n131en

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

37

1986

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

序

昭和56年３月臨床検査技師，衛生検査技師等に関する法律の一部が改正され，登録衛生検査所における試験検査についての精度管理事業が都道府県ごとに実施されることとなりました。これにともなって，都道府県衛生研究所等，公的試験研究機関の今後の責務と役割が問われることとなります。都立衛生研究所では，すでに都衛生局，都医師会，学識経験者などからなる精度管理委員会の一員として参加し，積極的に精度管理事業の役割の一端を担ってきましたが，今後は全国の地方衛生研究所相互間での内部精度管理を推進し，技術の研鑽，情報の交換等を通じ期待に応えてゆかなければなりません。又，自然食品や新しい感染症の問題など，衛生行政の動向をふまえ，それらに応えられるよう，新しい試験検査法の確立にも心がけなければなりません。更に，国の感染症サーベランス事業の拡大に伴う，検査情報の速かな提供や，情報のネットワーク化についても，地方衛生研究所の立場と役割を明確にして行く必要があります。

財団法人，ヒューマンサイエンス振興財団が新しく設立され，国立試験研究機関と提携して，企業及び民間研究機関等との共同研究事業が発足しようとしていますが，学際的共同研究のあり方として，一日も早く軌道に乗って，多くの成果があがることを期待するものであり，地方衛生研究所においても，将来関連分野における課題に積極的に参加してゆきたいものであります。

東京都立衛生研究所，「研究年報」第37号を発刊いたします。今回は81編の論文を報告いたします。各研究報告にたいし，御意見，御助言を賜われば幸いと存じます。

昭和61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

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3報）
訪問国パターン別赤痢菌およびサルモネラ検出状況解析システム
……津野　正朗，工藤　泰雄，大橋　　誠…… 1

パーソナルコンピュータを用いた腸チフスおよびパラチフス情報管理システムの開発
……津野　正朗，大橋　　誠，中村　明子…… 8

アジ由来病原ビブリオの薬剤感受性試験
……平田　一郎，新井　輝義，池島　伸至，入倉　善久，神　真知子，
楠　くみ子，太田　建爾，山田　澄夫，坂井　千三…… 15

東京都で冬季に集団発生した非細菌性急性胃腸炎のウィルス学的検索
……安東　民衛，林　　志直，関根　整治，藪内　　清，寺山　　武，大橋　　誠，岡田正次郎…… 23

都内の急性上気道炎患児からのウィルス分離成績（1984～1985年）
……林　　志直，矢野　一好，安東　民衛，吉田　靖子，関根　整治，藪内　　清，
渡辺　悌吉，石原　　祐，大久保さつき，小野　正恵，山本　　淳…… 29

伊豆七島におけるツツが虫病の研究（第三報）
式根島における既往者の発病後2年間の抗体価推移
……中村　清純，伊藤　忠彦，山崎　　清，坂井富士子，藪内　　清，大橋　　誠…… 34

東京都における日本脳炎の流行予測調査成績（1984年～1985年）
……吉田　靖子，矢野　一好，関根　整治，藪内　　清，中嶋　　誠，塩見　久章，
秋山　　陽，畑野　逸與，林　　績，福本　拓夫，林田　　陽，村田三紗子…… 41

河川水からのウィルス検出方法の改良
……矢野　一好，吉田　靖子，藪内　　清…… 49

各種動物における *Chlamydia psittaci* の抗体保有状況
……神崎　政子，丸山　　務，高島　郁夫，橋本　信夫，萩原　敏且…… 54

スポット法に基づいた神経芽細胞腫のマス・スクリーニング検査成績
……武士俣邦雄，高野　弘紀，大橋　　誠，峰岸　正子，石塚　　実，長岡　常雄…… 60

報文Ⅱ　医薬品等に関する調査研究

バニリルマンデル酸スポットテスト法の反応生成色素
……高橋利恵子，安田　一郎，奥本千代美，秋山　和幸，鈴木　重任…… 69

ガスクロマトグラフィーによる生薬牛黄中のコール酸類の定量
……高野伊知郎，安田　一郎，瀬戸　隆子，浜野　朋子，秋山　和幸…… 73

シアン測定システムへのパーソナルコンピュータの導入
……奥本千代美，高橋利恵子，岩崎由美子，秋山　和幸…… 79

微量拡散分析用多試料サンプラーの開発
……高橋利恵子，奥本千代美，岩崎由美子，秋山　和幸…… 85

緑色204号（ピラニンコンク）中のピレンの高速液体クロマトグラフィーによる分離定量
……伊藤　弘一，観　　照雄，中村　義昭，岸本　清子，中村　　弘，渡辺四男也…… 90

家庭用品の衛生化学的研究（第17報）
ポリエステルおよびその混紡衣料中の染色キャリアーの残留量について
……雨宮　　敬，酒井　正美，池田　一夫，森　謙一郎，鈴木　助治，渡辺四男也…… 94

家庭用品の衛生化学的研究（第18報）
塩化アルキル第四アンモニウムの水素化リチウムアルミニウムによる第三アミンへの誘導化と
ガスクロマトグラフィーによる定量法
……酒井　正美，池田　一夫，森　謙一郎，雨宮　　敬，鈴木　助治，渡辺四男也…… 99

家庭用品の衛生化学的研究（第19報）
ガスクロマトグラフィーによる塩化ベンゼトニウムの定量法
……池田　一夫，酒井　正美，森　謙一郎，雨宮　　敬，鈴木　助治，渡辺四男也……105

α-フェトプロテインの精度管理調査
……仲川　千種，大石　向江，蓑輪　佳子，鈴木　重任……111

血液学的検査の精度管理調査結果について（第２報）
――白血球像検査――
……蓑輪　佳子，大石　向江，仲川　千種，鈴木　重任……115

報文Ⅲ　食品等に関する調査研究

消毒剤や熱処理によるカンピロバクターの消毒効果ならびに調理器具・器材中からの本菌効果について
……伊藤　　武，斉藤　香彦，高橋　正樹，柳川　義勢，甲斐　明美，稲葉美佐子……119

食鳥処理場および市販鶏肉のカンピロバクター・ジェジュニー汚染状況
……神保　勝彦，小久保彌太郎，金子　誠二，桐谷　礼子，松本　昌雄……129

市販豚肉における *Yersinia enterocolitica* およびその他の *Yersinia* 属菌の分布
……金子　誠二，丸山　　務，小久保彌太郎，神保　勝彦，松本　昌雄……136

Bioautography による動物性食品中の残留ポリエーテル・イオノフォア抗生物質の検出法
……竹葉　和江，村上　文子，神保　勝彦，桐谷　礼子，松本　昌雄……141

ゴム製ほ乳用具に関する衛生化学的調査
乳首，おしゃぶりについての材質試験および溶出試験
……水石　和子，竹内　正博，山野辺秀夫，渡辺四男也……145

水素化物加熱原子吸光分析法による魚介類中のセレンの定量
……山野辺秀夫，竹内　正博，水石　和子，渡辺四男也……149

ビス（トリブチルスズ）オキシド（TBTO）による魚介類の汚染実態について（第１報）
東京湾産スズキおよびアサリ中の TBTO 含有量
……竹内　正博，水石　和子，山野辺秀夫，渡辺四男也……154

東京都における PCB 汚染の実態について（第14報）
食品および器具，容器類中の PCB 含有量
……植田　忠彦，竹内　正博，水石　和子，山野辺秀夫，渡辺四男也……158

化学物質及び自然毒による食中毒事件例（第3報）
——昭和60年——
……真木　俊夫，観　　公子，永山　敏廣，飯田　真美，二島太一郎……163

緑茶，ウーロン茶およびコーヒー浸出液中の元素量
……観　　公子，真木　俊夫，永山　敏廣，飯田　真美，二島太一郎……166

野菜，果実類中の残留農薬実態調査
（昭和59・60年度）
……永山　敏廣，真木　俊夫，観　　公子，飯田　真美，二島太一郎……173

食品中のアジピン酸の分析法
……島村　保洋，石川ふさ子，小川　仁志，西島　基弘，二島太一郎……184

ジエチレングリコール混入ワインについて
——その経緯と分析結果——
……田村　行弘，安田　和男，上村　　尚，牛山　博文，田端　節子，橋本　秀樹，斉藤　和夫，
中里　光男，菊地　洋子，井部　明広，藤沼　賢司，勝木　康隆，冠　　政光，中沢久美子，
鈴木　二郎，小川　仁志，落合　節子，上田　　工，嶋村　保洋，石川ふさ子，真木　俊夫，
観　　公子，永山　敏廣，飯田　真美，二島太一郎……187

ワイン中の多価アルコール類の分析
……野沢　竹志，大石　充男，平田　恵子，大西　和夫，西島　基弘，坂井　千三……197

タウロコール酸のペクチンへの吸着
……小関　正道，安野　哲子，荻野　周三，風間　成孔……203

着香料中のジエチレングリコールモノエチルエーテル(カルビトール)の含量調査
……広門　雅子，中島　和雄，植松　洋子，高橋　　巌，松井　敬子，風間　成孔……206

高速液体クロマトグラフィーによる天然糊料の分析（第2報）
……中島　和雄，広門　雅子，高橋　　巌，植松　洋子，松井　敬子，風間　成孔……211

クエン酸の定量に及ぼすアルミニウムイオンの影響
……高橋　　巌，小関　正道，広門　雅子，安野　哲子，荻野　周三，
中島　和雄，植松　洋子，松井　敬子，風間　成孔……214

油脂に対する酸化防止剤の加熱劣化抑制効果
……植松　洋子，高橋　　巌，広門　雅子，中島　和雄，松井　敬子，風間　成孔……218

食品用ポリ塩化ビニル製フィルム中の可塑剤の分析
……佐藤　憲一，渡辺　悠二，吉田　令子，風間　成孔……228

高速液体クロマトグラフィーによる粉乳中のビタミンB_6の定量
……笠原　利英，井口　正雄，友松　俊夫，道口　正雄……232

小笠原産シカクマメ「ウリズン」のビタミン分析
……菊谷　典久，佐藤　直子，笠原　利英，井口　正雄，友松　俊夫，
道口　正雄，浦野　元幸，山下　三雄，小沢　　聖……237

食品中の灰分および金属元素の測定におけるアルミはくカップの利用（第1報）
粉乳中のナトリウム，カリウムの定量
……佐藤　直子，菊谷　典久，井口　正雄，友松　俊夫，道口　正雄……241

健康食品の栄養成分調査
……牛尾　房雄，船山　恵市，関　　博磨，笠原　利英，川島満春美，友松　俊夫，道口　正雄……244

報文Ⅳ　生活環境に関する調査研究

走査形電子顕微鏡によるコロモジラミの形態学的観察法の検討
……前木　吾市，大野　正彦，安達　充宏……251

東京のツツガムシ相（第2報）
式根島のツツガムシ病流行期（1984年11月）と流行閑期（1985年6月）のネズミ寄生ツツガムシ類
……大野　正彦……259

殺虫剤によるツメダニの予防効果（Ⅰ）
……吉川　　翠……269

毛髪および母乳中の元素について
—Mg，Ca，Fe，Cu，Zu，Hg—
……江波戸舉秀，竹内　正博，水石　和子，山野辺秀夫，渡辺四男也，鵜沼　洋子，南條　静代，山梨　靖夫……280

トリプトファン代謝産物の尿中排泄量に及ぼすNO_2暴露の影響
……鈴木　孝人，加納　堯子，溝口　　勲……283

大気汚染と尿中のヒドロキシプロリン，クレアチニン比
—都内3地区に居住する学童尿を用いて—
……池田　眞悟，鈴木　孝人，加納　堯子，溝口　　勲……288

NO_2，O_3及びSO_2による長期複合暴露のラットの肺に及ぼす影響
……渡辺　伸枝，池田　眞悟，大沢　誠喜，鈴木　孝人，溝口　　勲，林　　豊……293

NO_2暴露したピレン投与マウスの尿および糞便の変異原性
……福田　雅夫，加納　堯子，溝口　　勲……301

回帰モデルを用いた亜急性症状の量・反応関係に関する考察
……牧野　国義，溝口　　勲……306

メチル水銀暴露時期がラットの繁殖におよぼす影響
……関　比呂伸，加納　堯子，田村　行弘……313

大気浮遊粉塵中の重金属について
多摩地域の濃度特性（第2報）
……佐藤　泰仁，多田　宇宏，溝口　　勲，本間　慶一，山本　英一，
多摩地区環境衛生監視員一同……318

室内浮遊粉塵の質に関する調査
—ビル空調系における汚染質の動態—
……佐藤　泰仁，狩野　文雄，多田　宇宏，加納　堯子，細井　　潔，菱山　　仁……324

東京湾の環境汚染モニタリング調査（第4報）
昭和59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……331

NO_2とO_3の長期複合曝露がラットにおよぼす生化学的影響
……大沢　誠喜，鈴木　孝人，池田　眞悟，渡辺　伸枝，加納　堯子，溝口　　勲……336

飲料用タンク水から検出された大腸菌群とその塩素，熱抵抗性
……古畑　勝則，松本　淳彦……343

我国とナイジェリア・ジヨス市における飲料水の微量元素レベルの比較検討
……土屋　悦輝，G.A.Ubom，野田千代一，笹野　英雄，溝口　　勲……349

多摩地区における飲料水中のトリハロメタン調査
……大橋　則雄，矢口久美子，関山　　登，渡辺　　学，西島　基弘，坂井　千三……356

飲料水中の揮発性有機塩素化合物の家庭での除去方法
……矢口久美子，渡辺　　学，関山　　登，大橋　則雄，池島　伸至，西島　基弘，坂井　千三……363

報文Ⅴ　毒性に関する調査研究

オルトフェニルフェノール・ナトリウム（OPP-Na）の肝薬物代謝酵素系におよぼす影響
……牛山　慶子，佐藤かな子，長井二三子，中川　敦子，加納　いつ，市川　久次，中尾　順子……371

経口投与によるオルトフェニルフェノール・ナトリウム（OPP-Na）のラット乳汁への
排泄の可能性についての検討（第2報）
……小林　博義，神谷　信行，市川　久次……373

アセトアミノフェンの変異原性増強効果について（第2報）
化学構造と活性の関係について
……藤谷　和正，佐々木美枝子……376

赤血球形態変化および赤血球膜 Ca^{2+}，Mg^{2+} -ATPase に対するクロロキンの作用
……長井二三子，牛山　慶子，中川　敦子，加納　いつ，中尾　順子……380

Na-NMR による赤血球のナトリウム輸送の測定
……深野　駿一……387

Light Scattering（光散乱）法による溶血検査（Ⅱ）
ウサギ血液を用いて
……市川　久次，小林　博義……391

細胞膜酵素（馬腎 Na，K-ATPase）のモノクローナル抗体（第2報）
……佐藤かな子，長井二三子，牛山　慶子，中川　敦子，加納　いつ，市川　久次，中尾　順子……395

オルトフェニルフェノール（OPP）腎障害としょ糖ネフローゼにおける腎尿細管の微細構造変化の比較
……福森　信隆，佐々木美枝子……399

オルトフェニルフェノールナトリウムによるラット膀胱発がんにおける
チアベンダゾールの用量に伴う増強効果の検討
……三栗谷久敏，藤井　　孝，林田　志信，神谷　信行，平賀　興吾……407

オルトフェニルフェノールナトリウムの低濃度暴露ラットにおける膀胱発癌に及ぼす
チアベンダゾールの増強効果
……藤井　　孝，三栗谷久敏，林田　志信，平賀　興吾……411

アカゲザルを用いた TBZ の催奇形性に関する予備試験
……井口　重孝，米山　允子，小縣　昭夫，多田　幸恵，安藤　　弘，久保　喜一，佐々木美枝子……415

チアベンダゾール（TBZ）のラットを用いた催奇形成試験
……小縣　昭夫，安藤　　弘，久保　喜一，佐々木美枝子，平賀　興吾……421

クロム鉱さい粉じんのラットによる2年間持続吸入実験（第3報）
腸器中クロムの分析
……神谷　信行，坂本　義光，佐々木美枝子……426

F344ラットの加齢に伴う血液性状の変化
……多田　幸恵，佐々木美枝子……430

SPF ウサギ KBL：JW に関する基礎的生理学研究（第1報）
体重増加，摂餌量，血液学および血清生化学データの週令変化について
……林田　志信，小林　博義，井口　重孝，市川　久次……436

Diethylene Glycol の変異原性試験
……吉田　誠二，藤田　博，佐々木美枝子……442

Salmonella typhimurium TA97a，TA102を用いた食品添加物の変異原性試験（第1報）
……藤田　博，佐々木美枝子……447

天然酸化防止剤の Ames 試験における変異原性について
……小嶋　昭江，藤田　博，佐々木美枝子……453

Ames 試験における増菌用液体培地の検討
——Nutrient broth と合成液体培地の比較
……小嶋　昭江，藤田　博，佐々木美枝子……457

他　誌　発　表……463

学　会　発　表……471

CONTENTS

REPORTS I PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

Development of a Computerized Data Base System of Processing Results of Bacteriological Examinatior of Overseas Travellers Diarrhea (III)
A System for Analyzing *Salmonella*- and *Shigella*- detected Cases by Patterns of Countries Visited
..... M.Tsuno, Y.Kudoh and M.Ohashi 1

A Data Base for the Typhoid and Paratyphoid Fever Surveillance by Using Personal Computer
..... M.Tsuno, M.Ohashi and A.Nakamura 8

Antimicrobial Agents Susceptibility of Pathogenic Vibrios Isolated from Horse Mackerel
..... I.Hirata, T.Arai, N.Ikejima, Y.Irikura, M.Jin, K.Kusunoki, K.Ohta, S.Yamada and S.Sakai 15

Winter-Outbreaks of Acute Nonbacterial Gastroenteritis in Tokyo Associated with Small Round Virus
..... T.Ando, Y.Hayashi, S.Sekine, K.Yabuuchi, T.Terayama, M.Ohashi and S.Okada 23

Virological Survey for Outpatients of Acute Respiratory Illness in a Pediatrics during 1984−1985 in Tokyo
..... Y.Hayashi, K.Yano, T.Ando, Y.Yoshida, S.Sekine, K.Yabuuchi, T.Watanabe, Y.Ishihara, S.Ohkubo, M.Ono and A.Yamamoto 29

Studies on Tsutsugamushi Disease in Izu Islands (III)
Two Years' Follow-up Study on Changes in Antibody Level of the Residents in Shikine Island with the History of Scrub Typhus
..... K.Nakamura, T.Ito, K.Yamazaki, F.Sakai, K.Yabuuchi and M.Ohashi 34

Epidemiological Survey of Japanese Encephalitis in Tokyo in 1984−1985
..... Y.Yoshida, K.Yano, S.Sekine, K.Yabuuchi, M.Nakajima, H.Shiomi, M.Akiyama, I.Hatano, I.Hayashi, T.Fukumoto, Y.Hayashida and M.Murata 41

Improved Method for Isolation of Viruses in River Water
..... K.Yano, Y.Yoshida and K.Yabuuchi 49

Seroepidemiological Survey on Chlamydia psittaci Infection in Various Animals and Birds
..... M.Kanzaki, T.Maruyama, I.Takashima, N.Hashimoto and T.Hagiwara 54

Results of Mass-screening to Detect Neuroblastoma by Means of a Spot Test for Urinary Vanillymandelic Acid
..... K.Bushimata, H.Takano, M.Ohashi, M.Minegishi, M.Ishizuka and T.Nagaoka 60

REPORTS II PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

Colored Substance Produced in Spot Test of Vanillylmandelic Acid
..... R.Takahashi, I.Yasuda, C.Okumoto, K.Akiyama and S.Suzuki 69

Determination of Bile Acids in Crude Drugs Oriental Bezoar by Gas Chromatography
..... I. Takano, I.Yasuda, T.Seto, T.Hamano and K.Akiyama 73

Application of Personal Computer to Analysis of Cyanide in Waste Water from Metal Plating Process
..... C.Okumoto, R.Takahashi, Y.Iwasaki and K.Akiyama 79

Multi-sampler for Microdiffusion Analysis
..... R.Takahashi, C.Okumoto, Y.Iwasaki and K.Akiyama 85

Determination of Pyrene in Green No.204 (Pyranine conc, D&C Green No. 8) by High-Performance Liquid Chromatography
..... K.Ito, T.Kan, Y.Nakamura, K.Kishimoto, H.Nakamura and Y.Watanabe 90

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XVII)
Residues of Some Carriers Used for Dyeing Process in Polyester and Its Mixed Textile Products
..... T.Amemiya, M.Sakai, K.Ikeda, K.Mori, S.Suzuki and Y.Watanabe 94

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XVIII)
Derivertization of Alkyl Quaternary Ammonium Chlorides to Tertiaryamine with $LiAlH_4$ and Analytical Method of the Ammonium Compounds by Gas Chromatography
..... M.Sakai, K.Ikeda, K.Mori, T.Amemiya, S.Suzuki and Y.Watanabe 99

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XIX)
Gas Chromatographic Method for the Determination of Benzethonium Chloride
..... K.Ikeda, M.Sakai, K.Mori, T.Amemiya, S.Suzuki and Y.Watanabe 105

Interlaboratory Quality Control of Alfa-fetoprotein
..... C.Nakagawa, H.Oishi, K.Minowa and S.Suzuki 111

Interlaboratory Quality Control in Hematology (II)
—Leukocyte Differential Counting—
..... K.Minowa, H.Oishi, C.Nakagawa and S.Suzuki 115

REPORTS III PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

Effects of Disinfectants, Heating and Drying for Killing *Campylobacter* Organisms on Cooking Utensils
..... T.Itoh, K.Saito, M.Takahashi, Y.Yanagawa, A.Kai and M.Inaba 119

Incidence of *Campylobacter jejuni* in Poultry Process Plant and Commercial Chicken Meat
..... K.Jinbo, Y.Kokubo, S.Kaneko, R.Kiritani and M.Matsumoto 129

Distribution of *Yersinia enterocolitica* and Other *Yersiniaea* in Retailed Pork
..... S.Kaneko, T.Maruyama, Y.Kokubo, K.Jinbo and M.Matsumoto 136

Determination for Polyether-Ionophore Antibiotics Residues in Eggs and Animal Tissues by Bioautography
..... K.Takeba, F.Murakami, K.Zinbo, R.Kiritani and M.Matsumoto 141

Hygienic Chemical Survey on Rubber Nursing Products
Migratind and Material Test for Nipples and Pacifiers
..... K.Mizuishi, M.Takeuchi, H.Yamanobe and Y.Watanabe 145

Determination of Selenium in Fish and Shellfish by Hydrogen Selenide Evolution-Electrothermal Atomic Absorption Method
..... H.Yamanobe, M.Takeuchi, K.Mizuishi and Y.Watanabe 149

Survey of Pollution with Bis (tri-butyltin) oxide (TBTO) in Fish and Shellfish (I).
Content of TBTO in Sea-Bass and Short-necked Clam Collected from Tokyo Bay.
..... M.Takeuchi, K.Mizuishi, H.Yamanobe and Y.Watanabe 154

Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (XIV)
Concentrations of Polychlorinated Biphenyl in Foods, Tablewares and Kitchenwares
..... T.Ueta, K.Mizuishi, M.Takeuchi, H.Yamanobe and Y.Watanabe 158

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toxicants in Tokyo (III) — (1985) —
..... T.Maki, K.Kan, T.Nagayama, M.Iida and T.Nishima 163

Contents of Trace Element in Green Tea Oolong Tea and Coffee
..... K.Kan, T.Maki, T.Nagayama, M.Iida and T.Nishima 166

Survey of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits (1984. 4～1986. 3)
..... T.Nagayama, T.Maki, K.Kan, M.Iida and T.Nishima 173

Determination of Adipic Acid in Foods
..... Y.Shimamura, F.Ishikawa, H.Ogawa, M.Nishijima and T.Nishima 184

Wine Contaminated by Diethylene Glycol
— The Progress and The Analytical Result —
..... Y.Tamura, K.Yasuda, H.Kamimura, H.Ushiyama, S.Tabata, H.Hashimoto, K.Saito, M.Nakazato, A.Ibe, Y.Kikuchi, K.Fujinuma, Y.Katuki, M.Kanmuri, K.Nakazawa, J.Suzuki, H.Ogawa, S.Ochiai, K.Ueda, Y.Shimamura, F.Ishikawa, T.Maki, K.Kan, T.Nagayama, M.Iida and T.Nishima 187

Analytical Methods for Polyalcohol in Wine
..... T.Nozawa, M.Ohishi, K.Hirata, K.Ohnishi, M.Nishijima and S.Sakai 197

Binding of Taurocholate to Pectin
..... M.Koseki, T.Yasuno, S.Ogino and M.Kazama 203

Survey of Content of Diethylene Glycol Monoethyl Ether (Carbitol) in the Flavouring agents
..... M.Hirokado, K.Nakajima, Y.Uematsu, I.Takahashi, K.Matsui and M.Kazama 206

High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Natural Thickening and Stabilizing Agents (II)
..... K.Nakajima, M.Hirokado, I.Takahashi, Y.Uematsu, K.Matsui and M.Kazama 211

Effect of Aluminum Ion on the Determination of Citric Acid
..... I.Takahashi, M.Koseki, M.Hirokado, T.Yasuno, S.Ogino, K.Nakajima, Y.Uematsu, K.Matsui and M.Kazama 214

Retarding Effect of Antioxidants on the Thermal Deterioration of Oils
..... Y.Uematsu, I.Takahashi, M.Hirokado, K.Nakajima, K.Matsui and M.Kazama 218

Analysis of Plasticizers in Polyvinyl Chloride Films for Food
..... K.Sato, Y.Watanabe, R.Yoshida and M.Kazama 228

Determination of Vitamin B_6 in Milk Powder by High-Performance Liquid Chromatography
..... T.Kasahara, M.Iguchi, T.Tomomatsu and M.Doguchi 232

Studies on Vitamin Contents of the Winged Bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) "Urizn" in Ogasawara Islands
..... N.Kikutani, N.Sato, T.Kasahara, M.Iguchi, T.Tomomatsu, M.Doguchi, M.Urano, M.Yamashita and K.Ozawa 237

Application of Aluminum Foil Cup in Dry Ashing to Determination of Ash and Mineral Contents in Foods (I) Determination of Sodium and Potassium in Modified Milk Powder
..... N.Sato, N.Kikutani, M.Iguchi, T.Tomomatsu and M.Doguchi 241

Amounts of Nutritional Components in Nutrient Supplementary Foods
..... F.Ushio, K.Funayama, H.Seki, T.Kasahara, M.Kawashima, T.Tomomatsu and M.Doguchi 244

REPORTS IV PAPERS CONCERNING ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

Morphological Observation of Human Body Louse by Scanning Electron Microscopy
..... G.Maeki, M.Ohno and M.Adachi 251

Trombiculid Mites of Tokyo (II) Trombiculid Mites Found on Rodents in Shikinejima Island during an Outbreak (November 1984) and Absence (June 1985) of Tsutsugamushi Disease
..... M.Ohno 259

Prevention of Breeding of Cheyletid Mites by Treatment of Insecticides on Tatami-mats in Concrete Apartment Buildings (I)
..... M.Yoshikawa 269

Mg, Ca, Fe, Cu, Zn and Hg Content in Hair and Human Milk
..... K.Ebato, M.Takeuchi, K.Mizuishi, H.Yamanobe, Y.Watanabe, Y.Unuma, S.Nanjou and Y.Yamanashi 280

Effect of NO_2 Exposure on Urinary Excretion of Tryptophan Metabolites.
..... T.Suzuki, T.Kanoh and I.Mizoguchi 283

Air Pollution and Urinary Hydroxyproline : Creatinine Ratio. — Using Urine of Schoolchildren Living in Three Areas in Tokyo —
..... S.Ikeda, T.Suzuki, T.Kanoh and I.Mizoguchi 288

Pulmonary Effects in Rats Induced by Prolonged Exposure to NO_2, O_3 and SO_2
..... N.Watanabe, S.Ikeda, M.Ohsawa, T.Suzuki, I.Mizoguchi and Y.Hayashi 293

Urinary and Feces Mutagenicity in Pyrene-treated Mice under Exposure to NO_2
..... M.Fukuda, T.Kanoh and I.Mizoguchi 301

A Study on Dose-response Relation for Subacute Symptoms by Using Regression Models
..... K.Makino and I.Mizoguchi 306

The Effects of Methylmercury Exposure Time Schedules to Reproduction of Rats
..... H.Seki, T.Kanoh and Y.Tamura 313

Heavy Metals in Suspended Particulate Matters of Atmosphere. Feature in Tama District of Tokyo (II)
..... Y.Sato, T.Tada, I.Mizoguchi, K.Homma, E.Yamamoto and All Inspecter of Environmental Hygene at Tama District 318

A Survey of Suspended Particulate Matters in Room Air Dynamics of Polluted Particles Circulating through Air Ducts in Buildings
..... Y.Sato, F.Kano, T.Tada, T.Kanoh, K.Hosoi and H.Hishiyama 324

Survey of Chemical Pollutants in Biota from Tokyo Bay (IV)
Residue Levels in Japanese Sea Bass and Gull in 1984
..... H.Seto and T.Kanoh 331

Biochemical Findings of Tissues of Rats Exposed to NO_2 and O_3
..... M.Ohsawa, T.Suzuki, S.Ikeda, N.Watanabe, T.Kanoh and I.Mizoguchi 336

Isolation of Coliform Bacteria from Chlorinated Drinking Tank Water, and Resistance of Isolates for Chlorine and Heat
..... K.FuruHata and A.Matsumoto 343

Comparative Study on Trace Elements Levels in Drinking Water of Jos in Nigeria and Several Japanese Areas
..... Y.Tsuchiya, G.A.Ubom, C.Noda, H.Sasano and I.Mizoguchi 349

Survey of Trihalomethanes in Drinking Water in Tama District
..... N.Ohhashi, K.Yaguchi, N.Sekiyama, S.Watanabe, M.Nishijima and S.Sakai 356

Removal of Volatile Chlorinated Organic Compounds in Drinking Water in Home
..... K.Yaguchi, S.Watanabe, N.Sekiyama, N.Ohashi, N.Ikejima, M.Nishijima and S.Sakai 363

REPORTS V PAPERS CONCERNING ON TOXICOLOGY

Effects of OPP-Na on Hepatic Metabolizing Enzyme system
..... K.Ushiyama, K.Satoh, F.Nagai, A.Nakagawa, I.Kano, H.Ichikawa and T.Nakao 371

Possibility of Excretion of Sodium o-Phenylphenate (Opp-Na) into milk by Oral Admimistration to Mother Rat (II)
..... H.Kobayashi, N.Kamiya and H.Ichikawa 373

Promoting Effect of Acetaminophen on Mutagenicity (II)
Relation of the Chemical Structures and the Activities
..... K.Fujitani and M.Sasaki 376

Shape Change of Erythrocyte Ghosts and Inhibition of Calmudulin stimulated Ca^{2+}, Mg^{2+} -ATPase by Chloroquine
..... F.Nagai, K.Ushiyama, A.Nakagawa, I.Kano and T.Nakao 380

The Measurement of the Sodium Efflux in Red Blood Cells by Na-NMR
..... S.Fukano 387

Hemolysis Test by Light Scattering Method (II). Using Rabbit Blood
..... H.Ichikawa and H.Kobayashi 391

Monoclonal Antibody to Horse Kidney Na, K-ATPase (II)
..... K.Satoh, F.Nagai, K.Ushiyama, A.Nakagawa, I.Kano, H.Ichikawa and T.Nakao 395

Comparison of Ultrastructural Changes between o-Phenylphenol (OPP) -Kidney Damage and Sucrose-Nephrosis in the Rat Proximal Tubules
..... N.Fukumori and M.Sasaki 399

Examination of Dose-Related Enhancing Effects of Thiabendazole on Urinary Bladder Carcinogenesis by Sodium *o*-Phenylphenate in Rats
..... H.Mikuriya, T.Fujii, S.Hayashida, N.Kamiya and K.Hiraga 407

Enhancining Effects of Thiabendazole on Urinary Bladder Carcinogenesis in Rats Fed Diet Containing Low-Dose of Sodium o-Phenylphenate for 13 Weeks
..... T.Fujii, H.Mikuriya, S.Hayashida and K.Hiraga 411

Preliminary Studies for Teratogenicity of Thiabendazole in Rhesus Monkey
..... S.Iguchi, M.Yoneyama, A.Ogata, Y.Tada, H.Ando, Y.Kubo and M.Sasaki 415

Teratological Studies of Thiabendazole (TBZ) in Rats
..... A.Ogata, H.Ando, Y.Kubo, M.Sasaki and K.Hiraga 421

Inhalation Experiment of Chromite Ore Residue Dust to Rats for 2 Years (III) Analysis of Chromium in Rat Tissues
..... N.Kamiya, Y.Sakamoto and M.Sasaki 426

Changes of Hematological Findings with the Aging in F344 Rats
..... Y.Tada and M.Sasaki.....430

Studies on the Physiological Parameters in the SPF Rabbit (KBL-JW) (I) Body Weight Gain, Food Intake and Blood Components in 7～10 Weeks of Age.
..... S.Hayashida, H.Kobayashi, S.Iguchi and H.Ichikawa 436

Mutagenicity Tests of Diethylene Glycol
..... S.Yoshida, H.Fujita and M.Sasaki 442

Mutagenicity Test of Food Additives with Salmonella typyimurium TA97a and TA102 (I)
..... H.Fujita and M.Sasaki 447

Mutagenicity of Natural Antioxidants in the Ames Test
..... A.Kojima, H.Fujita and M.Sasaki 453

Studies on the Liquid Meduim for Bacterial Growth in the Ames Test — Comparison of Nutrient Broth with Synthetic Liquid Medium —
..... A.Kojima, H.Fujita and M.Sasaki 457

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS 463

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS 471

報　　文　Ⅰ

感染症等に関する調査研究

REPORTS Ⅰ

PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS AND OTHERS

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 1-7, 1986

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3報）訪問国パターン別赤痢菌およびサルモネラ検出状況解析システム

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 (III) A System for Analyzing *Salmonella*- and *Shigella*- detected Cases 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, パターンアナリシス pattern analysis

我々は1983年以後，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）[1,2]および同システムのサポート用として検査成績解析システム（MDAシリーズ）[3,4]の開発を行い，海外旅行者検便業務に係わる情報の管理・処理に活用してきた．後者のMRFC用サポートシステムの内，特に訪問国パターン別検査成績解析システム（MDAシリーズ・010，110およびその後追加開発した120，130）の利用によって，手作業によっては多大の時間と労力を要する海外渡航者の訪問国パターン（訪問1－5ケ国の組み合わせ）別病原菌検出状況の解析が必要に応じて随時行えるようになった．対象とした海外旅行者下痢症患者は，各々が多彩な国々に渡航歴を有するばかりでなく，2ケ国以上を歴訪した者も多く，いずれの国に旅行するとどんな疾患に罹患し易いかを推定することは必ずしも容易でない．上記の各システムは，これをいわば散発事例の集合であると考えて，当該下痢症例の細菌学的検査成績を大量に累積して分析することによって，訪問国別の病原菌検出傾向を推定するという手法を採用した解析システムであった．

それらのシステムを用いた解析の結果，コレラ菌，非0-1ビブリオ・コレレ，ビブリオ・フルビアリス，腸炎ビブリオ，赤痢菌，病原大腸菌・血清型（EPEC），毒素原性大腸菌（ETEC），プレジオモナスなどは渡航者の訪問国パターンによって検出状況が大きく左右されるが，サルモネラおよびカンピロバクターはこれに関係なく比較的平均して検出される傾向など，海外旅行者下痢症の疫学的考察に有用な情報を得ることができるようになった[3,4]．また赤痢菌については，検出菌の血清型には，訪問国パターンによる特徴が認められることが明らかになった[3]．

そこで我々は，海外渡航者の訪問国別病原菌検出状況についてさらに詳細な解析を行うために，訪問国パターン別の赤痢菌種・菌型別およびサルモネラO群別検出状況解析システムを開発した．以下にその概要を述べる．

システムの開発手順

システム開発当初に採用したパーソナルコンピュータの主要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）は，NEC（日本電気株式会社）のPC80S31（5Dタイプのデュアル・ディスクドライバ）およびPC8024（ドットプリンタ）装備のPC8001 mkⅡ（64Kバイト仕様），および，NEC PC－8001BASIC Ver 1.3 Copyright 1979（C）by Microsoft（いわゆるN－Basic版）である．またシステム開発途上において同社製のPC－9800FおよびPC9800VMラインが導入され，これらにはDOSとしてNEC N－BASIC

* 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

(86) Version 1.0 Copyright (c) 1983 by NEC Corporation／Microsoft Corp. を採用した.

試験解析用には，MRFC[1]の運用によって蓄積された，1980－1984年の5ケ年分のデータを供試した．解析時に参照した主要収録情報は，被検者区分（下痢現症者・既往者・健康者の別），旅行国，検出菌株数および検出病原菌である.

訪問国パターン別赤痢菌およびサルモネラ検出状況解析システムの開発にあたっては，まず，MDA シリーズ・010および110を用いて供試データにおける出現訪問国パターン数の測定を行い，MRFC の Activity15および16[1,2]によって赤痢菌の菌型別およびサルモネラのO群別出現傾向を把握して，分類集計処理の所要取扱情報量を推定した．これらを基礎資料として，両システム開発に対する詳細な請求要件（いわゆる Requirment）を得た.

またソフトウエアのデザインに際しては，訪問国コードの取り扱い，基本的なデータ処理アルゴリズム，プログラミング言語など，MDA シリーズ・110[3,4]のそれらを踏襲した.

各々のシステム完成後，1980－1985年の6ケ年分の検査成績を用いて，実務運用における評価を行った.

供試データの試験解析結果

1980－1984年の各年に認められた海外渡航者の訪問国パターンは，それぞれ，213，192，220，212および219種であり，5年間の累積では542種であった.

赤痢菌の出現菌型数は，各年で8－15菌型，5年間の累積で23菌型であり，また，サルモネラの出現O群数は，各年で11－15群（ただし，チフス菌，パラチフスA菌，パラチフスB菌を別途に取り扱い，B－Lの各O群および，その他のO群をまとめて1つのO群とみなした），5年累積では17群であった.

訪問国パターン別赤痢菌およびサルモネラ検出状況解析システムの概要

上述の試験解析結果を基礎資料として，各々のシステム開発に対する詳細な請求要件を得，ソフトウエアのデザインおよびプログラミングを行った．完成した訪問国別赤痢菌およびサルモネラ検出状況解析システムは各々，MDA シリーズ・220および MDA シリーズ・320と名付けた．両システムの情報処理手順は図1に示すとおりである．なお対象病原菌のコード番号は，赤痢菌の菌型別コードおよびサルモネラのO群別コード共に，MRFC のものをそのまま使用し，分類集計に際してはそれらを変数配列に適応させるために独自に設定した一連のシフトコード番号に変換して利用する方式とした.

取扱訪問国パターン数の上限は，過去の実績に基づいた推察から，20年分以上のデータの累積解析ができるように充分な余裕を見積もって，1000と設定した．また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分類集計結果の記憶方法については，MDA シリーズ・110と同様に，前者をパーソナルコンピュータ本体のメモリー上に内部記憶し，後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，データ処理を行う方式とした．“：Temp：”ファイルのデータフォーマットは，MDA シリーズ・110とほぼ同様に行った．すなわち，訪問国パターン別の該当検査件数および赤痢菌あるいはサルモネラ検出例数に続いて，各菌型あるいはO群別の検出菌株数をシフトコード番号順に配列し，最後の10バイトに訪問国パターンを納めて，1パターン分の検出状況の記憶に256バイトを割り当てた.

各々の解析は，被検者区分を指定して行うことができる．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，下痢有症者群として，〔P＋G〕の指定，採便時に下痢がなかった者として，〔G＋H〕の指定，および，被検渡航者の合計として，〔P＋G＋H〕の指定をすることができる.

ハードコピーの出力様式は，基本的に MDA・110のそれを踏襲し，“：Temp：”ファイルに記憶した訪問国パターン別の分類集計結果をそのままの数値と順序で出力するプルーフィング・リスト，および，解析結果を直接視覚に訴えるための検出状況グラフィック表示を含むものとを用意した．後者の様式は，それぞれ訪問国パターン別印字の，上段に各検出状況の実数を出力し，下段にグラフィック印字を行う．下段のグラフは，各検出菌型あるいはO群ごとに，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½未満，½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するものである．この様式を出力する場合には，まず，“：Temp：”ファイルから全ての収録訪問国パターンを読み出し，これらを訪問国コード番号順に並べ換え（swapping）を行う．プリンターへの出力は，その後，該当被検者の下限指定（1－250の任意の値を指定可）に従って行われる．また陽性者数の下限指定もそれぞれのシステムにおいて可能である.

各々のシステムにおける分類集計処理および解析結果

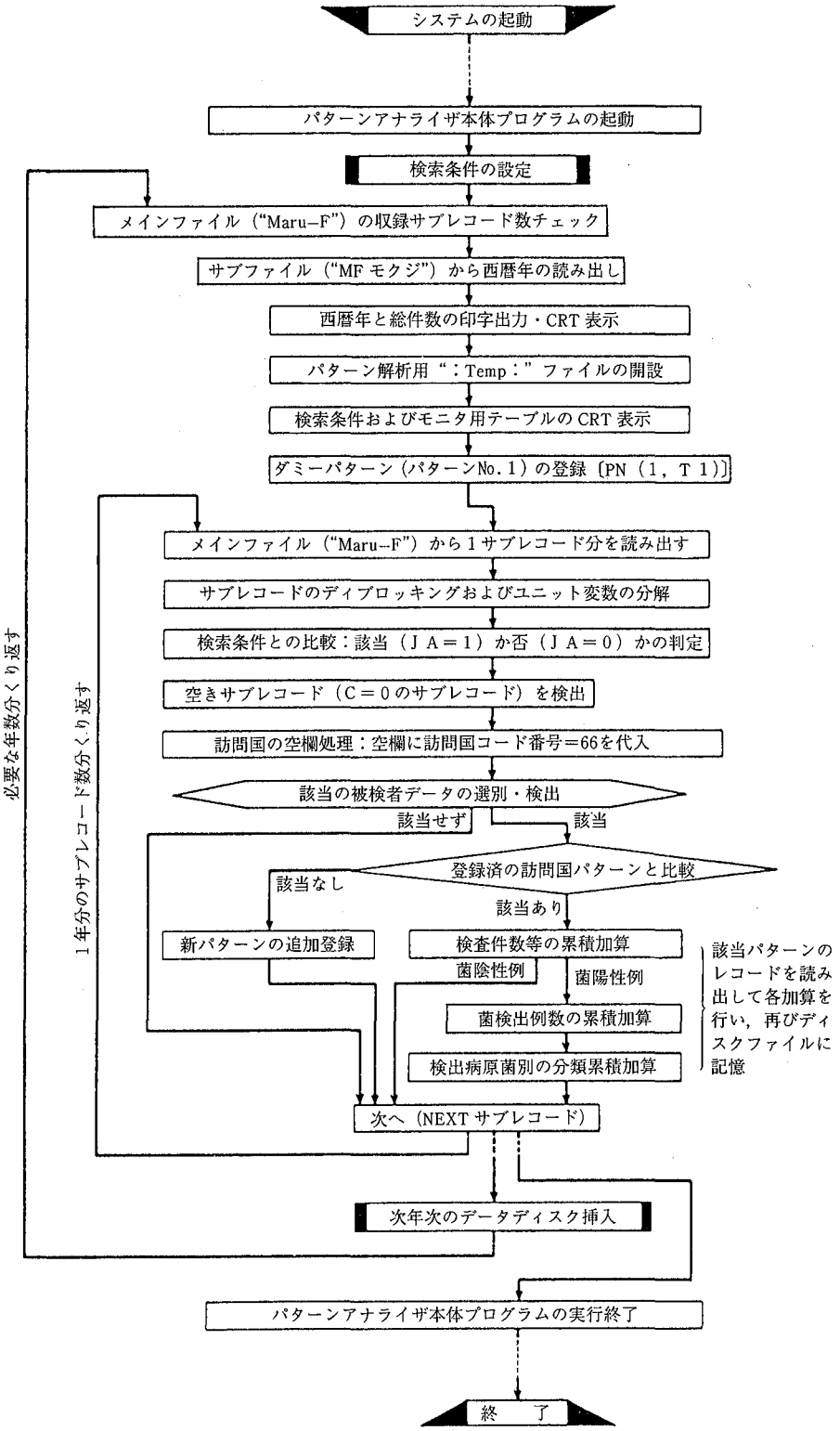


図1．訪問国パターン別赤痢菌およびサルモネラ検出状況解析システムの情報処理フロー

のハードコピーの出力は次のような項目分類で行う．

すなわち，訪問国パターン別赤痢菌検出状況解析システム（MDA シリーズ・220）の場合，訪問国パターン別の集計は，A群10型（A 1－A 10），B群11型（1 a，1 b，1 c，2 a，2 b，3 a，3 b，3 c，4，5，6），C群15型（C 1－C 15），D群，A－C各群の型別不能株等（各々〔A〕，〔B〕，〔C〕と略記）に分類して行う．ただしハードコピーの出力は，検出された菌型のみ行う．また，訪問国別サルモネラ検出状況解析システム（MDA シリーズ・320）の場合，訪問国パターン別の集計は，チフス菌（Typ.），パラチフスA菌（P.A.），パラチフスB菌（P.B.），B－I，KおよびLの16O群，および，その他のO群（Otr.）に分類して行う．ただしハードコピーの出力は，E 3群を除いて行う．新しいサルモネラ分類への対応については，後述する．

実務運用における評価

両システムは，ディスク・ドライバのドライブ1にシステムディスク，ドライブ2にMRFCデータディスクを各々装填した後，システムのメインスイッチまたは本体のリセットボタン操作によって自動的に起動する．起動後オペレータが手作業を要するのは，検索条件の設定および年次毎に行うデータディスクの入れ替え程度である．データ処理作業は，データディスク上の記憶情報を収録順に従って1件ずつ読み出して検索指定条件に該当するレコードを識別する，リニアサーチ方式で，自動的に実行される（図1参照）．累年処理が終了すると，分

● Proof-list of Pattern Analysis by Countries Visited ●

Pattern (countries)	No. of	No. of	Shigella (by Serotype)																				
No. (1 2 3 4 5)	Cases	Posi.	Shigella group A = 3-13, group B =14-25, group C = 26-41, group D = 42, (43-50 = Spaces)																				
[R] CP(1),2),3),4),5)	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)
			26)	27)	28)	29)	30)	31)	32)	33)	34)	35)	36)	37)	38)	39)	40)	41)	42)						
1 (67/67/67/67/67)	53	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2						
2 (13/66/66/66/66)	1607	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	7	0	1	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13						
3 (22/66/66/66/66)	951	73	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	7	2	1	1	0	1	2	9	0
			0	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	43						
－－（一部省略）－－－－－－－－－－																									
611 (12/15/25/66/66)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
Total (611 patterns)	15233	365	0	7	1	0	0	0	0	1	1	0	0	2	29	1	45	4	13	3	0	11	3	19	0
			3	9	1	2	0	0	2	4	0	1	1	3	0	0	0	1	202						

図2．訪問国パターン別赤痢菌検出状況解析システム（MDA シリーズ・220）のプルーフィング・リスト出力例

● Proof-list of Pattern Analysis by Countries Visited ●

Pattern (countries)	No. of	No. of	Salmonella (by O-group)																		
No. (1 2 3 4 5)	Cases	Posi.	typ.	p.A	p.B	B	C1	C2	C3	D1	D2	E1	E2	E4	F	G	H	I	K	L	Otr.
[R] CP(1),2),3),4),5)	DC(1)	DC(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	10)	11)	12)	13)	14)	15)	16)	17)	18)	19)	20)	21)
1 (67/67/67/67/67)	53	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 (13/66/66/66/66)	1,607	188	0	0	1	61	29	30	0	4	0	54	0	16	2	5	1	0	1	0	0
3 (22/66/66/66/66)	951	62	0	1	0	21	23	5	0	2	0	6	0	4	0	3	0	0	2	0	0
4 (14/66/66/66/66)	3,721	445	0	0	1	150	72	65	0	9	0	106	14	28	2	8	0	12	18	1	6
5 (11/66/66/66/66)	2,227	212	0	0	0	64	63	28	0	9	0	37	0	17	0	10	0	0	1	0	1
－－（一部省略）－－－－－－－－																					
611 (12/15/25/66/66)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total (611 patterns)	15,233	1,429	1	2	2	446	307	235	1	45	0	293	20	93	7	37	2	15	35	1	12

図3．訪問国パターン別サルモネラ検出状況解析システム（MDA シリーズ・320）のプルーフィング・リスト出力例

類集計結果は“：Temp：”ファイルに記憶されて，パーソナルコンピュータ本体のメモリーはクリアされる．その後に，必要な様式を指定してハードコピーを得ることができる．“：Temp：”ファイルは必要に応じて何時までも保存できるようになっているので，以後何度でもハードコピーの出力が可能である．

1980－1985年の被検渡航者合計15,233名分の蓄積情報について，PC9800シリーズ用の両システムを用いて累年処理を行って得たハードコピーの出力例を図２－５に示す．対象とした６年間における出現訪問国パターンの総数は611であった．図２および３は，“：Temp：”ファイルに記憶した訪問国パターン別の分類集計結果をそのままの数値と順序で出力したプルーフィング・リストであり，前者が赤痢菌用，後者がサルモネラ用のシステムによって得られた例である．

図４および５は，同じく“：Temp：”ファイルに記憶・保存された訪問国パターン別の分類集計結果を読み出し，これらを訪問国コード番号順に並べ換え，検出状

● The Result of Pattern Analysis by Countries Visited ●

Countries visited	P-No.	No. of Shigella isolates (by serotype)																										
No. of Cases	No. of Shig. Posi.	A2	A3	A8	A9	B1a	B1b	B1c	B2a	B2b	B3a	B3b	B4	B5	B6	C1	C2	C3	C4	C7	C8	C10	C11	C12	[C]	D
Kore, -, -, -, -	50 (1 66 66 66 66)																									
187	14	0	0	0	0	0	8	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
IndN, -, -, -, -	5 (11 66 66 66 66)																									
2,227	38	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	28
IndN,Sinp, -, -, -	22 (11 12 66 66 66)																									
216	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Sinp,Mals, -, -, -	45 (12 15 66 66 66)																									
419	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Thai, -, -, -, -	2 (13 66 66 66 66)																									
1,607	23	0	0	0	0	0	1	1	7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13
Thai,Indi, -, -, -	37 (13 22 66 66 66)																									
308	28	2	0	0	1	0	3	0	3	1	3	0	1	0	3	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	9
Thai,Indi,Nepl, -, -	26 (13 22 24 66 66)																									
226	17	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
Thai,Nepl, -, -, -	17 (13 24 66 66 66)																									
201	15	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	8
PhiP, -, -, -, -	4 (14 66 66 66 66)																									
3,721	35	0	0	0	0	1	3	0	6	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	20
Indi, -, -, -, -	3 (22 66 66 66 66)																									
951	73	1	0	0	0	0	2	0	7	2	1	1	1	2	9	0	5	0	1	0	0	0	0	0	0	43
Indi,Nepl, -, -, -	14 (22 24 66 66 66)																									
257	24	2	0	0	0	0	3	0	3	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	11
SriR, -, -, -, -	10 (23 66 66 66 66)																									
130	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Total (611 patterns)																										
15,233	365	7	1	1	1	2	29	1	45	4	13	3	11	3	19	3	9	1	2	2	4	1	1	3	1	202

図４．訪問国パターン別赤痢菌検出状況解析システム（MDA シリーズ・220）によって得た菌型別検出状況のハードコピー出力例
パターン別被検者数が100以上で，かつ，その内の赤痢菌陽性例が３件以上の訪問国パターンのみ限定出力した．

況を検出菌株数（上段）にグラフィック表示（下段）を添えてプリンタに出力したものである．下段のグラフは，前に述べたとおり，赤痢菌の検出菌型ごと（図4）あるいはサルモネラのO群（図5）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の比較において，横型棒グラフの巾を段階的に太くして表示してある．従って，上段の数値を横に通覧することによって各訪問国パターンにおける検出菌型あるいはO群の頻度を比較することができ，グラフ表示を縦に観察することによって各訪問国パターン間における検出状況の比較検討ができる．

図4は，赤痢菌用の解析システム（MDAシリーズ・220）によって，該当被検者数が100名以上でかつ，その内の赤痢菌陽性例数が3件以上のパターンを限定出力して，得られたハードコピーの出力例である．例示した各訪問国パターンにおいて，「韓国（Kore)」および「インド（Indi)」の各1ケ国渡航例，および，「タイ（Thai）・インド」，「タイ・ネパール（Nepl)」，「インド・ネパール」，「タイ・インド・ネパール」の各複数国歴訪例における赤痢菌の検出率は，7.4−9.3%と他に比

The Result of Pattern Analysis by Countries Visited

Countries visited / P-No. (1 2 3 4 5)	No. of Cases	No. of Sal. Posi.	No. of salmonella isolates (by O-group) typ.	p.A	p.B	B	C1	C2	C3	D1	D2	E1	E2	E4	F	G	H	I	K	L	Otr.
Kore, −, −, −, −	187	4	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50 (1 66 66 66 66)																					
Tawn, −, −, −, −	514	44	0	0	0	12	17	1	0	5	0	6	0	1	0	1	0	0	3	0	0
13 (2 66 66 66 66)																					
HonK,Sinp,Thai, −, −	101	13	0	0	0	4	2	1	0	1	0	5	0	2	0	0	0	0	0	0	0
24 (4 12 13 66 66)																					
HonK,Thai, −, −, −	112	9	0	0	0	5	2	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
34 (4 13 66 66 66)																					
IndN, −, −, −, −	2227	212	0	0	0	64	63	28	0	9	0	37	0	17	0	10	0	0	1	0	1
5 (11 66 66 66 66)																					
IndN,Sinp, −, −, −	216	22	0	0	0	3	5	6	0	2	0	4	0	2	0	1	1	0	0	0	0
22 (11 12 66 66 66)																					
Sinp, −, −, −, −	512	45	0	0	0	4	8	24	0	3	0	7	0	1	0	1	0	0	0	0	0
8 (12 66 66 66 66)																					
Sinp,Thai, −, −, −	114	13	0	0	0	4	2	2	0	0	0	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0
54 (12 13 66 66 66)																					
Sinp,Mals, −, −, −	419	51	0	0	0	13	8	21	1	1	0	4	0	1	1	1	0	0	1	0	1
45 (12 15 66 66 66)																					
Thai, −, −, −, −	1607	188	0	0	1	61	29	30	0	4	0	54	0	16	2	5	1	0	1	0	0
2 (13 66 66 66 66)																					
Thai,Indi, −, −, −	308	16	0	0	0	8	3	2	0	0	0	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0
37 (13 22 66 66 66)																					
Thai,Indi,Nepl, −, −	226	7	0	0	0	2	2	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26 (13 22 24 66 66)																					
Thai,Nepl, −, −, −	201	11	0	0	0	6	3	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
17 (13 24 66 66 66)																					
PhiP, −, −, −, −	3721	445	0	0	1	150	72	65	0	9	0.	106	14	28	2	8	0	12	18	1	6
4 (14 66 66 66 66)																					
Mals, −, −, −, −	286	27	0	0	0	6	7	9	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	2	0	0
46 (15 66 66 66 66)																					
Indi, −, −, −, −	951	62	0	1	0	21	23	5	0	2	0	6	0	4	0	3	0	0	2	0	0
3 (22 66 66 66 66)																					
Indi,Nepl, −, −, −	257	20	1	0	0	8	6	1	0	0	0	3	0	1	0	0	0	0	1	0	0
14 (22 24 66 66 66)																					
SriR, −, −, −, −	130	13	0	0	0	3	4	3	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 (23 66 66 66 66)																					
SriR,●CEA, −, −, −	142	14	0	0	0	5	4	1	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0
30 (23 27 66 66 66)																					
Total (611 patterns)	15,233	1,429	1	2	2	446	307	235	1	45	0	293	20	93	7	37	2	15	35	1	12

図5．訪問国パターン別サルモネラ検出状況解析システム（MDAシリーズ・320）によって得たO群別検出状況のハードコピー出力例
パターン別被検者数が100以上の例のみを限定出力した．

較して高く，グラフ巾が各々同程度に広く表示されている．しかしこれらを検出菌型別に観察すると，例えば，それらの内で高頻度に検出された（グラフ巾が広い）菌型では，韓国渡航例においてはフレキシネル1bおよび2aの2菌型であるが，インドやネパール渡航を含む各パターンの例においては7－11菌型と多彩であり，前者と当該菌検出率および陽性数が近似する「タイ・ネパール」および「タイ・インド・ネパール」歴訪パターンと比較した場合においても同様の傾向がうかがえる．このような解析結果のハードコピーを観察することにより，海外旅行者の渡航先の如何によって罹患し易い菌型の傾向を推察することができた．

図5には，サルモネラ用の解析システム（MDAシリーズ・320）によって，該当被検者数100名以上の訪問国パターンのみ（陽性例数の下限指定なし）を限定して，得られたハードコピーの出力例を示した．サルモネラの検出率は，訪問国パターン別に見ると韓国1ケ国の渡航例および「タイ・インド・ネパール」3ケ国歴訪例では他に比較してやや低い（グラフの巾が小さい）が，その他の例では互いに大差なかった．これらをO群別に観察すると，例えばB群やC1群は訪問国パターン間におけるグラフ巾に大差が認められないが，C2群においては「シンガポール（Sinp)」1ケ国訪問および「シンガポール・マレーシア（Mals)」歴訪パターンのグラフ巾が広く表示されており，これらのグラフ巾の差異を観察することによって，訪問国パターン別の検出傾向を容易に比較・検討することができる．

考　察

上述の両検査成績解析システムは，先に開発したMDA・010，110[3,4]や120，130等と同様にMRFC[1,2]のサポート用として開発された．これらの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とを要する訪問国パターン別赤痢菌あるいはサルモネラ検出状況を各々菌型別あるいはO群別に分類集計して解析する作業が自動化され，必要に応じて随時処理ができるようになった．またそれらの成績を直接的に視覚に訴える様式でプリントアウトできるようにシステムをデザインしたことによって，当該業務担当者以外にも理解し易い資料を提供し得るようになった．これらのシステムによって得られる解析結果を，MDA・110や120など，すべての病原菌を対象とした検査成績解析システムによって得られる結果と併わせて検討することにより，さらに詳細な訪問国別の病原菌罹患状況を推察できるようになったと考える．

なお，赤痢菌の検出率はサルモネラのそれに比較して低く，6年間の累積では，特に該当被検者数が少ない訪問国パターンあるいは菌型については，検出傾向を充分に把握でき得ない．したがってさらに詳細な検出状況の分析を行うためには，解析主旨に応じて，累積年数を重ね検出例数の総数を大きくして解析を行うか，あるいは，MDAシリーズ・110で実施したと同様に，各訪問国個別の延べ被検者数を得て検出状況を推定する解析手法[1,2]を試みることが望まれよう．

また，システム開発後，赤痢菌の血清型，サルモネラのO群分類表示に追加あるいは変更があったので，分類集計の項目については適切な変更を行いたいと考えている．

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ー，10(8),23,1985
3）津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：東京衛研年報，36,52,1985
4）津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：マイコンサーキュラー，11(3),2,1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 8-14, 1986

パーソナルコンピュータを用いた腸チフスおよびパラチフス情報管理システムの開発

津野正朗*, 大橋誠*, 中村明子**

A Data Base for the Typhoid and Paratyphoid Fever Surveillance by Using Personal Computer

MASAAKI TSUNO*, MAKOTO OHASHI* and AKIKO NAKAMURA**

Keywords：データベース data base, パーソナルコンピュータ personal computer, 感染症サーベイランス infectious disease surveillance, 腸チフス Typhoid fever, パラチフス Paratyphoid fever

法定伝染病の1つである腸チフスおよびパラチフスに対しては，伝染病予防法の定めるところにより対策がとられているところであるが，これに加えて1966（昭和41）年11月には厚生省公衆衛生局長通知「腸チフス対策の推進について」が発行されて，別途全国的なサーベイランスシステムが組織され，対策の強化が計られている[1]．このシステムでは，厚生省へ集められる腸チフス・パラチフス患者の発生情報と国立予防衛生研究所において実施されている分離菌株のファージ型別試験成績とが活用され，これらを指標として流行解析が行われている（図1参照）．同疾患の疫学的解析におけるファージ型別成績の利用価値は高く，これを応用して，広域的に罹患者が分布していて認識が困難であるような流行事例の確認，感染経路や感染源の追究などに多大の実績をおさめてきている[2,3]．本事業発足当初と比較すると，腸チフス・パラチフス患者の発生は多少の減少傾向を示しているが，現在でもなお年間300例余が報告されており，毎年数件の流行も認められる．また近年における海外旅行者の増加により，輸入事例が年々増加しつつある．したがって今後も本サーベイランスシステムの維持が必要である．

このシステム中で著者らは，検査室由来情報を生産する立場で事業に参画してきた．本事業に係わる情報管理は，従来，検査室由来情報および関係行政担当部署などからの患者・保菌者情報をマークシートに集約し，カードセレクタ（タナック）の使用によって，検索・分類・集計等の処理作業を実施してきた．しかし，より詳細な分類集計，流行の分析などを行う上でなお不便な点があったので，情報処理をさらに迅速化し，必要に応じて随時多様な資料を行政担当者に提供できるようにするため，パーソナルコンピュータを導入して，専用データベースの自家開発を行った．開発したシステムには，“Typhoid and Paratyphoid Fever Surveillance, Japan”に由来して“ＴＦＳＪ”の略称を与えた．以下にこれを紹介する．

なお，本システムによって取り扱われる情報には，個人的な情報が含まれており，その秘密厳守に万全を期すべき要がある．したがって本報では感染症サーベイランス領域におけるパーソナルコンピュータの活用例として同システムを紹介するにとどめ，患者・保菌者の個人的な内容に触れることを避けた．

パーソナルコンピュータシステム開発の基本方針

著者らがこれまで，感染症サーベイランス領域におけるパーソナルコンピュータシステムの開発[4-7]を行うにあたって採用した手順をシステムのライフサイクルとして表1に示した．今回のシステム開発においても，検査室由来情報の生産者であるラボワーカー自らが，ユーザーとして請求要件（Requirment）をまとめ上げ，システムデザイナー，システムエンジニアおよびプログラマーの役をも果たした．

腸チフス・パラチフスサーベイランス事業の目的は全国的によく徹底しており，関連情報の収集率もこの数年

* 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
** 国立予防衛生研究所細菌部

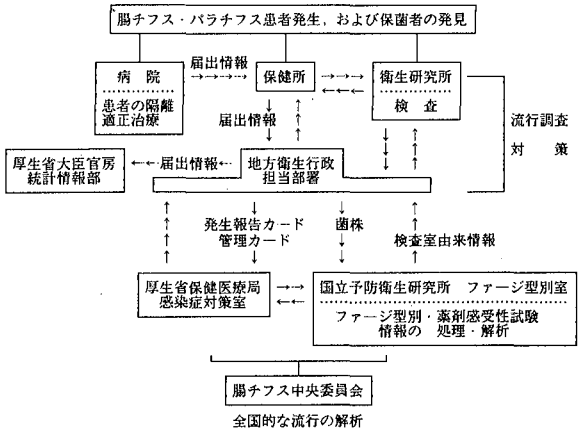


図1．腸チフス・サーベイランス・システムと情報の流れ

間90％をはるかに上回っている．さらに従来からカードセレクタが使用されていた経緯もあり，パーソナルコンピュータシステム開発に対する請求要件の把握が容易であった．そこでまず従来のシステムにおける諸情報の取り扱い方をおおむねそのままの方式で継承し，必要に応じて新たなActivityの追加を行うという基本方針に基づいて開発を進めた．

本事業においては，収録情報の処理結果は，中央あるいは地方における対策会議での検討資料として用いられることが多いため，専ら紙上へのハードコピーとして出力する必要がある．したがって分類集計処理用の各Activityには，当該処理用の本体プログラムに加えて各様式のハードコピー出力用プログラムを組み込んだ．出力様式のデザインに対する請求要件としては，従来手作業によって作成・使用されてきた，検査室における情報管理用の個票（マークシート）と，個票中の基本的な情報のみを1件当て1行に記載・並列したいわゆる大福帳，ならびに行政側への報告用として用いられてきた図・表など，合計20種を参考とした．中でも前二者は利用頻度が高く，疫学情報解析用の資料としてしばしば利用されてきた．したがってハードコピーの様式も，従来のものを出来るだけそのままの形で継承した．また，隠れた流行事例の発見や，遠隔地で発生した関連事例の選出などが本サーベイランスシステムの最も重要な狙いであることに鑑み，これらを容易にするために集団・流行・再発事例検索支援用のリストを新たに追加した．

また検査室の担当職員自らがシステムのオペレーションに当たるため，比較的簡易に運用できるように配慮した．特に各ハードコピー出力Activityは，数回以内の簡単なキー操作によって実行できるようにプログラムデザインを行った．

なお対象疾患は，患者が回復後長期保菌者に移行し，これが新しい流行の原因となる場合がある伝染病であり，その対策には広域かつ長期にわたる患者・保菌者の管理が要求される．したがって，当面は各年単位の情報処理用としてシステムの開発を行うが，累年解析を要するようなActivityについては，将来，これらを累年処理用に改造できるように配慮した．

システムの概要

以下にＴＦＳＪ（腸チフス・パラチフス情報管理システム）の主な仕様を述べる．

1．使用ハードウエア

システム開発に使用したパーソナルコンピュータの主要ハードウエアは，NEC（日本電気株式会社）のPC8001mkⅡ（64Kバイト仕様），PC80S31（5Dタイプのデュアル・ディスクドライバ），および，PC8024（ドットプリンタ）である．またディスクオペレーションシステム（DOS）には，NEC PC－8001 BASIC Ver1.3 Copyright 1979 (C) by Microsoft（いわゆるN-Basic版）を使用した．なお実務運用には，同ハードウエアを用いたシステム（TFSJ）のほか，同系の上位機種PC9801F用に変換した「TFSJ98」システムも合わせて開発した．後者の場合，DOSは，NEC N－BASIC (86) Version 1.0 Copyright (C) 1983 by NEC Corporation／Microsoft Corp. およびNEC N－88 BASIC (86) Version 2.0 Copyright (C) 1983 by NEC Corporation／Microsoft Corp. を採用した．

2．入・出力データおよびその取り扱い

データファイルの入・出力データは，合計36事項76項目である（表2参照）．この中には，事務管理用の諸情報をはじめ，流行調査等に利用するための個人特性情報，臨床情報，分離菌株情報および疫学情報などが包含される．

これらの取り扱いデータのうち，年・月・日・週目，日数，年齢および番号については各々の実数をそのままの形で入力する．ただし週目，日数および年齢の入力には，原則としてキー操作を要さず，関連入力情報およびデータディスク上に自動的に開設される簡易カレンダーを利用して自動的に算定・入力されるように工夫した．

所轄都道府県および同保健所名，患者・保菌者の性別，診定方法，検出菌種（チフス菌，パラチフスA菌，パラチフスB菌），検査材料，患者／保菌者別，薬剤感受性試験成績（最少発育阻止濃度；M. I. C.），菌株・発生報告や管理カードの有無については，それぞれにコード番

表1　コンピュータ・システムのライフサイクル

STEPS（開発の段階）	FACTORS（内容）	PART（役割分担）
（新規）	necessity, needs	
	analysis, detaile	
REQUIRMENT（請求要件を得る）	description	USER（ユーザー）
	confermation	
	documentation	
	hard ware	
	soft ware	
	input/output data	
SYSTEM DESIGN	file design	SYSTEM DESIGNER
（システムデザイン）	record design	（システムデザイナー）
	(format design)	SYSTEM ENGINEER
	display design	（システムエンジニア）
	printing design	
	program design	
	programing language	
	algorithm	
PROGRAMING	main routine	PROGRAMER
（プログラミング）	sub-routine	（プログラマー）
	fool-proofing	
	system-up	
	operation	
TRACE RUNNING	detection of error	PROGRAMER
TEST RUNNING（試験運用）	detection of bugs	(OPERATOR)
	check for fool-proofing	
	proof listing	
	recording data	
	reading out the data	
	display	
OPERATION（実務運用）	printing out	OPERATOR
	searching	(USER)
	differencial count	
	analysis	

改良・追加

号化を行って，入力所要時間およびデータ収録所要バイト数の節減を計った．

残る各項目は，カナ（またはローマ字）による文字入力をするが，入力文字数を最少限にとどめて誤入力を少なくするために，薬剤感受性試験薬剤名，推定感染地域および同国名にはそれぞれ略号を割り当てた．さらに，職業，推定感染地域については，テンキーまたはファンクションキーの1回操作によって必要な入力ができるように省力化を計った．また備考欄には10文字分の領域を配分した．

3．データファイルの仕様

入力データの収録には，年単位で1枚のデータ専用ディスクを使用した．同ディスク上には，上述の各入力データを収録するメインファイル（ファイル名＝“TFSJ－f”）をはじめ，割当西暦年号および制御システム名識別用サブファイル（ファイル名＝“C－YEAR”）および，当該年の週目算定用として簡易型カレンダーを記憶するサブファイル（ファイル名＝“Week－N”），合計3本のランダムアクセス型ファイルを開設した．

メインファイルにおいては，1件分に256バイトを割

表2 TFSJの入力情報一覧

取扱事項	入力情報	割当桁数（文字数）
患者(保菌者)診定年次	西暦年号	4桁
患者(保菌者)番号	年別の連続番号	4桁
分離菌株番号	年別の連続番号	4桁
取扱都・道・府・県	都道府県コード番号	3桁
取扱保健所	保健所コード番号	2桁
流行調査に利用するための	カナ・英文字	45文字＋15文字×2
患者・保菌者個人特性情報	実数	8桁(4＋2＋2)＋2桁
(性・年齢・職業等，6事項)	コード番号	1桁
患者の発病年月日・週	西暦年号＋月日＋週目	10桁(4＋2＋2＋2)
患者の診定月日・週	月日＋週目	6桁(2＋2＋2)
患者の発病－診定日数	発病から診定までの所要日数	2桁
患者(保菌者)診定方法	診定法別コード番号	1桁
検出菌種名	菌種別コード番号	1桁
菌分離年月日	西暦年＋月日	6桁(2＋2＋2)
検査材料	検査材料別コード番号	1桁
菌株受理年月日	西暦年号＋月日	8桁(4＋2＋2)
初発時患者番号	西暦年号＋初発時患者番号	6桁(2＋2＋2)
推定感染地	エリア別略号	3文字
患者・保菌者の別	患者・保菌者別コード番号	1桁
集団発生事例番号	集発番号＋患者枝番号	5桁(2＋3)
分離菌のファージ型	英文字	5文字
ファージ型別成績報告年月日	西暦年号＋月日	8桁(4＋2＋2)
感受性試験薬剤名	薬剤名略号	24文字(3×8)
薬剤感受性試験成績	M. I. C. コード番号	30桁(2×15)
病院収容月日	月日	4桁(2＋2)
転帰	転帰区分コード番号	1桁
転帰年月日	西暦年号＋月日	6桁(2＋2＋2)
入院日数	入院から退院までの所要日数	3桁
菌株受理(未・済)	未・済別コード番号	1桁
発生報告カード受理(未・済)	未・済別コード番号	1桁
管理カード受理(未・済)	未・済別コード番号	1桁
備考	例外性状，推定感染国名等	10文字

り当てて1セクタ単位でこれを利用する，標準的なデータフォーマットを採用した．本ファイルには，5インチ2Dタイプのディスクを使用した場合で約1,000件，2DDタイプのものを用いた場合で約2,000件分の入力が可能である．他のサブファイルはいずれも，データディスクの初期化に付随して，自動的に開設される．

“Week－N”ファイルの収録情報は，システムディスク上の万年カレンダープログラムによって与えられ，各週始めの月日が記憶される．この週目算定用簡易カレンダーの出力に際しては，今後も長期間に渡って使用できることを配慮し，400年，100年および4年に1回の閏年補正を行った．

4．ハードコピーの出力様式

ハードコピーの出力 Activity は，検査室における収録情報の管理用，行政側への報告用および疫学解析用など，各々の目的に合わせて多数の様式が出力できるようにした（表3参照）．

1件分の入力内容を一覧できる個表の様式は，入力

表3 TFSJ の Activity 一覧

Activity No.	Activity の 内 容	プリント Form No.
1	データディスクのフォーマット，サブファイルの開設	−
2	データの入力および訂正	−
3	データディスクのバックアップ	−
4	個表(レコード番号により一部分の指定出力可)	1
5	☆大福帳(原型の Form 2 他；輸入事例の限定指定可)	2,2',6
6	Illegals' list(Form 3A)のプリントアウト	3A
7	データファイルの(患者番号順に)清書，および Illegals' list の出力	3B
8	簡易カレンダー(Week−No.リスト)	(Calender)
9	内表紙(バインダー用の内表紙)	(Cover)
11	都道府県別リスト(大福帳スタイル；項目名はカナ表示)	4
12	☆病因別リスト(大福帳スタイル；輸入事例の限定指定可)	2',6
13	☆集団・流行・再発事例チェック用リスト1(大福帳スタイル)〔主要参照情報は，ファージ型別成績および所轄都道府県〕	5
14	☆集団・流行・再発事例チェック用リスト2(大福帳スタイル)〔主要参照情報は，診定週およびファージ型別成績〕	7
15	☆発生報告カード，管理カードおよび分離菌株の受理状況	T−1
	☆発生事例数およびファージ型別供試菌株数	T−2
	☆年齢別性別発生状況	T−3,4,5
16	☆診定方法別件数および菌株のファージ型別試験供試状況	T−6
	☆診定方法別，発症−診定所要日数分布	T−7
	検査材料別診定状況	T−8
17	☆ファージ型分布	T−9,10,11
18	☆薬剤感受性試験のM. I. C. 分布	T−12
19	☆患者由来株の診定週別ファージ型分布	T−13〜18
21	☆患者由来株の診定月別ファージ型分布(輸入事例再掲)	T−19,20,21
22	☆患者および保菌者由来株の診定月別ファージ型分布(同上)	T−22,23,24
23	☆患者由来株の所轄都道府県別ファージ型分布(輸入事例再掲)	T−25,26,27
24	☆患者および保菌者由来株の都道府県別ファージ型分布(同上)	T−28,29,30
25	☆輸入事例由来株の診定月別ファージ型分布	T−31,32,33
26	☆輸入事例リスト(大福帳スタイル)	6
27	ハードコピー出力フォームリスト	(Form list)

Activity 2以外の各 Activity は専ら，極く単純なテンキー操作のみによって実行できる．
☆：チフス菌，パラチフスA菌，パラチフスB菌用にそれぞれ別表として，あるいは限定指定してハードコピーの出力ができる．

データの確認および訂正作業時の参照用として兼用することを配慮し，データの訂正時（Activity 2）における CRT 表示と同様の項目配置とした（図2）．一方大福帳は，ほぼ従来のそれと同じ様式で，Form 2 として再現された（図3）．この Form 2 の出力用プログラムを母体とし，分離菌の種類（チフス菌，パラチフスA菌，同B菌）に従ってそれぞれに，都道府県別，輸入事例限定出力機能を加えた各 Activity（Form 2', 4, 6, 合計9種のハードコピーを出力）を開発した．

さらにこれらを応用して，分離菌の種類，分離菌株のファージ型，所轄都道府県，発病週目などの組み合わせによって，該当レコードの必要項目を本体のメモリー上

◆ TFSJ (Thphoid & Paratyphoid Fever Surveillance, Japan) [Record-No.=] ◆

1. ﾈﾝｼﾝﾃｲ	2.Strain-No.=	3.Patient-No.=	4.	5.HC-No.=
6.ﾅﾏｴ:	(7. 年 月 日ｳﾏﾚ:8. ｻｲ:9.)		11.ｼｮｸｷﾞｮｳ:	
10.ｼﾞｭｳｼｮ:			(ｾﾀｲﾇｼ:	
13.ﾊｯﾋﾞｮｳ: 年 月 日(14. ｼｭｳﾒ)	15.ｼﾝﾃｲ: 月 日(16. ｼｭｳﾒ)		17.ﾊｯﾋﾞｮｳｰｼﾝﾃｲ: 日	
18.ｼﾝﾃｲﾎｳ:ｻｲｷﾝ	19.ﾋﾞｮｳｹﾞﾝｷﾝ:	(20.ｷﾝ･ﾌﾟﾝﾘ: 年 月 日)		
21.ｻﾞｲﾘｮｳ:	22.ｷﾝ･ｳｹﾄﾘ: 年 月 日	(23.ｼｮﾊﾂｼﾞ･ｶﾝｼﾞｬ･No.=)		
24.ｽｲﾃｲ･ｶﾝｾﾝﾁ(ｴﾘｱｺｰﾄﾞ):	25.ｶﾝｼﾞｬ/ﾎｷﾝｼｬ:	(26.ｼｭｳﾊﾂ･No.= ･)		
27.ﾌｧｰｼﾞ ｶﾞﾀ:	(28.ﾎｳｺｸ: 年 月 日)	34.Remarks:	(ｶﾝｾﾝﾁ=･)	

A.B	CP	TC	SM	AM	KM	SA	TM	FOM	CEX	CEZ	ST				
MIC															

29.ｼｭｳﾖｳ: 月 日	30.ﾃﾝｷ:	(31. 年 月 日) 32.ﾆｭｳｲﾝ･ｷｶﾝ: 日

33. [ｷﾝｶﾌﾟ: , ﾊｯｾｲ･ｶｰﾄﾞ: , ｶﾝﾘ･ｶｰﾄﾞ: .]

< TFSJ Form-1 / Phage Typing Laboratory, NIH >

図2．TFSJ用個票のハードコピー出力様式

TFSJ (Typhoid & Paratyphoid Fever Surveillance, Japan)

Patient's No.	Prefecture in charge		H.C. code No.	Patient's Name (Sex / Age) Home address	Patient/Carrier	Date onset diag.	Card report follow	Strain isolated: received	isolated	source	Phag.typ	reported	R No.
840001	Tokyo	P	24	● ●●● ●● ●●●●●●●●●●●●●	Patient	/ / 84/ 1/18	(ﾅｼ) (ﾅｼ)	84/ 1/18	84/ 1/14	Stool	S.typhi D2	/ /	1
840002	Kagawa	P	5	● ●●● ●● ●●●●●●●●●●●●●	Patient	84/ 1/ 2 84/ 1/14	(ﾅｼ) (ｱﾘ)	84/ 1/25	84/ 1/14	Blood	S.para.A UT	/ /	2
840348	Toyama	P	0	● ●●● ●● ●●●●●●●●●●●●●	Patient	/ / 84/ 1/14	(ﾅｼ) (ﾅｼ)	84/ 2/14	/ /	Stool	S.para.B 3a	/ /	19
840350	Kumamoto	P	18	● ●●● ●● ●●●●●●●●●●●●●	Patient	84/ 1/ 5 84/ 1/24	(ｱﾘ) (ｱﾘ)	84/ 2/17	84/ 1/20	Stool	S.typhi E1	/ /	20

< TFSJ Form-2 / Phage Typing Laboratory, NIH >

図3．TFSJ用大福帳のハードコピー出力様式
1頁当たり20件を出力する。

の配列変数に読み込み，比較および並べ換え処理（Swapping）し，集団・流行に属することが疑われる事例や再度届出事例を一箇所に集めて出力してその発見を促す．集団・流行・再発事例チェック用リスト（Form 5，7によって各3菌種，合計6種）の出力プログラムを開発した．

そのほか各種集計処理結果の出力様式としては，1985年末までにTable 1－33を用意した．

また上述の各ハードコピー出力とは目的を異にするが，TFSJにおいて取り扱う情報は多彩であり入力忘れや入力ミスをそれと気付かずに見逃す懸念があるので，不合理データあるいは欠損データの類を検出して訂正・追加入力等を促すため，一覧表形式のIllegals'list（Form 3 A，3 B）を出力するActivityを設けた（図4参照）．

実務運用における評価

TFSJの実務運用は，1985年から，国立予防衛生研究所・細菌部・ファージ型別室にシステムを設置して，開始した．同システムの実務運用を担当する者にはパーソナルコンピュータの操作経歴を有さないものもあったが，簡易操作を配慮したプログラムデザインおよび添付された運用マニュアルによって，いずれも数日以内に同システムの運用法を修得することができた．また，1レコードの入力所要時間は，当初は20分以上を要したが，慣れるに従い10分以内（時に数分台）にまで短縮された．

また，Illegals' list（Form 3 A，3 B）の参照によって，本来入力されるべき情報の欠損あるいは入力ミスなどが埋められまたは訂正されるようになり，収録情報の質が高まりつつあることは，大きな成果であった．

TFSJ ILLEGALS' LIST (A list for detected illegal data)

R-No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34/34	P-No.	Org	Note
1												/																/							840001	T	
2																												/							840002	A	
4		·												X						/								/							840019	T	
19		·			/		·X	X		/		/								/								/							840348	B	

[X] = Terrible (refer [·]), [/] = Wanted (TFSJ Form-3A / Phage Typing Laboratory, NIH)

TFSJ ILLEGALS' LIST (A list for detected illegal data)

P-No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34/34	R-No	Org	Note
840001												/																/							1	T	
840002																												/							2	A	
(((R-No.= 3))) was deleted. —— St-No.= 3 / P-No.= 3 / Name= (Org.= B / Prefect No.=371)																																					
840019		·												X						/								/							4	T	
840348		·			/		·X	X		/		/								/								/							19	B	

[X] = Terrible (refer [·]), [/] = Wanted (TFSJ Form-3B / Phage Typing Laboratory, NIH)

図4．TFSJ ILLEGALS' LISTの出力例

1頁当たり35件分を出力する。
Form－3B（下段）はActivity 7によって得られ削除レコードも〈 〉印付きで表示する。

上記のようなTFSJの多彩なハードコピー出力用のActivityは，それぞれの目的に応じて有効に活用されてきている．特に，Activity 13,14によって得られる集団・流行・再発事例チェック用リスト（Form 5，7）の参照によって，見逃されていた集団・流行事例あるいは保菌者としての再度届出例などの発見・確認が容易になった．このような事例検索は，一般的には個人の氏名や住所を頼りにして行われるべき処理のように思われがちであるが，検査室由来情報の1つである分離菌株のファージ型と所轄都道府県などの組み合わせによる並べ換え処理のみによって，充分な効果をあげていることは注目に値する．

また蓄積情報量が増加し，その処理結果のハードコピー出力の観察を重ねるに伴い，累年処理による情報解析のための請求要件も見出されるようになってきている．それらは今後，本システムの充実を計る上で有用な基礎資料となるであろう．

著者らは，これまでに感染症サーベイランス領域におけるパーソナルコンピュータシステムの開発を幾つか手掛けてきた[4-7]が，本TFSJシステムの開発は比較的円滑に進行した．請求要件の検討から主要Activityの試験運用に至るまでの所要日数も，1ケ月と短期であった．これには詳細かつ適切な請求要件の提示に負うところが多い．また実務運用において上述のような良好な成果が得られたのは，入力すべき諸情報の収集率が高かったためであると推察する．言い換えれば，このサーベイランスシステムそのものが専門的知見に基づいて充分に練りあげられた上に発足し，その後20年間にも及ぶ長期間の運用の実績をもつものであったからであると考える．

参考文献

1）厚生省公衆衛生局長通知：昭和41年11月16日付，衛発第788号，各都道府県知事宛
2）腸チフス中央調査委員会：公衆衛生，33,438,1969
3）中村明子，大橋　誠：藤野恒三郎他編，微生物学のめざすもの，1980,P.352－370
4）津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：東京衛研年報，35,22,1984
5）津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：東京衛研年報，36,52,1985
6）津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：マイコンサーキュラー，10(8),23,1985
7）津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：マイコンサーキュラー，11(3),2,1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 15-22, 1986

アジ由来病原ビブリオの薬剤感受性試験

平田一郎*, 新井輝義*, 池島伸至*, 入倉善久*,
神真知子*, 楠くみ子*, 太田建爾*, 山田澄夫**,
坂井千三*

Antimicrobial Agents Susceptibility of Pathogenic Vibrios Isolated from Horse Mackerel

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

The antimicrobial agents susceptibility of 6 species of pathogenic vibrios, *Vibrio parahaemolyticus*, non-O1 *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio damsela* isolated from horse mackerel was examined.

Minimal inhibitory concentration (MIC) of 7 antimicrobial agents used, Chloramphenicol (CP), Tetracycline (TC), Streptomycin (SM), Kanamycin (KM), Ampicillin (ABPC), Nalidixic acid (NA) and Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), against all the test strains was determined according to the standard agar dilution method using Mueller-Hinton Medium (BBL).

V. parahaemolyticus, *V. fluvialis* and *V. vulnificus* were highly sensitive to CP, TC, NA and SXT respectively, while they were less sensitive or resistant to SM, KM and ABPC respectively.

Most strains of non-O1 *V. cholerae* and *V. mimicus* were sensitive to all antimicrobial agents, however, one resistance strain to SM and 2 resistance strains to ABPC were detected.

In *V. damsela*, one resistance strain to TC was detected.

It was assumed that antibiotic sensitivity patterns of *V. parahaemolyticus* did not change during the past 20 years.

Keywords: Pathogenic vibrios, *Vibrio parahaemolyticus*, non-O1 *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio damsela*, antimicrobial agent susceptibility

緒　言

細菌性感染症の治療には，諸種の化学療法剤が使用され，その治療効果に大きな成果をあげてきた．しかし，その反面それらの薬剤に対する耐性菌の出現が，ブドウ球菌感染症や赤痢菌，チフス菌等に起因する腸管感染症で問題となっている[1,2]．また，同じ腸管感染症であるコレラでは，これまで耐性菌はあまり問題とされていなかったが，最近 O1 *V. cholerae* においても耐性菌の存在が知られるようになった[3,4]．

ヒトに対するビブリオ感染症としては，コレラおよび腸炎ビブリオ食中毒が知られていたが，近年さらに non-O1 *V. cholerae*, *V. mimicus* および *V. fluvialis* 等による下痢症，また *V. vulnificus* による敗血症，*V. damsela* による日和見感染等が大いに注目されるようになった．

当然のことながら，これらのビブリオ感染症の治療においても抗生物質が使用されており，耐性菌の問題を考

*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
**東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研

慮すべきであろう．これまで，ビブリオ属の薬剤感受性試験に関する報告例は少なく，特に最近注目されているnon-O1 *V. cholerae* をはじめとする病原ビブリオ等についての報告はほとんど見られない．

そこで我々は，主に自然界に分布する病原ビブリオについて常用抗生物質に対する感受性を検討したので，その結果を報告する．

実験材料および方法

供試菌株：供試菌株は，1985年4月～9月にかけて当研究室において，自然界における病原ビブリオの分布調査の一環として生食用アジから分離収集した *V. parahaemolyticus*214株，non-O1 *V. cholerae*36株，*V. mimicus*23株，*V. fluvialis*73株（うち *V. furnissii*25株），*V. vulnificus*27株および *V. damsela*35株，合計408株である．

なお比較する意味で当研究所微生物部細菌第一研究科において，1985年に分離したヒト由来の *V. parahaemolyticus*60株，non-O1 *V. cholerae*30株および *V. fluvialis*30株も併せて供試した．

供試薬剤：使用した薬剤はChloramphenicol（以下CPと略す），Tetracycline（以下TCと略す），Streptomycin（以下SMと略す），Kanamycine（以下KMと略す），Ampicillin（以下ABPCと略す），Nalidixic acid（以下NAと略す）およびSulfamethoxazole-trimethoprim合成剤（以下SXTと略す）の7薬剤である．

薬剤感受性試験：日本化学療法学会の標準法[5]に準拠し以下の方法で行った．すなわち，供試菌株をそれぞれ2％ NaCl加Trypticase soy broth（BBL）に接種し，37℃18時間培養した菌液を，新鮮な同培地で約100倍に希釈し，倍数希釈系列の薬剤寒天平板に接種し，37℃18時間培養後，発育の有無を観察して，最小発育阻止濃度（以下MICと略す）を求めた．

薬剤寒天の基礎培地は，2％ NaCl加Mueller Hinton No.2(BBL)を使用した．なお今回は，MIC100 μg/ml以上の菌株を耐性菌とした．

成　績

1．*V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus（アジ由来214株，ヒト由来60株）の薬剤感受性試験の成績をTable 1に示した．

アジ由来の *V. parahaemolyticus* はCP，TC，NAおよびSXTに対して全ての菌株が感受性を示した．これら薬剤のMICはCPおよびTCでは1.56 μg／mlをピークに，0.78～3.12 μg／ml，NAは1.56 μg／mlをピークに0.78～6.25 μg／ml，SXTは3.12 μg／mlをピークに0.78～12.5 μg／mlであった．

アミノグリコシド系薬剤のSMおよびKMに対するMIC分布は，SMでは50 μg／mlをピークに12.5～200

Table 1．Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* from horse mackerel and human

Antibiotics	MIC（μg／ml）														
	3200	1600	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19
CP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	135	77	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	52	8	—	—
TC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12	124	78	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	58	—	—	—
SM	—	—	—	—	7	23	77	66	41	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	3	14	42	1	—	—	—	—	—	—
KM	—	—	—	—	—	1	15	53	107	38	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	8	45	7	—	—	—	—	—
ABPC	1	—	2	5	5	36	116	44	5	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	1	5	2	12	26	14	—	—	—	—	—	—
NA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	23	136	52	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	2	26	31	—	—
SXT	—	—	—	—	—	—	—	—	17	50	134	12	1	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	5	23	29	3	—	—	—

Upper row : 214 organisms from horse mackerel
Down row : 60 organisms from human

μg／ml，KM は12.5μg／ml をピークに6.25～100μg／ml であり，それぞれ耐性菌が30株（14.0%），1株（0.5%）認められた．ABPC に対しては SM，KM と同様に高い MIC を示す菌株が多く，その MIC は12.5～3200μg／ml と幅広く，ピークは50μg／ml であった．このうち耐性菌は49株（22.9%）認められた．

ヒト由来の *V. parahaemolyticus* においても CP，TC，NA および SXT に対し，アジ由来株と同様に全ての菌株が感受性を示し，それぞれの MIC もほとんど同様の成績であった．さらに SM，KM および ABPC における MIC は，アジ由来株とほぼ同様であったが，SM で3株（5.0%），ABPC で8株（13.3%）の耐性菌が認められた．

2．Non-O1 *V. cholerae*

non-O1 *V. cholerae*（アジ由来36株，ヒト由来30株）の薬剤感受性試験の成績を Table 2 に示した．

アジ由来 non-O1 *V. cholerae* は CP，TC，KM，NA および SXT に対して全ての菌株が感受性を示した．それぞれの MIC は，CP では0.78～1.56μg／ml，TC は0.39～0.78μg／ml，KM は他の薬剤に比してやや高い値であり6.25～25μg／ml，また SXT では1.56μg／ml をピークに0.78～25μg／ml と幅広い分布であった．

ABPC に対する MIC はほとんどの菌株が3.12～6.25μg／ml と，感受性であったが，2株（5.6%）の耐性菌が認められ，MIC はそれぞれ400μg／ml，100μg／ml であった．また SM に対する MIC は25μg／ml をピークに12.5～100μg／ml であり，耐性菌が1株（2.8%）認められた．

ヒト由来株においても，各薬剤ともアジ由来の菌株とほぼ同様の傾向を示したが，SM，ABPC，NA および SXT に対して耐性を示す菌株が少数認められ，特に NA に対しては1,600μg／ml という高い MIC を有する菌株が認められた．

3．*V. mimicus*

*V. mimicus*23株の薬剤感受性（Table 3）は使用した7種の薬剤全てに対して感受性を示した．それぞれの MIC は，CP では全ての菌株が0.78μg／ml，TC は0.39～0.78μg／ml，SM は25～50μg／ml，KM は12.5～50μg／ml，ABPC は3.12～12.5μg／ml，NA は0.39μg／ml 以下，SXT は1.56～6.25μg／ml であった．

4．*V. fluvialis*

V. fluvialis（アジ由来73株，ヒト由来30株）の薬剤感受性試験の成績を Table 4 に示した．

なお前述のごとく供試したアジ由来73株中には25株の *V. furnissii* が含まれている．

アジ由来の *V. fluvialis* は CP，TC，KM，NA および

Table 2．Susceptibility of non-O1 *Vibrio cholerae* from horse mackerel and human

Antibiotics	MIC（μg／ml）														
	3200	1600	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19
CP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8	28	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	1	2	—	—	1	19	7	—
TC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	32	—
	—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	1	—	—	23	4
SM	—	—	—	—	—	1	6	22	7	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	2	1	—	—	25	2	—	—	—	—	—	—
KM	—	—	—	—	—	—	—	4	15	17	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	1	—	1	2	23	3	—	—	—	—
ABPC	—	—	—	1	—	1	—	—	—	14	20	—	—	—	—
	—	—	1	—	—	2	—	—	—	13	14	—	—	—	—
NA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	14	22
	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	29
SXT	—	—	—	—	—	—	—	2	2	6	8	12	6	—	—
	—	—	1	—	—	—	—	2	1	2	—	23	1	—	—

Upper row : 36 organisms from horse mackerel
Down row : 30 organisms from human

SXTに対して全ての菌株が感受性を示した．それぞれのMICは，CPでは0.78～25 μg／ml であり，そのピークは25 μg／ml と0.78 μg／ml の2濃度に認められ，2峰性を示した．また，TCは3.12 μg／ml をピークに1.56～50 μg／ml，KMは6.25 μg／ml をピークに6.25～50 μg／ml，NAは0.39～3.12 μg／ml，SXTは1.56 μg／ml をピークに0.78～12.5 μg／ml であった．

SMに対するMICは，ほとんどの株が12.5 μg／ml をピークに6.25～50 μg／ml の感受性域にあったが，MIC800 μg／ml を示す耐性菌が1株（1.4%）認められた．また，ABPCにおけるMICは25 μg／ml をピークに3.12～200 μg／ml を示し，耐性菌は20株であった．

ヒト由来の *V. fluvialis* におけるMICは，CPが0.78 μg／ml をピークに0.78～3.12 μg／ml と2峰性を示さなかったのを除き，残りの6薬剤においては，いずれの薬剤もアジ由来株とほとんど同様の成績であったが，SM，KM，ABPCおよびNAに対する耐性菌がそれぞれ1株（3.3%）ずつ認められた．

5．*V. vulnificus*

V. vulnificus（アジ由来27株）の薬剤感受性（Table

Table 3．Susceptibility of *Vibrio mimicus* from horse mackerel

Antibiotics	MIC（μg／ml）														
	3200	1600	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19
CP	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	23	−	−
TC	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	6	17	−
SM	−	−	−	−	−	−	15	8	−	−	−	−	−	−	−
KM	−	−	−	−	−	−	7	13	3	−	−	−	−	−	−
ABPC	−	−	−	−	−	−	−	−	1	20	2	−	−	−	−
NA	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	8	15
SXT	−	−	−	−	−	−	−	−	−	1	−	22	−	−	−

n＝23

Table 4．Susceptibility of *Vibrio fluvialis* from horse mackerel and human

Antibiotics	MIC（μg／ml）														
	3200	1600	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19
CP	−	−	−	−	−	−	−	22	3	1	1	18	28	−	−
	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	1	12	17	−	−
TC	−	−	−	−	−	−	1	−	4	7	31	30	−	−	−
	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	7	21	2	−	−
SM	−	−	1	−	−	−	6	24	30	12	−	−	−	−	−
	−	−	−	−	1	−	1	1	19	8	−	−	−	−	−
KM	−	−	−	−	−	−	4	8	25	36	−	−	−	−	−
	−	−	−	−	−	1	−	1	4	11	13	−	−	−	−
ABPC	−	−	−	−	8	12	13	18	17	4	1	−	−	−	−
	−	−	−	−	−	1	4	16	9	−	−	−	−	−	−
NA	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	4	15	18	36	−
	−	−	1	−	−	−	−	−	−	−	−	5	6	16	2
SXT	−	−	−	−	−	−	−	−	9	2	16	41	5	−	−
	−	−	−	−	−	−	−	−	−	1	9	19	1	−	−

Upper row：73 organisms from horse mackerel
Down row：30 organisms from human

5）はCP，TC，KM，NAおよびSXTに対して全ての菌株が感受性であった．これら薬剤のMICは，CP，TCおよびNAはいずれの薬剤も0.39～3.12μg／mlであり，KMは12.5～50μg／ml，またSXTは0.78～12.5μg／mlであった．

SMのMICは50μg／mlをピークに25～200μg／mlで，そのうち耐性菌は6株（22.2%）認められた．

一方ABPCに対するMICは，今回供試した病原ビブリオのうち最も高く，12.5～3200μg／mlと幅広い分布であった．耐性菌は供試した27株中6株がMIC3200μg／mlを示したのをはじめとして20株（74.0%）であった．

6．*V. damsela*

V. damsela（アジ由来35株）の薬剤感受性（Table 6）は，CP，KM，NAおよびSXTに対して全ての菌株が感受性であり，これら薬剤のMICは，CPでは0.78～1.56μg／ml，KMは12.5μg／mlをピークに1.56～50μg／ml，NAは全てが1.56μg／ml以下，SXTは6.25μg／mlあたりをピークに0.39～25μg／mlと幅広く分布していた．

TCにおいてはほとんどの菌株が0.39～0.78μg／mlのMICであったが，100μg／mlを示す耐性菌が1株（2.9%）認められた．また，SMおよびABPCのMICはそれぞれ，25μg／mlをピークとして3.12～100μg／ml，12.5μg／mlをピークに0.78～100μg／mℓで，耐性菌はおのおの1株（2.9%）であった．

7．薬剤耐性パターン

各菌種の薬剤耐性パターンをTable 7に示した．アジ由来の*V. parahaemolyticus*は214株中60株（28.0%）がSM，KM，ABPCのいずれかの薬剤に耐性であった．その耐性パターンはABPC単剤耐性が29株（13.6%）と最も多く，次いでSM・ABPC 2剤耐性19株（8.9%），SM単剤耐性11株（5.1%），KM・ABPC 2剤耐性1株（0.5%）の順であった．

Table 5．Susceptibility of *Vibrio vulnificus* from horse mackerel

Antibiotics	MIC（μg／ml）														
	3200	1600	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19
CP	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	2	11	11	3	−
TC	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	1	2	15	9	−
SM	−	−	−	−	1	5	15	6	−	−	−	−	−	−	−
KM	−	−	−	−	−	−	2	20	5	−	−	−	−	−	−
ABPC	6	6	1	3	3	1	3	2	2	−	−	−	−	−	−
NA	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	1	14	11	1	−
SXT	−	−	−	−	−	−	−	−	3	9	9	5	1	−	−

n＝27

Table 6．Susceptibility of *Vibrio damsela* from horse mackerel

Antibiotics	MIC（μg／mℓ）														
	3200	1600	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19
CP	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	21	14	−	−
TC	−	−	−	−	−	1	−	−	−	−	−	−	20	14	−
SM	−	−	−	−	−	1	6	20	5	2	1	−	−	−	−
KM	−	−	−	−	−	−	3	1	19	8	3	1	−	−	−
ABPC	−	−	−	−	−	1	1	2	11	7	7	4	2	−	−
NA	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	1	4	27	3
SXT	−	−	−	−	−	−	−	3	8	8	8	6	1	1	−

n＝35

Table 7. Resistance pattern of pathogenic vibrios from horse mackerel

Organisms	Resistance pattern									
	TC	SM	ABPC	SXT	SM ABPC	KM ABPC	SM KM NA	Sub-total	Sensi-tive	Total
V. parahaemolyticus	—	11	29	—	19	1	—	60	154	214
	—	1	6	—	2	—	—	9	51	60
Non-O1 *V. cholerae*	—	1	2	—	—	—	—	3	33	36
	—	1	2	1	1	—	1	6	24	30
V. mimicus	—	—	—	—	—	—	—	—	23	23
	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
V. fluvialis	—	1	20	—	—	—	—	21	52	73
	—	—	1	—	—	—	1	2	28	30
V. vulnificus	—	2	16	—	4	—	—	22	5	27
	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
V. damsela	1	1	1	—	—	—	—	3	32	35
	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·

Upper row : from horse mackerel
Down row : from human

一方，ヒト由来の *V. parahaemolyticus* は供試した60株中9株（15.0%）がSM，ABPCのいずれかの薬剤に耐性を示し，ABPC単剤耐性6株（10.0%），SM単剤耐性1株（1.7%）およびSM・ABPC 2剤耐性2株（3.3%）であった．

non-O1 *V. cholerae* はアジ由来株では供試36株中2株（5.6%）がABPC単剤耐性，1株（2.8%）がSM単剤耐性であったのに対し，ヒト由来株は30株中6株（20.0%）がSM，KM，ABPC，NAおよびSXTのいずれかに耐性を示した．そのうちわけは，SM・KM・NA 3剤耐性およびSM・ABPC 2剤耐性がそれぞれ1株（3.3%），ABPC単剤耐性が2株（6.7%），SMおよびSXT単剤耐性がそれぞれ1株（3.3%）であった．

V. fluvialis は，アジ由来では供試した73株のうち20株（28.8%）がABPC単剤耐性，1株（1.4%）がSM単剤耐性であった．

なお今回は，Tableには示していないが，*V. fluvialis* と *V. furnissii* を比較してみると，前者では10.4%が耐性菌であったのに対して，後者では約6倍の64.0%の菌株が耐性を示した．

また，ヒト由来株ではSM・KM・NA 3剤耐性，ABPC単剤耐性菌がそれぞれ1株（3.3%）認められた．

V. vulnificus は他の病原ビブリオに対して耐性菌の割合が高く，供試した27株中22株（81.4%）がSMおよびABPCのいずれかに耐性を示した．そのパターンはABPC単剤耐性16株（59.3%），SM単剤耐性2株（7.4%）およびSM・ABPC 2剤耐性4株（14.8%）であった．

V. damsela はTC，SMおよびABPC単剤耐性菌がそれぞれ1株（2.9%）ずつ認められた．

考　察

抗生物質の本来の目的は，ヒトや動物の感染症治療に用いられるものであるが，近年ではさらに農産，水産および畜産等の食料供給産業にまで広汎に使用され，その効果は人類の発展に大きく寄与してきた．

しかし，その反面，耐性菌の出現や増加は社会的問題として取りあげられ，耐性菌による感染症の治療に大きな影響をおよぼしている．

本報では，自然界に分布する，特にアジ由来の6種の病原ビブリオとヒト由来の3種の病原ビブリオを対象として，常用抗生物質である7薬剤について感受性試験を行った．

その結果，*V. parahaemolyticus* はアジ由来およびヒト由来の両者とも，CP，TC，NAおよびSXTに感受性を示したが，アミノグリコシド系抗生物質のSM，KMおよびペニシリン系のABPCには比較的耐性を示し，本菌の由来別による薬剤感受性の差異は認められなかった．

これまでに *V. parahaemolyticus* の各種薬剤に対する感

受性試験は，斉藤ら[6]，善養寺ら[7]および新井ら[8]によって報告されているが，CP，TC，NAに対するMIC分布は著者らの成績も含め，同じ結果であり，本菌はこれら3薬剤には感受性であることが確認された．

一方，SM，KM，ABPCに対するMIC分布は，前述のそれぞれの報告によって，多少の異りが見られるものの，いずれの報告においても中程度あるいは高度耐性であると述べている．次にSXTに対する*V. parahaemolyticus*の感受性試験の報告はほとんど見られないが，柳沢ら[9]は各種サルファ剤について感受性試験を行った結果，本剤に対するMICは25 μg／ml以下であると報告しており，今回得られた著者らの成績は，サルファ剤との合成剤であるが，そのMICはほぼ同様であった．

non-O1 *V. cholerae*および*V. mimicus*のABPCに対するMICは大部分の菌株が3.12～6.25 μg／mlであり，他の4菌種に比較して低い傾向であった．

Matsushitaら[10]は海外旅行者下痢症由来のnon-O1 *V. cholerae*について常用抗生物質に対するMICを検討しているが，その成績においても本薬剤に対するMICは3.12 μg／ml前後にあり，著者らの成績と一致し，non-O1 *V. cholerae*や*V. mimicus*の有するABPCに対する特性と考えられた．

V. fluvialis，*V. vulnificus*および*V. damsela*の薬剤感受性に関する報告は皆無といってよいぐらいで，わずかに*V. fluvialis*について深見ら[11]がセファロスポリン系薬剤を中心に検討した成績が見られるのみである．したがって，これら病原ビブリオのこれまでの常用抗生物質に対する態度をうかがうことはできない．

著者らの成績では，これらの病原ビブリオの各種薬剤に対する感受性は，*V. parahaemolyticus*とほぼ同様な結果であったが，*V. vulnificus*のABPCに対する態度が他の病原ビブリオと異なり，供試株中約50％がMIC800 μg／ml以上であることが特徴的であった．

一般にビブリオ属はアミノグリコシド系およびペニシリン系抗生物質に対して，自然耐性菌が多いと言われている．著者らの成績でもnon-O1 *V. cholerae*および*V. mimicus*を除いた病原ビブリオがSM，KM，ABPCに比較的耐性を示し，他の薬剤に比し耐性菌も多く認められた．これに対して，CP，TC，NAおよびSXTに対してはほとんどの菌株が感受性を示したが，わずかにnon-O1 *V. cholerae*（ヒト由来）にNAおよびSXT耐性菌がそれぞれ1株，*V. fluvialis*（ヒト由来）にNA耐性菌が1株，また*V. damsela*（アジ由来）にTC耐性菌が1株確認された．

CPに対しては供試した全てのビブリオが感受性を示し，耐性菌は認められなかった．Matsushitaら[10]はヒト由来のO1 *V. cholerae*においてCPに対する耐性菌の存在を報告しており，今後CPをはじめTC，NAあるいはSXT等の抗生物質に対する耐性菌の出現は増加するものと推測される．

Kuwahara[12]やMatsushitaら[10]は，O1 *V. cholerae*の，また青木[13]は海水産ビブリオ属のRプラスミドによる耐性伝達を確認しており，前述のnon-O1 *V. cholerae*のSXT耐性菌や*V. damsela*のTC耐性菌もO1 *V. cholerae*と同様にRプラスミドによる耐性であるか否か，今後検討が必要である．

なお，*V. parahamolyticus*のみについてみると，善養寺ら[7]の報告以降約20年間，本菌の各種薬剤に対する感受性値には大きな変化が認められず，引き続きCP，TC，NAに感受性であった．

また，今回用いたSXT（ST合剤）は病原ビブリオに対しても抗菌作用は高く，今後の治療に使用した場合，大きな効果が期待される．

結　論

アジ由来の病原ビブリオ6種について，CP，TC，SM，KM，ABPC，NAおよびSXTに対する薬剤感受性試験を行い以下の成績を得た．

1．*V. parahaemolyticus*，*V. fluvialis*および*V. vulnificus*はCP，TC，NA，SXTに感受性を示した．また，SM，KM，ABPCには中程度あるいは高度耐性であった．

2．non-O1 *V. cholerae*および*V. mimicus*はSMおよびABPCに対し，一部耐性菌が認められたが，その他の薬剤に対しては感受性であった．

3．*V. damsela*にTC耐性菌が1株認められた．

4．*V. parahaemolyticus*は，過去20年間，耐性菌の増加はないと推測された．

文　献

1）小川正之，後藤延一，堀内三吉，岡村　登，千田俊雄，長谷川潔：感染症誌，56，61，1982

2）Ohashi, M. : *Gastrointestinal Infections in Southeast Asia* (Ⅱ), Proceedings of the 3 rd SEAMIC Seminar, 32－38, 1970, Southeast Asia Medical Information Center, Tokyo

3）World Health Organization : *Weekly Epidemiological Record*, 22, 161－162, 1980

4）World Health Organization : *Weekly Epidemiological Record*, 38, 292－293, 1980

5）MIC測定法改定委員会 : *Chemotherapy*, 22, 1126, 1974

6）斉藤　誠，山口　剛，佐藤　肇：日本化学療法誌，11，397，1963
7）善養寺浩，大久保暢夫，堀　幹郎，五十嵐英夫，工藤泰雄，坂井千三：東京衛研年報，17，56－62，1965
8）新井武利，浜島　肇，長谷川浩子：*Chemotherapy*，31，517－521，1983
9）柳沢文徳：腸炎ビブリオ（Ⅱ），藤野恒三郎，福見秀雄編，357－365，1967，納谷書店
10）Matsushita, S., Ohta, K., Tsuno, M., Yamada, S., Kudo, Y., Sakai, S. and Ohashi, M.: *Advances in Research on Cholera and related Diarrheas* 2, Ed. Kuwahara and N. F. Pierce, 173－178, 1985, KTR Scientific Publishers, Tokyo
11）深見トシエ，村田三紗子，今川八束：感染症誌，57，358－359，1983
12）Kawahara, S., Kota, T. and Kanoh, T.: *In proceedings of the* 15 *th Conference, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel*, 237－241, 1980, National Institute of Health, Bethesda
13）青木　宙：薬剤耐性菌による環境汚染，三橋　進，五島瑳智子，清水喜八郎編，167－183，1985，学会出版センター

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 23-28, 1986

東京都で冬季に集団発生した非細菌性急性胃腸炎のウイルス学的検索

安東民衛*, 林志直*, 関根整治*, 藪内清*,
寺山武*, 大橋誠*, 岡田正次郎*

Winter-Outbreaks of Acute Nonbacterial Gastroenteritis in Tokyo Associated with Small Round Virus

TAMIE ANDO*, YUKINAO HAYASHI*, SEIJI SEKINE*, KIYOSHI YABUUCHI*,
TAKESHI TERAYAMA*, MAKOTO OHASHI* and SHOJIRO OKADA*

Keywords：非細菌性急性胃腸炎 nonbacterial acute gastroenteritis, 小型球形ウイルス small round virus

はじめに

Kapikianらが1972年に初めて冬季嘔吐症の原因ウイルスとしてNorwalkウイルスを報告[1]して以来，米国，オーストラリア，英国などではNorwalkウイルスをはじめ，Astroウイルス[2]，Caliciウイルス[3,4]，Snow Mountain因子[5]，Montgomery County因子[6]，Hawaii因子[7]など直径30nm前後の様々な小型ウイルスが非細菌性急性胃腸炎の病因ウイルスとして注目されてきた．しかし，これらのウイルスを培養細胞や実験動物中で増殖させる試みが未だに成功していないため，ウイルスの性状はほとんど解明されておらず，それらの分類学上の位置づけも行われていない．そのため，これらのウイルスは電子顕微鏡により患者糞便中に観察されるウイルス粒子の形態の特徴に基づいてsmall round virus（SRVと略す）と総称されている．我国でも，北海道，宮城県，千葉県，大阪府，鳥取県，岡山県などで集団発生した非細菌性急性胃腸炎患者の糞便から様々なSRVが検出されている[8,9]．我々もまた，1983年1月から1985年4月までの主として冬季に東京都で発生した非細菌性胃腸炎のうち，カキ（牡蠣）が原因食品として推定される事件の約半数が，SRV感染症に起因した可能性が高いことを前報[10]で明らかにした．しかし，SRVに関して今までに発表された報告例はいずれも特定の事件を対象とした研究であり，一年間に発生する急性胃腸炎事件全体の中でSRV感染症がどのように位置づけられるかという点を明らかにした報告はない．今回我々は，1984年12月から1986年3月までの2冬季間に東京都で発生した主要な急性胃腸炎事件のうち，従来原因不明とされてきた事件における患者糞便中のSRV検索を行った．検索対象には，カキ関連事件はもとより，食品との関係が不明確な事件も含まれ，事件数では原因不明事件全体の約50%，患者数では約90%が含まれた．これにより，東京都で発生する急性胃腸炎事件全体におけるSRV感染症の位置づけが基本的に可能となる結果が得られたので報告する．

材料および方法

対象：1984年12月から1985年4月までと1985年11月から1986年3月までの2冬季間に，東京都衛生局に報告された食中毒事件（他府県で喫食した患者が都内で発症した事件を含む）および患者5名以上の有症苦情事件で，原因物質が解明されなかった91事件，患者3,910名のうち，電子顕微鏡によるウイルス検索に適した糞便材料が入手できた50事件（食中毒事件33件，有症苦情事件17件），患者315名（食中毒事件164名，有症苦情事件151名）を対象とした．当然のことながら，これらの患者糞便からは既知腸管系病原菌は検出されなかった．検索対象とした病原菌は，腸炎ビブリオ，コレラ菌，非01ビブリオコレレ，ビブリオ・ミミカス，ビブリオ・フルビアリス，エロモナス・ヒドロフィラ，エロモナス・ソブリア，プレシオモナス・シゲロイデス，赤痢菌，サルモネラ，腸管病原性大腸菌（毒素原性大腸菌，組織侵入性大腸菌，病原大腸菌血清型），エルシニア・エンテロコリチカ，カンピロバクター・ジェジュニおよびカンピロバ

* 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

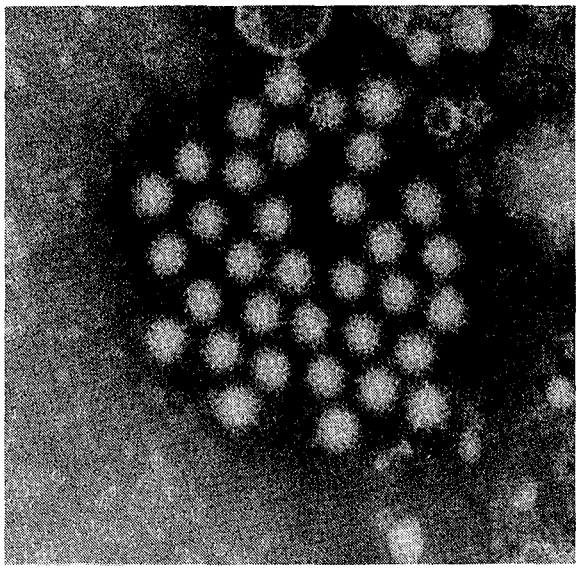


図1　急性胃腸炎患者のふん便中に観察されるSRVの電子顕微鏡像：ウイルス粒子の直径は約30nm

クター・コリー，セレウス菌，ウエルッシュ菌，黄色ブドウ球菌である．（これらの細菌学的検査は当研究所細菌第一研究科食中毒研究室において実施されたものである．）

材料：主として5病日以内に採取された患者糞便を用いてウイルス検索を行った．細菌学的検査を先行させたため，糞便材料は採取後約2日間4℃で保存された．その後ウイルス検索実施まで糞便材料は−20℃に凍結保存された．

ウイルス分離試験：既報[10]の方法に従って実施した．ウイルス分離に使用した細胞はFL細胞，Hep 2細胞，Vero細胞およびBGM細胞の4種類である．検体を接種した細胞を7日間隔で3代継代しても細胞変性が認められない場合はウイルス分離陰性と判定した．ウイルス分離試験は50事件の患者544名の糞便について実施した．

ロタウイルス抗原の検出：「ロタ・セル」キット（日水製薬）を使用した．本検査は476名の患者糞便について実施した．

電子顕微鏡によるウイルス検索：前報[10]の方法に従って実施した．表面にカプソメア様の特徴的な構造を有する直径30nm前後の球状粒子（図1）が数個確認された場合にSRV陽性と判定した．1視野に5分以上かけて少なくとも3視野を観察し検査対象1件あたりこの操作を独立に2回繰り返しても上記粒子が観察されない場合にSRV陰性と判定した．

成　績

1．原因不明急性胃腸炎事件の発生状況　図2に1981年4月から1986年3月までに東京都衛生局に報告された急性胃腸炎事件の発生状況を示す[11]．これらの事件には食中毒事件（他府県で喫食した患者が都内で発症した事件を含む）と患者5名以上の有症苦情事件が含まれる．毎年170～250事件が発生し，患者総数は3,000～6,000人に達する．その70～80％は食中毒事件として報告されている．急性胃腸炎事件の60～75％は各種細菌に，0.2～5％は化学物質に起因したことが明らかにされているが，残り25～40％の事件の原因物質は細菌学的検査および化学的検査では解明されていなかった．細菌性急性胃腸炎事件の場合には，事件数の85～90％，患者数の75～90％が5月から10月までの期間に発生した．これに対し，原因不明の急性胃腸炎事件は，事件数の50～75％，患者数の45～95％が11月から3月までの冬季に発生した．今回ウイルス検索を実施した1984年12月から1985年4月までと1985年11月から1986年3月までの2冬季間には患者3,814名を含む78件の原因不明急性胃腸炎事件が発生した．これは，1984年12月から1986年3月までの全期間に発生した原因不明事件数の85.7％，患者数の97.5％に相当する（表1）．上記2冬季間に発生した原因不明事件の64.1％に相当する50事件を対象に患者糞便中のウイルス検索を実施した．

2．ウイルス分離試験　上記50事件の患者544名についてウイルス分離試験を実施した．このうち，1986年2月に発生した1事件の患者88名中の2名（検出率2.3％）からアデノウイルス5型が，3月に発生した1事件の患者8名中1名（検出率12.5％）からアデノウイルス1型が，また，同月に発生した1事件の患者10名中2名（検出率20.0％）からコクサッキーウイルスB群4型が分離された．これ以外の539名の患者は全て陰性であった．アデノウイルスやコクサッキーウイルスが患者の1部から分離されてはいるが，これらのウイルスはその集団発生事件の原因ではなく，単に随伴因子として検出されたにすぎないと考えられる．

3．ロタウイルス抗原の検出　ウイルス分離に用いた糞便のうち，476名の患者糞便に対してロタウイルス抗原の検索を試みたが結果は全て陰性であった．

4．電子顕微鏡によるウイルス検索　ロタウイルス抗原検出に用いた糞便のうち，電子顕微鏡によるウイルス検索に適した糞便が入手できた315名についてSRV検索を実施した．その結果を表2に示す．50事件315名の患者のうち41事件（82.0％），164名（52.1％）からSRV

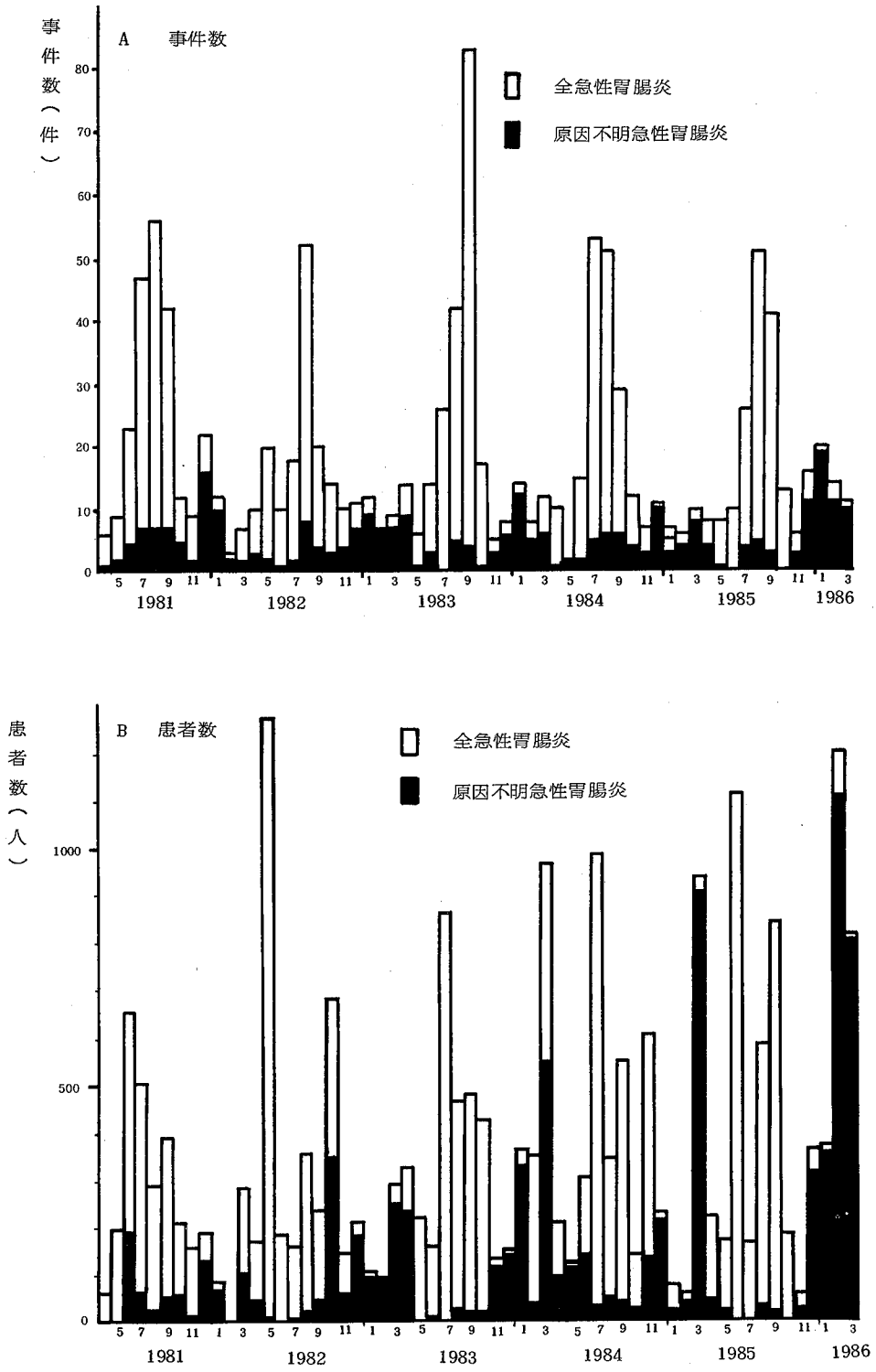


図２　東京都で発生した主要急性胃腸炎事件の発生状況

表1 1984年12月－1986年3月に東京都で発生した急性胃腸炎事件の概要

原因物質	行政における扱い区分				事件合計	
	食中毒事件		有症苦情事件*3			
	事件数*1(%)	患者数*2(%)	事件数(%)	患者数(%)	事件数(%)	患者数(%)
細菌	139(67.8)	2,888(63.3)	19(40.4)	564(20.0)	158(62.7)	3452(46.8)
化学物質	3(1.5)	18(0.4)	0(0)	0(0)	3(1.2)	18(0.2)
不明	63(30.7)	1,659(36.3)	28(59.6)	2251(80.0)	91(36.1)	3910(53.0)
合計	205(100)	4,565(100)	47(100)	2,815(100)	252(100)	7,380(100)

＊1 食中毒統計表に示されている事件数と異なり，都外で喫食した患者が都内で発症した事件を含む．
＊2 発生施設が都外の事件のうち，都内で発症した患者を含む．
＊3 患者5名以上の事件．

表2 原因不明急性胃腸炎事件におけるSRV検出状況
(1984年12月－1985年4月および1985年11月－1986年3月，東京都)

カキ喫食との関係	陽性事件数/検査対象事件数	陽性患者数/検査対象患者数
あり	26/32(81.3%)	75/130(57.7%)
なし	15/18(83.3%)	89/185(48.1%)
合計	41/50(82.0%)	164/315(52.1%)

が検出された．SRV検出率は，カキ喫食との関係が有り，無しいずれの場合にも，事件数の上では約80%，患者数では約50%となった．カキ喫食との関係がない事件には仕出し弁当喫食による1事件（患者総数835名）や学校給食が疑われる1事件（患者総数1,047名）など食品を介して発生したと推定される大規模な事件のほか，小学校で大規模に集団発生し，食品との関係が明らかにされていない1事件（患者総数575名）も含まれる．上記3事件におけるSRV検出率は，それぞれ86.4%（22名中19名），50.0%（24名中12名）および28.5%（28名中8名）であった．なお，これら事件のうち2番目の事件の患者2名からアデノウイルス5型が分離されたが，前述のとおり，その検出率は2.3%（88名中2名）にすぎなかった．

異なる事件から検出されたSRVの形態は互いによく類似しており，ウイルス粒子は直径約30nmの球状で，辺縁に突起あるいはカプソメア様の構造物が認められた．SRVは主として5病日以内に採取された糞便から検出され，7病日以降に採取された糞便を用いた場合は検出率が著しく低下した．

考察

1984年12月から1986年3月までの期間に患者7,380人を含む252事件の急性胃腸炎集団発生が東京都衛生局に報告された．その63%は各種細菌に起因し，1.2%は化学物質に起因することが明らかにされたが，残り36%に相当する91事件，患者3,910人（53.0%）の原因が解明されていなかった（表1）．これら原因不明事件のうち，事件数のうえでは85.7%（91件中78件），患者数では97.5%（3,910人中3,814人）が冬季に発生した（図3）．今回SRV検索を実施した50事件は上記期間中に発生した原因不明事件全体の事件数91件の54.9%に過ぎないが，そこに含まれる患者総数は3,587人であり，不明事件全体の患者数3,910人の実に91.7%にも達する．このように，今回の調査では，不明事件の主たる発生季節である冬期が2年連続で対象とされ，しかも不明事件全体の患者の大部分を含む事件が対象とされている．したがって，今回の調査により，東京都で発生する急性胃腸炎全体におけるSRV感染症の位置づけが基本的に可能となると考えられる．

SRVは，電子顕微鏡による検索を実施した50事件の患者315人のうち41事件（82.0%）の患者164人（52.1%）から検出された．SRVが検出された41事件に含まれる患者総数は3,465人に達し，検索対象事件全体に含まれる患者総数3,587人の96.6%を占める（表3）．この事実から，従来原因不明とされてきた急性胃腸炎事件全体に含まれる患者の大部分はSRV感染により発病

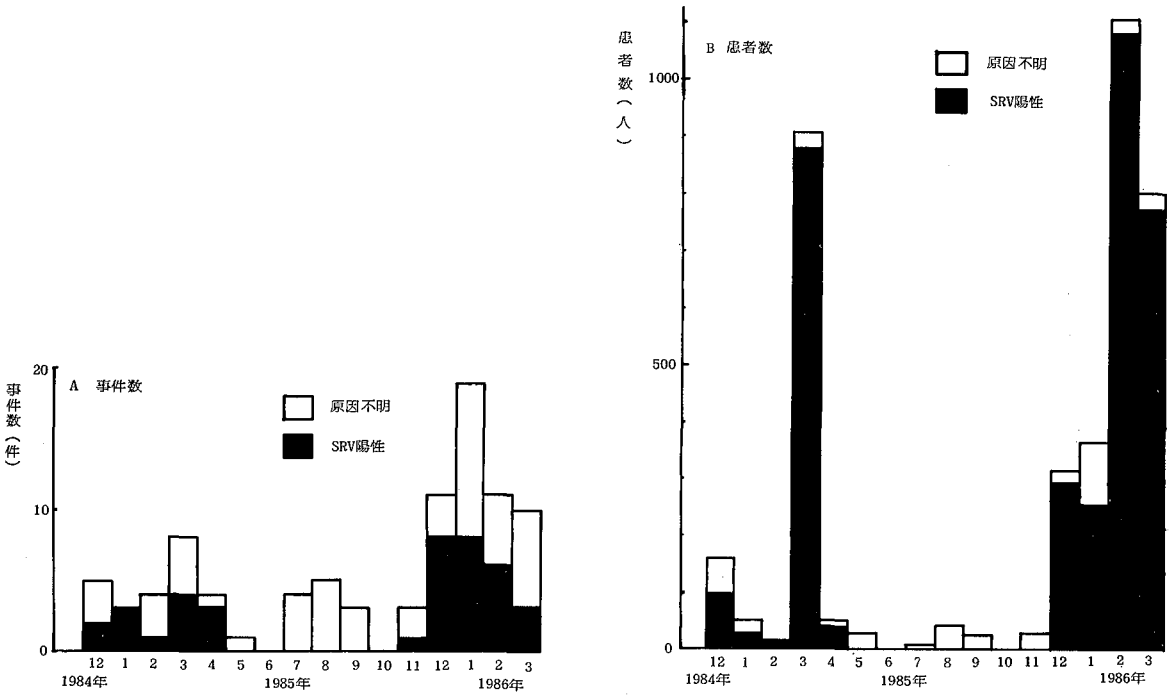


図3　原因不明急性胃腸炎事件における SRV 陽性事件の発生状況

表3　1984年12月－1986年3月に東京都で発生した原因不明急性胃腸炎事件と SRV の関係

SRV 検索結果	行政における扱い区分				不明事件合計	
	食中毒事件*1		有症苦情事件*2			
	事件数(%)	患者数(%)	事件数(%)	患者数(%)	事件数(%)	患者数(%)
	件	人	件	人	件	人
SRV 陽性	26(41.3)	1448(87.3)	15(53.6)	2,017(89.6)	41(45.1)	3,465(88.6)
カキ関連	19	368	7	61	26	429
カキ非関連	7	1,080	8	1,956	15	3036
SRV 陰性	7(11.1)	69(4.2)	2(7.1)	53(2.4)	9(9.9)	122(3.1)
カキ関連	5	46	1	13	6	59
カキ非関連	2	23	1	40	3	63
SRV 未検査	30(47.6)	142(8.6)	11(39.3)	181(8.0)	41(45.1)	323(8.3)
合計	63(100)	1,659(100)	28(100)	2,251(100)	91(100)	3,910(100)

＊1　食中毒統計表に示されている事件数と異なり，発生場所が都外で患者が都民の事件も含まれる．
＊2　患者5名以上の事件．

した可能性が高いと考えられる．したがって，東京都で発生する主要な急性胃腸炎事件のうち，夏季に発生する事件は主として細菌に起因するのに対し，冬季に発生する事件は主として SRV 感染に起因する可能性が高いと考えることができる．

SRV 陽性事件の行政上の扱い区分をみると，事件数

では食中毒事件が有症苦情事件の1.7倍となるが，患者数ではこの関係が逆転し，有症苦情事件の患者数は食中毒事件の患者数の1.4倍となる．また，SRV 陽性事件とカキ喫食との関係を見ると，事件数ではカキ関連事件はSRV 陽性事件の63％を占めるが，カキ関連事件の患者数はSRV 陽性事件全体の患者数の14％を占めるにすぎない（表3）．さらに，SRV 陽性事件の発生状況を月別にみると，2月，3月の患者数が著しく高いことが明らかになる（図2）．これは，この時期に数百人から千人以上の患者を含む大規模な事件が発生したためである．すでに述べたように，これらの事件には仕出し弁当や小学校の給食などカキ以外の食品を介して発生したと考えられる事件だけでなく，食品との関係が明らかにされていない事件も含まれた．この食品との関係が不明確な事件は小学校で発生した事件で，前報で報告したカキ関連SRV 陽性事件の場合と同様，患者の主症状は嘔気，嘔吐，腹痛，下痢であった．

東京都ではSRV 感染症に対する関心がようやく高まりつつあるが，現在のところそれに関する注意は主として食品，特にカキ，を介して発生した急性胃腸炎事件に限定される傾向があると言わざるを得ない．しかも，SRV 感染症と疑われる事件の発生時期はインフルエンザウイルスの流行時期と重なることが多く，両疾病には下痢，腹痛，微熱など類似の症状が含まれる．そのため，上記の事件のように，食品との関係が不明確な急性胃腸炎は「カゼ」と診断されることが少なくないと考えられる．このような事件の中にもSRV 感染に起因する事件が含まれる可能性が高いことが示唆された．今後は，単に食品衛生の観点からだけでなく，より幅広い公衆衛生の観点からもSRV 感染症について検討する必要があると考えられる．

要　約

1984年12月から1986年3月までの2冬季に東京都で発生した原因不明急性胃腸炎の集団発生事件のうち，電子顕微鏡によるウイルス検索に適した検査材料が得られた50事件の患者315人の糞便に対してSRV 検索を実施した．その結果，41事件（82.0％）の患者164人（52.3％）からSRV が検出された．検出されたウイルス粒子は直径約30nm の球状で，表面にカプソメア様の構造を有した．SRV 陽性事件は，事件数では不明事件全体の事件数91件の45.1％にしか過ぎないが，患者数では不明事件の患者総数3,910人の88.6％に相当する3,465人にも達する．この事実から，今回の調査により，従来原因不明とされてきた急性胃腸炎事件の主要な部分はSRV 感染に起因した可能性が強く示唆された．したがって，一年間に東京都で発生する急性胃腸炎事件のうち，細菌に起因する事件は主として夏季に発生するのに対し，冬季に発生する事件は主としてSRV に起因する可能性が高いと考えられる．SRV 感染症が疑われる事件には，様々な食品を介して発生した事件はもとより，小学校で大規模に集団発生し，食品との関係が不明確とされた急性胃腸炎事件も含まれた．したがって，今後は食中毒の観点ばかりでなく，幅広い公衆衛生の観点からもSRV 感染症に対する監視を行う必要があると考えられる．

謝　辞：本研究は，東京都衛生局環境衛生部食品衛生課および食中毒発生所轄保健所の協力によってなされた．関係各位に深く感謝する．

文　献

1）Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R. and Chanok, R. M. : J. Virol., 10, 1075, 1972

2）Madeley, C. R. : J. Infect. Dis., 139, 519, 1979

3）Madeley, C. R., and Cosgrove, B. P. : Lancet, 1 , 199, 1976

4）Flewett, T. H., and Davies, H. : Lancet, 1 , 311, 1976

5）Morens, D. M., Zweighaft, R. M., Vernon, T. M., Gary, G. W., Wood, B. T., Holman, R. C., and Dolin, R. : Lancet, 1 , 964, 1979

6）Wyatt, R. G., Dolin, R., Blacklow, N. R., DuPont, H. L., Buscho, R. F., Thornhill, T. S., Kapikian, A. Z., and Chanock, R. M. : J. Infect. Dis., 129, 709, 1974

7）Dolin, R., Blacklow, N. R., DuPont, H., Formal, S., Buscho, R. F., Kasel, J. A., Chames, R. P., Hornick, R., and Chanock, R. M. : J. Infect. Dis., 123, 307, 1971

8）石田名香雄，浦沢正三，松野重夫，鈴木　栄，栗村　敬，今野多助，中尾　亨，稲葉右二，大石　功：ウイルス，31，167，1981

9）上羽　修，井上正直，石田立夫，三宅道信，高木寛治：臨床とウイルス，11，257，1983

10）関根整治，林　志直，安東民衛，藪内　清，大橋　誠，岡田正次郎：感染症学雑誌，60，453，1986

11）東京都衛生局環境衛生部：東京都の食中毒概要，昭和56年，昭和57年，昭和58年，昭和59年，昭和60年

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 29-33, 1986

都内の急性上気道炎患児からのウイルス分離成績 (1984～1985年)

林　志直*, 矢野一好*, 安東民衛*, 吉田靖子*,
関根整治*, 藪内清*, 渡辺悌吉**, 石原祐**,
大久保さつき**, 小野正恵**, 山本淳**

Virological Survey for Outpatients of Acute Respiratory Illness in a Pediatrics during 1984－1985 in Tokyo

YUKINAO HAYASHI*, KAZUYOSHI YANO*, TAMIE ANDO*, YASUKO YOSHIDA*,
SEIJI SEKINE*, KIYOSHI YABUUCHI*, TEIKICHI WATANABE**, YU ISHIHARA**,
SATSUKI OHKUBO**, MASAE ONO**, and ATSUSHI YAMAMOTO**

Keywords：ウイルス分離 Virus isolation, 上気道疾患 upper respiratory illness, 疫学 epidemiology, 小児 pediatric ward

緒　言

1981年に開始された厚生省の感染症サーベイランス事業は，多種類のウイルス感染症を対象として全国的な患者発生状況およびウイルス分離状況を集計し，都道府県へ情報を提供することにより広域的に感染症の防疫対策に活用されることを意図したものである．東京都では検査定点の対象疾患として無菌性髄膜炎などの中枢神経系疾患や眼科領域の疾患について調査を行っているが，毎年流行を繰り返しているヘルパンギーナや手足口病などの小児の感染症に関する情報が不足している．

著者らは1977年から上気道炎を主とした小児科受診患児についてウイルス検索を行い，病原ウイルスの変遷について報告してきた[1～3]．本報では1984年1月から1985年12月末までのウイルス分離成績とそれに基づく疫学的考察について報告する．

材料と方法

調査対象　1984年1月から1985年12月までに，主として上気道症状を呈して東京逓信病院小児科で受診した，617名の患児についてウイルス検索を行った．患児から咽頭ぬぐい液を採取し，－80℃に保存した．

ウイルス分離試験　検体の処理方法は既報[3,4]に準じた．ウイルス分離に使用した培養細胞はFL，Hep 2，MDCK（大日本製薬），石川県衛生公害研究所より分与されたVero細胞である．ウイルスの検出は細胞培養法で細胞変性効果を指標に三代継代した．ヘルパンギーナ，手足口病などを呈した患児の材料は，乳のみマウスにも接種した．分離ウイルスの同定は既報[3,4]に準じた．

結　果

臨床症状と検出ウイルス　Tab. 1に示したようにウイルス分離を試みた617例の咽頭ぬぐい液のうち，陽性となったのは150例（24.3%）であった．もっとも多く検出されたのはコクサッキーA群ウイルス（CA）の51例であり，全陽性数の34.0%を占めた．次いで，インフルエンザウイルス（INF）43例（28.7%），アデノウイルス（AD）41例（27.3%）であった．その他に分離されたのはコクサッキーB群ウイルス12例（8.0%），単純ヘルペスウイルス5例（3.3%），エコーウイルス3例（2.0%），ポリオウイルス1例（0.7%）であった．

臨床症状別にウイルス分離状況をみると，インフルエンザ様疾患，ヘルパンギーナ，咽頭口内炎などの上気道炎と不明発疹症，手足口病などの発疹症状を呈した患児からのウイルス分離率が高く，それぞれ379例中113例（29.8%），80例中26例（32.5%）であった．上気道炎患児からは分離例113例のうちINFが40例（35.4%）と

* 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
** 東京逓信病院小児科

Table. 1 Isolation Frequency of Viruses from Pediatric Outpatients by Clinical Symptoms

Diagnosis	No. of Specimens	No. of Positive Cases	(%)	No. of Isolation						
				Adeno	Inf.	Cox. A	Cox. B	Echo	Polio	Herpes
Upper Respiratory Infection	379	113	29.8	33	40	31	7	3	1	4
Lower Respiratory Infection	59	5	8.5	3	2					
Exanthema	80	26	32.5	2	1	20	3			
Gastroenteritis	24	2	8.3	1			1			
Fever	19	2	10.5	2						
Others	56	2	3.6				1			1
Total	617	150	24.3	41	43	51	12	3	1	5

Table. 2 Isolation of Viruses from Pediatric Outpatients with Upper Respiratory Infection and Exanthema

Diagnosis	No. of tested	Adeno					Influ.			Coxsackie									Echo		Polio	Herpes
							AH1	AH3	B	groupA						groupB						
		1	2	3	4	5				2	4	5	6	10	16	4	5	6	7	11	2	
Upper Respiratory Infection	379	9	1	12	1	3	3	9	28	8	5	14	1			3	2	2	2	1	1	4
Exanthema	80								1		1	3	2	1	12	1	2					

最も多く，次いで AD が33例（29.2%），CA が31例（27.4%）であった．発疹症状を呈した患児では分離例26例中 CA が20例（76.9%）を占め，その他のウイルスの検出例は少なかった．

分離例数の多かった上気道炎と発疹からの検出ウイルスを血清型別にみると，Tab. 2 のように 6 種19血清型と 3 種 9 血清型のウイルスがそれぞれ分離同定された．上気道炎患児では INF B が28例，CA 5 が14例，AD 3 が12例の順に多く検出された．発疹を呈した患児では CA16 がもっとも多く12例検出された．CA は上気道炎，発疹症から高率に検出されたが，血清型別では検出状況が異なった．すなわち CA 2 はヘルパンギーナなどの上気道炎から，CA10・16は手足口病などの発疹症から，CA4・5・6は両疾患から検出された．

検出ウイルスの季節消長　2 年間の月別ウイルス分離成績を Fig. 1 に示した．各月の検索例数は12～41例であった．夏季と冬季にウイルス検出例が多く，ウイルス分離率も1984年 6 ～ 8 月，1985年 1 ～ 2 月，7 ～ 8 月には36.6～58.3%を示した．エンテロウイルス（EV）は夏季に検出例が多く，上記期間中の全分離例数74例のうち55例（74.3%）を占めた．一方冬季は29例のうち27例（93.1%）が INF であった．AD は特にはっきりとした季節消長はみられなかった．

検出ウイルスを血清型からみると，年次的変化が認められた．1984年にヘルパンギーナ患者から多く検出された CA 5 にかわって1985年は CA 2 が主流となった．AD についても1984年は AD 3 が全 AD 分離例27例中12例（44.4%）であったのに対し，1985年は14例中 2 例（14.3%）であった．INF は1984年 1 月に INF AH 1，1984年 5 月および1985年 1 月と 2 月に INF B，1985年 7 月，11月と12月に INF AH 3 が主に検出されており，短期間で血清型の変化が認められた．流行閑期である1984

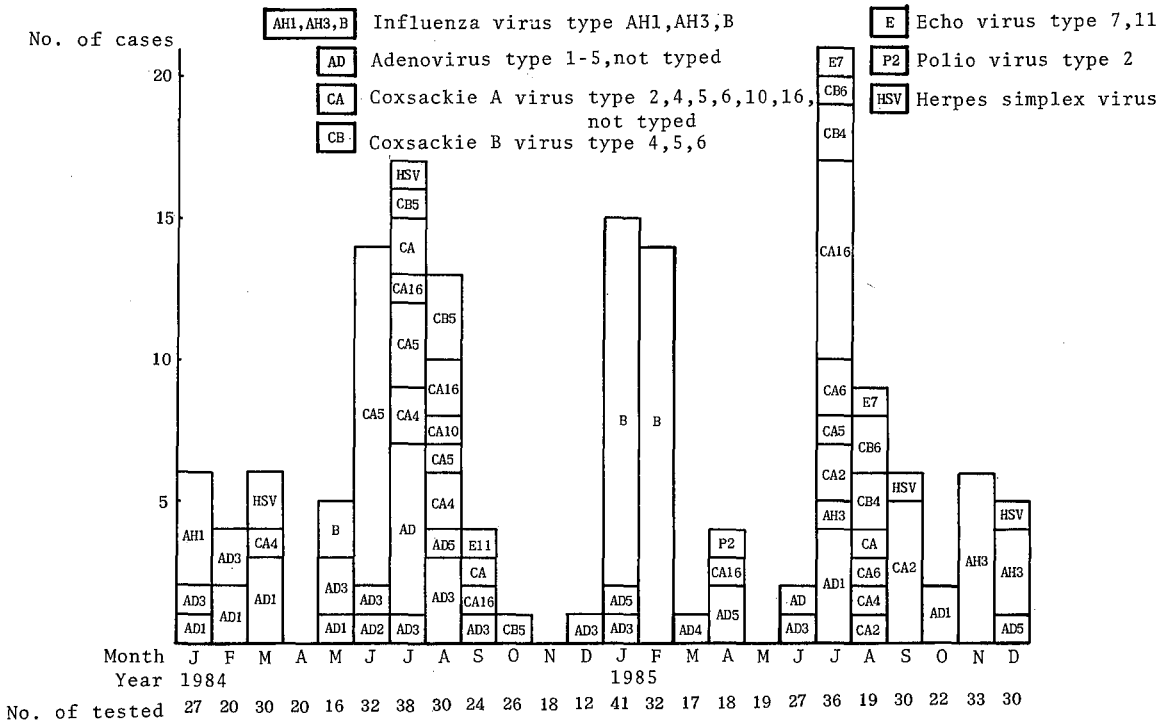


Fig. 1. Monthly Distribution of Pediatric Outpatients Associated with Viruses of Respiratory Pathogenes

Table. 3 Isolation Frequency of Viruses from Pediatric Outpatients by Age

Age	No. of tested	No. of positive cases (%)	Adeno					Influ.				Coxsackie											Echo		Polio	Herpes
									A H 1	A H 3		groupA							groupB							
			1	2	3	4	5	N T			B	2	4	5	6	10	16	N T	4	5	6	7	11	2		
<1	74	16	21.6	4					2	1	1	1	2	1				1		2		1			1	1
1-3	173	52	30.1	6	1	2		4	2		3	5	3	2	8	1	1	5	3		2	2	2				2
4-6	170	44	25.9	3		4	1	1	2	2	4	8	2	3	7	1		1	1	2	2						1
7-9	114	18	15.8			6			1	1		4	1		2	1		3			1						
10-17	86	20	23.3			2					2	11						2						1			1

年5月に検出されたINF Bおよび1985年7月に検出されたINF AH3は，次の流行期の検出ウイルスと一致していた．

患児の年齢と検出ウイルス 患児の年齢別のウイルス分離成績をTab. 3に示した．患児の年齢は生後4日から17歳までに分布していた．ウイルス分離率は1～3歳児からがもっとも高く30.1%，次いで4～6歳児は25.9%，10歳以上は23.3%であった．検出ウイルスを種別にみるとほとんどのウイルスは6歳以下で検出例が多く，7歳以上の年齢層からの検出例は減少する傾向が認められた．しかしAD 3とINF Bは高年齢層からの検出がめだった．6歳以下と7歳以上にわけて検出率を比較するとAD 3は1.4%に対して4.0%，INF Bは3.4%に対して7.5%であり，7歳以上の児童からの検出率の方が高かった．

考　察

小児の上気道疾患についてのウイルス検索はこれまでにも広く行われ，病原ウイルスとして8種以上のものが知られている[5]．著者らも1977年から都内の小児科を定点とした調査を行い，検出ウイルスは多岐にわたりその血清型は毎年変化していること，患児の年齢層によって症状や検出ウイルスに違いが認められることなどを報告[1~3]してきた．

松本らが盛岡市において行った1973年9月から1983年12月までの約10年間の小児呼吸器ウイルス感染症の調査[6]では，患児4,337名のうち919名（21.2%）からウイルスが検出され，ライノウイルス（RHINO）295例，RSウイルス（RS）143例，EV130例，AD116例，INF103例の順に多く，上気道疾患ではRHINO，INF，AD，下気道疾患ではRS，RHINOが重要なウイルスであったとしている．また1983年1月から1984年10月までのわが国における呼吸器感染症からのウイルス検出情報[7]ではINF，AD，EVが全分離例の83.4%を占めていた．

今回われわれが1984年1月から1985年12月にかけて小児の上気道疾患について行った検索結果では，617例中150例（24.3%）からウイルスが検出された．松本らの成績[5]と比較しても検出率はほぼ同じであり，ウイルス検出例もEV，AD，INFは同程度であった．これらのウイルスについては夏季にEV，冬季にINFが流行し，ADには季節消長が認められないことも一致していた．われわれの調査は上気道疾患を主体にしたこと，検体搬入まで咽頭ぬぐい液を凍結保存したこと，ウイルス分離試験に使用した細胞の種類の違いなどから，松本らの成績[6]と異なりRHINO，RSの検出例がなかったものと考えられる．

夏季に流行するウイルス疾患としてヘルパンギーナと手足口病があげられる．両疾患とも毎年流行を繰返し，いずれもEVによること[8,9]が明らかにされている．ヘルパンギーナは例年6月から流行が始まり，7～8月にピークを示す．感染症サーベイランス情報[10]によると，1984年は前年に比べて2倍以上の患者発生が記録され，起因ウイルスはCA 4，5，10であり，CA 4とCA 5が東日本を中心に流行していた．全国的にみるとCA10の検出例がもっとも多かったが，東京都ではCA 5，CA 4の順に多かった．ヘルパンギーナは数種類のウイルスによる混合流行像を示し，しかもその血清型は毎年変化していた[10]．1981年にはCA 5，6，10，1982年にCA 3，4，1983年にCA 2，6の流行のあと1984年の大流行へとつながった．

かつては手足口病の起因ウイルスとしてはCA16[11]とEV71[1]がほとんどで，両ウイルスによる流行が数年ごとに繰り返されていた[13]．しかし近年手足口病は毎年流行している．1982年から1985年までの手足口病からのウイルス分離成績[14]によれば，CA16とEV71が流行の中心であったことは明らかであるが，その他のウイルスによる手足口病症例の報告もされている[14,15]．板垣らの報告[16]では1981年に手足口病患者の水疱内容からCA10が分離され，中和抗体価の有意上昇が認められたという．また1984年にはCA10によるヘルパンギーナの大流行とともに，同ウイルスによる手足口病の発生も全国から報告された．鳥取，島根では特にCA10による症例が多い[14]．われわれの調査ではCA10による症例は1例認められたにすぎないが，今後は手足口病の症例においてはCA16とEV71以外のウイルスについても検索を積み重ねていく必要があると考えられる．

結　論

1984年1月から1985年12月までに都内の急性上気道炎を中心とした患児についてウイルス検索を行った結果，617名中150名（24.3%）からウイルスが検出された．夏季にはCA 2，4，5，16による上気道炎，発疹性疾患が多く，冬季にはINF AH 1，AH 3，Bの流行が認められた．AD感染症はほぼ年間を通じて発生し，AD 3の検出例が多かった．小児の呼吸器疾患では一般的に低年齢層からのウイルス検出率が高かったが，AD 3とINF Bだけは高年齢層からの検出率が高かった．

文　献

1）矢野一好，藪内　清，柴田タツ美，岩崎謙二，浦野純子，河野弘子，渡辺悌吉：東京衛研年報，29,49,1978

2）矢野一好，林　志直，柴田タツ美，吉田靖子，関根整治，藪内　清，岩崎謙二，浦野純子，河野弘子，渡辺悌吉：東京衛研年報，32,32,1981

3）林　志直，矢野一好，藪内　清，渡辺悌吉，石原祐，大久保さつき，印鑰史衛：東京衛研年報，35,55,1984

4）吉田靖子，関根整治，藪内　清：東京衛研年報，35,82,1984

5）渡辺悌吉，浦野純子：小児科，20,709,1979

6）松本一郎，高丸　宏，白井純一，小倉裕子，高橋清実，山高毅久，張簡俊義，阿部克久，篠原順子，佐藤成大，川名林二，吉田新二：第33回日本ウイルス学会総会演説抄録，4063,1985

7）国立予防衛生研究所：病原微生物検出情報，58,1，

1984
8) Flewett, T. H., Warin, R. P. and Clarke, S. K. R. : *J. Clin. Path.*, 16,53,1963
9) Lindembaum, J. E., Van Dyc, P. C. and Allen, R. G. : *Scand. J. Infect. Dis.*, 7 ,161,1975
10) 国立予防衛生研究所：病原微生物検出情報，64，1，1985
11) 名取克郎：臨床とウイルス，2 ,85,1974
12) 多ケ谷勇，橘　和代：医学のあゆみ，95,15,1975
13) 渡辺悌吉：臨床とウイルス，13,31,1985
14) 国立予防衛生研究所：病原微生物検出情報，67，1，1985
15) 栗村　敬：臨床とウイルス，11,213,1983
16) Itagaki, A., Ishihara, J., Mochida, K., Ito, Y., Saito, K., Nishino, Y., Koike, S. and Kurimura, T. : *Microbiol. Immunol.*, 27,929,1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 34-40, 1986

伊豆七島におけるツツガ虫病の研究（第三報）
式根島における既往者の発病後2年間の抗体価推移

中村清純*, 伊藤忠彦*, 山崎清*, 坂井冨士子*,
藪内清*, 大橋誠*

Studies on Tsutsugamushi Disease in Izu Islands (III)
Two Years' Follow-up Study on Changes in Antibody Level of the Residents in Shikine Island with the History of Scrub Typhus

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

The etiological and serological survey was conducted in every November from 1983 through 1985 in the Isle of Shikine where a local type of scrub typhus, so-called Shichito fever, is endemic. From 6 of 9 outpatients with fever and initial skin lesion, *Rickettsia tsutsugamushi* was isolated when the blood specimens obtained from them before tetracycline (TC) administration were intraperitoneally injected into mice. Every effort was made to collect as many sera as possible from the islander-patients. Significant rises in the antibody titer against the pathogen were observed for 30 of 31 cases examined by the complement fixation (CF) test of acute and convalescent sera.

One year follow-up of 5 patients with history of the disease treated with TC showed that their CF antibody titers to this microorganism were preserved at the level of 32-fold. As to two year follow-up of 12 patients, the antibodies remained in titers at 16-fold level.

We also encountered a case who suffered twice from the disease with one year interval and was diagnosed as with the rickettsial re-infection confirmed by CF and indirect immunofluorescent antibody tests. The role of antibody titer on prevention of infection by *R. tsutsugamushi* is discussed on the basis of serological data thus obtained.

Keywords: tsutsugamushi disease, Shichito fever, Rickettsia tsutsugamushi, follow-up study, serological test, human re-infection, tetracycline

緒　言

東京都衛生局では，伊豆七島におけるツツガ虫病（以下，七島熱という）患者の多発傾向が続いていたため，1983年より3年計画で，罹患率の最も高い新島本村式根島を主たる調査対象地域に選び，実態調査を実施してきた．第1回調査（1983年11月），第2回調査（1984年2月）および第3回調査（1984年11月）に関する成績については，既報[1,2]で報告した．本報では，1985年11月に行った第5回調査につき，七島熱患者からのリケッチア分離あるいは，過去の流行期に罹患した患者における血中抗体の推移を検討した結果などについて報告する．なお，第4回調査（1985年6月）は，流行閑期の野鼠について調査したもので，その成績は別途報告する．

調査対象および方法

調査期間および患者：式根島を主たる実態調査地域に選定し，前年，前々年度の患者発生状況から本年度の

* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

流行時期を予測し，1985年11月18日～26日の9日間を**第5回調査期間**として，現地に赴いた．その間，同島唯一の医療機関である国保新島本村式根島診療所（以下，式根島診療所と略す）で受診した急性期患者を問診し，血液を採取してリケッチア分離試験および血清学的試験に供した．また，第5回調査に赴く以前に発症した今流行期の患者で承諾の得られた人については，その回復期血液を採取した．さらに，1983年11月より1985年1月までの前々流行期および前流行期の患者についても，追跡調査のため，本調査期間中に重ねて採血した．

リケッチア分離同定試験：前報[2]に準じた．すなわち，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全血液を，ただちに4匹のマウス腹腔内に0.25m*l* 宛接種した．なお，その半数のマウスには前処置として，Cyclophosphamide（注射用エンドキサン）の腹腔内投与による免疫抑制処置を行った．継代はマウスの外見的発症が極期に達した日に行った．外見的発症のみられなかったものについては，接種後17日で盲継代した．一つの被検血液について，2代まで継代してすべてのマウスで開腹時の特異所見がみられなかったものは，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て，約4～5週後に採血し，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，分離同定試験では，5～8週令のddY系マウスを使用した．

血清学的検査：患者血清は，第1回ないし第3回および第5回調査中に採取した血清以外にも，式根島診療所および国保新島本村診療所（以下，新島診療所と略す）において採取した急性期または回復期血清を郵送により入手して検査に供した．また既往患者の一部の血清は，日本赤十字社による島民の献血液採取時の検査用血液の残余を入手して使用した．なお，両診療所を受診して七島熱と臨床診断された患者，すなわち本報の血清学的検査対象のすべては，その後3～5日間のテトラサイクリン系抗生剤の投与を受けている．

補体結合反応(CF)は，市販のRt標準3型，Karp型，Gilliam型およびKato型（デンカ生研製）と，第1回調査で七島熱患者（Table 4に示した患者No. 6）より分離したShikine-S株の自家作製した抗原を用いて行った[2]．

結　果

Ⅰ．都内の患者発生状況　1980年以降の全国および東京都にお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，1985年は前年に比べやや患者数が減少した．しかし地域的には，町田市で初めて1名の患者の感染が確認

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

Area	Number of Patients by Year					
	1980	81	82	83	84	85
Tokyo Metr.	4	49	32	66	27	23
Oshima Is.	4	16	4	29	7	11
Niijima Is.					8	
Shikine Is.		22	20	21	5	10
Kozu Is.				1		
Miyake Is.		10	8	3	5	
Mikura Is.				4	1	1
Tokyo in Japan proper		1*		8*	1*	1
Sum of Japan	212	388	508	672	948	882

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

*assumably infected outer site of Tokyo

された．また，罹患率では式根島が人口千対13.7と5年連続して断然高かった．

Ⅱ．1985年秋の発病患者に関する調査　式根島では今流行期は，過去2年に比して早く始まり，10月末から患者発生がみられ，式根島診療所および新島診療所で受診した成人患者は7名で，全員の血液または血清が得られた（Table 2）．

1）患者の症状　患者の多くは，発熱を主訴とし，発病から初診までの日数は明示されたもので2～9日であった．臨床所見では，発熱および刺し口は7名全例にみられた．また，初診時のリンパ節腫脹および発疹は，1例を除いて6例に認められた．しかし，この1例からはRtが分離されている（後述）．式根島での七島熱患者の自覚症状には共通性がみられ，それは，発熱をはじめとして全身倦怠，頭痛，違和感などが，朝から昼前までは軽度で軽作業が可能な程であるが，午後になると悪感がはじまり自覚症状が悪化して夜半まで続くというものであった．

2）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6名のCF検査成績をTable 2に示す．回復期に4倍以上の抗体上昇を示したのは，Shikine-S株およびGilliam株抗原に対しては6名全例であったが，Karp株およびKato株抗原に対しては6名中3例であり，ほとんどの回復期血清が，式根島患者由来のShikine-S株抗原に対してより強い上昇を示した．

3）リケッチア分離同定試験結果　第5回調査期間中に，患者2名が式根島診療所で受診した（Table 2）．2名の患者より採取した血液を，cyclophosphamide処置，同無処置マウスに接種した結果，その1名の材料を接種したマウスがいずれの群においても発症し，それよりRtが分離された．他の1検体では，初代および二代目マウスのすべてが発症せず，また剖検所見も正常であり，Rt分離陰性とした．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，前述の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株抗原に対して強く反応したので，今回のヒト由来分離株は，Rtの Karp型近縁株と同定・型別された．

Ⅲ．1～2年間にわたる既往患者の血中抗体追跡調査成績　1984年秋からの流行期に七島熱に罹患した7名に

Table 2．Serological Findings of Some of the Patients with Tsutsugamushi Disease in Izu Islands before and after Tetracycline Administration

Name of Island	Patient No.	Days after Onset	CF Titer by Antigenic Type of *R. tsutsugamushi* Karp	Gilliam	Kato	Shikine-S***
Shikine	1	4**	8	8	8	16
		18	64	128	64	256
	2	8**	<8	<8	<8	8
		22	8	16	8	128
	3	4**	<8	<8	<8	<8
		17	8	16	8	64
	4*	7**	<8	32	<8	8
	5*	3**	<8	8	<8	8
		48	8	64	16	32
Niijima	6	10**	<8	8	<8	64
		22	256	128	32	512
	7	7**	<8	8	<8	8
		21	32	128	64	256

*Isolation of *R. tsutsugamushi* was attempted and successful in patient No. 5.

**TC administration (per os) started soon after blood sample was taken.

***Shikine-S antigen for complement fixation (CF) test was a local strain of R. tsutsugamushi isolated from the patient No. 6 in Table 4, 1983.

ついて，その後1年間の抗体価の推移を検討した結果をTable 3に示した．このうち，血清が得られた5名全例が発病約1年後でも，Shikine-S株とGilliam株抗原のいずれか一方に対して32倍以上のCF抗体価を保持していた．No. 7の患者は，Table 4に示した患者No. 2と同一人であり，再感染後の抗体価は，初感染後のように低下せず，他の4名と同じく1年後でも32倍を保持していた．

1983年秋からの流行期に罹患した13名について2年間の抗体価の推移をTable 4に示した．発病より700日以上を経過しても，13例全例が，Shikine-S株とGilliam株抗原の一方あるいは双方に対して16倍以上のCF抗体価を保持していた．しかし，このうちNo. 2の患者は，1983年11月に初感染を受け，ついで1985年1月に再感染を認めた症例で，初感染の際には，ペア血清についての検査でGilliam株抗原に対して著明な抗体価上昇が認められ，95日後の検査でもそのレベルが保持されていたが，約430日後の再感染急性期には，前述4株抗原に対してすべて8倍以下の初感染前のレベルまで低下していた．しかし，その時点で再感染を受けて抗体の再上昇があったことが確認された[2]．

Ⅳ．急性期患者からのRtの分離と血中抗体価の検討

1983年11月，1984年11月と1985年11月の3流行期における調査期間中に，式根島診療所で受診した急性期患者は計8名で，その血液について有毛マウスによるRt分離試験を行い，6名よりRtが分離された．そのうち，順調に継代可能であった5株は，いずれもL 929細胞での培養が可能であった．また式根島，新島および三宅島在住の七島熱患者で，血清の得られた患者は延べ36名に及び，そのうち急性期血清とその後の血清が得られた者は延べ31名であった．さらに，急性期血清に較べてその後

Table 3. Serological Findings in Some Patients with Tsutsugamushi Disease in a Year after Onset in Izu Islands

Name of Island	Patient No.	Days after Onset	CF Titer by Antigenic Type of *R. tsutsugamushi*			
			Karp	Gilliam	Kato	Shikine-S
Shikine	1*	6**	<8	8	<8	<8
		Convalescent serum was not obtained				
		343	<8	32	<8	16
	2*	2**	<8	<8	<8	<8
		14	64	128	128	128
	3*	2**	<8	<8	<8	<8
		22	64	128	128	256
		367	16	16	8	32
	4	6**	<8	<8	<8	<8
		Convalescent serum was not obtained				
		365	8	8	<8	32
	5	8**	32	32	64	64
		22	128	128	128	256
		347	<8	8	<8	32
	6	7**	<8	<8	<8	<8
		21	128	128	128	256
	7***	2**	<8	8	<8	<8
		52	8	16	8	32
		313	<8	16	<8	32

*Isolation of *R. tsutsugamushi* was attempted and successful in patient No. 2 and No. 3.

**TC administration (per os) started soon after blood sample was taken.

***This patient is also presented in Table 4 as patient No. 2.

Table 4. Time Course of CF Titer in Patients of Tsutsugamushi Disease in Shikine Island

Patient No.	Days after Onset	CF Titer by Antigenic Type of *R. tsutsugamushi*			
		Karp	Gilliam	Kato	Shikine-S
1	4*	8	<8	8	16
	18	128	64	128	128
	100	16	16	16	32
	707	<8	<8	<8	16
	737	<8	<8	<8	16
2	8*	<8	<8	<8	<8
	22	<8	32	<8	<8
	95	<8	32	<8	<8
	434***	<8	8	<8	<8
	484	8	16	8	32
	746	<8	16	<8	32
3	6*	<8	<8	<8	<8
	20	32	32	64	128
	102	8	8	8	128
	743	<8	8	<8	16
4**	5*	<8	<8	<8	<8
	21	<8	64	16	16
	100	8	32	8	8
5**	4*	<8	32	<8	<8
	17	16	32	16	16
	94	32	64	32	128
	736	8	32	8	16
6**	8*	<8	<8	<8	<8
	22	64	32	64	64
	101	32	16	32	64
	740	8	16	8	16
7	13*	32	32	64	128
	29	256	256	512	512
	104	8	32	16	64
	744	<8	32	<8	32
8	5*	<8	<8	<8	<8
	19	16	256	32	8
	97	<8	32	<8	8
	736	<8	16	<8	8
9	3*	<8	8	<8	8
	17	16	32	32	128
	84	8	32	16	64
	724	<8	32	<8	16
10	5*	<8	8	<8	<8
	97	8	64	8	8
	734	<8	16	<8	<8
11	8*	<8	8	<8	8
	84	8	32	16	32
	723	<8	8	<8	16
12	8*	<8	8	<8	<8
	18	64	64	128	64
	704	<8	16	<8	8
13	16*	<8	<8	<8	8
	747	<8	<8	<8	16
14	2*	<8	<8	<8	8
	713	16	32	8	64

*TC administration (per os) started soon after blood sample was taken.
**Isolation of *R. tsutsugamushi* was attempted and positive in result.
***This patient had again the clinical signs of fever and initial skin lesion at that period.

の血中抗体価が，前述の4株抗原のいずれか一つ以上に対して4倍以上の有意上昇が認められたものは，延べ30名であった．

考　察

1983，84年の七島熱の流行期に，式根島における野鼠（ほとんどが *Rattus norvegicus*）のRt汚染調査を行った結果，その汚染率が85％にも達していることが明らかにされた[2]．このことから，同島には有毒ツツガムシがかなりの頻度で分布すると推察される．また同島の地形的条件から民家と畑地が隣接しており，住民がツツガムシの侵襲を受ける機会はかなり多いと考えられる．これらのことより，同島において七島熱が，毎年罹患率1％を超えて流行していることも当然の結果といえよう．1985年秋の流行時期が前年までのそれよりも2週間程早かったため，今回の調査では急性期患者からのRt分離試験は2例にしか実施できなかったが，そのうち1例から有毛マウスを用いてRtが分離された．前年，前々年の流行期調査と今回の調査を合せて6株のRtがヒトから分離された．Rt分離が成功したのは，いずれも比較的病日が早く，発疹が出現する以前に血液を採取できた症例であった．このように式根島での七島熱リケッチアの分離成功率は，検査病日に左右され，発病初期の血液を供試することが望ましいと思われる．

既往患者の抗体保有状況を経時的に追跡して評価するにあたっては，投与された抗生剤の影響も無視できない．式根島住民は，七島熱に関心が高く，毎年晩秋からの流行期には比較的早期に受診する傾向にある．また，式根島診療所での臨床診断の精度は高く，直ちにテトラサイクリン（アクロマイシン錠または同シロップ）を3～5日間投与することにより，外来治療のみで早期に治癒させている．感染発病後早期に，このように抗生剤投与を受けた七島熱既往者については，Rtの4株抗原に対する最高CF抗体価をとってみると，1年で32倍程度，2年後には16倍程度の抗体価が残存していた．CFでみるかぎり，残存抗体価がShikine-S株抗原に対して高いのは当然としても，そのほかGilliam株抗原に高く，一方，分離Rt免疫マウスおよびモルモット血清のCF反応態度より近縁であるとみられたKarp株抗原に対しては，より早い時期に抗体価が低下していることは，論理的に矛盾していた．その解釈には，抗生剤治療の影響，種による免疫応答の差などが考えられるが，ここでは速断は避けたい．

七島熱は概して軽症であり，1～2週間程度で自然治癒するとみられる[3]．自然治癒した既往患者の抗体価の経年変化が，本報で述べたような抗生剤治療を受けた患者におけるCF抗体価のそれと異なった態度をとるのかどうかが，きわめて注目されるところである．近い将来，伊豆七島における一般健康人のCF抗体保有状況を調査する予定であるが，島ごとの住民感染率，とくに不顕性感染率を求めるに際して，本報のデータは陽性，陰性の判定基準の設定に役立つものと考えられる．

保有抗体レベルと再感染・発病阻止との関係については，Shiraiら[4]がマウスを用いた動物実験を報告している．ヒトについては，宍戸ら[5]が，少数例ながら推定感染1年後，20～80倍のCF価が残っていた例と感染2年後に10～20倍のCF価が残存していた例を報告している．しかし，それらの症例は急性期血清についての調査が行われておらず，感染も臨床症状のみで診断されたものである．本報の症例においては，感染後約1年を経過した時点でのCF抗体価（Table 3）は，再感染症例以外の5名全例がいずれかの抗原に対して32倍を保持していたのに較べて，再感染の確認された症例（Table 4における患者No. 2）では，1年後にすでに8倍に下降していた．CF抗体価の低下と感染防御能の低下が関連しているために，次の流行期に再び感染発病したという可能性が示唆される．二度目の感染では自覚症状は比較的軽度であったという[2]が，このことは弱いながらも初感染における免疫の影響と考えられる．再感染1年後の保有抗体価はその他の既往患者のそれと同程度の下降にとどまっており，再感染における免疫は初感染時よりも強く生じたものといえよう．一方，1983年度の患者No.14（Table 4）は，2年後においてもShikine-S株抗原に対して64倍の抗体価を保持していた．この症例においては，回復期および1年後のCF抗体価の測定を行っていないため推測しかできないが，あるいは患者No. 2のように再感染をうけていた可能性も考えられる．

東京都のツツガ虫病は，永らく伊豆七島に限局されてきたが，1984年末（届出は翌年に入ってから）には都市部に近い町田市において同病に感染した患者が発見され，患者が本病流行地への旅行などをしていなかったことと付近の野鼠からRtが分離されたことから，当該地区での感染と断定された．これにより，多摩地区もRtに汚染されていることが確認された[6]．また，関東各県では，患者数の多寡に差はあるものの，いずれの県においても複数の患者発生をみている．このような状況にかんがみ，東京都では，都内での発生に対して医療機関の診断を補助するため，間接蛍光抗体法による確定診断を衛生研究所で実施すべく行政措置がとられることとなった．

謝辞 本研究を実施するにあたり，種々の御教示，御協力をいただいた群馬県衛生公害研究所，氏家淳雄博士ほかの各位，本調査に種々の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，新島本村診療所，式根島診療所，日赤大田血液センター，都衛生局防疫結核課，島しょ保健所の関係各位に深謝いたします．
（本研究は，昭和58，59，60年度東京都衛生局「ツツガ虫病実態調査」として実施されたものである．）

文　献

1）伊藤忠彦ほか：東京衛研年報，35,61,1984
2）中村清純ほか：東京衛研年報，36,33,1985
3）東京都衛生局予防課編：七島熱の研究，1952,東京
4）Shirai, A., et al : *Infect. Immun.*, 14,39,1976
5）宍戸　亮ほか：日本伝染病学誌，36,179,1962
6）著者ほか：投稿中

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 41-48, 1986

東京都における日本脳炎の流行予測調査成績 (1984～1985年)

吉田靖子*, 矢野一好*, 関根整治*, 藪内清*, 中嶋誠**, 塩見久章**, 秋山陽**, 畑野逸與**, 林績***, 福本拓夫***, 林田陽***, 村田三紗子***

Epidemiological Survey of Japanese Encephalitis in Tokyo in 1984－1985

YASUKO YOSHIDA*, KAZUYOSHI YANO*, SEIJI SEKINE*, KIYOSHI YABUUCHI*, MAKOTO NAKAJIMA**, HISAAKI SHIOMI**, MINAMI AKIYAMA**, ITSUYO HATANO**, ISAO HAYASHI***, TAKUO FUKUMOTO***, YOU HAYASHIDA***and MISAKO MURATA***

Keywords：疫学 epidemiology, 日本脳炎ウイルス japanese encephalitis virus, ブタ swine, 予測 forecast

緒　言

1954年にわが国で，はじめてヒトに対する日本脳炎（以下，日脳と略す）予防ワクチンの接種が行われるようになってから，日脳患者の発生数や本病の流行に関与する蚊やブタにおける日脳ウイルスの出現・消長には，著しい変化がみられてきた．最近数年間における全国の患者数は毎年20～30名に減少し，日脳の予防対策の成果が反映されてきてはいるものの，流行の根源である日脳ウイルスは毎年夏季に媒介蚊であるコガタアカイエカや増幅動物であるブタから検出されている[1～3]．したがって現在でも日脳ウイルス感染の機会がなくなったわけではなく，今後とも日脳の予防対策はゆるがせにできない公衆衛生上の重要な問題といえよう．

われわれは，都内における日脳ウイルスの汚染状況を知る目的で，感染源調査としてブタの日脳ウイルスHI抗体保有状況，コガタアカイエカの消長，ブタおよび蚊からのウイルス分離，おとりウサギの抗体応答を調査した．また感受性調査として健康都民における日脳HI抗体，中和抗体の保有状況を検討した．

日脳流行期前にその年の日脳の流行を予測することは，防疫上意義が深い．過去の都下飼育ブタの調査データを数値論的に分析し，ブタにおける日脳の感染流行予測を試みた．

材料と方法

ブタ血清　1984年1月から1985年12月までの間に，都下多摩地区で飼育されたブタから血液を採取し，実験に供した．1回の被検血清は50件で総数は2,598件である．

健康都民血清　1984年6月27日から12月13日までと1985年6月14日から11月7日までに，都内に居住する生後7か月から85才までの健康都民から採取した686件の血清である．

HI試験　常法[4]に準じ，マイクロタイター法によりHI試験を実施した．日脳ウイルスHA抗原は，市販品のJaGAr 01株抗原を4HA単位に調整して使用した．

日脳ウイルスに対する2-mercapto ethanol感受性抗体の測定法　2-mercapto ethanol（2-ME）処理による簡便法[5]を用いた．抗体価の測定法は常法[4]によった．

中和試験　鶏胎児繊維芽細胞上のプラック減少測定法を用い，中和抗体価は50%プラック減少率から算定した[4]．使用した抗原は，JaGAr 01株である．

コガタアカイエカの捕集　1984年6月19日から10月23日の間に，都区内の3定点にライトトラップを設置し32

* 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
** 東京都多摩食肉衛生検査所
*** 衛生局公衆衛生部防疫結核課

回にわたって，また都下の豚舎に8月28日から10月23日に8回にわたって蚊を捕集した．1985年は6月17日から10月22日の間に，都区内の3定点および都下の1定点にライトトラップを設置し18回にわたって蚊を捕集した．

ウイルス分離試験　1）ブタ血清からの分離：日脳ウイルスに対するHI価が10倍以下のブタ血清を，生後48時間以内の乳のみマウスの脳内に0.02m*l* ずつ接種し，10日間観察した．発症したマウスは放血して殺し，直ちに脳を摘出した．これより10%脳乳剤を作成し，本乳剤中の日脳ウイルスを抗日脳ウサギ血清によるHI試験により同定した．2）蚊からの分離：捕集した雌コガタアカイエカからのウイルス分離試験は，ヒトスジシマカの培養細胞C6／36（長崎大学熱帯医学研究所，五十嵐章教授から分与）を用いて行った[6]．

数値論的解析　と場の食肉用ブタは生後5か月から8か月であり，2回以上の日脳流行期を経験することがない．このブタにおける日脳ウイルスに対する抗体陽性率は，その年度の一定期間内における日脳の感染像を反映していると考えることができる．このことを前提として，毎年のブタにおける日脳流行開始時点のブタのウイルス保有率と日脳ウイルスの伝播係数（感染流行の拡大の強さ）から，ブタ集団における日脳ウイルスの感染流行の違いを数値論的に解析した．一定期間内に新たに感染すると考えられるブタの感染率を Y_i，集団内の感染源となるブタの比率を Y_{i-1}，当該時点における未感染ブタの比率を $\{100-(Y_0+Y_1+\cdots+Y_{i-1})\}$ とする．そして伝播係数（流行中は感染流行が終息するまで一定の値をとると考えられる）をKとすると，$Y_i=Y_{i-1}\{100-(Y_0+Y_1+\cdots+Y_{i-1})\}$ Kの式で表現されると考えた[7]．

結　　果

都下飼育ブタの日脳HI抗体保有状況　1984年1月から1985年12月にかけて，都下多摩地区で飼育されたブタから採取した血清2598件について，日脳ウイルスに対するHI抗体価を測定した結果をTable 1に示した．

1984年1月から4月までの調査では，HI抗体保有状況は月別に各々56，48，32，16%と高い陽性率を示しているとともに，高いHI抗体価をもっているものが多く認められた．しかし，2-ME感受性抗体陽性を示すブタの存在がないことから，日脳ウイルスの伝播は同時期にはなかったものと推定される．この時期におけるブタの日脳ウイルスに対する高い抗体陽性率ならびに高い抗体の存在は，1983年において日脳ウイルスの伝播が高率であったことの影響と考えられる．また1985年1月から4月においても同様に，高い抗体陽性率と高い抗体価を示すものが多く認められており，これは1984年の流行期における感染の影響と考えられる．

1984年には，8月21日以降の血清においてHI価640倍と高い値で，かつ2-ME感受性抗体陽性のブタがみられた．9月中におけるHI抗体陽性率は流行経過を追って14～28%の範囲で上昇し，2-ME感受性抗体を保有するブタの出現も各回の被検血清数に対して4～14%の比率でみられた．10月に入ると，第一週目に58%を示し，その後10月16日には84年度の最高値64%を示した．2-ME感受性抗体は，10月30日に10%みられたのを最後にそれ以降はみられなくなった．

1985年においては，8月26日に採取したブタ血清の中に高いHI抗体価をもつものがみられ，かつ2-ME感受性抗体陽性ブタも存在していた．その後抗体陽性率は漸次上昇し，10月8日と22日には85年度の最高値70%を示した．10月29日以降12月9日においても46～62%の陽性率を示し，ブタ間における日脳ウイルスの感染流行が活発であったことが示唆される．日脳流行予測調査の一環として実施しているブタにおける日脳ウイルスに対するHI抗体測定結果にもとづき，東京都は1983年以降3年間連続して日脳ウイルス汚染地区に指定された．

2-ME感受性抗体陽性率でみると，1985年は8月26日にはじめて陽性率が認められてから，9月10日には22%の最高値を示した．その後は4～10%の範囲で10月22日まで出現した．HI抗体陽性率の最高値は10月中旬にみられたが，ブタ間における日脳ウイルスの伝播が盛んだったのは9月中旬頃であったことが示唆された．

ウイルス分離に関しては，84年度はHI抗体陽性率が上昇しはじめた9月11日に1件とHI抗体陽性率が最高値を示した次の週の10月23日に2件の計3件から分離された．10月下旬に日脳ウイルスがブタ血清から分離されたことは，ブタがウイルス血症を起していたことを示し，この時期においても日脳の感染流行が持続していたことを示唆している．85年においては，HI抗体陽性率の急上昇期である9月3日に採取したブタ血清2件と9月17日に採取したブタ血清1件の計3件から分離された．

ブタにおける日脳流行の数値論的解析　ブタにおける日脳ウイルスの感染流行の拡大の数値論的想定式 $Y_i=Y_{i-1}\{100-(Y_0+Y_1+\cdots+Y_{i-1})\}$ Kを用いて解析した[7]．ブタ集団における日脳ウイルスの感染流行の開始時に感染源となりうるブタの比率 Y_0 を設定することによって，実測したHI抗体陽性率にもとづき想定式から最小二乗法により伝播係数Kが求められる．流行経過期間（当該年度において新たな感染が生じたとみられる時

Table 1. Seropositivity rate of swine for HI antibody and 2-ME sensitive antibody to JE virus in Tokyo.

Date of bleeding	Number tested	HI antibody titer (JaGAr 01 strain)										Positive rate*	2-ME rate**
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	≧2560		
84. 1.24	50	22	5	5	4	4	2	3	5			56.0	0.0
2.14	50	26	2	1	2	5	6	6	2			48.0	0.0
3.13	50	34	4	2		1	5	2	2			32.0	0.0
4.17	50	42	3		1	2	2					16.0	0.0
5.22	50	46	2	2								8.0	0.0
6.19	50	50										0.0	
7. 3	50	49	1									2.0	0.0
7.10	50	47	2	1								6.0	0.0
7.17	50	50										0.0	
7.24	50	47	3									6.0	0.0
7.31	50	49				1						2.0	0.0
8. 7	50											0.0	
8.14	50	49	1									2.0	0.0
8.21	50	47						2	1			6.0	6.0
8.28	50	48	2									4.0	0.0
9. 4	50	43	1	1	1	1	1	1	1			14.0	8.0
9.11	50	40	3			1	1	1	2	1	1	20.0	12.0
9.18	50	38		1		1		4	5	1		24.0	4.0
9.25	50	36						2	7	3	2	28.0	14.0
10. 2	50	21	3	2	1		1	7	6	8	1	58.0	8.0
10. 9	50	25		1		1	2	10	7	2	2	50.0	4.0
10.16	50	18	4	2		1	2	5	11	4	3	64.0	18.0
10.23	48	28	1				5	7	5	1	1	41.7	6.2
10.30	50	24	2	2				6	4	8	4	52.0	10.0
11.20	50	24				3	7	10	5		1	52.0	0.0
12.11	50	31			2	3	7	7				38.0	0.0
85. 1.22	50	32	4		3	5	4	2				36.0	0.0
2.19	50	36	4	4		1	1	2	2			28.0	0.0
3.12	50	43	1	2	1	1		2				14.0	0.0
4.16	50	47		1		1		1				6.0	0.0
5.21	50	48	1	1								4.0	0.0
6.18	50	50										0.0	
7. 2	50	49		1								2.0	0.0
7. 9	50	49	1									2.0	0.0
7.16	50	50										0.0	
7.30	50	50										0.0	
8. 6	50	47	2	1								6.0	0.0
8.13	50	47	1	2								6.0	0.0
8.19	50	50										0.0	
8.26	50	45	1	2				1	1			10.0	4.0
9. 3	50	42		1	1		2	1	1	1	1	16.0	8.0
9.10	50	29	2				3	6	6	2	2	42.0	22.0
9.17	50	39					6	3	2			22.0	4.0
9.24	50	27	1		2	3	7	8	1	1		46.0	8.0
9.30	50	28		2		1	4	11	4			44.0	8.0
10. 8	50	15				1	15	13	4	1	1	70.0	10.0
10.15	50	20	1	1		7	9	8	4			60.0	6.0
10.22	50	15		1	1	4	14	13	2			70.0	4.0
10.29	50	18	1	2	1	5	15	6	2			64.0	0.0
11. 5	50	27	1		1	2	8	10	1			46.0	0.0
11.19	50	22			1	1	9	15	2			56.0	0.0
12. 9	50	19	1	1		5	8	12	4			62.0	0.0

* Positive rate (%) ; ≧1 : 10

** Positive rate of 2-mercapto ethanol sensitive antibody.

期）の７月１日から各調査時点までの実測 HI 抗体陽性率を代入して，想定式から求めた K と Y_0 より感染率 Yi を求めた．累積感染率の理論値と HI 抗体陽性率の実測値を比較し，Table 2 に示した．

日脳感染における拡大の数値論的解析法において，拡大の早さは Y_0 の値により大きく影響することがわかった[7]．

1984年において８月14日以降 HI 抗体陽性率の上昇がみられること，また1985年は８月26日以降であることから，K を一定にし Y_0 を変化させて累積感染率の急上昇期が第13～15単位時間（１単位時間はブタがウイルス血症を起している期間で約3.5日とする[7]）時点に相当する値を示すのは，$Y_0=0.001$ のときであった[7]．両年とも $Y_0=0.001$ に設定すると，理論的に求めた累積感染率は実測 HI 抗体陽性率の急上昇期とよく一致していた．

1984年において，ブタ間における日脳の感染流行が終息したと思われる11月20日までの19回分の実測 HI 抗体陽性率を想定式に代入し，最小二乗法により誤差平方和の平均値の小さいときの伝播係数 $K=k\times10^{-3}$ を求めると，$K=15.08\times10^{-3}$ であった．あらかじめ設定してあった $Y_0=0.001$ と求めた $K=15.08\times10^{-3}$ を再び想定式に代入することによって理論的に累積感染率が求められる．理論的感染率の最高値は62.24％で，実測した HI 抗体陽性率の最高値は64％であり両者は近似の値を示した．19回の実測 HI 抗体陽性率と実測した月日に対応する累積感染率を比較すると，相関係数0.9584となり，両者は正の強い相関性を示した．同様にして，10月23日までの17回分の実測値を想定式に代入して求めた伝播係数は $K=15.15\times10^{-3}$ となり，さらに10月２日までの14回分のときは $K=15.27\times10^{-3}$，９月11日までの11回分の

Table 2. Forecast for Japanese encephalitis epidemic in swine by inductive theoretical analysis.

