〃	1	〃	
	15	61	女	26	主婦	〃	1	〃	戦前・焼いて
	16	37	〃	14	事務	〃	1	〃	
	17	31	男	13	〃	〃	2～3	〃	
	18	21	女	1	その他	〃	1	〃	
	19	35	〃	10	事務	〃	1	〃	
	20	62	男	11	漁業	〃	20	〃	
	21	42	〃	11	事務	〃	1	〃	
	22	29	〃	1	〃	〃	1	〃	
	23	40	〃	12	〃	〃	1	〃	
	24	40	〃	12	〃	〃	1	〃	
	25	41	〃	1	〃	〃	1	〃	
	26	42	〃	9	事務，その他	〃	10	〃	
	27	36	〃	7	事務	〃	3	〃	
	28	44	〃	15	農業センター	〃	5	〃	
好酸球数高値群	29	43	男	12	農業	〃	1	10.0%	やや高
	30	31	〃	3	事務	〃	2	8.0%	〃
	31	62	〃	5	〃	〃	1	8.5%	〃
	32	75	〃	25	その他	〃	2	7.5%	〃　戦前
	①	69	女			不明		14.0%	〃
	②	37	〃	2	事務	無	—	9.0%	〃　帰京
	③	39	男	1	〃	無	—	8.0%	〃
	④	42	〃	2	〃	無	—	11.0%	〃
	⑤	40	女	2	〃	無	—	17.5%	〃　帰京
	⑥	42	〃	10	主婦	無	—	8.5%	〃
	⑦		男	4	農業	無	—		

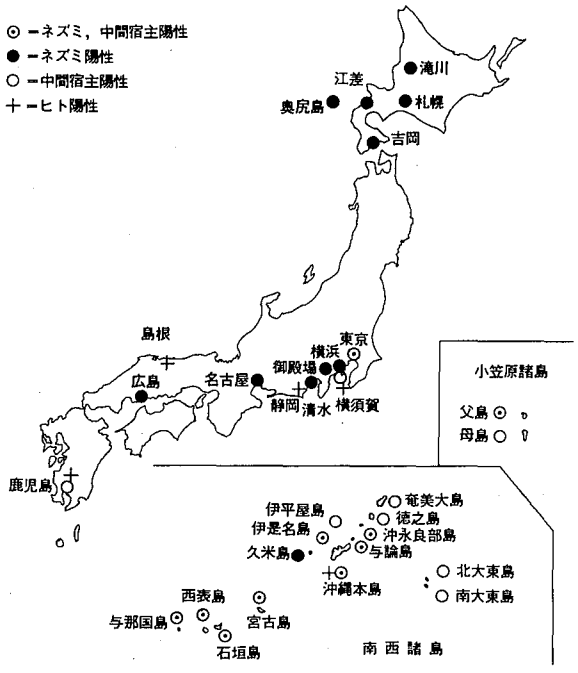
注）回答者数：39／163　　マイマイ試食経験有り：32／163（19.6%）
回答率　：23.9%　　〃　　無し：6／163（3.7%）
〃　　無回答：125／163（76.7%）

好酸球数正常者数：152／163（93.3%）
〃　高値者数：11／163（6.7%）
好酸球数高値者中のマイマイ試食経験者数（%）：4／11（36.4%）
マイマイ試食経験者中の好酸球数高値者数（%）：4／32（12.5%）

(4/11) で，逆にマイマイ試食経験者中の好酸球数高値者数は12.5% (4/32) を示した．これらの成績は統計学的有意差が認められず，マイマイ試食経験と好酸球増多の関係は明らかとはならなかった．アンケート回答者39名中，何らかの自覚症状を訴える者は皆無であり，また，マイマイの調理方法も生食は皆無で，ほとんどの者がヤキトリの様に焼いて食べており，沖縄の本症発生例のように，民間療法または迷信的奇習として生食する生活習慣は小笠原には全く存在しない．試みとして，好酸球数高値者血清11例について，本成虫VBS抽出粗抗原を用いたゲル内沈降反応を行なったが，いずれも沈降線が得られず，蛍光抗体法 (IFA)，酵素抗体法とも対照の都内健康者のプール血清との間に有意差が認められなかった．また，好酸球数高値者11名について，消化器系寄生虫の感染を調べるため虫卵検査を手配したところ，そのうち4名が検便に応じた．この4名は，いずれも虫卵陰性であり，いずれのアレルギー症状も呈しなかった．仲本ら[6]の報告によると，沖縄における本症の所見では，末梢血の顕著な好酸球増多と髄液細胞の57～87%に好酸球が認められるという．今回の検査成績の最高値が17.5%であるとともに，総じて正常値範囲をやや上まわる程度のものが多く，本症を積極的に疑い得る成績は得られなかった．

考　　察

1984年3月と7月に2回，小笠原に広く棲息するアフリカマイマイの広東住血線虫第3期幼虫の感染率を調査した．その結果，マイマイの休眠期に当る3月と活動期に当る7月の調査成績は，若干の差が認められ，また両月とも，過去11～13年前に行なわれた堀らの調査成績を約十数パーセント上まわった．この成績は小笠原における本虫の浸淫度がこの10年間に更に高まっていることを示唆するものといえよう．また，父島と母島の比較では，堀らの調査で，母島は父島より本虫の浸淫度が低いことが知られていたが，今回の調査では逆に母島の浸淫度が父島を上まわっていた．これらの成績は，小笠原住民のマイマイ試食経験の増加傾向とあいまって，広東住血線虫症の感染機会の増大を数字的に表わすものといえよう．しかしながら，食べ方，調理法に関する聞き取り調査で，沖縄の症例に見られるような，ナメクジの生食による咳嗽治療等の民間療法や奇習は，米軍統治後当地に全くみられない．このことは，本症発生が今日まで小笠原に認められない主要因子と考察される．一方，沖縄では延長宿主 Paratenic host としてヒキガエルやナメクジが注目されており，また，本虫の経皮感染例も報告されていることから，マイマイの加熱調理だけで万全の感染防止策といえるかどうか疑わしい．ナメクジ付着そ菜類の誤飲も考えられ，またヒキガエルの肉も食用に供されており，本症に対する知識を有しない島民が増えているので，今後さらに調査を継続するとともに，感染防止策について啓蒙・宣伝する必要があろう．1968年の小笠原返還以来，植物検疫および農作物の害虫駆除事業として，買い上げによるマイマイ対策事業がしばらく実施されていたが，広東住血線虫撲滅のための対策事業は全く行なわれていない．ヒトに感染した場合，好酸球性髄膜脳炎 eosinophilic meningoencephalitis を引き起し，重とくな症状を呈する本症対策については全くの野放し状態といっても過言でない．本虫の生活環をどこかでたち切るためには，マイマイ対策も有効であろうが，それと並行して，クマネズミ駆除対策事業も実施されなくては実効性が薄いと考えられる．小笠原の植物検疫指定害虫であるミカンコミバエ対策事業が，十余年の成果を上げ，1985年3月に撲滅宣言を発したことは特筆に値しよう．そして小笠原支庁産業課の事業として昭和60年度から新たにマイマイ対策事業がスタートした．先ずは，マイマイの生態調査から始める予定であるが，この機会をとらえて，ネズミ対策も含めて本虫撲滅対策事業が企画され



注) 堀　栄太郎 : Medical Tribune, 1983.8.11, P. 30 原図引用

図1　日本における広東住血線虫分布

るべきである．すでに，本虫は小笠原のみならず，東京湾の埋立て地に土着しており[7-8]，図1のとおり本症患者発生が，沖縄，鹿児島，島根，静岡，神奈川で計17例報告[9]されている．横須賀市では，小児の死亡例が報告されており，本症の迅速かつ確実な診断法の確立が求められている．そこで，われわれは引き続き本症の免疫学的診断法の確立に向かって今後とも検討を重ねていきたいと考えている．なお，マイマイの休眠期と活動期における本第3期幼虫の寄生率の変動については，ネズミおよびマイマイの生態学的研究を待たなくては結論が出せない．なお，今回の調査で得られたデータの有意性の検定では，父・母両島の今回と11～13年前の成績以外，統計的な有意差は見出されなかった．今後さらに，寄生虫疾患以外の好酸球増多をともなうアレルギー疾患等の調査も実施する必要があると思われる．

結　論

1．1984年3月と7月の2回，小笠原諸島の広東住血線虫の浸淫状況について調査した結果，過去11～13年前の調査成績と比較して，父島，母島の両島で採取されたアフリカマイマイ計560個の本第3期幼虫寄生率は，3月，7月の両月とも，約12～34%上まわっていた．

また，在家性捕獲ネズミの調査でもクマネズミ6匹中2匹から，計73隻の本成虫を見出し，本虫の生活環境は，以前にも増して，アフリカマイマイとクマネズミの間で着実にまわっていることが示唆された．

2．成人病検診に付随して，受診者163名を対象に，広東住血線虫症の既応の有無について，好酸球数カウントをマススクリーニングテストに応用して検討した結果，好酸球数高値者11例は，全例自覚症状もなく，抗 *Angiostrongylus* 抗体陰性であった．うち4例の虫卵検査はともに陰性で，本虫または他の寄生虫疾患を積極的に疑うデータは得られなかった．

3．これら受診者のうち39名にアンケート調査を実施して，マイマイの試食経験と好酸球増加の関係を中心に検討したが，試食経験者が漸増しているにもかかわらずこの両者の関係は明らかでなかった．

4．採取貝50個より人工胃液消化法で得られた第3期幼虫をWister系ラットに経口投与して，3～5か月後に剖検した結果，全例より *Angiostrongylus Cantonensis* の成虫326隻を回収した．

謝辞：本調査にあたり，終始ご協力をいただいた島しょ保健所，同小笠原出張所ならび東京都小笠原支庁の関係各位に深謝するとともに，当所の実習生のご協力があったことを記して謝意を表します．

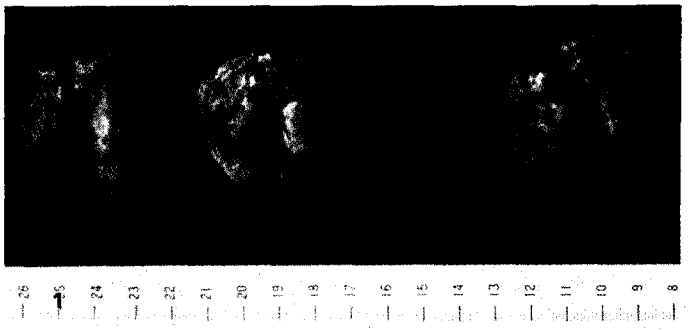
（本研究は昭和59年度当研究所課題研究「小笠原諸島における広東住血線虫および広東住血線虫症に関する研究」として実施し，その概要は第45回日本寄生虫学会東日本大会1985年10月5日で発表した．）

文　献

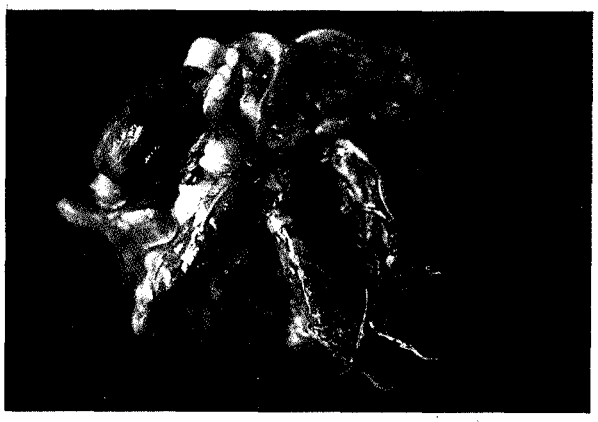
1）加納堯子，村田以和夫，門野義雄，大久保暢夫，浅沼邦広：東京衛研年報，26—1，42，1975
2）佐々　学，和田芳武，藤田紘一郎：小笠原諸島公衆衛生調査報告，「小笠原環境衛生調査」，1，（昭和44年12月），1969
3）堀　栄太郎，篠永　哲，和田芳武，楠井善久：寄生虫学雑誌，22，6，347，1973
4）堀　栄太郎，宮本健司，楠井善久，斉藤一三：寄生虫学雑誌，23，3，138，1974
5）安次嶺　馨：寄生虫学雑誌，26，1（補），36，第36回日本寄生虫学会東日本支部大会記事，1977
6）仲本将人：寄生虫学雑誌，26，1（補），37，第36回日本寄生虫学会東日本支部大会記事，1977
7）堀　栄太郎，楠井善久：寄生虫学雑誌，21，2，90，1972
8）堀　栄太郎，楠井善久，松井暎延，服部寿雄：寄生虫学雑誌，22，4，209，1973
9）堀　栄太郎：*Medical Tribune*，「特集・最近の寄生虫疾患」広東住血線虫症，30，1983年8月11日号

〈写真説明〉

1．広東住血線虫第3期幼虫感染後5か月目のラットの肺
2．ラット肺動脈より摘出中の *Angiostrongylus cantonensis* 成虫
3．ラット肺動脈より摘出した *Angiostrongylus cantonensis* 成虫
4．*Angiostrongylus cantonensis* 雌成虫の切断面より遊出した第1期幼虫　×100で撮影
5．同拡大写真　×400で撮影
6．同　未成熟虫卵および成熟虫卵　×400で撮影
7．アフリカマイマイの人工胃液消化法で得られた *Angiostrongylus cantonensis* の第3期（感染）幼虫　×100で撮影



1

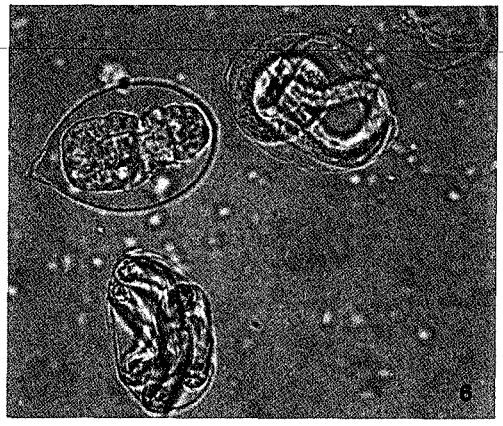


2

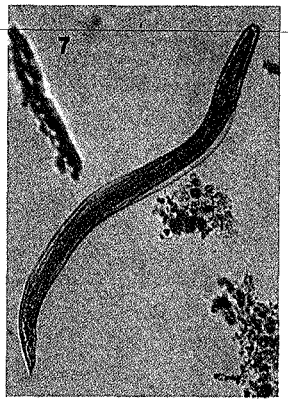
3

4

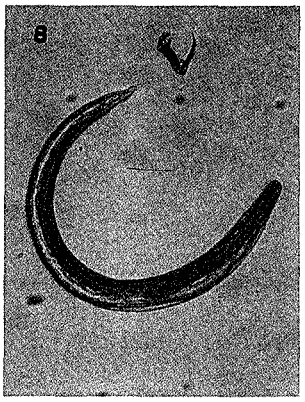
5



6



7



8

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 33-42, 1985

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 (第二報)

中村清純*, 伊藤忠彦*, 山崎清*, 坂井冨士子*
大野正彦**, 薮内清*, 大橋誠*

Studies on Tsutsugamushi Disease in Izu Islands
Field Works in Shikine Island (II)

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

We have conducted the survey since 1983 in the isle of Shikine, one of Izu Islands in the Pacific Ocean, where a local type of scrub typhus named Shichito fever is endemic. Late autumn in 1984, blood specimens obtained from 3 female patients with this fever and emulsions of spleen and liver derived from 13 rodents (suspected as Rattus norvegicus) captured in the field were intraperitoneally injected into mice from which 2 and 8 strains of R. tsutsugamushi were isolated respectively. The rats were proved as contaminated by the rickettsia in that about 85% of them had this organism in their spleen and/or positive serum antibody against it.

There was found another woman who suffered twice from the disease with one year interval. Two pairs of her sera, in acute and convalescent phases of infection, showed significant rises in complement fixation antibody titer and indirect immunofluorescent antibody titer to the pathogen. She was the first case in Japan diagnosed as with the rickettsial re-infection confirmed by the serological tests.

These data indicate that people in Shikine-isle are exposed to continuous risk of infection by R. tsutsugamushi.

Keywords: tsutsugamushi disease, Shichito fever, Rickettsia tsutsugamushi, human re-infection, rat, serological test

緒　言

最近, ツツガ虫病は全国的な多発傾向にあるが東京都においても例外ではなく, 伊豆七島において同疾患(以下, 七島熱という)発生届出数に増加がみられる. これに対処するため, 1983年東京都衛生局ではツツガ虫病実態調査委員会を組織し, 届出患者数の最も多い新島本村式根島を主たる調査対象地に選び, 3ケ年計画で七島熱の実態調査を実施することとした. 第1回調査(1983年11月)および第2回調査(1984年2月)に関する成績についてはすでに前報[1]で報告した. 本報では, 1984年秋から85年初頭にかけて行った第3回実態調査につき, 同島鼠族にリケッチアツツガムシによる高濃度の汚染が認められたこと, あるいは本病に再感染のあることなどの知見を含めて報告する.

調査材料および方法

調査対象患者: 式根島[1] (行政上は東京都新島本村に所属する)を主たる実態調査地域に選定し, 前年度の患者発生状況から当年度の流行時期を予測し, 1984年11月16日～22日の7日間を**第3回調査期間**とした. 同島唯一の医療機関である国民健康保険新島本村式根島診療所(以

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 同環境保健部環境衛生研究科

下，式根島診療所と略す）を受診した患者を問診し（Fig.1），刺し口および発疹を撮影した後，血液を採取した．

野鼠の捕獲：金網式トラップ150個をネズミによる作物被害の多い甘藷畑に5日間，Sherman Alive Trap（米国Sherman社製，L型230×76×92mm）20個を大型不燃物廃棄場に2日間，それぞれ設置して，生けどり法により野鼠の捕獲を行った．捕獲の有無は毎朝10時前後に確認した．誘引餌は，主として甘藷に食用油を塗布したものを用い，その他さつま揚げあるいはバターピーナツも用いた．

リケッチア分離同定方法：患者からの分離は，式根島診療所で七島熱と臨床診断され，テトラサイクリン系抗生物質投与による治療開始前に採取した血液をただちに4匹のマウス腹腔内に0.25m*l*宛接種した．野鼠からのリケッチア分離はクロロホルム麻酔下で心臓採血（血清学的試験用）により致死させて，体重，体長（頭胴長），尾長，後足長および耳長を測定後，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[2]，2匹のマウス腹腔内に0.25m*l*宛接種した．継代はマウスの外見的発症（立毛，腹部膨満，動作緩慢など）が極期に達した時に行った．外見的発症のみられなかったものについては，接種後14～17日に行った．すなわち，マウスをエチルエーテル麻酔して致死させ，開腹して発症の有無（リンパ節腫脹，脾腫，とくに牽糸性腹水の貯溜をもって発症陽性とした）を確認の上，同一被検材料については摘出した脾臓をプールし，SPG液にて約10%乳剤（以下，脾乳剤と略す）にして数匹の次代マウス腹腔内に0.25m*l*宛接種した．一つの被検材料について，3代まで継代してすべて発症陰性のものは，リケッチア分離陰性とした．リケッチアの同定は，発症マウスの脾乳剤をモルモット脳内およびマウス皮下に接種し，18～29日後さらにそれぞれの腹腔内に追加接種して，モルモットについては約8週，マウスについては約6週で採血し，その血清中のリケッチアツツガムシ（以下，Rtと略す）抗原に対する補体結合抗体の存在により判定した．なお，試験に使用したマウスは5～8週令のddY系有毛マウスで，一部cyclophosphamide（注射用エンドキサン，塩野義製薬製）の腹腔内投与による免疫抑制処置[3,4]を行った上で被検材料あるいは継代材料を接種した．

血清学的検査：患者血清は第1回ないし第3回調査中に採取した血清以外にも現地（式根島，新島）の診療機関において採取した血清を郵送により入手し，三宅島の患者については，島しょの基幹病院である都立広尾病院入院中に採取した血清を用いた．捕獲野鼠の血清は，前述の心臓採血により得たものを用いた．

間接蛍光抗体法（IF）　常法[2,5]に準拠して行った．抗原はマウス線維芽細胞由来のL929cell（以下，L細胞と略す）に感染させたRt標準株（Karp, GilliamおよびKatoの3株）および第1回調査で患者より分離したShikine-S株とした．抗原スライドはRtの充分な増殖を確認した感染細胞を，12 hole蛍光抗体用スライド（栄研化学製）にヘマトクリット管を用いて少量スポットし，風乾ののち冷アセトンで10分間固定して作成し使用時まで−80°に保存した．二次抗体には，抗ヒトIgG, IgM, IgA（Hyland社製）あるいは抗ラットIgG（Cappel社製）の各FITC標識抗体を用いた．

補体結合反応（CF）　抗原は，標準3株については市販抗原（デンカ生研製）を使用し，Shikine-S株抗原は自家製のものを使用した．すなわち，L細胞に本株Rtが充分増殖した時点で細胞をかき落し，凍結融解を3回繰り返して細胞内のRtを放出させる．次に紫外線照射により不活化後さらに超音波処理を行ったのち1,000rpm 5分間遠心して細胞成分を除き，上清を15,000rpm 1時間遠心してその沈渣を原材料の約1/5のPBSに浮遊させて抗原とした．

結　果

①患者発生状況　1980年以降の全国および東京都にお

Table 1. Number of Patients Registered by Year of Tsutsugamushi Disease in Tokyo Metr. and Sum of Those in Japan

Year	1980	81	82	83	84
Tokyo Metr.	4	49	32	66	27
Oshima Is.	4	16	4	29	7
Niijima Is.					8
Shikine Is.		22	20	21	5
Kozu Is.				1	
Miyake Is.		10	8	3	5
Mikura Is.				4	1
Tokyo in Japan proper		1*		8*	1*
Sum of Japan	212	388	508	672	948

This table is cited from "Information for Prevention of Infectious Disease" by MHW of Japan and from "Annual Report" by Bureau of Public Health, Tokyo Metr. Government.

* assumably infected outer site of Tokyo

つつが虫病患者臨床調査票

衛研受付 No.

氏名	男女	生年月日	明大昭 年 月 日
住所 式根島 番地 電話		職業	(歳)
発病日 年 月 日			
初診日 月 日		血液採取日 月 日	

臨床症状・経過等（初発症状には◎印，他は○でかこむ）

1．発熱 月 日より ℃～ ℃で 日間継続

2．発疹（部位 ） 月 日より 日間継続

3．リンパ節腫脹（部位 ）

4．刺し口（部位 ） 水疱，潰瘍，痂皮

5．全身倦怠 6．頭痛 7．違和感 8．食欲不振 9．嘔吐

10．腹痛 11．下痢 12．手足腰の痛み 13．関節痛 14．筋肉痛

15．せき 16．鼻汁 17．胸内苦悶 18．その他（ ）

その他の臨床所見

19．結膜充血 20．咽頭発赤 21．脾腫 22．肝腫

23．その他

治療

発病前の生活歴（もし判りましたら御記入下さい）

刺傷感 有，無 ： 月 日頃（部位 ）

推定被刺場所 畑＿＿＿＿ 山林＿＿＿＿ 不明＿＿＿＿

月 日頃 従事した作業＿＿＿＿＿＿＿＿

Fig. 1. Doctor's Check List of Clinical Manifestation for Physical Examination of a Patient with Shichito Fever (in Japanese)

Table 2. List of Clinical Manifestations of Some Patients of Tsutsugamushi Disease in Izu Islands

Name of Island	Patient No.	Age	Sex	Date of Onset	Initial Skin Lesion	Clinical Signs
	1*	28	F	1984. 11. 14	lt. leg (crust)**	fever, rash, LAP, headache
	2*	7	F	11. 20	lt. up. abd. (crust)	fever throat redness
	3*	57	F	11. 20	rt. poplitea (vesicle)**	fever, LAP
Shikine	4	36	M	11. 26	lt. leg (crust)	fever, rash, LAP, headache, cough
	5	43	F	12. 4	rt. poplitea (crust)	fever, rash, LAP
	6	43	F	1985. 1. 1	rt. ext. ear (crust)	fever, rash, headache
	7	47	F	1. 15	rt. shoulder (erythema)	fever, LAP
	8	44	M	1984. 11. 19	lt. umbilicus	fever, rash
	9	51	F	11. 22	rt. elbow	fever, rash, injected conj.
Niijima	10	66	M	12. 3	lt. thigh (ulcer)	fever, rash, LAP
	11	79	F	12. 4	head (crust) lt. axilla (ulcer)	fever, rash, throat redness, injected conj.
Miyake	12	8	M	11. 12	umbilicus	fever, rash, LAP

* Isolation of rickettsia were attempted and successful in patient No. 2 and No. 3.
** Skin lesions of patient No. 1 and No. 3 are shown in Photo 1 and Photo 2, respectively.
LAP is abbreviation of lymphadenopathy.

けるツツガ虫病届出患者数を Table 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，1984年は前年に比べやや患者数が減少したが，地域的には拡大し，新たに新島本島に患者発生が認められた．また式根島では依然として罹患率が人口千対6.9と最も高かった．島しょ保健所管内以外の届出患者は，すべて都外で感染を受けたと推定されるものである．

②患者に関する調査　第3回調査(1984年11月16日～22日)　この間，式根島診療所を受診した治療前の七島熱患者は，当流行期最初の患者で計3名であった(Table 2)．これらの患者よりリケッチア分離材料および血清学的検査材料として血液を採取した．なお，リケッチア分離成績は野鼠の成績と並列して第4項で後述する．

患者の症状　式根島，新島および三宅島在住の患者のうち，血清の得られた患者12名の初診時の臨床症状を，Table 2 に示した．発病から初診までの日数は，明記されたもので1～7日，平均3.5日であった．臨床所見については，発熱および刺し口は全例に見られた．なお，そのうち2名の患者のツツガムシによる刺し口のカラー写真を Photo 1，2 に示した．発疹は再罹患患者 No. 7 ならびに Rt の分離された患者 No. 2 および No. 3 では認められなかった．リンパ節腫脹は，12名中7例で確認された．

血清学的検査成績　七島熱と臨床診断され，急性期，回復期血清の双方とも得られた患者9例の血清学的検査成績を Table 3 に示す．CF では回復期に4倍以上の抗体上昇を示したのは，Shikine-S 株抗原に対して9名全例，Karp 株に対して7例であり，それ以外の Gilliam 株あるいは Kato 株に対して，より強い上昇を示したのは1例(No. 9)であった．IF では9名中8例で Karp 株および Shikine-S 株抗原に対して4倍以上の IF 価の上昇をみた．残り1例は No. 5 の患者で，第1回目の採血がすでに8病日を経ており，高い IF 価を保有していた．CF および IF の結果よりみると，全患者とも Karp 株，さらには現地患者由来の Shikine-S 株に対する抗体上昇が優位であった．

再感染事例の確認　1985年1月に発病した患者

Table 3. Serological Findings of Some Patients of Tsutsugamushi Disease in Izu Islands

Name of Island	Patient No.	Days after Onset	C F K	C F G	C F NK	C F S-S	I F K	I F G	I F NK	I F S-S
Shikine	1*	6	<8	8	<8	<8	16	32	<8	32
			Convalescent serum was not obtained							
	2*	2	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	16
		14	64	128	128	128	512	256	128	512
	3*	2	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
		12	64	128	128	256	256	128	128	512
	4	6	<8	<8	<8	<8	32	32	16	32
			Convalescent serum was not obtained							
	5	8	32	32	64	64	1024	512	512	1024
		22	128	128	128	256	≧2048	1024	512	≧2048
	6	7	<8	<8	<8	<8	8	8	8	8
		21	128	128	128	256	512	512	512	1024
	7	2	<8	8	<8	<8	16	32	<8	32
		50	8	16	8	32	128	128	64	256
Niijima	8	4	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
		18	128	128	128	128	≧2048	1024	512	≧2048
	9	1	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	32
		15	128	256	128	128	128	128	128	512
	10	2	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	8
		16	8	16	16	32	128	64	64	512
	11	1	<8	<8	<8	<8	16	<8	8	16
			Convalescent serum was not obtained							
Miyake	12	7	<8	<8	<8	8	64	64	64	128
		18	64	256	512	256	512	1024	512	2048
		22	128	512	512	512	512	1024	512	2048

Antigens for complement fixation test and indirect immunofluorescent antibody test were used K; Karp, G; Gilliam, NK; Kato and S-S; Shikine- S which was a local strain of R. tsutsugamushi isolated from one of the patients of Shichito fever in 1983.

* Isolation of rickettsia were attempted and successful in patient No.2 and No.3.

No.7 (Table 2) は前流行期の1983年11月にも発病しており(既報[1]の患者 No. 2), その臨床像を Table 4 に示す. 第1回感染では, 発熱, リンパ節腫脹, 刺し口および発疹の典型的症状を示したが, 第2回感染では, 発熱は前回より軽度で, 刺し口は掻痒感をもつ発赤が右肩に見られた程度と定型的なものではなく, 本人の申告によればそのまま黒化していったという. 初診時の発疹も第2回には認められず, 治療開始後に出現したかどうかは確認できなかった. この患者の血清学的検査成績を Fig.2に示す. 第1回感染における特徴は, CF, IF 共に回復期に Gilliam 株抗原に対してのみ抗体価が有意に上昇し, 95病日でも保持されたのに反して, 他の3株に対して, 特に CF で全く上昇を示さなかったことである. 第2回感染では, IF は Shikine-S 株を含めた4株抗原すべてに対して上昇し, CF では4株のうちでも特に Shikine-S 株に上昇が強くみられた. これらの結果より, No. 7 の患者は二流行期に連続して感染を受けたことが立証された.

③野鼠に関する調査　野鼠の捕獲　第3回調査期間中に金網式トラップにより13匹のドブネズミ様ラット(現在同定中)を捕獲した. そのうち一匹(No. 6)は死亡していたが, 他の12匹はすべて生けどりにした(Table 5). 一方, Sherman 式トラップでは一匹も捕獲されなかった. 誘引餌別では, 甘藷ですべての野鼠がかかった. なお野鼠からのリケッチア分離成績については第4項で述べる.

野鼠の血中抗体保有状況　捕獲した野鼠13匹中8匹(62%)が Karp 株または Shikine-S 株に対し CF 価32倍以上, IF 価64倍以上の高い抗体価を保持していた(Table 5).

Table 4. Clinical Manifestation of Tsutsugamushi Disease in the Case of Re-infection

Patient's Vocation
housewife (family hotel manager)

	Infection	
	first	second
Onset	Nov. 1983 (46ys.)	Jan. 1985 (47ys.)
Working Place When Bitten by Mites ?	mowing at home	picking leaves of "Ashitaba" in the field
Incubation Period	10 days	10 days
Initial Manifest	chilliness	chilliness
Fever	37.5-39.0 C for 3 days	37.1-38.3 C for 3 days
Initial Skin Lesion	site under rt. mamma (ulcer)	rt. shoulder (itchy erythema)
Lymphadeno-pathy	rt. axillar	rt. cervical
Rash	trunk	none ?

This patient is also presented in Table 2 and Table 3 as patient No. 7 and in Fig. 2.

ツツガムシの付着数　13匹の野鼠の両耳介(解剖後両耳介を切断し，70%エタノール液に入れて実験室に持ち帰った)に付着していたツツガムシ幼虫は，33正から2008正，平均354正であった(Table 5)．ツツガムシは，発見時死亡していたNo. 6のラットに特に多く付着していた．(ツツガムシの付着状況，その同定結果についての詳細は別に報告する．)

④リケッチア分離同定成績　3名の患者の血液のうち2検体からRtが分離され，さらに捕獲した13匹の野鼠のうち8匹(62%)の分離材料よりRtが分離された(Table 5)．Rtが分離されたすべての被検材料とも初代からマウスを発症させた．野鼠No.13についてはcyclophosphamide前処置マウスのみより分離できたが，他の9株は，同処置マウス，無処置マウスの双方から分離できた．野鼠No.13のRtについても，4代目より無処置マウスに接種を試み，以降無処置マウスで継代可能であった．また継代2代目以降に新たにマウスを発症させた被検材料はなかった．Rt陽性材料接種マウスは，発症すると外見上，動作緩慢，立毛，腹部膨満を示すが，これらの症状は初代でも半数以上のマウスにみられ，2代以降はほぼ全例に認められた．接種より発症までの日数は，

Table 5. Contamination of the Rats with R. tsutsugamushi and Number of the Larval Trombiculid Mites in Those Captured in the Isle of Shikine, 1984

Rat No.*	Date of Capture	Sex	Body Weight (g)	Serum Antibody C F K	C F S-S	I F K	I F S-S	Isolation of Rickettsia	No. of Mites from Ears of Rat
3	1984. 11. 17	M	70	32	128	64	128	+	131
4	11. 17	F	40	<8	16	8	16	−	90
5	11. 17	M	55	64	128	64	128	+	215
6**	11. 18	F	230	128	128	512	512	−	2008
7	11. 19	F	45	8	16	8	8	+	179
8	11. 19	M	45	8	16	16	8	+	147
9	11. 19	M	35	16	16	16	16	+	225
10	11. 20	M	45	16	128	128	128	+	146
11	11. 20	M	335	64	128	256	256	−	807
12	11. 20	M	170	64	128	256	256	−	152
13	11. 20	F	170	32	128	128	128	+	33
14	11. 20	F	75	32	128	128	256	+	245
15	11. 20	M	35	<8	16	8	8	−	156

Antigens for complement fixation test and indirect immunofluorescent antibody test were used K; Karp and S-S; Shikine-S which was a local strain of R. tsutsugamushi isolated from one of the patients of Shichito fever in 1983.

* Rat No. 1 and No. 2 were omitted from this table because their capture were in the first field study, 1983.

* * found dead

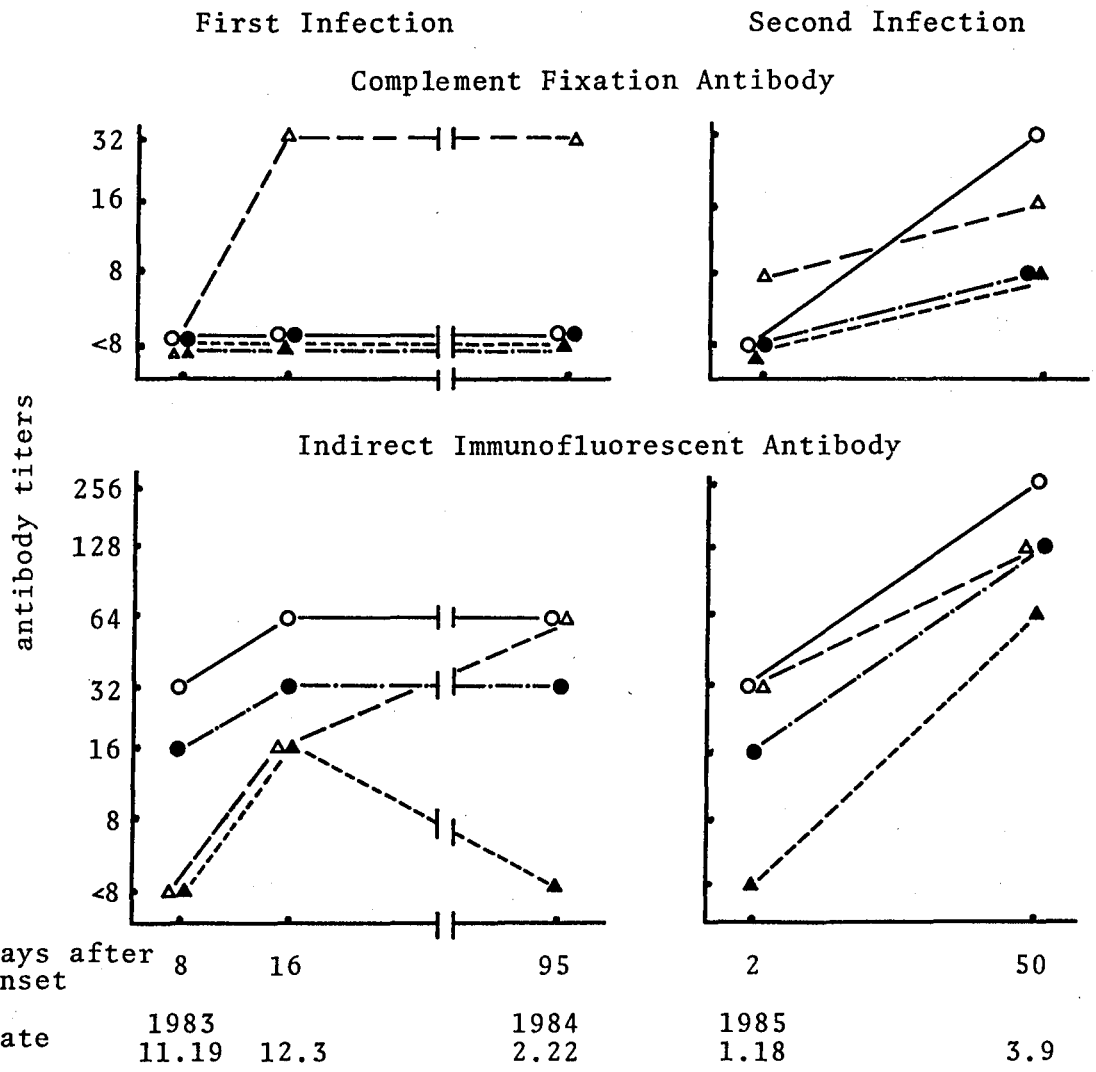


Fig. 2. Changes in Serum Antibody Lebel of the Patient Who Suffered Twice from Scrub Typhus with One Year Interval. Karp (●—·—●), Gilliam (△———▲), Kato (▲----▲) and Shikine-S (○———○).

初代では13～16日，2代以降は6～10日で，cyclophosphamide処置の有無にかかわらず，ほとんどの株で差はなかった．開腹剖検時，発症マウスは全例において，牽糸性の粘稠性腹水の貯溜を認めた．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．発症マウスでは，無発症あるいは発症後回復してかなりの日数を経たマウスの開腹時に特有な"生臭さ"がないのも特徴であった．発症マウスの腹膜塗抹標本のGiemsa染色では，大喰細胞の原形質内に数個のリケッチア粒子が見られたが，Rt標準株接種マウスの腹膜塗抹標本と比較すると，剖検時の肉眼所見に差はみられないのに，大喰細胞原形質内のリケッチア粒子は極端に少なかった．これら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血清が，前述4株のRt抗原に対してCF陽性を示し，特にKarp株およびShikine-S株抗原に高く反応したので，今回の分離リケッチア10株は，すべてRtのKarp型近縁株と同定型別された．

考　察

リケッチア分離率は，今回62%で前回同様比較的高く，ヌードマウスを使用せずに普通マウスで初代より発症し，結果的には免疫抑制剤の必要性もほとんどなかった．

このことより，式根島におけるツツガ虫病を流行させている病因リケッチアは，川村の分類[6]によるヒトおよびマウスに対して中等度以上の病原性をもつものであることがはっきりした．また，同島鼠族においてRt分離陽性あるいは血中抗体陽性のラットが85%に達した(Table 5)ことは，有毒ツツガムシがかなりの頻度で分布することを裏づけている．

今回の調査における臨床症状については，発熱とならんで全例に刺し口が認められ，発疹も75%にみられた．これは前報[1]でのそれぞれ74%，63%および26%と比較して格段に高率である．このことは，多彩な臨床像のバラツキとみなすよりは，現地医家の間に，七島熱に対する鑑別診断を徹底させるために刺し口検索へ一層の努力がはらわれた結果との考え方もできる．

次に患者の急性期から回復期への抗体価の推移であるが，CFでは各型の抗原間に交差反応が認められた[7]が，おおむねKarp株とShikine-S株に強い上昇を示した．特にShikine-S株抗原に対する抗体上昇が優位なため，まだ例数が少なく断定はできないが，式根島に隣接する新島本島の流行株もShikine-S株類似の抗原性をもつことが示唆される．しかし，分離株ないし流行株と標準株との抗原性の比較は，すでに単クローン抗体法によって詳細に検討する段階にさしかかっており[8]，今後の研究課題である．

ツツガ虫病に反復して感染発症した事例のあることは，宍戸らの報告[9]にみられ，七島熱に関しては，林らのアンケート調査結果[10]によっても示唆されていたが，いずれも第1回感染については患者の申告にもとづくもので，血清学的に裏付けられていなかった．本報告では，No. 7の患者を合計5回にわたって採血しており，このfollow-upの成果として再感染が裏付けられた．第1回感染は血清学的に診断すると一見Gilliam型株によるものとみなされる．第1回の発病は第1回調査の直前であり，数日前からテトラサイクリン投与を受けていたためリケッチア分離は試みられておらず，Gilliam型近縁株による感染を完全に否定することはできない．しかし，これまで式根島において分離されたRt13株がすべてKarp型近縁株に一致していたことから類推すると，この第1回感染のみがGilliam型株であったとは考えにくい．むしろ，個体差もあり第3病日という早い時期に投与を受けたテトラサイクリンなどの影響により免疫応答が不完全なものとなって，Karp株およびShikine-S株抗原に対する抗体産生が完成せず，1年余を経た再感染にも発症したと思われる．いずれにしても，この患者は本邦におけるツツガ虫病について，血清学的に再感染が確認できた最初の症例である．ここにおいて，式根島の如く有毒ツツガムシに接触する頻度の高い流行地の住民には，再感染の危険があることが立証された．

七島熱に限らず，1984年末には，都市部に近い東京都町田市においてもツツガ虫病患者が発生し，同病の地域的広がりはとどまるところを知らない．また1985年春以降，福島，岩手両県下で3名の死亡例が確認されて，届出患者数の増加のみならず時には重症化し，死亡例もでている．このような重症例では，交通機関の発達により他県で感染し，東京に来てから発病，診断のつかぬまま死亡する危険性[11]も少なくない．これらの事態に対処するためには，検査態勢の整備にとどまらず，抗原性および病原性の究明に向けてなお一層の研究態勢の充実をはかるべく，格段の措置を講ずることが緊要である．

謝辞 本研究を実施するにあたり，標準株の分与等種々の御教示，御協力を戴いた群馬衛研，氏家淳雄博士，小山孝氏，環境保健部の各位，本調査に種々御協力および御配慮を戴いた新島本村役場，同式根島支所，同診療所，式根島診療所，都衛生局防疫結核課，島しょ保健所，都立広尾病院の関係各位に深謝いたします．

(本研究は，昭和58，59年東京都衛生局「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74回1985年5月で発表した．)

文　献

1) 伊藤忠彦ほか：東京衛研年報，35，61，1984
2) 医科学研究所学友会編：細菌学実習提要，1983，丸善，東京
3) 橘　宣祥ほか：感染症誌，52，50，1978
4) 山本正悟ほか：臨床とウイルス，8，422，1980
5) Kawamura, A., Jr. and Aoyama, Y.,(eds.)：*Immunofluorescence in Medical Science*, 1982, University of Tokyo Press, Tokyo
6) 川村明義：日本細菌学誌，34，375，1979
7) 氏家淳雄：モダンメディア，27，408，1981
8) 大橋典男ほか：日本細菌学誌，40，309，1985
9) 宍戸　亮ほか：日本伝染病学誌，36，179，1962
10) 林　績ほか：東京都衛生局学誌，73，174，1984
11) 坂井冨士子，河口幸博：東京衛研年報，32—1，45，1981

Photo 1. Initial Skin Lesion of the Patient No.1 (Crust)

Photo 2. Initial Skin Lesion of the Patient No.3 (Vesicle)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 43-46, 1985

イヌにおけるレプトスピラ抗体保有調査成績

梅木富士郎*, 丸山　務*, 神崎政子*, 松本昌雄*

Study on Leptospira Antibody in Dogs

FUJIO UMEKI*, TSUTOMU MARUYAMA*, MASAKO KANZAKI* and MASAO MATSUMOTO*

Leptospira antibody in dogs was investigated using 457 house dogs collected in 11 prefectures and 89 stray dogs in Tokyo from 1983 to 1984. Titration of antibody was conducted by a means of microtitering by microscopic agglutination test using as antigens live cells with the following 5 serotypes: *Leptospira icterohaemorrhagiae* (L.i), *L. canicola* (L.c), *L. autumnalis* (L.at), *L. hebdomadis* (L.h), *L. australis* (L.au).

Of 457 house dogs, 31 (6.8%), 30 (6.6%) and 1 (0.2%) were found positive in respect of L.i, L.c and L.at respectively when agglutinin titer of over 1:80 was considered as positive. No dog was found positive in respect of L.h and L.au. There were 7 cases which showed agglutinin titer of over 1:80 in respect of more than 2 serotypes, amounting to a total of 55 positive individual cases among 457 with the positive ratio of 12.0%. The ratio was high in western Japan, i.e. in Kagawa and Hiroshima Prefectures. 31 cases in Tokyo were all negative. Positive ratio was slightly higher in males than in females and also in dogs kept outdoors than those kept indoors.

Positive ratio of stray dogs as seen in 89 cases from Tokyo was obviously higher compared to house dogs. 22 (24.7%) and 7 (7.9%) were respectivie in respect to L.i and L.c.

Keywords : leptospira, antibody, dog, microscopic agglutination test

はじめに

ワイル氏病に代表されるレプトスピラ症は，病原である *Leptospira interogans* がネズミなどの野生動物に保有されているためにその完全な制圧が困難であり，毎年死亡例を含む多数の症例が確認されている．一方，本菌はペット動物であるイヌにも高い感染性があり，イヌからヒトへの感染もみられる人畜共通伝染病菌としても重要である．したがって，野生動物やペット動物における感染状態を把握しておくことはヒトのレプトスピラ症予防のための貴重な情報である．

今回私達は，日本獣医師会が企画する「人畜共通伝染病感染動物の実態に関する調査研究」に参画し，全国の飼犬におけるレプトスピラ抗体保有状況を調査する機会を得た．また同時期に収集された東京都における放浪犬についても同様の調査を独自に行ったので両者の成績について報告する．

材料および方法

1．被検血清

供試したイヌの血清は，1983年10月から1984年1月にかけて，日本獣医師会に所属する全国11都県の開業獣医師によって収集された飼育犬457頭および東京都動物管理事務所に保護収容された放浪犬および継続飼育が出来ずに持ちこまれたいわゆる引取り犬計89頭の合計546頭のものである．

2．抗原

レプトスピラの抗原は，*L. interogans* の下記5種の血清型株を用いた，すなわち，*L. icterohaemorrhagiae* RGA (L.i)，*L. canicola* H.Ut, IV, (L.c)，*L. autumnais* 秋

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjnjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

疫A (L.at), *L.hebdomadis* 秋疫B (L.h), *L.australis* 秋疫C (L.au) である．これら5菌株を，コルトフ培地で30℃ 7日間培養し，得られた生菌を抗原とした．

3．抗体価の測定

Schüffner-Mochtar の方法をマイクロタイター化して行った，すなわち，5種の血清型株の生菌を抗原とした凝集反応を，顕微鏡で観察し，判定は対照50%以上の凝集を示した最高希釈倍数をもってその血清抗体価とした．

結　果

1．飼育犬の血清型別抗体保有状況

全国の飼育犬457件のL.i, L.c, L.at, L.h, およびL.auに対する抗体価を20倍以下から640倍以上の6段階に分けてそれぞれの該当数を表1にあらわした．東京都の放浪犬89件のそれは表2に示した．飼育犬で80倍以上の陽性例は，L.i.は31件(6.8%)，L.cは30件(6.6%)，L.atは1件 (0.2%) であった．L.hおよびL.auには80倍以上の陽性例は1件もなかった．陽性例のうち，L.iとL.cの双方の血清型に陽性を示したものが7件あったので，個体としては55件がレプトスピラ抗体陽性犬であった．また，抗体価の最高値はL.iが160倍，L.atが80倍であったが，L.cは320倍以上が5件あり，そのうちの3件は640倍以上であった．

2．放浪犬の血清型別抗体保有状況

東京都内の放浪犬および引取り犬89件の陽性例はL.iは22件 (24.7%)，L.cは7件 (7.9%) であった．これら陽性例のうち，L.iは640倍が2件，320倍2件，160倍5件，80倍13件であり，L.cの6件のうち1件は2,560倍であった．他の3菌型に対してはいずれも40倍以下であった．

3．地域別陽性率

飼育犬で抗体価陽性の55件を地域別に分類して表3に示した．最も高いのが香川県の49件 (34.7%) で次いで広島県の25.7%で，一般に西日本地区に陽性率が高かった．東京都の飼育犬は31件中陽性例は1件もなかったが，放浪犬および引取り犬の89件では26件 (29.2%) が陽性であった．

4．性別，飼養形態別陽性率

レプトスピラ抗体陽性の飼育犬55件を性別に分類すると雄30件(54.5%)，雌25件 (45.5%) でやゝ雄に陽性率

表1　飼育犬におけるレプトスピラの抗体保有状況

血清型 / 抗体価	*L. icterohae-morrhagiae*	*L. canicola*	*L. autumnalis* (秋疫A)	*L. hebdomadis* (秋疫B)	*L. australis* (秋疫C)
≧640	0	3	0	0	0
320	0	2	0	0	0
160	4	10	0	0	0
80	27	15	1	0	0
40	18	22	5	1	2
≦ 20	408	405	451	456	457
計	457	457	457	457	457

表2　東京都内の放浪犬におけるレプトスピラ抗体保有状況

血清型 / 抗体価	*L. icterohae-morrhagiae*	*L. canicola*	*L. autumnalis* (秋疫A)	*L. hebdomadis* (秋疫B)	*L. australis* (秋疫C)
≧640	2	1	0	0	0
320	2	0	0	0	0
160	5	1	0	0	0
80	13	5	0	0	0
40	24	13	0	0	0
≦ 20	43	69	89	89	89
計	89	89	89	89	89

表3　飼育犬の地域別，血清型別陽性率（陽性：抗体価80倍以上）

地域	検査数	陽性数（陽性率%）					
		全血清型個体	*L.icterohae-morrhagiae*	*L.canicola*	*L.autumnalis*（秋疫A）	*L.hebdomadis*（秋疫B）	*L.australis*（秋疫C）
北海道	50	3(6.0)	1(2.0)	2(4.0)	0(0)	0(0)	0(0)
宮城県	32	4(12.5)	4(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
埼玉県	50	5(10.0)	4(8.0)	2(4.0)	0(0)	0(0)	0(0)
東京都	31	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
横浜市	37	5(13.5)	4(10.8)	1(2.7)	0(0)	0(0)	0(0)
新潟県	50	1(2.0)	0(0)	1(2.0)	0(0)	0(0)	0(0)
名古屋市	36	2(5.6)	1(2.8)	1(2.8)	0(0)	0(0)	0(0)
兵庫県	47	6(12.8)	4(8.5)	3(6.4)	0(0)	0(0)	0(0)
広島県	35	9(25.7)	8(22.9)	3(8.6)	0(0)	0(0)	0(0)
香川県	49	17(34.7)	6(12.2)	15(30.6)	1(2.0)	0(0)	0(0)
北九州市	40	3(7.5)	1(2.5)	2(5.0)	0(0)	0(0)	0(0)
全国計	457	55(12.0)	31(6.8)	30(6.6)	1(0.2)	0(0)	0(0)

が高かった．また，陽性例55件のうち室外飼育は31件（56.4%），室内飼育24件（43.6%）であった．陽性個体の中でL.cに320倍以上の高い抗体価を示した5件はすべて雄の室外飼育例であった．

なお，品種によるあるいはレプトスピラワクチン接種の有無による両者の差異はみられなかった．

考　察

わが国におけるレプトスピラに関する疫学的研究は，稲田ら[1]によるワイル病病原体発見以来歴史があり，1940年北岡[2]，山本[3]がそれぞれイヌから*L.canicola*を分離し，また多数の抗体陽性例も検出して感染源としてのイヌの重要性を指摘して以来，イヌからのレプトスピラの分離および抗体保有調査の成績がある[4-8]．しかしながらこれらは安藤[6]の報告を除いていずれも野犬または放浪犬を対象としたものであり，また，限られた地域での成績である．今回の我々の調査はすべて現在家庭に飼育中のイヌが対象であり，しかも北海道から九州までの地域で同時に実施したものであることから，現在のわが国のイヌにおける実態をほぼ正確に表わしているものといえよう．

飼育犬の陽性率12.0%は従来の報告よりやゝ低い値であったが，地域別では香川県や広島県など西日本地区で陽性率が高く，これらの地域では飼育犬の間にもなお広範な感染があるものと推察される．東京都の飼育犬は31例はすべて陰性であったが，同時期に採取された放浪犬および引取り犬では89例中陽性が26例もあり6年前に我々が同じ東京都の放浪犬で調査した成績とほとんど同率であった．安藤[6]らも栃木県での調査から飼育犬の陽性率は放浪犬のそれに比較して有意に低いことを指摘している．放浪犬の感染率については従来と変わらずレプトスピラはイヌで根強く感染がくり返えされているものと思われる．

今回調査の対象となった合計546頭はすべてレプトスピラの臨床症状の無いもののみであるが，高い抗体価を示した個体は培検で腎臓に障害を認めるものが多かった．L.cに2,560倍の抗体価を認めた放浪犬は，その病理所見から間質性腎炎を疑わせるものであった．

我が国ではヒト，レプトスピラ症の原因となる血清型は沖縄県を除いてL.i, L.c, L.at, L.h, L.auであるので，血清学的診断にはこの5種の抗原を準備する必要がある．しかしながら今回の成績でも明らかなように，L.at, L.h, L.auに80倍以上の陽性を示したのは1件のみであり，イヌにおける抗体保有調査にはL.iとL.cの2種の抗原のみで十分である．

レプトスピラの血清学的診断にはいくつかの方法が考案され，その簡易化も進められてきているが，現在最も確実な方法は，今回我々も用いた生菌による凝集反応であるといわれている．しかしこの方法は生菌を常時準備しておかなければならないこと，生菌を扱うために危険性を伴うことなど，手技にやゝ難点があることが指摘されている．このために動物における疫学調査が進展しない理由を否定できない．最近，有光[9]はヒト血清でマイク

ロカプセルを担体としたより安全で感度の秀れた方法を開発した．我々は早速これを動物血清に応用し，基礎実験では良好な成績を得ることができた[10]．さらに血清処理の条件などを現在検討中であるが，このような安全で簡便な方法が実用化されることが強く望まれる．

ま と め

1983年から1984年にかけて，全国11都県の飼育犬457頭，東京都の放浪犬89頭を対象に，レプトスピラの抗体保有調査を行った．

抗体価の測定は *Leptospira icterohaemorrhagiae* (L.i)，*L.canicola* (L.c)，*L.automnalis* (L.at)，*L.hebdomadis* (L.h)，*L.australis* (L.au) の5種の血清型の生菌を抗原とした顕微鏡凝集反応をマイクロタイター化して行った．

凝集素価80倍以上を陽性とした場合，陽性数は飼育犬457例中 L.i 31(6.8%)，L.c 30(6.6%)，L.at 1 (0.2%) で，L.h と L.au の陽性例はなかった．2種以上の血清型で80倍以上の凝集素価を示した例が7例あったので個体として陽性数は457例中55で陽性率は12%であった．陽性率は香川県，広島県などの西日本地域で高く，東京都の31例はすべて陰性であった．また，陽性率は雌よりも雄で，室内飼育より室外飼育例でやゝ高い傾向であった．

一方，東京都の放浪犬89例の陽性数は L.i 22例(24.7%)，L.c 7例 (7.9%) で，飼育犬に比較して陽性率は明らかに高かった。

文 献

1) 稲田龍吉，井戸泰：東京医事新誌，1908，351,1951
2) 北岡正見：実験医学雑誌，24，861，1940
3) 山本脩太郎：日本獣医学雑誌，2，39，1940
4) 喜多英治：日本伝染病学会誌，35，105，1961
5) 湯川真嘉，今村 晋：第16回レプトスピラシンポジューム記録，1，1979
6) 安藤良子：第16回レプトスピラシンポジューム記録，2，1979
7) 山本脩太郎：日本獣医学雑誌，5，45，1943
8) 橋爪直規，田中豊隆，村田光明，塩見久章，高島利幸，梅木富士郎：東京都衛生局学会誌，63，118，1979
9) 有光佳子：山口医学，31，549，1982
10) 梅木富士郎，神崎政子，丸山 務，松本昌雄：第22回レプトスピラシンポジューム記録，8，1985

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 47-51, 1985

生食用アジの病原ビブリオ汚染調査

平田一郎*, 太田建爾*, 池島伸至*, 神　真知子*
新井輝義*, 入倉善久*, 坂井千三*

Distribution of Pathogenic Vibrios in Horse Mackerel

ICHIRO HIRATA*, KENJI OHTA*, NOBUYUKI IKEJIMA*, MACHIKO JIN*,
TERUYOSHI ARAI*, YOSHIHISA IRIKURA* and SENZO SAKAI*

The distribution of pathogenic vibrios was surveyed on horse mackerel during the period of July 1983 through August 1984.

It was confirmed that 6 kinds of vibrios were detected from horse mackerel, and those were *Vibrio parahaemolyticus*, non-O1 *Vibrio cholerae, Vibrio mimicus, Vibrio fluvialis*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio damsela*. *V. damsela* was detected throughout the year, although the frequency of isolation of the other vibrios was dependent on the temperature and was high only during the summer season.

Thirteen of 20 non-O1 *V. cholerae* isolates from horse mackerel, were typed into 6 serotypes, and O6 of them was predominant type. In the case of *V.mimicus*, 8 of 17 isolates were typed into 3 serotypes, and of them, O41 was predominant type.

No Kanagawa phenomenon positive strain of 640 isolates of *V. parahaemolyticus* was detected from horse mackerel. By using RPLA(Reversed passive latex agglutination)test, it was also found that 4 isolates of them produced Kanagawa hemolysin.

All of isolates of non-O1 *V. cholerae* and *V. mimicus* produced some hemolysin against human and sheep erythrocytes. On the other hand, 81.7% of *V. fluvialis* and 48.4% of *V. vulnificus* isolates produced hemolysin against human and sheep erythrocytes.

Keywords: pathogenic vibrios, non-O1 *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis*, Kanagawa hemolysin, distribution

緒　言

病原ビブリオの自然界における分布を明らかにすることは，これらビブリオに起因する食中毒や下痢症等の予防対策に大きな手がかりを与えることは言うまでもない．しかし，Non-O1 *V. cholerae*（以下NAGと略す）をはじめ最近注目されている *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. hollisae*, *V. vulnificus*, *V. damsela*, *V. metschnikovii* 等の病原ビブリオの生態は，ほとんど解明されていない．

これまで，自然界における病原ビブリオの分布についての報告[1,2]は散見されるが，いずれの報告も調査期間は夏季に限られ，年間を通しての分布調査は行われていない．

そこで我々は，自然界におけるNAGをはじめとした病原ビブリオの分布調査の一還として，今回は年間を通して比較的簡単に入手できる生食用アジを対象に，分布調査を行い，さらに分離菌株の血清型および病原性を検討したので，それらの結果を報告する．

材料および方法

1．材料

生食用アジは大部分が下関で陸揚げされ，都内の魚市場に入荷した直後のものである．

* 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, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, 16—25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan

調査期間は1983年7月より1984年8月までの1年2ケ月間で，原則として毎週一回5検体を採取し，合計270検体を供試した．

2．検査方法

供試アジを無菌的に表皮，エラおよび腸管の3部位に分け，その各々について常法[3]に準拠して検査した．

使用分離培地はTCBS寒天，ビブリオ寒天およびSPS寒天[4]を使用した．確認培地は第一段階として2％NaCl加TSI寒天培地，2％NaCl加LIM培地および無塩ペプトン水を用いた．さらにチトクロームオキシダーゼ試験，6％，8％，10％NaCl加ペプトン水における食塩耐容性，ブドウ糖からのガス産生性，VP反応，アミノ酸脱炭酸試験，および炭水化物分解性等の各生化学的性状試験を実施した．

3．分離菌株の血清型別（O抗原）

分離収集したNAGおよび*V.mimicus*の血清型別は，坂崎らの方法に従って自家調製した診断用血清と，供試菌株のトリプチケース・ソイ寒天培地培養菌を1時間加熱処理した抗原を用いて，スライド上凝集反応で行った．

*V. fluvialis*の血清型別については，工藤ら[5]がヒト下痢症由来株を家兎に免疫し調製した血清を用い，以下の方法で行った．抗原の調製は供試菌株の2％NaCl加トリプチケース・ソイ寒天培地培養菌を前述通り加熱処理を行い，その0.025m*l*と希釈調製された抗血清0.025m*l*をマイクロプレート（U）中で，50℃，18時間反応させて，凝集の有無を観察した．

4．神奈川溶血毒産生性

分離収集した*V. parahaemolyticus*の神奈川溶血毒産生性は我妻変法およびRPLA法で検討した．

我妻変法は，供試菌株を2％NaCl加トリプチケース・ソイ・ブイヨン，37℃，18時間前培養を行い，定量白金耳（1/1000 m*l*）を用いて5％ヒト血液加変法我妻培地に接種し，37℃，18時間湿箱中で培養後，溶血の有無を観察した．

RPLA法（Reversed Passive Latex Agglutination Test）は太田ら[6]のRPHA法に準拠して調製した感作ラテックスを用いて検討した．

5．溶血毒の産生性

NAG，*V.mimicus*，*V. fluvialis*および*V. vulnificus*の4菌種について，ヒトおよびヒツジ赤血球に対する溶血性をBlood Agar Base（OXID）を基礎培地とした2％NaCl 3％血球加平板を用いて検討した．

供試菌株の血球平板への接種および溶血の観察は，前述の我妻血球平板法の場合と同様に行った．

6．腸管病原毒素産生性

NAGおよび*V.mimicus*のコレラエンテロトキシン産生性は，RPLA法（デンカ生研製キットを使用）で検討した．

成　績

1．病原ビブリオ検出成績

生食用アジの各部位における病原ビブリオの検出成績をTable 1に示した．

生食用アジからは6種の病原ビブリオが検出され，それらの検出率は*V. damsela*が最も高く（58.9％），次いで*V. parahaemolyticus*（47.0％），*V. fluvialis*（23.6％），*V.vulnificus*（9.6％），NAG（3.3％），*V.mimicus*（3.0％）の順であった．

これらを部位別にみるとNAGおよび*V.mimicus*は表皮とエラから，*V.parahaemolyticus*は表皮から，*V. damsela*は腸管から優位に検出された．

Table 2に月別の検出成績を示した．*V.damsela*は年間を通して毎月検出されたが，*V. parahaemolyticus*は6～10月にかけて多く検出され，12～4月にはほとんど検出されなかった．また，*V. fluvialis*および残りの3菌種

Table 1. Detection of vibrios from horse mackerel

Organism	No. of positives n＝270	Region		
		Skin n＝270	Gill n＝270	Intestine n＝270
V. damsela	159(58.9)	81(30.0)	84(31.1)	124(45.9)
V. parahaemolyticus	127(47.0)	109(40.4)	65(24.1)	70(25.9)
V. fluvialis	88(32.6)	50(18.5)	31(11.5)	33(12.2)
V. vulnificus	26(9.6)	7(2.6)	12(4.4)	12(4.4)
Non-O1 *V. cholerae*	9(3.3)	6(2.2)	6(2.2)	2(0.7)
V. mimicus	8(3.0)	6(2.2)	5(1.9)	1(0.4)

( )：％

Table 2. Monthly detection of vibrios from horse mackerel

Organism	1983 Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	1984 Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.	Jul.	Aug.	Total(%)
	20*	25	20	20	15	15	15	20	15	20	20	20	25	20	270(100.0)
V. damsela	13	20	10	19	13	2	5	1	5	14	1	13	25	18	159(58.9)
V. parahaemolyticus	16	18	20	17	5	1	0	2	0	0	0	3	25	20	127(47.0)
V. fluvialis	11	17	14	8	5	0	0	0	0	0	2	7	8	16	88(32.6)
V. vulnificus	1	3	2	3	5	1	0	0	0	0	1	1	4	5	26(9.6)
Non-O1 *V. cholerae*	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	9(3.3)
V. mimicus	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	8(3.0)

* : No. tested

Table 3. O serovar distribution of non-O1 *V. cholerae* and *V. mimicus*

Organism	No. of isolates tested	O serovar*							
		2	6	12	14	22	36	41	UT
Non-O1 *V. cholerae*	20	2	5	1	2	2	1	-	7
V. mimicus	17	-	2	-	1	-	-	5	9

* : Sakazaki's non-O1 *V. cholerae* typing system

Table 4. O serovar distribution of *V. fluvialis*

No. of isolates tested	O serovar							
	1	6	11	12	13	14	16	UT
120	3	1	1	5	1	1	1	107

も前述の *V. parahaemolyticus* の場合と同様であった.

2. 分離菌株の血清型別 (O抗原)

生食用アジから分離したNAGおよび *V. mimicus* の血清型別をTable 3に示した.

NAGは供試した20株のうち13株が6菌型に型別された. そのうちわけはO6が5株, O2, O14およびO22がそれぞれ2株, O12とO36がそれぞれ1株であった. 残りの7株は本型別法では型別することができなかった.

一方, *V. mimicus* は17株中8株がO6, O14およびO41の3菌型に型別され, 残りの9株は型別不能であった.

Table 4に *V. fluvialis* の血清型別の結果を示した. 供試した120株のうち107株が型別不能で, 型別されたのはわずか13株(11.0%)で, その血清型はO1, O6, O11, O12, O13, O14およびO16の7菌型であった.

3. 神奈川溶血毒産生性

V. parahaemolyticus の神奈川溶血毒産生性を我妻血球平板法とRPLA法で検討した結果をTable 5に示した.

Table 5. Producibility of Kanagawa hemolysin of *V. parahaemolyticus*

Methods	No. of isolates tested	No. of Kanagawa hemolysis:	
		positive	negative
Agar plate*	643	0	643
RPLA**	643	4	639

* : Modified Wagatsuma Blood Agar
** : Riversed Passive Latex Agglutination Test

我妻血球平板法では, 供試株すべてが陰性であった. しかし, 特異性の高いRPLA法では, 神奈川溶血毒を産生する株が4株 (0.6%) 認められた.

4. 溶血毒の産生性

NAG (20株), *V. mimicus* (17株), *V. fluvialis* (120株), *V. vulnificus* (31株) のヒトおよびヒツジ赤血球に対する溶血性を検討した結果をTable 6に示した.

NAGおよび *V. mimicus* は供試株のすべてがヒトおよびヒツジ赤血球に対し溶血性を示した.

V. fluvialis は供試120株のうち94株がヒトおよびヒツジ赤血球に, 1株がヒト赤血球のみに, 3株がヒツジ赤血球のみに溶血性を示した.

V. vulnificus は供試31株中4株がヒトおよびヒツジ赤血球に, 10株がヒト赤血球のみに, 1株がヒツジ赤血球のみに溶血性を示した.

Table 6. Hemolytic activity for human and sheep red blood cells

Organism	No. of isolates tested	Red blood cells H*&S** + +	H&S + −	H&S − +	H&S − −
Non-O1 *V. cholerae*	20	20	-	-	-
V. mimicus	17	17	-	-	-
V. fluvialis	120	94	1	3	22
V. vulnificus	31	4	10	1	16

*：Human, **：Sheep

5．腸管病原毒素産生性

分離収集したNAG20株および *V. mimicus*17株について，コレラエンテロトキシンの産生性を検討したが，供試株のすべてが陰性であった．

考　察

従来，ヒトに病原性を示すビブリオとして，*V. cholerae*, O1および *V. parahaemolyticus* の2菌種が知られていたが，近年，さらに数種類のビブリオの病原性が明らかにされ，すでにわが国ではNAG，*V.mimicus* および *V. fluvialis* が食中毒起因菌として追加されている．この他 *V.hollisae* による下痢症[7,8]，*V.vulnificus* による敗血症[9,10]，*V.damsela* による創傷感染，さらに *V.metschnikovii* による日和見感染[11]等の報告もみられ，これら菌種のヒトに対する病原性が大いに注目されるようになった．

また，これまで我が国においては海外旅行者に限られていたコレラ等のビブリオ感染症が，海外渡航歴のない者からも認められ[12,15]，その感染源が問題となっている．

我々はこれら病原ビブリオの自然界における分布を明らかにするため，今回は生食用アジを対象とし，分布調査を実施した結果，*V.parahaemolyticus* のみならず，NAG，*V. mimicus*，*V. fluvialis*，*V. vulnificus* および *V. damsela* 等の病原ビブリオが高頻度に検出されたことは，誠に興味深い．

これらビブリオの自然界における季節変動は，*V.parahaemolyticus* についてはすでに詳細に検討されている[16]が，その他の病原ビブリオはほとんど検討されていない．今回の調査で，*V. damsela* は年間を通して検出されること，また，NAG，*V. mimicus*，*V. fluvialis* および *V. vulnificus* は *V. parahaemolyticus* の場合と同じ傾向を示すことが明らかにされた．また，海水温の高い時期には，生食用アジの約90%が同時に2種以上の病原ビブリオに汚染されていることも確認された．

これらの事実は，最近感染源が不明なNAGや *V. mimicus* による集団下痢症の国内発生例が報告[13,14]されているが，それらの感染源との関連において注目すべき点と考える．

次に，今回アジから検出されたNAG，*V. mimicus* および *V. fluvialis* については血清型別を実施した．その結果，前述の国内発生例のNAGビブリオ食中毒および *V. mimicus* による食中毒の原因菌と同一血清型菌，すなわち前者はO6，後者はO41が新鮮なアジに多数存在することが明らかとなった．

ヒトに対して病原性を示すビブリオの病原因子は，*V. cholerae*, O1についてはすでに解明されている[17]が，その他のビブリオはいまだに不明の点が多い．

V. parahaemolyticus の病原性を論じる場合，神奈川現象が常に問題となる．すなわち本現象にあずかる耐熱性溶血毒が病原性と密接に関連していることは衆知のとおりである．患者ふん便由来の *V. parahaemolyticus* の約98%は本毒素を産生するのに対し，魚介類をはじめ自然界より分離される大部分のものは非産生であり，本毒素を産生する株は0.1%前後に過ぎない[18]．

今回，著者らが分離したアジ由来 *V. parahaemolyticus* の耐熱性溶血毒産生性は，我妻血球平板法ではすべて陰性であったのに対し，感度および特異性の優れたRPLA法においては，本毒素産生株が0.6%存在することが確認された．

NAGは病原性の指標の一つとして，*V. cholerae*, O1の産生するコレラエンテロトキシンと同一の毒素を産生することが知られている[19,20]．また本菌はこのコレラエンテロトキシンのみでなく，溶血毒，培養細胞に対する致死毒，毒素原性大腸菌の産生する耐熱性腸管病原毒素に類似した毒素等を産生するものも報告されている[19,21]．

著者らの分離したNAGについて，上記コレラエンテロトキシンの産生性をRPLA法で，溶血毒産生性を血球平板を用いて検討した．ヒトおよびヒツジ赤血球に対し

ては，供試株のすべてが溶血活性を示したが，コレラエンテロトキシンを産生する菌株は認められなかった．しかし，島田ら[22]はヒト由来および自然界由来のNAGでは，コレラエンテロトキシン産生株がそれぞれ16%，17%存在すると報告している．この島田らと著者らの成績の異なる理由は，おそらく供試株の由来の違いによるものと思われる．

なお，今回の調査はビブリオ感染症の感染源追求の手懸として，新鮮な生食用アジを対象に病原ビブリオの分布調査を行ったが，今後もさらに調査対象をひろげ，また分離菌株の病原性についても詳細に検討していきたい．

結　論

自然界における病原ビブリオの分布調査の一還として，1983年7月より1984年8月に，生食用アジを対象として調査を実施し以下の結果を得た．

1．生食用アジから，*V. parahaemolyticus*，NAG，*V. mimicus*，*V. fluvialis*，*V. vulnificus*，*V. damsela* の6種の病原ビブリオが検出された．それぞれのビブリオの季節変動は，*V. damsela* は年間を通して検出され，その他のビブリオは *V. parahaemolyticus* と同様，海水温の高い季節に多く検出された．

2．検出されたNAG（20株）の血清型は13株が6菌型に型別され，*V. mimicus*（17株）の血清型は8株が3菌型に型別された．最も多く認められた血清型はそれぞれO6，O41であった．

3．検出された *V. parahaemolyticus*（643株）の神奈川現象は，すべて陰性であった．しかしRPLA法では，神奈川溶血毒を産生する株が4株（0.6%）認められた．

4．検出されたNAGと *V. mimicus* はすべてヒトおよびヒツジ赤血球に対して溶血性を示した．また *V. fluvialis* では81.7%，*V. vulnificus* は48.4%の菌株がヒトあるいはヒツジ赤血球に対して溶血性を示した．

5．検出されたNAGおよび *V. mimicus* におけるコレラエンテロトキシンの産生性はすべて陰性であった．

（本研究の概要は第59回日本感染症学会総会1985年5月で発表した．）

文　献

1）三輪憲永，赤羽荘資，佐野文彦，塩沢寛治，竹田晃男，浅川　豊：食品と微生物，1，148，1984

2）赤羽荘資，三輪憲永，佐野文彦，浅川　豊：第17回腸炎ビブリオシンポジウム抄録，1983

3）倉田　浩，坂井千三：食品の衛生微生物検査，242，1983，講談社

4）Kitaura, T., S.Doke, I.Azuma, M.Imaida, K.Miyano, K.Harada and E.Yabuuchi：*FEMS Microbiology Letters*, **17**, 205, 1983

5）工藤泰雄，津野正朗，松下　秀，山田澄夫，太田建爾，坂井千三，大橋　誠：日細菌誌，**37**，331，1982

6）太田建爾，工藤泰雄，津野正朗，坂井千三，丸山　務，伊藤　武，大橋　誠：日細菌誌，**34**，837，1979

7）Morris, J. G., H. G. Miller, R. Wilson, C. O. Tacket, D.G.Hollis, F.W.Hickman, R.E.Weaver and P. A. Black：*Lancet*, June 5, 1294, 1982

8）Hickman, F. W., J.J.Farmer, D.G.Hollis, G.R.Fanning, A.G.Steigerwalt, R.E.Weaver and Don J.Brenner：*J. Clin. Microbiol.*, **15**, 395, 1982

9）谷川信子，藤田一誠，川合清毅：感染症誌，**5**，81，1981

10）前田裕弘，福田幸治，入交清博，堀内　篤：感染症誌，**6**，335，1982

11）Jacques, W., K. P. Rajashekaraiah, J. J. Farmer III, F.W.Hickman, J.G.Morris and Charles A. Kallick：*J. Clin. Microbiol.*, **14**, 711, 1981

12）大橋　誠：臨床と細菌，**6**，8，1979

13）村松紘一，和田正道，小林正人，島田俊雄，坂崎利一：感染症誌，**55**，1，1981

14）篠川　至，池村謙吾，山作房之輔，金井　碵，坂崎利一：第28回日本感染症学会東日本地方会総会抄録，43，1979

15）福見秀雄：日本医事新報，**2866**，12，1979

16）西尾隆章，貴田正義，下内啓万：広島大学医学雑誌，**15**，615，1967

17）大橋　誠：日細菌誌，**29**，354，1974

18）Miyamoto, Y., T.kato, Y.Obara, S.Akiyama, K.Takizawa and S.Yamai：*J. Bacteriol.*, **100**, 1147, 1969

19）Ohashi, M., T. Shimada and H. Fukumi：*J. Med. Sci. Biol.*, **25**, 179, 1972

20）Spira, W. M., and P.J.Fedorka-Cray：*Infection and Immunity*, 45, 679, 1984

21）刑部陽宅，児玉博英：感染症誌，**59**，464，1985

22）島田俊雄，坂崎利一，小追芳正：感染症誌，**56**，1017，1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 52-59, 1985

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（第2報）訪問国パターン別検査成績解析システム

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 (II) A System for Analyzing Causative Agents by Patterns of Countries Visited

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, パターンアナライザ pattern analyzer

我々は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（MRFC）を開発し[1,2]，1983年以後実務に活用してきた．このシステムはもっぱら，海外旅行者検便（以下㊞と略す）業務における，被検者データおよび検査成績の記録，各種台帳類の作成，および集計・検索・作表等，従来手作業で行なってきたデータ処理作業のコンピュータ化を主目的に開発された．しかしこのようにして記憶・蓄積された諸情報をどのようにすればより有効に活用できるかという観点に立てば，手作業では容易でなかった処理に関する請求要件（いわゆるRequirment）の認識，そのためのサポートシステムあるいはソフトウエアの開発が残された問題と言えよう．とくに，この種の感染症サーベイランスの領域においては，情報の活用こそが重要である．

我々はそのようなサポートシステムの1つとしてまず海外旅行者の渡航先に注目し，それと検出病原菌との関係を把握すべく，㊞訪問国パターンアナライザを開発したので，以下にその概要を述べる．

システムおよび試験解析用供試データ

パーソナルコンピュータのハードウエアおよびディスク・オペレーション・システム（DOSと略称する）は，MRFCの場合[1]と同じ仕様で，それぞれ，デュアル・ミニ・ディスクドライバ装備のPC8000mk II（旧PC8001の使用を配慮して拡張RAMを利用せず32Kバイト仕様）ライン，および，NEC PC8001 BASIC Ver 1.3(Copyright 1979 by Microsoft)，Two surface version「20−Sep−1981」を用いた．

訪問国パターン解析システム（以下「パターンアナライザ」と略称）の開発には，試験解析用として，MRFCの運用によって蓄積した㊞検査データのうち，1981～1984年分（被検検体数合計9,875件）を供試した．収録データは次のとおりである．すなわち，検査年・月・日，検体番号，送付主(保健所)，年令，性別，検査材料の種類，被検者区分，旅行国（5カ国），出国年・月・日，帰国月・日，病日目，下痢の種類，下痢の回数，腹痛・嘔吐，嘔気の有無，発熱，抗生剤およびその他の薬剤投与の有無，検出菌株数，検出病原菌（5種），検出菌株番号（5株）である．

パターンアナライザの開発にあたっては，まず，各暦年単位で訪問国パターン別病原菌検出成績の解析を行う試作ソフトウエアを開発した．このソフトウエアにおける基本的なデータ処理アルゴリズムは図1に示すとおりである．

訪問国のコードは，MRFC開発に際して用いたもの（表1）を踏襲した．すなわち，過去における㊞被検者の渡航先に基づいて，頻度の高い国については各国単位で，その他の国については地理的関係からまとめた地域単位で，コードを与えた．まず試作ソフトを用いて，上記のコード化とくに地域的な統括が，訪問国パターン解析のために不都合をきたさないかどうかを検討した．ま

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

表1． MRFC用訪問国コード

```
=●  [マルカイ]  デ゛ータ・ヘ゛ース   ヨウ 「コート゛・リスト」  ●=

        [MRFC] リョコウサキ・コート゛No. ノ リスト ***
-------------------------------------------------------------------------
 1=カンコク(Kore)     2=タイワン(Tawn)     3=チュウゴ゛ク(Chin)   4=ホンコン(Honk)     5=マカオ(Maka)
 6=ソノタノ ヒカ゛シ・アシ゛ア(●EAA)
11=イント゛ネシア(IndN) 12=シンカ゛ホ゜ール(Sinp) 13=タイ(Thai)   14=フィリヒ゜ン (PhiP) 15=マレーシア(Mals)
16=ソノタノ トウナン・アシ゛ア(●SEA)
21=イラン(Iran)     22=イント゛(Indi)    23=スリランカ(SriR)   24=ネハ゜ール(Nepl)   25=ハ゜キスタン(Paks)
26=ハ゛ング゛ラ(Bang) 27=ソノタノ チュウオウ・アシ゛ア(●CEA)
31=イラク(Iraq)     32=ソノタノ セイナン・アシ゛ア(●SWA)
41=ケニア(Keny)     42=エシ゛フ゜ト(Egip) 43=ソノタノ アフリカ(●AFR)
46=オセアニア(オーストラリア,カ゛ム ナト゛;OCE)  51=チュウナンヘ゛イ(フ゛ラシ゛ル,メキシコ ナト゛;CSA)
56=キタ・アメリカ(アメリカ,カナタ゛ ナト゛;NOA)  59=ソノタノ アメリカ(●Ame)
61=キ゛リシア(Grec) 62=ソノタノ ヨーロッハ゜(●EUR)
64=ソノタノ クニ(●OTR)                    [ 65=6ケコク イシ゛ョウ(>6), 66=ナシ(-), 67=フメイ(?) ]
```

(MRFC, Activity 9によるプリント出力)

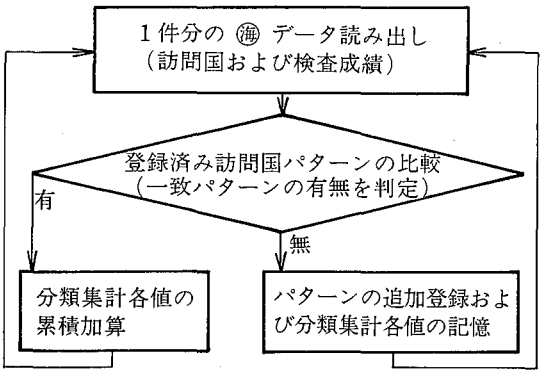


図1． 訪問国パターン解析の基本的アルゴリズム

た，各年における訪問国パターンの出現状況を把握して，最終目的とする累年被検体数1万件以上(5年分)のデータ解析の際の訪問国パターンの情報量を推定した．

以上の基礎的な検討を経て，累年式訪問国パターンアナライザの開発に入った．

㊥データの試験解析結果

まず，試作した訪問国パターン解析用ソフトウエアを用いて得た各年別㊥データ解析結果の概要を述べる．

表2は，各年における出現訪問国パターン数および原因菌別陽性数である．海外渡航者の訪問国パターンは，1981年192，1982年221，1983年212，1984年218種であったが検査総件数に対する出現パターン数の比は各々0.08～0.10の範囲にあり，ほぼ一定であった．

各年における病原菌検出率は，それぞれ31.3%，29.1%，27.4%，30.9%（平均29.6%）であり，ほぼ一定であった．また病原菌別の検出状況においても，この4年間における検出率の変動はごくわずかであった．

出現した訪問国パターンのうち，年ごとの該当被検者数が10名以上であった例を表3に示した．年別にみると，出現パターンは23～27（平均25.5）種であったが，4年間に出現したパターンは36種であった．この例数10名以上のパターンは出現総パターン数の約12%にすぎないが，該当被検者数にすると総数の80.5～85.1%，病原菌陽性例数では82.4～87.0%に相当した．また高頻度に出現するパターンは毎年ほぼ同じであった．

地域単位でコードの割り当てがなされた国々へのみ渡

表2． 年別訪問国パターン数および病原菌検出数

Year	No. of pattern	No. of Cases	No. of Posi.	V.cholerae		Vibrios			Shigella					Salmonella	Enteropathogenic E.coli						Other pathogens					
				O-1	NAG	fl.	pa.	spp.	All	(A	B	C	D)		EPEC	EIEC	ETEC	(LT	ST	L+S)	Cam.	Aer.	Ple.	Yer.	—	Ext.
(YE)	(CP)	DC(1)	DC(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9,	10,	11,	12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17,	18,	19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)
1981	193	2,194	687	2	25	4	128	1	55	(2	15	0	38)	276	44	6	176	(30	83	63)	72	3	32	0	0	0
1982	221	2,208	642	2	26	9	129	0	51	(0	20	3	28)	190	46	8	168	(26	91	51)	115	0	0	0	0	0
1983	212	2,758	753	5	41	9	129	0	58	(0	27	2	29)	257	42	17	191	(48	95	42)	95	7	47	0	0	0
1984	218	2,723	841	6	39	11	117	0	68	(3	26	3	36)	249	83	20	251	(56	117	78)	97	2	52	0	0	0
Total		9,875	2,923	15	131	33	503	1	232	(5	88	8	131)	972	215	51	786	(160	386	234)	379	12	131	0	0	0

表3．訪問国パターン別被検者数および病原菌陽性数

Pattern of countries visited※					1981		1982		1983		1984	
1	2	3	4	5	Cases	(Posi.)	Cases	(Posi.)	Cases	(Posi.)	Cases	(Posi.)
Kore,	－,	－,	－,	－	29	(6)	42	(8)	48	(16)	17	(0)
Tawn,	－,	－,	－,	－	27	(13)	49	(18)	48	(14)	184	(52)
Honk,	－,	－,	－,	－	14	(3)	15	(4)	10	(0)	·	( )
Honk,	Sinp,	－,	－,	－	·	( )	16	(2)	·	( )	·	( )
Honk,	Sinp,	Thai,	－,	－	20	(7)	13	(6)	13	(4)	·	( )
Honk,	Sinp,	Thai,	PhiP,	－	－	(－)	16	(3)	－	(－)	－	(－)
Honk,	Thai,	－,	－,	－	·	( )	·	( )	16	(2)	53	(10)
IndN,	－,	－,	－,	－	233	(82)	312	(72)	548	(133)	414	(131)
IndN,	Sinp,	－,	－,	－	29	(12)	41	(6)	36	(7)	37	(15)
IndN,	Sinp,	Mals,	－,	－	·	( )	·	( )	12	(3)	·	( )
IndN,	Thai,	－,	－,	－	·	( )	·	( )	10	(3)	10	(4)
Sinp,	－,	－,	－,	－	84	(14)	103	(29)	76	(21)	87	(30)
Sinp,	Thai,	－,	－,	－	25	(8)	20	(10)	20	(3)	13	(6)
Sinp,	Thai,	Mals,	－,	－	·	( )	·	( )	12	(3)	11	(1)
Sinp,	Mals,	－,	－,	－	46	(13)	80	(21)	65	(18)	64	(10)
Thai,	－,	－,	－,	－	236	(89)	245	(84)	303	(73)	226	(75)
Thai,	PhiP,	－,	－,	－	12	(2)	·	( )	12	(6)	·	( )
Thai,	@SEA,	－,	－,	－	·	( )	10	(3)	11	(5)	12	(4)
Thai,	Indi,	－,	－,	－	56	(20)	56	(20)	41	(10)	53	(18)
Thai,	Indi,	Nepl,	－,	－	34	(13)	40	(11)	43	(13)	38	(11)
Thai,	Nepl,	－,	－,	－	34	(11)	26	(10)	25	(6)	41	(14)
PhiP,	－,	－,	－,	－	580	(194)	463	(140)	720	(241)	614	(219)
Mals,	－,	－,	－,	－	32	(10)	44	(10)	45	(12)	49	(12)
Indi,	－,	－,	－,	－	150	(48)	99	(35)	146	(46)	191	(62)
Indi,	Nepl,	－,	－,	－	50	(10)	40	(15)	28	(9)	39	(9)
Indi,	@EUR,	－,	－,	－	15	(6)	·	( )	·	( )	·	( )
SriR,	－,	－,	－,	－	27	(7)	11	(3)	·	( )	35	(6)
SriR,	@CEA,	－,	－,	－	·	( )	·	( )	·	( )	49	(18)
Nepl,	－,	－,	－,	－	·	( )	·	( )	·	( )	17	(5)
Paks,	－,	－,	－,	－	·	( )	13	(5)	·	( )	·	( )
Keny,	－,	－,	－,	－	10	(2)	15	(6)	·	( )	14	(1)
Keny,	@AFR,	－,	－,	－	·	( )	·	( )	·	( )	11	(4)
Egip,	－,	－,	－,	－	·	( )	·	( )	14	(2)	·	( )
@AFR,	－,	－,	－,	－	12	(5)	·	( )	15	(3)	17	(5)
OCE ,	－,	－,	－,	－	·	( )	18	(6)	15	(2)	10	(3)
@EUR,	－,	－,	－,	－	·	( )	18	(4)	·	( )	·	( )
?,	?,	?,	?,	?	12	(3)	16	(0)	·	( )	18	(6)
Total					1,767	(578)	1,821	(531)	2,340	(655)	2,324	(731)

※ 該当被検者数が10例以上のもののみを記載した。
· 該当被検者数が10例以下のもの。
— 該当被検者なし。

表4. 個別コードを付さなかった国々へ渡航した被検者数および病原菌陽性数

Pattern of countries visited					1981	1982	1983	1984	Total
1	2	3	4	5	Cases (Posi.)	Cases (Posi.)	Cases (Posi.)	Cases (Posi.)	Cases (Posi.)
●EAA,	-,	-,	-,	-	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	0 (0)
●SEA,	-,	-,	-,	-	5 (1)	2 (0)	3 (1)	2 (1)	12 (3)
●SEA,	●EUR,	-,	-,	-	1 (0)	- (-)	- (-)	- (-)	1 (0)
●SEA,	●SWA,	●AFR,	-,	-	- (-)	- (-)	1 (0)	- (-)	1 (0)
●CEA,	-,	-,	-,	-	4 (1)	- (-)	- (-)	- (-)	4 (1)
●CEA,	●EUR,	-,	-,	-	- (-)	- (-)	- (-)	1 (0)	1 (0)
●SWA,	-,	-,	-,	-	- (-)	3 (0)	2 (0)	6 (1)	11 (1)
●SWA,	●EUR,	-,	-,	-	- (-)	- (-)	5 (1)	2 (1)	7 (2)
●AFR,	-,	-,	-,	-	12 (5)	9 (1)	15 (3)	17 (5)	53 (14)
●AFR,	●EUR,	-,	-,	-	- (-)	1 (0)	3 (1)	1 (0)	5 (1)
●AME,	-,	-,	-,	-	1 (0)	- (-)	- (-)	1 (0)	2 (0)
●EUR,	-,	-,	-,	-	6 (1)	18 (4)	4 (1)	6 (2)	34 (8)
OCE ,	-,	-,	-,	-	7 (0)	18 (6)	15 (2)	10 (3)	50 (11)
OCE ,	●AFR,	-,	-,	-	- (-)	- (-)	- (-)	1 (0)	1 (0)
OCE ,	●EUR,	-,	-,	-	- (-)	1 (0)	- (-)	- (-)	1 (0)
CSA ,	-,	-,	-,	-	5 (0)	4 (1)	2 (0)	- (-)	11 (1)
CSA ,	NOA ,	-,	-,	-	1 (0)	- (-)	- (-)	- (-)	1 (0)
NOA ,	-,	-,	-,	-	1 (0)	2 (2)	5 (1)	- (-)	8 (3)
NOA ,	●SWA,	-,	-,	-	- (-)	1 (0)	- (-)	- (-)	1 (0)
●OTR,	-,	-,	-,	-	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	0 (0)
Total					43 (8)	59 (14)	55 (10)	47 (13)	204 (45)

航した例は表4に示すとおりであった．すなわち，この範疇に該当する被検者数は総数の1.5～2.7%（平均2.1%），同じく病原菌陽性例数は総陽性数の1.2～2.2%（平均1.5%）であり，いずれもごく少ない部分を占めるにすぎなかった．またこの範疇に該当する例における病原菌検出率は，18.2～27.7%（平均22.1%）であり，全被検例における病原菌検出率をやや下まわった．4年分の合計でみると，● AFR（その他のアフリカ各国）への渡航者が53例ともっとも多かったが，それでもこれは総数の0.5%にすぎなかった．

以上のような試験解析結果から，MRFCで用いた訪問国のコード化は訪問国パターン解析に耐え得るものであると評価した．そしてこの4年間の加算による累年解析は，海外渡航者の訪問国と病原菌検出状況との関係を見る上で，年次的な変動に大きく影響を受けることがなくむしろ，各パターン別の観察例数が多くなるので有効であると判断した．

MRFCデータディスクでは最大許容記憶容量が約3,800件分であるから，前述のように検査総件数に対する出現パターン数の比が最高0.10であったことからすると，これに対応するパターンは約380種と想定しておけばよい．しかし，この訪問国パターン（それぞれ5カ国までを列挙）をパーソナルコンピュータの内部記憶装置に配列すると，これだけで9,150バイトを要し，DOS読み込み後のユーザ用記憶領域の約1/2を占めてしまうことになる．累年式のデータ処理を行なう場合には，年次を追って新規追加を要するパターンの出現を配慮する必要があり，記憶容量の不足が懸念された．そこで試作ソフトを用いて，累年出現パターン数の測定を行った．その結果，初年次には192パターン，次年次までの累積では312，3年目までで401パターンと次第に増加したが，2年目以後に追加される新パターンは年次毎に少なくなり，4年目に総被検者に対して471種であった．この累積曲線を延長して，1万件以上の㊙データすなわち5年分のデータ処理を行った場合に予想される出現パターン数を求めると，約540種になった．そしてその配列には，約13,000バイトを要することになる．

累年式訪問国パターンアナライザの概要

上に述べた試験解析成績を予想情報量の基準として，累年式訪問国パターンアナライザを開発した．以下に本システムの概要を述べる．

本システム開発における主たる請求要件は次のとおりである．

1．海外渡航者の訪問国と病原菌検出状況との関係を分

析するために，累年式訪問国パターン解析は最高5年間の情報の累積を可能にする．

2．訪問国パターンは，540種以上配列できるように記憶領域を確保する．

3．病原菌検出状況の集計は，各訪問国パターン別に，被検者数，病原菌検出例数，コレラ菌，0－1以外のビブリオ・コレレ（NAGビブリオ），ビブリオ・フルビアリス，腸炎ビブリオ，その他の病原ビブリオ，赤痢菌（A，B，C，D群および合計），サルモネラ，病原大腸菌血清型，組織侵入性大腸菌，毒素原性大腸菌（産生毒素型別すなわちLT，ST，LT＋ST，および合計），カンピロバクター，エロモナス，プレジオモナス・シゲロイデス，エルシニア，その他の腸管病原菌および予備項目，合計25項目について行なう．

4．被検者区分別に訪問国パターンと病原菌検出状況との解析を行う．すなわち，下痢現症者（Pと略），下痢既往者（G），健康者（H）の単一指定，下痢有症者として，[P＋G]の指定，被検渡航者の合計として，[P＋G＋H]の指定，および検査時下痢のなかったものとして，[G＋H]の指定による解析を行う．

5．それぞれの国別の延べ訪問者をまとめ，その病原菌検出状況の解析を行う．

6．解析結果のプリントアウト様式は，出力項目の構成および病原菌検出状況の表現法の組み合わせによって，複数種類を用意する．その中に，解析結果を直接視覚に訴たえるための，病原菌検出状況グラフィック表示を含める．

7．運用法は，できる限り簡素化する．

以上の各請求要件をシステムデザインおよびプログラミングに反映させるよう努力したが，パターンアナライザのプログラム，出現訪問国パターン，およびパターン別の病原菌検出状況の集計結果を同時に，使用したパーソナルコンピュータの内部記憶装置内におくことは不可能であった．したがって，前2者を内部記憶し，他者をフロッピーディスク上に開設したランダムファイル（ファイル名＝“：Temp：”）に一時的に外部記憶しながら[3]，目的のデータ処理を行なう方式を採用した．

本ファイルの入・出力データおよびデータ・フォーマットは，図2に示したとおりである．

解析結果のプリンタ出力は，別プログラムで“：Temp：”ファイルの記憶データを読み出し，出現パターンの並べ換えあるいは国別の延べ訪問者数の算定など，必要な処理を施してから行った．プリントアウトには，10×11インチサイズのプリンタ用紙を使用し，もっぱら縮少印字（136文字/行）を行った．出力様式は，合計9種類を用意した．ただし，その内の1つは，“：Temp：”ファイルの記憶データをそのままの順序でプリントアウトする，プルーフィングリストである．

No. of cases examined	1	DC(1)	EPEC [81-95]	81	DC(14)
	2			82	
	3			83	
	4			84	
	5		EIEC [96-110]	85	DC(15)
	6			86	
	7			87	
	8			88	
No. of pathogen positive cases	9	DC(2)	ETEC [111-115]	89	DC(16)
	10			90	
	11			91	
	12			92	
	13		ETEC (LT) [111]	93	DC(17)
	14			94	
	15			95	
	16			96	
V. cholerae O-1 [1-2]	17	DC(3)	ETEC (ST) [112]	97	DC(18)
	18			98	
	19			99	
	20			100	
NAG vibrio [3]	21	DC(4)	ETEC (LT+ST) [113]	101	DC(19)
	22			102	
	23			103	
	24			104	
V. fluvialis [5]	25	DC(5)	Campylobacter [121-124]	105	DC(20)
	26			106	
	27			107	
	28			108	
V. parahaemo. [7]	29	DC(6)	Aeromonas [125-129]	109	DC(21)
	30			110	
	31			111	
	32			112	
Other vibrio [4,6,8-10]	33	DC(7)	Plesiomonas [130]	113	DC(22)
	34			114	
	35			115	
	36			116	
Shigella [11-55]	37	DC(8)	Yersinia [131]	117	DC(23)
	38			118	
	39			119	
	40			120	
Shigella gr. A [11-22]	41	DC(9)		121	DC(24)
	42			122	
	43			123	
	44			124	
Shigella gr. B [23-35]	45	DC(10)	Others	125	DC(25)
	46			126	
	47			127	
	48			128	
Shigella gr. C [36-53]	49	DC(11)	（未使用領域省略）		
	50				
	51				
	52				
Shigella gr. D [54]	53	DC(12)	Country visited 1	246	CP(1)
	54			247	
	55		Country visited 2	248	CP(2)
	56			249	
Salmonella [56-80]	57	DC(13)	Country visited 3	250	CP(3)
	58			251	
	59		Country visited 4	252	CP(4)
	60			253	
			Country visited 5	254	CP(5)
				255	

図2．訪問国パターンアナライザ用“:Temp:”ファイルのデータ・フォーマット〔 〕内は病原菌コード番号

試験運用における評価

完成したパターンアナライザの試験運用によって得られた解析結果の出力例を，図3および図4に例示した．

● The Result of Pattern Analysis for Countries Visited ●

Pattern of countries visited	No. of Cases	No. of Posi.	V.cholerae		Vibrios		Shigella					Sal mone lla	Enteropathogenic E.coli						Other	
P-No. 1 2 3 4 5			O-1	NAG	flu.	para.	A-D	(A	B	C	D)		EPEC	EIEC	ETEC	(LT	ST	L+S)	Camp.	Ples.
93 Kore, -, -, -, - ※ (1 66 66 66 66)	136	30	0	0	0	1	13	0	10	0	3	3	2	0	10	1	2	6	4	0
17 Tawn, -, -, -, - (2 66 66 66 66)	388	97	3	5	0	15	1	0	0	0	1	26	7	0	34	6	21	7	14	1
108 Chin, -, -, -, - (3 66 66 66 66)	18	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
(一部省略)																				
8 Thai, -, -, -, - (13 66 66 66 66)	1010	321	0	22	1	83	12	1	7	0	4	108	18	6	68	13	34	20	41	12
26 Thai,PhiP, -, -, - (13 14 66 66 66)	37	12	0	2	0	3	0	0	0	0	0	9	0	0	3	1	1	1	1	0
37 Thai,Mals, -, -, - (13 15 66 66 66)	29	8	0	0	0	3	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	2	1
72 Thai,@SEA, -, -, - (13 16 66 66 66)	42	15	0	0	1	1	1	0	1	0	0	2	2	1	4	0	2	2	5	1
30 Thai,Indi, -, -, - (13 22 66 66 66)	206	68	0	2	2	1	21	0	10	2	9	13	3	0	13	2	7	4	25	2
29 Thai,Indi,SriR, -, - (13 22 23 66 66)	16	5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	2	0
25 Thai,Indi,Nepl, -, - (13 22 24 66 66)	155	48	0	2	0	1	14	1	5	0	8	5	9	1	16	5	7	4	16	2
98 Thai,Indi,Bang, -, - (13 22 26 66 66)	12	6	0	2	0	0	1	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	2	1
45 Thai,SriR, -, -, - (13 23 66 66 66)	15	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	1
33 Thai,Nepl, -, -, - (13 24 66 66 66)	126	41	0	1	0	1	10	0	2	3	5	10	2	2	10	3	7	7	7	2
132 Thai,Paks,Grec, -, - (13 25 61 66 66)	12	3	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
56 Thai,Bang, -, -, - (13 26 66 66 66)	14	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
156 Thai,Iraq, -, -, - (13 31 66 66 66)	11	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
5 PhiP, -, -, -, - (14 66 66 66 66)	2385	794	8	39	15	218	27	0	10	1	16	333	45	14	200	40	100	60	28	41
44 Mals, -, -, -, - (15 66 66 66 66)	170	44	0	1	0	13	1	0	0	0	1	11	9	2	5	0	4	1	1	7
34 @SEA, -, -, -, - (16 66 66 66 66)	12	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
7 Indi, -, -, -, - (22 66 66 66 66)	586	191	0	11	1	2	42	1	16	0	25	46	11	3	50	10	21	19	55	5
100 Indi,SriR, -, -, - (22 23 66 66 66)	10	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11 Indi,Nepl, -, -, - (22 24 66 66 66)	157	43	0	1	0	0	12	1	4	2	5	9	3	0	12	3	4	4	15	0
21 Indi,Paks, -, -, - (22 25 66 66 66)	16	2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
51 Indi,Keny, -, -, - (22 41 66 66 66)	10	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0
66 Indi,@EUR, -, -, - (22 62 66 66 66)	24	7	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0	2	0	1	1	1	1
9 SriR, -, -, -, - (23 66 66 66 66)	82	21	0	1	0	1	5	0	1	0	4	6	1	0	8	1	4	3	0	2
110 SriR,@CEA, -, -, - (23 27 66 66 66)	57	25	0	2	0	1	0	0	0	0	0	4	5	0	16	1	5	10	1	0
22 Nepl, -, -, -, - (24 66 66 66 66)	38	10	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	5	0	3	2	2	1
(一部省略)																				
Total (69/471 patterns)	9875	2923	15	131	33	503	232	5	88	8	131	972	215	51	786	168	386	234	379	131

図3． 訪問国パターン別出力例（1981－1984年分）
※：（ ）内は訪問国コード番号

● The Result of Pattern Analysis for Countries Visited ●

Country visited (code)	No. of Cases	No. of Posi.	V.cholerae		Vibrios		Shigella					Sal monella	Enteropathogenic E.coli						Other	
			O-1	NAG	flu.	para.	A-D (A	B	C	D)			EPEC	EIEC	ETEC	(LT	ST	L+S)	Camp.	Ples.
Kore(1)※	147	36	0	0	0	1	13	0	10	0	3	4	2	1	13	2	3	7	4	1
Tawn(2)	411	124	3	5	0	24	1	0	0	0	1	35	7	1	42	8	25	9	16	4
Chin(3)	59	16	0	0	0	1	2	0	0	0	2	4	0	0	7	1	6	0	1	2
HonK(4)	528	140	1	3	2	20	7	0	1	0	6	44	9	5	36	12	19	5	30	8
Maka(5)	23	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	2	0	0	0
@EAA(6)	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
IndN(11)	1,983	535	1	22	1	50	29	0	9	0	20	197	50	14	171	41	85	43	55	23
Sinp(12)	1,280	344	0	14	7	89	9	0	2	0	7	115	24	2	71	12	40	19	40	16
Thai(13)	2,385	740	2	36	7	127	73	2	30	5	36	245	50	13	170	35	80	53	140	35
PhiP(14)	2,658	863	8	45	15	235	30	0	12	1	17	350	49	17	217	43	111	63	30	43
Mals(15)	675	167	1	4	1	36	6	0	1	0	5	63	20	2	30	6	15	9	13	14
@SEA(16)	189	40	0	0	2	4	3	0	2	0	1	10	3	1	11	0	0	3	11	2
Iran(21)	22	8	0	0	1	0	2	0	1	0	1	7	0	0	2	0	2	0	2	1
Indi(22)	1,418	439	1	21	4	9	103	4	40	4	55	97	32	4	112	25	49	37	133	14
SriR(23)	264	79	0	3	0	5	7	0	2	0	5	23	8	1	33	2	15	16	7	4
Nepl(24)	564	160	0	4	0	2	44	2	16	5	21	20	17	3	50	12	24	20	50	5
Paks(25)	197	62	0	0	0	1	12	0	3	0	9	10	3	0	21	3	12	6	13	2
Bang(26)	61	10	0	2	0	2	1	0	0	0	1	7	0	0	1	0	1	0	6	3
@CEA(27)	93	34	1	3	0	2	0	0	0	0	0	7	6	0	10	1	6	11	2	0
Iraq(31)	26	6	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
@SWA(32)	102	29	0	0	1	0	5	0	3	0	2	7	1	1	6	2	4	0	2	1
Keny(41)	114	29	0	1	0	1	1	0	0	0	1	5	5	1	14	2	7	5	1	0
Egip(42)	104	20	0	1	0	0	3	0	1	0	2	5	3	0	17	5	7	5	1	1
@AFR(43)	115	31	0	0	1	2	4	0	2	0	2	6	6	0	10	4	3	3	4	0
OCE (46)	92	22	0	1	0	3	2	0	0	0	2	3	3	0	0	2	5	1	6	1
CSA (51)	15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
NOA (56)	24	0	0	0	0	3	2	0	0	0	2	0	0	0	4	1	2	1	2	1
@Ane(59)	7	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Grec(61)	87	24	0	0	0	1	6	0	0	0	6	0	1	0	9	0	5	4	1	2
@EUR(62)	219	70	1	2	0	0	9	1	3	0	5	13	4	0	22	4	7	11	15	1
@OTR(64)	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
()6)(65)	14	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
? (67)	55	11	1	2	0	1	2	0	0	0	2	1	0	1	1	0	0	1	2	1
Total	9,875	2,923	15	131	33	503	232	5	88	8	131	972	215	51	786	160	386	234	379	131

図４．　訪問国累積計上方式による出力例（1981－1984年分）
※：（　）内は訪問国コード番号．

前者（様式6）は，訪問国パターン別の病原菌検出状況を，後者（様式9）は，訪問国箇別に延べ渡航者を数えた国別の病原菌検出状況である．いずれも被検者区分（P，G，H等の別）を指定せず，全ての被検者を対象として，処理・解析を行ったものを出力した．

様式6においては，471種の出現パターンの内，該当渡航者数10名以上の各パターンが出力されているが，その合計は69種であった．検査対象とした各病原菌のうち、その他の病原ビブリオ，エロモナス，エルシニアおよびその他の腸管病原菌の各項目については，検出例が少いため，この例示では出力項目から除外した．

図3において，各欄の上段に印字された数字は，病原菌の検出状況を実数表示したものである．また下段のグラフィック印字は，各検出病原菌ごとに，総件数に対する平均検出率と各訪問国パターンにおける検出率とを比較して，平均の1/2未満，1/2以上平均値未満，平均値以上2倍未満，2倍以上3倍未満，3倍以上に区分し，各段階ごとに横型棒グラフの巾を太くして表示したものである．すなわち，上段の実数を横に比較することによって各訪問国パターンにおける検出病原菌種別の頻度を観察することができる．またグラフィック表示を縦に比較することによって，それぞれの病原菌について各訪問国パターン間での相対的検出頻度の比較検討ができる．図5に示した例では，コレラ菌，NAGビブリオ，ビブリオ，フルビアリス，腸炎ビブリオ，赤痢菌，EPEC，ETEC，プレジオモナスなどは，訪問国パターンによって検出状況が大きく左右される傾向が認められた．しかし，サルモネラおよびカンピロバクターは，訪問国パターンに関係なく比較的平均して検出される傾向を示した．

様式9においても，様式6の場合と同様に，訪問国別の病原菌検出傾向を把握することができた．例えば赤痢菌に注目すると，韓国ではB群，タイではC群，インド，ネパールではA，B，C，D各群，パキスタンではD群，に罹患する危険性が高いことが容易に読みとれる．

考　察

上述のパターンアナライザは，先に開発した海外旅行者下痢症の細菌検査成績用データベース「MRFC」のサポート用として開発された．

本システムの完成によって，手作業によっては多大の時間と労力を要する，訪問国パターン別病原菌検出状況の解析が自動化され，必要に応じて随時行えるようになった．さらにこれをもとに，訪問国箇別の延べ被検者数を得て，それに基づく訪問国別の病原菌検出状況を推定することも可能になった．これは2ケ国以上を歴訪した旅行者がどの国で罹患したかは必ずしも推定が容易でないため，訪問国すべての場合を想定してそれぞれに計上するという解析方法である．またそれらの成績を直接的に視覚に訴たえるプリント出力様式を用意したことによって，一般市民にも理解し易い資料を提供し得るようになったと考える．

なお開発した訪問国パターンアナライザは，MARUKAI-Data-Analyzerに由来して“MDAシリーズ·110”と呼称することにした．このシステムは各国の感染症事情とくに開発途上国のそれはそれ程急速に変わらないであろうと考えて，5年間分の集計を標準とした．しかし，今後開発が進んで下痢症の発生状況が急速に改善される場合も考え得る．そのような事情に対応できるように，試作した各歴年用の訪問国パターンアナライザも，“MDAシリーズ·010”として実務に供することにした．

本システムは，被検者区分指定による検索機能をそなえているので，対象被検者を限定してさらに詳細な検討を行うことができる．このパターンアナライザの開発によって，海外旅行者下痢症サーベイランス事業においてもっとも興味深い問題である，渡航先でもっとも罹患し易い病原菌の分析が容易になった．これによる解析結果は，旅行者および旅行業者の衛生教育用に利用できるし，情報公開制度が実行に移された今日この種の情報の提供が迅速にできるはずである．

このシステムの活用成果については別途報告する．

文　献

1）津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：東京衛研年報，35，22，1984
2）津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：マイコンサーキュラ，10（8），23，1985
3）津野正朗，土屋真一：ビジコム，3（2），150，1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 60-66, 1985

東京都内における病原体検出情報のためのコンピュータ・データベース開発

津野正朗*, 工藤泰雄*, 大橋誠*

Development of a Computerized Data Base System for Bacteriological Examination Results from Relevant Public Health Laboratories in Tokyo

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

わが国においてはこれまで感染症に関する検査室由来情報を統一的に収集・解析・環元するシステムがなかったが，1979年，国立予防衛生研究所および地方衛生研究所の関係者で組織された厚生科学研究(特別研究)「微生物検査情報のシステム化に関する研究班」によってそのシステム化の検討が開始された[1]．そして1980年3月には，地方衛生研究所，保健所，伝染病院，検疫所等の関係諸機関を包含して検査室由来の情報を国立予防衛生研究所へ収集，月報および年報の形式で情報を還元するシステムの試行が開始された．一方，1981年には厚生省によって，従来行政対応が明確でなかった疾病を対象とした感染症サーベイランス事業が発足され，上記微生物検出情報システムが事業の一環をになうようになった[2,3]．

東京都においては，1975年4月，23特別区内の保健所業務がそれぞれの区に移管され，以後公衆衛生にかかわる感染症検査の実施に関しては都区保健衛生連絡協議会総合部会の中に設けられた試験検査分科会で協議がなされるようになり，都区間の業務の分担と連継に遺憾のないよう努力がなされてきている．そして1980年以後，当研究所が，都区検査機関において得られる感染症にかかわる検査室由来情報を防疫対策上有効に活用する目的で収集・解析・環元するシステムを発足，上記厚生省の事業および研究班活動の一役をも担ってきた．集められた情報は，月刊および年刊の「東京都微生物検査情報」として編集され，保健所，都立病院，感染症定点観測調査定点医療機関などに配布されてきている[4,6]．

この病原体情報収集・環元にかかわる諸作業は，事業発足時はとりあえず，手作業によらざるを得なかった．しかしパーソナル・コンピュータの導入は当初から予定されていたところであり，5年間を経過して事業も定着したので，コンピュータ化の実現をめざした．我々はまず，月別・検査機関別のヒト由来病原菌検出情報の記録および東京都微生物検査情報掲載（月報および年報）用の分類集計を主目的に専用データベースを開発，1985年1月以降これを実務に使用している．以下にそのシステムの概要を述べる．

ハードウエアおよびディスクオペレーション・システム

パーソナルコンピュータのハードウエアおよびディスク・オペレーション・システム（いわゆるDOS）としては，先に開発した海外旅行者下痢症の細菌検査成績処理システム（MRFC)[7,8]の場合と同様，5インチ・デュアルディスクドライバ装備のPC8001mk II（ただし旧PC8001の使用を配慮して内蔵の拡張メモリーは使用せず），および，NEC PC8001 BASIC Ver 1.3 (Copyright 1979 by Microsoft)，Two Surface version「20—Sep—1981」を用いた．またプリンタは，縮少印字(136文字／行)機能を備えたインパクト型ドットプリンタPC8023Cを使用した．

請求要件の検討

1980年から1984年の4年間における検査機関別の月別病原菌検査・検出情報を基に，今後の取扱い情報量の推定を行い，さらに充分な余裕を見積って，本システム開発における具体的な請求要件（いわゆるRequirment）を決定した．

1．取扱検査機関数

各年ごとに東京微生物検査情報に掲載された検査機関

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

数は，1982年以後，区保健所26，都保健所7，衛生研究所本所および支所，合計35機関と一定であった．しかし将来はこの他にも都立病院検査室なども本事業に加わる可能性があるので，増加を見越し最大取扱機関数は65と設定した．

2．検査材料取扱件数

過去5年間における年間材料取扱総件数は年ごとに増減はあるが，約59万から70万，うち海外旅行者検便の件数は約2,200から3,300の間にあり，全体的に見ると，多少の増加傾向が観察された．また，月別に見た最多取扱件数も約6,000から14,000の間にあり，同様に多少の増加傾向にあった．したがって，各月の材料取扱総件数に8桁，同海外旅行者再掲分に4桁を割り当てた．

表1．検査機関別ヒト由来検査材料取扱い月間最多件数（1980—1984）

検査機関	月間最多件数				
区分	1980年	1981年	1982年	1983年	1984年
東京23区内保健所	6,332 (7)	6,024 (25)	6,496 (31)	6,367 (28)	6,290 (41)
東京23区外(都立)保健所	5,709 (11)	5,958 (—)	7,045 (—)	7,263 (—)	6,918 (—)
衛生研究所	11,788 (478)	12,052 (452)	12,748 (453)	13,577 (621)	11,922 (540)

（ ）：海外旅行者分再掲（原則として衛生研究所本所で一括実施方式をとっている。）

3．検査対象病原菌の種類

従来検査対象となっていた病原菌は，*Vibrio cholerae*, O1 および non O—1, *V. parahaemolyticus*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Shigella*, *Salmonella typhi*, *S.paratyphi* A, *S.paratyphi* B，その他の *Salmonella*, *E.coli* などで，そのうち赤痢菌は血清型別，サルモネラはO群別など細別されているものもあり，合計97項目を包含している．本システムの開発にあたっては，それらの各項目について見直し，今後の細分，追加を考慮して151項目にコード番号を与えるようにした．すなわち，例を挙げると，コレラ菌の場合，現在生物型および血清型の報告が求められていないが，これらの情報の有用性を考えて，その組み合わせおよび非定型的な場合を区別できるように7項目に分け，また赤痢菌の血清型については，1984年に国際分類委員会腸内細菌分類小委員会が勧告した新血清型分類[11,12]に基づいて追加し，A群に13項目，B群に20項目，C群に19項目，D群に1項目を与えた．またこれらの検出病原菌コード番号には4桁を割り当てた．

4．病原菌検出例数（陽性件数）

病原菌検出例数は各菌種ごとに計上される．この4年間においては衛生研究所におけるサルモネラの検出例が合計で692件（内，海外旅行者338件）と最高であったので，これを参考にして，検出例数および海外旅行者再掲分に各々4桁を割り当てた．

5．検出病原菌の種類

各月における検出病原菌の最多出現種類（項目）数は，1984年8月，衛生研究所における30項目が最高記録であったので，最高収録項目は40項目を想定した．

表2．検査機関別ヒト由来検査材料からの最多検出病原菌項目数（1980—1984，各月当り）

検査機関	月間最多検出病原菌項目数				
区分	1980年	1981年	1982年	1983年	1984年
東京23区内保健所	6	6	5	9	7
東京23区外(都立)保健所	3	3	4	7	5
衛生研究所	17	16	19	22	30

6．東京都微生物検査情報への掲載様式

月刊情報における集計表は毎月同一の様式で掲載されており，年報においても原則的には同じ様式が採用される．ただし月報においては，「その他の細菌」が個別に記載されるが，年報ではそれらも集計して表示される点において相違する．したがって，月報および年報用に各々作表様式を用意することにした．

システムの概要

上述の請求要件の全てを盛り込んでデザインしたシステムの概要は次のとおりである．

1．入・出力データ

本システムの入・出力データは，検査年・月，および検査機関別の検査材料取扱件数(内,海外旅行者数再掲)，検出病原菌の種類・陽性例数（内，海外旅行者からのもの再掲）とした．各検査機関にはコード番号を割り当てたが，その取扱いについては後述する．

2．ファイル・デザイン

開設するデータファイルはいずれもランダムアクセス用のものとし，各年単位で1枚のデータ専用ディスクを使用する方式を採った．

検査機関別・月別の検査情報はもっぱらメインファイ

ル(ファイル名＝"TBDB01")に記憶させた．これには，月別（1～12）・機関別（1～65）単位で1セクタを割り当て，合計780セクタを使用する．またレコード番号(すなわち収録セクタの位置）は，両者のコード番号の組み合わせによって，図1のごとく規定した．したがって検査機関は，このレコード番号によって判別できるので，記憶データから除外した．

メインファイルの1セクタに収録できる検出病原菌は，最高20種までである（図2のデータフォーマット参照)．検出菌の種類がこれを越える場合には，別途にサブファイル（ファイル名＝"AD+メインファイル中の対応レコード番号")を自動的に開設し，21種目以後の検出病原菌を収録することにした.これには各々1セクタを使用する．

検査年は，年単位で1枚のデータ専用ディスクを用いるので，サブファイル（ファイル名＝"C-YEAR"）にのみ収録．これには1セクタを割り当てた．

3．データフォーマット

メインファイルのデータフォーマットを図2に示した．必要に応じて随時開設する"AD●●●●"ファイルのデータフォーマットも，これと全く同じである．

検出菌は，入力順序に関係なく，コード番号の小さい

検査機関別（PS） \ 月別（MO）	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	…	11月	12月
1	1	2	3	4	5	6	7	8	…	11	12
2	13	14	15	16	17	18	19	20	…	23	24
3	25	26	27	28	29	30	31	32	…	35	36
4	37	38	39	40	41	42	43	44	…	47	48
5	49	50	51	52	53	54	55	56	…	59	60
6	61	62	63	64	65	66	67	68	…	71	72
7	73	74	75	76	77	78	79	80	…	83	84
63	745	746	747	748	749	750	751	752	…	755	756
64	757	758	759	760	761	762	763	764	…	767	768
65	769	770	771	772	773	774	775	776	…	779	780

図1．月別および検査機関別とデータ・レコード番号との関係（File 名＝"TBDB01"）

データ・レコード番号＝R，月別＝MO，検査機関別コード番号＝PSとした場合，R＝(PS－1)×12＋MOという関係にある．

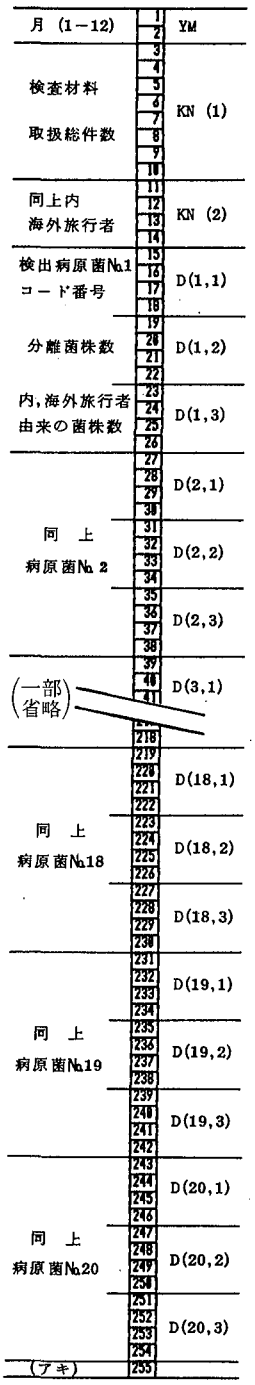


図2．メイン・ファイル("TBDB01")のデータフォーマット

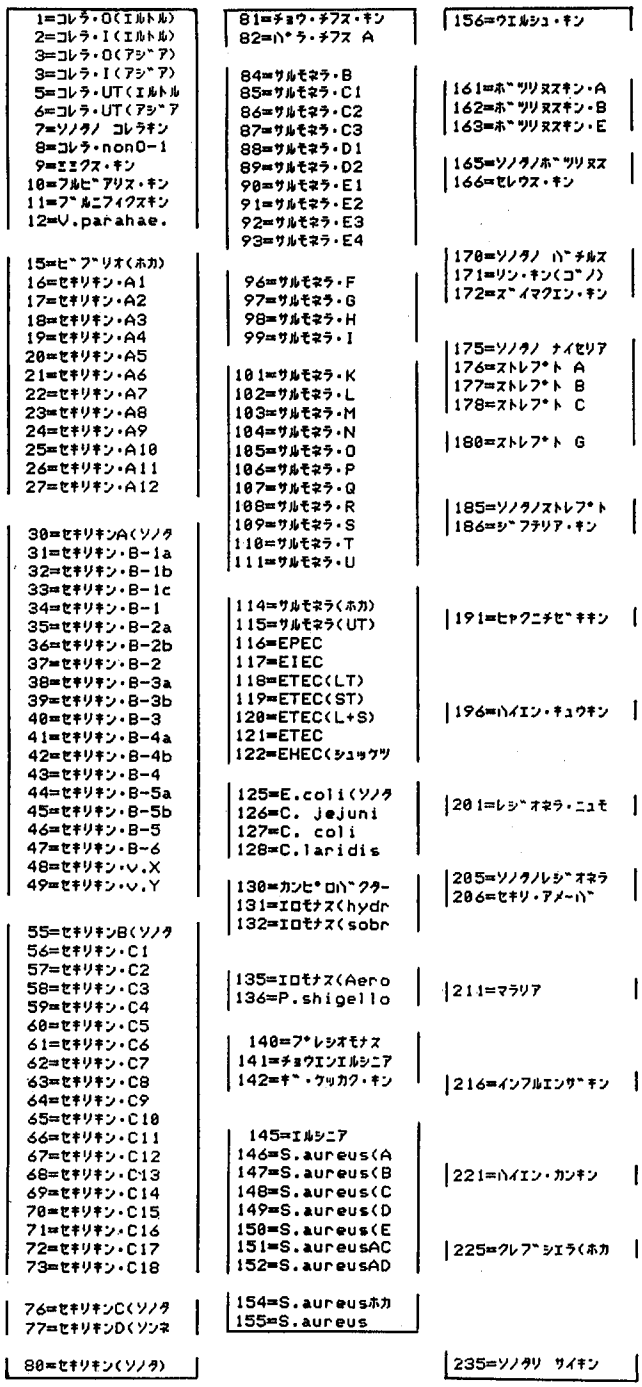
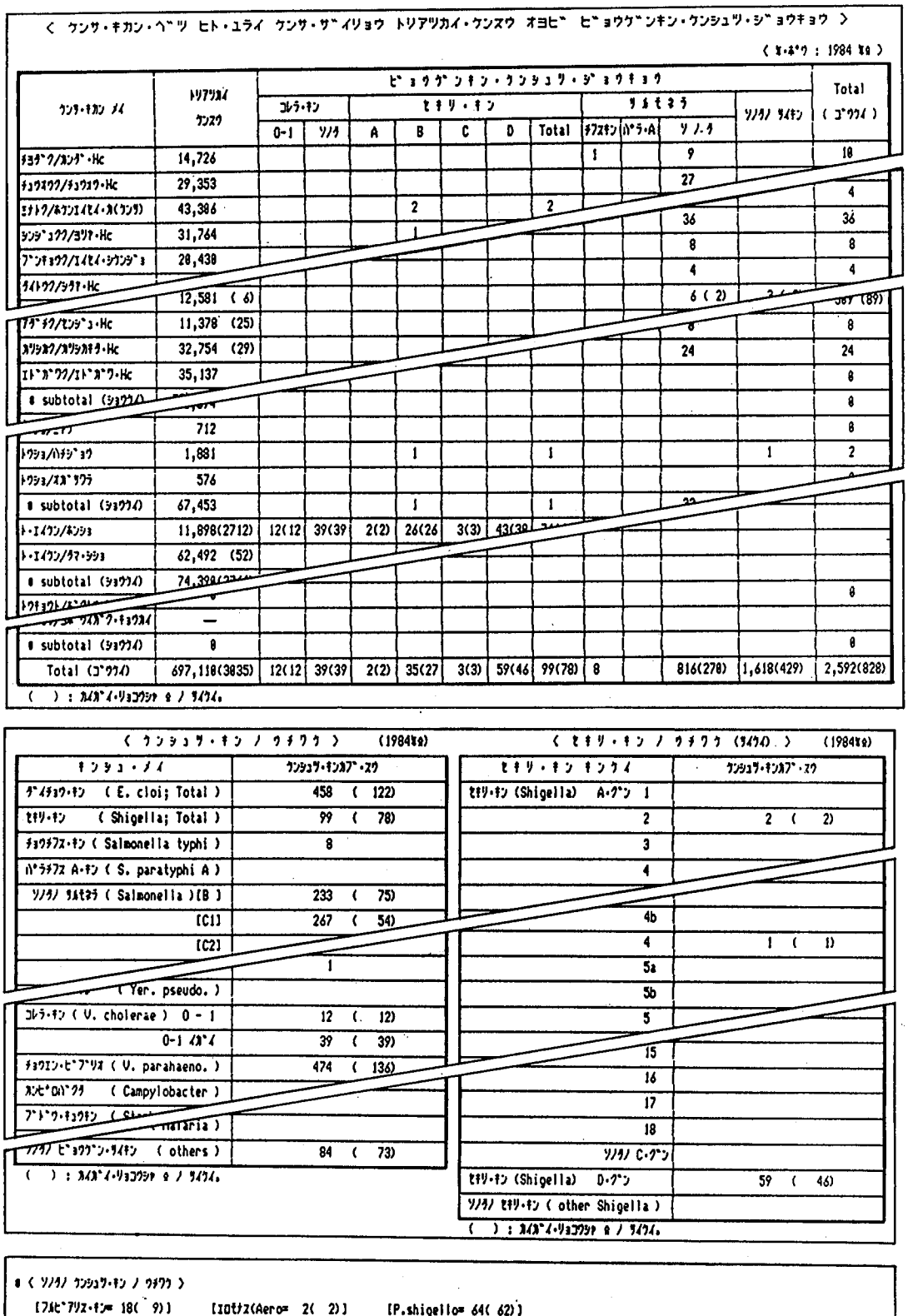


図3． 検出菌のコード番号割当



〈 ｹﾝｻ・ｷｶﾝ・ﾍﾞﾂ ﾋﾄ・ﾕﾗｲ ｹﾝｻ・ｻﾞｲﾘｮｳ ﾄﾘｱﾂｶｲ・ｹﾝｽｳ ｵﾖﾋﾞ ﾋﾞｮｳｹﾞﾝｷﾝ・ｹﾝｼｭﾂ・ｼﾞｮｳｷｮｳ 〉

〈 ﾀ・ﾎﾟｳ : 1984 ﾈﾝ 〉

ｹﾝｻ・ｷｶﾝ ﾒｲ	ﾄﾘｱﾂｶｲ ｹﾝｽｳ	ﾋﾞｮｳｹﾞﾝｷﾝ・ｹﾝｼｭﾂ・ｼﾞｮｳｷｮｳ											Total
		ｺﾚﾗ・ｷﾝ		ｾｷﾘ・ｷﾝ					ｻﾙﾓﾈﾗ			ｿﾉﾀﾉ ｻｲｷﾝ	(ｺﾞｳｹｲ)
		O-1	ｿﾉﾀ	A	B	C	D	Total	ﾁﾌｽｷﾝ	ﾊﾟﾗ・A	ｿﾉﾀ		
ﾁﾖﾀﾞｸ/ｶﾝﾀﾞ・Hc	14,726								1		9		10
ﾁｭｳｵｳｸ/ﾁｭｳｵｳ・Hc	29,353										27		
ｴﾅﾄｸ/ﾎｹﾝｴｲｾｲ・ｶ(ｹﾝｻ)	43,386				2			2					4
ｼﾝｼﾞｭｸｸ/ﾖﾘﾔ・Hc	31,764				1						36		36
ﾌﾞﾝｷｮｳｸ/ｴｲｾｲ・ｼｹﾝｼﾞｮ	20,430										8		8
ﾀｲﾄｳｸ/ｼﾀﾔ・Hc											4		4
	12,581 (6)										6 (2)	[illegible]	[illegible] (89)
ｱﾀﾞﾁｸ/ｾﾝｼﾞｭ・Hc	11,378 (25)										8		8
ｶﾘｼｶｸ/ｶﾘｼｶｷﾀ・Hc	32,754 (29)										24		24
ｴﾄﾞｶﾞﾜｸ/ｴﾄﾞｶﾞﾜ・Hc	35,137												0
● subtotal (ｼｮｳｹｲ)	[illegible]												0
[illegible]	712												0
ﾄｳｼｮ/ﾊﾁｼﾞｮｳ	1,881				1			1				1	2
ﾄｳｼｮ/ｽｶﾞﾂﾜﾗ	576												[illegible]
● subtotal (ｼｮｳｹｲ)	67,453				1			1			[illegible]		
ﾄ・ｴｲｹﾝ/ﾎﾝｼｮ	11,898(2712)	12(12	39(39	2(2)	26(26	3(3)	43(38	[illegible]					
ﾄ・ｴｲｹﾝ/ﾀﾏ・ｼｼｮ	62,492 (52)												
● subtotal (ｼｮｳｹｲ)	74,390([illegible]												
ﾄｳｷｮｳﾄ/[illegible]	[illegible]												0
[illegible] ﾜｲｶﾞｸ・ｷｮｳｶｲ	—												
● subtotal (ｼｮｳｹｲ)	0												0
Total (ｺﾞｳｹｲ)	697,110(3035)	12(12	39(39	2(2)	35(27	3(3)	59(46	99(78)	8		816(270)	1,618(429)	2,592(828)

( ) : ｶｲｶﾞｲ・ﾘｮｺｳｼｬ ﾀ ﾉ ｻｲｹｲ。

〈 ｹﾝｼｭﾂ・ｷﾝ ﾉ ｳﾁﾜｹ 〉 (1984ﾈﾝ)

ｷﾝｼｭ・ﾒｲ	ｹﾝｼｭﾂ・ｷﾝｶﾌﾞ・ｽｳ
ﾀﾞｲﾁｮｳ・ｷﾝ (E. cloi; Total)	458 (122)
ｾｷﾘ・ｷﾝ (Shigella; Total)	99 (78)
ﾁｮｳﾁﾌｽ・ｷﾝ (Salmonella typhi)	8
ﾊﾟﾗﾁﾌｽ A・ｷﾝ (S. paratyphi A)	
ｿﾉﾀﾉ ｻﾙﾓﾈﾗ (Salmonella)[B]	233 (75)
[C1]	267 (54)
[C2]	
	1
[illegible] (Yer. pseudo.)	
ｺﾚﾗ・ｷﾝ (V. cholerae) O - 1	12 (12)
O-1 ｲｶﾞｲ	39 (39)
ﾁｮｳｴﾝ・ﾋﾞﾌﾞﾘｵ (V. parahaeno.)	474 (136)
ｶﾝﾋﾟﾛﾊﾞｸﾀ (Campylobacter)	
ﾌﾞﾄﾞｳ・ｷｮｳｷﾝ (St[illegible] Malaria)	
ｿﾉﾀﾉ ﾋﾞｮｳｹﾞﾝ・ｻｲｷﾝ (others)	84 (73)

( ) : ｶｲｶﾞｲ・ﾘｮｺｳｼｬ ﾀ ﾉ ｻｲｹｲ。

〈 ｾｷﾘ・ｷﾝ ﾉ ｳﾁﾜｹ (ｻｲｹｲ) 〉 (1984ﾈﾝ)

ｾｷﾘ・ｷﾝ ｷﾝｸｲ	ｹﾝｼｭﾂ・ｷﾝｶﾌﾞ・ｽｳ
ｾｷﾘ・ｷﾝ (Shigella) A・ｸﾞﾝ 1	
2	2 (2)
3	
4	
4b	
4	1 (1)
5a	
5b	
5	
15	
16	
17	
18	
ｿﾉﾀﾉ C・ｸﾞﾝ	
ｾｷﾘ・ｷﾝ (Shigella) D・ｸﾞﾝ	59 (46)
ｿﾉﾀﾉ ｾｷﾘ・ｷﾝ (other Shigella)	

( ) : ｶｲｶﾞｲ・ﾘｮｺｳｼｬ ﾀ ﾉ ｻｲｹｲ。

● 〈 ｿﾉﾀﾉ ｹﾝｼｭﾂ・ｷﾝ ﾉ ｳﾁﾜｹ 〉

[ﾌﾙﾋﾞｱﾘｽ・ｷﾝ= 18(9)] [ｴﾛﾓﾅｽ(Aero= 2(2)] [P.shigello= 64(62)]

図４．年報の出力例（1984年分，一部省略）

ものから順に並べ換えて記憶される.

なお本システム用のデータディスクの初期化処理に際して,"TBDB01"および"C—YEAR"ファイルが自動的に開設され,前者にはダミー(全項目0構成のデータ)が,後者には検査年が入力される.本システムは,この専用ディスクのみが使用できる方式とした.

4. ディスプレイ・デザイン

CRTモニタによる諸表示は,横80文字表示を原則とした.また運用性の向上を計り,機関名や検出菌は慣用の表現形で表示し,必要に応じて入力状況一覧用のイメージスケールも添えた.

5. プリント・デザイン

プリンタ出力用には,10×11インチサイズの白紙プリンタ用紙を使用し,もっぱら136文字/行の縮少印字を行うことにした.

出力作表様式は,東京都微生物検査情報の掲載様式にならって,月間情報の出力用として,機関別ヒト由来検査材料取扱件数および病原菌検出状況,また年間集計の出力用として,機関別ヒト由来検査材料取扱件数および病原菌検出状況,同検出菌の内訳,同赤痢菌血清型別の内訳,その他の検出菌の内訳とした.なおこれらの様式の外に,各検査機関からの要望に答え機関別の月別病原菌検査・検出状況の一覧表を用意した.これは,年報の作成時に各機関へ送付して,追加・訂正分を確認する際にも利用される.

6. プログラム・デザイン

プログラム用言語は,今後の改造等に備え,平易なBASICを用いた.また本システムには複数のActivityが包含されるので,入力・訂正用のプログラムを1本とし,その外は数本のプログラムに分割した.これらは1枚の専用ディスク(すなわちシステムディスク)に納め,自動起動化処理を行い,メニュー表示プログラムを中心に自動チェイン方式で連結した.

なお,取扱機関の追加を容易にする目的で,機関名を割当コード番号順位に従って(予備スペースは0文字の文字変数として処理)各プログラム中のDATA文に組み込んだ.

試験運用における評価

システム完成後,1984年の検査機関別・月別のヒト由来病原菌検出情報を入力し,試験運用を行った.

検査情報の入力所要時間は,検出菌種の多少によって左右されたが,各機関1ケ月当たり最短で15秒から最長で5分程度であった。収録情報のプリント出力には,分類集計処理を含めて,月報用の様式で約7分,年報用の様式(検出機関別ヒト由来検査材料取扱件数および病原菌検出状況,同検出菌の内訳,同赤痢菌血清型別の内訳,およびその他の検出菌の内訳を1組として)に約40分を要した.また,機関別の病原菌検査・検出状況の一覧表出力に要した時間は,1機関当たり5～8分であった.

本システムの使用によって,検査情報の入力にはやはり多少の時間を要するものの,従来手作業で行われていた,転記・訂正・確認・分類集計等にかかわる手間は大巾に削減された.

考　察

本システムは,先に開発した旅行先,症状など被検者の個別情報と検出病原菌との関係を取扱う海外旅行者下痢症の細菌検査成績処理システム[7,8]とは対称的に,月別・検査機関単位のいわゆるマスデータの取扱いを目的として開発された.本システム開発の場合,過去の実績からその請求要件が極めて明確に把握できたため,短期間の内に目的に合ったシステムを得ることができた.

本システムの実務使用によって,毎月の検査室情報の集計における手作業の大巾な削減ができるばかりでなく,転記・分類集計作業等における過誤も解消できるものと考える.

本システムのソフトウエアは,汎用される高級言語(BASIC)によってプログラムされ,しかも自家製であるために,今後の改造・応用が容易であり,新らたな請求要件の追加・提示にも対応でき得るものと考える.将来はモデル保健所を2・3設定して,当研究所との間でのオンライン・システムの実用化を検討していきたい.

なお上に述べたシステムは,東京都微生物検査情報(Monthly Epidemiological Record, Tokyo)に由来して,「MERT」と略称することにした.

文　献

1) 病原微生物検出情報年報1979年, 7, 1980, 微生物検査情報のシステム化に関する研究班
2) 病原微生物検出情報年報1982年, 9, 1983, 微生物検査情報のシステム化に関する研究班
3) 東京都微生物検査情報, 2(6), 1, 1981, 東京都立衛生研究所
4) 東京都微生物検査情報, 1(1), 1, 1980, 東京都立衛生研究所
5) 東京都微生物検査情報, 2(12), 1, 1981, 東京都立衛生研究所
6) 東京都微生物検査情報, 3(1), 1, 1982, 東京都立衛生研究所
7) 津野正朗, 工藤泰雄, 大橋　誠：東京衛研年報, 35,

22, 1984
8) 津野正朗, 工藤泰雄, 大橋　誠：マイコンサーキュラ, **10**, (8), 23, 1985
9) 東京都微生物検査情報, **1**(1), 1980 — **5**(12), 1984, 東京都立衛生研究所
10) 東京都微生物検査情報, **1**～**5** (各13号, 2頁), 1980～1985, 東京都立衛生研究所
11) Brenner, D.J.：*Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**, 87, 1984
12) 工藤泰雄：*Medical Technology*, **12**, 1086, 1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 67-72, 1985

神経芽細胞腫のマス・スクリーニングに関する検討（第3報）
尿中バニリルマンデル酸スポットテスト発色部の簡易円形展開による鮮明化効果

武士俣　邦　雄*

Studies on Mass-screening Methods for the Neuroblastoma (III)
Effect of Simple Radial Development in Spot Test

KUNIO BUSHIMATA*

Keywords：尿中バニリルマンデル酸 urinary vanillylmanderic acid, 判定 reading, 鮮明化効果 effect of clearization, 簡易円形展開 simple radial development, スポットテスト spot test

神経芽細胞腫のスクリーニング検査が，行政サービスとして，全国的規模で実施されつつある．

こんにち，本腫瘍のスクリーニング検査としては，尿中のバニリルマンデル酸(以下VMAと記す)を発色させて，定性的に検索する方法[1,2]，あるいは各種のクロマトグラフィーの装置を用いて，カテコールアミンの代謝物質を分離して定量的に分析する方法とがある[4-11]．しかし，後者による検査は正確ではあるが，検査装置が高価であったり，検査を実施するのに時間と経費を必要とするうえ，操作が繁雑であるために，多数の検体を早くかつ精度よく処理しなければならないマス・スクリーニングには，適当な方法ではない．

そこで，神経芽細胞腫のマス・スクリーニング検査としては，一般的に，尿中のVMAにジアゾ化パラニトロアニリンを結合させて，特徴的な紫色のアゾ色素を指標として検索するスポットテスト法[1]あるいはディップ法[2]が採用されている．しかし，この尿中VMA発色法は，ジアゾ化パラニトロアニリンと反応して，黄褐色や褐色あるいは青褐色に呈色した化合物および遊離のパラニトロアニリンが，特徴的な紫色を呈するVMAのアゾ化合物と混在することになるために，肉眼による色調検出が困難であることが欠点となっている．

そこで永原[12]は，尿中VMAスポットテストろ紙の発色部をストリップ(短冊)状に切断し，ゴム栓で密閉した三角コルベンを用い，ペーパークロマトグラフィー技法の上昇法にもとづいて，混在する判定妨害呈色物質を除去する方法を考案し，報告を行っている．ところが，この方法においても，三角コルベンを並べて置くスペースが必要であるうえ，展開槽内を展開溶媒で常時飽和にしておくこと，あるいは展開に時間を要するなどの難点があり，簡易化が求められた．

そのために著者は，尿中VMAスポットテストの発色中心部から，大きなスポットの場合には中心からはずれた部位からの一部分を，開放系において円形クロマトグラフィー[14]の展開を応用して，VMAのアゾ化合物と混在している判定妨害呈色物質を，除去する方法を考案した．また，この方法を実際のマス・スクリーニング検査に活用して，肉眼による成績判定に効果を上げていることを報告した[13]．

ここでは，尿中VMAのスポットテストにおいて，本簡易円形展開法に従って，混在する色調検索妨害呈色物質を除去することによって，検査の成績判定がどのように容易になるかを，光学計測装置を用いて検討したので報告をする．

研究材料の作製

標準溶液の調製：VMAの標準物質（米国シグマ社製）を正確に10.0mg秤量したのちに，100m*l*容量のメスコルベンに完全に移し，少量のエチルアルコールと純水を加えて溶解したのちに標線まで純水を加えてよく混合し，10.0mg／d*l*濃度のVMA標準溶液を作製した．さらに，この10.0mg／d*l*濃度の標準溶液を，ホールピペットおよびメスコルベンを用いて正確に2倍および5倍に希釈し，50μg／m*l*および20μg／m*l*の各濃度のVMA標準溶液を調整した．

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科　160　東京都新宿区百人町3—24—1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

実験用尿試料：スポット用の尿試料としては，健康な成人の食前1時間尿(空腹時尿，66m*l*)および食後1時間から3時間の間の2時間尿(食後尿，92m*l*)ならびに塩酸酸性のもとに冷蔵保存しておいた患者尿を用いた．

実験用スポットろ紙の作製：60cm角のろ紙(東洋ろ紙No. 2)を5 cm×20cmに切断し，各試料のスポットの間隔が6 cmになるようにピンで目印を付けた．それから，ろ紙上のそれぞれのスポット目印の位置に，マイクロピペット(エクセルトリペット5—III型，硝英製作所製)を用いて，前述した各濃度の標準溶液および各尿試料を，おのおの20μlずつスポットした．また，試料をろ紙にスポットした後の乾燥方法の違いによる差異についても検討するために，自然に乾燥したものとヘアードライヤーを用いて急激に乾燥した場合の，二種類の実験用材料を作製した．

簡易円形展開の方法

このことの概略については，すでに報告[13]したところであるが，技術的な細部を，あらためてここに記述する．

まず，VMAの標準物質および尿試料の発色操作については，すでに常用されているスポットテスト法を改善した方法にもとづいて行い，ジアゾ未反応物質が残存することのないように，ろ紙の表側のスポットを発色乾燥したのちに，ろ紙のスポット裏側からも発色試薬を噴霧した．

次に，この円形展開の溶媒としては，1%の炭酸カリウム(あるいは炭酸ナトリウム)水溶液90m*l*にエチルアルコール10m*l*を加える永原[12]の簡易ペーパークロマトグラフィー法に従って調製した．そして，この展開溶媒を，先端を直角に切断した25Gの太さの注射針を取り付けた50m*l*容量のプラスチック製注射筒外筒に，約15m*l*入れる．この注射針の先端を，すでに記した方法に従って発色し，自然に乾燥させた実験用ろ紙を，手の平で水平に保持しながら，スポットのほぼ中央に(大きなスポットの場合は辺縁偏りに)垂直になるように，注射針から展開溶媒が滴下する合い間を見計らって，そっと接触させ，展開溶媒をろ紙に自然に浸潤させる．そして，展開溶媒がスポットの外縁から5～6 mm位の所まで浸潤したとき(約20秒後)に，注射針の先端をろ紙面から離すとともにろ紙上から外す．この展開処理が完了したろ紙を自然に乾燥させると，試料スポットの発色部よりも外側に黄褐色ないし褐色(患者尿においては青系色調も認められる)のリングが現われるとともに，内側にはアゾ化合物の色素のリングが残る．

すなわち，この場合のVMA検査の成績判定は，検査ろ紙の簡易展開処理によって内側に残留した紫色のリングの度合と色調にもとづいて行う．また，新たに，試料スポット部位よりも外側に現われた褐色系のリングの濃さは，被検体の尿の濃度を反映しているものであり，その濃淡をも参考にして，検査の成績判定に利用することができる．

光学機器による計測

光学測定機器としては，島津二波長クロマトスキャナーCS-910型に，同社の卓上型自動平衡記録計U—235型を接続し，反射法にもとづいて吸光度を記録した．また，この時の，クロマトスキャナーのステージの移動および記録計の記録紙の送りは，40mm／minの等速度で行い，ResponseはSlowに設定し，感度は5倍で測定記録した．

なお，この吸光度測定に際して，実験用の発色ろ紙は，傷のない二枚の薄層クロマトグラフィー用のガラス板の間に密着させ，スポットセンターの目印が光路の中央を移動するように固定した．

さらに，実験用ろ紙上の発色スポットの吸光度測定は，Gitlowら[3]がVMAアゾ化合物の最大吸収波長として報告しているところの，550nmの波長にもとづいて行った．

結果および考察

標準液および各尿試料をスポットした実験用ろ紙を，すでに記した方法にもとづいて発色し，自然に乾燥したのちに，前記の要領に従って記録した吸収曲線を図1.に示す．この吸収曲線の試料ごとのピークは，標準VMAおよび尿試料のスポットの辺縁の位置である．すなわち，各試料の二つの吸収ピークの間隔は，個々のスポットの直径を示している．

図1.の吸収曲線から明らかなように，標準液および尿試料の全てのスポット内部にも，吸収のあることが認められるが，尿試料の場合に，健康な成人の尿に比べて，患者尿ではスポット内部と辺縁との吸光度の差が，きわめて少ないことが明らかである．この患者尿のスポット辺縁における吸光度を，標準液のスポット辺縁の吸光度に比較すると，VMAの100μg／m*l*濃度のそれに匹敵することが認められるとともに，食後尿のそれと同程度である．

なお，この時の液体クロマトグラフィーによる尿中VMAの定量測定によれば，空腹時尿3.9μg／m*l*，食後尿22.7μg／m*l*および患者尿106μg／m*l*のそれぞれの濃度であった．

次に，図1.と同一のVMAスポット発色ろ紙につい

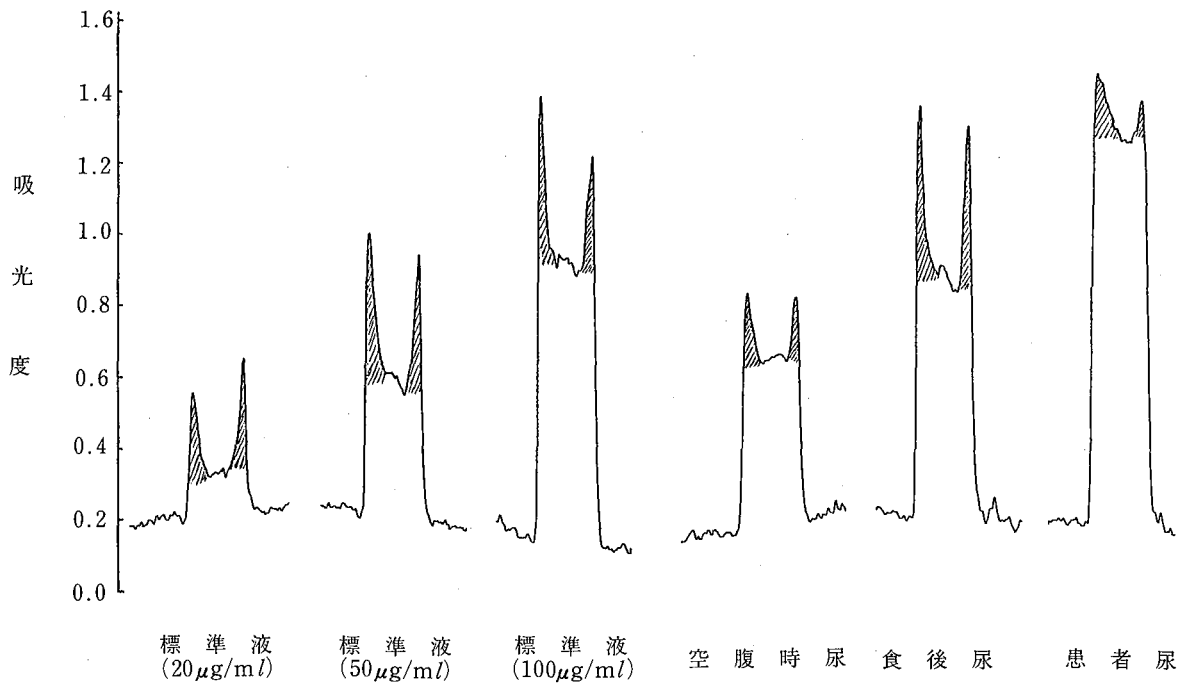


図1．VMAスポットテスト発色ろ紙の550nm波長における吸収曲線(感度5倍)

て，二波長による吸光度差(E_{550}—E_{450})を計測して記録した吸収曲線を，図2.に示す．

図2.の各吸収曲線について比較すると，VMA標準物質の全てのスポットおよび患者尿のスポットではスポット内部に吸収が認められるのに対し，食後尿ではスポット内部の吸収がほとんどないうえに，空腹時尿スポット内部の吸収は450nmの波長に強度に影響されていることが明らかである．また，図2.の全てのスポット辺縁の吸光度を，図1.のそれと対比した場合に，図2.のほうが約半分の値になっていることが認められるが，これは450nmの波長における吸光度を減じたためである．

なお，発色反応による定性検査の肉眼による色調判断は，全光線波長における吸収を相加したものであり，図1.に示した吸光度よりも黒く感じるのが普通である．

すなわち，特異的な色調を検索する場合には，その吸収波長以外の吸光色調の部分をできるだけ除外することによって，目的とする色調はより鮮明になる．

そこで，図1.および図2.に用いた実験用のVMAスポット発色ろ紙を，すでに記した方法にもとづいて，円形展開処理を行い，自然に乾燥させた後に，前記した吸収曲線を記録したスポットセンターと同じ位置について，550nmの波長で計測記録した吸収曲線を図3.に示す．

図3.に示したそれぞれの吸収曲線のうち，各濃度のVMA標準液および尿試料について斜線で示した部分は，VMAスポットテスト発色部の簡易展開処理によって，展開移動が小さいために残留したアゾ化合物の，550nm波長における吸収を示している．また，それぞれの吸収曲線における外側の白い部分の吸収は，すでに記した展開溶媒によって，VMA発色部から外側に展開移動した遊離のパラニトロアニリンあるいはVMA以外の尿中成分のアゾ化合物の存在を示している．

そこで，この図3.に示した吸収曲線について詳細に観察したところ，標準液の20μg／ml濃度のスポット内部は，発色試薬を噴霧したベースラインよりも低く，50μg／ml濃度のスポット内部はベースラインと同程度の吸光度であることが認められ，アゾVMAのほとんどがスポット辺縁に集積されたような状態であった．しかし，100μg／ml濃度の標準液のスポットでは，その内部に吸収のあることが認められ，多量のアゾVMAが存在した場合には，本簡易円形展開方法ではその移動が起り難いことが分った．このことは，尿試料のスポットの吸収曲線において，空腹時および食後の各尿については内部にほとんど吸収を認めないが，患者尿では相当多量のアゾ

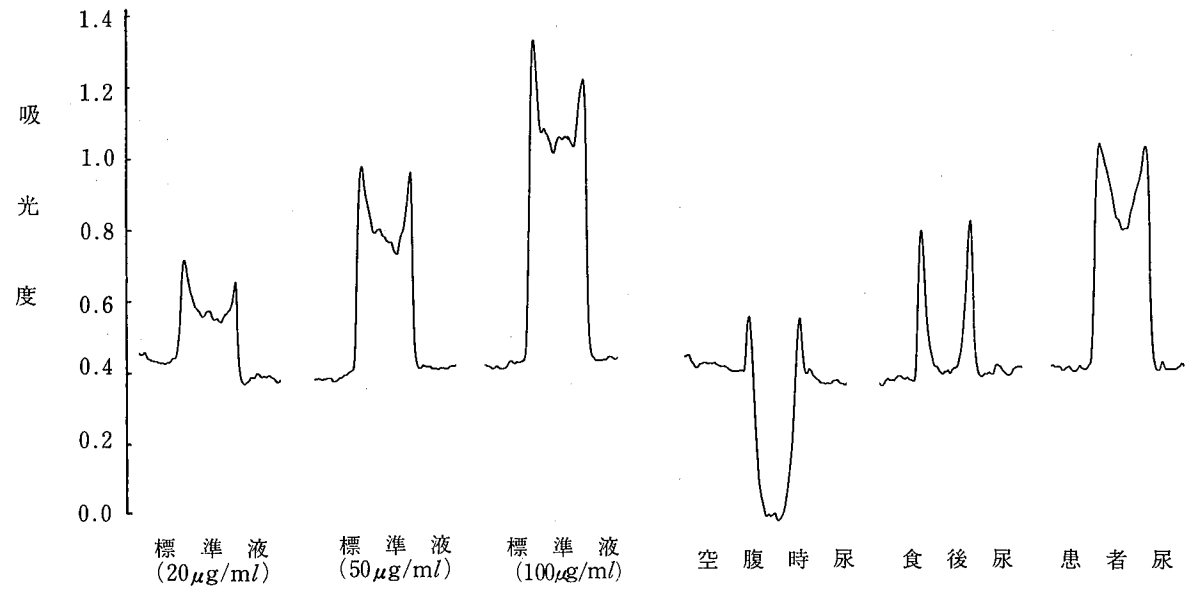


図2． VMAスポットテスト発色ろ紙の二波長測光(E_{550}—E_{450})における吸収曲線(感度5倍)

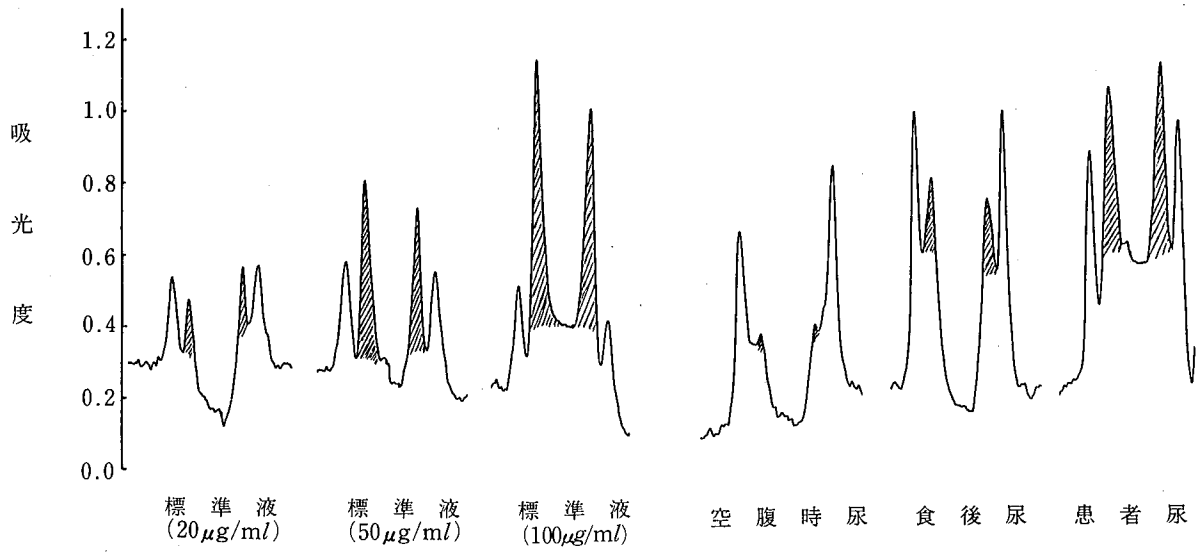


図3． VMAスポットテスト発色部簡易円形展開後の550nm波長における吸収曲線(感度5倍)

化合物が残存している状況からも観察することができる．

さらに，図3.の吸収曲線の斜線部分の吸収の大きさを図1.に示した簡易円形展開前の吸収曲線に比較すると，各標準液および尿ともに，簡易円形展開することによって，スポット内部の吸収が小さくなり，紫色を呈するア

ゾ色素部分の吸収が先鋭化され，スポット内部との色調差が増したことが認められる．

このことは，すでに記したように，スポットを円形展開することによって，スポット内部の希薄なアゾVMAが，アゾ化合物が高濃度に存在するスポットの辺縁部分で移動が小さくなり，集積される効果も一つの理由と思われる．

すなわち，本簡易円形展開法の操作は，VMAアゾ色素の検索を容易にするため，スポットテスト法の成績判定にとって，効果があることが裏付けられた．

また，図3.に用いた実験用ろ紙について，550nmおよび450nmの二波長で計測し，両波長における吸光度の差の吸収曲線($E_{550}-E_{450}$)を図4.に示す．

この図4.の吸収曲線を，図2.に示した簡易円形展開を行わなかった時の吸収曲線と比較してみると，とくに成人尿スポットの辺縁部分における吸収曲線に鋭さがなく，色素が巾広く存在していることが示唆された．なお，このことを，VMA標準物質と患者尿の吸収曲線は類似的であることと対比して考えると，成人尿の発色スポットリング近辺には，VMAアゾ化合物の他に，展開溶媒によってアゾVMAよりも移動され易い色素の存在が推察された．

そこで，簡易展開後の実験用ろ紙を肉眼で観察したところ，展開移動した褐色リングとスポット辺縁の間に，サーモンピンク系の色素が存在していることが認められた．

さらに，本簡易展開法による展開操作によって，アゾVMA化合物が展開移動するために，拡散希薄化することも考えられるので，ノギスを用いて，各吸収曲線の頂点の間の距離を測定した．その値を表1.に示す．

表1.の試料をスポットした後に，ヘアードライヤーを用いて急激に乾燥したスポットの直径は，自然に乾燥したスポットのそれよりも小さいが，本円形展開前後の直径比にもとづいて，その移動を検討したところ，乾燥方法の違いによる有意な差は認められなかった．さらに，本簡易円形展開を行う場合に，検査材料の乾燥度合の違いによる差についても調べてみたが，展開前後の比率に有意な差は認められなかった．

しかし，標準液と尿試料の場合について比較検討したところ，展開前後の比率は尿試料の方が大きかった．このことは，尿中には展開溶媒に溶解する多くの物質が存在しているために，展開時にそれらの物質によって誘導的に移動したために生じた差であろうと推察された．

以上，述べてきたことから，尿中VMAスポットテスト検査における本簡易円形展開法は，展開溶媒飽和下で

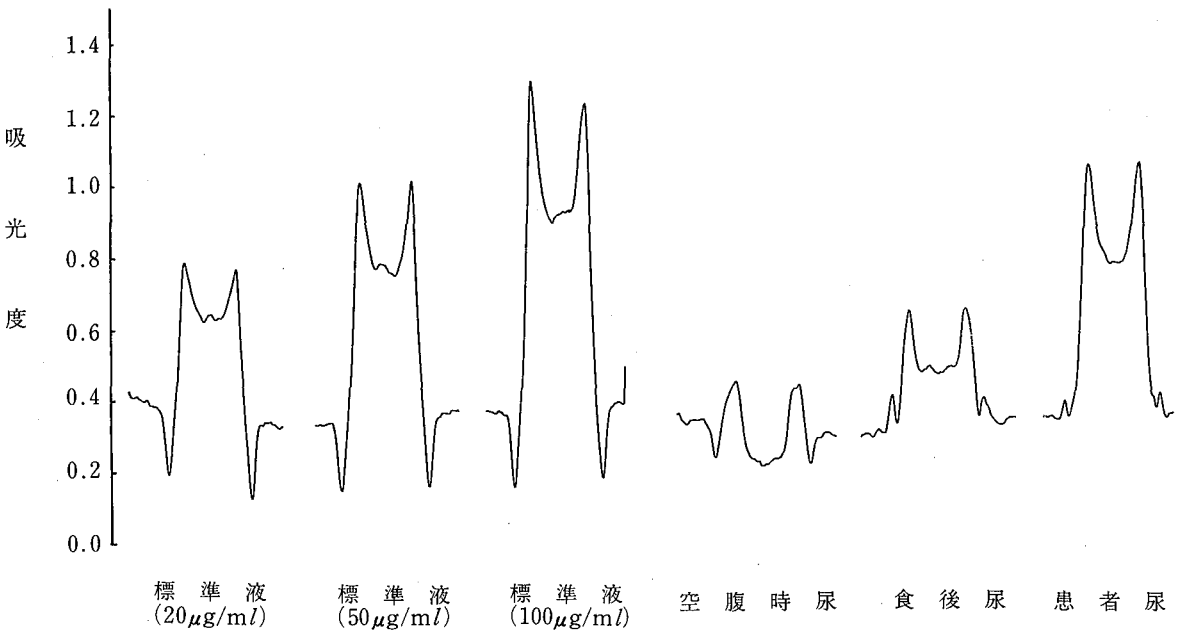


図4． VMAスポットテスト発色部簡易円形展開後の二波長測光($E_{550}-E_{450}$)における吸収曲線(感度5倍)

表1．550nm波長における吸収曲線から測定したスポットの直径

(mm)

		VMA標準液			尿試料		
		20μg/ml	50μg/ml	100μg/ml	食前尿	食得尿	患者尿
自然乾燥乾燥材料展開	展開前	17.5	17.0	18.2	16.8	16.9	15.6
	展開後	18.4	18.4	19.0	18.5	19.0	18.0
	B／A	1.0514	1.0824	1.044	1.101	1.124	1.154
自然乾燥湿気材料展開	展開前	13.5	13.6	13.3	13.1	13.8	13.1
	展開後	14.4	14.4	14.4	14.6	15.7	14.7
	B／A	1.0667	1.0588	1.0827	1.115	1.138	1.122
ドライヤー速乾乾燥材料展開	展開前	17.5	18.1	17.4	17.5	17.0	13.7
	展開後	19.1	19.1	18.3	19.0	19.0	16.7
	B／A	1.0914	1.055	1.0517	1.0857	1.1177	1.219

脚注；A：展開前，B：展開後

7分間上昇展開する永原[12]の方法よりも，数十秒間という短い時間で完了するなどの利点などを含めて，効率的かつ有効的であると結論づけられる．

まとめ

著者は，尿中バニリルマンデル酸スポットテスト法にもとづいた検査において，その成績の判定方法を改善し，すでに報告を行った．このたびその判定方法について，VMA標準物質および尿試料を用い，光学計測機器を導入して，有効性があるか否かを検討したところ，以下のような結果が得られた．

1．原法にもとづいた標準液および尿試料の発色スポット内部には，強い吸収が認められ，とくに患者尿の場合に，スポット辺縁との差が小さかった．

2．1．と同一の実験材料の発色部を，スポット中心部から簡易円形展開操作を行ったところ，検査成績の判定を妨害していた褐色物質が取り除かれて，VMAのアゾ化合物を主体とした紫色リング部分の吸光が増大した．

3．簡易展開前後のスポットについて，550nmおよび450nmの二波長で測定して比較したところ，その吸光度に大きな変化は認められなかった．

4．スポットテスト法における検査材料作製の際に，試料をスポットした後，自然に乾燥した材料の方が，ヘアードライヤーを用いて急激に乾燥した材料よりも，スポットの直径は大きいが，簡易円形展開前後における紫色部分の移動度に，大差は認められなかった．また，本簡易展開において，検査材料が多少の湿気を含んでいた場合でも，その処理操作によって，スポットリングが大きく移動するようなことはなかった．

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）中田利一，石井譲治，児玉京子，三谷一憲，土平一義，山中克己ほか：日本公衆衛生誌，30，227，1983

3）Gitlow, Stanley E., Ornstein, Leonard, Mendlowitz, Milton, Khassis, Sarah and Kruk, Elizabeth：*American Journal of Medicine*, 28, 921, 1960

4）Woiwod, A.J. and Knight, R.：*Journal of Clinical Pathology*, 14, 502, 1961

5）Anggard, Erik, Sjöquist, Birgitta and Sjöström, Rolf：*Journal of Chromatography*, 50, 251, 1970

6）Burtis, C.A., Butts, W.C. and Rainey, W.T. Jr.：*American Journal of Clinical Pathology*, 53, 769, 1970

7）Häggendal, J.：Scandinav. *J. Clin. & Lab. Investigation*, 14, 537, 1962

8）守　和子：臨床病理，22，304，1974

9）Akira Yoshida, Masanori Yoshida et al.：*Journal of Chromatography*, 116, 240, 1976

10）W.Dziedzic, Stanley, B.Dziedzic, Laura and E. Gitlow, Stanley：*Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 82, 829, 1973

11）H.B.Wu, Alan and G. Gornet, Terrie：*Clinical Chemistry*, 31, 298, 1985

12）永原　邉：神経芽細胞腫スクリーニング，174頁，1984，母子愛育会編

13）武士俣邦雄：東京衛研年報，35，92，1984

14）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

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 73-76, 1985

都立衛生研究所における神経芽細胞腫マス・スクリーニング検査の動向（昭和59年度）

高野弘紀*, 鈴木重任*, 武士俣邦雄*, 峰岸正子**,
石塚　実**, 村田篤司**

Mass-screening for the Neuroblastoma at the Tokyo Metropolitan Research Laboratory (1984.4—1985.3)

HIROKI TAKANO*, SHIGETOH SUZUKI*, KUNIO BUSHIMATA*, MASAKO MINEGISHI**, MINORU ISHIZUKA** and TOKUSHI MURATA**

Keywords: 再検査 re-examination, スポットテスト spot test, 尿中バニリルマンデル酸 urinary vanillylmandelic acid

緒　言

神経芽細胞腫は，予後不良の腫瘍であるが，早期に発見し，加療を施すことにより，完治することができる小児の固形がんの1つである[1]．

本腫瘍は，簡便なスクリーニング検査によって早期に発見することが可能であるため，多くの自治体が行政的に対応している．

東京都においても，多摩および島しょ地区の保健所管内に居住する乳児を対象として，昭和58年10月から本腫瘍のマス・スクリーニングを行っている．この検査は，尿中に排泄されるカテコールアミン代謝終末産物の1つであるバニリルマンデル酸(以下VMAと略す)を，発色検出するものであり，当衛生研究所で行っている．

神経芽細胞腫のマス・スクリーニングを行うにあたっての問題点について，採尿後の時間経過の検査成績にあたえる影響や，採尿方法の指導等については，武士俣ら[2]がすでに報告している．

このたび昭和59年度に行った検査成績の動向について解析を行ったところ，神経芽細胞腫マス・スクリーニング実施における初期の問題点がいくつか明らかになったので報告をする．

検査の材料および方法

すでに報告してあるシステムにもとづいて，当衛生研究所に搬入された尿スポットろ紙を検査した[3]．また，神経芽細胞腫のスクリーニングの尿検査としては，佐藤ら[4]が褐色細胞腫のスクリーニングとして行った検査方法を，沢田[5]が応用開発したスポット法[6]が，全国の多くの自治体で用いられている．我々はこのスポット法にもとづいて，当科において開発した簡易円形展開法[7]を用いて検査成績の判定を行った．この検査成績を集約し，内容解析をwelchの差の検定にもとづいて行った．

成績の集約および考察

昭和59年度に，当所で行った神経芽細胞腫スクリーニングとしての尿中VMAスポットテスト検査総数は，再検査を含めて34,758件であった．このうち，初回検査総数において，医療機関へ精密検査の受診を勧めた被検者は4名(4/31,141=0.013%)であった．この数字を，沢田ら[8]の診察にもとづいて偽陽性として取り扱った件数0.079%と比べると約1/6であり，きわめて低い偽陽性率であった．

次に，昭和59年度に行った尿中VMAスポットテストにおいて，初回の検査で要再検査と判定された被検体の出現率(以下再検率という)，およびこの再検査被検者において2回以上くり返して要再検査と判定された被検体の出現率(以下再々検率という)を，各月別に年間平均値と比較した(表1.)．その結果，4月および5月は有意に高く，10月，1月および3月は有意に低かった．

また，再々検率についても，同様な傾向が認められた．

要再検査となる理由には主に2つあり，その1つは，食事制限の不適切(食事の影響によって尿スポットテストの呈色反応がVMAと類似の発色をするため，陰性と判定が不可能)であり，他方は，材料不良(脱脂綿あるいはオムツなどを検査用ろ紙に押し当てたり，検体尿の滴下が多いため検査の成績判定が不可能)である．それぞれ

* 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
* The 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母子衛生課

表1．月別の再検率と再々検率 (%)

		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	全体(A)
						再	検	率						
	検査数	3,285	3,396	3,190	2,868	2,849	2,780	2,540	2,587	2,041	2,833	2,883	3,506	34,758
12ヶ月	平均値	25.92	14.79	9.35	8.26	9.05	8.42	4.49	8.20	10.13	8.83	6.44	6.09	10.02
平均	標準偏差値	9.60	6.32	6.23	5.11	4.30	4.30	2.38	4.46	4.54	5.59	3.16	2.44	2.45
	Aに対する有意性	***	*					***				**	***	
						再	々	検	率					
12ヶ月	平均値	28.64	23.49	19.98	14.23	10.71	8.08	7.47	4.45	7.00	5.31	7.32	6.71	11.98
平均	標準偏差値	14.91	10.05	12.16	17.02	13.78	4.06	6.82	2.81	6.72	3.96	3.39	3.07	4.24
	Aに対する有意性	**	**				*		***	*	***	*	**	

脚注：有意性； ＊：P<0.05, ＊＊：P<0.01, ＊＊＊：P<0.001

表2．検査成績の判定理由別再検率(月別) (%)

		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	全体(A)
						食	事	制	限	不	適			
	検査数	3,285	3,396	3,190	2,868	2,849	2,780	2,540	2,587	2,041	2,833	2,883	3,506	34,758
12ヶ月	平均値	0.50	1.76	0.89	1.16	3.66	4.33	2.23	5.54	5.79	6.16	4.83	4.14	3.35
平均	標準偏差値	0.70	1.82	0.97	1.38	2.71	2.94	1.84	2.65	3.54	3.67	3.23	2.33	0.86
	Aに対する有意性	***	*	***	***				*	*	*			
						材	料	不	良					
12ヶ月	平均値	18.27	9.05	5.74	4.06	3.69	2.64	1.56	1.35	1.63	1.56	1.20	1.12	4.28
平均	標準偏差値	7.20	4.74	4.79	3.25	2.61	2.18	1.83	1.19	1.66	2.19	1.60	0.97	1.59
	Aに対する有意性	***	**					**	***	***	**	***	***	

脚注：有意性； ＊：P<0.05, ＊＊：P<0.01, ＊＊＊：P<0.001

月ごとに再検率の理由別に検討を行った(表2.).

まず，食事制限指導を求めた再検率(材料不良を除く)についてみると年間平均(3.35%)は，ディップ法による尿中VMAマス・スクリーニングを実施している中田ら[9](3.4%)，新川ら[10,11](3.2%／昭和57年，2.3%／昭和58年)の要食事制限指導を求めた再検率とほぼ等しかった。このことは，神経芽細胞腫マス・スクリーニングの検査としての尿中VMA発色試験の成績判定の基準は，当所と他の自治体検査機関の間において，同水準であると思われた．また，当所においては，本スクリーニング検査には2人の技術者が携わっているが，食事制限指導を求めた再検査判定の比率は，51.8%対49.2%であり，検査成績の解析に大きな影響を及ぼすとは思われなかった．

さらに，月別に再検率を比べてみると，10月を除いた9月以降の各月は，有意に高く，それに対し，4月，5月，6月および7月は有意に低かった．

一般に夏季には，バニラエッセンスを含んだ食品や，ジュース類の摂取が多いために，これらの影響が現われ，再検率が上がると云われているが，今回の検査では，逆の傾向を示している．このことは，バニラや香辛物質を含む食事を摂取させた場合において，その前後の尿中VMA定量値に有意な差異は認められなかったという報告[12]を支持する結果であり，スポットテストによる，VMA類似呈色反応はバニラエッセンスなどよりも他の物質による影響が大きいという可能性を示唆するものであり，今後の重要な研究課題と思われた．

次に，材料不良による再検率を各月別に比較検討した

表3．保健所別の再検率及び再々検率　(%)

		再検率			再々検率		
		12ヶ月平均			12ヶ月平均		
	検査件数	平均値	標準偏差値	有意性	平均値	標準偏差値	有意性
T.s.o.H.C.	310	8.26	10.79		25.83	26.45	*
O.m.H.C.	1,185	5.30	2.93	***	6.24	3.78	**
I.c.H.C.	799	10.23	7.70		12.02	9.32	
H.j.H.C.	3,497	10.42	5.42		9.96	5.55	
N.s.H.C.B.	266	9.88	6.99		13.11	16.48	
H.o.H.C.	1,784	12.27	8.36		12.11	9.75	
N.m.H.C.B.	1,320	12.51	7.21		14.12	10.45	
I.g.H.C.B.	594	13.08	10.21		13.58	11.40	
M.d.H.C.	2,733	11.92	6.76		14.39	10.35	
T.w.H.C.B.	411	8.84	6.24		12.82	18.66	
F.c.H.C.	2,250	9.57	5.42		11.39	8.58	
M.k.H.C.	1,609	10.56	7.24		12.31	9.23	
T.w.H.C.	1,307	9.12	3.67		13.51	12.65	
M.m.H.C.B.	548	6.08	6.44	*	6.37	8.14	*
A.m.H.C.B.	1,109	6.45	5.22	*	7.20	4.20	*
K.c.H.C.B.	633	10.01	6.73		9.91	8.05	
M.f.H.C.	1,751	9.04	4.63		9.03	5.04	
K.e.H.C.B.	654	9.43	4.53		11.13	8.33	
K.i.H.C.	1,195	12.30	7.45		12.29	9.21	
K.j.H.C.B.	921	14.00	10.91		17.47	18.26	
M.n.H.C.	1,281	8.79	2.92		8.42	3.12	
T.s.h.H.C.	1,752	8.32	7.04		10.09	9.77	
K.r.H.C.	1,830	15.90	10.19	*	19.40	14.25	*
H.m.m.H.C.	1,919	13.24	7.20		18.08	12.50	*
H.k.m.H.C.	1,686	7.28	3.73	*	4.86	3.58	***
F.s.H.C.	1,414	8.91	6.27		8.07	7.54	
全体 (A)	34,758	10.30	5.25		11.52	7.29	

脚注：Aに対する有意性；＊：P<0.05，＊＊：P<0.01，＊＊＊：P<0.001

ところ，4月および5月は有意に高く，10月以降は有意に低いという結果が得られた．表1．に示した再検率で，4月および5月に有意に高かったことにおいて，さらに再検査の理由の内訳について検討したところ，食事制限指導を求めた検体(約8％)よりも，材料不良によるもの(約80％)がきわめて多かったことにもとづいている．年度後半になると食事制限指導を求めた検体が約70％に上昇したのに対し，材料不良検体は約25％に低下した．このことは，各保健所における検体作製方法の指導が徹底してきたことを示していると云えよう．

また，各保健所別の要再検査判定の出現率に差があるか否かについて，集約した結果を表3．に示す．表3．から明らかなように，再検査の年間平均出現率に比べて，K.r.の保健所のそれは有意に高く，O.m.，M.m.，A.m.ならびにH.k.m.の保健所で有意に低かった．なお，再々検率についても同様に比較したところ，T.s.o.，K.r.ならびにH.m.m.の保健所のそれは有意に高くO.m.，M.m.，A.m.ならびにH.k.m.の保健所のそれは有意に低い結果であった．このように，再検率が有意に低い保健所では，再々検率もきわめて低く，これに対し，再検率が有意に高い保健所では再々検率もきわめて高い傾向を示している．これらの理由から，保護者への検査における注意や指導ならびに再検時の連絡内容方法が徹底している保健所において，再検率が有意に低いが，連絡や指導が不十分な保健所では，再検率が有意に高いのではないかと推察された．

さらに，各保健所の再検査理由別に再検率を検討した(表4．)．

まず，食事制限指導を求めた再検率について調べてみると，T.s.o.およびI.g.の両保健所は，全体の平均値に比べ有意に低いことが認められた．

また，材料不良についても同様に観察すると，O.m.，T.w.およびH.k.m.の各保健所は有意に低い結果が得られた．

ま と め

昭和59年度東京都下の乳児に対して行った神経芽細胞腫マス・スクリーニングの検査結果を集計し，再検率の変動を理由別および保健所別に解析を行った．

1．食事制限の不適切による再検率においては，季節変動が認められ，夏に低く，冬高い結果であった．これ

表4．保健所別の理由別再検率 (%)

		食事制限不適			材料不良		
		12ヶ月平均			12ヶ月平均		
	検査件数	平均値	標準偏差値	有意性	平均値	標準偏差値	有意性
T.s.o.H.C.	310	0.95	1.66	***	3.60	5.70	
O.m.H.C.	1,185	2.89	2.35		1.84	1.98	*
I.c.H.C.	799	3.68	2.95		3.88	5.89	
H.j.H.C.	3,479	2.89	1.72		4.77	4.70	
N.s.H.C.B.	266	3.31	5.04		4.05	5.66	
H.o.H.C.	1,784	3.67	2.10		6.02	6.59	
N.m.H.C.B.	1,320	3.54	3.08		6.02	6.42	
I.g.H.C.B.	594	1.20	1.81	**	6.19	6.45	
M.d.H.C.	2,733	3.85	2.85		5.40	6.54	
T.w.H.C.B.	411	2.89	4.10		4.24	6.20	
F.c.H.C.	2,250	3.89	2.82		3.58	4.44	
M.k.H.C.	1,609	4.67	3.28		4.00	5.89	
T.w.H.C.	1,307	4.89	3.28		1.95	2.17	*
M.m.H.C.B.	548	3.12	4.89		2.28	5.16	
A.m.H.C.B.	1,109	2.69	2.25		2.22	3.85	
K.c.H.C.B.	633	3.95	3.49		5.00	7.19	
M.f.H.C.	1,751	3.93	2.58		2.72	3.09	
K.e.H.C.B.	654	3.39	4.02		3.70	3.36	
K.i.H.C.	1,195	3.98	2.37		6.36	6.84	
K.j.H.C.B.	921	3.58	3.05		7.46	9.47	
M.n.H.C.	1,281	4.36	3.29		2.72	2.77	
T.s.h.H.C.	1,752	3.04	1.66		3.28	4.24	
K.r.H.C.	1,830	3.83	2.88		7.63	8.91	
H.m.m.H.C.	1,919	3.75	3.15		6.09	6.53	
H.k.m.H.C.	1,686	3.80	2.74		2.87	1.99	
F.s.H.C.	1,414	3.13	2.50		3.99	4.41	
全体 (A)	34,758	3.57	1.96		4.28	4.78	

脚注；Aに対する有意性；＊：P<0.05，＊＊：P<0.01，＊＊＊：P<0.001

はバニラエッセンスを含む飲食物以外の飲食物で偽陽性になることが多い可能性を示しており，こんご，試験研究するうえで重要であると思われた．

2．再検，再々検の割合は年度当初に比べ漸次低下した．再検の主な理由について検討したところ，初めのころには材料不良によるものが多かったが，後半になると食事制限の不適切によるものが主となってきた．このことは，各家庭に対する検査材料作製方法の指導が徹底してきたことによると思われる．

3．再検率は保健所により異なり，再検率の高い保健所は，再々検率も高く，低い保健所は再々検率も低いと云う傾向がみられた．こんご，被検保護者に対する検体作製指導の徹底を，さらに期待したい．

文　献

1）角田昭夫：神経芽細胞腫マス・スクリーニング：母子愛育編，52頁，1984，大門出版，東京．

2）武士俣邦雄：東京衛研年報，35，92，1984

3）武士俣邦雄，鈴木重任：東京衛研年報，35，101，1984

4）佐藤辰男，吉永　馨，石田　望：最新医学，16，371，1961

5）沢田　淳，今宿晋作，高田　洋，乾　明彦，楠　智一：周産期医学，5，62，1975

6）沢田　淳：癌の臨床，28，681，1982

7）武士俣邦雄：東京衛研年報，35，92，1984

8）沢田　淳：小児内科，14，1177，1982

9）中田利一，児玉京子，三谷一憲，山中克己ら：名古屋市衛研年報，23，70，1976

10）新川隆康，黒木俊郎，渡辺祐子，山井志郎，小原　寧：神奈川衛研年報，32，48，1982

11）新川隆康，黒木俊郎，渡辺祐子，山井志郎，小原　寧：神奈川衛研年報，33，45，1983

12）Rayfield.E.：*J. A. M. A.*，221，704，1972

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.*, **36**, 77-81, 1985

高速液体クロマトグラフィーによるイブプロフェンの定量

鎌田国広*, 萩原輝彦*, 高橋美佐子*, 上原真一*,
中山京子*, 秋山和幸*

Determination of Ibuprofen in Solid Dosage Forms by High-Performance Liquid Chromatography

KUNIHIRO KAMATA*, TERUHIKO HAGIWARA*, MISAKO TAKAHASHI*
SINICHI UEHARA*, KYOKO NAKAYAMA* and KAZUYUKI AKIYAMA*

A high-performance liquid chromatographic (HPLC) method for the determination of ibuprofen in tablets, powders, and granules was studied. The method involves a simple extraction using acetonitrile and sonication. Ibuprofen was determined by reverse-phase HPLC on a TSK-GEL 410 column using a mobile phase of acetonitrile-water-phosphoric acid, UV detector (264 nm) for the detection. The internal standard was *n*-butyl *p*-hydroxybenzoate.

The calibration curve was linear in the range of 0.2~1.0 mg/m*l* of ibuprofen. The HPLC method was simple and exhibited good accuracy, reproducibility and selectivity. The results obtained by the HPLC and BP methods were compared.

Keywords: ibuprofen, anti-inflammatory drugs, high-performance liquid chromatographic determination.

緒　言

イブプロフェン〔2—(4—isobutyl phenyl) propionic acid〕(IP)は非ステロイド性の抗炎症および鎮痛下熱薬としてリウマチ性関節炎の治療に広く用いられている.

IPの分析法として, 第10改正日本薬局方(日局)[1]およびイギリス薬局方(BP)[2]では, IPの有するカルボキシル基を利用した中和滴定による方法, アメリカ薬局方(USP)[3]ではガスクロマトグラフ(GC)法などが用いられている. しかし, 滴定法ではIPと同様にカルキシル基を有するアスピリン等の類似消炎物質が共存する場合, 分析が困難であり, またGC法では誘導体化して分析を行うので操作が複雑である.

そこで今回, 著者らは前処理操作の簡単な高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いる方法を検討し, 迅速で精度のよい定量法を確立したので報告する.

実験方法

1. 装置　高速液体クロマトグラフ——ポンプ：日本分光K.K.製BIP—1, 試料注入装置：レオダインK.K.製7125型, 検出器：日本分光K.K.製UVIDEC—100V型, データー処理装置：島津製作所K.K.製クロマトパックC—R3A, 超音波発振水槽——柴田製作所K.K.製

2. 試薬　IP標準溶液——日局適合品を乾燥(減圧・五酸化リン・4時間)後, 500mgを精秤し, アセトニトリルに溶かして正確に100m*l*とし, IP標準溶液とした. この標準溶液を必要に応じてアセトニトリルで希釈して用いた.

内部標準溶液——パラオキシン安息香酸ブチル(東京化成)50mgを精秤し, アセトニトリルに溶かして200m*l*とした. この溶液1 m*l*中に内部標準物質(I.S.) 250μgを含む.

類似消炎物質——サリチル酸(日局品), アスピリン(日局品), インドメタシン(日本メルク萬有K.K.), ケトプロフェン(SIGMA), ナプロキセン(SIGMA), メフェ

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

ナム酸（SIGMA）およびフルフェナム酸（Aldrich）を用いた．

その他の試薬——すべて和光純薬K.K.製試薬特級を用いた．

3．試料　医薬製剤は行政検体として衛生局薬務部より送付されたIP錠，散剤および顆粒剤を用いた．その剤型が錠剤の場合は20錠を，顆粒剤の場合は10g以上をとり乳鉢でよく研和して均質な粉末としたものを試料とした．

4．試料溶液の調製　IPの約20～50mgに相当する粉末を50m*l*のメスフラスコに精秤し，アセトニトリル30m*l*を加えてときどき振り混ぜながら超音波発振水槽で5分間抽出する．これに内部標準溶液1m*l*を正確に加え，アセトニトリルで50m*l*としたのち，この液をろ紙でろ過し，初めのろ液10m*l*を捨てる．つぎのろ液を試料溶液とする．

5．HPLCによる定性および定量　試料溶液およびIP標準溶液のそれぞれ5 μlについて，下記の測定条件に従って操作し，得られたピークの保持時間より定性を行う．また，IP標準溶液を希釈して0.2～1.0mg/m*l*（I.S. 5 μg/m*l*添加）の標準系列をつくり，それぞれの5 μlについて定性の場合と同様な条件でHPLCを行い，得られたクロマトグラムのピーク面積による内部標準法により検量線を作成して試料溶液中のIP含有量を測定する．

HPLC測定条件

カラム：TSK—GEL 410，25cm×4.0mmi.d.，移動相：60%アセトニトリル・リン酸混液（PH3），流速：1m*l*/min，検出器：紫外吸光光度計，測定波長：264nm，温度：室温

実験結果および考察

1．抽出溶媒および抽出時間について　超音波発振水槽を用いて抽出操作を行う場合，試料からIPを効率よく抽出できる溶媒および抽出時間について検討した．まず最初にメタノール，エタノールおよびアセトニトリルのそれぞれを用いて実際試料から20分間抽出操作をおこない抽出率を比較した結果，いずれの溶媒においても抽出率に差が認められなかった．そこで今回，HPLCの移動相溶媒に用いるアセトニトリルを抽出溶媒に選んだ．つぎに，抽出溶媒にアセトニトリルを用いて0，2.5，5，10分と抽出時間を変化させ各抽出時間における抽出率を求めた．その結果，2.5分以上で抽出率は一定となることが認められた．そこで抽出時間を5分に設定した．

2．HPLCについて　カラム充てん剤および移動相溶媒について検討した．IPの分析用カラム充てん剤として一般にオクタデシシルシラン処理を施した逆相系タイプの充てん剤が用いられている[4-11]．そこで今回，逆相系充てん剤としてLiChrosorb RP-8（5 μm，15cm×4.6mm i.d.），LiChrosorb RP-18（7 μm，25cm×4.6mm i.d.），Zorbax ODS（15cm×4.6mm i.d.），μ Bondapak C_{18}（30cm×4.0mm i.d.），ULTORON N-C_{18}（5 μm，15cm×4.6mm i.d.）およびTSK-GEL 410（25cm×4.0

Table 1. Retention Time of Anti-inflammatory Drugs

Compound	Retention time (min)							
	LiChrosorb RP-8(5μm) (15cm×4.6mm)	Zorbax ODS (15cm×4.6mm)	ULUTRON N-C_{18} (5μm) (15cm×4.6mm)	μ Bondapak C_{18} (30cm×4.0mm)	LiChrosorb RP-18(7μm) (25cm×4.6mm)		TSK-GEL 410 (25cm×4.0mm)	
	A	A	A	B	B	C	B	D
Aspirin	2.08	2.06	2.98	4.07	2.97	3.48	3.59	3.49
Salicylic acid	2.99	2.18	3.18	4.37	3.25	3.85	3.97	4.40
Ketoprofen	4.28	3.56	5.58	7.51	4.64	5.81	5.96	5.89
Naproxen	4.36	3.62	5.62	7.64	4.71	6.98	6.21	7.02
Indomethacin	7.67	6.52	10.83	13.37	7.97	13.98	9.75	12.43
Ibuprofen	9.04	7.56	11.38	13.85	8.46	15.46	11.04	13.18
Flufenamic acid	13.57	10.17	17.04	20.35	10.83	25.42	14.38	19.80
Mefenamic acid	12.67	10.65	17.22	18.98	11.40	26.30	14.85	21.45
n-Butyl *p*-hydroxybenzoate (I.S.)	5.41	4.50	7.25	9.25	5.81	7.81	7.55	7.71

Mobile Phases : A, acetonitrile-water-acetic acid(50 : 49 : 1) ; B, acetonitrile-water-acetic acid(60 : 39 : 1) ; C, methanol water-acetic acid(70 : 29 : 1) ; D, methanol-water-acetic acid(75 : 24 : 1).

mm i.d.）の6種類を，また移動相溶媒としてメタノール・水・酢酸混液およびアセトニトリル・水・酢酸混液を用いてIP，I.S.およびIPの類似消炎物質であるサリチル酸，アスピリン，ケトプロフェン，ナプロキセン，インドメタシン，メフェナム酸，フルフェナム酸についてクロマトグラフィーを行った．その結果はTable 1に示すように，いずれのカラム充てん剤を用いてもIPと類似消炎物質とは分離することが認められた．しかし，IPとインドメタシンとの分離能が悪いカラム充てん剤があったので，両者の分離度（R_s）を求めてカラム充てん剤の評価を行った．その結果，Table 2に示すようにTSK-GEL410がR_s＝1.44と最も優れていた．

つぎに，カラムを充てん剤にTSK-GEL410を用いた場合の移動相溶媒について検討した．すなわち，75%メタノール・リン酸混液(pH3)，メタノール・水・酢酸(75：24：1）混液，60%アセトニトリル・リン酸混液(pH3)，アセトニトリル・水・酢酸（60：39：1）混液の4種類を用いてクロマトグラフィーを行いIPとインドメタシンのR_sを求めたところ，それぞれ1.00, 1.07, 1.54, 1.44であり，メタノール系に比較してアセトニトリル系の移動相溶媒のR_sが優れていることが認められた．そこで，R_sの最も優れていた60%アセトニトリル・リン酸混液(pH3)を用いることとした．なお，Table 3にアセトニトリルの濃度とpHの変化によるIPおよびI.S.のキャパシティーファクター（K′）と保持時間を示した．その結果，IPおよびI.S.ともにアセトニトリルの濃度が増加するにつれて，またpH値が低くなるにつれてK′が減少することが認められた．

更に本実験では移動相溶媒の流速を1 m*l*/min，カラム温度は室温，検出器には紫外部検出器を用い，測定波長はIPの極大吸収波長264nmに設定した．なお，Fig. 1に上記の設定条件で得られたIP，I.S.および類似消炎物

Table 2. Comparison of Resolution Value for the Separation of Ibuprofen and Indomethacin on Various Columns

Column	Mobile phase	Resolution value
LiChrosorb RP-8	A	1.30
Zorbax ODS	A	1.09
ULTRON N-C_{18}	A	0.62
μ Bondapak C_{18}	B	0.70
LiChrosorb RP-18	B	1.29
	C	1.09
TSK-GEL 410	B	1.44
	D	1.07

Conditions of mobile phase are same as Table 1.