Values observed	Values calculated: Period of values observed from	to	Transmission coefficient	Peak infection rate(%)	Correlation coefficient (b)
1984	July 3	Aug.21	k =7.59(a)	77.36	0.7953**
	July 3	Aug.28	16.18	69.78	0.9514**
Peak positivity	July 3	Sept.4	16.24	70.12	0.9495**
rate for HI	July 3	Sept.11	15.90	68.04	0.9596**
antibody	July 3	Sept.18	15.51	65.40	0.9653**
Oct.16	July 3	Oct.2	15.27	63.72	0.9636**
64.0%	July 3	Oct.16	15.22	63.29	0.9625**
	July 3	Oct.23	15.15	62.73	0.9605**
	July 3	Nov.20	15.08	62.24	0.9584**
1985	July 2	Aug.26	16.74	73.01	0.9420**
	July 2	Sept.3	16.46	71.42	0,9467**
Peak positivity	July 2	Sept.10	16.66	72.52	0.9435**
rate for HI	July 2	Sept.24	15.72	66.84	0.9550**
antibody	July 2	Oct.8	15.58	65.88	0.9555**
Oct.8	July 2	Oct.15	15.55	65.72	0.9555**
70.0%	July 2	Oct.22	15.57	65.83	0.9555**
	July 2	Oct.29	15.56	65.79	0.9556**

(a) Transmission coefficient （K）: $K=k\times10^{-3}$.

(b) Correlation between values observed and values calculated.

** : Significant at 0.01 level.

ときは$K=15.90\times10^{-3}$，8月28日までの9回分のときは$K=16.18\times10^{-3}$，8月21日までの8回分のときは$K=17.59\times10^{-3}$となった．各々の調査時点での実測値を代入して求めたKと$Y_0=0.001$から求めた累積感染率は，それぞれ62.73%，63.72%，68.04%，69.78%，77.36%となり，HI抗体陽性率の最高値と近似の値を示した．理論値と実測値の相関性をみると相関係数0.9605，0.9636，0.9596，0.9514，0.7953を示し，1%の危険率で有意性が認められた．

一方，1985年の調査結果についても84年と同様の解析を行うと，日脳の感染流行が終息したと思われる10月29日までの17回分の実測値を想定式に代入して求めた伝播係数は$K=15.56\times10^{-3}$となり，各々実測した回数分のHI抗体陽性率を代入して求めた伝播係数は$K=15.55\times10^{-3}\sim16.74\times10^{-3}$の範囲にあり，また累積感染率は65.72～73.01%となり，85年度における最高HI抗体陽性率であった10月8日の70%と比較すると近似の値を示していた．各流行経過時点における累積感染率と実測値の間には，相関係数0.9420～0.9556の強い正の相関性が認められた．

以上のことより，日脳流行が終息したと思われる時期までの実測HI抗体陽性率を想定式に代入して最小二乗法から求めた累積感染率と，始めてブタのHI抗体陽性率がみられた時点から求めた累積感染率は非常に近似の値を示しており，ブタにおける日脳流行の感染拡大規模を，日脳感染のごく初期の段階（当該年度にはじめて2-ME感受性抗体が観察された時期）で予測できるものと考えられる．

コガタアカイエカの消長とウイルス分離　1984年6月19日から10月23日にかけて32回，1985年6月17日から10月22日にかけて18回，4定点にライトトラップを設置し蚊を捕集し，雌コガタアカイエカの消長およびウイルス分離を試みた．

1984年は都区内の3定点において捕集した雌コガタアカイエカは116匹（吸血蚊37匹，未吸血蚊79匹）その他の雌蚊1543匹であった．調査開始後，はじめて雌コガタアカイエカが捕集されたのは7月3日であり，それ以後10月16日まで継続的に捕集された．3定点ともに雌コガタアカイエカが捕集されたのは9月中旬であり，例年に比して，時期的に1か月遅くなっており，また捕集数も少なかった．一方，都下の豚舎において8月28日から10月23日に8回にわたって蚊の捕集を試みた結果，雌コガタアカイエカ140匹（吸血蚊133匹，未吸血蚊7匹），その他の雌蚊814匹が捕集された．雌コガタアカイエカが捕集されたのは，調査開始当初より10月2日までであり，9月10日に捕集数のピークがみられた．

1985年においては，都区内の3定点で18回にわたって捕集した雌コガタアカイエカは26匹（吸血蚊8匹，未吸血蚊18匹），その他の雌蚊は610匹であり，雌コガタアカイエカの捕集数は激減していた．同時期に都下の豚舎における雌コガタアカイエカの消長をみると，8月20日から10月8日にみられ，捕集数は125匹（吸血蚊104匹，未吸血蚊21匹），その他の雌蚊611匹であり，9月24日に雌コガタアカイエカ捕集数のピーク（吸血蚊35匹，未吸血蚊9匹計44匹）がみられた．

両年とも，捕集された蚊の中から雌コガタアカイエカを捕集月日，定点別に吸血蚊，未吸血蚊にわけ，ヒトスジシマカの培養細胞C6／36を用いてのウイルス分離試験を行った．検体接種後，C6／36細胞のCPEと，培養細胞液のガチョウ血球液を用いての赤血球凝集反応により日脳ウイルス分離を判定した．1984年は51プール材料，1985年は30プール材料で，全例とも培養細胞におけるウイルス分離は陰性であった．

健康都民における日脳抗体保有状況　1984年6月27日から12月13日の間の生後7か月から74才まで，また1985年6月14日から11月7日の間の生後7か月から85才までの，都内に居住する健康者340名と346名の計686名から採取した血清について，日脳抗体調査を実施した．その結果をTable 3とTable 4に示した．

1984年の抗体保有状況は，JaGAr 01株抗原に対するHI抗体保有率でみると，5才以下の年令層が一番低く19.2%であり，次いで17～30才の年令層の33.3%であった．しかし，平均抗体価でみると5才以下の年令層で$5\times2^{3.00}$と一番高い値を示しており，これは3～5才においてワクチン接種を受けた比率が他の年令層にくらべて高かったためと推定される．一方，日脳ウイルス中和抗体保有率でみると，各年令層ともに41.7～100%の範囲であるが，HI抗体保有率と同様に5才以下の年令層が一番低かった．17才以上の年令層においては，HI抗体保有率にみられたような低い抗体価のみの保有状況とは違って，高い抗体価をもつ比率も高くなり，平均抗体価は31～59才で$5\times2^{3.22}$と一番高く，次いで6～12才の$5\times2^{3.02}$であった．

1985年においても，HI抗体保有率でみると，5才以下の年令層が一番低く22.2%であり，次いで31～59才の年令層で53.2%であった．しかし，平均抗体価でみるとむしろ57.5%のHI抗体保有率を示した17～30才，77.8%の保有率を示した60才以上の年令階層が5×

Table 3. Distribution of JE antibody in healthy human sera in 1984.

Age group	No. of tested	Method*	Antibody titer (n value of 5×2^n)								Positive rate**	Mean titer n±SD
			<1	1	2	3	4	5	6	7		
≦5	99	N	79	4	6	2	5	1	2		20.2	2.95±1.60
	99	J	80	3	5	5	3	1	2		19.2	3.00±1.52
	96	NT	56	12	14	4	3	3	3	1	41.7	2.60±1.70
6～12	60	N	23	15	12	5	3	1	1		61.7	2.08±1.25
	60	J	23	13	12	6	4	1	1		61.7	2.21±1.27
	60	NT	12	8	15	8	8	5	2	2	80.0	3.02±1.63
13～16	30	N	8	2	10	7	1	1	1		73.3	2.63±1.17
	30	J	6	8	5	5	2	3	1		80.0	2.58±1.55
	30	NT	4	5	7	5	2	2	4	1	86.7	3.19±1.87
17～30	69	N	50	11	6	1	1				27.5	1.57±0.83
	69	J	46	12	8	3					33.3	1.60±0.72
	69	NT	36	9	14	3	4	1		2	47.8	2.45±1.58
31～59	78	N	44	21	9	3			1		43.5	1.58±1.01
	78	J	38	10	17	9	3		1		51.2	2.22±1.07
	78	NT	29	6	17	7	7	5	5	2	62.8	3.22±1.72
≧60	4	N	2	1	1						50.0	1.50±0.70
	4	J	1	1	2						75.0	1.66±0.57
	4	NT		1	2	1					100.0	2.00±0.98

*Method N : Distribution of HI antibody to JE Nakayama strain.
J : Distribution of HI antibody to JE JaGAr 01 strain.
NT : Distribution of Neutralizing antibody to JE JaGAr 01 strain.

**Positive rate (%) : n ≧1

$2^{1.78}$, $5\times2^{1.64}$と低い値を示していた.

各年令層における中和抗体保有状況をみると, 5才以下が33.3%であった以外は他の5階層で90.4～100%と高い抗体保有率を示した. 平均抗体価でみると, 中和抗体保有率が一番低かった5才以下でも$5\times2^{2.55}$を示しており, ワクチン接種の影響が大きかったものと推定される. 他の5階層でも$5\times2^{2.40}$～$5\times2^{3.73}$の範囲で平均中和抗体価でみるかぎりでは17～30才の階層が低かった.

考　察

最近のように日脳真性患者の発生が極端に減少してくると, ただ単に患者数だけをみていたのではあたかもその地域にはもはや日脳ウイルスが存在しないのではないかという錯覚におちいる危険がある. 東京地区における日脳ウイルスの浸淫は, ここ数年来希薄になっていたことは事実であるが, ヒトにおける患者発生数には関係なく, 毎年確実に存在していることがブタからのウイルス分離ならびに抗体測定の結果から明らかにされている[3,8]. 1983年, 日脳流行予測調査の一環として実施してきたブタの血中抗体測定の結果, HI抗体陽性率の上昇が認められたことにより東京都が11年ぶりに日脳ウイルス汚染地区に指定され, 以来3年連続して指定されている[1].

1968年以降都内では日脳ウイルス感染の確認された真性患者の発生こそないが, 1982年以降千葉県, 茨城県, 埼玉県存住者が日脳にり患したり[1], 本調査でも示されたようにブタにおけるHI抗体陽性率の上昇さらに日脳感染流行拡大地域が東北地方まで広範囲にわたっている

Table 4. Distribution of JE antibody in healthy human in 1985.

Age group	No. of tested	Method*	Antibody titer (n value of 5×2^n)								Positive rate**	Mean titer n±SD
			<1	1	2	3	4	5	6	7		
	102	N	81	9	3	5	2	1		1	20.5	2.38±1.62
≦5	102	J	79	6	8	4	3		1	1	22.5	2.56±1.59
	102	NT	68	11	8	8	2	2	3		33.3	2.55±1.58
	72	N	21	16	15	10	10				70.8	2.27±1.11
6～12	72	J	21	14	14	12	6	5			70.8	2.49±1.28
	72	NT	6	14	13	16	15	5	3		91.6	2.89±1.41
	19	N		7	4	3	4	1			100.0	2.36±1.34
13～16	19	J	1	3	5	4	3	2	1		94.7	2.94±1.47
	19	NT		1	3	3	7	3	2		100.0	3.73±1.36
	73	N	46	16	6	4	1				36.9	1.62±0.88
17～30	73	J	31	22	9	9	2				57.5	1.78±0.95
	73	NT	7	15	27	10	10	4			90.4	2.40±1.17
	62	N	41	11	6	4					32.2	1.66±0.79
31～59	62	J	29	11	8	5	9				53.2	2.36±1.22
	62	NT	3	9	20	14	14	2	2		95.2	2.72±1.24
	18	N	10	7	1						44.4	1.12±0.35
≧60	18	J	4	9	2	2	1				77.8	1.64±1.00
	18	NT	1	1	7	4	4	1			94.4	2.82±1.07

*, ** See the legend table 3.

という感染流行の様式の変化に伴ない[1]，日脳ウイルス感染の危険性は過ぎ去ったとはいえない．

日脳流行の減少の原因を的確に指摘するのは困難であるが，多くの研究者は媒介蚊の減少を主要因としている[9,10]．コガタアカイエカの減少は農薬の散布によるとされているが，最近の上村ら[11]の報告によると，コガタアカイエカの有機燐剤およびカーバメイト剤に対して高い抵抗性を持っていることが発表され，全国規模でこれら薬剤の抵抗性の調査が行われた結果，予想以上に抵抗性の蚊が増加していることがわかった[12]．これらの抵抗性の蚊が増加すれば，今後の日脳流行に何らかの影響を与える可能性が考えられる．

本症の疫学からいって，この他にも気温，湿度，雨量などの気象条件やその他の種々の要因が複雑にからみあっているので，今後における日脳患者発生数を予測することは非常に困難である[13]．そこで，ブタ集団における日脳の感染流行の拡大規模をより早い時期に予測することによって，間接的にヒトへの感染機会を推定する試みとして数値論解析を行って，満足される結果を得てきた[7,14]．今回の調査でもこの理論が正しいことが，理論値と実測値の高い相関性により証明された．日脳患者の症状は，非常に重篤であり，かつ現在有効な治療方法もないことから，ワクチン接種により個人および集団の免疫を高め，また媒介蚊に対する対策をおこたらず，流行の発生，発病を予防することが今後とも重要である．

結　論

1984，1985年の東京都における日脳ウイルスの汚染状況を知る目的で，感染源調査として都下飼育ブタの抗体保有調査およびウイルス分離，コガタアカイエカの出現消長とウイルス分離，おとりウサギの抗体獲得調査を，感受性調査として健康都民の抗体保有調査を実施し，次の結果を得た．

1）都下飼育ブタの日脳HI抗体陽性率は，1984年における最高値は64%，1985年は70%を示した．

2）1984年におけるブタ血清からの日脳ウイルス分離結果は，HI抗体陽性率が上昇しはじめた9月中旬に1件，ブタにおけるHI抗体陽性率が最高値を示した次の週である10月下旬に2件計3件から検出された．この時期にブタから本ウイルスが分離されたことは，ブタがウイルス血症を起していたことを示し，日脳の感染流行が持続していたことを示している．1985年においてはHI抗体陽性率の急上昇期に採取したブタ血清3件から本ウイルスが検出された．

3）ブタにおける日脳流行の数値論的解析により，ブタ集団の日脳流行の感染拡大規模をより早い時期に予測することができた．

4）都区内3件，都区外1件の計4定点でコガタアカイエカが捕集された時期は，1984，1985年とも例年より1か月位遅く，また捕集数も減少していた．

5）健康都民血清における日脳HI抗体保有率は，1984，1985年とも5才以下の年令層で19.2%と22.2%と一番低かったが，平均抗体価でみると$5\times2^{3.00}$，$5\times2^{2.56}$を示し，他の年令層より高い価であった．これは3～5才においてワクチン接種を受けた比率が他の年令層にくらべて高かったためと推定される．

6）健康都民血清における中和抗体保有率でみると，両年とも5才以下の年令層で41.7%，33.3%と低い率であったが，他の年令層においては高い保有率を示しており，年令層間における顕著な差はみられなかった．

文　献

1）厚生省保健医療局結該難病感染症対策室：全国日本脳炎情報，1980－1985

2）緒方隆幸：臨床とウイルス，13,150,1985

3）吉田靖子，藪内　清，田口文章：臨床とウイルス，13,349,1985

4）大谷　明：微生物検査必携ウイルス・リケッチア検査，249,1978,日本公衆衛生協会

5）国立予研ウイルス第4室：日本脳炎流行予測事業における血清の2メルカプトエタノール処理方法について，1971

6）五十嵐　章ほか：日本脳炎ウイルス生態学研究会会報，11，1，1979

7）吉田靖子，藪内　清，岩崎謙二，田口文章：感染症学雑誌，59,1061,1985

8）吉田靖子ほか：東京衛研年報，35,73,1984

9）Yamamoto, H.: *Jap. J. Sanit. Zool.*, 35,47,1984

10）中村　央ほか：大阪府立公衛研所報，公衆衛生編，21,71,1983

11）上村　清，丸山由紀子：衛生動物，34,33,1983

12）国立予防衛生研究所衛生昆虫部：コガタアカイエカの殺虫剤抵抗性調査報告，1984

13）佐々　学：衛生動物，22,181,1971

14）吉田靖子，藪内　清，岩崎謙二，田口文章：感染症学雑誌，60,91,1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 49-53, 1986

河川水からのウイルス検出方法の改良

矢野一好*, 吉田靖子*, 藪内　清*

Improved Method for Isolation of Viruses in River Water

KAZUYOSHI YANO*, YASUKO YOSHIDA* and KIYOSHI YABUUCHI*

Keywords：河川水　river water, 濃縮　concentration, 腸管系ウイルス　enteric virus

緒　言

欧米先進諸国では，水系感染症の予防を目的としてヒトの生活環境を取り巻く水系のウイルス検査が早くから取り入れられていたが，わが国では，1985年に至りようやく上水試験方法に水中ウイルスの検査法が取り上げられるようになった[1]．

ヒトにおける水系ウイルス感染症としては，肝炎の原因であるA型肝炎ウイルスや胃腸炎の原因ウイルスであるノルウォークウイルスが注目されている[2-5]．しかし，これらの因果関係については，ウイルスの検出方法がむずかしいこと，感染の機会が水系以外にも多数あること等が原因して，実証が非常に困難であるといわれている．

一方，生カキが原因食品と推定される急性胃腸炎事例からノルウォークウイルス様粒子が検出されている[6]事実から考えると，水中に混入している微量のウイルスを魚介類が蓄積し，ヒトへの感染源となりうることが示唆される．

筆者らは，このような観点から，河川水等の水中に混入するウイルスを不活化させるためのモデル実験として，下水中に混入しているポリオウイルスに対する紫外線[7]，塩素[8]，オゾン[9]の効果を検討してきた．また，水中に混入している微量なウイルスを検出するには，ゼータープラスフィルターが有効であることも報告した[10]．しかし，その後の検討によりこのフィルターによるウイルスの濃縮法は，試料水の水質によりその効果に大きな差があり，本法を実用化するにはそれぞれの水質に合わせた方法の改良が必要と思われた．

そこで，実際の河川水からウイルスを検出することを意図して，実験的にポリオウイルスを添加した河川水を用いてウイルスの検出方法を検討した．その結果，ゼータープラスフィルターのウイルス捕集能力がDEAEセルロースで補強され，この組合せにより河川水中のポリオウイルスが効果的に検出されることがわかったので報告する．

材料と方法

ウイルス　夏季の一時期を除いてポリオ生ワクチン由来のウイルスが下水から高率に検出されていること[11]，およびバイオハザードの面からも取扱いが容易であることから，実験の指標ウイルスとして弱毒ポリオウイルス1型（Lsc, 2ab株）を用いた．ウイルスの培養は，BGM細胞を用い常法[12]に従って行った．供試ウイルス液の感染価は$10^{9.8}TCID_{50}/ml$であった．

フィルター　実験にはゼータープラス電位を持った直径90mmのフィルター（以下，フィルターと略記する）を用いた．このフィルターは，ゼーター電位により水中ウイルスを吸着させるようにしたもので，AMF社から「ヴァイロゾーブ　1MDS, 64085－01－1MDS」として市販されているものである．フィルターホルダーには1*l*容量の「東洋KG－90」を用いた．

DEAEセルロース　実験にはBrown社製DEAEセルロース（以下セルロースと略記する）を，0.1N NaOHと0.1N HClを用いて活性化し，蒸留水でゲル状にしたものを用いた．保存はゲル状のまま冷蔵，もしくは，凍結乾燥によった．

河川水　都内を流れる2つの河川から20*l*のポリエチレン製容器に河川水を採取し，実験室に搬入後すみやかに実験に供した．それぞれの河川水の水質は表1に示したとおりである．

ウイルスの定量　試料中のウイルス量は，BGM細胞を用いたプラック形成法により測定し，PFU単位で表

*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

表1．実験に供した河川水の水質分析結果

採取月	4月		5月		6月		7月	
河川	A	B	A	B	A	B	A	B
濁度	8.2	26	8.8	19	7.5	14	73	13
色度	8	44	9	40	14	48	18	32
pH	7.1	7.3	6.9	7.1	7.4	7.2	7.0	7.1
アルカリ度	25.5	137	16.0	140	37.5	137	24.0	117
電気伝導率	211	597	128	520	241	554	168	424
$KMnO_4$消費量	6.5	74	5.5	29	11	45	10	27
アンモニア性窒素	0.24	9.5	0.21	8.2	0.44	8.2	0.09	4.7
陰イオン界面活性剤	0.06	4.8	0.03	2.0	0.09	3.1	0.02	2.2
臭気濃度	7	60	20	200	10	200	4	200

示した．プラックの形成は，6穴のプラスチックプレート（Costar 社）を使用し，試料を1穴あたり1 m*l* ずつ接種して，37℃炭酸ガス培養器中で90分間ウイルスの吸着を行った後，常法[12]に準じて実施した．

ウイルスの回収実験　試料水に一定量のウイルスを添加し，よくかくはんした．ウイルスのフィルターへの吸着は，フィルターホルダーにフィルターをセットし，試料水を吸引ろ過することにより行った．セルロースはあらかじめ試料水に一定量を添加し，よくかくはんしておき，フィルターでろ過して回収した．ウイルスの誘出は，フィルターおよびセルロースをプラスチックシャーレに移し，誘出液を約8 m*l* 添加してもみほぐした後，しぼり取ることにより行った．誘出液は，ただちに抗生物質混合液[11]を添加後，1 N HCl で pH を7.0に補正し全容量をリン酸緩衝食塩液で10m*l* に統一した．誘出液としては，0.1 M 炭酸緩衝液（pH 8，1 %NaCl 添加）を用いた．誘出液の検討については別に報告した[10]．

結　果

セルロースの保存状態とウイルスの回収率　セルロースを手軽に使用できるようにすることと，試料水に添加する量を統一できるようにする目的で，セルロースを凍結乾燥させてウイルスの吸着効果に変化があるかどうかを検討した．結果は表2に示したとおりで，蒸留水に懸濁させ冷蔵保存しておいた場合は，ウイルスの回収率が67.4%であった．同じく凍結乾燥させた場合は57.0%であり10%程度の低下がみられた．しかし，その他の利点を考慮して以下の実験には，凍結乾燥させたセルロースを用いた．セルロースの試料水への添加量は，乾燥重量

表2．DEAE セルロースの保存状態とウイルスの回収率

保存状態	PFU(総量)	回収率(%)
対照	2,640	
蒸留水に懸濁	1,780	67.4
凍結乾燥	1,504	57.0

蒸留水500m*l* にポリオウイルスを添加し10m*l* に濃縮した．
誘出液は0.1 M 炭酸緩衝液（pH 8，1 %NaCl 添加）を用いた．
DEAE セルロースの添加量は乾燥状態で3 g とした．

で調節した．

ウイルスの回収に及ぼすセルロースの効果　実際の河川水に添加したポリオウイルスを効率よく回収する方法を検討した．実験は500m*l* の河川水に1～50PFU／m*l* の割合でウイルスを添加し，フィルターのみの場合のウイルスの回収率と，セルロースを添加した場合の回収率を比較した．結果は表3に示したとおりで，フィルターのみによるウイルスの回収率は，河川Aで7.7%から11.7%，河川Bで14.5%から32.6%の範囲となり，河川水の採取月よりも河川 AB の間の差が大きくなった．一方，セルロースを併用した場合のウイルスの回収率は，河川Aで14.3%から26.1%，河川Bで37.1%から68.7%の範囲になり，セルロースを併用するとウイルスの回収率は両河川ともほぼ2倍に上昇した．このことから，フィルター単独よりもセルロースを併用することが河川水からのウイルスの検出に有効であることがわかった．

表3．ゼータープラスフィルターによる河川水からのウイルスの回収とDEAEセルロースの効果

河川	採取月	処理	PFU（総量） 1回目	2回目	3回目	平均	回収率(%)
		対照	500	750	625	625	
A	4月	AMF	70	65	85	73	11.7
		DEAE	140	160	190	163	26.1
		対照	520	480	630	543	
B	4月	AMF	120	190	160	157	28.9
		DEAE	380	430	310	373	68.7
		対照	15,800	12,600	10,900	13,100	
A	5月	AMF	995	763	1,250	1,003	7.7
		DEAE	1,516	1,926	2,160	1,867	14.3
		対照	11,400	9,200	13,700	11,433	
B	5月	AMF	1,430	1,650	1,900	1,660	14.5
		DEAE	3,000	3,750	5,980	4,243	37.1
		対照	2,000	1,650	3,500	2,383	
A	6月	AMF	240	302	270	271	11.4
		DEAE	360	575	440	458	19.2
		対照	1,820	1,600	2,350	1,923	
B	6月	AMF	420	710	630	587	30.5
		DEAE	770	585	1250	868	45.1
		対照	3,360	2,700	2,270	2,777	
A	7月	AMF	290	160	335	262	9.4
		DEAE	420	765	660	615	22.1
		対照	2,850	3,740	4,050	3,547	
B	7月	AMF	680	1,046	1,740	1,155	32.6
		DEAE	1,050	2,340	3,210	2,200	62.0

500m*l* の河川水にポリオウイルスを添加し90㎜φのゼータープラスフィルターでろ過して10m*l* に濃縮した．
誘出液は0.1M炭酸緩衝液（pH 8，1 %NaCl 添加）を用いた．
対照：河川水に添加したウイルスの総量
AMF ：ゼータープラスフィルターのみを使用して，濃縮した時の回収ウイルス量
DEAE：DEAEセルロース 3 g を添加して濃縮した時の回収ウイルス量

フィルターによる河川水のろ過限界　実験に用いたフィルターは，試料水の電位の変化によりウイルスを吸着，あるいは誘出させる原理を利用したものであるため，フィルターの能力は，目ずまりよりも試料水の電位により差が生じると思われる．実験は，一定量のウイルスを添加した河川水のろ過容量を変化させ，ろ過量ごとのウイルスの回収率を指標にして行った．結果は表4に示したとおりで，ろ過容量ごとの回収率をみると，河川Aでは500m*l* から 1 *l* のろ過容量で最大（20.4～20.9%）となり，河川Bでは100m*l* で最大（61.7%）となった．このことから，直径90㎜のフィルターではろ過容量が 1 *l* を超えるとウイルスの捕集能力が低下することがわかった．

フィルターを重ねた時の効果　フィルターのウイルス捕集能を増強させるために，フィルターを2枚重ねにして，上部のフィルターに吸着しなかったウイルスを下部のフィルターが捕集できるかどうかを検討した．実験はフィルターホルダーにフィルターを2重にセットし 1 *l* の試料水をろ過し，各々のフィルターから別々にウイルスを回収することにより行った．結果は表5に示したとおりで，1枚目のフィルターでの回収率は10.9から28.5%であったのに対し，2枚目のフィルターでは1.3から3.3%となった．このことから，フィルターを2枚重ねにしても，下部のフィルターが上部のフィルターを補強する効果はないことがわかった．

表4．ゼータープラスフィルターによる河川水のろ過容量とウイルスの回収率

河　川	採取月	ろ過容量	PFU（総　量）			回収率(%)
			1回目	2回目	平均／l	
A	6月	対　照	2,640	3,340	2,970	
		100ml	26	18	220	7.4
		500ml	296	310	606	20.4
		1l	520	720	620	20.9
		2l	824	996	455	15.3
		3l	614	502	186	6.3
B	6月	対　照	2,210	2,994	2,575	
		100ml	192	126	1,590	61.7
		500ml	286	410	696	27.0
		1l	760	912	836	32.5
		2l	924	1,120	511	19.8
		3l	1,152	1,784	489	19.0

一定のポリオウイルスを添加した河川水10lをあらかじめ調製しておき，各実験容量の河川水を90mmφのゼータープラスフィルターでろ過し10mlに濃縮した．
対照のPFUは河川水1l当りのプラック数で表示した．実験系のPFUは各実験容量において回収したウイルスの総量であり，PFUの平均値は検水1l当りに換算して表示したものである．
誘出液は0.1M炭酸緩衝液（pH 8，1％NaCl添加）を用いた．

表5．ゼータプラスフィルターを重ねて使用した時の回収率

河　川	採取月	方　法	PFU（総量）	回収率（%）
A	7月	対　照	2,300	
		1枚使用	220	9.6
		2枚重ねの上	250	10.9
		2枚重ねの下	30	1.3
B	7月	対　照	2,500	
		1枚使用	550	22.0
		2枚重ねの上	712	28.5
		2枚重ねの下	82	3.3

河川水1lにポリオウイルスを添加し90mmφのゼータープラスフィルターでろ過して10mlに濃縮した．
誘出液は0.1M炭酸緩衝液（pH 8，1％NaCl添加）を用いた．

考　察

セルロースの凍結乾燥保存は，化学的安定性から考えると決してよい方法とはいえない．しかし，水中ウイルスの吸着に使用する場合は，今回の実験でも蒸留水500mlに対して2,640PFU添加したウイルスの回収率が57％あったことから，それほどその活性に影響しないと思われる．さらに，凍結乾燥によるセルロースの保存は，長期間保存できるため一度にまとめてセルロースの活性化処理ができる．試料水に添加するセルロースの量を容易にコントロールできる等の利点がある．

フィルターによる河川水からのウイルスの回収率は，試料水の違いによって差が認められたが，同一の河川であれば採取月が異っても比較的バラツキは小さいものと思われる．つまり，水質の違いによってウイルスの回収率は変化したが，同一河川である限り大きな変化はなかった．

セルロースの併用は，フィルター単独でウイルスを回収するよりも，回収率を2倍程度増加させる効果があった．このことから，セルロースは河川水からのフィルターによるウイルスの回収において，試料水に含まれているウイルス吸着妨害物質の影響を抑える効果があるものと思われる．

試料水の水質とウイルスの回収率の相関は，両河川ともはっきりしなかった．むしろ，水質そのものは河川Bの方がAよりはるかに悪いのに，ウイルスの回収率はBの方がよい，という結果になった．この点に関しては今後の検討課題として残された．

直径90mmのフィルターを使用して河川水中のウイルスを検出する場合，その試料水の容量は1*l*以下がよいことがわかった．この容量を通常のウイルス検査に使用するカートリッジタイプのフィルターに換算すると138*l*となる．すなわち，直径90mmのフィルターの場合その有効ろ過面積が約50cm²となり，カートリッジフィルターは長さ300cm幅23cmであるので6900cm²となる．従って，6900／50＝138倍となり，138*l*以下がカートリッジタイプのフィルターにおけるろ過容量の限界となることが推定される．

今回検討したセルロースによる河川水中のウイルス検出方法について，その実用的な利点をあげてみると，①誘出液量が少なくてすむので二次濃縮の必要がない．②ウイルスの回収率が上昇する．③コストが安い．④操作が容易である等が考えられる．

結　論

2か所の異なる河川から河川水を採取しポリオウイルスを添加して，添加ウイルスを回収する実用的な方法について検討し，以下の結果を得た．

1）ゼータープラスフィルター（AMF社：ヴァイロゾーブ　1MDS）で河川水に添加したウイルスを回収すると，回収率は河川によって差があり，河川Aでは7.7%～11.7%，河川Bでは14.5%～32.6%となった．

2）ゼータープラスフィルターのウイルス捕集能をDEAEセルロースで補強すると，添加ウイルスの回収率は，河川Aで14.3～26.1%，河川Bで37.1～68.7%となり，フィルターのみの場合に比べて2倍程度上昇した．

3）河川水中のウイルスは，試料水が500m*l*から1*l*の範囲であれば，試料水にDEAEセルロースを3g添加しかくはん後，直径90mmのゼータープラスフィルターでろ過してウイルスをフィルターに吸着させ，吸着したウイルスを0.1M炭酸緩衝液（pH8，1% NaCl添加）で10m*l*に誘出すれば効率よく検出できることがわかった．

文　献

1）日本水道協会：上水試験方法，656，1985，東京
2）Floyd, B. T.: *J. AWWA*, 66,306,1974
3）James, H. M.: *J. AWWA*, 66,693,1974
4）Mahdy, M. S.: *J. AWWA*, 71,445,1979
5）Grabow, W. O. et al.: *Wat. Tech.*, 10,389,1978
6）関根整治ほか：第33回日本ウイルス学会演説抄録，4060,1985
7）矢野一好ほか：用水と廃水，27,596,1985
8）矢野一好ほか：用水と廃水，27,693,1985
9）矢野一好ほか：用水と廃水，27,1256,1985
10）矢野一好ほか：用水と廃水，28,183,1986
11）矢野一好ほか：用水と廃水，27,489,1985
12）国立予防衛生研究所学友会：ウイルス実験学各論，1982，丸善，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 54-59, 1986

各種動物における *Chlamydia psittaci* の抗体保有状況

神崎政子*, 丸山務*,
高島郁夫**, 橋本信夫**, 萩原敏且***

Seroepidemiological Survey on Chlamydia psittaci Infection in Various Animals and Birds

MASAKO KANZAKI*, TSUTOMU MARUYAMA*,
IKUO TAKASHIMA**, NOBUO HASHIMOTO** and TOSHIKATSU HAGIWARA***

During period from 1978 to 1985, a total of 1,810 animal and bird sera was studied for the incidence of *Chlamydia psittaci* complement-fixing antibody by the use of tissue culture antigen. Animals sera studied were dogs obtained from and cats collected from all over the country, pigeons captured at five places in Tokyo and 20 species of animals being kept at two zoos in Tokyo. In this survey, the specimens which had 1:8 or higher titer were regarded as positive.

Consequently, the sera from 116 (28.9%) out of 401 pet dogs, 124 (32.0%) of 387 stray dogs, 27 (5.9%) of 460 pet cats and 21 (6.4%) of 329 stray cats showed positive results respectively. As for feral pigeons, 94 (52.2%) of 180 were found to be positive. Of 53 animals of 20 species of the zoos, 18 animals of 11 species were positive. The animals studied were mainly sheep, monkeys, an elephant, etc.

Keywords: serological survey, *Chlamydia psittaci*, complement fixing antibody, dog, cat, pigeon

緒　言

オウム病は古くから知られている人畜共通感染症の1つであり，世界各国で主に愛がん鳥からヒトへの感染例が数多く報告されている[1-6]．わが国でも最近のペットブームを反映して本症が増加の傾向にあり，死亡例も発生していることから社会的関心が寄せられている．このような背景から愛がん鳥を中心に鳥類については *Chlamydia psittaci* の分離，血中抗体価の測定など疫学的調査が積極的に進められ，鳥類における感染実態はかなり正確に浮彫りにされてきた[7,8]．

一方，オウム病の病原体 *C. psittaci* は元来鳥類を感染宿主としているが，ヒトをはじめ哺乳動物一般にも感染性があり，各種動物におけるオウム病の症例あるいはそれらからのヒトへの感染例も知られている[9-12]．

そこで著者らは愛がん鳥以外で人の生活に最も密接なペット動物における *C. psittaci* の感染実態を把握する目的で，今回はイヌおよびネコにおける血中抗体価を測定して血清疫学的調査を行った．同時に鳥類ではオウム・インコ類に次いで重要な感染源であるといわれる市街地に生息するドバトについて，また都内の動物園で飼育，展示されている動物についても同様の調査を行ったので併せて報告する．

材料および方法

被検血清

イヌおよびネコの血清：1983年に日本獣医師会が厚生省依託研究事業として実施した人畜共通伝染病感染動物に関する実態調査の際に全国11都道府県の開業獣医師の協力のもとに収集されたもので，対象動物は飼育中とい

*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
**北海道大学獣医学部
***国立予防衛生研究所獣疫部

うことからこれを飼育犬および飼育猫と仮称した．いずれも1983年10月から12月の3ケ月間に採取されたもので，飼育犬が401，飼育猫が460検体である．また1978年から1985年の8年間に東京都動物管理事務所に引き取られまたは収容されたものを収容犬および収容猫と仮称し，それぞれから採取した387，329検体で合計イヌが788，ネコが789検体である．

ハトの血清：1985年1月から1986年3月までに都内4ケ所の動物園を含む公園内および1ケ所の神社境内で捕獲したドバトより採取した計180検体である．

動物園で飼育されている動物の血清：都内2ケ所の動物園で飼育，展示されている動物より採取した20種53検体である．

抗体価測定

C. psittaci に対する抗体価の測定は補体結合反応(CF)により行った．CF試験は50%溶血法によるマイクロ法[13]によった．

抗原はセキセイインコ由来 *C. psittaci* Izawa−1株をL−929細胞で増殖させβ−プロピオラクトンで不活化後，分画遠心し部分精製したもの[14]を使用した．

被検血清の非働化は56℃30分で行い，抗補体作用のあるものはトリプシンを0.05%の割合で加え，再度56℃30分間加温し，抗補体作用を除いて試験に供した．

CF価は血清希釈1：8を陽性限界とし，すべての血清はまず1：8でスクリーニングを行い，陽性のものについては直ちに定量を行って抗体価を測定した．

成　績

イヌおよびネコにおける *C. psittaci* の抗体保有状況

飼育犬については全国11都道府県から集められた401検体を県別に供試数，陽性数，陽性例の抗体価を Table 1に示した．地域別の陽性率は6.9〜53.7%とかなりの幅がみられたが，平均で28.9%であった．全国の陽性数116検体のうち，1：8〜1：16の低い CF 価を示すものが107例，陽性例全体の92.2%を占め，最も高いものでも1：64にとどまった．

同様全国の飼育猫についての成績を Teble 2 に示した．11都道府県の地域別 CF 抗体陽性率は0〜13.3%であったが，全国の総計では460検体中27例，平均で5.9%であった．陽性例27の抗体価の内訳は21例までが1：8であり，1：16が6例で，1：32以上はみられなかった．

陽性率の高かった飼育犬について，表には示さなかったが，陽性例の年令分布を調べてみると供試数に対する陽性数の割合は3才以下では30%以上で低年令の方が高く，加令に従って低くなる傾向がみられた．

その他雌雄別，飼育形態別に分類を試みてみたが，いずれも有意の差はみられなかった．

Table 1. Distribution of Complement Fixing Antibody Titers against *Chlamydia psittaci* in Pet Dogs in Japan

Prefectures	No. of sera examined	No. of positive* sera (%)	Antibody titers					
			＜1：8	1：8	1：16	1：32	1：64	≧1：128
Hokkaido	43	13(30.2)	30	9	2	1	1	0
Miyagi	29	2(6.9)	27	2	0	0	0	0
Saitama	43	11(25.6)	32	6	4	1	0	0
Tokyo	27	6(22.2)	21	5	1	0	0	0
Kanagawa	35	12(34.3)	23	8	4	0	0	0
Niigata	47	10(21.3)	37	6	2	2	0	0
Aichi	34	9(26.5)	25	2	7	0	0	0
Hyogo	32	12(37.5)	20	11	0	1	0	0
Hiroshima	33	6(8.2)	27	4	2	0	0	0
Kagawa	41	22(53.7)	19	13	6	1	2	0
Fukuoka	37	13(35.1)	24	11	2	0	0	0
Total	401	116(28.9)	285	77	30	6	3	0

*Titers ≧1：8 are regarded as positive

Table 2. Distribution of Complement Fixing Antibody Titers against *Chlamydia psittaci* in Pet Cats in Japan

Prefectures	No. of sera examined	No. of positive* sera (%)	Antibody titers			
			＜1：8	1：8	1：16	≧1：32
Hokkaido	48	2(4.2)	46	2	0	0
Miyagi	38	0	38	0	0	0
Saitama	45	2(4.4)	43	0	2	0
Tokyo	40	1(2.5)	39	0	1	0
Kanagawa	44	3(6.8)	41	2	1	0
Niigata	46	6(13.3)	40	6	0	0
Aichi	24	2(8.3)	22	1	1	0
Hyogo	55	4(7.3)	51	4	0	0
Hiroshima	27	1(3.7)	26	1	0	0
Kagawa	50	4(8.0)	46	3	1	0
Fukuoka	43	2(4.7)	41	2	0	0
Total	460	27(5.9)	433	21	6	0

*Titers ≧1：8 are regarded as positive

飼育猫についても同様の検討を行ったが，陽性例の特徴を見出すことはできなかった．

一方，1978年から1985年の8年間に東京都の収容犬387検体について同様の調査を行った成績をTeble 3に示した．陽性数は124例，平均陽性率32.0%であった．この陽性率は1978年の20.2%が，年代とともに漸次増加し，1985年では52.6%となった．陽性例の抗体価は1：8が陽性例全体の67.7%，1：16が27.4%，1:32が4.8%であった．

また，東京都の収容猫については，1982年から1985年までの4年間の成績を年次ごとに分けてTable 4に示した．計329検体中陽性は21例，陽性率6.4%であり，年ごとの陽性率は3.3～8.1%の変動がみられた．陽性例の抗体価は21例の半数以上が1：8であったが，1：32以上が7例あり，最高値1：256を示したものが2例みられた．

ハトにおける *C. psittaci* 抗体保有状況

調査対象とした4ケ所の公園のうち1ケ所（Park 1）は1985年1月から1986年3月までに3回にわたって，他の3ケ所の公園，1ケ所の神社は各1回ずつドバトを計180羽補獲し，それぞれ調査時期ごとに検体数，陽性数，陽性例の抗体価を分けてTable 5に示した．陽性率は場所によって21.4%から69.6%まで，また同一場所でも採取時期によって28.6%から59.8%までの差がみられた．平均では計180検体中94例（52.2%）が陽性であった．陽性94例の中で，1：32以上の抗体価を示すものが31例あり，1：64と1：128が各々5例ずつみられた．

動物園に飼育されている動物における *C. psittaci* 抗体保有状況

動物園に飼育，展示されている動物20種53検体の成績をTable 6に示した．

陽性であった動物種はコンゴウインコScarlet macawをはじめサルPatas monkey等，ゾウIndian elephantなど20種中11種であった．1：32の高い抗体価を示したものはヒツジであった．

考　察

C. psittaci は鳥類を自然宿主とし，ヒトのオウム病もそのほとんどが鳥類，特に愛がん鳥からの感染のため，当然のことながらその血清疫学的調査も鳥類を中心に進められてきた．最近になって，愛がん動物であるイヌやネコにも感染例が報告され[9,15-18]，これらの動物からヒトへの感染が示唆されるようになり[9]，オウム病の予防対策が鳥類ばかりでなく少くとも哺乳愛がん動物にまで拡大しなければならないすう勢にある．

しかしながらイヌやネコにおけるクラミジアに関する調査研究は極めて乏しく，特に我国における血清疫学的

Table 3. Incidence of Complement Fixing Antibody Titers against *Chlamydia psittaci* in Stray Dogs in Tokyo during 1978 through 1985

Year	No. of sera examined	No. of positive* sera (%)	Antibody titers				
			< 1 : 8	1 : 8	1 : 16	1 : 32	≧ 1 : 64
1978	173	35 (20.2)	138	27	8	0	0
1979	4	1 (25.2)	3	1	0	0	0
1982	97	35 (36.1)	62	25	8	2	0
1984	94	43 (45.7)	51	24	15	4	0
1985	19	10 (52.6)	9	7	3	0	0
Total	387	124 (32.0)	263	84	34	6	0

*Titers ≧ 1 : 8 are regarded as positive

Table 4. Incidence of Complement Fixing Antibody Titers against *Chlamydia psittaci* in Stray Cats in Tokyo during 1982 through 1985

Year	No. of sera examined	No. of positive* sera (%)	Antibody titers						
			< 1 : 8	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	≧ 1 : 256
1982	146	9 (6.2)	137	7	1	0	0	1	0
1983	42	2 (4.8)	40	1	0	0	1	0	0
1984	111	9 (8.1)	102	3	1	1	2	0	2
1985	30	1 (3.3)	29	1	0	0	0	0	0
Total	329	21 (6.4)	308	12	2	1	3	1	2

*Titers ≧ 1 : 8 are regarded as positive

Table 5. Incidence of Complement Fixing Antibody Titers against *Chlamydia psittaci* in Feral Pigeons Inhabited at Five parks in Tokyo

Places	Date of examined	No. of sera examined	No. of positive* sera (%)	Antibody titers						
				< 1 : 8	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	≧ 1 : 256
Park 1	Jan.–Apr.,1985	10	5 (50.0)	5	1	0	1	1	2	0
Park 1	July–Sept.,1985	14	4 (28.6)	10	1	2	1	0	0	0
Park 2	Oct.,1985	14	3 (21.4)	11	1	1	0	0	1	0
Shrine 1	Dec.,1985	18	6 (33.3)	12	4	1	1	0	0	0
Park 1	Mar.,1986	82	49 (59.8)	33	11	23	12	2	1	0
Park 3	Mar.,1986	23	16 (69.6)	7	3	10	3	0	0	0
Park 4	Mar.,1986	19	11 (57.9)	8	1	4	3	2	1	0
Total		180	94 (52.2)	86	22	41	21	5	5	0

*Titers ≧ 1 : 8 are regarded as positive

Table 6. Distribution of Complement Fixing Antibody Titers against *Chlamydia psittaci* in Various Animals in Two Zoos

Species of animals	No. of sera		Antibody titers				
	examined	positive*	<1:8	1:8	1:16	1:32	≧1:64
Pig-tailed macaque *Macaca nemestrina*	1	0	1	0	0	0	0
atas monkey *Erythrocebus patas*	4	2	2	1	1	0	0
Hamadryas baboon *Papio hamadryas*	4	1	3	1	0	0	0
Sheep *Ovis aries*	8	6	2	2	2	2	0
Goat *Capra hircus*	2	1	1	1	0	0	0
White-tailed deer *Odocoileus virginianus*	1	1	0	0	1	0	0
Indian elephant *Elephas maximus*	6	2	4	2	0	0	0
Black panther *Panthera pardus*	1	1	0	1	0	0	0
Chinese leopard *Panthera pardus japonensis*	2	1	1	1	0	0	0
Tigar *Panthera tigris*	3	1	2	1	0	0	0
Puma *Felis concolor*	6	0	6	0	0	0	0
Ocelot *Felis pardalis*	1	0	1	0	0	0	0
Linx *Felis linx*	2	0	2	0	0	0	0
Wolf *Canis lupus*	1	0	1	0	0	0	0
Dhole *Cuon alpinus*	1	0	1	0	0	0	0
Fox *Vulpes vulpes*	1	0	1	0	0	0	0
Sea lion *Zalophus californianus*	1	1	0	0	1	0	0
Koala *Phascolarctos cinerus*	5	0	5	0	0	0	0
Scarlet macaw *Ara macao*	2	1	1	1	0	0	0
Blue and yellow macaw *Ara rauna*	1	0	1	0	0	0	0
Total	53	18	35	11	5	2	0

*Titers ≧ 1:8 are regarded as positive

調査はFukushiら[19]，田村[18]の報告のみである．このような背景から愛がん動物における*C. psittaci*の感染実態を把握しておくことは予防対策上も重要である．

今回，著者らが行った*C. psittaci*に対する各種動物での抗体保有調査結果から，まず，1983年に全国の家庭で飼育中のイヌでは地域によって多少の差異はあるが，その陽性率は平均で28.9%であり，飼育猫では5.9%であった．また，東京都の動物管理事務所に1978年から1985年までの間に収容された犬では32.0%，同様に猫では6.4%で，これらの陽性率はいずれもFukushiら[19]の報告よりも高い値であった．しかしながらイヌでの抗体陽性率がネコのそれに対し約5倍であったことは一致した成績であった．一方，抗体価をみるとイヌでは1:16以下の低い値がそのほとんどを占め，飼育犬，収容犬あわせて1:8以上の陽性例240例中225例，94%で，1:32倍以上は15例，6%に過ぎない．これに対し，ネコでは陽性例48例のうち1:32以上が7例，15%で，しかも1:128～1:256の高いCF価を示すものが3例もあった．つまり，イヌでは陽性率そのものは高いがその抗体価は低く，ネコでは陽性率は低いが，陽性例のものではその抗体価は概して高いという成績であった．このことはイヌよりネコでの症例報告[9,16-18]が多いことと照らしあわせて興味深い．

ハト，特に市街地に生息するドバトは*C. psittaci*の感染率が愛がん鳥であるオウム・インコ類に次いで高いことは我国でもしばしば指摘され[20-22]，ハトからと思われるヒトへの感染症例も報告されている[2,5]．今回，1985年から1986年にかけて東京都内5ケ所の公園や神社で捕獲されたドバト180羽の抗体陽性率は52.2%であり，抗体価も1:32以上が陽性例の33.0%を占めていたことから，ドバトにおける*C. psittaci*の感染率の高いことが再確認された．愛がん鳥のほとんどは家庭内で飼育されているので，家庭内では濃厚に接触するものの，その人数は限られるのに対し，ドバトは公園，動物園，神社仏閣等多数の人の集まる場所で広範囲に排泄物を散布するので直接ヒト，その他の動物への影響ばかりでなく，ドバトの行動から病原体の拡散の役目を担い，公衆衛生学的にはより重要な存在といえよう．

C. psittaci は鳥類ばかりでなく哺乳動物にも広く感染性のあることは古くから知られている事実であるが，動物園で飼育されている各種動物における抗体保有状況を調査した報告はこれまでにない．今回の調査対象とした動物種は本研究のために計画的に選択されたものではなく，さまざまな理由によって収集された血清ではあるが，陽性例は11種18検体および *C. psittaci* の感染域の広さを示している．これらの動物で比較的高い抗体価を示しているヒツジから陰性であったコアラにいたるまで，何らオウム病を疑わせる症状は確認できなかった．なお，コアラについてはオーストラリアで結膜炎等のクラミジア性疾患が問題となっているが，1985年から1986年に輸入された3個体から2回にわたって採取されたものを含めて計5検体供試したが，いずれも陰性であった．動物園内の動物間での感染の広がりは，陽性個体との接触もあり得るが，園内に生息するドバトを含めた野生鳥類の存在も無視できない．

結　　論

各種動物における *Chlamydia psittaci* の感染状況を知る目的で，組織培養抗原を用いた補体結合反応（CF）による血清疫学的調査を行った．

CF 価 1：8 以上の陽性は，イヌでは1983年に全国から集められた飼育犬401検体中116例（28.9%），1978～1985年の東京都の収容犬387検体中124例（32.0%）であった．ネコでは1983年に集められた全国の飼育猫460検体中27例（5.9%），1982～1985年の東京都の収容猫では329検体中21例（6.4%）が陽性であった．一方，1985～1986年にかけて，東京都内の5カ所の公園および神社で捕獲されたドバト180検体中94例（52.2%）が陽性であった．また，都内の動物園で飼育されている動物20種53検体のうち11種18検体が陽性であり，その主な動物種はヒツジ，サル，ゾウなどであった．

謝　辞　本研究にあたり動物血清の採取に御協力いただいた当研究所環境保健部関　比呂伸研究員，東京都動物管理事務所動物愛護センター，恩賜上野動物園，多摩動物公園の関係各位ならびに日本獣医師会に深謝いたします．（本研究の一部は第101回日本獣医学会総会，昭和61年4月で発表した．）

文　　献

1）Eugster, A. K.: *Handbook Series in Zoonoses, Section A*, 365, 1980, CRC Press, Florida
2）徐　慶一郎：ウイルス，31,21,1981
3）Harris, J. W.: *Wld Poult. Sci. J.*, 39, 5 ,1983
4）Matsumoto, A., Bessho, H., Soejlma, R. and Hino, J.: *Kawasaki Med. J.*, 10,77,1984
5）金沢　裕：臨床と細菌，11,297,1984
6）平井克哉，島倉省吾，福士秀人：日獣会誌，38，147,1985
7）平井克哉：鶏病研究会報，21(2),59,1985
8）萩原敏且，志賀定祠，赤尾頼幸，高島郁夫，橋本信夫，福士秀人，平井克哉：動物，鳥類，魚介類のクラミジア感染症に関する疫学的研究・研究成果報告書，26，岐阜大学農学部，1986
9）Schachter, J., Ostler, H. B. and Meyer, K. F.: *Lancet*, 1 ,1063,1969
10）Shewen, P. E.: *Can. Vet. J.*, 21 , 2 ,1980
11）Schachter, J. and Caldwell, H. D., : *Ann. Rev. Microbiol.*, 34,285,1980
12）Johnson, F. W. A.: *Br. Vet. J.*, 139,93,1983
13）井上　栄：微生物検査必携　ウイルス・リケッチア検査（第2版），日本公衆衛生協会，1978
14）Chiba, N., Takashima, I., Arikawa, J. and Hashimoto, N.: *Microbiol. Immunol.*, 28,1273,1984
15）Fraser, G., Norval, J., Withers, A. R. and Gregor, W. W.: *Vet. Rec.*, 85,54,1969
16）Wills, J., Gruffydd-Jones, T. J., Richmond, S. and Paul, I. D.,: *Vet. Rec.*, 114,344,1984
17）Gaillard, E. T., Hargis, A. M., Prieur, D. J., Evermann, J. F. and Dhillon, A. S.: *Am. J. Vet. Res.*, 45, 2314,1984
18）田村　弘，小動物臨床，4(6),25,1985
19）Fukushi, H., Ogawa, H., Minamoto, N., Hasimoto, A., Yagami, K., Tamura, H., Shimakura, S. and Hirai, K.: *Vet. Rec.*, 117,503,1985
20）三宅恭司，石原佑戈，藤浦　明，井上裕正：感染症誌，57,788,1983
21）Fukushi, H., Itoh, K., Ogawa, Y., Hayashi, Y., Kuzuya, M., Hirai, K. and Shimakura, S.: *Jpn. J. Vet. Sci.* 45,847,1983
22）Chiba, N., Arikawa, J., Takashima, I. and Hashimoto, N.: *Jpn. J. Vet. Sci.* 46,243,1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 60-68, 1986

スポット法に基づいた神経芽細胞腫のマス・スクリーニング検査成績

武士俣 邦 雄*, 高 野 弘 紀*, 大 橋 誠*
峰 岸 正 子**, 石 塚 実**, 長 岡 常 雄**

Results of Mass-screening to Detect Neuroblastoma by Means of a Spot Test for Urinary Vanillylmandelic Acid

KUNIO BUSHIMATA*, HIROKI TAKANO*, MAKOTO OHASHI*,
MASAKO MINEGISHI**, MINORU ISHIZUKA** and TSUNEO NAGAOKA**

Keywords：神経芽細胞腫 neuroblastoma, 尿中バニリルマンデリン酸 urinary vanillylmandelic acid, スポット法 spot test

われわれは，昭和58年10月から，小児固形ガンの1つである神経芽細胞腫のマス・スクリーニング検査を，多摩および島しょ地区に居住する乳児を対象に，担当の保健所ならび保健相談所を窓口にした行政事業として行っている．また，当所においては，23特別区のうち，新宿区および文京区についても，両区の要請にもとづいて同検査を行っている．

この腫瘍は，予後がきわめて不良で[1]悲惨であるが，早期に発見して加療することによって，完治することが期待できると云われている[2]．また，その罹患率は，ほかの難治性小児疾患のそれに比べると比較的高く[3]，約2万人に1例であると報告[4]されていた．しかし，厚生省の全国規模のマス・スクリーニング検査の結果によれば，最近では15,000人の小児に対して1例の割合で発見されていると云われている．なお，厚生省「神経芽細胞腫マス・スクリーニング研究班」による発見症例の調査表の集計によれば，地域的には関西や北海道(札幌市)からの報告が多いことが認められている．

前記の，東京都におけるスクリーニングの結果，昭和61年1月に1症例を発見したので，昭和61年3月末日までに当所で行った検査成績の解析結果と合わせて報告する．

研究方法

1．検査の対象および材料：すでに報告した様式にもとづいて，当所に搬入される尿検体ろ紙を材料として，検査を行った[5]．対象は前記地域内に居住する6ケ月児である．

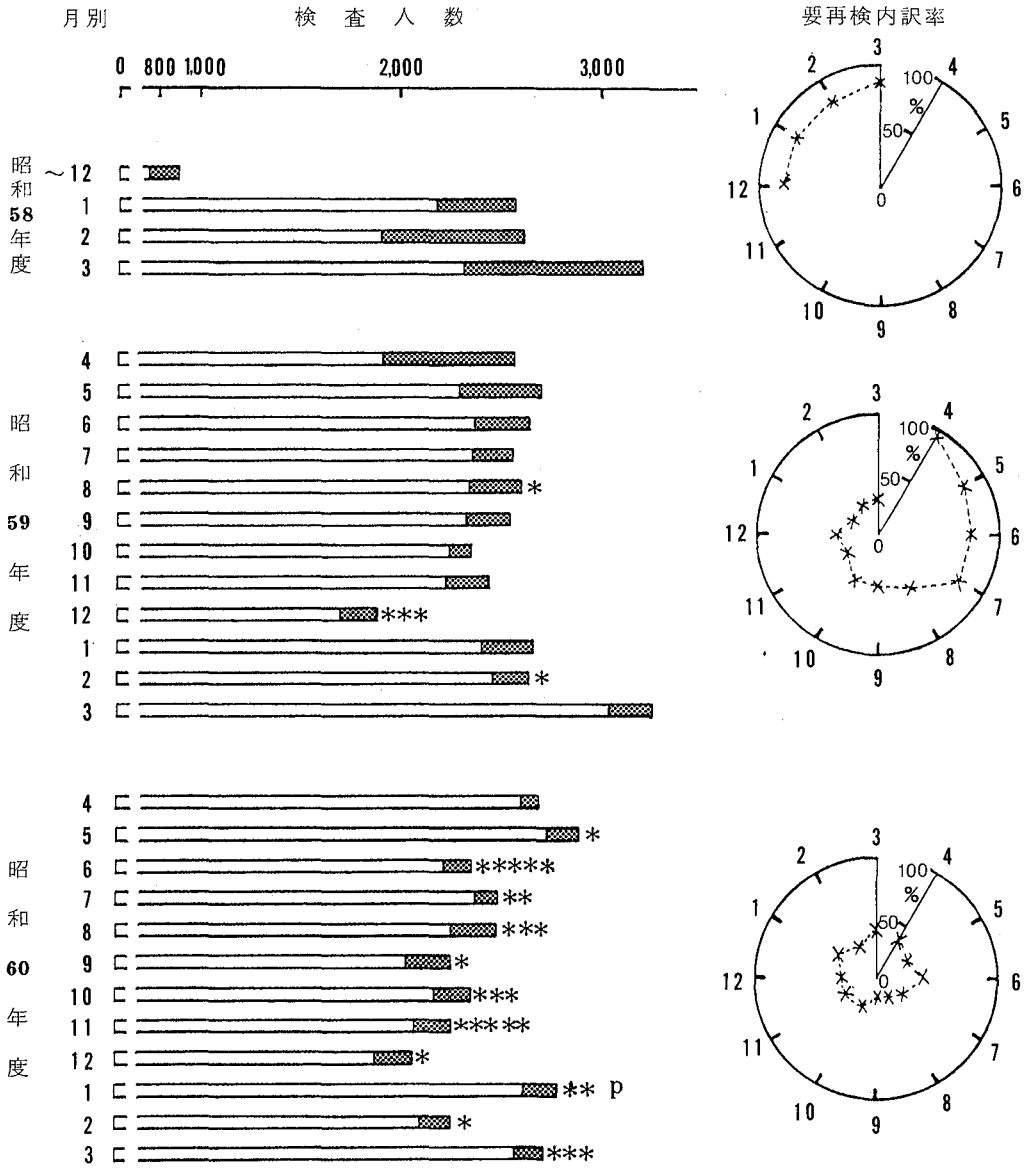
2．検査方法：本腫瘍においては，カテコールアミンの代謝が亢進されるものが多いことから，その終末代謝産物の尿中排出量の増加が有るか否かの検査にもとづいて，患児の検索を行う．すなわち，カテコールアミン代謝終末産物のうちのバニリルマンデリン酸を，化学的にジアゾ化合物として発色させて検出する方法のうち，Studnitz ら[7]の発色試薬を用いるスポット法[8]に従って成績の判定を行った．なお，検査成績の判定が困難あるいは腫瘍が疑われるような被検体については，著者が開発したペーパー円形展開処理[9]を発色部に施し，呈色の鮮明化を計ってから判定する方法[10]をとった．

結果および考察

1．検査の実施状況

本事業を開始して以来，昭和61年3月末日までの2年半の間に，76,578人(行政事業としての多摩および島しょ地区の70,443人ならびに受託検査である新宿区の4,019人および文京区の2,116人)の乳児について検査を実施した．各年度における月別の検査申請人数および検査成績の内容ならびに医療機関における精密検査の受診を必要とした被検者数などの推移を，図1.および図2.に示す．

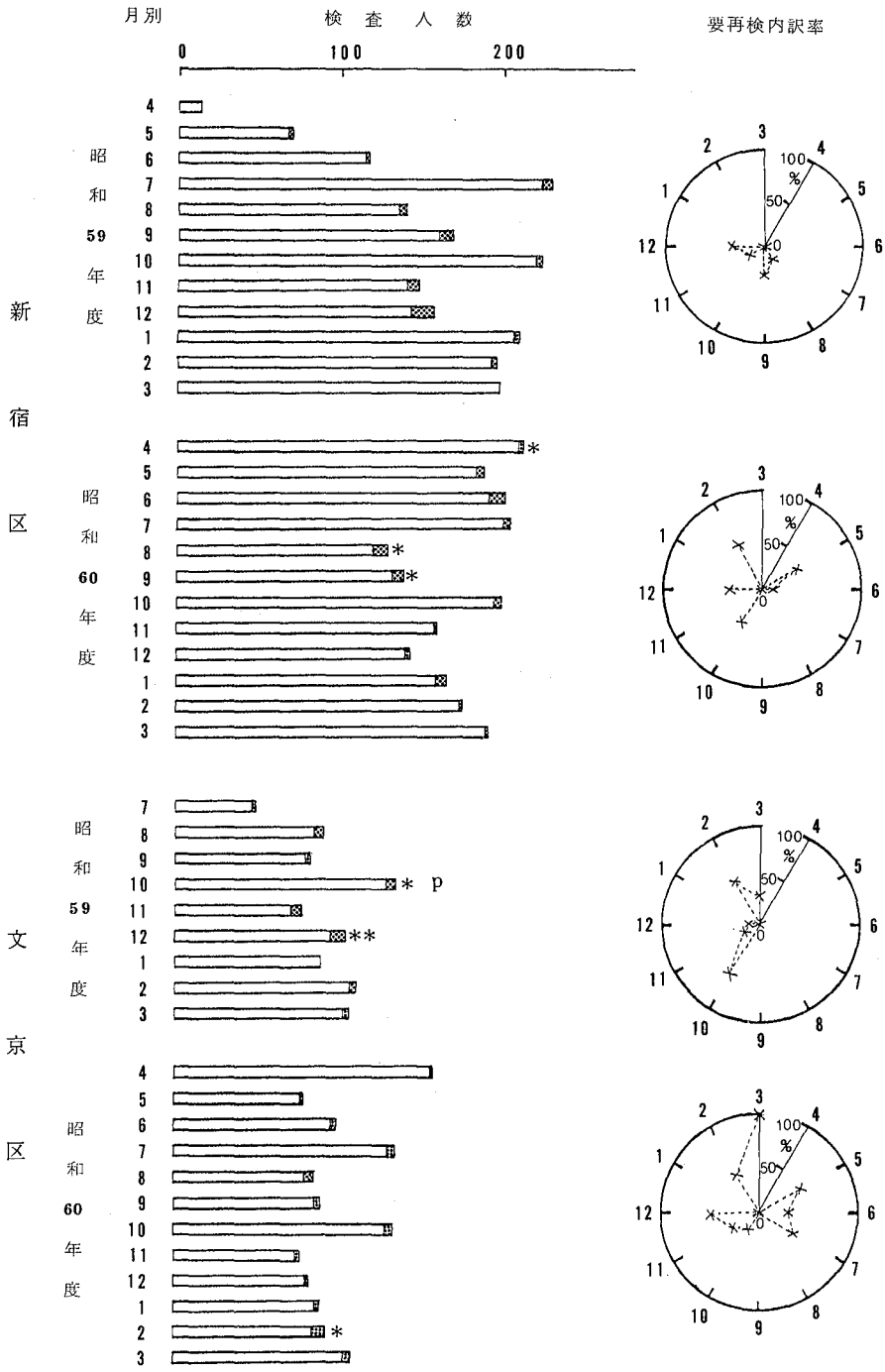
*東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
**東京都衛生局公衆衛生部母子衛生課



▒▒ 部分：要再検査検体数
＊：要臨床精密検査(印１個は１人を表す)
P：患児発見

破線外側：食事制限不良
破線内側：検体不良

図１．多摩および島しょ地区の月別の神経芽細胞腫スクリーニング検査動態



▩部分：要再検査検体数
＊：要臨床精密検査(印1個は1人を表す)
P：患児発見
破線外側：食事制限不良
破線内側：検体不良

図2．新宿区および文京区の月別の神経芽細胞腫スクリーニング検査動態

図1.に示したように，多摩および島しょ地区の検査動態において，各年度ともに12月の検査実施人数が減少しているのに対して1月に増加しているのは，年末年始の休暇にともなう受け付け業務の一時停止にもとづいた検体の滞留による現象である．

また，この図1.に示した多摩および島しょ地区における年度別の初回検査申請人数は，昭和58年度は第4四半期が主体である9,351人にとどまったが，年間を通じて検査を行うようになった昭和59年度の31,141人に対し，昭和60年度は前年度よりも1,190人少ない29,951人であった．なお，多摩および島しょ地区における本検査の受検該当乳児[5]に対するろ紙の配布数は，昭和59年度分39,360枚および昭和60年度分40,545枚であった．この検査用ろ紙の配布枚数および前述の初回検査申請人数にもとづいて，両年度における受検率を算出すると，昭和59年度の79.12％に対し，昭和60年度の73.87％は前年度よりも5.25％も低かった．この両年度における初回検査受検率の5.25％という差は，前述した初回検査申請乳児人数の両年度の差である1,190人のほぼ2倍に相当するものであった．このように検査申請人数が急激に減少した理由は不明であるが，今後保護者に対して本検査の意義の説明を強化し，意識の高揚を計り，受検をうながすなど広報活動の必要性を認識させられたところである．

2．再検査の理由およびその頻度

初回検査で要再検査として判定された検体数およびそれらの被検者のくり返し受検状況ならびに検査終結率を表1.に示す．

多摩および島しょ地区の初回検査における要再検率は，年度を経るに従って急激に低下していることがうかがわれる．しかし，その率が最も低かった昭和60年度の6.46％でさえ，新宿区の昭和60年度の2.65％に比べると，約2.5倍も高いものであった．

そこで，初回検査において要再検査として判定した理由について分析を行った．まず，再検査を必要とした理由を，食べ物の制限が不完全なために偽陽性反応が現われて判定が出来なかった検体群(以下食事制限不良検体と記す)および検体ろ紙の作製にあたって，検査用のろ紙に脱脂綿あるいはオムツなどを押し当てたり，ろ紙をオムツと一緒に当てたために検査に適した尿スポットが得られていないもの，尿滴下量の過少過多，希薄尿，尿滴下後長期経過したもの，さらにはろ紙に香料を散布したものなどの検体群(以下検体不良と記す)に大別した．それぞれの理由による件数は比率化して，図1.および図2.の右側に半径分割グラフにして示した．図1.の多摩および島しょ地区のグラフでは，検査を開始してから月を経るに従って，破線の内側(検体不良)が渦状に減少してゆくのに対し，図2.の新宿区および文京区のそれは不規則な突起状を示して推移している．

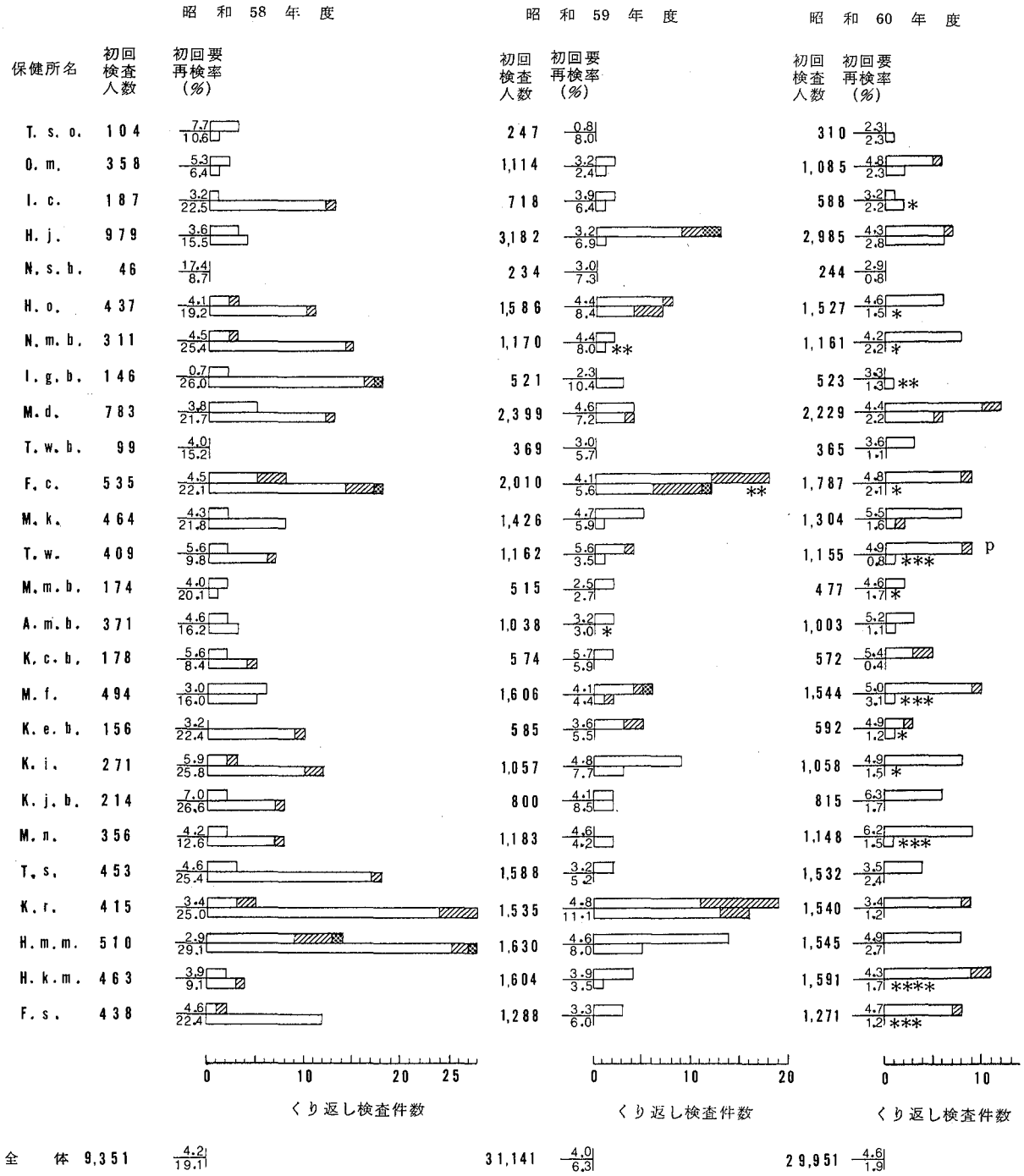
多摩および島しょ地区の初回検査における要再検査検体の出現率が，年度を径るに従って急激に低下したのは，図1.に示したように検体不良による検体の比率の低下による．この変化を検体数として観察すると，検体不良による要再検査検体は，昭和59年度に1,938件であったものが，昭和60年度には約1/4の561件に減少している．これに反し，食事制限の不良による検体は，昭和59年度の1,257件が昭和60年度には1,373件あり，116件増加している．すなわち，多摩および島しょ地区においては，検体作製方法の指導は効果をあげているものの，食べ物の制限に関する説明および指導が不足していることを示唆している．

昭和60年度における要再検査検体のうち，偽陽性検体の出現率をみると，多摩および島しょ地区では4.5％なのに，新宿区の2.32％および文京区の2.67％は半分以下の低率であった．偽陽性反応は多くの場合，尿採取直前の食べ物によるので，多摩および島しょ地区においては，食べ物の制限に関する指導に改善の余地のあることが認められた．ちなみに，初回検査における要再検査検体の出現率が最も低い新宿区においては，すでに報告[5]したように，検査に関する指導方法などについて，検査担当者を交えた協議を数回実施している．

表1.に示したように，多摩および島しょ地区は新宿区および文京区に比べて，くり返し検査の回数が多い．ただし，多摩および島しょ地区においても，昭和60年度にはくり返し検査の回数および件数ともに減少している．このことは，疑わしい結果を得た場合には，医療機関の診断に委ねるように方針を転換したためである．また，表1.に示したように，昭和60年度の要精密検査と判定した検体数が急増していることも，この理由による．

なお，医療機関において精査を受けた被検者の96％が陰性と判定されたことから考えると，要再検査の原因は，食べ物の制限の不撤底あるいは代謝成分の尿中排出時間に個体差があるためではないかと推察する．

また，要再検査あるいはくり返し検査は，神経芽細胞腫の疑いを想定させ，被検児の保護者に不安を抱かせていることも事実である．このような再検査やくり返し検査をなくするためには，液体クロマトグラフィーによる定量分析など，精度の高い判定方法の導入が必要であると考える．



上段：食事制限不良，下段：検体不良，□：要再再検査数，▨：要再再再検査数，▩：要再再再再検査数，＊：要臨床精密検査(印1個は1人を表す)，P：患児発見

図3．保健(相談)所別の要再検査検体の理由別出現率およびそのくり返し検査頻度

ついで，くり返し検査の多い多摩および島しょ地区について，各保健所および保健相談所別にその出現状態を調べた．その結果を図3.に示す．

この図3.で，昭和58年度から昭和60年度までの３年間を通じて，初回検査における要再検査検体の理由別出現率が，全体のそれよりも高い保健(相談)所を調べた．食事制限不良(上段)では H.o., F. c., M. k., T. w., K. c. b., K. i., K. j. b., および M. n. などがあり，検体不良(下段)は I. c., N. m. b., M. d. および H. m. m. などで，両方を兼ねている所はなかった．また，３年度共にくり返し検査の回数が多かった保健(相談)所としては，H. j., H. o., M. d., F. c., M. f., K. i., K. r. および H. m. m. などがあげられる．これらには，食事制限不良検体の多かった所が３ケ所，検体不良検体の多かったところが２ケ所含まれていた．

また，昭和60年度に要精密検査と判定された被検者が３人以上出ている所について検討してみると，T. w., K. i., M. n., H. k. m. および F. s. の５ケ所であったが，H. k. m. および F. s. の２ケ所は，前記の要再検査検体が多い，あるいはくり返し検査回数が多い保健所群には含まれていない所であった．

以上のように，再検査を必要とする不良検体が，特定の保健(相談)所に偏っている傾向については，すでに報告[5,11]したところであるが，保健所によってその指導の姿勢に違いがあることを示唆しているものと考える．

３．検査終結率

初回検査における要再検査被検者の検査終結率については表1.に示した．多摩および島しょ地区では，昭和58, 59, 60の各年度のそれはそれぞれ93.0%，95.2%および94.8%であった．しかし，新宿区の昭和59年度87.3%，昭和60年度74.6%および文京区の昭和59年度92.3%，昭和60年度78.7%は，多摩および島しょ地区のそれよりも低かった．

４．患児の発見

図2.に示したように，文京区において昭和59年度に患児が１例発見された．この患児の検査経緯について検討したところ，初回検査の疑陽性判定から再検査を実施するまでに１ケ月を費していることが分かった．再検査の結果，強い陽性反応が認められたために，ただちに所轄の保健所と連絡をとり，臨床精密検査の必要性を伝達した．しかし，保護者が入院させることを渋ったために，時間が経過し，大学病院において末期的な第Ⅳ病期であるとの診断が下されたのはさらに20日後であった[12]．ただし，この患児は，その後の治療によって寛解している模様である．この例に見るように，本腫瘍の増殖進行はきわめて速いことがうかがわれる．従って，今後のマス・スクリーニングにおける要再検被検者検体の取り扱いを，迅速化することについて，改めて検討する必要性を強く感じさせられた．

図1.および図3.に示してある昭和61年１月に発見された症例は，T. w. 保健所管内に居住する乳児であって，初回検査において尿中バニリルマンデリン酸の濃度が，要臨床精密検査と判定する対照基準の15 μg／ml 以下であったが，シャープなスポット輪郭と比較的明瞭な辺縁の色相が観察されたため，精査を要望する決定を行った．このことを直ちに，保健所および母子衛生課に連絡をした．この患児は，保健所の受診勧奨指導に従って，速に都立八王子小児病院で診察を受けた．その結果，腫瘤が触知されたために入院・手術が行われ，その後は副腎機能低下に対する治療を受けながら，経過観察中である．この症例は，早期発見というマス・スクリーニングの意義を，再認識させるものであった．

５．今後の対応

以上のように，われわれは，神経芽細胞腫のマス・スクリーニング検査を開始してから，昭和61年３月末日までに76,578人の乳児について検査を行い，２人の患児を発見した．

東京都予防医学協会は，都内の足立，墨田，江戸川，葛飾，江東，台東，豊島，千代田および荒川の９区の同検査を受託して39,902人の乳児の全てにつうて，液体クロマトグラフィーを用いた定量検査を行い，８人の患児を発見し，定量検査にもとづいたスクリーニングの有効性を報じている[13]．しかしながら，われわれはスポット法による検査のみでスクリーニングを実施して来ているので，検査結果が陰性であったにもかかわらず，その後発症した被検者が居るか否かを検討してみる必要性を感じた．そこで，悪性新生物に対する医療費助成の資料にもとづいて，これを調べたところ，現段階では該当する乳児は１人もいなかった．

このことからわれわれは，その検査精度の信頼性にもとづいて，現行法を今後も継続する方針を確認した．また，液体クロマトグラフィーによるスクリーニングは理想的ではあるが，多数の検体を処理するには能力に限界もあって，直ちには導入し難い．そこで，要再検査検体で検体不良でないものについて，定量検査を実施するなどの方法を導入する方向で検討を開始した．このような方法論については，コストベネフィットの観点からも考慮しなければならないことであろう．

表1．年度別要再検率とその後の受検および判定の状況

地区	年度	検査人数	初回検査 要再検査数 (%)	2回目検査 要再再検査数 (%)	3回目検査 要再再再検査数 (%)	4回目検査 要再再再再検査数 (%)	要臨床精密 検査数	検査 終結率 (%)
多摩・島しょ地区	昭和58	9,351	2,178 (23.3)	290 (13.3)	35 (1.6)	6 (0.3)		93.0
	昭和59	31,141	3,195 (10.3)	149 (4.7)	36 (1.1)	4 (0.1)	初回 2 3回目 3	95.2
	昭和60	29,951	1,934 (6.5)	163 (8.4)	21 (1.1)		初回 7 2回目11 3回目 8 4回目 1	94.8
新宿区	昭和59	1,871	55 (2.9)	2 (3.6)	1 (1.8)			87.3
	昭和60	2,116	55 (2.6)	2 (3.6)			初回 1 2回目 3	74.6
文京区	昭和59	852	39 (4.6)	2 (5.1)			2回目 2 (患者1)	92.3
	昭和60	1,237	47 (3.6)	2 (4.3)			2回目 1	78.7

注：2回目以降の要再検査出現率は初回検査における要再検査検体数に対する比率

まとめ

われわれは，スポット法によって，多摩および島しょ地区，新宿区および文京区の乳児について，神経芽細胞腫のマス・スクリーニング検査を実施した．昭和58年度後半から昭和61年3月末日までに76,578人の乳児について検査した結果，2人の患児が発見された．このうちの1患児はスクリーニングの目的とする早期発見にはやゝ反して，第Ⅳ病期での診断であったが，他方は第Ⅰ病期で発見されており，スクリーニングの意義を再認識させるものであった．

また，これらの検査成績について検討し，以下のような知見を得た．

1）初回検査において要再検査と判定された検体の占める割合は，多摩および島しょ地区で高率であった．この率は，年度を経るに従って改善されたが，昭和60年度のそれでも新宿区および文京区の約2.5倍であった．

2）多摩および島しょ地区の初回検査において，要再検査となった検体の理由別内訳の3年間における推移をみると，検体不良によるものの占める率は1/10に低下した．

3）多摩および島しょ地区の初回検査において，要再検査となった検体の占める割合は，特定の保健(相談)所において高い傾向が見られた．ただし，食事制限不良による要再検および検体不良による要再検共に高率の保健(相談)所は認められなかった．

4）多摩および島しょ地区で，3年度を通じてくり返し検査回数の多い保健(相談)所は8ケ所あったが，この中には食事制限不良の多い所が3ケ所，検体不良の多い所が2ケ所含まれていた．

5）初回検査において要再検査となった被検乳児の検査終結率は，新宿区および文京区よりも，多摩および島しょ地区の方が高かった．

以上のことから，それぞれの保健(相談)所における，神経芽細胞腫マス・スクリーニング事業に対する取り組みの姿勢に，多少の相違があることが推察された．

6）患児の早期発見の見地から，適正な検査材料の採取および作製の方法についての指導の徹底が望まれるが，再検検体の一部については，定量法の導入も考慮する必要がある．

本稿の概要は，第76回東京都衛生局学会(昭和61年5月21日)に於いて発表した．

文献

1）沢田 淳：癌の臨床，28，681，1982
2）D'Angio, G. J., Evans, A. E. and Koop, C. E.: *Lancet*, 1, 1046, 1971
3）沢田 淳，今宿晋作，高田 洋，乾 明彦，楠 智一：周産期医学，5，62，1975
4）Sawada T., Todo S., Fujita K., Iino S., Imashuku S. and Kusunoki T.: *American Journal of Diseases of Children*, 136, 710, 1982
5）武士俣邦雄，鈴木重任：東京衛研年報，35，101，1984
6）Armstrong, M. D., McMillan, A. and Shaw, K. N. F.: *Biochimica Biophysica Acta*, 25, 422, 1957
7）Studnitz, W. v. and Hanson, A.: *Scandinav. J. Clin. and Lab. Investigation*, 11, 101, 1959
8）佐藤辰男，吉永 馨，石田 望：最新医学，16，371，1961
9）武士俣邦雄：東京衛研年報，35，92，1984
10）武士俣邦雄：東京衛研年報，36，67，1985
11）高野弘紀，鈴木重任，武士俣邦雄，峰岸正子，石塚実，村田篤司：東京衛研年報，36，73，1985
12）鈴木重任，武士俣邦雄，高野弘紀：厚生省マス・スクリーニングシステムに関する研究－昭和60年度研究報告書－投稿中
13）東京都予防医学協会：よぼう医学，第179号，4，1986

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.*, 37, 69-72, 1986

バニリルマンデル酸スポットテスト法の反応生成色素

高 橋 利恵子*, 安 田 一 郎*, 奥 本 千代美*,
秋 山 和 幸*, 鈴 木 重 任**

Colored Substance Produced in Spot Test of Vanillylmandelic Acid

RIEKO TAKAHASHI*, ICHIRO YASUDA*, CHIYOMI OKUMOTO*,
KAZUYUKI AKIYAMA* and SHIGETO SUZUKI**

The mechanism of vanillylmandelic acid (VMA) spot test for the screening of neuroblastoma was elucidated. Diazotized *p*-nitroaniline coupled with VMA in an alkaline solution as well as in the spot test was conducted to afford a colored substance as a sole pigment. From ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, MS and UV data, the structure of the colored substance was determined as 4-hydroxy-3-methoxy-4′-nitroazobenzene. This compound had an absorption at 395 nm in methanol, and at 517 nm in alkaline methanol respectively.

VMA was shown to be diazotized with release of the carboxylic side-chain. Therefore, after diazotization, VMA can not be distinguished from guaiacol derivatives with different side-chains which produce the same pigment in the spot test.

Keywords: neuroblastoma, spot test, vanillylmandelic acid, 4-hydroxy-3-methoxy-4′-nitroazobenzene, MS, NMR

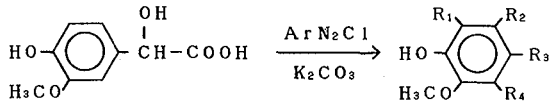
緒　　言

神経芽細胞腫は小児悪性腫瘍の一割を占めている．このマススクリーニングには，バニリルマンデル酸（以下VMAと略す）スポットテスト法が広く使われている．

この方法は，神経芽細胞腫がカテコールアミン産生腫瘍であることから，カテコールアミンの終末代謝産物の一つであるVMAのジアゾカップリング反応によるアゾ色素の発色をその診断，発見に利用したものである．しかし，この*p*-ニトロフェニルジアゾニウム塩による方法では，偽陽性が2～4％出現することが問題となっている[1]．これは，食品由来の尿中物質がジアゾカップリング反応により，VMAと同様の紫色を呈すること，すなわちこの反応の選択性（基質特異性）が低いことが主な理由と考えられている．偽陽性物質の検索を行うにあたり，まずこの方法の反応機構について，検討した．

この反応は，VMAとジアゾ化された*p*-ニトロアニリンのジアゾカップリング反応と考えられているが[2]，VMAのカップリングの起こる位置については少なくとも四つの可能性が考えられる．Fig. 1のように生成物1～3は，水酸基またはメトキシル基のパラ位，またはオルト位が置換される通常の反応であるが，4は側鎖の-CH-(OH)COOHが脱離し置換が起こる異常ジアゾカップリング反応である．Gitlowら[3]は生成物1の存在を推定し，Vauquelinら[4]はアルカリ性の条件で4が，また酸性の条件で1と4が生成すると考察しているが，その根拠は，^{1}H-NMRスペクトルによる検討にとどまり構造等，解析が不充分である．そこで，われわれは，通常スクリーニングに用いられているスポットテストの条件下でモデル実験を行い，得られた成績体を単離後，MS, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMRスペクトルの解析により構造を明らかにしたので報告する．またその可視，紫外吸収についても若干の検討を加えた．

*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
**東京都八王子保健所



	R_1	R_2	R_3	R_4
1	-N＝N-Ar	H	CH(OH)COOH	H
2	H	-N＝N-Ar	CH(OH)COOH	H
3	H	H	CH(OH)COOH	-N＝N-Ar
4	H	H	-N＝N-Ar	H

Ar ＝ *p*-nitrophenyl

Fig. 1. Expected Structures of the Pigment Produced in Spot Test of VMA

実験の部

1 標準品および試薬

VMA として東京化成特級品 *dl*- 4 -hydroxy- 3 -methoxymandelic acid を，他は全て和光純薬特級品を用いた．

2 装置

融点：矢沢 BY-1 微量融点測定器（未補正）．可視部紫外部吸収スペクトル：日立320自記分光光度計．^{1}H-NMR (270 MHz)，^{13}C-NMR (67.5 MHz) ：日本電子 FX-270，共に重クロロホルム中 TMS を内部標準として測定した．MS：日本電子 (JMS) D-300 (70eV)，高分解能測定は直接導入法により行った．

3 スポットテスト発色物質の抽出

VMA2.0mg を約 1 m*l* の0.01 N 塩酸溶液に溶かし，東洋ろ紙 NO. 2 に滴下した．0.1%*p*-ニトロアニリン／2%塩酸溶液，0.2%亜硝酸ナトリウム溶液，10%炭酸カリウム溶液を約 5 ℃に冷却後，1：1：2 の割合で順に混合し前述のろ紙に噴霧した．紫色に発色した部分を切り取り，クロロホルムで抽出し，減圧濃縮した．

4 反応生成物の合成

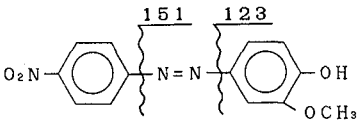
VMA (1.778g) の0.01 N 塩酸溶液91.2m*l* と10%炭酸カリウム溶液2,500m*l* を氷水中で混合し，別に0.1%*p*-ニトロアニリン／2%塩酸溶液1,250m*l* と0.2%亜硝酸ナトリウム1,250m*l* を氷水中で混合し，前述の混液に滴下混合した．反応後に酢酸を加え，pH7にし，クロロホルムで抽出し，溶媒を減圧，留去した．残留物をメタノールから再結晶し，4 -hydroxy- 3 -methoxy- 4′-nitroazobenzene の赤褐色針状晶，1.03 g を得た．(収率41%)，mp172 ～ 173.5℃ (ref. 171.5 ～ 173.5℃[5]，150℃[4]，125～135℃[6])．

5 TLC による確認

液相条件における反応生成物とスポットテスト発色物質の TLC による確認試験は Kieselgel 60 F_{254} (Merk) を用い，下記の条件により行った．1）展開溶媒，クロロホルム　2）エタノール：*n*-アミルアルコール：アンモニア (10：10：1)　3）酢酸エチル：メタノール：強アンモニア水 (45：10：10)

結果および考察

スポットテストおよびそれに準じた液相中アルカリ性の条件では紫色の同一の生成物が検出され，実験の部に記載した三種の TLC 条件では，TLC 上に他の色素は認められなかった（1）Rf 0.58，2）Rf 0.57，3）Rf



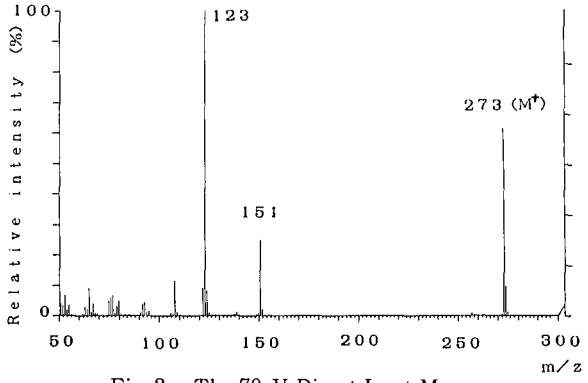


Fig. 2. The 70eV Direct Inret Mass Spectrum of the Pigment

Table 1. High Resolution Mass Spectrum of the Pigment

Selected ion (m/z)	Observed (m/z)	Error (mmu)	Assignment
273	273.0753	0.3	C_{13} H_{11} N_3 O_4
151	151.0510	0.2	C_7 H_7 N_2 O_2
123	123.0439	−0.5	C_7 H_7 O_2

0.47). この物質はMSスペクトル及び^{13}C-NMRスペクトルより，分子量273が明らかとなり，-CH-(OH)COOH部分の脱離した成績体4 (Fig. 1) が推定され，1～3は否定された．Fig. 2及びTable 1のMSスペクトルにおいて組成式$C_7H_7O_2$を示すm/z 123を基準ピークに認め，組成式$C_7H_7N_2O_2$を示すm/z 151に特徴的なピークが出現している．これはこの構造が正しいことを支持するものであり，^{1}H-NMRスペクトルにおいてはプロトン3個分のシグナルが7.67, 7.51, 7.09ppmに現われ，三置換ベンゼンの存在が，またプロトン4個分のシグナルが8.35, 7.97ppmに現れ，二置換ベンゼンの存在が明らかとなった (Table 2)．そして，^{13}C-NMRスペクトルに現れる各炭素シグナルの帰属も矛盾なく説明される (Table 2) ことから，成績体は4と決定された (Fig. 3)．融点の文献値が種々異なるのは結晶多型のためと考えられる．反応機構としてはVauquelinら[4]が指摘しているように電子供与性の側鎖のつけねのC_1炭素への親電子反応と考えることができるが，またラジカル反応機構の可能性もある．

単離された色素4は溶媒の種類，液性により異なった色調を示す．すなわちメタノール中，酸性，中性では黄色，アルカリ性では赤紫色を示す．この呈色はエタノール，アミルアルコール等，他のアルコールでも同様である．アセトン，ピリジン中では深色効果が認められ (Table 3)，酸性，中性溶液中の吸収は母核のトランスーアゾベンゼンλ_{max}320nm (ε_{max}21,500)[7]とよく対応している．このpH変化に伴う変色はアゾ型とヒドラゾン型の互変異性に基くものと考えられている．

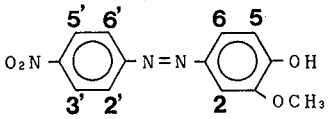


Fig. 3. Chemical Structure of the Pigment

Table 2. ^{1}H and ^{13}C NMR Data of the Pigment in $CDCl_3$

^{1}H Chemical Shifts (ppm/TMS) and Coupling Constants (Hz)		^{13}C Chemical Shifts * (ppm/TMS)	
Hydrogen atom	^{1}H δ (ppm)	Carbon atm	^{13}C δ (ppm)
H_3', H_5'	8.35, m, 2 H	C_1'	156.0 s
H_2', H_6'	7.97, m, 2 H	C_4'	150.3 s
H_6	7.67, dd, 1 H (J=2.4, 8.8)	C_1#	148.3 s
H_2	7.51, d, 1 H (J=2.4)	C_3#	147.3 s
H_5	7.09, d, 1 H (J=8.8)	C_4#	146.8 s
OH	6.12, s, 1 H	C_3', C_5'	124.7 d
OCH_3	4.00, s, 3 H	C_6	123.2 d
		C_2', C_6'	123.1 d
		C_5	114.5 d
		C_2	101.8 d
		OCH_3	56.2 q

*：The assignments were confirmed by off-resonance and proton-carbon selective decoupling experiments.
#：Interchangeable assignments

Table 3. UV-VIS Spectra of the Pigment

Solvent	λ_{max} (nm)	ε_{max}	λ_{max} (nm) (alkaline soln.)	ε_{max}
Methanol	395	23,900	517*	37,600*
Aceton	394	23,400	605*	64,000*
Pyridine	412	22,700	615#	64,000#

*：To a solution (50m*l*) was added 25% NaOH 0.5m*l*.
#：To a solution (50m*l*) was added 25% NaOH 2.0m*l*.

以上まとめると，スポットテストではジアゾカップリング反応が起こる際，側鎖が切断され呈色物質の形成が行われることが確認された．*p*-ニトロフェニルジアゾニウム塩とカップリングして色素4を生ずる化合物はVMAの他にも存在するので，反応が行われた後では，成績体の色素を分析しても，これらの物質を識別することができない．

すなわちスポット法の疑陽性検体について，そのような色素を分離する試みは，尿中に共存する物質による不鮮明さを除く目的には適するが，グアヤコール核を持ち，同じような反応を起こす物質[2,4]とVMAを識別することはできないことが明らかとなった．

結　論

VMAスポットテストの生成色素は一物質より成り，これを単離した．この構造は種々のスペクトルデータより4-hydroxy-3-methoxy-4′-nitroazobenzeneと決定した．本テストの化学反応はVMAの側鎖が失われる異常ジアゾカップリングによるものであり，生成された色素の分析からVMAを同定することは不可能である．

文　献

1）沢田　淳，小出　亮，佐藤泰昌，他：神経芽細胞腫マス・スクリーニング，母子愛育会編，61,208,1984，大門出版
2）Knight, J. A., Fronk, S. and Haymond, R. E.: *Clin. Chem.*, 21,130,1975
3）Gitlow, S. E., Ornstein, L., Mendlowitz, M., Khassis, S. and Kruk, E.: *Am. J. Med.*, 28,921,1960
4）Vauquelin, G., Verheyden, R., Ebinger, G. and Strosberg, A. D.: *Clin. Chem.*, 22,1955,1976
5）Ronaldson, J. W.: *Aust. J. Chem.*, 34,1935,1981
6）*Beilsteins Handbuch*, 4 Aufl, XVI, 177, syst. No. 2126,1943, Berlin
7）Rao, C. N. R.: 紫外・可視スペクトル，第2版，44,1970，東京化学同人

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 73-78, 1986

ガスクロマトグラフィーによる生薬牛黄中のコール酸類の定量

高野伊知郎*, 安田一郎*, 瀬戸隆子*,
浜野朋子*, 秋山和幸*

Determination of Bile Acids in Crude Drugs, Oriental Bezoar by Gas Chromatography

ICHIRO TAKANO*, ICHIRO YASUDA*, TAKAKO SETO*,
TOMOKO HAMANO* and KAZUYUKI AKIYAMA*

For the purpose of evaluating crude drugs, Oriental Bezoar (OB) samples were analyzed for bile acids. Bile acids were identified by means of capillary GC and GC-MS. With and without preceding hydrolysis, bile acids were extracted, derived with 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) and trifluoroacetic anhydride (TFAA), and then determined by FID-GC on 2% QF-1/Uniport HP column.

The calibration curves of deoxycholic acid (DC), chenodeoxycholic acid (CDC), hyodeoxycholic acid (HDC) and cholic acid (C) showed straight lines. Recovery rate of taurocholic acids (TC) added to crude drug was 89.9% (CV 3.8%), and this method was successfully applied to OB without interference.

Using this method, 58 natural samples and an artificial one were analyzed. In the naturally obtained samples, DC, CDC and C were contained at the levels of 22.7, 3.5, 56.3mg/g respectively, and HDC was not detectable.

The total bile acid contents of OB varied from 32.5 to 98.6mg/g by the place of origin or by the lot. The artificial sample called "Gosei-Goou" had a characteristic distribution of bile acids, such as DC 24.0, CDC 24.9, C 127.0, HDC 49.7 and total 225.6mg/g.

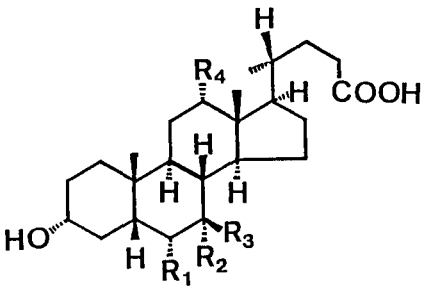
Keywords: crude drugs, Oriental Bezoar, *Bezoar Bovis*, on the market, bile acids, determination, capillary GC, GC, GC-MS

緒　言

牛黄 *Bezoar Bovis* はウシ *Bos taurus* Linné var. *dometicus* Gmelin (*Bovidae*) の胆のうまたは胆管中に生じた結石で，強心，利胆，鎮静，鎮けい，解熱，解毒などの目的で古くから六神丸，救命丸などの家庭薬に配合されている数少ない動物性生薬の一つである．日本薬局方による牛黄の品質規格には，ビリルビンおよび灰分の含量基準[1]が記載されており，その他は主に経験にもとづく外観性状による鑑別試験がある．今回，合成牛黄と呼ばれる粉末品を入手する機会を得たが，日局試験結果からこの生薬の品質の良否を評価することはできない．牛黄の薬効の主なものは含有するデオキシコール酸やコール酸などのコール酸類(Fig. 1)，あるいはペプチド性の物質によるものとの報告[2-8]がある．コール酸類は胆汁や各種動物胆の形で，また精製されたコール酸類として，かぜ薬，滋養強壮剤などにも多く配合されているが，ウルソデオキシコール酸，デオキシコール酸のように強い鎮けい作用を持つものもあれば，ケノデオキシコール酸のように肝臓毒性を発現しやすいものもあり，それぞれ薬理作用が異なっている．そこで，牛黄中のこれらのコール酸類の種類，含有量を正確に把握しておくことが必要であると考え，精度の良い分析法の検討を行うことにした．一般的なコール酸の分析については薄層クロマトグラフィー (TLC)[9]，液体クロマトグラフィー (HPLC)[10]

*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

およびガスクロマトグラフィー(GC)[11]が報告されているが，個々のコール酸類の分離精度の点でTLC法およびHPLC法には問題がある．GC法については加水分解処理を行う必要があり，その際多少の定量誤差を生じやすい欠点が指摘されている．しかし，生薬製剤，漢方製剤など多種成分配合の試料への適用を考えると，妨害成分が出現しにくいなどその汎用性に富む利点が考えられた．そこで今回，生薬牛黄について胆汁試料の誘導体化法[12]を応用し，各種コール酸類のGCによる分析を試みた．



		R_1	R_2	R_3	R_4
cholic acid	C	H	OH	H	OH
deoxycholic acid	DC	H	H	H	OH
chenodeoxycholic acid	CDC	H	OH	H	H
ursodeoxycholic acid	UDC	H	H	OH	H
hyodeoxycholic acid	HDC	OH	H	H	H

Fig. 1. Chemical Structures of Bile Acids

実験の部

1．装置

水素炎イオン化検出器付きガスクロマトグラフィー(FID-GC)：島津製作所製GC-7A型，Hewlett Packard社製GC-5790A型(キャピラリー仕様)

ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)：Hewlett Packard社製 GC-5710型に日本電子社製JEOL D-300およびJMA-2000データ処理システムを接続したもの．

2．標準品および標準溶液

標準品：デオキシコール酸(DC)：和光純薬製をアセトンおよびエタノールから再結晶 純度97.8%(FID-GCにおける面積百分率で表す．以下同様)，コール酸(C)：ミクニ化学製をエタノールから再結晶 純度98.0%，ケノデオキシコール酸(CDC)：東京化成製をシリカゲルカラムで精製した後，エタノールから再結晶純度99.7%，ヒオデオキシコール酸(HDC)：東京化成製をアセトンから再結晶 純度98.9%，ウルソデオキシコール酸(UDC)：東京化成製を酢酸エチルから再結晶 純度99.0%，タウロコール酸(TC)：ガスクロ工業製GC用標準品をそのまま用いた．

標準溶液：各標準品を48時間減圧下乾燥し，約100mgを正確にとり，エタノール100m*l*にとかし各標準溶液とした．

GC定量用内部標準物質*d, l*-α-トコフェロールオクタン酸エステル(IS)：東京化成製*d, l*-α-トコフェロール2.6gをピリジン2m*l*に溶かした後，無水オクタン酸4m*l*を加え，約50℃で30分間加熱し，エステル化を行った．反応液を氷水に移し，さらにエーテル100m*l*を加えた後，エーテル層を分取．エーテル留去後，残さをシリカゲルカラムクロマトにかけ，クロロホルム溶出画分から*d, l*-α-トコフェロールオクタン酸エステル2.1gを得，これをこのまま内部標準物質とした．

内部標準溶液：IS 160mgを正確にとり，酢酸エチル200m*l*にとかし，IS溶液とした．

3．試料

牛黄(天然品)：オーストラリア産，ブラジル産，北アメリカ産，メキシコ産，スイス産およびインド産の各全形生薬の中から適当に約20gを採取し，さらに形状，色，つや，大きさの異なるものを2～10個ずつ選んだ．なおブラジル産のものについては流通経路が互いに異なるもの2種を選び試料とした．

牛黄(人工品)：中国広西省南寧市において“合成牛黄”の名称で販売されていた淡黄色の粉末を試料とした．

4．試薬

誘導体調製試薬：1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール(HFIP)，無水トリフルオロ酢酸(TFAA)は和光純薬製，ニトロソメチル尿素はICP Pharmaceutical社製．

その他の試薬はすべて和光純薬特級を用いた．

5．牛黄エキスの調製

ヒトの胆石分析法[13]に準じてエキスの調製を行った．すなわち，各産地牛黄を乳鉢中で粉末とし，その50mgをとり，クロロホルム・メタノール(1：1)混液20m*l*を加えて，水浴上で1時間加熱還流した後，ろ過．残さについてはさらにエタノール20m*l*を加え，2時間還流抽出を行い，両抽出液を合わせ，約15m*l*になるまで溶媒留去し，エタノールで正確に25m*l*とし，牛黄エキスとした．

6．GC 用試料溶液の調製

試料溶液A（総コール酸類含量測定用）：牛黄エキス5 m*l* を正確にとり，テフロン製ねじ口びんに移し，溶媒を留去．4N NaOH 10m*l* を加え，オートクレーブ中，120℃ 4時間加熱し，加水分解を行った．冷後，6N HC*l* を加え，pH 3 以下とし，エーテル30m*l* で2回抽出を行った．エーテル層に無水硫酸ナトリウムを加え乾燥，一夜放置後ろ過し，ろ液を試料溶液Aとした．

試料溶液B（遊離コール酸類含量測定用）：牛黄エキス5 m*l* を正確にとり，加水分解操作は行わずに，HC*l* 酸性下，エーテル30m*l* で2回抽出を行い，以下，試料溶液Aと同様に処理した．

7．誘導体化

a）メチル化：各コール酸標準溶液および試料溶液Aは，常法に従い，ジアゾメタン含有エーテル溶液で処理し，各コール酸メチル誘導体を得た．

b）HFIP-トリフルオロアセチル(TFA)化：各コール酸標準溶液および試料溶液A，BにIS 1 m*l* を加え，減圧下濃縮した後，少量のエタノールを用いて2 m*l* 容量のサンプル管に移した．N_2気流下，溶媒を完全に留去し，HFIP 0.2m*l* およびTFAA 0.4m*l* を加え，40℃ 30分間加温して誘導体化を行い，各コール酸HFIP-TFA誘導体を得た．

a），b）両者については過剰の誘導体調製試薬を留去後，酢酸エチル2 m*l* にとかし，その4 μl をGCに供した．

8．GC，GC-MS による定性

各コール酸標準溶液および試料溶液Aのメチル誘導体ならびにHFIP-TFA誘導体をGCカラムに注入し，ピークの保持時間(t_R)およびマススペクトルの比較により化合物の同定を行った．

9．GC による定量

各コール酸標準溶液から0.01～1.50mgの標準系列をつくり，先の誘導体化法により得たHFIP-TFA誘導体溶液4 μl をGCカラムに注入し，得られたクロマトグラムにおけるISとのピーク面積比から各検量線を作成した．試料溶液Aを総コール酸類，Bを遊離コール酸類，両者の差を抱合コール酸類とし，生薬中の各コール酸類含量を求めた．

含量算出式

面積比を検量線に代入して得た値を x (mg)，生薬1 g中の含有量を y (mg/g) とすると，

$$y = x \times 5 \times 1000 / s \times f / 100$$

s ：試料採取量 (mg)

f ：標準品純度 (%)

で求められる．

10．GC の条件

GC分析条件はTable 1に示したとおりである．

結果および考察

1．各コール酸類の定性

QF-1 (Condition 2) によるDC，CDC，Cの各標準品のピークの分離は良好であったが，HDCとUDCの分離はできなかった．そこで両者のメチル誘導体をOV-1[14] (Condition 3) およびHP-1 (Condition 4) を使って識別した．試料溶液A中のコール酸類のクロマトグラムをFig. 2に，標準品とのt_Rの比較をTable 2に，HFIP-TFA誘導体のマススペクトルをTable 3に示した．天然品には3個，人工品には4個のコール酸類に由来すると思われるピークが出現した．ピーク1はいずれのGC条件においてもDC標準品のt_Rと一致し，またマススペクトルも標準品同様 m/z 369 ($M^+ - C_{10}H_{10}O_4F_9$) を基準ピークとし，m/z 620 ($M^+ - C_2O_2F_3$)，507 ($M^+ - C_4HO_4F_6$)，255 ($M^+ - C_{12}H_{11}O_6F_{12}$) などに特徴的なフラグメントイオンが観察されることから，DCと同定した．他のピークについても標準品とのt_Rおよびマススペク

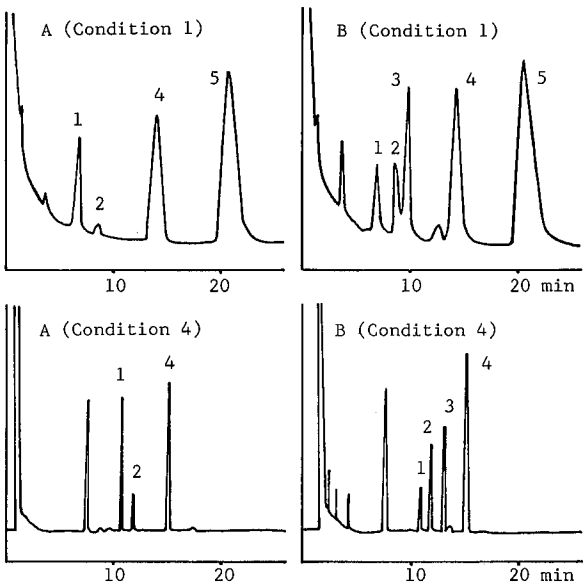


Fig. 2．Gas Chromatograms of Derivatives of Bile Acids in Oriental Bezoar under Conditions 1 and 4

A：Natural　B：Artificial　1：DC　2：CDC
3：HDC　4：C　5：IS (d, l-α-tocopheryloctanoate)

Table 1. GC Conditions for Qualitative and Quantitative Analysis of Bile Acids

Condition	1 *	2 *	3 **	4 **
Column	2%QF-1	2%QF-1	2%OV-1	HP-1
	UniportHP	UniportHP	GaschromQ	Fused silica
	80/100	80/100	80/100	0.33 μm
	3mm×1m	3mm×1m	3mm×1m	0.20mm×25m
Oven	230℃	230℃	250℃	310℃
Carrier	He 45ml/min	N_2 30ml/min	N_2 45ml/min	N_2 0.48ml/min
Detector	FID	EI-MS (20eV, 50 μA)	FID	FID

*Hexafluoroisopropyl ester-trifluoroacetyl (HFIP-TFA) derivatives
**Methyl esters

Table 2. Retention Times of Derivatives of Bile Acids

Condition*		1	3	4
		t_R (t_R'**) min	t_R (t_R'**)	t_R (t_R'**)
Standard	DC	6.60 (1.00)	9.45 (1.00)	10.40 (1.00)
	CDC	8.42 (1.27)	10.56 (1.12)	11.03 (1.06)
	HDC	9.50 (1.44)	11.23 (1.19)	11.71 (1.13)
	UDC	9.50 (1.44)	10.14 (1.07)	10.85 (1.04)
	C	14.00 (2.12)	15.61 (1.65)	14.49 (1.39)
Sample	peak 1	6.60 (1.00)	9.46 (1.00)	10.30 (1.00)
	2	8.43 (1.28)	10.48 (1.11)	10.95 (1.06)
	3	9.50 (1.44)	11.33 (1.20)	11.52 (1.12)
	4	14.00 (2.12)	15.76 (1.67)	14.48 (1.41)

*These conditions are shown in Table 1.
**Retention times relative to the corresponding derivative of deoxycholic acid

Table 3. Mass Spectra of HFIP-TFA Derivatives of Bile Acids

DC m/z (%)	621 (M^+−113, 22.0), 620 (59.9), 507 (13.5), 370 (24.8), 369 (100.0), 290 (39.8), 255 (27.4)
CDC m/z (%)	734 (M^+, 2.3), 620 (100.0), 507 (17.2), 506 (18.0), 369 (16.9), 342 (25.5), 328 (27.4), 327 (16.6)
HDC m/z (%)	734 (M^+, 13.6), 620 (100.0), 507 (17.2), 506 (16.7), 491 (11.4), 369 (17.3), 342 (27.7), 328 (55.5), 327 (45.6)
C m/z (%)	732 (M^+−114, 4.2), 619 (34.1), 618 (70.7), 367 (74.7), 290 (100.0), 253 (25.8)

トルの比較からピーク 2 を CDC, ピーク 3 を HDC, ピーク 4 をCと同定した.

2. 各コール酸類の定量

1) **GC 条件の設定**：ピークの分離, 再現性および誘導体化の操作性を考慮し, 今回は HFIP-TFA 誘導体を選び, QF-1 を充てん剤としたパックドカラムで定量を行うことにした(Condition 1).

2) **検量線**：各標準品による検量線は下記のようにい

ずれもほぼ原点を通る直線であった.

DC……Y＝0.704X－0.008 (r＝1.000)
CDC……Y＝0.652X－0.004 (r＝0.999)
HDC……Y＝0.619X＋0.064 (r＝0.991)
C……Y＝0.607X－0.014 (r＝1.000)

Y：ISとのピーク面積比
X：標準品量 (mg)

3）**繰り返し精度**：実際試料の分析においてISピークとの面積比は，CV 1.7～4.2% (各n＝5)で精度は良好であった.

4）**添加回収実験**：TCおよびCの添加回収率をTable 4に示した．遊離体(C)の回収率はほぼ満足すべきものであった．一方，抱合体(TC)の添加回収実験で全処理工程におけるTC回収率は90%程度であることがわかった．そこで標準品TCのみをいくつかの異なる条件で加水分解処理しGC分析を行ったところ，クロマトグラム上に明らかに分解副生成物に由来するピークを認めた．これは加水分解処理工程が回収率にかなり影響することを示唆している.

5）**試料の分析**：牛黄(天然品)7産地58件および合成牛黄(人工品)1件，計59件について各コール酸類の含量を調査した結果をTable 5にまとめた．天然品にはDC，CDC，Cの3種が認められ，その平均含量はそれぞれ22.7，56.3，3.5mg/g(総コール酸類含量は生薬全体の8～10%)であった．同一産地内での個体差，ロット差もあるが，インド産の生薬は明らかに含量が低い傾向にあった．人工品においては，DCは天然品と同等，Cは2倍，CDCは7倍の高い値を示した．また天然品中には検出されなかったHDCも49.7mg/g含んでおり，総コール酸類含量も生薬全体の23%を占め，天然品に比べかなり高い分析値となった．HDCはブタ胆汁中のコール酸類の主成分であり[15]，特異的に多く含まれることから合成牛黄の原料にブタ胆汁が使用されていることが推察される.

Table 4. Recoveries of Cholic Acid and Taurocholic Acid Added to Oriental Bezoar 50mg*

Runs	Added	Recovery	CV
5	C 2mg	97.1%	4.2%
5	TC2	89.9	3.8

*Each contained 3.3mg of cholic acid

コール酸類の一部は生体内でタウリンやグリシンと抱合体を形成して存在しているといわれている．そこで牛黄中のコール酸類の存在形態について考察した．Fig. 3に遊離体と抱合体の存在比を示した．天然品ではその大半が抱合体を多く含む形で存在していたのに対し，人工品では100%遊離体であった．牛黄の平滑筋に対する鎮けい作用は主にDCの抱合体に由来するとの報告[2]もあり，コール酸類の分析結果からみる限り，“合成牛黄”は天然品とは異なる品質のものとして，区別して用いるのが適当であろうと考える.

結　論

GCによる胆汁の分析法を応用し，牛黄中のコール酸類の定量法を検討した．各コール酸類の分離は良好で，検量線も直線性を示した．繰り返し精度はCV 1.7～

Table 5. The Contents of Bile Acids in Oriental Bezoar (mg/g)

	(n)	DC	C	CDC	HDC	TOTAL
Natural						
Australia	(10)	30.6±13.9*	63.6±15.8	4.4± 2.4	n.d.**	98.6±27.6
Brazil－A	(10)	25.4± 4.3	54.6±12.0	3.1± 1.1	n.d.	83.1±23.3
Brazil－B	(8)	26.9± 9.1	62.3± 9.3	3.4± 1.1	n.d.	92.6±12.0
North America	(10)	25.0± 8.3	56.3±15.2	3.9± 1.3	n.d.	85.2±15.3
Mexico	(10)	19.5± 4.5	72.4±10.1	4.7± 2.3	n.d.	96.6±14.5
Switzerland	(8)	22.8± 7.3	62.9±13.8	3.3± 1.5	n.d.	89.0±19.4
India	(2)	8.5± 2.9	22.2± 6.7	1.8± 0.4	n.d.	32.5±10.1
AVE	(58)	22.7± 7.2	56.3±11.8	3.5± 1.4	n.d.	82.5±17.5
Artificial	(1)	24.0	127.0	24.9	49.7	225.6

* mean ± SD　　** not detected

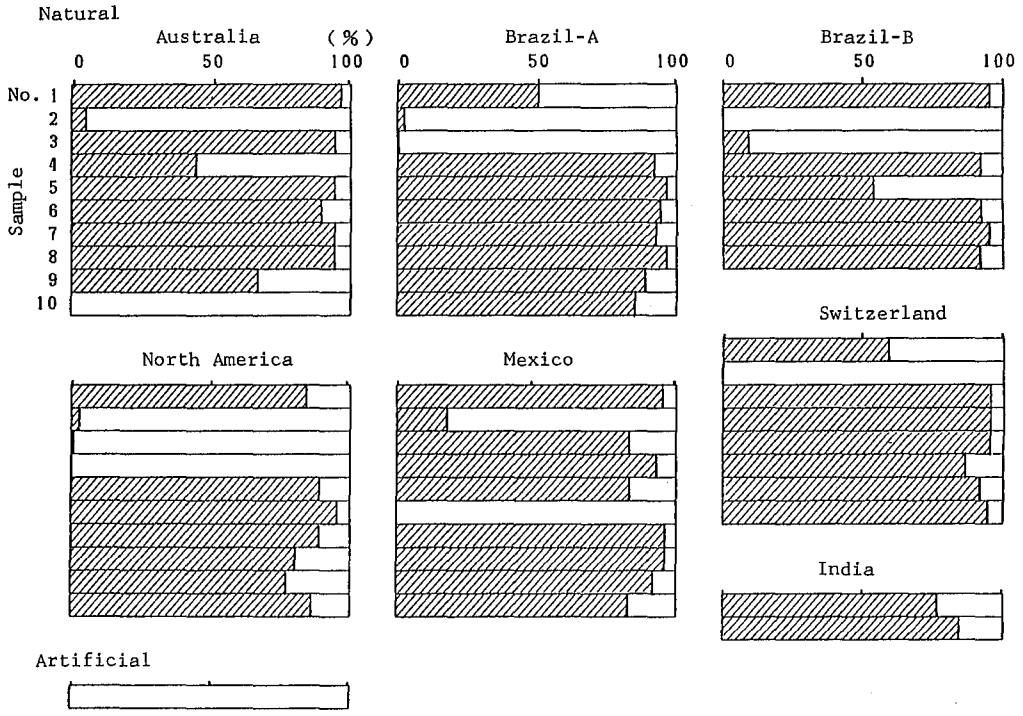


Fig. 3. Ratio of Conjugated and Non-conjugated Total Bile Acids in Oriental Bezoar
▨ means Conjugated Bile Acids
□ means Non-conjugated Bile Acids

4.2%，遊離体(C)の添加回収率は約97%，抱合体(TC)の添加回収率は約90%であった．

この方法により市場品牛黄の分析を行ったところ，天然の牛黄では各コール酸類含量の平均値は DC 22.7, CDC 3.5, C 56.3mg/g,すなわち，組成比は7：1：16であり，総コール酸類含量は82.5mg/g であった．また，産地，ロットによって差があり，32.5～98.6mg/g とばらつきを認めた．一方，今回入手した合成牛黄(人工品)では DC 24.0, CDC 24.9, C 127.0, HDC 49.7mg/g，組成比1：1：5：2，総コール酸類含量 225.6mg/g で，天然品とは明らかにコール酸類の組成，含量が異なっていた．

文　献

1) 日本公定書協会編：第十改正日本薬局方解説書，D-301，1981，広川書店，東京
2) 木村正康，吉崎正雄，平井嗣郎，森田直賢，志甫伝逸：薬誌，86，366，1966
3) 木村正康，長田永三朗，本家忠治，吉崎正雄，志甫伝逸：薬誌，86，877，1966
4) 木村正康，長田永三朗，加賀美壮一，志甫伝逸：薬誌，87，550，1967
5) 木村正康，長田永三朗，脇　功巳：薬誌，88，125，1968
6) 木村正康，長田永三朗，松井竹史，小林千代子：薬誌，88，135，1968
7) 木村正康，長田永三朗，野上祐治：薬誌，88，1367，1968
8) 木村正康，脇　功巳，石田　貢：薬誌，98，442，1979
9) 宇治　昭：薬誌，95，214，1975
10) 難波恒雄，布目慎勇，服部征雄，東舘　栄，前窪哲也：薬誌，102，760，1982
11) 宇治　昭，滝浦　潔：薬誌，95，114，1975
12) Kazuhiro Imai, Zenzo Tamura : *J. Chromatogr.*, 120, 181, 1976
13) 穂下剛彦：生化学実験講座，第3巻，483，1975，東京化学同人，東京
14) W. H. Elliott et. al. : *J. Chromatogr.*, 44, 452, 1969
15) Windaus, Bonne : *Ann.*, 433, 278, 1923

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 79-84, 1986

シアン測定システムへのパーソナルコンピュータの導入

奥本 千代美*, 高橋 利恵子*, 岩崎 由美子*, 秋山 和幸*

Application of Personal Computer to Analysis of Cyanide in Waste Water from Metal Plating Process

CHIYOMI OKUMOTO*, RIEKO TAKAHASHI*, YUMIKO IWASAKI* and KAZUYUKI AKIYAMA*

A computer-aided analysis system was developed and successfully applied to the determination of cyanide in waste water from metal plating process.

Many samples were treated in parallel with microdiffusion units, and the resulting cleaned-up sample solutions were subjected to cyanide ion-selective electrode analysis. The potential signals from 24 electrodes were accepted by a personal computer via a multiplexer and an A／D converter, and automatically transformed into the corresponding concentration data with this system. The data processing was carried out in 6 seconds, and the data were displayed, printed and stored on a floppy disk.

This system can also function as a computer-aided data acquisition and editor system.

Keyword：determination of cyanide, waste water from metal plating process, personal computer

我々はメッキ廃水中のシアン化合物の簡易測定法として，微量拡散法とシアン化物イオン電極法を組み合わせる方法を検討し[1]，表面に24組の拡散ユニットを6行×4列に配列した拡散板を開発した．拡散後のシアン濃度の測定は1試料ずつシアンメーターを用いて行ってきたが，今回は，このシアン簡易測定にパーソナルコンピュータを導入し，検体の受付，試験依頼書に記載された情報の記録，1枚の拡散板上の24試料同時測定および測定値の記録，集計などの作業の自動化を検討したので報告する．

装置

シアン化物イオン電極：前法[1]と同規格のイオン電極研究所製LT－08－SF型，感応面はフラット状，外径8㎜の電極を24本使用．電極ホルダー：厚さ5㎜のアクリル板に，拡散板上のアルカリ吸収室の位置に合わせて，電極を差し込む穴を開けたものを使用．拡散板[2]：材質は前報[1]のポリエチレン製から磁製に，また，試料室および吸収室の深さを15㎜に変更した（西村工業製）．パーソナルコンピュータ：NEC PC－9801F，CRTディスプレイ：NEC PC－KD551K，プリンター：NEC PC－PR201．CUⅢ：マルチプレクサー，メインアンプ，A／Dコンバータ，PC用インターフェイス（飯尾電機製）．増幅変換ユニット：電極中継コネクター部，バッファーアンプ（飯尾電機製）．

システムの概要

電極ホルダーにセットされた24本の電極を，増幅変換ユニット部の各々の電極受けに差し込む．シアン化物イオン電極で生じた起電力は，各電極毎に設けられたバッファーアンプを用いて安定化された後，マルチプレクサーに入力される．入力されたデータは，マイクロコンピュータの制御を受け指定されたチャンネル毎に切り換えられ，メインアンプにより0～5Vに増幅された後，デジタル信号に変換され，RS232Cインターフェイスにより，パーソナルコンピュータに転送され，所定のプログラムにより演算処理され，受付情報と共に整理され，デイスケットに格納される．（図1，2）

ソフトウエアーの構成

本プログラムは，①イオン電極による測定信号（mV）

*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

を，オンラインで取込み，自動的にシアンイオン濃度（$\mu g/ml$）に演算処理しディスケットに記憶する部分と，②検体の受付および成績表の作成等の，編集，整理，記憶を行う部分から成り立つ．使用中，プログラムの変更，追加，修正などが簡単に行えるように，プログラミング言語はBASICを用いた．

システムを起動させると画面にメニュー表が表示されるので，当日の作業にあったメニュー番号を選ぶ．（表1）

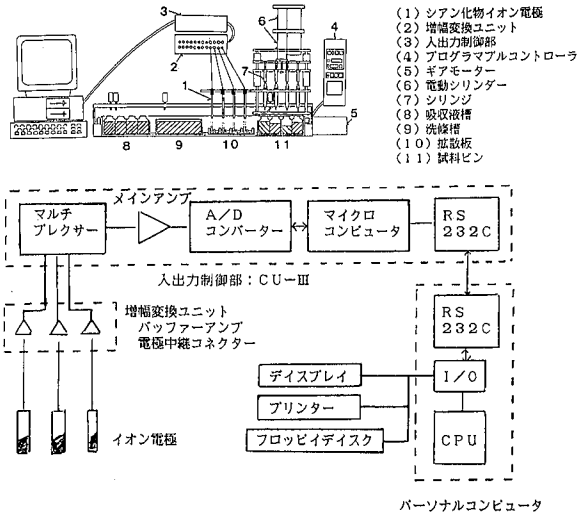


図1．装置概略図およびブロックダイヤグラム

1．シアン含有量の定量

シアン化物イオン電極の起電力は，0～－250mVと小さくまた不安定であるため，先のバッファーアンプを用いた．本システムで採用した複合シアン化物イオン電極は，感応電極の起電力を，内蔵する参照電極（銀－塩化銀電極）との電位差で取り出し，増幅，測定する．イオン電極法[3]では，測定電位とシアンイオン濃度との間に次式の関係があるが，一般的に，シアン化物イオン電極は，製品間の完全な互換性を持たせること，すなわち，実際の電極常数A，Bの各々を，全電極同一の値に保つことは困難である．そこで使用電極毎に各々の電極固有の常数を測定し，これを用いなければ正しいイオン濃度の測定はできない．

$$E = A \times 1n\,(C) + B$$

E：測定電位

C：シアンイオン濃度

A，B：常数

濃度既知の2種類の標準液を使用すれば，測定電位から各電極毎の常数AおよびBを求めることができる．本プログラムでは，常数A，Bの測定をイオンデンキョクノヒョウジュンコウセイ（メニュー2）で行い，そのデータ，すなわち常数A，Bは，電極常数ファイル“COR”に記憶され，〔センサ別補正係数表〕としてプリントアウトされる．表2の数字は上段から，電極端子番号，AおよびBを表す．

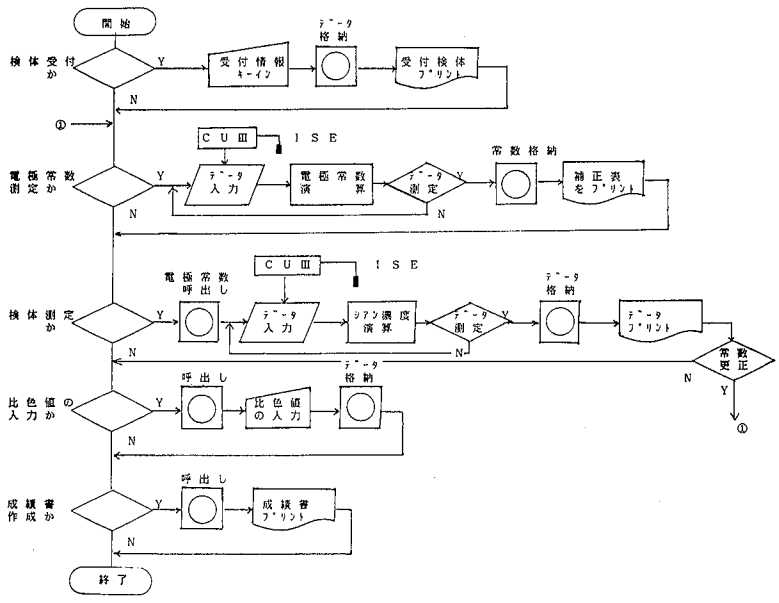


図2．シアン測定のフローチャート

表1．初期画面

[メニュウ]
(1) ケンエキ ノ ウケツケ セイリ
(2) イオンデンキョク ノ ヒョウジュン コウセイ
(3) ケンエキ ノ ソクテイ
(4) ヒショクチ ノ input
(5) セイセキショ ノ print
(6) DATA ノ テイセイ
(7) アタラシイ ディスケット ニ ホセイヒョウ ヲ ウツシカエ
ジッコウシタイバンゴウヲキーイン？

表2．ヒョウジュンコウセイで得られる電極常数

13：02 [センサ別 補正係数表]

No 1	No 2	No 3	No 4	No 5	No 6
30.778	30.184	30.457	30.184	31.864	29.190
110.380	112.380	118.880	116.130	115.000	118.000
No 7	No 8	No 9	No10	No11	No12
28.503	31.378	30.726	32.681	30.127	30.674
115.380	117.750	127.380	114.130	114.500	121.250
No13	No14	No15	No16	No17	No18
35.612	31.595	33.441	28.772	30.996	30.127
117.630	119.750	109.630	110.630	112.880	107.750
No19	No20	No21	No22	No23	No24
30.835	33.658	29.801	29.749	30.349	32.194
118.750	113.250	113.880	109.130	111.630	114.000

数字：上段から順に電極端子番号，常数AおよびB

電極常数ファイルのデータ・フォーマット

測定月日 □□／□□ 5バイト
A □□□・□□□ (単精度) 4バイト
B □□□・□□□ (単精度) 4バイト

従って，電極30本分のデータと測定月日（合計 245バイト）が1セクターに収納されている．

A，Bの測定は電極の劣化，破損などにより電極を補充した場合は必ず行う．また，A，Bの値は，測定条件あるいは使用にともなう劣化等により変動するため，検体の測定に先だって，そのつど，「ヒョウジュンコウセイ」を実行した方が，精度の良い測定ができる．補正に使用する標準液の濃度は任意に選べるが，当研究室では，1および10 μg/ml を使用している．常数は，測定のつど入換えられる．また，必要に応じて常数の一部のみを入換える事ができる．

2．シアン検体の処理

1）検体の受付け

メニュー表の1を選ぶ．

検体を月毎のファイル：□□SN（□□は受付月）にまとめ，6桁の研究室番号を付けてこの番号順に，送り先，送付番号，検体番号などの，検体送付名簿に記載された情報と共にディスクに収納する．研究室番号は，検体整理のため当研究室で付けたもので，初めの2桁が受付月でファイル名の□□，後の4桁がその月中に受付た検体の通し番号を表す．

検体の受付月，ブロック番号，検体数，最初の研究室番号等を入力する．始めに指定した検体数の処理が終われば受付表がプリントアウトされる．（表3）

検体ファイルのデータ・フォーマット

受付年月日 □□／□□／□□ 8バイト
ブロックの検体数 □□□□ (整数) 2バイト

表3．検体受付画面とプリントアウトされた表

1

```
1  50001  H  41  セイリNo ，ヨシテスト ，キタガワシキ？  2 ，  ，0
2  50002  H  42  セイリNo ，ヨシテスト ，キタガワシキ？  6 ，  ，0
3  50003  H  43  セイリNo ，ヨシテスト ，キタガワシキ？
```

2

コードNo	ケンキュウシツNo	B. No	月	ソウフNo	セイリNo	ヨシテスト	キタガワシキ
1	50001	H	4	1	2		0.00
2	50002	H	4	2	6		0.00
3	50003	H	4	3	8		0.00

テイセイガアリマスカ y／n？

3

[シアン濃度　試験検体受付表]　　受付年月日　61／05／27

[研究室番号]	[整理番号]	[B. No]	[月]	[送付番号]	[ヨシテスト]	[北川式]
50001	2	H	4	1		0.00
50002	6	H	4	2		0.00
50003	8	H	4	3		0.00

1：受付作業中の画面，2：作業終了時の画面，3：作業終了時に得られる受付結果表

試験年月日　□□／□□／□□　　8バイト
小計　　18バイト

メッキ廃水1検体

(1) 研究室No　□□□□□□　　6バイト
(2) ブロック別検体の通しNo　□□□□（整数）　　2バイト
(3) 整理No　□□□□（整数）　　2バイト
(4) ブロックNo　□□（文字）　　2バイト
(5) 採水月　□□（整数）　　2バイト
(6) 送付No　□□□（整数）　　2バイト
(7) ヨシテスト　□□□□□□（文字）　6バイト
(8) 北川式　□□□.□□□（単精度）　4バイト
(9) シアン測定値　□□□.□□□（単精度）　4バイト
(10) 判定　□　　1バイト
(11) 比色値　□□□.□□□（単精度）　4バイト
(12) 報告値　□□□.□□□（単精度）　4バイト
予備　　11バイト
小計　　50バイト

従って，1セクターに4検体のデータ（50×4＋18＝218バイト）が格納される．

データファイルは，電極常数ファイル“COR”と検体ファイル“□□SN”がランダムファイルで作成されている．電極常数ファイルのデータはそのつど書換えるので1セクターだけで良く，検体に使用できるセクター数は，2496（5インチ両面倍密倍トラックのディスケットのセクター数）－1＝2495セクターとなり，4×2495＝9980の検体のデータが，1枚のディスケットに収納可能である．月別にファイルを作成しているので多少のロスが生じるが，安全をみても1年間の検体に対応できる．

2）検体のシアン濃度測定

メニュー表の3を選ぶ．

このメニューの実行に先だってメニュー1の受付処理が行われている事が必要条件である．その日試験する予定の，検体受付月，検体数，最初に測定する検体の研究室番号，使用する電極の本数すなわち1度に測定する検体の数，電極の使用端子の最初の番号等をキー入力すると，必要な検体ファイルと電極常数ファイルがロードされる．

拡散処理が終了した拡散板のシールを取り去り，電極の位置を検液の上にセットし，マルチサンプラー[2]を操作して電極の上下および左右移動を行い，シアン濃度の測定を開始する．先の操作により使用する電極の常数が電極ファイルからロードされており，検体の測定電位から濃度が演算され，同時にその値が所定のデータファイルに格納される．測定の終了は，先に設定した試験本数分の測定が終わるとともに自動的に行われ，終了と同時に測定結果がプリントアウトされる（表5－1，2）．結果は，必要に応じて全部あるいは任意に設定した範囲で取り出せる．

表4．測定中の画面

13：29：40　　データトリコミチュウ　　1　　5

[センサーベツソクテイチ（ppm)]

No 1	No 2	No 3	No 4	No 5	No 6
1.01	1.00	1.01	1.03	1.01	1.01
No 7	No 8	No 9	No10	No11	No12
1.01	1.01	0.98	1.03	1.01	1.03
No13	No14	No15	No16	No17	No18
1.00	1.01	1.01	1.03	1.02	1.01
No19	No20	No21	No22	No23	No24
1.01	1.02	0.98	1.01	1.01	1.03

試験液：シアン標準液1 μg／ml

表5．シアン濃度試験成績書

1

[シアン濃度　試験成績書]　　試験年月日　61/06/02

[研究室番号]	[整理番号]	[B]	[月]	[送番]	[ヨシテスト]	[北川式]	[ppm]	[判定]	[比色値]	[報告値]
50001	2	H	4	1		0.00	0.00		……	0.0
50002	6	H	4	2		0.00	0.00		……	0.0
50003	8	H	4	3		0.00	0.00		……	0.0

2

[シアン濃度　試験成績書]　　試験年月日　61/06/02

[研究室番号]	[整理番号]	[B]	[月]	[送番]	[ヨシテスト]	[北川式]	[ppm]	[判定]	[比色値]	[報告値]
50001	2	H	4	1		0.00	0.21		……	0.0
50002	6	H	4	2		0.00	0.17		……	0.0
50003	8	H	4	3		0.00	0.30	*	……	0.0

3

[シアン濃度　試験成績書]　　試験年月日　61/06/02

[研究室番号]	[整理番号]	[B]	[月]	[送番]	[ヨシテスト]	[北川式]	[ppm]	[判定]	[比色値]	[報告値]
50001	2	H	4	1		0.00	0.21		0.01	0.0
50002	6	H	4	2		0.00	0.17		0.00	0.0
50003	8	H	4	3		0.00	0.30	*	0.25	0.3

1：電極測定実行前，2：測定終了時，3：比色値入力後に得られる試験結果表

検体24本の測定時間は見かけ上6秒である．すなわち測定中，画面には電極端子番号と測定値が表示されているが，右上に24本の電極毎の測定値の取込み状態が示され，電極端子1番から24番まで1巡するのに6秒かかる（表4）．各電極で，1回目の測定値の取込みが終了すれば2回目の取込みに入り，次の画面に移る．

3）比色値の入力

メニュー表の4を選ぶ．

比色値入力予定検体の，研究室番号の範囲を指定し，研究室番号順に，比色値，試験年月日をキー入力する（比色値は，公定法[4]に従って操作して得られたシアン濃度）．比色値を入力すると，この値がデータファイルに収納され，同時に，比色値の小数点以下2桁の数字を自動的に四捨五入した値が，報告値（最終的な試験報告値）として先のファイルに収納される．拡散試験のみ終了した時点では，表5－2のように比色値および報告値

は－－－および0.00となっているが，比色値の入力が終了すると，表５－３のような成績書が得られる．

４）成績書のプリントアウト

メニュー表の５を選ぶ．

シアン濃度測定時には，試験終了時に自動的に成績書が得られるが，このメニューにより，測定と独立して，以前に測定の終了している検体の成績書をプリントアウトすることができる．成績書の必要な検体の受付月数をキー入力すると，該当する検体ファイルがロードされ，最初の研究室番号と最後の研究室番号を入力して，必要な範囲を指定すれば，成績書がプリントアウトされる．（表５－１，２，３）

５）データの訂正

メニュー表の６を選ぶ．

ファイルに記憶されている内容を訂正したい場合は，研究室番号でファイルから呼び出し，必要な項目を選び，正しい値を入力する．測定値を訂正したい時には，改めて測定し直せば，後から測定した値が，前の値と書換えられて収納される．

６）補正表の移し換え

メニュー表の７を選ぶ．

年度の変更等によりディスケットの交換が必要になった場合，電極常数を新しいディスケットに移す作業をする．

７）システムのチェック

測定が正常に行われているかどうかをチェックするために，毎測定時，検体に引き続いて，シアンイオン標準液（１μg／ml）の測定を実施するようにしている．すなわち，測定値が，0.90～1.10の範囲にあり，24本の電極間および測定日間の標準偏差が，いずれも0.03以下となる場合にはシステムが正常であると判断し，使用する．測定値が上記の範囲を越える場合には，電極の劣化，接続部位の異常などが生じていると判断し，適正なシステムの修正を行ってから使用することとする．

結果および考察

当研究室が扱うメッキ廃水中のシアン定量用検体は，その数が極めて多いため，パーソナルコンピュータを導入した簡易測定の自動化システムを開発した．

本研究では，使用中のプログラムの変更，修正，追加など書換えが簡単なように，言語はBASICを用いた．

微量拡散－イオン電極によるシアン測定にコンピュータを導入することにより，拡散板上の24本の検体を１度に測定し，結果をプリントアウト出来るようになった．これにより，従来行っていた１検体ずつシアン濃度を測定し，測定値を読み取り，書き写すという操作が自動化され処理能率が上がった．

システムのチェック方法として採用した標準試料による方法は，実用面で適切に機能することが確かめられてきた．表４の例では，シアン標準液（１μg／ml）を用いて測定した場合の，24本の電極間の平均値および標準偏差が，1.01±0.01（CV 1.3%）となっておりシステムは正常である．

また，データファイルには，依頼書に記載された各情報，比色値および報告値などが収納されているため，測定済みの多数の検体データから，違反検体を取出したり，各データを照合する事が容易になった．

謝　辞　実験にご協力いただいた折井健氏に深謝いたします．

（本研究は，昭和60年度当研究所調査研究課題「シアン測定法の検討」として実施したものである．）

文　献

１）秋山和幸，長嶋真知子，奥本千代美，寺島　潔，萩原輝彦：分析化学，31,402,1982

２）高橋利恵子，奥本千代美，岩崎由美子，秋山和幸：東京衛研年報，37,85,1986

３）Frant M. S., Ross J. W. Jr. and Riseman J. H.: *Anal. Chem.*, 44,2227,1972

４）厚生省令第46号（昭和46年12月27日）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 85-89, 1986

微量拡散分析用多試料サンプラーの開発

高 橋 利恵子*, 奥 本 千代美*, 岩 崎 由美子*, 秋 山 和 幸*

Multi-sampler for Microdiffusion Analysis

RIEKO TAKAHASHI*, CHIYOMI OKUMOTO*, YUMIKO IWASAKI*
and KAZUYUKI AKIYAMA*

A multi-sampler was developed for application to microdiffusion analysis of cyanide in the waste water samples.

The sampler system consists of sampling, dispensing and washing processes. The operation unit consists of a programmable controller which controls the functions of the operation processes with limit switches. Samples or reagents are drawn into macropipette tips connected to glass syringes and dispensed into diffusion units. Twentyfour glass syringes are actuated by electric motor cylinders. To transfer between sample bottles, a reagent reservoir., diffusion units and a washing solvent container, the sampling dispenser unit on a rail is actuated by a reversible motor.

Precision of the multi-sampler was not more than 1.3% C. V. for 2m*l* and about the same as that of the conventional one.

The multi-sampler permitted rapid and effective sampling and dispensing for microdiffusion analysis.

Keywords: multi-sampler, microdiffusion analysis, cyanide, waste water

緒　　言

著者等は，メッキ廃水中シアンの測定の能率化，自動化の一環として，簡易測定法としての微量拡散分析法[1]を開発し，また本法の電極測定システムの自動化について前報[2]で報告した．今回，シアン化物イオン電極による測定の前段階である，微量拡散処理における，試料と試薬の分注作業の省力化のため，多試料同時サンプリング法について試行し，装置を試作，実用化を行ったので報告する．

既製品の多試料同時サンプリング装置には，数種類の容積計量方式のものがある．パルスモーターやエアーシリンダーによるプランジャー駆動のもの，空気圧と時間とノズルの口径により調節するもの等である．しかし，それらは同一試料の多点分注に限られていたり，試料数や分注の位置間隔が固定されている等の点から採用できなかった．そのため，著者等は，シアンの微量拡散分析法に適用するように，多種試料と同一試薬の分注が共にできる方式で装置を試作した．

実 験 の 部

1　多試料サンプラーの概要

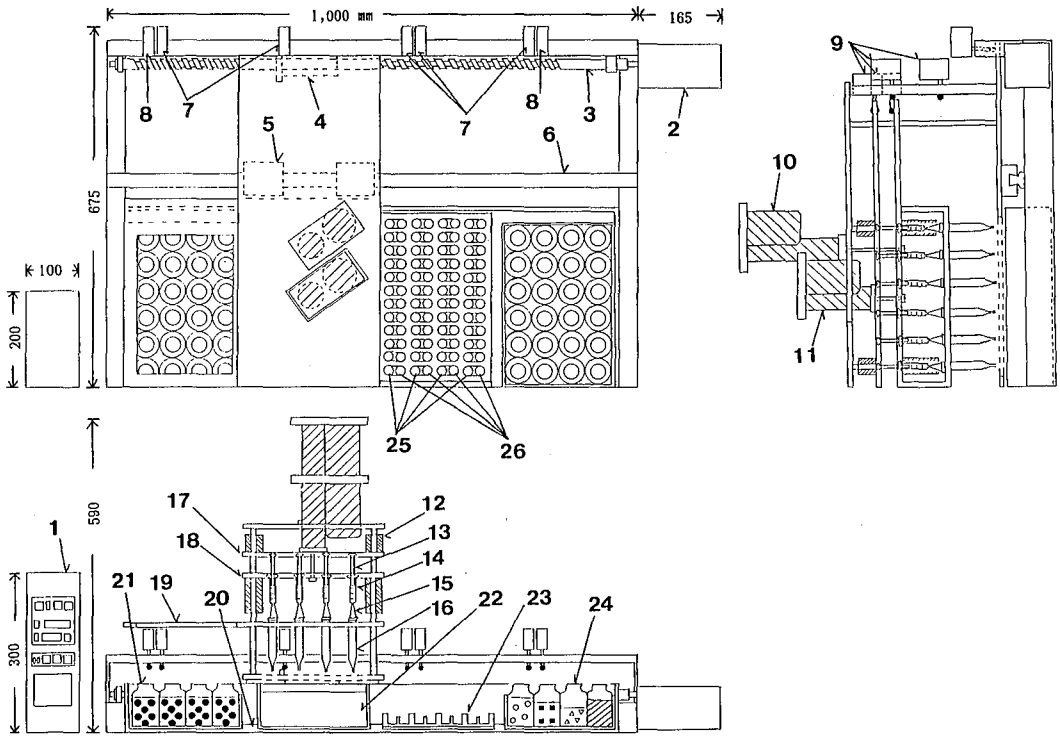
装置の構成を図1に示す．吸収液と試料を各々24本のシリンジに同時吸入計量し，拡散板に分注する．電動シリンダーによるプランジャー駆動の容積計量方式で，水平移動を組み合わせ，分注，洗條操作を自動的に行う．

2　構成

2－1　サンプラー部

24本のガラスシリンジ（2 m*l*）にマクロピットのチップ（5 m*l* 用）をチューブジョイントで接続したもので，シリンジとプランジャーはアクリル製支持板に固定されている．支持板の四隅にリニアボールベアリング4個をつけ，電動シリンダーにより上下動を行い，試料等を吸入吐出する．

*東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan



1 プログラマブルコントローラ
2 ギアモーター
3 ボールネジシャフト
4 ボールネジ軸受
5 リニアモーションベアリング
6 軌道台
7 リミットスイッチ（水平移動検出用5個）
8 リミットスイッチ（誤動作検出用2個）
9 リミットスイッチ（垂直移動検出用4個）
10 電動シリンダー（シリンジ支持板用）
11 電動シリンダー（プランジャー支持板用）
12 リニアボールベアリング（8個）
13 プランジャー
14 シリンジ
15 チューブジョイント
16 マクロピペット用チップ
17 プランジャー支持板
18 シリンジ支持板
19 イオン電極支持板
20 位置決めガイド用トレイ
21 吸収液槽
22 チップ及び電極水洗用洗條槽
23 拡散板（48ユニット）
24 試料ビン（24本）
25 拡散板吸収室
26 拡散板試料室

図1．多試料サンプラー

2－2 駆動部

a 水平駆動

電磁ブレーキ付ギアモーター（National 8RH25GB）およびボールネジによって，軌道台上のサンプラーを水平駆動する（回転数300RPM／min，速度23mm／sec）．リミットスイッチ（OMRON D4MC）で位置の検出を行う．位置は七カ所で吸収液槽，洗條槽，拡散板の吸収室，試料室，試料ビンの五カ所と誤動作検出用に両端に二カ所である．

b 垂直駆動

電動シリンダー（推力5 kg，速度25mm／sec）によりシリンジ支持板とプランジャー支持板を垂直移動させる．シリンジ支持板用シリンダー（SUZUKI SEIMITU KIKAI CO. LAM 5010S）はストローク100mm，プランジャー支持板用シリンダー（同 LAM 5005S）はストローク50mmのものを使用する．リミットスイッチで位置の検出を行う．位置はシリンジとプランジャーの上下各二カ所の計四カ所である．

2－3 制御部

工程歩進型プログラマブルコントローラ（OMRON SCYPO）がリミットスイッチを介して，サンプラーの水平，垂直移動を自動的に行う．動作フローチャート（図2）に従い入力したプログラムにより歩進動作を行う．ステップ数24，自動運転の分注と洗條の1工程は2分である．電極測定時は手動運転に切り換える．

2－4 イオン電極支持板

アクリル製，シリンジ支持板に固定してあり，拡散終了後に，ここにイオン電極を固定し前報[2]のようにイオ

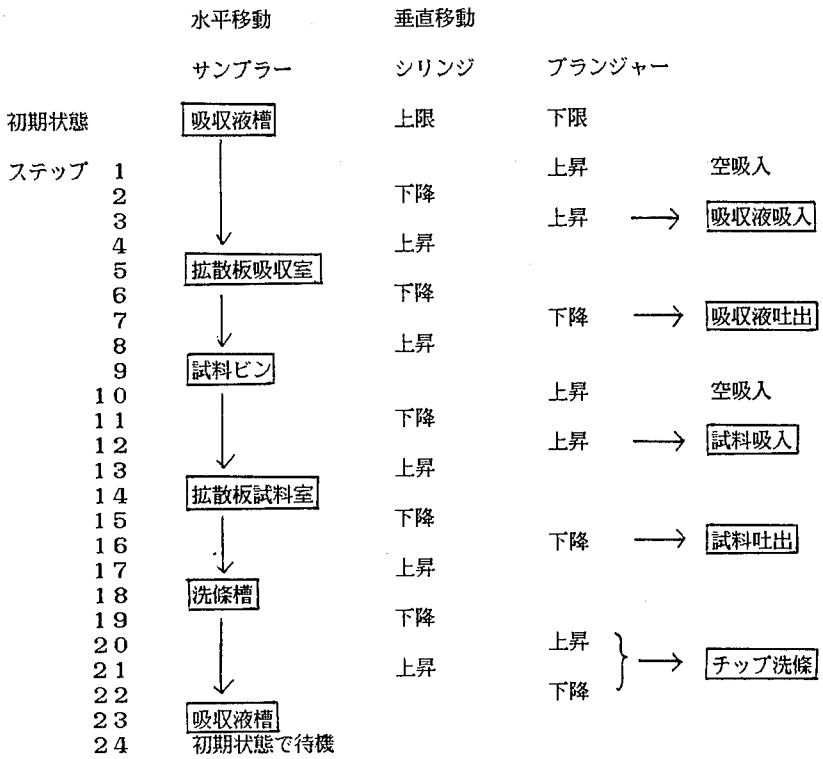


図2．多試料サンプラー自動運転の動作フローチャート

ン濃度の測定を行う．

3　操作手順

1）吸収液槽，洗條槽，拡散板，試料箱を位置決めガイド用トレイに沿ってセットする．吸収液は0.15N水酸化ナトリウム溶液．吸収液と試料は各々100m*l* のポリビン24本に入っており，塩ビ製の箱に24本を6行×4列に並べる．拡散板は1枚に48ユニットで，2回分注分をセットする．洗條槽には蒸留水を4.5*l* 入れる．

2）多試料サンプラーの自動運転で，吸収液と試料を各々2m*l* 分注し，チップの洗條を行う．

3）1回分注ごとに試料箱を交換し，2回分注ごとに拡散板を交換する．2回目の分注時には拡散板を1ユニット分，手前に移動して分注する．

4）分注後の拡散板試料室に濃硫酸0.1m*l* を添加し，フィルムでシールして，一夜放置する．

5）イオン電極を支持板にセットし，手動運転で，拡散板吸収室の吸収液に捕集したシアンイオン濃度を測定する．

4　タコ足分注器の試作

プラスチック製の箱（容量42m*l*）に24個の突起口をつけ，その先端にマクロピペット用チップ（1m*l* 用）とテフロンチューブ（0.5mm ϕ x 20cm）を接続し，チューブ先端は試料ビン（6行×4列）の中心点に合わせて位置決めをする．プラスチック製の箱に1個のマクロピペット（25m*l* 用）を接続し，24本同時に吸入，吐出する方式とした（図3）．

5　分注精度

水の重量測定により分注精度を求めた．多試料サンプラーは自動運転を5回行い，分注量2m*l* の時の，全体の変動係数（C.V.）値，繰り返し精度，シリンジ間バラツキ，絶対誤差を求めた．手動分注の場合は，吸収液はリビューレット（ニチリョー，10m*l* 用）に接続した

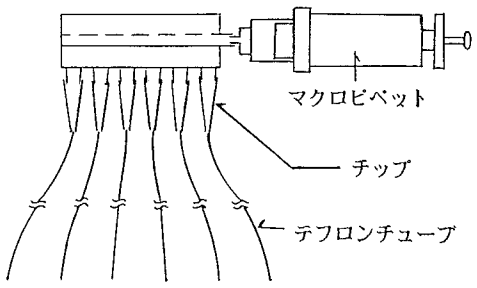


図3．タコ足分注器試作品

ニードルディスペンサー（リコオ，6本針）で，1 m*l* を6本同時分注し，試料はエッペンドルフピペット（4700）で，1 m*l* 分注した．手動分注は60回分注時の精度を求め，それらを比較した．

結果と考察

まず最初にオートサンプラーにどのような機能が必要か，またそのために必要な機構，機材構成を検討した．その結果，処理能力は一日当たり数百から一千検体とし，サンプリング部分は少なくともマクロピペットと同程度の精度，耐久性があることを条件に，迅速化，自動化をはかり，また装置の信頼性，経費の面から，できるだけ市販の機材を活用することにした．次ぎに細部について述べる．

1　サンプラー部（吸入，吐出部）

作業条件，拡散板，検体容器，装置の機構などを考慮して，液に接する吸入吐出部は，6行×4列の24試料同時処理型とした．容積計量方式は1本の大容量のシリンジの先端部を分岐する方式（タコ足分注器）と小容量のシリンジをそれぞれの接液部に直結する方式（シリンジ方式）について検討した．

試作したタコ足分注器は，6本分岐のニードルディスペンサーの場合とは異なり，わずかの衝撃で，吸入された液が保持されずに滴下しはじめることがあり，容積計量と液の保持を，24本もの多数まとめて行う，今回のタコ足方式は実用に適さないことが判明した．

シリンジ方式の場合，シリンジの材質は，ポリプロピレン製とガラス製で比較すると，ポリプロピレン製は破損しにくいという利点はあるが，プランジャーの上下動に要する力はガラス製の約10倍であり，プランジャー部のゴムの劣化により，連続使用に適さないことから，ガラス製を使用した．また，プランジャーの上下動の潤滑剤として，シリコン KF96（信越化学）を塗布することにより，良い結果が得られた．

採用した市販品ガラスシリンジのバラツキをみると，2 m*l* を分注した時のシリンジ間のバラツキは，C.V. 0.37%（n＝24）であった．多数を並列配置し，プランジャーの上下動を同時に行うように自動化した場合，シリンジ間のバラツキは1%以下を保持できると推定されたため，この方式を採用した．

2　垂直駆動部

エアーシリンダーは動きが滑らかであるが，空気の配管とコンプレッサーが必要なため，より簡便な電動シリ

表1．分注精度の比較

	吸収液	試料	
	多試料サンプラー	多試料サンプラー	タコ足分注器
分注量(m*l*)	2	2	1
n	24本×5回＝120	24本×5回＝120	24本×5回＝120
$\bar{X}$(m*l*)	1.8900	1.8915	1.0104
MIN	1.8456	1.8490	0.9682
MAX	1.9423	1.9259	1.0421
絶対誤差(%)	−7.7〜−2.9	−7.6〜−3.7	−3.2〜+4.2
C.V.(%)	1.3	1.1	1.7
繰り返し精度 (%, n＝5)	1.2〜1.5	1.0〜1.3	0.1〜0.7
シリンジ間のバラツキ (%, n＝24)	0.2〜0.6	0.3	1.6〜1.7 (チューブ間バラツキ)
	手動分注 ニードルディスペンサー (リコオ)6本針	手動分注 エッペンドルフ4700	
分注量(m*l*)	1	1	
n	60	60	
$\bar{X}$(m*l*)	0.9961	0.9822	
MIN	0.9732	0.9713	
MAX	1.0209	0.9991	
絶対誤差(%)	−2.7〜+2.1	−2.9〜−0.1	
C.V.(%)	1.0	0.7	

ンダーを採用した.

3 水平駆動部

ステッピングモーターは精度が良いが，価格の点でギアモーターを採用した.

4 制御部

ステップ数が5個以上の場合はリレーよりシークエンスプログラムのほうが低価格であり，プログラムの変更が容易である点から，プログラマブルコントローラを採用した.

5 分注精度

試作した多試料サンプラーなどの分注精度を表1に示す．吸収液，試料共に，多試料サンプラーは従来の手動分注やタコ足分注器の場合と比較し，全体のバラツキで，ほぼ同じ分注精度が得られた．なお，分注量は電極測定の便宜上，1 m*l* から 2 m*l* に変更した．多試料サンプラーの場合に，絶対誤差がマイナス側に偏っているのは，プランジャーの動きを 2 m*l* まで上げると，プランジャーのぶれを大きくし，シリンジが破損し易くなるという機械の構造上の問題から，吸入量を低めに設定したためである．しかし，吸収液と試料の対応でみると，試料に対する吸収液の比は97.6～102.7％と，良好な精度で，測定上問題はない.

6 処理能力

多試料サンプラーでは，1サイクル24試料の分注時間が2分で，従来の1／3に短縮，自動化され，特に処理件数の多いシアン廃水の測定には有効であった.

結　論

多試料サンプラーの試作，実用化を行った．分注精度は従来の手動分注と同程度のものが得られたので，これを廃水中シアンの微量拡散分析法に適用することにより，作業を省力化し，時間を短縮することができた.

謝辞 実験にご協力いただいた，阿部洋二氏と寺沢秀美氏に深謝致します.

（本研究は昭和60年度当研究所調査研究課題「シアン測定法の検討」として実施したものである.）

文　献

1）秋山和幸，長嶋真知子，奥本千代美，寺島　潔，萩原輝彦：分析化学，31,402,1982

2）奥本千代美，高橋利恵子，岩崎由美子，秋山和幸：東京衛研年報，37,79,1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 90-93, 1986

緑色204号（ピラニンコンク）中のピレンの高速液体クロマトグラフィーによる分離定量

伊藤弘一*, 観照雄*, 中村義昭*,
岸本清子*, 中村弘*, 渡辺四男也*

Determination of Pyrene in Green No. 204 (Pyranine conc, D & C Green No. 8) by High-Performance Liquid Chromatography

KOICHI ITO*, TERUO KAN*, YOSHIAKI NAKAMURA*, KIYOKO KISHIMOTO*,
HIROSHI NAKAMURA* and YOHYA WATANABE*

Determination of Pyrene remaining in Green No. 204 (Pyranine conc, trisodium salt of 1－hydroxy－3,6,8－pyrenetrisulfonic acid, Colour Index No. 59040, D&C Green No. 8) by high performance liquid chromatography (HPLC) is described.

Pyrene is a starting material of Green No. 204, and its amount is limited to 0.2% by weight of the dyestuff in the Code of Federal Regulations (CFR) of USA. Pyrene was extracted from the dyestuff with chloroform using a Soxhlet apparatus. The chloroform layer was washed with cold water until washings were colorless and filtered through Whatman 1 PS and evaporated with a rotary evaporator. The residue was dissolved in chloroform and determined by HPLC on Lichrosorb RP－18 column, using acetonitrile-water (70：30) as an eluting solvent and the fluorescent monitor (Excitation 334 nm, Emission 384 nm) for detection. A calibration curve showed linearity in the range of 0.02－2ng. Average recoveries of pyrene added in amount of 0.5 and 1.0 ppm to the dyestuff were 88.13 and 101.50%, and both of the coefficients variations were 2.64%. Fifteen samples of Green No. 204 produced domestically and abroad were analyzed according to the proposed procedure. Pyrene was quantitatively analyzed for all samples and its amount ranged from 0.06 to 1.82 ppm. This procedure can be successfully applied to the analysis of pyrene in Green No. 204.

Keywords：Pyrene, Green No. 204, D & C Green No. 8, high-performance liquid chromatography

緒　言

緑色204号（ピラニンコンク，Colour Index No. 59040）（以下PCと略す）は我国の薬事法において，その使用が外用の医薬品，医薬部外品および化粧品用色素として定められており，種々の規格が設けられている[1]．また，米国においても本色素は，D&C Green No.8という名称で，我国と同様に種々の規格が定められている[2]．

PCは，Fig. 1．に示すような経路により合成されているため本色素中には夾雑物として未反応のピレン（以下PYと略す）が含有される可能性がある．そしてPY

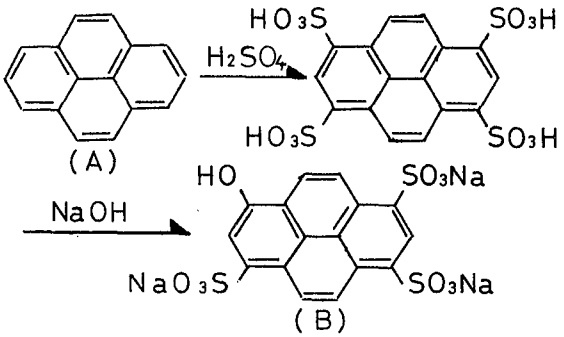


Fig. 1．Preparation of Green No.204
(A)Pyrene (B)Green No.204

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

Table 1. Recoveries of Ryrene from Green No. 204 by Various Extract Methods

Method	Spiked sample(g)	Added (μg)	Recovery			
			Range(%)	Av(%)	S. D.	C. V.(%)
Liquid-liquid ext.	5	20	93−105	97.75	5.85	5.98
Ultrasonicate ext.	5	20	85− 90	87.30	2.06	2.35
Reflux ext.	5	20	80− 90	88.13	2.32	2.63
Soxhlet ext.	5	20	98−100	98.75	0.96	0.97

No. of experiment 5

は新生物発現作用物質としてその毒性が認められている[3]. 我国においてはPC中のPYおよびその他の有機夾雑物の含有量は個々にではなく，クロロホルムエキス量として規定されているため，PYの含有量の規制はなされていない.

そこで著者らは，現在国内において流通しているPC中のPY含有量を調査する目的で，高速液体クロマトグラフ（以下HPLCと略す）法を用いて，国内および国外で製造された市販PCについて分析したところ，精度よく確認および定量を行うことができたので報告する.

実験方法

1．試薬 PY標準液：PY（東京化成）試薬特級，約10mgを精秤し，クロロホルムに溶して，100μg／mlの溶液とした.

その他の試薬：すべて試薬特級を用い，HPLC分析には，HPLC用試薬を用いた.

2．器具および装置 HPLC：日本分光TWINCLE

検出器：日立F1000螢光モニター

データ処理装置：島津クロマトパックC−R1A

ガスクロマトグラフー質量分析装置（GC−MS）：GC部；Hewlett Packard社製5710A型，MS部；日本電子D−300型（JMS2000システム付）

3．HPLC条件 カラム：メルク Hibar Lichrosorb RP−18（7μm）4 i.d.×250mm

溶離液：アセトニトリル／水（70：30）

測定波長：励起波長334nm，螢光波長384nm

温度：室温

4．GC−MS条件 カラム：2%OV−1（chromosorb W AW−DMCS, 60～80mesh 3feet）カラム温度：170° 注入口，検出器，セパレーター温度：250° イオン化電圧：70ev

5．定量法 試料約5gを精秤し，クロロホルム200mlを用い，ソックスレー抽出器を用いて6時間抽出を行う. 得られたクロロホルム層を冷水を用い，水層が着色しなくなるまで洗浄する. 水層をすて，クロロホルム層をワットマン1PSろ紙を用いてろ過後，ロータリーエバポレータにより，減圧留去する. 残留物にクロロホルム1mlを加え，その2μlをHPLCに注入する. PYの定量はピーク高により，PY標準液を希釈して得た0.01～1.00ppmの検量線を用いて行う.

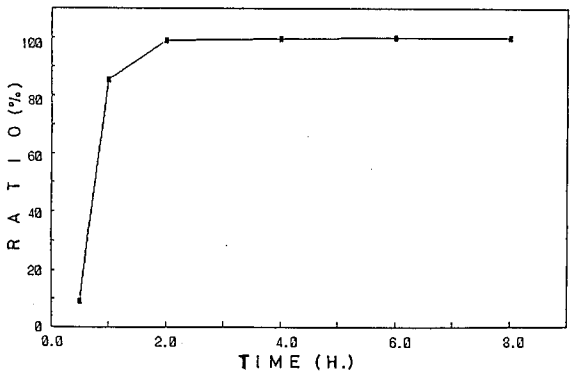


Fig. 2. Effect of Time on the Extraction Ratio of the Soxhlet Extraction Method

実験結果および考察

1．抽出方法の検討

クロロホルムを抽出溶媒として用い，PYの種々の抽出方法について検討を行い，結果をTable 1. に示した. 抽出方法として液−液抽出法，超音波抽出法，還流抽出法およびソックスレー抽出法を行ったところ，ソックスレー抽出法が，平均回収率98.75%，変動率0.97%と最も良好な値を示したため，ソックスレー抽出法を用いることとした.

2．抽出時間の検討

ソックスレー抽出における抽出時間と抽出率について検討を行い，結果をFig. 2. に示した. 抽出時間，15分より8時間まで検討を行なったところ，6時間で抽出率は100%となったため，抽出時間は6時間とした.

Table 2. Recoveries of Pyrene added to Green No.204

Addition (ppm)	No. of exp.	Recovery			
		Range (%)	Av (%)	S.D.	C.V. (%)
0.5	5	85.0− 90.5	88.13	2.32	2.64
1.0	5	98.5−104.0	101.50	2.68	2.64

3. HPLC 測定条件の検討

3－1. 充填剤および移動相　Amos. は多環芳香族炭化水素の分析用 HPLC カラムについて検討を行っているが[4]，著者らは本報告に基づき種々の HPLC カラムを検討したところ，逆相系のカラムである Hibar Lichrosorb RP−18（7 μm）が最適と認められたことにより，本カラムを用いることとした．また溶離液を検討したところ，アセトニトリル／水（70：30）が良好な分離を示したため，移動相にはこの溶離液を用いた．

3－2. 測定波長　PY の検出波長を検討したところ，Obana 等[5]が用いた励起波長334nm，螢光波長384nm の螢光測定法が最も感度が良好であったため，この波長を用いて測定を行なった．

3－3. 検量線　PY の標準溶液をクロロホルムにて希釈し，0.01～1.00ppm の標準系列を作成し，各溶液 2 μl をHPLC に注入し，得られたクロマトグラムよりピーク高（Y）を測定し検量線を作成したところ，PY の濃度（X）が0.01～1.00ppm（0.02～2.00ng）の範囲で，ほぼ原点を通る Y＝393X－2.2の直線関係が成り立つことが認められた．

4. 市販色素における添加回収実験および分析結果

試料約 5 g を精秤し，PY を 5 μg および100 μg それぞれ添加し回収率を求め，結果を Table 2. に示した．0.5および1.0ppm の添加量に対し，平均回収率は88.13%および101.50%と良好な値を示し，それぞれの回収率における変動係数もいずれも2.64%であった．また Fig. 3. に試料の HPLC クロマトグラムを示し，そしてクロマトグラム上のピレン相当ピークのGC−MS スペクトルを Fig. 4. に示した．PY 付近には妨害ピークは認められず，他成分との分離も良好であった．またマススペクトルにおいて，M^+が202であることにより，本ピークが PY であることを確認した．次に Table 3. に国内および国外で生産された市販色素の分析結果を示した．国産および外国産の両色素中の PY の含有量には差がみられず，PY の含有量は0.06～1.82ppm であった．なおこの値は米国の規格値[2]2000ppm を大巾に下まわるものであった．

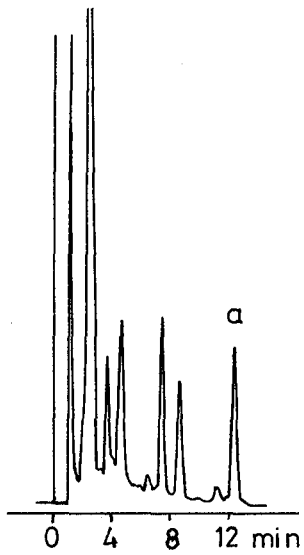


Fig. 3. HPLC chromatogram of commercial sample
HPLC conditions ; column : Hibar Lichrosorb RP−18 (7 μm, 4 i. d. X250mm), mobile phase : acetonitril−water (70 : 30), flow rate : 1 ml／min. FL detection wave length : EX. 334 nm, Em. 384 nm
Peak a : Pyrene

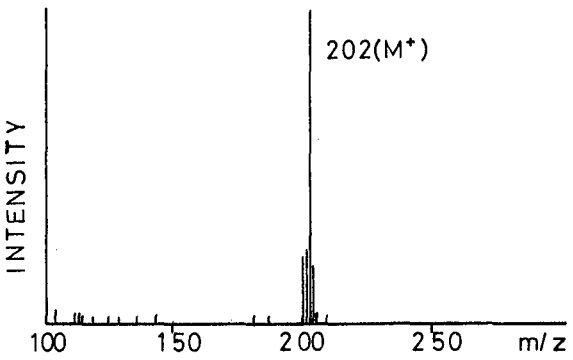


Fig. 4. EI Mass Spectra of the Peak a from HPLC Chromatogram of Commercial Sample

Table 3. Determination of Pyrene in Commercial Samples

Sample	found (ppm)	Sample	found (ppm)
1*	0.190	9	0.074
2	0.074	10	0.079
3*	0.069	11*	0.063
4	0.059	12*	0.084
5*	0.069	13	1.152
6	0.120	14*	1.824
7*	0.097	15	0.192
8*	0.065		

*) foreign-made articles

結　論

PC 中の PY の分析を意図し，前処理法および HPLC の測定条件について検討を行った．抽出溶媒として，クロロホルムを用い，ソックスレー抽出法を用いて抽出を行ったところ，PY は PC より定量的に抽出できることが認められた．また HPLC 用カラムとして逆相系の Hibar Lichrosorb RP−18（7 μm）を用い，溶離液として，アセトニトリル／水（70：30）を用いたところ，満足すべき結果が得られた．本法による PC からの PY の添加回収率は，添加量0.5 ppm において88.13%，1.0 ppm において101.50%であり，変動係数もいずれも2.64%であった．また国内および国外で生産された市販色素15種について，PY の含有量を調査したところ，含有量は0.06～1.82 ppm であった．この値は米国の規格値である2000 ppm をすべて下まわっていた．

文　献

1）厚生省令第30号（昭和41年８月31日）
2）Code of Federal Regulations (1985) Title 21, U. S. Goverment Printing office, Whashington, D. C. sec. 74. 1208 (b)
3）米国国立職業安全衛生研究所：化学物質毒性データ総覧，第７版，794,1979，日本メディカルセンター
4）Amos, R.,: *J. Chromatogr.*, 204,461,1981
5）Obana, H., Hori, S., Kashimoto, T. and Kunita, N.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 27,23,1981

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 94-98, 1986

家庭用品の衛生化学的研究（第17報）
ポリエステルおよびその混紡衣料品中の染色キャリヤーの残留量について

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 (XVII)
Residues of Some Carriers Used for Dyeing Proccess in Polyester and Its Mixed Textile Products

TAKASHI AMEMIYA*, MASAMI SAKAI*, KAZUO IKEDA*, KENICHIRO MORI*,
SUKEJI SUZUKI* and YOHYA WATANABE*

Trichlorobenzene, methylnaphthalene, biphenyl, dimethylnaphthalene, orthophenylphenol and benzylbenzoate mainly used as carriers in the dyeing process for polyester and polyester blended textile products were analysed by programmed temperature gas chromatography with a flame ionization detector.

The conditions for gas chromatography were as follows; column: 3 mm i. d. x 1 m, 5 % SE－30 (Uniport HP), column temperature: 100→250℃, rate of column temperature increase: 5 ℃／min, injection and detector temperature: 250℃, detector: FID, carrier gas flow rate: N_2 40m*l*／min, sample size: 5 μl.

Seventy samples of commercial textile products were analysed; trichlorobenzene, biphenyl and benzylbenzoate were detected from pajamas and girdles for women (trichlorobenzene: 130 ppm, biphenyl: 300 ppm, benzylbenzoate: 500 ppm), benzylbenzoate and biphenyl from pajamas for children (benzylbenzoate: 470 ppm, biphenyl: 130 ppm), methylnaphthalene and biphenyl from pajamas and underwears for babies (methylnaphthalene: 80 ppm, biphenyl: 200 ppm, biphenyl: 130 ppm).

Keywords : polyester textile product, carrier, trichlorobenzene, methylnaphthalene, biphenyl, dimethylnaphthalene, orthophenylphenol, benzylbenzoate, gas chromatography,

緒　言

ポリエチレンテレフタレートを主鎖とするポリエステル繊維は，繊維構造がきわめてち密なため，一種の難染性繊維となり，染着性を向上させる措置が講じられている．ポリエステル繊維は，通常，加圧下において120－130°の高温で染色される．しかし，このような加熱を伴う染色によって繊維の寸法安定性が失われたり，染色堅ろう度等がそこなわれる場合，染色キャリヤーと称する助剤を使用して100°以下の温度で染色する方法が用いられる[1,2]．染色キャリヤーとしては，芳香族炭化水素，芳香族塩素化炭化水素等のうち揮発性化合物が用いられる．これらは繊維内に吸収されて繊維分子間の結合をゆるめ，染料分子の繊維への浸透，拡散を容易にし，染着性を高める作用を有する．

染色キャリヤーは，染色仕上げ工程において150－160°の加熱処理により，大部分除去されるが，本来，キャリヤー染色法が繊維の高熱処理を避ける目的で使用されること，染色浴中の染色キャリヤーの濃度が3－5 g／*l* [1,2]と高いことを考慮すると，染色仕上げ後においてもかなりの染色キャリヤーが製品に残留することが考えられる．このため，キャリヤー残留衣料品を着用した場合，皮膚への影響が懸念される．

染色キャリヤーに関する報文は，原料としての染色キャリヤー剤[3,4]および市販布[5,6]について二，三みられるが，市販衣料品についての報告はみられない．

そこで今回，ポリエステル繊維およびその混紡衣料品

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

について染色キャリヤーの残留量調査をガスクロマトグラフィーにより行ったので報告する．

なお，調査対象は使用頻度の高いトリクロロベンゼン（TRCB），α－メチルナフタリン（MN），ビフェニル（BP），ジメチルナフタリン（DMN），オルトフェニルフェノール（OPP）および安息香酸ベンジル（BZB）とした．

実験方法

1 試薬 染色キャリヤー混合標準溶液：TRCB, MN, BP, DMN, OPP およびBZB（和光純薬）の各標準品をそれぞれ約500mgを精秤してアセトンに溶かし全量100mlとする．この溶液を必要に応じてアセトンで希釈して用いる．フロリジール：和光純薬，60－80メッシュ，内部標準溶液：ミリスチン酸イソプロピルをアセトンに溶かして250 μg／ml の溶液を調製する．

2 装置 ガスクロマトグラフ：島津製作所製GC－4CM，ガスクロマトグラフー質量分析計：島津製作所製LKB－9000

3 試料 昭和60年10月都内において，ポリエステル繊維あるいはポリエステル混紡衣料品を購入して試料とした．市販衣料品の総検体数は70検体であり，その内訳は，生後24ケ月以内の乳幼児が着用する衣料品20検体，子供用20検体，婦人用20検体および紳士用10検体である．

4 試験溶液調製 細切した試料1.0gを100ml ナス型フラスコにとり，ベンゼン50mlを加えて60分加熱還流した後，ガラスろ過器（G 2）で温時ろ過する．ろ液をロータリーエバポレーターを用いて減圧留去し，ついで残留物に２％酢酸エチル・ヘキサン混合溶液を加えて溶かす．つぎに内径10㎜，長さ300㎜のガラス製カラム管にフロリジール3.5gをヘキサンに懸濁させて充てんし，さらに無水硫酸ナトリウム１gを積層したカラムを調製する．さきに溶かした残留物をカラム柱に静かに注ぎ込み，２％酢酸エチル・ヘキサン混合溶液100mlを流して染色キャリヤーを溶出する．溶出液を減圧乾固して内部標準溶液１mlを加えてFID－GC用試験溶液とする．

5 FID－GCによる定量 染色キャリヤー混合標準溶液をアセトンで希釈して標準系列を調製し，FID－GC測定条件に従って操作を行い，内部標準物質に対するピーク高比から検量線を作成する．試験溶液についても同様に操作して試料中の染色キャリヤーの含有量を求める．

FID－GC測定条件 カラム：５％SE－30（Uniport HP，60－80メッシュ）３㎜φ×１m，カラム温度：100－250°，昇温速度：５°／min，注入口温度：250°，検出器：FID，キャリヤーガス流量：N_2 40ml／min，注入量：５μl

結果および考察

1 試験溶液調製の検討

抽出溶媒について 試料から染色キャリヤーを効率よく抽出できる溶媒について検討を行った．すなわち，細切したサラシ布地1.0gに染色キャリヤーをそれぞれ500μg添加し，抽出溶媒としてヘキサン，ベンゼン，メタノールおよびエタノールを用いて試験溶液調製およびFID－GC測定条件に従って操作した．その結果をFig. 1に示す．横軸には各染色キャリヤーの名称を示し，縦軸は抽出率を表した．まずアルコール系のメタノールおよびエタノールを抽出溶媒として用いた場合，TRCB, MNの抽出率はともに悪く50－60％程度であり，他の染色キャリヤーの抽出率も70－85％であった．つぎにヘキサンでは，TRCB, MN, BPおよびDMNは90％以上の抽出率を示したが，OPP, BZBは70％程度であった．これに対してベンゼンを用いた場合は，いずれの染色キャリヤーも95％前後抽出することができた．これはポリエステル繊維の染色には，主に分散染料が用いられることからも抽出溶媒としてベンゼンを用いることが妥当である．

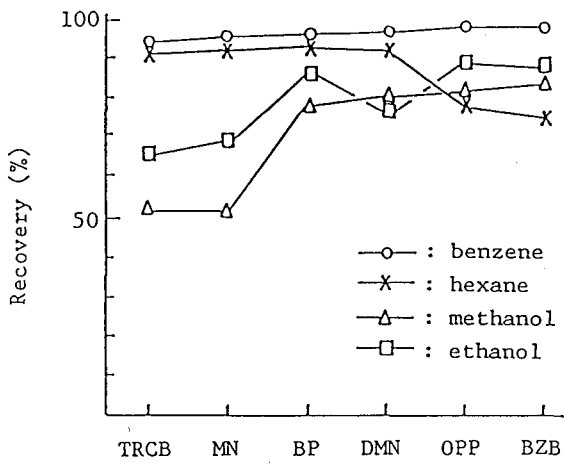


Fig. 1. Effect of solvents on extraction of dye carriers

抽出時間について ベンゼンによる抽出時間について検討を行った．すなわち，抽出溶媒の検討の項と同様に細切したサラシ布地1.0gに染色キャリヤーをそれぞれ500μg添加して，時間を10, 20, 30, 40, 50および60分とし，さらに120, 240分まで抽出を行った．その結果

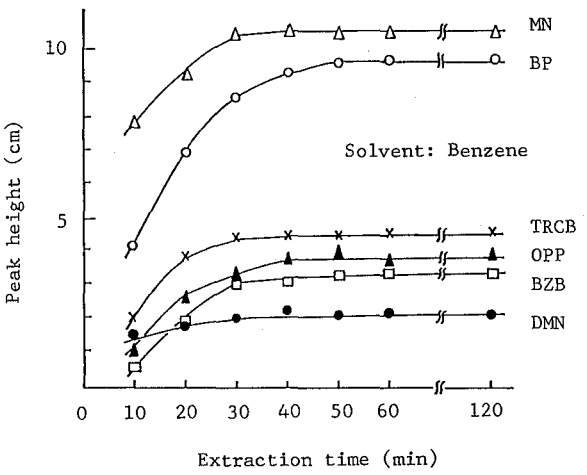


Fig. 2. Effect of reflux time on extraction of dye carriers.