Table 3. Effect of Mobile Phase pH and Percent Acetonitrile on the Capacity Facter and Retention Time of Ibuprofen and Internal Standard

Acetonitrile (%)	pH	Capacity factor (retention time, min)	
		Ibuprofen	I.S.
50	3	5.61(14.59)	1.98(9.43)
60	2	2.02(8.95)	1.19(6.50)
	3	2.04(9.09)	1.20(6.57)
	4	2.22(9.82)	1.30(7.01)
	5	2.44(10.04)	1.44(7.37)
70	3	1.07(5.74)	0.68(4.65)

Table 4. Comparison of HPLC and BP Methods for the Determination of Ibuprofen in Commercial Tablets

Sample	Declared potency (mg/Tab.)	Number of determination	HPLC method			BP method		
			Mean(%)	S.D.	C.V.(%)	Mean(%)	S.D.	C.V.(%)
1	100	10	93.28	1.09	1.17	92.46	1.52	1.64
2	100	10	101.80	1.15	1.13	100.83	1.33	1.32
3	100	10	97.45	1.04	1.07	98.05	1.45	1.47
4	100	10	95.11	1.15	1.21	95.23	1.20	1.26
5	100	10	98.95	1.08	1.09	98.04	0.92	0.94

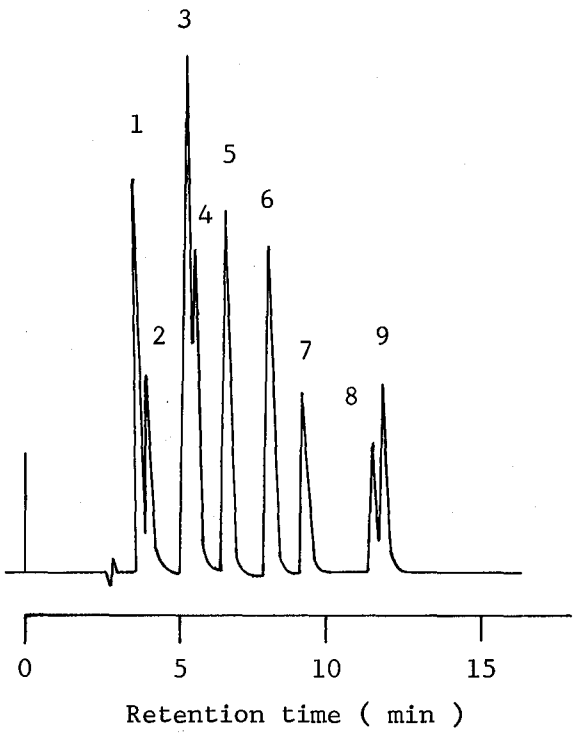


Fig. 1. Separation of the Anti-inflammatory Drugs
Peaks : 1 =aspirin ; 2 =salicylic acid ; 3= ketoprofen ; 4 =naproxen ; 5 =*n*-butyl *p*-hydroxybenzoate (I.S.) 6 =indomethacin ; 7 =ibuprofen ; 8 =flufenamic acid ; 9 = mefenamic acid.

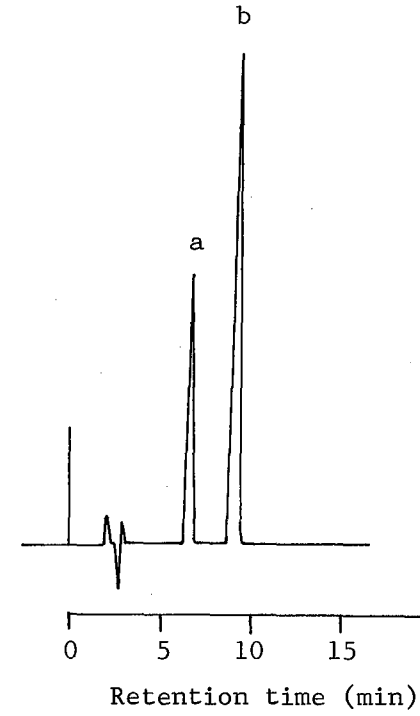


Fig. 2. High Performance Liquid Chromatogram of Ibuprofen and Internal Standard
Peaks : a = *n*-butyl *p*-hydroxybenzoate, b = ibuprofen

質のクロマトグラムを示した.

3. 検量線および再現性について IP 標準溶液を希釈して0.2~1.0mg/m*l* (I.S. 5 μg/m*l*, 添加) の標準系列を作り, 各5 μl を前記の HPLC 測定条件に従って操作し, ピーク面積による内部標準法により検量線を作成したところ, ほぼ原点を通る良好な直線関係 ($y = 0.2497x - 0.0062$, $n = 3$, $\gamma = 0.9998$; y : 濃度(mg/m*l*), $x : \frac{\text{試料のピーク面積}}{\text{I.S.のピーク面積}}$) が認められた. なお, Fig. 2 に IP のクロマトグラムを示した.

IP の0.5および1.0mg/m*l* (I.S. 5 μg/m*l*, 添加) の溶液5 μl をとり7回ずつ HPLC を行い, 再現性を検討した. I.S. に対する IP のピーク面積比の平均値および変動係数はそれぞれ2.0017 (0.91%), 3.9981 (0.79%) であった.

4. 市販製剤への応用 本法による市販製剤 (錠剤, 散剤および顆粒剤) 中の IP の定量結果を Table 4, 5 に示す.

日局には IP 標準品についての定量法の記載はあるが, 製剤中の IP の定量法について記載がない. 製剤中の IP の定量法としては USP および BP に錠剤中の IP の定量法が記載されている. そこで本法の精度を確認する目的で, 日局 IP 標準品の定量法と同様の中和滴定法を用いている BP 法とについて単味製剤中の IP の定量値の比較を行った (Table 4). 本法と BP 法との間に精度

Table 5. HPLC Determination of Ibuprofen in Commercial Products

Sample	Dosage form	Declared potency	Found (%)
6	Tablet	100mg/Tab.	97.59
7	Tablet	100mg/Tab.	92.72
8	Tablet	100mg/Tab.	97.48
9	Tablet	100mg/Tab.	97.34
10	Tablet	100mg/Tab.	93.95
11	Tablet	100mg/Tab.	93.33
12	Powder	200mg/g	102.49
13	Granule	200mg/g	99.59
14	Granule	200mg/g	101.18
15	Granule	200mg/g	102.54

および含量ともに有意な差は認められなかった（$P < 0.05$）．しかし，本法は類似消炎物質の分離定量においてBP法より優れている．

まとめ

HPLCによる製剤中のIPの定量法について検討した．その結果，IPはTSK—GEL410をカラム充てん剤とし，60%アセトニトリル・リン酸混液（pH3）を移動相溶媒とし，パラオキシ安息香酸ブチルを内部標準とし，UV264nmを測定波長として定量する．なお，本法は操作も簡単で，バラツキも少なく精度よく類似消炎物質と分離定量することが可能であった．また，BP法ともよく一致することを認めた．

文献

1）日本公定書協会，第十改正日本薬局方解説書，C—204，1981，廣川書店

2）*British Pharma Copoeia* 1973, *Addendum* 1975, 27, 1975, London Her Majesty's Stationery Office, England

3）*The United States Pharmacoeia*, 21th Rev., *The National Formulary*, 16th Ed., 526, 1985, United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD

4）Pitre, D. and Grandi, M.：*J. Chro matogr.*, **170**, 278, 1979

5）Dusci, J. L. and Hackett, P. L.：*ibid.*, 172, 516, 1979

6）John, K. Baker and Fifer, K. E.：*J. Pharm. Sci.*, **69**, 59, 1980

7）Anwer, A., Syed, K. and Fotios, M. P.：*ibid.*, **70**, 944, 1981

8）Snider, B. G., Beaubine, J. L., Sears, J. D. and Rahn, D. P.：*ibid.*, **70**, 1347, 1981

9）Cregory, L. Kearns and John, T. Wilson：*J. Chromatogr.*, **226**, 183, 1981

10）Judy, L. Shimek, Rao, G. S. N. and Khalil, S. K. Wahba：*J. Pharm. Sci.*, **70**, 514, 1981

11）Albert, S. K., Raabe, A., Garry, M., Antal, J. E. and Gillespie, R. W.：*ibid.*, **73**, 1487, 1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 82-86, 1985

高速液体クロマトグラフィーによる鎮暈剤の定量法

高橋美佐子*, 中山京子*, 上原真一*, 鎌田国広*,
萩原輝彦*, 秋山和幸*

Determination of Antiemetics by High-Performance Liquid Chromatography

MISAKO TAKAHASHI*, KYOKO NAKAYAMA*, SHINICHI UEHARA*
KUNIHIRO KAMATA*, TERUHIKO HAGIWARA* and KAZUYUKI AKIYAMA*

Keywords：高速液体クロマトグラフィー High-Performance Liquid Chromatography, 鎮暈剤 Antiemetics, 塩酸ピリドキシン Pyridoxine Hydrochloride, ジプロフィリン Diprophylline, カフェイン Caffeine, 塩酸メクリジン Meclizine Hydrochloride, ブロムワレリル尿素 Bromvaleryl Urea, サリチル酸ジフェンヒドラミン Diphenhydramine Salicylate

はじめに

鎮暈剤は乗り物酔いの諸症状の緩和または予防を目的とする内用薬剤，及び乗物酔い薬以外の鎮暈薬（たとえばつわりに用いる内用薬剤）をさし，その有効成分[1]としては副交感神経遮断薬，抗ヒスタミン薬，鎮痙薬，鎮吐薬，鎮静薬，強心利尿薬，ビタミン類(特にビタミンB_6)など数種類が使われている．このため分析対象の化合物の種類も多く，性状も水に易溶性成分，難溶性成分，非常に極性の弱い成分から極性が強く水溶液中でイオンに解離する成分まで様々である．従って高速液体クロマトグラフィー（以下HPLCと略す.）で分析[2]する場合分析条件を統一することは，なかなか困難である．今回一斉収去により多量に送付される検体を，能率よく分析するために試験法を検討した結果，市販の鎮暈剤に繁用されている塩酸ピリドキシン（以下B_6と略す.），ジプロフィリン（以下Diと略す.），カフェイン（以下Cfと略す.），塩酸メクリジン（以下Meと略す.），ブロムワレリル尿素（以下Br.Uと略す.）及びサリチル酸ジフェンヒドラミン（以下S.Dhと略す.）のHPLCによる定量法を確立した．分析対象に応じて3種類の分析条件を選択することにより，迅速かつ高精度に測定できる定量法が得られたので報告する．

実験の部

使用機器 HPLC：日立製作所K.K.製日立635型高速液体クロマトグラフ，UVディテクター：日本精密K.K.製NS—310A，データ処理装置：島津製作所K.K.製クロマトパックR1A，超音波発振水槽：柴田製作所K.K.製，遠心分離器：久保田製作所K.K.製KN—70

標準品 Me：定量値100.1%，水分定量値3.1%のものを使用した．Di, Cf, B_6, Br.U, S.Dh：いずれも次の条件で乾燥し定量するとき99.0%以上のものを使用した．Di（105°, 4時間），Cf（80°, 4時間），B_6（減圧，シリカゲル，4時間），Br.U（80°, 2時間），S.Dh（減圧，シリカゲル，5時間）．

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鎮暈薬（素錠）を用いた．錠剤をそれぞれ10個以上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，試料とした．

試薬，試液 特に本文に記載のないものは日本薬局方（日局）一般試験法，または日局通則により調製したもの，および和光純薬K.K.製試薬特級を用いた．

測定 日局一般試験法第3項「液体クロマトグラフ法」の操作法，絶対検量線法に従い測定する．

Ⅰ．Di, Cf, B_6の定量法(定量法Ⅰ.)

1．標準溶液の調製 Di標準品約15mg，Cf標準品約20mg，B_6約35mgをそれぞれ精密に量り，水を加えて溶かし正確に100m*l*とし標準溶液とする．

2．試料溶液の調製 試料を製剤の表示から換算して，標準溶液のDi, Cf, B_6にほぼ対応する量を精密に100m*l*のかっ色メフフラスコに量り入れ，水を加えて振り混ぜ，

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

正確に100mlとした後，15分間超音波処理を行い，5分間遠心分離（3000r.p.m.）する．この上澄液をメンブランフィルター（0.45μm）でろ過し，その液を試料溶液とする．

3．HPLC測定条件 HPLCカラム：日立ゲル#3020（22～28μm）50cm×2.6mmI.D.，移動相：0.025Mリン酸二水素アンモニウム溶液（リン酸でpH3に調整）・メタノール混液（95：5），流速：1.0ml/min.，感度：0.1A.U.F.S，検出器：紫外吸光光度計（以下U.V.と略す.），測定波長：275nm，温度：室温，注入量：10μl

II．Meの定量法（定量法II.）

1．標準溶液の調製 Me標準品約50mgを精密に量りメタノールを加えて溶かし正確に100mlとし標準溶液とする．

2．試料溶液の調製 試料を製剤の表示から換算して標準溶液のMeにほぼ対応する量を精密に100mlのメスフラスコに量り入れ，メタノールを加えて振り混ぜ，正確に100mlとした後，15分間超音波処理を行い，以下定量法I．と同様に操作する．

3．HPLCの測定条件 HPLCカラム：日立ゲル#3030（17～23μm）50cm×2.6mmI.D.，移動相：アセトニトリル，流速：1.0ml/min，検出器：U.V.，測定波長：235nm，温度：室温，注入量：5 μl

III．Br.U，Cf，S.Dhの定量法（定量法III.）

1．標準溶液の調製 Br.U標準品約150mg，Cf標準品約20mg，S.Dh約25mgをそれぞれ精密に量り，70%メタノール溶液（リン酸でpH2に調整）を加えて溶かし正確に100mlとし標準溶液とする．

2．試料溶液の調製 試料を製剤の表示から換算して標準溶液のBr.U，Cf，S.Dhにほぼ対応する量を精密に100mlのメスフラスコに量り入れ，70%メタノール溶液（リン酸でpH2に調整）を加えて振り混ぜ，正確に100mlとした後，15分間超音波処理を行い，以下定量法I．と同様に操作する．

3．HPLC測定条件 HPLCカラム：日立ゲル#3010 50cm×2.6mmI.D.，移動相：70%メタノール溶液（リン酸でpH2に調整），流速：1.0ml/min，感度：0.1A.U.F.S.，検出器：U.V.，測定波長：245nm，温度：室温，注入量：5 μl

実験結果および考察

鎮暈剤の配合成分の性状は，多種多様なので同一条件下での分析は困難であった．そこで以下のように3種の方法を検討し，適宜，選択適用することとした．定量法I．による標準混合溶液のクロマトグラムをFig. 1.，定

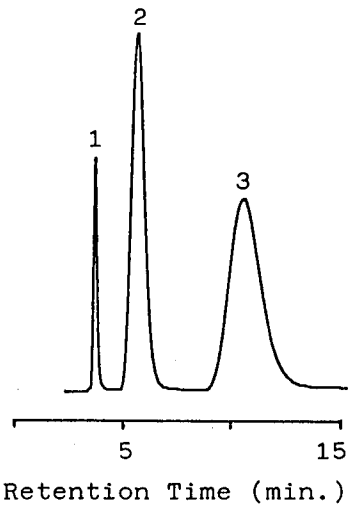


Fig. 1. Chromatogram of Standard Mixture.

Peak 1：Pyridoxine Hydrochloride
2：Diprophylline
3：Caffeine

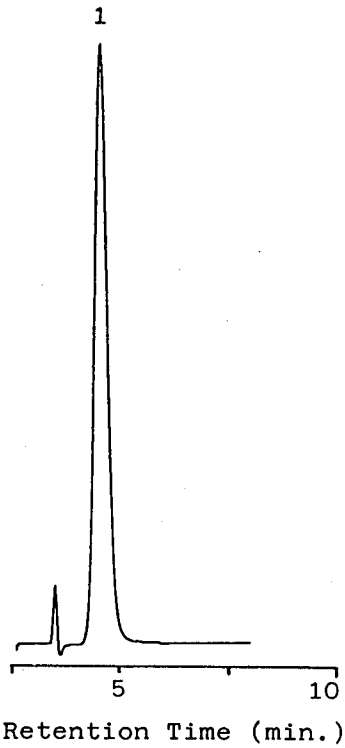


Fig. 2. Chromatogram of Pharmaceutical Preparation.

Peak 1：Meclizine Hydrochloride

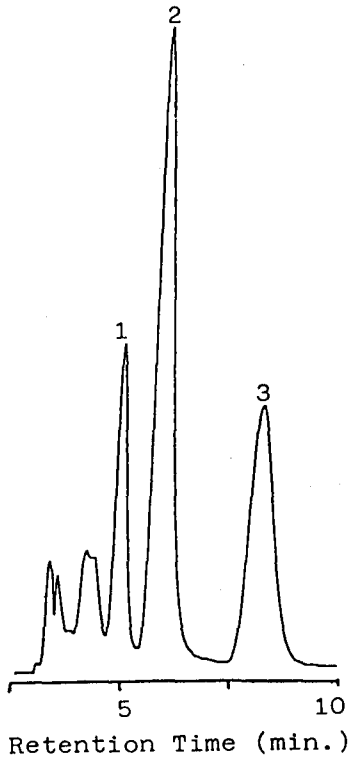


Fig. 3. Chromatogram of Pharmaceutical Preparation.

Peak 1 : Bromvaleryl Urea
2 : Caffeine
3 : Diphenhydramine Salicylate

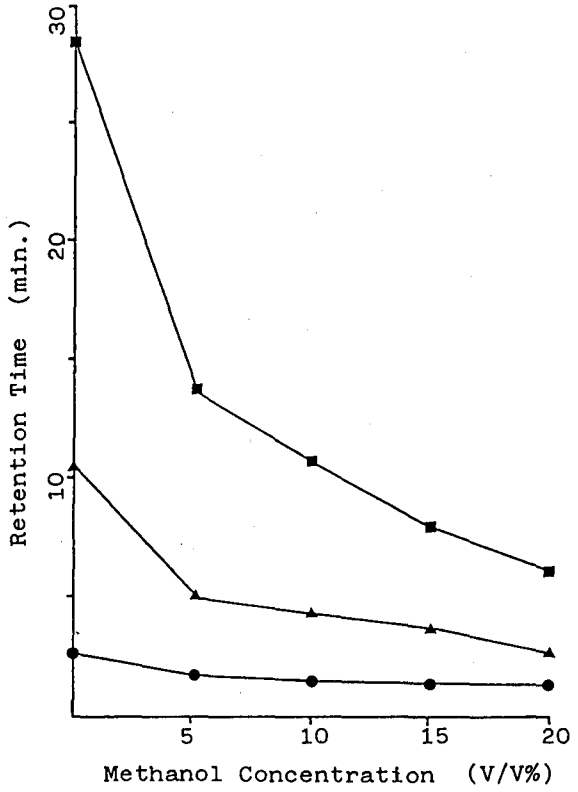


Fig. 4. Effect of Methanol Concentration on Retention Time of Pyridoxine Hydrochloride, Diprophylline and Caffeine.

—■— Caffeine
—▲— Diprophylline
—●— Pyridoxine Hydrochloride

量法II. による市販製剤のクロマトグラムを Fig. 2., 定量法III. による市販製剤のクロマトグラムを Fig. 3. にそれぞれ示す. いずれも良好な結果が得られた.

I. Di, Cf, B_6の定量法（定量法I.）の検討

1. 充てん剤 逆相系で最も一般的な充てん剤であるオクタデシルシリル（ODS）化したシリカゲル（LiChrosorb RP—18, merck 製）と, これより炭素数の少ないオクチル基を化学結合したシリカゲル（LiChrosorb RP— 8, merck 製）について定量法I. の測定条件で分析したところ, いずれもB_6と Cf の分離が不じゅうぶんで, Di は保持時間（Rt）20分以降にブロードなピークが現われる. 移動相をメタノールのみ, 又はアセトニトリルと0.025M リン酸二水素アンモニウム溶液（リン酸でpH3に調整）の混液（95 : 5）等に変えても良い結果は得られなかった. 次に極性の低い Cf や水溶性ビタミン, 水溶性医薬品の分析に適している, ポーラスポリマーの中でも極性の大きなアクリル酸エステル系ゲル（日立ゲル #3020）を用いて分析した結果, 良好な分離が得られた. 但し軟質充てん剤のため圧力80kg/cm²以下で使用できるように移動相, 流速に注意が必要であった.

2. カラムの選定 定量法I. の条件で操作するとき B_6, Di, Cf の順で溶出し, Di に対して B_6, Cf とも分離度1.7以上のカラムを用いた.

3. 移動相 0.025M リン酸二水素アンモニウム溶液（リン酸でpH3に調整）・メタノール混液のメタノール濃度 0 ～20%と各 Rt との関係を Fig. 4. に示した. この結果メタノール5%混液が良好な分離で, 他の成分（Me, S.Dh, Br.U）との分離, 保持時間が定量に適しているものと考えられた. B_6はメタノール濃度による Rt の変化は少ない. pH については, Di, Cf はあまり影響を受けないが, B_6の Rt は大きく変化するため, 検討したところ, pH3に調整した溶離液が Di, Cf とも充分に分離し, 良好な結果であった.

B_6を含まない処方であれば, 20%メタノール溶液を移動相に使うことにより, Di と Cf の定量分析は可能であ

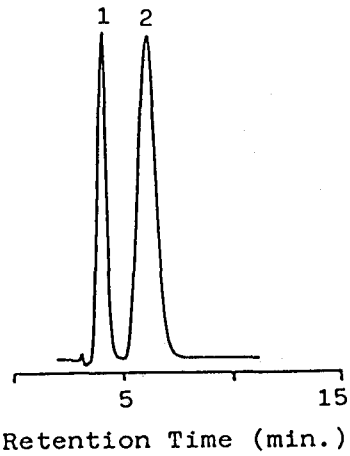


Fig. 5. Chromatogram of Pharmaceutical Preparation.

Peak 1：Diprophylline
2：Caffeine

る．このときのRtはDi 3.68分，Cfは7.04分であった．(Fig. 5)

4．測定波長　吸収極大波長はそれぞれpH3のとき$B_6$291nm，Di 273nm，Cf 273nmである．この結果，測定波長を275nmとした．

5．検量線　$B_6$0.05～0.50mg/ml，Di 0.05～0.30 mg/ml，Cf 0.10～0.6mg/mlの間でそれぞれ5段階の標準溶液系列を作製した結果，いずれも相関関係γ＝0.9998以上でほぼ原点を通る良好な直線性を示した．(B_6 Y＝13.27X＋0.1249 γ＝0.9999，Di Y＝16.985X－0.01347 γ＝0.9999，Cf Y＝15.520X＋0.09748 γ＝0.9998，X：濃度mg/ml Y：ピーク面積)

II．Meの定量法（定量法II.）の検討

1．充てん剤　Meは極性の低い分子量の大きい化合物なのでODS化したシリカゲル(LiChrosorb RP—18, RP—8)を用いて，検討したが，Rt15分以降でピークもブロードであった．

ポーラスポリマーで極性は中程度のポリメチルメタアクリレートゲル（日立ゲル#3030）で分析した結果，Rt4.64分でピークもシャープであった．

2．移動相　強アンモニア水・水・メタノール混液(0.5：4：95.5)(pH約8.5)を移動相として分析したところ，Rt11.42分にややブロードのピークが得られた．他の成分Di，B_6，Cf，S.Dhおよび臭化水素酸スコポラミン（以下Scp.と略す）はRt3.5分以内に検出され影響はなかった．この移動相を用いても分析は可能であるが，Meを分析目的としたときはアセトニトリルを用いた方が良い結果が得られた．他の成分，Di，B_6，Cf，S.Dh，Scp.はRt 3分以内，マイレン酸クロルフェニラミンはRt6.5分，Br.UはRt 7分にそれぞれピークが検出され影響はなかった．

3．検出波長　Meの吸収最大波長である235nmを用いた．

4．検量線　Me0.12～1.0mg/mlの間で5段階の標準溶液系列を作り検量線を作製した結果，Y＝1.872X＋0.0263，γ＝0.9997で良好な直線性を示した．

III．Br.U，Cf，S.Dhの定量法（定量法III.）の検討

1．充てん剤，移動相　極性の小さなポーラスポリマーでスチレン-ジビニルベンゼン共重合体を主とする充てん剤（日立ゲル#3010，15～20μm）とこれより粒子の小さな#3011，10～15μmについて検討した．S.Dhはサリチル酸（以下Sと略す）とジフェンヒドラミン（以下Dhと略す）に分離するが，移動相が酸性の場合RtはDhの方が早い．#3011を用いて95%メタノール溶液をリン酸でpH 2，3，4に調製した移動相で試験した結果，Dhはいずれも Rt約1.68分で大きな変化は無いが，SはpHが低くなるとRtは遅くなった．Br.UとCfは液性によりRtには大きな影響をうけないがSとの分離がじゅうぶんではなかった．移動相をアンモニアアルカリ性にした場合(pH8.5)，SのRtはDhより早く約1.7分であった．DhはpHが高くなるとRtは早くなり，またメタノール濃度が低くなるとピークがブロードになりRtも遅くなる傾向で，Cfとの分離もじゅうぶんではなかった．

#3010について移動相のpHをリン酸で2に固定しメタノール濃度を90，80，70，65%で検討した結果，70%メタノール溶液が良好な分離を示した．又，移動相を0.1 N塩酸･メタノール混液（30：70）(pH約2.0)で分析した場合，Br.UとCfは，より良好な分離結果を得られたが，器機の保守のため本法はリン酸を用いた．

2．検量線　Br.U 0.5～2.0mg/ml，Cf 0.1～0.6mg/ml，S.Dh 0.2～0.7mg/mlの間でそれぞれ5段階の標準溶液系列を作り，検量線を作製した結果，いずれも相関係数γ＝0.9997以上でほぼ原点を通る良好な直線性を示した．

IV．市販製剤の分析　鎮暈剤の剤型にはカプセル剤，顆粒剤，丸剤，細粒剤，錠剤及び内用液剤があり，最も製品数の多い錠剤について，検量線より妥当と思われる濃度を選び，定量を行った結果はTable 1．に示すとおりである．定量法はそれぞれの成分毎に本文中の番号を付

Table 1. Determinasions of Components in Commercial Preparations Antiemetics

Preparation	Label(mg/Tab.)	Found(%)[a]	C.V.(%)[b]
TabletA(I)B_6	3.0	100.42	0.79
(I)Di	14.0	95.7	0.52
(III)S.Dh	20.0	100.9	0.58
TabletB(I)B_6	5.0	99.5	0.72
(I)Cf	10.0	101.1	0.96
(II)Me	12.5	100.4	0.78
Scp	0.05		
TabletC(I)Di	13.0	100.1	0.66
(III)S.Dh	20.0	99.1	0.84
TabletD(I)Di	14.0	98.8	0.69
(III)Dh·HCl	25.0	99.1	0.77
(III)Br.U	75.0	97.8	0.31
TabletE(I)Cf	6.0	98.5	0.97
(III)S.Dh	12.5	98.9	0.56
Scp	0.015		
TabletF(II)Me	15.0	95.9	0.77
(I)Cf	10.0	99.0	0.63
TabletG(III)Cf	40.0	95.2	0.34
(III)S.Dh	25.0	98.9	0.56
(III)Br.U	75.0	95.6	0.94
TabletH(II)Me	25.0	98.2	0.75

a) Mean value of five determinations.
b) Coefficient of variation.

した．変動係数は0.3～0.97%で良好な結果であった．又，鎮暈剤は混合製剤であるが一般に1～4種類の成分の処方が多く，目的定量成分以外の影響は受けずに，上記のそれぞれの方法で分析が可能であった．

臭化水素酸スコポラミンについてはHPLC法[3,4]を検討中であるが処方量が少ないので他成分の除去，濃縮などの前処理が必要になる．ガスクロマトグラフィーによる方法[5]は内服液中のMe，ジメンヒドリナート，塩酸ジフェンヒドラミン，テオフィリン，CfのHPLCによる定量法とともに報告[6]済みである．

まとめ

鎮暈剤に配合されている多種の成分のうち，今回は市販製剤に繁用されている成分の中からDi，Cf，B_6，Me，Br.U，S.DhについてHPLCによる分析法の検討を行った．固定相にはポーラスポリマーを用いた．Di，Cf，B_6は充てん剤に日立ゲル#3020，移動相0.025Mリン酸二水素アンモニウム溶液・メタノール混液（95：5）（リン酸でpH＝3に調整），Meは充てん剤日立ゲル#3030，移動相アセトニトリル，Br.U，Cf，S.Dhは充てん剤日立ゲル#3010，移動相70%メタノール溶液（リン酸でpH2に調整）により，それぞれ良好な結果が得られた．本法は前操作も簡単で迅速且つ精度よく定量分析ができた．この結果，一斉収去による行政検体の試験法としてじゅうぶん適用できる．また他の剤型についても試料濃度に留意して試験することにより適用できるものと考えられる．

文献

1）厚生省告示：第40号，昭和60年3月26日
2）Hovin,G.,Bree,F.,Lerumeur,N.and Tillement, J.P.：*J.Pharm.Sci.*,72, 71, 1983
3）山田貞二，野田直希，早川順子，宇野圭一：薬学雑誌104, 199, 1984
4）Pennington,L.J.and Schmidt,W.F.：*J.Pharm. Sci.*,71, 951, 1982
5）Wyatt,D.K.,Richardson,W.G.,Mcewan,B.：*J.Pharm.Sci.*,65, 680, 1976
6）岩崎由美子，中山京子，高橋美佐子，秋山和幸：第21回全国衛生化学技術協議会年会，92, 1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 87-92, 1985

生薬製剤の品質評価に関する研究（第2報）
高速液体クロマトグラフィーによる瀉下薬中のセンノシドA およびセンノシドBの定量

瀬戸隆子*, 安田一郎*, 浜野朋子*, 秋山和幸*

Studies on the Evaluation of Preparations of Crude Drugs (II)
Determination of Sennoside A and Sennoside B in Laxative Preparations by High-Performance Liquid Chromatography

TAKAKO SETO*, ICHIRO YASUDA*, TOMOKO HAMANO* and KAZUYUKI AKIYAMA*

Contents of sennoside A (SA) and sennoside B (SB) from Rhubarb (*Rhei Rhizoma*) and Senna Leaf (*Sennae Folium*) in various laxative preparations were determined by two HPLC systems, on ODS column or dimethylaminosilica column. The proposed method was applicable to 12 of 13 commercial preparations composed of crude drug powders and was found unsuitable for only one sample because of the low ratio of Rhubarb content and coexisting inhibitory components.

SA and SB contents of 4 preparations including Rhubarb as an exclusive source of sennosides were in the range of 5.1—6.2 and 1.9—1.1 mg per lg Rhubarb respectively, and these values were comparable to those of raw material Rhubarbs. Thus, it is suggested that no degradations of SA and SB have occurred during manufacturing processes of these preparations, although the components have decomposed in manufacturing processes of dry extract preparations.

Keywords: determination, sennoside A, sennoside B, rhubarb, *Rhei Rhizoma*, senna leaf, *Sennae Folium*, HPLC, preparation, crude drugs

緒　言

センノシドA（以下SAと略す）およびセンノシドB（以下SBと略す）は大黄およびセンナの瀉下活性物質である．筆者らは，漢方処方桃核承気湯製剤中のSA定量法を開発し，市販の製剤について試験した結果，SA含量はエキス製剤ではエキス製造中に変質して低くなっていることをすでに報告[1,2]した．大黄およびセンナは瀉下薬として多くの製剤に配合されて繁用されており，これらの丸剤などの製造工程中には加熱乾燥が行なわれているものもあり，センノシドの損失があれば，品質上問題となる．また，従来これら瀉下薬中のセンノシドの試験はほとんど行なわれていなかったが，現在は瀉下有効成分として製造（輸入）承認[3]に当り規格試験が求められ，行政上もその試験を行なう必要がある．そこで，高速液体クロマトグラフィー（以下HPLCと略す）によるSAおよびSBの定量法2種を選び，配合生薬による妨害の有無など瀉下薬への応用の可否について検討を加え，市販瀉下薬中のSAおよびSB含量を測定したので報告する．

実験の部

1．装置および機器

HPLC装置：日本分光工業K.K.製　TWINCLE, UVIDEC-100-II．振盪抽出器：K.K.イワキ製　KM式万能シェーカー．遠心分離機：K.K.久保田製作所製KN-70.

2．試　料

生薬大黄およびセンナ　1983年中に入手した市場品各10検体

配合される生薬　一般薬日本医薬品集[4]および瀉下薬

* 東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科　160　新宿区百人町3—24—1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

製造(輸入)承認基準[5]により瀉下薬として大黄またはセンナと配合される生薬のうち入手できたもの67種．試料量は原則として，大黄，センナまたはその合計量1gに対応する最大の配合量が，1gを越えるときは切り上げた整数g数を，1g以下のときは1gを用いた．以下に生薬名および試料量を示す．

赤芽柏2g，亜麻仁1g，アロエ2g，茴香1g，営実2g，延命草2g，黄芩1g，黄柏1g，黄連1g，莪蒁1g，甘草（東北甘草，新彊甘草）3g，寒梅粉1g，只実2g，吉草根2g，杏仁1g，金銀花1g，荊芥1g，桂皮1g，決明子1g，牽牛子1g，ゲンチアナ1g，牛黄 0.1g，紅花1g，香附子1g，厚朴1g，山帰来3g，山梔子2g，山奈1g，地黄1g，芎藭1g，車前子1g，車前草1g，十薬2g，生姜1g，昌蒲根1g，升麻1g，川芎3g，当薬1g，蒼朮1g，大棗1g，茶葉1g，陳皮1g，当帰1g，冬瓜子1g，蕃椒1g，桃仁3g，人参1g，忍冬4g，白桃花1g，薄荷1g，繁蔞1g，白朮1g，檳榔子1g，枇杷葉1g，茯苓5g，防已1g，蒲公英根1g，牡丹皮1g，牡蠣1g，麻子仁5g，木通5g，木香1g，薏苡仁2g，竜胆1g，連翹1g，ロートエキス0.1g．

市販製剤 1984年中に市販されていた瀉下製剤，丸剤を中心にA～Mの13種．以下に各製剤の表示成分及び分量を示す．

A：丸剤，32粒中大黄0.78g，アロエ0.16g，甘草0.05g，桂皮0.03g，牽牛子0.23g，ギフトエキス0.10g．

B：錠剤，6錠中アロエ0.45g，センナ0.75g，大黄0.05g，桂皮0.15g，香附子0.10g．

C：丸剤，60粒中アロエ0.5g，センナ1.0g，大黄0.3g，営実0.3g，ゲンチアナ0.3g，生姜0.3g，ℓ-メントール0.01g，牽牛子0.3g．

D：丸剤，15粒中大黄0.30g，センナ0.10g，アロエ0.05g．

E：丸剤，90粒中大黄1.2g，営実0.8g，山帰来0.8g，川芎0.5g，甘草0.5g，厚朴0.4g．

F：錠剤，12錠中大黄1.0g，営実0.4g，厚朴0.5g，山帰来0.4g，川芎0.2g，甘草0.2g，忍冬0.2g．

G：丸剤，45粒中大黄1g，センナ1g，当薬0.2g，甘草0.1g，川芎0.2g，茯苓0.5g，営実0.5g，山帰来0.3g，忍冬0.3g．

H：丸剤，12粒中大黄0.64g，アロエ0.16g，センノシドカルシウム0.024g．

I：丸剤，30粒中大黄0.1g，センナ0.5g，牽牛子0.4g，桂皮0.2g，黄芩0.1g，香附子0.1g，川芎0.1g，山奈0.1g，木香0.1g，陳皮0.2g．

J：錠剤，5錠中大黄0.5g，牽牛子0.1g，アロエ0.1g，センナ0.2g，黄連0.05g，黄芩0.05g，グリチルリチンモノアンモニウム0.005g，ロートエキス散0.03g．

K：丸剤，100粒中黄連0.75g，大黄1.125g，黄芩0.75g，アロエ0.375g，川芎1.125g，山帰来1.5g，牽牛子0.225g．

L：丸剤，40粒中大黄0.6g，黄芩0.6g，黄連0.3g，センナ0.45g，寒梅粉0.2g．

M：丸剤，60粒中大黄0.20g，茯苓0.90g，木通0.60g，甘草0.60g，山帰来0.60mg，忍冬0.80g，川芎0.60g，桃仁0.60g，麻子仁1.00g．

3．HPLCによる定量法

抽出液の調製 大黄，センナまたはその合計量1gに対応する試料粉末を精秤後70%メタノール20m*l*を加え10分間振盪抽出し，約2,000Gで5分間遠心分離して上澄液をとる．本操作を計5回行ない上澄液を合し，40°以下で15m*l*以下に減圧濃縮後，70%メタノールを加えて25m*l*にメスアップする．

定量法(1) 抽出液0.2m*l*をSEP-PAKシリカカートリッジ（ウォーターズ社製）に付加し，酢酸エチル・メタノール（9：1）混液で洗った後，逆方向から，メタノール・水・アセトニトリル・酢酸（100：85：15：1）混液5m*l*を注入溶出させる．溶出液を減圧留去し，残留物に水・アセトニトリル・酢酸（70：30：1）混液0.5m*l*を正確に加えて溶解，カラムガードHV4（孔径0.45μmのメンブランフィルター，日本ミリポア社製）によりろ過してHPLC試料溶液とする．ピーク高法により検量線からSAおよびSB量を求める．

HPLC条件 カラム：ODS 5 μm，4.6mmϕ×25cm（TSK-GEL ODS-120T，東洋曹達工業K.K.製），移動相：水・アセトニトリル・酢酸（81：19：1），流速：1m*l*/min，検出器：紫外吸光光度計，測定波長：340nm，検出感度：0.02a.u.f.s.，試料注入量：2～5 μ*l*．

定量法(2) SEP-PAK C_{18}カートリッジ（ウォーターズ社製）をメタノール，次いで水で処理した後，抽出液0.5m*l*を付加し，水・アセトニトリル・酢酸（70：30：1）混液で溶出しながら5m*l*にメスアップしてHPLC試料溶液とする．ピーク高法により検量線からSAおよびSB量を求める．

HPLC条件 カラム：ジメチルアミノシリカNUCLEOSIL 5N$(CH_3)_2$5μm，4.6mmϕ×25cm（センシューパックアクアシルSN-142N，K.K.センシュー科学製），移動相：テトラヒドロフラン・水・酢酸（160：

40：7)，流速：1 ml/min，検出器：紫外吸光光度計，測定波長：340nm，検出感度：0.02a.u.f.s.，試料注入量：5 μl.

検量線 センナより抽出したSAおよびSB標品約3 mgを精秤し，アンモニア0.02mlと共に70%メタノールを加えて溶解，25mlにメスアップして原液とする．2，4，5および10倍の希釈液を作り，各定量法のHPLC条件に従いクロマトグラムを得，ピーク高法により検量線を作製する．

添加回収実験 製剤Gの粉末3 gに対し標品溶液5 ml（SA 5.04mg；SB 2.00mg）を添加したもの5検体について各定量法に従いSAおよびSB含量を測定する．別にSAおよびSBを添加しないもの5検体をとり同様に測定した値の平均値を用いて補正し，添加検体5検体各々のSAおよびSB添加回収率を求める．

結果および考察

1．定量法について

HPLC条件 定量法(1)は著者らがすでに報告した順相系のSEP-PAKシリカカートリッジと逆相系のODSカラムの組み合わせによる方法[1,2]を応用し，ODSカラムはRP-18を自家充塡したものからTSK-GEL ODS-120 Tに変えたところ溶出時間が早く，分離も良く，大黄およびセンナ中のSBの定量が可能であった．定量法(2)は大島ら[6,7]の用いている逆相系のSEP-PAK C_{18}カートリッジと順相系のジメチルアミノカラムを組み合わせた方法であるが，著者らはSEP-PAKカートリッジによる精製条件についてさらに検討を加えた．定量法(2)は(1)に比べSAとSBの分離度はやや低いが，SBとその他の成分との分離に良い結果が得られるものであった．Fig. 1.に両定量法による大黄およびセンナのクロマトグラムを示す．なお，両定量法とも，ほぼ原点を通る良好な検量線を与えた．

配合生薬成分の影響 大黄やセンナに配合される生薬のうち入手できたもの67種について，それぞれに含有されている成分による妨害を検討した．その結果，両定量法において，SA，SBをともに妨害する成分を有し，配合されれば定量は困難と思われるものに黄柏があり，定量法(1)においてのみ妨害するものに忍冬，木通および連翹，定量法(2)においてのみ妨害するものに黄芩(Fig. 2.)と黄連があった．また，妨害ピークはあっても小さいため，配合量が少ない場合に無視しうるものとして，定量法(1)における川芎，牽牛子，山梔子，紅花，吉草根，升麻，茯苓，白桃花，金銀花，枇杷葉，延命草および新彊甘草が，そして定量法(2)における防已があった．残り47種については両定量法において全く妨害ピークをみとめなかった．なお，定量法(2)における黄芩の妨害は，黄芩中のバイカリンによるものであるが，大島ら[6]のデータではセンノシドピークとバイカリンピークは分離しており，両者の分離度は移動相の酸濃度により変化すると述べられていることから，移動相の組成を変えることにより，妨害はさけ得ると思われる．以上の結果から，多種類の製剤において，配合生薬の妨害を受けずにSAおよ

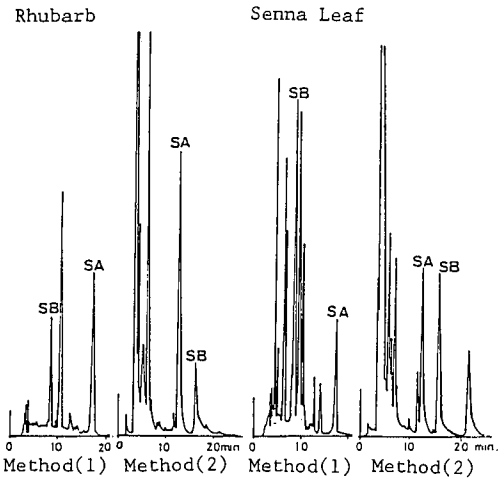


Fig. 1. HPLC Chromatograms of Rhubarb and Senna Leaf

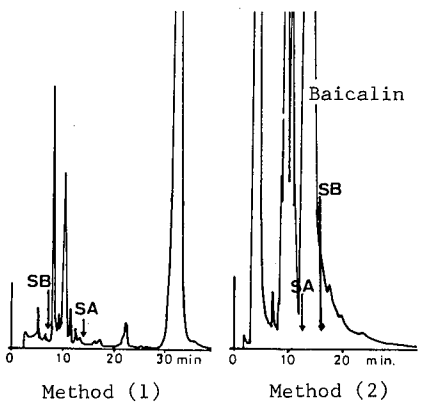


Fig. 2. HPLC Chromatograms of Scutellaria Root

びSBの定量が可能と推定されたので，次に，実際の市販製剤へ応用した．

市販製剤への応用 エキス化せず，生薬粉末をそのまま練って丸剤とするか又は打錠した市販製剤A～Mの13種について，その表示された成分分量に従い配合成分を混合したモデル製剤と，その大黄およびセンナ非配合のモデル製剤を調製して分析した．その結果，定量不能であったのは，大黄の配合比率が低く，しかも，忍冬，川芎など妨害性生薬の配合比率も高い製剤Mのみであった．黄芩配合のI，J，KおよびLはFig. 3.に製剤Lで例示したように，定量法(2)では定量不能であったが定量法(1)では可能であった．その他の製剤AからHまでの8種は両定量法で定量可能で，その例として製剤Gのクロマトグラムを Fig. 4．に示した．

製剤Gを用いて行った結果，添加回収率は定量法(1)のSAが86.3%，SBが83.3%，定量法(2)のSAが94.7%，SBが94.9%となり，シリカカートリッジへの吸着のため定量法(1)でやや低い値であったが，CV値（n＝5）はそれぞれ1.7%，2.6% および 2.1%，2.7%といずれも良好であった．

市販製剤についてSAおよびSBを定量した結果をTable 1．に示した．定量値は定量法(1)と(2)で大差はないが，SAの定量値は回収率を反映して定量法(2)でやや

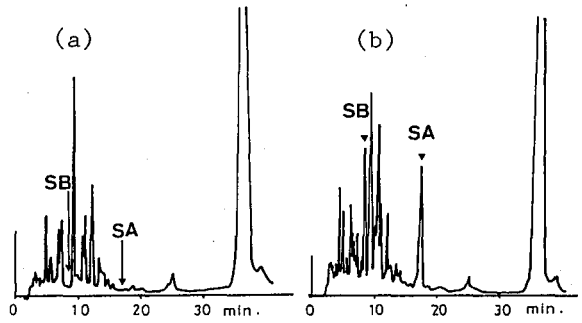


Fig. 3. HPLC Chromatograms of Preparation L Model (a) and Preparation L Model without Rhubarb and Senna Leaf (b) by Method (1)

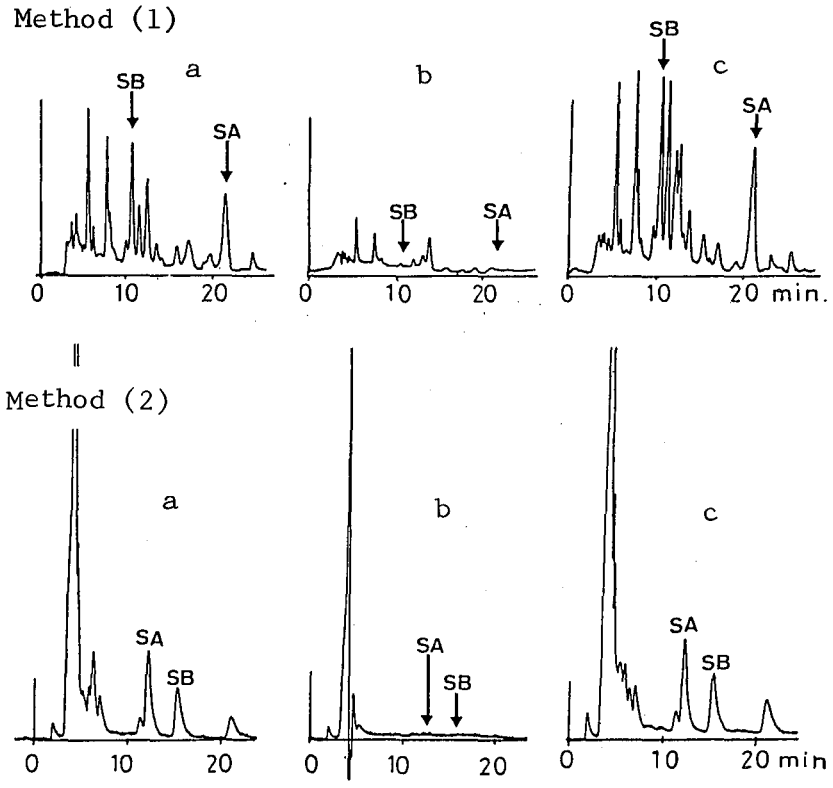


Fig. 4. HPLC Chromatograms of Preparation G
a : Model of Preparation G b : Model of Preparation G without Rhubarb and Senna Leaf c : Preparation G

Table 1. SA and SB Contents in Commercial Preparations

Preparation	SA Content*		SB Content*	
	Method (1)	Method (2)	Method (1)	Method (2)
A (Pill)	3.2	3.2	1.4	1.3
B (Tablet)	2.0	2.1	3.3	2.9
C (Pill)	2.7	2.9	4.1	3.7
D (Pill)	2.4	2.6	2.0	1.8
E (Pill)	1.3	1.3	0.7	0.7
F (Tablet)	1.7	1.7	0.6	0.6
G (Pill)	2.1	2.1	2.3	2.2
H (Pill)	6.0	6.9	4.9	4.6
I (Pill)	2.7	—	2.5	—
J (Tablet)	3.6	—	3.5	3.3
K (Pill)	0.9	—	0.3	—
L (Pill)	2.6	—	2.7	—
M (Pill)	—	—	—	—

* mg in lg of Preparation

高い傾向がみられる．ところが，SBでは反対に定量法(1)で高く，特にアロエ配合のものにその傾向が強い．これは定量法(1)ではアロエの大きなピークとの分離がやや不十分のため，SBの定量値を高めたと思われる．定量法(1)では，SBピークの前後にその他の成分のピークが近接して出現することが多く，わずかな条件の変動で分離に影響が出てくる．一方，定量法(2)の場合はSBピークとその他の成分のピークの分離が良く実用的である．生薬製剤では含有成分が多いので，実施に当り，モデル製剤により他成分との分離状態をチェックすることが必要である．

以上の結果，両定量法を用い多種の市販瀉下製剤中のSAおよびSB含量の測定が可能であることが明らかとなった．

2．市販製剤中のSAおよびSB含量について

各市販製剤中の含量（Table 1.）を1回投与量に換算したSAとSBの合計量は1.7～10.3mgで，瀉下薬製造（輸入）承認基準[5]の1回最大分量16mgを越えていなかった．生薬中のSAおよびSB含量は，大黄のSA 2～8 mg/g[1,2]，SBはSAの1/2～1/3（1983年の市場品10検体），また，センナのSAは5～6 mg/g，SBは9～10 mg/g（1983年の市場品10検体）である．センナを配合せず，大黄のみを含有する製剤A，E，FおよびKにおいて大黄1 gに対応するSA含量は各々5.2mg，5.5mg，5.4mgおよび6.2mg，SB含量は2.3mg，3.0mg，1.9mgおよび2.1mgと生薬大黄中の含量にほぼ見合うものであった．その他の大黄とセンナを同時に含有する製剤でも，大黄，センナ合計1 g当りに換算してSA4.1mg～6.6mgという値が得られた．漢方エキス製剤ではエキス製造工程中にセンノシドが変化し，含量が低下していたが[1,2,4]丸剤のような生薬粉末製剤ではエキス剤のように異常な含量低下はみられず，加熱乾燥などの影響はあるとしても些少である．従って生薬粉末製剤の品質はセンノシドに関しては原料生薬の品質を直接反映するので，製剤の品質確保のためには原料のチェックが重要である．

結　論

市販瀉下製剤中のSAおよびSBのHPLCによる定量法を検討した結果，多種類の製剤に応用できることが判明した．また，市販製剤中のSAおよびSB含量は原料の生薬中の含量とほぼ同等で，エキス剤にみられたような製造工程中の変化による極端な含量低下はみとめられなかった．

（本研究の概要は第21回全国衛生化学技術協議会年会1984年9月で発表した．）

文　献

1）瀬戸隆子，岩崎由美子，安田一郎，奥澤昌子，下平彰男：東京衛研年報，32，78，1981
2）瀬戸隆子，岩崎由美子，安田一郎，浜野朋子，秋山和幸：第11回生薬分析討論会講演要旨集，37，1982
3）日本公定書協会編：医薬品製造指針，1984年版，275，薬事日報社
4）日本医薬情報センター編：一般薬日本医薬品集，第2版，223，1979，薬業事報社

5）昭和57年5月17日付，薬発第463号，薬務局長通知
6）Ohshima, Y. and Takahashi, K., *J. Chromatogr.*, **258**, 292, 1983
7）大島由喜夫，高橋邦夫，平賀敬夫，柴田承二：生薬，**37**, 217, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 93-97, 1985

高速液体クロマトグラフィーによる塩基性色素の分析（第2報）
香粧品中のローダミンBの定量法について

伊藤弘一*, 観照雄*, 中村義昭*,
岸本清子*, 渡辺四男也*

High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Basic Coal-tar Dyes (II)
Determination of Rhodamine B in Cosmetics and Toiletries

KOICHI ITO*, TERUO KAN*, YOSHIAKI NAKAMURA*,
KIYOKO KISHIMOTO* and YOHYA WATANABE*

Application of SP-Sephadex to separate Rhodamine B in various cosmetics and its determination by high performance liquid chromatography (HPLC) are described.

Rhodamine B was extracted from samples with ethanol by the ultrasonicate bath, the extract was evaporated, the residue was placed on an SP-Sephadex column and the column was washed with ethanol to remove impurities. The dye was eluted from the column with 50% NH_4OH/ethanol (1:1) and determined by HPLC on a UNISIL PACK 5C18-250A column, using acetonitrile-water containing $HClO_4$ and naphthalenesulfonic acid as an eluting solvent and a 553 nm monitor for detection. A calibration curve showed linearity in the range of 0-5 ng of Rhodamine B, and the detection limit was 0.005 ng.

Average recoveries of Rhodamine B added to samples of skin lotion, milk lotion, vanishing cream, cold cream and hair rinse were 97.8%, 96.6%, 93.0%, 97.8% and 96.6% respectively, and the coefficients of variation were 2.96%, 3.05%, 1.11%, 2.27% and 2.48% respectively. The method was successfully applied to the analysis of various commercial cosmetic samples.

Keywords: Rhodamine B, high performance liquid chromatography, cosmetics

緒　言

著者らは，前報[1]において，高速液体クロマトグラフィーにより，ローダミンB等5種の塩基性タール色素について，その分析法を報告した．今回は，種々の化粧品に配合されているローダミンBの分析法について検討を行った．

現在まで報告されたローダミンBの分析法には，ペーパーおよび薄層クロマトグラフ法[2-3]，吸光光度法[4]，赤外吸収スペクトル法[5]および高速液体クロマトグラフ法[6]等がある．しかし，これらの報告の多くは，混合色素よりローダミンBを分離したもの，又はローダミンB中の不純物の定性あるいは定量を行ったもので，共存物質の多い化粧品，医薬部外品等の試料を対象にした報告はほとんどみられない．そこで著者らは，これら化粧品，医薬部外品に含有されるローダミンBの分析法を確立するため，セファデックス樹脂を用いたカラムクロマト法と高速液体クロマトグラフ法（以下HPLCと略す）との併用による分析条件を検討したところ，共存する他成分の障害もなく，精度よく分析することができたので報告する．

実験方法

1．試薬　標準色素：ローダミンB（以下RH-Bと略す）（アルドリッチ）レーザーグレード，99%を用いた．

色素標準液：上記色素10mgを精秤し，エタノールに溶解し，100μg/mlの液とする．

ナフタレンスルホン酸：1-ナフタレンスルホン酸(以

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

下NSAと略す）（東京化成）特級品を用いた．

SP-セファデックス：SP-セファデックスC-25（ファルマシア）を水で膨潤させたのち，1N塩酸で処理し，その後樹脂を洗液が酸性を呈さなくなるまで洗浄し，さらに95%エタノールにて平衡化を行ったのち使用した．

セライト545：セライト545（和光純薬）を塩酸で処理したのち，洗液が酸性を呈さなくなるまで洗浄する．次に110°で10時間以上乾燥したのち，粉砕して用いた．

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 TRIROTAR—II型

検出器：日本分光紫外・可視分光光度計 UVIDEC100 II型

自記分光光度計：日立323型

データ処理装置：島津クロマトパックC-1B型

3．試験溶液の調製 各試料における試験溶液の調製法をChart 1に示した．

3—1．化粧水，乳液，クリーム類，ネイルエナメル，エナメルリムーバー，コールドパーマネント液，フェイスパック

試料1.0～20.0gをビーカーに取り，エタノール50m*l*を加え，超音波バスにて約15分間抽出を行う．抽出液をろ過し，ろ液をロータリーエバポレーターを用い，40°以下で約2 m*l*まで濃縮する．ついで径1.5cm，長さ15cmのクロマト管に層長5 cmとなるようにSP-セファデックスをエタノールを用いて湿式充填する．作製したカラムに先の濃縮液を付し，エタノール100m*l*および50%エタノール100m*l*を流し，試料中の共存物質を除く．ついで50%アンモニア水—エタノール（1：1）混液で色素層を溶出する．ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を留去，残留物にエタノールを加えて正確に5 m*l*とし，これをHPLC試験溶液とする．

3—2．シャンプー

試料0.5gをセライト545 100gと混合し，クロマト管に乾式充填し，セライトカラムを作成する．カラムをヘキサンで洗浄後，3%酢酸—酢酸エチル混液で溶出する．溶出液をロータリーエバポレーターを用いて濃縮乾固し，残留物にエタノールを加えて溶解し，SP-セファデックスカラムに付し，以後3—1と同様に操作し，HPLC試験溶液を調製する．

3—3．固型石けん

試料5.0～10.0gをビーカーにとり，水100m*l*を加え，50°の水浴中で10～60分時々かきまぜながら加温する．次に温時，濃塩酸を用いてPHを1～2に調整する．冷後沪紙を用いてろ過し，沪紙上の残留物を少量の水で洗い，洗液をろ液と合わせ，ロータリーエバポレーターを用いて濃縮乾固し，残留物にエタノールを加えて溶解し，SP-セファデックスカラムに付し，以後3—1と同様に操作し，HPLC試験溶液を調製する．

4．HPLCによる定性および定量 RH-B標準溶液および試験溶液のそれぞれ5 μlについて，下記の測定条件に従い，HPLCを行い，得られたピークの保持時間を比較して定性を行う．また，RH-Bの標準溶液を希釈して0～1.0ppmの標準系列をつくり，定性の場合と同一条件でHPLCを行い，得られたクロマトグラムのピーク高と濃度から検量線を作成する．ついで試験溶液5 μlについて同様にHPLCを行い得られたクロマトグラムからRH-Bのピーク高を測定し，検量線によって濃度を求め，試料中の含有量を算出する．

HPLC測定条件—カラム：UNISIL PACK，5 C18—250A（5 μm，4.6mmi.d.×250mm）（ガスクロ工業），移動相：0.005M NSAおよび0.002M過塩素酸を含むアセトニトリル—水(75：25)の混液，流速：1 m*l*/min.

測定波長：553nm，温度：室温

実験結果および考察

1．試料溶液調製の検討 イオン交換樹脂を用いたタール色素の分析法には，液体アニオン交換樹脂である，アンバーライトLA-2を用いる方法[7]，DEAE-セファデックスを用いる方法[8-9]があるが，これらはいずれも酸性色素の分析に使用されている．しかし，塩基性色素であるローダミンBの分析にはこれらの方法は使用できない．そこで，本実験においては，カチオン交換樹脂であるSP-セファデックスを用いて，試料から得た抽出液のクリーンアップについて検討を行った．

カチオン交換樹脂であるセファデックスには，SP-セファデックスおよびCM-セファデックスがあるが，これら両者を吸着剤として，それぞれにRH-B 100μgを添加した後，エタノールを流し，それらの吸着力の強さを比較した結果，RH-BはSP-セファデックスのみに吸着されることが認められた．

つぎに，クリーンアップのための洗浄溶媒と樹脂に吸着したRH-Bの溶離溶媒について検討した．すなわちRH-Bを吸着した樹脂にエタノール100m*l*および50%エタノール100m*l*を流してもRH-Bの溶出は認められず，50%アンモニア水—エタノール（1：1）混液により，50m*l*以内で完全に溶出が認められた．以上のことより，洗浄液としてエタノールおよび50%エタノール

Chart 1 Isolation and Identification Method for Rhodamine B in various cosmetics

Sample[1]
- add Ethanol 50 m*l*
- treat with the Ultrasonicate bath
- filtrate

Filtrate
- evaporate
- add Ethanol

SP-Sephadex column[2]
(1.5 i. d. × 5 cm)
- wash with Ethanol 100 m*l* and 50% Ethanol 100 m*l*
- elute with (50% NH_4OH/Ethanol, 1/1) solution

Elution part
- evaporate
- add Ethanol

H P L C

Shampoo
- mix with Celite 545 100 g and transfer into the glass tube

Celite column
- wash with hexane
- elute with 3% Acetic acid/ Ethyl acetate

Elution part
- evaporate
- add Ethanol

SP-Sephadex column[2]
(2.5 i. d. × 5 cm)
- wash with Ethanol 100 m*l* and 50% Ethanol 100 m*l*
- elute with (50% NH_4OH/Ethanol, 1/1) solution

Elution part
- evaporate
- add Ethanol

H P L C

Soap
- add water 100 m*l*
- warm at 50℃, 10～60 min.
- prepare pH1～2 with conc. HCl
- cool to room temp.
- filtrate

Filtrate
- evaporate
- add Ethanol

SP-Sephadex column[2]
(1.5 i. d. × 5 cm)
- wash with Ethanol 100 m*l* and 50% Ethanol 100 m*l*
- elute with (50% NH_4OH/Ethanol, 1/1) solution

Elution part
- evaporate
- add Ethanol

H P L C

1) Sample : Skin lotion, Milk lotion, Cream, Nail enamel, Enamel remover, Hair rinse, Cold permanent waving solution, Face pack, Sunscreen preparation

2) Soak into the 1 N HCl, wash with the distilled water and transfer into the glass tube.

を用い，溶出液としては，50%アンモニア水—エタノール（1：1）を用いることとした．

2．HPLC測定条件の検討

2—1．充塡剤および移動相　前報[1]において，RH-Bを含む塩基性色素のHPLC測定条件を報告したが，本報においては，RH-Bのみの分析のため，使用したカラム及び移動相を一部変更して用いた．すなわち，カラムは前報と同じく逆相系のカラムであるUNISIL PACK 5 C18-250Aを用い，移動相には，0.005M NSAおよび0.002M過塩素酸を含むアセトニトリル—水(75：25)混液を用いた．

2—2．RH-Bの吸収スペクトル　エ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，553nmに吸収極大波長を示したので，測定波長を553 nmとした．

2—3．検量線　RH-Bの標準溶液をエタノールで希釈し，0～1.0ppmの標準系列を作成し，各溶液5 μl を前記のHPLC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高（Y）を測定して，検量線を作成したところ，RH-Bの濃度(X)が0～1.0ppm(0～5 ng)の範囲で，原点を通るY＝61.29Xの直線関係が成り立つことが認められた．また検出限界は0.005ngであった．

3．市販化粧品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，乳液，バニシングクリーム，コールドクリームおよびヘアリンスを試料とし，化粧水10gにRH-Bを0.5μg，その他各5 gにRH-B，5 μgをそれぞれ添加し回収率を求め，結果をTable 1に示した．その結果，5～10回の試験の平均回収率は，化粧水97.8%，乳液96.6%，バニシングクリーム93.0%，コールドクリーム97.8%およびヘアリンス96.6%と良好な回収率を示した．またそれぞれの回収率における変動係数を求めたところ，2.96%，3.05%，1.11%，2.27%および2.48%であった．

また，Fig. 1にRH-Bが配合してある市販化粧品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，他の成分との分離も良好であった．なお，Table 2に市販化粧品11種について，RH-Bの分析結果を示した．

結　論

化粧品中のRH-Bの分析法の確立を意図して，前処理法およびHPLCの測定条件について検討した．その結

Table 1. Recovery of Rhodamine B added to various cosmetics

Sample	No. of exp.	Added(μg)	Range(%)	AV.(%)	S.D.(s)	C.V.(%)
Skin Lotion	10	0.5	92.5～101.7	97.8	2.89	2.96
Milk Lotion	5	5.0	95.0～100.2	96.6	2.95	3.05
Vanishing cream	5	5.0	91.7～ 94.3	93.0	1.03	1.11
Cold cream	5	5.0	96.0～101.1	97.8	2.22	2.27
Hair Rinse	5	5.0	92.2～107.6	96.6	2.40	2.48

C.V. ： coefficient of variation
S.D. ： standard deviation

Table 2. Analysis of Rhodamine B in various Commercial Samples

Sample	Content(ppm)
Skin losion	0,375, 0.200, 0.080, 0.110, 0.330, 0.100
Milk lotion	0.820, 0.041, 0.220
Gream	2.700, 0.550, 0.318, 1.306, 2.350
Sunscreen preparation	0.124, 0.220
Nail enamel	1.500
Enamel remover	0.015
Soap	0.638, 0.098, 3.875
Shampoo	3.150, 0.225,
Hair rinse	1.375, 1.625, 0.255, 2.500, 0.120, 2.375
Cold permanent waving solution	1.500, 1.000,0, 450,0, 200
Face pack	10.16

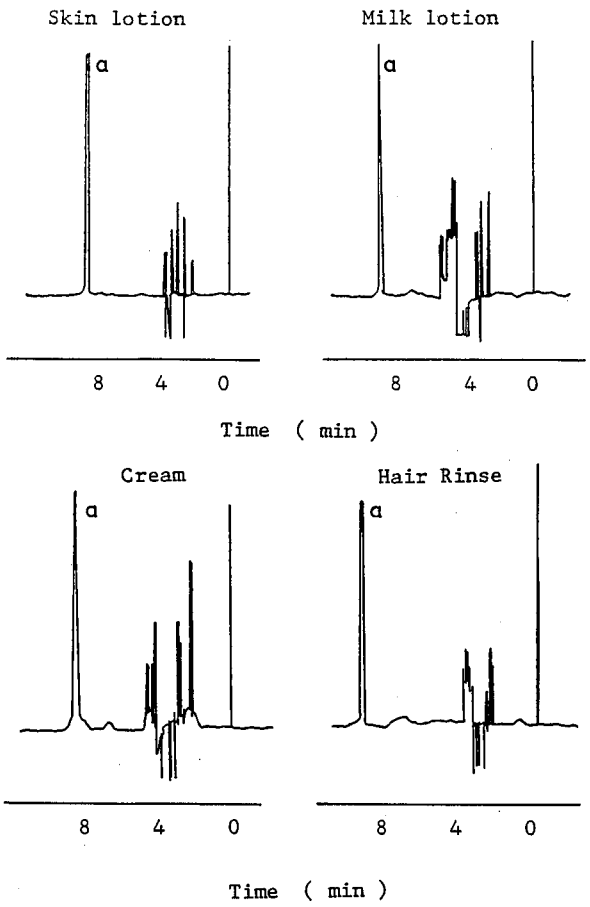


Fig. 1. High Performance Liquid Chromatogram of Commercial Samples
(Peak a : Rhodamine B)
HPLC conditions ; column ; UNISIL PACK 5C18-250A (4.6mm i.d. ×250mm) mobile phase ; acetonitril-water (75 : 25) containing 0.002 M Perchloric acid and 0.005 M Naphthalen sulfonic acid, flow rate ; 1m*l*/min., detector ; vis. 553nm

果,1) 抽出溶媒としてエタノールを用い,クリーンアップ操作としてSP-セファデックスを用いたカラムクロマト法が有効であることが認められた.またHPLC用カラムとして逆相系のUNISIL PACK5C18-250Aを用い,移動相として0.002M過塩素酸および0.005M NSA含有の75%アセトニトリル／水を用いたところ,満足できる結果が得られた.2) 本法による化粧品からのRH-Bの添加回収率は,すべて90%以上であり,変動係数も3%以下であった.また種々の市販化粧品を本法により分析したところ,本法は十分に実用に適用しうるものと思われる.

文 献

1) 伊藤弘一, 観 照雄, 中村義昭他：東京衛研年報, **35**, 146, 1984
2) 日本薬学会編：衛生試験法注解, 697, 1980 金原出版
3) Sandra, B.：*J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **57**, 961, 1974
4) 五島文韶, 石野二三枝, 木谷幸司：分析化学, **26**, 124, 1977
5) Calvin, D. R., John, A. W., John, H. J.,：*J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **42**, 720, 1959
6) 伊藤誉志男, 鈴木英世, 小川俊次郎他：粧技誌, **16**, 105, 1983
7) 伊藤誉志男, 外海泰秀, 三ツ橋幸正他：分析化学, **32**, 47, 1983
8) 竹下隆三, 坂上米次：衛生化学, **15**, 72, 1969
9) 松本勲, 高柴和子, 本間康子：衛生化学, **18**, 278, 1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 98-100, 1985

香粧品（固型化粧石けん）中のケイ光X線分析法による酸化チタンの定量法

中村義昭*, 観　照雄*, 伊藤弘一*,
岸本清子*, 渡辺四男也*

Quantitative Analysis of Titanium Dioxide in Commercial Toilet Soaps by X-ray Fluorescence Spectrometry

YOSHIAKI NAKAMURA*, TERUO KAN*, KOICHI ITO*,
KIYOKO KISHIMOTO*and YOHYA WATANABE*

Keywords：ケイ光X線分析法 x-ray fluoresence analysis, 酸化チタン titanium dioxide, 市販化粧石けん commercial toilet soap

緒　言

香粧品に使用される顔料のうち，白色顔料としての酸化チタンは着色力，隠蔽力に優れているため固型化粧石けんに使用されることが多い．固型化粧石けん中の酸化チタンの分析法については，アルカリ溶融後，生成したチタンイオンを原子吸光法を用いて定量する方法[1]が報告されている．しかしいまだ酸化チタンそのものを直接測定する報告は見られない．そこで今回，ケイ光X線を用いる酸化チタンの定量法を検討したところ，簡便な前処理で，精度よく定量することが出来たので報告する．

実験方法

1．試料　東京都内で昭和54年から58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51検体を試料とした．このうち34検体は国産品で，医薬部外品10検体，透明石けん6検体である．残り17検体は輸入品で医薬部外品2検体，透明石けん3検体である．

2．試薬　1）標準酸化チタン：(メルク社製，アナターゼ型，純度99%)105°，3時間乾燥したものを用いた．2）石けん用素地：化粧品原料基準の規格に適合したもの．

3．装置　1）ケイ光X線分析装置：エネルギー分散型ケベックス社0600ウルトラトレースシステム，2)X線管球：フィリップス社製モリブデン対陰極管球3 kW，3）データー処理システム：ケベックス社　ユニペックスシステム7000，4）試料ホルダ：プラスチック製液体ホルダ（ケベックス社製25mmϕ×20mm）に同ホルダ用ポリプロピレン膜（マイラ膜，厚さ6 μm）を底部に均一に張ったもの．

4．試料の調製　市販固型化粧石けんの中心部から，くさび形の小片をとり，手早くメノウ乳鉢を用いて粉末としたのち，試料ホルダに入れ，これをケイ光X線分析用試料とした．

5．ケイ光X線測定条件　1）X線管球：電圧25kV，電流20mA，2）二次ターゲット：ゲルマニウム，3）エネルギーレンジ：0—10KeV，4）測定時間：測定経過状態を示す積算時間300秒，ただし補正用のコンプトン散乱線の測定は30秒とする．5）データー処理システム：㋐定性分析；ⓐ分析元素　チタン　ⓑ使用モード　MLKモード，IDEモード　㋑定量分析；ⓐ分析元素　チタン　ⓑバックグラウンド補正　4.29，4.75，5.15KeV　ⓒ分析元素　チタン　ⓓチャンネル幅　15　ⓔ使用モード　LSQ分析モード　6）試料室　大気圧

6．試験操作　1）定性：標準酸化チタン5 mgに石けん用素地1 gを加え，メノウ乳鉢でよく混和したのち，試料ホルダに入れたものについて，ケイ光X線分析を行い，得られたX線スペクトルからデーター処理システムを用いてチタンのKα，4.51KeVおよびKβ，4.93KeVのピークを求める．次に試料について同様に操作してピークを求め，標準酸化チタンのそれと比較して定性を行う．

2）定量：ケイ光X線測定用試料について，はじめに測定時間として30秒間ケイ光X線分析を行い得られたX線スペクトルから，二次ターゲットであるゲルマニウムが示すコンプトン散乱線のうち9.00～9.75KeVの強度

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

(A)を測定する．つぎに測定時間を300秒としケイ光X線分析を行い，チタンのKαの強度（B）を測定する．励起効率を一定にするためAに対するBの比（B/A）を求め，これを試料のX線強度比とし，データー処理システムに入力し，別に作成した検量線から試料中の酸化チタン含有量を自動計算する．

7．検量線の作成 標準酸化チタンを石けん用素地で希釈して，100gあたり0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40および0.50gを含む標準系列をつくり，各々を試料ホルダに入れ，ケイ光X線分析を行い，データー処理システムに格納した．

実験結果および考察

1．試料の調製の検討 石けん中の酸化チタンを直接測定することを目的としたため，試料を粉末としたのち，①コイン状にプレスする方法，②試料ホルダに充填する方法，③溶解後ろ過する方法を比較検討した．

①は試料が有機物のためプレス成形が一定の形状を示さず，表面が不均一になることなどから，測定値にバラツキが生じた．③は酸化チタンの粒子が微細なため，酸化チタンをろ別することが困難であった．これらのことから②の試料ホルダ法を用いることとした．

2．添加回収試験 石けんに酸化チタンを0.2%濃度に添加したときの回収率を求めた．回収率は96.9%から101.5%，平均値98.5%（n＝8），変動係数2.17%と良好な結果が得られた．

3．共存物質の影響 石けんへの使用が考えられ，化粧品原料基準に収載された白色無機顔料を，0.2%酸化チタン含有の石けんに混和したのち，本法を適用したところ，ベントナイト，酸化ジルコニウム，カオリン，酸化マグネシウム，タルクは5%濃度まで影響は認められなかった．

酸化亜鉛は等量濃度ではKα強度に影響をおよぼさなかった．しかし，2%濃度以上ではチタンのKα強度に低下が認められたが，通常高濃度で石けんに使用されることはないので，問題はないと考えられる．

4．市販品の分析結果 51検体の試料について酸化チタンの測定を行い，その結果をTable 1に示した．いずれの試料からも特に妨害ピークは認められず，良好なケ

Table 1. Results of Examination of Titanium dioxide in Commercial Toilet Soaps

Sample No.	Sample Name	Manufacturer (State)	Sample Color	Kind of Soap	Contain (%)	Sample No.	Sample Name	Manufacturer (State)	Sample Color	Kind of Soap	Contain (%)
1.	R.G.	JR(J)	White		0.35	27.	S.S.K.	I(E)	Red		0.10
2.	T.J.	T(〃)	〃		0.30	28.	A.B.	AJ(S)	〃	Trs.	N.D.
3.	P.R.	BJ(F)	〃		0.29	29.	S.S.P.	PS(J)	Pink		0.28
4.	R.A.	T(J)	〃		0.14	30.	K.C.	NS(〃)	〃		0.10
5.	M.N.	Y(〃)	〃		0.10	31.	T.C.	YZ(〃)	〃		0.10
6.	S.P.	T(〃)	〃	Med.	0.09	32.	S.V.	S(〃)	〃		0.09
7.	N.M.	M(〃)	〃	Med.	0.07	33.	S.K.P.	HK(〃)	〃	Trs.	N.D.
8.	M.S.S.	PS(〃)	Brown		0.37	34.	H.S.	P(U)	Green		0.47
9.	K.S.2	M(〃)	〃	Med.	0.23	35.	I.D.	JC(U)	〃	Med.	0.40
10.	K.S.1	M(〃)	〃	Med.	0.17	36.	P.S.	JC(〃)	〃		0.30
11.	Y.P.	YP(〃)	〃		0.10	37.	A.H.	I(I)	〃		0.28
12.	N.I.	N(〃)	〃		0.03	38.	L.B.	MC(J)	〃		0.24
13.	I.S.	I(〃)	〃	Trs.	N.D.	39.	P.S.S.	W(W)	〃		0.09
14.	L.S.	KE(〃)	〃	Trs.Med.	N.D.	40.	K.G.1	K(J)	〃	Med.	N.D.
15.	D.T.	BJ(F)	〃		N.D.	41.	K.G.2	K(〃)	〃	Med.	N.D.
16.	A.S.	M(J)	〃		N.D.	42.	P.Q.	SC(〃)	〃	Trs.	N.D.
17.	K.D.	KS(〃)	Yellow		0.14	43.	V.A.	YZ(〃)	〃	Trs.	N.D.
18.	P.Y.	SK(〃)	〃		0.13	44.	L.G.	YT(E)	〃	Trs.	N.D.
19.	S.S.U.	I(E)	〃		0.10	45.	B.D.	A(J)	Blue		0.34
20.	S.R.	I(〃)	〃		0.10	46.	B.G.	A(〃)	〃		0.34
21.	V.P.	W(W)	〃		0.05	47.	T.J.	YZ(〃)	〃		0.10
22.	H.S.	Z(J)	〃	Med.	N.D.	48.	S.K.	I(E)	〃		0.09
23.	M.S.4	PG(〃)	Orange	Med.	0.05	49.	S.K.B.	HK(J)	〃	Trs.	N.D.
24.	A.P.	BJ(F)	〃		0.05	50.	M.S.U.	PS(〃)	Violet		0.28
25.	M.S.8	PG(J)	〃	Med.	0.03	51.	P.R.	W(W)	〃		0.04
26.	J.P.	AD(U)	〃	Trs.Med.	N.D.						

(State) J：Japan, E：England, F：France, I：Italy, S：Spain, U：U.S.A., W：West Germany
(Kind of Soap) Med.：Medicate soap, Trs.：Transparent soap
N.D.：<0.005%

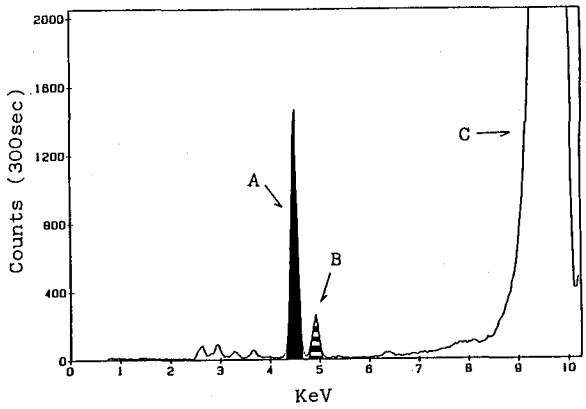


Fig. 1. X-ray Fluorescent Spectrum of Commercial Toilet Soap (No. 2)
A : Ti Kα 4.51Kev B : Ti Kβ 4.93KeV
C : Compton scattered peak (Germanium)

イ光X線スペクトルが得られた．その1例として試料No.2 T.J.のスペクトルをFig. 1に示す．

酸化チタンを検出した試料は51検体中37検体(72.5%)で，このうち国産品は24検体，輸入品13検体であった．国産品の中で最も多量の酸化チタンを検出した試料はNo.8 M.S.S.で0.37%であり，また酸化チタンを検出したものの中で最少量の試料は，No.25 M.S.8で0.03%であった．また輸入品の中で最も多量を検出した試料はNo.34 H.S.で0.47%であり，最少量の試料はNo.51 P.R.で0.04%であった．

①透明石けんについて　国産品6検体，輸入品3検体の透明石けんは全て酸化チタンを検出しなかった．それはこれらの石けんが透明度を必要とするため，着色はタール色素のみで行うことを著者らは前報[2]において確認している．

②白色石けん　Table 1のNo.1から7は白色の固型化粧石けんで，全て酸化チタンを白色顔料として用い，着色していることが認められた．また含有量は最低0.07%から最高0.35%で，平均0.19%であった．

③褐色～紫色石けん　44検体で全体の86%であり，酸化チタンを検出した石けんは30検体で，検出しない石けんは透明石けん9検体と化粧石けん5検体の14検体であった．酸化チタン量は0.03%から0.47%であり，平均値は0.16%（n＝30）であった．これは目的とする色調を作るためにタール色素と混合して石けんに配合されているものと思われる．

ま と め

ケイ光X線分析法による市販固型化粧石けん中の酸化チタンの定量について検討し，次の結果を得た．

1．ケイ光X線分析法による化粧石けん中の酸化チタンの確認は，4.51 KeV，4.93 KeV のチタンのKα，Kβのピークを用いることとした．

2．酸化チタンは0.02%から0.50%の濃度でチタンのKαのケイ光強度との間に比例関係が認められた．また検出限界は酸化チタンとして0.05mg/gであった．

3．本法による酸化チタンの回収率は98.5%であった．

4．石けんに使用が考えられる白色無機顔料のうちカオリン，酸化ジルコニウム，ベントナイト，タルクおよび酸化マグネシウムの障害は認められなかった．

5．市販固型化粧石けん51検体中酸化チタンを検出した試料は37検体(国産品24検体，輸入品13検体)(72.5%)であり，その平均含有量は，0.18%であった．

文　献

1）井上安雄，倉野晃司：フレグランスジャーナル臨時増刊，**No.5**，45，1984
2）中村義昭，観　照雄，伊藤弘一，風間成孔：東京衛研年報，**35**，152，1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 101-107, 1985

家庭用品の衛生化学的研究（第13報）
TLC, GC, NMR および FAB—MS による 長鎖アルキル第四アンモニウム塩の定性分析について

鈴木助治*, 酒井正美*, 池田一夫*, 森　謙一郎*, 雨宮　敬*, 渡辺四男也*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XIII) Qualitative Analysis of Long Chain Alkyl Quaternary Ammonium Compounds by TLC, GC, NMR and FAB-MS

SUKEJI SUZUKI*, MASAMI SAKAI*, KAZUO IKEDA*, KENICHIRO MORI*, TAKASHI AMEMIYA* and YOHYA WATANABE*

Various qualitative analyses of some long chain alkyl quaternary ammonium compounds are described. Blue coloration with bromphenol blue was useful for the screening test of contained ammonium compound of which was not indicated on containers or packages ; these were antistatic or antifungal aerosol products, fabric softening agent, wet tissues and textile products. The positive results obtained by the coloration test were identified by thin layer chromatography (TLC) on aminopropyl bonding silicagel plate developed with ethanol-hexane (75 : 25) and detected with Dragendorff's reagent. The quaternary ammonium compounds of the hydrophilic group having trimethyl, alkyldimethyl or benzyldimethyl group attached to nitrogen or having pyridinium group could be distinguished from each other by nuclear magnetic resonance spectroscopy. The homologs of lipophilic straight-chain alkyl group (C_{12}, C_{14}, C_{16}, C_{18}, C_{20}, C_{22} and C_{24}) were qualitatively analyzed by molecular ion peak of the polar substance by fast atom bombardment-mass spectrometry and the modified Hofmann degradation method established previously in our study ; the degradation method consisted of treatment of the substance with potassium *tert*-butoxide in benzene. Except for alkylpyridinium chloride the quaternary ammonium compounds were easily decomposed into corresponding 1-olefins which were detected by gas chromatography or reverse phase RP-18 TLC (solv. : MeOH, detection : 20% H_2SO_4 with heating). The homologous alkyl quaternary ammonium compounds indicated as contained on the containers or packages of hair rinses, skin cleansing and disinfection swabs and liquid disinfectant were identified by the present qualitative procedures.

Keywords : qualitative analysis of alkyl quaternary ammonium compound, alkyltrimethylammonium, dialkyldimethylammonium, benzalkonium, benzethonium, alkylpyridinium, NMR spectroscopy, FAB-mass spectrometry, modified Hofmann degradation

緒　言

長鎖アルキル第四アンモニウム塩は，親油基として炭素鎖がC_8—C_{24}のアルキル基と親水基として四級アミノ基を有する陽イオン界面活性剤である．これらは親油基と親水基の性質を利用して柔軟加工剤，帯電防止剤，防腐殺菌剤など広範な用途を有し，主に塩化物として家

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

庭用品，化粧品，医薬部外品，医薬品等に使われている．例えば，塩化アルキルトリメチル第四アンモニウム（C_{14}，C_{16}，C_{18}，C_{20}，C_{22}，C_{24}）やジアルキルジメチル第四アンモニウム（C_{16}，C_{18}）は，衣料用の柔軟仕上げ剤，帯電防止剤として家庭用品に，また，同様の目的で頭髪用のリンス剤として化粧品に繁用されている．塩化アルキルベンジルジメチル第四アンモニウム，すなわち塩化ベンザルコニウム（C_{12}，C_{14}，C_{16}，C_{18}），または塩化ベンゼトニウムは，殺菌作用と洗浄作用をもつことから殺菌消毒薬，清浄綿，消毒綿，薬用石けん等に含有され，手指や皮膚の消毒，清浄，清拭に医療用として用いられている．また，家庭において特に乳幼児の食事前後の手足の清浄，清拭のために，最近，雑貨品としてぬれティッシュや紙おしぼりが市販されている．これらのなかにも塩化ベンザルコニウムを含有するものがある．

このように長鎖アルキル第四アンモニウム塩は，各種の市販製品に使用されているが，繊維製品，帯電防止用エアゾール製品，衣料用柔軟仕上げ剤，ぬれティッシュなどは，一般の雑貨品に相当して成分表示がなく，それらの包装から第四アンモニウム塩の使用は判断できない．また，化粧品のヘアーリンス剤は，第四アンモニウム塩の種類が表示されているが，アルキル基の炭素鎖に関しては，それらの混合物であり，同族体の割合は不明である．これに対して医療用の外用皮膚消毒剤や清浄綿などは，医薬部外品としてその使用基準[1]が決められており，当然，第四アンモニウム塩の品名と使用量が表示されている．このようなことから，市販製品中の第四アンモニウム塩の定性分析を行う場合，包装上表示されている製品は，親油基の同定を行えばそれらの同族体の構造が明らかになるが，無表示の製品は，第四アンモニウム塩の一斉検索を行い，さらに，親水基および親油基の同定を行う必要がある．

そこで，著者らは長鎖アルキル第四アンモニウム塩の系統的な定性分析を目的としてブロムフェノールブルーによる呈色（BPB 法），薄層クロマトグラフィー（TLC 法），核磁気共鳴スペクトル（NMR 法），ファースト アトム ボンバートメントーマススペクトル（FAB—MS 法）およびガスクロマトグラフィー（GC 法）について検討し，合わせて若干の市販製品に適用した．

実験の部

1．試料　分析に供した試料は，1984年10月から1985年3月までの間に都内の小売店より購入した．その内訳は，ヘアーリンス剤，衣料用柔軟仕上げ剤，清浄綿，消毒綿，ぬれティッシュ，繊維製品，家庭用エアゾール製品である．

2．試薬　塩化アルキルトリメチル第四アンモニウム：アルキル基の炭素数C_{12}，C_{14}，C_{16}，C_{18}（東京化成工業製，特級），C_{20}，C_{22}，C_{24}，（花王石鹸㈱製，各純度99.2%，95.7%，98.7%），塩化ジアルキルジメチル第四アンモニウム：C_{16}，C_{18}（花王石鹸㈱製，各純度94.4%，95.0%），塩化ベンザルコニウム：C_{12}（花王石鹸㈱製，純度97.6%），C_{14}，C_{16}（東京化成工業製，特級），塩化ベンゼトニウム，塩化アルキルピリジニウム：C_{12}，C_{16}（東京化成工業製，特級），ブロムフェノールブルー，カリウム *tert*-ブトキシド（和光純薬工業製，特級），重クロロホルム（メルク社製，99.7%），薄層クロマトグラフィー：RP-18F_{254}S プレート（メルク社製），NH-P プレート（アミノプロピル結合シリカゲル，ガスクロ工業製），その他の試薬は特級をそのまま用いた．

3．装置　水素炎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，核磁気共鳴装置：日本電子社製 JMN—FX270型，^{1}H269.65 MHz，^{13}C67.8MHz，質量分析計：日本電子社製 JMS—D300型．

4．試験溶液の調製　水抽出液　繊維製品は 3—4 cm^{2}に切ったものを 2 g，また，ぬれティッシュは包装シールを開封してとりだし，その 2 g を試料とした．これを 100 m*l* のビーカーにとり，水 50m*l* を加えてときどき振りまぜる．室温に30分間放置後，試料をしぼり水抽出液を得る．この液を BPB 法の試験溶液とする．

エタノール（EtOH）抽出物　BPB 陽性のものについては，前述と同様に試料をとり，また，清浄綿や消毒綿は，包装シールされたものを 5 包開封して内容物をとり，EtOH 50m*l* を加えて以下水抽出の場合と同様に操作して得た EtOH 抽出液を濃縮乾固する．

液状試料の濃縮物　液状のヘアーリンス剤，衣料用柔軟仕上げ剤，家庭用エアゾール製品は，2 g をとって EtOH 20—30m*l* を加えて濃縮乾固を 3 回くりかえし，水分を除去して油状残留物を得る．

5．定性分析　第四アンモニウム塩の分析は，適宜，BPB 法，TLC 法，FAB—MS 法，GC 法を駆使して行う．試料中に第四アンモニウム塩が含有されているかどうかは，BPB 法あるいは TLC（NH-P プレート）法で確認し，その種類は NMR 法で判別する．さらに，同族の第四アンモニウム塩のアルキル基の判別は，FAB—MS 法あるいはカリウム *tert*-ブトキシド（*tert*-BuOK）存在下分解後，生成した 1-オレフィンを TLC（RP-18F_{254}S プ

レート)法，またはFID—GC法で確認して同族体を同定する．

5－1．BPB法 水抽出液10m*l*を共栓試験管にとり，10%炭酸ナトリウム溶液0.5m*l*，0.05%BPB溶液7－8滴を加えて振りまぜ，1，2-ジクロロエタン5 m*l*を加え強振する．静置後，下層のジクロロエタン層が青色に着色したとき，第四アンモニウム塩の存在を認める．なお，衣料用柔軟剤のように水溶液試料は，そのまま試験を行う．このとき有機層の分離がわるい場合は，塩化ナトリウム2 gを加えて有機層の着色をみる．また，エアゾール製品はアルコール分を含有しているので，その濃縮物を水にとかして試験を行う．

5－2．TLC法 EtOH抽出物，または，液状試料の濃縮物をメタノール（MeOH）に溶かし，NH-Pプレートにスポットする．EtOH—ヘキサン（75：25）の混合溶媒で展開し，ドラゲンドルフ試薬を噴霧して第四アンモニウム塩を検出する．この方法でアルキルトリメチル体とジアルキルジメチル体，ベンザルコニウム塩の判別ができる．

5－3．NMR法 EtOH抽出物，または，液状試料の濃縮物を重クロロホルムに溶かし，綿栓ろ過後，サンプル管に入れて^{1}H-NMRおよび^{13}C-NMRを測定する．テトラメチルシランを基準物質として化学シフト（δppm）を求め，^{13}C-NMRは完全デカップリング法およびオフレゾナンス法でシグナルの観測を行う．四級アミンの窒素原子に結合したメチル基，メチレン基，ベンジル基あるいはピリジニウム基等の置換基のシグナルより第四アンモニウムの種類を同定する．

5－4．FAB—MS法 EtOH抽出物，または，液状試料の濃縮物をMeOHにとかしてグリセリンを付着させたプローブヘッドのステンレス板に塗付する．これを導入口より入れて測定する．反応ガスはキセノンガスを用い，イオン銃は6 KeVで測定した．スペクトルを解析し，M^{+}を帰属することにより同族体を同定する．

5－5．1-オレフィンの生成による確認法 EtOH抽出物，または，液状試料の濃縮物をとり，*tert*-BuOK100 mg，ベンゼン（Bz）25m*l*を加えて30分間水浴中で加熱還流する．この反応溶液を10%塩化ナトリウム溶液25m*l*で振とう洗浄したのち，Bz層を4－5 m*l*に濃縮し，ついで，シリカゲルカラムクロマトグラフィー（シリカゲル60，2g，1cmϕ×7 cm）に付し，ヘキサン30m*l*を流して1-オレフィンを溶出する．この1-オレフィンをFID—GCまたは逆相TLCで検出してアルキル基の識別を行い，第四アンモニウム塩の同族体を同定する．ヘキサン溶出液は1－2 m*l*に濃縮してFID—GCに5 μ*l*注入し，下記の測定条件で昇温分析を行う．

TLC：RP—18F_{254}Sプレート（0.25mm）；展開溶媒，MeOH；発色，20%H_2SO_4を噴霧後，加熱する．

FID—GC：カラム，5%SE—30（クロモソルブWAW—DMCS，80—100メッシュ），3 mmϕ×2 m；注入口および検出器温度，250°；カラム温度，120°→270°，昇温速度，6°/min；キャリアガス，N_2 40m*l*/min，H_2 0.7 kg/cm^2，air 1kg/cm^2．

結果および考察

長鎖アルキル第四アンモニウム塩は，ヘアーリンス，ヘアートリートメント，消毒薬，清浄綿，消毒綿，口腔口中薬など化粧品，医薬部外品，医薬品等各種の製品に含有されているが，皮膚や手指，その他の身体部分に直接適用するため，薬事法により品名あるいはその使用量が表示されている．従って，これらの製品に関しては，表示に従い，第四アンモニウム塩の分析を行えばよい．しかし，一般の雑貨品に属する家庭用品，例えば，紙おしぼり，ぬれティッシュ，繊維製品，エアゾール製品等では，そのような表示義務がないため，第四アンモニウム塩の種類や使用量については全く不明である．従って，Table 1に示す長鎖アルキル第四アンモニウム塩を想定した場合，Chart 1に示すように検索→親水基の同定→親油基の同定→第四アンモニウム塩の確認と系統的な定性分析を実施する必要がある．Chart 1に示すようにBPB法[2]は簡単な操作で行うことができる．Table 1に示す**1c**，**2a**，**3c**，**4b**，5のC_{16}アルキル基を有する第四アンモニウム塩について，1，2-ジクロロエタン5 m*l*を用いて検討したところ，いずれも検出限界が約5 μgであり，きわめて鋭敏な反応を示した．ブランク液に比べて有機層が青色に着色すれば，BPB陽性と判定した．この方法をTable 2の無表示の市販製品に適用した場合，柔軟仕上げ剤2種，家庭用エアゾール製品16種中3種，ぬれティッシュ11種中3種がBPB陽性を示した．このエアゾール製品は，帯電防止剤2種と抗カビ剤1種であった．このように無表示の製品を多数分析する場合にBPB法は有効なスクリーニング法である．特に，繊維製品は，今回，40種を検索して陽性のものがみられなかったが，ホルムアルデヒドの公定試験法[3]で得られる水抽出液を利用すれば，一斉検査が可能である．

つぎに，TLC法は，第四アンモニウム塩がイオン化合物であるため，直接シリカゲル[4]，RP-18逆相シリカゲル，アルミナ等を利用してもテーリングが大きいか，スポットの分離が困難である．そこで，今回はFig. 1に示

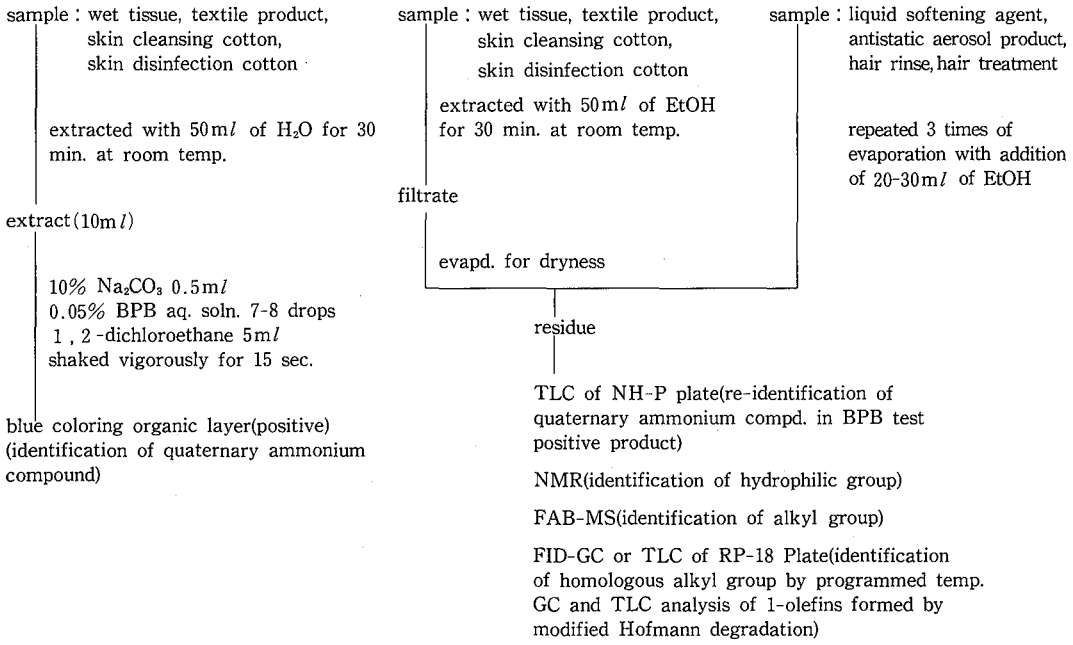


Chart 1. Qualitative Analysis of Quaternary Ammonium Compound

Table 1. Quaternary Ammonium Compounds

Compound	C_n alkyl group
Alkyltrimethyl-ammonium chloride	C_{12} : **1a**, C_{14} : **1b**, C_{16} : **1c**, C_{18} : **1d**, C_{20} : **1e**, C_{22} : **1f**, C_{24} : **1g**
Dialkyldimethyl-ammonium chloride	C_{16} : **2a**, C_{18} : **2b**
Benzalkonium chloride	C_{12} : **3a**, C_{14}, : **3b** C_{16} : **3c**
Alkylpyridinium chloride	C_{12} : **4a**, C_{16} : **4b**
Benzethonium chloride	**5**

Table 2. Positive Frequency of Some Commercial Products Tested by BPB Procedure

Sample	n	Positive cases
Liquid softening agent	2	2
Aerosol product	16	3 [1)]
Wet tissue	11	3
Textile product	40	0

1) Antistatic agent : 2, antifungal agent : 1

すようにアミノプロピル基で修飾されたシリカゲルプレート（NH-P1090）を検討した．**1c**，**4b**，**5**（*Rf*：0.3）と**2a**，**3c**（*Rf*：0.55）のスポットの分離がみられ，それらの判別が可能となった．Fig. 1の6のヘアーリンス剤は，塩化アルキルトリメチル第四アンモニウムの使用が表示されているもので，TLCでも*Rf*：0.3を示した．これに対してTable 2のBPB陽性の無表示製品については，8種中7種が*Rf*：0.55のグループに属し，ジアルキルジメチル体か，またはベンザルコニウム塩と推察された．Chart 1に示すように，この方法はEtOH抽出物や液体試料の濃縮物をスポットして直接，第四アンモニウム塩を検出できることがわかった．

ここに検索された第四アンモニウム塩は，親水基を特定できれば，その種類を推定できる．Table 1に示した各種の塩化アルキル第四アンモニウムのNMRデータをTable 3と4に示す．^{1}H-NMRおよび^{13}C-NMRにおいて，窒素原子に結合したメチル基とメチレン基の化学シフト（δppm）は，**1a**—**1g**と**2a**，**2b**の判別に役立つと考えられる．**3a**—**3c**，**4a**，**4b**，**5**に関しては，それらのシグナルのほかに，当然，ベンジル基やピリジニウム基等の芳香環に基づくシグナルを指標として判別が可能である．例えば，Fig. 2に示すように前述のヘアーリンス剤は**1c**のスペクトルと比較してアルキルトリメチル第四アンモニウム塩と確認できる．同様に帯電防止用エア

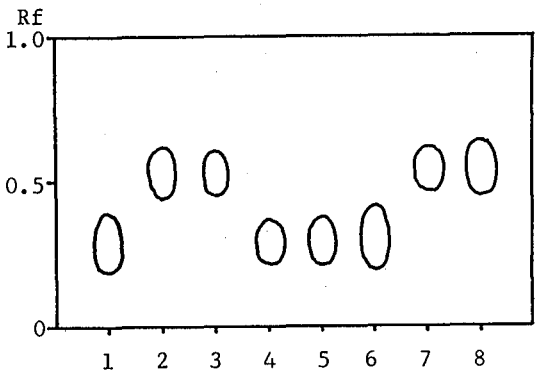


Fig. 1. Thin Layer Chromatogram of Quaternary Ammonium Compounds

1 : 1c, 2 : 2a, 3 : 3c, 4 : 4b, 5 : 5, 6 : hair rinse, 7 : antistatic aerosol product, 8 : wet tissue, Plate : NH-P1090, aminopropyl bonding silica gel (GASUKURO KOGYO), Solv.: EtOH-hexane (75 : 25), Detection : Dragendorff's reagent

ゾール製品とぬれティッシュは，**2a**, **3c** のスペクトルと一致するシグナルが観察され，それぞれジアルキルジメチル第四アンモニウム塩およびベンザルコニウム塩であることがわかった．また，^{13}C-NMR は10−20mgの試料量を必要とし，他の分析法に比べて低感度であるが，製剤中の他の成分との混合物であっても，炭素シグナルの分離がよく，第四アンモニウム塩の種類の識別手段としてすぐれている．さらに測定後，試料を MS, TLC, Hofmann 分解等の他の分析法に利用できる利点を有する．

残る親油基，すなわちアルキル基の炭素鎖が特定できれば，同族体の分析が成立し，第四アンモニウム塩の構造が明らかになる．その方法として，① FAB—MS 法，② Hofmann 分解によって生成する 1-オレフィンの分析が有効と考えられる．まず，FAB—MS 法は，難揮発性のイオン化合物でも微量の測定が可能であり，一般に $M^+ + 1$ が観測される．Fig. 3 に示すように，第四アンモ

Table 3. ^{1}H-NMR Data (δ ppm) of Quaternary Ammonium Chlorides in $CDCl_3$

Compound	$-CH_3$	$-(CH_2)_n-$	$-\overset{|}{N}-CH_2-$	$-\overset{|}{N}-CH_3$	The other group
1a-1g	0.88(3H,t,J=6.6)	1.1-1.5,1.73(2H,m)	3.62(2H,m)	3.47(9H,s)	
2a,2b	0.88(3H,t,J=6.6)	1.1-1.5,1.68(2H,m)	3.48(2H,m)	3.40(6H,s)	
3a-3c	0.88(3H,t,J=6.6)	1.1-1.5,1.77(2H,m)	3.48(2H,m)	3.28(6H,s)	5.00(2H,s), 7.66(2H,d,J=6) 7.41(2H,d,J=6), 7.41(1H,m)
4a,4b	0.88(3H,t,J=6.6)	1.1-1.5,2.05(2H,m)	4.97(2H,m)		8.23(2H,brs), 8.59(1H,m) 9.54(2H,brs)
5	0.70(9H,s),1.32(6H,s),1.68(2H,s)3.88(2H,brs),3,96(2H,s),4.09(4H,brs),3.32(6H,s),5.02(2H,s),7.37(1H,d,J=6),7.39(1H,brs),7.66(2H,d,J=6),6.76(2H,d,J=8.6), 7.23(2H,d,J=8.6)				

Table 4. ^{13}C-NMR Data (δ ppm) of Quaternery Ammonium Chlorides in $CDCl_3$

Compound	$-CH_3$ (q)[1]	$-(CH_2)_n-$ (t)	$-\overset{|}{N}-CH_2-$ (t)	$-\overset{|}{N}-CH_3$ (q)	The other group
1a-1g	14.1	22.7,23.3,26.3,29.3 29.4,29.5,29.7,31.9	66.8	53.3	
2a,2b	14.1	22.7,22.8,26.3,29.2 29.4,29.5,29.7,31.9	63.6	51.3	
3a-3c	14.1	22.6,22.9,26.4,29.2 29.4,29.5,29.7,31.9	63.3-63.9	49.5-50.1	67.6(t),127.8(s),129.1(d) 130.5(d),133.3(d)
4a,4b	14.1	22.6,26.1,29.2,29.4 29.6,29.7,31.9,32.0	62.0		128.6(d),145.3(d)
5	31.6(q),31.7(q),32.2(s),38.0(s),50.6(q),62.8(t),65.3(t),67.0(t),113.7(d),127.2(d) 127.8(s),129.0(d),130.5(d),133.6(d),142.8(s),156.1(s)				

1) Splitting pattern of the signals : q, quartet ; t, triplet ; d, doublet ; s, singlet.

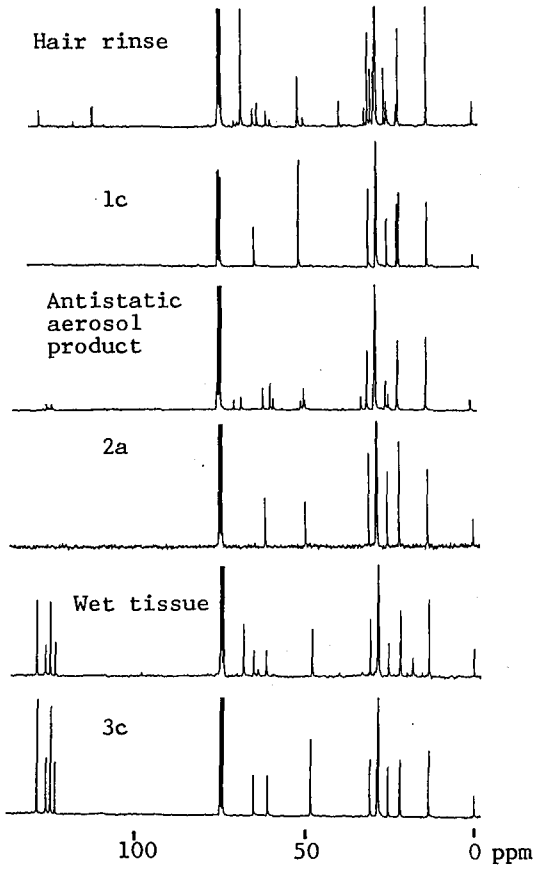


Fig. 2. ^{13}C-NMR Spectrum of Quaternary Ammonium Compounds in $CDCl_3$

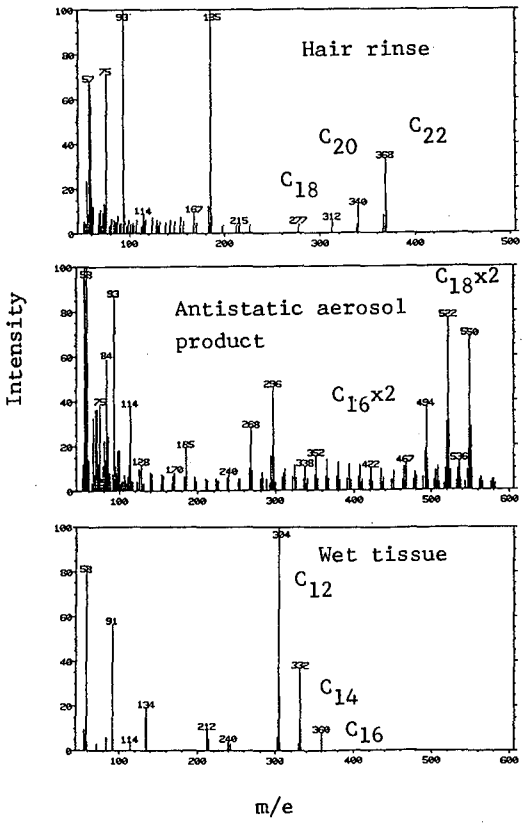


Fig. 3. FAB-Mass Spectrum of Quaternary Ammonium Compounds

ニウム塩の場合はM^+が観測され，ここではそれらの種類が識別されているので，容易に化合物の推定ができる．ヘアーリンス剤はC_{18}，C_{20}，C_{22}の炭素鎖をもつアルキルトリメチル体，帯電防止用エアゾール製品はC_{16}，C_{18}のジアルキルジメチル体，ぬれティッシュはC_{12}，C_{14}，C_{16}のベンザルコニウム塩の同族体より成り立っていることがわかった．また，**4a**，**4b**，**5**についても当然，M^+より同定が可能である．つぎに，②の方法は，著者ら[5]が開発した改良 Hofmann 分解法である．すなわち，第四アンモニウム塩を Bz 中 *tert*-BuOK の存在下加熱還流すると，容易にアルキル基が1-オレフィンに変換されるので，これを FID—GC または逆相 TLC で検出し，同族体の分析を行う方法である．前述の市販製品の分析例を Fig. 4 に示す．Fig. 4 に示すように，ヘアーリンス剤は，やはりC_{18}，C_{20}，C_{22}，C_{24}の1-オレフィンのピークが認められ，これらの炭素鎖を有するアルキルトリメチル第四アンモニウム塩の同族体であることがわかった．また，帯電防止用エアゾール製品とぬれティッシュも FAB-MS 法の同定結果と一致していることがわかり，それぞれC_{16}，C_{18}ジアルキル第四アンモニュウム塩，C_{12}，C_{14}，C_{16}ベンザルコニウム塩であった．これらの結果は RP-18の逆相 TLC によっても同様に確認することができた．なお，**4a**，**4b** はこの分解条件で単純に1-オレフィンを生成せず，**5** はベンジルジメチルアミンの生成を確認しているが，詳細は不明である．今後，この点に関しては検討してゆく考えである．

以上の定性分析法によって，今回調査した市販製品の分析結果を Table 5 に示す．衣料用柔軟仕上げ剤2種，帯電防止用エアゾール製品1種はC_{16}，C_{18}ジアルキルジメチル第四アンモニウム塩と同定した．ヘアーリンス剤は，6種中3種はC_{14}，C_{16}，C_{18}，2種はC_{18}，C_{20}，C_{22}，C_{24}アルキルトリメチル第四アンモニウム塩であり，他の1種はC_{16}，C_{18}ジアルキルジメチル第四アンモニウム塩であった．また，抗カビ用エアゾール製品1種，ぬれティッシュ3種，消毒剤，消毒綿，清浄綿の各1種は，

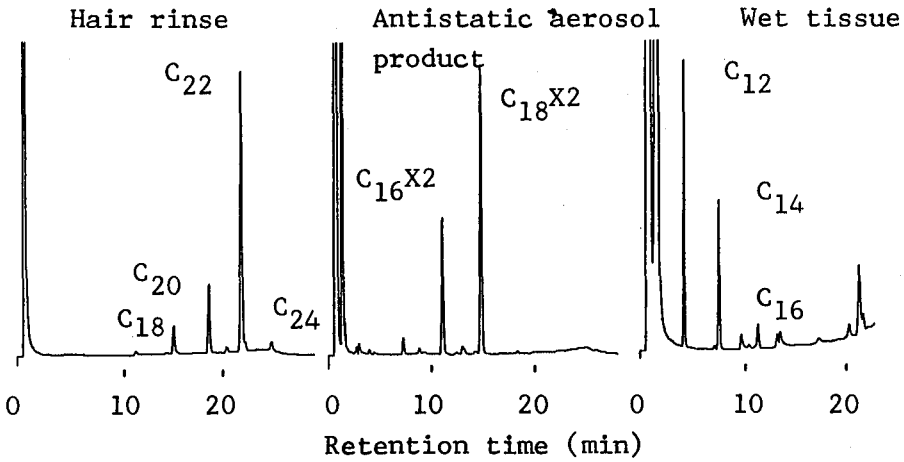


Fig. 4. Gas Chromatograms of 1-Olefins Formed from Quaternary Ammonium Compounds

Column : 5% SE-30/chromosorb WAW-DMCS (80-100 mesh), 3 mmϕ x 2 m glass column, Column temp.: 120°⟶270°,Program rate : 6° / min., Injection and detection temp.: 250°, Detector : FID, Chart speed : 2.5 mm/min

Table 5. Qualitative Analytical Results of Quaternary Ammonium Compounds in Commercial Products

Sample	n	Identification
Liquid softening agent	2	2a,2b
Antistatic aerosol product	1	2a,2b
	1	1a,1b,1c,1d
Antifungal aerosol product	1	3b
Hair rinse	3	1b,1c,1d
	2	1d,1e,1f,1g
	1	2a,2b
Wet tissue	3	3a,3b,3c
Skin cleansing cotton	1	3a,3b,3c
Skin disinfection cotton	1	3a,3b,3c
Liquid disinfectant	1	3a,3b,3c

いずれもC_{12}, C_{14}, C_{16}を主体とするベンザルコニウム塩であった．これらの第四アンモニウム塩の含有量と同族体の分布については，別報に報告する．

結　論

長鎖アルキル第四アンモニウム塩の定性分析法として，BPB法は多数の試料をスクリーニングする方法として有効であり，BPB陽性のものはNH-Pプレートを用いたTLCで確認できる．第四アンモニウム塩の親水基は，NMR法によって窒素原子に結合したメチル基，メチレン基あるいは芳香環の化学シフトから判別し，第四アンモニウム塩の種類が推定できる．親油基のアルキル炭素鎖は，改良Hofmann分解により生成する1-オレフィンの逆相TLCあるいはFID—GCの分析で判別し，これより同族体が明らかになる．また，同族体の同定はFAB—MS法によっても達成することができる．なお，FID—GCはFAB—MS法に比べて微量の同族体の同定が可能である．これらの方法は，市販製品中の第四アンモニウム塩およびその同族体の系統的な定性分析法として成立する．

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，井藤秀雄氏，大角悦子氏ならびにFAB—MSを測定していただいた神奈川県衛生研究所，渡辺重信氏，貝瀬利一氏に深謝します．

文　献

1）日本公定書協会編，薬事時報社：医薬品製造指針，351，1984
2）北原文雄，早野茂夫，原　一郎：界面活性剤の分析と試験法，139，1982
3）厚生省環境衛生局企画課家庭用品安全対策室編著：家庭用品規制関係実務便覧，833，1975
4）H.K.Mangold and R.Kammereck, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 39, 201, 1962
5）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，35，138，1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 108-114, 1985

家庭用品の衛生化学的研究（第14報）
ガスクロマトグラフィーによるヘアーリンス剤，衣料用柔軟仕上剤中の塩化アルキルトリメチルおよび塩化ジアルキルジメチル第四アンモニウムの定量法

酒井正美*，池田一夫*，森　謙一郎*，雨宮　敬*，
鈴木助治*，観　照雄*，渡辺四男也*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XIV)
Analytical Method of Alkyltrimethyl-and Dialkyldimethylammonium Chlorides in Hair Rinse and Liquid Softening Agent for Clothes by Gas Chromatography

MASAMI SAKAI*, KAZUO IKEDA*, KENICHIRO MORI*, TAKASHI AMEMIYA*, SUKEJI SUZUKI*, TERUO KAN*, and YOHYA WATANABE*,

A useful analytical method for alkyltrimethyl-and dialkyldimethylammonium compounds by gas chromatography was established. Degradation of the ammonium compounds with potassium *tert*-butoxide in benzene-dimethylsulfoxide (8 : 2) under reflux for 30 minutes was found to give l-olefin corresponding to alkyl group as well as alkyldimethylamine from dialkyldimethylammonium compound. Alkyldimethylamine thus formed was used to distinguish between alkyltrimethylammonium compound and dialkyldimethylammonium compound. The two ammonium compounds were analyzed by means of measuring l-olefin by gas chromatography equipped with a flame ionization detector on 5% SE-30 column. The present method was applied to determination of the homologous ammonium compounds in commercial hair rinses, liquid softening agents and antistatic aerosol products.

Keywords : alkyltrimethylammonium chloride, dialkyldimethylammonium chloride, hair rinse, softening agent, modified Hofmann degradation, gas chromatography

緒　言

アルキルトリメチル第四アンモニウム塩やジアルキルジメチル第四アンモニウム塩は，その界面活性剤としての性質から頭髪や繊維に滑らかな柔軟性をもたせたり，表面に発生する静電気を除去するために，ヘアーリンス剤，衣料用柔軟仕上げ剤，帯電防止剤として使用されている．市販のヘアーリンス剤については，薬事法により容器や包装上にこれらの成分表示がなされているが，使用量は記載されていない．これに対して家庭用品に属する衣料用の柔軟仕上げ剤や帯電防止剤は，通常，第四アンモニウム塩の表示は全くなされていない．そこで，今回，化粧品，家庭用品に配合されている第四アンモニウム塩の定量法を確立し，市販製品の含有量を測定した．

長鎖アルキル第四アンモニウム塩の分析法に関して，著者らはすでに前報[1]においてガスクロマトグラフ（GC）法を報告している．この方法は第四アンモニウム塩をベンゼン（Bz）－ジメチルスルホキシド（DMSO）の混合溶媒中カリウム *tert*-ブトキシド（*tert*-BuOK）を塩基として用いて分解し，長鎖アルキル基を1－オレフィンに変換してGC分析するものである．アルキルトリメチルおよびジアルキルジメチル第四アンモニウム塩が，前述の化粧品や家庭用品に含有される場合には，ガラス管に封入して行うような Hofmann 分解[2]や GC の注入口温度で熱分解させる方法[3]を適用しても，再現

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

性や検体処理の面で困難な点があると考えられる．そこで，著者らが開発した GC 分析法[1]をヘアーリンス剤，柔軟仕上げ剤，帯電防止剤に適用するため，若干，先の分析法に検討を加えることにより，これらのアルキルトリメチルおよびジアルキルジメチル第四アンモニウム塩を簡便に測定することができたので報告する．

実験の部

1．試薬 塩化アルキルトリメチル第四アンモニウム：アルキル基の炭素数C_{12}(**1a**)，C_{14}(**1b**)，C_{16}(**1c**)，C_{18}(**1d**)（東京化成工業製，特級），C_{20}(**1e**)，C_{22}(**1f**)，C_{24}(**1g**)（花王石鹸㈱製，各純度99.0%, 98.8%, 99.8%），塩化ジアルキルジメチル第四アンモニウム：C_{16}(**2a**)，C_{18}(**2b**)（花王石鹸㈱製，各純度95.0%，94.4%），*tert*-BuOK（和光純薬工業製，特級），重クロロホルム（99.7%）およびシリカゲル60，70—230メッシュ（メルク社製），その他の試薬はすべて特級を用いた．

第四アンモニウム塩標準液：**1a**～**1g**，および**2a**, **2b**をそれぞれ100mg精秤し，エタノール(EtOH)に溶かして100m*l*とし標準溶液とした．

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）：日立製作所製 GC-163型，ガスクロマトグラフィー質量分析計（GC-MS）：日本電子社製D—300，核磁気共鳴装置（^{1}Hおよび^{13}C-NMR）：日本電子社製JEOL FX-270型，^{1}H269.65MHz，^{13}C67.8 MHz.

3．試料 昭和59年10月から昭和60年2月までの間に都内で購入したヘアーリンス剤6検体，衣料用柔軟仕上げ剤2検体および帯電防止剤2検体を試料とした．

4．試験溶液の調製 試料1～10gをとり，EtOH—Bzの混合溶媒を加えて均一な100m*l*の溶液とする．この10m*l*を100m*l*ナス型フラスコにとり，ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を蒸発乾固させる．ここにBz—DMSO（8：2）の混合溶媒25m*l*，*tert*-BuOK100mgを加えて還流冷却器を付して30分間加熱還流する．冷後，Bzを留去してヘキサン10m*l*を加え100m*l*の分液ロートに移し，フラスコはヘキサン5 m*l*で2回洗って合する．このヘキサン層を5%塩酸20m*l*で15秒間振とう洗浄し，ヘキサン層を分取する．つぎに内径1 cm，長さ20 cmのカラム管にシリカゲル2 gをヘキサンに懸濁して充塡し，長さ6 cmのカラムをつくる．ここに先のヘキサン層を流し込み，さらにヘキサン30m*l*を流して1—オレフィンを溶出させる．このヘキサン溶液を40°以下でロータリーエバポレーターで1～2 m*l*まで濃縮し，ヘキサンを加えて5 m*l*として，GC 用の試薬溶液とする．

自家製クリームタイプヘアーリンス剤の調製：セチルアルコール0.5%，プロピレングリコール4%，メチルセルロース（#4000）1%，香料および着色料適量，精製水を加え100%とする．

5．定性分析 前述4の1—オレフィンを溶出させた後のカラムを Bz 5 m*l*で洗い，ついでメタノール30m*l*を流してアルキルジメチルアミンを溶出させる．このメタノール溶液を濃縮乾固し，残渣にメタノール2 m*l*を加えて FID-GC に5 μl注入する．このときの GC の測定条件は次の定量法の項に従いカラム温度は210°で分析する．

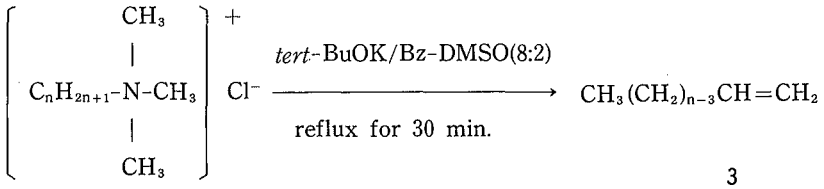
6．定量法 各第四アンモニウム塩標準溶液より1a～1gおよび2a，2bをそれぞれ0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0mgとり，以下試験溶液の調製の項に従って操作し，100, 200, 400, 600, 800ppm の濃度系列をつくり，これらと試験溶液の5 μlを GC に注入する．下記の GC 条件に従って測定し，得られたピーク高より検量線を作成して試験溶液中の第四アンモニウム塩の濃度を求める．

FID-GC の測定条件 カラム：5%SE—30(Chromosorb W AW-DMCS, 80～100mesh)，内径3 mm×長さ2 m，注入口温度および検出器温度：250°，カラム温度：130°，150°，170°，210°，230°，250°，キャリアガス：$N_2$40m*l*/min，$H_2$0.8kg/cm^2，air 2.0 kg/cm^2.

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．

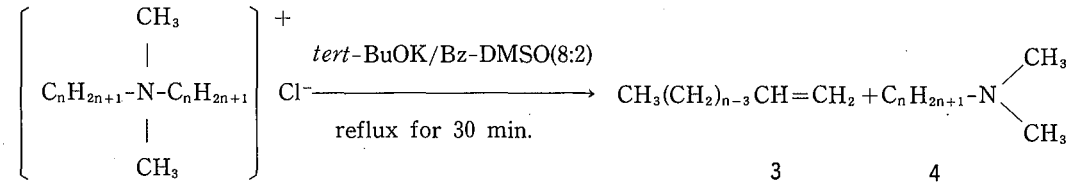
結果および考察

1．分解反応の検討 アルキル基の炭素数がC_{12}, C_{14}, C_{16}, C_{18}である塩化トリメチル第四アンモニウムについては，すでに前報[1]においてBz—DMSO（8：2）の混合溶媒中，*tert*-BuOK を塩基として加熱処理すると，親水基に相当するトリメチルアミンが脱離してC_{12}～C_{18}の1—オレフィンが生成することを報告した．また，市販のヘアーリンス剤には，C_{20}，C_{22}，C_{24}等の炭素鎖を有するアルキルトリメチル第四アンモニウム塩も使用されているので，この点を考慮して再度分解反応を FID-GC の昇温分析で検討した．**1a**～**1g**および**2a**, **2b** の各第四アンモニウム塩の5 mgについて，同様の条件で分解反応を行ったのち，反応溶媒を同量の10%塩化ナトリウム溶液で洗浄し，濃縮後，ヘキサンに溶かして GC 分析を行った．Fig.1に**1b**, **1d**, **1f** の測定結果を示す．いず



1a : n=12, 1b : n=14, 1c : n=16, 1d : n=18
1e : n=20, 1f : n=22, 1g : n=24

Chart 1



2a : n=16, 2b : n=18

Chart 2

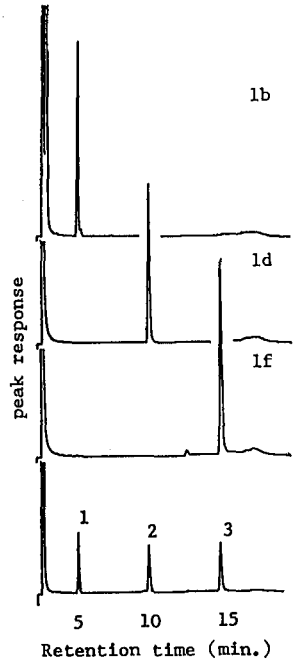


Fig. 1. Gas Chromatograms of 1-01efin Formed from Alkyltrimethylammonium Chlorides
Conditions : 5% SE-30/Chromosorb W AW-D MCS (80-100 mesh), 3mmϕ x 2m, Column temp.: 160°⟶270°, Program rate : 6°/min.,
Chart speed : 2.5mm/min.,
Carrier gas : N_2 40ml/min.
Peaks : 1, 1-tetradecene; 2, 1-octadecene; 3, 1-docosene

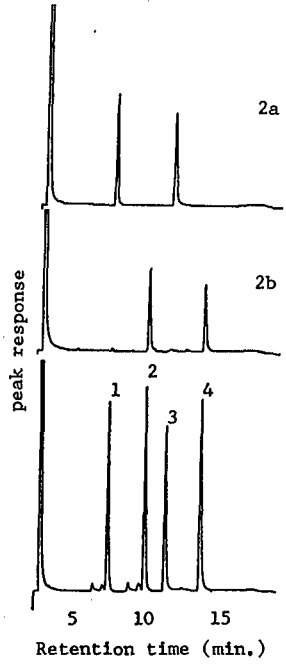


Fig. 2. Gas Chromatograms of 1-01efin and Alkyldimethylamine Formed from Dialkyldimethylammonium Chlorides
Column temp : 160°⟶270°, Program rate : 6°/min. Other conditions of GC were the same as those in Fig. 1.
Peaks :1, 1-hexadecene; 2, 1-octadecene; 3, hexadecyldimethylamine; 4, octadecyldimethylamine

Table 1. 1-Olefin Formed from Alkyltrimethyl-and Dialkyldimethylammonium Chlorides

Compound	GC-MS[1] (M^+,m/e)	1-Olefin
Ia	168	1-dodecene
Ib	196	1-tetradecene
Ic	224	1-hexadecene
Id	252	1-octadecene
Ie	280	1-eicosene
If	308	1-docosene
Ig	336	1-tetracosene
2a	224	1-hexadecene
2b	252	1-octadecene

1) Column : 5% SE-30(Chromosorb W AW-DMCS,80-100 mesh),4mmϕ x 2m, Column temp. : 120°→270°, 8°/min., 70eV

Table 2. Yield Rate and Reproducibility of 1-Olefin and Alkyldimethylamine

Compound	1-Olefin		Alkyldimethyl amine	
	Yield rate[1] (%)	C.V. (%)	Yield rate[1] (%)	C.V. (%)
Ib	91.5	1.2		
Id	95.9	2.5		
If	117.7	1.0		
2a	97.7	1.7	93.4	2.4
2b	95.7	0.6	98.5	0.6

1) Taken as the average of 3 replicate analyses by FID-GC

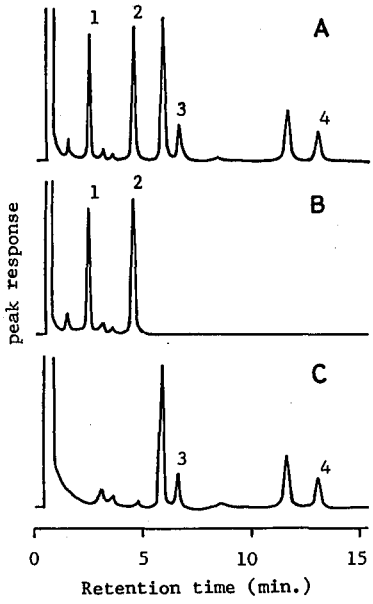


Fig. 3. Gas Chromatograms of 1-01efins and Alkyldimethylamines Formed from Dialkyldimethylammonium Chlorides in Hair Rinse
A, reaction mixture without any treatment; B, hexane fraction obtained from treatment with silica gel column; C, methanol fraction obtained from silica gel column after elution with hexane
Peaks : 1, 1-hexadecene; 2, 1-octadecene; 3, hexadecyldimethylamine; 4, octadecyldimethylamine

れの場合もガスクロマトグラム上，1つの主ピークが認められた．これらを1—オレフィンの標品と比較すると，**1b** のピークは1—テトラデセン，**1d** は1—オクタデセン，**1f** は1—ドコセンに一致した．**1b**, **1d**, **1f** 以外の当該第四アンモニウム塩についても同様に唯一の主ピークを示し，Table 1に示すように GC-MS のM^+から，これらのピークは長鎖アルキル基に対応する1—オレフィンであることを確認した．従って，Chart 1に示すように，**1a**～**1g** の塩化アルキルトリメチル第四アンモニウムは容易に分解して1—オレフィン3に変換できることがわかった．つぎに，**2a**, **2b** は，Fig.2に示すようにガスクロマトグラム上，2つのピークが認められた．第一のピークは，予期した通り GC-MS より1—オレフィンであった．(Table 1) 第二のピークを検索するため，両者の反応生成物をカラムクロマトグラフィー（シリカゲル60, 2 g, 1 cmϕ×6 cm)に付し，ヘキサンで1—オレフィンを溶出させてから，ついでメタノールを流し，ガスクロマトグラム上相当するピークを示す分画を得た．このメタノール分画は，^{1}H-NMR($CDCl_3$) δ0.88(3H, t, J=6.6Hz), 2.21(6H, S)ppm, ^{13}C-NMR($CDCl_3$)δ14.2(q), 22.8(t), 27.7(t), 28.0(t), 29.6(t), 29.9(t), 32.1(t), 45.5(q), 60.1(t)ppm のシグナルを示し，アルキル基と窒素原子に結合した2個のメチル基の存在が認められ，また，MS より m/e 269(M^+), 297(M^+)が観測された．これらのことから Fig.2の **2a**, **2b** の第二のピークは，それぞれヘキサデシルジメチルアミンおよびオクタデシルジメチルアミンであることが明らかになった．従って，**2a**, **2b** の塩化ジアルキルジメチル第四アンモニウムは，Chart 2に示すように，第三アミン **4** が脱離して1—オレフィン **3** を生成することがわかった．また Table 2に示すように，1—オレフィンとアルキルジメチルアミンの生成率はそれぞれ91.5～117.7%, 93.4～98.5%であり，その変動係数(C.V.)も小さく，これらの分解反応は定量的に，しかも再

現性よく進行していることがわかった．

2．定量法の検討 前述の分解反応より生成する1—オレフィンを GC 分析すれば，第四アンモニウム塩の定量が可能である．そこで分析条件は，前報[1]と同様に *tert*-BuOK に反応溶媒として Bz—DMSO（8：2）を用いて行ったが，実試料に適用するためには，若干の前処理操作が必要であった．ヘアーリンス剤，柔軟仕上げ剤，帯電防止用エアゾール製品は，多量の水分や EtOH を含有し分解反応に影響を与えることが予想されたので，試料を減圧下濃縮を繰り返し，これらを除去した．なお，ヘアーリンス剤はセタノール，グリセリン，プロピレングリコールを1～5％含有しているものが多いが，これらの影響を検討するため塩化オクタデシルトリメチル第四アンモニウム3 mg に同濃度の上記アルコール類を添加したところ，いずれも定量的に回収され，アルコール類の妨害は認められなかった．また，反応溶液を直接5％塩酸で洗浄すると，試料によっては溶液が乳化し，Bz 層の分取が困難になる場合があるため，反応終了後直ちに Bz を留去し，残液にヘキサンと5％塩酸を加えて振とうし，ヘキサン層に1—オレフィンを抽出し

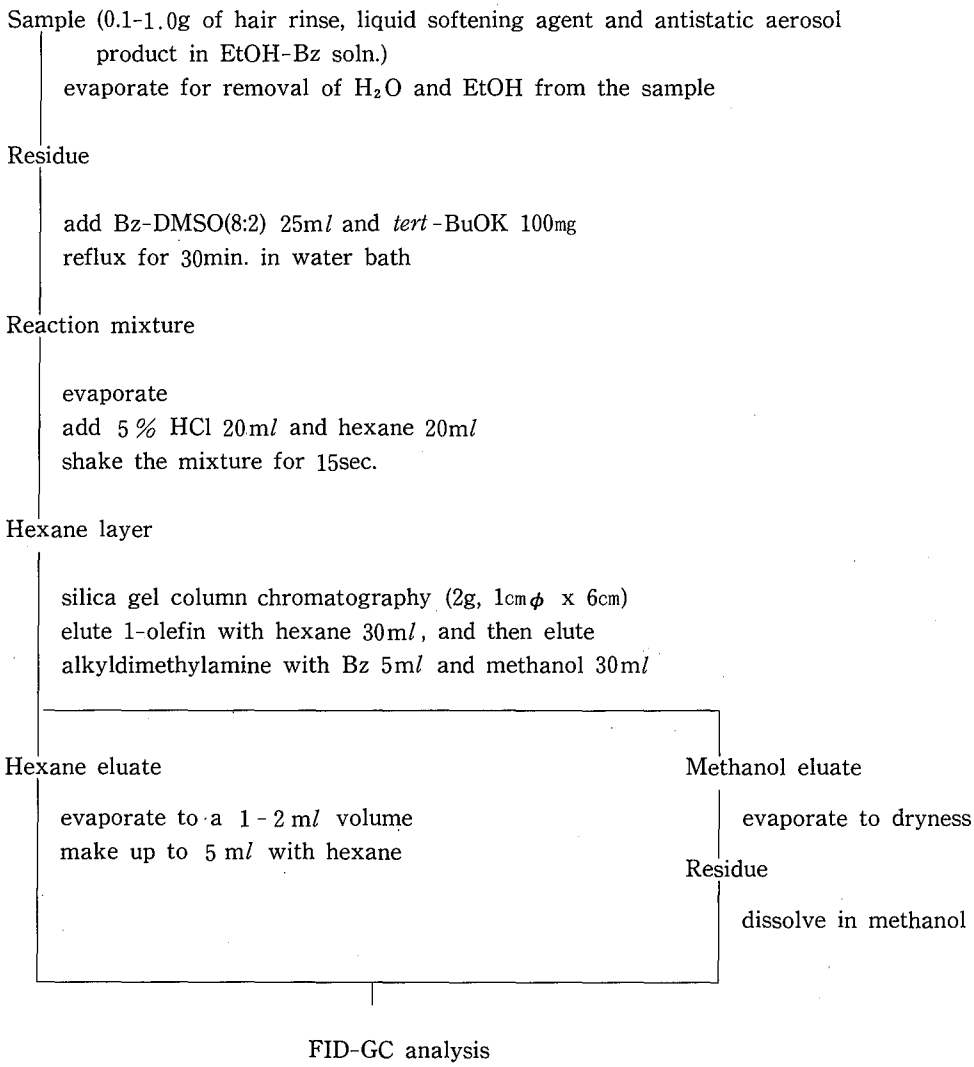


Chart 3. Analytical Method for Alkyltrimethyl-and Dialkyldimethylammonium Chlorides

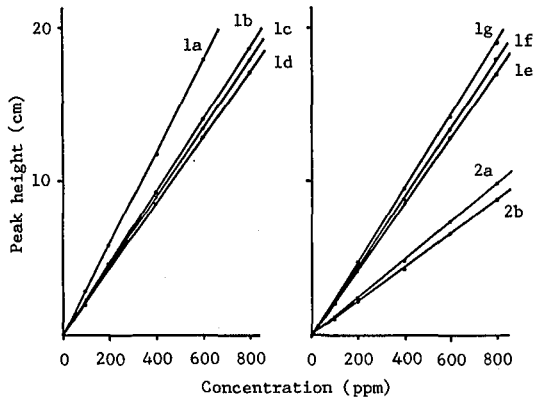


Fig. 4. Calibration Curves for Alkyltrimethyl-and Dialkyldimethylammonium Chlorides
Column teap.: 1a,130 ;1b, 150°;1c, 2a,170°; 1d 2b, 190°; 1e,210°; 1f 230°; 1g, 250°;, Range : 10^2x32, Chart speed : 5mm/min.
Other conditions were the same as those in Fig. 1 .

た．しかし，このヘキサン層を濃縮して GC 分析しても，Fig.3 のAに示すように1—オレフィンを妨害するピークが認められた．そこで，シリカゲルカラムクマトグラフィーによるクリーンアップを行い，ヘキサンで1—オレフィンを溶出し，妨害ピークを除去した（Fig.3 のB）．以上の結果から定量法を Chart 3 に示すように設定した．

3．定性分析 Chart 2 に示すように，塩化ジアルキルジメチル第四アンモニウム（**2a**, **2b**）は1—オレフィンと共にアルキルジメチルアミン **4** を生成するので，これを指標としてアルキルトリメチル体との区別が可能である．すなわち，分解後，シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得たメタノール分画を GC 分析すると，Fig.3 のCに示すようにアルキルジメチルアミンのピークを確認することができる．なお，第四アンモニウム塩の系統的な定性分析については，別報に詳述した[4]．

4．検量線 Chart 3 の定量法に従って **1a**～**1g** および **2a**, **2b** の各第四アンモニウム塩を処理し，1—オレフィンの保持時間が5分程度になるように，炭素鎖に応じてカラム温度を130°, 150°, 170°, 190°, 210°, 230°, 250°に設定して測定した．Fig.4 に示すように，検量線はいずれも100～800ppm の濃度範囲で良好な直線性を示した．

5．添加回収実験 「実験の部4」に示した処方に従って自家製リンス剤を作成し，これより第四アンモニウム塩の回収率を調べた．リンス剤0.5gに対し**1b**, **1d**, **1f**, **2a**, **2b** をそれぞれ1,2,3mg 添加し，Chart 3 の定量法に従って GC 分析を行った．その結果，Table 3 に示すように回収率は96.3～102.0%であり，そのときの C.V.は1.0～3.0%と極めて良好であった．従って本法は，定量性，再現性共にすぐれており，実試料に対して十分適用できることがわかった．

Table 3. Recovery of Alkyltrimethyl- and Dialkyldimethylammonium Chloride from Hair Rinse Soln.

Sample	Compound	Added (mg)	Ave. recovery (n= 3) (%)	C.V. (%)
Hair Rinse[1)]	1b	1.0	97.0	2.9
		2.0	102.0	1.0
		3.0	97.0	3.0
	1d	1.0	98.1	1.5
		2.0	96.4	1.7
		3.0	96.9	2.0
	1f	1.0	101.7	1.7
		2.0	98.3	1.0
		3.0	98.3	1.0
	2a	1.0	98.7	1.9
		2.0	96.3	2.7
		3.0	101.6	1.6
	2b	1.0	101.0	1.0
		2.0	100.0	1.4
		3.0	100.0	1.0

1) The quaternary ammonium chloride were added to 0.5g of handmade hair rinse soln. The hair rinse formula is follows : cetyl alcohol 0.5%, propyleneglycol 4%,methylcellulose(#4000)1%,colour and perfume q.s. the whole quantity 100% with purified water.

6．市販製品の分析結果 Table 4 に市販のヘアーリンス剤6種，衣料用柔軟仕上げ剤2種，帯電防止用エアゾール製品2種の分析結果を示す．なお，包装に表示のない場合は塩の構成陰イオンは不明であるが，すべて塩化物として測定した．ヘアーリンス剤は，6種中3種が C_{16}, C_{18}のアルキル基を主体とするアルキルトリメチル体の同族体であり，その総含有量は0.66～0.87%であった．また，2種は C_{20}, C_{22} を主体とし，他の1種は C_{16}, C_{18}のジアルキルジメチル体の同族体で，それらの総含有量は1.36～1.76%であった．衣料用柔軟仕上げ剤は，2種共にジアルキルジメチル体を含有し，総含有量は3.85%，4.08%であった．エアゾール製品については，

Table 4. Analytical Results of Alkyltrimethyl- and Dialkyldimethylammonium Chlorides in Commercial Hair rinses, Liquid Softening Agents and Antistatic Aerosol Products

Sample		Type of the Compound	Quaternary ammonium chloride content (%)							Total (%)
			C_{12}	C_{14}	C_{16}	C_{18}	C_{20}	C_{22}	C_{24}	
Hair rinse	A	1		0.01	0.34	0.34				0.69
	B	1		0.01	0.15	0.71				0.87
	C	1		0.03	0.57	0.06				0.66
	D	1				0.08	0.23	1.02	0.03	1.36
	E	1				0.11	0.20	1.32	0.03	1.66
	F	2			0.62	1.14				1.76
Softening agent	G	2			1.18	2.67				3.85
for clothes	H	2			1.28	2.80				4.08
Antistatic	I	1	0.12	0.05	0.02	0.03				0.22
aerosol product	J	2			0.44	1.06				1.50

衣料用帯電防止剤が同様にジアルキルジメチル体を1.50%含有していた．またプラスチック用の帯電防止剤はC_{12}，C_{14}，C_{16}，C_{18}のアルキルトリメチル体で，その総含有量は0.22%であった．以上，本定量法によって，市販製品中の第四アンモニウム塩の同族体を分析することができた．本法は，第四アンモニウム塩の定量法として簡便で実用的な方法と考えられる．

結　論

塩化アルキルトリメチルおよびジアルキルジメチル第四アンモニウムは，*tert*-BuOK による分解反応によって定量的に1—オレフィンを生成する．この1—オレフィンを FID-GC で測定し，第四アンモニウム塩およびその同族体の定量法を確立した．

本法は，市販製品のヘヤーリンス剤，衣料用柔軟仕上げ剤および帯電防止用エアゾール製品に有効に適用することができた．また，塩化ジアルキルジメチル第四アンモニウムは分解反応によって1—オレフィンと共にアルキルジメチルアミンを生成するが，これを GC 上確認すればそれらとアルキルトリメチル体との区別が可能であり，定性分析として役立つことがわかった．以上本法は，長鎖アルキル第四アンモニウム塩およびその同族体の GC 分析法として簡便で実用的な方法である．

謝辞　本研究にあたり，第四アンモニウム塩の標品を供与いただいた花王石鹸㈱　長谷川　章氏に深謝します．

文　献

1）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**，138，1984
2）E.C.Jennings, and H.Mitchner, *J. Pharm. Sci.*, **56**, 1590, 1967
3）宇野豊三，宮嶋孝一郎，中川照真：分析化学，**15**，384，1960
4）鈴木助治，酒井正美，池田一夫，森　謙一郎，雨宮敬，渡辺四男也：東京衛研年報，**36**，**101**，1985

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 115-122, 1985

家庭用品の衛生化学的研究（第15報）
ガスクロマトグラフィーによるぬれティッシュ，清浄綿および消毒綿中の塩化ベンザルコニウムの定量法について

鈴木助治*，酒井正美*，池田一夫*，森　謙一郎*，
雨宮　敬*，江波戸舉秀*，渡辺四男也*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XV)
Analytical Method of Benzalkonium Chlorides in Disposable Wet Tissues, Skin Cleansing Cotton and Skin Disinfection Cotton by Gas Chromatography

SUKEJI SUZUKI*, MASAMI SAKAI*, KAZUO IKEDA*, KENICHIRO MORI*, TAKASHI AMEMIYA*, KIYOHIDE EBATO* and YOHYA WATANABE*

A simple method for determination of benzalkonium chloride by gas chromatography was developed. C_{12}, C_{14} and C_{16}-alkylbenzyldimethylammonium chlorides were decomposed with potassium *tert*-butoxide in benzene under reflux for 30 minutes. Gas chromatography of the reaction products revealed formation of benzyldimethylamine, alkyldimethylamine and 1-olefin corresponding to the long chain alkyl group of benzalkonium chloride. Using the peak of 1-olefin separated from the reaction products by extraction, benzalkonium chloride was determined with good reproducibility. On the other hand, the formed benzyldimethylamine and alkyldimethylamine were useful for identification of benzalkonium chloride. The present method was applied to determination of contents and alkyl homologous distributions of benzalkonium chlorides in commercial skin cleansing cotton, skin disinfection cotton and wet tissues. The contents per package were 0.83—0.89mg, 4.63—5.17mg and 5.82—29.1mg respectively; distribution was 58.8—63.0% for C_{12} homolog, 27.5—36.8% for C_{14} homolog and 4.4—12.7% for C_{16} homolog to the total benzalkonium chloride content. The method established in this study facilitates detection of benzalkonium chloride at the milligram level by gas chromatography.

Keywords: benzalkonium chloride, 1-olefin, wet tissue, skin cleansing cotton, skin disinfection cotton, gas chromatography, modified Hofman degradation

緒　言

ベンザルコニウム塩は抗菌作用と洗浄作用を合せもつ陽イオン界面活性剤であり，防腐，殺菌剤として広範囲に用いられている．これらは一般に塩化物で使われている場合が多く，塩化ベンザルコニウム（BC）は日本薬局方に収載されている．BC は従来より外皮用消毒剤として10%溶液が市販されており，実際には使用時に0.05—0.2%液に希釈して手指，皮膚や医療用具の殺菌消毒に用いる[1]．また，日本薬局方脱脂綿や精製脱脂綿に0.1%BC を吸収させた消毒綿あるいは0.01%BC を吸収させた清浄綿は，いわゆる衛生綿類で手指，皮膚，口腔，乳首などの清浄，清拭に産院や乳児院において繁用されており，従ってこれらは医薬部外品として製造基準が設けられている[2]．最近，家庭用の一般雑貨品として各

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjukuku, Tokyo, 160 Japan

種のぬれティッシュ（wet tissue）が市販されているが，これらは紙または綿紙を材質としたものにエタノールやBC を含浸させたもので，主として食事前後の手指の清浄，清拭のために使用されている．しかし，市販のぬれティッシュに関しては，BC の使用基準はなく，繁用されているにもかかわらず含有量の実態は不明であるため，市販品の BC 含有量の調査が必要である．

BC の分析法はベンジル基の紫外部吸収(254nm)を利用し，液体クロマトグラフィー(HPLC)で行っているものが多い[3-6]．これに対してガスクロマトグラフィー(GC)による分析は，BC が強極性のイオン化合物であり，当然，難揮発性であることから直接行うことはできないが，最近，著者らは前報[7,8]においてアルキルトリメチル第四アンモニウム塩，ジアルキルジメチル第四アンモニウム塩の GC 分析法を開発している．これは塩基としてカリウム *tert*-ブトキシド（*tert*-BuOK）を用いて第四アンモニウム塩を緩和な条件で分解し，長鎖アルキル基を1-オレフィンに変換して GC 分析する方法である．そこで，今回，著者らはこの方法を炭素数 C_{12}，C_{14}，C_{16} のアルキル基を有する BC に適用し，GC による定量法を検討した．また，若干の清浄綿，消毒綿，ぬれティッシュの BC 含有量の測定を実施した．

実験の部

1．試料　分析に供した清浄綿1種，消毒綿1種，ぬれティッシュ11種および消毒液1種は，1984年10月から1985年3月までの間に都内の小売店より購入した．包装シールされた袋づめのものは，1包中に含まれる全内容物をとり，また，1枚づつとりだせるペーパーティッシュは，1－5枚をとって試料とした．このうち材質が紙のものは，3－4 cm^2 に切って試料に用いた．

2．試薬　塩化ドデシルベンジルジメチル第四アンモニウム(**1a**)：花王石鹸㈱製，純度97.6%，塩化テトラデシルベンジルジメチル第四アンモニウム（**1b**）：東京化成工業製(特級)，塩化ヘキサデシルベンジルジメチル第四アンモニウム（**1c**）：東京化成工業製（特級），1-ドデセン，1-テトラデセン，1-ヘキサデセン，*tert*-BuOK：和光純薬工業(特級)，アルキルジメチルアミン(ADMA，アルキル基：ドデシル，テトラデシル，ヘキサデシル)，ベンジルジメチルアミン(BDMA)：東京化成工業製(試薬一級)，重クロロホルム：メルク社製（99.7%），その他の試薬はすべて特級を用いた．

BC 標準溶液：**1a**，**1b**，**1c** の100 mg を精秤し，それぞれベンゼン（Bz）20m*l* に加温して溶かし，Bz を加えて100m*l* とした．

3．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）：日本電子社製 JMS—D300 型，核磁気共鳴装置（^{1}Hおよび^{13}C—NMR）：日本電子社製 JMN—FX270型，^{1}H269.65 MHz，^{13}C 67.8MHz．

4．試験溶液の調製

4－1．抽出法　包装シールされた試料は，袋ごと秤量してから開封し，材質が綿のものはそのまま，また，紙のものは3－4 cm^2 に切って200m*l* のナス形フラスコにとる．袋づめはその内側に BC が残留しているため，エタノール（EtOH）で洗い内容物をフラスコに入れて全量 EtOH 100m*l* とする．この袋は風乾後，秤量し試料量をはかる．なお，綿の場合は抽出中に浮上してくるため，ピンセットを入れて押える．1枚づつとりだせるティッシュペーパーについては，1－5枚を3－4 cm^2 に切って秤量し，薬包紙ごと200m*l* のナス形フラスコにとり，EtOH 100m*l* を加える．これらを水浴中で還流しながら30分間，加熱抽出したのち，熱時，G 2 ガラスフィルターを用いて吸引ろ過する．ろ過物は EtOH 20m*l* で3回押し洗い，ろ過し，ろ液を合せて濃縮乾固する．

4－2．*tert*－BuOK による分解　先に得た残渣に *tert*-BuOK 100mg，Bz 25m*l* を加えて30分間，加熱還流する．冷後，反応溶液を100m*l* の分液ロートに移し，フラスコを Bz 5m*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%塩化ナトリウム溶液 20m*l* で1回それぞれ15秒間振とう洗浄する．Bz 層を分取し，これにn-ノナン 1 m*l* を加え，40°以下で液が1－2 m*l* になるまで減圧下濃縮する．この残液を目盛付試験管に移し，ヘキサンで5 m*l* とし GC 用試験溶液とする．

5．定性分析　4－2で得られた5%塩酸溶液に20%水酸化ナトリウム溶液を加えて液性をアルカリ性としたのち，ヘキサン 5 m*l* で振とうする．ヘキサン層を分取し，5 μl を GC に注入する．GC 測定条件に従って昇温分析を行い，BDMA および ADMA のピークを確認する．これより BC の同定を行う．

6．定量分析　BC 標準溶液よりそれぞれ0.5，1，2，3，4 mg をとり，以下4－2に従って操作し，100，200，400，600，800ppm の濃度系列を調製し，これらと試験溶液の5 μl を GC に注入する．GC 測定条件に従って恒温分析し，ピーク高より検量線を作成し試験溶液中の BC の濃度を求める．

FID—GC 測定条件　カラム：5%SE—30（クロモソ

ルブW　AW—DMCS, 80—100メッシュ), 3 mmϕ×2 mガラスカラム, 試料注入口および検出器温度：250°, カラム温度：アルキル基の炭素数C_{12}　130°, C_{14}　150°, C_{16}　170°, 昇温分析120°→270°, 6°/min (チャートスピード　2.5mm/min), キャリアガス：N_2　40 ml/min, H_2　0.7 kg/cm^2, air　1 kg/cm^2.

GC—MS 測定条件　カラム：5%SE—30 (クロモソルブW　AW—DMCS, 80—100メッシュ), 4 mmϕ×2 m, カラム温度：100°→270°, 8°/min, キャリアガス：N_2　40ml/min.

NMR　試料を重クロロホルムに溶かし, 綿栓ろ過後, 5 mmϕ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として化学シフト (δppm) を示した.

実験結果および考察

1. 抽出法の検討　清浄綿の BC(1包当り0.80—0.86 mgを含有する)については, 植田ら[5]がすでに0.05N 塩酸—メタノール (1：1) の混合溶媒でろ過しながら押し洗いする抽出法を報告しているが, この方法では溶媒の濃縮に長時間を要し, 且つ塩酸の完全除去が困難なため, ここでは EtOH を溶媒とした加熱抽出法を検討した. すなわち, BC を含有する市販の消毒綿について, EtOH 100mlを加えて加熱還流したところ, Fig.1に示すように, アルキル基の炭素数がC_{12}, C_{14}, C_{16}のいずれの BC においても10分間以上の加熱処理で一定の抽出率を示した. そこで, 抽出法は EtOH を用いて30分間加熱還流後, 吸引ろ過し, 濃縮乾固することにした. この方法は濃縮が短時間ですみ, 抽出回数も1回で十分であった.

2. 反応条件の検討　前報[7,8]において Bz—DMSO (8：2) の混合溶媒中 *tert*-BuOK の存在下で長鎖アルキル第四アンモニウム塩の分解反応を検討し, アルキル基に対応する1-オレフィンの生成を報告した. アルキルトリメチル体 (C_{14}, C_{18}, C_{22}) およびジアルキルジメチル体(C_{16}, C_{18})については, 定量的に1-オレフィンが生成することを確認しているが, BC(C_{14}, C_{16})は, これらに比べてかなり FID—GC の感度がわるく, 1-オレフィンの生成率が低いことが推察された[7]. そこで, 今回, あらためて BC の分解反応について検討を加えた. Chart 1 に示す**1a**—**1c**の各30mg を Bz 中 *tert*-BuOK (100mg) で分解したのち, 反応生成物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル60, 2 g, 1 cmϕ×7 cm) に付し, Bz, ついでメタノール (MeOH) で溶出した. Bz 分画は, FID—GC の昇温分析で保持時間 (t_R) 4.0, 7.3, 11.0min のピークとそれらの GC—MS がM^+ m/e　168, 196, 224を示すことから, それぞれ1-ドデセン, 1-テトラデセン, 1-ヘキサデセンが認められ, 1-オレフィン2の生成を確認した. 一方, MeOH 分画は, t_R　2.3, 9.3, 13.1, 16.5min, GC—MS でM^+ m/e 135, 213, 241, 269を示し, また, いずれも^{1}H—NMR($CDCl_3$) δ2.21(s), 3.39(s), 7.28と0.88(t, J=6.6Hz), 2.23(s) ppm, ^{13}C—NMR($CDCl_3$) δ46.2(q), 65.3(t), 127.8(d),

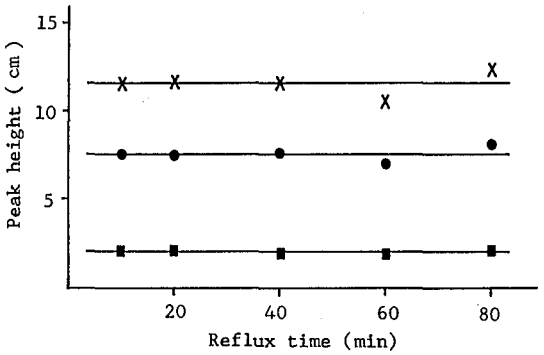
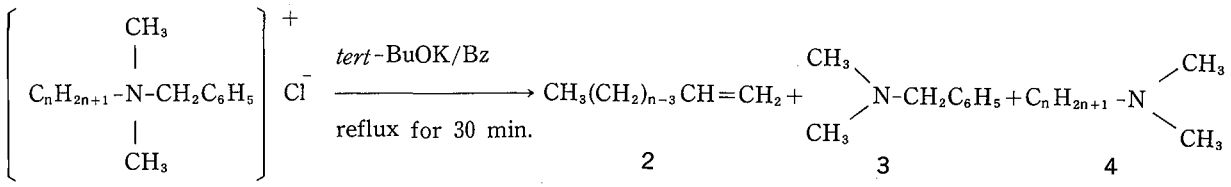


Fig. 1. Effect of Reflux Time on the Extraction of Benzalkonium Chlorides from Skin Disinfection Cotton

The plots show the peak heights of 1-olefin formed by degradation of benzalkonium chlorides :-×-, 1-dodecene ; -●-, 1-tetradecene ; -■-, 1-hexadecene. GC conditions of programmed temperature analysis were the same as those in Chart 2.



1a : n=12
1b : n=14
1c : n=16

Chart 1

129.0(d), 129.8(d), 139.9(s)と14.2(q), 45.5(q), 60.1(t)ppm にシグナルが認められた. これらのデータから, BDMA 3 とやはりアルキル基に対応した ADMA 4 (n＝12, 14, 16) が生成していることがわかった. 従って, Chart 1 に示すように, 1 の分解は脱離反応と置換反応が同時に進行していることになる. ここで, 脱離反応は溶媒の極性と塩基の濃度によって影響を受けるため, さらに反応条件を詳細に調べた. まず, *tert*-BuOK の添加量について検討するため, **1a** (5 mg)に対して Bz 中 *tert*-BuOK の添加量を40, 80, 120, 160, 200mg と増加させ, 分解後, 反応溶液と同量の10%塩化ナトリウム溶液で1回洗浄し, FID—GC の昇温分析で1-ドデセン, BDMA, ドデシルジメチルアミンのピークを観察したところ, それらの生成率に大きな変化はみられず, *tert*-BuOK の添加量による影響は認められなかった. つぎに, 溶媒効果について検討するため, **1a**—**1c** の各5 mg に対して *tert*-BuOK 100mg を加え, Bz—DMSO の混合比を変えて前述と同様に操作し, 1-オレフィン, BDMA および ADMA のピークを観察した. その結果, Fig.2に示すように DMSO 濃度の増加と共に1-オレフィンの生成率が低くなり, これに対して ADMA は逆に増大することが明らかになった. 従って, 反応溶媒として Bz を用いた方が, 反応の選択性が増し, 1-オレフィンの生成率がよいことがわかった. しかし, なお ADMA のピークが若干認められるので, さらに, この分解反応について検討した. **1a**—**1c** の各5 mg を前述と同様の条件下, Bz 中で反応させ, 1-オレフィン, BDMA, ADMA を定量した. Table 1 に示すように, 1-オレフィンの生成率はそれぞれ56.6, 56.6, 57.0%であり, BDMA の生成率とほぼ一致している. 変動係数(C.V.)も1.0—1.5%と小さく, 一定の条件下で分解すると, きわめて再現性よく反応が進行することがわかった. 以上の結果から, BC の分解は Bz を反応溶媒とし, *tert*-BuOK の添加量を100mg として行った.

2. 定性分析 分解反応より生成した1-オレフィンのピークから, BC の判定はできないが, BDMA, ADMA のアミン類を利用して BC の同定が可能である. Chart 2 に示すように反応溶液を10%塩酸で洗浄したとき, この水層をアルカリ性としヘキサンでアミン類を再抽出し, FID—GC の昇温分析を行うと, BDMA と ADMA のピークから BC を同定することができる. この方法を市販の消毒綿に適用したところ, Fig.3に示すように主として C_{12}, C_{14}の同族体を含有していることがわかった. なお, 長鎖アルキル第四アンモニウム塩の同定法について, 前報[10]に詳述してある.

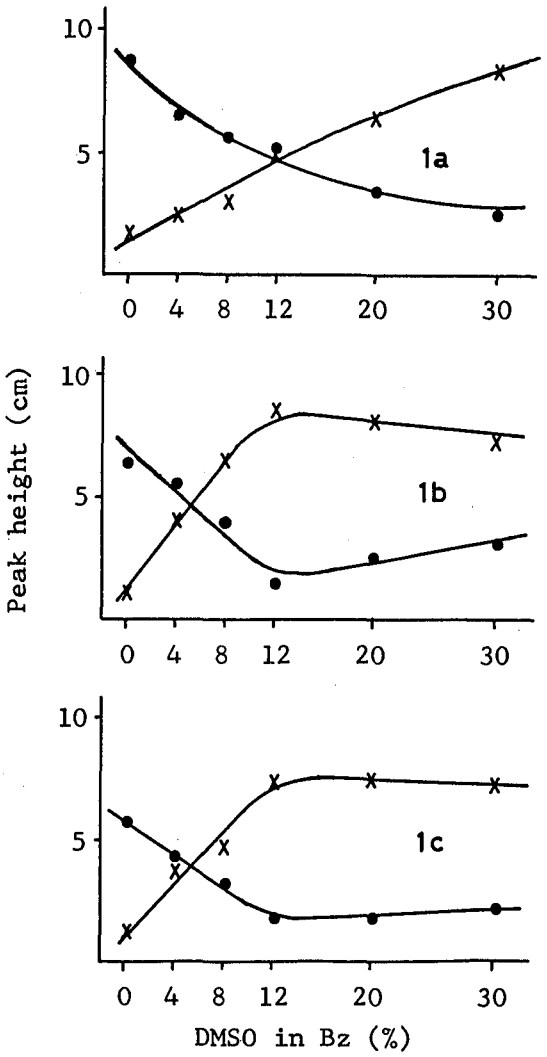


Fig. 2. Effect of Dimethylsulfoxide (DMSO) on the Formation of l-Olefin and Alkyldimethylamine (ADMA)
-●-: l-olefin, -×-: alkyldimethylamine
GC conditions of programmed temperature analysis were the same as those in Chart 2

4. 定量分析および検量線 以上の検討の結果から, Chart 2 に示すように定量法を設定した. この際, Bz 層を濃縮乾固すると, 1-ドデセンや1-テトラデセンが揮散するので, あらかじめ Bz 層に n-ノナンを添加し, 残液が1—2 m*l* になるまで減圧下濃縮を行った. Fig.4に本定量法で測定した消毒綿と **1b** のガスクロマトグラムを示す. FID—GC の恒温分析では, 特に1-オレフィンのピークに妨害するものは認められない. また, 検量

線はたて軸にピーク高，よこ軸に濃度をとってプロットすると，Fig.5に示すように，**1a**—**1c** は 100—800ppm の濃縮範囲で原点を通る直線が得られた．このときのカラム温度は，1-オレフィンの t_R が約5 min ぐらいになるように，**1a** は130°，**1b** は150°，**1c** は170°に設定して測定した．

5．添加回収実験　本定量法の実試料への適用性を調べるため，回収実験を行った．すなわち，清浄綿の製造承認例[9]に準じて50m*l* のビーカーに日本薬局方脱脂綿1.7gをとり，**1a** および **1b** の0.5, 1.0, 2.0mg をそれぞれ0.02%水溶液として加え，さらに加水して全量10m*l* として吸収させた．これをアルミホイルでおおい，オートクレーブ中120°，30分間高圧蒸気滅菌した．冷後，「実験の部」に従って GC 分析したところ，Table 2 に示す

Table 1. Yield Rate and Reproducibility of 1-Olefin and Amines Formed from Benzalkonium Chloride

Compound	1-Olefin[1]		BDMA[1]		ADMA[1]	
	Yield rate (%)	C.V. (%)	Yield rate (%)	C.V. (%)	Yield rate (%)	C.V. (%)
Ia	56.6	1.0	56.4	1.5	18.2	3.3
Ib	56.6	1.5	56.4	0.7	19.7	1.4
Ic	57.0	1.0	60.1	0.9	23.0	0.9

1) Taken as the average of 3 replicate analyses.

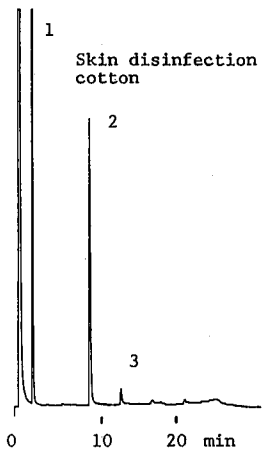


Fig. 3. Gas Chromatogram of Benzyldimethylamine (BDMA) and Alkyldimethylamine (ADMA)

1 : BDMA, 2 : dodecyldimethylamine, 3 : tetradecyldimethylamine
GC conditions were the same as those of programmed temperature analysis in Chart 2.

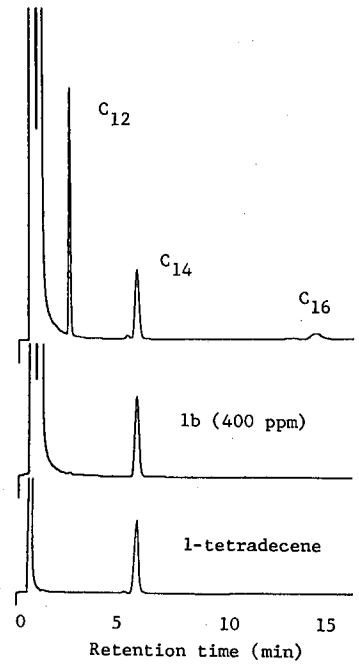


Fig. 4. Typical Gas Chromatogram of 1-Olefins from the Skin Disinfection Cotton

Column temp.: 150°, Range : $10^2 \times 16$

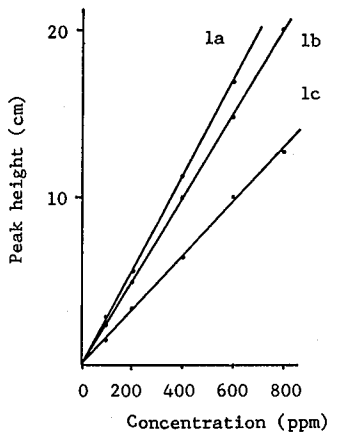


Fig. 5. Calibration Curves for Benzalkonium Chlorides

Column temp.: 1a, 130°; 1b, 150°; 1c, 170°, Range : $10^2 \times 16$

sample (the whole substance in a package of sanitary cottons and wet tissues)

refluxed with 100 m*l* of EtOH for 30 min.
filtrated and evapd.

residue

Bz 25 m*l*
tert-BuOK 100 mg
refluxed for 30 min.

reaction mixture

washed the Bz soln. with 20 m*l* of 5% HCl twice, and then 20 m*l* of 10% NaCl

Bz layer	HCl aq. layer
added 1 m*l* of *n*-nonane and evapd. to 1-2 m*l* of residual soln. made up to 5 m*l* with hexane	changed into alkalinity with 20% NaOH shaked with 5 m*l* of hexane
FID-GC, isothermal analysis	hexane layer
	evapd. to 0.5-1 m*l* of residual soln.
	FID-GC, programmed temperature analysis

GC conditions: 5% SE-30/chromosorb WAW-DMCS (80-100 mesh), 3mmϕ x 2m; Injection and detection temp., 250°; Carrier gas, N_2 40 m*l*/min.; Sample size, 5 μ l; Range, 10^2 x 16; Column temp. for isothermal GC analysis: C_{12}, 130°; C_{14}, 150°; C_{16}, 170°; Chart speed, 5 mm/min,; Column temp. for programmed temperature GC analysis: 120°⟶270°; Program rate, 6°/min.; Chart speed, 2.5 mm/min.

Chart 2. Analytical Method of Benzalkonium Chloride

ように回収率は96.2—101.6%, C.V. 3%以下であった. 従って, BC は精度よく定量できることがわかった.

6. 市販製品中の BC 含有量 本定量法を用いて清浄綿1種, 消毒綿1種の BC を測定し, また, ぬれティッシュ11種は塩の構成陰イオンが不明であるが, BC として測定を行った. その結果を Table 3 に示す. 市販製品に含有していた BC の同族体は, C_{12}, C_{14}, C_{16}のアルキルベンジルジメチル第四アンモニウム塩が主体であり, そ

れらの分布は，C_{12}のものが58.8—63.0%，C_{14}が27.5—36.8%，C_{16}が4.4—12.7%であった．この値は中村ら[4]がHPLCで分析したBCの分布とほぼ一致するものである．清浄綿のBCは，医薬部外品の製造基準[2]によって0.01%以下の濃度で配合されるが，Table 3に示すように1包当りの含有量は，0.83—0.89mgで植田ら[5]がすでにHPLCで行った測定結果(0.80—0.86mg/1包)とよく一致した．また，消毒綿に関しては，同一ロットの製品を5検体測定し，実試料における分析精度を調べた．その結果，1包当りの含有量は，平均4.84mg，C.V.4.1%で若干のバラツキが認められたが，C_{12}, C_{14}, C_{16}のBC分布量のC.V.は，それぞれ0.6, 1.0, 1.8%と変動がきわめて少なく，1包当りの含有量のバラツキは，同一ロット内に含有される内容量のちがいに基づくものであり，定量法自体の精度はよいものと考えられる．つぎに，ぬれティッシュについては，いわゆる一般消費者が生活に供する家庭用品であり，多種多様のものが市販されているが，現在，BCに関する基準はない．今回，11種の製品について調査したところ，3種よりBCが検出された．いずれも清浄綿より含有量が高く，製品Aは清浄綿の7倍，Bは11倍，Cは，内容物が約9gとほぼ同じ試料量にもかかわらず，35倍にも達している．これらは食事前後のおしぼりとして手足の汚れやおむつの交換時の肌の清浄，化粧落とし等の用途に使われている．従って，BC含有のぬれティッシュが現に衛生上の用に供されるものであるかぎり，清浄綿と同様に使用基準等何らかの規制を設ける必要があると考える．

Table 2. Recovery of Benzalkonium Chloride from Absorbent Cotton

Sample	Compound	Added (mg)	Ave. recovery (n=3) (%)	C.V. (%)
Absorbent cotton[1]	Ia	0.5	99.9	1.7
		1.0	97.1	2.9
		2.0	101.6	2.1
	Ib	0.5	96.2	2.2
		1.0	98.9	1.7
		2.0	100.4	2.6

1) Benzalkonium chloride in 10 ml of H_2O were added to absorbent cotton (1.7g), and then treated by autoclave at 120° for 30 min.

結　論

BCはBz中*tert*-BuOKと加熱還流するとき，1-オレフィン，ベンジルジメチルアミンおよびアルキルジメチルアミンを与え，その生成比率は再現性がよく，1-オレフィンをGC分析することによりBCを精度よく定量することができた．また，ベンジルジメチルアミンおよびアルキルジメチルアミンは，BCの同定に役立

Table 3. Analytical Results of Commercial Sanitary Cottons and Wet Tissues Contained Benzalkonium Chloride

Sample		Net weight (g)	Content (mg/package)				Homologous distribution (%)		
			C_{12}	C_{14}	C_{16}	Total	C_{12}	C_{14}	C_{16}
Skin cleansing cotton		9.96	0.47	0.27	0.09	0.83	56.7	32.5	10.8
		9.65	0.49	0.26	0.08	0.83	59.0	31.8	9.7
		9.68	0.51	0.29	0.09	0.89	57.5	32.7	10.1
Skin disinfection cotton		6.83	2.85	1.75	0.22	4.82	59.1	36.3	4.6
		6.65	2.76	1.66	0.21	4.63	59.6	35.8	4.6
		6.70	2.83	1.77	0.21	4.82	58.8	36.8	4.4
		7.18	3.07	1.86	0.23	5.17	59.5	36.1	4.5
		7.13	2.83	1.72	0.21	4.76	59.5	36.1	4.5
			Ave. 2.87	1.75	0.22	4.84	59.3	36.3	4.5
			c.v. 3.8	4.0	4.5	4.1	0.6	1.0	1.8
Wet tissue	A	14.67	3.67	1.72	4.40	5.82	63.0	29.5	7.5
	B	2.32[1]	5.41	2.49	1.15	9.06	59.8	27.5	12.7
	C	9.05	17.71	8.75	2.64	29.10	60.9	30.1	9.1
10% benzalkonium chloride soln. for disinfection			6.02[2]	3.64[2]	1.07[2]	10.76[2]	56.3	33.8	9.9

1) A sheet of wet tissue.
2) Expressed as per cent of benzalkonium chloride content.

ち，定性分析として有効であった．本定量法を清浄綿，消毒綿およびぬれティッシュの分析に適用したところ，BC含有量は，それぞれ1包当り0.83—0.89mg，4.63—5.17mg，5.82—29.1mgであり，その同族体の分布は，C_{12}が58.8—63.0%，C_{14}が27.5—36.8%，C_{16}が4.4—12.7%であった．本法は緩和な条件でBCを分解することができ，簡便で実用的な定量法である．

謝辞　本研究にあたり終始御協力をいただいた衛生局薬務部薬事衛生課家庭用品担当，井藤秀雄氏ならびに大角悦子氏に深謝します．

文　献

1）大阪府病院薬剤師会編，薬事時報社：医薬品要覧，760，1984
2）日本公定書協会編，薬事時報社：医薬品製造指針，351，1984
3）R.C.Meyer, *J.Pharm.Sci.*,**69**, 1148, 1980
4）K.Nakamura, Y.Morikawa and I.Matsumoto, *J.Am.Oil Chem.Soc.*,**58**, 72, 1981
5）植田忠彦，風間成孔：東京衛研年報，**35**，159，1984
6）佐藤仁尤，本橋晴美，三輪　昭：日本薬学会第104年会講演要旨，568，1984
7）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**，138，1984
8）酒井正美，池田一夫，森　謙一郎，雨宮　敬，鈴木助治，観　照雄，渡辺四男也：東京衛研年報，**36**，108，1985
9）日本清浄綿工業会：医薬部外品「清浄綿」製造承認申請要項，1980
10）鈴木助治，池田一夫，森　謙一郎，雨宮　敬，酒井正美，渡辺四男也：東京衛研年報，**36**，101，1985

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 123-128, 1985

家庭用品の衛生化学的研究（第16報）
市販衣料品中の抗菌防臭加工剤・イルガサン DP—300 およびチアベンダゾールの溶出試験について

雨宮　敬*, 酒井正美*, 池田一夫*, 森　謙一郎*,
鈴木助治*, 渡辺四男也*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XVI) Dissolution Test of Irgasan DP—300 and Thiabendazole Used as Sanitary Finishing Agent in Commercial Textile Products

TAKASHI AMEMIYA*, MASAMI SAKAI*, KAZUO IKEDA*, KENICHIRO MORI*,
SUKEJI SUZUKI*and YOHYA WATANABE

Under the condition of extraction at 40°C for 60 minutes, dissolution test of Irgasan DP—300 and thiabendazole, used as an antimicrobial agent and sanitary finishing agent, was performed on commercial textile products and cotton fabrics experimentally treated with them in the laboratory.

Irgasan DP—300 and thiabendazole were simultaneously determined by high performance liguid chromatography on an octadecyl bonding silica gel column (Finepak SIL C18) with ultraviolet detection. The amout of Irgasan DP—300 dissolved in acidic artificial perspiration (pH 4.5), water (pH 6.6) and alkaline artificial perspiration (pH 8.9) increased in the order of the alkalinity of the dissolution solution, and varied with the kinds of fabrics.

Keywords: Irgasan DP—300, thiabendazole, sanitary finishing agent, high performance liquid chromatography, textile product, dissolution test, artificial perspiration

緒　言

従来，抗菌性の強さから有機水銀化合物，有機スズ化合物が繊維製品の衛生加工剤として広く用いられてきた．しかし，その毒性から昭和48年「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」によって有機水銀化合物，有機スズ化合物のうちトリフェニルスズおよびトリブチルスズ化合物の使用が禁止された[1]．昭和56年に抗菌，防臭加工を施したくつ下が発売されて以来，現在では下着，スポーツウエア，寝衣，寝具等の繊維製品にも抗菌・防臭加工が施されている[2]．これらの加工剤として主にイルガサン DP—300(DP—300)，チアベンダゾール(TBZ) および有機シリコーン系第四アンモニウム塩が用いられている[2,5]．著者らは，すでに昭和59年度において高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による DP—300 および TBZ の定量法を設定し，本定量法を用いて下着，くつ下等の市販繊維製品の調査を行い，DP—300 と TBZ の含有量を報告した[3]．これらの加工剤は，水に対する親和性を有することから，このような衣料品を着用したとき，当然，汗などによって体表面への移行が考えられるが，水や人工汗に対する溶出試験の報告例はみられず，量的にどの程度移行するものかわかっていない．人体汗は発汗時と発汗後では pH に変化が認められており[4]，DP—300 と TBZ の化学的性質を考えると，特に日本工業規格で規定されているアルカリ性人工汗液に対する溶出性に興味がもたれる．

そこで今回は，前述の調査[3]において用いた市販繊維製品について，水，酸性人工汗液およびアルカリ性人工汗液に対する DP—300 および TBZ の溶出量を把握

* 東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究料　160　東京都新宿区百人町 3 —24— 1
* The Tokyo Metroporitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

する目的で本調査を行い，若干の知見が得られたので報告する．

実験方法

1．試薬 DP—300 標準溶液：DP—300（チバガイギー社製）100mg を精秤し，メタノール（MeOH）に溶かして全量100m*l* とする．TBZ 標準溶液：TBZ(東京化成工業製)100mg を精秤し，MeOH に溶かして全量100m*l* とする．これらの溶液を MeOH で希釈して100ppm 溶液を調製し，標準溶液として用いる．人工汗液：日本工業規格（JIS—L—0848；汗に対する染色堅ろう度試験方法のBおよびC法）に従って酸性人工汗液およびアルカリ性人工汗液を調製する．酸性人工汗液：塩化ナトリウム10g，乳酸１g，リン酸ニナトリウム(12水化物)2.5 g を水に溶かして全量１*l* とする（pH4.5）．アルカリ性人工汗液：塩化ナトリウム10g，炭酸アンモニウム４g，リン酸ニナトリウム(12水化物) 2.5g を水に溶かして全量１*l* とする（pH8.9）．その他の試薬は全て和光純薬工業製試薬特級を用いた．

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 C_{18}，検出器：島津製作所製紫外可視分光光度計検出器 SPD—１，GC—MS：島津製作所製 LKB—9000.

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」の表示のある繊維製品を購入し，それぞれから約50g をとり，５ mm²以下に細切し，十分に混ぜ合せて試料とした．また試料は，ポリエチレン製の袋に入れ，デシケーター中に保存して用いた．

4．DP—300および TBZ 含浸加工布の調製 DP—300 80mg, 300mg, TBZ 80mg を各々 MeOH 500m*l* に溶かしてそれぞれを 22×６×21cm の薄層クロマトグラフィー用のガラス製容器に移す．つぎに DP—300, TBZ とも検出されないことを HPLC で確認した布（サラシ生地）約 60g をガラス製容器に静かに浸せきし，フタをして一夜放置する．ピンセットを用いて布を取り出し，MeOH をよく絞って風乾する．これを DP—300 および TBZ 含浸加工布とする．含有量は，DP—300 が 380ppm および1500ppm，TBZ が 280ppm であった．

5．試験溶液の調製 試料1.0g を200m*l* 共栓試験管にとり，水，酸性人工汗液およびアルカリ性人工汗液50m*l* を別々に加える．つぎに40°の恒温水槽中で60分間放置し，ガラスろ過器（3G2）を用いて温時ろ過する．ろ液は100m*l* 分液ロートに移して室温になるまで放置する．この液に塩化ナトリウム７g を加えて溶かし，ジクロロメタン10m*l* を加えて５分間しんとうする．２層に分離後，下層のジクロロメタン層を100m*l* ナス型フラスコに分取する．さらにジクロロメタン10m*l* を加え，５分間しんとうして同様に操作し，分取したジクロロメタン層を先液に合わす．これをロータリーエバポレーターを用いてジクロロメタンを留去し，残留物に MeOH を加えて HPLC 分析用の試験溶液とする．

6．HPLC による定量分析 DP—300 標準溶液および TBZ 標準溶液を MeOH で希釈して DP—300：５，10，20，40，60，80，100ppm, TBZ：0.5，１，２，４，６，８，10ppm の標準系列を作成し，HPLC 分析条件に従って操作して検量線を作成する．また，試験溶液についても同様に操作し，ピーク高から試験溶液中の DP—300 および TBZ の濃度を求める．

HPLC 分析条件 カラム：Finepak SIL C_{18}（10 μm，内径4.6mm×250mm），移動相：0.05M 炭酸アンモニウム—メタノール(25：75)，流速：1.0m*l*/min，検出器：282nm，試料注入量：５ μl

7．GC—MS による DP—300 の確認 試料1.0g をとり，前報[3]に従って MeOH 抽出液を得る．これを約40°で MeOH を減圧下留去して酢酸エチル３ m*l* を加えて内容物を溶かし，ジアゾメタン・エーテル溶液でメチル化する．反応後，溶媒を留去し，ヘキサン１ m*l* を加えて GC—MS 測定用試験溶液とする．

GC—MS 測定条件 カラム充填剤：２% Silicone OV—１，Chromosorb W AW DMCS 80—100 mesh，カラム：ガラス製３ mmϕ×1000mm，カラム温度：220°，注入口温度：250°，キャリアガス：He 30m*l*/min，マススペクトルより m/z 302(M)⁺, 252(M—50) で DP—300 メチル化体を確認する．

結果および考察

1．DP—300 および TBZ 含浸加工布について 市販品中の DP—300，TBZ の水，酸性人工汗液およびアルカリ性人工汗液に対する溶出量を測定し，その多少を比較検討するため，まず，加工布を調製して溶出条件の検討を行った．加工布は，実験方法の DP—300 および TBZ 加工布の調製に従った．これについては，前報[3]の試験溶液調製の項に述べた方法を用いて試験溶液を得，HPLC 分析条件に従って操作して DP—300 および TBZ の量を求めた．その結果を Table１に示す．すなわち布60g に DP—300 80mg を含浸させた布を５回くり返し測定したときの平均値は380ppm であり，その時の変動係数（C.V.）は5.1%であった．つぎに DP—300 を 300mg 含浸させたものは，平均値 1500ppm，変動係数7.8%であった．さらに TBZ は80mg を布に含浸させ

Table 1. DP-300 and TBZ Content in Their Processed Cotton Fabrics

Compound	Sample weight (g)	Added (mg)	Content in processed fabrics[1] (ppm)
DP-300	60	300	1500
	60	80	380
TBZ	60	80	290

1) Taken as average in quintuplicate analysis.

たもので，平均値290ppm，変動係数2.0%であった．

2．溶出液からの DP—300 および TBZ の抽出法について 試験溶液調製後，直接 HPLC に注入したところ，溶出量が少なく測定困難な試料がみられたため，溶媒抽出を行うこととした．まず，溶媒として酢酸エチルおよびベンゼンについて試みたが，強固なエマルジョンを形成する場合がみられ実用的でなかった．つぎに，ジクロロメタン，クロロホルムについて検討を行ったところ，クロロホルムよりジクロロメタンの方が分離が良好であったので抽出溶媒としてジクロロメタンを採用した．しかし，一部の試料にエマルジョン形成がみられたため，水層に塩化ナトリウムを加えることとした．まず，塩化ナトリウムを1，2，3，4，5，6，7 gと増量させ，ジクロロメタン10m*l* を加えて5分間しんとうした．まず，5 gまでは，いずれの試料においても分離不能か分離不十分であった．さらに6，7 gでは分離が良好であったので，塩化ナトリウムの量を7 gとした．つぎに，ジクロロメタン量および抽出回数について検討を行った．すなわち，DP—300，TBZ を含有しない布の水，酸性人工汗液，アルカリ性人工汗液の各溶出液50m*l* に DP—300 および TBZ 各1000μg を添加し，塩化ナトリウム7 gを加えて溶かし，ジクロロメタン10m*l* を加えて試験溶液調製，HPLC 分析条件に従って操作したところ，1回の抽出では DP—300が90%，TBZ が87%抽出できた．さらにジクロロメタン10m*l* を加え，同様に操作したところ，両者ともほぼ定量的に抽出された．以上の検討結果から，添加する塩化ナトリウムの量を7 g，ジクロロメタンは10m*l* ずつ2回抽出することとした．

3．溶出条件の検討

3—1．溶出温度の影響について 一般に温度が上昇すると溶解度も上昇するため，温度差による DP—300，TBZ の溶出量の変動について検討を行った．まず，DP—300 加工布および TBZ 加工布1.0gにそれぞれ水，酸性人工汗液，アルカリ性人工汗液50m*l* を加え，25°（室温），40°，60°で1時間放置後，これらを試験溶液調製および HPLC 分析条件に従って操作した．Fig. 1に測定結果を示す．結果は溶出液50m*l* 中の量(μg)であり，Fig. 1に示すように DP—300 加工布（1500ppm）において，酸性人工汗液溶出では25°，400μg，40°，430μg，60°，450μg であり，温度による溶出量の差は認められなかった．また，水溶出では，25°，40°，60°における溶出量はそれぞれ550μg，670μg，690μg と多少変動が生じたが，40°および60°では差が認められなかった．つぎにアルカリ性人工汗液溶出は，酸性人工汗液および水溶出に比して溶出量は多いが，20°，1270μg，40°，1260μg，60°，1290μg とほとんど差は認められなかった．さらに別の DP—300 加工布（380ppm）については，DP—300加工布（1500ppm）の場合と同様の溶出傾向を示し，やはり，アルカリ性人工汗液での溶出が最も高い値を与え，25°，340μg，40°，

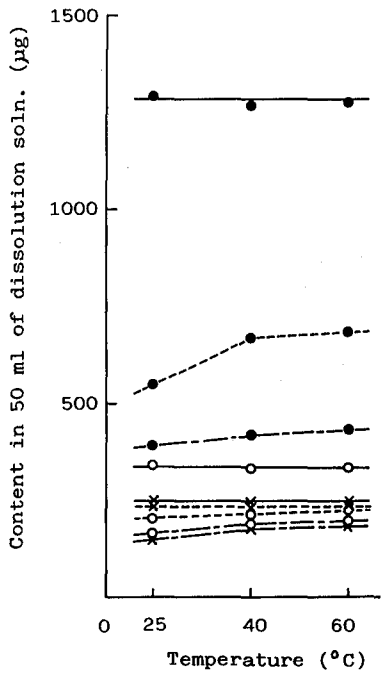


Fig. 1. Effect of Extraction Temperature on Dissolution of DP-300 and TBZ
1500ppm DP-300 processed cotton fabric : —●—, alkaline artificial perspiration soln. ; --●--, water ; ——●——, acidic artificial perspiration soln.
380ppm DP-300 processed cotton fabric : —○—, alkaline artificial perspiration soln. ; --●--, water ; ——●——, acidic artificial perspiration soln.
290ppm TBZ processed cotton fabric : —×—, alkaline artificial perspiration soln. ; --×--, water ; ——×——, acidic artificial perspiration soln.

330μg, 60°, 330μg とほぼ一定であり，温度による影響は認められなかった．また，水および酸性人工汗液溶出においても温度による溶出量の差は認められなかった．TBZ加工布（290ppm）についても，Fig. 1に示すようにいずれの溶出液においても温度による溶出量の差は認められず，ほぼ一定であった．以上の検討結果から，人体の体温に最も近似していることも考慮に入れ，溶出温度を40°とした．

3－2　溶出時間の影響について　溶出温度を40°とした時の DP—300加工布（1500および380ppm），TBZ加工布（290ppm）の水，酸性人工汗液，アルカリ性人工汗液に対する溶出時間の影響について検討を行った．すなわち，試料1.0gをとり，水，酸性人工汗液およびアルカリ性人工汗液50m*l* を別々に加え，溶出時間を20，40，60，80，100，120，240および360分と増加させ，試験溶液調製，HPLC 分析条件に従って操作して得られた結果を Fig. 2 に示す．DP—300加工布（1500および380ppm）においては，どの溶出液に浸せきしても，多少の差異はあるものの60分で一定となった．さらに TBZ 加工布については，どの溶出液においても20分で一定となった．以上の結果から実際試料の溶出時間を60分とした．

4．DP—300および TBZ の溶出量について　下着，シーツ，くつ下の3種6検体について40°，60分の条件下で水，酸性人工汗液およびアルカリ性人工汗液（50m*l*）に対する溶出量（μg）を測定した．その結果を Table 2 に示す．試料のうちわけは，下着2（アンダーシャツ，ズボン下，材質はともに綿100%，DP—300含有量：A，560ppm，B，600ppm），くつ下3（綿—ナイロン混紡，綿100%のもの，DP—300含有量：D，620ppm，E，590ppm，綿—ナイロン混紡，TBZ 含有量：F，385ppm），シーツ1（ポリエステル65%—綿35%混紡，DP—300含有量：C，630ppm）であった．なお，これらの DP—300は別にメチル化して GC—MS を測定し，分子イオンピークから確認を行っている．Table 2 に示すように，くつ下Fは TBZ を含有しているが，水（pH6.6），酸性人工汗液（pH4.5），アルカリ性人工汗液（pH8.9）における溶出量は，溶出液50m*l* 中のμgで示すと26, 32, 49μgで，Fの1g中の含有量385μgに対する溶出量の割合を溶出率とすると7，8，13%に相当し，液性のちがいに基づく大きな差は認められなかった．これに対して DP—300の溶出傾向は，Table 2 に示すように試料A—Eのいずれの場合も特徴的に酸性人工汗液＜水＜アルカリ性人工汗液の順に大きくなっており，液性によって溶出量

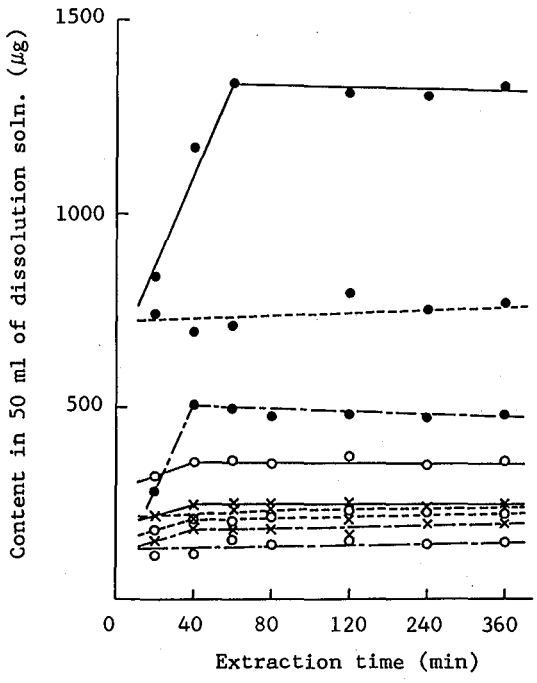


Fig. 2. Effect of Extraction Time on Dissolution of DP-300 and TBZ
The symbols of each line were the same as those in Fig. 1.