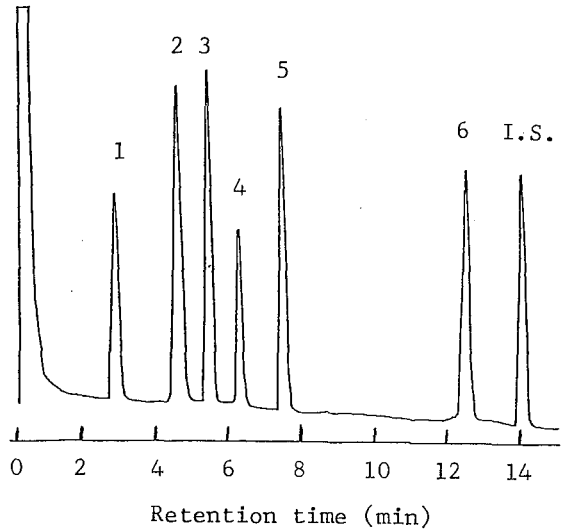


Fig. 3. Gas Chromatogram of Carriers

1 : trichlorobenzene (TRCB)
2 : methylnaphthalene (MN)
3 : biphenyl (BP)
4 : dimethylnaphthalene (DMN)
5 : orthophenylphenol (OPP)
6 : benzylbenzoate (BZB)
I.S. : Isopropyl myristate

を Fig. 2 に示す．いずれの染色キャリヤーも50分でほぼ定量的に抽出された．以上のことから抽出時間を60分とした．

クリーンアップの検討　市販衣料品中に残留している染色キャリヤーをベンゼンで抽出する際，抽出液が染料により赤，青，黄等に着色する場合が多いので，これを除去するためカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップについて検討を行った．まず吸着剤としてシリカゲル，アルミナ，フロリジールを選び，ヘキサンを用いて湿式法でカラムを調製した．溶媒としてヘキサンを用いて検討したところ，シリカゲルでは色素がカラムに吸着せず溶出液が着色した．またアルミナでは溶出に長時間を要した．フロリジールでは溶出液は着色せず，しかも溶出時間が短縮されたことから吸着剤としてフロジールを用いることとした．つぎにフロリジールカラムから染色キャリヤーのみを効率よく溶出できる溶媒について検討を行った．溶媒として①ヘキサン，②クロロホルム，③酢酸エチル，④メタノールを用いたところ，①では色素との分離は良好であったが OPP，BZB のフロリジールカラムからの溶出は悪かった．また②，③および④においては，色素がカラムから溶出してしまうことから用いることができなかった．そこで，ヘキサン・酢酸エチル混合溶液を用いたところ，カラムからの染色キャリヤーの溶出が良好であったので，つぎにその比率の検討を行った．その結果，2％酢酸エチル・ヘキサン混合溶液が最も有効であった．なお酢酸エチルの混合比を順次増加させ，4％をこえると色素の溶出がみられた．つぎに溶出溶液の液量について検討を行った．すなわち，2％酢酸エチル・ヘキサン混合溶液を用い，フロリジールカラムに各染色キャリヤーをそれぞれ500 μg，1000 μg 添加した．その結果，液量40－80m*l* で95％以上溶出したので溶出液の液量を100m*l* とした．

2　FID－GC 測定条件の検討　各染色キャリヤーの昇温ガスクロマトグラフィーに適したカラム充てん剤を選択するため，2％OV－1，2％OV－7，2％OV－11，2％OV－17，2％OV－101および5％SE－30の6種類の液相について検討を行った．OV－1，17，101では各ピークは若干テーリングしており，OV－7，11では BP と DMN のピークの分離が悪かった．5％SE－30を用いると他の5種類の液相に比して各ピークの分離およびプロフィルとも良好であった．これらの結果より，カラム充てん剤として5％SE－30（Uniport HP）を用いることとした．Fig. 3 には染色キャリヤー混合標準溶液の昇温ガスクロマトグラムを示した．FID－GC 測定条件では TRCB，MN，BP，DMN，OPP，BZB の順にピークが出現した．

3　検量線および添加回収実験　まず検量線については，染色キャリヤー混合標準溶液をアセトンで希釈して

Table 1. Recoveries of dye carriers from cotton fabrics

Sample	Sample weight (g)	Added (μg)	TRCB Recovery (%)	TRCB C.V. (%)	MN Recovery (%)	MN C.V. (%)	BP Recovery (%)	BP C.V. (%)
Cotton fabrics (bleached)	1.0	100	91.1	4.0	91.7	1.4	96.1	2.1
		500	90.3	2.3	94.1	1.5	94.5	2.8
		1000	91.1	2.9	90.5	1.7	93.5	2.0
			DMN		OPP		BZB	
			Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
Cotton fabrics (bleached)	1.0	100	95.2	4.9	99.5	2.4	97.4	3.7
		500	93.8	5.0	97.0	1.9	98.4	2.1
		1000	94.0	3.8	98.5	2.1	98.9	2.5

average value in triplicate

Table 2. Analytical results of dye carriers from commercial textile products

Sample	Materials		Colors	Dye carriers (ppm)			
Intermediate garment (for babies)	Po : 40	Co : 60	Light blue	MN	80	BP	200
Pajamas (for babies)	Po : 50	Co : 50	Blue, Grey	BP	130		
Pajamas (for children)	Po : 70	Co : 30	Yellow	BZB	470		
Pajamas (for children)	Po : 40	Co : 60	Blue	BP	130		
Pajamas (for women)	Po : 55	Co : 45	Dark green	BP	300	TRCB	130
Underwear (for women)	Po : 50	Co : 50	Belge	BZB	500		

Po : polyester Co : cotton

25, 50, 100, 200, 300, 400および500 ppm の標準系列を調製し，各溶液を FID－GC 測定条件に従って操作して作成した．各染色キャリヤーとも良好な直線性が得られた．

つぎに添加回収実験については，細切したサラシ布地 1.0g に各染色キャリヤーをそれぞれ100, 500および1000 μg の濃度段階を設けて添加し，本法による添加回収率を求めた．その結果を Table 1 に示す．結果はいずれも 3 回の繰り返しであり，各濃度段階において90％以上の回収率示した．また変動係数も 5 ％以下であり，ほぼ定量的に回収された．

4 **市販衣料品の分析結果** 本法を用いて市販衣料品70検体について染色キャリヤーの残留量を測定し，その結果を Table 2 に示す．検体はいずれもポリエステルを素材としたもの，あるいはポリエステル・綿混紡の衣料品を選んで行った．

まず，乳幼児用衣料品については，Table 2 に示すように中衣（トレーナー）からMN80ppmおよびBP200ppm を検出した．さらにパジャマからも BP130ppm を検出した．染色キャリヤーを検出した検体については，試験溶

液をGC－MSに付し，分子イオンピークにより確認を行った．つぎに子供用衣料品については，2検体からBP130ppm，BZB470ppmが検出され，婦人用パジャマからBP300ppmおよびTRCB130ppmが検出された．さらに婦人用下着（ガードル）からもBZB500ppmを検出した．

今回の調査において，染色キャリヤーを検出した衣料品は70検体中6検体であった．これらはいずれも材質がポリエステル・綿混紡であり，ポリエステル100％のものからは検出されなかった．

今回の調査において染色キャリヤーの残留が6検体に認められたが，これらがただちに皮膚へ影響するかどうかは明らかでない．しかし，6検体のうち乳児用および子供用衣料品からそれぞれ2検体ずつ検出されたことは，BP，OPP，BZBに皮膚刺激性の疑いがもたれている報告[7－9]があることからも決して望ましいことではない．

今回調査対象とした染色キャリヤーは，その代表的なものであるが，これら以外の染色キャリヤーも使用される場合があることから，今後も市販衣料品の広範な調査が必要であると考える．

ま と め

1　ガスクロマトグラフィーを用いて，ポリエステルおよびその混紡衣料品中の染色キャリヤーの残留量を調査した．

2　染色キャリヤーとして比較的使用頻度の高いトリクロロベンゼン（TRCB），α－メチルナフタリン(MN)，ビフェニル（BP），ジメチルナフタリン(DMN)，オルトフェニルフェノール（OPP）および安息香酸ベンジル（BZB）の6種類を選んだ．

3　試料をベンゼンで抽出後，フロリジールカラムに付して染料を吸着後，2％酢酸エチル・ヘキサン混合溶液で染色キャリヤーを溶出してFID－GCによって分析を行った．

4　ガスクロマトグラフィーは，充てん剤として5％SE－30（Uniport HP）を用い，カラム温度を100°から毎分5°の割合で250°まで昇温して分析したところ，各染色キャリヤーとも良好なピークが得られた．

5　本法を市販衣料品に適用したところ，70検体のうち6検体からTRCB，MN，BPおよびBZBを検出した．

謝　辞　本研究を行うにあたり，御便宜，御協力いただいた東京都衛生局薬務部薬事衛生課家庭用品担当井藤秀雄氏ならびに石田佳子氏に深謝いたします．

文　献

1）赤土正美：染色・加工学，147,1983，三共出版
2）繊維学会編：繊維便覧，加工編，823,1974，丸善
3）Karasek, W. F., Stepanik, T. : J. Chromatogr. Sci., 10, 573,1972
4）Perry, S. R., Green R. and Richard, L. : J. Chromatogr., 150,179,1978
5）間瀬孝一：名市大医誌，33－4,543,1982
6）間瀬孝一，藤瀬　浩，青山光子，平野　繁，吉川邦彦：日公衛誌，25,561,1978
7）麓　　泉，池田　清，河合享三：繊消誌，20－11，485,1979
8）藤瀬　浩，間瀬孝一，青山光子：日公衛誌，25，562,1978
9）西谷宣雄，原　一郎：産業医学，13－3,48,1971

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 99-104, 1986

家庭用品の衛生化学的研究（第18報）
塩化アルキル第四アンモニウムの水素化リチウムアルミニウムによる第三アミンへの誘導化とガスクロマトグラフィーによる定量法

酒井正美*, 池田一夫*, 森　謙一郎*, 雨宮　敬*,
鈴木助治*, 渡辺四男也*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XVIII)
Derivertization of Alkyl Quaternary Ammonium Chlorides to Tertiaryamine with $LiAlH_4$ and Analytical Method of the Ammonium Compounds by Gas Chromatography

MASAMI SAKAI*, KAZUO IKEDA*, KENICHIRO MORI*, TAKASHI AMEMIYA*,
SUKEJI SUZUKI* and YOHYA WATANABE*

Hexadecyl-and octadecyltrimethylammonium chlorides and dihexadecyl-, hexadecyloctadecyl-and dioctadecyldimethylammonium chlorides were converted into hexadecyldimethylamine, octadecyldimethylamine, dihexadecylmethylamine, hexadecyloctadecylmethylamine and dioctadecylmethylamine, respectively, by means of demethylation with lithium aluminium hydride in dioxane by heating in oil bath. For the analysis of their ammonium compounds, tertiary amines obtained were measured on 2 % OV－17 column by programmed-temperature gas chromatography with a hydrogen flame ionization detector. By this method, it was possible to distinguish between homologs of alkyl quaternary ammonium compound possessing hexadecyl group and octadecyl group. The present method was applied to the homologous analysis of their ammonium compounds in commercial household fabric softeners and hair rinses.

Keywords：stearyltrimethylammonium chloride, distearyldimethylammonium chloride, tertiaryamine, lithium aluminum hydride, demethylation, fabric softener, hair rinse

緒　言

塩化ステアリルトリメチル第四アンモニウムおよび塩化ジステアリルジメチル第四アンモニウムは，陽イオン界面活性剤のうちでも特に繊維や人毛に対して柔軟効果や帯電防止効果がすぐれているため，衣料用柔軟仕上げ剤やヘアーリンス剤として広範に使用されている[1,2]．これらの市販製品中の第四アンモニウム塩は，通常，オクタデシル基のほかにヘキサデシル基のものを混合しているものがほとんどである．製品に塩化ジステアリルジメチル第四アンモニウムを使用している場合はさらに複雑で，ジヘキサデシル基のもの，ヘキサデシル基とオクタデシル基のもの，ジオクタデシル基のものと3種類の同族体を含有している．しかし，市販製品に含まれる同族体の分布に関しては，今までのところ，ほとんど報告がなされていないのが現状である．

長鎖アルキル第四アンモニウム塩の分析法については，液体クロマトグラフ法[3,4]，ガスクロマトグラフ法[5-7]など，若干報告されているが，液体クロマトグラフ法は可視部検出器を装着してポストラベル法をとるなど，比較的操作が煩雑なため簡易な分析法とはいえない．これに対してガスクロマトグラフ法は，第四アンモニウム塩を一度ガスクロマトグラフィー（GC）に有利な揮発性物質に誘導する必要があるが，この点を克服できるなら有望な方法である．著者らは，前報[8,9]においてホフマン

*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

分解とGC分析を組み合せた方法を報告した．これはホフマン分解によりアルキル基を，対応する1－オレフィンに誘導するものであるが，同族体が混合して存在するときは分析が不可能となり，その適用に限界がある．そこで，今回は第四アンモニウム塩を還元的に脱メチル化してヘキサデシル基やオクタデシル基を保持した第三アミンへの誘導化を考えた．この脱メチル化法は小島ら[5]がすでに無水溶媒中水素化リチウムアルミニウム（$LiAlH_4$）を還元剤として用い，その還元成績体のGCについて報告している．しかし，この方法を直接ルーチン分析に適用することは操作性などに若干の改良が必要であり，以下の(1)～(3)について検討を行った．すなわち，(1)小島らは，塩化ジステアリルジメチル第四アンモニウムに関しては同族体の混合物を用い，GCのみで確認を行っているので，まず，Fig. 1に示す各第四アンモニウム塩の単体を用いて反応を行い，それぞれの還元成績体の単離同定を行う．(2)無水の反応溶媒や冷却器付の反応容器を用いるなど，煩雑な操作を必要とするので簡素化する．(3)製品分析への応用を示していないので，分析精度を含め実試料への応用を意図した分析法を求める．今回これらの点に留意して塩化アルキル第四アンモニウムのGC分析法を設定し，合せて若干の市販製品の分析を行ったので報告する．

実験の部

1．試薬　塩化ヘキサデシルトリメチル第四アンモニウム（**HTA**），塩化オクタデシルトリメチル第四アンモニウム（**OTA**）：東京化成工業製（特級），塩化ジヘキサデシルジメチル第四アンモニウム（**DHDA**），塩化ジオクタデシルジメチル第四アンモニウム（**DODA**）：花王石鹸㈱（各純度95.0%，94.4%），水素化リチウムアルミニウム（$LiAlH_4$）：和光純薬工業製，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．

塩化ヘキサデシルオクタデシルジメチル第四アンモニウム（**HODA**）の調製　オクタデシルジメチルアミン1.5g（5 mmol）と塩化ヘキサデシル1.3g（5 mmol）をジメチルホルムアミド10m*l*に溶かし，6時間加熱還流する．冷後，反応物をアルミナカラム（7g，1.5cmϕ×7.5cm）に付し，ベンゼン，ついで酢酸エチルを流して未反応のアミンを除去してからメタノールで第四アンモニウム塩を溶出する．この操作を繰り返し行い，得られたメタノール分画を留去する．アセトン－酢酸エチルより再結晶を行い無定形の無色結晶を得る．収率27%，これを分析法に従ってGC分析し，ピークの面積比より求めると**HODA**86.3%，**DHDA**4.4%，**DODA**3.5%，未反応アミン5.8%であった．

第四アンモニウム塩標準溶液：**HTA**，**OTA**，**DHDA**，**HODA**，および**DODA**をそれぞれ約100mg精秤し，エタノールに溶かして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（^1Hおよび^{13}C－NMR）：日本電子社製JEOLFX－270型，^1H 269.65MHz，^{13}C 67.8MHz

3．試料　昭和59年10月から昭和60年12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検体を試料とした．

4．試験溶液の調製　試料4～10gをとり，エタノールおよびベンゼンを加えて溶かし100m*l*とする．この5m*l*を目盛付共せん試験管（25m*l*，内径15mm×長さ180mm）にとり，ロータリーエバポレーターを用いて濃縮乾固し，エタノールや水分を除去する．これにジオキサン5m*l*，$LiAlH_4$ 50mgを加えて105°の油浴中2時間加熱する．冷後，10%水酸化ナトリウム溶液10m*l*を加えて過剰の$LiAlH_4$を分解し，50m*l*共せん付遠沈管に移す．ここにジエチルエーテル10m*l*を加えて2分間振とう抽出し，3000rpmで10分間遠心分離してエーテル層を分取する．再度抽出を繰り返したのち，エーテル層を合せて蒸留水10m*l*で振とう洗浄する．このエーテル層にセライト1gを加えて蒸発乾固し吸着させる．このセライトを粉砕し，内径1.5cm，長さ30cmのガラス管にシリカゲル2gをベンゼン－ジエチルエーテル（9：1）の混合溶媒を用いて充塡した長さ約6cmのカラムに重積する．これにベンゼン－ジエチルエーテル（9：1）40m*l*を流して夾雑物を除去したのち，つぎにクロロホルム－メタノール－10%酢酸（5：3：1）40m*l*を流して第三アミンを溶出する．この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たのち，メタノール5m*l*を加えて試験溶液とする．

添加回収実験用の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，精製水を加えて100%とする．

5．定量法　各第四アンモニウム塩標準溶液より**HTA**，**OTA**，**DHDA**，**HODA**および**DODA**をそれぞれ0.5，1，2，3，4，5m*l*をとり，以下試験溶液の調製の項に従って操作し，100，200，400，600，800，

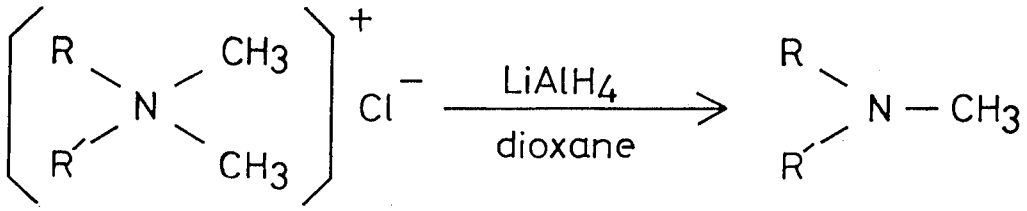


Fig. 1. R=CH_3, R′=$C_{16}H_{33}$: hexadecyltrimethylammonium chloride (**HTA**)
R=CH_3, R′=$C_{18}H_{37}$: octadecyltrimethylammonium chloride (**OTA**)
R=R′=$C_{16}H_{33}$: dihexadecyldimethylammonium chloride (**DHDA**)
R=$C_{16}H_{33}$, R′=$C_{18}H_{37}$: hexadecyloctadecyldimethylammonium chloride (**HODA**)
R=R′=$C_{18}H_{37}$: dioctadecyldimethylammonium chloride (**DODA**)

1000ppm 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：2％ OV－17 (Chromosorb W AW DMCS, 80－100mesh) 内径3 mm×長さ500mm，注入口温度および検出器温度：330°，カラム温度：130°→300°（昇温速度7.5°／min.），キャリアガス：$N_2$60ml／min., $H_2$1.5kg／cm², Air2.0kg／cm²

NMR 試料を重クロロホルムにとかし，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（δ ppm）を示した．

結果および考察

1．脱メチル化反応の検討 Fig. 1 に示すように，アルキル基が C_{16} と C_{18} を有する第四アンモニウム塩について25ml の目盛付共せん試験管（内径15mm×長さ180mm）を用い，ジオキサン中 $LiAlH_4$ を加えて開放系で加熱して還元し，その還元成績体について同定を行った．**HTA**, **OTA**, **DHDA**, **HODA** および**DODA** の各50mg を25ml の試験管にとり，ジオキサンと $LiAlH_4$100mg を加えて油浴中で加熱し，溶媒が突沸したり蒸発が激しくならないように静かに反応させた．反応後，水酸化ナトリウム溶液で過剰の $LiAlH_4$ を分解してエーテル抽出し，還元成績体を GC で昇温分析した．Fig. 2 に示すように，いずれの第四アンモニウム塩もガスクロマトグラム上1本の主ピークが認められた．そこで，これらをシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シリカゲル60, 2 g, 1.5cm ϕ × 3 cm）に付しピーク1－5に相当する還元成績体を単離した．**HTA** および **OTA** の還元成績体は，GC－MS より m／z279 (M^+), 297 (M^+) を示し，NMR データより $-CH_2-N\leqq$ [H^1－NMR ($CDCl_3$) δ：2.23 (2 H, t) ppm, ^{13}C－NMR ($CDCl_3$) δ：60.1

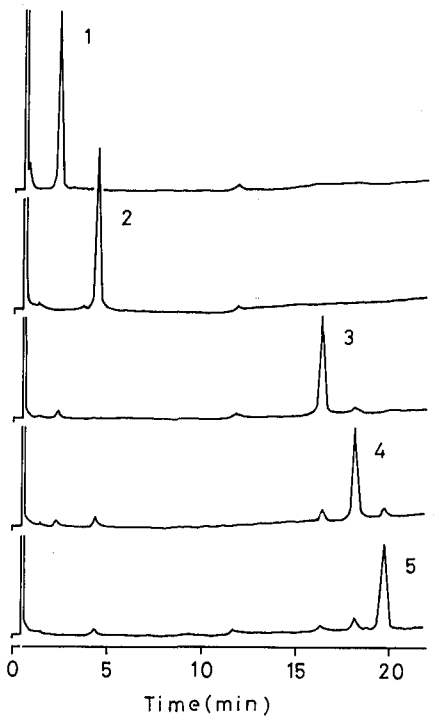


Fig. 2. Gas Chromatograms of Tertiaryamines Formed from Alkyltrimethyl-and Dialkyldimethylammonium Chlorides
Conditions : 2% OV－17/Chromosorb W AW-DMCS (80－100mesh), 3 mm ϕ x 500mm, Column temp. 130°→300°, Program rate : 7.5°/min., Carrier gas : 60ml/min.
Peaks : 1. hexadecyldimethylamine,
2. octadecyldimethylamine,
3. dihexadecylmethylamine,
4. hexadecyloctadecylmethylamine,
5. dioctadecylmethylamine

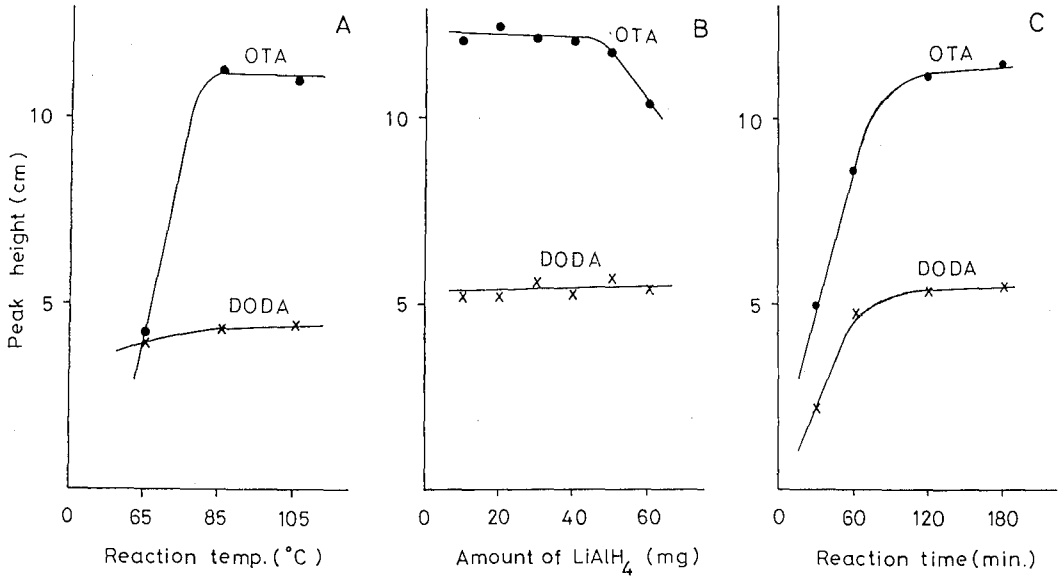


Fig. 3. Effect of Reaction temperature, Amount of $LiAlH_4$ and Reaction time on the Formation of Tertiaryamine from **OTA** and **DODA**

(t) ppm〕および$-N\lessgtr^{CH_3}_{CH_3}$〔2.21 (6 H, s) 45.5 (q)〕が認められるため，ピーク1はヘキサデシルジメチルアミン，ピーク2はオクタデシルジメチルアミンと同定した．また，**DHDA**，**HODA**および**DODA**はm/z479, 507, 535にM^+を示し，それぞれ$-CH_2-\underset{|}{N}-CH_2-$〔2.27 (4 H, t), 2.31 (4 H, t), 2.28 (4 H, t), 58.0 (t), 57.9 (t), 58.0 (t)〕および$\gtrless N-CH_3$〔2.20 (3 H, s), 2.22 (3 H, s), 2.19 (3 H, s), 42.3 (q), 42.3 (q), 42.4 (q)〕が認められることから，ピーク3はジヘキサデシルメチルアミン，ピーク4はヘキサデシルオクタデシルメチルアミン，ピーク5はジオクタデシルメチルアミンと同定した．従って，Fig. 1に示すようにいずれの第四アンモニウム塩においても，$LiAlH_4$の脱メチル化反応によりジオキサン中で第三アミンを生成することが確認できた．小島らの結果と同様にこの反応は優先的にメチル基を脱離することがわかった．そこで，つぎにこれらの反応条件について検討を行った．

2．反応条件の検討　反応温度　**OTA**，**DODA**の各5 mgをジオキサン中，反応温度（油浴温度）を65°，85°，105°に変えて反応させ，生成したオクタデシルジメチルアミン，ジオクタデシルメチルアミンをFID－GCのピーク高で観察した．Fig. 3のAに示すように，85°以上で第三アミンの生成率が一定となったので，今回は反応温度を105°に設定した．

$LiAlH_4$の添加量　**OTA**，**DODA**の各5 mgに対し反応温度105°の条件下で$LiAlH_4$の添加量をFig. 3のBに示すように10mgから60mgまで増加させて反応させたところ，$LiAlH_4$は10mgでも反応は十分進行することがわかった．$LiAlH_4$の添加量は50mgに設定した．

反応時間　**OTA**，**DODA**の各5 mgに対しジオキサン中，$LiAlH_4$50mgを加えて105°で反応時間を30分から180分に変えて反応させたところ，Fig. 3のCに示すように120分でほぼ生成率が一定となったので反応時間を120分に設定した．

3．妨害物質の除去　前述の設定した分析条件を市販のヘアーリンス剤に適用して脱メチル化反応を行ったのち，エーテル抽出し，そのエーテル層をGC分析するとFig. 4のAに示すように目標の第三アミンを妨害するピークが認められた．これらはGC－MSの脱水ピークよりFig. 4のAに示した高級アルコール類であることがわかった．そこで，シリカゲルカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップを行い，ベンゼン－ジエチルエーテル（9：1）で高級アルコール類を含む夾雑物を除去したのち，クロロホルム－メタノール－10%酢酸（5：3：1）で第三アミンを溶出した．(Fig. 4のB)なお，ヘアーリンス剤はセタノールや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，これらの脱メチル化反応に対する影響を調べるため**OTA** 5 mgに

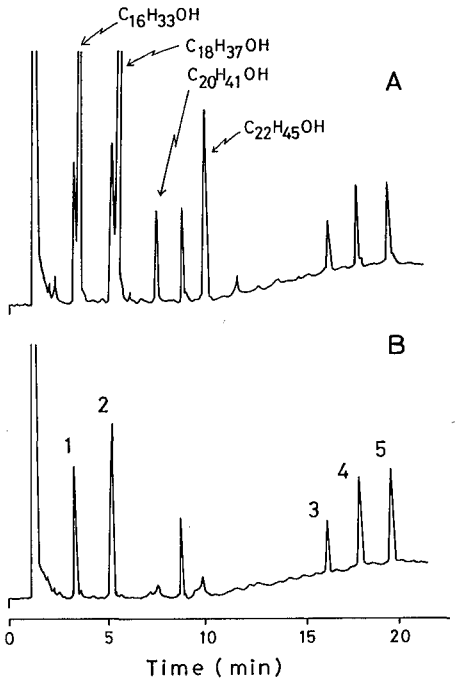


Fig. 4. Gas Chromatograms of Tertiaryamines Derived from Alkyltrimethyl-and Dialkyldimethylammonium Chlorides in Hair Rinse
Peak 1,2,3,4 and 5 are showed in Fig. 1.

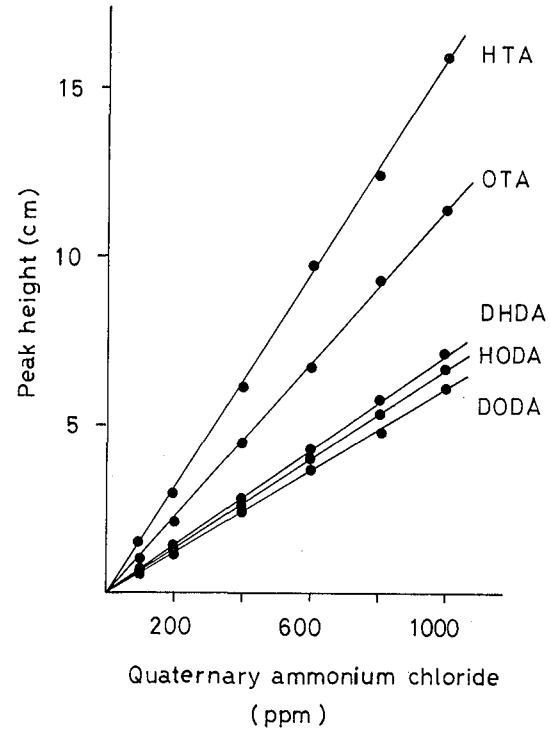


Fig. 5. Calibration Curves for Alkyltrimethyl-and Dialkyldimethylammonium Chlorides

セタノールやプロピレングリコールをそれぞれ2％および5％に相当する濃度を添加して反応させたところいずれも妨害は認められなかった.

4. 検量線 試験溶液の調製に従って **HTA**, **OTA**, **DHDA**, **HODA** および **DODA** の各第四アンモニウム塩を処理し, GC のカラム温度を130°から300°まで昇温して測定した. Fig. 5 に示すように検量線はいずれも100～1000ppm の濃度範囲で良好な直線性を示した.

5. 添加回収実験 試験溶液の調製に示した処方に従って調製したリンス剤に第四アンモニウム塩を加えて回収率を求めた. リンス剤0.5g に対し **HTA**, **OTA**, **DHDA**, **HODA** および **DODA** をそれぞれ1および3 mg添加し, 定量法に従ってGC分析を行った. Table 1 に示すように回収率は91.2～104.3%, C. V. は1.7～4.5%であった.

6. 市販製品の分析結果 Table 2 に市販のヘアーリンス剤6種, 衣料用柔軟仕上げ剤2種類の分析結果を示す. AからEまでのヘアーリンス剤は「塩化ステアリルトリメチルアンモニウム, 塩化ジステアリルジメチルアンモニウム」の含有を表示されているもので, これらは

Table 1. Recovery Test for Alkyltrimethyl-and Dialkyldimethylammonium Chlorides from Hair Rinse

Compound	Added (mg)	Average recovery (n=3) (%)	C. V. (%)
HTA	1	91.7	1.9
	3	98.9	2.2
OTA	1	92.7	3.6
	3	92.7	2.3
DHDA	1	96.7	4.5
	3	99.2	1.7
HODA	1	97.7	1.9
	3	93.3	2.5
DODA	1	104.3	4.5
	3	91.2	3.4

The quaternary ammonium chlorides were added to 0.5g of handmade rinse solution. The rinse formula is as follows ; propyleneglycol 2%, polyoxyethylene stearylether 1.5%, polyoxyethylene oleylehter 5%, colour and perfume q. s., the whole quantity 100% with purified water.

Table 2. Analytical Results of Alkyltrimethyl-and Dialkyldimethylammonium Chlorides in Commercial Hair Rinses and Liquid Softening Agents

Sample		Quaternary ammonium chloride content (%)					Total (%)
		HTA	**OTA**	**DHDA**	**HODA**	**DODA**	
Hair rinse	A	0.14	0.68	0.20	0.51	0.56	2.09
	B	0.09	0.32	0.23	0.60	0.68	1.92
	C	0.15	0.67	0.19	0.44	0.50	1.95
	D	0.12	0.57	0.06	0.15	0.16	1.06
	E	0.59	1.60	0.16	0.44	0.47	3.26
	F			0.30	0.87	0.96	2.13
Softening agent for clothes	G			0.51	1.67	1.88	4.06
	H			0.62	1.74	1.99	4.35

いずれも **HTA**, **OTA**, **DHDA**, **HODA** および **DODA** の混合物であり，総含有量は1.06～3.26%であった．また，Fは「塩化ジステアリルジメチルアンモニウム」と表示されているもので **DHDA**, **HODA** および **DODA** の混合物で総含有量は2.13%であった．衣料用柔軟仕上げ剤は2種類で陽イオン系界面活性剤と表示されており，これらは **DHDA**, **HODA** および **DODA** の混合物で総含有量は4.06%と4.35%であった．以上，本定量法により，市販製品中の第四アンモニウム塩の同族体を精度良く分析することができた．

結　論

ヘキサデシル基とオクタデシル基を有する塩化アルキルトリメチル第四アンモニウム塩と塩化ジアルキルジメチル第四アンモニウム塩について $LiAlH_4$ を還元剤として脱メチル化反応を検討し，ジオキサン中でそれぞれアルキルジメチルアミンとジアルキルメチルアミンに誘導した．これらの第三アミンはFID－GCの昇温ガスクロマトグラフィーで同族体の分離が認められた．特に，ジヘキサデシルメチルアミン，ヘキサデシルオクタデシルメチルアミンおよびジオクタデシルメチルアミンのピークより塩化ジアルキルメチル第四アンモニウムの同族体の識別が可能であった．また，本分析法を市販のヘアーリンス剤や衣料用柔軟仕上げ剤の第四アンモニウム塩の分析に適用することができた．

文　献

1）化粧品原料基準注解編集委員会編：化粧品原料基準注解，第2版，185,1984,薬事日報社
2）Puchta, R.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61,367,1984
3）Kawase, J.: *Anal. Chem.*, 52,2124,1980
4）Kawase, J.: *J. Chromatography*, 262,293,1983
5）小島次雄，岡　恒：工業化学雑誌，71,1844,1968
6）Metcalfe, E. D.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 40,25,1963
7）Takano, S., Takasaki, C., Kunihiro, K. and Yamanaka, M.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 54,139,1977
8）鈴木助治，酒井正美，森謙一郎，雨宮　敬，風間成孔：東京衛研年報，35,138,1984
9）酒井正美，池田一夫，森謙一郎，雨宮　敬，鈴木助治，渡辺四男也：東京衛研年報，36,108,1985

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 105-110, 1986

家庭用品の衛生化学的研究（第19報）
ガスクロマトグラフィーによる塩化ベンゼトニウムの定量法

池田一夫*, 酒井正美*, 森　謙一郎*, 雨宮　敬*,
鈴木助治*, 渡辺四男也*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XIX)
Gas Chromatographic Method for the Determination of Benzethonium Chloride

KAZUO IKEDA*, MASAMI SAKAI*, KENICHIRO MORI*, TAKASHI AMEMIYA*,
SUKEJI SUZUKI* and YOHYA WATANABE*

A simple method for the determination of benzethonium chloride (1) by gas chromatography is described. Benzethonium chloride was easily decomposed with potassium *t*－butoxide in benzene at 40℃ for 30 minute. The reaction products were identified as 2－{2－[p－(1,1,3,3－tetramethylbutyl) phenoxy] ethoxy} ethylene (2), benzyldimethylamine (3) and p－(1,1,3,3－tetramethylbutyl) phenol (4) by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy, and the compounds (2) and (4) were measured on 5 % SE－30 column with a hydrogen flame ionization detector. Using the peak (2) on the gas chromatogram, (1) was determined in the range of 1－10mg with good precision below 5 % of coefficient variation. The present method is useful for the routine analysis of (1) in commercial disinfectants.

Keywords: benzethonium chloride, gas chromatography, NMR spectroscopy, mass spectrometry, disinfectant, modified Hofmann degradation.

緒　言

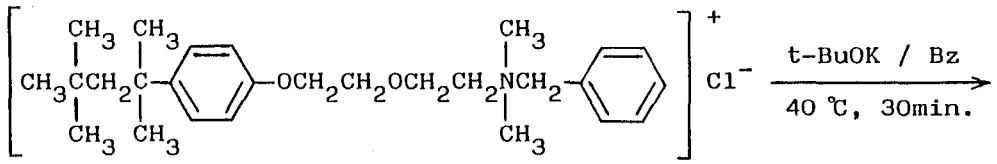
塩化ベンゼトニウムは，塩化ベンザルコニウムと同様に強い殺菌力があり，表面張力を低下させる作用，清浄作用，角質溶解作用，乳化作用，防臭作用を有するため，医療用殺菌消毒剤，制汗剤，化粧品等に使用されている．塩化ベンゼトニウムの分析法として，分光光度法[1-4]，滴定法[5]，ガスクロマトグラフ（GC）法[6-7]，高速液体クロマトグラフ（HPLC）法[7]など数多くの報告がある．しかし，分光光度法および滴定法は，いずれも第四アンモニウム塩類一般の分析法であり，これらの成分と塩化ベンゼトニウムとが混合して配合された場合その分別定量は不可能である．また，GC法およびHPLC法は，試料の前処理が比較的煩雑であるという欠点を有しているが，これを改良することができれば，塩化ベンゼトニウムを分離分析するためにきわめて有望な手段である．

著者らは，前報において，Hofmann分解を利用した一連の第四アンモニウム塩のGC分析法を報告している[8-10]．この方法は，不揮発性の第四アンモニウム塩をGC分析に有利な揮発性の誘導体に化学変換するものであり，脱メチル化反応により第三アミンに誘導して行う方法とは異なる分析方法である．すなわち，第四アンモニウム塩をベンゼン－ジメチルスルホキシド混合溶媒中または単にベンゼン中で，塩基としてカリウム*t*－ブトキシドを用いて分解し，長鎖アルキル基を対応する1－オレフィンに変換し，GC分析するものである．この分析法は前処理が簡便であり，定量分析の精度も良好である．そこで今回は，第四アンモニウム塩ののなかでも特異な構造を有する塩化ベンゼトニウム(1)にこの分析法を適用し，生成したオレフィン2のGC分析より，満足すべき結果を得たので報告する．

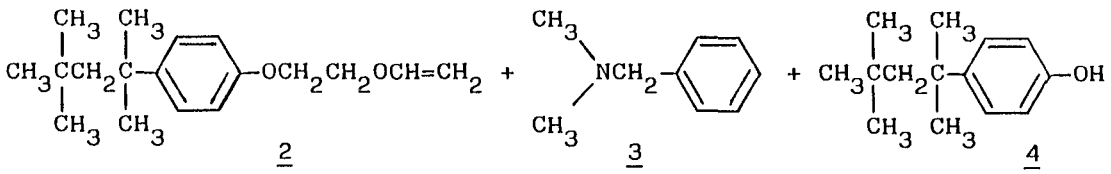
実験の部

1．**試薬**　塩化ベンゼトニウム（東京化成工業製，

*東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan



benzethonium chloride (1)



2 3 4

Fig. 1.

TCI－EP)，カリウム*t*－ブトキシド（*t*－BuOK）（和光純薬工業製，特級），重クロロホルム（99.7%，Merck），その他の試薬はすべて特級を使用した．

塩化ベンゼトニウム標準溶液：塩化ベンゼトニウムを約100mg精秤し，エタノールに溶解し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）：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}C67.8MHz.

3．**試料**　昭和60年度中に都内で購入した消毒剤3検体（A，B，C）を試料とした．

4．**試験溶液の調製**　100m*l*の3角フラスコに塩化ベンゼトニウムを一定量（1－10mg）採取し，水分やエタノールを除去するためにロータリーエバポレータを用い40℃で試料を蒸発乾固する．これに，ベンゼン（Bz）20m*l*，*t*－BuOK100mgを添加して，密栓し，40℃で30分間インキュベートする．冷後，反応溶液を100m*l*の分液ロートに移し，フラスコはBz 5 m*l*で2回洗浄し分液ロートに合わせる．このBz層を10%塩化ナトリウム溶液20m*l*で15秒間振とうすることにより1回洗浄する．Bz層を100m*l*のナス型フラスコに移し，n－ノナン0.5m*l*添加しロータリーエバポレータを用い40℃で約1m*l*まで濃縮する．濃縮した溶液をアセトンを用い目盛り付き共栓試験管に移し，アセトンを加え全量を5m*l*とする．これをGC用試験溶液とする．

5．**分析操作**　塩化ベンゼトニウム標準溶液より塩化ベンゼトニウムをそれぞれ1～10mgまで1mg間隔で採取し，以下試験溶液の調製の項に従って操作し，これらと試験溶液の5 μlをGCに注入する．下記のGC測定条件に従い測定し，得られたピーク高より検量線を作成し，試験溶液中の塩化ベンゼトニウムの濃度を求める．

FID－GC測定条件　カラム：5%SE－30 (Chromosorb W AW DMCS, 80－100mesh)，内径3㎜×長さ2m，注入口温度：250℃，カラム温度：210℃，キャリヤーガス：N_2 40m*l*／min，H_2 0.7kg／㎠，air 1kg／㎠.

GC－MS測定条件　カラム：2%OV－17 (Chromosorb W AW DMCS, 80－100mesh)，内径2㎜×長さ0.5m，注入口温度：250℃，カラム温度：60→250℃ 10℃／min.，キャリヤーガス：N_2 20m*l*／min.

NMR：試料を重クロロホルムに溶解し，綿栓ろ過後，内径5㎜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，化学シフト（δ ppm）を測定した．

実験結果および考察

1．分解反応の検討

著者らは，すでに塩化アルキルトリメチル第四アンモニウムをBz－ジメチルスルホキシド中，*t*－BuOKの存在下加熱還流した場合，および塩化ベンザルコニウムをBz中，*t*－BuOKの存在下加熱還流した場合，いずれも対応する1－オレフィンが生成することを報告した[10]．そこで，第四アンモニウム塩のなかでも特異な構造を有する塩化ベンゼトニウムを同様に処理した場合，どのような分解物が生成するかを検討した．塩化ベンゼトニウム（500mg）をBz中，*t*－BuOKの存在下40℃で30分間

Table 1. MS and NMR Spectral Data of the Degradation Products

	2	4
MS m/z	276(M^+)	206(M^+)
^{1}H−NMR δ ppm ($CDCl_3$)	0.71(9H,s),1.34(6H,s),1.70(2H,s) 4.04(2H,q,J=2,7),4.18(2H,q,J=5,7) 4.23(2H,q,J=2,12),6.53(1H,q,J=4,12) 6.83(2H,d,J=9),7.26(2H,d,J=9)	0.71(9H,s),1.33(6H,s),1.69(2H,s) 4.77(1H,brs) 6.74(2H,d,J=9),7.22(2H,d,J=9)
^{13}C−NMR δ ppm ($CDCl_3$)	31.7(q),31.8(q),32.4(s),38.0(s),57.1(t) 66.4(t),66.6(t),87.0(t),151.7(d) 113.9(d),127.1(d),142.7(s),156.3(s)	31.7(q),31.8(q),32.3(s),38.0(s),57.1(t) 114.5(d),127.2(d),142.3(s),153.1(s)

処理し，反応物を濃縮後，TLC（シリカゲル60F_{254}，展開溶媒：ヘキサン－酢酸エチル＝9：1，検出：UV254nm）を行ったところ，*Rf* 値0.65，0.21，0.02の3つのスポットが観察された．そこで，これらをシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シリカゲル60 70－230mesh，Merck，内径10mm×長さ10cm）に付しヘキサン－酢酸エチル（99：1）で溶出し化合物2，4を単離し，ついでメタノールで化合物3を溶出単離した．Table 1に2，4のマススペクトルおよびNMRのデータを示す．

2は，マススペクトルで，m／z276（M^+）を示した．また，Table 1において^{1}H−NMR：δ0.71（9H，s），1.34（6H，s），1.70（2H，s）ppm，^{13}C−NMR：δ31.7（q），31.8（q），32.4（s），38.0（s），57.1（t）ppmよりメチル基5個，メチレン基1個，4級炭素2個が認められることから，テトラメチルブチル基を有することがわかった．また，δ6.83（2H，d，J＝9），7.26（2H，d，J=9）ppm，δ113.9（d），127.1（d），142.7（s），156.3（s）ppmより2置換ベンゼン環が，さらにδ4.04（2H，q，J＝2，7），4.18（2H，q，J＝5，7）ppm，δ66.4（t），66.6（t）ppmに酸素原子に結合したほぼ等価なメチレン基2個が認められた．またδ4.23（2H，q，J＝2，12），6.53（1H，q，J＝4，12）ppm，δ87.0（t），151.7（d）ppmには酸素原子に結合した二重結合に特徴的なシグナルが認められ，エノール型の末端ビニル基の存在がわかった．したがって，この化合物は，2－｛2－[*p*－(1,1,3,3－tetramethylbutyl)phenoxy]ethoxy｝ ethyleneと同定した．

3は，マススペクトルで，m／z135（M^+）を示し，NMRスペクトルより，窒素原子に結合したメチル基2個，メチレン基1個，フェニル基1個が認められることから，benzyldimethylamineと同定した．

4は，マススペクトルで，m／z206（M^+）を示しTable 1に示すように，化合物2と同様に，テトラメチルブチル基に対応するシグナル，2置換ベンゼン環に対応するシグナル，および，^{1}H−NMRにおいてδ4.77（1H，brs）ppmに水酸基のプロトンに対応するシグナルを示した．したがって，この物質は，*p*－(1,1,3,3－tetramethylbutyl)phenolと同定した．

以上の結果より，塩化ベンゼトニウムは，窒素原子に結合したオキシエチル基の位置でβ－脱離反応を起こし，オレフィン2を生成することがわかった．2からフェノール4が生成しないことから，4は塩化ベンゼトニウムが直接加水分解を受けて生成したものと考えられる．なお，2と4の生成率は，それぞれ46％と35％であった．そこで，つぎにガスクロマトグラム上のオレフィンのピークを利用して反応条件の検討を行った．

2．分析条件の検討

反応温度　Hofmann分解による反応生成物の生成比率は温度依存性が高いため，まずこの点について検討した．塩化ベンゼトニウム4mgに対し，*t*－BuOKを100mg添加し，Fig. 2に示すように温度を30－80℃まで変化させ，1時間反応を行った．その結果，オレフィン2の生成量は反応温度が高くなるにつれ減少した．ベンゼンの沸点である温度80℃では，逆に加水分解物であるフェノール4の生成が増加していた．したがって，オレフィン2の生成率が高く，温度をコントロールしやすい40℃に反応温度を設定した．

BuOKの添加量　反応温度40℃で，塩化ベンゼトニウム4mgに対しFig. 3に示すように*t*－BuOKの添加量を10－200mgと増加して反応させたところ，オレフィン2の生成は，*t*－BuOKの添加量とともに増加し，80－200mgの範囲で一定となった．そこで，*t*－BuOKの添加量を100mgに設定した．

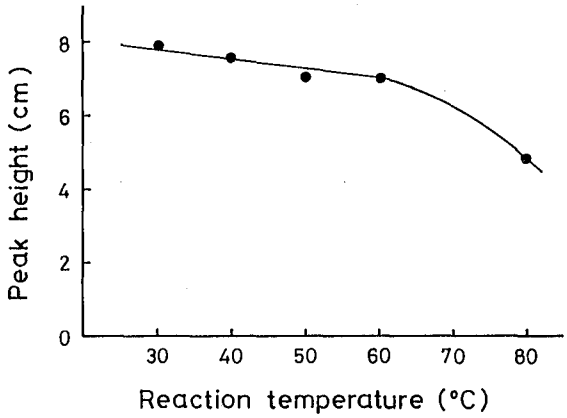


Fig. 2. Influence of the Reaction Temperature on the Formation of Olefin 2

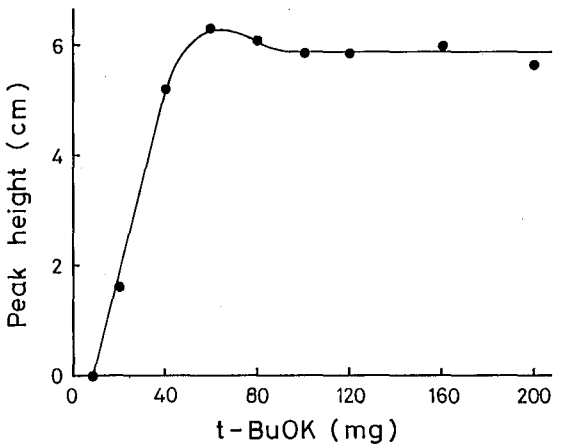


Fig. 3. Influence of the Amount of *t*−BuOK on the Olefin 2

反応時間 塩化ベンゼトニウム 4 mg に対して *t*−BuOK を100mg 添加し，40℃で，Fig. 4 に示すように反応時間を 2 −60分と変化させ反応させたところ，オレフィン 2 の生成は，約10分以上で一定となった．そこで，反応時間を30分と設定した．

3．分析法および検量線

反応条件の検討より，分析法を実験の部に示すように設定した．FID−GC 測定条件に従い，作成した検量線が Fig. 5 である．塩化ベンゼトニウム量として 1 −10mg の範囲できれいな直線が得られた．また，この検量線の再現性も良好で各濃度においての 3 回繰り返しの変動係数は，3 − 4 %であった．

4．添加回収実験

塩化ベンゼトニウムを含む市販の消毒剤を使用し，塩化ベンゼトニウムの添加回収実験を行った．塩化ベンゼトニウム（0.1w／v%），塩酸ジブカイン（0.1w／v%），塩酸ナファゾリン（0.1w／v%），マレイン酸クロルフェニラミン（0.2w／v%）を含有する消毒剤 C を 2 ml 採取し，これに塩化ベンゼトニウムを1,2,3mg 添加し，その回収率を検討した．その結果，Table 2 に示すように回収率は96−99%，変動係数は 1 −2.6%で定量性がよいことがわかった．

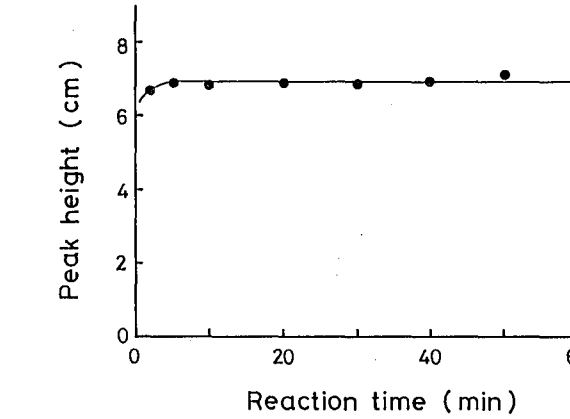


Fig. 4. Influence of the Reaction Time on the Olefin 2

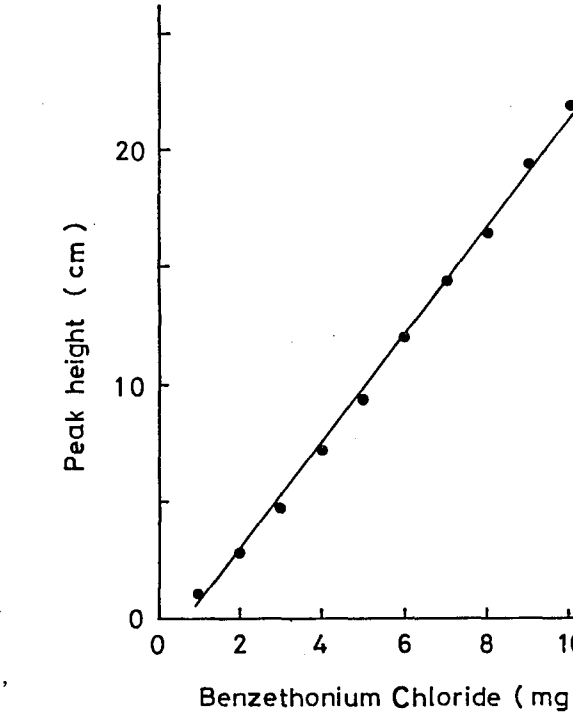


Fig. 5. Calibration Graph for Benzethonium Chloride

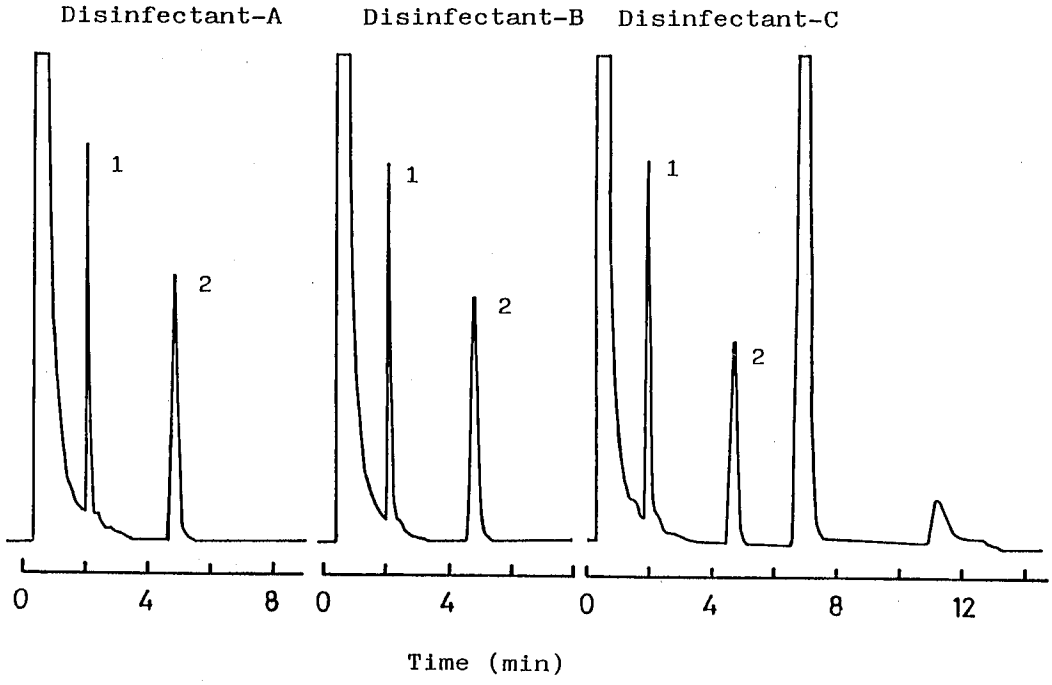


Fig. 6. Typical Gas Chromatograms of Olefin 2 derived from Benzethonium Chloride in Commercial Disinfectants
Peak 1 : phenol 4, Peak 2 : olefin 2

Table 2. Recoveries of Benzethonium Chloride from a Commercial Disinfectant

Sample	Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)	CV (%)
Disinfectant−C	1.00	0.96	96.0	2.6
	2.00	1.95	97.5	1.0
	3.00	2.98	99.3	1.9

n= 3, Sample size: 2 m*l*
Disinfectant−C: benzethonium chloride (0.1w/v%)
dibucaine hydrochloride (0.1w/v%),
naphazoline hydrochloride (0.1w/v%),
chlorpheniramine maleate (0.2w/v%).

Table 3. Analytical Results of Commercial Disinfectant

Sample	Benzethonium Chloride	
	Content (%)	CV (%)
Disinfectant− A	10.2	4.8
Disinfectant− B	10.1	3.9
Disinfectant− C	0.10	4.6

n= 5
Disinfectant− A : benzethonium chloride (10w/v%)
Disinfectant− B : benzethonium chloride (10w/v%),
alkyl allyl polyether alcohol (10w/v%).
Disinfectant− C : the same as those in Table 2.

5. 市販製品の分析結果

この方法による市販の消毒剤3種のガスクロマトグラムを Fig. 6 に，また，その分析結果を Table 3 に示す．消毒剤Aは，塩化ベンゼトニウムのみを10%含有する試料，消毒剤Bは，塩化ベンゼトニウムとアルキルアリルポリエーテルアルコールをそれぞれ10%含有する試料，消毒剤Cは，塩化ベンゼトニウム0.1%のほかに，塩酸ジブカイン，塩酸ナファゾリン，マレイン酸クロルフェニラミンを含有する試料である．Fig. 7 に示すように，いずれもガスクロマトグラム上，オレフィン2を妨害するピークはみられず，塩化ベンゼトニウムの分析を行うことができた．

消毒剤A，B，Cの塩化ベンゼトニウム含有量は Table 3 に示すように，おのおの10.2，10.1，0.10%でありラベル上に表示された含有量とよく一致した．また，その変動係数は，4.8，3.9，4.6%と良好であった．

結　論

塩化ベンゼトニウム(1)は，Bz 中 *t*−BuOK の存在下

40℃で30分間反応すると，容易に脱離反応を起こし，その反応生成物は，2－{2－[p－(1,1,3,3－tetramethylbutyl) phenoxy] ethoxy} ethylene (2)，benzyldimethylamine (3)，p－(1,1,3,3－tetramethylbutyl) phenol (4)であった．反応生成物のガスクロマトグラフィーにおいて，オレフィン2のピークを利用することにより，1－10mgの範囲で1の定量を精度よく行うことができた．この分析法は，再現性も良く簡便であるため，ルーチン分析として有効である．

文　献

1）宇野豊三，宮嶋孝一郎，中川照真：分析化学，15，584－588，1966

2）酒井忠雄，坪内正弘，畦地義久：分析化学，25，675－679，1976

3）Lowry, J. B.: *J. Pharm. Sci.*, 68, 110－111, 1979

4）Kawase, J.: *Anal. Chem.*, 52, 2124－2127, 1980

5）Tsubouchi, M., Mitsushio, H. and Yamasaki, N.: *Anal. Chem.*, 53, 1957－1959, 1981

6）Kawase, S., Kanno, S. and Ukai, S.: *J. Chromatogr.*, 247, 273－280, 1982

7）Abidi, S. L.: *J. Chromatogr.*, 213, 463－474, 1981

8）鈴木助治，酒井正美，森謙一郎，雨宮　敬，風間成孔：東京衛研年報，35，138－145，1984

9）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，36，108－114，1985

10）鈴木助治，酒井正美，池田一夫，森謙一郎，雨宮敬，江波戸擧秀，渡辺四男也：東京衛研年報，36，115－122，1985

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab., P.H.*, 37, 111-114, 1986

α-フェトプロテインの精度管理調査

仲川千種*, 大石向江*, 裳輪佳子*, 鈴木重任**

Interlaboratory Quality Control Survey of Alfa-Fetoprotein

CHIGUSA NAKAGAWA*, HISAE OISHI*, KEIKO MINOWA*, and SHIGETOH SUZUKI**

Keywords：α-フェトプロテイン alpha-fetoprotein, 精度管理調査 quality control survey

緒　言

東京都では検査精度の向上を図ることを目的として，都内衛生検査所を対象とする精度管理調査を昭和57年度から毎年実施し，60年度までに4回の調査が行われた[1~4]．昭和59年度まではルーチン検査項目を中心に調査を実施してきたが，特殊検査や二次委託検査の精度管理調査が普及していないことから，昭和60年度（第4回）の調査では肝癌の指標であるα-フェトプロテイン（AFP）が新たに実施項目の中に加えられた．そのために当研究科では精度管理用試料として既知濃度の試料の作製を試み，本調査に使用した．本報告は第4回調査におけるAFP用試料についての検討およびAFPの精度管理調査結果についての解析を行った．

材料及び方法

調査方法　調査方式として直接試料を検査所に配付するオープン方式と，検査所に感知されないよう協力医療機関を通じて試料を検査所に配付するブラインド方式の2方式を併用し，オープン方式とブラインド方式をほぼ同一期間内に実施した．オープン方式では調査試料を直接検査所に配付し，検査結果，測定法，使用キット名，二次委託先等を回答させた．調査対象は都内衛生検査所で参加数は48施設であった．そのうち37施設にはブラインド方式もあわせて実施した．なお，ブラインド調査対象施設のうち9施設は2か所の協力医療機関を通じて同一試料を配付した．

試料　日本バイオテスト研究所（NBL）製のAFP標準液[5] 4種類（濃度0, 1000, 4000, 16000ng／m*l*）をそれぞれ酵素免疫測定法（EIA）でAFP陰性であることを確認した正常ヒトプール血清で正確に10倍希釈しバイアルに1m*l*ずつ分注し，これらを試料1，2，3，4とした．オープン調査には試料1と試料4を，ブラインド調査には試料2と試料3を用いた．各試料は冷蔵状態で配布した．

試料作製に関する検討　AFP標準液（NBL）および調査試料をEIA（イムノテックAFP，第一化学）で反復測定した．また，AFP標準液（NBL）の希釈に用いる希釈液として生理食塩水，2.5%ウシ血清アルブミン（BSA）溶液（pH7.4のリン酸緩衝液で溶解），正常ヒトプール血清，ウマ血清の4種類を用いてAFP標準液を10倍希釈したものを1日冷蔵保存後EIA（AFP・EIA「アボット」，ダイナボット社）で測定し，希釈液による測定の影響を調べた．なお，これらの希釈液はあらかじめAFP陰性であることを確認した．AFP濃度が300ng／m*l*以上の試料の測定の際，標準曲線の影響を避けるため，測定時に試料をあらかじめ100ng／m*l*前後になるようにキット添付の希釈液で希釈してから測定した．

結果と考察

精度管理では，対象施設において実施している測定法についても調査がなされたが，これによればオープン調査で9施設が逆受身赤血球凝集反応法（RPHA），32施設がラジオイムノアッセイ（RIA），7施設がEIAで測定していた．RPHAは希釈倍数から換算した離散量の定量値を出す半定量法であるので集計から除外し，連続量の定量値が得られるRIAとEIAのみを集計の対象とした．その結果を測定方法別，測定試薬キット別，施設別にTable 1．に示した．

*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 phome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
**東京都八王子保健所

Table 1. Quality Control Survey Data of AFP Measured by RIA and EIA

Method (Kit)	Laboratory	Sample 1 (Open) N	Sample 1 (Open) Mean (ng/ml)	Sample 2 (Blind) N	Sample 2 (Blind) Mean±S. D. (ng/ml)	Sample 3 (Blind) N	Sample 3 (Blind) Mean±S. D. (ng/ml)	Sample 4 (Open) N	Sample 4 (Open) Mean±S. D. (ng/ml)
RIA (all)		33	<5	32	103±12[a)]	33	319±36[a)]	32	1143±138[a)]
EIA (all)		7	<5	11	124±13[a)]	11	390±39[a)]	7	1439±333[a)]
RIA (A)		9	<5	9	113± 5[b)]	9	343± 8	9	1259± 95[b)]
RIA (B)		20	<5	18	97±12[b)]	19	308±38	20	1117±123[b)]
RIA (etc.)		3	<5	5	104± 8[b)]	5	320±44	3	969± 15[b)]
RIA (B)	a	4	5	3	109± 1	3	289±10	4	1077±17
	b	5	2	4	105±10	4	345±17	5	1060±55
	c	4	<5	4	93±17	5	309±33	4	1337±19[c)]
	d	4	4	4	91± 8	4	296±63	4	1100± 0

a) Significant difference between RIA and EIA ($p<0.01$)
b) Significant difference between RIA Kits ($p<0.05$)
c) Significant difference from other kits ($p<0.01$)

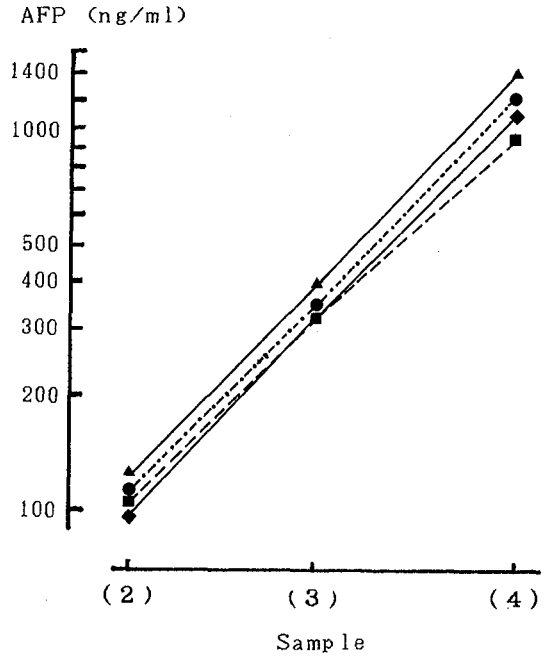


Fig. 1. Means of Sample 2,3,4 Measured by EIA and RIA Kits in Control Survey

▲——▲ EIA
●----● RIA (Kit A)
◆——◆ RIA (Kit B)
■----■ RIA (Other kits)

期待値0ng／ml の試料1では1施設で14ng／ml という報告を除いて5 ng／ml 以下の結果を報告し，おおむね良好な結果であった．RIA または EIA で測定した全施設の平均値と標準偏差は，試料2では108±15ng／ml であり100ng／ml 付近の結果を大部分の施設が報告したが，試料3では337±48ng／ml で期待値の84%，試料4では1196±215ng／ml で期待値の75%という結果であった．

試料2，3，4における方法別平均値では t 検定で1%の危険率で RIA より EIA による測定法のほうが有意に高値に出ることが認められた．RIA においては複数のキットが使用されたのでキット間の測定値の差の有無をみるために，キットA，キットB，その他のキットの3グループに分類して一元配置分散分析を行った．その結果，試料2と試料4で5%の危険率でキットによる測定値の差がみられた．このような測定値の差を図式化するために，試料2，3，4のキット別平均値をプロットして Fig. 1. に示した．この図から，4種類のキットすべてにおいてほぼ直線上に平均値が分布し，直線性は良好であることがわかった．また，それぞれの線が互いに平行であることからキット間に系統誤差があることも同時に認められた．この原因はキット添付の検量線用標準液の濃度差によるものと考えられる．新発田ら[7]によれば標準物質の統一によりキット間差が少なくなることが報告されている．本調査結果からもキット間の系統誤差の改善は統一された標準品の使用により可能であることが示唆された．

この調査に参加した48施設のうち半分の24施設では他施設に検査を委託している．その委託先は都内衛生検査

所が4施設，他県の衛生検査所が4施設であった．RIAのうち複数の施設で使用されていたのはB社のキットだけであった．これを使用した4施設（a，b，c，d）の測定値の比較をTable 1．に示した．これについて一元配置分散分析を行ったところ，試料4において施設cの平均値が他の3施設の平均値より有意に高いことが認められた．このように同一キットを使用した場合においても，試料の二次委託先までの運搬条件，施設間誤差等の要因によって測定値に差が現れる場合があることがわかった．

以上のような調査結果から，調査試料の測定成績が期待値どおりにならなかったので，調査試料とその原料であるAFP標準液の検討を行った．

AFP標準液および調査試料を反復測定した結果をTable 2．に示した．1000ng／ml の標準液は表示値の118%，4000ng／ml の標準液は表示値の92%，16000ng／ml の標準液は表示値の73%という実測値が得られ，高濃度の標準液ほど実測値が低く出る傾向が認められた．また，これらの標準液を正常ヒト血清で10倍希釈して作製した調査試料の実測値は，試料2では120%，試料3では92%，試料4では78%であり，AFP標準液そのものの実測値と同じ傾向が認められた．

RIAまたはEIAによる測定の上限は300～800ng／ml であるためそれより高濃度の検体の測定には希釈が必要である．測定時の検体希釈に用いる希釈液の違い，ヒト血清中の何らかの成分によるAFPへの影響等が期待値から離れた調査試料の実測結果となった要因と思われた．このような影響をみるためにキット添付の検体希釈液として使用されるBSA溶液，生理食塩水，ウマ血清，正常ヒト血清の4種を選び，AFP標準液をこれらで10倍希釈したものの測定値の差をみた．

AFP標準液の希釈に使用する希釈液の検討結果をTable 3．に示した．4種類いずれの希釈液においても濃度に差がみられず，1000ng／ml の標準液の場合は回収率が約110%であるが，4000ng／ml，16000ng／ml の場合では回収率が60～80%となった．表示値の1／10の濃度にはならなかったが，標準液を実測したときの1／10の濃度に近い値が得られた．これらの実験からヒト血清成分がAFPの測定に影響を与えることは考えられない．

東京都以外でもAFPの精度管理調査は，主にRIAを中心に日本アイソトープ協会[6]，試薬メーカー[7]等の主催で実施されている．これらの調査で用いられている試料は我々の試料作製方法，材料と同様で濃度が200ng／ml 以下のものを使用し，調査結果においてはどの試料も平均値がほぼ期待値どおりの測定成績が得られていた．東京都の調査において高濃度の試料では期待値より低い成績が得られる傾向が認められたのには，高濃度の試料作製になんらかの問題があると考えられる．Wuら[8]によれば，精製されたAFP溶液は4℃では安定であるが，−20℃，−60℃の凍結状態で保存した場合は2～3日でAFP値が下がり，高濃度の精製されたAFP溶液をリン酸緩衝液等で希釈した場合のAFPの活性に損失がみられると報告されている．我々は4濃度のAFP標準液を試料作製前まで凍結保存したが，1000ng／ml の標準液中のAFP実測値は表示値に近かったので凍結保存による影響は確認されなかった．AFP標準液の最初の希釈による損失が期待値どおりの測定値が得られなかった原

Table 2．AFP Concentrations in AFP Standards (NBL) and Survey Samples

	N	Sample 1 Mean*	Sample 2 Mean±S. D.*	Sample 3 Mean±S. D.*	Sample 4 Mean±S. D.*
AFP Standards (NBL)	9	<5	1176±126	3679±241	11629±582
Survey Samples	8	<5	120±9	369±16	1252±74

* ng/ml

Table 3．Effect of Dilution on AFP Standards (NBL) Concentraion

diluent	Standard 1 Mean*	Standard 2 Mean±S. D.*	Standard 3 Mean±S. D.*	Standard 4 Mean±S. D.*
Normal Human Serum	<2	116± 4	248±40	961± 75
Horse Serum	<2	109±11	295±50	1295±152
0.9% NaCl	<2	108± 9	261±45	913± 89
2.5% BSA in PBS	<2	109±11	247±29	1164±314

* ng/ml, N＝4

因である可能性があり，今後の検討課題としたい．

要　約

我々は，AFPの精度管理調査用試料として，正常ヒト血清にAFP標準液を加える方法で4種類の濃度の既知濃度試料を作製し，昭和60年度東京都衛生検査所精度管理調査に用いた．その結果，低濃度試料2種類（0ng／ml，100ng／ml）は全施設の平均値が期待値に近い値であったが，高濃度試料（400ng／ml，1600ng／ml）では全施設の平均値が期待値より2～3割低い結果となり，当研究科での調査試料の測定値とも一致した．

試料の測定成績が期待値から離れた原因をつきとめるため，AFP標準液の希釈に用いる希釈液として，生理食塩水，BSA溶液，正常ヒト血清，ウマ血清の4種類を用いて希釈液によるAFPの測定値に与える影響を検討した．いずれの場合においても測定値に差はなく，低濃度標準液2種類は期待値（0ng／ml，100ng／ml）に近い値であったが，高濃度標準液では期待値（400ng／ml，1600ng／ml）より2～4割低い測定結果であり，また希釈液による測定値の差は認められなかった．この原因として検体希釈によるAFPの損失が推測された．

精度管理調査の集計結果において，測定試薬キット別の平均値に系統誤差が認められた．また，二次委託先別集計で施設による測定値の差が1試料でみられ，運搬条件，施設間誤差による測定値の差が現れる可能性があることがわかった．

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）東京都：昭和60年度（第4回）東京都衛生検査所精度管理調査結果報告書，1986
5）平井秀松：医学のあゆみ，132,38,1985
6）㈳日本アイソトープ協会医学・薬学部会インビトロテスト専門委員会：*RADIOISOTOPES*, 33,484,1984
7）新発田杏子，杉崎　肇，亀山真弓，八島利博：*RADIOISOTOPES*, 34,180,1985
8）James T. Wu and Joseph A. Knight : *Clin. Chem.*, 31, 1692,1985

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 115-118, 1986

血液学的検査の精度管理調査結果について（第2報）
——白血球像検査——

蓑輪佳子*, 大石向江*, 仲川千種*, 鈴木重任**

Interlaboratory Quality Control in Hematology (II)
——Leukocyte Differential Counting——

KEIKO MINOWA*, HISAE OISHI*, CHIGUSA NAKAGAWA*, and SIGETOH SUZUKI**

Keywords：精度管理調査 quality control survey, 白血球像 leukocyte differential counting, WBC ヒストグラム WBC histogram

緒　言

血液学的検査の一つである血液像は血球算定や凝固検査と異なり，標準物質がなく各検査所で白血球の分類の判定基準に差異がありその作業は概して主観的なものである．したがって，その検査成績のバラツキが大きい事が従来から懸念されていた．そこで昭和60年度の東京都精度管理調査では項目に白血球像を新たに加え，調査を実施した[1]．

昭和57年より当科では調査時の試料を準備し配付しており，その際の試料の安定性等についても検討を行っている[2,3]．今回は，白血球の形態が抗凝固剤，試料の保存状態および測定までに要する時間によりどのように変化するか観察した．本報告では，白血球の大きさによって分類を行う全自動血球計数装置で求められるWBCヒストグラムを用いて観察した．

方　法

1．抗凝固剤による影響　成人健康者2名（A，B）から採血を行い，各血液を4群に分け，血液10m*l*に対して保存液ACD（クエン酸ナトリウム，クエン酸，ブドウ糖）を1.5m*l*，保存液CPD（クエン酸ナトリウム，クエン酸，リン酸二水素ナトリウム，ブドウ糖）を1.4m*l*，EDTA－2Kを10mgあるいはAnticlot／ETを10滴（約0.3m*l*）添加し混和した．小試験管に1m*l*ずつ分注後，冷蔵保存（4℃）した．30分，2，4，7時間，1，2，3日後各血液を室温に戻した後，多項目自動血球計数装置（コールターカウンターSPLUS－IV，コールター・エレクトロニクス社）で2回測定した．

2．保存条件による影響　昭和60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を用い，保存状態を変えた場合のWBCヒストグラムの経時変化を観察した．試料Ⅰは成人正常者の血液，試料Ⅱはステロイド剤（デキサメサゾン1mg）投与を受けた成人の血液で白血球数が増加した血液（9800／mm^3）である．試料Ⅰ，Ⅱには保存液ACDを30m*l*／血液200m*l*の割合で添加した．採血当日（0日），1，2，3日目にコールターカウンターで各試料を3回以上測定した．採血から測定までの保存条件を以下のように設定した．

1）4℃
2）室温（20－23℃）
3）1日のうち9時間は室温，残り15時間は4℃

結果および考察

1．抗凝固剤のWBCヒストグラムに及ぼす影響

コールターカウンターによる白血球分類は顕微鏡下の形態観察に比べ，詳細な変化を検討するには多少問題が残る．しかし，精密性，正確性，感度等において高い評価を得ている[4]．加えて測定者の主観，塗抹標本作成時のバラツキが入らない，能率的である等の特長をもつ．

コールターカウンターでは添加された溶血剤が細胞膜と細胞質に作用し白血球を収縮させ，その収縮度の違いで血球をリンパ球，顆粒球，単核細胞の3種類に分類する．そのためWBCヒストグラムに表示される血球分布サイズは，血球の大きさというよりは核等の内部構造の

*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
20－1, Hyakuninchо 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160, Japan
**八王子保健所

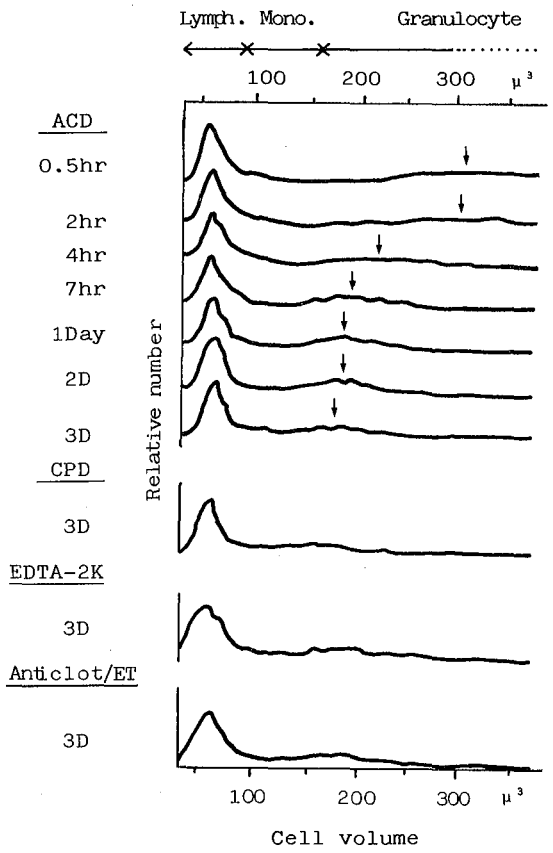


図1．抗凝固剤添加血液における WBC ヒストグラムの経時変化

大きさを投影していると考えられる．

図1に，抗凝固剤として添加した保存液 ACD，CPD，EDTA－2 K および Anticlot／ET の WBC ヒストグラムに対する影響を示した．試料 A と試料 B は同一傾向を示したので，図には試料 A の WBC ヒストグラムを示した．ACD 添加血液について，採血後30分以内に測定した試料の WBC ヒストグラムを基準にして他のヒストグラムを比較してみると，2時間目のヒストグラムではほとんど変化していなかった．しかし，4時間目になると160 μ^3以上にある顆粒球のピーク（図中の矢印）が左方移動しているのが認められた．この左方移動は1日後，より顕著になった．30分以内の測定では350 μ^3以上に及んでいた顆粒球が1日後，250 μ^3まで血球が収縮した．2日目以降，血球の内部構造は変化せず1日目と同じヒストグラムを示した．他の抗凝固剤添加血液は，ACD 添加血液における変化と同一の変化を示し，抗凝固剤による差は認められなかった．今回，検討した抗凝固剤の中では血球に与える影響に差が認められないため，白血球，血小板の血球数の安定性に効果が認められている[3]保存液 ACD を血液に添加し，昭和60年度の調査試料として使用した．

2．保存条件の WBC ヒストグラムに及ぼす影響

精度管理調査の実施にあたっては各検査所に対し，試料は冷蔵保存に努めるよう指導するが，ブラインド調査（協力医療機関を通して試料を各検査所へ配付する方式）では，医療機関での試料提出までの保存状態は明らかではない．そこで，3種の保存状態を想定し保存状態の違いが白血球像にどのように影響するか WBC ヒストグラムで観察した．すなわち試料配付から測定まで，4℃で保存した場合，試料配付後室温で放置した場合，冷蔵と室温放置を3回繰り返した場合の3種類を想定した．

試料Ⅰ，Ⅱの3日間のヒストグラムを図2に，ヒストグラムから求めたリンパ球，単核細胞領域にある細胞の比率を表1に示した．採血当日，試料Ⅰではリンパ球（36－90 μ^3）40.1%，顆粒球（160 μ^3以上）54.5%，単核細胞（90－160 μ^3）5.4%，試料Ⅱはリンパ球14.9%，顆粒球83.8%，単核細胞1.3%であった．これらの試料を目算法で測定すると，試料Ⅰはリンパ球39.5%，顆粒球（杆状核球，分節核球を合計したもの）54.0%，単球5.4%，試料Ⅱはリンパ球12.5%，顆粒球84.5%，単球3.0%であり良く一致した．

4℃保存でのヒストグラムの変化をみると，実験1と同様に顆粒球のピークが1日目には左方移動しているのが認められた．保存条件による細胞の内部構造の変化は室温放置で著明に現れた．試料Ⅱでは1日目に160 μ^3以上にある血球の比率が40.2%に減少し，それに伴い90－160 μ^3にある血球が37.4%に増加した．試料Ⅰでも同じ傾向が認められたが，試料Ⅱのように急激な変化ではなく緩やかな変化を示した．これは，試料Ⅱがステロイド剤を投与した成人から得た血液で，リンパ球に比べ経時的に変化しやすい顆粒球が異常に高い試料であるためと考えられる．他の原因としてステロイド剤により増加した顆粒球では正常血液の顆粒球よりも温度等の外的要因の影響を受けやすいことが推察される．

2日目，3日目のヒストグラムは1日目のヒストグラムに類似していた．すなわち顆粒球中で生じる内部構造特に核形の変化は初期に起き，その後に内部構造が変化する割合は少ないと考えられた．

3種の保存条件を比較すると，血球の形態が最もよく保たれたのは4℃で保存した場合であった．室温で放置した場合，160 μ^3以上にある血球の左方移動が顕著と

表1．昭和60年度精度管理調査試料における白血球像の経時変化
（コールターカウンターによる白血球分類，平均値±標準偏差）

保存状態		4℃			室　温			4℃－室温		
血球サイズ		36－90 μ^3 (リンパ球%)	90－160 μ^3 (単球%)	160 μ^3－ (顆粒球%)	36－90 μ^3 (リンパ球%)	90－160 μ^3 (単球%)	160 μ^3－ (顆粒球%)	36－90 μ^3 (リンパ球%)	90－160 μ^3 (単球%)	160 μ^3 (顆粒球%)
試料Ⅰ	0日	40.1±0.7	5.4±1.4	54.5±1.2						
	1日	42.7±0.5	(1.8)*	(56.1)*	44.9±0.7	12.3±1.5	42.8±1.5	43.3±1.3	5.5±2.0	51.2±3.0
	2日	43.9±1.3	(1.6)*	(54.7)*	48.9±0.5	23.0±1.6	28.1±1.5	46.3±0.5	8.8±1.4	44.9±1.6
	3日	44.4±1.7	2.1±1.1	53.6±2.5	53.2±0.6	27.0±1.4	19.8±0.9	51.7±1.1	14.6±0.7	33.7±0.7
試料Ⅱ	0日	14.9±0.3	1.3±0.6	83.8±0.6						
	1日	15.1±0.5	**	**	22.4±1.4	37.4±1.1	40.2±0.6	18.0±0.5	26.4±0.9	55.6±1.0
	2日	14.9±0.3	**	**	32.6±3.9	31.7±4.3	36.6±1.8	31.1±5.0	(25.5)*	(36.5)*
	3日	14.7±0.3	**	**	35.5±3.7	32.7±3.9	32.1±2.3	(40.1)*	(33.3)*	26.7±1.6

＊　測定回数1回
＊＊　算出不能

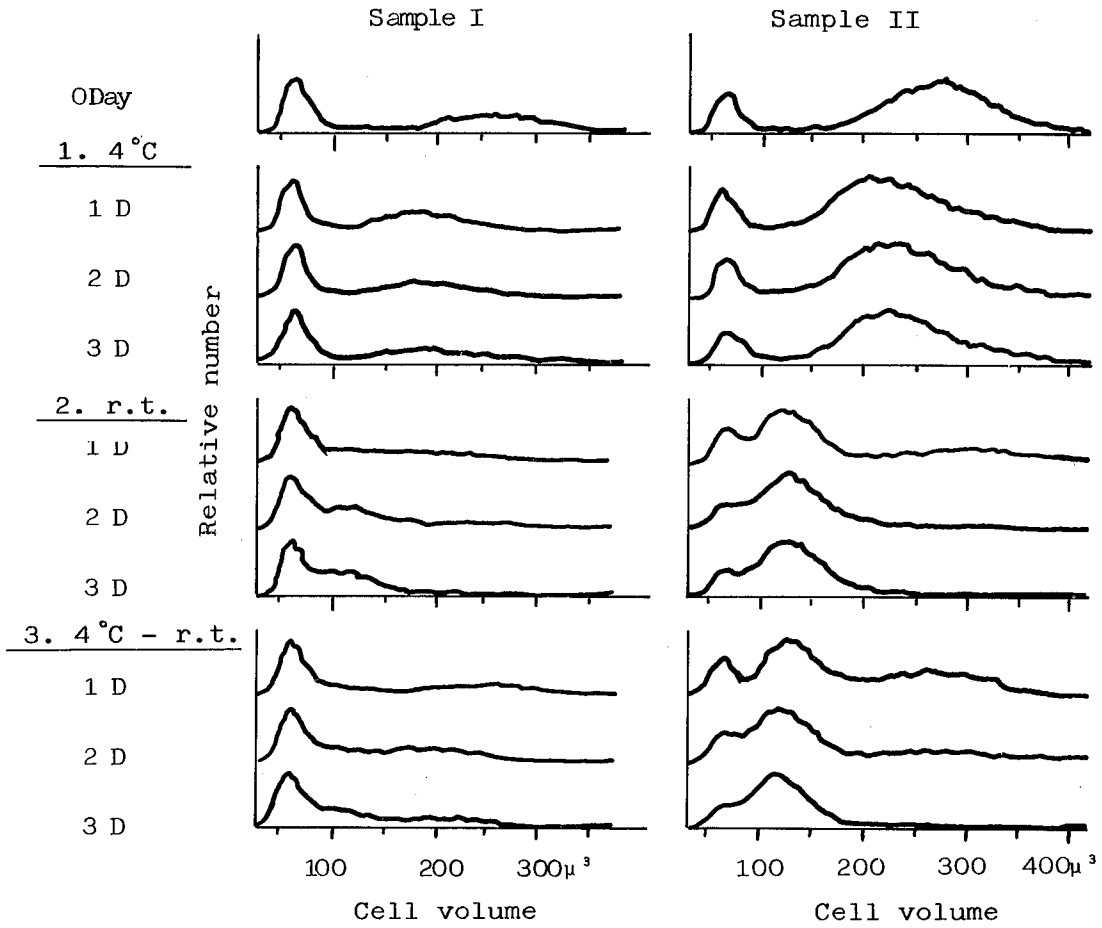


図2．昭和60年度精度管理調査試料の経時変化
（WBC ヒストグラム）
r.t.：室温

表2．昭和60年度白血球像検査の精度管理調査結果
（オープン調査における測定日別平均値±標準偏差）

測定日	試料 I		試料 II	
	リンパ球 (%)	顆粒球 (%)	リンパ球 (%)	顆粒球 (%)
1日**	45.3± 7.8(24)*	48.2± 7.9(24)	18.5± 5.0(24)	78.2± 5.4(24)
2日	48.5±13.5(14)	43.2±13.1(14)	22.7±11.4(13)	73.1±10.8(13)
3日	52.5±10.5(3)	42.2±13.7(3)	30.2±23.6(3)	66.0±24.8(3)

＊ 施設数
＊＊ 試料作製後測定までの日数

なった．この理由としては血球中の代謝が進み，核および膜の変化が起きやすいことなどが考えられる．4℃と室温の保存を繰り返した場合も変化は著しく，一度室温に放置すれば，その影響が大きく現れる事が示された．

3．白血球像の精度管理調査成績

昭和60年度精度管理調査における結果をリンパ球と顆粒球（杆状核球と分節核球を合計したもの）についてまとめ表2に示した．対象施設43のうち，配付日（試料作製後1日）に試料を測定した施設が24施設，2日後が14施設，3日後が3施設あった．2施設では細胞崩壊のため算定不能として結果が報告されなかった．結果を報告した41施設中9施設は細胞崩壊とのコメント付きで報告された．

測定結果は他の血液学的検査の項目（赤血球数，ヘモグロビン濃度等）の変動係数が5％以下[1]であるのに比べ，施設間のバラツキの大きいのが目立った．次に測定日別に比較すると測定日が遅くなるにつれてリンパ球は高値を，顆粒球は低値を示す傾向がみられた．この傾向は試料IIの方が大きく，前述の保存条件の検討結果と同じ傾向を示した．対象41施設中37施設（90％）では用手法（目算法）を使用しており，測定者の判定基準の差が，測定値の変動の一因として考えられる．他の原因としては前述のように試料は保存状態，放置時間により，形態変化の程度を異にする事が挙げられ，これが結果のバラツキをより大きくしたと考える．

血液像の判定基準を含め各作業行程の標準化がNCCLS（*National Committee for Clinical Laboratory Standards*）では進められている[5,6]が，日本ではまだ確固たる基準等は作成されていないのが現状である．これらの標準化も含め，検査精度を上げるために有効な精度管理調査の方法にも幾つかの問題点が残っている．施設の日常の検査状況を的確に反映する調査を行うために，変動原因の検索，安定した試料の作製などが今後の検討課題であると考える．

要　約

昭和60年度東京都精度管理調査には新たに白血球像検査が項目に加えられた．そこで，抗凝固剤，試料の保存状態及び測定までに要する時間による白血球の形態変化を観察した．血球の変化は全自動血球計数装置（コールターカウンターSPLUS－IV）で測定されるWBCヒストグラムを用いて観察し，以下のような知見を得た．

抗凝固剤として添加した保存液ACD，CPD，EDTA－2KおよびAntinlot／ETの白血球に及ぼす影響の差異はWBCヒストグラムから認められなかった．経時変化は顆粒球領域にあったピークの左方移動が4時間後ですでに現れ始め，24時間後に最大となりその後2日間の変化は初期に比べ少なかった．

保存状態による差は明確に認められ，4℃で保存した場合に比較して，室温保存，4℃と室温の保存を繰り返した場合には160μ^3以上にあった顆粒球の左方移動が顕著となり血球の形態変化が大きいことが認められた．

文　献

1）東京都：昭和60年度第4回東京都精度管理調査結果報告書，1985
2）蓑輪佳子，笠原利英，大石向江等：東京衛研年報，34,75,1983
3）蓑輪佳子，大石向江，仲川千種等：東京衛研年報，36,100,1985
4）Richardson-Jones, A., Hellman, R. and Twedt D.: *Blood Cells*, 11,203,1985
5）*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 4(11),257,1984
6）Koepke, J. A.: *Blood Cells*, 11,161,1985

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.*, 37, 119-128, 1986

消毒剤や熱処理によるカンピロバクターの消毒効果ならびに調理器具・器材中からの本菌の除菌効果について

伊藤　武*, 斉藤香彦*, 高橋正樹*, 柳川義勢*, 甲斐明美*, 稲葉美佐子*

Effects of Disinfectants, Heating, and Drying for Killing *Campylobacter* Organisms on Cooking Utensils

TAKESHI ITOH*, KAHIKO SAITO*, MASAKI TAKAHASHI*, YOSHITOKI YANAGAWA*, AKEMI KAI* and MISAKO INABA*

Keywords：カンピロバクター *Campylobacter*, 消毒剤 disinfectant, 除菌 elimination of organism, 加熱殺菌 heat sterilization, 調理器具・器材 cooking utensil

緒　言

急性胃腸炎や食中毒の原因菌である *Campylobacter jejuni* や *Campylobacter coli* は各種の家畜・家禽および野生の動物の腸管に保菌されるため，これら保菌動物のし尿によって汚染された食肉や牛乳あるいは飲料水がヒトへの感染源として重要なことが指摘されてきた[1,2]．著者ら[3]もこれまで東京都内で発生したカンピロバクターによる集団食中毒の疫学調査において，鶏肉（バーベキュー）を直接原因とする事例を1例認めたほか，原因食を特定できなかった食中毒事例のなかにも鶏肉や豚肉から二次的に汚染された調理食品が原因と考えられる事例を多く認めている．

さらに著者らは食肉店舗のまな板，包丁，冷蔵庫内などの環境から多数のカンピロバクターを検出し，これらの器具・器材を介して他の食品がカンピロバクターで汚染される危険性を指摘してきた[4]．

本稿では，本菌食中毒の具体的な予防対策に資する基礎資料を得る目的で，*C. jejuni* あるいは *C. coli* に対する各種消毒剤や物理的処理による殺菌・消毒効果を実験室レベルで検討した．また，調理器具・器材からのカンピロバクター除菌方法についても検討を行ったのでこれらの成績についても併せて報告する．

材料および方法

供試菌株：　本実験には東京都内で発生した集団食中毒例の患者ふん便から検出した *C. jejuni* CF 1, *C. jejuni* CF256, *C. jejuni* CF 82-403株を用いた．さらにヒトの散発下痢症より検出された *C. coli* HP1755株およびブタふん便由来の *C. coli* CF82-368と CF395株を供試した．これらの菌株は分離後，Brain heart infusion broth（BHI ブイヨン：Difco）で培養し，15％にグリセリンを加えて凍結保存していたものである．本菌株を解凍し，純培養後，中試験管に5 m*l* 分注された BHI ブイヨンに接種し，O_2 5％，CO_2 15％，N_2 80％の微好気培養用混合ガスを本試験管に噴入後直ちにゴム栓で密封した．この試験管を37℃，18～24時間振とう培養した菌液を実験に用いた．

なお対照として *Salmonella typhimurium* 84-207株と enterotoxigenic *Escherichia coli* 06:NM 83-389株を用いた．

湿潤条件：　薬剤感受性ろ紙（6 M／M：東洋製作所）に被検菌の一定菌量をそれぞれ0.1 m*l* ずつ接種し，湿潤箱に入れて密封した．4℃，15℃および25℃の各温度条件下で一定時間保存した．

乾燥条件：　細菌ろ過用ろ紙を円形（直径6㎜）に切断し，本ろ紙に *C. jejuni* および *C. coli* の濃厚菌液の2 μl を接種し，五酸化リンを入れた容器におさめ，真空ポンプで10分間吸引した．乾燥したろ紙を25℃条件下に一定時間保存した．

加熱処理：　0.1％ペプトン加生理食塩液で10^5個／m*l* に調製した *C. jejuni* および *C. coli* 菌液を38×12㎜の小チューブ（Nunc）に1 m*l* 接種し，密封後55℃，60℃，

*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

65℃，70℃，80℃および98℃の各温度の湯槽の深部にこの小チューブを沈め，一定時間放置した．

消毒剤： アルコール（無水エタノール，局方），次亜塩素酸ナトリウム（ピューラック，オーヤラック），塩化ベンザルコニウム液（トリゾン液，岩城製薬KK），中性洗剤（ライポン，ライオン油脂KK），およびエタノール殺菌スプレー（アロクリン，イカリ消毒KK）を用いた．消毒剤の希釈には滅菌生理食塩液を使用した．

食品： 鶏肉，ささ身，牛肉は市販品を購入し，それぞれ所定の重さや大きさに揃えて使用した．

カンピロバクターの生菌数測定法： 消毒剤や各種物理的処理によるカンピロバクターの死滅状況や除菌効果は生残菌数を算定して判定した．すなわち，各試料を0.1%ペプトン加生理食塩液で10倍段階希釈液をつくり，各希釈列菌液の0.05m*l* を血液寒天平板培地に接種し，コンラージ棒で塗抹した．本培地を嫌気培養ジャーにおさめ，内部の空気を前記の微好気用混合ガスで置換し，42℃ 2日間微好気培養後，出現したカンピロバクターの集落数を算出した．ただし，カンピロバクター以外の細菌汚染がみられる調理器具や食肉中のカンピロバクターの生残菌数算定には血液寒天のかわりにSkirrowの寒天平板培地を用いた．

なお，サルモネラと大腸菌の生残菌数算定にはDHL寒天を用い，上記と同様にコンラージ棒で塗抹し，37℃ 18～24時間培養後出現した集落数を算定した．

成　績

1．湿潤および乾燥条件下でのカンピロバクターの生残

調理器具・器材の表面に付着した*C. jejuni* や*C. coli* の生残性を把握するために，湿潤した環境と乾燥した環境中での本菌の生残性を検討した．

湿潤条件下での生残： ろ紙に付着させた*C. jejuni* および*C. coli* をそれぞれ湿潤箱（湿度87%）に入れ，ろ紙の乾燥を防いで，4℃，15℃および25℃の各温度条件下に一定時間保存後，生残したカンピロバクター菌数を測定した．

表1に示すごとく，*C. jejuni* CF1株の場合，4℃保存では10^5個接種で3日後でも10^3個が生残した．15℃保存ではやや生菌数の減少がはげしく，1日後で10^3個，2日後で10^2個，3日後で10^1個の生残菌数であった．25℃の保存条件下では早期に生残菌数の減少が認められた．すなわち，1日で既に10個，2日以降では陰性であった．

C. coli の場合は，*C. jejuni* に比し菌数の減少が早く4℃および15℃の温度条件下でも2日保存で菌陰性となった．また25℃では8時間後で10^3個認められたが，1日後ですでに菌陰性となった．

表には示さなかったが，対照として用いた*Salmonella* と*E. coli* についても同様の実験を行った．両菌種の場合は25℃ 3日間の保存でもほとんど菌数の減少は認められなかった．

乾燥条件下での生残： ろ紙当り約10^7個接種した被検各菌株の経時的生残性を図1に示した．*C. jejuni* と*C. coli* は，乾燥直後でも10^3個であった．*C. jejuni* は3時間保存後，*C. coli* は1時間の保存後ですでに菌陰性となり，実験的に接種したカンピロバクターはすべて死滅した．他方，対照とした*Salmonella* と*E. coli* では長期間の菌の生残が認められ，15日間保存でも10^2個のレベルであった．

2．加熱処理によるカンピロバクターの殺菌効果

0.1%ペプトン加生理食塩液に*C. jejuni* 3菌株および*C. coli* 3菌株をそれぞれ10^5個／m*l* に浮遊させ，小チューブに分注し，55℃，60℃，65℃，70℃，80℃，

表1．湿潤条件下における*C. jejuni* および*C. coli* の生存

供試菌株	接種菌量／m*l*	保存温度	*Campylobacter* の生菌数／m*l*						
			1時間	3時間	6時間	8時間	1日	2日	3日
C. jejuni CF1	4.1×10^5	4℃	1.5×10^4	1.7×10^4	1.6×10^4	4.5×10^3	1.5×10^4	4.1×10^3	1.7×10^3
		15℃	1.5×10^4	1.2×10^4	1.4×10^4	1.1×10^4	1.1×10^3	8.1×10^2	2.1×10^1
		25℃	1.2×10^4	1.5×10^4	1.1×10^4	1.0×10^4	5.1×10^1	0	0
C. coli CF395	1.1×10^5	4℃	1.4×10^4	6.2×10^3	1.8×10^3	1.8×10^3	2.4×10^1	0	NT*
		15℃	1.1×10^4	5.2×10^3	6.3×10^3	4.9×10^3	2.4×10^2	0	NT
		25℃	1.1×10^4	1.2×10^4	9.1×10^3	5.4×10^3	0	0	NT

*検討せず

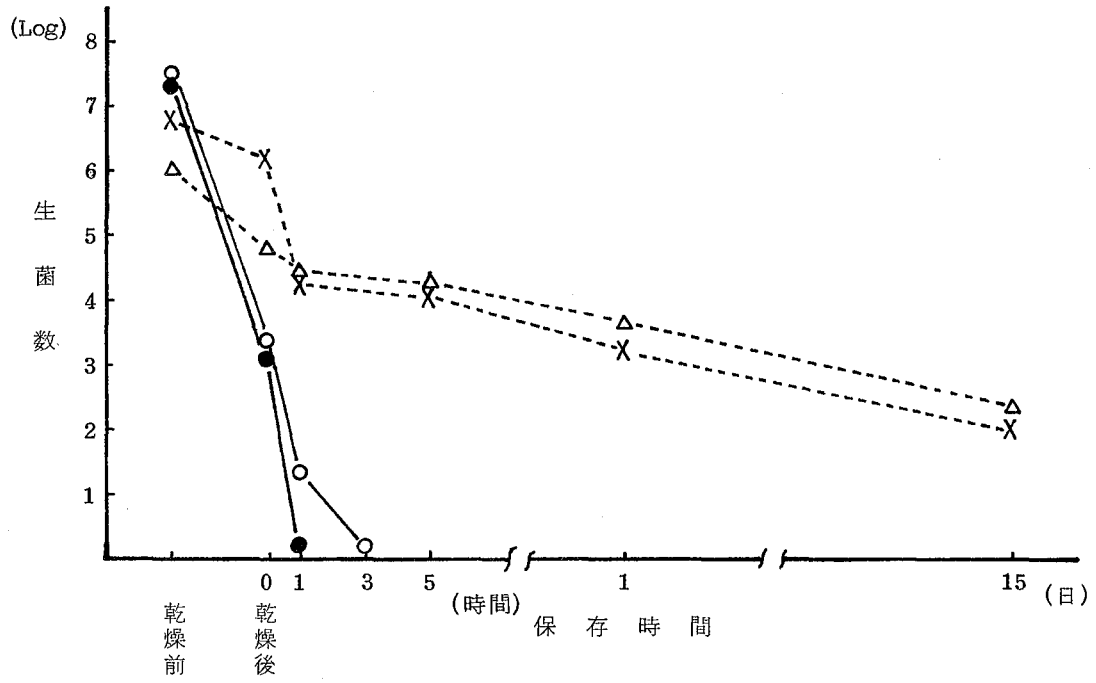


図1．乾燥状態での *C. jejuni*, *C. coli*, *E. coli* および *Salmonella* の生存
○——○：*C. jejuni*, CF1, ●——●：*C. coli*, HP1755, ×·····×：*E. coli*, 83-389
△·····△：*S. typhimurium*, 84-207

98℃の各温度条件の湯槽に入れ，一定時間ごとに生残している菌数を測定した．

55℃ 5分間の加熱処理では供試した *C. jejuni* 3菌株，*C. coli* 3菌株とも10^5個／ml の菌数が10^1～10^2個／ml に減少した．55℃10分間の作用ではすべての菌株は死滅した．60℃以上の温度条件下ではいずれの条件でも1分間の作用ですべての菌株が死滅する結果であった．なお，60℃や70℃ 30秒間の作用では少数菌が生残した．

3．各種消毒剤によるカンピロバクターの殺菌効果

次亜塩素酸ナトリウム： 0.2ppm，0.5ppm，2 ppm，5 ppm の各濃度に希釈した次亜塩素酸ナトリウム溶液に *C. jejuni* および *C. coli* をそれぞれ10^4個／ml 接種し，一定時間作用後カンピロバクターの生残性を調べた．

表2に示すごとく，0.2ppm 5分間および10分間の作用では供試した6菌株とも生残し，殺菌効果が認められなかった．0.5ppm でも5分間の処理では菌数の減少はみられたが，完全に殺菌されなかった．2 ppm では1分間の作用で一部の菌株が生残したが，5分間の作用ではすべて死滅した．5 ppm では，1分間の作用で *C. coli* HP1755株が10^1個／ml 生残したが，他の菌株はすべて死滅した．5分間の作用では *C. coli* HP1755株も完全に死滅した．

塩化ベンザルコニウム液： 塩化ベンザルコニウム液の0.02%，0.05%，0.1%，0.2%，0.5%の各濃度液に *C. jejuni* および *C. coli* をそれぞれ10^5個／ml 接種し，本薬剤による殺菌効果を調べた．

本剤0.05%以上の濃度では1分間以上の作用で *C. jejuni* 3株，*C. coli* 3株ともすべて死滅した．濃度が0.02%の場合，1分間の作用では *C. jejuni* 3株中1株，*C. coli* 3株中1株が完全に殺菌されず，少数菌が生残した．5分間および10分間の作用では *C. coli* HP1755株以外の菌株はすべて殺菌された．*C. coli* HP1755株は10分間の作用でも少数菌が生残した．

アルコール： アルコールの30%，50%，75%，90%，99%の各濃度溶液に10^6個の *C. jejuni* と *C. coli* を接種し，1分，3分，5分，10分，30分，60分間作用させた．30%濃度では，10分間の作用で少数菌が生残したが，30分以上の作用ではすべての菌数が死滅した．アルコール濃度50%以上では1分間の作用によって供試した *C. jejuni* 3菌株，*C. coli* 3菌株のいずれもが死滅した．

表2．次亜塩素酸ナトリウムによる *Campylobacter* の消毒効果

次亜塩素酸ナトリウムの濃度	作用時間	*Campylobacter* の生菌数／ml					
		C. jejuni			*C. coli*		
		CF1	CF256	CF82-403	CF82-368	CF395	HP1755
未処理		4.5×10^4	2.2×10^4	1.8×10^4	3.1×10^4	1.8×10^4	2.5×10^4
0.2ppm	5分	1.4×10^4	1.0×10^4	3.9×10^3	1.8×10^4	9.8×10^3	9.4×10^3
	10分	1.1×10^4	4.4×10^3	2.7×10^3	1.5×10^4	1.1×10^4	1.9×10^4
2.0ppm	1分	4.0×10^1	0	4.5×10^1	1.2×10^1	1.0×10^1	1.0×10^1
	5分	0	0	0	0	0	0
5.0ppm	1分	0	0	0	0	0	4.4×10^1
	5分	0	0	0	0	0	0

表3．各種処理による包丁表面からの *Campylobacter* の除菌

処理方法	生残菌数／ml			
	C. jejuni		*C. coli*	
	CF1	CF82-403	CF82-368	CF395
対照(未処理)	3.6×10^3	5.6×10^3	2.7×10^3	4.0×10^3
水道水	1.6×10^1	9.5×10^1	5.0×10^1	4.5×10^1
中性洗剤	5.6×10^1	2.1×10^1	1.0×10^1	2.6×10^1
70℃温水	0	0	0	0
アルコール	1.0×10^1	1.8×10^1	0	4.0×10^1
次亜塩素酸ナトリウム				
30秒	1.6×10^1	1.4×10^1	0	2.3×10^1
1分	2.0×10^1	4.0×10^1	0	2.2×10^1
塩化ベンザルコニウム				
30秒	7.2×10^1	1.1×10^1	0	5.7×10^2
1分	9.6×10^1	1.1×10^1	0	4.8×10^2

4．調理器具・器材表面のカンピロバクターの除菌

C. jejuni あるいは *C. coli* を接種した鶏肉乳剤を包丁，ステンレス板，ホーロー板，まな板，ざるおよび軍手にそれぞれ塗布した後，次の各処理を行い，カンピロバクターに対する除菌効果を検討した．

①水道水による水洗（20秒間）②中性洗剤による水洗（20秒間）③70℃熱湯中で1分間作用　④アルコール殺菌スプレーによる噴霧　⑤200ppm 次亜塩素酸ナトリウム溶液の30秒および1分間作用　⑥0.1%逆性石けん液の30秒および1分間作用　の各処理を行った．処理後，器具・器材の表面を滅菌ガーゼでよく拭き取り，生残したカンピロバクターの生菌数を測定した．軍手の場合には、滅菌生理食塩液を50ml 加え，ストマッカーによって布中の菌を洗い出した．なお，次亜塩素酸ナトリウムと塩化ベンザルコニウム液により処理したものは，残存する薬剤の影響を避けるため，処理後軽く水洗した．

包丁：　表3に示すごとく，包丁表面のカンピロバクターは70℃の熱湯処理によって完全に殺菌ないし除菌された．アルコール噴霧では少数菌が生残する場合もあった．次亜塩素酸ナトリウムや塩化ベンザルコニウム液処理では水道水や中性洗剤による水洗とほぼ同程度の菌量が生残した．

表4．各種処理によるステンレス板表面からの *Campylobacter* の除菌

処理方法	生残菌数／ml			
	C. jejuni		*C. coli*	
	CF1	CF82-403	CF82-368	CF395
対照(未処理)	8.1×10^3	1.4×10^2	3.0×10^3	4.4×10^3
水道水	5.2×10^2	$<10^1$	5.0×10^1	4.1×10^2
中性洗剤	4.3×10^2	3.0×10^1	3.3×10^1	1.6×10^2
70℃温水	0	0	0	0
アルコール	4.0×10^1	2.0×10^1	1.4×10^1	1.2×10^2
次亜塩素酸ナトリウム				
30秒	0	0	0	0
1分	0	0	0	0
塩化ベンザルコニウム				
30秒	3.9×10^1	0	0	0
1分	0	0	0	0

表5．各種処理によるホーロー板表面からの *Campylobacter* の除菌

処理方法	生残菌数／ml			
	C. jejuni		*C. coli*	
	CF1	CF82-403	CF82-368	CF395
対照(未処理)	8.0×10^3	4.9×10^3	3.5×10^3	8.0×10^3
水道水	1.4×10^2	1.3×10^2	1.3×10^1	4.6×10^1
中性洗剤	3.5×10^1	9.0×10^1	2.6×10^1	5.4×10^1
70℃温水	0	0	0	0
アルコール	0	3.0×10^1	0	0
次亜塩素酸ナトリウム				
30秒	0	0	0	0
1分	0	0	0	0
塩化ベンザルコニウム				
30秒	0	0	0	0
1分	0	0	0	0

ステンレス板： ステンレスバットの表面100㎠にカンピロバクターと鶏肉乳剤とを塗布し，各処理を行った後，生残菌数を測定した．熱湯処理では供試カンピロバクターはいずれも完全に除菌できたが，水道水や中性洗剤による水洗いでは完全に除菌ができず，アルコールの噴霧でも一部のカンピロバクターが生残した（表4）．次亜塩素酸ナトリウムや塩化ベンザルコニウム液による処理ではほとんどのカンピロバクターが除菌された．

ホーロー板： ステンレス板と同様にホーローバットの表面100㎠に菌と鶏肉乳剤を塗布した．表5に示すごとく，上記のステンレス板に比して容易に各処理によって除菌できた．すなわち，熱湯，次亜塩素酸ナトリウム，

表6．各種処理によるポリエチレン製まな板表面からの *Campylobacter* の除菌

処理方法	生残菌数／ml			
	C. jejuni		*C. coli*	
	CF1	CF82-403	CF82-368	CF395
対照(未処理)	1.0×10^4	9.5×10^3	2.7×10^3	7.6×10^3
水道水	3.2×10^2	4.9×10^2	1.6×10^2	3.6×10^2
中性洗剤	1.8×10^2	1.5×10^2	1.0×10^2	3.6×10^2
70℃温水	1.0×10^1	0	0	6.0×10^1
アルコール	1.0×10^1	0	2.0×10^1	1.9×10^1
次亜塩素酸ナトリウム				
30秒	1.5×10^2	5.0×10^2	8.0×10^1	8.4×10^2
1分	3.0×10^1	4.3×10^2	1.2×10^2	5.0×10^2
塩化ベンザルコニウム				
30秒	6.8×10^2	7.1×10^2	1.2×10^2	8.3×10^2
1分	1.4×10^2	2.1×10^2	8.0×10^1	4.2×10^2

表7．各種処理による木製まな板表面からの *Campylobacter* の除菌

処理方法	生残菌数／ml			
	C. jejuni		*C. coli*	
	CF1	CF82-403	CF82-368	CF395
対照(未処理)	3.3×10^3	9.0×10^2	4.1×10^3	4.8×10^3
水道水	6.4×10^2	5.3×10^2	8.6×10^2	7.6×10^2
中性洗剤	3.8×10^2	2.4×10^2	1.9×10^2	2.0×10^2
70℃温水	0	0	0	8.0×10^1
アルコール	1.0×10^1	1.5×10^1	0	2.9×10^1
次亜塩素酸ナトリウム				
30秒	1.3×10^2	1.0×10^1	4.2×10^2	3.6×10^2
1分	1.5×10^2	0	3.7×10^1	1.3×10^2
塩化ベンザルコニウム				
30秒	2.3×10^2	8.1×10^2	2.6×10^2	5.6×10^2
1分	7.1×10^2	8.0×10^1	1.9×10^2	2.3×10^2

塩化ベンザルコニウム液による処理ですべて除菌されたし，アルコール噴霧でもほとんど除菌された．ただし，水道水や中性洗剤による水洗いでは10^1～10^2個／mlのカンピロバクターが生残した．

ポリエチレン製まな板： 包丁傷のある使用済みのポリエチレン製まな板表面100cm^{2}にカンピロバクターと鶏肉乳剤を塗布し，各処理を行った．本まな板では，70℃の熱湯処理でも一部のカンピロバクターが生残した（表6）．その他の各処理の場合もほとんど除菌効果はなかった．

木製まな板： 使用済みの木製まな板の場合も上記ポリエチレン製まな板と同様に熱湯処理によってほとんどの菌が除菌できたが，少数生残する場合もみられた（表7）．各種消毒剤ではほとんど除菌できなかった．

ざる： ざる表面からのカンピロバクターの除菌は熱湯による処理が最も効果があった．アルコールによる噴

表8．各種処理によるざる表面からの *Campylobacter* の除菌

処理方法	生残菌数／ml			
	C. jejuni		*C. coli*	
	CF1	CF82-403	CF82-368	CF395
対照(未処理)	2.4×10^4	8.1×10^3	1.1×10^4	7.0×10^3
水道水	2.7×10^2	2.7×10^2	2.2×10^1	7.4×10^1
中性洗剤	2.0×10^2	6.0×10^1	1.0×10^1	9.2×10^1
70℃温水	0	0	0	0
アルコール	0	0	9.4×10^2	2.2×10^1
次亜塩素酸ナトリウム				
30秒	1.6×10^2	4.0×10^1	1.0×10^3	7.0×10^2
1分	2.6×10^3	7.9×10^2	1.9×10^1	0
塩化ベンザルコニウム				
30秒	6.0×10^2	2.1×10^2	7.6×10^2	8.0×10^2
1分	1.3×10^3	6.6×10^2	3.1×10^3	1.9×10^2

表9．とりの唐揚げおよび焼肉調理における *Campylobacter* の生残

調理方法	調理時間	*Campylobacter* が生残した件数/供試件数					
		C. jejuni			*C. coli*		
		CF1	CF256	CF82-403	CF82-368	CF395	Hp1755
とり肉から揚げ(温度180℃)	1分	1/4	0/4	2/4	0/4	1/4	3/4
接種菌量：10^3-10^4/g	3分	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4
焼肉(温度160℃)							
A接種菌量：10^3-10^4/g	5秒	4/4	4/4	NT*	4/4	4/4	NT
	10秒	2/4	0/4	NT	4/4	4/4	NT
B接種菌量：10^2/g	5秒	3/4	4/4	NT	2/4	3/4	NT
	10秒	0/4	1/4	NT	0/4	1/4	NT

* 検討せず

霧でも一部除菌できたが，生残する場合もみられた．次亜塩素酸ナトリウムや塩化ベンザルコニウム液では生残菌数が多くみられ，あまり除菌効果がなかった（表8）．

軍手： 食鳥処理所で解体作業者が軍手を使用することがあるので，軍手からのカンピロバクターの除菌について同様に検討した．この場合も熱湯処理が最も効果があった．水道水や中性洗剤による洗浄ではほとんど除菌できず，次亜塩素酸ナトリウムによる5分間の処理でも生残菌が認められた．本薬剤10分間の処理でも一部のカンピロバクターが生残した．

5．加熱調理過程における *C. jejuni* および *C. coli* の消長

60℃，1分間以上の加熱処理によってカンピロバクターは死滅したが，実際の加熱調理食品中でのカンピロバクターの生残について実験的に検討した．

唐揚げ調理： 鶏肉10gの中心部に *C. jejuni* および *C. coli* をそれぞれ10^3-10^4個／g接種し，180℃の油で一定時間唐揚げし，生残菌数を測定した成績を表9に示す．1分間の唐揚げでは *C. jejuni* CF 1株で試料4件中1件，*C. jejuni* CF 82-403株で4件中2件，*C. coli* CF395株で4

表10. ささみの湯通し処理過程における *Campylobacter* の生残

調理温度	調理時間	*Campylobacter* が生残した件数/供試件数			
		C. jejuni		*C. coli*	
		CF1	CF82-403	CF82-368	CF395
98℃	1秒	4/4	2/4	4/4	3/4
	3秒	3/4	4/4	4/4	3/4
	5秒	3/4	4/4	2/4	3/4
80℃	1秒	3/4	4/4	4/4	3/4
	3秒	4/4	0/4	2/4	3/4
	5秒	4/4	0/4	0/4	4/4
70℃	1秒	4/4	4/4	4/4	4/4
	3秒	4/4	4/4	4/4	4/4
	5秒	4/4	3/4	3/4	4/4

接種菌量：10^2個/ g

件中1件，*C. coli* HP1755株で4件中3件にカンピロバクターの生残が認められた．3分間の唐揚げではいずれのサンプルでもカンピロバクターは検出されなかった（表9）．なお，油の温度が180℃でも唐揚げ物の中心部の温度は低く，唐揚げ開始後30秒で70℃，1分後でも90℃であった．

焼肉調理： 牛肉10g の表面に *C. jejuni* および *C. coli* をそれぞれ10^3～10^4個／g あるいは10^2個／g 接種し，ホットプレート（温度120℃）で5秒間および10秒間調理した．

表9に示すごとく，5秒間の処理ではほとんどのカンピロバクターが生残したし，接種菌量が多い場合では，10秒間の調理でもカンピロバクターは死滅しなかった．接種菌量が10^2個／g の場合，10秒間の調理では一部にカンピロバクターが生残したが，ほとんどのサンプルで本菌は死滅した．

ささ身の湯通し： 鶏肉のささ身表面に *C. jejuni* あるいは *C. coli* をそれぞれ10^2個／g 付着させ，98℃，80℃，70℃の各熱湯中で，1秒，3秒，5秒間処理した．表10に示すごとく，98℃，80℃，70℃の各温度で5秒間処理してもささ身表面のカンピロバクターはほとんど生残し，この程度の処理ではカンピロバクターは死滅しなかった．

考　察

C. jejuni や *C. coli* は好気的条件では発育できず，むしろ死滅する微好気性細菌であり，発育温度も31～46℃と高温度であって，食品中や環境中の本菌の生存あるいは増殖態度は従来のサルモネラなどの食中毒起因細菌とは著しく異なっていることが考えられる．著者ら[5]は，*C. jejuni* や *C. coli* は生肉中での生存が環境の温度条件によって大きく影響されることを報告した．すなわち，生肉中のカンピロバクターは25℃や37℃では1日以内に死滅するが4℃の低温条件では3日以上生存した．また，酸素に対する抵抗性も低く，真空包装食品中のカンピロバクターは長期間生存するが，O_2とCO_2によるガス充填包装では4℃の低温保存でも短期間に死滅することを報告してきた[6]．

本菌の発育可能温度が31℃以上であることから，食品中でカンピロバクターが増殖できる機会は極めて少ないと考えられる．Black ら[7]の人体投与実験では *C. jejuni* 800個の投与で10名中5名が発病しているし，Robinson[8]の投与実験でも500個で発症しており，極めて少量菌の感染で発症するものと推察される．従って，本菌食中毒の予防の要点は食品中での本菌の増殖を抑制する対策も必要であるが，まず第一に食品にカンピロバクターを汚染させないことが重要であろう．

食品への病原菌汚染過程で，包丁やまな板などの調理器具・器材からの二次汚染防止が大切であるので，これらの環境からのカンピロバクターの除菌方法について検討を進めた．

今回の実験成績より，器具・器材表面のカンピロバクターの生存性は環境の温度条件の他に表面の水分含量も

大きな影響を与えることを明らかにした．すなわち，湿潤した環境では長期間本菌が生存したが，乾燥条件下では数時間内で死滅した．Oosterom ら[9]はタイル表面に *C. jejuni* を付着させ実験を行ったところ，急速に乾燥させた場合30分以内で本菌が死滅し，徐々に乾燥させた場合には7時間後でも本菌が生存することを報告した．また豚と体表面の *C. jejuni* も急速な換気によって早期に本菌が死滅していくことを観察し，*C. jejuni* は乾燥に弱いことを指摘している[10]．

器具や手指の消毒に用いられている次亜塩素酸ナトリウム，塩化ベンザルコニウム液およびアルコールによるカンピロバクターの殺菌力は大腸菌などの腸内細菌の場合もほぼ同じであった．次亜塩素酸ナトリウムでは，2 ppm 5分以上で本菌は死滅したし，0.05％塩化ベンザルコニウム液で1分の作用，75％アルコールでは1分以内に菌が死滅した．ただし，包丁やまな板などの器具・器材表面で，食肉などの有機物が含まれている場合には所定の濃度によっても十分に消毒されなかった．

Wang ら[11]は塩素剤による殺菌は大腸菌の場合と同程度あるいはそれ以下の濃度で十分に効果があること，フェノールやグルタルアルデヒド，あるいはエタノールによる殺菌も通常の濃度で効果があることを報告している．ただし，食鳥処理所では高濃度の残留塩素存在下であっても，鶏と体表面のカンピロバクターの消毒にはほとんど効果がみられていない．

包丁，まな板，ざるなど調理器具・器材表面のカンピロバクターの除菌は各種の消毒剤では十分に除菌ができなかった．70℃以上の熱湯による処理は最も効果のある除菌方法であった．

C. jejuni や *C. coli* は加熱によっても容易に殺菌された．55℃10分，60℃ 5分以上の加熱で菌がすべて死滅した．70℃では1分間で菌は死滅するが，30秒の処理では生残することがあるので，調理器具・器材の消毒には70℃以上の熱湯で1分間以上作用させる必要がある．

カンピロバクター汚染の高い食肉を対象に加熱調理過程での *C. jejuni* や *C. coli* の死滅状況を観察した結果，鶏肉唐揚げでは1分間の加熱処理ではまだ菌が生残することがあったし，焼肉では10秒間の調理でも菌が生残しており，深部に熱が通るまで十分に加熱することが必要であった．湯通しでも，通常行われている熱湯で数秒間の処理ではほとんど菌が死滅せず，感染源として危険性の高い食品であると言える．

調理器具・器材からのカンピロバクターの除菌は，従来より指導されている熱湯処理が最も効果が高かったし，本菌が乾燥に極めて弱いことから，器具・器材の乾燥も大切である．カンピロバクター食中毒予防としてはニ次汚染防止対策と併せて，家畜・家禽の解体時のと体へのカンピロバクター汚染防止対策が重要である．特に食鳥処理所でのと体の解体作業あるいは消毒についての改善が望まれる．

結　論

カンピロバクター食中毒の予防対策に必要な基礎資料を得るために各種消毒剤や物理的処理による本菌の殺菌・消毒効果について検討した．また，カンピロバクター汚染率の高い食肉を対象に加熱調理過程と本菌の死滅状況についても検討を行った結果，以下の成績を得た．

1．*C. jejuni* および *C. coli* は湿潤な環境では好気的条件下でも長期間生存した．ただし，環境の温度が本菌生存に影響を与え，4℃と15℃では3日以上生存したが，25℃では2日間で死滅した．

2．*C. jejuni* と *C. coli* は55℃10分間の加熱，60℃ 1分間の加熱処理で死滅した．

3．次亜塩素酸ナトリウムは2 ppm の濃度で1分間，塩化ベンザルコニウムは0.05％濃度で1分間，エチルアルコールは50％濃度で1分間の作用で *C. jejuni* や *C. coli* は死滅した．

4．包丁，ステンレス板，ホーロー板，ポリエチレン製まな板，木製まな板，ざるの各表面に付着させたカンピロバクターは70℃ 1分間の熱湯処理によって除菌できた．アルコール，次亜塩素酸ナトリウム，塩化ベンザルコニウムの消毒剤では，菌数の減少を認めたが，完全に除菌することはできなかった．軍手に付着したカンピロバクターも70℃の熱湯処理が最も除菌効果が高かった．

5．鶏肉10g の中心部に *C. jejuni* および *C. coli* を接種し，唐揚げを行った結果，1分間調理では本菌が生残し，3分間処理では死滅した．5秒間や10秒間の焼肉調理では肉表面に付着させたカンピロバクターは死滅しなかった．ささ身の湯通しでも，98℃ 5秒間程度の処理では本菌は死滅しなかった．

文　献

1）Blaser, M. J. and Reller, L. B. : *New Engl. J. Med.*, 305, 1444, 1981

2）伊藤　武，高橋正樹，斉藤香彦，高野伊知郎，甲斐明美，大橋　誠，福山正文，上村知雄：感染症誌，59(2), 86, 1985

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) 坂井千三，伊藤　武：日細誌，40(3),563,1985
5) 斉藤香彦，伊藤　武，高橋正樹，高野伊知郎，柳川義勢，甲斐明美，坂井千三，石川隆三，下地洋之，酒井　宏，川崎こずえ：東京衛研年報，33,150,1982
6) 伊藤　武，高野伊知郎，高橋正樹，富国芳彦，高橋栄一：食品と微生物，2(2),97,1985
7) Black, R. E., Levine, M. M., Blaser, M. J., Clements, M. L. and Hughes, T. P. : Campylobacter Ⅱ, 13,1983, Public Health Laboratory Service, London
8) Robinson, D. A. : *Brit. Med. J.*, i, 1374,1981
9) Oosterom, J., De Wilde, G. J. A., De Boer, E., De Blaauw, L. H. and Karman, H. : *J. Food Protec.*, **46**(8), 702,1983
10) Luechtefeld, N. W. and Wang, W. L. : *J. Clin. Microbiol.*, 13(2),266,1981
11) Wang, W. L., Powers, B. W., Luechtefeld, N. W. and Blaser, M. J. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**(4), 1202, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **37**, 129-135, 1986

食鳥処理場および市販鶏肉のカンピロバクター・ジェジュニー汚染状況

神保勝彦*, 小久保彌太郎*, 金子誠二*, 桐谷礼子*, 松本昌雄*

Incidence of *Campylobacter jejuni* in Poultry Process Plant and Commercial Chicken Meat

KATSUHIKO JINBO*, YATARO KOKUBO*, SEIJI KANEKO*, REIKO KIRITANI* and MASAO MATSUMOTO*

Keywords：食鳥処理場 poultry process plant, 市販鶏肉 commercial chicken meat, カンピロバクター・ジェジュニー *campylobacter jejuni*

緒　言

近年，カンピロバクター・ジェジュニーによる食中毒の発生が漸増し[1]，その原因食品としては鶏肉[2]が特に重要視されている．鶏のカンピロバクター保菌状況や鶏肉およびその肝臓などの汚染実態調査については数多く報告[3-8]され，食鳥肉等のカンピロバクター汚染は解体時に起ると言われている．しかし，これらの食鳥処理場における汚染調査[6-9]はと体解体のみの処理場を対象としたもので，生鶏から食肉になるまでの系統的な汚染調査は少ない．

そこで，著者らは解体処理方式の異なる代表的な食鳥処理場を対象に，鶏から食肉に至るまでの処理工程について汚染調査し比較検討した．また，併せて東京都内で販売されている鶏肉およびその内臓などについても，同様に汚染実態調査を行ったので報告する．

材料および方法

1．供試鶏肉

1984年6月から9月の間にかけて，東京都内で採取した市販鶏肉61，鶏肝臓などの内臓51，鶏皮6の計118検体である．

2．調査対象食鳥処理場

1日の処理数が約6000羽の中抜き方式のA社と外むき方式のB社，および処理数が約3000羽の外むき方式のC社の3処理場である．各処理場の処理工程を図1に示した．

3．試料の調製

各検体10gに滅菌リン酸緩衝生理食塩液90m*l*を加え，ストマッカーで混合均一化したものを試料原液とした．ふき取り試料は，100㎠を拭い取ったガーゼに滅菌リン酸緩衝生理食塩液9 m*l*を加え振盪したものを試料原液とした．

4．細菌学的検査

1）カンピロバクター・ジェジュニー（以下，カンピロバクター） a）定性試験　試料原液1 m*l*を改良B－FBP－AM培地[10]に接種，42℃で24時間微好気培養した．その後，スキロー寒天培地に塗抹し，42℃で48時間微好気培養後，定型的集落は常法[11]により確認した．b）定量試験　改良B－FBP－AM培地を用いて3本法によるMPN法で行った．以下，定性試験と同様に行った．

2）サルモネラ　a）定性試験　試料原液1 m*l*をEEMブイヨンに接種，35℃で18時間培養後，その0.1m*l*をセレナイト培地に接種し35℃で18時間培養した．その後，DHL寒天培地に塗抹培養し，定型的集落については常法により確認した．b）定量試験　EEMブイヨンを用いて3本法によるMPN法で行った．以下，定性試験と同様に行った．

3）その他の食中毒起因菌　黄色ブドウ球菌，ウェルシュ菌およびエルシニア・エンテロコリチカ（以下，エルシニア）の検査は，それぞれの常法[12,13]に従って行った．

*東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Reseach Labolatory of Public Health
24－1 ,Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

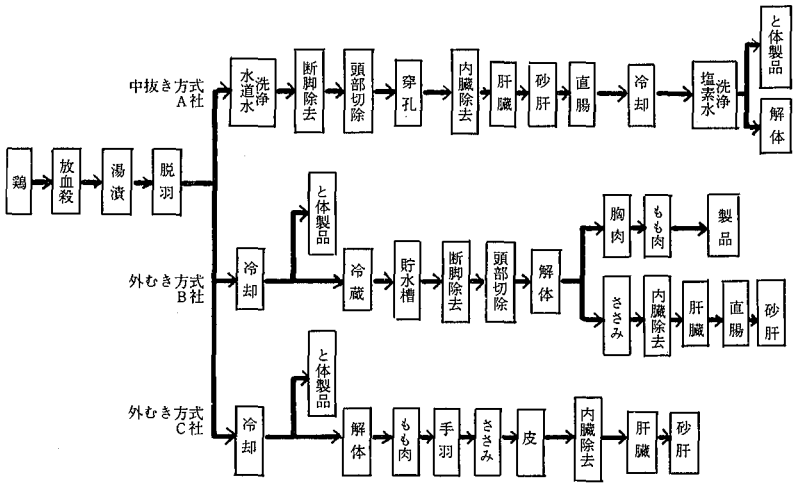


図1．食鳥処理場における処理工程

4）汚染指標菌　細菌数および大腸菌群の検査は，それぞれの常法に従って行った．

調査成績および考察

1．市販鶏肉およびその内臓などのカンピロバクター汚染状況

市販の鶏肉およびその内臓など118検体を対象にして調べたカンピロバクターおよびサルモネラの検出成績は，表1に示した．カンピロバクターは42検体（35.6%）から検出され，とくに肝臓は35検体中17検体（48.6%）と高い検出率を示した．一方，サルモネラは10検体（8.5%）から検出されたが，カンピロバクターに比べて検出率は低かった．

このように肝臓はカンピロバクターによる汚染が比較的高いことが判明したので，市販の肝臓18検体を対象に，細菌汚染状況を調べ，その成績は表2に示した．カンピロバクターは13検体から検出され，その菌数は100g当り10^2～10^4の範囲であり，そのうち1検体が10^5個レベルと高い菌数のものがあった．サルモネラは1検体から検出され，その菌数は100g当り10^3個レベルであった．黄色ブドウ球菌は4検体，ウェルシュ菌は12検体から検出され，それらの菌数はそれぞれ0.1g当り10^2以下，1g当り10^2以下であった．また，エルシニアは11検体から検出された．細菌数は1g当り10^4～10^7の範囲，大腸菌群数は1g当り10^2～10^4の範囲であった．

鶏肉におけるカンピロバクターの汚染は，食中毒起因菌のうちで最も高く，その汚染菌数も多いことが判明した．これは，カンピロバクターは鶏の腸管に高率に分布していることから，解体処理工程で鶏肉などが汚染されるものと考えられる．一方，解体処理方法には中抜き法と外むき法などがあり，さらにそれらの方法は解体処理場によって異なることから，汚染にも差があるものと考えられる．そこで，処理場によってカンピロバクターの汚染に違いがあるかどうかを比較検討した．その成績を表3に示した．

処理場D，E，H，L，Mなどから採取した検体は半数以上がカンピロバクターに汚染されており，これに対して，処理場G，J，Kなどから採取した検体は全く汚染されていなかった．このように，鶏肉のカンピロバクター汚染は処理場によって明らかに異なるものと考えられる．

表1．市販鶏肉およびその内臓からのカンピロバクターとサルモネラの検出状況

検体名	検体数	陽性検体数(%)	
		カンピロバクター	サルモネラ
肉	36	9(25.0)	5(13.9)
ささみ	8	2(25.0)	1(12.5)
もも肉	9	3(33.3)	0
手羽肉	8	3(37.5)	0
皮	6	2(33.3)	0
肝　臓	35	17(48.6)	1(2.7)
砂　肝	11	4(36.4)	2(18.2)
も　つ	5	2(40.0)	1(20.0)
計	118	42(35.6)	10(8.5)

表2．市販鶏肝臓における細菌検査成績

検体 No	細菌数 (1g当り)	大腸菌群 (1g当り)	カンピロバクター (MPN/100g)	サルモネラ (MPN/100g)	黄色ブドウ球菌 (0.1g当り)	ウェルシュ菌 (1g当り)	エルシニア・エンテロコリチカ (定性)
1	81×10^3	48×10	14×10^4	23×10^2	10	20	−
2	79×10^3	49×10	43×10^2	−	−	50	+
3	86×10^3	66×10^2	36×10	−	−	5	+
4	94×10^4	56×10^2	36×10	−	−	12	+
5	26×10^4	50×10^2	−	−	30	4	−
6	58×10^3	11×10^3	36×10	−	−	7	+
7	11×10^6	54×10^3	−	−	−	−	+
8	15×10^4	34×10	24×10^3	−	−	25	−
9	47×10^5	88×10^2	24×10^3	−	70	45	−
10	10×10^5	62×10^2	73×10	−	−	−	+
11	14×10^4	34×10^2	−	−	−	−	−
12	80×10^3	74×10	36×10	−	−	19	+
13	14×10^5	94×10^2	23×10^2	−	10	2	+
14	54×10^3	11×10^2	−	−	−	3	+
15	19×10^4	96×10	−	−	−	−	−
16	19×10^3	30×10	91×10	−	−	−	+
17	15×10^5	62×10	91×10	−	−	−	+
18	19×10^3	61×10	24×10^3	−	−	17	−

2．食鳥処理場の細菌汚染状況

1）中抜き方式A社

A社は1日の処理数が約6000羽の中抜き法の処理場である．その処理工程を系統的に調査し，その成績を表4に示した．

検査当日搬入された鶏の糞5検体を対象に調べたところ，カンピロバクターは全てから検出され，その中で100g当り10^5以上の菌数を示すものもあった．

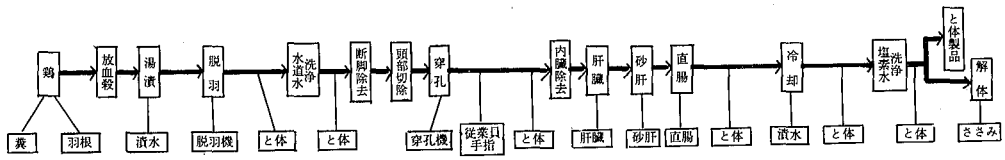
サルモネラは1検体から検出され，その菌数は，100g当り10^5以上であった．また，ウェルシュ菌は4検体から検出されたが，黄色ブドウ球菌およびエルシニアは検出されなかった．なお，羽根からはカンピロバクターおよびサルモネラは検出されなかった．

処理工程では，最初に湯漬工程の漬水，次に脱羽機，そして脱羽後と体表面の汚染が認められた．これらの汚染は保菌鶏の糞によるものと思われる．脱羽後と体表面からはカンピロバクターが5検体中2検体，サルモネラ

表3．食鳥処理場別鶏肉からのカンピロバクターの検出状況

処理場名	検体数	カンピロバクター陽性数
D	8	5
E	7	4
F	6	2
G	6	0
H	5	3
I	5	1
J	5	0
K	5	0
L	4	3
M	3	3

表4．A社の処理工程における細菌検出状況



細菌数 (1g,ml,cm²当り)	77×10^6	69×10^5	17×10^4	10×10^3	80×10	38×10			11×10^2	24×10^4			25×10^2	<10	21×10	<10	83×10^2
大腸菌群 (1g,ml,m²当り)	$>10^4$	51×10^2	68×10	14×10^2	2	1			16×10	46×10^2			41×10	−	1	1	−
カンピロバクター (MPN/100g,ml,cm²)	5/5 (>14×10^4)	0/4 (−)	2/3 (36)	2/3 (43×10)	2/5 (91)	0/5 (−)	0/2	2/3	0/5 (−)	4/5 (>14×10^4)	5/5	4/5	5/5 (23×10)	0/3 (−)	3/5 (−)	1/5 (−)	2/5 (−)
サルモネラ (MPN/100g,ml,cm²)	1/5 (>14×10^4)	0/4 (−)	1/3 (−)	1/3 (−)	1/5 (−)	0/5 (−)	0/2	0/3	0/5 (−)	0/5 (−)	1/5	0/5	1/5 (−)	0/3 (−)	0/5 (−)	0/5 (−)	0/5 (−)
黄色ブドウ球菌	0/5	0/4	0/3	0/3	0/5	0/5	0/2	1/3	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/3	0/5	0/5	0/5
ウエルシュ菌	4/5	4/4	1/3	2/3	0/5	0/5	0/2	3/3	2/5	5/5	3/5	3/5	4/5	1/3	0/5	0/5	0/5
エルシニア・エンテロコリチカ	0/5	0/4	0/3	0/3	0/5	0/5	0/2	0/3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/3	0/5	0/5	0/5

は1検体から検出された．次の洗浄工程ではと体表面の汚染菌量は少なくなる傾向が見られ，カンピロバクターおよびサルモネラは検出されなかった．しかしながら，穿孔工程で再び汚染菌量が増える傾向が見られ，細菌数は1桁高くなった．しかし，カンピロバクターとサルモネラは検出されなかった．さらに，内臓除去工程で汚染は急激に増大した．すなわち，肝臓5検体中4検体からカンピロバクターが検出され，その菌数は100g当り10^5以上であった．細菌数は1g当り10^5個レベル，大腸菌群数は1g当り10^3個レベルであった．「すなぎも」でも同様の汚染傾向が見られた．この汚染は内臓除去時の腸管損傷によるものと考えられる．そして，この影響は内臓除去後のと体表面にも見られ，カンピロバクターは5検体中5検体，サルモネラは1検体から検出された．

冷却，塩素水洗浄へと工程が進むと汚染菌量は次第に減少した．塩素水洗浄後と体表面1検体からカンピロバクターが検出されたが，細菌数は1cm²当り10以下であった．一方，内臓除去されたと体の一部は，「もも肉」，「胸肉」，「ささみ」などに解体され，この工程の最終製品である「ささみ」5検体中2検体からカンピロバクターが検出された．この汚染は塩素水洗浄工程で，塩素水がと体内腔まで十分に噴射されなかったため，菌が残存したものと思われる．

2）外むき方式B社

B社は1日の処理数が約6000羽の外むき法の処理場である．その処理工程を系統的に調査し，その成績を表5に示した．

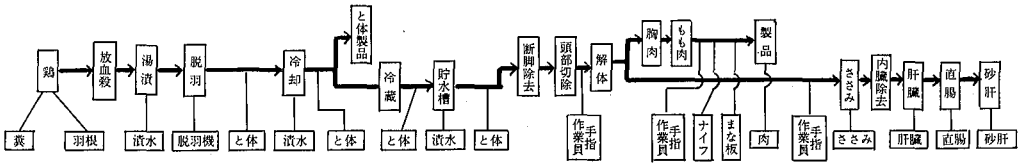
検査当日搬入された鶏の糞5検体を対象にして調べたところ，カンピロバクターは全ての検体から検出され，その中の1検体について菌数を調べた結果，100g当り10^5以上であった．ウェルシュ菌は4検体から検出されたが，サルモネラ，黄色ブドウ球菌およびエルシニアは検出されなかった．羽根でも同様の汚染傾向が見られた．処理工程ではA社と同様に，保菌鶏の糞により湯漬工程の漬水，脱羽工程の脱羽機が汚染をうけたものと思われる．脱羽後と体表面5検体全てからカンピロバクターが検出され，その菌数は1cm²当り10^3個レベルであった．また，ウェルシュ菌も2検体から検出された．冷却工程ではと体表面汚染は若干希釈される傾向を示し，大腸菌群，ウェルシュ菌は検出されなかった．しかし，カンピロバクターは残存し2検体から検出された．

と体の一部はそのまま製品として出荷され，残りのと体は冷蔵庫へ保管される．冷蔵保管されたと体表面からは，保管前は検出されなかった黄色ブドウ球菌とエルシニアが検出された．これはと体収納籠，冷蔵庫壁からの汚染と思われる．

貯水槽浸漬工程で汚染菌量は急増し，浸漬後と体表面5検体中4検体からカンピロバクターが検出され，黄色ブドウ球菌，ウェルシュ菌も各1検体から検出された．また，細菌数も1桁高くなった．なお，使用中の漬水の細菌数は1ml当り10^5個レベル，大腸菌群数は1ml当り10^2個レベル，カンピロバクター数は100ml当り10^4以上であった．このように，貯水槽での汚染が著しいことから，漬水を常時溢流させるとか，塩素水を加えるなどの対策が必要であると思われる．

解体工程に入ると汚染は拡大され，各工程での作業員手指，器具等からはカンピロバクター，黄色ブドウ球菌，ウェルシュ菌，エルシニアなどが検出された．さらに，

表5．B社の処理工程における細菌検出状況



細菌数 (1g,ml,cm²当り)	25×10^7	53×10^8	50×10^5	69×10^2	92×10	12×10^3	12×10	12×10	34×10^4	10×10^2					17×10^5		34×10^4	10×10^4		39×10^4
大腸菌群 (1g,ml,cm²当り)	$>10^4$	$>10^4$	−	8	27	53	−	−	30×10	3					$>10^4$		$>10^4$	24×10^2		$>10^4$
カンピロバクター (MPN/100g,ml,cm²)	5/5 ($>14\times10^4$)	4/5 (46×10^3)	0/1 (−)	1/1 (43×10)	5/5 (46×10^2)	1/3 (91)	2/5 (−)	0/5 (−)	1/1 ($>14\times10^3$)	4/5 (93×10)	1/2	1/2	1/2	1/2	3/5 (93×10)	1/1	4/5 (23×10^2)	4/5 (43×10^2)	2/5	1/5 (−)
サルモネラ (MPN/100g,ml,cm²)	0/5 (−)	0/5 (−)	0/1 (−)	0/1 (−)	0/5 (−)	0/3 (−)	0/5 (−)	0/5 (−)	0/1 (−)	0/5 (−)	0/2	0/2	0/2	0/2	0/5 (−)	0/1 (−)	0/5 (−)	0/5 (−)	0/5	0/5 (−)
黄色ブドウ球菌	0/5	0/5	0/1	0/1	0/5	1/3	0/5	1/5	1/1	1/5	2/2	2/2	2/2	2/2	5/5	0/1	1/5	1/5	2/5	1/5
ウエルシュ菌	4/5	2/5	1/1	1/1	2/5	2/3	0/5	0/5	1/1	1/5	2/2	1/2	1/2	0/2	5/5	1/1	3/5	3/5	5/5	4/5
エルシニア・エンテロコリチカ	0/5	0/5	0/1	0/1	0/5	0/3	0/5	1/5	0/1	0/5	2/2	1/2	0/2	1/2	1/5	1/1	2/5	1/5	1/5	2/5

解体された「胸肉」,「もも肉」などの汚染菌量は著しく，これらの肉5検体中3検体からカンピロバクター，5検体全てから黄色ブドウ球菌およびウェルシュ菌が検出され，エルシニアは1検体から検出された．細菌数は1g当り10^6個レベルと多かった．一方，内臓除去工程でも汚染は著しく，「ささみ」5検体中4検体からカンピロバクターが検出され，その菌数は100g当り10^3個レベルであった．黄色ブドウ球菌は1検体，ウェルシュ菌は3検体，エルシニアは2検体からそれぞれ検出された．また，細菌数は1g当り10^5個レベルであった．これらの汚染の原因は，不慣れな解体作業員が腸管を損傷し，その腸内容物の漏出によるものと考えられる．

内臓除去後も汚染菌量は減少せず，肝臓5検体中4検体からカンピロバクターが検出され，その菌数は100g当り10^3個レベルであった．黄色ブドウ球菌は1検体，ウェルシュ菌は3検体，エルシニアは1検体から検出された．細菌数は1g当り10^5個レベル，大腸菌群数は1g当り10^3個レベルであった．「すなぎも」でも同様の汚染傾向が見られた。

3）外むき方式C社

C社は1日の処理数が約3000羽の外むき法の処理場である．その処理工程を系統的に調査し，その成績を表6に示した．

検査当日搬入された鶏の糞および羽根各5検体からはカンピロバクター，サルモネラ，黄色ブドウ球菌，エルシニアは検出されなかった．さらに，処理工程および解体された「ささみ」，肝臓などからも，これらの菌種は検出されなかった．しかしながら，処理工程ではA社，B社と同様に鶏の糞により湯漬工程の漬水，脱羽工程の脱羽機そして脱羽後と体表面が汚染された．冷却工程でと体表面の汚染菌量は急激に減少し，細菌数は1 cm²当り10個レベルと少なく，大腸菌群およびウェルシュ菌は検出されなかった．これらのことは冷却水が2℃と低いため，鶏の肛門からの糞の漏出が少なかったことによるものと考えられる．

解体工程に入ると汚染菌量は次第に増え，「ささみ」の細菌数は1g当り10^4個レベル，大腸菌群数は1g当り10個レベルであった．ウェルシュ菌は5検体中2検体から検出された．しかし，同じ外むき法のB社に比べて汚染菌量は少なく，解体工程における作業員手指，まな板などの器具の汚染も少なかった．また，内臓除去後の肝臓，「すなぎも」などの汚染菌量もB社のそれらに比べて1桁低かった．これは，解体作業が熟練者によって行われており，腸管などの損傷による汚染が少なかったものと考えられる．

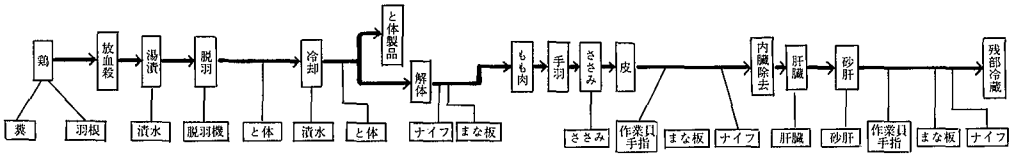
3．食鳥処理場における細菌汚染箇所

処理方式および処理数の異なる処理場を対象にして調査した結果，それぞれの細菌汚染箇所は表7に示したような箇所であることが判明した．

今回調査した3処理場の汚染状況は脱羽工程まではほぼ同様であり，その汚染は鶏の糞によるものと考えられる．汚染はA社では洗浄工程，B社，C社では冷却工程で希釈拡大され，特にC社では冷却水の温度が他の2社に比べて2℃と低く，汚染菌量は急激に減少した．

解体工程では3処理場ともに汚染菌量は次第に増加した．すなわち，A社では内臓除去工程が最も著しい汚染

表6．C社の処理工程における細菌検出状況



細菌数 (1g, ml, cm²当り)	15×10^7	46×10^5	62×10^2	45×10	30×10	<10	34			15×10^3		40×10		10×10^3	43×10^3		15×10^3			
大腸菌群 (1g, ml, cm²当り)	$>10^4$	$>10^4$	−	2	18	−	−			30		−		15×10	11×10		67×10			
カンピロバクター (MPN/100g, ml, cm²)	0/5	0/5	0/2	0/1	0/5	0/3	0/5	0/3	0/3	0/5	0/2	0/3	0/3	0/5	0/5	0/2	0/3	0/3		
サルモネラ (MPN/100g, ml, cm²)	0/5	0/5	0/2	0/1	0/5	0/3	0/5	0/3	0/3	0/5	0/2	0/3	0/3	0/5	0/5	0/2	0/3	0/3		
黄色ブドウ球菌	0/5	0/5	0/2	0/1	0/5	0/3	0/5	0/3	0/3	0/5	0/2	0/3	0/3	0/5	0/5	0/2	0/3	0/3		
ウエルシュ菌	5/5	3/5	2/2	0/1	1/5	0/3	0/5	0/3	0/3	2/5	0/2	0/3	0/3	4/5	4/5	1/2	1/3	2/3		
エルシニア・テンテロコリチカ	0/5	0/5	0/2	0/1	0/5	0/3	0/5	0/3	0/3	0/5	0/2	0/3	0/3	0/5	0/5	0/2	0/3	0/3		

表7．食鳥処理工程における細菌汚染の問題箇所

処理場名	検査項目	内臓除去*（肝臓）	（と体）	冷却（漬水）	（と体）	塩素水（と体）	解体*（ささみ）
中抜き方式 A社	細菌数 (1g, ml, cm²当り)	24×10^4	25×10^2	<10	21×10	<10	83×10^2
	大腸菌群 (1g, ml, cm²当り)	46×10^2	41×10	−	1	1	−
	カンピロバクター (MPN/100g, ml, cm²)	4/5 (>14×10^4)	5/5 (23×10)	0/3 (−)	3/5 (−)	1/5 (−)	2/5 (−)
処理場名	検査項目	冷　却（漬水）	（と体）	貯水槽*（漬水）	（と体）	解体*（ささみ）	内臓除去*（肝臓）
外むき方式 B社	細菌数 (1g, ml, cm²当り)	12×10^3	12×10	34×10^4	10×10^2	34×10^4	10×10^4
	大腸菌群 (1g, ml, cm²当り)	53	−	30×10	3	$>10^4$	$>10^4$
	カンピロバクター (MPN/100g, ml, cm²)	1/3 (91)	2/5 (−)	1/1 (>14×10^3)	4/5 (93×10)	4/5 (23×10^2)	1/5 (−)
処理場名	検査項目	冷　却（漬水）	（と体）	解　体*（ささみ）	内臓除去*（肝臓）		
外むき方式 C社	細菌数 (1g, ml, cm²当り)	<10	34	15×10^3	10×10^3		
	大腸菌群 (1g, ml, cm²当り)	−	−	30	15×10		
	カンピロバクター (MPN/100g, ml, cm²)	0/3	0/5	0/5	0/5		

*問題箇所

箇所であり，この工程で汚染は最高値に達した．これは内臓を摘出する際の腸管損傷によるもので，この工程でと体表面およびと体内部がともに著しく汚染されるものと思われる．と体表面の汚染菌量は冷却工程，塩素水洗浄工程で減少するが，最後に解体される「ささみ」からカンピロバクターが検出されたことは，内臓除去工程での汚染菌が残存したものと考えられる．

B社では1晩冷蔵庫へ保管したと体を貯水槽へ浸漬してから解体する方式で，その貯水槽が前述のごとく10^5個レベルと高度に細菌汚染されている箇所の一つであった．したがって，この工程でと体表面は急激に汚染された．さらに，解体工程で腸管が損傷され汚染菌量は最高となり，その汚染は内臓除去後まで認められた．

C社では解体，内臓除去工程での汚染が著しかったが，A社，B社に比べて汚染菌量は少ない傾向であった．これは処理場内の衛生管理が良好であると共に解体作業員が熟練者であったことなどによるものと考えられる．

以上，今回の調査から食鳥肉の細菌汚染は，中抜き方式では内臓除去工程，外むき方式では解体および内臓除去工程で著しく，その原因は腸管の損傷により糞便が漏出しておこることが判明した．今後，各処理場それぞれに適した改善策，およびいずれの処理方式の処理場でも内臓除去工程での汚染が最も著しいので，それに対する改善策を立て食鳥肉の細菌汚染を最少限に防止する必要があると考える．

要　約

1984年6月から9月の間に，東京都内で採取した市販鶏肉およびその内臓など計118検体を対象に，カンピロバクター汚染実態調査を行った．

また，食鳥肉がどのように細菌に汚染されていくのか，カンピロバクターを中心として，解体処理方式の異なる代表的な食鳥処理場を対象に，各処理工程を追って調査を行い，次の結果を得た．

1）調査した市販鶏肉およびその内臓など118検体中42検体（35.6%）からカンピロバクターが検出され，とくに肝臓は48.6%と最も検出率が高かった．サルモネラは10検体（8.5%）から検出された．

2）鶏肝臓のカンピロバクター汚染菌数は100g当り10^2～10^4範囲であり，10^5個レベル検出されたものもあった．サルモネラの汚染菌数は100g当り10^3個レベル．あった．

3）市販鶏肉のカンピロバクター汚染度は処理場により差が認められ，半数以上が汚染を受けているもの，また，全く汚染を受けていないものがあった．

4）処理方式が異なっていても，脱羽工程までの汚染は同様の傾向であり，その汚染は鶏の糞によるものであった．

5）脱羽後と体表面の汚染菌量は，洗浄工程あるいは冷却工程で減少した．なお，冷却水の温度が低いほど汚染菌量は少なかった．

6）B社で採用しているような外むき方式では，解体前にと体を漬ける貯水槽でのと体表面の汚染が著しかった．

7）鶏肉の細菌汚染は，解体および内臓除去工程で最も著しく，腸管の損傷によるものであった．

8）A社で採用しているような中抜き方式では，内臓除去後のと体表面汚染菌量は冷却工程，塩素水洗浄工程で減少したが，と体内部の汚染菌量は減少しなかった．

文　献

1）厚生省大臣官房統計情報部編：食中毒統計，1984年，厚生統計協会

2）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

3）仲西寿男，貫名正文，村瀬　稔：食品衛生研究，31,459,1981

4）松崎静枝，片山　淳，川口信行，田中一成，後藤章：食衛誌，23,434,1982

5）吉田泰子：食品衛生研究，33,975,1983

6）西浦　清，中野三郎，細田康彦，野村　薫，武田陽之：食品衛生研究，34,1047,1984

7）谷口悦子，八嶋　務，野田朱実，千野根純子，小野口勝己，渡辺恒明，加藤敏彦，矢沢嗣夫：第6回食品微生物研究会講演要旨集，1985

8）東京都食品衛生調査会：カンピロバクター食中毒予防対策，1985年，東京都衛生局環境衛生部

9）斉藤香彦，伊藤　武，高橋正樹，高野伊知郎，柳川義勢，甲斐明美，坂井千三，石川隆三，下地洋三，酒井　宏，川崎こずえ：東京衛研年報，33,150,1982

10）神保勝彦，金子誠二，小久保彌太郎，松本昌雄：東京衛研年報，35,197,1984

11）厚生省レファレンスシステム研究班：カンピロバクターの分離・同定法，1985

12）神崎政子，小久保彌太郎，神保勝彦，松本昌雄，村上　一：東京獣畜誌，24,39,1977

13）金子誠二，丸山　務，小久保彌太郎，神保勝彦，松本昌雄：東京衛研年報，37,136,1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 136-140, 1986

市販豚肉における *Yersinia enterocolitica* およびその他の *Yersinia* 属菌の分布

金子誠二*, 丸山　務*, 小久保彌太郎*, 神保勝彦*, 松本昌雄*

Distribution of *Yersinia enterrocolitica* and Other *Yersiniaea* in Retailed Pork

SEIJI KANEKO*, TSUTOMU MARUYAMA*, YATARO KOKUBO*, KATSUHIKO JINBO*, and MASAO MATSUMOTO*

A total of 206 samples of retailed pork was collected in summer and winter and examined for distribution of *Yersinia enterocolitica* and related species. *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* and *Y. kristensenii* detected were 45.6%, 21.4%, 31.1%, and 5.8% respectively. Pathogenic strains of *Y. enterocolitica* were detected in two samples which were collected in winter. Both of these strains were serotype O3 and biotype 4 (Wauters). Detection rates of *Y. enterocolitica* and related species were similar in summer and winter. None of other pathogenic *Y. enterocolitica* strains such as serotype O5:27, O8 and O9 and *Y. pseudotuberculosis* was detected from all the samples.

Virulence associated properties of the presence of 44 megadalton plasmid, calcium dependent growth at 37℃, autoagglutination activity at 37℃ and congo red absorption were studied for these isolates. Two strains of *Y. enterocolitica* serotype O3 were positive for these four virulence associated properties. However, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* and *Y. kristennsenii* had approximately 44 megadalton plasmid, and these plasmids were different from virulence plasmid analyzed by restriction endonuclease digestion patterns.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, pork, distribution, pathogenicity

緒　言

Yersinia enterocolitica は家畜，愛がん動物，野生動物や河川などの自然環境にも広く分布し，食肉や魚介類からも分離されることが報告されている[1-3]．このうち病原株が最も高頻度に分離されるのはブタであり，健康ブタにおける病原株保菌が感染源として最も重要な役割を担っていることが指摘されている[4-7]．したがって，ヒトへの感染を予防する上で豚肉の *Y. enterocolitica* 汚染実態を明らかにすることは重要である．ところで，*Y. enterocolitica* の病原株は40～50メガダルトン(Md)のプラスミドを保有し[8]，このプラスミド保有がカルシウム依存性[9]や自己凝集性[10]などの性状と密接な関係にあることが知られている．これまでに報告された環境および食肉由来株の多くは Wauters の分類による生物型1の非病原性株であるとされている[11]．しかし，これら菌株について，実際に病原性状を検討した報告例はほとんどない．

そこで，今回は流通過程の末端にある市販豚肉を対象に *Y. enterocolitica* の分布を夏季と冬季の2回に分けて調査し，さらに分離株についてはプラスミドをはじめとした病原性状[9-12]を検討した．併せて，その他の *Yersinia* 属菌についても同様の検討を行ったので報告する．

材料および方法

1．調査材料　東京都23区の食肉販売店で市販されている豚肉を調査材料とした．検体数は，1985年の夏季の7月から8月に103，同年の冬季の11月から12月に103の

*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

合計206検体である.

2．**使用培地**　増菌培地に Sorbitor-Bile Salt-Peptone[13] (SBP : Na_2HPO_4 8.23g, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 1.2g, NaCl 5g, D-Sorbitor10g, Bile salts No.3 1.5g, peptone 5 g, 蒸留水1,000m*l*, pH7.6) を用い，分離培地に Cefsulodin-irgasan-novobiocin (CIN:Yersinia Selective Agar Base に Yersinia Selective Supplement を添加：Oxoid) 培地を用いた.

3．***Y. enterocolitica* の分離同定**　*Y. enterocolitica* とその他の *Yersinia* 属菌の分離同定法は Fig. 1 に示した方法で行った[14,15]. すなわち，豚肉約 1 g を10m*l* の SBP に接種し 4 ℃で21日間低温増菌培養を行った．低温増菌培養後，SBP 増菌液0.5m*l* を4.5m*l* の0.4％水酸化カリウム加0.5％食塩水に加え，ボルテックス・ミキサーで30秒間激しく混合してアルカリ処理を行い，その 1 白金耳を CIN 培地に塗抹し32℃，24時間培養した後 *Yersinia* 属菌と疑われる集落を一平板当り 5 個釣菌した．また，*Y. pseudotuberculosis* は CIN 培地では発育が遅いのでさらに24時間培養し，疑わしい集落を釣菌した.

Y. enterocolitica およびその類縁菌の鑑別は著者らの報告[15]した方法で行った．*Y. enterocolitica* と同定された菌株は，市販の診断用抗血清（デンカ生研）を用い，スライド凝集反応法により血清型別を行った.

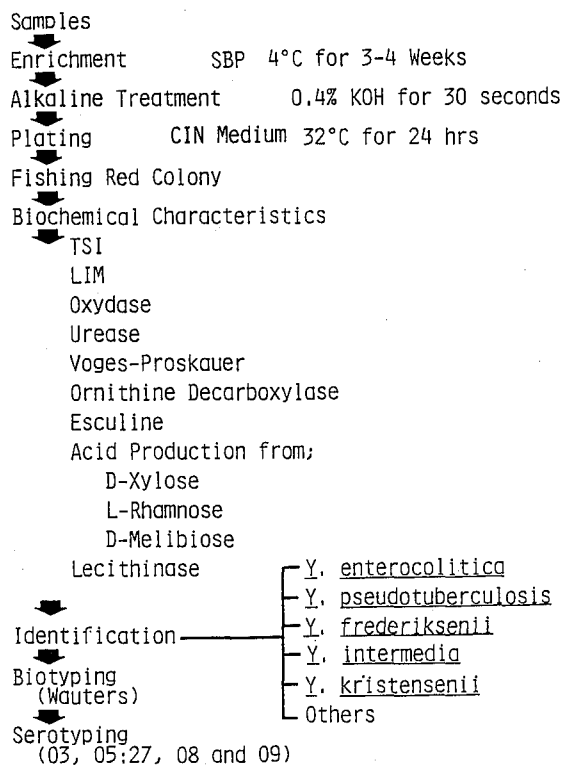


Fig. 1．Isolation and Identification of *Yersinia enterocolitica* and Related Species

4．**分離菌株の病原性試験**　プラスミドの分離と確認は，Kado と Liu の方法[16]および Birnboim と Doly の方法[17]を合わせ，さらに改良を加えた著者らの方法[18]を用いた.

カルシウム依存性については Higuchi と Smith の方法[19]を用いた．自己凝集性は Laird と Cavanaugh の方法[10]にしたがい，本報では Brain Heart Infusion Broth (Difco) を用いて判定した．またコンゴーレッド吸着能は Prpic らの方法[12]にしたがい，一部改良を加えた．すなわち，カザミノ酸を除き，これに替えて Heart Infusion Broth (Difco) を基礎培地1,000m*l* 当たり10g 加えたコンゴーレッド寒天を用いた.

結　　果

1．***Y. enterocolitica* およびその他の *Yersinia* 属菌の分離状況**　市販豚肉における *Yersinia* 属菌の季節別分離状況を Table 1 に示した．*Yersinia* 属菌の分離頻度は，夏季，冬季いずれの季節でも差はなくほぼ同様の結果であった．すなわち，*Y. enterocolitica*，*Y. frederiksenii*，*Y. intermadia* および *Y. kristensenii* が夏季にはそれぞれ45.6％，20.4％，32.0％および8.7％で，また冬季にはそれぞれ45.6％，22.3％，30.1％および2.9％の割合で検出された．このうち *Y. enterocolitica* の病原株としては血清型O3のみが冬季の 2 検体から検出された．その他すべての *Y. enterocolitica* は生物型 1 の非病原株であった.

Y. pseudotuberculosis は検出されなかった.

Table 1．Incidence of *Y. enterocolitica* and Related Species in Pork

Species	No. of Detected		
	Summer (n =103)	Winter (n =103)	Total (n =206)
Y. enterocolitica			
pathogenic (O3)	0	2(1.9)	2(1.0)
others	47(45.6)	45(43.7)	92(44.7)
Y. frederiksenii	21(20.4)	23(22.3)	44(21.4)
Y. intermedia	33(32.0)	31(30.1)	64(31.1)
Y. kristensenii	9(8.7)	3(2.9)	12(5.8)
Y. pseudotuberculosis	0	0	0

Note : Figures in the table indicate the number of detected and figures in parenthesis indicate precent.

Table 2. Virulence Associated Properties of *Y. enterocolitica* and Related Species Isolated from Retailed Pork

Species	Biotype[1]	CAD[2]	AGG[3]	CRA[4]	Plasmid[5]
Y. enterocolitica O3(Te 664)	4	+	+	+	+
Y. enterocolitica O3	4	+	+	+	+
Y. enterocolitica O3	4	+	+	+	+
Y. enterocolitica	1	−	−	−	−
Y. enterocolitica	1	−	−	−	−
Y. frederiksenii	1	−	+	+	+
Y. frederiksenii	1	−	−	−	−
Y. intermedia	1	−	−	−	−
Y. intermedia	1	−	−	−	+
Y. kristensenii	1	−	−	+	−
Y. kristensenii	1	−	−	−	+

[1]According to Wauters' biotypes. [2]Calcium dependent growth at 37℃.
[3]Autoagglutination activity at 37℃. [4]Congo red absorption.
[5]Presence of approximately 44 megadalton plasmid.

2．分離株の病原性試験 分離された *Y. enterocolitica* 血清型O3, *Y. enterocolitica* 生物型1, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* および *Y. kristensenii* から各2株を選び，これら10株について病原性の指標性状とされているカルシウム依存性，自己凝集性，コンゴーレッドの吸着能および約44Md のプラスミド保有について，*Y. enterocolitica* 血清型O3Te664株(イヌ由来)を対照に比較検討した．その結果を Table 2，および，これらの菌株が保有するプラスミドのアガロースゲル電気泳動の結果を Fig. 2 にそれぞれ示した．

供試した11菌株のうち上記の病原性指標性状がすべて陽性であったものは対照菌株と *Y. enterocolitica* 血清型O3の2株だけであった．

Y. enterocolitica 血清型O3以外の供試菌株は，すべてカルシウム非依存性であった．また，自己凝集性を示す菌株が *Y. frederiksenii* で1株認められた．

コンゴーレッド吸着能陽性株が *Y. frederiksenii* と *Y. kristensenii* に各1株ずつ認められたが，これらの菌株の集落形態は *Y. enterocolitica* 血清型O3に比較して大きく偏平であった．

約44Md のプラスミドは *Y. enterocolitica* 血清型O3以外に *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, および *Y. kristensenii* の各1株ずつに認められた．しかし，*Y. intermedia* 以外の菌株は約44Md プラスミドの他に1－4個のプラスミドを保有していた．また，*Y. enterocolitica* 生物型1の2株は44Md 以下の様々な大きさのプラスミドを保有していることが確認された．そこで，これらのプラスミドを制限酵素で切断して病原株である *Y. enterocolitica* 血清型O3, O5：27, O8およびO9の保有するプラスミドと比

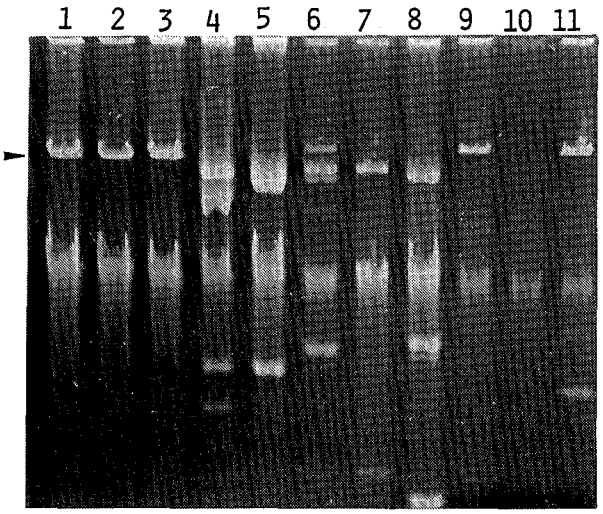


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA from *Yersinia* strains. lane 1. reference strain (Te 664); lane 2, 3. *Y. enterocolitica* O3; lane 4, 5. *Y. enterocolitica* biotype 1; lane 6, 7. *Y. frederiksenii*; lane 8, 9. *Y. intermedia*; lane 10, 11. *Y. kristensenii*.
The arrow indicate 44 megadalton plasmid.

較したところ明らかに異なった切断パターンを示した．

考　察

市販豚肉における *Yersinia* 属菌汚染調査についてはこれまでにいくつかの報告があり，*Y. enterocolitica* の病原株の検出頻度は対象とした食肉の種類や検査法により多少の違いはあるものの，その検出率は0～2％である[1]．今回著者らが行った調査では206検体中2検体（1.0％）から *Y. enterocolitica* の病原株が検出された．この検出率は現在最も確実な *Yersinia* 属菌検査法であるとされているアルカリ処理とCIN培地を組み合わせた方法を用いたこと，およびLeeらの報告[1]とも照らし合わせた結果この数値は市販豚肉の汚染実態をほぼ正確に捉えているものと考えられる．今回，検出された2例はいずれも冬季に採取された検体由来で，夏期の検体では検出されなかった．この傾向は，ブタからの検出率が夏季より冬季に高いというTsubokuraらの報告[7]ともよく一致している．

わが国で *Y. enterocolitica* 腸炎患者から分離される病原株およびブタが保菌する病原株の血清型はいずれも95％以上がO3であり生物型は4である．今回豚肉から分離された菌株もこれまでにわが国で発生した10例の *Y. enterocolitica* 集団食中毒の起因菌と同一型であった．

市販豚肉における非病原性の *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii* および *Y. intermedia* の汚染率はきわめて高く，本研究においても上記3菌種のいずれかが検出されたものは206検体中152例，73.7％であった．

一方，Fukushima[20]は豚肉中では *Y. enterocolitica* の非病原株が病原株に比してより旺盛に増殖することを実験的に確認し，豚肉の検査においては低温増菌した後には生物型1の *Y. enterocolitica* が多く検出されることを裏づけた．このようなことから，市販豚肉においては低温流通過程中の菌の発育態度の差により非病原性の *Y. enterocolitica* やその他の *Yersinia* 属菌の分布が濃厚になるものと考えられる．

Y. enterocolitica の病原株はO3やO8など特定の血清型にかたよっているが，これ以外の血清型菌についても諸種の病原性指標性状について検討することは疫学的意味付けからも重要である．そこで，今回分離された菌株の中から *Y. enterocolitica* 血清型O3, *Y. enterocolitica* 生物型1，*Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* および *Y. kristensenii* を各々2株選び，計10株について44Mdプラスミドとこれに関連した3種の病原性指標性状を検査した結果，すべての性状が陽性であったのは *Y. enterocolitica* 血清型O3の菌株のみであった．しかしその他一部の菌株でも44Mdプラスミド保有株が認められたが，制限酵素切断パターンから病原性プラスミドとは異なるものであることが確認された．また，*Y. frederiksenii* と *Y. kristensenii* の一部の菌株に自己凝集性やコンゴーレッド吸着能が陽性である菌株がみられたが，これらの性状は病原性プラスミドとは関係のない染色体性の性状であると思われた．

今回の調査で，市販豚肉のほぼ半数から *Y. enterocolitica* が分離されたが，病原性指標性状を有する菌株はきわめて少なかった．しかし，健康ブタの腸管における病原株保菌は多くの研究者が指摘するようにきわめて高い[6]ことを考慮すると，ブタがと殺され食肉となり，その後の流通過程で病原株と非病原株がどの様な消長を示すかを解明する必要があろう．また，今回は豚肉からは分離されなかったが，ブタが保菌し，最近わが国でもその感染症が注目されている *Y. pseudotuberculosis* についても検査法などをさらに検討して，その汚染実態を明らかにしていくことが必要であろう．

要　約

東京都内で市販されている豚肉を夏季に103検体，冬季に103検体合計206検体を採取して *Y. enterocolitica* とその他の *Yersinia* 属菌の分布を調査した．その結果，*Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* および *Y. kristensenii* が全検体からそれぞれ45.6％，21.4％，31.1％および5.8％検出された．夏季と冬季とでその分離頻度に差は認められなかった．これらのうち，*Y. enterocolitica* の病原株は冬季の2検体から検出され，いずれも血清型O3生物型4であった．

これら分離株について病原性の指標として44Mdのプラスミド保有，カルシウム依存性，自己凝集性およびコンゴーレッド吸着能について検討した．その結果，すべての性状が陽性を示したのは，*Y. enterocolitica* 血清型O3の菌株だけであった．

文　献

1）Lee, W. H., Vanderzant, C. and Stern, J. : *Yersinia enterocolitica*, Bottone, E. J. 161,1981,CRC Press, Florida

2）Swaminathan, B., Harmon, M. C. and Mehlman, I. J. : *J. Appl. Bacteriol.*, 52,151,1982

3）Zink, D. L., Lachika, R. V. and Dubel, J. R. : *J. Food Safety*, 4 ,223,1982

4）Zen-Yoji, H., Maruyama, T. and Sakai, S. : *Jpn. J. Microbiol.*, 18,103,1974

5）Doyle, M. P., Hugdahl, M. B. and Taylor, S. L. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 42,661,1981

6) Christensen, S. G. : *J. Appl. Microbiol.*, 48, 377, 1980
7) Tsubokura, M., Fukuda, T., Otsuki, K., Kubota, M., Itagaki, K., Yamaoka, K. and Wakatsuki, S. : *Jpn. J. Vet. Sci.*, 38, 1, 1976
8) Zink, D. L., Feeley, J. C., Wells, J. G., Vanderzant, C., Vickery, J. C., Roof, W. D. and O'Donovan, G. A. : *Nature* (*London*), 283, 224, 1980
9) Gemski, P., Lazere, J. R. and Casey, T. : *Infect. Immun.*, 27, 682, 1980
10) Laird, W. J. and Cavanaugh, D. C. : *J. Clin. Microbiol.*, 11, 430, 1980
11) Wauters, G. : *Contr. Microbiol. Immunol.*, 2, 38, 1973
12) Prpic, J. K., Robins-Browne, R. M. and Davey, R. B. : *J. Clin. Microbiol.*, 18, 486, 1983
13) Weagant, S. D., and Kaysner, C. A. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 468, 1983
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) 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：東京衛研年報，36, 158, 1985
16) Kado, C. I. and Liu, S. T. : *J. Bacteriol.*, 145, 1365, 1981
17) Birnboim, H. O. and Doly, J. : *Nucleic. Acid Res.*, 7, 1513, 1979
18) Kaneko, S. and Maruyama, T. : *Jpn. J. Vet. Sci.*, 48, 205, 1986
19) Higuchi, K. and Smith, J. L. : *J. Bacteriol.*, 81, 605, 1961
20) Fukushima, H. : *Jpn. J. Vet. Sci.*, 48, 183, 1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 141-144, 1986

Bioautographyによる動物性食品中の残留ポリエーテル・イオノフォア抗生物質の検出法

竹葉和江*, 村上文子*, 神保勝彦*, 桐谷礼子*, 松本昌雄*

Determination for Polyether-Ionophore Antibiotics Residues in Eggs and Animal Tissues by Bioautography

KAZUE TAKEBA*, FUMIKO MURAKAMI*, KATSUHIKO ZINBO*, REIKO KIRITANI* and MASAO MATSUMOTO*

Keywords：抗コクシジウム剤 anticoccidial agent, モネンジン monensin, サリノマイシン salinomycin, バイオオートグラフィー bioautography, 枯草菌 *Bacillus subtilis*, *Batillus calidolactis*

緒　言

鶏のコクシジウム症の予防や治療用に，現在10種類以上の抗コクシジウム剤が使用されている．この中でポリエーテル・イオノフォア抗生物質に属するモネンシン(MN)およびサリノマイシン(SL)は，他の抗コクシジウム剤とくらべ，免疫阻害が少ないことや耐性株が出現しないことなどから，最近多く使用されるようになり特にわが国で開発されたSLの使用量は急速に増加している[1]．

また，これらの抗生物質は抗コクシジウム作用だけでなく，牛や豚の成長促進効果があることから，肥育牛に対しても使用され，その残留が問題となっている．

動物性食品中に残留するMNおよびSLの公定検査法[2]によると，これらは化学的に同系統の抗生物質でありながら，検査法は異なっている．すなわち，試料からの抽出法，分離精製法，試験菌，培地等がそれぞれ異なっているため，多数の検体を同時処理する日常検査法としては，操作が煩雑で時間がかかるなどの難点がある．

そこで今回，MNおよびSLを同時に検出する方法を開発する目的で，公定法の改良を試みたので，これらの結果について報告する．

実験方法

1．試薬

a）MNおよびSLの標準溶液：MNナトリウム（武田薬品工業製），SLナトリウム(科研化学製)をそれぞれメタノールで溶解し，適宜希釈したものを使用した．

b）試験菌：*Bacillus subtilis* ATCC6633(*B. subtilis*)および *Bacillus stearothermophilus* var. *B. calidolactis* C-953 (*B. caliclolactis*)を用いた．

c）培地：継代保存用，増殖用，基層および種層用等の培地は公定法[2]に従った．

d）シリカゲルカラム：シリカゲル(メルク製，シリカゲル60，35～70メッシュ)を120℃，60分間加熱し，デシケーターで冷却後3gを内径1cmのカラム管にn-ヘキサンで充てんし，その上部に無水硫酸ナトリウム2gを充てんしたものを用いた．

e）アルミナカラム：活性アルミナ(和光純薬製，30メッシュ)を120℃，60分間加熱し，デシケーターで冷却後5gを1cmのカラム管に90%メタノールで充てんしたものを用いた．

f）シリカゲル薄層板：シリカゲル60アルミシート(メルク製，20×5cm，0.2mm)を用いた．

g）展開溶媒：酢酸エチルを用いた．

h）INT試薬：3-(P-Iodophenyl)-2-(P-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride（同仁化学製）の0.05%水溶液を用いた．

その他の試薬，有機溶媒はすべて特級品を用いた．

2．試験溶液の調製法

試料10gにメタノール20ml加えてホモゲナイザーで

*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

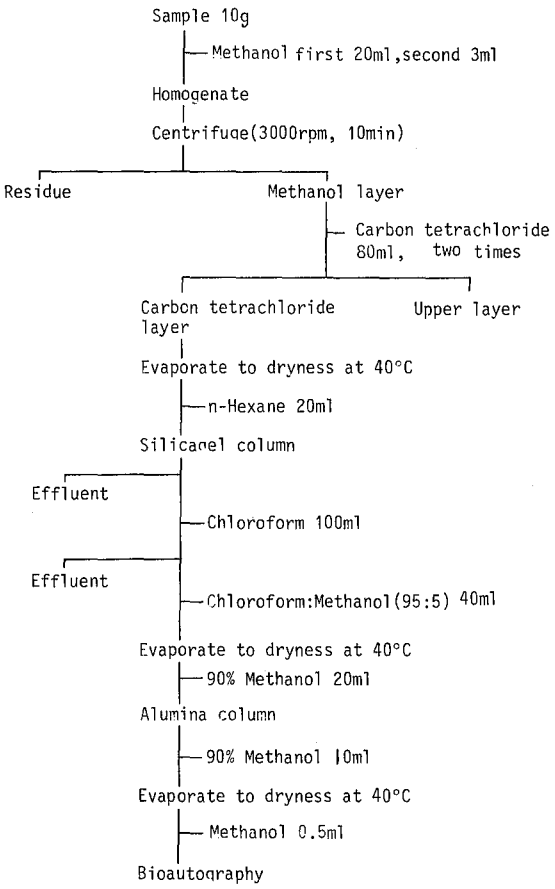


Fig. 1. Analytical Procedure of Monensin and Salinomycin Eggs and Animal Tissues

均質にした後遠心分離し，その上清を分離した．さらに遠心管内の残渣にメタノール3 ml 加えよく振り遠心分離した後，上清液を先の上清液に合わせた．これに四塩化炭素80ml 加え10分間振とうした後，四塩化炭素層を分取した．この抽出操作をさらに1回繰返して四塩化炭素層を合わせ，40℃で減圧乾固した．この乾固物にn－ヘキサン20ml を加えて溶解し，これをシリカゲルカラムに移してクロロホルム100ml (流速0.6ml／min) で洗浄した後，クロロホルム＋メタノール (95＋5) 40ml で溶出した．この溶出液を40℃で減圧乾固し，90％メタノール20ml を加えて溶解した．これをアルミナカラムに移して流し，さらに90％メタノール10ml で溶出し，溶出液を40℃で減圧乾固した．これにメタノール0.5ml を加えて溶解したものを試験溶液とした．この方法をFig. 1に示した．

3．試験方法

試験溶液を20 μl シリカゲルアルミシートにスポットし，展開溶媒で10cm展開した．この薄層板を風乾後，滅菌角型シャーレに収納し，この表面に55℃に保温したM－19号培地を均一に吹きつけた後，55℃に保温した試験菌混合培地を薄層板上に50ml 注入し，水平に保持して凝固させた．その後，*B. subtilis* 混合寒天平板の場合は37℃，*B. caliclolactis* 混合寒天平板の場合は55℃で17±1時間培養した．培養後寒天平板上にINT 試薬を10ml 流して発色させた後阻止円を測定した．

結果および考察

1．検量線および試験菌の選択

MN およびSL の段階希釈液をシリカゲル薄層板にスポットし，酢酸エチルで展開した．*B. subtilis* 混合平板および *B. caliclolactis* 混合平板による bioautography の阻止円の直径から検量線を作成したものをFig. 2 に示した．

MN は，試験菌が *B. calidolactis* の場合，0.01～1.0 (μg) の範囲で，試験菌が *B. subtilis* の場合は0.1～5.0の範囲で直線性を示した．SL は，試験菌が *B. calidolactis* の場合，0.005～0.1の範囲で，試験菌が *B. subtilis* の場合，0.05～5.0の範囲で直線性を示した．

阻止円は，MN およびSL ともに *B. subtilis* 混合平板の方が鮮明で判定は容易であったが，感受性においてはFig. 2 からも明らかのように，MN およびSL ともに *B. calidolactis* 混合平板の方が *B. subtilis* 混合平板にくらべ10数倍高かった．したがって試験菌は感受性の高い *B. calidolactis* を使用した．

2．展開溶媒の検討

Golab[3] およびMartinez[4] らが，MN の分析で報告した4種類の溶媒系とその混合比を変えたものについて，MN およびSL を同時に展開し，それぞれの *Rf* 値を調べた．その結果，いずれもMN とSL との分離および再現性が十分でなかった．MN の公定法に使用されている酢酸エチルは，MN の *Rf* 値は0.33，SL は0.54と両者の分離がよく，また再現性も良好で，展開時間も早いことなどから，酢酸エチルを展開溶媒として使用した．Table 1にこの結果を示した．

3．再抽出用四塩化炭素量の検討

試料にメタノールを加え均質化したのち，公定法ではMN の場合は四塩化炭素10ml で3回抽出し，SL の場合は80ml で3回抽出することになっている．今回，同時に抽出のための四塩化炭素量について調べた結果をTable 2 に示した．MN は80ml で1回抽出で十分であったが，SL は2回抽出まで必要であった．したがって，

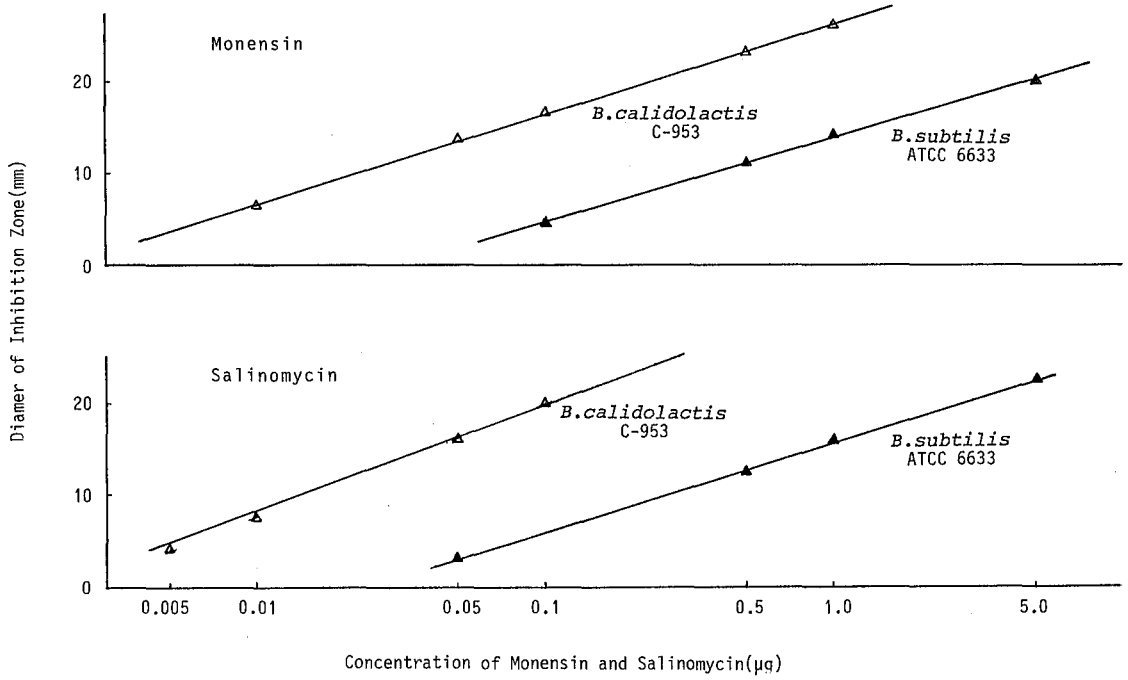


Fig. 2. Calibration curves of Monensin and Salinomycin

Table 1. *Rf* Values of Monensin and Salinomycin with Various Developing Solvent Systems

Developing Solvent System	*Rf* Value	
	Monensin	Salinomycin
Carbon tetrachloride-Methanol (95+5)	0.23	0.38
Ethyl acetate-Methanol (95+5)	0.59	0.67
Benzene-Methanol (95+5)	0.11	0.17
Methylene chloride-Methanol (90+10)	0.26	0.28
Ethyl acetate	0.33	0.54

Table 2. Carbon tetrachloride Volume on the Recovery of Monensin and Salinomycin

Total Volume of Carbon tetrachloride (ml)	Times of Extract	Recovery (%)	
		Monensin	Salinomycin
80	1	100.0	89.6
160	2	nd*	100.0

* not detected

四塩化炭素の抽出は80m*l* で2回とした.

4. シリカゲルカラムおよびアルミナカラムにおける溶出液量の検討

シリカゲルカラムにおける溶出液クロロホルム+メタノール(95+5)の溶出量について調べた結果をTable 3に示した. MNの溶出には30m*l*, SLの溶出には40m*l* 必要であった. 公定法では, MNは35m*l*, SLは30m*l* 使用しているが, この実験結果から溶出液量は40m*l* とした.

Table 3. Effect of the Elution Volume on Silicagel Column Chromatography

Elution Solvent* (ml)	Recovery (%)	
	Monensin	Salinomycin
30	100.0	90.6
40	nd**	100.0

* chloroform : methanol (95 : 5)

** not detected

Table 4. Effect of the Elution Volume on Alumina Column Chromatography

Elution Solvent* (ml)	Recovery (%)	
	Monensin	Salinomycin
20	80.0	89.7
30	100.0	100.0

* 90% methanol

Table 5. Recovery of Monensin and Salinomycin added to Egg Yolk, Muscle and Liver of Chicken

Antibiotics	Added (μg/g)	Recovery (%)*		
		Muscle	Liver	Egg Yolk
Monensin	0.1	86.8±7.5	90.8±4.8	88.3±7.3
Salinomycin	0.1	84.6±9.3	79.2±4.5	85.6±4.5

* mean ± S. D. of five determinations

アルミナカラムについても同様にして，溶出液90%メタノールの溶出液量について調べた結果を Table 4 に示した．MN および SL ともに，90%メタノール20ml の試料溶液を溶出した後の溶出液量は，10ml で十分であった．

5．動物性食品からのMN および SL の回収実験

添加物を含まない飼料で飼育した鶏のもも肉，肝臓および卵それぞれ10g に MN および SL を0.1μg/g になるように添加し回収実験を行い，その結果を Table 5 に示した．なお，卵については予備実験の結果，MN および SL は卵黄に移行残留することがわかったので，卵黄について回収実験を行った．

MN および SL の添加回収率は，それぞれ鶏もも肉86.8(%)±7.5，84.6±9.3，肝臓90.8±4.8，79.2±4.5，卵黄88.3±7.3，85.6±4.5であった．

本検出法による検出限界は，MN および SL ともに0.05μg/g であった．

6．各種抗菌性物質による妨害作用

汎用されている17種類の抗生物質および合成抗菌剤が，本検出法で試験菌の発育を阻止する妨害があるかどうかを調べた．使用した抗菌性物質は，Amprolium, Ethopabate, Clopidol, Decoquinate, Nicarbazine, Zoalene, Sulfamonomethoxine Sulfadimethoxine, Penicillin G, Ampicillin, Oxytetracycline, Chlortetracycline, Tyrosin, Spiramycin, Bacitracin, Virginiamycin および Chloramphenicol である．その結果，いずれの抗生物質および合成抗菌剤も試料中10μg で阻止円の形成は認められず，これらの抗菌性物質が共存していても検査結果に影響はないことがわかった．

結　論

動物性食品中の残留 MN および SL の公定検査法は，それぞれ異なる検査法となっている．今回，公定法の改良を試み，bioautography による同時検出法を検討し，以下の結論を得た．

1．試験溶液は，試料にメタノールを加え均質化したのち，四塩化炭素で抽出し，これをシリカゲルカラムおよびアルミナカラムでクリンナップして調製した．薄層板は，シリカゲルアルミシートを使用し，酢酸エチルで展開した．試験菌は，*B. calidolactis* を使用した．

2．本検出法を用いて MN および SL を0.1μg/g になるように添加した時の回収率は，鶏もも肉86.8(%)±7.5，84.6±9.3，肝臓90.8±4.8，79.2±4.5および卵黄88.3±7.3，85.6±4.5であった．

本検出法の検出限界は，0.05μg/g であった．

文　献

1）農林水産省畜産局：家畜衛生統計

2）厚生省環境衛生局：畜産物中の残留物質検査法，第1集の2 (1979)

3）Golab, T., Barton, S. J. and Scroggs, R. E.: *J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM.* 56, 171 (1973)

4）Martinez, E. E. and Shimoda, W.: *J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM.* 66, 1506 (1983)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 145-148, 1986

ゴム製ほ乳用具に関する衛生化学的調査
乳首，おしゃぶりについての材質試験および溶出試験

水石和子*，竹内正博*，山野辺秀夫*，渡辺四男也*

Hygienic Chemical Survey on Rubber Nursing Products
Migrating and Material Test for Nipples and Pacifiers

KAZUKO MIZUISHI*, MASAHIRO TAKEUCHI*, HIDEO YAMANOBE* and YOHYA WATANABE*

Commercially available rubber nipples (38 samples of nipples and pacifiers purchased in Tokyo during 1984－1985) were examined according to the methods authorized by the Food Sanitation Law. The results showed that formaldehyde, heavy metals and arsenic migrating from samples, and cadmium and lead contained in samples were all less than their regulatory levels or not detected. Some values of residue on evaporation were above the regulatory level (40 ppm), and some values of potassium permanganate consumption were also high (more than 20ppm). Migrating nitrosamine levels of rubber nipples were determined. N-nitrosodimethylamine was detected in the range of 0.6～14.2 ppb in 7 samples and N-nitrosodiethylamine of 1.3～11.2 ppb in 4 samples. N-nitrosodibutylamine was detected 8.6 and 28.2 ppb in 2 samples. The levels of migrating nitrosamine seemed to have been reduced in 1985 compared to 1984. Natural rubber products had a tendency to show high level of residue on evaporation, potassium permanganate consumption and migrating nitrosamines.

Keywords：rubber nipple, cadmium, lead, formaldehyde, heavy metals, arsenic, residue on evaporation, potassium permanganate comsumption, N-nitrosamines

緒　　言

ゴム製品のほ乳用乳首については，これまで食品衛生法で「鉛または亜鉛を含むゴムをもって製造してはならない」とのみ規制されていた．近年，乳幼児の健康を考慮し実態に即した規格基準の設定が望まれていたが，厚生省は昭和61年4月1日付けの告示第85号により，食品衛生法の規定に基づく食品，添加物等の規格基準の一部改正を行い[1]，器具および容器包装の部にゴム製ほ乳器具の項を設け，乳首およびおしゃぶりに関して衛生化学的見地から材質試験及び溶出試験の規制措置を行った．これらの規制項目は，材質試験としてカドミウムおよび鉛，溶出試験としてフェノール，ホルムアルデヒド，亜鉛，重金属および蒸発残留物であり，それぞれの規格基準値はTable 1の通りである．

著者らはこれまでゴム製のほ乳用具中のN－ニトロソアミンに関する調査研究を行っており，その衛生化学的安全性について報告してきた[2,3]．今回はN－ニトロソアミンの調査に加え，法の改正に先立って市販のゴム製乳首およびおしゃぶりについて，材質試験としてカドミウムおよび鉛，また溶出試験としてホルムアルデヒド，亜鉛，重金属，蒸発残留物並びに今回の改正では削除された過マンガン酸カリウム消費量およびヒ素の検査を行った．以下，その結果について報告し若干の知見を述べる．なお，フェノールは改正原案においては規制項目になかったので検査は実施しなかった．

実　　験

1．試料

試料は昭和59年(1984年)7月から11月および昭和60年(1985年)7月から12月にかけて，都内で購入したゴム製の乳首およびおしゃぶり，38検体である．内訳は天然ゴ

*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

Table 1. Restrictions for Rubber Nipples

Items	Regulatory leve
Cd	less than 10ppm
Pb	less than 10ppm
Phenol	ND
Formaldehyde	ND
Zn	lees than 1ppm
Heavy metals	less than 1ppm
Residue on evaporation	lees than 40ppm

ム製が18種(59年7種，60年11種)，イソプレンゴム製が13種(59年7種，60年6種)，スチレンブタジエンゴム製4種(59年2種，60年2種)，シリコンゴム製3種(59年2種，60年1種)であり，その内国産が25種(59年13種，60年12種)，外国製(西ドイツおよびアメリカ)13種(59年5種，60年8種)である．

2．試験法

食品衛生法の食品，添加物等の規格基準中，器具および容器包装，並びにおもちゃの試験法に準じて行った[4]．

(1) 材質試験

試料1gを乾式灰化し，原子吸光光度法によりカドミウムおよび鉛の試験を行った．

(2) 溶出試験

試料を水でよく洗い，表面積1㎠につき2mlの割合で水を加え40℃に保ちながら24時間放置し，この浸出液をホルムアルデヒド，亜鉛，蒸発残留物，過マンガン酸カリウム消費量およびヒ素の試験溶液とした．また，4％酢酸溶液を用いて同様に調製し，重金属の試験溶液とした．

なお，N－ニトロソアミンの試験は既報に従って行った[2,3]．

結果および考察

1．材質試験について

カドミウム，鉛は全試料とも規格基準値以下であった．

2．溶出試験について

ホルムアルレヒド，亜鉛，重金属およびヒ素：全試料ともホルムアルデヒドは検出されず，また亜鉛，重金属はいずれも規格基準値以下であった．また，今回の改正では規制項目からはずされたが，ヒ素は1ppm以下であった．

蒸発残留物および過マンガン酸カリウム消費量：蒸発残留物はTable 2に示すように59年の試料では10－85ppm，60年の試料では1－75ppmで基準値(40ppm)を越えたものがそれぞれ4および3検体あった．基準値を越えていたものは59年のイソプレンゴム製のもの2検体を除いて，他は天然ゴム製のものであった．過マンガン酸カリウム消費量については改正原案では基準値が20ppm以下と定められていたが今回の規格からは削除され，今後の検討課題となった．調査した結果では59年は0.4－28.5ppm，60年は1.0－55.6ppmであり，原案の基準値20ppmを越えたものがそれぞれ3および4検体

Table 2. Results of Residue on Evaporation (A) and Potassium Permanaganate Comsumption (B) for Rubber Nipples in '84 and '85

ppm

'84				'85			
	Sample	(A)	(B)		Sample	(A)	(B)
1	SI[1]	18	5.4	1	SI	3	1.0
2	SI	19	3.2	2	IP	12	5.5
3	IP[2]	10	4.3	3	IP	1	4.9
4	IP	16	4.3	4	IP	1	3.0
5	IP	19	2.2	5	IP	4	3.0
6	IP	14	2.2	6	IP	3	2.0
7	IP	29	2.8	7	IP	4	17.0
8	IP	47	1.7	8	NR	10	8.8
9	IP	45	0.4	9	NR	36	18.4
10	NR[3]	19	3.2	10	NR	12	15.0
11	NR	12	5.4	11	SB	5	1.9
12	SB[4]	17	1.1	12	SB	2	7.0
13	SB	18	0.4	13	NR	7	13.3
14	NR	22	3.7	14	NR	1	6.8
15	NR	29	27.0	15	NR	29	48.0
16	NR	32	29.1	16	NR	28	55.6
17	NR	85	28.5	17	NR	49	33.0
18	NR	50	19.4	18	NR	72	17.0
				19	NR	75	22.0
				20	NR	55	39.0

1) Silicone, 2) Isoprene, 3) Natural,
4) Styrene Butadiece
Samples of 14－18 in '84 and 13－20 in '85 were made in U. S. A. or West Germanny.

Table 3. N-nitrosamines Migrated from Rubber Nipples in '84

ppb

Sample[1]	Concentration		
	NDMA[2]	NDEA[3]	NDBA[4]
1 IP	1.3		
2 IP	1.5	1.7	
3 NR	0.6		8.6
4 NR			28.2
5 NR	14.2	3.3	
6 NR	2.7		
7 NR	1.6		

1) Eighteen samples were examined. N-nitrosamines detected in 7 samples are showed. IP and NR are same as those in Table 1. 2) NDMA : N-nitrosodimethylamine, 3) NDEA : N-nitrosodiethylamine, 4) NDBA : N-nitrosodibutylamine

あり，それらは全て天然ゴム製であった．以上の結果から蒸発残留物，過マンガン酸カリウム消費量に関しては，天然ゴム製のものが高い値を示し，特に外国製にその傾向が認められた．ゴム製の乳首およびおしゃぶりは製造に際し架橋剤，加硫促進剤，老化防止剤等多数の配合剤が使用されているため，配合剤そのもの，あるいはそれらの分解生成物が溶出する可能性が極めて高い．今回の調査結果はこれを裏付けるものであり，過マンガン酸カリウム消費量の試験は，蒸発残留物の試験と同様にゴム製の乳首類の品質に関する安全性の面において必要な試験項目であると考えられる．

Nーニトロソアミン：ゴム製の乳首およびおしゃぶり中の加硫促進剤に由来すると考えられるNーニトロソアミンについては既に報告している[2,3]．

59年の調査では，Table 3 に示すように18検体中6検体からNーニトロソジメチルアミン(NDMA)が0.6－14.2ppb，2検体からNーニトロソジエチルアミン(NDEA)が1.7ppb，および2検体からNーニトロソジブチルアミン(NDBA)が8.6－28.2ppb 検出された．60年の調査では，Table 4 に示すように22検体中1検体からNDMAが0.6ppb，2検体からNDEAが1.3－11.2ppb 検出された．Nーニトロソアミンを検出した試料を素材別にみると59年のイソプレンゴム製2検体を除き全て天然ゴム製で，シリコンゴム製，スチレンブタジエンゴム製の試料からはNーニトロソアミンは検出されなかった．60年の調査では，西ドイツの規格基準(溶出Nーニトロソアミンとして10ppb)[5]を越えるものが1検体あったが，59年の調査と比較するとNーニトロソアミンの検出率，検出量とも減少傾向がみられ，品質の改善がなされていることが推測される．しかし，60年の試料についてニトロソ化可能物質を測定したところ，NDMA が13検体から2.5－44.2ppb，NDEA が6検体から2.5－602ppb，NDBA が1検体から542ppb 検出され，西ドイツの規格基準(200ppb)[5]を越えるものが1検体みられた(Table 4)．これらの結果は乳首類の製造にNーニトロソアミンの生成の原因となる加硫促進剤が依然として使用されていることを示すものである．

Table 4. N-Nitrosamines and Nitrosatable Compounds Migrated from Rubber Nipples in '85

ppb

Sample[1]	Concentration		
	NDMA	NDEA	NABA
1 IP	(25.6)[2]		
2 IP	(44.2)		
3 IP	(2.5)		
4 IP	(2.5)	(2.5)	
5 NR	(4.3)		
6 NR	(3.4)		
7 NR	(3.4)		
8 NR	(9.7)	(19.0)	
9 NR	(2.8)	1.3(602)	(542)
10 NR		(7.5)	
11 NR	(10.0)	11.2(27.5)	
12 NR	(2.5)		
13 NR	(5.0)		
14 NR	0.6(17.5)	(17.5)	

1) Twenty samples were examined. N-Nitrosamines or Nitrosatable Compounds detected in 14 samples are showed.
2) Values in brackets show nitrosatable compounds.

結　語

今回の食品，添加物規格基準の一部改正に伴なうゴム製乳首およびおしゃぶりの規制は，一般のゴム製器具または容器包装に関するものとほぼ同様の内容であり，数

年来懸案となっているゴム製乳首類中のN－ニトロソアミンおよびその原因物質については将来の検討事項とされた．しかし，今回の調査結果から明らかなように各種のゴム配合剤の溶出に関してはなんらかの規制が必要であると考えられる．従って，今後乳幼児の健康の安全性の面から必要とされる試験項目について適切な規格基準が設定されることが望ましいと思われる．

謝辞 本調査を実施するにあたり，御協力を頂いた衛生局食品監視課の皆様に深謝いたします．

文　献

1）厚生省告示85号，官報1986.4.1
2）水石和子，竹内正博，吉原武俊：東京衛研年報，34,146,1983
3）水石和子，竹内正博，風間成孔，同上，35,127,1984
4）食品衛生小六法：58年版，676,新日本法規
5）Dre Bundesminister für Jugend, Familie und Gesundheit : Isolierung und Bestimmung von N-nitrosieren Stoffen aus Besarfsgegentäanden nach deren Übergang in Speicheltestlösung. Bundesgesundheitsamt, Berlin, 1980

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 149-153, 1986

水素化物加熱原子吸光分析法による魚介類中のセレンの定量

山野辺 秀 夫*, 竹 内 正 博*, 水 石 和 子*
渡 辺 四男也*

Determination of Selenium in Fish and Shellfish by Hydrogen Selenide Evolution-Electrothermal Atomic Absorption Method

HIDEO YAMANOBE*, MASAHIRO TAKEUCHI*, KAZUKO MIZUISHI*
and YOHYA WATANABE*

A method of the determination for selenium in fish was investigated by atomic absorption spectrophotometry combined with hydride generation method. One gram of samples were decomposed with 5～10m*l* of nitric acid and 2m*l* of perchloric acid, and adjusted to 20m*l* with water. The sample solutions were introduced into the apparatus with a hydrochloric acid (1：1) and 1 % sodium borohydride－0.5% sodium hydroxide solution. The calibration curve was linear in the concentration from 0 to 100 ng／m*l* and the detection limit was 2 ng／m*l* in the sample solution. The recoveries of selenium added to 1g of sea-bass were 103.4% for the level of 100ng and 102.3% for the level of 200ng, and the coefficients of variations were 3.2% and 3.4% respectively. The selenium content of 30 samples of sea-bass, berycoid fish, Japanese bluefish, Spanish mackerel, etc. were determined. The results were ranged from 0.25ppm to 1.34ppm and the average was 0.70ppm.

Keywords：determination of selenium, hydrogen selenide, evolution-electrothermal atomic absorption, fish and shellfish

緒　　言

セレンが無機のカドミウム，水銀等に対して拮抗作用を示すことは良く知られているが，有機水銀の一種であるメチル水銀に対してもモル比１：１で毒性軽減作用を示すことがラットを用いた動物実験で証明されている[1]．従って，マグロ等の高メチル水銀濃度の魚介類を多食してもメチル水銀中毒にならないのは多量のセレンが共存するためであると言われている[2]．

著者らはこれまで食品衛生および環境監視の立場から魚介類中の水銀含有量を調査し報告してきたが[3]，共存セレンの含有量を同時に測定し両者の相関性を考察することを今後の課題として，今回は先ず魚介類中のセレンの定量法を検討した．

魚介類中のセレンの定量法としては，蛍光試薬をキレート剤とする蛍光光度法[4]およびガスクロマトグラフ法[5]等がある．しかし，前者は操作が煩雑で長時間を要し，後者は感度に若干難点がある．そこで，最近開発された水素化ホウ素ナトリウムを還元剤とするセレンの水素化物加熱原子吸光法[6]について，魚介類試料への適応性を検討したところ操作も簡便で感度，精度とも良好な結果が得られたので報告する．

実　　験

1．試料

本実験に使用した魚介類は比較的高濃度のメチル水銀を含有するもので，スズキ，キンメダイ，クロムツ，ギンサワラ，アカアマダイ，カツオ，カマス，アイリッシュクラブ，ニタリクジラ，ボラの10種，30検体である．これらの可食部をホモジナイズし，－20℃で保存した．

2．試薬

1）セレン標準溶液：和光純薬製1000ppm 標準溶液

*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

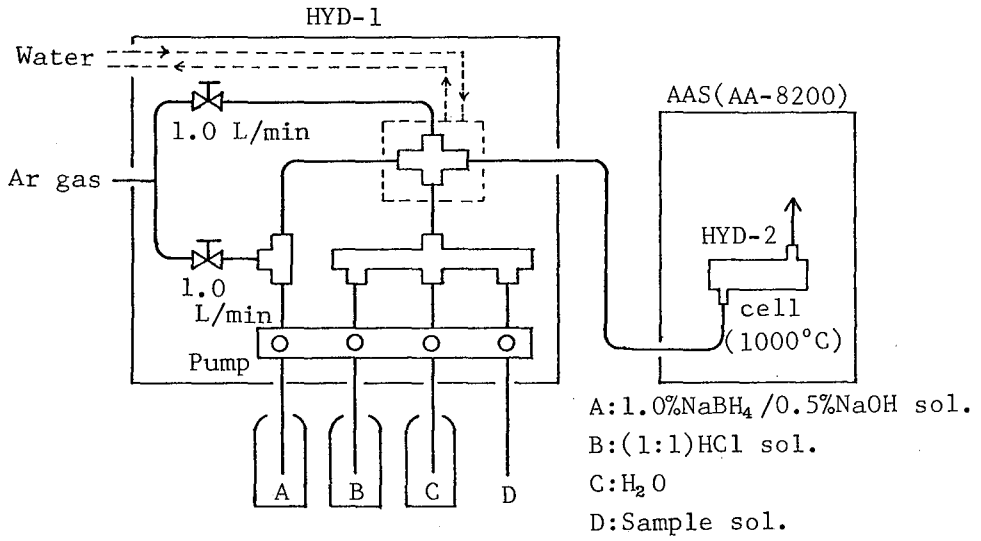


Fig. 1. Schematic diagram of apparatus for selenium determination

を水で順次希釈して使用した．2）水素化ホウ素ナトリウム溶液：和光純薬製原子吸光用水素化ホウ素ナトリウム10.0gおよび特級和光純薬製水酸化ナトリウム5.0gを水に溶かし1000m*l*とした．本溶液は用時調製した．3）塩酸：水で1：1とした．

その他，硝酸，過塩素酸は和光純薬製原子吸光用を使用した．

3．装置

日本ジャーレルアッシュ社製原子吸光分析装置AA－8200型に，同社製水素化物発生装置HYD－1および加熱原子化装置HYD－2を連結して使用した．装置の概略をFig. 1に示す．本装置はA，B，C内に個別に貯蔵された水素化ホウ素ナトリウム・水酸化ナトリウム溶液，塩酸，および水をポンプで吸い上げ，Dから吸入される試料溶液と混合することによって水素化物を発生させることを特徴としている．操作条件をTable 1に示す．

4．試験溶液の調製

試料1.0gをケルダールフラスコに採り，硝酸5－10m*l*を加え約10分穏やかに加熱した．次いで，過塩素酸2 m*l*を加え溶液が淡黄色透明になり，さらに過塩素酸の白煙が生ずるまで加熱した．冷後水で20m*l*とし試験溶液とした．

結果および考察

1．水素化セレンの発生条件

水素化ホウ素ナトリウム溶液濃度：水素化セレン発生の至適条件を決定するため水素化ホウ素ナトリウムの濃

Table 1. Operating conditions

AAS(AA－8200)		
Wave length		196 nm
Lamp current		20 mA
HYD－1		
Carrier gas(Ar)	1	0.1 *l*／min
	2	1.0 *l*／min
Pump control		8
HYD－2		
Cell temp.		1000 ℃

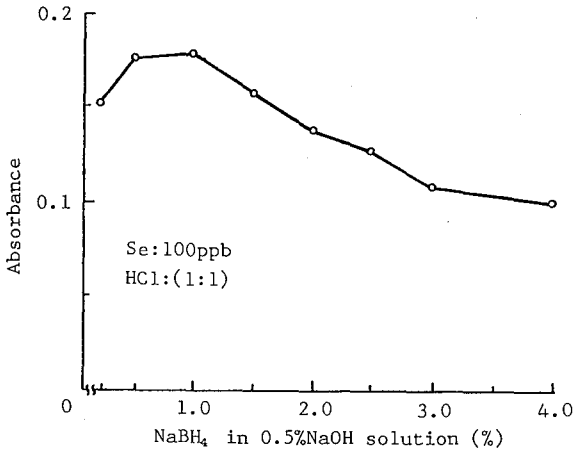


Fig. 2. Effect of concentration of sodium borohydride on hydrogen selenide

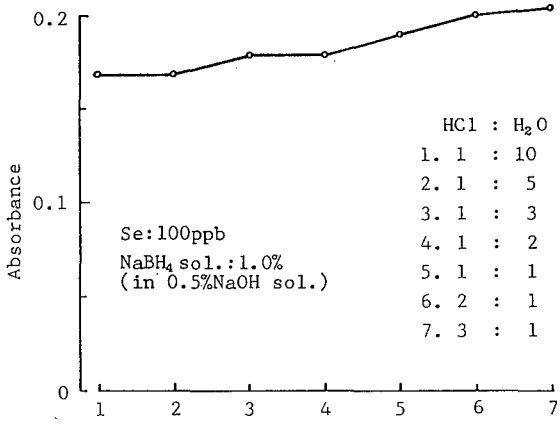


Fig. 3. Effect of concentration of hydrochloric acid on hydrogen selenide

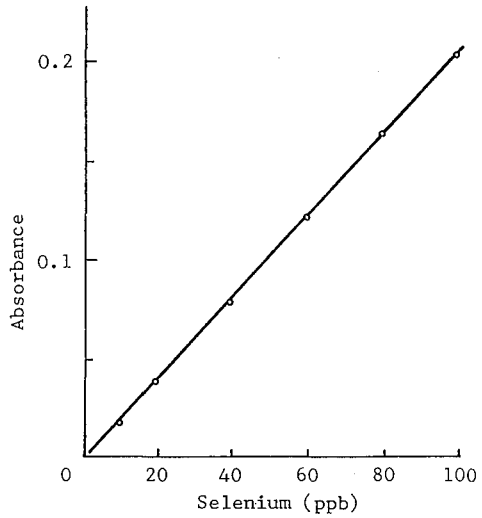


Fig. 4. Calibration curve for selenium

度を検討した．すなわち，Fig. 2 に示すように，塩酸濃度を（1：1）に固定し，水素化ホウ素ナトリウム溶液の濃度を変えて100ppb セレン標準溶液の吸光度を測定したところ，1％付近で吸光度は最大値を示した．なお，水素化ホウ素ナトリウム溶液はアルカリ性とした場合に安定であったので，0.5％水酸化ナトリウム溶液として調製した．

塩酸濃度：水素化ホウ素ナトリウム溶液を1％に固定し，塩酸濃度を変えて先と同様100ppb セレン標準溶液の吸光度を測定したところ，Fig. 3 に示すように濃度の増加と共に吸光度が少しずつ増加する傾向が認められた．従って，本実験においては取り扱い易さも考慮して，塩酸・水（1：1）を用いることにした．

2．検量線

セレン標準溶液10－100ppb を用いて検量線を作成したところ Fig. 4 に示すように良好な直線が得られ，この時の定量限界は 2 ppb（S／N＝2）であった．なお，装置の感度を切り替えることによって，1－10ppb の範囲でも直線性の良好な検量線が得られた．

3．共存元素の影響

実際試料中に共存が予想される各種元素の水素化セレン発生に及ぼす影響を検討した．セレン濃度10ppb に対

Table 2. Recoveries of selenium determination in the coexistence elements

Element	Added (μg)	Recovery (%)	
		I	II
Cu	50	26	38
	20	39	63
	10	66	103
As	50	60	61
	20	66	83
	10	73	100
Sb	50	19	28
	20	65	83
	10	87	100
Sn	50	42	84
	20	65	106
	10	84	106

I：in aqueous solution
II：in 10％$HClO_4$ solution
Se：0.2μg

Table 3. Recoveries of seleniun added to fish (suzuki)

Added (ng)	Found (ng)	Recovery (%)	
100.0	106.4	106.4	
	100.4	100.4	
	100.4	100.4	A.V. 103.4%
	100.4	100.4	C.V. 3.2%
	106.4	106.4	
200.0	214.4	107.2	
	204.6	102.3	
	194.6	97.3	A.V. 102.3%
	204.6	102.3	C.V. 3.4%
	204.6	102.3	

Table 4. Concentration of selenium in fish

Sample	N	Range (ppm)	Average (ppm)
Suzuki (sea-bass, *Lataolabrax japonicus*)	8	0.25−0.39	0.29
Kinmedai (berycoid fish, *Beryx splendens*)	6	0.76−1.31	0.93
Kuromutsu (Japanese bluefish, *Scobrops gilberti*)	4	0.55−1.17	0.86
Ginsawara (Spanish mackerel, *Scomberomyus niphonius*)	3	0.72−0.88	0.80
Akaamadai (Japanese tilefish, *Branchiostegus japonicus*)	2	0.63−0.67	0.65
Katuo (bonito, *Katsuwonus pelamis*)	2	0.89−1.34	1.11
Kamasu (barracuda, *Sphyraenna japonicus*)	2	0.36−0.69	0.53
Irish crab	1		1.28
Nitarikujira (whale, *Balaenoptera edeni*)	1		0.36
Bora (gray mullet, *Mugil cephalus*)	1		0.41
Total	30	0.25−1.34	0.70

N : number of samples

して Na, K, Zn は5000倍, Ca, Mg, Pb, Cd は500倍, Ni, Fe は250倍, Cr は100倍存在しても全く影響が認められなかった. しかし, Cu, As, Sb, Sn の場合は Table 2 に示すようにいずれの場合も50倍の濃度でセレンの回収率に負の影響を及ぼした. これらのうち, Cu 以外はセレンと同様水素化物を作るのでその影響と考えられるが, これらの元素の影響は過塩素酸が共存する場合は抑制されることが明らかとなった. すなわち, 実際の試験溶液中には過塩素酸が10%程度存在するので, その条件で回収率を求めたところ, Table 2 に示したように Cu, As, Sb, Sn は50倍程度までは存在してもセレンは定量的に回収された. 従って, 実際試料である魚介類中のそれぞれの元素含有量を考慮すれば, Cu, As, Sb, Sn のセレンに対する干渉はほとんど無視できるものと考えられる.

4. 硝酸の影響

本法の前処理は過塩素酸−硝酸分解によって行うので, 試験溶液中の残留硝酸について検討したが, セレンの測定にまったく影響を及ぼさなかった.

5. 再現性

スズキ1.0g を採り, 本法に従って10回繰り返しセレンを測定したところ, 平均14.4ppb, 変動係数4.4%であった.

6. 添加回収実験

スズキ1.0g にセレン100または200ng を添加し, それぞれ5回ずつ測定した. 結果を Table 3 に示す.

7. 実際試料の測定

本法を用いて10種, 30検体の魚介類中のセレンを測定した. Table 4 に示すように最高はカツオの1.34ppm, 最低はスズキの0.25ppm であり平均は0.70ppm であった.

結　語

セレンは水銀含有量の多い魚介類に蓄積されると言われており, マグロ類および深海性の魚介類等についてセレンとの関連における調査結果が一部報告[7−8]されているが, 報告例は極めて少ない. これは魚介類中のセレンの簡便な分析法が確立していなかったことにも一因がある. 今回水素化物加熱原子吸光法を用いるセレンの分析法について満足すべき結果が得られたので, 今後は本法を用いてセレンの分析を行い, 水銀含有量との相関性について検討する予定である.

謝　辞　本研究を行うにあたり, 御協力いただいた東京都衛生局環境衛生部食品監視課の方々に深謝致します.
(本研究の概要は日本食品衛生学会第50回学術講演会, 昭和60年10月, 新潟で発表した)

文　献

1) 上田喜一, 河合正計, 山本すみえ, 東条憲一：医学と生物学, 90,15,1975
2) 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
3) 山野辺秀夫, 竹内正博, 風間成孔：東京衛研年報, 35,184,1984

4) Watkinson, J. H. : Anal. Cnem., 38,92,1966
5) 日本薬学会編：衛生試験法注解，1980，金原出版
6) Cox. D. H. and Bibb, A. E. : J. Assoc. off. Anal. Chem., 64,265,1981
7) 西垣　進，田村行弘，真木俊夫，山田　洋，嶋村保洋，落合節子，木村康夫：東京衛研年報，25,235,1974
8) 田村行弘，真木俊夫，山田　洋，嶋村保洋，落合節子，西垣　進，木村康夫：東京衛研年報，26,200,1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **37**, 154-157, 1986

ビス（トリブチルスズ）オキシド（TBTO）による魚介類の汚染実態について（第Ⅰ報）東京湾産スズキおよびアサリ中のTBTO含有量

竹内正博*, 水石和子*, 山野辺秀夫*, 渡辺四男也*

Survey of Pollution with Bis (tributyltin) oxide (TBTO) in Fish and Shellfish (I) Content of TBTO in Sea-Bass and Short-necked Clam Collected from Tokyo Bay

MASAHIRO TAKEUCHI*, KAZUKO MIZUISHI*, HIDEO YAMANOBE* and YOHYA WATANABE*

To monitor the pollution with bis (tributyltin) oxide (TBTO) in fish and shellfish, 30 samples of sea-bass and 15 samples of short-necked clam were collected in Tokyo Bay from July in 1984 to January in 1985.

The samples were homogenized and acidified with dilute hydrochloric acid, by which TBTO in the samples was converted into tributyltin chloride. Extracted with n-hexane・ethyl ether (3 : 1), cleaned up by a florisil column and concentrated by a rotary evaporator, TBTO was determined by injecting 5 μl aliquot of the sample solution along with 1 μl of 0.01 N hydrochloric acid・acetone solution into a gas chromatograph equipped with an electron capture detector. The recoveries and the coefficients of variations for TBTO added to sea-bass and short-necked clam were 96.3% and 2.4%, 95.4% and 3.1%, respectively. The average content of TBTO in the samples were 32.6ppb for sea-bass and 28.5ppb for short-necked clams, and the standard deviations of them were 29.9ppb and 35.3ppb, respectively.

Kewords : bis (tributyltin) oxide, Tokyo Bay, fish and shellfish, sea-bass, short-necked clam, electron capture detector, gas chromatography

緒　言

養殖漁業において漁網防汚剤として使用されているビストリブチルスズオキシド（TBTO）が一部の養殖魚介類から検出され，TBTOの養殖魚介類への移行および蓄積がここ数年来問題となっている[1]．これについて厚生省は「食品中のTBTOの安全性評価検討委員会」を設置し，TBTOの残留する魚介類の食品としての安全性について検討を行なった結果，許容摂取量を暫定的に1.6 μg／kg／日とすることが妥当であり，かつ，現状における魚介類中のTBTOは比較的低レベルであるので，食品衛生上直ちに問題にすべき量ではないとの見解を発表している[2]．しかし，いずれにしてもTBTOの養殖魚介類への移行および残留は望ましいことではないので，養殖漁業における使用基準および残留防止対策を早急に検討する必要がある．

一方，TBTOによる魚介類の汚染は養殖魚介類に留まらず養殖地域に隣接する海域内の魚介類にも及ぶことが懸念される．TBTOは防汚剤として船底塗料中にも使用されているので，それに基づく環境汚染および魚介類による生物濃縮の可能性も十分考えられる．これについては環境庁が一部調査を開始したが[3,4]，現段階では調査例数が少なくTBTO汚染実態の把握には不十分であるため，今後の広範な調査が望まれる．

そこで，著者らは既に開発したTBTOの分析法[5]の東京湾産スズキおよびアサリへの適応性を検討すると共に，東京湾のTBTO汚染の実態を把握することを目的とし

*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

て本研究を行った．以下，得られた若干の知見について報告する．

実　　験

1．試料

1）スズキ：東京湾内富津沖において1984年7月，11月及び1985年1月の3回に渡って10検体ずつ合計30検体採取したものを試料とした．体長および体重を測定してから体側筋をホモジナイザーで均一化し，ポリエチレン製容器に入れて−20℃で冷凍保存した．

2）アサリ：採取地として神奈川県金沢八景（野島公園），大井埠頭（京浜島），葛西沖（三枚州），千葉県行徳海岸，千葉県富津（富津公園）の5定点を設定し，定点毎に1984年5月，7月及び9月に各1回ずつ計3回，いずれも約1kg採取した．各定点の位置をFig. 1に示す．アサリは採取後20−24時間3％食塩水に浸して砂出しを行ってから可食部を取り出し，十分水切りをしてからホモジナイザーで均一化した．スズキの場合と同様ポリエチレン製容器に入れ−20℃で冷凍保存した．

2．試薬

1）トリブチルスズクロライド（TBTC）標準溶液：和光純薬㈱製TBTC（純度99％）100.0mgをn-ヘキサン100mlに溶解して1mg／mlの標準原液を調製した後，n-ヘキサンで適宜希釈して調製した．

2）ビス(トリブチルスズ)オキシド（TBTO）標準溶液：和光純薬㈱製TBTO（純度96％）100mgをメタノール100mlに溶解し，1mg／mlの標準原液を調製した後，メタノールで適宜希釈して調製した．本溶液は添加回収実験に使用した．

3）フロージールカラム：Floridin Co. 製フロリジールPR 3gをn-ヘキサンに懸濁させて，内径1cm，長さ30cmの活栓付きガラスカラムに充塡し，さらに無水硫酸ナトリウム2gを積層させた．

4）塩酸・アセトン溶液：和光純薬㈱製精密分析用塩酸0.1mlを同社製残留農薬分析用アセトン100mlで希釈した．本溶液は用時調製した．

その他，n-ヘキサン，エチルエーテルは和光純薬㈱製残留農薬分析用，また酢酸は同社製精密分析用を使用した．

3．装置

1）ホモジナイザー：日本精機㈱製エクセル・オートDX型を使用した．

2）ガスクロマトグラフ（GC）：㈱島津製作所製GC−7A型（定電流型ECD付き）をTable 1の条件で使用した．

4．分析法[5)]

1）GC用分離カラムのコンディショニング：分離カラムを250℃で15−20時間空焼きした後GCに取り付け，所定の条件に保持した．次いで，GCが安定してから塩酸・アセトン溶液を数分おきに7−8 μlずつ，通常は10−15回，必要ならばさらに繰り返し注入した．

2）試験溶液の調製：試料10gを遠沈管に採り，メタノール4mlを加えてからガラス棒を用いて十分に混和した．次いで，0.3N塩酸40ml及びn-ヘキサン・エチルエーテル（3：1）混液70mlを加え，10分間激しく振とうした後遠心分離してから有機層をナス型フラスコに分取した．さらに，n-ヘキサン・エチルエーテル

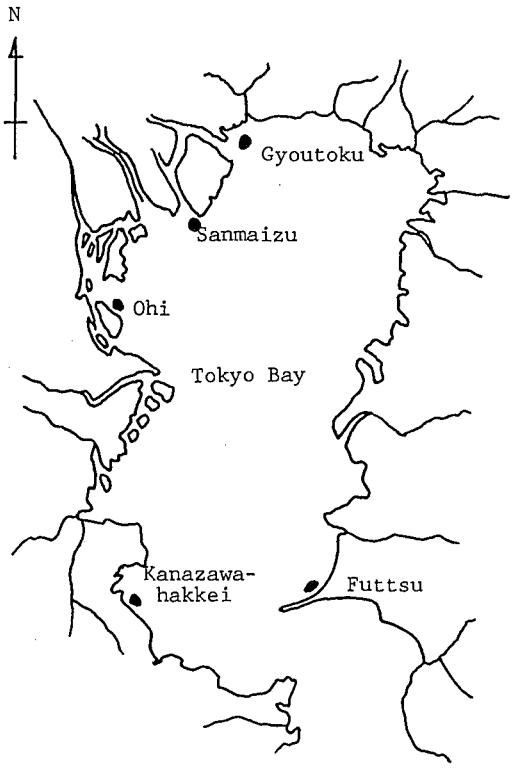


Fig. 1．Sampling Points of Short-nacked Clam

Table 1．Conditions of Gas Chromatography

Column	10% Thermon-HG, Chromosorb W (AW-DMCS), 80-100mesh (Shimadzu) 3.2mm I. D.×2.6m (glass)
Temp.	Column 170℃, ECD 250℃, Injection 250℃
Carrier Gas	N_2 50ml／min

Table 2. Recoveries of TBTO added to Samples

Sample	added (μg)	found (μg)	recovery (%)	C.V. (%)*
Suzuki	0	0.86	—	2.8
(Sea-Bass)	1.0	1.80	95.2	3.2
Asari	0	0.80	—	2.9
(Short-necked Clam)	1.0	1.75	96.5	2.7

*Coefficients of variation

（3：1）混液70ml を加え先と同様に再抽出および遠心分離した後分取した有機層を合わせてロータリーエバポレーターで約50ml まで濃縮した．濃縮液をフロリジールカラムに注入し，5 ml／min の速度で滴下させてから，初めアセトン50ml を，次いでn-ヘキサン・エチルエーテル・酢酸（75：25：1）混液30ml をそれぞれ5 ml／min，2 ml／min の速度で流した．n-ヘキサン・エチルエーテル・酢酸30ml の画分を捕集し，ロータリーエバポレーター（浴温，30℃以下）で濃縮後，n-ヘキサンで3 ml に調整した．

3）試験溶液の注入法：TBTC 標準溶液または試験溶液5 μl と塩酸・アセトン溶液1 μl を空気1 μl を介してマイクロシリンジに採取し，GC に注入した．すなわち，TBTC 標準溶液または試験溶液5 μl をマイクロシリンジに採り，次いでプランジャーを引いて空気1 μl を吸い込んでから，さらに塩酸・アセトン1 μl を吸い込んだ後全量を GC に注入した．

4）検量線：試験溶液の場合と同様に TBTC 標準溶液を注入し，0－1.0ppm（0－5 ng）の範囲で検量線を作成したところ原点を通る良好な直線が得られた．

5）定量限界：本試験法の定量限界は2 ppb（S／N＝2）であった．

結果および考察

1．添加回収実験

スズキおよびアサリ10g を遠沈管に採り，TBTO を1 μg（1 μg／ml メタノール溶液，1 ml）を添加した後，メタノール1 ml を加えてガラス棒で十分混和してから，以下前述の方法に従って TBTO の回収実験をそれぞれ5回繰り返した．Table 2 に示すようにスズキおよびアサリとも95％以上の高回収率が得られ，その時の変動係数はスズキの場合が3.2％，アサリの場合が2.7％であった．従って，本法は回収率および分析精度とも良好であると言える．また，無添加時の測定値の変動係数はスズキ2.8％，アサリ2.9％であり，いずれの試料の場合も添加時と無添加時における分析精度の有意差は認められなかった．従って，添加した TBTO はマトリックス中に完全に溶け込み，初めから試料中に存在する TBTO と一体になっており，添加回収実験の目的が達成されていると考えられる．

Table 3. Analytical Results of TBTO in Sea-Bass (ppb)

Sample No.	'84／Apr.	'84／Nov.	'85／Jan.	Total
1	4	8	18	
2	10	8	139	
3	21	21	15	
4	13	24	82	
5	30	49	6	
6	24	54	92	
7	22	61	13	
8	27	61	nd*	
9	18	25	32	
10	34	27	24	
Range	4－34	8－61	nd－139	nd－139
Mean	20.3	33.8	42.1	32.4
S.D.**	9.3	20.6	46.1	29.9

*nd : less than 2ppb

**Standard deviation

2．実際試料の分析

スズキについて得られた結果を Table 3 に示す．今回分析した30検体のうち'85年1月に採取した1検体を除く全検体から TBTO が検出された．'84年7月，'84年11月および'85年1月と平均値は見かけ上高くなったので，増加傾向が推定されたが，それぞれの平均値に有意差は認められなかった．なお，全30検体の平均値は32.4ppb，標準偏差は29.9ppb であった．

次に，アサリについて得られた結果を Table 4 に示す．全15検体中13検体から TBTO が検出された．'84年5月，7月および9月における平均値は9月が最も高くなっているが，5月および7月と比較して有意差は認められなかった．一方，採取地別の平均値は採取回数が少ないために統計的には結論できないが，金沢八景および富津が高く，大井がこれに続き，行徳及び三枚州は低い傾向を示した．なお，全15検体の平均値は28.3ppb，標準偏差

Table 4. Analytical Results of TBTO in Short-necked Clam (ppb)

Sampling point	'84/May	July	Sept.	Total Mean	S.D.**
Kanazawa-hakkei	27	28	74	43.0	26.9
Ohi	22	26	12	20.0	7.2
Sanmaizu	7	nd*	12	6.3	6.0
Gyoutoku	12	nd*	14	8.7	7.6
Futtsu	37	16	138	63.7	65.2
Mean	21.0	14.0	50.0	28.3	
S.D.**	12.0	13.6	55.9	35.3	

*nd : less than 2ppb
**Standard deviation

は35.3ppb であった.

以上，スズキおよびアサリの結果について述べたが，これらの試料の TBTO 汚染は東京湾における漁業の実態から判断して養殖漁業で使用される漁網防汚剤由来とは考えにくい．また，これまでに行われた東京湾の汚染調査によれば，例えば重金属，PCB 等による汚染は大井付近が最も高く，富津付近が最も低いことが定説化しており[6−10]今回得られた TBTO 汚染はこれらの汚染傾向とは異なるものと考えられる．従って，TBTO による東京湾内のスズキおよびアサリの汚染は，漁網防汚剤以外の TBTO の重要な用途である船底塗料に由来する汚染であり，船の航行，あるいは船底の補修等に伴う汚染であることが推測される．

まとめ

試料中の TBTO を塩酸酸性で TBTC に変換してから溶媒抽出し，次いでフロリジールカラムによるクリーンアップおよび溶媒濃縮後 ECD−GC で定量する方法により，東京湾で採取したスズキおよびアサリ中の TBTO を分析した．スズキは平均32.4ppb，標準偏差29.9ppb，アサリは平均28.3ppb，標準偏差35.3ppb であった．東京湾内では漁網防汚剤由来の TBTO は考えにくいので，汚染の原因は船底塗料に由来するものと考えられる．5 定点の分析結果から TBTO 汚染は富津，金沢八景等湾の入口部分が高く，大井付近がこれに続き，三枚州，行徳は低い値であることが推側された．

謝辞 本調査を実施するにあたり御協力頂いた東京都衛生局環境衛生部食品監視課の各位に深謝いたします．

文献

1) 朝日新聞，1984.12.1
2) 食品中のビストリブチルスズオキシド（TBTO）の安全評価検討委員会報告，1984.4.24
3) 環境庁：昭和59年版化学物質と環境
4) 環境庁：昭和60年版化学物質と環境
5) 分析化学：投稿中
6) 立川 涼，脇本忠明，薬師寺 積，渡辺 功：昭和47年度日本海洋学会春期大会，1972
7) 山県 登，大喜田敏一編：環境汚染分析法，No 9 (PCB) 124，第日本図書，東京
8) 竹内正博，水石和子，岸本清子，風間成孔：東京衛研年報，35，179，1984
9) 堀井昭三，山岸達典，宮崎奉之，金子誠二，村上一：東京衛研年報，31−1，156，1980
10) 安野哲子，荻野周三，小野綾子，大畠敏子，遠藤英美：同上，31−1，185，1980

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 158-162, 1986

東京都におけるPCB汚染の実態について（第14報）
食品および器具，容器類中のPCB含有量

植田忠彦*，竹内正博*，水石和子*
山野辺秀夫*，渡辺四男也*

Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (XIV)
Concentrations of Polychlorinated Biphenyl in Foods, Tablewares and Kitchenwares

TADAHIKO UETA*, MASAHIRO TAKEUCHI*, KAZUKO MIZUISHI*,
HIDEO YAMANOBE* and YOHYA WATANABE*

Keywords：ポリ塩化ビフェニール Polychlorinated Biphenyls，汚染 pollution，食品 foods，調理器具 kitchenwares，食器 tablewares

はじめに

昭和47年にPCBの製造ならびに使用が禁止されたが，食物連鎖等を通じて，今だ汚染は続いている．

著者らは，都民の食生活の安全性を確保することを目的とし，PCBの暫定規制[1]に基づいて，都内に流通する魚介類を中心に，食品ならびにこれらと接触する器具類等について，PCBの含有量調査を行うと共に，東京湾のPCB汚染についても調査を行ってきている[2]．

近年，都内に流通する魚介類には国内出荷魚介類の他に，市場外流通の輸入魚介をはじめ，市場に入荷する魚介の中にも外国で捕獲された，いわゆる，外国産魚介が増加して来ている．本報では昭和59年度中に行った食品，調理器具および食器中のPCB調査結果について報告する．

調査方法

(1) **調査試料**　昭和59年4月より60年3月の間に東京都中央卸売市場で買い上げた市場入荷魚介類69種，148検体，東京湾産スズキ30検体，市場外流通の輸入魚介類13種，31検体，水産加工品40検体，食肉6種30検体，鶏卵20検体，食用油脂2種，20検体，ベビーフード20検体，乳製品6種，22検体，育児用粉乳10検体，牛乳20検体，調理用器具類20検体の合計411検体である．

(2) **定量操作**　厚生省環境衛生局PCB分析研究班による統一分析法[3]に基づいて行った．

結果および考察

Table 1．は市場入荷魚介類の可食部のPCB含有量を示す．測定値は少数点以下3桁目を四捨五入した値である．海水産の国内出荷魚介類中，コノシロの1.25ppmが最高値であり，次いでスズキ0.27ppm，クロムツ，サワラ0.23ppm，キンメダイの0.21ppmの順である．これらは他と比較して高い値を示す魚種である．特に，コノシロの平均値は0.49ppm（n＝6）であり，他の魚種の平均値，スズキ0.27ppm（n＝1），クロムツ0.13ppm（n＝2），サワラ0.10ppm（n＝3），キンメダイ0.11ppm（n＝5）と比べても高濃度の汚染が認められる．また，0.01ppm以上のPCB検出魚介は海水産国内出荷魚介110検体中83検体（75.5%）であり，平均値は0.05ppmであった．次に，海水産の外国産魚介24検体中最高値はニシンの0.14ppmであり，また，0.01ppm以上の検出魚介は10検体（41.7%），平均値は0.01ppmであった．一方，国内出荷淡水魚は13検体であり，最高値はコイの0.09ppmであった．外国産魚のチカ（オンタリオ湖産）は0.06ppmであり，また，0.01ppm以上検出魚は7検体（50.0%），平均値は0.02ppmであった．

以上のことから，国内出荷魚介のPCB汚染は外国産魚介に比べて高く，また，養殖魚と考えられる淡水魚の汚染は比較的低いが，一部のコイに飼料からの食物連鎖汚染と思われるものが認められた．

今回調査した東京湾産のスズキは体長75.0±4.4cm，

*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

Table 1. Concentrations of PCB in Fishes

samples	N	range (ppm)	average (ppm)
Marine fish			
Aji (horse−mackerel, *Trachurus trachrus*)	8	0.00−0.02	0.01
Akaei (*Dasyatis akajei*)	1		0.02
Amadai (blanquillos, *Branchios tegidas*)	1		0.00
Agemate−gai (*Sinonovacula constricta*)	1		0.04
Bora (gray mullet, *Mugil cephalus*)	2	0.07−0.17	0.12
Buri (yellow tail, *Seriola quinqueradiata*)	4	0.01−0.05	0.03
Himeji (goatfish, *Upeneus bensasi*)	1		0.00
Hotalu−ika (*Watasenia scintillaus*)	1		0.02
Isaki (grunt, *Parapristipoma trilineatum*)	1		0.01
Itoyori (*Nemipterus virgatus*)	2		0.00
Iwashi (sardine, *Sardinos melanosticta*)	8	0.02−0.18	0.07
Kagami−dai (mirror perch, *Zenopsis nebulosa*)	1		0.01
Kamasu (barracuda, *Sphyraena japonicus*)	4	0.01−0.08	0.04
Katsuo (bonito, *Katsuwonus pelamis*)	4	0.00−0.01	0.01
Kichiji (*Sebastolobus macrochir*)	7	0.00−0.04	0.02
Kinme−dai (alfoncino, *Beryx splendens*)	5	0.03−0.21	0.11
Kochi (bartail fisthead, *Platycephalus indicus*)	1		0.05
Konoshiro (gizzard shad, *Clupanodon punctatus*)	6	0.07−1.25	0.49
Kurogarei (*Reinhardtius hippoglossoides*)	1		0.00
Kuromaguro (tuna, *Thunnus thynnus*)	1		0.01
Kuromutsu (*Scombrops gilberti*)	2	0.03−0.23	0.13
Madara (codfish, *Gadus macrocephalus*)	1		0.00
Mahaze (*Acanthogobius flavimanus*)	1		0.08
Managatsuo (harvest fish, *Pampus argenteus*)	2	0.00−0.07	0.04
Mebaru (gopher, *Sebastes inerumis*)	3	0.00−0.01	0.00
Menuke (rockfish, *Sebastes matsubarai*)	2	0.02−0.05	0.04
Nitari−kujira (*Balaenoptera edeni*)	1		0.17
Ohyo (halibut, *Hippoglossus stenolepis*)	1		0.00
Saba (mackerel, *Pneumotophrous japonicus*)	7	0.01−0.05	0.02
Sake (salmon, *Oncorhynchus kete*)	1		0.00
Sanma (mackerel pike, *Cololsbis saira*)	10	0.01−0.02	0.01
Sawara (*Scomberomorus niphonius*)	3	0.02−0.23	0.10
Shiba−ebi (*Metapenaeus joyneri*)	1		0.00
Shirauo (white fish, *Salangichthys microdon*)	1		0.00

Suma (little tuna, *Euthynnus affinis*)	1		0.02
Surume−ika (saguttated calamary, *Todarades pacificus*)	5	0.00−0.01	0.00
Suzuki (perch, *Lataolabrax japonicus*)	1		0.27
Tachiuo (hairtail, *Trichiurus lepturus*)	3	0.01−0.12	0.06
Tobiuo (flying fish, *Prognichthys agoo*)	3		0.00
Umeiro (*Paracaesio tumidus*)	1		0.00
total	110		0.05
Suzuki (perch, *Lataolabrax japonicus*) *	30	0.03−1.66	0.49
Marine fish trawled			
Aji (horse−mackerel, *Trachurus trachrus*)	1		0.00
Angorarenko−dai (*Dentex angolensis*)	2	0.00−0.02	0.01
Asahi−dai (*Pegellus bllottii*)	1		0.00
Gin−zame (shark, *Chimaera phantasma*)	1		0.00
Hiraaji (king fish, *Caranx epuula*)	1		0.02
Hirame (flounder, *Paralichthys olivaceus*)	1		0.00
Isaki (grunt, *Parapristispoma trilineatum*)	1		0.00
Kinme−dai (alfoncino, *Beryx splendens*)	1		0.01
Kogane−garei (*Limanda aspera*)	1		0.00
Matou−dai (black oleo dory)	1		0.02
Me−dai (bream, *Hyperoglyphe antarctica*)	1		0.00
Minami−ainame	1		0.00
Mongo−ika (*Sepia esculenta*)	1		0.00
Naga−dai	1		0.02
New Zealand mutsu	1		0.01
Nishin (herring, *Clupea pallasi*)	1		0.14
Obiredachi (frostfish, *Lepidopus caudatus*)	1		0.00
Roco−gai (*Concholepas peruviana*)	1		0.00
Saba (atlantic mackerel, *Sconber scombrus*)	1		0.06
Silver (silver warehou, *Seriolella maculata*)	1		0.00
European−madai (*Pagrus pagrus*)	3	0.00−0.01	0.00
total	24	0.00−0.14	0.01
Limnetic fish			
Ayu (ayu sweetfish, *Plecoglossus altivelis*)	1		0.00
Bero (elegant sculpin, *Bero elegans*)	1		0.00
Iwana (char, *Salvelius pluvius*)	2	0.00−0.01	0.01
Koi (carp, *Cyprinus carpio*)	5	0.00−0.09	0.01
Nijimasu (rainbow trout, *Salmo gairdnerii irideus*)	2	0.00−0.05	0.01

Chica (*Hypomesus japonicus*)	1		0.06
Unagi (eel, *Anguilla japonica*)	1		0.05
Yatsumeunagi (*Lampetra japonica*)	1		0.07
total	14	0.00−0.09	0.02

N : number of samples
*collected from the Tokyo−bay

Table 2. Concentrations of PCB in Marine Products, Meats and Others

samples	N	range (ppm)	average (ppm)
Imported fish			
shrimp	8		0.00
cattle fish	4	0.00−0.01	0.00
shell fish	4		0.00
red−salmon	2	0.02−0.22	0.12
pacific ocean perch	2	0.02−0.10	0.06
silver codfish	1		0.02
butter fish	1		0.03
sillago	3		0.00
whitebait	1		0.00
conger eel	2	0.01−0.02	0.02
others	3		0.00
Processed marine product	40	0.00−4.47	0.13
Meat			
pork	5	0.00−0.03	0.01
pig liver	5		0.00
beef	5	0.00−0.01	0.01
cow liver	5	0.00−0.01	0.01
chicken	5	0.00−0.01	0.00
chicken liver	5		0.00
Edible fat			
lard	18		0.00
tallow	2	0.00−0.01	0.01
Egg			
hen	20	0.00−0.02	0.00
Infant food	20		0.00
Tableware and kitchenware	20		0.00

N : number of samples

体重3.6±0.4kg のもの30検体であった．最高値は1.66ppm であり，平均値は0.49ppm であった．本年の国内出荷魚スズキが1検体と少ないため十分な比較はできないが，前年度の値（国内出荷魚スズキ平均0.17ppm, n＝4，東京湾産スズキ平均0.71ppm, n＝60）と比較するならば，本年はやや低い値となっている．

Table 3. Concentrations of PCB in Dairy Products

samples	N	range (ppm)	average (ppm)
Butter	8	0.00−0.01	0.00
Cheese	7	0.00−0.09	0.03
Powdered milk	2		0.00
Yoghurt	3		0.00
Fresh cream	1		0.00
Ice cream	1		0.00
Formulated milk	10		0.00
Milk	20		0.00

N : number of samples

Table 2．に市場外流通輸入魚介類，水産加工品等のPCB 含有量を示した．輸入魚介類は13種31検体であったが，紅ザケの0.22ppm が最高値であり，次いで赤魚の0.10ppm であった．冷凍エビ，貝類，キスなどからはいずれも検出されなかった．また，0.01ppm 以上の検出魚介は9検体（29.0%），平均値は0.02ppm と低い値であったが，紅ザケなどは国内出荷魚に匹適する値を示した．

水産加工品40検体中，ボラの卵巣より製造されたカラスミより4.47ppm の高い値が検出された．次いで，ヒシコイワシの酢漬（ままかり）の0.33ppm が高く，干物類はやや高い値を示したが，カニ，貝類の缶詰，練製品は共に低濃度であった．肉類は牛，豚，鶏について，各々肉および肝臓各5検体を調べた結果，牛肉，牛肝臓各々3検体より，いずれも0.01ppm を検出した．これは豚肉の0.03ppm および0.01ppm の2検体，鶏肉の0.01ppm 1検体と比較して，牛からの検出率が高いことを示している．鶏卵からは0.02ppm および0.01ppm のものが各1検体認められた．精製食用油脂（ラード）および生豚脂からは検出されなかったが，生牛脂より0.01ppm が検出された．

ベビーフードは肉あるいは野菜と混合したビン詰15検体および肉あるいは，魚と野菜を混合し，乾燥，顆粒状としたもの5検体の合計20検体について調べたが，いず

れからも検出されなかった．また，調理用具および合成樹脂製の食品用容器など20検体について調べたが，全て検出されなかった．

乳および乳製品の調査結果を Table 3．に示した．ナチュラルチーズから0.09ppm および0.08ppm のものが各1検体検出された．また，0.01ppm 以上が検出されたものはチーズ7検体中4検体（57.1%）で，平均値は0.03ppm と比較的高い値であった．

他に，バター8検体中2検体および生クリーム1検体より各々0.01ppm を検出した．

育児用粉乳10検体および牛乳20検体からはいずれも検出されなかった．

ま と め

昭和59年度中に東京都において入手した，魚介類，水産加工品，食肉，鶏卵，食用油脂，ベビーフード，調理用具類および乳製品について，PCB の含有量調査を行った．結果は，いずれからも暫定基準値を越えるものは認められなかった．

謝 辞 本調査にご協力いただいた東京都衛生局食品監視課の方々に深謝いたします．

文 献

1）昭和47年8月24日付環食第442号厚生省環境衛生局長通知「食品中に残留する PCB の規制について」
2）岸本清子，竹内正博，風間成孔：東京衛研年報，35,175－178,1984
3）厚生省環境衛生局 PCB 分析研究班：分析方法に関する研究（1972年1月）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 163-165, 1986

化学物質及び自然毒による食中毒事件例（第3報）
—昭和60年—

真木俊夫*, 観　公子*, 永山敏廣*,
飯田真美*, 二島太一郎*

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toxicants in Tokyo (III) (1985)

TOSHIO MAKI*, KIMIKO KAN*, TOSHIHRO NAGAYAMA*,
MAMI IIDA*, and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords：化学性食中毒 chemical food poisoning, ヒスタミン histamine, おにぎり rice ball, ビペリデン biperiden, プロメタジン promethazine, レボメプロマジン levomepromazine, ホウレン草 spinach, 灯油 kerosene, ウーロン茶 oolong tea, タンニン鉄 tannin black

現在，人類が手にし得る化学物質は約600万種類といわれ，このうち中毒を起こす可能性のあるものは約6万と言われている[1]．この膨大な数の化合物の中から原因物質1種を探し出すことは，現代の科学技術を駆使しても時には不可能に近いこともある．しかし，今日の食生活においてわれわれはこれまで以上に化学物質を食物から摂取する機会が多くなっていると言われ，毎年繰り返し発生している食中毒の原因物質は，この約6万種類の化合物のうちの僅かな化合物と予想されるが，中毒の発生状況を調べてみると複雑多様化の傾向にある．すなわち，食品中の天然成分[2,3]や常在成分の化学変化[4]等が原因で食中毒が発生している．

著者らは前報[5,6]において，都内で起きた食中毒事例を報告してきた．今回は昭和60年の化学性食中毒事例のうち主なものを報告する．

1．オキサワラ様切り身による食中毒

①事件の概要　昭和60年7月某会社社員及びアルバイト職員26名がオキサワラ様のショウガ焼きと称する定食を喫食したところ，そのうち20名位が発症した．医師により食中毒と診断された．

②食中毒の症状　喫食後30分から1時間にかけて20名が発疹，顔面紅潮，口のまわりのシビレ，血圧上昇，吐気及び嘔吐を呈し，ヒスタミン様症状を呈した．

③試料　飲食店に残っていた残品と同一ロットのオキサワラ様切り身1検体が搬入された．

④原因物質の検索　中毒症状はヒスタミン様と疑われたのでヒスタミン及び不揮発性アミン（カダベリン，チラミン，スペルミジン及びプトレシン）について薄層クロマトグラフィー及び液体クロマトグラフィー法を用いて分析を行った．その結果，ヒスタミン210mg％，カダベリン33mg％を検出した．

⑤考察　一般にヒスタミンは100mg％以上存在すれば中毒症状が起きると言われているが，今回はそれをはるかに上回る量であった．特にカダベリンやアグマチンの存在はヒスタミン作用を相対的に増強させると言われている．従ってヒスタミン量の少ない場合でも食中毒を起こすことが予想される[7]．今回の試料は，すでにやや腐敗臭を認め，ヒスタミンのみならずカダベリンの生成が認められ，オキサワラ様切り身の鮮度が極めて悪かった事が判明した．しかし，その後の調査で，この販売仕入先は市場からシイラを仕入れ，飲食店にオキサワラと間違えて販売をしたらしい．飲食店での保存法に問題があってヒスタミン中毒を起こした一例と考えられる．

2．おにぎりによる有症苦情

①事件の概要　昭和60年10月午前9時30分頃女性1名が都内の勤務先で自家製のシャケ入りおにぎりを喫食し，20分後に嘔気，脱力感，言語障害等の症状を呈し救急車で病院に運ばれた．担当医師から食中毒の疑いとして保

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

健所に届けられた.

②**食中毒の症状** 届出された患者は1名だが他県に同居している母親もシャケ入りおにぎりを喫食して同様の症状を呈していた. 喫食後20から30分で悪心, 倦怠感, 脱力感, 舌の麻痺, 運動及び言語障害等を呈した.

③**試料** シャケ入りおにぎりは患者が弁当に持参した2個のうちの1個がそのまま残っていたもので, おにぎりには小さなノリが巻いてあった.

④**原因物質の検索** 患者が中毒症状を呈し始めた直後に, おにぎりは少し苦く, 化粧品の様な臭と味があったと訴えた. そこで農薬の混入を疑い残留農薬分析法に従い有機リン系, イオウ系及びカーバイト系農薬について分析を行った. FID, FPD 及び FTD 検出器付ガスクロマトグラフィー (以下 GC と略す) で3本のピークが得られたものの数十種類の既知農薬に相当するものはなかった.

この事件は患者が母親と同居している他県にまたがっているため, 極めて限られた情報しか得られなかった. その後患者の住む家庭内で, その事件の前日の夜に殺虫剤を使用したという情報が得られたので, その成分に従いピレスロイド系農薬についても同時に分析を試みたが検出するにいたらなかった. そこでこの GC で得られたピークを指標にして動物試験を併用することにした. まず試料を酢酸エチルで抽出した後, マウスに腹腔内投与したところ, 15分程から動作が鈍く行動範囲が狭くなっていった. さらに前後脚で身体を支えることが出来ず, 腹を床にべったり着け, 物音や刺激に反応を示さなくなっていった. ヒゲのみを動かし, いかにも脱力及び倦怠に落ち入っている様子でヒトによる中毒症状に酷似していた. マウスのこの状態は数時間持続したが死亡することはなかった. 又, この症状はおにぎりの外側でも真中からでも観察された. ノリは僅かながら認められたが, シャケからの毒性は観察されなかった. 従って米飯の時点で何らかの化合物が混入したものと推定した. しかし, マウスが死亡しなかったのは, 農薬や毒物でなく鎮静薬の様な薬物混入ではないかと疑い, カラムクロマトを用いて分画, 精製を試みた. まず試料を酢酸エチルで抽出した後, 半分をシリカゲルカラムに負荷し, ベンゼン：アセトン (1：1) 混合溶液で分画③が溶出し始め, アセトンで大部分の分画③を溶出させた. この使用済みのシリカゲルをアセトンで攪拌抽出し, 分画②を得た. 一方, 残りの半分をフロリジルカラムに負荷し, 5％アセトン・ヘキサン混合溶液で分画①を得た. それぞれの分画について動物試験を試みたところ, 分画前の動物試験の結果とよく一致することが判明した. おにぎりから抽出した時のガスクロマトグラムを Fig. 1. に示した. ピーク①, ②及び③の精製画分について GC－MS 及び FT－GC－IR で測定し, ピーク①はビペリデン, ②はプロメタジン, ③はレボメプロマジンと推定し, それぞれの標品と一致し, 確認, 同定した. 又, 標品の動物試験ともよく一致した. これらはいづれもうつ病薬として使われるもので GC から定量したところ①は50ppm, ②は240ppm ③は1,000ppm 含有していることが判明した.

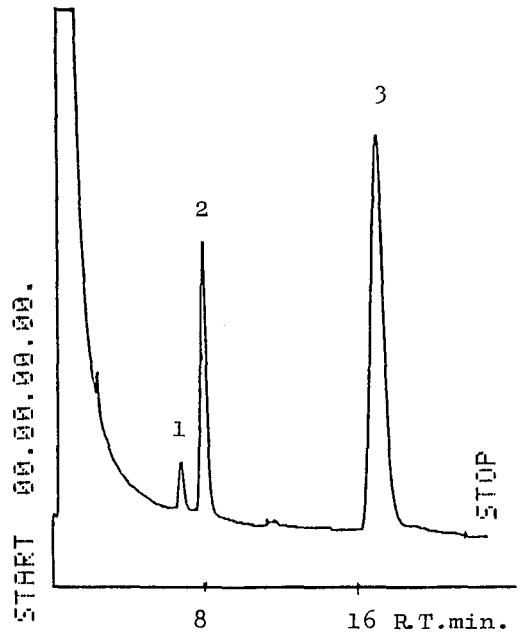


Fig. 1. Chromatogram of extract of rice ball (Onigiri)
Column : 3% OV－17 2m, column temp. 240°, N_2 50ml／min
1. biperiden 2. promethazine
3. levomepromazine

⑤**考察** 本事例は自家製のシャケ入りおにぎりに混入したうつ病薬が原因であった. このおにぎりは, 患者が母親と同居している他県の家で朝作られたもので, 都内の勤務先でおにぎりを喫食して食中毒を呈したという複雑なケースである. 最初は勤務先で朝食が取れるという状況が不可思議で, お茶とかコーヒー等の飲料水に毒物の混入があったのではないかと疑った. 又, 先の理由から情報は極めて限られた範囲内で結論を出すまでにはかなり難航した. 幸い, FID, FPD 及び FTD 検出器付 GC で得られたピークがそれぞれ動物試験で異常を示したこと, GC－MS, FT－GC－IR の検索から確率の高い情報が得られ, 原因物質を明らかにすることができた. しか

し，何故，いつ，どこで，この種の医薬品がおにぎりに混入したかは全く不明である．

3．ホウレン草の石油臭苦情

①事件の概要 昭和60年12月学校給食に用いられたホウレン草とそのホウレン草を用いて調理したソティーから石油臭を認める苦情がほぼ同時に2校から寄せられた．

②試料 石油臭が認められたホウレン草，その根及びホウレン草のソティーである．

③原因物質の検索 試料はいずれもビニール袋に入れられて搬入され，複数のヒトで臭いをかいでみたところ，ホウレン草にはかなり強い石油臭が認められた．しかし，ソティーは調理に用いられた醤油，食用油等で石油臭が消されて認めるまでにはいたらなかった．そこで試料をn－ヘキサンで抽出脱水後，クーデルナー・ダーニッシュ器を用いて緩和な条件で溶媒を一定量まで留去し，FID付GCによるパターン分析を試みた．苦情品，市販のホウレン草及び溶媒濃縮液から得られたガスクロマトグラムのパターンを種々比較検討したところ，苦情品のみに異なるパターンが得られ市販の灯油を標準品としたパターンとよく一致することが判明した．

④考察 学校給食用に仕入れたホウレン草であったため，一般から同様の苦情はなかった．運搬には小型トラックが使われたのでその周辺の調査が進められたが，灯油類に汚染される状況は見い出せなかった．しかし，幸運にも調査はこのホウレン草の生産した農家までさかのぼることができた．このホウレン草はビニールハウス内で栽培され，冬の時期であることから石油ストーブで暖房していることが判明した．従ってビニールハウス内で，灯油を継ぎ足す時等の取扱い不注意でホウレン草に汚染したことが推察された．

4．ウーロン茶の黒変色有症苦情

①事件の概要 昭和60年3月女性1名が昼食用の弁当とウーロン茶（冷ショーケース内に陳列）を購入し，昼食をとりながらウーロン茶を一気に半分飲んで缶を置いたところ，蓋の周辺に残ったウーロン茶が黒変しているのに気づいた．残りの半分をコップにあけて見たところ黒色に近い液であった．

②食中毒の症状 食後15分程で胃があつくなり気持ちが悪くなった．自ら水を飲んで嘔吐を2－3回繰り返した．

③試料 残品と同製品一缶が送付された．

④原因物質の検索 残品は黒に近い溶液であった．pHは6.3で，参考品は6.1と大差なかった．恐らく，この溶液の色はウーロン茶由来のタンニンと容器由来の鉄が反応してタンニン鉄が生成したものと推定した．そこでこの試料につきo－フェナントロリンによる比色法で鉄の定量を行ったところ40ppm含有していた．参考品は0.2ppmで，200倍程度の違いがあった．さらにこの缶詰の内装については，保健所からメーカ側への原因調査依頼でコーティングミスであることが判明した．

⑤考察 鉄の含有量にかなりの差が認められたのは容器由来と推定した．通常，この種の缶の内側はコーティングが確実になされているが，参考品の缶と比較すると巻き締部分が多少異なる様に見られた．鉄の含有量からも電子顕微鏡調査からも推定した通りコーティングミスであった．この部分から少量づつ鉄が溶出しタンニンと反応したものと思われる．事故品のロット番号から製造工場の其の時の状況を調査したところ，停電と思われるアクシデントが発生していた．そのため，コーティングミスが生じたものと推定した．今回，得られた40ppmの鉄から生成したタンニン鉄では，本中毒症状を起こさないと思われ，ウーロン茶が黒色を呈していた等外観の異常によると思われる．

本報告では昭和60年に起きた化学性食中毒事例のうち1．ヒスタミン中毒 2．おにぎり有症苦情 3．ホウレン草石油臭有症苦情 4．ウーロン茶有症苦情の4件を取り上げた．これらの調査は衛生局環境衛生部食品衛生課，各関連の保健所と協力して実施したものである．

謝 辞 貴重な医薬品の標品を提供していただきました塩野義製薬㈱並びに吉富製薬㈱に深謝いたします．

文 献

1）堀岡正義：月刊薬事，28－3,173,1986
2）中村雄彦：日本医事新報，3237,48,1986
3）岩崎久夫：食衛誌，25,449,1984
4）田村行弘，真木俊夫，嶋村保洋ら：同上，20,173,1979
5）田村行弘，真木俊夫，観 公子ら：東京衛研年報，34,171,1983
6）田村行弘，真木俊夫，観 公子ら：同上，36,19,1985
7）永山敏廣，田村行弘，真木俊夫ら：衛生化学，31,362,1985

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 166-172, 1986

緑茶，ウーロン茶およびコーヒー浸出液中の元素量

観　公子*，真木俊夫*，永山敏廣*，
飯田真美*，二島太一郎*

Contents of Trace Element in Green Tea, Oolong Tea and Coffee

KIMIKO KAN*, TOSHIO MAKI*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*,
MAMI IIDA* and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords：緑茶 green tea，ウーロン茶 oolong tea，コーヒー coffee，微量元素 trace element，フレームレス原子吸光法 flameless atomic absorption spectrophotometry，直接定量 direct determination，必須元素 essential elements，欠乏症 deficiency disease，浸出率 exudate ratio

緒　言

近年，生体内での微量元素の生理作用が数多く研究されてきて，栄養学的にいままで必須とみられてきた鉄や銅はもとより，かつては有毒金属とされていた鉛，ヒ素およびクロムのほかマンガン，亜鉛，コバルト，ニッケルも必須栄養成分であることが解明されて，微量元素に高い関心が集まっている．

これら微量元素の人における欠乏症例を挙げると鉄欠乏症は貧血，クロム欠乏症は糖尿病，高脂血症，亜鉛欠乏症は皮膚異常，腸炎症状，小人症，銅欠乏症は貧血，毛髪異常，白血球減少，未熟児，コバルト欠乏症は食欲減退，悪性貧血，マンガン欠乏症は成長障害，神経異常があり，他の微量元素についてもビタミンや体内の酵素又はホルモン等にかかわっていて，これらが欠乏することにより，生命維持発育等に障害を起こすと言われている[1~7]．これらの理由などから正常な人が代謝機能を営むために必須な元素は現在16種類（フッ素，ケイ素，バナジウム，クロム，マンガン，鉄，コバルト，ニッケル，銅，亜鉛，ヒ素，セレン，モリブデン，スズ，ヨウ素，鉛）であることが明らかにされてきた[8]．

しかし，最近は食生活の中に精製された加工食品が多種利用され，鉄，銅，マンガン等のミネラル摂取量が減少し，ミネラル不足におちいるのではないかと懸念されはじめている．そこで著者等は日常広く飲用されている緑茶，ウーロン茶およびコーヒーを通常の飲用状態で浸出しその浸出液についてマンガン，鉄，銅，亜鉛，ニッケル，コバルト，クロム，鉛，ヒ素，水銀，カドミウムおよび臭素の12元素の含有量を測定し，さらに浸出を数回繰り返したときの各元素の浸出度等を検討し，これが人のミネル源になるかどうかを考察した．

実験方法

1．試料

ウーロン茶は中国および台湾産のもので花茶も含めた半発酵茶9検体，緑茶は福岡，静岡，宇治および狭山地方で栽培加工されたもので煎茶，玉露およびほうじ茶を含み12検体，コーヒーはメキシコ，ジャマイカ，ブラジル，コロンビア，タンザニア，エチオピア，コートジボアール，カメルーンおよびハワイ産の焙炒豆各1種ずつ9検体，合計30検体を試料とした．

2．試薬

金属標準溶液：各金属標準溶液は和光純薬製の原子吸光分析用標準液1,000ppm を用い適宜希釈して使用した．

臭素イオン標準溶液：臭化カリウム（試薬特級，和光純製薬）0.149g を精秤して水にとかし，100ml とした後臭素イオンとして100ppm の溶液に希釈して使用した．

その他の試薬は精密分析用を用い，水は再蒸留水を用いた．

3．機械及び器具

原子吸光光度計：Varian 製，AA－975series GTA－95graphite atmizer

水銀分析計：島津製作所製，島津 UV－201

凍結真空乾燥機：Vir Tis 社製，Uni Top 600SL

*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

分解瓶：ガスクロ工業㈱製，Tuf－Tainer Vials

4．試験溶液の調製

1）緑茶およびウーロン茶：試料5gをビーカーに秤取し，熱湯（95°）300mlを加え，時々攪拌しながら5分間経過後，東洋ろ紙No.5Cのろ紙でろ過し，ろ液は1回目の浸出液とした．残渣にはさらに300mlの熱湯を加え，同様操作を2回繰り返し，ろ液を2回目および3回目の浸出液とした．各々の浸出液を試験溶液とした．又，残渣は乾式分解後0.5%硝酸溶液10.0mlに溶かし試験溶液とした．

2）コーヒー：コーヒー豆挽器で普通挽した試料10gをビーカーに秤取し，熱湯（95°）180mlを加え，時々攪拌しながら5分間経過後，東洋ろ紙No.5Cのろ紙でろ過し，ろ液は1回目の浸出液とした．残渣にはさらに180mlの熱湯を加え，同様操作を2回繰り返し，ろ液を2回目および3回目の浸出液とした．各々の浸出液を試験溶液とした．又，残渣は乾式分解後0.5%の硝酸溶液10.0mlに溶かし試験溶液とした．

5．分析方法

1）マンガン，鉄，銅，ニッケル，クロム，コバルト，カドミウムおよび鉛：試験溶液をそのまま，又濃度の高いものについては0.5%の硝酸溶液で適宜希釈後，フレームレス原子吸光法により分析した．

2）亜鉛：試験溶液をそのまま，又濃度の高いものについては適宜0.5%の硝酸溶液で希釈し，そのままフレーム原子吸光法により分析した．

3）ヒ素：緑茶およびウーロン茶の試験溶液は60ml，コーヒーの試験溶液は18mlを各々分取し，湿式分解を行い分解液は7Nの塩酸溶液になるようにして10mlとし，さらにそのうちの1mlを分取して7N塩酸溶液で8mlとした後，還元気化原子吸光法により分析した．

4）水銀：試験溶液20mlを分解瓶に分取し，凍結乾燥後，残渣に硫酸1滴と硝酸1mlを加え密栓して，110～120°で2時間加熱分解した[9]．分解後20%硫酸で10mlとし，そのうちの5ml又は全量を分取し，田村らの方法に従い，ヘッドスペース法により水銀測定器で分析した[10]．

5）臭素：緑茶，ウーロン茶の試験溶液は100ml，コーヒーの試験溶液は90mlを分取し，モノエタノールアミン・アルカリ溶液を加え濃縮乾固後，乾式分解した．分解物は水を加えよく溶かし20mlとした．このうちの10ml又は全量を分取し，検知管法により分析した[11]．

結果と考察

1．ウーロン茶，緑茶およびコーヒー浸出液中の元素量

嗜好飲料として飲用率の高い緑茶，さらにコーヒーおよびウーロン茶について，試験溶液の調製で述べた様なほぼ通常飲用する条件で浸出した．1回目の浸出液について，12元素の含有量を測定し，その結果を表1に示した．

必須元素については元素の種類の分布状況をみると，ウーロン茶ではマンガンが最も多く次いで鉄，亜鉛，ニッケル，銅，クロムの順に，緑茶ではマンガン，亜鉛，ニッケル，鉄，銅，クロム，コバルトの順に，コーヒーではマンガン，鉄，亜鉛，銅，ニッケル，ヒ素，クロム，コバルトの順に多く含有されていた．次に個々の元素について比較してみた．

マンガンは茶類に最も多く含有されていたが，これはツバキ科植物の特徴であることがすでに知られている[12]．特にマンガンを最も多く含有していたのは宇治の玉露茶の5,600ppbで，次に福岡八女および静岡の玉露茶の4,400ppbであった．マンガンは茶樹の葉位における上位葉より下位葉に多く含まれており，下位葉で加工された下級茶程多くマンガンが浸出されるという報告[13～16]もある．しかし，高級茶の玉露茶から多くのマンガンが検出されたことは，他の茶に比べて玉露茶中のマンガンの浸出性が高い性質によるのか，又は玉露の栽培方法からくる種特異性によるのかとも思われる．又ウーロン茶No.3の磚茶のマンガンが他の茶類に比較して少ない事は茶葉を半発酵した後，固めた特殊製法[17]のため，浸出液中に出にくいからと思われる．一方，コーヒー中のマンガンは400～1,900ppbで，ウーロン茶および緑茶より低い傾向にあった．

鉄の含有量はウーロン茶が92～190ppb（平均131ppb），緑茶が62～140ppb（平均101ppb），コーヒーが80～200ppb（平均152ppb）とウーロン茶，緑茶およびコーヒーではほぼ同じような値であった．

亜鉛の含有量は緑茶に多く最高は300ppbの福岡八女の玉露茶であった．又，ウーロン茶およびコーヒーはほぼ同じような値であった．

ニッケルは緑茶に多いのが特徴的で，特に静岡産のものに多く含まれ，最高360ppbで，コーヒーおよびウーロン茶では緑茶に比べて含有量は少なかった．最低は台湾産のウーロン茶鉄観音10ppbであった．

銅はウーロン茶の花茶に特徴的に多く，68～110ppbであった．コーヒーにも他のウーロン茶および緑茶に比べ比較的多く含有されていた．花茶に銅の含有量が多

表1．ウーロン茶，緑茶，コーヒー浸出液中の元素量

No.	品名	産地	元素量 (ppb)										Br (ppm)
			Mn	Fe	Zn	Ni	Cu	Cr	Co	Pb	As	Hg	Cd	
1	貴妃茶	中国(雲南省)	2700	150	130	51	18	2	ND[2]	ND[3]	ND[4]	ND[5]	ND[6]	ND[7]
2	普洱茶	中国(雲南省)	3000	190	160	43	13	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	普洱茶(磚)	中国(雲南省)	1100	170	110	20	9	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	鉄観音茶	台湾	2100	92	85	10	30	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	鐵観音茶	中国(福建省)	2900	98	80	19	29	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	鉄観音茶	中国(福建省)	3800	130	110	16	33	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	耶悉茗茶	中国	4100	140	250	34	110	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	茉莉花茶	中国(福建省)	2600	100	190	45	93	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	ジャスミン茶	台湾	2300	110	120	27	68	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	煎茶	福岡八女	3500	140	250	33	20	3	ND	ND	ND	ND	ND	0.2
11	煎茶	福岡八女	3100	130	250	83	24	1	ND	ND	ND	ND	ND	0.2
12	玉露	福岡八女	4400	94	300	110	19	1	ND	ND	ND	ND	ND	0.1
13	煎茶	静岡	3100	74	210	360	16	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	煎茶(有機農法)	静岡	2800	130	240	340	18	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	玉露(有機農法)	静岡	4400	84	250	290	20	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	煎茶	宇治	3000	68	250	240	13	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	煎茶	宇治	3800	110	220	130	26	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	玉露	宇治	5600	110	230	130	22	2	ND	ND	ND	ND	ND	0.1
19	煎茶	狭山	4100	130	220	120	16	ND[1]	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	煎茶	狭山	3200	62	240	110	15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21	ほうじ茶	狭山	3100	74	110	55	19	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22	コーヒー	メキシコ	900	170	130	28	53	3	2	ND	11	ND	ND	ND
23	コーヒー	ジャマイカ	750	200	150	17	42	4	ND	ND	13	ND	ND	0.8
24	コーヒー	ブラジル	1600	200	85	16	40	3	3	ND	ND	ND	ND	0.4
25	コーヒー	コロンビア	550	150	170	13	59	3	2	ND	21	ND	ND	0.3
26	コーヒー	タンザニア	600	130	150	13	61	4	2	ND	28	ND	1	0.3
27	コーヒー	エチオピア	1100	160	110	14	62	4	ND	ND	27	ND	1	0.4
28	コーヒー	コートジボアール	400	80	100	12	51	4	ND	ND	24	ND	ND	2.0
29	コーヒー	カメルーン	1900	130	180	18	41	2	3	ND	ND	ND	1	2.8
30	コーヒー	ハワイ	800	150	170	29	46	4	2	ND	36	ND	1	0.2

ND[1]：1 ppb 未満，ND[2]：2 ppb 未満，ND[3]：5 ppb 未満，ND[4]：10ppb 未満，ND[5]：0.5ppb 未満，ND[6]：1 ppb 未満，ND[7]：0.1ppm 未満

かったことは，後でも述べるように，花の成分中に溶出銅が多く含有されていたためと考える．

クロムは全般に含有量が少なく緑茶は 2 ppb 以下，ウーロン茶およびコーヒーでは 1 ～ 4 ppb であった．

コバルトはウーロン茶，緑茶からはほとんど検出されず，僅かにコーヒーに 2 ～ 3 ppb 含有するものがあり，全般的に含有量の低い元素であった．

鉛はウーロン茶，緑茶およびコーヒーでは全て検出限界以下であった．

ヒ素はコーヒーに比較的多く含有され，最高がハワイ産の36ppb であった．ウーロン茶および緑茶では全て検出限界以下であった．

元素の取り込みは植物により片寄りがあることは知られているが，産地別に元素含量の片寄りが認められたことは，土質，肥料，土壌改良剤，散布農薬等に大きく影響されているものと思われる[18]．

以上，微量元素の含有量について述べてきたが，必須微量元素の推定必要量はマンガン 2 mg／day，鉄10mg／day，鉛10mg／day，銅 2 mg／day，クロム0.05mg／day，ニッケル0.1mg／day を参考値[8]とし，これらをウーロ

ン茶，緑茶およびコーヒー飲料からだけ摂取するとして計算してみると，おおよそマンガンは1 l，鉄は100 l，亜鉛は50 l，ニッケルは緑茶で1 l，ウーロン茶，コーヒーでは10 l，銅は10 l，クロムは20 l 以上摂取しなければならないこととなる．一方，人間は食生活において微量元素，鉄，亜鉛，マンガン，銅，クロム，ニッケル鉛などを穀物類，野菜，魚介類等から日常多量に摂取しているが通常の食生活のなかで，今回の調査より茶類，コーヒーの飲料は，マンガンを初め数種の元素の補給源としての寄与は，小さいことが認められた．

その他の元素については，水銀は全て検出限界以下，カドミウムはコーヒー4検体に1 ppb 含有されるものがあったが問題はないとおもわれる．臭素は福岡八女茶3件と宇治玉露茶1件に0.1～0.2ppm 含有されていたが，これは緑茶栽培中の土壌燻蒸等に由来したものと考える．又コーヒーに0.2～2.8ppm 含有していたがこれは輸入又は貯蔵時の燻蒸剤由来によるものと考える．しかし，これら臭素の値は ADI 50mg／50kg／day を下回っている．ちなみに最高に含有されていた2.8ppm のコーヒーでは，約100杯（18 l）飲むと ADI の値とほぼ同じ値になり，人の健康に影響を及ぼす量ではないとおもわれる．

2．ウーロン茶，緑茶およびコーヒーの浸出回数による元素量と浸出率

次にこれらの嗜好飲料は通常2～3回は煎出させて飲用されるので，浸出を3回行い，各浸出液中の微量元素含有量について検討した．検体は新たにウーロン茶，緑茶およびコーヒーから各々3種類選び，浸出試験を行い比較的多く含有されていたマンガン，亜鉛，銅，鉄，クロムについて検討した．含有値は浸出液中の含有量を茶葉およびコーヒー豆1 g あたりに換算し，総量から各浸出液中の浸出率および残渣中の残存率を求めたので各元素別に報告する．

1）マンガン

ウーロン茶，緑茶およびコーヒーの浸出回数によるマンガン量と浸出率の結果を表2に示した．

1回目の浸出ではウーロン茶及び緑茶は26～40%，コーヒーは40～44%の浸出率であった．茶類とコーヒーではやや浸出率に差が見られるが，これはコーヒーの試料が粉砕されており表面積が多く，抽出されやすい形状のためとも思われる．総量からみると2回目の浸出率は7～17%，3回目の浸出率は2～8%で当然のことながら浸出率は底下してきたが3回目の浸出でも，まだ含有されていた．なお残渣中の残存率は37～57%であった．全体的に約半分のマンガンが浸出されることがわかった．

2）亜鉛

ウーロン茶，緑茶およびコーヒーの浸出回数による亜鉛量と浸出率の結果を表3に示した．

1回目の浸出ではウーロン茶で15～37%，緑茶で45～46%コーヒーで24～43%であった．3回目の浸出で亜鉛はほとんど浸出しなくなり残渣中の残存率は平均約50%

表2．ウーロン茶，緑茶，コーヒーの浸出回数によるマンガン量と浸出率

No.	品　名	1回目浸出量* (μg/g)	浸出率 (%)	2回目浸出量* (μg/g)	浸出率 (%)	3回目浸出量* (μg/g)	浸出率 (%)	残　渣* (μg/g)	残存率 (%)	総　量* (μg/g)
1	ウーロン茶	167	26	108	17	53	8	310	49	638
5	ウーロン茶	161	40	61	15	28	7	149	38	399
7	ウーロン茶(花)	193	36	66	12	17	3	269	49	545
10	緑茶	223	39	48	8	11	2	289	51	571
13	緑茶	197	36	46	9	11	2	290	53	544
17	緑茶	203	34	42	7	12	2	340	57	597
24	コーヒー	27	44	5	8	2	3	28	45	62
26	コーヒー	10	40	3	12	2	8	10	40	25
29	コーヒー	25	43	9	15	3	5	22	37	59

*：試料1 g に換算した値である．

表3．ウーロン茶，緑茶，コーヒーの浸出回数による亜鉛量と浸出率

No.	品　名	1回目浸出量*(μg/g)	浸出率(%)	2回目浸出量*(μg/g)	浸出率(%)	3回目浸出量*(μg/g)	浸出率(%)	残　渣*(μg/g)	残存率(%)	総　量*(μg/g)
1	ウーロン茶	7.1	25	3.5	12	1.7	6	16	57	28.3
5	ウーロン茶	3.3	15	1.5	7	0.4	2	17	76	22.2
7	ウーロン茶(花)	12.7	37	4.3	13	1.0	3	16	47	34.0
10	緑茶	15	45	3.3	10	<0.4	<1	15	45	33.7
13	緑茶	12.7	45	3.2	11	<0.4	1	12	43	28.3
17	緑茶	13.9	46	3.5	12	0.7	2	12	40	30.1
24	コーヒー	1.4	24	0.2	3	<0.1	2	4.2	71	5.9
26	コーヒー	2.9	43	0.7	10	<0.1	1	3.1	46	6.8
29	コーヒー	3.5	41	0.9	10	<0.1	1	4.1	48	8.6

*：試料1gに換算した値である．

表4．ウーロン茶，緑茶，コーヒーの浸出回数による銅量と浸出率

No.	品　名	1回目浸出量*(μg/g)	浸出率(%)	2回目浸出量*(μg/g)	浸出率(%)	3回目浸出量*(μg/g)	浸出率(%)	残　渣*(μg/g)	残存率(%)	総　量*(μg/g)
1	ウーロン茶	0.52	3	0.31	2	0.12	<1	18.4	95	19.35
5	ウーロン茶	1.20	11	0.40	4	0.11	1	9.2	84	10.91
7	ウーロン茶(花)	6.54	43	2.10	14	0.46	3	6.2	41	15.27
10	緑茶	1.88	19	1.20	12	0.10	1	6.6	68	9.78
13	緑茶	1.88	23	0.52	6	0.08	1	5.8	70	8.28
17	緑茶	1.88	21	0.52	6	0.17	2	6.3	71	8.87
24	コーヒー	0.88	6	0.27	2	0.04	<1	14.4	92	15.59
26	コーヒー	1.28	15	0.35	4	0.08	1	6.8	80	8.51
29	コーヒー	1.06	14	0.29	4	0.05	1	6.0	81	7.40

*：試料1gに換算した値である．

であった．

3）銅

ウーロン茶，緑茶およびコーヒーの浸出回数による銅量と浸出率の結果を表4に示した．

花を含有しているウーロン茶からの銅の浸出が1回目の浸出率43%と他の飲料に比べ顕著に多い．残存率も少なく，花茶においては花部からの銅の溶出が容易であると考える．

他のウーロン茶，緑茶およびコーヒーでは銅の浸出率は1回目の浸出で3～23%と悪く，又3回目の浸出ではほとんどなく，残渣中の残存率は68～95%で銅はほとんど浸出されてこない．一方，花に含まれている銅は茶葉中等の銅と結合状態が違い溶出しやすい形で存在しているものと考える．いずれにしても花茶を除いて最も浸出

表5．ウーロン茶，緑茶，コーヒーの浸出回数による鉄量と浸出率

No.	品名	1回目浸出量*(μg/g)	浸出率(%)	2回目浸出量*(μg/g)	浸出率(%)	3回目浸出量*(μg/g)	浸出率(%)	残渣*(μg/g)	残存率(%)	総量*(μg/g)
1	ウーロン茶	7.5	9	6.6	8	5.4	6	65.0	77	84.5
5	ウーロン茶	6.3	15	4.5	10	1.8	4	31.0	71	43.6
7	ウーロン茶(花)	6.6	9	4.8	7	2.7	4	57.0	80	71.1
10	緑茶	6.3	12	3.3	6	0.9	2	44.0	81	54.5
13	緑茶	5.1	14	2.7	7	0.9	3	28.0	76	36.7
17	緑茶	5.1	18	2.1	8	1.2	4	19.6	70	28.0
24	コーヒー	1.58	11	0.22	2	0.06	<1	12.0	87	13.86
26	コーヒー	0.65	5	0.11	1	0.05	<1	12.2	94	13.01
29	コーヒー	1.06	8	0.14	1	0.05	<1	11.6	90	12.85

*：試料1gに換算した値である．

表6．ウーロン茶，緑茶，コーヒーの浸出回数によるクロム量と浸出率

No.	品名	1回目浸出量*(μg/g)	浸出率(%)	2回目浸出量*(μg/g)	浸出率(%)	3回目浸出量*(μg/g)	浸出率(%)	残渣*(μg/g)	残存率(%)	総量*(μg/g)
1	ウーロン茶	75	9	53	6	29	4	680	81	837
5	ウーロン茶	82	22	29	8	12	3	255	67	378
7	ウーロン茶(花)	106	26	55	14	34	8	209	52	404
10	緑茶	50	24	17	8	7	3	136	65	210
13	緑茶	20	15	14	11	5	4	90	70	129
17	緑茶	24	23	10	9	9	8	65	60	108
24	コーヒー	36	39	9	10	6	6	42	45	93
26	コーヒー	24	35	4	6	2	3	38	56	68
29	コーヒー	22	37	6	10	1	2	30	51	59

*：試料1gに換算した値である．

率の低い元素であった．

4）鉄

ウーロン茶，緑茶およびコーヒーの浸出回数による鉄量と浸出率の結果を表5に示した．

鉄の残渣中の残存率は70～94%であり，銅と同様，浸出率が大変悪い．この原因は恐らく，天然成分と強固に結合しているためと考える．

5）クロム

ウーロン茶，緑茶およびコーヒーの浸出回数によるクロム量と浸出率の結果を表6に示した．

残存率は約60%前後で，やや浸出の悪い元素であるが3回目の浸出液まで溶出されていた．クロムは徐々に溶出されてくる傾向であった．

以上の結果からまとめてみると，ウーロン茶，緑茶お

よびコーヒーからの各元素の溶出は全ての元素について半分又は半分以下の量しか浸出されず，亜鉛，鉛，鉄および銅の様に１回目の浸出でほとんど浸出してしまうもの，あるいはクロムやマンガンの様に後の浸出でも比較的浸出されてくるものの２タイプがあった．

植物の表面組織の成分と結合している元素は比較的初回に浸出されるだろうし，中心の組織成分と結合している元素は浸出されにくいと推定される．又，鉄の様に不溶成分と結合しているものは浸出されないし，水溶性成分と結合しているものは溶出が容易であると考える．

又，金属のイオン化傾向は大きい順にマンガン，亜鉛，鉄，銅であり，銅及び鉄の浸出が大変悪いのはイオン化傾向によるものと考えられる．

要　約

日常飲用されているウーロン茶，緑茶およびコーヒーの浸出液についてマンガン，鉄，銅，亜鉛，ニッケル，コバルト，クロム，鉛，ヒ素，水銀，カドミウムおよび臭素の計12種の元素の含有量を調査した．

１．ウーロン茶浸出液のマンガンは1,100～4,100ppb，鉄は92～190ppb，亜鉛は80～250ppb，ニッケルは10～51ppb，銅は９～110ppb，クロムは１～３ppb 含有されておりコバルト，カドミウム，鉛，水銀，ヒ素および臭素は全て検出限界以下であった．

２．緑茶浸出液のマンガンは2,800～5,600ppb，鉄は62～140ppb 亜鉛は110～250ppb，ニッケルは55～360ppb，銅は13～26ppb，クロムは＜１～３ppb および臭素は＜0.1～0.2ppb，含有されており，コバルト，カドミウム，鉛，水銀およびヒ素は全て検出限界以下であった．

３．コーヒー浸出液のマンガンは400～1900ppb，鉄は80～200ppb，亜鉛は85～180ppb，ニッケルは12～29ppb，銅は41～61ppb，クロムは２～４ppb，コバルトは＜２～３ppb，カドミウムは＜１～１ppb，ヒ素は＜10～36ppb および臭素＜0.1～2.8ppm 含有されており鉛，水銀は全て検出限界以下であった．

４．ウーロン茶，緑茶およびコーヒー中のマンガン，亜鉛，鉄，銅およびクロムの浸出率は３回の浸出で各元素は浸出率が半分又は半分以下であった．鉄と銅は特に浸出率が悪く花茶を除きおおよそ20％以下であった．

５．ウーロン茶，緑茶およびコーヒー浸出液中の各元素の含有量は，他の食品類と比較して相対的に少なく，日常のミネラル摂取への寄与は少ない．

文　献

1）日本農芸化学会主催　第８回 ABC シンポジウム「微量元素－その生体とのかかわり」講演要旨集，日本農芸化学会，1～11,1986
2）和田　攻，荒川泰昭，阿部哲昭：ファルマシア，21,407,1985
3）食品微量元素マニュアル，細貝祐太郎，堤　忠一，高居百合子編，198,902,1985，中央法規出版社
4）厚生省環境衛生局食品化学課：食品衛生研究，24,509,589,761,1974
5）田中幸夫：化学の領域，37,45,1983
6）花井俊彦，Hubert, J.：化学の領域，35,99,1981
7）田中幸夫：化学の領域，36,356,1982
8）糸川嘉則：生体微量金属の話，４～260,1984，自然の友社
9）第２回重金属ワークショップ「生体試料中重金属の測定」講演要旨集，日本衛生学会，７,1985
10）田村行弘，真木俊夫，山田　洋：東京衛研年報，25,227,1974
11）上村　尚，西島基弘，永山敏廣：食衛誌，21,214,1980
12）石垣幸三：化学と生物，19,278,1981
13）中川　眸，横山静子：栄養と食糧，21,249,1968
14）梶田武俊：日食工会誌，10,311,1963
15）梶田武俊：日食工会誌，11,430,1964
16）梶田武俊：日食工会誌，12,179,1965
17）食の科学，28,28,1976，光琳
18）稲荷田萬里子，保屋野美智子，野崎　正：日本栄養食糧学会誌，37,151,1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 173-183, 1986

野菜・果実類中の残留農薬実態調査（昭和59・60年度）

永山敏廣*, 真木俊夫*, 観　公子*,
飯田真美*, 二島太一郎*

Survey of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits (1984. 4～1986. 3)

TOSHIHIRO NAGAYAMA*, TOSHIO MAKI*, KIMIKO KAN*,
MAMI IIDA* and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords：残留農薬 Pesticide residues, 野菜 vegetables, 果実 Fruits, 有機リン系農薬 organophosphorus pesticides, 有機塩素系農薬 organochlorine pesticides, 殺虫剤 insecticides, 殺菌剤 fungicides

緒　言

野菜・果実類中の残留農薬については，食品衛生法により残留基準が設けられ，厳しく規制されている．また，農薬取締法により安全使用基準や登録保留基準が設けられ，その使用方法や使用時期等の適正化が計られている．しかし，法に基づき検査される残留基準を有する農薬は26種の成分のみであり，現在使用されている約300種の農薬成分の1割にも満たない．

著者らは，残留基準の設定された農薬を中心に，その他生産量の多い農薬，残効性を有する農薬，収穫間際まで使用される農薬等についても毎年実態調査を行っている[1-6]．今回，59年度及び60年度における残留実態の調査結果を報告する．

実験の部

1．試料

1984年4月から1986年3月にかけて東京都内に入荷した野菜・果実類360検体について調査した．

2．調査農薬名

(1) 有機リン系農薬：EPN，クロルピリホス，クロルフェンビンホス (CVP-E,-Z)，ジクロルボス (DDVP)，ジメトエート，ダイアジノン，パラチオン，フェニトロチオン (MEP)，フェンチオン (MPP)，フェントエート (PAP)，ホサロン，マラチオン，トリクロルホン (DEP)，サリチオン，エチルチオメトン（ジスルホトン)，ジクロフェンチオン (ECP)，シアノホス (CYAP)，クロルピリホスメチル，ホルモチオン，プロチオホス，メチダチオン (DMTP)，テトラクロルビンホス (CVMP)，プロパホス，EPBP，エチオン，イソキサチオン，チオメトン，シアノフェンホス (CYP)，ホスメット (PMP)，ピリダフェンチオン，ジアリホール，IBP，アセフェート　計34種

(2) 有機塩素系農薬：総 BHC（α-，β-，γ-，δ-BHC)，総 DDT (pp'-DDT, pp'-DDE, pp'-DDD), op'-DDT，ディルドリン，エンドリン，アルドリン，ヘプタクロルエポキサイド，ジコホール（ケルセン)，ベンゾエピン（α-，β-ベンゾエピン)，クロロタロニル (TPN)，PCNB，プロシミドン，ビンクロゾリン，キャプタン，カプタホル（ダイホルタン）　計21種

(3) カーバメイト系農薬：カルバリル (NAC)　1種

総計56種

3．機器

(1) ガスクロマトグラフ：㈱島津製作所製 GC－5A（検出器 ECD)，同 GC－9A（検出器 ECD, FPD, FTD)

(2) 液体クロマトグラフ：㈱日本分光製 TRIROTAR Ⅱ（検出器 UV)，㈱島津製作所製 LC－5A（検出器 UV)

4．分析方法

昭和48年厚生省告示第2号，第332号及び残留農薬分析法[7]，残留農薬分析法 Draft[8]等に従い，あるいは一部改良して分析した．

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Contents of Organophosphorus Pesticides[1] in Vegetables and Fruits (1984.4~1985.3)

Sample	No. of sample	No. of positive	Detectable residue (ppm)				
			EPN	Diarifol	DMTP	Prothiofos	Others
Spinach	19	5	0.10,0.18,0.50	1.4,2.5	—	—	Tr[2] (CYAP)
Chinese cabbage [KOMATSUNA]	7	0	—	—	—	—	—
Crown daisy [SHUNGIKU]	2	1	—	—	—	—	0.05 (chlorpyrifos)
Cabbage	18	0	—	—	—	—	—
White rape [HAKUSAI]	12	0	—	—	—	—	—
Lettuce	3	0	—	—	—	—	—
Cucumber	7	2	—	—	—	—	Tr (DDVP), Tr (MEP)
Tomato	6	2	—	—	—	—	0.10 (PAP), 0.08 (phosalone)
Radish							
(root)	19	0	—	—	—	—	—
(leaf)	18	4	0.03,0.10	—	—	0.22	3.8 (CYP), 0.04 (salithion)
Turnip							
(root)	10	0	—	—	—	—	—
(leaf)	10	0	—	—	—	—	—
Potato	1	0	—	—	—	—	—
Japanese pear	3	1	—	—	—	—	0.15 (MEP)
Apple	5	1	—	—	—	—	0.02 (chlorpyrifos)
Strawberry	9	7	—	0.08,0.34	0.02	0.04,0.06,0.52	0.01 (DDVP), 0.01 (IBP)
Grape	5	0	—	—	—	—	—
Japanese persimmon [KAKI]	4	0	—	—	—	—	—
Mandarin orange							
(flesh)	5	0	—	—	—	—	—
Summer orange [AMANATSU]							
(flesh)	4	0	—	—	—	—	—
(peel)	3	3	—	—	0.02,0.11,0.42	—	0.35 (PAP), 1.2 (phosalone)
Iyokan							
(flesh)	5	0	—	—	—	—	—
Total	175	26	0.03~0.50	0.08~2.5	0.02~0.42	0.04~0.52	Tr~3.8

1) EPN, chlorpyrifos, CVP, DDVP, dimethoate, diazinon, MEP, MPP, PAP, phosalone, malathion, DEP, salithion, disulfoton, ECP, CYAP, chlorpyrifosmethyl, formothion, prothiofos, DMTP, CVMP, propaphos, EPBP, ethion isoxathion, thiometon, CYP, PMP, pyridaphenthion, dialifor and IBP are investigated.

2) Tr : below 0.01ppm

結果及び考察

1．昭和59年度における調査結果

(1)有機リン系農薬

昭和59年度（1984.4～1985.3）における野菜・果実類175検体の有機リン系農薬33種の検出検体数とその検出量を，Table 1に示した．

有機リン系農薬のうち，食品衛生法による残留基準のあるものは，EPN（ホウレンソウ，ダイコンの葉），MEP（キュウリ，ナシ）の2種類が7検体（検出率：4％）から検出された．そのうち，ホウレンソウから検出されたEPNは残留基準値0.1ppmを超えるものが2検体あった．また，EPNは農薬安全使用基準によりホウレンソウに使用してはならないと指導されているにもかかわらず，前回と同様，しばしばホウレンソウから検出されており[3,5,6,9]，その残留量も比較的高い．今後尚一層の農薬使用者に対するその使用方法の指導が望まれる．一方，ダイコンの葉中のEPNは1981年度の調査でも残留基準値0.1ppmを超えて0.2ppm検出されており[9]，EPNは葉菜類に比較的多く残留する傾向が見られた．

環境庁の定めた登録保留基準のある農薬では，ジアリホール（ホウレンソウ，イチゴ），DMTP（イチゴ，アマナツの外果皮），プロチオホス（ダイコンの葉，イチゴ），DDVP（イチゴ，アマナツの外果皮），PAP（トマト，アマナツの外果皮），ホサロン（トマト，アマナツの外果皮），CYP（ダイコンの葉）及びクロルピリホス（リンゴ）の8種類が18検体から検出された．そのうち，ホウレンソウ及びイチゴから検出されたジアリホール，アマナツの外果皮から検出されたDMTP，ダイコンの葉及びイチゴから検出されたプロチオホス，ダイコンの葉から検出されたCYP，アマナツの外果皮から検出されたPAP及びホサロンは，それぞれの登録保留基準値を超えていた．特に，ホウレンソウ中のジアリホール，ダイコンの葉中のCYP及びアマナツの外果皮中のホサロンは，いずれも1 ppmを超えて残留していた．これらの基準値はジアリホール0.01ppm，CYP0.05ppm，ホサロン1.0ppmであり，特に，ジアリホールの残留量はその140及び250倍，CYPでは75倍と非常に高いレベルであった．一方，ジアリホール及びCYPは加熱調理後もその60％以上が残存し[5,10]，そのまま摂取される．しかも，ジアリホールは毒物，CYPは劇物に指定されており，それぞれの1日当りの摂取許容量（ADI）はジアリホール0.0002mg／kg，CYP0.0026mg／kgと比較的低く設定されている．従って，2.5ppmのジアリホールを検出したホウレンソウ150g以上，あるいは0.34ppmを検出したイチゴ600g以上を1日で喫食した場合ADIを超える危険性がある．生産者に十分な注意が望まれる問題であり，消費者の健康を守る上から，今後このようなものの出回らない様生産者に対する十分な指導が行われ，同時に残留実態調査等による監視が必要と思われる．

(2) 殺虫剤

昭和59年度における有機塩素系殺虫剤15種，アセフェート及びカルバリル（NAC）の検出検体数とその検出量をTable 2に示した．

有機塩素系殺虫剤のうち残留基準のあるものは総BHC（α-，β-，γ-及びδ-BHCの総和；ホウレンソウ，コマツナ，ダイコンの根及び葉，カブの根及び葉），総DDT（pp'-DDT，pp'-DDE，pp'-DDDの総和；ダイコンの葉），エンドリン（ダイコンの根及び葉），ジコホール（イチゴ，アマナツの外果皮）の4種類が26検体（検出率：15％）から検出された．そのうち残留基準がNDと設定されているエンドリンがダイコンの根及び葉から0.007ppmと非常に低レベルであるが検出された．また，コマツナ，ダイコン及びカブから検出された総BHCはほとんどがβ-BHCであった．その原因として，BHCは昭和46年に使用が禁止されたこと，また，日本で過去に使用されたBHCはα-BHC70％，γ-BHC10～13％，δ-BHC 8％，β-BHC 5％の混合物であり，植物性食品ではα-BHCの残留が比較的多いこと，さらに，β-BHCは動物性食品に多く見出されることなどから[11]，今回検出されたBHCは輸入された動物性肥料等から移行したβ-BHCに由来するものと考えられる．

低毒性の有機塩素系殺ダニ剤であるジコホールはイチゴからの検出率が44％（4／9）と高く，他はアマナツの外果皮1検体から検出されたのみであった．しかし，ジコホールを検出したイチゴ4検体のうち2検体には有機リン系殺ダニ剤であるジアリホールが同時に含まれていた．このことは，同一の効果を有する農薬を，相乗効果を期待して2種以上混用したとも考えられる．新しいケースなので今後さらに監視の必要があると思われる．

有機リン系殺虫剤のひとつであるアセフェートの検出率は0.8％（1／124）と低かったが，検出されたホウレンソウ中での残留量は9.0ppmと非常に高かった．アセフェートは昭和48年に登録された比較的新しい農薬で，その毒性はADI0.02mg／kgと比較的低く，普通物の扱いを受けている．従って，今回の残留量では喫食上問題はないと思われる．しかし，このような高レベルの残留は農薬使用者の不注意な使用法によるところが大きいと考えられ[6]，農薬の使用方法やその使用時期等の早急な

Table 2. Contents of Insecticides in Vegetables and Fruits (1984.4～1985.3)

Sample	Organochlorine Pesticides[1]			Acephate			Carbaryl		
	No. of sample	No. of positive	Detectable residue (ppm)	No. of sample	No. of positive	Detectable residue (ppm)	No. of sample	No. of positive	Detectable residue (ppm)
Spinach	19	1	0.002 (T-BHC)	14	1	9.0	19	0	—
Chinese cabbage	7	1	0.006 (T-BHC)	7	0	—	7	2	Tr[2], 0.05
Crown daisy	2	0	—	1	0	—	2	0	—
Cabbage	18	0	—	17	0	—	18	0	—
White rape	12	0	—	12	0	—	12	0	—
Lettuce	3	0	—	3	0	—	3	0	—
Cucumber	7	0	—	7	0	—	7	0	—
Tomato	6	0	—	6	0	—	6	0	—
Radish									
(root)	19	9	0.003, 0.003, 0.004, 0.004, 0.005 (T-BHC) Tr[2] (op'-DDT) Tr[3], Tr (endrin) 0.010 (heptachlor epoxide)	19	0	—	19	0	—
(leaf)	18	11	0.006, 0.010, 0.017, 0.019, 0.025 (T-BHC) 0.02 (T-DDT) Tr (op'-DDT) 0.005, 0.005, 0.006, 0.007 (endrin) 0.005 (heptachlor epoxide)	1	0	—	6	0	—
Turnip									
(root)	10	2	0.002 (T-BHC) 0.032 (dieldrin)	1	0	—	1	0	—
(leaf)	10	2	0.002 (T-BHC) 0.023 (dieldrin)	1	0	—	1	0	—
Potato	1	0	—	1	0	—	1	0	—
Japanese pear	3	0	—	3	0	—	3	0	—
Apple	5	0	—	5	0	—	5	0	—
Strawberry	9	4	0.02, 0.02, 0.04, 0.13 (dicofol)	7	0	—	9	0	—
Grape	5	0	—	5	0	—	5	0	—
Japanese persimmon	4	0	—	4	0	—	4	0	—
Mandarin orange									
(flesh)	5	0	—	5	0	—	5	0	—
Summer orange									
(flesh)	4	0	—	3	0	—	3	0	—
(peel)	3	1	0.08 (dicofol)	0			3	0	—
Iyokan									
(flesh)	5	0	—	2	0	—	4	0	—
Total	175	31	Tr～0.032 (T-BHC, T-DDT, etc.) 0.02～0.13 (dicofol)	124	1	9.0	143	2	Tr～0.05

1) Total-BHC (T-BHC : α-, β-, γ-, δ-BHC), total-DDT (T-DDT : pp'-DDT, pp'-DDE, pp'-DDD), op'-DDT, dieldrin, endrin, aldrin, heptachlor epoxide, dicofol and benzoepin are investigated.

2) Tr : below 0.01ppm

3) Tr : below 0.005ppm

Table 3. Contents of Fungicides in Vegetables and Fruits (1984.4～1985.3)

Sample	No. of sample	No. of positive	Detectable residue (ppm)					
			TPN	PCNB	Procymidone	Vinclozolin	Captan	Captafol
Spinach	19	0	—	—	—	—	—	—
Chinese cabbage	7	0	—	—	—	—	—	—
Crown daisy	2	0	—	—	—	—	—	—
Cabbage	18	0	—	—	—	—	—	—
White rape	12	0	—	—	—	—	—	—
Lettuce	3	1	—	0.005[1)]	—	—	—	—
Cucumber	7	0	—	—	—	—	—	—
Tomato	6	3	—	—	—	0.01,0.07,0.21	—	—
Radish								
(root)	19	0	—	—	—	—	—	—
(leaf)	18	0	—	—	—	—	—	—
Turnip								
(root)	10	0	—	—	—	—	—	—
(leaf)	10	0	—	—	—	—	—	—
Potato	1	0	—	—	—	—	—	—
Japanese pear	3	0	—	—	—	—	—	—
Apple	5	1	—	—	—	—	—	0.08
Strawberry	9	1	—	—	0.04	—	—	—
Grape	5	0	—	—	—	—	—	—
Japanese persimmon	4	0	—	—	—	—	—	—
Mandarin orange								
(flesh)	5	0	—	—	—	—	—	—
Summer orange								
(flesh)	4	0	—	—	—	—	—	—
(peel)	3	0	—	—	—	—	—	—
Iyokan								
(flesh)	5	0	—	—	—	—	—	—
Total	175	6	—	0.005	0.04	0.01～0.21	—	0.08

1) This sample is containd Tr (below 0.001ppm) of HCB, was inpurities of PCNB fungicide, simultaneously.

改善が望まれる.

カーバメイト系農薬のうち野菜・果実類に使用されるNACは，コマツナ2検体から検出されたものの（検出率：1.4%），その残留量は0.05ppm以下と低かった.

(3) 殺菌剤

昭和59年度におけるTPN，PCNB，プロシミドン，ビンクロゾリン，キャプタン及びカプタホルの検出検体数とその検出量をTable 3に示した.

殺菌剤の検出は3.4%（6／175）と低く，そのうち残留基準のあるものはカプタホル（リンゴ）のみで（検出率：0.6%），残留量も残留基準値5.0ppmの1／60以下であった．また，登録保留基準のある農薬ではプロシミドン（イチゴ）及びビンクロゾリン（トマト）の2種類が4検体から0.01～0.21ppmの範囲で検出された．トマトの検出率が50%（3／6）と高かったが，検出量はいずれも基準値の1／20以下であった.

その他，PCNBがレタス1検体から0.005ppm検出され，同検体からPCNBの不純物であるHCBが0.001ppm未満検出された.

2．昭和60年度における調査結果

(1) 有機リン系農薬

昭和60年度（1985.4～1986.3）における有機リン系農薬の検出検体数とその検出量をTable 4に示した.

残留基準のあるものはEPN（ダイコンの葉），マラチオン（セロリ），MEP（温州ミカンの果肉）の3種類が6検体（検出率：3%）から検出されたが，いずれも残留基準値の1／10以下であった.

登録保留基準のある農薬ではジアリホール（アマナツの外果皮），DMTP（ホウレンソウ，アマナツ及びイヨカンの外果皮），プロチオホス（ホウレンソウ，ダイコンの葉），クロルピリホスメチル（レタス，セロリ），DDVP（イチゴ）の5種類が15検体（検出率：8.1%）から検出された．そのうちアマナツの外果皮から検出されたジアリホール及びホウレンソウから検出されたプロチオホスはそれぞれの基準値0.04ppm及び0.1ppmを超えており，特にホウレンソウ中のプロチオホスはその10

Table 4. Contents of Organophosphorus Pesticides[1] in Vegetables and Fruits (1985.4～1986.3)

Sample	No. of sample	No. of positive	Detectable residue (ppm)				
			EPN	Dialifol	DMTP	Prothiofos	Others
Spinach	6	2	—	—	0.03	0.81,1.3	—
Chinese cabbage	1	1	Tr[2]	—	—	—	—
Crown daisy	4	0	—	—	—	—	—
Cabbage	37	0	—	—	—	—	—
White rape	21	0	—	—	—	—	—
Lettuce	9	1	—	—	—	—	0.01 (chlorpyrifosmethyl)
Celery	9	4	—	—	—	—	0.01 (malathion)
							0.01,0.01,0.04 (chlorpyrifosmethyl)
Welsh onion	1	1	Tr	—	—	—	—
Cucumber	16	0	—	—	—	—	—
Tomato	11	0	—	—	—	—	—
Radish	15	0	—	—	—	—	—
(root)							
(leaf)	14	4	Tr, Tr, 0.01,0.01	—	—	0.02	—
Japanese pear	1	0	—	—	—	—	—
Strawberry	6	1	—	—	—	—	0.01 (DDVP)
Grape	5	0	—	—	—	—	—
Melon	2	0	—	—	—	—	—
Peach	5	0	—	—	—	—	—
Mandarin orange	8	1	—	—	—	—	0.02 (MEP)
(flesh)							
Summer orange							
(flesh)	4	0	—	—	—	—	—
(peel)	4	3	—	0.19	0.07,0.08,0.10	—	—
Iyokan							
(flesh)	3	0	—	—	—	—	—
(peel)	3	3	—	—	0.09,0.14,0.18	—	—
Total	185	21	Tr～0.01	0.19	0.03～0.18	0.02～1.3	0.01～0.03

1) EPN, chlorpyrifos, CVP, DDVP, dimethoate, diazinon, parathion, MEP, MPP, PAP, phosalone, malathion, DEP, salithion, disulfon, ECP, CYAP, chlorpyrifosmethyl, formothion, prothiofos, DMTP, CVMP, propaphos, EPBP, ethion, isoxathion, thiometon, CYP, PMP, pyridaphenthion, dialifor and IBP are investigated.

2) Tr : below 0.01ppm

Table 5. Contents of Insecticides in Vegetables and Fruits (1985.5～1986.3)

Sample	Organochlorine Pesticides[1]			Acephate			Carbaryl		
	No. of sample	No. of positive	Detectable residue (ppm)	No. of sample	No. of positive	Detectable residue (ppm)	No. of sample	No. of positive	Detectable residue (ppm)
Spinach	6	0	—	4	0	—	5	0	—
Chinese cabbage	1	1	0.008 (heptachlor epoxide)	0			1	0	—
Crown daisy	4	0	—	3	0	—	4	0	—
Cabbage	37	0	—	37	0	—	37	3	Tr[2], Tr, 0.04
White rape	21	0	—	21	0	—	21	0	—
Lettuce	9	0	—	9	0	—	9	0	—
Celery	9	2	0.001 (T-BHC) Tr[2] (β-benzoepin)	9	0	—	9	0	—
Welsh onion	1	0	—	1	0	—	1	0	—
Cucumber	16	2	0.010 (dieldrin) 0.02 (β-benzoepin)	16	0	—	16	0	—
Tomate	11	0	—	11	0	—	11	0	—
Radish									
(root)	15	5	0.002, 0.014 (T-BHC) Tr[3] (dieldrin) Tr[3] (endrin) Tr[3] (heptachlor epoxide)	15	0	—	15	1	Tr
(leaf)	14	5	0.003, 0.014 (T-BHC) 0.006 (dieldrin) 0.005 (endrin) Tr (heptachlor epoxide)	0			11	0	—
Japanese pear	1	0	—	1	0	—	1	0	—
Strawberry	6	0	—	6	0	—	6	0	—
Grape	5	0	—	5	0	—	5	0	—
Melon	2	0	—	2	0	—	2	0	—
Peach	5	0	—	4	0	—	5	1	0.22
Mandarin orange									
(flesh)	8	0	—	8	0	—	8	0	—
Summer orange									
(flesh)	4	0	—	3	0	—	4	0	—
(peel)	4	0	—	0			4	0	—
Iyokan									
(flesh)	3	0	—	1	0	—	2	0	—
(peel)	3	0	—	0		—	2	0	—
Total	185	15	Tr～0.014 (T-BHC, etc.) Tr～0.02 (benzoepin)	156	0	—	179	5	Tr～0.22

1) Total-BHC (T-BHC : α-, β-, γ-, δ-BHC), total-DDT (pp'-DDT, pp'-DDE, pp'-DDD), op'-DDT, dieldrin, endrin, aldrin, heptachlor epoxide, dicofol and benzoepin (α-, β-benzoepin) are investigated.
2) Tr : below 0.01ppm
3) Tr : below 0.005ppm

Table 6. Contents of Fungicides in Vegetables and Fruits (1985.4～1986.3)

Sample	No. of sample	No. of positive	Detectable residue (ppm)					
			TPN	PCNB	Procymidone	Vinclozolin	Captan	Captafol
Spinach	6	0	—	—	—	—	—	—
Chinese cabbage	1	0	—	—	—	—	—	—
Crown daisy	4	0	—	—	—	—	—	—
Cabbage	37	0	—	—	—	—	—	—
White rape	21	0	—	—	—	—	—	—
Lettuce	9	1	—	—	—	—	Tr[1)]	—
Celery	9	0	—	—	—	—	—	—
Welsh onion	1	0	—	—	—	—	—	—
Cucumber	16	0	—	—	—	—	—	—
Tomato	11	0	—	—	—	—	—	—
Radish								
(root)	15	0	—	—	—	—	—	—
(leaf)	14	0	—	—	—	—	—	—
Japanese pear	1	0	—	—	—	—	—	—
Strawberry	6	0	—	—	—	—	—	—
Grape	5	0	—	—	—	—	—	—
Melon	2	0	—	—	—	—	—	—
Peach	5	0	—	—	—	—	—	—
Mandarin orange								
(flesh)	8	0	—	—	—	—	—	—
Summer orange								
(flesh)	4	0	—	—	—	—	—	—
(peel)	4	0	—	—	—	—	—	—
Iyokan								
(flesh)	3	0	—	—	—	—	—	—
(peel)	3	0	—	—	—	—	—	—
Total	185	1	—	—	—	—	Tr	—

1) Tr : below 0.005ppm

倍以上の1 ppmを超えて残留していた．プロチオホスは加熱調理後もそのほとんどが残存するため[12)]，残留したプロチオホスはそのまま摂取されると考えられる．プロチオホスは低毒性の普通物であり，今回の残留量では喫食上問題はないと思われるが，比較的残留性が大きく[5,6,9)]，今後とも注意深く監視する必要があると考える．その他，セロリから0.04ppm検出されたクロルピリホスメチルが基準値0.03ppmを超えていたものの，クロルピリホスメチルのADIは0.01mg／kgであり，そのまま生食しても問題はないと思われる．また，DMTPがアマナツ及びイヨカンの外果皮から0.07～0.18ppm検出され，昭和59年度と同様，その検出率は86％（6／7）と非常に高かった．DMTPは劇物でありADIも0.005mg／kgと比較的低く設定されている．しかし，いずれも基準値以下であり，また，マーマレード等を作製した場合，加熱調理により外果皮中のDMTPの大部分は排水中に移行し，あるいは分解，揮散されて大きく減少し（喫食時における残存率：1％未満[10)]），実際に摂取される量は非常に少ないと考えられる．

(2) 殺虫剤

昭和60年度における有機塩素系殺虫剤，アセフェート及びNACについて調査した結果をTable 5に示した．

59年度と同様，コマツナ，ダイコンの根及び葉等からβ-BHCやエンドリン等が検出された．しかし，いずれも低レベルであり，殺虫剤として使用されたものではなく，土壌あるいは肥料等から移行したものと考えられる．一方，セロリ及びキュウリからβ-ベンゾエピンが痕跡及び0.02ppm検出されたが，いずれも登録保留基準値0.5ppmの1／25以下であった．NACはキャベツ及びダイコンの根から痕跡～0.04ppm検出された．また，モモから0.22ppmと比較的多く検出されたが，残留基準値1.0ppmを超えるものはなかった．しかし，モモで検出されたNACは外果皮及び核を除いた果肉部に残留していたものであり，このことから外果皮には多量残留していたと推察される．農薬安全使用基準によるNACの使用方法は，収穫前日まで使用できるため，高濃度の

Table 7. Contents of Disulfoton Sulfone in Vegetables and Fruits (1984.4～1986.3)

Sample	No. of sample	No. of positive	Detectable residue (ppm)
Spinach	25	1	Tr[1)]
Radish			
(root)	34	1	Tr
(leaf)	32	3	0.01,0.01,0.02
Turnip			
(leaf)	10	1	0.03
Strawberry	15	1	0.01
Others	244	0	—
Total	360	7	Tr～0.03

1) Tr : below 0.01ppm

NAC が付着していた可能性も考えられる.

(3) 殺菌剤

昭和60年度における有機塩素系殺菌剤6種の調査結果をTable 6に示した.

レタス1検体からキャプタンが0.005ppm未満検出されたのみで, 他は全く検出されなかった. 昭和59年度に比較し, 殺菌剤がほとんど検出されなかった理由として, 気象条件等が考えられる. すなわち, 昭和59年度は天候が不順であったため, 日照り続きで散布された農薬がそのまま作物に残留濃縮され, あるいは, 長雨で作物が傷みやすくより多種類の農薬が多量に散布されたことによると考えられる.

3. 代謝物

エチルチオメトンの酸化代謝物であるジスルホトンスルホンについての調査結果をTable 7に示した.

ジスルホトンスルホンは昭和58年度の調査でもコマツナから0.25ppm検出された[5]. 今回の調査でもホウレンソウ, ダイコンの根及び葉, カブの葉及びイチゴから痕跡～0.03ppmの範囲で検出されたが, いずれからも原体であるエチルチオメトンは検出されなかった. この原因は, 土壌処理剤であるエチルチオメトンが土壌中ですでにジスルホトンスルホンに酸化された後[13], 植物体の根から吸収され, あるいはガス化して植物体に吸着された後, 速やかに酸化代謝される[14]ことによると思われる.

4. 複合汚染

同一検体から2種類以上の農薬 (BHC, DDT等の使用禁止の農薬を除く) を検出したものをTable 8に示した.

複合汚染はホウレンソウ, ダイコンの葉, セロリ, イチゴ, リンゴ及びアマナツの外果皮等14検体 (検出率：3.9%) に見られた. ホウレンソウ及びダイコンの葉等の葉菜類には有機リン系殺中剤のみの組合わせによる, また, イチゴ及びアマナツの外果皮等の果実類には有機リン系殺虫剤と殺ダニ剤あるいは殺菌剤等の他の種類との組合わせによる農薬の多種成分残留の傾向が見られた.

農薬を検出した検体数は調査した360検体中68検体 (検出率：19%) あったが, そのうち14検体 (検出検体に対する割合：21%) と比較的多くの検体に2種類以上の農薬が残留しており, 3種類の農薬を同時に検出したものも3検体あった. このような傾向は, 最近の農薬は比較的殺虫スペクトルが狭く, 様々な病虫害に対しそれぞれに効果のある農薬を使用した結果とも考えられるが, その他, 病虫害の予防のためあるいは1. (2)で述べたような相乗効果を期待して, 多種類の農薬を使用した結果とも考えられる. いずれにしても, 複合汚染は今後益々進展する可能性があり, 十分注意して監視を続ける必要がある.

まとめ

1984年4月から1986年3月までに都内に入荷した野菜・果実類360検体について, 残留農薬の実態調査を行った.

有機リン系農薬は, EPN, ジアリホール, DMTP, プロチオホス, DDVP, MEP, PAP, クロルピリホス, ホサロン及びアセフェート等の殺虫剤15種類が47検体から痕跡～9.0ppmの範囲で, また, IBP (殺菌剤) が1検体から0.01ppm検出された. そのうち, ホウレンソウ2検体から残留基準を超えてEPNが検出された. また, ホウレンソウ, セロリ, ダイコンの葉, イチゴ及びアマナツの外果皮等13検体からジアリホール, DMTP, プロチオホス, クロルピリホスメチル, CYP, PAP, ホサロン等が検出された.

有機塩素系殺虫剤及び殺菌剤では, ダイコンの根及び葉8検体からエンドリンが痕跡～0.007ppmの範囲で検出された. また, ダイコンやカブ等から検出されたBHCはβ-BHCが主であり, 輸入肥料に由来する可能性が考えられた. その他, イチゴからジコホールが, トマトからはビンクロゾリンが検出された.

ホウレンソウ, イチゴ, アマナツの外果皮で2種類以

Table 8. Species and Items of the Samples Contained Some Kinds of Pesticides (1984.4～1986.3)

Sample	No. of sample	No. of positive	No.	Pesticide residue (ppm)
Spinach	25	7	1	EPN (0.50), CYAP (Tr[1)])
			2	EPN (0.18), Acephate (9.0)
			3	DMTP (0.03), Prothiofos (1.3)
Celery	9	4	1	Chlorpyrifosmethyl (0.04), β-Benzoepin (Tr)
Radish				
(leaf)	32	8	1	EPN (0.01), Prothionfos (0.02)
			2	Prothiofos (0.22), CYP (3.8)
Apple	5	1	1	Chlorpyrifos (0.02), Captafol (0.08)
Strawberry	15	8	1	Diarifol (0.34), Dicofol (0.13), Disulfoton sulfone (0.01)[2)]
			2	Prothiofos (0.52), IBP (0.01), Dicofol (0.02)
			3	DDVP (0.01), Procymidone (0.04)
			4	Diarifol (0.08), Dicofol (0.04)
Summer orange				
(peel)	7	6	1	DMTP (0.42), PAP (0.35), Phosalone (1.2)
			2	DMTP (0.08), Diarifol (0.19)
			3	DMTP (0.02), Dicofol (0.08)

1) Tr : below 0.01ppm

2) A metabolite of ethylthiometon.

EPN, DMTP, Prothiofos, CYAP, acephate, chlorpyrifosmethyl, CYP, chlorpyrifos, DDVP, PAP and phosalone are organophosphorus insecticides. β-Benzoepin is organochlorine insecticides.

Diarifol is organophosphorus acaricides. Dicofol is organochlorine acaricides.

IBP is organophosphorus fungicides. Captafol and procymidone are organochlorine fungicides.

上の農薬を残留したものが多く見られた．葉菜類では有機リン系殺虫剤の，また，果実類では有機リン系殺虫剤と他の殺虫・殺菌剤との混在が見られ，3種類以上を同時に検出したものがイチゴで2検体，アマナツの外果皮で1検体あった．

残留農薬は年々多種多様化しており，農薬使用者の不注意等によると思われる多量の農薬の残留や，複合汚染も増加する傾向が見られる．今後尚一層農薬使用者に対する十分な指導と，緊密な監視体制を続ける必要があると考える．

なお，本調査は東京都衛生局食品監視課と協同で行ったものである．

文　献

1) 西垣　進，田村行弘，鳥羽啓子他：東京衛研年報，23,217,1972

2) 小関正道，嶋村保洋，真木俊夫他：*ibid.*, 31－1, 170,1980

3) 小関正道，田村行弘，真木俊夫他：*ibid.*, 32－1, 172,1981

4) 永山敏廣，田村行弘，真木俊夫他：*ibid.*, 34,165, 1983

5) 永山敏廣，観　公子，田村行弘他：*ibid.*, 35,210, 1984

6) 田村行弘，観　公子，永山敏廣他：*ibid.*, 36,199, 1985

7) 後藤真康，加藤誠哉：残留農薬分析法，1980，ソフトサイエンス社

8) 厚生省環境衛生局食品化学課編：残留農薬分析法 Draft，厚生省食品化学レポートシリーズNo.40,1985

9）小関正道，田村行弘，真木俊夫他：日本農薬学会第7回講演　要旨集，230,1982
10）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：日本食品衛生学会第51回学術講演会　講演要旨集，56,1985
11）湯嶋　健，桐谷圭治，金沢　純：生態系と農薬，1973，岩波書店
12）未発表
13）高瀬　巌，津田秀子，吉本佳文：応動昆., **15**,63,1971
14）高瀬　巌，津田秀子：応動昆., **16**,32,1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 184-186, 1986

食品中のアジピン酸の分析法

島村保洋*, 石川ふさ子*, 小川仁志*,
西島基弘*, 二島太一郎*

Determination of Adipic Acid in Foods

YASUHIRO SHIMAMURA*, FUSAKO ISHIKAWA*, HITOSHI OGAWA*
MOTOHIRO NISHIJIMA** and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords：アジピン酸 adipic acid, 食品添加物 food additive, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography

まえがき

アジピン酸は諸外国において，チーズ，キャンディー，ゼリー等の酸味料，pH 調整剤として，あるいはアルコール飲料，インスタントプリン等の香味増進剤として利用されている。日本では昭和58年に食品添加物として許可され，清涼飲料水，冷果，ゼリー等の酸味料として使用される。

食品中のアジピン酸の分析法としては，キャンディーおよび清涼飲料水について，液々抽出後メチル化し，ガスクロマトグラフィーによる分析法[1)]が報告されている。著者らは，イオン交換樹脂カラムでクリーンアップし，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用い，アジピン酸を誘導体とすることなく，簡便に定量できる分析法について検討したところ，良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1．試料

市販の清涼飲料水，ジャム，ゼリーを試料とした。

2．試薬

アジピン酸標準液：アジピン酸100mg を水に溶解して100m*l* とした。

リン酸緩衝液：0.01 M Na_2HPO_4 と0.01 M KH_2PO_4 を混合し，pH メーターを用い pH 6.30に調製した。

イオン交換樹脂：アンバーライト CG 400（オルガノ製）．塩酸で Cl 型とし，内径 1 cmのクロマト管に高さ 5 cmとなるように湿式で充填した．

3．装置

高速液体クロマトグラフ：島津製作所製 LC－5 A型，検出器：SPD－2 A 型紫外分光光度計

4．試験溶液の調製

1）液状食品

試料 5 g を採取し，試料が酸性の場合は希アンモニア水を用いて中和した．これをあらかじめ調製したイオン交換カラムに負荷し，水—アセトン（1：1）混液100m*l* でカラムを洗浄後，アジピン酸を0.2 N 塩酸—アセトン（1：1）混液20m*l* で溶出した．溶出液は減圧下で濃縮乾固した．残留物にリン酸緩衝液 5 m*l* を加えて溶解し，試験溶液とした．

2）固形食品

細切した試料 5 g をとり，水に溶解し，不溶物のある場合は水浴上で加熱し，ろ紙でろ過した．以下1)と同様に操作した。

5．HPLC の測定条件

カラム：Partisil 10 SAX（Whatman 社製）4 ϕ × 250mm，移動相：0.01 M リン酸緩衝液（pH 6.30），流速1.0m*l*/min，温度：室温，測定波長：210nm

結果及び考察

1．HPLC 条件の検討

1）移動相の pH：アジピン酸および他の酸味料として用いられる有機酸（乳酸，酢酸，コハク酸，リンゴ酸，酒石酸，フマル酸）について，リン酸緩衝液の pH を5.7～6.4に変化させて，その分離能を検討した。その結

*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, Sinjuku-ku,Tokyo, 160 Japan
**同多摩支所

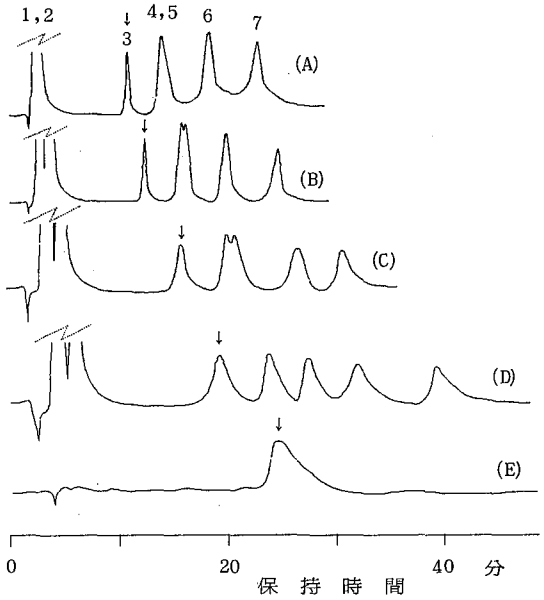


図1 移動相のpHによる分離能への影響
A：pH 6.4, B：pH 6.3, C：pH 6.1,
D：pH5.9, E：pH5.7
1：乳酸, 2：酢酸, 3：アジピン酸, 4：コハク酸, 5：リンゴ酸, 6：酒石酸, 7：フマル酸

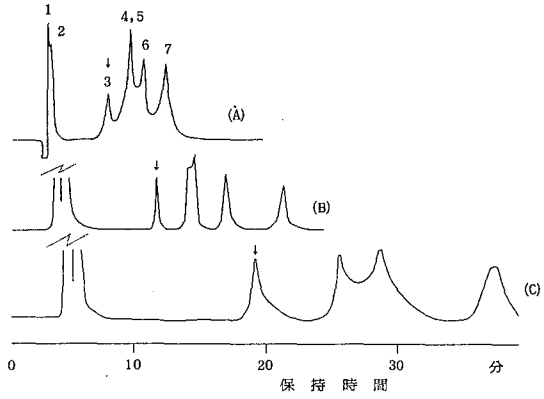


図2 移動相の濃度による分離能への影響
A：0.02 M, B：0.01 M, C：0.005 M
1：乳酸, 2：酢酸, 3：アジピン酸, 4：コハク酸, 5：リンゴ酸, 6：酒石酸, 7：フマル酸

果を図1に示した。pHはアジピン酸の保持時間および他の有機酸との分離に大きな影響を与えた．そこで共存物質との分離およびアジピン酸のピークの形状等を考慮して移動相のpHは6.3とした。

2）移動相の濃度：pHを6.3とし，リン酸緩衝液の濃度を0.005 M, 0.01 M, 0.02 Mにしたときの結果を図

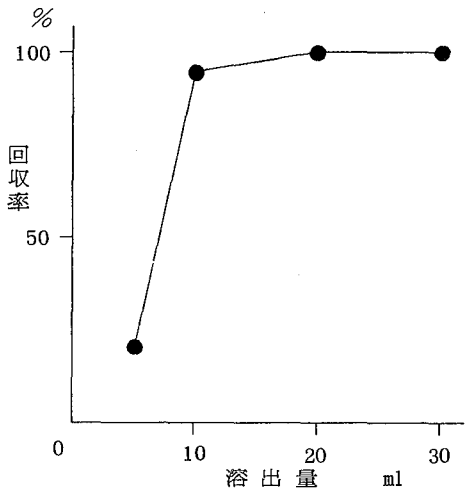


図3 前処理カラムからの溶出パターン

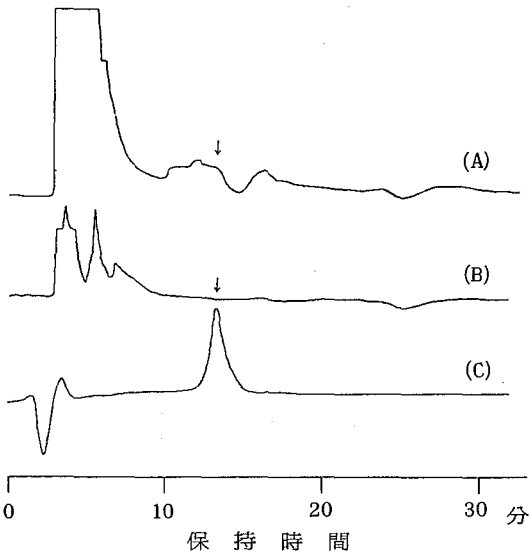


図4 クリーンアップの効果
A：オレンジジュース, B：Aをカラム処理,
C：アジピン酸標準液

2に示した。0.01 Mの場合が共存物質との分離，およびアジピン酸のピークの形状が良好であることから，リン酸緩衝液の濃度は0.01 Mとした．

なお，HPLCによるアジピン酸の定量限界は50ngであった．

2．クリーンアップの検討

一般に，有機酸のクリーンアップには，陰イオン交換樹脂，陽イオン交換樹脂，あるいは陽イオン交換樹脂を通した後，陰イオン交換樹脂を通すもの[2)−4)]などがあ

表1 添加回収率

	添加量(μg)	検出量(μg)	回収率(%)
オレンジジュース	500	513	103
キャンディー	500	492	98
	5000	4840	97
ゼリー	500	487	97

る．そこで，カラムによるクリーンアップを種々検討したところ，強塩基性アニオン交換樹脂であるアンバーライトCG－400を用い，塩酸とアセトンの混液で溶離させることにより，良好な結果が得られた．

ほとんどの食品のpHは弱酸性から酸性の範囲にあるため，このままアニオン交換樹脂カラムに負荷するとアジピン酸は吸着されないので，アンモニア水を用いて中和しカラムに負荷することとした．

また，塩酸—アセトン混液の塩酸濃度を0.01～1.0Nの範囲で変化させた場合，溶出パターンの変化はみられなかった．そこで操作性，およびその後の除去処理の点から，塩酸—アセトン混液中の塩酸濃度は0.1Nとした．図3にアジピン酸の溶出パターンを示したが，20ml以内に負荷量の99%以上が溶出できた．

次に，オレンジジュースについて以上の測定条件を用いて分析した場合と，直接オレンジジュースをHPLCに注入した場合のクロマトグラムを図4に示した．本法によりクリーンアップした場合，アジピン酸の保持時間の位置に特に妨害もなく，良好なクロマトグラムが得られた．

3．添加回収実験

あらかじめアジピン酸が検出されないことを確認したオレンジジュース，キャンディー，およびゼリー各5gにアジピン酸が100μg/g，キャンディーについてはさらに，1000μg/gとなるようにアジピン酸水溶液を添加し回収実験を行った結果を表1に示した．回収率はすべて97～103%の範囲にあり，良好な結果が得られた．

なお，本試験法による試料当りの定量限界は5μg/gであった．

4．市販品への応用

市販の清涼飲料水，ジャム及びゼリーなど53件について本法を適用した結果，いずれからもアジピン酸は検出されなかった．これは，アジピン酸が食品添加物としての許可後まだ日が浅いためと思われる．

要　約

前処理にイオン交換樹脂カラムを用いたHPLC法によるアジピン酸の分析法を検討した．

1．カラムとしてPartisil 10 SAXを，移動相として0.01 M，pH 6.3のリン酸緩衝液を用いたHPLCにより，特に妨害物質も見られず，良好な結果が得られた．

2．試料の前処理法はアンバーライトCG－400に負荷して水洗後，0.2N塩酸アセトン混液（1：1）20mlで溶出させた．

3，オレンジジュース，キャンディー，ゼリーについて，本法を応用したときの回収率は，97～103%であった。

なお，本報の要旨は，日本食品衛生学会第47回学術講演会（昭和59年5月，東京）において発表した．

文　献

1）Ito,Y., Ogawa, S., Iwaida,M：*J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*,62, 937, (1979)

2）Bakev,W.D.：*ibid*, 56,1257,(1973)

3）山下市二，田村太郎，吉川誠次，高波修一：農化，48, 165,(1974)

4）川井信子：生活衛生，26, 228,(1982)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 187-196, 1986

ジエチレングリコール混入ワインについて
——その経緯と分析結果——

田村行弘*, 安田和男*, 上村尚*, 牛山博文*,
田端節子*, 橋本秀樹*, 斎藤和夫*, 中里光男*,
菊地洋子*, 井部明広*, 藤沼賢司*, 勝木康隆*,
冠政光*, 中沢久美子*, 鈴木二郎*, 小川仁志*,
落合節子*, 上田工*, 嶋村保洋*, 石川ふさ子*,
真木俊夫*, 観公子*, 永山敏廣*, 飯田真美*,
二島太一郎*

Wine Contaminated by Diethylene Glycol
——The Progress and The Analytical Result——

YUKIHIRO TAMURA*, KAZUO YASUDA*, HISASHI KAMIMURA*, HIROFUMI USHIYAMA*,
SETSUKO TABATA*, HIDEKI HASHIMOTO, KAZUO SAITO*, MITSUO NAKAZATO*,
YOKO KIKUCHI*, AKIHIRO IBE*, KENJI FUJINUMA*, YASUTAKA KATSUKI*,
MASAMITSU KAMMURI*, KUMIKO NAKAZAWA*, JIRO SUZUKI*, HITOSHI OGAWA*,
SETSUKO OCHIAI*, KOU UEDA*, YASUHIRO SHIMAMURA*, FUSAKO ISHIKAWA*,
TOSHIO MAKI*, KIMIKO KAN*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*, MAMI IIDA*
and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords：ワイン wine, ジエチレングリコール diethylene glycol, 不凍液 antifreezing agent, オーストリア Austria, ガスクロマトグラフィー (FID) gas chromatography (FID).

はじめに

「西ドイツで有毒ワイン騒ぎ」,「不凍液入りワイン」などの見出しで，昭和60年７月中旬に続けて報道されたジエチレングリコール混入ワイン事件は，西ドイツ，オーストリアに留まらず，日本にも上陸し，大きな社会問題に発展した．健康被害の未然防止のために，東京都衛生局食品監視課，都衛研当研究科をはじめ諸機関の協力により，ワインの緊急監視，試験検査等を行い本事件の収拾にあたった．

本事件は，オーストリアのワイン業者が低級ワインを高級ワインに仕立てるために，ジエチレングリコール（以下 DEG と略す）を混入したことが発端であった．西ドイツ，オーストリア政府が DEG 混入の疑惑ワインのリストを発表したが，その数は1,005銘柄におよび，国際間に膨大な違反品が流通していることが明らかにされた．

食品の流通が国際化し，我が国の輸入量が増大する中で起きた本事件は，食品衛生の今後の方向について貴重な教訓を残したと受け止められている．

そこで，本報はワイン事件の経緯，当所で行った DEG の分析法，ワインの検査結果，その他の得られた情報なども含めて報告し，今後の参考に供することとした．

事件の経緯

1984 11. 「DEG の課税に配慮を」とオーストリアのアイゼンシュタットで，ワイン販売業者が税務署を訪れる．オーストリア当局，直ちに DEG の検査開始．

1985 4. オーストリア当局，1983年産のブルゲンランド産 DEG 混入ワインを摘発，1978，1979年産

*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

のものにも疑惑.

1985 7．9 西ドイツでDEG混入ワインが出回っていることが報道される.

1985 7．16 西ドイツ保健省，自国産モーゼルワインよりDEG検出，ワイン騒動大きく発展する.

1985 7．23 オーストリア当局，白ワイン日本にも輸出事実を認める.

1985 7．24 厚生省（衛食第105号），健康被害の未然防止の観点から関係業者に対し販売等の自粛を指導，都などへ収去検査の実施を要請.
DEG混入ワイン，日本国内で発見（白ワイン5.43g／l）.

1985 7．25 オーストリアで最高量48g／lの白ワイン発見．厚生省「DEG混入の疑惑ワイン」1,005銘柄（オーストリア政府公表分 350銘柄，西ドイツ政府分655銘柄）のリストを都道府県へ送付.
都，特別区，緊急監視開始，回収に乗りだす.

1985 7．26 厚生省（衛食第106号）白ワインに加えて，赤及びロゼワインについても販売等の自粛を指導．都は輸入業者90社を対象に一斉立入り検査.

1985 7．29 都，2銘柄よりDEGを検出（白ワイン5.16，0.44g／l）.

1985 7．30 厚生省，オーストリア及び西ドイツ産ワインの「樽買い」のものについて検査強化を指示.

1985 7．31 次々に混入ワイン発見，全国で9銘柄確認．厚生省はリスト外のワインが発見されたことから，「リスト収載銘柄は安全性の判断の決め手とならず」として，自主検査を業界に指導.
西ドイツでハンガリー産からも検出.

1985 8．1 都，初めて赤ワインからDEGを検出.
オーストリア政府，グレープジュースよりDEGを検出.

1985 8．3 厚生省，「国内産ワインほぼ安全」，「樽ワイン」輸入10工場“シロ判定”を発表.
イタリア産ワインからDEG検出（業者の自主検査）.

1985 8．5 厚生省，新たにイタリア産ワインを監視対象に加える.

1985 8．9 都，オーストリア産フルーツワイン3銘柄からDEG検出.

1985 8．20 都，高濃度DEG混入ワイン発見（13.9g／l）.

1985 8．28 国内産たばこ44銘柄に保湿剤としてDEG使用の事実が発覚，使用中止へ.

1985 8．29 国内産M社製貴腐，氷果ワインよりDEG検出，オーストリア ハーレー社製樽ワインをブレンド.

1985 8．30 国内産ワインメーカー全社を調査.
厚生省，オーストリア産ワインのブレンド銘柄販売中止の緊急措置.

1985 9．3 M社製42銘柄のうち6銘柄から検出，M社製合計7銘柄となる．他の国産10社不検出.

1985 9．6 都，DEG混入ワインを産業廃棄物として，126,300本を処分.

1985 9．7 厚生省，国内発見分のDEG混入ワインのリスト発表，「DEG不混入ワインの確認及びその明示等に関する実施要領」を通知（衛食第125号），安全シール貼付による販売再開を認める.

1985 10. 都，安全シール貼付ワインの緊急監視.

1985 11～12 都，ワインの一斉監視，安全を確認.

DEGと中毒事例

DEG[1~4]は無色，無臭，透明の粘稠な吸湿性液体，分子式$C_4H_{10}O_3$，分子量106.12，融点－6.5°，沸点244～245°，比重1.118（20°／20°），水，アルコール，アセトン，エーテルに可溶，ベンゼン，四塩化炭素に不溶，甘味と苦味を有する.

DEGは「不凍液に使用」と報道されたが，日本国内では，主に化成品の溶剤，石灰岩の粉砕助剤，プラスチックなどの軟質化剤として使われている.

経口投与におけるLD_{50}[2~4]は1g／kgヒト，3g／kg／ネコ，9g／kg／イヌ，20.76g／kg／ラットである．静脈内投与ではLD_{50} 2 ml／kg／ウサギ，皮下投与では5 ml／kg／マウスである.

生体内では，一部がシュウ酸に分解され排泄される．多量摂取の場合，代謝性アシドーシス，多尿症を起こすという動物実験の結果がある[5].

DEGによる中毒事例は過去に大きなものが2件ある.

1．1937年，アメリカ南部諸州で，溶血性連鎖球菌感染症の患者105名が死亡した[6,7]．原因は72% DEG溶液中に10%スルファニルアミドを含むエリキシル剤であり，4時間毎に1.5～6オンス（45～180ml）を患者が服用し，24時間以内に初発症状を呈し，2～7日後に死亡している.

症状は胸やけに始まり，悪心，不快感，眩暈，嘔吐，腹痛，下痢を併発し，腰及び背中の疼痛を訴え，乏尿，無尿症に陥いる．次いで意識混濁から死に至る．剖検的には，腎尿細管上皮に強い空胞性変性，肝臓には中心性空胞性変性が見られる.

2．1969年に南アフリカのケープタウンで平均生後14ヶ

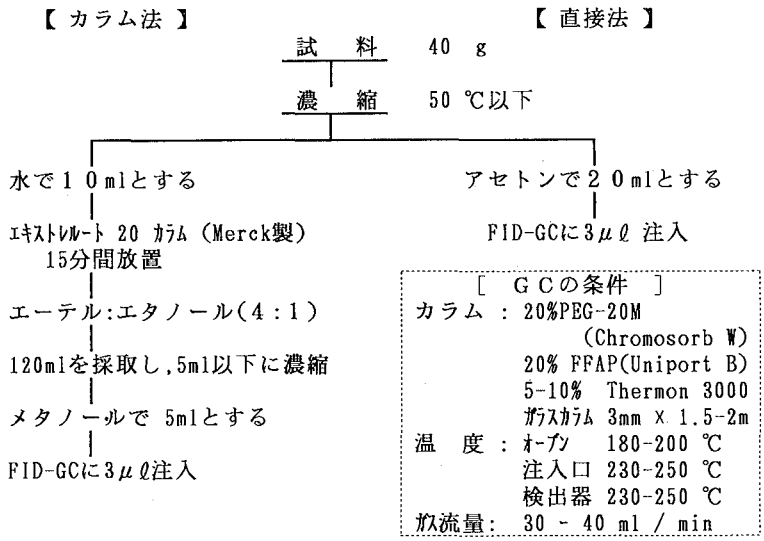


Fig. 1. ワイン中ジエチレングリコールの分析法

月の子供7名が死亡した[8]. 原因は鎮痛剤の Pronap または Plaxim の溶剤として DEG を使用したことにあった. 症状は前例と似ており, 嘔吐, 無尿症, 下痢等があり, ほかに脱水症状, 肝臓の浮腫, 腎臓の疼痛なども起こしている.

以上のほかにも, 誤飲や誤用による中毒事例の報告[2]はあるが詳細について明らかにされていない.

実験方法

1. 試 料

昭和60年7月から12月末までに搬入された, 白, 赤, ロゼ, 発泡及びフルーツワイン, グレープジュースの6種, 合計648検体を分析に供した. ワインの産出国は, オーストリア, 西ドイツ, イタリア, フランス, 日本, ハンガリー, アメリカ, スペイン, キプロス, ユーゴスラビア, オーストラリア, エジプト, 南アフリカの13カ国である.

2. 試 薬

DEG：東京化成㈱社製, 純度98%以上.

DEG 標準溶液：DEG 100mg をメタノールに溶解して 100ml とし標準原液 (1 mg／ml) とし, さらにメタノールで適宜希釈して用いた.

エキストレルートカラム (以下 Ext カラムと略す)：Extrelut 20カラム, Merck 社製 (Art. 11737).

その他の試薬：試薬特級.

3. 装 置

ガスクロマトグラフ (以下 GC と略す)：㈱島津製作所製, GC-7A, GC-5A, (検出器 FID).

インテグレータ：㈱島津製作所製, C-R3A.

GC-質量分析計 (以下 GC-MS と略す)：日本電子㈱製, JMS-D300.

4. 分析法

Fig. 1 に示したカラム法および直接法によった. また, 定量値は DEG のピーク面積による絶対検量線法により算出した.

結果と考察

1. 分析法

ワイン中の DEG 分析法は, 本事件発生以前には報告例がなく, 発生後に多数の報告がある. すなわち, Lehmann G. 等[9]は Ext. カラムとシリカゲル薄層板により分離精製後, 比色法で測定している. キャピラリーカラム－GC 法では, 前処理にイオン交換樹脂カラムによる精製法[10], セライトを用いたバッチ法で精製後シリル化する方法[11], 酢酸エチル抽出法[12], ワインの濃縮液にアセトンを加え遠心分離する方法[13]などがある. また, パックドカラム－GC 法では, テトラエチレングリコールジメチルテーテル, エタノール, 無水硫酸ナトリウムを組合せ抽出する方法[14], アルミナカラム法[15,16], Ext カラム法[17]などがある. 一方, 厚生省は事件発生後直ちにワイン中の DEG 分析法 (事務連絡, 60. 7. 27, 及び60. 8. 20) を都道府県等に連絡している.

ワイン中には, アルコール, 有機酸, グリセリン等の多価アルコールのほか, 100種以上の香味成分が含まれる[18,19]. 分析上, 特に1%前後含まれるグリコール類[18,20]は, DEG と類似の挙動をするため, 種々の前処

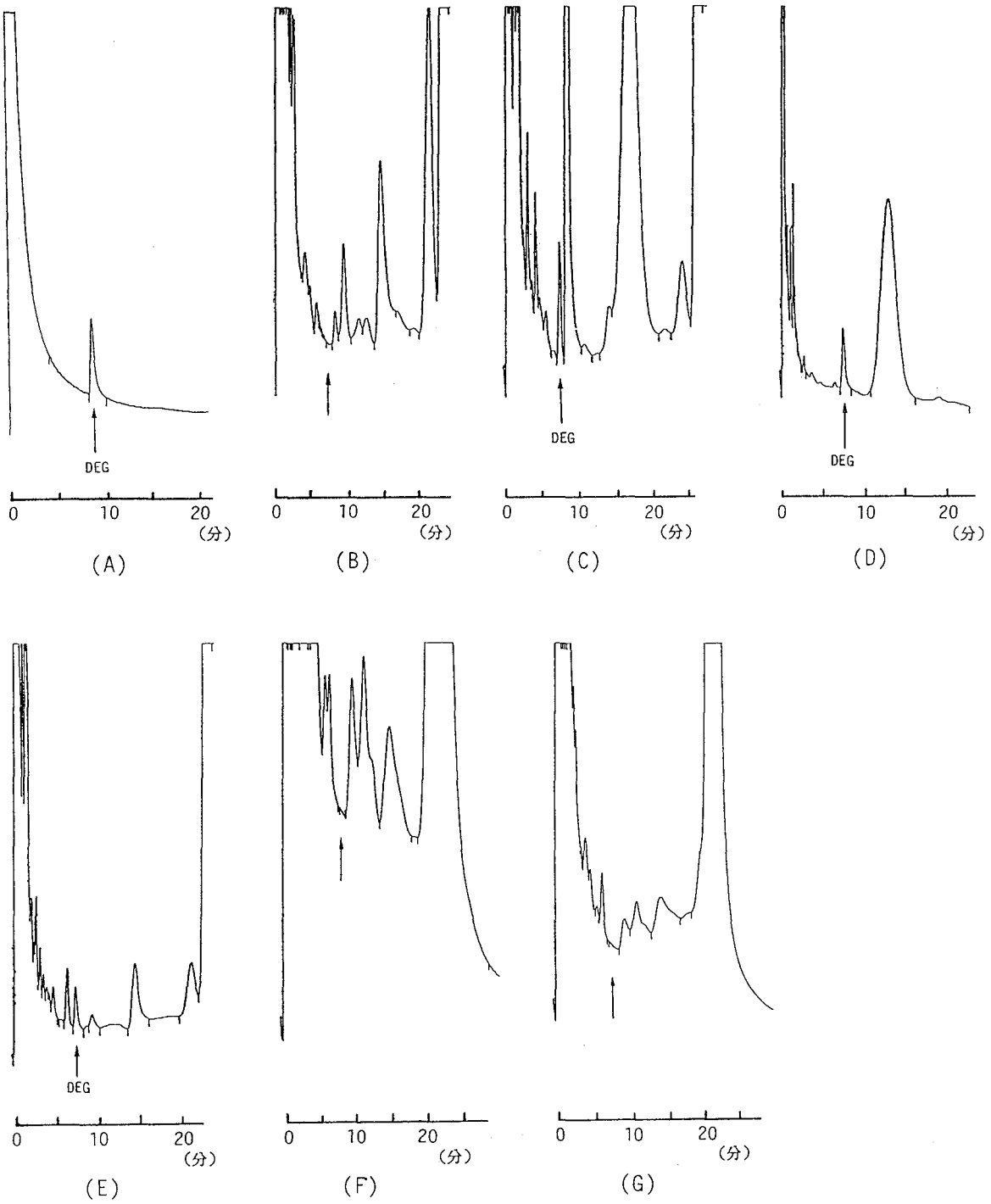


Fig. 2. ジエチレングリコールとワインのガスクロマトグラム
A）DEG 標準溶液，B）DEG 不検出白ワイン（直接法処理），C）DEG 混入白ワイン（Bと同じ），D）C）の20倍希釈ワイン（処理せず），E）DEG 混入ワイン（カラム法処理），F）DEG 不検出貴腐ワイン（Bと同じ），G）DEG 不検出貴腐ワイン（Eと同じ），〔GC 用カラム：20% PEG-20M，カラム温度：180℃〕

Table 1. ガスクロマトグラフにおける保持時間及び面積値に対する溶媒の影響

溶液	保持時間 $\bar{X}\pm$S.D. min (C.V.)		面積値 $\bar{X}\pm$S.D. (C.V.)	
メタノール溶液	9.36 ± 0.008[1] (0.09%)		9832 ± 202[1] (2.1%)	
エタノール	9.32 ± 0.016 (0.17)		10464 ± 317 (3.0)	
アセトン	9.32 ± 0.013 (0.14)		10538 ± 620 (5.9)	
10% メタノール溶液	9.56		5535	
10% エタノール溶液	9.81		5805	
水溶液	9.34		4368	
	10.13	10.08±0.72	2420	3785±1120
	10.77		4494	

1) 各々100mg／l 溶液, 3 μl を5回繰り返し注入した.

理が行なわれる.

本法ではワインを濃縮した後, Ext. カラムで精製又は単にアセトンで希釈し試験溶液とし, GC 法で測定した.

1) GC 用充塡カラム

ワインの成分と DEG の分離がよく, 再現性にも優れた GC 用充塡剤について検討したところ, 20% PEG-20M, 20% FFAP の2種類が優れ, さらに昇温した後の安全性もよく, 測定時間の短縮にもつながることが明らかになった. また, 10% Thermon 3000 (Shimalite TPA), 10% PEG 6000 (Chromosorb W) は分離は良いが, カラム温度を上げられないため測定に長時間を要した. 一方, Chromosorb 101, TENAX, SE-30, OV-17等は再現性や分離能が悪く, 利用できなかった.

Fig. 2 に20% PEG-20M のクロマトグラムを示した. 本カラムでワインを分析した場合, 保持時間 (以下 Rt と略す) 27分と45分附近にグリコール類の大きなピークが認められ, 次の測定を妨害するが, DEG 検出後にカラムオーブンを昇温することで測定時間の短縮を計った.

ワインでは Fig. 2 に示すように, クロマトグラム上に多数のピークが現われる. しかし, 糖分の低いワインにおいてはB), C) に示すように, 直接法でも DEG の単一ピークが得られ測定が可能であった. 一方, 5%以上の糖分を含む甘口の貴腐やアイスワイン等では, 定性的には直接法でも測定が可能であったが, 定量にはカラム法の適用が必要であった.

2) 標準溶液及び試験溶液の溶媒の検討

GC 法により, 測定する時の溶媒による影響を調べるために, 水, 10%メタノール及び10%エタノール溶液, メタノール, エタノール, アセトンで各々100ppm の DEG 溶液を調製し, 20% PEG-20M のカラムで検討した.

その結果を Table 1. に示したが, 水溶液は測定毎に DEG の Rt が次第に遅れる傾向を示し, ピーク面積についても満足な再現性が得られなかった. また, 10%メタノール及び10%エタノール溶液は, 水溶液の場合より Rt が遅れる程度は少ないが, メタノール単独の溶液と比べると60%と低い面積値を示した. さらにエタノール溶液はワインの種類により, 試験溶液がわずかに濁ることがあるため用いないこととした. 一方, メタノール及びアセトン溶液は Rt 及びピーク面積の変動係数が, それぞれ (0.09, 2.1%), (0.14, 5.9%) であり, いずれも再現性に優れていた. 但し, 標準溶液には沸点の高いメタノールを用いた.

3) GC 法による繰り返し精度

標準溶液及び白ワインをカラム法で処理した試験溶液について, 3 μl ずつを GC で繰り返し定し, 精度を求めたところ, Table 2. の結果を得た.

DEG 標準溶液の50, 100ppm 及びワイン1, 2における変動係数はそれぞれ2.6, 2.2, 1.6, 5.8%であり, バラツキも少なく良好な精度が得られた.

4) 回収率

DEG を検出しないことを確認したワイン1 ml について, 各々20, 200, 2000 μg の DEG を添加して, カラム法による回収率の検討を行った.

Table 3. に結果を示すように, いずれの場合も高い回収率が得られ, その変動係数は1.0%であり良好な結果であった. なお, No. 1 に見られる回収率の低下は, エキストレルートカラム精製後の濃縮過程で, 蒸発乾固したことが原因であった. このように DEG が低濃度で更に精製された状態のものは, たとえ低温下で濃縮した場合でも, 溶媒のない条件下で留去を続けると, 揮散する恐れがあり, 溶媒留去には十分な注意が必要である.

また, エキストレルートカラムを使用する場合, 負荷する液量は5 ml 以下にすることが望ましく, これが妨害物の流出を最少限とする条件である.

Table 2．ガスクロマトグラフィーにおける繰り返し精度

	標準溶液		ワインの試験溶液	
	50mg/l	100mg/l	1	2
	4182[1)]	9534	7231	6475
	4348	9498	7424	7069
	4439	9537	7440	7241
	4401	9111		
$\bar{X}$±S.D. (C.V.)	4343±113 (2.6%)	9420±207 (2.2%)	7365±116 (1.6%)	6928±402 (5.8%)

1）数値は面積値，注入量は3 μl.

Table 3．カラム法処理における回収率

	添加量	検出量	回収率	
	mg/l	mg/l	%	$\bar{X}$±S.D.(C.V.)
1	20	17.3	86.5[1)]	
2		19.0	95.1	96.9
3		19.7	98.6	
4	200	198	99.0	
5		196	98.1	97.9±1.0
6		194	97.0	(1.0%)
7	2000	2000	100.0	
8		2030	101.5	100.4±1.0
9		1990	99.5	(1.0%)

1）蒸発乾固のため回収率が低い.

なお，本法における検出限界はワイン中で0.01g／lであった.

5）GC-MSによる同定

アイスワインや貴腐ワインのような甘口のもので，しかもDEG混入量が0.05g／l以下のものは，GC-MSによる同定か，GCによる複数カラムを用いた同定が必要である．特にGC-MSによる同定は信頼性が高く有効であった.

Fig. 3．にDEGの標準溶液とDEG混入ワインのマススペクトルを示した．DEGの分子イオンピークは両者ともにみられないが，M／E 75，76，及び45に特徴あるピークが現われ，両者はよく一致することが確認された.

なお，DEGが低濃度のワインは濃縮並びにカラム法による精製が必要であった.

また，本法における確認限界は0.01g／lである.

2．ワインの検査結果について

ワイン事件が起きた1985年7月から12月までに当所で

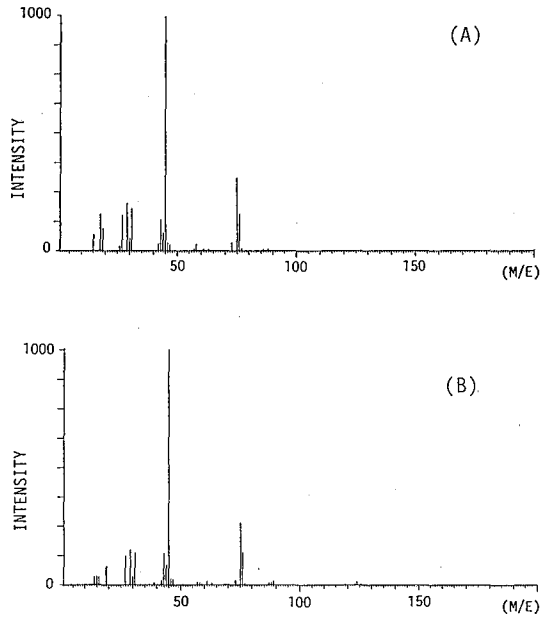


Fig. 3．ワイン中ジエチレングリコールのマススペクトル
ガスクロマトグラフィー条件　カラム：20% PEG－20M，カラム温度：200℃
質量分析計条件　イオン化電圧：70eV，イオン化電流：30 μA
A）DEG標準溶液，B）DEG混入ワイン

検査した件数は648件であり，都で実施した総件数1119件の58%にあたる．検査したワイン等の産出国は，オーストリア，西ドイツ，イタリア，フランス，ハンガリー，アメリカ，スペイン，キプロス，ユーゴスラビア，エジプト，オーストラリア，南アフリカ，日本の13カ国である.

1）DEG混入ワインの産出国

DEG混入ワインの産出国と検出数及び混入量をTable 4．に示した.

今回確認したDEG混入ワインは95検体であり，銘柄数では76銘柄（750mlと250mlの内容量に違いがあるだけのものは同一銘柄とすると68銘柄である.）であった．DEG混入ワインの産出国はオーストリア，西ドイツ，イタリアの3カ国と日本のM社であった．海外で報道されたハンガリー産については，日本では発見されなかった.

検出数の最も多かった国は西ドイツであり，中でもオーストリア産／西ドイツビン詰のDEG混入ワインが全体の31%を占めた．13.9g／lの最大混入量を示したアイスワインは，産地及びビン詰地ともにオーストリア

Table 4．ジエチレングリコール混入ワインの産地と検出量 単位：g/l

産地	ビン詰	銘柄数/検出数	最大値	最小値	$\bar{X}$±S.D.
オーストリア	オーストリア[1)]	14/16	13.9	0.02	1.83±3.49
オーストリア	西ドイツ	26/28	8.87	0.02	2.04±2.15
西ドイツ	西ドイツ	15/16	5.17	0.01	0.43±1.32
イタリア	イタリア	14/23	0.04	0.01	0.01±0.01
オーストリア	日本	6/11	2.71	1.22	1.98±0.60
オーストリア	(バルク)	1/1	1.61		1.61
合計		76/95			

1）フルーツワイン3検体を含む．

であり，次いで8.87，5.92g／l のものは，いずれもオーストリア産／西ドイツビン詰であった．なお，西ドイツでは49g／l のDEG混入ワインが発見されているが，日本国内では先の13.9g／l が他の機関の検査結果も含めて最高値であった．

また，日本のM社製のワインはTable 5．に示したようにいずれも貴腐または氷果であり，最高値2.7g／l，最低値1.22g／l であり，いずれも1g／l を超えていた．後日の調査で，オーストリア産バルクワインを一部ブレンドし，ビン詰したことが明らかとなった．

日本国内で発見されたDEG混入ワインは，厚生省発表のリスト（衛食第125号）によると，外国産74銘柄，国内産7銘柄であるが，このうち当科で判明したものが全体の84％を占めていた．また，これらの中には西ドイツ，オーストリア政府が発表したリストに記載されてないものが多数あった．これについてはリストが急造のものであり，またDEGが0.1g／l 以下のものは危険性がないと判断し除外されたという報道もあったことから，リストに漏れたものが発見されたと考えられた．いずれにしても混乱の中での集計であったため，詳細は不明のままとなっている．

2）DEGの混入濃度

外国産のものについて，DEGの混入濃度と検出数の関係をFig. 4．に示した．検出数の多いものは0.01～0.05g／l で39検体，全体の47％であり，次いで1.0～5.0g／l が16検体，19％であった．また，5g／l 以上が5検体，6％であった．

1.0g／l 以上の高い混入量を示したワインは全体の25％であり，このように高頻度に高濃度のものが検出されたことは，甘口の高級ワインを仕立てるために，DEGを混入したということを証明している．ワインは風味，まろやかさや厚みなどを調和するためにブレンドするが，今回の結果から元の原酒中にいかに多量のDEGが混入していたか想像される．また同時に，西ドイツで伝えられた49g／l のものがあっても不思議ではないと考えられた．

Table 5．国産ワインの混入量

銘柄	収穫年	内容量	混入量(g/l)
貴腐ワイン(M)	1978年	720ml	1.80
	1979	180	1.98,2.50
	1980	180	2.65,2.68,2.71
氷果ワイン(M)	1980	180	1.22,1.22
	1981	180	1.66,2.06
氷果ワイン	1981	180	1.26

一方，0.01～0.05g／l のものは，イタリア産の23検体が全て含まれている．これは西ドイツやオーストリアの場合と違った傾向であり，使用目的に相違があると考えられる．すなわち，ワインの樽の乾燥防止用，あるいはコルク栓を湿潤させビンと馴ませるために使われたと考えられる．しかし，現在までのところ実状は不明である．

3）同一銘柄におけるDEG混入量の違い

同一銘柄のワインで，DEG混入量が違うものをTable 6．に示した．No. 1～6は外国産，No. 7～10は日本のM社製であるが，No. 5は1.7倍，No. 6は4倍と同一銘柄でありながら，DEG混入量に大きな差があるものが見つかった．

通常，ワインは何種類かの原酒をブレンドし，味や香り等の調和を計っている．今回の結果はロットの標示が明確でなく，ロット差があったのか確認できなかったが，恐らくその相違がDEG混入量の差に現われたと考えられる．いずれにしても，特定銘柄のもつ特有な風味は一部人為的要素が加わることは明らかであり，ワインの神秘性に対して疑問を投げかける結果となった．

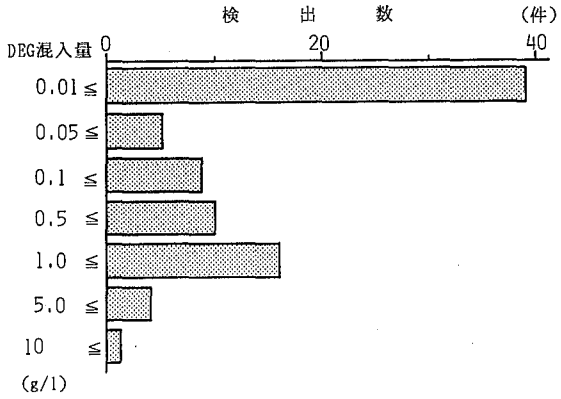


Fig. 4．外国産ジエチレングリコール混入ワインの濃度別検出数

4）収穫年と検出数

DEG 混入ワインを収穫年代別に分けたものを Table 7．に示した．

年代別では，1977年を除き1976年から1984年まで毎年検出されており，いかに長年にわたり DEG の混入が行なわれてきたかを，うかがい知ることができた．また，最も検出数の多いものは，オーストリア，西ドイツ産のもので1983年産17銘柄，次いで1982，1981，1979年産の順であった．

最も古い1976年産は，西ドイツの生産，ビン詰されたワインで，DEG の混入量は0.21，0.49g／l と比較的低濃度であった．また，高濃度13.9，8.87g／l のものは，1979，1978年産であった．1 g／l 以上の混入ワインは1983年産 5 件，1981年産 4 件，1982年産 2 件と1981～1983年産に集中していた．

Table 6．同一銘柄におけるジエチレングリコールの検出量

銘 柄	検出量 (g/l)		銘 柄	検出量 (g/l)	
	1	2		1	2
1	0.01	0.02	6	0.88	3.52
2	0.02	0.03	7	1.24	1.80
3	0.04	0.08	8	1.66	1.80
4	0.37	0.38	9	1.98	2.50
5	0.52	0.86	10	2.65	2.68

No. 1～No. 6：外国産，No. 7～No.10：日本産

西ドイツ政府のリストは，1977年を除き1976年から1984年まで，オーストリア政府のものは，1981年から1984年までのものが挙げられている．また，西ドイツ分では1983年産が最も多数挙げられているが，今回の結果も同じ傾向を示した．1977年産の西ドイツワインは天候不順で良質ブドウが収穫できず，ワイン業者間では品質が低く評価されている[21,22]．このことから，1977年産は高頻度に DEG 混入ワインが検出されると推察されたが，今回の結果や先のリストでも発見されず不思議に思われた．しかしこれらの原因については明らかにされていない．

5）ワインの種類及び等級と検出数

DEG 混入ワインを種類別に分けると，白ワイン59銘柄，赤ワイン13銘柄，発泡ワイン 1 銘柄，フルーツワイン 3 銘柄であった．このうち，白ワインではイタリア産 1 銘柄以外はオーストリア，西ドイツ，日本産であった．また赤ワインではオーストリア産 1 銘柄以外は，すべてイタリア産であった．発泡ワインではイタリア産，フ

Table 7．ジエチレングリコール混入ワインの年代と検出数

収穫年	オーストリア[1)] /オーストリア	オーストリア /西ドイツ	西ドイツ /西ドイツ	イタリア /イタリア	オーストリア /日本	計
1976			2			2
1977						0
1978	2	1		2	1	6
1979	2	1	4		1	8
1980		4		1	2	7
1981		6	2	1	2	11
1982	4	3	3	2		12
1983	4	10	3	7		24
1984		1	1			2
不明	3			1		4

1）産地／ビン詰地，同一銘柄のワインは除く．

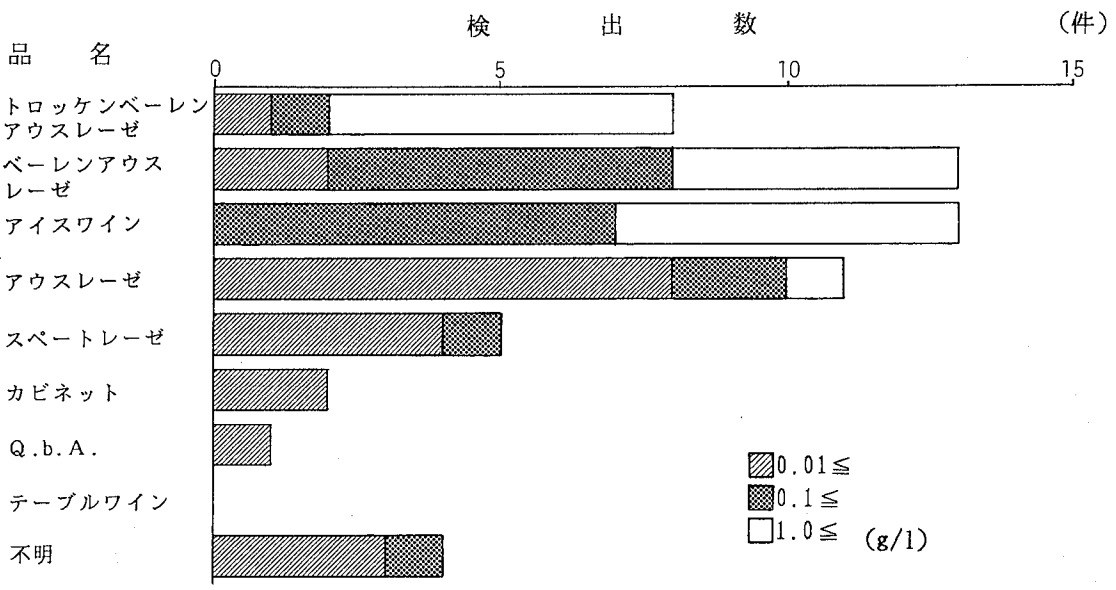


Fig. 5. オーストリア，西ドイツ産ワインの等級とジエチレングリコールの濃度別検出数

ルーツワインではいずれもオーストリア産であった．

ドイツワインは原料ブドウの糖含量等から，厳密に格付されている[18,22]．すなわち大別するとターフェルワイン（普級酒）とクアリテーツワイン（高級酒）に分けられ，また後者は指定栽培地域ワイン（QbA），肩書き付きワイン（QmP）に分けられる．QmP はブドウのつむ時期や熟度により①カビネット，②シュペートレーゼ，③アウスレーゼ，④アイスワイン，⑤ベーレンアウスレーゼ，⑥トロッケンベーレンアウスレーゼの6段階に分けられる．③～⑥は食後などに，ゆっくりと楽しむ甘口のデザートワインである．

そこで，これらの等級に従って，西ドイツ，オーストリア産の DEG 混入ワインを分類したところ，Fig. 5. に示す結果となった．

アイスワイン及びベーレンアウスレーゼが銘柄の中では最も多く，次いでトロッケンベーレンアウスレーゼであり，いずれも極甘口に相当する銘柄であった．また，1 g／l 以上の DEG 混入ワインが多数みつかったのは，最高級の極甘口のトロッケンベーレンアウスレーゼであった．

DEG は単味では 5 %以上の水溶液で，初めの甘味とその後の苦味を感じるが，今回の結果の最高混入量 13.9g／l（1.39%）をワインに加え味覚試験を試みた場合には，その効果を認めることができなかった．

終りに，今回の事件は今だに予期しない化学物質の混入した食品が，市場に出回る可能性のあることを示唆するものであった．また，輸入食品などの安全性に対して，消費者の不安を募らせ，同時にブドウだけで丹念に味を整え，年代や地方がことのほか大切にされてきたワインの信頼性を失なわせる結果となった．一方，厳重な検査体制の維持と新たな検査方法（パターン分析など）の確立の必要性，並びに多方面からの情報収集の重要性などが指摘された．

ま と め

昭和60年 7 月から約 2 ケ月におよび国内を騒然とさせた DEG 混入ワイン事件について，その概要をまとめ報告した．

1．DEG の分析法について

エキストレルートカラムで精製後，GC 法で測定する方法を検討した．GC 用充塡カラムは20% PEG 20M，20% FFAP が分離及び再現性ともに良好であった．回収率は20，200，2000 μg／ml の DEG の添加で，96.9，97.9，100.4%であった．本法の検出限界は0.01g／l であった．

2．DEG 混入ワインについて

疑惑ワイン648検体中95検体から DEG が検出した．銘柄数は76，産出国はオーストリア，西ドイツ，イタリア，日本（M社）であり，その中でもオーストリア産／西ドイツビン詰のものが全体の31%を占めた．最大混入量は 13.9g／l，次いで8.87，5.92g／l であり，いずれも極甘口の白ワインであった．

1 g／l 以上の混入のものは21銘柄25%，0.01～0.05g

／lのものが39銘柄47％であった．イタリア産はいずれも0.01～0.05g／lであった．収穫年別では最も古いものは，1976年であり，1981～1983年産に多数集中していた．

日本のM社製ワインはいずれも貴腐または氷果の銘柄で，6銘柄11検体からDEGが検出され，その混入量は1.22～2.71g／lであった．

文　献

1）既存化学物質データ要覧，第1巻，一般化学品編，2-80,1974，海外技術資料研究所

2）後藤　稠，池田正之，原口一郎：産業中毒便覧，増補版，775,1978，医歯薬出版㈱

3）Browaring,E.: *Toxicity & Metabolism of Industrial Solvents*, 624,1965, Elsevier Publishing co., Amsterdam

4）Habs,H. and Habs,M.: *Deutsche Apotheker Zeitung*, 125,1891,1985

5）MelonJ.M. and Thomas,J.: *Agressologie*, 14,357,1973

6）Leech,P.N.: *J.Am.Med.Assoc.*, 109,1531,1937

7）Geiling,E.M.K. and Cannon,P.R.: *Ibid.*, 111,919,1938

8）Bowie,M.D. and Mckenzie,D.: *S.Afr.Med.J.*, 46, 931, 1972

9）Lehmann,G. and Ganz, J.: *Z.Lebensm. Unters. Forsch*, 181,362,1985

10）Führling,D. and Wollenberg,H.: *Deut. Lebensm. Rundschau*, 81,325,1985

11）Littmann,S.: *Deut. Lebensm. Rundshau*, 81,328,1985

12）Werkhoff,P. and Bretshneider,W.: *Z.Lebensm. Unters Forsch.*, 182,298,1986

13）松居正己：島津評論，43,41,1986

14）達家清明，末兼幸子，小沢正江：日本食工誌，33，195,1986

15）堀　義宏，長南隆夫，西沢　信：食衛誌，27,187,1986

16）松原　博，小倉俊彦：日本食品衛生学会　第51回学術講演会要旨集，62,1986，東京

17）野沢竹志，大石充男，平田恵子ら：日本食品衛生学会　第50回学術講演会要旨集，37,1985，新潟

18）有島成夫：食の科学，26,68,1975

19）島津善美，上原三喜夫，岡村　信，渡辺正澄：醸協，77,625,1982

20）乙黒親男，荻野　敏，渡辺正平：醸協，78,214,1983

21）The ワイン　新版，167,1983，読売新聞社

22）ワインの研究，別冊暮しの設計　No.11,1984，中央公論社

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 197-202, 1986

ワイン中の多価アルコール類の分析

野沢竹志*, 大石充男*, 平田恵子*, 大西和夫*,
西島基弘*, 坂井千三*

Analytical Methods for Polyalcohol in Wine

TAKESHI NOZAWA*, MITSUO OHISHI*, KEIKO HIRATA*, KAZUO OHNISHI*,
MOTOHIRO NISHIJIMA* and SENZO SAKAI*

Keywords：多価アルコール polyalcohol, ワイン wine, ジエチレングリコール diethylene glycol, エチレングリコール ethylene glycol, 2，3－ブタンジオール 2，3－butanediol, グリセリン glycerin, ガスクロマトグラフィー gas chromatography, 薄層クロマトグラフィー thin layer chromatography.