Table 2. Analytical Results of Dissolution Test of Sanitary Finishing Agent in Commercial Fabrics

Sample			Compound	Content in sample (ppm)	Content in 50ml of dissolution soln. (μg)		
					Acidic artificial perspiration	Water	Alkaline artificial perspiration
Underwear	A	(drawers)	DP-300	560	64	123	333
	B	(shirt)	DP-300	600	68	155	342
Bedclothes	C	(sheet)	DP-300	630	20	21	81
Socks	D		DP-300	620	25	39	174
	E		DP-300	590	25	50	196
	F		TBZ	385	32	26	49

に差が認められた．例えば，下着Aでは，溶出量の順に比較すると64，123，333μgで，Aの1g中の含有量560μgに対する溶出率は11，22，60%であった．下着Bについても溶出率は11，26，57%で同様の傾向を示した．このようにアルカリ性人工汗液における溶出率の増大は，DP—300がフェノール性化合物であり，その化学的性質に起因してアルカリ性人工汗液によく移行するためと考えられる．

ところで，前述のDP—300加工布においては，どのような溶出率を示すか調べてみると，Fig. 1のデータから1500ppm 加工布の酸性人工汗液，水，アルカリ性人工汗液に対する溶出率は，それぞれ30，47，90%で，また，380 ppm加工布では43，53，93%であり，A，Bと同様の溶出傾向が認められるが，溶出率そのものはA，Bより大きい．しかし，Table 2に示すように，シーツCの溶出量は20，21，81μgであり，1g中の含有量630μgと，下着A，Bの場合よりも多いにもかかわらず，その溶出率は3，3，13%と明らかに低いものであった．くつ下DおよびEについても，DP—300の含有量が多いわりには，アルカリ性人工汗液で28%（174μg），33%（196μg）と溶出率がかなり低い．このような含有量と溶出量の差は，製品の材質に対するDP—300の親和性に基づくものと考えられる．例えば，前述の加工布や試料A，Bは綿100%の材質であり，これに対して溶出率の低いCはポリエステルを材質としている．Fig. 3に示すように，水およびアルカリ性人工汗液で同一試料に対してくりかえし溶出試験を行った場合，検体AとCでは溶出の挙動がかなり異なっている．特にアルカリ性人工汗液では，試料Aが溶出回数を増すごとに溶出量が減少し，560ppm の含有量に対する溶出率で示すと43，26，11，5，2%で，総溶出率は88%であった．しかし，試料Cは14，10，8，7，5%と減少傾向は少なく総溶出率は43%とAに比べて半分である．このように検体の材質がDP—300の溶出に大きく影響してくることがわかった．また，材質のみならず，DP—300の展着方法によっても溶出がかわってくるものと思われる．

DP—300は素材の網状構造に対して空間的，立体的に配置し，強固に組み込まれているといわれているが，今回の溶出試験の結果，水のみならず，特にアルカリ性人工汗液によってDP—300は比較的多く，かつすみやかに溶出してくることがわかった．従って，水に対する溶出は，洗濯等によって脱落していくことを示しており，また，DP—300を含有する衣料品を着用したとき，汗から皮膚への移行が十分考えられる．それがどの程度のものか，さらに調査が必要であると考える．

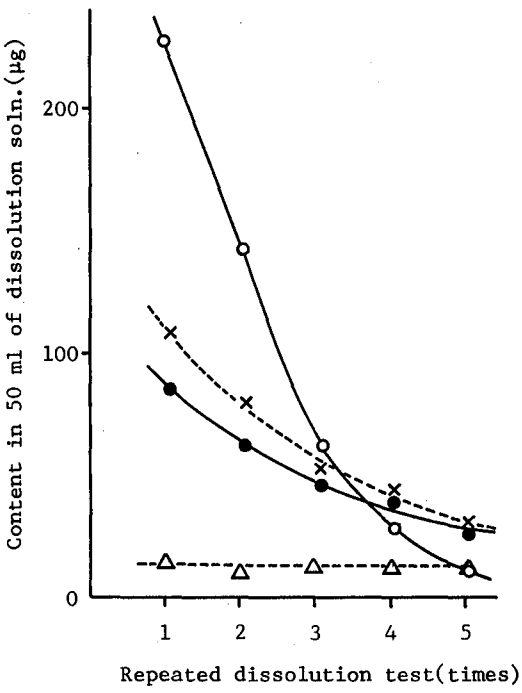


Fig. 3. Dissolution Pattern of DP-300 in Sample A (560 ppm) and Sample C (630 ppm) with Water and Alkaline Artificial Perspiration Soln.
—○—: sample A, alkaline artificial perspiration soln.
—×—: sample A, water
—●—: sample C, alkaline artificial perspiration soln.
—△—: sample C, water

ま と め

DP—300およびTBZの溶出条件について，それぞれの加工布を作成し，温度や溶出時間の検討を行ったところ，40°，60分の溶出が妥当な条件であった．この条件下でDP—300加工布，TBZ加工布および市販衣料品の酸性人工汗液（pH4.5），水（pH6.6），アルカリ性人工汗液（pH8.9）に対する溶出試験を行った．DP—300の溶出傾向は酸性人工汗液＜水＜アルカリ性人工汗液の順で大きくなり，特に材質が綿の場合は，その傾向が顕著であった．TBZはDP—300ほど液性による溶出量の差は認められなかった．今回の溶出試験の結果からDP—300は汗をかいして体表面への移行がありうると考えられる．

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井藤秀雄氏ならびに大角悦子氏に深謝いたします．

文　献

1）家庭用品規制関係実務便覧　第一法規出版
2）小若順一：技術と人間，Jun.,96，1983
3）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**，133，1984
4）瀬口和義，萩野孝子：繊消誌，**19**，42，1978
5）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**，138，1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 129-131, 1985

尿酸既知濃度血清の作成と測定例

大石向江*, 蓑輪佳子*, 仲川千種*, 鈴木重任*

Estimation of Fixed Concentration of Uric Acid in Serum

HISAE OISHI*, KEIKO MINOWA*, CHIGUSA NAKAGAWA* and SHIGETOH SUZUKI*

Keywords: 尿酸 uric acid, 精度管理調査 control survey

緒　言

都内の衛生検査所を対象とした精度管理調査はすでに3回を終了した[1-3]. 従来実施されている精度管理調査では, 東京都での場合も含めて, 生化学検査用の試料として凍結乾燥血清を配布していた. しかし, 凍結乾燥血清はその製法, 性状などにより溶解時に混濁を生じたり試薬と適確に反応しないなどの欠点を持ち[4-9], 精度管理調査用の試料として必ずしも最良のものであるとは言い難い. また, 絶対値が不明であるため結果の処理を推計学的手法に頼らざるを得ない. 東京都では毎回新しい企画を盛り込んで調査を実施しているが, 特に第3回調査では生化学検査において, 日常測定する検体により近い状態での検討を行うために前回までの凍結乾燥血清試料に加えて独自の試料を使用して結果を検討した. その試料とは, 新鮮なヒト血清から尿酸を一旦除去し, 既知量の尿酸を添加して作成した尿酸既知濃度血清のことであり, 以下にその詳細を報告する.

材料および方法

実験1. 3名のボランティアより血液を集め, 血清を分離してプールした. 松本らの方法[10]により, この血清から尿酸を除去し, 尿酸値が0.00mg/d*l* であることを日立705型自動分析装置にて確認した. 本血清に6.1mg/d*l* の尿酸（シグマ社製, 純度99.0%）を添加した. この血清における尿酸の回収率を上記の自動分析装置により求めた.

実験2. 実験1. で作成した血清を8種の用手法試薬を用いて反復測定し, 変動係数を求めて再現性を比較した.

また, 実験1. で作成した血清を昭和59年度東京都衛生検査所精度管理調査においてブラインド試料として各検査所に配布し, 各施設での再現性を比較した. 尚, 前回調査時の成績不良施設に対してはブラインド試料を2回投入した. 同時に配布した凍結乾燥血清の尿酸の測定結果と尿酸既知濃度血清の尿酸値の測定結果および当研究室での結果を比較し, 今回配布した尿酸既知濃度血清が精度管理調査に適するものであるかどうかを検討した.

結果および考察

結果1. 自動分析装置による測定の結果, 6.1mg/d*l* の尿酸を添加した後の血清の尿酸値は6.11±0.0839mg/d*l*（変動係数1.37%, N＝25）であり, 回収率100.2%との結果を得た.

結果2. 当研究室で用手法キットにより尿酸値を測定した結果を表1に示す. このうち試薬AとBの測定法は“リンタングステン酸ナトリウム法・除蛋白する方法”であり, 試薬A′からFまでの測定は“ウリカーゼ・ペルオキシダーゼ法”で行うものである. この結果をみるとウリカーゼ・ペルオキシダーゼ法でのD社による測定値が高いが, 同一メーカーの製造番号の異なる試薬で反復測定した場合および凍結乾燥血清を測定した場合にも尿酸の測定値は高くなり, このメーカーのキットで尿酸を測定する際に注意を要することがわかった. 他には試薬A″による測定値が若干高めだった以外はほぼ満足できる結果を得た.

都内の衛生検査所に対して行った精度管理調査での尿酸の測定結果を表2に示す. 測定結果をヒストグラムにしたものを図1に示す. これをみると6.1mg/d*l* に近い測定値を報告している施設が多いことがわかる. また, ± 2SDを超える値の報告は1例あった. 各検査所のうち, 用手法で測定していてブラインド調査を実施することができたのは5施設であったが, そのうち本実験で測定す

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjukuku, Tokyo, 160 Japan

表1．尿酸既知濃度血清の反復測定例

方　法	平均値±SD (mg/dl)	変動係数 (%)
リンタングステン酸ナトリウム法（除蛋白する法）		
メーカーA	6.33±0.125[a]	3.4
B	6.32±0.175[b]	2.8
ウリカーゼ・ペルオキシターゼ法		
メーカーA'	6.04±0.232[c]	3.9
A"	6.48±0.316[d]	4.9
C	6.03±0.125[d]	2.1
D	7.36±0.400[c]	5.4
E	5.96±0.0902[d]	1.5
F	6.21±0.240[c]	3.9

（注）A，A'，A"は同一メーカーキットで試薬の組成が異なる。
a：N＝5，b：N＝6，c：N＝9，d：N＝10

表2．第3回東京都衛生検査所精度管理調査における尿酸の測定結果

測　定　法	施設数	平均値±SD (mg/dl)	変動係数 (%)
リンタングステン酸法（除蛋白する法）	1	6.10	
リンタングステン酸法（除蛋白しない法）	2	6.20±0.00	0.0
ウリカーゼ・カタラーゼ法	1	6.60	
ウリカーゼ・ペルオキシダーゼ法	42	6.16±0.310	5.0
全　体	46	6.17±0.304	4.9

ることができたキットについてみると，メーカーBの試薬による測定例は1例あった．この測定値は6.1mg/dlと報告されており，本実験でも変動係数が2.8%と，このキットによる測定値は良好な再現性を示した．また，メーカーEの試薬を用いた1検査施設は6.9mg/dlを報告しており，またメーカーFの試薬を用いた1検査施設は6.6 mg/dlを報告している．これは本報告での測定値（E：5.96±0.0902mg/dl，F：6.21±0.240mg/dl）や，添加した6.1mg/dlという値よりもいずれも高い結果である．当研究室では配布試料作成後22日目までのうち7日を随意に選んで自動分析装置を用いて尿酸値を追跡測定した．それによると測定値はほとんど変動しない（レンジ：6.00～6.20mg/dl）ことが確認されており，今回2施設から報告された結果はいずれも高目であって，その測定手段などについて検討する必要があると思われる．

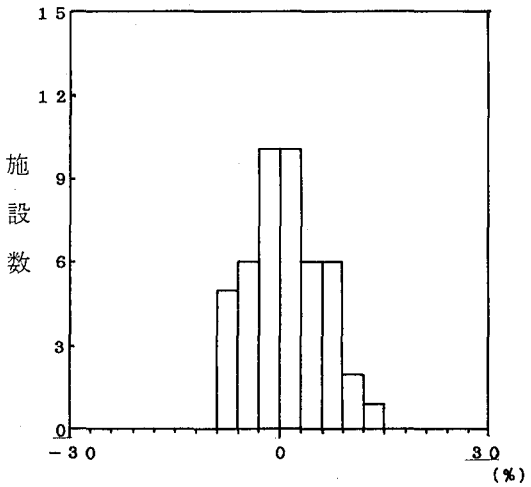


図1．尿酸既知濃度血清の真値（6.1mg/dl）に対する相対誤差(A)

$$A(\%)=\frac{\text{測定値}-6.1}{6.1}\times 100$$

検査所での測定結果を集計すると6.17±0.0304mg/dl（変動係数4.9%）であり，当研究室での自動分析装置による結果は6.11±0.0839mg/dl（変動係数1.4%）であった．検査所での結果は測定手段や使用試薬の異なるものをすべてまとめて集計してあるが，当研究室での結果と比較すると変動係数が大きく，バラつきがより大きいことがわかった．

今回は従来どおり凍結乾燥血清も試料として配布したのであるが，今回の調査における凍結乾燥血清4種類の尿酸の測定値の変動係数は5.2%，7.5%，7.6%および6.4%であった．これらはいずれも既知濃度血清の尿酸測定値の変動係数0.0839%より大きかった．これは従来よく言われていたような凍結乾燥血清の持つ欠点が多少なりとも除外できたことによるものであると考えられる．よって，試料としては日常の検査検体により近い性状のものを提供すべきであると考える．次回からは尿酸濃度の異なる血清を数種類用意してその相関をみることも検討したい．更に他の項目でもこのような試料を作成することを検討していきたい．

要　約

新鮮なヒト血清から尿酸を除去し，既知量の尿酸（6.1 mg/dl）を添加して尿酸既知濃度血清を作成した．当研究室での測定結果は6.11±0.0839mg/dl（変動係数1.37%，

N＝25)で，回収率は100.2%であった．異なる8種のキットでこの血清を反復測定したところ，1種のキットが常に高値を示す傾向を持ち，このキットは凍結乾燥血清に対しても同じ傾向を示すことがわかった．

この尿酸既知濃度血清を昭和59年度東京都衛生検査所精度管理調査にて試料として配布し，測定値を集計したところ，6.17±0.304mg/dl(変動係数4.9%，N＝46)という，現状ではほぼ満足できる結果を得た．

昭和59年度東京都衛生検査所精度管理調査で配布した4種類の凍結乾燥血清の尿酸測定値の変動係数は5.2%，7.5%，7.6%および6.4%であり，既知濃度血清における尿酸の測定値の変動係数は1.37%であった．これにより，精度管理調査には日常の検査検体と同じ性状をもつ試料を使用する方がよりよい精度を得ることができると考えられる．

文　献

1) 東京都：昭和57年度第1回東京都衛生検査所精度管理調査結果報告書，1983
2) 東京都：昭和58年度第2回東京都衛生検査所精度管理調査結果報告書，1984
3) 東京都：昭和59年度第3回東京都衛生検査所精度管理調査結果報告書，1985
4) 松本義明他：臨床検査，28，971，1984
5) 日本医師会：昭和56年度第15回臨床検査精度管理調査結果報告書，1982
6) 小田幸生他：臨床病理，31，1335，1983
7) Bullock, D.G. et al.：Clin. Chem., 26, 903, 1980
8) Warnick, G.R. et al.：Clin. Chem., 27, 116, 1981
9) Demacker, P.N.M. et al.：Clin. Chem., 28, 155, 1982
10) 松本尚子，中山年正，北村元仕，加野象次郎，久米均：尿酸，8，22，1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 132-136, 1985

同一試料による精度管理調査結果（生化学検査）の経年変化について

仲川千種*, 大石向江*, 蓑輪佳子*, 鈴木重任*

Interlaboratory Quality Control by Same Lot of Control Material for Three Years

CHIGUSA NAKAGAWA*, HISAE OISHI*, KEIKO MINOWA*, and SHIGETOH SUZUKI*

Keywords：精度管理調査 interlaboratory quality control, 試料 control material, 生化学 clinical chemistry, 経年変化 year to year precision

緒　言

最近の臨床検査の施設間精度管理調査は，参加施設数1万以上の世界的規模で行われているものから，自主研究会内で数施設の参加で行われている小規模なものまで多種多様に実施されている．東京都では臨検法改正を機会に，都内衛生検査所を対象とする精度管理調査を昭和57年度から開始し，昭和59年度まで年1回の割合で3回実施された[1~3]．

都の精度管理調査の特徴の1つとして，オープン方式とブラインド方式の2方式をとり，それぞれの方式で同一ロットの試料を複数用いたことがあげられる．そのうち，生化学検査において3年間にわたり同一ロットの試料を用いて調査を行った．この結果をもとに3年間にわたる施設間の検査精度の変化をとらえることができたので報告する．

方　法

1．試料　オープン方式では異常値レベルの市販凍結乾燥血清を用いた．ブラインド方式では，オープン方式と同一ロットの凍結乾燥血清を滅菌再留水で無菌的に溶解し滅菌済の容器に分注したものを用いた．

2．調査方法　オープン方式とブラインド方式を併用した．オープン方式では，検査施設に直接試料を配布し，試料の測定値及び測定方法，試薬メーカー名，標準物質の種類，外注の有無，使用機器名を回答してもらった．ブラインド方式では，配布前日に作成した試料を協力医療機関に送付し，数日の間隔をあけて同一試料を2回に分けて一般検体と区別できないようにして検査施設に投入した．検査報告書は協力医療機関を経て回収した．調査項目は，カルシウム（Ca），ナトリウム（Na），カリウム（K），クロール（C*l*），尿素窒素（BUN），尿酸（UA），クレアチニン（CRE）の7項目を実施した．同一ロットの試料を用いた調査は，昭和57年度がブラインド方式のみ2回（29施設），昭和58年度でオープン方式を1回（48施設），ブラインド方式を2回（38施設），昭和59年度で両方式とも2回ずつ（オープン53施設，ブラインド38施設）行うことができた．なお，昭和59年度のブラインド調査は9施設について特別に協力医療機関を2ケ所配置する措置がとられた．

3．解析方法　結果は測定方法，試薬メーカー名，標準物質の種類，外注の有無，使用機器に分類して平均値，標準偏差，変動係数を求めた．平均値の差の検定は，Student の t-test により行った．また，都調査試料と同一ロットの試料を用いた大規模な精度管理調査が行われたので，この調査結果における3SDオーバーのデータを除去した集団の平均値，標準偏差，変動係数を標準参考値として都調査の結果と比較検討した．

結果及び考察

7項目におけるオープン，ブラインド方式別に分けた平均値，標準偏差の3年間の変化を図1に，変動係数の変化を図2に示した．図中に参考として標準参考値をA，Tonks の許容誤差範囲[4]をBで表した．

カルシウムにおいて，3年間の調査全般にわたり平均値に変化はなく，標準参考値との差はみられなかった．オープン方式での平均値よりブラインド方式での平均値

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

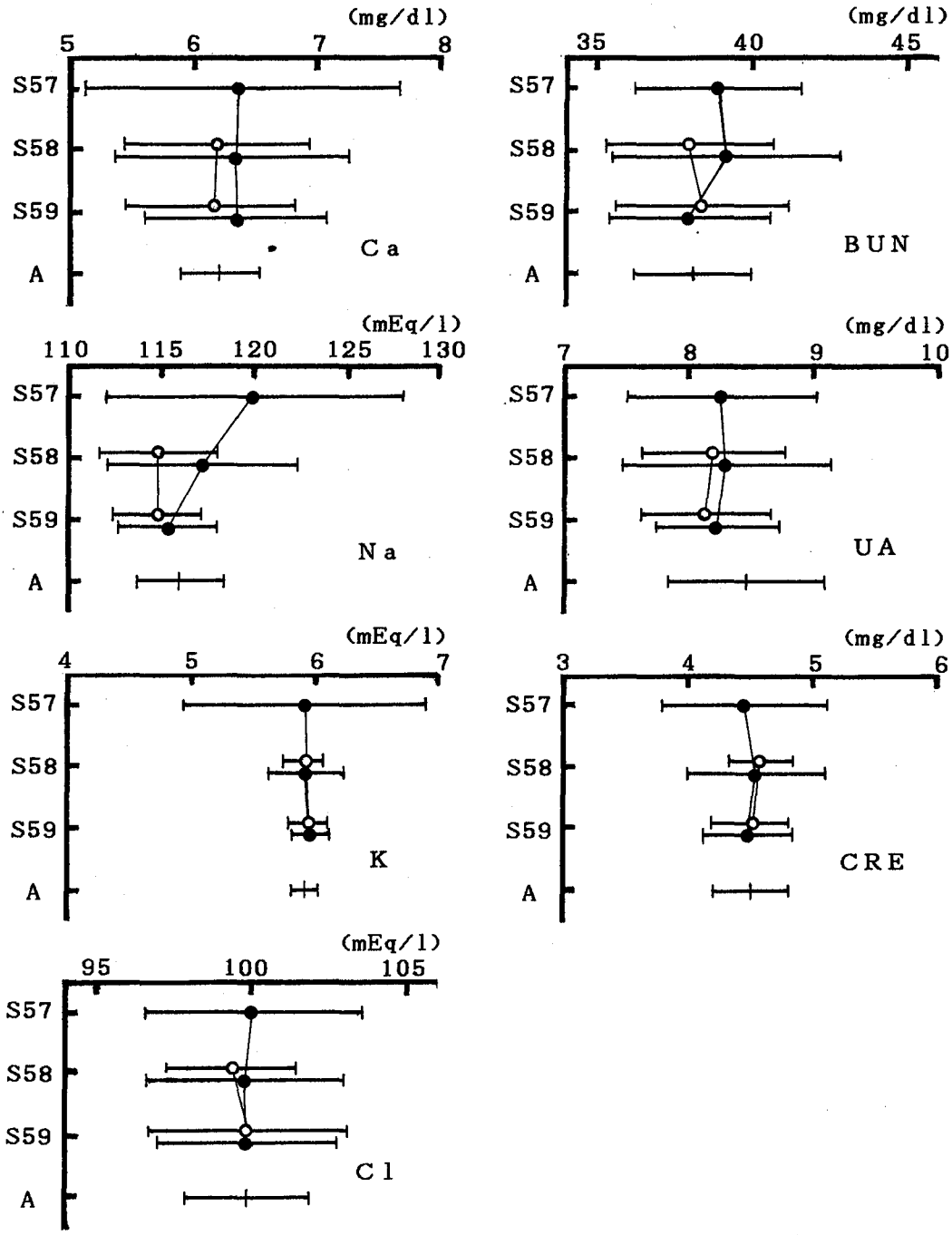


図1　同一試料による精度管理調査における平均値，標準偏差の経年変化
A：大規模な精度管理調査による平均値，標準偏差
○——○　オープン
●——●　ブラインド

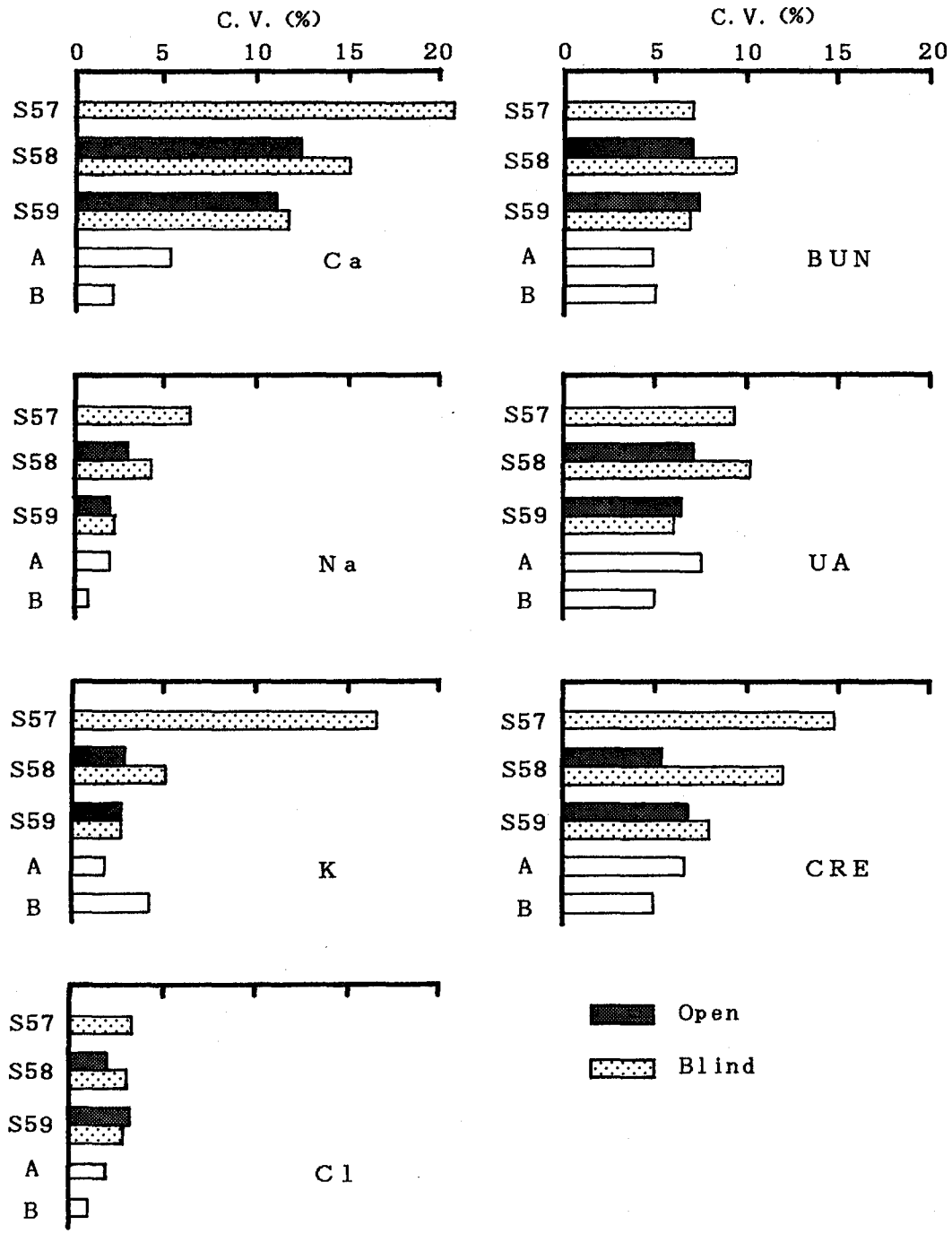


図2　同一試料による精度管理調査における変動係数の経年変化
A：大規模な精度管理調査による変動係数
B：Tonks の許容誤差限界

が0.2mg/dl高かったが有意差は認められなかった．変動係数については，昭和57年度のブラインド方式で20.2%と大変バラツキが大きかったが年々減少し，昭和59年度では11.7%で昭和57年度の半分近い値になった．また，オープン方式の場合でも変動係数が小さくなる傾向であった．ブラインド方式における変動係数はオープン方式における変動係数と比較して，各年度とも常に高いのも特徴である．3年間におけるオープン，ブラインド両方式の変動係数は標準参考値及び Tonks の許容誤差範囲の値の約2倍であり，都調査におけるカルシウムの精密度はよくないといえる．変動係数が大きくなる理由として，昭和57年度のブラインド方式での測定値を例にとると，最大値が10.8mg/dl，最小値が4.6mg/dlで，最大値が最小値の2倍と大きく解離したためである．標準参考値における $\bar{x}\pm3SD$ の範囲外のデータ数は昭和57年度のブラインド方式で15個と全体の26%も占めたことも変動係数を大きくした原因であった．検体取違え，単位及び計算まちがえ，ガラス器具等の汚染，オープン試料での溶解方法などが多かったことがデータが大きくバラついた要因として考えられる．特にカルシウムの場合，用手法で測定した施設の割合が約40%で他の項目の用手法の占める率が約20%以下であることと比較して高いことからもこのようなミスが多くなる可能性が高いと思われる．

ナトリウムでは，オープン方式での平均値に変化がなかった．それに対し，ブラインド方式での平均値の変化は，昭和57年度で119.9mEq/lと標準参考値の116.0 mEq/lと比べ4 mEq/lも高かったが年々下がり，昭和59年度では標準参考値及び59年度のオープン方式での平均値に近づいた．変動係数は，オープン，ブラインド両方式とも年々減少し，昭和59年度では両方式において標準参考値と同じ値になった．昭和57，58年度でのブラインド方式における最大値はそれぞれ144mEq/l，145 mEq/lというように異常低値の試料にもかかわらず正常値の報告をした施設が存在した．しかし昭和59年度においては正常値の報告及び標準参考値における $\bar{x}\pm3SD$ の範囲外のデータの報告はなくなった．このようなことがブラインド方式における経年変化をおこす要因である．測定法別に集計したところ，平均値の比較で昭和57年度のブラインド方式と昭和58年度のオープン方式の場合は炎光光度法が高目に，昭和58年度のブラインド方式と昭和59年度のオープン及びブラインド方式ではイオン選択電極法が高目に出て，方法による差は明らかではなかった．一方，方法別の標準参考値ではイオン選択電極法の方が炎光光度法と比べ平均値で1.3mEq/l高く測定され，平均値の差も有意であった．都調査の3年間にわたり炎光光度法(内部標準法)を採用した施設が80%を占めた．その中で使用機器別に集計してみると，H社製の炎光光度計を使用した施設は，昭和57年度で全体の1/4，昭和58，59年度で全体の約1/2を占めた．その集団の平均値は他社の炎光光度計を使用した施設での平均値より低かった(表1)．ただし，昭和57，58年度のブラインド方式においてはバラツキが大きかったので有意差は認められなかった．昭和58，59年度のオープン方式及び昭和59年度のブラインド方式での全体の平均値は全体の標準参考値における平均値と比べて有意に低く，さらに炎光光度法における平均値も比較すると都調査の方が有意に低かった．都調査における平均値が低かったのは，低目に測定される方法及び機器が原因であることと考えられる．

表1 ナトリウム・炎光光度法(内部標準法)における機器別集計

		H社炎光光度計		その他の炎光光度計	
		N	Mean±SD*	N	Mean±SD*
57年度	ブラインド	6	114.8±1.8	17	121.8±8.3
58年度	オープン	19	114.3±2.2**	18	116.2±1.9
58年度	ブラインド	15	116.7±4.5	15	117.3±4.4
59年度	オープン	19	113.0±2.0**	20	116.0±1.9
59年度	ブラインド	17	113.8±2.4**	19	115.6±1.8

*　：mEq/l
**：$p<0.05$

尿素窒素の変動係数の推移は，オープン方式では変化なく，ブラインド方式では昭和58年度で前年より2%上昇したが昭和59年度でもとにもどっている．これらの値を標準参考値と比較すると，2～3%大きく，都調査の3年間における精密度はよくないと思われる．平均値に関しては，オープン方式における平均値に変動も標準参考値との偏りはない．それに対し，ブラインド方式における平均値は，昭和57，58年度で標準参考値より1 mg/dl高目に偏り，明らかに差があることが認められた．昭和59年度のブラインド方式では平均値が下がり，オープン方式との差及び標準参考値との差はなくなった．昭和57，58年度のブラインド方式での測定値の分布は，他年度と比べ標準参考値における $\bar{x}+3SD$ を越えた測定値が多く，かつ最頻値が高目に偏っていた．このようなことが起こる原因はわからなかった．

尿酸の変動係数は年々減少する傾向にあり，昭和59年度の時点でオープン，ブラインド両方式とも標準参考値

表2 尿酸・ウリカーゼペルオキシダーゼ法における試薬別集計

		W社製		D社製	
		N	Mean±SD*	N	Mean±SD*
57年度	ブラインド	8	8.08±0.43	4	8.38±0.22
58年度	オープン	14	7.88±0.33**	6	8.50±0.20
58年度	ブラインド	13	8.18±0.69	4	8.69±0.32
59年度	オープン	21	7.99±0.44	7	8.24±0.45
59年度	ブラインド	20	8.00±0.45	5	8.43±0.42

＊ ：mg／dl
＊＊：$p<0.05$

を下回り，都調査の精密度はよい状態となったことがいえる．平均値に関しては，3年間にわたりオープン，ブラインド両方式とも変動はないが標準参考値より0.2～0.3mg/dl低く偏った．測定法別の集計では，ウリカーゼ・ペルオキシダーゼ法が昭和57年度で72%，昭和58年度で83%，昭和59年度で94%の割合の施設が採用し，大多数を占めるようになった．方法別の標準参考値では，ウリカーゼ・ペルオキシダーゼ法が全参加施設中64%を占め，平均値は8.36±0.59mg/dlであり，全方法の平均値より0.1mg/dl低かった．このことからウリカーゼ・ペルオキシダーゼ法は他方より低目の測定値を出す傾向があるといえる．都調査でのウリカーゼ・ペルオキシダーゼ法における平均値は同方法における標準参考値と比較してもさらに0.1～0.2mg/dl低目であった．そこで，この方法の中で試薬メーカー別に集計したところ，3年間にわたりW社製の試薬を用いた施設が最も多く，次に多く用いられたのがD社製の試薬であった．これら2社の試薬を使用した場合で比べると，平均値で0.2～0.6mg/dl W社製の試薬を使用した場合の方が低目であった．平均値の差は昭和58年度のオープン方式の場合のみ有意差が認められた(表2)．このことから，測定値の差が試薬に起因すると思われる場合があり，全体の集団の平均値及び変動係数に影響を及ぼすことが示唆される．

カリウム，クロール，クレアチニンについては，オープン，ブラインド両方式とも平均値に経年変化及び標準参考値との差はなく，正確度の面で良好な結果であった．変動係数では，ブラインド方式の場合は年々減少しているが，オープン方式の場合は，カリウムを除き上昇した．これらの3項目の変動係数は全て標準参考値より大きく，都調査における精密度はあまりよくないと思われる．ただし，カリウムのみがTonksの許容誤差範囲の値と比べ，昭和59年度における両方式の変動係数が小さくなったので都調査のカリウムの精密度は満足できるものかもしれない．昭和57年度でカリウムのブラインド方式の変動係数が他と比べて大変大きな値であった．このときの最大値は10.8mEq/l，最小値は3.2mEq/lで標準参考値における平均値，標準偏差をもとにすると－24SDから＋44SDまで測定値の範囲があることになる．ここで用いた試料はカリウムに関し異常高値であるのに，正常値の報告及びさらに異常に高い測定値の報告を出したことにもなる．カリウムで正常値の報告をした施設はナトリウムやカルシウムでも正常値又は正常値に近い測定値を報告し，大きなミスを犯している．昭和59年度ではこのような極端に間違った測定値を出した施設はなくなり，この点では大きな改善をみたといえよう．

ま と め

精密度について：年々変動係数が減少しているが，カルシウム，カリウム，クロール，尿素窒素においては昭和59年度の時点でも標準参考値の値よりも高い．またカリウムを除く6項目でTonksの許容誤差範囲と比べ変動係数は高い．全般的にオープン方式よりブラインド方式の精密度が悪く，ブラインド調査の結果がふだんの検査状況を反映すると仮定すれば，更に精密度の向上がはかれると思われる．

正確度について：標準参考値と比較した結果，3年間にわたり偏りもなく経年変化もなかった項目（Ca，K，Cl，CRE），年々偏りが改善された項目（Ca，K，Cl，CRE），経年変化はないが偏りのある項目（UA）に分類される．一般に，測定方法によっては測定値に差がある場合があることが知られており，それが偏りの原因になることが考えられる．また，同一方法の中においても機器，試薬が偏りの原因となり得ることがこの調査から示唆された．異常値レベルの試料を用いたにもかかわらず，正常値の報告をした施設は両方式を通じ年々減少の傾向にあるが項目によっては昭和59年度の時点でも完全になくなってはいない．このような誤りをなくすことが早急に望まれる次第である．

文 献

1）東京都：昭和57年度第1回東京都衛生検査所精度管理調査結果報告書，1983
2）東京都：昭和58年度第2回東京都衛生検査所精度管理調査結果報告書，1984
3）東京都：昭和59年度第3回東京都衛生検査所精度管理調査結果報告書，1985
4）北村元仕，仁科甫啓：実践臨床化学（増補版），80，1983，医歯薬出版

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 137-142, 1985

血液学的検査の精度管理調査結果について(第1報)
—— 保存液添加血液試料 ——

蓑輪佳子*, 大石向江*, 仲川千種*, 鈴木重任*

Interlaboratory Quality Control in Hematology (I)
——Evaluation of Preservatives in Control Material——

KEIKO MINOWA*, HISAE OISHI*, CHIGUSA NAKAGAWA* and SHIGETOH SUZUKI*

Keywords: 精度管理試料 quality control material, 血液学 hematology, 保存液 preservatives

緒　言

昭和57年から，東京都では衛生検査所を対象として年1回精度管理調査を実施している[1-3]．調査時の血液検査用試料を当衛生研究所で準備し配布している．血液学的検査における精度管理用試料としては，血球に固定等の処理を施したコントロール血球を使用するのが通常である．コントロール血球には特定の機器専用に作られているものが多く，様々な機種を使用している施設間での調査を行なう上では問題が生じてくることが多々ある．そのため東京都の調査ではルーチン検査の検体と同じヒト新鮮血を主な試料として使用している．血算用の試料に用いる抗凝固剤には，EDTA塩（2 Na, 2 K, 3 K），二重シュウ酸塩，Anticlot/ET，ヘパリン等がある．赤血球数，白血球数，ヘモグロビン量の変動がEDTA-2K添加血で比較的少ない[4]ことをこれまでに報告した．昭和57年の調査ではEDTA-2Kを抗凝固剤として血液に添加し試料とした．調査結果[2]をみると他の項目に比べて白血球数，血小板数において施設間の変動係数が大きかった．各施設の測定方法，手技上の問題点を考えると同時に試料配布から各検査所の測定までに要した期間中，試料の安定性が満足のいくものであったかを見直す必要がある．

今回，血球の保存物質として知られているACD, Adenine, Inosine, Phosphoenolpyruvate, Sucrose, Prostagrandin E_1の添加が，血球数の変化にどのような影響をおよぼすかを時間の経過と共に観察した．さらに，昭和58，59年に実施した精度管理調査の結果とその際使用した血液試料の変化との関係について考察を加えた．

方　法

1．成人正常者2名からAnticlot/ET入り血液バッグに採血後，血液を20m*l*ずつ分注し各々に表1のように予め調製した5種類（A～E）の保存液を3 m*l*ずつ添加した．保存液無添加の血液をF群とした．転倒混和後，小試験管に2 m*l*ずつ分注し冷蔵保存（4°）した．1，2，3，4，8日後各群2本ずつを室温に戻した後，赤血球数(RBC)，白血球数(WBC)，ヘモグロビン量(Hb)，ヘマトクリット値(Ht)，血小板数(Plt)を多項目自動血球計数装置（シスメックスCC—800，東亜医用電子K.K.）で測定した．

2．昭和58年度，59年度東京都衛生検査所精度管理調査で使用した血液試料の経時変化の観察を調査に並行して行なった．

58年度試料Ⅰ・Ⅱには抗凝固剤としてAnticlot/ET20 m*l*が血液400m*l*に添加されている．添加後1，2，3，4，7日目に多項目自動血球計数装置（同上）でRBC, WBC, Hb, Ht, Pltを測定した．59年度試料Ⅰ・ⅡにはCPD保存液が15m*l*／血液100m*l*の割合で添加されている．添加後1，2，3，4，7，8日目に多項目自動血球計数装置（SPLUS-IV，コールター・エレクトロニクス社）で上記と同項目を測定した．

結果および考察

血液中の赤血球，白血球，血小板は採血後の放置時間により，機能，形態，血球数が変化していくことは周知のとうりである．測定値の正確度，精密度が問われる精度管理調査では採血から検査所で測定するまでの期間，血球数，形態が不変であることが望ましい．抗凝固剤添

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-Ku, Tokyo, 160 Japan

表1　添加保存液の組成

群	A	B	C	D	E	F
添加物質	ACD*1 (3ml／Blood 20ml)	ACD	ACD	ACD	ACD	No add.
		A denine (0.3mM)*2	Adenine	Adenine		
		Inosine (6.5mM)*2	Inosine	Inosine		
			Phosphoenol-pyruvate(PEP) (26mM)*2	Phosphoenol-pyruvate(PEP)		
			Sucrose (83mM)*2	Sucrose		
				Prostagrandin E_1 (500ng/Blood 20ml)	Prostagrandin E_1	

＊1　クエン酸，クエン酸ナトリウム，ブドウ糖
＊2　最終濃度

加のみでは安定性の保持にも限界があり，それを延長するには保存液等の添加を検討する必要がある．輸血用血液の保存液として1940年代から使用されているACD液（クエン酸，クエン酸ナトリウム，ブドウ糖）を基本として赤血球中ATP，2,3 -Diphosphoglyceride 活性の維持に有効なAdenine[6]，Inosine[6]，PEP[5-9]，赤血球の膜強化に効果をもつSucrose，血小板の形態変化，凝集を抑えるProstagrandin E_1[10]の添加が各血球数にどのような影響をおよぼすか検討した．

図1にRBC，WBC，Hb，Ht，Plt各項目の8日間の経時変化を示した．A～F群共に2名の血液の測定値から平均値を求め，1日目の測定値を100%としてその後の変化を示した．RBC，Hbは保存液A～Eいずれの群も8日間変化はなく，安定した結果を示した．WBCを採血から4日間の変化で比較すると保存液無添加F群では32%減少したが，ACD液が添加されているA～Eでは血球数の減少が10%前後に抑えられていた．8日目で比べると差はより顕著になったが，C，D群の減少は10%以内に留まった．PEP，Sucrose添加による赤血求の寿命延長は報告されているが白血球に対しても同様の効果を持つと考えられる．Htは平均赤血球容積(MCV)と赤血球数の変化に左右され，そのMCVはATP活性低下により増加する．ATP活性の維持に有効であるAdenine，Inosine添加のB群は2試料共MCVが減少（1日目102μ^3→8日目97μ^3，1日目92μ^3→8日目87μ^3）し，その結果Htも減少傾向を示した．PEP，Sucrose，Prostagrandin E_1添加による効果はほとんど認められなかった．Pltは血小板凝集による減少，赤血球，白血球の崩壊による細胞片の混入，測定機器の電気的ノイズによる見せかけの増加等の影響を受けやすい項目である．血小板凝集，形態変化を抑制するProstagrandin E_1を添加し保存液無添加F群の変動と比較すると，4日間ではその差はなかった．8日目F群で10%程度減少したのに対してACDとProstagrandin E_1添加のE群ではPltの減少が全く認められなかった．D群はF群同様10%の減少を示しており，他の添加物質によりProstagrandin E_1が影響をうけ，効果を示さなかったことが考えられる．

オープン調査では試料配布後，ただちに測定するよう指示をしている事から大半の施設では2日以内に測定していると推察される．ブラインド調査では，返送されてきた報告伝票に記載された測定日を調べると90%の施設で配布後4日以内に測定し結果を報告していた．そこで4日間の変動をRBC，WBC，Hb，Ht，Plt 5項目全体から見て比較すると，ACD液の添加が血球の安定性に有効である事がわかった．その他の物質の添加は血球の機能を維持するには重要な因子となるが，血球数の変動をおさえる効果は少ないと考えられた．

図2に昭和58年度，59年度精度管理調査で使用した血液試料の8日にわたる経時変化を示した．1日目の各試料における15回測定のRBC，Hb，Htの変動係数は1%以内，WBC，Pltは2～3%で信頼のある測定値を示した．1日目の測定値を100%として表示した．昭和58年度

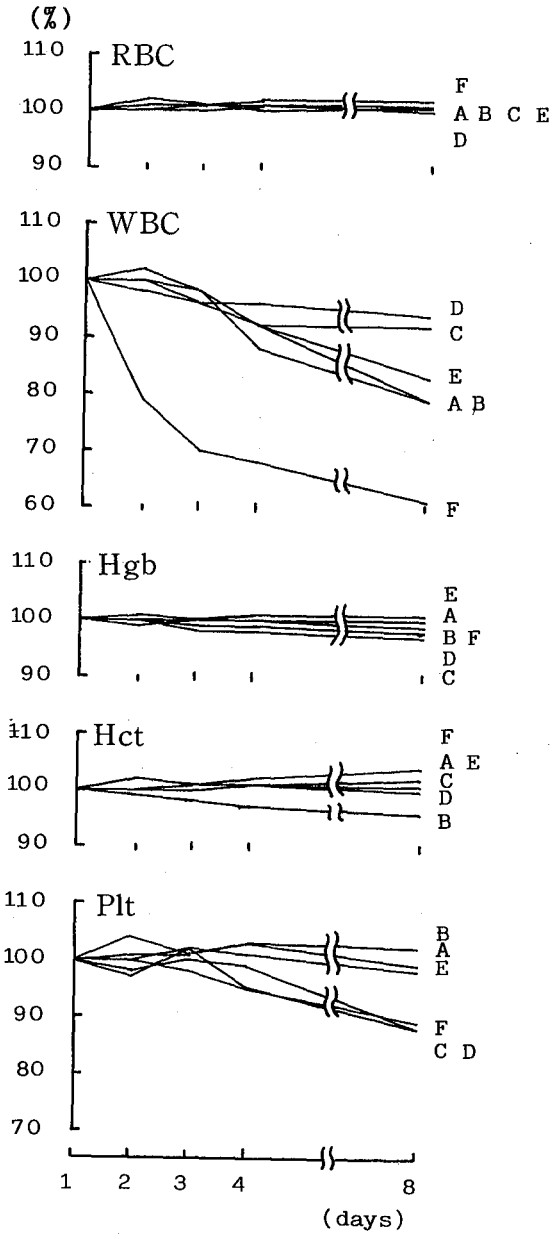


図1　各種の保存液添加血液の経時変化

試料はAnticlot/ETを抗凝固剤として添加した新鮮血であった．59年度では，先の実験結果で保存液添加が試料としての安定性に効果があったことから，保存液CPD（クエン酸ナトリウム，クエン酸，ブドウ糖，リン酸二水素ナトリウム）を添加し試料とした．ACD液とCPD液の差異は，CPD液中にはリン酸二水素ナトリウムが加えられている点である．

58年度試料のWBCは4日目で30%前後減少していたのに比較し，CPD加血液はブラインド調査で各施設が測定までに要したと思われる4日間では安定した測定値を示した．RBC，Hbの安定性は58，59年度試料で差がほとんどなく，HtではCPD加血液の方が安定した測定値を示す傾向が見受けられた．CPD加血液Pltの2日間の変動は数%だったが3日以降になると10～20%の減少を示した．ACD加血液中のPltは4日目でも5%程度減少したにすぎず，血小板の動態の差はACD液とCPD液に因るところが大きいと考えられる．

これらの試料を用いて実施した精度管理調査の結果を表2に示した．58年度，59年度いずれもオープン調査による施設間の変動係数である．RBC，WBC，Ht，Pltは測定法に電気抵抗法を用いた施設のみを対象とし，Hbでは全施設を対象として，平均値，標準偏差(S.D.)を求めた．±2 S.D.を越える値を棄却し再び計算した平均値，S.D.から変動係数を算出した（補正後）．

RBC，Hb，Htでは，図2の1～4日目の各測定値間の変動係数が1.2%以内にあった事と施設間の変動係数が昭和57，58年いずれも2～5%内にあった事を比較してもほぼ満足できる試料を供給できたと考えられる．WBCは58年度と59年度の経時変化の観察からすれば，もっとも安定性について改善できたと思われる項目である．それがどの程度調査結果に反映しているかをみると58年度の変動係数が12.2%，11.1%を示していたのが，59年度では8.4%，8.0%までに減少した．安定した試料の配布のみが施設間のバラツキの減少の原因とは言えないが，要因の一つに挙げることは可能であろう．Pltは59年度の試料中安定性が他項目に比較して悪かったが，実際の調査でどのように影響したかをみると，58年度の変動係数は14.9%，15.7%，59年度では13.9%，12.4%であった．経時変化を示した図2の3日目では20%近く減

表2　昭和58年度，59年度精度管理調査（血液）における施設間の変動係数

項　目	昭和58年度		昭和59年度	
	試料 I	試料 II	試料 I	試料 II
RBC	3.0%(44)*	3.1%(43)	2.1%(47)	2.3%(48)
WBC	12.2 (44)	11.1 (44)	8.4 (45)	8.0 (45)
Hb	2.0 (45)	2.1 (46)	2.5 (48)	2.4 (50)
Ht	3.7 (35)	3.2 (34)	3.8 (38)	4.5 (39)
Plt	14.9 (32)	15.7 (33)	13.9 (36)	12.4 (37)

＊施設数

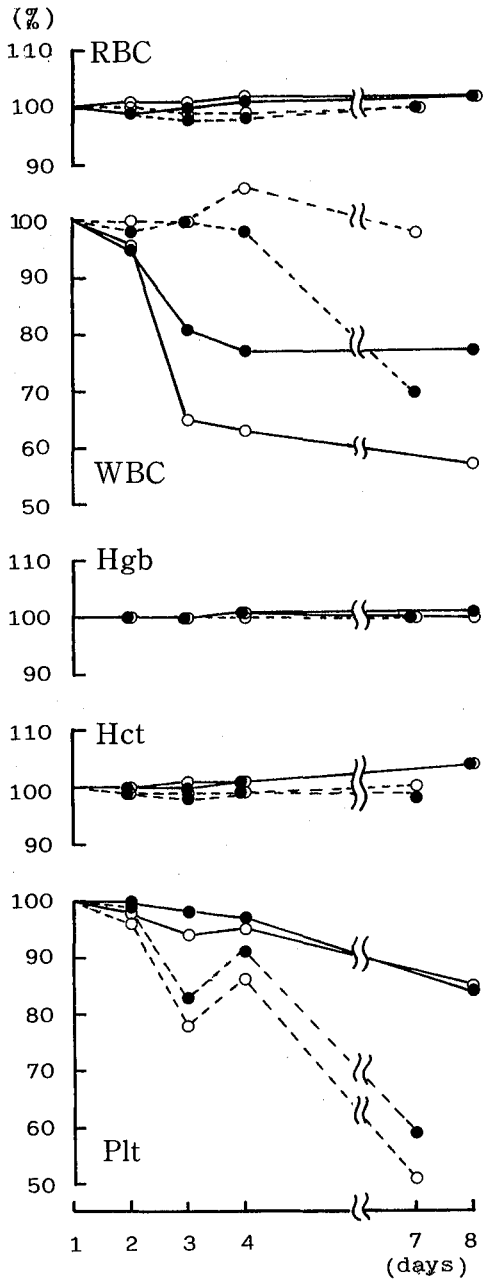


図2 昭和58，59年度精度管理用試料(血液)の経時変化

—○—昭和58年度 試料 I
—●— 〃 試料 II
---○---昭和59年度 試料 I
---●--- 〃 試料 II

少していたPltではあったが，各施設間の変動係数については，59年度で極端に変動係数が大きかったということはなく，試料による影響は認められなかった．Pltは保存状態が4°であるか室温であるかにより左右されるし，さらに保冷の状態から室温に戻し測定するまでに要する時間等にも影響をうけ(未発表データ)，正確な測定値を得るのが難かしい項目である．今回報告した当研究所での測定結果は，4°で静置した状態での比較である．

RBC，WBC，Hb，HtについてはCPD保存液添加試料中4日間の変動係数は±5％であり適切な試料であったが，10～20％の減少を示したPltについては安定性に問題が残った．加えて配布から測定までには，特にブラインド調査で輸送による影響，配布容器から検査所の容器への移しかえによる影響等いくつかの問題が残っている．これらの基礎的な検討を行ない，精度管理調査に参加した各施設の日常の検査状況を適確に反映したいと考える．

要　約

安定性が要求される精度管理調査試料としての血液に血球の保存物質として知られている保存液ACD，Adenine，Inosine，Phosphoenolpyruvate，Sucrose，Prostagrandin E_1を添加し，血球数の変化を経時的に観察した．ACD液添加血液のRBC，Hb，Pltの4日間の変動は3％以内であった．保存液無添加血液のWBCは4日目で32％減少したが，ACD液を添加することによりその減少は12％に留まった．RBC，WBC，Hb，Ht，Plt 5項目全体からみた比較で，保存液添加が安定性の延長に有効であった．

昭和59年度東京都衛生検査所精度管理調査において，保存液添加血液を試料として使用した．抗凝固剤のみ添加した58年度試料のWBCは4日目で30％前後減少していたのに対し，59年度試料である保存液添加血液は±5％以内の変動におさまった．精度管理調査のWBCの施設間変動係数においては，59年度の2試料で12.2％，11.1％を示したが，59年度では8.4％，8.0％となりバラツキが減少した．以上の点から，施設間精度管理調査試料として保存液添加血液は抗凝固剤のみ添加した血液よりも安定であると考えられた．

文　献

1）東京都：昭和57年度第1回東京都精度管理調査結果報告書，1983
2）東京都：昭和58年度第2回東京都精度管理調査結果報告書，1984
3）東京都：昭和59年度第3回東京都精度管理調査結果

報告書, 1985
4) 蓑輪佳子, 笠原利英, 大石向江等：東京衛研年報, 34, 75, 1983
5) Hamasaki, N. and Hirota-Chigita, C. : *Transfusion*, **23**, 1, 1983
6) Nakao, T., Nagai, F. and Nakao, M. : *Vox Sang.*, **42**, 217, 1982
7) 濱崎直孝, 井出口裕, 池原征夫：日本血液学雑誌, **43**, 129, 1980
8) 濱崎直孝, 原田実根：医学のあゆみ, **121**, 249, 1982
9) 笹川 滋：*Medical Techonology*, 11, 609, 1983
10) Shio, H. and Ramwell, P. W. : *Science*, **175**, 536, 1971
11) Kilkson, H., Holme, S. and Murphy, S. : *Blood*, **64**, 406, 1984
12) Becker, G. P., Tuccelli, M., Kunicki, T., Chalos, M. K. and Aster, R. H. : *Transfusion*, **13**, 61, 1973

報　　文 III

食品等に関する調査研究

REPORTS III

PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 143-150, 1985

Mycotoxin 産生カビの発育と毒素産生に及ぼす各種食品保存料の影響

諸角　聖*, 和宇慶朝昭*, 一言　広*

Effects of Preservatives on the Growth and Mycotoxin Production of Toxigenic Fungi

SATOSHI MOROZUMI*, TOMOAKI WAUKE* and HIROSHI HITOKOTO*

A study was conducted to determine the effects of 8 kinds of preservatives on the growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. versicolor* and *Fusarium graminearum* by introducing these substances into culture media.

At the maximum amount legally permitted, dehydroacetic acid (500 μg/m*l*) completely inhibited the growth of *A. flavus*, *A. versicolor* and *F. graminearum*, and partially inhibited the growth and completely inhibited the toxin production of *A. ochraceus*. Sodium dehydroacetic acid (570μg/m*l*) inhibited the growth of *A. flavus and A. versicolor*, sorbic acid (2,000μg/m*l*) inhibited the growth of *A. flavus* and *F. graminearum*, and potassium sorbate (2,680μg/m*l*), ethyl *p*-hydroxy benzoate (300μg/m*l*) and sodium benzoate (720μg/m*l*) inhibited the growth of *F. graminerum*. Benzoic acid and sodium propionate had shown no inhibitory effect of the growth and toxin production of toxigenic fungi.

Keywords: preservative, mycotoxin-producing fungi, mycotoxin, antifungal effect, food additive.

緒　言

これまでに食品添加物として各種の保存料，着香料，漂白剤，着色料等が開発され，法的にも認められて実用化されてきた．しかし，近年各種の食品添加物の毒性が詳細に再検討され，それらの一部に種々の毒性が証明され使用禁止措置がとられるなど，食品添加物が見直される傾向にある．また，無添加食品への関心も高まり，食品添加物の排斥が叫ばれるようになった．しかしながら，各種食品製造業のうちでGMPや無菌製造設備を導入しているのはごく一部にすぎず，いまなお食品添加物は広範に利用されている．こうした中で，現在我が国で使用が認められている各種食品保存料の細菌に対する有効性に関する研究はきわめて多く，また抗真菌効果に関する研究もすでに高鳥ら[1]および和宇慶ら[2]により詳細に検討されている．これらの研究において，現在保存料として法的に使用が認められているプロピオン酸ナトリウム，パラヒドロオキシ安息香酸エチル等一部の保存料は真菌汚染防止を目的とした場合に効果の少ないことが示されている．しかし，mycotoxin産生菌の発育と毒素産生に及ぼす保存料の影響については，これまでにソルビン酸，プロピオン酸など一部の物質について検討されているにすぎない[3-10]．

そこで著者らは，各種保存料のmycotoxin汚染防止効果の有無を把握する目的で，現在我が国で食品への添加が許可されている8種の保存料を対象に，mycotoxin産生性の *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. versicolor* および *Fusarium graminearum* の4菌種の発育と毒素産生に及ぼす影響について検討した．

材料および方法

1　保存料

Mycotoxin産生菌の発育および毒素産生に及ぼす保存料の影響は，食品衛生法により加工食品に使用が許可されているデヒドロ酢酸(関東化学，東京)，デヒドロ酢酸ナトリウム，ソルビン酸，ソルビン酸カリウム，プロピオン酸ナトリウム，パラオキシ安息香酸エチル，安息香酸および安息香酸ナトリウム（以上和光純薬工業，大阪）の計8種を用いて検討した．

2　Mycotoxin 産生菌

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjyuku-ku, Tokyo, 160 Japan

各種保存料のmycotoxin産生菌に対する阻害作用は，次の4菌種を用いて検討した．

Aflatoxin（以下AFと略）産生菌；*Aspergillus flavus* ATCC—28539（そば粉由来）．

Ochratoxin（以下OTと略）産生菌；*Aspergillus ochraceus* st A—15（大気由来株）．

Sterigmatocystin（以下STと略）産生菌；*Aspergillus versicolor* I—20—6（煮干し由来）．

Fusarium 毒素（Diacetoxyscirpenol, T—2 Toxin；以下DASPおよびT—2と略）産生菌；*Fusarium graminearum* F—135（大豆由来株）．

これらの菌株をあらかじめ25℃，7日間ポテトデキストロース寒天（栄研化学，東京）斜面に培養したのち，形成された分生子を滅菌した1%Driwel（富士フィルム，東京）水溶液に浮遊させた．接種には10^4/m*l*の胞子浮遊液の0.1m*l*を用いた．

3 各種保存料のmycotoxin産生菌に対する発育および毒素産生阻害作用の測定

a）測定用培地

各種保存料のmycotoxin産生菌に対する阻害作用は以下の培地を用いて検討した．すなわち，*A. flavus* 接種用としてSL培地[11]，*A. ochraceus* 接種用にはYES培地[12]，*A. versicolor* 接種用としてSSP培地[13]および*F. graminearum* 接種用としては1%ペプトン加ツァペック培地である．

供試した8種の保存料のうちデヒドロ酢酸ナトリウム，ソルビン酸カリウム，プロピオン酸ナトリウムおよび安息香酸ナトリウムはそれぞれ直接上記培地に添加した．また，デヒドロ酢酸，ソルビン酸，パラオキシ安息香酸エチルおよび安息香酸は5%水酸化ナトリウム溶液にそれぞれ4 mg/m*l*の濃度に溶解し，培地中に添加したのち，1N塩酸溶液を用いてpH 5に調整した．各保存料の添加濃度はいずれも食品衛生法により定められた食品添加許容濃度の最大値となるように調整した．このように作製した培地を原液として，無添加培地を用いて2倍希釈系列を作製したのち，試験管にそれぞれ10m*l*分注した．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．各被検培地はそれぞれ5本作製し，そのうちの2本を菌体重量測定用に，3本を毒素産生量測定用に使用した．培養はAFおよびOT産生菌を接種したものでは8日間，ST産生菌を接種したものでは12日間，*Fusarium* 毒素（DASP，T—2）産生菌を接種したものでは14日間，それぞれ表面積が最大となるよう斜めに静置し，25℃で行った．培養終了後，発育および毒素産生量を以下のようにして測定した．

b） Mycotoxin産生菌の発育度および産生毒素量の測定

被検菌の発育の程度は，著者らの方法[13,15]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，シリカゲルを入れたデシケーター中で7日間乾燥させたのち重量を計測し，培地10m*l*当りの乾燥菌体重量として表示した．

産生毒素量の測定は以下の方法により行った．すなわち，培養終了後各培養液は100℃，10分間加熱殺菌を行った．このうち*A. flavus*, *A. ochraceus* および*A. versicolor* の各培養液についてはそれぞれクロロホルム5*ml*を加えて2回抽出を行った．抽出液は無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過したのち減圧濃縮した．これら抽出物について，さらに高速液体クロマトグラフィー（以下HPLCと略）を用い，標準毒素として用いた各精製毒素（Macor Chem. Ltd., Israel）により作製した検量線と比較することにより毒素の定量を行った．*Fusarium* の毒素は上村ら[16]の方法に従い精製後定量した．すなわち，培養上清はあらかじめ調整したアンバーライトXAD—4（東京有機化学工業，東京）を10m*l*充てんしたカラムを水100m*l*で洗浄後，カラム管のコックを開放にしてカラム内の水をできるだけ除去したのち，メタノール100m*l*を用いて毒素を溶出させた．得られたメタノールを減圧濃縮後，残留物にクロロホルム・メタノール（9：1）溶液を15m*l*加え溶解した．この溶液をフロリジル（米山薬品，大阪）10gを湿式充填したカラムに負荷したのち，クロロホルム・メタノール（9：1）溶液100m*l*を用いて溶出させた．溶出液は減圧下で濃縮乾燥後，シリル化剤（N—トリメチルシリルイミダゾール・トリメチルクロルシラン・クロロホルム，1：0.2：9）0.5m*l*を加えたものを試験溶液としてガスクロマトグラフィー（以下GLCと略）を用いて毒素量の定量を行った．

C） HPLCの条件

AF，OTおよびST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Jasco100—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，AFの定量はWalter[17]の方法に従った．

カラム；日本分光25cm×4 mm(i.d.)ステンレスカラム．充鎮剤：Jasco ss—05．測定波長；350nm．溶出液；メタノール・水(70：30)，pH4.5．流速；1 m*l*/min．

OTはJosefson and Möller[18]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.

STは五十畑[19]の方法により定量した．

カラム；Jasco pack ss—05, 25cm×4 mm(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.

d) ・GLCの条件

*Fusarium*毒素の定量は，日立603型ガスクロマトグラフ(日立製作所，東京)を用い，上村ら[16]の方法に従い以下の条件で行った．

カラム；2%OV—17, 1 m×3 mm(i.d.)ガラスカラム．カラム温度；240℃．キャリアーガス；N_2．流速；25 m*l*/min．検出器；FID.

実験結果

各種保存料のmycotoxin産生菌に対する抗菌作用

a) デヒドロ酢酸およびデヒドロ酢酸ナトリウムの阻害効果

毒素産生菌4菌種のデヒドロ酢酸添加培地における発育と毒素産生量をTable 1に示した．すなわち，デヒドロ酢酸は62.5μg/m*l*で*A.versicolor*の，500μg/m*l*の濃度で*A.flavus*の発育をそれぞれ完全に阻止し，250μg/m*l*で*A.flavus*の発育を著しく阻害した(82%)．しかし，食品添加許容濃度の500μg/m*l*においても*A.ochraceus*の発育はわずかに認められ，*F.graminearum*の発育も70%程度阻害されたにすぎなかった．また，本物質はAFB$_1$産生を250μg/m*l*，OTAの産生を125μg/m*l*，ST産生を62.5μg/m*l*，DASP産生を125μg/m*l*およびT—2産生を62.5μg/m*l*の濃度で著しく（80%以上)阻害し，AF，DASPおよびT—2の産生に対しては，さらに低い濃度（7.8μg/m*l*）においても部分的に阻害した．

デヒドロ酢酸ナトリウムはTable 2に示したごとく，*A.versicolor*および*F.graminearum*の発育をそれぞれ71.3μg/m*l*で完全に阻止した．しかし，*A.flavus*および*A.ochraceus*の発育は570μg/m*l*の濃度においても80%程度阻害されたにすぎなかった．また，8.9μg/m*l*でDASPおよびT—2，35.6μg/m*l*でST，142.5μg/m*l*でOTの産生を完全に阻止し，285μg/m*l*でAFB$_1$の産生をそれぞれ約90%阻害した．

b) ソルビン酸およびソルビン酸カリウムの阻害効果

ソルビン酸はTable 3に示したように*F.graminearum*に対して最も強い阻害作用を示し，その発育を62.5μg/m*l*で，毒素産生を31.3μg/m*l*でそれぞれ完全に阻止した．また，*A.flavus*の発育を2,000μg/m*l*で完全に阻止し，毒素産生を1,000μg/m*l*で90%以上阻害した．*A.versicolor*および*A.ochraceus*の発育に対しては2,000μg/m*l*においてもそれぞれ21%および40%阻害したにすぎなかった．ST産生阻害率は500μg/m*l*の濃度において87%であった．しかし，OTAの産生は

Table 1. Inhibitory effect of dehydroacetic acid on the growth and mycotoxin production of toxigenic fungi

Concentration of dehydroacetic acid (μg/m*l*)	*A. flavus*			*A. ochraceus*			*A. versicolor*			*F. graminearum*				
	Mycelium		AF B_1*	Mycelium		OTA*	Mycelium		ST*	Mycelium		DASP*		T—2*
	mg/10m*l*	Inhibition (%)	μg/m*l*	mg/10m*l*	Inhibition (%)	μg/m*l*	mg/10m*l*	Inhibition (%)	μg/m*l*	mg/10m*l*	Inhibition (%)	μg/m*l*	Incibioion (%)	μg/m*l*
500	0	(100)	0	(100)	3	(99)	0	(100)	0	(100)	0	(100)	87	(70)	0	(100)	0	(100)
250	5	(82)	3	(97)	126	(77)	0	(100)	0	(100)	0	(100)	80	(72)	0	(100)	0	(100)
125	218	(23)	24	(76)	384	(31)	0.4	(89)	0	(100)	0	(100)	79	(73)	0	(100)	0	(100)
62.5	279	(1)	38	(62)	451	(18)	3	(14)	0	(100)	0	(100)	208	(28)	14	(77)	37	(95)
31.3	259	(8)	48	(52)	492	(11)	6	(0)	253	(4)	12	(34)	253	(12)	17	(72)	373	(52)
15.6	276	(2)	52	(48)	517	(7)	5	(0)	270	(0)	14	(22)	335	(0)	39	(35)	300	(62)
7.8	291	(0)	75	(25)	516	(7)	5	(0)	288	(0)	23	(0)	238	(18)	20	(66)	39	(95)
Control	282		99		552		4		264		18		289		60		784	

※ AF B_1：aflatoxin B_1, OTA：ochratoxin A, ST：sterigmatocystin, DASP：diacetoxyscirpenol, T-2：T-2toxin.

2,000μg/m*l* の濃度でも阻害されず，むしろ，対照に用いたソルビン酸無添加培地の1.5～2倍量の産生が見られた．

ソルビン酸カリウムは，ソルビン酸に較べてやや弱い抗菌活性が認められた．その抗菌パターンは Table 4 に示したように，*A. ochraceus*, *A. versicolor* の毒素産生および *F. graminearum* に対する阻害傾向はソルビン酸のそれとよく一致した．*F. graminearum* に対して特に強い抗菌活性を示し，167.5μg/m*l* で発育と DASP 産生を，83.8μg/m*l* でT－2産生をそれぞれ完全に阻止した．また，OTA の産生もソルビン酸の場合と同様にソルビン酸カリウム無添加培地より多量に産生される傾向が見られた．

c) プロピオン酸ナトリウムの阻害効果

Table 2. Inhibitory effect of sodium dehydroacetic acid on the growth and mycotoxin production of toxigenic fungi

	A. flavus		*A. ochraceus*		*A. versicolor*		*F. graminearum*		
	Mycelium	AF B_1	Mycelium	OTA	Mycelium	ST	Mycelium	DASP	T−2
Concentyation of Sodiun dehydroacetic acid (μg/m*l*)	mg／10m*l* Inhibition (%)	μg／m*l* Inhibition (%)	mg／10m*l* Inhibition (%)	μg／m*l* Inhibioion (%)	mg／10m*l* Inhibition (%)	μg／m*l* Inhibition (%)	mg／10m*l* Inhibition (%)	μg／m*l* Incibioion (%)	μg／m*l* Inhibition (%)
570	57(80)	4(96)	94(83)	0(100)	0(100)	0(100)	0(100)	0(100)	0(100)
285	185(34)	11(89)	115(79)	0(100)	0(100)	0(100)	0(100)	0(100)	0(100)
142.5	249(12)	47(53)	255(54)	0(100)	0(100)	0(100)	0(100)	0(100)	0(100)
71.3	258(9)	68(31)	446(19)	3 (29)	0(100)	0(100)	0(100)	0(100)	0(100)
35.6	288(0)	51(49)	503(9)	6 (0)	221 (16)	2 (88)	151 (48)	0(100)	0(100)
17.8	280(1)	92(7)	534(3)	4 (0)	253 (4)	22 (0)	257 (11)	11 (82)	14 (98)
8.9	302(0)	126(0)	545(1)	8 (0)	233 (12)	19 (0)	193 (33)	8 (86)	15 (98)
Control	282	99	552	4	264	18	289	60	784

Table 3. Inhibitory effect of sorbic acid on the growth and mycotoxin production of toxigenic fungi

	A. flavus		*A. ochraceus*		*A. versicolor*		*F. graminearum*		
	Mycelium	AF B_1	Mycelium	OTA	Mycelium	ST	Mycelium	DASP	T−2
Concentration of sorbic acid (μg/m*l*)	mg／10m*l* Inhibition (%)	μg／m*l* Idhibition (%)	mg／10m*l* Inhibition (%)	μg／m*l* Inhibioion (%)	mg／10m*l* Inhibition (%)	μg／m*l* Inhibition (%)	mg／10m*l* Inhibition (%)	μg／m*l* Inhibition (%)	μg／m*l* Inhibition (%)
2,000	0(100)	0(100)	434(21)	8(0)	158(40)	1(92)	0(100)	0(100)	0(100)
1,000	114 (60)	7 (93)	520 (6)	8(0)	163(38)	0.8(96)	0(100)	0(100)	0(100)
500	258 (9)	27 (73)	528 (4)	5(0)	139(47)	2(87)	0(100)	0(100)	0(100)
250	271 (4)	32 (68)	513 (7)	6(0)	210(20)	7(62)	0(100)	0(100)	0(100)
125	270 (4)	34 (66)	559 (0)	8(0)	240 (9)	18 (0)	0(100)	0(100)	0(100)
62.5	287 (0)	38 (62)	549 (1)	5(0)	244 (8)	13(26)	0(100)	0(100)	0(100)
31.3	292 (0)	32 (68)	518 (6)	6(0)	260 (2)	15(18)	168 (42)	0(100)	0(100)
Control	282	99	552	4	264	18	289	60	784

プロピオン酸ナトリウムはTable 5に示したように，最大添加許容量の3,250μg/m*l* においてもすべての接種菌の発育を阻止できなかった．また，毒素産生阻害作用も弱く，DASPおよびT－2の産生が1,625μg/m*l* の濃度で80%および93%阻害されたにすぎなかった．

d) パラオキシ安息香酸エチルの阻害効果

パラオキシ安息香酸エチルは150μg/m*l* で *F. graminearum* の発育を阻止し，300μg/m*l* で *A. versicolor* の発育を99%阻害した(Table 6)，さらに，4.7μg/m*l* の濃度でT－2の，75μg/m*l* でDASPの，300μg/m*l* でSTおよび AFB_1 の産生をそれぞれ80%以上阻害した．OTの産生はソルビン酸の場合と同様に4.7～300μg/m*l* の濃度においてむしろ増加する傾向を示した．

e) 安息香酸および安息香酸ナトリウムの阻害効果

安息香酸添加培地における各菌の発育および毒素産生

Table 4. Inhibitory effect of potassium sorbate on the growth and mycotoxin production of toxigenic fungi

Concentration of potassium sorbate (μg/m*l*)	*A. flavus*		*A. ochraceus*		*A. versicolor*		*F. graminearum*		
	Mycelium	$AF B_1$	Mycelium	OTA	Mycelium	ST	Mycelium	DASP	T—2
	mg/10m*l* Inhibioion (%)	μg/m*l* Inhibition (%)	mg/10m*l* Inhibition (%)	μg/m*l* Inhibition (%)	mg/10m*l* Inhibition (%)	μg/m*l* Inhibition (%)	mg/10m*l* Inhibition (%)	μg/m*l* Inhibition (%)	μg/m*l* Inhibition (%)
2680	297(0)	47(53)	434(21)	6 (0)	3(99)	0.1(99)	0(100)	0(100)	0(100)
1340	291(0)	85(15)	520 (6)	5 (0)	0.7(99)	0.5(97)	0(100)	0(100)	0(100)
670	282(0)	74(26)	528 (4)	3(14)	5(98)	4(80)	0(100)	0(100)	0(100)
335	280(1)	88(12)	513 (7)	3(14)	101(62)	7(60)	0(100)	0(100)	0(100)
167.5	275(3)	112 (0)	559 (0)	6 (0)	212(20)	13(25)	0(100)	0(100)	0(100)
83.8	259(8)	99 (1)	549 (1)	6 (0)	263 (0)	14(23)	83 (72)	2 (97)	2 (99)
41.9	288(0)	72(28)	518 (6)	6 (0)	233(12)	10(43)	217 (25)	4 (94)	13 (98)
Control	282	99	552	4	264	18	289	60	784

Table 5. Inhibitory effect of sodium propionate on the growth and mycotoxin production of toxigenic fungi

Concentration of sodium prorponate (μg/m*l*)	*A. flavus*		*A. ochraceus*		*A. versicolor*		*F. graminearum*		
	Mycelium	$AF B_1$	Mycelium	OTA	Mycelium	ST	Mycelium	DASP	T—2
	mg/10m*l* Inhibition (%)	μg/m*l* Inhibition (%)	mg/10m*l* Inhibition (%)	μg/m*l* Inhibition (%)	mg/10m*l* Inhibition (%)	μg/m*l* Inhibition (%)	mg/10m*l* Inhibition (%)	μg/m*l* Inhibition (%)	μg/m*l* Inhibition (%)
3250	281(0)	79(21)	469(15)	2(53)	204(23)	15(16)	53(82)	2(98)	11(99)
1625	293(0)	87(12)	494(11)	1(64)	223(15)	22 (0)	209(28)	12(80)	57(93)
812.5	312(0)	81(19)	501 (9)	2(53)	213(19)	20 (0)	174(40)	22(63)	206(74)
406.3	319(0)	97 (2)	524 (5)	1(66)	249 (6)	20 (0)	267 (8)	18(70)	135(83)
203.1	320(0)	85(15)	560 (0)	2(50)	272 (0)	14(18)	166(43)	22(64)	165(79)
101.6	309(0)	138 (0)	509 (8)	3(14)	265 (0)	16(12)	200(31)	5(92)	12(98)
50.8	299(0)	123 (0)	546 (1)	3(29)	279 (0)	21 (0)	163(44)	12(79)	11(99)
Control	282	99	552	4	294	18	289	60	784

量をTable 7に，安息香酸ナトリウム添加培地における成績をTable 8に示した．安息香酸添加培地においてはすべての濃度で4菌種すべての発育が認められ，毒素産生もT－2が75μg/mlで，AFB_1およびDASPが600μg/mlの濃度においてそれぞれ80%以上阻害されたにすぎなかった．

一方，安息香酸ナトリウムは安息香酸に比較して*F. graminearum*に対してはやや弱い抗菌活性を示し，180μg/mlの濃度でその発育を阻止した．また，DASPおよびT－2の産生を11.3μg/mlで80%以上阻害した．

考　察

各種加工食品は複雑な工程を経て製造され，極めて多様な包装形態で市販されている．このような食品の大部分はすでに多種多様な真菌胞子により汚染されており，mycotoxin産生菌の汚染もしばしば認められることは著者らのこれまでの調査[20-25]からも明らかとなってい

Table 6. Inhibitory effect of ethyl p-hydroxybenzoate on the growth and mycotoxin production of toxigenic fungi

Concentration of ethyl p-hydroxybenzoate (μg/ml)	*A. flavus*		*A. ochraceus*		*A. versicolor*		*F. graminearum*		
	Mycelium	$AF B_1$	Mycelium	OTA	Mycelium	ST	Mycelium	DASP	T—2
	mg/10ml Inhibition (%)	μg/ml Inhibioion (%)	mg/10ml Inhibition (%)	μg/ml Inhibition (%)	mg/10ml Inhibition (%)	μg/ml Inhibition (%)	mg/10ml Inhibition (%)	μg/ml Inhibition (%)	μg/ml Inhibition (%)
300	229(19)	12(88)	330(40)	5 (0)	3(99)	0.1(99)	0 (11)	0(100)	0(100)
150	280 (1)	70(30)	597 (0)	5 (0)	247 (7)	17 (6)	0(100)	0(100)	0(100)
75	297 (0)	73(26)	571 (0)	4 (0)	249 (6)	30 (6)	147 (49)	0(100)	0(100)
37.5	276 (2)	59(41)	513 (7)	3(29)	280 (0)	32 (0)	156 (46)	15 (75)	30 (96)
18.8	267 (5)	62(37)	517 (6)	4 (0)	274 (0)	26 (0)	164 (43)	22 (63)	49 (94)
9.4	281 (1)	58(41)	504 (9)	4 (0)	284 (0)	21 (0)	158 (45)	7 (88)	19 (98)
4.7	297 (0)	73(26)	494(11)	5 (0)	259 (2)	18 (0)	153 (47)	26 (57)	122 (84)
Control	282	99	552	4	264	18	289	60	784

Table 7. Inhibitory effect of benzoic acid on the growth and mycotoxin production of toxigenic fungi

Concentration of benzoic acid (μg/ml)	*A. flavus*		*A. ochraceus*		*A. versicolor*		*F. graminearum*		
	Mycelium	$AF B_1$	Mycelium	OTA	Mycelium	ST	Mycelium	DASP	T—2
	mg/10ml Inhibition (%)	μg/ml Inhibioion (%)	mg/10ml Inhibition (%)	μg/ml Inhibition (%)	mg/10ml Inhibition (%)	mg/ml Inhibition (%)	mg/10ml Inhibition (%)	μg/ml Inhibition (%)	μg/ml Inhibition (%)
600	260(8)	15(85)	489(12)	6(0)	250 (5)	12(35)	175(39)	0(100)	0(100)
300	273(3)	38(62)	543 (2)	5(0)	218(17)	31 (0)	154(47)	21 (65)	26 (97)
150	274(3)	43(57)	581 (0)	6(0)	280 (0)	33 (0)	222(23)	19 (67)	70 (91)
75	272(4)	47(53)	525 (5)	4(0)	277 (0)	37 (0)	312 (0)	12 (80)	61 (92)
37.5	280(1)	66(34)	524 (5)	8(0)	270 (0)	33 (0)	164(44)	90 (0)	213 (73)
18.8	277(2)	74(25)	537 (3)	6(0)	263 (0)	40 (0)	342 (0)	102 (0)	318 (59)
9.4	281(1)	77(22)	497(10)	10(0)	259 (2)	25 (0)	378 (0)	38 (36)	234 (70)
Control	282	99	552	4	264	18	289	60	784

る．食品に付着した汚染菌は流通過程で，あるいは消費者が購入後喫食するまでの間に増殖し，その食品の変質・変敗を招くこともまれではない．事実，高良[27]は都内の苦情届出食品の約1/3が真菌の発生によるものであり，保存料添加食品における真菌発生もしばしばみられると報告している．

一方，現在我が国で使用の許可されている保存料がその添加許容濃度の範囲で真菌に対して有効であるか否かについて，和宇慶ら[2]は空中由来真菌68菌種，高鳥ら[1]は保存株19菌種を指示菌として用いて検討し，ソルビン酸，安息香酸およびデヒドロ酢酸ナトリウムは許容濃度以下で多くのカビに対して有効であったのに対して，P—ヒドロキシ安息香酸エチルおよびプロピオン酸ナトリウムは弱い抗カビ作用を示したにすぎなかったことを報告している．ソルビン酸のAFB_1産生菌に対する抗菌性についてはすでに多くの研究者により調べられており[3-9]，Elbereir ら[4]は1,700μg/mlで，Przybylski ら[7]は500～1,000μg/mlで，坪内ら[6]は，1,500μg/mlの濃度でそれぞれ発育を完全に阻止したと報告している．

今回著者らも，各種保存料がmycotoxin産生菌に対して和宇慶ら[2]および高鳥ら[1]の報告とよく一致する抗菌パターンを示すことを明らかにした．また，ソルビン酸の*A. flavus*に対する最少発育阻止濃度もPrzybylski ら[7]の報告を除きいずれも著者らの成績に近似的な値であった．さらに，今回の結果から，デヒドロ酢酸およびデヒドロ酢酸ナトリウムは他の物質に較べ，*A. versicolor*に対して特に強い抗菌作用を示すこと，*F. graminearum*は他の菌種に較べ各種保存料に対する抵抗性の低いことが明らかとなった．ソルビン酸，安息香酸，安息香酸ナトリウムおよびP—ヒドロオキシ安息香酸エチル添加培地において，低濃度ではむしろ*A. ochraceus*のOT産生は増加した．同様の現象はソルビン酸において*A. parasiticus*[8]，*A. flavus*および*F. acuminatum*[28]との組合せにおいても見られることがすでに報告されている．

Elbereir ら[4]およびStewart ら[5]は，ソルビン酸およびプロピオン酸はAF産生菌に対して各々のナトリウムあるいはカリウム化合物に比較して強い抗菌活性を示すことを報告している．著者らも，ソルビン酸のみでなくデヒドロ酢酸とデヒドロ酢酸ナトリウムとの間にも同様の傾向がみられることを明らかにした．

今回の実験結果から，プロピオン酸ナトリウムおよび安息香酸はいずれも食品への使用基準濃度の範囲内においては4種のmycotoxin産生菌の発育と毒素産生を阻止できないことが判明した．しかし，これらの保存料の食品中における実質的効果については，その活性が食品成分，水分活性，pH，包装形態など種々の因子の影響により左右されると考えられることから，今後さらに実際に食品を用いて詳細な検討を行ったうえで判断すべきであろうと考える．

結　論

Mycotoxin産生菌の発育および毒素産生に及ぼす各種保存料の影響について，人工培地を用いて検討し以下の結論を得た．

Table 8. Inhibitory effect of sodium benzoate on the growth and mycotoxin production of toxigenic fungi

Concentration of sodium benzoate (μg/ml)	*A. flavus*		*A. ochraceus*		*A. versicolor*		*F. graminearum*		
	Mycelium	$AF B_1$	Mycelium	OTA	Mycelium	ST	Mycelium	DASP	T—2
	mg/10ml Inhibition (%)	μg/ml Inhibition (%)	mg/10ml Inhibition (%)	μg/ml Inhibition (%)	mg/10ml Inhibition (%)	μg/ml Inhibition (%)	mg/10ml Inhibition (%)	μg/ml Inhibition (%)	μg/ml Inhibition (%)
720	271(4)	27(73)	503 (9)	5 (0)	228(14)	11(44)	0(100)	0(100)	0(100)
360	277(2)	43(57)	535 (3)	5 (0)	235(11)	28 (0)	0(100)	0(100)	0(100)
180	267(5)	62(38)	514 (7)	5 (0)	268 (0)	21 (0)	0(100)	0(100)	0(100)
90	286(0)	65(35)	515 (7)	5 (0)	280 (0)	22 (0)	227 (21)	0.2(99)	7 (99)
45	290(0)	92 (7)	494(11)	5 (0)	269 (0)	19 (0)	275 (5)	11 (83)	29 (96)
22.5	277(2)	105 (0)	499(10)	3(29)	270 (0)	36 (0)	188 (35)	9 (84)	21 (97)
11.3	291(0)	109 (0)	535 (3)	5 (0)	269 (0)	25 (0)	193 (33)	11 (82)	32 (96)
Control	282	99	552	4	264	18	289	60	784

1 デヒドロ酢酸は *A. ochraceus* 以外の3菌種の発育とOTの産生を，デヒドロ酢酸ナトリウムは *A. flavus* および *A. versicolor* の発育とOT，DASPおよびT－2の産生を，ソルビン酸は *A. flavus* および *F. graminearum* の発育を，ソルビン酸カリウム，P－ヒドロオキシ安息香酸エチルおよび安息香酸ナトリウムは *F. graminearum* の発育をそれぞれ食品への添加許容量の範囲で完全に阻止した．また，いずれもそれ以下の濃度で各菌の発育と毒素産生を部分的に阻害した．しかし，プロピオン酸ナトリウムおよび安息香酸にはわずかな発育阻害活性が認められたにすぎなかった．

2 デヒドロ酢酸およびデヒドロ酢酸ナトリウムは他の保存料に較べ，*A. versicolor* に対して強い発育阻害作用を示した．

3 *F. graminearum* は今回供試した4種のmycotoxin産生菌のうちで，各保存料により最も発育および毒素産生を阻害された．

文　献

1) 高鳥浩介，中尾美津男：厚生省食品衛生調査研究費による「カビおよびカビ毒に関する研究」年次報告，昭和52年度報告，50，1977

2) 和宇慶朝昭，一言　広，諸角　聖，坂井千三，菅原通夫，佐藤史朗，山岸善樹：東京都衛生局学会誌，**67**，138，1981

3) Vicini, E., Palini, L. and Casolani, A.：*Ind. Consereve*, **49**, 173, 1974

4) Elbereir, M., Kung. G., Grunert, K. S. and Franke, C.：*Nahrrung*, **19**, K 3, 1975

5) Stewart, R. G., Wyatt, R. D. and Ashmore, M. D.：*Poultry Sci.*, **56**, 1630, 1977

6) 坪内春夫，山本勝彦，久田和夫，坂部美雄，森山繁隆：食衛誌，**22**，142，1980

7) Przybylski, K. S. and Bullerman, L. B.：*J. Food Sci.*, **45**, 375, 1980

8) Yousef, A. E. and Marth, E. H.：*J. Food Protect.*, **44**, 736, 1981

9) *Liewen, M. B. and Marth, E. H.*：*J. Food Protect.*, **47**, 554, 1984

10) Liewen, M. B. and Marth, E. H.：*J. Food Protect.*, **48**, 156, 1985

11) Reddy, T. V., Viswanasan, L and Venkitasubramanian. T. A.：*Appl. Microbiol.* **22**, 393, 1971

12) Davis, N. D., Diener, U. L. and Eldridqe, D. W.：*Appl Microbiol.*, **14**, 378, 1966

13) Hitokoto. H., Morozumi, S., Wauke, T. and Sakai, S：*Mycopathol.*, **78**, 99, 1982

14) Ueno, Y., Sawano, M. and Ishii, K.：*Appl. Microbiol.*, **14**, 378, 1966

15) 諸角　聖：真菌と真菌症，**19**，172，1978

16) 上村　尚，西島基弘，斉藤和夫，高橋尚子，井部明広，落合節子，直井家寿太：食衛誌，**19**，443，1978

17) Walter, A. P.：*J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**, 586, 1979

18) Josefsson, E. and Möller. T.：*J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**, 1165, 1979

19) 五十畑悦子，武田由比子，内山　充：食衛誌，**17**，392，1979

20) 一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，善養寺　浩：東京衛研年報，**24**，41，1972

21) 一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，善養寺　浩，倉田　浩，一戸正勝：食衛誌，**14**，364，1973

22) 一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，坂井千三，善養寺　浩：東京衛研年報，**25**，17，1974

23) 一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，坂井千三，善養寺　浩：東京衛研年報，**26**，30，1975

24) 一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，坂井千三，善養寺　浩，辺野喜正夫：東京衛研年報，**27**，36，1976

25) Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T., Sakai, S. and Kurata, H.：*Mycopathol.* **73**, 33, 1981

26) 諸角　聖，和宇慶朝昭，一言　広，菅原通夫，鵜野尚道：東京衛研年報，**32**，121，1981

27) 高良実之：食品衛生微生物研究会講演要旨集，**2**，31，1981

28) Gareis, M., Montgelas, B. A. and Gedek, B.：*Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 416, 1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 151-154, 1985

加熱気化一金アマルガム法による母乳中の総水銀の定量

山野辺 秀 夫*, 竹 内 正 博*, 水 石 和 子*, 江波戸 擧 秀*,
風 間 成 孔**, 渡 辺 四男也*

Determination of Total Mercury in Human Milk by Heating Vaporization-Gold Amalgamation Method

HIDEO YAMANOBE*, MASAHIRO TAKEUCHI*, KAZUKO MIZUISHI*, KIYOHIDE EBATO*
MASAYOSHI KAZAMA**and YOHYA WATANABE*

The heating vaporization-gold amalgamation method was applied to determination of trace amounts of total mercury in human milk. This method eliminated the most serious problem in determination by use of additive reagents. The coefficient of variation of the reproducibility was 1.95% for a human milk sample containing mercury. Recoveries of mercury added at the levels of 0.50ng and 1.00 ng were 97.9% and 102.0% and coefficients of variation 2.80% and 1.96% respectively. When this method was applied to 153 samples of human milk, the average and standard deviation of 0.99 ppb and 0.67 ppb were obtained.

Keywords：加熱気化一金アマルガム法 heating vaporization-gold amalgamation method, 総水銀 total mercury, 母乳human milk.

緒　　言

水銀汚染の問題は水俣病の例を引くまでもなく，大きな社会問題としてここ十数年来注目されており，食品および環境汚染の監視が広く行なわれている．これまで水銀による汚染はそれを使用する特定工場からの廃出が主要な経路であると考えられ種々の対策が立てられた．ところが最近になって，乾電池の廃棄および焼却に伴なう土壌汚染，大気汚染に強い関心が持たれ，これまでとは別の新たな経路による汚染の進行も懸念されるようになった．

このような状況の下に，著者らは魚介類を中心とする食品中の水銀含有量の調査を行なっているが，今回は人体の水銀暴露量の指標として母乳中の水銀含有量を測定することにした．現在主として使用される水銀の定量法には，酸分解一還元気化法および加熱気化一金アマルガム法がある．前者は感度が低く多量の試料を必要とするが，後者は気化した水銀を金アマルガムとして補集し再加熱することによって一度に水銀蒸気を遊離させるため高感度が得られる．したがって，多量の試料を採取することが困難な生体試料中の水銀の定量には，加熱気化一金アマルガム法が有効な方法であると考えられる．そこで加熱気化一金アマルガム法による母乳中の微量水銀の定量法を検討したところ，操作も簡便で，分析精度も良好な実用性の高い方法であることが認められた．

実験方法

試料　昭和59年4月から12月までの9か月間に東京都内在住の産婦から採取して出産後3～10日目の初乳153検体である．

試薬　水銀標準液（和光純薬製）1,000ppmを適宜希釈して用いた．希釈液はL—システイン（和光純薬製，特級）10mgを水に溶かし硝酸（和光純薬製，有害金属測定用）2 m*l*を加えて1,000m*l*とし冷暗所に保存した．試料測定用添加剤として炭酸ナトリウム・水酸化カルシウム（1：1）混合物（日本インスツルメント社製，添加剤

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 同生活科学部食品添加物研究科

M)および活性アルミナ(同，添加剤B)をそれぞれ700℃で3時間以上加熱してから用いた．水銀補集剤は塩化金をクロモソルブに焼き付けたもので，外径6 mmの石英管に80mg充填して使用した．

装置 理学マーキュリー／SP型（日本インスツルメント株式会社製）を使用した．装置の概略をFig. 1に示す．本装置は加熱分解部(A，B)，水銀補集部(E，G)，検出部（K，L）から構成されている．試料をあらかじめ700℃で1時間以上加熱した磁製の燃焼ボートに正確に採り，加熱分解部（A）に入れる．所定の分解温度，時間で遊離した水銀は酸化炉（B）を通り，水洗（C）脱水（D）されて第一水銀補集室（E）で捕集される．マルチパス自動バルブ（F）が60°回転して第二補集室（G）に接続し，Eの急激な加熱によって遊離した水銀がGにトラップされる．次いでFが再び60°回転し流路が検出部（K）に接続され，Gが加熱され水銀ガスがKに入り原子吸光測定される．

測定条件 加熱分解の時間と温度を適切に設定することは，本装置の機能を十分に発揮させるのに不可欠の要素である．加熱温度はLowモード（最高温度700℃）およびHightモード（最高温度900℃）の2通りの設定が可能であり，また各モードは直線昇温でなく二段昇温方式を採っている．加熱時間は各ステップ毎に任意に変えることが可能で，温度と時間の組み合せにより種々の加熱条件を選択できる．今回測定対象とした母乳については，種々検討の結果最適条件としてTable 1に示す加熱条件を設定した．

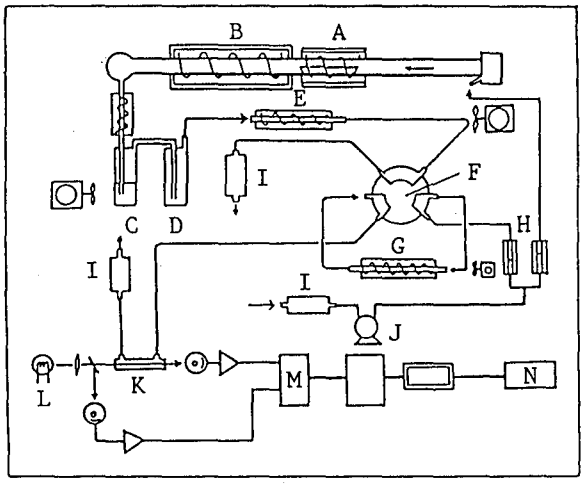


Fig. 1. Schematic diagram of apparatus for the determination of mercury

A : Heating furnace
B : Oxidizing furnace
C : Washing bottle
D : Condenser
E : lst mercury trapping room
F : Multipass-autobulb
G : 2nd mercury trapping room
H : Flow meter
I : Activated charcoal
J : Air pump
K : Absorption cell
L : Hg discharge tube
M : Amplifier
N : Recorder

試料の採取方法 試料の採取方法および添加剤の使用方法をFig. 2に示す．母乳は脂質および塩類が多量に含まれており，そのままでは正確な定量ができないばかりでなく，加熱炉をはじめ流路を汚染するため分析が不能になることが予備試験の結果明らかとなった．そこで，測定妨害物を抑える目的で添加剤を使用した．添加剤Mは試料の加熱によって生じる酸性ガスを中和除去するためのもの，Bは試料全体を均一に加熱するためのものであり，試料約0.4 gに対してMを約2 g，Bを約1 g使用した．

結果および考察

検量線の作成 1,000ppm水銀標準液を希釈し0.01 ppm標準溶液を調整した．ついでマイクロピペットを使用して25—200μl（Hgとして0.25—2.0ng）をFig. 2に示したように採取し，水銀の測定を行なったところ原点

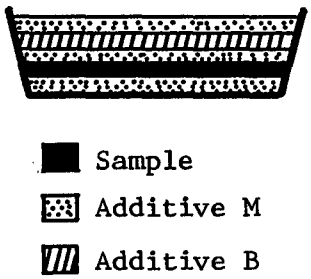


Fig. 2. Method of packing for sample and additives
M : Na_2CO_3 : $Ca(OH)_2$ = 1 : 1
B : activated Al_2O_3

Table 1. Operating conditions for the determination mercury

Mode	Low mode
Time	1st step(400°C) 4 min.
	2nd step(700℃) 6 min.
Calibration	5 ng
Recorder	10mV
	chart speed 600mm/h

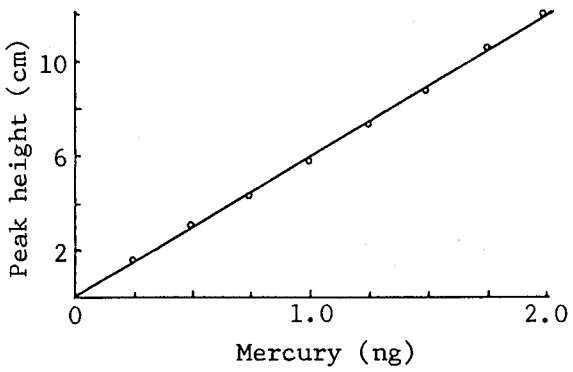


Fig. 3. Calibration curve for mercury

Table 2. Recovery of mercury added to human milk

Added(ng)	Found(ng)	Recovery(%)	
0.50	0.51	102.0	A.V.97.9%, C.V.2.80%
	0.51	102.0	
	0.47	94.0	
	0.47	94.0	
	0.47	94.0	
1.00	1.01	101.0	A.V. 103.0% C.V. 1.96%
	1.00	100.0	
	1.03	103.0	
	1.01	101.0	
	1.05	105.0	

を通る直線が得られた．この検量線を Fig. 3 に示す．このときの定量限界は0.02ng であった．また感度を切換えることによって，0—100ng の広い範囲で良好な直線性が得られた．

再現性 水銀の含有が認められた母乳約0.4g を精秤して，繰り返し10回測定した結果，平均は2.17ppb，変動係数は1.95%であり，分析精度は極めて高いといえる．

添加回収実験 母乳0.2g を精秤し，それに水銀0.50 ng および1.00ng を添加しそれぞれ 5 回づつ前述の方法で測定した．Table 2 に示すように，水銀0.50ng 添加したグループでは回収率94.0—102.0%，平均97.9%，変動係数2.80%，1.00ng 添加したグループでは回収率100.0—105.0%，平均102.0%，変動係数1.96%であった．

以上の結果から本定量法は，精度および回収率ともに優れており，また操作性においてもこれまでの還元気化法に比べて簡便であり母乳中の総水銀の定量法として有用性が高いことが認められた．

母乳中の総水銀の定量 本法を用いて母乳中の水銀の

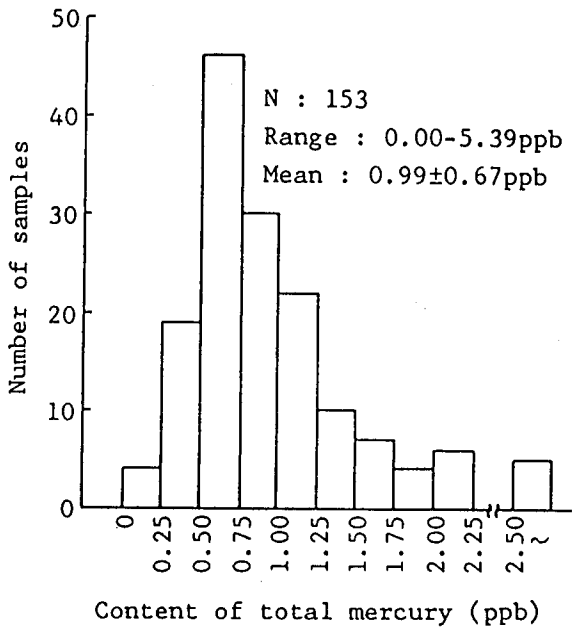


Fig. 4. Histogram of total mercury contents of humaman milk

定量を行なった．測定結果を Fig. 4 に0.25ppb の区間をもって作成したヒストグラムで示した．最高は5.39ppb，最低は0.05ppb 未満，平均0.99ppb，標準偏差は0.67ppb であった．中央値は0.79ppb で，平均値は中央値よりかなり右側に片寄っているが，これは2.50ppb 以上のデータが大きく影響しているためと考えられる．そこで最高値5.39ppb について Dixson の棄却検定を行なったところ，明らかに異常値と判定できた．

これまで母乳中の水銀は，三谷ら[1]，および Fujita ら[2]がともに酸分解—還元気化法で行なっており，それぞれ2.3ppb（標準偏差1.5ppb），3.6ppb（標準偏差2.2ppb）という値を報告している．今回の結果はこれらより有意に低い値となったが，このことは母乳中の水銀が低減傾向にあるのか，あるいは分析法および母集団の相違に基づく差であるのか今回結論することができなかったので今後も本法を用いて継続的に母乳中の水銀調査を実施する予定である．

要 約

1 加熱気化—金アマルガム法による母乳中の総水銀定量法を検討したところ，精度および回収率に優れかつ操作も簡便であり，日常分析法として満足できる結果が得られた．

2 本法を母乳153検体に適用したところ，最高5.39

ppb，最低0.05ppb 未満，平均および標準偏差は0.99ppb および0.67ppb の結果が得られた．

（本研究の概要は日本食品衛生学会第48回学術講演会昭和59年10月で発表した．）

文　献

1）三谷一憲，星野道雄，児玉京子，近藤正人，小瀬洋喜：衛生化学，22，327，1976

2）Fujita, M. and Takabatake, E.：Bull. Environ. Contam. Toxicol. 18, 205, 1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 155-157, 1985

母乳中の Mg, Ca, Fe, Cu, Zn の含有量について

江波戸 擧 秀*, 竹 内 正 博*, 水 石 和 子*, 山野辺 秀 夫*,
風 間 成 孔**, 渡 辺 四男也*, 鵜 沼 洋 子***,
南 條 静 代***, 中 沢 秀 夫***

Mg, Ca, Fe, Cu and Zn Content in Human Milk

KIYOHIDE EBATO*, MASAHIRO TAKEUCHI*, KAZUKO MIZUISHI*, HIDEO YAMANOBE*
MASAYOSHI KAZAMA**, YOHYA WATANABE*, YOUKO UNUMA***,
SHIZUYO NANJOU*** and HIDEO NAKAZAWA***

Two-hundred samples of human milk were taken from women residing in Tokyo.

The content of magnesium, calcium, iron, copper and zinc were determined by flame atomic absorption spectrometry.

The results were as follows:

1) The average content of the elements in human milk were 30.3ppm of magnesium, 256ppm of calcium, 0.73ppm of iron, 0.51ppm of copper and 4.17ppm of zinc.

2) Zinc and iron decreased with the passage of time after delivery, but magnesium and calcium did not show much variation.

3) The average magnesium content in samples taken from anemic women except those taken from the group 21-60 days after delivery did not show any significant difference compared to those from non-anemic women.

Keywords: humanmilk, magnesium, calcium, iron, copper, zinc, anemia, non-anemia

諸　　言

最近，乳幼児の栄養に関してその微量元素の重要性が指摘されており[1,2]，とくに栄養源である母乳について微量元素の含有量測定が行われるようになってきている[3,4,5]．

しかし現在，日本人の食生活は過去に例をみないほど多様化しており，母乳組成にも影響している可能性が考えられる．そこで，今回乳幼児の必須多量元素である Mg, Ca, 必須微量元素である Fe, Cu, Zn の母乳中含有量，および出産後の授乳時期による母乳中含有量を測定し，さらに，妊婦の貧血出現率は約15%といわれていることから，貧血のある母親と貧血のない母親の母乳中含有量も比較検討したので報告する．

実験方法

1　**試薬**　Mg, Ca, Fe, Cu および Zn 標準溶液：1,000ppm 原子吸光分析用標準液（和光純薬），硫酸，硝酸および過塩素酸：有害金属測定用（和光純薬），過酸化水素水：原子吸光分析用（和光純薬）を用いた．

2　**装置**　原子吸光分析装置：日本ジャーレル・アッシュ社製 AA8200型．

3　**試料**　1984年4月～1984年12月の9か月間，都内の産院で147名の母親より出産後3日から120日の間，1～2回，母乳を200試料採取した．

母乳採取と同時にアンケート調査を行い，その結果，

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
*** 同生活科学部食品添加物研究科
** 東京都豊島区長崎保健所

Table 1. Operating Conditions of Instrument

Element	Mg	Ca	Fe	Cu	Zn
Wavelength(nm)	285.2	422.7	248.3	324.7	213.9
Lamp current(mA)	10	10	10	10	10
Fuel gas ($kg/cm^2-l/min$)		C_2H_2 (0.5−2.5)			
Oxdant gas ($kg/cm^2-l/min$)		Air(1.5−8.0)			

Instrument : Nippon Jarrel—Ash Model AA—8200 Type
Burner head : water—cooled one slot.

母親の年令構成は20～24才７名，25～29才47名，30～34才68名，35～39才22名，40才以上３名であった．

貧血の有無について，貧血のある人71名，貧血のない人69名，未回答７名であり，貧血があると答えた人のうち25名は出産時まで，あるいは出産後も増血剤を服用していた．

4　試料溶液の調製　母乳は50m*l* ポリエチレン容器に冷所保存し，分析時水浴上で加温して分離した脂肪分を溶解して均一な溶液としたのち，その４～５ gを100 m*l* ケルダールフラスコに精秤し，硫酸0.5m*l*，硝酸１m*l*，過塩素酸0.5m*l* を加えて常法通り湿式分解を行うが，分解液が淡黄色に変化したとき過酸化水素水１ m*l* を加えて脂肪分の分解促進と同時に硝酸の除去を行い，白い泡だちの消えた状態で放冷し，冷後，正確に５ m*l* とし原子吸光測定用試料液とする．

5　原子吸光測定条件　原子吸光測定は重水素ランプでバックグランド補正を行い，Mg は10倍希釈，Ca は50倍希釈，その他の元素は原子吸光測定用試料液を直接アセチレン—空気炎に導入する方法で測定し，その条件はTable 1 に示した．

各元素の検量線濃度範囲は Mg および Ca は０～10 $\mu g/ml$，Fe, Cu および Zn は０～５ $\mu g/ml$ であり，バーナーヘッドの角度は，各元素のピーク高さが最適の位置になるよう調整して用いた．

実験結果および考察

母乳中の元素平均含有量は Table 2 に示した．各元素の平均含有量は Ca> Mg> Zn> Cu，Fe であり，必須微量元素では Zn が Cu，Fe に比較して１桁高い値であった．Mg の平均値30.3ppm は本邦の従来の報告[3,6,7]とほぼ等しく，Ca の平均値256ppm は松永ら[6]の290ppm，四訂日本食品成分表[8]の270ppm より低い値であった．Fe の平均値0.73ppm は松永ら[6]の0.31ppm と比較して約２倍高い値であったが，四訂日本食品成分表[8]の１ ppm より低い値であった．Cu の平均値0.51ppm は四訂日本食品成分表[9]の6.1ppm より１桁低く，従来の報告[3,5,7]では出産後時間の経過とともに Cu 含有量が減少する傾向があるため，採乳時の検体数のかたよりなどにより平均値の変動が予想され，単純な平均値の比較はむずかしいと考えられた．Zn の平均値4.17ppm は松永ら[6]の1.16ppm の約４倍高い値であるが，Cu と同様，出産後時間の経過とともに Zn 含有量が減少することから単純な平均値の比較はむずかしいと考えられた．

Table 2.　Content of Elements in Human Milk

Element	$\bar{x}\pm SD$	Range
Mg	30.3±7.38	(14.5−51.6)
Ca	256±88	(14.5−472)
Fe	0.73±0.71	(0.28−6.78)
Cu	0.51±0.17	(0.11−1.07)
Zn	4.17±1.72	(0.54−12.9)

(ppm)

つぎに山本ら[3]の報告に準じて分娩後の経過日数を５群に分類して，各元素の平均値と標準偏差を Table 3 に示した．Table 3 より Mg の平均値の最大値は21—60日群の31.6ppm，平均値の最小値は11—20日群の27.2ppm と出産後の経過日数によって変動は少なく他の報告[3,6,7]と同一の傾向があった．Ca の平均値の最大値は21—60日群の283ppm，平均値の最小値は11—20日群の209ppm と大きな変動はみられず，田中ら[7]の報告と一致した．Fe は３－５日群，６—10群でそれぞれ，0.70ppm，0.71ppm であるが，61—120日群で0.32ppm と半減しており，従来の報告[7]と同様な傾向があった．Cu は３－５日群で0.55 ppm，61—120日群で0.44ppm と20%減少しているが，他の報告[3,5,7]にみられる同期間の減少率31～35%よりは小さかった．Zn は３－５日群が4.77ppm，61—120日群で1.30ppm と約４倍の濃度差があり，田中ら[7]の７倍，山本ら[3]の2.5倍の中間的な値であった．

つぎに貧血があると答えた人の各元素の平均含有量と標準偏差は Table 4 に示した．Table 4 は11—20日群，60—120日群は例数が少ないため省略した．Mg は21—60日群で非貧血者群と比較して平均値の差の検定で差がみられた他は平均値間の差はなかった（$P<0.05$）．Ca は３群とも平均値間に差はなく，Fe の平均値は非貧血者群

Table 3. Content * of Elements in Human Milk(ppm)

Days after Childbirth	Mg	Ca	Fe	Cu	Zn	N
3—5	30.3±8.13	253±90	0.70±0.34	0.55±1.16	4.77±1.38	67
6—10	30.1±5.81	259±89	0.71±0.34	0.58±0.17	4.84±1.40	60
11—20	27.2±6.64	209±90	0.59±0.30	0.54±0.19	4.06±1.00	11
21—60	31.6±8.09	283±66	0.86±1.25	0.44±0.15	3.22±1.81	56
61—120	29.3±3.86	240±103	0.32±0.20	0.44±0.18	1.30±0.31	6

N : number of samples
* $\bar{X}\pm SD$

Table 4. Content * of Elements in Human Milk of Anemia and Non- Anemia(ppm)

Days after Childbirth	Symptoms	Mg	Ca	Fe	Cu	Zn
3—5	Anemia	29.1±8.77	244±76	0.65±0.29	0.59±0.16	4.61±1.42
	Non-Anemia	31.3±7.34	257±103	0.74±0.39	0.54±0.16	4.86±1.39
6—10	Anemia	31.2±4.48	260±101	0.69±0.31	0.56±0.14	4.74±1.30
	Non-Anemia	29.2±7.07	259±70	0.72±0.38	0.72±0.71	4.77±1.56
21—60	Anemia	29.2±8.25	290±65	0.56±0.25	0.42±0.02	2.85±1.20
	Non-Anemia	33.6±7.54	284±61	1.19±1.70	0.44±0.13	3.50±2.17

* $\bar{X}\pm SD$

が若干高い傾向にあるが，平均値の差の検定では差がなかった．Cuは3群とも平均値間に差がなく，Znは非貧血者群の平均値が貧血者群より若干高い傾向があるが，平均値の差の検定では差がなかった．

つぎに相関関係のみられた元素の組合せは，貧血があると答えた人では出産後3－5日群ではCu—Fe，Zn—Fe，Ca—Zn，Cu—Zn，Cu—Mg，Zn—Mg，6－10日群ではCu—Zn，21—60日群ではCu—Zn，貧血がないと答えた人では3－5日群ではZn—Fe，Cu—Zn，6—10日群ではCu—Zn，Zn—Mgとなり，出産後早い時期にCu，Mg，Znなどが相関のある場合が多いことがわかった．

結　論

Mg，Caは出産後の含有量の変動は少なく，Fe，Znは出産後時間の経過とともに減少する傾向があった．貧血のある母親と貧血のない母親の母乳中含有量の比較ではMgの21—60日群に平均値の差がみられた他は差がなく，また，Fe，Znは非貧血者の平均値が若干高い傾向にあるものの平均値の差の検定では差がなかった．

文　献

1）宮尾益英，鈴江純史：小児科臨床，32，1251，1979
2）小林　登，鈴木義之：小児科学大糸補遺，234，1974，中山書店，東京
3）山本良郎，米久保明得，飯田耕司，高橋　断，土屋文安：小児科，22，1477，1981
4）東　明正，池田哲雄，上原伊都子，松田一郎，安武律：小児科臨床，33，2239，1980
5）多田　裕，藤野紀子，財満耕二，西原潔子，小林　登：周産期医学，10，613，1980
6）松永明信，渡辺正雄：日衛誌，35，186，1981
7）田中俊行，杉山恭子，船川一彦，能勢隆之：日衛誌，36，240，1981
8）科学技術庁資源調査会編：四訂日本食品成分表，165，1982，医歯薬出版，東京
9）科学技術庁資源調査会編：四訂日本食品成分表，309，1982，医歯薬出版，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 158-163, 1985

Yersinia enterocolitica の分離方法の再検討——CIN 培地とアルカリ処理の併用による各種材料からの分離成績

金子誠二*, 丸山 務*, 神崎政子*, 小久保彌太郎*
神保勝彦*, 松本昌雄*, 竹重都子**

Isolation Methods for *Yersinia enterocolitica*——Result of *Y. enterocolitica* Isolation from Various Materials by Concurrent Use of CIN Medium and Alkali Treatment

SEIJI KANEKO*, TSUTOMU MARUYAMA*, MASAKO KANZAKI*, YATARO KOKUBO*, KATSUHIKO JINBO*, MASAO MATSUMOTO* and KUNIKO TAKESHIGE**

In order to reassess methods of isolating *Yersinia enterocolitica* from several kinds of meat and animals, detection and identification rates were compared regarding the following four methods ; direct plating on CIN medium and MacConkey agar (MAC) after PBS cold enrichment and on these two medium treated with alkali (KOH) respectively. A total of 437 specimens obtained from retailed pork, beef and chicken as well as swabs of swine carcasses, swine feces, swine cecum contents, bovine mesenteric lymph nodes and bovine feces obtained from abattoir were used.

Detection rates of *Y. enterocolitica* were 1.6%, 13.7%, 27.2% and 34.7%, respectively, for MAC, CIN, KOH-MAC and KOH-CIN. On the other hand, identification rates of *Y. enterocolitica* with regard to number of fishing was 6.9%, 23.4%, 50.2% and 67.7%, respectively, for MAC, CIN, KOH-MAC and KOH-CIN. Most of the isolates were non pathogenic strains of biotype 1 according to Wauters' classification. KOH-CIN showed highest detection rate (4.4%) of pathogenic strains.

It was thus demonstrated that alkali treatment after PBS cold enrichment is an excellent method to isolate *Y. enterocolitica* from meat and animals and that by using CIN medium in combination, the detection rate of *Y. enterocolitica* can be further improved.

Keywords : *Yersinia enterocolitica*, meat, animal, CIN medium, alkali treatment.

緒　言

食肉や環境材料から *Yersinia enterocoitica* を分離する方法は，リン酸緩衝液(PBS)を用いた低温選択増菌法とマッコンキー寒天やSS寒天などの腸内細菌用培地とを組み合わせた方法が採用されてきた[1-3]．しかし，この方法は糞便で用いられている方法なので，食肉や環境材料の場合は，これらの主要菌叢である低温細菌も同時に分離される．このため，分離平板上に多くの夾雑菌が発育して，夾雑菌と *Y. enterocolitica* の集落との鑑別が困難であり，分離・同定のために数多くの集落を釣菌しなければならない．

このような分離・同定上の問題を解決するために，Aulisio ら[4]は *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* がアルカリに対して比較的抵抗性のあることを利用して，PBS 低温増菌後に水酸化カリウムを用いたアルカリ処理法を開発した．Doyle と Hugdahl[5]，De Boer ら[6]，Lee ら[7]，Stern と Oblinger[8]および Weissfeld と Sonnenwirth[9]はそれぞれアルカリ処理が食肉や糞便から *Y. enterocolitica* を分離する有効な方法であることを報告している．また Schiemann[10,11]は，*Y. enterocolitica*

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 芝浦食肉衛生検査所

と種々の菌株の色素や抗菌剤に対する抵抗性を検討して，Cefsulodin-irgasan-novobiocin(CIN)培地を開発した．Harmon ら[12]と Head ら[13]はそれぞれ豚肉とヒトの糞便に *Y. enterocolitica* を接種し，その回収率を数種類の培地と比較した．その結果，CIN 培地が分離培地として最も優れていることを確認している．

われわれは，アルカリ処理の実際的な条件と CIN 培地の有効性を基礎的に検討したところ，PBS 低温増菌後のアルカリ処理は0.4%水酸化カリウムで30秒間処理し，分離培地に CIN 培地を用いれば *Y. enterocolitica* の分離率を高めることができることを報告した[14]．

今回は，アルカリ処理と CIN 培地を用いて食肉および家畜の糞便や盲腸内容物を対象に，従来用いられていた方法との比較で検討した．また，CIN 培地の選択性を検討するために，発育集落の簡易同定検査も行なった．

材料および方法

1．対象検体　東京都23区内の食肉販売店より採取した豚肉44検体，牛肉29検体および鶏肉68検体，およびと場で採取した豚枝肉ふきとり材料112検体，豚糞便28検体，豚盲腸内容物36検体，牛腸間膜リンパ節60検体および牛糞便60検体，合計437検体を対象とした．

2．使用培地　増菌培地に PBS(pH7.6)，分離培地に CIN 培地（Yersinia Selective Agar Base に Yersinia Selective Supplement を添加：Oxoid）とマッコンキー寒天（栄研化学）を用いた．

3．*Y. enterocolitica* の分離・同定　食肉，糞便，盲腸内容物および腸間膜リンパ節は約 1 g を10m*l* の PBS に加えた．豚枝肉ふきとり材料は，肩部100cm²をガーゼでふきとり，10m*l* の生理食塩水に洗い出しその 1 m*l* を10m*l* の PBS に接種した．これらの接種材料は 4 ℃，21日間増菌培養を行なった．分離方法は，CIN 培地およびマッコンキー寒天へ直接塗抹する方法とこれにそれぞれアルカリ処理を組み合わせた計 4 種類の方法を用いた．アルカリ処理は，われわれが報告した条件で行なった[14]．すなわち，4.5m*l* の0.4%水酸化カリウム加0.5%食塩水に PBS 増菌液0.5m*l* を加え，ボルテックス・ミキサーで30秒間激しく混合し，その 1 白金耳を分離培地に塗抹した．

塗抹後，CIN 培地は32℃で24時間，マッコンキー寒天は25℃で48時間培養して *Yersinia* 属菌と思われる集落を釣菌した．*Y.enterocolitica* およびその類縁菌は，Table 1 に示した各種生化学的性状試験を行ない鑑別した[15]．*Y. enterocolitica* と同定された菌株は，市販診断用抗血清（デンカ生研）を用いたスライド凝集反応により血清型O3, O5：27, O8 および O9 の病原株を検索した．

Table 1. Biochemical Characteristics of *Yersinia enterocolitica* and Other *Yersinia*

Test	*Y.entero-colitica*	*Y.intermedia*	*Y.frede-riksenii*	*Y. kris-tensenii*	*Y. pseudotu-berculosis*
Voges-Proskauer	+	+	+	+	−
Urease	+	+	+	+	+
Indole	V *	+	+	+	−
Lysine -Decarboxybse	−	−	−	−	−
Ornithine -Decarboxylase	+	+	+	+	−
β-Galactocidase	+	+	+	+	+
Acid production from					
D-Cellobiose	+	+	+	+	−
Galactose	+	+	+	+	+
Lactose	−	−	−	−	−
D-Melibiose	−	+	−	−	+
L-Rhamnose	−	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	−	−
L-Sorbose	+	+	+	+	−
D-Sorbitor	+	+	+	+	−
Salicin	V	+	+	+	+
Motility (25℃)	+	+	+	+	+
(37℃)	−	−	−	−	−

* V：variable

4．CIN 培地に発育した集落の同定　アルカリ処理をした材料を塗抹した CIN 培地と無処理の材料を塗抹した CIN 培地上に発育した各50株の集落について，ID-テスト（日水製薬）を使用して同定した．

結　果

1　分離法別 *Y. enterocolitica* の検出状況

Y. enterocolitica の各種材料からの4方法による検出状況を Table 2 に示した．マッコンキー寒天直接塗抹法（MAC 法），CIN 培地直接塗抹法（CIN 法），アルカリ処理-マッコンキー寒天塗抹法（KOH-MAC 法）およびアルカリ処理-CIN 培地塗抹法（KOH-CIN 法）での *Y. enterocolitica* の検出率は，それぞれ1.6%，13.7%，27.2%および34.7%であった．これら陽性検体のうち，病原株と *Y. pseudotuberculosis* が検出されたのは，MAC 法では豚盲腸内容物から1検体，CIN 法では豚肉から1検体と豚盲腸内容物から2検体の計3検体，KOH-MAC 法では豚肉から3検体と豚盲腸内容物から4検体の計7検体，KOH-CIN 法では豚肉から4検体，豚糞便から1検体および豚盲腸内容物から3検体の計8検体であった．*Y. pseudotuberculosis* は，KOH-MAC 法で豚盲腸内容物の1検体から検出された．

2．釣菌数に対する *Y. enterocolitica* の同定率

MAC 法，CIN 法，KOH-MAC 法および KOH-CIN 法を用いた釣菌数に対する *Y. enterocolitica* の同定率は，それぞれ6.9%，23.4%，50.2%および67.7%であった（Table 3）．これらのうち，病原株は MAC 法では豚盲腸内容物から1株，CIN 法では豚肉から2株と豚盲腸内容物から5株の計7株，KOH-MAC 法では豚肉から3株と豚盲腸内容物から6株の計9株，KOH-CIN 法では豚肉から5株，豚糞便から3株および豚盲腸内容物から7株の計15株をそれぞれ分離した．すなわち，釣菌数に対する病原株の同定率は，それぞれ MAC 法では0.2%，CIN 法では1.7%，KOH-MAC 法では2.9%および KOH-CIN 法では4.4%であった．また，*Y. pseudotuberculosis* は KOH-MAC 法で分離した1株で，その血清型はIIIであった．

3．CIN 培地に発育した集落の菌種　CIN 法と KOH-CIN 法で分離された *Y. enterocolitica* 様集落の菌種の内訳を Table 4 に示した．*Y. enterocolitica* とその他の *Yersinia* 属菌は CIN 法で50株中35株，KOH-CIN 法で50株中42株であった．*Yarsinia* 属以外の菌種は *Enterobacter* 属，*Serratia* 属，*Citrobacter* 属，*Proteus* 属および *Pseudomonas* 属であった．

考　察

Table 2. Comparison of Detection Rate of *Yersinia enterocolitica* from Various Materials Using Four Methods

Isolaton Methods	No. of	Pork	Beef	Chicken	Swine: Swabs of Carcases	Swine: Feces	Swine: Cecum Contents	Bovine: Mesenteric Lymph Nodes	Bovine: Feces	Total
	Samples	44	29	68	112	28	36	60	60	437
MacConkey	No. of Detection	3	0	0	0	1	1	2	0	7
	Pathogenic	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	Detection Rate(%)	6.8	0	0	0	3.6	2.8	3.3	0	1.6
CIN	No. of Detection	10	7	18	1	8	8	6	2	60
	Pathogenic	1	0	0	0	0	2	0	0	3
	Detection Rate(%)	22.7	24.1	26.5	0.9	28.6	22.2	10.0	3.3	13.7
KOH-MacConkey	No. of Detection	20	13	32	20	7	10	17	0	119
	Pathogenic	3	0	0	0	0	4*	0	0	7
	Detection Rate(%)	45.5	44.8	47.1	17.9	25.0	27.8	28.3	0	27.2
KOH-CIN	No. of Detection	31	20	47	16	9	11	14	4	152
	Pathogenic	4	0	0	0	1	3	0	0	8
	Detection Rate(%)	70.4	68.9	69.1	14.3	32.1	30.5	23.3	6.7	34.7

* Including *Yersinia pseudotaberculosis*

Table 3. Comparison of Identification Rate of *Yersinia enterocolitica* from Various Materials Using Four Methods

Isolation Methods		Pork	Beef	Chicken	Swine		Bovine		Total
					Feces	Cecum Contents	Mesenteric Lymph Nodes	Feces	
MacConkey	No. of Fishing	78	52	113	45	18	57	59	422
	Positive	14(17.9)	4(7.7)	7(6.2)	1(2.2)	1(5.6)	2(3.5)	0	29(6.9)
	Pathogenic	0	0	0	0	1(5.6)	0	0	1(0.2)
CIN	No. of Fishing	81	56	124	25	47	54	24	411
	Positive	16(19.8)	12(21.4)	23(18.5)	9(36.0)	21(44.7)	12(22.2)	3(12.5)	96(23.4)
	Pathogenic	2(2.5)	0	0	0	5(10.6)	0	0	7(1.7)
KOH | MacConkey	No. of Fishing	86	45	107	24	26	20	1	309
	Positive	39(45.3)	20(44.4)	46(43.0)	14(58.3)	19(73.1)	17(85.0)	0	155(50.2)
	Pathogenic	3(3.5)	0	0	0	6(23.1)*	0	0	9(2.9)
KOH | CIN	No. of Fishing	83	58	110	18	37	31	7	344
	Positive	52(62.7)	36(62.1)	70(63.6)	16(88.9)	27	26(83.9)	6(85.7)	33(67.7)
	Pathogenic	5(6.0)	0	0	3(16.6)	7(18.9)	0	0	15(4.4)

Figures in parenthesis indicate the percent. * Including one strain of *Yersinia pseudotuberculosis*

Table 4. Results of Identification of *Yersinia enterocolitica*-like Colony Grown on CIN Medium

Species	Isolation Methods	
	CIN	KOH | CIN
Yersinia enterocolitica	32	38
Yersinia kristensenii		1
Yersinia frederiksenii	1	1
Yersinia intermedia	2	2
Enterobacter agglomerans		1
Enterobacter aerogenes	1	3
Serratia marcescens	1	
Serratia liquefaciens	1	1
Serratia spp.	2	
Citrobacter freundii	2	
Proteus spp.	2	
Pseudomonas spp.	2	
Unidentified	4	3
Total	50	50

Figures in table indicate the number of identified strains.

Y. enterocolitica は，動物の腸管内をはじめとして食肉や環境中に広く分布していることが知られている[16]．これらの疫学調査に際し，本菌の分離方法は調査材料の種類に関係なく，ヒトの糞便を対象にした検査方法をそのまま採用してきたのが現状である．このため，本法で *Pseudomonas* 属菌などの低温細菌が主要菌叢である食肉等から，*Y. enterocolitica* の分離をすると，分離培地上に多くの夾雑菌や類似集落が発育し，*Y. enterocolitica* の分離・同定上の大きな妨げとなっていた．CIN 培地[11]はこのような欠点を補い，*Y. enterocolitica* とその類縁菌以外の菌の発育を抑制し，*Yersinia* 属菌は特徴的な集落形態を示し，その分離を容易にしたものである．また，低温増菌後のアルカリ処理法[4]は *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* がアルカリに対して比較的抵抗性であることを利用して夾雑菌を排除することを目的として開発された．

われわれは，前報で PBS 低温増菌後のアルカリ処理と CIN 培地の併用が *Y. enterocolitica* の分離効果を高めることを報告した[14]．今回，市販食肉や家畜の糞便などを対象に，KOH-CIN 法を応用して *Y. enterocolitica* の検出率と釣菌数に対する本菌の同定率を検討した．

CIN 法は確かに検出率，同定率ともに MAC 法より優れていた．両方法にアルカリ処理を併用した KOH-CIN 法，KOH-MAC 法は検出率がともに高まり，食肉では KOH-CIN 法を用いた場合特に検出率が高くなった．同定率でも KOH-MAC 法，KOH-CIN 法が MAC 法，CIN 法より 2 倍以上高まることが明らかとなった．このことは，われわれが以前報告したように，アルカリ処理を行なうことでマッコンキー寒天や CIN 培地に発育可能な *Y. enterocolitica* 類似集落が減少した結果である．さらに病原株である O3，O5：27 および O9は，KOH-CIN 法を用いた場合最も検出率が高く，病原株の検索でも本法が優れていることが明らかとなった．

一方，アルカリ処理の有無で CIN 培地上に発育可能な菌種の構成がどのように変化するかをみたところ，無処理の場合は CIN 培地上に多くの菌種が出現したが，アルカリ処理により夾雑菌種が確実に減少した．CIN 培地上に発育する夾雑菌種のうち，*E. agglomerans* や *S. liquefaciens* は Devenish と Shiemann[17]によっても報告されているが，これらの菌種の占める割合はわれわれの成績ではわずかであり，分離・同定上の問題とはならなかった．

以上の成績から，食肉や家畜の糞便などを対象とした *Y. enterocolitica* の分離には，PBS 低温増菌後アルカリ処理を行ない CIN 培地に塗抹する方法が極めて効果的であることが明らかとなった．しかしながら，本法は PBS で長期間増菌する必要があるので，日常検査法としては好ましくない．今後は，短期間の選択増菌法を開発すれば *Y. enterocolitica* を迅速に分離・同定できるであろう．

要　約

Yersinia enterocolitica を食肉や家畜の糞便などから分離する方法を検討した．対象検体は市販の豚肉，牛肉および鶏肉，と場より得た豚枝肉ふきとり材料，豚糞便，豚盲腸内容物，牛腸間膜リンパ節および牛糞便で，合計437検体である．これらを PBS 低温増菌後，アルカリ処理(KOH)したものとしないものについて，CIN 培地とマッコンキー寒天(MAC)に塗抹するという 4 つの分離方法を用いて検出率および同定率を比較した．

Y. enterocolitica の検出率は MAC 法，CIN 法，KOH-MAC 法および KOH-CIN 法でそれぞれ1.6%，13.7%，27.2%および34.7%であった．一方，釣菌数に対する *Y. enterocolitica* の同定率は MAC 法，CIN 法，KOH-MAC 法および KOH—CIN 法でそれぞれ6.9%，23.4%，50.2%および67.7%であった．なお，病原株の検出率が最も高かったのは KOH-CIN 法の4.4%であった．

これらのことより，食肉や家畜の糞便などから *Y. enterocolitica* を分離するには，PBS 低温増菌後アルカリ処理を併用した CIN 培地を使用する方法が高い検出率を示すことがわかった．

文　献

1) Paterson, J.S. and Cook, R.：*J. Path. Bact.*, 85, 241, 1963
2) Eiss., J.：*Scand. J. Infect. Dis.*, 7, 249, 1975
3) Pai, C.H., Songer, S., Lafleur, L., Lackman, L. and Marks, M.I.：*J. Clin. Microbiol.*, 9, 712, 1979
4) Aulisio, C.C.G., Mehlman, I.J. and Sanders, A.C.：*Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 135, 1980
5) Doyle, M.P. and Hugdahl, M.B.：*Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 127, 1983
6) De Bore, E., Hartog, B.J. and Oosterom, J.：*J. Food Prot.*, 45, 332, 1982
7) Lee, W.H., Harris, M.E., McClain, D., Smith, R.E. and Johnston, R.W.：*Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 205, 1980
8) Stern, N. J. and Oblinger, J. L.：*J. Food Prot.*, 43,

706, 1980
9) Weissfeld A.S.and Sonnenwirth,A.C.：*J.Clin. Microbiol.*,15, 508, 1982
10) Schiemann, D. A. ：*Appl. Environ. Microbiol.*,38, 205, 1979
11) Schiemann, D. A.：*Can. J. Microbiol.*, 25, 1298, 1979
12) Harmon,M.C.,Yu,C.L.and Swaminathan,B.：*J.Food Sci.*,48, 6, 1983
13) Head,C.B.,Whitty,D.A.and Rarnam,S.：*J. Clin.Microbiol.*,16, 615, 1982
14) 金子誠二, 神保勝彦, 小久保彌太郎, 松本昌雄, 丸山 務：食衛誌, 25, 424, 1984
15) Bercovier,H.,Brenner,D.J.,Ursing,J.,Steigerwalt,A.G.,Fanning,G.R.,Alonso,J.M., Carter,G.P.and Mollaret,H.M.：*Curr.Microbiol.*, 4, 201, 1980
16) Lee,W.H.,Vanderzant,C.and Stern,J.：*Yersinia enterocolitica*,Bottone,E.J.161,1981,CRC Press,Florida

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 164-167, 1985

Yersinia enterocolitica 血清型 O3, 生物型 3 の年次別検出状況

丸山　務*, 神崎政子*

Chronological Changes in Detection Ratio of *Yersinia enterocolitica* Serotype O3 ; Biotype 3

TSUTOMU MARUYAMA*and MASAKO KANZAKI*

Six hundred thirty eight strains of *Yersinia enterocolitica* serotype O3(O:3) isolated from men and animals were classified by biotypes during the period of 14 years from 1971 to 1984 and distribution of biotypes was chronologically studied. The method according to Wauters and Bercovier was slightly modified to classify VP positive strain as biotype 4(B:4) and VP negative strain as biotype 3(B:3). B:3 was further divided into two subtypes of positive and negative strains by sorbose; B:3A and B:3B.

Of 243 strains derived from sporadic patients, 30 obtained during the period from 1971 to 1972 were B:4. However, B:3 which appeared in 1973 for the first time gradually decreased, and 12 out of 15 strains (80%) were B:3 in 1983. Initially, B:3 were mainly B:3A, but in 1980s, B:3B came to replace B:3A. In other words, in the last 14 years biotypes derived from men changed from B:4 to B:3A and then to B:3B. Outbreak of 9 cases occurred in Japan between 1972 and 1981. However, all of these were of O:3 classified as B:4.

The change in biotype noted in human strains is similarly seen in the strains derived from animals such as pigs, dogs, cats and rats. B:3 appeared earlier in pig strain than in human strain and the detection frequency of B:3B was also higher. Of the 283 strains isolated during the period from 1983 to 1984, 66, 46 and 171 were respectively B:4, B:3A and B:3B.

Keywords : chronological change, *Yersinia enterocolitica*, serotype, biotye

Yersinia enterocolitica の血清型と生物型とは相互に密接な関係があり，ヒトに病原性のあるものは数種の限られた組みあわせであることが知られている[1]．わが国も含めて世界各地で患者から病原として最も頻繁に分離されている血清型O:3 (O:3) であり，その生物型はWautersの4 (B:4) であるとされてきた．しかしながら最近になってO:3の中で生物型3 (B:3)に該当する菌株が分離されるようになり，特に病原株の保菌動物であるブタではその分離率が高いことも報告されてきた[2]．

私達は早速このO:3, B:3の菌株の病原性について検討したところ，Yersinia 属の病原指標であるカルシウム依存性，自己凝集性，マウス腸管定着性などがB:4と同じであり，しかもこれら諸性状がいずれも約44Mdのプラスミドの支配を受けていることを示唆する成績を得た[3]．

そこで，今回はこれら病原性が同じであるO:3の中でB:3に該当する菌がいつ頃から出現し，どのような検出状況で推移してきたかをわが国で本菌がはじめて分離された1971年にまでさかのぼってヒトおよび動物由来株で検討した．

材料および方法

供試菌株は1971年から1984年までの14年間に当研究所で分離したもしくは同定型別依頼を受けてO:3と確認したヒト由来243, ブタ由来343, イヌ由来42, ネコ由来5, ネズミ由来5の計638株である．ヒト由来株はすべて散発例の主として下痢症患者のふん便から，動物由来株はすべて健康な個体の腸間膜リンパ節，回盲部内容物またはふん便から分離されたものである．またブタ由来株は全

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

国のと畜場で，それ以外の由来株は主として東京で分離されたものである．

血清型の確認は自家調製の家兎免疫因子血清を用いてスライド凝集反応によって判定した．生物型別はWauters[1]およびBercovier[4]の記載に従い，25℃でのVP反応陽性，xylose陰性をB:4，25℃でのVP反応陰性，xylose陽性をB:3とし，B:3はsorboseによってB:3AとB:3Bの2つの亜型に分類した．

成　績

供試した638株をヒト，ブタ，イヌおよびネコ，ネズミの4種の由来に分け，分離した年次毎にそれぞれを生物型に分類してTable 1に示した．

供試菌株はすべてB:4またはB:3に型別された．由来ごとにB:3の検出される割合は，ヒト，ブタ，イヌおよびネコ，ネズミでそれぞれ30.9%，64.7%，21.3%，20.0%であった．このB:3の出現は，ヒト由来株では1973年になってはじめて18株中2株にみられ，以後1984年まで毎年検出された．一方ブタ由来株ではヒトよりも1年早く，1972年に30株中2株，また，イヌおよびネコ，ネズミでは1975年になってそれぞれ12株中1株，5株中1株から検出された．

年次別にみたB:3の占める割合は，ヒトおよび動物由来株ともに，毎年同様に増加傾向がみられたので，供試全株をまとめてTable 2に示した．すなわち，B:3は1972年にはじめて出現し，この時の50株中わずか2株(4.0%)であったものが1973～1975年では10%台，1977年は45.5%，1983年には82.1%となった．

供試した638株のうち，B:3と同定された計308株についてさらに3Aと3Bの2つの亜型に分類した．ヒト由来株と，ブタ，イヌ，ネコ，ネズミは動物由来株としてまとめ，年次別に両亜型の分類をTable 3に示した．1972，1973の両年はヒト，動物由来ともにB:3の菌株はすべてB:3Aであったが，1974年にはヒト由来の4株にB:3Bがはじめて検出された．ヒト由来株では1981年まではB:3AがB:3Bより多いが，1982年以降B:3Bの割合は高くなる．一方，動物由来株では菌株数が少なく，特に1978～1982年は菌株が無いのでこの間の経過は不明であるが，1983年になるとブタ由来のB:3，84株中76株89%がB:3Bによって占められていた．

考　察

Y. enterocolitica の生物型は，はじめNiléhn[5]によって提案され，Wauters[1]がこれをより簡略化して5つの型にまとめたものが現在世界的に広く用いられている．これによると，B:4とB:3はlactoseとxyloseの2つの糖分解によって分けられる．一方，Bercovier[4]らは環境由来株を用いて生物形別を行い，基本的にはWautersの分類に従いながらもB:4とB:3はxyloseとVP反応を鑑別点とした．また，B:3の中でsorboseとinositolによって

Table 1. Chronological Distribution of *Y. enterocolitica* O3;B4 and O3;B3 Strains Isolated from Various Sources

Year	Human			Pig			Dog, Cat			Rat		
	Number of isolate	Biotype 4	Biotype 3	Number of isolate	Biotype 4	Biotype 3	Number of isolate	Biotype 4	Biotype 3	Number of isolate	Biotype 4	Biotype 3
1971	10	10	0									
1972	20	20	0	30	28	2						
1973	18	16	2	30	27	3						
1974	21	17	4				17	17	0			
1975	28	23	5				12	11	1	5	4	1
1976	43	29	14				6	3	3			
1977	19	12	7				3	0	3			
1978	12	8	4									
1979	12	7	5									
1980	11	6	5									
1981	13	6	7									
1982	17	9	8				1	1	0			
1983	15	3	12	100	16	84	2	2	0			
1984	4	2	2	183	50	133	6	3	3			
Total	243	168	75	343	121	222	47	37	10	5	4	1

3Aと3Bの2つの亜型を設けた.Wauters と Bercovier の両分類とも B:4と B:3の鑑別性状には xylose をあげているが，この糖分解能の判定は遅分解も含めてしばしば困難な場合があり，VP 反応の方がより明瞭な区別が可能である．また inositol 分解能は著者らが今回用いたヒトおよび動物由来株には48時間以内に陽性となる菌株は1株も無かった．従って，著者らは上記生物型別の原法とは若干異なるが，VP 反応陽性株を B:4，陰性株を B:3とし，この B:3の中で sorbose 陽性を B:3A，陰性を B:3B とすることが最も妥当であると考え，この規準に従って型別を行った。

Table 2. Isolation of *Y. enterocolitica* O3 Biotype 4 and 3 During the Period 1971 Through 1984

Year	Number of isolate	(%) Biotype 4	3
1971	10	10	0
1972	50	48	2(4.0)
1973	48	43	5(10.4)
1974	38	34	4(11.8)
1975	45	38	7(15.6)
1976	49	32	17(34.7)
1977	22	12	10(45.5)
1978	12	8	4(33.3)
1979	12	7	5(41.7)
1980	11	6	5(45.5)
1981	13	6	7(53.8)
1982	18	10	8(44.4)
1983	117	21	96(82.1)
1984	193	55	138(71.5)
Total	638	330	308(48.3)

わが国における *Y. enterocolitica* の最初の分離例は1971年，下痢症患者から検出された O:3であるが，この菌株も含めて1971年と1972年に分離された計30株と，1972年に相ついで発生した3例の集団事例はいずれも典型的な O:3, B:4であったことからその後の分離株も十分な検討がなされないまま O:3の生物型は4であるという固定観念が定着してきたといえよう．しかしながら今回の成績からも明らかなように，病原株である O:3には B:4と B:3とがあり，この B:3の菌はすでに1972年に本邦に存在していたことが確認された。

ヒト由来株における B:3は1973年に18株中2株(11%)が初めて出現し，その検出率は徐々に増加し，1980年代には B:4と同じかこれを上わまる様相に推移している．動物由来株でも同様の傾向がうかがえるが，B:3の出現とその検出頻度はヒトのそれよりも早い年代にあらわれている．また，ブタでは O:3の検出率そのものは1970年代のはじめと1980年代では特に差異はみられないが，分離株の中で B:3の占める割合は1970年代の8.3%から1980年代では76.6%となっており，B:3の菌がこの保菌動物で広く浸透してきたことがうかがわれる．

Table 3. Subtypes of *Y. enterocolitica* O3;B3 Isolated from Human and Animals

Year	Total Number of isolate	Total Subtype 3A	Total Subtype 3B	Human Number of isolate	Human Subtype 3A	Human Subtype 3B	Animals Number of isolate	Animals Subtype 3A	Animals Subtype 3B
1972	2	2	0	0			2	2	0
1973	5	5	0	2	2	0	3	3	0
1974	4	3	1	4	3	1	0		
1975	7	6	1	5	4	1	2	1	0
1976	17	8	9	14	8	6	3	0	3
1977	10	5	5	7	4	3	3	1	2
1978	4	3	1	4	3	1	0		
1979	5	3	2	5	3	2	0		
1980	5	3	2	5	3	2	0		
1981	7	4	3	7	4	3	0		
1982	8	3	5	8	3	5	0		
1983	96	9	87	12	1	11	84	8	76
1984	138	40	98	2	1	1	136	39	97
Total	308	94	214	75	39	36	233	54	178

B:3の中で亜型の変遷もまた経時的に認められる．すなわち，ヒト由来株でも動物由来株でもB:3が出現しはじめた1970年代の前半は3Aのみであったものが，1974年にはじめて出現した3Bは年毎に増加し，1980年代に入ると3Bが主流を占めるに至った．この現象もまたブタにおいて顕著であり，地域による差もみられない．

すなわち，1970年～1980年にかけてわが国で分離される *Y. enterocolitica* O:3の生物型は全国的にB:4からB:3Aへ，さらにB:3Bへと推移したといえよう．ただし，今回この報告に菌株を含めていないが，1972年から1981年までに発生した9例の集団事例は，すべてO:3であるがその生物型は典型的なB:4であったことが確認されている．

Y. enterocolitica のO:3でB:3が増加してきている現象は諸外国にはその報告例をみないが，わが国ではこの他にも最近福島ら[6]はB:4には該当するが，ornithin陰性あるいはmaltose陰性など非定型的性状を示す菌が出現してきていることを指摘している．O:3で病原性も同じでありながら生物性状の表現型が異なる菌の出現や変遷を今後も注目してゆく必要があると考える．

要　約

1971年から1984年までの14年間にヒト，動物から分離した *Yersinia enterocolitica* 血清型O3,638株について生物型別を行い，菌型の推移を年次別に観察した．

ヒト散発患者由来の243株のうち，1971～1972年の30株はすべて生物型4（B:4）であったが，1973年に出現したB:3が以後年々増加し，1983年には15株中12株（80%）がB:3によって占められた．B:3のうち1973年当初は3Aであったが1980年代ではB:3Bが主流となった．すなわち，ヒト由来株の生物型はこの14年間でB:4からB:3Aへさらに B:3Bへ推移したといえる．

ヒト由来株にみられた菌型の変遷はブタ，イヌ，ネコ，ネズミなどの動物由来株にも同様の傾向がみられた．特にブタ由来株ではB:3の出現がヒトよりも早く，またB:3Bの検出頻度も高かった．1983～1984年に分離された283株中B:4，B:3A，B:3Bの数はそれぞれ66，46，171であった．

文　献

1）Wauters G.:*Contribution a l'étude de Yersinia enterocolitica*, 1970, Vander, Louvain, Bergium

2）Fukushima, H., Tsubokura, M., Otsuki, k. and Kawaoka, Y.:*Current Microbiol.*, 11, 149, 1985

3）金子誠二，丸山　務：第52回日本細菌学会関東支部総会，1984

4）Bercovier, H., Brault, J., Barre, H., Treignier, M., Alonso, M.J. and Mollaret, H.H.:*Current Microbiol.*, 1, 353, 1978

5）Niléhn, .:*Acte Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.*, 206, 1, 1969

6）福島　博，坪倉　操，大槻公一，河岡義裕：第99回日本獣医学会，1985

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 168-173, 1985

食品中のエリソルビン酸，L-アスコルビン酸の同時分析法及び含有量調査

井部明広*，斉藤和夫*，中里光男*，菊地洋子*，
藤沼賢司*，二島太一郎*

Simultaneous Detection and Determination of Erythorbic Acid and L-Ascorbic Acid by Thin Layer Chromatography and High Performance Liquid Chromatography and Survey of Their Contents in Commercial Foods

AKIHIRO IBE*, KAZUO SAITO*, MITSUO NAKAZATO*, YOKO KIKUCHI*,
KENJI FUJINUMA*and TAICHIRO NISHIMA*

A method for the simultaneous detection and determination of erythorbic acid (ErA) and L-ascorbic acid (AsA) in foods by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) is described.

ErA and AsA were extracted from the sample with metaphosphoric acid solution and separated on a cellulose plate (pre-treated with 1% metaphosphoric acid) with methyl ethyl ketone saturated with water as the developing solvent. ErA and AsA were detected as white spots on the purplish-red background after being sprayed with 0.03% indophenol reagent. The detection limit of ErA and AsA was 50 ng on the TLC plate.

ErA and AsA were determined by HPLC on a column of LiChrosorb-NH_2 (pre-treated with 0.1M ammonium phosphate monobasic solution) with a mobile phase of acetonitrile-0.01M potassium phosphate monobasic solution (80:20) mixture at 254 nm. The recoveries of ErA and AsA added to food at 100 and 500 mg/kg were in the range of 94-103%. The detection limit of ErA and AsA in food was 10 mg/kg.

Using the prosed method,232 samples of commercial foods were analyzed.ErA was detected in 23 samples at tne range of 60-1115 mg/kg.AsA was detected in 115 samples at the range of 10-365000 mg/kg.Both of ErA and AsA were simultaneously detected in 5 samples.

Keywords : erythorbic acid, L-ascorbic acid, thin layer chromatography, high performance liquid chromatography

緒　言

エリソルビン酸（以下 ErA と略す）は酸化防止剤として，L-アスコルビン酸（以下 AsA と略す）は同様の目的の他，強化剤としてそれぞれ単独に，あるいは同時に食品に用いられている．ErA と AsA は共に使用量，対象食品の制限もなく使用が認められているにもかかわらず，今まで簡易な同時分析法がなかったため，食品中の ErA と AsA の含有量を同時に分析した報告は見あたらない．そこで，食品中の ErA と AsA の使用状況を知る目的で，ErA と AsA の同時分析法，すなわち薄層クロマトグラフィー（以下 TLC と略す）を用いた定性法及び高速液体クロマトグラフィー（以下 HPLC と略す）を用いた定量法について検討を行った．また，本法を用いて市販品の含有量調査を行ったので併せて報告する．

実験方法

1．試料

昭和58年1月から昭和60年5月までに都内で市販されていた清涼飲料水57検体，漬物64検体，食肉製品42検体，

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

かん詰27検体及びその他の食品42検体計232検体を分析に供した.

2．試薬

1)ErA及びAsA標準溶液：D-イソアスコルビン酸及びL-アスコルビン酸（いずれも和光純薬工業㈱製）をそれぞれ1％メタリン酸溶液に溶解し，それぞれ10～100 ppmになるように調製した.

2)展開溶媒：水飽和メチルエチルケトン（以下MEKと略す）

3)インドフェノール溶液：2,6ジクロロインドフェノールナトリウム（和光純薬工業㈱製）30mgを水に溶解し，100m*l*とした後沪紙でろ過した.

4)その他の試薬は特級を用いた.

3．装置

1)薄層プレート：セルロースプレート（メルク社製）に1％メタリン酸溶液を均一に噴霧し，湿潤した後室温で自然乾燥した.

2)液体クロマトグラフ：日本分光工業㈱製TRI ROTAR-II

3)検出器：日本分光工業㈱製UVIDEC-III

4．HPLC測定条件

カラム：LiChrosorb-NH_2 10μm 4.6mmid×250mm（0.1Mリン酸一アンモニウムを0.5m*l*/minで25時間送液したもの），移動相：アセトニトリル・0.01Mリン酸一カリウム溶液（80：20）混液，流速：1.2m*l*/min，測定波長：254nm，注入量：10μl

5．試験溶液の調製

固体試料は40gを秤取し，10％メタリン酸溶液20m*l*及び水40m*l*を加えて3～5分間ホモジナイズした後，水で200m*l*とした後良く混和し，沪紙でろ過を行い試験溶液とした.

液体試料は20gを秤取し，10％メタリン酸溶液10m*l*を加え，水で100m*l*とした後良く混和し，沪紙でろ過を行い試験溶液とした.

6．TLCによる定性

試験溶液20μl及び100ppmのErA及びAsA標準溶液の10μlを薄層プレートに塗布して，約15cm展開した後，インドフェノール溶液を噴霧し，赤紫色の背景に，白色スポットの有無を標準品と比較して同定した.

7．HPLCによる定量

試験溶液をメンブランフィルター（0.45μ）でろ過し，ろ液を4の条件下で測定し，あらかじめ作成した検量線から定量値を算出した.

結果及び考察

1．TLC条件の検討

ErAとAsAの定性法は，1980年版衛生試験法[1]にペーパークロマトグラフィー（以下PCと略す）による方法が掲載されていたが現在は削除されている．PCは展開に5～6時間を要し，検出感度も約1 μgと低い等，多数の検体を迅速かつ感度良く検査するには欠点があったが，PCは同時に多数の検体を同定できる利点があることから，これらの問題点を改良するためにTLCの適用について検討を行った.

プレートはペーパーと物性の似たセルロースプレートを用いて検討を行った．セルロースプレートはPCの場合と同様に展開中のErAとAsAの分解を防ぎ，また，分離を良くする目的でメタリン酸による処理を行った．その際，PCでは3％メタリン酸に浸漬しているが，セルロースプレートでは固定相の剥離を防ぐため，メタリン酸溶液を噴霧することにした．そこで，0.1,0.5,1,3,5,10％のメタリン酸溶液で処理したプレートを用いて，MEK展開溶媒で展開した際の，メタリン酸濃度とErA及びAsAの分離に与える影響について検討した．その結果，0.1,0.5,1,3％では両者の分離が良く，5％，10％とメタリン酸の濃度が高くなるに従って両者の分離が悪くなった．そこで，メタリン酸の濃度は3％以下とすることとし，両者の分解を防ぐことも考慮して1％メタリン酸溶液で処理することにした．この条件ではErAとAsAのRf値はそれぞれ0.42,0.32であり，検出感度はそれぞれ0.05μgとPCに比較して約20倍増加した．なお，両者は1 μg以下で良く分離し，2 μg以上では接近して分離が悪くなるため，1 μg以下となるようにスポットすることにした.

展開溶媒についてはMEKの他に，展開中にErA，AsAが酸化されにくいという報告[2]のあるアセトニトリル・アセトン・10％メタリン酸（80：5：15）について検討した結果，ErAとAsAの分離及び感度共にMEKの場合と特に差は見られなかった．しかし，MEKがより安定な分離を示したため，以後MEKを用いることにした.

本法を各種の試料に適用したところ，ErAとAsAと同一Rf値を示しインドフェノールを還元して脱色するような妨害物は見られなかったが，濃縮ジュースなどショ糖濃度が高いものではテーリングする傾向があったため，ショ糖のTLCに与える影響について検討した．1，5，10及び15％のショ糖溶液でErA，AsAがそれぞれ50ppmになるように調製し，TLC上にスポットし展開したところ，10％以上でAsAがテーリングしErAとの分離も悪くなったため，試験溶液はショ糖濃度が10％

以下となるように希釈することにした.

2. HPLC条件の検討

ErAとAsAのHPLCによる分離定量法は，すでにArakawa[3]ら，Bui-Nguyên[4]によりLiChrosorb-NH_2カラムを用いた報告があり，衛生試験法にも採用されている[5]. しかし，これらの条件で食品を分析した場合，ErA，AsA共に保持時間が短かいため，試料由来の妨害物質との分離，ErAとAsA相互の分離も悪く，かつ，保持時間が変動するなどの難点が見られたので，HPLCの測定条件について検討した.

カラム前処理なしのLiChrosorb-NH_2カラムを，移動相にBui-Nguyênの報告したアセトニトリル・0.005Mリン酸一カリウム溶液(75：25)混液を用いて分析したところ，ErAとAsAは吸着して溶出しなかった. そこで，Arakawaらが報告した方法に準じて，カラムにあらかじめ0.1Mリン酸一アンモニウム溶液を送液して，前処理を行ったところ，ErA，AsA共に溶出することができたため，この処理条件について検討した. すなわち，0.1Mリン酸一アンモニウム溶液を0.5ml/minの速度で送液した時の送液時間とErA及びAsAの保持時間について検討したところ，その結果はFig 1に示したように送液時間が約20時間までは両者の保持時間は30分以上から約20分までと急激に変化したが，25時間以上では再現性の良い一定の保持時間が得られた. そこで0.1Mリン酸一アンモニウム溶液を0.5ml/minで25時間以上送液したカラムを使用することにした.

また，移動相はArakawaらが使用したアセトニトリル・水・酢酸の溶媒系では両者の保持時間が短く，相互の分離も悪かったため，各種の溶媒系について検討したところ，アセトニトリル・リン酸一カリウム溶液の溶媒系を用いた場合，両者の保持時間及び分離共に優れていることがわかった. そこで，移動相にはこの溶媒系を用いることにして，その混合比について検討した結果，アセトニトリル・0.01Mリン酸一カリウム溶液の混合比を80：20とした場合，ErA，AsAの保持時間はそれぞれ15分，19分と分離が良かったためこれを用いることにした. なお，分析後了後のカラムは，移動相で十分洗浄してそのまま保管することにした. その結果，再度使用する際においても，ErA，AsA両者の保持時間及び分離の再現性は変らず，カラムの劣化も防ぐことができた.

Fig. 2に標準品及び各種試料を本法に適用した時のクロマトグラムを示した.

いずれの試料においても，合成保存料，甘味料，着色料などの食品添加物及びその他試料由来の妨害物質の影響もなく定量することができた. この条件における試料の定量限界は10mg/kgであった.

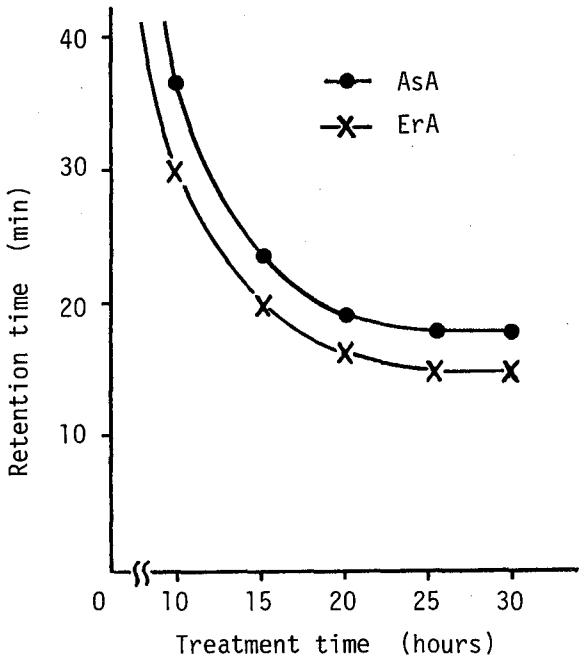


Fig. 1. Relationship between retention time of erythorbic acid(ErA) and L-ascorbic acid(AsA) and treatment time of 0.1M ammonium phosphate monobasic solution
HPLC Conditions: Column; LiChrosorb-NH_2 10μm 4.6mmi.d. ×250mm, Eluent; CH_3CN-0.01M KH_2PO_4(80：20), Flowrate; 1.2ml/min

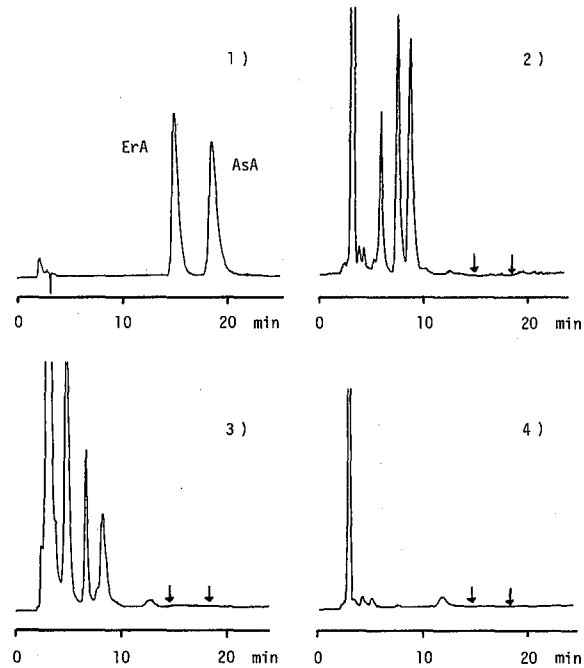


Fig. 2. High performance liquid chromatograms of ErA and AsA standards and sample extracts
1) standard, 2) ham, 3) pickled radish, 4) carbonated beverage

Table 1. Recoveries of Erythorbic Acid(ErA) and L-Ascorbic Acid(AsA) in foods

Sample	Added mg/kg	Recovery (%) ErA	AsA
Pickled radish	100	101	98
	500	103	101
Ham	100	98	94
	500	99	100

3．添加回収実験

ErA と AsA が添加されていないことを確認したたくあん漬及びハムに ErA, AsA をそれぞれ100mg/kg 及び500mg/kg となるように添加し，本法に従い回収実験を行った結果を Table 1 に示した．その結果，ErA は98%以上，AsA は94%以上と良好な回収率が得られた．

4．市販食品中の ErA 及び AsA 含有量調査

本法を用い市販の漬物類，食肉製品，清涼飲料水，かん詰など232検体について ErA 及び AsA の含有量を調査し，その結果を Table 2 に示した．

漬物類では，64検体中 ErA が 7 検体，AsA が21検体から検出され，そのうち ErA, AsA が同様に検出されたものは 3 検体であった．また，ErA と AsA を検出したもののほとんどはたくあん漬とべったら漬であった．ErA の検出されたものにはすべて酸化防止剤の添加表示があったが，AsA のみが検出されたものにはすべて添加表示はなかった．しかし，天然由来と思われる含量の少ないもの以外はすべて酸化防止を目的として添加されたものと思われた．

食肉製品では，ハム15検体，ソーセージ27検体計42検体について調査を行ったところ，ErA が15検体，AsA が13検体から検出され，そのうち ErA と AsA が同時に検出されたものは魚肉ハムの 1 検体のみであった．ErA, AsA が検出されたもののほとんどは酸化防止剤添加表示があったが，添加表示のないハム 2 検体から AsA が125及び466mg/kg 検出された．いずれも酸化防止剤あるいは発色の補助剤として添加されたものと思われた．

清涼飲料水では57検体について調査した結果，28検体から AsA のみが検出された．これはいずれも果実を原料としたものか，AsA の添加表示のあるものであった．

Table 2. Contens of ErA and AsA in Commercial Foods

Sample	No.	ErA No.of positive	ErA Range mg／kg	ErA Mean mg／kg	AsA No.of Positive	AsA Range mg／kg	AsA Mean mg／kg
Pickled vegetable							
Pickled radish (Takuan-zuke)	37	6	130—1025	722	17	20—1943	467
(Bettara-zuke)	4	1	482		3	85— 296	207
Others	23	0			1	30	
Meat products							
Sausage	27	11	60—1115	329	5	15— 393	173
Ham	15	4	114— 814	458	8	48— 630	371
Beverage							
Fruit juice	17	0			10	189— 591	291
Carbonated	13	0			5	97—1930	522
(contain juice)	11	0			8	25— 194	143
Conc. fruit juice	9	0			5	50— 169	92
Oolong tea(canned)	3	0			0		
Others	4	0			0		
Beer	20	0			19	10— 28	19
Canned goods							
Fruits	17	0			16	10— 861	217
Vegetable	10	0			9	19— 528	153
Jam	4	0			4	430— 590	487
Frozen fish and vegetable	3	0			1	165	
Film packaging foods	7	1	355		1	34	
Others	8	0			3	151000—365000	227000

また，2検体に酸化防止剤の表示があったにもかかわらずErA，AsAは検出されなかった．

ビールでは国産品のもの4社，19検体及び輸入品1検体について調査した結果，輸入品を除きすべてからAsAのみが検出された．なお，メーカー別及び「生」か「ラガー」ビールかによるAsA含有量の差は特に見られなかった．

かん詰では，果実かん詰17検体，野菜かん詰10検体について調査した結果，25検体からAsAのみが検出され，そのうちAsAの添加表示のあるものは果実かん詰で7検体，野菜かん詰で3検体であった．これら添加表示のあったもののAsA含有量の平均値は，果実かん詰で409mg/kg，野菜かん詰で303mg/kgであり，添加表示のなかったものの平均値はそれぞれ61及び67mg/kgであり，添加表示のあるものとないものとでは含有量に顕著な差が見られた．このことは添加表示のなかったもののAsAは，天然由来のものと思われた．

ジャム類ではアンズ1検体，イチゴ2検体，オレンジ1検体について調査した結果，いずれからもAsAが430～590mg/kgの範囲で検出されたことから，一般にジャム類はこのオーダーで添加されているものと思われた．なお，AsAの添加表示があったものは1検体であった．

冷凍食品では魚2検体，グリーンピース1検体について調査した結果，グリーンピースからAsAが165mg/kg検出されたが，AsAの添加表示はなく天然由来のものと思われた．

フィルム包装食品では，7検体を調査した結果，酸化防止剤の表示のあったれんこんの水煮1検体からErAが355mg/kg，AsAが34mg/kg同時に検出された．

その他の食品では，いわゆる健康食品として販売されていた錠剤形のもの3検体より151000，165000及び365000mg／kgと高濃度のAsAが検出された．

今回の調査結果では，ErA及びAsAの単独使用例が多く，両者共用されていた食品は5検体のみであり，これらの含有量をTable 3に示した．ハムの場合は両者を同時に添加したことが考えられるが，たくあん漬やれんこんの水煮の場合，ErAに比べてAsA量は1/4～1/30と極めて少ないことから，天然由来のAsAがErAを添加したことにより残存していたことも考えられた．

5．保存中の安定性

今回検査した検体はほとんどのものが密封された容器で包装されており，検査に際しては，開封後直ちに分析に供した．しかし，ErA，AsAの分解は開封直後から始まると考えられるため，それらの安定性について検討を行った．

Table 3. Contents of ErA and AsA Determined in Same Sample

Sample	Content (mg/kg) ErA	AsA
Pickled radish	1025	152
	838	200
	672	20
Ham	114	48
Boiled lotus root	355	34

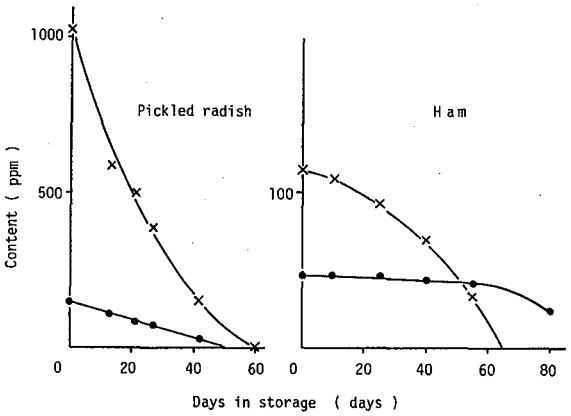


Fig. 3. Stability of ErA and AsA in foods
—●—AsA, -X-ErA

ErAとAsAの検出されたたくあん漬及びハムについて，試料を開封後，冷蔵庫内（4°）に保存した時のErAとAsAの含量を経時的に測定し，その結果をFig. 3に示した．たくあん漬の場合ErAは20日間保存することにより約1/2に減少し，60日目では検出されなかった．AsAも同様に徐々に減少し26日目で約1/2に，60日で検出されなくなった．

ErAとAsAが同時に用いられた場合，ErAがAsAより速く分解されるという報告もある[6]．しかし，今回試料中のErAとAsAの含有量が極端に異なっていたものの，ErAとAsAの減少するパターンはほぼ同様の傾向を示した．

ハムの場合はたくあん漬に比べErAは緩やかに減少し，80日目で検出されなくなった．AsAは55日頃まではほとんど減少せず，ErAが検出されなくなる60日目頃から減少せず，ErAが検出されなくなる60日目頃から減少速度を増したが，80日目でも約1/2が残存していた．ErAとAsAの減少パターンがたくあん漬の場合と異なっていた原因は，切り口以外は包装フィルムでシールされて

いたことにより空気との接触面が少なかったためと考えられた.

これらのことから, ErA, AsAは食品の包装形態の違いにより, 食品中における減衰もまた異なってくるので試料は開封後ただちに検査する必要がある.

まとめ

1. ErA, AsAの同時分析法としてTLC及びHPLCについて検討した.

試料はメタリン酸溶液で抽出し, 試験溶液とした. これを1%メタリン酸溶液で処理したセルロースプレートに塗布し, 展開溶媒としてMEKを用いて展開後, インドフェノール溶液を噴霧し, 白色スポットの出現の有無により定性を行った.

定量法は, カラムは0.1Mリン酸一アンモニウム溶液で処理したLiChrosorb-NH_2, 移動相にはアセトニトリル・0.01Mリン酸一カリウム溶液 (80 : 20) 混液を用いたHPLCにより, 妨害物質も見られず, かつErAとAsAの分離も良く正確に定量することができた.

また, 本法の回収率は94~103%で, 定量限界は10mg/kgであった.

2. 市販食品を調査した結果, ErAは漬物類のうちたくあん漬より6検体, べったら漬より1検体, 食肉製品より15検体及びフィルム包装食品のうちれんこんの水煮より1検体の計23検体から検出された. これらErAの検出された食品は, すべて酸化防止剤の添加表示のあるものに限られていた. これに対してAsAは添加表示の有無にかかわらず, 232検体中115検体と約半数のものから検出され, 含有量も10~365000mg/kgと広い範囲にわたっていた. このことは天然由来のもの, 酸化防止剤として使用されたもの, そして強化剤として使用されたものなど, その由来や使用目的が種々異なるためである.

3. たくあん漬とハム中に含有するErA, AsAの保存中における安定性について検討した. ErA, AsAはいずれの試料中でも減少したが, その傾向はたくあん漬とハムでは異なっていた. すなわち, 空気と接触面の大きいたくあん漬では速く, 包装フィルムで密封されたハムでは緩やかであった. これらのことから, 食品の包装形態の違いにより減少パターンが異なっていたとも考えられたが, たくあん漬ではErAとAsAは同じ割合で減少したのに対し, ハムではErAに比べAsAの減少が遅く80日目でも残存していたことから, 食品成分の違いによる減少パターンへの影響の可能性も考えられた.

文　献

1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解, 218, 1980 金原出版
2) 沢井秀樹, 嶺 和正, 伊藤公子, 佐藤興治, 山崎正孝, 藤沢俊郎：ビタミン 28, 185, 1965
3) Arakawa N., Otsuka M., Kurata T.：*J. Nutr. Sci. Vitaminol* 27, 1, 1981
4) Bui-Nguyên M.H.：*J. chromatogr.*, 96, 163, 1980
5) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 追補 1300, 1983 金原出版
6) 石井清文, 高木誠司, 楠井貞郎, 西森勝彦：食衛誌., 7, 399, 1966

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 174-179, 1985

はちみつ中のフェノール分析法及びその実態調査

小川仁志*, 鈴木二郎*, 落合節子*,
西島基弘**, 二島太一郎*

Gas Liquid Chromatographic Determination of Phenol in Commercial Honeys

HITOSHI OGAWA*, JIRO SUZUKI*, SETSUKO OCHIAI*,
MOTOHIRO NISHIJIMA**and TAICHIRO NISHIMA*

A method is described for determining phenol, a bee repellant, in honey by gas liquid chromatography (GC) with a flame ionization detector on 2.0m glass-column packed with 5% THERMON-1000 at 170℃.

Phenol in honey was separated by steam distillation from samples acidified with tartaric acid. An aliqout of the distillate was alkalified by adding 10% sodium hydroxide, evaporated to substantial dryness under reduced pressure in a flask, and the residue was dissolved in water and transferred into a test tube. This solution was acidified by adding 10% sulfuric acid. Phenol was extracted with a small portion of ethyl acetate containing n-docosane as an internal standard and the resulting solution was subjected to GLC for the determination of phenol.

The calibration curves of phenol (2-20μg/ml) showed a straight line. Recovery rates of phenol added to honey were 93-95% at 1μg/g and 96-98% at 5μg/g. The detection limit of phenol in honey was 0.2μg/g. Phenol was identified by means of GC-Mass spectrometry. When this method was applied to the analysis of phenol in commercial honeys, phenol could be determined without the influence of obstructive substances.

Using this method, 49 samples were analysed. Phenol was detected in 13 samples at the level of 0.2-4.4 ppm.

Keywords: bee repellent, phenol, honey, gas liquid chromatography, steam-distillation

緒　　言

フェノールは，消毒剤として一般には良く知られているが，1930年頃から，北アメリカ及びオーストラリア等の国々の養蜂業においては，みつばち忌避剤としても使用されている．これは，養蜂業者がはちみつを採取する際に，みつばちを巣箱から遠ざけ，又，活動を鎮静化させその作業能率を高める目的で使用されるもので，20～50%フェノールを浸み込ませた布を巣箱の屋根等に置き，太陽熱で蒸散させる方法がとられている[1)-3)]．又，フェノールは，みつばちの代表的な病気であるノセマ病の予防や治療のために，巣脾に噴霧されることもある[4)]．このようにして，フェノールが使用された場合，はちみつにフェノールが混入する可能性は十分に考えられる．すでに，カナダのDaharuらは，採取時にフェノールが使用されたはちみつ及びみつロウについて，高速液体クロマトグラフィーを行い，はちみつからは0.5～17ppm，みつロウからは0.5～27ppmのフェノールを検出したことを報告している[2)]．

我国の市販はちみつの多くは，中国，アルゼンチン，カナダ，ソ連等の国々からの輸入品によって占められているが，これら，はちみつ中のフェノール含有量の調査報告例はみられない．そこで著者らは，市販はちみつ中

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 同多摩支所

のフェノール含有量を知るために，ガスクロマトグラフィーによる分析法を検討し，本法を用いて市販はちみつ中のフェノール含有量の調査を行ったので，その報告をする．

実験方法

1．試料

アカシア，クローバー，レンゲ，オレンジ，みかん，りんご等をみつ源とする市販はちみつの缶詰及びビン詰計49検体を購入して，実験に供した．

2．試薬

1）フェノール標準液：特級のフェノール（和光純薬工業㈱製）を，水及び酢酸エチルに溶解し，それぞれ0.1mg/mlになるように調製した．

2）内部標準液：n-ドコサン（和光純薬工業㈱製）を酢酸エチルに溶解し，0.1mg/mlになるように調製した．

3）ガスクロ用充てん剤：5％Thermon-1000 chromosorb W(AW-DMCS)60～80mesh

4）試薬は全て，市販特級品を用いた．

3．装置

ガスクロマトグラフ(GC)：GC-7AG型(FID付)㈱島津製作所製

データ処理装置：CR-3A ㈱島津製作所製

ガスクロマトグラフ一質量分析計(GC-MS)：GC部5710A型Hewlett Packard社製，MS部 D-300（JMS 2000システム付）日本電子㈱製

試料（50g）
- NaCl 100g
- 15％ 酒石酸 10ml
- シリコン樹脂 適量
- 水 100ml

水蒸気蒸留

留液 200ml
- 100ml 分取
- 10％ NaOH（アルカリ性）

減圧濃縮（1～2ml）

濃縮物
- 10％ H_2SO_4（酸性）
- 水 （NaCl, 酢酸エチル飽和）5ml×3
- NaCl 3g
- 酢酸エチル（n-ドコサン 50ppm 含有）2ml

試験溶液

G. C.

図1． フェノールの分析法

4．試験溶液の調製

はちみつ50gを500mlの二頸フラスコに秤取し，塩化ナトリウム100g，15％酒石酸10ml，シリコン樹脂及び水100mlを加えた後，水蒸気蒸留を行い，留液200mlを得た．留液100mlを分取し，これに10％水酸化ナトリウムを加えてアルカリ性とした後，減圧下，50～60℃で濃縮した．濃縮物は，メチルオレンジを指示薬として，氷冷しながら10％硫酸を徐々に加えて酸性とした後，予め塩化ナトリウム及び酢酸エチルで飽和した水約15mlを用いて，25ml比色管に移して全量を20mlとした．これに塩化ナトリウム3gを追加した後，内部標準物質を含む酢酸エチル2mlを正確に加えて強振し，静置後，得られた酢酸エチル層を試験溶液とした．操作の概略は図1に示した．

5．測定条件：GC；カラム管2m×3mmガラス製，5％ Thermon-1000 chromosorb W(AW-DMCS) 60～80mesh，カラム温度170℃，注入口及び検出器温度210℃，キャリヤガス流量60ml/min，注入量2 μl，GC-MS：カラム管1.8m×2.5mmガラス製，5％ Thermon-1000 chromosorb W(W-DMCS)60～80mesh，カラム温度170℃，キャリヤガス流量20ml/min，イオン化電圧70eV．

結果及び考察

1．分析法

フェールの分析法を作成するにあたり，水蒸気蒸留及びGC条件，添加回収実験，妨害物質の検討を行った．

1)水蒸気蒸留の留液量

予めフェノールを検出しないことを確認したはちみつ50gに500μgのフェノールを添加し，留出速度毎分10mlで水蒸気蒸留した場合の，留液量と回収率の関係を図2に示した．留液150mlで，ほぼ100％が回収されることから，留液量は約180mlとし，水を加えて200mlすること

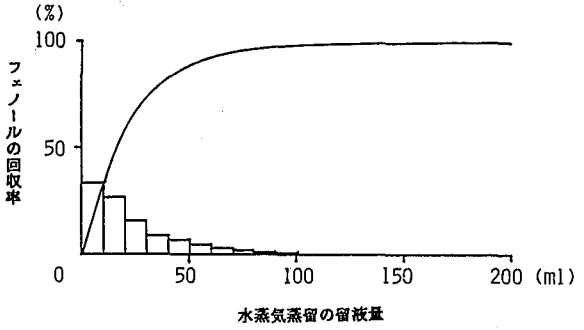


図2． フェノールの回収率
試料量 50g
添加量 500μg
留出速度 10mℓ／min

とした.

2)ガスクロ充てん剤及び内部標準の検討

ガスクロ充てん剤は，5%DEGS-1%リン酸chromosorb W(AW-DMCS)60～80mesh，5%Thermon-1000 chromosorb W(AW-DMCS)60～80mesh，5%OV-17 Chromosorb W(AW-DMCS)60～80mesh及び5%SE-30 Chromosorb W(AW-DMCS)60～80meshを用いて検討した．いずれのカラムを用いても測定可能であったが，感度，ピークの形状及び妨害ピークとの分離等を考慮して，5%Thermon-1000を用いることとした．この充てん剤を用いて，クローバーはちみつを分析したところ図3に示した通り，フェノールの保持時間付近に特に妨害ピークを認めなかった．アカシア，レンゲ，オレンジ，みかん，りんご，スミレ，ライム等のみつ源を異にするはちみつにあっても，同様な結果が得られた．なお，内部標準物質について種々の検討したところ，n-ドコサンを用いるとフェノールとの分離が良好であった．また，みつ源を異にする種々のはちみつに適用したところ，n-ドコサンの保持時間に妨害ピークが出現しないことから，内部標準として，n-ドコサンを用いることとした．

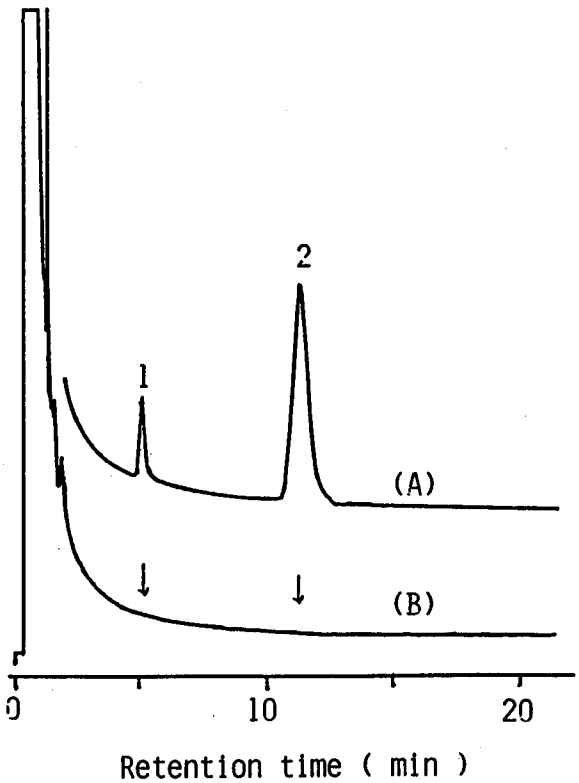


図3. フェノール及びはちみつ抽出物のガスクロマトグラム
(A) フェノール
(B) はちみつ抽出物
ピーク；1：フェノール
2：n-ドコサン(内部標準)

3)添加回収実験

予めフェノールを検出しないことを確認したはちみつに，フェノールを添加し，各々3回ずつの添加回収実験を行った結果を表1に示した．はちみつ50gにフェノール50μgを添加した場合の回収率の平均は94%，250μgを添加した場合の回収率の平均は97%と，いずれも良好な結果が得られた．

2．市販品への応用

本法を用い市販はちみつ中のフェノール含有量の調査を行った．なお，容器の表示により，みつ源（みつばちがはちみつを収集した花の種類)及び生産国を分類した．

1）みつ源別によるフェノール含有量

みつ源別に分類し，はちみつ中のフェノール含有量を調査した結果を表2に示した．アカシアはちみつ13検体中1検体から1.4ppmのフェノールを検出した．クローバーはちみつでは7検体中4検体から検出し，その含有量は0.2～4.0ppmの範囲であった．その他，レンゲ，オ

表1. フェノールの添加回収率

添加量 (μg/50g)	検出量 (μg/50g)	回収率 (%)	平均 (%)
50	47.5	95	
50	47.5	95	94
50	47.5	93	
250	240	96	
250	240	96	97
250	245	98	

表2. はちみつ中のフェノール含有量（みつ源別）

みつ源（花別）	試料数	検出数	結果（ppm）
アカシア	13	1	1.4
クローバー	7	4	0.2, 0.5, 0.6, 4.0
レンゲ	5	1	0.3
オレンジ	4	2	0.2, 0.6
ミカン	2	1	0.2
スミレ	1	1	1.8
リンゴ	1	1	0.2
その他※	4	0	
不明	12	2	0.6, 0.7
計	49	13	0.2～0.4

※サンフラワー，トチ，マロニエ，ライム

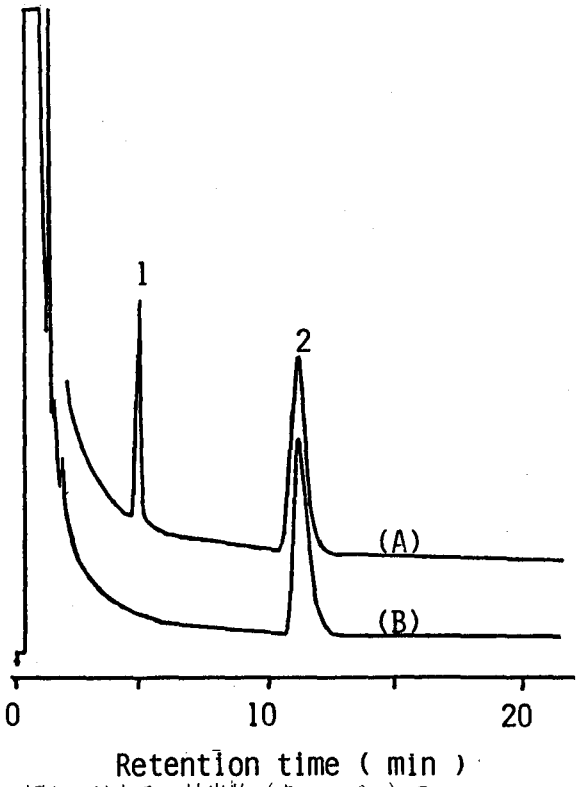


図4. はちみつ抽出物（クローバー）のガスクロマトグラム
(A) フェノールを検出したもの
(B) フェノールを検出しなかったもの
ピーク；1：フェノール
2：n-ドコサン(内部標準)

レンジ，みかん，りんご，スミレ等のはちみつからもフェノールを検出するものがあった．サンフラワー，とち，マロニエ，ライム等のはちみつは，入手できたのが1検体ずつであったが，いずれからもフェノールは検出されなかった．また，みつ源の表示がないものが12検体あり，そのうち2検体から0.6，0.7ppmのフェノールが検出された．これらの結果から，スミレ及びりんごはちみつ以外はフェノールを検出しないものがあることから，はちみつ中には，成分としてフェノールはないものと考える．したがって，フェノールが検出されたはちみつはみつば

表3. はちみつ中のフェノール含有量（生産国別）

生産国	試料数	検出数	含有量（ppm）
日　本	21	7	0.2, 0.2, 0.2, 0.3, 0.6, 0.7, 1.4
中　国	7	0	
アルゼンチン	5	2	0.2, 0.5
ハンガリー	4	0	
カナダ	1	1	4.0
西ドイツ	1	1	1.8
イギリス	1	1	0.6
その他※	4	0	
不　明	5	1	0.6
計	49	13	0.2 ～ 4.0

※アメリカ，イスラエル，ニュージーランド，ルーマニア

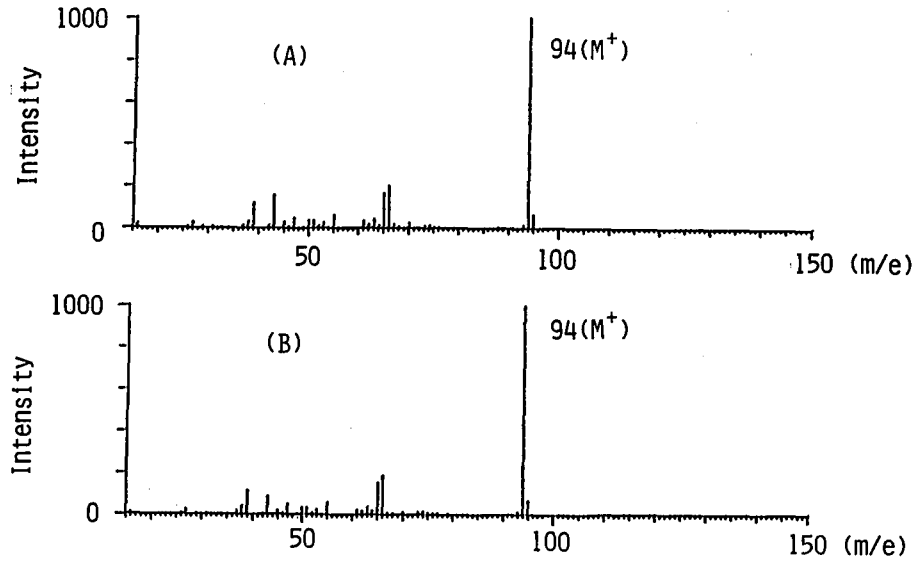


図5. フェノール及びはちみつ抽出物のマススペクトル
(A) フェノール
(B) はちみつ抽出物

表4. はちみつ中のフェノール含有量
(生産国及び輸入年月日別)

試料(みつ源)	試料数	含有量(ppm)	生産国(商社)	輸入年月日
スミレ	2	1.8, 2.0	西ドイツ(A)	59. 1.20.
	3	0.5, 0.6, 0.5	〃 (B)	59. 6. 3.
	5	0.3, 0.3, 0.3, 0.3, 0.3	〃 (B)	59. 1. 1.
クローバー	5	4.0, 4.2, 4.1 4.2, 4.4	カナダ	58.11.28.
不明	1	0.6	イギリス(A)	59. 6.10.
	2	1.3, 1.2	〃 (B)	58.10.14.

ち忌避剤としてフェノールが使用されたために混入したか,あるいは,他の何らかの原因によってフェノールが混入したものと考える.

著者らは,はちみつ中のフェノール検出例は初めてであるため,ガスクロマトグラム上で,フェノールの保持時間に出現したピークについて,GC-MSを用いて確認を行った.フェノールが混入したと思われるカナダ産のクローバーはちみつ抽出物のガスクロマトグラムを図4に,フェノール標準品と同じ保持時間のピークのマススペクトルを図5に示した.はちみつ抽出物のマススペクトルには,フェノールの分子イオン94,及びフェノールを確認する上で重要なフラグメントイオンである65,66のピークが出現したこと[5),6)],また,フェノール標準品とのスペクトルとも一致したことから,抽出物中の該当ピークがフェノールであることが確認された.

2)生産国別によるフェノール含有量

はちみつを生産国別に分類し,表3に示した.日本産のはちみつは,21検体中7検体からフェノールが検出され,その含有量は0.2~1.4ppmであった.日本産のものからフェノールが検出されたことは国内においてもフェノールが使用されている可能性があると考え,その使用実態について調査した.その結果,外装や容器の表示に,生産国として日本,又は国内産と記載されたものであっても,実際には輸入はちみつや輸入はちみつを混和したものが充てんされている場合があって,これら21検体中何検体が純国産のはちみつであるかを判別できなかった.又,日本国内でフェノールを使用しているとの確認も,現在のところ得られていない.

輸入はちみつでは,アルゼンチン,カナダ,西ドイツ,イギリス等のものからフェノールを検出した.一方,いずれも例数が少ないため,各国によるフェノールの使用の有無について推察するまでには至らなかったが,中国,ハンガリー,アメリカ,イスラエル,ニュージーランド,ルーマニア産のものからは,検出されなかった.

輸入品のうちでフェノールが検出された西ドイツ,カナダ,イギリス産の同銘柄のはちみつを新たに購入して調査した.新たに入手したのは,西ドイツ産の3種,10検体カナダ産の1種,5検体であり,イギリス産のものは表3で示したはちみつを入手できなかったため,別に1種,2検体を購入した.表4に表3の結果とあわせて生産国別に分類し,その結果を示した.

西ドイツ産のはちみつ3種類は,同一ロットのものはほぼ同程度の含有量を示した.カナダ産のはちみつは,4~4.4ppmといずれも比較的高い値を示し,かつ同程度検出された.なお,4.4ppmという値は,今回の調査では,最も高い値であった.イギリス産の新たに購入したロットは,1.2, 1.3ppmとやや高い値を示した.

要 約

はちみつ中のフェノールのFIDガスクロマトグラフィーによる分析法を検討し,本法を用いて,市販はちみつ中のフェノール含有量を調査した.

ガスクロ用充てん剤は,5%Thermon-1000が,分離能や感度の面で優れ,比較的短時間で分析できた.みつ源を異にする各種はちみつにフェノールを添加し,回収率を調べたところ94~97%であり,確認限度は,それぞれの検体について0.2ppmであった.

本法を用いて市販のはちみつ—アカシア,クローバー,レンゲ,りんご,スミレ等—49検体について試験を行ったところ,13検体からフェノールが検出された.その含有量は0.2~4.4ppmであった.

フェノールの毒性は,比較的弱いことから,この程度のフェノールが,はちみつに混入していたとしても,それがただちに食品衛生上問題があるとは考えられない.しかし,フェノールも誤って多量に摂取すると,嘔吐,下痢,昏睡等の中毒症状を起こす他,動物実験では,腎臓や肝臓に障害を起すことも知られており[7),8)],その使用

には十分注意を払い，不必要な使用は避けるべきであると考える．

（本研究の概要は，日本食品衛生学会第48回学術講演会1984年10月で発表した．）

文　献

1）*Bee world*, **49**, 60, 1968

2）Daharu, P.A. and Sporns, P.：*J. Agr. Food Chem.*, **32**, 108, 1984

3）Sporns, P.：*J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **64**, 337, 1981

4）中野　茂：ミツバチ，81, 1962, 農山漁村文化協会

5）Budzikiewicz, H., Djerassi, C. and Williams, D. H.：有機化合物のマススペクトル，中川有造，池田正澄訳，116, 1981, 丸善

6）McLafferty, F.W.：マススペクトルの解釈と演習，上野民夫訳，116, 1979, 化学同人

7）Dreisbach, R.H.：中毒ハンドブック，川村秀夫訳，401, 1979, 広川書店

8）産業中毒便覧，695, 1982, 医歯薬出版

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 180-184, 1985

高速液体クロマトグラフィーによる食品中のホウ素分析法

落合節子*, 小川仁志*, 鈴木二郎*,
西島基弘**, 二島太一郎*

High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Boron in Foods

SETSUKO OCHIAI*, HITOSHI OGAWA*, JIRO SUZUKI*,
MOTOHIRO NISHIJIMA** and TAICHIRO NISHIMA*

A method for determining boron spectrofluorimetrically with carminic acid in neutral solutions was examined by using high-performance liquid chromatography (HPLC). Other ions which form fluorescent complex with carminic acid must be separated by cation exchange column. Excitation and emission were set at 470 nm and 585 nm respectively.

Sample solutions were prepared as follows. Boron in food was dissolved in water and suitable hydrochloric acid, after ashing under alkaline condition. The dissolved solutions were adjusted to pH 7 to 8 with diluted hydrochloric acid, and filtrated using a membrane filter for measurement by using HPLC.

Recoveries of boron added to food ranged from 91 to 105%. The detection limit of this method was 0.3 ppm for boron. Boron was detected in 17 of 18 samples at the level of 0.4-204 ppm when determined by this method.

Keywords: foods, boron, carminic acid, fluorescence, high-performance liguid chromatography, cation exchange column, membrane filter

緒　言

ホウ素は植物の微量必須元素であるため，農産物あるいは海産物に含まれることが知られている．食品衛生法では寒天について規格基準[1]があるのみで，食品添加物として許可されていないが，過去に塩蔵クラゲ，せんべいなどに不正使用された例[2),3)]もある．従って食品中からホウ素を検出した場合，添加されたものか常在成分であるかの判断上，農産物あるいは海産物のバックグラウンド値を知る必要がある．しかし，それらについての詳細な報告例[4)]は少ない．そこでホウ素のバックグラウンド値を調査するに先立ち，分析法を検討した．

ホウ素の分析法として従来からクルクミンによる発色法[5)]及びその改良法[6)]が用いられ，他にホウ素錯陰イオンと陽イオン染料による抽出一吸光光度法[7),8)]やクロモトロープ酸[9)]，アゾメチンH[10)]などの発色試薬による吸光光度法が報告されている．しかし，これらは一般に操作が煩雑で熟練を要し，一定の値を得にくい難点を有している．そこで著者らは，ホウ素がカルミン酸と蛍光体を生成するというT. Bruceの報告[11)]に基づき高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に応用したところ簡便性，感度の点で良好な結果を得たので報告する．

実験方法

1．試料

市販の穀類，豆類，魚類，野菜・果実類，海草類，嗜好飲料を購入して実験に供した．

2．試薬

1) ホウ素標準原液　ホウ酸ナトリウム・$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$（和光純薬工業㈱製）0.882gを水100mlに溶かし，

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 同多摩支所

ホウ素として1000ppmの原液とした.

2)カルミン酸試薬　カルミン酸（東京化成工業㈱製）1,476gを0.1N-水酸化ナトリウム20mlに溶かし，リン酸二ナトリウム・Na_2HPO_4（無水）71gとエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水塩18.6gを加え，水で950mlとし，りん酸でpH7に調整し1 lとした.

3)水は，すべて脱イオン水を用いた.

4)カルミン酸以外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LC-5A，検出器RF-530，データ処理装置C-R3A：いずれも㈱島津製作所製，送液ポンプ：日本分光工業㈱製PG-350D，pHメーター：東亜電波工業㈱製HM-18ET

4．試験溶液の調製

試料1～10gをるつぼに秤取し，1%水酸化ナトリウムを加えてアルカリ性とし，蒸発乾燥後500℃で灰化した.得られた灰分は，水3 mlに溶かし10mlスピッツ型遠沈管に移した.残査は20%塩酸数滴と水3 ml 2回で先の遠沈管に洗い込んだ.合わせた液は，希塩酸でpH 7～8に調整した後，水を加えて10mlとした.必要に応じて遠心分離し，上澄液をメンブランフィルターでろ過して試験溶液とした.なお試験溶液は，ポリプロピレン製試験管に移し保存した.（図1.）

5．HPLCによる定量

試験溶液50μlをHPLCに注入し，得られたクロマトグラムのピーク高さを測定し，予め作製した検量線により定量した.なお検量線は，ホウ素標準原液を水で希釈し，0.5～10ppmの標準溶液を作製し，その50μlをHPLCに注入して得られたピーク高さと濃度から作製した。

〔HPLC測定条件〕

カラム：Perisorb KAT(MERCK)4.6mmϕ×250mm

移動相：水　流速：1 ml/min 発蛍光試薬：3×10^{-3}Mカルミン酸試薬（pH7）流速：0.7ml/min 波長：Ex. 470nm, Em. 585nm

試　料　（1-10g）
↓ 1%NaOHでアルカリ性
↓ 灰　化
灰　分
↓ 水
↓ HClでpH調整(pH7-8)
↓ 遠心分離
↓ メンブランフィルター
試験溶液
↓
HPLC

図1．　食品中のホウ素分析法

結果および考察

T.Bruceはホウ酸にカルミン酸を作用させた場合，中性域ではカルミン酸の蛍光強度は低いが，カルミン酸—ホウ素錯体の蛍光強度は最も高くなると述べている[11].著者らは，この原理をHPLCに応用した.試験法の作成にあたりHPLCの条件，灰化条件，試験溶液の調製，妨害イオンの影響および添加回収試験について検討を行った.

1）HPLC条件の検討

2価と3価の陽イオンは発蛍光試薬のカルミン酸と錯体を生成するため，ホウ素との錯体生成に妨害となる[11].そこで陽イオン交換カラムに試験溶液を通して，ホウ酸イオンと陽イオンを分離し，得られたホウ酸イオンをカルミン酸と合わせ，氷水中の反応コイルに導いた後，生成した蛍光体の蛍光を測定する装置を考案し，移動相など蛍光強度に与える最適条件を検討した.なお装置の概要図を図2に示した.

(1) **移動相**　陽イオン交換カラムをホウ素の分析に適用した場合，使用できると考えられる移動相のうち，水，0.01M-リン酸緩衝液(pH6.8及びpH7.0)，Clark-Lubs氏緩衝液(pH6.9及びpH7.0)について検討した.水による場合，ピーク高さが他の移動相に比較し約2倍となり，かつピークのまとまりもよく一定の保持時間が得られたため，水を移動相とすることにした.

(2) **陽イオン交換カラムの温度**　カラム部分の温度を

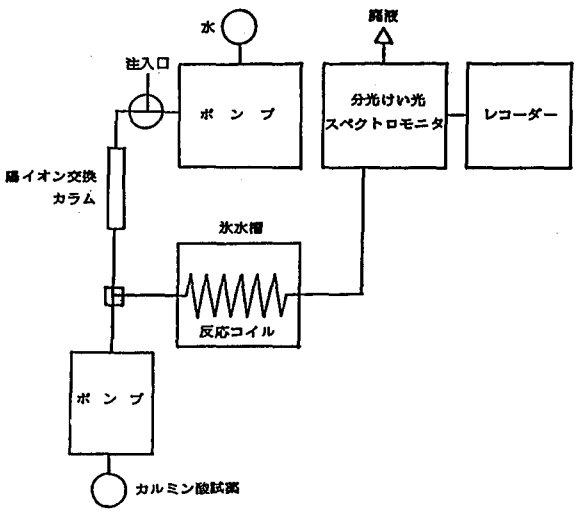


図2.　装置の概要図

2～35℃の範囲で変化させて，蛍光強度に与える影響について検討したところ，ピークの保持時間および感度に影響を与えなかったので以後の実験は，約23℃の室温で行うことにした．

(3) **反応コイルの長さ** 反応コイルの長さは蛍光強度に影響を与えることが予想されるため，4～23mのコイルを用いて検討したところ，図3に示す通り10m以上で一定のピーク高さが得られた．そこで以後の実験は12mコイルを用いることにした．

(4) **反応槽の温度** 反応槽の温度を1～22℃の範囲で変化させて，蛍光強度に与える影響を検討したところ，温度が上昇するに伴ない蛍光強度が低くなる傾向が見られた．(図4.) そこで比較的低温でかつ一定に保持しやすい氷水を設定した．反応槽に十分な氷を投入すると2～3℃を示し，温度1℃の差はピーク高さで2%の差であることから実用上十分使用できるものと考える．

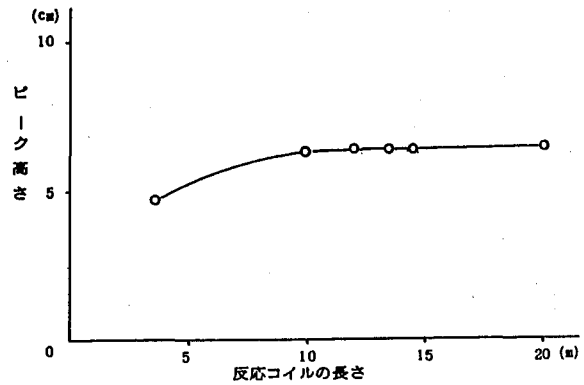


図3. 反応コイルの長さと蛍光強度の関係

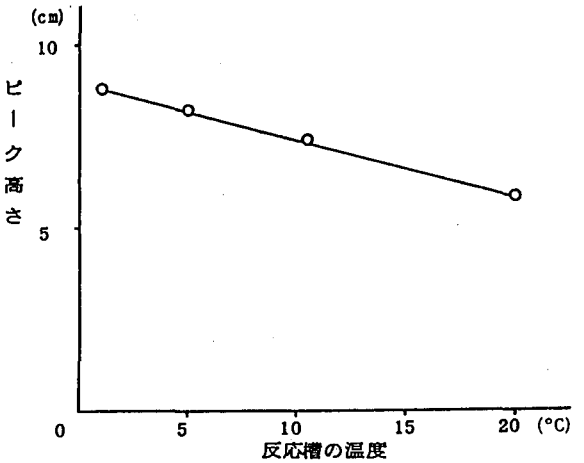


図4. 反応槽の温度と蛍光強度の関係

(5) **発蛍光試薬濃度** Ognerの報告した[12]カルミン酸試薬に基づいて，カルミン酸濃度と蛍光強度の関係を検討し，それぞれの試薬濃度の検量線を図5に示した．カルミン酸試薬濃度が3×10^{-3}Mのとき最も高い蛍光強度が得られたので3×10^{-3}Mを用いることにした．

2) **灰化条件の検討**

ホウ素固定のためのアルカリ剤として水酸化ナトリウム，炭酸ナトリウム，石灰乳について検討したところ，炭酸ナトリウムの場合，赤外ランプでの蒸発乾燥時に試料が突沸する難点があり，石灰乳の場合，灰分が多くかつ生成される酸化カルシウムは水に難溶性であるため試験溶液の調製に支障をきたした．水酸化ナトリウムは，これらの欠点がなく回収率も良好であることから以後の実験は水酸化ナトリウムを使用することにした．

3) **試験溶液の pH**

カルミン酸試薬の pH が7の場合，ホウ素の錯体が最

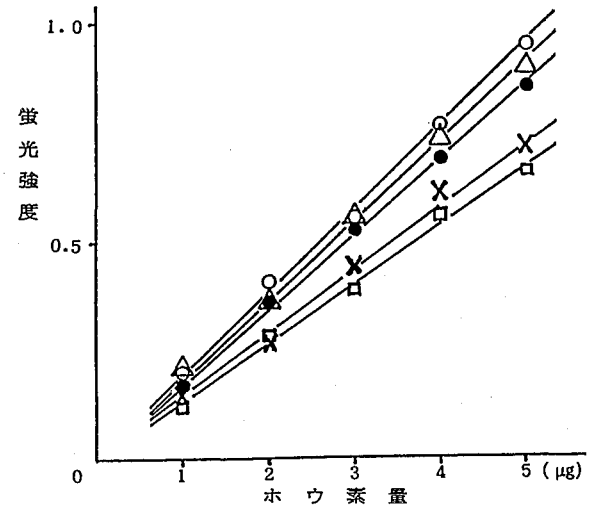


図5. カルミン酸試薬濃度と蛍光強度の関係
□——□ 1×10^{-3}M ●——● 2×10^{-3}M
○——○ 3×10^{-3}M △——△ 4×10^{-3}M
×——× 5×10^{-3}M

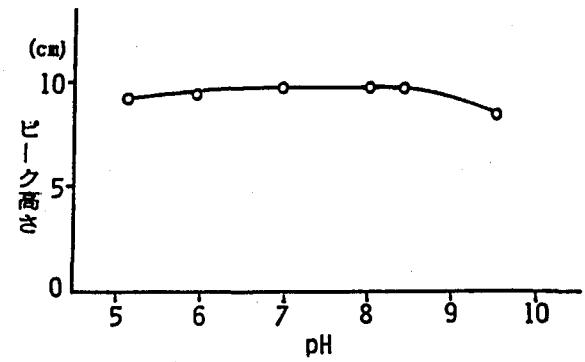


図6. 試験溶液のpHと蛍光強度の関係

も強い蛍光強度を示すことから試験溶液のpHが蛍光強度に与える影響について検討し，図6に示した．pHが6.8～8.4でピーク高さが高くかつ一定となったので試験溶液のpHを7～8に調整することにした．

4) 妨害イオン

T.BruceによりCH_3COO^-，NO_3^-，PO_4^{3-}，Cl^-，SO_4^{2-}，Al^{3+}，Cr^{6+}，などはホウ素—カルミン酸錯体生成に影響しないことが報告されている[11]が，著者らはその他の食品中の成分を考慮してホウ素に対しCu^{2+}，Fe^{2+}，Fe^{3+}，Pb^{2+}は10倍量，Mg^{2+}は20倍量，As^{3+}は500倍量，Ca^{2+}，K^+，Na^+は1000倍量を添加し本法に従い測定したところ特に影響は見られないことを確認した．

以上の検討事項により作製した試験法による食品中ホウ素の液体クロマトグラムを図7に示した．保持時間3.2

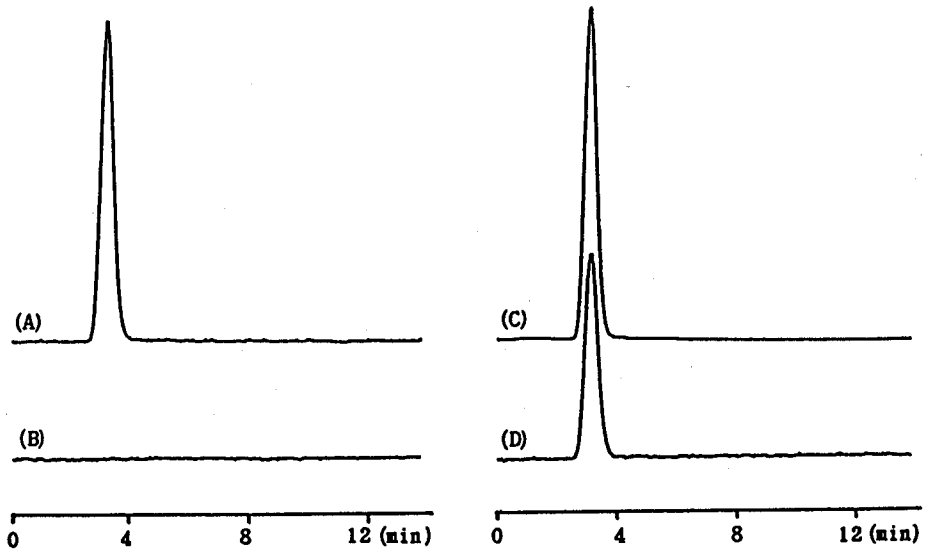


図7. 食品中のホウ素の高速液体クロマトグラム
(A) ホウ素0.1μg　(C) かんてん
(B) ブランク　(D) ブロッコリー

表1. ホウ素の添加回収試験

品名	試料 (g)	添加量 (μg)	検出量 (μg)	回収率 (%)	C.V.(%) n=3
りんご	5.0	0	8.3	—	0.6
	5.0	10	17.6	93	1.7
	5.0	20	28.3	100	6.4
ワイン	10.0	0	42.2	—	0.5
	10.0	50	92.2	100	7.4
	10.0	100	144	102	3.5
ブロッコリー	5.0	0	15.3	—	4.2
	5.0	50	65.8	101	1.8
	5.0	100	120	105	1.9
寒天	1.0	0	167	—	0.5
	1.0	500	635	94	6.8
	1.0	1000	1160	99	2.8
ひじき	1.0	0	112	—	4.4
	1.0	500	568	91	6.9
	1.0	1000	1115	100	2.1

表2. 市販食品中のホウ素含有量

品名	含有量(ppm)	品名	含有量(ppm)
こんぶ	204	長ねぎ	1.0
生わかめ	5.8	にら	0.8
ひじき	112	大根	0.4
寒天	167	ブロッコリー	3.0
たらこ	0.8	りんご	1.7
米	N.D.	いちご	0.8
大豆	21.2	オレンジ	2.4
小豆	10.8	ワイン	4.2
人参	1.5	抹茶	14.4

分にホウ素のピークが得られ，くり返し注入による変動率は5％だった．

5) 添加回収試験

りんご，ワイン，ブロッコリー，寒天，およびひじきにホウ酸をホウ素として10～1000μg添加し，本法に従い定量したところ回収率は91～105％と良好な結果が得られた．(表1.)

6) 市販品への応用

市販の海産物及び農産物に本法を適用した結果を表2に示した．こんぶが204ppmと最も高く，その他寒天が167ppm，ひじき112ppmと海草類に高い値が得られた．農産物では大豆が21.2ppm，小豆10.8ppm，抹茶14.4ppmと比較的高い値が得られた．

まとめ

高速液体クロマトグラフィーによるホウ素分析法について検討した．試料を水酸化ナトリウムアルカリ性で灰化後，水に溶かし塩酸でpH 7～8とした試験溶液50μlをHPLCに注入し，励起波長470nm，蛍光波長585nmで測定した．HPLCカラムは陽イオン交換カラムのPerisorb KAT，移動相は水，発蛍光試薬は3×10^{-3}Mカルミン酸試薬を用いた．本法による確認限度は0.3ppmであった．本法を市販食品に適用したところ，こんぶが204ppmと最も高く次いで寒天，ひじきなどの海草類に高い値が得られた．農産物では大豆が21.2ppmと高く，小豆，抹茶などに比較的高い値が得られた．

文献

1) 食品衛生小六法：58年版，125，中央法規出版
2) 富安行雄，榎本則行：食衛試，4，254，1963
3) Ogawa,S.,Toyoda,M. and Ito,Y.：*Bull,Nat, Inst Hyg Sci.*,96, 130, 1978
4) Inoue,T.,Iwaida,M. and Ito,Y.：*J.Food Hyg. Soc.*,21, 465, 1980
5) 日本薬学会編：衛生試験法注解，327，1980，金原出版
6) 同上：同上追補，1303，1983，同上
7) Kuwada,K.,Motomizu,S. and Toei,K.：*Analytical Chemistry*, 50, 188, 1978
8) 大島光子，本木昌二，桐栄恭二：分析化学，32，268，1983
9) Korenaga,T.,Motomizu,S. and Toei,K.：*Analyst*,103, 745, 1978
10) 竹内正邦，武山主郎：分析化学，32，T66，1983
11) Bruce,T. and Ashley,R.W.：*Atomic Energy of Canada Limited*,1973
12) Ogner,G.：*Analyst*,105, 916, 1980

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 185-190, 1985

保存性に関与する物質及び要因の実態調査（第1報）漬物類について

上田　工*, 島村保洋*, 石川ふさ子*, 二島太一郎*

Survey of Preservatives in Foods(I)
Preservative Content of Tsukemono

KOU UEDA*, YASUHIRO SHIMAMURA*, FUSAKO ISHIKAWA*and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords：漬物 tsukemono, 保存料 preservative, 保存効果 preservative effect

緒　言

現在，漬物には合成保存料としてソルビン酸の使用が，認められている．しかし，近年消費者などから，合成添加物を使用するこに対し疑義がもたれ，漬物においても合成保存料を使用していないものが好まれる傾向にある．

また，一般に漬物は高塩分食品の代表と考えられているが，最近は高血圧などの成人病対策として，食生活全体に低塩化が推奨されており[1-3]，漬物においても減塩化が進んでいる．

しかし，この様に漬物において合成保存料の使用を控えたり，塩化ナトリウムの使用濃度を下げることは，微生物の活動，増殖をより可能とするため，食品衛生上問題であると思われる．

そこで，現在市販されている漬物が，その保存性という面でどのような因子が介在しているかを明らかにする目的で調査をおこなった．すなわち，漬物の保存に関与すると思われる因子のうち，水分含量，水分活性，食塩，pH，および合成保存料としてソルビン酸，安息香酸，また現在表示義務がなく使用量の規制もない天然添加物のアルコール，桂皮酸，有機酸，遊離アミノ酸(グリシン)の各項目について，実態調査を行った．

実験方法

1．試料及び試料区分

1984年8月から10月の間に購入した市販漬物70品目を対象とし，可食部を実験に供した．

2．分析方法

(1) 水分，pH，合成保存料

衛生試験法注解[4]に準じた．

(2) 水分活性

コンウェイのユニットを用い，グラフ挿入法[5]で測定した．

(3) 塩化ナトリウム

細切した試料2gを550°の電気炉で灰化後モール法[4]により測定し，塩化ナトリウムとして換算し求めた．

(4) エタノール及びメタノール

細切した試料10gに水50m*l*を加え直火で蒸留し，その留液についてガスクロマトグラフィー[4]により測定した．

(5) 桂皮酸

細切した試料50gを酒石酸々性で水蒸気蒸留を行ない，その留液について液体クロマトグラフィーにより測定した。

(6) 有機酸，遊離アミノ酸

細切した試料10gを約85°の温湯で，ホモジナイズしながら2回抽出した．有機酸については，そのろ液をセップパックを用いてクリーンアップ後カチオン交換樹脂カラムを用いて液体クロマトグラフィーにより測定した．遊離アミノ酸については，ろ液をアミノ酸分析計により測定した．

結果及び考察

試料の表示の違いから，酢漬，たくあん漬，しょう油漬，その他の漬物の4郡に分類し，それらの結果を表1に示した．

(1) 水分

酢漬，たくあん漬，しょう油漬，その他の各グループ間では水分含有量に特に差は見られなかった．全試料（n＝70）では，61～94（83±7.4）%であった．

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究所　160　東京都新宿区百人町3—24—1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Pulbic Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表1．漬物類の保存性に関与する物質及び要因の調査結果

			水分 (%)	Aw	NaCl (%)	pH	エタノール (μg/g)	メタノール (μg/g)	ソルビン酸 (g/kg)	桂皮酸 (μg/g)	クエン酸 (mg/100g)	酒石酸 (mg/100g)	リンゴ酸 (mg/100g)	コハク酸 (mg/100g)	乳酸 (mg/100g)	フマル酸 (mg/100g)	酢酸 (mg/100g)	グリシン (μg/g)
酢漬	SU-1	らっきょう	72	0.96	1.0	3.5	2210	32.6	0	0	85	29	89	—	314	0.40	257	6
	SU-2	〃	88	0.95	4.5	4.0	906	27.9	0	0	156	22	—	—	347	—	654	65
	SU-3	しょうが	85	0.93	8.6	2.9	149	0	0.20	0	302	—	171	—	37	0.50	826	4
	SU-4	〃	86	0.93	8.1	3.1	160	6.8	0.28	2.2	285	—	141	—	30	0.40	832	3
	SU-5	〃	81	0.91	9.5	3.9	77.2	2.9	0.39	0	—	—	282	—	416	1.78	—	364
	SU-6	〃	79	0.96	1.7	3.4	115	0.5	0.37	0	47	19	98	—	270	0.50	617	463
	SU-7	〃	85	0.94	5.9	3.4	34.1	17.2	0	0	334	13	322	—	111	1.07	181	190
	SU-8	〃	85	0.92	8.7	3.1	120	15.6	0.11	0	356	—	282	—	—	0.70	697	6
	SU-9	〃	86	0.94	6.8	3.5	39.7	14.7	0	0	107	48	309	—	—	1.38	573	4
	SU-10	さくら漬	88	0.94	4.0	4.2	5770	29.5	0.21	0	—	—	63	—	205	—	272	55
	SU-11	しばワカメ	77	0.92	5.8	4.6	200	2.0	0.55	0	346	—	264	107	80	4.40	304	1936
	SU-12	刻みすぐき	86	0.96	3.9	4.2	2220	146	0.15	0	114	37	646	355	346	2.93	7	105
	SU-13	あつみかぶ	81	0.96	2.0	3.7	3040	118	0	0	288	—	486	—	66	0.20	214	19
	SU-14	大根	90	0.94	5.5	4.1	66.7	12.1	0.29	0	—	—	—	32	250	—	484	—
たくあん漬	TA-1		76	0.93	4.0	4.3	2220	59.6	0	22.4	—	—	—	—	114	1.46	190	1672
	TA-2		82	0.93	3.0	4.6	1790	84.7	0.76	32.5	—	—	388	—	209	1.17	3	284
	TA-3		75	0.92	5.9	5.0	4690	106	0	0	82	31	703	—	—	21.7	214	1238
	TA-4		82	0.95	2.9	4.4	4870	286	0	0	—	—	159	—	104	8.97	—	22
	TA-5		88	0.96	4.6	4.3	3290	147	0.38	4.6	—	—	—	—	179	7.88	—	387
	TA-6		74	0.92	5.4	4.7	3720	441	0.64	0	—	—	—	280	197	0.24	388	729
	TA-7		89	0.95	3.3	4.6	1490	112	0.18	0	—	—	—	—	97	4.50	32	56
	TA-8		85	0.94	4.6	5.2	3500	415	0.78	0	—	—	198	—	—	1.81	65	80
	TA-9		82	0.94	4.5	4.8	1670	107	0	30.0	78	—	384	—	91	5.31	51	517
	TA-10		84	0.95	3.0	5.5	6780	142	0.65	41.3	42	—	483	—	52	3.10	126	300
	TA-11		87	0.95	3.9	4.4	495	74.5	0	0	76	—	—	125	—	0.20	42	1068
	TA-12		84	0.94	3.7	4.9	4100	206	0	0	57	—	—	—	—	2.60	50	49
	TA-13		86	0.96	3.6	5.1	1340	165	0.70	0	25	12	251	—	85	0.50	—	48
	TA-14		84	0.94	7.2	5.3	1290	221	0.23	0	—	15	31	82	69	—	20	36
しょう油漬	SY-1	福神漬	62	0.87	7.4	3.9	39.2	34.5	0.66	0	—	—	—	—	—	—	141	100
	SY-2	〃	62	0.90	5.9	4.7	752	36	0.49	0	—	—	662	8	145	1.50	227	748
	SY-3	〃	61	0.89	5.8	4.7	760	42.5	0.55	0	174	74	691	69	107	2.22	238	750
	SY-4	てっぽう漬	82	0.93	5.8	5.2	9400	64.5	0.47	0	187	40	1145	231	470	4.60	352	3328
	SY-5	はつかり漬	86	0.94	5.1	4.6	4240	216	0.37	0	96	—	195	—	365	7.07	168	670
	SY-6	日白漬	79	0.93	4.0	4.6	4350	243	0	0	82	—	505	28	196	15.5	146	302
	SY-7	つぼ漬	85	0.95	3.6	4.5	894	105	0.48	0	—	16	65	—	76	0.10	—	301

（表1つづき）

しょう油漬（つづき）	SY-8	高菜漬	67	0.88	8.1	4.7	2200	57.1	0	1.4	—	—	768	—	260	1.22	119	31
	SY-9	〃	87	0.95	4.0	3.9	425	163	0	0	—	—	—	—	550	0.60	65	302
	SY-10	〃	91	0.98	1.7	5.2	214	318	0.32	0	—	—	—	280	90	2.59	—	132
	SY-11	野沢菜漬	89	0.96	3.7	4.4	934	93.7	0.31	0	—	—	—	54	423	0.40	66	153
	SY-12	〃	89	0.96	3.8	4.3	1070	144	0.46	0	33	—	45	—	788	1.01	44	169
	SY-13	広島菜漬	91	0.98	2.0	4.0	415	174	0	0	—	25	103	—	662	0.20	37	186
	SY-14	胡瓜	84	0.94	4.8	5.2	76.4	236	0	0	36	29	542	66	137	9.10	147	792
	SY-15	〃	85	0.95	4.7	5.0	4270	21.9	0.74	0.2	219	57	1248	—	425	1.00	202	661
	SY-16	メロン	83	0.94	6.3	5.4	92	208	0	0	—	—	—	—	130	0.50	—	1328
	SY-17	味なす	90	0.97	4.2	4.7	398	23.5	0.62	0	—	18	61	95	94	0.10	104	276
	SY-18	〃	89	0.96	4.3	4.3	3610	183	0.83	0	—	91	208	673	191	74.3	—	673
	SY-19	青しそ実	76	0.88	10.8	4.5	15.7	112	0.70	0	116	39	16	—	685	0.80	—	1705
	SY-20	山ごぼう	85	0.95	5.2	4.4	4890	5.0	0.33	0	94	—	299	—	454	0.90	—	888
	SY-21	しば漬	81	0.93	8.6	4.3	17500	16.8	0.44	0	119	—	167	—	293	3.71	576	689
	SY-22	胡瓜	85	0.94	6.9	4.5	5300	34.6	0.88	0	44	12	152	—	373	0.40	162	411
	SY-23	しその実	83	0.95	3.6	4.5	36.8	56.8	0	0	107	—	210	—	621	0.10	—	1489
	SY-24	にんにく	80	0.90	3.6	5.1	2980	34.4	0.14	0	67	—	269	—	—	24.5	48	1216
	SY-25	わらび	91	0.98	1.5	5.0	108	8.9	0.32	0	—	—	347	—	45	0.20	77	621
	SY-26	きのこ山菜	87	0.97	2.9	5.0	1290	10.7	0.48	0	47	20	397	—	214	—	46	208
	SY-27	朝鮮漬	76	0.92	6.1	4.4	917	64.4	0.67	0	33	—	303	—	130	—	222	138
	SY-28	茎わかめ	71	0.93	8.7	4.2	29.3	0	0.58	0	210	—	178	43	100	0.80	153	2045
その他	SO-1	べったら	76	0.94	4.0	4.3	992	71.1	0.55	0	—	—	—	146	80	0.50	—	32
	SO-2	〃	85	0.96	3.0	4.6	10700	66.2	0.75	0	—	—	288	—	297	0.50	—	18
	SO-3	〃	86	0.95	2.7	4.2	3920	66.0	0.19	0	22	—	—	—	220	3.1	416	32
	SO-4	〃	91	0.97	2.9	4.1	922	146	0.46	0	—	10	24	—	345	0.10	109	24
	SO-5	朝鮮漬	89	0.97	3.2	4.5	1780	107	0	0	—	—	—	—	438	0.10	289	343
	SO-6	〃	89	0.96	3.0	4.4	1320	139	0	0	—	—	226	61	771	15.4	250	240
	SO-7	瓜	92	0.97	3.6	4.6	19600	248	0	0	—	—	244	—	650	0.20	79	265
	SO-8	青じそ実	80	0.91	8.8	4.6	6600	22.7	0.76	0	204	108	204	—	473	67.7	—	1144
	SO-9	味わかめ	82	0.95	5.2	4.0	6390	6.9	0.28	0	501	117	—	—	356	8.63	97	293
	SO-10	しいたけ割干	94	0.88	5.3	5.0	8880	164	0.66	0	146	115	3484	276	1986	18.2	646	919
	SO-11	赤かぶら	86	0.94	5.5	3.7	4410	193	0	0	124	—	55	100	2228	—	165	133
	SO-12	わらび	88	0.98	2.4	5.0	70.5	21.0	0.58	0	68	14	318	—	176	3.63	183	47
	SO-13	わさび漬	62	0.92	2.4	5.1	51600	57.6	0.36	0	47	20	397	—	214	—	46	860
	SO-14	しょうが	78	0.82	11.6	4.5	145	12.8	0.61	0	169	140	181	55	444	0.20	126	1006

(2) 水分活性

70試料中65件は，0.90以上であり，更に酢漬は全てが0.91以上，たくあん漬では全て0.92以上であった．特にたくあん漬では，水分活性が高いうえに，pHも4.8±0.4と酢漬などに比較して高く，また食塩濃度は，4.3±1.2%と比較的低く保存面で不安がある．しかし，たくあん漬の方が酢漬よりソルビン酸の使用量が多く，桂皮酸の使用率も多い，またエタノール濃度も高い値を示しエタノール添加の可能性も考えられるなど，保存効果として他の因子がはたらいていると思われる．

(3) 塩化ナトリウム

モール法で塩素を，原子吸光法でナトリウムを測定し，それぞれ塩化ナトリウム量に換算し比較した結果，良く一致し，Y＝1.08X＋0.00033，r＝0.998で相関を認めた．近年減塩目的から塩化ナトリウムの代りに塩化カリウムなどを使用する場合が見られるが[3]，今回の調査においては，漬物には塩化ナトリウムが使用されていると思われる。

塩化ナトリウム量は，酢漬で1.0～9.5(5.4±2.6)%，たくあん漬で2.9～7.2(4.3±1.2)%，しょう油漬で1．5～10.8(5.1±2.2)%と，特にグループによ傾向は見られなかった．

漬物は，年々減塩化が進んでいる[2,6]．今回の調査でも10%を超えるものは，70試料中3件だけであった．また，70試料の平均は4.9±2.3%であり，10年前の平均的塩分約7%[7]と比較しても確実に減塩方向にあるといえる．

(4) pH

酢漬で2.9～4.6(3.7±0.02)，たくあん漬で4.3～5.5(4.7±0.4)，しょう油漬で3.9～5.4(4.6±0.4)，その他の漬物で3.4～5.1(4.5±0.4)であり，酢漬は他のグループのものり値が低く有意差があった．

次に，全試料を表示の違いにより下記のA～Dの4つに分類し，結果を表2に示した．

A 酢添加の旨表示のあるもの
B 酸味料添加の旨表示のあるもの
C 酢及び酸味料添加の旨表示のあるもの
D どちらの表示もないもの

酢及び酸味料添加のもの(C)のpHが3.5とかなり低い値を示し，有意差が認められた。しかし，どちらか一方だけが添加されているもの（A及びB）については，どちらも使用されていないもの(D)に比較して特にちがいは，見られなかった．

(5) アルコール

エタノールは，酢漬34.1～5770（平均1080）μg/g，たくあん漬495～6780（2950）μg/g，しょう油漬15.7～17500（2400）μg/g，その他の漬物70.5～51600（8380）μg/gであり70試料全てから検出された．

表2．漬物類のpH値

使用表示	平均値	試料数
A 酢	4.0±0.32	7
B 酸味料	4.7±0.25	13
C 酢，酸味料	3.5±0.44	8
D その他	4.6±0.43	42

その他の漬物のうちで，わさび漬(SO-13)は，風味上かもアルコール添加は予測されるものであった．それ以外のものについては，保存効果を狙った添加物としてのエタノールと[8]，食品成分としてのエタノールとを区別することはは川名ら[9]が述べているように困難ではあるが，同種類の漬物でもエタノールの値の差が大きいことに着眼して，著しく大きな値を示した試料については，添加されていると判断しても良いと思われる．

メタノールは，70試料中68件から検出されたが，漬物という発酵食品の性格上，野菜に含まれるペクチン質が，分解して生成したものと思われる。

(6) 合成保存料

合成保存料としてソルビン酸を検出した．酢漬では14試料中9件から検出され含有量は0.11～0.55(0.28±0.13)g/kgであった．たくあ漬では14試料中8件に0.23～0.78(0.54±0.23)g/kg，しょう油漬では28試料中21件に0.14～0.88(0.52±0.18)g/kg，そしてその他の漬物では14試料中10件から0.19～0.76(0.52±0.18)g/kgが検出された．

これらの平均値を比較すると，酢漬では0.28±0.13g/kgと，たくあん漬，しょう油漬，その他の漬物にくらべて明らかに低い値であった。これは酢漬のpHが3.7±0.02と他のグループに比較して酸性が強いため，ソルビン酸の使量が少なくても効果があるためと思われる．なお，しばワカメ(SU-11)は，0.55g/kgを示し，食品衛生法[10]での，酢漬のソルビン酸使用基準が0.5g/kg以下であることから違反であった．

1970～1978年ソルビン酸の使用率は，酢漬，たくあん漬，しょう油漬で各々88,96,93%であったが，今回の調査では，酢漬64%，たくあん漬57%，しょう油漬75%と使用率が低下していた．

(7) 桂皮酸

酢漬で14試料中1件，たくあん漬で14試料中5件，しょう油漬で28試料中2件から検出された．その中でも，特

にたくあん漬では4.6～41.3(26.2±12.4)μg/gと使用量が多く，かつ，他のグループに比較して使用頻度も多かったが，これは，たくあん漬においては，香味付けと保存性の目的から香辛料抽出物を使用している場合[7]があるためではないかと思われる．また，これら検出された8試料のうち5件はソルビン酸との併用であった。桂皮酸は，今回70試料中8件からだけ検出されたが，香辛料の抗菌作用が強いことやそれらの保存効果は古くから知られており，なかでも桂皮酸は，pHの低下に伴い抗菌活性が増加する[7),11-13)]ことから，漬物においても今後使用率が増加していくものと考えられる．

(8) 有機酸

全体では，リンゴ酸，乳酸，酢酸が比較的多く，クエン酸は予想に反し少なかった．また，いずれの試料からもアジピン酸は検出されなかった．有機酸が添加されたものであるか否かを判断することは困難であるが，検出量の非常に多いものや，同グループ内で比較的多く検出されたものについては，有機酸を使用したと判断しても良いと思われる。

酢漬では，当然ではあるが酢酸が多量に検出された．しかし，酢漬の表示がありながら酢酸が少ないものも見られた。クエン酸は，14試料中12件から検出され，他のグループと比較するとかなり高濃度であった。リンゴ酸も14試料中12件から検出され特に，すぐき漬(SU-12)は646mg/100g，あつみかぶ漬(SU-13)は486mg/100gと高い値であった。なを，酢漬では，酢の表示と共に酸味料（有機酸）の表示が見られたものが多かった．

たくあん漬では，リンゴ酸は14試料中8件から検出され，そのうち2件(TA-3,TA-9)がそれぞれ703mg/100g,483mg/100gという高い値を示した。フマル酸は14試料すべてから検出され，その中の1件(SU-3)は217mg/100gという他試料と比較して極めて高い値を示し，フマル酸が添加されていると思われる．

しょう油漬では，リンゴ酸が28試料中23件から検出され，その含有量が多いものも見られた．その中でも特に，てっぽう漬(SY-4)は1145mg/100g，きゅうり漬(SY-14)は1248mg/100gと，どちらも1％を超えていた．これは，他の試料すべてと比較しても，明らかにリンゴ酸が添加されていると思われる．コハク酸は28試料中10件から検出され，てっぽう漬(SY-4)は231mg/100g，高菜漬(SY-10)は280mg/100g，味なす(SY-18)621mg/100gと特に高い値を示した．これら同グループの他の試料の値と比較して，コハク酸が添加されているということが推察される．乳酸は28試料中26件から検出され，含有量が多いものも見られた．その中でも野沢菜(SY-11)は788mg/100gで約0.8％という高い値を示した．フマル酸は28試料中26件から検出された．日向漬(SY-18)は74.3mg/100gと特に高い値を示し，この味なすには，同グループの別の味なす(SY-17)と比較して明らかに添加されているものと思われる．

その他の漬物では，酒石酸は14試料中7件から検出され，青しその実(SO-8)は108mg/100g，味わかめ(SO-9)は117mg/100g，しいたけ割干(SO-10)は115mg/100g，しょうがみそ漬(SO-14)は140mg/100gであった．70試料すべてで比較してもこれらの4試料は高い値であり，また先の3件は同一製造者であることも考え含めて，酒石酸が添加されていると考えられる．ンゴ酸は14試料中10件に検出され，特にしいたけ割干(SO-10)は3484mg/100gという極めて高い値を示し，明らかに添加されていると思われる．乳酸は，14試料すべてから検出された．その中でも朝鮮漬(SO-6)771mg/100g，青うり(SO-7)650mg/100g，そして特にしいたけ割干し(SO-10)，赤かぶら(SO-11)が，それぞれ1986mg/100g,2228mg/100gという高い値を示し，この2試料は，添加されていると思われる．フマル酸は14試料中12件から検出され，朝鮮漬(SO-6)15.4mg/100g，しいたけ割干(SO-10)18.2mg/100g，そして特に青しその実(SO-8)は67.7mg/100gという高い値を示し，添加されているものと思われる．

しいたけ割干(SO-10)では，7種すべての有機酸が高濃度で検出された．その中でも特にリンゴ酸は約3.5％，乳酸は約2.0％，酢酸は0.65％と含有量が多かった．この試料の水分（94％）及び塩分（5.0％）含有量から水分活性を考えると予想外に低く(0.88)，これは有機酸が水分活性調整剤として作用している[2),14),15),18)]可能性があり，有機酸も保存に大きな役割を果しているのではないかと思われる．

(9) 遊離アミノ酸

必須アミノ酸であるグリシンは，近年抗菌作用が認められており[13)-18)]，グラム陽性菌，陰性芽胞形成菌に対し，1～5％で発育阻止が報告されている．また，グリシンは単独ではなく，他物質との併用により効力が増大することも知られており，卵白リゾチーム，有機酸（特にクエン酸ナトリウム），エタノール，ソルビン酸，低級脂肪酸モノグリセリド，縮合リン酸塩などとの相乗効果があることが知られ報告されている[13),15-16),19)]．

今回調査した試料のうちでは，グリシンが比較的多く検出されたものも見られた．前述のことも含め考え，1000μg/gを目安とし，これを超えて検出されたものについ

ては添加されたものと考えてよいと思われる．そこで，たくあん漬の2件(TA-1及びTA-3)，てっぽう漬(SY-4)，にんにくの茎（SY-24)，青しその実（SO-8）などについてはグリシンがエタノールと併用されているものと思われる．その他ソルビン酸と併用されているものも数件見られた．

要　約

市販漬物類について，水分，水分活性，食塩，pH，アルコール，合成保存料，桂皮酸，有機酸及び遊離アミノ酸について，調査を行なった．

1．水分

61～94(83±7.4)%であり，全体的に含有量は多かった．

2．水分活性

0.83～0.99(0.94±0.03)で，全体的にかなり高く，この値で考える限りでは微生的に対し抵抗性がないように思われた．保存性を高めるために，何らかの手段をこうじているであろうことが示唆された．

3．塩化ナトリウム

平均4.9±2.3%であり，近年の低塩化傾向を裏付ける結果となった．

4．pH

酢及び酸味料併用の表示がある試料は，それ以外のものに比較してpHは低く有意差が認められた．

5．アルコール

エタノールが，15.7～51600(3842±6853)μg/gと検出量に大きなバラッキが見られた．また，漬物の保存料として，エタノールが添加されているという可能性が示唆された．

6．合成保存料

漬物類に許可されているソルビン酸が，70試料中48件から検出され，使用率は69%であり使用率の低下が見られた．ソルビン酸が検出された試料の平均値は，0.48±0.21であった．

7．桂皮酸

70試料中8件から検出され，そのうちの5件はたくあん漬であった．

8．有機酸

アジピン酸は，いずれの試料からも検出されなかった．リンゴ酸，乳酸，酢酸が含有されている試料が多く見られた．これら有機酸が添加されている可能性が示唆された．

9．遊離アミノ酸

抗菌作用を有するグリシンを使用していると思われる試料が数件見られ，そのうちいくつかは，他の保存性に関与する物質との併用であった．

終りに，今回調査した項目の他にも，食品に保存効果をもたらす[20]低級脂肪酸，グリセリド，縮合リン酸塩，リゾチーム等も使されている可能性があり，今後調査する必要があると思われる．

文　献

1）田中治夫：ジャパンフードサイエンス，20,60,1981
2）白石俊訓：食品と科学，24,93,1982
3）三好英昂：食品と科学，25,72,1983
4）日本薬学会編：衛生試験法・注解，1980,金原出版，東京
5）横関源延，渡辺忠美：昭和45年度日本水産学会春季大会講演要旨集，1970
6）隅谷賢二：食品と料学，23,88,1981
7）金井由美子，篠原雅弘，上沢佳乃，上杉　祥，山下晴美：*New Food Industry*,25,22,1983
8）山本　泰，東　和男，好井久雄：日食工誌，31,531,1984
9）川名清子,中岡正吉,池田陽男：食衛誌，22,326,1981
10）厚生省食品衛生課，乳肉衛生課，食品化学課：食品六法，115,1981,中央法規出版，東京
11）上田成子，山下晴美，中島真理子，桑原祥造：日食工誌，29,49,1982
12）中島智恭：*New Food Indusry*,24,28,1982
13）松田敏生：*New Food Industvy*,25,1，1983
14）深田哲司,佐藤友太郎：ジャパンフードサイエンス，21,39,‥1982)
15）佐藤友太郎：*New Food Industry*,23,41,981
16）金山龍男：食品と科学，春季増刊，117,1982
17）角野　猛,佐久間久仁子：家政学雑誌，34,118,1983
18）芝崎　勲：*New Food Industvy*,25,28,1983
19）鳥居教敏，大脇　薫，森田日出男：*New Food Industvy*,23,38,1981
20）堤　将和，須田郁夫，李在根,加藤祥子，渡辺忠雄：食衛誌，24,301,1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 191-198, 1985

化学物質及び自然毒による食中毒事件例（第2報）
—昭和58年～昭和59年—

田村行弘*, 真木俊夫*, 観公子*,
永山敏廣*, 二島太一郎*,

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toxicants in Tokyo (II) (1983—1984)

YUKIHIRO TAMURA*, TOSHIO MAKI*, KIMIKO KAN*
TOSHIHIRO NAGAYAMA* and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords: 食中毒 food poisoning, 化学性食中毒 chemical food poisoning, 自然毒 naturally occurring toxicants, 銅 cupper, 界面活性剤 surface active agene, ハシリドコロ *scopolia japonica*, アトロピン atropine, エゾボラ *neptunea polycostata*, クリイロエゾボラ *naptunea eulimata lamellosa*, テトラミン tetramin.

近年の食中毒は，新物質に基因するものよりも，過去に起きた事件のくり返しの形で現われている．特に自然毒は事件の発生当時，販売者や調理師等に十分に伝達され，常識化されてもう二度と起こることはないと考えられるものが，十年も過ぎると忘れさられてしまう．そこで類似の事件が再発し改めて驚かされることになる．

この三年間にも，フグ中毒のテトロドトキシン，アブラボウズのワックス，モロコのビタミンA称中毒，エゾボラのテトラミン等の事件が発生している．

一方，保存法に問題があると考えられる魚介類のヒスタミン中毒は，毎年数件絶えることなく起っている．又，不注意による家庭用薬剤の混入，あるいは十分な知識をもたず，図鑑等を頼りに採取し喫食してしまうキノコや山菜等の有毒植物の事例もあとを絶たない．

著者らは前報において昭和55年～昭和57年に都内で起きた食中毒事例を報告した[1]．今回は昭和58～59年の事例のうち主なものを報告する．

1．銅混入による食中毒

① 事件の概要 銅ナベで調理したタヌキ丼による食中毒と，着色の目的で銅を使用した梅砂糖漬による食中毒が2件続けて発生した．

事件1：昭和58年11月，夕食にタヌキ丼とウドンを2ケずつを出前させ喫食したところ，食事中から食後にかけて気分が悪くなり，間もなく下痢をしたため届けでた．

事件2：昭和59年1月，田舎から持ち帰った梅砂糖漬を職場の仲間と共に喫食したところ，気分が悪くなり病院に入院し，担当の医師から届出された．

② 食中毒の症状 事件1では，同一の丼を食べた母親と二人の子どもが症状を訴えた．症状は母親食事中から食後にかけて，頭がボーとし，酩酊感に襲われ，食後5時間目より黒色系の水様性下痢を8～10回呈した．一方，子供は少量の喫食のためか軽い下痢だけであった．なお，他のタヌキ丼とウドンを食べたものには異常がみられなかった．

事件2では喫食者5人中3人が食後30分頃より，はき気，嘔吐（2～10回）を激しく呈し，次いで腹痛，下痢（2～5回）を起こした．患者は40，50，51才の女性で，このうち二人は婦人諸病に用いられる漢方薬を溶かした湯と共に，又他の一人はコーヒー牛乳と共に喫食したもので，その喫食量はそれぞれ2，3，5個であった．この三名中コーヒー牛乳と共に喫食した者は軽症であった．一方，症状を呈しない二名は日本茶あるいはコーヒーと共に，それぞれ1/4，3個を喫食していた．

③ 試 料 タヌキ丼は残品では具がなく米飯だけであり，飯粒はやや緑色を呈していた．又は，同時に収去された銅ナベは直径17cm，深さ1.5cmの片手ナベで，すでにスズメッキがほとんど剥離し赤銅色を呈していた．

又，梅砂糖漬は青梅の種子を抜き，砂糖漬にしたもの

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

で鮮やかな緑色を呈しており，1個15～25gであり，カリカリと歯切れはよいが金属味が感じられた．

④ **原因物質の検索** 両試料ともに銅による汚染が考えられたので，試料を乾式灰化した後，常法に従い試験溶液を調製し，原子吸光法及びポーラログラフィーにより分析を行った．

タヌキ丼の残品からは370ppmの銅が検出された．又銅ナベについて衛生試験法に従い銅の溶出試験を行ったところ，4％酢酸溶出では7.0mg/100m*l*，水溶出では0.03mg/100m*l*であった．更に，銅ナベで玉丼の具を作り溶出する銅量について検討を行った．

調理法はスライスした玉ねぎ100gに調味液（だし汁，しょう油，みりん）100m*l*を加え，5分間加熱したのち溶かし卵で全体をとじ，30秒後に火を止め試験に供した．結果はTable 1．に示したが，ナベからの溶出量は連続使用の場合には89ppmと比較的溶出は少なかった．ところが前日使用し洗浄後一晩放置して，翌朝洗わずに使用した場合は217ppmと高い溶出量を示した．なお調理場に常備される漂白剤の次亜塩素酸ソーダの混入が銅溶出をまねくことも考えられたため少量添加し調理したところ，銅溶出量は少ない傾向を示した．

梅砂糖漬の銅含有量は1,500ppmであった．又，このものを作った山形地方では色上げを良くするために，食塩を銅板上でよくもみ，その食塩を用いる習慣がある．このような処理をした緑色の食塩が，同時期に参考品として持ち込まれたので銅含有量を測定したところ，3,160ppm検出された．

⑤ **汚染経路** タヌキ丼では調理後のナベの洗浄が不十分であったか，調理後ナベ中に長時間放置したために，銅の溶出が促進したものと考えられた．

一方，梅砂糖漬では銅片や銅粉が混入した経過はないが，山形地方の習慣から考えると銅板上でもんだ食塩の添加，又は梅の塩もみが銅板上で行なわれたために銅の混入をまねいたと推定された．

⑥ **考　察** 銅による食中毒は古くから知られ[2,3]，緑青は特に有害性が高いとされていた．ところが最近の報告[4]では緑青は溶解性が悪いため，それほど毒性が強くないと報告されている．しかし，今回のような形で食べ物に混入した銅による中毒の詳しい報告はないため，本来の銅中毒量は明らかでない．

今回の結果から，中毒量を推定すると，丼中の米飯量を300gとし，又具の部分には少なくとも5倍量の銅が含まれ，200gの具が入っていたとすると丼中には約400mgの銅が入っていたと推定される．母親はその2/5量，銅160mgを摂取したと推察された．又，梅では60～150mg/人であると推察された．

Table 1．調理時の銅の溶出

測定条件	検出値
調理後洗浄し，翌日洗浄せずに調理	217ppm
調理後銅なべ中に1日放置	362
連続使用した時の銅なべで調理	89
5％次亜塩素酸ソーダ0.5ml添加後調理	56

金属の食中毒は同時に摂取される食品や，空腹状態により症状の程度が異ってくる．これは今回の梅5個をコーヒー牛乳と共に食べた婦人が軽い症状であったことからも明らかである．両事例ともに銅の形態は明らかではないが，銅60～160mg/人を摂取した時に中毒に陥ることは確かなようである．なお，吐剤の硫酸銅は局方で0.2g/1回用いている．

食中毒の原因となったような銅ナベの使用にあたっては，調理後ナベ中に食品を放置しないことは当然のことであるが，使用前後には十分に洗うことが銅溶出を防ぐのに役立つと思われる．なお，スズメッキが剝離している銅ナベは，食品衛生法では不良品とみなされる．

2．洗剤入サラダドレッシング食中毒

① **事件の概要** 昭和59年5月ファミリーレストランで主婦6名が野菜サラダ等を喫食したところ，洋風ドレッシングをかけ食べた5名が異常な苦味を感じ，同時に気分が悪くなり入院した事件で，医師により食中毒と診断された．

② **食中毒の症状** 患者は5名，症状は喫食直後から15分の間に，苦味感と口腔内の灼熱感を伴い，悪心，嘔吐を呈した．なお口腔内の苦味感は長時間消失しなかった．又，下痢はいずれも起こらなかった．

③ **試　料** 試料には事故ドレッシング，新たに作ったドレッシング，洗浄水，洗剤が搬入された．患者がドレッシングの異常を申し立て，又は当該店の店長がドレッシングに洗浄剤の混入した疑いがあることを申し立てたため，関連品の収去も行なわれた．なお，ドレッシングは食用油，酢，及び香辛料等を混合したものである．

④ **原因物資の検索** 初めに泡立ち試験をしたところ，残品に泡立ちが認められた．そこで洗剤について検索が行なった．

洗剤の定性試験：試料に1％水酸化ナトリウム溶液を加えて中和し試験溶液として，薄層クロマトグラフィーにより試験を[5-7]．分析条件は次のとおりである．

展開溶媒：ⓐ クロロホルム・0.1N硫酸を5％含有メタノール（8：20），ⓑ 酢酸エチル・アセトン・水（55：

35：10)，ⓒ 酢酸エチル・メタノール・アンモニア水(45：5：2.5)，ⓓ n-プロパノール・クロロホルム・メタノール・10N アンモニア水 (10：10：5：2)

発色剤：ⓐ ヨウ素蒸気，ⓑ ピナクリプトールイエロー・メタノール溶液(アニオン系界面活性剤……UV 下で黄色蛍光)，ⓒ ドラーゲンドルフ変法試薬(カチオン系界面活性剤……黄色，ノニオン系……橙色)，ⓓ チオシアン酸アンモニウム・硝酸コバルト試薬（ノニオン系……青色)

標準品：ポリオキシノニルフェニルエーテル (Nikkol NP—10)，アルキルフェニルエーテル（リポノックス NA）ドデシルベンゼンスルホン酸塩（ソフト型)

洗剤の定量試験：1)非イオン界面活性剤の定量；試料に水を加え20m*l* とし，チオシアン酸コバルトアンモニウム 5 m*l*，ジクロルメタン20m*l* を加え，さらに食塩を飽和量加えて振とうする．ジクロルメタン層を分取，脱水後，620nm の吸光度を測定する．2)ABS の定量；JIS 規格 陰イオン界面活性剤メチレンブルー法 (K0102) 及び毛利等[8]の方法に従い測定した．

定性試験の結果，事故ドレッシングにはポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系非イオン及びアルキベンゼンスルホン酸塩陰イオン界面活性剤が混入していることを確認した．又，これらの定量値を Table 2．に示したが，事故ドレッシングと洗剤が近似値を示すことから，わずかに残ったドレッシングの容器の中へ洗剤の原液を入れたものと推察された．

⑤ 汚染経路

汚染原因は営業終了後，従業員が空になったドレッシング用容器を洗うために，洗剤の原液を入れ洗い場に放置しておいたことにある．その後，別の従業員が未だドレッシングが残っているものと思い違いをし，冷蔵庫に保管した．これが翌日客に提供されてしまったために事件をまねいた．

⑥ 考 察

本事件は洗剤の混入が原因で起ったものであった．又，患者及び店長の申し出が原因物質を検索する上で大きな役割をはたした．洗剤の摂取量はサラダの量にもよるが，通常 2～10m*l* のドレッシングが使われ，野菜に付着し摂取されるものはその1/5量とすると，両界面活性剤合わせて0.05～0.2g と推定された．

本事件の起こった背景には，店の従業員の基本的な衛生教育の不十分さと同時に，アルバイトやパートにまかせきっている体質がある．異物の混入は不注意からくるものがほとんどであり，これを避けるには店舗における管理体制の強化と衛生教育以外にはないものと考える．

Table 2. 界面活性剤の分析結果

	pH	陰イオン系*	非イオン系**
事故ドレッシング	3.7	5.5%	3.9%
新鮮なドレッシング	3.4	nd	nd
洗浄水	3.9	0.02	0.01
洗剤	8.8	7.9	4.9

* ：アルキルベンゼンスルホン酸塩
**：ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル類
nd：検出しない。

3．ハシリドコロによる食中毒

① **事件の概要** 昭和59年 4 月都下西多摩郡の雲取山にて，山菜「ふきのとう」を採取し，近所に配り自らも喫食したところ，喫食者全員が食中毒症状を呈した．

② **食中毒の症状** 患者は喫食者 7 名全員である．Table 3．に喫食状況や症状を示した．発症時間は早い人で喫食後15分，遅い人では 2 時間であった．症状はいずれも重症であり，軽症の場合にみられる口喝，めまい等より，神経系障害の意識障害，幻覚症状，異常行動等が強く現われた．しかし，いずれの患者も24—30時間後には回復に向かった．

③ **試 料** 残品は phot. 1．に示したように，約 4～5 cm の若芽で，7 片とも未調理のものであった．

④ **原因物質の検索** 残品を鑑定した結果，いずれもハシリドコロ様ナス科植物であることが判明し，ふきのとうは含まれていなかった．ハシリドコロにはトロパンアルカロイドのアトロピン，ヒヨスチアミン，スコポラミンが含まれることから検索を行った．

試料 2 g にエーテル適量を加え，アンモニアでアルカリ性としたのち，ホモジナイズしろ過する．ろ液を脱水，濃縮，乾固後エタノールを加え試験溶液とする．

a) 薄層法：薄層板にはシリカゲル，展開溶媒にはクロロホルム・メタノール・アセトン・アンモニア水 (73：15：10：2)，発色剤にはドラーゲンドルフ試薬を用いる．なお，呈色は橙色である．Rf 値はヒヨスチアミン及びスコポラミン，それぞれ 0.28と0.67である．又，アトロピンは抽出操作中に光学異性体であるヒヨスチアミンに変換する．

b) ガスクロ法：FID 検出器付ガスクロマストグラフで測定する．測定条件；カラム—3％ OV—17, 1m×3mmϕ，カラム温度 230°，標準液—ヒヨスチアミン，スコポラミンともに200～1000ppm のエタノール溶液．

残品を分析した結果，ヒヨスチアミン及びスコポラミ

Table 3. ハシリドコロによる食中毒

発症月日	性別	年齢	摂取状況 形態	量(本)	発症時間(分)	症状
4.28	女	49	みそ汁	約 10	15	戦、倦、脱、麻(手)、めまい、口渇、嚥下困難、幻覚、錯乱、眼、尿閉
	男	56	〃	約 10	45	はき気、おう吐、戦、倦、脱、麻、眼かすむ、めまい、口渇、嚥下困難
	女	82	〃	約 10	15	戦、脱、麻(手)、臥床、意識障害、錯乱
4.30	女	60	天ぷら	2	30	戦、倦、脱、臥床、麻(手)、尿閉、口渇、幻覚、錯乱、意識不明、眼
5. 1	女	67	〃	2－3	90	戦、倦、脱、麻、めまい、意識障害、幻覚、錯乱、眼、意識不明
	男	36	〃	12—13	120	戦、脱、麻、めまい、意識障害、幻覚、錯乱、眼、意識不明
	女	40	〃	4－5	120	戦、倦、脱、麻、めまい、眼

戦：戦りつ、倦：倦たい感、脱：脱力感、麻：麻ひ、眼：眼症状

ンの両者が同定され，定量値はそれぞれ570，290ppmであった．

⑤ **考察** 有害植物による食中毒事件は，都内においても毎年発生しているが，いずれも採取者の知識，経験が浅く，十分な鑑定ができず目的のものと異なるものを採取してしまうケースがほとんどである．本事件はふきのとうと思い込み採取したものであった．

患者の喫食状況からトロパンアルカロイドの摂取量を推定すると，2～10mgである．これは若芽1片が約1gであったことを考慮し算出した．アトロピンまたはスコポラミンの経口によるLD_{50}は1～5mg/kgであり，局方に示される極量は3 mgである．Table 4.にアトロピンの用量と症状を示す[9]．本食中毒では極量をこえて摂取する人もいたが，幸いなことに死者がでなかった．

4．ツブ貝による食中毒

① **事件の概要** 昭和59年12月 小料理屋でツブ貝のサシミ他をビールと共に喫食したところ，約30分後に気分が悪くなり，油汗をかくなどの食中毒症状を呈した．

② **食中毒の症状** 患者は48才，男性一名である．症状は悪心，血圧低下(40—80)，胸部疼痛，全身発疹，発熱(37.1°)，四肢けいれん（約6時間後），呼吸困難等の症状を呈した．患者は酒酔のためか，過去の食中毒症例にみられる視神経の障害である「めまい，目がかすむ」等の訴えはなかった．なお，つぶ貝の喫食量は1～2個であった．

③ **試料** 試料には残品の巻貝1個の外に，購入先の東久留米市場内より収去したツブ貝の合計7検体が送付された．

Table 4. アトロピン用量と症状[9]

用量（mg）	症状
0.5	弱い口内の乾燥（遅脈）
0.5- 1	口渇
2	散瞳，速脈，制汗
3- 5	嚥下困難，頭痛，不快，筋無力
7	著しい散瞳，調節困難
8	興奮，筋の協調不能
10	無感動，幻覚，錯乱，昏睡

④ **原因物質の検索** 試料の巻貝について鑑定したところ，残品はクリイロエゾボラ *Neptunea eulimata Lamellosa*，また参考品はエゾボラ *Neptunea polycostata* が1件の外はいずれも残品と同一種であった．これらの巻貝は唾液腺中に四級アミンのテトラミンが局在していることから，これについて分析を行った．

摘出した唾液腺に70%エタノールを加え，還流し抽出しする．ろ過後，残査にはエタノールを加え再び抽出をくり返えす．得られたろ液を合せ減圧濃縮し，エーテルで脱脂後，水で一定量とし試験溶液とする．セルロース系のアビセルWS薄層板を用い，展開溶媒：水・イソプロパノール（1：3）で展開する．発色剤にはドラーゲンドルフ試薬を用いる．

クロマトグラフィーの結果，標品のRf値0.5～0.55と一致するテトラミンが残品及び参考品から検出された．

⑤ **考察** ツブ貝はエゾバイ科の肉食性の巻貝であり，昭和52年6月にも都内において患者2名を，又全国的には過去に8件，44名の患者がでている[10]．通常，ツブ

貝食中毒は一過性で数時間後に回復し，症状の軽い場合には酩酊感だけで食中毒と気付かないことが多いようである．今回の事例は眼症状が訴えられておらず，又20個程度が中毒量と報告[11]されていることからも，従来のツブ貝による中毒とは相違がある．

唾液腺中のテトラミンの含有量は，加納ら[12]が生物学的手法でヒメエゾボラにおいて3.3～5.9mg/g，エゾボラで1.5～2.4mg/gと報告している．又浅野[13]，高野ら[14]はヒメエゾボラでそれぞれ7～9 mg/g，4.5～7.0mg/gと報告している．なお，唾液腺は1～3 g/個である．

昭和52年7月15日，52衛環乳第208号においてツブ貝の取り扱いが通達されている．ツブ貝は殻付き又はむき身で流通しているが，産地や採取時期によりテトラミン含有量が変動するため，又その摂取量により中毒量を超えたテトラミンを摂取してしまう恐れもあることから，販売に際しては唾液腺の除去を義務づける必要があると考える．

終りに，本報告以外に異物の混入として，ラクト牛乳中へのキシレン，及び洋菓子中への殺虫剤の混入の事例がある．ラクト牛乳は喫食直後にキシレン臭及び異常味を感じ，はき気を呈したものであった．キシレンはガスクロマトグラフィーとマススペクトル法により同定されたが，混入の原因は不明であった．洋菓子は喫食後直ちに薬品臭を感じ，さらに口腔内のしびれ感を呈したという訴えであった．種々の状況から農薬の分析を行ったところ，DDVP，フェニトロチオンの有機リン系殺虫剤が微量検出された．これは調理場を消毒した際に使用した殺虫剤が洋菓子の生地に付着したことが原因であり，作業者の不注意によるものであった．

又，明らかにヒスタミンによると考えられた食中毒事例が4件発生している．いずれも冷蔵庫保存を過信したために起きたもので，ヒスタミンの外にカダベリンやプトレシンの不揮発性アミン類を検出したイワシもあった．これらのアミン類はヒスタミンの生理作用に関与し，その作用を強める役割を果している．

一方，近県ではアブラソコムツの食中毒が昭和58年春に神川県下で発生した．これらワックス含有魚による食中毒は追去10年間に6件，171人の患者[10]をだしており，食品衛生法上販売禁止魚となっている．本事件は悪徳業者がトロミリン等と高級魚風の名を付け密売し，これを幼稚園児が喫食して下痢を起こしたものである．

更に，埼玉県下ではソラニン中毒と推察された事件[15]が起きている．理科の実習に学校でジャイガイモを栽培し，それをゆでて食べた生徒間で起きた食中毒である．本事例は栽培法に問題があったもので，土の被覆が十分でなく，光の当る状態でジャガイモを育てたことに起因している．これは家庭菜園にもあてはまるもので，新たな問題を提起したものである．さらに，この事件は前報[1]のニガウリ事件と同様に，一度調理加工してしまうと多少異臭味を呈しても，喫食してしまうという点が共通していた．このようなことは今後の事件解明時のカギとして，役立つもので記憶に留める必要がある．

本報告では昭和58年から59年にかけて起きた食中毒事例のうち，異物の混入と動植物性自然毒を各2例づつ

1．銅混入による食中毒，2．洗剤入りサラダドレッシング食中毒，3．ハシリドコロによる食中毒，4．ツブ貝による食中毒を取り上げ報告した．

謝　辞　本調査の遂行にあたり，検体採取及び疫学的調査等の労を取り計られた東京都衛生局環境衛生部食品衛生課，五日市保健所，荒川区荒川保健所，町田市保健所，文京区小石川保健所，小平保健所，市場衛生検査所の職員各位並びにハシリドコロ及びツブ貝の鑑定をしていただいた当所理化学部医薬品研究科及び国立科学博物館動物研究部　松隅明彦氏に深謝いたします．

文　献

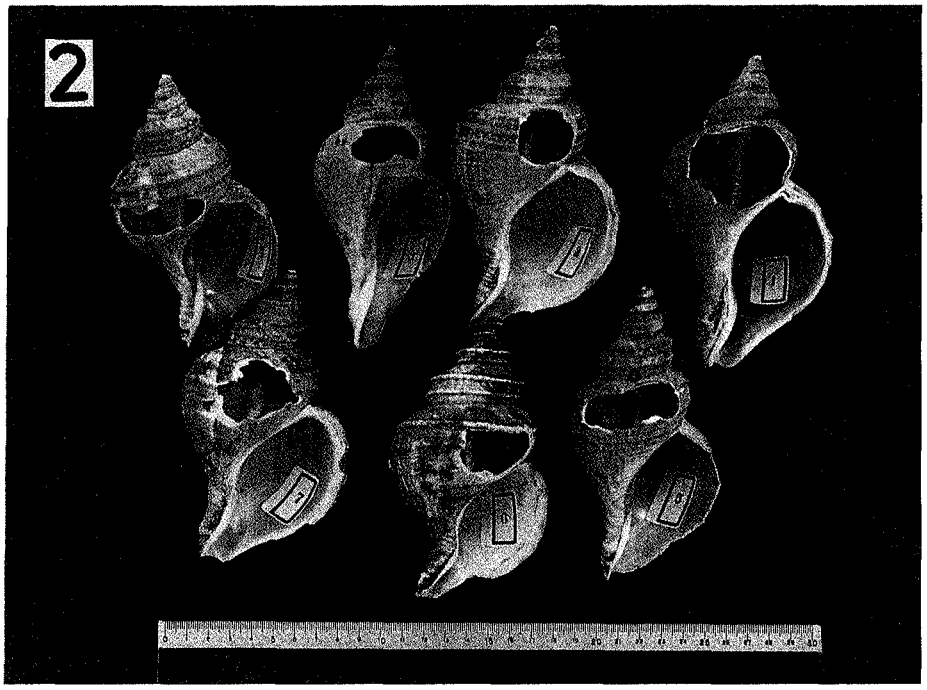
1）田村行弘，真木俊夫，観　公子ら：東京衛研年報，34，141，1983
2）山本俊一：日本食品衛生史（明治編），p292，1980，中央法規出版
3）長橋　捷：医学のあゆみ，96，705，1976
4）降矢　強：食品衛生研究，34，925，1984
5）石綿　肇，渡辺晴美，林　敏夫ら：食衛誌，14，425，1973
6）米勢千鶴男，宍戸　健，金子隆英ら：油化学，27，592，1978
7）下山徳重：東京都消費者センター研究要報　1，27，1983
8）毛利善一：常盤文克：食衛誌，13，141，1972
9）高木敬次郎，小澤　光：薬物学，p180，1962，南山堂
10）厚生省環境衛生局，食品衛生課：全国食中毒事件録
11）橋本芳郎：魚貝類の毒，p24，1977，学会出版センター
12）加納碩雄：事業概要，昭和53年版，p81，1979，東京市場検査所
13）Asano, M. and Itoh. M.：*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 90, 674, 1960
14）高野　修，安元　健：日本食品衛生学会　第35回学

術構演会要旨集, p41, 1978, 東京
15) 斉藤貢一, 堀江正一, 能勢憲英ら：日本食品衛生学会　第49回学術講演会要旨集, p18, 1985, 東京

写真の説明

1．食中毒の原因となった残品のハシリドコロの若芽
2．食中毒の原因となった残品及び参考品のバイ貝
　1）～5）：参考品；クリイロエゾボラ
　6）　　：参考品；エゾボラ
　7）　　：残　品；クリイロエゾボラ

1


2

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 199-205, 1985

農作物の残留農薬の実態と動向
—1977～1984—

田村行弘*, 観　公子*, 永山敏廣*,
真木俊夫*, 二島太一郎*

Survey and Tendency of Pesticide Residues in Crops
(1977—1984)

YUKIHIRO TAMURA*, KIMIKO KAN*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*,
TOSHIO MAKI* and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords：残留農薬　pesticide residues, 有機塩素系農薬　organochlorine pesticides, 有機リン系農薬　onganophosprus　pesticidts, カルバメート系農薬 carbamate　pesticises, TPN　chlorothalonil, カプタホール captafol, キャプタン　captan, 野菜 vegetables, 果物　fruits, 米　rice

緒　言

都内に流通する農作物の残留農薬の特徴及び存在量から，農薬汚染の動向を明らかにし，さらに食品の安全性評価と対策に役立てるために，筆者らは毎年実態調査を行っている[1-5]．

現在，農薬は有効成分で約300種，銘柄別で約4,000種許可されている．この内，食品衛生法及び農薬取締法に残留基準のある農薬は，それぞれ26種及び125種である．これは実際に使用される農薬の半分にも満たないものである．

食品衛生法上の農薬の残留実態は，各方面で明らかになりつつある．しかし農薬取締法に基づくものは，特定のものを除きほとんど明らかにされていない．最近の農薬は残留期間が短いことから，連続使用や多種類の重複散布も行なわれている．さらに，収穫間際まで散布できるものもある．これらは連続収穫をする果菜や葉物において特に問題があり，残留したまま出荷されてしまう危険性を含んでいる．又，実験圃場と実際の栽培では環境や耕作条件等が異なることから，残留状態も違いが生じるために実態調査は必須のこととなっている．

このような中で52年度より食品衛生法上基準のある農薬の外に，効果的に調査するために生産量の多いものや，残留性の比較的長いもの，収穫間際まで使用できるもの，さらに新たに開発許可された農薬を対象として実態調査を実施している．今回，52年度までに実施した結果を基として，農薬の年次推移，検出実態，残留状況等について検討を加えたので報告する．

実験の部

1．試料　昭和52年4月から昭和60年3月までに都内に入荷した玄米，果物等の農産物を試料とした．

2．調査農薬名　**有機塩素系農薬**〔BHC（α, β, γ, δ 体），DDT（*pp'*-DDT, *pp'*-DDD, *pp'*-DDE），アルドリン，ディルドリン（DLD），エンドリン（END），ヘプタクロルエポキサイド（Hepa.epox.）〕，**有機リン系農薬**〔食品衛生法に基づくもの：ジクロルボス(DDVP)，ジメトエート，ダイアジノン，パラチオン，フェニトロチオン，フェンチオン（MPP），フェントエート（PAP），マラチオン．農薬取締法他：アセフェート，イソキサチオン，エチオン，エチルチオメトン，クロルピリホス，クロルピリホスメチル，サリチオン，ジアリホール，チオメトン，ピリダフェンチオン，プロチオスホス，プロパホス，ホサロン，ホルモチオン，CVMP, CVP, CYAP, CYP, DMTP, ECP, EPBP, IBP, PMP〕，**カルバメート系農薬**〔ジチオカルバメート（ジネブ，マンゼブ，マ

* 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
* The Tokyo Metoroporitan Research Labolatory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

ンネブ，ジラムについて総量として分析した)，カルバリル（NAC)，メソミル)，**その他**〔TPN，PCNB，D-D，HCB，ジコホール，ビンクロゾリン，プロシミドン，ベンゾエピン，キャプタン，カプタホール，キノメチオネート，クロルピクリン〕，**除草剤**〔玄米のみを対象とした：CNP，ベンチオカーブ〕

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 G—5A（ECD，FPD)，同 GC—9A（ECD，FPD，FTD)，同 GC—R1A（FTD)〕，分光光度計〔日立製作所　UV—320型〕，液体クロマトグラフ〔日本分光㈱　TRIROTAR II，(蛍光検出器及び紫外部検出器)〕

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号に準じた．又，キャプタン，カプタホールは昭和48年厚生省告示第332号に準じた，さらに，アセフェート，クロルピクリン，メソミル，TPN 等は農薬取締法に基づく分析法及び残留農薬分析法等[6-13]に従い，あるいは一部改良し分析した．

結果及び考察

1．玄　米

都内に搬入された玄米を対象に，毎月定期的に年間50検体を検査している．調査農薬は合計49種であり，その内容は有機塩素系農薬　14種〔BHC，DDT，ALD，DEL，END，Hepta.epox.，ジコホール，キャプタン，カプタホール〕，有機リン系農薬　32種，カルバリル　1種，除草剤2種〔CNA，ベンチオカーブ〕である．

昭和52年から昭和59年度までに検査した400検体の結果を集約すると，検出した農薬は BHC，ダイアジノン，NAC である．ダイアジノンと NAC はわずか一検体ずつの検出であり，検出値も0.03ppm と trace であり，いずれも低値であった．一方，BHC は Fig.1に示した年次推移のように，昭和52年度は68%と高検出率を示し，又0.008ppm と高値を示したが，57年度後以降は0.001ppm を超えて検出するものではなく，年々減少の傾向を示している．

現在分析している方法による玄米からの抽出液では，ガスクロマストグラム上において未知のピークがほとんど認められず，又，NAC について液体クロマトグラフィーを検討しているが，現在までのところ未知ピークは認められない状態である．

2．野菜及び果物

2-1．検出状況

過去8年間に調査した各種残留農薬の検出状況の結果をまとめ Table 1．に示した．現在までに実態調査した

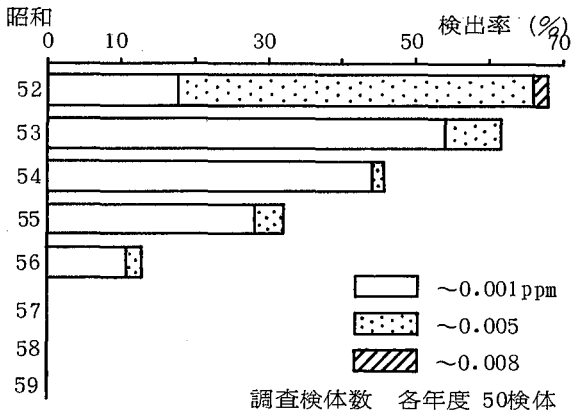


Fig. 1.　玄米中BHC残留量の年次推移

農薬は70種を超えるが，高検出率を示したものを挙げると有機塩素系農薬22%，TPN14%，有機リン系農薬9～10%である．又，全体では9%であり，すでに過去のものとなり使われていない有機塩素系農薬を除くならば6.3%である．

一方，発ガン性のある農薬として新聞等に報道されてきたキャプタン，カプタホールは0.85%と低検出率であり，又検出したものも0.1ppm 以下と低値であった．カルバメート系農薬のメソミルは58年～59年に東京，埼玉などで野犬等の変化を招いた原因物質である．主として稲の殺虫剤に使われるが，野菜等にも使われることから調査したがいずれからも検出されなかった．

他方，野菜，果実において残留農薬の検出率の高いものは，キュウリ，トマトの葉菜類が15%で最も高く，次いで，ホウレンソウ，コマツナの果菜類の12%，果物の9%である．最も低いものは根菜類であった．

2—2．年次推移

(1) **有機塩素系農薬**　高検出率22%を示した有機塩素系農薬の年次推移を Table 2．に示した．最も検出率の高い BHC は根菜を除き年々減少の傾向を示し，その検出濃度も0.001ppm 程度と低くなっている．しかし，根菜はこの3年間をみても9～20%と比較的高く，又検出値も0.01ppm を超えるものもある．この理由に，根菜の成育期間が葉菜類と比べ長いため，濃縮割合が高まることが挙げられる．さらに，ここ数年の新たな傾向は β-BHC が単独又は α 型より高濃度検出されることが挙げられる．これは近年の肥料に何らかの変化が起っていることも考えられるが，原因は明らかでなく，現在追跡調査中である．

ドリン剤では，時々トマト，キュウリに特異的に DLD

Table 1. 野菜における各種残留農薬の検出率

%（検出数／総数）

品目	有機塩素系農薬	有機リン系農薬 食品衛生法	有機リン系農薬 農薬取締法他	カプタホール キャプタン	TPN	PCNB
葉菜	26(54／210)	13(29／219)	11(8／75)	0(0／35)	10(10／103)	8(3／39)
結球葉菜	17(37／215)	4(9／224)	3(2／75)	0(0／43)	7(8／111)	4(2／47)
果菜	21(31／148)	18(33／184)	8(4／49)	4(1／27)	37(53／142)	0(0／19)
根菜(根)	10(10／ 97)	3(3／107)	5(2／40)	0(0／33)	0(0／ 45)	0(0／33)
(葉)	24(15／ 63)	9(6／ 69)	11(4／36)	0(0／29)	0(0／ 28)	
その他	16(8／ 50)	2(1／ 47)				
果物	29(51／173)	11(21／196)	14(11／79)	1(1／68)	2(3／102)	2(1／52)
計	22(206／956)	10(102／1046)	9(31／354)	1(2／235)	14(74／531)	3(6／190)

品目	カルバメート メソミル	カルバメート ジチオカルバメート	NAC	アセフェート	ビンクロゾリン	プロシミドン	ベンゾエピン
葉菜	0(0／ 6)		8(2／ 26)	3(1／ 36)	0(0／ 26)	0(0／ 26)	0(0／ 26)
結球葉菜	0(0／10)		0(0／ 33)	0(0／ 51)	0(0／ 33)	0(0／ 33)	0(0／ 33)
果菜	0(0／20)	0(0／ 9)	0(0／ 13)	0(0／ 23)	23(3／13)	0(0／ 13)	0(0／ 13)
根菜(根)	0(0／ 3)		0(0／ 30)	0(0／ 24)	0(0／ 30)	0(0／ 30)	0(0／ 30)
(葉)	0(0／ 1)			0(0／ 3)			
その他							
果物	0(0／13)	0(0／ 8)	0(0／ 43)	0(0／ 47)	0(0／ 45)	2(1／ 45)	0(0／ 45)
計	0(0／53)	0(0／17)	1(2／145)	0.5(1／184)	2(3／147)	1(1／147)	0(0／147)

品目	ジコホール	D−D	キノメチオネート	HCB	クロルピクリン	計
葉菜	0(0／ 26)	0(0／10)		8(3／ 39)	0(0／14)	12(110／ 916)
結球葉菜	0(0／ 33)	0(0／12)		4(2／ 47)	0(0／16)	6(60／1016)
果菜	0(0／ 13)	0(0／11)	4(3／76)	5(1／ 19)	0(0／13)	16(129／ 805)
根菜(根)	0(0／ 30)	0(0／ 3)		0(0／ 33)	0(0／ 3)	3(15／ 571)
(葉)						11(25／ 229)
その他						9(9／ 97)
果物	9(4／ 45)	0(0／11)	0(0／ 4)	0(0／ 52)	0(0／13)	9(93／1041)
計	3(4／147)	0(0／47)	4(3／80)	3(6／190)	0(0／59)	9(441／4675)

やENDが検出される．又，59年度の新たな傾向として，根菜類からDLDやENDが0.005～0.03ppm検出されたことが挙げられる．又検出数も両者合せて6検体もある．これは59年度には他の農薬の検出率も高いことから，天候不順の影響の現われとも考えられる．すなわち，今だに土壌中に残存するドリン剤が降水量が少ないために濃縮係数に変化をきたしたものと推察された．

ジコホールは昭和53～55年に果物より特異的に検出されていたが，その後検出されず，再び59年になり検出され始めた．検出果物はいずれも苺であり，検出値は0.02～0.13ppmと低値であるが，7検体中5検体と高検出率である．今後注目して調査する必要があると考えている．

(2) **有機リン系農薬** 過去3年間における有機リン系農薬の年次推移と検出率をTable 3．に示した．年度毎に検出率が増加する傾向が葉菜類，果菜類でみられ，又果物では59年度に急増の傾向がみられた．特に59年度の特色は過去に検出したことのない農薬，すなわちCYAP，CYP，DMTP，IBP，ジリアホール，クロルピリホス等多種類が広範囲の農作物から検出されることである．これは59年度春から夏にかけての異常乾燥の影響で，雨による農薬の流亡がなくクチクラ層へ浸透し，蓄

Table 2．主な野菜中有機塩素系農薬の年次推移と検出率

品目	農薬	昭和53年	昭和54年	昭和55年	昭和56年	昭和57年	昭和58年	昭和59年
		n＝11	23	25	31	50	38	28
葉菜	BHC	90%	48%	12%	16%	10%	5%	7%
	DDT	18	4	0	0	2	0	0
	DLD	0	0	4	0	0	0	0
		n＝22	36	21	31	10	19	13
果菜	BHC	14	19	19	0	0	5	0
	DDT	9	0	0	0	0	0	0
	DLD	13	8	10	0	0	0	0
	END	5	0	5	0	0	0	0
		n＝17	8	13	12	9	7	30
根菜	BHC	12	25	8	17	9	14	20
	DDT	12	0	0	0	0	0	3
	DLD	0	0	0	0	0	28	7
	END	0	0	0	0	0	0	14
		n＝11	36	25	50	63	45	43
果物	BHC	18	22	12	20	3	7	0
	DDT	18	0	0	0	0	0	0
	ジコホール	36	17	4	0	0	0	5

n：検査件数，　DLD：ディルドリン，　END：エンドリン

Table 3．過去3年間における有機リン系農薬の年次推移と検出率

%（検出数／総数）

検査年度 / 有機リン検査項目 / 品目	昭和57年 22種	昭和58年 26種	昭和59年 34種	計
葉菜	11.8(2／17)	18.4(7／ 38)	28.6(8／ 28)	20.5(17／ 83)
結球葉菜	0 (0／22)	3.3(1／ 33)	0 (0／ 33)	1.1(1／88)
果菜	0 (0／ 7)	26.3(5／ 19)	30.8(4／ 13)	23.1(9／ 39)
根菜	18.5(2／11)	0 (0／ 7)	10.0(3／ 30)	10.4(5／ 48)
果物	11.1(2／18)	7.7(3／ 39)	27.5(11／ 40)	16.5(16／ 97)
計	8.0(6／75)	11.8(16／136)	18.1(26／144)	13.5(48／355)

Table 4．野菜，果物中のＴＰＮの年次推移と検出率

%（検出数／総数）

品目	昭和54年	昭和55年	昭和56年	昭和58年	昭和59年	計
葉菜	75(6／ 8)	15(4／ 26)	0(0／ 5)	0(0／ 38)	0(0／ 26)	10(10／103)
結球葉菜	43(3／ 7)	14(5／ 35)	0(0／ 3)	0(0／ 33)	0(0／ 33)	7(8／111)
果菜	100(10／10)	44(39／ 89)	9(1／11)	16(3／ 19)	0(0／ 13)	37(53／142)
根菜		0(0／ 9)		0(0／ 6)	0(0／ 30)	0(0／ 45)
果物	10(2／20)	0(0／ 5)	0(0／11)	5(2／ 21)	0(0／ 45)	1(0／102)
計	47(21／45)	30(48／164)	3(1／30)	6(5／117)	0(0／147)	15(74／503)

積した現われと考えられた．このような結果は実験圃場においてもえにくい結果であり，今後の実態調査を行う上で大変貴重な資料となった。

(3) TPN

有機塩素系農薬に続いて高検出率を示したTPNは殺菌剤であり，除草剤のPCPとよく似た構造をもち，比較的残留性の長い農薬である．Table 4．に年次変化を示したが，検出頻度は54年度をピークとして，順次減少し59年度には検出率がゼロとなっている．特に最も頻繁に使われた果菜では，検出率が急速に低下して行く様子がよく現われている．又Fig. 2に主に検出された野菜のTPNの濃度分布を示した．検出濃度は農薬取締法の登録保留基準値1ppmを超えるものもあり，特にトマト，キュウリでは高いレベルにあった。これらのことからもTPNは分解しにくく，残留性の長い農薬であることは明かである．

単一の農薬が実態調査の中でこれほど明確に出現し，

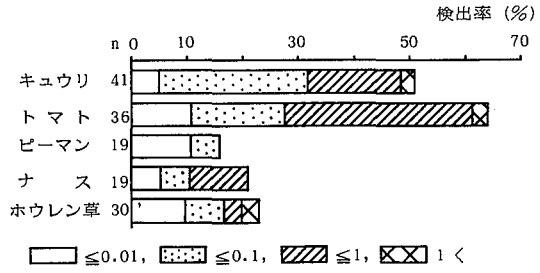


Fig. 2.　TPN残留量

消失する傾向を示したものは極めて希れである．

このような現象は耐薬性等を考慮するならば当然のことであるが，実態調査中で捕えることができたのは，いかに一時期多量に使用されたかその様子をうかがい知るものである．また，58年頃よりTNPと同属のPCNBが検出され始じめているが，今後TPNに変わるものかどうかその動向に興味がもたれている．

2－3．検出頻度と濃度の高い農薬

有機リン系農薬の中で，検出頻度と濃度の高いものをTable 5．に示した．最もよく検出されているものはEPN，フェニトロチオンであり，次いでDDVPが挙げられるが，いずれも殺虫剤である．Table 5．のEPNからダイアジノンまでの上位のものは毎年検出されるものであるが，プロチオホス，ジアリホール，DMTPなどは近年検出されはじめた農薬である．

検出濃度は最も高い値を示したものにイソキサチオン，アセフェートがあり，それぞれ11と9 ppmであり，いずれもホウレンソウから検出された．又1 ppmを超えて検出したものには，EPN，プロチオホス，ジアリホール，ホサロンがあり，これらの中でもEPNは高い頻度で1ppmを超えるものがあった．高濃度の検出値を示した農作物は，ほとんど葉菜類のホウレンソウやコマツナである．

10ppm前後という残留量は，後藤の提案する方法[11]で算出すると，50%乳剤液を1000倍に希釈し散布した場合に相当する量である．すなわち，通常の最高量がそのまま残った状態に匹敵するもので，散布後まもなく出荷し

Table 5．検出頻度または濃度の高い有機リン系農薬

単位：ppm

農　薬	n	検　出　値	基準値
1．EPN	21	5.6, 4.8, 4.2, 3.9, 2.8, 2.3, 0.3, 0.18, 0.1(3)*, 0.09, 0.05(3), 0.04(2), 0.03(2), 0.01(2)	0.1
2．フェニトロチオン	21	0.57, 0.15, 0.11, 0.10(2), 0.07, 0.04(2), 0.03(4), 0.01(5), 0.005, Tr(3)	0.2
3．DDVP	10	0.9, 0.09, 0.04, 0.01(3), Tr(4)	0.1
4．ダイアジノン	6	0.13, 0.02(2), 0.01(3)	0.1
5．プロチオホス	6	1.0, 0.72, 0.52, 0.22, 0.06, 0.04	
6．ジアリホール	4	2.47, 1.40, 0.34, 0.08	0.04
7．DMTP	4	0.42, 0.11, 0.02(2)	0.2
8．ホサロン	2	1.17, 0.08	1.0
9．CYP	2	0.08, 0.07	0.05
10．イソキサチオン	1	11	0.1
11．アセフェート	1	9	

＊：（ ）内の数字は検出件数を示す．

Table 6. 有機リン系農薬の検出頻度の高い野菜

品目		n	検出率(%)	農薬 (検出数)
葉菜	ホウレンソウ	124	11	EPN 8, ジアリホール 2, フェニトロチオン 1, CYP 1
	コマツナ	60	13	EPN 2, ダイアジノン 2, カルバリル 2, フェニトロチオン 1
果菜	キュウリ	85	9	EPN 2, DDVP 2, フェニトロチオン 1, ダイアジノン 1
	トマト	34	18	フェニトロチオン 2, EPN 1, フェントエート 1, ホサロン 1, DMTP 1
果物	ナシ	20	40	フェニトロチオン 8, ダイアジノン 2, クロルピリホス 1

た疑いがある. このようなものは一年に一検体あるかないかであるが, 農薬使用者の不注意から生まれるものであり, 今後十分な指導をし改善を図らねばならない.

2－4. 農作物の検出状況

残留農薬の検出頻度の高い農作物及びその農薬の種類を Table 6. に示した. 検出頻度の高い野菜は葉菜のホウレンソウ, コマツナ, 果菜のキュウリ, トマト, 果物ではナシが挙げられる. 特にナシは40%の高検出率を示した. しかし, ナシに残留するフェニトロチオンは, 基準値0.2ppm を超えて検出するものが今までになく, 又果皮に付着し果肉中からは検出されていない. 一方, EPN は農薬取締法の安全使用基準では, ホウレンソウに使用できないことになっている. しかしこのように検出されることは, 使用者が基準を守らないことや無知のために起ってくることと考えられる.

2－5. 複合汚染

複合汚染は有機塩素系農薬との共存を除くと, 比較的その例は少ない傾向にある. 昭和58年, 59年度の例を挙げると, それぞれ130検体中 3 件, 175検体中 4 件であり, 検出率は共に2.3%である. その内容は 3 者同時検出もの：甘夏の果皮—フェントエート, ホサロン及び DMTP, 2 者同時検出したもの：ホウレンソウ—EPN と CYAP；大根の葉—CYP とプロチオホス；トマト—フェニトロチオンと TPN；ブドウ—TPN とフェニトロチオンである.

複合汚染は, 今日の農薬が万能型ではなく, より特性をもたせた型になってきていることから考えるならば, 今後進展する可能性もあり, 十分注目し監視を怠らないようにしなければならない.

ま と め

昭和52～59年度の 8 年間にわたる実態調査の結果を集約し, 流通過程にある農作物中の残留農薬の特徴や推移を明らかにした.

有機塩素系農薬の BHC や DDT のような過去のものも今だに検出されるが, 0.001 ppm 以下の検出値であり, 非常に遅いが土壌中等で分解が進んでいると解された. 但し, 乾燥状態が続く気候の折には, 農作物への移行も高まることから注意が必要である.

有機リン系農薬では登録農薬の90%について検査しているが, EPN, フェニトロチオン, DDVP などのように毎年検出されるものの外に, 59年度には新たな農薬としてプロチオホス, ジアリホール, DMTP などが検出されはじめた.

農作物別には残留農薬のないもとして米が挙げられる. 逆に比較的よく残留農薬を検出するものとしては, 野菜ではホウレンソウ, コマツナであり, 果物ではナシが挙げられる.

農薬の複合汚染は例が少なく58年, 59年度において, 検出率は2.3%であった.

農薬の使用量は病害虫の発生状態に関係するが, 59年度のように降雨量の少ない天候の時にもその使用量が増加し, 同時に残留性も高まり検出する種類も増大することを明らかにした. 又, TPN のように生産量が年々急増するものは, 残留実態調査とともに年次的推移も含めて調べる必要のあることを示した.

謝 辞 本調査の遂行にあたり, 検体の採取及びその他の労を取り計っていただいた東京都衛生局食品監視課並びに生活文化局価格流通部米穀課の職員に深謝いたします.

(本研究の概要は当研究所'84衛研セミナー 1984年10月 2 日で発表した.)

文 献

1) 西垣 進, 田村行弘, 鳥羽啓子ら：東京衛研年報, 23, 217, 1972
2) 小関正道, 嶋村保洋, 真木俊夫ら：*ibid*., 31—1, 170, 1980
3) 小関正道, 田村行弘, 真木俊夫ら：*ibid*., 32—1, 172, 1981
4) 永山敏廣, 田村行弘, 真木俊夫ら：*ibid*., 34, 165, 1983

5）永山敏廣，観　公子，田村行弘ら：*ibid*，**35**，210，1984
6）厚生省環境衛生局食品化学課編：残留農薬分析法，Draftその1，厚生省食品化学レポートシリーズNo23，1982
7）厚生省環境衛生局食品化学課編：残留農薬分析法，Draftその2，厚生省食品化学レポートシリーズNo34，1984
8）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
9）後藤真康：日本農薬学会誌，**3**，169，1978
10）後藤真康：*ibid*.，**3**，315，1978
11）後藤真康：*ibid*.，**4**，219，1979
12）加藤正男，岩永恵夫：*ibid*.，**5**，271，1980
13）阪本　剛，大井明夫：*ibid*.，**9**，159，1984
14）後藤真康：植物防疫，**32**，95，1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 206-214, 1985

臭化メチルくん蒸米中の残留臭素量とその存在形態

観　公子*, 田村行弘*, 真木俊夫*,
永山敏廣*, 二島太一郎*

Survery of Bromide Residues and The Bromine Form in Methyl Bromide Fumigated Rices

KIMIKO KAN*, YUKIHIRO TAMURA*, TOSHIO MAKI*,
TOSHIHIRO NAGAYAMA* and TAICHIRO NISHIMA

Keywords：臭化メチル methyl bromide, 臭素 bromine, 臭素形態 bromine form, 米 rice, 古米 long-stored rice, 滴定法 titration, 検知管法 reaction tube method, 比色法 colorimetry, イオンクロマトグラフィー ionchromatography, 鮮度試験 freshness test

緒　言

昭和59年3月，異常気候による米の不作で主食の米不足が懸念され，食糧庁は長い間貯蔵していた53年産米を主食用として放出した．ところが，害虫駆除のために使われたくん蒸剤の残留が問題となり，この米の食品としての安全性が提起された．

これを受けて著者らは都内搬入米についてくん蒸剤の調査を行ったところ53年産米から臭化メチル，リン化水素は検出されなかったものの，総臭素が最高68ppm検出された．

臭素は日常摂取する食品にも含まれており，渡辺ら[1]は通常1日あたり10～15mgの臭素を摂取していると報告している．しかし，臭素は大量に摂取すると悪心，嘔吐，腹痛，麻痺等を起こすとも言われている[2]．

すでに臭化メテル由来の総臭素量はFAO/WHOが穀物について50ppmという国際食品規格を定め，また我国においても同様，小麦では50ppmと定めている．又53年度産米放出の問題を契機として米については昭和59年5月29日厚生省より環食第29号をもって暫定基準値50ppmが定められた．

若者らは米中の総臭素の測定に際し，3種類の試験法すなわち検知管法[3]，比色法[4]，滴定法[5]，について比較検討を行い，同時に米中の総臭素実態調査を行った．また臭素残留米については炊飯による臭素の消長や残留臭素の存在形態を検討した．さらに古米の簡易判別法として米の鮮度試験[6,7]についても検討し若干の知見を得たので報告する．

実験方法

1．試料

都内搬入米で都内の倉庫より昭和59年3月から昭和60年3月の間に収去した玄米及び精米22検体，都内のスーパーから収去した精米3検体及び消費者から譲り受けた自主流通米1検体，合計26検体を試料とした．

試料の生産年度別はくん蒸を1～5回受けている53年産古米8検体，53産古米と58年産新米の20対80割合混合米2検体，58年産新米5検体及び59年産新米11検体である．表3に示した古米及び混合米の精米は各々の玄米を精白したもので，例えばNo.1とNo.2は同一種類である．

2．試薬

臭素イオン標準溶液：臭化カリウム（試薬特級，和光製）0.149gを精秤して，水に溶かし100m*l*とし，さらにその10m*l*をとり水で100m*l*とし標準溶液とした．本液1m*l*は臭素イオンとして0.1mgを含有する．

フルオレセイン・エタノール溶液：フルオレセイン（和光製）0.5gをエタノールに溶かして100m*l*としたものを原液とし，遮光して保存した．同時この原液をエタノールで20倍希釈して使用した．

フルオレセイン・アルカリ溶液：フルオレセイン0.165gを0.1N水酸化ナトリウム溶液に溶かして100m*l*としたものを原液とし，遮光して保存した．同時この原液を

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Rublic Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

水で50倍に希釈して使用した.

モノエタノールアミン・アルカリ溶液：モノエタノールアミン（和光製）15m*l* 及び水酸化ナトリウム3 gをエタノール380m*l* に溶解した.

酢酸緩衝液：1 M酢酸ナトリウム溶液に1M酢酸を加え，pH5.6に調整した.

滴定法用メチルレッド指示薬：メチルレッド0.1gを0.1N 水酸化ナトリウム溶液4 m*l* で溶かし，水で100m*l* に希釈した.

混合指示薬原液：メチルレッド0.1gとブロムチモールブルー0.3g をエタノール200m*l* に溶かし調製した.

混合指示薬I：用時，混合指示薬原液と水を1対50の割合に混合し調製した.

混合指示薬II：用時，混合指示薬原液と水を1対4の割合に混合し，0.1N 水酸化ナトリウム溶液を用い液の色が黄色となるまで中和し調製した.

その他の試薬はすべて市販特級品を使用した.

3．器具及び装置

イオンクロマトアナライザー：横河北辰電機㈱製，YEW Model IC-500

分光光度計：日立製作所㈱製，　HITACHI 220A 型

ポンプ：日本治生産業㈱製，　Airpump NS-SI 型

臭素発生装置：図1に示した.

透析膜：Spccrum Medical Industries Inc. 製，Spectrapor membrane tubing spectra/por 6 wet tubing MWCO 1000 Diameter 11.5

4．試験溶液の調製

1)　総臭素試験用試験溶液の調製

(1)玄米及び精米：試料をよく粉砕し，必要量を秤取してモノエタノールアミン・アルカリ溶液25m*l* を加え一昼夜放置する．水浴上でエタノールを蒸発乾固し，赤外ランプで炭化後550°の電気炉で灰化する．灰分に0.1N 水酸化ナトリウム溶液を25m*l* 加えてよく溶解後，濾紙でろ過し，濾液を試験溶液とする.

(2)炊飯米：総臭素の検出された精米について1合（180 m*l*）を量り重量を測定後，通常の炊飯法に従い電気釜で炊き，冷後全量を秤量しその20gを秤取して上記(1)に従い試験溶液を調製する.

2)　イオンクロマトグラフィー用試験溶液の調製

(1)透析法：粉砕した玄米及び精米5 gを透析膜に入れ内外共に水で満し，全量を50m*l* として時々振り動かしながら一昼夜透析し，その外液をイオンクロマトグラフィーの試験溶液とする.

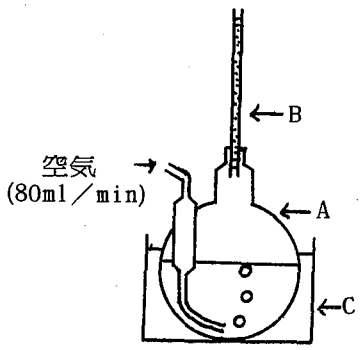
また，透析内残渣は3日間流水で充分透析後，1)—(1)に従い試験溶液を調製し，検知管法により総臭素を定量する.

(2)浸出法：粉砕した玄米及び精米5 gを50m*l* の水で撹拌後一昼夜浸漬し，遠沈後，上澄液をミリポア（0.4 mμ）を用いろ過し，この濾液をイオンクロマトグラフィーの試験溶液とする.

5．定性及び定量

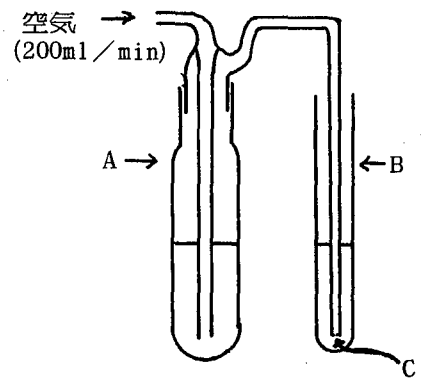
1)　総臭素の定性及び定量

検知管理法については上村や[3]の方法，比色法については百川ら[4]の方法，滴定法については食品添加物分析



検知管法

A：二径フラスコ
B：検知管　。
C：水浴（50 ）



比色法

A：反応管（2. 5cmφ×11cm）
B：吸収管（1. 5cmφ×15cm）
C：ガラスフィルター

図1.　臭素発生装置

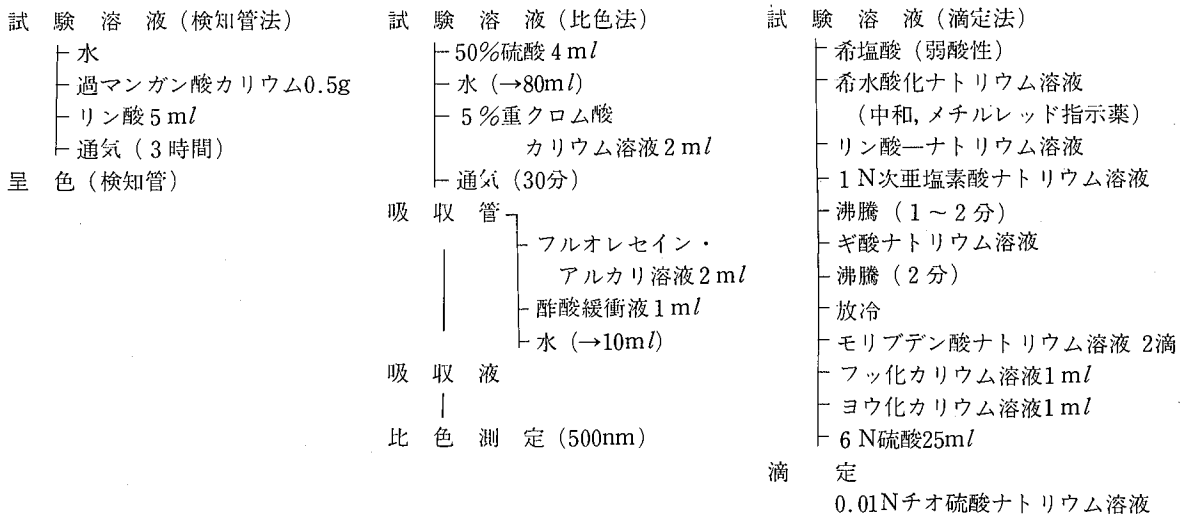


チャート1．総臭素試験法

法[5]の方法を準用し，それぞれのフローシートをチャート1に示した．

2） 臭素イオンの定量

透析及び浸漬により得られた試験溶液をそのままイオンアナライザーに注入して臭素イオンの定量を行った．イオンクロマイトの条件を表1に示した．

3） 米の鮮度試験（古米，新米の判定法）

(1)溶液法：試料5gに混合指示薬Iを10ml加え振り混ぜ1分後に溶液の呈色の色調で判定する．

(2)米粒染色法：試料20～100粒に混合指示薬IIを10ml加え，3～5分放置する．上清液を除去し，試料を水で2～3回洗浄後，ろ紙上で水分を除き，米に着色した色調で判定する．

結果と考察

1．総臭素の試験法の比較

新米及び古米(くん蒸米)を用いて検知管法[4]，比色法[5]及び滴定法[6]による総臭素の定量を行った結果を表2に示した．

臭素濃度の高いくん蒸米では各試験法間に大きな相違はみられなかった．しかし，臭素くん蒸されてない新米では試験法による差がみられた．特に滴定法はチオ硫酸ナトリウム滴定液1 mlが13ppmに相当するために熟練者でも終点誤差が生じやすいと考えられた．この誤差を少なくするためには，10ppm前後の試料では本法のサンプル量を3～5倍量とる必要がある．一方，比色法は硫酸濃度に影響されやすく，また導入管の先の径により誤差が生じるために厳密な操作が要求された．検知管法

表1．イオンクロマトグラフの測定条件

機種	YEW Model IC—500
プレカラム	陰イオン交換樹脂 PAX1—035
分離カラム	陰イオン交換樹脂 SAX1—205
溶離液	4mM 炭酸ナトリウム／4mM 炭酸水素ナトリウム
流量	2ml／min.
注入量	100μl
温度	40℃

表2．総臭素試験法の比較

検出方法	総臭素量（ppm）		
	玄米(新米)	玄米(古米)	検出限界
検知管法	1.5	81	1
比色法	<5	84	5
滴定法	<10	82	10

においては毎回検知管を作成するわずらわしさがあったが，誤差は少なく正確な値を出せることが明らかとなった．また検出限界は検知管法が1ppmと一番低い値であった．そこで以後の総臭素量の測定には検知管法を用いることとした．

2．玄米及び精米中の総臭素量

新米と古米の玄米及び精米中総臭素量は表3に示した通りであった．新米である58年産精米及び59年産玄米のいずれからも臭素は検出されなかった．しかし，くん蒸を受けた53年産米からは19～68ppmの臭素を検出した．くん蒸回数と総臭素量の関係については1回処理のものは19～23ppmであり，5回処理のものは59～68ppmで

表3．玄米及び精米中の総臭素量

検体番号	種類	生産年度	総臭素量 (ppm)	臭化メチル	くん蒸回数
1	玄米	53	19	ND**	1
2	精米	53	23	ND	1
3	玄米	53	67	ND	5
4	精米	53	64	ND	5
5	玄米	53	44	ND	3
6	精米	53	33	ND	3
7	玄米	53	68	ND	5
8	精米	53	59	ND	5
9	玄米	53／58 (2：8)	11	ND	
10	精米	53／58 (2：8)	8	ND	
11	精米	58	ND*	ND	0
12—15 (4検体)	精米	58	ND		0
16—26 (11検体)	玄米	59	ND		0

＊：1ppm以下，　＊＊：0.05ppm以下

表4．精米炊飯時の総臭素の消長

検体番号	重量（g）		増加比	総臭素量（ppm）			回収率 (%)
	炊飯前	炊飯後		炊飯前	炊飯後	精米換算	
2	145	366	2.5	23	6.8	17	74
4	145	408	2.8	64	21	59	92
6	144	395	2.7	33	11	30	91
8	142	393	2.8	59	23	65	110
10	144	380	2.6	8	2.2	5.8	73

備考：炊飯前の精米の重量は1合カップで秤取した値である．

あった．この結果はくん蒸回数が多いもの程臭素量が高く，従ってこれら米中の臭素は臭化メチルくん蒸に由来した残留であると考えられた．混合米については，その残留値から3回以上くん蒸したものが混ぜられていたと推察された．新米については全て臭素含量が1 ppm以下であることから，これらの値をバックグラウンド値と考えるならば，これ以上の総臭素が検出された場合にはくん蒸処理したものか，あるいはくん蒸米が混合されたものと推定される．

3．炊飯時の臭素の消長

米は通常炊飯し，米飯として食する事が多い．そこで精米を水洗後炊飯した時の臭素の残存量については調査を行った．

結果は表4に示した通りである．米飯中の総臭素量を炊飯前の値に換算し，もとの米中の臭素量と比較すると残存率は73～110%であった．この値から米中の残存臭素は通常の炊飯では，水洗による溶出あるいは熱による分解または揮散は認められず，ほとんど減少することがなかった．

また，実際に食する時の米飯中臭素濃度は最高23ppmであり，水分は60～64%含まれる．この米飯を1日600g摂取したとして臭素摂取量を試算すると約14mgとなり，日常食から摂取される臭素量は10～15mgを加算すると，合計24～30mg摂取される．この摂取量は臭素のADIが1mg/kg（体重）であるからADI 50mg/50kg（体重）を下回っており，人の健康に影響を及ぼす量ではないと思われる．

4．米中臭素の形態

くん蒸後の残留臭素は穀物ではイオン形または水溶性化合物の形で存在しているという報告[8,9]がある．しか

表5．浸漬液中の臭素イオン量

検体名	総臭素量 (ppm)	浸漬液中臭素イオン量(ppm)	米中臭素量換算値(ppm)	回収率 (%)
精　米	64	7.2	72	113
精　米	59	6.0	60	102
玄　米	67	6.5	65	97
玄　米	81	7.8	78	96
玄　米	ND	ND	—	—
玄　米＊	100	10.6	106	106

＊：臭素イオン量が100ppmになるように添加したもの．
ND：1 ppm以下

表6．透析時の臭素イオン量

検体名	総臭素量（ppm）		臭素イオン量（ppm）		回収率
	透析前	透析後残査	透析外液(50ml)	米中濃度換算	(%)
玄米	67	ND	5.9	59	88
玄米	81	ND	7.9	79	97
精米	64	ND	5.5	55	85
	64	ND	6.8	68	106
玄米	84	ND	8.3	83	99
	84	ND	8.4	84	100
精米	59	ND	6.1	61	103
	59	ND	5.8	58	98
玄米	ND	ND	ND	—	—
	ND	ND	ND	—	—
玄米(20)＊	20	ND	2.1	21	105
玄米(100)＊＊	100	ND	8.4	84	84

ND：1 ppm以下，　＊：臭素量20ppmになるように添加したもの．
＊＊：臭素量100ppmになるように添加したもの．

し，米についてはその存在形態を明らかにする報文は見当らない．そこで粉砕した米を水に浸漬し，その浸漬液について，また粉砕した米を水で透析したものについてはその透析外液をイオンクロマトグラフィーに付し，存在形態を検討した．浸漬液中の臭素イオン量の結果を表5に示し，透析外液の臭素イオン量及び流水透析後の残渣米中の残留臭素の結果を表6に示した．またイオンクロマトグラムを図2に示した．

透析膜にスペクトラポア分子量1000を用いて透析を行った時の透析外液中の臭素イオン量は回収率85～106%であり，浸漬液中の臭素イオン量は回収率97～113%であった．また，透析残渣米からは臭素が検出されなかった．

この結果から米中の残留臭素は9割以上が分子量1000以下のイオン結合形で存在しており，水溶液中では臭素イオンとして存在しているものと推察された．

5．鮮度試験

新米か古米かを測定するための簡易な鮮度試験法を検討した．米は貯蔵中に酵素作用，酸化，呼吸などが関与して米の成分である澱粉，蛋白質，脂肪などが化学的変化を受ける[7]．その中でもリパーゼによる脂肪の分解が速やかで最も起こりやすく，分解してグリセリンと脂肪酸になる．この遊離脂肪酸は米の水分及び温度が高いと増加するので常温倉庫に貯蔵した古米はこの遊離脂肪酸により酸度の増加がみられる．そのためpHを測定することにより古米と新米の判別を行うことが出来る[6,7]．そこで溶液法と米粒染色法の2方法を検討した．

結果は写真I及びIIに示した通りである．53年産古米は溶液及び米粒共に橙赤色を呈し，58年度産新米は緑色を呈し明らかに区別することが出来た．すなわち溶液法では新鮮な米ほど溶液の色調は緑色，古くなるに従い黄色を経て橙赤色を呈する．米粒染色法では新鮮な米は緑

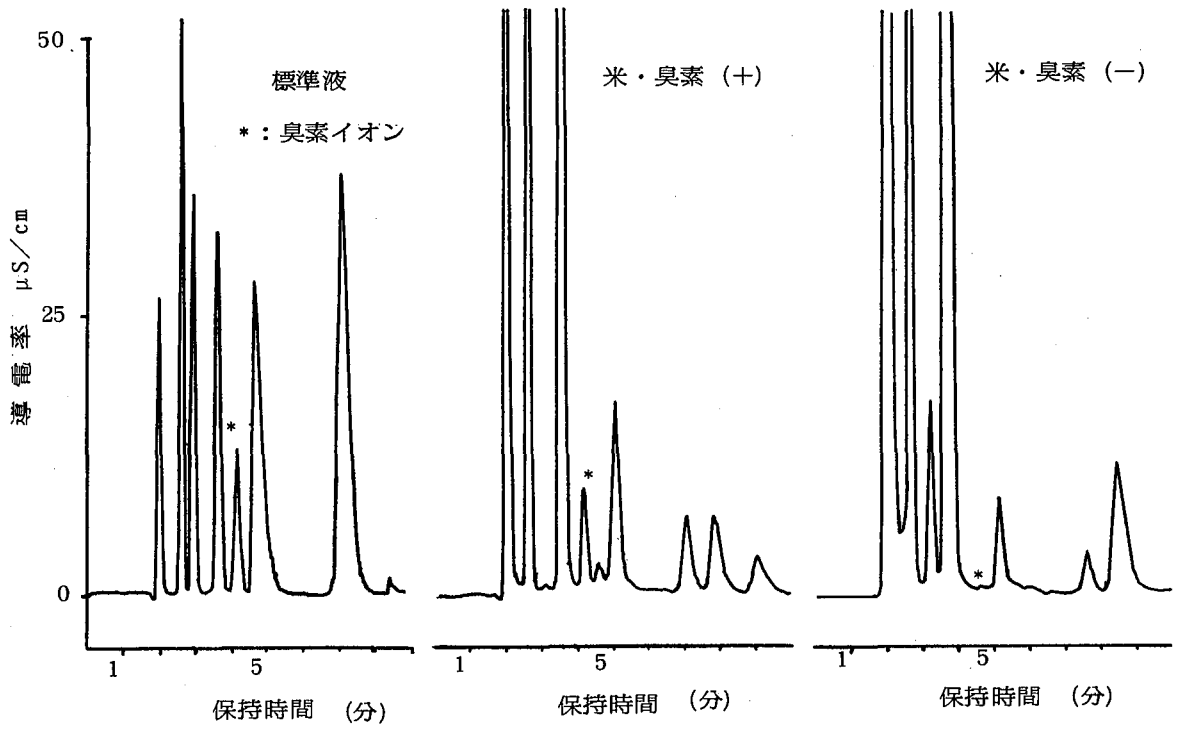


図2. イオンクロマトグラム

色，古くなると橙赤色を米粒自体が呈色する．新米，古米の混合されている場合にはそれぞれ該当する米粒が呈色され，米粒を緑色及び橙赤色に分別することが出来る．

また混合米の場合には米粒そのものに呈色させる方法がよく，緑色と橙赤色の米粒が混合している状態が明瞭に見分けられた．これらの米粒をそれぞれ選別すると新米と古米の割合もとらえることが出来る．米粒法は特に混合米には有効利用出来ると考えられた．

結　論

古米及び新米を用いて3種の総臭素試験法を検討したところ検知管法が感度及び精度の点で最も優れていた．この検知管法で古米及び新米の総臭素量を測定したところ，古米で19～69ppmを検出し，新米では全て1 ppm以下であった．古米中臭素の検出量は，くん蒸回数に比例していたことから臭化メチルに起因するものと考えられた．

臭素残留米について炊飯したところ総臭素量の減少はみられなかった．

米中の残留臭素の化学形態は水浸出液並に透析液についてイオンクロマトグラフィーにより検討したところ臭素の9割以上がイオン結合形態として存在している事が判明した．

新米及び古米についてpH指示薬による鮮度試験法を検討したところ新米は緑色，古米は赤褐色を明らかに呈し，新米と古米の区別の指標とする事ができた．

謝辞　本調査の遂行にあたり，検体の採取及びその他の労を取っていただいた東京都衛生局食品監視課並びに東京都生活文化局価格流通部米穀課の職員各位に深謝致します．

文　献

1）渡辺　功，樫本　隆：大阪府立公衆衛生研究所年報，11，93，1981
2）産業中毒便覧，第2版，後藤　稠，池田正之，原　一郎編，17，1982，医歯薬出版株式会社
3）上村　尚，西島基弘，永山敏廣：食衛誌，21，214，1980
4）百川　滉，山田わか，佐藤文子：食衛誌，22，531，1981
5）厚生省環境衛生局食品化学課：食品添加物分析法，4，14，1984
6）農林省食品総合研究所：食糧―その科学と技術，16，14，1973

7）食糧研：食糧技術普及シリーズ，7，41，1969
8）Evaluation of Some Pesticides Residues in Food, WHO Pesticide Residues Series, **No**.1, 1971
9）Houser S. G. and Scudamore K. A. : *Pestic. Sci.* 1，244，1970

写真の説明

写真Ⅰ：溶液法
1．古米，2．混合米，3．新米
写真Ⅱ：米粒染色法
1．古米，2．混合米，3．新米

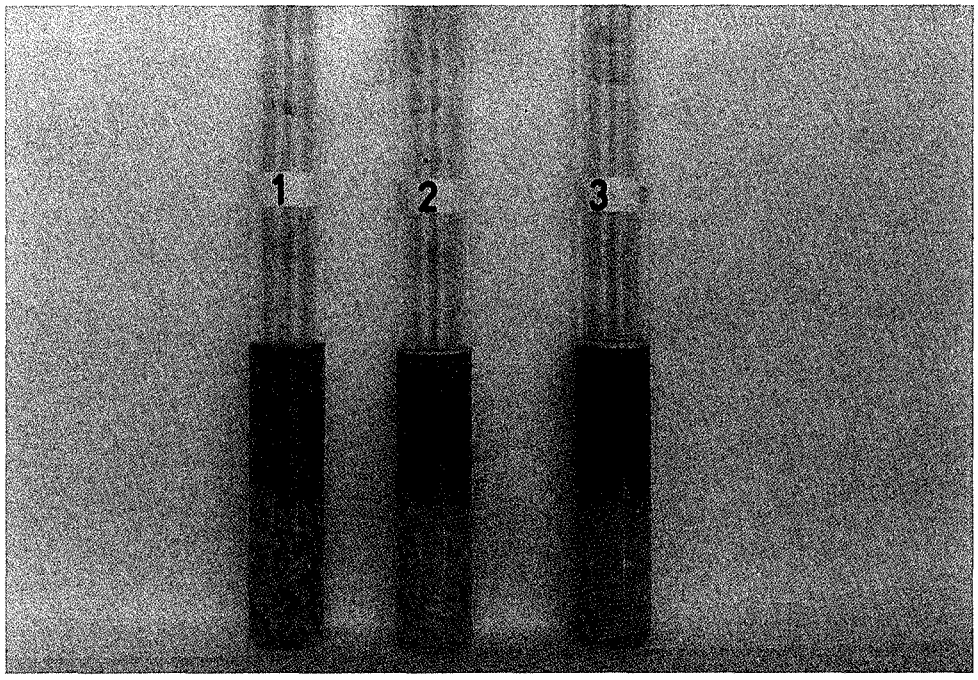


写真　I.

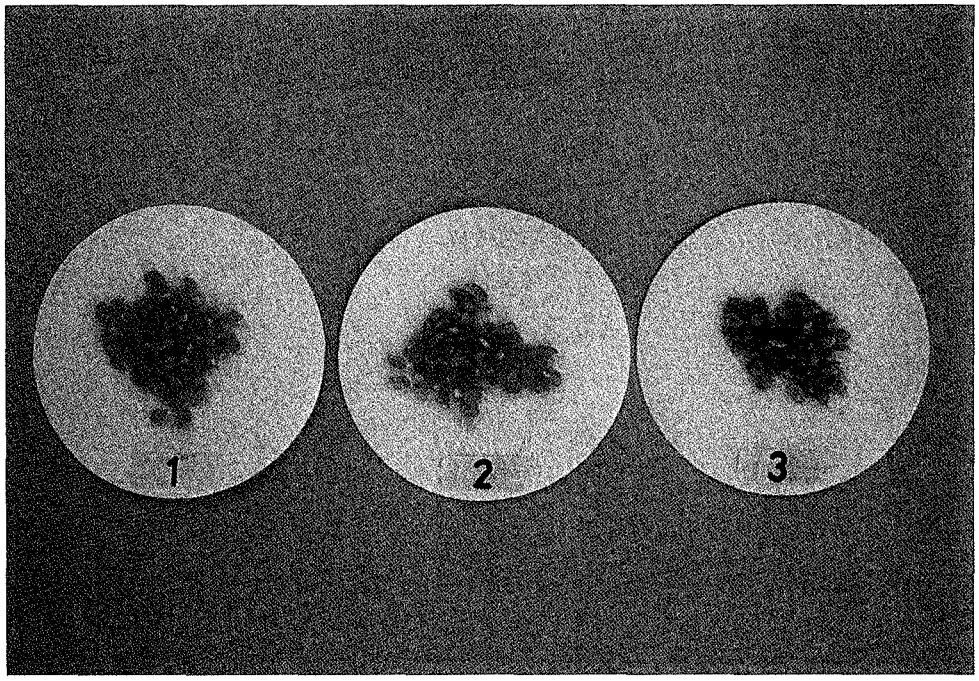


写真　II.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 215-218, 1985

高速液体クロマトログラフィーによる天然糊料の分析

中島和雄*, 広門雅子*, 高橋巌*, 植松洋子*,
遠藤英美**, 風間成孔*

High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Natural Stabilizing and Thickening Agents

KAZUO NAKAJIMA*, MASAKO HIROKADO*, IWAO TAKAHASHI*, YOKO UEMATSU*,
FUSAYOSHI ENDO**and MASAYOSHI KAZAMA*

Nine component monosaccharides of natural thickening and stabilizing agents were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). These separations were achieved with both the column with cation exchange resin in the lead form and the column with cation exchange resin in the H^+ form. The optimum column temperatures were 80°C and 40°C, respectively.

Twentyfour commercial products were analyzed by the method described above. Five main products were carrageenan·locust bean gum·saccharide, carrageenan·saccharide, guar gum·xanthan gum, tamarind seed gum·saccharide and tamarind seed gum·gur gum·saccharide.

Keywards: thickening and stabilizing agents, high performance liguid chromatography, carrageenan, locust bean gum, guar gum, xanthan gum, tamarind seed gum

緒　言

天然食品添加物の使用実態調査の一環として，昭和55年以降，天然糊料の調査および分析法の検討を行ってきた．天然糊料は食品添加物として使用量が多いので，その使用実態を調査し，迅速な分析法を検討することは重要である．前報[1]において，呈色反応，薄層クロマトグラフ法およびガスクロマトグラフ法（GC法）の併用による系統的分析法を報告した．

天然糊料に関する最近の分析法としては，GC法[2,3]，キャピラリーGC法[4,5]，熱分解法[6]，電気泳動法[7,8]と多様であるが，GC法以外は実用性に乏しい．一方，液体クロマトグフ法（HPLC法）による分析は，単糖類[9-11]の報告があるのみで，いまだ天然糊料の構成糖の分析には応用されていない．そこで今回，Wentyら[12]およびPettersenら[13]がパルプ加水分解物中のガラクトースとマンノースを含む5種の単糖の分析をHPLC法で行った方法に着目して，天然糊料の分析法を検討した．その結果，GC法のように単糖を誘導体化することなく，迅速で簡便な天然糊料の実用分析法を確立したので報告する．

実験の部

標準品　アラビアガム，カラギーナン，グァーガム，ローカストビーンガム，キサンタンガム，カラヤガム，トラガントガム，寒天，およびペクチンはシグマ社製を，タマリンド種子多糖類は大日本製薬㈱製を用いた．

試料　都食品監視課より昭和55年4月～60年3月にかけて当所に送付された天然糊料46検体を用いた．

試薬　すべて試薬特級品を用いた．

装置　高速液体クロマトグラフ：日本分光工業製TRIROTAR-VI，検出器：日本分光工業製紫外可視分光光度計検出器　UVIDEC100VI，昭和電工製示差屈析計（RI）SE-51，データ処理装置：島津製作所製クロマトパックC-R3A，オートサンプラー：日本分光工業製AS-L350

構成糖によるHPLCの最適条件の検討　構成単糖の

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 帝京短期大学

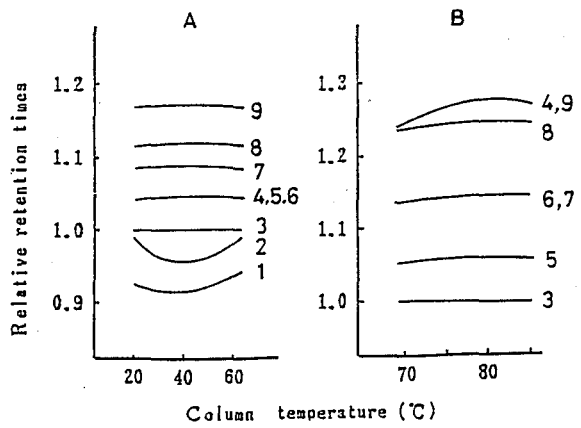


Fig. 1. Effect of temperature on relative retention times of various monsaccharides
All retention times are relative to that of D-glucose A=Shodex Ionpak C811, B=Shodex Sugar SP1010
1=D-Glucuronic acid; 2=D-Galacturonic acid; 3=D-Glucose; 4=D-Mannose; 5=D-Xylose; 6=D-Galactose; 7=L-Rhamnose; 8=L-Arabinose; 9=L-Fucose

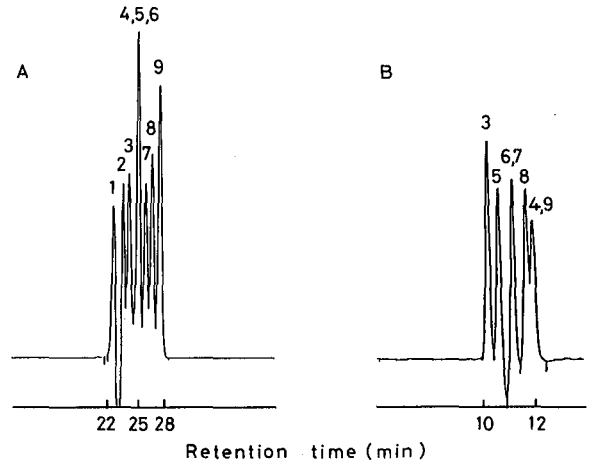


Fig. 2. HPLC Chromatograms of Monosaccharides.
HPLC conditions: A: Column=Shodex Ionpak C 811 8mmφ×500mm; Flow rate=0.5 ml/min; Column Temperature=40°C; Detector=RI; Mobile phase=0.1%Phosphoric acid. B: Column=Shodex Sugar SP1010 8mmφ×300mm; Flow rate=1.0ml/min; Column Temperature=80°C; Detector=RI; Mobile phase=Water.
Peaks: 1=D-Glucronic acid: 2=D-Galacturonic acid: 3=D-Gucose; 4=D-Mannose; 5=D-Xylose; 6=D-Galactose; 7=L-Rhamnose; 8=L-Arabinose; 9=L-Fucose.

標準溶液として9種，すなわちガラクツロン酸，グルクロン酸，グルコース，マンノース，キシロース，ガラクトース，ラムノース，アラビノースおよびフコース，各々50mgをとり混合し，水で全量50m*l*とした．この液をミリポアフィルター(0.22mμ)でろ過し，ろ液10μlについてHPLCを行った．

天然糊料の標準品の分析　試験管中に標準品をそれぞれ100mgと1N硫酸4 m*l*を加え，窒素で置換した後，封管し，加水分解炉中で100℃15時間加熱した．その加水分解液に炭酸カルシウムを加えて中和し，沈でんをろ過した後，ろ液を水で全量25m*l*とした．この液をミリポアフィルター(0.22mμ)でろ過して標準溶液としHPLCにより，その構成糖を分析した．

硫酸根の定量　前報[1]に従い定量した．

市販品天然糊料の分析　標準品と同様に調製しHPLCにより，その構成糖の分析を行い，構成糖から天然糊料の分析を行った．

結果と考察

HPLCの最適条件の検討　天然糊料の構成糖である．9種の糖を含んだ標準溶液によりHPLCの分離条件の検討を行った．酸性糖の検出にはUV210nmとRIを，中性糖はRIを用い分析した．Shodex Ionpak C811カラムでは，溶解液のリン酸濃度を0～0.1%で検討したが，分離および保持時間に変化がなかった．しかし0%に近づくにしたがいベースラインが下がってきたので，リン酸濃度は0.1%とした．次にカラム温度を20℃～60℃で測定したところ，図1に示すようにガラクツロン酸とグルコースの分離が，40℃で最適であった．Shodex Sugar SP1010カラムでは，カラム温度を70℃～85℃で測定したところ，アラビノースとマンノースの分離が80℃で最適であった．C811とSP1010カラムを用い，最適条件で測定したクロマトグラムを図2に示した．

標準天然糊料の分析　加水分解液の検討をおこなったところ，前報[1]で報告した2Mトリフルオル酢酸溶液では，酸性糖のところにマイナスピークが現われ確認が困難であったので，今回は1N硫酸で加水分解を行った．図2に示されているように，カラムC811では6種の糖の

Table 1. Component Monosaccharides of Natural Thickening and Stabilizing Agents

Thickening and Stabilizing Agents	D— Gal	D— Man	D— Glc	D— Xyl	L— Ara	L— Rha	L— Fuc	D— GlcUA	D— GalUA
Guar gum	+	+							
Locust bean gum	+	+							
Carrageenan	+								
Agar agar	+								
Tamarind seed gum	+		+	+	+				
Xanthan gum		+	+					+	
Gum tragacanth	+		+	+	+		+		+
Gum arabic	+				+	+		+	
Karaya gum	+					+		+	+
Pectin	+			±	±	±			+

Gal : Galactose Man : Mannose Glc : Glucose Xyl : Xylose Ara : Arabinose Rha : Rhamnose Fuc : Fucose
GlcUA : Glucuronic acid GalUA : Galacturonic acid

Table 2. Analytical Results of Commercial Natural Thickening and Stabilizing Agents

Product	N	D— Gal	D— Man	D— Glc	D— Xyl	L— Ara	D— GlcUA	Sul- fate
Carrageenan・Locust bean gum・Saccharide	7	+	+	+				+
Carrageenan・Saccharide	4	+		+				+
Guar gum・Xanthan gum	3	+	+	+			+	
Tamarind seed gum・Guar gum・Saccharide	2	+	+	+	+	+		
Tamarind seed gum・Saccharide	2	+		+	+	+		
Others	8							

N : Number of Samples
These abbreviations are shown in Table 1.

分析ができるが，3種の糖，すなわちガラクトース，マンノースおよびキシロースの分離ができない．カラムSP1010では，酸性糖2種のピークは検出できない．また中性糖7種の中では，ガラクトースとラムノース，マンノースとフコースの分離が不十分である．カラムC811とSP1010の分析パターンより，前者で分離しない3種の糖が，後者ではよく分離しているので，両者のカラムを併用することにより，すべての糖の分析が可能となった．以上の検討結果から，構成糖の差による天然糊料の分析を行った．なお構成糖の同じグァーガムとローカストビーンガムは，構成糖の構成比から分析した．すなわちグァーガムは，ガラクトースとマンノースの構成比1：2から，ローカストビーンガムは，構成比1：4から分析した．カラギーナンと寒天は，硫酸根の定量値から分析した．すなわちカラギーナンは18%以上，寒天は3%以下から分析した．この方法により天然糊料10種の分析をおこなった結果を表1に示す．

市販天然糊料への応用 HPLCの分析による構成糖と硫酸根値より，市販天然糊料46検体の分析を行った．その結果は単品20検体，製剤24検体であった．製剤の分析結果を表2に示した．主な製剤は5種であった．その構成糖は，表2に示した様に特徴的であるので容易に分析できた．またその他の製剤8検体は，2種の糊料よりなる製剤で，同様の方式により分析できた．残りの4検体は複雑な製剤であり，主成分は容易に分析できるが，含有量の少ない他成分については，前報りに報告した方法により分析する必要があった．このようにHPLCと硫酸根値より製剤の83%が迅速に分析できた．

ま と め

天然糊料の構成糖9種，グルクロン酸，ガラクツロン酸，グルコース，ガラクトース，マンノース，キシロース，ラムノース，アラビノースおよびフコースのHPLCによる分離条件の検討をおこなった．Shodex Ionpak C811とShodex Sugar SP1010の併用により分離分析が

できた．カラム温度の最適条件は，前者が40℃で後者が80℃であった．

HPLCと硫酸根値より天然糊料10種，グァーガム，ローカストビーンガム，カラギーナン，寒天，タマリンド種子多糖類，キサンタンガム，トラガントガム，アラビアガム，カラヤガム，ペクチンの分析をおこなった．

標準天然糊料の分析結果をもとに，市販品46検体の分析をおこなった．製剤は24検体であった．主な製剤は，カラギーナン・ローカストビーンガン・糖，カラギーナン・グァーガム・キサンタンガム，タマリンド種子多糖類・糖，タマリンド種子多糖類・糖，およびタマリンド種子多糖類・グァーガム・糖の5種であった．

文　献

1）中島和雄，広門雅子，中嶋　巌，溝入　茂，遠藤英美：東京衛研年報，32—1，177，1981

2）Glück, U. and Thier, H.：*Z. Lebensm. Unters Forsch.*, 170, 272, 1980

3）Scherz, H. and Mergenthaler, E.：*ibid.*, 170, 280, 1980

4）Preuβ, A. and Thier, H.：*ibid.*, 175, 93, 1982

5）Preuβ, A. and Thier, H.：*ibid.*, 176, 5, 1983

6）Sjöberg, A. and Pyysalo, H.：*J. Chromatogr.*, 319, 90, 1985

7）Schäfer, H. and Scherz, H.：*Z. Lebensm. Unters-Forsch.*, 177, 193, 1983

8）Plchanek, U. and Blaicher, G.：*J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM.*, 65, 745, 1982

9）Shaw, P. and Wilson, C.：*J. Chromatographic Science.*, 20, 209, 1982

10）Oshima, P. Kurosu, Y. and kumanotani, J.：*J. Chromatogr.*, 179, 376, 1979

11）Hicks, K. Lim, P. and Haas, J.：*ibid.*, 319, 159, 1985

12）Wentz, F. March, A. and Gray, M.：*J. Chromatographic Science.*, 20, 349, 1982

13）Pettersen, R. Schwandt, V. and Effland, M.：*ibid.*, 22, 478, 1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 219-223, 1985

テーブルオリーブ中のグルコン酸鉄の定量法

広門雅子*, 中島和雄*, 高橋　巖*, 植松洋子
遠藤英美**, 風間成孔*

Method for Quantitative determination of Ferrous Gluconate in Table Olive

MASAKO HIROKADO*, KAZUO NAKAJIMA*, IWAO TAKAHASHI*, YOKO UEMATSU*,
FUSAYOSHI ENDO**and MASAYOSHI KAZAMA*

As ferrous gluconate consists of gluconic acid and iron, the quantity of this additive in table olive can be estimated from the content of gluconic acid or iron in the sample.

The enzymatic analysis with 6-phosphogluconate dehydrogenase and glucokinase was applied for gluconic acid and iron was determined by atomic absorption spectrometry.

The laboratorial experiment showed that the recoveries of ferrous gluconate estimated from the contents of gluconic acid and iron in olive were shown to be 96.4±1.0% and 100.1±2.6% respectively.

More than 5 ppm of ferrous gluconate was detectable when the enzymatic analysis for gluconic acid was applied and the analysis of iron by atomic absorption spectrometry allowed to detect 1 ppm of this additive.

A sample of commercial table olive showed to contain 10 ppm of gluconic acid and 543 ppm of iron which corresponded to 12 ppm and 4688 ppm of ferrous gluconate respectively.

This discrepancy between ferrous gluconate concentrations in the sample estimated from gluconic acid and iron content, together with the fact that the maximum level of iron derived from ferrous gluconate in the sample is settled at 150 ppm, lead us to conclude that no iron content is applicable to estimate ferrous gluconate added in commercial table olive.

Keywords: ferrous gluconate, table olive, gluconic acid, iron, enzymatic method, atomic absorption spectrometry

緒　言

グルコン酸鉄は昭和58年8月に食品添加物として指定され，母乳代替品の栄養強化に，またテーブルオリーブの黒色安定剤として150mg/kg（鉄として）の使用が許可された．昭和59年10月に厚生省食品化学課からの依頼を受け，テーブルオリーブ中のグルコン酸鉄の分析法を検討した．

グリコン酸はその構成成分である鉄の一部がテーブルオリーブ中の色素と結合し遊離するため，グルコン酸鉄の定量値は真の添加量を示すものとはならない．そこでまず鉄を定量し，これよりグルコン酸鉄量に換算することを考えた．しかし我国では栄養強化剤として既に硫酸第一鉄が使用制限無しで許可され，実際にテーブルオリーブに使用されている事実があるため，鉄の定量値からだけではグルコン酸鉄の値と断定できない．従ってグルコン酸と鉄の値を測定して総合的に判断する方法を検討した．

食品中のグルコン酸の定量法は既に「食品中の添加物分析法[1]」に記載されている．しかし，種々の問題点があるのでこれを基に改良を試み，回収率の良い方法を作成

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 帝京短期大学

した．一方鉄の定量は「食品中の添加物分析法[2]」に記載された方法を用いたところ，操作が簡便で精度の良い方法であった．そこでこれ等の方法を用いて，小豆島より入手したテーブルオリーブ中のグルコン酸および鉄の定量を行ったので報告する．

実験の部

I．試料 1．テーブルオリーブ：香川県小豆郡池田町の東洋オリーブ㈱より購入した．なお本品は桜赤色に熟したオリーブを塩水中で発酵したのち苛性ソーダ液で渋抜きしながら空気にさらし黒色にし，ついで水洗したのち塩漬したライプオリーブのことである．

II．試薬・試液 1．ATPおよびNADPの混液，グルコン酸キナーゼ懸濁液，6—ホスホグルコン酸脱水素酵素：ベーリンガー・マンハイム山之内製の食品分析酵素試薬F—キット D—グルコン酸／D—グルコノデルタラクトンの試薬溶液 I，II，IIIをそれぞれ用いた．2．オキシン・クロロホルム溶液：オキシン（和光純薬・特級品）5 gにクロロホルム500m*l*を加えて溶かした後，密閉し褐色ビンに入れて保存．3．グルコン酸標準液：グルコン酸（和光純薬の50%溶液）約5 gを正確にとり，水70m*l*と混和した後さらに水を加えて正確に250m*l*としグルコン酸原液とした．この原液50m*l*を正確にはかり酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液10m*l*を加え，さらに水を加え正確に250m*l*とし標準液とした．この液1 m*l*はグルコン酸F mgを含む．別にグルコン酸原液15m*l*をとり，食品中の添加物分析法[1]に従って標準液の力価（F）を求めた． 4．酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）：氷酢酸 30gをはかり水を加えて 500m*l*としA液とする．酢酸ナトリウム（3水塩）68gをはかり水を加えて500m*l*としB液とする．A液300m*l*にB液300m*l*を加えた後，さらにA液を加えてpH4.5に調整．5．グルコン酸鉄：藤沢薬品製の食品添加物規格適合品を105°，4時間乾燥して用いた．6．鉄標準液：和光純薬の原子吸光分析用鉄標準液（Fe 1000ppm）を用いた．7．その他の試薬：JIS特級品を用いた．

III．装置 1．分光光度計：島津UV—240 2．原子吸光光度計：日本ジャーレル・アッシュ製AA—1 MARK II

IV．操作法

1．試料の調製 テーブルオリーブ60～90個を蒸留水でよく洗浄し水切りした後，果皮および果肉部を細切しその約100gをブレンダーで粥状とし，グルコン酸分析用試料Aとした．残りの約100gを磁製の乳鉢でよくすりつぶして鉄分析用試料Bとした．

2．試料液の調製および測定

1） グルコン酸測定用試料液の調製 試料A約10gを正確にはかり200m*l*のコニカルビーカーに採取した．これに10%トリクル酢酸溶液10m*l*を加え，水80～90m*l*を加えて約30分間かきまぜた後ろ過した．容器および残渣は温湯70～80m*l*を用いて数回洗い，洗液をろ液に合わせた．冷後酢酸ナトリウム（1 M）を加えてpH4.5に調整した後，300m*l*の分液ロートに移す．酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液5 m*l*および少量の水を用いて容器を洗い洗液を分液ロートに移し，オキシン・クロロホルム溶液30 m*l*を加えて約2分間振り混ぜ，約30分間静置した後下層を除いた．水層にオキシン・クロロホルム溶液30m*l*を加え同様に操作し，水層をさらにクロロホルム50m*l*で洗った．ついで水層に水を加えて全量200m*l*としこれを試料液とした．また試料を用いず同様に操作して空試料液を調製した．

2） 酵素法によるグルコン酸の測定 光路長1 cmのキュベット2本を用意し，A，Bとし，それぞれにNADPおよびATP混液 1 m*l*を加えた．Aには試料液を0.5～2.0m*l*の範囲で正確に加え，2.0m*l*未満の場合は水を加えて2.0m*l*とした．Bには試料液のかわりに同量の空試料液を加え同様に操作した．A，Bに6—ホスホグルコン酸脱水素酵素懸濁液0.02m*l*ずつを加え混和し，5分間放置した後，それぞれ水を対照として波長340 nmにおける吸光度EaおよびEbを測定した．次にA，Bにグルコン酸キナーゼ懸濁液0.02m*l*ずつを加え混和し，15分後に再び同条件で吸光度を測定し，Éaおよびébとした．EaとÉaの差△Ea，EbとÉbの差△Ebを求め，△Ea－△Eb＝△Etを計算した．

一方，用時グルコン酸標準液10m*l*を正確にはかり，酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液10m*l*を加え，さらに水を加えて正確に200m*l*とした．この液1，5，10，20，30m*l*をそれぞれはかり，水を加えて100m*l*とし検量線用標準液をつくった（これらの液1 m*l*はそれぞれグルコン酸0.5 F，2.5F，5 F，10F，15F μgを含む）．検量線用標準液2.0m*l*ずつをそれぞれキュベットS_1，S_2，S_3，S_4，S_5に入れ，試料液の場合と同様に操作した．また空試料液のかわりに水2.0m*l*を用い同様に操作し，△Es_1，△Es_2，△Es_3，△Es_4，△Es_5を求め検量線を作製した．

試料液の△Etと検量線から試料液中のグルコン酸濃度を求め，分子量比からグルコン酸鉄の量に換算した．

3） 鉄測定用試料液の調製および測定 試料B約5 gを100m*l*の灰化容器に正確に秤取し，食品中の添加物分析法に記載された方法[2]に従って乾式灰した後，原子吸

光法で鉄を測定した.

一方, 鉄標準液5 m*l*を正確にはかり塩酸溶液(1N)で100m*l*とし, これを測定用標準液とした(この液1 m*l*は鉄50μgを含む). この液2, 4, 6, 8, 10m*l*をそれぞれはかり, 塩酸溶液(1N)で100m*l*とし, それぞれ原子吸光度を測定して検量線を作成した.

試料液の吸光度と検量線より試料中の鉄濃度を求め, 分子量比からグルコン酸鉄の量に換算した.

結果および考察

I. グルコン酸の定量法の検討

1. 除鉄の検討 グルコン酸は水溶液の状態で鉄と光により分解[3]する. また水溶液中で一部鉄と安定なキレートを作り, グルコン酸の酵素法による測定を妨害するので, 従来法[1]の除蛋白操作に加え除鉄操作を検討した. なおグルコン酸の分解を避けるため出来るだけ遮光して操作した.

1) キレート剤の検討 鉄はオキシン, クペロンおよびジエチルジチオカルバミン酸等のキレート剤と錯体を作り有機溶媒に移行することからこれらの3種について比較したところ, オキシンおよびクペロンの鉄錯体はクロロホルムにきわめて易溶であり, 除鉄操作が簡便であった. ついでこの2種につき酵素阻害作用を比較したところオキシンの方がクペロンより少なかったのでオキシンを用いることにした.

2) 除鉄の際のpHの検討 酸性溶液にあらかじめオキシンを溶かし, ついでpHを調節した後クロロホルムを用いて抽出を行う場合は, pH 2以上の広い範囲で鉄の抽出を完全に行うことが出来るが, オキシン・クロロホルムで抽出を行う場合は, 定量的に抽出を行い得るpHの範囲がきわめて狭いという報告[4]がある. 酵素測定時の妨害を出来るだけ少なくするため, オキシンを試料液の中に溶かさずオキシン・クロロホルム溶液で抽出する方法を採用し, 至適pHを検討したところ, 2.0~5.0で抽出が良好で特に酸性側では抽出率が高かった. しかしオキシンは酸性が強くなる程水に移り易くなること, また後の酵素測定をpH7.5付近で行うこと等を考慮し, 出来るだけ中性に近いpH4.5を用いることにした.

3) オキシンの濃度 本島[4]は鉄3500μgを含む溶液に1%オキシン3 m*l*を加え全量50m*l*にした溶液を10m*l*のクロホルムで1回抽出したところ除鉄が完全であったと報告している. これによればオキシンは鉄に対しモル比で約5倍量あれば十分といえる. 本法では液量が約200m*l*でしかもオキシン・クロロホルム溶液を用いるため, 10倍量の30m*l*を用いることにした. 鉄として2000μgを含むpH4.5に調整したグルコン酸鉄溶液200m*l*をオキシン・クロロホルム溶液30m*l*で抽出したところ, 2回で完全に抽出できた. なお完全に除鉄できたかどうかは, オキシン一鉄錯体が黒色に着色するため, クロロホルム層の黒色度で判定できた.

2. 酵素測定法の検討

1) 従来法の改良点 従来法[1]では空試料液に水を用いているが, 除鉄した溶液はわずかに溶解しているオキシンの影響で吸光度が高くなるため, 空試料液には試料と全く同様に操作した溶液を用いた方が良かった.

また酵素試薬に市販のF・キットグルコン酸/グルコノデルタラクトンを用いたところ従来法より試薬調製操作が省略でき, 測定操作も簡便であった.

検量線は, 1キュベット当り2~60μgの範囲で直線性を示した.

II. 鉄の定量法の検討

1. 乾式灰化 テーブルオリーブには水分および油が多量に含まれ, 加熱時激しく飛びはねた. 飛散を防ぐため, ルツボに試料を入れた後, 無灰ろ紙をルツボの内側に入るように四つ折りにし試料の上にかぶせたところ良好であった. 灰化後の残留物に塩酸溶液(1→4) 10m*l*を加えて溶かす時, ルツボの器壁に付着した不溶物を, 注意して完全に溶かしたところ, 回収率が上がった.

2. 原子吸光法 検量線は1~5 μg/m*l*の範囲で直線性を示した.

III. 添加回収実験

テーブルオリーブへのグルコン酸鉄の添加量はほぼ使用基準値(鉄として150ppm, グルコン酸鉄に換算して1295ppm)とした.

ライプオリーブ10gにグルコン酸鉄12734μgを添加し酵素法(グルコン酸からの定量法)に従って回収率を求めた結果をTable 1. に示した. グルコン酸鉄の回収率は95.0~97.3%, 変動係数1.1%と良好な結果が得られた. またグルコン酸を添加したときの回収率もTable 1. に示したとおり良好であった. グルコン酸とグルコン酸鉄の回収率および精度に差はなく, 検量線用標準液としては含量測定が簡便なグルコン酸を用いてもよいことが判った. 定量限界は酵素法では10gの試料を用いた場合, 50μgまで測定できることから5 ppmであった.

テーブルオリーブ5 gにグルコン酸鉄6565.5 μgを添加し, 原子吸光法(鉄からの定量法)に従って回収率を求めた結果をTable 2. に示した. 回収率は96.3~101.8%, 変動係数1.6%と良好な結果が得られた. なお定量限界は1.0ppmであった.

Table 1. Recoveries of Gluconic Acid and Ferrous Gluconate added to Table Olive by the Enzymatic Method

Compound	Added (μg/g)	Recovery (%)	Mean+S.D. (%)	C.V. (%)
Gluconic Acid	515.8	94.5		
	103.6	94.8		
	〃	95.9		
	〃	96.3	96.4±1.0	1.0
	〃	98.0		
	〃	97.3		
	〃	96.1		
Ferrous Gluconate	1273.4	95.4		
	〃	95.0		
	〃	97.7	96.1±1.0	1.1
	〃	95.1		
	〃	95.8		
	〃	97.3		

Ten Grams of Table Olive were used

IV. 市販テーブルオリーブ中のグルコン酸および鉄含量

本法を用いて小豆島東洋オリーブ㈱製のテーブルオリーブ中のグルコン酸および鉄含量を測定した．グルコン酸含量10ppm，鉄含量は543ppm であった．4訂日本食品標準成分表[5]によると，ライプオリーブの鉄含量は 8 ppm であり，これと比較すると東洋オリーブ㈱製のものは使用基準値をはるかにこえた異常値であった．しかしグルコン酸含量が低いことからグルコン酸鉄は添加されていないことが推定された．メーカーに問い合わせたところ黒色安定剤に硫酸第一鉄を用いたことが判った．

今回は1メーカーのみのオリーブを分析したが，今後さらに輸入品などの種々のオリーブについて分析し，グルコン酸の天然分布状態や，グルコン酸鉄の使用実態を調査する必要がある．

ま と め

テーブルオリーブ中のグルコン酸鉄をその構成成分であるグルコン酸と鉄の両方から定量する方法を検討した．

グルコン酸は試料をトリクロル酢酸で除蛋白し，オキシンで除鉄した後，6－ホスホグルコン酸脱水素酵素とグルコン酸キナーゼを用いる酵素法で定量し，鉄は試料を乾式灰化した後，原子吸光法で定量した．

テーブルオリーブへのグルコン酸鉄添加の回収率は，酵素法が91.1±1.0%，変動係数1.1%，定量限界 5 ppm で，原子吸光法が回収率100.1±2.6%，変動係数1.6%，

Table 2. Recovery of Ferrous Gluconate added to Table Olive by the Atomic Absorption spectrometry

Recovery (%)	Mean±S.D (%)	C.V. (%)
100.6		
96.3		
101.8	100.1±2.6	1.6
100.3		
100.6		
100.6		

Ferrous Gluconate was added to 5g of table olive at level of 1313.1 ppm

定量限界1.0ppm でいずれも良好であった．

本法を用いて小豆島産のテーブルオリーブ中のグルコン酸および鉄含量を測定した結果，グルコン酸含量は10 ppm，鉄含量は543ppm であった．鉄が使用基準値をこえた異常に高い値を示したが，グルコン酸含量が少ないことからグルコン酸鉄が添加されたものではないことが推定された．メーカーに問い合わせたところ硫酸第一鉄の使用が判明した．

謝辞 試料収集を行うに際し，御協力いただいた香川県小豆農業改良普及所主席普及員 大野勝夫氏に深謝いたします．

文　献

1）厚生省環境衛生局食品化学課編：食品中の添加物分析法，261，1982，講談社
2）厚生省環境衛生局食品化学課編：食品中の添加物分析法，58，1982，講談社
3）Johnson,C.A. and Thomas,J.A. ：*J.Pharm. and Pharmacol.*, 6, 1037, 1954
4）本島健次：日本化学雑誌，76，903，1955
5）科学技術庁資源調査会編：四訂日本食品標準成分表，236，1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 224-230, 1985

石綿繊維の経口摂取による生体への影響（第1報）
ラットにおける血液中への移行について

荻野周三*, 福森信隆**, 安野哲子*, 小関正道*
佐々木美枝子**, 遠藤英美***, 風間成孔*

Biological Effects of Ingested Asbestos Fibers (I)
Migration to Blood in Rats

SHUZO OGINO*, NOBUTAKA FUKUMORI**, TETSUKO YASUNO*, MASAMICHI KOSEKI*, MIEKO SASAKI**, FUSAYOSHI ENDO*** and MASAYOSHI KAZAMA*

Asbestos fibers were investigated in blood of rats previously exposed to asbestos using transmission electron microscope. Blood samples (test samples) from 10 rats single gavaged with asbestos fibers at the dose level of 17 mg/kg were analyzed. The test samples from rats sacrificed on day 1 or 4 after administration showed significantly higher levels of asbestos fibers than control samples.

Length distribution of asbestos fibers observed in test samples indicated that many longer fibers existed in samples from day 1 group compared with day 4 group. This study suggests that it is possible for asbestos fibers to penetrate the gastrointestinal wall and migrate into blood.

Keywords: asbestos fiber, penetration, blood, gastrointestinal wall, transmission electron microscope

緒　言

多量の石綿繊維の吸入が肺癌や中皮腫を生じさせることは良く知られている[1-4]. しかし最近の疫学調査によると，石綿労働者に消化器系の癌の罹患率が高い傾向が認められ[5,6]，石綿繊維の経口暴露と癌の関連が指摘されている[7]. また近年，石綿鉱山地帯を流下する河川水[8,9]や，石綿セメントパイプを用いて給水される都市水道水[10-12]，さらには石綿をろ過助剤に用いて製造された各種のアルコール飲料[8,13]や食品中[14]から多数の石綿繊維が検出されたことから，石綿繊維の経口摂取による健康への影響[14-26]，特に石綿繊維が消化管壁を貫通し，他臓器に移行する可能性について大きな関心が寄せられている．著者らは石綿繊維の体内での挙動を解明する目的で石綿を経口的に強制投与したラットの血液と腎臓，肝臓，心臓，ひ臓，腸間膜，肺および脳を摘出し，各臓器中の石綿繊維の数および長さを透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて分析した．今回は血液についてその結果を報告する．

実験方法

動物は6週令のJcl：SD系雄性ラット（日本クレア）を用い，体重が約300gになるまで馴化飼育したのちに使用した．石綿はUICC（Union Internationale Contre le Cancer）クリソタイルAを使用した．

石綿懸濁液の調製　石綿170mgをあらかじめ孔径0.1 μmのメンブランフィルターでろ過した水100mlに加え，超音波を30秒間かけて分散懸濁させた．

強制投与　20匹の動物を16時間絶食させたのち，10匹にネンブタール麻酔下で，内径1.8mmのゾンデを用いて石綿懸濁液10ml/kg（石綿繊維として17mg/kg）を胃内へ注入し，投与群とした．残りの10匹には石綿を含まない水10ml/kgを同様の方法で投与し，対照群とした．

血液の採取とTEM用試料の作成　投与群は投与後1

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 同毒性部病理研究科
*** 帝京短期大学

日目および4日目に各5匹の動物をネンブタール麻酔下で開腹し，下大静脈より血液2.5m*l*を採取した．なお対照群は10匹を同様の方法で処置し，血液を採取した．血液は乾燥（70℃，20時間）後，低温灰化装置で灰化（80 W，3時間）し，さらにマッフル炉内で完全に灰化（550℃，6時間）した．TEMによる観察時に障害となる無機塩類を除去するために，残留物にあらかじめ孔径0.1μmのメンブランフィルターでろ過した1%酢酸30 m*l*を加え，超音波を1分間かけて分散させたのち，孔径0.2μmのメンブランフィルターでろ過した．フィルターは乾燥（70℃，6時間）後，先と同様の条件で低温灰化装置およびマッフル炉を用いて灰化し，残留物に，あらかじめ孔径0.2μmのフロリナートフィルターでろ過したアセトン3 m*l*を加え，超音波を30秒間かけて分散懸濁させた．この懸濁液5 μlをフォルムバール支持膜を張った銅製200メッシュのグリッド上に滴下し，室温で乾燥後，カーボンを蒸着し，試料とした．

TEMによる観察 加速電圧75kV，倍率10,000倍で計25個のグリッド穴を観察し，石綿繊維の数と長さを測定した．なお石綿繊維の同定はクリソタイル石綿が持つ特徴的な管状構造の確認によった（Fig. 1，2）．

結果および考察

Cunningham ら[18]は石綿を1%添加した飼料で6週間ラットを飼育した結果，大網膜，肺，腎臓および脳から検出された石綿繊維の数には投与群と対照群の間で有意な差があったと報告している．またPatel−MandlikとMillette[26]も同様に石綿を添加した飼料で終生期間ラットを飼育し，腎臓皮質について分析した結果，投与群からは対照群に比べて有意に多数の石綿繊維が検出されたと報告している．これらの実験では飼料に混和した石綿繊維が鼻腔から吸入されて肺に入る可能性があり，その場合，肺のクリアランス作用によってリンパ系を経由し，血液中に移行する危険が考えられる[27]．したがって著者らは経口ゾンデによる強制投与法を今回採用した．一方Gross ら[16]は経口ゾンデを用いた強制投与実験を行い，その結果，石綿繊維が消化管壁を貫通した形跡は認めら

Table 1. Recovery of Fibers in Bbood of Rats gavaged a Single Dose of Asbestos

ID	Rat	Total Numbers of Fibers in 25 Grid Openings				
		Length in μm				
		0.2−0.5	0.5−1.0	1.0−2.0	2.0<	Total
Test 1*	1	0	2	0	0	2
	2	1	8	1	0	10
	3	0	6	4	0	10
	4	2	0	1	0	3
	5	4	3	5	0	12
Test 2**	6	7	2	3	0	12
	7	3	4	0	0	7
	8	6	4	0	0	10
	9	3	5	0	0	8
	10	1	7	0	1	9
Control	11	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0
	13	0	0	0	0	0
	14	0	0	0	0	0
	15	0	1	0	0	1
	16	0	0	0	0	0
	17	0	0	0	0	0
	18	0	1	0	0	1
	19	0	0	1	0	1
	20	0	0	0	0	0

＊：Animals were gavaged with 17mg／kg asbestos and sacrificed at 1 day after administration.
＊＊：Animals were gavaged with 17mg／kg asbestos and sacrificed at 4 days after administration.

Table 2. Frequency of Length Distribution of Fibers in Blood of gavaged Rats

Length interval (μm)	Per cent fibers	
	Rat group	
	Test 1	Test 2
0.2−0.5	18.9	43.5
0.5−1.0	51.4	47.8
1.0−2.0	29.7	6.5
2.0<	0.0	2.2

れなかったが，一部，誤ってゾンデによって食道に穿孔を生じた場合に限って他の臓器への移行が起きたことを報告している．したがって著者らは血液の採取を終えたのちに食道と胃の内壁を肉眼で観察したが，いずれの動物においてもゾンデによる穿孔はもとより，何らかの障害を受けた兆候を認めることはなかった．

各動物の血液中から検出された石綿繊維をTable 1に示した．投与群では投与から屠殺までの経過日数にかかわらず，すべての動物の血液から2～12本/25グリッド穴の石綿繊維が検出されたのに対し，対照群では10匹中7匹の血液からは検出されず，3匹からそれぞれ1本/25グリッド穴の繊維を検出したことにとどまった．検出した繊維数について，Welchの補正を含むt—検定を行ったところ，投与後1日経過群と対照群の間で危険率5%，また4日経過群と対照群の間では危険率1%でそれぞれ有意差が認められた．Jaurandら[28]はクリソタイルの構成成分の内，マグネシウムは酸性溶液中で溶出しやすい性質があることを報告している．著者らは実験に先立ち，1%酢酸による処理がクリソタイルの形状に及ぼす影響について検討を行った．その結果，TEMによる繊維の識別に支障となるような形状の変化は認められなかった(Fig. 3)．検出された繊維の長さの分布をTable 2に示した．投与後1日経過群では0.5～1.0μmの長さの繊維が最も多く，以下1.0～2.0μm，0.2～0.5μmの順であったが，投与後4日経過群では，1.0～2.0μmの長い繊維が減少し，逆に0.2～0.5μmの短い繊維が増加する傾向が認められた．以上の結果，経口的に強制投与した石綿繊維はその一部が消化管壁を貫通し，血液中に移行する可能性が高く，また血液中への移行は投与後1日を経過した後もさらに継続するものと考えられる．

謝　辞　本研究を行うにあたり，UICCクリソタイルAと関連する貴重な資料を提供していただいたLlandough Hospital, Medical Research Council(Gt. Britain)のV. Timbrell博士ならびにNational Centre for Occupational Health(South Africa)のF. Coetzee博士に深謝いたします．

文　献

1) Lieben, J.：*Arch. Environ. Health*, 13, 619, 1966
2) Mancuso, T.F. and Coulter, E.J.：*Arch. Environ. Health*, 6, 210, 1963
3) Selikoff, I.J., Churg, J. and Hammond, E.C.：*J.A.M.A.*, 188, 22, 1964
4) Wagner, J. C., Sleggs, C.A. and Marchand, P.：*Brit. J. Ind. Med.*, 17, 260, 1960
5) Selikoff, I.J.：*Environ. Health. Perspect.*, 9, 229, 1974
6) Selikoff, I.J., Hammond, E.C. and Sediman, H.：*Ann. N.Y. acad. Sci.*, 330, 91, 1979
7) Kanarek, M.S., Conforti, P.M., Jackson, L, A., Cooper, R.C. and Murchio, J.C.：*Amer. J. Epidemiol.*, 112, 54, 1980
8) Cunningham, H.M. and Pontefract, R.D.：*Nature*, 232, 332, 1971
9) Kay, G.H.：*J. AWWA*, 66, 513, 1974
10) Burns, A.F.：*Johns−Manville Res. Rep.*, 404, 1971
11) Millette, J.R., Clark, P.J., Pansing, M.F. and Twyman, J.D.：*Environ. Health Perspect.*, 34, 13, 1980
12) Kanarek, M.S., Conforti, P.M. and Jackson, L.A.：*Environ. Sci. Technol.*, 15, 8, 923, 1981
13) 荻野周三，小関正道，安野哲子，福森信隆，伊東昭子，遠藤英美：東京衛研年報，34, 178, 1983
14) Merliss, R.R.：*Science*, 173, 1141, 1971
15) Pontefract, R.D. and Cunningham, H.M.：*Nature*, 243, 352, 1973
16) Gross, P., Harley, R.A., Swinburne L.M., Davis, J.M.G. and Green, W.B.：*Arch. Environ. Health*, 29, 341, 1974
17) Bolton, R.E. and Davis, J.M.G.：*Ann. Occup. Hyg.*, 19, 121, 1976
18) Cunningham, H.M., Moodie, C.A., Lawrence, G.A. and Pontefract, R.D.：*Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 6, 507, 1977
19) Hallenbeck, W.H. and Hesse, C.S.：*Rev. Environ. Health*, 2, 3, 157, 1977
20) Hallenbeck, W.H. and Patel−Mandlik, K.J.：*Environ. Res.*, 20, 335, 1979

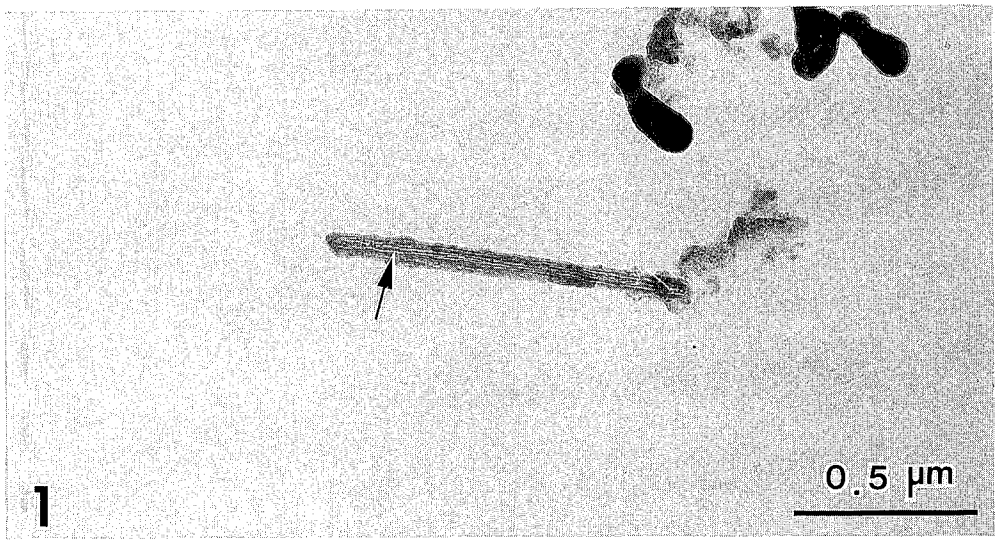
21) Cook, P.M. and Olson, G.F. : *Science*, **204**, 1195, 1979
22) Donham, K.J., Berg, J.W., Will, L.A. and Leininger, J.R. : *Cancer*, **45**, 1073, 1980
23) Sebastien, P.M., Masse, R. and Bignon, J. : *Environ. Res.*, **22**, 201, 1980
24) Patel−Mandlik, K.J. and Millette, J.R. : *Scanning Electron Microsc.*, 1, 347, 1980
25) Hallenbeck, W.H., Markey, D.R. and Dolan, D.G. : *Environ. Res.*, **25**, 349, 1981
26) Patel−Mandlik, K.J. and Millette, J.R. : *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **12**, 247, 1983
27) Godwin, M.C. and Jagatic, J. : *Environ. Res.*, **3**, 391, 1970
28) Jaurand, M.C. Bignon, J., Sebastien, P. and Goni, J. : *Environ. Res.*, **14**, 245, 1977

Explanation of Figures

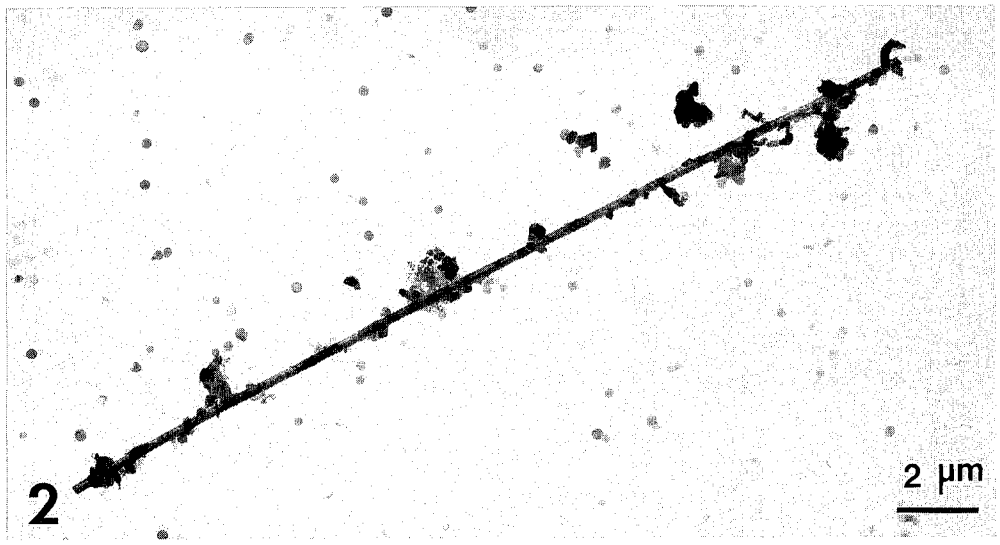
Fig. 1. An asbestos fiber found in blood sample from the rat sacrificed at 1 day after administration of asbestos. A central canal showing a distinction of chrysotile is observed clearly (arrow). ×49,500

Fig. 2. The longest asbestos fiber found in blood sample from the rat sacrificed at 4 days after administration of asbestos. ×5,700

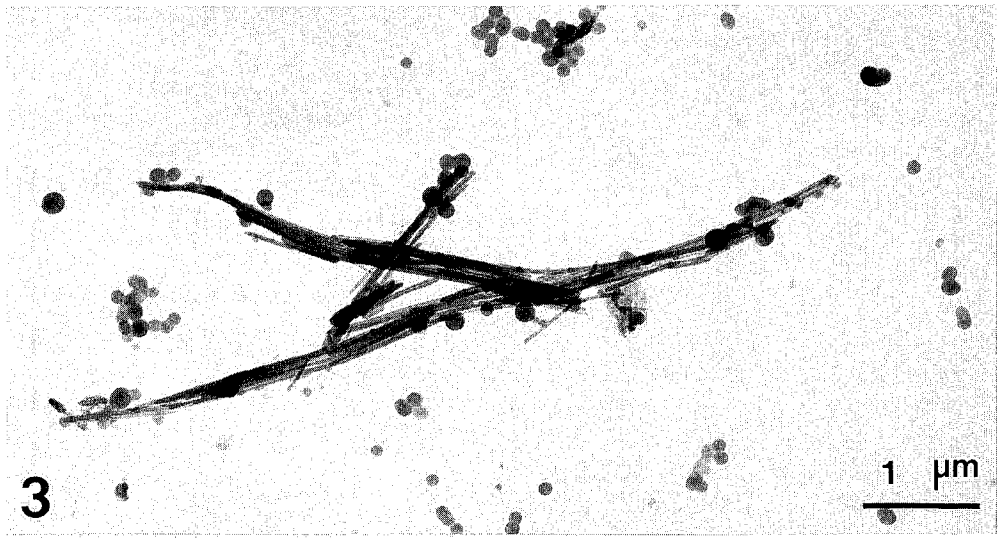
Fig. 3. The standard asbestos fibers treated with 1% acetic acid. The shapes of fibers are not disturb. ×16,000



1



2



3

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 231-235, 1985

脂肪酸分析法の検討

船山恵市*, 牛尾房雄*, 友松俊夫*,
道口正雄*

Examination of Analytical Method on Fatty Acid

KEIICHI FUNAYAMA*, FUSAO USHIO*, TOSHIO TOMOMATSU*
and MASAO DOGUCHI*

The fatty acids in the fish oil were methylated with boron trifluoride (BF_3), diazomethane (DAM) or sodium methylate (SM) for gas chromatography analysis.

No statistically significant difference was observed between the analytical values of the fatty acids methylated with BF_3 and with DAM.

However, the sample oil treated with SM, with which fatty acids in the form of neutral fat were methylated, showed higher values of polyunsaturated fatty acids than those obtained with BF_3.

In the case of methylation with BF_3, addition of dibutyl hydroxy toluene and pyrogallol during saponification increased the analytical values of icosapentaenoic acid (IPA) and docosahexaenoic acid (DHA) up to respective 107 and 112% of the values obtained without any addition of such antioxidants.

This result suggests that some part of polyunsaturated fatty acids such as IPA and DHA in the oil are oxidized during the saponification and extraction procedures.

Keywords : analytical method, fish oil, saponification, polyunsaturated fatty acid, icosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, dibutyl hydroxy toluene, pyrogallol

緒　　言

食生活の欧米化に伴い，血栓形成に起因する，脳・心臓疾患等の成人病による死亡率が高まってきている[1]．これらの疾患に対し，魚油中に含まれる高度不飽和脂肪酸が，その予防および治療に，有効であることが明らかになって以来[2]，食品中の脂肪酸組成および含有量が，重要視されつつある．

従来，脂肪酸の定量法については，多くの報告があるが，すべての食品に応用できる定量法は，まだ確立されたとは言いがたい．これらの脂肪酸分析法のうち，三フッ化ホウ素メタノール法[3]（以下 BF_3 法と略す）は，試薬の取扱いが容易で，不ケン化物除去の操作過程で，コレステロールを同時に分析できることなどから，比較的汎用されている．しかし，同法では，高度不飽和脂肪酸が副反応を起こす場合も知られている．また，高度不飽和脂肪酸を多く含む魚油の分析に，操作の簡便なナトリウム・メチラート法[4]（以下 SM 法と略す）も，用いられるようになってきた．

そこで，比較的利用度の高い BF_3 法，SM 法およびジアゾメタン法[4]（以下 DAM 法と略す）の比較検討を行った．また，BF_3 法の改善を試み，若干の知見を得たので報告する．

実験の部

1．**試料**　市販ハマチより，Scheme 1 に示した抽出法[5]で抽出した油脂，および市販イワシ・サバ抽出油脂を使用した．

2．**試薬**　すべて和光特級品を使用した．また，ガスクロマトグラフィー用脂肪酸メチルエステル標準品は，SRL 社および SIGMA 社製を使用した．

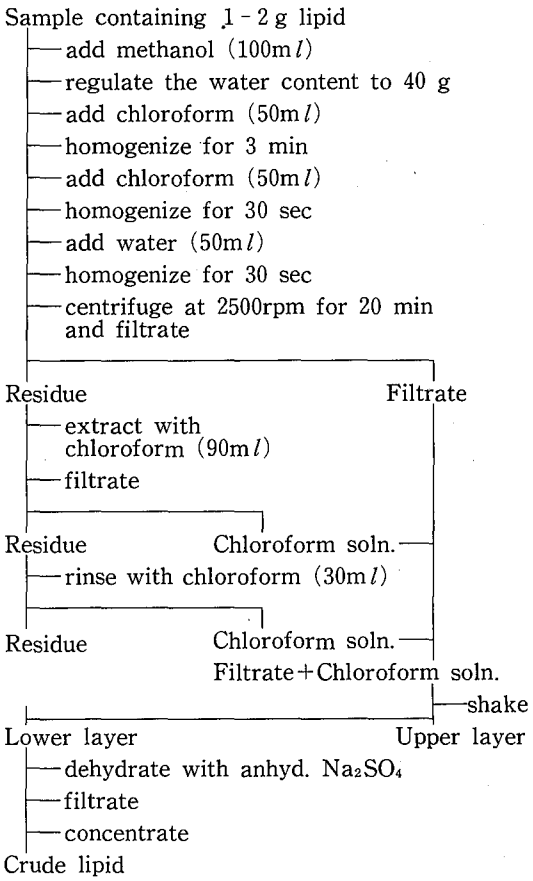
3．**操作**　脂肪酸分析の基本的操作は，1) 脂質の抽出，

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

2)脂質のケン化および脂肪酸抽出，3)エステル化，4)ガスクロマトグラフィー分析で，これを Scheme 1，2[6]および3に示した．この基本操作のうち，エステル化に三フッ化ホウ素メタノールを用いた方法を，BF_3法，ジアゾメタンを用いた方法を，DAM 法とした．また，ナトリウム・メチラートを用いてトランスエステル化を行う方法を，SM 法とした．それぞれの操作を，Scheme 4 および5に示した．

脂肪酸の定量は，ヘプタデカン酸メチルエステルを用い，外部標準法により行った．

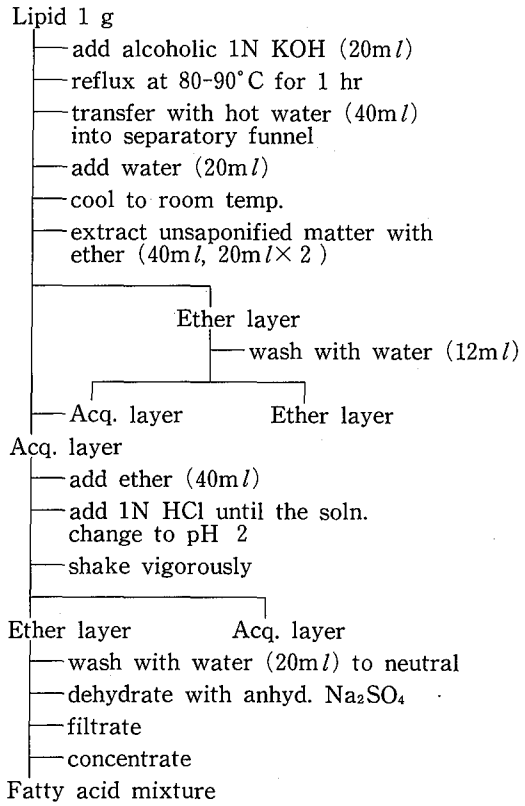
4. 装置および分析条件 装置：島津 GC—7A，積分計：Varian CDS 401，検出器：FID，カラム：Diasolid－ZF(80～100mesh，1.6m×3 mmϕ)，カラム温度：193℃，注入口温度：240℃，キャリアガス：N_2 62 ml/min，Attenuation：8，Range：10^2



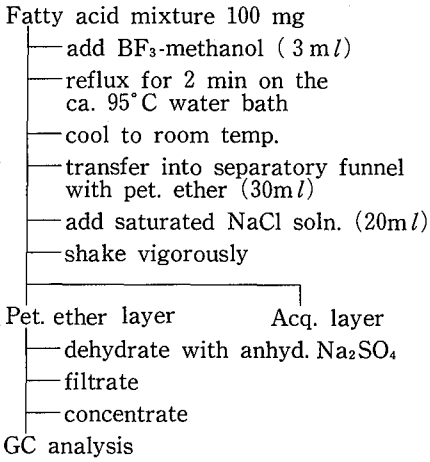
Scheme 1. Extraction of Lipid

結果および考察

1. BF_3法，DAM 法，および SM 法の比較



Scheme 2. Saponification and Extraction of Fatty Acid



Scheme 3. Esterification by Boron Trifluoride

ハマチ抽出油脂を用い，BF_3法を基準として，DAM法およびSM法との比較を行い，結果をTable 1に示した．

BF_3法とDAM法で行った9種の脂肪酸分析値のうち，C_{16}酸（$p < 0.01$）およびC_{18}，$C_{18:3}+C_{20:1}$酸（$p < 0.05$）については，統計的には有意差が認められたが，全般的には両法の分析値がよく近似していることから，両分析法間には差がないと言える．

Fatty acid mixture 10 mg
- add diazomethane-ether soln. (5ml)
- keep at room temp. for 30 min
- evaporate
- dissolve with *n*-hexane

GC analysis

Scheme 4. Esterification by Diazomethane

Lipid 10-20 mg
- dissolve with benzene (1ml)
- add 0.5N sodium methylate (3ml) and mix
- keep at room temp. for 30 min
- add 0.5N acetic acid (3ml)
- extract with *n*-hexane (3ml×2)

n-Hexane layer
- add 4-5 g anhyd. $Na_2SO_4+NaHCO_3$ (2+1)
- shake vigorously
- stand for 30 min
- filtrate

GC analysis

Schem 5. Sodium Methylate Method

また，BF_3法とSM法では，高度不飽和脂肪酸である$C_{12:5}$，$C_{22:6}$酸に有意差が認められ（$p < 0.01$），その差はそれぞれ，+9.6%および+15.9%であった．これは，BF_3法では，両脂肪酸の一部が影響されるのに対して，SM法では，トランスエステル化のみが行われ，また，操作工程が少ないことから，影響されにくいためと推測される．

以上の結果，BF_3法では高度不飽和脂肪酸の減少は，エステル化よりも前の工程で起きたものと考えられる．

2. BF_3法における改善の試み

市販イワシ・サバ抽出油脂を用い，光およびアルカリ濃度の影響について，また，脂肪酸に及ぼす酸化防止剤の保護効果について検討した．

1) 光の影響

BF_3法の操作工程全域に及ぶものとして，光による影響を，白色ガラスおよび褐色ガラス器具を用いて検討した．その結果，両者間には有意差は認められず（$p > 0.05$），光による影響は無視できるものと思われた．

2) ケン化時におけるアルカリ濃度の影響

エステル化工程以前にあるこの工程では，油脂をアルカリ条件下で空気と接触させるため，油脂が酸化される可能性が考えられる．そこで，油脂量(0.5gおよび1.0g)と，アルカリ濃度（水酸化カリウム1Nおよび2N）の変化による影響を検討し，その結果をTable 2に示した．

油脂量0.5gの条件では，油脂量1.0gとの間に有意差は認められなかった($p > 0.05$)．しかし，アルカリ濃度2Nの条件では，$C_{18:2}$，$C_{18:3}+C_{20:1}$酸（$P < 0.05$）およびC_{18}，$C_{20:5}$，$C_{22:6}$酸（$p < 0.01$）に有意差が認められ，

Table 1. Comparison of Boron Trifluoride Method, Diazomethane method, and Sodium Methylate Method

Fatty Acid	BF_3 (n=5)	DAM (n=5)	SM (n=5)
C_{14}	5.20±0.10 *	5.17±0.05	5.16±0.05
C_{16}	14.96±0.30	14.02±0.38 *2	14.81±0.11
$C_{16:1}$	7.57±0.18	7.71±0.22	7.60±0.07
C_{18}	3.44±0.08	3.32±0.02 *1	3.44±0.04
$C_{18:1}$	11.86±0.28	12.14±0.39	11.93±0.11
$C_{18:2}$	1.09±0.04	1.20±0.10	1.11±0.02
$C_{18:3}+C_{20.1}$	3.27±0.06	3.44±0.13 *1	3.27±0.03
$C_{20:5}$	9.02±0.21	9.20±0.35	9.89±0.09 *2
$C_{22:6}$	11.32±0.25	11.66±0.47	13.12±0.16 *2

* : Mean±S.D. (mg/Oil 100mg)
*1 : $P < 0.05$
*2 : $P < 0.01$

$C_{20:5}$, $C_{22:6}$酸では，定量値がそれぞれ，16%および28%減少した．

以上の結果，高度不飽和脂肪酸はアルカリ濃度変化の影響を受け，同条件下で不安定であることから，BF_3法でも，一部が影響を受けているものと推測される．

3) 酸化防止剤の添加による効果

アルカリ条件下での高度不飽和脂肪酸の減少は，酸化によると思われるので，ケン化操作前での酸化防止剤の添加を試みた．脂溶性酸化防止剤としてジブチルヒドロキシトルエン(以下BHTと略す)を，また水溶性酸化防止剤としてピロガロールを，それぞれ単独あるいは混合して添加した．油脂量に対する添加割合は，BHT 0．4%，ピロガロール20%とした．その結果をTable 3および4に示した．

BHT単独添加およびピロガロール単独添加共に，$C_{22:6}$酸に有意差が認められた($p<0.05$)．また，BHT・ピロガロール混合添加では，$C_{18:2}$，$C_{20:5}$酸($P<0.05$)および$C_{22:6}$酸($P<0.01$)に有意差が認められ，$C_{22:6}$酸は12%増加した(Table 3)．

BHT・ピロガロール混合添加による効果として，$C_{18\ 2}$，$C_{20:5}$，$C_{22:6}$酸において，SM法に対する減少率は，それぞれ9%→5%，14%→8%，22%→13%に改善された(Table 4)．しかし，SM法との間には，まだ有意差が認められた($P<0.01$)．

以上の結果から，BF_3法では，BHTおよびピロガロールを混合添加することにより，高度不飽和脂肪酸の減少

Table 2. The Effect of The Hydrolyzing Reagent on Fatty Acid Value

Fatty Acid	Lipid KOH	1.0g 1N (n=3)	0.5g 1N (n=3)	1.0g 2N (n=3)
C_{14}		3.87±0.05*	3.85±0.08	3.87±0.04
C_{16}		6.51±0.01	6.44±0.14	6.53±0.06
$C_{16:1}$		6.73±0.08	6.67±0.14	6.74±0.06
C_{18}		0.63±0.00	0.63±0.01	0.65±0.01 *2
$C_{18:1}$		8.34±0.09	8.31±0.18	8.40±0.09
$C_{18:2}$		4.51±0.04	4.46±0.14	4.20±0.19 *1
$C_{18:3}+C_{20:1}$		3.36±0.01	3.36±0.03	3.55±0.08 *1
$C_{20:5}$		15.23±0.17	14.86±0.64	12.83±0.37 *2
$C_{22:6}$		7.21±0.09	6.83±0.39	5.21±0.32 *2

* : Mean±S.D. (mg/Oil 100mg)
*1 : $P<0.05$
*2 : $P<0.01$

Table 3. The Effect of Antioxidant on Fatty Acid Value during Saponification— I

Fatty Acid	BF_3 (n=3)	BHT (n=3)	Pyrogallol (n=3)	BHT Pyrogallol (n=3)
C_{14}	3.89±0.09 *	3.85±0.10	3.85±0.09	3.90±0.03
C_{16}	6.55±0.17	6.48±0.16	6.47±0.14	6.56±0.06
$C_{16:1}$	6.77±0.17	6.67±0.16	6.68±0.14	6.81±0.07
C_{18}	0.64±0.02	0.63±0.02	0.63±0.01	0.65±0.01
$C_{18:1}$	8.41±0.24	8.30±0.20	8.31±0.17	8.50±0.08
$C_{18:2}$	4.56±0.12	4.55±0.08	4.59±0.08	4.76±0.06
$C_{18:3}+C_{20:1}$	3.34±0.11	3.32±0.10	3.29±0.08	3.28±0.01
$C_{20:5}$	15.33±0.36	15.46±0.32	15.64±0.33	16.39±0.28 *1
$C_{22:6}$	7.12±0.10	7.43±0.10 *1	7.51±0.16*1	7.96±0.23 *2

* : Mean±S.D. (mg/Oil 100mg)
*1 : $P<0.05$
*2 : $P<0.01$

Table 4. The Effect of Antioxidant on Fatty Acid Value during Saponification—II

Fatty Acid	SM (n = 3)	BHT Pyrogallol (n = 3)	BF_3 (n = 3)
C_{14}	3.92±0.02 *	3.90±0.03	3.89±0.09
C_{16}	6.64±0.02	6.56±0.06	6.55±0.17
$C_{16:1}$	6.89±0.02	6.81±0.07	6.77±0.17
C_{18}	0.64±0.01	0.65±0.01	0.64±0.02
$C_{18:1}$	8.58±0.03	8.50±0.08	8.41±0.24
$C_{18:2}$	5.01±0.02	4.76±0.06 *2	4.56±0.12 *2
$C_{18:3}+C_{20:1}$	3.24±0.01	3.28±0.01 *1	3.34±0.11
$C_{20:5}$	17.84±0.07	16.39±0.28 *2	15.33±0.36 *2
$C_{22:6}$	9.10±0.06	7.96±0.23 *2	7.12±0.10 *2

* : Mean±S.D. (mg／Oil 100mg)
*1 : P < 0.05
*2 : P < 0.01

が，若干改善されることが明らかとなった．しかし，SM 法との差はまだ大きいことから，高度不飽和脂肪酸の定量には，SM 法の使用が好ましいと考えられるが，遊離脂肪酸およびアミド結合している脂肪酸を，エステル化できないことを考慮すると，BF_3法での高度不飽和脂肪酸の減少防止について，さらに検討が必要である．

要　約

現在脂肪酸分析に使用されている，BF_3法，DAM 法，および SM 法の比較検討を行った．また，比較的汎用されている，BF_3法の改善を試みた．

1. 高度不飽和脂肪酸定量値において，BF_3法と DAM 法の間では，有意差は認められなかった．また，BF_3法と SM 法の間では，有意差が認められた．

2. BF_3法において，光の影響は認められなかった．

3. BF_3法において，油脂量0.5g の条件では，各脂肪酸定量値に，有意差は認められなかった．また，アルカリ濃度2N の条件では，高度不飽和脂肪酸定量値の減少が認められた．

4. 脂溶性酸化防止剤（BHT）および水溶性酸化防止剤（ピロガロール）を，ケン化の際に混合添加することにより，BF_3法における高度不飽和脂肪酸の減少防止に，わずかながら効果が認められた．

文　献

1）㈱厚生統計協会編：国民衛生の動向，31（9），53，1984
2）奏　和彦，三ケ尻昭博，藤田孝夫：調理科学，16，155，1983
3）Metcalfe, L.D.：*Anal. Chem.*, 33, 363, 1961
4）日本薬学会編：衛生試験法注解，185，1980，金原出版，東京
5）*Methods of Analysis*—*A.O.A.C.*, 13th Ed., 778, 1980
6）日本油化学協会編：基準油脂試験法，2．4．10—71

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 236-239, 1985

プレカラム螢光体化法によるチーズ中のチラミンの分析

菊谷典久*, 山口直子*, 井口正雄*,
友松俊夫*, 道口正雄*

High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Tyramine in Cheese by Precolumn Fluorescence Derivatization with *o*-Phthalaldehyde

NORIHISA KIKUTANI*, NAOKO YAMAGUCHI*, MASAO IGUCHI*,
TOSHIO TOMOMATSU* and MASAO DOGUCHI*

A sensitive, simple and selective high-performance liquid chromatographic method for determination of tyramine in cheese is described.

Tyramine extracted with 0.4M $HClO_4$ from cheese was modified by precolumn derivatization with *o*-phthalaldehyde. Complete separation was achieved on a reversed-phase column using mixtures of methanol with phosphate buffer as mobile phase. The derivatives were quantitated by their fluorescence intensity at 340 nm (excitation) and 455 nm (emission). The average recovery of tyramine standards added to cheese samples was 101.5±5.7 (S.D.)%.

This method was applied to nine samples of Japanese processed cheese. The amounts of tyramine found ranged between 1.8 and 58.1 μg/g with the average being 22.7±19.9 (S.D.)μg/g.

Keywords: tyramine, processed cheese, *o*-phthalaldehyde, precolumn derivatization

緒　言

チラミン(tyramine, 4-hydroxyphenethylamine)は，いわゆる間接型の交感神経様薬の範ちゅうに属する生理活性アミンである．その作用は，交感神経効果器官接合部に働いて，ノルエピネフリン(以下NEと略す)をNEストアよりシナプス間隙に遊離させることにあり，それによって交感神経興奮を起こすことが知られている．

神経終末のNEは，モノアミンオキシダーゼ(以下MAOと略す)によって分解を受けるが，ある種の抗うつ剤などMAO阻害作用を持つ薬物を服用している患者の間では，心悸亢進，頭痛，高血圧等の症状を示す例が見られ，使用に注意が促されていた[1]．1963年Blackwell[2]は，MAO阻害剤服用者に上記の症状が，食後，とりわけチーズ摂食後に生ずることを報告，同年Asatoorら[3]は，この様なチーズの作用は，その中に含まれるチラミンに由来すると考えた．また1964年Horwitzら[4]は，チラミンの経口投与実験を行い，MAO阻害剤とチラミンとの相乗作用によって，頭痛および極度の高血圧発作が発現することを実証し，以来，食品中のチラミンの存在が注目され始めた．

食品中のチラミンの分析については，チーズ[4,5]，ヨーグルト[4]，ビール[4]，ワイン[4,6]，ココア[7,8]，肉製品[9]等に関しての報告がなされており，その分析方法も多様である．サンドカラムによってチラミンを抽出し，α-ニトロ-β-ナフトールと反応させ，その螢光強度を測定する方法[7,9]，ガスクロマトグラフ法[10]，高速液体クロマトグラフ(以下HPLCと略す)-電気化学検出器法[8]などがあるが，近年HPLC-螢光分析の誘導体化法が発展し，そのための試薬が各種開発されてきた．このうち，オルトフタルアルデヒド(以下OPAと略す)については，反応時間の短さ，経済性などで利点がある反面，カラム分離後に誘導体化を行うポストカラム法のために，複数の送液ポンプを要するなど，手法の煩雑さの上で難点があったが，Davisら[11]は，プラズマ中の各種生理活性アミンの分析

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

に際し，カラム分離前に誘導体化を行い，良好な成績を得た．今回，著者らは，このOPA-プレカラム法をチーズ，とりわけ国内消費の大部分を占めるプロセスチーズ中のチラミン分析に適用し，若干の知見を得た．以下報告する．

実験方法

I．試料　都内において市販されているプロセスチーズ，5社一9銘柄について分析を行った．これらはすべて国内生産品であり，A社一長野，B社一兵庫，C社一岡山，D社一神奈川，E社一神奈川の製品である．

II．試薬　チラミン塩酸塩，オクトパミン塩酸塩，ヒスタミン塩酸塩，ドーパミン塩酸塩(以上シグマ社製)，オルトフタルアルデヒド(フナコシ薬品K.K.)を使用．その他の試薬については，和光純薬K.K.の試薬特級品，同液体クロマトグラフ用試薬を用いた．

III．機器　高速ブレンダー：Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, 西独)．HPLCシステム：バリアン5,000型液体クロマトグラフおよび島津螢光モニター・RF-530.