緒　言

1985年7月，オーストリア産ワインから，食品衛生法で不許可のジエチレングリコール（DEG）が検出される可能性があるとの情報が入り，著者らはその分析法の開発に着手した．

DEGは多価アルコールの一種であり，多量に摂取すると腎臓障害などの毒性を有することが知られている[1]．このDEGと味や毒性で類似したものにエチレングリコール（EG）がある．

また，ワインには2，3－ブタンジオール（2，3－BD），2－フェニルエタノール（2－PE）及びグリセリン（GL）などの多価アルコール類が存在し[2~4]，香りやとろみなど，風味に大きく関与している．

そこで，著者らはワイン中のDEGの他に，EG，2，3－BD，2－PE，及びGLについて系統的分析法の検討を行うとともに，これらの含有量を調査し，若干の知見を得たので報告する．

実験方法

1．試料　試料は昭和60年に東京都多摩地区で販売されていた白ワイン155検体，赤ワイン24検体及びロゼワイン12検体の合計191検体を用いた．

2．試薬　2，3－BD，過ヨウ素酸ナトリウム及びパラアミノジメチルアニリンは市販一級品を用い，その他の試薬は市販特級品を用いた．

多価アルコール標準原液：DEG，EG，2，3－BD，2－PE及びGLの標準品をそれぞれ500mg精秤し，水で50mlとした．

ガスクロマトグラフィー（GC）用標準溶液：標準原液をそれぞれ水で適宜希釈して一定量とした．なお，EGの定量分析を行う場合は80％アセトン－水溶液で希釈した．

薄層クロマトグラフィー（TLC）用標準溶液：EG，2，3－BD及びGLは標準原液をそれぞれ水で希釈し，濃度が0.3g／lとなるように調製した．DEGは標準原液をそのまま用いた．

セファデックスカラムの調製：DEAE－セファデックスA－25（ファルマシア社製）を0.5％アンモニア水に一昼夜浸漬した後，洗液が中性になるまで水で洗浄した．セファデックスを内径1.8cm×高さ30cmのクロマト管に高さが4cmとなるように充てんした．

TLC用発色試薬：A）ベンジジン2.8gをエタノール80mlで溶解後，水70ml，アセトン30ml及び1N塩酸1.5mlを順次加えた[5]．B）パラアミノジメチルアニリン0.34g及び塩化第一スズ0.76gを100mlのエタノールに溶解した[6]．TLC用展開溶媒：クロロホルム・アセトン・メタノール（4：1：1）を用いた．TLC板：HPTLC－キーゼルゲル60（10cm×10cm，メルク社製）を用いた．

3．装置　水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ：島津製作所K.K.製GC－7AG型（ガラスインサート使用），ガスクロマトグラフー質量分析計（GC-MS）：日本電子K.K.製JMS-D300型，インテグレーター：日

*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 Metoropolitan Research Laboratory of Public Health
16－25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan

本分光 K.K. 製 DP-L220型

4．ガスクロマトグラフ条件

〔カラム1〕 充てん剤：25%PEG－20M (Uniport HP, 60～80メッシュ，ガスクロ工業 K.K. 製)，カラム管：内径3㎜×長さ2m，カラム温度：170℃ (EG, 2,3－BD を対象とする場合)，200℃ (2－PE, DEG)，220℃ (GL)，注入口及び検出器温度：250℃，キャリヤーガス：N_2, 50ml／min，注入量：2 μl

〔カラム2〕 充てん剤：10%FFAP (Chromosorb WAW, 60～80メッシュ，ガスクロ工業 K.K. 製)，カラム温度：170℃ (DEG)，その他の条件はカラム1と同様に行った．

5．ガスクロマトグラフー質量分析条件 キャリヤーガス：He，35ml／min，イオン化電圧：70eV，イオン化電流50μA，その他の条件はカラム2と同様に行った．

6．GC 用試験溶液の調製 ワインはそのまま，または水で適宜一定量に希釈したものを試験溶液とした．

EG の存在が疑われる場合は，試料10ml を採り，2%水酸化ナトリウム溶液で PH7.0とした後，あらかじめ作成した DEAEーセファデックスカラムに注入した．流出液をとり，さらに水30ml を流し，流出液をさきの溶液と合わせ，これに0.01Mリン酸溶液を加えて，PH7.0とした後45℃で約2ml まで減圧濃縮した．濃縮液にアセトンを加え10ml とした．約30分放置し，上澄液を GC 用試験溶液とした．

7．GC による定量 同時に作成した検量線から，ピーク面積法により定量した．

8．TLC による確認 ワイン及び TLC 用標準溶液10μl を TLC 板に塗布し，約7㎝まで展開した後，乾燥し，以下の発色法A及びBにより発色させた．

発色法A：石川ら[5]の方法に準拠し，0.1%過ヨウ素酸ナトリウム溶液を噴霧し，乾燥した後ベンジジン試薬を噴霧した．

発色法B：Zweig ら[6]の方法に準拠し，パラアミノジメチルアニリン試薬を噴霧した後120℃で約1時間加熱した．

それぞれの Rf 値及び色調は標準品と比較し，同定した．

結果及び考察

1．GC 条件の検討 検査対象とした多価アルコール類を分析するために，クロモソルブ101[2]，10%Ucon oil LB 550X[3]，テナックス GC，10%FFAP 及び25%PEG－20M など，多価アルコール類の分析に適していると考えられる充てん剤を検討した．クロモソルブ101，10% Ucon oil LB 550X 及びテナックス GC は DEG と EG とも，ワイン中の成分との分離，感度あるいはテーリングの点で不適当であった．

また，10%FFAP では，DEG はワインの成分と良く分離されるが，EG のピークがブロードとなった．したがって，FFAP はワイン中の DEG のみを対象とする場合は良好な充てん剤であった．

25%PEG－20M は今回対象とした，いずれの多価アルコールもピークの形，感度及び相互分離の点で良好な結果を示した．なお，液相は5%に比較して，25%が分離の点で優れていた．

25%PEG－20M を用いた場合，対象とした多価アルコールの沸点に大きな差があるため，一定のカラム温度では，5種類の多価アルコールを同時に分析できなかった．昇温分析が適していると考えたが，昇温分析は保持時間の再現性及びベースラインの安定性に問題があった．そこで，EG 及び2,3－BD を測定する場合は170℃，2－PE 及び DEG は200℃，GL は220℃で測定することとした．それぞれのクロマトグラムは図1～3に示す通

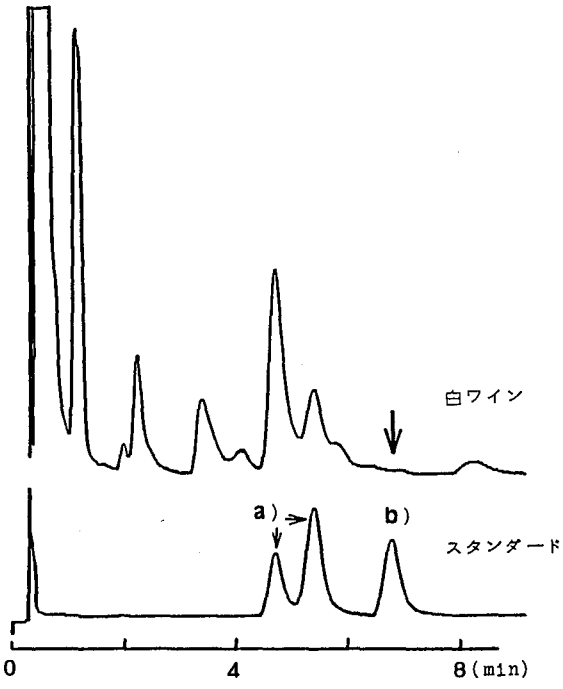


図1．白ワインの2,3－ブタンジオール及びエチレングリコールのガスクロマトグラム
a) 2,3－ブタンジオール b) エチレングリコール 充てん剤：25%PEG-20M, カラム温度：170℃

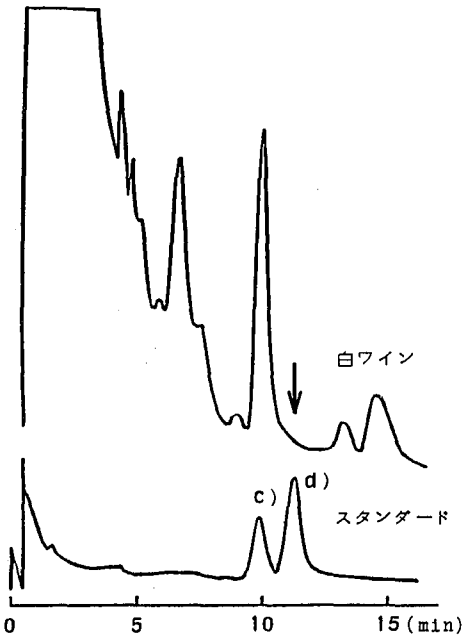


図2．白ワインの2－フェニルエタノール及びジエチレングリコールのガスクロマトグラム
c）2－フェニルエタノール　d）ジエチレングリコール 充てん剤：25％PEG-20M，カラム温度：200℃

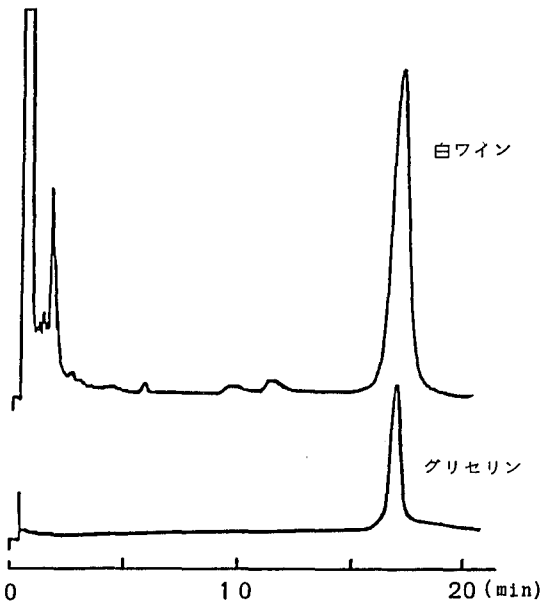


図3．白ワイン及びグリセリンのガスクロマトグラム
充てん剤：25％PEG-20M，カラム温度：220℃

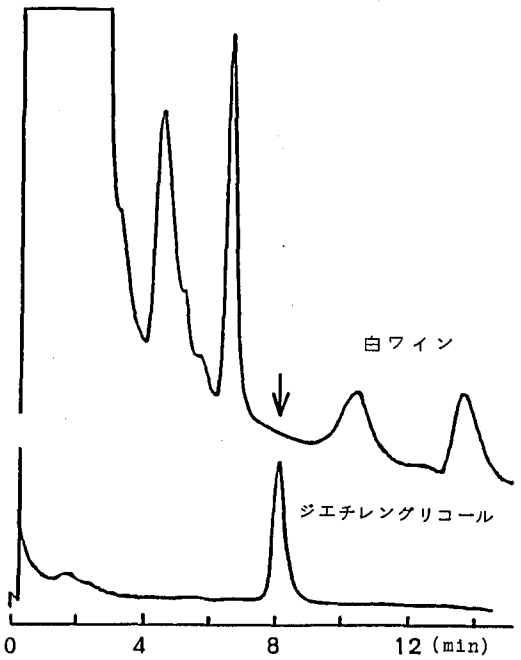


図4．白ワイン及びジエチレングリコールのガスクロマトグラム 充てん剤：10％FFAP(ChromosorbWAW)，カラム温度：170℃

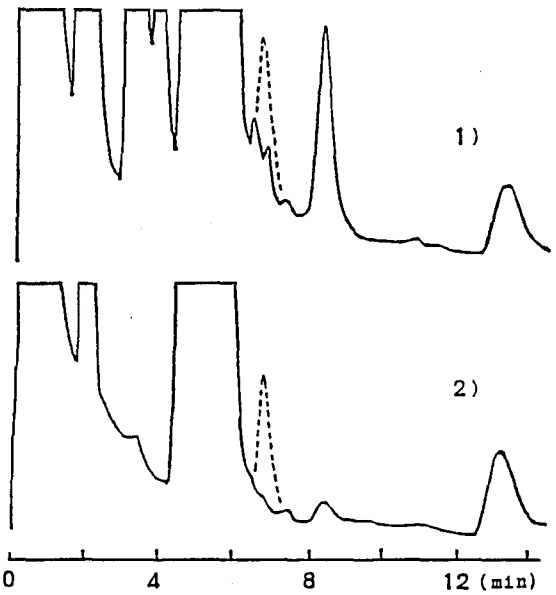


図5．DEAE－セファデックスカラムによるワイン中の妨害物質の除去
1）未処理のワインのガスクロマトグラム
2）セファデックスカラム処理をしたワインのガスクロマトグラム……はエチレングリコールの位置を示す

り，良好な結果が得られた．また，10%FFAPを用いた場合のクロマトグラムを図4に示した．

なお，EGを25%PEG－20Mで定量する場合，分離及びテーリングなどの点で，ロットによる差がみられたので，あらかじめそれらの点を確認しておく必要があった．また，試料を直接GCに注入すると，ゴーストピークが出現したが，試料を80%アセトン溶液とすることにより，ゴーストピークは消失した．

試験溶液を直接GCに注入する場合，注入口部分に糖が炭化して黒く付着するので，カラム保持のため，ガラスインサートを用いることとした．

2．ワイン中の妨害物質の除去　EGの保持時間の付近に妨害物質の小さなピークが観察される場合があった．

その妨害物質を除去するため，有機溶媒による抽出，フロリジル，ポリアミド，DEAE－セファデックスA－25，ダウエックスWGR及びダウエックス50Wなど，種々の吸着剤及びイオン交換樹脂による処理方法を検討した．

その結果，DEAE－セファデックスA－25カラムを通すことにより，図5に示すように，妨害ピークを除去することができた．

EGをワインに50ppm及び300ppmとなるように添加し，本法により分析した結果，回収率は96～106%と良好な結果を示した．

3．検量線及び検出限度　2－PEは0.005～0.13g／l，DEGは0.01～0.4g／l，EGは0.02～0.4g／l，2，3－BD及びGLは0.1～1.2g／lの範囲でいずれも直線性を示した．

また，2，3－BDは異性体があり[2]，PEG－20Mでは2つのピークに分離した．そこで，2つのピークの和を2，3－BDの量とした．

検出限度は2－PEが0.003g／l，DEGが0.01g／l，EGが0.02g／l，2，3－BD及びGLが0.05g／lであった．

4．TLCによる確認　GCの他に，TLCによる確認を行った．TLC板には，HPTLC－キーゼルゲル60を用い，展開溶媒としてはクロロホルム，アセトン，酢酸エチル，メタノールなどを用いて，それらの混合比を種々検討した．

その結果，クロロホルム・アセトン・メタノールの比を4：1：1としたものを用いたところ，図6に示すように4種類の多価アルコールを短時間で相互分離することができた．発色法Aを用いると，GLは青色のバックに黄色のスポット，他の多価アルコール類は白色のスポットが得られた．GL，EG，DEG及び2，3－BDのRf値はそれぞれ0.26，0.48，0.55及び0.68であった．

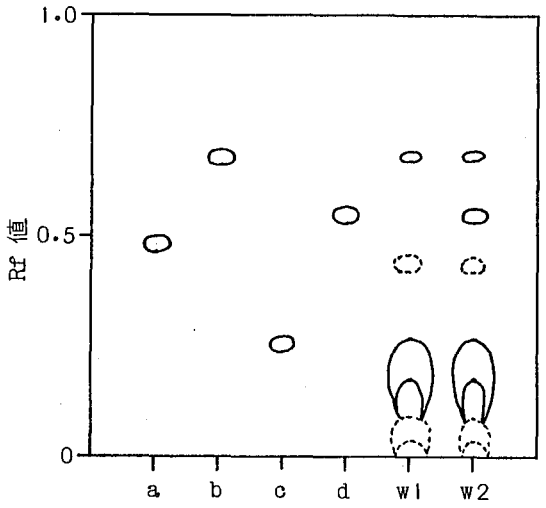


図6．ワイン及び多価アルコール類の薄層クロマトグラム
a）エチレングリコール
b）2，3－ブタンジオール
c）グリセリン
d）ジエチレングリコール
W1）ワイン
W2）ワイン（ジエチレングリコール検出）
TLC板：メルク社製HPTLC－キーゼルゲル60，展開溶媒：クロロホルム・アセトン・メタノール（4：1：1），発色法A：ベンジジン－過ヨウ素酸試薬

確認限度はEG，2，3－BD及びGLが0.03g／l，DEGが5.0g／lであった．DEGの感度が低いので，発色法Bを用いたところ，DEGは赤紫色のバックに白色のスポットが得られた．確認限度は0.1g／lと良好であった．DEG以外の多価アルコールでは発色法Aの方が発色法Bより，10倍以上高感度であった．2－PEは発色法A，Bいずれを用いても発色しなかった．

5．ワイン中の多価アルコールの分析結果　ワイン中の多価アルコールの含有量を表1に示した．2－PEは白ワインに，2，3－BDとGLは赤ワインにそれぞれ比較的多く含まれていた．これらの結果は，篠原ら[2]の報告とほぼ一致した．また，DEGは白ワイン155検体中4検体から検出された．

PEG－20MカラムでDEGを検出したワインについては，厚生省の事務連絡による方法[7]により，試験を行ったところ，ほぼ一致した値を得た．さらにGC－MSに

表1．ワインの多価アルコール類の分析結果(g／l)

ワインの種類	2－フェニルエタノール 範囲(平均値)	2,3－ブタンジオール 範囲(平均値)	グリセリン 範囲(平均値)	ジエチレングリコール 測定値
白ワイン	n＝13 0.01～0.13(0.07)	n＝13 0.17～0.66(0.40)	n＝13 4.31～11.68(7.87)	n＝155 0.16 0.44 1.80 2.60
ロゼワイン	n＝12 0.02～0.04(0.03)	n＝12 0.16～0.56(0.36)	n＝12 5.51～8.80(6.43)	n＝12 ND
赤ワイン	n＝10 0.03～0.05(0.04)	n＝10 0.41～0.83(0.59)	n＝10 8.03～11.04(9.15)	n＝24 ND

n：試料数
ND：検出せず

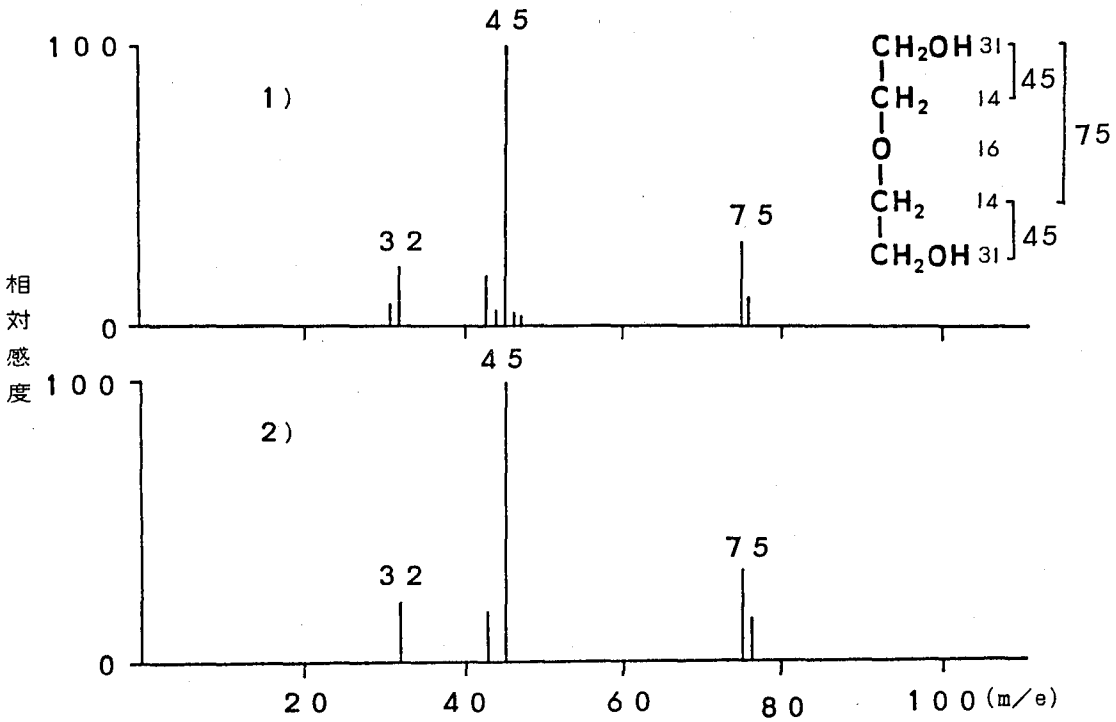


図7．ジエチレングリコールのマススペクトル
1）ワイン中のジエチレングリコール　　2）ジエチレングリコール

より確認した結果，図7に示すように，DEGのスタンダードのマススペクトルとよく一致した．

また，いずれの検体からも，EGは検出されなかった．

ま と め

ワイン中のDEG，EG，2，3－BD，2－PE及びGLなどの多価アルコール類の分析法を検討した．さらに，その分析法を市販ワインの検査に応用し，次の結果を得た．

1）GCによる分析　充てん剤として，25%PEG－20Mを用い，3段階のカラム温度で行うことにより，対象とした多価アルコール類のすべてを分離することができた．ワインを直接GCに注入して分析し，EGが混入している疑いのある場合は，妨害物を除去するためにDEAE－セファデックスカラム処理を行う必要がある．

2）TLCによる確認　TLC板はHPTLC－キーゼルゲン60，展開溶媒はクロロホルム・アセトン・メタノール

（4：1：1）を用いることにより，4種の多価アルコールを分離できた．発色剤として，ベンジジン－過ヨウ素酸試薬及びパラアミノジメチルアニリン－塩化第一スズ試薬を用いることにより，EG，2，3－BD及びGLは0.03g／l，DEGは0.1g／lまで確認が可能であった．

3）検査結果　ワイン35検体を検査したところ，2－PEは0.01～0.13g／l，2，3－BDは0.16～0.83g／l，GLは4.31～11.68g／l含有されていた．DEGは191検体中4検体より，0.16～2.6g／lの範囲で検出された．また，EGはいずれの検体からも検出されなかった．

（本研究の概要は日本食品衛生学会第50回学術講演会1985年10月で発表した．）

文　献

1）後藤　稠，池田正之，原　一郎編：産業中毒便覧，775，1977，医歯薬出版

2）篠原　隆，渡辺正澄：*J. Brew. Soc. Japan*, 71, 888, 1976

3）Postel, W., Adam, L. and Rustler, M. : *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 78, 170, 1982

4）岩野君夫，佐藤俊一，水野昭博，高原康生，佐野英二，木崎康造，辻　邦司，梅田紀彦，戸塚　昭，川島　宏：*J.* Brew. *Soc. Japan*, 76, 778, 1981

5）石川正幸，原　昭二，古谷　力，中沢泰男編：薄層クロマトグラフィー，203，1972，南山堂

6）Zweig, G., Sherma, J. : *Hand Book of Chromatography*, 126, 1972, Chemical Rubber, Ohio

7）厚生省生活衛生局食品保健課：事務連絡（昭和60年8月20日）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 203-205, 1986

タウロコール酸のペクチンへの吸着

小関正道*, 安野哲子*, 荻野周三*, 風間成孔*

Binding of Taurochlate to Pectin

MASAMICHI KOSEI*, TETSUKO YASUNO*
SHUZO OGINO* and MASAYOSHI KAZAMA

The cholesterol lowering activity of pectin is described as due to binding of bile acids to pectin.We studied whether pectin-Ca complex could bind taurocholate *in vitro*, and found that 1 g of pectin could bind only about 3 mg of sodium taurocholate. Since its adsorption was as little as that of fibers in vegetables, taurocholate binding cannot be considered to bring about the main hypocholesterolemic effect of pectin.

Keywords cholesterol, pectin, bile acids, binding

諸　言

ダイエッタリーファイバーに，血清コレステロールを低下させる作用があることは，良く知られている[1]．なかでもペクチンやグアーガム等の水溶性ファイバーに，コレステロール低下力の強いものが多い．これらの作用機構として考えられているものには，胆汁酸のファイバーへの吸着，脂質の吸収阻害，消化酵素の作用阻害などがあげられる．

ペクチンについては，その胆汁酸吸着能に関心が持たれ，桐山らによってタウロコール酸の吸着実験がなされたが，吸着能なしという結果であった[2]．しかしその後，Nagyvaryらが動物実験の結果から，ペクチン・アルミニウムコンプレックスが，胆汁酸を吸着するという仮説を提唱し[3]話題となった．しかし日常の食事から相当量のアルミニウムを摂ることはむずかしく，コレステロールの低下をアルミニウムに期待することは実際的ではない．しかしカルシウムならば，牛乳等から十分に摂取することが可能であることから，陽イオンとしてカルシウムを用い，またペクチンも陽イオンとの結果部位の多いLow Metoxylペクチンを用いて，ペクチン－カルシウム系がタウロコール酸を吸着できるかどうか，*in vitro*の実験を行った．

実　験

試薬　タウロコール酸ナトリウム（以下TCと略す）は，半井化学㈱製．Low Metoxylペクチン（以下LMペクチンと略す）（GE-NU PECTIN Type LM-104 AS Degree of esterification ： 28%）は㈱富士商事から恵与されたものを，72%エタノールで5回洗浄し，エーテルで1回洗浄後に，真空・50℃で一夜乾燥し，単糖・少糖を含有していないことをTCLで確認した．その他の試薬は和光純薬製．バッファー ： KrebsRinger溶液から$CaCl_2$と$MgSo_4$を除いてPM 7.3に調製した．TC溶液 ： バッファーにTCを溶かし0.1%に調製した．カルシウム溶液：乳酸カルシウム（$C_6H_{10}O_6Ca \cdot 5\ H_2O$）をバッファーに溶かし，0.5～2.5%に調製した（この液2.5m*l*はカルシウム16.25～81.25mgを含有する）．ペクチン溶液 ： LMペクチンをバッファーに溶かし1～4%濃度に調製した．

装置　自記分光光度計：島津製作所㈱製UV-240

方法　100m*l*溶共栓付エルレンマイヤーフラスコに長さ45㎜の回転子を入れ，TC溶液2.5m*l*，ペクチン溶液25m*l*を入れて，マグネチックスターラーで30秒間高速で混合する．これにカルシウム溶液25m*l*を加え2分間高速で混合する（この系をTCの反応系とする）．これをNO5Aのろ紙又はJIS G 3のガラスろ過器によりろ過し，ろ液中のTCをErwinらの方法[4]により吸光度法で定量し，ペクチンに吸着されずに残ったTC量を求めた．

*東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

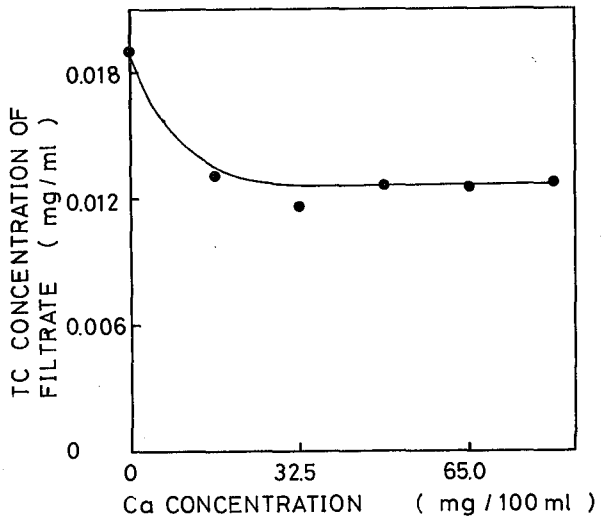


Fig. 1. Effect of Ca concentration in the reaction mixture on TC binding to pectin.The binding reaction and the TC assay were carried out as described in Experimental. TC in the filtrate not bound to pectin after the reaction was measured.

1 TC吸着に及ぼすカルシウム濃度の影響

2%ペクチン溶液を使用し，反応系のカルシウム濃度を16.25～81.28mg/100ml とし，カルシウム濃度がTCのペクチンへの吸着に及ぼす影響を調べた．

2 ペクチンのゲル化時期とTC吸着量

ペクチン溶液に，一定濃度範囲でカルシウムを加えると，ペクチンはゲル化する．従ってゲル化してからTCを加える場合とゲル化前にTCを加える場合，すなわちペクチン溶液にカルシウムを加えてからTCを加える場合とTCを加えてからカルシウムを加える場合とでの，ペクチンのTC吸着量を比較した．

3 ペクチン量の変化とTC吸着量

反応系溶液100ml 中のペクチン濃度を0.25～1.0%（添加するペクチン溶液濃度1～4%に相当）とし吸着実験を行い，ろ液の量とそのTC濃度から，ペクチンに吸着されたTC量を求めた．

4 反応時間とTC吸着量

反応系での反応を振とうしながら，37℃・0～6 hrの範囲に保ち，ペクチンへのTC吸着量の時間による変化を調べた。

結果と考察

1 TC吸着に及ぼすカルシウム濃度の影響

ペクチンへのTC吸着に及ぼすカルシウム濃度の影響は，Fig. 1に示す通り，カルシウムが16.25～81.25ml /100ml の範囲において，ほぼ一定であった．同時にこの範囲では，ペクチンはすべてゲル化していた．なおTC吸着量が一定であったので，以下の実験からはカルシウム濃度を32.5mg/100ml に固定して実験を行った．

Table 1. Effect of gelling time on TC binding to pectiin.

gelling time	TC concentration in the filtrate(mg/ml)[a]
before TC adding	0.0120±0.0004
after Tc adding	0.0115±0.002

a. Experiments were run five times.
b. TC concentration of control was 0.019 mg/ml.

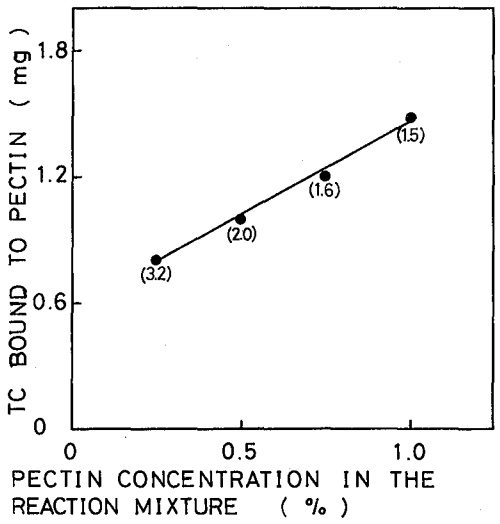


Fig. 2. Effect of pectin concentration on TC binding.TC bound to pectin was calculated as a difference between the TC residual in the filtrate and that of control.TC (mg) binding to 1 g of pectin was shown in the blanket.

2 ペクチンのゲル化とTC吸着量

人がペクチンを多量に摂るには，ゼリーとなっていることが望ましい．従ってゲル化後にもTC吸着能があるか否かが問題となる．そこでペクチンにカルシウムを加えてゲル化する時期を，TCを加える前後両方に設定し，TCの吸着量に差があるか否かを調べた．Table. 1に示すようにゲル化時期によるTCの吸着には差が見られず，ペクチンゼリーを食べた場合にも，小腸内でTC吸着が生じる可能性がある．

3 ペクチン濃度とTC吸着量

ペクチンに対するTCの吸着量は，Fig. 2に示す通り，反応溶液中のペクチン濃度0.25～1.0%の範囲で直線的に増大している．Fig. 2の（ ）内に示すようにペクチ

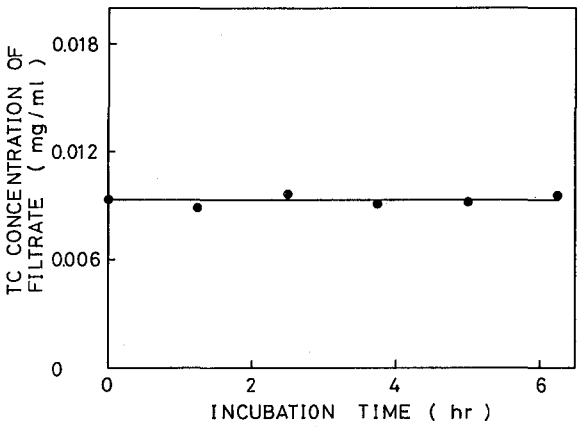


Fig. 3. Time course of the TC binding reaction with pectin.The mixtire was incubated at 37℃ with shaking.The control value of TC was 0.019 mg/ml.

ン1g当たりのTC吸着量は，ペクチン濃度0.25%の場合には3mgとなっている．この量は海老原ら[5]によって求められた，野菜のダイエッタリーファイバーの吸着量と同程度である．野菜のファイバーにはコレステロール低下力がほとんどないことが報告されている[5,6]ことから，ペクチンのコレステロール低下作用の主効果として，胆汁酸の吸着を考えることには無理がある．

4 反応時間・温度とTC吸着量

小腸とファイバーなどが混合されている時間は2時間程度なので，反応溶液を6時間インキュベートして，時間によるTC吸着の変化を見たが，TC吸着量には変化がなかった（Fig. 3）．この結果はEastwoodら[7]が行った，非水溶性ダイエッタリーファイバーのTC吸着が，時間と共に増大していった結果と異っており，彼らがhydrophobicな吸着と判断したものとは異なる吸着様式ではないかと考える．またNagyvaryらの主張するようなイオン吸着でもないということになるのではなかろうか．

Nagyvaryらはペクチンがアルミニウムと配位した場合の陰イオン吸着性に着目し，動物実験の結果から，ペクチン金属配位体の胆汁酸吸着力が，ペクチンのコレステロール低下作用であるという仮説を提唱した．しかし人が日常の食事から摂るアルミニウムの量が多いとは考えられず，わざわざアルミニウムを摂るぐらいなら，胆汁酸吸着力の強いコレスチラミンを服用する方が，コレステロール低下の目的にふさわしい．そこで今回アルミニウムではなく，カルシウムを用いた実験を行った．すなわちカルシウムならば牛乳から多量に摂取できること，またLMペクチンとカルシウムからデザートゼリーなどが作られていることから，アルミニウムよりカルシウムの方が望ましいと考えられるからである．さらにペクチンもNagyvaryらはHM（High Metoxyl）を用いたが，ここではLMを用いた．それはイオンの配位を考えた場合，LMの方が配位部位が多いことによっている．

従って今回の実験とNagyvaryらの実験との直接の比較はできないが，ペクチンカルシウム系のタウロコール酸吸着力が小さいことから，アルミニウムを添加しない通常の食事を考える場合，ペクチンによるコレステロール低下の主因を，胆汁酸の吸着に求めることは，無理であろう．

ペクチンの血清コレステロール低下作用の様式は，胆汁酸の吸着というよりも，unstired water layerの安定化，消化酵素作用の阻害，脂質ミセルの安定化による酵素作用からの保護等，多くの因子の複合作用であろう．その中で特に効果の高い因子を探し出すことが，他のファイバーの効果，食事の摂り方などを考える上で重要と言える．

文　献

1) Trowell, H., Burkit, D. and Heaton,K. : *Dietary Fibre-,Fibre-Depleted Food and Disease*,305,1985,Academic Press,London
2) Kiriyama, S., Enishi, A. and Yura,K. : *J.Nutr.*,104, 69,1974
3) Nagyvary, J. and Bradbury, E. L. : *Biochem. Biophys. Comm.*,77, 592,1977
4) Mosbach, E. H., Kalinsky, H. J., Halpern, E. and Kendoll, F. E. : *Arch. Biochem. Biophys.*,51, 402,1954
5) 海老原清，平尾昭彦，桐山修八：農化誌，52, 401, 1978
6) Jenkins, D. J. A., Reynolds, D., Leeds, A. R., Walker, A. L. and Cummings, J. H. : *Am. J. Clin. Nutr.*,32, 2430,1979
7) Eastwood, M. A. and Hamilton, D. : *Biochim. Biophys. Acta*,152, 165,1968

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 206-210, 1986

着香料中のジエチレングリコールモノエチルエーテル(カルビトール)の含量調査

広門雅子*, 中島和雄*, 植松洋子*, 髙橋巖,
松井敬子*, 風間成孔*

Survey of Content of Diethylene Glycol Monoethyl Ether (Carbitol) in the Flavouring agents

MASAKO HIROKADO*, KAZUO NAKAJIMA*, YOKO UEMATSU*, IWAO TAKAHASHI*
KEIKO MATSUI* and MASAYOSHI KAZAMA*

Keywords：ジエチレングリコールモノエチルエーテル diethylene glycol monoethyl ether, カルビトール carbitol, 着香料 flavouring agent

緒　言

昨年7月ワインのジエチレングリコール(以後DEGと略す)混入事件がおこり，輸入食品の安全性が疑問視されていた最中に，西独でイタリア製アイスフリーム用香料からジエチレングリコールモノエチルエーテル(カルビトール)が検出されたとの報道があった．

イタリアおよびオランダにおいては許可されているが，わが国では許可されていない溶剤である．カルビトールの致死量(LD_{50})は6.5g／kg(経口，ラット)[1]，0.9g／kg(静脈，ウサギ)[1]であり，DEGのLD_{50}の14.8g／kg(経口，ラット)[1]，2g／kg(静脈，ウサギ)[1-2]と比較すると急性毒性の強さはDEG以上である．またDEGのFAO／WHO(JECFA)における毒性評価[3]はCリスト(使用すべきではない)に分類され，カルビトールの毒性評価[3]はいまだ終了していない．

厚生省および都衛生局で輸入業者を割出し調査した結果，イタリアからの輸入香料に最高数%入っていることが判明した．その後，イタリア製品以外の香料からも検出されたことが判り，東京都では特別区と協同して，都内の輸入，製造および販売業者の特別監視を実施することになり，著者らは収去された27社の着香料109検体中のカルビトール含量を分析することとなった．

カルビトールの香料溶剤としての効果が認められる量を最低1%と考え，多種の香料で調合される調合香料や食品添加物等で希釈される香料製剤を考慮し，1／100の安全率を乗じた値，100 ppmを混入量の限度と設定し，100 ppm以上確認された試料について定量を行ったのでこの結果について報告する．

実験の部

Ⅰ．試料　昭和60年10月から61年2月の間に食品監視課および特別区から当所に送付された着香料109検体で，その内訳は，チョコレート系21検体，レモン系11検体，オレンジ系10検体，バニラ系8検体，ココアおよびコーヒー系それぞれ7検体，ミルク系5検体，ストロベリー，メロンおよびグレープフルーツ系それぞれ4検体，バター系3検体，パイナップル，アップル，ピーナッツおよびココナッツ系それぞれ2検体，その他17種17検体であった．

Ⅱ．試薬　1．カルビトール　東京化成　純度98%以上　2．カルビトール標準溶液A　カルビトールを100 mgとりジクロルメタンに溶かし全量100 *ml*とし標準原液とした．この原液をさらにジクロルメタンで希釈し，20 μg／*ml*の濃度とした．3．カルビトール標準溶液B　カルビトールを100mgとり水で溶かし全量100 *ml*とし標準原液とした．この原液をさらに水で希釈し，20 μg／*ml*の濃度とした．4．その他の試薬　JIS特級品を用いた．

Ⅲ．装置および測定条件

1．ガスクロマトグラフ(GC)：島律GC-7AおよびGC-9A(検出器FID)；カラム，20% PEG 20 M／Uniport HP, 80-100メッシュ，3 mm×3m；カラム温度，140°；注入口温度，200°；N_2流量，32*ml*

*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

2．高速液体クロマトグラフ(HPLC)：日本分光 TRIROTAR－Ⅵ；カラム，Shodex Ionpack C-811，8㎜×50㎝；移動相，0.1％リン酸；流速，0.5m*l*／min；検出器 Shodex RI SE－51

3．GC-マススペクトロメーター(GC-MS)：ヒューレットパッカード5710 A 型－日本電子 JMS D-300；カラム，20％ PEG 20 M／Uniport HP，80-100メッシュ，2㎜×2 m；カラム温度，140°；注入口温度，250°；イオン源温度，250°；イオン化，EI 70 eV；He，30m*l*／min

Ⅳ．操作法

1．定性法 (1)第一法(スクリーニングテスト) エッセンスおよびフレーバー等の水溶性試料は1ｇをとりメタノールに溶解し，必要あればろ過したのち，メタノールで全量5 m*l*とし試料液(W)とした．オイルおよびオレオレジン等の油溶性試料は1ｇをとりジクロルメタンに溶解し，必要あればろ過したのち，ジクロルメタンで全量5 m*l*としこれを試料液(O)とした．HPLC用は油溶性試料1ｇをとり水5 m*l*を加えてよく振とうしたのち，水層を分離して用いた．

各試料液および標準溶液Aそれぞれ5 μlずつをGCに，各試料液および標準溶液Bそれぞれ50 μlずつをHPLCに注入し，試料液のカルビトールのピーク高を標準液のそれと比較した．(2)第二法 水溶性試料は1ｇをとり水24m*l*に溶解し，一方油溶性試料は1ｇをとりn-ヘキサン100m*l*に溶解したのち，それぞれ300m*l*の分液ロートに移し，前者の場合は，分液ロートにn-ヘキサン100m*l*を加え，後者の場合は水25m*l*を加えて約3分間振り混ぜ，約30分間静置したのち水層を分取した．各水層を塩化ナトリウム(NaCl)約9ｇで飽和したのちジクロルメタン60m*l*を加えて約3分間振とう抽出し，約30分間静置したのちジクロルメタン層を分取した．水層にジクロルメタン60m*l*を加え同様に操作し，ジクロルメタン層を前の抽出液に合わせた．なお抽出の際に分液ロートの口および栓に付着したNaClは出来るだけ少量の水(10m*l*以下)で洗い込み，NaClをさらに追加して水層を飽和させて抽出した．またエマルジョンを生じた時は遠心分離を行った．合わせたジクロルメタン抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水したのち，乾固させないよう40°以下で減圧濃縮したのちジクロルメタンで5 m*l*とし，これを試料液(E)とし第一法と同様にGC測定を行った．HPLCの場合は乾固寸前まで濃縮したのちメタノールで5 m*l*としこれを試料液(E)とし第一法と同様に測定した．

(3)GC-MSによる同定 第一法および第二法により100 ppm以上確認された試料液についてGC-MSにより同定を行った．

2．定量法 スクリーニングテストでGCおよびHPLC上に妨害ピークがなく100ppm以上のカルビトールが確認された試料は，約1ｇを正確にとり試料液(W)または(O)と同様に調製し，妨害が認められた試料は，約1ｇを正確にとり試料液(E)と同様に調製したのち，カルビトールの濃度がGC用には50～500 μｇ／m*l*，GC-MS用には20～100 μｇ／m*l*になるようジクロルメタンで希釈し，HPLC用には20～500 μｇ／m*l*になるようメタノールで希釈し定量用試料液とした．

定量用試料液5 μlをGCまたはGC-MSに，50 μlをHPLCに注入した．

検量線用標準溶液は定量用試料液中のカルビトールの濃度に合わせて標準原液を適宜希釈したのち，試料液と同様にGC，GC-MSまたはHPLCで測定し，その面積またはピーク高からそれぞれ検量線を作成し試料中のカルビトールの含量を求めた．なおGC-MSの場合は，フラグメントイオンのm/z 72とm/z 104を用いマスフラグメントグラフィを行った．

結果および考察

Ⅰ．香料中のカルビトールの検出レベルの設定

輸入香料にカルビトールが使用されたとすると，溶剤として効果が認められる量は少くとも1％以上であると考え，輸入後他の香料や溶剤等でかなり希釈されたとしても，希釈倍率は100倍以下であると考え，1％の1/100倍量の100ppmをカルビトールの混入限度とし定性の検出レベルを100ppmと定めた．

なお香料をアイスクリーム等の食品に使用する際にはさらに100倍以上に希釈して用いるとのことから，食品中では1 ppmよりはるかに低くなると考えられる．食品中からの検出限界が10ppmであることから，この限度は妥当であると考えた．

Ⅱ．定性（第一法：スクリーニングテスト）に及ぼす溶剤の影響

スクリーニングテストでは試料を溶解したのち直接GCまたはHPLC測定を行うため，香料の常用溶剤として使用されるエタノール，プロピレングリコール(PG)およびグリセリン等の妨害が考えられた．3種の溶剤およびカルビトールについてGC測定を行ったところ，沸点および極性が類似しているPG[4]のピークがカルビトールのピークの保持時間に最も近かった(Fig.1)．カルビトールの確認を妨害するPGの濃度はカルビトールが100 ppmのとき50,000ppm（5％）以上であった．従ってPGが主溶剤（5％以上）のフレーバー類等の測定には

GC は適さないと言えた．一方，HPLC のクロマトグラム上には PG の妨害はなかったが，エタノールの妨害が認められ(Fig.2)，エタノールが主溶剤のエッセンス類の測定には HPLC は適さなかった．従って GC と HPLC を組み合わせてスクリーニングテストを行う必要があった．

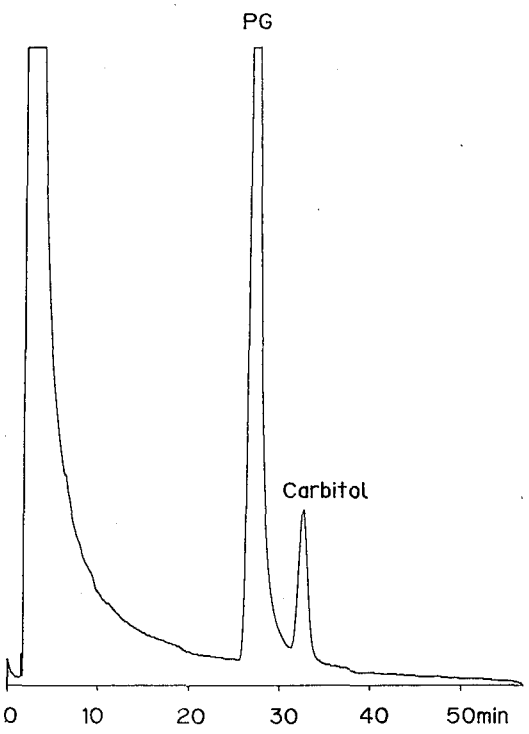


Fig. 1．GC Chromatogram of Carbitol and Propyrene Glycol

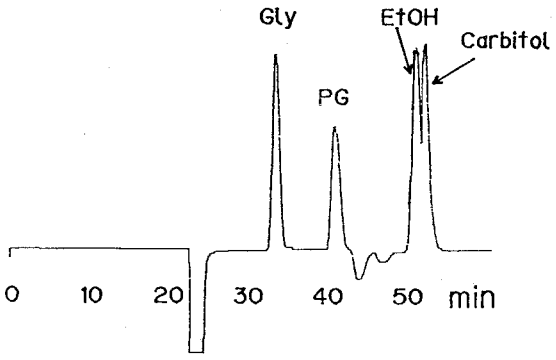


Fig. 2．HPLC Chromatogram of Calbitol and Other Solvents
Gly：Glycerine, EtOH：Ethanol
PG ：Propyrene Glycol

Ⅲ．定性（第二法）における抽出溶媒の検討

スクリーニングテストで妨害が認められた検体については前処理を行う必要があり，溶媒抽出法を検討した．昭和60年９月３日付の厚生省事務連絡報「アイスクリーム原料食品中のジエチレングリコールモノエチルエーテルの検査法」では，加水分解した後，ジクロルメタン抽出を行っているが，操作が繁雑なので神奈川県衛生研究所の n-ヘキサンで脱脂した後，ジクロルメタン抽出を行う方法を採用した．抽出溶媒としてカルビトールに極性が近い酢酸エチルも良いのではないかと考え，ジクロルメタンと酢酸エチルの比較を行った．

食塩で飽和した水溶液15，25，30，35m*l* にそれぞれカルビトール100μg を添加し，ジクロルメタンおよび酢酸エチル60m*l* で抽出した時の抽出率を比較したところ，ジクロルメタンの場合は，15，25m*l* の水層からほぼ100%，30，35m*l* の水層から78%抽出できた．酢酸エチルの場合は15m*l* の水層からほぼ100%抽出できたが，25m*l* で85%，30および35m*l* では67%と低下した．試料を溶かし分液ロートに移す時，水が最低25m*l* 必要であることから，水層25m*l* からの抽出率がほぼ100%であったジクロルメタンの方が良好であることが判った．

次に PG がカルビトールの抽出に影響を及ぼすかどうかを検討した．カルビトール100μg を含む飽和食塩水24m*l* に PG 1 mg／m*l* 溶液 1 m*l*(カルビトールの10倍量に相当)および10mg／m*l* 溶液 1 m*l*(カルビトールの100倍量に相当)をそれぞれ加え，ジクロルメタン60m*l* で２回抽出した時のカルビトールの抽出率は，PG 10倍添加では91.9，90.7，90.2%(平均93.3%)，100倍添加では87.6，72,1，84.7%(平均81.5%)であり PG の大きな影響はなかった．また PG のジクロルメタンへの移行率は低い程よいが，10倍量の 1 mg 添加では2.2～2.4%，100倍量の10mg 添加でも1.3～2.0%であり，PG はジクロルメタンへは移行しにくいことが判明した．したがってカルビトールの抽出溶媒としてジクロルメタンが良好であることが判明した．

Ⅳ．添加回収実験

前処理を必要とする試料の中からレモンオイル(油溶性)とココアフレーバー(水溶性)を選び，それぞれ１g をとりカルビトール100 ppm を添加し，第二法に従って試料液を調製したのち，ジクロルメタンで全量５m*l* とし，GC-MS で定量し回収率を求めた結果を Table 1．に示した．レモンオイルへの添加回収率(%)と標準偏差は99.3±0.75でバラツキも少なく良好な結果が得られた．ココアレーバーの添加回収実験では抽出時にエマルジョ

ンを生じたので遠心分離操作を行ったが，回収率は88.2%と良好であった．

V．市販香料中のカルビトールの分析結果

都内の香料メーカー27社から収去された32種類109検体についてカルビトールの検出を試みた．検査した香料のうち輸入先の記載のあったものは，アメリカ16検体，スイス12検体，フランス2検体，イギリス2検体，イタリア，オランダおよびベルギー各1検体であった．

最初に収去された11検体は，溶媒に溶解したのち直接GC-MSで100 ppm以下であることを確認したが，他の98検体は，先ずスクリーニングテストを行い，妨害が認められた場合は第二法を行い，100 ppm以上確認されたものについて最終的にGC-MSによる同定を行った．

98検体のうちスクリーニングテストで100 ppm以下が確認できた検体は68検体で全体の68%に相当した．エッセンスの表示のものは18検体中17検体とほとんどが，またフレーバー表示のものは34検体中26検体が100 ppm以下であることが確認できた．7検体のオイル類（マロン，ライム各1検体，レモン2検体，オレンジ3検体）すべてにGC上の妨害ピークが確認されたが，HPLCでは妨害がなくすべて100 ppm以下であることが確認できた．その他GC上で香料成分の妨害が認められたレモン，オレンジ，バニラ，ペパーミントおよびスペアミント等においてもHPLCでは妨害がなかった．オレンジオイルやココアフレーバーなどのように前処理を行ってもGC上の妨害ピークが除去できないものがあったが，GC-MS測定には全く影響がなかった．GC-MSによる同定の結果，Fig. 3のカルビトールの標準品のマススペクトルと一致した検体は，チョコレートフレーバー1検体，レモンエッセンス1検体およびレモンオイル1検体の合計3検体であった．

次にカルビトールが確認された3検体について定量操作を行った．チョコレートフレーバーおよびレモンエッセンスはスクリーニングテストで妨害が確認されたので，第二法により前処理を行い，また妨害が認められなかったレモンオイルはジクロルメタンに溶かし，それぞれGC-MSで定量を行った結果，カルビトール含量は，チョコレートフレーバー　6.0%，レモンエッセンス　0.05%　および　レモンオイル　2.0%であった．

チョコレートフレーバーには自社製造との記載のみで輸入先の記載がなかった．レモンオイルには英国企業から輸入との記載があり，またレモンエッセンスにはレモンオイルの輸入業者と同じ名称で自社製造と書かれていたこと，レモンオイルの方のカルビトール含量が高かったことなどから，レモンオイルが英国から輸入され，こ

Table 1．Recovery of Carbitol added to Lemon Oil and Cocoa Flavour by GC-MS Method

Compound	Added (μg/g)	Recovery (%)	Mean±S.D. (%)
Lemon Oil	100	100.1	
	〃	98.3	99.3±0.75
	〃	99.5	
Cocoa Flavour	〃	89.8	
	〃	88.3	88.2±1.31
	〃	86.6	

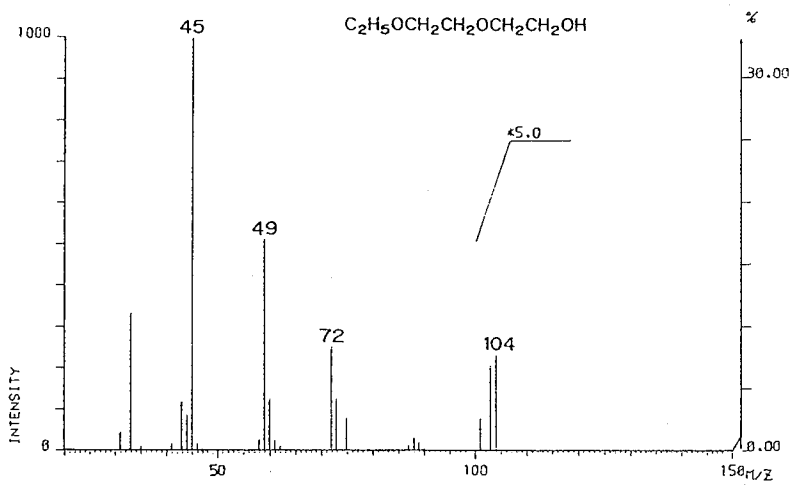


Fig. 3．Mass Spectrum of Carbitol

れをもとにレモンエッセンスが製造されたと考えられる.

検出された検体については，この程度の量では可溶化溶剤として使用されたことが特定できなく，また香料製造時の抽出溶媒として使用され残留していたもの，つまりキャリーオーバーの添加物であるとも考えられるため，食品衛生法違反の行政処分は行われなかった.

今回，検出された検体が3検体と少なかったのは，収去開始時期が事件発生後既に2ヶ月経過していたため，業者が自主的に検査し対処したためではないかと考える.

まとめ

昭和60年10月～61年2月の間に特別監視により当所に送付された着香料109検体中のカルビトール含量を測定した.

まずスクリーニングテストを行い，妨害が認められた場合は前処理を行ったのち，GCおよびHPLCで測定し，100 ppm以上検出されたものについてGC-MSで同定したのち，定量を行った.

スクリーニングテストでは，GC上にPGの妨害が，HPLC上にエタノールの妨害が認められたが，両者を組み合わせることにより68%の検体の確認が可能であった.

前処理法としてn-ヘキサンで脱脂したのちジクロルメタンで抽出する方法を採用した．カルビトール100 ppmの添加回収実験における回収率は，レモンオイル99.3%およびココアフレーバー88.2%と良好であった.

GC-MSによりカルビトールが確認された検体は，チョコレートフレーバー，レモンエッセンスおよびレモンオイルの3検体であり，それらのカルビトール含量はそれぞれ6.0%，0.05%，2.0%であった.

検出された検体については，含量から考えて，可溶化溶剤として使用されたことが特定できなかった.

謝　辞　試料収集に当り御協力いただいた東京都衛生局環境衛生部食品監視課ならびに都および特別区食品機動監視班各位に深謝いたします.

文　献

1) Edward J. Fairchild ： Registry of Toxic Effects of Chemical Substances, Ⅰ, 1977
2) 後藤稠，池田正之，原一郎：産業中毒便覧，増補版，1982，医歯薬出版
3) 国民生活センター編：海外生活情報　世界の食品添加物(その1)，No 6，31－33,1981
4) 有機合成化学協会編：溶剤ポケットブック，1967，オーム社出版

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 211-213, 1986

高速液体クロマトグラフィーによる天然糊料の分析（第2報）

中島和雄*, 広門雅子*, 高橋巖*
植松洋子*, 松井敬子*, 風間成孔*

High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Natural Thickening and Stabilizing Agents (II)

KAZUO NAKAJIMA*, MASAKO HIROKADO*, IWAO TAKAHASHI*,
YOKO UEMATSU*, KEIKO MATSUI* and MASAYOSHI KAZAMA*

Keywords：糊料 thickening and stabilizing agents, グァーガム Guar gum, ローカストビーンガム Locust bean gum, カラギーナン Carrageenan, タマリンド種子多糖類 Tamarind seed gum, キサンタンガム Xanthan gum, トラガントガム Gum tragacanth, アラビアガム Gum arabic, カラヤガム Karaya gum, ペクチン Pectin

緒　言

天然糊料は，増粘剤，ゲル化剤，安定剤の用途で食品添加物として使用されている．さらに低カロリー食品として注目され，食品中に広く使用されている．

天然糊料の分析法としては，ガスクロマトグラフ法（GC法）[1-3]が一般に用いられている．GC法では，天然糊料の加水分解で得られた単糖を誘導体化して分析するので，操作が複雑である．著者ら[4,5]は，これまでGC法および高速液体クロマトグラフ法（HPLC法）による分析法の検討を行ってきた．今回，前報[5]にひきつづき，加水分解物を直接分析できるHPLCによる検討を行い，分析法を改善したので報告する．

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，およびペクチンはすべてシグマ社製を，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：昭和電工製示差屈折計 SE-51，データ処理装置：島津製作所製クロマトパック C-R 3 A,オートサンプラー：日本分光工業製 AS-L 350

HPLCによる構成単糖の分析　構成単糖の標準溶液として7種，すなわちグルコース，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（0.22μm）でろ過し，ろ液10μlについてHPLCを行った．

HPLCの条件：ガラム Shodex Ionpak C-811　8mmø×500mmと Aminex HPX-87 P 7.8mmø×300mmを連結して用いた，流速0.5m*l*/min，溶離液　水，カラム温度　70℃，検出器　示差屈折計（RI）感度　2×

天然糊料の分析　試験管中に，天然糊料の標準品9種を，各々200mgとり，2Nトリフルオロ酢酸4m*l*を加

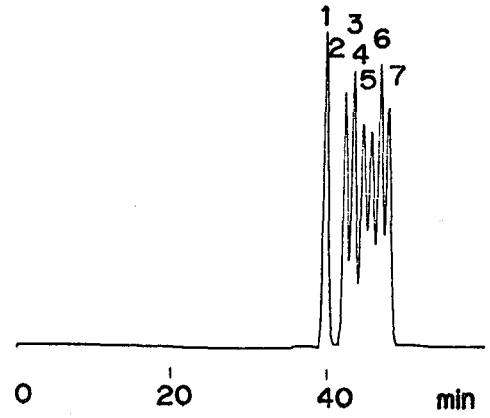


Fig. 1. HPLC Chromatogram of Monosaccharides
Peaks : 1,D-Glucose : 2,D-Xylose : 3,D-Galactose : 4,L-Rhamnose : 5,D-Mannose : 6,L-Arabinose : 7,L-Fucose

*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

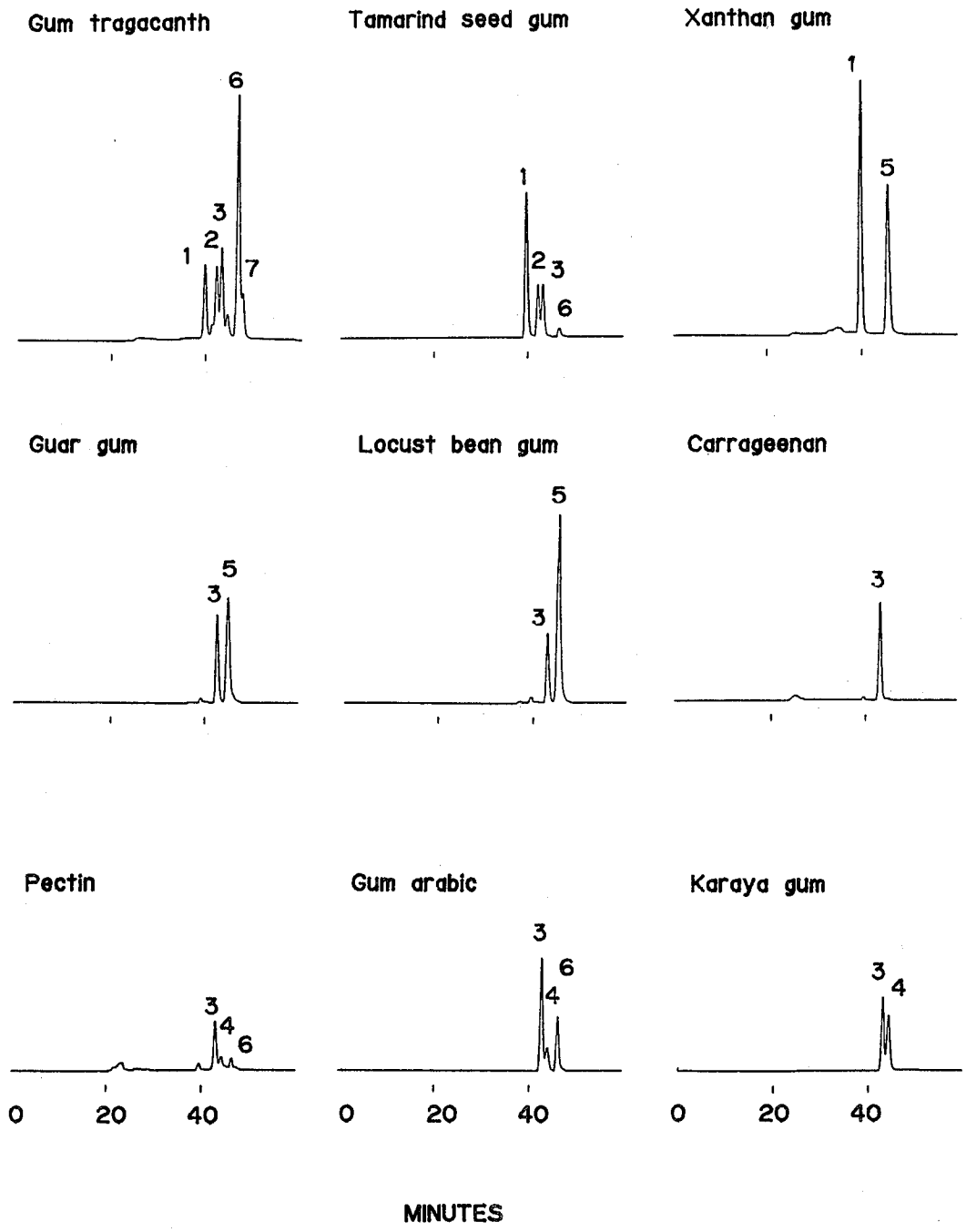


Fig. 2. HPLC Chromatograms of Typical Nutral Monosaccharide Obtained from Hydrolysed Thickening and Stabilizing Agents
Peaks : 1,D-Glucose : 2,D-Xylose : 3,D-Galactose : 4,L-Rhamnose : 5,D-Mannose : 6,L-Arabinose : 7,L-Fucose

え，窒素で置換した後，封管し，加水分解炉中で100℃で8時間加熱した．その加水分解液を水酸化ナトリウムで中和し，水で全量50mlとした．この液をミリポアフィルター（0.22μm）でろ過し，ろ液10μlについてHPLCを行った．

結果と考察

構成単糖の分析　天然糊料の7つの中性構成単糖は，前報[5]では，HPLCによっては一本のカラムで分離することができなかったので，Shodex C-811およびShodex SP 1010で，各々分析した結果を併用して，7つの糖の分析を行った．

今回，二つのカラムを連結して分析する方法を，二種類の連結カラムで検討した．第一にShodex SP 1010とAminex HPX-87 Pを連結したカラムで分析した．その結果はShodex SP 1010のカラムで分析したと同様に，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は良くなかったが，他の5つの単糖の分離はさらによくなった．これは5つの単糖の分析を連結したカラムで分析したWentg[6]の報告に似ていた．

次にShodex C-811とAminex HPX-87 Pを連結したカラムで分析した．その結果は，図1に示したように7つの中性糖がよく分離した．その時のカラム温度は70℃が最適であった．

天然糊料の分析　天然糊料の加水分解中の中性糖は上記の結果から，Shodex C-811とAminex HPX-87 Pを連結したカラムで分析した．検出器はRIを用いた．この結果からの構成糖の特徴的なパターンから，9種の天然糊料の分析が行えることがわかった．この天然糊料の加水分解中の中性糖のパターンを示すHPLCのクロマトグラムを図2に示した．この図からわかるように単一の糊料の分析は容易である．また二つ以上の糊料を含む添加物製剤の分析にも適用することができたが，これらの製剤分析の詳細および定量法については，別に報告する予定である．

まとめ

天然糊料の分析法をHPLCによって検討した．天然糊料の加水分解物中の7つの中性構成単糖の分析は，Shodex C-811とAminex HPX-87 Pを連結したカラムで分析が可能であった．その時のカラム温度は70℃が最適であった．この分析条件で7つの中性糖がよく分離した．9種の天然糊料，すなわちアラビノース，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，ペクチン，およびタマリンド種子多糖類の分析を行った結果，それぞれ特徴的な構成単糖のパターンが得られた．

文　献

1）Glück, U. and Thier, H. : *Z.Lebensm. Unters-Forsch.*, 170, 272, 1980

2）Scherz, H. and Mergenthaler, E. : *ibid.*, 170, 280, 1980

3）Lawrence, J. and Iyenger, J. : *J. Chromatogr.*, 350, 237, 1985

4）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

5）中島和雄，広門雅子，高橋巌，植松洋子，遠藤英美，風間成孔：ibid., 36, 215, 1985

6）Wentg, F. March, A. and Gray, M. : *J.Chromatographic Science.*, 20, 349, 1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 214-217, 1986

クエン酸の定量に及ぼすアルミニウムイオンの影響

高橋　巖*, 小関正道*, 広門雅子*, 安野哲子*,
荻野周三*, 中島和雄*, 植松洋子*,
松井敬子*, 風間成孔*

Effect of Aluminum Ion on the Determination of Citric Acid

IWAO TAKAHASHI*, MASAMICHI KOSEKI*, MASAKO HIROKADO*, TETSUKO YASUNO*,
SHUZO OGINO*, KAZUO NAKAJIMA*, YOKO UEMATSU*,
KEIKO MATSUI* and MASAYOSHI KAZAMA*

Keywords：クエン酸 Citric Acid, ミョウバン Alum, アルミニウムイオン Aluminum Ion, キレート Chelate, 実験計画法 Design of Experiments, 高速液体クロマトグラフィー High-Performance Liquid Chromatography, 酵素法 Enzymatic Method

緒　言

クエン酸は酸味料として単独あるいは甘味料，保存料，着色料など他の食品添加物との混合製剤の型で多くの食品に利用されている[1,2].

混合製剤中のクエン酸は，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）[3]，酵素法[4]により定量されている．しかし，混合製剤の中にはクエン酸の定量値が配合量を大きく下回るものがある．この時，他の配合成分の定量値は配合量と一致していることから，クエン酸の定量に対して他の配合成分が影響していると考えられる．そこで，実験計画法[5]を用いてクエン酸の定量に影響を及ぼす成分を明らかにし，合わせてクエン酸の定量法を検討したので報告する．

実験方法

1．試薬　クエン酸分解酵素，リンゴ酸脱水素酵素，乳酸脱水素酵素，ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチド・還元型（NADH）はベーリンガー・マンハイム社製，その他の試薬はすべて試薬特級を用いた．

2．装置　自記分光光度計－島津製作所製 UV－240，高速液体クロマトグラフーポンプ：日本分光工業製 BIP－I，検出器：日本分光工業製 UVIDEC－100 V 型，データ処理装置：島津製作所製クロマトパック C－R 2 AX

3．影響を及ぼす成分の検索実験

混合製剤中のクエン酸の定量に影響を及ぼす成分を明らかにするため，クエン酸の定量に影響がみられた混合製剤の配合（表1に示す）を基に，表2に示す因子と水準を選んで実験を行った．各水準はクエン酸（結晶）に対する重量倍率とした．実験は表3に示すように L_{27}（3^{13}）に割付けて行った．

4．定量操作

試験溶液の調製：クエン酸（結晶）および各因子を各々，別に，水に溶かして25mg／ml の溶液とした．次に，クエン酸（結晶）溶液 1 ml に対し，表3の割付け表に従い，各因子の溶液を各水準量（水準1は0 ml，水準2は1 ml，水準3は3 ml）加えた後，さらに水を加えて100ml とし，これを試験溶液とした．

HPLC：各試験溶液を次の条件で測定した．

カラム：Nucleosil 7 C_{18}　30cm × 4 mm i.d.，移動相：2 % KH_2PO_4（pH 2．4），流速：1.0ml／min，検出波長：UV210nm

酵素法：各試験溶液を Dagley[6] の方法に従って測定した．

結果および考察

1．影響を及ぼす成分の検索

クエン酸の定量に対する各因子の効果を分散分析表と

*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

表1．クエン酸混合製剤の配合例

クエン酸（結晶）
ミョウバン
d－酒石酸ナトリウム
炭酸ナトリウム
リン酸－ナトリウム
天然物

表2．因子と水準

因　子	水準1	水準2	水準3
A：ミョウバン	0	1	3
B：d－酒石酸ナトリウム	0	1	3
C：炭酸ナトリウム	0	1	3
D：リン酸－ナトリウム	0	1	3

表3．要因の割付け

割付けた要因	A	B	A・B	A・B	C	A・C	A・C	B・C	誤差	誤差	B・C	誤差	D
列番 No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3
4	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2	3	3	3
5	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	1	1	1
6	1	2	2	2	3	3	3	1	1	1	2	2	2
7	1	3	3	3	1	1	1	3	3	3	2	2	2
8	1	3	3	3	2	2	2	1	1	1	3	3	3
9	1	3	3	3	3	3	3	2	2	2	1	1	1
10	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
11	2	1	2	3	2	3	1	2	3	1	2	3	1
12	2	1	2	3	3	1	2	3	1	2	3	1	2
13	2	2	3	1	1	2	3	2	3	1	3	1	2
14	2	2	3	1	2	3	1	3	1	2	1	2	3
15	2	2	2	1	3	1	2	1	2	3	2	3	1
16	2	3	1	2	1	2	3	3	1	2	2	3	1
17	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3	3	1	2
18	2	3	1	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3
19	3	1	3	2	1	3	2	1	3	2	1	3	2
20	3	1	3	2	2	1	3	2	1	3	2	1	3
21	3	1	3	2	3	2	1	3	2	1	3	2	1
22	3	2	1	3	1	3	2	2	1	3	3	2	1
23	3	2	1	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2
24	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2	2	1	3
25	3	3	2	1	1	3	2	3	2	1	2	1	3
26	3	3	2	1	2	1	3	1	3	2	3	2	1
27	3	3	2	1	3	2	1	2	1	3	1	3	2

表4．分 散 分 析 表

(1) HPLC

要 因	S	ϕ	V	F_0	プ ー ル	F_0'
A	314.63	2	157.32	44.69		54.06*
B	22.46	2	11.23	3.19		3.86
C	179.44	2	89.72	25.49		30.83*
D	11.30	2	5.65	1.61		1.94
A×B	17.69	4	4.42	1.26		1.52
A×C	348.21	4	87.05	24.73		29.91*
B×C	8.03	4	2.01	——	$V_E'=2.91$	
誤 差	21.11	6	3.51	——	$\phi_E'=10$	
計	922.87	26				

(2) 酵素法

要 因	S	ϕ	V	F_0	プ ー ル	F_0'
A	489.38	2	244.69	27.34		42.12*
B	1.80	2	0.90	——		
C	139.44	2	69.62	7.78		11.98*
D	0.21	2	0.11	——	$V_E'=5.81$	
A×B	30.42	4	7.61	——	$\phi_E'=18$	
A×C	378.13	4	94.53	10.56		16.27*
B×C	36.34	4	9.09	1.02		
誤 差	35.79	6	8.95	——		
計	1111.30	26				

*…1％危険率で有意差あり

して表4に示した．解析の結果，HPLC，酵素法ともに，ミョウバンと炭酸ナトリウムの交互作用により，クエン酸の定量に影響を及ぼすことが認められた．この影響は，ミョウバンのアルミニウムイオン（Al^{3+}）がクエン酸とキレートを形成するためと考えられる[7]．

2．炭酸ナトリウムの影響

炭酸ナトリウムの影響が単に混合剤のpHを調整する点にあるのかを調べるために，炭酸ナトリウムに代えて水酸化ナトリウムを用い，ミョウバンと水酸化ナトリウムによる二元配置法実験（表5に示す）を行い，クエン酸の定量に対する影響を調べた．表6に実験結果の分散分析表を示した．解析の結果，HPLC，酵素法ともに，水酸化ナトリウムは炭酸ナトリウムと同様に，ミョウバンとの交互作用によりクエン酸の定量に対して影響を及ぼすことが認められた．このことから，炭酸ナトリウムは，クエン酸とAl^{3+}のキレート形成時において，pH調整剤の役割を果しているものと考えられる．

3．各pHにおけるAl^{3+}の影響

炭酸ナトリウムの影響がpHの調整にあることから，pHの違いによるAl^{3+}のクエン酸測定への影響を調べた．すなわち，クエン酸・ミョウバン・炭酸ナトリウムの混合液を塩酸でpH 1～5に調整し，各pHの溶液中のクエン酸を定量して，その回収率を求めた．各pHにおけるクエン酸の回収率を図1に示した．

HPLC，酵素法ともに，pH 3～5では明らかにAl^{3+}の影響がみられたが，pH 1～2では良好な回収率が得られた．この結果，試験溶液をpH 2に調整することにより，クエン酸の定量に対するミョウバンと炭酸ナトリ

表5．ミョウバンとNaOHによる二元配置法実験

因　子	水準1	水準2	水準3
ミョウバン	0	1	3
NaOH	0	1	3

表6．二元配置法実験の分散分析表

(1) HPLC

要　因	S	ϕ	V	F_0
ミョウバン	123.42	2	61.71	8815.7*
NaOH	144.08	2	72.04	10291 *
交互作用	261.35	4	65.34	9334.3*
級　間	528.85	8		
誤　差	0.06	9	0.007	
全変動	528.91	17		

(2) 酵素法

要　因	S	ϕ	V	F_0
ミョウバン	122.33	2	61.17	191.16*
NaOH	95.04	2	47.52	148.50*
交互作用	235.72	4	58.93	184.16*
級　間	453.09	8		
誤　差	2.87	9	0.32	
全変動	455.96	17		

*…1％危険率で有意差あり

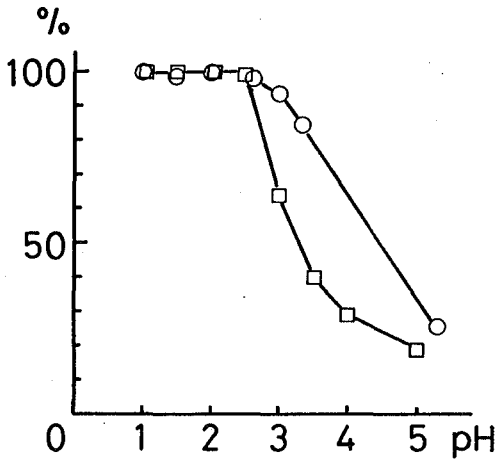


図1．各pHにおけるクエン酸の回収率
□——□ HPLC
○——○ 酵素法

表7．市販混合製剤中のクエン酸含量

品　名	試料調整		配合量
	Ⅰ	Ⅱ	
1	18.8%	3.6%	19.3%
2	4.9	1.3	5.0
3	36.1	19.0	35.7
4	14.9	1.9	14.3

Ⅰ：pH 2に調整
Ⅱ：無調整

ウムの交互作用による影響を除去できることが判った．

4．市販製剤への応用

本法による市販製剤4種中のクエン酸の定量結果を表7に示した．また，試験溶液のpHを調整せずに定量した結果も合わせて示した．本法による定量値は配合量に対してそれぞれ97.4,98.0,101.0,104.2％と良好な結果であった．

結　論

今回の実験で，混合製剤中のクエン酸の定量に対する影響はクエン酸とAl^{3+}のキレート形成によるものであり，また，このキレート形成はpH調整により防ぐことができることが判った．

しかし，クエン酸以外の有機酸にもAl^{3+}とキレートを形成するものがある．さらに，有機酸と金属イオンのキレート形成も多く存在していることから，クエン酸をはじめ有機酸の定量に際して，この点を十分考慮する必要があると考える．

文　献

1）食品添加物公定書解説書編集委員会編：第四版食品添加物公定書解説書，B－230,1979,広川書店
2）食品添加物便覧，1985年版，食品と科学社
3）Coppola, E.D., Conrad, E.C. and Cotter, R.：*J.Assoc. Off. Anal. Chem.*, 61,1490,1978
4）厚生省環境衛生局食品化学課編：食品中の食品添加物分析法，101,1982,講談社
5）石川　馨，藤森利美，久米　均：実験計画法（上，下），1967,東京化学同人
6）Dagley, S.：*Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd.Ed., Ed. Bergmeyer H.U., 1562, 1974, Academic Press, New York
7）上野景平：キレート滴定法，1973,南江堂

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 218-227, 1986

油脂に対する酸化防止剤の加熱劣化抑制効果

植松洋子*, 高橋　巖*, 広門雅子*, 中島和雄*
松井敬子*, 風間成孔*

Retarding Effect of Antioxidants on the Thermal Deterioration of Oils

YOKO UEMATSU*, IWAO TAKAHASHI*, MASAKO HIROKADO*, KAZUO NAKAJIMA*
KEIKO MATSUI* and MASAYOSHI KAZAMA*

Retarding effect of antioxidants and silicone oil on the thermal deterioration of frying oils was studied by determination of the carbonyl value (COV) of substrates and the residual amount of antioxidants in the substrates.

BHA, α-tocopherol and a mixture of tocopherols were used as antioxidants. Two lots of rapeseed oil and lard were used as substrates respectively. It was found that the tendency of deterioration of oils was remarkably different between two substrates of the same kind of oils.

Antioxidants were effective on one lot of rapeseed oil and lard respectively,both of which had a tendency not to be easily deteriorated.

Antioxidants tended to decrease in the order of BHA $>$ α-tocopherol $\geqq$ mixture of tocopherols.There was a significant negative correlation between COV of the substrates and the residual amount of tocopherol in the substrates.

Silicone oil effectively retarded the thermal deterioration of the substrates which rapidly deteriorated when silicone oil was not added. It also retarded the consumption of antioxidants.

Keywords: retarding effect, tocopherol, BHA, silicone oil, thermal deterioration, rapeseed oil, lard, antioxidant, COV

諸　言

油脂を揚物の場合のように高温で加熱すると，熱酸化を主とする種々の反応により劣化する．この加熱劣化油は，風味も劣るが毒性もあるといわれている[1]．油脂の酸化防止剤としては，BHA（ブチルヒドロキシアニソール）等が認められているが，BHAの安全性に対して疑いがもたれているため，これに代わりトコフェロールが多く使用されている．トコフェロールについては，ラードの加熱劣化を抑制するという報告がある[2]が，一般に天然の抗酸化剤の含まれている植物油に対しては無効であるといわれている[3]．そこで，食品監視機動班の先行調査との関連でこれらの酸化防止剤の油脂に対する加熱劣化抑制効果を比較検討した．基質としてナタネ油，ラードを用い，それぞれにトコフェロール，BHAを添加して加熱し，カルボニル価（COV）および酸化防止剤の残存量の測定を行い，その効果を検討した．また，消泡剤として使用されるシリコーンオイル（シリコーン樹脂）が油脂の加熱劣化抑制に有効であるといわれている[4)-6)]ため，シリコーンオイルを添加したものについても同様に検討したところ，若干の知見を得たので報告する．

実験の部

1　**試料**　ナタネ油（1，2）およびラード（1，2）は，日本油脂㈱に添加物を加えていないものを調製してもらった．（ナタネ油-1，ラード-1は実験1に使用，ナタネ油-2，ラード-2は実験2に使用した．）

*東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

トコフェロール類（以下，Tocと略記，実験1に使用）

α-Toc：イーストマンコダック㈱製，純度78.6%

mix-Toc-1：純度63.1% 組成 α：β：γ：δ＝13.2：1.3：34.9：50.6 エーザイ㈱製

mix-Toc-2：純度63.0% 組成 α：β：γ：δ＝13.5：1.6：56.8：28.1 理研ビタミン㈱製

mix-Toc-3：純度96.4% 組成 α：β：γ：δ＝1.0：0.1：2.5：96.4

mix-Toc-4：純度74.5% 組成 α：β：γ：δ＝23.1：1.2：37.9：37.8

mix-Toc-5：純度92.6% 組成 α：β：γ：δ＝50.6：1.4：24.6：23.4 以上，エーザイ㈱製

dl-α-Toc：理研ビタミン㈱製，食品添加物規格 Toc類（実験2に使用）

mix-Toc：純度72.3% 組成 α：β：γ：δ＝11.5：0.7：39.8：48.0 エーザイ㈱製

dl-α-Toc：実験1と同じ

BHA：和光純薬製，シリコーンオイル：東芝シリコーン㈱製，食品添加物規格 を用いた．

2 **試薬** Toc標準品：α-, β-, γ-, δ-Tocの標準品をエーザイ㈱より入手した．内部標準：2,2,5,7,8－ペンタメチル－6－ヒドロキシクロマン ビタミンE定量用，n－ヘキサン：液体クロマトグラフ用，イソプロピルエーテル：GR 10%硫酸，10%水酸化ナトリウム溶液で洗った後，蒸留しbp 68℃以上の留分を使用した．カルボニル価測定用の試薬：基準油脂分析試験法記載のもの ただし，ベンゼンは油脂カルボニル価測定用，その他の試薬：特にことわりのないかぎり，JIS規格特級品を用いた．

3 **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：日立製作所製分光蛍光光度計F 1000，オートサンプラー：日本分光工業製AS－L 350，データ処理装置：島津製作所製クロマトパックC－R 3 A，ガスクロマトグラフ：島津製作所製GC－9A（FIDつき），自記分光光度計：島津製作所製UV－240

4 **高速液体クロマトグラフ測定条件** カラム：Nucleosil 5 NH_2（4mmø×300mm），移動相：イソプロピルエーテル：n－ヘキサン（8：92），流速：2.0ml/min，検出器：蛍光分光光度計（E_X298 nm，Em 325 nm）検量線は，標準品の一定濃度と内部標準とのピーク面積比から作成した．試料の各Toc含量は，試料を内部標準の一定量とともに直接n－ヘキサンに溶かして高速液体クロマトグラフに注入し，検量線からその含量を求めた．

5 **ガスクロマトグラフ測定条件** カラム：5% OV－17（3mmø×2m），カラム温度：175℃，注入口温度：200℃，キャリヤーガス：N_2，キャリヤーガス流量：25ml/min，検出器：FID

6 **操作法** 1）**試料液の調製**（実験1）油脂（ナタネ油，ラード）に*dl*-α-Toc，α-Toc，mix-TocをそれぞれToc量として0.05%添加した．BHAは0.02%添加した．

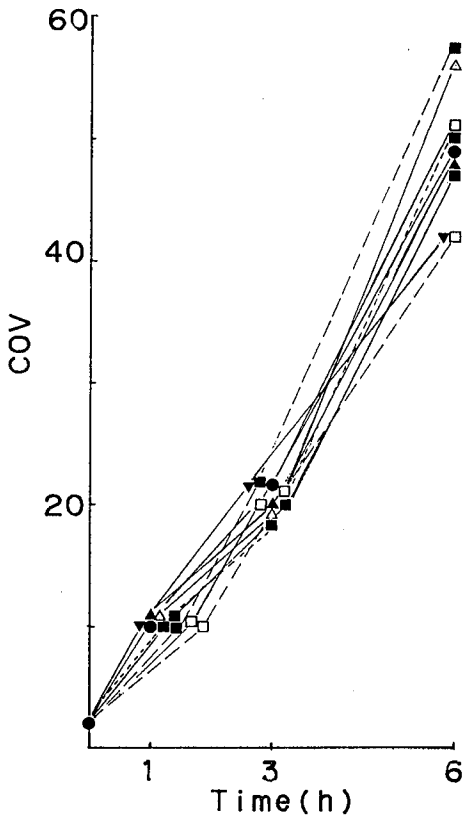


Fig. 1. Change in Carbonyl Value of Rapeseed Oil－1 during the Course of Heating at 180℃

●——● no addition
▲——▲ *dl*-α-Toc added
△——△ α-Toc added
■——■ mix-Toc-1 added
■－－■ mix-Toc-2 added
■……■ mix-Toc-3 added
□——□ mix-Toc-4 added
□－－□ mix-Toc-5 added
▼——▼ BHA aded

Toc : Tocopherol

Composition of Tocopherols（α：β：γ：δ）

mix-Toc-1：13.2：1.3：34.9：50.6
mix-Toc-2：13.5：1.6：56.8：28.1
mix-Toc-3：1.0：0.1：2.5：96.4
mix-Toc-4：23.1：1.2：37.9：37.8
mix-Toc-5：50.6：1.4：2.6：23.4

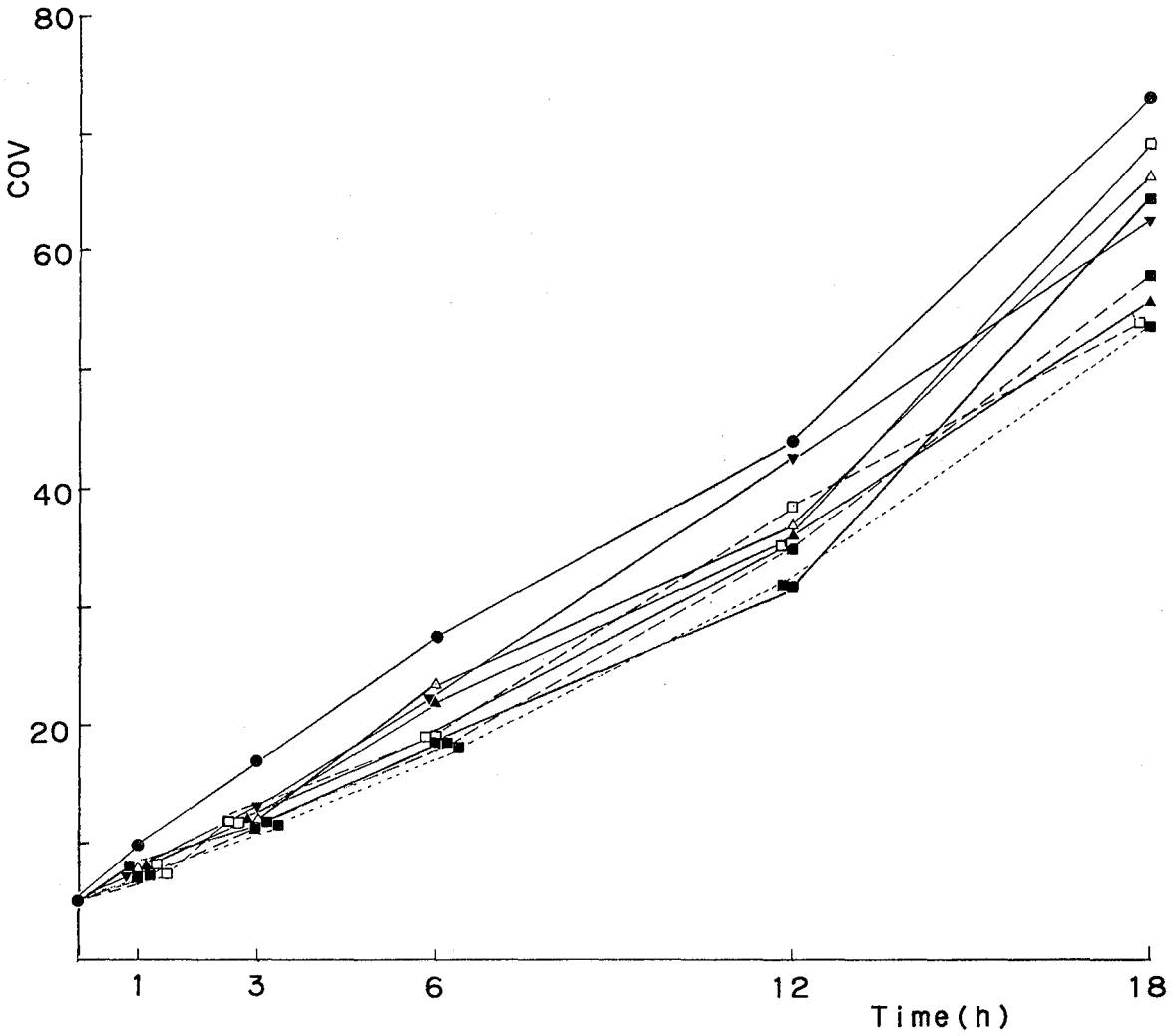


Fig. 2. Change in Carbonyl Value of Lard-1 during the Course of Heating at 180℃

- ●——● no addition
- ▲——▲ *dl*-α-Toc added
- △——△ α-Toc added
- ■——■ mix-Toc-1 added
- ■－－■ mix-Toc-2 added
- ■·····■ mix-Toc-3 added
- □——□ mix-Toc-4 added
- □－－□ mix-Toc-5 added
- ▼——▼ BHA aded

Toc : Tocopherol

これらの油脂を一試料あたり5個の内径26.7㎜のガラス製ビーカーに4gずつ入れ，オイルバスを用いて180℃±2℃で加熱した．加熱開始後，1,3,6,12,18時間毎にビーカーを1つずつ取り出し試料液とした．加熱は6時間ずつ連続して行い，加熱時以外はビーカー毎冷凍庫に保存した．（実験2）実験1とは異なるロットのナタネ油，ラードを用い，それぞれに *dl*-α-Toc，mix-Toc，BHAを実験1と同量ずつ添加したもの，およびこれらの酸化防止剤を添加した上にシリコーンオイルを1 ppm 添加したものを一試料あたり9個のビーカー（実験1と同じもの）に入れ実験1と同様に加熱し，1，3，6時間毎に3個ずつビーカー毎取り出し試料液とした．

2）カルボニル価（以下 COV と略記）の測定および Toc, BHA 含量の測定　実験1および実験2で得られた

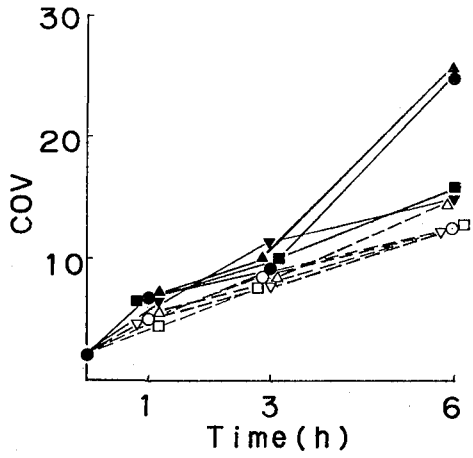


Fig. 3. Change in Calbonyl Value of Rapeseed Oil-2 during the Course of Heating at 180℃
● ○ antioxidant not added
▲ △ *dl*-α-Toc added
▼ ▽ BHA added
■ □ mix-Toc added
——— silicon oil not added
– – – silicon oil added

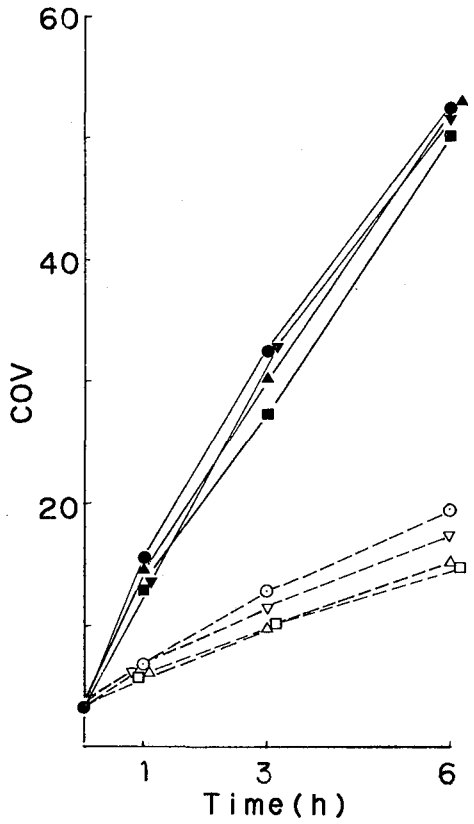


Fig. 4. Change in Calbonyl Value of Lard-2 during the Course of Heating at 180℃
● ○ antioxidant not added
▲ △ *dl*-α-Toc added
▼ ▽ BHA added
■ □ mix-Toc added
——— silicon oil not added
– – – silicon oil added

試料液について，COV の測定は，日本油化学協会編，基準油脂分析試験法に従って行った．Toc 含量の測定は液体クロマトグラフ法，BHA含料の測定は，ガスクロマトグラフ法を用いて行った．

結　　果

1　酸化防止剤の加熱劣化抑制効果

ナタネ油-1に対しては，添加した酸化防止剤のいずれも，加熱劣化抑制効果を示さなかった（Fig. 1）．ラード-1に対しては，添加したすべての酸化防止剤が加熱劣化を抑制した．6時間加熱した場合の COV が無添加のもので27.6であったのに対し，α-Toc, BHA を添加したものでは22～23，mix-Toc を添加したものでは18～19であり，mix-Toc が最も劣化を抑制した．しかし，mix-Toc の種類によるちがいはみられなかった．また，さらに加熱時間が長い場合には，加熱6時間までにみられたような酸化防止剤の種類による影響はみられなかった（Fig. 2）．

ナタネ油-2の場合は，6時間加熱した場合の COV が無添加，*dl*-α-Toc 添加のものでは24～5であったのに対し，mix-Toc, BHA を添加したものでは14～5と差がみられた（Fig. 3）．一方，ラード-2ではほとんど酸化防止剤の効果がみられなかった（Fig. 4）．このように酸化防止剤の加熱劣化抑制効果は，油脂の種類が同じであってもロットにより異なった傾向を示した．なお，同時に3個加熱したものの COV の標準偏差はナタネ油-2については加熱1時間で0.1～1.4，3時間で0.1～1.3，6時間で0.3～3.0，ラード-2については1時間で0.2～1.4，3時間で0.4～2.8，6時間で0.3～2.3であった．

また，油脂そのものの COV の増加もかなり異なっており，同じ種類の油脂でも約2倍の開きがあった．

2　シリコーンオイルの加熱劣化抑制効果

上記の4つの基質にシリコーンオイルを1 ppm 添加して加熱したところ，Fig. 5 のように，ナタネ油-1，ラード-2についてはっきりとした抑制効果がみられ，ナタネ油-2についてはわずかに抑制，ラード-1につい

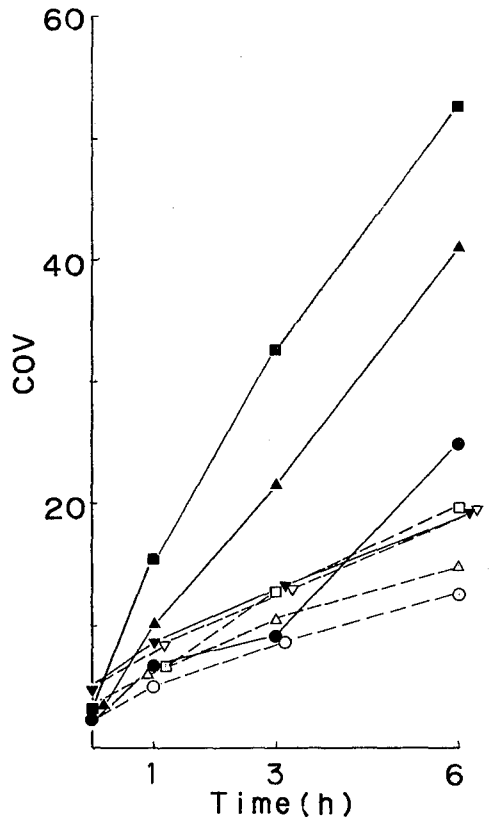


Fig. 5. Change in Calbonyl Value of Rapeseed Oil and Lard during the Course of Heating at 180℃
▲ △ rapeseed oil-1
▼ ▽ lard-1
● ○ rapeseed oil-2
■ □ lard-2
——— silicon oil not added
– – – silicon oil added

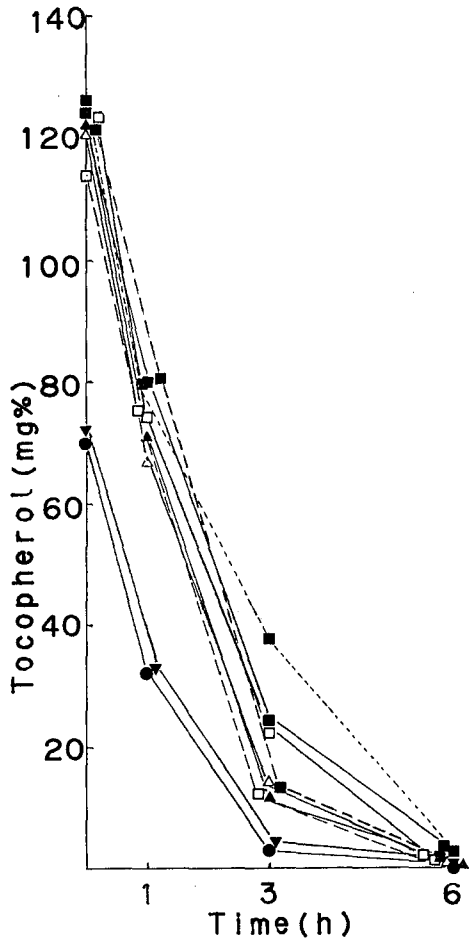


Fig. 6. Change in Residual Amount of Tocopherol in Rapeseed Oil-1 during the Course of Heating at 180℃
●——● no addition
▲——▲ *dl*-α-Toc added
△——△ α-Toc added
■——■ mix-Toc-1 added
■– –■ mix-Toc-2 added
■·····■ mix-Toc-3 added
□——□ mix-Toc-4 added
□– –□ mix-Toc-5 added
▼——▼ BHA aded

てはほとんど抑制効果がみられなかった.

3 シリコーンオイルを添加した場合の酸化防止剤添加の効果

シリコーンオインを添加することによって全体的に加熱劣化が抑制されるが，その場合の酸化防止剤の効果はシリコーンオイルを添加しない場合とは異なった傾向を示した．ナタネ油-2の場合は，シリコーンオイルを添加すると酸化防止剤の添加によるCOVの差がみられなくなった（Fig.3）．ラード-2の場合は，シリコーンオイルを添加しない時はほとんど酸化防止剤の効果がみられなかったが，シリコーンオイルを添加した場合のCOVは無添加＞BHA添加＞*dl*-α-Toc添加，mix-Toc添加の順であり，抑制効果がみられた（Fig.4）．

4 Tocおよび BHA 残存量

ナタネ油-1とナタネ油-2とを比較するとCOV増加の著しいナタネ油-1の方がTocの減少も速かった（Fig.6,8）．また，ラード-1とラード-2の間にも同様の関係がみられた（Fig.7,9）．同時に3個加熱したもののToc残存量の標準偏差は，ナタネ油-2については加熱1時間で0.7～11.8，3時間では1.2～6.3，6時間で

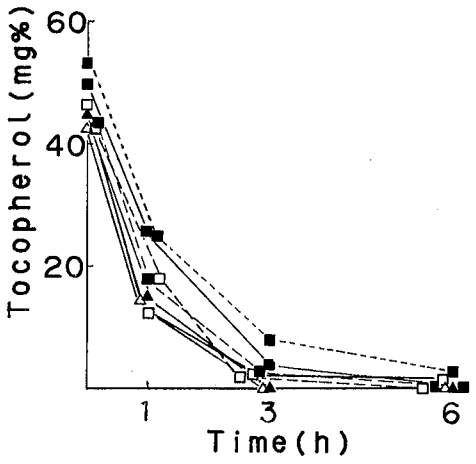


Fig. 7. Change in Residual Amount of Tocopherol in Lard-1 during the Course of Heating at 180℃
▲——▲ *dl*-α-Toc added
△——△ α-Toc added
■——■ mix-Toc-1 added
■－－■ mix-Toc-2 added
■……■ mix-Toc-3 added
□——□ mix-Toc-4 added
□－－□ mix-Toc-5 added

0.7～10.7，ラード-2については，1時間で0～3.4，3時間で0.7～3.2，6時間で0.2～1.5であった．

一方，BHAの減少の速さは，ラード-2，ナタネ油-1，ラード-1，ナタネ油-2の順であり，ほぼCOVの高い順であった（Fig.10）．シリコーンオイルを添加した場合は，Toc, BHAともに減少が抑制された（Fig.6, ～10）．また，α-Toc, mix-Toc, BHAの間のTocの減少の速さを比較すると，BHA＞α-Toc ≧ mix-Tocの順であった．α-Tocとγ-, δ-Tocあるいはmix-Tocの減少速度については，α-Tocが消失しやすいとする報告[7～9]とα-Tocの方が残存するという報告[10]があるが，今回のα-Tocとmix-Toc（γ-, δ-Tocを多く含有）を用いた実験における減少速度は，どの基質の場合もα-Toc ≧ mix-Tocであった．

考　察

1　酸化防止剤の添加と加熱劣化抑制効果

天然にTocのほとんど含まれていないラードの場合，加熱劣化の著しいラード-2については，酸化防止剤はほとんど有効でなかった．これは，加熱1時間で添加したToc, BHAがともにほとんど消失してしまったためではないかと考えられる（Fig.9,10）．一方，ラード-1は比較的劣化しにくかったが，加熱1時間で添加したToc

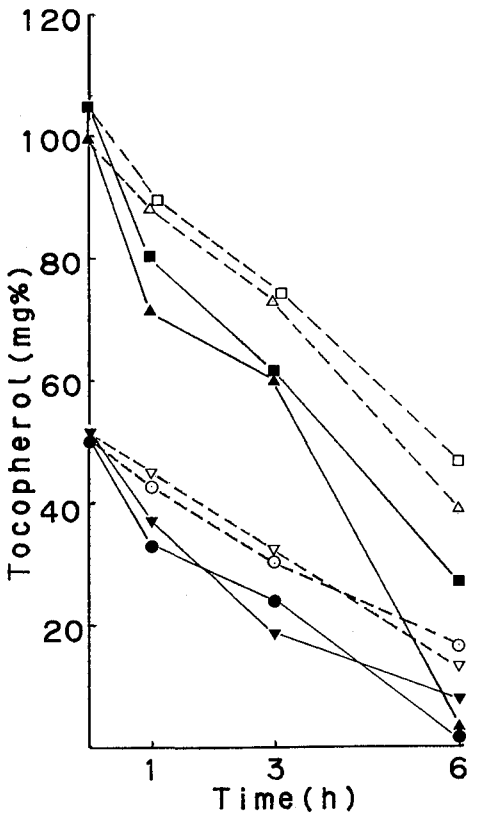


Fig. 8. Change in Residual Amount of Tocopherol in Rapeseed Oil-2 during the Course of Heating at 180℃
● ○ antioxidant not added
▲ △ *dl*-α-Toc added
▼ ▽ BHA added
■ □ mix-Toc added
—— silicon oil not added
－－－ silicon oil added

の約28～47%が残存していた（Fig. 7）．このため，ラード-1に比べ酸化防止剤の効果が認められたと推察される．酸化防止剤は加熱6時間でほぼ消失し，加熱12～18時間のCOVには酸化防止剤の種類，添加の有無との関連があまりみられなかった．このことから，酸化防止剤による加熱劣化の抑制は消失後一定時間しか持続しないものと思われる．ラード-2についても，シリコーンオイルを添加した場合には*dl*-α-Tocは加熱3時間で31.2%，加熱6時間でも16.4%が残存，BHAについても加熱1時間で23%が残存していた．このため酸化防止剤が有効に作用したものと考えられる（Fig.9,10）．

ナタネ油-2の場合，加熱3時間まではほとんど酸化

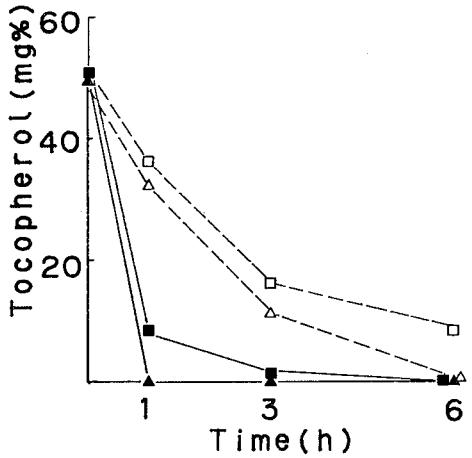


Fig. 9. Change in Residual Amount of Tocopherol in Lard-2 during the Course of Heating at 180℃
▲ △ *dl*-α-Toc added
■ □ mix-Toc added
——— silicon oil not added
– – – silicon oil added

防止剤の効果がみられなかったが，加熱6時間で無添加のものと *dl*-α-Toc 添加のものの COV が著しく上昇した（Fig. 3）．これらのサンプルについては残存 Toc 量も著しく減少しており（Fig. 8），Toc 減少によって加熱劣化が促進されたと推察される．BHA は加熱3時間でほぼ消失してしまったが（Fig. 5）BHA を添加したサンプルの場合加熱6時間でもまだ Toc が残存しており，そのため無添加のものに比べて劣化が抑制されたと考えられる．小沢ら[8]は，AOM 試験（活性酸素法，Active Oxygen Method）下で「Toc の消失とともに POV（過酸化物価）の急な上昇がみられた.」と報告している．今回の実験結果から，熱酸化時における COV についても同様の傾向がうかがわれる．しかし，Toc消失後も COV の測定を行った他の基質について，COV の上昇速度が Toc 消失後速くなるような傾向はみられず，COV の急速な上昇は AOM 試験下における POV と異なり一時的なものではないかと思われる．一方，シリコーンオイルを添加した場合には加熱6時間でもすべてのサンプルに Toc が残存しており（Fig. 8），そのため BHA, Toc 等の酸化防止剤添加による差がみられなかったと考えられる．

2 基質による加熱劣化傾向のちがい

油脂の加熱劣化傾向は，同じ種類の油脂であってもロットにより大きく異なっており，その差は酸化防止剤の添加による差よりもはるかに大きかった（Fig. 5）．

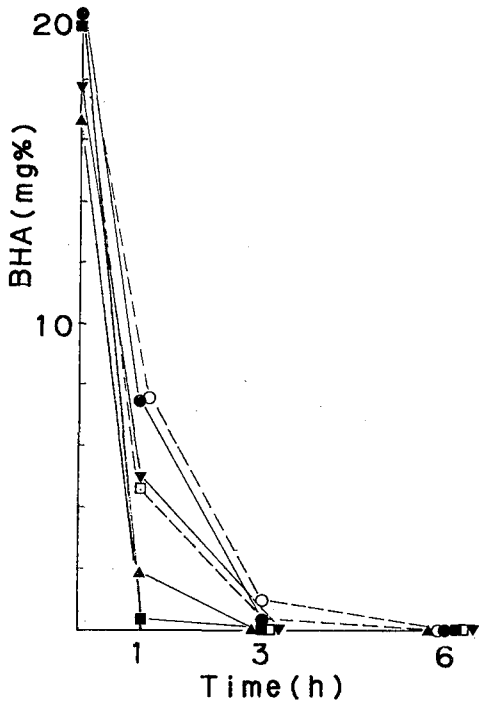


Fig. 10. Change in Residual Amount of BHA in Rapeseed Oil and Lard during the Course of Hedting at 180℃
▲ rapeseed oil-1
▼ lard-1
● ○ rapeseed oil-2
■ □ lard-2
——— silicon oil not added
– – – silicon oil added

ナタネ油-1とナタネ油-2とでは，ナタネ油-1の方が Toc の含有量が多いにもかかわらず COV が著しく上昇した．加熱劣化しやすい油脂に対してシリコーンオイルを添加すると劣化が抑制されるのに対し，比較的加熱劣化しにくい油脂に対してはシリコーンオイルの添加による効果はあまりみられなかった．一般に，油脂の加熱劣化を抑制するのにシリコーンオイルの添加が有効であるといわれているが，今回の実験では基質により有効なものとそれほどではないものとがあった．湯木ら[11]らは，シリコーンオイルの添加効果のみられない油脂中に微量のシリコーンオイルが含まれていると報告している．今回の実験でシリコーンオイルの添加効果のみられなかった油脂中にも微量のシリコーンオイルが含まれている可能性があり，現在その分析を検討中である．

3 COV と Toc 残存量

COV と Toc 残存量の関係を図にあらわすと Fig.11～

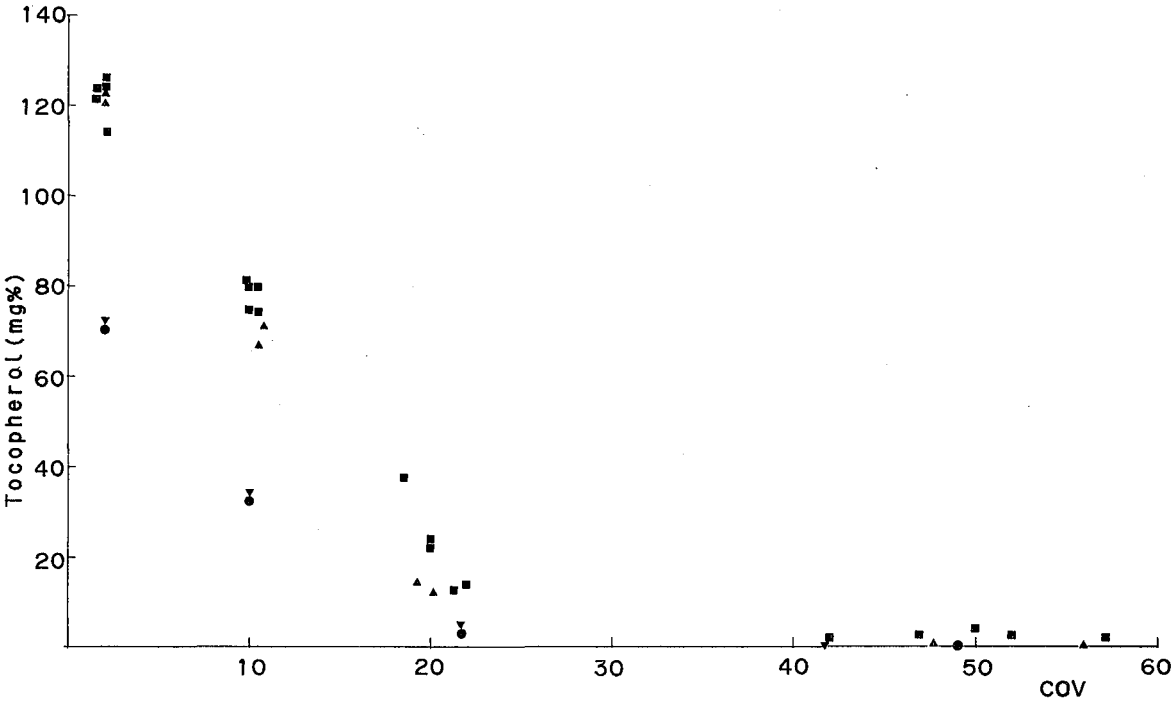


Fig. 11. Correlation between Carbonyl Value and Residual Amount of Tocopherol in Rapeseed Oil-1
- ● no addition
- ▲ *dl*-α-Toc, α-Toc added
- ▼ BHA added
- ■ mix-Toc added

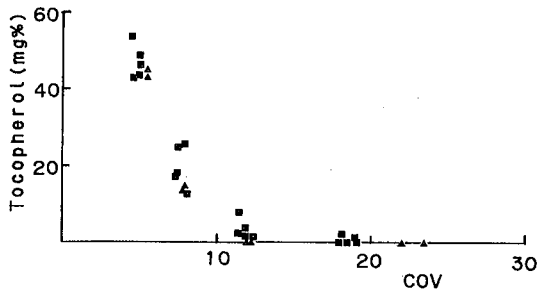


Fig. 12. Correlation between Carbonyl Value and Residual Amount of Tocopherol in Lard-1
- ▲ *dl*-α-Toc, α-Toc added
- ■ mix-Toc added

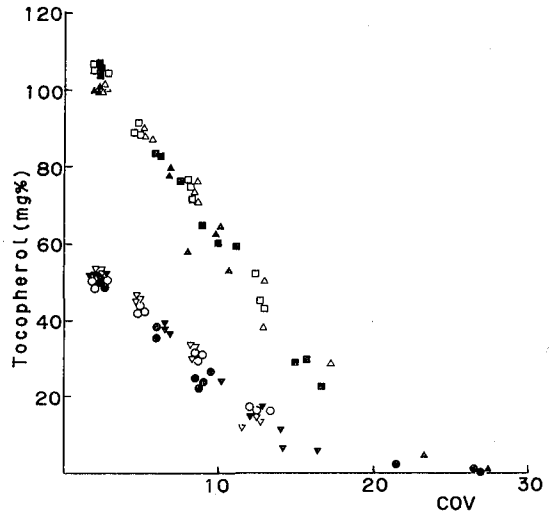


Fig. 13. Correlation between Carbonyl Value and Residual Amount of Tocopherol in Rapeseed Oil-2
- ● no addition
- ▼ BHA added
- ▲ *dl*-α-Toc added
- ■ mix-Toc added
- ○ silicone oil added
- ▽ BHA, silicone oil added
- △ *dl*-α-Toc, silicone oil added
- □ mix-Toc, silicone oil added

14のようになり，負の相関関係がみられた．ナタネ油の場合，もともとTocが含まれているため相関図の上でもTocを添加しないもの（無添加，BHA添加）とTocを添加したものの2つのグループに分けられる．COVとToc残存量との関係はTocが一定量以上ある場合はほぼ直線的であったが，Tocが消失してもCOVは上昇するため，Tocがほとんど消失した状態では，ほぼx軸上に点が分布する．ナタネ油-1，ラード-1では加熱6時間のもの，ナタネ油-2では酸化防止剤，シリコーンオイルともに無添加の加熱6時間のもの，ラード-2ではシリコーンオイル無添加の加熱3，6時間のものがこのような傾向を示した．そこで，これらの点を除いて回帰式を計算したところTable 1のようになり，良い直線関係が得られた．

Tocの初期値が異なる場合，回帰直線の傾きを比較することはあまり意味がないので，初期値のほぼ同じものを比較検討した．まず，基質によるちがいを検討したところ，ナタネ油-1とナタネ油-2（シリコーンオイル無添加）の回帰直線の傾きは，無添加，BHA添加の場合はほとんど同じであったが，Toc添加の場合は，ナタネ油—1の方が急であった（回帰直線の傾きの差の検定，$P<0.01$）．ラード-1とラード-2では，ラード-1の方が急であった（$P<0.01$）．シリコーンオイル添加の有無によるちがいは，ナタネ油-2，ラード-2ともみられ

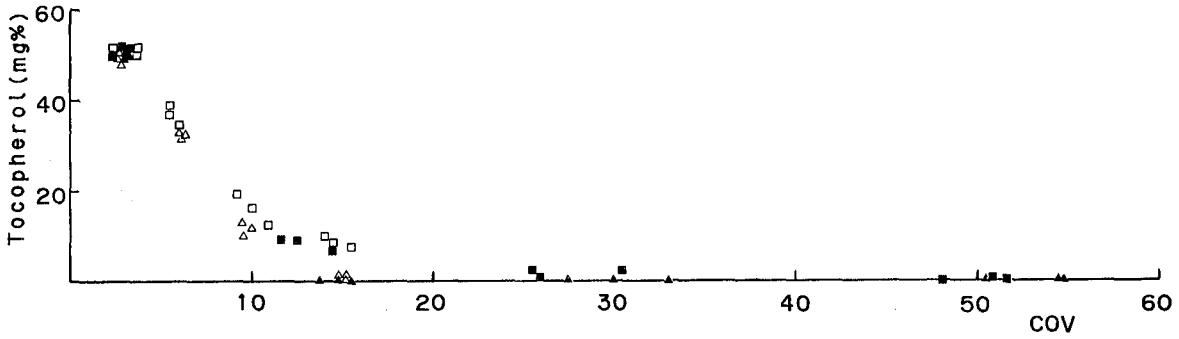


Fig. 14. Correlation between Carbonyl Value and Residual Amount of Tocopherol in Lard-2
▲ *dl*-α-Toc added △ *dl*-α-Toc, silicone oil added
■ mix-Toc added □ mix-Toc, silicone oil added

Table 1. Correlation Coefficient and Expression of Regression Line between Carbonyl Value and Residual Amount of Tocopherol (Toc) in Rapeseed Oil and Lard

Substrate	Addition of Antioxidant	Addition of Silicone oil	Correlation Coefficient	Expression of Regression line
Rapeseed oil-1	no addition,BHA		−0.981	$y=-3.37_x+73.52$
〃	dl-α-, α-,mix-Toc		−0.994	$y=-5.69_x+133.99$
Lard-1	dl-α-, α-,mix-Toc		−0.946	$y=-6.23_x+73.36$
Rapeseed oil-2	no addition,BHA	−	−0.989	$y=-3.48_x+58.30$
〃	〃	+	−0.987	$y=-3.57_x+60.22$
〃	α-,mix-Toc	−	−0.976	$y=-4.60_x+108.98$
〃	〃	+	−0.988	$y=-5.20_x+115.10$
Lard-2	α-,mix-Toc	−	−0.994	$y=-4.26_x+63.01$
〃	〃	+	−0.961	$y=-3.86_x+58.07$

Table 2. Correlation Coefficient and Expression of Regression Line between Carbonyl Value and Residual Amount of Tocopherol in Rapeseed Oil and Lard

Substrate	Addition of Antioxidant	Addition of Silicone oil	Correlation Coefficient	Expression of Regression line
Rapeseed oil-2	no addition	−	−0.985	$y=-3.80_X+58.85$
〃	〃	+	−0.996	$y=-3.24_X+57.65$
〃	BHA	−	−0.996	$y=-3.51_X+59.70$
〃	〃	+	−0.988	$y=-3.93_X+62.86$
〃	dl-α-Toc	−	−0.982	$y=-4.11_X+104.43$
〃	〃	+	−0.985	$y=-5.00_X+113.48$
〃	mix-Toc	−	−0.997	$y=-5.73_X+118.56$
〃	〃	+	−0.994	$y=-5.48_X+117.10$
Lard-2	dl-α-Toc	−	−0.996	$y=-4.29_X+63.04$
〃	〃	+	−0.968	$y=-4.04_X+57.70$
〃	mix-Toc	−	−0.992	$y=-4.21_X+62.87$
〃	〃	+	−0.969	$y=-3.66_X+58.31$

なかった．無添加とBHA添加，*dl*-α-Toc添加とmix−Toc添加の間にはっきりしたちがいはみられなかった（Table 2）

まとめ

1．油脂の劣化の速さは同じ種類の油脂であっても，ロットによりかなりのちがいがみられた．

2．ラードの場合，急速な加熱劣化により酸化防止剤が短時間のうちに消失してしまう基質では酸化防止剤の効果がみられなかったが，酸化防止剤が残存している基質では効果がみられた．しかし，酸化防止剤による加熱劣化の抑制は，酸化防止剤消失後一定時間までしか持続しなかった．

3．ナタネ油の場合も，劣化しやすい基質では効果がみられなかったが，劣化しにくい基質ではTocの消失したもの（無添加，*dl*-α-Toc添加）のCOVが，残存しているものに比べ上昇した．

4．同じ種類の基質2ロットの間では，COVの上昇の速い方がBHAやTocの減少も速かった．また基質の種類にかかわらず，酸化防止剤の減少速度はBHA＞α-Toc≧mix-Tocの順であった．

5．シリコーンオイルは一般に油脂の劣化を抑制するといわれているが，今回の実験では同じ種類の油脂でも有効なものとそれほどではないものがあり，劣化の著しい油脂に対して有効であった．シリコーンオイルを添加するとToc, BHAの減少も抑制された．

6．COVはToc残存量と良い負への相関を示した．

謝　辞　試料収集にあたり御協力いただいた東京都食品監視機動班ならびに，データの統計的解析にあたり御指導，御協力いただいた当研究所環境衛生研究科牧野国義主任研究員に深謝いたします．

文　献

1）太田静行，湯木悦二：フライ食品の理論と実際，65,1980,幸書房
2）藤谷　健，梶川春代，湯木悦二：油化学，24,856,1975
3）長井正信：*New Food Industry*,24,(8),1,1982
4）太田静行，日下兵爾：油化学，28，747,1979
5）藤川琢馬：化学工業，32,839,1981
6）太田静行：油化学，23,259,1974
7）梶本五郎，吉田弘美，三宅佐和子：栄養と食糧，23,437,1970
8）小沢順子，池谷　理，中村恵雄，日高義雄：栄養と食糧，33,393,1980
9）兼松　弘，青山　稔，丸山武範，新谷　勛，松本太郎：油化学，33,241,1984
10）藤谷　健，安藤久子：油化学，28,896,1979
11）湯木悦二，守本京三：油化学，31,915,1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 228-231, 1986

食品用ポリ塩化ビニル製フィルム中の可塑剤の分析

佐藤憲一*, 渡辺悠二*, 吉田令子*, 風間成孔*

Analysis of Plasticizers in Polyvinyl Chloride Films for Food

KENICHI SATO*, YUJI WATANABE*, REIKO YOSHIDA* and MASAYOSHI KAZAMA*

Examination of plasticizers in polyvinyl chloride films on the market was carried out. An analysis of 21 samples (8 makers in Japan) identified 5 plasticizers (o-acetyl tributyl citrate, dialkyl adipate, di-*i*-nonyl adipate, di-*n*-alkyl adipate, diacetyl lauryl glyceride).

Quantitative analysis was very difficult if plasticizers were blended, and their amounts were calculated by the area proportional allotment method. Their amounts in polyvinyl chloride films were 15.2～25.8% (W/W). They met standards set by the Positive List of Japan Hygienic PVC Association.

Keywords: Plasticizer, Polyvinyl chloride, o-acetyl tributyl citrate, dialkyl adipate, di-*i*-nonyl adipate, di-*n*-alkyl adipate, diacetyl lauryl gryceride

はじめに

食品用ポリ塩化ビニル（以下PVCと略す）製フィルムには柔軟性を持たせるため，可塑剤の添加が必要不可欠である．PVC用可塑剤として以前はフタル酸エステル類が使用されていたが[1]，毒性・環境汚染などの問題から主にアジピン酸ジ－２－エチルヘキシル（以下DOAと略す）が使用されるようになった．しかしDOAについても，1981年米国で発ガン性の疑いがあるとの指摘[2]があってから他の可塑剤へ変更され今日に至っている．しかしその代替可塑剤については，現在一部[3~5]を除いて明らかにされていない．また食品用PVC製フィルムには可塑剤が多量に添加されており，食品への移行性も問題となることから[6]，可塑剤の使用実態を明らかにしておく必要がある．そこで食品用PVC製フィルム中の可塑剤の分析法を検討し，その使用実態について調査を行ったので報告する．

実験の部

試料　昭和59年４月から昭和61年３月までに都内で収去した業務用PVC製フィルム８社21検体を用いた．なお国内で食品用PVC製フィルムを製造しているのは，現在この８社だけである．

試薬　１．クロロホルム（和光純薬工業製，液体クロマトグラフィー用）２．0.5Nアルコール性水酸化カリウム溶液（食品添加物公定書[7]により調製）３．三フッ化ホウ素メタノール試液（ガスクロ工業製）４．標準試薬*o*－アセチルクエン酸トリブチル（東京化成製，以下ATBCと略す）アジピン酸ジアルキル（三菱化成ビニル製，以下7・9Aと略す）アジピン酸ジ－*i*－ノニル（三建化工製，大日本インキ化学製，以下DINAと略す）アジピン酸ジ－*n*－アルキル（三建化工製，以下6・10Aと略す）ジアセチルラウリルグリセライド（理研ビタミン製，以下DALGと略す）*n*－ブタノール，*n*－ヘキサノール，*n*－ヘプタノール，*n*－オクタノール，*n*－ノナノール，*n*－デカノール，*o*－アセチルクエン酸トリメチル，アジピン酸ジメチル，ラウリン酸メチル（東京化成製）オキソアルコール（三菱化成ビニル製，炭素数７と９を主体としたアルコール）*i*－ノニルアルコール（三建化工製）５．標準溶液　上記４の各標準試薬をクロロホルムに溶かしてそれぞれ0.1W／V％溶液に調製した．

装置　ガスクロマトグラフ（以下GCと略す）：Ⅰ．島津GC９A型FID検出器付　Ⅱ．日立GC 163型TCD検出器付　赤外分光光度計（以下IRと略す）：日本分光製A－３型ビームコンデンサー付　記録計：島津クロ

*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

マトパックC−R1B

GC条件　Ⅰ.島津GC 9A, 3％シリコンE−301／Uniport HP 60～80 mesh, 3㎜×2mガラスカラム，カラム温度180°—300°（1°/min），注入口温度310°，キャリヤーガス N_2 60ml/min, 注入量2 μl　Ⅱ.5％PEG−HP, カラム温度70°—200°（10°/min）その他の条件はⅠと同じ　Ⅲ.日立GC 163, 8㎜×1m分取用ステンレスカラム，キャリヤーガスHe，注入量50 μl その他の条件はⅠと同じ

分析方法　試料0.1gにクロロホルム20ml を加え一昼夜放置して試験溶液とし，GC条件Ⅰでガスクロマトグラムを得た．また試料5gにクロロホルム100ml を加え，一昼夜放置して得た抽出液をロータリーエバポレーターで濃縮し，衛生試験法[8]に準じてシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し，クロロホルムで5 ml としてGC条件Ⅲで各ピークを分取した．このピーク分取溶液をKBrミクロ錠剤の液膜法でIRスペクトルを測定した．また分取溶液を常法に従ってアルコール性KOH溶液でケン化し，GC条件Ⅱでガスクロマトグラフィーを行いアルコール成分の検索を行った．さらにこのケン化溶液に三フッ化ホウ素メタノール試液を1 ml 加えてメチルエステル化し[5]，上澄液をGC条件Ⅱでガスクロマトグラフィーを行い，メチルエステル化合物の検索を行った．

結果と考察

可塑剤の同定　IRスペクトルから各分取溶液はすべてエステル結合を有することがわかった．またベンゼン環は存在せず脂肪酸のエステルと考えられた．そこで分取溶液をケン化してGCでアルコール成分の検索を行ったところ，*n*−ブタノール，*n*−ヘキサノール，*n*−ヘプタノール，*n*−オクタノール，*n*−ノナノール，*n*−デカノールの6種類のアルコールを検出した．しかし残りのアルコール成分については，市販の種々のアルコールと比較したがGCのリテンションタイムで該当するものは見出せなかった．そこでオキソ法により合成される工業用アルコールではないかと考え，オキソアルコール及び*i*−ノニルアルコールと比較したところGCにおいてピークのリテンションタイムが一致した．しかし1分取成分についてはGCにおいてアルコール成分は検出されず，グリコールあるいはグリセリン系化合物ではないかと考えられた．

各分取溶液のケン化溶液をメチルエステル化して脂肪酸成分の検索を行ったところ，アジピン酸ジメチル，*o*−アセチルクエン酸トリメチル，ラウリン酸メチルが検出された．そこでアルコール成分との関係から分取成分

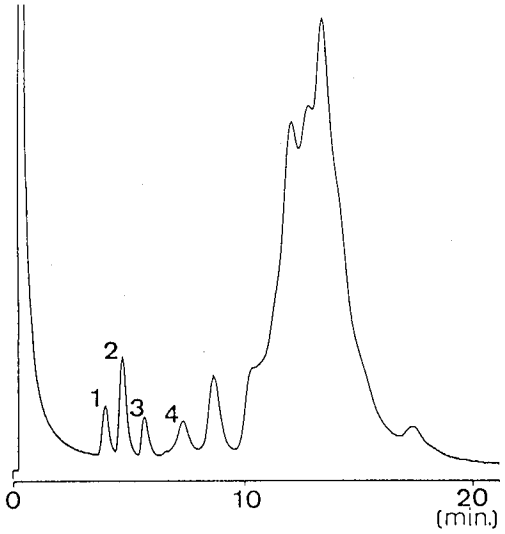


Fig. 1．Gas Chromatogram of No. 1

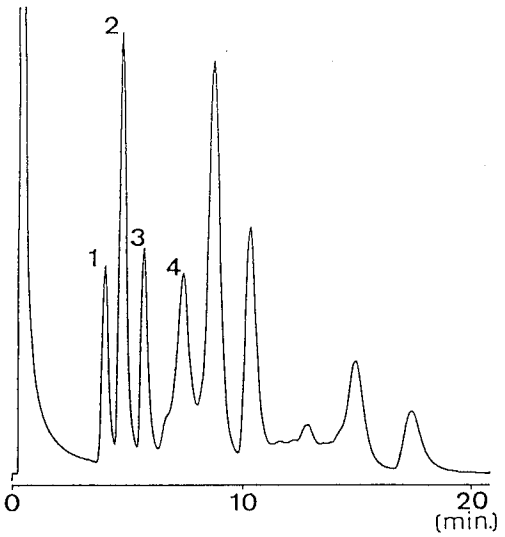


Fig. 2．Gas Chromatogram of　7・9A

はATBC, 7・9A, DINA, 6・10Aであることが判明し，標準溶液と比較したところGCで各成分とも一致した．なお各可塑剤の特徴として，7・9Aはピークが9本，DINAは幅広い山形のピーク，6・10Aはピークが5本出現する．これはエステルの構成アルコールが同族体化合物の集合体であることによる．さらにDINAについては原料アルコールの組成の違いにより，2種類あることが判明した．またアルコール成分が検出されなかった分取溶液はメチルエステル化でラウリン酸メチルが検出されたことから，グリセリンの脂肪酸エステルではないかと考え，DALG比較したところGCで一致し，主成分の

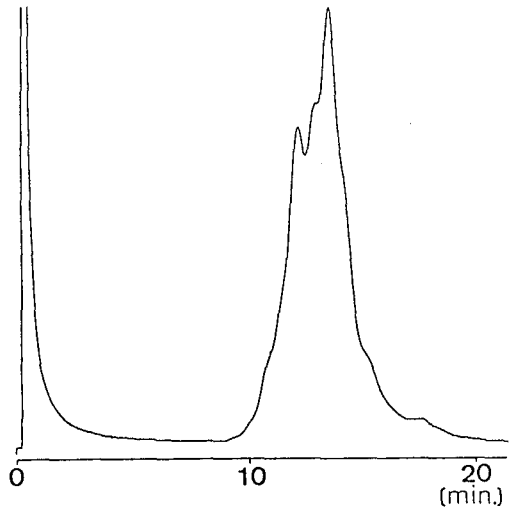


Fig. 3. Gas Chromatogram of DINA

DALG の他に副成分として数本のピークを伴っていた.

可塑剤の定量 今回検出した ATBC, 7・9A, 6・10A, DALG の 5 種類の可塑剤において, それぞれが単独使用されているかあるいは単一ピークとなる ATBC については, 標準溶液から GC により定量することができる. しかし7・9A, 6・10A, DALG については混合使用されている場合, 複数のピークが重なるため直接定量することは困難である. そこで可塑剤標準試薬と配合可塑剤の組成が同じであると仮定し, ピーク面積から比例計算により定量を行った.

検体 No. 1 については計算例を以下に示した. Fig. 1 は検体 No. 1, Fig. 2 は7・9 A の0.1%標準溶液, Fig. 3 は DINA の0.1%標準溶液のガスクロマトグラムである. ここで Fig. 1 における 1 ～ 4 のピーク面積を A, Fig. 1 における全ピーク面積を B, Fig. 2 における全ピーク面

Table 1. Contents of Plasticizers in PVC Films

No.	Manufacturer	ATBC	7・9A	DINA	6・10A	DALG	Total
1	A		4.1	20.5			24.6
2			6.0	14.8			20.8
3			5.9	14.7			20.6
4			3.8	18.2			22.0
5	B			18.4		5.9	24.3
6	C		13.4	11.6			25.0
7			15.7	4.3			20.0
8	D				22.7		22.7
9					19.6		19.6
10					17.5		17.5
11	E	1.2		20.0	4.6		25.8
12		1.5		15.5	5.4		22.4
13				8.0	9.1		17.1
14	F		4.7	14.2			18.9
15			6.2	10.8			17.0
16			5.8	9.9			15.7
17			3.8	11.4			15.2
18	G			3.6	16.0		19.6
19				6.5	10.7		17.2
20				3.1	14.9		18.0
21	H		12.3	10.3			22.6

(%)

ATBC : o-acetyl tributyl citrate, 7・9A : dialkyl adipate, DINA : di-*i*-nonyl adipate, 6・10A : di-*n*-alkyl adipate, DALG : diacetyl lauryl glyceride

積中の1～4のピーク面積比率をCとすると，Fig.1における7・9Aのピーク面積はA／C，DINAのピーク面積はB－A／Cとなる．このようなピーク面積を比例配分する方法でFig.1の7・9A，DINAの量をあらかじめ作成しておいた検量線により算出した．

可塑剤の使用実態　食品用PVC製フィルム8社21検体の可塑剤の分析結果をTable 1に示した．使用可塑剤はATBC, 7・9A, DINA, 6・10A, DALGの5種類であった．21検体中DALGは1検体，ATBCは2検体に使用されていただけであるが，7・9Aが11検体，DINAが18検体，6・10Aが9検体に使用されており，この3種類のアジピン酸エステルがDOAの代替可塑剤となっていることがわかった．単独使用はD社の6・10Aが3検体，3種類使用がE社の2検体で，残り16検体は2種類の混合使用であった．そのうち7・9AとDINAの組合せが11検体で可塑剤配合の主力となっていた．検体数が少ないが，各社によって使用可塑剤の組合せは一定しているようであった．可塑剤の添加量は15.2～25.8%（平均20.3%）であった．

全検体とも業界の自主規格である塩ビ食品衛生協議会のポジティブリスト[9]に従って使用されていた．なお今回検出した5種類の可塑剤のうちDALGについては，ポジティブリストの可塑剤の項に収載されていない．この件について塩ビ食品衛生協議会に問い合せたところ，DALGは食品添加物収載品（グリセリン脂肪酸エステル）に該当し，用途については規制していないとのことであった．

ま と め

1．食品用PVC製フィルム中の可塑剤の定性・定量法を検討し，国内8社21検体について分析を行った．

2．定性法として抽出可塑剤をTCD分取ガスクロマトグラフィーで各ピークを分取し，ケン化・メチルエステル化の方法により構成アルコール及び脂肪酸の検索を行い，ATBC, 7・9A, DINA, 6・10A, DALGの5種類の可塑剤を検出した．

3．定量法として可塑剤標準品と配合可塑剤の組成が同じと仮定し，ピーク面積比例分配方式で行ったところ，可塑剤の添加量は15.2～25.8%（平均20.3%）であった．

4．今回分析した可塑剤については，塩ビ食品衛生協議会のポジティブリストに従って使用されていた．

謝　辞　本研究にあたり可塑剤標準品を提供していただいた，三菱化成ビニル㈱，三建化工㈱，大日本インキ化学㈱，理研ビタミン㈱，の各社に深謝いたします．

文　献

1）渡辺悠二，佐藤憲一，吉田令子，諏訪世津子，藤居瑛：東京衛研年報，22—1,230,1975
2）厚生省，食品化学行政連絡報，No.3,1981
3）渡辺悠二，佐藤憲一，吉田令子，遠藤英美：東京衛研年報，33,232,1982
4）厚生省，食品化学行政連絡報，No.14,1982
5）加藤クニ，中岡正吉，伊藤和敏：食品衛生学雑誌，25,317,1984
6）美藤克幸，栗田滋通，大脇敏和，広瀬俊之，天上孝：食品衛生研究，33,969,1983
7）食品添加物公定書，第4版，538,1978,日本食品衛生協会
8）日本薬学会編：衛生試験法・注解，621,1980,金原出版
9）塩ビ食品衛生協議会編：塩化ビニル樹脂製食品容器包装等に関する自主規制基準，PL規格改定第8版，1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 232-236, 1986

高速液体クロマトグラフィーによる粉乳中のビタミンB_6の定量

笠原利英*, 井口正雄*, 友松俊夫*, 道口正雄*

Determination of Vitamin B_6 in Milk Powder by High-Performance Liquid Chromatography

TOSHIHIDE KASAHARA*, MASAO IGUCHI*, TOSHIO TOMOMATSU* and MASAO DOGUCHI*

A reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorometric detection was applied to the determination of vitamin B_6 in milk powder. Samples were extracted with 0.2M potassium acetate buffer (pH 4.8) and extracts were analysed by HPLC. Four vitamin B_6 compounds (PMP, PM, PL and PN) in extracts were well separated from each other with 0.033M potassium phosphate buffer (pH 3.0) as mobile phase and were highly recovered. There was a good correlation between total vitamin B_6 content determined by HPLC and by microbiological assay using *Saccharomyces carlsbergensis* ($y=-0.056+1.023x$, $r=0.984$). These results showed that the HPLC method was available for the determination of vitamin B_6 in milk powder.

Keywords: vitamin B_6, milk powder, high-performance liquid chromatography

緒　言

食品および生体試料中のビタミンB_6（以下B_6と略す）の定量については，構造的に類似した6種のB_6化合物が存在することならびにそれらの含有量が低いことにより，様々な分離法と定量法が考え出されてきた[1]．従来，食品中のB_6の定量には，総B_6量の定量で充分であることおよび測定感度が高いことから微生物学的定量法が一般的に使われているが，食品中には微生物の生育を阻害あるいは促進する成分が混在し測定値に影響を与える[2,3]ことも考えられる．このような観点からここ十数年来，高速液体クロマトグラフィー（以下HPLCと略す）を食品中のB_6化合物の分離定量に適用した例が幾つか報告されている[4-8]．J.F.Gregoryはビタミン強化をした朝食穀類中のB_6（ピリドキシン）の定量について，HPLCによる簡便な定量法を報告している[8]．今回，著者らは動物性食品である粉乳について，HPLCによるB_6の分離定量を検討し，微生物学的定量法と比較したところ，粉乳中のB_6の定量においてHPLCが有用な方法であることを示す結果を得たので報告する．

実験方法

試薬　ピリドキサミン（以下PMと略す），ピリドキサール（PL），ピリドキシン（PN），ピリドキサミン5′－リン酸（PMP），ピリドキサール5′－リン酸（PLP），4′-デオキシピリドキシン（DPN）および酸性ホスファターゼ（EC 3.1.3.2.，ジャガイモ起源）はSigma社製を用いた．PNについては国立衛生試験所標準品（日本薬局方標準品）も用いた．微生物学的定量法で用いた*Saccharomyces carlsbergensis* strain 4228 ATCC 9080および麦芽寒天培地とB_6定量用基礎培地は日水製薬K.K.製を用いた．その他の試薬はすべて特級品を用いた．

試料　市販の乳児用調製粉乳5種（No.1～5）および妊産婦・授乳婦用粉乳2種（No.6～7）の7種類を用いた．

HPLC装置および条件　ポンプ：バリアンLC－5000，検出器：分光蛍光スペクトロモニターRF－530（島津），インテグレーター：クロマトパックC－R3A（島津），カラム：Unisil NQ C18（5 μm，4.6mmi.d.×250mm，ガスクロ工業），ガードカラム：Unisil Q C18（10 μm，4.0mmi.d.×10mm，ガスクロ工業），移動相：

*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

0.033M リン酸カリウム緩衝液（pH3.0），流速：1.0ml/min，カラム温度：室温，試料注入量：50 μl，検出波長：励起波長295nm，蛍光波長390nm. なお，計算にはピーク高を用いた．

HPLC 法による B_6 の定量　試料からの B_6 の抽出および HPLC 条件は J.F.Gregory の方法[8]を改変した．すなわち，約2gの粉乳試料を50ml容遠沈管（キャップ付）に正確にはかりとり，0.2M酢酸カリウム緩衝液（pH4.8）20mlを加えて15分間振とう後2500 rpm で20分間遠心分離した．その上清を2部（各2.0ml）に分け，一方はそのまま酢酸カリウム緩衝液0.5mlおよび30%（W/V）トリクロロ酢酸（TCA）0.5mlを加えて除蛋白した．他方には酸性ホスファターゼ溶液0.5ml（2U）を加えて37℃で2時間作用させた後，30% TCA 0.5mlで反応停止，除蛋白をした．両者とも30分間室温に放置した後2500 rpm で15分間遠心分離し，その上清を0.45 μmのメンブランフィルター（日本ミリポアリミテッド）に通して HPLC 用検液とした．なお，内部標準として各遠沈管毎に DPN 100 μg（塩酸態として）を添加した．

微生物学的定量法による総 B_6 の定量　検定菌として *S. carlsbergensis* を用いる濁度測定法[9]によった．すなわち，約1gの粉乳試料を300ml容三角フラスコに正確にはかりとり，0.055 N 塩酸180mlを加えて121℃で4時間加圧分解後，pH 5.0に調整し，定容，ろ過したろ液を希釈して検液とした．B_6 の定量値は，この検液を0.5, 1.0および2.0mlずつ培養試験管に添加した3段階の濃度において得られた値を平均して算出した．接種菌液の調製，測定操作，培養および計算は常法[10]にしたがった．

結果および考察

標準 B_6 化合物および粉乳の酢酸カリウム抽出液のクロマトグラムを Fig. 1．に示した．5種類の B_6 化合物および内部標準である DPN は30分以内に完全に分離した．なお，後述するように，粉乳中にはピリドキシンリン酸（PNP）は存在しないものと思われたので PNP については考慮しなかった．各 B_6 化合物に対する検量線につ

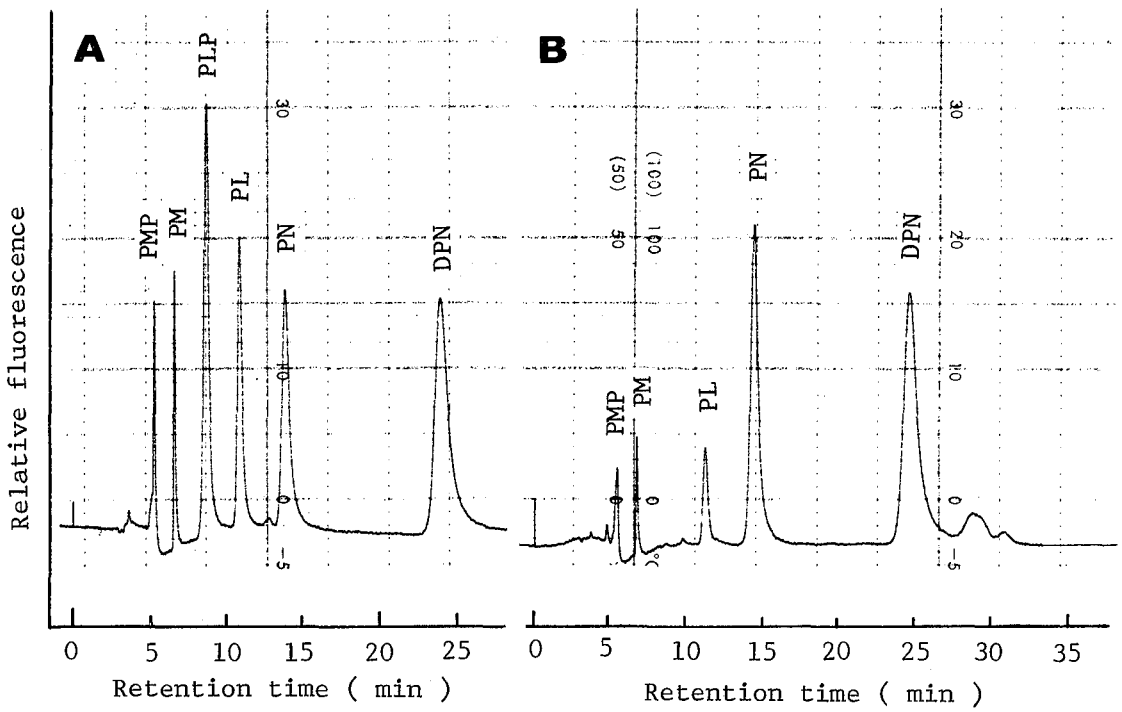


Fig. 1. HPLC Chromatograms of Vitamin B_6 Standard (A) and Extract from Milk Powder (B)
Abbreviations and amounts of standard per 50 μl injection: PMP,pyridoxamine 5′−phosphate,2.09 ng; PM,pyridoxamine,1.67 ng; PLP,pyridoxal 5′−phosphate,150 ng; PL,pyridoxal,9.85 ng; PN,pyridoxine, 9.88 ng; DPN,4′−deoxypyridoxine,121 ng

いても良好な直線性が得られた．各B_6化合物の検出限界は，PMP と PM が約0.2ng，PLP が約10ng，PL とPN が約 1 ng であった．これらの値を試料あたりに換算すると，PMP と PM が約 6 μg/100g，PLP が約300 μg/100g，PL と PN が約30 μg/100gである．これに対して微生物学的定量法における検出限界は総B_6量として 6～10 μg/100g（試料採取量 1 g のとき）である．このようにHPLC における検出限界は微生物学的定量法における値と比較して，同等か若干大きい程度（数倍）であり，HPLC による粉乳中のB_6の定量が充分可能であることが示された．粉乳抽出液のクロマトグラムは，妨害ピークもなく各B_6化合物が良好に分離していることを示している．また35分以降には何らピークが出現しなかった．PLP のピークは認められなかったが，このことは上記の検出限界と粉乳中のPLP 含量から考えて当然である．そこで PLP 量については，酸性ホスファターゼによる PLP の分解を行い，PL の増加量から算出した．酸性ホスファターゼによる PLP の分解率は 2 時間で85％であった．また酸性ホスファターゼ作用前後の PN 量には有意差が認められなかったので，粉乳中にはピリドキシンリン酸は存在しないものと思われる．粉乳抽出液の HPLC における各B_6化合物の同定は，保持時間の一致，標準物質を添加した時のスパイキングおよびクロマト溶出液の蛍光スペクトルの一致によって確認した．調製粉乳のB_6の主成分である PN の蛍光スペクトルを Fig. 2．に示した．

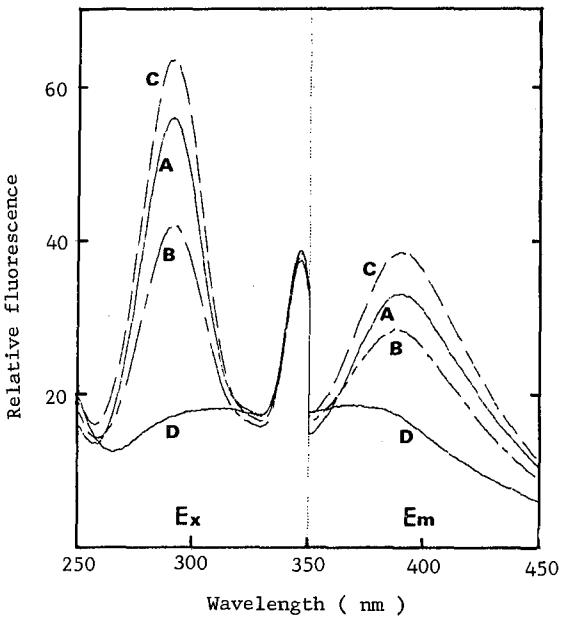


Fig. 2．Fluorescence Excitation (Ex) and Emission (Em) Spectra of Collected PN Chromatographic Peak
A,Standard; B,Sample; C,Sample + Standard; D,Buffer＝HPLC mobile phase (pH 3.0)

酢酸カリウム緩衝液による粉乳からのB_6の抽出量と試料重量との関係を Fig. 3．に示した．PMP，PM および PN については試料重量が 4 g までは定量的に抽出されるが，PL については 2 g 以上で抽出効率が低下していることが示された．従って以下の測定では試料重量を 2 g とした．

粉乳に既知量のB_6化合物を添加した場合の回収率を Table 1．に示した．PLP の添加回収率が59％と低い値であることは，PLP 溶液について試料と同様に処理した場合の回収率が85％であり酸性ホスファターゼによる PLP の分解率と一致していたことから考えて，酸性ホ

Table 1．Recovery of Vitamin B_6 Compounds Added to Milk Powder Prior to Extraction and HPLC

compund	amount added[a)]	recovery,%[b)]
PMP	1	95.7±3.1
PM	1	96.2±0.9
PLP	2	59.4±5.5
PL	2	94.7±1.1
PN	5	109.9±7.5

a) μg as their hydrochloride forms except PLP
b) Mean ± SD for 3 milk powder samples (No. 1, 3, 5)

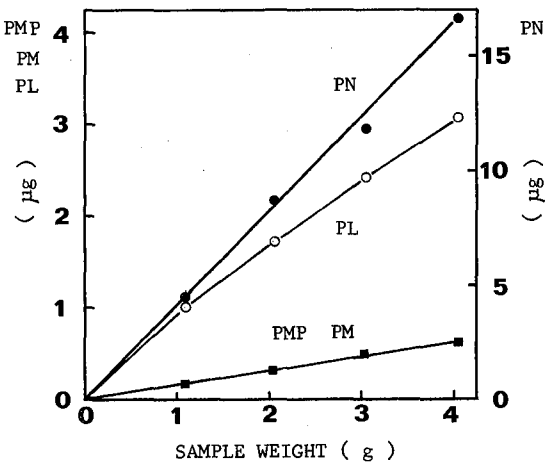


Fig. 3．Relationship between Vitamin B_6 Amounts in Extract and Sample Weight of Milk Powder

Table 2. Content of Vitamin B_6 in Milk Powder Determined by HPLC and Microbiological Assay [a)]

Milk powder	HPLC						MBA*
No. [b)]	PMP	PM	PLP	PL	PN	Total B_6	Total B_6
1	0.24	0.17	0.19	0.82	4.3	5.7	5.6
2	0.30	0.16	0.15	0.41	2.9	3.9	4.4
3	0.35	0.31	0.09	0.67	2.6	4.0	4.1
4	0.23	0.16	0.20	0.67	3.8	5.1	4.7
5	0.42	0.35	0.12	0.88	2.8	4.5	4.1
6	0.21	0.27	0.19	1.27	5.5	7.4	7.3
7	0.16	0.24	0.10	0.98	ND	1.5	1.5
mean	0.27	0.24	0.15	0.81			
SD	0.09	0.08	0.05	0.27			

* MBA, Microbiological assay

a) Values are given in μg/g milk powder as pyridoxine equivalent. ND, not detected
Each value represents mean of duplicate analyses except that HPLC value of No. 1 represents mean of six analyses

b) No. 1 − 5 , modified milk powder for infant
No. 6 − 7 , milk powder for pregnant and lactating woman

スファターゼによるPLPの分解が粉乳試料共存下では低下していることを示すものと思われる．PLPの添加回収率は低かったが，総B_6量に占めるPLPの割合から考えて影響は小さいものとして，回収率による補正は行わなかった．PLP以外のB_6化合物については高い回収率が得られた．

HPLCおよび微生物学的定量法によって測定された粉乳試料中のB_6含量の結果をTable 2．に示した．粉乳No. 1において6回の分析によるHPLCでの変動係数を調べたところ，PMP 4.8%，PM 2.7%，PLP 8.0%，PL 1.7%，PN 6.6%，総B_6で4.6%であり，ほぼ良好であった．PLPについては先に示した様に添加回収率が低いことおよび酸性ホスファターゼ作用によるPL増加量からの計算値であることが関係して大きな変動係数になったものと思われる．

総B_6量についてHPLCによる値（y）と微生物学的定量法による値（x）とを比較すると，$y = -0.059 + 1.023x$ ($r = 0.984$) という関係が得られ，両測定法による値はよく一致していることが示された．またHPLCの利点の一つは各B_6成分が測定可能なことである．粉乳No. 1 ～ 5は乳児用調製粉乳でありPNが添加されているのに対して，No. 6 ～ 7の妊産婦・授乳婦用粉乳においてはNo. 6ではPNが添加されているが，No. 7ではPNが認められずB_6強化がされていないことが示された．このNo. 7の場合も，HPLCによる値と微生物学的定量法による値がよく一致したことは，原料乳由来のB_6化合物もよく抽出されていることを示している．Table 2．にはPN以外のB_6化合物についてその平均値が示されているが，それらの値をJ.F.Gregoryら[7]がスルホサリチル酸で抽出しイオンペアHPLCで分析した牛乳のB_6成分の分析値と比較してみると，PLPの含有量割合は約1/2であるが，他のB_6成分の含有量割合はよく一致していた．

本実験で用いられたB_6抽出条件および逆相HPLCによるB_6の分析は，最初にJ.F.Gregory[8]がビタミンB_6（ピリドキシン）を強化した朝食穀類の分析で良好な結果を得たものであるが，本報告ではさらに，動物性食品である粉乳についても，ビタミンB_6強化の有無に関係なくHPLCが適用でき，回収率，変動係数，微生物学的定量法との一致，さらには手順の簡便さ，多数試料処理の可能性からみて充分有用であることが示された．

要　約

乳児用調製粉乳および妊産婦・授乳婦用粉乳中のビタミンB_6の定量に逆相HPLCを適用した．0.2M酢酸カリ

ウム緩衝液（pH4.8）による粉乳抽出液中の各B_6化合物（PMP, PM, PL およびPN）は0.033Mリン酸カリウム緩衝液（pH3.0）を移動相とするHPLCにより，妨害ピークもなく完全に分離し，添加回収率，変動係数も良好であった．またHPLCによって定量した総B_6量の値は，微生物学的定量法による値とよく一致しており（$y=-0.056+1.023x$, $r=0.984$），動物性食品である粉乳中のB_6の定量についてもHPLCが適用でき，充分有用な方法であることが示された．

文　献

1）谷　吉樹：ビタミン，57,263,1983

2）Voigt, M. N., Eitenmiller, R. R. and Ware, G. O.: *J. Food Sci.*, 44,723,1979

3）*idem*:*ibid.*,44,729,1979

4）Gregory, J. F. and Kirk, J. R.: *J. Food Sci.*,43, 1801, 1978

5）Vanderslice, J. T., Brownlee, S. R. and Cortissoz, M. E.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*,67,999,1984

6）Bognar, A.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*,181,200,1985

7）Gregory, J. F. and Feldstein, D.: *J. Agr. Food Chem.*,33,359,1985

8）Gregory, J. F.: *J. Agr. Food Chem.*,28,486,1980

9）前川昭男：改訂食品分析ハンドブック，小原哲二郎他監修，林淳三他編，356,1982,建帛社，東京

10）工藤悦子：ビタミン・アミノ酸の微生物学的定量法の原理ならびに基本操作，ニッサンライブラリーNo. 2，新村寿夫監修，1965,日水製薬株式会社，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 237-240, 1986

小笠原産シカクマメ「ウリズン」のビタミン分析

菊谷典久*, 佐藤直子*, 笠原利英*, 井口正雄*,
友松俊夫*, 道口正雄*, 浦野元幸**,
山下三雄***, 小沢　聖****

Studies on Vitamin Contents of the Winged Bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) "Urizun" in Ogasawara Islands

NORIHISA KIKUTANI*, NAOKO SATO*, TOSHIHIDE KASAHARA*, MASAO IGUCHI*,
TOSHIO TOMOMATSU*, MASAO DOGUCHI*, MOTOYUKI URANO**,
MITSUO YAMASHITA*** and KIYOSHI OZAWA****

Analyses of vitamins were made on immature pods of the winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) "Urizun" harvested in Ogasawara Islands.

The winged bean "Urizun", a new breed selected from tropical species M-13-1, is experimentally grown to supply its immature pods in summer season to cover shortage of vegetables in subtropical areas of Japan.

Samples of immature pods were divided into six groups according to weight and subjected to analyses of vitamin A, B_1, B_2, C and niacin. A medium size group (7.3g／pod) suitable for serving as vegetables was found to contain 620 μg carotene, 0.34mg B_1, 0.09mg B_2, 10mg C and 0.7mg niacin per 100g respectively. Vitamin B_1 content in immature pods of the winged bean was significantly higher than those of other leguminous plants. The composition of other vitamins in immature pods of the winged bean was similar to that of kidney beans. These results suggest that the winged bean "Urizun" may play an important role as a summer vegetable in subtropical areas of Japan.

Keywords: winged bean, *Psophocarpus tetragonolobus*, Urizun, summer vegetable, vitamin content

緒　言

シカクマメ (winged bean, *psophocarpus tetragonolobus*) は，熱帯地方原産のつる性の多年生マメ科植物で，過去，パプアニューギニア，あるいは東南アジアの一部地域において，栽培されてきた[1]．その莢の形が，四稜になっており，切り口が四角に見えるところから，シカクマメの名がある．食用部位は，若莢，葉，若枝，花，種子，塊根など，ほぼ植物全体に及んでおり，特に熟した豆は，タンパク質を多く含んでいる．

近年，熱帯地方における食糧の不足，住民の栄養不良の深刻化に伴い，有用な植物資源が求められている折，高温多湿の気候条件のもとで良く生育するシカクマメが新しい熱帯作物として注目され始めた．

わが国では，沖縄や小笠原といった亜熱帯地域において，夏期の野菜不足がはなはだしいところから，その対策として，シカクマメの若莢を利用することが検討されている．夏野菜として若莢を用いるには，夏期の長日条件下でも，開花，結莢可能な極早生の品種を開発することが必要であり，現在，農林水産省熱帯農業研究センター，東京都小笠原亜熱帯農業センターなどにおいて，

*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
**東京都衛生局島しょ保健所
***東京都立神経病院栄養科
****東京都小笠原亜熱帯農業センター

栽培条件，品種改良等の研究が進められている．このうち，1982年に西オーストラリア農務局より導入されたシカクマメ・M－13－1号から選抜された新品種「ウリズン」は，春まき栽培で，7～8月の盛夏期に安定して若莢が収穫でき，しかも収量も多いところから，亜熱帯地域での夏野菜としての利用が，有望視されている．

今回，著者らは，このシカクマメ「ウリズン」の栄養成分評価の一環として，若莢中のビタミンA，B_1，B_2，C，ナイアシンの分析調査を行った．以下報告する．

試料および実験方法

Ⅰ．試料　シカクマメ「ウリズン」：東京都小笠原亜熱帯農業センターにおいて，春まき栽培され，10月に収穫された若莢を試料とした．（本種子は，農林水産省熱帯農業研究センターより，現地適応性検定試験のために，供与されたものである．）若莢は重量別に第1群（平均重量4.3g／莢），第2群（同5.9g／莢），第3群（同7.3g／莢），第4群（同9.6g／莢），第5群（同11.7g／莢），第6群（同16.0g／莢）の6種に分けた．なお，この6群の中では，第3群，第4群のものが，食味あるいは生産効率などの面からみて，食用に最適な大きさである．これら各群について，約20～30莢を細切し，以下の各分析に供した．分析項目は，ビタミンA（レチノール，カロチン），B_1，B_2，C，ナイアシンである．

Ⅱ．ビタミンAの分析　①レチノール：試料10gを秤取し，衛生試験法[2]に準じ，試験溶液を調製し，高速液体クロマトグラフィー（以下HPLCと略す）により定量した．HPLC条件については，著者らがマーガリン中のレチノール定量に用いた方法[3]によった．

カラム：逆相型，Unisil QC_{18}（5 μm），4.6mmI. D.×250mm（ガスクロ工業K.K.），プレカラム：Unisil QC_{18}（10 μm），4.0mmI.D.×10mm，カラム温度：30℃，溶離液：メタノール－水（91：9），流速：1.0ml／min，螢光検出：励起波長340nm，検出波長460nm．標準品としてシグマ社製レチノールアセテート，他の試薬については，試薬特級品を用いた．②カロチン：試料5gをとり，Yen-Pingの方法[4]に準じて試験溶液を調製し，αおよびβ－カロチンをHPLCにより定量した．HPLC条件は，カラム：レチノールの項と同様，溶離液：クロロホルム－アセトニトリル（8：92），流速：1.5ml／min，可視部検出：436nm，感度0.05AUFSであった．標準品としてシグマ社製α－カロチン，β－カロチンを使用した．またクロロホルム，アセトニトリルについてはHPLC用，その他の試薬については，試薬特級品を用いた．なお，カロチンのビタミンA効力値換算方法は，四訂日本食品標準成分表（科学技術庁・資源調査会編）によった．

Ⅲ．ビタミンB_1の分析　衛生試験法[5]に準じ，チオクローム螢光法により定量を行った．試料10gを磨砕後，塩酸酸性の条件下，沸騰水浴中で加熱抽出し，次にジアスターゼを加え，37℃にて一夜放置し，結合型チアミンの酵素分解を行った．得られた試料溶液は，パームチットカラムを用いて精製した．チアミンの酸化には，フェリシアン化カリウムを用い，生成したチオクロームをイソブチルアルコールで抽出し，その螢光強度を，励起波長375nm，検出波長420nmにて測定した．なお，標準として国立衛生試験所標準品（以下衛試標準品と略す），ジアスターゼは「V.B_1定量用タカジアスターゼB」（三共K.K.），パームチットは「V.B_1定量用活性ビタチェンジ」（和光純薬K.K.），他の試薬類は，試薬特級品を用いた．

Ⅳ．ビタミンB_2の分析　衛生試験法[6]に準じ，ルミフラビン螢光法により定量を行った．試料10gを磨砕後，塩酸酸性の条件下，沸騰水浴中で加熱抽出した．抽出液は，盲螢光を除去するため，同容量のクロロホルムを加え，3回予浸を行った．試料溶液は，終濃度0.5N NaOHとして1時間光分解し，生成したルミフラビンをクロロホルムで抽出し，その螢光強度を，励起波長430nm，検出波長530nmにて測定した．標準には衛試標準品，他の試薬については，試薬特級品を用いた．

Ⅴ．ビタミンCの分析　衛生試験法[7]に準じ，インドフェノール滴定法により定量を行った．試料7gを秤取し，メタリン酸を加え，乳鉢にて磨砕し，粥状とした．次に遠心分離を行い，上澄液を取り，試験溶液とした．ビタミンC標準品により，力価を検定したインドフェノール溶液を，試験溶液で滴定し，その値より試験溶液中のビタミンC量を算出した．標準には衛試標準品，他の試薬については，試薬特級品を用いた．

Ⅵ．ナイアシンの分析　微生物学的定量法によった．試料2gを秤取し，1N硫酸を加えてホモゲナイザーにて均質化した後，121℃で30分間分解を行った．冷後，水酸化ナトリウムを加えてpH6.8とし，定容後ろ過した．このろ液を適宜希釈して検液とした．検定菌としては，*Lactobacillus arabinosus* 17－5 ATCC 8014を用いた．菌の接種と培養，並びに濃度測定と計算法は，常法[8]に従った．標準として衛試標準品を用いた．また乳酸菌保存培地及びニコチン酸定量用基礎培地は，日水製薬K.K.製を，他の試薬については，試薬特級品を用いた．

結果および考察

Table 1に，シカクマメ若莢中の各ビタミン含有量を

示す.

ビタミンAについては，レチノールの存在は認められなかった．カロチンは，最軽量の第1群に最も多く含まれ（790 μg／100g），逆に第6群では最少値となり，第1群の約65％にすぎなかった．

ビタミンB_1は，ビタミンAと似た存在分布を示した．第1群が0.4mg／100gで最高含有量となる一方，第2群，第6群が低く，それらは第1群の60～65％程度であった．

ビタミンB_2については，第1群が0.12mg／100gでやや高い値であった他，各群に大きな差は見出せなかった．

ビタミンCについては，今回はインドフェノール滴定法により，還元型のものを測定した．第4群が6 mg／100gと低い値であった他，各群とも，ほぼ同レベルの値を示した．

ナイアシンは，各群とも0.6～0.8mg／100gの範囲にあり，それぞれ大きな差はみられなかった．

若莢を食用とする野菜には，サヤエンドウ（Garden Peas），サヤインゲン（Kidney Beans），オクラ（Okra）などがある．これらの野菜類と，シカクマメとのビタミン含有量を比較した表が，Table 2である．なお，シカクマメについては，第3群のものを，食用としての最適性から，その代表値としてあげた．他の野菜については，四訂日本食品標準成分表（科学技術庁・資源調査会編）の値である．ビタミンAは，ほぼサヤエンドウと同程度であり，サヤインゲンやオクラよりも多い．ビタミンB_1は，著しく高く，サヤエンドウの約2倍，サヤインゲンの約3倍であった．逆に，ビタミンB_2，Cについては，やや低い値であった．ナイアシンは，シカクマメ，サヤエンドウ，サヤインゲン，オクラとも，ほぼ同程度であった．

わが国の亜熱帯地域－沖縄，小笠原等では，8～10月が野菜生産の端境期となり，その生産量は激減する．このために，本土より多量の野菜が，この時期に出荷されているが，それにはいくつかの問題点が存在する．輸送コストなどの経済性，また流通過程における品質低下などである．これらの解決には，現地において，適当な夏野菜を生産する以外に方法は無い．

今回，分析を行ったシカクマメ「ウリズン」は，熱帯農業研究センター沖縄支所が，西オーストラリア農務局より導入したシカクマメ・M－13－1号（マレーシア原産）を，亜熱帯の条件下，夏野菜として若莢を利用できるように選抜育成し，昭和61年に新品種として登録したものである．

小笠原亜熱帯農業センターの試験では，このシカクマメは，①非常に高収量の成績で，商品化率が100％近いこと，②栽培が比較的容易であること，③室温保存が可能であること，④多種の料理に利用でき，食味が良いこと，などのメリットをあげている[9]．

今回，著者らが行ったビタミン分析では，サヤエンドウ，サヤインゲン，オクラなど，同類の野菜に比し，遜色の無い結果を示した．このシカクマメ「ウリズン」の現地生産が本格化することにより，亜熱帯地域での夏野菜不足が解消されるとともに，夏期において不足になりがちなビタミンの補給源として，地域住民の健康の保持，増進にも大いに役立つことが期待される．

Table 1. Vitamin Content in Immature Pods of the Winged Bean

	Sample					
	1	2	3	4	5	6
Average weight per pod (g)	4.3	5.9	7.3	9.6	11.7	16.0
Vitamin A (IU／100g)	440	320	340	310	350	290
retinol (μg／100g)	0	0	0	0	0	0
carotene (μg／100g)	790	570	620	560	630	520
Vitamin B_1 (mg／100g)	0.40	0.24	0.34	0.29	0.28	0.26
Vitamin B_2 (mg／100g)	0.12	0.08	0.09	0.09	0.09	0.10
Vitamin C (mg／100g)	9	10	10	6	11	10
Niacin (mg／100g)	0.8	0.7	0.7	0.6	0.7	0.7

All values are expressed on fresh weight basis.

Table 2. Comparison of Vitamin Contents in Immature Pods of the Winged Bean, Garden Peas, Kidney Beans and Okra

	Winged Bean	Garden Peas*	Kidney Beans*	Okra*
Vitamin A (IU／100g)	340	350	270	190
Vitamin B_1 (mg／100g)	0.34	0.15	0.11	0.13
Vitamin B_2 (mg／100g)	0.09	0.13	0.13	0.10
Vitamin C (mg／100g)	10	55	9	16
Niacin (mg／100g)	0.7	0.9	0.6	0.8

*Standard Tables of Japanese Food Composition, 4th ed. (1982)

文　献

1) National Research Council : *The Winged Bean. A High-Protein Crop for the Tropics* (2 nded.), v, 1981, National Academy Press, Washington,D.C.

2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，追補1288,1983, 金原出版

3) 井口正雄，友松俊夫，道口正雄：東京衛研年報，30－1,173,1979

4) Yen-Ping C.Hsieh : *J. Chromatogr.*, 259,515,1983

5) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，211,1980,金原出版

6) 同　上，213，同　上

7) 同　上，217，同　上

8) 宮沢　滋：ビタミン，56,487,1982

9) 熱帯農業研究センター沖縄支所：新品種命名登録候補に関する資料　シカクマメ石垣一号，9,1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 241-243, 1986

食品中の灰分および金属元素の測定におけるアルミはくカップの利用（第1報）粉乳中のナトリウム，カリウムの定量

佐藤直子*，菊谷典久*，井口正雄*，
友松俊夫*，道口正雄*

Application of Aluminum Foil Cup in Dry Ashing to Determination of Ash and Mineral Contents in Foods (I) Determination of Sodium and Potassium in Modified Milk Powder

NAOKO SATO*, NORIHISA KIKUTANI*, MASAO IGUCHI*,
TOSHIO TOMOMATSU* and MASAO DOGUCHI*

Keywords：sodium, potassium, ash content, aluminum foil

緒　言

食品の一般成分試験における灰分測定の際の灰化容器としては，一般に磁製蒸発皿，磁製るつぼあるいは，ホウケイ酸ガラス製ビーカー等を用い，これらを強熱し，デシケーター内で室温まで放冷して秤量する．この際，容器を放冷して室温まで下げるのに要する時間は，容器の大きさ，デシケーター内に入れる個数にもよるが，30分～1時間以上かかるのが普通である．また，灰分が比較的少なく，加熱により膨張する試料を測定する場合，大型の容器を必要とするので，放冷するのにかなり長時間を要する．さらに測定誤差も大きくなり，正確な測定が困難になる．これらの点を解決するため，灰化容器にアルミはくカップを利用して灰分の測定を行う方法が提案されている[1,2]．

一般成分試験においては，灰分の測定とあわせて，その灰を利用して金属元素の定量を同時に行うことが多い．そこで著者らは，灰化容器にこのアルミはくカップを利用し，灰分の測定のみならず，金属成分のうちのナトリウムおよびカリウム（以下それぞれNa，Kと略す）を測定する方法を検討したので，以下報告する．

実験方法

1．試薬　Na標準液およびK標準液：原子吸光分析用（和光純薬製），NaClおよびKCl：試薬特級（和光純薬製），塩酸：精密分析用20%塩酸（和光純薬製），水は再蒸留水を用いた．

2．装置　電気炉：トリオサイエンス社製電気マッフル炉，原子吸光分析装置：Nippon-Jarrel Ash AA845型，原子吸光分析用ランプ：浜松ホトニクス製ホローカソードランプL733

3．器具　ガラスビーカー：PYREX製ホウケイ酸ガラスビーカー，アルミはくカップ：アルミはく（JIS規格においては，アルミニウム約99.3%，その他不純物として，鉄，マンガン，銅等を含むとされている）は，三菱アルミニウム製，幅30cm×長さ25m×厚さ15ミクロンを用い，これを直径15cm前後の円型に切り，試料の容量に応じた大きさ（今回は50ml ビーカー程度）に成型したものを自製した．アルミはくを予め600℃（アルミニウムの融点は660.2℃）で2～3時間，加熱すると，表面に酸化アルミニウムの被膜ができ，その重量は約0.25%増加する．更に加熱時間を増やしても，これ以上，増加が認められなかったことから成型したカップを600℃で3時間加熱後，放冷して使用した．なお，加熱後の平均重量は約0.7gであった．

4．試料　市販の乳児用調整粉乳（W社製）

5．試料検液の調製　衛生試験法[3]に準じて実施したが，予備炭化した後の試料の灰化条件は500℃で16時間行った．アルミはくカップを用いた場合は灰分秤量後，別のビーカーにその灰分とカップの洗液とを合わせ，蒸発乾固させた後塩酸処理を行った．他の容器を用いた場合はそのまま塩酸処理を行った．ついでこれらを1%塩酸溶

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

Table 1. Ash Content of Modified Milk Powder ashed in Various Cups

(g/100 g)

time	in the air		in the desiccator			
	Al	PYREX	Pt	Al	Crucible	PYREX
0	2.6	—	—	2.3	—	—
30min	2.5	2.4	2.4	2.3	2.4	2.5
60min	2.5	2.9	2.5	2.3	2.5	2.6
24hr	2.5	3.1	2.6	2.3	2.7	2.8

Pt : Platinum Dish
Al : Aluminum Foil Cup

液を用いて定容して試料検液とした.

結果および考察

1. 灰分の測定について 恒量とした白金皿，アルミはくカップ，磁製るつぼおよびガラスビーカーにそれぞれ試料約2gをとり，予備炭化の後，灰化を行った．なお，アルミはくカップを用いた灰分の測定では，灰化終了後，直ちに上部を折りまげて密封した．灰分の測定結果をTable 1. に示した．放置時間0は，電気炉よりとり出した直後の時間を示すが，アルミはくカップ以外の容器は，秤量が不可能であった．容器による吸湿性の比較を検討したところ，アルミはくカップを用いた場合は，デシケーター外の放置およびデシケーター内の放置のいずれの場合も，吸湿は殆んど認められなかった．アルミはくカップ以外の容器においては，デシケーター内に放置した場合でも，放置時間の経過とともに吸湿が認められた．アルミはくカップは，電気炉よりとり出した後，急速に温度が下がり，秤量可能となり，また，デシケーター外でも容器の中の灰の吸湿性が殆んど認められなかったことから，灰分測定に適した容器であることが認められた．

2. Na, Kの測定について 磁製るつぼ，ガラスビーカーで試料を強熱すると，灰の組成によっては容器表面が浸され，Naの溶出およびKの吸着損失を生ずることが報告されている[4]．したがって，金属元素の定量分析の前処理として乾式灰化を行う場合は，白金皿を用いることがのぞましい．しかし，多くの検体を処理する場合，多数の白金皿を準備するのは困難である．そこで，アルミはくカップを用いた灰化後の試料について，NaおよびKの定量が可能であるかどうかを，白金皿，磁製るつぼ，ガラスビーカーを用いた場合と比較検討し，その結果をTable 2. に示した．Naの定量においては，アルミはくカップを用いた場合は，白金皿を用いた場合の値に最も近い値が得られ，磁製るつぼおよびガラスビーカーを用いた場合の値は，白金皿を用いた場合と比較して，やや高かった．Kの定量においては，やはり，アルミはくカップを用いた場合の値が白金皿を用いた場合の値に最も近かったが，Naの定量とは逆に，磁製るつぼおよびガラスビーカーを用いた場合の値は，白金皿を用いた場合の値に比べ，やや低かった．これらの事実は，磁製るつぼおよびガラスビーカーを用いて試料を灰化した場合，Naの溶出およびKの吸着が起こっている可能性を示すものであり，アルミはくカップを用いた場合は，試料の中のNaおよびKが正確に回収できたと考えられる．アルミはくカップで，粉乳の灰化を行うと，終了後，カップの底が，若干変形しているのが観察されたが，灰化前との容器の重量の差はみられなかった．

Table 2. Na and K Contents of Modified Milk Powder ashed in Various Cups

(mg/100 g)

cups	Na (%)	K (%)
Pt	166.6	567.5
Al	165.7(99.5)	569.9(100.4)
Crucible	178.4(107.1)	508.1(89.5)
PYREX	202.0(121.2)	525.6(92.6)

3. Na, Kの添加回収試験 灰化容器にアルミはくカップを用いた場合のNaおよびKの測定精度を確認するため，添加回収試験を行い，同時に，白金皿を用いた場合と比較した．試料約2gをとり，NaClおよびKClの水溶液を一定量加えたものについてNaおよびKの測定を行い，結果をTable 3. に示した．アルミはくカップを用いた場合，94.9%以上の回収率が得られ，これは白金皿を用いた場合の回収率とほぼ同レベルであった．

Table 3. Recovery of Na and K added to Samples

cups	found	added	total found	recovery	found	added	total found	recovery
	mgNa/100 g			%	mgK/100 g			%
Pt	166.6	150	311.1	98.3	567.5	500	1073.3	100.3
Al	165.7	150	303.0	96.0	569.9	500	1015.2	94.9

以上の実験により，アルミはくカップは，灰化容器として用いた場合，灰分測定時間は短かく，測定誤差も少ないことが確かめられた．また，灰分測定後の灰を用いてNa，Kの測定を行ったところ，粉乳中の含量および添加回収試験の回収率ともに白金皿に匹敵する値が得られた．さらにアルミはくカップは，大きさ，形などを自由に決められ，非常に手軽に用いることができるので，今後の一般成分試験および金属元素の定量にあたって大いに有用な容器であると考えられる．

今回は，試料として，乳児用調整粉乳を対象に，実験を行ったが，あらゆる食品について，また他の金属についても，アルミはくカップの有用性を検討する必要がある．さらにアルミはくカップは灰を入れたまま塩酸処理を行うことが困難であるので，今後の改善の余地があると考えられる．

要　約

1．アルミはくカップを，粉乳の灰化容器として用いたところ，灰分測定時間が短縮され，吸湿も認められず，非常に精度良く測定することができた．

2．アルミはくカップを用いて灰化した粉乳中のNaおよびKを定量したところ，粉乳中の含量および添加回収試験の回収率とも，白金皿とほぼ変わらない結果が得られ，磁製るつぼおよびガラスビーカーで観察されたNaの溶出およびKの吸着損失は認められなかった．

文　献

1）堤　忠一，小泉英夫：“食品分析法”，日本食品工業学会・食品分析編集委員会編，239,1982，光琳
2）堤　忠一：ぶんせき，11,814,1985
3）日本薬学会編：衛生試験法注解，1984，金原出版㈱
4）堤　忠一，小泉英夫，吉川誠次，森井ふじ，小林純：食品総合研究所研究報告，34,132,1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 244-250, 1986

健康食品の栄養成分調査

牛尾房雄*, 船山恵市*, 関　博磨**, 笠原利英*,
川島満春美*, 友松俊夫*, 道口正雄*

Amounts of Nutritional Components in Nutrient Supplementary Foods

FUSAO USHIO*, KEIICHI FUNAYAMA*, HIROMARO SEKI**, TOSHIHIDE KASAHARA*,
MASUMI KAWASHIMA*, TOSHIO TOMOMATU* and MASAO DOGUCHI*

Keywords：健康食品 nutrient supplementary foods, 蛋白質 protein, 脂質 lipid, 繊維 fiber, 灰分 ash, 無機質 minerals, ビタミン vitamins, アミノ酸 amino acids, トコフェロール tocopherols, 脂肪酸 fatty acids

緒　言

近年，国民の健康志向の高揚によりいわゆる健康食品が各種生産販売され，その消費量も急激に増加している．現在，健康食品の市場には大手メーカーの参入が相い次いでおり，その市場はさらに増大することが予想される．しかし，一方ではこれら食品の安全性，内容成分，効用などについて，消費者からの苦情が行政機関に多数寄せられている．

栄養素の補助，補給を謳っているこれら食品について，栄養成分を検討した報告は少なく，数報[1,2]あるのみである．

本報では，いわゆる健康食品の内，貝類等動物性加工食品，海草加工食品およびビタミンE，F補給食品としてその消費量が高い植物性油脂加工食品について，栄養成分を分析し，これら食品の栄養学的検討を行った．

実験方法

試料：昭和58年から59年にかけ，東京都内デパートおよび健康食品専門店より購入した．

試料の内容は動物性加工食品ではシジミ加工食品10試料，カキ加工食品4試料，スッポン加工食品および牛肝臓加工食品各1試料，合計16試料である．また海藻加工食品2試料についても行った．植物性油脂加工食品は15試料を用いた．

動物性加工食品の形状は一様でなく，粉末状9例（シジミ加工食品8例，表－1における試料No. 2，No. 4－10，牛肝臓加工食品），錠剤状4例（シジミ加工食品試料No. 1，カキ加工食品3例，試料No.11－13），液状はシジミ加工食品の1例（試料No. 3）であった．またカキ加工食品の1例（試料No.16）およびスッポン加工食品（試料No.17）は植物性油脂とともにカプセルに入っているものであった．海藻加工食品は2例とも粉末状であった．植物性油脂加工食品は全てカプセル状であった．

分析方法：動物性加工食品および海藻加工食品における試験項目は水分，蛋白質，脂質，灰分等一般成分，カルシウム，リン，鉄，ナトリウム，カリウム，マグネシウム，塩素，カドミニウムについて行った．またビタミンB_6，B_{12}，ナイアシン，アミノ酸についても分析した．植物性油脂加工食品では4種トコフェロール，脂肪酸について分析した．

各々の試験項目について用いた方法を下記に示した．

水分：常圧加熱乾燥法
蛋白質：ケルダール法
脂質：ソックスレー抽出法
繊維：ヘンネベルグ・ストーマン改良法
炭水化物：水分，蛋白質，脂質，繊維および灰分の合計量を100 gから差し引いて求めた．
カルシウム：EDTA滴定法
リン：ゴモリー法
鉄：オルトフェナントロリン法
ナイリウムおよびカリウム：炎光光度法
塩素：モール法
マグネシウムおよびカドミニウム：原子吸光法

*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
**昭和女子大学

表－1　一般成分およびミネラル測定結果

No.	水分	蛋白質	脂質	炭水化物	繊維	灰分	酸不溶性灰分	Ca	P	Fe	Na	K	Mg	Cl	Cd
	単位 g／100g							単位 mg／100g							
シジミ加工食品															
1	4.4	5.5	0.4	71.1	1.7	16.9	9.5	2342	70	13	125	196	317	220	N.D.
2	9.1	9.3	0.1	78.6	0.2	2.7	0.1	397	153	16	411	215	43	241	N.D.
3	34.0	18.5	0.2	29.5	0.1	17.7	0.2	976	332	48	5308	1664	442	8390	N.D.
4	6.0	26.3	9.1	42.2	2.4	14.0	0.03	337	355	21	3442	1268	306	8066	N.D.
5	4.4	6.9	2.5	83.3	0.5	2.4	0.06	361	120	17	386	212	44	429	N.D.
6	2.6	7.5	0.1	85.3	N.D.	4.5	0.28	593	140	8	742	435	123	924	N.D.
7	3.5	3.0	0.1	91.8	N.D.	1.6	0.20	200	53	13	210	239	33	264	N.D.
8	2.9	6.8	0.1	86.1	N.D.	4.1	0.26	399	140	12	571	880	102	951	N.D.
9	3.3	6.7	3.5	84.0	0.4	2.1	0.06	301	110	10	413	141	33	343	N.D.
10	3.0	8.1	0.1	82.4	0.2	6.2	0.46	544	163	20	611	1391	136	1660	N.D.
カキ加工食品															
11	3.9	8.0	0.8	85.3	N.D.	11.0	4.04	162	619	10	1076	757	227	2005	N.D.
12	7.4	10.2	1.0	54.7	0.2	26.5	11.7	4006	287	32	784	660	2097	1338	N.D.
13	5.4	10.3	1.2	66.4	5.4	11.3	0.39	1731	389	15	1394	1046	162	2428	N.D.
14	4.5	22.1	58.8	13.7	N.D.	0.9	0.03	25	32	7	279	33	14	369	N.D.
海草加工食品															
15	3.5	6.6	2.7	54.2	16.7	16.3	0.21	1213	300	19	1721	6418	330	5092	N.D.
16	5.4	11.1	1.6	57.0	7.9	17.0	0.56	1467	114	33	2158	6546	603	2332	N.D.
スッポン加工食品															
17	4.5	34.1	48.1	8.7	N.D.	4.6	0.06	1821	862	7	211	153	47	146	N.D.
牛肝臓加工食品															
18	3.9	34.6	7.1	53.2	N.D.	1.2	0.22	43	343	8	121	169	6	49	N.D.