IV．試薬の調製　**1．OPA試薬**：OPA40mgを0.5m*l*のエタノールに溶解し，その溶液に0.1m*l*の2-メルカプトエタノールおよび0.4Mホウ酸緩衝液 (pH10.0, 水酸化カリウムにて調整)を加え，全量50m*l*とした．**2．洗浄用緩衝液**：0.05Mリン酸二ナトリウム水溶液 (pH10.0, 水酸化ナトリウムにて調整) を用いた．

V．試料の調製　**1．抽出**：試料5 gを秤取し，0.4M過塩素酸水溶液20m*l*を加え，高速ブレンダーにて3分間磨砕．次に同液10m*l*を加えて更に3分間混和し抽出．得られた試料溶液は，水酸化ナトリウムを加えて中和後，蒸留水を加えて全量50m*l*とした．この液を4,000rpm, 10分間遠沈し，表面のクリーム層を取り除き，上清部分をろ過し，試験溶液とした．**2．OPA誘導体化**：試験溶液2 m*l*にOPA試薬0.4m*l*を加え，混合し1分間放置．次に酢酸エチル3 m*l*で反応生成物を抽出し，洗浄用緩衝液2.5m*l*で酢酸エチル層を洗い，最後に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し，HPLC用の試料とした．

VI．HPLCによる分析　**1．カラム**：Unisil Q C_{18} (5 μm), 250×4 mm I.D.(ガスクロ工業K.K.)，プレカラムとしてPermaphase ODS (30μm), 50×4 mm I.D.(デュポン)を併用した．**2．移動相**：0.05Mリン酸一ナトリウム緩衝液(pH5.10, 水酸化ナトリウムにて調整)とメタノールを67：100(V/V)に混和して使用した．**3．条件**：流速0.6m*l*/min., 圧力170atm, 試料注入量30μl．ピークの検出は，励起波長340nm，螢光測定波長455nmで行った．

結果および考察

1　チラミン-OPA誘導体の螢光安定性

チラミン-OPA誘導体の，酢酸エチル中での螢光安定性を調べた．酢酸エチル抽出後，0～240分の間，20℃にて放置し，40分ごとに，その螢光強度を測定した．Fig. 1では，0分での強度を100%として，その経時変化を示した．螢光強度は40分後に極大(100.3%)となり，以下，漸減していった．なお，80分後でも99.0%の値を示しており，定量に際して充分な安定性をもつことが認められた．Davisら[11]の実験では，4℃条件下では，20時間にわたり安定であったことを報告している．

2　検量線

本実験における，チラミン標準品による検量線をFig. 2に示す．2.5～50ngの範囲で，良好な直線性が得られた．

3　チラミンの分離

Fig. 3は，チラミンと他の生理活性アミン一オクトパミン，ドーパミン，ヒスタミンとの分離を示したクロマトグラムである．今回のHPLC条件では，オクトパミンとヒスタミンの分離に難点はあったが，チラミンと他のアミンとは良好に分離された．

Fig. 4は，プロセスチーズ中のチラミンの分離を示したクロマトグラムである．チーズに含まれる遊離アミノ酸の多くは，チラミンよりも溶出時間が短いが，しばしばチラミンの検出を妨害することがある．今回の実験では，塩基性緩衝液を用いた酢酸エチル層の洗浄によって，その妨害を抑えることができた．

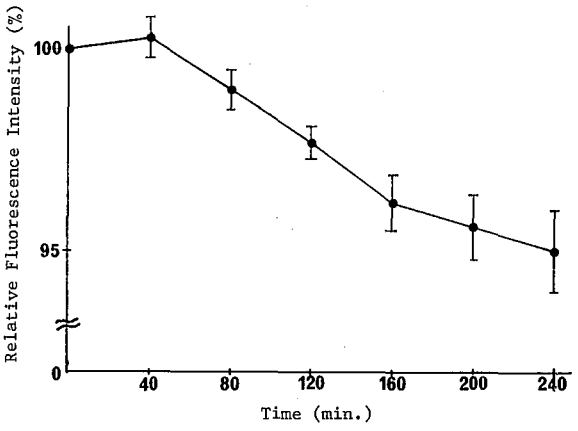


Fig. 1. Stability of Tyramine-OPA Derivative in Ethyl Acetate
All results indicated are means±S. D. (n=3).

4 チラミン添加回収率

プロセスチーズ5 gに，7.6～30.4μgのチラミンを添加し，抽出，OPA-誘導体化等一連の操作を行い，その回収率を調べた結果を Table 1 に示す．7.6μg 添加では，

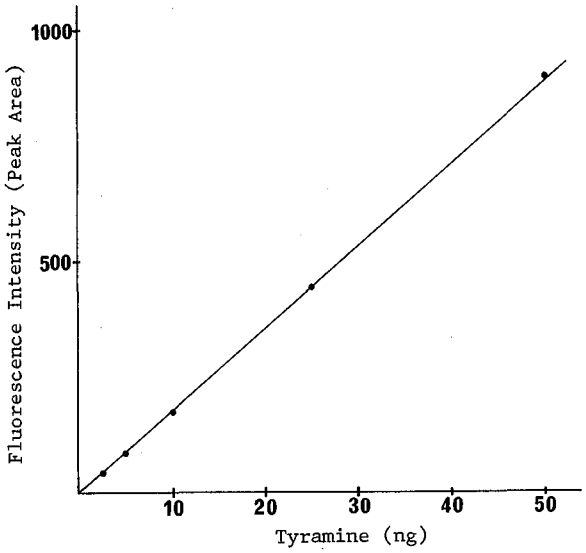


Fig. 2. Linearity of Detection for Tyramine Standard

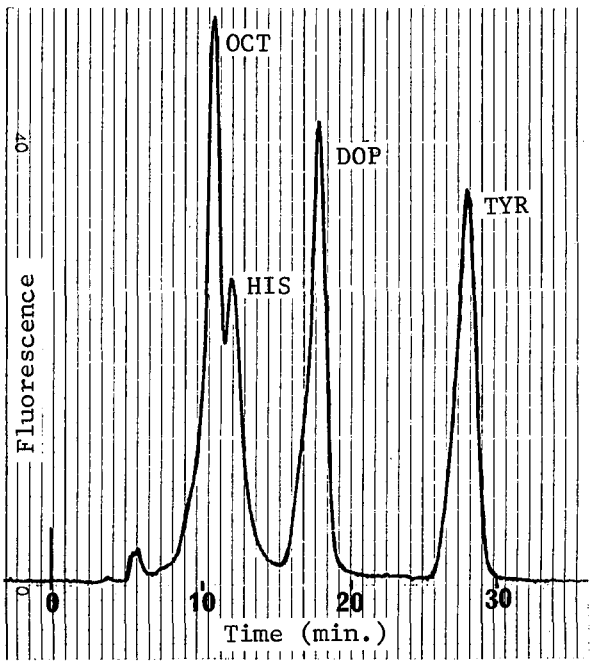


Fig. 3. HPLC Separation of Biogenic Amines
Peaks: OCT, Octopamine; HIS, Histamine; DOP, Dopamine; TYR, Tyramine

やや高い値が出たが，6回の試行すべての平均では，101.5%の回収率であった．

5 市販プロセスチーズ中のチラミン含量

Table 2 に市販プロセスチーズ(5メーカー，9銘柄)中のチラミン含量を示す．その量は，1.8～58.1μg/g と銘柄によって30倍を越す違いがみられた．なお，9銘柄すべての平均値は，22.7μg/g であった．

一般にチーズは，ナチュラルチーズ（エダム，エメンタール，チェダーなど）と，プロセスチーズに大別される．プロセスチーズは，ナチュラルチーズを数種混合し，加熱処理して作られるため，製品にむらが少なく，保存性が高いという利点がある．

ナチュラルチーズ中のチラミン含量については，各国で研究がなされている．Antila ら[5]は，フィンランド産のエダム，エメンタールを中心に分析を行い，エダムで平均7 μg/g，最高90μg/g，エメンタールで同じく218μg/g，726μg/g という結果を報告している．米国産チェダーでは，1,416μg/g という高濃度のものもある[4]．わが国では，福原ら[12]が，チェダーチーズで192.2～629.0μg/g という値を報告している．今回のプロセスチーズに関する著者らの結果は，上記よりも低い値であった．チーズ中のチラミンの生成は，微生物によるアミノ酸の脱炭酸作用に由来するところから，熟成をとめられたプロセスチーズの方が，ナチュラルチーズよりもチラミン含量は低くなる傾向があるのではないかと考えられる．

Horwitz ら[4]によるチラミンの血圧上昇作用に関する実験では，健常者に対し，チラミン250mg 経口一回投与では収縮期血圧は35mmHg 上昇し，MAO 阻害剤服用者では，同じく 6 mg 投与で40mmHg 上昇という結果を得

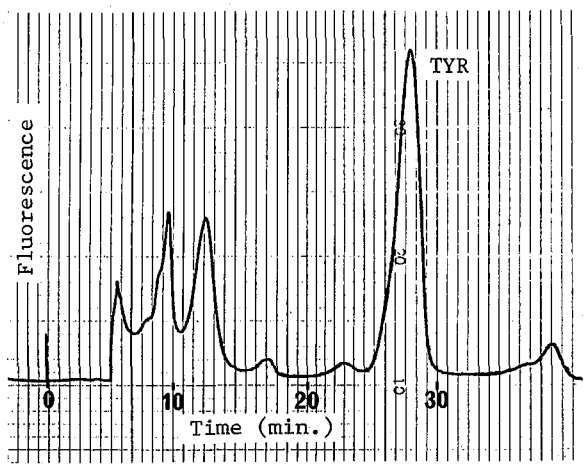


Fig. 4. HPLC Separation of Tyramine(TYR)in Processed Cheese

Table 1. Recovery Rate of Tyramine Added to Cheese Sample

Added (μg)	Found (μg)	Recovery Rate (%)
7.6	8.2	107.9
7.6	8.4	110.5
15.2	14.4	94.7
15.2	14.8	97.4
30.4	29.8	98.0
30.4	30.6	100.7

Table 2. Tyramine Content in Japanese Processed Cheese

Sample	Manufacturer	Tyramine (μg/g)
1	A	22.7
2	A	57.9
3	A	58.1
4	B	11.8
5	B	11.9
6	C	3.3
7	C	18.9
8	D	1.8
9	E	18.2

ている．今回のサンプルのうち，最高含量（58.1μg/g）のものでは，約100g摂食することで，チラミン摂取量は6 mgに達することになる．MAO阻害作用のある薬物は，抗うつ剤（antidepressants）として広く用いられているところから，それら薬剤の服用者では，食生活に充分な配慮が必要と思われる．

（本研究は昭和59年度当研究所調査研究課題「食品に含まれる微量生理活性物質に関する研究」として実施したものである．）

文　献

1) *J. Am. Med. Assoc.*, 186, 854, 1963
2) Blackwell, B.: *Lancet*, 2, 849, 1963
3) Asatoor, A.M., Levi, A.J. and Milne, M.D.: *Lancet*, 2, 733, 1963
4) Horwitz, D., Lovenberg, W., Engelman, K. and Sjoerdsma, A.: *J. Am. Med. Assoc.*, 188, 1108, 1964
5) Antila, P. and Antila, V.: *Milchwissenschaft*, 39, 81, 1984
6) Rivas Gonzalo, J.C., Garcia Moreno, C., Gomez Cerro, A. and Marine Font, A.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 62, 272, 1979
7) Jalon, M., Santos Buelga, C., Rivas Gonzalo, J.C. and Marine Font, A.: *J. Food Sci.*, 48, 545, 1983
8) Kenyhercz, T.M. and Kissinger, P.T.: *Phytochemistry*, 16, 1602, 1977
9) Santos Buelga, C., Nogales Alarcon, A. and Marine Font, A.: *J. Food Sci.*, 46, 1794, 1981
10) Yamamoto, S., Wakabayashi, S. and Makita, M.: *J. Agric. Food Chem.*, 28, 790, 1980
11) Davis, T.P., Gehrke, C.W., Gehrke JR, C.W., Cunningham, T.D., Kuo, K.D., Gerhardt, K.O., Johnson, H.D. and Williams, C.H.: *J. Chromatogr.*, 162, 293, 1979
12) 福原克治，石神由比子，勝村利恵子，伊東富晴，松木容彦，南原利夫：食衛誌，23, 384, 1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 240-244, 1985

一滴法を用いた原子吸光分析法および炎光光度法の食品への応用

山口直子*, 菊谷典久*, 井口正雄*,
友松俊夫*, 道口正雄*

Application of One-drop Method in Flame Atomic Absorption and Flame Emission Spectrophotometry to Determination of Elements in Foods

NAOKO YAMAGUCHI*, NORIHISA KIKUTANI*, MASAO IGUCHI*,
TOSHIO TOMOMATSU* and MASAO DOGUCHI*

One-drop method in flame atomic absorption and flame emission spectrophotometry was applied to determination of minerals (Na, K, Ca and Mg) in food. A drop of sample solution was taken into Teflon funnel with micro-pipet and nebulized into an apparatus. The measurements with smaller volume of the standard solution than that of conventional method were carried out rapidly with fairly good reproducibility and linearity of calibration curves. The contents of 4 kinds of minerals in 7 groups of food were measured by the present method with good accuracy.

One-drop method is simple, time-saving, precise and suitable for routine multielement analysis in various food.

Keywords : flame atomic absorption, flame emission, minerals, one-drop method

緒　言

食品中の金属元素は，生体機能あるいは種々の酵素反応に関与し，栄養学上，重要な役割を果たしている．しかし，多くの金属元素は人体にとってその摂取量により有害ともなり得るものであり，食事を通じて正しい栄養指導のもとに適量摂取されることが大切である．それには，食品に含まれる金属元素の量を正しく把握する必要があり，多数の食品あるいは食事献立中の金属元素を精度よく，迅速に定量する試験法が求められる．さらに近年，加工食品中の栄養成分の表示制度実施への動きがあり，特に塩分の過剰摂取防止の観点からナトリウムを中心に各成分の測定法の確立が急がれているところである．

現在，食品中の金属元素の定量分析には原子吸光分析法が多く用いられている．また特に食品中のナトリウム，カリウムについては，比較的大量に存在しているので従来から主として炎光光度法が用いられている．両法とも感度はよく，比較的前処理も簡単であるが，1回の注入に1～2 m*l*を噴霧する必要があり，その都度ベースラインの安定を待たなければならないため，測定に約1分ほど要する．これにより，多数の検体を処理する場合，多くの試料溶液と時間を要することになる．

これらの難点を改良する方法として，少ない試料溶液を用いた原子吸光分析法は，1973年，Sebastianiら[1]により，はじめて報告された．その後，検討が加えられて[2-10]，わが国でもこの方法は，内田ら[11]により"一滴法"と名づけられた．そこで今回，著者らは，一滴法による原子吸光分析法および炎光光度法を用いて，この一滴法を複雑な食品のマトリックスにおいて応用することを検討し，食品中の主要元素として，ナトリウム，カリウム，マグネシウム，カルシウム(以下それぞれNa, K, Mg, Caと略す)の分析を行い，良好な結果を得たので報告する．

実験方法

1　**試薬**　Na, K, Mg, Caの各金属標準液および塩化ランタン10%溶液は和光純薬製の原子吸光分析用を用いた．また，塩酸は和光純薬製の精密分析用，水は再蒸留

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

水を用いた.

2 装置 原子吸光一炎光共用分光分析装置：Nippon－Jarrel Ash AA845型，原子吸光用ランプ：浜松ホトニクス製ホローカソードランプL733.

3 試料 マーケットバスケット方式により集めた食品を下記の主要な7つの食品群に分類し，各々を均一に混合した.なお混合比は，昭和57年国民栄養調査成績[12]記載の関東地区の食品群別摂取状況に準じた.

1．穀類 米，小麦およびその加工品
2．菓子類 カステラ，ケーキ，せんべい，チョコレート，その他
3．油脂類 植物油，バター，マーガリン，その他
4．豆類 豆腐，みそ，その他
5．魚介類 生魚，魚肉ねり製品，その他
6．肉類 獣鳥肉およびその加工品
7．乳類 牛乳およびその加工品

4 試料の調製 各食品の可食部を家庭用ミキサーで適宜水を加えて食品群別に均一とした後，その約10～20gをビーカーにとり，衛生試験法[13]の乾式灰化法に準じて灰化した.得られた灰分を1％塩酸により定容して試料検液とした.なお，Caの測定については他元素の干渉防止のため塩化ランタンを1％となるように添加した.

5 測定 従来の原子吸光分析法あるいは炎光光度法において行われている溶液の連続噴霧(以下従来法と略す)は，テフロン製キャピラリーの先端を溶液中に入れ，吸入させて行った.一滴法による噴霧は，Fig. 1に示したように，原子吸光分析装置のキャピラリー接続部分にテフロン製ろうとを直結し，この中にマイクロピペットを用いて溶液を注入した.また，測定値への影響を考えて，測定の後に少量の水を噴霧してろうとの洗浄を行った.測定条件は次のとおりである.

アセチレン流量：1.8l/min，空気流量：8.0l/min，ランプ点燈電流：10mA，試料溶液吸入速度：約3.8ml/min，測定波長は，Na：589.0nm，K：766.5nm，Mg：285.2nm，Ca：422.7nm.

また，原子吸光分析法における吸光度および炎光光度法における発光の強度の測定は，チャート上にあらわれ

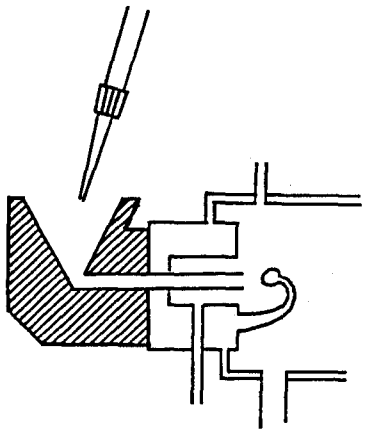


Fig. 1. Cross Section of Small Teflon Funnel Mounted on Burner

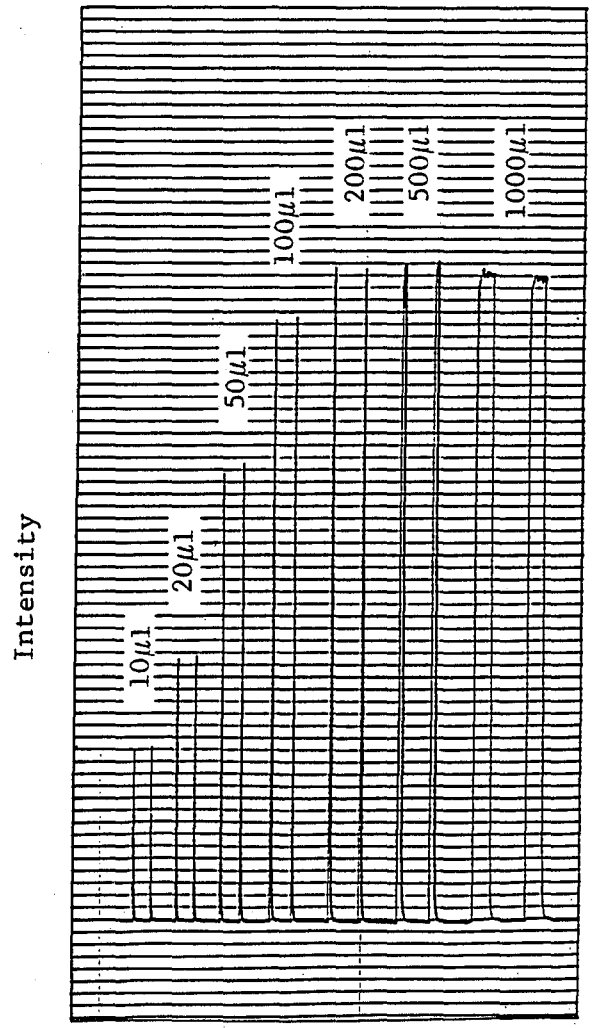


Fig. 2. Signals with Various Sample Volumes of 5ppm Na in Flame Emission spectrophotometry

るピーク高さによった．

結果および考察

1　注入液量とピーク高さとの関係　5 ppm の Na 標準液を液量を変えて注入し，炎光光度法により測定した結果を Fig. 2 に示した．液量が少ない場合 (20～200μl) は，ピークの形状はスパイク状となり，溶液の増加にともないピーク高さは高くなったが，200μl 以上ではピークの高さは変わらずに，巾のみが増加した．液量が少ない場合は瞬間的に噴霧が終了し，装置（記録計も含む）の応答速度が関与して記録計のペン先が追いつかないため，ピーク高さが低くなったものと思われる．

原子吸光分析法および炎光光度法において，同様に注入液量を変えて測定し，注入液量とピーク高さとの関係を Fig. 3 に示した．両法とも200μl でほぼ最大ピーク高さに達し，200μl 以上の液量で測定した場合は，従来法による場合と変わらないピーク高さが得られた．なお測定間隔は10秒以下で行うことも可能であった．通常，炎光光度法で測定されているKについても同様に実験を行ったところ，Naと同じくほぼ 200μlで最大ピーク高さに達した．

次に注入液量を変えて検量線を作成し，Fig. 4，Fig. 5 に示した．Fig. 4 は炎光光度法でKを測定したものであるが，液量が最大ピーク高さを与える量でなくても，ほぼ直線性を示した．これはKを原子吸光分析法で測定した結果とも一致した．Fig. 5 は Mg を原子吸光分析法で測定したものである．従来法によれば 4 ppm 付近で，すでに検量線はわん曲したが，10～20μl までの注入液量で測定すると，8 ppm までほぼ直線性を保った．

200μl の液量を用いた場合，炎光光度法で，Na は 0 －2 ppm，Kは 0 －10ppm，原子吸光分析法で，Mg は 0 － 2 ppm，Ca は 0 －100ppm の範囲で直線性を示した．

2　注入液量とピーク高さの再現性　5 ppm のK標準液を炎光光度法を用いて液量を変え，各10回測定した結果を Table 1 に示した．注入液量が増加するのにともない変動係数は小さくなり，100μl 以上では１％以下という結果が得られた．再現性をよくするには，少なくとも，ろうとに少々とどまるくらいの液量と吸入速度を考慮する必要があると思われる．

以上の実験の結果から，実試料の測定にあたっては，

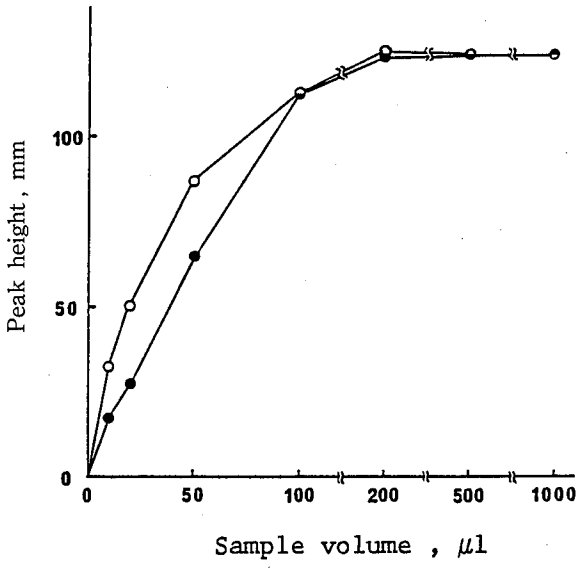


Fig. 3. Relation between Peak Height and Sample Volume of 5ppm Na in Flame Atomic Absorption (●—●) and Flame Emission (○—○) Spectrophotometry

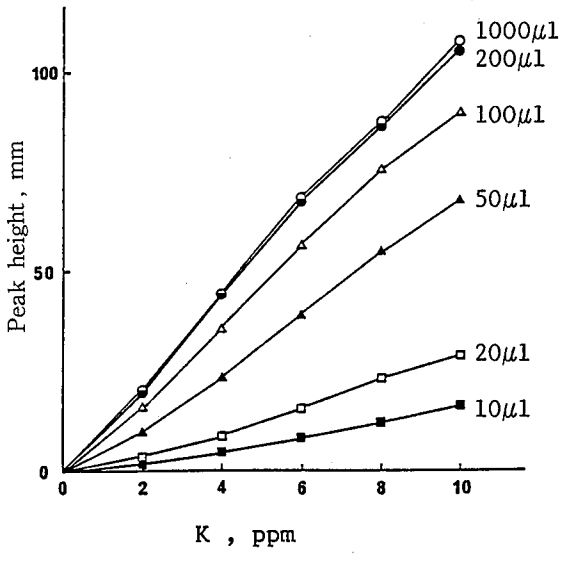


Fig. 4. Calibration Curves of K for Various Sample Volumes in Flame Emission Spectrophotometry

Na, Kについては炎光光度法, またMg, Caについては原子吸光分析法により, 200μlの試料溶液を注入することとした. なお, 特にMgについては20μlの試料溶液を用いたときの測定も行った.

3 従来法と一滴法による測定値の比較と添加回収試験

同じ試料を従来法と一滴法とを用いて測定した結果を比較するため, 7つの食品群の試料溶液を両法を用いて測定した. Fig. 6は, Naを測定した結果を比較したものであるが, いずれの方法で測定しても変わらない結果が得られた(t_R<0.05%). そこでこの7群の各試料溶液に, 既知量の4元素(Na, K, Mg, Ca)を加え, 測定を行った結果がTable 2である. 測定は従来法で3回, 一滴法で5回くりかえし行った結果の平均値であるが, 従来法では平均102.7%, 一滴法では平均102.1%の回収率が得られた. また, Mgにおいては20μlの試料溶液を用いたにもかかわらず, 良い回収率が得られた. これによって, 従来法では検量線のわん曲により測定濃度範囲が, 0—2 ppm程度に限られていたが0—8 ppmまで利用できた.

まとめ

一滴法を用いたCa, Mgの原子吸光分析法およびNa, Kの炎光光度法は, 感度も良く, 従来法に比べて, 約1/5～1/10と, はるかに短時間で測定することが可能であった. また, Mgについては, 従来よりも測定濃度範囲を広げることもできた. さらに実際の複雑なマトリックスを含む食品群に応用し, 添加回収試験を行ったところ, 平均102.1%と従来法と変わらない回収率が得られた. 以上の結果から, 一滴法は食品中のこれらの金属元素の定量分析において多数の試料を迅速に測定する場合にも非常に有効な方法であることが判明した.

Table 1 Reproducibility for Various Sample Volumes K : 5ppm (n =10)

volumes (μl)	peak height mean±S.D.(mm)	c.v.(%)
10	20.3±0.7	3.3
20	37.6±1.0	2.7
50	80.1±1.3	1.6
100	113.4±1.0	0.9
200	124.7±0.6	0.5
1,000	126.6±0.5	0.4

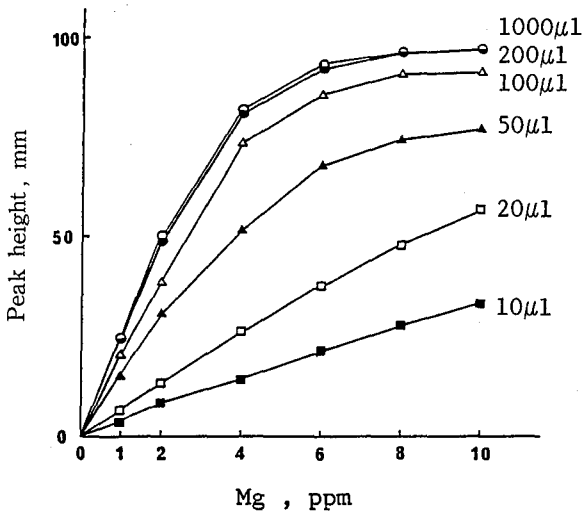


Fig. 5. Calibration Curves of Mg for Various Sample Volumes in Flame Atomic Absorption Spectrophotometry

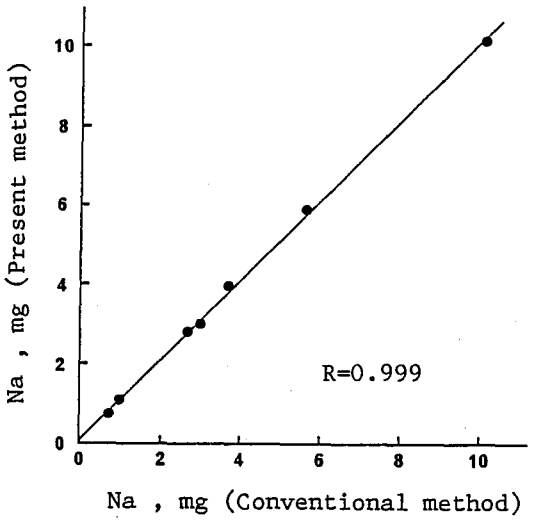


Fig. 6. Correlation Between Present (200μl) and Conventional Method (n= 5)
R : Coefficient of Correlation

Table 2. Recovery of Minerals added to Samples.

samples		found	added	total found	recovery	found	added	total found	recovery
		mg Na／100g			%	mg k／100g			%
1	①	76.7	70	144.0	98.2	130.6	100	231.5	100.4
	②	77.2	70	149.8	101.8	135.7	100	242.6	102.9
2	①	300.6	200	557.2	111.3	194.3	200	391.8	99.4
	②	296.1	200	498.3	100.4	212.5	200	443.0	107.4
3	①	368.1	200	647.5	114.0	9.5	8	18.3	104.6
	②	400.6	200	603.4	100.5	9.5	8	18.5	105.7
4	①	1090.4	500	1612.8	101.4	306.8	200	524.3	103.5
	②	1090.0	500	1601.4	100.7	314.6	200	521.5	101.3
5	①	564.2	300	869.8	100.6	219.6	200	415.5	99.0
	②	590.6	300	895.4	100.5	220.1	200	415.9	99.0
6	①	271.9	200	496.6	105.2	188.0	150	342.9	101.4
	②	288.8	200	490.3	100.3	181.8	150	318.9	96.1
7	①	101.0	50	157.7	104.4	120.5	100	213.5	96.8
	②	109.2	50	151.8	95.4	132.8	100	223.6	96.0

samples		found	added	total found	recovery
		mg Ca／100g			%
1	①	7.4	5	12.2	98.4
	②	7.4	5	13.2	106.5
2	①	69.0	30	98.1	99.1
	②	69.6	30	101.2	101.6
3	①	8.9	5	14.2	102.2
	②	9.2	5	14.6	102.8
4	①	76.8	50	129.5	102.1
	②	83.1	50	139.9	105.1
5	①	39.4	30	68.3	98.4
	②	39.6	30	74.2	106.6
6	①	25.8	20	47.5	103.7
	②	29.4	20	51.9	105.1
7	①	117.3	50	163.4	97.7
	②	135.6	50	173.0	93.2

① Conventional Method (n= 3)
② Present Method: 200μl (n= 5)
③ Present Method: 20μl (n= 5)

samples		found	added	total found	recovery
		mg Mg／100g			%
1	①	8.1	3	11.4	102.7
	②	7.4	3	10.3	99.0
	③	7.3	3	10.3	100.0
2	①	37.7	30	72.5	107.1
	②	36.9	30	72.5	107.1
	③	34.9	30	67.0	103.2
3	①	1.4	1	2.5	104.2
	②	1.4	1	2.5	104.2
	③	1.4	1	2.5	104.2
4	①	69.6	50	125.2	104.8
	②	69.9	50	127.2	106.1
	③	65.3	50	126.2	109.5
5	①	33.3	30	65.2	103.0
	②	33.3	30	65.9	104.1
	③	35.0	30	63.9	98.3
6	①	18.7	10	30.6	106.6
	②	19.2	10	30.4	104.1
	③	19.2	10	29.5	101.0
7	①	11.1	5	17.0	105.6
	②	11.6	5	17.0	102.5
	③	11.2	5	16.2	100.0

文　献

1) Sebastiani, E. Ohls, K. Riemer, G.: *Fresenius Z. Anal. Chim.*, **264**, 105, 1973
2) 戸田昭三, 不破敬一郎, Vallee, B.L.: 第30回日本化学会春季年会講演要旨集, 883, 1974
3) Manning, D.C.: *At. Abs. Newslett.*, **14**, 99, 1975
4) Berndt, H. Jackwerth, E.: *Spectrochim. Acta*, **30B**, 169, 1975
5) Jackwerth, H.: *Anal. Chim. Acta*, **74**, 299, 1975
6) Thompson, K.G. Godden, R.G.: *Analyst*, **101**, 96, 174, 1976
7) Berndt, H. Jackwerth, E.: *At, Abs, Newslett.*, **15**, 109, 1976
8) Eagle, G.A. Orren, M.J.: *ibid.*, **16**, 151, 1977
9) Goulden, P.D.: *ibid.*, **16**, 121, 1977
10) Ramelow, G.J. Balkas, T.I.: *Anal. lett.*, **10**, 733, 1977
11) 内田哲男, 小島　功, 飯田忠三: 分析化学, **27**, T44, 1978
12) 厚生省公衆衛生局栄養課編: 昭和59年版国民栄養の現状, 88, 1984, 第一出版株式会社
13) 日本薬学会編: 衛生試験法注解, 1984, 金原出版株式会社

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 245-250, 1985

市販食品における天然色素の使用実態調査

荻原　勉*, 天川映子*, 平田恵子*, 野沢竹志*,
大西和夫*, 坂井千三*

Survey of Natural Dyes in Commercial Foods

TSUTOMU OGIWARA*, EIKO AMAKAWA*, KEIKO HIRATA*, TAKESHI NOZAWA*,
KAZUO OHNISHI* and SENZO SAKAI*

Keywords：水溶性天然色素 water soluble natural dyes, 油溶性天然色素 water insoluble natural dyes, 加工食品 processed food

緒　言

食品の着色料として古くから天然色素が用いられていたが，比較的安価で，色彩も美しく，かつ色調が安定な酸性タール色素の開発に伴い，天然色素の使用頻度が少なくなった．しかし，いくつかの酸性タール色素は肝臓あるいは腎臓に毒性を示すことが明らかにされ，食品衛生法で不許可となったことから，消費者は酸性タール色素全体の安全性に対する疑義を抱きその使用を忌避する傾向が出て来た．反面，天然色素は天然という言葉から受ける安心感から消費者に好まれ，再び広く食品の着色料として使用される傾向が認められる．

食品の添加物として用いられる天然色素は主として植物あるいは昆虫の抽出物をそのまま使用しているため，その成分は単一でなく，その多くは成分が不明である．天然色素のうちラッカイン酸，カプサンチン，カルミン酸，クロシン等はゾウリムシに対し毒性を示し[1]，また，サフラワーエロー及びエルダベリー等はサルモネラに対して突然変異原性を示す[2]報告もあり，天然色素であればすべて安全であるとの保障はない．

食品添加物として使用されている天然色素の実態調査は非常に少なく[3,4]，また，同色素の良好な分析法も確立されていない．

そこで，著者らはまず食品中の天然色素の分析法を検討し，水溶性及び油溶性天然色素[5-7]の分析法を確立し，報告してきた．

今回は更に，著者らが確立した分析法を応用して，市販食品における天然色素の使用実態調査を行ったので，その結果を報告する．

実験方法

1．試料

試料は昭和56年4月から昭和59年12月の間に都内において市販されていた加工食品で，外観上何らかの色が認められ，かつ，主として合成着色料添加等の表示のない合計303件を対象とした．なお，試料は便宜上次に示す6群に大別して実験に供した．

1)	菓　子	81検体
2)	清涼飲料水	29検体
3)	食肉及び魚介加工品	94検体
4)	穀類・豆類及び野菜加工品	49検体
5)	油脂類・乳製品及び卵加工品	38検体
6)	調味料及び香辛料	12検体

2．試薬及び装置

いずれも前報[5-7]に従った．なお，カロチン類の標準色素としてβカロチンを用いた．

3．分析方法

試料調製については，かまぼこの場合は平田ら[6]の方法に従い，その他は前報[5,7]に準じた．すなわち，試料の着色の程度により，5～25gを秤取し，液体試料はそのまま，固体試料は細切し，水・エタノール（1：1）混液50mlを加えてホモジナイズした後，1N酢酸及び0.5Nアンモニア水を用いて，pH 6～7に調整した．更にエーテル50mlを加えて振とう後有機層及び水層をそれぞれ分取し，有機層は高速液体クロマトグラフィー[7]で，水層は薄層クロマトグラフィー[5]により分析した．なお，カロ

* 東京都立衛生研究所多摩支所　190　東京都立川市紫崎町3—16—25
* Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 16—25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan

チン類のうちβカロチンのみが食品添加物として許可されている．しかし，天然にはα，β，γ，δが存在し，これらカロチン類の相互分離が本報の分析条件では困難なため，食品から検出された場合，食品添加物として加えたものか成分として食品に存在するのか判別が出来ない．従って，以後は一括してカロチンとして扱うこととした．

結果及び考察

1．菓　子

菓子の天然色素の検査結果を表1に示した．赤色のあめ8検体を検査したところ6件からアントシアン色素が検出された．他にラッカイン酸単独，ラッカイン酸及びリボフラビンの両色素が検出されたものがそれぞれ1件あった．一般にアントシアン色素はアルカリ性で暗藍色となり，不安定であるが，酸性では美しく，かつ安定な赤色を呈するため，あめには適した色素であると考える．

橙色のあめ16検体中9件からコチニールが検出された．また，4検体からラッカイン酸が検出された．ラッカイン酸は酸性で橙色，中性附近で赤色，アルカリ性で赤紫色を呈するためクエン酸等の酸味料を添加した比較的酸性の強いあめの色は橙色を示す．しかし，酸性で赤色を呈しているあめが1検体あった．これは，ラッカイン酸にミョウバンを添加すると酸性溶液中でも赤色を呈することから，ミョウバン等の色調安定剤[8]を併用していることが考えられる．

黄色のあめ10検体のうち，サフラワーエロー及びクロシンがそれぞれ5件から検出された．緑色のあめからは，検出報告例の少ない[4]クロシンブルーが検出された．

ゼリー及びゼリービーンス15検体中，8件からコチニールが，3件からラッカイン酸が検出された．ゼリーは，特に色のあざやかさと透明度を保つことが重要なため，比較的透明感があり，かつ安定なこれらの色素が選択されたと考える．

マシュマロ9検体のうち桃色の4検体からベタニンが，黄色の5検体からサフラワーエローが検出された．

揚げ菓子6検体中4件からパプリカ抽出色素が検出された．その他，1検体からクルクミンが，パプリカ抽出色素及びクルクミンの両色素を用いたものが1検体認められた．これらの色素は，いずれも油溶性であり熱に対して比較的安定[9]であることから今後使用が増加するものと考える．

その他の菓子では，クレープ，ラムネ菓子，チューインガムからリボフラビン（ビタミンB_2）が検出された．リボフラビンは，醱酵法あるいは合成法で製造されているが[10]，わが国では化学的合成品とみなされており，欧米では天然物として扱われている．今回の調査で検出され

表1．菓子からの天然色素検査結果

検体名	検体の色調	検体数	検出色素（検出検体数）
あめ	赤色	8	アントシアン色素(6)，ラッカイン酸(1)，ラッカイン酸＋リボフラビン(1)
	橙色	16	コチニール(9)，ラッカイン酸(4)，パプリカ抽出色素(3)
	黄色	10	サフラワーエロー(5)，クロシン(5)
	緑	1	クロシンブルー(1)
ゼリー	赤色	9	コチニール(8)，アントシアン色素＋コチニール(1)
	橙色	5	ラッカイン酸(3)，コチニール(1)，カロチン(1)
	黄色	1	リボフラビン(1)
マシュマロ	桃色	4	ベタニン(4)
	黄色	5	サフラワーエロー(5)
揚げ菓子	橙色	5	パプリカ抽出色素(4)，パプリカ抽出色素＋クルクミン(1)
	黄色	1	クルクミン(1)
氷菓	赤色	3	アントシアン色素(1)，ベタニン(1)，コチニール(1)
砂糖菓子	橙色	1	クルクミン＋アントシアン色素(1)
	黄色	2	クルクミン(2)
	緑色	1	クルクミン(1)
大福の皮	赤色	2	コチニール(2)
菓子パン	黄色	2	カロチン(2)
その他の菓子	赤色	2	コチニール(1)，ラッカイン酸(1)
	黄色	3	リボフラビン(3)

たリボフラビンは醗酵法で得られたものか否かは不明であるが，ここでは天然色素として扱うこととした．

2．清涼飲料水

清涼飲料水29検体についての検査結果を表2に示した．オレンジ飲料15検体中いずれからも天然色素が検出された．オレンジ飲料の色調は橙色から黄色であり，その液性は弱酸性である．そこで，コチニール，ラッカイン酸が酸性で橙色を呈することを利用して，これらの色素が多用されていると思われる．また，コチニールは橙色，サフラワーエローは黄色であるが，両者を併用し独特な色調を出しているものもみられた．イチゴ飲料は6検体中4件からアントシアン色素が，2検体からはコチニールが検出された．グレープ飲料2検体からはアントシアン色素が検出された．これはブドウ由来かあるいはブドウ果皮抽出物を添加したかいずれかであると考える．

これら飲料を色別に分類し，その検出色素をみると，赤色系の飲料11検体中6件からアントシアン色素が，4件からコチニールが検出された．橙色飲料の場合は13検体中カロチンが検出されたものが9件あり，その他コチニール，ラッカイン酸，サフラワーエローなどが併用あるいは単独で使用されていた．前述のごとく，清涼飲料水から油溶性のカロチンが検出された．このことは原料のかんきつ類由来も十分考えられるが，飲料をやや混濁させ果汁らしさを出すため，本色素を乳化剤等と併用したとも考えられる．

黄色系の飲料のうちオレンジ及びレモン飲料の5検体を検査したが検出された色素はすべてサフラワーエローであった．

3．食肉及び魚介加工品

食肉及び魚介加工品についての検査結果を表3に示した．94検体中79件に何らかの天然色素が使用されていた．この場合に使用されていた色素の種類は非常に限定されており，53検体にノルビキシンが，30検体にモナスカス色素が，12検体にパプリカ抽出色素が単独あるいは混合して添加されていた．

表2．清涼飲料水からの天然色素検査結果

検体名	検体の色調	検体数	検出色素（検出検体数）
オレンジ飲料	橙色	13	カロチン(5)，カロチン＋コチニール(4)，ラッカイン酸(3)，コチニール＋サフラワーエロー(1)
	黄色	2	サフラワーエロー(2)
イチゴ飲料	赤色	6	アントシアン色素(4)，コチニール(2)
グレープ飲料	赤色	2	アントシアン色素(2)
レモン飲料	黄色	3	サフラワーエロー(3)
その他の飲料	赤色	3	コチニール(2)，ラッカイン酸(1)

表3．食肉及び魚介加工品からの天然色素検査結果

検体名	検体の色調	検体数	検出色素（検出検体数）
豚肉のみそ漬け	橙色	6	パプリカ抽出色素(3)，ノルビキシン＋パプリカ抽出色素(1)
豚モツのみそ漬け	橙色	7	パプリカ抽出色素(4)，ノルビキシン＋パプリカ抽出色素(1)
ハム	橙色	5	ノルビキシン＋R－3(5)
ソーセージ	橙色	13	ノルビキシン＋R－3(13)
魚肉のみそ漬け	橙色	17	ノルビキシン(10)，ノルビキシン＋モナスカス色素(2)
	黄色	3	ノルビキシン(2)
イカのみそ漬け	橙色	6	ノルビキシン(3)，ノルビキシン＋パプリカ抽出色素(2)
マグロの生姜漬け	橙色	6	ノルビキシン＋モナスカス色素(3)，ノルビキシン(1)
カニ風かまぼこ	赤色	29	モナスカス色素(17)，モナスカス色素＋ノルビキシン＋ラッカイン酸(5)，モナスカス色素＋ノルビキシン(2)，ノルビキシン＋ラッカイン酸(2)，ノルビキシン＋R－3(1)
その他の魚介加工品	赤色	1	モナスカス色素(1)
	橙色	1	パプリカ抽出色素(1)

マグロ，イカ，豚肉等のみそ漬39検体中28件から天然色素が検出され，それらのうち21検体にノルビキシン，11検体にパプリカ抽出色素，2検体にモナスカス色素が単独あるいは併用されていた．なお，一部のみそ漬にとうがらしの細片が観察されたことから，みそ漬中のパプリカ抽出色素は添加されたものかあるいはトウガラシ由来であるかは不明である．

カニ風かまぼこの場合は供試した29検体のうちモナスカス色素のみ検出されたものが17件と極めて多く，その他ノルビキシン及びラッカイン酸も検出された．特にラッカイン酸は蛋白質と結合して暗紫色となるため，黄色のノルビキシンと混合させてカニ風の色に調整していることが判った．また，ソーセージ及びハムはいずれもノルビキシンと食用赤色3号により着色されており，これらの使用方法はおそらく天然色素で着色し色の調整に酸性タール色素を使用したものと考える．

4．穀類・豆類及び野菜加工品

穀類・豆類及び野菜加工品についての検査結果を表4に示した．中華めん33検体中7件からリボフラビンが，6件からクロシンが検出された．リボフラビンは鮮やかな黄色を呈し，ビタミンB_2として栄養強化の面もあり[11]，用いられていると考えられる．また，中華めんを製造する際に，かんすいを使用するため，めんのpHは8.5～9.5となる．その結果，アルカリ性において比較的安定で，染着性のよい性質[12]をそなえたクロシンが使用されているものと考える．

ソーメン3検体のうち橙色の2検体からモナスカス色素が，黄色の1検体からクロシンが検出された．

また，近年市販されるようになった冷凍食品あるいは半調理品のフライのころも部分からノルビキシンが検出された．本色素は油溶性色素であるにもかかわらず食用油にはほとんど溶解しない．また熱にも強く蛋白質とよく結合するため，ころも中の蛋白質に染着し，揚げ上がりのころもを美味そうな淡褐色にするなど種々の利点を有するため用いられたと考える．

5．油脂類・乳製品及び卵加工品

油脂類・乳製品及び卵加工品についての検査結果を表5に示した．バターの場合はその全例からカロチンが検出された．バターの色調は乳牛の飼料中のカロチノイド量の季節的変動によって影響されることが知られている[13]．従って，カロチンのバターへの添加は色調の補色を目的として使用されていることが推定される．

マーガリンからは，前述のバターの場合と同様にカロチンが高頻度に検出された．なお，マーガリンの原料と

表4．穀類・豆類及び野菜加工品からの天然色素検査結果

検体名	検体の色調	検体数	検出色素（検出検体数）
中華めん	黄色	33	リボフラビン(7)，クロシン(6)
ソーメン	橙色	2	モナスカス色素(2)
	黄色	1	クロシン(1)
フライの衣	橙色	3	ノルビキシン(3)
コーンカップ	橙色	3	ノルビキシン(3)
その他の穀類加工品	黄色	2	クロシン(2)
あん	紫色	2	コチニール(1)
タクアン	黄色	3	クロシン(3)

表5．油脂類・乳製品及び卵加工品からの天然色素検査結果

検体名	検体の色調	検体数	検出色素（検出検体数）
バター	黄色	8	カロチン(8)
マーガリン	黄色	13	カロチン(11)，クルクミン＋ビキシン(1)，ビキシン(1)
チーズ	黄色	7	カロチン(6)，ビキシン＋カロチン(1)
	橙色	1	ビキシン＋カロチン(1)
アイスクリーム	赤色	2	ラッカイン酸(1)，ベタニン(1)
	黄色	2	リボフラビン(2)
卵加工品	黄色	5	カロチン(5)

なる植物油脂にはカロチノイドが含まれていないので，人工的に着色しない場合の製品は白色である[14]．しかし，わが国において，マーガリンはバターの代用品として利用されるため，バターと同様の色が消費者に好まれることから，カロチンあるいはそれに類似の色素が添加されているものと考える．

チーズからもカロチンが高率に検出された．その使用目的は前述のバターの場合と同様と推定される．その他カロチンよりやや赤色の強いビキシンを使用し，特徴を出している銘柄もみられた．

アイスクリーム4検体中，淡黄色のアイスクリーム2件からリボフラビンを，イチゴ色アイスクリーム2件からベタニン及びラッカイン酸を検出した．ベタニンは，美しい赤色を呈するが，光及び熱に弱いため，低温で遮光され保存されるアイスクリーム，氷菓などに適していると考える．

卵加工品ではカロチンが高率に検出されたが，その由来は卵黄のカロチノイドによるものか，バターと同様に補色のために添加されたものかは不明である．

6．調味料及び香辛料

マヨネーズ4検体中いずれからもカロチンが検出された．これはおそらく主原料の卵黄由来と思われる．

ドレッシング6検体中5件からパプリカ抽出色素が検出された．これは，着色よりむしろ辛味を目的として加えられるトウガラシ抽出物によるものと考える．即席カレーは2検体中，いずれからも材料のウコンの主成分であるクルクミンが検出された．

7．食品群別による天然色素の検出状況

各食品群ごとに検出された色素をまとめて表6に示した．303検体について検査した結果267検体から14種類の総計302の色素が検出された．検出検体数と検出色素数の差は，2～3種の色素が1検体中で併用されていたことを示すものである．

菓子では11種の色素が検出され，コチニールが最も多く用いられていた．また，食肉加工品等では，ノルビキシン，モナスカス色素，パプリカ抽出色素及びラッカイン酸の4種類の色素のみが検出され，各食品群により，多用されている色素に特徴がみられた．

今回の調査において多く検出された色素は，水溶性色素では，コチニール，モナスカス色素，ラッカイン酸，クロシンであり，油溶性色素では，ノルビキシン，カロチン及びパプリカ抽出色素であった．

ま と め

天然色素の添加が予測される市販食品を対象として，その使用実態調査を行い次の結果を得た．

1．供試食品303検体中267検体からコチニール，モナスカス色素，ラッカイン酸，ノルビキシンなどの14種類の天然色素が検出された．

2．市販食品を6群に大別し，検出された天然色素の種類を検討した結果，各群により使用状況に特徴がみられた．特に菓子の場合は11種類と多くの色素が使用されており；それらは，単独で使用している例が多かった．

食肉及び魚介加工品では，4種類の限定された色素が使用され，かつそれらの併用，あるいは酸性タール色素との併用例が多く認められた．

3．添加物として食品に用いられている天然色素は，

表6．食品群別による天然色素の検出状況

食品群	検体数	検出検体数	検出色素数	水溶性天然色素									油溶性天然色素				
				ラッカイン酸	コチニール	アントシアン色素	モナスカス色素	ベタニン	クロシン	サフラワーエロー	リボフラビン	クロシンブルー	カロチン	ノルビキシン	パプリカ抽出色素	クルクミン	ビキシン
菓子	81	81	85	10	23	9		5	5	10	5	1	3		8	6	
清涼飲料水	29	29	34	4	9	6				6			9				
食肉及び魚介加工品	94	79	102	7			30							53	12		
穀類・豆類及び野菜加工品	49	28	28		1		2		12		7			6			
油脂類・乳製品及び卵加工品	38	38	41	1				1			2		32			1	4
調味料及び香辛料	12	12	12										5		5	2	
計	303	267	302	22	33	15	32	6	17	16	14	1	49	59	25	9	4

物理化学的性質も多種多様である．しかし，それらの性質が食品の着色に巧みに利用されていることが推察された．

4．すでに毒性があると報告されているラッカイン酸，コチニール等が，今回の調査では，種々の食品に使用されていることが判った．

今後，消費者の自然食指向や食品加工技術の開発にともない，天然色素の種類が更に増加し，より広範囲の食品加工に高頻度で使用されることは予測される．

従って，それらの天然色素の安全性確保のため，その基礎資料として，今後も継続して本色素の食品における使用実態を十分把握しておくことが必要であると考える．

（本研究は昭和59年度当研究所調査研究課題「食品中の天然色素の使用実態に関する研究」として実施したものである．

文　献

1）酒向史代，小林則子，矢部勝昌他：食衛誌，22, 209, 1981
2）安井陽子，武田信幸，逸見希子他：食衛誌，23, 86, 1982
3）桐ケ谷忠司，小林香代子，日高利夫他：横浜衛研年報，21，139，1982
4）桐ケ谷忠司，小林香代子，宝井辰紀他：横浜衛研年報，22，117，1983
5）荻原　勉，野沢竹志，平田恵子他：食衛誌，21, 207, 1980
6）平田恵子，荻原　勉，天川映子他：食衛誌，24, 1, 1983
7）天川映子，平田恵子，荻原　勉他：分析化学，33, 586, 1984
8）谷村顕雄，片山　脩，遠藤英美他：天然着色料ハンドブック，581，1979，光琳
9）谷村顕雄，片山　脩，遠藤英美他：天然着色料ハンドブック，583，1979，光琳
10）谷村顕雄，片山　脩，遠藤英美他：天然着色料ハンドブック，463，1979，光琳
11）谷村顕雄，片山　脩，遠藤英美他：天然着色料ハンドブック，468，1979，光琳
12）神蔵美枝子，加藤三郎，遠藤英美：天然食品添加物，93，1976，日本衛生技術研究会
13）谷村顕雄，片山　脩，遠藤英美他：天然着色料ハンドブック，193，1979，光琳
14）神蔵美枝子，加藤三郎，遠藤英美：天然食品添加物，83，1976，日本衛生技術研究会

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.*, 36, 251-262, 1985

肺胞マクロファージの貪食能と Superoxide Anion 産生能に及ぼす NO_2 の影響

鈴木孝人*, 池田真悟*, 加納堯子*, 溝口勲*

Effects of Nitrogen Dioxide on Alveolar Macrophage Phagocytosis and Superoxide Anion Production

TAKAHITO SUZUKI*, SHINGO IKEDA*, TAKAKO KANOH* and ISAO MIZOGUCHI*

Enhanced susceptibility to pulmonary infection has been demonstrated in animals exposed to nitrogen dioxide (NO_2). Mechanisms for this phenomenon have not been clarified yet. It, however, is suggested that the antibacterial activity of alveolar macrophages (AM) is reduced in these animals. In this report, we investigated the effect of NO_2 on the phagocytosis and superoxide anion (O_2^-) production by AM. Rats were exposed to 8 ppm of NO_2 for 7 days and 4 ppm of NO_2 for 10 days respectively. The phagocytic activity of AM was determined by taking yeast particles into the cells. The O_2^- production by AM was determined at rest during phagocytosis of zymosan particles and stimulation with phorbol myristate acetate (PMA, a non-phagocytic stimulus of O_2^- production).

The suppression of phagocytosis of AM was observed in cells from rats exposed to 8 ppm NO_2 for 5 and 7 days. The suppression was also shown in cells from 4 ppm NO_2-exposed rats for 7 days, and it returned to the control level at 10 days of exposure. There were remarkable decreases in O_2^- production by AM from 8 ppm NO_2-exposed rat at rest during zymosan phagocytosis and PMA stimulation on and after day 3. That by AM from 4 ppm NO_2- exposed rats at rest and during zymosan phagocytosis decreased on days 3, 5 and 10, but remained unchanged on day 7. O_2^- production by PMA-stimulated AM from 4 ppm NO_2-exposed rats decreased only on day 3.

These results suggest that such diminution in O_2^- production and phagocytosis by AM from NO_2-exposed rats potentially causes bacterial infections.

Keywords: nitrogen dioxide, rat, alveolar macrophage, phagocytosis, superoxide anion production

緒　　言

肺の感染防禦機構として主に2つのメカニズムが考えられており，1つは気道の線毛運動による除菌であり，他はマクロファージ（AM）による貪食，殺菌作用であることが知られている．Green ら[1,2]及び Rylander ら[3]は ^{32}P や ^{35}S などのアイソトープで標識した種々の細菌を用いて感染実験を行い，この2つのメカニズムについて検討した結果，AM が除菌作用の主役を演じており，細菌の線毛運動によるクリアランスは20%以下であることを報告している．AM が貪食作用を行う際，ライソゾーム酵素[4]と共に胞体中の貪食細菌を融解したり，また，直接に細菌に作用し，細菌に対し強力な殺菌作用を及ぼすこと[5,6]が知られている。一方，比較的高濃度の二酸化窒素（NO_2）に暴露後，細菌に感染させた動物が易感染状態になることは数多くの報告がある[7-17]。また，NO_2 暴露により線毛細胞の脱落[17]や線毛運動の低下[18]，AM の形態学的変化[19,20]，AM の貪食能の低下[11,21,22]及びインターフェロン産生能の低下[23]などが生じることが確認されて

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

いる。しかし，NO_2の暴露により易感染状態になるメカニズムとして，主にAMを中心とする食細胞の殺菌能の障害が示唆されているが[14,15]，その詳細については必ずしも明確にされていない．そこで，我々は8 ppmと4 ppm濃度のNO_2をラットに暴露し，AMの貪食能，superoxide anion (O_2^-) 産生能（殺菌能）及びAMの生存率に及ぼす影響を検討した結果，対照群と比較し，NO_2に暴露された動物に，これらのAMの機能低下を示す知見が得られたので報告する．

実験方法

(I) 動物の暴露

実験動物は7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（空気暴露，72匹）とNO_2暴露群（8 ±0.5ppm，32匹；4 ±0.5ppm，40匹）に分け，暴露は既報[24]の装置及び条件によって行った．暴露期間は8 ppmの場合は1，3，5及び7日間，また，4 ppmの場合は1，3，5，7及び10日間の連続暴露を行った．

(II) 検体の調製

気管支—肺胞洗浄液（BALF）の採取は経時的に各群8匹ずつのラットから既報[25]のごとく行った．得られたBALFは300×g，4℃で10分間遠心し，更に，2回生理食塩水で細胞を洗浄後，RPMI 1640培養液（GIBCO製）に再浮遊させ，その一部分を計算盤（Burker-Turk社製）を用いて細胞数をカウントした．

(III) 生存率の測定

AMの生存率はtrypane blue dye exclusion法で測定した．

(IV) 貪食能の測定

細胞の培養はLab-Tek tissue culture chamber／slides（8チャンバー，マイルス・三共K.K.）を用い，各チャンバーに4 ×10^4個の細胞を加え，更に総容量0.2 mlになるようにRPMI 1640を加えて，37℃で5 %CO_2培養器内にて60分間培養した．その後上清を除き，RPMI 1640にて2回洗浄後得られた粘着細胞の貪食能を測定した．すなわち，あらかじめ100℃で30分間滅菌処理をした酵母溶液（和光純薬製，1.66×10^7個／mlRPMI 1640）の0.1mlとRPMI 1640の0.1mlを各チャンバーに加え，37℃で5 %CO_2培養器内で30分間培養後，貪食されていない過剰な酵母粒子をRPMI 1640での洗浄によって除き，スライドに粘着した細胞をGiemsa染色した．光学顕微鏡下で少くとも1個の酵母粒子を粘着細胞中に有するものを貪食陽性細胞とし，200個の細胞について観察し貪食率（Index, %）を求めた．また，貪食陽性粘着細胞の中で貪食現象の程度を比較するために，酵母粒子を1個貪食している細胞をscore 1，2個のものをscore 2，3個のものをscore 3，4個のものをscore 4，5個のものをscore 5，6個以上のものをscore 6とし，これらを合計してtotal scoreを算定した．

(V) O_2^-産生能の測定

Lab-Tek tissue culture chamber／slides（4チャンバー）の各チャンバーに7 ×10^5個の細胞を加え，総容量0.5mlのRPMI 1640中で37℃，30分間，5 %CO_2培養器内で培養後，上清を除き，フェノールレッドを含有していないHanks' Balanced Salt Soln.（HBSS, GIBCO製）で粘着細胞を2回洗浄後，Johnstonら[26]の方法に準じて，粘着細胞のO_2^-産生能を測定した．すなわち，細胞の休止状態でのO_2^-産生能の測定は，各チャンバーに80 μMのferricytochrome C（Cyt.C, Sigma製）を含有するHBSS溶液を1ml加えて37℃で90分間培養後，その上清部分を550nmで比色した．また，Zymosan（Sigma製）を貪食時のO_2^-産生能はCyt. Cと Zymosan溶液（7.8×10^6個／チャンバー）を加えて培養後，上清をすみやかにマイクロチューブに取り，氷水中に入れ反応を停止後，8000×gで約2分間遠心し過剰なZymosanを沈殿させ，その上清を同様に比色した．なお，ブランクとして，総容量1 mlのHBSS溶液中に150μgのsuperoxide dismutase（SOD, Sigma製）を加え，あらかじめ細胞の内外にあるO_2^-をH_2O_2に変化させ，これらのO_2^-とCyt. Cとの反応を阻止した．次に，この溶液にCyt. Cを加えて培養し，その比色値をそれぞれのブランク値として差し引いた．なおO_2^-産生能は培養中に産生されるO_2^-がCyt. C (Fe^{3+}) をCyt. C (Fe^{2+}) に還元するため，還元されたCyt. C (Fe^{3+}) の10^6個細胞あたり及び1時間培養あたりのnanomole数として示した．また，還元されたCyt. Cの濃度は$\triangle E_{550nm}=2.11\times10^4 M^{-1} cm^{-1}$の方程式によって計算した[27]。更に，細胞膜刺激剤であるphorbol myristate acetate（PMA, Sigma製）で細胞を刺激した時のO_2^-産生能は，Cyt.Cと各チャンバー濃度が1.5μgになるようにPMA／dimethylsulfoxide（DMSO, Sigma製）溶液を添加して培養し，その上清を比色した．なお，DMSOには若干細胞毒性が認められたので，ブランクとして，SOD及び同容量のDMSOを加え培養したものをPMA刺激時におけるブランク値とした．

(VI) AM，リンパ球及び好中球の染色

BALF中の細胞にはAMのみならず少数のリンパ球及び好中球が存在している．また，これらの細胞も貪食

能やO_2^-産生能を有しているため,測定値に影響を与えることが考えられるので,O_2^-産生能の比色測定後の粘着細胞中のリンパ球,好中球及びAMを染色した.すなわち,Yamら[28]のChloroacetate EsteraseとNonspecific Esteraseを染める二重染色法と伊東ら[29]のAcid α—Naphtyl Acetate Esterase染色法を用いて染色し,光学顕微鏡にてAM,リンパ球及び好中球が粘着細胞中に占める割合を観察した.

実験結果

結果を表1に示した.図1～図6には表1に示した各対照群を100とした場合の%変化の値を示した.

(I) BALF中の細胞数と細胞生存率の変化

表1及び図1と図2に示すごとく,BALFのm*l*あたりの細胞数は8 ppmNO_2暴露群では3日目から対照群に比べて有意な増加が認められ,4 ppmNO_2暴露群では3,5及び10日目に有意な増加が認められた.また,生存率の変化は8及び4 ppmのNO_2暴露群で暴露期間中有意な低下が認められた.

(II) 貪食能の変化

8 ppmNO_2暴露群では5日目と7日目に貪食能のIndex及びScoreの双方において有意な低下が認められたが,4 ppmNO_2暴露群では7日目のみに,Index及びScoreの双方に有意な低下が認められた(表1,図3,図4).

(III) O_2^-産生能の変化

表1及び図5と図6に示すように,8 ppmNO_2暴露群のO_2^-産生能は3日目から休止時,Zymosan貪食時及びPMA刺激時のいずれの場合にも著しい低下が認められ,特に休止時における低下は暴露開始後1日目からも認められた.また,4 ppmNO_2暴露群では,休止時での変化は3,5及び10日目に有意に低下するが,7日目では有意な差は認められなかった.また,Zymosan貪食時の変化は休止時における変化と相似した低下を示した.しかし,PMA刺激時の変化は3日目のみ有意な低下を示した.

(IV) 粘着細胞の染色分類結果

スライドに粘着した細胞の染色状態を図7,図8に示した.二重染色法ではAMは赤褐色に染まり,好中球は青色に染色されている.Acid α-Naphthyl Acetate Esterase染色法ではAMは細胞質全体がびまん性に赤褐色に染色され,リンパ球は赤褐色の1個のスポットまたは数個のスポットを形成していた.スライドあたり200個の細胞について分類を行ったが,ガラス面に付着残存した細胞の99%以上はAMであり,リンパ球及び好中球は1%以下にすぎなかった.

考察

NO_2暴露によってAMは破壊されるため,その代償作用として他の組織からAMが肺胞腔内に遊走してくるものと思われる.この現象を確認するため,BALF中の細胞数と生存率との相関関係を検討してみた.8 ppmNO_2暴露群における両者の相関係数(r)は-0.614($n=64$, $P<0.0001$),4 ppmNO_2暴露群での相関係数(r)は-0.571($n=80$, $P<0.0001$)を示し,負の有意な相関関係が認められた.また,図1と図2に示すように,BALF中の細胞数の変化も8 ppm暴露群では3日目以降の細胞数の増加が著しいが4 ppm暴露群の場合は3及び5日目には細胞数は増加するが,7日目以降は余り増加が認められなかった.これらの結果から,NO_2の濃度に依存してAMの破壊が進み,他組織からAMの遊走が促進されている可能性が考えられる.

AMなどの食細胞は細菌などの異物を貪食すると細胞内の代謝を亢進して,異物を分解処理することが知られている.しかし,NO_2はAMの貪食能を低下させることが予想されたので,AMによるO_2^-産生能を測定する際にはZymosan貪食時のO_2^-産生能の他に,休止時及び細胞膜を刺激し,O_2^-を産生させる刺激剤のPMAを休止時に加えて,この時のO_2^-産生能の変化も検討した.その結果,8 ppmNO_2暴露群のAMによるO_2^-産生能は休止時,PMA刺激時において著しい低下が認められた(図5).また,AMの貪食能は最高でも14%程度の低下(図3)を示したが,AMのZymosan貪食時のO_2^-産生能の低下は20～32%の低下を示した(図5).確かに,貪食能の低下はO_2^-産生の低下を伴うが,NO_2暴露によるAMのO_2^-産生能の著しい低下は単にAMの貪食能の低下に原因があるとは考えにくい.すなわち,休止時及びPMA刺激時のO_2^-産生能の低下,また,Zymosan貪食時では貪食能の低下以上にO_2^-産生能が抑制される結果からも,O_2^-産生の抑制がAMの貪食能の低下によるものと判断することは出来ない.また,4ppmNO_2暴露群でのO_2^-産生能は8 ppmNO_2暴露群に比べると,休止時,Zymosan貪食時及びPMA刺激時には全体にAMのO_2^-産生能へのNO_2の影響が減弱した結果が得られた(図6).そこで暴露期間中におけるZymosan貪食時のO_2^-産生能と酵母を用いた貪食能のtotal score値の相関関係を検討したところ,図9に示したごとく,O_2^-産生能と貪食能の間には有意な負の相関関係が認められた($P<0.003$).この結果から,NO_2暴露の影響でAMの貪食能が低下した場合,O_2^-産生能を含めた細胞内機能が代償的に亢進した可能

Table 1. Average Values on Alveolar Macrophage of Rats Exposed to Air or NO_2 for Various Days

	Exposure Term (day)		Cell Number/ ml BALF($\times 10^5$)	Viability (%)	Phagocytosis		O_2^- Produetion (n moles/10^6cells/hr)		
					Index (%)	Score	Resting	Zymosan	PMA
8 ppm Exposure Group	1	control	4.53±0.80	86.6±1.2	75.1±3.1	574± 63	10.13±1.70	16.73±0.75	13.10±1.34
		NO_2	4.19± 0.46	73.6±2.8	76.7±4.8	592± 98	8.58±1.12	16.95±0.63	14.98±1.88
	3	control	4.26±0.20	88.8±1.6	80.2±5.5	656±107	10.67±1.12	16.19±0.95	12.76±1.06
		NO_2	7.14±1.25	72.7±2.7	76.6±7.1	635±161	4.39±0.58	12.92±1.45	6.90±1.00
	5	control	4.30±0.73	88.7±0.9	81.7±9.3	726±148	8.91±3.04	14.53±2.78	10.99±3.37
		NO_2	7.95±1.10	75.0±1.4	71.8±8.5	565±116	2.93±1.26	9.85±2.20	6.38±1.53
	7	control	4.43±0.22	89.5±1.5	81.2±6.9	695±119	9.23±0.60	17.04±0.70	9.75±1.30
		NO_2	6.37±0.78	71.0±3.8	69.7±9.3	526±117	3.95±0.62	12.11±2.34	6.33±2.09
4 ppm Exposure Group	1	control	4.27±0.82	89.4±0.7	78.5±3.1	519± 35	11.01±1.07	16.01±1.44	15.03±1.57
		NO_2	4.86±1.20	79.8±1.9	80.6±5.4	498± 72	11.89±0.94	15.88±0.83	14.17±2.22
	3	control	3.46±0.30	86.5±1.7	77.4±7.5	565±138	10.91±0.95	16.06±1.39	12.30±0.81
		NO_2	6.26±1.08	77.5±1.2	79.6±5.9	651 ± 71	5.67±1.28	12.45±2.29	8.29±1.19
	5	control	3.97±0.53	88.8±1.4	77.2±5.6	551±114	9.75±1.14	15.01±1.10	10.71±1.99
		NO_2	5.70±1.27	77.1±1.2	76.3±7.8	536±114	7.00±1.81	12.91±0.77	11.12±2.00
	7	control	4.80±0.69	86.9±1:0	71.6±7.8	541±124	9.96±2.87	14.58±3.31	10.22±2.56
		NO_2	5.23±0.76	75.8±1.5	60.7±6.7	344±101	7.96±2.03	14.85±3.08	8.10±3.37
	10	control	4.69±0.36	89.1±1.2	73.6±6.8	505±103	8.12±2.11	13.02±2.25	10.03±1.77
		NO_2	5.77±0.96	76.0±1.6	73.4±9.4	426±103	5.43±1.65	10.44±1.40	9.17±1.84

All results are mean ±S. D. (n = 8) .Index of phagocytosis shows the percentages of positive cells in which one or more yeast particles are phagocytized, out of 200 cells tested. Score of phagocytosis is the cumulative number of yeast particle phagocytized by positive cells.

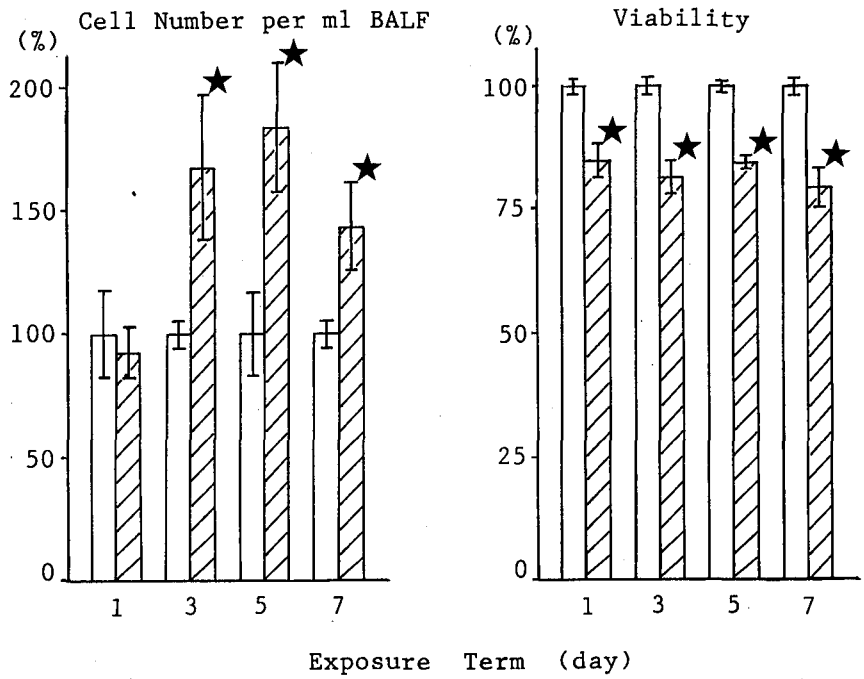


Fig. 1. Percent Changes of Cell Number per ml Broncho-Alveolar Lavage Fluid (BALF) and Viability on Alveolar Macrophages of Rats Exposed to 8 ppm NO_2 against Average Value of Control at Various Days

□ : Control, ▨ : NO_2, ★ : $P<0.001$

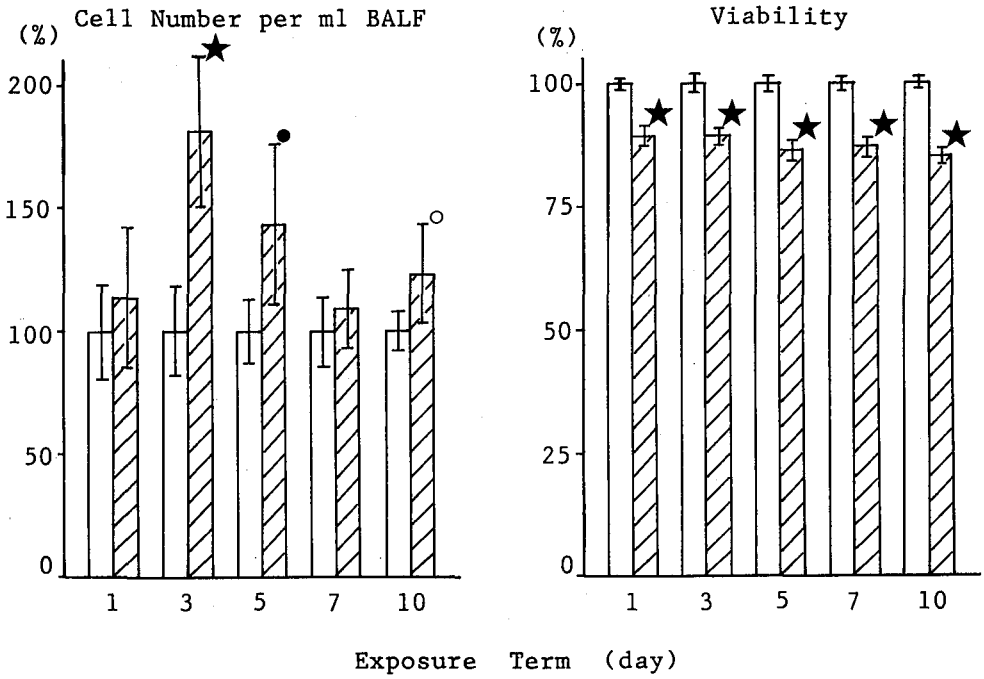


Fig. 2. Percent Changes of Cell Number per ml Broncho-Alveolar Lavage Fluid (BALF) and Viability on Alveolar Macrophages of Rats Exposed to 4 ppm NO_2 against Average Value of Control at Various Days

□ : Control, ▨ : NO_2, ○ : $P<0.02$, ● : $P<0.01$, ★ : $P<0.001$

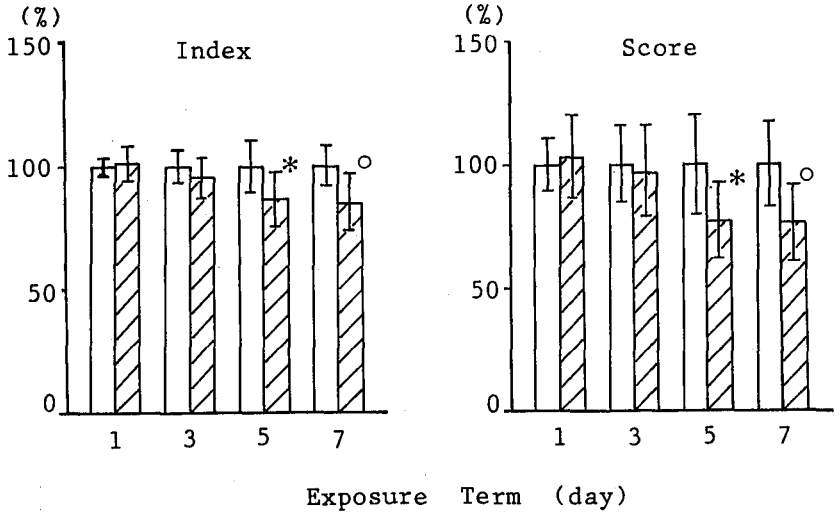


Fig. 3. Percent Changes of Phagocytosis on Alveolar Macrophages of Rats Exposed to 8 ppm NO_2 against Average Value of Control at Various Days
□ : Control, ▨ : NO_2, ＊ : $P<0.05$, ○ : $P<0.02$

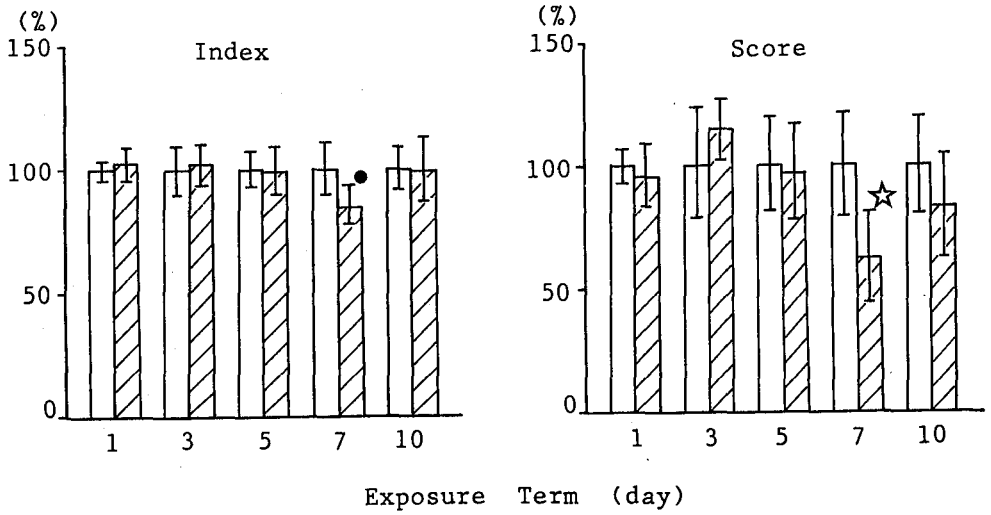


Fig. 4. Percent Changes of Phagocytosis on Alveolar Macrophages of Rats Exposed to 4 ppm NO_2 against Average Value of Control at Various Days
□ : Control, ▨ : NO_2, ● : $P<0.01$, ☆ : $P<0.005$

性が考えられた．すなわち，4 ppm 暴露では 7 日目のみに有意な貪食能の低下（図 4）が認められ，O_2^-産生能は 7 日目に対照レベルまで戻る現象が認められた（図 6）．また，島田ら[30]は喫煙者では AM の貪食能の低下に伴い，ある程度 AM の殺菌能を反映すると考えられている Nitroblue Tetrazolium（NBT）還元能が上昇し，貪食能と NBT 還元能の間には負の相関関係が認められることを報告している．しかし，8ppmNO_2暴露群では Zymosan 貪食時の O_2^-産生能と貪食能とは有意な相関関係は認められなかった．このことは，NO_2の AM に及ぼす影響として，8 ppmNO_2暴露群の場合は，4 ppmNO_2暴露に比べて，貪食能の低下を償う O_2^-産生能の代償的亢進が起こりにくかったものと思われる．尚，Goldstein ら[14,15]は17時間の NO_2暴露後に感染させたマウスの肺における殺菌能の低下は 7 ppm 以下の NO_2濃度では有意差が認められないことを報告している．NO_2の殺菌能

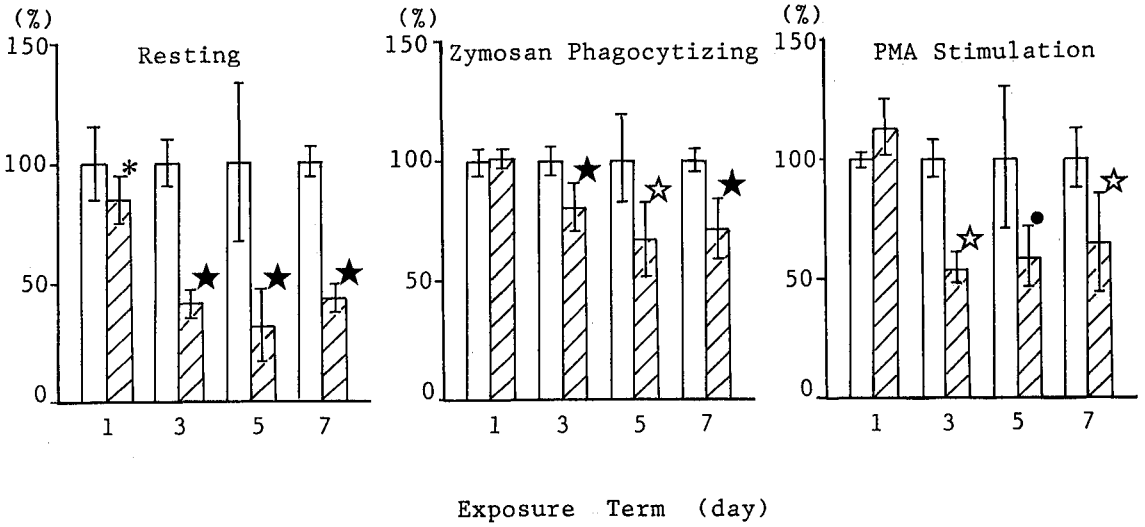


Fig. 5. Percent Changes of O_2^- Production on Alveolar Macrophages of Rats Exposed to 8 ppm NO_2 against Average Value of Control at Various Days
□ : Control, ▨ : NO_2, ＊ : $P<0.05$, ● : $P<0.01$, ☆ : $P<0.005$, ★ : $P<0.001$

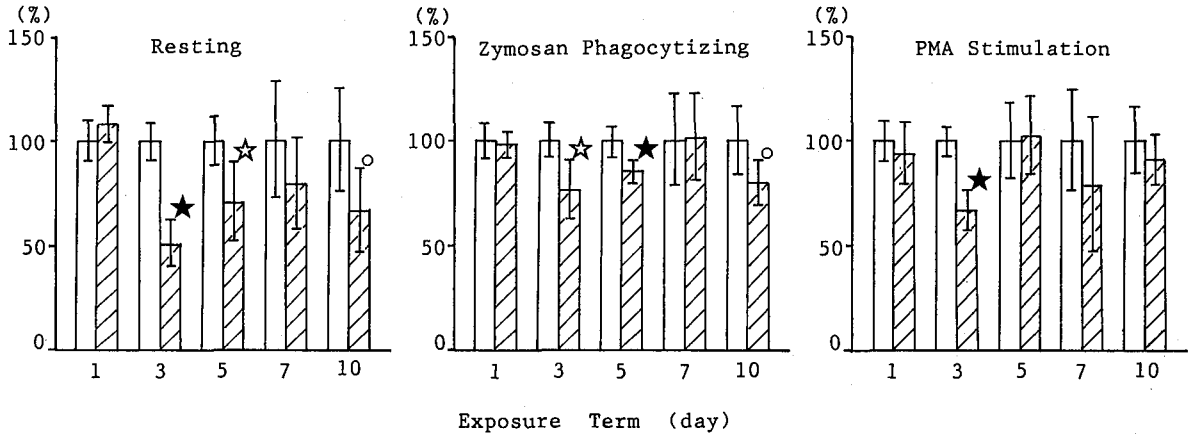


Fig. 6. Percent Changes of O_2^- Production on Alveolar Macrophages of Rats Exposed to 4 ppm NO_2 against Average Value of Control at Various Days
□ : Control, ▨ : NO_2, ○ : $P<0.02$, ☆ : $P<0.005$, ★ : $P<0.001$

の低下をもたらすメカニズムについては良く分っていない．しかし，NO_2が細胞膜に作用し過酸化脂質を作ること[31-33]，また，in vitro の実験ではあるが，その過酸化脂質と AM を培養して細菌を貪食させた場合，細菌の貪食率が著しく低下すること，更に，AM 中のグルコースからのCO_2産生能の低下及び解糖系のペントース回路の酵素活性の低下が生じることが報告されている[34]．一方，AM によるO_2^-産生は細胞膜にある NAD(P)H oxidase によって行われると考えられており，平井ら[35]は組織化学的な方法を用いて，ラットの AM 中の NAD(P)H oxidase は主に細胞膜の外面，細胞内の液胞には内腔面に存在することを確認している．上記の報告例から，NO_2が直接に，又は，暴露によって生じた過酸化脂質が解糖系に作用した場合には，NAD(P)H oxidase 活性に必須の補酵素 NADPH 又は NADH の産生が阻害されてO_2^-産生能の低下が生じるだろう．もう一つの可能性としては，AM 中に SOD が存在し[36]，また，SOD はO_2^-を$10^9 M^{-1}$ sec^{-1} の早さでH_2O_2に変換すること[37]も知られており，更に，NO_2の暴露によって肺中の SOD 活性が上昇することも報告されていること[38]から，NO_2の暴

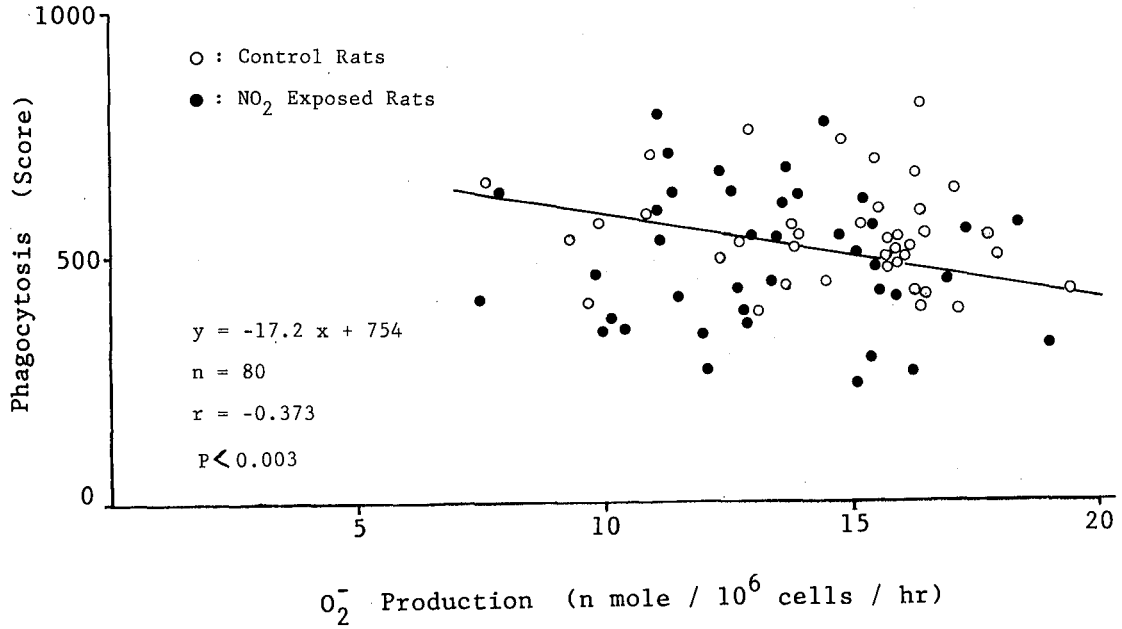


Fig. 9. Correlation between O_2^- Production and Phagocytosis on Alveolar Macrophages of Rats Exposed to 4 ppm NO_2

露によってAM中のSODも同様に活性化され，培養中に生じたO_2^-をすみやかにH_2O_2に変換させ，O_2^-の低下を招いたことも考えられる．それ故，AM中のNAD(P)H oxidase活性及びSOD活性に及ぼすNO_2の影響についても検討する必要があろう．最後に，4 ppm濃度のNO_2暴露でAMの生存率，貪食能及びO_2^-産生能の低下が認められたことから考えると，現在の労働衛生上で勧告されているNO_2濃度の5 ppmでは，易感染状態になり得る可能性が強いと思われる．

謝　辞　本研究にあたり有益な御助言を下さった順天堂大学医学部野沢龍嗣博士に深謝いたします．

（本研究は昭和59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

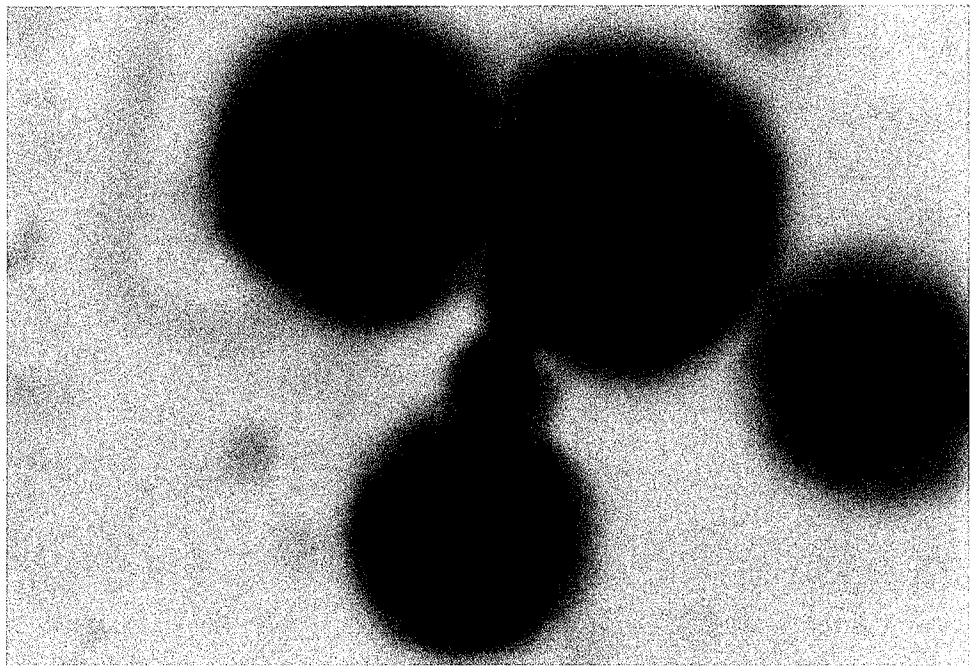
1) Green, G.M. and Kass, E.H.: *J. Exp. Med.* 119, 167, 1964
2) Green, G.M. and Goldstein, E.: *J. Lab. & Clin. Med.*, 68, 669, 1966
3) Rylander, R.: *Acta. Physiol. Scand.*, (*suupl.*), 306, 1, 1968
4) 高安正夫，荻野耕一，松永正人　他：日本臨床，25, 129, 1967
5) Murray, H.W. and Cohen, Z.A.: *J. Exp. Med.*, 150, 938, 1979
6) Murray, H.W., Juangbhanich, C.W., Nathan, C.F. et al.: *J. Exp. Med.*, 150, 950, 1979
7) Ehrlich, R. and Henry, M.C.: *Arch. Environ. Health*, 17, 860, 1968
8) Herry, M.C., Ehrlich, R. and Blair, W.H.: *Arch. Environ. Health*, 18, 580, 1969
9) Henry, M.C., Findlay, J., Spangler, J. et al.: *Arch. Environ. Health*, 20, 566, 1970
10) Buckley, R.D. and Loosli, C.G.: *Arch. Environ. Health*, 18, 588, 1969
11) Acton, J. D. and Myrvik, Q.N.: *Arch. Environ. Health*, 24, 48, 1972
12) Vassallo, C.L., Domm, B.M., Poe, R.H. et al.: *Arch. Environ. Health*, 26, 270, 1973
13) *Fenters, J.D., Findlay, J.C., Port, C.D. et al.: Arch. Environ. Health*, 27, 85, 1973
14) Goldstein, E., Eagle, M.C. and Hoeprich, P.D.: *Arch. Environ. Health*, 26, 202, 1973
15) Goldstein, E., Warshauer, D., Lippert, W. et al.: *Arch. Environ. Health*, 28, 85, 1974
16) Coffin, D.L., Gardner, D.E. and Blommer, E.J.: *Environ. Health Perspect.*, 13, 11, 1976

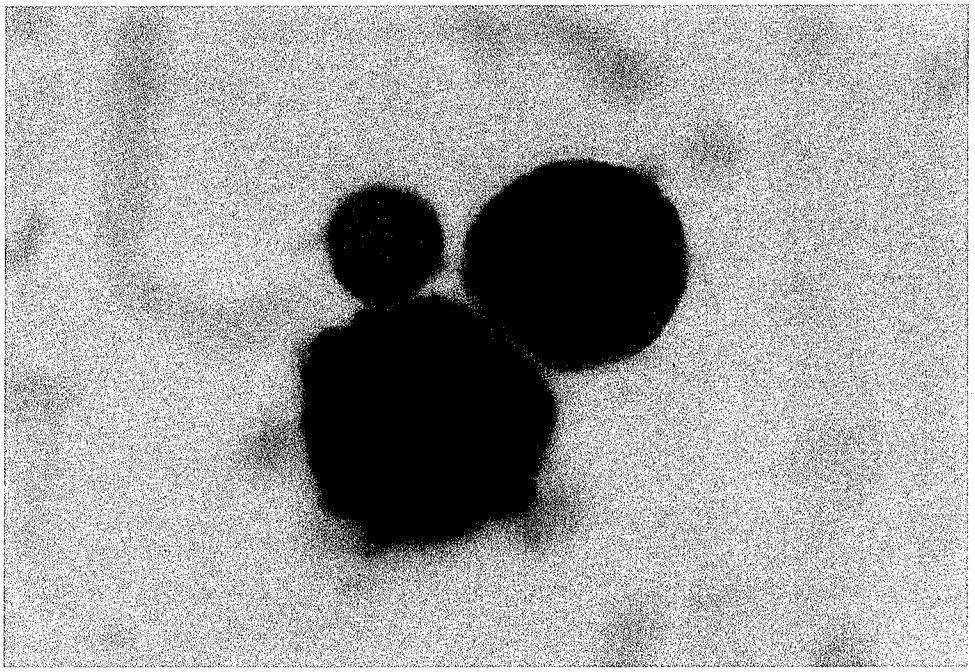
17) 加藤 収：日胸疾会誌, 18,435,1980
18) Giordano,A.and Morrow,P.E.:*Arch,Environ. Health*,25,443,1972
19) Boren,H.G.:*Environ.Res.*,1,178,1967
20) 服部正次, 建石竜平, 宝来 威 他：日胸疾会誌, 10,16,1972
21) Gardner,D.H.,Holzman,R.S.,and Coffin,D. L.:*J.Bacteriol*.98,1041,1969
22) Myrvik,Q.N.and Evans,D.G.:*Arch,Environ. Health*,14,92,1967
23) Valand,S.B.,Acton,J.D.and Myrvik,Q. N.:*Arch,Environ.Health*,20,303,1970
24) 鈴木孝人, 寺田伸枝, 溝口 勲 他：東京衛研年報, 34,224,1983
25) 鈴木孝人, 寺田伸枝, 池田真悟 他：東京衛研年報, 35,279,1984
26) Johnston,R.B.,Godzik,C.A.,and Cohn,Z.A.:*J. Exp.Med.*,148,115,1978
27) Van Gelder,B.F.and Slater,E.C.：*Biochim.Biophys.Acta*,58,593,1962
28) Yam,L.T.,Li,C.Y.,and Crosby,W.H.：*Amer. J.Clin.Path.*,55,283,1971
29) 伊藤恭悟, 佐藤 譲, 安保 徹 他：免疫実験操作法, 日本免疫学会編, 免疫細胞Ⅷ—3,2173,1978
30) 島田久夫, 安岡 劭, 中山 正 他：日胸疾会誌, 19,162,1981
31) Thomas,H.V.,Mueller,P.K.and Lyman,R. L.:*Science*,159,552,1968
32) Roehm,J.N.,Hadley,J.G.,and Menzel,D. B:*Arch,Environ.Health*,23,142,1971
33) Roehm,J.N.,Hadley,J.G.,and Menzel,D. B:*Arch.Int.Med.*,128,88,1971
34) Khandwala,A.,Bernard,J.,and Gee, L.:*Science*,182,1364,1973
35) 平井圭一, 上野聰樹, 小川和朗：最新医学, 35,718,1980
36) Kimball,R.E.,Reddy,K.,Peirce,T.H.et al.:*Am.J.Physiol.*,230,1425,1976
37) McCord,J.M.and Fridovich,I:*J.Biol. Chem.*,244,6049,1969
38) 鈴木孝人, 大沢誠喜, 狩野文雄, 他：東京衛研年報, 32—1,238,1981

Explanation of Figures

Fig. 7 Chloroacetate esterase activity is indicated by discrete blue granules in the cytoplasm of the neutropils and nonspecific esterase is indicated by dark red granules in the macrophage.(×1000)

Fig. 8 The cytoplasm of macrophages is indicated on diffused dark red and that of lymphocytes is indicated on a few spotty dark red.(×1000)





東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 263-276, 1985

NO_2とO_3の長期複合暴露によるラットの病理組織学的変化（第2報）
——肺の電子顕微鏡的観察——

寺田伸枝*, 池田真悟*, 福田雅夫*, 大澤誠喜*,
鈴木孝人*, 溝口勲*, 林豊**

Eeffects of Long-Term Exposure to a Mixture of Nitrogen Dioxide and Ozone (II)
——Electron Microscopic Study of Pulmonary Alveolus——

NOBUE TERADA*, SHINGO IKEDA*, MASAO FUKUDA*, MASANOBU OHSAWA*,
TAKAHITO SUZUKI*, ISAO MIZOGUCHI* and YUTAKA HAYASHI**

The pulmonary response of rats was observed by electron microscopy after continuous exposure to either 0.1 ppm ozone (O_3) or a mixture of 0.1 ppm O_3 and 0.3 ppm nitrogen dioxide (NO_2) for 1,3,6 and 18 months.

After 1-month exposure to O_3, hypertrophy and increase of Type II cells, increasing permeability of capillary endothelial cells were observed. After 3-month exposure a more remarkable edema was observed which almost disappeared after longer exposure of 6 and 18 months.

The changes caused by a combined exposure to O_3 and NO_2 at the interstitial connective tissue appeared to be somewhat more marked than those caused by exposure to O_3 alone. The edema of pulmonary connective tissue further progressed as the exposure was prolonged.

Keywords: mixture nitrogen dioxide, ozone, rats, pulmonary, electron microscopy, edema, permeability, Type II

緒　言

二酸化窒素（NO_2）は，大気汚染物質のひとつとして，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．低濃度のNO_2への長期暴露による肺の病変として，気管支上皮細胞の肥大性変化，細胞浸潤を伴う肺胞道壁および肺胞道付近の肺胞壁の肥厚と細胞増加などがあげられる[1,2,3,4,5]．また，これらの病変の強さの程度と暴露濃度の間に量・影響関係がみられること，低濃度領域における病変の進行はごく緩徐であり，一旦病変が成立した後，病変が次の段階に進むまでに，同程度の強さの変化がかなりの期間持続することが報告されている[3,4,5]．

一方，オゾン（O_3）は，NO_2と同様に主要な大気汚染物質のひとつであるが，肺の末梢部に至り，そこに主な障害を起すことが報告されている[6,7,8]．しかし，低濃度のO_3による長期暴露実験の報告は少く，その詳細は明らかではない．また，NO_2とO_3の複合影響に関する研究も，Freemanら[9]，Yokoyamaら[10]，寺田ら[11,12]の少数の報告のみである．

本報告は，NO_2およびO_3ともに，各々の単独暴露による影響の認められ得る最少有効濃度限界を用いて，長期複合暴露を行い，複合暴露のラットの肺に及ぼす影響について病理組織学的に検討したものである．

方　法

5週令のF344／DuCrj雄ラット（日本チャールス・リバー）を用いて，0.1 ppm濃度のO_3に単独暴露した群，0.3 ppm濃度のNO_2に0.1 ppm濃度のO_3を複合して暴露した群および対照群にわけ，1,3,6,18ケ月間の連続暴露を行った．なお，O_3は1日8時間，NO_2については終日暴露である．

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　160　東京都新宿区百人町3—24—1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

病理学的検索のためには，各群100匹のうちから各観察時期に無作為に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．左肺中央部から2片の水平断切片を採取し，透過電顕および光顕用試料とした．電顕用試料は，常法に従ってオスミウム酸後固定し，Epon包理，薄切，錯酸鉛・ウラニル重染色を行って観察した．

結　　果

I．0.1 ppm O_3単独暴露群

1）1ケ月暴露群　光顕的には，肺の病変はきわめて軽度であり，肺胞領域では細胞の増多と，肺胞壁の不規則な幅の増加がみられる程度である．

電顕的な観察では，肺胞壁間質に軽度の水腫がみられる．すなわち，肺胞壁毛細血管の内皮細胞はやや膨化し，細胞質に小型のpinocytotic vesiclesが増加している．肺胞上皮細胞では，I型細胞の細胞質の一部が乳頭状に膨出している部分がみられる．また細胞質の小空胞も増加している．肺胞壁間質に規則正しく配列していた膠原線維は，部分的に配列が乱れ，疎鬆化している．また水腫を起している肺胞壁に遊走細胞が少数みられる．肺胞上皮のII型細胞は，数を増しており，かつ個々の細胞は腫大し，細胞質には，多数の増大した層状封入体とミトコンドリアがみられる．また，中間型の細胞，すなわち細胞質が乏しく，核の性状もI型細胞に近い形態を示すが，層状封入体が不明瞭ながら存在し，微繊毛も少数認められ，II型細胞の形態が保たれている細胞もみられる．また，ところにより肺胞壁に間質細胞が目立つ．(Fig.1,2,3,4)

2）3ケ月暴露群　光顕的には，肺胞領域では，びまん性に細胞の増多がみられたが，その程度は1ケ月暴露群より軽く，肺胞壁の肥厚も軽度かつ散在性である．

電顕的には，肺胞壁間質の水腫は，1ケ月暴露群より著明である．肺胞壁毛細血管の内皮細胞は膨化し，このため毛細血管の内腔が狭少化している部分もある．また，細胞質のpinocytotic vesiclesは数を増し，個々の空胞も大きくなっている．肺胞上皮I型細胞の細胞質の小空胞も大型になっている．これに対応して，肺胞壁間質に水腫液が貯留し，組織間隙の開大がみられ，膠原線維は配列が乱れ，疎鬆化している．水腫を起こしている肺胞壁には，遊走細胞と，線維芽細胞がみられる場合もある．(Fig.5,6,7,8)

3）6ケ月暴露群　光顕的には，1，3ケ月暴露群にみられた肺胞領域における細胞の増多と肺胞壁の肥厚はほとんど認められない．

電顕的にも，大部分の肺胞壁は，対照群と同様にきわめて薄いair-blood barrierの像として認められる．しかし，部分的に肺胞壁間質の水腫がみられ，これは3ケ月暴露群より進行した変化である．毛細血管内支細胞の細胞質のpinocytotic vesiclesの数の増加に加えて，空胞の大小不同がみられる．基底膜と内皮細胞の密な結合が失われ，空隙様の部分を生じていることもある．肺胞上皮のII型細胞のみいだされる頻度は低い．(Fig.9,10)

4）18ケ月暴露群　光顕的には，6ケ月暴露群と同様に肺胞領域の変化は認められず，対照群との違いは明らかではない．

電顕的にも，肺胞壁は薄く伸展したair-blood barrierを形成していることが多い．また，肺胞上皮のII型細胞の数や形態にも変化がみられない．しかし，部分的に肺胞壁の水腫が認められ，これは6ケ月暴露群よりさらに進行した変化である．すなわち，毛細血管内皮細胞の細胞質が内腔に向って輪状に突出したり，基底膜と内皮細胞との間の密な結合が失われ，空隙様部分を生じており，このため血管内腔が狭少化している場合がみられる．(Fig,11,12)

II．0.3 ppm NO_2と0.1 ppm O_3による複合暴露群

1）1ケ月暴露群　光顕的には，O_3単独暴露群と同様で，肺胞領域における細胞の増多と，肺胞壁の不規則な幅の増加がみられる．

電顕的には，肺胞壁間質に水腫がみられ，これはO_3単独暴露群より著明である．肺胞壁毛細血管の内皮細胞は膨化し，細胞質のpinocytotic vesiclesの数が増加している．I型細胞の細胞質の一部が乳頭状に膨出し，細胞質の小空胞も増加している．水腫液が貯留し，開大した組織間隙に遊走細胞が数多く見出され，また，膠原線維の離開がみられる．肺胞壁に間質細胞の見出される頻度が高い．部分的に，基底膜と内皮細胞との間の密な結合が失われ，空隙様部分を生じている．大型のミトコンドリアと層状封入帯を多数有するII型細胞が増加しており，またI型とII型の中間型の細胞もみられる．(Fig.13,14,15,16)

2）3ケ月暴露群　光顕的には肺胞領域の細胞の増多は，1ケ月暴露群より減弱しているが，局所的に肺胞壁の幅の増している部分もある．

電顕的には，1ケ月暴露群にみられた肺胞壁の水腫はさらに著明となり，肺胞壁毛細血管の内皮細胞は膨化し，膨化した内皮細胞のための血管内腔が狭くなっている部分もみられる．また細胞質内のpinocytotic vesiclesの数

が増し，かつ大型化している．Ⅰ型肺胞上皮細胞の表面には，小さい突出が多くみられ，細胞質内の小空胞の数が増し，大型化している．基底膜と内皮細胞の間の密な結合が失われ，空隙様の部分がみられる．肺胞壁の膠原線維は，配列が乱れ，水腫液の貯留によって開大した組織間隙に散在しており，肺胞壁に規則正しく配列している膠原線維はほとんどみられない．Ⅱ型細胞は，大型のミトコンドリアと層状封入体を多数有しており，またその放出像もみられる．Ⅰ型細胞とⅡ型細胞の中間型細胞もみられる．(Fig.17,18,19)

3）6ヶ月暴露群　光顕的には，1，3ヶ月暴露群にみられた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，O_3単独暴露群の場合と同様に消失する傾向にあった．

電顕的には，肺胞壁間質に，3ヶ月暴露群より進行した水腫がみとめられる．毛細血管内皮細胞の膨化は目立つものではないが，細胞質の pinocytotic vesicles の数の増加と大小不同に加えて，空胞化した部分がある．基底膜と内皮細胞との間の密な結合が失われ，空隙様の部分を生じており，毛細血管を囲んで空隙様部分がその全周にみられる．肺胞上皮細胞のⅡ型細胞の増加は目立つものではなかったが，個々の細胞は大型ミトコンドリアを有している．水腫液の貯留によって開大した組織間隙に，走行の乱れた膠原線維と遊走細胞がみられる．(Fig.20,21,22,23)

4）18ヶ月暴露群　光顕的には，肺胞領域の変化は明らかではない．

電顕的には，1，3，6ヶ月暴露群より，またO_3単独暴露群より著明な水腫がみられる．毛細血管内皮細胞の細胞質の pinocytotic vesides の数の増加，大小不同に加えて，のう胞状のものもみられる．肺胞上皮Ⅰ型細胞の細胞質にものう胞状の空胞がみられる．血管内皮細胞の細胞質が内腔に向って輪状に突出していたり，基底膜と内皮細胞の密な結合が失われ空隙様部分を生じている．この空隙様部分に遊走細胞と，離開した膠原線維がみられる部分もみられる．Ⅱ型細胞の増加は目立つものではないが個々の細胞は，大型ミトコンドリアと層状封入体を有しており，またその放出像もみられる．(Fig.24,25,26)

考　察

0.1ppm O_3単独暴露による変化として，肺胞壁間質の軽度の水腫がみられた．その主病変として，血管透過性の亢進と示唆する肺胞壁毛細血管の内皮細胞の膨化と細胞質の pinocytotic vesicles の増加と，肺胞上皮Ⅰ型細胞の細胞質の小空胞の増加がみられた．水腫液が貯留し開大した組織間隙に遊走細胞と，疎鬆化した膠原線維がみられた．間質におけるこのような変化は，光顕的に観察された肺胞壁の不規則な幅の増加と対応するものと考える．しかし，光顕的に，これらの水腫性変化に相当する肺胞壁の厚さの増加は，肺胞領域全体に均等にみられず，肺胞壁には種々の段階の変化が混在しているものと推定される．また大きなミトコンドリアと層状封入体を多数有するⅡ型細胞の増加と，Ⅰ型とⅡ型の中間型の細胞がみられ，肺胞腔内への肺胞被覆物質の分泌の亢進と，損傷されたⅠ型細胞を修復する機構が働いていると考える．また，電顕的にみられたⅡ型細胞の増加は，光顕的にみられた肺胞領域の細胞の増多と対応するものと考える．

低濃度のO_3による長期暴露実験の報告は少い．7日間の連続暴露の場合，Plopper らは[6]，0.1 ppm が，Schwartz らは[7]，0.2ppm が組織的学変化の検出できる濃度限界であるとしている．また，Boorman ら[8]は，0.2,0.5,0.8 ppm のO_3に20,50,90日間の暴露を行い，0.5,0.8 ppm では全期間とも air-blood barrier の平均肺胞壁厚の増加と，炎症性細胞の滲出などの組織学的変化がみられたが，0.2 ppm では90日後には対照群と同様であったことから，0.2 ppm のO_3では順応がみられると述べている．

本実験においても，暴露6,18ヶ月後では，大部分の肺胞壁は薄く伸展した air-blood barrier の像として認められたが，部分的に進行した水腫がみられ，肺胞壁には微弱ながらも常に進行的な変化が起きていると考える．一方，肺胞上皮では，暴露6,18ヶ月後には，暴露1，3ヶ月後に比べ，Ⅱ型細胞の見出される頻度が低く，またⅠ型とⅡ型の中間型細胞もみられなかった．このことから，0.1 ppm 程度のO_3の肺胞上皮に及ぼす影響は一過性のものであり，継続的な変化をひきおこすことはないと考える．

0.3 ppm のNO_2と0.1 ppm のO_3による複合暴露による変化として，基本的にはO_3単独暴露群と同様の病変，すなわち，肺胞壁間質の水腫と，Ⅱ型細胞の増加としてみとめられた．しかし，暴露のいずれの時期においても，O_3単独暴露群より顕著で，広範な水腫がみられ，暴露期間の長期化に伴って進行する変化であった．また，前報に記した様に[12]，肺胞毛細血管の血流障害等による赤血球の崩壊を示唆する血鉄細胞が，複合暴露群の18ヶ月後に多数認められており，病変の進行を裏づけるものと考える．

NO_2とO_3による複合暴露実験は，ほとんどなされていない．Freemanらは[9]，2.5 ppmのNO_2と0.25 ppmのO_3に複合暴露されたラットで観察された肺胞道と末梢気管支の病変は，主にO_3によるものであり，暴露6ケ月後には正常に復したことを報告している．寺田らは[11]，0.5,1.0,2.0 ppmのNO_2に各々0.1 ppmのO_3を複合して，90日間の暴露を行い，複合暴露では，O_3単独暴露に比べ，病変が増強され，また一旦成立した病変のより長期にわたる持続が認められたことを報告している．

一方，低濃度のNO_2による病変として，河野らは[4]，0.5 ppmのNO_2を19ケ月間長期連続暴露し，肺胞ではII型細胞の腫大と増加，肺胞壁では2ケ月後から毛細血管内皮細胞の透過性の亢進，4ケ月後から肺胞壁間質の水腫がみとめられ，この変化はその後も増強し，19ケ月後にも持続していることを報告している．また，竹中らは[5]，0.4 ppmのNO_2に連続暴露したラットで，電顕的な平均肺胞壁厚の上昇を，18ケ月後にみとめたことを報告している．

以上のように，きわめて低濃度のNO_2によっても，長期暴露を行うと，肺に変化が生じることが推定される．本研究の複合暴露群にみられる水腫の増強と，II型細胞の継続的な変化は，主にO_3によるものとはいいきれず，微弱ながら進行していたNO_2の影響が，O_3を複合することによって強められ，より顕著に表われてきたとも考えられる．

（本研究は昭和59年度当研究所調査研究課題「複合大気汚染に係わる健康影響調査に関する研究」として実施したものである．）

文　献

1) Stephens, R.J., Freeman, G. and Evans, M.J.: Arch. Environ. Health, 24, 160, 1972
2) Stephens, R.J., Freeman, G., Grane, S.C. and Furioshi, N.J.: Exp. Mol. pathol., 14, 1, 1971
3) 寺田伸枝，鈴木孝人，大沢誠喜，福田雅夫，池田真悟，溝口　勲：東京衛研年報，32—1, 250, 1981
4) 河野俊彦，林　豊：大気汚染学会誌，16, 313, 1981
5) 竹中参二ら：国立公害研究所研究報告，15, 171, 1980
6) Plopper, C. G. et al : Arch. Environ, Health, 34, 390, 1979
7) Schwartz, L.W. et al: Lab. Invest., 34, 565, 1976
8) Boorman, G.A. et al: Lab. Invest., 43 108, 1980
9) Freeman, G., Juhos, L.T., Furioshi, N.J., Mussenden, R., Stephens, R. J. and Evans, M. J.: Arch. Environ. Health, 29, 203, 1974
10) Yokoyama, E., Ichkawa, I. and Kawai, K.: Nitorogen Oxides and their Effects on Health, Ed, Lee. S.D., Ann Arbor Science, 217, 1980
11) 寺田伸枝，鈴木孝人，大澤誠喜，福田雅夫，池田真悟，溝口　勲：東京衛研年報，33, 337, 1982
12) 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：東京衛研年報，35, 265, 1984

Explanation of figures

Fig. 1, 2, 3 and 4 show exposed to O_3 for 1 month.

Fig. 1. Slight edema of interstitial connective tisuues (*).
Wandering cell in alveolar wall(* *)(×9000).

Fig. 2. Pinocytotic vesicles in capillary endothelial cells(*).
Edema and interstitial cell(* *)(×9000).

Fig. 3. Increased alveolar Type II cells(*)(×7000).

Fig. 4. An alveolar Type II cell resembled to alveolar Type I cell (microvillies and few lamellar bodies) (*)(×3000)

Fig. 5, 6, 7 and 8 show exposed to O_3 for 3 months.

Fig. 5. Edema of interstitisl connective tissues(*).
Pinocytotic vesicles in capillary endothelial cells(* *).
Blebbing of Type I cell(▲)(×9000).

Fig. 6. Edema of interstitial connective tissues.
Fibroblast(*)and wandering cell(* *)(×10000).

Fig. 7. Increased alveolar Type II cells(×3000).

Fig. 8. Increased Type II cells.
Edema of interstitial connective tissues(*)(×3000).

Fig. 9 and 10 show exposed to O_3 for 6 months.

Fig. 9. Loose contact of cappilary endothelial cells with basement membrane were observed(*)(×3600).

Fig. 10. No difinite change(×3600).

Fig. 11 and 12 show exposed to O_3 for 18 months.

Fig. 11. Ring structure projecting into capillary lumen (×2400).

Fig. 12. Loose contact of capillary endothelial cells with basement membrane were observed(×7000).

Fig. 13, 14,15 and 16 show exposed to a mixture for 1

month.

Fig. 13. Loose contact of capillary endothelial cells with basement membrane were observed partialy (×6000).

Fig. 14. Interstitial cells (*) (×1800).

Fig. 15. Type II cell with enlarged lamellar bodies (×3000).

Fig. 16. Edema of interstitial connective tissues and thickened interstitial tissues (*) (×2400).

Fig. 17, 18 and 19 show exposed to a mixture for 3 months.

Fig. 17. Remarkable pinocytotic vesicles in capillary endothelial cells (*) (×10000).

Fig. 18. Edema of interstitial connective tissues Fibroblast (*) and wandering cell (**) (×3000).

Fig. 19. Increased alveolar Type II cells Type II cells resembled to Type I cell (*) (×7000).

Fig. 20, 21, 22 and 23 show exposed to a mixture for 6 months.

Fig. 20. Edema of interstitial connective tissues Remarkable pinocytotic vesicles (*) (×12000).

Fig. 21. Increased Type II cells resembled to Type I cell (*) (×6000).

Fig. 22. Wandering cell in the edematous alveolar wall (*) (×6000).

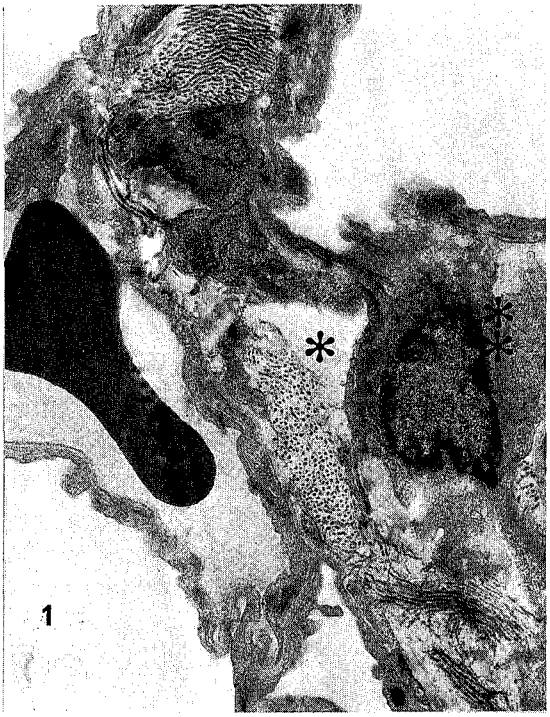
Fig. 23. Loose contact of capillary endothelial cells with basement membrane (×6000).

Fig. 24, 25 and 26 show exposed to a mixture for 18 months

Fig. 24. Marked edema, ring structure and pinocytotic vesicles (×4800)

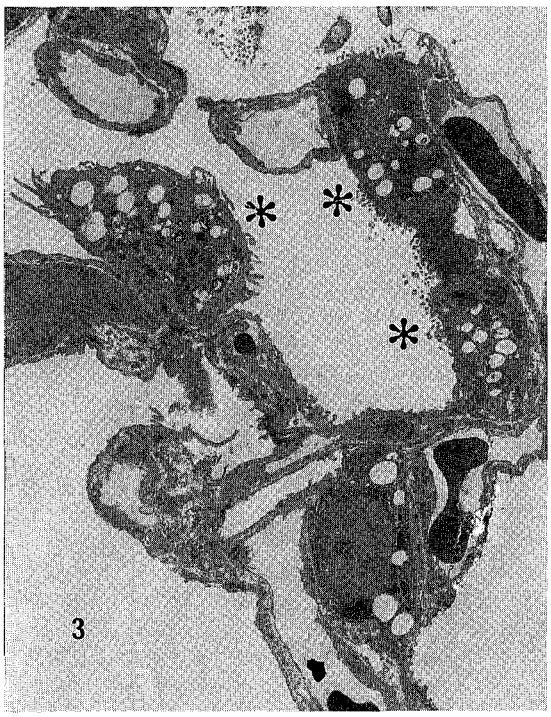
Fig. 25. Loose contact of capillary endothelial cells with basement membrane and Type II cell with enlarged lamellar bodies (×3600)

Fig. 26. Marked edema. Vacuolar changes in cytoplasm of capillary endothelial cells and Type I cells (*) (×7000).

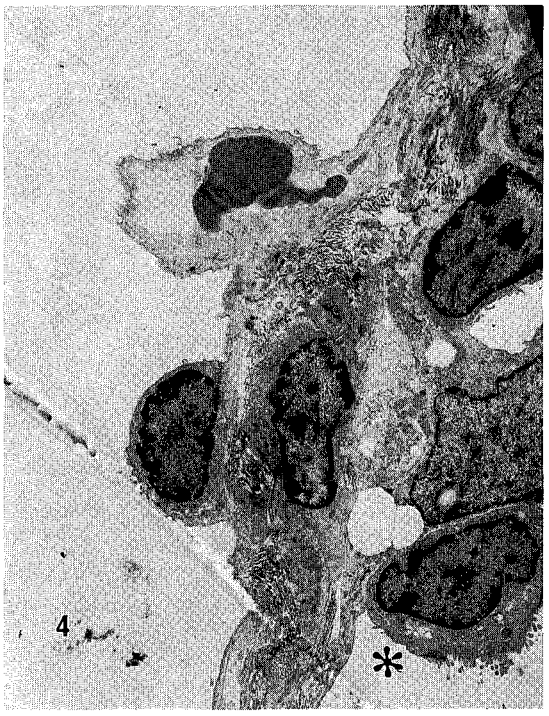


1

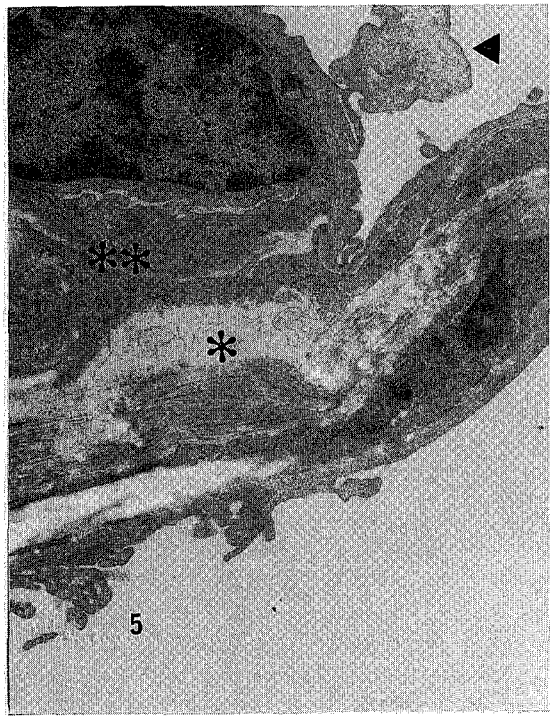
2



3

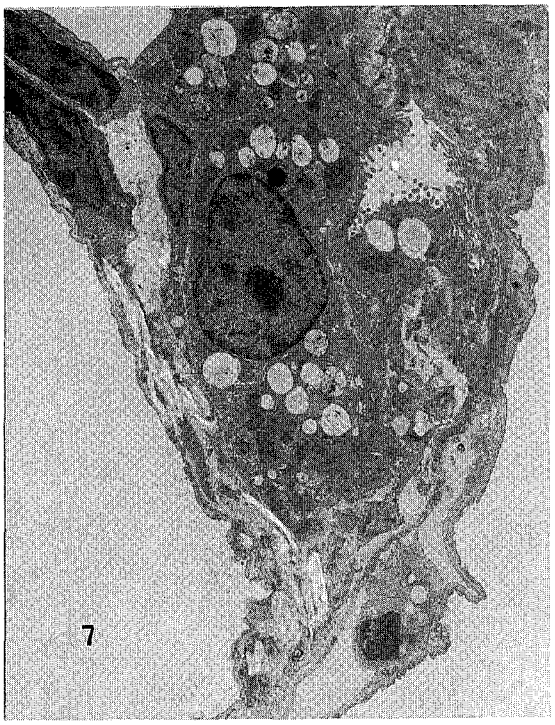


4

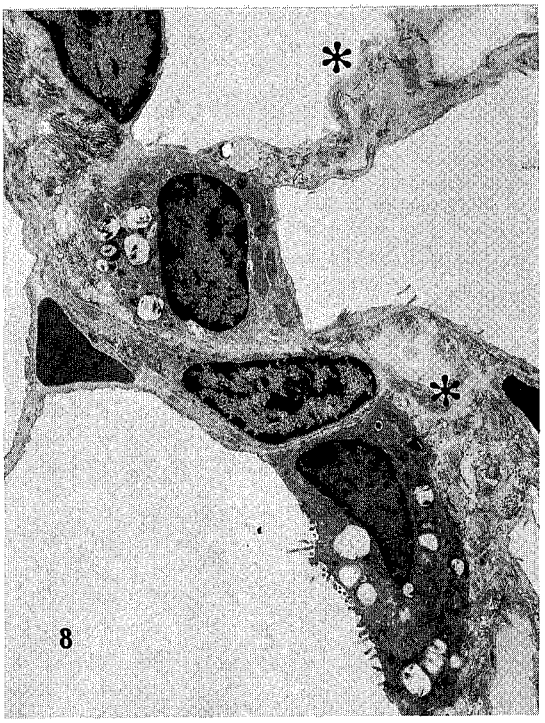


5

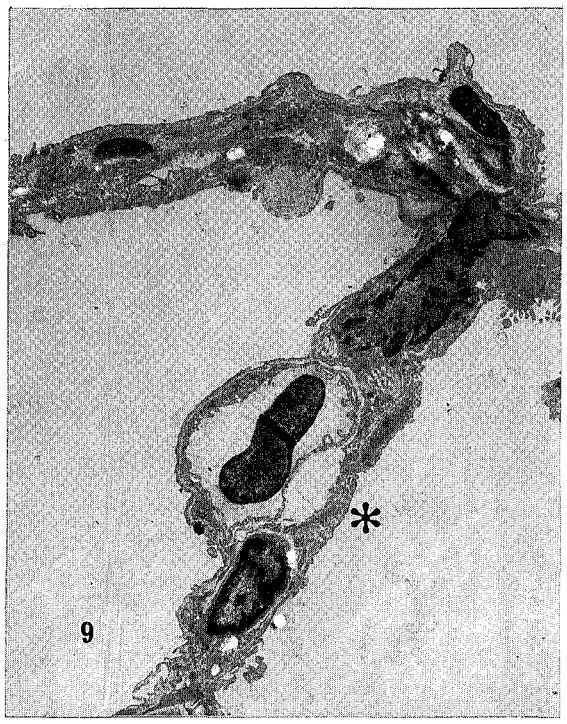
6

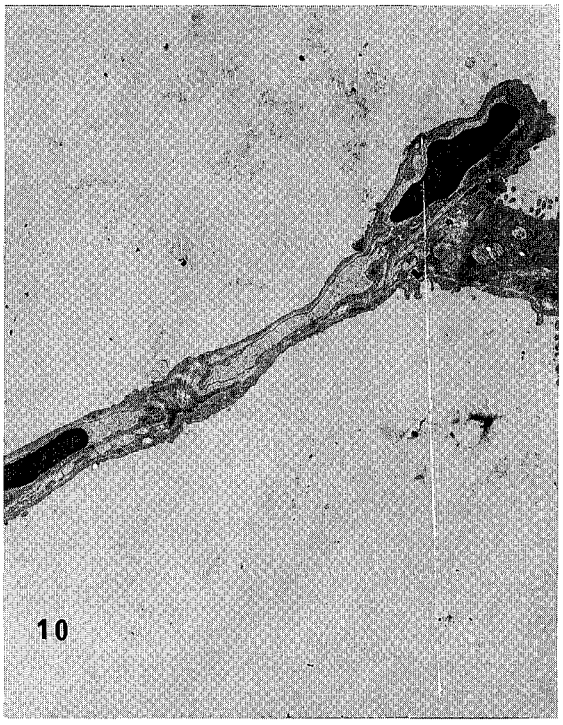


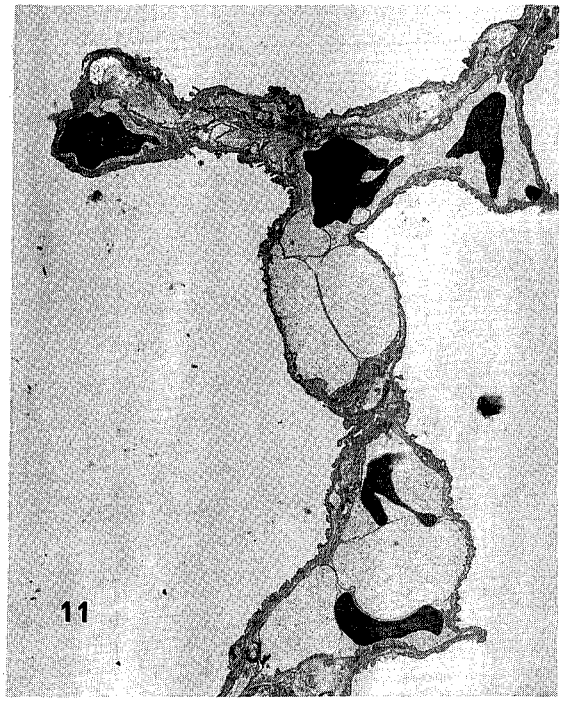
7

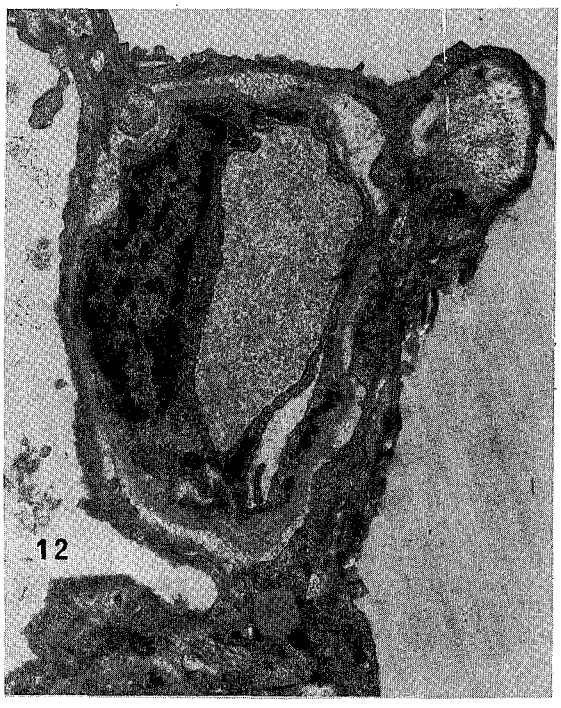


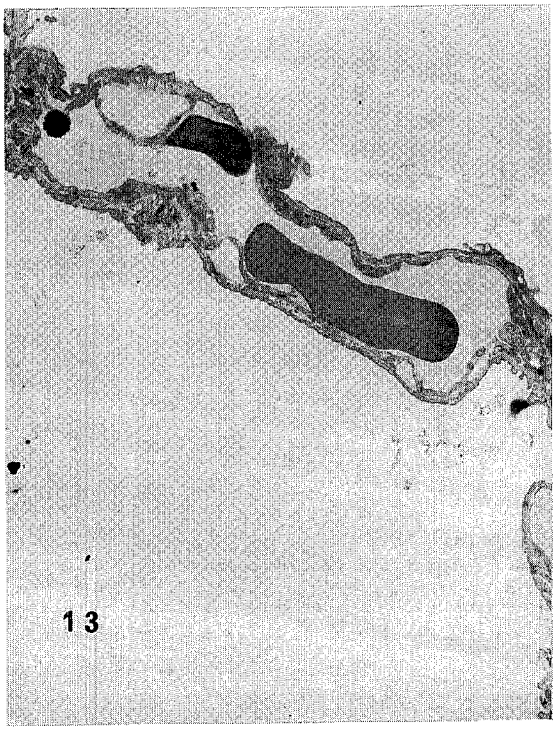
8


9

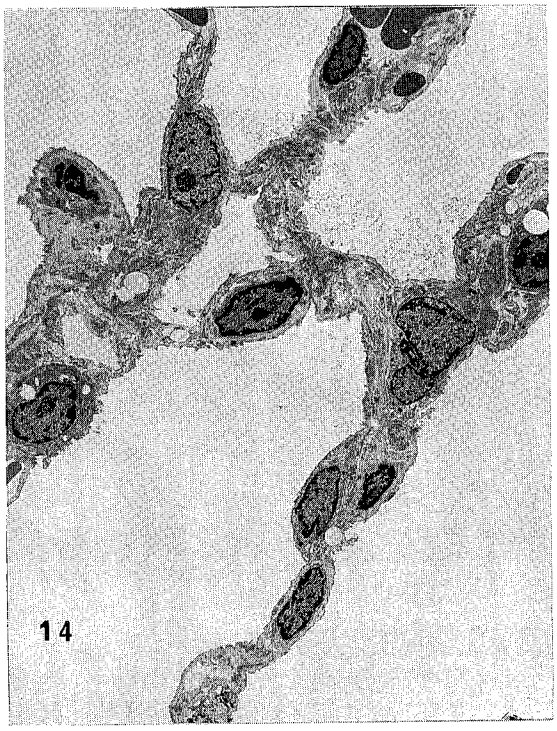

10


11

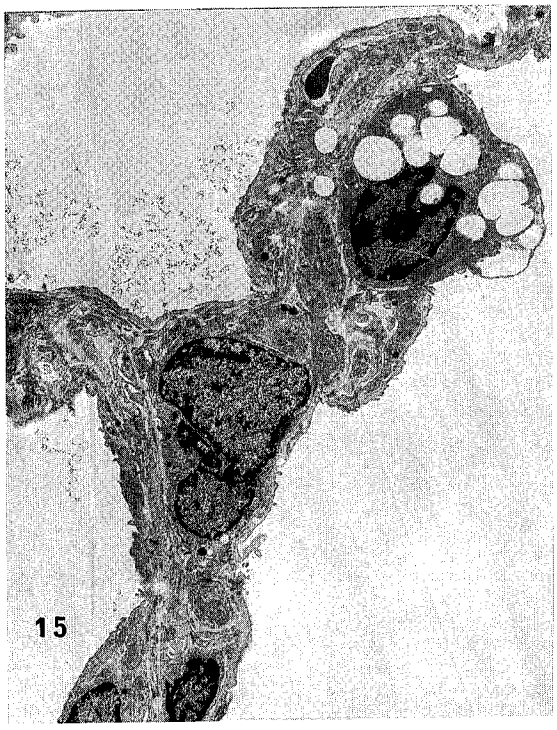

12



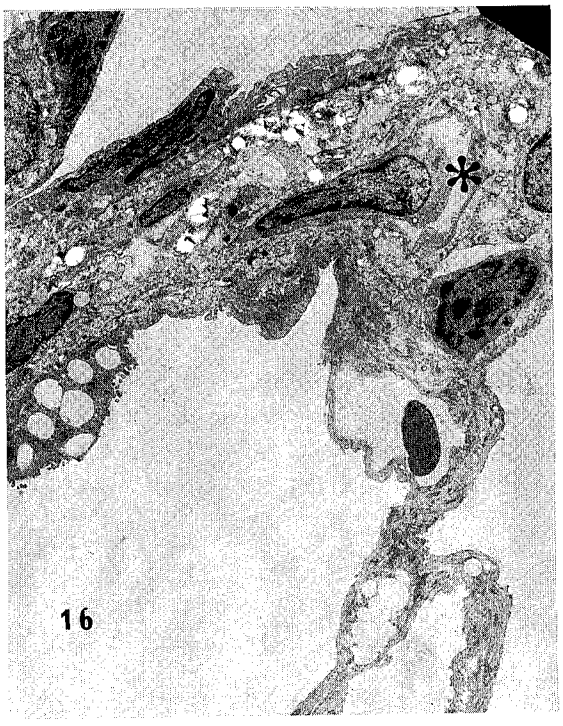
13



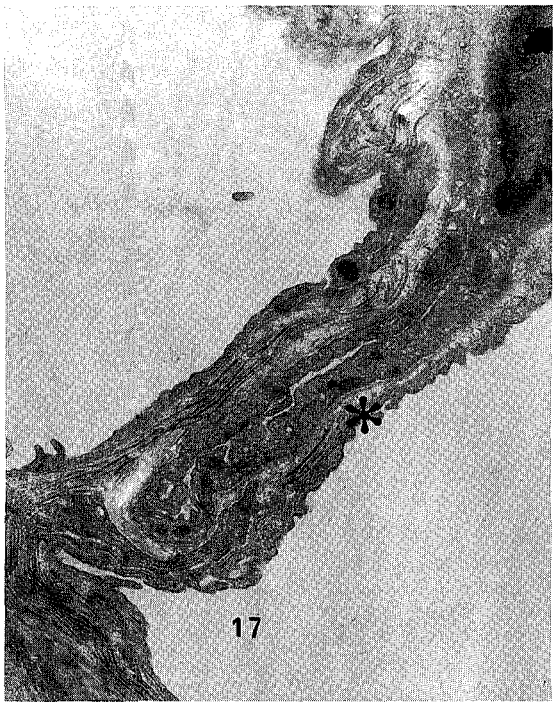
14



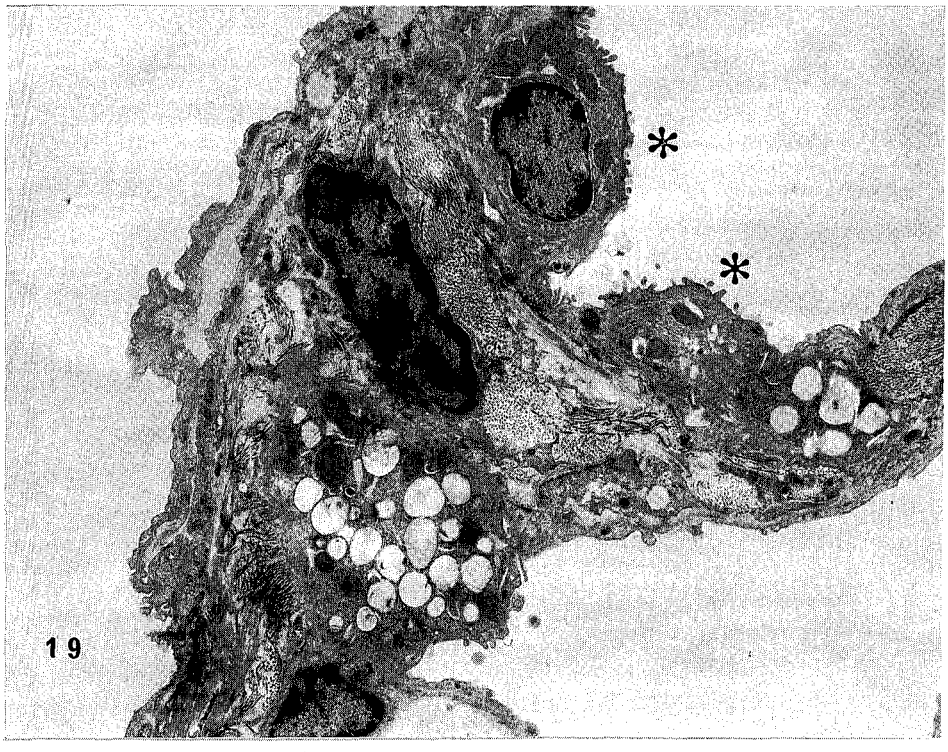
15

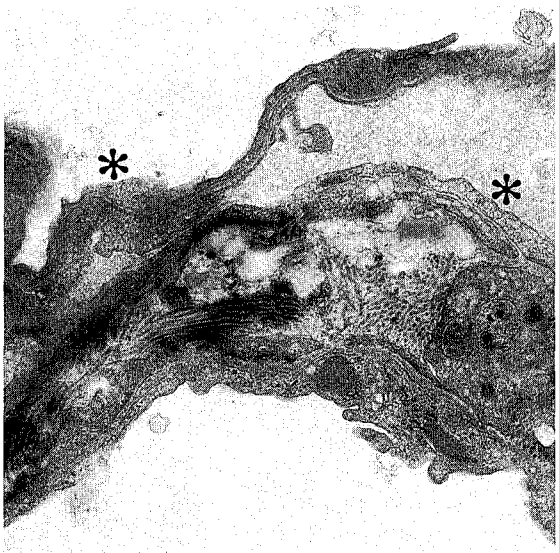


16


17

18

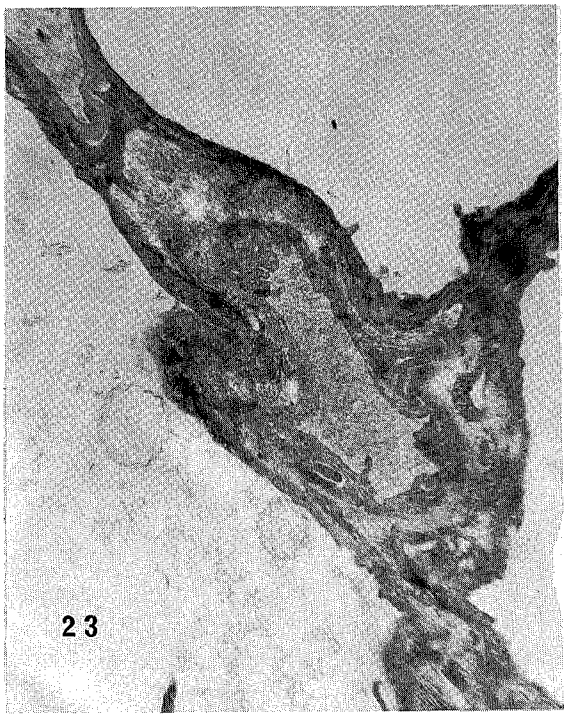

19



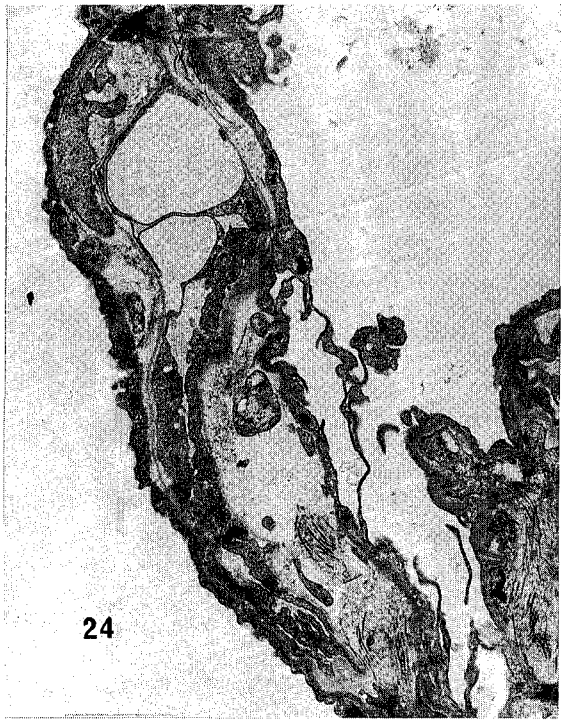
20

21

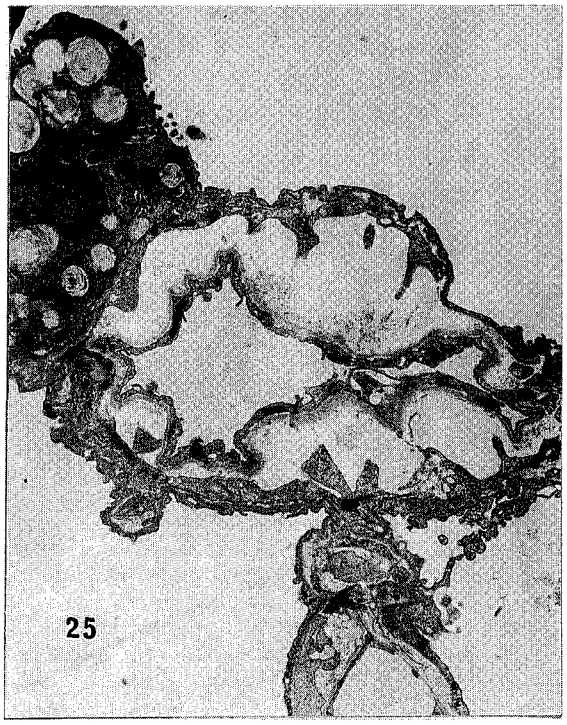
22



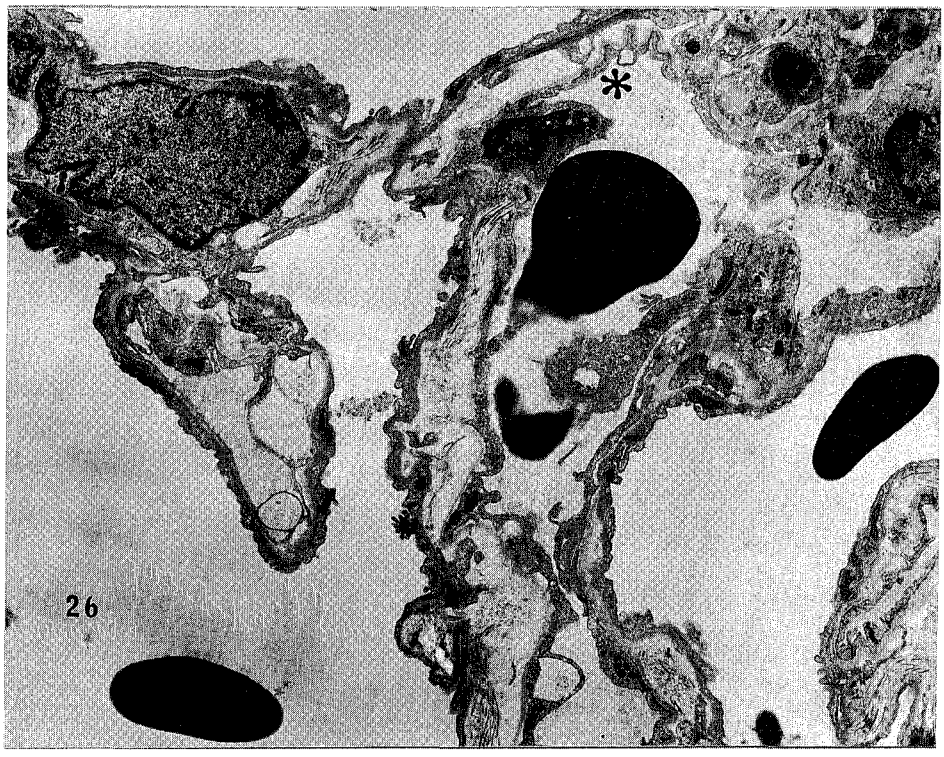
23



24



25



26

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 277-282, 1985

尿中ハイドロオキシプロリンの測定法の検討

池田眞悟*, 鈴木孝人*, 加納堯子*, 溝口 勲*

Improved and Simplified Method for the Spectrophotometric Determination of Urinary Hydroxyproline

SHINGO IKEDA*, TAKAHITO SUZUKI*, TAKAKO KANOH*
and ISAO MIZOGUCHI*

Urinary excretion of hydroxyproline (HOP) results from the breakdown and metabolism of collagen in the lung tissue or skin. Kasuga and his co-workers showed that urinary hydroxyproline served as a useful index for the objectionalbe effects on human health caused by air pollution, especially through exposure to nitrogen dioxide.

Many reports have been made concerning optimum conditions for the measurement of urinary HOP on the basis of the Kasuga method using both an ion-exchange resin and activated charcoal. We developed a simpler manual method for HOP measurement incorporating several modifications. Our method did not use an ion-exchange resin and activated charcoal because their use occasionally had adverse effects on the sensitivity and reproducibility of urinary HOP measurement.

Our method gave good quantitative recoveries (approximately 97.0—100.0%) and high sensitivity.

As a further advantage, the presence of amino acids other than HOP in urine had little or no adverse effects on the color development.

Keywords: air pollution, urinary hydroxyproline, nitrogen dioxide

緒　言

大気汚染，特に窒素酸化物による生体影響調査で健康障害の指標として，尿中ハイドロオキシプロリン（Hydroxyproline：HOP）が注目されている．

尿中のHOPの測定は，膠原病，骨腫瘍および肺気腫など主に組織損傷に係る疾患の補助診断の一つとして開発され種々の測定法[1-10]が報告されている．最近，春日ら[11,12]は，喫煙および大気汚染（主に窒素酸化物）による人体影響調査で同じく尿中HOPを測定している．春日ら[11,12]の方法は，尿を加水分解し，その水解物に活性炭と樹脂の混合物を加えて，溶液の脱色を行う．次いで，その上澄液を蒸発乾固し，残渣を希塩酸溶液で溶解してその溶液中のHOPをBergman[5]らの方法に従いオートアナライザーで分析している．

活性炭，樹脂の添加は，主に尿水解物の着色，およびHOP発色阻害物質を除去し，試料吸光度への影響を少くするためである．しかし，尿水解物中のHOPは活性炭に吸着され易い．そこで，活性炭，樹脂を使用せずに尿水解物の着色による影響を低下させる方法を考案し，これにBergman[5]らの所用試薬量などに若干の変更を加えた方法を組み合せて鋭敏性，再現性など良好な結果が得られる簡便な測定方法を見出した．以下その報告である．

測定方法

1．試　薬

1）Oxidant溶液

Ⓐ 酢酸クエン酸緩衝液（pH6.0）

酢酸ナトリウム（3水塩）57.0g，クエン酸ナトリウム（2水塩）37.5g，クエン酸5.5gを約500m*l*の水に溶解し，更にイソプロパノール385m*l*および水を加えて全量

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

1*l* とした.

Ⓑ 7％クロラミンT溶液（w／v）

ⒶとⒷを4：1の割合にして，良く混ぜ合せた.

（使用時調整）

2）Ehrlich 試薬

70％過塩素酸20.9m*l* にパラジメチルアミノベンズアルデヒド（p-dimethylaminobenzaldhyde）17.6g を溶解し，イソプロパノールを用いて全量100m*l* とした.（使用時調製）

3）ハイドロオキシプロリン標準液

Hydroxy-L-prolin 50mg を0.02規定塩酸溶液50m*l* に溶解し，この液を HOP 標準液の原液とした.検量線作成は，この原液をイソプロパノールを用いて，所要濃度（0,2,5,8,10 μg／m*l*）に希釈調整して用いた.

使用薬品は，いずれも和光純薬工業株式会社製を使用し，p-dimethylaminobenzaldhyde は生化学用.クロラミンT，イソプロパノール，Hydroxy-L-prolin および過塩素酸は特級品.他の薬品は，アミノ酸自動分析用を使用した.なお測定方法の検討と実験の項，4で使用したアミノ酸混合液は，アミノ酸混合標準液，AN 型を用いた.

2．供試材料

使用した尿は，小学校学童4年と5年の早朝尿である.採尿後，ただちに保冷し，分析時まで－20℃で保存した.

3．HOP の定量

1）試料の加水分析

試料尿1.0m*l* をネジ付試験管（PYREX）にとり，蒸留水1.0m*l* と濃塩酸2.0m*l* 添加し試料を110℃で15時間放置した.なお尿は最終濃度6規定塩酸で4倍に希釈され加水分解された.

2）中和処理

加水分解した試料を冷却し，その1.0m*l* を共栓小試験管に移し，1.2規定水酸化ナトリウム4.0m*l* を加えて中和した。加水分解物は5倍希釈され，中和後の試料 pH は約0.8～1.7の範囲を示した.

3）HOP の比色測定

中和処理済の試料0.5m*l* を小試験管にとり，次にイソプロパノール1.0m*l* と Oxidant 溶液1.0m*l* を加えて良く混合し，約4～5分室温に放置後，Ehrlich 試薬1.0m*l* を加える.

更に良く混合して60℃の水浴中で20分間加熱して流水で冷却後，分光光度計（島津製作所，UV240型）で波長562 nm，10mm セルを用いて吸光度を測定した.

試料 Blank は，中和試料0.5m*l* にイソプロパノール1.0m*l* を加え，Ehrlich 試薬1.0m*l* および Oxidant 溶液1.0m*l* の順に順序を変えて添加し，上記の HOP 測定方法と同様に処理して試料 Blank 値とした.

4）計算方法

測定日毎に，HOP 標準液で検量線を作り，試料吸光度に相当する HOP 量を検量線から求める.更に各々の試料 Blank 値を差し引いた測定値を20倍して，試料 HOP，μg／m*l* を求めた.

測定法の検討と実験

1．加水分解溶液の中和

尿を加水分解した溶液は，一般に，フェノールフタレインを指示薬として水酸化ナトリウム液で中和し，更に塩酸溶液で至適 pH に調整する.しかし，試料毎に添加す

Table 1. Composition of Amino Acids Standard Solution, Type AN ((注)約0.1N HCl 溶液)

アミノ酸	μmol/m*l*	アミノ酸	μmol/m*l*
o- Phosphoserine	1.25	L- α- Aminoadipic	1.25
o- Phophoethanolamine	1.25	DL- α- Amino- n- butyric Acid	1.25
Taurine	1.25	L- Valine	2.50
Urea	50.00	L- Cystine	2.50
Hydroxy- L- Proline	2.50	L- Cystathionine	1.25
L- Aspartic Acid	2.50	L- Methionine	2.50
L- Serine	2.50	L- Isoleucine	2.50
L- Asparagine	1.25	L- Leucine	2.50
Sarcosine	6.25	L- Tyrosine	2.50
L- Proline	2.50	L- Phenylalanine	2.50
L- Glutamic Acid	2.50	β- Alanine	2.50
L- Citrulline	2.50	L- β- Amino- iso- butyric Acid	2.50
Glycine	2.50	L- Threonine	2.50
L- Alanine	2.50		

る酸，アルカリ溶液が異なるため，試料の希釈率は同一にはならない．春日ら[11,12]はこの繁雑さをさけるため水解物の一定量を蒸発乾固し，残渣に一定量の塩酸を加えて試料希釈率を同一にしている．蒸発乾固には3～4時間を要しこの間の試料の飛散や汚染も無視できない．そこで先づ尿水解物を中和し至適 pH に調整する水酸化ナトリウム溶液の濃度およびその量を検討した．

すなわち，加水分解した同一尿の種々の pH を示す溶液を調整し，それぞれに Oxidant，Ehrlich 試薬を加えて発色させその吸光度を測定した．最高吸光度を示した試料吸光度を100%として各 pH 試料の発色率を求め，この発色率から至適 pH と，添加水酸化ナトリウム液量および濃度を計測した．

2．Oxidant 溶液の作用時間

加水分解された尿中の遊離 HOP は，酸化剤クロラミン T によって酸化され pyrrole-2-carboxylic acid を生成し，次の操作の加熱で脱炭酸した pyrrole に変換する．この pryrrole は Ehrich 試薬中の p-dimethyl-aminobenzaldehyde と反応して赤色の化合物を作る．

そこで，酸化剤クロラミン T の有効作用時間を Ehrlich 試薬で発色させた吸光度の変化から検討した．

3．Ehrlich 試薬による呈色の安定性

Ehrlich 試薬添加後の加熱温度および反応時間については，笠原ら[13]の検討報告に従った．しかし，多数検体を同時処理する場合には，呈色の安定性が要求される．

そこで，尿水解物にイソプロパノール，Oxidant 試薬および Ehrlich 試薬を加えて60℃，20分間加熱した後，ただちに流水で試料を冷却した．反応終了後から150分までの吸光度を測定し，その変動を調査した．

4．HOP の回収試験および共存するアミノ酸の影響

HOP はアミノ酸の一種であるから尿中に共存する他のアミノ酸が示す発色過程への影響は無視出来ないものと思われる．そこで試料尿に HOP 標準液1.0m*l* 或はアミノ酸混合液1.0m*l* を添加し，HOP 測定方法の項に示した方法で各溶液中の HOP 量を測定し HOP 回収率から共存アミノ酸の影響を検討した．

5．HOP の測定範囲

濃度の異なる A，B 尿の加水分解液に種々の濃度（0～25μg）の HOP 標準液1.0m*l* を添加し，上記の HOP 測定方法により，各A，B溶液中の HOP 量を求め尿を用いた検量線を画いて，HOP 測定値の直線域から HOP 測定範囲を求めた．

6．試料 Blank 値について

尿水解物の着色は吸光度測定に影響し，また操作手順を繁雑にする．春日ら[11,12]の方法および Goverde[6]，Nobbs ら[9]の方法では，操作工程にイオン交換樹脂，又は活性炭処理を加えて脱色を試みている．しかし，HOP 含量が低い試料などその使用量によって測定誤差が生じ易く，あまり容易な方法ではないと思われる．また，この操作を省略することは，省力，処理能力を増大させる．

尿水解物の着色を抑える基本的な操作は，原尿を希釈することである．そこで，本方法では，試料を測定可能な範囲まで希釈しそこに必要な試薬使用濃度を調整して試料 Blank 値の低下を試みた．

7．本方法と活性炭，および活性炭と樹脂使用方法，並びに，水解物の中和工程に試料の蒸発乾固工程を加えたこれら3方法の比較

濃度の異なる3試料尿について，本方法と活性炭および活性炭に樹脂を加えた方法，また中和工程に試料の蒸発乾固工程を加えた試料中の HOP を測定し，3方法を比較し検討した．なお，いずれも同一試料を3回測定した．

結　　果

1．加水分解溶液の中和

図1で明らかなように pH0.7～1.8の範囲の試料が高い吸光度を示し，アルカリ側に pH が進むほど吸光度の低下が認められ，中和工程の試料至適 pH 域は，0.7～1.8であった．

2．Oxidant 溶液の作用時間

Oxidant 溶液の添加後，約2～3分後に吸光度は安定し，その後約20分間は一定値を示した．この結果から Oxidant 溶液による酸化は約5分間の作用で充分であり，Oxidant 溶液添加後20分以内に Ehrlich 試薬を加えることが必要であることがわかった．（図2）

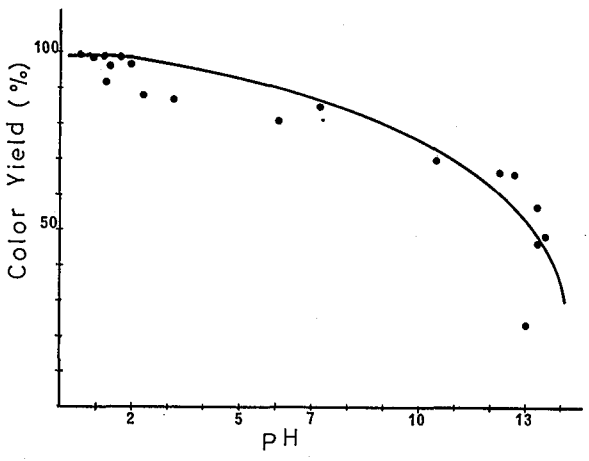


Fig. 1. Color Yield as a Function of pH

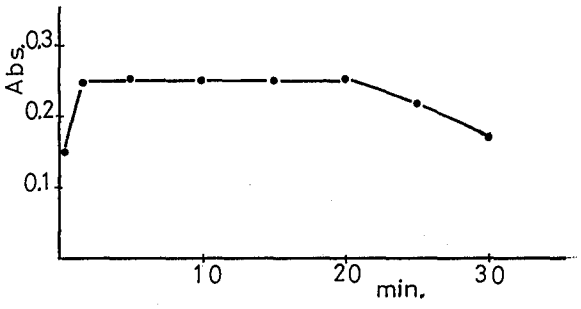


Fig. 2. Time Course of the Reaction between the Oxidant Solution and Free Hydroxyproline.

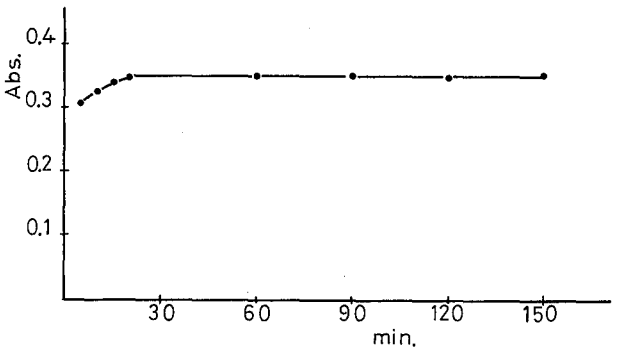


Fig. 3. Time Course of Color Development by Ehrich Reagent.

Table 2. Infulence of Urinary Amino Acids on Hydroxyproline Recovery (n: 4)

	Recovery		
	mean±SDμg/mg	(%)	
①HOP	24.2±0.92	(100)	
②MIX	20.4±0.52	—	(100)
③URINE	14.5±0.25	—	
④URINE+HOP	38.4±0.17	(97.9)	
⑤URINE+MIX	34.5±0.76	—	(97.2)
⑥HOP +MIX	45.6±1.77	(104.9)	(104.1)

HOP : Hydroxyproline Standard Solution
MIX : Amino Acids Standard Solution Type AN

3. Ehrlich 試薬による呈色度の安定性

Ehrlich 試薬を添加して加熱，冷却した後，約20分間で吸光度は安定し，150分まで同一吸光度を示した.(図3)

4. HOP 回収試験および共存アミノ酸の影響

尿に HOP 或はアミノ酸混合液を添加し本方法による添加 HOP 回収率を求めた.

標準 HOP 溶液の回収 HOP 濃度を100%とした場合，尿からの HOP 回収率は97.9%アミノ酸混合液と添加した HOP 回収率は104.9%であった．また，アミノ酸混合液の回収 HOP 濃度を100%とした場合では，尿からの HOP 回収率は97.2%，HOP 標準液からの HOP 回収率は104.1%といずれも高い回収率が得られた．(表2)

更にこれらの結果から本方法は尿中に共存するアミノ酸の影響をあまりうけないことが明らかにされた.

5. HOP の測定範囲

図4に示すように本方法による HOP 検量線の直線域は，0～10μg／3.5m*l* であった.

6. 試料 Blank 値について

本方法による試料 Blank 値は学童尿では吸光度 0.02～0.09 (HOP1μg／3.5m*l* 以下に相当) の範囲で低値を示した．(図5)

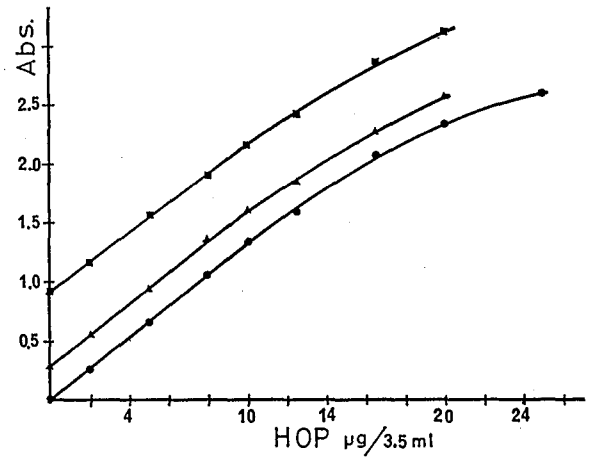


Fig. 4. Effective Range for Hydroxyproline Determination.
●—● Standard Hydroxyproline Solution.
▲—▲ Standard Hydroxyproline Solution +A Urine.
■—■ Standard Hydroxyproline Solution +B Urine.

7．本方法と活性炭，および活性炭と樹脂使用方法，並びに，水解物の中和工程に試料の蒸発乾固工程を加えたこれら3方法の比較

表3が示すように，本方法による各試料HOP測定値の31.5～107.0μg／m*l* を100%とすると，活性炭添加方法は蒸発乾固工程有無にかかわらず，そのHOP測定値は，約15.5～53.5μg／m*l* で本方法との一致率は，44.4～62.2%，平均52%と低値を示した．

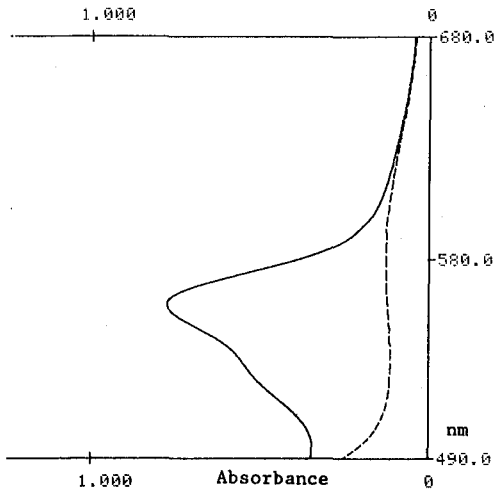


Fig. 5． Absorption Spectra of Urine Blank and Solution Corresponding 7μg/3.5m*l* of Hydroxyproline.
(———Sample ——— Blank)

春日ら[11,12]によるHOP測定値は，本方法のHOP測定値と蒸発乾固工程の有無にかかわらず良く一致し各HOP値は29.0～101.5μg／m*l* を示し，本方法との一致率は，76.3～98.2%平均89%で高い値を示した．またHOP測定値の再現性は本方法のSDは0.5～1.50を示したのに比べて，活性炭法はSD1.5～4.5，春日ら[11,12]の方法は0.0～2.0を示し，本方法と春日ら[11,12]の方法の再現性は良好で，また類似した結果を示した．

考　察

尿中HOPは最近，喫煙および大気汚染の健康影響調査で健康指標としてその有効性が報告されて以来，HOP測定に感心がもたれている．

基本的な測定方法は，尿を加水分解したん白質など尿中の共存物質との結合を切り離して遊離HOPとし，呈色試薬で発色させる比色測定である．

HOP比色測定には，大別して加水分解尿にアミノ酸呈色試薬のニンヒドリンで発色させる場合と本法と同じく更に酸化剤を添加して，HOPをピロールに転換しEhrlich試薬で呈色させ比色する方法がある．前者は，

Table 3． Comparison of Our Method with Two Existing Method ② and ③

			sample A(n: 3) mean±SD	sample B(n: 3) mean±SD	sample C(n: 3) mean±SD	proportin(%)
① nothing (our method)	concentration	(μg/ml)	31.5±0.50	75.5±1.00	107.0±1.00	
	proportion	(%)	100%	100%	100%	100%
② charcoal	concentration	(μg/ml)	16.5±2.50	39.5±1.50	47.5±1.50	
	proportion	(%)	52.4±6.49%	53.4±0.94%	44.4±1.14%	50.1±4.03%
③ charcoal +resin	concentration	(μg/ml)	29.0±0.00	74.0±2.00	101.5±0.50	
	proportion	(%)	92.1±0.00%	98.2±1.66%	94.9±0.45%	95.1±2.49%
evaporation to dryness						
① nothing (our method)	concentration	(μg/ml)	27.5±0.50	59.5±1.50	85.0±1.00	
	proportion	(%)	87.8±0.81%	79.3±1.63%	82.5±5.08%	83.2±3.50%
② charcoal	concentration	(μg/ml)	15.5±1.50	46.5±4.50	53.5±2.50	
	proportion	(%)	49.2±3.92%	62.2±5.15%	50.0±1.88%	53.8±5.95%
③ charcoal +resin	concentration	(μg/ml)	29.0±0.00	59.5±0.50	82.3±0.94	
	proportion	(%)	92.1±0.00%	79.3±0.50%	76.3±0.92%	82.6±6.85%

Method ② uses activated charcoal and Method ③ uses both ion-exchange resin and activated charcoal on HOP measurement

HOP以外の共存アミノ酸が影響し測定値の変動が大きく低濃度HOPの測定には困難なため現在では殆んどが後者の方法を用いている．しかし，比色測定法を採用する場合には測定工程で検討を要する点がいくつかある．すなわち，測定物質に特異的な呈色で更に高い鋭敏度で一定時間安定な発色であること，また，発色防害物質や試料Blankに着色が認められる場合，前処理により両者の除去が可能かどうかの点である．そこで本方法についてもこれらの点を検討した．本方法に用いたクロラミンTを含む酸化剤およびp-dimetylaminobenzaldhydeとHOPの反応機構については，詳細な報告があり，HOPに特異的な化合物が生成されることが知られている．生成物の呈色の安定性は，本方法による検討結果でも長時間安定で，多数検体を同時処理する場合など非常に良好であることがわかった．更に本方法は，鋭敏性も高く，測定範囲も広く，共存するアミノ酸の影響もほとんど認められなかった．発色防害物質や水解物の着色除去には他の測定方法ではイオン交換樹脂や活性炭の添加などの配慮がなされている．しかし，いずれも操作が簡便でなく，この工程で誤差を招き易い．本方法ではこれらの除去剤を使用しないで比色測定操作までに原尿の20倍希釈を試みた．必然的に発色防害物質も着色も希釈され，測定値への影響が少くなった．試料の高希釈を実施した場合にはHOP測定の鋭敏が問題とされるが同一試料を用いた春日ら[11,12]の方法との比較試験では，本方法は鋭敏性，再現性などの点で春日ら[11,12]の測定値と優るとも劣らない結果を示した．本方法は単に簡便なばかりでなく，測定方法の良好性も認められたものと考える．

学童（9才男女同数145人）の早朝尿について本方法で尿中HOP量を測定した結果，その平均値は，82.3±36.0 $\mu g/ml$ 同一尿中クレアチニン測定値で補正したHOP平均値は，100±21.0$\mu g/mg$と得られた．同一尿を用いた春日ら[11,12]の測定値と比較した結果，両方法は良く一致し，尿中HOP測定に本方法は充分に有効であることがわかった．

今後，公害検診などに本方法による尿中HOP測定を組み入れ，健康指標として尿中HOPの有用性を検討したい．

要　約

尿中HOP測定方法の改良および簡便化を試みた．従来の尿中HOP測定方法は，その処理工程で加水分解尿の希釈倍率を一定にするために，蒸発乾固したり，また，加水分解尿の着色が比色測定時に影響することをさけるために活性炭やイオン交換樹脂を添加する脱色操作が実施されている．これらの工程はいずれも操作が簡便ではなく，また，測定誤差が生じ易い上に，処理に長時間を要する．そこで，直接，試料尿を所要試薬で希釈する処理工程を考え，試料尿の使用量，至適試薬濃度とその量，作用時間および比色可能な時間等について検討した．その結果，従来法と比較して共存するアミノ酸の影響も少く，鋭敏性，再現性ともにすぐれた簡易な測定方法が見出された．

学童尿を用いて本方法と春日らの方法と比較検討した結果，本方法はすぐれた結果を示したので，尿中HOP測定に充分有用であることがわかった．

文　献

1）Neuman, R.E. and Logan, M.A.: *J. Biol. Chem.*, **184**, 299, 1950
2）Prockop, D.J. and Udenfriend, S.: *Anal. Biochem.*, **1**, 228, 1960
3）Bergman, I. and Loxley, R.: *Anal. Chem.* **35**, 1961, 1963
4）Kivirikko, K.I., Laitinen, O. and Prockop, D.J.: *Anal. Biochem.*, **19**, 249, 1967
5）Bergman, I. and Loxley, R.: *Clin. Chim. Acta.*, **27**, 347, 1970
6）Goverde B.C. and Veenkamp F.J.N.: *Clin. Chim. Acta.*, **41**, 29, 1972
7）Seyman G.C. and Jackson, M.J.: *Clin. Chim.*, **20**, 544, 1974
8）Walser, A. and Schownenberger, G.A.: *Arzneim-Forsch*, **24**, 841, 1974
9）Nobbos, B.T., Walker, A.W. and Davies, T.J.: *Clin. Chim. Acta.*, **64**, 219, 1975
10）Hodgkenson, A. and Thompson, T.: *J. Clin. Pathol.*, **35**, 807, 1982
11）松本秀明，春日　斉，逢坂文夫，杉田　稔：日本公衛誌，**28**, 505, 1981
12）松木秀明，春日　斉，逢坂文夫，柳沢幸雄，西村　肇：日本公衛誌，**30**, 166, 1983
13）笠原利英，大澤誠喜，鈴木孝人，溝口　勲：東京衛研年報，**30—1**, 195, 1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 283-289, 1985

東京における呼吸器疾患死亡時系列の検討

牧野国義*, 溝口 勲*

Time Series Study on Mortality from Respiratory Diseases in Tokyo

KUNIYOSHI MAKINO* and ISAO MIZOGUCHI*

Time series data of mortality from respiratory diseases, lung cancer, pneumonia-bronchitis and asthma, in Tokyo were observed and were statistically analyzed in order to investigate their annual transition, their monthly variation and death hour variation.

Lung cancer mortality rates for both sexes have monotonicly increased during the study period from 1952 to 1981. It was estimated by multiple regression equation that lung cancer for both sexes would show higher mortality rates than gastric cancer in 2000 although they were placed in the reverse order till 1981.

Monthly pneumonia-bronchitis and asthma mortality rates manifested seasonal variation which were high in winter and low in summer, in the study period from 1952 to 1981. However, the mortality rate in winter has gradually decreased year by year and the monthly variation has not been great in the recent years. In the standardized normal time series data, these mortality rates showed a close association with meteorological factors.

In the period from January 1980 to December, 1981, there was little difference for sex in the shape of the death hour distribution of pneumonia-bronchitis and asthma mortality in those over 70 years of age. In addition, the mortality rate from any of these diseases increased at 4 or 5 a.m.

Keywords : time series study, respiratory disease, lung cancer, pneumonia-bronchitis, asthma

緒　　言

我々は東京における呼吸器疾患死亡の risk factor や confounding factor からの寄与を明らかにするため，先に上記死亡と大気汚染や社会経済的要因との関連性を検討して報告した[1,2]*. その検討の際の観察方法は地域比較検討 (cross-sectional study) であった．一方，各疾患による死亡は時代により大きく変化し，東京では，昭和27年の結核死亡率は80.4 (10万人対) で死因順位第2位であったが，昭和56年には4.7と約17分の1に減少した．また，冬期には多くの疾患による死亡が多発することが知られている．このように，死亡率は時代，年，季節，月，時刻といった時間に関する変量によっても変動すると考えられる．したがって，各死亡の時間的変化の検討 (time series study または longitudinal study) も各死亡の特徴を理解するために重要である．そこで，本研究では呼吸器疾患 (肺癌，肺炎・気管支炎，喘息) 死亡の年次別，月別，時刻別の時系列データを用いて時間的変化を観察し，統計的性質を検討した．さらに，上記疾患死亡と季節変化の代表的指標である気象との関連性についても若干の検討を加えた．

方　　法

(1) 死亡資料

年次別の時系列データとして東京における昭和27年から56年までの30年間の肺癌，肺炎，気管支炎，喘息を死因とする死亡統計資料を利用した．また，月別の時系列データとして，肺炎・気管支炎死亡については昭和27年

* 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

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

から56年までの資料，喘息死亡については昭和30年から56年までの資料を利用した．以上は全て東京衛生年報掲載の死亡統計資料による（ただし，月別の肺癌死亡資料は不掲載のため利用できなかった）．また，死亡の時刻変動のデータとして厚生省統計情報部編集の資料を利用し，昭和55，56年の東京における上記3疾患死亡について性別，年令層別（40～69才，70～才，0～才）に分類した．

(2) 解析方法

時系列データの統計的性質を解析する場合に，時系列分布図を観察することによって，疎なトレンドを知ることができる．また，大きなトレンドがあるときの外れ値[3]は分布図の観察で容易に見分けることができる．したがって，本研究では，年次別，月別，時刻別の各死亡の時間変化を図示し，観察した．

年次別時系列データでは，先ずトレンド曲線を3次の多項式回帰分析（重回帰分析を利用）により求めた．ただし，年次別時系列データが粗死亡率の場合には年令構成の影響を大きく受ける．そこで，昭和30年の全国人口を標準人口として訂正死亡率を求め，この時系列データについても同様にトレンド曲線を求めた．このトレンド曲線が単調増加または減少の場合には，疎かであるが今後の死亡予測が可能である．参考までに西暦2000年における死亡率を予測した．次に，男女の時系列の死亡傾向が一致しているかどうかを検討した．トレンドが大きい場合にはその影響も大きいことを考慮し，ここでは年次変化率により相関分析を行った．

月別時系列データでは，月変化を検討するために年次のトレンドを除去した（定常時系列化と呼ぶ）．つまり，死亡の月変化が各年とも3次式で近似できることを考慮して，3次の多項式回帰分析をn＝12として1カ月ずつずらして行い，回帰式から得られた中点を結ぶことにより年次のトレンド曲線が得られる[4]．時系列データとトレンドの差をとることにより定常時系列データが得られる．この値は相対値であるので，これを標準化した．周期性の確認のため，ラグタイムを1月ずつ12カ月まで変化させてそれぞれの自己相関係数を計算し，コレログラムを作成した．また，この定常時系列データを用いて5気象要素（気温，湿度，気圧，蒸気圧，降雨量）との相関分析を行い，気象の死亡への寄与を検討した．

死亡の時刻変化については，統計学的検討としては多少の死亡時刻のずれを考慮して時刻を3時間毎にまとめ，時間帯を8区分（0～2，3～5，6～8，9～11，12～14，15～17，18～20，21～23時）した各疾患の性別，年令層別（40～69才，70～才，0～才）の死亡の上記時間帯区分によりカイ2乗検定を行い，死亡と時刻の関係を検討した．

結果と考察

(1) 年次変化

東京における昭和27年から56年までの性別の肺癌，肺炎・気管支炎，喘息の死亡率の年次時系列データをFig.1に示した．肺癌死亡は男女とも明らかに単調増加のトレンドが認められた．肺炎・気管支炎死亡については，昭和41年頃まで男女とも減少傾向であったが，以後男は漸増，女も微増のトレンドが認められた．また，喘息死亡については男女とも漸減傾向からプラトーの状態に変化した．しかし，訂正死亡率の年次変化では肺炎・気管支炎死亡は必ずしもFig.1のように増加していない．この死亡は高令者の割合が高く，近年高令者の人口が増加したことが死亡率増加の主な原因となったと考えられる．なお，男の喘息死亡率は昭和28年と32年にピークがあるが，両年にはインフルエンザが大流行しているのでその影響が窺われる（肺炎・気管支炎死亡率も同年にピークがある）．上記のトレンド（2次式）を3次の多項式回帰分析により求めて結果をTable 1に示した．この回帰式

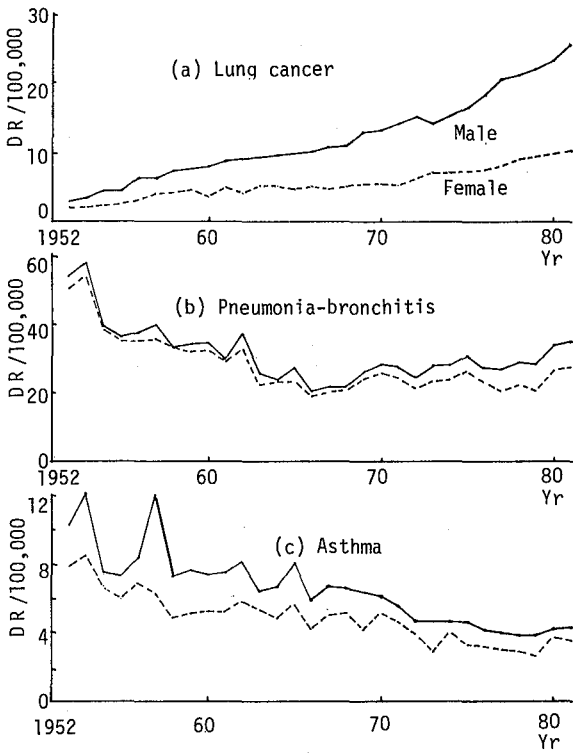


Fig. 1. Annual Transition of Mortality from Respiratory Diseases

Table 1. Annual Trends of Mortality from Respiratory Diseases with Multiple Regression Analysis

Cause of Mortality	Sex	Mult. Corr. Coeff	Mult. Reg. Coeff. a_0	a_1	a_2	Mean Square of Residual
Lung cancer	m	0.990***	4.17	0.195	0.0160	0.36
	f	0.972***	2.61	0.0815	0.00535	0.30
Pneumonia-bronchitis	m	0.895***	54.4	- 3.23	0.0815	15.4
	f	0.921***	50.1	- 2.86	0.0692	11.8
Asthma	m	0.873***	10.4	- 0.304	0.00270	1.21
	f	0.915***	7.70	- 0.250	0.00302	0.38

Mult. Reg. Coeff. : Mortality rate $= a_0 + a_1 t + a_2 t^2$, t : Year(t=1 in 1952)
*** : $p < 0.001$

より単調増加が明らかな肺癌死亡について西暦2000年の死亡率を求めると，男は97.4（訂正死亡率50.0），女は43.7（同17.0）とかなりの増加が見込まれた．悪性新生物の部位別死亡率順位は，昭和56年には男女とも胃癌が第1位(男46.0，女28.6)で，肺癌が次いでいる(男25.9，女10.2)．しかし，胃癌死亡が漸減傾向であることを考慮すると，男だけでなく女も早晩肺癌死亡が胃癌死亡を上回ることが予想される．この肺癌死亡率の増大の原因として先ず第一に喫煙が挙げられ，多くの研究者により報告されている[5-9]．他の原因として大気汚染，職業暴露などが知られているが，死亡率への寄与は必ずしも明らかでない．ただし，非喫煙者の肺癌死亡の時系列的増大を示す報告[10]があり，喫煙以外の原因も軽視できない．男女間の相関分析結果では，肺癌死亡が−0.321($p > 0.05$)，肺炎・気管支炎死亡が0.969（$p < 0.001$），喘息死亡が0.583（$p < 0.001$）で，肺炎・気管支炎死亡は3疾患中最も相関が高く，Fig.1から推測されるように性差が認められなかった．この理由は，この疾患の発症，悪化の原因が性によらないためであると考えられる（肺癌の場合には喫煙率が男女でかなり異なる）．

(2) 月変化

肺炎・気管支炎と喘息の死亡について，調査期間（昭和27～56年，喘息死亡は同30～56年）の初期と終期それぞれ5年間と全期間の死亡率月変化をFig.2に示した．両疾患とも冬期に死亡率が高く，夏期に低い傾向を示しているが，その月変化は期間初期の方が顕著で，終期には変化の小さいことが明らかである．両疾患死亡について定常時系列を標準化した全期間（定常時系列のため期間の前後6カ月ずつが欠損した）の定常時系列データをFig.3に示した．この図からも月変化の減少が明らかである．次に，両疾患死亡と12カ月周期性の高いと考えられる気温についてコレログラムを作成し，Fig.4に示し

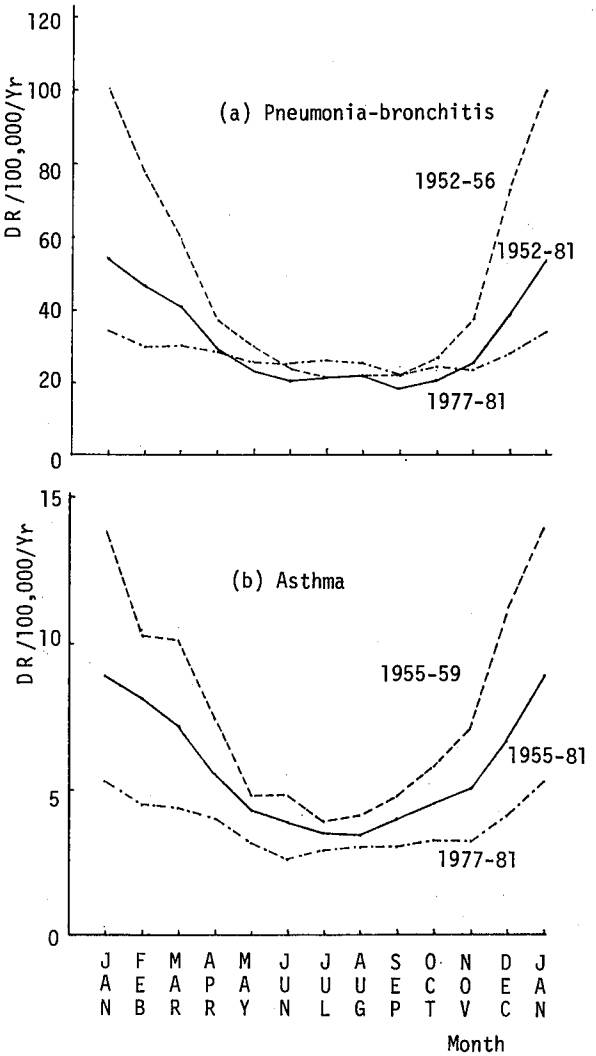


Fig. 2. Monthly Variation of Mortality from Respiratory Diseases during 30-year Period of 1952-81

た．両死亡についても12カ月周期性が認められる．この月変化に気象が寄与していることが考えられるので，気温，湿度，大気圧，蒸気圧，降雨量の5気象要素と定常時系列の両死亡との相関分析を行い，結果をTable 2に示した．両死亡とも5気象要素全てと有意の相関を示し，低温，低湿度，高大気圧，低蒸気圧，小雨の時期に高死亡となるとの結果を得た．この気象条件は全て冬期に該当するが，寒冷刺激が気管狭窄や血圧上昇をもたらすなどの生体影響が大きいことを考慮すると，気象要素中では気温の死亡率への寄与が大きいと思われる．この死亡率の月変化が近年減少したことは，老人体力の増強，温熱環境の向上，医療施設の整備，予防・治療技術の進歩などが図られた結果と考えられる．

(3) 時刻変化

呼吸器疾患3死因による性別の死亡時刻分布を1年の死亡率に換算してFig.5に示した．肺癌死亡は男女とも不規則に変動し，格別の特徴は得られなかった．年令層別に分けても，死亡率最高時刻は，40～69才で男18時，女12時，70～才で男10時，女8時と一致しなかった．また，肺炎・気管支炎死亡では，図のように男女の死亡時刻分布が類似した．年令層別では70～才で男女とも死亡率最高時刻は13時であった．しかし，40～69才では最高時刻が男女間で一致せず，年令層間でも一致しなかった．この理由は，70～才の死亡率が1年換算で各時刻とも男500以上，女300以上であったのに対し，40～69才ではその20分の1以下の低死亡率であったために誤差変動の影響の大きいことが考えられる．低死亡率の場合に誤差変動の影響を受け易いことは他の疾患死亡でも同様である

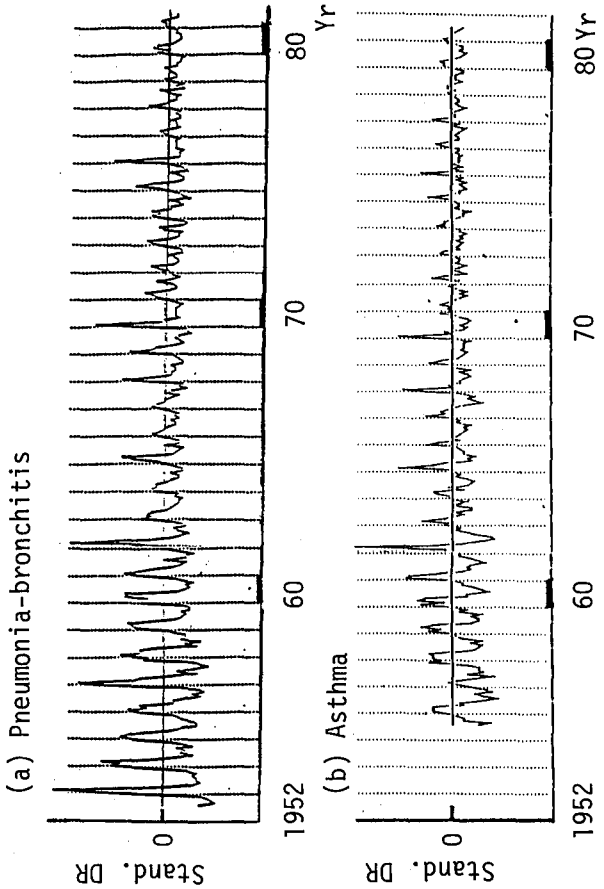


Fig. 3. Standardized Monthly Normal Time Series Data of Mortality from Respiratory Diseases from 1952 to 1981

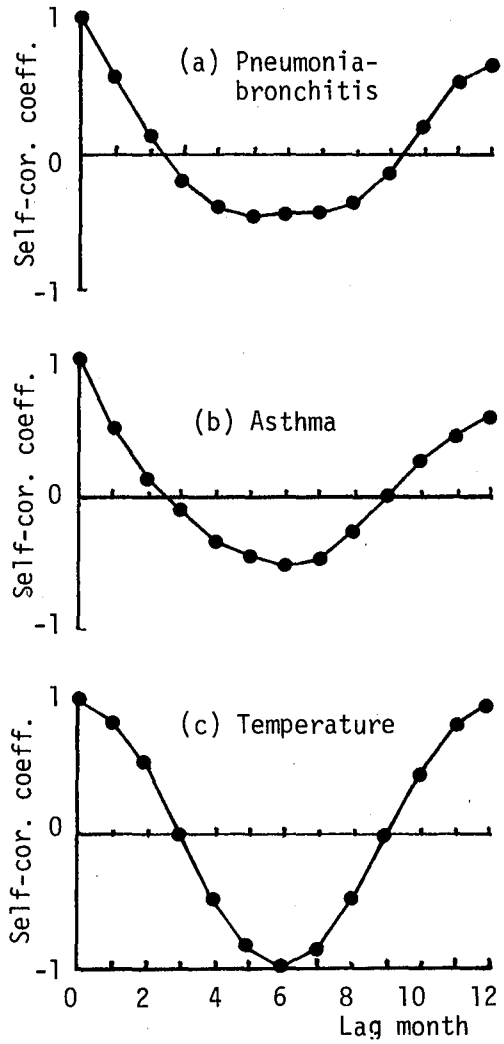


Fig. 4. Display of Correlogram computed by Monthly Data on Mortality and Temperature

Table 2. Correlation between Mortality Rate and Meteorological Factor

Cause of Mortality	Meteorological factor# Temp.	Hum.	AP	VP	RF	N
Pneumonia-bronchitis	＊＊＊ - 0.608	＊＊＊ - 0.622	＊＊＊ 0.264	＊＊＊ - 0.567	＊＊＊ - 0.372	348
Asthma	＊＊＊ - 0.645	＊＊＊ - 0.667	＊＊＊ 0.342	＊＊＊ - 0.631	＊＊＊ - 0.374	312

# : Temp.=Temperature, Hum.=Humidity, AP=Atmospheric pressure
VP=Vapour pressure, RF=Rainfall
＊＊＊ $p < 0.001$

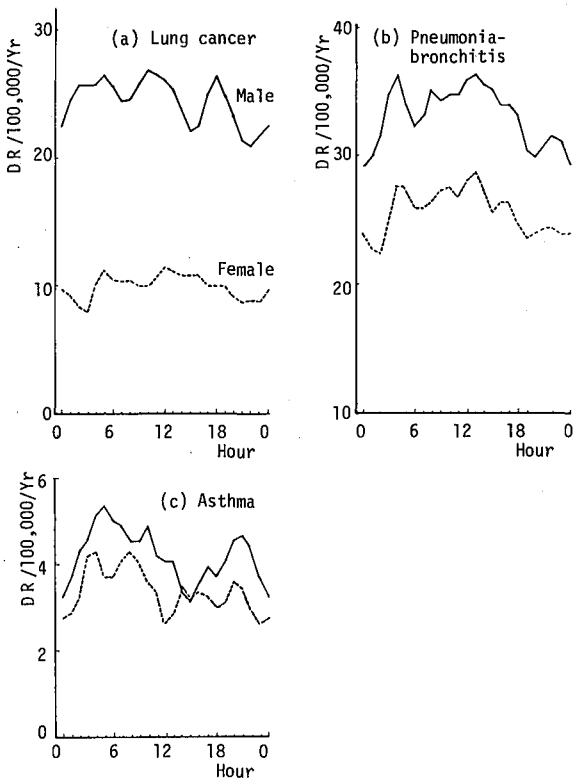


Fig. 5. Distribution of Death Hour for Respiratory Diseases

が，その喘息死亡の場合には性および年令層間で死亡時刻の分布型が比較的類似した．性および年令層間で死亡の時刻変化を比較するために相関分析を利用し，Table 3に性別間，Table 4に年令層間の結果を示した．性別間では肺炎・気管支炎死亡が，年令層間では肺癌や喘息の死亡が頻似するとの結果が得られた．また，死亡率最高時刻は疾患，性，年令層により必ずしも共通していなかったが，いずれの分布でも午前4，5時頃に一つのピークが認められた．この死亡時刻に差があるかどうかを8区分の時間帯に分けてカイ2乗検定を用いて解析し，

Table 3 Correlation between Mortality Rates for Male and Female

Age	Cause of Mortality: Lung cancer	Pneumonia-bronchitis	Asthma
40～69	0.017	- 0.101 ＊＊＊	0.576 ＊＊
70～	0.171	0.795 ＊＊＊	0.298 ＊＊＊
0～	0.370	0.858	0.649

＊＊$p < 0.01$, ＊＊＊$p < 0.001$

Table 5に各時間帯別の死亡率とともに表示した．有意の結果は少なかったが，死亡率の高い70～才では，肺癌は男が9～11時，女が18～20時に，肺炎・気管支炎はともに12～14時に，喘息もともに3～5時に高い死亡率が認められた．

死亡時刻を解析した報告は少ないようで，東京については昭和27年の死亡統計を用いた鈴木の報告[11]があるが，肺炎死亡が午后5～8時に高いとの結果であり，昭和55，56年資料による上記結果と異なった．この死亡時刻の特徴については時間生物学的知見，臨床的知見を考慮し，さらに検討したい．

まとめ

東京における呼吸器疾患（肺癌，肺炎・気管支炎，喘息）死亡の時間的変化を，昭和27年から56年までの死亡統計資料を用いて年次変化や月変化を検討し，さらに，昭和55，56年の資料により死亡時刻変化を検討した結果以下の知見を得た．

1．肺癌死亡率は男女とも明らかな単調増加傾向，肺炎・気管支炎死亡率は減少傾向から男は漸増，女は微増の傾向変化，喘息死亡率は男女とも減少傾向からプラトーの傾向への変化が認められた．ただし，訂正死亡率によると，肺炎・気管支炎死亡の増加は認められず，近年の高令者人口の増加により死亡率が増加したと考えられる．

Table 4. Correlation between Mortality Rates in Three Age Groups

Age groups	Cause of Mortality: Lung cancer m	Lung cancer f	Pneumonia-bronchitis m	Pneumonia-bronchitis f	Asthma m	Asthma f
	***				**	*
40~69 & 70~	0.744	0.357	- 0.164	−0.097	0.516	0.425
	***	***			***	***
40~69 & 0~	0.877	0.930	0.193	0.052	0.745	0.796
	***	***	***	***	***	***
70 ~ & 0~	0.964	0.661	0.928	0.977	0.927	0.858

* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001

Table 5. Motality Variation in Death Hour Observation

Age	Death Hour	Cause of Mortality: Lung cancer m	Lung cancer f	Pneumonia-bronchitis m	Pneumonia-bronchitis f	Asthma m	Asthma f
40~69	0 ~ 2	39.9	12.2	22.9	10.3	4.5	2.7
	3 ~ 5	41.6	14.3	23.8	11.8	4.9	4.3
	6 ~ 8	39.6	15.4	20.5	12.7	5.3	4.6
	9 ~11	41.2	15.4	20.9	11.0	4.2	4.6
	12~14	38.9	17.2	20.8	9.7	4.2	3.1
	15~17	36.4	15.4	22.2	9.3	4.0	3.0
	18~20	41.9	13.0	17.5	10.8	4.4	3.4
	21~23	35.1	12.1	21.6	10.8	5.0	4.0
70~	0 ~ 2	303.7	85.1	563.4*	332.1*	55.8	34.5
	3 ~ 5	336.1	84.6	672.2	396.3	77.0	41.6
	6 ~ 8	325.6	93.3	656.1	381.1	72.9	40.3
	9 ~11	350.8	90.2	677.1	405.3	69.2	36.7
	12~14	328.3	94.2	722.0	423.8	59.8	31.3
	15~17	305.5	95.2	678.6	402.8	51.0	36.6
	18~20	308.6	96.5	631.2	363.0	62.0	35.2
	21~23	267.3	83.1	595.2	358.8	59.7	29.7
0~	0 ~ 2	24.0	9.0	30.3	22.9	3.8	3.0
	3 ~ 5	25.9	9.8	35.1	26.7	5.1	4.1
	6 ~ 8	24.7	10.4	33.6	26.2	4.9	4.0
	9 ~11	26.3	10.2	34.7	27.3	4.6	3.6
	12~14	24.9	11.2	36.0	28.1	3.8	3.0
	15~17	28.2	10.6	34.5	26.3	3.5	3.3
	18~20	24.7	9.7	31.2	24.1	4.2	3.2
	21~23	21.2*	8.7	31.2	24.2	4.3	3.1

* p < 0.05, ** p < 0.01 (Chi-sqare test)

また，昭和56年の肺癌死亡率の悪性新生物部位別死亡率順位は男女とも胃癌に次いで第2位であるが，西暦2000年には男だけでなく女も第1位になると予想される．

2．肺炎・気管支炎と喘息の死亡はいずれも冬期高死亡，夏期低死亡の傾向があり，12カ月周期も認められたが，昭和20年から56年までの期間の初期と終期との死亡率月変化を比較すると，両死亡とも初期に月変化が大きく，終期に小さい結果を示した．この月変化減少，冬期死亡の減少は近年の体力面，衛生面の向上が寄与したと考えられる．

3．肺癌死亡の時刻変化は性，年令層（40～69才，70～才）により異なり，また，各別死亡について特に高い死亡時

刻は認められなかった．肺炎・気管支炎死亡については70～才，0～才で男女の死亡時刻分布が類似し，死亡率最高時刻はともに13時であった．また，喘息死亡は性別間，年令層間で比較的類似した死亡分布を示した．なお，3疾患死亡の性別，年令層別のいずれの死亡率にも共通して，午前4，5時に，死亡率最高ではないがピークが認められた．

文　献

1）牧野国義，溝口　勲：東京衛研年報，34,143,1983
2）牧野国義，溝口　勲：東京衛研年報，35,302,1984
3）竹内　啓，大橋靖雄：統計的推測－2標本問題，66,1981,日本評論社，東京
4）奥野忠一編：応用統計ハンドブック，432,1984，養賢堂，東京
5）Fraumeni,J.F.:*J Natl Cancer Inst*,41,1205,1968
6）Kahn,H.A.:*J Natl Cancer Inst*,19,1,1966
7）Carnow, B. W.：*Environ Health Perspect*, 22,17,1978
8）Doll, R. and Peto, R.：*J Natl Cancer Inst*, 66,1193,1981
9）Holck,S.E.et al:*AJPH*,72,38,1982
10）Enstrum,J.E.:*J Natl Cancer Inst*,62,735,1979
11）鈴木康弘：順天堂医誌，5，292,1959

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 290-292, 1985

ビタミンAの二酸化窒素による分解

太田与洋*，鈴木孝人*，加納堯子*

Decomposition of Vitamin-A with NO_2

TOMOHIRO OHTA*, TAKAHITO SUZUKI* and TAKAKO KANOH*

Gas-liquid reactions of NO_2 with retinal and retinol were carried out in test tubes. The concentrations of the reactants were monitored by the UV-VIS absorption for each reactant. Results showed that a few ppm of these Vitamin A's easily decomposed by bubbling only 17 ppm NO_2 in N_2 at the flow rate of 30 m*l*/min.

Keywords: retinal, retinol, nitrogen dioxide

緒　言

生体内ではプロビタミンAとしてβ—カロテン等からレチナールやレチノールなどの共役二重結合を持つビタミンAが形成されることが知られている．ビタミンAは網膜ではレチナールの形で，その他の組織ではレチノールの形で生理作用を持っていると思われる[1,2]．網膜ではレチナールはオプシンと結合して視物質（ロドプシン）を形成し，そして，視物質は酵素等の反応回路によってレチナールとレチノールに互換していることが知られている[3,4]．一方，Shalamberidze[5]によれば，健康人に0.14 mg/m³濃度のNO_2暴露でも暗順応の遅延が生じることが報告されている．また，in vitroでの気相反応では共役二重結合を持った化合物とNO_2との反応速度は，モノオレフィン化合物とNO_2の反応に比べて，1000倍以上の反応性を持つこと[6]，さらに，in vivoでも肺の共役二重結合を持つ不飽和脂肪酸とNO_2はよく反応することが知られている[7,8,9]．ここでは，NO_2が生体内のビタミンAへ及ぼす影響を検討する第1歩として，レチナール及びレチノールとNO_2の反応について調べた結果を報告する．

実　験

レチナールとレチノール（シグマ製）を各々，別に，四塩化炭素（関東化学製）に溶解し，レチナールは14.3 ppm，レチノールは13.8ppmの溶液をつくった．その溶液15m*l*を内径1.6cmのガラス管に入れ，素焼ガラスフィルター（木下式ボールフィルター，No.4）を用いて，窒素気流中96.0ppmのNO_2標準ガスをバブリングし，その適当な時間間隔のサンプルの紫外可視部の吸収スペクトルを測定した．結果は，各々，図1と図2に示す．これらの図によるとそれぞれ最大吸収が減少し，他に生成物と考えられる物質の吸収が増加してくるのがわかる．

次に1.9ppmのレチナールと3.5ppmのレチノールについて，液体クロマトグラフを用いて，二酸化窒素による分解の過程を明らかにした．これらの2つのビタミンAは室内光でも簡単に異性化するために，アルミホイルを用いて完全に遮光した．所定の時間放置した場合，あるいは酸素，もしくは窒素を30m*l*/minの速さで，バブリングした場合，ビタミンAの減少は全く見られなかった．つぎに，NO_2の標準ガス（96.0ppm，窒素中）を30 m*l*/min流した場合，および，この標準ガスを5 m*l*/min，酸素を25m*l*/min同時に流したとき（つまり，NO_2が16.7ppm）の分解過程をそれぞれ図3と図4に示した．なお，液体クロマトグラフのカラムはODSであり，アセトニトリル100%を移動相として用いた．反応，および分析は室温で行なった．レチナールは360nm，レチノールは325nmの吸収により定量を行なった．反応が進むにしたがって，この検出器で，複数の生成物のピークが成長してきた．

考　察

以上の結果から，共役二重結合を持つ，レチナールと

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

レチノールは，低濃度のNO_2で容易に分解されることがわかった．この濃度は，都市部環境レベルよりも高いが，さらに，低濃度レベルになっても，バブリング時間を長くすると，分解はすすむであろうと考えられる．

かりに，NO_2のin vivoでの暴露によっても，生体内のビタミンAが減少するなら，網膜中の視物質の量が減少し，眼の暗順応も平行して減弱することも考えられる．その意味では，Shalamberidzeの報告[5]と一致し，興味ある結果である．さらに，ビタミンAは肺胞中隔細胞，胸膜下結合組織に存在する線維芽細胞，血管周囲や細気管支周囲に存在する線維芽細胞等に存在することが知られており[10]，肺においてもビタミンA貯蔵細胞と肺胞壁内の線維化との関連も示唆され[11]，また，最近では，ビタミンAの抗腫瘍作用についての報告もある[12,13,14]．さらに，血中ビタミンA濃度[15]ないし食事のβ—カロテンの摂取[16]と発癌リスクとの間に有意な負相関が存在するとの疫学調査が得られている．それ故，NO_2の生体内ビタミンAへ及ぼす影響について今後は検討する必要があると

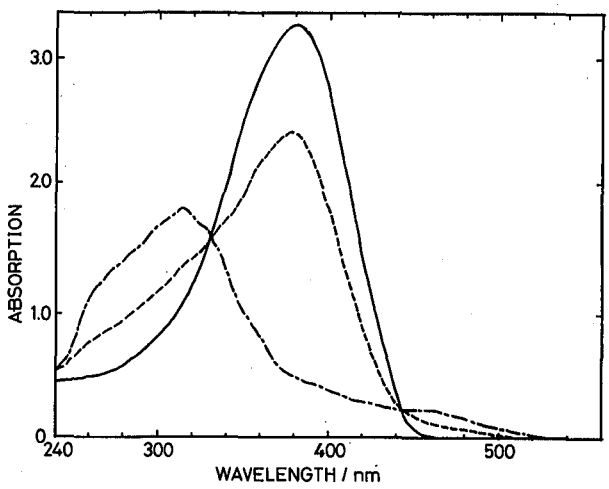


Fig. 1. Variation of UV-VIS spectra of retinal with bubbling of NO_2 : $[retinal]_0$=14.3 ppm in CCl_4; $[NO_2]$=96.0 ppm in N_2 : ———, before; - - - - - -, 10 min bubbling; — — — —, 40 min bubbling.

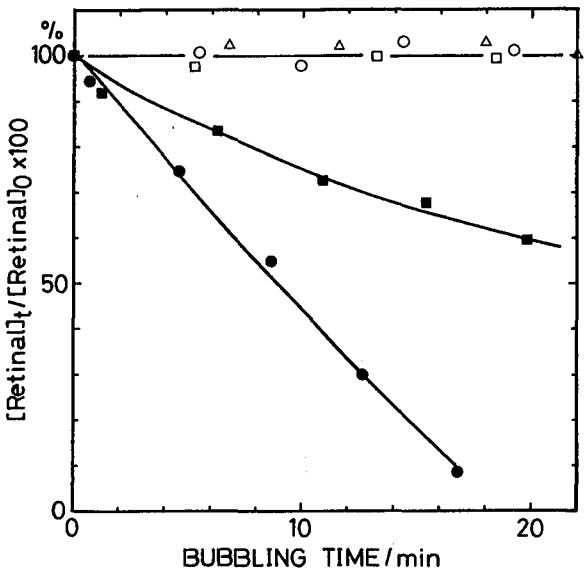


Fig. 2. Decomposition of retinal by gas-liquid reaction of NO_2 : △, no bubbling; ○, bubbling of N_2 with flow rate of 30 m*l*/min; □, O_2 with 30m*l*/min; ●, 96.0 ppm of NO_2 in N_2 with 30 m*l*/min; ■, 17 ppm of NO_2 with 5 m*l*/min of N_2 and 25 m*l*/min of O_2.

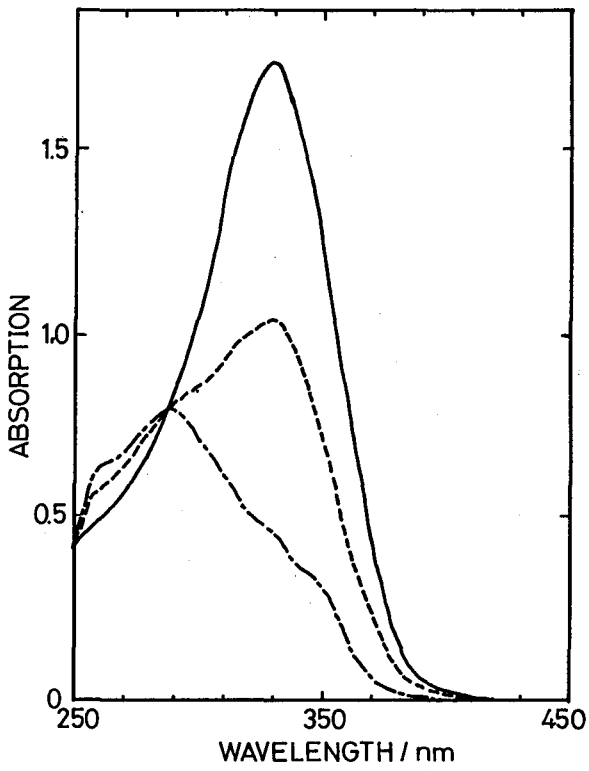


Fig. 3. Variation of UV-VIS spectra of retinol with bubbling of NO_2 : $[retinol]_0$=13.8 ppm in CCl_4 ; $[NO_2]$=96.0 ppm in N_2 : ———, before; — — — —, 16 min bubbling; — - — - —, 24 min bubbling.

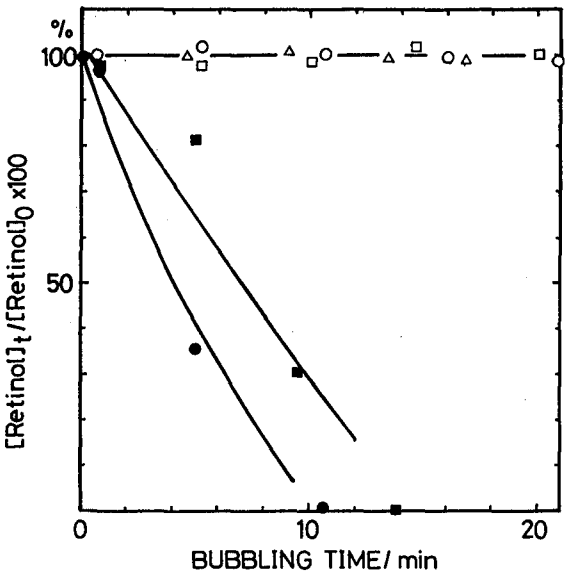


Fig. 4. Decomposition of retinol by gas-liquid reaction of NO_2; symbols are the same as in Fig. 2.

思われる.

文　献

1) Dowling, J.E. and Wald, G.: *Vitamines and Hormones*, 18, 515, 1960
2) Moor, T.: *Exp. Eye Res.*, 3, 305, 1964
3) Wald, G.: *Vitamines and Hormones*, 18, 417, 1960
4) Dowling, J.E.: *Nature*, 188, 114, 1960
5) Shalamberize, O.P.: *Hyg, Sanit* 32, 10, 1967
6) Ohta, T., Nagura, H., and Suzuki, S., submitted for publication
7) Dowell, A.R.: *Arc. Intern. Med*, 128, 74, 1971
8) Thomas, H.V., Muller, R.K. and Lyman, R.L.: *Science*, 159, 532, 1968
9) Williams, R. A. et al.: *Arc. Intern. Med.*, 128, 101, 1971
10) Yamada, E., and Hirasawa, K.: *Cell Structure and Function*, 1, 201, 1976
11) 影山圭三：日病会誌 62, 3, 1973
12) 武藤泰敏：ビタミン 56, 555, 1982
13) 武藤泰敏：ビタミン 57, 291, 1983
14) Sporn, M.B.: *Nature*, 287, 107, 1980
15) Wald, N., Idle, M., Boreham, J. et al.: *Lancet*, 2, 1185, 1981
16) Peto, R., Doll, R., Buckley, J. D., et al.: *Nature*, 290, 201, 1981

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 293-299, 1985

都内幹線道路沿道周辺の浮遊粉塵中の多環芳香族炭化水素濃度と変異原活性について

狩野文雄*, 加納堯子*, 高尾精一**, 溝口 勲*

The Mutagenic Activity and the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Contents of ambient Particulate Matter collected near a Main Road in Tokyo

FUMIO KANOH*, TAKAKO KANOH*, SEIICHI TAKAO**
and ISAO MIZOGUCHI*

Keywords: 浮遊粉塵 airborne particulate matter, 多環芳香族炭化水素 polycyclic aromatic hydrocarbon, 変異原性 mutagenicity.

緒　言

人の発癌原因として，外的環境因子の係わりが明らかになりつつあるが[1,2]，環境中の大気汚染物質の発癌性については，未だ正確には把握されていない．最近の疫学調査で，肺癌発生率は統計的に田園地帯に比べて都市部に高く，大気中の汚染物質の中でも浮遊粒子状物質が正の相関を持つという報告がある[3]．都市大気中の浮遊粉塵は，固定および移動発生源に由来しているが，近年，降下ばいじんや亜硫酸ガスが排出規制などの行政施策によりかなり減少したのに対して[4,5]，浮遊粉塵の都市大気中濃度はいまだ高い．さらに，最近では燃料効率の高いディーゼルエンジン搭載車の急増の結果，窒素酸化物（NOx）の年平均値は横ばいで，環境庁の58年度調査によると，東京をはじめ全国五都府県の自動車排ガスの影響を監視する測定局では，NOxの基準の未達成率は24.1%であった[6]．幹線道路沿道周辺はNOx濃度とともに，浮遊粉塵量も高いことが予想される．そこで，今回，都内の幹線道路の浮遊粉塵による汚染実態の把握を試みた．すなわち，粉塵を沿道からの距離別，粒径別に採取し，粉塵中の多環芳香族炭化水素（PAH）濃度を調べ，合わせて，変異原性試験[7]を実施した．さらに，同時に測定した気象要素，窒素酸化物濃度と比較することにより，浮遊粉塵による汚染の影響範囲について検討した．

実験方法

1．試料採取

浮遊粉塵試料は，1984年10月2日より8日までの連続7日間，都内の国道17号線（板橋区蓮沼町）沿道周辺にて採取した．道路の境界から距離0m，20m，150m地点を選び，地上高1.2mに5段分粒式アンダーセン・カスケードインパクター（日本科学工業製，紀本電子製）を計6台設置した．4段の各ステージと最終のバックアップに石英繊維ろ紙（Pallflex, AHQ—630, サイズ40′ϕ, 2500QAST, 8′×10′）を装着して，同時にサンプリングした．なお，バックアップ・フィルターは48時間毎に交換した．

2．気象要素および窒素酸化物濃度

試料採取地点近傍において，気象庁「地上気象観測法」に基づく気象要素の測定と，日本工業規格に定められた自動計測器（JIS B7953）による窒素酸化物濃度の測定を実施した．

3．試料調整

1）粉塵量測定

採取フィルターを調湿剤（硫酸水素ナトリウム飽和水溶液）を入れたデシケーター内に48時間放置し，恒湿化した後，ただちに，天びんで秤量した[8]．

2）PAH分析試料

フィルターの一部分，ステージフィルターの1／4部分およびバックアップ・フィルターをベルトポンチでく

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　160　東京都新宿区百人町3—24—1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** ㈱ケー・シー・エス

り抜いた直径50mm部分を試料として，ベンゼン・エタノール（3：1体積比）8 m*l*を加えて，超音波抽出した[9]．遠心後，上清2 m*l*を取り，5％水酸化ナトリウム3 m*l*を加えて，液液分配した．遠心後，ベンゼン層1 m*l*を取り，減圧乾固し，残渣をジメチルスルホオキシド（DMSO）に溶解してPAH分析試料とした．

3）変異原性試験試料

フィルターの半分（ステージ，バックアップとも）を，ベンゼン・エタノール（3：1体積比）の混合溶媒に入れ，20分間，超音波抽出した．その後，抽出液をNo.5Cのろ紙でろ過し，ろ液をロータリーエバポレーターで減圧乾固した残渣をDMSOに溶解し，変異原性試験に供した[10]．

4．試薬

1）PAH分析用試薬；アセトニトリル（液クロ用，和光純薬），ジメチルスルホオキシド（特級，同仁化学），ベンゼン，エタノール（残留農薬試験用，和光純薬）

2）PAH標準物質；ベンゾ(k)フルオランテン（R.K chemical），ベンゾ(a)ピレン（和光純薬），ベンゾ（ghi）ペリレン（アルドリッチ社）

上記3物質をそれぞれ0.25μg／m*l*，0.1μg／m*l*，0.15μg／m*l*の濃度になるようにDMSOで調整し，混合したものを標準物質として用いた．

5．PAH分析装置

高速液体クロマトグラフ（島津LC—2F，島津製）

分光蛍光光度計（RF—500，島津製）

6．PAHの分析[11,12,13]

距離別，粒径別に採取した粉塵より得られたタール分をDMSO100～500μlに溶解し，高速液体クロマトグラフを用いて分析した．分析条件は以下の通りである．

カラム；Finepak SIL-C_{18}P（50mm×4.6mm I.D.）
Finepak SIL-C_{18}（250mm×4.6mm I.D.）
（日本分光工業製）

カラム温度：35℃　　流量：1.5m*l*／min

移動相；アセトニトリル：水（80：20体積比）

検出器；励起波長　370nm，蛍光波長　410nm

なお，同定は分析目的ピークの保持時間を標準物質のそれと比較することにより行った．さらにピーク高を測定し，検量線にもとづいて定量した．

7．突然変異原性試験（エームズ法）[14]

浮遊粉塵中に含まれる変異原活性物質を検索する目的でエームズ試験を実施した．菌株として，*Salmonella typhimurium* TA100（塩基置換型変異検出株），TA98（フレームシフト型変異検出株）を用いた．

供試量は，1プレート当たりの濃度を，100μg～250μgになるように，DMSOで調整した．陽性対照として，S9 mix無添加の場合は，2—ニトロフルオレン（2—NF），S 9 mix添加の場合は，3,4—ベンゾ(a)ピレン（B(a)P）を用いた．それぞれのプレート当たりの供試量を，1.0～2.5μgになるように調整した．なお，溶媒対照として，DMSOを用いた．

変異原性試験は，エームズらの原法にもとずくプレ・インキュベーション法[15]により行った．代謝活性化に必要なS9 fractionは雄のSD系ラットに，PCB（アロクロール1254）を腹腔内投与し，酵素誘導した肝臓の超遠心分画（9000×G）を使用した[16]．調整した試料100μlに0.1Mリン酸緩衝液（代謝活性化の場合はS 9 mix）を500μl，さらに菌液100μlを加えて，37℃，20分間インキュベーションした．その後，ただちにソフトアガー（0.5mMヒスチジンと0.5mMビオチン溶液を融解した寒天に1対10の割合で加えたもの）2 m*l*を加えて，混合し，最小栄養寒天培地上に広げ，37℃，48時間培養後，復帰変異コロニー数を計測した．変異原活性値は，後藤らの方法に[10]より求めた値を吸引空気量当たりに換算して比較検討した．

結果および考察

1．天気概況

調査期間中は，10月3日(水)から10月4日(木)にかけて前線を伴った低気圧の通過があり，一時降雨があったが，他の日は曇天が多かった．調査地点及び期間中の風配図を図1に示した．期間中，風向はN系風（NNW，N，NNE）が最も多く，その出現頻度は36.9％である．次いでE系風（ENE，E，ESE）の31.0％，他の風向の出現は7.1％であった．従って，調査地点から対象道路へ吹く風が多かった．なお，calm（静穏：風速が0.4m／s以下）の出現は，両地点とも皆無であった．風速の期間変化は，10月3日に最も強く，10月5日に最も弱い．風速の日変化は，昼間に強く，夜間に弱い変化であった．期間平均風速は2.2m／sであった。気温及び湿度の期間平均値は19.1℃，63％である．東京管区気象台の10月の平均値（1951～1980年）[17]と比較すると，気温は平年並であり，湿度は平年より低い．

2．窒素酸化物濃度

表1に調査期間中の窒素酸化物濃度レベルを示した．各測定点のNO_2の最低および最高濃度は，0 m地点：0.031～0.056ppm，20m地点：0.014～0.037ppm，150m地点：0.014～0.033ppmであり，いずれもNO_2の環境基準（0.06ppm）の93％以下であった．期間平均濃度に

よる減衰率【1.0－(20mまたは150m地点の濃度÷道路端の濃度)×100】は，20m地点：16～49%，150m地点：45～54%であり，各測定値には距離による減衰が認められた．NOの最低，最高濃度は，0m地点：0.043～0.132ppm，20m地点：0.005～0.021ppm，150m地点：0.006～0.016ppmで，減衰率は20m地点：69～88%，150m地点：89～90%で道路から離れるにつれて急激に減衰している．NOxについても，NO及びNO_2と同様，距離減衰しており，減衰率は20m地点：53～76%，150m地点：76～79%であった．

以上の結果より，NO_2はNOよりも距離による減衰率が少ないことがわかる．その理由として，NOは自動車より直接排出される一次汚染物質であることから，道路近傍ほど高い濃度を示す局地汚染であるのに対して，NO_2はNOより排出量は少ないが，大気中の酸性ガスで酸化されて生成するNOからのNO_2が多いため，広域的汚染を起こしやすいものと考えた．

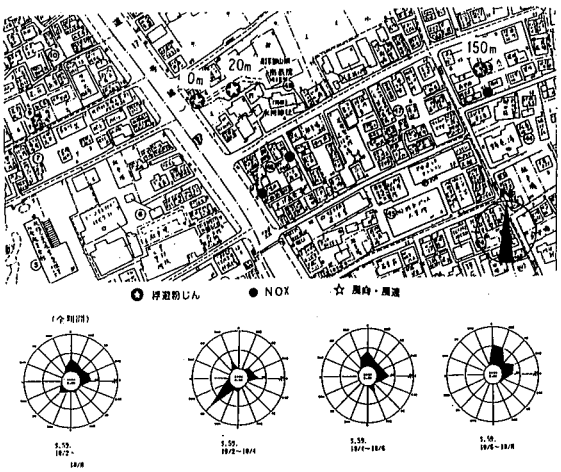


図1．　調査地点および測定期間中の風配図

3．粉塵量およびタール含量

距離別，粒径別に採取された粉塵量とタール含量を表2に示した．全体量で見ると，粉塵量は0m地点が最も高く，次いで20m，150mの順に距離減衰している．タール含量についても同様の減衰が見られた．しかし，タール分が粉塵に含まれる割合（タール分／粉塵量）は，150mが16.9%と最も高く，次いで20m：15.3%，0m：13.6%の順となり，粉塵量の距離減衰とは逆の傾向を示している．次に，図2，3に，各地点での粉塵量とタール含量の粒径分布を示した．粉塵量は各測定点とも2.0μ以上の粒子領域の割合が2.0μ以下の粒子領域に比べて多いが，粒径分布を見ると，7.0μ以上と1.1μ以下に大きなピークがあることがわかる．また，タール含量は各地点とも1.1μ以下の微細粒子に多く，その割合は150m地点が0m地点とほぼ等しく，1.1μ以下の微細粒子が150m地点まで運ばれていることが推定された．

4．多環芳香族炭化水素濃度

距離別，粒径別のPAH濃度を表2に示した．B(k)F，B(a)P，B(ghi)Pとも1.1μ以下の微小粒子域において濃度が高く，全粉塵中のPAH量の84～87%を占めた．各PAH間で濃度を比較すると，最も高い濃度を示したのは，B(ghi)Pであり，次いで，B(a)P，B(k)Fの順であった．各PAHの距離減衰率を1.1μ以下の粉塵について比較すると，B(k)Fは0mと20mで大差がなかったが，B(a)PとB(ghi)Pでは，距離減衰傾向を示し，減衰率は20m地点でそれぞれ6.3，8.3%，150m地点で35.4，32.4%であった．以上の結果より，浮遊粉塵中のPAHはいずれも1.1μ以下の粒径域に集中して存在し，距離減衰傾向が認められた．1.1μ以下の呼吸域粉塵は肺内沈着率が極めて高い．Van Cauwenbergheらによれば[18]，粒径が7μ以上の粗大粒子の99%は鼻咽頭部で捕捉されるのに対して，呼吸域粒子のおよそ30%が肺内沈着するこ

表1．　窒素酸化物濃度レベル

単位：ppb

項目	NO					NO_2					NOx				
	期間	日平均		1時間値		期間	日平均		1時間値		期間	日平均		1時間値	
地点	平均	最高	最低	最高	最低	平均	最高	最低	最高	最低	平均	最高	最低	最高	最低
0m	92	132	43	245	13	41	56	31	106	25	134	183	75	285	38
20m	11	21	5	64	1	21	37	14	69	5	32	58	19	98	6
150m	9	16	6	54	2	19	33	14	62	5	28	50	20	85	7

注）　1ppb＝1／1,000ppm

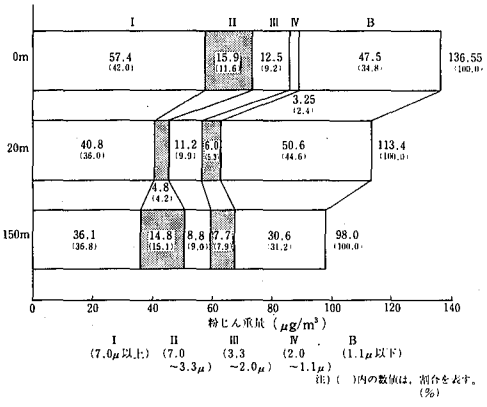


図２． 距離別に採取した粉塵の粒径分布

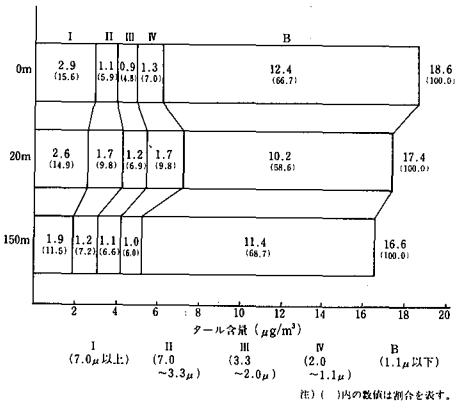


図３． 距離別粉塵のタール含量の粒径分布

とが報告されている．従って，粉塵量自体の量的把握もさることながら，住民の健康影響調査では，呼吸域(1.1 μ 以下）粉塵を中心としたさらにこまかい把握が重要かと思われた．

環境中のPAHは，その生成過程で，粒子の表面に吸着して存在しているものが多いと思われる[19,20]．そのため，体内に吸引された粒子から比較的容易に離れ，体内で作用する可能性があり，今後，生体内の挙動，分布についても追跡する必要があろう．また，PAHのサンプリングに際して，各種のアーティファクトの可能性が指摘されている[21]．今回は，石英ろ紙を用いてサンプリングしたが，試料採取期間が6日間と長期であり，バックアップが2日間で交換しているものの，フイルター上での汚染物質間の反応も考えられ，今後採取方法について検討を要するものと思われる．次に，距離による減衰率の比較から，150m地点でも，PAHがかなりの割合存在し，NO_2 のように減衰しないことが確かめられた．B(k)FとB(ghi)Pは，B(a)Pよりも比較的安定であるため，減衰率が低いものと理解されたが，大気中で容易に分解されやすいB(a)Pが150m地点でも認められたのは，他の発生源からの寄与が加わった結果とも考えられた．松下らによれば[22]，PAHは自動車排気ガスの他にも都市内の固定発生源から多く排出されている．従って，今回の結果をそのまま道路からの影響と断定できない．今後さらに，自動車の走行状態，数や種類などについて調べ，また，市街地の形状などの立体的調査を行い，よりこまかい環境影響のデータを作成する必要があると考えた．

5．変異原活性値

距離別，粒径別の変異原活性（復帰変異コロニー数）を表2に示した．表から明らかなように，各地点とも1.1 μ 以下の粒径域に高い活性が見られた．すなわち，全粉塵の82～91%の活性が1.1μ 以下に集中して認められた．変異原活性はTA100の方がTA98よりも高く，S9 mixの添加の有無について比較すると，概ねS9 mix添加の方が高い活性を示した．

次に，距離別に活性を比較してみると，TA100については概ね減衰が認められた．図4で見られるように，減衰率は各菌株及びS9 mixの有無で一様ではなかった．また，S9 mixの添加／無添加の比について見てみると，TA100では0m地点：1.5，150m地点：1.6と差がなかったのに対して，TA98では，0m地点：1.8，150m地点：1.2となり，相対的に150m地点の方がS9 mix無添加の活性が高くなる傾向が見られた．この結果より，TA98S9 mix無添加，すなわち代謝活性化を要しない直接変異原活性物質の減衰率がより少ないことがわかった．TA100およびTA98のS9 mix添加，すなわち代謝活性化を要する変異原活性物質はB(a)Pのように，距離減衰を示したことから，一次汚染物質の中に多く，大気中で比較的分解されやすいものと思われた．

後藤らは[10]，変異原活性の年間変動調査から，理由は明らかにされていないが，東京の大気中では，4月と10月に一年間の中で直接変異原物質が特に多いことを指摘している．さらに，都市大気中の浮遊粉塵は比較的強い直接変異原活性を持つことが知られ，最近，多くの研究が行なわれている[23,24]．PAHの多くはpremutagenであり，通常，S9 mixの添加により変異原活性を示すが，

表2．距離別，粒径別の粉塵重量，ＰＡＨ濃度および変異原活性

粉塵特性		調査項目 距離	粉塵重量 (タール含量) μg／m³	ＰＡＨ濃度 B（k）F ng／m³	B（a）P ng／m³	B(ghi)P ng／m³	変異原活性(＋S9／－S9) TA100 Rev／m³	TA98 Rev／m³
全粉塵		0m	136.6(18.6)	0.89	1.11	2.90	61.9／39.3	32.4／17.5
		20m	113.4(17.4)	—	—	—	58.1／28.7	30.9／15.7
		150m	98.0(16.6)	0.63	0.74	1.98	38.8／23.5	16.7／13.3
粉塵粒径（ミクロン）	7.0μ 以上	0m	57.4(2.9)	0.028	0.037	0.110	1.3／0.7	0.5／0.5
		20m	40.8(2.6)	—	—	—	0.7／0.3	0.4／0.4
		150m	36.1(1.9)	0.015	0.019	0.040	0.7／0.5	0.4／0.5
	7.0～3.3μ	0m	15.9(1.1)	0.019	0.018	0.040	1.7／1.0	0.7／0.9
		20m	4.8(1.7)	—	—	—	0.8／0.5	0.4／0.6
		150m	14.8(1.2)	0.014	0.013	0.030	0.8／0.5	0.4／0.6
	3.3～2.0μ	0m	12.5(0.9)	0.025	0.027	0.060	1.9／0.9	0.6／0.8
		20m	11.2(1.2)	0.023	0.027	0.060	1.3／0.9	0.6／0.5
		150m	8.8(1.1)	0.019	0.023	0.050	1.0／0.7	0.4／0.4
	2.0～1.1μ	0m	3.3(1.3)	0.068	0.069	0.160	2.9／1.2	1.2／0.9
		20m	6.0(1.7)	0.063	0.074	0.160	3.5／0.9	2.0／0.9
		150m	7.7(1.0)	0.054	0.064	0.150	2.8／1.1	1.4／0.9
	1.1μ 以下	0m	47.5(12.4)	0.750	0.960	2.530	54.1／35.5	29.4／14.4
		20m	50.6(10.2)	0.760	0.900	2.320	51.8／26.1	27.5／13.3
		150m	30.6(11.4)	0.530	0.620	1.710	33.5／20.7	14.1／10.9

PAH のニトロ体やオキシ体などの各種のニトロアレーンは S9 mix の無添加で変異原活性を示す[26,27,28,29]．最近，松下らはニトロアレーン類を東京の大気中から検出している[25]．今回の調査の分析では，ニトロアレーン類を測定していないが，150m地点でも，直接変異原活性がほとんど減衰傾向を示していないことから，発生源に含まれる直接変異原活性物質とともに，PAH と NO_2 との大気光化学反応により，さらに強い直接変異原活性を持つニトロ体が生成している可能性も考えられる．

6．PAH と変異原活性との相関

今回の調査データから PAH と変異原活性との相関を計算したものが，表3である．各 PAH 間での相関はいずれも非常に高い．一方，PAH と変異原活性との間では，TA100 S9 mix 添加と TA98 S9 mix 添加が各 PAH といずれも高い相関を示したが，各 PAH と TA100 および TA98 の S9 mix 無添加とは，さほど有意の相関を示さなかった．

7．各測定項目の距離減衰率

各測定項目別に見た距離減衰率を1.1μ 以下の粒子についてのみ調べた結果を一括して図5に示した．粉塵量は0m，20mで逆転しているが，150mではかなり減衰している．一方，タール分は20mよりも150mのほうが高く

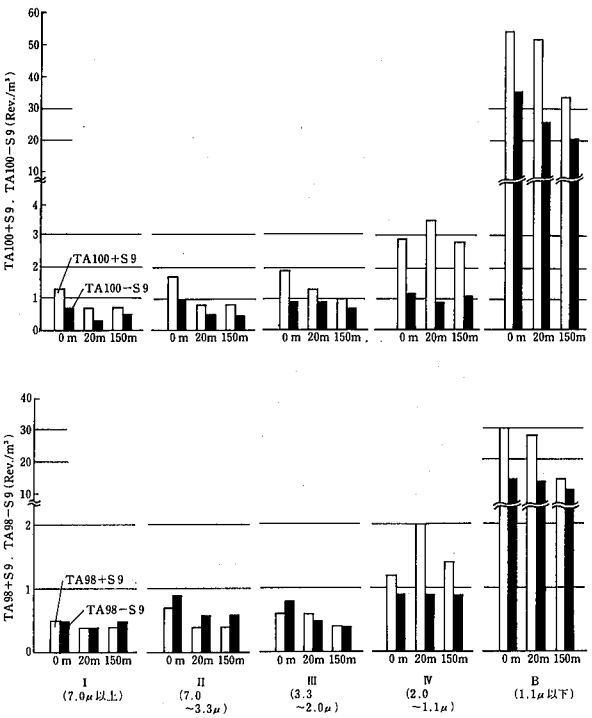


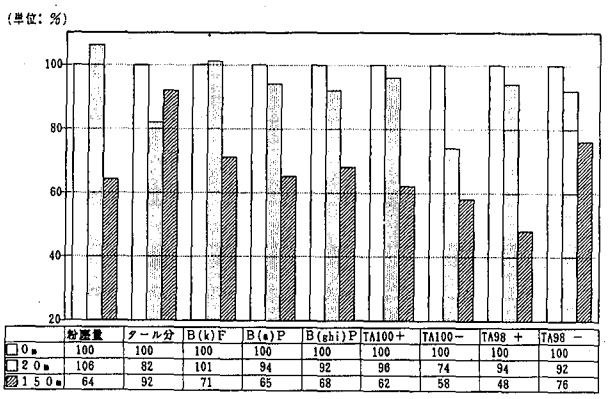
図4．　距離別に見た粉塵の変異原活性

表3．PAHと変異原活性との相関（吸引空気量当たり）

（n＝8）

	PAH			変異原活性			
	B(k)F	B(a)P	B(ghi)P	TA100＋S9	TA100－S9	TA98 ＋S9	TA98－S9
B（k）F		—	—	—	—	—	—
B（a）P	0.975**		—	—	—	—	—
B(ghi) P	0.974**	0.973**			—	—	—
TA100 ＋S9	0.954**	0.933**	0.970**		—	—	—
TA100 －S9	0.616	0.666	0.720*	0.633		—	—
TA 98 ＋S9	0.941**	0.917**	0.908**	0.837**	0.666*		—
TA 98 －S9	0.841**	0.764*	0.878**	0.886**	0.585	0.675*	

＊＊p＜0.01,　＊p＜0.05



	粉塵量	タール分	B(k)F	B(a)P	B(ghi)P	TA100+	TA100−	TA98 +	TA98 −
□0m	100	100	100	100	100	100	100	100	100
□20m	108	82	101	94	92	96	74	94	92
▨150m	64	92	71	65	68	62	58	48	76

図5．　項目別の距離減衰率(1.1μ以下粒子)

なっている．PAHについては，B(k)Fを除いて，ほぼ減衰している．また，変異原活性にもPAHと同様の距離減衰が見られる．なかでも，TA98 S9 mix添加が顕著な減衰を示したのに対して，TA98 S9 mix無添加の減衰率はあまり顕著でなかった．

結　　語

浮遊粉塵中のPAH含量および変異原活性を幹線道路からの距離別の試料について調査し，以下の結果を得た．

1）粉塵量は道路端が高く，距離減衰を示したが，タール含量は150m地点でも高く，粉塵中のタールの割合は道路端とほぼ等しかった．粒径別では7 μ以上と1.1μ以下に粉塵量が多く，タール含量は1.1μ以下に多かった．

2）PAH濃度は道路端が一番高く，距離減衰を示し，1.1μ以下の粉塵中のPAH濃度が全粉塵量の濃度の84～87%の値を占めた．距離別の各PAH減衰率はB(a)PとB(ghi)Pがほぼ等しく，B(k)Fが少なかった．

3）変異原活性はPAHと同様に，1.1μ以下の粒子に高く，距離減衰を示したが，減衰率は一様でなかった．すなわち，TA98 S9 mix添加が150m地点で52%減衰したのに対して，TA98 S9 mix無添加では24.3%とわずかな減衰を示すにとどまった．

4）PAH濃度と変異原活性値は有意の相関を示した．なかでも，TA100 S9 mix添加およびTA98 S9 mix添加と各PAHとの相関が高く，TA100 S9 mix無添加との相関は低かった．

（なお，調査の概要については，第74回衛生局学会1985年5月で発表した．）

文　　献

1）松下秀鶴：化学の領域，増刊129,115,1980
2）Ames,B.N.:Science,204(11),587,1979
3）村田　紀，福間誠吾：日本癌学会総会，465,1984
4）大澤誠喜，池田眞吾，福田雅夫：東京衛研年報，35,296,1984
5）狩野文雄，牧野国義，野牛　弘：東京衛研年報，28—1,205,1977
6）環境庁：日本の大気汚染状況，1984
7）矢作多貴江：蛋白質，核酸，酵素，20,1178,1975
8）本間克典，深田雄一，橋本芳一：分析化学，26,T1,1977
9）後藤純雄，河合昭宏，米川　徹：大気汚染学会誌，16,18,1981
10）後藤純雄，加藤幸彦，折井章子：大気汚染学会誌，17,295,1982
11）菅　邦子，石黒辰吉，松下秀鶴：大気汚染学会誌，17,117,1982
12）松下秀鶴，塩崎卓哉，加藤幸彦：分析化学，30(6),362,1981
13）松下秀鶴，加藤幸彦，久松由東：大気汚染学会誌，15,348,1980
14）Maron,D.M.and Ames,B.N.:Mutation Research,113,173,1983

15) T. Yahagi, M. Nagao, Y. Seino: Mutation Res., 48, 121, 1977
16) B. N. Ames, W. E. Durston, E. Yamasaki, et al: Proc. Natl. Sci., 70, 2281, 1973
17) 理科年表, 丸善, 1985
18) Van Cauwenberghe, and Van Vaeck, L: Mutation Research, 116, 1, 1983
19) 松下秀鶴：油化学, 25, 711, 1976
20) 松下秀鶴：化学の領域, 増刊129, 115, 1980
21) 松下秀鶴, 嵐谷奎一, 半田 隆：分析化学, 25, 415, 1976
22) 松下秀鶴：トキシコロジーフォーラム, 6, 356, 1983
23) 北森成治, 堀川和美, 片岡恭一朗：日本公衛誌, 29 (1), 37, 1982
24) 清水英佑：トキシコロジーフォラム, 6 (4), 324, 1983
25) 松下秀鶴：大気汚染学会誌, 18, 241, 1983
26) 松下秀鶴：変異原と毒性, 11, 39, 1983
27) 大西克成, 木内武美：トキコロジーフォラム, 6 (4), 335, 1983
28) Rosenkranz, H. S., and Mermelstein, R., : Mutation Research, 114, 217, 1983
29) Tokiwa, H., Nakagawa, R., Morita, K. et al.: Mutation Research, 85, 195, 1981

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 300-303, 1985

東京湾の環境汚染モニタリング調査（第3報）
昭和58年度スズキおよびウミネコ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 (III)
Residue Levels in Japanese Sea Bass and Gull in 1983

HIROSHI SETO* and TAKAKO KANOH*

The levels of 36 chemical pollutants in Japanese sea bass (*Lataolabrax Japonicus*) and black-tailed gull (*Larus crassirostris* Vieillot) collected from Tokyo Bay in 1983 were determined. Nineteen chemicals were detected in the fish muscle. Decreasing tendencies were observed during past 6 years (from 1978 to 1983) on the levels of PCB, α-BHC, dieldrin, p,p'-DDT and p,p'-DDE in the fish. It is noteworthy that dichlorobenzene isomers, chlordanes and related compounds were detected in all of the samples. Residual concentrations of "chlordane" in the fish muscle on wet weight basis were as follows: *trans*-chlordane (0.003ppm), *cis*-chlordane (0.007ppm), *trans*-nonachlor (0.012ppm), *cis*-nonachlor (0.004ppm) and oxychlordane (0.001ppm). The levels of "chlordane" in the gull except *trans*-chlordane were higher than those in the sea bass: *trans*-chlordane (0.001ppm), *cis*-chlordane (0.013ppm), *trans*-nonachlor (0.107ppm), *cis*-nonachlor (0.029ppm) and oxychlordane (0.036ppm).

Keywords: pollution, chlorinated hydrocarbon, sea bass, gull, chlordane

緒　言

東京湾の環境汚染モニタリング調査で，スズキ（*Lataolabrax Japonicus*）中の化学物質濃度の経年変化および特徴を報告してきた[1,2]．またカモメ類は一般に有機塩素系化合物の組織内濃度が高いが，BHC, DDTの各異性体の蓄積パターンはスズキの場合と異なることを報告した[2]．

最近，我国においてもクロルデン類による環境汚染[3]，人体汚染[4,5]が問題となった．環境庁が実施した調査[6]でも汚染は全国的に広がっていることが明らかになった．そのため，あらたに監視をする化学物質として昭和58年度の環境庁委託生物指標環境汚染測定調査にはクロルデン類5種が分析項目として加えられた．

前回の調査[2]でカモメ類は種によりこれら化学物質の汚染程度がかなり異なること，同じ種でも個体差が大きいことがわかった．このことから試料数の確保，データの安定性と年令・採取時期の関係を検討したところ，分析対象としてウミネコの幼鳥ないし若鳥を選び，5～6月頃に採取するのが良いと結論された．

本報告は昭和58年度に実施した東京湾のスズキおよびウミネコの調査結果である．

試料および分析方法

試料　スズキは昭和58年9月，千葉県富津沖で捕獲された25尾を重さの順に5尾づつまとめ5検体とした．ウミネコ（*Larus crassirostris* Vieillot）は，昭和58年5月から6月にかけて羽田空港付近で捕獲された35羽を重さの順に7羽づつまとめ5検体とした．鑑定および試料の調製は前報[2]と同様に行った．試料の概要はTable 1，2に示した．

分析方法　前報[2]と同様に行った．クロルデン類の分析は別に環境庁の指示する方法[7]により行った．但し，検出器には質量分析計を用いた．詳細な操作法，条件は報告書[8]に記載した．

分析した化学物質は前報の31種類の他，クロルデン関

* 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
* The 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	463±28	31.0±0.9	76.8	2.77
2	419± 5	29.4±0.9	76.4	2.30
3	402± 4	29.1±1.1	77.1	2.64
4	380± 7	28.6±0.9	76.9	3.00
5	359± 1	27.9±0.7	76.1	3.08
mean	404.6	29.2	76.7	2.76

* : not included the part of tail fin.

Table 2. Constitution of the Sample (Black-Tailed Gull) and water and Fat Contents of the Muscle. n=7

group No.	sex	body weight (g)	wing length (cm)	Water(%)	fat(%)
1	male	702±41	36.5± 7	70.4	5.62
2	male	651±14	36.9± 4	69.1	6.83
3	male	623± 7	36.3± 6	70.0	6.53
4	male	577±20	35.8±13	69.8	6.90
5	female	499±58	35.6±12*	70.1	6.85
mean		610	36.2	69.9	6.55

* : n=6

連物質（トランス(*t*)-クロルデン，シス(*c*)-クロルデン，*t*-ノナクロル，*c*-ノナクロル，オキシクロルデン）を加えた計36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，また一部の物質の年次推移を Table 4に示す．スズキ中の PCB 濃度は昭和53年から昭和57年まで，ほぼ 0.3ppm であった．しかし，今回は平均0.12ppm で例年の約1／2を示した．また，α-BHC，ディルドリン，*p*, *p*′-DDE，*p*, *p*′-DDT についても減少傾向がうかがわれる．一方，塩素化ベンゼン類のうち前年度まで検出されなかった DCB が高頻度で検出されたのが特記される．DCB 類は有機溶剤，農薬，染料・医薬品等の中間体として，*o*一体，*p*一体だけでも約3万3千トン（1975）生産されている．散布・廃棄により環境中へ放出される量はかなりあるものと考えられる．DCB, 1,2,4-TCB は今後も環境中から検出される可能性があり，その汚染状況や汚染径路を調査していく必要がある．

クロルデン類はすべての検体から検出された．昭和57年度環境庁精密環境調査[6]によれば，クロルデン類は海水からは検出されず，底質から0.0002～0.021μg／g で高頻度に検出されている．東京湾におけるその濃度レベルの順序は *t*-クロルデン＞*c*-クロルデン＞*t*-ノナクロル＞*c*-ノナクロル＞＞オキシクロルデンである．この順序はクロルデン原体中の各異性体の存在量[9]と一致している．一方，スズキでは *t*-ノナクロル＞*c*-クロルデン＞*c*-ノナクロル＞ *t*-クロルデン＞ オキシクロルデンで *t*-クロルデンの順位低下が注目される．

母乳では[5] *t*-ノナクロル・オキシクロルデン＞ *c*-ノナクロル＞ *c*-クロルデン・*t*-クロルデンでオキシクロルデンの比率が高く，*c*-，*t*-クロルデンは低い．哺乳類ではオキシクロルデンは *t*-，*c*-クロルデンおよび *t*-ノナクロルの代謝により生成する[10,11]．各生体試料中のクロルデン類の存在比の違いは，種によってクロルデン類の代謝活性が異なることを示唆している．

クロルデンは主としてシロアリ駆除用として使われている．年間総使用量は昭和50年に約350トンであったが昭和57年には約1680トンと急速に増加した．クロルデンは毒性（ADI 0.001mg／kg.day, WHO）があり，難分解性で生体蓄積性があることから特に注意すべき環境汚染物質の一つであろう．

ウミネコについて ウミネコは5月～6月に採取された若鳥である．前年度の試料は8月末から10月に捕獲された成鳥であった．両者の汚染物質濃度には差があり，本年度試料は前年度試料に比べて PCB・ディルドリンが約

Table 3. Concentrations of Pollutants in Muscle Tissues of Sea Bass and Black-Tailed Gull.

(ppm on wet basis)

compound	Sea Bass		Black-Tailed Gull	
	range	mean	range	mean
PCB	0.08-0.15	0.12	1.2-2.6	1.9
PCN	nd*1	nd	nd	nd
α-BHC	0.002	0.002	nd	nd
β-BHC	0.001	0.001	0.050-0.103	0.072
γ-BHC	nd	nd	nd	nd
δ-BHC	nd	nd	nd	nd
aldrin	nd	nd	nd	nd
dieldrin	0.001-0.002	0.002	0.019-0.037	0.025
endrin	nd	nd	nd	nd
o,p'-DDT	nd	nd	nd	nd
p,p'-DDT	0.001-0.002	0.001	nd-0.001	—
o,p'-DDE	0.001	0.001	0.001	0.001
p,p'-DDE	0.006-0.015	0.009	0.35-0.51	0.41
o,p'-DDD	nd	nd	nd	nd
p,p'-DDD	0.003-0.007	0.004	0.001	0.001
heptachlor	nd	nd	nd	nd
HCE	0.001-0.002	0.001	0.019-0.025	0.022
t-chlordane	0.002-0.004	0.003	0.001-0.002	0.001
c-chlordane	0.005-0.010	0.007	0.009-0.017	0.013
t-nonachlor	0.009-0.014	0.012	0.094-0.120	0.107
c-nonachlor	0.003-0.006	0.004	0.024-0.036	0.029
oxychlordane	0.001-0.002	0.001	0.029-0.049	0.036
DnBP	nd*2	nd	nd	nd
DEHP	nd*2	nd	nd	nd
TBP	nd*1	nd	nd	nd
o- DCB	0.03-0.04	0.04	0.02-0.04	0.03
m-DCB	0.01-0.02	0.02	0.01-0.04	0.02
p- DCB	0.01	0.01	nd	nd
1,2,3- TrCB	nd	nd	nd	nd
1,2,4- TrCB	0.001	0.001	nd-0.001	—
1,3,5-TrCB	nd	nd	nd	nd
1,2,3,4-TeCB	nd	nd	nd	nd
1,2,3,5-TeCB	nd	nd	nd	nd
1,2,4,5-TeCB	nd	nd	nd	nd
PeCB	nd	nd	nd	nd
HCB	0.001	0.001	0.023-0.030	0.026

nd : <0.001, *1<0.01, *2 : <0.1

1/3, *p,p'*-DDE が約1/2である. しかし β-BHC は今年度の方が約7倍も高い. 成長過程でこのように汚染物質の蓄積状態が変化するのであろうか. 本種は日本近海に広く分布する漂鳥なので東京湾以外の環境で受ける影響も大きいと思われる.

クロルデン類の濃度は *t*-ノナクロル> オキシクロルデン> *c*-ノナクロル> *c*-クロルデン> *t*-クロルデンの順序である. カモメの種類によってクロルデンの蓄積量がどのように異なるかを知るため, 前年度に採取した試料中のクロルデンを測定した. 結果を Table 5 に示す. クロルデン, ノナクロル, オキシクロルデンの総和 (全クロルデン濃度とする) はウミネコ (0.567 ppm)> セグロカ

Table 4. Trends in Chlorinated Hydrocarbon Residues in Sea Bass Collected from Tokyo Bay.

compound	1978*	1979*	1980*	1981*	1982*	1983
PCB	0.3	0.4	0.3	0.75	0.31	0.12
HCB	0.002	0.002	0.002	nd-0.001	nd-0.001	0.001
α-BHC	0.006	0.002	0.005	0.006	0.004	nd
dieldrin	0.007	0.012	0.011	nd-0.001	0.004	0.002
p,p'-DDE	0.029	0.037	0.052	0.043	0.014	0.009
p,p'-DDT	0.013	0.028	0.007	nd	0.002	0.001
1,2,4-TrCB	—	—	nd-0.001	0.004	nd	0.001
t-chlordane	—	—	—	—	0.003	0.003
c-chlordane	—	—	—	—	0.007	0.007
t-nonachlor	—	—	—	—	0.011	0.012
c-nonachlor	—	—	—	—	0.004	0.004
oxychlordane	—	—	—	—	0.004	0.001

*: data from ref. 6 and 12, but chlordane and related compounds were determined by this study. - : not determined.

Table 5. Chlordane Residues in Muscle Tissues of Gulls (1982)
(ppm on wet weight basis)

compund	gull A	gull B	gull C
t-chlordane	0.012(2)	0.003(2)	0.005(2)
c-chlordane	0.031(6)	0.008(5)	0.022(9)
t-nonachlor	0.35 (62)	0.063(43)	0.098(42)
c-nonachlor	0.064(11)	0.020(14)	0.030(13)
oxychlordane	0.11 (19)	0.053(36)	0.079(34)

Samples were collected in 1982 for biological monitoring.[2] ( ) : percentage of the concentration in total concentration of chlordane, nonachlor and oxychlordane. gull A : Black-Tailed Gull(*Larus crassirostris* Vieillot). gull B : Kamchatkan Black-Headed Gull(*Larus ribibundus sibiricus* Buturlin). gull C : Vega Herring Gull (*Larus argentatus vegae* Palman)

モメ (0.234 ppm)〉ユリカモメ (0.147 ppm) である．セグロカモメ，ユリカモメの中のオキシクロルデン濃度は全クロルデンの34～36%でウミネコ (19%) より高い比率である．本年度のウミネコの全クロルデン濃度は0.186ppmで前年度の約1／3だが，オキシクロルデン濃度は全クロルデンの19%で変わらない．他のクロルデン類についてもほぼ同様である．このことは，生体中のクロルデン類の濃度比は種によってかなり一定しているのではないかと思われる．

謝辞 本調査のため試料採取等御尽力を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) 瀬戸 博，加納堯子：東京衛研年報，35,316,1984
3) Miyazaki,T.,Akiyama,K.,Kaneko,S.,Horii,S.,Yamagishi,T.,and Kodera,K.:*Bull. Environm. contam. Toxicol.*,25,305,1980
4) Miyazaki,T.,Akiyama,K.,Kaneko,S.,Horii,S.,and Yamagishi,T.,*Bull. Environm. Contam. Toxicol.*,**25**,518,1980
5) 樫本 隆，環境技術 13,51,1984
6) 環境庁編：化学物質と環境 No. 9，1983
7) 環境庁編：生物試料中化学物質系統分析法，1982
8) 東京都立衛生研究所：昭和58年度生物指標環境汚染測定調査報告書,1984
9) Sovocool,G.W.,Lewis,R.G,,Harless,R.L.,Wilson,N.K.,and Zehr R.D.,*Anal. Chem.*,49,734,1977
10) Street,J.C.,and Blau,S.E.,*J. Agr. Food Chem.*,**20**,395,1972
11) Tashiro,S.and Matusmura,F.,*Arch. Environm. Contam. Toxcol.*,7,113,1978
12) 環境庁編：化学物質と環境 No. 5,1979～No. 8,1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 304-307, 1985

ラット胎仔および新生仔に対するメチル水銀毒性

関　比呂伸*, 加　納　堯　子*, 田　村　行　弘**

Toxicological Effects of Methylmercury on the Fetal and Neonatal Rats

HIRONOBU SEKI*, TAKAKO KANOH* and YUKIHIRO TAMURA**

We examined the effects of methylmercury on offsprings of two groups, A and B of dams, group A being exposed to methylmercury during their pregnancy and group B not exposed to methylmercury.

The offsprings of the two groups were cross-fostered until they were weaned.

When 13 reproduction indices were checked, significant differences were observed between the two groups only in respect to "Mean mortality at parturition" and "Lactating Index". Group A had a mean mortality at parturition of 43.6±40.0% and a lactating index of 58.4±45.6%. The respective values for group B were 0.9±2.7% and 97.8±4.4%.

It was therefore concluded that methylmercury had greater effects on rats during pregnancy than during the suckling period.

Keywords: methylmercury, reproduction index, cross fostering, fetal and neonatal rats

緒　　言

水俣の水銀中毒事件の調査で，胎児性および先天性水俣病患者が見出され[1~5]，またこの事例は，実験的にも確認されたことから[6~9]，母体から胎児への有機水銀の影響について多くの研究がなされた．

一般に，毒物が妊娠母体に侵入した場合には，毒物の胎盤通過性が胎児への影響を左右する．有機水銀も胎盤を容易に通過し[7,8,10~17]，更に，胎仔に蓄積してEmbryo-toxicityやFeto-toxicityを生じ[18~27]，胎仔の致死率を高めることが知られている[8,20,25]．また，母体に蓄積した有機水銀は，母乳を介して新生仔に移行し[8,9,28~31]，有機水銀の中毒症状を発症させることもある[9,29,30]．

一方，有機水銀の上記のような繁殖毒性に対して，亜セレンの保護作用が知られている[32,33]．昨年の研究年報で[33]，セレンを比較的高濃度に含有する海産哺乳類（イルカ・マッコウクジラ）の肉とメチル水銀を飼料に添加してラットに投与した結果，肉由来セレンにも亜セレン酸と同様に，メチル水銀の繁殖毒性に対する保護作用が認められることを報告した．

本報告では，妊娠期間中に，メチル水銀とマッコウクジラ肉添加飼料かつ投与された新生仔（A群）およびメチル水銀無添加飼料が投与された新生仔（B群）を出生時に交換して，以後離乳期まで無添加飼料で飼育した場合，A，B両群新生仔への水銀曝露の影響程度，更に，添加したクジラ肉中のセレンの水銀中毒保護作用程度について前年度の実験結果とも合わせて観察した．

方法・材料

ウィスター系雌性ラット（日本クレアK.K.）18匹（体重251±18g）を雌雄1対ずつラット用金網ゲージに入れて交配させる．受精の有無は，毎朝ケージ下に落下したVaginal Plugの存在で確認する．受精確認日を妊娠0—Dayとし，AB 2群に分けて，A群にはメチル水銀20 ppmとマッコウクジラ肉含有飼料を自由摂取させる．B群はメチル水銀無添加飼料を給飼させる．出産時にA，B群の新生仔を交換した後は，離乳日（生後21日目とした）までB群に投与したメチル水銀無添加飼料で飼育した（図1）．飲料水は，水道水を用いた．

両群の基本飼料は，日本クレア社繁殖用飼料CA—1成分より，魚粉・フスマ・小麦を取り除いた飼料で，A群には，塩化メチル水銀20ppmとマッコウクジラ肉25%

* 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
* The 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

および除去成分量に合わせて残量をコーンを用いて調製した飼料，B群のメチル水銀無添加飼料は，A群のマッコウクジラ肉の代りにカゼイン25%添加した以外はA群と全て同一成分である．

実験動物飼育室は，12時間照明・12時間暗室として，温度22±2℃，湿度60±5%とする．

受精確認後，4～5匹をラット用金網ケージに入れて出産前まで飼育する．そして，各ラットの出産予定日(妊娠21—Days)の前日より，マウス用ポリカーボネートケージに移して単独飼育にし，離乳時まで母仔を飼育する．出産は，朝・昼・夕方の一日3回確認を行い，A群とB群の新生仔を交換する (Cross Fostering)．

観察項目には，妊娠期間中週一回の体重測定，妊娠率，出産率，出産仔数，出産時死亡数，卵巣内黄体数および子宮内着床部位数からの吸収胎仔数および出産した新生仔数の確認，離乳仔数，離乳率，離乳時体重を用いる．

結　果

妊娠期間中の体重増加を図2に示した．メチル水銀投与群は，最初の2週間ではB群より多い体重増加量を示したが，第三週目には逆転してB群が高く，A群の体重増加は抑制された．ただし，有意の差が認められたのは第一週目 ($P<0.01$) のみであった．各週毎の体重増加量と累積体重増加量を図3に示した．第二週から第三週目の一週間の体重増加は，B群で有意 ($P<0.05$) に増加していることが認められた．(A群：44.8±13.5g，B群58.0±12.7g)

表1に各繁殖データを示した．妊娠率，出産率は両群とも100%，合計および平均出産仔数は，メチル水銀投与群の方が少ないがAB群間に有意の差は認められなかった．出産時における新生仔の死亡率は，A群がB群の約48倍多く，新生仔の平均死亡率によれば有意 ($P<0.02$) に差があることが観察された．しかし，吸収胎仔数は，8匹対5匹と両者の間に差は少なかった．

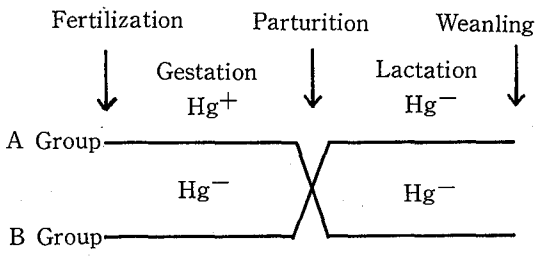


Fig. 1. Schema of treatment combination

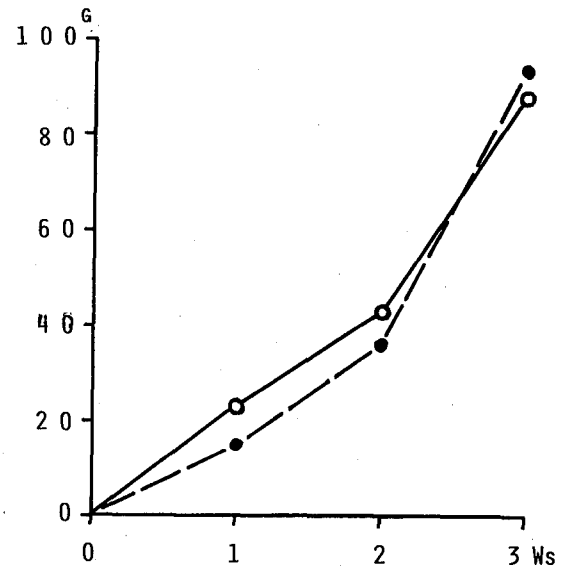


Fig. 2. Chronological change of weight gain during the gestational periods
○——○ A ●——● B

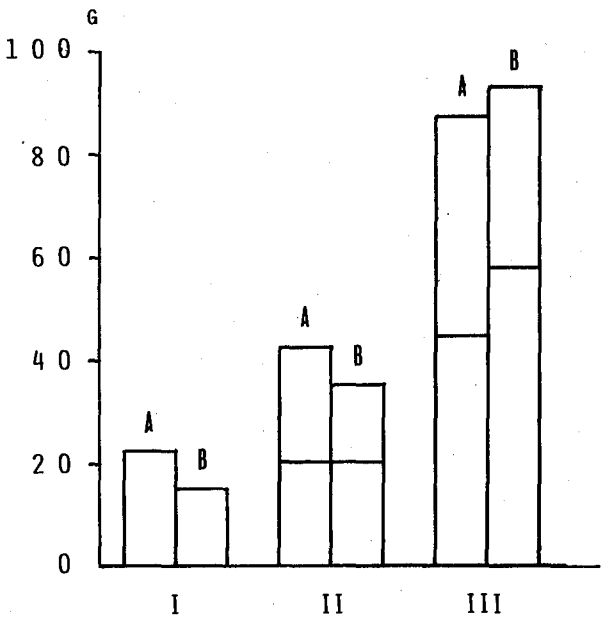


Fig. 3. Chronological change of weight gain on every one thirds of pregnancy
column : upper(ccumulated weight gain), lower(weight gain per week)
A : A group, B : B group
I : 1st week, II : 2nd week, III : 3rd week

出産予定日と実際の出産日とのズレは，両群とも予定日に出産したラットが44.4%，一日遅れて出産したラットが55.6%で同じ割合を示し，メチル水銀による影響は認められなかった．このように，出産予定日とそのズレが同率を示したため，新生仔の両群との交換は，出産日内に行うことができた．

合計離乳仔数において，メチル水銀投与のA群はB群と比較してB群の約半数と低値を示し，また，平均離乳仔数でもA群がB群より低値を示した．前者はA群の3匹の母親の同腹仔が全て死亡したため，後者はA群一腹の離乳仔の少数例が認められたためで，一見，AB群間で有意な現象と思われるが，統計的にも差は認められない．しかし，出産時生存していた仔が離乳時まで授乳していたことを表わす離乳率では，メチル水銀投与群が有意($P<0.01$)に低いことがわかった．離乳時における新生仔の平均体重はほゞ同等で，性別による体重差も認められなかった．

A群とB群の結果を妊娠時から離乳時まで全期間水銀曝露された前年度の実験結果と比較してみると，平均離乳仔数では，A群：10.0±4.3 vs 7.7±4.4匹，B群：13.0±1.0 vs 11.3±3.1匹であった．離乳率では，A群：58.4±45.6 vs 49.1±32.9%，B群：97.8±4.4 vs 88.3±17.9%であった．総離乳仔の平均体重では，A群：37.5±4.0 vs 36.1±9.6g，B群：36.4±5.1 vs 37.5±6.4gを示した．すなわち，平均離乳仔数および離乳率は，AB群ともに今年度の結果が前年度の結果と比較してやゝ高い数値を示したが，総離乳仔の平均体重では，AB群の平均体重は前年度のそれとほゞ同等であまり差が認められなかった．

Table 1. Reproduction indices

Group	A	B
Fertility Index(%)	100	100
Gestation Index(%)	100	100
Total No. of pups delivered	103	121
Mean No. of pups delivered	11.4±4.6	13.4±1.4
No. of dead neonate	33	2
Mean mortality at parturition	43.6±40.0	0.9±2.7
No. of absorbed fetus	8	5
Total No. of implantation site	115	129
Mean No. of implantation site	14.4±3.9	14.3±1.7
Total No. weaned pups	60(6*)	117(9*)
Mean No. of weaned pups	10.0±4.3	13.0±1.0
Lactating index(%)	58.4±45.6	97.8±4.4
Mean body weight at weanling	37.5±4.0	36.4±5.1

* No. of Dams

考　察

A群とB群の繁殖データーで著しい差が認められたのは，出産仔の死亡率であった．A群は43.6%でB群の0.9%の約48倍も高率であった．これは，胎盤通過したメチル水銀が胎仔に蓄積[10~16]して死亡率を高めた[8,20,25]結果と考察した．

その他の測定値でA，B群で有意の差が認められたのは，離乳までの生存率である．B群の離乳までの生存率が高かったのは，以下の報告からも容易に理解できるように，母乳移行する水銀量が少なかった結果と推測した．

すなわち，Olson等[35]は，今回と類似の実験を試み，新生仔ラットの臓器水銀蓄積量を測定した結果，胎盤移行による水銀量は母乳移行水銀量の約8～25倍量であることを報告している．

また，Spyker等[34]は，メチル水銀の曝露期間を変えて新生仔への水銀の影響について調査した結果，出産前の方が出産後よりも新生仔へのメチル水銀の影響は約2倍大きいと報告している．

メチル水銀毒性は，胎仔期に強く現われ，出産後においても継続して，メチル水銀の毒性発現力が残っており，たとえ，授乳期にメチル水銀の曝露がなくても，離乳期まで生存する能力が低下してしまうと推測される．

更に，これらの報告結果に加えて，クジラ肉由来セレンの影響も考えられる．すなわち，セレンは乳汁中に移行することが知られているので[36,37]，クジラ肉由来セレンの乳汁移行により水銀の毒性が減弱しB群の生存率を高めたかもしれない．

今後，Spyker等の方法に準じたLitter sizeを等しくする実験をもとに，肉由来セレンを除いた方法およびA群出産仔臓器とB群離乳仔臓器の水銀量の測定を試みる必要があると考える．

要　約

メチル水銀の毒性が，投与方法によってラットの胎仔および新生仔に対してどのように影響するか，Cross-Fostering方法を用いて調査した．

ウィスター系雌ラットを妊娠させて，胎仔期間中のみメチル水銀投与されるA群と母乳を介してのみメチル水銀を投与されるB群に分けて，出産時に両群の新生仔を互いに交換した．更に，離乳時まで両群ともメチル水銀無添加飼料で飼育された．

妊娠率，出産率，出産仔数，出産時死亡数，吸収胎仔数，離乳仔数，離乳時体重，離乳率を観察した．

その結果，A，B群の出産仔死亡率に大差が認められ，A群の出産仔死亡率はB群のそれの約48倍を示したことから妊娠期間中に受ける水銀毒性の強さが明示された．

また，離乳までの新生仔の生存率においても，A群はB群より低値を示した．しかし，その他の測定値には有意差が認められなかった．

これらの結果から，メチル水銀の毒性は，乳汁移行よりも胎盤移行による影響が大きいものと考えられた．

（本研究は，昭和57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，その概要の一部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) Matsumoto, H., Koya, G. and Takeuchi, T.: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **24**, 563, 1965
2) 原田義孝：水俣病，熊本大学医学部水俣病研究班，94，1966，秀版印刷
3) 武内忠男，松本英世，高屋豪瑩：神経進歩，**8**，867，1964
4) 原田正純：精神経誌，**66**，429，1964
5) 立津政順，原田正純：神経進歩，**12**，181，1968
6) Morikawa, N.：*Kumamoto Medical J.*, **14**, 87, 1961
7) 森山弘之：熊本医学会雑誌，**41**，506，1967
8) 藤田英介：同上，**43**，47，1969
9) 立津政順，高木元昭，宮川太平他：神経進歩，**13**，130，1969
10) 布谷弘光：久留米医学会雑誌，**34**，934，1971
11) 浮田忠之進，武田寧，佐藤善重，高橋忠男：*Radioisotopes*，**16**，31，1967
12) 田口良雄：日本衛生学雑誌，**25**，563，1971
13) 石原信夫：医学のあゆみ，**90**，127，1974
14) Null, D. H., Gartside, P. S. and Wei, E.：*Life Sci.*, **12**, 65, 1973
15) Suzuki, T., Matsumoto, N., Miyama, T. and Katsunuma, H.：*Ind. Health*, **5**, 149, 1967
16) Garcia, J. D., Yang, M. G., Wang, J. H. C. and Belo, P. S.：*Proc. Exp. Biol. Med.*, **147**, 224, 1974
17) Murakami, U., Kameyama, Y. and Kato, T.: *Ann. Rep. Environ. Med. Nagoya Univ.*, 3, 88, 1956
18) Murakami, U.：*ibid.*, **18**, 33, 1971
19) Inoue, M., Hoshino, K. and Murakami, U.：*ibid.*, **19**, 69, 1972
20) Spyker, J. M. and Smithberg, M.：*Teratol.*, **5**, 181, 1972
21) Harris, S. B., Wilson, J. G. and Printz, R. H.：*ibid.*, **6**, 139, 1972
22) Fuyuta, M., Fujimoto, T. and Hirata, S.：*ibid.*, **18**, 353, 1978
23) Gilani, S.：*Environ. Res.*, **9**, 128, 1975
24) Gale, T. F.：*ibid.*, **24**, 152, 1981
25) Su, M-Q. and Okita, G. T.：*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **38**, 207, 1976
26) Khera, K. S.：*ibid.*, **24**, 167, 1973
27) 松本英世，高屋豪瑩，武内忠男：日本病理学会誌，**54**，187，1965
28) 三谷一憲，星野道雄，児玉京子他：衛生化学，**22**，333，1976
29) Magos, L., Peristianis, G. C., Clarkson, T. W. and Snowden, R. T.：*Arch. Toxicol.*, **45**, 143, 1980
30) 弟子丸元紀：精神経誌，**71**，506，1969
31) Mansour, M. M., Dyer, N. C., Hoffman, L. H. et al：*Environ. Res.*, **6**, 479, 1973
32) Nobunaga, T., Satoh, H. and Suzuki.：*Toxicol. App. Pharmacol.*, **47**, 79, 1979
33) 関比呂伸，田村行弘，蓑輪佳子，加納堯子：東京衛研年報，**35**，309，1984
34) Spyker, D. A. and Spyker, J. M.：*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **40**, 511, 1977
35) Olson, F. C. and Massaro, E. J.：*ibid.*, **39**, 263, 1977
36) Parizek, J., Ostadalova, I., Kalouskova, J. et al：*J. Reprod. Fert.*, **25**, 157, 1971
37) McConnell, K. P. and Roth, D. M.：*J. Nutr.*, **84**, 340, 1964

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 308-318, 1985

Relation Between Feeding Apparatus in Mites and Experimentally Induced Lesions on Human Skin

MIDORI YOSHIKAWA* and KIYOSHI HANAOKA**

The relation between the structure of the mouthpiece chelicerae in 8 mites and lesion formation on human skin was studied and an additional attempt was made to illuminate a mechanism of causing a lesion using a scratch test. The cheliceral structure of the mites which caused lesions was the piercing type. Mites with piercing chelicerae used were a bird blood sucker *Dermanyssus hirundinis*, predators of insects and mites *Blattisocius keegani* and *Androlaelaps casalis casalis*, and a plant parasite *Tetranychus cinnabarinus*. They insert their chelicerae first and then inject their salivary fluid into human skin. On the other hand, mites with chewing chelicerae such as *Glycyphagus domesticus*, *Aleuroglyphus ovatus*, *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Haplochthonius simplex* did not cause any lesion. A scratch test, using 3 mites, those which caused and did not cause lesions, showed positive skin reactions on abraded skin. Thus mite body fluid which is thought to be high molecular weight protein, was responsible for an allergic reaction and resultant papular formation when it penetrated skin.

Keywords : chelicera, papular urticaria

Introduction

Cheyletids, especially an undetermined *Chelacaropsis* sp., were thought to be the mites which caused dermatitis on residents of houses with insufficiently dried tatami mats in a 1979 survey[1]. Ecological studies of house dust samples showed that a high density of cheyletids on tatami mats increassed the incidence of dermatitis among the residents[2]. No papules, however, were found on residents when densities of a cheese mite *Tyrophagus putrescentiae* or house dust mites *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* were extremely high[2,3].

Cheyletids of *Chelacaropsis* sp. and *Cheyletus malaccensis* were proven experimentally to bite humans and induce papular urticaria, using a method in which a starved cheyletid was affixed to human skin for 24 h[4,5]. Occurrences of papules induced experimentally by living *Chelacaropsis* sp. and *C. malaccensis* were 51.9% and 68.0%, respectively. The papular formation was a type IV allergic reaction (delayed type hypersensitivity), and the sizes of lesions were 2—5 mm in diam in *Chelacaropsis* sp. and 5—7 mm in C. malaccensis[5]. The most sever itching occured on the 2nd to 3rd day after removal but disappeared on about the 6th day. A blood sucking tropical rat mite *Ornithonyssus bacoti* also experimentally caused a lesion on a human and caused similar but slightly stronger itching and papular formation compared with the cheyletids[5,6]. On the other hand, exposure of a human to *T. putrescentiae* and *D. farinae* for 24 h using the same method did not result in any lesions[5]. Thus the results from the experimentally induced papular formation on humans agreed with the results of our previous ecological studies.

Papules induced experimentally by *Chelacaropsis* sp. and *C. malaccensis* were compared histologically to those of *O. bacoti*[5,7]. The lesions caused by these 3 kinds of mites were acute inflammation involving infiltration of eosihophils. Histological observation showed that the lesions induced experimentally by the 2 kinds of cheyletids were similar to those of *O. bacoti* but a little weaker or showing slower papular forma-

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都福生保健所衛生課

tion. Thus the histological analysis agreed with the macroscopic observation of the experimental papular formation between the 2 kinds of cheyletids and *O. bacoti*.

A scratch test is a method of testing certain agents which cause contact dermatitis by applying the agents to abraded human skin. The reaction usually appears within a few minutes but disappears within hours, leaving normal looking skin[8]. Protein contact dermatitis occured only when high molecular weight protein factors were used as the test material[9].

The purpose of this study is to check which mites that are found in houses bite humans and cause lesions, using the method applied to the cheyletids, and to discuss how the chelicerae are structurally different between the mites which cause and do not cause lesions. The scratch test is also performed using 3 kinds of mites in order to discuss a mechanism of papular formation.

Materials and Methods

Formation of experimental papules

Eight kinds of living mites were used for the biting tests. They were : an adult blood sucking bird mite *Dermanyssus hirundinis*, free-living female gamasids *Blattisocius keegani* and *Androlaelaps casalis casalis*, an adult spider mite plant parasite *Tetranychus cinnabarinus*, adult acaridids *Glycyphagus domesticus* and *Aleuroglyphus ovatus*, a European house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*, and an adult oribatid *Haplochthonius simplex*.

Dermanyssus hirundinis, *T. cinnabarinus* and *H. simplex* were collected from sparrow nests, carnations and tatami mats in a tatami factory, respectively. *Blattisocius keegani* and *A. casalis casalis* were reared at about 20 ℃ and 75—80% RH feeding on *T. putrescentiae*. *Glycyphagus domesticus*, *A. ovatus* and *D. pteronyssinus* were reared under the same conditions as above, feeding on mouse lab chow powder which contained a tonic Ebios for *A. ovatus* and pieces of dried bonito for *G. domesticus* and *D. pteronyssinus*. All the mites were placed individually in specimen bottles and starved for 1—2 days at about 20 ℃ and 75—80% RH on the assumption that they would bite humans if no other food sources were available and also that they would not usually release feces on the human skin surface.

The method of caging a mite and affixing it to human skin followed the methods of Yoshikawa[4-6]. The number of mites affixed to volunteers were : 2 mites with 1 control for each person on 2 volunteers for *D. hirundinis* ; 14—22 mites of *B. keegani* with 2 controls on 2 volunteers ; 16 mites of *A. casalis casalis* with 2 controls on 1 volunteers ; 14 mites of *T. cinnabarinus* with 2 controls on 3 volunteers ; and 12—13 mites with 2 controls on 6 volunteers for *D. pteronyssinus*, on 2 volunteers for *G. domesticus* and *H. simplex*, and on 1 volunteer for *A. ovatus*.

After a 24 h fixation period. the mites were removed from the human skin and cheked to see if the mite was still alive and whether a papule was present. Observation of lesion formation or absence, and of subsidence of papules was performed for 3—4 weeks.

Scratch test

Three circles of about 20 mm in diam were drawn softly by a pen on the left forearm of a male volunteer. The skin surface of each circle was softly abraded by a sterilized injection needle about 5 mm in length and thinner than the basal layer of epidermis in depth.

About 100 living mites of *Chelacaropsis* sp., *T. putrescentiae* and *D. farinae* were washed in sterile water. One kind of mite was placed on the abraded skin surface of each circle and was flattened by the backside of a washed spoon in order to cause mite body fluid to penetrate human skin.

The reaction was observed 15 minutes later. The reaction is judged both by the size of the wheal and that of the erythma, multiplying the length of the vertical axis by that of the horizontal axis of both wheal and erythma. The reaction is positive when the size of wheal/the size of erythma is larger than that of control noted below.

As a control, the skin was abraded without flattening mites on the left arm in order to check for reaction from the needle alone. And on the right arm, the skin inside of each circle was not abraded and the 3 kinds of mites used above were flattened on the unabraded skin surface.

Results

Among the 8 mites tested, *D. hirundinis*, *B. heegani*, *A. casalis casalis* and *T. cinnabarinus* bit volunteers and caused lesions, whereas *G. domesticus*, *A. ovatus*, *D. pteronyssinus* and *H. simplex* neither bit the volunteers nor caused lesions (Table 1, Pphotos 1—4).

Dermanyssus hirundinis showed a 100% occurrence of lesions against the affixed mites but no lesions in controls (Photo 1). Most of papules were observed at the moment of removal of the mites after a 24 h fixation period. The average size of the papules was 5—10 mm in diam, ranging from 3—15 mm. Itching was severe from the 1st day after the mite removal and continued for 6—14 days until no irritation was felt. Lesions subsided in 10—20 days but pigmented relics were in evidence for more than a month.

Occurrences of papules against mites affixed were 9.7% and 28.6% on average for living females of *B. keegani* and *A. casalis casalis*, respectively (Tables 2—3, Photos 2—3). The average size of the lesions was 1—2 mm, ranging from 1—3 mm. The pale red papules had already been observed when removing the mites from the skin. Volunteers noticed light pain, like a needle prick, when these mites bit. Itching was not felt and the lesions had almost disappeared within 24 h after removal.

Tetranychus cinnabarinus showed a 15.0% occurrence of papules against living mites after removal (Table 4, Photo 4). No papules appeared in the controls. Papules were observed 24 h after removal and the average size was 2—3 mm in diam, ranging from 1—4 mm. Itching was not severe and disappeared in 2—3 days after removal. Lesions subsided in 6 days and pigmented relics did not remain.

No papules appeared during a 7—day observation period when *G. domesticus*, *A. ovatus*, *D. pteronyssinus* and *H. simplex* were affixed to volunteers (Table 1).

Results of the scratch test were 10×9/38×42 mm in *Chelacaropsis* sp., 4×6/28×28 mm in *T. putrescentiae*, 10×8/40×37 mm in *D. farinae* and 0×0/0×0 mm in control (only abraded) on the left arm (Photo 5), so all 3 kinds of mites caused a positive reaction. No reaction appeared at 15 minutes after the test in the controls of the right arm (Photo 5).

Discussion

Chelicerae in mites are generally adapted for piercing, sucking and chewing. Modifications in the chelicerae have occured in correlation with feeding habits. Karg (1961) noted that there was a correlation between cheliceral structure and the type of food chosen by free-living Gamasida[10]. In the same way, cheliceral modification in phytophagous or parasitic mites or in highly specialized predatory groups often involves fusion of the fixed digits into a stylophore and development of movable digits into stylet or spines for piercing plant or animal tissue[11].

In the cheliceral structure of *Cheyletus cacahuamilpensis* the right and left basal segments are completly fused together to form a stylophore, which is integrated with the fused coxal segments of the pedipalps. Cheliceral stylets lie above the baccual cavity, where the pharynx lies. The pharyngial pump, immediately anterior to the pharynx, serves as a suction pump for ingested food materials. Muscles which control the pump co-operate with muscles which control the movement of the chelicerae and palpi[12]. The piercing thrust of the axial chelicerae of cheyletids is ascribable to protractile movements of the cheliceral stylets. Cheyletids suck body fluid of preys after inserting their chelicerae by protractile movements, and they may also introduce their salivary fluid through the baccual cavity into the skin wound of the preys, as seen in a bat tick *Ornithodoros kelleyi*[13]. The salivary fluid of cheyletids anesthetizes prey and may destroy the tissue thus making it easier to ingest.

To cause a lesion on a human a cheyletid pierces and inserts its chelicerae into the skin and then injects its salivary fluid through the skin wound. Allergic reaction occurs against the penetrated salivary fluid and other mite body fluid which are assumed to consist of high molecular weight protein factors as seen in protein contact dermatitis[9]. The results of the scratch tests proved that all 3 kinds of *Chelacaropsis* sp., *T. putrescentiae* and *D. farinae* caused positive

Table 1. The presence of skin lesions induced experimentally by mites collected from houses.

mite		structure of chelicerae and food source	lesions induced	no. of volunteer with lesions / no. of volunteers tested
suborder	species			
Gamasida	*Ornithonyssus bacoti*	long, phercing type ; animal blood	yes	6 / 6
	Dermanyssus hirundinis	whipped, piercing type ; bird blood	yes	2 / 2
	Blattisocius keegani	long, piercing type ; predation of insects and mites	yes	2 / 2
	Androlaelaps casalis casalis	same as above	yes	1 / 1
Actinedida	*Chelacaropsis sp.*	needle-shaped, piercing type; predation of insects and mites	yes	6 / 6
	Cheyletus malaccensis	same as above	yes	3 / 4
	Tetranychus cinnabarinus	whipped, piercing type ; plant-parasite	yes	2 / 3
Acaridida	*Glycyphagus domesticus*	short, round, chewing type ; mold, food, dead insects and mites	no	0 / 2
	Tyrophagus putrescentiae	same as abowe	no	0 / 6
	Aleuroglyphus ovatus	same as above	no	0 / 1
	Dermatophagoides farinae	short, round, chewing type ; dandruff, mold, food	no	0 / 6
	Dermatophagoides pteronyssinus	same as above	no	0 / 6
Oribatida	*Haplochthonius simplex*	short, round, chewing type ; mold	no	0 / 2

note : mites used in previous experiments were included.

Table 2. Occurrence of papules experimentally induced by *Blattisocius keegani.*

	volunteer A	volunteer B	$\bar{x}$
Occurrence of papules induced by all mites(%)*	2/22(2)	1/14(2)	
	9.1	7.1	8.1
Occurrence of papules induced by living mites(%)**	1/12	1/9	
	8.3	11.1	9.7

* No. papules induced by all mites/no. cages attached on skin excluding controls (no. controls in parentheses).
** No. papules induced by living mites/no. cages in which mites were alive.

Table 3. Occurrence of papules experimentally induced by *Androlaelaps casalis casalis.*

	volunteer
Occurrence of papules induced by all mites (%)*	3/16(2) 18.8
Occurrence of papules induced by living mites (%)**	2/7 28.6

*&** Same as Table 2.

Table 4. Occurrence of papules experimentally induced by *Tetranychus cinnabarinus*

	volunteer A	volunteer B	volunteer C	$\bar{x}$
Occurrence of papules induced	2/14(2)	1/14(2)	0/14(2)	
by all mites (%)*	14.3	7.1	0	7.1
Occurrence of papules induced	1/4	1/5	0/2	
by living mites (%)**	25.0	20.0	0	15.0

*&** Same as Table 2.

reactions (Phote 5). Of the 3 kinds of mites, only *Chelacaropsis* sp. induced lesions experimentally ; *T. putrescentiae* and *D. farinae* did not in our previous tests (Photos 6—7). The results of the scratch tests apparently disagreed with the results of the biting tests except for *Chelacaropsis sp*. But this phenomenon is explained by the fact that high molecular weight protein factors can cause lesions when they penetrate human skin. *Tyrophagus putrescentiae* and *D. farinae* could experimentally induce lesions on a human if their chelicerae were of a piercing structure. The abraded skin, the skin with stratum corneum removed, sweat duct openings, apocrine openings and pilo-sebaceous opeings are ready to react with any high molecular weight protein factors. We have learned from our previous test that living unstarved mites of *T. putrescentiae* and *D. farinae*, when many mites are caged together, can cause lesions on humans since their feces, that are also high molecular weight protein, penetrate the skin through sweat and other openings. Unstarved mites more often release feces than the starved mites. So, in this test all mites used in the experiment were starved and only one mite was housed in each cage.

Starved *G. domesticus, A. ovatus, D. pteronyssinus* and *H. simplex* did not induce any lesions on a human. Since their chelicerae are chewing structures which are adapted for feeding on mold, dandruff, pieces of food or dead insects and mites, they can not abrade human skin (Table 1, Phtos 8—11). These mites had never caused papular urticaria or dermatitis on residents in houses where they were found in high density[6]. On the other hand, mites with piercing chelicerae such as *D. hirundinis*, *B. keegani*, *A. casalis casalis* and *T. cinnabarinus* caused lesions (Table 1, Photos 1—4, 12—15). They are a bird blood sucker, predators of insects and mites, and a plant parasite. Their chelicerae are structurally adapted for piercing or abrading the surface of animals or plants. So, it is easy for them to pierce and abrade the human

skin surface, given their feeding habits. Thus the results of the experimentally induced papular formation on humans using these 8 kinds of mites agreed with the results from our previous ecological surveys, in addition to the agreement noted in the introduction.

The mechanism of inducing lesions on humans by these mites seems to be the same as that of the cheyletids described above. However, the occurrences of papules are quite different among species. Of the *Dermanyssus hirundinis* mites affixed, 100% induced papules, whereas living mites of *B. keegani*, *A. casalis casalis* and *T. cinnabarinus* caused 9.7—28.6% formation, which is lower than the occurrences by *Chelacaropsis* sp. and *C. malaccensis* as mentioned in the intoduction (Table 2—4). The diffence seems to come from 3 factors : aggressive behavior, native structural adaptation for piercing human skin surface and adaptation to the high temperature on human skin. *Dermanyssus hirundinis* sucks human blood normally, so it was not surprising that it caused 100% occurrence of papules. The second highest occurrence of papules after *D. hirundinis* was from the cheyletids, *Chelacaropsis* sp. and *C. malaccensis*. It is due to strong aggressive behavior since they even attack a brush brought close to them while *D. hirundinis* escapes. *Blattisocius keegani*, *A. casalis casalis* and *T. cinnabarinus* seem to be less aggressive than the cheyletids since they also escape from the brush ; and also *B. keegani* and *A. casalis casalis* are less well adapted for piercing human skin as the width of chelicerae in *B. keegani* and *A. casalis casalis* is 20—30 μm, whereas that of *C. malaccensis* is about 3 μm (Photo 16) and of *D. hirundinis* about 5 μm and of *O. bacoti* about 12 μm (Photo 17). So, the volunteers felt itchy when *B. keegani* and *A. casalis casalis* penetrated their skin with their chelicerae. *Tetranychus cinnabarinus* might be weakened by the high temperature of 32～34 ℃ on human skin surface, so that the occurrence of papules by living mites became lower than from the cheyletids or *D. hirundinis*.

Delayed hypersensitivity (type IV allergic reaction) appeared on the volunteers using all mites which caused lesions. But the response time for papular formation induced by *Chelararopsis* sp., *C. malaccensis* and *T. cinnabarinus* was more delayed than that induced by *O. bacoti*, *D. hirundinis*, *B. keegani* and *A. casalis casalis*. This results agreed with histological observation of the cheyletids and *O. bacoti* [5,7]. Two reasons might be responsible for this phenomenon : the length of chelicerae affects the response time as the chelicerae of the 4 gamasids in Table 1 were longer than those of the cheyletids but were shorter or the same as those of *T. cinnabarinus* ; and secondly, the salivary fluid for anesthetizing animals is stronger to a human than the fluid for parasitizing plants. The weak pale papules induced by *B. keegani* and *A. casalis casalis* might be due to the fact that an insufficient amount of salivary fiuid was injected for an allergic response to occur.

References

1) Yoshikawa, M. : *Tokyo-to Eiken Nenpo*, 31—1, 253, 1980
2) Yoshikawa, M. : *House and Household Insect Pests*, 12, 62, 1982
3) Nagoya City Report : *J. Yakuen*, 298, 27, 1983
4) Yoshikawa, M. : *Tokyo-to Eiken Nenpo*, 34, 264, 1983
5) Yoshikawa, M. : *J. Med. Ent.*, 22, 115, 1985
6) Yoshikawa, M. : *J. Environ. Cont. Tech.*, 3, 4, 1985
7) Yoshikawa, M. : *Jap. J. Pub. Health*, 30, 254, 1983
8) Stone, J. : *Dermatology Immunology and Allergy*, 362, 1984, The C. V. Mosby Company, St. Louis
9) Hjorth, N. & Roed-Peterson, J. : *Contact Dermatitis*, 2, 28, 1976
10) Karg, W. : *Pedobiologia*, 1, 53, 1961
11) Kranz, G. W.: *A Manual of Acarology*, 2nd Ed., 16, 1978, Oregon State Univ. Book Stores, Inc.
12) Summers, F. M. & Witt, R. L. : *Proc. Ent. Soc. Wash.*, 73, 158, 1971
13) Sonenshine, D. & Gregson, J. D. : *J. Med. Ent.*, 7, 46, 1970

実験的に皮疹を発症したダニと口器鋏角の構造

吉川 翠*, 花岡 暉**

一般家屋内で見つかる8種類のダニが被験者に対し実験的に皮疹を発症させるか否かを調べ，発症ダニと無発症ダニの口器鋏角の形態を比較した．また，別の3種類を用いてスクラッチテストを試みた．皮疹を発症したダニはすべてさし込み型の鋏角を有するダニで，それらは吸血性スズメサシダニ，捕食性タンカンマヨイダニとホソゲチトゲダニ，植物寄生性ニセナミハダニであった．これらのダニは被験者に対しまず鋏角を皮膚内にさし込み，そのさし込み口から唾液を注入する．被験者は高分子蛋白の唾液に対してアレルギー反応を起こすと考えられた．一方，イエニクダニ，ムギコナダニ，ヤケヒョウヒダニ，イエササラダニは皮疹を発症せず，これらのダニの鋏角は，人間の皮膚に傷をつけるのが不可能な噛み砕き型であった．

スクラッチテストでは，前実験で被験者に皮疹を発症させたケラカロプシスと，無発症のコナヒョウヒダニとケナガコナダニを用いた．被験者の左腕3か所に軽く注射針で傷をつけ，その上から生きたこれら3種類のダニをそれぞれつぶすといずれも陽性反応を示したが，傷をつけない右腕では同様な方法を用いても何の反応も現われなかった．これらのことから，高分子蛋白のダニ体液が人間の皮膚の中に入り込めば，アレルギー性の皮膚炎を起こすので，ダニが皮疹を発症させうるか否かは，被験者の表皮に傷をつけうる鋏角を有するか否かにかかっていると判明した．

Photo. 1. A papule experimentally induced by *Dermanyssus hirundinis* (the day after removal of the mite).

Photo. 2. A papule (No. 1) experimentally induced by *Blattisocius keegani* (the day after removal).

Photo. 3. Lesions (No. 3 & 6) experimentally induced by *Androlaelaps casalis casalis* (pale red papules on the 2nd day after removal).

Photo. 4. Papules (No. 3 & 4) experimentally induced by *Tetranychus cinnabarinus* (on the 2nd day after removal).

Photo. 5. Positive allergic reactions in scratch tests. *Chelacaropsis* sp. was flattened on abraded skin (a) and unabraded skin (e), *Dermatophagoides farinae* flattened on abraded skin (b) and unabraded skin (f), *Tyrophagus putrescentiae* flattened on abraded skin (c) and unabraded (g) and only abraded skin (d).

Photo. 6. Papular urticaria experimentally induced by *Chelacaropsis* sp. (a) and no papules by *Tyrophagus putrescentiae* (*b*).

Photo. 7. Papular urticaria experimentally induced by *Cheyletus malaccensis* (*a*) and no papules by *Dermatophagoides farinae* (b).

Photo. 8. Chelicerae of *Glycyphagus domesticus* (Glycyphagidae)

Photo. 9. Chelicerae of *Aleuroglyphus ovatus* (Acaridae).

Photo.10. Chelicerae of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Pyroglyphyidae).

Photo.11. Chelicerae of *Haplochthonius simplex* (Haplochthoniidae).

Photo.12. Chelicerae of *Dermanyssus hirundinis* (Dermanyssidae).

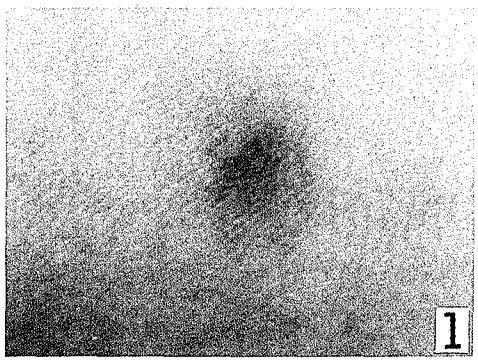
Photo.13. Chelicerae of *Blattisocius keegani* (Ascidae).

Photo.14. Chelicerae of *Androlaelaps casalis casalis* (Laelapidae).

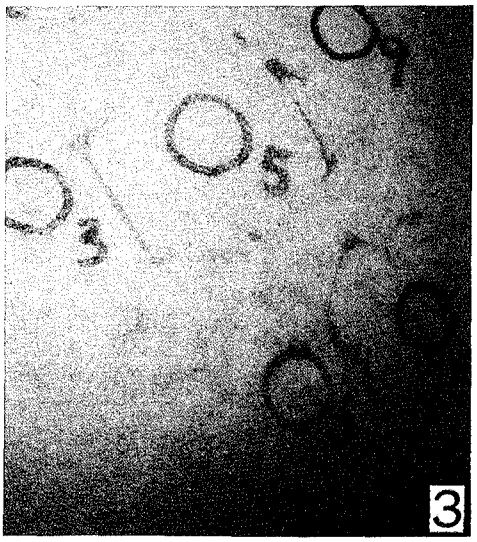
Photo.15. Chelicerae of *Tetranychus cinnabarinus* (Tetranychidae).

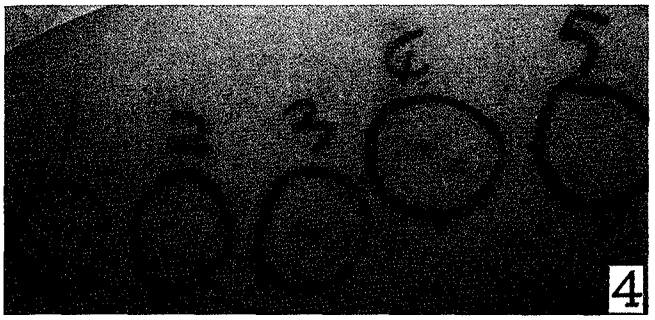
Photo.16. Chelicerae of *Cheyletus malaccensis* (Cheyletidae).

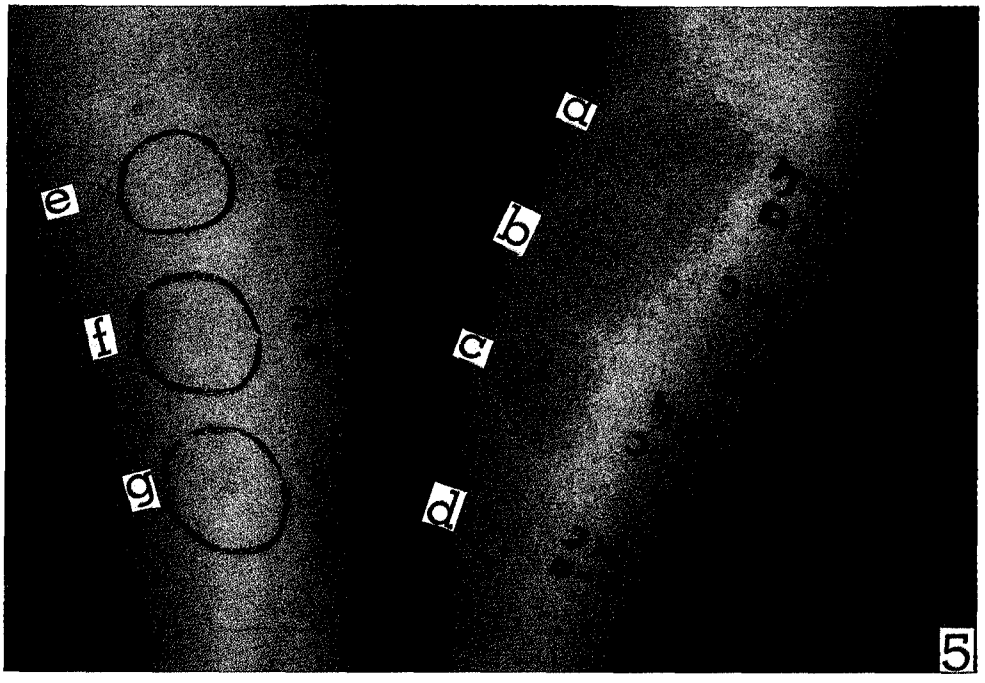
Photo.17. Chelicerae of *Ornithonyssus bacoti* (Machronyssidae).

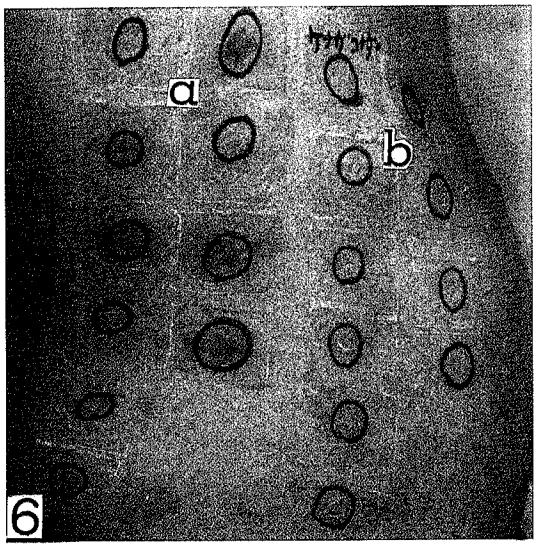

1

2

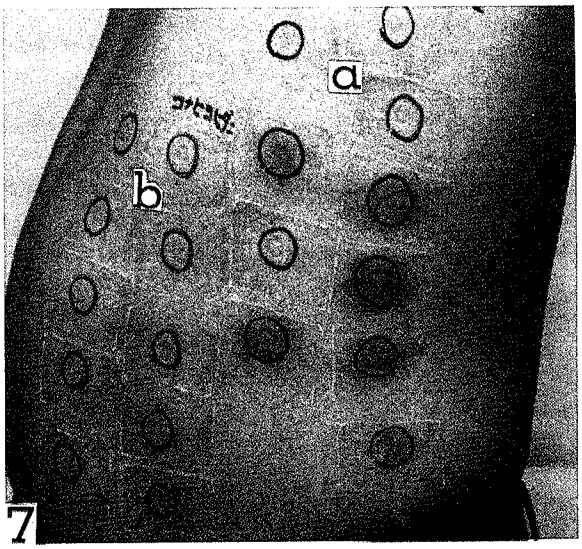

3


4

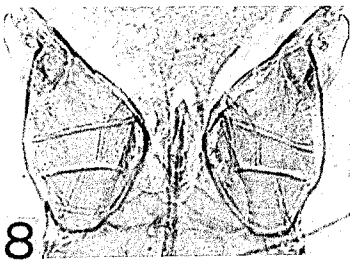

a
b
c
d
e
f
g
5

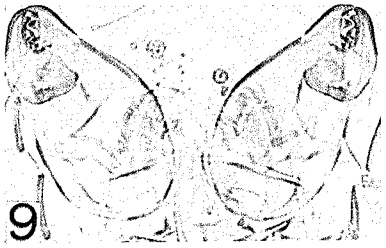


6

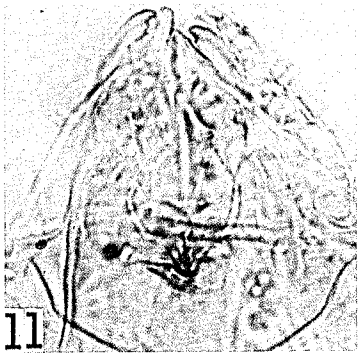


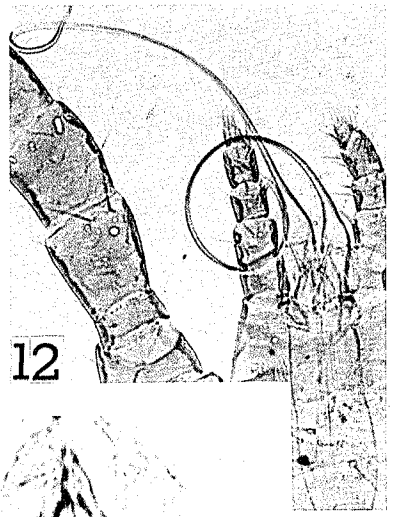
7


8

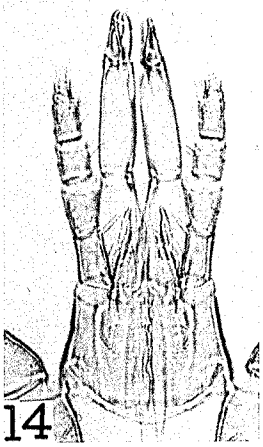

9

10

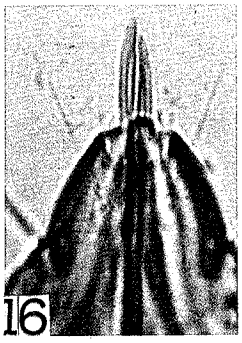

11


12

13


14

15


16

17

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 319-321, 1985

東京のツツガムシ相（第1報）
式根島のツツガムシ病流行期（1983年秋）の鼠寄生ツツガムシ類

大野正彦*

Trombiculid Mites of Tokyo (I)
Trombiculid Mites Found on Rats in Shikinejima Island during An Outbreak of Tsutsugamushi Disease in 1983

MASAHIKO OHNO*

Trombiculid larvae found as parasites on rats in Shikinejima Island which belongs to Izu Islands during an outbreak of tsutsugamushi disease in November, 1983 were studied. The numbers of larvae collected from 2 brown rats captured there were 1649 and 1795 respectively. Those larvae were *Leptotrombidium scutellare*, *L. pallidum*, *L. kitasatoi* and *Neotrombicula nagayoi*, which has not been reported from Izu Islands previously, with more than 99% being *L. scutellare*. Thus the trombiculid larvae which carried the tsutsugamushi disease to residents on this island were assumed to be *L. scutellare*.

Keywords: trombiculid mite, tsutsugamushi disease, brown rat

緒　言

1．はじめに

伊豆諸島において1951～53年に多発したツツガムシ病（七島熱）[1-4]は一時終息したかに見えたが，最近再び急増し，毎年数十名の患者がでている[5]．大島，式根島で特に患者の発生が著しく，10月から1月に集中する．

1950年代の七島熱はタテツツガムシ *Leptotrombidium scutellare* の媒介によるものと推定されているが[1-4,6-10]，現在の伊豆諸島のツツガムシ病媒介種は，三宅島でタテツツガムシが疑われている[11]以外，明らかでない．そこで，今回，式根島においてツツガムシ病流行期の鼠に寄生するツツガムシ幼虫を調べたので報告する．

2．調査方法

1983年11月下旬，式根島の民家近くの甘藷（サツマイモ）畑を中心に20の調査地点を選び，各調査地点に鼠捕獲用金網製生どり籠，及びシャーマン式トラップをそれぞれ1台づつ計40台設置した．捕獲用の餌としてサツマアゲ，ソーセージなどを用いた．設置後，毎日，捕獲器を見回り，鼠が捕れてないか調べた．

捕れた鼠は直ちに，リケッチア分離のため採血し，内臓を摘出した．処理後，次の方法でツツガムシ幼虫を調査した．ツツガムシ幼虫は鼠の耳介に多いため両耳介部をその基部から切除し，それらを70%エチルアルコールに浸し保存した．耳介切除後の鼠本体は5%ホルマリン溶液に入れ保存した．

これら耳介部，耳介を除く鼠本体を実験室に持ち帰り，筆，針，ピンセット，ブラシなどでツツガムシ幼虫を丁寧に取り外した．ツツガムシをよく水洗いし，スライドグラス上にとり，ネオシガラール（志賀昆虫普及社製）で封入し，標本を作った．顕微鏡下で種を同定し，各種個体数を調べた．

3．結果及び考察

11月20，21日に金網製生どり籠でドブネズミ *Rattus norvegicus* 各1頭ずつ（計2頭）捕獲した（Fig. 1，Table 1）．以下，20日捕獲の鼠を鼠1，21日の鼠を鼠2と呼ぶことにする．鼠1，2に寄生していたツツガムシ幼虫はそれぞれ1649，1795個体で，以前の七島熱関係の報

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

Table 1. Species and Numbers of Trombiculid Larvae Collected from 2 Brown Rats Captured on Shikinejima Island in November 1983.

species	rat(1)*		rat(2)**	
	larvae collected from the ears	larvae collected from the other parts	larvae collected from the ears	larvae collected from the other parts
Leptotrombidium scutellare	1557	79	1738	48
L. pallidum	2	1	4	
L. kitasatoi	10			
Neotrombicula nagayoi			5	
total	1649		1795	

* *Rickettia tsutsugamushi* was isolated.
** Negative to *R. tsutsugamushi*, but positive to antibody titer against *R. tsutsugamushi*.

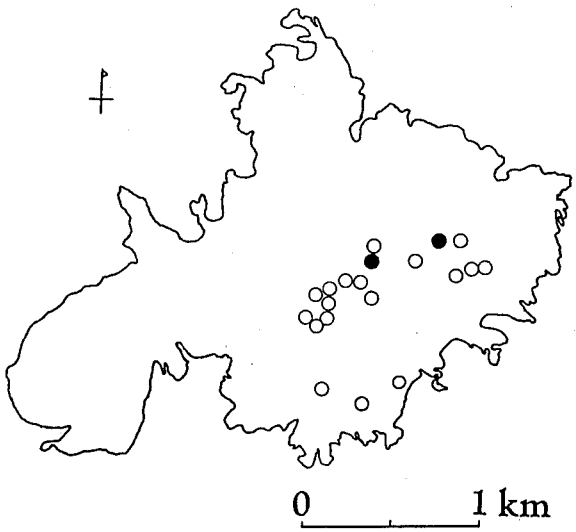


Fig. 1. Location of Cages Set up to capture Rats.
●: place where rat was captured.

告[1,26-8]に比べかなり多かった．その大部分は耳介に付いていた．

今回の調査では4種のツツガムシ幼虫が見られた．中でもタテツツガムシ *L. scutellare* が鼠1，2とも全体の99%以上を占めた(Table 2)．フトゲツツガムシ *L. pallidum* は両者に少数付いていた．キタサトツツガムシ *L. kitasatoi* は鼠1に，ナガヨツツガムシ *Neotrombicula nagayoi*（伊豆諸島から今まで報告されていなかった）は鼠2にそれぞれ少数付いていた．

伊藤ら[12]が報じたように，このツツガムシ病流行期に捕獲した鼠1からツツガムシ病リケッチアが分離された．一方，鼠2は陰性であったが，Karp株に対し高い抗体価を有していた．採取したツツガムシ4種の中でツツガムシ病の媒介種として知られているのはタテツツガムシとフトゲツツガムシで[9,10]，特にタテツツガムシの個体数が多かった．以上のことから，調査時（1983年）の式根島のツツガムシ病は30年前の七島熱と同様，タテツツガムシが媒介している可能性が高いと思われる．

Table 2. Ratio of Each Trombiculid Larval Species to Total Larvae Collected

species	rat (1)	rat (2)
Leptotrombidium scutellare	99.2%	99.5%
L. pallidum	0.2	0.2
L. kitasatoi	0.6	—
Neotrombicula nagayoi	—	0.3

謝辞 様々な御助言を賜わり，ナガヨツツガムシの同定をしていただいた国立科学博物館動物研究部前部長浅沼靖博士に深謝いたします．また，調査を行なうに当り，御協力，御配慮を賜った都衛生局公衆衛生部防疫結核課，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皆様，及び当所微生物部ウィルス研究科の諸氏に深謝いたします．

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) 東京都衛生局予防課編：七島熱の研究第2編，1953，東京都刊
3) 東京都衛生局予防課編：七島熱の研究第3編，1954，東京都刊
4) 東京都衛生局予防課編：七島熱の研究総括編，1958，東京都刊
5) 東京都衛生局：伝染病統計年報速報，1984
6) 佐々学：恙虫と恙虫病，473，1956，医学書院，東京，

大阪
7) 上野康治：衛生動物, 7, 231, 1956
8) Tamiya, T.: *Recent Advances in Studies of Tsutsugamushi Disease in Japan*, 210, 1962, Medical Culture Inc., Tokyo
9) 浅沼靖：自然科学と博物館, 37, 19, 1970
10) 浅沼靖：第31回日本感染症学会東日本地方総会・第29回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会プログラム抄録集, 16, 1982
11) 村田道里ほか：感染症学雑誌, 54, 235, 1980
12) 伊藤忠彦ほか：東京衛研年報, 35, 61, 1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 322-325, 1985

トリハロメタンの生成抑制に関する検討
—クロラミン転化処理によるTHM生成抑制—

笹野英雄*, 西垣進*

A Study on Controlling Trihalomethane Formation in Drinking Water
——Controlling Trihalomethane Formation with chlorine transformed to chloramine—

HIDEO SASANO* and SUSUMU NISHIGAKI*

Keywords: トリハロメタン trihalomethane, クロラミン処理 chloramine treatment

はじめに

水道水の塩素処理過程で，発癌性のあるトリハロメタン（以下THM）が生成されること[1]が明らかになって以来，その低減化が検討されるようになった．現在，THM生成抑制の実用的な方法として，THM前駆物質の除去[2-6]，生成したTHMの除去[7]，現行の塩素剤に代る代替消毒剤の使用[8,9]等が考えられている．著者らは，前報[10]で粉末活性炭処理，中塩素処理，凝集沈でん処理，逆浸透膜処理によるTHMの低減化を検討し，総合的見地から粉末活性炭処理がTHM前駆物質の多い原水の処理に有効であると報告した．しかし，粉末活性炭処理にもランニングコストや作業操作上の汚泥処理等若干の問題が残された．そこで著者らは，THMが次亜塩素酸によるフミン質等の前駆物質の塩素化によって起こること，水中にアンモニアが存在すると次亜塩素酸はアンモニアと反応して速やかにクロラミンになり，このクロラミンは次亜塩素酸に比べて著しく反応が弱くTHMの生成が抑制されること，さらに，現行の水道法ではクロラミン処理施行に問題のないこと等を考慮し，本報では次亜塩素酸をクロラミンに転化させるクロラミン処理法を検討することにした．

実験方法

1．試料

原水：小笠原村（父島，母島）のダム水

処理水：原水をポリ塩化アルミニウム150mg／l濃度で凝集沈でん処理した上澄液

2．試薬

1）THM分析用混合標準溶液（関東化学製），2）食品添加物用10%次亜塩素酸ソーダ（和光純薬製），4）特級亜硫酸ナトリウム（岩井化学製），5）N,N—ジエチル—P—フエニレンジアミン硫酸塩（DPD）試薬及びリン酸緩衝液（1978年版上水試験方法により調製したもの）

3．THM分析方法

ヘッドスペース・ガスクロマトグラフ法[11]

4．THM分析機器

ECD付ガスクロマトグラフィー（島津GC—5A）

5．残留塩素測定方法

DPD法（比色法）[12]

6．クロラミン処理方法

クロラミンは殺菌力が弱いので，試料に遊離塩素を30分間接触させた後にアンモニアを加え，クロラミンに転化させる方法を採用した．

試料＋遊離塩素 $\underline{\frac{30\text{分間接触}}{25℃,\ 37℃}}$ ＋アンモニア（クロラミンへ転化）$\underline{\text{一定時間放置}}$ THM測定

実験結果及び考察

1．遊離塩素とアンモニアの混合比（HClO：NH_3）の検討

クロラミン転化の最適条件を設定するために，遊離塩素とアンモニアの混合比を検討した．その結果を表1に示す．

測定結果からは，30分後に0.1mg／lの遊離残留塩素が認められたが，HClO：NH_3＝4：1比のものが痕跡であり，DPD法の精度から考えて総ての混合比でクロラミンへの転化が終了しているものと思われる．

2．25℃におけるクロラミン転化処理によるTHM生成量の経時変化

* 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

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

クロラミンへの転化によるTHM生成抑制効果を確認するために，THM生成量の経時変化を検討した．その結果を表2に示す．

試料に4.5mg/lの遊離塩素を25℃で30分作用させた後，直ちにアンモニアを1 mg/l(30分接触後の残留塩素の約1/3量)を加え，クロラミンに転化し以後1,3,6,24,48時間後のTHM生成量と遊離塩素処理だけのTHM生成量との比較を行った．

その結果，クロラミン転化処理試料は，24,48時間後のTHM生成量が約50%抑制されることが認められた．な

表1　クロラミン転化条件の検討

混合比		30分接触後の残留塩素濃度(ml/l)		
遊離塩素	アンモニア	総残留塩素	遊離残留塩素	結合残留塩素
1	1	1.8	0.1	1.7
1	1／2	1.8	0.1	1.7
1	1／3	1.8	0.1	1.7
1	1／4	1.8	痕跡	1.8
1	1／5	1.8	0.1	1.7

実験条件：2.0mg／l遊離塩素含有蒸留水にアンモニア(硫酸アンモニウム)を添加した。

表2　25℃におけるクロラミン処理によるTHM生成量の経時変化

トリハロメタン生成条件			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		総トリハロメタン	
塩素(mg/l)	アンモニア(mg/l)	経過時間	mg/l	低減率%	mg/l	低減率%	mg/l	低減率%	mg/l	低減率%	mg/l	低減率%
4.5	0	1時間	0.028		0.013		0.014		0.000		0.055	
	1	〃	0.028	0	0.013	0	0.014	0	0.000	0	0.055	0
	0	3時間	0.028		0.013		0.014		0.002		0.057	
	1	〃	0.028	0	0.013	0	0.014	0	0.002	0	0.057	0
	0	6時間	0.028		0.024		0.020		0.002		0.074	
	1	〃	0.028	0	0.014	41.7	0.020	0	0.002	0	0.064	13.5
	0	24時間	0.050		0.045		0.045		0.002		0.142	
	1	〃	0.038	24.0	0.013	71.1	0.024	46.7	0.002	0	0.077	45.8
	0	48時間	0.065		0.048		0.045		0.002		0.160	
	1	〃	0.038	41.5	0.016	66.7	0.022	51.1	0.002	0	0.078	51.3
	0	塩素消去後1時間	0.028		0.013		0.014		0.000		0.055	
	1	〃 〃	0.028	0	0.013	0	0.014	0	0.000	0	0.055	0
	0	〃 3時間	0.028		0.013		0.014		0.002		0.057	
	1	〃 〃	0.028	0	0.013	0	0.014	0	0.002	0	0.057	0
	0	〃 6時間	0.028		0.013		0.014		0.002		0.057	
	1	〃 〃	0.028	0	0.013	0	0.014	0	0.002	0	0.057	0
	0	〃 24時間	0.034		0.015		0.016		0.002		0.067	
	1	〃 〃	0.034	0	0.013	13.3	0.012	25.0	0.002	0	0.061	9.0
	0	〃 48時間	0.035		0.019		0.016		0.002		0.072	
	1	〃 〃	0.035	0	0.016	18.8	0.013	18.8	0.002	0	0.067	6.9

※経過時間は遊離塩素30分接触後の時間，試料は処理水

お，低濃度のブロモホルムを除くと各成分にわたり抑制効果がみられた．

さらに，遊離塩素30分接触で生成されたTHM中間生成体が亜硫酸ナトリウムで残留塩素を中和後THMに移行する可能性の検討を併せて行った．

その結果，①遊離塩素30分接触後に残留塩素を中和した試料，②遊離塩素30分接触後にアンモニア（硫酸アンモニウム使用）を加え，クロラミンに転化後残留塩素を中和した試料についてのTHM生成量は，48時間生成能で両試料共大きな増加が認められなかった．以上から，遊離塩素30分間接触ではTHM中間生成体が大量に生成されることはないように思われる．

3．37℃におけるクロラミン転化処理によるTHM生成抑制効果

THM生成促進因子の一つに水温上昇がある．そこで，夏期に水道水の水温が上昇した時や亜熱帯地域の小笠原村等の水道事情を想定し，37℃の水温時におけるクロラミン転化処理のTHM生成抑制効果を検討した．その結果を表3－1，表3－2に示す．

表3－1はクロラミン転化処理によるTHM生成低減率を示したもので，浄水に相当するPAC処理水は24時間で58.6%，48時間で78.4%低減効果が得られた．そこで，クロラミン転化処理によるTHM濃度の経時変化を知るために，24時間の間に増加するTHM生成量を25℃，37℃条件下で遊離塩素処理だけのものと比較検討してみた．その結果は表3－2の通りで，25℃，37℃とも1桁低い増加率を示し，この面でもクロラミン転化処理は，THM濃度の低減化に有効であることが示された．

4．遊離塩素とアンモニアの混合比別THM生成抑制効果の検討

表3－1　37℃におけるクロラミン処理のTHM生成抑制効果

トリハロメタン生成条件					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		総トリハロメタン	
試料水	温度	時間	塩素 (mg/l)	アンモニア (mg/l)	mg/l	低減率%	mg/l	低減率%	mg/l	低減率%	mg/l	低減率%	mg/l	低減率%
PAC処理水	37℃	24	4.5	0	0.018	38.9	0.018	61.1	0.020	50	0.014	85.7	0.070	58.6
				1	0.011		0.007		0.010		0.002		0.029	
		48		0	0.067	79.1	0.036	72.2	0.032	68.8	0.032	93.8	0.167	78.4
				1	0.014		0.010		0.010		0.002		0.036	
原水（ダム水）	37℃	24	9.0	0	0.095	80	0.050	70	0.032	62.5	0.002	0	0.179	73.2
				2	0.019		0.015		0.012		0.002		0.048	
			18.0	0	0.100	79	0.055	70.9	0.030	66.7	0.002	0	0.187	73.8
				4	0.021		0.016		0.010		0.002		0.049	
		48	9.0	0	0.135	78.5	0.065	76.9	0.032	62.5	0.002	0	0.234	78.6
				2	0.021		0.015		0.012		0.002		0.050	
			18.0	0	0.135	79.3	0.070	64.3	0.032	31.3	0.002	0	0.239	67.8
				4	0.028		0.025		0.022		0.002		0.077	

表3－2　経時によるTHM増加率

試料	水温 (℃)	塩素添加物 (mg/l)	アンモニア添加物 (mg/l)	24時間THM生成量 (mg/l)	48時間THM生成量 (mg/l)	24時間後から48時間までのTHM増加率 (%)
PAC処理水	25	4.5	0	0.142	0.160	12.7
			1	0.077	0.078	1.3
	37	4.5	0	0.070	0.167	138.6
			1	0.029	0.036	24.1

表4 遊離塩素とアンモニアの混合比別 THM 生成抑制効果

試料名	混合比	反応時間	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		総トリハロメタン	
	$HClO:NH_3$		mg/l	低減率%	mg/l	低減率%	mg/l	低減率%	mg/l	低減率%	mg/l	低減率%
原水(ダム水)	1 : 0	24	0.130		0.100		0.050		0.006		0.286	
PAC処理水	1 : 0	24	0.019	0	0.026	0	0.038	0	0.008	0	0.091	0
〃	1 : 1/2		0.010	47.4	0.012	53.8	0.018	52.6	0.008	0	0.048	48.0
〃	1 : 1/3		0.008	57.9	0.013	50.0	0.018	52.6	0.007	12.5	0.046	49.5
〃	1 : 1/4		0.010	47.4	0.011	57.7	0.016	57.9	0.008	0	0.045	50.5
〃	1 : 0	48	0.019	0	0.027	0	0.038	0	0.008	0	0.092	0
〃	1 : 1/2		0.010	47.4	0.012	55.6	0.018	52.6	0.008	0	0.048	47.8
〃	1 : 1/3		0.010	47.4	0.011	59.3	0.018	52.6	0.008	0	0.049	46.7
〃	1 : 1/4		0.010	47.4	0.011	59.3	0.017	55.3	0.008	0	0.046	50.0

※反応温度25℃, 遊離塩素添加量：原水9.0mg/l, 処理水 4.5mg/l

将来, クロラミン転化処理が実用化されることを想定し, 表1のクロラミン生成条件の検討結果を基に THM 生成量からみた遊離塩素とアンモニアの混合比を検討した. その結果を表4に示す.

検討した混合濃度比は, $HClO:NH_3 = 1:1/2$, 1 : 1/3, 1 : 1/4である. いずれの混合比も25℃, 24時間接触, 48時間接触で遊離塩素単独処理にくらべて THM 低減率は45～50%であり, 混合比の違いによる差を認めなかった. この結果を Allen L. Lange らの報告[13]やアンモニアのブレークポイントなどを考慮して適用混合比を設定すると, $HClO:NH_3 = 1:1/3$又は 1 : 1/4が実用に適する条件と思われる.

まとめ

本実験では, クロラミンが遊離塩素にくらべ殺菌力が弱い点を考慮し, アンモニアを加える前に遊離塩素を30分間接触させる方法を採用し THM の低減化を検討した. その結果は次の通りであった. 従来の遊離塩素処理とくらべて① THM 生成量の低減効果が高い, ②時間経過にともなう THM の増加率が1桁低い, ③水温上昇による THM の増加も著しく低い.

以上の結果から, クロラミン転化処理法は THM 低減化に有効な方法であることを確認した.

謝辞 本実験にあたり, 試料提供その他の便宜を計って下さった東京都衛生局環境衛生課, 小笠原村役場水道建設課並びに東京都水道局浄水課の各位に深謝いたします.

文献

1) Rook, J. J., : *Watertreatment and Examination*, 23, 234, 1972
2) Singer, P. C., Borchardt, J. h., and Colthurst, J. M., : *J. AWWA*, 10, 573, 1980
3) 丹保憲二：水道協会雑誌, 367, 13, 1965
4) 浦野紘平, 山本英二, 網谷幸二：水道協会雑誌, 573, 34, 1982
5) Rice, R. G., : *Science and Engineering*, 2, 1, 1980
6) 浦野紘平, 山本英二, 網谷幸二：第17回水質汚濁講演集, 294, 1983
7) 丹保憲二編著：水道とトリハロメタン, 215, 1983技報堂
8) Vogt, C., and Regli, S., : *J. AWWA*, 73, 33, 1981
9) Rice, R. G., Robson, C. M., Miller, G. W., and Hill, A. G., : *J. AWWA*, 73, 44, 1981
10) 笹野英雄, 西垣 進：東京衛研年報, 35, 339, 1984
11) 厚生省：環水第15号, ヘッドスペース・ガスクロマトグラフ法, 1984
12) 日本水道協会：上水試験方法, 1978年版
13) Lange, A. L., and Kawczynski, E., : *J. AWWA*, 70, 654, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 326-334, 1985

糞便汚染指標細菌としての大腸菌群に関する検討（第2報）

古畑勝則*, 松本淳彦*

Studies on Fecal Coliforms as the Indicator Bacteria for Fecal Contamination (II)

KATSUNORI FURUHATA* and ATSUHIKO MATSUMOTO*

Keywords：糞便性大腸菌群 fecal coliforms, 糞便指標細菌 indicator bacteria for fecal contamination, M-FC 寒天培地 M-FC agar medium

緒　言

飲料水や排水，公共水域等の水質評価を細菌学的に判断する一つに，腸管系病原微生物の共存の指標とする大腸菌群の項目がある．法規的には水道法の水質基準，下水道法の放流水水質基準，水質汚濁防止法の排水基準，公害対策基本法の環境基準等があり，それぞれに基準値が定められ，試験法も異なる．水質試験でいう大腸菌群は，乳糖を分解して酸およびガスを産生するグラム陰性の無芽胞桿菌（好気性，通性嫌気性）を総称し，これには *Escherichia coli*（I，II，III型）をはじめ *Citrobacter freundii*（I，II型），*Klebsiella aerogenes*（I，II型）等がこの範ちゅうに含まれている[1]．しかし，*E. coli*（I型）以外は，元来，水中や土壌中を生息場所としているものであり，糞便汚染とは直接関係がないことが以前から指摘されていた[2-6]．そのため，糞便由来の大腸菌群のみを対象として，糞便汚染の指標性をより高めようとする考えが強くなってきている[7-9]．この試験方法は，従来の培養温度35～37℃を44.5℃の高温にするもので，この温度条件で増殖可能な大腸菌群を糞便由来と考えるものである．この基礎的な考え方は1904年にEijkmanが推奨したといわれ[6]，現在ではEC Test, FC Testとして上水試験方法[1]，Standard Methods (15版)[10]に記載されているが，水質検査においては，これまで日常的には用いられていなかった．

1983年8月，環境庁より水浴場を対象とした水質環境基準と試験法の改定が通達され[11]，汚染の指標細菌を従来の大腸菌群から糞便性大腸菌群とすることになった．これは，メンブランフィルター法によりM-FC培地上で44.5±0.2℃，24時間培養し，フィルター上に出現した青色集落を糞便性の大腸菌群とするものである．この試験法に採用されたM-FC寒天培地については，従来，大腸菌群検出に用いられている種々培地と比較したところ，最も良好な発育を示す培地であった[12]．一方，水質分野で対象とされる大腸菌群のなかで，44.5℃の温度条件で増殖を示すのは，*E. coli*（I型）のみであるといわれてきた[1]．しかし実際に，排水や河川水等をM-FC培地で培養すると，*E. coli*ばかりでなく *Klebsiella pneumoniae* や *K. oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *E. agglomerans* 等が増殖してくることがある[12]．そして集落の色調も定型的青色集落のほかに種々な色調のものが多数出現する．ところがこれら形態が違う集落がすべて乳糖を分解する腸内細菌，すなわち大腸菌群であるか否かが明らかになっていない．そこで，ヒトの糞便を培養して，集落の色調と大腸菌群の種構成を明らかにし，これをもとに，排水，河川水を培養したときに増殖してくる集落の性状とそれぞれの菌種について若干の検討を試みた．

材料および方法

1．材料　1）糞便；健康成人の糞便，30試料．2）団地排水；住宅団地の浄化槽放流水，10試料．3）河川水；都内の荒川，江戸川，墨田川，多摩川の下流域から採取した河川水，7試料．

2．方法　糞便はおよそ1gを生理食塩水9 m*l*中で均一化した．これを10倍段階で希釈した各1 m*l*について，M-FC寒天培地（1 *l*中のg：トリプトース10.0，プロテオーゼペプトン5.0，酵母エキス3.0，塩化ナトリウム5.0，乳糖12.5，胆汁酸塩1.5，アニリンブルー0.1，寒天15）を用いて混釈し，36±1℃および44.5±0.5℃の両温度で24時間培養して菌数を測定した．また5枚のM-FC

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

平板培地に試料0.1m*l*を塗抹して44.5±0.5℃で培養し，平板上に発育した集落を色調別に4グループに分けて釣菌した．すなわちAグループは濃青色集落，Bグループは淡青色集落，Cグループは青白色集落，Dグループは白色ないしクリーム色の集落とした．このグループ分けでそれぞれ405株，162株，19株，64株の計650株を分離した．これら釣菌した各集落は新たにM-FC寒天平板上に画線培養し，独立した集落を形成させて純化したのち，BGLB培地に移植し，36℃で48時間培養してガス産生による乳糖分解を調べた．次いでオキシダーゼ試験，OF試験を行い，さらに腸内細菌同定用キット（バイオテスト1号'栄研'）を使用して21項目の生化学的性状により同定し，それぞれの菌種の構成とその比率を調べた．

排水および河川水については，菌数を測定した後，44.5℃で発育した集落をそれぞれ177株(79，35，22，41株)，64株(52，3，0，9株)を分離して同様に同定を行った．

結　果

1．糞便中の菌数および集落の色調と菌種の関係

糞便をM-FC寒天培地により36℃および44.5℃の温度で24時間混釈培養し，発育したすべての集落を計数した．36℃の場合は1.3×10^6～4.7×10^8／g，44.5℃の場合では1.0×10^6～4.5×10^8／gであり，両培養温度における菌数には差がみられなかった．また色調別集落の出現割合もほぼ同様であったので，これらを糞便由来大腸菌群とみなして，44.5℃培養条件で発育してくる集落について比較を行った．

集落の色調の違いによって分離した菌株について同定した結果を表1．にまとめた．これによると定型的濃青色集落は，405株中90%（364株）が*E.coli*であった．また5%（22株）が*K.pneumoniae*で，その他3%（12株）が*E.agglomerans*，1%（4株）が*E.cloacae*，0.7%（3株）が*C.freundii*であり，これらも濃青色の集落を形成した．淡青色集落では，*E.coli*の占める比率は下がり，162株中64%（104株）となり，*K.pneumoniae*が31%（50株）と高くなった．しかし青白色を呈する集落は糞便中には少なく，30試料中1試料のみにみられた．この19株中79%（15株）が*K.pneumoniae*であり，他には*E.coli*，*E.agglomerans*が低率ながら分離された．青味のないクリーム色集落では，意外に*E.coli*と同定されたものがかなり存在したが，乳糖を分解するものは18%にすぎなかった．他には*K.pneumoniae*（17%），*E.cloacae*（11%）が低率ながら分離された．これら濃青色から青白色を呈する分離株はすべてBGLB培地でガス産生を認めた．

表2．には糞便30試料中無作為に選んだ10試料から検出された大腸菌群の種構成を示した．試料によってかなり違いがみられたが，*E.coli*の占める割合は57～100%であった．次いで*K.pneumoniae*が2～23%の割合であった．他に*E.cloacae*が10～14%，*E.agglomerans*が6～10%ほどみとめられた．

このように糞便からM-FC培地上に44.5℃で増殖してくる菌種には*E.coli*および*K.pneumoniae*が多く，その他のものとして*E.agglomerans*，*E.cloacae*，*C.freundii*等も低率ではあるが発育可能であり，これらを糞便性大腸菌群とみなすことができる．*E.coli*と同定されたものの集落の色調は，93.6%（500株中468株）が濃青色—淡青色を呈するものであった．しかし，*K.pneumoniae*の色調は，濃青色では22.4%の低い比率であるが，淡青色—青白色を呈するものに多くみられ，66.3%（98株中65株）がこれに該当していた．

2．排水，河川中の菌数および集落の色調と菌種の関係

排水は36℃の培養で1.9×10^2～4.1×10^5/m*l*，44.5℃では3.1×10～2.8×10^3/m*l*の菌数であり，高温培養すると36℃培養における菌数の0.4～30.8%，平均10.6%が発育を示した．

表1．　糞便中の色調別大腸菌群の構成（M-FC寒天培地，44.5℃，24時間培養）

菌種＼集落の色調	濃青色		淡青色		青白色		クリーム色	
	株数(割合%)		株数(割合%)		株数(割合%)		株数(割合%)	
分離株数	405	(100)	162	(100)	19	(100)	64	(100)
Escherichia coli	364	(89.9)	104	(64.2)	2	(10.5)	30	(46.9)
Klebsiella pneumoniae	22	(5.4)	50	(30.9)	15	(79.0)	11	(17.2)
Enterobacter cloacae	4	(1.0)	2	(1.2)	—	—	7	(10.9)
E. agglomerans	12	(3.0)	—	—	2	(10.5)	—	—
Citrobacter freundii	3	(0.7)	—	—		—	—	—
その他	—	—	6	(3.7)	—	—	16	(25.0)

これら高温培養で出現した集落を色調別に同定した結果を表3.に示した.釣菌した79株の濃青色集落は91.1%（72株）が*E.coli*であり，残り8.9%（7株）は*K.pneumoniae*であった．淡青色集落の35株は68.5%（24株）が*E.coli*，25.7%（9株）が*K.pneumoniae*であった．青白色を呈する集落は22株と少なくなるが，*E.coli*，*K.pneumoniae*とも同率の36.4%にみられ，その他*E.cloacae*，*E.agglomerans*，*C.freundii*が13.6～4.5%と低率ながら検出されるようになった.これら分離した136株は82%以上が乳糖を分解した．排水から*E.coli*と同定されたA－Dグループの122株のうち,78.7%の96株が濃青色あるいは淡青色の集落を形成した．また，*K.pneumoniae*と同定された26株で，定型的青色を呈するものは26.9%と少なく，淡青色ないしは青白色のグループに属するものが65.4%（17株）と多くなり，これは糞便中の割合と同じような傾向がみられた．

表4．には排水10試料から検出された糞便性大腸菌群の種構成を示してみた.各試料からの釣菌数は15～20株であるが，*E.coli*が40～90%ともっとも多く，次いで*K.pneumoniae*が5～40%を占めていることがわかった．その他，*E.cloacae*，*E.agglomerans*，*C.freundii*が5～7%と低率ながら検出された．

次に，河川水の菌数は，36℃で2.7×10^2～3.6×10^4/ml，44.5℃では0.6×10～3.9×10^2/mlであり，36℃での0.3～6.8%，平均2.2%が44.5℃で検出された．このように，河川水では36℃培養での菌数に対する44.5℃培養での菌数の割合は非常に低かった．

44.5℃の温度条件で発育した集落を，色調別に分離して同定し表5．に示した．濃青色を呈した集落52株のうち69.2%（36株）が*E.coli*であり，21.2%（11株）が*K.pneumoniae*であった．淡青色を呈する集落は3株と非常に少なく，河川水はほとんどこの両菌種によって占められていた．これら55株のうち87%が乳糖を分解するものであった．

表6．には河川水7試料から分離された糞便性大腸菌群の種構成を示したが，4菌種が同定され，43～100%が*E.coli*であった．また*K.pneumoniae*が8～40%であった．

以上のように，糞便をM-FC培地により44.5℃で培養した場合に増殖してくる菌種には，*Escherichia coli*，*Kleb-*

表2．ヒト糞便中の大腸菌群の構成

菌種＼試料No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
分離株数	50	50	30	28	28	20	20	20	20	20
Escherichia coli	49 (98)	49 (98)	23 (77)	22 (79)	16 (57)	20 (100)	17 (85)	18 (90)	19 (95)	18 (90)
Klebsiella pneumoniae	0	1 (2)	7 (23)	3 (11)	3 (11)	0	0	0	1 (5)	0
Enterobacter cloacae	0	0	0	1 (4)	4 (14)	0	0	2 (10)	0	0
E. agglomerans	0	0	0	2 (6)	0	0	0	0	0	2 (10)
その他	1 (2)	0	0	0	5 (18)	0	3 (15)	0	0	0

数字は株数を示し，（ ）内はその割合（%）

表3．排水中の色調別大腸菌群の構成（M-FC寒天培地，44.5℃，24時間培養）

菌種＼集落の色調	濃青色		淡青色		青白色		クリーム	
	株数（割合%）		株数（割合%）		株数（割合%）		株数（割合%）	
分離株数	79	(100)	35	(100)	22	(100)	41	(100)
Escherichia coli	72	(91.1)	24	(68.5)	8	(36.4)	18	(44.0)
Klebsielle pneumoniae	7	(8.9)	9	(25.7)	8	(36.4)	2	(4.9)
Enterobacter cloacae	—	—	—	—	3	(13.6)	1	(2.4)
E. agglomerans	—	—	—	—	2	(9.1)	1	(2.4)
Citrobactem freundii	—	—	1	(2.9)	1	(4.5)	—	—
その他	—	—	1	(2.9)	—	—	19	(46.3)

表4. 排水中の糞便性大腸菌群の構成

菌種 ＼ 試料No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
分離株数	20	20	20	20	20	18	15	15	15	15
Escherichia coli	8	18	15	14	15	15	10	8	8	11
	(40)	(90)	(75)	(70)	(75)	(83)	(67)	(52)	(53)	(73)
Klebsiella pneumoniae	8	1	4	2	2	1	0	1	5	2
	(40)	(5)	(20)	(10)	(10)	(6)		(7)	(33)	(13)
Enterobacter cloacae	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	(5)							(7)	(7)	(7)
E. agglomerans	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	(5)							(7)	(7)	
Citrobacter freundii	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
							(7)	(7)		
その他	2	1	1	4	3	2	4	3	0	1
	(10)	(5)	(5)	(20)	(15)	(11)	(26)	(20)		(7)

数字は株数を示し，( )内はその割合(%)

表5. 河川水中の色調別大腸菌群の構成(M-FC 寒天培地，44.5℃，24時間培養)

菌種 ＼ 集落の色調	濃青色		淡青色		青白色		クリーム色	
	株数(割合%)		株数(割合%)		株数(割合%)		株数(割合%)	
分離株数	52	(100)	3	(100)	—	—	9	(100)
Escherichia coli	36	(69.2)	1	(33.3)	—	—	3	(33.3)
Klebsiella pneumoniae	11	(21.2)	2	(66.7)	—	—	—	—
Enterobacter cloacae	1	(1.9)	—	—	—	—	—	—
E. agglomerans	—	—	—	—	—	—	1	(11.1)
その他	4	(7.7)	—	—	—	—	5	(55.6)

表6. 河川水中の糞便性大腸菌群の構成

菌種 ＼ 試料No.	1	2	3	4	5	6	7
分離株数	15	12	10	8	7	6	6
Escherichia coli	10	5	6	5	5	6	3
	(67)	(43)	(60)	(63)	(72)	(100)	(50)
Klbsiella pneumoniae	2	1	4	3	1	0	2
	(13)	(8)	(40)	(37)	(14)		(33)
Enterobacter cloacae	0	1	0	0	0	0	0
		(8)					
E. agglomerans	0	1	0	0	0	0	0
		(8)					
その他	3	4	0	0	1	0	1
	(20)	(33)			(14)		(17)

数字は株数を示し，( )内はその割合(%)

siella pneumoniae, Enterobacter agglomerans, E. cloacae および *Citrobacter freundii* の5菌種があり，これらを糞便性大腸菌群と称することができる．そして排水や河川水からも同様に検出されるため，糞便汚染の指標細菌として有効なものと考えられた．主要菌種は *E. coli, K. pneumoniae* の2菌種であるが，この純培養したものと両者を混合培養したもの，および実際に河川水を培養して出現した集落を写真に示した．

考　察

細菌学的な水質検査における大腸菌群の試験法には乳糖ブイヨン，BGLBブイヨン培地を使用する液体培養法と，デソキシコレート寒天培地を使用する寒天平板培養法とが採用されている．いずれも培養温度が35～37℃であるため，この条件では糞便汚染とは直接関係がないといわれる *Citrobacter freundii, Klebsiella*（現在は *Enterobacter*）*aerogenes* 等も同時に増殖してくる．そこでこの培養温度を44.5℃に高くするとこれらの大腸菌群は発育が抑制されることをEijkmanが提唱した．このことについては，著者らも保存菌株である *E. coli*（I，II型），*C. freundii*（I，II型），*K. aerogenes*（I，II型）の6菌種を44.5℃で培養すると，やはり *E. coli* I型のみが増殖を示したことからもうなずけることであった[12]．

一方では，糞便汚染の指標性を高めるための高温培養法を推奨する反面，糞便由来の乳糖分解腸内細菌，すなわち糞便性大腸菌群の種的構成が明らかにされておらず，*E. coli* のみであるのか，あるいはこの他にも存在するのかについての議論が水質分野では少ないのが実状である．従来はIMViC分類体系によって糞便性，非糞便性を区別していたが，この方法では菌種が異なっても同じ性状を示すものがあって十分ではない．Standard methods（15版，1980）[10]でも *Klebsiella* 属と *Enterobacter* 属を一つのグループに含めているが，これらを区別するには運動性の有無を確認しなければならない．

著者らは，高温培養によってM-FC培地上に発育する集落を色調によって4グループに分け，これらについてIMViC系列と21項目の生化学的性状試験を並行して行ってみた．ヒトの糞便を36℃と44.5℃の両温度で培養しても菌数間に差はみられないが，排水や河川水等の環境水を同条件で培養すると44.5℃で発育するものは明らかに少ない．しかし，菌種の構成は既述したように *E. coli, K. pneumoniae, E. cloacae, E. agglomerans* そして *C. freundii* 等の共通性があるため，これらの5菌種を糞便性大腸菌群と称することができると考える．これら菌種をM-FC培地上の集落の色調から区別することは困難であるが，あえて優占種2種を比較してみると，写真に示したように，濃青色から淡青色を呈する集落であれば95%ほどは *E. coli* であると思われる．また淡青色ないし青白色と薄い青色を呈する集落はほぼ65%が *K. pneumoniae* に該当するであろうと考えられた．Geldreichらは，いろいろな自然環境水を同様に培養し，色調について論じているが，青色集落であれば93%は糞便性大腸菌群であり，青味のないクリーム色ではおよそ12%がこれに該当するにすぎないと述べている[13]．集落の青色度合の濃淡は大腸菌によって酸の産生量が異なるためであり，事実，*E. coli* の方が *K. pneumoniae* に比べて液体培地のpHが低くなる傾向が認められている．

これらのことから実際に海水や河川水等の水浴場水を検査した場合に，M-FC培地上に発育する集落は濃青色のものばかりでなく，淡青色ないし青白色を呈するものも糞便性大腸菌群として計数する必要がある．

要　約

水浴場の細菌学的水質環境基準，試験法が改定された機に，糞便性大腸菌群について検討を行い，次の知見を得た．

1）ヒトの糞便をM-FC培地によって44.5℃温度条件で培養し，発育してくる集落を色調別に分けて菌種構成を調べ，排水，河川水からのそれと比較した．

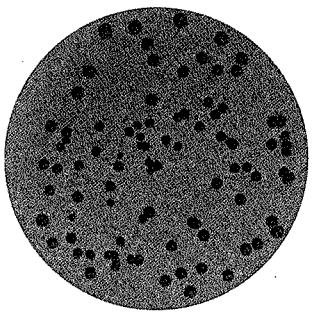
2）糞便性大腸菌群と称されるものには，*Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter agglomerans, E. cloacae, Citorobacter freundii* の5菌種があった．なかでも前二者が主要種で，環境水からも高率に検出され，糞便汚染の指標細菌となることが示唆された．

3）M-FC培地上で濃青色—淡青色を呈する集落は *E. coli*，淡青色—青白色の集落は *K. pneumoniae* に高い比率で該当した．

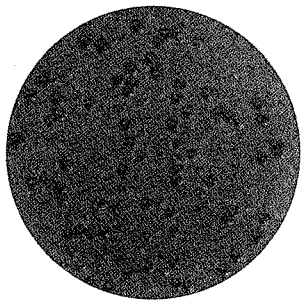
文　献

1）日本水道協会：上水試験方法，1978，東京
2）Clark, H. F. and Kabler, P. W.：*J. AWWA*, 56, 931, 1964
3）桑原驎児：用水と廃水，4，99，1965
4）小島貞男，萩原光子：モダンメディア，16，240，1970
5）坂崎利一：モダンメディア，16，308，1970
6）上野英世：用水と廃水，19，555，1977
7）萩原光子，末吉和美：水道協会雑誌，第425号，48，1970
8）萩原光子：水道協会雑誌，第437号，8，1971
9）谷本浩一：日本公衆衛生雑誌，31，199，1984
10）American Public Health Association：*Standard Methods for the Examination of Water and*

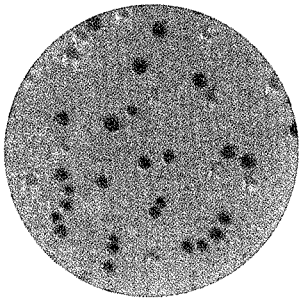
Wastwater, 15th ed., 1980, Washington
11) 環境庁水質保全局：水質環境基準検討会報告書, 1983
12) 古畑勝則，松本淳彦：水道協会雑誌，第612号，32, 1985
13) Geldreich, E.E., Clark, H.F., Huff, C.B. and Best, L.C.：*J. AWWA*, **57**, 208, 1965



Escherichia coli

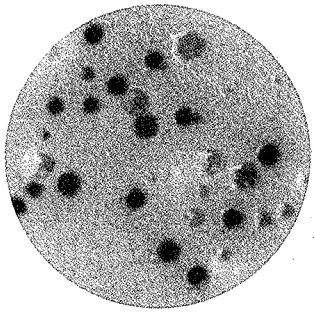


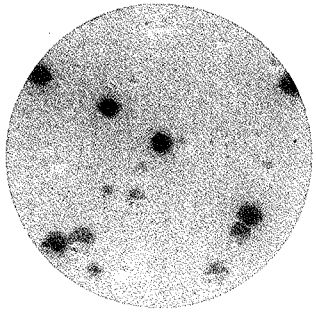
Klebsiella pneumoniae



Escherichia coli

Klebsiella pneumoniae





*M-FC*培地上における河川水中の大腸菌群

濃青色集落：*E. coli*

淡青色集落：*K. pneumoniae*

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.*, 36, 335-339, 1985

Light Scattering（光散乱）法による溶血検査

市川久次*, 小林博義*

Hemolysis Test by Light Scattering Method

HISATSUGU ICHIKAWA* and HIROYOSHI KOBAYASHI*

Keywords：溶血検査 hemolysis test, 光散乱法 light scattering method

現在最も広く，一般的に使われている溶血検査法は原理的には溶血検査用血液サンプルを調整した後被検物質と反応させ，反応時間終了後直ちに遠心し，その上清中に含まれる赤血球より漏出したヘモグロビン量を測定し，溶血の程度の大小を検討する遠心法によっている．しかしながら，この方法には①赤血球を分離するための遠心分離操作中の溶血②反応終了後からヘモグロビン量測定までの時間という二つの因子が溶血反応以外の因子として加わっている．このため，この方法では直接薬物等と赤血球との反応のみによる真の溶血を検討することはできず，加えて同一サンプルによる経時的変化を追跡し動力学的解析を行うことならびに他の薬物等の途中添加による影響を検討することは不可能である．そこでより簡便で，使用血液量が少なく，さらに直接溶血を測定できる方法として，最近 Brown[1]によりヒト赤血球を用いて，正常の赤血球は光を透過せず散乱させ，溶血が進行するにつれて赤血球サンプルの透過度が増す（吸光度が減少する）という原理に基づく溶血検査法が考案され，放射線による溶血の検討に応用されている．そこで今回，本法を毒性試験研究の一環としての血液毒性（溶血毒性）の検討への導入，応用を目的とし，材料としてヒト赤血球，溶血毒としてよく知られている無機水銀（Hg^{2+}）を用いて検査方法としての基礎的検討を行い，その方法を確立したので報告する．

実験材料ならびに方法

1．原理

本法は正常の赤血球は光を透過せず散乱させ，赤血球の崩壊（ゴース化を含む）が進むにつれて赤血球サンプルの透化度が増加（吸光度の減少）する現象を根本原理とし，さらに赤血球より漏出するヘモグロビンの吸収スペクトル（Fig. 1）に影響されない波長である700nmを用いて，赤血球サンプルの吸光度（A700）を経時的に測定し溶血曲線を作製し，溶血を検討する．

2．試薬

溶血毒として用いた無機水銀（Hg^{2+}，塩化第二水銀）は和光純薬製（試薬特級 Lot No. PJ 1110）を使用し，他の試薬はすべてJIS特級を使用した．

3．保存用赤血球サンプルの調整

健康な成人男子より得た新鮮なヘパリン加静脈血を遠心(2000rpm, 5 min)し赤血球を分離する．遠心分離により得た赤血球を2～3倍のリン酸緩衝液加生理食塩

Table 1. Effect of Days Elasped on Times for 50% Hemolysis by 0.4 ppm Hg^{2+} in 0.03% Hematocrits (Human)

Day after Collection	50% Hemolysis Time ($t_{1/2}$, min) D1	D2
0	55.50±0.50[1)](3)[2)]	67.57±0.60 (3)
1	59.95±3.66 (4)	67.17±0.76 (3)
2	56.10±2.77 (5)	67.50±0.50 (3)
3	52.66±1.61*(5)	65.33±0.76*(3)
4	53.57±2.69 (3)	64.83±3.25 (3)
5	51.17±1.89*(3)	63.43±3.86 (3)
6	47.67±0.29*(3)	64.33±0.29*(3)
7	44.33±0.76*(3)	61.00±0.87*(3)
10	43.07±0.60*(3)	58.43±0.51*(3)

1) mean±SD
2) No. of determinations
* significantly different from the 0 day's value at $p<0.05$. Hemolysis was observed slightly in control samples.

* 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

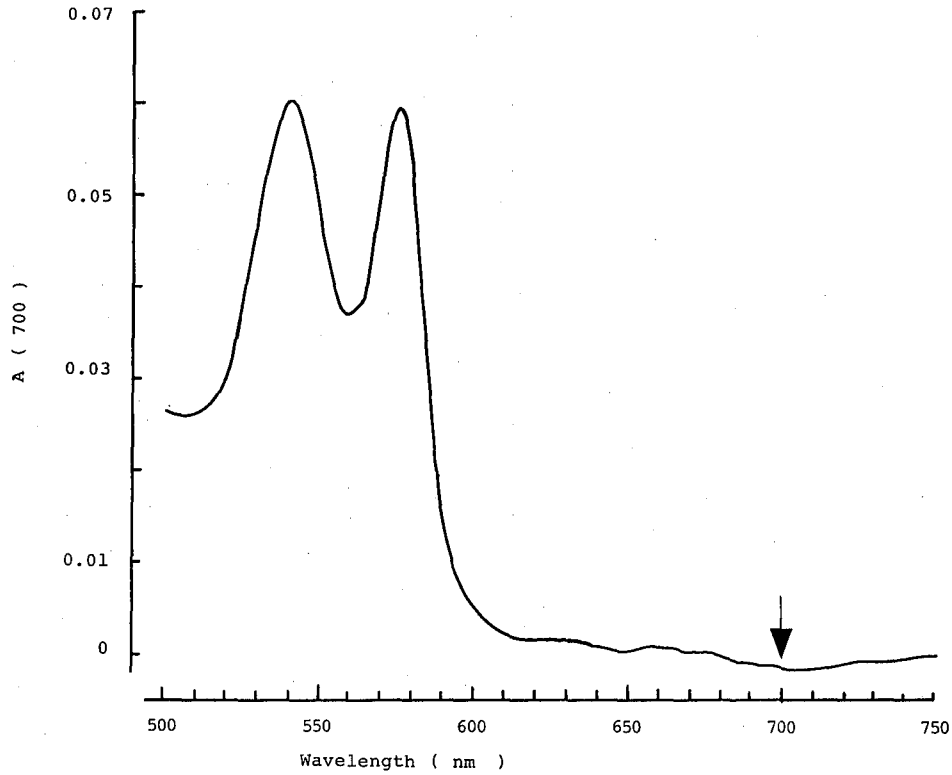


Fig. 1. Hemoglobin Spectrum from Sample in Complete Hemolysis (t=18 hrs) by Hg^{2+} (0.1 ppm)

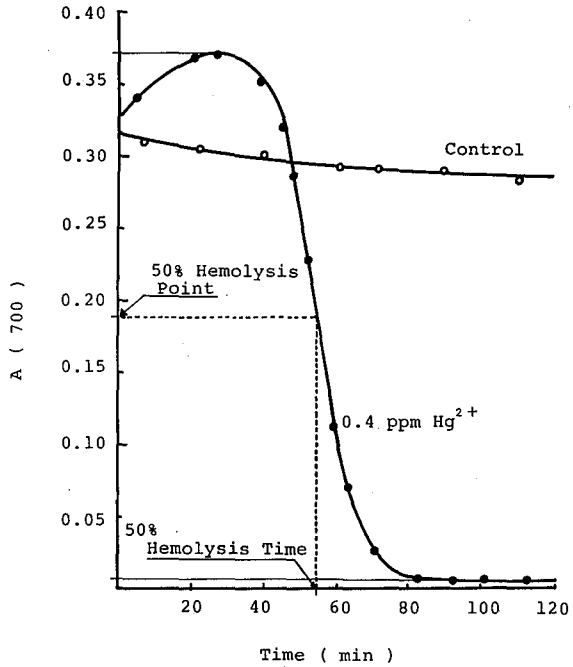


Fig. 2. Examples of Hemolysis Curve and 50% Hemolysis Time
Control ○ 0.4 ppm Hg^{2+} ●

液，pH7.4 (148mM NaCl, 6 mM KCl, 10mM リン酸緩衝液，pH7.4：以下 PBS と略) にて 3 回洗浄した後，PBS を用いて 1 %ヘマトクリット (Hct) 赤血球液を調整し，4 ℃で保存し使用時 PBS にて必要濃度に希釈し実験に供した．

4．溶血の測定方法ならびに50%溶血時間 ($t_{1/2}$) の求め方

実験方法 3 で得た 1 %Hct 赤血球液90μl，被検物質 (PBS に溶解していることが望ましい) 必要量をテフロン栓付吸光度測定用キュベットにとり PBS を加えて全量3.0ml とし，37℃で incubate しながら経時的に分光光度計 (Cary17) で700nm における吸光度を測定し溶血曲線を得る，例として0.4ppmHg^{2+}による溶血曲線を示した(Fig. 2.)，グラフ上にて吸光度の最高値ならびに最低値より50%溶血値を求め，その時の経過時間をグラフ上にて求め50%溶血時間 ($t_{1/2}$, min) とする．

実験結果

1．赤血球濃度 (Hct 値) と吸光度の関係

本法は溶血の進行により赤血球サンプルの吸光度が減少するという原理に基づいているが，実験精度上の必須条件として，吸光度の減少は即 Hct 値の減少を示すとい

う条件，すなわち吸光度とHct値が直線的比例関係にあることが要求される．そこで，その直線的比例関係の範囲を求めた．その結果Fig. 3．に示した如く少なくともHct値0－0.04%までは吸光度との間に直線関係が認められたので，実験には0.03%Hct値を使用することにした．

2．PBS中における1%Hct（ヒト）赤血球液の経時的安定性

実験材料として用いた健康な成人男子二人（D_1，D_2）より得た1%Hct赤血球液の安定性を0.4ppmのHg^{2+}による50%溶血時間（$t_{1/2}$）を指標として採血後の0—10日間にわたって経時的に検討した．その結果，Table 1に示した如く両者の赤血球ともに採血後3日目に50%溶血時間（$t_{1/2}$）の低下（$P<0.05$）がみられたが採血後4日目には差はなくなり，D 1の方は採血後5日目以後，D 2は採血後6日目以後有意（$P<0.05$）な低下が認められ，さらに時間の経過につれ50%溶血時間（$t_{1/2}$）が短かくなって行くことが認められた。この結果より，本溶血検査においては実験材料として採血後4日目までは実験に供するに良好なものとし，以後本実験においては採血後4日目までのものを実験に供した．

3．ヒト0.03%ヘマトリット赤血球液の溶血に対する無機水銀（Hg^{2+}）の濃度の影響

本実験法の実用性の可否を検討する目的で溶血毒として良く知られている無機水銀（Hg^{2+}）0，0.1，0.4，4 ppmを加えて37℃にてincubateし，ヒト0.03%Hct赤血球液の溶血に対する影響を検討した．その結果，Table 2，Fig. 4に示した如くcontrolは17時間以上経過しても吸光度の低下はほとんど起らず溶血は起きなかったが無機水銀Hg^{2+}の濃度を0.1ppm（$t_{1/2}=405.5\pm15.55$

Table 2. Effect of Various Concentrations of Mercury (Hg^{2+}) on Times for 50% Hemolysis in 0.03% Hematocrits (Human)

Concentration of Hg^{2+} (ppm)	50% Hemolysis Time ($t_{1/2}$, min)	No. of Determinations
0.1	408.5±15.55[1)]	3
0.4	54.4± 2.80	10
4.0	46.2± 1.26	3

1) mean±SD
Hemolysis was observed slightly in control samples.

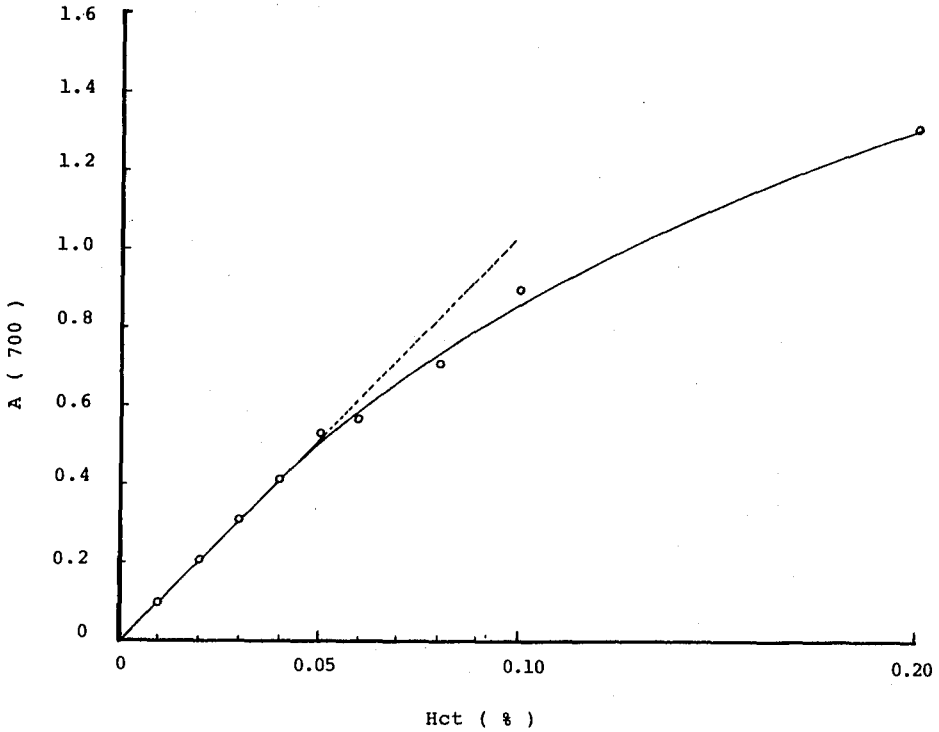


Fig. 3. Relationship between Absorbance at 700 nm and Hematocrit Values (Human)

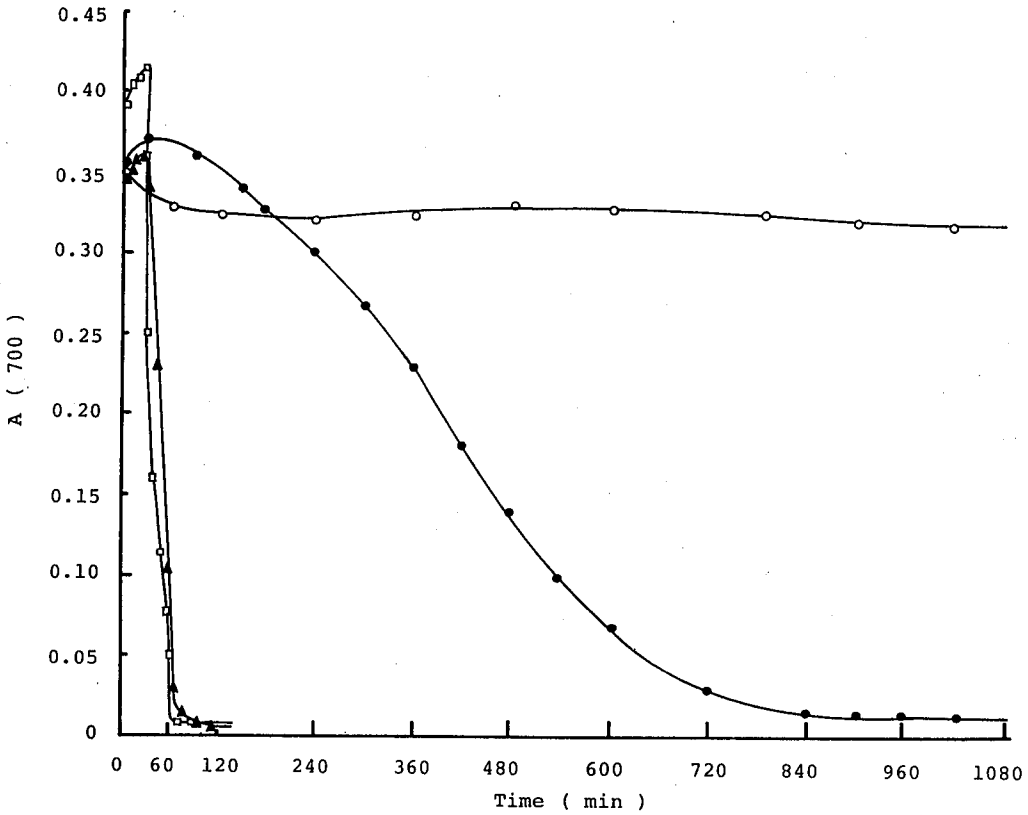


Fig. 4. Examples of Hemolysis Curve in Various Hg^{2+} Concentrations
Control ○ 0.1 ppm ● 0.4 ppm ▲ 4.0 ppm □

min), 0.4ppm($t_{1/2}$ = 54.4±2.80min), 4 ppm($t_{1/2}$ = 45.5±0.71min) と増加させると50%溶血時間 ($t_{1/2}$) は減少するという用量—反応関係が認められた.

考　察

より直接的に毒物（環境化学物質，食品添加物，医薬品等）の溶血毒性の検討を可能にする light scattering（光散乱）法による溶血検査法の毒性試験研究への導入，応用を目的とし，溶血毒として良く知られている無機水銀 (Hg^{2+}) を用いて基礎的検討を行った．本法は原理のところにおいても述べたが，700nm における吸光度の減少を溶血の指標としているので，赤血球サンプルの溶血の進行により漏出したヘモグロビンの吸収(スペクトル)による妨害が問題になることが予想されたので，0.1ppm Hg^{2+} を加えて18時間37℃で反応させ溶血完了後のサンプルの吸収スペクトルをとったが Fig. 1 に示した如く，その吸収は700nm にはなく，溶血により漏出するヘモグロビンによる妨害はないことが明らかとなった.次に Hct 値と吸光度の関係であるが実験値として測定されるのは吸光度であり，溶血を表わす値としては Hct 値である．したがって，この両者には直線的比例関係が必須である．その範囲を求めたところ Fig. 3 に示した如く 0.04%Hct 値までは直線的関係が認められたので，吸光度との関連性も加味し0.03%Hct を使用することにした．また，50%溶血時間の求め方については吸光度の最高，最低値より50%溶血点を求めグラフ（溶血曲線）より50%溶血時間を算出したが，これは動力学的解析の定法としてよく用いられているので特に問題はないと考える．実験材料として使用した健康成人男子より得た赤血球サンプルの安定性については，実験結果のところで述べたように，0.4ppmHg^{2+} を加えたその50%溶血時間の経時変化より採血後 4 日目までは安定なものと考え，実験材料として使用する期間をを採血後 4 日目までとした.

本溶血検査法を毒性試験研究への導入，応用を行った場合の実用性について無機水銀 (Hg^{2+}) を用いて検討を加えたところ Table 2，Fig. 4 に示した如く Hg^{2+} の濃度の増加により50%溶血時間 ($t_{1/2}$) が短縮されるという用量—反応関係のある結果が得られた．以上のことより

本法は毒物の溶血検査法としてのみだけでなく，毒物の溶血作用に対する動力学的解析法としての実用性についての可能性も十分あるものと考える．今回はヒト赤血球を用いて検討を行ったが，今後は犬，サル等の赤血球を用いての検討を加えつつ，毒性試験研究への導入，応用を進めて行く予定である．

要　旨

ヒト赤血球を用いて，より直接的に毒物の溶血毒性の検討を可能にする light scattering（光散乱）法の毒性試験研究への導入，応用を目的とし，溶血毒としてよく知られている無機水銀（Hg^{2+}）を用いて，実験方法の基礎的検討を行い，実験方法を確立した．

文　献

1）Brown, M.A.,：*Radiation Research*, **95**, 303, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 340-343, 1985

Slc：Wistar ラットの核型について

田山寿美子*, 田山邦昭**, 平賀興吾***

Karyotype of Slc：Wistar Rats

SUMIKO TAYAMA*, KUNIAKI TAYAMA**and KOGO HIRAGA***

Keywords：Slc：Wistar ラット　Slc：Wistar rats, 核型分析　Karyotype analysis, C-banding

はじめに

Slc：Wistar ラットは，各 Wistar 系の中では小型で扱い易いなどの理由で，これまで癌原性或は毒性試験などに用いられて来た．当部でも F344ラットが導入される以前にはこの系統を用いていた経緯がある．しかし Slc：Wistar は，その各種飼育成績が F344のそれと非常によく似ており，さらに腫瘍移植，皮膚移植が両系の間で成立するなどの，両系の由来の同一性を推測させるような成績が得られている[1,2]．動物の遺伝的特性を調べる方法はいくつかあるが，その一つに核型分析がある．ラットにおいては種々の系統間で性染色体或は常染色体の一部に多型が見られることが報告[3-6]されており，C-band 法により分染される構造的異質染色質も系統間で異なることが見い出されている[5,6]．そこでわれわれは，Slc：Wistar ラットについてその染色体の形態を調べ，さらに C-band 法も試み，すでに報告のある F344ラットの染色体と比較検討したので報告する．

材料および方法

1．動物　Slc：Wistar ラット，静岡県実験動物農業協同組合より 4 週令で購入した．雌雄各 3 匹について10～16週令で実験に供した．

2．骨髄染色体標本の作成　ラットにコルヒチン0.1%液を 1 mg／kg で腹腔内投与し，2 時間後エーテル麻酔下で断頭屠殺して大腿骨を切り出し，37°の生理食塩液で骨髄細胞を洗い出した後，0.075 M塩化カリウム液で37°20分低張処理を施した．固定はメタノール 3：酢酸 1 容の冷カルノア液で 2 時間，途中 2，3 度液換えして行った．標本は，この細胞浮遊液を，冷50%メタノール液に浸しておいたスライドグラス上に滴下し，そのまま室温放置して作った．

3．banding および染色

G-banding：Kato と Yoshida[7]が開発した尿素法を以下のように改変して行った．8 M 尿素水溶液を原液とし，使用時に1/15 Mリン酸緩衝液 pH6.8を 1，尿素を 3 の割合で混和して用いた．処理は室温で数秒～4，5分行い，水道水でよく洗った後，1／100 Mリン酸緩衝液で 2%に希釈したギムザ液で染色した．banding が足りない標本は再び尿素処理を施し，よく広がった核板をノーカバー100倍対物レンズを用いて検鏡し，写真撮影した．

C-banding：G-banding を施し，写真撮影した標本を50%酢酸で脱染色した後，Sumner[8]の BSG 法を一部変更して行った．60°の0.5%水酸化バリウム中に標本を数秒～1分浸し，充分に水洗した後，60°の2×SSC 液(塩化ナトリウム0.3 M，クエン酸ナトリウム0.03 Mの水溶液)中で30分処理し，水洗後 3%のギムザ液で20～30分染色し，検鏡後写真撮影した．

4．核型標本の作成　標準核型作成委員会[9]で示されたラット G-band パターンより，各々の染色体 No.を決定し，その C-band とともに並べて作成した．

結　果

ラット(*Rattus norvegicus*)の標準核型は標準核型作成委員会[9]により示されているが，それによるとそれらは常染色体 Nos. 1～12の端部(telo-，t と略す，および acro-) 或は次端部 (subtelo-，st と略す) 動原体染色体のグループと，常染色体 Nos. 13～20の次中部 (submeta-) または中部 (meta-) 動原体染色体のグループ，および X と Y の大小の端部動原体染色体に大別されるグループから成る．この中で Nos. 3，12の染色体[4-6]および性染色

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1，Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 同毒性部病理研究科
*** 東京都八王子保健所予防課

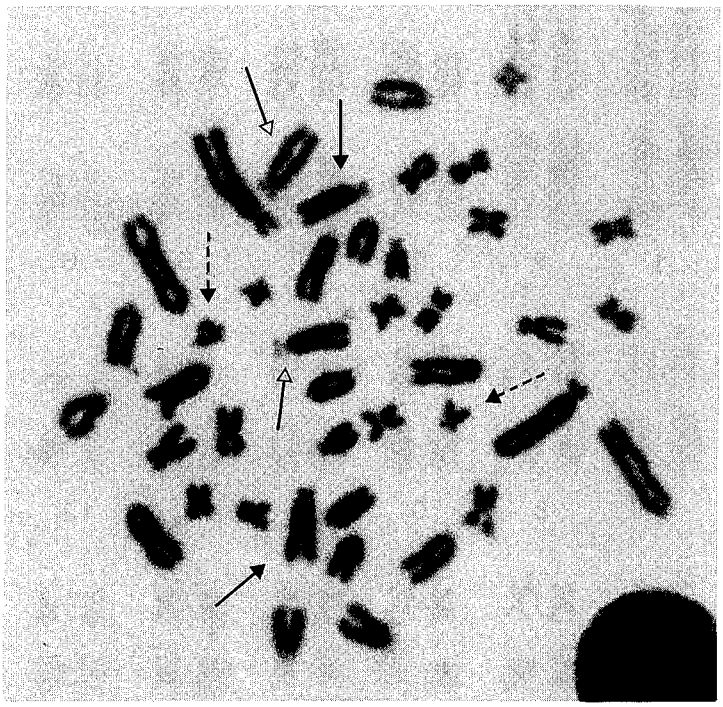


Fig. 1. Metaphase plate of a female Slc : Wistar rat, showing a remarkable short arm and /or satellites classified into subtelocentric type on Nos. 3 (⇨) and 12 (⇢) autosomes and the X (→) chromosome.

体X[3]には，系統間でしばしば多型が見られることが知られ，マーカー染色体となっている．調べられたSlc：Wistarラットの核板および核型は，Fig. 1および2に示したが，Nos. 3，12およびX染色体はすべてst型であった．またC-band法によりラットでは普通動原体部に濃染して現われる構造的異質染色質も，常染色体Nos. 4，5，7，9においてその有無に系統によりいくつかのパターンがあることが示されている[5,6]．Slc：WistarではFig. 2に示したように，C-bandはNos. 4，6および8～11，13～18の常染色体で明瞭であり，Nos. 1～3，5，7，12，19，20の常染色体およびX染色体には弱いか或は殆んど認められず，雄のY染色体は全体が濃染した．

考　　察

Slc：Wistarラットはその性状がF344ラットと極めて近似しており，両系ラット間で組織適合性抗原の一致を示す腫瘍移植，皮膚移植も成立している[1,2]ところから，Slc：WistarはF344由来であろうと推察される．そこで核型の上から両系ラットの遺伝的性状を検討しようと，まだ報告のないSlc：Wistarラットについて，今回その核型およびC-band像を調べ，Nos. 3，12およびXの各マーカー染色体はすべてst型，またC-bandマーカーのNos. 4，5，7，9染色体の各bandパターンは＋－－＋という結果を得た．これに対し，F344ラットの核型或はマーカー染色体は，YoshidaとAmano[4]，Millerら[10]およびSasakiら[6]により報告されており，No. 3st, Xtである．No. 12は2型が示されており，前二者はst型，後者はt型としている．C-bandマーカーはSasakiら[6]が，Nos. 4，5，7，9のマーカー染色体について，それぞれ＋－－＋の成績を示している．

われわれは日本チャールス・リバー㈱より購入のF344／DuCrjについて，その核型およびC-band像を調べてみた．結果は，染色体形態における3つのマーカーおよび4つのC-bandマーカーのすべてがSlc：Wistarのそれらと一致した．これら7つの染色体マーカーにつ

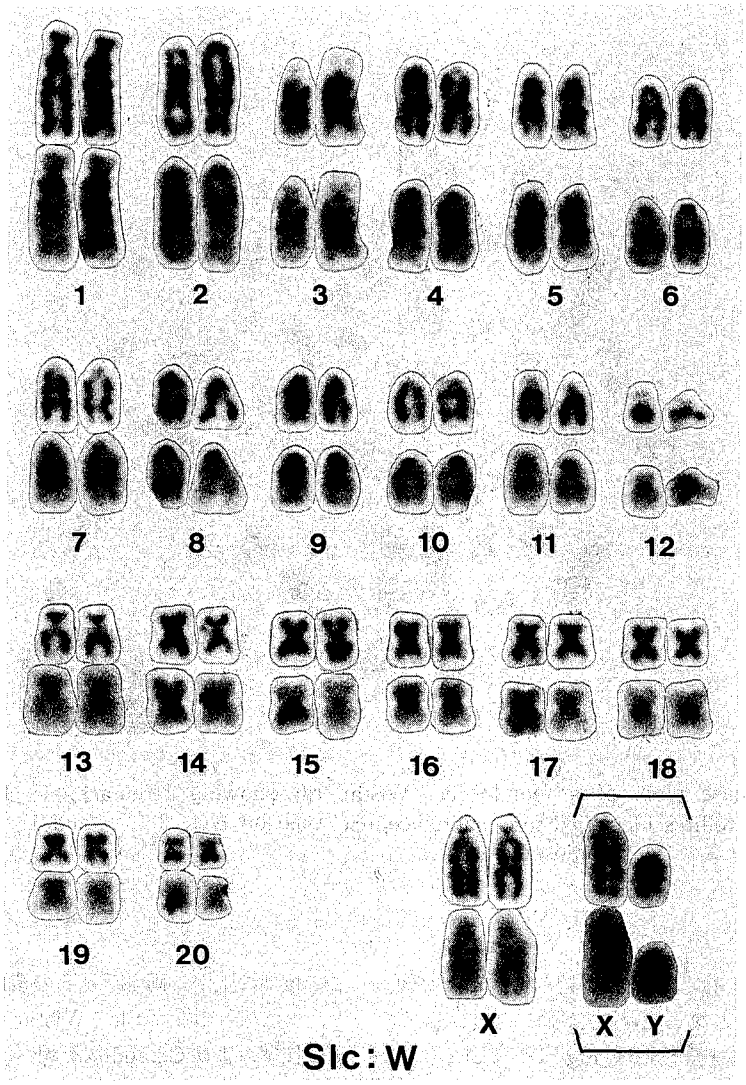


Fig. 2. Karyotype of a female Slc : Wistar rat, showing G-bands (upper) and C-bands (lower). Bracket shows sex chromosome pair from male metaphase. In the marker chromosomes, Nos. 5 and 7 are C-band negative, while Nos. 4 and 9 are positive.

いては，異なる系統間でも同じ組み合わせを取るものもあり[6]，これらの一致が必ずしも遺伝的由来の同一性を示すものではないが，酵素型，血液型，組織適合性抗原および毛色遺伝子など他の検索法と組み合わせることにより，系統間の遺伝的差異の判定の1つの重要な指標となり得ると考えられる．今回示されたSlc：WistarとF344／DuCrjの核型の一致は，両系の間での腫瘍移植，皮膚移植の成立を考える時，Slc：WistarがF344／DuCrjに遺伝的に極めて近いと判断される．ただ，Slc：Wistarはクローズドコロニーとして販売されており，山田ら[11]は生化学的遺伝子座の検索から，かなり均一性が高いコロニーであるとしているが，コロニーとしての核型を述べるには更に多くの個体についての検索が必要であるかもしれない．

近交系であるF344については，はからずも今回X染色体についてこれまでと異なるst型が示され，またNo.12

染色体についてもst型とt型との2つの異なる報告が為されている．これらの相違はF344の亜系間における遺伝的差異であるかとも考えられるが，生化学的遺伝子座や免疫学的遺伝子座などの他の遺伝的品質検査法[12]では，それらの間に明確な変異は見られていない．F344の亜系間の核型については，更に詳細な検索が必要であると思われる．

要　旨

Slc：Wistarラットは，F344由来であることを示唆する各種成績が示されているところから，今回その核型について調べた．系統間で多型が見られるマーカー染色体については，Nos. 3，12およびX染色体はすべて次端部着糸(st)型，またC-bandはNos. 4，9で(+)，Nos. 5，7では(−)であった．これらの結果は，F344についての他の報告と比較すると，X染色体の形態に相違が見られた．しかしわれわれが調べたF344／DuCrjとは，これらマーカー染色体において一致が見られた．F344の核型については更に詳細な検討が必要であると考えられた．

文　献

1）田山邦昭，中村清純，平賀興吾：東京衛研年報，33，444，1982

2）田山邦昭，藤井　孝，平賀興吾：第3回Fischerラット研究会データー集，2，1983

3）Hungerford, D. A. and Norwell, P. C.: *J. Morph.*, 113, 275, 1963

4）Yoshida, T. H. and Amano, K.：*Chromosoma* (*Berl.*), 16, 658, 1965

5）吉田俊秀：*Exp. Anim.*, 27, 143, 1978

6）Sasaki, M., Kodama, Y., Hayata, I. and Yoshida, M. C.：*Cytogenet. Cell Genet.*, 23, 231, 1979

7）Kato, H. and Yoshida, T. H.：*Chromosoma* (*Berl.*), 36, 272, 1972

8）Sumner, A. T.：*Exptl. Cell Res.*, 75, 304, 1972

9）Committee for a Standardized Karyotype of *Ruttus norvegicus*：*Cytogenet. Cell Genet.*, 12, 199, 1973

10）Miller, D. A., Dev, V. G., Borek, C. and Miller, O. J.：*Cancer Res.*, 32, 2375, 1972

11）Yamada, J., Nikaido, H. and Matsumoto, S.：*Exp. Anim.*, 28, 259, 1979

12）山田淳三代表：実験動物としてのラットにおける遺伝的統御と特性の開発に関する研究．科学研究費補助金(総合研究(A))研究成果報告書，1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 344-348, 1985

酵素免疫測定法における模擬実験

深野駿一*

Simulation of Enzyme Immunoassay

SHUNICHI FUKANO*

Keywords：酵素免疫測定法 enzyme immunoassay，理論式 theoretical equation，模擬実験 simulation，競合反応 competitive reaction

はじめに

生体内に毒物が取り込まれた場合，特定の酵素量の変化がしばしば観察される．この酵素の変化量を知る目的で酵素免疫測定法の利用を試みている．酵素免疫測定法の中で競合反応を利用する定量法は，抗原（ここでは定量を目的とする酵素）量の変化と発色量との間に比例関係が成立しない．そこでこの関係を知るために理論式を誘導し，さらにこの理論式が正しいかを検証する目的でマイクロコンピューターによる模擬実験を試みた．従来生化学分野では理論式又は実験式をコンピューターにより計算しシュミレートすることは一般化されている．しかし反応を分子同志のランダムな衝突と考えコンピューター内で実験し結果を予測する例は少い．コンピューターによるシュミレーションは多くの分野で利用されており実験の効率化，精度の向上，経費の節減等に役立っている．今回はその一つの事例として報告する．

理論式の誘導

競合法による抗原量測定の原理

1．ガラスビーズ(5 mm)に抗原(定量しようとする酵素)を結合させる．
2．このガラスビーズを試験管にとり被検液を加える．
3．特異抗体を含んだIgGフラクションを加え（ビーズに結合した抗原と被検液中の抗原とで競合反応を行わせる．）反応終了後ビーズを洗浄する．
4．これに酵素標識抗体を加え反応後ビーズを同様に洗浄する．
5．酵素基質を加え発色させ，ビーズに結合した抗体量を測定する．

本法はすでに一般化されているが[1]理論式誘導の根拠となるため原理を示した．

理論式の誘導

抗原量を測定するためには抗原添加量と発色量との関係を示す検量線が必要である．この検量線がどのような曲線となるか知る目的で理論式を導いてみた．

ガラスビーズに結合している抗原量をX_0，反応後のそれをXとする．同様に被検液中の抗原量をx_0，反応後のそれをx，加えた抗体量をB_0，反応後のそれをBとすると，

$$x + B \rightleftarrows y$$
$$X + B \rightleftarrows Y$$
$$K_1 = xB/y \quad \cdots\cdots ①$$
$$K_2 = XB/Y \quad \cdots\cdots ②$$
$$x_0 - x = y \quad \cdots\cdots ③$$
$$X_0 - X = Y \quad \cdots\cdots ④$$
$$B_0 - B = y + Y \quad \cdots\cdots ⑤$$

の関係が成立する．ここでK_1，K_2はそれぞれ解離定数を，y，Yはそれぞれ抗原抗体複合体の濃度を示す．ガラスビーズに結合した抗原と被検液中の抗原とが同様に反応すると考えると，

$$K_1 = K_2 \quad \cdots\cdots ⑥$$

となる．

まず抗体量B_0と複合体量y，Yの関係を求める．反応は同一溶液系であるから次の関係が成り立つ．

$$x + X = A,\ y + Y = C \cdots\cdots ⑦$$

とすると

$$K_1 = AB/C \quad \cdots\cdots ⑧$$

ここで反応前の抗原，抗体量をA_0，B_0とすると

$$A_0 - A = C,\ B_0 - B = C$$

* 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

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

これを⑧式に代入し変形すると

$$C^2-C\ (A_0+B_0+K_1)+A_0B_0=0$$

Cの根を求めると

$$C=[(A_0+B_0+K_1)\pm\sqrt{(A_0+B_0+K_1)^2-4A_0B_0}]/2$$

ここでK_1は10^{-9}mol前後であるから$A_0, B_0 \gg K_1$で省略することができる.

$$\therefore\quad 2C=(A_0+B_0)\pm\sqrt{(A_0-B_0)^2}$$

よって　$C=A_0$　又は$C=B_0$

これは複合体量Cは抗原量A_0又は抗体量B_0の値と一致することを示している. ガラスビーズにおける競合反応においては抗体が抗原量以上あってはビーズと結合している抗原が無制限に複合体を形成し定量できない. 従って$B_0 < A_0$で実験する必要がある. よって　$C=B_0$である. これを⑦式に代入すると,

$$B_0=y+Y\quad\cdots\cdots⑨$$

次にガラスビーズ上の複合体量Yと被検液の抗体量xの関係を求める.