N.D.：不検出

ビタミンB_6，ビタミンB_{12}，ナイアシン：微生物学的試験法

アミノ酸：トリプトファン以外のアミノ酸は塩酸加水分解し，トリプトファンは水酸化ナトリウム加水分解を行い，各々アミノ酸分析計により測定した．なおシスチン，メチオニンについては塩酸加水分解の際，十分脱気を行えば影響を受けないことを確認したので塩酸加水分解から得られた値を用いた．

トコフェロール：蛍光光度計による高速液体クロマトグラフにより測定した．

脂肪酸：ナトリウム・メトキシド法によりメチルエステル化した後，ガスクロマトグラフにより測定した．

結果および考察

1．動物性加工食品および海草加工食品

表－1に一般成分およびミネラルの測定結果を示した．

一般成分では炭水化物含有量の高い試料が多く，18例中14例において50g／100g以上を示していた．蛋白質では牛肝臓加工食品が全試料中最高値34.6g／100gを示した．脂質はカプセル状の2試料以外は10g／100g未満であり，特にシジミ加工食品は10例中7例が1g／100g未満の数値であった．一般成分で特徴的なものは灰分含有量であり，シジミ加工食品，カキ加工食品の各3例およ

び海草加工食品において10%以上の値を示した．しかもシジミ加工食品1例，カキ加工食品2例においては，この灰分の50%前後は酸不溶性灰分であった．なおこの酸不溶性灰分については主成分がケイ素であることを確認している．灰分含有量の高いこれら試料では当然のことながら数種のミネラルが高い値を示し，シジミ加工食品，カキ加工食品ではナトリウム，カルシウム，塩素，海藻加工食品ではカリウム，カルシウム，塩素がパーセントオーダーで含まれていた．なお貝類に比較的高濃度で存在することが知られ，しかも加工過程で濃縮されることが推測されたカドミニウムはシジミ加工食品，カキ加工食品いずれの試料からも検出されなかった．海草加工食品では粗繊維量が著しく高く，食物繊維ではさらに高い値となることがうかがわせた．

表－2　アミノ酸測定結果

単位：mg／g

No.	ILU	LEU	LYS	MET	CYS	PHE	TYR	THR	TRP	VAL	ARG	HIS	ALA	ASP	GLU	GLY	PRO	SER	TAU
シジミ加工食品																			
1	1.4	2.9	2.9	1.2	0.2	1.5	1.5	2.4	0.4	1.8	2.8	1.3	3.2	4.7	7.0	3.5	2.1	2.2	0.1
2	1.9	3.8	4.1	1.5	0.3	2.0	2.1	3.2	0.7	2.0	3.8	2.0	3.9	6.7	9.4	5.3	3.3	3.0	0.1
3	1.5	2.7	3.2	1.0	0.3	1.3	1.7	2.4	0.7	1.6	2.9	1.4	13.7	5.5	9.8	3.5	3.5	2.0	6.4
4	8.1	17.5	12.1	3.3	1.5	11.0	8.2	9.6	2.8	8.4	15.5	5.6	15.3	24.2	42.4	10.5	13.6	12.5	3.8
5	0.9	2.0	2.4	0.8	0.4	1.1	1.0	1.9	0.4	1.0	2.2	1.9	2.9	3.9	5.5	2.7	1.4	1.9	0.1
6	1.5	2.5	3.2	1.0	0.3	1.5	1.4	2.5	0.4	2.0	2.7	1.5	5.0	4.5	6.5	3.6	3.3	2.5	0.1
7	0.4	0.8	1.0	0.4	0.3	0.5	0.5	0.8	N.D.	0.6	1.0	0.5	2.6	1.5	2.6	1.0	1.7	0.7	0.1
8	1.3	2.2	2.7	0.8	0.6	1.3	1.2	2.1	0.4	1.5	2.3	1.0	3.6	3.7	5.4	2.9	2.3	1.9	N.D.
9	1.0	1.9	2.2	0.8	0.4	1.0	0.8	1.7	0.3	1.4	2.5	0.8	4.0	3.4	4.7	4.2	2.9	1.7	0.3
10	1.1	2.7	3.3	1.1	0.4	1.5	1.5	2.4	0.3	1.6	3.0	1.7	3.5	5.4	7.3	4.1	2.8	2.5	0.1
カキ加工食品																			
11	0.6	1.0	1.2	0.3	0.3	0.7	0.5	1.4	N.D.	0.8	2.0	0.7	4.1	2.6	7.5	4.1	5.2	1.5	19.8
12	1.4	2.5	2.1	1.3	0.7	1.3	1.3	2.2	0.4	2.0	3.0	1.4	3.9	4.5	10.4	4.1	5.5	1.8	18.2
13	1.2	2.0	2.1	0.5	0.5	1.4	1.0	2.6	0.3	1.5	2.8	1.2	5.9	4.8	11.8	4.8	6.9	2.3	25.3
14	0.5	1.0	1.0	0.1	0.1	0.6	0.3	0.9	0.1	0.6	1.1	0.3	0.9	1.3	4.1	0.8	1.2	0.7	1.7
海草加工食品																			
15	1.2	2.6	1.9	0.7	0.3	1.5	1.1	2.0	0.4	1.9	2.0	0.6	11.7	7.0	6.1	2.9	2.3	2.2	2.6
16	3.4	6.8	2.9	1.4	0.3	4.0	2.6	4.7	1.2	4.4	4.1	1.1	7.3	8.4	12.9	4.9	5.0	4.5	0.1
スッポン加工食品																			
17	4.3	8.8	7.9	0.4	0.8	5.6	2.7	7.1	0.2	4.8	9.9	3.0	9.4	9.7	15.2	14.3	12.6	6.7	0.3
牛肝臓加工食品																			
18	14.2	35.0	23.0	9.6	3.0	19.7	15.4	17.8	4.8	18.1	19.6	8.3	19.5	29.5	44.2	17.4	20.4	19.7	0.4

N.D.：検出せず
必須アミノ酸
ILE：イソロイシン　LEU：ロイシン　LYS：リジン　MET：メチオニン　CYS：シスチン
PHE：フェニルアラニン　TYR：チロシン　THR：スレオニン　TRP：トリプトファン　VAL：バリン
その他のアミノ酸
ARG：アルギニン　HIS：ヒスチジン：　ALA：アラニン　ASP：アスパラギン酸　GLU：グルタミン酸
GLY：グリシン　PRO：プロリン　SER：セリン　TAU：タウリン

表－2にアミノ酸の測定結果を示した.

今回のこれら食品の容器および包装には含有成分名が記載されており，カルシウム等ミネラルとともにタウリン，アルギニン，メチオニンなどもほとんどの試料に記載されていた．タウリンはカキ加工食品の3例，シジミ食品2例，海草加工食品1例に高い値が認められた．特にカキ加工食品では20mg／g前後の値であり，グルタミン酸量の約2倍に相当した．メチオニン，アルギニンおよびその他のアミノ酸含有量は高蛋白質量であったシジミ加工食品の1例，牛肝臓加工食品を除き，日本食品アミノ酸組成表[3]に記載されていたシジミ，カキ，海藻のアミノ酸含有量より若干低いかほぼ同レベルであった．シジミ加工食品の1例，牛肝臓加工食品では上記アミノ酸組成表[3]のシジミ，牛肝臓のアミノ酸濃度の約2倍に相当する値であった.

表－3にビタミン測定結果を示す.

ニコチン酸では4～6mg／100gの値を示した試料が多く，各食品群間に大きい差が見られなかった．ビタミンB_6はシジミ加工食品が0.1～0.3mg／100gの値であったのに対し，その他食品ではカキ加工食品の1例（試料No.14）を除き，0.1mg／100g以下となっている．試料No.14のカキ加工食品は180mg／100gという通常の食品には見られない高濃度のビタミンB_6が検出され，ビタミンB_6の添加が推測された．なおこのビタミンB_6濃度は，高速液体クロマトグラフにより確認を行っている．ビタミンB_{12}は通常，動物性食品には検出されるが，植物性食品には検出されないことが知られている．今回用いた試料においても，海草加工食品には微量しか検出されなかったが，シジミ加工食品，カキ加工食品，牛肝臓加工食品には28～110μg／100g検出された.

以上のようにこれら健康食品試料の中には通常の食品の数倍から10倍の濃度で，ある種のミネラル，ビタミン，アミノ酸を含んでいるものがあった．しかしこれら食品の容器，包装等に記載されている用量，または予想される用量から計算されるミネラル，ビタミン，アミノ酸の摂取量は通常の食品から得られる量に比較し多いとは言えない．例えばシジミ加工食品の1例（No.2）は1回分大匙3～6杯（7～15gになる）と記載されており，この用量ではカルシウム摂取量は多く見積って約60mg程度，牛乳1／3本分のカルシウム摂取量となる．また高タウリン含有量であったカキ加工食品から摂取されるタウリン量は50mg弱と推察されるが，小沢らの報告[4]によるとアジ，カツオ，ニシン等の魚類には1～2mg／gのタウリンを含有しており，これら魚類を通常の量を食すれば50～100mg程度のタウリンが摂取出来ることになる．以上概観すれば，これら食品は栄養補助剤として必須であるとは認めがたいものがあると判断された.

表－3　ビタミン測定結果

No.	ニコチン酸 mg/100g	ビタミンB_6 mg/100g	ビタミンB_{12} μg/100g
シジミ加工食品			
1	3.7	0.06	51
2	6.2	0.16	66
3	10.8	0.13	110
4	2.9	0.13	8.3
5	4.2	0.12	83
6	6.4	0.29	39
7	4.3	0.06	31
8	6.6	0.26	62
9	2.0	0.13	110
10	6.1	0.21	50
カキ加工食品			
11	4.2	0.04	45
12	4.3	0.03	4.7
13	6.5	0.06	36
14	0.4	180	2.0
海草加工食品			
15	8.8	0.04	N.D.
16	2.4	0.01	0.2
スッポン加工食品			
17	1.5	0.02	1.2
牛肝臓加工食品			
18	4.5	0.09	28

N.D.：検出せず

2．植物性油脂加工食品

表－4にトコフェロール，脂肪酸測定結果を示す.

総トコフェロール量は2～375mg／gと試料により大差を示した．最小値2mg／gを示したものは玄米胚芽油であった．検出されたトコフェロール（以下Tocと略す）同族体は最小値2mg／gを示した例を除き，2種類以上の異性体が検出されていた．その内，α-Tocが70％以上であった試料が6例，α-Tocが約50％，γ-

表－4　植物性油脂加工食品の脂肪酸およびトコフェロール測定結果

No.	原材料	脂肪酸						トコフェロール（Toc）					
		C14	C16	C18	C18：1	C18：2	C18：3	αToc	βToc	γToc	δToc	総Toc	αToc等量*
1	濃縮小麦胚芽油	3	58	9	83	208	33	182	32	80	41	335	200
2	濃縮小麦胚芽油	6	140	18	135	407	6	128	7	13	7	155	131
3	小麦胚芽油	1	110	9	140	405	52	119	1	14	6	140	121
4	小麦胚芽油,天然ビタミンE	1	114	8	142	407	60	57	9	27	14	107	63
5	小麦胚芽油	1	130	7	157	440	63	30	3	15	9	57	32
6	小麦胚芽油	N.D.	90	14	192	486	23	34	N.D.	1	N.D.	35	34
7	小麦胚芽油,天然ビタミンE	1	130	5	141	483	73	7	1	16	7	31	9
8	濃縮胚芽油,紅花油,小麦胚芽油	2	35	13	67	295	14	189	26	86	41	342	206
9	濃縮胚芽油,小麦胚芽油,大豆レシチン	2	63	12	94	257	35	367	6	2	N.D.	375	369
10	小麦胚芽油,大豆油,サフラワー油,レシチン	1	67	17	104	307	26	174	6	44	22	246	180
11	大豆油,小麦胚芽油,サフラワー油	1	47	16	87	522	3	15	3	120	63	201	29
12	大豆油,紅花油	1	53	19	99	590	4	7	2	62	33	104	14
13	玄米胚芽油,ビタミンE	2	143	16	310	326	16	27	5	16	7	55	30
14	玄米胚芽油,ビタミンE	2	130	12	320	300	15	55	1	N.D.	N.D.	56	55
15	玄米胚芽油	1	155	18	279	356	14	2	N.D.	N.D.	N.D.	2	2

脂肪酸名　C14…ミリスチン酸　C16…パルミチン酸　C18…ステアリン酸　C18：1…オレイン酸
C18：2…リノール酸　C18：3…リノレン酸
単位：mg／g　N.D.：0.5未満
＊：α-Tocの生物活性を100としたとき，β-Toc30，γ-Toc10，δ-Toc 2として換算

Tocが約25％の構成比を示した試料が5例であった．これらα-Tocの比率が高い試料は小麦胚芽油を主原料としているものであった．γ-Tocの比率が50％以上の試料は3例あったが，この内2例は大豆油を原料としている．各Toc同族体の生物活性は測定方法，測定者によって異なるが，Bieriらの報告[5]によると，α-Tocを100とした場合，β-Tocは30，γ-Tocは10，δ-Tocは2とされている．この係数に基づいて計算すると，α-Toc以外の異性体を多く含むものほどビタミンE（以下V.Eと略す）効果が低いことになる．

脂肪酸ではパルミチン酸，オレイン酸，リノール酸が主要なものであった．特に玄米胚芽油加工食品以外ではリノール酸が50～80％を示していた．玄米胚芽油加工食品はオレイン酸，リノール酸がほぼ同量の比率で含まれていた．なおリノレン酸は全試料とも10％未満であった．

以上のように，今回供試した植物性油脂加工食品はトコフェロールの量，質において製品によりかなり異なることが明らかになった．

V.Eは生体内における抗酸化作用および生体膜の安定化に寄与すると推測され，生体内脂質過酸化が一因と言われる老化，動脈硬化症等の成人病に対して予防効果が期待されている．しかし日本においてはいまだV.E所要量は決定されておらず，米国では15IU／日（α-Tocとして10mg／日）とされているが[6]，それに対する異論もないわけではない．日本人の日常食からのα-Toc摂取量は6～7mg／日ほどと推定されているが，V.E欠乏症はほとんど認められないとのことである．ビタミンE，Fの補給を目的としているこれら植物性油脂系健康食品は老化防止，成人病予防効果をうたっているが，V.Eの多量摂取にそのような効果があるという確証はなく，またV.Eの過剰症も報告されている．さらに日本人の平均的食事の脂肪のエネルギー供給比率は20数％[10]，その脂肪酸組成をみると飽和脂肪酸，モノ不飽和脂肪酸，ポリ不飽和脂肪酸の比率は約3：4：3で

あることなどから[11,12]，特に必須不飽和脂肪酸摂取量を増加させる必要性は認められない．

以上のように健康食品の科学的必要性，有効性については現在のところ明らかではない．もし健康食品が健康保持もしくは増進に寄与しているという個人があれば，それは個人のある種の栄養素必要量が異常に高いか，または食生活に欠陥があるためと解釈されよう．健康食品は特定の栄養素を抽出，濃縮したものが多く，長期間摂食すればむしろ過剰症の発現の可能性すら考えられる．このような食品については内容成分表示とともに1日摂取量，有効期限等についての表示を義務づけるべきであろう．

ま と め

いわゆる健康食品の内，シジミ加工食品等動物性食品，海草加工食品および植物性油脂加工食品について栄養成分分析を行った．

(1) シジミ加工食品，カキ加工食品，スッポン加工食品，牛肝臓加工食品，海草加工食品について一般成分，ミネラル，アミノ酸類，ナイアシン，ビタミンB_6，ビタミンB_{12}の分析を行った．その結果，シジミ，カキ，海草加工食品には10％以上の灰分を含む試料が見られた．これら高い灰分量を示した試料の内，シジミ加工食品の1例，カキ加工食品の2例ではこの灰分の約50％が酸不溶灰分であった．また高灰分量の試料はナトリウム，カリウム，カルシウム，塩素が多かった．カキ加工食品はタウリン含量も高く，4例中3例は約20mg／gであった．さらにカキ加工食品の1例には180mg／100gのビタミンB_6を含む試料が見られた．以上のように，今回供試した動物性加工食品，海草加工食品の中にはカルシウム等ミネラル，アミノ酸，ビタミンが高濃度で含まれるものがあった．

(2) 植物性油脂加工食品ではトコフェロールと脂肪酸を分析した．その結果，総トコフェロール含量は2～375mg／gと試料による差が大きかった．脂肪酸では全試料において，パルミチン酸，オレイン酸，リノール酸が主要なものであった．

謝辞 本調査を遂行するにあたり，試料収集に御協力いただいた衛生局環境衛生部食品環視課ならびに公衆衛生部保健栄養課各位に深謝いたします．

文 献

1) 寺田志保子，増井俊夫，渡辺圭一郎：食衛誌，26，73,1985
2) 前田有美恵，石川雅章，山本政利，寺田志保子，増井俊夫，渡辺圭一郎：食衛誌，26,500,1985
3) 科学技術庁資源調査会編：日本食品アミノ酸組成表，30,1966
4) 小沢昭夫，青木 滋，鈴木香都子，杉本昌明，藤田孝夫，辻 啓介：日本栄養・食糧学会誌，37,561,1981
5) Bieri,J.G., and Evarts,R.P.: J.Nutr., 104,1974
6) 日本ビタミン学会編：ビタミン学Ⅰ，177,1980，東京化学同人，東京
7) 福場博保：調理化学，6,215,1973
8) 井崎やえ子，日高公雄，吉田宏三，戸田和子：日本栄養・食糧学会誌，38,351,1985
9) 古賀民穂，南部庸子：日本栄養・食糧学会誌，37，355,1985
10) 厚生省保健医療局健康増進栄養課編：第三次改定日本人の栄養所要量，45,1984
11) 道口正雄：食物の見方・考え方，124,1981，女子栄養大学出版部
12) 地方衛生研究所全国協議会：日本国民の栄養摂取量の地域差に関する研究 III「日常食品中のコレステロール含量並びに脂肪酸組成調査」,1985

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.*, 37, 251-258, 1986

走査型電子顕微鏡によるコロモジラミの形態学的観察法の検討

前木吾市*, 大野正彦**, 安達充宏***

Morphological Observation of Human Body Louse by Scanning Electron Microscopy

GOICHI MAEKI*, MASAHIKO OHNO**, MITSUHIRO ADACHI***

Keywords：臨界点乾燥法 Critical point drying method

緒　言

コロモジラミはヒトの血液を吸い生活するため，肌着などに好んで棲息する有害昆虫として知られ，特に終戦後の昭和20年には *Rickettsia prowazekii* を保有したコロモジラミによる発疹チフスが発生し，社会的問題となった．しかしながら戦後の復興による生活環境の向上は，コロモジラミの分布に影響を与え，その数は激減し，現在では珍しい存在となった．

昭和58年，冬，偶然当研究所で患者由来のコロモジラミを入手できたのを機会に，走査型電子顕微鏡（以下SEM）による形態観察を企だて，以下の実験を試みた．すなわち①しらみをSEM観察するために試料作製中最も成否が懸念される臨界点乾燥[1~2]（以下CPD）の検討，②吸血機構解明の手掛かりとなる口器およびほとんど退化したと思われる複眼の微細構造の観察，および③SEMと光学系マクロ写真との比較である．

実験材料および方法

供試しらみは発疹チフス患者のメリヤス肌着から採取したコロモジラミ（以下しらみ）である．合計9匹を採取し，4匹をマクロ撮影用に，5匹をSEMによる形態観察に供した．

1．マクロ撮影

マクロ写真[3]は農林水産省家畜衛生試験場，写真室，伊藤道男技官に撮影依頼した．家畜衛試では，供試しらみは光学系低倍率専用撮影装置マルチフォト（日本光学KK製）を用い，斜光照明撮影と，通常の封入剤による病理標本撮影の2通りを実施し，いずれもカラースライドに記録した．なおマクロ写真とは，絞りを備えた専用マクロレンズ一個のみを撮影用として用い，等倍から30倍以下の光学系拡大写真を得る技法を指していう写真用語である．絞りの効果で，通常の対物レンズを用いた光学顕微鏡像よりも，より深い焦点深度をもつ像が得られる特長がある．

当研究所では簡易マクロ装置（約4倍）として，複写台，ニコンF3，専用ベローズFB－6および光顕用光源2台等からなる組立セットを作り，CPD処理済みしらみと対照しらみの撮影に用いた．その装置を図1に示した．

2．走査型電子顕微鏡（SEM）

1）試料作製法

SEM観察用しらみの試料作製法はCPDのみで行った．固定からCPDまでの処理条件は以下の通りである．

固定液として2％グルタール加カコジール緩衝液を用い，1時間固定を行った．脱水溶液としてアセトン（50, 70, 100％）系列を用いて30分ずつ脱水し，次に置換液として醋酸イソアミルを用いた．以下常法により回転式滲透器を用い処理を行い，次で日立製HCP－1を用いてCPDを行った．CPD済みのしらみは，ASID（後述）専用の試料台上に両面テープで接着し，サンユー電子製イオンスパッターで導電処理を行った．

2）機種と操作法

使用したSEMは当研究所所属のJEM－100B（日本電子製透過型電顕）付属のEM－ASID（走査像観察装置，以下ASID）および東京大学総合試験所に設置された日立製S－520の両機種である．ASIDは昭和48年製の古い型で，その機能は加速電圧20kV，最低倍率300倍およ

*東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
**東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科
***東京大学工学部総合試験所

び試料は単傾斜（±60°）可能で，回転が不可能である．これに対してS－520はSEM専用機で，使用加速電圧10kV，最低倍率20倍および万能型試料ステージを備え，分解能も60Å保証の機種である．

観察結果

〔1〕マクロ写真での観察

図2，3は家畜衛試で撮影されたカラー写真で，可視光線による虫体の色調の識別，高い透過性の特長がよく示されSEM写真の対照として用いられた．図2は生きたままの状態のしらみが、斜光照明により撮影された写真で，2対の黒い塊りのうち下側に見える大きな黒い部分が眼の存在部位である．水分を含むため，頭部と胸部がみずみずしく表現されている．撮影は直接倍率25倍で，マクロ専用レンズの絞り効果にも拘らず，焦点深度の不足が目立ち，脚部など不鮮明である．図3は封入剤を用いた病理標本写真で，しらみは乾燥し扁平状態になっている．腹部に卵が入っているのが透視されたことから，この虫体は雌と判別された．

図1に示す拡大接写装置（TTLオート撮影が可能）を用い，SEM観察用のしらみとして，CPDを終了した直後の段階を図4に示した．図4中の試料Aは固定処理操作から最終のCPDまで，試料作製に成功した雌の大型しらみである．さらに図4中の試料B，CおよびDは，試料Aと同一条件でCPD処理を行ったが，途中で液体CO_2ガスの供給がとだえ，その結果CPDが完全に行われなかったしらみである．この段階で，すでに虫体に異常な収縮が観察された．試料Eは対照として，グルタール固定後，脱水，置換操作を行わず自然乾燥したしらみである．虫体は著しい収縮を生じ，もろくなっており，撮影の際整列させるため用いた楊子の軽い衝撃で，一体の脚が脱落した．

〔2〕SEM（S－520）での観察

CPDに成功した試料Aについてのみ観察を行った．撮影条件として①全体像，②正面像，③側面像，④斜方向からの拡大像とし，特に口器と眼の構造の観察に重点をおいた．観察結果を図5～11に示した．これらの写真は大キャビネサイズに拡大した結果，詳細な構造を観察することが可能になり，その結果多くの知見が得られた．以下それらのポイントを列記する．図7において胴体部の背中部に，体長と直角方向に微細な縞模様が観察された．図10では複眼，脚の関節の細かいひだ構造，さらに図9～11では口器の微細構造がよく観察される．

〔3〕SEM（ASID）による観察

試料A～Eの5匹について，ASIDによる観察を試みた．図16，17に示す如く試料Aについては，高倍率（最高6,000倍）による口器の撮影を行った．ASIDは試料回転がきかないため，口器の前面からの観察ができず，傾斜を40°つけた角度からの観察が限度であった．内部からのかぎのような突起物の他に，口器内側に小さい爪の形をした突起物の存在も観察された．

一方ASIDによる低倍率撮影は，最低60倍（CRT画面上）を試みたが，本機の機構に無理があり，画面中央部に明るい光斑を生じて，しらみの全体像は出せないことが判った．そこでむらの出ているネガから，いったん大キャビネサイズの印画紙上で，階調を整えて修正焼付を行い，通常の方法で複写して第2原板を作製し，図12～15を得た．

試料B，C，Dは，CPDの途中で液体CO_2がストップしたため，その影響による張力を受け，頭部，胴体部および脚部等にかなり収縮が認められる．しかし胴体部の横縞の模様は平行が保たれており，形態の崩れ方は比較的少ない．一方，対照Eでは胴体部の横縞は極端な崩れ方をみせており，B，C，Dに比べ，甚しい差違があることが判った．

考　察

（Ⅰ）試料の作製について

しらみは軟かい表面組織をもつので，固定，脱水からCPDまで，試料作製を規定通り正確に行う必要があった．例えばCPDの操作時に液体CO_2の不足により，虫体の表面構造に人工的変化が生じた．さらに対照例との比較において，形態変化に明らかな差違がみられた．何故このような変化や差違が生じたか，CPDの理論に基づいて考察を加えてみた．

試料B，C，Dは液体CO_2ガスの不足により，試料室の加温の際に，試料をCO_2の界面（液体とガス）が通り抜けたので，その界面張力によって表面構造に変化を生じたことが判った．しかしながらCO_2の界面張力は，1.18ダイン/cm（20℃）で，水の70.6に比較して格段に小さい．また試料B，C，Dは固定処理済みで，対照Eは無固定であり，これらのことが形態の差違となって現れたことが推察される．

CPDの処理が良好であった試料Aは，胸部の背中に著明な背板孔の凹みが見出された．光学像に比べ凹みの程度が極端なのは，この部分の構造がぜい弱なためと推察された．この点に関しては実験例数が少ないので，今後の課題としたいと考えている．

（Ⅱ）SEM観察について

今回の実験ではASIDを多用した．ASIDは高解像機

種の性格を持つが，本機の欠点として，①試料サイズが2（W）×11（L）×2（H）mmと小さく制限される．②試料の回転ができない，③最低倍率が約300倍と高いことがあげられる．したがって，しらみの観察用としては不適当な機種であった．しかし数百倍，数千倍のレベルでは，しらみの平面像，傾斜像が高いコントラストで観察できて有用であった．例えば平面像では，眼の膨らみの緩いカーブが撮影されている．しらみの全体像では掲載写真にみるように，覆い焼きと複写の写真技術を駆使すれば，50倍の超低倍写真も作成できた．しかし，第2原板まで作って写真製作にかかわるのは煩雑で非能率的である．ASIDの高倍率観察では，口器の三次元構造が把握できない欠陥があった．

そこで次の段階として，ASIDの欠陥をおぎない，高解像情報を得る目的で，CPD処理に成功した試料Aを対象に，S－520による撮影を行った．試料は，ASID用試料台上のしらみの移し替えを行う必要もなく，S－520で観察可能と判り，撮影成功へつながった．図5～11はその成果である．図11で僅かにチャージアップの横縞が見られたが，他には何のトラブルも認められず，像の解像性は優れ，階調は豊富である．S－520では焦点合せ，非点補正および像の明るさとコントラスト調整が，コンピュータ制御で自動化され便利になっている．具体例として，図9の前面からの撮影像で，口器下方に割れ目の存在が確かめられた．このことから，これまで不明であったASIDによる口器の像が，どの方向から見たものであるか解釈が可能となった．また図10で退化した眼の輪廓が丸くとらえられており，表面が円滑であることも判った．ASIDの観察像から眼のふくらみ具合がわかり，両者の知見から眼の立体構造が観察できた．その他S－520が深い焦点深度や高い解像性を持っているため，触角や脚の関節部の粒状構造帯まで解像できた．

（Ⅲ）マクロ像について

生きたしらみの斜光照明によるマクロ写真では，虫体の色彩や透明感の観察が可能であった（図2）．モノクロームのSEM像では明確に観察できなかった眼の退化像や背板孔も観察できた．短所としては焦点深度の浅いことである．図3の病理標本写真は，可視光線本来の透過能力を十分に発揮した照明法による作例で，体内の卵まで解像できた．

ま と め

臨界点乾燥処理を行ったコロモジラミについて，SEMによる観察を試み，以下の結果を得た．

① 固定，脱水，CPD処理過程を通じ，理想的状態に近い標本作製に成功した．

② 上記標本について，眼，口器を中心にして微細構造の観察をすることができた．コロモジラミは眼の表面が平滑で，ゆるい曲面をしていることが確認された．また口器は，内側に円錐状の鉤が数個みられた．

③ 光学系マクロ像では，カラーおよび透過力による眼，卵等の識別能力が優れ，SEM像では高い解像力と深い焦点深度により，虫体表面構造の解析にすぐれていた．

謝 辞

光学系マクロ写真提供の御協力を賜った農林水産省家畜衛生試験場，写真室，伊藤道男技官に深く感謝の意を表します．

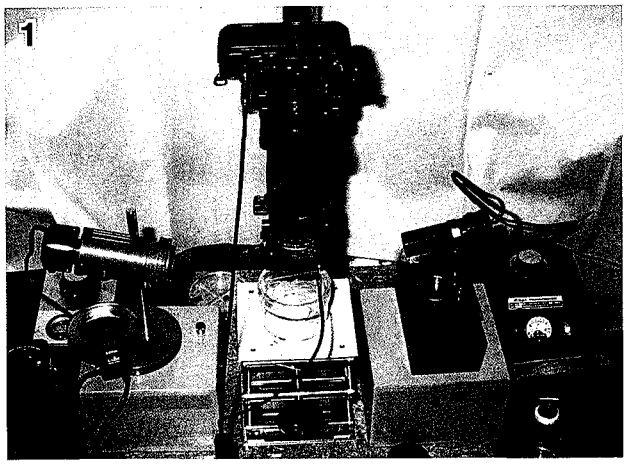
（本研究の概要は日本医学写真学会第24回学術講演会，1983年8月で発表した）

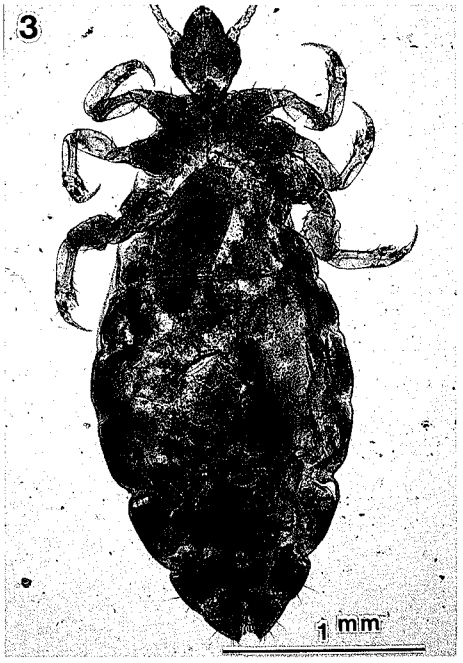
文 献

1）田中敬一，永谷 隆：図説走査電子顕微鏡，朝倉書店，1980

2）日本電子顕微鏡学会関東支部編：電子顕微鏡観察法，丸善KK，1982

3）伊藤道男ら：日本医学写真学会雑誌，11,1,1975





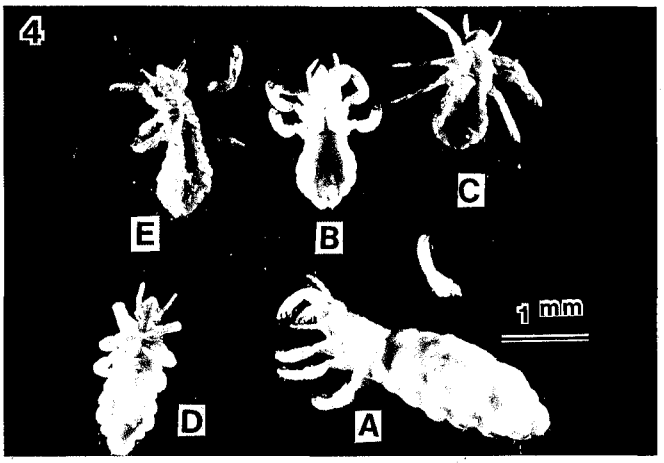


図1．簡易マクロ装置
図2．マクロ写真によるコロモジラミ
図3．封入剤による病理標本
図4．CPD処理後の標本

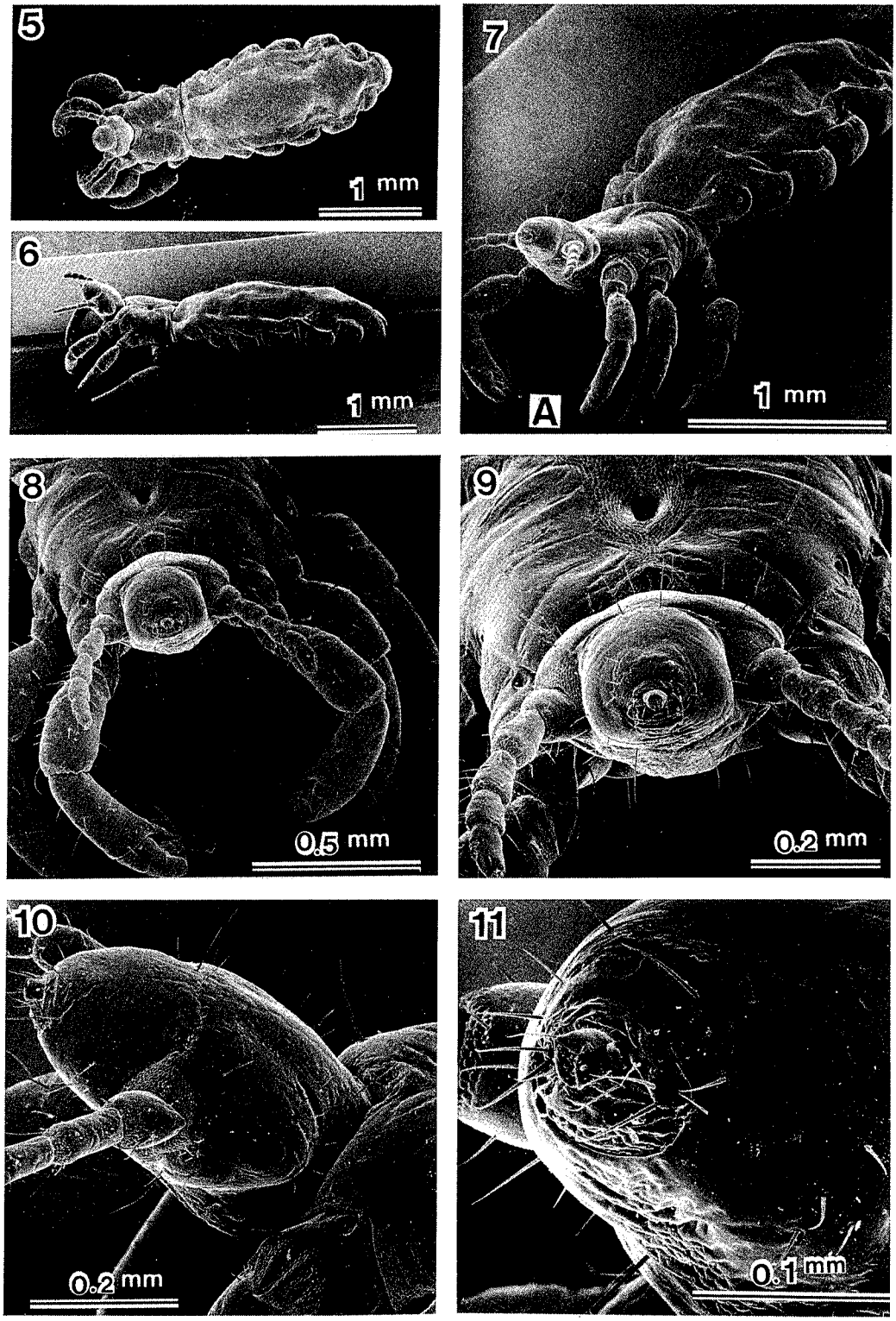
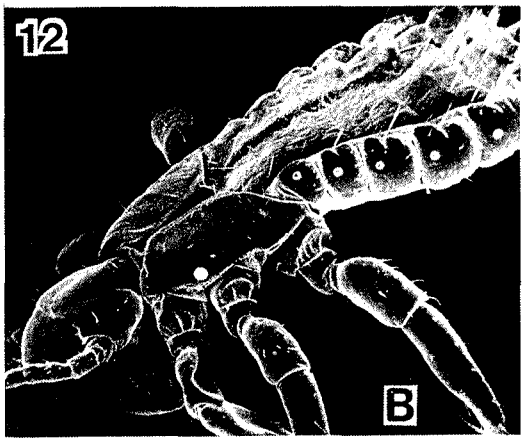
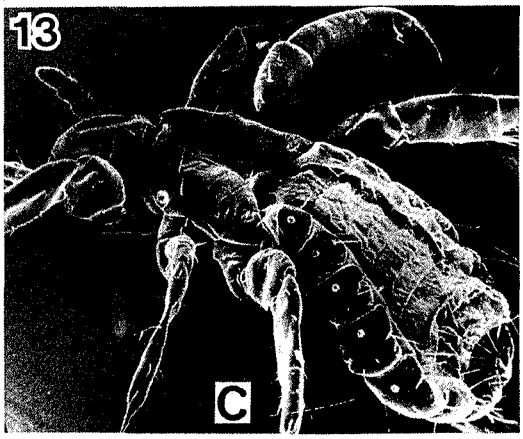
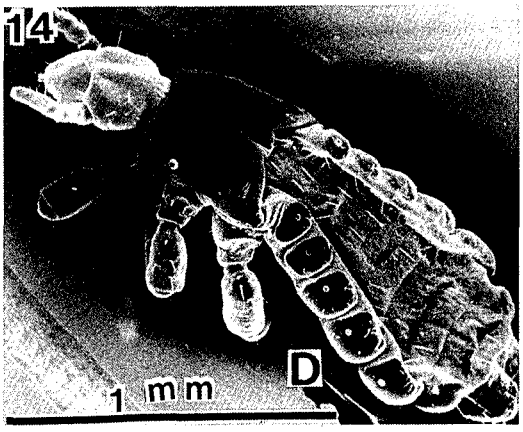
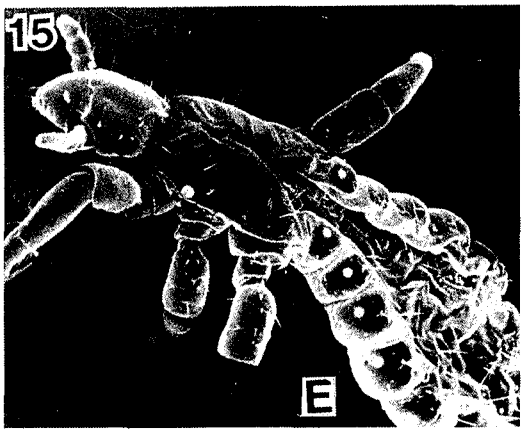


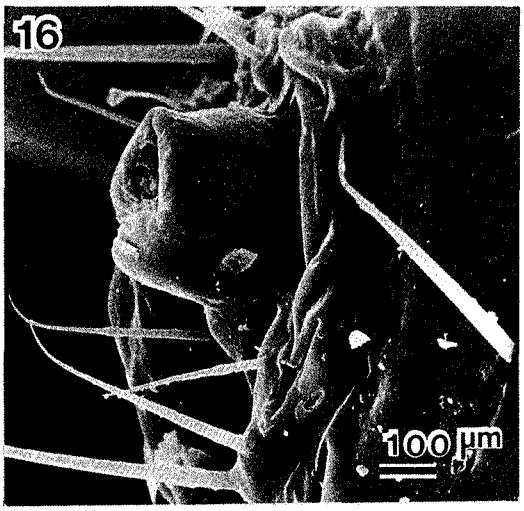
図5～11. SEM（S－520）によるコロモジラミ











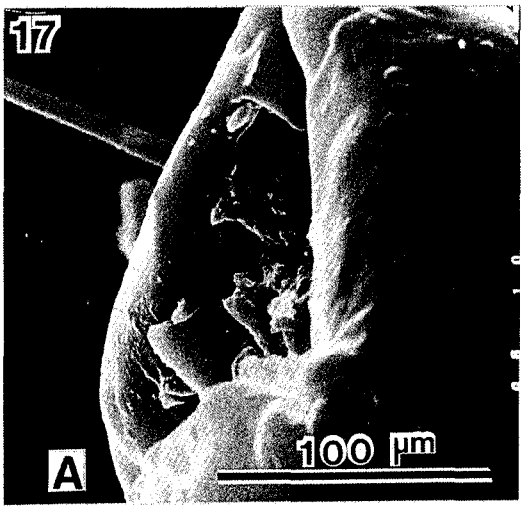


図12～17. SEM（EM-ASID）によるコロモジラミ

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 259-268, 1986

東京のツツガムシ相（第2報）
式根島のツツガムシ病流行期（1984年11月）と流行閑期（1985年6月）のネズミ寄生ツツガムシ類

大野正彦*

Trombiculid Mites of Tokyo (II)
Trombiculid Mites Found on Rodents in Shikinejima Island during an Outbreak (November 1984) and Absence (June 1985) of Tsutsugamushi Disease

Masahiko Ohno*

Trombiculid larvae found as parasites on rodents on Shikinejima Island were investigated during the periods of an outbreak and an absence of tsutsugamushi disease.

During an outbreak of the disease in November 1984, 12 Norway rats (*Rattus norvegicus*) and 1 roof rat (*R. rattus*) were captured. Estimated ages of the Norway rats by eye lens weight were 1.0～8.6 months old. The average number of larvae collected from the Norway rats was 436, ranging from 36 to 2454 in 1 rat. On the other hand, 175 larvae were collected from 1 roof rat. The dominant species collected from both rats was *Leptotrombidium scutellare*, followed by *L. pallidum*, *L. kitasatoi*, *Neotrombicula nagayoi* and *Gahrliepia saduski*.

During an absence of the disease in June 1985, 46 Norway rats, 6 roof rats and 11 Japanese wood mice (*Apodemus* sp.) were captured. Estimated ages of the Norway rats and Japanese wood mice were 1.0～22.4 months old and 30～94 days old respectively. The mean of larvae collected from the Norway rats was 0.6, an average of 25 larvae of *L. kitasatoi* on 13 rats, 1 and 3 larvae of *L. scutellare* from each of 2 Norway rats. On the other hand, no larvae were found on the roof rats but 1 larva of *G. saduski* was found on a Japanese wood mouse.

L. scutellare was thought to be the species which carried tsutsugamushi disease to the residents on this island, because 1) it was the dominant larva during the outbreak of the disease, and 2) *Rickettia tsutsugamushi* was isolated from the infant Norway rats during the outbreak of the disease.

Keywords: trombiculid mite, *Leptotrombidium scutellare*, rodent, tsutsugamushi disease

緒　言

筆者は前報[1]で伊豆諸島式根島のツツガムシ病流行期（'83年11月．晩秋から冬にかけて患者が発生する）のネズミに寄生するツツガムシ相を述べ，タテツツガムシ（*Leptotrombidium scutellare*）がツツガムシ病の媒介種であると推測した．媒介種をより明らかにするため，翌年の流行期と，翌々年の，患者が発生してない流行閑期に調査を行なった．以下，その結果を報告する．

調査方法

流行期（'84年11月下旬）に甘藷（サツマイモ）畑を中心に13地点（A，B，C，D，F，J，P，Q，R，S，T，V，W）に金網製生どり籠150台，シャーマン式トラップ20台をそれぞれ5，2日間設置した．

流行閑期（'85年6月下旬）には16地点（A～I，K～O，S，U）で金網製生どり籠150台，シャーマン式トラップ60台を5日間設置した．各調査地点の位置と概要は図1，表1の通りである．捕獲用の餌として食用油

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生科　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．流行閑期

ドブネズミ46匹（地点A，B，C，D，E，F，G，H，I，K），クマネズミ6匹（同H，L，M，N，O）アカネズミの一種（*Apodemus* sp.）11匹（同C，G，H，O），計63匹を捕獲した（表3，4）．ドブネズミの月令は1.0～22.4ヶ月で，1～4ヶ月の個体が過半数を占め

Table 3．Larval Trombiculid Mites Collected from *Rattus novegicus* Captured on Shikinejima Island during an Absence of Tsutsugamushi Disease (June 1985)

R. norvegicus	Date	Trapping Point	Age in Months**	Sex	Trombiculid Mites*** from *R. norvegicus*
No.47	20 June '85	A	1.0	M	—
74	21	A	1.1	M	—
28	19	G	1.1	F	—
23	19	A	1.2	F	—
24	19	A	1.2	M	—
51	20	A	1.2	M	—
70	21	C	1.5	F	—
54	20	F	1.7	F	—
75	21	F	1.9	M	—
45	19	E	2.0	M	*L. kitasatoi* (2)
32	19	C	2.1	M	—
65	20	C	2.3	M	—
71	21	C	2.3	F	—
56	20	I	2.3	F	*L. kitasatoi* (2)
63	20	C	2.3	F	—
55	20	I	2.6	M	—
73	21	K	2.9	M	—
64	20	C	3.0	M	—
20	18	F	3.0	F	—
76	21	E	3.1	F	*L. kitasatoi* (1)
44	19	F	3.1	F	—
38	19	D	3.6	F	—
49	20	A	3.6	F	—
48	20	A	3.6	M	*L. kitasatoi* (3)
57	20	I	4.0	M	*L. kitasatoi* (1)
46	19	E	4.0	M	*L. kitasatoi* (3)
31	19	C	4.1	M	—
66	20	C	5.1	M	—
25	19	A	5.2	F	*L. scutellare* (1), *L. kitasatoi* (6)
39	19	D	5.7	M	*L. kitasatoi* (1)
18	18	H	5.9	F	—
50	20	A	5.9	F	—
34*	19	C	6.7	M	—
41	19	H	6.7	M	—
62	20	E	7.9	F	*L. kitasatoi* (2)
52*	20	A	8.9	M	—
72	21	C	9.0	M	*L. kitasatoi* (1)
42	19	H	9.8	M	*L. kitasatoi* (1)
33	19	C	10.7	F	—
26*	19	A	10.7	M	—
37	19	D	11.1	F	—
19	18	A	11.8	M	—
77	21	B	12.8	F	*L. kitasatoi* (1)
53	20	F	15.6	F	*L. kitasatoi* (1)
40	19	I	21.0	M	—
22*	18	E	22.4	M	*L. scutellare* (3)

*, **：same as Table 2
***　：Figures in parenthese indicate numbers of trombiculid mites collected.

た．アカネズミの一種は日令が30～94日で，ドブネズミに比べ若く，民家がほとんど無い，島の中央から西の地域（図１）で捕獲された．

ドブネズミ46匹の内，13匹にキタサトツツガムシが総計25個体（１匹当り１～６個体）みられた．また，No.22，25のドブネズミにタテツツガムシがそれぞれ１，３個体みられ（表３），この調査時のドブネズミのツツガムシ指数は0.6であった．クマネズミにはツツガムシがみられず，アカネズミの一種の１匹にサダスクガーリェプツツガムシが１個体みられた（表４）．

各地点で捕獲したネズミの数と，そのうちツツガムシ幼虫が付いていたネズミの数を表５に示した．Ｅ地点（林の中で，式根島には珍しく井戸がある）で捕ったドブネズミ５匹すべてにツツガムシ幼虫がみられ，その中の１匹からタテツツガムシが採集された．他の地点に比べＥ地点のネズミにツツガムシがよく付く傾向にあった．

以上述べたように，ツツガムシ病流行閑期のネズミ寄生ツツガムシ幼虫の個体数は，前報[1]や前述した'84年の流行期に比べ少なかった．しかし，前報でツツガムシ病媒介種と推測したタテツツガムシが極めて少数ながら幼虫の状態で発生していることもわかった．

Table 4. Larval Trombiculid Mites Collected from *Rattus rattus* and *Apodemus* sp. Captured on Shikinejima Island during an Absence of the Disease (June 1985)

Rodents	Date	Trapping Point	Eye Lens* Weight (mg)	Ages in** Days	Sex	Trombiculid Mites*** from Rodents
Rattus rattus						
No.78	21 June '85	N	11.8	—	M	—
79	21	M	13.2	—	M	—
43	19	H	21.0	—	F	—
17	18	H	27.3	—	F	—
36	19	O	28.4	—	F	—
21	18	L	29.1	—	F	—
Apodemus sp.						
No.68	21 June '85	C	4.2	30	F	—
27	19	G	4.7	34	F	—
61	20	H	5.3	41	F	—
67	21	H	6.2	53	F	—
29	19	G	6.4	57	F	—
30	19	G	6.4	57	F	—
60	20	G	6.5	58	M	—
69	21	C	6.7	61	M	—
58	20	G	7.2	71	M	—
59	20	G	7.5	78	M	—
35	19	O	8.2	94	M	*G. saduski* (1)

*：Mean dry-weight of paired lenses

**：Ages of *Apodemus* sp. were estimated from eye lens weight according to Takada's (1982) method.

***：same as Table 3

Table 5. Numbers of Captured Rodents and Those Infested with Larval Trombiculid Mites at Each Trapping Point in the Survey (June 1985)

Trapping Point	No. Captured Rodents				No. Rodents with Trombiculid Mites	No. Rodents with *L. scutellare*
	Rn[1]	Rr[2]	As[3]	Total		
A	12	0	0	12	2	1
B	1	0	0	1	1	0
C	11	0	2	13	1	0
D	3	0	0	3	1	0
E	5	0	0	5	5	1
F	5	0	0	5	1	0
G	1	0	6	7	0	0
H	3	2	2	7	1	0
I	4	0	0	4	2	0
K	1	0	0	1	0	0
L	0	1	0	1	0	0
M	0	1	0	1	0	0
N	0	1	0	1	0	0
O	0	1	1	2	1	0
Total	46	6	11	63	15	2

1) *Rattus norvegicus*, 2) *Rattus rattus*, 3) *Apodemus* sp.

考　察

式根島のツツガムシ病媒介するツツガムシの種を寄生していたツツガムシと，宿主のネズミに分けて以下考察する．

1950年代には伊豆諸島でツツガムシ病の調査が頻繁に行なわれ，七島熱調査報告書[4]，大島における年間を通した調査[5]およびSasa[6]の詳細な考察などから，これらの島々のツツガムシ病はタテツツガムシの媒介によるものと考えられてきた．最近では，村田ら[7]が三宅島を調べ，患者発生時期に最も一致するのはタテツツガムシであると報じている．現在，患者が多発している式根島[8,9]でも同様のことが言える．すなわち，前報[1]や今回述べた患者発生期（ツツガムシ病流行期）にタテツツガムシ幼虫が多数発生し，患者のみられない時期（流行閑期）には個体数が極めて少なかった．ツツガムシ相からみてタテツツガムシが媒介種と思われる．

次に捕獲したネズミから媒介種を考察する．ツツガムシ病流行期のツツガムシ調査と同時に行なわれたネズミからのツツガムシ病リケッチア分離成績[9]によると，表2に示したようにタテツツガムシの優占するネズミ13匹中8匹からリケッチアが分離された．このリケッチア分離陽性のネズミの中には生後まもないドブネズミNo. 9（月令1.0ヶ月），No. 7（同1.1ヶ月），No. 8（同1.1ヶ月）などが含まれていた．これら若いNo. 7，8，9のネズミは捕獲時からそう遠くない時期に有毒ツツガムシ幼虫（リケッチアを保有しているツツガムシ）からリケッチアの感染を受けていたことがわかる．

ツツガムシ病流行閑期のネズミでは，ドブネズミNo.34（月令6.7ヶ月），No.52（同8.9ヶ月），No.26（同10.7ヶ月），No.22（同22.4ヶ月）がリケッチア分離陽性で，生存期間の長いドブネズミ（月令4ヶ月以上）に抗体価が高かったという[10]．リケッチア分離陽性のネズミは晩秋から冬にかけてのツツガムシ病流行期を経験したものであった．また，アカネズミの一種（日令30～94日）11匹中8匹でリケッチア分離を試みたがすべて陰性であった[10]．アカネズミの一種は推定した日令からみて流行期を経験してない個体であろう．ネズミにツツガムシ病リケッチアが長期に保有されること[11-13]，高い

抗体価が長期間続くこと[11,14]を考えると，No.34, 52, 26, 22のネズミ，および抗体価の高い大多数のネズミが有毒ツツガムシ幼虫からリケッチア感染を受けたのは，調査時（'85年6月）ではなく，それよりも前のツツガムシ病流行期であろう．式根島のツツガムシ病媒介種は，晩秋から冬にかけてその幼虫が多数発生する種と考えて間違いなさそうである．

以上述べたように，ツツガムシ，ネズミの調査結果，および同時に行なわれたリケッチア分離成績[9,10]などから，式根島のツツガムシ病は主にタテツツガムシの媒介によるものと言えよう．

この媒介種と考えられるタテツツガムシ幼虫の出現期は1～5月，9～12月で，夏にはみられない[15]という．しかし，前述したように，今回の6月の調査で2匹のドブネズミからタテツツガムシを少数ながら採集した．これには以下の理由が考えられる．

①多数のネズミ（63匹）を捕獲し，前報[1]同様ネズミの体をブラシでよく擦ってツツガムシを落とし，丹念に調べたのでタテツツガムシを採集できた．

②式根島は民家，畑，藪が混在し（図3A），林に隣接している民家も多い（図3B）．ツツガムシ，特に*Leptotrombidium*属がよく発生するような人為的に攪乱された環境[16]と思われる．最盛期には多数のタテツツガムシが発生し[1]，6月まで続いたその残りを採集した．

③佐々[17]の報告によると，七島熱調査時の大島のタテツツガムシは，その発生の最盛期にはかなり広く分布するが，最盛期を外れると山林の中の沢などに限局されるという．式根島のE地点は湿った場所で，そこで調査したためタテツツガムシを採集した．

流行閑期にもタテツツガムシ幼虫が出現することから，この時期にも患者が発生しないとは限らない．しかし，タテツツガムシ幼虫の個体数が少ないこと，リケッチアの分離陽性率（有毒率）が低いこと（5000個体に1個体程度）[18]，その最盛期を外れると式根島でも発生場所が限局すると予想されること，以上の事柄からこの時期のタテツツガムシはあまり大きな問題にならないように思われる．

要　約

1．伊豆諸島式根島においてツツガムシ病流行期（'84年11月）と流行閑期（'85年6月）にネズミを捕獲し，寄生しているツツガムシ幼虫を調べた．

2．流行期にドブネズミ12匹，クマネズミ1匹を捕獲した．各ネズミに36～2454個体のツツガムシ幼虫が寄生していた．ドブネズミ1匹当り平均436個体寄生していた．タテツツガムシが優占し，その他，フトゲツツガムシ，キタサトツツガムシ，ナガヨツツガムシ，サダスクガーリェプツツガムシもみられた．

3．流行閑期にドブネズミ46匹，クマネズミ6匹，アカネズミの一種11匹を捕獲した．ドブネズミ46匹中13匹に総計25個体のキタサトツツガムシがみられ，2匹にタテツツガムシが総計4個体みられ，ドブネズミ1匹当りのツツガムシ平均寄生数は0.6であった．クマネズミにはツツガムシがみられず，アカネズミの一種の1匹にサダスクガーリェプツツガムシが1個体みられた．

4．ツツガムシの種類，捕獲したネズミの生後経過日数（推定値）およびネズミからのリケッチア分離成績などから，式根島のツツガムシ病は主にタテツツガムシの媒介によるものと考察した．

謝辞　本調査で捕獲したネズミを同定していただいた国立科学博物館動物研究部，吉行瑞子博士，ネズミの生態について御教示を賜わった神奈川県衛生研究所環境生物科科長，矢部辰男博士に深謝いたします．また，調査を行なうに当り，種々の御協力，御配慮を戴いた新島本村役場，同式根島支所，式根島診療所，都衛生局公衆衛生部防疫結核課，島しょ保健所及び当所微生物部ウイルス研究科の皆様に深謝いたします．

文　献

1）大野正彦：東京都衛研年報，36,319,1985
2）Yabe, T.: J.Mammal. Soc. Jap., 8,54,1979
3）高田靖司：成長，21, 8 ,1982
4）東京都衛生局予防課編：七島熱の研究総括篇，1958，東京都刊
5）Tamiya, T. (ed.) : *Recent Advances in Studies of Tsutsugamushi Disease in Japan*, 255, 1962, Medical Culture Inc., Tokyo.
6）Sasa, M.: 衛生動物特別号，4 ,233,1954
7）村田道里，野上貞雄，白坂昭子，田中　寛，川村明義，宮入毅匡：感染症学雑誌，54,235,1980
8）伊藤忠彦，中村清純，山崎　清，坂井冨士子，藪内　清，大橋　誠：東京衛研年報，35,61,1984
9）中村清純，伊藤忠彦，山崎　清，坂井冨士子，大野正彦，藪内　清，大橋　誠：東京衛研年報，36,33,1985
10）東京都衛生局公衆衛生部：ツツガムシ病実態調査報告書（新島本村式根島），1986
11）Fox, J.P.: J.Immunol., 59,109,1948
12）鈴木　誠：日本衛生学雑誌，14,917,1959

13) Shirai, A., Chan, T.C., Gan, E. and Huxsoll, D.L.: Japan. J. Med. Sci. Biol., 32, 179, 1979
14) Van Peenen, P.F.D., Ho, C.M. and Bourgeois, A.L.: Infect. Immun., 15, 813, 1977
15) Tamiya, T. (ed.): *Recent Advances in Studies of Tsutsugamushi Disease in Japan*, 228, 248, 1962, Medical Culture Inc., Tokyo
16) Traub, R. and Wisseman, C.L., Jr. : J. Med. Entmol., 11, 237, 1974
17) 佐々　学：七島熱の研究第3篇，45，1954
18) 浅沼　靖：臨床と細菌，10，174，1983

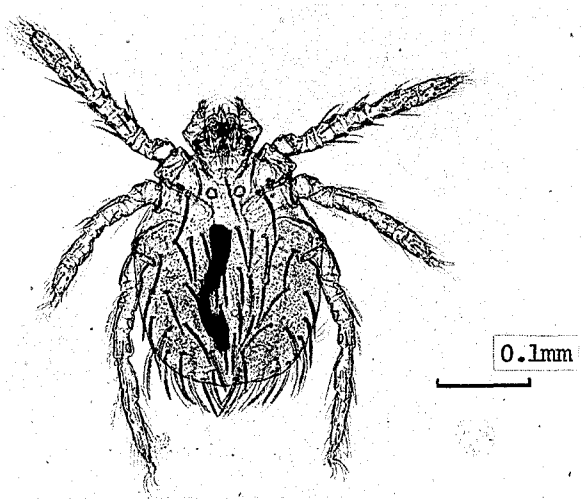


Fig. 2. *Leptotrombidium scutellare* (Larva)

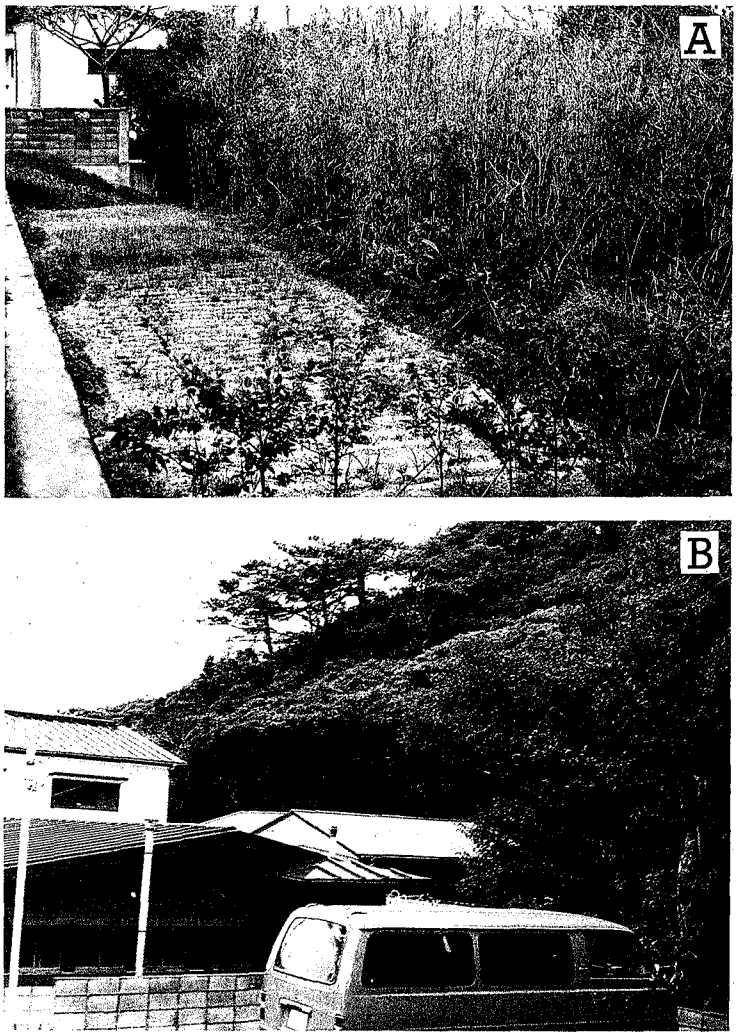


Fig. 3. Patterns of Land Use in Shikinejima Island
A: Farm
B: House

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 269-279, 1986

Prevention of Breeding of Cheyletid Mites by Treatment of Insecticids on Tatami-mats in Concrete Apartment Buildings (I)

MIDORI YOSHIKAWA*

Four types of insecticides, A, B, C and D, were applied to the bottom of and underneath tatami-mats at 17 homes from May through September 1985, in order to determine whether insecticdes can prevent the presence of cheyletid mites which bite humans and cause lesions, and which insecticides work effeftively. Examinations were performed by checking mite fauna in September compared to May, skin lesion appearances, and questionnaire answers of residents in the homes treated by insecticides.

The best results were found in homes treated by insecticide A. The best combinations of 2 items among the 3 items above, namely, no lesions appeared and cheyeltids decreased in September, or no lesions appeared and residents thought the insecticides were effective, or cheyletids decreased in September and residents thought the itsecticides were effective, were found more often in these homes than in those treated with the other 3 types of insecticides. However, the best results were found in only 1 / 3 of the total number of combinations of valid results, omitting cases of no answers, no decision or no data, while 1 / 3 of the combinations showed the worst results in which there were combinations of 2 items among the 3 such as lesions and an increase in cheyletids, or lesions and the residents did not find the insecticides effective. The remaining 1 / 3 of the combinations showed inconclusive results such as appearance of lesions but decrease in cheyletids, or an increase in cheyletids when residents thought the insecticides were effective. From these results, it is difficult to conclude that insecticides are useful for preventive control against cheyletids which breed in tatami-mats.

Keywords : preventive control, insecticide, dermatitis, lesion, cheyletid mite

Introduction

Cheyletid mite-bites have been found on residents of new houses in urban areas since 1979[1-3]. Residents have been especially troubled with itching dermatitis in August through September in 2 — 3 year old concrete apartment-houses with tatami-rooms[4]. The surrounding concrete walls release moistened air, which affects the tatami-mats set into the rooms. The mats absord humidity from the moistened air and consequently, the amount of water content of the mats increase[5]. Mold and mites then breed inside these moist mats.

Cheyletid mites which bite humans, or those which feed on mold and appear in large numbers cause itching dermatitis and discomfort in residents[6-7]. The best method for controlling these mites is to dry the mats by heating them in a drying machine. If the mats are heated to 90 — 100℃ for 2 hours and the inside of the mats are kept at 50℃ for at least 30 minutes, all the mites inside the mats are killed[8].

However, for preventing the appearance of mites, it is easier to treat the surfaces of the mats with insecticides than to heat them. So it is necessary to determine what types of insecticides are useful for controlling the mites, including those which hide inside.

The porpose of this study is to examine whether insecticides are useful for preventive control against the

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

cheyletid mites of tatami-mats, and what kinds of insecticides are more useful, as determined by the following 3 points : 1) whether skin lesions appear on residents in summer after insecticides are used; 2) whether the number of cheyletid mites on the tatami-mats decreases after treatment with insecticides; and 3) whether the residents admit the effectiveness of insecticides, by answering on questionnaires that they do not have any itching lesions during the test period.

Materials and Methods

Outline of procedure

Outline of the test procedure is: 1) dust samples were collected at 20 homes in May and water content of tatami-mats was also measured at this time in rooms where dust samples were collected; 2) insecticides were applied to the bottom of tatami-mats and to the floor under the mats; 3) bodies of the residents were checked by us to see whether skin lesions appeared at the beginning of September; 4) dust samples were collected in September from the same rooms as in May; 5) lesion appearance and mite fauna from dust samples were compared between May and September, and answers on questionnaires were calculated. The details are as follows.

Location and household

Two tall concrete apartment buildings were selected for the tests. One house faces south (building A) and the other south-east (building B). Both of them were built along the Sumida River to the west. Building A has 11 stories and B has 10, and both were built 3 years ago.

In building A, the 10 apartments tested have same room arrangement: 2 rooms of 6 tatami-mats each, facing south and a wooden floored kitchen north of the tatami rooms, and 1 room of 4.5 tatami-mats, a wash room, a bath room and an entrance in the northest part. Each apartment has a floor area of about $60m^2$. In building B, the 10 apartments have the same arrangement of rooms with a total area of about $45m^2$. In both buildings only the tatami rooms were used for this investigation. The tatami-mats in some homes were covered by carpets or mats, which were removed before this test.

Period for test

Mite fauna was investigated on the souface of tatami-mats of 1 tatami room in each home in the middle of May in 1985 and again at the beginning of September. The residens of the homes followed their ordinary routines through both periods of mite fauna examinations in May and in September.

Insecticide

Four types of insecticides were used for this test, each one applied in 5 homes, several from building A and the others from B. The 4 types of insecticides were organophosphorus insecticide A, B and C, and carbamate insecitide D. The main ingredients of these insecticides are phoxim in organophosphorus, insecticide A, fenitrothion in organophosphorus, B and C, propoxur in carbamate, D. Approximately $100ml/m^2$ of each insecticide was applied to the bottom of a mat and the floor under the mat, so that 0.7－2 grams of raw material in each insecticide were applied per m^2. Differing amounts of material per m^2 was due to different concentrations in each insecticide. When treating with insecticides, tatami-mats and furniture were moved.

Sample collection

Dust was collected into a small paper bag using a vacuum cleaner in order to investigate mite fauna[9]. Dust samples were collected from the surfaces of tatami-mats, spending 1 minute sweeping 1 mat-surface. Furniture, pianos and other heavy objects were not removed and areas covered by these items were not subject to dust collection. A dust sample was collected from 1 tatami room at each home in May before starting insecticide treament. In September, a sample was collected in the same tatami room at the same rate of sweeping time as in May.

Mites and insects were extracted from the dust samples using a centrifuging method[10]. Numbers of tarsonemids, cheyletids, pyroglyphids, haplochthoniids

and other mites were compared in May and in September. Numbers of Psocoptera were also compared as Psocoptera was almost always found with cheyletids.

Skin lesion

Most of the residents were checked for skin lesions on their bodies before dust sample collections in September. The residents also responded to us through questionnaires, whehter or not felt itching or found lesions on their bodies.

Others

On questionnaires, information was asked about family members and pets; date of moving in; when new tatami-mats were used; use of carpets or other floor coverings, thickness of curtains; how often the residents stay at home, previous skin lesions from mites in the home, on which parts of bodies skin lesions appeared and their size, how long itching lesions lasted; names of insecticides previously used, effectiveness of those insecticides, names of pest control companies if hired for spraying insecticides; skin lesions appearing during our tests; and the judgement of the effectiveness of our treatment. Water contents of tatami-mats were also checked in the rooms where mite fauna was investigated, before treating with insecticides in May.

Results

Organophosphorus insecticide A

Skin lesions did not appear in any of the 5 homes during the test period when organophoshorus insecticide A was used as a preventive control (Table 1). However, the questionnaires showed that only 1 home thought the insecticide was effective; 1 home did not think the treatment was effective, since the residents felt itching although no lesions could be found on their bodies; and 1 home could not decide on the effectiveness of the treatment. Questionnaires were not returned from the other 2 homes (Table 1).

Cheyletid mite numbers decreased after the treatment except in home II (Table 1).

Amounts of water content of tatami-mats were measured at several points in 1 tatami room where mites were collected, and then averaged. The average values were over 10% in all 5 homes (Table 1).

Each family of mite such as Tarsonemidae, Cheyletidae, Pyroglyphidae, Haplochthoniidae and others and an order of insect, Psocoptera, were compared in number before and after the application of insecticides (Fig. 1). In Psocoptera and all families of mites except Pyroglyphidae, the numbers collected in September were lower than in May, using geometric means (Fig. 1).

Organophosphorus insecticide B

Skin lesions were found on the residents in 2 out of 3 homes; the other 2 homes refused to join the investigation during the test period (Table 2). Lesions appeared on backs or legs of some residents, and the residents also answered as not-effective in 2 homes. In addition, cheyletid mites increased in number in 2 homes, and in the 3rd home mite numbers decreased slightly. The water content of the tatami-mats was slightly higher in this group (Table 2).

In the September survey, only tarsonemids had decreased in number and haplochthoniids had not changed when compared to the May survey. The other mite families, total number of mites and insect Psocoptera increased in number in September compared to May, using geometric means (Fig. 2).

Organophosphorus insecticide C

Four out of 5 homes participated in our investigation. Skin lesions could be found on the residents in 3 homes but not in the other (Table 3). Thus only 1 home admitted the effectiveness of the treatment with insecticide C, while the others found the treatment to only slightly, or not at all effective. Cheyletids decreased in September in homes which felt the insecticide was effective. (Table 3). The water content of tatami-mats was from 10 to 15%.

Geometric means of mite numbers in September showed a decrease in Haplochthoniidae, other kind and total mites, while the number of Tarsonemidae increased and that of Cheyletidae, Pyroglyphidae and Psocoptera had not changed (Fig. 3).

Table 1. Effectiveness of organophosphorus insecticide A applied to the bottom of and under tatami-mats.

Effectiveness \ Home No.	I	II	III	IV	V
Presence or absence of skin lesions (checked by us)	absence	absence	absence	absence	absence
Resident's decision on questionnaire	no decision*	not effective	—	—	effective
Cheyletid mite number in Sept. compared with May	slightly decreased	increased	slightly decreased	decreased	decreased
Average water content of tatami-mats in May (%)	10	10	10	10.5	11

Note 1) Residents of home II covered the tatami-mats wich used to check mite fauna with a carpet after treating with insecticide A in May. Mite fauna in September were checked on the surface of the tatami-mats under the carpet.

2) Tatami-mats used to check mite fauna had been covered by a carpet in home V before this test started. Investigation was performed after removing the carpet. No carpet has been used in the room since application of insecticide A in May.

3) * : no decision means that the residents could not decide the effectiveness.

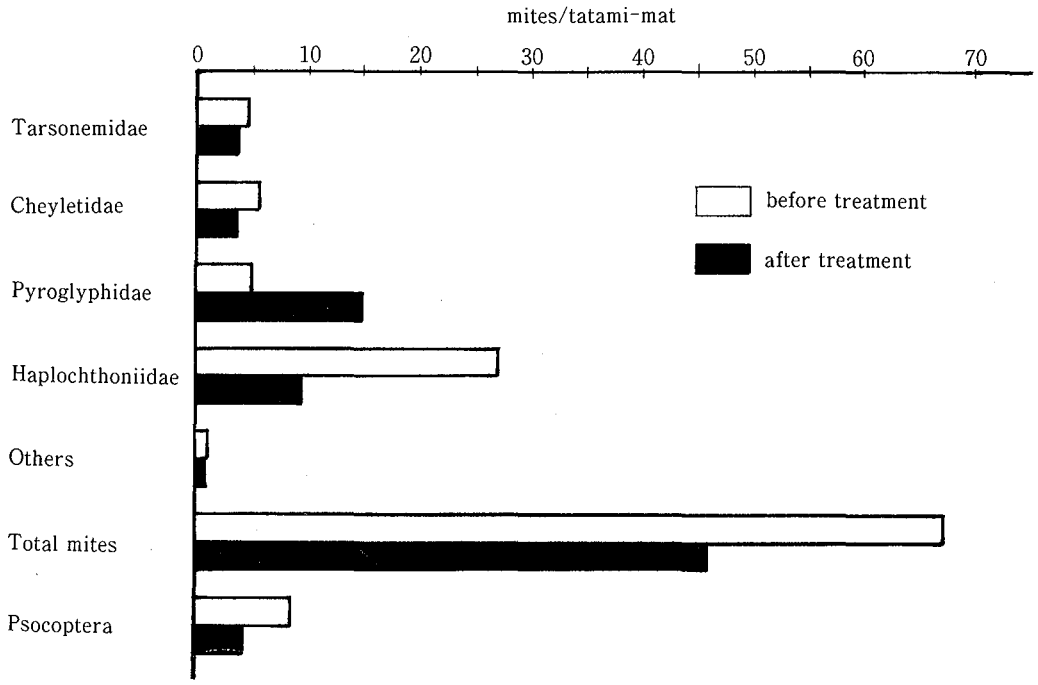


Fig. 1. Geometric means of mites collected from tatami-mast at 5 homes before (in May) and after (in September) application of organophosphorus insecticide A.

Table 2. Effectiveness of organophosphorus insecticide B applied to the bottom of and under tatami-mats.

Effectiveness \ Home No.	VI	VII	VIII
Presence or absence of skin lesions (checked by us)	presence	presence	—
Resident' s decision on questionnaire	—	not effective	not effective
Cheyleted mite number in Sept. compared with May	increased	slightly decreased	increased
Average water content of tatami-mats in May (%)	9.5	12	13

Note 1) Homes IX and X refused to participate during the test period, so were omitted.
2) The top cover of the tatami-mats used to check mite fauna in home VIII were turned over in August during the test period.

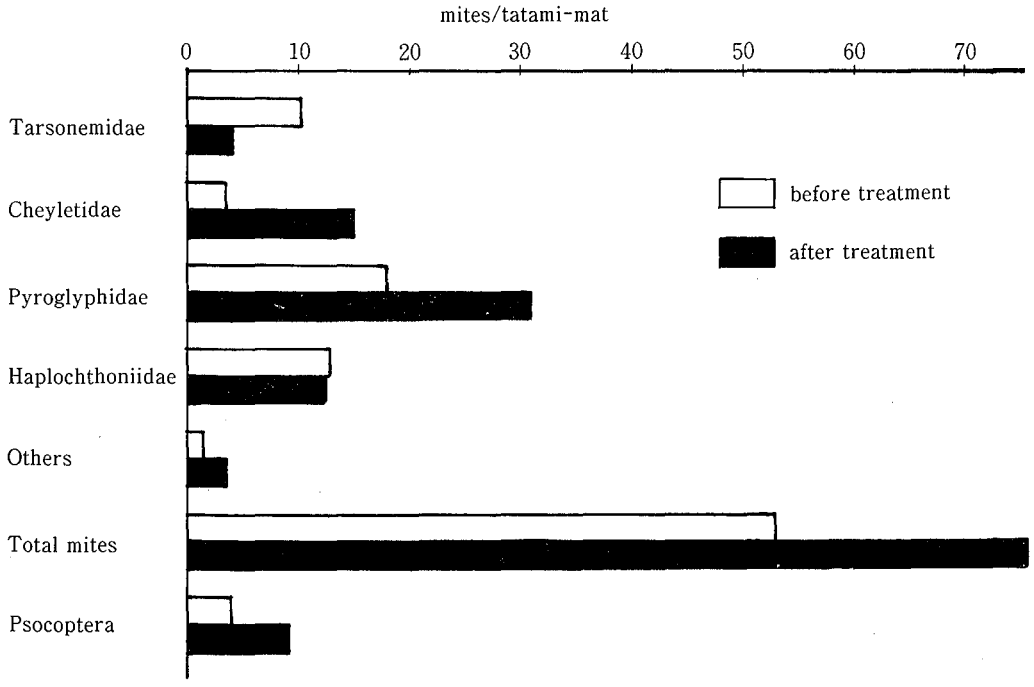


Fig. 2. Geometric means of mites collected from tatami-mats at 3 homes before (in May) and after (in September) application of organophosphorus insecticide B.

Table 3. Effectiveness of organophosphorus insecticide C applied to the bottom of and under tatami-mats.

Effectiveness \ Home No.	XI	XII	XIII	XIV
Presence or absence of skin lesions (checked by us)	absence	presence	presence	presence
Resident's decision on questionnaire	effective	not effective	not effective	slightly effective
Cheyletid mite number in Sept. compared with May	decredsed	increased	—	decreased
Average water content of tatami-mats in May (%)	11.5	10	15	11.5

Note 1) Home XV refused to participate during the test period, so was omitted.
2) Dust sample of home XIII in May was lost.

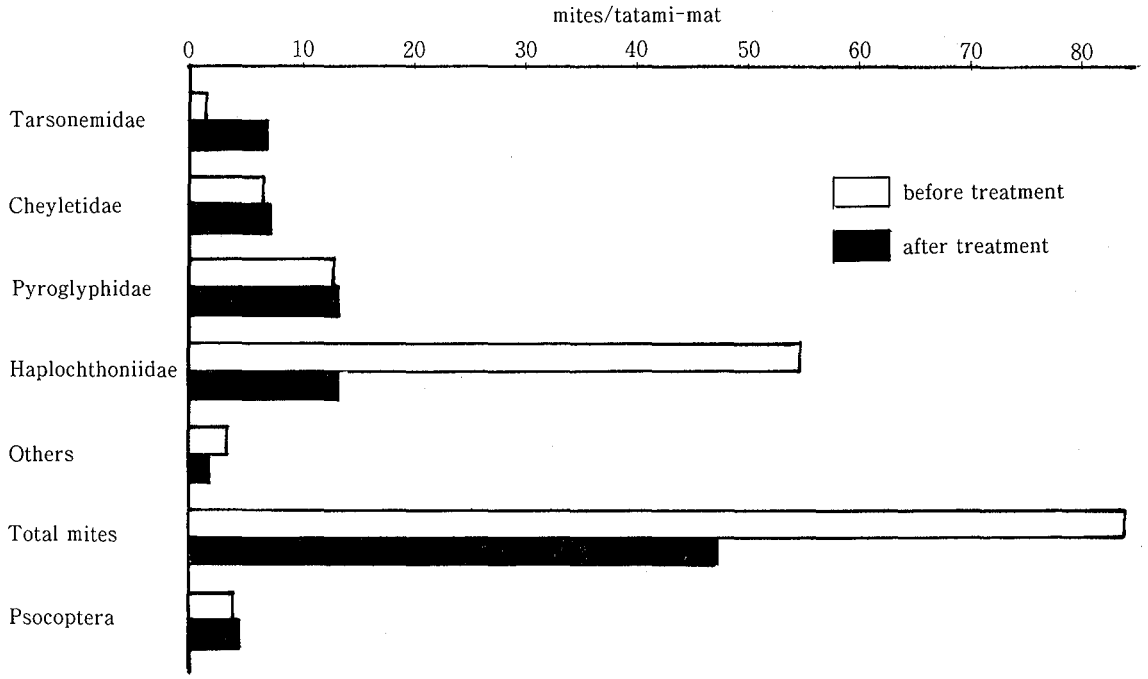


Fig. 3. Geometric means of mites collected from tatami-mats at 4 homes before (in May) and after (in September) application of organophosphorus insecticide C.

Carbamate insecticide D

In all 5 homes, lesions appeared on the residents (Table 4). But 2 homes felt the treatment was slightly effective, while the other 3 homes gave no answers or no decision. Cheyletids decreased in September in 1 home and did not change in 2 homes, but increased in 2 homes. Percentages of water content of tatami-mats were 11.5－13% and higher than in the homes treated by the other 3 types of insecticides.

Geometric means of mite numbers in September showed a decrease or no change in all kinds except Cheyletidae and Pyroglyphidae, and Psocoptera also decreased (Fig. 4).

Discussion

In September, the presence or absence of skin lesions was confirmed by us early in the morning before most of the residents left home, and before dust samples were collected. Almost all the residents' bodies, hands and legs were checked. Judgment of whether a lesion was caused by a mite-bite was performed according to the data of Yoshikawa[6,11]. From the data, the characteristics of a lesion caused by a cheyletid are: 1) a 3－7 mm clear red papule which turns pale after 1－2 weeks, 2) pierced wounds by needle-like chelicerae are sometimes found, 3) itching continues for about 1 week, 4) lesions are scattered around the back, legs, buttocks and inner thighs.

The number of lesions increased in proportion to cheyletids collected from 1 tatami-mat, such as 0% appearance of lesions in homes where insecticide A was used and 4.17 cheyletids were collected from 1 tatami-mats (Table 1, Fig. 1), 75% appearance of lesions in homes treated by insecticide C and 7.29 cheyletids from 1 tatami-mat (Table 3, Fig. 3), 100% appearances in homes treated by B and D with 15.18 and 10.20 cheyletids from 1 tatami-mat, respectively (Table 2, 4, Fig. 2, 4). In the September survey, lesions did not appear when 4.14 cheyletids were found on 1 tatami-mat, while 7.29 cheyletids／mat showed lesion appearances. This is similar to the results of Yoshida who found that lesions start appearing at 1 cheyletid per 1 m² surface[12]. The results of Yoshida are thought to indicate that a chance for cheyletid to touch a human occurs when a human sits on a 1 m² tatami-mat where a cheyletid walks on the surface, since a cheyletid bites a human when it touches him. Also, lesion appearances increase when more than 5 cheyletids are found on 1 m² of tatami-mat.

There were only 10 homes among 17 in which all 3 items, skin lesion appearances, mite fauna in September compared to May, and completed questionnaires of residents, could be used as results (Tables 1－4). Of these, 2 homes out of the 10 gave no decisions on the questionnaires, and the results from 4 homes contradicted each other. Thus only the results from 4 homes could be used. Therefore, combinations of 2 items instead of 3 were used to determine the effectiveness of insecticides applied (Tables 1－4).

From the relationship between lesion appearance and insecticide effectiveness indicated on the questionnaires, 2 homes where insecticides A (1 home) and C (1) were used belonged to the best combination and the best treatment as group i (Table 5). In these 2 homes no lesions were found and the residents admitted the effectiveness of the insecticide. On the contrary, 3 homes treated by insecticides B (1) and C (2) belonged to the worst combination and ineffective treatment of group ii. So, lesions appeared among the residents who did not feel the insecticide was effective. Homes treated by insecticides A (1), C (1) and D (2) belonged to groups iii and iv which were inconclusive as the results contradicted each other when lesions did not appear but the residents did not find the insecticide effective (Table 5). This result is thought to be caused by the fact that a carpet used during the test period after treatment increased the number of cheyletids; or the residents were bitten but lesions did not appear since a lesion occurs from an allergic reaction due to cheyletid saliva; or the residents answered on the questionnaires that the treatment was only slightly effective because they felt that itching lesions appeared less often than in the last year when they suffered serious itching dermatitis (Table 1, 3 and 4) [13].

The best combination concerning lesion appearance and cheyletid number occurred in 5 homes, 4 out of 5 treated by insecticide A and 1 by C (Tables 1－4,

Table 4. Effectiveness of carbamate insecticide D applied to the bottom of and under tatami-mats.

Effectiveness \ Home No.	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX
Presence or absence of skin lesions (checked by us)	presence	presence	presence	presence	presence
Resident's decision on questionnaire	—	slightly effective	—	no decision*	slightly effective
Cheyletid mite number in Sept. compared with May	increased	increased	no change	no change	decreased
Average water content of tatami-mats in May (%)	11.5	13	11.5	12	11.5

Note 1) Home XVII was closed for about 10 days in August.
2) Other insecticides which were not used by us were treated after turning the outside cover over in August in the room used to check mite fauna.
3) *: the same as Table 1.

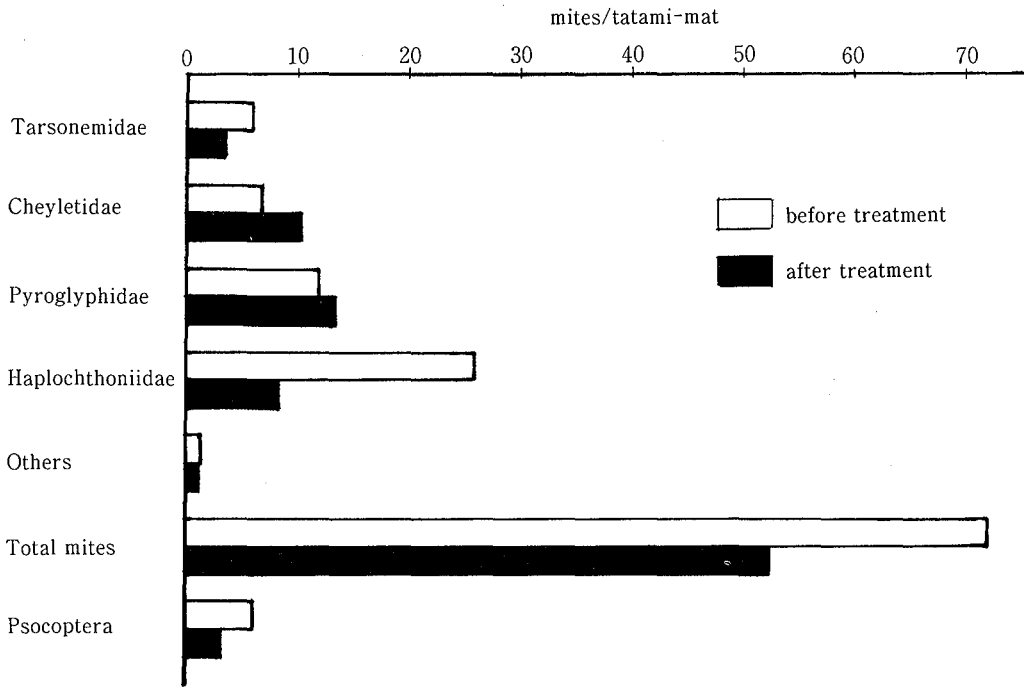


Fig. 4. Geometric means of mites collected from tatami-mats at 5 homes before (in May) and after (in September) application of carbamate insecticide D.

6). Insecticides A (1) and C (1) decreased the number of cheyletids so that lesions did not appear. But the worst combination was found in 4 homes treated by insecticides B (1), C (1) and D (2). Inconclusive combinations were found in 4 homes treated by insecticides A (1), B (1), C (1) and D (1). This was because cheyletid numbers still remained around 10/mat in September; or some residents were sensitive to mite-bites (Table 1 − 4).

The best combination of insecticide effectiveness and cheyletid mite number was from 4 homes treated by insecticides A (1), C (2) and D (1) (Tables 1 − 4, 7). In

Table 5. Relation between lesion appearance and insecticide effectiveness answered on questionnaires at 17 homes.

Group	i	ii	iii	iv	v	vi
	best combination	worst combination	inconclusive combination			
Relation between lesion appearance and insecticide effectiveness	Lesion absent and Insecticide effective	Lesion present and Insecticide not effective	Lesion absent but Insecticide not effective	Lesion present but Insecticide effective	Others, including no answer, no decision	Total
No. of homes (treated with insecticide)	2 (A+C)	3 (B+2C)	1 (A)	3 (C+2D)	8	17

Note: Slightly effective in Table 1 − 4 is included in effective.

Table 6. Relation between lesion appearance and increase or decrease of cheyletids at 17 homes.

Group	i	ii	iii	iv	v	vi
	best combination	worst combination	inconclusive combination			
Relation between lesion appearance and increase or decrease of cheyletid mites	Lesion absent and Cheyletids decreased	Lesion present and Cheyletids increased	Lesion absent but Cheyletids increased	Lesion present but Cheyletids decreased	Others, including no answer, no decition no change	Total
No. of homes (treated with insecticide)	5 (4A+C)	4 (B+C+2D)	1 (A)	3 (B+C+D)	4	17

Note: Slightly decreased in Table 1 − 4 is included in decreased.

these homes, the residents admitted that the insecticides were useful and the cheyletids decreased. But in 3 homes treated by insecticides A (1), B (1) and C (1), they found no effect and the cheyletids increased, so these 3 homes belonged to the worst group for treatment. The results from groups iii and iv at 2 homes contradicted each other (Table 7).

Groups i and ii, which showed conclusive combinations, make up 68% of the 31 valid combinations of groups i−iv of Tables 5 − 7, excluding such results as no answers, no decision, no change and no opportunity to check from all 51 combinations (=17 homes multiplied by 3). So, these results might indicate whether an insecticide is useful for mite control and which insecticides are effective for the preventive control of cheyletids. The best combinations were shown in group i numbering 11 (6 of A, 4 of C and 1 of D). These 11 combinations equal 22% of the best combination group when divided by the 51 total combinations, while they equal 35% when divided by the 31. However, the worst combinations in group ii were found in 20% among the 51 and 32% among the valid 31. From these results, it is difficult to conclude that insecticides are useful for prevention of cheyletids.

Of the 4 types of insecitcides used, A was the most effective, showing 19% effectiveness among the valid results 31; followed by 13% of insecticide C; 3 % of insecticide D and 0 % insecticide B. On the contrary, 13%, 10%, 6 % and 3 % of combinations belonged to the worst group treated by insecticides C, B, D and A, respectively.

Each mite family except Pyroglyphidae and insect number decreased or did not change from May to September in the homes treated by insecticide A, while Psocoptera and all mites except Cheyletidae and Pyroglyphidae decreased in the homes treated by D (Fig. 1 and 4). Haplochthoniidae, others and total mites decreased in homes treated by C, while only Tarsonemidae decreased in homes treated by insecticide B (Fig. 2 − 3). Thus, by calculating the increase or decrease of mite families and Psocoptera, insecticide A was found to be the most useful of the 4 kinds tested.

However, if insecticide A is found to be less useful than other insecticides B, C and D in a future survey, water content must be considered. As the average amount of water content in the homes treated by insecti-

Table 7. Relation between lesion appearance and insecticide effectiveness answered on questionnaires at 17 homes.

Group	i	ii	iii	iv	v	vi
	best combination	worst combination	inconclusive combination			
Relation between insecticide effectiveness and increase or decrease of cheyletid mites	Insecticide effective and Cheyletids decreased	Insecticide not effective and Cheyletids increased	Insecticide effective but Cheyletids increased	Insecticide not effective but Cheyletids decreased	Others, including no answer, no decision, no change	Total
No. of homes (treated with insecticide)	4 (A+2C+D)	3 (A+B+C)	1 (D)	1 (B)	8	17

Note: Slightly decreased in Tables 1 − 4 is included in decreased.

cide A was 10.3% while the averages treated by the other 3 insecticides were 11.5−12%, perhaps an insecticide works more effectively when used in a home in which there is a small amount of moisture in the tatamimats.

References

1) Yoshikawa, M. : *Tokyo-to Eiken Neopo*, 31 − 1 , 253, 1980
2) Yoshikawa, M. : *Inform. Environ. Sanit.*, 4 , 14, 1980
3) Yoshikawa, M. : *Pubilc Health*, 49, 814, 1985
4) Nagoya City Report : *A Report of Environ. Sanit. in the Nagoya City*, 16, 1 , 1985
5) Kenzai Test Center : *An effeciency Test of Tatamimats*, 1982
6) Yoshikawa, M. and K. Hanaoka : *Tokyo-to Eiken Nenpo*, 36, 308, 1985
7) Maeda, T. and K. Aekohji : *Rinsho-hifuka*, 38, 883, 1984
8) Yoshikawa, M. : *Pest Control*, 38, 1 , 1982
9) Yoshikawa, M. : *Jap. J. Public Health*, 28, 141, 1981
10) Yoshikawa, M. : *Mites and Their Control ed. by Sasa*, M., 13, 1984, Japan Enviromental Sanitation Center, Kawasaki
11) Yoshikawa, M. et al : *Tokyo-to Eiken Nenpo*, 34, 264, 1983
12) Yoshida, M. et al : *Biruno Eiseikanri*, 8 , 29, 1984
13) Yoshikawa, M. : *J. Med. Entomol.*, 22, 115, 1985

殺虫剤によるツメダニの予防効果（I）

吉川　翠*

4種類の殺虫剤A，B，C，Dを，17世帯の畳裏面と，畳の下の床面にまき，人を刺すツメダニの発生が予防できるかを調べた．ツメダニの発生予防的効果は，3つの調査項目，すなわち，皮疹発症の有無，5月と9月の時点でのツメダニ数の増減，殺虫剤を散布した世帯でのアンケート結果から推察した．調査は，1985年5月から9月の間に行っている．

上記3項目のうち，殺虫剤の有効性を認めるような項目の組合わせ，例えば，皮疹無発症と9月時のツメダニ数の減少，皮疹無発症とアンケート調査での居住者側の有効を認める判定，ツメダニ数の減少とアンケート調査での有効判定などを考えると，殺虫剤Aを散布した世帯でこの傾向が一番多く見られた．しかし，この有効性を認めるような組合わせは，4種類の殺虫剤効果を合計しても全体の⅓にしかならない．他の⅓は，殺虫剤効果の無効性を指する項目の組合わせ（例えば，皮疹発症とツメダニ数の増加）に含まれた．残りの⅓は，皮疹は無発症だが9月時のツメダニ数は増加をしたとか，ツメダニ数は増加したのにアンケートでは効果ありと判定したという逆判定を指す結果となっている．

以上のことから，ツメダニの発生を予防する目的で散布した4種類の殺虫剤のうち，殺虫剤Aが一番有効であったが，殺虫剤のみによるツメダニの予防効果は有効率が低いといえる．

*東京都衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　160　東京都新宿区百人町3−24−1

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 280-282, 1986

毛髪および母乳中の元素について
——Mg, Ca, Fe, Cu, Zn, Hg——

江波戸 擧 秀*, 竹 内 正 博*, 水 石 和 子*, 山野辺 秀 夫*,
渡 辺 四男也*, 鵜 沼 洋 子**, 南 條 静 代**, 山 梨 靖 夫**

Mg, Ca, Fe, Cu, Zn and Hg Content in Hair and Human Milk

KIYOHIDE EBATO*, MASAHIRO TAKEUCHI*, KAZUKO MIZUISHI*, HIDEO YAMANOBE*,
YOHYA WATANABE*, YOUKO UNUMA**, SHIZUYO NANJOU** and YASUO YAMANASHI**

One hundred twenty seven samples of human milk and hair were taken from mothers residing in Tokyo.

Magnesium, calcium, iron, copper and zinc concentrations were determined by inductively coupled argon plasma atomic emission spectrometry (ICP) and mercury by the heating vaporization-gold amalgamation method.

The results were as follows:

(1) The average concentration of the elements in human milk were 30.0ppm of magnesium, 253ppm of calcium, 0.69ppm of iron, 0.56ppm of copper, 4.67ppm of zinc and 1.02ppb of mercury respectively.

(2) The average concentrations of the elements in hair were 76.1ppm of magnesium, 1052ppm of calcium, 9.71ppm of iron, 162ppm of copper, 175ppm of zinc and 3.02ppm of mercury respectively.

(3) Concentrations of elements in 111 samples of hair and human milk of mothers obtained between 3 days to 10 days after parturition were measured. There were no differences in the average concentration of elements or the correlation coefficient in samples of mothers in their twenties and thirties.

Keywords: human milk, hair, magnesium, calcium, iron, copper, zinc, mercury

緒　　言

環境汚染調査の一環としてヒトの金属暴露量を検討する場合，指標のひとつとして利用される毛髪は排せつ器官の一種と考えられ，排せつされた金属と毛髪に多量に含まれる硫黄が－SH，S－S等の架橋をつくるため，血液と比較して毛髪の金属含有量が多くなるといわれている．さらに，血液のように恒常性がなく，一般にヒトの金属の暴露量の変化をより敏感に反映すると考えられ，また，母乳も人体金属暴露量の指標として考えられる．著者らは，前報[1,2]で母乳中のHg測定方法及び含有量，Mg, Ca, Fe, CuおよびZnの含有量を測定し，授乳期別の含有量の変動，また，貧血のある母親とない母親の各元素量を比較検討した．今回，さらに，前報の母乳採取時に同時に採取した母親の毛髪中の前記の各元素量を測定し，その母乳と毛髪の元素含有量の相関性を検討したので報告する．

実 験 方 法

1．**試薬**　Mg, Ca, Fe, Cu, ZnおよびHg標準液：1.000ppm原子吸光分析用標準液（和光純薬），硝酸および過塩素酸：有害金属測定用（和光純薬），水銀分析用添加剤：炭酸ナトリウム＋水酸化カルシウム（1＋1）（Mと略す）および活性アルミナ（Bと略す）（日本インスツルメント）を用いた．

2．**装置**　高周波誘導結合アルゴンプラズマ発光分光分析装置（ICP）：ジョバン・イヴォン社製JY48P型

水銀分析装置：日本インスツルメント製理学マーキュ

*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
**東京都豊島区長崎保健所

Table 1. Mother's age and days after childbirth

Mother's age	N	Days after childbirth	N
20-29	54	3-5	19
		6-10	30
		11-20	2
		21-60	2
		61-120	1
30-39	90	3-5	47
		6-10	30
		11-20	7
		21-60	4
		61-120	1
		120-	1

N : Number of sample

Table 2. Operating conditions for determination of iron, magnesium, copper, calcium and zinc

Wave length	;	
Mg	;	279.55nm
Ca	;	422.67nm
Fe	;	259.94nm
Cu	;	324.75nm
Zn	;	213.86nm
Incident Power	;	1.7kW
Reflect Power	;	0.0kW
Coolant Gas	;	15.0 L/min 3.5kg/cm²
Plasma Gas	;	0.0 L/min
Nebulizer Gas	;	0.5 L/min 2.1kg/cm²
Observation Height	;	16mm above coil

Apparatus ; Jobin ybon inductively coupled argon plasma atomic emmission spectrometer : JY48P リー SP 型

3．試料 1984年4月－1984年12月の9ケ月間，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，母乳を採取したが同時に毛髪が採取できた127例について検討した．その際，年齢および授乳期調査を行い，その結果を Table 1．に示した．

4．測定用試料および測定 母乳中の Mg，Ca，Fe，Cu，Zn，および Hg の値は，前報[1,2]の試料中，毛髪が同時に採取できた試料の測定値を用いた．毛髪は1％中性洗剤で5分間振とう後，水で十分すすいだ後 IAEA の方法[3]で洗浄後乾燥し分析時までデシケーターに保管した．毛髪の Hg 測定は，試料1－2 mg を正確に秤取し直接分解ボートにとり，金アマルガム測定法により測定した．毛髪の Mg，Ca，Fe，Cu および Zn の測定は毛髪 0.4g を小試験管に秤取し，硝酸，過塩素酸を加えホットプレート上で湿式分解を行い蒸発乾固した後，0.5規定塩酸を加えて ICP 用試料溶液とし測定した．

5．測定条件 ICP 測定条件は Table 2．に示した．Hg 測定条件は前報[1]に準じ，LOW MODE，4分（400℃），6分（700℃）で気化し，毛髪は分解ボートに水銀添加剤M，試料，水銀添加剤M，B，Mの順序で積層し分析した．

実験結果および考察

同時に採取した母乳および毛髪中の元素平均含有量は Table 3．に示した．母乳中の各元素の平均含有量は

Table 3. Elements concentration in human milk or hair (ppm)

	Human milk	Hair
	Arithm. mean ±S. D.	Arithm. mean ±S. D.
Mg	30.01±7.45	76.1±57.9
Ca	253.3±84.7	1052±735
Fe	0.69±0.35	9.78±11.1
Cu	0.56±0.17	16.2±17.5
Zn	4.67±1.41	175±96
Hg	0.00102±0.00070	3.02±1.34

Ca＞Mg＞Zn＞Fe＞Cu＞Hg であり，毛髪中の元素の平均含有量は Ca＞Zn＞Mg＞Cu＞Fe＞Hg の順であった．

毛髪に対する母乳の含有量の倍率を比較してみると，Mg：2.5倍，Ca：4倍，Fe：14倍，Cu：29倍，Zn：37倍，Hg：2960倍といずれも毛髪の含有量が高く，特に有害元素である Hg の蓄積量が高かった．今回の母乳の測定値は毛髪と同時に採取した母乳のみの結果をもちいたので，前報[1,2]の平均含有量と若干数値の異なるものがあったが，大きな相違は見られなかった．母乳の金属含有量の考察は前報[1,2]に記載したので今回は，毛髪について考察する．毛髪の Mg の平均値は76.1ppm で寺岡ら[4]の190ppm より低値であったが大森ら[6]の57ppm より高値であった．

Table 4. Elements concentration in human milk and hair according to the classfication of the twenties and thirties of age (ppm)

	20−29Age		30−39Age	
	Human milk	Hair	Human milk	Hair
Cu	0.56±0.16	15.2±8.2	0.57±0.18	14.3±6.1
Zn	4.72±1.42	186±88	4.76±1.43	158±51
Fe	0.85±1.07	12.2±18.1	0.86±1.22	8.49±3.10
Mg	30.9±8.0	82.2±53.2	30.1±7.3	78.2±64.2
Ca	238±94	1201±726	268±78	1026±769
Hg	0.00099±0.00083	2.73±1.06	0.00107±0.00065	3.1±1.43

Caの平均値1052ppmは明石ら[7]の946ppmより高値であるが，寺岡ら[4]の2800ppmより低値であった．しかし，今井ら[5]がパーマネントについて処理毛で1298−1839ppm，無処理毛で579−1148ppmと報告しているようにパーマネント処理によって大幅にCaの測定値が変動するが，今回の毛髪試料はパーマネント処理毛と無処理毛が混在しているが，測定値は既報の範囲内に含まれていた．Feの平均値9.78ppmは寺岡[4]らの47ppm，高木ら[9]の15.1ppmより低値であった．Cuの平均値16.2ppmは高木ら[9]の10.7ppm，寺岡ら[4]の31ppmの中間的値であった．Hgの平均値3.02ppmは芳賀ら[10]の1.92ppm，高橋ら[11]の5.5ppm，三谷ら[12]の2.57ppmの中間的値であった．つぎに母乳と毛髪の金属の関係を検討するため，Table 1．に記載した母親の年齢構成20代，30代について，授乳期3−5日，6−10日をまとめて授乳期3−10日の母乳とし，114名，127例を試料として検討した．

Table 4．に20代，30代の母乳と毛髪の元素含有量を示した．各年代の母乳と毛髪の含有量の平均値はほとんど変わらず，平均値の差の検定を行ったところ差はなかった．また，母乳と毛髪の相関係数を検討したところ相関関係はみられなかった．

結　論

20代−30代の母親の毛髪と母乳のMg，Ca，Fe，Cu，ZnおよびHgを測定したところ，平均値でFeが既報に比較して低値を示した他はすべて中間的な値であった．母親の年齢を20代，30代の年代別に分類し，上記の元素を測定したところ両年代の含有量の平均値に差はなく，また，相関関係もみられなかった．

文　献

1）山野辺秀夫，竹内正博，水石和子，江波戸挙秀，風間成孔，渡辺四男也：東京衛研年報，36,151,1985

2）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，南条静代，中沢秀雄：東京衛研年報，36,155,1985

3）IAEA：IAEA／AG−53,Vienna 1976

4）寺岡久之，小林　純：日衛誌，32,574,1977

5）今井準三，森本隆司，杉田　哲，山田不二雄：岐阜衛研所報，21,17,1976

6）大森佐与子，武内孝之，青木　敦，塚谷恒雄：日本公衆衛生学会第43回講演要旨集，683,1984

7）明石潤子，福島一郎，今掘　彰：公衛誌，28,443,1981

8）丸茂義輝，瀬田季茂：衛化，27,381,1981

9）Y. TAKAGI. S. MATSUDA, S. IMAI, Y. OHMORI. T, MASUDA, J. A. VINSON, M. C. MEHRA, B. K. PURI and A. KANIENSKI：福井衛研年報，23,13,1985

10）芳賀義昭，今野　宏，池田清一，小沢喬志郎，勝又貞一，鈴木　憲，武藤倫子，小林淑子，高階光栄，石塚英馬，大谷裕行，松田恵利子：秋田衛研年報，27,85,1983

11）高橋康子，辻　キヨ，岡野真治：衛化，22,296,1976

12）三谷一憲，星野道雄，児玉京子，近藤正人，小瀬洋喜：衛化，22,327,1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 283-287, 1986

トリプトファン代謝産物の尿中排泄量に及ぼすNO_2暴露の影響

鈴木孝人*, 加納堯子*, 溝口　勲*

Effect of NO_2 Exposure on Urinary Excretion of Tryptophan Metabolites

TAKAHITO SUZUKI*, TAKAKO KANOH* and ISAO MIZOGUCHI*

Rats were exposed to 5 ppm nitrogen dioxide (NO_2) for 2 and 4 weeks. Changes in urinary excretion of xanthurenic acid and kynurenic acid of tryptophan metabolites were studied. The activity levels of kynureninase, which is a key enzyme in tryptophan metabolism, in the liver were also examined.

The increases of xanthurenic acid and kynurenic acid in urine and the decrease of kynureninase activity in the liver were observed at week 2, and they returned to the control levels at week 4.

These results suggest that the increased tryptophan metabolites in urine at week 2 was due to the inhibinion of kynureninase activity by NO_2 exposure.

Keywords: nitrogen dioxide, urinary xanthurenic acid, urinary kynurenic acid, kynureninase, rat

緒　言

Nizhegorodov と Markhotskii[1] は五二酸化窒素（N_2O_5, 1.3ppm）に104～113日間暴露されたラットではトリプトファンの代謝産物である xanthurenic acid（XA）の尿中排泄量の増加，ビタミンB_6の代謝産物である4－pyridoxic acid の尿中排泄量と組織中のビタミンB_6含量の減少が生じることを報告し，さらに，彼等は二酸化窒素（NO_2, 1.1ppm），一酸化炭素（18.3ppm）とアンモニアガス（23ppm）の混合物に139～149日間暴露されたラットでも4－pyridoxic acid の尿中排泄量と組織中のビタミンB_6含量の減少が生じることも報告している[2]．上記の報告はこれらの大気汚染物質の暴露によって組織中のビタミンB_6が減少することを示している．また，尿中の XA 含量の増加は，図1のごとく，哺乳動物のトリプトファンは主に代謝されるので，ビタミンB_6群のひとつである pyridoxal phosphate（PALP）の減少によって，この PALP を必須の補酵素とする kynureninase に活性阻害が生じたためと推測される．一方，ビタミンB_6依存性のアミノ酸代謝異常症も以前から報告されていた[3]．そこで，我々はトリプトファン代謝に及ぼすNO_2の影響を把握するために，NO_2を暴露したラットのトリプトファン代謝産物である XA と kynurenic acid（KA）の尿中への排泄量及び肝臓の kynureninase 活性の変化について検討を行った結果，XA と KA の含量及び kynureninase 活性の変動が認められたので報告する．

実験方法

（Ⅰ）動物の暴露

実験動物は5週令の雄のF 344／DuCrj ラット（日本チャールスリバー社）を用いて，対照群（空気暴露，16匹）とNO_2群（5±0.5ppm, 16匹）に分け，既報[4]の装置及び条件において2週間または4週間の暴露を行った．

（Ⅱ）尿中のトリプトファン代謝産物の分析

各暴露期間の終了後にラットをガラス製の代謝ケージ（杉山元医理器）に移し，自由に水と飼料（NMF 飼料，オリエンタル酵母）を摂取させながら，尿を24時間採取した．尿中のわずかな混入飼料片を遠心によって除去したのち，上澄を分析時まで－20℃で保存した．トリプトファンの代謝産物である XA と KA の尿中含量の分析は Satoh と Price[5] の方法に準じて実施した．すなわち，高純度に精製された Dowex 50型の AG イオン交換樹脂（H^+型，架橋度12%，200～400メッシュ，商品名：ムロマック，室町化学工業）を1 m*l* つめたミニカラム（5×50mm，室町化学工業）に脱イオン水で5倍希釈した2 m*l* の希釈尿に0.5m*l* の0.1N HCl を添加し，この

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

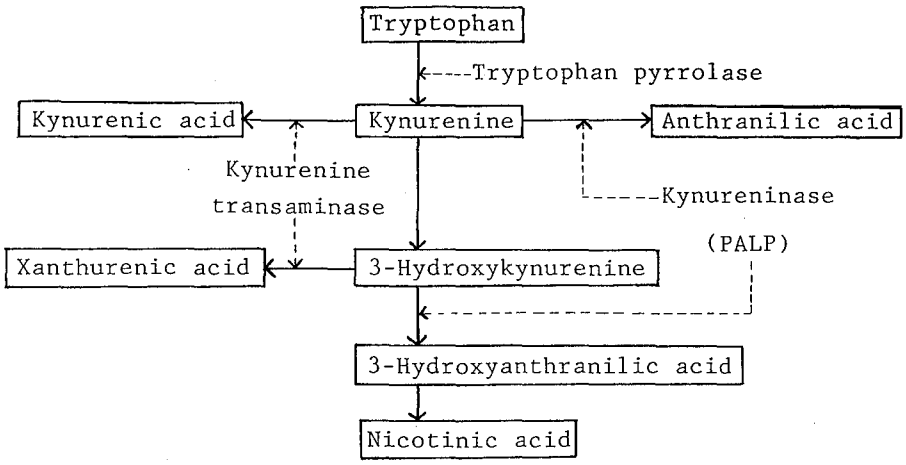


Fig. 1. Main Pathway of Tryptophan Degradation

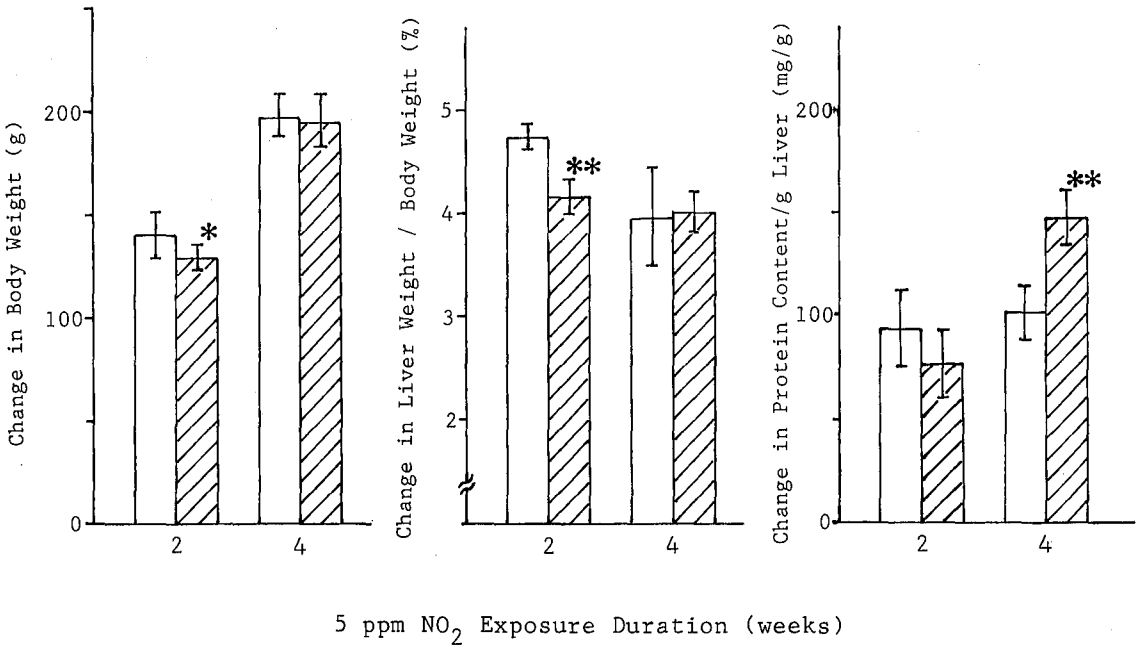


Fig. 2. Changes of Body Weight, Liver Weight and Protein Content in Liver of Rats Exposed to 5 ppm NO_2 or Air. Data are expressed as the mean ± S. D. (n = 8).
＊: P<0.05, ＊＊: P<0.001, □: Control, ▨: NO_2

2.5m*l* をペリスタミニポンプ（SJ−1211H 型，アトーK. K.）で流速を 1 m*l*／min でチャージした．その後，2 m*l*／min の流速で順次17m*l* の0.2N HCl，34m*l* の0.5N HCl，6 m*l* の脱イオン水でカラムを洗い，さらに，132m*l* の脱イオン水で XA と KA を溶出した．溶出液中の XA と KA の測定は常法[5]に従って実施した．なお，希釈尿への標準品の XA と KA を添加した回収実験の結果は，XA の場合は95～100%，KA の場合は90～93%であった．

(Ⅳ) 肝臓の kynureninase 活性の分析

採尿後，ラットをネンブタール麻酔下で放血により屠

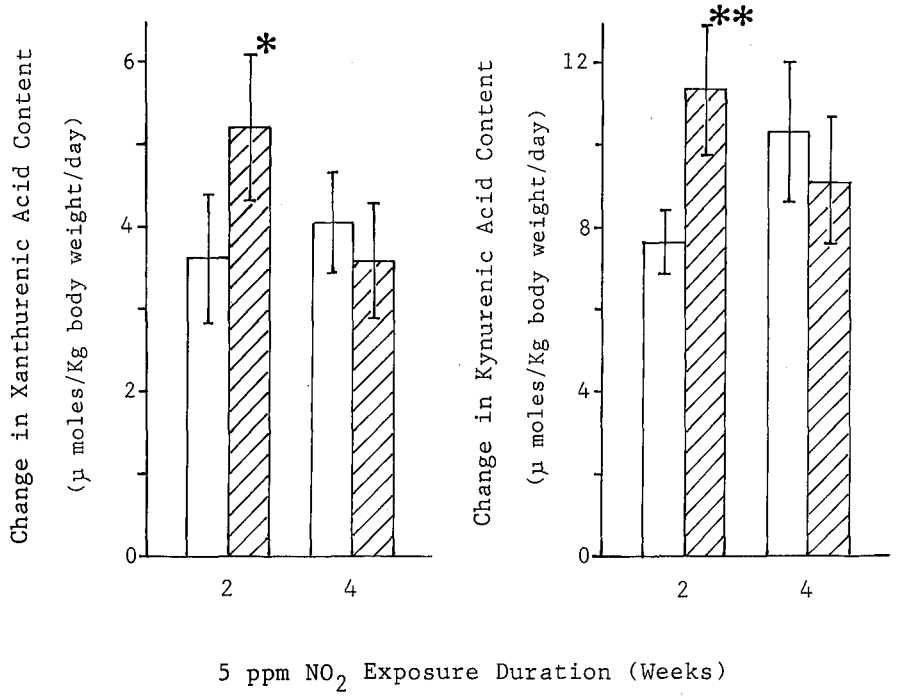


Fig. 3. Changes in the Contents of Xanthurenic Acid and Kynurenic Acid in Urine of Rats Exposed to 5 ppm NO_2 or air. Data are expressed as the mean ± S. D. (n = 8). *: P<0.005, **: P<0.001, □: Control, ▨: NO_2

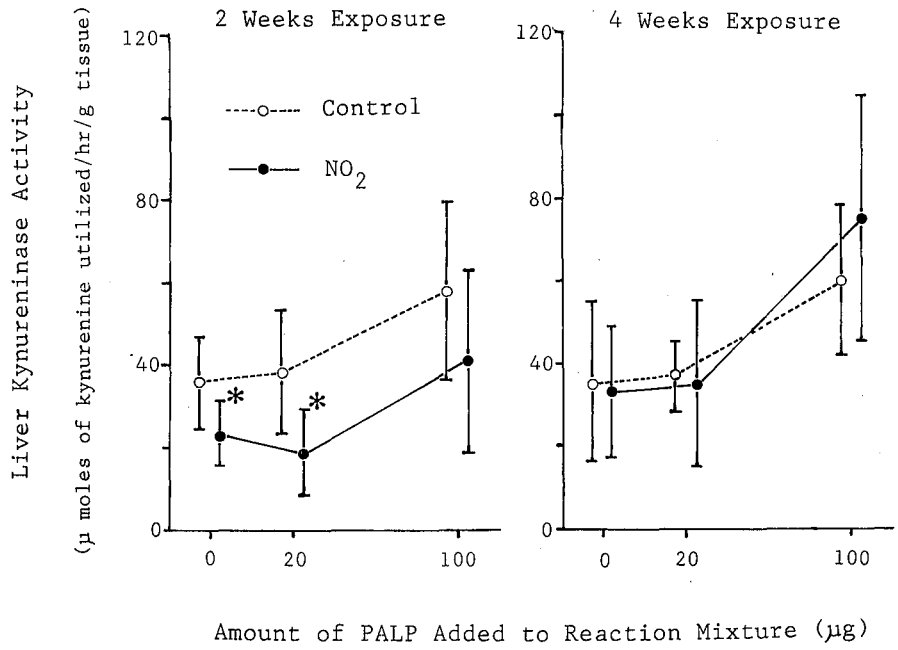


Fig. 4. Changes of Liver Kynureninase Activities under Various Amounts of Pyridoxal Phosphate (PALP) Added to Reaction Mixture on the Rats Exposed to 5 ppm NO_2 for 2 or 4 Weeks. Data are expressed as the mean ± S. D. (n = 8). *: P<0.05

殺して肝臓を採取した．肝臓の一部分に氷冷した0.25M sucrose－0.2M KCl（pH7.4）を9倍容加えてから，Potter-Elvehjem型のホモジナイザーを用いてホモジナイズ後，まず，冷却遠心機を用いて3,300×gで10分間遠心をし，その上清をさらに15,000×gで60分間遠心した．また，その上清を透析膜（8／32型，三光純薬）に入れ，外液に0.2mM Tris－HCl（pH8.0）を用いて，24時間冷蔵庫内で透析した．透析後の試料は分析時まで－20℃で保存した．kynureninase活性の分析はKnoxの方法[6]を用いて実施した．なお，この酵素は補酵素にPALPを必要とするので，分析する際には反応液に添加するPALP濃度の影響についても検討を行った．タンパク含量の測定にはLowryらの方法[7]を用いた．

実験結果

図2に示すように，対照群に比較してNO_2群の体重は2週目で有意な減少が認められ，また，体重補正した肝臓重量も2週目で有意な減少が認められたが，それらは4週目ではそれぞれの対照レベルに戻った．一方，肝臓のgあたりの組織タンパク含量はNO_2群では2週目では減少傾向（$P<0.10$）を示したが，4週目では有意な増加が認められた．

24時間中に排泄された尿中のXAとKA含量はkg体重で補正をした．NO_2群のラット尿中のXAとKAの含量は2週目では増加を示したが，4週目では有意差は認められなかった（図3）．

図4に示すように，肝臓のkynureninase活性の変化は2週目のNO_2群では，PALP無添加と20 μgのPALP添加の場合に有意な低下が認められたが，100 μgの多量のPALPを添加した場合は低下傾向（$P<0.10$）を示した．しかし，有意な差は認められなかった．また，4週目ではPALP添加の有無にかかわりなく対照群に比べ有意な差は認められなかった．

考　察

NO_2に暴露されたラットの2週目におけるXAとKAの尿中排泄量の増加の原因は，肝臓のkynureninaseが2週目で活性が低下した結果から考えると，主にこの酵素の活性阻害によって生じたものと思われる．NO_2暴露によるkynureninaseの活性阻害は，①この酵素はPALPを補酵素としているので，肝臓中のPALP含量の減少による活性低下，②この酵素とPALPの結合阻害による活性低下，および，③この酵素自体の阻害などが考えられる．すなわち，NizhegorodovとMarkhotskii[1,2]はNO_2やN_2O_5などが暴露されたラットでは組織中のビタミンB_6含量が減少することを報告しているので，5 ppm NO_2によっても肝臓中のPALP含量が減少する可能性も考えられる．すなわち，肝臓のPALP含量の減少がkynureninase活性の低下を惹起したのかも知れない．

しかし，Knapp[8]によって報告されたビタミンB_6依存型のトリプトファン代謝異常症の患者ではXAやKAなどが多量に尿中に排泄され，この患者にビタミンB_6群のひとつであるpyridoxineを大量投与するとXAやKAの尿中排泄量が著明に減少することが確認されている[9]．さらに，本症患者では肝臓のkynureninase活性が著しく低下しており，活性測定の際に反応液に多量のPALPを添加するとこの酵素活性値が正常レベルに戻ることから，本症患者ではこのkynureninaseとPALPの結合に障害が生じていると考えられている[10]．我々も2週目のkynureninase活性の分析の際にPALPを添加した場合について検討したところ，図4に示すように，20 μgのPALP添加の場合には活性の回復は認められなかったが，多量（100 μg）のPALP添加の場合には対照群と比べてやや低下傾向ではあるが対照レベルにまで回復が認められた．NO_2を暴露した場合においてもkynureninaseとPALPの結合性が減弱した可能性が考えられた．

一方，呼吸器を介して吸入されたNO_2はNO_2^-として血液やリンパ液などの循環系を通じて肝臓中に存在し，また，肝臓中の脂質過酸化物が増加傾向を示すという報告[11,12]，および，kynureninaseがSH試薬によって阻害されること[13]などから，この酵素はSH酵素と考えられるので，NO_2^-や脂質過酸化物によってkynureninase自体が阻害された可能性も考えられる．なお，NO_2暴露によるkynureninase活性の低下の原因は，恐らく，単独ではなく推測した複数の原因が組み合わさって生じたものではなかろうか．

NO_2暴露群のXAとKAの尿中含量が4週目で対照レベルにまで戻る現象については肝臓のkynureninaseが4週目に回復したことが主因と思われる．この酵素活性が4週目に回復した理由は，図2に示すように，2週目における肝重量の減少が4週目で回復したこと，同様に，4週目では肝臓中のタンパク含量が増加した結果と考え合わせると，4週目では肝臓でのタンパク合成が亢進し，それに伴ってkynureninaseの生合成も活発化したためと推測した．

現在，NO_2などの大気汚染物質による人間の健康に及ぼす影響を把握する有効な指標の開発が切望されていることから，トリプトファンの代謝産物の尿中含量がより低濃度のNO_2暴露によって，どの様な変動を示すか今後検討して行きたい．

(本研究は昭和60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) Nizhegorodov, V. M. and Markhotskii, Ya. L. : *Hig. Sanit.*, 34, 272, 1969
2) Nizhegorodov, V. M. and Markhotskii, Ya. L. : *Hig. Sanit.*, 36, 137, 1971
3) 吉田稔男：代謝, 8巻, 2号, 1168, 昭和46年
4) 鈴木孝人, 大沢誠喜, 狩野文雄, 福田雅夫, 笠原利英, 寺田伸枝, 溝口　勲：東京衛研年報, 32－1, 238, 1981
5) Satoh, K. and Price, J. M. : *J. Biol. Chem.*, 230, 781, 1958
6) Knox, W. E. : *Biochem. J.*, 53, 379, 1953
7) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
8) Knapp, A. : *Clin. Chim. Acta*, 5, 6, 1960
9) Tada, K., Yokoyama, Y., Nakagawa, H., Yoshida, T. and Arakawa, T. : *Tohoku J. Exp. Med.*, 93, 115, 1967
10) Tada, K., Yokoyama, Y., Nakagawa, H. and Arakawa, T. : *Tohoku J. Exp. Med.*, 95, 107, 1968
11) Goldstein, E., Peek, N. F., Parks, N. J., Hine, H. H., Steffey, E. P. and Tarkington, B. : *Am. Rev. Resp. Dis.*, 115, 404, 1977
12) 市川　勇, 横山栄二：第22回大気汚染学会講演要旨集, 384頁, 1981
13) Moriguchi, M., Yamamoto, T. and Soda, K. : *Biochemistry*, 12, 2969, 1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 288-292, 1986

大気汚染と尿中のヒドロキシプロリン，クレアチニン比
——都内3地区に居住する学童尿を用いて——

池田眞悟*，鈴木孝人*，加納堯子*，溝口　勲*

Air Pollution and Urinary Hydroxyproline : Creatinine Ratio.
——Using Urine of Schoolchildren Living in Three Areas in Tokyo——

SHINGO IKEDA*, TAKAHITO SUZUKI*, TAKAKO KANOH* and ISAO MIZOGUCHI*

We studied the usefulness of urinary hydroxyproline (HOP) : creatinine (CRE) ratio as a new biochemical index for the adverse effects on human health caused by air opllution, especially through exposure to nitrogen oxides (NOx) and nitrogen dioxide (NO_2). The urinary HOP : CRE ratios of 739 healthy schoolchildren aged 11－12 living in three regions (Nakano-ku, Chuo-ku and Oume city) in Tokyo producing different concentrations of air pollutants were examined in June, 1984 when heaters were not used for heating rooms and in January 1985 when heaters were used.

The children living in Oume city where the NO_2 concentrations were lower than in Chuo-ku and Nakano-ku showed lower HOP : CRE ratios. The urinary HOP : CRE ratio showed a significant positive correlation both with NO_2 concentration ($r=0.221$, $P<0.01$) and with Nox concentration ($r=0.195$, $P<0.01$). The urinary HOP : CRE ratios of the boys living in Chuo-ku and Oume city were significantly high in winter, but no seasonal variation was observed in the HOP : CRE ratios of girls.

These results show that the ratio is useful as an index for monitoring air pollution caused by nitrogen dioxide and other NOx.

Keywords : urinary hydrxyproline at schoolchildren, nitrogen oxides, nitrogen dioxide, air pollution

緒　　言

大気汚染物質による健康影響調査には，一般に，肺機能や呼吸器疾患罹患率および死亡率などが健康障害の指標として用いられている．しかし，これらの指標は特異性に欠けるため，大気汚染物質，特に窒素酸化物に対して特異的で，さらに客観性を示す生化学的な指標の探求が望まれている．

最近，春日らは[1,2,3]大気中の窒素酸化物は，肺結合組織を損傷して，肺組織中のコラーゲン構成成分であるヒドロキシロプリン (Hydroxyproline:HOP) の尿中排泄量を増加させると報告し，さらに，この尿中HOPを尿中クレアチニン (Creatinine:CRE) で補正した値 (HOP／CRE) は，家庭内の喫煙者の有無，および暖房用石油ストーブの種類等の影響をうけて変化することも報告している．笠原らは[4]，NO_2の動物（ラット）暴露実験で尿中HOP排泄量を調査し，NO_2暴露群では尿中排泄量の増加が認められるが，その後徐々に再び尿中HOP排泄量はコントロール群と同じ値に戻ること，さらに，尿中HOP排泄量の増加する時期はNO_2濃度に依存し，濃度が高いほど早期におこることを報告している．この尿中のHOP量の変動は，NO_2が肺組織を刺激，または，損傷して肺組織のコラーゲンの代謝回転を亢進させた結果であろうと推測している．

これらの結果から尿中HOP量は大気汚染物質，特にNO_2暴露による健康障害の指標として有効であろうと考え，実際に大気窒素酸化物濃度の異なる地域に居住する小学生を対象にして，その尿中HOP量を測定し，その有用性の検討を試みた．以下その報告である．

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

Table 1. Urinary Hydroxyproline to Creatinine Ratio oe Schoolchildrem Living in Three Areas.

Area	Time	Sex	Number	HOP/CRE (μg/mg) mean ± SD (range)	HOP (μg/ml) mean ± SD (range)	CRE (mg/dl) mean ± SD (raen ± SD)
Nakano-ku	Jun. 1984	M, F	140	106.6±24.4 (63.2～176.9)	98.6±47.3 (18～274)	96.2±40.1 (20～258)
		M	69	96.2±20.5 (63.2～155.9)	84.7±35.2 (18～198)	90.6±40.0 (26～212)
		F	71	112.9±25.0 (65.1～176.9)	112.1±53.3 (20～274)	101.6±48.9 (20～258)
	Jan. 1985	M, F	133	107.1±19.8 (57.1～157.4)	120.2±47.4 (20～246)	114.8±46.8 (16～256)
		M	64	101.9±18.2 (57.1～157.4)	113.7±46.2 (45～239)	113.7±47.2 (40～256)
		F	69	112.0±19.9 (76.5～156.4)	126.3±47.6 (20～246)	115.7±46.4 (16～220)
Chuo-ku	Jun. 1984	M, F	83	99.1±22.4 (73.5～169.6)	110.5±49.9 (26～247)	114.8±44.7 (22～246)
		M	42	87.4±12.1 (73.5～114.6)	98.9±28.4 (36～178)	116.3±34.6 (46～178)
		F	41	111.0±24.2 (74.1～169.6)	122.3±56.3 (26～247)	113.3±53.1 (22～246)
	Jan. 1985	M, F	78	107.9±19.9 (74.1～161.9)	117.5±47.5 (37～250)	110.6±43.3 (26～204)
		M	40	104.1±20.6 (74.1～158.2)	107.2±47.4 (37～236)	104.9±45.4 (30～196)
		F	38	111.8±18.2 (80.7～161.9)	128.5±45.0 (39～250)	116.5±39.9 (26～204)
Oune city	Jun. 1984	M, F	158	93.9±22.6 (43.8～158.8)	99.8±49.5 (19～281)	108.6±51.8 (24～324)
		M	71	83.3±21.9 (43.8～144.1)	90.6±48.9 (24～281)	103.9±49.1 (26～264)
		F	87	98.4±22.0 (52.7～158.8)	107.3±48.7 (19～241)	112.4±53.7 (24～324)
	Jan. 1985	M, F	147	95.4±21.0 (54.8～170.6)	91.1±42.6 (27～219)	98.6±48.4 (22～238)
		M	66	91.9±18.7 (54.8～140.9)	87.0±43.2 (27～219)	96.6±49.1 (22～238)
		F	81	98.2±22.3 (64.5～170.6)	94.4±41.2 (27～190)	100.3±47.6 (30～218)

調査方法

1．検査材料

被検者は，中野区M小学校，中央区T小学校および青梅市O小学校の五年生（739名）を対象に同一学童を室内暖房非使用期（59年6月）と使用期（60年1月）に区分して調査した．調査方法はこれらの学童の早朝尿10m*l*を採取し，広口共栓ポリ容器（20m*l*）に保管，分析時まで−20℃で保存した．

Table 2．Average Concentrations of Nitrogen Oxides in Three Areas (ppb)

	Jun. 1984		Jan. 1985	
	NO_2	NOx	NO_2	NOx
Nakano-ku	25	34	37	75
Chuo-ku	25	43	37	69
Oume city	15	25	25	40

Table 3．Statistical Comparision by Area on Averaged Hydroxyproline to Creatinine Ratio of Schoolchildren

Jun. 1984

	male+female			male			female		
	Nakano-ku	Chuo-ku	Oume city	Nakano-ku	Chuo-ku	Oume city	Nakano-ku	Chuo-ku	Oume city
Nakano-ku		P<0.05	P<0.01		P<0.02	P<0.01		N. S	P<0.01
Chuo-ku	N. S		N. S	N. S		N. S	N. S		P<0.01
Oume city	P<0.01	P<0.01		P<0.01	P<0.01		P<0.01	P<0.01	

Jan. 1985

(N. S : no significant)

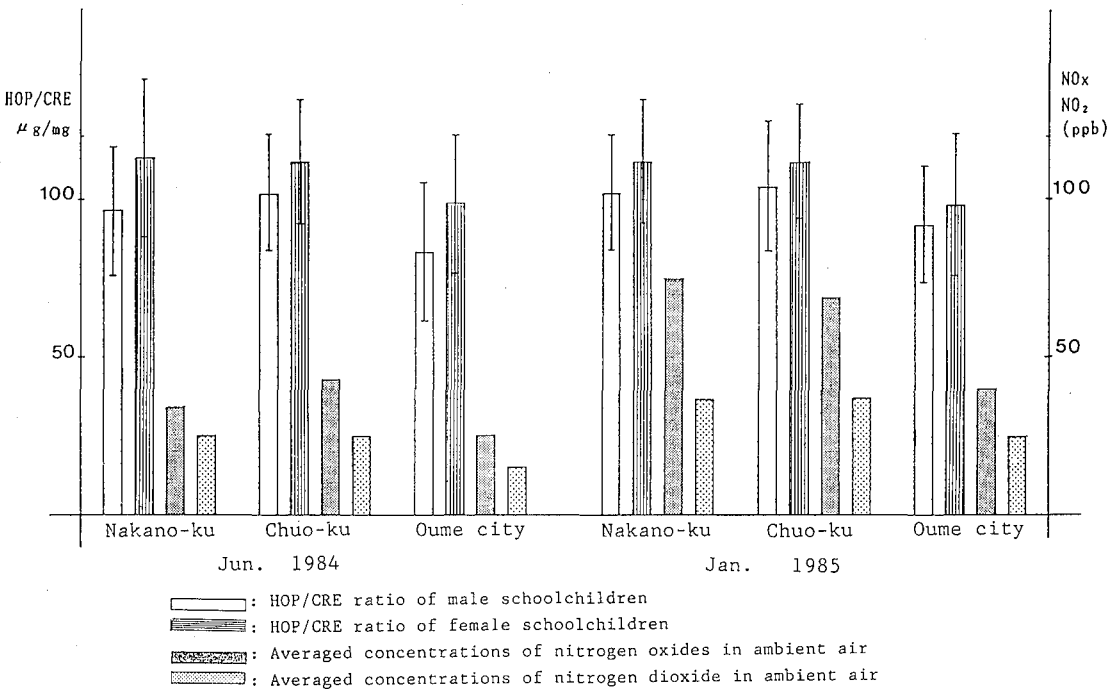


Fig. 1．Averaged Urinary Hydroxyproline to Creatinine Ratio of Schoolchildren and Averaged Concentrations of Nitrogen Oxides in Three Areas

2．測定方法

1）HOPの測定

試料尿を6規定塩酸下，110℃で15時間加水分解後，1.2規定水酸化ナトリウムで5倍希釈した．このサンプルを60年東京都衛研年報[5]に登載した測定方法により，島津自記分光光度計UV−240型を用いて測定した．

2）CREの測定

尿中へのHOPの排泄量は，食事内容や健康状態，特に腎臓における尿の濃縮程度で大きな影響を受けるので，一般には，この影響の補正をCREで行っている．CREの測定は尿を20倍希釈し，日立705型自動分析装置で，第一化学薬品株式会社のオートセラCRE試薬を使用し，Jaffi法[6]で測定した．

3）大気中窒素酸化物平均濃度

大気中窒素酸化物濃度は，東京都環境保全局大気保全部測定の，大気汚染常時測定局測定結果報告によった．

結果および考察

大気中窒素酸化物濃度の異なる中野，中央，青梅の三地区の学童尿中HOP／CRE値を調査した結果，大気中窒素酸化物濃度の低い青梅地区に比べ，大気中窒素酸化物濃度の高い中野および中央地区の学童尿中HOP／CRE値は高い値を示した（表1．2．3，図1）．

NO_2濃度とHOP／CRE値の相関は相関係数0.221で有意な正の相関関係（$P<0.01$）を示し，NOx濃度との間においても相関係数は0.195で，同じく有意な相関関係（$P<0.01$）を示した．

尿中HOP／CRE値の季節変動は，女性では季節による差は認められないが，男性の場合は，中央と青梅地区において，HOP／CRE値が夏期より冬期に明確な増加が認められた（表1．4，図1）．この結果から，冬期の尿中HOP／CRE値には大気中のNO_2，NOx量の増加に加えて，石油ストーブ等の室内暖房器具から発生するNO_2の影響も考えられる．

性差の比較では，どの地区でもHOP／CRE値は，女性の測定値が男性の測定値より高い傾向を示し，特に夏期（6月）の測定値では明確な性差が認められ，冬期では中野区のみで女性の方が高かった（表4．5，図1）．米山は[7]四年生から五年生までの学童尿中HOP／CRE値を比較しているが，この年令のHOP／CRE値は身長の増加量と有意な正の相関関係を示し，五年生の初期（9月）までは女性の平均身長増加率が高いことから，男性より女性の方がHOP／CRE値が高くなることを報告している．この結果は我々の成績とも良く一致している．すなわち，我々の結果でもHOP／CRE値の男女間の差は夏期（6月）ではいずれの地区でも女性の方が男性の値より高い値を示した．さらに，米山は[8]4月又は5月の時期における三年生から六年生までの学童についても検討し，HOP／CRE値は三年生から五年生までは女性の方が高いが，六年生では差が認められなかったことを報告している．この結果も，五年生の冬期（1月）では中野区でのみ女性が男性のHOP／CRE値を有意にうわまっているが，青梅市および中央区では有意な差が認められなかった我々の成績とほぼ一致したものと思われる．

尿中へのHOP排泄量は発育期の子供の場合には成長ホルモンの関与も報告されており[9,10]，また，米山の[7,8]報告から考えると，成長や年令によって変動するので，大気汚染，喫煙および暖房器具等による健康影響を，HOP／CRE値を指標として検討する際には同一年令，同時期における比較が必要であろう．しかし，今回の調査結果および春日ら[1,2,3]の結果から考えると，尿中HOP排泄量は暖房器具等による影響も受けると考えられるが，しかし，大気中窒素酸化物濃度に依存して増加すること，また，尿中HOP／CRE値は健康指標として，大気汚染による公害検診には非常に有用であることがわかった．

要　約

都内大気中窒素酸化物濃度の異なる，中野区，中央区および青梅市三地区の小学五年生を対象に，夏期（6月）と冬期（1月）に同一学童の尿中HOPを測定した．

青梅市は，尿中HOP／CRE値と大気中窒素酸化物濃度共に，中野，中央地区に比べ低い値を示し，大気中NOx，NO_2濃度と尿中HOP／CRE値との間には，共に正の相関（$P<0.01$）が認められた．

Table 4．Statistical Comparison by Season on Averaged Hydroxyproline Creatinine Ratio of Scoolchildren in Each Area

	Nakano-ku HOP/CRE	Chuo-ku HOP/CRE	Oume city HOP/CRE
male＋female	N. S	$P<0.01$	N. S
male	N. S	$P<0.01$	$P<0.02$
female	N. S	N. S	N. S

N. S：no significant

Table 5．Statistical Comparison by Sex on Avereged Hydroxyproline Creatinine Ratio of Schoolchildren in Each Area

	Nakano-ku HOP/CRE	Chuo-ku HOP/CRE	Oume city HOP/CRE
Jun. 1984	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$
Jan. 1985	$P<0.01$	N. S	N. S

N. S：no significant

尿中 HOP／CRE 値の性差は，三地区で夏期，冬期ともに男性より女性の方が高い値を示した．

夏期と冬期の HOP／CRE 値を比較すると，女性では季節による差は認められないが，男性は冬期の方が高い値を示した．

尿中 HOP 排泄量測定は，試料の採取が容易なこと，さらに，我々の改良した測定方法により比較的簡便に測定可能なことから大気汚染，特に窒素酸化物による健康障害の指標として非常に有効な方法である．

謝辞 試料収集にあたり，御協力していただいた東京都衛生局公害保健課職員並びに教育委員会はじめ担当先生方に深謝いたします．

（本研究は昭和60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）松木秀明，逢坂文夫，春日　斉，杉田　稔：日本公衛誌，28,505,1981

2）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

3）松木秀明，春日　斉，逢坂文夫，柳沢幸雄，西村肇：日本公衛誌，32,549,1985

4）笠原利英，大澤誠喜，鈴木孝人，溝口　勲：東京衛研年報，30－1，195,1975

5）池田眞悟，鈴木孝人，加納堯子，溝口　勲：東京衛研年報，36,277,1985

6）Cook, J. G. H. : Clin. *Chim. Acta.* 32,284,1971

7）米山京子：日本公衛誌，23,540,1976

8）米山京子：日本公衛誌，24,417,1977

9）Jasin, H. E., Fink, C. W., Wise, W. and Ziff, M. : *J. Clim. Invest.* 41,⑩,1928,1963

10）野田春彦，永井　裕，藤本大三郎：コラーゲン，229,217,南江堂（東京），1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 293-300, 1986

NO_2, O_3およびSO_2による長期複合暴露のラットの肺におよぼす影響

渡辺伸枝*, 池田真悟*, 大沢誠喜*, 鈴木孝人*,
溝口勲*, 林豊**

Pulmonary Effects in Rats Induced by Prolonged Exposure to NO_2, O_3 and SO_2

NOBUE WATANABE*, SHINGO IKEDA*, MASANOBU OHSAWA*, TAKAHITO SUZUKI*,
ISAO MIZOGUCHI* and YUTAKA HAYASHI**

The pathological pulmonary response of rats observed by light and electron microscopies,and gaseous exchange measured using a blood pH/gas analyzer after continuous exposure to 0.3 ppm NO_2, 0.08 ppm O_3 and 0.1 ppm SO_2, for 19 months were studied.

In the group exposed to the mixture of NO_2, O_3 and SO_2, there was a marked enlargement of capillary vessel,vacuolar degeneration of endothelial cells with edema of interstitial connective tissues and thickened alveolar walls. Cells and collagen bundles of the interstitium were sparsely present in the edematous spaces. When the lesions were less evident, loosened contact between the capillary endothelial cells and basement membrane and edematous fluid accumulation in the subendothelium were detected.

The changes caused by the combined exposure to O_3 and SO_2 at the capillary vessel appeared to be somewhat lighter than those caused by exposure to the mixture of NO_2, O_3 and SO_2.

Arterial blood oxygen tension (PaO_2) was significantly lower in the rats of either of the exposed groups than that of the control. These findings suggest that persistent edema may affect pulmonary functions and change the gaseous exchange in the lung.

Keywords: Pulmonary ettects, prolonged exposure, rats, NO_2, O_3, SO_2, vacuolar degeneration, endothelial cells, PaO_2

緒　言

大気汚染物質の中でも，二酸化窒素（NO_2）と，オゾン（O_3）は，酸化性の強い物質として注目され，その生体影響に関する研究が進められている。動物実験も，長期吸入実験を含めて少なくないが[1,2]，暴露量と病変の進展を長期間にわたって系統的に検討した実験は稀である．

著者らは，低濃度領域におけるNO_2，O_3各々の単独暴露およびNO_2とO_3の複合暴露実験を実施し，NO_2あるいはO_3によっても暴露期間の長期化に伴って，肺胞壁間質の水腫を主病変とした変化が認められたこと，また，このような変化は，NO_2とO_3を複合暴露することによって増強されたことを報告した[3,4,5,6]．

一方，二酸化硫黄（SO_2）は，気道に対する最も重要な慢性刺激物質であるといわれており[7]，呼吸器疾患との関係が問題となっている．

本報告は，NO_2とO_3に，さらにSO_2を複合して長期暴露実験を行い，その結果得られたラットの肺の病理組織学的変化および肺のガス交換能について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

*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
**千葉大学医学部肺癌研究施設病理研究部

バー)を用いて，NO_2(0.3ppm)，O_3(0.08ppm)およびSO_2(0.1ppm)を複合して暴露した群，O_3(0.08ppm)とSO_2(0.1ppm)を複合して暴露した群および対照群の3群にわけ，19ヶ月間の連続暴露を行った．O_3は1日8時間，NO_2とSO_2は終日暴露であり，暴露実験に用いられた吸入装置および実験条件は，前報[8]と同様である．動物は，全面がステンレスのケージに10匹づつ収容し，飼料は固型飼料（オリエンタル酵母 NMF）を，飲料水は水道水を自由に摂取させた．

肺のガス交換能を検査する為，各群100匹の中から無作為に6匹を選び，ウレタン腹腔注射(0.25g／100g)による浅麻酔を行い，開腹後，腹大動脈から採血し，動脈血酸素分圧を，血液 PH／ガス分析器(Corning 170, Medfield)を使用して測定した．

病理組織学的検索の為には，血液採取後，脱血，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，透過型電子顕微鏡（電顕）および光学顕微鏡（光顕）用試料とした．電顕用試料は，常法に従ってオスミウム酸で後固定し，Epon 包埋，薄切，酢酸鉛・ウラニル重染色を行って観察した．光顕用試料は，上記の他の各葉から採取し，パラフィン包埋切片を作成し，ヘマトキシリン・エオジン染色を行って観察した．

結　　果

1．NO_2，O_3およびSO_2による複合暴露群

光顕的には，気管支系および肺胞領域の変化は明らかではなかった．

電顕的には，肺胞の毛細血管に顕著な変化が認められた．すなわち，毛細血管内腔が著しく拡張し，血管内皮細胞は浮腫性膨化像を呈しており，細胞質の水腫あるいは空胞がみられ，空胞が巨大化して血管内腔に突出しているもの（Fig. 1），内皮細胞が基底膜から剝離しているもの（Fig. 2）がみられた．血管周囲の結合織は，水腫液の貯留によって組織間隙が開大し，その為に肺胞壁がその巾を増して認められた（Fig. 3，4）．開大した肺胞壁間質には，配列の不規則なあるいは離開している膠原線維（Fig. 3），細長い突起をだした線維芽細胞とその近辺に膠原線維の束が認められた（Fig. 4）．このような著しい変化の認められる血管および周囲結合織に隣接した毛細血管では，血管内腔がやや拡張しているが，内皮細胞の変性が明瞭ではないもの，内腔の拡張はみられず，内皮細胞と基底膜の間の密な結合が失われ，空隙様部分を生じているもの，内皮細胞の細胞質が腫張し内腔が狭少となっているもの，あるいは変化のほとんど認められないものなどが観察され（Fig. 5），これら種々の段階の変化が混在していた．

上記の様な著しい変化のみられない部位では，毛細血管内皮細胞と基底膜に間の密な結合が失われ，空隙様部分を生じたり，さらに肺胞壁間質の軽度の浮腫によって部分的な肺胞壁の肥厚が認められる場合もあった（Fig. 6）．

肺胞上皮Ⅰ型細胞およびⅡ型細胞には，変性像や，細胞数の増加などの明瞭な変化は認められず，また，Ⅰ型とⅡ型の中間型細胞の形成も明らかではなかった．

動脈血の酸素ガスの分析を行った結果，対照群との間に有意な差が認められた（Table 1）．心拍数，呼吸数には差が認められなかった．

2．O_3とSO_2による複合暴露群

NO_2を複合した暴露群と同様の変化が観察されたが，変化の程度は弱いものであった．すなわち，血管内皮細胞の浮腫性膨化像と，内皮下及び肺胞壁間質の軽度の浮腫による部分的な肺胞壁の肥厚が主たる変化であり，NO_2を複合した群にみられたような，内腔が著しく拡張した毛細血管や，血管周囲結合織の顕著な水腫を認めることは少なかった（Fig. 7，8）．

動脈血の酸素ガス分析を行った結果，対照群との間に有意な差が認められた（Table 1）．心拍数，呼吸数には差が認められなかった．

考　　察

NO_2,O_3およびSO_2による長期複合暴露実験を行った結果，肺胞領域の毛細血管に顕著な水腫性変化が認められ，この変化は，各個体から無作為に選んだ各試料に各々観察されたことから，肺の全域に生じていることが推測された．O_3とSO_2による複合暴露群においても，NO_2を加えた群と同様の変化が認められたが，著しく変化した毛細血管が見出される頻度は少なく，むしろその前段階の変化と考えられる内皮細胞の浮腫性膨化像が多

Table 1．Changes of arterial blood PO_2 and PCO_2

Exposure group	PO_2	PCO_2
$NO_2+O_3+SO_2$	76.00±5.62*	41.00±2.76
O_3+SO_2	77.33±3.78*	40.00±2.83
control	84.00±6.13	39.50±0.84

*：$P<0.05$

PO_2：arterial blood oxygen tension

PCO_2：arterial blood carbon dioxide tension

く，NO_2を複合した場合より病変の程度は弱いものと考えられた．

低濃度のSO_2の長期暴露肺に及ぼす影響については，ほとんど研究がなされていないが，未梢気管支および肺胞における病理組織学的変化の発生については否定的である[9]．その理由として，SO_2は易溶性ガスであり，上気道壁による摂取率がきわめて高く，下気道に達する量が，NO_2,O_3などに比較して少ない為とされている[10]．しかし一方，SO_2吸入時の時異な変化として，気管支系の変化が軽微な場合でも，肺胞毛細血管系の障害に由来する水腫性病変が形成され[11]，これは，ガスの直接的な作用と[12]，上部気道より吸収されたSO_2が血管を経て肺胞内に再びガスとして排泄される深部気管支暴露機構[13]との相乗作用による[11]とする報告もある．NO_2，O_3およびSO_2と，あるいはO_3とSO_2を複合暴露した場合の変化は，NO_2(0.3ppm)と，O_3(0.1ppm)の複合暴露およびO_3(0.1ppm)の単独暴露の場合には，部分的な肺胞壁間質の水腫が主たる変化であった[6]のに比べ，明らかに強く，より進行した病変であった．毛細血管系の変化の増強が，NO_2,O_3およびSO_2あるいは，O_3とSO_2を複合して暴露したための相加・相乗作用によるものか，あるいはSO_2の特異的な作用によるものなのか明らかではない．低濃度のSO_2の暴露が肺におよぼす影響について，より詳細な研究が必要と考える．

また，本研究において，いずれの複合暴露群においても，動脈血酸素分圧が対照群に比べ有意に低下していた，換気能の変化については，単独暴露の場合では，0.4ppm NO_2の9ヶ月暴露[14]，0.05ppm O_3の18ヶ月暴露[15]，複合暴露の場合では，0.4ppm，NO_2と0.4ppm，O_3の4週間暴露[16]，0.4ppm，NO_2と0.05ppm，O_3の18ヶ月間暴露[15]によって，動脈血の酸素分圧が有意に低下したとの報告がある．換気能の低下は，病理組織学的などのような変化と対応するものから必ずしも明らかではないが，肺の広汎な部分に生じていると推測された毛細血管を中心とするair–blood barrierの水腫性肥厚もその一因と考えられる．

一方，低酸素状態に暴露された場合，alveoar–capillary membraneの水腫性変化の後，細動脈にも変化がおよび，内皮細胞，線維芽細胞，平滑筋細胞などの過形成が起り，内膜の肥厚によって血管内腔が狭窄すること，毛細血管周囲にもエラスチンが増加することが報告されている[17]．本研究ではこのような変化は認められなかったが，低酸素状態が持続すると，さらに進展した病変が生じることも充分考えられる．

以上のことから，きわめて低濃度の大気汚染ガスではあっても，複合暴露されることによって，直接的あるいは間接的な影響がおよび，病変の増強が生じることに留意すべきと考える．また，現在まで行ってきたNO_2を中心とする一連の実験の結果から，低濃度の大気汚染物質の暴露は，病理組織学的には肺の微弱な変化を引き起すものの，臨床的には，明確な異常が認められない状態であり，この異常状態をいかにして知り，また評価するかが，大きな課題と考える．

（本研究は昭和60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., Crone, 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，溝口　勲，河合清之：東京衛研年報，32-1,250,1981

4）寺田伸枝，鈴木孝人，大沢誠喜，福田雅夫，池田真悟，溝口　勲：東京衛研年報，33,337,1982

5）寺田伸枝，池田真悟，福田雅夫，遠藤圭子，大沢誠喜，鈴木孝人，溝口　勲：東京衛研年報，35,265,1984

6）寺田伸枝，池田真悟，福田雅夫，大沢誠喜，鈴木孝人，溝口　勲，林　豊：東京衛研年報，36,263,1985

7）Spencer, H.：Pathology of the Lung, 3rd ed., Pergamar Press；122,1977

8）福田雅夫，狩野文雄，寺田伸枝，溝口　勲：東京衛研年報，30-1,189,1979

9）依田弘史：日胸疾会誌，13,443,1975

10）Frank, N.R., Yoder, R.E., Brain, J.D., Yokoyama, E.：*Arch. Environ. Health*, 8,315,1968

11）林　和宏：日臨電子会誌，4,883,1971

12）Bils. R.F. and Evans,M.J.：Proceeding, 28th Anual Meeting Electron Microscopy Society of America, Haustor, Texas, 1970

13）岡田　宏：広大医誌，17,105,1969

14）鈴木　明，局　博一，嵯峨井勝：国立公害研究所研究報告，40,229,1983

15）鈴木　明，局　博一，河田明治，久保田憲太郎：第26回大気汚染学会講演要旨集，319,1985

16）鈴木　明，局　博一，久保田憲太郎：第24回大気汚

染学会講演要旨集, 822,1983
17) Meyrick,B.and Reid,L. : Lab. Invest. 38,188,1978

Explanation of figures

Fig. 1. Marked vacuolar degeneration of endothelial cells (↑) of rats exposed to a mixture of 0.3 ppm NO_2, 0.08ppm O_3 and 0.1ppm SO_2 for 19 −month. Cp : Capillary vessel, Ed : Endothelial cell, IT : Interstitial tissue

Fig. 2. The endothelium is separated from the basement membrane (↑). BM:Basement membrane

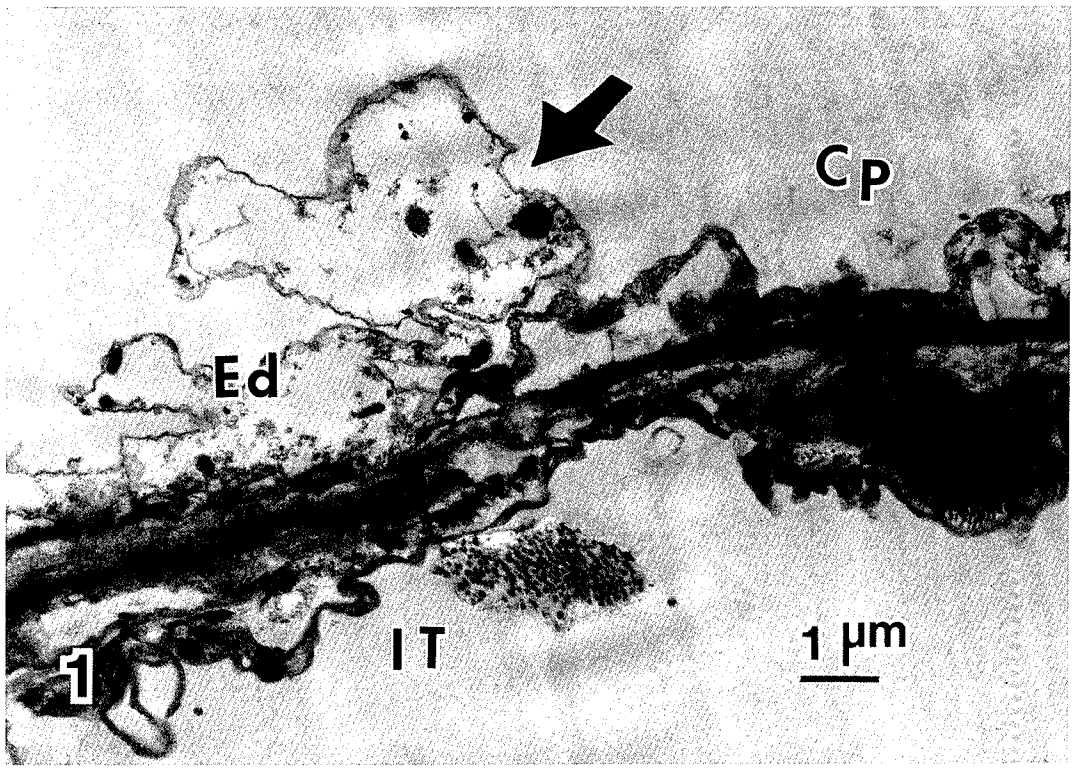
Fig. 3. Vacuolar degeneration of endothelial cells (↑) and edema of alveolar interstitial connective tissues. Cells and collagen bundles of the interstitium were sparsely present in the edematous spaces.
CF:Collagen bundles

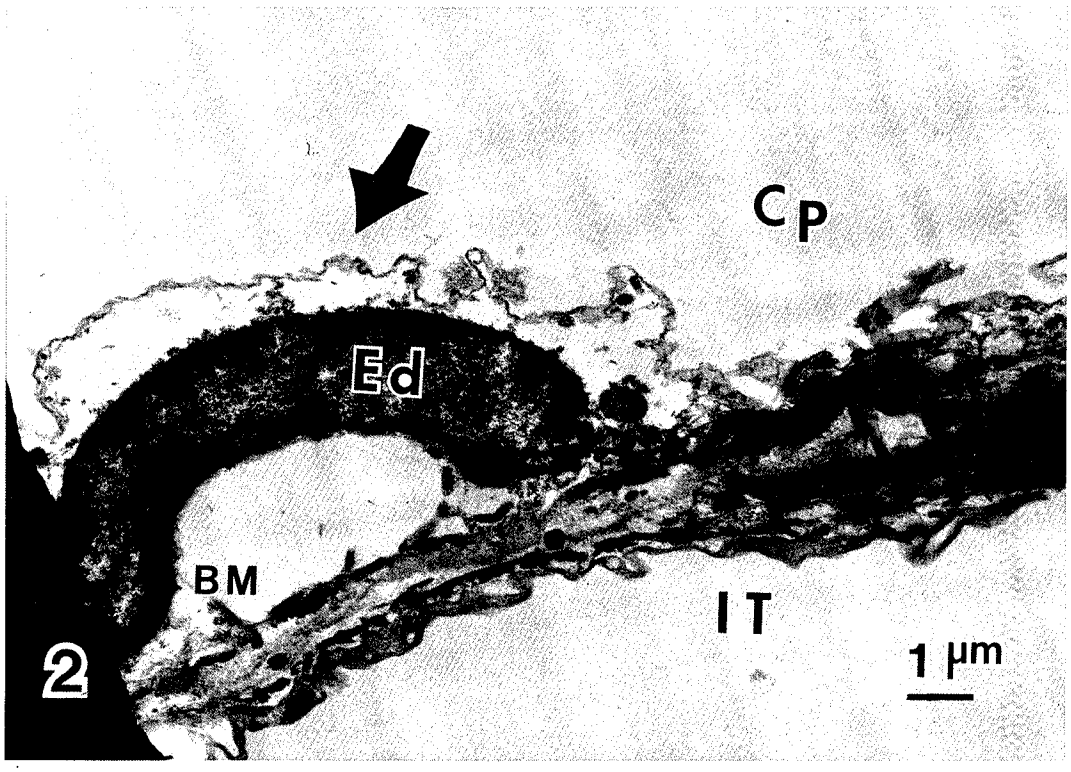
Fig. 4. Thickened alveolar walls with edematous interstitial connective tissue. Fibroblast and collagen bundles were detected.
Fb : Fibroblast, Ep : Epithelial cell, A : Alveolus

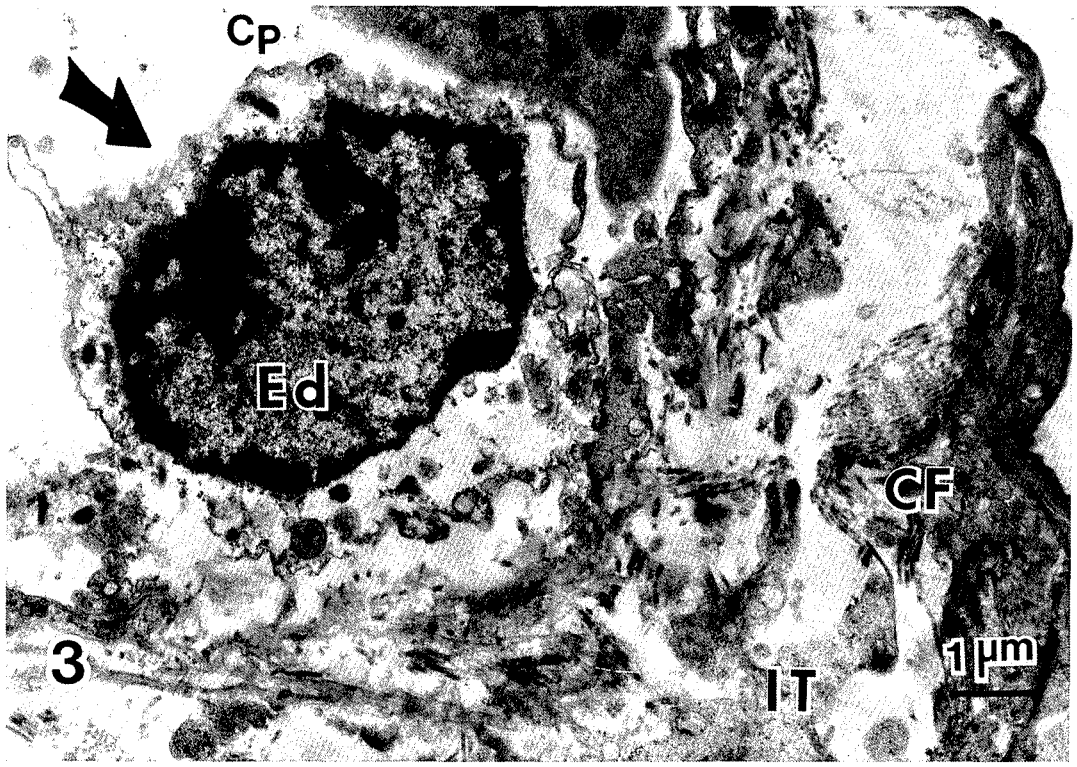
Fig. 5. Capillary vessels in the edematous interstitial connective tissue. Loose contact of capillary endothelial cells with basement membrane were observed partialy. Changes of endothelial cells were not remarkable.

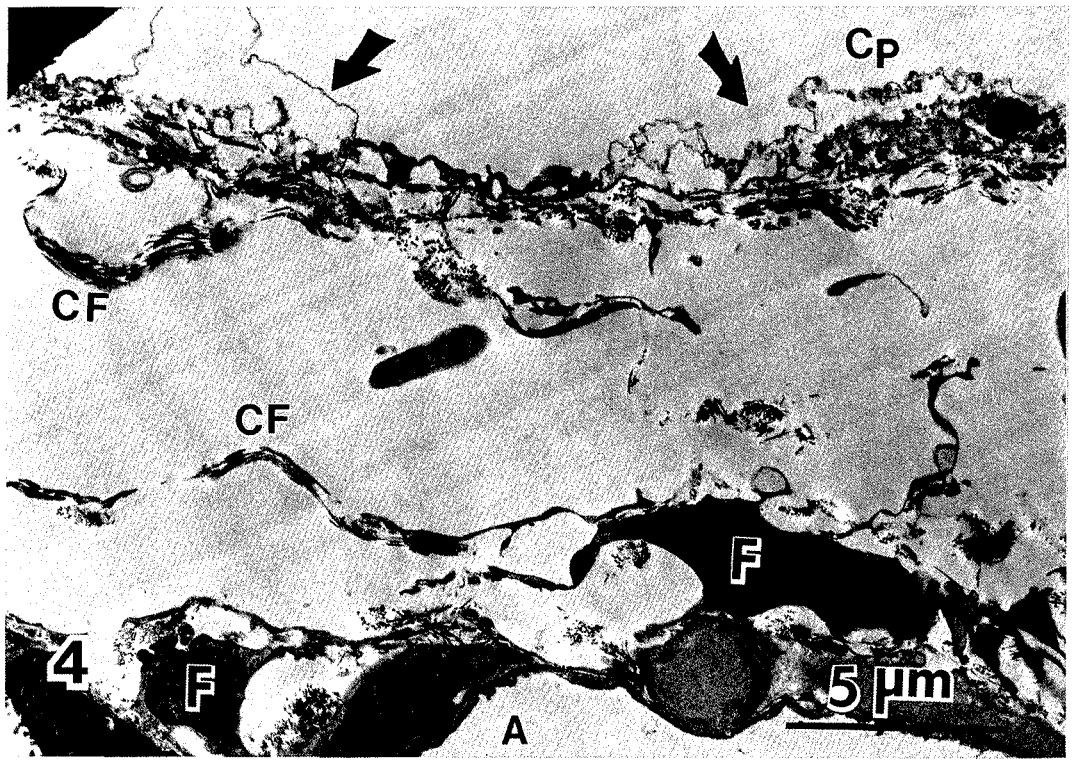
Fig. 6. Loose contact of capillary endothelial cells with basement membrane (↑).

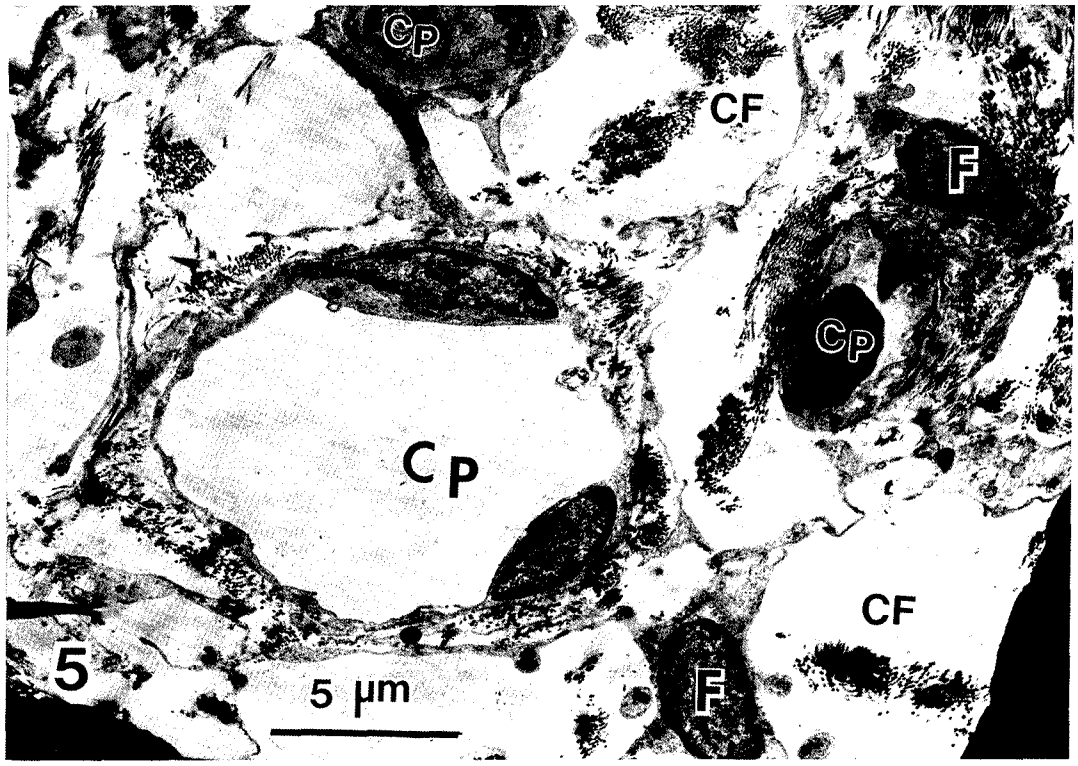
Fig. 7, 8. After 19−month exposure to a mixture of 0.08ppm O_3 and 0.1ppm SO_2. Vacuolar degeneration of endothelial cells (↑). Edema of interstitial connective tissues was not remarkable.

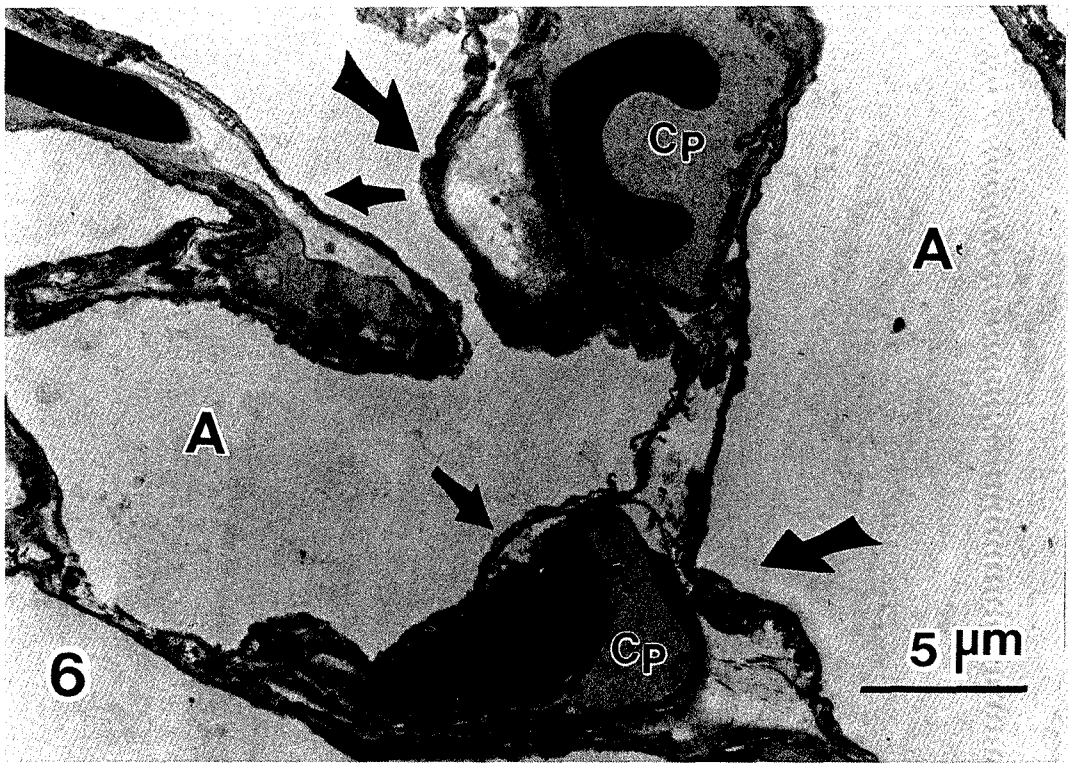

Cp
Ed
IT
1 µm
1

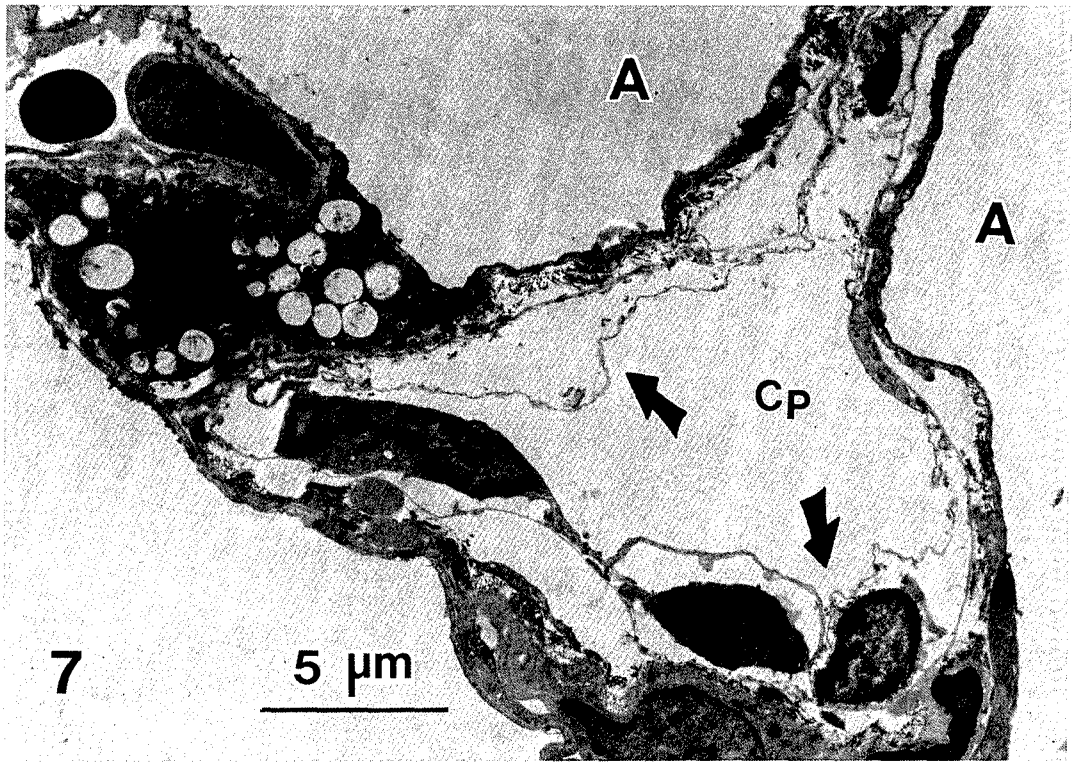

Cp
Ed
BM
IT
1 µm
2

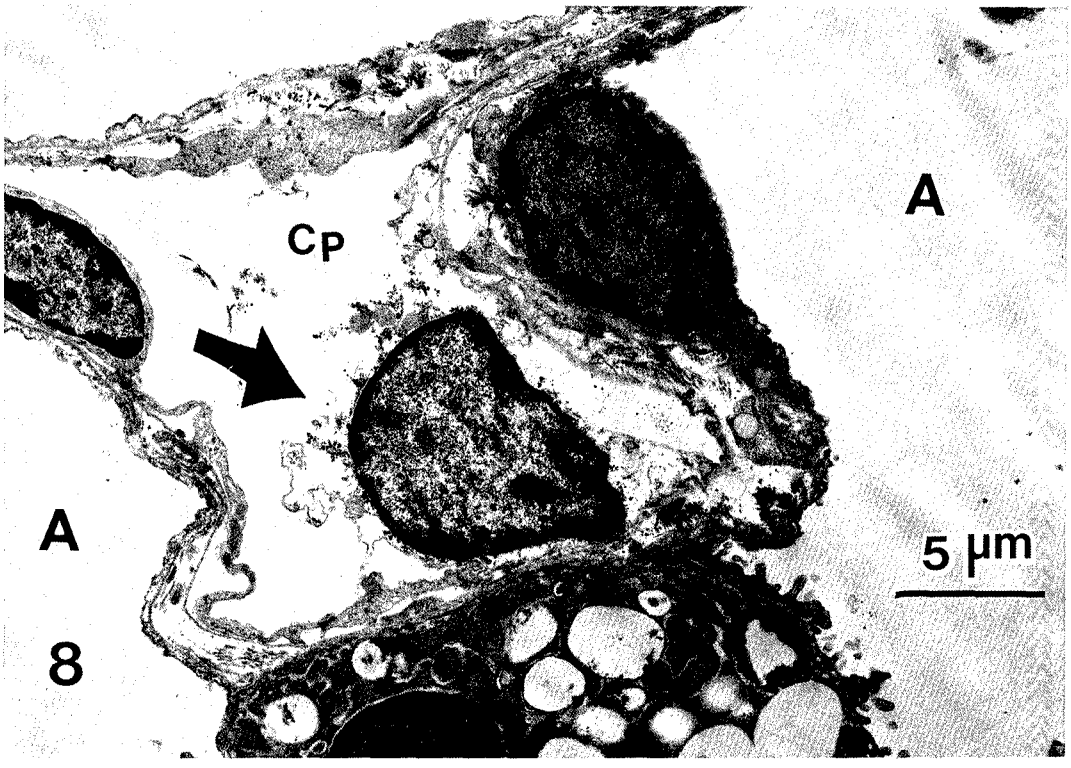

Cp
Ed
CF
3
IT
1 µm


Cp
CF
CF
F
4
F
5 µm
A


Cp
CF
F
Cp
Cp
CF
F
5
5 µm


Cp
A
A
Cp
6
5 µm


A
A
CP
7
5 µm


CP
A
A
5 µm
8

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 301-305, 1986

NO_2暴露したピレン投与マウスの尿および糞便の変異原性

福田雅夫*, 加納堯子*, 溝口勲*

Urinary and Feces Mutagenicity in Pyrene-treated Mice under Exposure to NO_2

MASAO FUKUDA*, TAKAKO KANOH* and ISAO MIZOGUCHI*

Keywords：変異原性 mutagenicity，二酸化窒素 NO_2，ピレン pyrene，マウス mouse，尿 urine，糞便 feces

緒　言

人の肺癌発生には，喫煙が重要な要因であることは広く認められているが，大都市における肺癌の増加傾向から，最近ディーゼル車排出ガス中のニトロピレンや種々の変異原が新たにその要因の一つとして疑われている．特に，ディーゼル車排出ガス中の1,8−ジニトピレンは，現在最も強い変異原性物質に属すると考えられている．

Pitts ら[1]は，ベンゾ(a)ピレンをろ紙に塗布した後，NO_2に暴露させるとニトロベンゾ(a)ピレンが生成することを報告している．松下[2]や常盤ら[3]は，ろ紙に塗布したピレンをNO_2に暴露させると1−ニトロピレンが生成することを報告している．一方生体内に取り込まれたNO_2は，肺胞において硝酸イオンと亜硝酸イオンの形で血液中に入り，体内を循環した後尿中に排泄されることが知られている[4,5]．

これらのことから，我々は無作用量の変異原性物質あるいは非変異原性物質でも大気中の汚染ガスNO_2と共に生体内に取り込まれた時には，生体内で何らかの作用を受けて強い変異原性物質に変換されたりあるいはニトロ化される可能性もあるのではないかと考えた．

今回は，NO_2吸入マウスに変異原性がないと考えられているピレンを投与し，その尿および糞便に変異原性物質が生成されるか否かについて検討した．

方　法

1）実験動物

ICR マウス（日本チャールス・リバー）5週令，雄，体重26〜30g を用いた．各群12匹使用した．

2）暴露方法

次の5群に分けて実験を行った．

1）コントロール群　2）Solvent（1％界面活性剤含有の生理食塩水）投与群　3）20 ppm NO_2 4日間暴露群　4）ピレン（400mg/kg body weight）投与群　5）NO_2暴露ピレン投与群：20 ppm NO_2を3日間吸入させたマウスの腹腔内にピレン（400mg/kg body weight）を投与した後，さらにNO_2を暴露しながら24時間尿（氷冷下）と糞便を採取した．

尿および糞便は各群12匹分をプールし実験まで−20℃で保存した．腹腔投与したピレンは1％界面活性剤（Pluronic F 68）含有の生理食塩水にけん濁した．

3）尿から変異原の抽出[6]と濃縮

プール尿の14m*l* を塩酸にて pH 6.0に調整した後，0.45 μmフィルターでろ過した．ろ過尿を1,000ユニットのβ-グルクロニダーゼを用いて37℃24時間処理した後，塩酸を用いて PH 3.0に調整した．次いで尿中ヒスチジン除去および変異原性物質の分離抽出を目的として，Sep Pack C_{18}カートリッジ（Waters Assoc.）を用い，試料尿をカートリッジに通して吸着させ2m*l* の水で洗いヒスチジンを除去した．次いで5m*l* のメタノールでカートリッジに吸着している物質を溶出させた．溶出液はエバポレータで濃縮し，残渣をジメチルスルホオキサイド（DMSO）で2m*l* に調整して Ames 試験に供した．

4）糞便から変異原の抽出と濃縮

プールした糞便1.5g をメタノール15m*l* に加え超音波抽出し，遠心後その上清液をエバポレータで濃縮した．残留物は DMSO で2m*l* に調整し，これを Ames 試験の試料とした．

5）Ames試験[7]

Salmonella typhimurium TA 98および TA 100株を用いプレインキューベーション法で実験した．なおS 9 mix は，PCB 処理ラット肝臓より精製したS 9分画の4％濃

*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 Reseach Laboratory of Public Health
24−1, Hyakunincho 3 chome, shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

度を使用した.

6）尿中変異原物質（ニトロピレン，ピレン）の分析

方法3）と同様に抽出・濃縮を行ない，残渣をDMSO 200 μl およびメタノール500 μl で溶解して分析用試料とした．高速液体クロマトグラフィーで標準物質の1－ニトロピレン（RK Chemical Co.），ピレン（Sigma Chemcal Co.）の下記条件下における各々の保持時間を定めた後，分析試料の1－ニトロピレン，ピレンに相当する保持時間分画を分別した.（図1） 分別した試料を濃縮し，そのマススペクトルを標準物質と比較して分析した.

高速液体クロマトグラフィーの分析条件

装置：島津高速液体クロマトグラフィー LC－6 A, SPD－6 A

カラム：Shim Pack CLC－ODS 6.0mm ϕ ×15cm

カラム温度：45℃ 移動層：メタノール，水（8：2）

流速：1.5ml/min 波長：254 nm

ガスクロマトグラフィー質量分析の分析条件

装置：島津 GCMC－QP 1,000

カラム：OV－101（FQ カラム）

カラム温度：1-ニトロピレン200℃，ピレン160℃

注入口温度：270℃ セパレータ温度：280℃

イオン源温度：250℃ イオン化電圧：70 eV

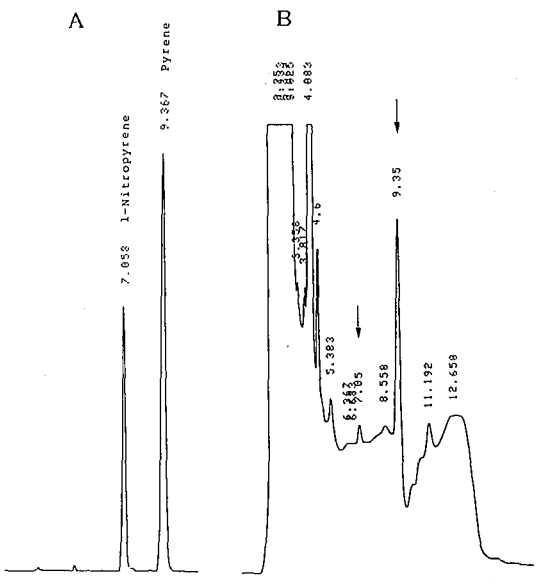


図1．高速液体クロマトグラム
(A) 標準1－ニトロピレンとピレン
(B) NO_2暴露ピレン投与マウス尿

結　果

1）変異原性

1）尿について

Ames試験による尿の変異原性を表1に示した．コントロール群とSolvent投与群が示したTA 98,TA 100株の復帰変異コロニー数は，両試料間で差がみられず，溶媒対照のDMSOが示した数値とほぼ同等であった．20 ppm NO_2 4日間暴露群およびピレン投与群の復帰変異コロニー数は，コントロール群と比較してTA100株でわずかな増加傾向がみられたもののTA 98株では差が認められなかった．一方，NO_2暴露ピレン投与群は，TA 98,TA 100両株でS 9 mixの添加の有無にかかわらず復帰変異コロニー数の増加が認められた．特に，TA 98株のS 9 mix添加の場合はコントロール群の復帰変異コロニー数51に比べて約28倍の1402と顕著な増加を示した．なお，この試料の添加量は他の群の添加量の$\frac{1}{4}$量すなわち25 μl/plateで最も多い復帰変異コロニー数を示した.（図2）

2）糞便について

表2に示した様に，コントロール群とSolvent投与群の糞便が示した変異原性は，尿の結果と同様に両試料間で差がみられなかった．NO_2暴露群の糞便は，コントロール群と比較してTA 98,TA 100両株のS 9 mix非添加で若干の増加傾向がみられたものの，S 9 mix添加の場合では差がみられなかった．ピレン投与群では，TA 98株のS 9 mix非添加のみ若干の増加傾向がみられた．NO_2暴露ピレン投与群は，尿の結果と同様TA 98,TA 100両株でS 9 mixの添加の有無にかかわらず顕著な復帰変異コロニー数の増加が認められた．特に糞便の場合は，TA 98株S 9 mix非添加において顕著な増加が認められた.

2）尿中変異原性物質（ニトロピレン，ピレン）の分析

標準1-ニトロピレンのマススペクトル（図3 A）にみられるフラグメントイオンは，247・217・201・189であった．Ames試験で変異原性を示したNO_2暴露ピレン投与群（図1 B）の1-ニトロピレン相当分画からえたマスクロマトグラム（図4 A）をみると，標準1-ニトロピレンが示したすべてのフラグメントイオンが同一保持時間で認められた．なおこの尿には，保持時間がわずかに異なるフラグメントイオン218の物質が比較的多量に含まれていた，（図4 ピークC）この物質はヒドロキシピレンではないかと推定している．次にピレン相当分画からえたマスクロマトグラム（図4 B）のフラグメントイオンは202を示し，標準ピレンのマススペクトル(図

表1．実験各群における尿中変異原性

Treatment	Urine	TA 98		TA 100	
	μl/Plate	−S9 mix	+S9 mix	−S9 mix	+S9 mix
DMSO	100	34	42	107	116
Untreated mice	100	38	51	120	120
Solvent-treated mice	100	36	51	129	118
NO_2 exposed mice	100	47	56	178	152
Pyrene-treated mice	100	45	54	169	154
NO_2 exposed pyrene-treated mice	25	163	1,402	209	596

The values represent the mean number of revertants of 2 plates.

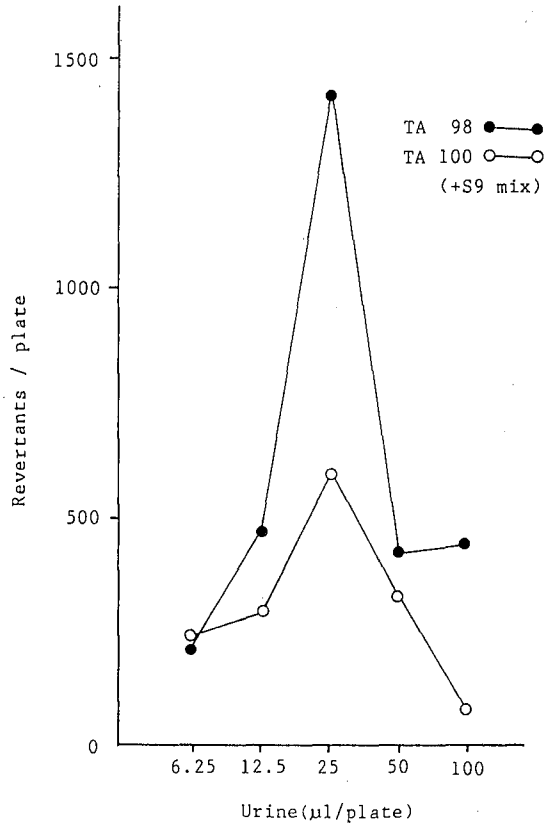


図2．NO_2暴露ピレン投与マウス尿の添加量と変異原性との関係

3 B）のそれと一致した．このことから，この試料尿にニトロピレン並びにピレンの存在が認められた．

考　　察

NO_2暴露群，ピレン投与群の糞尿中には変異原性はみられなかったが，NO_2暴露ピレン投与群の糞尿中には明らかな変異原性が認められた．特にTA 98株S 9 mix非添加でも強い変異原性が認められたので，直接変異原物質として知られているニトロアレーンの生体内生成の可能性が示唆された．そしてこの群の尿分析から微量のニトロピレンが検出された．しかしニトロピレンの含有量が微量であることから，この試料尿が示した復帰変異コロニー数への寄与は少ないものと思われる．また試料尿にはニトロピレン以外の変異原性物質及びこれらの代謝産物が存在していると考えられる．ニトロピレンの生体内代謝の研究で，Ball ら[8]はラット腹腔内にニトロピレンを投与した場合，その初期尿には1-ニトロ3/8-ヒドロキシピレンが多く，後期になると1-アセチルアミノ-6/8-ヒドロキシピレンが多く排泄されたと報告している．大西ら[9]はラットにニトロピレンを経口投与すると，尿から1-アセチルアミノ6/8-ヒドロキシピレンを，糞便からはこれに加えて素通りの1-ニトロピレン，1-アミノピレン，1-アセチルアミノ3-ヒドロキシピレンを検出したと報告している．

日常生活を通じて生物は大気から，また食品からニトロピレンを直接体内に取り入れる．さらに環境中にはピレンやNO_2等も共存することから，生物は摂取したニトロピレンは勿論，生体内で生成される変異原性物質およびその代謝産物によってより大きな影響を受けるものと考えられる．今後ピレンの投与量によるニトロピレン生成の程度，ニトロピレン生成経路および代謝産物の同定

表2．実験各群における糞便中の変異原性

Treatment	Feces	TA 98		TA 100	
	μl/Plate	−S9 mix	+S9 mix	−S9 mix	+S9 mix
DMSO	100	26	28	134	149
Untreated mice	100	28	47	116	131
Solvent-treated mice	100	26	46	112	135
NO_2 exposed mice	100	45	54	144	138
Pyrene-treated mice	100	54	55	102	134
NO_2 exposed pyrene-treated mice	100	987	1,065	304	309

The values represent the mean number of revertans of 2 plates.

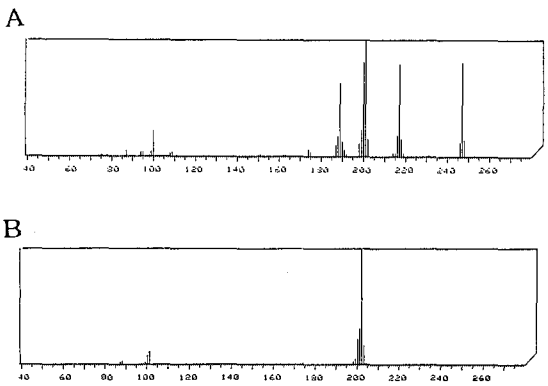


図3．標準物質のマススペクトル
(A) 1−ニトロピレン (B) ピレン

等の検討を行なう予定である．

要　約

大気中に共存するピレン，NO_2が生体内に侵入した場合，生体内で変異原性物質が生成されるか否かについて生体試料の糞尿を用いて実験を行った．

1）20 ppmNO_2 4日間暴露ピレン投与群の糞尿試料が示した *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100株の復帰変異コロニー数は，S 9 mix の有無にかかわらずコントロール群の糞尿のそれと比べて顕著な増加を示した．この結果からこの糞尿中に変異原性物質が生成されたことを推測した．

2）高速液体クロマトグラフィーを用いて，NO_2暴露ピレン投与マウスの尿をニトロピレン及びピレン相当の分画に分別し，各分画を GC−MC で分析した．その結果この試料尿にはニトロピレンおよびピレンの存在が認

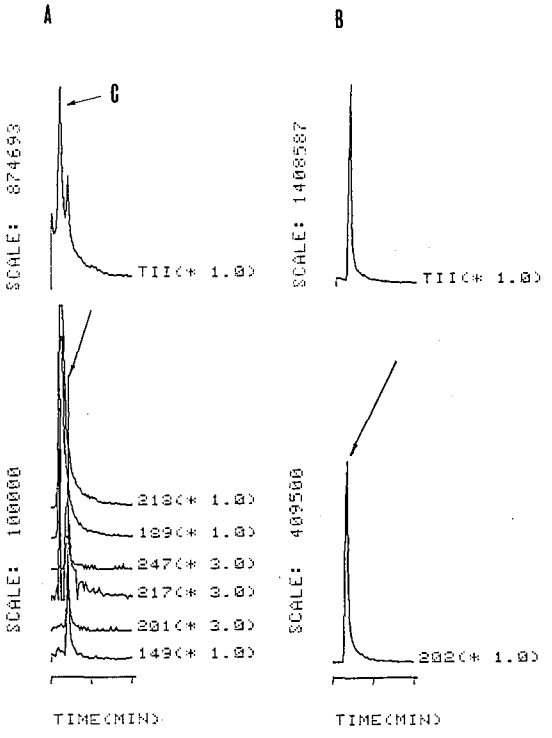


図4．NO_2暴露ピレン投与マウス尿のマスクロマトグラム
(A) 1−ニトロピレン分画 (B) ピレン分画

められた.

(本研究は昭和60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,その概要は大気汚染学会第26回大会1985年11月で発表した.)

文　献

1) Pitts, J.N. Jr., V an Cauwenberghe, K.A., Grosjean, D., Schmid, J.P., Fitz, D.R., Belser, W.L. Jr., Knudson, G.B. and Hynds, P.M.：*Science*, 202,515,1978

2) 松下秀鶴，久松由東，後藤純雄：昭和56年度環境保全研究成果集，30−1

3) Tokiwa, H., Nakagawa, R., Morita, K. and Ohnishi, Y.：*Mutation Res.*, 85,195,1981

4) Shvorcova, S. and Kant, V.：*Cesk. Hyg.*, 16,71,1971

5) 織田　肇，永沢節子，局　博一，鈴木　明：国立公害研究所研究報告，第31号，45,1981

6) Becher, G. and Bjφreseth, A.：*Cancer Lett.*, 17,301, 1983

7) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.：*Mutation Res.*, 31,347,1975

8) Ball, L.M., Kohan, M.J., Inmon, J.P., Ciaxton,L.D. and Lewtas, J.：*Carcinogenesis*, 5,1557,1984

9) 大西克成，木内武美：代謝，22,725,1985

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 306-312, 1986

回帰モデルを用いた亜急性症状の量・反応関係に関する考察

牧野国義*, 溝口 勲*

A Study on Dose-response Relation for Subacute Symptoms by Using Regression Models

KUNIYOSHI MAKINO*, and ISAO MIZOGUCHI*

Statistical methods using some models were examined in order to study the dose-response relation of 7 subacute symptoms and 10 factors for air pollution or weather conditions for 47 days in the summer of 1977. In the present study, regression models or multiple regression models usually utilized, logistic regression models and AR models on the residual item of the regression were employed for comparison of estimations.

According to the results obtained from the regression models conducted usually, many symptoms correlated significantly with weather factors. Although multiple regression models were closely associated with various factors at significance levels of less than 0.1 percent, the confidence level of these models decreased because of high correlation between those factors. In addition, it seemed that the logistic regression models worked more effectively at high average incidences of the symptoms or large sample. On the other hand, the AR models for sore throat, cough, sputum and hoarseness caused less relative errors and more significant correlation of the observed values and the estimated values from the models than the other models. Furthermore, the serial correlations and the estimation by AR models revealed that respiratory incidences of cough, sputum, sore throat and hoarseness were greatly affected not only by the factors on one day but also by the factors on the previous day. These results indicated that the dose-response relation should be examined by using statistical methods such as the AR models.

Keywords: Dose-response relation, Regression model, Logistic regression, AR model, Subacute symptom

緒　言

大気汚染などによる急性または亜急性症状発現の定量的検討のためにいくつかの手法が応用されており，従来からの最も一般的手法は寄与因子を説明変数とした線形回帰分析である[1~4]．寄与因子が複数の場合にはこれを一次結合の形で表わし，複合指標とした報告もある[5,6]．しかし，実際の量・反応関係は必ずしも線形回帰モデルでは充分表現し得ず，近似手法として hockey-stick 法[7]，turning point 法[8]などが利用されたが，これらの手法は経験的で，論理的整合性に欠ける難点がある．また，高次の多項式回帰モデルは，良好的な近似を得ることはできるが，普遍性に乏しく，結果の解釈が困難となる．一方，近年には整合性，近似性を充たす手法が検討され，あるいは疫学分野に応用されて，probit 回帰モデル[9]，logistic 回帰モデル[10]，time lag モデル[11]，横断的時系列モデル[12]，相対危険回帰モデル[13]，誤差の時間依存性を考慮した AR（自己回帰）モデル[14]などが利用されるようになった．これらのモデルは必ずしも汎用的でないので，ここでは自覚症状有訴率と大気汚染物質，気象要素との関係を調べるために有効と考えられる線形モデル，logistic 回帰モデル，誤差項に AR モデルを適用した回帰モデルについて検討した．

方　法

1．調査データ

利用したデータは，昭和52年度に調査されたN高校男子139人の夏季（6，7月）47日間の自覚症状有訴率と

*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

同校に設置された大気汚染物質測定局で観測した大気汚染物質および気象条件である．対象自覚症状は7種の急性または亜急性症状（眼の痛み，のどの痛み，頭痛，だるい，咳，痰，声がれ）で，有訴率が2％以下の症状，原因が明らかに大気汚染や気象条件でないと考えられる症状を除いた．一方，寄与因子として，オキシダント（Ox），亜硫酸ガス（SO_2），二酸化窒素（NO_2），一酸化炭素（CO），炭化水素（HC），浮遊粒子状物質（SPM）の6大気汚染物質および気温（Temp），湿度（Hum），風速（WV），紫外線量（UV）の4気象条件を用いた．これらの基礎統計量をTable 1に示した．

2．解析方法

まず，量・反応関係を検討するために多く利用される線形回帰モデルを次式により仮定する．

$$y = a_0 + a_1 x + \varepsilon_a, \quad \varepsilon_a \sim N(0, \ \sigma_a^2) \tag{1}$$

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^{k} b_i x_i + \varepsilon_b, \quad \varepsilon_b \sim N(0, \ \sigma_b^2) \tag{2}$$

ここで，a，bは回帰係数，εは残差で，右式は残差が正規分布に従うことを意味し，(2)式のkは，各症状が有意の相関を示した寄与因子の数がk_0のとき，$2 \leqq k \leqq k_0$で，kを変化させてstepwise重相関分析（相関の高い寄与因子順に説明変数に加えていく）を行う．説明変数を増加させれば残差は減少するが，効果の低い変数を加えることは意味がないので，自由度修正済み重相関分析で説明変数増加の寄与を検討する．この自由度修正済み重相関係数R^*は，重相関係数Rと標本数n，説明変数の数mにより次式で表わされる．

$$R^{*2} = 1 - \frac{n-1}{n-m-1}(1 - R^2) \tag{3}$$

次に，有訴率はdoseの増加によりS字型の成長曲線を描く場合が考えられる．このモデルは次式で表わすことができる．

$$y^{-1} = 1 + \exp(-\mathbf{X}) \tag{4-1}$$

ここで，$\mathbf{X}$をlogitと呼び，これが説明変数の1次式または1次結合で次式のように表わせるとき，

$$\mathbf{X} = c_0 + \sum_{i=1}^{m} c_i x_i \tag{4-2}$$

このモデルをlogistic回帰モデル（mが複数のとき多重logistic回帰モデル）と呼ぶ．（4－1），（4－2）式は次のように書き改めることができる．

$$\log(y / (1-y)) = c_0 + \sum_{i=1}^{m} c_i x_i \tag{4-3}$$

説明変数の数mは最尤法を用いて決定されるが，ここでは繁雑さを避けるためm＝1とする．

さらに，(1)式において残差ε_aが時間依存性を有する場合，つまり，誤差項の系列相関が有意で，(1)式の右式の仮定が成立しない場合に，次式のモデルを仮定する．

$$y = a_0 + a_1 x + \varepsilon_t \tag{5-1}$$

$$\varepsilon_t = d_0 + \sum_{j=1}^{m} d_j \varepsilon_{t-j} + \varepsilon_d, \quad \varepsilon_d \sim N(0, \sigma_d^2) \tag{5-2}$$

ここで，mの決定のために通常AIC（Akaike Information Criterion）が利用され，AICが最小となるモデルが最適と考えられている．この場合m日前までの情報が必要となるが，調査データは47日分のみで，m日分は欠測となる．よって，ここではmを最小に留め（m＝1），残差ε_tは前日の残差ε_{t-1}により説明される場合に限定する．

以上で得られた回帰モデルの精度については各モデルにおける推定値と観測値（実際の有訴率）との相関係数および推定値の相対誤差（平均2乗誤差／平均値）により比較する．

結果および考察

Table 1のように，7自覚症状の平均有訴率は，2.02～5.48％と比較的低率で，平均有訴者数も2.8～7.6と少数であるため偶然変動の影響が考えられ，必ずしも理想的な調査データではなかった．

まず，線形回帰モデルを仮定したときの自覚症状と寄与因子との相関分析結果をTable 2に示した．大気汚染物質の中では亜硫酸ガスと一酸化炭素がのどの痛み，咳，痰と有意の相関を示したが，それよりも気象要素の湿度が多くの症状と比較的高い相関を示したことがこの結果の特徴である．大気汚染物質と一般に低相関を示した原因は，調査期間が夏季であったにもかかわらずオキシダント濃度などは余り上昇せず，低汚染レベルであったことが一因と考えられた．(1)式の回帰モデルによる呼吸器症状と非呼吸器症状に分けた相対誤差，平均2乗誤差はFig. 1の通りであった．すべての相対誤差が50％を越え，精度からみて良好と云えない．また，10寄与因子間では，湿度がほとんどの症状について最小相対誤差を示したが，その変動は相関の高さの変動と必ずしも一致しなかった．次に，有意の相関を示した寄与因子が2以上ある症状について(2)式のモデルを仮定したときのstepwise重相関分析結果をTable 3に示した．眼の痛み，のどの痛み，咳，痰の4症状について全て危険率0.1％以下の水準で有意であった．これに自由度修正済重相関係数を計算したところ，この重相関係数が最大となったときの説明変数の数は，それぞれ2，3，3，4であった．これはFig.

Table 1. Summary of Symptoms, Air Pollutants and Weather Factors

Symptom (%)	Mean±SD	Air Pollutant or Weather Factor	Mean±SD
Eye Irritation	2.95±2.05	Ox (pphm)	7.00±2.77
Sore Throat	4.76±2.76	SO_2 (pphm)	1.56±0.69
Headache	4.12±2.08	NO_2 (pphm)	5.35±1.90
Lethargy	3.96±2.14	CO (ppm)	1.80±0.61
Cough	4.98±3.24	HC (ppm)	1.35±1.04
Sputum	5.48±3.42	SPM ($mg/100m^3$)	6.73±2.38
Hoarseness	2.02±1.09	Temp (℃)	23.0 ±2.77
		Hum (%)	61.4 ±16.0
		WV (m/sec)	3.96±1.19
		UV (langley)	3.71±1.57

Table 2. Correlation between Symptoms and Air Pollutants or Weather Factors

	Air Polluthant or Weather Factor									
Symptom	Ox	SO_2	NO_2	CO	HC	SPM	Temp	Hum	WV	UV
Eye Irrit.	.196	.255	−.062	.044	−.094	−.317*	.117	−.581***	.441**	.343*
Sore Throat	.240	.410**	.347	.430**	−.095	.097	.066	−.421**	.186	.361*
Headache	.280	.150	.115	.206	−.194	−.081	.155	−.279	.057	.257
Lethargy	.129	.255	.114	−.034	.097	.033	.178	−.231	.155	.164
Cough	.397**	.522***	.239	.416**	−.164	.073	.005	−.621***	.400**	.466**
Sputum	.212	.420**	.323*	.446**	−.248	.015	−.047	−.497***	.302*	.374**
Hoarseness	.219	.204	.143	.149	−.053	.032	−.054	−.305*	.180	.249

*：$P<0.05$, **：$P<0.01$, ***：$P<0.001$

2に示した(2)式の回帰モデルにおける相対誤差，2乗平均誤差の減少勾配からも推察することができる．このモデルで，推定値と観測値との相関係数（重相関係数と一致），相対誤差とも(1)式のモデルに比べかなり良好な精度が得られた（上記説明変数時の相関はそれぞれ，.639, .567, .701, .658, また，相対誤差はそれぞれ，41.9, 39.4, 38.1, 38.0）．ただし，多説明変数の回帰モデルは調査データ固有のモデルであることがあり，良好な予測値を得る普遍性は保証されない．ここでは標本数や期間の限定でその検討が行えなかった．

さらに，（4－1）～（4－3）式の logistic 回帰モデルを仮定した場合に，（4－3）式の有訴率項（左辺）と寄与因子との相関分析を行い，結果を Table 4 に示した．この結果は(1)式の回帰モデルを仮定した結果（Table 2）とほぼ同程度であった．このモデルは，寄与因子に対して有訴率がS字型の成長曲線を描く場合には効果的であるが，このデータ（Table 1）のような低有訴率，小標本数では偶然変動が影響してS字型が得られず，結果として線形回帰モデルと差が生じないことが考えられた．よって，以下の解析ではこのモデルについては省略した．

以上で利用した回帰モデルでは誤差（残差）の特徴について正規分布に従うことを仮定し，いわゆるホワイトノイズであるとの前提に立った．しかし，もし誤差の系列相関が有意で時間依存性を有することが示された場合にはこの前提は成立しない．そこで，(1)式の線形回帰モデルについて誤差項の1階の系列相関分析を行い，結果を Table 5 に示した．眼の痛み，頭痛，だるいの非呼吸

Table 3. Multiple Correlation of Each Symptom on Explanatory Variables which correlated significantly with The Symptom

Symptom	Explan. Var.	d. f.	Mult. C. C.
Eye Irrit.	Hum, SPM	2,44	.639***
	Hum, SPM, UV	3,43	.640***
	Hum, SPM, UV, SO_2	4,42	.640***
Sore Throat	Hum, SO_2	2,44	.477**
	Hum, SO_2, CO	3,43	.567**
	Hum, SO_2, CO, UV	4,42	.566**
	Hum, SO_2, CO, UV, Ox	5,41	.576**
Cough	SO_2, Hum	2,44	.644***
	SO_2, Hum, CO	3,43	.701***
	SO_2, Hum, CO Ox	4,42	.712***
	SO_2, Hum, CO Ox, NO_2	5,41	.724***
	SO_2, Hum, UV Ox, NO_2, CO	6,40	.725***
Sputum	CO, Hum	2,44	.621***
	CO, Hum, SO_2	3,43	.623***
	CO, Hum, SO_2, Ox	4,42	.658***
	CO, Hum, SO_2, Ox, NO_2	5,41	.658***
	CO, Hum, SO_2, Ox, NO_2 UV	6,40	.659***

*：P<0.05, **：P<0.01, ***P<0.001

器3症状についてはどの寄与因子とも有意の相関を示さなかった．特に，後2症状については有訴率自身も有意の相関がなく（Table 2），この2症状の発現に，ここで用いた寄与因子は寄与しないことが推察された．一方，呼吸器4症状の系列相関は多くの場合に有意で，特に咳について，他症状よりも高い相関が顕著に認められた．呼吸器症状と非呼吸器症状とのこのような相違は他のモデルでは得られなかった点である．（5－1），（5－2）

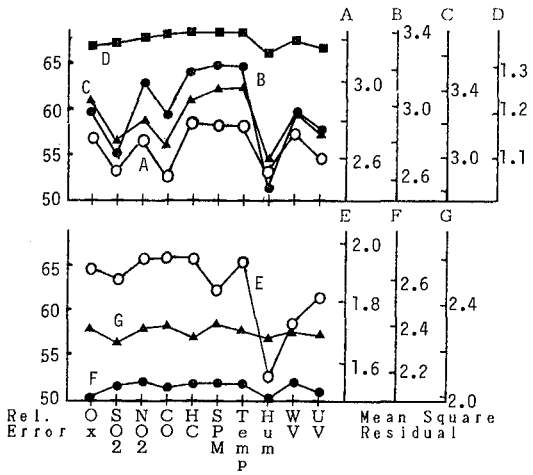
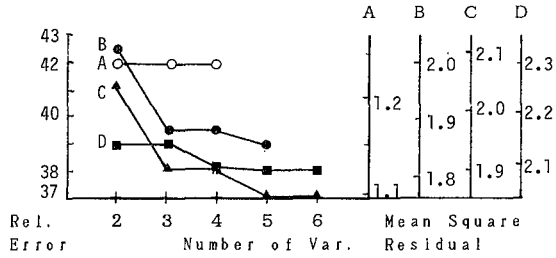


Fig. 1. Relative Errors and Mean Square Residuals by Linear Regression

Unit of Mean Square Residual is Percent of Incidence and Relative Error is shown by Percentage of The MSR to Average Incidence Symptom A～D : Respiratory, E～G : Nonrespiratory, A : Sore Throat, B : Cough, C : Sputum, D : Hoarseness, E : Eye Irritation, F : Headache, G : Lethargy



	Symptom	Significant Explan. Var. (Stepwise)
A	Eye Irr.	Hum SPM UV SO2
B	Sore Throat	Hum SO2 CO UV Ox
C	Cough	SO2 Hum CO Ox NO2 UV
D	Sputum	CO Hum SO2 Ox NO2 UV

Fig. 2. Relative Errors and Mean Square Residuals by Multiple Regression

式による推定値と観測値（有訴率）との相関はTable 6のようである．4症状はどの寄与因子とも高い相関を示したが，これらの因子間にも高い相関関係（例えば，オキシダントと湿度は－0.658，二酸化窒素と一酸化炭素

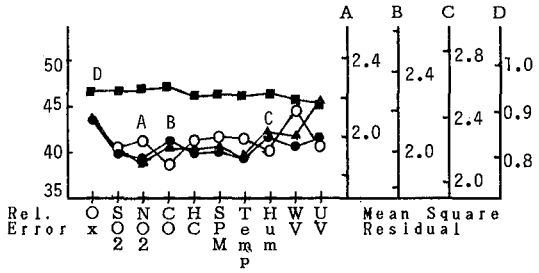


Fig. 3. Relative Errors and Mean Square Residuals by Regression Adjusted according to AR Models

[A : Sore Throat, B : Cough, C : Sputum, D : Hoaseness]

は0.649など）が認められ，この因子の非独立性が影響していると考えられる．上記4症状についての推定値の相対誤差，平均2乗誤差をFig. 3に示した．どの症状の相対誤差も30%以上ではあるが，呼吸器4症状については相関係数，相対誤差ともこのモデルの中で最良の結果が得られた．その症状と寄与因子との組み合わせは，のどの痛みが一酸化炭素，咳が気温，痰が浮遊粒子状物質，声がれが風速であった．（5－1），（5－2）式のモデルによるこの組み合わせの推定値を観測値とともにFig. 4に示した．推定値の変動は観測値以上だが，一応の近似が得られた．

以上の結果，症状別に検討すると，急性症状の眼の痛みは光化学スモッグの代表的被害症状であるが，調査期間中のオキシダント濃度が全体に低かったために，オキ

Table 4. Correlation between Observed Incidences and Estimated Values by Logistic Regression

	Air Polluthant or Weather Factor									
Symptom	Ox	SO_2	NO_2	CO	HC	SPM	Temp	Hum	WV	UV
Eye Irrit.	.216	.261	−.055	.056	−.081	−.337*	.114	−.572***	.425**	.330*
Sore Throat	.252	.428**	.237	.431**	−.120	.092	.065	−.428**	.194	.359*
Headache	.283	.159	.108	.203	−.188	−.092	.157	−.294*	.061	.259
Lethargy	.138	.252	.098	−.048	.094	.016	.187	−.240	.154	.155
Cough	.395**	.519***	.230	.407**	−.177	.062	.021	−.626***	.395**	.427**
Sputum	.230	.422**	.320*	.436**	−.254	.002	−.034	−.508***	.311*	.378**
Hoarseness	.215	.212	.151	.141	−.066	.031	−.052	−.303*	.185	.241

*：$p<0.05$, **：$p<0.01$, ***：$p<0.001$

Table 5. Serial Correlation between Residuals in One Day and in The Following Day by Linear Regression

	Air Polluthant or Weather Factor									
Symptom	Ox	SO_2	NO_2	CO	HC	SPM	Temp	Hum	WV	UV
Eye Irrit.	.061	.115	.161	.130	.141	.220	.136	−.129	.000	.018
Sore Throat	.315*	.310*	.375**	.316*	.453**	.434**	.430**	.201	.284	.295*
Headache	.075	.153	.163	.152	.191	.199	.200	.102	.185	.111
Lethargy	−.054	−.008	−.009	−.006	−.048	−.005	−.035	−.094	−.063	−.068
Cough	.519***	.470***	.634***	.520***	.620***	.668***	.680***	.314*	.498***	.463**
Sputum	.458**	.380**	.527***	.381**	.526***	.571***	.571***	.265	.495***	.355*
Hoarseness	.294*	.298*	.278	.303*	.352*	.343*	.358*	.204	.297*	.257

*：$p<0.05$, **：$p<0.01$, ***：$p<0.001$

Table 6. Correlation between Observed Incidences and Estimated Values by Regression applied AR Model on The Residual

	Air Polluthant or Weather Factor									
Symptom	Ox	SO_2	NO_2	CO	HC	SPM	Temp	Hum	WV	UV
Sore Throat	.704***	.724***	.719***	.745***	.721***	.737***	.734***	.704***	.686***	.707***
Cough	.768***	.780***	.802***	.764***	.803***	.807***	.811***	.765***	.747***	.760***
Sputum	.740***	.735***	.774***	.742***	.771***	.777***	.776***	.734***	.761***	.761***
Hoarseness	.691***	.694***	.675***	.660***	.703***	.702***	.705***	.695***	.708***	.704***

*：$p<0.05$, **：$p<0.01$, ***：$p<0.001$

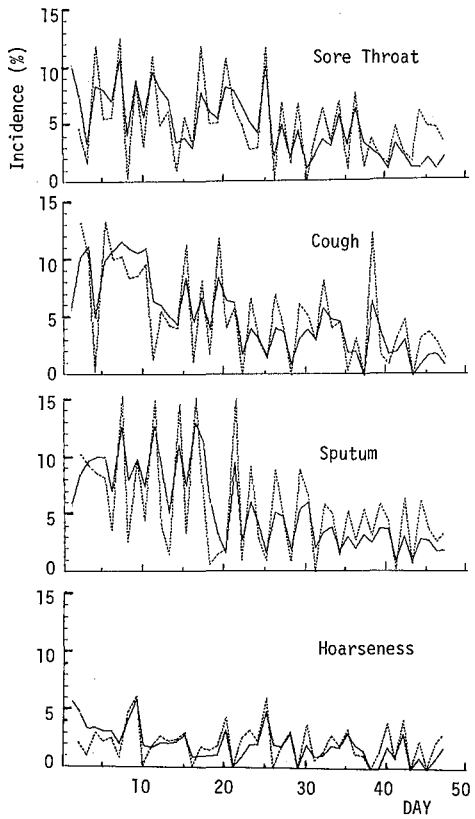


Fig. 4. Observed Incidences (Solid line) and Estimated Values by Using AR Models (Dotted Line)

シダントの寄与は余り認められず，むしろその日の湿度と浮遊粒子状物質が寄与すると推察された．頭痛やだるいはこの研究で用いた大気汚染物質や気象要素には依存しない（少なくとも期間中の濃度レベル，気象条件下では）と思われる．これら非呼吸器3症状と異なり，呼吸器4症状はその日の dose の影響が翌日にも及ぶことを示唆した．特に，慢性症状として取り扱われることのある咳や痰は，誤差項に AR モデルを適用した回帰モデルで推定したとき，観測値との間に高い有意の相関が認められた．このように，亜急性や慢性の（特に呼吸器）症状については，寄与因子との線形回帰モデルだけでなく，症状の分布や誤差の性質に応じて，AR モデルや logistic 回帰モデルをも検討する必要がある．なお，重回帰モデルを適用した4症状でも推定値と観測値との間にかなり高い相関が認められた．しかし，前述したように，説明変数の寄与因子間に密接な関連があり，ある因子は関連した因子に影響されることになるので，その因子を説明変数の一つとした重回帰モデルの安定性は低下する（この性質を多重共線性と呼ぶ）．したがって，ここで得られた重回帰モデルが普遍的であるためにはさらに検討が必要となる．また，この研究では各手法の比較に主眼を置いたので，1階の AR モデルのみに記述を留めたが，階数を増加させたときのいくつかの症状の推定は観測値にさらに近似した．このことは誤差の原因の追求が一層重要であることを示している．

結　論

大気汚染などにより発現した亜急性症状の量・反応関係を検討するため，急性症状を含めた夏季の自覚症状調査データを用いて，一般的線形回帰モデル，logistic 回帰モデル，誤差項の時間依存性を考慮した AR モデルを利用して検討した．

従来一般的に利用されている線形回帰モデルによると，7自覚症状のうち頭痛とだるいの2症状は6大気汚染物質と4気象要素の10寄与因子との間に有意の相関が認められず，他の5症状については気象要素特に湿度との間に高い相関が認められた．また，2寄与因子以上と有意の相関を示した症状について，その因子を説明変数とする重回帰モデルを仮定したとき，単回帰モデルに比べ，

相対誤差，推定値と観測値との相関ともに良好な結果が得られたが，説明変数間の相関が高いため多重共線性が問題となった．次に，logistic 回帰モデルを利用した場合，この調査データでは線形回帰モデルとほぼ同様の結果であった．標本数が少なく，低有訴率であったために偶点変動が影響したことに起因すると思われる．一方，線形回帰モデルの誤差項の1階の系列相関によると，呼吸器4症状に有意の相関が認められ，誤差に時間依存性のあることが示された．したがって，これら4症状は寄与因子の影響が翌日の有訴率にも及ぶことが推察される．この誤差に AR モデルを適用し，得られた推定値は他のモデルよりも観測値により近似した．ただし，その相対誤差がどの症状についても30％を越え，小標本調査の欠点がここにも現われた．以上の検討の結果，大気汚染などによる症状の量・反応関係を追求する場合，線形回帰モデルだけでなく，症状の分布や誤差の性質に応じて AR モデルなど他の統計学的手法をも利用すべきであることが示唆された．

文　献

1）Coffin, D. L. and Knelson, J. H.: *Ambio*, 5,239,1976

2）常後義三，山口泰正，中山典子，上田美代子：日本公衛誌，24,293,1977

3）Fishelson, G. and Graves, P.: *JAPCA*, 28,785,1978

4）坪田信孝，中島泰知，目黒忠道，緒方正名：日本公衛誌，26,333,1979

5）Babcock, L. R.: *JAPCA*, 20,653,1970

6）牧野国義，溝口　勲：日本公衛誌，22,421,1975

7）Hammer, D. I., Hasselblad, V., Wehle, P. F. and Portnoy, B.: *Arch. Environ.* Health, 28,255,1974

8）Makino, K. and Mizoguchi, I.: *Proc. of The 4 th Clean Air Congress*, 27,1977, Tokyo

9）坪田信孝：日本公衛誌，27,111,1980

10）Korn, E. L. and Whittmore, A. S.: *Biometrics*, 35, 795,1979

11）Durham, W. H. and Mich, A.: *Arch. Environ, Health*, 28,241,1974

12）Fienberg, S. E., Bromet, E. J. et al: *Environ, Health Perspect*, 63,241,1985

13）Prentice, R. L.: *Environ, Health Perspect*, 63,225,1985

14）Harrington, W. and Krupnick, A. J.: *JAPCA*, 35, 1061,1985

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 313-317, 1986

メチル水銀暴露時期がラットの繁殖におよぼす影響

関 比呂伸*, 加納堯子*, 田村行弘**

The Effects of Methylmercury Exposure Time Schedules to Reproduction of Rats

HIRONOBU SEKI*, TAKAKO KANOH* and YUKIHIRO TAMURA**

The effects of methylmercury on the rat reproduction by the exposure time schedule of methylmercury were examined.

Wistar strain, virgin female rats were fed the diet containing 20 ppm methylmercury during three weeks before and after mating.

While 15 reproduction indices were checked, weight gain showed a tendency to decrease in the late stage of pregnancy, and significant differences were observed in "Mean mortality at parturition" and "Lactating index" between D, E, G groups and other groups.

It was suggested that methylmercury had far greater effects on rats during the late stage of pregnancy than in the earlier stage.

Keywords: methylmercury, reproduction index, exposure time schedule

緒　　言

水俣地方に発生した有機水銀中毒事件において，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[6~9]．

有機水銀は，母体から胎盤を容易に通過して[7,8,10~17]，胎仔に蓄積し，Embryotoxicity や Fetotoxicity 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]．

我々は，前回の実験において[28]，妊娠・授乳期間を通してメチル水銀20ppm 含有飼料をラットに投与した時，体重増加の抑制，出産率や離乳率の低下を観察した．さらに，メチル水銀を用いてラットの離乳率を検討する実験においては，メチル水銀の投与濃度は，20ppm が限界濃度であることがわかった．

一方，森山は[7]，メチル水銀化合物の投与量を変え，あるいは，メチル水銀の投与期間をいくつか組合せて繁殖影響を観察しており，胎仔の異常（例えば死産や奇形など）は投与量の増加，または，投与期間を延長した場合に多発することを示した．

今回の実験では，ラットの繁殖・離乳率におよぼすメチル水銀の投与時期について検討した．すなわち，交配の前後３週間を１週間ずつ区切り，前回[28]と同一のメチル水銀濃度含有飼料を合計３週間投与した場合と，さらに，妊娠期の前半３分の２と後半の３分の２に分けて投与した場合の繁殖影響について観察した．

方法・材料

ウィスター系，未経産雌性ラット（日本クレア K.K.）51匹（体重213±22g）11週令を８群に分け，１群６～８匹とし，図１のようにA～Fの６群は計３週間，GHの２群は計２週間，塩化メチル水銀20ppm 含有飼料を投与した．その他の期間は，メチル水銀無添加の基本飼料を与えた．

飲料水は，水道水を自由に摂取させた．

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％とした．

交配は，雌雄１対ずつラット用金網ケージに同居させて行った．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日

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　160　東京都新宿区百人町３－24－1
*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

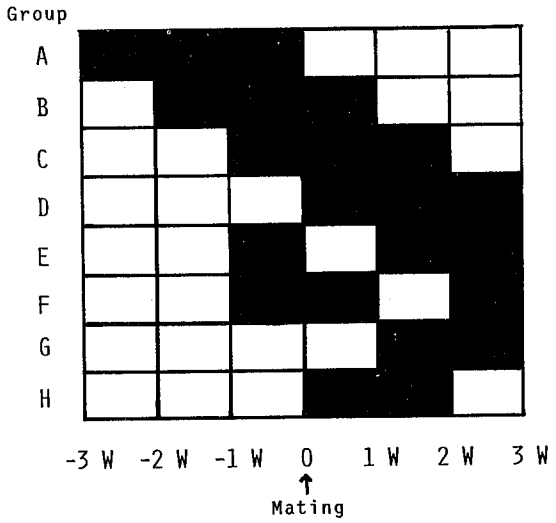


Fig. 1. Exposure time schedule
closed square : exposure week

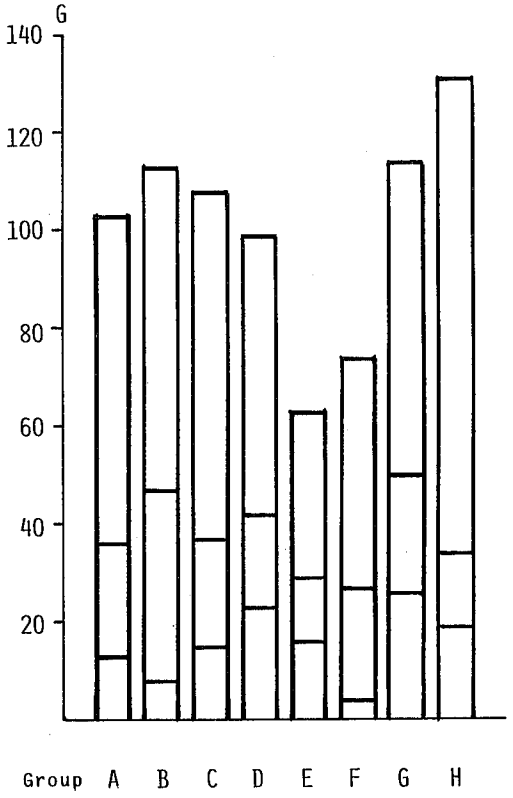


Fig. 2. Body weight gains of each gestational period

Column : lower (1 st week)
middle (2 nd week)
upper (3 rd week)

目とした.

交配前および受精確認後，3～4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日目）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とし，出産後は離乳時（出産後21日目）まで母仔を同一ケージ内で飼育した.

出産の確認は，朝・昼・夕方の一日3回行う.

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.

統計処理は，Welch の方法およびカイ2乗検定を用いた.

結　果

妊娠期間中の体重増加を図2に示した．各群の各妊娠期間（妊娠Ⅰ期：0～7日目，妊娠Ⅱ期：8～14日目，妊娠Ⅲ期：15～21日目とする）における体重増加量は，各々異っていることが認められた．メチル水銀を合計3週間投与した6群の中で，A・B・C・D群では，妊娠Ⅲ期にメチル水銀を摂取したD群が一番少ない増加量を示したが，4群間には，増加量に大差がみられなかった．しかし，これら4群は，EFの2群よりも増加量は有意に（$P<0.05\sim0.001$）多かった．一方，2週間のみメチル水銀を摂取させたGH群は，他の群より増加量が多く，妊娠Ⅰ～Ⅱ期投与のH群は，妊娠Ⅱ～Ⅲ期投与のG群よりも多く増加していた.

表1に各繁殖データーを示した．妊娠率は各群ともに100％であったが，出産率では100％のA・D・E群を除いて，他の群で1匹ずつ流産していた.

平均出産仔数において，D・E・G群はB群を除いた他の群と比較すると有意に少ないが，着床数から計算した平均出産仔数で比較すると有意な差は認められない．出産時における新生仔の死亡数は，D群が最も多く42匹，ついでE群25匹，B群7匹，F・G群各4匹およびA群3匹であった．さらに，新生仔の死産および出産直後に死亡し母親に食べられた可能性がある仔数（その形跡が確認された）などを考慮して，着床数からみた死亡数および死亡率を計算すると，D群92匹85.2％，E群65匹72.2％の2群が極めて有意に高く，G群28匹34.6％，B群15匹20.8％，F群12匹16.4％，C群10匹13.0％，H群11匹12.0％，A群5匹7.6％と順次減少していた.

Table 1. Reproduction indices

	Group							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Fertility index (%)	100	100	100	100	100	100	100	100
Gestation index (%)	100	86	83	100	100	83	86	86
Total No. of pups delivered	64(5)*	64(6)	67(5)	58(7)	50(6)	65(5)	57(6)	81(6)
Mean No. of pups delivered	D1F1 12.8±3.3**	10.7±3.3	D2E2G2 13.4±0.9	F1H2 8.3±3.0	F1H2 8.3±2.6	G1 13.0±3.1	H3 9.5±1.9	13.5±2.0
Total No. of dead neonates	3	7	0	42	25	4	4	0
Mean No. of dead neonates	D3E2G1 1.0±1.2	D3E2 2.5±3.7	D3E2 2.0±1.6	F3G2H2 13.1±4.1	F1G1H2 10.8±5.0	2.4±3.8	4.7±2.7	1.8±3.1
Total No. of absorbed fetuses	1	8	2	1	3	1	3	6
Total No. of implantation site	67	80	79	109	93	74	84	98
Mean No. of implantation site	13.2±3.0	D1 12.0±3.0	15.4±1.9	15.4±2.7	15.0±2.6	14.6±3.6	13.5±1.9	15.3±3.6
Total No. of weaned pups	59(5)*	53(5)	66(5)	0	17(2)	61(5)	42(5)	76(6)
Mean No. of weaned pups	11.8±3.6	10.6±4.0	G2 13.2±0.8	0	8.5±4.9	12.2±3.3	H2 8.4±2.1	12.7±1.9
Lactating index	D3E3F1G1 96.7	C1D3E2F2 93	D3E3G3 98.5	E3F3G3H3 0	F3H3 68	G3 100	H3 79.3	93.8
Mean body weight at weanling	B2C1F2G1 38.7±6.1	E2F3H1 42.6±8.1	E3F3H1 40.9±3.1	0	G2H2 36.0±5.1	G3H3 34.6±9.9	H1 42.1±6.7	39.4±4.4
Mortality at birth (%) (No. of death/No. of implantation site)	B1D3E3G3 7.6	D3E3G1 20.8	D3E3G3 13.0	E1F3G3H3 85.2	F3G3H3 72.2	G2 16.4	H3 34.6	12.0
Mortality at weanling (No. of death/No. of implantanion site)	B1D3E3G3 10.6	D3E3G3 26.8	D3E3G3 14.3	E3F3G3H3 100	F3G3H3 81.1	G3 16.4	H3 48.2	17.4

*No. of dams
**Mean ± S.D.
Superscripts mean significant difference (1 : $P<0.05$, 2 : $P<0.01$, 3 : $P<0.001$)

平均離乳仔数では，C・H群は，G群より有意（P＜0.01）に多い値を示した．D群の仔は，出産後6日目までに全匹死亡した．また，同腹仔が全て死亡した母親数は，E群4匹で，B・G群1匹ずつであった．

離乳率（出産時の生存仔数／離乳仔数）では，D群0％，E群68％，G群79％と有意に低く，その他の群は90％以上を示していた．

離乳時における仔の体重は，E・F群が少なく，他の群（ただしE群とA群間には差がみられなかった）と有意な差が認められた．

考　　察

今回の結果から，妊娠期間中の体重増加が少ないのは，メチル水銀を計3週間投与した群において観察された．

森山は[7]，メチル水銀投与量の微量（0.2mg／100g／日）と中等量（0.5mg／100g／日），または投与期間の差による体重増加に違いはなかったとしているが，微量よりは中等量，妊娠前期よりは後期の方が体重増加の少ない傾向を示していた．今回の結果では，B・C・Dの3群で比較すると妊娠Ⅰ期よりⅡ期，Ⅱ期よりⅢ期まで投与した方が有意ではないが体重増加が少なくなる傾向を示した．

繁殖データーでは，D・E・G群が他の群よりも劣る結果を示した．これら3群に共通していることは，妊娠のⅡ期とⅢ期の2週間連続してメチル水銀の暴露を受けていたことである．

メチル水銀の繁殖毒性に関する報告はいくつかなされているが，メチル水銀が妊娠期間中のどの時期に投与されると最も強い影響を示すのかあまり良く知られていない．その中で，松本は[27]，ネズミに水俣病々変を起さしめる量（10mg/100g）より少ない量のメチル水銀を経口投与し，妊娠前半投与より後半投与の方が生命保持に対する障害（胎仔死亡数を指すと思われる）がつよい傾向を示したとしている．また，森山は[7]，メチル水銀投与を受胎日前日まで，臨界期（妊娠8日目までとした）まで，および分娩までに分け投与量もかえて観察したが，対照群と比べ胎仔数，仔体重で減少傾向はみられるが，有意差が認められないと報告している．さらに，ラット胎仔の異常は投与量の増加，または投与期間の延長，特に，妊娠後半期に大量，中等量を投与した場合に多発する傾向があると報告している．一方，布谷は[10]，メチル水銀（投与水銀総量は8.56～11.76mg／kg）をラットに皮下注射し，投与終了後交配して繁殖影響を観察しているが，交配前に比較的微量のメチル水銀を投与すると妊娠率の低下をきたし，妊娠中の体重増加へ影響をおよぼす．しかし，早産・死産なく，かつ，産仔数・生下時体重に差は認められなかったと報告している．

以上のことから，妊娠の前半期よりも後半期において母体にメチル水銀が暴露されると，胎仔に強い悪影響をおよぼすものと考えられる．

尚，今回のD群と同じタイムスケジュール（妊娠Ⅰ期からⅢ期投与）の前回の結果と比較すると，ほぼ同程度かもしくは前回以上のメチル水銀毒性を示したことが観察された．

要　　約

メチル水銀の暴露時期が，ラットの繁殖にどのような影響をおよぼすか調査した．

ウィスター系雌ラットに交配日の前後3週間に，メチル水銀含有飼料を与えた．

妊娠中の体重変化，妊娠率，出産率，出産仔数，出産時死亡数，離乳仔数，離乳時体重，離乳率を観察した．

その結果，暴露時期が妊娠後期に進むにつれて体重増加が少なくなる傾向がみられた．また，繁殖データーでは，D・E・Gの3群は，出産時死亡数および離乳率が，他の群よりも劣る結果を示した．

これら3群に共通する因子には，妊娠のⅡ～Ⅲ期にメチル水銀が暴露されていることから繁殖毒性は妊娠の前期よりも後期の方に強く影響すると考えた．

（本研究は，昭和58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

13) 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. Soc. 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-O. and Okita, G. T. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 38,207,1976
26) Khera, K. S. : *ibid.*, 24,167,1973
27) 杉本英世，高屋豪瑩，武内忠男：日本病理学会誌, 54,187,1965
28) 関比呂伸，田村行弘，蓑輪佳子，加納尭子：東京衛研年報, 35,309,1984
29) Ohi, G., Nishigaki, S., Seki, H., et al : *Environ. Res.*, 12,49,1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 318-323, 1986

大気浮遊粉塵中の重金属について 多摩地域の濃度特性（第2報）

佐藤泰仁*, 多田宇宏*, 溝口勲*,
本間慶一**, 山本英一**
多摩地区環境衛生監視員一同

Heavy Metals in Suspended Particulate Matters of Atmosphere Feature in Tama District of Tokyo (II)

YASUHITO SATO*, TAKAHIRO TADA*, ISAO MIZOGUCHI*,
KEIICHI HOMMA**, EIICHI YAMAMOTO** and
ALL INSPECTER OF ENVIRONMENTAL HYGENE AT TAMA DISTRICT

Analysis of heavy metals in the Tama district of Tokyo was carried out following the previously reported methods used in 1978 through 1980. Studies were performed at 18 points, with 2 more points in the central area of Tokyo added to the previously tested points : one in the metropolitan government office building and the other in our research office building.

The average amount of suspended particulate matters was nearly equal to the amount found previously in 1978 through 1980, but the average amounts of Pb, Zn and Fe increased according to this study. Most of the areas in the Tama district are in a worsened stage of air pollution, and only in such low-traffic areas as Ohme, Itsukaichi and Higashimurayama there is clean air.

Keywords : Heavy metals, regional pollution, Fluorescence X-ray analysis

はじめに

昭和53年，衛生局公害保健課の「大気汚染に係る生活環境調査」の一環として大気浮遊粉塵中の重金属のモニタリングを開始して8年余になる．その間，当初よりの3年間のデータについては第一報で報告[1]を行なった．

今回はその後の3年間（昭和57年より昭和59年）のデータについて前回同様，地域特性を中心に解析を行なったので，その結果について報告する．

測定場所及び試料採取

浮遊粒子状物質の採取場所は前報[1]と同じであるが，昭和57年4月より都心の都庁内にある衛生局庁舎屋上，新宿区にある当所屋上でもサンプリングを開始したので，18ポイントで行なっている．採取方法は変らないが，採塵用フィルターは前回までの結果を考慮し，フィルター中の元素含有量（バックグランド）の少ないメンブラン製（東洋沪紙 TM－80, 47φ）のものに統一した．

測定項目及び分析方法

対象測定項目は総粉塵量（Total Dust），鉛（Pb），ヒ素（As），亜鉛（Zn），銅（Cu），鉄（Fe），マンガン（Mn），クロム（Cr）及びバナジウム（V）である．

総粉塵量については前報と同じ方法により秤量し重量を求めた．

重金属類の分析は，昭和59年9月分の試料より従来実施してきた波長分散型螢光X線分析法（以下WD法と記す）からエネルギー分散型螢光X線分析法（以下ED法と記す）に変った．各元素の定量方法は，As及びVについてはあらかじめ標準液をろ紙に滴下し，乾燥させた後の試料の螢光X線強度を，またPb, Zn, Cu, Fe,

*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
**東京都衛生局医療福祉部公害保健課

Mn, Crについては，あらかじめ採塵したろ紙の各種重金属について螢光X線強度を測定しておき，次にこのろ紙を湿式灰化処理を行ない，フレームレス原子吸光法で各種重金属濃度を定量した．さらにこの定量値の螢光X線強度を使用して，自動分析のためのデータ処理装置の検量線とした．今回の方法と従来法が示す測定値の変動を検討するため，以前にWD法で分析した13試料を任意に選び，Pb, Zn, Cu, Fe, MnについてED法による数値を求めた．

両方法による回帰式及び相関係数をTable 1．に示す．その結果，Fe, Mn, Znについてはほぼ1：1の関係（r＝0.99）がみられ，他の2元素についても良好な対応関係が認められたので，昭和59年度の試料（7ヶ月分）については補正を行なわず，ED法の結果を使用した．

Table 1．Comparison of ED (X) and WD method (Y) for five elements in Particulate matters

element	regression line	correlation-coefficient
Pb	Y＝1.16X＋0.80	r＝0.96
Zn	Y＝1.08X＋0.91	r＝0.99
Cu	Y＝0.68X＋1.39	r＝0.97
Fe	Y＝0.85X＋1.16	r＝0.99
Mn	Y＝0.89X＋1.11	r＝0.99

装置：エネルギー分散型螢光X線分析装置（㈱理学電機工業製，ウルトラトレースシステム0600型にデータ処理システム7077型を組み合わせたもの）

測定条件：管球：モリブデン．2次ターゲット：Ge (V, Fe, Cu, Cr, Mn), Mo (Pb, Zn, As)．螢光X線スペクトル：As, Zn, Cu, Mn, Cr, VはKα線，FeはKβ線，PbはLβ線．X線発生装置の電圧，電流及び測定時間：40KV, 25mA, 200秒 (Ge), 40KV, 60mA, 300秒 (Mo)．チャンネル幅：10KeV (Ge), 20KeV (Mo)．

結果及び考察

昭和57年度から昭和59年度の18測定点における総粉塵量及び各重金属の平均濃度，最低濃度，最高濃度をTable 2．に示した．総粉塵量（T.D.）は16保健所での平均値は38.8μg/m³で，前回の平均値44.4μg/m³よりやや減少した．

平均値を越えている地区は9ヶ所あり，前報と同様，川崎などの工業地域に隣接している八王子及び町田保健所と都区部に近い武蔵野保健所などの多摩地区東部であり，多少の変化はあるが傾向としては変っていない．

各元素毎の濃度をみると，Pbについては16保健所の平均値は0.090μg/m³で，前回報告平均値0.058μg/m³に比べ若干増加している．同様にAsは0.014μg/m³（前回値0.008μg/m³）で，Pb同様増加傾向がみられている．

また，Pb及びAsとも平均濃度以上を示した地区は前回の結果と同じく9保健所で，T.D.で平均濃度以上を示した保健所と全く同一であった．このことはPb及びAs濃度とT.D.間の高い相関性を意味していると考える．

人為発生源からの寄与が大きいとされるZnについてもその平均濃度が0.217μg/m³（前回値0.179μg/m³）とやや高くなっている．しかし，前回高濃度を示した八王子，東久留米保健所は，今回は両保健所とも平均濃度を若干上廻った程度であった．

Cuについては平均濃度が0.021μg/m³で，前回値0.030μg/m³より低く，測定金属の中で前回より測定値が減少した唯一の金属であった．表からもわかるように各保健所間の値も同程度であり，平均値の差の検定でも有意差がみられないことから，Cuの地域特性はないものと判断される．

自然発生源（土壌等）からの寄与が高いFeは，平均濃度が0.591μg/m³と前回値0.469μg/m³よりも高くなっている．この平均濃度以上を示したのは田無など8つの保健所で，その保健所数は前回と変らないが，今回は小金井，立川，武蔵野保健所が加わっている．前回，最高濃度を示していた武蔵調布保健所は平均をやゝ下廻った値を示した．Feについては平均値で最大を示した武蔵野保健所と最小の五日市保健所では，約3.4倍の濃度差がみられることから，同じ多摩地域でも都区内に近い場所と都心から約40km離れた場所では，自然および人為的発生の違いに寄因する影響がでているものと考える．

Mnは平均濃度が0.026μg/m³で，前回値0.023μg/m³と変りがないが，平均濃度以上を示した保健所は前回の約2倍の9ヶ所であった．今回，平均で濃度が一番高い値を示したのは武蔵野保健所（0.035μg/m³）で，逆に一番低い値は東村山保健所（0.015μg/m³）であった．Mnは自然および人為的発生源の寄与が50％ずつの元素と考えられているため，前回報告から今回までの間に，測定点周辺の環境に大きな変化がなかったものと考えられた．

CrおよびVについては，平均値が0.010μg/m³, 0.009μg/m³を示し，前回値がそれぞれ0.009μg/m³,

Table 2. Average, Minimum and Maximum concentration of heavy metals and total dust in 18 points in Tokyo in 1981 through 1983

unit : $\mu g/m^3$ AVERAGE (MIN~MAX)

Health Center	T.Dust	Pb	As	Zn	Cu	Fe	Mn	Cr	V
① OHME	23.2 (2.3~51.3)	0.053 (0.019~0.119)	0.007 (0.003~0.014)	0.102 (0.024~0.341)	0.014 (0.001~0.025)	0.276 (0.116~0.628)	0.017 (0.005~0.098)	0.007 (0.002 ~0.014)	0.007 (0.001>~0.012)
② FUSSA	38.1 (8.2~ 66.4)	0.111 (0.017~0.261)	0.017 (0.010~0.034)	0.171 (0.087~0.311)	0.019 (0.011~0.048)	0.603 (0.259~1.381)	0.027 (0.012~0.050)	0.008 (0.001 ~0.020)	0.008 (0.001>~0.016)
③ ITUKAICHI	23.5 (6.0~ 50.8)	0.067 (0.023~0.191)	0.009 (0.004~0.017)	0.100 (0.015~0.240)	0.014 (0.002~0.026)	0.270 (0.070~0.742)	0.019 (0.008~0.041)	0.014 (0.001 ~0.083)	0.007 (0.003 ~0.013)
④ HACHIOJI	42.0 (19.4~ 76.7)	0.112 (0.042~0.253)	0.016 (0.007~0.028)	0.219 (0.113~0.414)	0.025 (0.012~0.043)	0.562 (0.163~1.143)	0.025 (0.012~0.047)	0.010 (0.002 ~0.017)	0.009 (0.001>~0.018)
⑤ HINO	31.2 (8.4~ 52.0)	0.080 (0.026~0.198)	0.012 (0.003~0.025)	0.174 (0.035~0.301)	0.021 (0.012~0.044)	0.554 (0.162~0.936)	0.021 (0.005~0.035)	0.010 (0.001 ~0.043)	0.007 (0.001>~0.015)
⑥ MACHIDA	51.2 (5.0~120.4)	0.094 (0.042~0.269)	0.014 (0.005~0.039)	0.205 (0.062~0.459)	0.025 (0.013~0.039)	0.698 (0.170~2.817)	0.028 (0.007~0.065)	0.014 (0.001 ~0.042)	0.008 (0.001>~0.027)
⑦ FUCHYU	42.6 (10.2~106.9)	0.096 (0.031~0.328)	0.015 (0.008~0.042)	0.260 (0.115~0.629)	0.021 (0.009~0.037)	0.659 (0.179~2.012)	0.032 (0.011~0.105)	0.009 (0.001 ~0.021)	0.011 (0.001>~0.027)
⑧ MUSASHICHOFU	46.9 (51.5~120.1)	0.097 (0.024~0.345)	0.014 (0.002~0.045)	0.285 (0.075~0.899)	0.023 (0.012~0.046)	0.562 (0.182~1.292)	0.030 (0.005~0.066)	0.008 (0.001 ~0.017)	0.009 (0.001>~0.024)
⑨ KOGANEI	42.4 (15.4~ 92.6)	0.103 (0.038~0.182)	0.016 (0.001~0.033)	0.284 (0.105~0.788)	0.021 (0.012~0.041)	0.674 (0.234~2.845)	0.030 (0.009~0.072)	0.008 (0.001 ~0.016)	0.009 (0.001>~0.028)
⑩ TACHIKAWA	39.8 (18.1~ 71.8)	0.102 (0.041~0.209)	0.015 (0.008~0.030)	0.197 (0.106~0.490)	0.022 (0.008~0.045)	0.721 (0.201~2.030)	0.027 (0.011~0.056)	0.009 (0.001 ~0.018)	0.009 (0.001>~0.021)
⑪ MUSASHINO	52.1 (17.2~127.1)	0.120 (0.007~0.369)	0.017 (0.002~0.048)	0.297 (0.050~0.747)	0.025 (0.007~0.093)	0.908 (0.109~2.333)	0.035 (0.008~0.085)	0.011 (0.001 ~0.024)	0.012 (0.001>~0.022)
⑫ MITAKA	35.8 (9.4~ 78.3)	0.088 (0.025~0.281)	0.016 (0.004~0.106)	0.311 (0.061~0.815)	0.023 (0.003~0.054)	0.499 (0.046~1.078)	0.025 (0.004~0.079)	0.010 (0.001 ~0.016)	0.009 (0.001>~0.021)
⑬ TANASHI	56.4 (20.0~126.8)	0.114 (0.050~0.348)	0.017 (0.008~0.042)	0.296 (0.135~0.590)	0.025 (0.002~0.057)	0.863 (0.254~2.551)	0.034 (0.018~0.082)	0.009 (0.002 ~0.016)	0.009 (0.001>~0.026)
⑭ HIGASHIKURUME	44.9 (20.3~ 93.3)	0.093 (0.040~0.183)	0.013 (0.005~0.025)	0.244 (0.103~0.589)	0.022 (0.009~0.052)	0.885 (0.256~2.828)	0.029 (0.011~0.070)	0.010 (0.001 ~0.016)	0.010 (0.001 ~0.026)
⑮ KODAIRA	26.7 (6.1~111.9)	0.066 (0.010~0.291)	0.015 (0.001~0.188)	0.224 (0.035~0.740)	0.020 (0.012~0.029)	0.423 (0.102~1.453)	0.022 (0.008~0.074)	0.009 (0.001 ~0.014)	0.006 (0.001 ~0.017)
⑯ HIGASHIMURAYAMA	24.0 (5.7~ 55.3)	0.051 (0.009~0.205)	0.007 (0.001~0.022)	0.104 (0.020~0.250)	0.013 (0.003~0.031)	0.291 (0.030~1.036)	0.015 (0.001~0.040)	0.007 (0.001 ~0.015)	0.009 (0.005~0.014)
⑰ EISEIKYOKU	44.1 (5.5~ 88.3)	0.113 (0.043~0.308)	0.015 (0.001~0.038)	0.445 (0.131~1.244)	0.039 (0.013~0.077)	1.009 (0.562~1.690)	0.060 (0.026~0.224)	0.003 (0.001<~0.018)	0.013 (0.011 ~0.026)
⑱ EISEIKENKYUJO	43.6 (19.3~ 87.9)	0.111 (0.005~0.272)	0.014 (0.001<~0.037)	0.447 (0.100~0.962)	0.029 (0.001<~0.098)	0.718 (0.258~1.493)	0.045 (0.011~0.200)	0.004 (0.001<~0.046)	0.011 (0.001<~0.030)

0.011 μg/m³であることから，Mnと同様変化の少ない元素であると言える．

Crについては町田保健所の0.014 μg/m³が平均で一番高い値であった．前回報告でも同保健所が高い値を示していたので，同保健所周辺に関連する発生源（Cr等を取り扱う業種）があると推測して調査を行なったが，特にそれらしきものはなかった．CrはFe，Mnに次いで多い土壌成分でもあり，同保健所周辺は未だ小高い山や田畑が多くみられることから，土壌よりの影響と判断された．

V値は武蔵野保健所の0.012 μg/m³が最も高く，低くても青梅保健所等の0.007 μg/m³と各保健所間での差異は少ないが，平均濃度以上を示したのは八王子保健所を除くと，前回報告同様，多摩地域東部に集中している．

今回より新たに対象地区として加えた，都衛生局庁舎および当研究所のデータをTable 2．の⑰，⑱に示したが，Crを除く8測定項目が多摩地域の平均値を上廻っており，都心と郊外の濃度差がでているものと判断された．

今回は総粉塵量も含め，全ての元素が平均濃度以上を示しているのは武蔵野保健所のみであり，粉塵量およびCr量を除く他の項目で最も高い値を示していた．Znについては前回も含め高濃度を示していたことから，何らかの発生源のあることが考えられた．その結果，同保健所の南東約300m程に大規模な電機工場の存在が判明したため，測定当初よりの高値はこの工場よりの影響を受けているものと推察した．

測定対象元素が平均濃度以下でかつ最低濃度を示しているのは，T.D.，As，Crについては青梅保健所，Zn，Feについては五日市保健所，Pb，As，Cu，Mn，Crについては東村山保健所である．前回，東村山保健所はCuのみが最低値を示していたが，今回は他の元素も低濃度を示していたことから，北多摩の一部地域が従来からの西多摩地域に加わって，多摩地域での清浄地区と判断された．

Table 2．より多摩地域16保健所の総粉塵量に占める各元素の割合を求めてみる．尚，（ ）内は前回値を示す．

まずPbについては0.23%（0.13%），As 0.04%（0.02%），Zn 0.56%（0.39%），Cu 0.05%（0.07%），Fe 1.52%（1.04%），Mn 0.07%（0.05%），Cr 0.03%（0.02%），V 0.02%（0.03%）となり，今回はPb，Zn，Feが占める割合の増加が目立っている．前述したようにこれらの元素は，自然界の活動（Fe）や人為的活動（PbおよびZn）により生ずる元素であることから，毎年の自然現象の変化や産業活動に寄因し変動していると判断した．ちなみに都心地区を同様な方法で求めてみるとPbが0.26%，Znが1.02%，Feが1.97%とさらにその割合が大きくなり，産業活動との関連が裏づけられる．

また，総粉塵量と各元素の相関性をみるとPb，Zn，Cu，Fe，Mnについては，相関係数がそれぞれ0.87，0.76，0.86，0.90，0.93と0.1%の危険率においても有意性を示した．このことは，粉塵量の高低がそれに含まれる元素濃度の高低に，とりわけ前述のPb，Zn，Fe濃度の増加につながっているものと思われた．

最後に総浮遊粉塵量の平均値を経年的にみてみると，昭和56年度が32.7 μg/m³，昭和57年度が43.3 μg/m³，昭和58年度が40.1 μg/m³となり，前回のデータをも含めてみると漸減する傾向が鈍っているように思われる．

保健所における浮遊粉塵量および各金属成分の分布状態を，前回と同じ五日市，町田，三鷹，東村山の4つの保健所および都心地区の衛生局庁舎での各年次毎の濃度をプロットしFig. 1～5．に示した．前回同様Cu，Cr，Vについてのサンプル数は他の元素に比べ少ないが，これは今回の分析条件での検出限界（それぞれ0.02 μg，

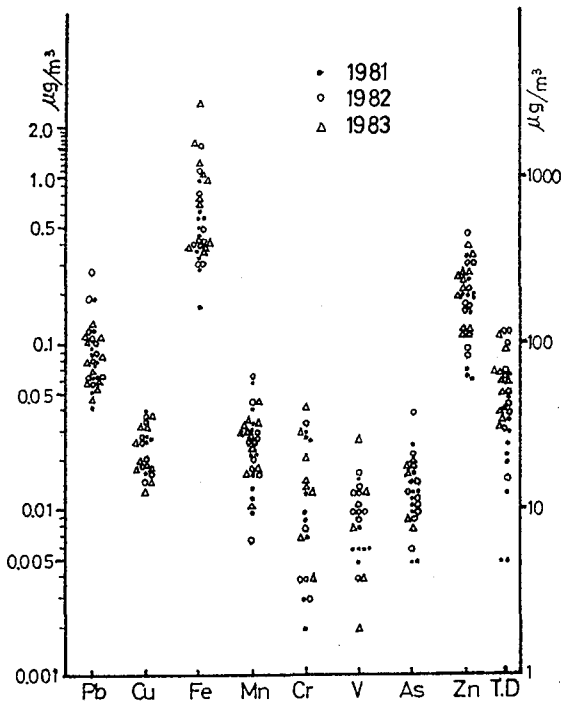


Fig. 1．Distribution of eight metals in the ITSUKAICHI Health Center

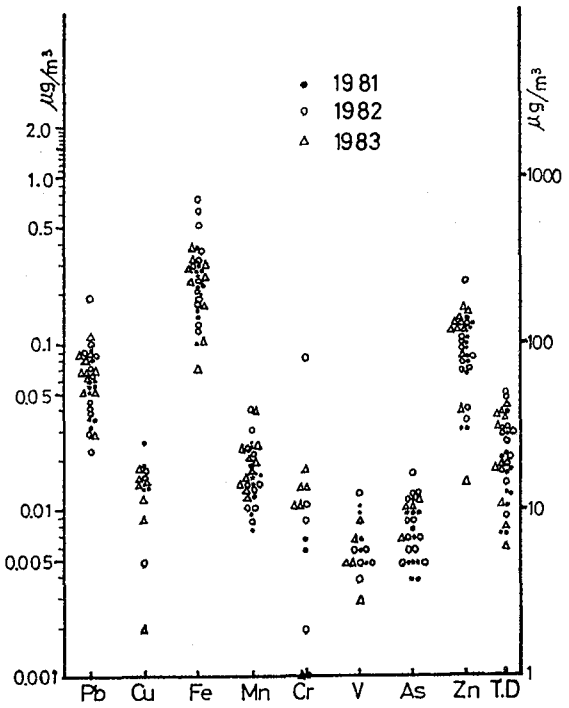


Fig. 2. Distribution of eight metals in the MACHIDA Health Center

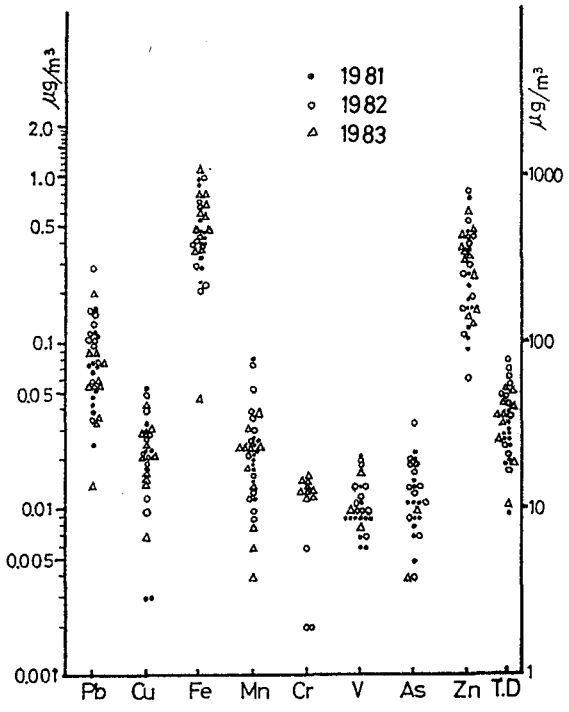


Fig. 3. Distribution of eight metals in the MITAKA Health Center

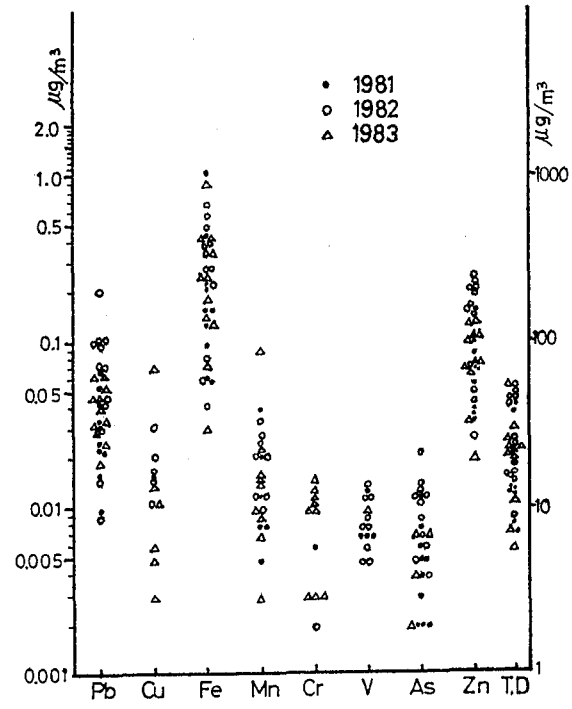


Fig. 4. Distribution of eight metals in the HIGASHI-MURAYAMA Health Center

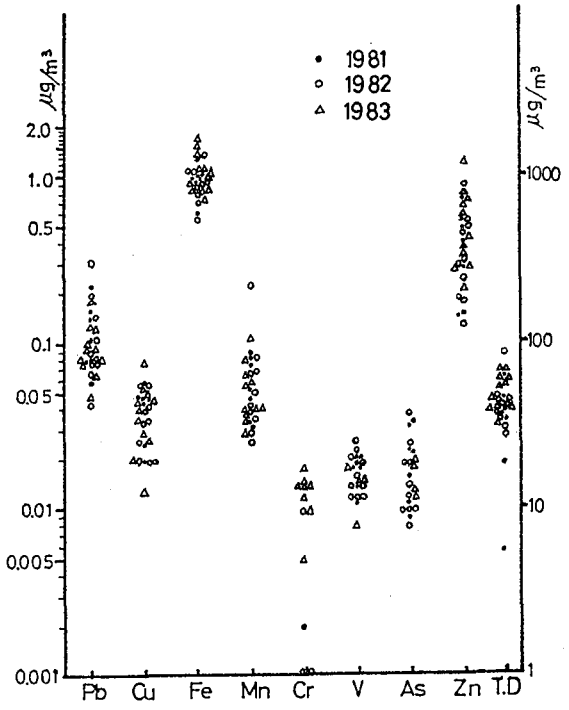


Fig. 5. Distribution of eight metals in the EISEIKYOKU ROOF

0.09μg, 0.04μg) の値以下を示したことによる.

結　　語

今回の解析の結果, 浮遊粉塵中重金属の動向は大要次の如くである.

(1) 総粉塵量は40μg/m³前後にあり, 経年的には漸減傾向よりむしろ横バイ状態である.

(2) 全ての測定項目が平均濃度以上を示した保健所が, 前回は2ヶ所であったが, 今回は, 前回と同じ田無保健所を含め5ヶ所で, 年々汚染が進行していることが推察された.

(3) 各測定項目が最も低い値を示しているのは, 青梅, 五日市, 東村山保健所であり, この地域が比較的清浄な場所と考える.

(4) 武蔵野保健所は総粉塵量, Cr量を除く他の測定項目において全て高い値を示している. このことは近くの発生源 (大規模電機工場) の影響と思われた.

(5) Pb, Zn, Feの粉塵中に占める割合が高くなっていることは, 都市化現象が進んでいることを示すものと考える.

文　　献

1) 佐藤泰仁他：大気浮遊粉塵中の重金属について, 三多摩地域の濃度特性 (第一報), 都衛研年報, 32—1,218—222,1981

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 324-330, 1986

室内浮遊粉塵の質に関する調査
——ビル空調系における汚染質の動態——

佐藤泰仁*, 狩野文雄*, 多田宇宏*, 加納堯子*,
細井　潔**, 菱山　仁***

A survey of Suspended Particulate Matters in Room Air Dynamics of Polluted Particles Circulating through Air Ducts in Building

YASUHITO SATO*, FUMIO KANO*, TAKAHIRO TADA*, TAKAKO KANO*,
KIYOSHI HOSOI** and HITOSHI HISHIYAMA***

The use of recycled air, or the air of a room which has been filtered, is increasing today in order to decrease introduction of the outside air in summer and winter and to reduce energy needed for air conditioning and heating. Pollutants in the recycled air, including suspended particles, heavy metals, mutagens and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), were compared simultaneously with those in the outside air and the supplied air which was circulated in 2 office building in summer and winter.

Suspended particles and heavy metals in the recycled air were removed by air filters, but the values of mutagenic activity and carcinogenic benzo(a)pyrene contained in PAH increased in the recycled air compared with those of the other two kinds of air.

This phenomenon may be due to accumulation of the materials contained in the air of a room such as tabaco smoke.

Keywords: Indoor pollution, Suspended-Particulate Matter, Mutagen activity, Polycyclic-aromatic hydrocarbons

はじめに

ビル室内の空気環境については，「建築物環境衛生管理基準」及び「事務所衛生基準規則」によって，居室及び室内に供給する空気の基準が示されており[1,2]，その中で浮遊粉塵については0.15mg／m³以下にするように量的評価の基準が示されている．

通称，ビル管理法が制定されて16年が経過しているが，東京都における実態調査[3]をみると，当初60％台を示した浮遊粉塵の基準値に対する不適率は，現在では10％台と顕著な低下をみせており，粉塵に対する量的問題としては改善されてきている．

しかし最近のビルは夏季や冬季には省エネルギーの観点から，外気導入量を減らし浄化した再循環空気で空調を行っているのが実状である．そのため空気調和機により有害物質等の除去が充分に行われない場合は，還気循環による有害物質の濃縮が考えられ，居住者の健康に影響を与えるものと思われる．

そこで今回我々は，浮遊粉塵を主に室内空気汚染の実態把握及び空気調和機による有害物質の除去効果等，質的評価を行った．検討方法は，冷暖房期における事務所ビルの空調運転時に，空調系統毎（外気，還気，給気）の浮遊粉塵を採取し，その中の汚染質（粉塵量及び重金属，変質原活性，多環芳香族炭化水素（以下PAHと記す）量を調査したので，その結果について述べる．

*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
**東京都八王子保健所衛生課
***東京都衛生局環境衛生部環境衛生課

調査概要

1．調査期日

Aビル　昭和58年8月2日～8月8日（冷房期）

Bビル　昭和60年2月18日～2月22日（暖房期）

2．調査項目及び分析方法

1）外気，還気，給気中浮遊粉塵量：ローボリュームエアサンプラー及びハイボリュームエアサンプラー

2）浮遊粉塵中重金属：エネルギー分散型螢光X線分析装置（2次ターゲット励起方式）

3）居室者の喫煙者率：目測法

4）変異原活性値：エームズ等の原法に基づくプレインキュベーション法[4]

5）PAH濃度：高速液体クロマトグラフ（島津LC－2型）

3）採塵方法

両ビルともほぼ同じ採塵方法であるのでAビルでの方法を図－1に示す．外気及び還気については空調機室内にハイボリュームエアサンプラー（吸引流量約1.2m³／min）を設置し，給気については室内のアネモ型吹出し口にB型ローボリュームエアサンプラー（吸引流量30l／min）を設置した。そして、午前8時より午後5時までの空調機運転時に、石英製フィルター（パールフレックスQAST2500）を用いて同時採塵を行なった。

4・試験方法

採塵後，フィルターを50％湿度のデシケータ内に一昼夜放置し，恒湿化を行なった後秤量し，採塵前のフィルター重量を差し引いて，粉塵の絶対重量を求めた．秤量したフィルターはアルミホイルで密封し，他の分析試験に供するまで－20℃に保存した．

吸引空気量については，ハイボリュームサンプラーの場合は，採取前後の流量計の値から求めた平均流量と吸引時間を積算して求めた．ローボリュームサンプラーについては乾式ガスメーターの採取前後の値から求めた．

4－2　浮遊粉塵中重金属

今回対象とした元素について，あらかじめ採塵したろ紙の各元素の螢光X線強度を測定し，このろ紙を湿式灰化後，フレームレス原子吸光法で各種重金属を定量し，この定量値の螢光X線強度を使用して検量線を作成し計算した．

4－3　居室者の喫煙者率

調査期間中任意に2～3日を選び，午前（10時頃）及び午後（15時頃）に各フロアの各部室の喫煙者数を目測し，在室者数で除して喫煙者率とした．

4－4　変異原性試験

変異原活性はエームズ試験法[5]を用いて測定した．この試験法は，ヒスチジン合成酵素の遺伝子に突然変異が起ったサルモネラ菌を用いて，試料中の変異原物質が作用すると，ヒスチジン合成能が回復する原理を利用した方法である．試料を添加したプレート上に発育する復帰変異コロニー数を計数して，試料の変異原活性を評価する．

超音波抽出法により採塵フィルターからの抽出液を供試株TA100株（塩基置換型突然変異検出株）とTA98株（フレームシフト型突然変異検出株）に作用させ，さらに代謝活性化を必要とする変異原性物質を検出するために，S9ミックスを加えた場合と，加えない場合について試験を行った．

4－5　PAH濃度

試料中に含まれているベンゾ(a)ピレン（以下B(a)Pと記す）及び同時分析が可能なベンゾ(k)フルオランテ

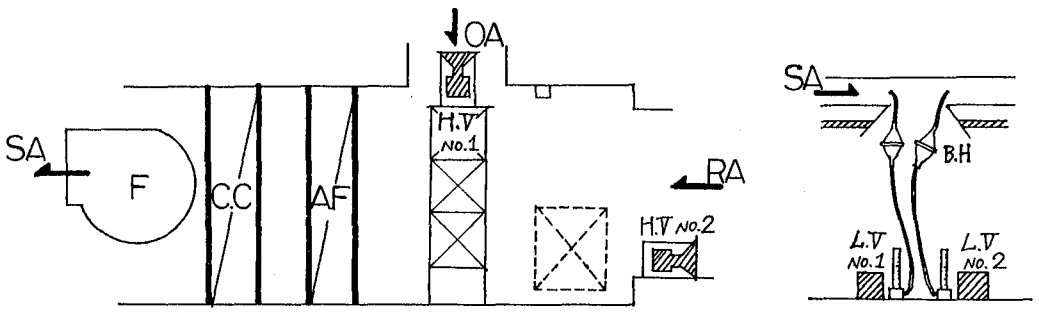


図1．試料の採取方法　（左）外気及び還気　（右）給気

SA：給気　　C.C：冷却コイル　　H.V：ハイボリュームエアサンプラー

OA：外気　　A.F：空気清浄用フィルター　　L.V：ローボリュームエアサンプラー

RA：還気　　F：送風機　　BH：B型ホルダー（フィルター装填）

ン（以下B(k)Fthと記す），ベンゾ（ghi）ペリレン（以下B（ghi）Pと記す）の3成分を，松下らの方法[6]に基づいて同定，定量を行った．すなわち採塵フィルターの一定量を細片化し，エタノール，ベンゼン溶液（1：3）に入れ超音波抽出を行った．その後遠心分離を行い，上清液に水酸化ナトリウム溶液を加え攪拌後，上層（ベンゼン層）を減圧濃縮し，その残渣を分析用試料とした．

同定は標準物質の保持時間と比較し，定量はピーク高を測定した標準物質の検量線より求めた．

結果及び考察

(1) Aビルについて

当ビルは都心の交通量頻発な街路より50m程入りこんだ7階建（延面積5500m²）の雑居ビルで，築後25年以上を経ている．空調設備は中央管理方式で，不織布使用のユニット型パネルフィルターを用いていた．

浮遊粉塵量についてみると，表－1に示すように外気濃度が0.08mg／m³，還気濃度が0.11mg／m³，給気濃度が0.10mg／m³であった．外気に比べて，還気，給気の方がやゝ高い傾向が見られたが，3系統の間に大きな差はみられず，基準値（0.15mg／m³）以下であった．粉塵中の元素分析については，重金属用のフィルターが再々破損してしまったため，採塵できず欠測とした．先の方法により当ビルの喫煙者率は日によっての変動は少なく，平均5.1％という結果であった．東京都のビル衛生検査班は都内の事務所ビルについて同様な方法による事務所ビルの喫煙者率を報告[7]しているが，それによると平均6.3±1.8％（最低4.1％，最高10.7％）である．したがってこのビルの場合は，喫煙の程度は平均的と考えられる．

変異原活性は，各系統から得られた浮遊粉塵抽出物について，試料濃度と復帰変異コロニー数の関係を求めてみた．その結果，量－反応関係が認められたので試料濃度と復帰変異コロニー数について，二次回帰分析を行ない，試料濃度200μg当りの復帰変異コロニー数を求め，その値より試料1mg当たりに換算し，最終的に吸引空気1m³当たりの数として示した（表－2）．なお，給気については試料量が少なかったので欠測とした．

表－2から明らかなように，復帰変異コロニー数は還気＞外気＞給気の順に活性値が高く，給気は外気の約1/10，還気の約1/20～1/40を示した．外気ではTA100株とTA98株の復帰変異コロニー数は，ほぼ等しい値を示し，両菌株とも代謝活性化を行った場合に高い値を示す傾向がみられた．

還気はTA100株よりもTA98株の方が高い値を示し，また，代謝活性化を行なった場合では，TA100株は高い値を示したが，TA98株は変化がなかった．これらのことより還気中には，室内発生源由来の汚染物質が再循環空調により蓄積されており，その中には代謝活性化を要する汚染質が多いことが推測された．また，還気に比べて給気中の復帰変異コロニー数が少ないことから，空調機は汚染質の除去機能をもつと考えられた．

最後に各系統別空気から採取した浮遊粉塵中のPAH濃度について表－3に示す．外気ではB(a)PとB(k)Fthの濃度に比べてB(ghi)Pの濃度が約4倍程高くみられ，還気中ではB(k)Fthが0.24ng／m³と低く，B(a)PとB(ghi)Pの濃度差は外気と比べて大きな差はみられなかった．

給気中では，また，PAHのうちB(a)P以外は，外気＞還気＞給気の順に濃度関係がみられた．還気中のB(a)Pは外気と大きな差はなかったが，量的に多い傾向であることが指差された．

表1．Aビルの浮遊粉塵量及び吸引空気量

	外気	還気	給気	
			No. 1	No. 2
全粉塵量(mg)	111.9	153.1	9.19	8.35
吸引空気量(m³)	1316.4	1411.2	96.3	95.1
浮遊粉塵量(mg/m³)	0.08	0.11	0.10	0.09

表2．Aビルの系統別変異原活性

系統	菌株	S9の有無	復帰変異コロニー数(個) 吸引空気量1m³当り
外気	TA100	－	15
		＋	22
	TA 98	－	16
		＋	20
還気	TA100	－	41
		＋	53
	TA 98	－	59
		＋	59
給気	TA 98	－	1.3
		＋	2.5

各粉塵中の3つのPAHの構成比をみると，給気と還気は同一パターンを示しており，さらに3物質とも給気は還気の約1/3に減少していることから，これらの発生源は同一のものと考えられ，かつ空調機による除去効果があるものと考えられた．

表3．Aビルの系統別多環芳香族炭化水素濃度

系統	多環芳香族炭化水素(ng/m³)		
	B(k)Fth	B(a)P	B(ghi)P
外気	0.55	0.53	1.96
還気	0.24	0.73	0.96
給気	0.09	0.25	0.36

B(k)Fth　：ベンゾ(k)フルオランテン
B(a)P　：ベンゾ(a)ピレン
B(ghi)P　：ベンゾ(ghi)ペリレン

(2) Bビルについて

当ビルは都内の商業地域に近い住宅地の一角にある自社ビルで，築後20年以上を経過しており4階建（延面積5500m²）に220人前後が勤務している．空調方式はAビルと同じであるが，調査時は冬季の温度コントロールのため，外気取入口を合板によりほとんど遮幣してあった．また，当ビルでの外気採塵は空調機内での捕集が困難であったため，3階の外気取入口側の屋上にハイボリュームサンプラーを設置して行った．

当ビルの各系統別の浮遊粉塵量を表－4に示す．今回の調査では浮遊粉塵量は外気＞還気＞給気の順に濃度関係がみられている．特に外気濃度は，同一時期の大気濃度に比べ高い値を示した．この原因の1つとして当ビルの立地環境の影響（私鉄線軌道の近接，隣接ビルの焼却用煙道口の近接）が関与しているものと思われた．

なお，表中試料No.1は前半期（2月18日午前8時より20日午前10時まで）のものであり，試料No.2は後半期（2月20日午前10時より22日午後5時まで）のもの，試料No.3は調査期間を通して採取した試料である．

浮遊粉塵中の重金属成分の濃度について表－5に示す．表中T.D.は総粉塵量を示し，前述したように外気＞還気＞給気の順に多かった．また，その各種重金属も同じ傾向を示した．外気においてFe以外の元素は，都内の大気環境の濃度とほぼ同等であったが，Feは高濃度を示し，先に述べた原因を裏づけたものと思われる．つまり当ビルの隣接直下にある私鉄軌道のレール等摩耗粉塵が捕集されたため，高濃度になったものと判断される．

喫煙者率をみるとAビルとは異なり，午前の平均が5.6%，午後の平均が1.6%と時間帯により大きな違いがみられた．Bビルは営業活動が主であるため，午前は在席者（喫煙者含む）も多いが，午後は少なかったためと考えられた．

表5．Bビルの粉塵中重金属成分濃度

μg/m³(*mg/m³)

系統	*T.D.	Fe	Ni	Cr	Mn	Pb	Zn
外気	0.16	2.30	0.08	0.03	0.07	0.17	0.25
還気	0.12	0.79	0.05	0.02	0.03	0.08	0.26
給気	0.08	0.35	0.04	0.02	0.02	0.07	0.18

*T.D. tatal dust

変異原活性をAビルと同様に表－6に示した．表中No.1は前半期，No.2は後半期の結果であるが，前半期は雨天であったためか，後半期に比べ数値が低くなっている．TA100株及びTA98株のS9ミックスを加えた場合では，粉塵量とは傾向を異にして還気＞給気＞外気の順位を示した．外気よりも還気，給気が高い活性を示したことは，先のAビル同様，主に室内発生源由来の汚染物質が，再循環空調により畜積されている結果と考える．

また，代謝活性化を必要とする復帰変更コロニー数（S9＋）と必要としない復帰変異コロニー数（S9－）で比較すると，前者では給気の測定値は外気よりも高かったが，後者の給気は外気及び還気よりも低かった．

このことは再循環空調による還気に畜積された変異原性物質は，主に代謝活性化を要する汚染質が多いことを示していると考えた．

表4．Bビルの浮遊粉塵量及び吸引空気量

	外気		還気		給気		
	No.1	No.2	No.1	No.2	No.1	No.2	No.3
全粉塵量(mg)	150.7	146.5	116.9	167.8	3.10	3.49	8.16
吸引空気量(m³)	941	916	949	1522	37.79	51.42	90.64
浮遊粉塵量(mg/m³)	0.16	0.16	0.12	0.11	0.08	0.07	0.09

表6．Bビルの系統別変異原活性

系統	菌株	S9の有無	復帰変異コロニー数(個) 吸引空気量1m³当り No.1	No.2
外気	TA100	+	70.2	80.0
		−	57.8	91.2
	TA 98	+	32.9	89.6
		−	26.9	48.3
還気	TA100	+	92.6	152.2
		−	100.4	97.2
	TA 98	+	130.6	171.1
		−	25.7	27.5
給気	TA100	+	75.6	98.0
		−	41.4	58.5
	TA 98	+	88.2	138.6
		−	14.0	16.5

復帰変異コロニー数で測定した空調機の汚染質除去値は，代謝活性化を要する汚染質には低かった．つまり給気中には，粒子状物質としては少量ではあるが代謝活性化を要する強い変異原性汚染質が残存したこと，言いかえれば，空調機では除去されにくい，かつ今回測定した3種類のPAH以外の代謝活性化を要する汚染質が存在したものと考えられる．

各系統別PAH濃度について表－7に示す．変異原活性の項でも述べたように，前半期（No.1）は雨天であったため，後半期（No.2）と比較すると，外気及び還気では3成分とも5倍前後の濃度差が認められた．

試料No.2の給気中の各成分濃度は，平均して外気濃度の約1/4，還気濃度の約1/3量を示している．これらの

表7．Bビルの系統別多環芳香族炭化水素濃度

系統	多環芳香族炭化水素(ng／m³) B(k)Fth No.1	No.2	B(a)P No.1	No.2	B(ghi)P No.1	No.2
外気	1.87	7.02	2.89	11.47	5.43	19.17
還気	0.99	5.06	1.82	13.50	3.63	17.72
給気	0.98	1.34	2.32	3.91	3.31	5.95

B(k)Fth ：ベンゾ(k)フルオランテン
B(a)P ：ベンゾ(a)ピレン
B(ghi)P ：ベンゾ(ghi)ペリレン

値を空調機によるPAH汚染質の除去値と考えると，Bビル空調機の汚染質除去値は，先のAビルとほぼ同等であった．しかし，各汚染質の濃度はAビルの時と比較して非常に高濃度であった．この原因の1つとして季節による大気中PAH濃度の違いが考えられた．菅ら[8]は大気中のPAHは冬季の方が夏季よりも8倍程度濃度が高いと報告している．したがって調査時期が冬季であった今回は，外気濃度の関与が大きいと考えた．

また，隣接ビルの焼却炉用排気口が外気サンプリング地点に近接していたことも，相当影響したものと考えられた．

最後に個々に述べてきた汚染質について，外気濃度を100とした時の還気，給気の割合を図－2に示した．

粉塵量及びPAH量には外気＞還気＞給気の濃度差がみられることから，程度の差はあるが現在使用の空調機フィルター（パネル型不織布）により汚染質は捕集，除去されていると判断した．変異原活性は特にTA100株及びTA98株でS9ミックスを加えた場合に，還気において活性が高くなっていることが示されており，B(a)P以外の変異原性の強い汚染質の存在が指差された．

ま と め

今回の2つのビルでの実態調査の結果をまとめてみると次のようなことがあげられる．

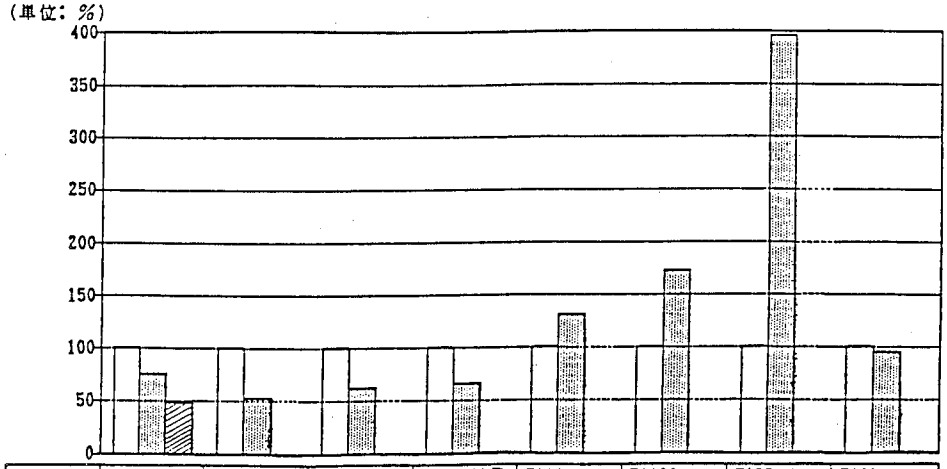
1）取り入れ外気の浮遊粉塵量は，ビルの立地環境に左右され，特にBビルでは高濃度であったが，現在の空調設備でも十分に捕集，除去されており給気口での濃度は，Aビルと同じく基準値（0.15mg／m³）を越えることはなかった．

2）Bビルの浮遊粉塵量には，近接鉄道レール摩耗粉塵が影響し，元素分析の結果，高濃度のFeが測定された．

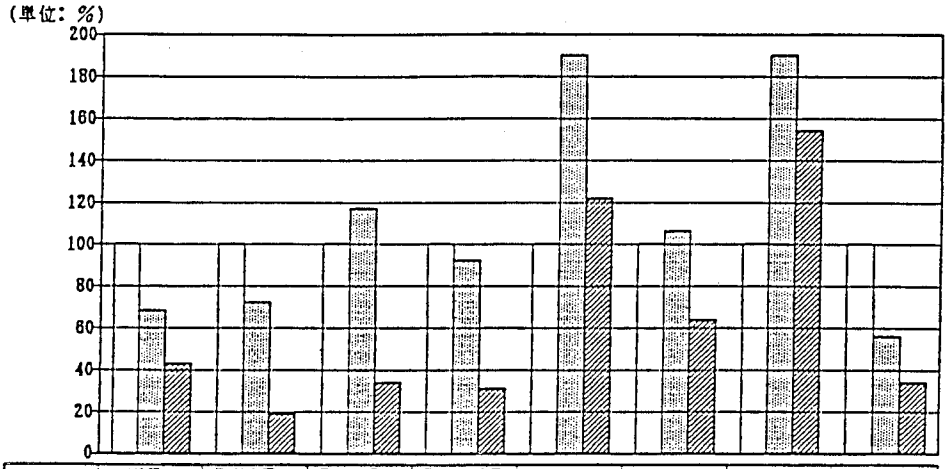
3）喫煙者率は両ビルで差異がみられれたが，汚染質との関係については言及できなかった．

4）変異原活性はA，Bビルとも還気中の活性値が高く，またS9ミックスを加えた場合の方が，加えない場合よりも高い値を示した．このことは，主に再循環空調による代謝活性化を必要とする変異原性物質の蓄積，及びこれらの汚染質に対する空調機の機能による結果と考えられた．

5）室内空気のPAH濃度は季節及び立地環境を受け，なかでもB(a)Pは還気中の濃度がA，Bビルとも他系統に比べ高かった．これは室内由来の発生源（例えばタバコの煙など）の影響があるものと推察された．また，



	粉塵量	B(k)F	B(a)P	B(ghi)P	TA100+	TA100−	TA98 +	TA98 −
外気	100	100	100	100	100	100	100	100
室気	75	53	62	66	131	173	396	95
給気	50	—	—	—	—	—	—	—



	粉塵量	B(k)F	B(a)P	B(ghi)P	TA100+	TA100−	TA98 +	TA98 −
外気	100	100	100	100	100	100	100	100
室気	68	72	117	92	190	108	190	56
給気	43	19	34	31	122	64	154	34

図2．Bビルにおける空調系統別の各項目割合
（上段　試料No.1，下段　試料No.2，－は欠測）

給気中PAHは還気中の1/3～1/4に減少しており，フィルターによる除去効果と考えた．

謝　辞　今回の調査に際し，対象ビルの選定等に御尽力いただいた東京都衛生局環境衛生課ビル衛生検査班の長良健次氏及び下山勇氏並びに同検査班各位に深謝いたします．

（本研究は昭和60年度当研究所調査研究課題「大気中の浮遊粉塵に関する調査研究」の一部として実施し，概要は日本公衆衛生学会第44回大会1985年10月で発表した）

文　献

1）ビル管理ハンドブック編集委員会編：ビル管理ハンドブック，昭和57年９月

2）鈴木庄亮：空気環境の基準，建築雑誌，96（1185），15--18，(1981)

3）東京都衛生局環境衛生課編：ビル衛生管理講習会資料，23－32，昭和59年度

4）後藤純雄他：大気浮遊粉じんの変異原性モニタリング用超音波抽出法，大気汚染学会誌，17，53－57（1982)

5）D.M.Maron and B.N.Ames : Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, Mutation Res., 113，173－215（1983)

6）松下秀鶴他：高速液体クロマトグラフィーによる大気浮遊粉じん中のベンゾ(a)ピレン簡易分析法，分析化学，30，362－368（1981)

7）仁科彰則他：事務所における在室者の変動と喫煙量について，第40回日本公衆衛生学会講演集，487，昭和56年10月

8）菅　邦子他：高速液体クロマトグラフィーによる大気浮遊粉じん中の多環芳香族炭化水素の迅速分析法，大気汚染学会誌，17(２)，117－125（1982)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 331-335, 1986

東京湾の環境汚染モニタリング調査（第4報）昭和59年度スズキおよびウミネコの調査結果について

瀬戸　博*，加納尭子*

Survey of Chemical Pollutants in Biota from Tokyo Bay (IV) Residue Levels in Japanese Sea Bass and Gull in 1984

HIROSHI SETO*, and TAKAKO KANOH*

The levels of 36 chemical pollutants in japanese sea bass (*Lataolabrax japonicus*) and black-tailed gull (*Larus crassiorostris* Vieillot) collected from Tokyo Bay in 1984 were determined. Fifteen chemicals were detected in the fish muscle. During the investigation period (1978−1984), decreasing tendencies on the levels of PCB, BHCs, DDTs, heptachlorepoxide and HCB in the fish muscle were apparent. On the other hand, the levels of "chlordanes" and chlorobenzenes showed almost the same height as previously observed (1983).

CR was defined as the ratio of concentration of certain pollutants in the gull to the sea bass. β−BHC, HCB, PCB, dieldrin and nonachlor were highly accumulated in the gull compared with the sea bass (CR 7～72). In contrast, low CR values were obtained for chlordane, p, p′−DDT, α−BHC, 1, 2, 4−TrCB and DCB (CR 0.3～2). Although the CR value is a simple index, it is useful to estimate the tendency of accumulation of a pollutant.

Keywords: pollution, chlorinated hydrocarbon, sea bass, gull

環境中における化学物質の安全性を点検することは保健対策上重要である．1978年以来，東京湾の環境汚染モニタリング調査が実施され，スズキ (*Lataorabrax japonicus*) およびウミネコ (*Larus crassirostris* Vieillot) 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[1−3]．

それによると，スズキでは1978年から1983年までの6年間でPCB，BHC類，DDT類，ディルドリンは減少傾向を示し，使用禁止措置の効果が認められた．一方，最近汚染が憂慮されているクロルデン類はすべての検体から検出された．クロルデン類の1982，1983年両年度の蓄積濃度はほぼ同程度でPCBを除けば汚染物質の中で最も高いレベルにあることが判明した．また，他水域の魚類からはほとんど検出されていない塩素化ベンゼン類（ジクロロベンゼン，1，2，4−トリクロロベンゼン）が東京湾のスズキからは高い頻度（5／5）で検出された．

このように，東京湾の環境汚染状況は変化しつつあるので，新しい環境汚染へ対応し，健康への影響を未然に防止するために本調査内容を充実し，継続的に監視していく必要がある．

本報告は昭和59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59年9月，千葉県富津沖で捕獲された25尾を重量の順に5尾ずつまとめ5検体とした．ウミネコは，昭和59年5月から8月にかけて羽田空港付近で捕獲された若鳥を重量の順に6～7羽ずつまとめ5検体とした．鑑定および試料の調製は既報[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　環境庁で定めた分析法[4]により行った．詳細な操作法，分析条件は報告書[5]に記載した．

分析した化学物質は36種類である．使用した略号は既報[1,2]と同様である．

*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

Table 1. Constitution of the Sample (Sea Bass) and Water and Fat Contents of the Muscle. (n = 5)

group No.	body weight(g)	lenght*(cm)	water(%)	fat(%)
1	458± 8	30.4±1.1	76.4	1.94
2	436± 8	29.6±0.4	76.5	2.44
3	413± 6	28.8±0.6	76.8	2.46
4	381±17	28.6±1.1	77.1	2.71
5	339±14	26.9±1.1	76.9	2.20
mean	405.0	28.9	76.7	2.35

*: 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 lenght*(cm)	water(%)	fat(%)
1*	male	668±28	36.7±0.7	65.1	6.40
2	male	639± 6	35.9±2.0	68.4	6.52
3	male	614± 8	36.6±0.8	67.8	6.38
4	male	572±10	35.3±1.1	69.5	6.20
5*	female	522±40	34.4±0.6	65.9	7.37
mean		603.0	35.8	67.3	6.57

*: n = 6

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.

PCB濃度は，0.11ppmで前年とほぼ同様だが，この数年間をみると漸減傾向が認められる．昭和59年度の環境庁の調査結果[6]をもとに，他水域のスズキと比較すると濃度の順位は1．瀬戸内海 (0.68)，2．大阪湾 (0.58)，3．四万十川河口 (0.28)，4．山陰沖 (0.13)，5．東京湾 (0.11)，6．薩摩半島西岸 (0.04) ( ) 内平均値ppmで，東京湾は5番目であった．ディルドリン，DDT類も減少しており，5年前の1／4～1／20程度となった．HCB，α－BHC，ヘプタクロルエポキシド (HCE) は検出されなかった.

一方，ジクロロベンゼン，1，2，4－トリクロロベンゼンは前年同様すべての検体から検出された．その濃度は前年とほぼ同程度であった．また，クロルデン類もひきつづき比較的高いレベルにある．検出例数の多いt－ノナクロルについて他水域のスズキ[6]と比較すると濃度順に1．大阪湾 (0.064)，2．山陰沖 (0.020)，3．四万十川河口 (0.016)，4．東京湾 (0.010)，5．薩摩半島西岸 (0.006)，6．瀬戸内海 (0.005)，( ) 平均値ppm，であった．瀬戸内海を除けば，PCBの順序とほぼ共通している．クロルデンは農薬としては使用禁止され，主としてシロアリ駆除用に輸入，使用されている（昭和57年，1680トン）．毒性の強さから本物質の環境汚染には特に注意する必要があると思われる．また，塩素化ベンゼン類についても，現在のところ他水域の魚介類からはほとんど検出されていない[6]が継続的な監視が必要であろう.

ウミネコについて β－BHCは昨年 (0.072ppm) の半分程度に下がったが，他の汚染物質は同程度か増加した．クロルデン類の濃度レベルはウミネコにおいても高くPCBに次ぐ汚染物質である（DDEはDDTの代謝分解物であり除く）．また，本年初めてペンタクロロベンゼンが検出された（検出率4／5）．1，2，4－トリクロロベンゼンの検出頻度も前年より高くなった（1／5→5／5）.

ウミネコは昆虫，カエル，イカ，小魚を食べ[7]，食物連鎖のうえで魚類よりも高次の捕食者である．そのため，化学物質の蓄積程度は一般に魚類よりも高い．スズキも

Table 3. Concentrations of Pollutants in Muscle Tissues of Sea Bass and Black-Tailed Gull.

(ppm on wet weight basis)

compound	Sea Bass		Black-Tailed Gull	
	range	mean	range	mean
PCB	0.07−0.15	0.11	1.6−2.3	2.0
PCN	nd*1	nd	nd	nd
α−BHC	nd	nd	nd	nd
β−BHC	nd	nd	0.033−0.055	0.043
γ−BHC	nd	nd	nd	nd
δ−BHC	nd	nd	nd	nd
aldrin	nd	nd	nd	nd
dieldrin	0.001	0.001	0.022−0.037	0.029
endrin	nd	nd	nd	nd
o,p′−DDT	nd	nd	nd	nd
p,p′−DDT	0.001−0.002	0.002	nd	nd
o,p′−DDE	0.001	0.001	0.001	0.001
p,p′−DDE	0.008−0.011	0.009	0.43−0.58	0.48
o,p′−DDD	nd	nd	nd	nd
p,p′−DDD	0.003−0.005	0.004	nd	nd
heptachlor	nd	nd	nd	nd
HCE	nd	nd	0.018−0.026	0.021
t−chlordane	0.002−0.004	0.003	0.001	0.001
c−chlordane	0.005−0.008	0.007	0.007−0.010	0.008
t−nonachlor	0.008−0.011	0.010	0.13−0.20	0.17
c−nonachlor	0.003−0.005	0.004	0.035−0.057	0.041
oxychlordane	0.001	0.001	0.023−0.049	0.038
DnBP	nd*2	nd	nd	nd
DEHP	nd*2	nd	nd	nd
TBP	nd*1	nd	nd	nd
o−DCB	0.02−0.07	0.04	0.03−0.07	0.05
m−DCB	0.02−0.09	0.04	0.03−0.08	0.05
p−DCB	nd−0.01	−	nd−0.01	−
1,2,3−TrCB	nd	nd	nd	nd
1,2,4−TrCB	0.001−0.006	0.002	0.002−0.005	0.004
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−0.001	−
HCB	nd	nd	0.010−0.014	0.012

nd : <0.001, *1 <0.01, *2 <0.1

肉食性で小魚類を食べている[8]. したがって両者の化学物質濃度を比較すれば, 生体内での安定性, すなわち蓄積性に関する指標を得ることができると考えられた. Table 5 に両者の化学物質濃度比 (CR) を示した. その数値は巾があり, 大きく 3 つのクラスに分けることができる. CR が 1 程度, すなわち両者の濃度にあまり差がないもの(B)を中心に, ウミネコで濃度が高いもの(A)と逆に低いもの(C)である.

CR は前年と比べあまり変動しない. β−BHC, HCB, ヘプタクロルエポキシド等はウミネコでよく蓄積される. クロルデン類のうちノナクロルもかなり蓄積性があることがわかる. しかし, クロルデン, 特に t−クロルデン

Table 4. Trends in Chlorinated Hydrocarbon Residues in Sea Bass Collected from Tokyo Bay. (ppm)

compound	1979*	1980*	1981*	1982*	1983*	1984
PCB	0.4	0.3	0.75	0.31	0.12	0.11
HCB	0.002	0.002	nd−0.001	nd−0.001	0.001	nd
α−BHC	0.002	0.005	0.006	0.004	nd	nd
dieldrin	0.012	0.011	nd−0.001	0.004	0.002	0.001
p,p'−DDE	0.037	0.052	0.043	0.014	0.009	0.009
p,p'−DDT	0.028	0.007	nd	0.002	0.001	0.002
DCBs	−	nd	nd	nd	0.07	0.08
1,2,4−TrCB	−	nd−0.001	0.004	nd	0.001	0.002
t−chlordane	−	−	−	0.003	0.003	0.003
c−chlordane	−	−	−	0.007	0.007	0.007
t−nonachlor	−	−	−	0.011	0.012	0.010
c−nonachlor	−	−	−	0.004	0.004	0.004
oxychlordane	−	−	−	0.004	0.001	0.001

＊：data from ref. 3 and 9. −：not determined.

Table 5. Concentration ratios of pollutants.

class A(≧5)			class B(0.8～4.9)			class C(≦0.7)		
compound	'83	'84	compound	'83	'84	compound	'83	'84
β−BHC	72	>43	*c*−chlordane	1.9	1.1	*t*−chlordane	0.3	0.3
p,p'−DDE	46	53	1,2,4−TrCB	1.0	2.0	*p,p'*−DDD	0.3	<0.3
oxychlordane	36	38	*o,p'*−DDE	1.0	1.0	*p,p'*−DDT	<1.0	<0.5
HCB	26	>12	*m*−DCB	1.0	1.1	α−BHC	<0.5	−
HCE	22	>21	*p*−DCB	<1.0	1.0			
PCB	16	18	*o*−DCB	0.8	1.1			
dieldrin	13	29						
t−nonachlor	9	17						
c−nonachlor	7	10						

Concentration ratio is defined as ; ratio of concentration of pollutant in gull to that in sea bass.

のCRは0.3程度でウミネコ体内では分解されやすいことを示している．代謝産物であるオキシクロルデン濃度が高いことがこれを裏付けている．同様のことが*p,p'*−DDT，*p,p'*−DDD，*p,p'*−DDEの関係についてもいえる．このようにCRは簡単に求められる数値でありながら，生体内での分解性，蓄積性を知る指標として非常に有用である．CRを用いれば，未同定の蓄積性物質を検索する際にも効率的である．今後は人体への蓄積についても，この考え方を進め，検討していきたいと考えている．

謝辞 本調査のため試料採取等御尽力いただいた衛生局医療福祉部公害保健課各位に感謝いたします．

文　　献

1）瀬戸　博，加納堯子：東京衛研年報，34,260,1983
2）瀬戸　博，加納堯子：東京衛研年報，35,316,1984
3）瀬戸　博，加納堯子：東京衛研年報，36,300,1985
4）環境庁編：生物試料中化学物質系統分析法，1984
5）東京都立衛生研究所：昭和59年度生物指標環境汚染測定調査報告書，1985
6）環境庁編：化学物質と環境，No11,1985
7）清棲幸保：野鳥の事典，337
8）檜山義夫編：日本産魚類大図鑑，155,1982,講談社
9）環境庁編：化学物質と環境No. 6 ,1980～No. 10,1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 336-342, 1986

NO_2とO_3の長期複合曝露がラットにおよぼす生化学的影響

大澤誠喜*, 鈴木孝人*, 池田真悟*, 渡辺伸枝*,
加納堯子*, 溝口勲

Biochemical Findings of Tissues of Rats Exposed to NO_2 and O_3

MASANOBU OHSAWA*, TAKAHITO SUZUKI*, SHINGO IKEDA*, NOBUE WATANABE*,
TAKAKO KANOH* and ISAO MIZOGUHI*

Rats were exposed to 0.1 ppm ozone (O_3) only, to a mixture of 0.1 ppm O_3 and 0.3 ppm nitrogen dioxide (NO_2), to a mixture of 0.1 ppm O_3 and 0.15 ppm NO_2 and to 0.15 ppm NO_2 only for 3, 12 and 24 months. Biochemical changes of the lung, liver and serum of these rats were examined.

In the lung, the increases of activity levels of glutathione peroxidase (GP), glutathione reductase (GR), glycogen phosphorylase (GPase), β-glucuronidase (β-Gl) and amylase were observed. On the other hand, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) fluctuated and phosphoglucomutase (PGM) and lactate dehydrogenase (LDH) remained unchanged during the period of exposuse. In the liver, the increases of activity levels of PGM, β-Gl and amylase and the decreases of activity levels of GR and G-6-PD were observed, and GP, GPase and LDH were unchanged. In the serum, the activity levels of alkaline phosphatase (ALP) and the content of glucose (Glu) increased. The decreases of activity levels of glutamic oxaloacetate transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), amylase and leucine aminopeptidase (LAP) were observed. These significant changes decreased in the order of (0.1 ppm O_3+0.3 ppm NO_2) > (0.1 ppm O_3+0.15 ppm NO_2) > (0.1 ppm O_3) > (0.15 ppm NO_2). These results suggest that exposure to O_3 and/or NO_2 affects the glycometabolic enzymes in the lung and liver, and that the variation of activity levels in serum is suspected to be the result of the disturbance of the liver function.

Keywords: nitrogen dioxide, ozone, glutathione peroxidase, glutathion reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glycogen phosphorylase, phosphoglucomutase, lactate dehydrogenase, β-gluconidase,.

緒　言

二酸化窒素 (NO_2) とオゾン (O_3) は主要な大気汚染物質であり，それらの大気環境濃度は都市部において長期にわたって横ばい傾向が続いている．

NO_2とO_3の単独曝露による生体影響についての報告は数多くなされているが，NO_2とO_3の複合作用を検討したものは比較的少なく，しかも，それらの報告は比較的高濃度での短期曝露実験である．

前回，著者らは，NO_2単独(0.3, 0.5, 0.1ppm)の長期曝露実験(18ケ月)を行った[1]．その結果，NO_2濃度が0.5ppm以上で肺臓，肝臓，および血清中の各種酵素活性に変動が認められたので，今回はこれらの酵素活性を指標として，NO_2(0.15, 0.3ppm)とO_3(0.1ppm)の長期曝露の影響を調査し，NO_2単独曝露による影響とは若干異なる知見が得られたので報告する．

実験方法

実験動物はF344／DuCrjラット(♂, 5週令)を用い，0.1ppm O_3単独群(A群)，0.30ppmNO_2+0.1ppm O_3複合群(B群)，0.15ppmNO_2+0.1 ppm O_3複合群(C群)，0.15ppm NO_2単独群(D群)，および対照群(E群)に分け，既報[1]の装置を用いて2年間にわたる曝露を行った．なお，O_3は昼間の8時間／日，NO_2は24時間／日の曝露を

*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

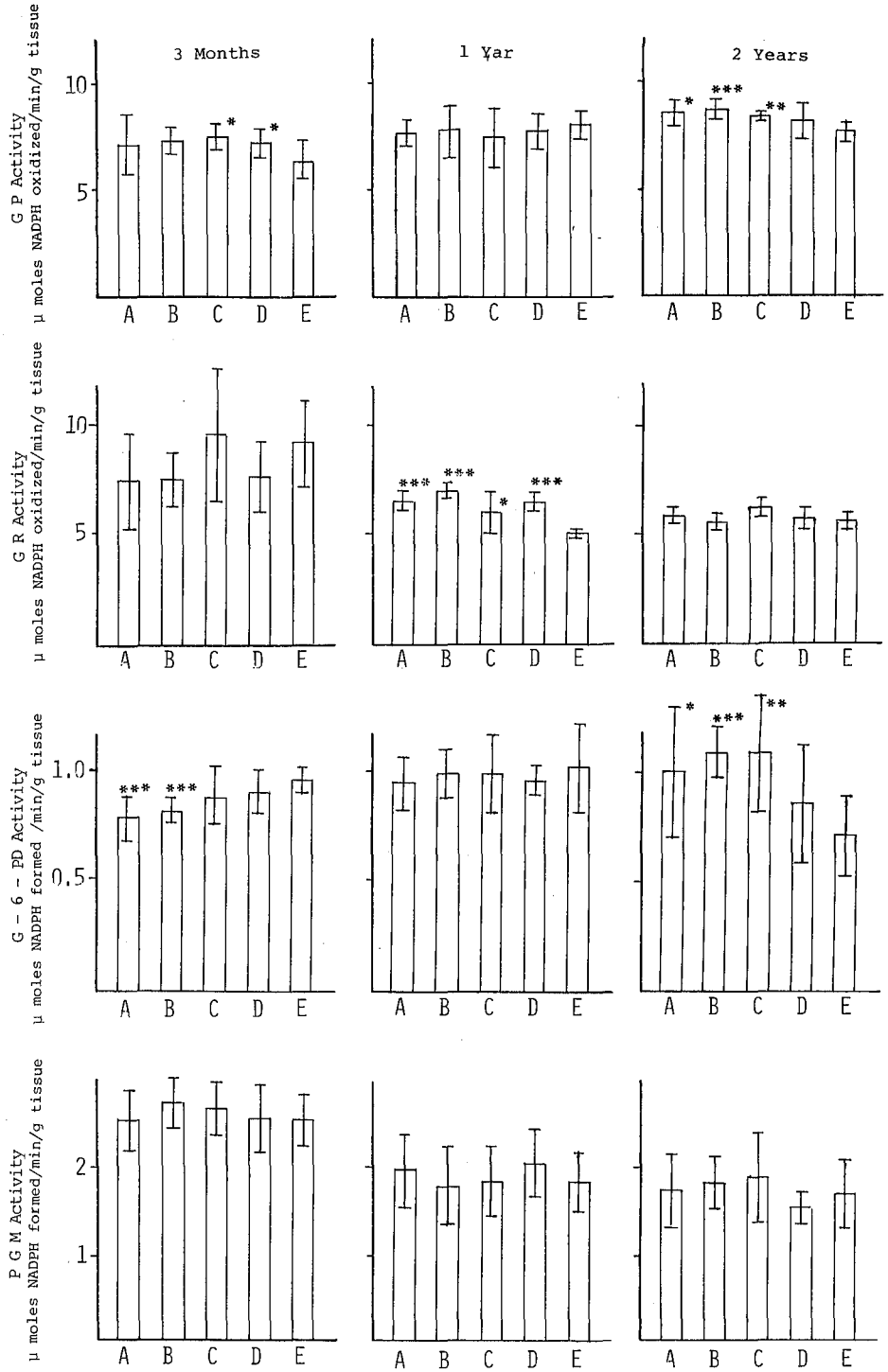


Fig. 1. Changes of Various Enzyme Activities per Gram of Lung on Rats Exposed to O_3 and/or NO_2 at Each Exposure Period

A : 0.1ppm O_3, B : 0.3ppm NO_2+0.1ppm O_3, C : 0.15ppm NO_2+0.1ppm O_3, D : 0.15ppm NO_2, E : Control, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$

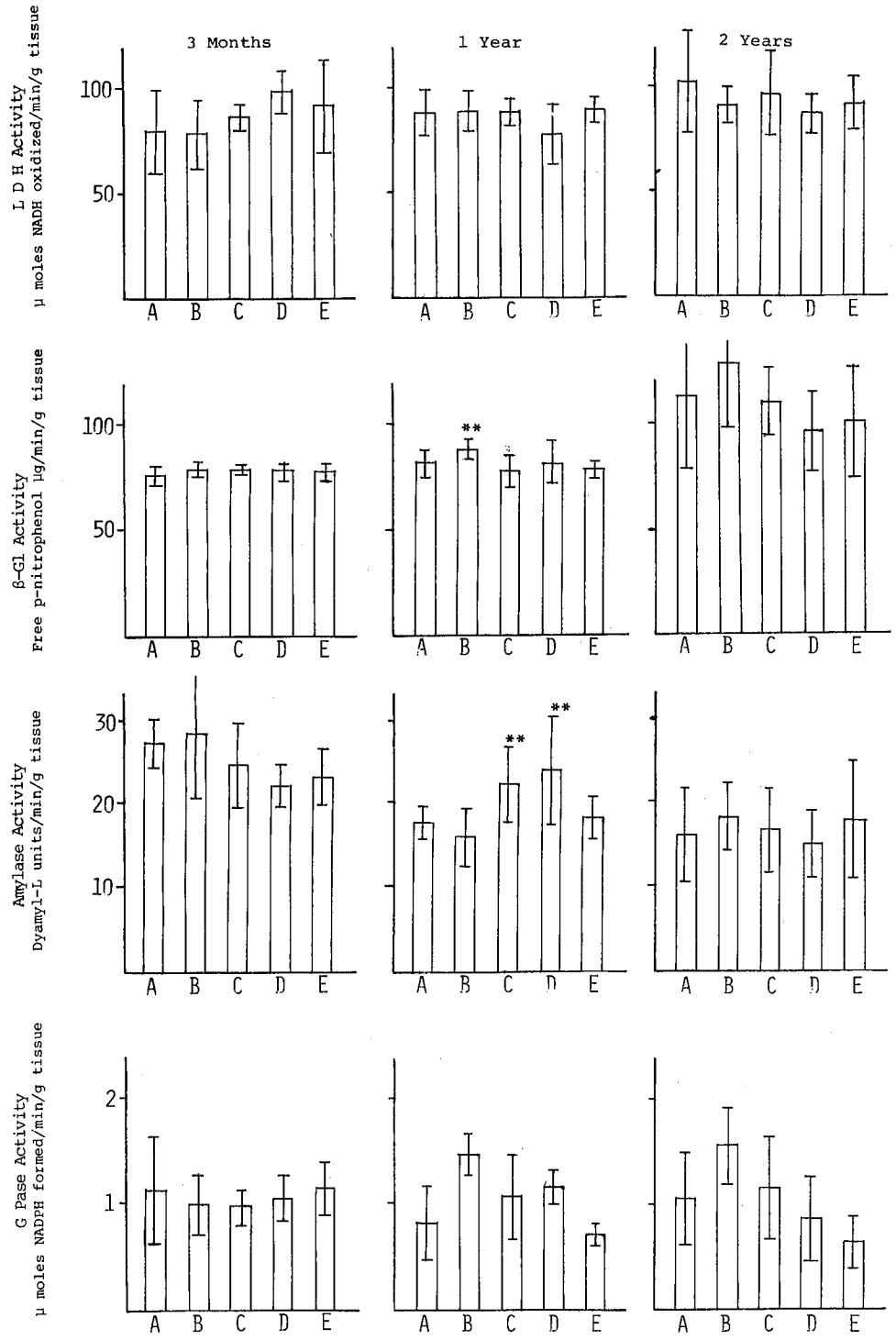


Fig. 2. Changes of Various Enzme Activities per Gram of Lung on Rats Exposed to O_3 and/or NO_2 at Each Exposure Period

A : 0.1ppm O_3, B : 0.3ppm NO_2+0.1ppm O_3, C : 0.15ppm NO_2+0.1ppm O_3
D : 0.15ppm NO_2, E : Control, * : $P<0.05$, ** : $P<0.01$, *** : $P<0.001$

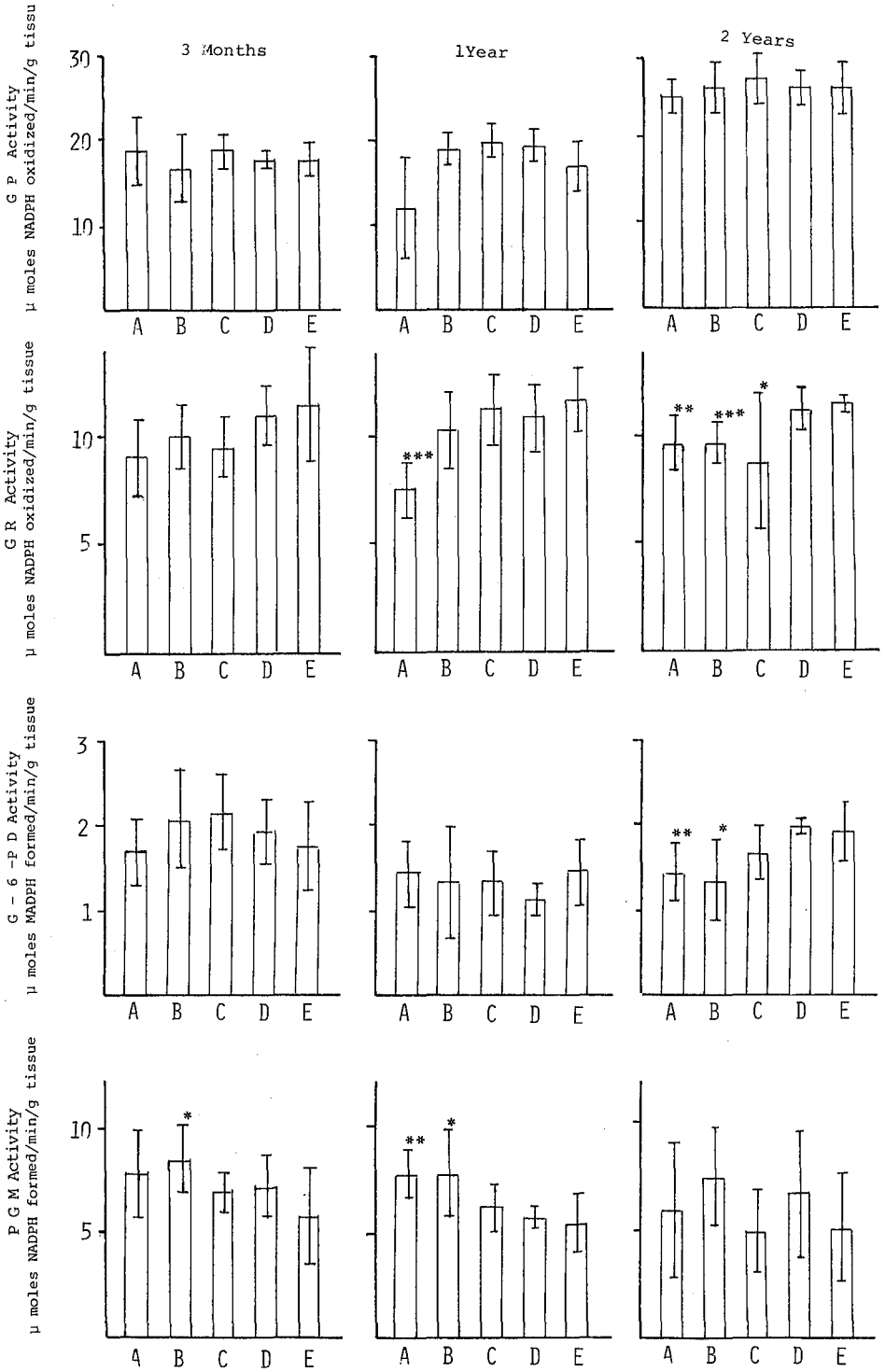


Fig. 3. Changes of Various Enzyme Activities per Gram of liver on Rats Exposed to O_3/or NO_2 at Each Exposure Period

A : 0.1ppm O_3, B : 0.3ppm NO_2+0.1ppm O_3, C : 0.15ppm NO_2+0.1ppm O_3
D : 0.15ppm NO_2, E : Control, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$

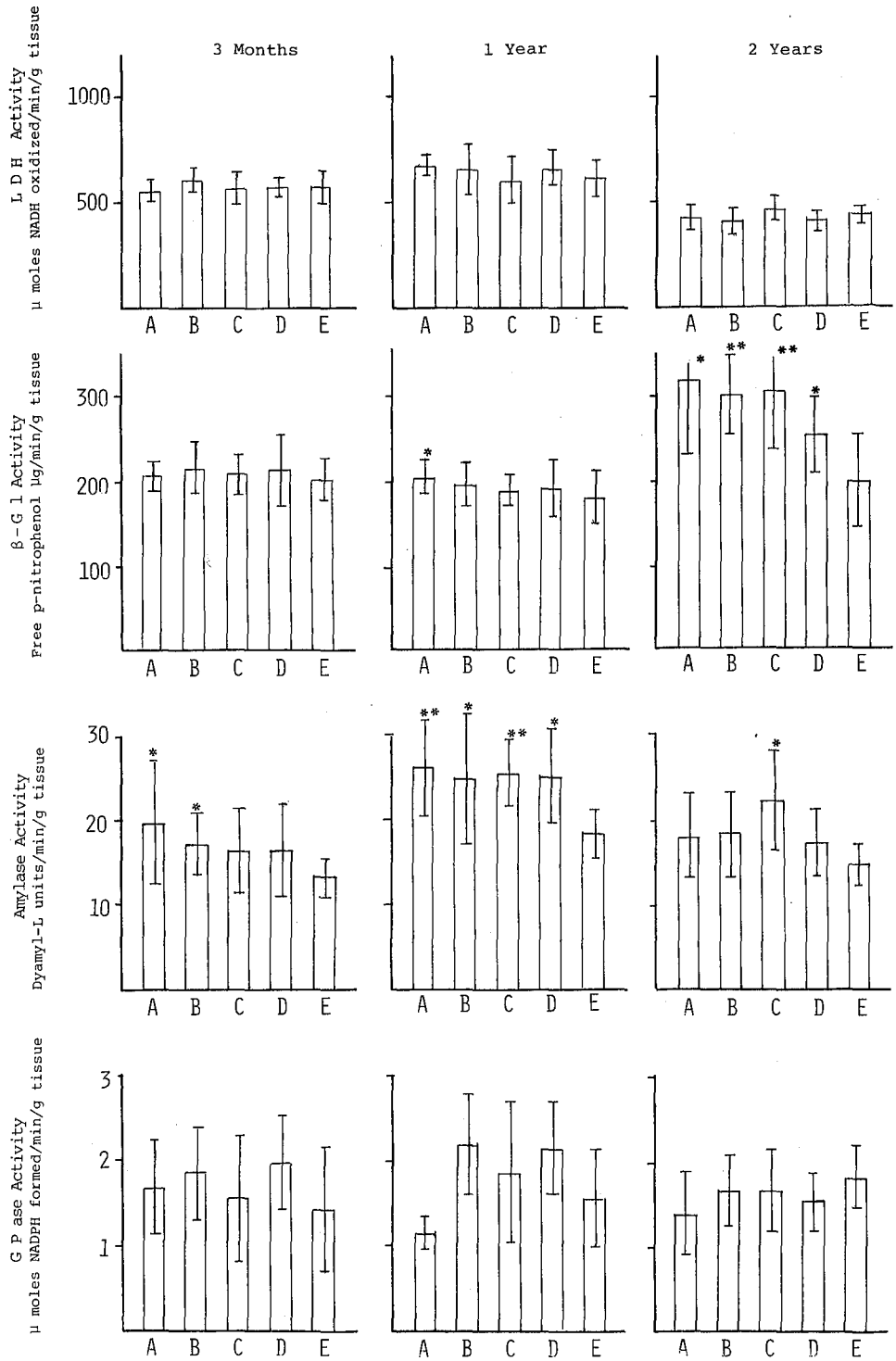


Fig. 4. Changes of Various Enzyme Activities per Gram of Liver on Rats Exposed to O_3 and/or NO_2 at Each Exposure Period

A : 0.1ppm O_3, B : 0.3ppm NO_2+0.01ppm O_3, C : 0.15ppm NO_2+0.1ppm O_3
D : 0.15ppm NO_2, E : Control, * : $P<0.05$, ** : $P<0.01$, *** : $P<0.01$

した.

動物は，曝露3ケ月目，1年目，および2年目に各群より無作為に8匹を選び，屠殺し，組織を採取，前報に準じて試料を調製，測定した.

結果と考察

曝露ラットの体重，肺臓，肝臓，副腎，および心臓の臓器重量には対照群と比較して有意な差はみられなかった．また，肝臓，および肝臓の蛋白質含量にも有意な差は認められなかった.

肺臓における各酵素活性の変化を図1と図2に示した．対照群と比較して有意な酵素活性上昇がみられたのは，3ケ月目では，Glutathione Peroxidase (GP，C群とD群)，1年目では，Glutathione Reductase (GR，A～D群)，Glycogen Phosphorylase (GPase，B群とD群)，β－glucuronidase (β－Gl，B群)，およびAmylase (C群とD群)であった．また，2年目では，GP (A～C群) Glucose－6－phosphate (G－6－PD，A～C群)とGpase (A～C群)であった．一方有意な活性低下が認められたのは，3ケ月目のG－6－PD (A群とB群)であり，Phosphoglucomutase (PGM) と Lactate Dehydrogenase には有意な活性変化は認められなかった.

肝臓における酵素活性の変化を図3と図4に示した．対照群と比較して有意な活性上昇を示したのは，3ケ月目ではPGM（B群）とAmylase（A群とB群）であり，1年目ではPGM（A群とB群），β－Gl（A群），Amylase（A～D群）である．また，2年目ではβ－Gl（A～D群）とAmylase（C群）であった．一方，有意な活性低下が認められたのは，1年目のGR（A群）と2年目のGR（A～C群），およびG－6－PD（A群とB群）であった．また，肝臓のGP，LDH，およびGPaseには有意な活性変化は認められなかった.

さらに，血清での変化を図5に示した．対照群と比較

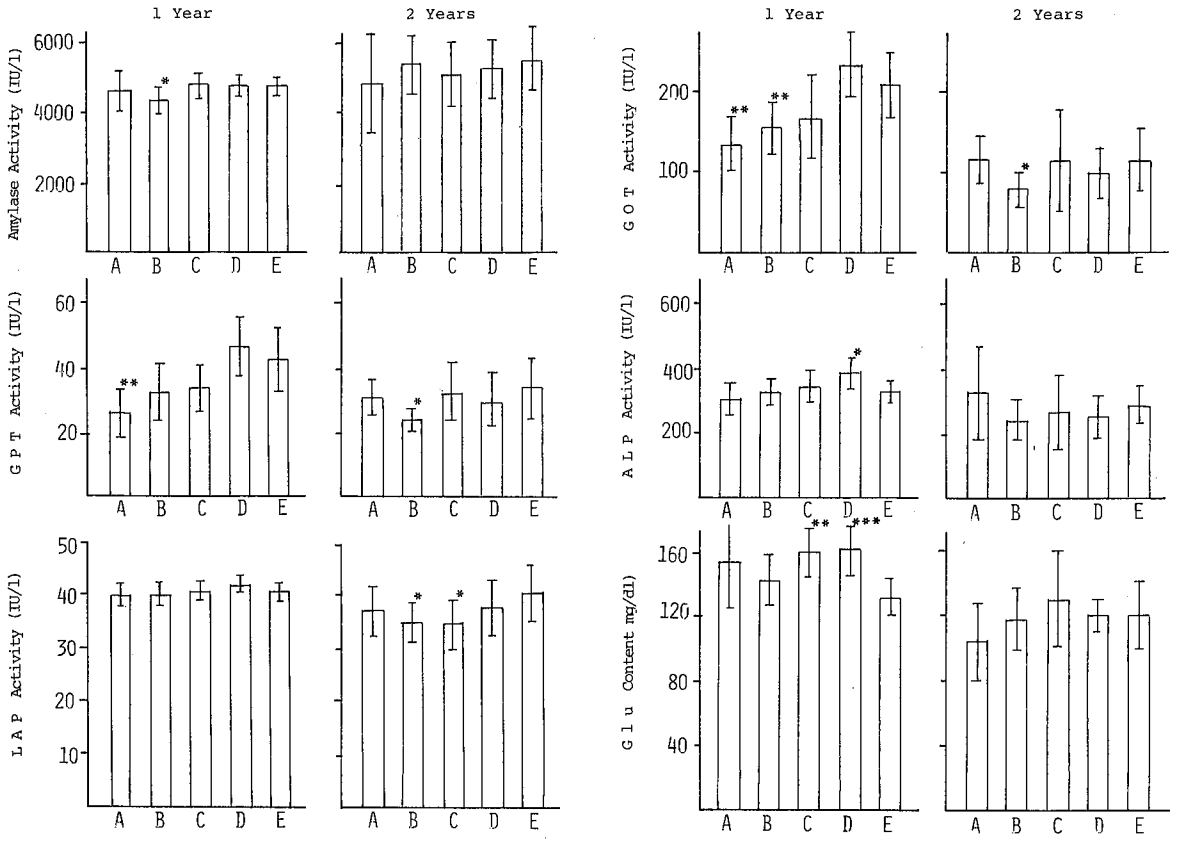


Fig. 5. Changes of LAP Activitty and Glu Content of Serum on Rats Exposed to O_3 and/or NO_2 at Each Exposure Period

A：0.1ppm O_3，B：0.3ppm NO_2+0.1ppm O_3，C：0.15ppm NO_2+0.1ppm O_3

D：0.15ppm NO_2，E：Control，＊：$p<0.05$，＊＊：$p<0.01$，＊＊＊：$p<0.001$

して有意な上昇を示したのは，1年目ではAlkaline Phosphatase(ALP，D群)とGlucose(Glu，C群とD群)であり，一方，有意な低下を示したのは，1年目でGlutamic Oxaloacetate Transaminase(GOT，A群とB群)，Glutamic Pyruvic Transaminase(GPT，A群)，Amylase(B群)であった．また，2年目ではGOT(B群)，GPT(B群)と，Leucine Aminopeptidase(LAP，B群とC群)であった．

これらの肺臓，肝臓，および血清における変化は，特に，B群において有意な変化を示す項目が認められ，その変化はB群＞C群≒A群＞D群の順であった．また，O_3やNO_2による影響の寄与度については，O_3とNO_2の複合曝露による相加的作用が認められる項目には，GPase(肺)，β－Gl(肺)とLAP(血清)があげられる．

一方，O_3の作用による影響が主であると思われるものは，GP(肺)，GR(肺と肝)，G－6－PD(肺と肝)，PGM(肝)，β－Gl(肝)，Amylase(肝)，GOT(血清)とGPT(血清)で，総体的に判断すると，NO_2による影響よりもO_3による影響の方が大きかった．

このことから，混合曝露の場合の各種酵素活性に与える影響は，O_3濃度(0.1ppm)とNO_2濃度(0.15，0.3ppm)では，O_3の作用の方が強いものと考えられる．

前回のNO_2(0.3，0.5，.0ppm)の単独での曝露実験で，各酵素活性に有意な変動が認められた最低NO_2濃度は0.5ppmであったが，今回は0.15ppm NO_2単独曝露群(D群)で，GP(肺)，GR(肺)，GPase(肺)，Amylase(肺と肝)，β－Gl(肝)，Glu(血清)とALP(血清)に有意な変化が認められた．その変化は殆んど曝露後1年以降に現われることから，これらの結果には動物の加令による影響も考慮する必要があろう．しかし，0.1ppm NO_2を6ケ月間曝露されたマウスの肺に形態学的変化が認められるという報告[2]，さらに，0.04ppm NO_2曝露のラットで，9ケ月目以降に呼気中のエタン産出量と血清中のGlu含量の増加を示す報告[3,4]から考えると，0.15ppm NO_2濃度の曝露によって影響を受けることも充分に考えられる．

(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) 鈴木孝人，大澤誠喜，狩野文雄，福田雅夫，笠原利英，寺田伸枝，溝口　勲：東京衛研年報，32－1，238，1981
2) Port, C. E.: J. Toxico, Environ. Health, 2, 589, 1977
3) 嵯峨井　勝：国立公害研究所研究報告，31，95，1981
4) 市瀬孝道，鈴木　明，局　進一：国立公害研究所研究報告，15，241，昭和54年度

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 343-348, 1986

飲料用タンク水から検出された大腸菌群とその塩素，熱抵抗性

古畑勝則*，松本淳彦*

Isolation of Coliform Bacteria from Chlorinated Drinking Tank Water, and Resistance of Isolates for Chlorine and Heat

KATSUNORI FURUHATA* and ATSUHIKO MATSUMOTO*

Keywords：飲料用タンク水 drinking tank water, 大腸菌群 coliform bacteria, 残留塩素 residual chlorine, 塩素抵抗性 chlorine resistance, 熱抵抗性 heat resistance

緒　言

大腸菌群は糞便汚染の指標細菌として重要な意義を持っている．飲料水から大腸菌群が検出されることは，その水が恒温動物の糞便により汚染され，同時に消化器系伝染病の病原菌が混在している可能性があることを意味している．このため水道法水質基準では大腸菌群は“検出されないこと”となっている．

水質試験でいう大腸菌群は，乳糖を分解して酸とガスを産生するグラム陰性の無芽胞桿菌（好気性または通性嫌気性）を総称しているが，この定義では *Escherichia* 属をはじめ，*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* 等の腸内細菌や，*Aeromonas* 属，*Plesiomonas* 属，*Vibrio* 属などの広範囲の細菌類まで含まれることになる．しかし，*Escherichia coli*（Ⅰ型）を除くと他のほとんどは，元来，土壌中や水中を生息場所としている菌種であるため，糞便汚染とは直接関係がない場合が多い[1,2]．このため，糞便由来の大腸菌群のみを汚染の指標細菌とする考えが強くなっている[3,4]．反面，飲料水に関してはこの考え方を危険視する向きもあり，WHO の飲料水水質ガイドライン（1984）では大腸菌群と糞便性大腸菌群の両者を水質基準に採用している[5]．

ビル，マンション等多くの中高層建築物における飲料水は，受水槽，高置水槽を経由したいわゆる簡易専用水道水（以下，“タンク水”と称す）である．このような給水施設は1984年の統計で，全国におよそ61万ケ所あると言われている[6]．これら給水施設の衛生的維持管理については，1970年に“建築物における衛生的環境の確保に関する法律（通称ビル管理法）”が制定されている．また，1977年には水道法の一部が改正され，受水槽の有効容量が20立方メートルを越えるものを簡易専用水道として，その設置者に衛生的管理が義務付けられた[7]．さらに，1986年11月からは10立方メートルを越えるものも対象とされ，法的規制の範囲が拡大されることになった[6]．以前からこれら様々な給水施設における衛生管理の不備がしばしば問題視されてきたが[8-10]，小規模のものほど実態が明らかになっていない．

これらのタンク水は細菌学的な安全性の面から，給水栓の末端で0.1mg／*l* 以上の遊離残留塩素が保持されていなければならず[11]，水質基準には一般細菌と大腸菌群が試験項目に定められている[12]．

ところで，日常の検査において，これらのタンク水から大腸菌群がしばしば検出され，水質基準に不適合となる場合がみられている．そこで，東京都内のタンク水を対象に細菌学的検査を実施し，大腸菌群の汚染状況を調査するとともに，検出された大腸菌群の菌種を調べ，タンク水の汚染経路について考察を行った．また，残留塩素が存在しているタンク水から検出された大腸菌群は，糞便由来の大腸菌群とは塩素に対する抵抗性が異なることも推察されたので，分離菌株の塩素抵抗性について若干の検討を行った．

材料および方法

1．材料　1）供試水　1985年4月から1986年3月にかけて，水道法水質基準試験のため当研究室に搬入されたタンク水，3,240試料について調査を実施した．これらの試料は，水を十分流してから給水栓を火炎滅菌したのち，チオ硫酸ナトリウム入滅菌ポリエチレン容器

*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

(100ml容) に採水されたものである．なお，採水時にオルトトリジン法により残留塩素濃度を測定した．

2）**供試菌株**　タンク水から分離した *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *E. intermedium*, *Serratia liquefaciens*, および糞便からの分離株 *Escherichia coli* の各1株，計6株を用いた．

2．**方法**　1）**大腸菌群の分離同定**　大腸菌群の検査法は上水試験方法[11]に従った．なお，確定試験で陽性となったBGLB発酵管から1白金耳量をEMB培地に画線塗抹して，37℃，24時間培養し，平板上に形成された形態の異なる集落について完全試験を行った．大腸菌群と確認された菌株はOF試験を行い，発酵的に糖を分解したものをブドウ糖発酵性桿菌同定用キット（IDテスト，EB−20，日水）により菌種の同定を行った．また，それぞれの分離菌株についてEC試験を行った．すなわち，EC培地を用いて44.5℃で24時間培養しガス産生を調べた．

2）**塩素抵抗性試験**　各供試菌6株を標準寒天培地で37℃，20時間培養し，これを集菌して滅菌生理食塩水に浮遊させた．内容300mlコルベンに蒸留水200mlを入れて常法により高圧蒸気滅菌した．これに上記の菌液を希釈して加え，菌数が10^5／mlになるように調整した．次に，次亜塩素酸ナトリウム溶液を滅菌蒸留水で希釈して残留塩素濃度が0.1mg／lになるように添加した．随時攪拌しながら室温（25±1℃）にて一定時間接触させたのち，直ちに1mlをシャーレに取って標準寒天培地で混釈した．37℃で24時間培養後の生菌数を求めた．同時にオルトトリジン法により残留塩素濃度を測定した．対照として次亜塩素酸ナトリウム溶液無添加のものを用いて同様に行った．なお，各菌株について2回試験を実施し，その平均値を測定値とした．

3）**熱抵抗性試験**　上記と同様な方法により滅菌蒸留水1,000mlに10^5／mlの菌数になるように菌液を添加し，ガスバーナー上で加熱した．随時攪拌しながら50，60，70℃に達したとき，直ちに，それぞれの1mlを取って標準寒天培地により生菌数を測定した．同時に，各温度に達するまでの所要時間を計った．なお，室温（25±1℃）に放置したものを対照とした．試験は各菌株について2回ずつ行った．

結　果

1．**タンク水の残留塩素濃度**　調査したタンク水の残留塩素を表1に示した．すべての試料に残留塩素が存在し，0.1〜1.0mg／lの濃度範囲内にあった．全体の41％の試料は0.5〜0.6mg／lであった．

表1．タンク水の残留塩素濃度と大腸菌群検出状況

残留塩素濃度 (mg/l)	検査試料数	大腸菌群検出試料数	検出率 (%)
0.1〜0.2	124	5	4.0
0.3〜0.4	871	13	1.5
0.5〜0.6	1,327	13	1.0
0.7〜0.8	715	12	1.7
0.9〜1.0	203	9	4.4
合　計	3,240	52	1.6

2．**大腸菌群の検出状況**　大腸菌群は3,240試料中，52試料（1.6％）から検出された（表1）．これを残留塩素量と対比すると，0.1〜0.2mg／lと0.9〜1.0mg／lの濃度範囲のタンク水から比較的高率に検出され，それぞれの検出率は4.0，4.4％とやや高かった．0.3〜0.4，0.5〜0.6，0.7〜0.8mg／lにおいては，いずれも1.0〜1.7％の検出率であった．

試料50mlを10mlずつ5本の試験管で培養した結果，確定試験の陽性管数は（1＋）が52試料中30試料（57.7％）と最も多く，次に（2＋）と（5＋）がそれぞれ7試料（13.5％），（3＋）が6試料（11.5％），（4＋）が2試料（3.8％）であった．これを最確数表から菌数に換算すると，タンク水100ml中に2〜16個の大腸菌群が存在していることになった．

表2．月別大腸菌群検出状況

年・月	検査試料数	大腸菌群検出試料数	検出率 (%)
1985. 4	271	10	3.7
5	275	6	2.2
6	272	6	2.2
7	275	8	2.9
8	271	5	1.8
9	268	4	1.5
10	274	1	0.4
11	248	7	2.8
12	272	2	0.7
1986. 1	266	0	0
2	269	2	0.7
3	279	1	0.4
合　計	3,240	52	1.6

表3．タンク水から分離された大腸菌群の菌種

菌種	分離株数	EC試験陽性株数
Klebsiella pneumoniae	26	2
K. oxytoca	11	0
Klebsiella sp.	2	0
Enterobacter cloacae	15	0
E. intermedium	7	0
E. sakazakii	1	0
Serratia liquefaciens	9	0
Kluyvera cryocrescens	2	0
K. ascorbata	1	0
Citrobacter freundii	1	0
C. amalonaticus	1	0
Escherichia adecarboxylata	1	0
合計	77	2

大腸菌群の検出状況を月別に表2に示した．1月の検査では検出されなかったが，毎月0.4～3.7%の割合で検出され，特に水温の上昇する季節に高頻度に検出される傾向はみられなかった．

3．検出された大腸菌群の菌種　52試料のタンク水から分離された77株の大腸菌群は，表3に示したように6属12種に分類された．*Klebsiella* 属が最も多く，なかでも *K. pneumoniae* が26株，66.7%で，次に *K. oxytoca* が11株，28.2%であった．*Enterobacter* 属は30%を占め，このうち *E. cloacae* が65.2%，*E. intermedium* が30.4%であった．また *Serratia liquefaciens* が11.7%，その他，*Kluyvera cryocrescens*, *K. ascorbata*, *Citrobacter freundii*, *C. amalonaticus*, *Escherichia adecarboxylata* が1.3～2.6%と低率ながら分離された．しかし，糞便中の優占構成菌種である *E. coli* は1株も分離されなかった．

これら大腸菌群の検出状況と残留塩素濃度との関係を表4に示した．*K. pneumoniae* は0.1～1.0mg／*l* までの広範囲に渡って検出されているが，ことに0.3～0.8mg／*l* で検出率が高かった．この傾向は *K. oxytoca* についても同様であった．*E. cloacae* と *E. intermedium* は，0.5mg／*l* 以上の濃度の試料から多く検出される傾向があった．また，*S. liquefaciens* は0.7mg／*l* 以上の試料から多く検出された．このように残留塩素が十分存在しているにもかかわらず，様々な大腸菌群が検出された．

同一タンク水から1菌種のみならず多種類の菌種が同時に検出されるものもあった．表5に示したように，1菌種のみが検出された試料が32と最も多く61.5%であった．なかでも *K. pneumoniae* であるものが11試料あった．*K. oxytoca* あるいは *S. liquefaciens* のみ検出されたものが

表4．タンク水から分離された大腸菌群の菌種と残留塩素濃度

菌種	残留塩素濃度 (mg/*l*)					合計
	0.1～0.2	0.3～0.4	0.5～0.6	0.7～0.8	0.9～1.0	株数
Klebsiella pneumoniae	2	7	4	8	5	26
K. oxytoca	1	4	3	2	1	11
Klebsiella sp.	0	0	1	1	0	2
Enterobacter cloacae	2	3	1	5	4	15
E. intermedium	0	1	3	2	1	7
E. sakazakii	0	0	0	0	1	1
Serratia liquefaciens	1	1	1	3	3	9
Kluyvera cryocrescens	0	0	1	1	0	2
K. ascorbata	0	0	1	0	0	1
Citrobacter freundii	0	1	0	0	0	1
C. amalonaticus	0	0	0	1	0	1
Escherichia adecarboxylata	0	1	0	0	0	1
合計株数	6	18	15	23	15	77

それぞれ5試料あった．次に2菌種が検出されたタンク水は17試料，32.7%であった．これらは *K. pneumoniae* と *E. cloacae* の共存が6試料，*K. pneumoniae* と *K. oxytoca* であるものが2試料あった．その他，*K. pneumoniae* と *S. liquefaciens*, *K. pneumoniae* と *E. intermedium* 等の共存であった．3菌種が検出されたのは2試料で，これらは *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. intermedium* および *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *S. liquefaciens* であった．5菌種（*K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *K. cryocrescens*, *C. amalonaticus*, *Klebsiella* sp.）が同時に検出されたものが1試料あった．

表5．タンク水1試料中から分離された大腸菌群の菌種構成

	菌種	試料数
Ⅰ	1菌種	32
	K. pneumoniae	11
	K. oxytoca	5
	S. liquefaciens	5
	E. cloacae	4
	E. intermedium	4
	K. ascorbata	1
	E. adecarboxylata	1
	Klebsiella sp.	1
Ⅱ	2菌種	17
	K. pneumoniae, *E. cloacae*	6
	K. pneumoniae, *K. oxytoca*	2
	K. pneumoniae, *S. liquefaciens*	1
	K. pneumoniae, *E. intermedium*	1
	K. pneumoniae, *C. freundii*	1
	K. pneumoniae, *E. sakazakii*	1
	K. oxytoca, *E. cloacae*	1
	K. oxytoca, *S. liquefaciens*	1
	K. oxytoca, *E. intermedium*	1
	K. oxytoca, *K. cryocrescens*	1
	E. cloacae, *S. liquefaciens*	1
Ⅲ	3菌種	2
	K. pneumoniae, *E. cloacae*, *E. intermedium*	1
	K. pneumoniae, *E. cloacae*, *S. liquefaciens*	1
Ⅵ	5菌種	1
	K. pneumoniae, *E. cloacae*, *K. cryocrescens*, *C. amalonaticus*, *Klebsiella* sp.	1
	合計	52

これらの結果をみると，残留塩素が存在するタンク水の多くから *K. pneumoniae* が頻繁に検出されており，単独であったり，他の大腸菌と共存していることもあり，検出率の高い菌種であった．

4．糞便性大腸菌群試験（EC試験） 分離された77株の大腸菌群をEC培地により44.5℃で培養したところ，*K. pneumoniae* の2株のみ（2.6%）がガスを産生し，糞便性大腸菌群であった（表3）．

5．大腸菌群の塩素抵抗性 タンク水から分離された *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *K. oxytoca*, *S. liquefaciens*, *E. intermedium* のそれぞれ1菌株について塩素に対する抵抗性を調べた結果，これらの大腸菌群は糞便由来の *E. coli* に比べて塩素に対する抵抗性が強いことがわかった（図1）．すなわち，遊離残留塩素0.1mg／*l* 濃度において，*E. coli* が100%死滅するまでの時間はわずかに1分間であったが，タンク水分離株はいずれもこれより長時間を要した．なかでも *S. liquefaciens* が最も強い抵抗性を示し，100%死滅するまでに15分もの時間を必要とした．次いで *E. intermedium* が5分間，*K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *K. oxytoca* が3分間で死滅した．

対照として使用した塩素無添加の実験水では20分経過しても菌数の変動は認められなかった．なお，添加した0.1mg／*l* の残留塩素は試験終了まで残存していた．

6．大腸菌群の熱抵抗性 塩素抵抗性試験に供試した菌種について熱抵抗性を調べた．

タンク水からの分離菌株と比較菌として用いた *E. coli* はいずれも類似した傾向を示した．すなわち，室温（25℃）から50℃まではほとんど菌数に変化はなく，10^5／ml であったが，60℃になると急激に減少（99.9%以上死滅）し，70℃に達するとすべて死滅した．なかでも *K. pneumoniae* と *E. intermedium* は60℃で100%死滅し，とくに後者は50℃で99%以上が死滅した．

室温（25℃）に放置した場合（対照）は菌数の変化はみられなかった．なお，これらの実験水が50，60，70℃に達するまでの所要時間はおよそ7，9，11分であった．

考察

残留塩素が存在するタンク水（簡易専用水道）から時折大腸菌群が検出されたため，これらの種構成と塩素耐性について若干の検討を行った．

試験したタンク水は，すべて水道法により規制を受け

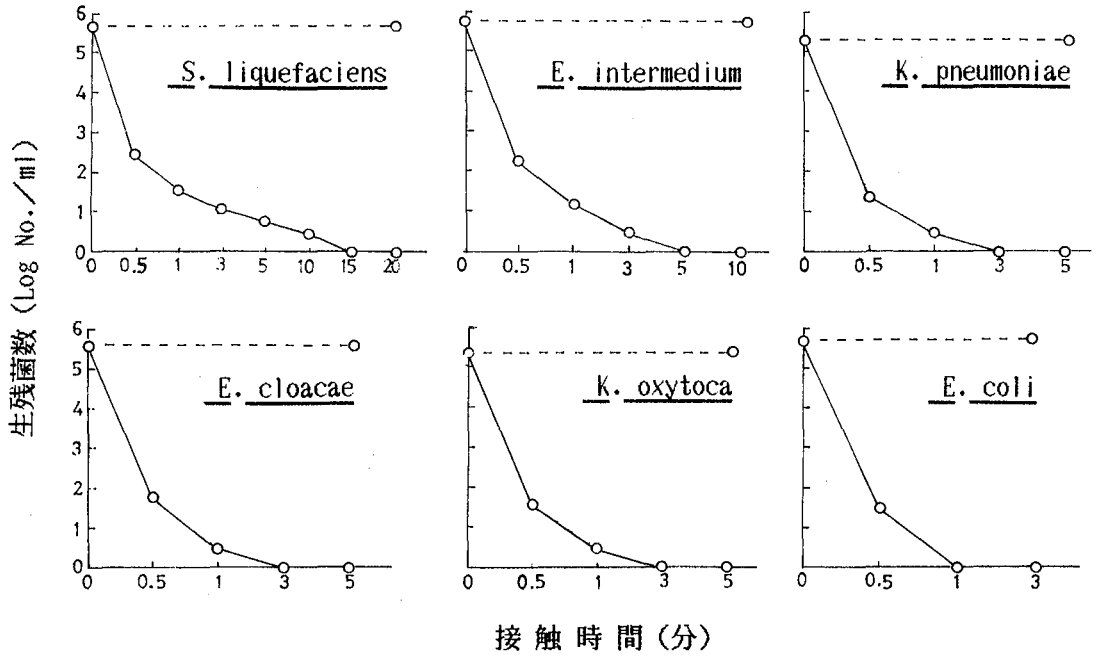


図1．残留塩素0.1mg／l（水温25℃，pH7.5）における各大腸菌の生残曲線
----対照（次亜塩素酸ナトリウム無添加）

ている簡易専用水道であり，いずれも0.1mg／l以上の残留塩素が存在していたため，消毒効果は十分であろうと思われた．ところが，これらのタンク水からも低率（1.6%）ながら大腸菌群が検出された．菌数は100ml中に2～16個と少なかったが，種構成はやや複雑であり，6属12種に分類することができた．すなわち*Klebsiella*属，*Enterobacter*属がそれぞれ3種，*Citrobacter*属と*Kluyvera*属が2種ずつ，*Serratia*属，*Escherichia*属が各1種であった．なかでも最も検出頻度が高かったのは*K. pneumoniae*であり，26試料のタンク水から検出された．次いで*E. cloacae*の検出率が高く，15試料であった．この検出率が高かった2菌種については，すでにPtakら[13]（1973），Seidlerら[14]（1977），Talbotら[15]（1979），Goshkoら[16]（1983）も残留塩素の存在する水道水中からしばしば検出されることを報告している．

*K. pneumoniae*と*E. cloacae*は，ともにヒトの糞便中にも存在する菌種である[17]．糞便から分離されるこれらの菌株の多くは，44.5℃の高温培養で良好に増殖することが知られている[18,19]．一方，自然環境から分離される菌株には，同じ温度条件で増殖を示すものが非常に少ないといわれている[18,20-23]．今回，タンク水から分離された菌株のうち，44.5℃培養において，乳糖を分解しガスを産生したものは*K. pneumoniae*だけであり，しかも26株のうち2株のみ（7.7%）であった．したがって，タンク水が糞便によって汚染されていることは非常にまれなことであると思われ，むしろこれらの大腸菌群は，土壌などの自然環境に由来する場合がほとんどを占めていると考えられた．

これら残留塩素が存在するタンク水から検出された大腸菌群の塩素に対する抵抗性をみたところ，水道法に定められている最下限の0.1mg／l濃度では，糞便由来の*E. coli*よりやや抵抗性を示したものの3分から5分で殺菌された．ところが*S. liquefaciens*のみは15分間と長く，塩素耐性が強かった．

ReillyとKippinは[24]，残留塩素が存在する水道水から分離される大腸菌群には莢膜が形成されており，これによって塩素耐性を示すものと考えた．彼らは実際に莢膜を形成している*K. pneumoniae*や*E. cloacae*を分離し，耐塩素性について実験を行っている．その結果，遊離残留塩素が1.2mg／lある水道水中でも4時間は生存可能であることを明らかにした．また，Ptakら[13]やGoshkoら[16]は，*K. pneumoniae*が菌体表面に粘液層を形成し，給水施設のスライムや沈殿物に付着あるいは侵入するため，水道水中でも長時間生存できるのであろうと推察している．

このことに関して，著者らもタンク水からの分離菌株

77株について人工培地で培養し，莢膜の有無を調べてみたが，いずれの菌株にも莢膜は確認できなかった．しかし，莢膜の形成は培地の組成や培養条件等に影響を受けることが知られており，塩素の存在するタンク水の自然環境とは異なることが推測される．今後，生息環境等の変化による大腸菌群の莢膜形成と耐塩素性について検討する予定である．

要　約

残留塩素が存在する簡易専用水道水から検出された大腸菌群について検討を行った．

1）大腸菌群は3,240試料中52試料（1.6%）から検出されたが，その菌数は2～16個／100ml と非常に少なかった．また，残留塩素が0.1～0.2mg／l および0.9～1.0mg／l の濃度範囲から4.0%，4.4%とやや高率に検出された．

2）分離された77株の大腸菌群は，*Klebsiella* 属と *Enterobacter* 属が大半を占めた．なかでも，*K. pneumoniae*, *E. cloacae* の検出頻度が高かった．他に *K. oxytoca*, *S. liquefaciens*, *E. intermedium* なども多く，合計6属12種に分類された．

3）EC 培地による44.5℃の培養でガス産生が認められたものは *K. pneumoniae* の2株のみ（2.6%）であった．

4）分離菌株の塩素抵抗性は糞便由来の *E. coli* よりもやや強かった．遊離残留塩素0.1mg／l，pH7.5，25℃の条件における100%死滅時間は，*E. coli* の1分に対して，*S. liquefaciens* が15分，*E. intermedium* は5分，*K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *K. oxytoca* は3分であった．

5）熱に対する抵抗性はいずれも *E. coli* と同様に弱かった．60℃に加温されると急激に殺菌され，70℃で100%死滅することが確認された．

文　献

1）坂崎利一：モダンメディア，16,308,1970
2）上野英世：用水と廃水，19,555,1977
3）環境庁水質保全局：水質環境基準検討報告書，1983
4）谷本浩一：日本公衆衛生雑誌，31,199,1984
5）World Health Organization : *Guidelines for drinking-water quality*, Vol. 1 ,1984
6）小林康彦：水道協会雑誌，55,29,1986
7）日本水道協会：水道維持管理指針，251,1982
8）高橋孝則，尾上洋一，森　實：神奈川衛研研究報告，第11号，63,1981
9）本多浩一，他：東京都衛生局学会誌，第74号，86,1985
10）前田正憲，他：東京都衛生局学会誌，第75号，88,1985
11）日本水道協会，厚生省監修：上水試験方法，904,1985年版
12）大蔵省：官報，第15490号，1978
13）Ptak, D. J., Ginsburg, W. and Willey, B. F. : *J. AWWA*, 65,604,1973
14）Seidler, R. J., Morrow, J. E. and Bagley, S. T. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 33,893,1977
15）Talbot, H. W., Morrow, J. E. and Seidler, R. J. : *J. AWWA*, 71,349,1979
16）Goshko, M. A., Pipes, W. O. and Christian, R. R. : *J. AWWA*, 75,371,1983
17）光岡知足：腸内菌の世界，20,1980,叢文社，東京
18）Bagler, S. T. and Seidler, R. M. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 33,1141,1977
19）古畑勝則，松本淳彦：東京衛研年報，36,326,1985
20）Duncan, D. W. and Razzell, W. E. : *Appl. Microbiol.*, 24,933,1972
21）Brown, C. and Seidler, R. J. : *Appl. Microbiol.*, 25,900,1973
22）Knittel, M. D. : *Appl. Microbiol.*, 29,595,1975
23）Dufour, A. P. and Cabelli, V. J. : *J. WPCF*, 48,872,1976
24）Reilly, J. K. and Kippin, J. F. : *Jour. of the New England Water Works Association*, 94,24,1980

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 349-355, 1986

Comparative Study on Trace Elements Levels in Drinking Water of Jos in Nigeria and Several Japanese Areas

YOSHITERU TSUCHIYA*, GREGORY. A. UBOM**, CHIYOICHI NODA***, HIDEO SASANO* and ISAO MIZOGUCHI*

Distribution of trace elements was determined in the water samples from water works (raw, treated and tap water), surface water and underground water in Jos area of Plateau State. Concentrations of the dissolved species were compared with water qualities of several Japanese surface and underground waters. Values of trace elements such as Cu (0.001−0.009mg/l), Cd (0.001mg/l) and Pb (trace−0.006mg/l) detected in tap water of Jos area were similar to those of Tokyo metropolis.

Diagrams of water characteristics were drawn by plotting the figures of concentrations of Na, K, SO_4, Cl, NO_3, SiO_2, Ca and Mg in surface water. The diagram of Jos was extremely small compared with the diagram of Tokyo metropolis and average value of world river water. It was noted that most elements in the surface water of Jos area were dissolved at very low concentrations. On the other hand, the diagram of well water in Jos area showed a different pattern from that of surface water; that is, each element in well water was detected at a high concentration. Especially, NO_3 ion was detected higher than in Japanese well water.

Though Plateau State has many mines, result of this examination indicates that they have no effect on the water quality since Sn, Cd, Pb and Cu were not detected in surface and underground waters.

Keywords: drinking water, surface water, underguound water, trace element, iodide, water quality

Introduction

Trace element levels of surface and underground waters which are used for drinking in Jos, Plateau State were examined. There are relatively few published studies about the water quality of surface and underground waters in Africa. It is interesting limnologically to know the water characteristics of western African surface (lake, river, spring and reservoir) and underground waters because the composition of dissolved elements varies with the nature of soil.

Plateau State, especially around jos area, has many tin mines producing cassuterite (Sno_2), tin pyrites (Cu_2SnFeS_4) etc as ores. It is likely that Sn is to dissolve in surface and underground waters. Besides, Cu, Mn, Cd, Pb etc may have some effects on water qualities in the same area. In Nigeria containing Plateau State, there have been incidences of endemic goiter due to some environmental factors such as diet, quality of drinking water and geological formation. It has been said that the distribution of endemic goiter was associated with deficiency of iodide in water. Therefore, we were interested in the behavior of iodide in drinking water of Jos area.

The distribution of the elements ; 12 cations, 6 anions, PH, turbidity, color, surfactant, coliform and fecal coliform, were determined in sources of drinking water around Jos such as lake, river, spring, reservoir and well water. For the evaluation of water quality of drinking water in Jos area, the comparison with water quality of Japanese drinking water collected around Tokyo metropolis was attempted.

*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of public Health.
24− 1. Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
**Faculty of Medical Sciences, University of Jos
***Institute for Agricultural and Biological Sciences Okayama University

Table 1. The Result of Physiochemical Analysis of the Water on JOS, PLATEAU STATE

	PH	Turbidity	Color	NO_3	F	Cl	I	SO_4	SiO_2	Na	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu	Cd	Pb	AS	Sn	Surfactant	Coliform (n/1ml)	MPN (n/100ml)
Water Purification Plants																								
SHEN Dam (Raw)	6.7	50	120	1.5	0.27	0.3	0.6	0.4	8.9	1.7	1.9	3.6	0.4	2.1	0	0.02	0	0	0	0	0	0	45	23
(Treat.)	6.7	3	5	2.8	0.26	1.0	0	14.1	7.2	1.7	1.5	8.4	0.3	0.04	0	0.02	0	0	0	0	0	0	30	0
(Tap)	6.1	4	8	1.0	0.20	0.7	0	12.6	7.7	1.7	1.5	11.2	0.2	0.23	0.01	0.13	0.001	0.001	tr	-	0	-	-	-
VOM (Raw)	6.4	40	80	1.5	0.09	0.6	0	0.4	8.4	1.7	1.5	1.6	0.3	0.54	0	0.04	0	0	0	0	0	0	65	79
(Treat.)	5.9	3	5	1.5	0.03	1.7	0	36.8	7.3	9.6	1.5	7.2	0.4	0	0.06	0.14	0	0	0	0	0	0	30	0
(Tap)	6.0	-	-	-	-	-	-	-	-	3.1	2.3	3.0	1.8	0.68	0.01	0.09	0.003	0	0	0	0	-	-	-
LAMINGO Dam (Raw)	6.5	6	24	0	0.10	0.2	1.8	0.7	11.5	1.9	2.0	2.7	0.3	0.18	0.01	0.02	0	0	0	0	0	0	89	0
(Treat.)	6.4	4	6	0	0.14	0.2	3.1	0.8	11.0	1.8	1.3	2.9	0.3	0.46	0.01	0.04	0	0	0	0	0	0	46	33
(Tap)	6.1	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1	1.5	1.4	tr	0.48	0.11	0.79	0.007	0	0.004	-	0	-	-	-
LIBERTY Dam (Raw)	6.4	8	96	0.1	0.12	0.3	2.4	0.2	7.8	1.2	1.4	2.9	0.5	0.51	0.02	0.03	0	0	0	0	0	0	45	79
(Treat.)	6.8	8	48	0.1	0.12	0.3	0.8	1.3	7.5	1.3	1.5	4.6	0.5	0.51	0	0.05	0	0	0	0	0	0	30	0
(Tap)	6.7	-	-	-	-	-	-	-	-	1.3	1.3	5.0	0.5	0.24	0.04	1.02	0.009	0.001	0.006	-	0	-	-	-
Lake 1.	6.5	4	12	0.07	0.22	0.2	7.6	0.1	5.1	1.1	0.8	2.3	0.3	0.09	0	0.02	0	0	0.001	0	0	0	100	0
2.	6.4	8	20	0.06	0.26	0.2	1.5	0.2	5.6	1.1	0.8	2.0	0.3	0.12	0	0.03	0	0	0	0	0	0	-	-
River 1.	6.4	8	24	2.1	0.14	0.7	0	0.3	5.2	2.8	1.7	1.1	0.2	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0.03	200	460
2.	6.8	4	20	0.4	0.08	0.8	6.0	0.2	17.3	3.1	1.1	2.4	0.4	0.19	0.05	0.02	0	0	0	0	0	0.04	450	1,100
Well 1.	6.2	10	12	27.0	0.15	5.0	0	1.0	4.8	8.2	3.7	5.6	0.7	0.02	0.04	0.04	0	0	0	0	0	0.04	200	2,400
2.	6.4	12	28	5.8	0.11	0.6	0	0.1	3.6	3.1	1.6	1.0	0.1	0.02	0	0.02	0	0	0	0	0	0	400	1,000
3.	5.7	2	24	0.1	0.23	2.9	1.7	2.2	42.9	12.2	2.8	17.2	14.0	1.22	0.02	0.02	0	0	0	0	0	0.12	640	460
4.	5.7	2	4	63.7	0.19	14.6	2.3	0.7	1.0	24.0	4.6	6.6	0.7	0.02	0.13	0.12	0	0	0	0	0	0.14	300	1,100
5.	5.7	1	4	88.7	0.23	67.8	-	1.0	12.0	53.0	10.3	8.6	1.7	0.10	0.30	0.15	0	0	0	0	0	0.56	2,000	2,400
6.	6.4	4	8	64.5	0.22	65.0	-	5.1	8.3	62.5	6.5	8.2	0.4	0.20	0.25	0.03	0	0	0	0	0	2.2	2,000	0
7.	5.7	4	10	8.5	0.18	3.1	0	1.2	18.2	5.8	2.6	1.8	0.2	0.05	0.03	0.04	0	0	0	0	0	0.07	-	-
BASSA, BINCHI Area																								
River	6.7	12	28	0.9	0.20	0.5	0	0.4	13.7	3.5	1.4	4.6	1.3	0.13	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0	300	0
Spring	6.7	3	10	0.7	0.27	1.3	0	1.2	46.7	8.4	9.4	9.6	1.7	0.19	0.03	0.03	0	0	0	0	0	0	100	0
Well 1.	6.7	20	16	2.0	0.19	0.3	0	0.8	36.0	5.6	4.3	10.8	0.7	0.60	0.04	0.04	0	0	0	0	0	0	340	460
2.	7.2	12	40	97.2	0.47	29.9	0	23.4	35.2	14.6	9.5	64.0	10.0	0.56	0.04	0.03	0	0	0	0	0	0.16	2,000	0
3.	6.9	12	48	2.9	0.37	3.2	0	1.7	54.2	11.5	1.9	16.4	9.8	0.60	0.04	0.04	0	0	0	0	0	0.04	320	2,400
4.	7.2	40	120	—	0.28	14.9	0	0.9	29.4	43.8	26.0	36.0	8.2	3.42	0.17	0.02	0	0	0	0	0	-	1,500	2,400
5.	6.9	20	40	0.3	0.24	1.8	0	1.9	33.1	6.7	9.4	7.4	1.3	0.55	0.12	0.03	0	0	0	0	0	0	340	240
6.	6.9	50	50	7.9	0.42	3.7	0	1.7	41.8	11.0	1.8	10.0	1.3	1.25	0.02	0.02	0	0	0	0	0	0	1,000	0
7.	6.8	24	32	2.0	0.35	12.8	0	1.5	47.9	13.0	1.7	13.8	1.1	1.90	0.02	0.02	0	0	0	0	0	0	300	240

Measurements are in mg/l. I is in ug/l. tr : trace

Experiment

Sample

Jos city has four water purification plants ; Shen, Vom, Lamingo and Liberty. Shen, Lamingo and Liberty water purification plants use surface water of reservoirs as water sources and Vom purification plant uses the river water as a water source. Water samples were collected during October 1985 from four water purification plants (raw, treated and tap water) , rivers and wells around Jos city. Furthermore, samples were also collected from a river and wells at Binch in Bassa Local Government area where has an incidence of endmic goiter. Water samples were collected in acid washed polyethylene bottles for physicochemical analyses. Water samples collected in sterile polyethylene bottles were used for biological examination. Cations in water samples were analyzed with atomic absorption spectrometry and anions were with ion chromatographic analyzer. Other physicochemical analyses were done according to a text book named Standard method examination of water.[1)]

Instrument

For the analyses of Fe, Mn, Cu, Cd, Pb and Sn, a Varian flameless AAS instrument model AA－875 equipped with CRA－90 carbon rod atomizer was employed. The determination of Na, K, Ca, Mg, Zn and As were carried out by employing a Jarrell－Ash AAS model AA－845. For the analyses of NO_3, F, Cl, SO_4 and I, a Yokokawa ion chromatographic analyzing instrument model IC－100 equipped with conductivity detector and ultraviolet detector was employed. Determination of I was used 10m*l* loop for sample injection, which could detect more than 0.1μg/*l*.

Results and Discussion

Concentrations of cations, anions, surfactant and numbers of coliform organisms and faecal coliforms in the water samples of Jos area and Binchi, Bassa area are presented in Table 1 .

Water quality of water works

Water purification plants of Jos area use floculation, filtration and chlorination systems to treat water. As regards water qualiy of each plant, treated water of Shen and Vom water purification plants decreased the concentrations of turbidity, color, Fe etc compared with raw water with appropriate treatments. Lamingo water

Table 2 . The Result of Physiochemical Analysis of Water on Tokyo Metropolis

	PH	Turbidity	Color	NO_3	F	Cl	I	SO_4	SiO_2	Na	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu	Cd	Pb	AS	Surfactant	Coliform (n/1ml)	MPN (n/100ml)
Water Purification Plants																							
NAGASAWA (Raw)	7.2	21	4	1.1	0.05	4.2	0.6	12	25	8.4	1.1	13.6	4.1	0.60	0.04	0.01	0	0	0	0	0.02	19000	1940
(Treat.)	7.0	0	0	1.0	0	7.4	0	13	26	8.4	1.1	13.2	4.4	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0	-
(Tap)	6.8	0	0	1.5	0.08	10.1	-	16	25	-	-	13.6	4.8	0.01	0	0	0	0	0	0	0.02	0	-
KANAMACHI (Raw)	7.2	20	10	2.1	0.10	18.4	5.8	33	21	13.6	1.7	19.2	4.4	0.68	0.10	0.009	0	0	0	0	0.12	78000	74000
(Treat.)	6.9	0	0	2.1	0.07	24.8	0	42	21	15.8	2.0	19.4	4.1	0	0	0.004	0	0	0	0	0.09	0	-
(Tap)	6.8	0	0	2.5	0.07	23.0	-	42	21	-	-	18.3	5.4	0.03	0	0.009	0.003	0	0.002	0	0.06	0	-
ASAKA (Raw)	7.3	23	8	1.9	0.07	15.6	3.3	36	20	12.0	2.1	21.6	5.5	0.60	0.08	0.010	0	0	0	0	0.08	1100	6200
(Treat)	6.8	0	0	1.6	0.07	22.9	0	43	20	7.6	1.1	20.0	7.8	0	0	0.002	0	0	0	0	0.06	0	-
(Tap)	6.8	0	0	2.2	0.05	20.2	-	39	18	-	-	20.8	5.3	0.06	0	0.010	0.010	0	0	0	0.04	0	-
KINUTA (Raw)	6.7	3	3	3.3	0.04	24.6	4.0	35	18	25.2	2.8	29.4	5.8	0.20	0.10	0.005	0	0	0	0	0.04	5800	20000
(Treat.)	6.7	0	0	3.0	0	18.2	0	32	20	25.6	2.9	24.6	5.1	0.02	0.01	0.008	0	0	0	0	0.02	0	-
(Tap)	6.8	0	0	2.8	0	21.6	-	30	22	-	-	23.6	5.3	0.02	0	0	0	0	0	0	0.02	0	-
SUGINAMI (Raw)	6.1	0	0	9.9	0	20.5	0.6	9	23	12.6	0.7	19.0	10.0	0.01	0	0.013	0	0	0	0	0.02	2	-
(Treat.)	6.3	0	0	6.4	0	17.1	0	16	20	9.8	0.7	17.4	7.4	0.01	0	0.003	0	0	0	0	0.02	0	-
(Tap)	6.5	0	0	5.8	0	18.0	-	19	21	-	-	19.6	5.5	0.01	0	0.005	0.010	0	0	0	0.02	0	-
Well (n =64)	7.6	1	2	4.1	0.08	19.1	-	14	33	18.1	4.5	24.5	12.1	0.15	0.02	0.002	0	-	0	0	0	-	-
OGASAWARA																							
Surface Water	7.1	40	64	tr	-	94.8	-	13	34	58.7	3.6	10.7	13.5	1.4	0.18	0	-	-	-	-	-	-	-
Well Water	7.2	2	6	tr	-	298.	-	57	33	165.	8.7	108.	38.8	0.11	0.12	0	-	-	-	-	-	-	-

Measurements are in mg/*l*. I is in ug/*l*.

purification plant employed only sandfiltration. As a result of this examination, it was clear that turbidity and color of raw water were removed by sandfiltration but Fe and I were increased through the filtration. At Liberty purification plant, concentrations of turbidity, color and Fe in treated water were almost not changed compared with raw water even though it had passed through the treatment system. It seems that water purification systems of Lamingo and Liberty were not been driving under optimum conditions.