①, ②, ⑥式より

$$Y=Xy/x\cdots\cdots⑩$$

⑨式を代入すると,

$$Y=X\ (B_0-Y)/x\cdots\cdots⑪$$

ここで③, ④式を⑩式に代入すると,

$$x/X=(x_0-x)/(X_0-X)$$

$$\therefore\quad x/X=x_0/X_0$$

これを⑪式に代入すると,

$$Y=(B_0-Y)\ X_0/x_0$$

$$\therefore\quad Y=B_0X_0/(x_0+X_0)$$

である. ここでB_0, X_0は定数であるからこの理論式は抗原x_0とビーズに結合した複合体の濃度Yとの関係において双曲線であることを示している.

模擬実験法

前提条件としてガラスビーズに結合した抗原と被検液中の抗原が抗体とランダムに結合するものとする.

まずガラスビーズに結合した抗原量(AGO;プログラム中で使用している記号)と被検液中の抗原量(NGO(i))とを各々一定の数値範囲に割りふる. 乱数を発生させてその数値がガラスビーズ側の範囲の数値の場合はガラスビーズの抗原と抗体が結合したものとする. 被検液側の数値の場合は被検液側の抗原と抗体が結合したものとみなす. このようにして抗体のある限り乱数発生をくりかえす. 例えばAGOを2000n(分子の数とする.)とし, これを0～1999の範囲(NCG)に割りふる. NGO(i)の値を500nとした場合これを2000～2499の範囲とする. 乱数を発生させ数値が10の場合はガラスビーズの抗原と結合したものとする. 乱数が2001の場合は被検液中の抗原と結合したものとみなす. 2500以上の数値は反応しなかったものとみなす. このようにして抗体がある限り乱数の発生をくりかえす. 抗体量(NABO)が2000nの場合は2000回これをくりかえす. 2000回くりかえした後の0～1999の範囲内に乱数が発生した数(NCG(j))がガラスビーズ上の抗原と結合した抗体量となる. この複合体量は発色量と比例するものとする.

プログラムの説明

1000～1050；初期設定
1060；乱数のシードの設定
1070～1090；データのファイルネームの設定
1100；ディメンションの設定
1110～1130；抗体量の設定
1140；実験試行の開始
1150～1180；初期設定
1190；実験の試行回数
1200；被検液の抗原量の設定
1220～1230；乱数のシードを与える.
1240；実験の開始
1250；乱数発生
1260；ガラスビーズの抗原と結合する抗体数の蓄積
1270～1470；被検液中の抗原と結合する抗体数の蓄積(抗原濃度を20段階に分けて蓄積)
1490～1510；抗体量又はガラスビーズの抗原量以上に複合体が生成したかを判断し,その時点の複合体数を記憶させる.
1520；抗原と抗体との反応をくりかえす.
1530～1550；結果の表示
1560～1570；試行を10回くりかえす.
1590；時間の計算
1600～1640；結果をディスクに記憶させる.

結果と考察

実験例として抗体量1500n, ガラスビーズに結合している抗原量2000nの場合のガラスビーズ上に形成された複合体量を表1に示した. 最左段は被検液中の抗原量を0から400おきに8000まで変化させて試行したことを示し, 横列は試行回数を示した. Averageは試行10回の平均値を, T.V.は理論値を示した. 抗原量を変化させた時の複合体生成量の平均値と理論式より求めた理論値とはよく一致した値となった. またこの表をグラフ化し図1に示した. 図2に抗体量を1000～4000まで変化させ他の

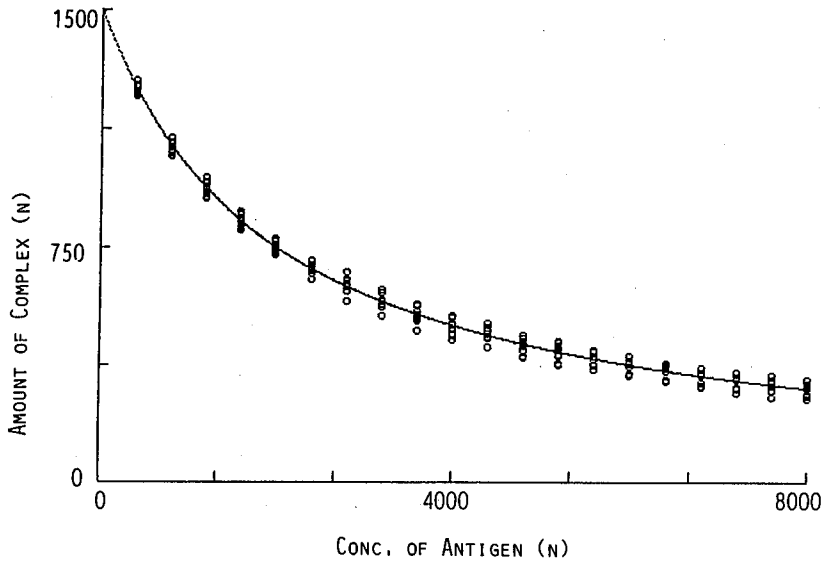


Fig. 1. Theoretical Curve(—) and Simulated Points(○) of Competitive Immunoassay (at the Antibody Concentration : 1500n)

Table 1. The Simulated Amounts of Antigen-Antibody Complex Formed by Competitive Immunoassay

	Amounts (n) of Antigen-Antibody Complex											
A.S.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Aver-age	T.V.
0	1,499	1,500	1,500	1,500	1,500	1,498	1,499	1,500	1,500	1,498	1,499.4	1,500.0
400	1,240	1,259	1,233	1,228	1,236	1,241	1,274	1,238	1,256	1,234	1,243.9	1,250.0
800	1,085	1,068	1,051	1,041	1,058	1,067	1,097	1,053	1,085	1,054	1,065.9	1,071.4
1,200	954	909	903	918	936	934	970	911	943	937	931.5	937.5
1,600	863	817	804	811	843	826	852	819	856	833	832.4	833.3
2,000	775	742	728	729	769	742	759	738	780	746	750.8	750.0
2,400	710	686	675	646	695	681	682	681	710	667	683.3	681.8
2,800	669	626	627	577	640	634	633	625	647	609	628.7	625.0
3,200	613	566	576	528	605	580	568	575	606	560	577.7	576.9
3,600	567	520	529	483	562	536	526	544	563	517	534.7	535.7
4,000	530	568	501	454	530	504	488	506	527	474	498.2	500.0
4,400	505	430	473	431	494	459	462	481	491	452	467.8	468.8
4,800	468	400	446	404	460	421	436	445	461	430	437.1	441.2
5,200	448	378	431	376	434	403	409	420	443	412	415.4	416.7
5,600	420	363	404	361	405	374	392	403	415	396	393.3	394.7
6,000	402	343	382	345	383	348	369	386	389	373	372.0	375.0
6,400	382	322	366	327	368	329	355	370	373	354	354.6	357.1
6,800	365	303	349	310	349	319	344	346	352	338	337.5	340.9
7,200	352	384	337	302	333	307	328	331	335	322	323.1	326.1
7,600	340	271	328	289	322	294	310	320	320	309	310.3	312.5
8,000	330	267	316	278	313	280	298	305	309	295	299.1	300.0

A.S. : Antigen concentrations in sample solution, 1-10 : Trial number, T.V. : Theoretical values calculated by the equation $Y = B_o X_o/(x_o + X_o)$

The reaction mixture consists of 1500 numbers(n) of antibody, 2000 n of antigen on a glass bead and 0-8000 n of antigen in sample solutions.

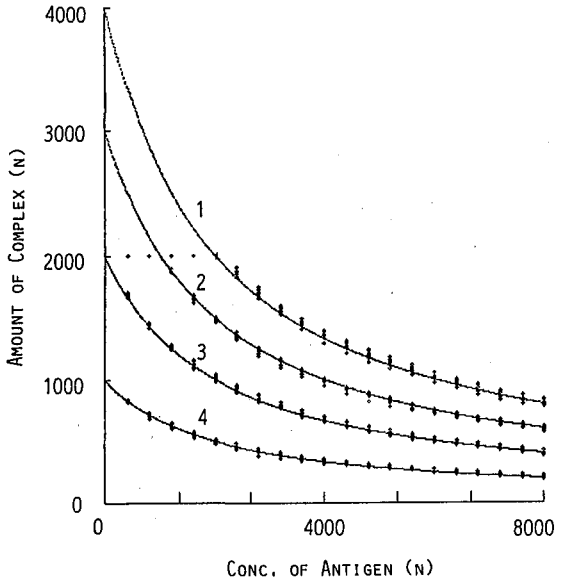


Fig. 2. The Simulation of Competitive Immunoassay at the Different Concentrations of Antibody (1 : 4000n, 2 : 3000n, 3 : 2000n, 4 : 1000n conc. of antibody)

条件は表1と同一の場合の結果を示した．このように模擬実験値と理論値はよく一致し誘導された理論式がまちがいでないことを示している．この理論式を実際の実験結果に応用した例が図3である．これは抗原として δ-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) を使用し，抗体として Rabbit IgG を使用した場合の結果である．実際の実験では吸光度を全体に増加させる因子があるためYに定数を加えた理論式を利用した．図3に示したように理論曲線と○印で示した実験値とはよく一致した．このことは理論式を導いた仮定通り実際の反応も進行していることを裏付けている．

ラジオイムノアセーにおいては実験値を各種の変換により直線化する試みがなされている．Täliedal らは logit plot[2] を初め6つの直線近似式を検討しているが $1/(Y-C)=ax+b$ が最も近似が良いと報告している．この式を変形すると今回求めた理論式と一致し，ガラスビーズ法においてもラジオイムノアッセイと同様，ビーズ上の抗原と被検液中の抗原が競合反応を均一に行っていることを示している．今回求めた理論式は抗原と抗体が互に一価であると仮定して導かれたものであるが，実際の反応は一価とは限らない．モノクローナル抗体でない限り2価，3価の抗原が存在し互に異なる抗体同志が干渉し合っている．また非特異的吸着，タンパク質の変成も加わり実際にはもっと複雑な反応が進行しているものと考えられる．このような場合にも模擬実験においてはこのような因子を導入することは容易であり，これらの因子の重みを適当に変えて実験結果を予測することができる．今後この基本プログラムを利用して反応因子の解明，阻害剤の効果，反応時間の推定等を行いたいと考えている．

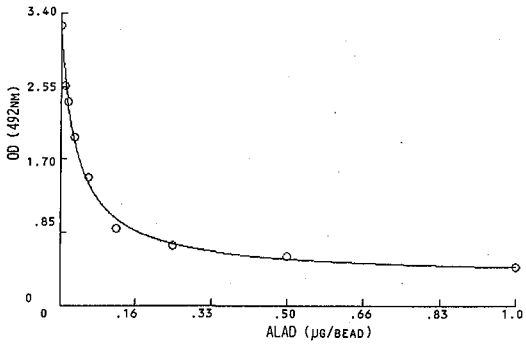


Fig. 3. Experimental Values of Competitive Immunoassay for ALAD(Enzyme)

まとめ

競合反応を利用した酵素免疫測定法における標準曲線を求めるために理論式を誘導した．この理論式はマイクロコンピューターにおける模擬実験結果，又実際の実験結果ともよく一致し，式の誘導が正しいことが示された．この理論式及び模擬実験を利用することにより実験を効率化し精度を上げることができるものと考える．

謝　辞　理論式の誘導に当り御助言頂いた当研究所ウイルス研究科，酵素免疫測定法について御指導頂いた細菌第一研究科の諸氏，並びに貴重な酵素及び抗体を提供して頂いた順天堂大学千葉百子，藤本暢子両氏及びロックフェラー研究所佐々　茂氏に心から感謝致します．

文　献

1）五十嵐英夫，藤川　浩，新垣正夫ら：日細誌，36(1)，175，1981

2）Täljedal, I. B. and Wold, S.：*Biochem. J.*, 119, 139, 1970

List of Simulation Program

```
1000 CONSOLE 0,25,0,1:COLOR 2
1010                 PRINT " SIMULATION OF COMPETITIVE IMMUNOASSAY by S.Fukano "
1020 'NCG=*Complex; NAB0=Antibody initial; AG0=*Antigen initial(Beads)
1030 'NG0(i)=Antigen ; NCG(i)=*Complex sample
1040 'NN=Trial number
1050 DEFINT I,J,M,N:COLOR 4:PRINT:PRINT
1060 INPUT "RANDAMIZE  ";NA1
1070 IMUDATA$="DATA":NAB0=500
1080 IMUDATA$=IMUDATA$+"5"
1090 INPUT "FILE NAME OF IMUDATA ";IMUDATA$ :'GOTO 5050
1100 DIM NG0(30),NT$(30),NC(30),NCG(30),NCGT(20,20)
1110 NAB0=NAB0+500 :IF NAB0>4000 THEN STOP
1120 INPUT "Number of antibody ";NAB0
1130 NAB0=NAB0-1
1140 *AGAIN
1150 FOR I=0 TO 30:NG0(I)=0:NT$(I)="":NC(I)=0:NCG(I)=0:NEXT
1160 NCG=0:N=0:JN=0
1170 AG0=1999
1180 D=(9999-AG0)/20
1190 LPRINT NN+1:COLOR 6:PRINT NN+1:COLOR 5
1200 FOR I=0 TO 20:NG0(I)=AG0+I*D:NEXT
1210 'T$=TIME$:GOSUB *CLOCK:T0=T1
1220 NA=RND*30000-15000+NA1
1230 RANDOMIZE(NA)
1240 *START
1250 NRND=RND*10000:N=N+1
1260 IF NRND<AG0+1 THEN NCG=NCG+1
1270 IF NG0( 0)<NRND THEN NC( 0)=NC( 0)+1
1280 IF NG0( 1)<NRND THEN NC( 1)=NC( 1)+1
1290 IF NG0( 2)<NRND THEN NC( 2)=NC( 2)+1
1300 IF NG0( 3)<NRND THEN NC( 3)=NC( 3)+1
1310 IF NG0( 4)<NRND THEN NC( 4)=NC( 4)+1
1320 IF NG0( 5)<NRND THEN NC( 5)=NC( 5)+1
1330 IF NG0( 6)<NRND THEN NC( 6)=NC( 6)+1
1340 IF NG0( 7)<NRND THEN NC( 7)=NC( 7)+1
1350 IF NG0( 8)<NRND THEN NC( 8)=NC( 8)+1
1360 IF NG0( 9)<NRND THEN NC( 9)=NC( 9)+1
1370 IF NG0(10)<NRND THEN NC(10)=NC(10)+1
1380 IF NG0(11)<NRND THEN NC(11)=NC(11)+1
1390 IF NG0(12)<NRND THEN NC(12)=NC(12)+1
1400 IF NG0(13)<NRND THEN NC(13)=NC(13)+1
1410 IF NG0(14)<NRND THEN NC(14)=NC(14)+1
1420 IF NG0(15)<NRND THEN NC(15)=NC(15)+1
1430 IF NG0(16)<NRND THEN NC(16)=NC(16)+1
1440 IF NG0(17)<NRND THEN NC(17)=NC(17)+1
1450 IF NG0(18)<NRND THEN NC(18)=NC(18)+1
1460 IF NG0(19)<NRND THEN NC(19)=NC(19)+1
1470 IF NG0(20)<NRND THEN NC(20)=NC(20)+1
1480 '
1490 IF NCG>AG0 THEN NCG=AG0+1
1500 FOR J=JN TO 20:IF NCG>AG0 OR  NCG+NC(J)>NAB0 THEN NCG(J)=NCG:JN=J+1:IF J=20
 THEN *EXIT
1510 NEXT J
1520 GOTO *START
1530 *EXIT
1540  PRINT " I      NC(I)              NCG(I)            TD "
1550 LOCATE 0,24: PRINT:J=20+1 :FOR I=0 TO 20:J=J-1:NCGT(J,NN)=NCG(I): PRINT I,
NC(I),NCG(I);:T$=NT$(I):GOSUB *CLOCK:TD=T1-T0:NT$(I)=STR$(TD): PRINT TD :NEXT
1560 NN=NN+1:IF NN>10 THEN *STORE1
1570 PRINT: LPRINT:GOTO *AGAIN
1580 STOP
1590 *CLOCK:HH=VAL(LEFT$(T$,2)):MM=VAL(MID$(T$,4,2)):SS=VAL(RIGHT$(T$,2)):T1=HH*
3600+MM*60+SS:RETURN
1600 *STORE1
1610 OPEN IMUDATA$ FOR OUTPUT AS #1
1620 FOR NN=0 TO 19:FOR I=0 TO 20:WRITE #1,NCGT(I,NN):PRINT NCGT(I,NN);:NEXT:NEX
T
1630 NAB0=NAB0+1:WRITE #1,AG0,NAB0,D,NSEC
1640 CLOSE #1
1650 STOP
```

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 349-352, 1985

キノホルムの代謝（第1報）
キノホルムの化学イオン化法によるマススペクトル

深野駿一*, 牛山慶子*, 長井二三子*, 中川敦子*
加納いつ*, 中尾順子**

Metabolism of Chinoform (I)
Chemical Ionization Mass Spectrum of Chinoform

SHUNICHI FUKANO*, KEIKO USHIYAMA*, FUMIKO NAGAI*
ATSUKO NAKAGAWA*, ITSU KANO* and TOSHIKO NAKAO**

Keywords：キノホルム Chinoform, 質量スペクトル mass spectra, 化学イオン化法 Chemical ionization, TMS化誘導体 TMS-derivatives

キノホルムはスモンの原因物質であることが明らかにされているが，その代謝及び発症機構については完全に解明されていない．現在代謝物としてグルクロン酸胞合体及び硫酸胞合体が確認されており，さらに我々は肝薬物代謝酵素であるチトクロームP-450類によりキノホルムが代謝されることを推定してin vitroで実験している．これらのP-450代謝物がさらに強い毒性を示す場合もあり，代謝物の化学構造を明らかにすることは毒性発現機構を知る上で必須である．代謝物の同定法の一手段として我々はマススペクトルを利用しているがすでに報告のあるエレクトロンインパクトイオン化法（以下EI法と略す）では分子量を決定するために必要な分子イオンピークをほとんど検出することができない．そこで温和な条件でイオン化できる化学イオン化法（以下CI法と略す）を利用したところ充分実用となる結果が得られたので報告する．また分子式を推定するために必要な高分解能マススペクトルも測定したので合わせて報告する．

実験方法

ミクロソームによる代謝実験：フェノバルビタール誘導のラット肝ミクロソーム分画と，キノホルムを常法りにより反応させた．反応条件はNADPH 0.5mM, G6PDHase 1 unit, G6P 8mM, $MgCl_2$ 5mM, EDTA 100 μMの最終濃度になるように0.1Mリン酸緩衝液10m*l*で希釈し，これにマイクロソーム（タンパク質含量10mg）及びキノホルム（0.5mg/0.5m*l* DMSO）を加えしゃ光下で37℃，20hr反応させた．

代謝物の抽出：ベンゼン27m*l*とピリジン3 m*l*の混液により抽出し，窒素ガス中で濃縮乾固した．

シリル化：キノホルムは熱不安定であるため熱安定性と揮発性を増すために以下の方法によりTMS化した．抽出物をベンゼン1 m*l*に溶解しN.O-Bis(Trimethylsilyl)trifluoroacetamide(BSTFA) 1 m*l*を加え70℃，20minで反応させ直接ガスクロマトグラフに供した．

ガスクロマトグラフィー質量分析（GC-MS）：質量分析計は日本電子JMS-D300を，データ処理は日本電子JMA-2000データ処理システムを使用した．その他の条件は図中に示した．

結果及び考察

図1にTMS化した試料のECD(Electron Capture Detector) ガスクロマトグラムとRIC(Reconstructed Ion Current)ガスクロマトグラムを示した．ピーク3がキノホルムのTMS誘導体のピークで，キノホルムはハロゲン元素*Cl*，Iを含むためECDガスクロマトグラムにおいてするどい山がみられた．3以外のピークは①キノホルムを含まないミクロソーム代謝実験において同様のピークが見られること，②ECDガスクロマトグラムにピークが見られないこと，③マススペクトル分析の結

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京女子医科大学生化学教室

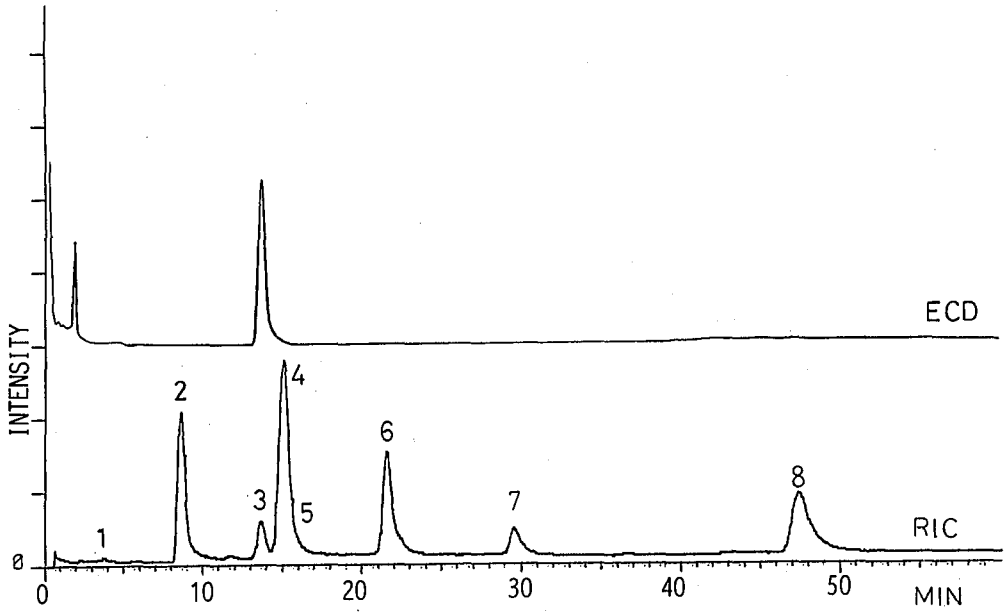


Fig. 1. ECD and RIC Gas Chromatograms of Chinoform-O-TMS

Conditions : Column; 2 % OV—17/Chromosorb W(AW, DMCS, 80—100 mesh), 2mmϕ×1m, Column temp.; 160°C(0 min)~ 2°C/min~250°C(15 min), Carreier gas ; He 30m*l*/min

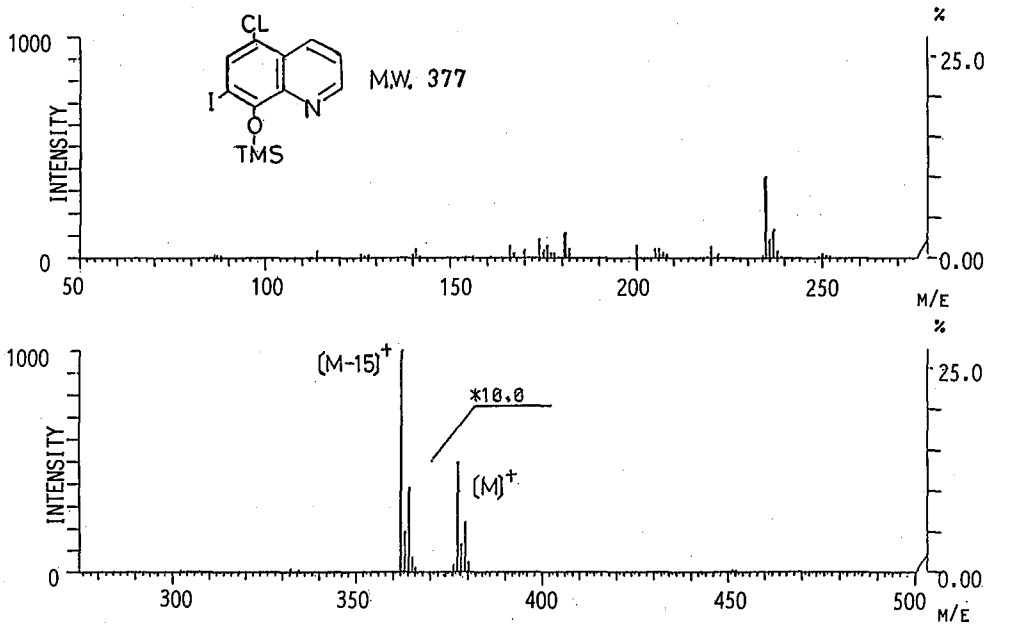


Fig. 2. EI Mass Spectrum of Chinoform-O-TMS

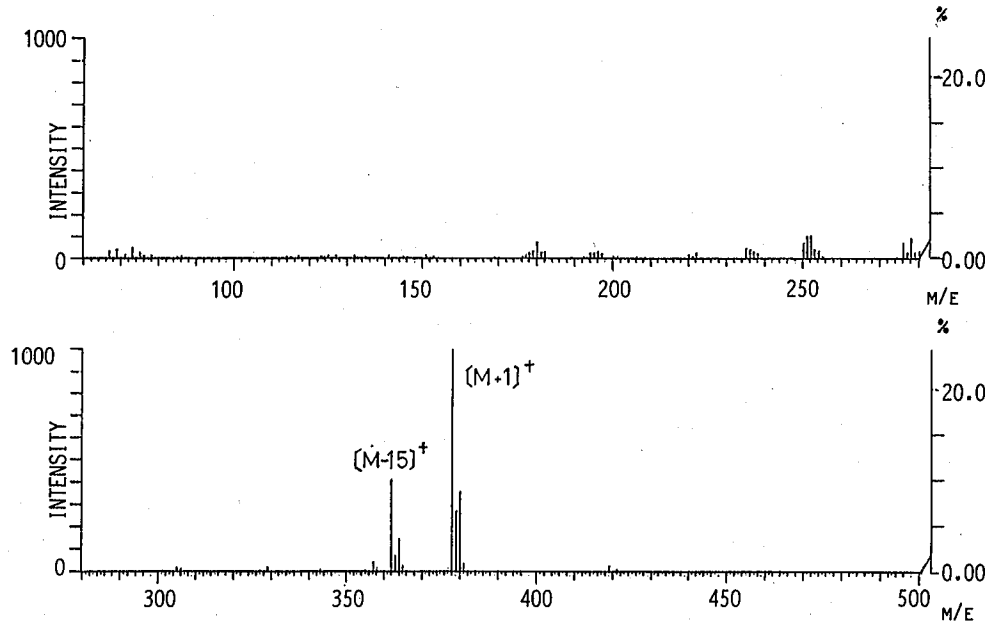


Fig. 3. CI Mass Spectrum of Chinoform-O-TMS
Conditions : Ion source temp.; 250°C, Ionization potential ; 70eV, Accelerating volt ; 1.6KV, Emission current ; 0.3mA, Reagent gas ; 1×10^{-5} Torr Butane

Table 1. Confirmed Composition of Chinoform-O-TMS by High Resolution Mass Spectrum

OBSD.	ERROR	U.S.	COMPOSITION						
377.9622	1.3	1.5	C8	H18	N1	O2	Cl1	I1	SI1
	5.0	6.5	C8	H15	*C2	N1	O1	I1	SI3
	0.5	6.0	C9	H16	*C1	N1	O1	I1	SI3
	1.5	5.0	C10	H19	I1	SI4			
	−3.8	5.5	C10	H17	N1	O1	I1	SI3	
	1.8	6.0	C11	H15	O3	I1	SI2		
	0.8	7.0	C11	H14	*C2	O1	CL1	I1	SI1
	−4.3	7.5	C11	H12	*C2	N1	O2	CL1	I1
	→4.5	6.5	C12	H14	N1	O1	CL1	I1	SI1
	−3.5	6.5	C12	H15	*C1	O1	CL1	I1	SI1
361.9277	2.6	6.5	C8	H14	*C1	I1	SI4		
	−2.5	7.0	C8	H12	*C1	N1	O1	I1	SI3
	−1.5	6.0	C9	H15	I1	SI4			
	3.0	7.5	C9	H10	*C1	O3	I1	SI2	
	−1.1	7.0	C10	H11	O3	I1	SI2		
	→1.2	7.5	C11	H10	N1	O1	CL1	I1	SI1

OBSD. ; Observed mass, ERROR ; Observed-Theoretical mass, U.S. ; Degree of unsaturation, → ; Confimed composition

果等からキノホルムの代謝物以外の物質と思われる.

3のピークのEI及びCIマススペクトルをそれぞれ図2,図3に示した. EIマススペクトルでは質量数370以上で強度を10倍に上げているため分子イオンピーク〔M〕$^+$イオンが観察されている. しかしメチル基が解離したベースイオンピーク〔M-15〕$^+$イオンとの強度比では1/20以下で実際上分子イオンピークを見のがしてしまう恐れがある. Kotakiら[2]はキノホルムをアセチル化しEIスペクトルをとっているがその強度比は1/160でほとんど分子イオンピークを検出していない. キノホルムをTMS化し, さらにCI法によりイオン化したところ図3. に見られるように分子イオンピークがベースピークとなりスペクトル解析が容易となった. 但しこのピークはプロトン化された〔M+1〕$^+$イオンでありTMS化された物質をCI法によってマススペクトルをとるとごく一般に見られるピークである[3].

高分解能マススペクトルを測定した結果, キノホルムのTMS誘導体のCI法による〔M+1〕$^+$イオン及びEI法による〔M−15〕$^+$イオンの平均の質量はそれぞれ377.9622及び361.9277であった. この値からデータ処理システムにより分子式を推定した結果を表1に示した. 表よりキノホルムのTMS誘導体の〔M+1〕$^+$イオンの分子式は$C_{12}H_{14}N_1O_1Cl_1I_1Si_1$, 〔M−15〕$^+$イオンのそれは$C_{11}H_{10}N_1O_1Cl_1I_1Si_1$であることが確認された. また実測質量と理論値との差は5 m mass以内であり充分実用に耐える値であった.

まとめ

従来, キノホルムの質量分析法では分子イオンピークを検出することが困難であったが, キノホルムをTMS誘導体としCI法によりイオン化することにより, 分子イオンピーク(但し〔M+1〕$^+$)がベースピークとなり分子量の推定が容易になった. さらに高分解能マススペクトルにより質量を測定したところ理論値との差は5 m mass以内にあり充分実用になる値であった. これらの質量分析法は今後キノホルムの代謝物推定の一助となるものと考える.

文献

1) Gielen, J. E., Goujon, F. M. and Nebert, D. W.: *J. Biol. Chem.*, 252, 4712, 1977

2) Kotaki, H., Yamamura, Y., Tanimura, Y., Saitoh, Y., Nakagawa, F. and Tamura, Z.: *Chem. Pharm. Bull.*, 31(1), 299, 1983

3) Cashaw, J. L., Ruchirawart, S., Nimit, Y. and Davis, V. E.: *Biomed. Mass Spectrom.*, 11(2), 63, 1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 353-355, 1985

キノホルムの肝チトクロームP-450に対する影響

牛山慶子*, 長井二三子*, 中川敦子*, 佐藤かな子*,
深野駿一*, 加納いつ*, 中尾順子**

Effect of Chinoform on Hepatic Cytochrome P-450 Content

KEIKO USHIYAMA*, FUMIKO NAGAI*, ATSUKO NAKAGAWA*,
KANAKO SATOH*, SHUNICHI FUKANO*, ITSU KANO*
and TOSHIKO NAKAO**

Keywords：キノホルム chinoform, チトクローム P-450 cytochrome P-450, 3-メチルコラントレン 3-methylcholanthrene

緒　言

キノホルムは，スモンの原因物質といわれているが[1]，その作用機序については，まだ明らかではない．また，投与された場合の体内での代謝は，グルクロン酸抱合体になり尿中に排泄されることが報告されている[2]．それ以外の代謝についての報告はなく，体内での挙動および肝薬物代謝系に対する影響については，解明されていない．

肝臓の異物代謝には，酸化反応，還元反応，抱合反応などがある．これらに関与する酵素は，肝ミクロソームに存在し，NADPHと酸素を必要としている．チトクロームP-450は，この薬物代謝酵素の本体といわれている．チトクロームは，細胞や微生物に存在するヘムタンパク質のうち，生理的にヘムが，$Fe^{2+} \rightleftarrows Fe^{3+} + e^-$の反応を行なって，電子伝達系の構成成分をなすものでP-450は，還元型で一酸化炭素と結合して450nm付近に極大吸収をもつため，この名前がある．この450nmの吸収で，量を測定する[3]．催眠剤であるフェノバルビタールの投与は，肝チトクロームP-450量を著しく上昇し，種々の薬物代謝酵素活性も上昇させる．また発ガン物質として知られている3-メチルコラントレンもチトクロームP-450を増加させるが，極大吸収の位置は448nmにシフトし，フェノバルビタールとは異なるものを誘導する[4]．

キノホルムもこのような薬物代謝系に影響を与えるのではないかと考え，キノホルムをマウスに腹腔投与し，肝ミクロソーム中のチトクロームP-450を測定し，検討した．

実験方法

動物は，マウスC57BL/6NCrj 6週令を用いた．キノホルム（食品薬品安全センター提供）は，コーンオイルに溶かし，50mg/kg，100mg/kgを腹腔内投与，これを隔日4回行ない，最終投与後2日で肝臓を摘出した．

3-メチルコラントレンは，コーンオイルに溶かし，40mg/kgを腹腔内投与した．

マウスを断頭屠殺後，肝臓を摘出し，250mM sucrose, 10mM Tris-HCl緩衝液（pH.7.4）を加えて10倍量とし，ポッター型テフロンホモジナイザーでホモジナイズ後，9000×g，20分間遠心分離し，その上清を105,000×g，60分遠心分離して，その沈殿をミクロソーム分画として測定に使用した．

チトクロームP-450は，このミクロソーム分画をタンパク濃度1～2 mg/m*l*になるように，0.1Mリン酸緩衝液（pH.7.0）で希釈し，これに，ジチオナイトを少量加え，一酸化炭素を約20秒間吹きこみ，一酸化炭素処理していないものを対照として，450nmの差スペクトルを測定した[3]．

結　果

図1に示したのは，チトクロームP-450の極大吸収で，破線は一酸化炭素を吹きこむ前のベースラインである．この450nmと490nmでの吸光度の差をextinction co-

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京女子医科大学生化学教室

efficient 91cm^{-1}mM^{-1}で計算した．

極大吸収の位置は，3-メチルコラントレンでは，448 nmであったが，キノホルム投与では450nmで，3-メチルコラントレンとは異っていた．

図2は，肝臓の重量を体重100gに対して計算したものである．キノホルム投与では，50mg/kgでは変化はないが，100mg/kg投与で7%上昇した．

図3は，チトクロームP-450量である．キノホルム単独投与では，50mg/kg投与で16%上昇し，100mg/kgでは反対に33%減少していた．3-メチルコラントレン単独投与では，52%上昇していた．また，3-メチルコラントレン前処理でキノホルムを投与したものは，両薬物とも投与していないものを100%とすると，50mg/kg投与は65%上昇し，3-メチルコラントレンのみの場合より，13%上昇していた．100mg/kgでは，15%上昇していたが，3-メチルコラントレン単独と較べると上昇は37%抑えられていた．

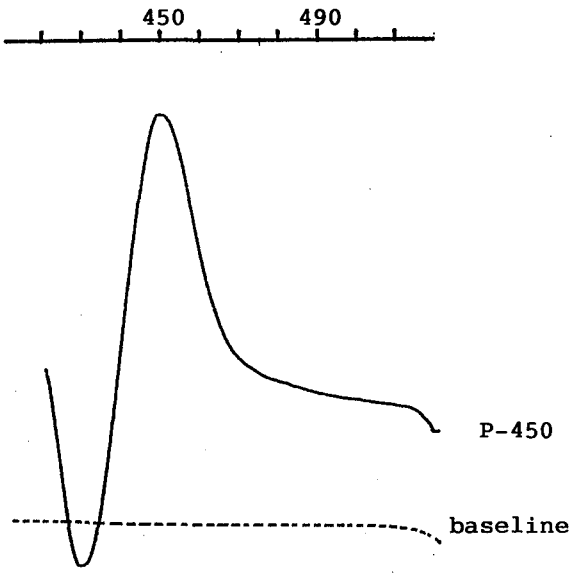


図1． 肝ミクロソームP-450，CO差スペクトル
実線は，ジチオナイト添加後，一酸化炭素を吹き込んだもの

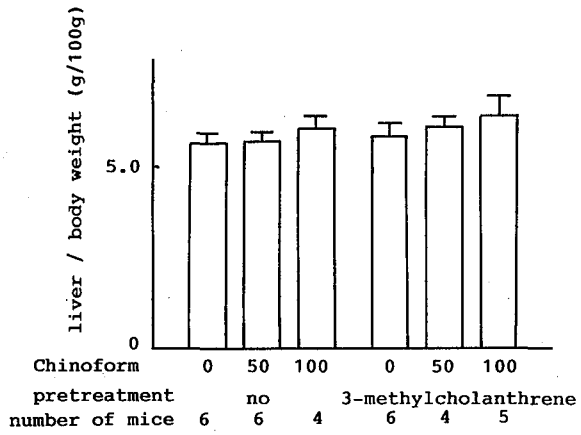


図2． キノホルム投与量による肝重量の変化
右側はキノホルム投与前に3—メチルコラントレンを投与したもの

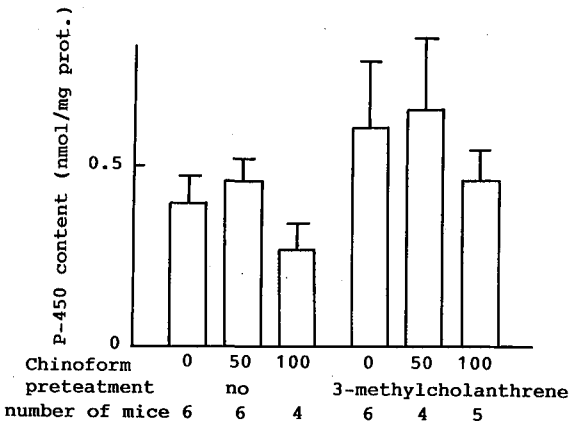


図3． キノホルム投与量による肝チトクロームP-450の変化
右側はキノホルム投与前に3—メチルコラントレンを投与したもの

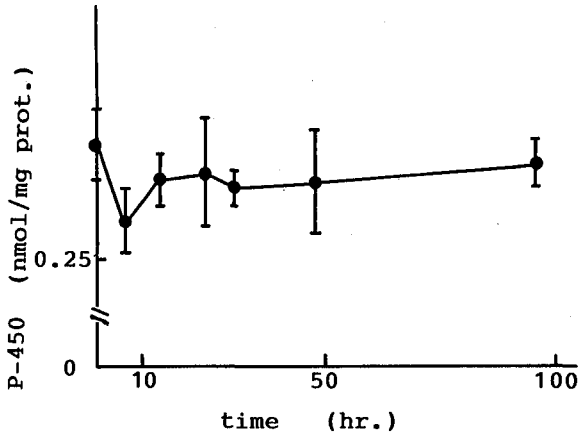


図4． キノホルム投与後の肝チトクロームP-450量の変化
動物は0時間5匹，6時間5匹，14時間5匹，24時間4匹，30時間3匹，48時間3匹，96時間3匹

図4は，キノホルム100mg/kgを1回腹腔投与後，時間を追って肝臓を摘出し，チトクロームP-450を測定したものである．6時間で，20%低下し，その後は徐々に上昇し，96時間では5%の低下になった．

考　察

チトクロームP-450の極大吸収の位置は，発ガン物質である3-メチルコラントレン，ベンツピレンなどは，448 nmにシフトし[4]，フェノバルビタールで誘導されたものとは異なっている．キノホルム投与の場合の極大吸収は450nmにあり，3-メチルコラントレンとは，明らかに違う性質である．

フェノバルビタール等，チトクロームP-450誘導剤では，肝重量の増加は顕著である[5]．キノホルム投与では，50mg/kg投与のとき，肝重量はほとんど変化がなかった．チトクロームP-450量はこのとき増加していた．100 mg/kg投与では，チトクロームP-450は著しく減少した．3-メチルコラントレンで前処理を行なうと，3-メチルコラントレンによるチトクロームP-450の増加は認められ，キノホルムと3-メチルコラントレンの影響は相加的であった．少量では，キノホルムはチトクロームP-450をわずか誘導する．しかし，大量投与では，生体がダメージをうけ，チトクロームP-450を低下させると考えられる．このチトクロームP-450の低下は，ヘム生成系（アミノレブリン酸シンターゼ）の阻害か，また，分解系（ヘムオキシゲナーゼ）の促進が考えられる．有機スズのラットへの投与により，チトクロームP-450が低下したという報告があり[6]，これには，ヘム生成系には影響はないが，ヘムオキシゲナーゼ活性が著しく高くなっており，そのためチトクロームP-450が低下したと，している．

また，キノホルムは鉄とキレートして，体外に排出されるという報告がある[1]．このため，チトクロームP-450の構成成分であるヘムのFeをキノホルムがキレートし，チトクロームP-450の合成を抑制したとも考えられる．

文　献

1) 中島　章，秋吉正豊　編集：薬物と感覚障害，349，1980，ソフトサイエンス社
2) Kotaki, H., Yamamura, Y., Tanimura, Y., Satoh, Y., Nakagawa, F. and Tamura, Z.：*Chem. Pharm. Bull.* 31, 299, 1983
3) Omura, T. and Sato, R.：*J. Biol. Chem.* 239, 2370, 1964
4) 今井嘉郎，佐藤　了，：代謝19，1723，1982
5) 佐藤　了：薬物代謝，8，1973
6) Rosenberg, D.W., Sardana, M.K. and Kappas, A.：*Biochem. Pharmac.*, 34, 997, 1985

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 356-358, 1985

キノホルム投与によるベンツピレンおよびビフェニル水酸化酵素系の誘導

中川敦子*, 深野駿一*, 長井二三子*, 佐藤かな子*,
牛山慶子*, 加納いつ*, 中尾順子**

Induction of Benzo(a)pyrene and Biphenyl Hydroxylation System by Chinoform in Mouse Liver Microsomes

ATSUKO NAKAGAWA, SHUNICHI FUKANO, FUMIKO NAGAI
KANAKO SATOH, KEIKO USHIYAMA, ITSU KANO
and TOSHIKO NAKAO

Keywords：キノホルム chinoform, ビフェニル4-ヒドロキシラーゼ biphenyl 4-hydroxylase, ビフェニル2-ヒドロキシラーゼ biphenyl 2-hydroxylase, アリルヒドロカーボンヒドロキシラーゼ arylhydrocarbon hydroxylase

緒　言

キノホルム（CF）は整腸剤として広く使用されてきたが，長期間の連続投与によりスモン発症の原因物質であることが明らかとなった．CFの生体内移動については腸管からグルクロン酸抱合体として吸収され[1]，かなりの速度で糞尿中に排泄される[2]こと，吸収されたCFは末梢神経，後根神経節，脊髄神経根，網膜など主要病変部に一致して分布する[2]こと，更に分子レベルの反応としてはCFは*in vitro*でCa^{2+}-カルモジュリン依存性ホスホジエステラーゼ活性[3]および細胞膜酵素であるCa^{2+}-Mg^{2+}ATPase活性[4]，Na^+,K^+-ATPase活性[4]，アデニレートシクラーゼ活性[5]を阻害することが報告されている．CFの生体内における作用機作を明らかにするためにはCF代謝の分子レベルでの検討が更に必要と考え，肝薬物代謝酵素系に対するCFの影響を観察した．ここでは酵素系のなかのベンツピレンおよびビフェニル水酸化反応のCFによる誘導について検討した．

実験方法

試薬：CFは食品薬品安全センター秦野研究所より提供されたものを使用した．ビフェニル，p-ヒドロキシビフェニルは東京化成工業，o-ヒドロキシビフェニルは関東化学，NADPH，NADH，3-メチルコラントレン（3-MC），n-ヘプタン，コハク酸は和光純薬のものを使用した．

肝薬物代謝酵素系の誘導：C57BL/6NCrjマウス（6週令）の雄を3群に分け一群を5匹にして使用した．対照群はコーンオイルのみを，CF投与群はCFをコーンオイルに溶解し50mg/kgあるいは100mg/kgになるように腹腔内投与した．3-MC投与群は3-MCをコーンオイルに溶解し40mg/kgを腹腔内に投与した．

肝ミクロソームの調製：断頭屠殺後肝を摘出し，9倍量の0.25M庶糖を含む10mM Tris-HCl緩衝液（pH7.4）を加えテフロンホモゲナイザーでホモジェネートとし，10,000g20分間遠心した上清を105,000g 1時間遠心し，沈澱部分をミクロソーム画分として酵素活性の測定に使用した．

酵素活性の測定：ビフェニル水酸化反応の測定はビフェニルをアセトンに溶かした以外はAtlas等の方法[6]に従い，生成物である4-ヒドロキシビフェニルおよび2-ヒドロキシビフェニルをそれぞれEx275nm Em338nmおよびEx295nm Em415nmの蛍光で測定した．ベンツピレンの水酸化反応（AHH活性）はNebert等の方法[7]で測定した．

タンパクの測定はBSAを標準としてLowry法[8]に従った．

* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　160　東京都新宿区百人町3—24—1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京女子医科大学生化学教室

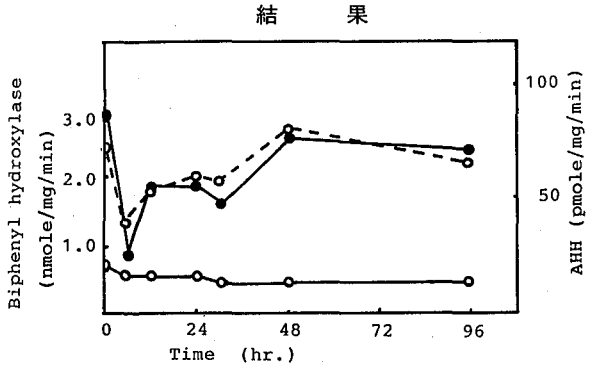


図1．キノホルム投与によるbiphenyl hydroxylase活性およびAHH活性の時間経過
キノホルムは100mg/kg腹腔内に投与した．
図の値は0，6，14時間が5匹，24，96時間が3匹，30，48時間が2匹の平均値で表わした．
○—○ biphenyl 2-hydroxylase, ●—● AHH,
○···○ biphenyl 4-hydroxylase

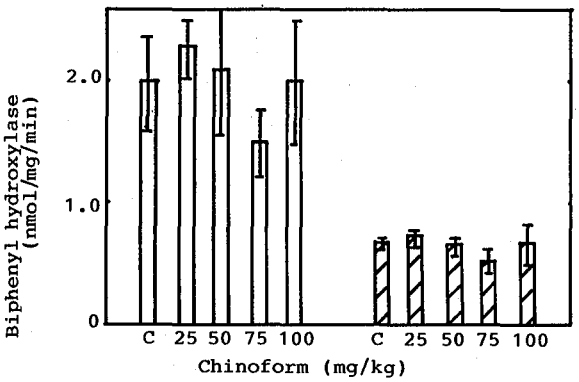


図2　キノホルム投与量のちがいによるbiphenyl hydroxylase活性への影響
キノホルムを腹腔内に投与し，24時間経過後肝を摘出し酵素活性を測定した．
□ biphenyl 4-hydroxylase
▨ biphenyl 2-hydroxylase

図1にキノホルム100mg/kg CF投与後の薬物代謝酵素活性の時間経過を示した．biphenyl 2-hydroxylase活性以外は投与後6時間で活性が低下し，その後次第に回復した．しかし96時間以内に強い酵素活性の誘導はみられなかった．図2にCF投与量による酵素活性の変動を示した．25mg/kgから100mg/kg CF投与で活性の誘導はみられなかった．

CFによる薬物代謝酵素活性の誘導を得るためには100mg/kg 1回投与で4日間以内に充分な結果が得られなかったことから，以後の実験ではCFを隔日に4回腹腔内投与して酵素活性の誘導を検討した．3-MCは第1回目のCF投与時にのみ腹腔内に投与した．表1にCFおよびCFと3-MCを同時投与した時のAHH活性，biphenyl 2-hydroxylase活性およびbiphenyl 4-hydroxylase活性誘導の結果を示した．CF単独投与の場合，AHH活性およびbiphenyl 2-hydroxylase活性は100mg/kg CFにより約150%に誘導された．これに対し，

表1　キノホルム投与のbiphenyl hydroxylase活性およびAHH活性に対する影響

キノホルム投与量 (mg／kg)	biphenyl 4-hydroxylase (nmol/mg/min)	biphenyl 2-hydroxylase (nmol/mg/min)	AHH (pmol/mg/min)
	対照群		
0	1.75±0.184 (100%)	0.265±0.008 (100%)	58.9± 16.0 (100%)
50	1.61±0.214 (92%)	0.257±0.063 (97%)	59.3± 17.4 (101%)
100	1.95±0.181 (111%)	0.395±0.018 (149%)	85.6± 29.3 (145%)
	3-MC (40mg／kg) 投与群		
0	4.69±0.498 (268%)	1.18 ±0.622 (445%)	182.1± 44.4 (309%)
50	4.70±0.895 (268%)	1.59 ±0.920 (600%)	203.6±115.6 (346%)
100	4.90±0.956 (280%)	1.96 ±0.409 (739%)	394.4±135.7 (670%)

値は5匹のマウスの平均値±標準偏差で示した．
キノホルムは隔日4回腹腔内投与した．
3-MCは第1回目のキノホルム投与時にのみ腹腔内投与した．

biphenyl 4-hydroxylase 活性の誘導は弱かった．CF と 3-MC を同時投与した時の AHH 活性および biphenyl 2-hydroxylase 活性の誘導は強く，CF と 3-MC の作用は相乗的であった．一方 biphenyl 4-hydroxylase 活性は相加的であった．なお，ミクロソームから持込まれる反応液中の CF 量は酵素反応には影響を与えない量である．

考　察

CF を100mg/kg 連続腹腔内投与することにより AHH 活性および biphenyl 2-hydroxylase 活性は対照群に比べ約150%誘導されたが，biphenyl 4-hydroxylase 活性の誘導は弱く，p-nitroanisol O-demethylase および aminopyrine N-demethylase 活性の誘導と同程度であった．[9] 3-MC は肝ミクロソームの薬物代謝系のなかの AHH 活性，biphenyl 2-hydroxylase 活性および P-448含量の誘導剤である．CF を 3-MC と同時投与した場合には AHH および biphenyl 2-hydroxylase 活性が相乗的に誘導されたのに対し，biphenyl 4-hydroxylase 活性の誘導は p-nitroanisol O-demethylase[9]および aminopyrine N-demethylase 活性[9]の誘導と同じく相加的な誘導であった．これらのことから CF は P-448誘導剤に類似の作用を有すると推測された．

薬物代謝酵素系の活性と P-450含量は一般に相関関係があると考えられている．今回行った高濃度 CF 投与条件下では薬物代謝酵素活性が誘導されるにもかかわらず P-450含量は非常に低下していた[10]．このことから CF は P-450の合成阻害あるいは分解の促進を通して P-450量を低下させる一方，かなり特異的に CF で誘導される薬物代謝活性を誘導する作用があると推測された．

要　約

1．CF を100mg/kg 腹腔内に 4 回隔日投与することにより，AHH 活性および biphenyl 2-hydroxylase 活性が150%に誘導された．

2．CF を 3-MC と同時投与することにより AHH 活性および biphenyl 2-hydroxylase 活性は相乗的に誘導された．

文　献

1）Kotaki, H., Yamamura, Y., Tanimura, Y., Satoh, Y., Nakagawa, F., and Tamura, Z.：*Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 299, 1983

2）高須俊明：薬物と感覚障害，中島章，秋吉正豊，347, 1980

3）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：東京衛研年報，**35**, 390, 1984

4）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**, 385, 1984

5）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**, 387, 1984

6）Atlas, S.A., and Nebert, D.W.：*Arch. Biochem. Biophys.* **175**, 495, 1976

7）Nebert, D.W.：Methods Enzymol, **52**, 226, 1978

8）Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.：*J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951

9）長井二三子，佐藤かな子，中川敦子，牛山慶子，深野駿一，加納いつ，中尾順子．：東京衛研年報，**36**, 359, 1985

10）牛山慶子，長井二三子，中川敦子，佐藤かな子，深野駿一，加納いつ，中尾順子：東京衛研年報，**36**, 353, 1985

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 359-361, 1985

キノホルム投与による肝薬物代謝系（アミノピリンN-デメチラーゼ，P-ニトロアニソールO-デメチラーゼ）の誘導

長井 二三子*，佐藤 かな子*，中川 敦子*，牛山 慶子*，
深野 駿一*，加納 いつ*，中尾 順子**

Induction of Hepatic Drug Metabolizig enzymes (Aminopyrine N-demethylase and p-Nitroanisole O-demethylase) by Chinoform

FUMIKO NAGAI*, KANAKO SATOH*, ATSUKO NAKAGAWA*,
KEIKO USHIYAMA*, SHUNICHI FUKANO*, ITSU KANO*
and TOSHIKO NAKAO**

Keywords：キノホルム chinoform，メチルコラントレン methylcholanthrene，チトクローム P-450 Cytochrome P-450，アミノピリンN-デメチラーゼ aminopyrine N-demethylase，p-ニトロアニソールO-デメチラーゼ p-nitroanisole O-demethylase.

緒　言

スモンはキノホルムの長期連用によって生ずることが明らかになっている．しかし，その発症機序についてはいまだ解明されているとはいえない．著者らは前年キノホルムがCa^{2+}依存性ホスホジエステラーゼ活性を特異的に阻害することを報告[1,2]したが，キノホルムの毒性について分子レベルでの解明を進めるためには，生体内でのキノホルムの変化について詳しい研究が必要であると考えた．キノホルムは疎水性の強い物質であり，生体内での変化についてはグルクロン酸抱合体，硫酸抱合体の形成がしられているが[3]，薬物代謝酵素の誘導に関しては詳しい検討は行われていない．

動物に種々の薬物を投与すると肝ミクロソーム P-450が増加し，薬物代謝活性が亢進する．肝ミクロソームの主要な機能は広く脂溶性物質のモノオキシゲナーゼ型酸化を触媒していることにあるが，近年肝ミクロソームにはフェノバルビタールとメチルコラントレンで誘導されたP-450の基質特異性が違うことなどが示され，分子種の異なる数種のP-450が存在することが明らかになっている．

そこでマウスにキノホルムを投与し，肝チトクローム P-450および薬物代謝活性を測定することにより，キノホルムによる薬物代謝酵素系の誘導について検討した[5,7]．本報告においてはアミノピリンN-デメチラーゼおよびp-ニトロアニソールO-デメチラーゼの活性についての結果を示す．

方　法

キノホルムは食品薬品安全センター秦野研究所より供与されたものを用いた．メチルコラントレンは和光純薬製を用いた．マウスは，日本チャールズリバー㈱よりC57BL/6NCrj. 6週令を購入した．

投与方法　マウスを一群5匹に別け，キノホルムを50 mg/kgおよび100mg/kgになるようにコーンオイルに溶解し，隔日に4回腹腔投与した．メチルコラントレンとキノホルム同時投与についてはコーンオイルに溶解したメチルコラントレンを40mg/kgになるように第一回目のキノホルム投与時にのみ腹腔投与し，2回目以後はキノホルムのみを隔日に腹腔投与した．

肝ミクロソームの調製　マウスを断頭屠殺後，肝を摘出し，重量を測定したのち，9倍量の0.25M 蔗糖，10mM TrisHCl(pH7.4)緩衝液を加えてポッター型テフロンホモジナイザーによりホモジネートとし，10,000×g，20分間遠心した上清を105,000×g，60分間遠心し，沈殿部分をミクロソーム分画とした．

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京女子医科大学生化学教室

アミノピリンN-デメチラーゼ活性の測定[4] NADPH生成系(0.8mM NADP, 4 mM グルコース-6-リン酸, 5 mM $MgCl_2$, 0.3ユニット グルコース-6-リン酸脱水素酵素)を含む50mM TrisHCl(pH7.4)にミクロソーム懸濁液(400～500 μg)を加えて37℃予備加温したあとアミノピリンを3 mMになるように加えて反応液を0.5 m*l*にし, 37℃, 5分間振とうインキュベートし, 10% TCA 0.5m*l*を加えて, 反応を停止した. 10分後に4℃, 3,000rpm, 10分間遠心し, 上清を0.75m*l*とって, 0.75m*l*のNash試薬(酢酸3 m*l*, アセチルアセトン2 m*l*/水1 *l*)を加え60℃, 30分間で発色し, 415nmの吸光度を測定することにより, 生成したホルムアルデヒドを測定した.

p-ニトロアニソールO-デメチラーゼ活性の測定[4] 1 mM P-ニトロアニソール, ミクロソーム懸濁液(400～500μg), 50mM リン酸緩衝液(pH7.2)を混和し, 37℃, 5分間予備加温したあと, NADPH生成系(0.5 mM NADP, 5 mM グルコース-6-リン酸, 5 mM $MgCl_2$, 1.5ユニットグリルコース-6-リン酸脱水素酵素)を加えて0.5 m*l*にし37℃, 10分間振とう, インキュベートし, 15% TCAを0.5m*l*加えて10分間放置後, 4℃, 2,800 rpm, 15分間遠心し, 上清を0.8m*l*とり, 1Nの NaOHを0.5m*l*加えて生成したp-ニトロフェノールを410nmで測定した. たんぱく質はLowry法により測定した[6].

結　果

キノホルムをマウスに単独投与した場合, アミノピリンN-デメチラーゼ活性は表1に示したように, 50mg/kg投与では無投与に比べ, 108%, 100mg/kg投与で122%とやや上昇傾向にあった. メチルコラントレン投与はアミノピリンN-デメチラーゼ活性を無投与群に比べ, 157%に上昇させた. メチルコラントレン, キノホルム同時投与時のキノホルムによる影響についてはキノホルム単独投与に対して相加的な上昇傾向を示した.

p-ニトロアニソールO-デメチラーゼについてはキノホルム単独投与では50 mg/kgの場合105.0 %, 100mg/kgの場合は116.0%とやや上昇した. またメチルコラントレン投与により, p-ニトロアニソールO-デメチラーゼ活性は無投与群の約2倍に上昇した. さらにメチルコラントレン, キノホルム同時投与においては, キノホルム単独投与に比べて, 上昇率が高くなっていた.

次にキノホルム100mg/kg, 1回投与後の肝薬物代謝活性を時間を追って測定し, 投与後の時間経過とアミノピリンN-デメチラーゼおよびp-ニトロアニソールO-デメチラーゼ活性との関係を図1に示した. アミノピリンN-デメチラーゼ, p-ニトロアニソールO-デメチラーゼ活性ともに投与6時間では減少し, その後は無投与群に近い値に回復した. しかし100mg/kg 1回投与では活性の上昇をみることはできなかった.

表1 肝薬物代謝活性におよぼすキノホルムの影響

Chinoform * (mg/kg)	p-nitroanisole O-demethylase (nmo/min/mg)	aminopyrine N-demethylase (nmol/min/mg)
0	2.55±0.10 (100%)	6.01±0.53 (100%)
50	2.70±0.26 (105%)	6.48±0.67 (108%)
100	2.96±0.20 (116%)	7.33±0.68 (122%)
	MC (40mg/kg) **	
0	5.23±0.28 (205%)	9.42±1.67 (157%)
50	5.79±0.99 (227%)	8.85±1.09 (147%)
100	7.19±1.28 (282%)	9.72±1.77 (162%)

5匹のマウスの平均値±標準偏差で示した.
※ キノホルムは1日おきに4回投与し, 2日後に断頭屠殺して, 肝を摘出した.
※※3-メチルコラントレンは一回目のキノホルム投与時にのみ投与した.

次にキノホルムの投与量を変えて1回投与し, 肝ミクロソームアミノピリンN-デメチラーゼおよびp-ニトロアニソールO-デメチラーゼ活性を測定した. 両酵素とも25mg/kg投与でやや上昇, 75mg/kg投与ではやや減少した. 50mg/kg, 100mg/kg投与では無投与群に対して有意の差はみられなかった.

考　察

アミノピリンN-デメチラーゼ活性はキノホルム単独投与によってやや上昇傾向を示した. しかしP-448誘導剤だと言われているメチルコラントレンとキノホルムの同時投与による影響についてはメチルコラントレン投与による上昇にキノホルムの効果が加算されただけであり, メチルコラントレン投与による活性上昇を抑制することはなかった. この結果は中川らの報告[5]したP-450誘導剤によって誘導されると言われているビフェニル4-ハイドロロキシラーゼ活性に対する影響と類似していた. p-ニトロアニソールO-デメチラーゼ活性についてメチルコラントレンとキノホルムの同時投与時の上昇率が, 単独投与時よりも高くなっていた. 中川らが報告[5]したP-448 誘導剤によって誘導されると言われているアリルハイドロカーボンハイドロキシラーゼ(AHH)活性

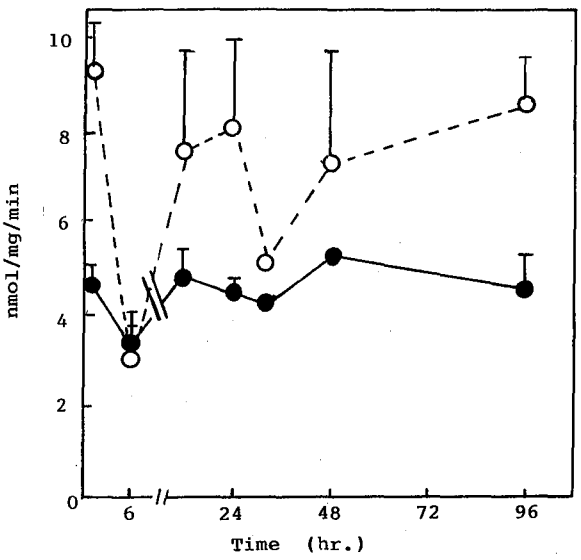


図1 キノホルム投与による肝ミクロソームアミノピリンN-デメチラーゼおよびp-ニトロアニソールO-デメチラーゼ活性の経時変化
キノホルムは100mg/kgを投与した.
縦軸は酵素活性, 横軸は投与後の時間を示した.
---○--- アミノピリンN-デメチラーゼ,
—●— p-ニトロアニソールO-デメチラーゼ
0, 6, 14時間後の値については5匹の動物の平均値±標準偏差, その後の値は3匹の動物の平均値±標準偏差で示した.

表2 キノホルム投与量と肝薬物代謝活性について

キノホルム投与量 (mg/kg)	p-nitroanisole O-demethylase (nmol/min/mg)	aminopyrine N-demethylase (nmol/min/mg)
0	3.53±0.52(5)	11.38± 1.54(5)
25	3.61±0.38(5)	13.65± 2.40(5)
50	3.29±0.95(5)	11.83± 3.71(5)
75	1.94±0.69(5)	8.03± 1.84(5)
100	3.29±0.29(3)	12.90± 4.74(3)

( )内はマウスの匹数
キノホルム投与数24時間で断頭屠殺し, 肝を摘出した.

およびビフェニール2-ハイドロキシラーゼ活性の結果に近い傾向を示したことは興味深い.

キノホルム投与後の時間経過および投与量に関しては動物のキノホルムに対する感受性の違いなどがあり, 顕著な結果を得ることができなかった. キノホルムの投与量を感じた連続投与などを試みてキノホルムの薬物代謝活性への影響をさらにくわしく検討したいと考えている.

要 約

1. マウス(C57BL/6Ncrj) へのキノホルムの投与は肝ミクロソーム アミノピリンN-デメチラーゼ活性およびp-ニトロアニソールO-デメチラーゼ活性を上昇させた.
2. メチルコラントレンとキノホルムの同時投与によるアミノピリンN-デメチラーゼ活性は単独投与に比し, 相加的な上昇傾向しか示さなかったが, p-ニトロアニソールO-デメチラーゼ活性の上昇率はキノホルム単独投与より高い傾向を示した.

文 献

1) 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: 東京衛研年報, 35, 390, 1984
2) 中島章, 中尾順子: 厚生省特定疾患スモン調査研究班 昭和58年度, 研究業積, 94, 1984
3) Kotaki, H. Yamamura, Y., Tanimura, Y., Satoh, Y., Nakagawa, F., and Tamura, Z.: *Chem. Pharm. Bull.* 31, 299, 1983
4) 佐藤 了, 伊藤明夫, 高畠英伍, 楠瀬正道: ミクロソーム, 生化学実験講座12 エネルギー代謝と生体酸化 (下), 日本生化学会編, 445, 1976 東京化学同人, 東京
5) 中川敦子, 深野駿一, 長井二三子, 佐藤かな子, 牛山慶子, 加納いつ, 中尾順子: 東京衛研年報, **36**, 356, 1985
6) Lowry, O.H., Rosebrough, N.Y., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* 193, 265, 1951
7) 牛山慶子, 長井二三子, 中川敦子, 佐藤かな子, 深野駿一, 加納いつ, 中尾順子: 東京衛研年報, 36, 353, 1985

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 362-365, 1985

キノホルム投与によるラット肝P—450および薬物代謝酵素活性の変化

加納いつ*, 牛山慶子*, 長井二三子*, 中川敦子*
佐藤かな子*, 深野駿一*, 中尾順子**

Effect of Chinoform on Rat Hepatic Cytochrome P—450 and Activities of Drug Metabolizing Enzymes

ITSU KANO*, KEIKO USHIYAMA*, FUMIKO NAGAI*, ATSUKO NAKAGAWA*, KANAKO SATOH*, SHUNICHI FUKANO*and TOSHIKO NAKAO**

Effect of chinoform (CF) on hepatic cytochrome P-450 content and drug metabolizing enzymes was examined in F344 rats in vivo. Chinoform suspended in olive oil was administered to rats p.o. at 700 mg/kg body weight daily. P-450 content increased about twofold in rats treated for 5 days and sacrificed a day after the last treatment. On the other hand, body weight loss and decreases of both liver weight/body weight and P-450 content were prominent in rats sacrificed on the 8th day after 7-day treatment. In microsomes with decreased P-450 content, p-nitroanisole O-demethylase and biphenyl 4-hydroxylase activities increased. Aminopyrine N-demethylase, biphenyl 2-hydroxylase and arylhydrocarbon hydroxylase (AHH) activities decreased. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed minute increases of 46 kilodalton and 52 kilodalton bands in the microsomes of CF-treated rats as compared to the control.

Keywords: chinoform, cytochrome P-450, p-nitroanisole O-demethylase, aminopyrine N-demethylase, AHH, biphenyl 4-hydroxylase, biphenyl 2-hydroxylase

緒　言

キノホルムは腸疾患の治療に使用されていたが，スモンの原因物質であることが判明し現在は使われていない．疾患の発症機構解明のアプローチとして，薬物が細胞の外側から作用するとすればまず細胞膜に何らかの影響を及ぼすと考えられることから，キノホルムによる赤血球膜Na,K-ATPase，Ca,Mg-ATPaseに対する阻害[1]，アデニレートシクラーゼに対する阻害[2]，ホスホジエステラーゼの阻害[3]等膜酵素活性のin vitroでの変化について検討されている．キノホルムは鉄が共存するとキレート化合物をつくることがわかっているが，単独で生体に及ぼす影響とくに生化学的変化についてまだ詳細な研究は行われていない．キノホルムが薬物代謝系に及ぼす影響についてP-450の定量およびP-450関連のいくつかの酵素活性を測定して検討を行った．

実験方法

試薬：キノホルムは食品薬品安全センター秦野研究所より供与されたものを，エタノールで再結晶して実験に用いた．

肝ミクロソームの調製：F344ラットは日本チャールスリバーより購入した．体重65～75 gの4週令ラットに100mg/m*l*の濃度でオリーブオイルに懸濁したキノホルムを700mg/kg体重，経口ゾンデで投与した．対照群は同容量のオリーブオイルを投与した．比較のため，生理食塩水リン酸緩衝液に溶かしたフェノバルビタールを40 mg/kg体重，一群に投与した．1日1回投与を5日間(実験1）あるいは7日間（実験2）連続で行い，最終投与から24時間後に肝臓を摘出した．0.25Mショ糖，1 mM

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京女子医科大学生化学教室

表1 ラット肝重量とチトクローム P-450量

		n	liver/body weight (%)	cytochrome p-450 (n mol/mg prot.)
exp. 1	control	4	3.99	0.329
	chinoform	7	3.43	0.708
exp. 2	control	7	4.30±0.17	0.500±0.063
	chinoform	8	3.89±0.42	0.417±0.071
	phenobarbital	6	5.57±0.13	1.008±0.020

キノホルム700mg/kgを，実験1は5時間毎日投与し6日目に，実験2は7日間投与し8日目に肝ミクロソームを調製した．実験1は各群の肝臓を混合一括したミクロソームで測定し，実験2では個々のラットについて測定した。nは一群のラットの数を示す．

表2 ラット肝ミクロソームの酵素活性

	p-nitroanisole O-demethylase	biphenyl 4-hydroxylase	biphenyl 2-hydroxylase	AHH	aminopyrine N-demethylase
control	2.80±0.50	0.260±0.007	2.25±0.25	178.4±45.7	7.18±0.64
chinoform	3.52±0.52	0.340±0.025	1.96±0.28	41.5±37.5	5.83±0.86
phenobarbital	5.29±0.22	0.668±0.120	6.75±0.78	359.3±70.4	20.18±1.43

各酵素活性は，表1実験2と同一のラット肝ミクロソームを用いて測定した．活性の単位はAHH以外はn mol/mg prot./min AHHはp mol/mg prot./min

EDTAを含む10mMトリス緩衝液（pH7.4）を用い0～4℃で12,000xg 20分遠心した上清をさらに105,000 xg 60分間遠心し沈澱画分をミクロソームとした．

測定法：チトクローム P-450はOmuraらの方法[4]で定量，p-ニトロアニソールO脱メチル活性およびアミノピリンN脱メチル活性は佐藤らの報告[5]に従い，ベンツピレン水酸化活性（AHH）はNebertの方法[6]，ビフェニル2および4水酸化活性はCreavenらの方法[7]により測定した．タンパクはLowryらの方法[8]で測定した．

電気泳動：SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動はLaemmliの方法[9]により行った．

結　果

フェノバルビタールは体重当りの肝重量を増加させるのに対し，キノホルムの連続投与によりラットの体重増加が阻止され，体重当りの肝重量も対照群よりやゝ小さい値を示した（表1）．チトクローム P-450量は実験1では約2倍に増加したが実験2では約20%低下した．両実験の差異はキノホルムの投与期間の相違である．ラットは7日頃より急激に個体差を伴って一見して明らかな位衰弱をはじめた．キノホルム投与により衰弱したラット（実験2）ではP-450量低下が肝重量減少とほゞ比例していた．

フェノバルビタール投与はチトクローム P-450のみでなく，測定を行った5種の薬物代謝酵素活性をすべて上昇させた（表2）．キノホルム7日間投与のラットではP-450量の低下にもかゝわらずP-ニトロアニソールO脱メチル活性およびビフェニル4水酸化活性は上昇した．ビフェニル2水酸化活性，アミノピリンN脱メチル活性は低下を示し，特にAHHの低下は顕著であった．

肝ミクロソームのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果対照と比較して，フエノバルビタール投与では主に47KD（キロダルトン）（E），49KD（C），52KD（A）のバンドが著しく増加した（図1）．キノホルム投与では変化は顕著ではないが，P-450領域（およそ46～57KD）以外のバンドを基準にとってデンシトメトリー上のピーク高を比較すると，図1に示すように46KD（F），52KD（A）のバンドがわずかに増加していた．これはキノホルム投与を行ったすべてのラット肝ミクロソームに共通した傾向であり，実験1でP-450が増加した場合でも同様であった．

考　察

ミクロソームに含まれるチトクローム P-450は多成分から成り薬物の酸素添加反応に関与している．メチルコラントレン，フェノバルビタール等の誘導剤はP-450量，薬物代謝酵素活性を増加させ，特定の分子種の著しい増加を示す[10]．キノホルムでは電気泳動で認められる変化が非常にわずかであり，酵素活性においても顕著な上昇はないので解釈は簡単ではない．モノオキシゲナーゼの阻害剤であるクロトリマゾールはin vivoでモノオキシゲナーゼの誘導と阻害を同時にひき起していると考えら

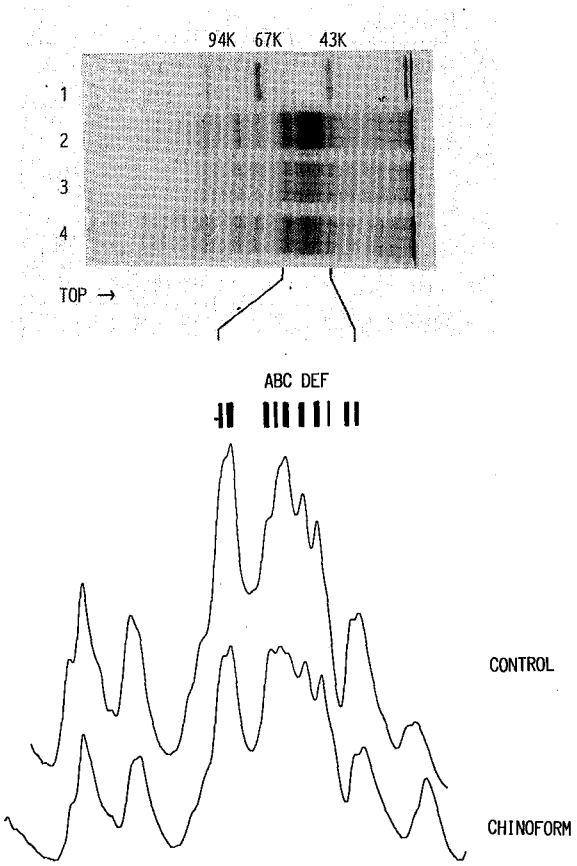


図1．ラット肝ミクロソームのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

表1．実験2のラット肝ミクロソーム各1例ずつのパターンを示した．上部は電気泳動ゲルの写真．矢印は泳動の方向を示す．1：分子量標準試料，94k(キロダルトンの略)：ホスホリラーゼb，67k：牛血清アルブミン，43k：オボアルブミン，2：フェノバルビタール投与，3：キノホルム投与，4：対照．下部はゲルをデンシトメーターでスキャンし，枠で示した部分を中心に拡大したもの．模式図で示したA～Fのバンドはそれぞれ52KD，50.5KD，49KD，48KD，47KD，46KDの分子量に相当する．

れる例である[11]．本実験におけるわずかな活性上昇が誘導かどうかは不明であるが，キノホルムの作用は一つの機構で説明できない可能性もある．P-450の各成分を例えば抗体を用いて検出する方法等を用いれば誘導あるいは成分の低下を明確に結論づけることができるであろう．

スモン患者ではキノホルムと鉄が一緒に投与された時緑色舌苔，緑色便，尿中沈澱物を生じることが見出され，この緑色物質はキノホルムが3価鉄イオンとキレート化合物をつくっているものであることが証明されている[12]．また過酸化脂質の増量が認められた[13]ことから，鉄とキレート結合したキノホルムが脂質の過酸化を通じて細胞内構造および機能を障害すると推測されている[14]．

プリマキンおよびクロロキンはキノホルムと同じキノリン骨格をもつ抗マラリア剤である．両物質はラット肝においてP-450を低下させ，アミノピリンN脱メチル活性を下げる[15]．クロロキンはイミダゾールNメチル転移酵素，アルコール脱水素酵素，コハク酸脱水素酵素，P-ニトロアニソールO脱メチル酵素，グルクロン酸転移酵素活性を阻害する[16-19]ことが知られている．P-450の代謝を直接しらべた例では，3-アミノ1，2，4トリアゾール[20]，酢酸，[21]コバルト[22]などはヘムの生合成を阻害することにより，ヘムタンパクであるチトクローム P-450を低下させる．コバルト[23]あるいは水酸化トリヘキシルチン[24]はヘムオキシゲナーゼ活性を促進してヘムの分解を進める．四塩化炭素[25]は脂質の過酸化反応を介して阻害することなどが報告されている．キノホルムがヘムの生合成を抑制するのか分解を促進するのか，あるいはヘムではなくアポタンパクの代謝に影響を及ぼしているのか今後検討を行う必要があると思われる．

要　約

キノホルムはラット肝ミクロソームのチトクローム P-450を，5日間投与で約2倍に上昇させ，7日間投与で約20%低下させた．肝重量の低下は肝障害を示唆している．7日間投与のラット肝ミクロソームにおいてP-ニトロアニソールO脱メチル活性とビフェニル4位水酸化活性は上昇したが，AHH，ビフェニル2位水酸化活性，アミノピリンN脱メチル活性は低下した．電気泳動で46 KD，52KDの成分の増加が認められた．

文　献

1）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，35，385，1984
2）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，35，387，1984
3）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：東京衛研年報，35，390，1984
4）Omura, T. and Sato, R.：*J. Biol. Chem.*, 239, 2370, 1964
5）佐藤　了，伊藤明夫，高畠英伍，楠瀬正道：生化学

実験講座, 12, 445, 1976, 東京化学同人
6) Nebert, D.W. : *Methods Enzymol.*, 52, 226, 1978, Academic Press
7) Creaven, P.J., Parke, D.V. and William, R.T. : *Biochem. J.*, 96, 879, 1965
8) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
9) Laemmli, U.K. : *Nature*, 227, 680, 1970
10) Haugen, D.A., Coon, M.J. and Nebert, D.W. : *J. Biol. Chem.*, 251, 1817, 1976
11) Kahl, R., Friederici, D.E., Kahl, G.F., Ritter, W. and Krebs. R. : *Drug Met. Disp.*, 8, 191, 1980
12) 吉岡正則, 田村善蔵 : 医学のあゆみ, 74, 320, 1970
13) 八木国夫, 大石誠子, 大塚健三 : 厚生省特定疾患スモン調査研究班, 昭和53年度研究業績, 94, 1979
14) 中島 章, 秋吉正豊 : 薬物の感覚障害, 347, 1980, ソフトサイエンス社
15) Back, D.J., Purba, H.S., Staiger, C., Orme, M. L'E. and Breckenridge, A.M. : *Biochem. Pharmac.*, 32, 257, 1983
16) Cohn, V.H. : *Biochem. Pharmac.*, 14, 1686, 1965
17) Fiddick, R. and Heath, H. : *Nature*, 213, 628, 1967
18) Sanabria, A., Carbonell, L.M. and Soto, R. : *J. Histochem. Cytochem.* 7, 391, 1959
19) Davis, J.E., Cranmer, M.F. and Peoples, A.J. : *J. Toxic. Envir. Hlth.*, 2, 1193, 1977
20) Baron, J. and Tephly, T.R. : *Mol. Pharmac.* 5, 10, 1969
21) Giger, U. and Meyer. U. : *Biochem. J.*, 198, 321, 1981
22) Ravishankar, H. and Padmanaban, G : *Arch. Biochem. Biophys.*, 225, 16, 1983
23) Maines, M. D. and Kappas, A. : *J. Biol. Chem.*, 250, 4171, 1975
24) Rosenberg, D.W., Sardana, M.K. and Kappas, A. : *Biochem. Pharmac.*, 34, 997, 1985
25) De Matteis, F. : *Pharmacol. Ther.*, 2, 693, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 366-369, 1985

馬腎 Na,K-ATPase のモノクローナル抗体

佐藤 かな子*, 中尾 順子**

Monoclonal Antibodies to Horse Kidney Na,K-ATPase

KANAKO SATOH* and TOSHIKO NAKAO**

Keywords: Na,K-ATPase, モノクローナル抗体 monoclonal antibody

緒　言

1975年, Köhler と Milstein は, 抗原で感作したマウス脾臓細胞とマウス骨髄腫細胞を細胞融合させることにより, 抗原特異性の明らかなモノクローナル抗体を産生する雑種細胞 (hybridoma, hybrid myeloma) の作製に成功した[1)2)]. 彼らの成功によって, 免疫学の領域に新しいきわめて強力な突破口が開かれた. 例えば, マウスにおいては, 1個体当り血清中に1～5×10^7種類もの抗体が存在することが知られている. また, ある1つの抗原決定基に対応して出現してくる抗体は1000～8000種類に及ぶと考えられる. ところが, 実際に得られたマウス抗血清を調べてみると, ある1つの抗原決定基に対応するのは5～10種類位の抗体しか区別されない. マウス以外の動物細胞でマウスを免疫した場合を考えてみると, 細胞膜表面上には10～100種類の抗原性を持った蛋白質があって, それぞれの抗原は大体5個位の主要な抗原決定基を持っていると思われる. 1匹のマウスは少くとも5種類の異なる抗体を産生してくるので, 血清中には抗細胞抗体は, 250～2500種類あるという計算となり, 他の1匹は異なった250～2500種類の抗体を産生することになる. このことは, 抗体を reagents として用いる場合, 抗血清から調製された reagents は厳密な意味においてすべてロット毎に異なった抗体の集合であることを意味する. 適当な吸収作用を行うことによって抗血清の heterogeneity による影響を少くすることができたとしても, 抗血清より調製された reagents には次の4つの欠点がある. 1)抗体価が低い. 2)抗原特異性は同一であっても, heterogenous である. 3)供給面に限りがある. 4)全く同一な reagents を再生産することができない. 細胞融合法はこれらの問題点を完璧に解決した.

最近, ホルモンや薬物, 毒物の受容体が細胞膜に存在するという証拠が蓄積されつつあり, 毒物が細胞膜に作用することによって障害が発現することも示されている[3)]. 細胞膜に存在する代表的な酵素で, 細胞膜内外の Na^+ と K^+ の能動輸送をおこなっている Na,K-ATPase に対して, 毒物の作用から毒物の細胞膜障害を推定することは毒性発現機序解明のために有用な方法であると考える. 現在迄, 我々は馬の腎臓髄質外帯より高純度に Na,K-ATPase を精製し, それに対する各種の薬物 (ウァバイン[4)5)], ジギタリス[6)7)]), 有機水銀化合物[8)9)10)], 洗剤[11)], 有機塩素剤[11)], 抗酸化剤[11)], 有機フッ素化合物[12)], dibutylhydroxytoluene (BHT)[13)], フロリジン[14)], showdomycin[15)16)17)], オルトフェニルフェノール (OPP)[18)] の作用を報告してきた. これらの作用を細胞膜障害という観点からより明らかにするため, 馬腎髄質外帯 Na,K－ATPase に対するモノクローナル抗体の作製に着手し, 成功したので報告する.

方　法

Na, K-ATPase の精製　馬腎臓の髄質外帯より, 長井等[19)]の方法により得たミクロゾーム分画を, 更に Jørgensen[20)] 等の方法にて調製した.

免疫方法　7週齢の雌, BALB/c マウスを用いて, 比活性約1000μmol/mg/h の Na,K-ATPase (50μg) と等量の Freund's adjuvant とを混合してエマルジョンを作り腹腔及び皮下に, 2～3週間の間隔で3回注射した.

ハイブリドーマの作成　Köhler[1)] 等の方法に従った. 上記の方法で免疫したマウスに, 同量の抗原を生理食塩水に懸濁させて追加免疫をし, 3日後に脾臓を摘出した. その脾臓細胞 (約1×10^8) と, マウスミエローマ細胞 P3－X63－Ag8－Ul (約2×10^7) とをポリエチレングリコールを用いて細胞融合をおこなった. 融合させた細胞を, RPMI-1640培地にて2×10^6cell/ml に希釈して, 96

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京女子医科大学生化学教室

もしくは24ウェルのプレートに播種した．翌日 hypoxanthine/aminopterin/thymidine(HAT)培地を加え，細胞が充分増殖してきた10日から14日後より徐々に hypoxanthin/thymidine(HT)培地に交換していき，下記の方法で抗体価を測定した．抗体価を有するものを更に増殖させ，細胞を凍結保存すると同時に限界希釈法をもちいて，リクローニングをおこない，目的とするモノクローナル抗体を得た．抗体を産生する細胞を凍結保存すると同時に，マウスの腹水にて増殖させた．(図1)

抗体価測定方法 図2に従っておこなった．Na,K-ATPaseを10mM-Tris-0.25mM EDATAで1ウェル当り1 $\mu g/20\mu l$ となる様に希釈し，96穴の塩化ビニル製のマイクロタイタープレート（三光純薬）に分注した．風乾させた後，1%牛血清アルブミン（BSA）を加え，室温で1時間放置後，リン酸緩衝液（PBS）で洗浄し，培養上清もしくは希釈した血清40μl を加え，37℃で1時間反応させた．1)Radioimmuno Assay(RIA)では，1%BSAを含むPBSで1500倍希釈した，抗マウスIgG(Nordic)，IgAとIgM(MBL)50μl を加えて，室温で1時間反応させ，PBSで洗浄した．^{125}I−ProteinA(20,000cpm/well)を加え，室温で30分反応後，各ウェルを切り取り，γ-カウンターを用いてその放射能を測定した．2)Enzymeim-

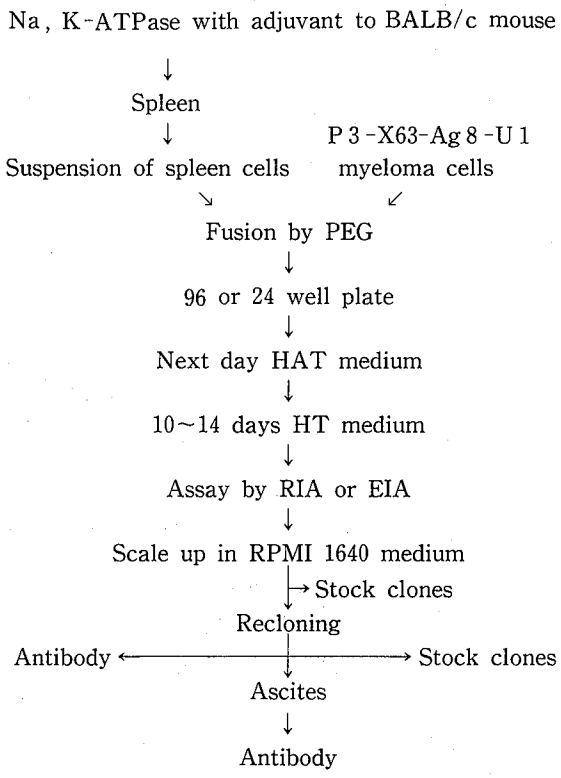


図1． モノクローナル抗体の作製(文献2を改図)

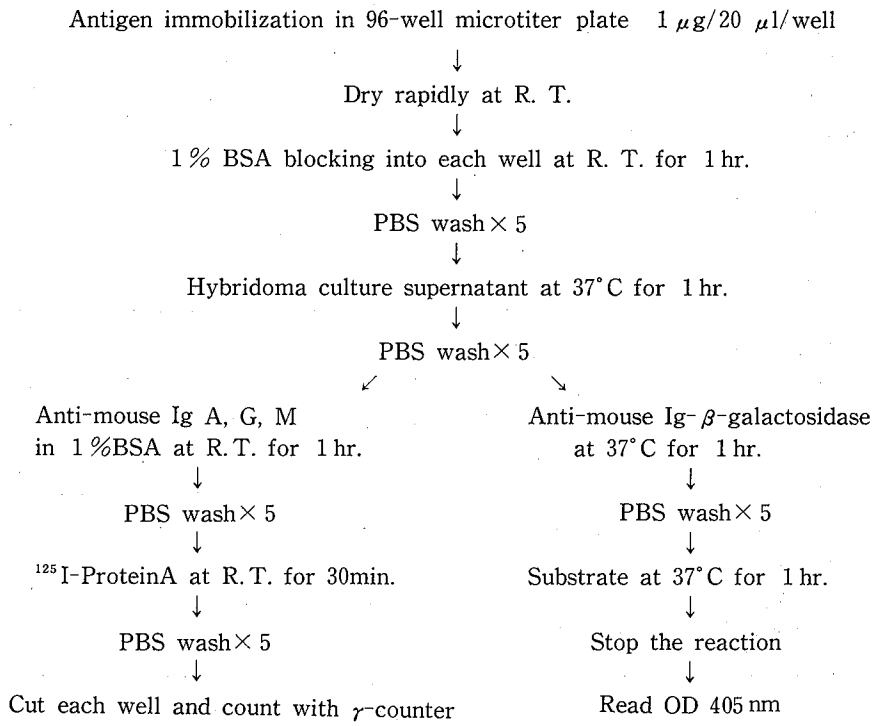


図2． ハイブリドーマの抗体価測定方法

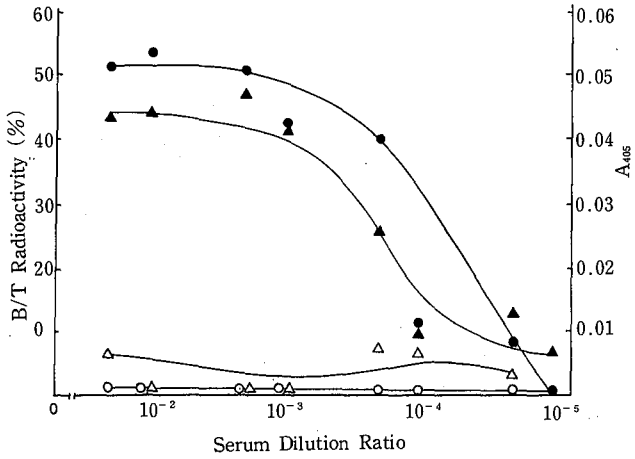


図3． 免疫，非免疫血清のRIA及びEIA法による希釈曲線

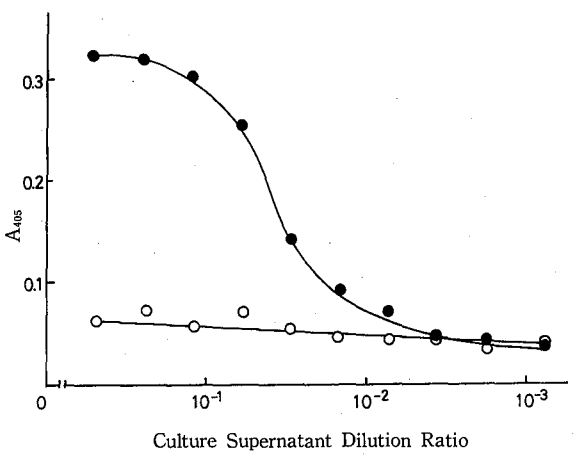


図4． ハイブリドーマの培養上清による希釈曲線

—●—：ハイブリドーマM45-80,
—○—：抗体結合価(−)のハイブリドーマ

muno Assay(EIA)では，PBS−Tween 20で50倍希釈した抗マウスIg-β-ガラクトシダーゼ（NEN）を50μl加えて37℃で1時間反応させた．PBSで洗った後，10mM $MgCl_2$を含むトリス緩衝液で20倍に希釈したo-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド(NEN)50μlを加え，37℃で1時間反応後0.1Mグリシン（pH 10.3）液で反応を止め，その吸光度をマイクロプレート分光光度計をもちいて405nmで測定した．

結果と考察

方法の項で述べた免疫スケジュールに従っておこなった結果，すべてのマウスに抗体価の上昇が見られた．

細胞融合後のクローン出現率は最近の4回で140/588, 196/432, 181/432, 212/528ウェルであった．しかし抗体価の上昇が見られたのは，4ウェルのみで，うち3ウェルはリクローニングの段階で抗体価は消失した．残り1ウェルのものをリクローニングを繰り返し，現在迄5個の安定したハイブリドーマを得ている．

免疫したマウスより脾臓を摘出する直前に採血した血清と，非免疫のマウス血清をRIAとEIAによって測定した結果を図3に示す．RIAによる測定とEIAのそれは，一致した結果を得，1000倍希釈迄抗体価は低下しなかった．又，非免疫血清については，両方法とも結合は見られなかった．

ハイブリドーマ（M45-80）と抗体結合を有しないものの細胞培養上清の希釈曲線を図4に示す．EIAで測定した結果，この培養上清は8倍希釈より抗体価が低下し始め，250倍でプラトーとなった．

要　旨

馬腎臓の髄質外帯由来のNa,K-ATPaseに対するモノクローナル抗体の作製に成功した．RIA及びEIAの技術を利用することによって，この抗体の抗体価を測定する方法を確立した．この方法により，免疫したマウスの血清及びハイブリドーマの培養上清の力価を測定することができた．

文　献

1） Köhler, G. and Milstein, C.：*Nature*, 256, 495, 1975
2） ミルシュタイン，C.：サイエンス，10, 8, 1980
3） Strom, D.R. and Gunsalus, R.P.：*Nature*, 250, 778, 1974
4） Skou, J.C.：*Biochim. Biophys. Acta*, 42, 6, 1960
5） Post, R.L., Meritt, C.R., Kinsolving, C.R. and Albright, C.D.：*J. Biol. Chem.*, 235, 1976, 1960
6） Schwartz, A., Lindenmayer, G.E. and Allen, J.C.：*Pharm. Rev.*, 27, 3, 1975
7） Glynn, I.M. and Karlish, S.J.D.：*Annu. Rev. Physiol.*, 37, 13, 1975

8) 矢ヶ崎しげ子, 原　諭吉, 中尾順子：東京衛研年報, 25, 691, 1974
9) 矢ヶ崎しげ子, 原　諭吉, 中尾順子：東京衛研年報, 26-2, 148, 1975
10) 原しげ子, 中尾順子：東京衛研年報, 27-2, 161, 1976
11) 厚井麻里, 長井二三子, 中尾順子：東京衛研年報, 25, 697, 1974
12) 厚井麻里, 中尾順子：東京衛研年報, 26-2, 152, 1975
13) 清水麻里, 中尾順子：東京衛研年報, 27-2, 77, 1976
14) 中川敦子, 中尾順子：東京衛研年報, 27-2, 166, 1976
15) 原しげ子, 中尾順子：東京衛研年報, 28-2, 196, 1977
16) 原しげ子, 中尾順子：東京衛研年報, 29-2, 147, 1978
17) 原しげ子, 原諭吉, 中尾順子：東京衛研年報, 30-2, 133, 1979
18) 大野知子, 長井二三子, 中尾順子：東京衛研年報, 33, 477, 1982
19) 長井二三子, 厚井麻里, 中尾順子：東京衛研年報, 26-2, 143, 1975
20) Jørgensen, R.T.：*Methods in ENZYMOLOGY*, 32, 285, Edited by Sidney Fleischer & Lester Packer, ACADEMIC PRESS, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 370-372, 1985

妊娠マウスにおける生体高分子へのチアベンダゾール（TBZ）の不可逆結合

米山允子*, 小縣昭夫**, 藤谷知子*, 安藤弘**
久保喜一**, 市川久次*

Irreversible Binding *in vivo* of Thiabendazole to Macromolecules in Pregnant Mice

MASAKO YONEYAMA*, AKIO OGATA**, TOMOKO FUJITANI*, HIROSHI ANDO**, YOSHIKAZU KUBO** and HISATSUGU ICHIKAWA*

Keywords：催奇性物質 teratogen, 不可逆結合 irreversible binding, 生体高分子化合物 macromolecules, 妊娠マウス pregnant mice

緒　言

チアベンダゾール（TBZ）は，かんきつ類，バナナの防カビ剤として食品添加物に許可され，また，動物の駆虫剤としても広く使用されている．当部において小縣らは[1]，マウスを用いた催奇形試験においてTBZの懸濁媒体の違いについて報告している．すなわち，TBZをオリーブ油に懸濁して経口投与した場合とアラビアゴムに懸濁して投与した場合では，前者に有意に胎仔奇形が発現する．我々は[2]，両懸濁媒体による催奇形頻度の差がTBZの生体への吸収量，及び，胎盤通過量，胎仔への吸収量の差であることを報告した．経口的に生体に吸収されたTBZは，全身に分布し，1週間後には97%が尿糞へ排池される[3]．少量のTBZは，肝，胎盤，胎仔を含む主要臓器の高分子化合物と不可逆結合し，長期間，各組織に貯留し，生体からの排泄を抑制している[4]．今回，我々は，組織細胞内におけるTBZの挙動を検討するために，催奇形を発現する濃度と高分子化合物への結合量との関係および高分子化合物を更に分画し，蛋白，核酸(DNA, RNA）へのTBZの結合量を検討したので報告する．

実験材料と方法

（実験動物）　JCL：ICRマウス雌雄を日本クレアk. kより4週令時に購入し，8週令に達した発育良好なものを選び交配させた．交配方法は，雌雄1：1終夜同居により翌朝，腔栓の確認されたものを妊娠動物とみなし，その日を妊娠0日とした．使用匹数は1群3匹とした．

（試薬）　〔U-^{14}C〕-TBZ (Specific activity 4.68mCi/mmole）は，New England Nuclearから購入した．純度は，TLC上で99%であった．

（生体高分子への結合）　^{14}C-TBZとキャリアーとして催奇形を発現する量200, 800, 1600mg/kgのTBZをオリーブ油に懸濁した．各投与量の比放射能活性は，各々，0.124, 0.029, 0.004μCi/μmoleであった．各懸濁液を妊娠13日目マウスに経口投与し，投与後6時間目に断頭し，母親の肝，胎仔を摘出した．肝は，0.25Msucrose中でホモジネイトし，10%ホモジネイト液とし，胎仔は，母体当り全胎仔を10%ホモジネイト液とした．ホモジネイト1 mlに対し，3 ml冷10%TCAを加え，高分子化合物を沈澱させ前報の方法[4]で非結合性TBZを除去した．

（蛋白，核酸への結合）　^{14}C-TBZと1000mg/kgのTBZをオリーブ油に懸濁した．比放射活性は，0.124 μCi/μmolであった．懸濁液を妊娠13日目マウスに経口投与し，6時間目に断頭し，肝，胎仔を摘出した．肝は，冷6% sodium p-aminosalicylate中でホモジネイトし，10%ホモジネイト液とし，phenol：cresol混液で抽出し，Irvingの法[5]に従って，DNA, RNAを分離精製した．蛋白は，phenol：cresol混液にmethanolを加え，遠心分離により沈澱させ，分離精製し，5%TCAで煮沸することにより核酸を除いた．胎仔は，lmM magnesium acetateを含む0.25Msucrose中でホモジネイトし，Murthyらの法[6]に従って蛋白，DNA, RNAを分画し，Irvingの法[5]を用いて精製した．

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 同病理研究科

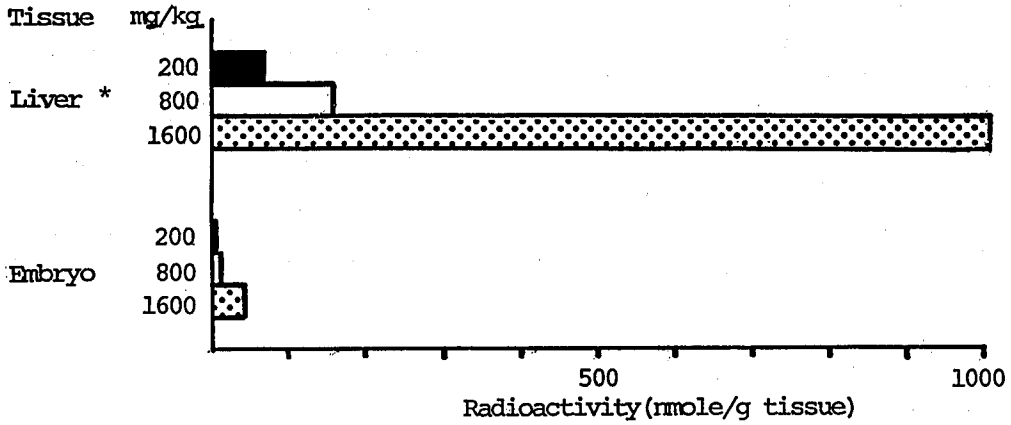


Fig. 1. Comparison of the binding of ^{14}C-TBZ to Macromolecules of Liver and Embryo in teratogenic dose.
Each value represents mean of three mice.
* mother

（測定法） 放射能活性は，液体シンチレーションカウンター（Beckman LS355）で測定し，シンチレーターは，Aquasol II（NEN 社製）を用いた．蛋白は，牛血清アルブミンを標準物質として Lowry らの法[7]で定量した．DNA，RNA は，紫外部吸収260mμ で定量した．

結果と考察

経口投与された TBZ と各組織内高分子化合物の不可逆結合の最大結合量は，投与後，6～24時間目に認められる[4]．従って，以下の実験結果は，投与後6時間目の組織について行った．Fig. 1 に肝，胎仔の高分子化合物への結合量を示した．投与量200，800，1600mg/kg は骨格融合を発現する濃度である．その頻度は，各々母体当たり16，50，70%である[1]．肝において，結合量は，69.6，151.9，1009nmol/g tissue を示し濃度の増加とともに結合量も増加した．胎仔でも肝と同様な傾向を示した．Tocco ら[8]は，羊を用いた TBZ の吸収，排泄の実験において，吸収量のほとんどが代謝され，5-hydroxy-TBZ の形で尿中に排泄されることを報告している．これらの結果は，TBZ が生体内で酸化的代謝経路を介して代謝されることを意味している．本実験で示された高濃度 TBZ における高分子化合物への結合量の急激な増加は，TBZ 代謝経路における抱合機構が飽和されることにより過剰の代謝活性中間体が高分子化合物へ結合することにより生じるものと考えられる．胎仔では，出生直前まで薬物代謝活性は非常に低いと報告されている[9]．胎仔内での高分子化合物への結合は，母体で代謝された TBZ によるものか，あるいは，胎仔内での他の代謝系によるものかもしれない．この問題は，胎盤の機能と合せて今後，検討していきたい．高分子化合物を蛋白と DNA，RNA に分画し，各分画への結合量を検討した．（Table 1）．DNA，RNA への結合は検出されず蛋白への結合が認められた．化学物質による組織傷害の原因の1つとして高分子化合物への不可逆結合が述べられている[10]．蛋白に不可逆結合することにより肝及び腎の細胞死を生じるアセトアミノフェンは良く知られた例である．TBZ でも餌に混和し13週間摂取させたラットの肝に細胞死が認められ[11]，又，経口投与した妊娠マウスの腎にも細胞死が認められている．これらの細胞死は恐らく TBZ が蛋白に不可逆結合した結果によるものであろう．Scott ら[12]は，奇形発現の原因として胎仔組織における細胞死の程度を述べている．奇形を発現する TBZ の各濃度における胎仔高分子化合物への結合量と1胎仔当りの骨格奇形数に相関性のあることは，前報に述べた[4]．以上の事から妊娠マウスに経口投与された TBZ は，胎盤を通過し胎仔に移行し蛋白に不可逆結合することにより細胞分裂を阻害

Table 1. Binding of ^{14}C-TBZ to DNA, RNA and Protein of Liver and Embryo at 6hr after oral administration

	DNA nmole/g	RNA nmole/g	Protein nmole/g
Liver *	N. D.	N. D.	6.68±0.98
Embryo	N. D.	N. D.	0.97±0.15

Each value is the mean±SE of three mice.
* mother

し，細胞死を生じその結果奇形を発現するのではないかと推測される．今後，薬物代謝酵素と不可逆結合能との関係を *in vitro. in vivo* において検討する必要があると考えられる．

文　献

1）Ogata, A., Ando, H., Kubo, Y. and Hiraga, K.：*Fd Chem. Toxic.*, **22**, 509, 1984

2）Yoneyama, M., Ogata, A., Fujii, T. and Hiraga, K.：*Fd Chem. Toxic.*, **22**, 731, 1984

3）米山允子，小縣昭夫，藤井　孝，三栗谷久敏，矢野範男，高橋　博，湯沢勝広，安藤　弘，久保喜一，長沢明道，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，**34**, 337, 1983

4）Yoneyama, M., Ogata, A. and Hiraga, K.：impress *Fd Chem. Toxic.*, 1985

5）Irving, C.C. and Veazey, R.A.：*Biochim. Biophys. Acta*, **166**, 246, 1968

6）Murthy, V.V., Becker, B.A. and Steele, W.J.：*Cancer Research*, **33**, 664, 1973

7）Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.：*J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951

8）Tocco, D.J.：*J. Med. Chem.*, **7**, 399, 1964

9）Manson, J.M.：*Principles and Mothods of Toxicology*, 146, 1982, Raven Press, New York

10）Gillette, J.R., Mitchell, J.R. and Brodie, B.B.：*Ann. Rev. Pharmacol.*, **14**, 271, 1974

11）藤井　孝，福森信孝，長沢明道，三栗谷久敏，林田志信，高橋　博，矢野範男，湯沢勝広，平賀興吾：東京衛研年報，**32**, 16, 1981

12）Scott, J.W., Ritter, J.E. and Wilson, J.G.：*Devl. Biol.*, **26**, 306, 1971

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 373-376, 1985

妊娠マウス尿中のチアベンダゾール（TBZ）およびその代謝物の分析

藤谷知子*, 米山允子*, 小縣昭夫**, 安藤弘**,
久保喜一**, 市川久次*

Analysis of Thiabendazole and its Metabolites in Urine of Pregnant Mice

TOMOKO FUJITANI*, MASAKO YONEYAMA*, AKIO OGATA**, HIROSHI ANDO**, YOSHIKAZU KUBO** and HISATSUGU ICHIKAWA*

Keywords：チアベンダゾール Thiabendazole, 代謝物 metabolites, 分析法 analysis method, 尿 urine, 妊娠マウス pregnant mice

はじめに

チアベンダゾール Thiabendazole〔2－（4'－thiazolyl）－benzimidazole〕（以下，TBZと略す）（図1）は，かんきつ類・バナナの防カビ剤ならびに家畜の駆虫剤として用いられている．一方，小縣らは，ICRマウスを用いた催奇形性試験で，オリーブ油に懸濁したTBZを妊娠9日に一回経口投与すると高頻度で胎児奇形をおこすことを報告している[1]．米山らは，妊娠9日のマウスに^{14}C-TBZを投与すると大部分が尿中に排泄されることを報告している[2]．さらに，生体内での代謝・分布・排泄については，羊[3]・牛・山羊・豚[4]・犬・ラット・人[5]で報告があり，主な代謝物は5-水酸化チアベンダゾール（以下，5-水酸化TBZと略す）（図1）およびそのグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体であることがわかっている．しかし，妊娠中マウスによるTBZの代謝に関する報告はないので，今回，尿中添加したTBZおよび5-水酸化TBZの抽出方法ならびに高速液体クロマトグラフィーによる分析方法を検討し，さらに，妊娠9日マウスに投与したTBZの尿中代謝物の分析を行った結果を報告する．

実験材料と方法

実験動物　JCL：ICRマウス雌雄を日本クレア㈱より4週令時に購入し，8週令に達した発育良好なものを選び交配させた．交配は雌雄1：1終夜同居により翌朝腔栓の確認されたものを妊娠動物とみなし，その日を妊娠0日とした．

投与と尿採取　TBZはMerck Sharp & Dohme International社製（純度98.5%）を，日本薬局オリーブ油（岩城製薬社製）に懸濁し，妊娠9日のマウス（各群5匹）に1000mg/10ml/kg体重となるように一回強制経口投与した．対照群には，オリーブ油（10ml/kg体重）を同様に投与した．投与後，3日間，マウスを個別に代謝ケージにて飼育した．24時間毎に尿を集め，さらにケージ内壁を約3 mlの蒸留水で洗い．洗液を尿と合せて遠心分離し，上清（以下，尿溶液と記す）を分析するまで－80°で凍結保存した．

試薬　TBZ（Merck Sharp & Dohme International社製）は熱メタノールから再結晶したものを標準物質として用いた．5-水酸化TBZは和光純薬㈱から購入した．n-ブタノール，iso-ブタノール，酢酸は和光純薬㈱の特級，酢酸エチルは関東化学㈱の高速液体クロマトグラフィー用を用いた．β-グルクロニダーゼTypeB-3およびTypeH-2は，Sigma社製G-0376をそれぞれ用いた．

チアベンダゾール（TBZ）　5-水酸化チアベンダゾール（5-水酸化TBZ）

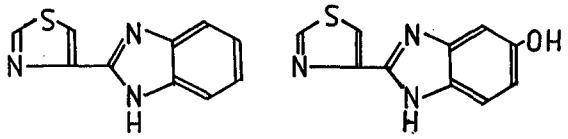


図1．チアベンダゾール(TBZ)および5-水酸化チアベンダゾール(5-水酸化TBZ)の構造式

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 同病理研究科

抽出前処理 TBZおよびその代謝物のそれぞれの分析に合せて次のような前処理を行った.

1) 未変化TBZおよび遊離の5-水酸化TBZの分析には,尿溶液0.5m*l*に1Mリン酸緩衝液(pH7.0) 0.05m*l*を加えて試料とし抽出,高速液体クロマトグラフィーにて分析した.

2) グルクロン酸抱合体の分析には,尿溶液0.5m*l*に1M酢酸緩衝液(pH5.5) 0.2m*l*,蒸留水4 m*l*,*β*-グルクロニダーゼTypeB-3 5,000unitを加え,37°約42時間反応後1Mリン酸緩衝液(pH7.0) 0.4m*l*を加えて凍結乾燥後,蒸留水0.5m*l*に溶解して試料とし,1)と同様に抽出・分析し,1)との差をグルクロン酸抱合体量とした.

3) 硫酸抱合体の分析には,尿溶液0.5m*l*に1M酢酸緩衝液(pH5.5) 0.2m*l*,蒸留水4 m*l*,*β*-グルクロニダーゼTypeH-2, 5,550unitを加え,37°約42時間反応後,1Mリン酸緩衝液(pH7.0) 0.4m*l*を加えて凍結乾燥後,蒸留水0.5m*l*に溶解して試料とし,1)と同様に抽出・分析し,2)との差を硫酸抱合体量とした.

抽出方法 前処理1)2)3)の各試料に,*iso*-ブタノール:酢酸エチル1:1を水飽和させた溶液1.0m*l*を加えて,混和後,遠心分離し,有機層に抽出された化合物を,高速液体クロマトグラフィーにて分析した.化合物濃度が低かった場合には2～5倍に濃縮し,高かった場合には2～5倍に希釈して分析した.

高速液体クロマトグラフィー分析 ポンプはVarian System4200を用いた.カラムは,Zorbax TMS(デュポン社製)内径4.6mm×250mmカラムを用い,移動相として,n-ブタノール:酢酸:水 4:1:1溶液を流速60m*l*/hrで流し,溶出化合物は紫外部吸収計(波長280nm)で検出し,島津クロマトパックRC 1-Aで記録した.

結果と考察

TBZおよび5-水酸化TBZの分析法の検討

高速液体クロマトグラフィーによる定量:神谷らが試験飼料中のTBZの分析にZorbax TMSカラムを用いていること[6]と,ToccoらがペーパークロマトグラフィーによるTBZおよび代謝物の分析でn-ブタノール:酢酸:水 4:1:1 溶液を展開溶媒に用いていること[3]から,Zorbax TMSカラムと移動相としてn-ブタノール:酢酸:水 4:1:1 溶液を用いてTBZと5-水酸化TBZの同時定量を検討した.図2-Aに示したように,標準溶液中のTBZおよび5-水酸化TBZが妨害ピークなく分離分析でき(図2-B, C),抽出液を希釈して作成した検量線は,両化合物とも良好な直線性を示した(データは示していない).

抽出溶媒の検討:Toccoらが生体試料からの抽出に用いている酢酸エチル[3)-5)]の他に,種々の溶媒を用いてTBZおよび5-水酸化TBZの溶解度について検討したところ,*iso*-ブタノール:酢酸エチル1:1溶液が両化合物の溶解性にすぐれていたのでこれを抽出溶媒とした.尿溶液の前処理1)2)3)による抽出回収率への影響を検討するため,対照群(オリーブ油のみ投与)の尿溶液

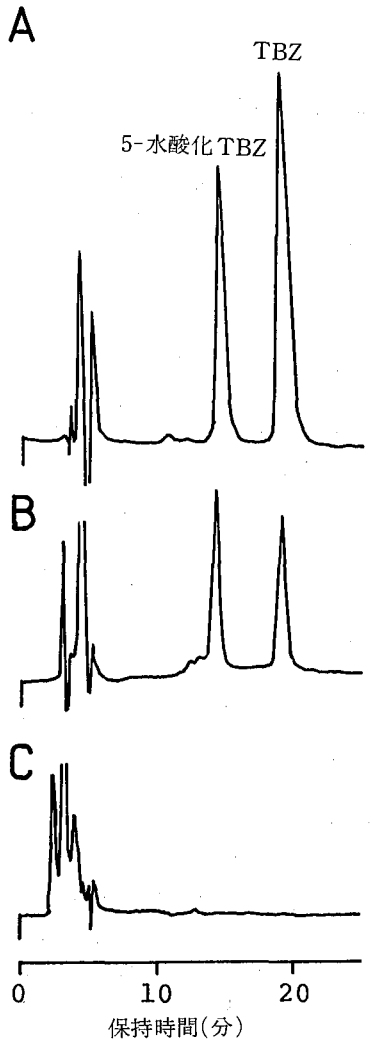


図2. TBZおよび5-水酸化TBZの高速液体クロマトグラム
A:標準溶液
B:TBZ投与群の尿からの抽出液
C:対象群の尿からの抽出液

に，TBZおよび5-水酸化TBZを添加して前処理・抽出を行った．前処理1)2)3)とも，図4に示したように，TBZおよび5-水酸化TBZの回収量は添加量に比例し，回収率はTBZで99%，5-水酸化TBZで84%であった．

以上の結果から，尿中のTBZおよび5-水酸化TBZの分析には，抽出溶媒に*iso*-ブタノール：酢酸エチル 1：1（水飽和）を用い，Zorbax TMSカラムと移動相

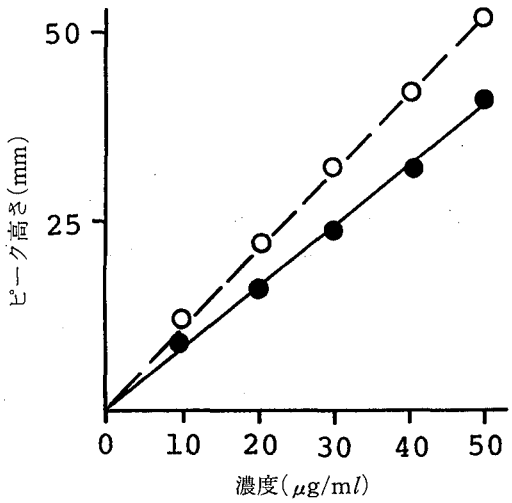


図3．TBZおよび5-水酸化TBZの高速液体クロマトグラフィー分析による検量線
——○——：TBZ
——●——：5-水酸化TBZ

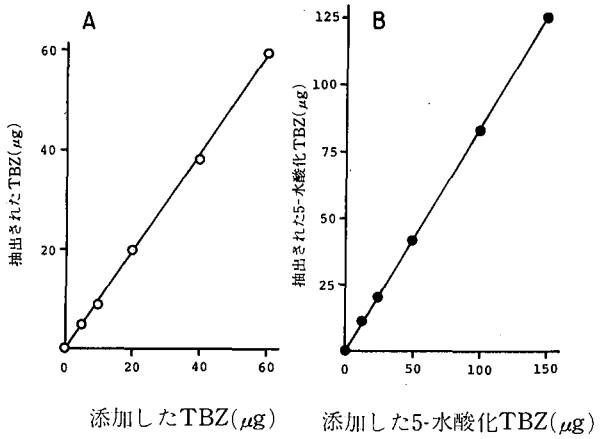


図4．TBZおよび5-水酸化TBZの抽出回収量

n-ブタノール：酢酸：水 4：1：1 溶液による高速液体クロマトグラフィーを用いることとした．この方法は，酢酸エチル抽出後さらに塩酸水溶液に逆抽出して螢光光度法で分析する方法[4]に比べて，操作が簡便である．

尿中に排泄されるTBZおよびその代謝物

妊娠9日のマウスにオリーブ油に懸濁したTBZ(1000 mg/kg体重)を一回経口投与後3日間の尿を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ，TBZ(未変化)，5-水酸化TBZ(遊離)，5-水酸化TBZのグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体が検出された．オリーブ油のみ投与の対照群からは，これら化合物は検出されなかった．投与後3日間で尿中に排泄されるTBZおよびその代謝物の量を表1に示した．3日間で尿中に排泄されるTBZおよびその代謝物の合計量のうち，TBZそのままで排泄される量は10分の1以下であり，ほとんどが体内で代謝されて5-水酸化TBZとなって排泄されている．5-水酸化TBZは，抱合されていない遊離体はごくわずかで，グルクロン酸抱合体が合計排泄量の52%，硫酸抱合体が合計排泄量の38%であり，牛[4]・人・ラット[5]と同様に，グルクロン酸抱合体が硫酸抱合体より多い傾向を示した．また，合計排泄量の約50%が投与後1日目に，約95%が2日目までに排泄された．3日目には排泄量は明らかに減少し，Toccoらの報告[3)-5)]にある他の動物種における結果や，米山らの報告[2]している妊娠マウスにおける^{14}C-TBZの排泄の結果ともよく一致している．未変化のTBZの排泄は投与後1日目が最も多く，その後，日数にともなって排泄量が減少しているが，5-水酸化TBZは，遊離体，グルクロン酸抱合体，硫酸抱合体，ならびにそれら三者の合計いずれも，3日目の排泄量は明らかに減少しているものの，1日目の排泄量と2日目の排泄量に明らかな差がなかった．これは，水酸化および抱合という過程を経るために未変化体（TBZ）よりも排泄がやや遅れる結果と考えられる．

以上の結果から，TBZは妊娠マウスにおいても比較的すみやかに代謝され，主に5-水酸化TBZのグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体として排泄されると考えられる．しかし，今回分析した，TBZ，5-水酸化TBZおよびそのグルクロン酸抱合体・硫酸抱合体の合計排泄量は，米山らの^{14}C-TBZの尿中排泄量[2]よりも低い値を示している．また，Toccoらも，牛・人・ラット・犬の尿で化学分析によるこれら代謝物の合計値が，アイソトープを用いた分析値よりも低くなることを報告している[4)5)]．さらに，Toccoらが行ったペーパークロマトグラフィーに

表1．TBZおよびその代謝物の尿中排泄量（%投与量，TBZ換算）

	投与後			
	1日 (0—24時間)	2日 (24—48時間)	3日 (48—72時間)	1—3日 (0—72時間)
TBZ	1.72±0.49	0.68±0.46	0.01±0.01	2.41±0.42
5—水酸化TBZ	11.30±4.54	11.45±7.94	1.00±1.24	23.75±9.64
遊離	0.14±0.07	0.17±0.14	0.04±0.04	0.35±0.13
グルクロン酸抱合	5.46±2.14	7.53±5.84	0.61±0.76	13.59±6.17
硫酸抱合	5.71±2.47	3.83±2.39	0.35±0.45	9.89±4.31
合計	13.03±4.75	12.13±8.33	1.01±1.25	26.17±9.88

数値は5匹のマウスの平均値±S.D.

よる羊の尿の代謝物分析において，これら代謝物の他に未知の代謝物が微量ながら検出されている[3]ことは無視できない．一般に，妊娠動物では肝臓の代謝機能が低下すると言われている他，胎盤・胎児による代謝など，非妊娠動物とは異なる条件が考えられるので，今回分析した以外の代謝物の存在についても検討する必要がある．また，TBZおよびその代謝物の体内分布も興味ある点であり，特に催奇形性との関連を考える上で，胎盤通過なども含めて引き続き検討することが大切であると考えている．

文　献

1) Ogata, A., Ando, H., Kubo, Y. and Hiraga, K.：*Fd. Chem. Toxic.*, 22, 509, 1984

2) 米山允子，小縣昭夫，藤井　孝，三栗谷久敏，矢野範男，高橋　博，湯沢勝広，安藤　弘，久保喜一，長沢明道，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，**34**, 337, 1983

3) Tocco, D.J., Buhs, R.F., Brown, H.D., Matzuk, A.R., Mertel, H.E., Harman, R.E. and Trenner, N.R.：*Journal of Medical Chemistry*, 7, 399, 1964

4) Tocco, D. J., Egerton, J. R., Bowers, W., Christersen, V.W. and Rosenblum, C.：*The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **149**, 263, 1965

5) Tocco, D.J., Rosenblum, C., Martin, C.M. and Robinson, H.J.：*Toxicology and Applied Pharmacology*, **9**, 31, 1966

6) 神谷信行，平賀興吾：東京衛研年報，**33**, 561, 1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 377-389, 1985

チアベンダゾール（TBZ）のラットを用いた慢性毒性試験

林田志信*, 三栗谷久敏*, 神谷信行*,
佐々木美枝子*, 平賀興吾**

Chronic Toxicity on Rats Fed Thiabendazole (TBZ) for 104 Weeks

SHINOBU HAYASHIDA*, HISATOSHI MIKURIYA*, NOBUYUKI KAMIYA*,
MIEKO SASAKI* and KOGO HIRAGA**

A chronic toxicological study of thiabendazole (TBZ), a fungicide, was conducted in F344/DuCrj rats. TBZ was given as pelleted diets at dietary levels of 0(control), 0.05, 0.1, 0.2or 0.4% to groups of 30 rats of each sex for 104 weeks. The mean intakes of TBZ at 0.05, 0.1, 0.2 or 0.04% dietary levels were 21, 43, 90 or 207 mg/kg body weight/day respectively in the males, and 26, 53, 112 or 237 mg/kg body weight/day in the females.

Mean body weights of 0.4% group of both sexes were significantly lower throughout the study than that of the control.

At the termination of study, RBC count, serum GOT and serum GPT values were significantly lower in 0.4% female group than in the control. The weight of urinary bladder of 0.4% groups of each sex was significantly higher than that of the control.

These findings suggest that TBZ may cause an anemia and hepatopathy and may somewhat affect the urinary bladder in F344/DuCrj rats. Further studies of hematology and pathology for these animals have been conducted, and will be published in the near future.

Keywords: Thiabendazole, Fungicide, F344/DuCrj Rat, Chronic Toxicity

緒　言

防カビ剤であるチアベンダゾール（以下TBZと略す）は，我国で1978年に食品添加物として認可され，柑きつ，バナナなどに使用されている．TBZの毒性についてはRobinsonらは数種の動物を用いた短期・長期毒性試験を行ない，顕著な害作用が認められないと報告している[1]．しかしながら，当部で行ったマウスによる催奇形性試験において小縣らは，TBZに奇形誘発作用を認めて報告しており[2,3]，TBZの毒性は発がん性の有無を含めさらに詳細な検討が必要となった．当部ではTBZの安全性試験の一環としてラットを用いた経口毒性試験を企画し，すでに急性・亜急性毒性試験の結果については報告してきた[4-6]．本報では，TBZ長期連続投与によるラットに対する影響を調べるために行なったTBZ添加飼料による104週間摂取試験の結果のうち，体重変動，飼料摂取量，飲水量，血液学検査，血清生化学検査，器官重量について報告する．

実験材料および方法

検体：チアベンダゾールはMerck Sharp & Dohme International Co.製thiabendazole microfine MSD (Lot. No. BZA-539, 純度98.5%) を使用し，粉末飼料CE-2（日本クレア）にそれぞれ0％（対照群），0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.4%の割合で添加し固型化したものを試験飼料とした．

試験動物：F344/DuCrj（日本チャールス・リバー社）ラット雌雄を4週齢で購入し，1週間予備飼育後，発育良好なものを試験に用いた．

飼育条件：室温25± 1°，湿度55± 5％，換気回数毎時

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都八王子保健所予防課

10回，照明6時より18時に制御されたバリア式飼育室において，前面および底面が網目のステンレス製の個別ケージに動物を収容し，自動給水装置(細菌ろ過器経由)付のベルト式飼育架台にて飼育した．

試験方法：TBZ添加濃度は0(対照)，0.05，0.1，0.2および0.4%の5段階とし，各々標準粉末飼料に添加し固型化したものを試験飼料として動物に摂取させた．ラットは各濃度の試験飼料に雌雄それぞれ30匹をあて，これをランダムに飼育架台に配置した．試験期間は104週間とし，ラットが5週齢になった時点で試験飼料の摂取を開始した．飼料は細菌ろ過器を経由した水道水とともに自由摂取させた．

動物の一般状態の観察は毎日9時より10時頃までの間に行ない，生死の判別は午前と午後の2回行なった．体重は全試験期間毎週1回測定した．飼料摂取量および飲水量は試験開始後4週間は毎週1回，その後2ケ月間は2週間に1回測定し，以後は試験終了まで4週間に1回測定を行なった．試験終了時には動物を屠殺し，血液学検査，血清生化学検査および主要器官重量測定を行なった．

検査方法：飼料摂取量，飲水量は雌雄各群10匹について既報[5]に準じて測定した．血液学検査および血清生化学検査は動物の屠殺時，大腿動静脈切断により放出する血液を採取し行なった．

血液学検査：約0.5mlの血液をEDTA-2K処理試験管に採取し，Coulter Counter Model S(Coulter Electric Co.)を用いて，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(MCH)，平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)および白血球数(WBC)の各項目について測定した．

血清生化学検査：5 mlの血液を遠心管に採取し，常法に従って血清を分離し，Automatic Analyzer 705(日立)を用いて，グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ活性(GOT)，グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性(GPT)，総タンパク量(TP)，アルカリホスファターゼ活性(ALP)，尿素窒素(UN)およびアルブミン量(Alb)について測定した．

器官重量：解剖時に主要器官を摘出し，その重量を測定した．心，肝，腎，脾，脳，副腎，胸腺，精巣，前立腺，子宮については摘出直後に湿重量を測定し，また膀胱については，注射筒を用いて残留尿を採取した後に10%緩衝ホルマリン液0.5mlを注入し膨張させて内尿道附近を結紮して固定させ，そのまま1週間固定後に測定した．

体重および検査結果の処理にあたっては，当部で開発した毒性試験データー解析システム(TOXI-STUDY)[8]を用いた．

結果および考察

1. **一般状態**：TBZ0.4%群に全試験期間を通じて雌雄ともに“痩せ”がみられた他は，被毛の状態，動物の行動などは対照群と投与群との間に認めるべき差異はなかった．

2. **体重**：Table 1，2およびFig. 1，2に体重増加の推移を示した．対照群と比べ，雄0.2%群および0.4%群，その後雌0.1%群，0.2%群および0.4%群では全試験期間を通じて体重が有意に小さく，また，雄0.1%群でも，54週および58週を除くと全期間有意に小さかった．0.4%群雌雄には試験開始20週目頃から強い体重増加の抑制がみられ，雌では試験終了時までわずかに体重が増加する傾向がみられたが，雄では66週頃からさらに体重が減少する傾向がみられた．0.05%群雄では試験70週目頃までは対照群と同等あるいはやや大きく，以後は対照群より小さい値を示した．また0.05%群雌は対照群より小さい傾向を示した．

3. **飼料摂取量**：Table3，4に飼料摂取量を示した．0.2%および0.4%群に，投与開始直後に摂取量の低下がみられ，特に0.4%群では対照群に対し1/3に落ちた．ラット1日当りの摂取量は雌雄とも0.4%群で全期間を通じて有意に少なく，0.05%群を除く他の投与群でも少ない傾向を示した．また体重比摂取量は0.2%群および0.4%群雄で試験2週，雌で試験4週頃までは対照群と比べて少なく，以後は有意に多いか，多い傾向を示した．試験群にみられた体重増加抑制は飼料摂取量の少ないことが原因と思われるが，0.2%および0.4%群雌雄では，体重比摂取量が対照群に比べて多いことおよび雄の各投与群では試験後半にそれまでと変わらぬ飼料摂取量を示しているにもかかわらず体重が減少する傾向がみられたことなどから，TBZが体重増加抑制に何らかの影響を与えている可能性も考えられる．

4. **飲水量**：Table 4，5に飲水量を示した．ラット1日当りの飲水量は，0.2%群および0.4%群雌雄で，試験0週に低下したことを除けば，全試験期間を通じて対照群より有意に多いか，多い傾向を示した．他の投与群でも，飲水量は対照群と同等，あるいはやや多い傾向を示した．また，体重比飲水量では，試験0週を除き，0.1%群以上の各投与群で雌雄ともに投与量にともなった増加傾向がみられた．一般に飲水量は飼料摂取量に連動して増加するが，0.2および0.4%群では飼料摂取量に比し飲

Table 1. Body Weights of Male Rats Fed TBZ for 104 Weeks

Week on study	Dietary level of TBZ (%)				
	0	0.05	0.1	0.2	0.4
0	90.5± 3.9[1]	91.6± 4.4	90.2± 4.9	91.4± 4.6	91.4± 3.5
	(100.0± 0.0)[2]	(100.0± 0.0)	(100.0± 0.0)	(100.0± 0.0)	(100.0± 0.0)
1	119.2± 5.7	121.1± 7.5	115.7± 7.4*	111.9± 6.3*	98.4± 5.6*
	(131.7± 3.8)	(132.2± 3.8)	(128.4± 4.6)*	(122.4± 3.1)*	(107.8± 3.8)*
2	143.6± 8.7	145.9±10.7	137.9±11.0*	133.6± 8.6*	114.9± 8.0*
	(158.7± 7.0)	(159.1± 7.2)	(153.0± 8.3)*	(146.1± 5.9)*	(125.6± 6.4)*
3	167.5±13.6	168.6±13.7	156.1±14.0*	152.7±12.4*	130.1±11.4*
	(185.2±13.7)	(183.9±10.4)	(173.0±11.2)*	(167.1±10.9)*	(142.2±10.3)*
4	189.5±17.3	188.9±15.0	174.7±17.6*	171.9±15.0*	146.8±14.4*
	(209.5±18.2)	(206.1±12.2)	(193.7±16.0)*	(188.2±13.4)*	(160.6±13.5)*
6	222.7±21.1	222.9±17.9	204.1±22.0*	202.6±16.2*	174.5±16.1*
	(246.3±23.2)	(243.4±16.3)	(226.5±22.4)*	(222.0±16.6)*	(191.1±15.5)*
8	251.4±21.3	252.5±16.5	231.7±22.3*	229.4±14.8*	197.8±14.6*
	(278.1±23.4)	(275.7±15.4)	(257.3±24.7)*	(251.4±15.9)*	(216.4±13.9)*
10	267.3±22.4	269.8±15.3	247.0±21.8*	243.8±15.0*	208.1±14.7*
	(295.6±24.8)	(294.8±14.8)	(274.5±25.2)*	(267.3±16.7)*	(227.8±13.2)*
12	287.4±23.0	291.2±13.9	267.3±21.2*	264.3±14.7*	224.4±16.8*
	(317.9±25.5)	(318.1±13.7)	(297.0±25.6)*	(289.7±17.6)*	(245.5±15.2)*
14	297.9±22.4	301.8±13.5	277.8±22.5*	274.0±14.2*	229.2±16.0*
	(329.4±25.2)	(329.9±14.0)	(308.7±27.9)*	(300.4±17.3)*	(250.9±14.6)*
18	322.0±23.2	326.4±13.8	304.0±24.0*	296.0±13.5*	245.9±17.5*
	(356.2±26.0)	(356.8±15.7)	(337.9±30.2)*	(324.6±18.6)*	(269.2±16.3)*
22	337.2±23.8	342.4±13.6	319.0±25.6*	308.2±13.8*	255.3±17.5*
	(372.9±27.6)	(374.3±16.1)	(354.6±33.5)*	(338.0±19.9)*	(279.5±16.1)
26	354.6±24.6	358.7±15.5	335.5±29.7*	321.6±14.9*	264.2±19.2*
	(392.4±29.4)	(392.1±18.7)	(372.9±37.7)*	(352.7±21.6)*	(289.4±20.5)*
30	365.1±24.6	368.5±15.7	348.8±22.8*	328.9±15.2*	271.1±17.3*
	(403.8±30.0)	(402.8±19.3)	(388.0±33.1)	(360.8±22.9)*	(296.8±16.6)*
34	369.0±25.0	371.9±13.1	353.5±22.7*	332.5±13.5*	273.1±18.5*
	(408.4±31.1)	(406.6±19.3)	(393.3±32.6)	(364.8±22.3)*	(298.9±18.0)*
38	378.2±26.4	379.7±14.7	362.5±24.8*	337.9±16.2*	278.8±18.8*
	(418.4±32.1)	(415.2±22.0)	(403.3±35.6)	(370.6±24.9)*	(305.1±18.1)*
42	383.2±27.1	385.1±14.0	367.9±26.0*	343.5±16.1*	282.7±17.2*
	(424.0±32.7)	(421.1±22.5)	(408.3±35.6)	(376.8±24.3)*	(309.4±16.8)*
46	389.1±28.6	392.9±14.9	374.5±25.7*	350.1±16.1*	287.7±16.9*
	(430.6±34.9)	(429.7±23.7)	(416.6±36.1)	(384.0±25.1)*	(314.9±16.4)*
50	393.5±30.6	394.9±18.4	378.6±24.8*	354.9±16.8*	291.0±16.5*
	(435.5±37.7)	(431.8±24.4)	(421.2±35.7)	(389.4±25.4)*	(318.5±16.3)*
54	396.4±33.7	396.7±24.3	382.9±25.8	358.2±16.9*	292.9±16.7*
	(438.7±39.9)	(433.7±30.9)	(426.0±36.9)	(392.9±25.3)*	(320.7±16.6)*
58	396.9±36.0	396.1±27.3	384.0±25.6	357.3±17.3*	292.6±16.1*
	(439.2±42.2)	(433.1±33.8)	(427.3±38.0)	(391.9±26.6)*	(320.4±16.8)*
62	400.7±28.9	401.6±15.0	382.8±25.2*	358.4±17.2*	290.9±15.8*
	(443.9±34.6)	(438.9±21.4)	(425.9±36.6)	(393.2±26.1)*	(318.5±16.7)*
66	408.5±30.7	409.5±17.6	390.2±26.7*	365.1±18.0*	296.0±14.7*
	(452.7±37.3)	(447.4±22.1)	(434.3±40.7)	(400.7±27.4)*	(324.1±15.2)*
70	417.2±25.4	411.5±15.9	392.1±26.7*	367.7±17.0*	295.7±14.4*
	(462.8±32.0)	(451.5±22.0)	(436.5±41.0)*	(403.6±26.9)*	(323.8±15.0)*
74	421.1±26.5	414.1±16.3	395.0±26.3*	369.2±18.2*	294.8±13.1*
	(467.6±34.1)	(454.4±23.3)	(439.7±40.9)*	(405.4±29.1)*	(322.9±13.0)*
78	422.6±28.9	416.9±15.9	396.8±25.8*	369.2±18.6*	292.4±13.2*
	(469.2±38.3)	(457.5±23.9)	(441.9±43.1)*	(405.4±29.5)*	(320.1±13.2)*
82	429.4±31.4	420.8±15.4	397.2±26.4*	372.7±19.2*	290.6±17.3*
	(476.9±40.6)	(461.9±23.9)	(442.4±44.2)*	(409.3±30.9)*	(318.3±17.8)*
86	433.4±36.1	421.9±15.0	397.5±28.0*	370.0±20.2*	287.9±16.5*
	(481.4±46.5)	(463.1±24.3)	(442.9±46.0)*	(406.4±31.7)*	(314.8±18.4)*
90	438.4±49.8	420.9±19.7	397.1±30.2*	367.5±21.6*	282.8±21.6*
	(487.4±63.2)	(462.2±30.9)	(442.4±47.6)*	(403.6±32.1)*	(309.4±25.1)*
94	436.5±59.0	407.0±27.7*	389.3±37.6*	361.3±21.2*	275.6±21.1*
	(485.0±74.2)	(446.7±37.7)*	(435.7±53.3)*	(396.7±30.8)*	(302.4±25.0)*
98	436.0±91.5	407.1±44.5	384.0±37.7*	355.1±20.7*	270.8±20.0*
	(483.5±111.0)	(447.8±50.4)	(428.8±55.0)*	(387.9±30.6)*	(297.7±22.8)*
102	446.6±123.4	411.9±50.7	379.3±25.1*	345.2±24.1*	262.1±21.1*
	(495.5±149.8)	(452.9±54.7)	(424.1±42.1)*	(377.3±33.5)*	(288.0±24.1)*

1) mean±SD(g) 2) mean of growth rates±SD

* significantly different from control, $p<0.05$

Table 2. Body Weights of Female Rats Fed TBZ for 104 Weeks

Week on study	Dietary level of TBZ (%)				
	0	0.05	0.1	0.2	0.4
0	80.9± 2.9 [1]	80.9± 2.0	81.4± 2.7	81.2± 2.7	81.1± 2.9
	(100.0± 0.0) [2]	(100.0± 0.0)	(100.0± 0.0)	(100.0± 0.0)	(100.0± 0.0)
1	98.7± 4.3	97.4± 3.8	95.7± 3.2*	91.4± 3.4*	83.1± 3.4*
	(122.0± 2.6)	(120.5± 3.0)*	(117.8± 2.3)*	(112.6± 2.2)*	(102.4± 2.0)*
2	111.6± 5.2	110.1± 4.3	107.2± 4.3*	101.3± 4.4*	89.8± 4.6*
	(137.9± 4.3)	(136.2± 3.4)	(131.8± 3.7)*	(124.9± 4.5)*	(110.7± 3.3)*
3	122.0± 6.2	120.2± 5.4	115.7± 4.8*	108.8± 5.7*	94.9± 5.2*
	(150.8± 5.3)	(148.8± 5.3)	(142.3± 4.8)*	(134.2± 6.6)*	(116.9± 4.2)*
4	130.0± 7.3	127.7± 6.4	122.8± 5.4*	114.7± 5.8*	99.5± 6.0*
	(160.7± 6.9)	(158.0± 5.9)	(151.0± 6.2)*	(141.4± 7.2)*	(122.5± 5.6)*
6	141.5± 9.6	138.5± 8.2	131.9± 7.6*	122.6± 8.6*	107.2± 8.1*
	(174.9± 9.1)	(171.3± 9.1)	(162.2±10.2)*	(151.3±11.4)*	(132.1± 8.6)*
8	153.8± 9.5	150.7± 8.1	143.5± 9.1*	135.0± 9.5*	117.8± 9.7*
	(190.1± 8.8)	(186.5± 9.3)	(176.5±12.1)*	(166.4±12.8)*	(145.1±10.0)*
10	159.2± 9.2	156.6± 8.3	149.2± 8.5*	141.1± 8.5*	122.5± 9.7*
	(196.9± 8.7)	(193.7± 9.6)	(183.6±11.3)*	(174.1±11.6)*	(150.9±10.1)*
12	168.2± 9.0	165.1± 8.7	158.5± 8.4*	149.5± 8.2*	130.4± 9.7*
	(207.8± 8.6)	(204.3±10.0)	(194.9±11.0)*	(184.3±11.6)*	(160.7±10.1)*
14	174.7± 9.8	171.3± 8.9	165.0± 9.1*	154.7± 8.4*	134.4± 9.8*
	(216.0± 9.9)	(211.9±10.8)	(202.9±11.6)*	(190.8±12.0)*	(165.7±10.7)*
18	185.9±11.6	182.3±10.0	175.0± 9.2*	165.2± 8.9*	140.8± 8.6*
	(229.8±11.4)	(225.5±11.8)	(215.3±11.3)*	(203.8±12.4)*	(173.5± 9.6)*
22	193.4±11.9	189.4±10.6	181.1± 8.4*	171.8± 9.4*	143.0± 8.1*
	(239.1±12.7)	(234.4±12.9)	(222.7±10.3)*	(211.9±11.9)*	(176.3± 8.5)*
26	203.4±12.1	198.5±11.1	189.5± 9.5*	178.6± 8.5*	146.5± 8.1*
	(251.4±12.1)	(245.6±13.5)	(233.1±11.5)*	(220.3±11.3)*	(180.7± 9.0)*
30	209.5±12.5	203.8±11.3	195.2±10.2*	184.2± 8.1*	149.2± 8.2*
	(259.0±12.9)	(252.2±15.2)	(240.1±12.1)*	(227.1±10.9)*	(183.9± 9.1)*
34	214.0±13.5	207.0±11.8*	197.3±10.8*	185.3± 9.3*	149.3± 8.1*
	(264.6±14.2)	(256.3±15.9)*	(242.7±13.0)*	(228.5±12.5)*	(184.1± 8.8)*
38	219.8±14.3	212.7±18.6	202.3±12.0*	189.4±10.0*	151.3± 8.2*
	(271.8±15.7)	(263.4±23.4)	(248.8±14.5)*	(233.6±13.0)*	(186.6± 9.1)*
42	225.4±15.1	218.6±15.3	205.8±12.4*	192.3±10.6*	153.9± 7.9*
	(278.7±16.1)	(270.5±19.7)	(253.2±15.1)*	(237.1±14.0)*	(189.8± 8.5)*
46	229.9±15.8	223.7±14.5	210.3±12.7*	195.7±10.0*	157.2± 8.7*
	(284.2±17.1)	(276.8±18.4)	(258.7±15.6)*	(241.4±13.5)*	(193.8± 9.2)*
50	234.8±16.4	226.4±15.8*	213.2±13.1*	199.6±11.0*	160.1± 8.9*
	(290.4±18.0)	(280.3±20.8)*	(261.7±15.9)*	(246.1±14.6)*	(197.3±10.3)*
54	240.6±16.9	230.7±17.8*	219.9±15.6*	201.7±11.1*	161.2± 9.1*
	(297.5±18.2)	(285.5±23.2)*	(269.9±19.0)*	(248.7±14.3)*	(198.7± 9.7)*
58	242.1±19.2	232.1±18.1*	223.0±22.6*	203.4±11.0*	163.8± 9.0*
	(299.3±21.5)	(287.4±23.9)*	(273.9±27.9)*	(250.7±14.5)*	(201.9± 9.8)*
62	243.4±28.2	235.7±18.9	223.3±17.0*	204.0±12.1*	163.8± 9.8*
	(301.1±31.4)	(291.9±25.6)	(273.9±19.1)*	(251.3±15.9)*	(201.9±10.7)*
66	257.6±23.6	245.1±20.5*	231.3±19.3*	209.5±13.4*	169.1±10.3*
	(319.0±27.8)	(303.5±27.8)*	(283.8±22.8)*	(258.1±17.5)*	(208.4±11.0)*
70	265.8±26.5	250.5±21.1*	236.8±21.3*	212.8±14.0*	170.5±13.3*
	(329.2±31.9)	(310.1±28.2)*	(290.2±25.7)*	(262.1±18.6)*	(210.1±14.4)*
74	270.3±30.6	256.8±21.7*	245.4±19.6*	218.2±14.9*	170.5±10.0*
	(334.8±36.7)	(317.9±28.9)	(301.0±24.1)*	(269.2±19.8)*	(210.3±11.2)*
78	285.1±26.8	265.9±22.2*	254.6±20.7*	223.9±17.0*	172.2±10.7*
	(353.0±33.1)	(329.3±30.0)*	(312.2±25.1)*	(276.1±22.5)*	(212.3±11.5)*
82	295.0±27.8	272.5±23.1*	263.0±22.7*	231.2±17.9*	173.7±10.6*
	(365.3±34.2)	(337.4±31.0)*	(322.4±27.3)*	(285.0±23.2)*	(214.2±12.1)*
86	300.8±30.6	279.0±22.5*	268.4±22.2*	233.6±18.6*	173.2±11.4*
	(372.3±37.2)	(345.4±30.1)*	(329.2±27.5)*	(288.2±24.6)*	(213.7±12.7)*
90	305.3±32.4	280.9±22.5*	273.8±22.0*	238.7±17.8*	174.1±12.3*
	(378.3±39.2)	(347.8±30.5)*	(334.9±27.6)*	(294.4±23.2)*	(214.8±13.7)*
94	308.1±33.8	283.5±22.7*	274.0±29.2*	240.9±18.8*	175.4±11.4*
	(381.4±40.0)	(351.0±31.2)*	(335.0±35.5)*	(297.2±24.8)*	(216.5±12.6)*
98	304.2±39.1	280.2±29.7*	277.8±18.9*	241.6±15.4*	174.5±11.6*
	(376.4±46.1)	(346.9±39.3)*	(339.8±25.9)*	(298.0±21.3)*	(215.3±12.8)*
102	299.5±43.2	284.1±23.3	273.8±20.1*	240.6±15.0*	183.3±28.5*
	(370.0±51.2)	(351.6±31.9)	(335.0±27.3)*	(297.3±21.4)*	(225.8±34.5)*

1) mean±SD(g) 2) mean of growth rates±SD

* siqnificantly different from control, $p<0.05$

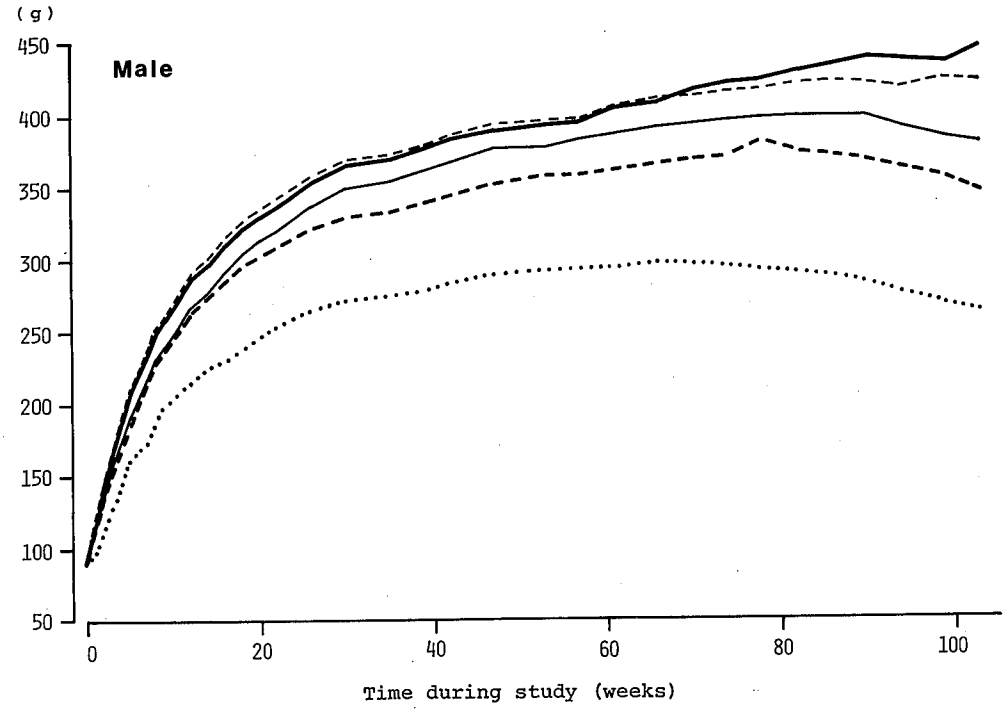


Fig. 1. Body Weight Changes of Male Rats Fed TBZ for 104 Weeks
(—) 0 %, (···)0.05%, (—)0.1%, (--)0.2%, (····)0.4%

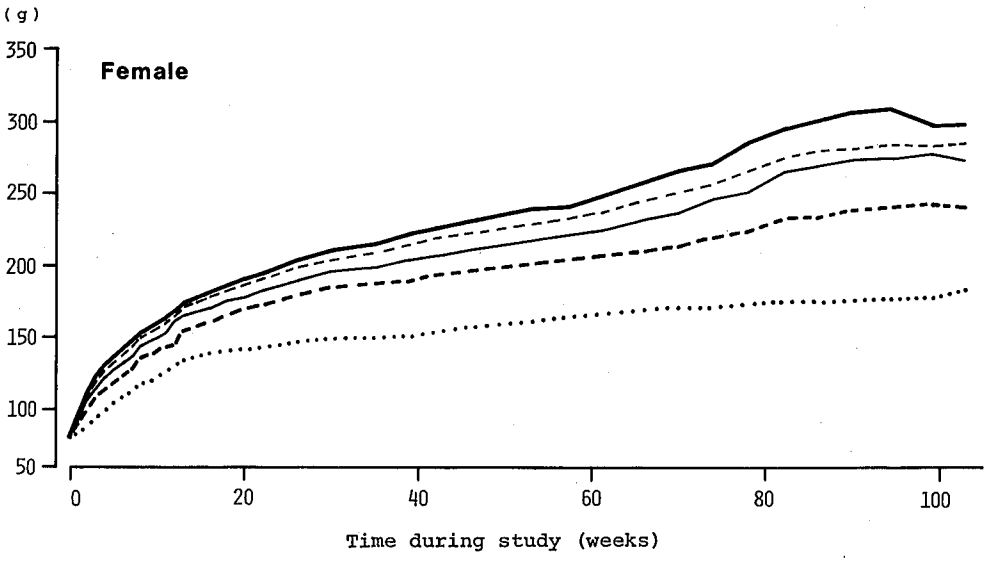


Fig. 2. Body Weight Changes of Female Rats Fed TBZ for 104 Weeks
(—) 0 %, (···)0.05%, (—)0.1%, (--)0.2%, (····)0.4%

Table 3. Food Intake of Male Rats Fed TBZ for 104 Weeks

Week on study	Dietary level of TBZ (%)				
	0	0.05	0.1	0.2	0.4
0	9.6± 0.8[1]	9.5± 0.6	8.5± 0.7*	7.0± 0.5*	3.5± 0.7*
	(106.5± 8.2)[2]	(105.9± 7.0)	(96.0± 8.3)*	(76.9± 4.9)*	(38.0± 9.0)*
1	11.5± 1.0	11.6± 0.5	11.4± 1.2	11.0± 0.7	8.7± 1.0*
	(97.6± 8.8)	(99.3± 3.9)	(97.5± 5.6)	(97.1± 6.4)	(88.6±11.4)
2	12.9± 1.3	12.4± 0.9	13.0± 1.5	12.3± 1.4	10.3± 0.8*
	(90.9± 5.9)	(88.7± 4.8)	(91.1± 3.6)	(90.0± 5.8)	(91.2± 6.1)
3	12.3± 2.1	11.9± 0.9	12.4± 2.1	11.9± 1.3	10.1± 1.3*
	(73.9± 7.3)	(74.0± 3.5)	(76.1± 7.3)	(75.7± 5.2)	(78.4± 7.0)
4	13.2± 2.0	13.2± 1.1	13.2± 1.9	13.1± 1.2	11.0± 1.2*
	(70.7± 3.1)	(73.0± 3.9)	(72.1± 5.4)	(73.9± 6.0)	(76.2± 7.8)
6	12.9± 1.8	13.2± 1.2	13.2± 1.2	12.9± 1.3	11.5± 1.5
	(58.8± 3.7)	(61.6± 2.1)	(61.5± 4.0)	(61.9± 5.1)	(66.2± 3.4)*
9	14.2± 1.4	14.4± 0.6	14.1± 1.0	14.0± 1.0	12.6± 1.0*
	(55.9± 4.9)	(56.6± 2.1)	(55.7± 2.0)	(57.5± 2.5)	(61.8± 3.1)*
11	14.8± 1.6	14.7± 0.7	14.4± 1.0	14.2± 1.0	13.2± 0.9*
	(54.3± 4.1)	(53.5± 2.8)	(53.0± 4.3)	(54.6± 3.5)	(60.7± 3.1)*
14	14.0± 1.3	14.1± 0.6	13.8± 1.1	13.4± 0.9	12.4± 0.9*
	(47.5± 3.1)	(47.3± 2.5)	(46.8± 3.7)	(47.8± 3.2)	(53.1± 2.3)*
18	14.6± 1.3	14.8± 1.0	14.8± 1.0	14.2± 1.0	13.4± 0.8*
	(45.4± 2.7)	(45.8± 2.7)	(46.1± 3.1)	(46.9± 2.9)	(53.6± 2.4)*
22	15.3± 1.1	15.4± 0.6	14.8± 1.5	15.0± 1.0	13.7± 0.6*
	(45.3± 2.2)	(45.0± 2.1)	(43.7± 2.8)	(47.5± 2.2)*	(52.7± 1.2)*
26	14.8± 1.4	14.1± 0.8	15.1± 1.2	14.5± 1.0	13.3± 0.7*
	(41.5± 4.1)	(39.6± 1.9)	(42.3± 2.0)	(44.2± 1.9)*	(49.3± 2.5)*
30	15.3± 0.7	15.4± 0.6	14.8± 0.9	14.9± 0.9	13.7± 0.5*
	(41.6± 2.2)	(41.8± 1.9)	(40.4± 2.1)	(44.3± 3.3)*	(49.5± 1.8)*
35	15.0± 1.2	14.6± 0.8	14.3± 0.9	14.3± 1.1	13.6± 1.0*
	(39.7± 2.1)	(38.8± 1.3)	(38.6± 1.3)	(41.8± 2.5)	(48.0± 1.9)*
39	15.3± 0.8	15.5± 0.8	15.1± 1.0	14.3± 1.4	14.1± 0.8*
	(39.6± 2.2)	(40.5± 2.3)	(39.6± 1.8)	(40.9± 2.4)	(49.6± 1.9)*
42	15.0± 1.0	15.3± 0.4	14.9± 0.8	14.8± 1.3	13.8± 0.7*
	(38.5± 2.2)	(39.2± 1.4)	(38.6± 1.9)	(41.7± 2.4)*	(47.5± 1.1)*
47	16.0± 0.6	15.5± 0.5	16.2± 0.9	16.0± 0.7	14.8± 0.4*
	(40.2± 2.6)	(38.8± 1.5)	(40.9± 1.8)	(44.2± 1.6)*	(50.5± 3.0)*
53	15.5± 0.9	15.5± 0.7	15.4± 0.8	14.6± 2.2	14.4± 0.5*
	(38.4± 3.6)	(38.6± 1.9)	(39.3± 2.2)	(40.0± 6.1)	(48.4± 1.9)*
57	15.5± 1.5	15.2± 0.8	15.7± 0.8	15.4± 1.2	14.1± 0.6*
	(38.4± 3.7)	(37.8± 2.1)	(39.0± 1.9)	(41.9± 1.8)*	(48.0± 3.5)*
66	16.7± 1.6	16.8± 1.4	16.9± 0.9	16.4± 1.1	14.9± 0.8*
	(40.1± 2.5)	(40.8± 4.6)	(41.1± 1.7)	(43.7± 2.7)*	(49.6± 2.0)*
70	16.9± 1.4	16.1± 0.6	15.8± 0.7*	15.8± 0.8*	14.1± 0.6*
	(40.3± 4.1)	(38.8± 1.7)	(38.2± 2.2)	(41.9± 2.2)	(46.8± 2.4)*
74	15.7± 4.4	16.1± 1.7	16.5± 1.2	15.7± 0.9	14.0± 1.9
	(36.8±10.6)	(38.7± 3.8)	(39.5± 2.2)	(41.2± 2.1)	(46.8± 6.2)*
78	16.8± 1.4	15.2± 0.8*	16.4± 1.4	15.8± 1.1	14.3± 0.6*
	(39.4± 4.1)	(36.3± 2.0)	(39.3± 2.4)	(41.6± 1.8)	(48.5± 1.7)*
82	16.9± 0.9	15.8± 0.5*	16.0± 1.1	15.6± 1.2*	14.0± 0.7*
	(39.5± 4.2)	(37.6± 1.4)	(38.3± 1.2)	(40.6± 2.5)	(48.4± 3.4)*
86	16.4± 1.3	15.1± 1.8	15.6± 1.0	14.9± 1.4*	13.5± 0.7*
	(37.9± 4.8)	(35.6± 4.0)	(37.4± 2.1)	(39.1± 2.6)	(46.6± 2.7)*
90	14.9± 3.8	14.2± 2.3	15.0± 1.1	13.9± 1.5	12.5± 2.2
	(33.6± 8.6)	(33.1± 6.1)	(35.9± 1.7)	(36.8± 2.8)	(44.0± 8.6)*
94	16.3± 5.7	15.1± 0.8	15.6± 1.5	13.9± 1.6	13.3± 0.9
	(35.7±12.0)	(36.0± 2.2)	(37.9± 4.4)	(37.5± 2.3)	(48.0± 4.4)*
99	18.4± 3.5	16.5± 1.4	15.5± 1.6	15.2± 1.7*	14.2± 1.0*
	(40.3±10.2)	(39.0± 3.0)	(38.7± 4.1)	(41.6± 2.4)	(52.7± 5.2)*

1) mean±SD(g/rat/day) 2) mean±SD (g/kg body weight/day)

* Significantly different from control, $p<0.05$

Table 4. Food Intake of Female Rats Fed TBZ for 104 Weeks

Week on study	Dietary level of TBZ (%)				
	0	0.05	0.1	0.2	0.4
0	7.9± 0.5[1]	7.5± 0.9	7.0± 0.7*	4.7± 0.6*	2.2± 0.7*
	(97.3± 6.4)[2]	(94.4±12.4)	(86.9± 8.1)*	(58.0± 6.4)*	(26.6± 8.9)*
1	9.5± 0.8	9.5± 0.6	9.4± 0.7	8.5± 0.5*	6.9± 1.1*
	(95.7± 8.4)	(99.7± 6.8)	(97.9± 7.3)	(92.9± 5.6)	(83.9±12.8)*
2	10.3± 0.8	10.0± 0.8	10.1± 0.6	9.1± 0.7*	7.8± 0.7*
	(91.6± 6.0)	(92.8± 7.8)	(93.9± 5.9)	(90.8± 7.4)	(87.6± 6.8)
3	8.9± 1.1	8.4± 0.9	8.8± 0.8	7.9± 0.9*	6.6± 0.8*
	(72.9± 6.1)	(70.8± 7.9)	(75.6± 7.6)	(73.0± 6.8)	(70.2± 6.1)
4	9.9± 0.9	9.7± 0.7	9.6± 0.9	8.4± 0.9*	7.3± 0.7*
	(75.5± 5.0)	(77.3± 3.9)	(77.0± 6.6)	(74.1± 7.0)	(75.0± 3.7)
6	8.7± 1.3	8.9± 1.1	8.5± 1.1	7.5± 1.3	6.6± 0.8*
	(61.4± 7.0)	(65.7± 5.3)	(64.4± 7.1)	(62.5± 8.5)	(64.0± 4.2)
9	9.4± 0.9	9.5± 0.9	9.4± 0.9	8.5± 1.0*	7.5± 0.8*
	(59.8± 4.5)	(62.6± 4.0)	(64.3± 5.8)	(62.9± 4.9)	(64.3± 2.7)*
11	9.4± 0.7	9.6± 0.7	9.4± 0.8	8.8± 0.6	7.6± 0.8*
	(56.9± 2.8)	(60.3± 3.5)*	(61.0± 4.4)*	(61.8± 2.7)*	(62.0± 4.5)*
14	9.5± 1.0	9.8± 0.9	9.3± 0.5	8.6± 1.0	7.9± 0.9*
	(54.1± 4.0)	(57.7± 3.8)	(56.6± 1.8)	(56.4± 4.6)	(60.0± 6.2)*
18	10.2± 1.0	10.0± 0.8	9.4± 0.7	9.2± 0.7*	8.1± 0.7*
	(54.4± 3.9)	(55.6± 2.9)	(54.6± 4.2)	(56.7± 2.9)	(57.3± 4.0)
22	10.3± 0.7	10.4± 1.0	9.7± 0.8	9.6± 0.8	8.0± 0.7*
	(52.3± 3.3)	(55.4± 4.6)	(53.6± 3.3)	(57.1± 3.6)	(54.9± 4.4)
26	10.4± 1.1	9.8± 0.8	9.7± 0.7	9.3± 0.6*	7.8± 0.8*
	(50.6± 4.8)	(49.3± 3.2)	(51.3± 3.5)	(53.1± 2.0)	(52.6± 4.4)
30	10.4± 0.6	10.9± 0.6	10.3± 0.7	10.5± 0.5	8.9± 0.8*
	(48.6± 2.3)	(53.3± 2.9)*	(52.5± 3.1)*	(58.2± 2.4)*	(59.2± 2.8)*
35	10.6± 0.9	10.7± 0.6	10.0± 0.7	10.3± 1.0	8.4± 0.7*
	(48.2± 3.6)	(51.3± 2.8)*	(50.7± 2.7)	(56.1± 4.6)*	(55.3± 3.0)*
39	11.4± 0.7	11.2± 1.1	11.2± 0.8*	10.9± 1.0*	9.3± 0.7*
	(50.4± 3.9)	(51.6± 4.2)	(55.1± 3.6)*	(58.1± 4.3)*	(60.9± 4.1)*
42	11.3± 0.8	11.0± 1.0	10.7± 0.7	11.0± 1.3	8.8± 0.7*
	(48.8± 3.7)	(49.7± 3.5)	(51.8± 2.9)	(57.5± 4.9)*	(56.1± 3.6)*
47	11.7± 1.1	12.0± 0.9	11.2± 0.4	11.5± 1.3	9.6± 0.6*
	(49.4± 4.7)	(53.3± 2.9)*	(53.4± 3.1)*	(59.2± 5.1)*	(59.8± 3.1)*
53	11.7± 0.9	11.3± 0.8	11.4± 0.7	10.5± 0.8*	9.7± 0.9*
	(47.6± 3.0)	(48.5± 3.3)	(53.0± 3.9)*	(52.9± 4.2)*	(59.8± 4.6)*
57	11.4± 1.4	11.5± 0.9	10.9± 0.9	10.9± 0.7	9.4± 0.7*
	(45.9± 5.5)	(49.1± 2.9)	(50.9± 2.4)*	(54.2± 3.1)*	(56.6± 5.2)*
66	13.1± 1.4	12.8± 1.1	12.0± 1.2	11.3± 0.9*	10.1± 0.5*
	(49.4± 4.0)	(50.7± 3.9)	(53.1± 3.5)	(54.7± 3.6)*	(58.5± 2.4)*
70	12.2± 1.4	11.6± 1.1	12.1± 1.4	11.0± 0.9*	9.4± 0.7*
	(44.5± 5.2)	(44.9± 3.3)	(52.2± 3.7)*	(52.5± 3.1)*	(54.9± 4.1)*
74	12.7± 3.1	12.6± 0.9	12.1± 1.5	12.1± 3.1	10.3± 1.0
	(45.0±11.2)	(47.9± 3.8)	(50.1± 4.4)	(56.4±13.8)	(59.8± 5.2)*
78	11.8± 3.9	11.8± 1.0	11.8± 1.4	11.4± 1.0	9.9± 0.8
	(39.5±12.5)	(43.2± 4.1)	(47.8± 4.1)	(52.3± 3.9)*	(56.7± 3.2)*
82	12.9± 1.1	12.7± 1.2	11.9± 1.5	11.8± 0.7*	10.4± 0.7*
	(42.1± 4.0)	(45.5± 3.5)	(46.7± 4.1)*	(52.3± 2.9)	(59.0± 3.8)*
86	13.4± 1.1	12.6± 1.0	12.0± 1.3*	11.2± 2.0*	10.6± 0.6*
	(42.9± 2.6)	(44.0± 2.4)	(45.6± 3.8)	(48.7± 8.8)	(57.0± 3.4)*
90	12.1± 3.1	12.5± 1.6	11.4± 1.0	11.5± 0.5	9.5± 0.9*
	(38.2± 9.5)	(43.0± 5.4)	(42.8± 2.8)	(48.7± 2.4)*	(54.2± 5.5)*
94	12.9± 1.3	12.3± 1.4	12.5± 1.1	11.1± 1.0*	10.1± 1.1*
	(40.5± 2.8)	(42.3± 4.1)	(48.4± 8.2)*	(46.4± 4.4)*	(56.6± 6.0)*
99	12.2± 3.5	12.5± 1.4	12.2± 1.1	11.7± 0.9	10.2± 1.1
	(38.4± 9.6)	(42.9± 4.3)	(44.4± 3.4)	(48.2± 3.1)*	(57.0± 6.1)*

1) mean ±SD (g/rat/day) 2) mean ±SD (g/kg body weight/day)

* Significantly different from control, $p<0.05$

Table 5. Water Intake of Male Rats Fed TBZ for 104 Weeks

Week on study	Dietary level of TBZ (%)				
	0	0.05	0.1	0.2	0.4
0	16.3± 1.2[1]	16.5± 1.7	15.9± 2.5	15.6± 0.8	12.6± 4.5*
	(181.2±14.0)[2]	(184.1±21.4)	(179.0±27.5)	(170.7± 9.1)	(137.6±48.4)*
1	15.7± 1.5	16.0± 0.9	16.8± 2.5	17.6± 1.6*	17.1± 2.4
	(133.1±14.2)	(136.8± 8.6)	(143.4±16.1)	(155.9±12.7)*	(174.7±26.4)*
2	17.1± 1.6	16.6± 0.8	18.0± 2.5	20.2± 3.8*	18.3± 2.4
	(120.2± 8.7)	(119.1± 8.7)	(126.0± 6.7)	(149.1±33.6)*	(161.1±19.8)*
3	16.6± 1.8	17.8± 3.8	17.7± 3.0	18.0± 1.6	17.9± 2.6
	(100.4± 5.4)	(111.7±30.7)	(109.1±11.5)*	(114.4± 9.1)*	(139.1±16.4)*
4	17.6± 2.9	17.5± 2.0	18.4± 3.3	18.7± 1.8	17.3± 2.8
	(94.1± 5.5)	(96.9± 7.0)	(99.6±10.1)	(105.6± 3.2)*	(119.6±13.5)*
6	17.6± 3.5	19.0± 2.7	19.1± 2.5	19.8± 2.1	18.9± 3.3
	(79.5± 8.5)	(88.3± 8.5)*	(88.2± 5.4)*	(95.1± 8.1)*	(108.6± 9.3)*
9	19.5± 2.2	21.1± 2.6	20.6± 2.7	21.7± 2.3*	20.4± 3.4
	(76.7± 5.9)	(83.2±14.6)	(80.9± 7.8)	(89.0± 5.9)*	(99.3± 9.0)*
11	19.7± 2.5	22.3± 4.7	20.9± 2.7	21.3± 2.0	21.6± 3.0
	(72.3± 8.2)	(81.8±21.8)	(76.9± 6.5)	(82.1± 4.7)*	(98.4± 7.0)*
14	20.2± 2.1	21.3± 2.2	20.7± 3.8	21.7± 2.2	23.1± 4.2
	(68.5± 6.9)	(71.9±10.0)	(69.8± 8.1)	(77.5± 6.9)*	(97.2±13.2)*
18	19.3± 1.9	21.5± 2.5*	22.3± 4.4	21.6± 2.0*	23.6± 3.6*
	(59.9± 6.1)	(66.8± 8.7)	(68.6± 8.7)*	(71.4± 6.3)*	(93.8± 9.4)*
22	18.6± 1.2	19.5± 1.6	20.3± 3.2	21.6± 1.9*	22.9± 3.4*
	(55.3± 4.7)	(57.1± 4.4)	(59.6± 5.8)	(68.4± 5.8)*	(88.0± 9.2)*
26	18.6± 1.6	19.9± 3.2	21.6± 3.7*	21.4± 1.8*	22.9± 2.5*
	(52.2± 4.7)	(55.9±10.0)	(60.4± 7.0)*	(65.4± 5.7)*	(84.7± 6.6)*
30	19.3± 1.2	20.9± 2.0*	20.7± 3.1	21.6± 1.5*	24.6± 3.0*
	(52.5± 5.0)	(56.8± 5.9)	(56.2± 5.6)	(64.2± 3.7)*	(89.4± 9.5)*
35	19.4± 2.0	19.5± 1.5	20.4± 2.6	21.6± 1.6*	25.3± 3.5*
	(51.7± 4.8)	(51.9± 3.2)	(54.9± 4.1)	(63.6± 4.9)*	(89.7± 8.9)*
39	17.7± 0.8	21.0± 3.6*	21.5± 4.0*	22.5± 2.7*	25.9± 3.1*
	(46.9± 4.5)	(54.8±10.4)*	(56.3± 7.1)*	(64.5± 5.8)*	(91.2± 9.6)*
42	18.1± 1.6	20.7± 2.3*	21.5± 3.8*	22.8± 2.5*	26.1± 2.8*
	(46.6± 4.3)	(53.1± 6.6)*	(55.3± 6.0)*	(64.4± 5.0)*	(90.1± 8.3)*
47	19.9± 2.5	20.4± 1.8	22.9± 4.2	24.4± 1.7*	27.7± 2.0*
	(49.9± 5.6)	(51.2± 5.3)	(57.6± 8.0)*	(67.7± 4.9)*	(94.5± 7.7)*
53	21.8± 2.5	21.2± 2.4	24.1± 4.1	25.7± 2.0*	31.6± 2.4*
	(54.3± 8.7)	(52.9± 6.6)	(61.6±12.4)	(70.1± 4.1)*	(106.5± 9.0)*
57	22.2± 4.7	22.2± 2.4	24.4± 2.1	28.0± 3.4*	32.1± 3.7*
	(54.8±11.0)	(55.3± 5.4)	(60.9± 5.8)	(76.1± 6.0)*	(108.8±11.1)*
66	23.3± 3.7	24.9± 3.1	28.7± 4.9*	30.8± 3.4*	36.0± 2.5*
	(55.2± 9.1)	(60.4± 8.0)	(69.3± 8.8)*	(82.1± 7.3)*	(119.9± 8.8)*
70	24.8± 3.7	26.0± 3.0	28.6± 4.2*	31.3± 3.6*	36.1± 3.4*
	(59.0± 9.6)	(62.6± 6.8)	(68.7± 7.0)*	(83.0± 7.3)*	(120.6±11.1)*
74	26.3± 6.9	26.4± 4.8	30.3± 4.4	30.8± 4.0	36.7± 5.3*
	(61.8±18.2)	(63.6±12.0)	(72.4± 7.2)	(81.0±10.4)*	(122.5±17.6)*
78	28.3± 8.5	25.7± 2.1	30.0± 7.3	30.4± 5.2	36.1± 6.5*
	(67.0±23.5)	(61.4± 4.9)	(71.5±15.2)	(79.7±13.1)	(122.8±25.7)*
82	29.0±10.0	25.2± 2.1	31.2± 7.1	31.4± 6.4	36.9± 7.5
	(68.1±27.9)	(60.1± 5.6)	(74.3±13.6)	(81.2±15.0)	(128.2±33.7)*
86	28.5±10.0	24.8± 3.3	30.2± 6.0	29.0± 8.2	33.3± 3.6
	(66.8±29.2)	(58.5± 7.4)	(72.0±10.6)	(76.0±20.3)	(115.3±13.6)*
90	28.4± 7.6	24.7± 3.5	30.0± 7.2	32.0± 8.3	34.3± 6.9
	(66.4±24.1)	(57.7± 9.4)	(71.7±15.3)	(84.2±19.7)	(120.5±25.3)*
94	30.0± 8.6	27.4± 3.1	28.5± 4.7	29.7±11.5	34.0± 6.5
	(66.0±16.1)	(65.4± 8.9)	(70.9± 7.8)	(80.5±30.3)	(122.9±24.3)*
99	35.9± 8.5	29.6± 3.5	32.1± 6.9	33.5± 5.9	40.0± 5.9
	(78.2±19.7)	(70.2±11.2)	(80.2±17.0)	(92.4±13.3)	(148.7±23.3)*

1) mean±SD (g/rat/day) 2) mean±SD (g/kg body weight/day)

* Significantly different from control, $p<0.05$

Table 6. Water Intake of Female Rats Fed TBZ for 104 Weeks

Week on study	Dietary level of TBZ (%)				
	0	0.05	0.1	0.2	0.4
0	13.4± 3.3[1]	14.7± 1.7	15.6± 1.2	13.6± 1.7	11.4± 2.1
	(166.2±41.2)[2]	(183.7±22.4)	(192.4±13.0)	(167.5±21.3)	(140.9±27.7)
1	13.5± 1.2	15.0± 1.2*	15.4± 1.3*	14.8± 1.4*	14.6± 3.4*
	(136.1±10.8)	(157.4±11.5)*	(160.3±11.9)*	(162.2±15.0)*	(178.1±39.6)*
2	15.2± 2.7	15.7± 1.8	16.3± 3.3	15.9± 2.4	14.3± 2.0
	(134.9±21.2)	(145.2±16.1)	(150.8±26.7)	(158.6±23.3)*	(162.2±19.3)*
3	13.0± 2.3	14.6± 1.3	15.0± 1.6*	14.0± 2.1	13.5± 2.7
	(106.2±15.5)	(123.0±10.6)*	(128.6±14.3)*	(130.1±17.0)*	(145.5±27.1)*
4	14.8± 2.7	14.6± 2.2	14.3± 2.1	13.9± 3.0	12.9± 2.7
	(112.2±15.0)	(116.6±15.0)	(115.2±15.5)	(122.4±23.6)	(132.3±22.4)*
6	14.8± 2.7	15.6± 2.4	12.7± 2.7	13.4± 3.1	12.9± 2.7
	(104.8±15.4)	(115.5±16.1)	(95.7±18.5)	(110.6±20.0)	(123.5±17.9)*
9	14.9± 2.3	16.1± 2.1	15.8± 2.4	14.8± 3.1	13.3± 2.3
	(94.4±12.7)	(106.6±13.6)	(107.9±12.4)*	(109.1±17.3)*	(113.6±14.0)*
11	15.5± 1.6	16.6± 1.8	16.2± 2.5	15.5± 2.9	15.1± 2.8
	(94.3± 9.2)	(104.1±12.0)	(104.7±13.5)	(108.6±21.1)	(122.6±20.5)*
14	16.3± 2.8	17.0± 2.0	18.4± 2.3	17.2± 3.6	15.7± 1.8
	(92.6±14.6)	(100.7±12.8)	(111.8±10.1)*	(112.4±21.5)*	(119.1±14.1)*
18	17.0± 3.6	18.2± 3.7	18.5± 3.2	17.9± 1.6	17.6± 2.3
	(90.7±18.4)	(101.1±20.0)	(106.5±18.3)	(110.2± 8.1)*	(124.2±12.5)*
22	15.4± 1.7	17.6± 2.2*	16.9± 1.7	17.8± 2.0*	16.7± 1.4
	(78.6± 9.4)	(93.9±11.2)*	(93.3± 8.7)*	(105.2± 9.1)*	(115.1± 6.6)*
26	15.1± 2.5	16.5± 2.2	18.3± 2.2*	18.7± 1.6*	17.5± 3.0
	(73.6±11.4)	(83.6±11.5)	(96.9±11.7)*	(106.1± 7.8)*	(117.7±18.5)*
30	16.2± 2.5	17.8± 2.9	17.8± 1.4	20.1± 2.0*	19.3± 1.7*
	(75.7±10.8)	(87.3±14.4)	(90.9± 7.7)*	(110.7±10.5)*	(128.6± 7.4)*
35	16.6± 2.7	17.0± 2.9	17.7± 2.3	21.1± 3.3*	18.2± 2.8
	(75.6±12.6)	(81.6±14.0)	(89.1± 9.1)*	(114.9±16.2)*	(119.8±14.9)*
39	17.7± 2.2	17.4± 2.9	19.2± 3.3	19.1± 2.9	19.9± 3.3
	(78.2±10.3)	(80.3±14.5)	(94.2±16.2)*	(101.9±18.6)*	(131.4±22.7)*
42	16.8± 3.7	17.3± 3.1	17.7± 2.4	19.7± 4.3	19.7± 2.5
	(72.9±17.1)	(78.1±14.3)	(85.7±10.4)	(103.5±22.6)*	(126.4±14.3)*
47	16.9± 1.7	18.6± 2.4	18.9± 1.9*	22.2± 4.6*	22.8± 1.8*
	(71.2± 6.4)	(82.4±10.9)*	(89.9± 8.3)*	(113.5±20.2)*	(142.7± 7.9)*
53	16.8± 2.2	17.6± 2.2	20.2± 2.4*	22.5± 2.2*	25.4± 3.4*
	(68.5± 8.2)	(75.7±10.0)	(93.9± 9.5)*	(113.3±10.9)*	(156.4±18.2)*
57	17.2± 2.2	17.9± 2.1	21.0± 2.8*	23.4± 2.9*	26.3± 2.5*
	(69.6±10.0)	(76.2± 9.3)	(97.3±10.0)*	(116.6±13.7)*	(158.3±10.7)*
66	22.8± 4.7	22.2± 5.5	25.9± 6.4	22.2± 3.0	21.1± 4.1
	(85.9±16.9)	(88.3±21.3)	(114.8±27.1)*	(108.0±14.5)*	(123.1±27.4)*
70	18.8± 1.6	19.6± 2.2	21.8± 2.7*	25.3± 3.0*	28.2± 4.6*
	(68.5± 6.3)	(76.1± 9.4)	(96.0± 9.8)*	(121.4±12.7)*	(165.1±25.0)*
74	20.2± 2.1	20.8± 1.7	24.6± 6.7	26.2± 2.5*	28.8± 3.0*
	(71.2± 6.8)	(79.0± 6.4)*	(101.4±20.3)*	(122.5± 9.8)*	(167.1±18.1)*
78	20.0± 2.0	20.5± 2.3	23.3± 6.4	26.1± 3.3	26.9± 3.8
	(66.9± 6.1)	(75.5±11.1)	(93.8±22.9)*	(119.2±13.2)*	(154.5±21.8)*
82	19.1± 2.7	20.7± 3.3	24.4± 7.7	26.6± 3.0*	28.5± 4.6*
	(62.5± 9.2)	(74.0±12.5)*	(95.0±26.1)*	(117.6±10.8)*	(161.0±23.4)*
86	25.3± 7.1	21.7± 4.5	23.8± 5.7	25.2± 4.9	24.9± 4.5
	(81.6±25.1)	(75.7±14.5)	(91.9±26.0)	(109.9±22.0)*	(142.3±29.3)*
90	19.8± 5.5	21.6± 4.7	23.6± 6.5	25.0± 4.5*	27.7± 3.4*
	(62.7±16.0)	(74.9±16.5)	(88.2±22.0)*	(105.5±17.0)*	(157.4±20.5)*
94	21.2± 5.1	21.5± 4.0	25.1± 5.3	24.9± 5.7	29.2± 3.3*
	(66.3±14.2)	(73.9±12.9)	(97.3±23.7)*	(104.1±21.4)*	(164.3±18.8)*
99	22.3± 9.1	23.0± 4.9	25.7± 6.5	27.9± 5.1	31.4± 6.7*
	(70.0±26.2)	(78.3±15.1)	(93.4±21.9)	(115.2±18.9)*	(178.5±45.9)*

1) mean±SD (g/rat/day) 2) mean±SD (g/kg body weight/day)

* Significantly different from control, $p<0.05$

水量がかなり多い傾向がみられ，TBZの摂取が飲水の必要性を高めているものと考えられる．

5. **TBZ摂取量**：104週間におけるラット当りの総摂取量およびラット体重kg当りの平均1日摂取量は，雄では0.05%群5442mg・21mg/kg B. W./day，0.1%群は10892mg・43mg/kg B.W./day，0.2%群21175mg・90mg/kg B.W./day，0.4%群39180mg・207mg/kg B.W./day，また雌では0.05%群4030mg・26mg/kg B.W./day，0.1%群7766mg・53mg/kg B.W./day，0.2%群15035mg．112mg/kg B.W./day，0.4%群25960mg・237mg/kg B.W./dayであった．なお，TBZ摂取量は飼料摂取量より求めた．

6. **生存率（死亡率）**：Fig. 3に生存率（死亡率）の推移を示した．試験動物の最初の死亡は雌雄ともに0.1%群にみられ，27週目に雄，38週目に雌各1匹が死亡した．対照群では雌雄ともに試験60週に最初の死亡がみられ，以後死亡の増加が目立った．全体的に生存率は雌に比べて雄が低く，投与群に比べて対照群の方が低かった．しかしながら雌雄ともに投与群と対照群との間には，推計学的な有意差は認められなかった．死亡発生の時期，生存率の推移には投与量との相関は認められなかった．各群の最終生存率は，対照群雄63.3%，雌73.3%，0.05%群雄70%，雌93.3%，0.1%群雄80%，雌76.7%，0.2%群雄83.3%，雌90%，0.4%群雄80%，雌93.3%であった．

7. **血液学検査**：Table 7に結果を示した．0.4%群雌雄にRBC，Hb，Htに有意な減少が認められ，MVCの増加がみられた．このことは，0.4%群ラットが貧血の状態にあると考えられる．また，0.2%群雄にも同様の傾向がみられた．これらの変化は亜急性毒性試験結果とも一致する[5]．雌の各群投与ではWBCが減少する傾向がみられた．

8. **血清生化学検査**：Table 8に結果を示した．雌のGOT値にTBZ投与量に相関するとみられる減少が認められ，特に0.2%および0.4%群では対照群と比べ有意に低下していた．また，雌の0.4%，0.2%群ではGPT値も有意に低下し，ALP値も有意ではないが増加していた．以上のような変化から0.4%群の雌での肝障害が予想された．

9. **器官重量**：Table 9，10に絶対重量および体重100g当りの相対重量を示した．雄の肺，雌の卵巣および膀胱では，TBZ投与量の増加にともなって絶対重量，体重比重量がともに大きくなる傾向を示し，膀胱重量は雌の0.1，0.2，0.4%群，雄の0.4%群で対照群と比較して有意の増加を示した．腎臓重量は投与群において絶対重量の減少，相対重量の増加の傾向を示し，0.2および0.4%群では雌雄ともに，この傾向が目立った．これら高濃度投与群では，この他に肝臓，心臓，副腎などの体重比重量が増加した．これら器官重量の変化とTBZの組織毒性との関連については検討中である．

要　旨

1. チアベンダゾール（TBZ）0.4%，0.2%，0.1%，0.05%添加飼料によるF344/DuCrjラット雌雄を用いた104週間投与毒性試験を行なった．

2. 0.4%TBZ投与動物に顕著な体重増加の抑制が認められた．

3. 血液学検査により，0.4%投与群雌雄に有意な赤血

Table 7. Hematological Study of Male and Female Rats Fed TBZ for 104 Weeks

Dietary level of TBZ (%)	No. of rats	RBC ($\times10^6/\mu l$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (μ^3)	MCH ($\mu\mu g$)	MCHC (%)	WBC ($\times10^3/\mu l$)
Male								
0	19	8.17±1.46[1)]	17.0±2.8	42.7±6.4	52.6±3.3	20.9±1.2	39.7±1.4	8.6±3.8
0.05	21	7.87±0.94	16.1±1.9	41.1±4.5	52.3±1.9	20.5±0.7	39.2±1.1	7.6±1.7
0.1	23	7.90±1.17	16.3±2.0	41.4±4.8	52.9±4.5	20.8±1.3	39.3±1.4	8.1±6.0
0.2	25	7.50±0.65	15.5±1.2*	39.7±3.1	53.0±1.5	20.7±0.7	39.1±1.2	7.0±2.0
0.4	24	6.54±0.45*	14.0±0.7*	36.3±1.8*	55.7±2.4*	21.5±1.0	38.5±1.0*	7.0±1.3
Female								
0	20	7.36±0.93	15.9±1.6	40.0±3.2	54.8±5.1	21.7±1.4	39.7±1.3	7.0±5.1
0.05	27	7.83±0.39*	16.5±1.7	41.7±2.1*	53.2±1.4	21.1±2.2	39.6±3.9	5.0±1.5
0.1	21	7.70±0.47	16.2±1.2	40.9±1.8	53.2±2.1	21.1±1.7	39.6±2.9	4.8±1.3
0.2	27	7.25±0.40	15.1±1.6	39.1±2.5	53.9±1.4	20.8±2.0	38.8±4.0	6.7±6.6
0.4	26	6.19±0.53*	13.4±1.0*	34.6±2.6*	56.1±2.3	21.8±0.7	38.8±1.2*	5.6±2.0

1) Mean ± SD

* Significantly different from control, $p<0.05$

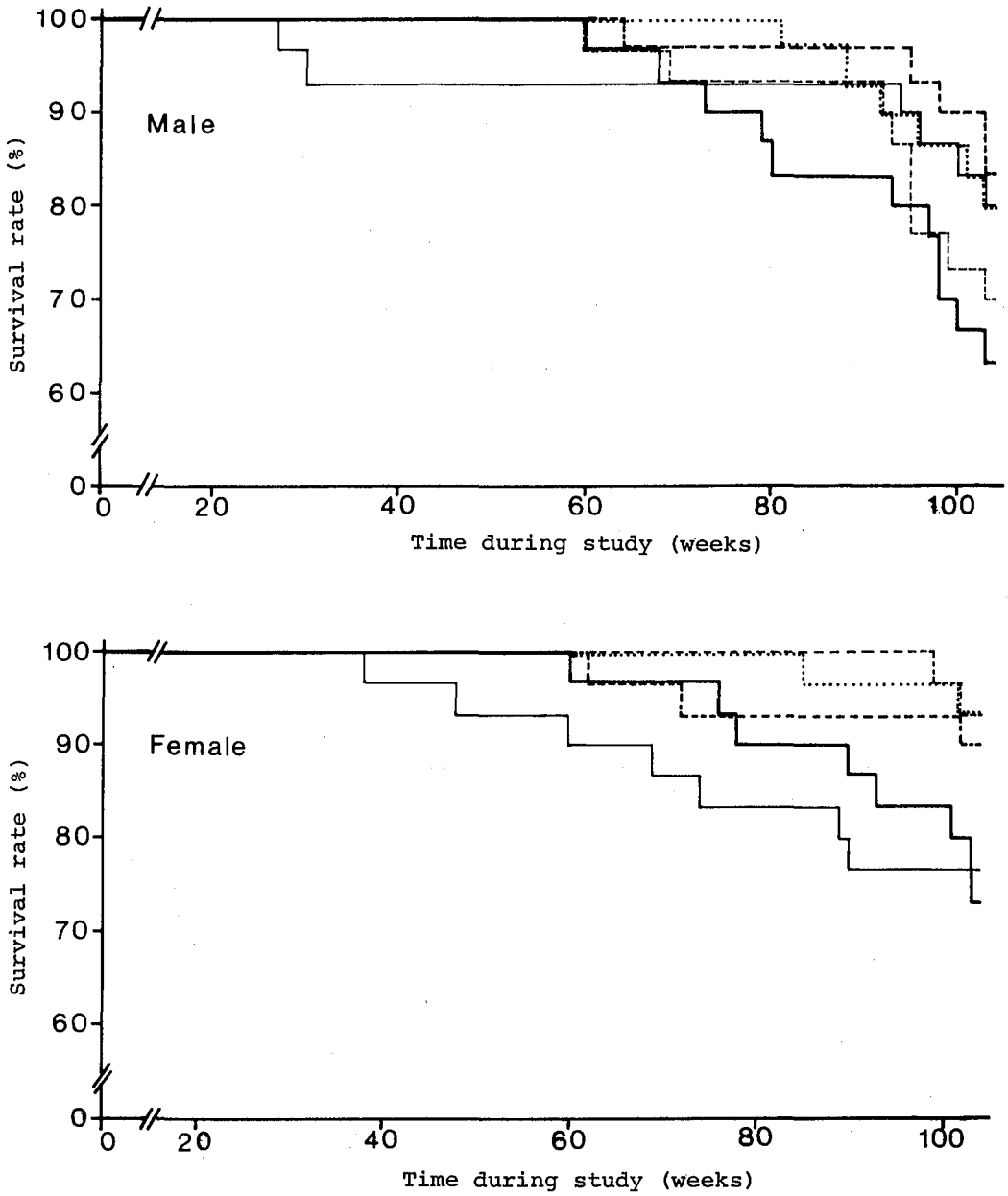


Fig. 3. Survival Curves of Male and Female Rats Fed TBZ for 104 Weeks
(—) 0 %, (···)0.05%, (—)0.1%, (--)0.2%, (····)0.4%

Table 8. Serum Biochemical Study of Male and Female Rats Fed TBZ for 104 Weeks

Dietary level of TBZ(%)	No. of rats	GOT (IU/*l*)	GPT (IU/*l*)	UN (mg/d*l*)	TP (g/d*l*)	ALB (g/d*l*)	ALP (IU/*l*)
Male							
0	20	79.6±24.2[1)]	28.0± 6.8	24.2±6.7	7.27±0.78	3.00±0.41	343.7±115.4
0.05	21	85.1±16.9	29.5± 7.4	23.4±5.3	7.81±1.17	3.27±0.41*	361.3± 86.0
0.1	20	74.9±15.9	28.1± 6.2	23.8±6.8	7.16±0.39	3.07±0.27	378.6± 55.0
0.2	23	99.7±52.6	32.0±17.3	23.1±3.8	7.39±0.93	3.21±0.43	355.8± 66.0
0.4	24	69.5±18.3	25.7± 5.3	24.3±5.7	6.86±0.48*	3.01±0.32	341.8± 55.6
Female							
0	20	151.8±56.2	49.8±17.5	21.5±5.3	8.61±1.27	3.96±0.72	319.7± 94.3
0.05	26	146.8±56.0	59.4±19.6	20.5±3.1	9.01±1.60	4.38±0.79	368.2± 49.0*
0.1	22	129.1±42.4	50.8±16.4	20.1±4.1	8.69±1.36	4.27±0.61	330.0± 47.0
0.2	26	95.2±24.6*	37.5±10.2*	21.9±3.1	8.70±1.43	4.29±0.78	345.9± 49.4
0.4	27	82.0±20.7*	34.0± 7.5*	24.7±2.1*	8.15±0.91	3.96±0.43	360.7± 77.5

1) Mean ± SD
* Significantly different from control, $p<0.05$

Table 9. Organ Weights of Male Rats Fed TBZ for 104 Weeks

TBZ CONC(%)	Brain (mg)	Heart (mg)	Lung (mg)	Liver (g)	Spleen (mg)	Kidney-R (mg)	Kidney-L (mg)
0	2175±55[1)]	1139±86	1276±99	15.27±2.20	1221±319	1435±143	1469±138
	506±77[2)]	267±41	299±40	3.57±0.65	291±68	333±59	341±60
0.05	2168±37	1123±75	1328±68	14.53±1.56	1485±1327	1368±96	1384±95*
	532±45	276±28	327±28*	3.57±0.47	364±331	336±34	340±32
0.10	2159±42	1098±73	1469±712	14.33±2.48	1810±2360	1341±139*	1388±185
	570±31*	290±22*	389±201*	3.79±0.71	485±654	354±40	367±54
0.20	2176±27	1065±88*	1407±244*	13.92±1.76*	1180±738	1355±109*	1372±111*
	626±35*	306±19*	404±71*	4.00±0.51*	340±223	389±28*	394±30*
0.40	2133±50*	1003±65*	1381±141*	13.39±1.41*	821±135*	1356±205	1402±227
	809±47*	380±27*	523±57*	5.10±0.77*	312±58	516±98*	533±105*

TBZ CONC(%)	Adrenal-R (mg)	Adrenal-L (mg)	Testis-R (mg)	Testis-L (mg)	Prostate (mg)	Bladder (mg)
0	30.1±3.7	35.4±5.8	2612±2191	2601±1272	203±66	127±37
	7.0±1.2	8.3±1.7	624±540	635±360	47±17	30±8
0.05	28.8±4.4	32.0±4.4*	2325±1013	2499±1093	208±88	135±37
	7.1±1.0	7.9±1.1	582±258	628±280	50±21	34±9
0.10	28.3±3.1	31.0±3.3*	2402±926	2258±959	196±72	130±26
	7.5±0.8	8.2±0.9	632±241	598±266	52±18	34±6
0.20	27.6±4.9	42.4±53.8	2591±999	2444±975	209±73	125±42
	7.9±1.2*	12.0±14.4	751±296	701±273	60±19*	36±12
0.40	25.9±3.4*	29.4±4.8*	2026±1210	2161±1169	216±102	155±46*
	9.9±1.7*	11.2±2.2*	780±504	809±434	81±38*	59±20*

1) mean±SD 2) mean of relative±SD (/100g body weight)
* Significantly different from control, $p<0.05$

Table 10. Organ Weights of Female Rats Fed TBZ for 104 Weeks

TBZ CONC(%)	Brain (mg)	Heart (mg)	Lung (g)	Liver (mg)	Spleen (mg)	Kidney-R (mg)	Kidney-L (mg)
0	1961±45[1)]	868±58	1013±264	9.74±2.00	1476±2286	1009±161	1011±172
	673±105[2)]	296±44	354±147	3.36±0.62	538±942	346±64	345±63
0.05	1958±37	825±69*	952±194	8.69±0.93*	644±434	896±57*	909±55*
	693±53	291±24	336±63	3.06±0.21*	226±139	316±19*	321±18
0.10	1965±39	827±72*	954±92	9.28±2.65	712±480	922±139	935±150
	721±50	303±21	350±40	3.38±0.84	260±176	338±50	343±52
0.20	1985±39	811±54*	1012±103	9.08±1.25	728±603	909±52*	908±54*
	828±54*	338±24*	423±57*	3.78±0.57*	309±276	379±24*	378±24*
0.40	1950±41	746±65*	980±94	8.60±0.86*	593±73	923±52*	914±57*
	1111±61*	425±42*	560±55*	4.88±0.38*	338±44	526±35*	520±38*

TBZ CONC(%)	Adrenal-R (mg)	Adrenal-L (mg)	Ovary-R (mg)	Ovary-L (mg)	Uterus (mg)	Bladder (mg)
0	30.2±4.0	33.8±4.7	29.0±9.7	29.9±9.9	1186±1562	112±53
	10.5±2.3	11.1±2.6	9.9±3.5	10.3±3.5	393±474	38±18
0.05	28.1±4.0	31.7±5.1	31.2±9.8	34.0±6.7	864±204	126±46
	10.0±1.6	11.2±2.0	10.9±3.0	12.0±2.7	306±74	44±14
0.10	29.2±5.4	32.1±7.0	32.4±7.8	32.6±6.6	838±228	142±51
	10.7±2.0	11.8±2.6	11.8±2.8*	12.0±2.5	308±89	52±20*
0.20	28.6±3.3	31.5±2.8	33.1±6.5	36.2±7.4*	1011±238	132±42
	12.0±1.7*	13.1±1.3*	13.8±2.7*	15.0±2.9*	422±100	55±17*
0.40	27.4±2.2*	30.7±4.1*	39.9±8.6*	40.2±9.9*	1144±462	168±65*
	15.6±1.6*	17.5±3.1*	22.7±5.1*	22.8±5.4*	653±271*	96±37*

1) mean±SD 2) mean of relative±SD (/100g body weight)
* Signifcantly different from control, $p<0.05$

球数の減少が認められ，貧血傾向が示された．

4. 血清生化学検査において，0.2%および0.4%投与群雌雄に GOT，GPT 値の有意な減少がみられた．

5. 器官重量では，0.4%群雌雄に膀胱重量の増加が認められた．

文 献

1) Robivson, H.J., Stoerk, H.C. and Graessle, O.E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 7, 53, 1965
2) 小縣昭夫，安藤 弘，久保喜一，平賀興吾：東京衛研年報，29-2，112，1978
3) Ogata, A., Ando, H., Kubo, Y. and Hiraga, K.: *Fd. Chem. Toxic.*, 22-7, 509, 1984
4) 三栗谷久敏，林田志信，高橋 博，平賀興吾：東京衛研年報，31-2，20，1980
5) 三栗谷久敏，林田志信，高橋 博，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，32-2，5，1981
6) 藤井 孝，福森信隆，長澤明道：東京衛研年報，32-2，16，1981
7) 三栗谷久敏，林田志信，藤井 孝，平賀興吾：東京衛研年報，33，492，1982
8) 三栗谷久敏，藤田 博，神谷信行：東京衛研年報，34，421，1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 390-395, 1985

チアベンダゾール（TBZ）のマウスにおける長期投与優性致死試験

小縣昭夫*, 安藤　弘*, 久保喜一*, 藤井　孝*,
佐々木美枝子*, 平賀興吾**

Dominant Lethal Tests in BDF_1 Mice Fed with Thiabendazole (TBZ) in Diets for 14 Weeks

AKIO OGATA*, HIROSHI ANDO*, YOSHIKAZU KUBO*, TAKASHI FUJII*,
MIEKO SASAKI* and KOGO HIRAGA**

Keywords：チアベンダゾール thiabendazole, 防かび剤 fungicide, マウス mouse, 長期投与 long term administration, 優性致死 dominant lethal

はじめに

先に，われわれは防かび剤チアベンダゾール（TBZ）の優性致死作用を検討するために，オリーブ油に懸濁したTBZの単回大量投与による優性致死試験を行なった．この結果，優性致死誘発の重要な指標となる早期死胚数に有意な増加は認められなかったが，第4週での優性致死誘発率に未受精卵および未着床卵の増加を窺わせるやや高い値が認められ，また同時に検索した精巣の病理組織学的所見では，精細胞の軽度な退行性変性像がみられた[1]．

今回，TBZ添加飼料を長期にわたって摂取させた雄マウスでの優性致死試験を行なったので，その成績を報告する．なお，本法は当部によって開発されたもので，従来の優性致死試験法に較べ，検体の体内での代謝や蓄積性が加味され，さらに検出感度も高められたものである[2-5]．

試験材料ならびに方法

1．試料　チアベンダゾール（TBZ）は，Merck Sharp & Dohme International 社製 Lot No. BZA-539, 純度98.5%を使用した．

2．実験動物　マウスは㈱日本チャールス・リバー社生育の Crj：BDF_1 を使用した．雌雄とも4週齢時に購入，9週齢に達した発育良好な雄に，23週齢まで14週間TBZ添加飼料を摂取させた．摂取開始6週間後，雄と同齢（15週齢）の雌と第1回目の交配を行ない，さらに8週間後，8週齢の雌と第2回目の交配を行なった．

3．飼育条件　動物は温度25±1°，湿度55±5%，照明午前6時～午後6時，換気毎時10回（HEPAフィルター経由）の飼育室にて，雌雄とも試験開始時までアルミケージ（225×325×110mm³，チップ床敷）に10匹飼いとし，日本クレア㈱固型飼料 CE-2 および水道水を自由に摂取させた．雄はTBZ添加飼料摂取開始時より，また雌は交配後，夫々プラスチックケージ（180×305×110 mm³，チップ床敷）にて1匹飼いとした．

4．実験群の設定　TBZ添加量群の設定に関しては，当部，三栗谷ら[6]の報告したTBZ添加飼料による13週間のラット飼育試験の結果を参考にした．すなはち三栗谷らはTBZ0.8%，0.4%，0.2%，0.1%および0.05%の添加飼料を雌雄ラットに摂取させ，体重の増加抑制，血液学的および血清生化学的検査などから0.4%以上を中毒量と推定している．われわれが行なったTBZの臨界期連続投与催奇形性試験によれば，マウスはラットに較べ，TBZ大量投与に耐えられることから，本試験でのTBZ添加量群はラットでの中毒量0.4%を最大量とし，以下0.2%，0.1%，0%（対照）群とした．

5．TBZ添加飼料と投与方法　TBZは日本クレア㈱粉末飼料 CE-2（水分7.8，粗蛋白23.6，粗脂肪4.4，粗繊維4.9，粗灰分6.6，可溶性無窒素物52.7%，344.8Cal/100 g）に夫々0（対照），0.1，0.2および0.4%の割合で添加し，固型化したものを試験飼料とした．雌雄とも飼料，水道水を自由摂取させた．雄には9週齢時より試験終了時まで14週間TBZ添加飼料を与え，雌は全期間を通じ

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都八王子保健所予防課

無添加飼料を与えた．なお交配時雌雄同居期間は雄も無添加飼料を摂取させた．

6．体重および飼料摂取量　TBZ添加飼料を摂取させた雄マウスの体重，飼料摂取量を測定する為，各群5匹の雄をランダムに選別し，5連金網ケージ（1区画145×205×150mm³）にて飼育した．

7．交配方法　雌雄1：1のマウスを4日間同居させ，その間毎朝膣栓の確認を行なった．膣栓の確認されたものを妊娠動物とみなし，その日を妊娠0日とした．膣栓の確認されたマウスはすぐにプラスチックケージに移し，また4日間膣栓の確認されなかった動物についても交配最終日後プラスチックケージにて1匹飼いとし，解剖日に屠殺開腹，妊娠の有無を確かめた．

8．観察方法　妊娠12・13日の母獣を頸椎脱臼により屠殺開腹し，卵巣と子宮を摘出した．卵巣については黄体数を，子宮については着床数，生存胚子数，早・後期死胚数を調べ，常法に[7-9]従い統計処理した．また添加飼料摂取14週間後の交配終了時にランダムに各群5匹の雄マウスを屠殺し，精巣を摘出，重量測定後，中性緩衝ホルマリンにて固定し，病理組織学的検索に供した．組織は固定後定法に従ってパラフィン切片を作製，ヘマトキシリン・エオジン重染色を施し鏡検した．

結果および考察

使用した動物数を表1に示した．

Table 1. Experimental Design

Dietary levels of TBZ %	Number of male mice fed diet cotaining TBZ	Number of male mice used for mating	Number of female mice used for mating lst	2nd
0(Cont.)	27	27	27	27
0.1	26	26	26	26
0.2	26	26[1)]	26	25
0.4	26	26	26	26

1） one male mouse was killed before 2nd mating

Table 2. Body Weights of Male Mice

Days on Study	Dietary levels of TBZ 0%	0.1%	0.2%	0.4%
0	26.1±1.8[1)]	24.9±1.7	23.5±1.2	24.2±1.5
	(100.0±0.0)[2)]	(100.0±0.0)	(100.0±0.0)	(100.0±0.0)
3	25.3±1.2	24.8±1.0	23.5±1.2	23.1±1.7
	(97.0±3.4)	(99.7±3.0)	(99.9±1.9)	(95.3±1.4)
6	25.3±1.5	25.2±1.0	23.5±1.1	23.5±1.4
	(97.2±2.8)	(101.6±3.2)	(100.1±1.7)	(97.0±0.8)
10	25.3±0.9	25.6±1.3	24.1±0.8	23.9±1.3
	(97.4±4.5)	(102.9±3.3)	(102.5±2.7)	(98.6±1.0)
13	25.4±1.0	25.4±0.9	23.9±1.1	23.7±1.1
	(97.5±3.7)	(102.1±4.1)	(102.0±3.4)	(98.0±1.9)
17	25.6±1.0	26.4±1.1	24.7±0.9	23.7±1.5
	(99.8±5.2)	(106.0±3.5)	(105.2±4.3)	(97.9±2.0)
21	26.1±1.0	26.9±0.7	25.4±0.6	24.8±1.4
	(100.5±5.1)	(108.1±4.4)	(108.2±4.3)	(102.2±1.5)
24	26.0±1.1	27.1±1.1	25.2±1.0	24.7±1.6
	(100.2±4.7)	(108.9±3.7)	(107.6±3.6)	(102.1±1.0)
28	26.7±1.0	27.2±1.2	25.7±1.2	25.4±1.5
	(102.5±6.0)	(109.6±4.1)	(109.4±4.1)	(104.7±2.1)
31	27.1±1.1	28.2±1.5	25.9±1.0	25.4±1.1
	(104.0±5.1)	(113.1±4.4)	(110.6±4.6)	(104.9±3.8)
35	27.5±1.1	28.1±1.3	26.4±1.2	25.8±1.4
	(105.6±6.2)	(113.0±4.2)	(112.4±4.1)	(106.4±3.0)
90	35.8±4.4	31.2±2.5	28.0±1.7	27.9±1.8
	(137.0±8.7)	(126.1±16.8)	(119.1±2.3)**	(115.0±3.1)***

1） Body weight (gm)±SD

2） Increasing rate of body weight＝ (B.W./B.W.of day 0 on study)×100 **$p<0.01$ ***$p<0.001$

1. 体重，飼料およびTBZ摂取量

ランダムに選択した各群5匹の雄マウスでの平均体重，飼料摂取量およびTBZ摂取量の経時的変化を表2・3・4に示した．摂取開始より1カ月間の体重では，対照（0％）群と較べ，処置群での増加抑制は認められなかった．しかし摂取開始より3か月後の体重には，用量に伴う処置群での増加抑制がみられ，0.2および0.4群では対照群に較べ，推計学的に有意な抑制であった(表2)．

TBZ添加飼料摂取量では，0.4%群が摂取開始より3日間は対照群に較べ減少したが，その後回復し，以後はいずれの処置群とも対照群に較べ有意な添加飼料摂取量の減少はみられなかった（表3）．

添加飼料摂取量より求めたTBZ摂取量は表4に示すとおりで，1か月間のマウス当りのTBZ総摂取量は，0.1%群146.1mg，0.2%群275.9mg，0.4%群515.1mgとなった．

2. 母体および胎児に係わる所見

(1) 交配率および妊娠率　TBZ添加飼料を摂取させた雄マウスに試験期間中の死亡はみられず，一般状態にも顕著な変化はみられなかった為，総て雌と交配させた．第1回目交配（TBZ添加飼料摂取6週間後）および第2回目交配（摂取14週間後）時，4日間同居での交配率は，夫々0％(対照)群1回目27/27(100%)，2回目27/27 (100%)，0.1%群25/26 (96.2%)，26/26 (100%)，0.2%群25/26 (96.2%)，25/25 (100%)，0.4%群26/26 (100%)，25/26 (96.2%) で，対照群に較べ処置群での有意な低下はみられなかった．

妊娠率では，第1回目対照群25/27 (92.6%) に対し，0.1%21/25 (84%)，0.2%群21/25 (84%)，0.4群18/26 (69.2%) と処置群での低下がみられ，特に0.4%群では対照群に較べ推計学的に有意な低下であった．第2回目では対照群24/27 (88.9%)，0.1%群25/26 (96.2%)，0.2%群22/25(88%)，0.4%群21/25(84%)の値で，0.2%群および0.4%群に低下の傾向が窺えるが，対照群での値も低く推計学的有意差を認めなかった（表5）．

(2) 黄体数，着床数，生存胚子数，死胚数　第1回目および2回目交配の結果共に，黄体(排卵)数，着床数，未着床数，生児数，後期死胚数のいずれも対照群と較べ，処置群での推計学的に有意な増減を認めなかった．しかし1回目交配では，処置群に着床数減少およびそれに伴

Table 3. Food Intakes

Days on Study	Dietary levels of TBZ			
	0%	0.1%	0.2%	0.4%
3	2.37±0.45[1)]	2.45±0.40	2.17±0.19	1.67±0.24
	92.02±23.48[2)]	98.99±19.11	92.40±7.93	69.16±9.96
6	3.42±0.15	4.05±0.13	3.54±0.24	3.41±0.51
	135.01±11.11	163.51±9.14	150.91±4.88	146.97±14.43
10	2.76±1.15	4.59±0.46	4.06±0.28	3.78±0.19
	109.96±47.23	182.28±20.24	172.88±9.59	161.08±5.82
13	4.84±2.29	4.37±0.56	4.46±0.40	3.88±0.28
	193.58±100.17	171.69±28.33	185.17±14.52	162.65±12.39
17	4.09±0.32	4.60±0.21	4.46±0.26	4.10±0.26
	161.43±14.17	181.40±11.50	186.23±9.80	172.62±4.36
21	4.00±0.23	4.46±0.28	4.21±0.31	4.06±0.16
	156.62±9.53	169.72±16.95	170.70±13.13	171.52±8.77
24	3.31±0.29	3.62±0.28	3.57±0.39	3.54±0.24
	126.88±11.23	134.78±10.97	140.73±15.21	143.15±9.21
28	3.93±0.32	4.21±0.30	3.99±0.26	3.92±0.34
	151.60±12.84	155.97±13.10	158.13±6.65	158.45±7.04
31	4.17±0.20	4.62±0.24	4.36±0.16	4.02±0.27
	156.44±5.55	169.13±13.51	169.93±7.40	158.51±5.87
35	4.00±0.38	4.32±0.27	4.26±0.27	3.91±0.23
	147.58±11.27	153.87±14.83	164.11±9.01	154.44±11.82

1) Mean (g/mouse/day)±SD
2) Mean (g/kg/day)±SD

Table 4. Intakes of TBZ

Days on Study	Dietary levels of TBZ		
	0.1%	0.2%	0.4%
3	2.5±0.4[1)]	4.3±0.4	6.7±1.0
	99.0±19.1[2)]	184.8±15.8	276.7±39.8
6	4.0±0.1	7.1±0.5	13.6±2.1
	163.5±9.1	301.8±9.8	587.9±57.7
10	4.6±0.5	8.1±0.6	15.1±0.7
	182.3±20.2	345.8±19.2	644.3±23.3
13	4.4±0.6	8.9±0.8	15.5±1.1
	171.7±28.3	370.3±29.0	650.6±49.5
17	4.6±0.2	8.9±0.5	16.4±1.0
	181.4±11.5	372.5±19.6	690.5±49.5
21	4.5±0.3	8.4±0.6	16.3±0.6
	169.7±16.9	341.4±26.3	686.1±35.1
24	3.6±0.3	7.1±0.8	14.2±0.9
	134.8±11.0	281.5±30.4	572.6±36.9
28	4.2±0.3	8.0±0.5	15.7±1.3
	156.0±13.1	316.2±13.3	633.8±28.2
31	4.6±0.2	8.7±0.3	16.1±1.1
	169.1±13.5	339.9±14.8	634.0±23.5
35	4.3±0.3	8.5±0.5	15.7±0.9
	153.9±14.8	328.2±18.0	617.8±47.3

1) Mean (mg/mouse/day)±SD
2) Mean (mg/kg/day)±SD

Table 5. Effects of TBZ on Dams and Fetuses

	Dietary levels of TBZ	No. of female mice mated	No. of pregnant mice	No. of corpora lutea Mean±SD	No. of implants Mean±SD	No. of preimplants loss Mean±SD	No. of live fetuses Mean±SD	No. of embryo death		Induced dominant lethality (%) #	
								late Mean±SD	early Mean±SD	J	J′
6W	0 %	27	25	10.6±2.7	10.0±3.0	0.7±0.8	9.2±2.8	0.4±0.6	0.4±0.6		
	0.1%	25	21	11.1±1.5	9.3±3.3	1.8±2.5	9.1±3.3	0.1±0.5	0.1±0.3	−5.5	10.3
	0.2%	25	21	11.2±1.4	9.7±2.7	1.5±2.4	9.1±2.8	0.2±0.4	0.3±0.5	−2.4	9.8
	0.4%	26	18*	10.1±1.3	8.5±2.7	1.5±2.5	7.9±2.6	0.4±0.6	0.2±0.4	−0.5	35.4
14W	0 %	27	24	10.7±1.4	9.5±1.6	1.3±1.6	8.9±1.6	0.2±0.4	0.4±0.6		
	0.1%	26	25	10.0±2.1	8.7±2.7	1.4±1.7	8.3±2.6	0.1±0.3	0.3±0.5	−1.7	−0.9
	0.2%	25	22	9.9±1.9	8.9±2.0	1.0±1.1	8.4±2.1	0.2±0.4	0.3±0.6	−0.1	6.2
	0.4%	25	21	9.7±2.1	8.8±2.2	0.9±1.0	8.1±2.3	0.2±0.5	0.4±0.7	0.9	6.2

J = [1−(No. of live fetuses/total implants) ((treatment)/ (No. of live fetuses/total implants) (control)]×100
J′= [1−(No. of live fetuses/No. of mice mated) (treatment)/(No. of live fetuses/No. of mice mated) (control)]×100
$p<0.05$

う未着床数増加の傾向がみられ，2回目交配では，処置群での黄体数に減少傾向がみられた．

優性致死現象の重要な指標となる早期死胚数では，1・2回目の交配結果共に，夫々の対照群に較べ処置群での有意なまた用量に関連した増加はみられなかった．その際，Röhrborn の提示[9]した2式（JおよびJ′（表5注））で優性致死誘発率を求めたところ，1回目交配の0.4%群がJ′式で不妊雌増加に伴う高値（35.4%）を示し

Table 6. Effects of TBZ on Male Mice

Dietary levals of TBZ	No. of male mice	Body weights Mean±SD(g)	Testicular weight(mg) Mean±SD L	R
0 %	5	31.4±5.6	1)126.6±12.5 2)407.1±33.7	132.2±16.2 424.6±39.9
0.1%	5	29.9±1.1	123.4±18.3 412.0±53.5	123.6±16.8 412.7±48.0
0.2%	5	26.0±1.6	109.8±13.7 422.6±50.4	111.0±17.2 427.0±64.0
0.4%	5	26.5±1.2	110.4±18.0 415.8±54.0	113.6±10.6 428.8±31.4

1) absolute 2) relative ; mg/100g body weight

た．その傾向は他の処置群，0.1%群(10.3%)，0.2%群(9.8%)でも窺われたが，2回目交配結果のJ'式では，0.1%群(−0.9%)，0.2%群(6.2%)，0.4%群(6.2%)といずれの処置群も低値であった．

3. 病理組織学的所見

2回目交配終了時，ランダムに選択した各群5匹の雄マウスの精巣を摘出，重量測定後ホルマリン固定し，病理組織学的検索に供した．各群の平均体重および左右平均精巣重量を表6に示した．処置群に，体重増加抑制に伴う左右精巣の絶対重量減の傾向がみられたが，相対重量での減少は認められなかった．

精巣の縦断面の病理組織学的所見では，1回大量投与優性致死試験でみられた精細胞の退行性変性および巨細胞の出現による精巣の萎縮を窺わせる変化[1]は，今回全く認められなかった．

以上，本試験の結果，TBZ添加飼料摂取6週間後交配により，未受精および未着床を考慮した優性致死誘発率が0.4%群で35.4%と高値を示し，また他の処置群においてもやや高い値を示した．今回行なった長期投与優性致死試験では，優性致死誘発の検出感度は高まるが，薬物が精子形成段階のどの時期に作用しているかを推測することはむずかしい．しかしながら先にわれわれが報告した単回大量投与優性致死試験においても，TBZは第4週交配での優性致死誘発率に未受精および未着床の増加を窺わせる結果を得ている．このことはTBZがマウス精子形成段階の比較的早い時期，すなはち精母細胞期に何らかの影響を与えていることが示唆された．

TBZの殺菌および殺寄生虫作用の機序については不明であるが，Davidse[10]らは，同じベンズイミダゾール化合物であるベノミルやメベンダゾール等の殺菌・殺寄生虫作用はおそらく細胞質の微小管に関与しているのであろうと述べている．微小管は細胞分裂の際に形成される紡錘体の主要な構成要素となるばかりでなく，染色体の動原体と結びついて，染色体の移動に必須の構造である．

石舘[11]は，*in vitro* での培養細胞を用いて行なった染色体試験で，TBZが染色体の数的異常を誘発することを報告しており，この所見はTBZが他のベンズイミダゾール化合物と同様に，その作用が微小管に関与していることを示唆する．

精母細胞は，2回の減数分裂を経て精細胞へと移行する．TBZはおそらくこの時期，減数分裂を阻害し，その後の精子形成に何らかの影響（例えば精子数の減少）を与え，今回の優性致死試験でみられた不妊雌増加の一因になっているのではないかと推測された．

今後，問題の時期について改めて，未受精卵増加の有無を検索し，TBZの優性致死誘発作用の有無を確認する．

要　旨

チアベンダゾール（TBZ）を飼料に添加，長期摂取させたマウスに対する優性致死誘発性を検討した，優性致死誘発の重要な指標となる早期死胚数の増加はみられなかったが，妊娠率低下の傾向がみられた．

文　献

1) 小縣昭夫，安藤　弘，久保喜一，藤井　孝，佐々木美枝子，平賀興吾：東京衛研年報，**34**，354，1983
2) 益淵正典，高橋昭夫，吉田誠二，安藤　弘，久保喜一，平賀興吾：日本環境変異原研究会第6回研究発表会要旨集，1977
3) 益淵正典，高橋昭夫，吉田誠二，安藤　弘，久保喜一，平賀興吾：遺伝学雑誌，**52**，456，1977
4) 益淵正典：環境変異原研究，1，30，1978
5) 平賀興吾，小縣昭夫，吉田誠二，安藤　弘，久保喜一，益淵正典：東京衛研年報，31-2，7，1980
6) 三栗谷久敏，林田志信，高橋　博，井口重考，平賀

興吾：東京衛研年報，32-2，5，1981
7) 田島彌太郎，吉田俊秀，賀田恒夫編：化学物質の突然変異検出法，講談社サイエンティフィク，1973
8) 高野喜一，菊池康基，飯島貞二，土川　清：薬物の特殊毒性－1，胎児毒性と遺伝毒性，南江堂，1975
9) Röhrborn, G.：*Chemical Mutagenesis in Mammals and Man*, ed. by Vogel, F. and G. Röhrborn, chapt. 4, 148, 1970 Spring-Verlag, Berlin
10) Davidse L.C. and W. Flach：*J. Cell Biol.* 72, 174, 1977
11) 石舘　基：昭和51年度厚生省がん研究助成金による研究報告集(下), 750, 1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 396-399, 1985

カルベンダゾール（CBZ）の細胞遺伝学的研究

吉田誠二*, 佐々木美枝子*,

Cytogenetic Studies of Carbendazole

SEIJI YOSHIDA* and MIEKO SASAKI*

Keywords：カルベンダゾール Carbendazole, 染色体分析 Chromosome Analysis, チャイニーズハムスター Chinese hamster

緒　言

化学物質の突然変異誘発性を調べる方法としては，細菌から哺乳動物にいたるまで種々の方法が考案され盛んに行われている[1]．

我々は *in vivo* 染色体試験を行っているが，これはラットやマウスなどに被検物質を投与し，その骨髄細胞を調べる方法であり，哺乳動物の系の中では最も繁用されている．この方法が推される理由は投与した被検物質それ自身，もしくはその代謝物の染色体に対する作用を比較的簡単に調べることが出来る点にある．また，変異原のほとんどは遺伝子突然変異を誘発すると同時に染色体異常も誘発することが明らかにされており，このことからも本試験法の有用性は高い．

今回，小縣ら[1-2]によって催奇形性が明らかになったチアベンダゾールと同じくイミダゾール系化合物であるカルベンダゾールの染色体異常誘発性の有無をチャイニーズハムスターを用いて調べた．また，溶媒による染色体異常発現の差異についても検討したので報告する．

材料および方法

1．**試験物質**：Carbendazole（以下CBZと略す）は和光純薬工業社製でLot No.WKJ 7082 のものを用いた．

2．***in vivo* 染色体試験**：本実験に使用したチャイニーズハムスターは当部動物室において繁殖させたものを用いた．ランダム交配により得られた雄チャイニーズハムスターを4週令で母獣より分離し，12週令の時点で以下の実験に供した．CBZをOlive oilもしくはDimethylsulfoxide（以下DMSOと略す）に溶解し種々濃度のCBZ溶液を作成した．投与方法は胃ゾンデによる経口投与とし，投与容量は全て10m*l*/kgとした．なお，陽性対照には既知変異原物質[5,6]であるEthylnitrosourea（以下ENUと略す）を用いた．ENUは生理食塩水で溶解し種々濃度のENU溶液を作成し，10m*l*/kgの投与容量で腹腔内投与を行った．一方，陰性対照はOlive oilもしくはDMSOのみを前述の容量で経口投与を行ったものとした．本実験に用いた動物数はCBZ各濃度群では一群4匹，陽性対照および陰性対照は一群2匹とした．CBZおよびENU投与後24ないし48時間目に各群の動物を放血により屠殺後常法により骨髄細胞を採取し染色体標本を作製した．標本の染色は通常の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．

結果および考察

Olive oilを溶媒として用いたCBZの染色体分析の結果をTable 1に示す．

CBZ 400および200mg/kg投与群の24時間処理において顕著な染色体異常細胞の増加が認められた．誘発された異常細胞はgapおよびbreakを主とする切断型異常とringないしはexchangeなどの交換型異常であった．また，100mg/kg投与群でも染色体異常誘発頻度は上記高濃度投与群の頻度よりも低いが，breakを主とする異常細胞が200細胞中11例見られており CBZによる影響と思われる結果であった．一方，50，25mg/kgおよびOlive oilのみを投与した陰性対照群では染色体異常細胞の増加はいずれの群においても認められなかった．

48時間処理においても24時間処理と同様にCBZ 400および200mg/kg投与群で染色体異常細胞の増加が見られた．しかし，誘発された異常細胞のほとんどが切断型であり24時間処理において観察された交換型異常は一例も見られなかった．また，100mg/kg投与群ではgapを

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakuninchо 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

主とする異常が200細胞中9例見られており，その頻度は低いが24時間処理の同用量と同じくCBZによる影響がうかがわれた．一方，50 および 25mg/kg 投与群の染色体異常誘発頻度は陰性対照群の誘発頻度と同程度であり50mg/kg以下の投与量では染色体異常の誘発は認められなかった．

次にDMSOを溶媒として用いたCBZの染色体分析の結果をTable 2に示す．

CBZ 400および 200mg/kgの投与群の24時間処理において切断型異常を主とする染色体異常細胞の増加が認められた．また，100mg/kg投与群でも異常細胞の頻度が陰性対照群より高く，CBZの作用によるものと思われた．一方，50，25mg/kg投与群およびDMSOのみを投与した陰性対照群ではいずれにおいても染色体異常細胞の増加は認められなかった．

CBZ48時間処理においても24時間処理同様に400および200mg/kg投与群で染色体異常細胞の増加を認めた．誘発された異常のほとんどがgap, breakであるがCBZ400mg/kg投与郡で200細胞中6例，200mg/kg投与郡で3例の倍数体が観察された．一方，50および25mg/kg投与群ではいずれにおいても染色体異常細胞の増加は認められなかった．

Table 1. Frequency of chromosome Aberrations Induced by Carbendazole-Olive Oil

Duration of Treatment (h)	Treatment Dose (mg/kg)	No. of Cells Observed	Total Aberrations	gap		break		Ex.	Ot
				C1	C2	C1	C2		
24	400	200	20	10	0	9	0	0	1[1]
	200	200	20	8	0	10	0	1	1[2]
	100	200	11	4	0	7	0	0	0
	50	200	4	3	0	1	0	0	0
	25	200	2	2	0	0	0	0	0
	0	100	1	1	0	0	0	0	0
48	400	200	20	14	1	5	0	0	1[3]
	200	200	16	9	0	7	0	0	0
	100	200	9	7	0	2	0	0	0
	50	200	5	4	0	1	0	0	0
	25	200	4	4	0	0	0	0	0
	0	100	2	2	0	0	0	0	0

1) Ring 2) Fragment 3) Polyploidy

Table 2. Frequency of Chromosome Aberrations Induced by Carbendazole-DMSO

Duration of Treatment (h)	Treatment Dose (mg/kg)	No. of Cells Observed	Total Aberrations	gap		break		Ex.	Ot
				C1	C2	C1	C2		
24	400	200	20	10	0	8	0	0	2[1,2]
	200	200	18	8	0	8	0	1	2
	100	200	9	8	0	1	0	0	0
	50	200	4	3	0	1	0	0	0
	25	200	4	4	0	0	0	0	0
	0	100	2	1	0	1	0	0	0
48	400	200	24	13	0	8	0	0	6[2]
	200	200	20	6	1	10	0	0	3[2]
	100	200	10	7	0	3	0	0	0
	50	200	4	2	0	2	0	0	0
	25	200	3	3	0	0	0	0	0
	0	100	2	2	0	0	0	0	0

1) Fragment 2) Polyploidy

次に陽性対照として用いたENUの結果をTable 3に示す.

ENU24時間処理における200および100mg/kg投与群で顕著な染色体異常細胞の増加を認めた.とりわけ,200mg/kg投与群における染色体異常細胞は一細胞に一例以上の異常細胞が見られており,ENUの強い作用を示す結果であった.また,48時間処理におけるENUの200mg/kg投与群においても100細胞中に8例の異常細胞が見られており,ENUによる影響と思われる結果であった.

通常,我々の行っている *in vivo* 染色体試験は動物に供試検体を投与し,その骨髄細胞の染色体を調べるというものであり,用いた供試検体の水溶性が大,もしくは検体自身が液体である場合には溶媒に関する問題は少ない.しかし,検体が非水溶性の場合には充分な考慮を必要とする.我々は非水溶性検体の場合には溶媒もしくは懸濁基質としてOlive oil, DMSOおよびPropylene glycol等を用いており,これらの溶媒を使用して経口および腹腔内投与を行う場合には10m*l*/kg以内の投与用量を原則としている.これは上記三種の溶媒自身を投与した場合における被検動物の毒性症状および骨髄細胞に与へる作用,とりわけ細胞の分裂頻度への影響を検討した結果,10m*l*/kgの用量では影響が全く見られない事を確認している.また,これらの溶媒自身による染色体異常誘発頻度も無処理動物の自然異常誘発頻度のバックグランド値1～2%と同程度であり染色体への影響も認められなかった.

今回,カルベンダゾールの染色体異常誘発試験をOlive oilとDMSOの二種の溶媒を用いて行い,いずれの溶媒を用いた場合においても染色体異常細胞の増加が認められ,カルベンダゾールの染色体異常誘発性が明らかになった.また,各用量群における染色体異常誘発頻度はどちらの溶媒を用いた場合にも非常に近以しており溶媒における差異は全く見られなかった.カルベンダゾール24および48時間処理における400ないし200mg/kgの用量で異常細胞の顕著な増加を認めるとともに,誘発された異常細胞の分布はgap, break, exchange等の構造異常および倍数体に代表される数的異常と極めて多岐にわたっていた.

チアベンダゾールとカルベンダゾールはいずれもイミダゾール系化合物であり,小縣らはTBZ[2-4], CBZ[7]の両者に催奇形性誘発を認める実験結果を得ている.また,Delatour[8]もCBZの催奇形性を報告している.しかしながら,我々の行った染色体異常誘発試験では,CBZは本報で示したように染色体異常誘発性が認められたがTBZには*in vitro,in vivo*染色体試験および小核試験[10]等の各試験系において同様の作用は認められなかった.

染色体異常誘発性と催奇形性の関連を考えると,生殖細胞の存在が重要なポイントとなる.この生殖細胞に突然変異が誘発され受精した場合には異常発生の確率も上昇する.また,胎児細胞であっても奇形の一因となり得る.しかし,生体における突然変異の自然修複,受精機会の減少,ならびに受精した場合においても発生の初期に胎児が死滅してしまう場合等があり,突然変異が必ずしも奇形とは結びつかない.また,突然変異の成立がDNAの変化に帰結されるのに対し奇形の発生は胎児もしくは胎児組織の機能変性および酵素活性の阻害等極めて多岐にわたる誘因がある.故に,変異原性を示す物質は催奇形性を誘起する一因にはなりうるが直接の要因と結論することは出来ない.

Table 3. Frequency of Chromosome Aberrations Induced by Ethylnitrosourea

Duration of Treatment (h)	Treatment Dose (mg/kg)	No. of Cells Observed	Total Aberrations	gap		break		
				C1	C2	C1	C2	Ex
24	200	100	31	5	0	26	2	9
	100	150	17	4	0	11	1	2
	50	100	3	3	0	0	0	0
	25	100	4	4	0	0	0	0
	0	100	1	0	1	0	0	0
48	200	100	8	6	0	3	0	0
	100	100	5	2	0	3	0	0
	50	100	1	1	0	0	0	0
	25	100	2	1	0	1	0	0
	0	100	2	2	0	0	0	0

文　献

1) 田島弥太郎, 吉田俊秀, 賀田恒夫：化学物質の突然変異検出法, 講談社, 1973
2) 小縣昭夫, 安藤　弘, 久保喜一, 平賀興吾：東京衛研年報, 29-2, 112, 1978
3) 小縣昭夫, 安藤　弘, 久保喜一, 高橋　博, 平賀興吾：第21回日本先天異常学会抄録集, 1981
4) 小縣昭夫, 安藤　弘, 久保喜一, 平賀興吾：東京衛研年報, 33, 495, 1982
5) Sange, W.G. and Eisen, J.D.：*Mut. Res.*, 34, 415, 1976
6) Cough, D.B. and Hsie, A.W.：*Mut. Res.*, 57, 209, 1978
7) 小縣昭夫：未発表
8) Delatour, P.L.：*Bul. Soc. Scient. ve't Med.*, 76 (2), 147, 1980
9) 吉田誠二, 縄井寿美子, 平賀興吾：東京衛研年報, 30-2, 48, 1979
10) 吉田誠二：未発表

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 400-408, 1985

オルトフェニルフェノール（OPP）によるラット腎尿細管の微細構造変化

福森信隆*, 佐々木美枝子*

Ultrastructural Alterations of the Proximal Tubules induced by *o*-Phenylphenol (OPP) in the Rat Kidney

NOBUTAKA FUKUMORI* and MIEKO SASAKI*

Nephrotoxicity induced by *o*-phenylphenol (OPP) in the proximal tubules of male Jcl:SD rats was observed using transmission electron microscopy ultrastructurally. Animals were administered orally at the dose levels of 0 or 1500 mg/kg/day OPP dissolved in olive oil for 3 days. A group of animals were killed at the 24th hr after the last administration of OPP. The other group of animals were given control diet for additional 7 days after 3-day administration of OPP.

A marked swelling of mitochondria in the cytoplasm of proximal tubules was partly seen accompanying the disruption of cristae and mitochondrial membrane. Moreover, the arrangement of basal intussusception on the side of basement membrane was disturbed. The brush border in the lumen became progressively shorter, and the disappearance of the brush border was often noted. When rats were fed control diet after the administration of OPP, the degenerative changes of tubules were restored owing to the restoration of fine structure. It is suggested that the nephropathy induced by acute oral administration of OPP is a reversible change of the proximal tubules.

Keywords: *o*-phenylphenol, ultrastructural alteration, proximal tubule, rat kidney

緒　言

オルトフェニルフェノール（OPP）は果実，特に柑きつ類の真菌による腐敗を抑制する目的で防ばい剤として使用されている．OPPの腎臓に対する影響は，1952年にHodgeらによるラットへの2%OPPの2年間経口摂取で[1]，また当部で行ったFischer系ラットでの91週間のオルトフェニルフェノールナトリウム(OPP-Na)の4%濃度で腎盂腎炎を認める報告がみられる[2]．一方，近年化学物質，薬剤，代謝産物による中毒性腎症が増加しているがその発症機序は明らかでない場合が多く[3]，生体異物の排泄能を有する腎臓での毒作用の検索は毒性学的意義が大きい．今回，OPPの腎臓への作用を検討する一環として，腎皮質部近位尿細管の微細構造の初期変化を透過型電子顕微鏡を用いて観察したので報告する．

実験方法

動物は6週齢のJcl:SD系雄性ラット（日本クレア）を使用し，飼育用普通飼料（日本クレア，CE-2）で馴化飼育を行った後，体重約300g前後の成熟動物を実験に供した．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1群3匹ずつステンレスケージに収容し，ろ過水道水を自由に摂取させた．投与群は，OPP(東京化成，Lot No. AT01)を日本薬局方オリーブ油(宮沢薬品）に溶解し1500mg/kg量で100g体重当たり1m*l*の割り合いで経口ゾンデを用い3日間の強制投与を行った．対照群は同様な方法でオリーブ油のみを与えた．また回復試験として3日間OPPを与えた後投与を行わ

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

ず，普通飼料（CE-2）で7日間飼育した動物を回復群と設定した．はじめに項背部の皮下注射によりネンブタール麻酔を行った後開腹して，左右の腎動脈の分枝する部の腹大動脈を結紮した．結紮した腹大動脈へ3％パラホルムアルデヒド前固定液（0.1Mリン酸緩衝液，pH7.4）を注入して腎動脈を経て腎臓に至る灌流固定を行った．さらに腎臓を摘出した後浸せき固定を行い，皮質部を細切して電顕用試料とした．一晩，0.1Mリン酸緩衝液で洗浄した後，1％オスミウム酸（0.1Mリン酸緩衝液，pH7.4）で1.5時間の後固定を実施した．固定後，エタノール系列で脱水を充分に行い*n*-ブチルグリシジルエーテルでエタノールを置換しEpon樹脂に包埋した．重合用恒温槽で樹脂を完全に重合させた後，厚さ約1 μm の準超薄切片を作製しトルイジン青で染色を施して光顕的観察を行った．再トリミングをし小片とした後，Porter-Blum MT-1型ミクロトームで超薄切片を作製し酢酸ウラン，クエン酸鉛で二重染色を施して日立HU-12A型透過電子顕微鏡で観察を行った．

実験結果

光顕的所見　連続3日間投与群の腎臓は肉眼的に表面が茶白色を呈し腫大傾向を示した．近位尿細管の上皮細胞は，トルイジン青染色で細胞により濃淡の染色性の差異がみられ，全体に細胞の背高が低い状態であった．さらに尿細管腔が拡張し，管腔内に無構造な蛋白様物質の蓄積が認められた．刷子縁側は短小化し欠損する部がみられた．細胞質内では，大小の空胞が多く散在しいわゆる吸収空胞とは異なった空胞形成が認められ，また核の形状も不整形を呈しchromatinの減少が観察された．3日間投与した後7日間普通飼料を与えた回復群では，尿細管上皮の背高が伸長して上皮細胞の一部が管腔内に突出して不規則な形を呈した．管腔内の拡張は軽度となり，蛋白様物質の蓄積が減少して核の形状の変化も正常に近かった．しかし，障害の程度が顕著でないものの対照群と比較すると刷子縁側の整列は若干不整を呈した．

電顕的所見　対照群の近位尿細管は，長く伸びた刷子縁が並列して尿細管腔内に張り出して，刷子縁側の細胞質に幾らかの吸収空胞が散見された．糸粒体は比較的長形が多く時には円形も存在しており，基底膜の陥入が糸粒体の間に認められた．基底細胞膜の陥入が少ない上皮細胞では，糸粒体の数が多くその間にmicrobody，lysosome，小胞体などの細胞小器官が分布して脂肪滴も時折認められた．核は円形を保持し豊富なchromatinが核膜周囲，核質内にみられた（Fig.1）．刷子縁は細く伸長した微細繊毛で管腔内を覆い，起始部では電子密度の高いterminal webとともに小胞状の短い長形をした突起が集合をなしていた（Fig.2）．投与群では，尿細管上皮の壊死はみられなかったが核膜が不整となり萎縮傾向の像が多く観察された．細胞質の糸粒体は，膨化してcristaeが崩壊し基質の淡明化がみられた．著しく膨化した糸粒体は空胞化を呈し，細胞質内に多く散見された．これに伴って基底細胞膜の陥入が乱れ基底膜側で小胞状を形成した．Microbody，lysosomeは，若干の増加傾向を示した（Fig.3）．糸粒体の膨化による崩壊が中等度の部の刷子縁は多く残存していたが，伸長がやや低下していた（Fig.4）．崩壊の顕著な糸粒体は大きな空胞を形成して細胞質成分の乱れがみられ，この部の刷子縁は剝離，脱落傾向（矢印）にあり（Fig.5），管腔内に細胞成分の残渣がみられた．刷子縁の剝離は先端部が小胞状となり短小化し，整列の乱れが初期変化として観察された（Fig.6）．また小胞体の大小の拡張を示す細胞が散見された．回復群では，糸粒体の膨化が若干残存するもののcristaeの崩壊，糸粒体膜の断裂がほとんどみられず対照群に近い糸粒体像を示した．従って小空胞の形成も散見するにとどまり，基底細胞膜の陥入が細胞質内に深く入り込み正常像に近い形態を示した（Fig.7）．核の形状は，円形を呈するものが多く萎縮傾向が認められなかった．Microbody，lysosomeはやや増加傾向を示し，またmicrobodyと思われる基質の電子密度が中等度な大型の顆粒（矢印）が散見された．刷子縁は細胞により伸長の程度に差があるが，全体的に長く伸び，対照群でみられた刷子縁の起始部の短い小胞状の集合が認められた（Fig.8）．

考　察

近年，腎不全を伴う中毒性腎症が薬剤，化学物質により多く発症しその解明が急がれているが作用機序の明らかでない場合が少なくない．特に尿細管障害時には再吸収の機能不全が起こり尿の生成に与える影響は大きい．OPPの腎障害で，Hodgeらは2％濃度のOPPを2年間摂取させたラットで尿細管の拡張や変性を伴った腎盂腎炎を認めているが，500mg/kgのOPPを週5日間の割で6ヶ月間強制経口投与させた時，あるいは2％濃度のOPP添加飼料を3ヶ月間摂取させた時には腎重量が若干増加するのみで光顕で組織的変化がみられなかったと報告している[1]．今回設定した1500mg/kgの用量は，OPPのLD50値のおよそ半分量で，当部で行った13週間の毒性試験の2.5％濃度時での平均1日摂取量に該当する[4]．この試験では，腎重量の増加，機能障害などは認められなかったが，OPPの初期変化を検索する目的でこの

濃度のOPPを3日間強制経口投与したところ，投与後3日で明らかに尿細管の変性が認められた．また代謝過程でOPPに変化するというジフェニルでは，腎障害が0.5%濃度で60日間の摂取で始まり，120日間では赤血球を取り込んだ拡張した尿細管がみられ，その周囲の尿細管は萎縮する傾向が皮質内帯に多く認められた．これらの変化は，添加飼料を普通飼料に切りかえて飼育すると軽減し腎組織は正常像に近くなることから，可逆的な毒性であるとBoothらは報告している[5]．本実験においてもOPPを3日間投与した後7日間普通飼料を与えた回復群で同様に障害が軽減され尿細管の微細構造の修復がなされていることから，ジフェニルと同傾向の作用と推察される．さらに13週間の4%OPP-Naで尿細管上皮の扁平化，管腔の拡張，白血球の浸潤を伴った腎盂腎炎が報告されていることから[2]，これらの化学物質の腎臓への共通した毒性が示唆される．

OPPによる近位尿細管での微細構造の初期変化は，顕著な糸粒体の膨化とそれに続くcristaeおよび糸粒体膜の崩壊であった．これらの膨化の著しいものは，基質が淡明化し空胞形成へと移行がみられた．糸粒体の傷害は，エネルギー産生の抑制を伴うために能動輸送を介する近位尿細管の特異機能である糖，無機塩，水分の再吸収機構の低下が考えられる．糸粒体の膨化，崩壊は水銀，鉛化合物などの重金属，ある種の抗生物質などで早くから知られており[6,7]，尿細管の変性の初期変化と思われる．糸粒体の間に位置する基底細胞膜の陥入は糸粒体の変化に従って乱れ，陥入が浅くなり基底膜側で小胞状を形成した．また管腔側の刷子縁は，短小化し剝離，脱落する細胞が多かった．これらの変化は，尿細管上皮細胞の壊死に至らなくとも再吸収の機能を著しく低下させ重大な障害を与えていると思われる．

一方，OPPの3日間投与後7日間普通飼料を摂取すると投与群でみられたこれらの変化が軽減され，光顕的に観察された管腔内への凹凸の突出は電顕的にみると再生されて伸長した刷子縁の像と解される．尿細管は傷害の原因を除去すると再生力が顕著なためすみやかに修復されるといわれていることから，3日間投与では糸粒体の崩壊，核の萎縮にかかわらず尿細管上皮細胞の壊死に至らないで修復されたと思われる．

近位尿細管の初期変化として認められた糸粒体の崩壊，小胞体の拡張や刷子縁の減少などは，OPPに向尿細管上皮毒性のあることを明らかに示しており，投与の継続でさらに上皮細胞の壊死に至ると考えられる．先に行った実験で高用量の1週間の連続投与では，3割程度の死亡がみられたことから，これらの動物は腎障害により死亡した可能性が推察される．腎盂腎炎は長期間摂取で発症していることと，今回の実験では髄質，乳頭部も含め炎症性細胞の浸潤の増加が認められなかったことから，尿細管障害がOPPの腎臓に対する初期作用と考えられるが，腎障害の発生機序は複雑多岐で今後nephronの機能をも含め検討する必要がある．

文　献

1）Hodge, H.C., Maynard, E.A., Blanchet, H.J., Spencer, H.C. and Rowe, V.K.：*J. Pharmac. Exp, Ther.*, 104, 202, 1952

2）Hiraga, K. and Fujii, T.：*Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 303, 1981

3）宮原　正：医学のあゆみ，**119**，431，1981

4）中村清純，井口重孝，池田虎雄，平賀興吾：東京衛研年報，32-2，33，1981

5）Booth, A.N., Ambrose, A.M., DeEds, F. and Cox, A.J., Jr.：*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 3, 560, 1961

6）高橋日出彦：薬の毒性，213，1973，南江堂

7）阿部　裕ら：最新医学，**23**，1868，1968

Explanation of Figures

Fig.1. A proximal tubule of kidney cortex from the control rat treated with olive oil. A number of long or round-shaped mitochondria (M) are seen in the cytoplasm between basement membrane (Bm) and lumen. The basal intussusception (arrows) among mitochondria lengthens toward the brush border (Bb). There are absorption vacuoles (V), microbody (Mb) and lysosome (Ly). x10,000

Fig.2. A portion of the brush border in the proximal tubule from the control rat. The arrangement of brush border (Bb) appeares as a regular position, surrounding by the terminal web shown high density. x12,500

Fig.3. A proximal tubule of kidney cortex from the rat administered with 1500mg/kg/day OPP for 3 days. A marked swelling and vacuolation of mitochondria (M) are often seen. The brush border (Bb) in the lumen containing cellular debris becomes shorter.

x4,500

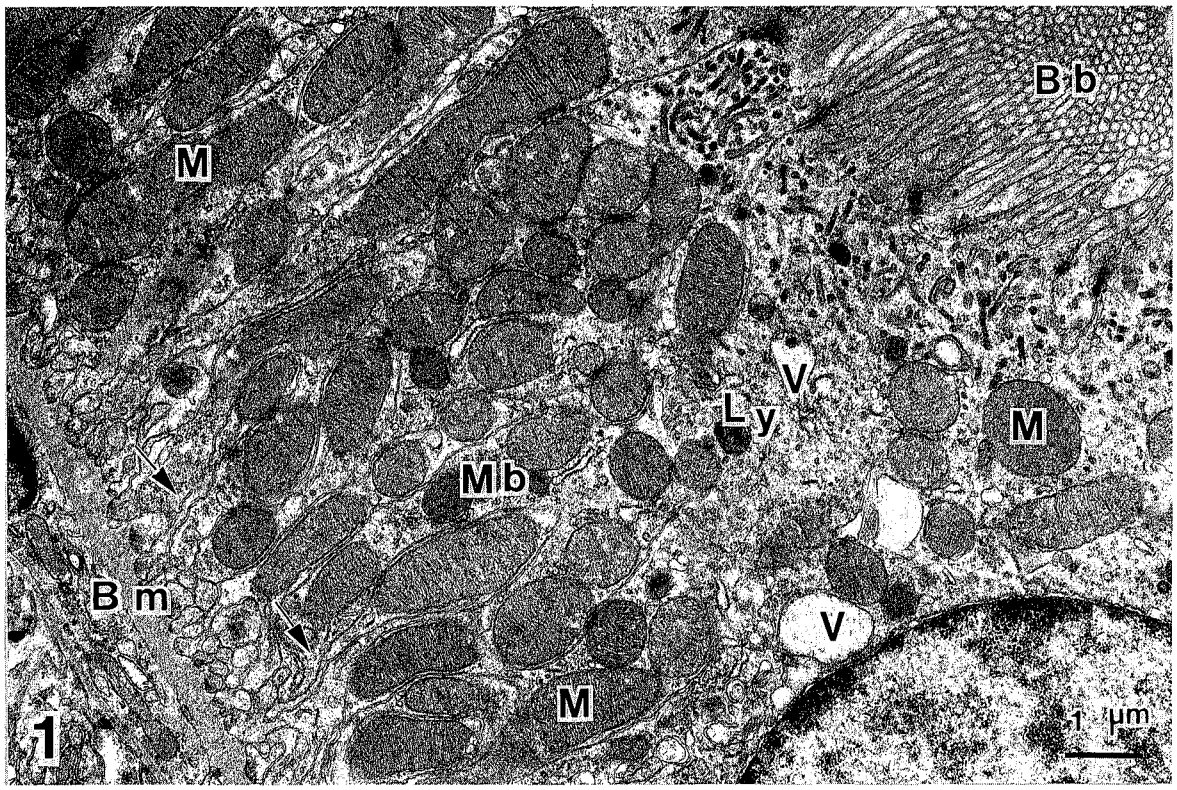
Fig.4. A portion of the proximal tubule after the administration of OPP for 3 days. The disruption of cristae and vacuolation of substrate in mitochondria(M) are severe changes. The basal intussusception is disturbed. The external form of nucleus (N) shows irregular shape. x8,500

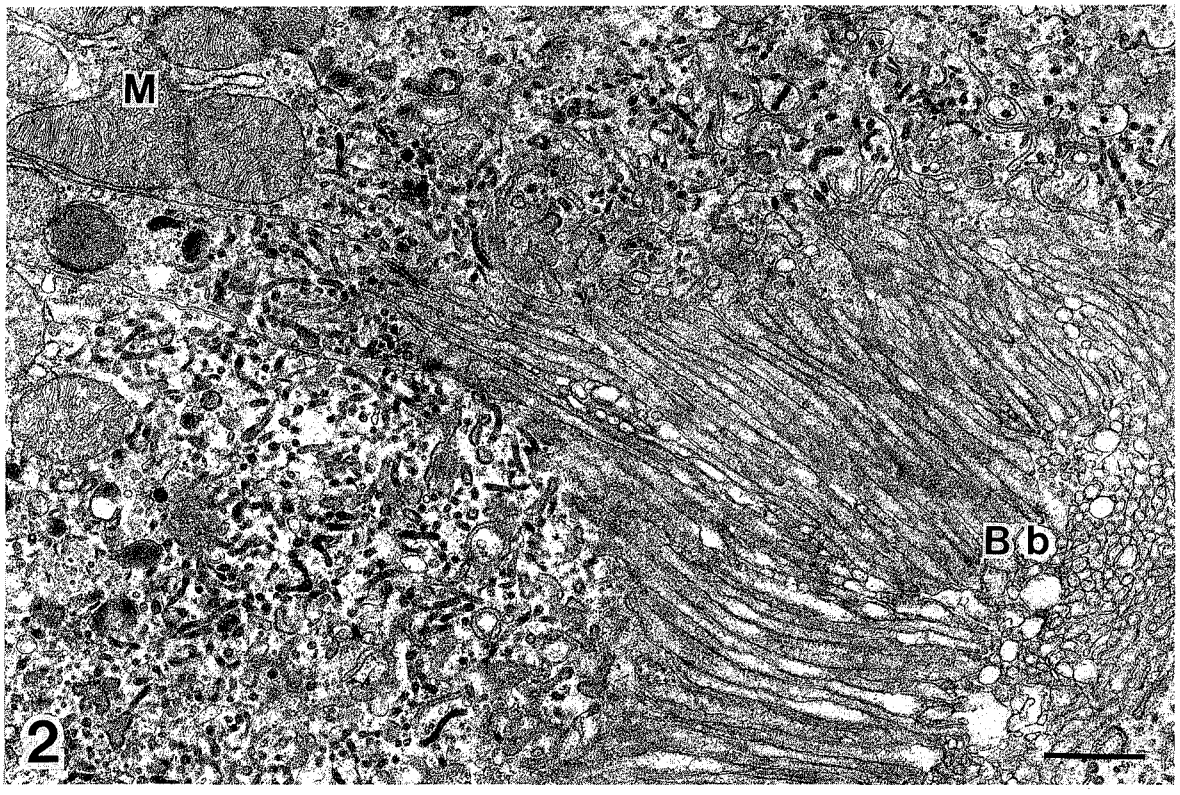
Fig.5. A portion of the proximal tubule after the administration of OPP for 3 days. The brush border in the lumen tends to tear and disappear(arrows). x10,000

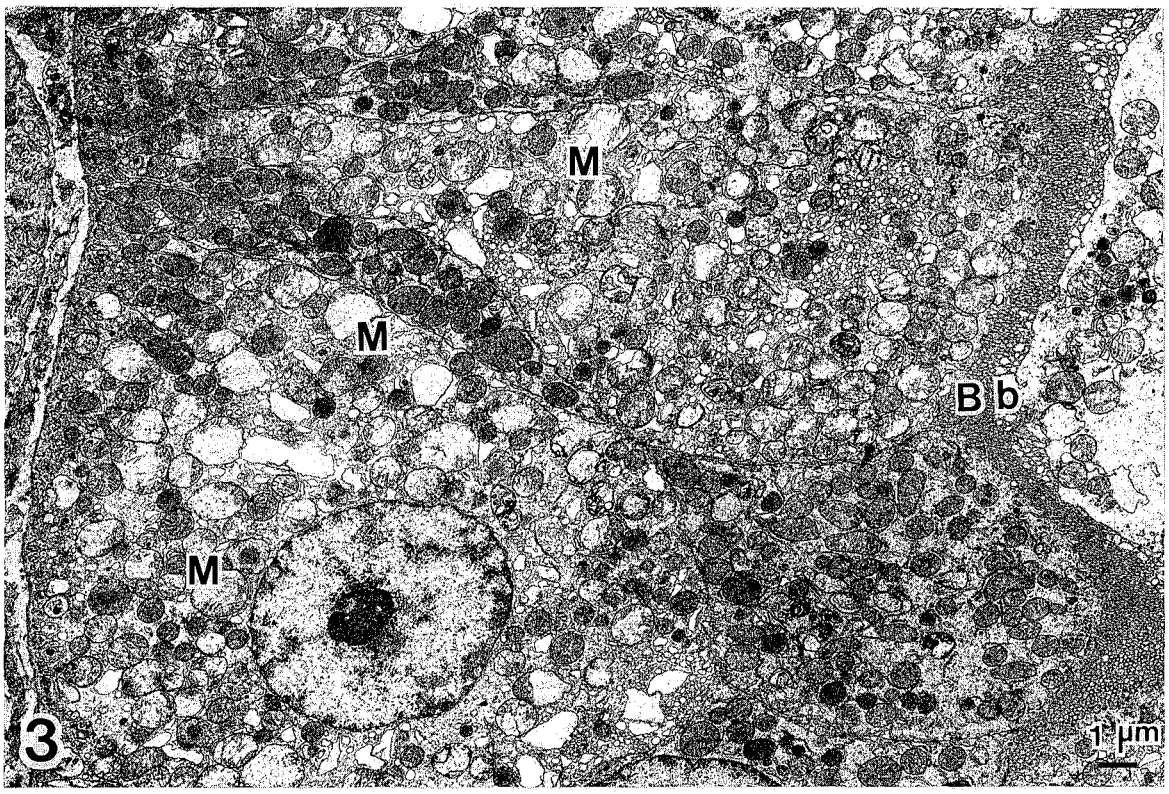
Fig.6. A portion of the brush border in the lumen after the administration of OPP for 3 days. The slight damages of brush border(Bb) are found the distortion of arrangement and the decrease of terminal web. The swelling and disappearance of cristae are seen in numerous mitochondria (M). x12,000

Fig.7. A proximal tubule of kidney cortex from the rat fed the control diet for 7 days after the administration of 1500mg/kg/day OPP for 3 days. There are no changes in the form of mitochondria(M) and basal intussusception. The restoration of organelles is made rapidly in the cell. The arrangement of brush border(Bb) shows a regular alignment. x8,000

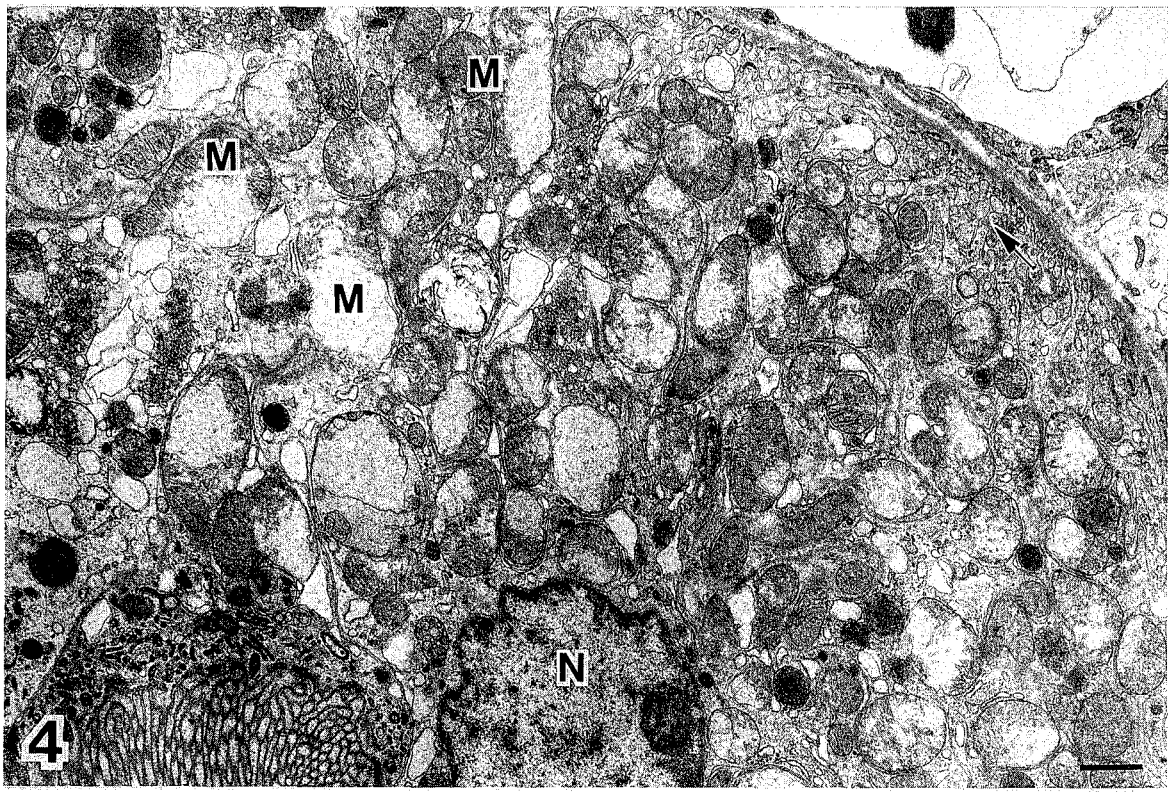
Fig.8. A portion of the lumen side in the proximal tubule of the rat feeding the control diet after the administration of OPP. The terminal web around the brush border(Bb) is present. There are some large microbody-like granules(arrow heads). x11,000


M
B b
V
L y
M
M b
B m
V
M
1 µm
1

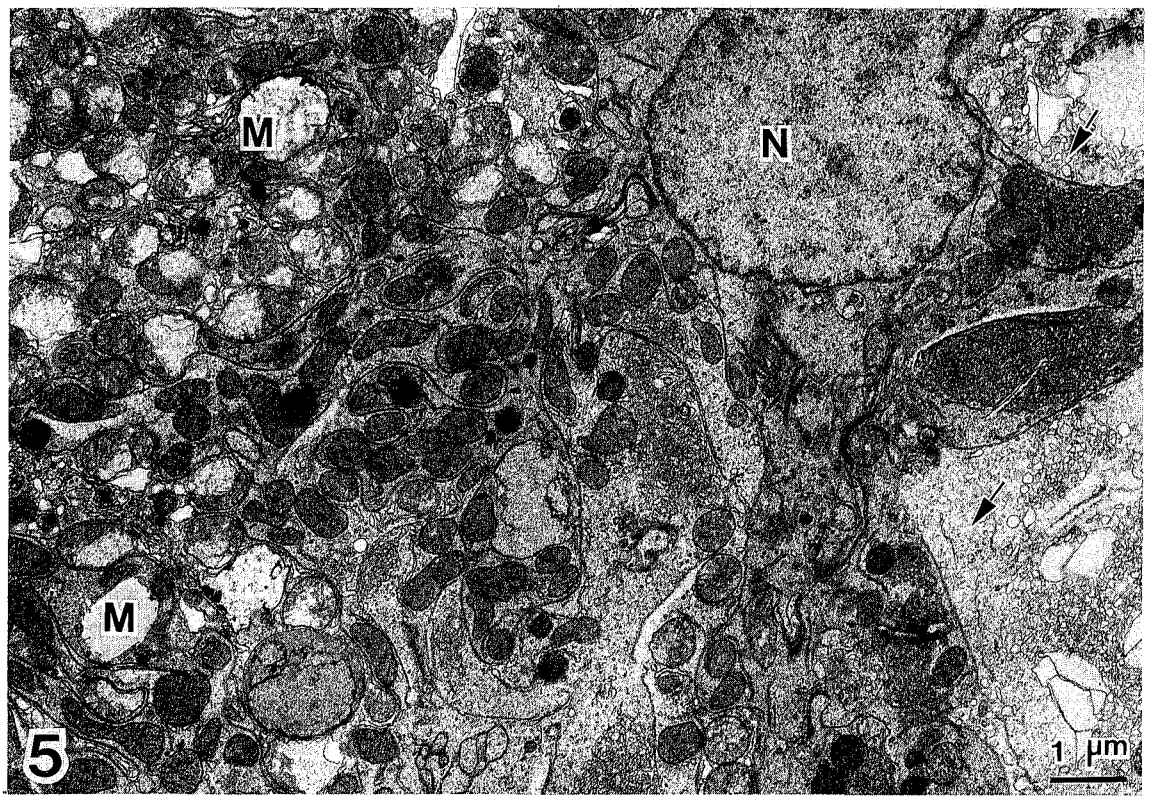

M
B b
2

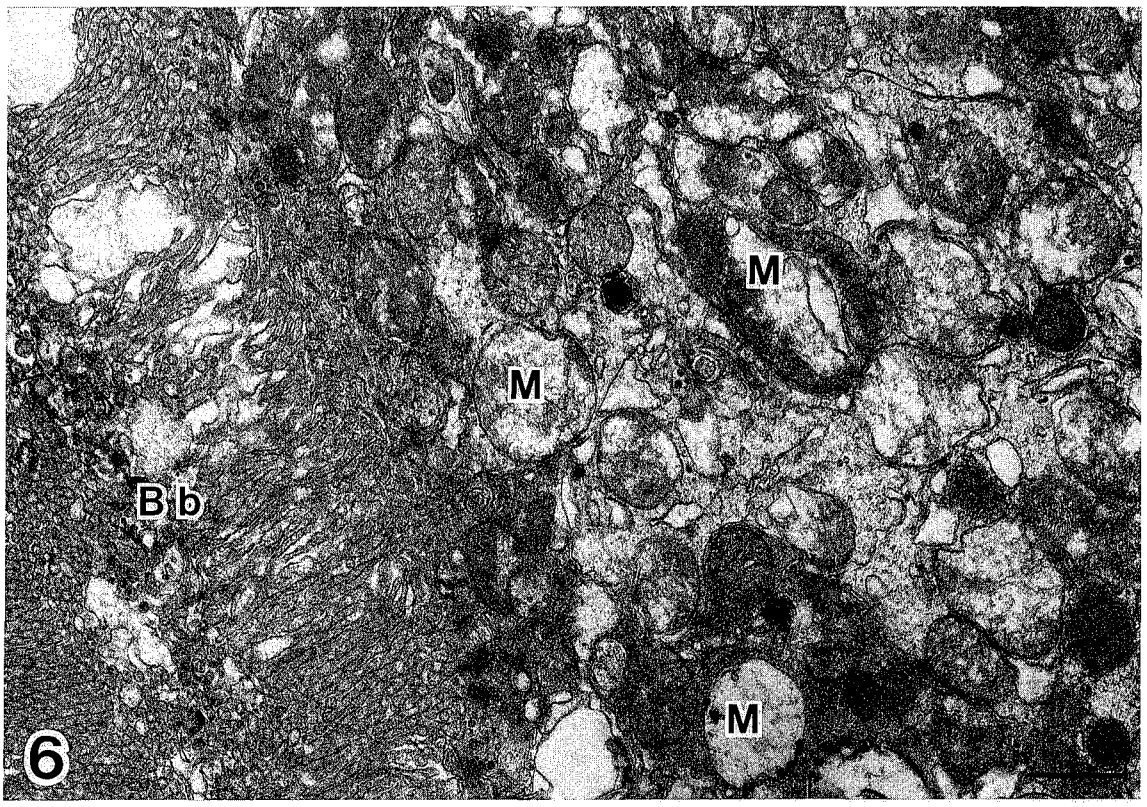


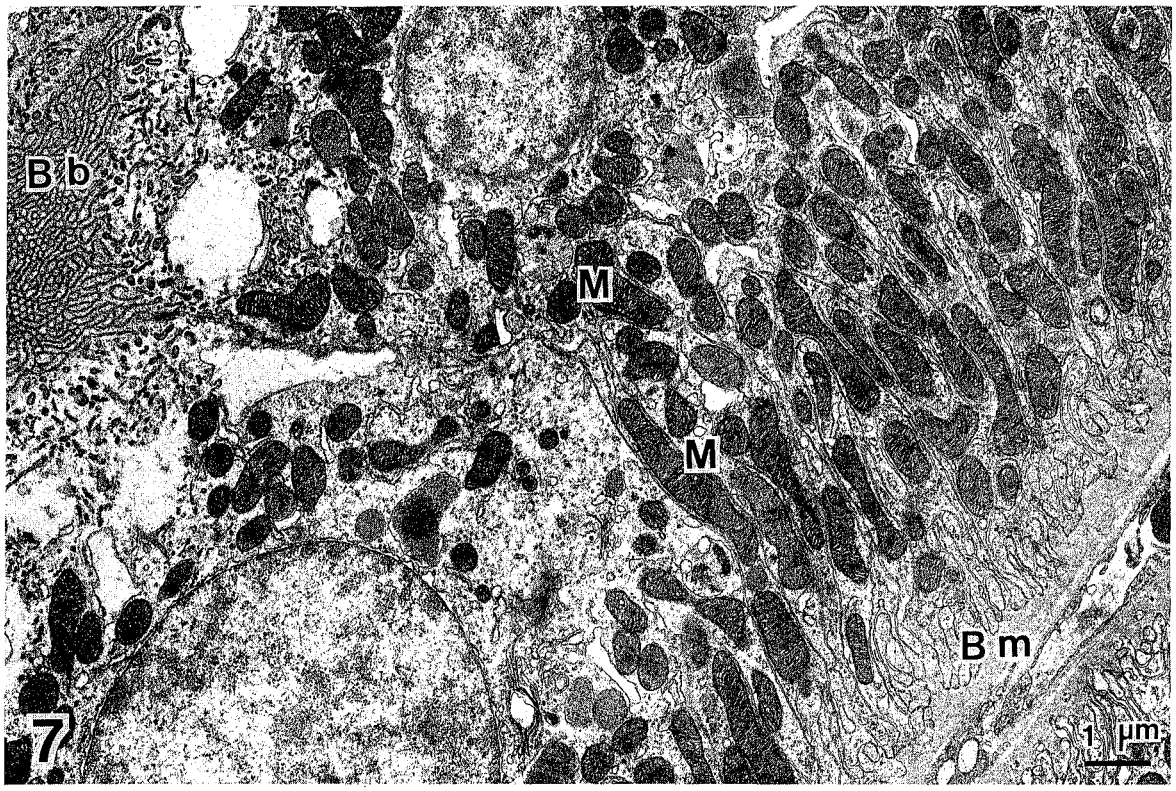
3



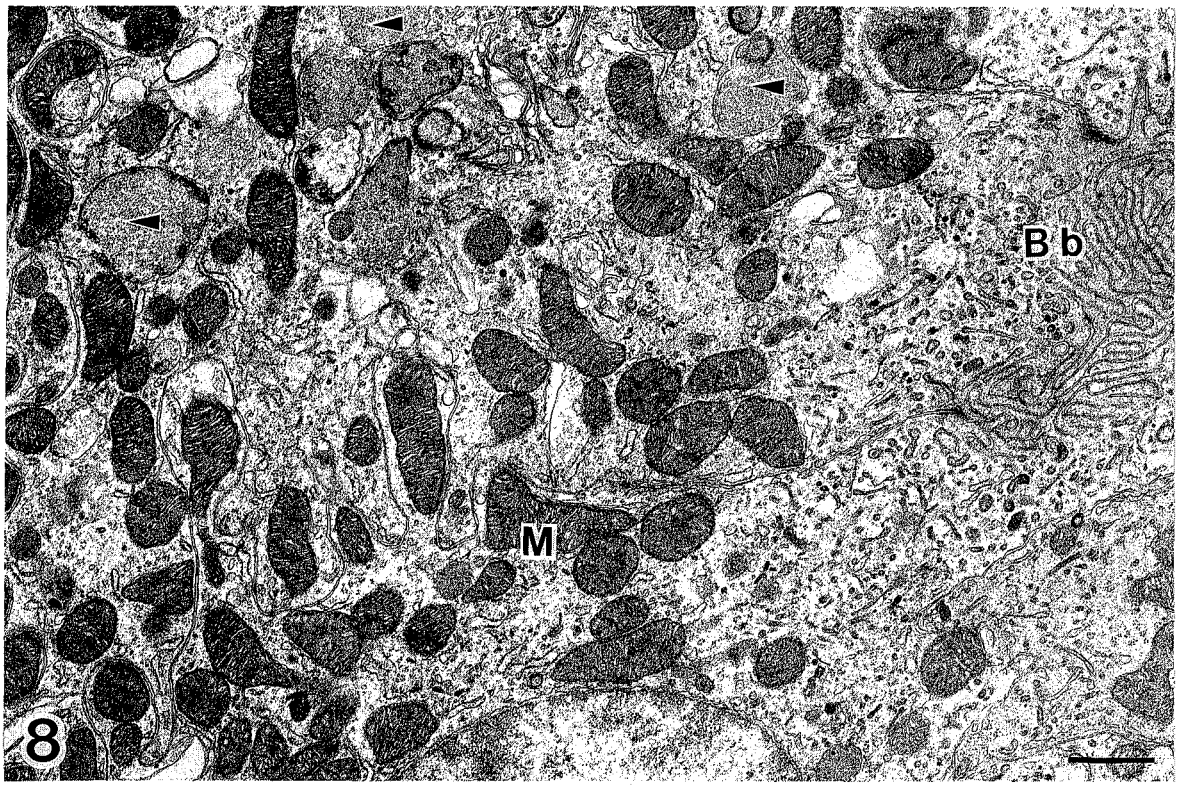
4


M
N
M
5
1 μm


M
M
B b
M
6



7



8

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **36**, 409-412, 1985

オルトフェニルフェノールナトリウム（OPP-Na）のラットを用いた慢性毒性試験 —血液検索—

多田幸恵*, 林田志信*, 井口重孝*, 田山邦昭*,
佐々木美枝子*, 平賀興吾**

Hematological Studies of Rats Fed with Sodium *o*-Phenylphenate(OPP-Na) for 104 Weeks

YUKIE TADA*, SHINOBU HAYASHIDA*, SHIGETAKA IGUCHI*, KUNIAKI TAYAMA*,
MIEKO SASAKI* and KOGO HIRAGA**

Keywords：血液検索 hematological study, オルトフェニルフェノールナトリウム sodium *o*-phenylphenate(OPP-Na), F344 ラット F344 rat

緒　言

当部ではかんきつ類のかび防止剤として使用されているオルトフェニルフェノール（以下OPPと略す）およびそのナトリウム塩（以下OPP-Naと略す）の安全性を各方面より検討しており，急性および亜急性試験の結果をすでに報告している[1-6]．今回OPP-Naの長期摂取による影響を知るため，F344ラットの雌雄を用い，OPP-Na添加飼料による104週間投与試験を試みた．本報で血液検索結果を報告する．

実験方法

検体　OPP-Na (Dow Chemical Co.,Dowicide A：Lot No.1044) を用いた．

実験動物および飼育環境　日本チャールスリバー㈱生育のF344/DuCrjラットを4週齢で購入，1週間馴化飼育後の5週齢時より試験に用いた．ラットはベルト式飼育架台に配置した前・底面が鋼のステンレスケージ（幅22×奥行20×高さ16cm）に個別飼いとし，室温25±1°，湿度50—60%，照明11時間，換気回数毎時10回のバリア飼育室で飼育した．

投与および検索方法　OPP-Naを粉末飼料CE-2に添加，固型飼料とし，細菌ろ過器を経由した水道水とともに自由に摂取させた．投与検体の濃度は当部での亜急性試験の結果を参考とし[4]，雄0，0.7，2.0%，雌0，0.5，1.0%とした．各群50匹のラットに5週齢時より104週間添加飼料を与え，その後2週間基礎飼料を与えた．対照群（OPP-Na 0%）には基礎飼料(CE-2)を与えた．

試験期間終了後，ラットの大腿動脈および大腿静脈を無麻酔下に切開し，流出する血液をEDTA-2K処理した小試験管に採取した．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．同時に血液塗抹標本を作製し，May-Grünwald Giemsa染色後，光顕的に赤血球および白血球の形態，白血球百分比を観察した．血液採取後ラットを解剖，組織標本を作製し光顕的に観察した．

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

試験終了時に生存したラット数は，雄0%群34，雄0.7%群44，雄2.0%群10，雌0%群42，雌0.5%群40，雌

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome,Shinjuku-ku,Tokyo,160 Japan
** 東京都八王子保健所予防課

Table 1. Hematological Values of Rats Fed with OPP-Na for 104 Weeks

Dietary Level of OPP-Na(%)	No. of[1] Rats	RBC $\times10^6/\mu l$	Hb g/dl	Ht %	MCV μ^3	MCH $\mu\mu g$	MCHC %
Male							
0(Cont.)	33	8.09±1.06[2]	16.9±2.2	42.0±5.5	52.0±1.4	20.9±0.8	40.3±1.7
0.7	43	7.87±1.57	16.4±3.2	40.6±7.4	52.0±3.5	20.8±1.2	40.2±2.3
2.0	7	7.03±0.58	13.3±2.3	33.1±4.6	47.0±4.4*	18.9±2.6	39.9±1.9
Female							
0(Cont.)	41	7.48±0.66	16.0±1.2	39.9±2.9	53.5±1.5	21.4±0.6	40.1±0.9
0.5	37	7.34±0.91	15.7±1.6	38.3±5.3	53.4±6.3	21.6±1.2	41.3±8.7
1.0	38	7.44±0.59	15.9±1.0	39.5±2.5	53.2±1.7	21.4±0.7	40.3±1.1

			Percentages of				
		WBC $\times10^3/\mu l$	Neutrophils	Lymphocytes	Monocytes	Eosinophils	Basophils
Male							
0(Cont.)	33	7.9±4.6	29.8±12.8	68.0±11.9	0.9±0.9	1.2±1.4	0
0.7	43	9.0±6.7	32.3±14.5	65.7±14.5	0.9±0.9	0.8±1.0	0
2.0	7	9.2±2.3	33.7± 9.6	64.1± 9.7	0.5±0.5	0.8±0.6	0
Female							
0(Cont.)	41	5.6±2.2	27.0±10.2	71.2±10.3	0.7±0.8	1.0±1.1	0
0.5	37	7.0±7.5	30.2±10.9	68.0±11.2	0.7±0.8	0.9±0.9	0
1.0	38	5.7±1.0	27.2±11.3	71.5±11.8	0.5±0.7	0.8±1.1	0

1) Number of examined rats(Except rats having abnormal cells in peripheral blood)
2) Mean±SD
* : $P<0.05$ in comparison with control value

Table 2. Hematological Findings of Rats Fed with OPP-Na for 104 Weeks

Dietary Level of OPP-Na(%)	No. of[1] Rats	Alterations of Erythrocytes: Anisocytosis − + ǂ ǂǂ[2]	Poikilocytosis − + ǂ ǂǂ[2]	Polychromasia − + ǂ ǂǂ[2]	Polychromatic Erythroblast 0 ~10~20over[3]	Orthochromatic Erythroblast 0 ~10~20over[3]
Male						
0(Cont.)	33	25[4] 8 — —	31 2 — —	30 3 — —	32 1 — —	24 9 — —
0.7	43	34 8 1 —	38 5 — —	36 4 1 2	39 4 — —	28 15 — —
2.0	7	3 4 — —	3 3 1 —	5 2 — —	7 — — —	4 3 — —
Female						
0(Cont.)	41	37 3 1 —	39 — — —	35 6 — —	41 — — —	28 13 — —
0.5	37	34 3 — —	37 — — —	35 1 1 —	35 1 1 —	23 14 — —
1.0	38	34 4 — —	36 2 — —	33 5 — —	36 2 — —	17 21 — —

1) Number of examined rats (Except rats having abnormal cells in peripheral blood)
2) Grade of changes : -None, +Slight, ǂ Moderate, ǂǂ Marked
3) Number of erythroblasts/100 WBC count
4) Number of rats

1.0%群42であった．OPP-Naが膀胱腫瘍を誘発することはすでに報告されており[7]，今回の試験で雄2.0%群に生存例が少なかったのは，膀胱腫瘍による死亡例が試験途中に多発したためである．試験終了時に生存したラットの平均体重±SDは，雄0%群413.5±37.4(g)，雄0.7%群419.0±46.9，雄2.0%群394.6±46.1，雌0%群298.9±42.4，雌0.5%群295.7±43.6，雌1.0%群292.6±50.1であった．

Table 1，Table 2に血液所見を，Table 3に白血病の発生例数を示した．血球数では，対照群と比較し雄

Table 3. Incidence of Leukemia

Dietary Level of OPP-Na (%)	No. of Rats	Number of Leukemia		
		Died[1] Rats	Sacrificed[2] Rats	Total
Male				
0	50	0[3]	3	3
0.7	50	0	2	2
2.0	50	1	0	1
Female				
0	50	1	0	1
0.5	50	0	1	1
1.0	50	0	1	1

1) Died rats for study
2) Sacrificed rats at termination of study
3) Number of rats

2.0%群のRBCおよびMCVに有意な減少がみられ($P<0.05$)，同群のHb, Htに減少傾向が認められた．また雄0.7%群および雄2.0%群のWBCに有意差はないが増加傾向が認められた．雌では血球数における変化はみられなかった．白血球百分比では雄・雌ともに投与群での変化はみられなかった．赤血球の観察では，各群に軽度の赤血球大小不同および破砕赤血球がみられる個体が散見された．特に雄2.0%群ではこれらの変化を呈する個体が多く認められた．

白血病の検索は，試験途中に死亡した個体については組織標本により行い(血液採取が不可能なため)，試験終了時に屠殺・解剖した個体については，血球数，血液塗抹，組織標本により行った．末梢血に異常細胞が観察されたが肝臓，脾臓，骨髄，リンパ節，肺など組織での反応が軽度であった個体(雄2.0%群1例，雌0.5%群1例，雌1.0%群2例)については白血病より除外した．白血病は雄0%群に3例，雄0.7%群に2例，その他の各群に1例ずつ認められ，いずれもmononuclear cell leukemia (単核細胞白血病) であった．

考　察

井口らはラットのOPP-Na13週間投与試験で0.5%以上の高濃度投与群の雌に貧血がみられたと報告し[4]，中村らはOPPの13週間投与試験で雄の2.5%群にRBC, Hbの低下がみられたと報告している[5]．これに対しHodgeらはOPPの2年間投与試験で2.0%群のラットの血液に変化がみられなかったと報告[8]，中村らもOPPの91週間投与試験では1.25, 2.5%群ともに変化がみられなかったと報告している[6]．今回の試験では雄2.0%群にRBC, MCVの有意な減少が認められた．前述したOPPの13週間投与試験で，中村ら[5]はOPP2.5%群にみられた貧血が尿路系からの出血に帰因するのではないかとの考察をしているが，今回の試験においても雄2.0%群では試験終了時に生存した10匹中の9例に膀胱腫瘍が認められた．他の各群では自然発生腫瘍が数例に認められた．一般に腫瘍を有する個体では貧血を示す例が多く，赤血球の形態の変化が軽度であった点，雄0.7%群および雌の各投与群で貧血傾向がみられなかった点を考慮すると，雄2.0%群にみられた貧血傾向は腫瘍の発現などにより二次的に発生した現象であり，OPP-Naによる直接作用ではないものと考えられる．

今回観察されたmononuclear cell leukemia (単核細胞白血病) はF344ラットおよびWistar Furthラットに好発する自然発生腫瘍として知られている[9-11]．Colemanらは白血病の出現率を2年間飼育ラットで16%，終生飼育ラットで20%と報告しているが，今回の104週間投与試験(ラットの生後週齢は111週)では雄0%群で6%，雄0.7%群で4%，その他の各群で2%の出現率を示した．雄2.0%群では膀胱腫瘍により早い時期に死亡した個体が多く，本来の白血病出現率が不明であり，OPP-Naの白血病に及ぼす影響を知ることはできなかった．また今回の白血病出現率はColemanらの報告した出現率と比較しかなり低い値を示しているが，mononuclear cell leukemiaは発生原因，細胞の帰属，細胞の増殖の場などに不明な点が多く，今回の低い出現率が何に帰因するかは明らかでなかった．今後の毒性試験で基礎データを集積するとともに，白血病細胞の帰属など不明な点の検討を進めていきたい．

ま と め

OPP-Naの長期摂取による影響を知るためF344ラットの雌雄を用い，OPP-Na添加飼料による104週間投与試験を行った．

血液検索の結果，雄の高濃度群 (2.0%) に貧血傾向が認められた．これはOPP-Naの直接作用によるものでなく膀胱腫瘍の誘発により二次的に発生した現象であると考えられた．

文　献

1) 田山邦昭，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，30-2，57，1979
2) 田山邦昭，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，31-2，1，1980
3) 小縣昭夫，安藤　弘，久保喜一，平賀興吾：東京衛研年報，30-2，54，1979

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) Hiraga, K. and Fujii, T.：*Fd. Cosmet. Toxicol.*, **19**, 303, 1981
8) Hodge, H.C., Maynard, E.A., Blanchet, H.J., Jr., Spencer, H.C. and Rowe, V.K.：*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **104**, 202, 1952
9) Moloney, W.C., Boschetti, A.E. and King, V.P.：*Cancer Res.*, **30**, 41, 1970
10) Moloney, W.C., Boschetti, A.E. and King, V.P.：*Cancer Res.*, **29**, 938, 1969
11) Coleman, G.L., Barthold, S.W., Osbaldiston, G.W., Foster, S.J. and Jonas, A.M.：*Journal of Gerontol.*, **32**, 258, 1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 413-417, 1985

Salmonella typhimurium TA97a, TA102を用いた酸化防止剤およびかび防止剤の変異原性試験

藤田　博*, 小嶋昭江*, 佐々木美枝子*, 平賀興吾**

Mutagenicity Test of Antioxidants and Fungicides with *Salmonella typhimurium* TA97a, TA102

HIROSHI FUJITA*, AKIE KOJIMA*, MIEKO SASAKI*and KOGO HIRAGA**

Keywords：変異原性 mutagenicity, 酸化防止剤 antioxidants, かび防止剤 fungicides, *Salmonella typhimurium* TA97a, *Salmonella typhimurium* TA102

化学物質の変異原性試験には，Amesらにより開発された*Salmonella typhimurium*TA株[1-3]が広く利用されている．これまではTA98[1]およびTA100[1]が主に用いられてきた．最近Amesらは，TA97[4]およびTA102[5,6]を開発し，TA98およびTA100を加えた4株を試験に用いることを提案している[3]．

新しい株の特長は，TA97がフレームシフト型の突然変異を誘起する変異原によく反応し，これまで用いられてきたTA1537[2]に比べて感受性が数倍高い[4]．またTA102は，これまでの株ではほとんど検出できなかった過酸化水素，ストレプトニグリン，ホルムアルデヒドなどの変異原性を検出することができる[5,6]．

われわれはTA98，TA100を用いて食品添加物などの変異原性の検索を行ってきたが，最近TA97a，TA102を導入し，TA98，TA100において陰性であった化合物の再検索を始めた．本報告では，酸化防止剤およびかび防止剤各4種について試験を行った結果を述べる．

実験材料および方法

試料　酸化防止剤：アスコルビン酸（和光純薬，Lot No. WAF4686），ブチルヒドロキシアニソール（BHA，和光純薬，Lot No. TCJ1058），ジブチルヒドロキシトルエン（BHT 和光純薬，Lot No. KIK5562），DL-α-トコフェロール（和光純薬，Lot No. TCI2020）．かび防止剤：ジフェニール（東京化成，Lot No. AR01），オルトフェニルフェノール（OPP，東京化成，Lot No. FB101），パラヒドロキシ安息香酸ブチル（PHBB，和光純薬，Lot No. KIO2284），チアベンダゾール（TBZ，東京化成，Lot No. AI01）．陽性物質：2-アミノアントラセン（2-AA，和光純薬），9-アミノアクリジン（9-AA，東京化成），2-アセチルアミノフルオレン（AAF，東京化成），2-アミノフルオレン（AF，ALDRICH），フリルフラマイド（AF-2，上野製薬），ベンゾ(a)ピレン（BaP，和光純薬），ジメチルニトロソアミン（DMN，和光純薬），ホルムアルデヒド（和光純薬），過酸化水素（関東化学），マイトマイシンC（MMC，協和発酵），N-メチル-N′-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（MNNG，ALDRICH），2-ニトロフルオレン（NF，ALDRICH），4-ニトロキノリン-N-オキシド（4NQO，岩井化学），トリプ-P-1（T-P-1，和光純薬）．アスコルビン酸，DMN，ホルムアルデヒド，過酸化水素およびMNNGは蒸留水に，他の化合物はジメチルスルホキシド（和光純薬，吸収スペクトル用）に溶解し用いた．

菌株　*Salmonella typhimurium* TA97a（*hisO*1242, *hisD*6610, △ *uvrB*, *rfa*, pKM101)[4]，TA102（*his G* 428＝pAQ1, *rfa*, pKM101)[5]，TA98（*hisD*3052, △ *uvrB*, *rfa*, pKM101)[1]およびTA100（*hisG46*, △ *uvrB*, *rfa*, pKM101)[1]をブロス（OXOID, Nutrient broth No. 2）で一夜培養し用いた．これらの株は，B.N. Ames教授（カリフォルニア大）より分与を受けた．

Mutation test　Ames法[3]の変法であるプレインキュベーション法[3,7]により行った．代謝活性化には，アロクロール1254（三菱モンサント化成）により薬物代謝

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都八王子保健所予防課

酵素を誘導したSD系ラット(日本クレア)雄の肝臓ホモジネートから得たS9[3]を用いた．S9mix[3,7]中のS9量は10%（50μl／プレート）とした．

試料溶液0.1mlを小試験管に入れ，S9mix 0.5ml，代謝活性化しない場合にはリン酸緩衝液（pH7.4）0.5mlおよび菌液0.1mlを加え，37°で20分間の前培養を行った．これに45°に保温した軟寒天[3] 2 mlを加え混合後，最少グルコース寒天培地[3]に重層した．37°で2日間培養後，プレートに生じた復帰コロニーを計数した．なお，各用量は，プレート3枚を用い結果は平均値で示した．さらにMooreら[8]のプログラムにより回帰分析を行った．

結　果

1．既知変異原に対する反応性の比較

分与を受けた新しい株の変異原に対する反応性を確認するとともに，これまで用いてきたTA98，TA100との反応性の比較を行った．14種類の変異原による結果を表1に示した．TA102はホルムアルデヒド，過酸化水素およびMMCなどの変異原性を検出できるだけではなく，多くの変異原にも比較的良く反応することがわかる．特長としては，他の株に比べて塩基置換型の変異原であるMNNG，DMNに良く反応する．一方，AAF，AF，NFおよびT-P-1のようなフレームシフト型の変異原に対しても反応するが，TA98，TA100の方が感受性は高いようである．ただし，TA98株では検出できなかったフレームシフト型の変異原である9-AAの検出ができる．TA97aは，9-AAに最も良く反応するが，他のフレームシフト型の変異原に対してはTA98，TA100に比べて必ずしも高い感受性を持っているとは言えないようである．両株は，調べた変異原のすべてに対して必ずしも高感受性ではないが，TA98，TA100で検出できなかった変異原の検出ができることから，これまで陰性であった化合物の再検索に用いることは有効であると考えられる．

2．酸化防止剤およびかび防止剤の mutation test

酸化防止剤のアスコルビン酸，BHA，BHT，DL-α-トコフェロールおよびかび防止剤のジフェニール，OPP，PHBB，TBZは，陰性の結果が報告されている[9-11]．これらの化合物についてTA97a，TA102を用いたmutation testを行った（表2，3，図1）．その結果，アスコルビン酸は代謝活性化なしのTA97a，TA102の場合に，OPPおよびTBZは代謝活性化したTA102の場合に用量相関を持って復帰コロニー数が増加した．ただし，OPPは50μg以上では致死性のため直線からはずれる．TBZは1,000μg以上ではプレート中に化合物が析出してコロニー計数を正しく行うことができなかった．他の化合物では実験用量内では変化が見られないか，致死によるわずかの減少が見られた．

増加が見られた化合物の直線的に増加している用量での増加量を計算すると（図1），アスコルビン酸は，TA97a

表1．テスト株の既知変異原に対する反応性の比較

変異原	S9	用量 μg/プレート	TA97a	TA102	TA98	TA100
2-AA	+	5	786[1]	825	1,072	1,820
9-AA	−	50	1,179	759	12	171
AAF	+	10	250	478	406	319
AF	+	10	1,757	702	3,930	2,828
AF-2	−	0.05	243	397	21	321
BaP	+	5	747	1,665	189	867
DMN	+	1,000	179	707	32	166
ホルムアルデヒド	−	50	264	591	26	238
過酸化水素	−	100	335	724	21	318
MMC	−	0.5	—[2]	4,379	—	—
MNNG	−	2	507	14,597	15	2,876
NF	−	10	563	431	2,110	3,137
4NQO	−	0.5	644	1,339	268	1,600
T-P-1	+	5	7,743	2,187	13,243	612
Control	+	0	154	367	24	170
	−	0	140	262	17	140

1）復帰コロニー数／プレート　2）MMCの致死性により計数できない。

表2. 酸化防止剤のTA97a, TA102を用いたmutation test

試料	用量 μg/プレート	TA97a		TA102	
		−	+S9	−	+S9
アスコルビン酸	10,000	200	214	404	436
	5,000	182	202	384	465
	1,000	156	225	344	435
	500	166	213	336	448
	100	157	227	319	456
	0	146	206	316	444
	陽性対照[1]	298	1,008	5,423	628
BHA	200	120	154	(58)[2]	(345)
	100	129	183	209	475
	50	136	173	278	514
	10	141	191	309	505
	5	130	188	320	524
	0	146	208	315	464
	陽性対照	252	1,283	3,910	735
BHT	1,000	148	157	275	391
	500	137	154	289	447
	100	142	182	276	452
	50	137	188	256	498
	10	148	218	286	482
	0	129	206	280	469
	陽性対照	260	1,290	5,191	921
DL-α-トコフェロール	10,000	135	156	287	435
	5,000	135	160	297	422
	1,000	131	166	306	423
	500	134	158	292	474
	100	115	162	270	478
	0	123	197	283	465
	陽性対照	306	964	4,060	822

1) TA97a：−=9-AA 20μg, +S9=2-AA 5μg, TA102：−=MMC 0.5μg, +S9=2-AA 5μg
2) 致死性により直線からはずれる値

ではコントロールの1.4倍, 0.00086 復帰コロニー／nmole, TA102では1.3倍, 0.0015／nmole, OPPでは1.1倍, 1.018／nmole, TBZは1.3倍, 0.053／nmoleであった.

考察

アスコルビン酸, OPPおよびTBZは復帰コロニー数に増加が見られたが, その増加量は, いずれも非常にわずかであった. かつてAmesらによって提案された復帰コロニー数がnmoleあたり0.01を越える化合物を変異原陽性と判断する方法[12]によるとアスコルビン酸は陰性と判断される. また, 自然復帰コロニー数の2倍の増加を示す化合物を陽性と判断する方法[13]に従うならば, TA97a, TA102が自然復帰コロニー数が高い点から条件はきびしくなり, これらの増加はすべて陰性と判断される.

TA97a, TA102を用いた試験の報告は少ない. DeFloraら[14]は, メタノール, エタノール, カドミウム塩が1,5～2倍の増加を示すことを報告しており, 現段階では陽性とできないながらも再現性があることから(±)の判定を与えている. 本報告で増加が見られた化合物の場合も増加は非常に少ないが, 用量相関が見られ, 再現性があるという点では類似の結果であり, 現段階では疑陽性

表3. かび防止剤のTA97a, TA102を用いたmutation test

試料	用量 μg/プレート	TA97a		TA102	
		−	+S9	−	+S9
ジフェニール	500	131	193	(178)[2]	(257)
	100	156	193	227	420
	50	155	205	250	436
	10	153	171	293	439
	5	150	195	314	465
	0	144	186	293	440
	陽性対照[1]	257	986	3,959	677
OPP	100	148	167	287	(464)
	50	143	166	340	(533)
	10	158	184	325	530
	5	143	186	311	516
	1	141	205	321	477
	0	148	209	320	476
	陽性対照	197	1,117	5,032	1,088
PHBB	500	(0)	174	(0)	(145)
	100	85	148	195	397
	50	98	165	206	383
	10	104	164	211	406
	5	90	167	219	437
	0	95	154	242	373
	陽性対照	183	1,334	2,944	921
TBZ	1,000	127	195	255	(516)
	500	135	213	279	559
	100	137	197	262	452
	50	138	217	259	453
	10	156	204	264	422
	0	139	222	250	428
	陽性対照	220	1,805	5,002	773

1) TA97a：−=9-AA 20μg, +S9=2-AA 5μg, TA102：−=MMC 0.5μg, +S9=2-AA 5μg
2) 致死性により直線からはずれる値

(±)であると考える.

アスコルビン酸, OPPおよびTBZは, TA98, TA100では変異原性は陰性であるが, TBZとアスコルビン酸あるいはTBZとOPPを混合するとTA98に対し弱い変異原性が認められている[9,10]. 今回, TA97a, TA102において復帰コロニー数がわずかではあるが増加したのは, これらの化合物が持つ混合によって検出された変異原性が菌株の感受性の違いによりTA97a, TA102では単独でも検出されたのかもしれない. OPP, TBZについては, 復帰コロニー数がわずかしか増加しない原因として, OPPでは50μg以上で強い致死性があり, 復帰コロニーの増加が抑制されている. TBZの場合は難溶のため培地中に析出し, 変異原性が十分に発現できない可能性が考えられる. 復帰コロニー数の増加量を高める方法の試みを含め, これらの化合物については様々な角度から検討を加えている. TA97a, TA102の試験結果の報告は少ないが, DeFloraのデータ[14]と合わせて復帰コロニー数の増加が少なく疑陽性と判断された化合物が7種見られる. 今後, データが蓄積されて行くことにより弱い変異原に対する判断が確立されて行くと思われる.

導入した新しい株には, 使用上問題となる点があった. TA102は微小な復帰コロニーが出現し, 計数が困難で

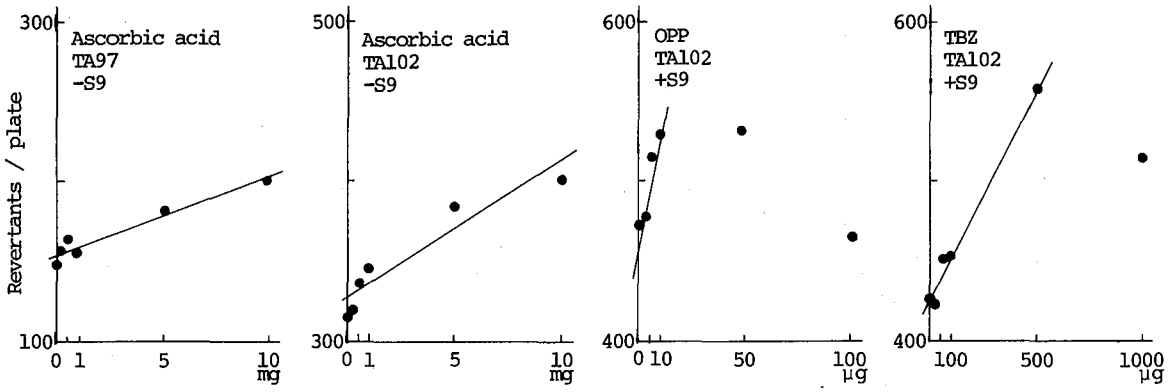


図1．アスコルビン酸，OPPおよびTBZのTA97a，TA102を用いたmutation testによって得られた用量－反応関係．

あった．さらに，両株とも自然復帰コロニー数が高く分散が大きい．特にTA102にS9を添加した場合には約400であった．この対策としてS9量を下げること，ブロス中には変異原が存在する[3]が，今のところOXOID No. 2が良い[3]とされている．これに代わる自然復帰コロニー数の少ないブロスを探すことなどを検討している．

要　旨

4種の酸化防止剤および4種のかび防止剤についてAmesの新しいテスト株TA97a, TA102を用いて変異原性試験を行った．その結果，アスコルビン酸は代謝活性化なしのTA97a, TA102で，オルトフェニルフェノールおよびチアベンダゾールは代謝活性化したTA102の場合に復帰コロニー数が増加した．増加量が非常にわずかであることから疑陽性(±)と判断した．

文　献

1）McCann, J., Spingarn, N. E., Kobori., J. and Ames, B. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 979, 1975
2）Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E.: *Mutation Res.*, **31**, 347, 1975
3）Maron, D. M. and Ames, B. N.: *Mutation Res.*, **113**, 173, 1983
4）Levin, D. E., Yamasaki, E. and Ames, B. N.: *Mutation Res.*, **94**, 315, 1982
5）Levin, D. E., Hollstein, M. and Ames, B. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7445, 1982
6）Levin, D. E., Marnett, L. J. and Ames, B. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4457, 1984
7）矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，**20**，1178，1975
8）Moore, D. and Felton, J. S.: *Mutation Res.*, **119**, 95, 1983
9）藤田　博，平賀興吾：東京衛研年報，**31-2**, 29, 1980
10）藤田　博，平賀興吾：東京衛研年報，**32-2**, 25, 1981
11）石館　基，吉川邦衛，祖父尼俊雄：変異原と毒性，**12**, 82, 1980
12）McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 5135, 1975
13）Chu, K. C., Patel, K. M. and Lin, A. H.: *Mutation Res.*, **85**, 119, 1981
14）DeFlora, S., Camoirano, A., Zanacchi, P. and Bennicelli, C.: *Mutation Res.*, **134**, 159, 1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 36, 418-428, 1985

ブチルヒドロキシアニソール（BHA），ジブチルヒドロキシトルエン（BHT），*tert*-ブチルヒドロキノン（TBHQ）のラット肺におよぼす影響

坂本義光*，高橋　省*

Effects of Butylated Hydroxyanisole(BHA), Butylated Hydroxytoluene(BHT) and *tert*-Butylhydroquinone(TBHQ) on Rat Lung

YOSHIMITU SAKAMOTO* and OSAMU TAKAHASHI*

Butylated hyaroxyanisole(BHA), butylated hydroxytoluene(BHT) *and tert*-butylhydroquinone (TBHQ), phenolic antioxidant, were examined for their effects on the rat lung by intraperitoneal administration. Jcl-SD rats were given 250, 400 mg/kg/day BHA, 640, 1024 mg/kg BHT or 98, 156 mg/kg TBHQ by i.p. injection once a day for 7 days. Rats were killed 24 hours after the last injection. At the termination mean body weight of all the dosed groups was significantly lower than that of control group. Body weight of 400 mg/kg BHA group was smallest in all the group. Dose related increase of the lung weight was observed only in BHA groups. Plasma prothrombin indices were depressed significantly in 400 mg/kg BHA and 640 and 1024 mg/kg BHT groups. Histologically, BHA caused congestion of capillaries and small vessels, perivascular edema, hemorrhage, cellular proliferation and enlargement in alveolar walls with large lipid droplets accumulation. Severity of these lesions was related to doses of BHA. In BHT groups, congestion and edema were observed, but these were slight changes without relation to dose. In 156 mg/kg TBHQ group, lipid droplets in alveolar wall were observed, but these were markedly smaller and less than those of BHA groups in size and quantity. Of three antioxidants tested in this experiments, it is found that BHA caused marked lesions to the rat lung.

Keywords: butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, *tert*-butylhydroquinone, rat, lung, histopathological changes

緒　言

ブチルヒドロキシアニソール(BHA)，ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）およびtert-ブチルヒドロキノン（TBHQ）はいずれも食品，油脂等の酸化防止剤として広く用いられている．このうちTBHQは現在米国で使用されているものである[1]．これらの酸化防止剤のうちBHA，BHTの生体におよぼす影響について当部で行なった添加飼料摂取実験[2-4]では，BHTに腎，肝への障害作用や，致死性の出血作用がみられたのに対し，BHAにはこの様な作用はほとんど認められなかった．BHAの毒性の低いことに関して，Sgaragli[5]らは，経口的に摂取されたBHAが小腸壁で代謝されることにより不活性化されることを報告した．この報告にもとづき高橋[6]はBHAをラットに腹腔内投与したところ，肺に出血を伴なう障害を起すことを観察した．従来，BHAのラットによる腹腔内投与実験の例は少ないが，この事は，BHTやTBHQについても同様である．とくにBHTはマウスに肺障害を起こすことが知られているにもかかわらず，ラットを用いた実験はほとんどその例を見ない．本報では，BHAを含めこれらの酸化防止剤をラットに腹腔内投与し，BHAによる肺障害の組織学的な成り立ち，BHTおよびTBHQによる肺への作用の有無について

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

得られた結果を述べる．

実験材料および方法

動物は Jcl：SD 系，雄ラット，4 週令を日本クレアより購入し，1 週間予備飼育した後実験に用いた．実験は 1 群 6 匹として，BHA250, 400, BHT640, 1024, TBHQ 98, 156 mg/kg 体重を 1 日 1 回，7 日間連続して腹腔内に注射した．なお試料はすべて大豆油に溶かしたものを用い，対照群は大豆油のみを投与した．飼料は予備飼育期間中は日本クレア製 CE-2，投与期間中は精製飼料[9]を各々水道水とともに自由に摂取させた．動物は最終回投与24時間後エーテル麻酔下，プロトロンビン時間測定のため後大静脈より採血し，脱血死させた．採取した血液について Quick ら[10]の方法により血漿プロトロンビン時間を測定した．本報では，その値をプロトロンビン指数(%)[9]として示した．肺は気管とともに摘出し，秤量し，気管より10%緩衝ホルマリンを注入再膨張させた後，気管を切り離し固定した．肺重量は切除した気管重量を減じて求めた．固定後，肺の各葉について常法によりパラフィン切片を作製，HE, Azan, PAS 染色を行なった．さらに凍結切片により Sudan 黒 B 染色を行なった．なお本実験で用いた試料の投与量は，BHA は前実験[6]の結果を参考にし，BHT および TBHQ は，Krasavage[8]の報告を参考にした．

結　　果

投与期間中の死亡例は各群 6 匹中，BHA250mg/kg 投与群で 1 例で，400mg/kg 群で 1 例，TBHQ156mg/kg 群で 2 例であった．

体重　各群の投与期間中の平均体重の増加推移を Fig. 1 に，屠殺時体重を Table 1 に示した．BHA 群では，250 mg/kg および400mg/kg 群とも投与開始後 1 日目に減少し，その後 4 日目までは対照群と同様の増加傾向を示した．さらに 5 日目より250mg 群では増加抑制，400mg 群では減少を示した．最終回投与時および終了時では，400mg 群が低値を示した．BHT 群では，BHA 群と同様，投与開始後 1 日目に，640mg/kg 群および1024mg/kg

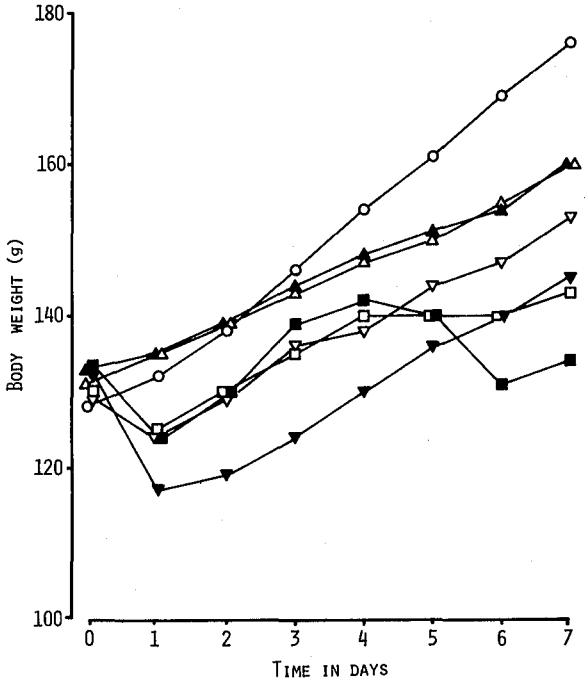


Fig. 1．Changes of Body Weight. Control：(○)
BHA：250mg/kg (□), 400mg/kg (■)
BHT：640mg/kg (▽), 1024mg/kg (▼)
TBHQ：98mg/kg (△), 156mg/kg (▲)

Table 1．Effects of BHA, BHT and TBHQ on Terminal Body and Lung Weight.

Compound/Dose (mg／kg)	No. of rats	Terminal body weight (g)	Lung weight	
			Absolute weight (g)	Relative weight (% Body weight)
Control	6	178± 9	1.123±0.03	0.632±0.022
BHA 250	5	143± 8*	1.492±0.147*	1.040±0.095*
400	5	134±18*	2.234±0.299*	1.566±0.310*
BHT 640	6	153±20*	1.009±0.060	0.703±0.015*
1024	6	145±14*	1.082±0.067	0.692±0.031*
TBHQ 98	6	160± 9*	1.057±0.079	0.657±0.036
156	4	169± 5*	1.025±0.021	0.640±0.019

：values in figure represent mean±SD
：＊：Statistically different from control ($p < 0.05$)

Table 2. Effects of BHA, BHT and TBHQ on Plasma Prothrombin Activity.

Compound/Dose (mg/kg)	Number of rats	Prothrombin Index (%)
Control	6	103± 8
BHA 250	5	80±16
400	5	58± 6*
BHT 640	6	42±12*
1024	6	40± 8*
TBHQ 98	6	90±10
156	4	100± 6

Values in figure represent mean±SD.
*: Statistically different from control.($p < 0.05$)

群で，ともに減少した．その後両群ともほぼ直線的に増加したが，その割合は，対照群に比べ小さかった．また，投与開始後のすべての期間で1024mg/kg群が低い値を示した．TBHQ群では，98および156mg/kg群ともに投与開始後よりほぼ直線的な増加を示すが，その増加率は徐々に減少する傾向を示した．TBHQ群では両群の値は投与期間を通してほぼ同値であった．各投与群の終了時体重はいずれも対照群に比べ有意に小さかった．

肺重量 Table 1に示すように，BHA250および400mg/kg群でのみ絶対重量と体重比重量の有意な増加がみられた．その割合は用量に比例したものであった．

プロトロンビン指数 Table 2に示すように，BHA250mg/kg群では対照と差がなかったが，400mg/kg群では有意な減少を示した．BHT群では640および1024mg/kg群で，ともに有意な減少を示した．TBHQ群では，対照群と差はみられなかった．

肉眼的所見 解剖時各群からのラットの肺に見られた変化は次の様であった．BHA250mg/kg群では，各葉の表面にゴマ粒～米粒大の赤黒色点が散在しており，一部互いに融合し斑点状になっているものも見られた．これらの変化は各葉の辺縁に多くみられた．400mg/kg群では，表面の黒赤色部分が多くなっていて，顕著な例では，ひとつの葉の中央の一部分以外はすべて黒赤色を呈していた．またBHA群の肺は，明らかに他の群のものに比べ大きかった．BHT群では，表面にケシ粒大の黒赤色が数個存在しているのが見られた．この変化の見られるラットは1024mg/kg群で多かったが，変化の程度は640mg/kg群と明らかな差はなかった．TBHQ群では，表面が部分的に暗赤色を呈している肺がみられたが，98mg/kg群と156mg/kgで，程度や例数に差はなかった．

病理組織所見 肺の組織学的観察は各群の終了時生存例についてのみ行なった．対照群の肺は典型的な正常構造を示し，血管および気管周囲の単核細胞の浸潤などの炎症性変化の徴候は見られなかった(Photo 1)．BHA250mg/kg投与群では，小血管およびその周辺の肺胞壁毛細血管のうっ血が組織全体に亘って部分的またはほぼびまん性に見られた(Photo 2)．変化を示す部分では，肺胞壁は血液の貯留によりじゅず状を呈していた．さらに充血を見る部位またはその周辺で軽度な肺胞内出血が散見された．その他，中～大血管では周囲の間質に軽～中等度の浮腫を見る例が多かった．肺胞壁は組織の所々で肥厚していてた．程度は肺胞腔が認められているものから，小塊状になり肺胞腔の認められないものまで存在した．これらの変化は肺胞壁における細胞数の増加や細胞の腫大によるものであった．これらの細胞は通常の大形の肺胞上皮と同様な大きさで，好塩基性が強い核を有しているものと，やや大きく，細顆粒状の明るい核質の核を有しているものとがあった(Photo 3)．細胞境界は不明瞭であるが，細胞質は細かい泡沫状のものが多かった．また肺胞壁に沿って様々な大きさの空胞の存在が見られ，大きなものは肺胞の1/4～1/3大のものもあった (Photo 3)．これらの空胞は，小さなものが肺胞壁に存在する細胞の細胞質に見られることから，肺胞壁で増生，腫大している細胞の細胞質に由来すると思われた．その他，肺胞壁では，壁を構成する細胞または間質が部分的にエオジン淡染の均質な物質に変化していたり，好中球，好酸球などの炎症性細胞の浸潤も散見された．これらの変化はとくに出血や，肺胞壁の変化の程度の強い例で見られた．400mg/kg投与群では，250mg/kg群で見られた変化の程度が強くなった．そのうち出血はとくに顕著で，巣状散在性またはほぼびまん性に，より広い範囲に見られ，それらの部位では，肺胞の多くは，赤血球で満たされていた．出血の程度はとくに組織の辺縁で強く，肉眼所見と一致していた．充血のみられる肺胞壁も見られたが，出血や肺胞壁の変化の程度が強いために見分け難くなっていた．またより多くの血管でその周囲の間質の浮腫がみられ，その部分に炎症性細胞や線維芽細胞の存在する例も認められた．出血部位の周囲では肺胞内水腫を見る例も散見された．肺胞壁は，細胞数の増加，細胞の腫大，空胞の大きさや数量などからみて，いずれもその程度は強くなっていた．それらの結果として，肺胞壁は，250mg/kg投与群に比べ，形が不規則で，より大きな小塊状または小結節状を呈し，肺胞構造の認められないものも多

かった．また，空胞が特に多く存在する部分では，ちょうど蓮根の切り口の様に見えた．組織全体に亘ってこの様な小巣が点在していた(Photo 4)．これらの肺胞壁に存している細胞は，大きな長円形またはだ円形の核を有しているものが多くみられた．それらの核質は細顆粒状または胞状で大きな核小体が存在し，まれに分裂像もみられた(Photo 5)．これらの細胞は肺胞と接している小血管周囲にも見られ，その部分では，血管外膜より由来した線維芽細胞のように見えた(Photo 5)．変化の見られた肺胞壁での線維の増生に注目し，アザン染色を行ない観察したが，いずれの部位にも線維の増生は認められなかった．また肺胞壁が部分的にエオジン淡染の均質物質様に変化しているものも，より多くの部位で見られた．細胞の増生や腫大によって肥厚した肺胞壁の他に，同時に細胞成分が少なく，線維状に細くなったものも多く見られた．肺胞腔内や上位の気道内には，エオジン淡染均質物質など変性剝離した壁成分の残渣，赤血球，大食細胞などが多く見られた(Photo 6)．肺内の各気管支では，出血や肺胞壁の変化の程度に応じて，粘膜上皮細胞の腫大，増生が認められた．

BHT 投与群では640および1024mg/kg 群でともに小血管および毛細血管のうっ血や血管周囲間質の浮腫を見る例が散見されたが，いずれも軽度であり，その発生頻度に用量との相関はなかった (Photo 7)．

TBHQ 群では98mg/kg 群では対照と同様であったが，156mg/kg 群では肺胞壁に空胞が見られた．その大きさや数量は BHA 群に比べ，はるかに小さく，また少ないものであった(Photo 8)．その他は対照に比べ，特に変化は見られなかった．

次に BHA，TBHQ 群で観察された空胞の性状について，クリオスタット切片を作製しズダン黒による脂肪染色を行なった結果を示す．対照群では，肺胞壁に沿って，微細顆粒状の脂肪滴の存在が，認められた (Photo 9)．BHA 群では，様々な大きさの脂肪滴の存在が認められた．これらは肺胞壁の肥厚した部位に多くみられ，HE 切片で見られた空胞と一致していた(Photo10)．BHT 群では，対照と同様で，特に大きな脂肪滴の存在はなかった (Photo 11)．TBHQ 群では156mg/kg 群で HE 切片で見られた空胞に一致した脂肪滴の存在がみられた (Photo 12)．

考　察

酸化防止剤である BHA，BHT および TBHQ の腹腔投与によるラット肺への障害作用を観察した．BHA のみが，肺にうっ血，浮腫，出血，肺胞壁での細胞増生および脂肪滴の蓄積などからなる強い作用を示した．除草剤であるパラコートによるラット肺障害では，散在性の巣状出血，肺胞壁での細胞増生および線維化などが主に観察され，また BHT によるマウス肺障害では，毛細血管の充血および血管間質の浮腫，肺胞上皮細胞の増生などが認められている[7,11,12]．このうち BHT による肺胞細胞の増生は，肺胞壁の損傷に対する修復反応と考えられている．脂肪滴の蓄積については，パラコートや BHT による肺障害では，報告されていないが，肺の脂質の存在に関して，肺胞上皮細胞よりホスファチジルコリンなどのリン脂質からなる肺胞表面活性物質が分泌されることが知られている[13]．Valdvia[14]らは四塩化炭素を投与したモルモットで肺胞壁の脂肪滴の形成を観察し，この変化が肝細胞の脂肪変性と同様，脂質の分泌抑制の結果生じることを報告した．BHA による変化でも，脂肪滴が細胞質に生じたものと考えられたが，その性状については，今後の分析により明らかにしたい．今回観察された BHA による一連の変化は BHT やパラコートによる肺障害で見られる変化と同様な性質のものと思われるが，その成り立ちについては，さらに時間的経過を追った観察や，電顕を用いた観察が必要である．

BHT 投与ラットの肺では，用量との相関はなかったが，うっ血と浮腫がみられた．またプロトロンビン指数の低下も見られた．この血液性状の変化と組織変化との関係が考えられたが，BHA250mg/kg 投与群では，顕著な変化を見るにもかかわらず血液性状の変化は見られず，これがうっ血や浮腫の原因ではないものと考えた．

TBHQ 群では156mg/kg 投与群で BHA に比べ非に軽度であるが肺胞壁での脂肪滴の形成がみられた．TBHQ のラット肺への作用については，BHT 同様，報告例がないが，マウス肺については，Krasavage[15]の報告があり，これによれば TBHQ による作用は認められていない．脂肪滴の形成に関して BHA と同様の作用が考えられるが，BHT で見られた充血などの変化と同様，大変軽度なものであり，再度実験を行ない確認したい．

BHA と BHT の肺への作用について，今回得られた結果と既知の結果とをまとめると次のようである．腹腔内注射によって BHA はラットに肺障害を起こすが BHT は起さなかった．マウスに対しては BHA は前実験[6]で示したように作用はみられなかったが，BHT は強い肺の障害作用を起こすことが知られている[7,11]．また経口的に投与された BHA および BHT は，ともにラット肺に対して作用はみられなかった[2]．以上のことから BHA の肺に対する作用には投与経路や動物種による明

らかな差があることが示された．

腹腔内投与された酸化防止剤のうちBHAが最も強い作用を示した．しかし，体重の変化のうち，実験後半の肺障害による減少傾向を除くと，その変化の傾向は，BHTのそれと同様であった．またプロトロンビン活性に対する作用もBHA，BHTともにみられた．さらにBHTがマウス肺に同様な変化を起すことから，種差はあるものの，生体への作用のしかたはよく似ているものと思われる．TBHQは，BHAと同様な肺の変化を起す可能性はあるが，体重の変化の傾向はBHAおよびBHTとは異っていた．またプロトロンビン活性に対する作用がなかったこと，さらにLD50値[8]が特に低いことなどから，その生体への作用のしかたは，BHAとBHTとは異なった性質を有するものと思われた．

文　献

1) Food Chemical Codex, 3rd Ed., 321, 1981, National Academy Press, Washington, D.C.
2) 平賀興吾ら：東京衛研年報，22, 231—249, 1970
3) 藤井　孝ら：東京衛研年報，26, 36—39, 1975
4) Takahashi, O. and Hiraga, K.：*Toxicol. Appl. Pharmacol.* 46, 811—814, 1978
5) Sgaragli, G., Corte, L. D., Pulti, R., Desario, F., Fancalanci, R. and Guarna, A.：*Biochem. Pharmacol.* 29, 763—769, 1980
6) 高橋　省，坂本義光，平賀興吾：第71回日本薬理学会関東部会講演要旨集，21, 1984
7) Marino, A. A. and Mitchell, J. T.：*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 140, 122—125, 1972
8) Krasavage, W. J.：*Drug, Chem. Toxicol.*, 7, 329—334, 1984
9) Takahashi, O. and Hiraga, K.：*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 43, 399—406, 1978
10) Quick, A. J., Stanley-Brown, M. and Bancroft, F. W.：*Am. J. Med. Sci.* 190, 501—511, 1935
11) Saheb, W. and Witsch, H.：*Toxicol. Appl. Pharmacol.* 33, 309—319, 1975
12) Clark, D. G., McElligott, T. F. and Hurst, E. W.：*Brit. J. Investr. Med.* 23, 126—132, 1966
13) 大野公吉，下条　貞：代謝，11, 1568—1585, 1974
14) Valdvia, E. and Sonnadi, J.：*Arch. Path.* 81, 514—519, 1966
15) Krasavage, W. J.：*Drug Chem. Toxicol.* 7, 335—343, 1984

Explanation of plates

Photo 1—8. Photomicrographs were prepared from paraffin sections stained with hematoxiline and eosin.

Photo 1. Lung section with normal alveolar structure from control rat. ×100

Photo 2. Section from rat given 250 mg/kg BHA. Congestion of capillaries and small vessels, perivascular edema and thickened alveolar wall in several places. ×100

Photo 3. Higher magnification of section in photo 2. Enlarged cells and various size of vacuoles in thickened alveolar wall. ×200

Photo 4. Section from rat given 400 mg/kg BHA. Alveolar hemorrhage and marked changes of alveolar wall. ×100

Photo 5. Higher magnification of secion in photo 4. Enlarged cells with large nuclei and mitotic figure in thickened alveolar wall. ×200

Photo 6. Same section of photo 5. Pink stained materials in air spaces. ×200

Photo 7. Section from rat given 1024 mg/kg BHT. Slight congestion of capillaries and small vessels. ×100

Photo 8. Section from rat given 156 mg/kg TBHQ. Small vacuoles in alveolar wall. ×200

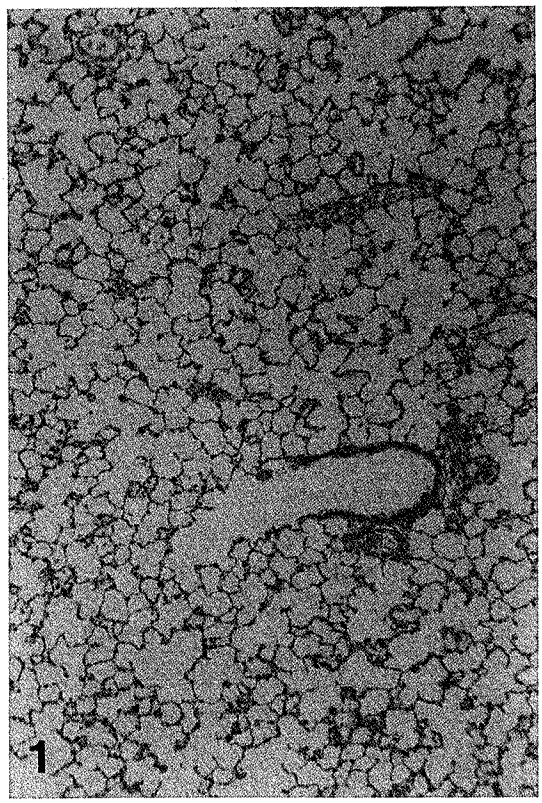
Photo 9—12. Photomicrographs were prepared from cryostat section stained with sudan black B.

Photo 9. Section from control rat. Fine glanular lipid droplets in alveolar wall. ×200

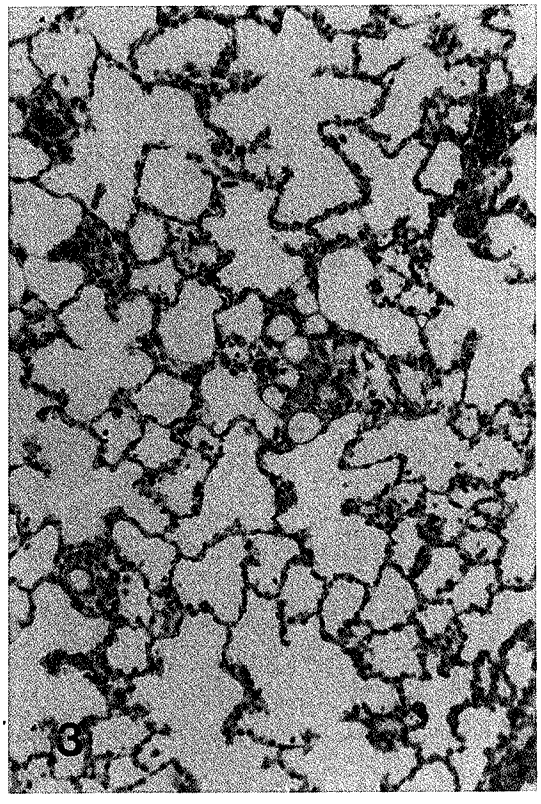
Photo 10. Section from rat given 400 mg/kg BHA. Large lipid droplets in thickened alveolar walls. ×200

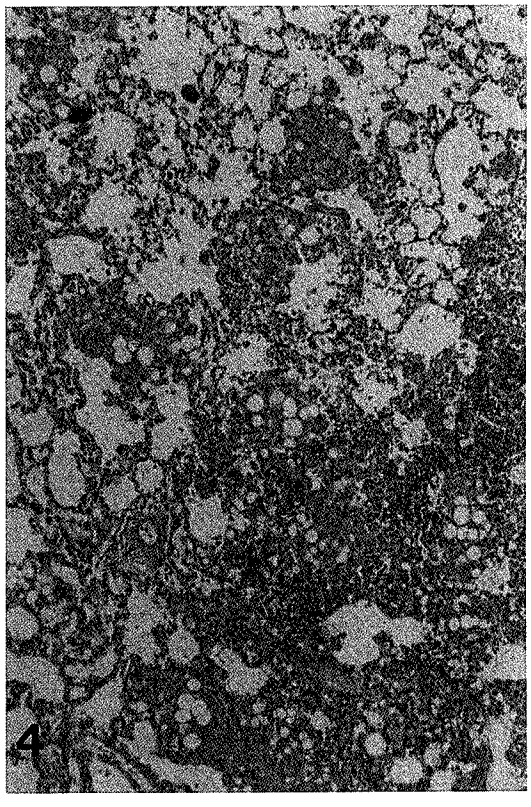
Photo 11. Section from rat given 1024 mg/kg BHT. Same figure as control rat in photo 9.

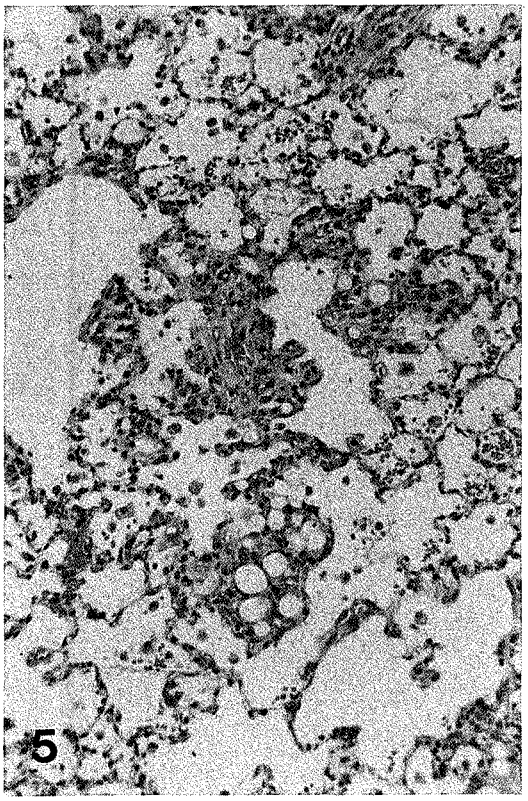
Photo 12. Section from rat given 156 mg/kg TBHQ. Small lipid droplet in alveolar wall. ×200

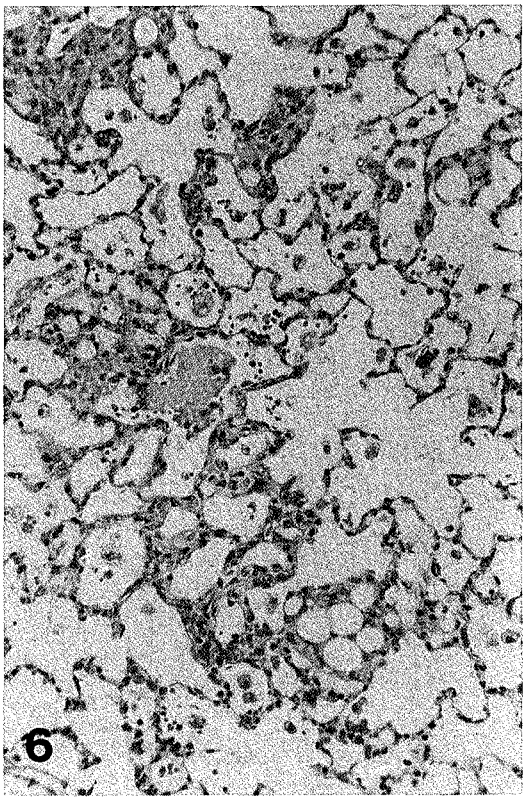

1

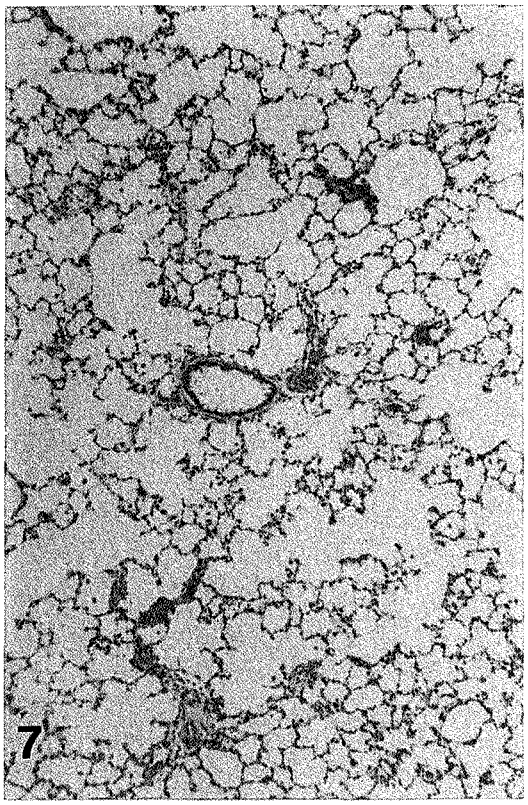
2

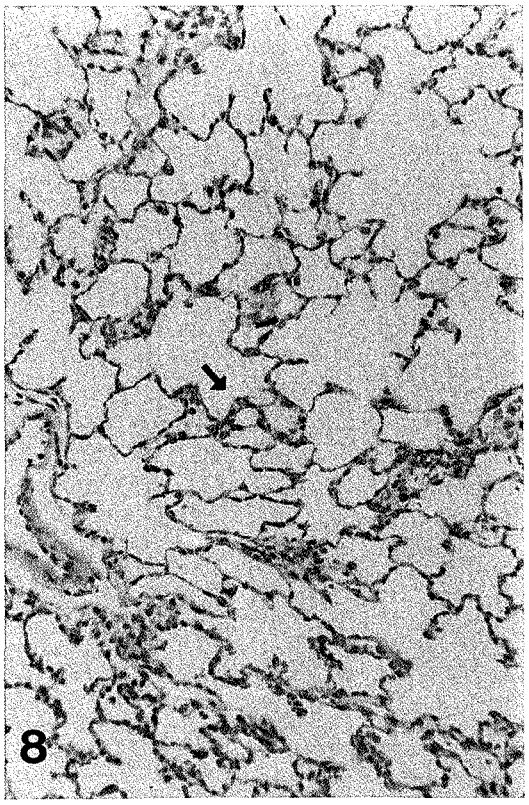

3

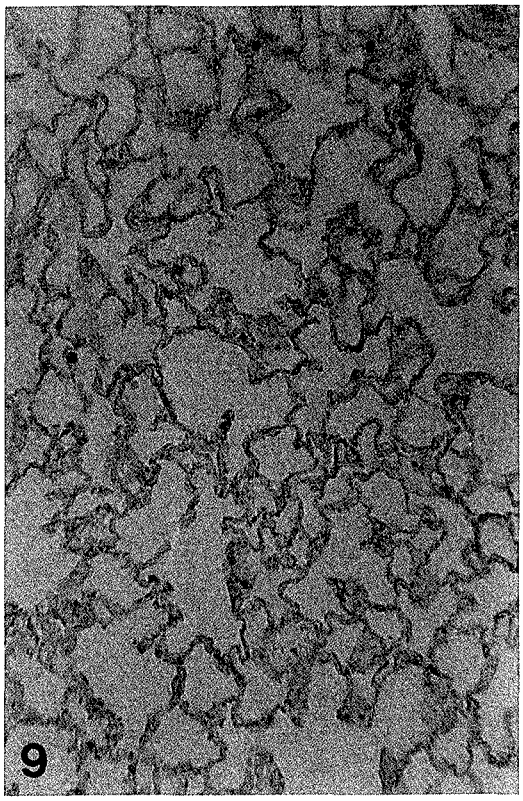

4

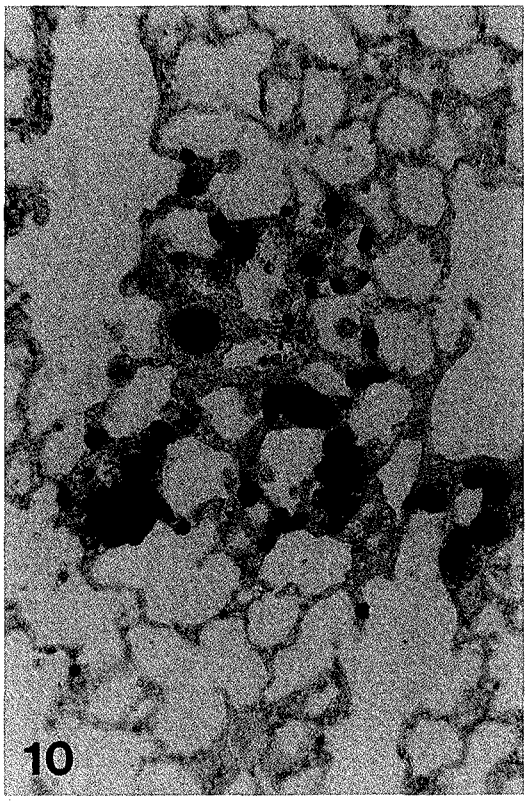

5

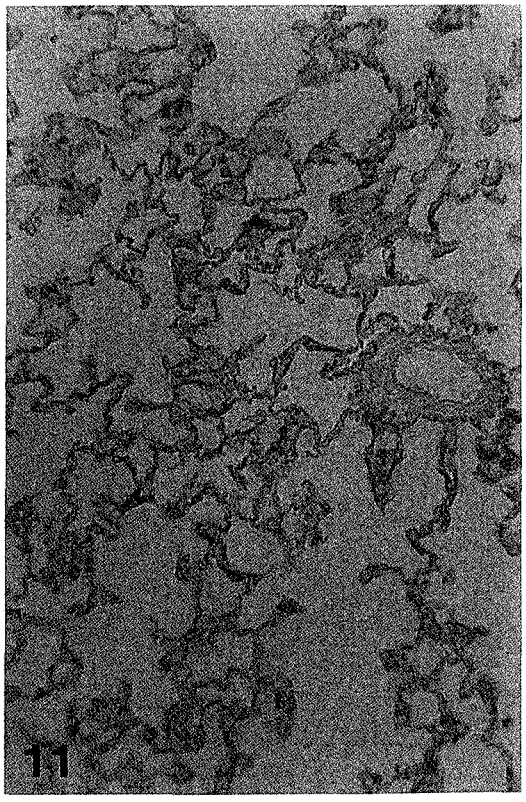

6

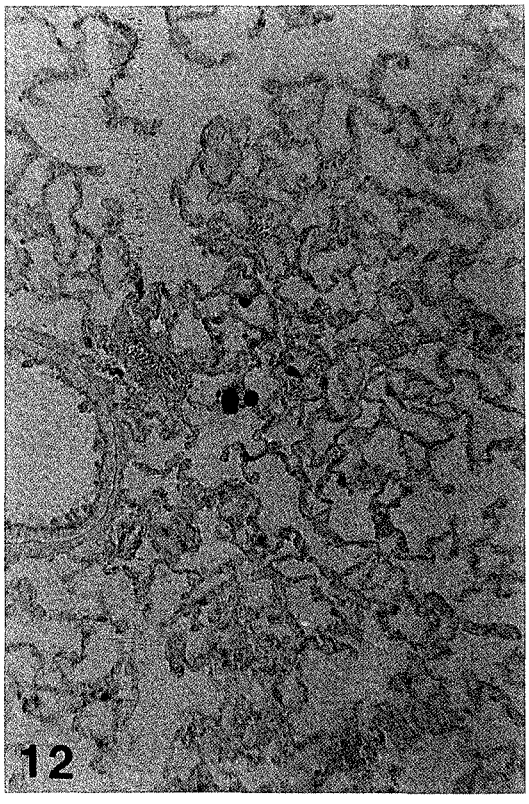

7


8


9


10


11


12

他 誌 発 表

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1984. 7—1985. 6)

原著論文

ヒトおよび各種動物から分離された *Campylobacter jejuni* および *Campylobacter coli* の抗生物質感受性の比較

伊藤　武，高橋正樹，甲斐明美，高野伊知郎，斎藤香彦，大橋　誠：感染症学雑誌，58(11)，1206，1984

Transferable Resistance to the Vibriostatic Agent 2, 4-Diamino-6, 7-Diisopropyl-Pteridine(O/129)in *Vibrio cholerae*

Shigeru Matsushita, Yasuo Kudoh and Makoto Ohashi：Microbiology and Immunology, 28(10), 1159, 1984

Staphylocoagulase-Biding Region in Human Prothrombin

Shun-ichiro Kawabata, Takashi Morita, Sadaaki Iwanaga, Hideo Igarashi：J. Biochem, 97(1), 325, 1985

Difference in enzymatic properties between α-thrombin-Staphylocoagulase complex and free α-thrombin

Shun-ichiro Kawabata, Takashi Morita, Sadaaki Iwanaga, Hideo Igarashi：J. Biochem, 97(4), 1073, 1985

TSS(Toxic shock syndrome)に類似した黄色ブドウ球菌性敗血症の3例

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：日本救急医学会関東地方会雑誌，6(1)，15，1985

ニワトリにおけるカンピロバクターの保菌状況ならびに本菌の排菌推移および養鶏場の環境における本菌汚染状況について

伊藤　武，高橋正樹，斎藤香彦，高野伊知郎，甲斐明美，大橋　誠，福山正文，上村知雄：感染症学雑誌，59(2)，86，1985

Thermophilic Bacteria：a New Couse of Human Disease

C.S.Rabkin, E.I.Galaid, D.G.Hollis, R.E.Weaver, S.B.Dees, A.Kai, C.W.Moss, K.K.Sandhu and C.V.Broome：J.Clin.Microbiol, 21(4)，553，1985

寝たきり老人の異常精神症状発現の要因――知力低下と介護者との人間関係――

大井　玄，深山智代，甲斐一郎，武長脩行，山崎信行，市川伸一，鈴木重任，中川正宣，柄沢昭秀，山本俊一：老人社会科学，6，2，124，1984

農村地域における長谷川式簡易知的機能評価スケールの適用可能性――東京都と沖縄県における比較検討より――

甲斐一郎，大井　玄，鈴木重任，深山智代，市川伸一，武長脩行，山崎信行，名嘉幸一，山本俊一：老人精神医学，12，2，293，1985

ボケ老人の異常精神症状発現率――地域環境指標たりうるか――

大井　玄，鈴木重任，山本俊一，深山智代，甲斐一郎，武長脩行，山崎信行，市川伸一，原　実，中川正宣，佐藤弘明，名嘉幸一：日本公衆衛生雑誌，31，569，1984

虚弱老人のための介護者・患者関係アセスメントの試み

市川伸一，中川正宣，大井　玄，鈴木重任，深山智代，武長脩行，甲斐一郎，山崎信行，山本俊一，柄沢昭秀，名嘉幸一，當山冨士子：日本公衆衛生雑誌，32，5，1985

5月末に集団発生をみたB型インフルエンザ

坂井冨士子：病原微生物検出情報，(54)，2，1984

下水中のウイルスの消長とその不活化に関する研究．第1報下水のウイルス学的実態調査

矢野一好，林　志直，藪内　清，田口文章：用水と廃水，27(5)，489，1985

抗原決定基の構造とモノクローナル抗体利用の展望

安東民衛：組織培養，11(5)，186，1985

インフルエンザ流行の時間差に関する研究．平均気温，平均相対湿度を中心として

薩田清明，乗木秀夫，坂井冨士子，藪内　清：感染症学雑誌，59(4)，355，1985

下水中のウイルスの消長とその不活化に関する研究. 第2報紫外線によるポリオウイルスの不活化

矢野一好, 薮内　清, 田口文章：用水と廃水, 27(6), 596, 1985

高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中のグアイアズレンの定量法

鎌田国広, 観　照雄, 原田裕文：衛生化学, 30(3), 144, 1984

High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Estradiol Benzoate in Cosmetics

K.Kamata, H.Harada：衛生化学, 30(5), 313, 1984

高速液体クロマトグラフィーによる乳液, クリーム中の没食子酸プロピルの定量法

鎌田国広, 風間成孔：衛生化学, 30(6), 390, 1984

Separation of Methyl-Substituted Benz〔c〕acridines by Gas-Liquid Chromatography and High--Performance Liquid Chromatography

K.Kamata, N.Motohashi：J.Chromatogr., 319, 331, 1985

日本薬局法エナント酸テストステロン注射液. プロゲステロン注射液, プロピオン酸テストステロン注射液の定量法

重岡捨身, 宮武ノリエ, 秋山和幸, 原田裕文：医薬品研究, 16(1), 151, 1985

医薬品製剤の定量法に関する研究. 局方製剤中の微量カプサイシノイドの定量

風間成孔, 寺島　潔, 高橋利恵子, 安田一郎, 秋山和幸, 原田裕文：医薬品研究, 16(1), 155, 1985

河川水中の発熱性物質と細菌汚染の比較

正木宏幸, 徳丸雅一, 宇佐美博幸, 岩崎久夫：日獣会誌, 38, 27, 1985

食肉からの *Yersinia enterocolitica* の分離方法の再検討——CIN 培地の選択性とアルカリ処理効果

金子誠二, 神保勝彦, 小久保彌太郎, 松本昌雄, 丸山努：食品衛生学雑誌, 25(5), 424, 1984

Characterization and pathogenicity of *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from swine and other animals

Misao Tsubokura, Koichi Otsuki, Yoshihiro Kawaoka and Tsutomu Maruyama：J.Clin.Microbiol.19(6), 1984

Virulence-associated plasmids of *Yersinia enterocolitica* isolated in Japan

Mayumi Tanaka, Masayuki Nakamura, Osamu Ito, Tsutomu Maruyama and Masuo Ogawa：Jpn.J.Vet.Sci.46(6), 954, 1984

Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains of serovars 1a, 3, 5, 6, 8, 11, 21, and Type N isolated from slaughter pigs affected with chronic erysipelas

Toshio Takahashi, Takuo Sawada, Kenji Seto, Masatake Muramatsu, Tsutomu Maruyama and Masako Kanzaki：Jpn.J.Vet.Sci.47(1), 1, 1985

いわゆる健康食品の衛生学的調査（I）

安田和男, 西島基弘, 斉藤和夫, 上村　尚, 井部明広, 永山敏廣, 牛山博文, 田端節子, 松本幸子, 直井家壽太, 二島太一郎：食品衛生学雑誌, 26(4), 371, 1984

市販穀類の汚染実態調査及び汚染粒の出現率

上村　尚：マイコトキシン, 19, 12, 1984

The Organ Distribution of Tin and The effect of Tin on Concentrations of Several Essential Elements in Rabbit

Momoko Chiba, Kazuko Ogihara, Yutaka Inaba, Taichiro Nishima and Masakazu Kikuchi：Toxicology, 31, 23, 1984

高速液体クロマトグラフィーによる食品中のオクラトキシンA及びBの分析法

井部明広, 西島基弘, 安田和男, 斉藤和夫, 上村　尚, 永山敏廣, 牛山博文, 直井家壽太, 二島太一郎：食品衛生学雑誌, 25(4), 334, 1984

酵素法によるシアン配糖体の分析（第一報）
β—グルコシダーゼによるシアン配糖体の加水分解

冠　政光，直井家壽太，宇田　裕，伊藤智子：衛生化学，30(5)，291，1984

ICP発光分光分析法によるヒト血液の多元素同時分析

二島太一郎：病態生理，30(10)，828，1984

食品中のアスパルテーム分析法

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，二島太一郎：食品衛生学雑誌，26(1)，1，1985

Aflatoxicol汚染飼料用コーンから分離した糸状菌による Aflatoxin B_1 から Aflatoxicol への変換について

中里光男，斉藤和夫，菊地洋子，井部明広，藤沼賢司，西島基弘，直井家壽太，二島太一郎，諸角　聖，和宇慶朝昭，一言　広：食品衛生学雑誌，26(1)，33，1985

Simple, Rapid Cleanup Method for Analysis of Aflatoxins and Comparison with Various Methods

Hisashi Kamimura, Motohiro Nishijima, Kazuo Yasuda, Hirofumi Ushiyama, Setsuko Tabata, Sachiko Matsumoto and Taichiro Nishima：J.Assoc.Off.Anal.Chem.,68(3)，458，1985

東京都区部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（I）

牧野国義，溝口　勲：日本公衆衛生雑誌，31(7)，297，1984

Furan ring formation in OH-initiated photooxidation of 1, 3-butadiene and cis-1, 3-pentadiene

T.Ohta：Bull.Chem.Soc.Jpn.,57，960，1984

Rate constants for the reactions of OH radicals with alkyl substituted olefins

T.Ohta：Int.J.Chem.Kinetics,16，879，1984

Reactivity of allylic hydrogen in cyclohexadiene towards OH

T.ohta：Int.J.Chem.Kinetics,16，1495，1984

大規模食中毒の起因菌とその疫学

坂井千三：食品衛生研究，34(7)，709，1984

高速液体クロマトグラフィーによる食品中の油溶性天然色素の定量

天川映子，平田恵子，荻原　勉，大西和夫：分析化学，33(11)，586，1984

On the Mechanism of Butylated Hydroxytoluene-Induced Hepatic Toxicity in Rats

Y.Nakagawa, K.Tayama, T.Nakao and K. Hiraga：Biochem.Pharmac.,33，2669，1984

The Maternal-Foetal Distribution of Thiabendazole Administered in Two Different Vehicles to Pregnant Mice

M.Yoneyama, A.Ogata, T.Fujii and K.Hiraga：Fd Chem.Toxic.,22(9)，731，1984

Effects of Di-2-ethylhexyl Phthalate on Lipid Compositions of Serum and Testis in Rats

S.Oishi：Toxicol.Lett.,23(1)，67，1984

Introduction of Chromosome Aberrations and Sister-Chromatid Exchanges in CHO-K1 Cells by *o*-Phenylphenol

S.Tayama, S.Yoshida, T.Nakao and K.Hiraga：Mutation Res.,141，95，1984

Reversibility of Testicular Atrophy Induced by Di(2-ethylhexyl) Phthalate

S.Oishi：Environ.Res.,36(1)，160，1985

Effect of Cobaltous Chloride on Butylated Hydroxytoluene-Induced Hepatic Necrosis in Rats

Y.Nakagawa, K.Tayama, T.Nakao and K.Hiraga：Toxicol.Lett.,24，85，1985

Differences in the Haemorrhagic Toxicity of Aspirin between Rats and Mice

O.Takahashi and K.Hiraga：Acta. Pharmac. Tox.,56(1)，6，1985

Orthophenylphenol Mutagenicity in a Human Cell Strain

H.Suzuki, N.Suzuki, M.Sasaki and K.Hiraga：Mutation Research，156，123，1985

Induction of tumours of the urinary bladder in F344 rats by dietary administration of *o*-phenylphenol

K.Hiraga and T.Fujii：Fd Chem.Toxic.,22(11), 865, 1984

Carcinogenicity testing of acetaminophen in F344 rats

K.Hiraga and T.Fujii：Jpn.J.Cancer Res.(Gann),76(2), 79, 1985

Teratogenicity of thiabendazole in ICR mice

A.Ogata,H.Ando,Y.Kubo and K.Hiraga：Fd Chem.Toxic.,22(7), 509, 1984

総説・解説

トキシック・ショック・シンドローム

五十嵐英夫，藤川　浩，宇佐美博幸：医学のあゆみ，131(13)，945，1984

大腸菌による下痢症

工藤泰雄：医学のあゆみ，131(13)，853，1984

細菌性輸入腸管感染症その現状と対策

大橋　誠：医学のあゆみ，131(13)，858，1984

ブドウ球菌食中毒

寺山　武：Medico，15(7)，15，1984

ウエルシュ菌食中毒

寺山　武：Medico，15(7)，22，1984

輸入感染性下痢症

工藤泰雄：Medico，15(7)，25，1984

腸内細菌科（Family Enterobacteriaceae）分類の歩み

寺山　武：Clinical Laboratory,summer,13，1984

下痢症からのAeromonas属およびPlesiomonas属の分離・同定

伊藤　武：Medical Technology,12(8)，799，1984

昨今のコレラ事情

大橋　誠：Medical Tribune,17(32)，18，1984

食中毒

大橋　誠：Current Concepts in Infectious Diseases 今日の感染症，4(2)，9，1985

ブドウ球菌によるToxic Shock Syndrome

五十嵐英夫，藤川　浩，宇佐美博幸：小児科診療，48(4)，94，1985

サルモネラ食中毒とその予防

寺山　武：食品衛生，(5)，28，1985

***Campylobacter jejuni* および *Campylobacter coli* の検査法**

伊藤　武，高橋正樹，甲斐明美：メディアサークル，30(4)，14，1985

冷蔵肉の細菌叢について

小久保彌太郎：肉の科学，25(1)，1，1984

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

小久保彌太郎：食品と微生物，1(1)，93，1984

***Yersinia enterocolitica* の病原性**

丸山　務：メディアサークル，29(8)，346，1984

空調ダクト内堆積塵の性状—6ビルの調査結果より—

佐藤泰仁：ビルメンテナンス，5(20)，46，1985

著　書

感染症の変貌とその対策

五十嵐英夫（分担執筆）：メディカル・ジャーナル社，1985

食品微生物検査の簡易化，自動化，迅速化

五十嵐英夫(分担執筆)：サイエンスフォーラム，1985

Current Status of Bacterial Diarrheal Diseases in Japan

Y.Kudoh and S.Sakai : Bacterial Diarrheal Diseases, 〔Eds〕, Y.Takeda and T.Miwatani, 83, Martinus Nijhoff Publ., Boston, 1985

Biochemical and Serological Characteristics and Fatty Acid Composition of Thermophilic Campylobacter

M.Ohashi, S.Sakai, T.Itoh, K.Saito, A.Kai and Y.Yanagawa : 〔Eds〕 Y.Takeda and T.Miwatani, 241, Martinus Nijhoff Publ., Boston, 1985

Etiological Survey on Diarrheal Diseases in a Rural Area in Thailand, Chanthaburi

M.Tsuno, K.Ohta, S.Matsushita, S.Yamada, Y.Kudoh, S.Sakai, M.Ohashi, D.Bhanthunkosol and R.Ran-Vrai : Adovances in Research on Cholera and Related Diarrheas, 〔Eds〕 S.Kuwahara and N.F.Pierce, 41, Martinus Nijhoff Publ., Boston, 1985

Antibiotic Resistance of *Vibrio Cholerae* Recently Isolated from Human Sources in Japan and Other Countries

S.Matsushita, K.Ohta, M.Tsuno, S.Yamada, Y.Kudoh, S.Sakai and M.Ohashi : Adovances in Research on Cholera and Related Diarrheas, 〔Eds〕 S.Kuwahara and N.F.Pierce, 173, Martinus Nijhoff Publ., Boston, 1985

Simplified Method for Identification of Enterotoxigenic *Escherichia coli*

Y.Kudoh, S.Matsushita, S.Yamada, M.Tsuno, K.Ohta, S.Sakai and M.Ohashi : Adovances in Research on Cholera and Related Diarrheas, 〔Eds〕 S.Kuwahara and N.F.Pierce, 261, Martinus Nijhoff Publ., Boston, 1985

Data-Exchange Project on Infection Diseases SEAMIC

M.Ohashi : In Proceedings of the 12th SEAMIC Workshop "Problems of Malaria in the SEAMIC countries" Edited by Chamlong Harinasuta and Denisec Reynolds, 5, SEAMIC/IMFJ, Tokyo, 1985

単クローン抗体ハンドブック

安東民衛，富山朔二(分担執筆)：講談社サイエンティフィク，1985

最近の製剤技術とその応用II

宇佐美博幸（分担執筆）：医薬ジャーナル社，1985

食品微生物検査の簡易化，自動化，迅速化

小久保彌太郎（分担執筆）：サイエンスフォーラム，1985

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5）

樋口育子，坂本朋子，中川順一，西垣　進：昭和59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），1985

学 会 発 表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1984. 7—1985. 6)

藤川　浩，五十嵐英夫，植田忠彦：**月経処理用タンポン中における黄色ブドウ球菌 Toxic shock toxin の産生性**
第57回日本細菌学会総会（1984．7）

五十嵐英夫，宇佐美博幸，藤川　浩，田村弘志，田中重則：**合成発色基質を用いたリムルステストによる黄色ブドウ球菌 Toxic shock toxin 投与ウサギの血中エンドトキシンの挙動について**
第57回日本細菌学会総会（1984．7）

柳川義勢，伊藤　武，斎藤香彦，大橋　誠，藤原　徹，中村明子，鈴木健之，栗原金治：***Campylobacter jejuni* の病原性に関する研究　3）サルにおける胃内投与による感染実験**
第57回日本細菌学会総会（1984．7）

松下　秀，工藤泰雄，山田澄夫，津野正朗，大橋　誠：**Vibrio-static agent O／129耐性 *V. cholerae* について**
第57回日本細菌学会総会（1984．7）

工藤泰雄：**大腸菌による腸管感染症**
第57回日本細菌学会総会（1984．7）

M.Ohashi：**Data-Exchange Project on Infectious Diseases**
The 12th SEAMIC Workshop"Problem of Malaria in SEAMIC countries"（1984．8）

潮田　弘，五十嵐英夫，新垣正夫，藤川　浩，寺山　武：**ブドウ球菌食中毒原因菌型の推移**
第29回ブドウ球菌研究会（1984．9）

五十嵐英夫，新垣正夫，潮田　弘，藤川　浩，寺山　武，河野潤一，清水　晃：***Staphylococcus aureus* および *Staphylococcus intermedius* の産生するコアグラーゼの免疫学的相違性について**
第29回ブドウ球菌研究会（1984．9）

五十嵐英夫：**トキシックシンドローム**
第29回ブドウ球菌研究会（1984．9）

五十嵐英夫，藤川　浩，宇佐美博幸，星野忠夫，長尾憲樹：**黄色ブドウ球菌 Toxic Shock toxin のウサギ生体に及ぼす影響**
第31回毒素シンポジウム（1984．9）

M.Ohashi：**Antibiotic Resistance in Enteric Pathogens in Southeast Asia and Japan**
International Task Forces and Symposium on The Use of Antibiotics Worldwide（1984．9）

川畑俊一郎，森田隆司，宮田敏行，岩永貞昭，五十嵐英夫：**スタフィロコアグラーゼの機能ドメインとその1次構造解析**
第35回タンパク質構造討論会（1984．10）

藤川　浩，五十嵐英夫，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 Toxic Shock Toxin の精製と性状**
第2回診断クロマトグラフィシンポジウム（1984．11）

五十嵐英夫，川畑俊一郎，森田隆司，岩永貞昭：**ウシ・プロトロビン-Sepharose アフィニティーカラムを用いたブドウ球菌コアグラーゼの精製**
第2回診断クロマトグラフィシンポジウム（1984．11）

A.Kai，M.A.Lambert and C.W.Moss：**Cellular fatty acid composition and isoprenoid quinone content of *Vibrio cholerae* and related vibrios**
The 20th Joint Conference Cholera，US-Japan Cooperative Medical Science Program，Cholera Panel（1984．11）

S.Yamada，S.Matsushita，Y.Kudoh and M.Ohashi：**Purification and characterization of hemolysin produced by *Vibrio fluvialis***
The 20th Joint Conference Cholera，US-Japan Cooperative Medical Science Program，Cholera Panel（1984．11）

Y.Kudoh，S.Matsushita and M.Ohashi：**O/129 resistance and R.plasmids in *Vibrio cholerae* O-1 isolated from human sources**
The 20th Joint Conference Cholera，US-Japan cooperative Medical Science Program，Cholera panel

(1984. 11)

松下真理，生方公子，山下直子，紺野昌俊，五十嵐英夫：**外来患者由来の膣分泌物から分離した黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン産生状況とコアグラーゼ型，ファージ型との関係について**
第33回日本感染症学会東日本地方会総会（1984. 11）

高野伊知郎，伊藤　武，高橋正樹，斎藤香彦，富岡芳彦，高橋栄一：**食品中におけるカンピロバクターの生存および増殖に関する研究．2．真空包装およびガス置換包装した生肉中の本菌の生存について**
食品衛生微生物研究会第5回学術講演会（1984. 11）

山田澄夫：**輸入食品の検疫，海外帰国者の病原菌保菌者の現状**
食品衛生微生物研究会第5回学術講演会（1984. 11）

高橋正樹，斎藤香彦，甲斐明美，稲葉美佐子，柳川義勢，伊藤　武，高野伊知郎：**食品中におけるカンピロバクターの生存および増殖に関する研究．3．野菜・惣菜中の本菌の生存**
食品衛生微生物研究会第5回学術講演会（1984. 11）

斎藤香彦，高野伊知郎，高橋正樹，伊藤　武，大橋　誠：***Campylobacter coli* の血清型別とヒトおよび各種動物由来菌株の型別状況**
第52回日本細菌学会関東支部総会（1984. 11）

甲斐明美，M.A.Lambert，C.patton，C.W.Moss：**カンピロバクター属のイソプレノイドと菌体脂肪酸組成の分析**
第52回日本細菌学会関東支部総会（1984. 11）

M. Ohashi：**A new Horizon for Cholera Control**
Robert Koch Memorial Symposium on Cholera (1984. 11)

三原純司，朝倉　斌，森内正人，小島弘之，牧　正裕，斎藤　顕，白土寿晨，五十嵐英夫：**救命し得た toxic shock syndrome(TSS)の1例**
第344回日本内科学会関東地方会例会（1985. 2）

潮田　弘，新垣正夫，五十嵐英夫，藤川　浩，寺山　武：**ブドウ球菌食中毒原因菌のコアグラーゼ型の推移**
第58回日本細菌学会総会（1985. 3）

相川直樹，鈴木啓一郎，奥野星二郎，五十嵐英夫，石引久弥，阿部令彦：**外科臨床分離菌における黄色ブドウ球菌の分離頻度の増加とその臨床的意義**
第85回日本科学会総会（1985. 3）

若井真理子，鎌形有祐，内山竹彦，吉岡守正，五十嵐英夫，藤川　浩：**ブドウ球菌の産生する外毒素（TSST－1）によるマウスマクロファージのインターロイキン－1（IL－1）産生**
第58回日本細菌学会総会（1985. 3）

五十嵐英夫，藤川　浩，宇佐美博幸，星野忠夫，長野憲樹：**Toxic-Shock Syndrome 毒素のウサギ生体に及ぼす影響**
第58回日本細菌学会総会（1985. 3）

柳川義勢，伊藤　武，高橋正樹，甲斐明美，斎藤香彦，大橋　誠，中村明子，武藤　健，鈴木健之：**ウサギから検出されたカンピロバクターの性状について**
第58回日本細菌学会総会（1985. 3）

伊藤　武，甲斐明美，斎藤香彦，柳川義勢，稲葉美佐子，高橋正樹，高野伊知郎，工藤泰雄，松下　秀，大橋誠：**集団下痢症事例から検出された *Escherichia coli* O145：H-の病原性に関する検討**
第58回日本細菌学会総会（1985. 3）

山田澄夫，工藤泰雄，松下　秀，大橋　誠：***V.fluvialis* の産生する溶血毒素について―その安定性及び他ビブリオ溶血毒素との免疫学的関連性―**
第58回日本細菌学会総会（1985. 3）

津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：**感染症サーベイランス領域におけるラボラトリーコンピュータの導入**
第2回日本マイコンクラブ研究会（1985. 3）

川畑俊一郎，海田茂典，森田隆司，宮田敏行，岩永貞昭，五十嵐英夫：**スタフィロコアグラーゼのプロスロンビン結合部位の構造解析**
昭和60年度日本生化学会九州支部例会（1985. 4）

伊藤　武，高橋正樹，高野伊知郎，斎藤香彦，甲斐明美，柳川義勢，稲葉美佐子，大橋　誠：**市販食肉および食鳥処理場の環境におけるカンピロバクターの汚染および分離菌株の血清型別状況について**
第59回日本感染症学会総会（1985．5）

松下　秀，工藤泰雄，山田澄夫，津野正朗，大橋　誠：**近年分離されたヒト由来下痢原性ビブリオ(*V. cholerae* O-1，non O-1，*V. parahaemolyticus*，*V. fluvialis*)の薬剤耐性と保有伝達性Rプラスミッド**
第59回日本感染症学会総会（1985．5）

工藤泰雄，山田澄夫，松下　秀，津野正朗，大橋　誠：**ヒト下痢症・環境由来 Aeromonas の性状と病原性**
第59回日本感染症学会総会（1985．5）

M.Ohashi，Y.Kudoh，S.Matsushita，A.Nakamura：**Antibiotic resistance in enteric pathogens in Japan**
14th International Congress of Chemotherapy（1985．6）

工藤泰雄：**東京都における微生物検査情報システム**
衛生微生物技術協議会第6回研究会（1985．6）

伊藤　武：***Escherichia coli* O145：H-による食中毒例**
衛生微生物技術協議会第6回研究会（1985．6）

工藤泰雄：**赤痢菌の分類について**
衛生微生物技術協議会第6回研究会（1985．6）

寺山　武：**ブドウ球菌の分類について**
衛生微生物技術協議会第6回研究会（1985．6）

深山智代，山本俊一，大井　玄，甲斐一郎，鈴木重任，市川伸一，名嘉幸一，當山冨士子，山内弘子，豊里芳子，大田邦子，知花真悠美，松田重信，池原博盛：**寝たきり老人における異常精神症状の要因―知力低下と環境中ストレス，沖縄県読谷村の調査から―**
第43回日本公衆衛生学会総会（1984．11）

甲斐一郎，大井　玄，武長脩行，矢野栄二，鈴木重任，深山智代，市川伸一，名嘉幸一：**老人ボケと社会適応―東京と沖縄における在宅高齢者の比較より**
第55回日本衛生学会総会（1985．4）

山岡和枝，大井　玄，矢野栄二，甲斐一郎，武長脩行，深山智代，鈴木重任，木内とき子，大塚はな：**虚弱老人における介護負担度**
第55回日本衛生学会総会（1985．4）

鈴木重任，甲斐一郎，大井　玄：**老人病院における入退院の適応**
第55回日本衛生学会総会（1985．4）

児玉博英，徳満尚子，刑部陽宅，柏木義勝：**富山県における臨床材料由来溶血レンサ球菌について**
第59回日本感染症学会総会（1985．5）

柏木義勝，植田忠彦，土屋悦輝，風間成孔，林　勝宏，石井敏夫，二木鋭雄，中川茂男：**オゾンガスによる滅菌に関する検討**
第60回日本医科器械学会大会（1985．5）

植田忠彦，柏木義勝，土屋悦輝，風間成孔，林　勝宏，石井敏夫，二木鋭雄，中川茂男：**ガスクロマトグラフィによる残留オゾンの分析法について**
第60回日本医科器械学会大会（1985．5）

柴田　実，安部昭子：**ELISA法による百日咳抗体調査**
衛生微生物技術協議会第6回研究会（1985．6）

伊藤忠彦，坂井冨士子，山崎　清，中村清純，薮内　清，大橋　誠：**最近の伊豆七島におけるツツガ虫病(七島熱)の調査研究．式根島を中心とした実態調査**
第32回日本ウイルス学会総会（1984．7）

川本尋義，渡辺　豊，林　志直，矢野一好，薮内　清：**急性出血性結膜炎（AHC）ウイルスの血清学的研究．第7報非許容温度増殖株の性状とその抗原性について**
第32回日本ウイルス学会総会（1984．7）

伊藤忠彦：**腎症候性出血熱研究の現状．我が国の野外における感染現状**
第5回衛生微生物技術協議会（1984．7）

伊藤忠彦：**最近急増しているツツガ虫病について（七島熱を中心として）**
第3回東京都微生物技術協議会（1984．9）

林　績，上田隆司，林田　陽，丸山　脩，伊藤忠彦，坂井冨士子，山崎　清，中村清純，薮内　清，大橋　誠，大野正彦，吉川　翠，石館敬三，山本　正，前田正吉，前田旨子：**最近の伊豆七島におけるツツガ虫病(七島熱)の調査研究．式根島で実施したアンケート調査**
第73回東京都衛生局学会（1984．11）

渡辺悌吉，石原　祐，大久保さつき，小野正恵，薮内清，吉田靖子，関根整治，林　志直，矢野一好：**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15回日本小児ウイルス病研究会（1984．11）

伊藤忠彦他：**伊豆七島におけるツツガ虫病（七島熱）の調査研究．式根島を中心とした実態調査（第3報）**
第74回東京都衛生局学会（1985．5）

薩田清明，坂井冨士子，薮内　清：**1983年～1984年にかけての東京地域におけるインフルエンザの流行について．異常気象を中心としての解析**
第59回日本感染症学会総会（1985．5）

I.Yasuda, T.Hamano, T.Seto, K.Akiyama and H.Itokawa：**The Structures of Pungent Principles Belonging to Unsaturated Aliphatic Acid Amide in Some Crude Drugs**
The 5th Asian Symposium on Medical Plants and Spices（1984．8）

岩崎由美子，中山京子，高橋美佐子，秋山和幸：**HPLC，GCによる鎮咳剤の定量法**
第21回全国衛生化学技術協議会年会（1984．9）

瀬戸隆子，安田一郎，浜野朋子，秋山和幸：**HPLCによるセンノシドA・Bの定量法―瀉下剤への応用について―**
第21回全国衛生化学技術協議会年会（1984．9）

萩原輝彦，上原真一，鎌田国広，高橋美佐子，中山京子，秋山和幸：**HPLCによるラナトシドCの微量定量法**
第21回全国衛生化学技術協議会年会（1984．9）

安田一郎，浜野朋子，瀬戸隆子，秋山和幸：**細辛の品質評価（第2報）非精油成分によるウスバサイシン近縁植物のケモタキソノミー的考察**
日本生薬学会第31回年会（1984．10）

浜野朋子，安田一郎，瀬戸隆子，秋山和幸：**紫雲膏の薬剤学的研究（第2報）紫雲膏の酸化成績体について**
日本生薬学会第31回年回（1984．10）

田中孝治，田中　博，鈴木幸子，吉沢政夫，秋山和幸，安田一郎：**各地のオウレンの有効成分の含量の比較について**
第73回東京都衛生局学会（1984．11）

鈴木助治，酒井正美，森謙一郎，雨宮　敬，風間成孔：**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**
第21回全国衛生化学技術協議会年会（1984．9）

伊藤弘一，観　照雄，中村義昭，岸本清子，風間成孔：**香粧品中のグリコール類およびグリセリンのガスクロマトグラフィーによる定量法について**
第21回全国衛生化学技術協議会年会（1984．9）

雨宮　敬，酒井正美，森謙一郎，鈴木助治，風間成孔：**高速液体クロマトグラフィーによる衣料用衛生加工剤チアベンダゾールおよびイルガサンDP-300の定量法**
第21回全国衛生化学技術協議会年会（1984．9）

中村義昭，観　照雄，伊藤弘一，岸本清子，風間成孔：**市販固形化粧石けん中のタール色素の調査報告**
第21回全国衛生化学技術協議会年会（1984．9）

竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，江波戸舉秀，風間成孔：**ゴム製哺乳用具中の揮発性N-ニトロソアミンの定量**
第48回日本食品衛生学会（1984．10）

山野辺秀夫，竹内正博，水石和子，江波戸舉秀，風間成孔：**加熱気化―金アマルガム法による母乳中の総水銀の定量**
第48回日本食品衛生学会（1984．10）

酒井正美，鈴木助治，雨宮　敬，森謙一郎，風間成孔，浅井　葵，井藤秀雄，大角悦子，土屋正康：**市販衣料品中の防臭抗菌剤の使用実態調査**
第73回東京都衛生局学会（1984．11）

観　照雄，中村義昭，伊藤弘一，風間成孔：**ガスクロマトグラフィー質量分析法による化粧品中のエデト酸およびその塩類の分離定量**
日本薬学会第105年会（1985．4）

原田裕文，木嶋敬二，風間成孔，観　照雄，永山富雄，岩倉良平，沢村邦夫，西島　靖，平松　功，広田　博，藤山喜雄：**香粧品試験法シノキサート**
日本薬学会第105年会（1985．4）

原田裕文，木嶋敬二，風間成孔，観　照雄，永山富雄，岩倉良平，沢村邦夫，西島　靖，平松　功，広田　博，藤山喜雄：**香粧品試験法パラフェノールスルフォン酸亜鉛**
日本薬学会第105年会（1985．4）

伊藤弘一，中村義昭，観　照雄，風間成孔：**高速液体クロマトグラフ法による化粧品中の塩基性タール色素，特にローダミンBの分離定量法**
日本薬学会第105年会（1985．4）

酒井正美，森謙一郎，雨宮　敬，鈴木助治，風間成孔：**ガスクロマトグラフィーによる柔軟加工剤・長鎖アルキルトリメチルおよびジメチルアンモニウム塩の定量法**
日本薬学会第105年会（1985．4）

竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，江波戸舉秀，風間成孔：**魚介類中のトリブチル錫化合物の分析**
第49回日本食品衛生学会（1985．5）

江波戸舉秀，竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，風間成孔：**母乳中の Mg，Ca，Fe，Cu，Zn の含有量について**
第49回日本食品衛生学会（1985．5）

水石和子，竹内正博，山野辺秀夫，江波戸舉秀，風間成孔：**母乳中の揮発性N－ニトロソアミンの分析**
第49回日本食品衛生学会（1985．5）

植田忠彦，柏木義勝，土屋悦輝，風間成孔，林　勝宏，石井敏夫，二木鋭雄，中川茂男：**ガスクロマトグラフィーによる残留オゾンの分析法について**
第60回日本医科器械学会（1985．5）

柏木義勝，植田忠彦，土屋悦輝，風間成孔，林　勝宏，石井敏夫，二木鋭雄，中川茂男：**オゾンによる滅菌に関する検討**
第60回日本医科器械学会（1985．5）

小久保彌太郎：**食品の微生物学的安全性をめぐる諸問題－食中毒予防からみた各種危害要因：食中毒発生頻度の面から**
第5回衛生微生物技術協議会研究会（1984．7）

金子誠二，丸山　務，金子賢一：***Yersinia enterocolitica* O3，生物型3のプラスミド保有と病原性因子との関係**
第98回日本獣医学会（1984．10）

岡崎留美，小泉清明，田中豊隆，池沢聖明，宇井昌生，高橋宗和，早野　剛，神崎政子，丸山　務，松本昌雄：**水槽で飼育する愛玩用カメのサルモネラ汚染実態と二次汚染防止対策の一考察**
第73回東京都衛生局学会（1984．10）

金子誠二，丸山　務，中村政幸：***Yersinia enterocolitica* 血清型O3の保有するプラスミドと生物型との関係について**
第52回日本細菌学会関東支部総会（1984．11）

梅木富士郎，神崎政子，丸山　務，松本昌雄：**MCA－LS法の動物レプトスピラ症への応用**
第22回レプトスピラシンポジウム（1985．3）

金子誠二，丸山　務：**病原性 *Yersinia enterocolitica* の保有する血清型固有プラスミドの比較**
第99回日本獣医学会（1985．4）

丸山　務，神崎政子：***Yersinia enterocolitica* 血清型O3:生物型3の年次別検出状況**
第99回日本獣医学会（1985．4）

沢田拓士，川本英一，丸山　務，中井豊次，久米勝己：**我が国で分離された豚由来 *Pasteurella multocida* の血清型と壊死毒素産生能**
第99回日本獣医学会（1985．4）

竹重都子，長谷川徹，宮田　耕，高橋宗和，斉藤維雅，丸山　務，神崎政子：**東京都内における犬及び猫からの *Pasteurella multocida* の検出状況**
第74回東京都衛生局学会（1985．5）

小久保彌太郎，松本昌雄，寺田　厚，斉藤　真，品川邦汎，小沼博隆，倉田　浩：**加熱食肉製品中の *Clostridium* 属汚染について**
第49回日本食品衛生学会（1985．5）

神保勝彦，桐谷礼子，竹葉和江，松本昌雄：**食肉中の残留 TC 系抗生物質の簡易細菌学的検査法について**
第49回日本食品衛生学会（1985．5）

竹葉和江，村上文子，松本昌雄：**食肉中の残留肝蛭駆除剤の検出法について**
第49回日本食品衛生学会（1985．5）

上村　尚，西島基弘，安田和男，片山博文，田端節子，松本幸子，二島太一郎：**麦類及び豆類の Zearalenone 汚染**
第48回日本食品衛生学会（1984．10）

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：**食用油脂中のクエン酸イソプロピル分析法**
第48回日本食品衛生学会（1984．10）

小川仁志，鈴木二郎，落合節子，西島基弘，二島太一郎：**はちみつ中のフェノール分析法**
第48回日本食品衛生学会（1984．10）

真木俊夫，高橋邦夫，柴田承二：**クサウラベニタケ中の毒成分**
第31回日本生薬学会年会（1984．10）

熊江　隆，菅原和夫，町田和彦，大下喜子，島岡　章，二島太一郎：**NaCl と KCl のラットに及ぼす影響（3）各種臓器中必須金属レベルの検討**
第43回日本公衆衛生学会（1984．10）

熊江　隆，菅原和夫，町田和彦，大下喜子，島岡　章，二島太一郎：**NaCl と KCl のラットに及ぼす影響(4)体毛中必須金属レベルの検討**
第43回日本公衆衛生学会（1984．10）

真木俊夫，高橋邦夫，柴田承二：**半夏の鎮吐作用成分**
第105回日本薬学会年会（1985．4）

冠　政光，勝木康隆，中沢久美子，二島太一郎，宇田裕：**食品中のシアン化合物に関する研究（2）シソ中のシアン配糖体について**
第105回日本薬学会年会（1985．4）

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：**食用油のマイコトキシン汚染実態及び製造工程による消長**
第49回日本食品衛生学会（1985．5）

落合節子，小川仁志，鈴木二郎，西島基弘，二島太一郎：**高速液体クロマトグラフィーによる食品中のホウ素分析法**
第49回日本食品衛生学会（1985．5）

田端節子，西島基弘，上村　尚，安田和男，牛山博文，松本幸子，二島太一郎：**各種食品添加物によるアフラトキシンの分解**
第49回日本食品衛生学会（1985．5）

中里光男，斉藤和夫，菊地洋子，井部明広，藤沼謙司，二島太一郎：**かんきつ類及びバナナ中のジフェニル，オルトフェニルフェノール及びチアベンダゾールの同時分析法**
第49回日本食品衛生学会（1985．5）

冠　政光，勝木康隆，中沢久美子，二島太一郎：**食品中のシアン化合物に関する研究（3）食品中のシアン化合物含有量**
第49回日本食品衛生学会（1985．5）

石川ふさ子，嶋村保洋，上田　工，二島太一郎：**高速液体クロマトグラフィーによる食品中のピマリシンの分析法**

第49回日本食品衛生学会（1985．5）

K.Makino and I.Mizoguchi：**Relationship of respiratory disease mortality and air Pollution or social indices in Tokyo Metropolis**

The 12th International Biometric Conference（1984．9）

杉森文夫，成末雅恵，関比呂伸，成島悦雄：**ドバトの飢餓実験，1)栄養診断**

1984年度 日本鳥学会（1984．9）

成島悦雄，斉藤 勝、杉森文夫，関比呂伸，：**ドバトの飢餓実験，2)血中の生化学的性状の動態**

1984年度日本鳥学会（1984．9）

大澤誠喜，池田真悟，福田雅夫，牧野国義，関比呂伸，鈴木孝人，加納堯子，溝口 勲：**東京都における降下ばいじん量の推移（昭和44～昭和58年）**

第73回東京都衛生局学会（1984．11）

遠藤圭子，鈴木孝人，池田真悟，溝口 勲，：**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およぼすNO_2暴露の影響**

第25回大気汚染学会（1984．11）

鈴木孝人，寺田伸枝，池田真悟，大澤誠喜，遠藤圭子，溝口 勲：**NO_2の肺中Angiotensin Converting Enzyme活性へおよぼす影響**

第25回大気汚染学会（1984．11）

狩野文雄，佐藤泰仁，多田宇宏：**空調器ダクト内堆積粉じんの多環芳香族炭化水素の分析と変異原性**

第25回大気汚染学会（1984．11）

牧野国義，溝口 勲：**健康指標と大気汚染指標，社会指標との関連性の検討（II）**

第25回大気汚染学会（1984．11）

関比呂伸，加納堯子，田村行弘：**メチル水銀毒性に対する食物繊維の影響**

第43回日本公衆衛生学会（1984．11）

佐藤泰仁：**空調ダクト内堆積粉じんの性状（第2報）**

第43回日本公衆衛生学会（1984．11）

H.Seto,T.Takesue and T.Ikemura：**Reaction of malonaldehyde With nucleic acid, 2) Formation of fluorescent pyrimido〔1, 2-a〕purin-10(3H)-one5′-nucleotide**

The 1984 International chemical Congress of Pacific Basin Societies（1984．12）

狩野文雄，加納堯子，溝口 勲：**幹線道路沿道周辺の浮遊粉塵中の多環芳香族炭化水素濃度と変異原活性について**

第74回東京都衛生局学会（1985．5）

太田与洋，名倉広明，大山敏郎，鈴木 伸，溝口 勲：**ppmレベルでのオレフィン類のNO_2に対する反応性**

第25回大気汚染学会（1984．11）

太田与洋，大山敏郎，名倉広明，溝口 勲：**芳香族類のOHに対する反応性**

第25回大気汚染学会（1984．11）

太田与洋，名倉広明，大山敏郎，鈴木 伸，溝口 勲：**NO_2とジオレフィン類の反応速度定数**

第1回化学反応討論会（1984．11）

松本淳彦：**藍藻によるカビ臭**

第21回日本水処理生物学会，水道水のカビ臭に関するシンポジウム（1984．11）

高橋保雄，笹野英雄：**ヘキサン抽出による水道水中の有機物**

第43回日本公衆衛生学会（1984．10）

土屋悦輝：**イオンクロマトグラフィーによる水中ヨウ素イオンの微量定量**

第105回日本薬学会（1985．4）

土屋悦輝，安藤正典，梶野勝司，佐藤 孝：**水質試験法・臭気物質**

第105回日本薬学会（1985．4）

平田一郎，池島伸至，神真知子，入倉善久，新井輝義，太田建爾，坂井千三：**生食用アジおよびアサリの病原ビ**

ブリオ汚染

第18回腸炎ビブリオシンポジウム（1984．10）

矢口久美子，渡辺　学：**東京都多摩地区地下水中の塩素系有機溶剤に関する調査**

第43回日本公衆衛生学会（1984．10）

太田建爾，川田浩子，平田一郎，坂井千三，山田澄夫，松下　秀，津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：**海外旅行者下痢症より分離された Shigella sonnei のコリシン型と薬剤感受性**

第59回日本感染症学会（1985．5）

太田建爾，平田一郎，池島伸至，神真知子，新井輝義，入倉善久，坂井千三：**生食用アジおよびアサリの病原ビブリオ汚染**

第59回日本感染症学会（1985．5）

能勢征子，風戸実香，坂井千三：**腸炎ビブリオの増殖に及ぼす有機酸とコール酸ナトリウムの影響**

第49回日本食品衛生学会（1985．5）

米山允子，小縣昭夫，中尾順子，平賀興吾：**Thiabendazole の妊娠マウスにおける生体高分子への不可逆結合について**

第11回日本毒科学会学術年会（1984．7）

O.Takahashi and K.Hiraga：**Metabolism and Haemorrhagic Toxicity of Phenolic Compounds**

IUPHAR 9th International Congress of Pharmacology（1984．7）

S．Oishi：**Testicular Atrophy Induced by Di-2-ethylhexyl Phthalate**

IUPHAR 9th International Congress of Pharmacology（1984．7）

T.Nakao, K．Satoh, I. Kano, M.Nakao：**Sodium and Potassium Ion-Dependent Change in Oligomerization of Na,K-ATPase in $C_{12}E_8$ Detected by Low-Angle Laser Light Scattering Technique in Combination with High Performance Porous Silica-Gel Chromatography**

4th International Congress on Na,K-ATPase（1984．8）

佐藤かな子，浦山　修，長宗秀明，加納いつ，中尾順子，中尾　真：**馬腎　Na, K-ATPase のモノクローナル抗体（第二報）**

第57回日本生化学会大会（1984．10）

中尾順子，加納いつ，長井二三子，佐藤かな子，牛山慶子，中川敦子，中尾　真：**Na, K-ATPase の精製法の改良標品**

第57回日本生化学会大会（1984．10）

長宗秀明，浦山　修，原　諭吉，中尾　真，佐藤かな子，中尾順子：**ブタ腎　Na^+,K^+-ATPase に対するモノクローナル抗体の作用**

第57回日本生化学会大会（1984．10）

長井二三子，樺島順一郎，中川敦子，加納いつ，中尾順子，中島　章：**赤血球ゴーストおよび Ca-ATPase に対するクロロキンの作用**

第57回日本生化学会大会（1984．10）

牛山慶子，深野駿一，樺島順一郎，長井二三子，加納いつ，中尾順子：**代謝酵素存在下の OPP と DNA の結合**

第57回日本生化学会大会（1984．10）

高橋　省，坂本義光，平賀興吾：**ラットとマウスの肺に対するブチルヒドロキシアニソール（BHA）の効果の差異**

日本薬理学会第71回関東部会（1984．10）

大石真之，渡辺真利代，平賀興吾：**監藻 Microcystis aeruginasa の急性毒性とその心臓血管系への影響**

第58回日本薬理学会総会（1985．3）

高橋　省，平賀興吾：**ジブチルヒドキシトルエン（BHT）の出血致死効果（続報）**

第58回日本薬理学会総会（1985．3）

中川好男，田山邦昭，中尾順子，平賀興吾：**ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）によるラット肝障害**

日本薬学会第105年会（1985．4）

T.Nakao, K.Satoh, F.Nagai, I.Kano, O.Urayama and M.Nakao：**A Monoclonal Anti-Horse Kidney Na^+, K^+-ATPase Antibody Inhibiting ATP Hydrolysis and Rb^+ Transport and Activating K^+-pNPPase Activity**

The 11th Yamada Conference on Energy Transduction in ATPase (1985. 5)

藤井　孝, 井口重孝, 田山邦昭, 平賀興吾：**サッカリンナトリウムのラット膀胱発癌に対するオルトフェニルフェノールおよびオルトフェニルフェノールナトリウム前処理の影響**

第43回日本癌学会総会 (1984. 10)

平賀興吾, 藤井　孝, 井口重孝, 田山邦昭：**オルトフェニルフェノールナトリウムのF344/DuCrjラットによる発癌性試験**

第43回日本癌学会総会 (1984. 10)

田山邦昭, 井口重孝, 藤井　孝, 平賀興吾：**オルトフェニルフェノールナトリウムにより誘発されたラット膀胱腫瘍の移植性について**

第43回日本癌学会総会 (1984. 10)

M.Sasaki：**Enhancing effect of acetaminophen on mutagenesis**

4th International Conference on Environmental Mutagens (1985. 6)

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

溝口　勲（委員長）
日野是温
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60年12月7日　発行

規格表　第2類
印刷番号(60)595
刊行物番号(H)24

東京都立衛生研究所研究年報第36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　：　株式会社丸井工文社
〒102 東京都千代田区九段北1-12-4
電　話 03(262)0841(代)