Table 2 shows th water qualities of raw, treated and tap water from five water purification plants in Tokyo metropolis,[2] underground water at Chiba prefecture[3] near Tokyo metropolis and surface and well waters in Ogasawara island.[4] This island is located on the Pacific ocean about 1,000km south from Tokyo. According to water quality of water purification plants Tokyo metropolis, it noted that turbidity, color and Fe of treated water were almost removed by treatment systems.

As regards tap water in Jos,[5] the amounts of Cu, Cd and Pb detected in several tap water were 0.001−0.009, 0.001, tr − 0.006mg/l, respectively. Since these three metals were not detected in raw water and water just after treatment. It indicates that contamination was occurred through the distribution system. In tap water Fe, Mn and Zn were also increased, which was also regarded as an effect of distribution system. On the other hand, Cu (0.003−0.01mg/l) and Pb (0.002mg/l) were also detected in several tap water of Tokyo metropolis. This fact has been found in tap water of USA.[6] As a result of inquiry in 26 States in USA, Fe, Mn, Cu and Zn were detected 30, 29, 0.6 and 0.07%, respectively, from full distribution systems. In raw water of Jos water purification plants, coliform organisms and faecal coliforms (MPN) were detected 45 − 89 and 0 − 79, while in raw water from water purification plants in Tokyo metropolis, coliform was detected from 1,100 to 78,000 and faecal coliform was from 1,940 to 70,000. It seems to be caused by using river water as a water source at water purification plants in Tokyo metropolis. It is considered that rivers are contaminated with living drainage by human as their branch streams flow in towns. However, the surface waters in Jos area were not affected by human life.

Eight elements, Na, K, SO_4, Cl, NO_3, SiO_2, Ca and Mg,

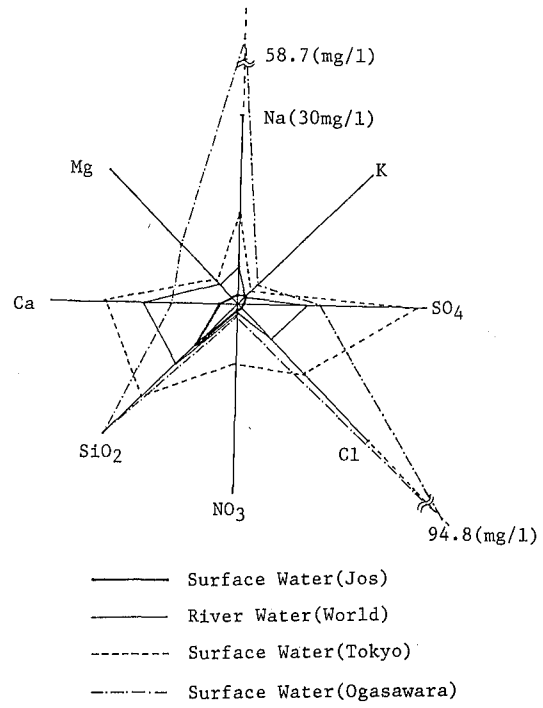


Fig. 1. Physiochemical Charecteristics of the Surface Water

were used to make clear the characteristics of surface waters in Jos area. The result is shown in Fig. 1. Bars in the diagram indicate the concentration of each element, and a full scale of bar corresponds 30mg/l. The data of raw water from water purification plants, lake and river were plotted to show the surface water of Jos area. Figures of raw water in Tokyo metropolis, average values of the data of world river and surface water of Ogasawara island were also plotted. Fig. 1 reveals clearly that in surface water of Jos area, each element was dissolved in water at a much lower concentration than other water samples while K was dissolved at the same concentration. On the surface water in Tokyo metropolis, concentration of each element was a little higher than that of world river, but the plotted pattern was similar. Surface water a small island like Ogasawara were affected by sea water, so that concentrations of Na and Cl were found high in water. Since the stratum of Plateau State is old and composed of granite belt of Pre-cambrian period, elution of each element seems a little because of having been weathered. Na, K, Ca, Mg and Cl

are needed as fundamental elements for human bodies. It is necessary to know the effect of intake of low concentration elements for a long term through the human life.

Quality of well water

According to the measurement of water quality of fourteen wells, element concentrations showed noticeable variations at different wells except heavy metals such as Cd, Pb, As and Sn. The various concentrations seem to show that those wells have been affected by human because this zone includes high population areas. Different geologic strata can also be considered as a reason because they affect the concentrations and compositions of elements when water pass through in. Wells detected a rather high concentration of Na also contained high concentrations of Cl, NO_3 and Ca, and especially, the surfactant was detected in those wells. It suggests that wells including high concentration elements have been contaminated by human life. The bacteriological examination also proved the contamination by human life because of existence of coliform and faecal coloform. Water quality data of Japanese well water as shown in Table 2 are average values at 64 samples from Chiba prefecture near Tokyo metropolis. To make clear the water characteristics of well water in Jos, the diagram of Na, K, SO_4, Cl, NO_3, SiO_2, Ca and Mg were drawn (Fig. 2).

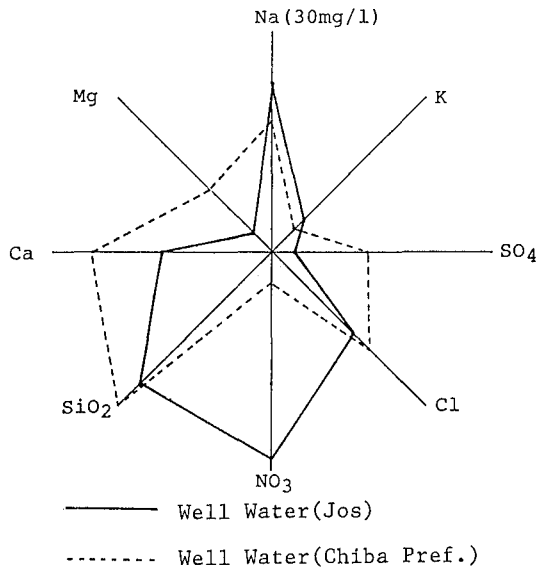


Fig. 2. Physiochemical Characteristics of the Well Water

Diagram of well water in Jos area has a different pattern compared with that of surface water. Each element in the well water was detected at a high concentration and NO_3 ion was found high compared with Japanese well water. Underground water of Ogasawara island was more affected than surface water by sea water but K and NO_3 were detected at almost the same levels.

Iodide and fluoride ions in water

Iodide in water samples from Jos area (22 stations) and from Binchi, Bassa area (9 stations) was analyzed. In Jos area iodide was detected from 0.6 to 7.6 $\mu g/l$ in eight samples. However, no iodide was found in river, spring and well waters at Binchi where the endemic goiter was prevalent. Ekpechi[7] showed that distribution of endemic goiter was associated with samples of low iodide content 0.6 − 0.7 $\mu g/l$ from Pre-cambrian granites. It was noted that at Binchi, distributed endemic goiter area, iodide content in water was less than 0.1 $\mu g/l$. Iodide in raw and treated waters of Tokyo metropolis were also analyzed. As a result, iodide was detected from 0.6 to 5.8 $\mu g/l$, but not found in all the treated water.

It seems that iodide is oxidized by chlorination such as $I^- \rightarrow I_2 \rightarrow IO^-_3$. In the case of treated water in Jos, treated water of Shen water purification plant contained chlorine residue of 0.8mg/l, so that iodide was not detected. Treated water of Lamingo was not detected the chlorine residue and iodide content increased through the filtration system. Though iodide was found in treated water of Liberty which contained trace chlorine residue, the amount was decreased from 2.4 to 0.8 $\mu g/l$ during purification system. Regarding the fluoride ion, surface and underground waters in Jos area contented almost the same concentration levels from 0.1 to 0.4mg/l. In surface and underground waters of Japan, lower concentration of fluoride was detected than in samples of Jos.

Heavy metals

The mines near Jos[8] had been producing cassiterite (SnO_2), tin pyrites (Cu_2SnFeS_4) etc as ores. According to our examination, Sn was not detected from any of water samples in Jos area. It might have been caused by the sensitivity of instruments because detection limit of Sn is 20 $\mu g/l$ by means of flameless AAS, which is much lower than that of other heavy metals such as Cu, Cd, Pb and As which can measure more than 1 $\mu g/l$. The

Table 3. Concentration of Cd, Pb and Zn in the Water

	PH	Cd(mg/l)	Pb(mg/l)	Zn(mg/l)
Mine Water	2.7	0.140	0.157	9.52
Deposition Pond	10.3	0.011	0.002	0.76
River 1 (upper stream of mine)	7.3	0.000	0.002	0.04
2	7.1	0.004	0.004	0.23
3	7.2	0.003	0.001	0.21
4	7.1	0.003	0.003	0.20
5 (6km down stream)	6.8	0.003	0.001	0.20
6	7.1	0.000	0.001	0.30
7 (16km down stream)	7.2	0.000	0.000	0.04
8	7.3	0.000	0.000	0.02
9	7.4	0.000	0.000	0.03
10 (20km down stream)	7.3	0.000	0.000	0.02

other heavy metals, Cr, Cd, Pb and As, were not detected as show in Table 1. However, these data show only average values of several times measurements. As the result of examination, Cu ; 0.001−0.02mg/l in four surface water and 0.001−0.03mg/l in eight well water, Cd ; 0.001mg/l in a river water and 0.001−0.002mg/l in three well water and Pb ; 0.001−0.008mg/l in two surface water and 0.001−0.005mg/l in eleven well water, were detected. It is not clear whether the detected metals were concerned with any effects of mines or not. This examination suggests that no influence on water quality is found since the amounts of heavy metals detected in surface and underground waters are only at low ppb levels.

In Japan, few water quality data have been reported about the sample of tin mining area. Okuzono[9] et. al reported the concentrations of Cd, Pb and Zn in river water near a tin mine. The result of analyzed data is shown in Table 3.

The twelve stations, which were dotted from upper stream of tin mine to down stream about 20km away from mine. The amounts of Cd, Pb and Zn detected in river water were 0−0.14, 0−0.157, 0.02−9.52mg/l, respectively. As regards the influence of tin mining to river, river water has not been affected at about 6 km down stream.

As the result of this investigation, drinking water of Jos area are not affected by heavy metals such as Cu, Cd, Pb, As and Sn.

Acknowledgement

This work was supported by the Japanese International Co-operation Agency (JICA). We thank Dr. H. Takahashi, the JICA-UNIJOS medical research project team leader for his help in preparing this manuscript.

References

1) Greenberg. A. E, Trussell. R. R and Clesceri. L. S,:Standard Method for the Examination of water and waste water, 16th Ed., 1985, American public Health Association, washington DC

2) Annual Report of the Water Quality, 1982, Bureau of Water Works Tokyo Metropolitan Government,

3) Annual Report on the Underground Water Quality in Chiba prefecture, 1983
The public Health Laboratory of Chiba Prefercture

4) Nakamura. H, Yamazaki. Y and Matsumoto. K, Ann.

Rep. Tokyo. Metr. Res. Lab. P. E., 25,427,1974
5) Ubom. G. A and Noda. C., in preparation
6) Committee Report, J. A. W. W. A 77,67,1985
7) Ekpechi. O. L, *Br. J. Nutr* 21,537,1967
8) The Histroy of Tin Mining In Nigeria, 1979
Federal Depertment of Antiquities National Museum, Jos Nigeria
9) Okuzono. K, Nakauchi. T, Kouriyama. M and Hashiguchi. T., Rept. Kagoshima pref. Inst. E. P&PH, 11, 172,1975

我国とナイジェリア・ジヨス市における飲料水中の微量元素レベルの比較検討

土 屋 悦 輝*, G. A. Ubom**, 野 田 千代一***
笹 野 英 雄*, 溝 口 勲*

ナイジェリア，プラトー州ジヨス市の水道水，表流水，地下水中の微量元素について調査を行った．この結果を日本の水道水，表流水，地下水の水質と比較検討した．ジヨス市の給水栓水から配管に由来するCu (0.001～0.009mg／l)，Cd (0.001mg／l)，Pb (tr～0.006mg／l) を検出した．東京の給水栓水からもCu，Pbを検出している．表流水の水質特性を見るためにNa，K，SO_4，Cl，NO_3，SiO_2，Ca，Mgの各イオン濃度をプロットしてダイアグラムを作成した．ジヨス市のダイアグラムは東京の表流水，世界河川水の平均値よりも極端に小さい．このことからジヨス市の表流水では殆んどのイオンは非常に低い濃度であることが明らかである．一方ジヨス市の井戸水のダイアグラムは表流水と異ったパターンを示し，各イオンが高濃度に検出した．特にNO_3イオンが日本の井戸水と比較して高濃度に検出された．プラトー州は多くの鉱山を有しているが，Sn，Cd，Pb，Cuなどの重金属類の調査からはいづれも表流水，地下水から検出せず水質に影響を及ぼしていないと考えられる．

*東京都立衛生研究所環境保健部水質研究所　新宿区百人町3－24－1
**Faculty of Medical Sciences, University of Jos
***岡山大学農業生物研究所

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 356-362, 1986

多摩地区における飲料水中のトリハロメタン調査

大橋則雄*, 矢口久美子*, 関山登*, 渡辺学*,
西島基弘*, 坂井千三*

Survey of Trihalomethanes in Drinking Water in Tama District

NORIO OHHASHI*, KUMIKO YAGUCHI*, NOBORU SEKIYAMA*, SATORU WATANABE*
MOTOHIRO NISHIJIMA* and SENZO SAKAI*

Keywords：総トリハロメタン total trihalomethane, トリハロメタン trihalomethane, 飲料水 drinking water, 表流水 surface water, 地下水 groundwater, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography

はじめに

クロロホルムが飲料水の塩素消毒により生成される[1]ことや，水道水中の有機物質と発癌との関係が否定できないとの報告[2]を受けて，米国のEPA（環境保護庁）は水道水の安全性を確認するため，水道水中の有機物質に関する汚染実態調査[3]を行い，トリハロメタン（THM）が多くの水道水に検出されることを明らかにした．現在，米国をはじめ各国は水道水中の総THM（TTHM）濃度の規制値を設けている[4]．わが国もその制御目標値100 $\mu g/l$[5]を維持するために，各水道事業体は定期的な検査を実施している．

著者らは，東京都多摩地区の専用水道及び簡易水道についてTHM検査を毎年1回実施している．これらの水源は表流水（山間部の河川水），地下水，地下水と都水道水の混合水（混合水と略す）に分類されることに着目して，1981年から1985年までの検査結果を用い，水源別によるTHMの生成特性を検討した．また，表流水と地下水について高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による紫外部吸収測定を行い，その紫外部吸収の強度（主として有機成分）とTHM生成能との関連を検討したのでその結果を報告する．

測定方法

1 試料

行政または依頼により各水道の末端給水栓から採取された水を試料とした．なお，試料は表流水58件，地下水372件，混合水112件であった．

2 THMの測定

THM（クロロホルム（$CHCl_3$），ブロモジクロロメタン（$CHCl_2Br$），ジブロモクロロメタン（$CHClBr_2$），ブロモホルム（$CHBr_3$））の測定は，ヘッドスペース・ガスクロマトグラフ法[3]で行った．

3 試薬

THMはTHM分析用混合標準溶液，次亜塩素酸ナトリウム溶液は食品添加物用，その他の試薬はいずれも市販特級品を用いた．

4 分析装置

1）ガスクロマトグラフ：㈱島津製作所製GC－7A型（電子捕獲検出器付）

2）恒温循環水槽：小松エレクトロニクス㈱製クールニクスCTE－220型，CTR－220型

3）イオンクロマトグラフ：Dionex社製2010i型（電気伝導度検出器付）

4）高速液体クロマトグラフ：日本分光工業㈱製TWINCLE型（検出器：日本分光工業㈱製UVIDEC－100－Ⅵ型，昭和電工㈱製Shodex RI Model－11型付）

5）データ処理装置：㈱島津製作所製クロマトパックC－R3A型

6）記録計：㈱日立製作所製056型

5 THM生成能の測定

試料に遊離残留塩素が0.6mg／lになるように次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えた後，上水試験方法に従って測定した．

6 臭素イオン濃度の測定

イオンクロマトグラフ法[8]に準じた．

*東京都立衛生研究所多摩支所　190　東京都立川市柴崎町3－16－25
*Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
16－25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan

表1　水源別による水道水のTHM検査結果

年度	水源	表流水					地下水					混合水				
	成分	n	TTHM	$CHCl_3$	$CHCl_2Br$	$CHClBr_2$	$CHBr_3$	n	TTHM	$CHCl_3$	$CHCl_2Br$	$CHClBr_2$	$CHBr_3$	n	TTHM	$CHCl_3$	$CHCl_2Br$	$CHClBr_2$	$CHBr_3$
1981	平均値	15	3	3	ND	ND	ND	45	ND	ND	ND	ND	ND	19	7	3	3	1	ND
	範囲		ND-16	ND-16	ND-1	ND	ND		ND-6	ND-6	ND-2	ND-2	ND		5-29	ND-14	ND-11	ND-4	ND-2
1982	平均値	11	5	5	ND	ND	ND	50	1	1	ND	ND	ND	20	8	3	3	2	ND
	範囲		ND-18	ND-17	ND-1	ND	ND		ND-23	ND-6	ND-2	ND-5	ND-17		3-20	1-7	ND-7	ND-6	ND
1983	平均値	22	5	5	ND	ND	ND	87	1	1	ND	ND	ND	18	7	3	2	2	ND
	範囲		ND-40	ND-37	ND-3	ND	ND		ND-9	ND-5	ND-1	ND-4	ND-5		4-21	ND-7	ND-8	ND-6	ND-2
1984	平均値	8	6	5	ND	ND	ND	121	ND	ND	ND	ND	ND	28	6	3	2	1	ND
	範囲		ND-11	ND-9	ND-3	ND	ND		ND-26	ND-7	ND-9	ND-9	ND-4		3-20	ND-30	ND-14	ND-5	ND
1985	平均値	2	3	3	ND	ND	ND	69	ND	ND	ND	ND	ND	27	10	5	3	2	ND
	範囲		2-6	2-5	ND	ND	ND		ND-8	ND-4	ND-1	ND-4	ND-2		ND-47	ND-34	ND-12	ND-8	ND-1

単位　$\mu g/l$，NDは1 $\mu g/l$未満，nは試料数

イオンクロマトグラフィー条件

検出器：電気伝導度検出器，分離カラム：Dionex HPIC－AG 4 A　4 ×50㎜＋HPIC－AS 4 A　4 ×250㎜，除去カラム：陰イオンファイバーサプレッサー，溶離液：3 mM $NaHCO_3$／2.4mM Na_2CO_3，溶離液流速：1.0m*l*／min，検出器感度：1 μS

7　水中有機成分の測定

試験溶液の調製

0.45μm メンブランフィルターでろ過した試料1*l*を，ロータリーエバポレーターで10～15m*l* に濃縮した．濃縮液に精製水を加えて，全量20m*l* としたものを HPLC 用試験溶液とした．

HPLC 条件

カラム：Shodex OHpak B－800P＋B－803（8㎜φ×500㎜），検出波長：260nm，移動相：0.05M　NaC*l* 水溶液，流速：1.0m*l*／min，カラム温度：20°，検量線用標準物質：Shodex STANDARD P－82（分子量5,800, 12,200），ポリエチレングリコール（分子量1,000, 4,000）

結果及び考察

試料は表流水を水源とする上水道と簡易水道，地下水を水源とする上水道と専用水道及び混合水に分類し，各年度の試料数，TTHM 濃度，$CHCl_3$，$CHCl_2Br$，$CHClBr_2$，$CHBr_3$の各平均値と濃度範囲を水源別に表1に示した．

1　水源別による水道水の THM 検査結果

1）表流水を水源とする上水道と簡易水道

各年度の TTHM 濃度の平均値は3～6 μg／*l* であり，経年的な増減の傾向はみられなかった．

表流水から検出された THM は $CHCl_3$が大半であり，$CHCl\,Br_2$，$CHBr_3$は検出されなかった．

1983年の夏期に TTHM 濃度が40μg／*l* と高い値を示した試料がみられた．この試料は屋外の高架水槽に長時間滞留し，日光の影響で水温が上昇したため THM 生成能が高くなり[9]，他の試料に比較して高い値が得られたものと考える．

多摩地区の西部は山間部の表流水を水道水の水源としている[10]．これらの地域は廃水などの人為的汚濁は少なく，水源かん養林や林業の目的で，スギ，ヒノキ（常緑針葉樹），カラマツ（落葉針葉樹）等を植林している．表流水の周辺にはフサザクラ・タマアジサイ群集やコナラ・クリ群落などの落葉広葉樹が植生している．これらのことから，表流水中の THM は山林の腐葉土[12]や藻類[13,14]から溶出した成分が前駆物質となったものと推察される．

2）地下水を水源とする上水道と専用水道

各年度の TTHM 濃度の平均値は ND～1 μg／*l* と非常に低かった．検出される THM は水源によって異なり，$CHCl_2Br$，$CHCl\,Br_2$，$CHBr_3$が検出されるものがあった．

3）混合水

各年度の TTHM 濃度の平均値は6～10μg／*l* であった．57年度10月において多摩地区に分水している都水道水の TTHM 濃度は20～30μg／*l*[15]であり，前述のように地下水の TTHM 濃度は低いことから，混合水の TTHM 濃度は都水道水の混合比が大きく関与していることが推測される．THM は都水道水と同様に $CHCl_3$，$CHCl_2Br$ 及び $CHCl\,Br_2$が同時に検出されるものが多くみられた．

4）水源別による水道水の THM の比較

水源別に TTHM 濃度の高いものからそれぞれ5件の試料を選びそれらの THM を表2に示した．

表流水では TTHM の大部分が $CHCl_3$で占め，$CHCl_2Br$ は少なかった．なお，$CHCl\,Br_2$及び $CHBr_3$は全く検出されなかった．

地下水を水源とする水道水で THM が検出された試料は，臭素を含む THM が検出され，$CHCl_3$，$CHCl_2Br$，$CHCl\,Br_2$及び $CHBr_3$の濃度比が試料により異なっていた．

混合水は，$CHCl_3$の濃度が最も高く次いで $CHCl_2Br$，$CHCl\,Br_2$の順であった．このように水源により検出される THM の成分に特徴がみられた．

表2．水源別による水道水の THM 検出例

水源	No.	TTHM	$CHCl_3$	$CHCl_2Br$	$CHClBr_2$	$CHBr_3$
表流水	1	40	37	3	ND	ND
	2	29	27	2	ND	ND
	3	18	17	1	ND	ND
	4	9	9	ND	ND	ND
	5	8	7	1	ND	ND
地下水	1	26	7	9	9	1
	2	23	1	1	4	17
	3	15	5	6	4	ND
	4	10	2	4	4	ND
	5	8	1	1	4	2
混合水	1	47	34	12	1	ND
	2	29	14	11	4	ND
	3	21	7	8	6	ND
	4	20	7	7	6	ND
	5	20	8	7	5	ND

単位は μg／*l*，ND は1 μg／*l* 未満

2　臭素イオン濃度とTHM生成パターン

表流水及び地下水の原水について臭素イオン濃度を測定したところ，20～50 μg／l 及び15～40 μg／l であった．これらの値は大沼ら[16]が行った愛知県下の河川水，地下水の臭素イオン濃度の調査結果とほぼ同程度であった．THMの生成は，水中に溶存している有機物と臭素イオンの濃度比により変化することが報告されている[17,18]．そこで，表流水と地下水について原水の臭素イオン濃度とTHM生成の関係を検討した．

1）表流水

臭素イオンを30 μg／l 含む表流水に臭化イオン濃度が30～520 μg／l になるように臭素カリウムを添加し，24時間放置後のTHM生成量を測定した．その結果は図1に示したとおりで，$CHCl_3$の生成量は原水で18 μg／l 検出されたが，臭素イオン濃度の上昇に伴い減少した．それに対し，$CHCl_2Br$ 及び $CHClBr_2$の生成量は臭素イオン濃度の上昇に伴い増加したが，$CHCl_2Br$ は臭素イオン濃度110 μg／l，$CHClBr_2$は360 μg／l で生成量が最も高くなり以後は減少する傾向を示した．臭素イオン濃度520 μg／l では $CHBr_3$が最も多く，次いで $CHClBr_2$，$CHCl_2Br$，$CHBr_3$の順であった．今回試料とした表流水は，臭素イオン濃度が20～50 μg／l であったことから $CHCl_2Br$ が生成される可能性があるものの $CHClBr_2$，$CHBr_3$は生成されにくいことが推測された．

2）地下水

福島ら[19]らは，地下水を水源とする水道水から$CHBr_3$が検出されることを報告している．今回の調査では，前述のように多摩地区の地下水を水源とする水道水の大半はTHMが検出されなかった．しかし，対象とした試料のうち最も高濃度に臭素を含むTHMが検出された例として，$CHCl_3$，$CHCl_2Br$，$CHClBr_2$及び $CHBr_3$がそれぞれ1，1，4及び17 μg／l が検出されたものがあった．この地下水は，原水中に臭素イオン370 μg／l 検出されたことから，$CHBr_3$が多く生成されたと推測される．

3　表流水と地下水の有機成分及びTHM生成能

1）有機成分

丹保ら[20]は，THM生成能は河川水や廃水中の有機物に占める紫外部吸光度の比と相関関係があることを報告している．そこで，表流水と地下水についても同様の関係があるかを調査するために，それらの原水の濃縮液についてHPLCを行い，得られたクロマトグラムを図2に

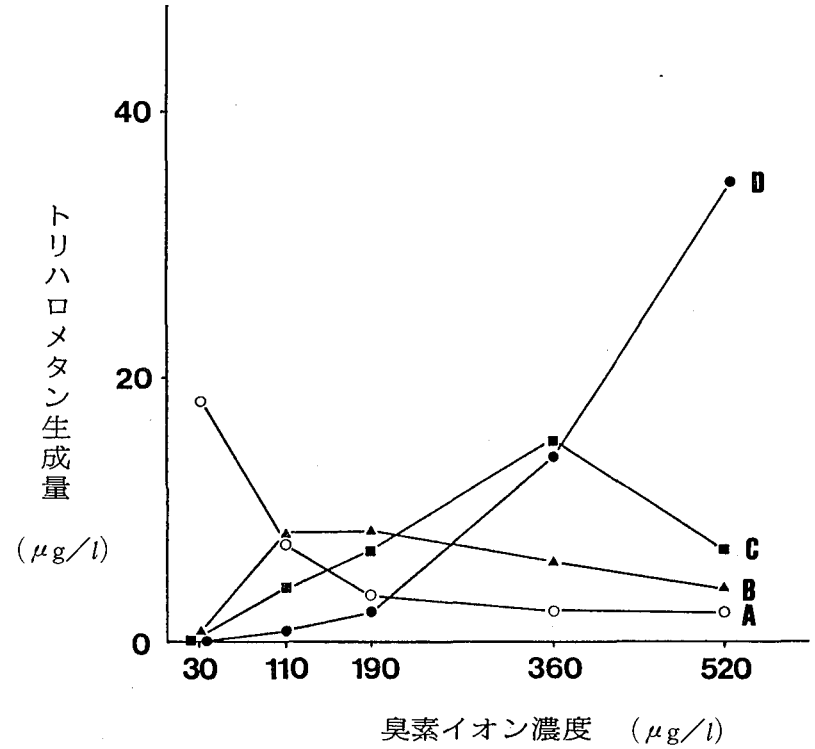


図1．表流水への臭素添加によるTHM生成パターンの変化
A：$CHCl_3$　　B：$CHCl_2Br$　　C：$CHClBr_2$　　D：$CHBr_3$

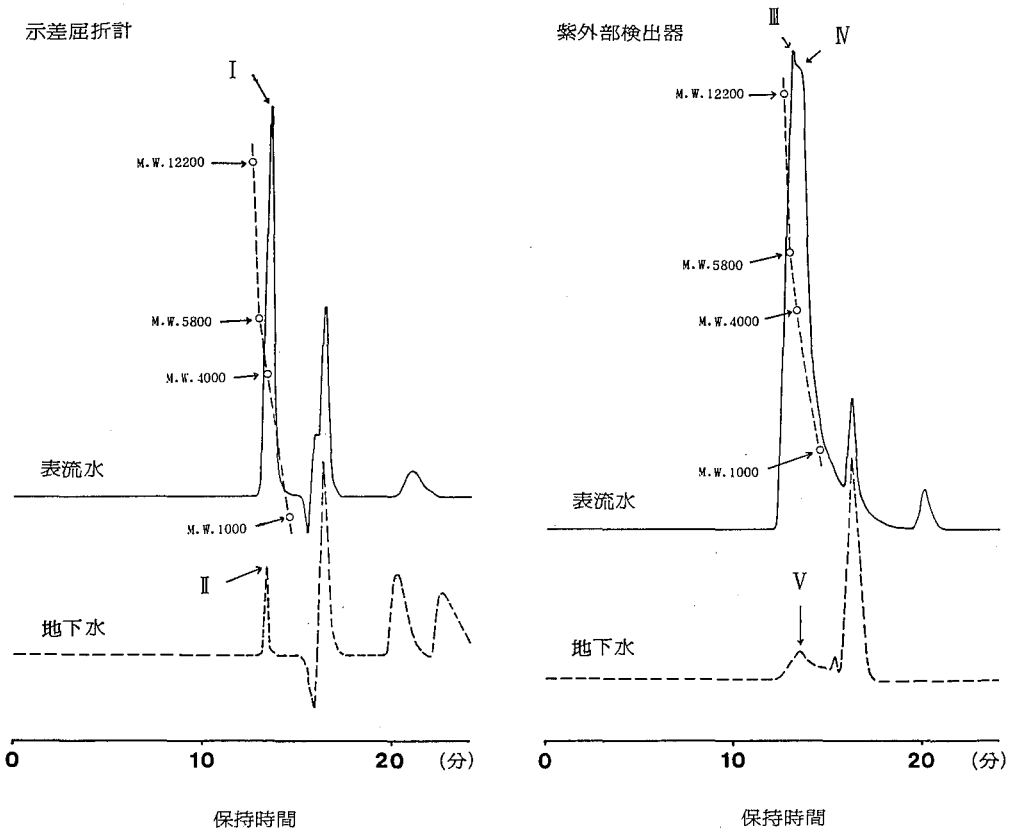


図2：表流水と地下水の高速液体クロマトグラム

示した．検出器は紫外部検出器を用い，同時に紫外部吸収を示さない有機物の存在を知るために示差屈折計[21]を紫外部検出器に連結した．

示差屈折計により得られた表流水と地下水のクロマトグラムのⅠ及びⅡのピークは保持時間がいずれも13.9分であり，示差屈折計により得られた検量線によるとⅠ，Ⅱのピークは分子量約4,000で分子量的に同一物質であることが推察される．紫外部検出器により得られたクロマトグラムから，表流水は2つのピークの合成波と推定されるⅢ，Ⅳのピークを認めた．Ⅲのピークは分子量約6,000，Ⅳ及びⅤのピークはいずれも分子量約4,000であった．

表流水の濃縮液に遊離塩素を添加し24時間放置した後，HPLCを行い得られたクロマトグラムを図3に示した．示差屈折のクロマトグラムから得られたピークⅠは，塩素添加後も特に変化はみられなかった．しかし，紫外部検出器で得られたピークⅢ，Ⅳは塩素添加後は弱いピークⅥ，Ⅶに変化した．このことから，示差屈折計で得られたピークⅠと紫外部検出器で得られたピークⅣは異なる物質であるか，あるいは同一物質であるが，分子内の紫外部吸収を示す官能基が遊離塩素と反応し，吸収が弱くなったこと等が考えられる．

なお，地下水の紫外部吸収は遊離塩素の添加により変化しなかった．

2）THM生成能

表流水の原水を分画分子量限界1,000及び10,000の限外ろ過膜により分画しそれぞれのTHM生成能を測定した結果を表3に示した．分子量10,000以上については有機物が存在するか否かは明らかではないが，THMは生成されなかった．1,000～10,000の画分のTHM生成能は全生成量の80～90％であり，1,000以下の画分は10～20％であった．また図3に示したように，表流水の紫外部吸収は遊離塩素の添加により減少することから，紫外部吸収を示す有機成分は表流水中のTHM前駆物質であると推測される．

試料とした地下水原水の有機成分の紫外部吸収は全て弱く，THM生成能も極めて低かった．

ま と め

1　1981年から1985年までの東京都多摩地区における水道水のTHM検査の結果，表流水，地下水，混合水を

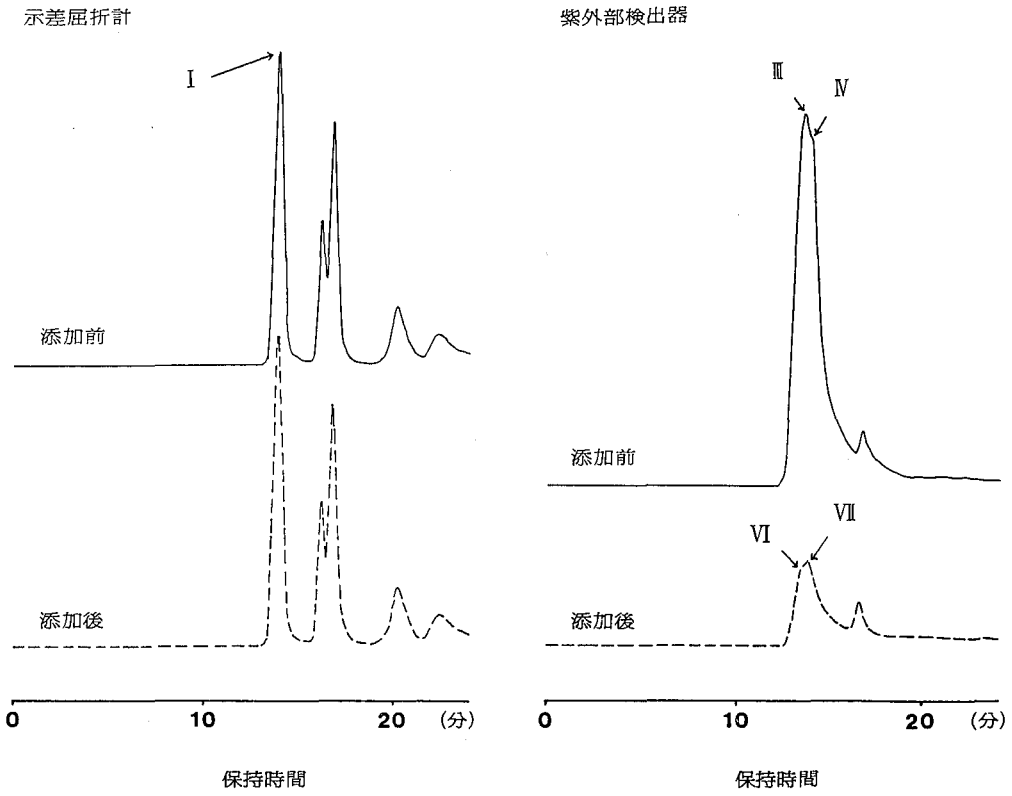


図3．表流水の濃縮水への遊離塩素添加
遊離塩素は20mg／lとなるように添加した

表3．表流水のトリハロメタン生成能

限外ろ過膜による分子量分布	生成率※(%)
>10,000	0
1,000～10,000	80～90
<1,000	10～20

※表流水の総トリハロメタン生成能を100としたときの割合

水源とする水道水のTTHM濃度は，それぞれND～40 μg／l，ND～26 μg／l，ND～47 μg／lであり，いずれも水道水中のTHM制御目標値100 μg／lを下回っていた．

2　水源別にTHMを比較すると，表流水を水源とした水道水からは，主に$CHCl_3$が検出された．地下水を水源とする水道水では，水源によりTHMの濃度比が異なっていた．混合水の場合，$CHCl_3$，$CHCl_2Br$，$CHClBr_2$が同時に検出されるなど水源別に特徴がみられた．

3　表流水と地下水について原水の濃縮液のHPLCを行った結果，表流水は紫外部検出器で分子量約6,000と約4,000にピークが認められた．このピークは遊離塩素の添加により弱くなることからTHM前駆物質と推定される．また，地下水は分子量約4,000にピークを示し，THM生成能は低かった．

謝　辞　本研究にあたり資料を提供された奥多摩町，昭島市の水道課，水道局水源林事務所計画課，労働経済局農業試験場林業分場に感謝します．

（本研究の概要は第44回日本公衆衛生学会1985年10月で発表した．）

文　献

1）Rook, J. J.: *Watertreatment and Examination*, 21, 259, 1972

2）Harris, R. H. and Brecher, E. E.: *Comsumer Reports*, 39, 436, 1974

3）Symons, J. M., Beller, T. A., Carswell, J. K., DeMarco, J., Kropp, K. L., Robeck, G. G., Seeger, D. R., Slocum, C. J, Smith, B. L. and Steavens, A. A.: *J. AWWA*, 67, 634, 1975

4）丹保憲仁編著：水道とトリハロメタン，48, 1983,

技報堂
5) 厚生省環境衛生局水道環境部長通知：環水第46号，1981
6) 厚生省環境衛生局水道環境部水道整備課長通知：環水第47号，1981
7) 日本水道協会：上水試験方法，489,1985
8) 伊藤久昭，新堀義夫：分析化学，29,239,1980
9) Oliver, B. G.: *WATER CHLORINATION Environmental Impact and Health Effects*, Vol 3, 141, 1980, Ann Arbor Science
10) 東京都衛生局環境衛生部：東京都の水道，昭和58年版，1985
11) 東京都公害局：東京都現存植生図，1975
12) 石川哲也：衛生化学，28,10,1982
13) Briley, K. F., Williams, R. F., Longley, K. E. and Sorbor, C. A.: *WATER CHLORINATION Environmental Impact and Health Effects*, Vol 3,117,1980, Ann Arbor Science
14) Hoehn, R. C., Panres, D. B., Thompson, B. C., Randall, C. W. and Shaffer, P. T. B.: *J. AWWA*, 72,344, 1980
15) 東京都水道局：水質年報，昭和57年度，418,1982
16) 大沼章子，茶谷邦男，浜村憲克：第21回全国衛生技術協議会年会講演集，142,1984
17) 梶野勝司：水道協会雑誌，514,17,1977
18) Minear, R. A. and Bird, J. C.: *WATER CHLORINATION Environmental Impact and Health Effects*, Vol 3, 151,1980, Ann Arbor Science
19) 福島正明，飲塚俊彦，氏家淳雄：第19回全国衛生技術協議会年会講演集，70,1982
20) Tambo, N. and Kamei, T.: *Water Research*, 12, 931, 1978
21) 波多野博行編：高速液体クロマトグラフィー，31，1973,南江堂

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 363-370, 1986

飲料水中の揮発性有機塩素化合物の家庭での除去方法

矢口 久美子*, 渡辺 学*, 関山 登*, 大橋 則雄*
池島 伸至*, 西島 基弘*, 坂井 千三*

Removal of Volatile Chlorinated Organic Compounds in Drinking Water in Home

KUMIKO YAGUCHI*, SATORU WATANABE*, NOBORU SEKIYAMA*, NORIO OHASHI*, NOBUYUKI IKEJIMA*, MOTOHIRO NISHIJIMA* and SENZO SAKAI*

Keywords：飲料水 drinking water, トリクロロエチレン trichloroethylene, テトラクロロエチレン tetrachloroethylene, 1,1,1-トリクロロエタン1,1,1-trichloroethane

緒　言

トリクロロエチレン（TCE），テトラクロロエチレン（PCE），1,1,1-トリクロロエタン（1,1,1-TCE）などの揮発性有機塩素化合物（Volatile Chlorinated Organic Compounds：以後 TCE，PCE，1,1,1-TCE の三化合物を総称して VCOC と略す）が金属材料，機械部品等の脱脂洗浄やドライクリーニング用洗浄剤として多量にかつ広く利用されている．

近年，これらの化合物の地下水汚染が世界各地の工業国で確認されている[1]．特に TCE と PCE は発癌性が疑われ[2]，かつ環境中で分解されにくい物質であることなどから公衆衛生上問題となっている．

わが国においては1982年に環境庁が全国15都市の地下水汚染実態調査を行い[3]，VCOC による汚染が広範囲に及んでいる事を報告し，注目された．

著者らは前報[4]で東京都多摩地区の地下水の汚染調査を行い，特に家庭での利用の多い浅層地下水の汚染が広がっていることを報告した．

現在，VCOC の除去方法は浄水場や工場等多量の水を処理する施設においては，曝気による方法などが実用化されている[5,6]．一方，家庭の井戸水の場合は VCOC の除去方法として煮沸が提唱されている[7]．

著者らはこれまでの調査で井戸水からの検出例の多い TCE，PCE，1,1,1-TCE を対象に，家庭で簡易に行える方法として市販の家庭用浄水器（以後，浄水器と略す），加熱およびくみ置きによる除去効果を比較検討したので報告する．

実験方法

1．供試井戸水

あらかじめ TCE，PCE，1,1,1-TCE に汚染されていることを確認した東京都小平市の井戸水を用いた．なお，実験期間中（1985年6月～1986年4月まで）の井戸水中の各化合物の濃度は，TCE が30～153 μg/l（平均88 μg/l，PCE が13～31 μg/l（21 μg/l），1,1,1-TCE が5～11 μg/l（8 μg/l）である．

2．調製試料

高濃度の VCOC が水中に含まれる場合の除去効果を検討するために，調製試料を作製した．すなわち精製水 1 l に TCE，PCEおよび1,1,1-TCE の各標準物質（いずれも和光純薬工業㈱社製　試薬特級）を 1 μl 加え，溶解したものを調製試料原液とした．用時，精製水で適宜希釈して次の調製試料を作製した．

1）TCE 濃度が84 μg/l，PCE55 μg/l，1,1,1-TCE 55 μg/l の水溶液．

2）TCE 濃度が470 μg/l，PCE320 μg/l，1,1,1-TCE，270 μg/l の水溶液．

3）TCE 濃度が280 μg/l，PCE200 μg/l，1,1,1-TCE140 μg/l の水溶液．

3．装置

ガスクロマトグラフ：前報[4]に従った，イオンクロマトグラフ：ダイオネックス社製　モデル2010i 型，オートサンプラー：協和精密㈱製　KMT－60 A 型，インテ

*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 Metropolitane Reserch Laboratory of Public Health 16－25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan

表1．実験に供した家庭用浄水器の仕様

浄水器	ろ過剤の種類および重量(g)*	ろ過流速 (l／min)	ろ過剤の交換	使用上の注意
Ⅰ	銀処理粒状活性炭 30g	不明	約3か月	2日以上使用しなかった時はコップ1杯分の水を流す
Ⅱ	粒状活性炭 550g	2	約1年	毎朝使用始めに最大流速で2～3分流す
Ⅲ	セラミック 不明	3～4	1日使用量6～8 l で約1年	使用始めに数秒間流す

*各ろ過剤の重量は実際に測定した

グレーター：㈱島津製作所製　C－R3A，浄水器：表1に示した，加熱実験の使用器具：三角フラスコ　容量1,100ml　開口部の内径4cm，やかん　ステンレス製　容量2 l，くみ置き実験の使用器具：ポリエチレン製容器　容量2,400ml　直径11.5cm　高さ24cm　開口部の直径7.5cm，鍋　ステンレス製　容量4,200ml　直径22cm　深さ11cm

4．検査項目及び分析方法

検査項目は①揮発性有機塩素化合物としてTCE，PCE，1,1,1-TCE，②水道法の毎月一回の定期水質検査項目（以後，定期水質検査項目と略す）は，すなわちpH，塩素イオン，過マンガン酸カリウム消費量，硝酸

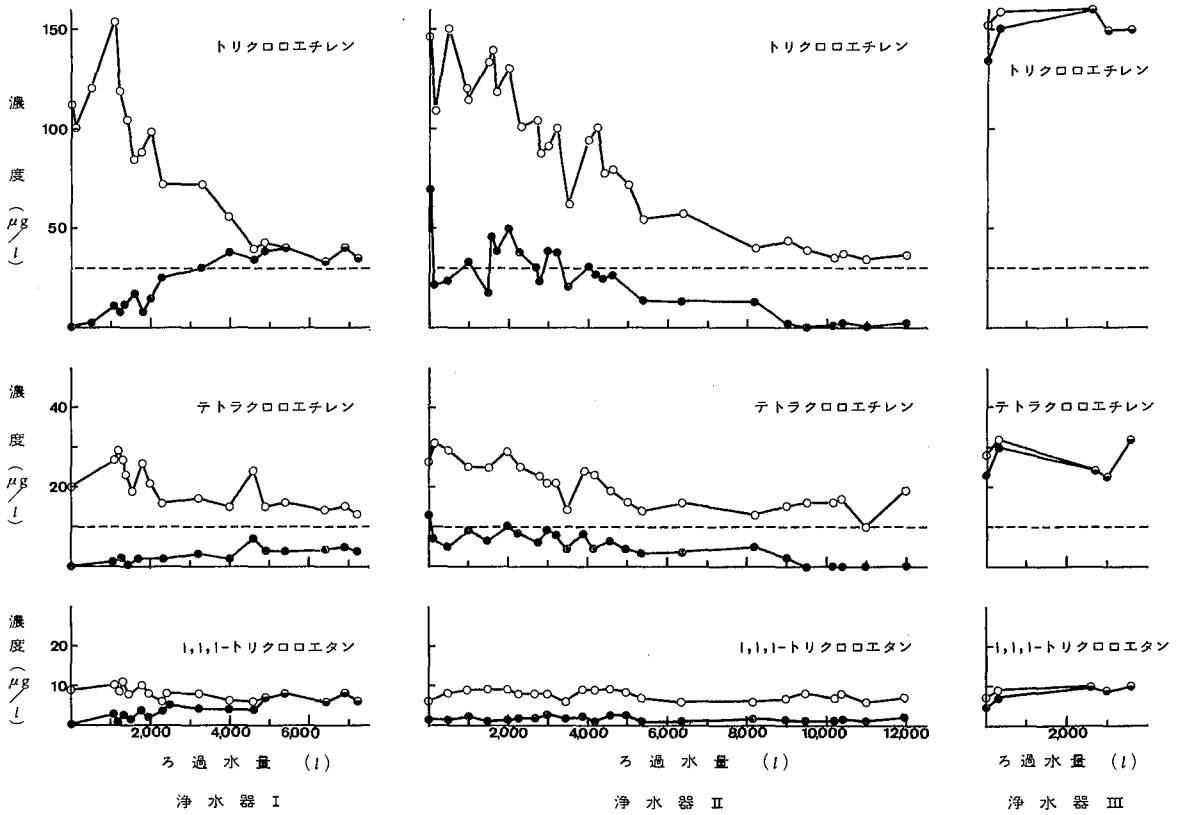


図1．浄水器による井戸水中の揮発性有機塩素化合物の除去効果
○—○ろ過前の濃度　●—●ろ過後の濃度
·····厚生省通達による水道水中の暫定的な水質基準値

及び亜硝酸性窒素，濁度，色度，臭気，残留塩素，一般細菌および大腸菌群である．

分析方法は前述の①については既報[4]のECD法に従った．②のうちの塩素イオン，硝酸及び亜硝酸性窒素はイオンクロマトグラフィーによる方法[8]に準じ，試料50μlを直接イオンクロマトグラフに注入して測定した．その他の項目は上水試験方法[9]に従った．pHはガラス電極法，残留塩素はオルト・トリジン法で測定した．

このうち水温，pH，臭気，残留塩素は採水時に現場で測定した．VCOC用は250ml褐色ガラス瓶に空気を入れないように採水後，密栓した．定期水質検査用は250mlポリエチレン容器に採水した．なお，浄水器ろ過水の細菌用の試料水は，ろ過始めの水2lを棄てた後，滅菌容器に採水した．

5．実験操作

1）浄水器による除去

三種類の浄水器をそれぞれ供試井戸水を利用している家庭の蛇口に取り付け，また積算流量計を併設してろ過水量を確認した．

ろ過前後の水について，VCOC及び定期水質検査項目を測定した．

2）加熱による除去

(i) 煮沸

調製試料1）および2）の2種類の試料について実験した．沸騰水を経時的にバイアルに秤取し，ただちに密封した後，室温で放冷し，その後20℃の恒温水槽に1時間静置後測定した．

(ii) 沸騰後放置

供試井戸水および調製試料3）を容量1,100ml三角フラスコに1,000ml秤取し，ガスバーナー上で沸騰させた後，約25℃の室温に放置した．

(iii) 家庭用瞬間湯沸かし器（以後，湯沸かし器と記す）での加熱

供試井戸水が導かれている家庭の湯沸かし器から最高温度の湯を空気を入れないように採水後，ただちに密栓した．

3）くみ置きによる除去

水と空気との接触面積が異なる次の2種類の容器を用いて実験した．①容量2,400mlのポリエチレン容器に供試井戸水1,500mlを入れ，ゆるくふたをしたもの．②容量4,200mlの鍋に供試井戸水2,500mlを入れふたをしたもの，についてそれぞれ実験室内に放置した．その時の気温は約25℃であった．

結果及び考察

1．浄水器によるVCOCの除去

浄水器はろ過剤の種類および量により，性能が大きく異なることが予測される．そこで，一般的には粒状活性炭を使用しているものが多いことから，活性炭の銀処理の有無，重量，粒径の大きさの異なるもの2種類およびセラミックによるもの1種類についてVCOC除去効果を検討した．供試井戸水を1985年6月～1986年3月まで10か月間，家庭で使用するように流速2l／minで毎日約30lろ過し，定期的に採水し分析した（以後間歇ろ過実験と記す）．また，浄水器ⅠとⅡについては，供試井戸水を短期間に連続でろ過し除去効果を検討した．

1）間歇ろ過実験

供試井戸水を間歇ろ過した場合の各浄水器のVCOCの除去効果および持続性を図1に示した．

浄水器Ⅰの場合，使用初期には良好な除去効果を示した．

また，1983年度厚生省通達による暫定水質基準値（TCE：30μg／l，PCE：10μg／l，1,1,1-TCE：300μ

表2．井戸水の浄水器ろ過前後の水質

浄水器	供試水	残留塩素 (mg／l)	pH	塩素イオン (mg／l)	硝酸性窒素 (mg／l)	$KMnO_4$消費量 (mg／l)	一般細菌(件) ≦100	一般細菌(件) >100	大腸菌群(件) 陰性	大腸菌群(件) 陽性
Ⅰ	ろ過前	0.2±0	6.5±0.09	23.2±1.4	9.2±0.5	0.5±0.4	26	0	26	0
	ろ過後	0.0±0	6.5±0.09	23.2±1.4	9.1±0.7	0.4±0.1	24	2	26	0
Ⅱ	ろ過前	0.2±0	6.5±0.07	23.4±1.3	9.1±0.4	0.7±0.3	30	0	30	0
	ろ過後	0.0±0	6.5±0.09	23.5±1.4	9.1±0.6	0.7±0.4	28	2	30	0
Ⅲ	ろ過前	0.2±0	6.5±0.07	23.1±1.7	9.2±0.5	0.5±0.3	19	0	19	0
	ろ過後	0.0±0	6.5±0.09	23.1±1.4	9.2±0.4	0.9±0.4	15	4	19	0

注）細菌検査用の供試水は初流2lを廃棄後採水した

表3．浄水器ろ過水量の一般細菌への影響

ろ過開始後の水量*	一般細菌が101コ以上／ml の件数	
	浄水器Ⅰ（n＝8）	浄水器Ⅱ（n＝10）
ろ過始め	2	6
1 l	0	0
2 l	0	0
3 l	0	0

*試料として100ml 採水

g／l）以下まで，VCOC 除去効果が持続したろ過水量は図1に示すとおりであった．すなわち TCE は約3,200l（約100日間に相当）まで除去効果が持続し，約5,000l で消失した．PCE は実験期間中，総ろ過水量7,200l（約240日間）の時点においても除去効果が認められた．1,1,1-TCE はろ過前の濃度がすでに基準値内であったが約5,000l で除去効果が消失した．

浄水器Ⅱの場合は，Ⅰに比較して使用初期から除去効果が悪く，また，ろ過水量に対する変化が不規則で変動も大きかった．特にろ過前の供試井戸水中の濃度の高かった TCE については，暫定水質基準値以下まで除去できない場合があった．

浄水器Ⅲは仕様書にトリハロメタン等の有機物を除去できると表示されているが，今回の実験では VCOC の除去効果がほとんど認められなかった．その理由はセラミック自体に除去効果がないのか明らかではない．

次に供試井戸水の各浄水器でのろ過後について，定期水質検査項目の検討をした．表2に示すように，その結果は一般細菌を除く各項目には浄水器ろ過前とろ過後に差異は認められなかった．なお，表2には示さなかったが濁度，色度および臭気もすべて差異は認められなかった．一般細菌についてはろ過前に比較してろ過後の方が多い場合があった．この現象に関連した，浄水器のろ過

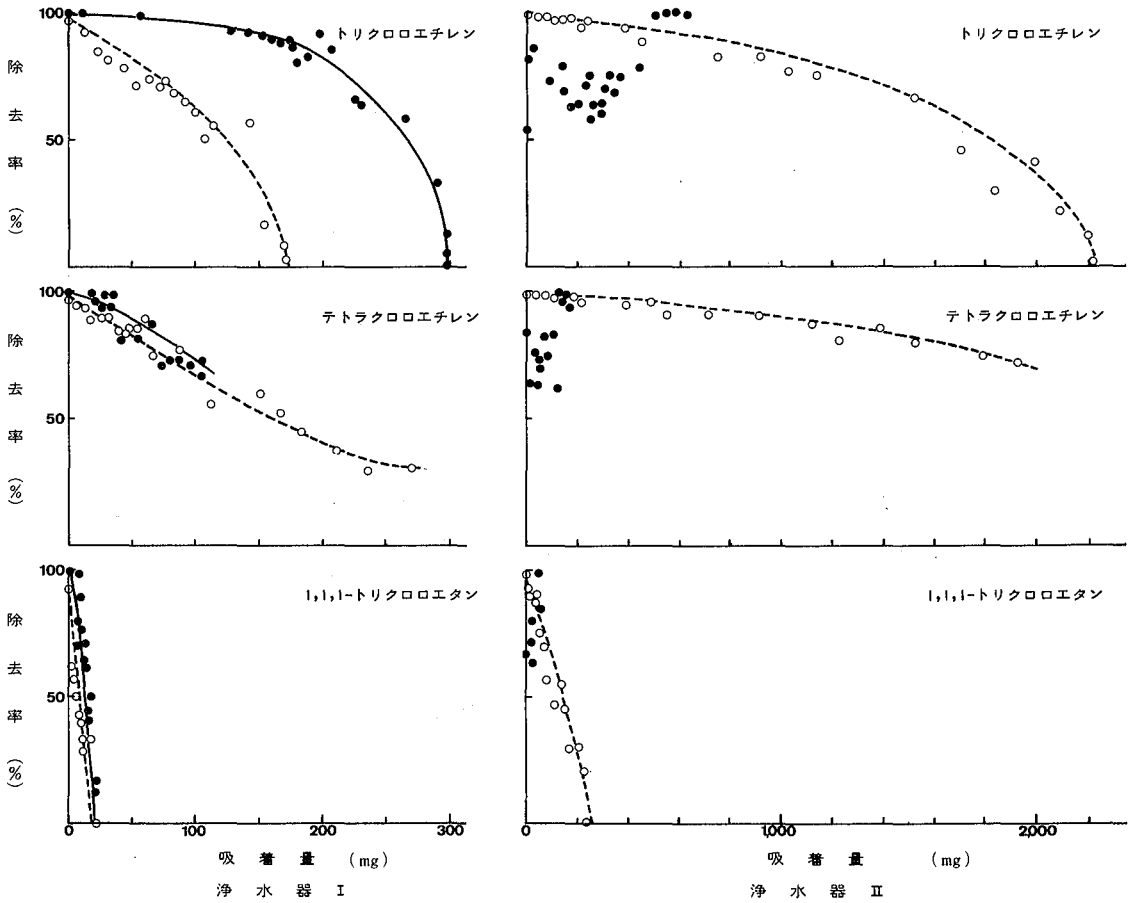


図2．浄水器の揮発性有機塩素化合物の活性炭吸着量と除去率
●—●間歇ろ過　　○---○連続ろ過

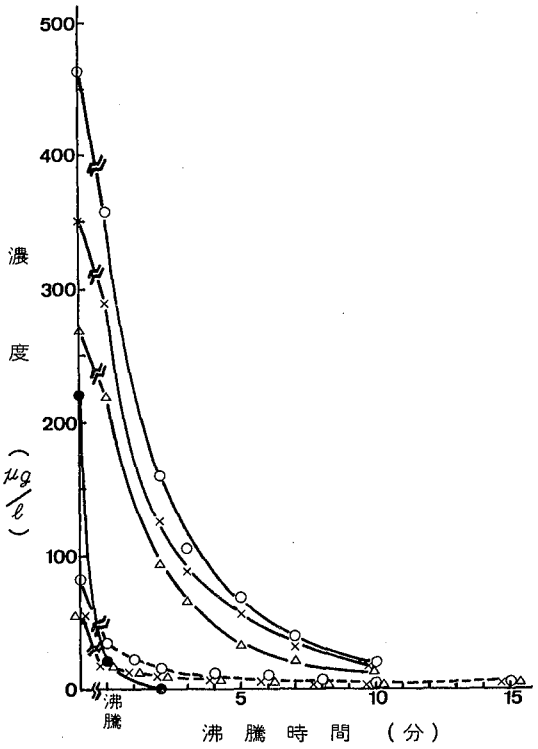


図3．煮沸による揮発性有機塩素化合物の除去

三角フラスコ使用：○—○ ○…○ トリクロロエチレン
×—× ×…× テトラクロロエチレン
△—△ △…△ 1,1,1-トリクロロエタン
やかん使用　：●—● トリクロロエチレン

剤の中で細菌が増殖することはすでに問題にされている[10]．

そこで著者らも，水のろ過量による一般細菌の変化を検討し，表3にその結果を示した．本実験では一般細菌が基準値を上まわるものがみられたが，それらは1 l 流すことによって，いずれも基準値を下まわるようになった．

なお，浄水器Ⅰには細菌の増殖を防ぐ目的で活性炭に銀処理がほどこされている．しかし浄水器ⅠとⅡの細菌の成績には大きな差異はみられなかった．

2）連続ろ過実験

活性炭の吸着効果は，空気との接触によりその効力が低下することや，微生物の増殖により影響を受けることも考えられる．そこで前述の間歇ろ過実験の再現性を確

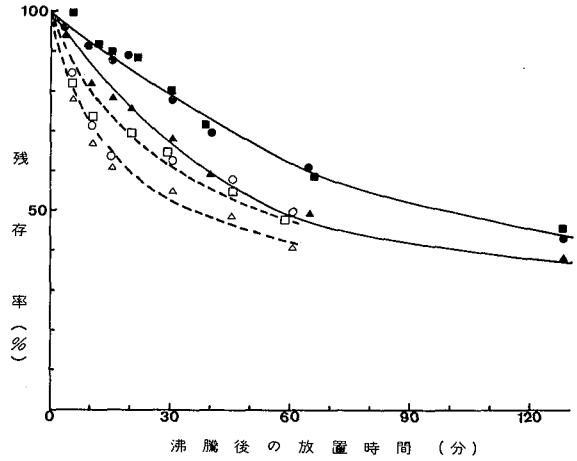


図4．沸騰後放置による揮発性有機塩素化合物の減少

●—● ○…○ トリクロロエチレン　：沸騰直後の濃度　220 μg/l　24 μg/l
■—■ □…□ テトラクロロエチレン　：沸騰直後の濃度　160 μg/l　10 μg/l
▲—▲ △…△ 1,1,1-トリクロロエタン：沸騰直後の濃度　115 μg/l　4 μg/l

認する目的で，VCOC の除去効果が認められた浄水器ⅠとⅡについて連続ろ過を行った．

なお活性炭の除去効果をろ過前の供試井戸中の VCOC 濃度に影響されることなく検討するために，活性炭への VCOC 総吸着量を次式により求めた．

$$\text{総吸着量}(\mu g) = \sum_{i=1}^{n} \{(a_i - b_i) + (a_{i-1} - b_{i-1})\} \times (V_i - V_{i-1}) / 2$$

a_i ：i 回め採水時のろ過前の VCOC 濃度（μg）
b_i ：i 回め採水時のろ過後の VCOC 濃度（μg）
V_i ：i 回め採水時の積算ろ過水量（l）

使用始めの VCOC 除去効果は図2に示すように，浄水器Ⅰの場合，間歇ろ過と同様に除去率95％以上であった．浄水器Ⅱについても除去率は95％以上で，その変動も小さく，間歇ろ過実験の結果より良好であった．

浄水器Ⅱにおける間歇ろ過実験と連続ろ過実験の除去効果に差異がみられた原因は明らかではない．

次に浄水器ⅠとⅡの除去効果の持続性をそれぞれ TCE と1,1,1-TCE の総吸着量で比較した結果，図2に示すようにⅡはⅠの約13倍であった．活性炭の量は，ⅡはⅠの約18倍であり，Ⅰの方がⅡに比較して活性炭の単

表4．瞬間湯沸かし器の揮発性有機塩素化合物への影響

湯沸かし器	温度* (℃)	1,1,1-トリクロロエタン 湯沸かし前 (μg/l)	1,1,1-トリクロロエタン 湯沸かし水 (μg/l)	1,1,1-トリクロロエタン 残存率 (%)	トリクロロエチレン 湯沸かし前 (μg/l)	トリクロロエチレン 湯沸かし水 (μg/l)	トリクロロエチレン 残存率 (%)	テトラクロロエチレン 湯沸かし前 (μg/l)	テトラクロロエチレン 湯沸かし水 (μg/l)	テトラクロロエチレン 残存率 (%)
1	77.5	11.4	9.5	83	47	40	85	24	20.5	85
2	62.0	11.3	10.1	89	47	43	91	24	22	91
3	63.0	11.6	10.5	91	47	44	94	25	23	93
4	53.5	9.6	8.7	91	44	41	93	21	19	92
5	66.0	12	12	100	46	43	93	25	25	100

*使用湯沸かし器の最高温度

表5．くみ置き水の揮発性有機塩素化合物の残存率

保存容器	放置日数 (日)	残存率(%) 1,1,1-トリクロロエタン	残存率(%) トリクロロエチレン	残存率(%) テトラクロロエチレン	残留塩素 (mg/l)
ポリエチレン製広口びん	1	60	68	50	0.3
	2	60	59	50	0.3
	3	53	50	44	0.2
	6	29	32	25	0.1
鍋	1	0	50	47	43
	2	0	17	21	21
	3	0	5	3	7
	6	0	0	0	0

放置前の井戸水中の各化合物の濃度：1,1,1-トリクロロエタン　7 μg/l，トリクロロエチレン　21 μg/l，テトラクロロエチレン　8 μg/l，残留塩素　0.4mg/l

位重量あたりの吸着量が多かった．これはⅠの活性炭がⅡより細かい粒子であったためと考えられる．

またTCE，PCE，1,1,1-TCEの三化合物の中で活性炭に一番よく吸着されたのはPCEで，ついでTCE，1,1,1-TCEの順であった．PCEが一番多かった理由の一つとして，一般に水溶液の状態で活性炭と接触する場合，水に対する溶解度の小さい物質の方が，より活性炭に吸着されやすい[11]といわれており，PCEの水に対する溶解度が他の2種と比較して約1/7と小さいためであると考えられる．

間歇ろ過と連続ろ過のVCOCの除去効果を浄水器Ⅰについて比較検討した．その成績は図2に示すように，PCEと1,1,1-TCEの場合は除去率と吸着量の関係が連続および間歇ろ過の両者とも同じような傾向を示した．従って間歇に使用した場合も活性炭の吸着能力に影響は与えないと考えられる．しかしTCEについては連続ろ過における総吸着量が約175mgであるのに対し，間歇ろ過の場合は約300mgで後者の方が吸着能力が大きかった．この違いはTCEの場合，間歇ろ過実験中のろ過前の濃度が，連続実験中の濃度と比較して2～3倍高かったことによることも考えられる．

2．加熱によるVCOCの除去

VCOCはいずれも水との共沸点が90℃以下と低い．従って加熱することにより容易に除去されることが予測される．そこで一般に家庭で行っている煮沸，沸騰後の放置および加熱が容易である湯沸かし器による除去効果について検討した．

1）煮沸による場合

前報[4]の東京都多摩地区の井戸水におけるVCOCの汚染実態を参考にして調製試料1）を，また高濃度に汚染されている場合も想定して調製試料2）について検討した．

(1) 三角フラスコによる加熱

調製試料1）および2）をそれぞれ1*l*三角フラスコに秤取し加熱した．沸騰し始めから経時的にVCOCを測定した成績を図3に示した．

調製試料1）の場合は，TCEは約1分，PCEは約2分で暫定的水質基準値以下に減少した．調製試料2）の場合，TCEが基準値以下になるまでに約8分，PCEは約10分の煮沸が必要であった．

(2) やかんによる加熱

家庭での除去方法を考え，TCE220 $\mu g/l$，1,1,1-TCE38 $\mu g/l$に汚染されている井戸水1.5*l*をやかんに入れ，煮沸して除去効果を調査したところ，いずれも2分後には検出限界以下であった．多摩地区の井戸水のVCOCによる汚染は，その大半が100 $\mu g/l$以下である[4]ので，一般的にはやかんを用い約2分間の煮沸で，VCOCは除去できると思われる．

2）沸騰後放置した場合

供試井戸水および調製試料3）を三角フラスコにそれぞれ1,000m*l*秤取しバーナー上で加熱沸騰後，室温に放置して，経時的にVCOCの濃度を測定した．図4に示すように供試井戸水および調製試料3）の両者共，30分間放置後も50%以上のVCOCが残存した．

3）湯沸かし器で加熱した場合

供試井戸水を湯沸かし器で加熱した場合のVCOC濃度の変化を表4に示した．

湯沸かし器によるVCOCの濃度変化は，加熱温度が高くなるに伴い，残存率がやや低くなる傾向がみられたが，実用上はほとんど除去効果がないと思われる．これは湯沸かし器の構造が閉鎖性であるため，加熱されてもVCOCが揮散する空間がないこと，加熱が短時間でしかも温度が低いためであると考えられる．

3．くみ置きによるVCOCの減少

供試井戸水をポリエチレン製広口瓶および鍋に入れ，室内に放置した場合のVCOCの変化を表5に示した．VCOCの残存率がポリエチレン製広口瓶の場合は6日後でも25%以上残存し，鍋の場合は3日後には3～7%に減少した．

また，放置により細菌の増殖が懸念されるので，残留塩素についても調査した．供試井戸水の残留塩素が調査開始時に減少していたため次亜塩素酸ナトリウム液を数滴加え，残留塩素濃度を0.4mg/*l*として調査した．

ポリエチレン製容器の場合は6日後でも0.1mg/*l*の残留塩素を認めたが，鍋の場合はすみやかに減少し1日後にはすでに検出されなかった．

これらの結果から，除去効果をあわせて考えた場合，くみ置きは有効な方法とは考えられない．

ま と め

家庭におけるVCOCの除去方法として，1．浄水器による方法，2．加熱による方法，3．くみ置きによる方法について検討し，次の結果を得た．

1．ろ過剤に粒状活性炭を使った浄水器では，使用開始時にはVCOCの除去効果が95%以上と良好であった．しかし，除々にその効果は低下する事がわかった．また間歇的に使用した場合，ろ過始めの水から水質基準を上まわる一般細菌が検出されたが，1*l*のろ過水を棄てることにより，基準値以下となった．

セラミックを使った浄水器では除去効果はみられなかった．

2．加熱による除去方法は，やかんで2分間以上沸騰により効率よく除去できる事が判明した．しかし，沸騰後放置および瞬間湯沸かし器での加熱では十分な効果は得られなかった．

3．くみ置による方法は，除去効果も低く，細菌の増殖の懸念があることから適切な方法ではない．

謝辞 本調査にあたり，供試井戸水の確保に御協力下さった小平保健所衛生課の方々に心から謝意を表します．

文 献

1）Westrick, J. J., Mello, J. W.: *Jour. AWWA*, 76(5),52, 1984
2）日本水道協会抄録委員会訳：水道協会雑誌，614, 34,1985
3）杉戸大作：水道協会雑誌，589,53,1983
4）矢口久美子，大橋則雄，渡辺 学，関山 登，中村弘，坂井千三：衛研年報，35,363,1984
5）古賀輝彦：水道協会雑誌，611,2,1985
6）三宅酉作：公害と対策，20,1001,1984
7）東京都環境保全局：昭和60年度 地下水汚染実態調査の結果について 昭和61年4月
8）及川紀久雄：PPM，7,52,1978
9）日本水道協会：上水試験方法，1985年版
10）鈴木妙子，唐沢 栄，河村太郎，矢野栄三：第43回日本公衆衛生学会年会要旨集，644,1984
11）J. W. ハスラー：活性炭 効果的な応用への手引き，第3版，江口良友，織田考訳，14,1978，共立出版㈱

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.*, 37, 371-372, 1986

オルトフェニルフェノール・ナトリウム（OPP—Na）の肝薬物代謝酵素系におよぼす影響

牛山慶子*, 佐藤かな子*, 長井二三子*, 中川敦子*
加納いつ*, 市川久次*, 中尾順子**

Effects of OPP-Na on Hepatic Drug Metabolizing Enzyme System

KEIKO USHIYAMA*, KANAKO SATOH*, FUMIKO NAGAI*, ATSUKO NAKAGAWA*,
ITSU KANO*, HISATSUGU ICHIKAWA*, and TOSHIKO NAKAO**

Keywords：オルトフェニルフェノール *o*-Phenylphenol，薬物代謝酵素 Drug metabolizing enzyme，チトクローム P-450 Cytochrome P-450

緒　言

オルトフェニルフェノール・ナトリウム（OPP-Na）は防カビ剤として，柑橘類に使用されている．OPP-Naの経口投与で，F344ラットに膀胱ガンの発生が報告された[1]．これは，雄ラットに特に発生が多いこと，他の低濃度の添加飼料の投与に較べ，2％添加で，著しくガンの発生が多いことが指摘されている．

尿中代謝物の分析をした結果，OPPグルクロン酸抱合体の他に，水酸化された2.5-ジハイドロキシジフェニルグルクロン酸抱合体を同定した[2]．この代謝物の尿中濃度は，メスに較べオスの方が50％程高いことを示した．また，OPP-Naの飼料中添加量による，この代謝物の尿中濃度は，他の低濃度添加に較べ，2％で高くなっていた[3]．このことは，この代謝物の尿中濃度と膀胱ガンの発生とは相関性があり，発ガンは，この代謝と関連していることを示唆している．そこで，OPP-Na投与による代謝の変化をみるため，肝薬物代謝酵素系の検討を行った．

方　法

F344／DuCrjラットのオス5週令にコントロール飼料（クレアCE-2），1％OPP-Na添加飼料，2％OPP-Na添加飼料を1群6匹を使用し，自由摂取させた．1週間飼育後，断頭屠殺し，肝を摘出，重量を測定した．肝重量の9倍量の0.25Mショ糖，10mM Tris-HCl（pH7.4）緩衝液を加え，Potter型テフロンホモジナイザーにより，ホモジネートとした．10,000×g，20分間遠心分離した上清を105,000×g，60分間遠心分離し，その沈殿をミクロソーム分画として使用した．

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／*ml* の濃度に0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）で希釈し，これに，ハイドロサルファイト・ナトリウム（$Na_2S_2O_4$）を少量加え，一酸化炭素を20秒間吹きこんだ．一酸化炭素処理していないものを対照として，450nm付近の差スペクトルを測定した[4]．

ビフェニル水酸化酵素の活性の測定は，Atlasらの方法[5]に従い，生成物である4-ハイドロキシビフェニル，2-ハイドロキシビフェニルを蛍光分光光度計で分別，測定した．

ベンツピレン水酸化反応（AHH活性）は，Nebertらの方法[6]で測定した．

タンパク濃度の測定は，牛血清アルブミンを標準として，Lowry法[7]で行った．

結果と考察

肝重量と体重の比は，OPP-Naの飼料中添加量に従って増加した．

薬物代謝酵素の本体といわれる[8]チトクロームP-450は，OPP-Na 1％，2％添加とも，約35％上昇がみられた．フェノバルビタールや3-メチルコラントレンのような著しい誘導剤[9]ほどではないが，OPP-Naも肝薬物代謝酵素系を誘導する．

*東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*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．肝重量比と肝薬物代謝酵素活性

飼料中のOPP-Na濃度	肝重量／体重 (g／100g)	チトクローム P－450量 (nmol/mg prot)	AHH活性 (pmol/mg prot/min)	ビフェニル2位水酸化酵素 (nmol%mg prot/min)	ブフェニル4位水酸化酵素 (nmol/mg prot/min)
0	3.41±0.128	0.436±0.090	45.2±14.3	0.2265±0.004	1.973±0.323
1%	3.77±0.202***	0.583±0.076*	31.6±7.07	0.2504±0.031	1.989±0.254
2%	3.97±0.219***	0.588±0.064*	90.2±30.3***	0.2816±0.029**	1.718±0.122

* $P<0.05$
** $P<0.02$
*** $P<0.01$

AHH活性は，OPP-Na 1％添加では，変化はないが，2％では，コントロールに較べて2倍の上昇があった．3-メチルコラントレンでは，F344ラットのオスで，この活性は，40倍上昇する．OPP-NaもAHH活性を，2倍増加させた．

ビフェニル水酸化酵素活性は，4位水酸化酵素では変化はないが，2位水酸化酵素活性は，OPP-Naの飼料中添加量に応じた活性の上昇がみられた．特に2位水酸化酵素が誘導される薬物には，チトクロームP-450の誘導剤である3-メチルコラントレン，β-ナフトフラボン，TCDDのような[9]発ガン剤が多く，チトクロームP-450の誘導剤であっても，フェノバルビタールでは，この酵素は，ほとんど誘導されない．しかし，OPP-Naは，これらの発ガン剤のような著しい誘導ではなく，しかも，4位水酸化酵素の誘導はない．また，OPP-Naにより誘導されるチトクロームP-450のCO差スペクトルの極大ピークは，450nmにあり，3-メチルコラントレンのような448nmではない．

このように，OPP-Naの肝薬物代謝酵素系の変化は，顕著ではないが，いずれかのチトロクロームP-450成分が変化していることは明らかである．どのような成分に起因しているか，さらに詳細に検討を加える必要がある．

ま と め

OPP-NaをF344／DuCrjラットに経口投与した結果，肝ミクロソーム画分の，チトクロームP-450量，AHH活性，ビフェニル2位水酸化酵素活性の上昇がみられた．

文　献

1）Hiraga, K. and Fujii, T.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 303, 1981
2）Nakao, T., Ushiyama, K., Kabashima, J., Nagai, F., Nakagawa, A., Ohno, T., Ichikawa, H., Kobayashi, H. and Hiraga, K.: *Fd Chem. Toxicol.*, 21, 325, 1983
3）牛山慶子，樺島順一郎，中尾順子：東京衛研年報 34, 297, 1983
4）Omura, T. and Sato, R.: *J. Biol. Chem.* 239, 2370, 1964
5）Atlas, S. A. and Nebert, D. W.: *Arch. Biochen. Biophys.*, 175, 495, 1975
6）Nebert, D. W.: *Methods Enzymol.*, 52, 226, 1978
7）Lowry, O. H., Rosebrough, N. Y., Farr, A. L. and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
8）今井嘉郎，佐藤　了：代謝，19, 1723, 1982
9）Haugen, D. A., Coon, M. J. and Nebert, D. W.: *J. Biol. Chem.*, 251, 1817, 1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 373-375, 1986

経口投与によるオルトフェニルフェノールナトリウム（OPP−Na）のラット乳汁への排泄の可能性についての検討（第2報）

小林博義*, 神谷信行*, 市川久次*

Possibility of Excretion of Sodium o−Phenylphenate (OPP−Na) into milk by Oral Admimistration to Mother Ret (II)

HIROYOSHI KOBAYASHI*, NOBUYUKI KAMIYA* and HISATSUGU ICHIKAWA*

Keywords：乳汁 milk, オルトフェニルフェノールナトリウム sodium o−Phenylphenate, 幼若ラット infant and young rat

緒　言

オルトフェニルフェノール（以下OPP）ならびにオルトフェニルフェノルナトリウム（以下OPP−Na）は，当部での毒性試験の結果，膀胱腫瘍の発生が認められた[1]．さらに体内分布，排泄[2]，酵素[3]ならびに核酸関連物質への影響[4]，代謝物の分析等[5]について検討が加えられて来た．動物の幼若期は代謝および各種器官機能が著しく変化，成長する時期であり，したがって毒物による影響もうけやすい．加えてこの時期に受けた障害は以後の発育に多大な影響を与えるといわれており，幼若期における毒物の各器官に対する生理学的影響を検討することは意義あるものと考えられる．このような観点より我々はOPP−Na（2％）を分娩直後の母ラットに投与し乳汁への移行を確認する目的で，薄層クロマトグラフィー法により仔ラット胃内乳汁中のOPPの分析を行ったが，これを証明，するに至らなかった[6]．今回前報と同様の実験をくりかえし，さらに分析精度の良い高速液体クロマトグラフ法を用いて検討を行ったところ，乳汁への移行が確認できた，また肝臓，脾臓重量におよぼす影響について検討を加えた．

実験材料ならびに方法

1．使用動物

日本チャールス・リバー㈱生産のF 344／DuCrjラットを妊娠8日目で購入し，1母体当り8～10匹の仔を出産した母仔を用いた．実験使用動物数は，対照群母ラット5匹仔ラット雌15匹雄25匹，投与群母ラット5匹仔雌25匹雄18匹を用いた．動物は，室温25±1℃，湿度55±5％，照明時間午前6時～午後5時にて，母仔をプラスチックケージに滅菌カンナクズ，水は給水ビンより自由に飲水させた．

2．OPP投与方法

OPPは，OPP−Naをラット用粉末飼料（日本クレア㈱製）CE−2に2％の割合で（OPP−NaはDow Chemical社製のDowicide A Lot MM8208017B）混合調整後整型乾燥したものを分娩直後より14日間母ラットに連続投与した．対照群には，CE−2粉末を整型乾燥したものを同様に14日間投与した．

3．体重，飼料摂取量ならびに臓器重量の測定

体重は母仔体重を毎日午前9時～10時の間に測定し，同時に飼料摂取量をも測定した．なお，飼料摂取量はコボン量も含む量とした．さらに実験終了時屠殺後，肝臓脾臓を摘出し秤量した．

4．試料

OPP標準品は東京化成㈱製（Lot No FBPO 2），PHQ（フェニルヒドロキノン）は東京化成㈱製（Lot No FCR03超高純度試薬）を用い，その他の試薬はJIS特級を使用した．

5．乳汁の採取ならびに高速液体クロマトグラフィーによる乳汁中のOPPの分析法

実験終了時（投与14日目）仔ラットの胃内乳汁を胃に入ったまま噴門および幽門部にて切断摘出し，バキュームバイアル（キャップゴム付，日電理化硝子株式会社製）に入れ−80°にて保存し，分析時に胃内乳汁を切り出し，その1gを精秤し，メタノール1mlを加え混和，

*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

抽出した後不溶物を遠心（2000rpm，10min）分離し，得た上清について高速液体クロマトグラフィー（CPLC）法（カラムにはUnisi）QC184×250㎜を用い，移動相としてはアセトニトリル：水（1：1）をpH 3に調整したものを用い，流速0.8ml／㎜で流し，254nmにおける吸光度を測定にてOPPの分析を行った．

実験結果ならびに考察

1．一般状態の変化

生後10～14日目にかけて，体温低下をともない急な体重減少をもって死ぬものが，対照群，投与群とも一部にみられたがBHT投与時にみられた母ラットの哺乳のぎこちなさはみられなかった[7]．

2．体重の変化

OPP－Na投与群の母ラットは，増加率で実験開始早期に，抑制傾向がみられたが，12～14日目には，対照群に近づいた．対照群219.6g（119.45％増加）OPP－Na群213.8g（118.12％増加），仔体重もOPP－Na投与群全期間にわたって抑制傾向がみられ，雄対照群，15匹，20.84g（増加率404％）OPP－Na群25匹，18.21g（354.6％），雌，対照群25匹，19.8g（396.9％）OPP－Na群18匹，18.06g（380.4％）であった．

3．臓器重量

分娩直後より14日間2％OPP－Na含有飼料を投与した母仔ラットの肝臓，脾臓重量におよぼす影響を検討したところ，表1に示したごとく，2％OPP－Na投与群仔ラット雌雄の肝臓，脾臓の重量が有意に減少したことが認められた．この結果は，母ラットに投与したOPP－Naあるいはその代謝物が乳汁中に移行し肝臓ならびに脾臓に作用した結果重量の減少したものと推察された．

4．飼料摂取量

対照群，投与群との間に差はなかった．

5．乳汁

仔ラット乳汁量は，対照群，投与群とも240～300mg／仔ラットで両群間の乳汁量，色調等の差はみられなかった．

Table 1．Effect of OPP－Na Admimistration to Mother Rat on Liver and Spleen Weight of Mother and Infant Rat

		No of Animals	Liver	Spleen
Mother Rat	Control	5	10.26±0.571[1)] 4.67±0.187[2)]	484.29±38.529[3)] 220.32±14.638[4)]
	OPP－Na	5	11.50±0.893 5.37±0.291	496.60±33.351 232.29±14.753
Infant Rat Male	Control	15	632.82±102.351[3)] 3024.61±183.973[4)]	65.67±14.175 313.05±41.912
	OPP＝Na	25	504.57±64.348** 2772.08±230.855	48.31±8.211**[5)] 265.03±31.993
Femal	Control	25	642.43±103.906 3239.80±214.030	64.23±13.873 323.53±52.686
	OPP－Na	18	508.21±103.769** 2810,02±432.845	46.66±10.063** 258.36±45.714

Mean＋S.D 1）g 2）g／100g B.W 3）mg 4）mg／100g B.W 5）**P＜0.01

6．乳汁中に含まれるOPPの高速液体クロマトグラフィによる分析

(1) **検量線** 2，5，10ppmのOPP標準液（メタノール液）を調整し，高速液体クロマトグラフィによりOPP濃度と245 nmにおける吸光度（ピークの高さ）との関係をプロットし検量線を作成したところ，その結果図1に示したように良好な直線性を示した．

(2) **分析結果** 図2に示したように生後14日目の胃内仔乳汁中にOPPが2.8ppmの濃度で含有することが検出できた．先に報告した薄層クロマトグラフ法による仔乳

汁中OPP－Naは促えられなかったが，高速液体クロマトグラフィ法により，OPP－Naが乳汁を介して，仔にとりこまれていることが示された．図2に示したOPPピークの前にある小さいピークは（矢印で示す）OPP－Na溶液の長期保存時にみられる分析ピークに類似していた[8]．このピークについてはOPPの代謝物なのかあるいは保存中に変化したもの等であるのかを今後の研究によって明らかにしたいと考えている．

添加回収実験 対照群乳汁にOPP標品およびPHQ標品を添加し，前述の分析方法に従って回収実験を行なった．その結果 回収率は93％の結果が得られほぼ良好な回収率と考えられ，参考までに，添加飼料中のOPP回収率は98％以上と報告されている[9]．乳汁中からの回収率もほぼ良好なるものと推察される．

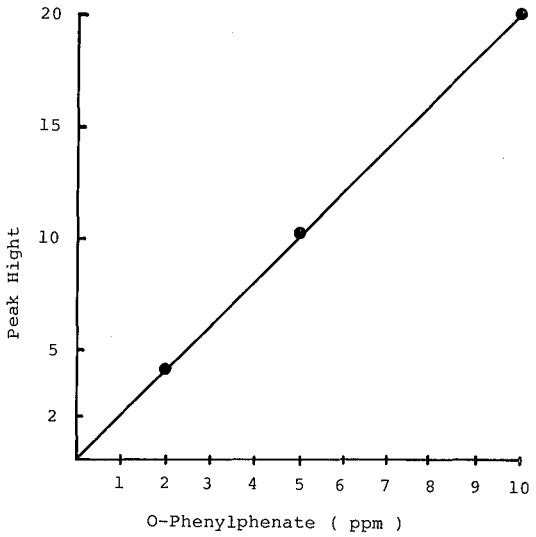


Fig. 1 . Linearity of Detection for OPP Standard

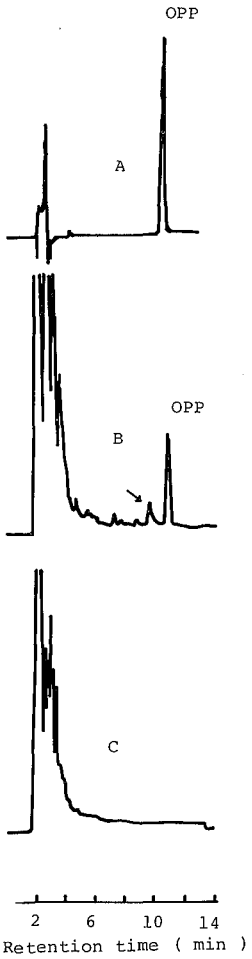


Fig. 2 . HPLC Separation of OPP in Young rat milk
A ：OPP standard
B ：Admimistration
C ：Control

ま と め

F 344／DuCrj 母ラットへ2％オルトフェニルフェノールナトリウム（OPP－Na）を14日間連続経口投与したところ，哺乳中の仔ラット胃内乳汁中にOPP 2.8 ppmが検出された．

前報のWistar系ラットを用いた実験系で投与OPPの証明ができなかったことは検出方法の感度によるものと思われた．しかし，両実験系でみられた体重および臓器重量の違いは動物の系統による感受性の差も推察された．

文 献

1）Hiraga, K and Fujii, T : Food and Cosmetic Toxicology 19,303,1981
2）市川久次，小林博義，中尾順子：東京衛研年報33－2,451,1982
3）長井二三子，中尾順子：東京衛研年報33－2,458,1982
4）大槻慶子，樺島順一郎，中尾順子：東京衛研年報32－2,51,1981
5）藤谷和正，牛山慶子，中尾順子：東京衛研年報33－2,470,1982
6）小林博義，中尾順子：東京衛研年報34－2,302,1983
7）小林博義：東京衛研年報30－2,5,1979
8）神谷信行：私信
9）神谷信行，平賀興吾：東京衛研年報33－2,561,1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 376-379, 1986

アセトアミノフェンの変異原性増強効果について（第2報）
化学構造と活性の関係について

藤谷和正*, 佐々木美枝子**

Promoting Effect of Acetaminophen on Mutagenicity (II)
Relation of the Chemical Structures and the Activities

KAZUMASA FUJITANI* and MIEKO SASAKI*

Keywords：変異原性 Mutagenicity, アセトアミノフェン Acetaminophen, アセトアミドフェノール Acetamidophenol, N-メチル-N′-ニトロ-N-ニトロソグアニデン N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine, CHO-K1 cell

緒　言

アニリン系鎮痛解熱剤として広く用いられているフェナセチン(*p*－アセトアミドフェネトール)およびアセトアミノフェン(*p*－アセトアミドフェノール)の発癌性，発癌プロモーター活性および染色体異常誘発性についてはいくつかの報告がある[1-6]．このうちアセトアミノフェンは培養細胞および実験動物に染色体異常を誘発し[4]，また強力な変異原物質である N－methyl－N′－nitro－N－nitrosoguanidine（以後 MNNG と略す）によってひき起こされる突然変異および染色体異常を増強させる効果のあること[6-9]アセトアミノフェンのこの変異原活性増強作用は化学変異原による突然変異だけでなく紫外線による突然変異にもおよぶこと[9]がすでに報告されている．

今回我々はアセトアミドフェノールの三異性体，すなわち *o*－acetamidophenol, *m*－acetamidophenol および，*p*－acetamidophenol（acetaminophen）（以後，それぞれ *o*－AAP, *m*－AAP および *p*－AAP と略す）の細胞毒性および MNNG によって誘発されるウアバイン耐性突然変異に対する増強作用について化学構造と活性の関係を検討したので報告する．

材料と方法

細胞は当部で継代維持されている CHO－K1 細胞（チャイニーズハムスター卵巣由来株化細胞）を用いた．

試薬：*o*－AAP（和光純薬工業　010－00182），*m*－AAP（Aldrich A－720－5），*p*－AAP（和光純薬工業　017 － 00192　97%），MNNG（Aldrich 12,994 － 1　97%），ジメチルスルホキシド（以後 DMSO と略す　和光純薬工業　045－07215　試薬特級），ouabain octahydrate（Sigma O－3125），ハム F－12培地ニッスイ（日水製薬　05910），炭酸水素ナトリウム（和光純薬工業　191－01305　試薬特級），結晶ペニシリン G カリウム明治（明治製菓），硫酸ストレプトマイシン明治（明治製菓），Calf Bovine Serum（Flow Laboratries, Australia 29－131－54）

o－, *m*－, および *p*－AAP は使用直前に，10 μl DMSO／4 ml medium となるように DMSO に溶解した．MNNG は200 μg／ml の水溶液を－20℃に保存し用時解凍して用いた．ウアバインは1.0gを100 ml のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に溶解し，メンブランフィルターでろ過滅菌し遮光保存した．培地はハム F－12培地ニッスイ（粉末）10.6 g を再留水で1 l とし，炭酸水素ナトリウム1.5 g を溶解した後ペニシリン10万単位／l，硫酸ストレプトマイシン 1 mg／l を添加し，メンブランフィルターでろ過滅菌して4℃で保存，用時に仔牛血清を10%（v／v）となるように加えたものを正常培地とした（以後 F－12+10%CS と略す）．

1）*o*－, *m*－, および *p*－AAP の毒性比較試験：直径60mm（培養直径50mm）の滅菌済シャーレに培地 4 ml を

*東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
**同・病理研究科

入れ，37℃，5％CO_2インキュベーターで温度およびpHを一定にしておく．CHO－K 1細胞を0.25％トリプシンで処理して浮遊液とし1.0×10^2cells／dishになるように播種した．翌日，三異性体の各濃度のDMSO溶液10μlを0,25,100,200および400μg AAP／ml mediumとなるように添加して培養を続け，播種の7日後に細胞を0.05％ゲンチアナバイオレット／メタノールで固定・染色し，コロニーを数えた．

2）MNNGの変異原性に対するo－, m－および, p－AAPの効果：培養フラスコTD－40　5本に，2×10^6cells／TD－40のCHO－K 1細胞を播き（第0日とする）一晩培養した．翌日0.3または0.5μg MNNG／mlを含み，血清を含まないF－12培地で2時間培養し，その後正常培地で洗條・培地交換して一晩培養した．

① 生存率試験：第2日にトリプシン処理により浮遊液とした細胞を60㎜シャーレ（5枚／群）に2.0×10^2～1.0×10^3cells／dishになるように播種した．第3日にo－, m－, およびp－AAPの各濃度のDMSO溶液またはDMSOを10μlづつ添加して2時間培養し，その後正常培地に交換して培養を続けた．第9日に固定・染色してコロニーを数えた．

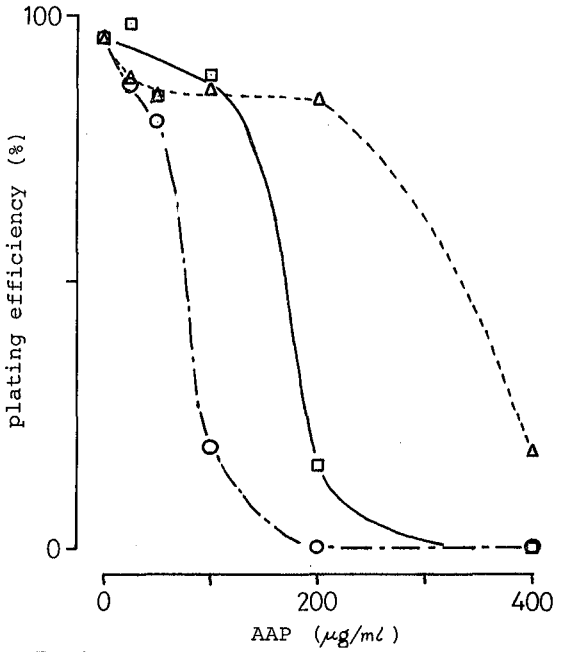


Fig. 1. Effect of Concentrations of o －, m － and p－AAP on the Viability
—□— o－AAP　---○--- p－AAP
---△--- m－AAP

Table 1. Effect of o －, m －· and p －AAP on the Mutagenicity of MNNG

		MNNG (μg/ml)	AAP (μg/ml)	P.E. (%)	M.F. (oua^r/10^6survivor)
EXP 1	cont	0.3	0	37.0	88.3
	o－AAP	0.3	150	37.6	77.8
	m－AAP	0.3	300	37.2	85.3
	p－AAP	0.3	75	37.8	95.2
EXP 2	cont	0.3	0	27.7	62.8
	o－AAP	0.3	100	24.5	73.5
	m－AAP	0.3	100	24.8	76.6
	p－AAP	0.3	100	20.8	64.4
EXP 3	cont	0.5	0	7.24	190
	o－AAP	0.5	100	5.27	279
	m－AAP	0.5	100	5.00	356
	p－AAP	0.5	100	4.07	353
EXP 4	o－AAP	0.5	100	13.4	364
	m－AAP	0.5	100	15.3	314
	p－AAP	0.5	100	14.2	304

P.E.：plating efficiency　M.F.：mutation frequency

② ウアバイン耐性試験：第2日に同じ細胞浮遊液を60mmシャーレ（5枚／群）に約1.0×10^6cells／dishになるように播種した．第3日に$o-$, $m-$, および$p-$AAPの各濃度のDMSO溶液またはDMSOを10 μlづつ添加して2時間培養し，その後正常培地に交換して培養を続けた．第4日に1 mM ouabainを含むF－12＋10％CSに培地を交換した．途中2回培地交換して，第9日に固定・染色してウアバイン耐性細胞のコロニーを数えた．

コロニー形成率（生存率）および突然変異率は次の式により求めた．

$$\text{コロニー形成率}=\frac{\text{正常培地でのコロニー数}}{\text{播種した細胞数}}$$

$$\text{突然変異率}^*=\frac{\text{選択培地でのコロニー数}}{\text{播種した細胞数}}\times10^6$$

$$\div\text{コロニー形成率}$$

＊10^6の生存細胞あたりのウアバイン耐性細胞数

結果および考察

AAPの三異性体のCHO－K 1細胞に対する毒性比較の結果を図1に示す．コロニー形成率で見る限り，毒性の強さは$p-$AAP（アセトアミノフェン）$>o-$AAP$>m-$AAPの順となった．またCHO－K 1細胞に対するLD_{50}はおよそ$p-$AAP 75 μg／ml，$o-$AAP 150 μg／ml，$m-$AAP 300 μg／mlであった．

AAPの三異性体がMNNGの変異原性に及ぼす効果を調べるために行なった試験の結果を表1に示す．MNNG処理濃度は実験1と2ではCHO－K 1細胞に対するLD_{50}[6]にあたる0.3 μg／ml，実験3と4ではそれよりいくらか毒性の強い0.5 μg／mlとした．AAPによる後処理濃度は実験1ではCHO－K 1細胞に対するLD_{50}にあたる各濃度とし，実験2，3および4では一定の100 μg／mlとした．MNNG 0.3 μg／mlの処理ではAAP後処理群と無処理群（MNNG処理のみ）との間にも，$o-$, $m-$, および$p-$AAP間にもウアバイン耐性突然変異誘発率の差は見られなかった．MNNG 0.5 μg／mlの処理ではウアバイン耐性はAAP処理によって増加したが，AAP三異性体間には差がなかった．すなわち，比較的

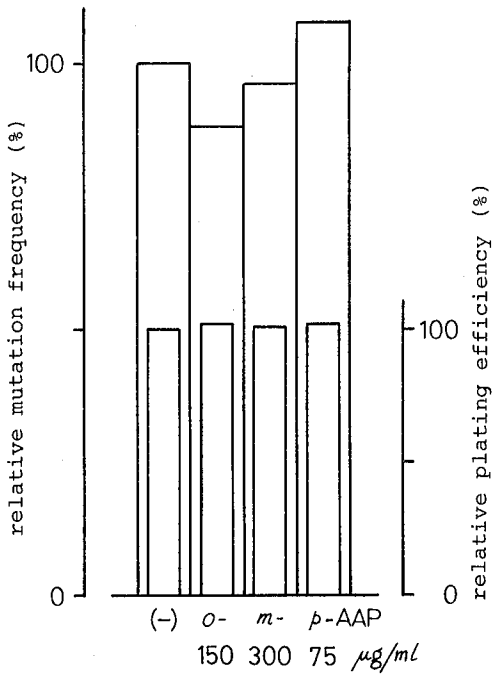


Fig. 2 －① Effect of $o-$, $m-$ and $p-$AAP on the Mutagenicity of MNNG
MNNG Concentration : 0.3 μg／ml

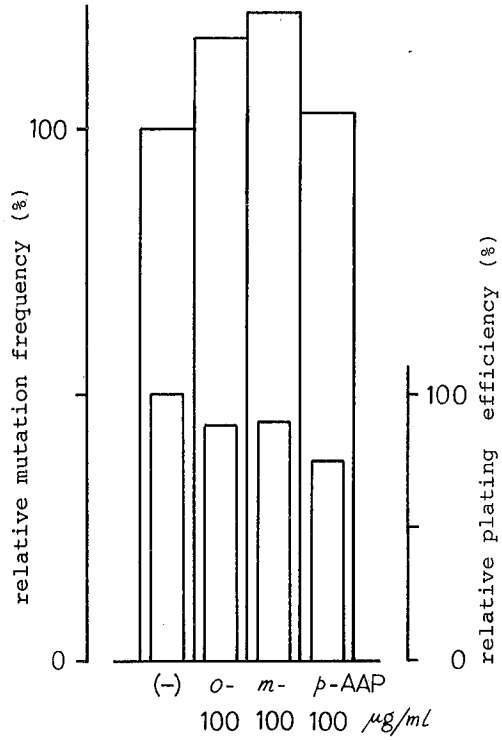


Fig. 2 －② Effect of $o-$, $m-$ and $p-$AAP on the Mutagenicity of MNNG
MNNG Concentration : 0.3 μg／ml

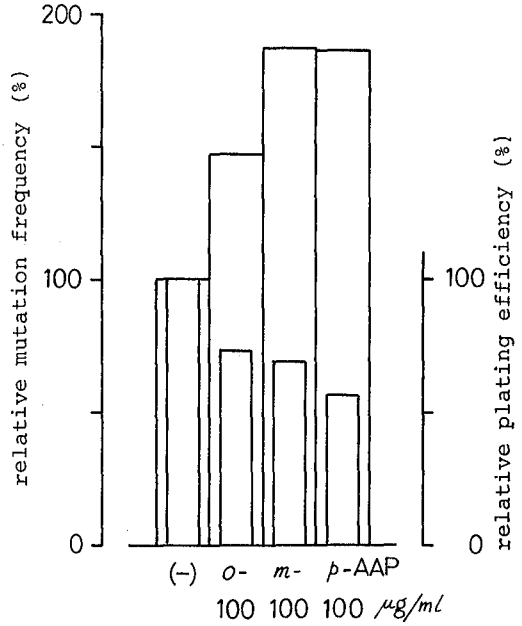


Fig. 2 −③ Effect of *o* −, *m* − and *p* −AAP on the Mutagenicity of MNNG
MNNG Concentration : 0.5 μg／ml

高濃度の MNNG (0.5 μg／ml) によって処理した場合は AAP の後処理によって MNNG によるウアバイン耐性突然変異が増強されたが，低濃度の MNNG 処理では AAP の効果は見出せなかった．*o*−, *m*− および *p*−AAP の活性差はこの条件下では見出せなかった．図2−①②③に細胞生存率と突然変異誘発率の関係を相対値で示した．

アセトアミノフェン (*p*−AAP) の変異原性増強効果が，比較的高濃度の MNNG 処理した場合の方が，低濃度 (sub−mutagenic dose) の MNNG の場合よりも有効に発現されることはすでに報告している[7]．本実験で示された0.3 μg／ml MNNG 処理と0.5 μg／ml MNNG 処理との差，すなわち前者（実験1，2）では AAP の後処理の効果が殆んど見られないのに対し，後者（実験3，4）では AAP の後処理により MNNG 単独処理の場合の2倍近い突然変異率が見られたことは，この点を再現している．さらに MNNG の濃度を変えて実験を行なう予定である．

本実験の目的であった AAP の三異性体間の活性の差は少なくとも MNNG の突然変異原性に対する増強効果という点では *o*−, *m*− および *p*−AAP いずれもほぼ同等であった．

文　献

1) Isaka,H., Yoshii,H., Otsuji,A., Koike,M., Nagai,Y., Koura,M., Sugiyasu,K. and Kanabayashi,T.: *Cann*, 70, 29−36,1979
2) Nakanishi,K., Fukushima,S., Shibata,M., Shirai,T., Ogiso,T. and Ito,N. : *Gann*, 69,395−400,1978
3) Ishidate,M.Jr. and Odashima,S.: *Mutation Res.*, 48,337−354,1977
4) 吉田誠二，縄井寿美子，平賀興吾：東京衛研年報，31−2,102−108,1980
5) 佐々木美枝子，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，33,547−551,1982
6) 佐々木美枝子，吉日誠二，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，32−2,97−102, 1981
7) Sasaki,M., Yoshida,S. and Hiraga,K.: *Mutation Res.*, 122,367−372,1983
8) 佐々木美枝子，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，31−2,99−101,1980
9) 佐々木美枝子，平賀興吾：東京衛研年報，34,392−398,1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 380-386, 1986

赤血球形態変化および赤血球膜 Ca^{2+}, Mg^{2+}−ATPase に対するクロロキンの作用

長井 二三子*, 牛山 慶子*, 中川 敦子*
加納 いつ*, 中尾 順子**

Shape Change of Erythrocyte Ghosts and Inhibition of Calmodulin stimulated Ca^{2+}, Mg^{2+}−ATPase by Chloroquine

FUMIKO NAGAI*, KEIKO USHIYAMA*, ATSUKO NAKAGAWA*,
ITSU KANO* and TOSHIKO NAKAO**

Keywords：クロロキン Chloroquine, カルモデュリン calmodulin, Ca^{2+},Mg^{2+}−ATPase

緒　言

抗マラリヤ剤のクロロキンは副作用として網膜症をひきおこすことが知られているが，その発症機序は未だ明らかではない．著者らは膜のモデルとして赤血球膜を用いてクロロキンの作用を検討することにより，網膜変性発生の機序解明を試みた．クロロキンの赤血球におよぼす影響については，村山らによって赤血球形態変化，浸透圧溶血抵抗，赤血球膜酵素への影響および赤血球膜表面荷電の変化などについて報告されている[1-3]．

最近，骨格構造タンパク質についての研究が進み，スペクトリンなどの裏打ち構造タンパク質が赤血球の形態変化に関与しているという報告が数多く出されている[4]．さらに，広く細胞内に存在するカルシウム調節タンパク質のカルモデュリンがスペクトリンと結合すること，カルモデュリン阻害剤であるトリフルオロペラジン，プロメタジン，クロルプロマジン等が赤血球を内方陥没させる作用があることなどが報告されており，カルモデュリンは赤血球の正常な形態の維持に骨格構造タンパク質への作用を介して関与していると推定される証拠[4,5]が提出されている．クロロキンが赤血球の形態を内方陥没させることは村山らの報告[2]に示されているが，クロロキンの濃度が15.6 mM と高い．そこで，著者らはクロロキンによる形態変化を赤血球の可溶性分画であるヘモグロビンを除き，純粋な形質膜（ゴースト）を調製して，ゴーストに対する作用で観察した．赤血球のゴーストは一定の条件下では，無傷赤血球の性質をかなり残しており，膜の構築および機能の研究材料として数多く使われている．またカルモデュリンによって活性化され，細胞内のカルシウムおよびATP レベルを調節すると言われている Ca^{2+},Mg^{2+}−ATPase[6,7] についてクロロキンの阻害作用をしらべ，クロロキンがカルモデュリンの拮抗阻害剤である可能性を見いだした．またこの酵素活性阻害作用とゴーストの形態変化との関連についても討論した．さらにアデニルシクラーゼ，Na^+,K^+−ATPase などの細胞膜酵素についてもクロロキンによる阻害作用をしらべた．

実験材料および方法

材料

クロロキンは Sigma 社のクロロキンリン酸塩を Bio・Rad AGI−X8を用いてクロロキンアセテートに転換して使用した．カルモデュリンは Goparakrishna の方法[8]により牛脳より精製した．

方法

赤血球ゴーストの形態観察

赤血球ゴーストは Jinbu らの方法[9]に従って，採血後3−5日の CPD 保存血を用いて調製し，50％グリセリン含有懸濁液にして液体窒素中に保存した．形態の観察は 2 mM $MgCl_2$ または 2 mM $MgCl_2$および 2 mM ATP を含む0.154 M NaCl にクロロキンを加えて Zeiss フォトマイクロスコープⅢを用いて暗視野法により行った．

*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

赤血球膜 Ca^{2+},Mg^{2+}－ATPase 活性の測定

赤血球膜標品は上記の CPD 保存血を生理食塩水で3回洗浄し，Jarrett らの方法[10]に従い，20倍量の 1 mM EDTA，28 mM Tris. HCl（pH7.4）を用いて溶血させる方法で調製した．酵素反応は 3 mM ATP，5 mM $MgCl_2$，140 mM NaCl，14 mM KCl，0.5 mM EGTA，0.8 mM $CaCl_2$，0.1 mM ウアバイン，30 mM imidazole HCl（pH7.4）を含む液0.5 ml 中に10～200 μg の酵素標品，0～10 μg のカルモデュリン，0～1×10^{-2}M のクロロキンを加えて，37℃，45分間インキュベートして行った．40%トリクロロ酢酸0.1 ml を加えて反応を停止し，さらに DOWEX50W－X4懸濁液0.1 ml を加えて激しく攪拌し，無機リン酸測定時に発色を妨害するクロロキンを吸着させた．3,000 rpm，15分間遠心により除タンパクと樹脂の除去を行ったあと，Fiske,Subbarou 法[11]により遊離した無機リン酸を測定した．タンパク質は Lowry 法[12]により測定した．

アデニルシクラーゼは，ラット脳より酵素標品を調製し，$C_{12}E_8$（オクタエチレングリコールモノドデシルエーテル）により可溶化し，可溶化酵素として用いた．測定は salmonn の方法[13]に従って，α－^{32}P－ATP を基質に用いて測定した．

Na^+,K^+－ATPase は馬髄質外帯より精製した SDS 酵素（比活性：約1,000 μmol Pi／mg. Pr.／hr）を用い，Nakao らの方法[14]に従って測定した．

結　果

赤血球ゴーストを用いて形態観察を行った結果を図1に示した．図1－(A)は 2 mM $MgCl_2$を含んだ等張液中でのクロロキンの添加によるゴーストの形の変化を示したものである．赤血球ゴーストの形は 2 mM $MgCl_2$を含んだ等張液中では echinocyte または spherocyte であるが，0.1 mM クロロキン添加により棘を持った内方陥没の形に変形した．0.5 mM クロロキン添加においても同じ結果が得られた．2 mM $MgCl_2$，2 mM ATP 含有等張液中ではゴーストの形は ATP レベルを保った無傷赤血球の場合とおなじように discocyte であったが，この懸濁液に0.1 mM クロロキンを添加すると，ゴーストは内方に陥没し，カップ型に変形した．0.5 mM クロロキン添加はさらに典型的なカップ型に変形した［図1－(B)］．またゴーストの直径は0.1 mM および0.5 mM クロロキンの添加では変化しなかったが，1.0 mM クロロキンでは有意に減少した（表1）．

図2はカルモデュリン存在下および非存在下でのクロロキンの Ca^{2+},Mg^{2+}－ATPase 活性に対する阻害作用を示したものである．図2はカルモデュリン存在下での活性から非存在下での活性を差し引くことによってカルモデュリン依存性 Ca^{2+},Mg^{2+}－ATPase に対するクロロキ

表1．クロロキン処理赤血球ゴーストの直径

Chloroquine	diameter 2 mM $MgCl_2$, 0.154 M NaCl	 2 mM Mg–ATP, 0.154 M NaCl
mM	μm	μm
0	6.44±0.28(120)	8.18±0.61(90)
0.05	—	8.28±0.49(40)
0.1	6.71±0.76(50)	7.90±0.30(50)
0.2	6.51±0.38(40)	7.50±0.39(50)
0.5	6.44±0.44(80)	7.86±0.61(110)
1.0	6.08±0.29(60)	7.35±0.38(50)

( )内は測定した赤血球ゴーストの数

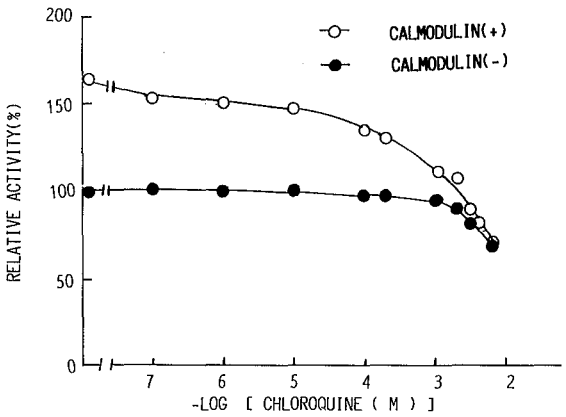


図2．赤血球膜 Ca^{2+}，Mg^{2+}－ATPase 活性に対するクロロキンの阻害

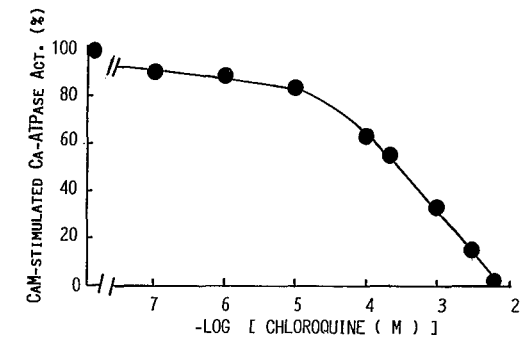


図3．赤血球膜カルモデュリン依存性 Ca^{2+},Mg^{2+}－ATPase 活性に対するクロロキンの阻害

ンの阻害を示したものである．カルモデュリンを添加しないときの活性すなわちカルモデュリン非依存性活性は 1×10^{-4} M のクロロキンでほとんど阻害されず 1×10^{-3} M クロロキンの存在下でも90%以上の活性を保持していた．カルモデュリン依存性活性は図3に示したようにクロロキンによって特異的に阻害され，1×10^{-7} M の濃度でも弱い阻害を示し，その半阻害濃度は約 2×10^{-4} M であった．図4にクロロキン0.3 mM, 1.0 mM 存在下での Ca^{2+}, Mg^{2+}－ATPase 活性に対する添加したカルモデュリン量の影響について示した．クロロキン0.3 mM によって阻害された活性はカルモデュリンの量を増すことによってほぼ完全にクロロキン無添加の場合と同じ活性を示すまでに回復した．しかしクロロキン1.0 mM によって阻害されたカルモデュリン依存性 Ca^{2+}, Mg^{2+}－ATPase 活性はカルモデュリンの量を増やしても完全には回復しなかった．さらにクロロキンの阻害作用を動力学的に解析するためにクロロキン 0 mM, 0.3 mM, 1 mM 存在下でカルモデュリンの量を変えて Ca^{2+}, Mg^{2+}－ATPase 活性を測定し，結果を両逆数プロットであらわした（図5）．この図より0.1 mM のクロロキンはカルモデュリンの Ca^{2+}, Mg^{2+}－ATPase に対

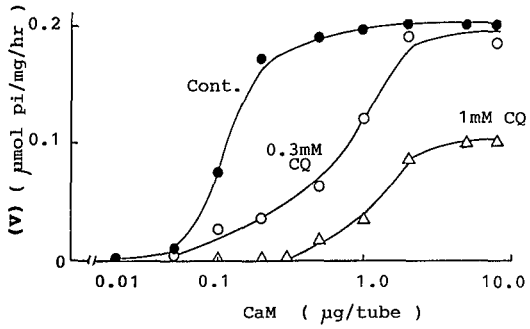


図4．ヒト赤血球 Ca^{2+}, Mg^{2+}－ATPase 活性のクロロキンによる阻害とカルモデュリン量との関係

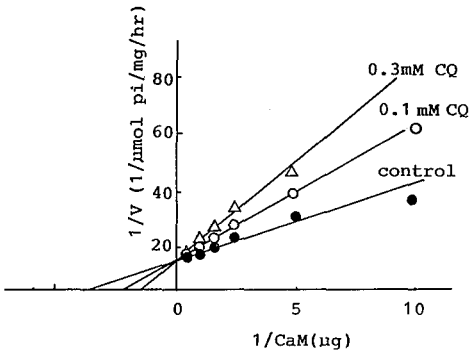


図5．ヒト赤血球 Ca^{2+}, Mg^{2+}－ATPase 活性のクロロキンによる阻害とカルモデュリン量との関係(両逆数プロット)

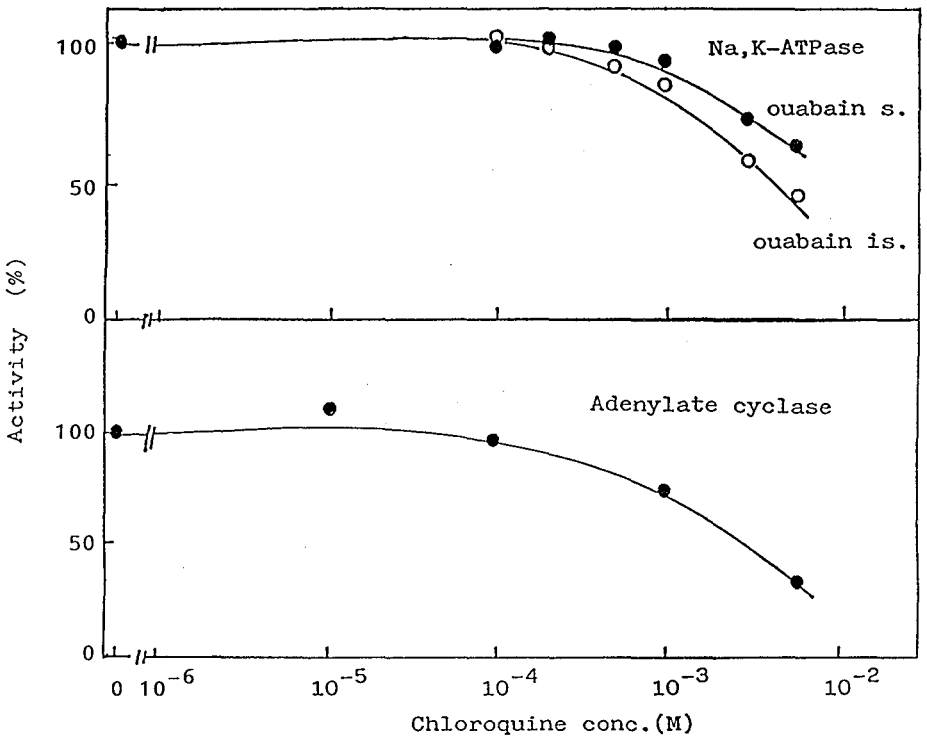


図6．Na^{+}, K^{+}－ATPase およびアデニルシクラーゼ活性に対するクロロキンの阻害

するkm値を1.7倍，0.3mMクロロキンは2.5倍増し，カルモデュリンのCa^{2+},Mg^{2+}－ATPaseに対する親和性を下げた．また最大活性値を示すY軸との切片は，クロロキン無添加および0.1 mM，0.3 mM添加共に同一点にあった．すなわち，クロロキンがカルモデュリンのCa^{2+},Mg^{2+}－ATPaseに対する活性化作用を拮抗的に阻害したことを示したものである．

つぎに細胞膜酵素であり，膜障害の指標としてよく使われるNa^{+},K^{+}－ATPaseおよびアデニルシクラーゼ活性についてもクロロキンによる阻害をしらべたが，カルモデュリン依存性Ca^{2+},Mg^{2+}－ATPaseの場合のような特異的な阻害は見られなかった（図6）．

考　察

村山ら[2]は無傷赤血球を用いてクロロキンによる形態変化を観察し，内方陥没を引き起こすことを報告した．

著者らはさらに詳しくクロロキンの形態変化作用をしらべるため純粋な赤血球膜として調製したゴーストを用いて観察した．赤血球ゴーストは0.1 mMのクロロキンの添加により内胞陥没し，無傷赤血球の場合の15.6 mMで内方陥没が見られたという結果にくらべてかなり低濃度であった．また赤血球膜Ca^{2+},Mg^{2+}－ATPase活性のクロロキンによる阻害作用は少なく，15.5 mMのクロロキンで，52.6%阻害したと報告[2]しているが，著者らの実験でもカルモデュリン無添加の反応系では，クロロキンによる阻害は12.0 mMで約50%阻害とほぼ同じ結果を得た．しかし，カルモデュリンにより活性化されたCa^{2+},Mg^{2+}－ATPase活性は図3に示したように1×10^{-7}Mの低濃度から徐々に阻害し，半阻害濃度は約2×10^{-4}Mであった．この濃度は形態変化を引き起こす濃度に近い値であり，Nelsonらの報告[4]と一致する結果であった．またクロロキンはカルモデュリンのCa^{2+}，Mg^{2+}－ATPaseに対する活性化を拮抗的に阻害することも明らかになった．クロロキンは種々のカルモデュリン阻害剤の場合[15-18]と同じように，カルモデュリンと特異的に結合することにより，その結合タンパク質との親和性を低下したものと推定した．

まとめ

(1) クロロキン0.1 mMを含む生理食塩水中で，ヒト赤血球ゴーストは内方陥没の形に変形することを暗視野像により証明した．

(2) クロロキンは，赤血球膜Ca^{2+},Mg^{2+}－ATPaseのカルモデュリンによる活性化を拮抗的に阻害した．その半阻害濃度は約0.2 mMであった．

(3) クロロキンのカルモデュリン依存性Ca^{2+},Mg^{2+}－ATPaseに対する半阻害濃度とゴーストを変形する濃度は，相関していた．

(4) Na^{+},K^{+}－ATPase，アデニルシクラーゼについてはクロロキンによる特異的な阻害は見られなかった．

文　献

1) 村山季美枝，進藤典子，堀米京子，中島　章，昭和52年厚生省依託研究「医薬品の視覚障害に関する研究」，P9，1978

2) 村山季美枝，進藤典子，中島　章，昭和53年厚生省依託研究「医薬品の視覚障害に関する研究」，P9，1979

3) 村山季美枝，進藤典子，中島　章，昭和54年厚生省依託研究「医薬品の視覚障害に関する研究」，P6，1980

4) Nelson, G. A., Andrews, M. L., and M. J. Karnovsky, : *J. Cell. Biol.* 96,730,1983

5) 神部芳則，佐藤真吾，中尾　真，：蛋白質，核酸，酵素，28,531,1983

6) Gopinat R. M. and Vincenzi F. V., : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77,1203,1977

7) Jarret, H. W. and Penniston, T., : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77,1210,1977

8) Gopalakrishna, R. and Anderson, W. B., : *Biochem. Bionhys. Res. Commun.*, 104,830,1982

9) Jinbu, Y., Sato, S., Nakao, M. and Tsukita, S., : *Exp. Cell Res.*, 151,160,1984

10) Jarret, H. W. and Penniston, J. T., : *Biochim. Biophys. Acta*, 448,314,1976

11) Fiske, C. H. and Subbarow, Y. J., : *J. Biol. Chem.*, 66, 375,1925

12) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., : *J. Biol. Chem.*, 193,265,1951

13) Salmon, Y., Lodos, C. and Rodbell, M., : *Anal. Biochem.*, 58,541,1974

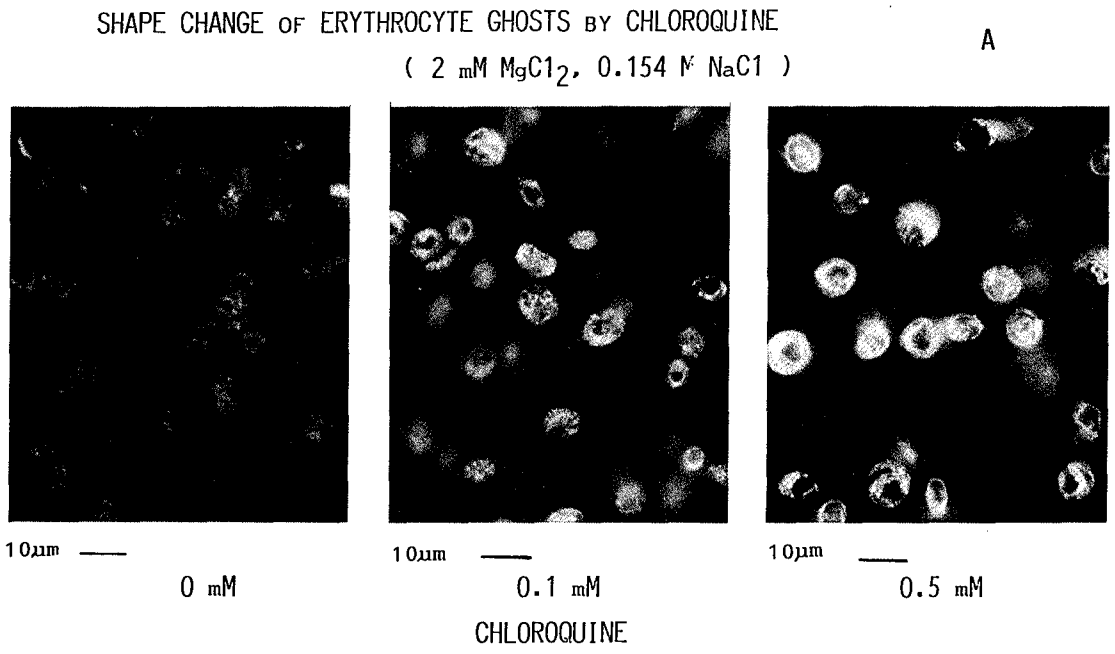
14) Nakao, T., Nakao, M., Mizuno, N., Komatsu, Y., and Fujita, M., : *J. Biochem.*, 73,609,1973

15) 日高弘義，：蛋白質，核酸，酵素，27,2393,1982

16) Tanaka, T., and H. Hidaka, H., : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101,447,1981

17) Hing-Yat, P. L., : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118, 27,1984

18) Kubo, K., Matsuda, Y. and Yamada, K., : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124,315,1984



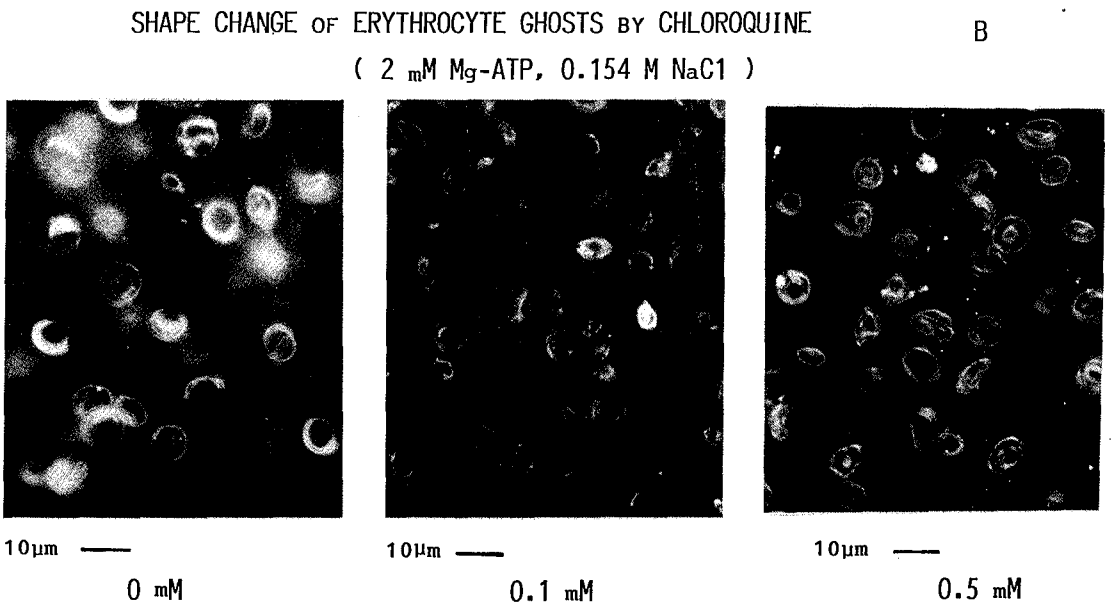


図1．ヒト赤血球ゴーストのクロロキンによる形態変化

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **37**, 387-390, 1986

Na-NMRによる赤血球のナトリウム輸送の測定

深野駿一*

The Measurement of the Sodium Efflux in Red Blood Cells by Na-NMR

SHUNICHI FUKANO*

Keywords：核磁気共鳴吸収 NMR，ナトリウム sodium，ナトリウムポンプ sodium pump，赤血球 red blood cell，ディスプロシウム・トリポリリン酸塩 dysprosium(Ⅲ)tripolyphosphate，ATPアーゼ ATPase

はじめに

重金属である水銀又はカドミウムの毒性として，中枢神経あるいは腎への毒性が良く知られている．これらの組織での Na^+,K^+-ATPase活性は非常に強くこの酵素への阻害が毒性の一部を説明しているのではないかと考えられている．Na^+,K^+-ATPaseは細胞内外の Na^+, K^+ バランスを維持している酵素であり，人の赤血球の場合 Na^+ 濃度は細胞内では8.7 mM，細胞外では140 mMと大きな差がある．この濃度差はこの酵素の Na^+ を細胞外へ汲み出すポンプ作用によるものであり，この作用に対する阻害の程度を知ることは，化学物質の毒性を知る一つの指標になるものと考えられる．従来ポンプ作用を測定する方法としてNa又はRbの放射性物質を使用し，遠心分離により細胞と外液を分離して，その金属の移動量を測定していた[1]．この方法は放射性物質を使用するため問題も多く，遠心分離を行なうなど操作が煩雑で多量の試料を検査する上で適していない．また一つの試料に対し連続的に Na^+ ポンプ作用を測定することはできない．

最近，核磁気共鳴吸収（以下NMRと略す）装置の進歩により容易にC-13，H-1以外の元素を測定できるようになった．特にNa-23はNMRとしての検出感度も高く天然に100％存在するためインタクトな生体試料を，そのままの状態で短時間で測定できる利点を持っている．しかしながら生体試料を測定すると，Naのピークは一つとなり細胞内外のNaを区別することができない．Na核の緩和時間の差を利用することも可能であるが精度と測定時間の点で問題が多い．近年Gupta等[2]の努力により常磁性シフト試薬が開発され，細胞内外の Na^+ を分離して直接測定できるようになった．シフト試薬とは目的とする元素と弱い錯体を形成し，共鳴位置をずらす試薬であり，これを数滴生体試料に添加しNMRで測定すれば数分で結果を得ることができる．この測定法を利用して赤血球中の Na^+,K^+-ATPase活性の簡易測定法を開発したので報告する．

実験方法

ヒト赤血球及び反応液の調製

材料は扱いが容易な赤血球細胞を利用した．新鮮なヒト赤血球濃厚液を3倍量の生理的食塩水に拡散させ6000 rpm，10分間遠心し得られた赤血球を同様にしてさらに2回洗浄した．最後に赤血球を4倍量の反応液（NaCl 40 mM，sucrose 50 mM，imidazol 20 mM，EDTA 0.1 mM，glucose 0.2 mM，KCl 40 mM，inosine 30 mM，adenine 6 mM，pyruvic acid Nasalt 14 mM濃度溶液）に拡散し，15時間以上4℃保存し細胞内外の Na^+ 濃度を均一にした．この赤血球を6000 rpm，10分間遠心し得られた赤血球を目的に応じて適当量の反応液を加えた．この赤血球浮遊液3 mlをNMR用試験管にとり，37℃一定時間反応後Gupta等の見い出したシフト試薬dysprosium(Ⅲ)tripolyphosphate 53 mM溶液40 μl を入れ，すばやく撹拌しNMR測定した．

NMR測定条件

装置はJEOL社製JMN－FX270型NMR装置（H-1；270MHz）を用い，37℃恒温状態で以下の条件によりNa核を測定した．Observe frequency 71.30 MHz，Pulse width 20 μsec，Pulse interval 1 sec，Pulse delay 300 msec，Scans 50，Spectral width 3000 Hz，Acquisition time 341 msec，Obserre set 48.97 KHz，Temparature

*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, Shinjuk-ku, Tokyo, 160 Japan

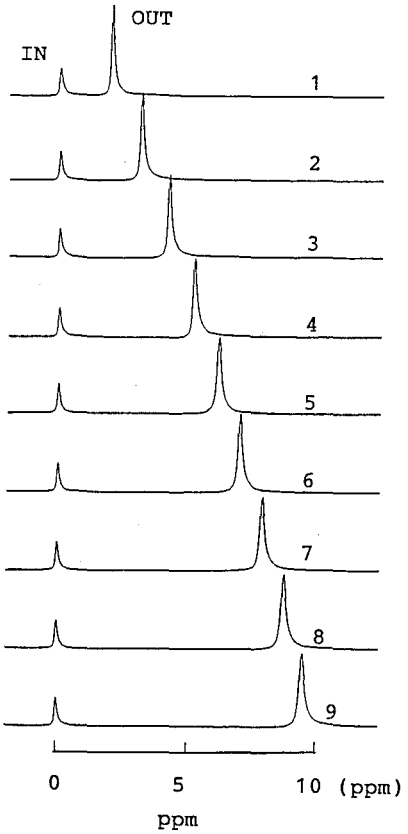


Fig. 1. Na Chemical Shifts by the Paramagnetic Shift Reagent, Dysprosium(Ⅲ)tripolyphosphate
IN ; Na-NMR peaks of 0.9%NaCl in a 5 mm o.d. NMR tube inside a 10mm o.d. NMR tube
OUT ; NMR peaks (1, 2, ……9) of 0.9% NaCl in annular space between the inner and outer NMR tubes containing 0.70, 1.04, 1.38, 1.71, 2.04, 2.36, 2.68, 3.00, 3.31 mM dysprosium(Ⅲ)-tripolyphosphate respectively

37℃, Sample spinning 0 rpm, Sample tube 10 mm, Lock no lock

実験結果及び考察

モデル実験

はじめに Gupta 等と同様にしてモデル実験を試み，結果を Fig. 1 に示した．生理的食塩水（0.9% NaCl を含む重水溶液）を 5 ㎜及び10 ㎜直経の NMR 用試験管にそれぞれ 1 m*l*, 3 m*l* とり，10 ㎜管中に 5 ㎜管を入れる．これにより 5 ㎜管中の液は細胞内を，10 ㎜管と 5 ㎜管との間の液は細胞外液と見なすこととする．この細胞外液に 53 mM dysprosium 液 40 μl を加え得られた Na-NMR スペクトルを Fig. 1 の 1 に示した．次に外液に dysprosium 液 20 μl を加え同様にして測定し，順次これをくりかえし合計 dysprosium 量 200 μl までを加え，結果を Fig. 1 の以下のチャートに示した．このモデル実験の結果から細胞内外の Na^+ を充分分離して測定するには 1 mM 程度の dysprosium 濃度（約 3 ppm シフトする）で良いことがわかった．従って実際の実験では血球浮遊液 3 m*l* に約40 μl の dysprosium 液を加え Na^+ ポンプ作用を測定した．

連続観測による Na ポンプ作用の測定

遠心分離した赤血球液 3 m*l* を10 ㎜ NMR 用試験管にとり反応液 0.5 m*l* 及び dysprosium 液40 μl を加え37℃で連続的に NMR 測定し，結果を Fig. 2 に示した．（連続測定のため測定中に赤血球が沈降する．これを防ぐため濃い赤血球濃度とした．）図より明らかなように細胞内の Na^+ ピークは時間と供に減少し続けていることが観測された．図に示された時間以上に観測し続けると 3 時間後には最初のピーク高の半分以下に減少した．この間 dysprosium 塩は細胞内に入ることなく細胞外のピー

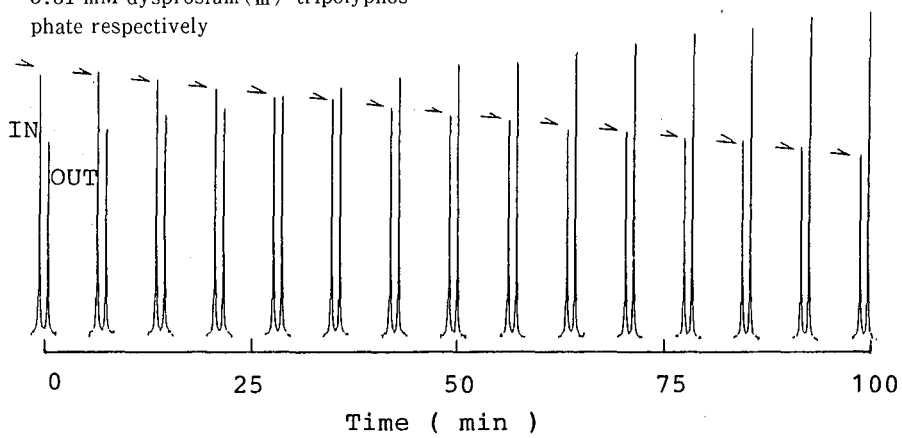


Fig. 2. Na-NMR spectra of the Sodium Efflux from Human Red Blood Cells IN ; Na-NMR peak (→) in red blood cells OUT ; Na-NMR peak in reaction medium The spectra were obtained continuously in NMR probe at 37℃.

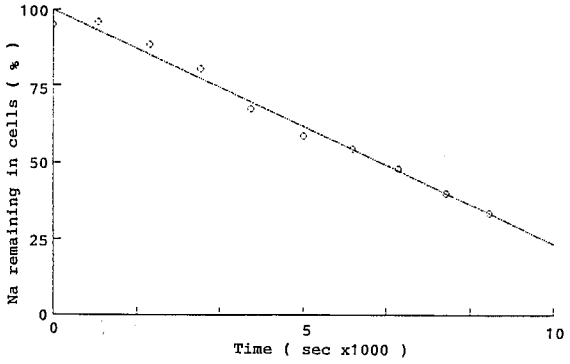


Fig. 3. The Sodium Efflux from Human Red Blood Cells The cells were incubated for up to 2.5 hr at 37℃ in a water bath.

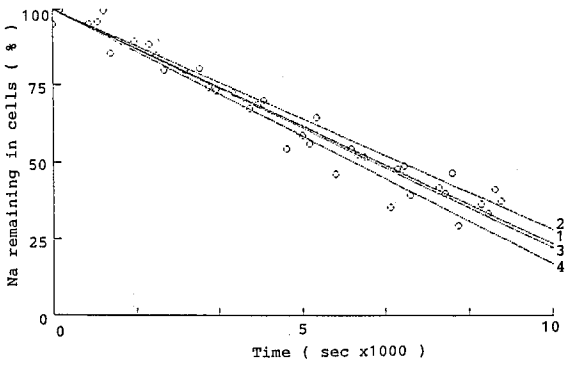


Fig. 4. The Sodium Efflux from Human Red Blood Cells in the Presence (1, 2, 3) and Absence (4) of Dysprosium(Ⅲ)tripolyphosphate

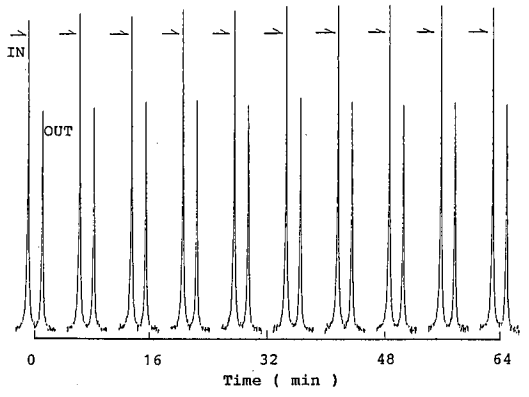


Fig. 5. Na-NMR Spectra of the Sodium Efflux from Human Red Blood Cells in the Presence of Ouabain

クは分離して観測された．このピークの減少は次のように説明することができる．赤血球を低温に放置することにより Na^+, K^+-ATPase 作用は停止し，粒子の小さい Na^+ は細胞膜を自由に透過し細胞内外の Na^+ 濃度は平衡に達する．この赤血球を体温と同じ37℃に加温すると Na^+, K^+-ATPase が活性化し，Na^+ ポンプが活動し細胞内の Na^+ を汲み出すため細胞内の Na^+ ピークが減少し続けるものと思われる．しかしこの Na^+ の減少は細胞外の Na^+ が dysprosium 塩と錯体を形成することにより実質的に濃度が低下し，平衡を維持するために順次減少していることも考えられる．また dysprosium 塩が酵素を阻害又は活性化していることも考えられる．そこでこれを検証する目的で以下の実験を試みた．

シフト試薬無添加による Na^+ ポンプ作用の測定

まず dysprosium 塩が観測時間中常に含まれている実験を行なった．遠心して得られた赤血球 2 m*l* を氷冷中の NMR 用試験管にとり反応液 1 m*l* 及び dysprosium 液 40 μl を加え撹拌し恒温槽に入れ反応させる．この試験管を約16分毎に恒温槽より取り出し撹拌して NMR 測定を行い，結果を Fig. 3 に示した．測定時間は撹拌，NMR 装置セット，測定を含め 2 分以内で行なった．一方 NMR 用試験管10本を用意し同様にして赤血球及び反応液を入れ同時に恒温槽に入れた．この内の試験管 1 本を約16分後に取り出し，今回は取り出した時点で dysprosium 液40 μl を加えすばやく撹拌し，NMR 測定を行なった．同様にして別の試験管を32分後に取り出し NMR 測定を行い，順次これをくりかえした．この実験では NMR 測定の寸前まで dysprosium 液を加えておらず，この間 dysprosium 塩の影響を受けることなく Na^+ ポンプ作用が働いていたことになる．この 2 つの実験を比較し Fig. 4 に示した．図中の 1, 2, 3 の直線は dysprosium 液を含んだ反応系であり，4 の直線は NMR 測定寸前に dysprosium 液を加え測定した結果である．回帰直線の値は

1 は $y = -3.82$ (S.D. 0.164) $x + 100$ (S.D. 0.86)
2 は $y = -3.59$ (S.D. 0.256) $x + 100$ (S.D. 1.40)
3 は $y = -3.89$ (S.D. 0.307) $x + 100$ (S.D. 1.68)
4 は $y = -4.14$ (S.D. 0.406) $x + 100$ (S.D. 2.16)

であった．4 の直線と他の直線を welch-Aspin の方法により検定すると危険率 5 % で両者間に有意差が認められなかった．このことは dysprosium 塩が Na^+ ポンプ作用に対しほとんど影響を与えていないことを示している．また ATPase の特異的阻害剤であるウワバインを 0.14mM 濃度になるよう添加し Fig. 2 と同一の実験条件

下で測定した結果をFig. 5に示した．図に示すように赤血球内のNa^+濃度はほとんど変化せずNa^+, K^+-ATPaseが完全に阻害され，細胞中のNa^+の減少はこの酵素作用によることを示している．以上の結果よりシフト試薬を使用する本方法はインタクトな生体試料中のNa^+輸送を測定するすぐれた方法となり得ると思われる．

ま と め

赤血球浮遊液にシフト試薬であるdysprosium(Ⅲ)tripolyphosphateを加えNa-NMR測定をした結果，細胞内外のNa^+濃度を2分以内で測定することができた．シフト試薬添加により赤血球膜のNa^+ポンプは阻害されることなく作用した．またこのポンプ作用はATPaseの特異的阻害剤であるウワバインにより完全に停止した．これらの実験結果より本測定法は細胞膜のNa^+ポンプ作用を測定するきわめて簡便な精度の良い測定法であり，細胞膜に変化を与える水銀，カドミウムを初めとする重金属類又はその他の化合物の毒性検査法として今後広く利用されていくものと思われる．

文 献

1) Garraham, P. J. and Glynn, I. M. : *J. Physiol.*, 192, 159, 1967

2) Gupta, R. K. and Gupta, P. : *J. Mag. Res.*, 47, 344, 1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 391-394, 1986

Light Scattering（光散乱）法による溶血検査（Ⅱ）ウサギ血液を用いて

市川久次*, 小林博義*

Hemolysis Test by Light Scattering Method (II) Using Rabbit Blood

HISATSUGU ICHIKAWA* and HIROYOSHI KOBAYASHI*

Keywords：溶血 hemolysis，光散乱法 light scattering method，ウサギ rabbit

我々は前報[1]において，ヒト血液を用いて，より簡便で使用血液量が少なく，さらに即時的かつ直接的に溶血を測定できる light scattering（光散乱）法による溶血試験の毒性試験研究への応用を企図し，基礎的検討を行い，その方法の実用性について十分なることを報告した．今回は材料としてウサギの血液を用いて実用に供するための基礎的検討を行ったところ，ヒト血液との差異を認めたので報告する．

実験材料ならびに方法

1．使用動物

最近継続的に SPF 動物として供給が可能になった北山ラベス KK 生産のウサギ（KBL：JW 系）雄を用いた．生後17週令にて購入し，ベルト式飼育架台用吊下式アルミ製ケージ（日本クレア KK 製）に一匹づつ入れ，6週間予備飼育後，体重増加，一般状態に異状のないものを実験に供した．（実験開始時平均体重3.75kg，8羽）

2．飼育条件

室温21±1℃，湿度50±10％に調整された飼育室内にて，ベルト式架台を使用し飼育した．飼料は船橋農場製（GBW－1）ウサギ用固型飼料を与え，水は自由飲水とした．

3．試薬[1]

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.PJ1110）を使用し，採血時血液凝固防止剤として局方ヘパリンナトリウム液（持田製薬）を使用した．その他の試薬はすべて JIS 試薬特級を使用した．

4．保存用赤血球液（1％ Hct）の調製

ウサギ耳静脈よりあらかじめ0.2m*l* のヘパリンナトリウム液を入れた5 m*l* のディスポーザブルシリンジ（テルモ製）を用いて採血し，直ちに遠心（2000rpm，10min，4℃）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液，ph 7.4[2]（154mM NaCl，20mM リン酸緩衝液，ph7.4，以下 PBS－Rbt. と略）にて3回洗浄した後，PBS－Rbt. を用いて1％ Hct 赤血球液を調製し，4℃で保存し使用時 PBS－Rbt. にて必要濃度に希釈し実験に供した．

5．溶血の測定方法ならびに50％溶血時間（$t_{1/2}$）の求め方

市川ら[1]の方法に従って行った．

実験結果

1．赤血球濃度（Hct 値）と吸光度（A700）の関係

本法は原理的には Hct 値と吸光度（A 700：ヘモグロビン自身による吸光度は0（Fig. 1.））の間には直線的比例関係があるということに基づいている．ヒトの新鮮血液を用いた場合には少なくとも0－0.04％の Hct 値においては吸光度（A 700）との間に直経的比例関係があった[1]．そこで本実験において用いたウサギ新鮮血における Hct 値と吸光度（A 700）の直線的比例関係の成立つ範囲を求めた．その結果 Fig. 2．に示したごとく少なくとも Hct 値0－0.04％までは吸光度（A 700）との間に直線的比例関係が認められた．実験には吸光度（A 700）の値も考慮し，ヒトの場合と同様0.03％ Hct 値の赤血球液を実験に供することにした．

2．PBS－Rbt. 中における1％ Hct 赤血球保存液の経時的安定性

実験材料として用いたウサギより得た1％ Hct 赤血球液の4℃における経時的安定性を0.04ppm の Hg^{2+} によ

*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 ceome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

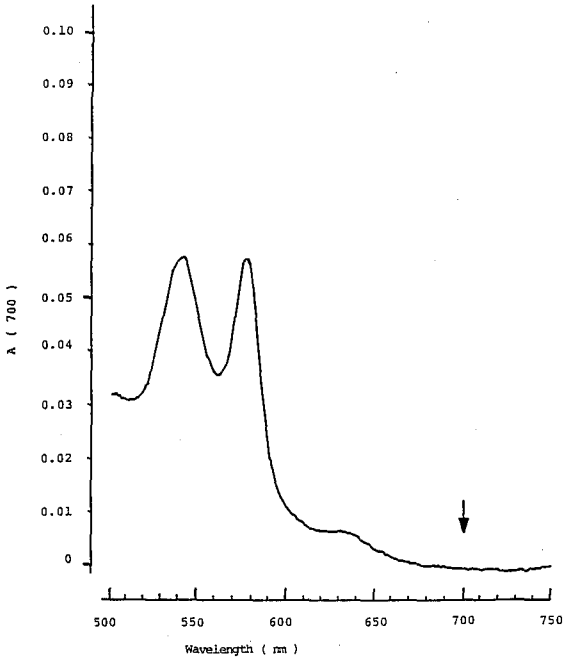


Fig. 1. Hemoglobin Spectrum from Sample in Complete Hemolysis (t = 22 hrs) by 0.02ppm Hg^{2+} (Rabbit)

る50%溶血時間 ($t_{1/2}$) を指標として毎日測定し検討した. その結果 Table 1 に示したごとく 1 日経過すると50%溶血時間が有意に長くなり, 2 日後になるとさらに長くなることが認められた. この結果より, ウサギの血液を用いて本法により溶血試験を行う場合には実験材料として, 採血後直ちに赤血球液を調製し実験に供さなければならないことが明らかとなった.

3. ウサギ0.03% Hct 赤血球液の溶血に対する無機水銀 (Hg^{2+}) の濃度の影響

ウサギの血液を用いて, 本実験法の実用性の可否ならびにヒト血液との比較検討を目的とし, 溶血毒として無機水銀 (Hg^{2+}) 0.02, 0.03, 0.04, 0.1ppm を加えて37℃にて incubate し, ウサギ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. 3 に示したごとく, ヒトの赤血球液の場合と異なり, ウサギの赤血球液の場合は incubation 時間が180分以上になると control の吸光度の低下が著しく, control の赤血球自身の状態が反応開始時点と著しく異なってしまうことが認められた. この結果を考慮して, 実験データの採用にあたっては incubation 時間180分においてほぼ溶血が完了しているものを採用した. この条件において, Hg^{2+} の濃度を 0.03ppm ($t_{1/2}$ = 112.6 ± 10.50min), 0.04ppm ($t_{1/2}$ = 68.7 ± 11.33min), 0.1ppm ($t_{1/2}$ = 27.7 ± 3.18min) と増加すると50%溶血時間 ($t_{1/2}$) は短縮するという用量一反応関係が認められた. しかしながら, 0.02ppm Hg^{2+} を添加した場合はその溶血速度は非常に遅く control とほぼ同様な溶血曲線を示し, その溶血を起す力は非常に弱かった.

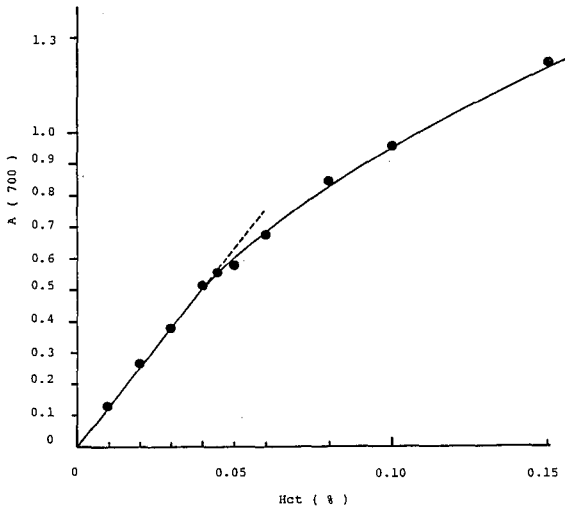


Fig. 2. Relationship between Absorbance at 700 nm and Hematocrit Values (Rabbit)

考　　察

本報は前報[1]に引き続き実験材料としてウサギ血液を用いて, light scattering (光散乱) 法による溶血試験法の実用性について基礎的検討を加えたものである. まず, 原理的に問題になる700nm における吸光度の減少を溶血の指標にすることにおいては Fig. 1 に示したごとく, ヘモグロビンの吸収による妨害はないことが明らかであった. 次に実験値として測定される吸光度 (A700)

Table 1. Effect of Days Elasped on Times for 50% Hemolysis by 0.04ppm Hg^{2+} in 0.03% Hematocrits (Rabbit)

Day after collection	50% Hemolysis Time
0	68.7± 11.33 (11)
1	136.2± 24.87*** (6)
2	239.2±149.94* (5)

significantly different from 0 day's value
*p<0.05 ***p<0.001
Values in parentheses indicate number of determinations

Table 2. Effect of Various Concentrations of Inorganic Mercury (Hg_{2+}) on Times for 50% Hemolysis in 0.03% Hematocrits

Concentration of Hg^{2+} (ppm)	50% Hemolysis Time ($t_{1/2}$)	No. of Determinations
0.1	27.7± 3.18	6
0.04	68.7±11.33	11
0.03	112.6±10.50	5
0.02	—— a)	6

a) Slow hemolysis as well as control was observed.

と実際の赤血球量を示す値，ヘマトクリット値（Hct）の関係は，前報でヒトの赤血球液において得られたのと同様少なくとも0.04% Hct 値以下においては両者の間に直線的比例関係が認められた．

実験材料として使用したウサギ（SPF，KB−JW 系）より得た赤血球液の安定性は悪く，0.04ppm Hg^{2+} を加えて50%溶血時間（$t_{1/2}$）の経時的変動を検討したところ，リン酸緩衝液の濃度を高め，緩衝性を高くしたにもかかわらず，ヒトの赤血球液（採血後4日目まで安定）とは異なり，採血後1日，2日と日経るにつれて $t_{1/2}$ は有意に長くなることが認められ，PBS−Rbt.中でウサギ赤血球を保存している間に，変化が生じたものと考えられる．この結果より実験材料としてウサギ赤血球液を実験に供するのを採血日だけのものとした．

light scattering（光散乱）法による溶血試験法の毒性試験研究への導入，応用を目的として，今回ウサギ血液を用いて，そ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. 3 に示したごとく incubation 時間180分以内において 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逆比例関係の用量一反応関係のある結果が得られた．以上の

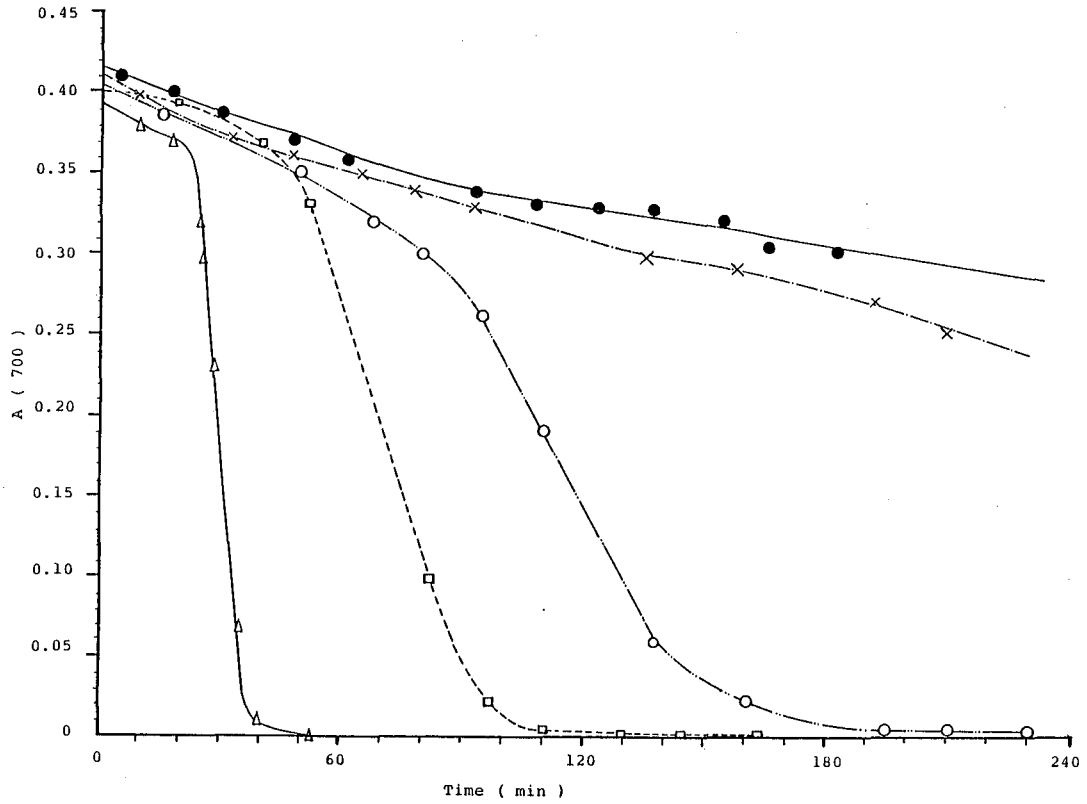


Fig. 3. Examples of Hemolysis Curve in Various Hg^{2+} Concentrations
Contrl● 0.1ppm△ 0.04ppm□ 0.03ppm○ 0.02ppm×

ことより，本法を用いて，ウサギの血液を材料として用いる時には，採血当日に実験を行い，incubation 時間180分以内においてほぼ溶血が完結するよう実験を行うことが必要であることが明らかとなった．しかしながら今回の実験においてPBS中における1％ Hct赤血球液の4℃での経時間的安定性がヒト[1]とウサギでは著しく異なることが明らかになったが，この点については今後の検討課題であると考えている．

要　　点

ウサギ赤血球液を用いて，light scattering（光散乱）法による溶血試験法の毒性試験研究への導入，応用を目的として，その実用性について基礎的検討を行ったところ，採血当日に実験を行い，incubation 時間180分以内にほぼ溶血が完結するよう行うことが必要であることが明らかとなった．

文　　献

1）市川久次，小林博義：東京衛研年報，36,335,1985
2）Barnes, G. and Frieden, E : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 115,680,1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **37**, 395-398, 1986

細胞膜酵素（馬腎Na, K−ATPase）のモノクローナル抗体（第2報）

佐藤 かな子*, 長井 二三子*, 牛山 慶子*, 中川 敦子*,
加納 いつ*, 市川 久次*, 中尾 順子**

Monoclonal Antibody to Horse Kidney Na, K−ATPase (II)

KANAKO SATOH*, FUMIKO NAGAI*, KEIKO USHIYAMA*, ATSUKO NAKAGAWA*,
ITSU KANO*, HISATSUGU ICHIKAWA* and TOSHIKO NAKAO**

Keywords：Na, K−ATPase, モノクローナル抗体 monoclonal antibody, 免疫グロブリン Immuno globulin

緒　言

薬物，毒物やホルモン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あきらかにされている[1]．細胞膜に存在する代表的な酵素で，細胞内外のナトリウムとカリウムの能動輸送をおこなっている Na, K−ATPase に対して，毒物の作用からそ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，我々は上記の考えに基づいて馬腎髄質外帯より Na, K−ATPase を高純度に精製[2]し，それに対して各種の薬物の作用を，細胞膜障害という観点から報告してきた[3−13]．これら毒性発現機序を細胞膜障害という点から，より明らかにするためにはさらに微細な障害を検出しなければならない．そのためには，アイソトープを用いたり，抗原抗体反応を利用した検出方法を開発しなければならないと考えた．そこで，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，成功したことはすでに報告した[14]．今回，我々は，このモノクローナル抗体のグロブリンのサブクラスの決定，およびハイブリドーマ培養上清からの効率的な精製方法を検討したので，その結果について報告する．

方　法

イムノグロブリンサブクラスの決定　前報[14]による方法で作製した．Na, K−ATPase のモノクローナル抗体（M45−80）を産生するハイブリドーマ培養上清を用いた．ハイブリドーマ細胞が，培養皿の底面に一面に増殖した時期（培養5～7日目）の培養上清を採取し，1,200rpm で10分間遠心し，その上清を集めた．集めた培養上清を，10mM トリス緩衝液（TB），pH7.5の外液にて4℃で1日透析後，10,000×g（ソーバル SS−34 ローター）で遠心し，得られた沈殿を10mMTB−0.15MNaCl（pH7.2）で溶解し，Ouchterlony 法[15]にてイムノグロブリンのサブクラスの決定をした．アガロース ME（Marin Colloids. Inc.）を10mMTB−0.15MNaCl（pH7.2）に1％濃度で溶解し，スライドグラス上でアガロース平板を作製した．ゲルパンチ（ゲルマン社）をもちいて，アガロース平板に穴を開け，中央の穴に，培養上清を透析することにより得た沈殿を10 μl 加えた．周辺の穴には，抗マウス IgA, IgM（LBM 社），IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b} と IgG_3（Nordic 社）血清を各10 μl 加えた．4℃で4日間反応させ，生じた沈降線を判定した．さらに，アガロース平板を生理食塩水に4℃で1週間浸洗し，続いて蒸留水に1時間浸した．その後，各穴に蒸留水を満たし，蒸留水で濡らしたろ紙をアガロース平板に乗せ，ドライヤーをもちいて乾燥させた．1％アミドブラックにて10分間染色し，メタノール：酢酸：水（9：2：9）混液にて脱色し，標本とした．

培養上清よりモノクローナル抗体の精製　上記方法にて集めた培養上清に，攪拌しながら4℃で等量の冷硫酸アンモニウム（硫安）飽和溶液，pH7.4，をゆっくり滴加した（最終濃度50％）．30分間4℃で混和後，10,000×g で30分間4℃で遠心することにより得た沈殿を，50％硫安−0.1M リン酸緩衝液（PB）にて洗い，さ

*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 Labaratory 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

らに10,000×gで遠心した．沈殿をできる限り少量の0.1MTB−0.5MNaCl, pH8.0（＝溶出緩衝液）で溶解し，次の操作にもちいた．以後のモノクローナル抗体の精製操作は，Parham[16]の方法に準じてゲル沪過をおこなった．ゲル担体として，Sephacryl S−300とSepharose CL−6B（Farmacia F. C. 社）を選択し比較検討を行った．カラム（2.5×100cm）にゲルを充填し，上記溶出緩衝液にてカラムを平衡化した後，硫安を処理して得た培養上清の沈殿溶液を添加し，分離溶出させた．溶出液は紫外／可視モニター（ISCO社，Model UA−5）をもちいて吸光度280nmでその蛋白を検出した．蛋白の吸収を有する部分40 μl を，前報[14]に従って，β−ガラクトシダーゼによるEnzymeimmuno Assay（EIA）法によってその抗体価を測定した．そして抗体価を有する部分を集めて，外液10mMTB（pH7.5）にて，4℃で1日透析をおこなった．生じた沈殿を，10,000×g，4℃で30分間遠心し，TBで2度洗った後遠心し集めた．ここで得た抗体は，Bradford[17]の方法で蛋白量を測定し，1 mg／ml の濃度に10mMTB−0.25mM EDTA（pH7.2）で希釈し，−80℃に保存した．

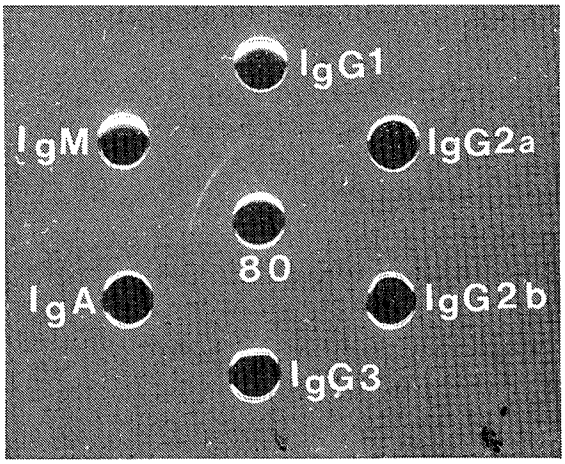


Fig 1．モノクローナル抗体（M45−80）と免疫グロブリンとのオクタロニー法によるゲル内沈降反応
80：モノクローナル抗体（M45−80）
IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3, IgA, IgM：抗マウス血清

SDS−ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS−PAGE）　上記2種のゲル沪過担体をもちいて行ったゲル沪過によって，精製された抗体の純度を次の方法で比較した．Laemmli[18]の方法をもちいて，SDS−PAGEをポリアクリルアミドゲル濃度10％でおこなった．コントロールのIgMとして，マウスミエローマIgM（Miels社）をもちいた．

結果と考察

ハイブリドーマ細胞の培養上清より精製した，馬腎臓Na, K−ATPaseのモノクローナル抗体（M45−80）のイムノグロブリンのサブクラスの決定を行った．その結果，図1に示したようにIgMに明らかな沈降線を認めた．

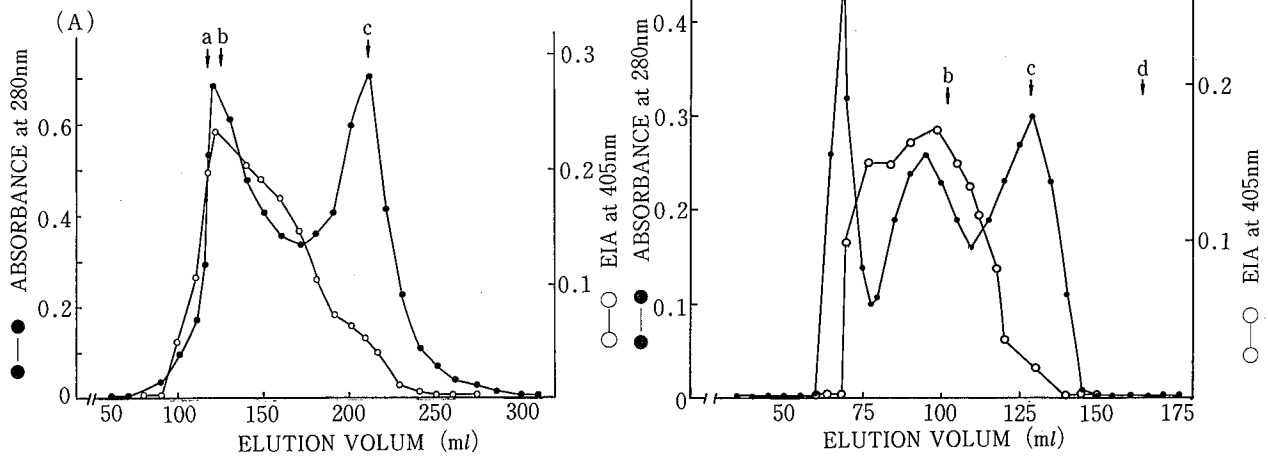


Fig. 2．培養上清からモノクローナル抗体のゲル沪過による精製
●—●280㎚での吸光度，○—○β−ガラクトシダーゼを用いたEIA法による，405nmでの吸光度
(A)Sephacryl S−300　(B)Sepharose CL−6B　矢印はマーカー蛋白の流出部位を示す：a，ブルーデキストラン；b，サイログロブリン；c，アルブミン；d，ATP

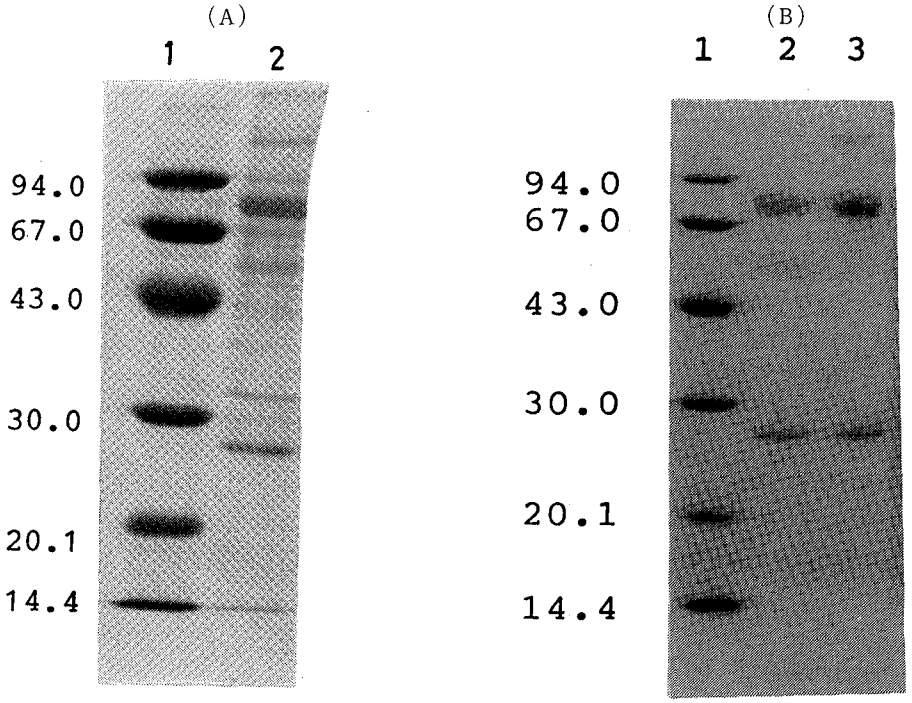


Fig. 3．ハイブリドーマ細胞の培養上清より精製したモノクローナル抗体（M45－80）のSDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動
（3 A）1；分子量標準試料，94.0（キロダルトン）：ホスホリラーゼb，67.0：牛血清アルブミン，43,0：オブアルブミン，30.0：カルボニックアンハイドラーゼ，20.1：トリプシンインヒビター，14.4：α－ラクトアルブミン　2；Sephacryl S－300より流出して得た抗体
（3 B）1；分子量標準試料　2；マウスミエローマ IgM　3；Sepharose CL－6 Bより流出して得た抗体

IgMは分子量が約90万と大きな蛋白のため，分子量約16万のIgGと較べると，一般的にその分離精製が困難である．イムノグロブリンのサブクラスがIgGであるモノクローナル抗体に関しては，その分離精製方法の報告や成書は数多くあり，またそれ専用のゲル沪過用支持担体や，高速液体クロマトグラフィー用のカラムも各社から発売されている．しかし，IgM分離精製に関しての報告[16,19,20]に用いられている担体は，Sephadex G－200である．これは，耐圧性が低く，流圧が充分に上げられないなど取り扱いにくい上，精製可能な容量，純度の点で満足が得られていない．我々はゲル沪過にもちいる担体として，Sephacryl S－300とSepharose CL－6 Bを選び比較検討した．その結果を図2に示す．溶出液中の蛋白の吸光度を280nmで示し，EIA法にて測定した抗体価の吸光度を405nmで示した．図2 Aで示したSephacryl S－300による分離精製抗体の流出部位と，voidの部位の分離ができなかった．次に抗体価の有する部位を集めて，10% Lammli[18]の方法を用いたSDS－PAGEにてその精製純度を比較した結果を図3に示す．この結果より図3 Bに示した，Sepharose CL－6 Bをもちいての精製の方が，ゲル沪過による分離パターン（図2 B）の結果とも考え合せて，Sephacyl S－300（図3 A）をもちいるより，抗体の純化精製に適することがわかった．以後の精製はSepharose CL－6 Bをもちいて行っているが，25×100cmのカラムにおいて，培養液1000m*l*，カラム流速50cm／hで同様の結果を得ている．最終的に得られた抗体の蛋白量は，ハイブリドーマ培養上清100m*l*当り，64～306mgであった．

現在迄，ハイブリドーマ培養上清よりモノクローナル抗体を調製しているが，ハイブリドーマ細胞は，その培養液に血清を添加して増殖させている．そのため，図2より明らかなように，アルブミンのフラクションを多量

に含み，その分離精製能を悪くしている．又，培養上清より得られるこのモノクローナル抗体は，イムノグロブリンのサブフラクションがIgMのこともあり，得られる量が少い．今後，この抗体をもちいて，毒性発現機序を細胞膜障害という観点から，より明らかにするためには，その性質も含めて検討する必要があり，それを効率的により多く得なくてはならない．そこで今後，ハイブリドーマ細胞をマウスの腹腔内で増殖させ，多量の腹水を作らせ，目的とする抗体を量産する方法を検討していきたい．

要　旨

前報[14]で報告した，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（M45－80）のイムノグロブリンのサブクラスは，IgMであった．このモノクローナル抗体をハイブリドーマ培養上清から，Sepharose CL－6Bを用いたゲル沪過により純化精製することができた．

文　献

1）Strom, D. R. and Gunsalus, R. P. : *Nature*, 250, 778, 1974
2）長井二三子，厚井麻里，中尾順子：東京衛研年報，26－2，143，1975
3）矢ケ崎しげ子，原諭吉，中尾順子：東京衛研年報，25，691，1974
4）矢ケ崎しげ子，原諭吉，中尾順子：東京衛研年報，26－1，148，1975
5）原しげ子，中尾順子：東京衛研年報，27－2，161，1976
6）厚井麻里，長井二三子，中尾順子：東京衛研年報，25，697，1974
7）厚井麻里，中尾順子：東京衛研年報，26－2，152，1975
8）清水麻里，中尾順子：東京衛研年報，27－2，77，1976
9）中川敦子，中尾順子：東京衛研年報，27－2，166，1976
10）原しげ子，中尾順子：東京衛研年報，28－2，196，1977
11）原しげ子，中尾順子：東京衛研年報，29－2，147，1978
12）原しげ子，原諭吉，中尾順子：東京衛研年報，30－2，133，1979
13）大野知子，長井二三子，中尾順子：東京衛研年報，33，477，1982
14）佐藤かな子，中尾順子：東京衛研年報，36，366，1985
15）Ouchterlony, O. : *Acto Path. Microbiol. Scand.*, 22, 231, 1953
16）Parham, P. : *Methods in ENZYMOLOGY*, 92, 110, Edited by Langone, J. J. & Vunakis, H. V., ACADEMIC PRESS, 1983
17）Bradford, M. M. : *Anal, Biochem.*, 72, 248, 1976
18）Laemmli, U. K. : *Nature*, 227, 680, 1970
19）Kennedy, R. C., Adler－Storthz, K., Henkel, R. D. and Dreesman, G. R. : *J. Immunol.*, 130, 1943, 1983
20）Ballard, D. W., Kranz, D. M. and Voss, W. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 5071, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 399-406, 1986

オルトフェニルフェノール（OPP）腎障害としょ糖ネフローゼにおける腎尿細管の微細構造変化の比較

福森信隆*, 佐々木美枝子*

Comparison of Ultrastructural Changes between *o*—Phenylphenol (OPP)—Kidney Damage and Sucrose-Nephrosis in the Rat Proximal Tubules

NOBUTAKA FUKUMORI* and MIEKO SASAKI*

Nephropathy induced by *o*—phenylphenol (OPP) and the osmotic nephrosis by sucrose were compared on the ultrastructural changes of renal proximal tubules of male Jcl : SD rats by the method using the transmission electron microscopy. The animals received oral administration of 1,500 mg／kg B. W. ／day OPP dissolved in olive oil for 3 successive days, or given daily i. p. injection of a 50% sucrose solution (1 ml／100g B. W.) dissolved in the distilled water for injection for 3 days.

A marked change induced by OPP was the detachment of brush border accompanied by the dilatation of tubular lumen. The swelling of mitochondria, the disruption of cristae in mitochondria and the small vacuolation of rough endoplasmic reticulum were also observed in the cytoplasm. An alteration of mitochondria was not noted in the renal proximal tubules of sucrose treated animals, whereas a hydropic degeneration and swollen cytoplasm forming the vacuoles were observed. In both groups, the disappearance of basal intussusception at the side of basement membrane and the disturbance of terminal web around the brush border were observed. These findings of cellular ultrastructure in the rat kidney suggest that the alterations of renal tubules induced by OPP may be different from those of osmotic nephrosis by a hypertonic sucrose solution.

Keywords : *o*—phenylphenol, sucrose, ultrastructural change, proximal tubule, rat kidney

緒　　言

防ばい剤オルトフェニルフェノール（OPP）は，柑きつ類等の果実の腐敗を防ぐ目的で使用されている．先に，1,500 mg／kg の OPP 濃度でラット腎臓に対する OPP の初期変化を観察したところ，近位尿細管部で刷子縁の短小化，microvilli の剝離，糸粒体の崩壊が認められ，向尿細管上皮毒性があることを報告した[1]．この時用いた OPP 濃度は，当部で行った経口摂取試験の2.5%濃度の平均1日摂取量に相当した[2]．一方，腎臓は複雑な生理機能を持ち，腎障害の発生機序に関して種々の原因が明らかにされているが[3]，医薬品以外の化学物質の毒作用の機作については明らかでない．

本報は OPP の腎臓に対する作用を検討する一環として，先に行った近位尿細管での変化が比較的高用量の OPP 濃度であったため特異的な変化であるかについて検討を加えた．また今回，高滲透圧による細胞障害を惹起させるといわれているしょ糖[4,5]を用いて，ラット腎皮質部での微細構造の初期変化を透過型電子顕微鏡で比較観察したので報告する．

実験方法

動物は Jcl：SD 系雄性ラット（日本クレア）を6週齢で購入し，飼育用固型飼料（日本クレア，CE－2）を与え馴化飼育した後，体重300 g 前後の成熟動物を実験に供した．飼育条件は，室温24～26°，平均湿度50～60%，照明時間12時間の環境下で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．OPP 群およびしょ糖群は，各3匹ずつのラットを設定し3日間の連続投与を行った．

*東京都立衛生研究所毒性部病理研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

OPP（東京化成，LotNo.AT01）は日本薬局方オリーブ油（宮沢薬品）に溶解し，ラットの体重100 g 当たり1 ml の割り合いでOPP濃度1,500 mg／kg 量を強制経口投与により与えた．また，しょ糖（和光純薬）は温浴にて注射用蒸留水に溶解した50％水溶液を体重100 g 当たり1 ml の割で腹腔内投与を行った．連続3日間の投与終了後，動物は大腿動静脈の切断により放血屠殺を行い，すみやかに腎臓を摘出した．腎臓は，冷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）中で細切し，さらに数時間の浸せき固定を実施した．一晩，0.1Mリン酸緩衝液でアルデヒド固定液を洗浄後，腎皮質部を細片とし1％オスミウム酸（0.1Mリン酸緩衝液，pH7.4）で1.5時間の後固定を行った．二重固定後，低濃度からの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と置換し，Epon樹脂を用いてゼラチンカプセルに包理した．重合用恒温槽で段階的に加熱を加え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行い光顕用観察試料とした．さらに実体顕微鏡下で再トリミングを正確に行い，Porter－Blum MT－1型ミクロトームでガラスナイフを用いて超薄切片を作製した．グリッドに載せた切片は，酢酸ウラン，クエン酸鉛二重染色を施し，洗浄乾燥後日立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　OPP群では，腎臓は3例中2例で顕著な腫大傾向がみられ，肉眼的に表面が茶白色の濃淡を呈した．1例の腎臓は，茶白色を認めたが腫大の程度が軽度であった．トルイジン青染色による光顕的観察で，腫大の著しい腎臓では近位尿細管の上皮細胞は，管腔が拡張して細胞の背高が低く，この部の刷子縁は短小化し剝離傾向がみられた．管腔内には無構造物質の貯留や赤血球の存在が散見された．また，細胞質内に大小の空胞形成がみられ，一部細胞質の淡明化も認められた．他に遠位尿細管，集合管での管腔の拡張，扁平化が著明であった（Fig.1a）．軽度な障害部位では，管腔の拡張，刷子縁の剝離は比較的少なく，近位尿細管上皮細胞の淡明化と小空胞形成を認めた．

しょ糖群の腎臓では，全体的に軽度な腫大を示したが，肉眼的に他の変化はみられなかった．近位尿細管の上皮細胞は，細胞質の膨化が著しく核周囲の淡染と細胞質の染色性の濃淡が大きかった．管腔側の刷子縁は短小化して凹凸の突起状を呈したが，管腔の拡張は少なかった．また，遠位尿細管，集合管の拡張も著しくはなかった（Fig.1b）．両群とも，尿細管上皮の壊死像は確認されなかった．

電顕的所見　OPP群での近位尿細管における微細構造の初期変化は，刷子縁の短小化，microvilli の脱落が顕著で（Fig. 2 矢印）管腔内には脱落した細胞残渣がみられた．刷子縁起始部では，電子密度が高い terminal web の減少，消失傾向がみられ，刷子縁の不整が認められた（Fig. 2，3，4）．また，基底部の基底細胞膜の陥入が乱れ減少し，著しい部では消失がみられた（Fig. 2，3）．一方これらの変化に対し細胞質成分では，障害の強い尿細管上皮で糸粒体の膨化，外膜の変形とそれに伴う cristae の崩壊，糸粒体基質の小空胞化が認められた（Fig. 3，4）．糸粒体の膨化の顕著な細胞では，粗面小胞体が集合し拡張する傾向がみられた（Fig. 3，4）．Ribosome の多くは遊離して細胞質内に存在し（Fig. 2，3），細胞質の軽度な水腫様変化を呈する部では curling を伴った（Fig. 4）．また，拡張し扁平化した遠位尿細管の細胞質にミエリン像が散見された．障害の軽度な細胞では，刷子縁の伸長の低下が認められるが microvilli の脱落はなく，糸粒体の変化も一部基質の小空胞化がみられたが少なかった．しかし，基底細胞膜の陥入は乱れ，また刷子縁起始部の terminal web の配列が不明瞭を呈した（Fig. 5）．

しょ糖群では，光顕的観察で細胞質の腫脹が認められ，その部の電顕像は明らかに細胞質の著しい水腫性変化がみられ細胞小器官の疎な分散を示した（Fig. 6，7）．基底細胞膜の陥入は，ほとんど認められず，糸粒体の間に粗面小胞体が散見するにすぎなかった．糸粒体は，ほぼ正常像を示し膨化がみられず cristae の崩壊も認められなかった（Fig. 6，7，8）．水腫性変化の少ない糸粒体の集合した部では，細胞質内に膜性の小空胞が観察された．また，核は外形が不整となり核膜の消失が多くみられ（Fig. 7，8），核周囲では淡明化し細胞質の水腫性変化が強く認められた．

考　察

腎臓は機能と形態が密接に関連した臓器で，生体の恒常性保持のため水分，電解質の組成を保ち尿の生成に関与する重要な器官である．特に近年，化学物質によりそれらの機能に障害を与える例が多く，毒作用の解明がなされているにもかかわらず腎障害の発生機序が多彩なため原因の明らかでない場合が多い[6]．このような観点から検索方法として電子顕微鏡を用い化学物質による微細構造の初期変化像を細胞形態的に把握した．これまでOPPの腎臓への影響について，LD50値のおよそ半分量

の1,500 mg／kg 濃度で刷子縁の脱落，糸粒体の崩壊，小胞体の拡張，基底細胞膜陥入の消失などの変化を観察した[1]．しかし，腎臓は複雑な機能を持ち，また予備実験において腎皮質部の血管内で赤血球の変形がみられたことから1,500 mg／kg の濃度が高用量となり腎機能へ滲透圧の影響が示唆されるため，本来滲透圧による腎障害を起こすと報告されているしょ糖を用いて[4,5]微細構造の初期変化を比較し，しょ糖と同作用であるか検討を加えた．

しょ糖で近位尿細管の腫脹は，光顕，電顕的観察とも顕著に認められ，核周囲で特に著しかった．その結果，細胞小器官は分散し，さらに基底細胞膜の陥入が乱れ消失しており，明らかに滲透圧の影響で細胞質内に水腫性変化が生じ体液成分の貯留が起こっていることが確認された．また刷子縁は短小化がみられるが完全な剝離は少なく，細胞質内では空胞形成が認められた．これらの変化はしょ糖ネフローゼの特徴を示していると考えられる．

OPP としょ糖を比較すると，近位尿細管の腫脹はしょ糖が強く，OPP ではむしろ刷子縁の剝離，microvilli の脱落が強度で尿細管上皮の扁平化傾向がみられた．また遠位尿細管，集合管の拡張はしょ糖でほとんどみられないのに対し，OPP では著しかった．また糸粒体の変化は，今回の OPP の実験で前回[1]と同投与量にもかかわらず若干弱くみられたが，同様に糸粒体の膨化，変形を伴う cristae の崩壊，空胞化が認められた．この変化は，尿細管の障害あるいは刷子縁の脱落の程度により異なるが，糸粒体の cristae の崩壊が OPP による初期変化であると推察される．糸粒体の変化は，しょ糖でほとんど認められず，細胞質の水腫性変化が著しいにもかかわらず糸粒体が正常像を示したことは，しょ糖が細胞質の基質で滲透圧による高張性変化を引き起こし他の細胞小器官への影響を少なくしたと考えられる．

OPP でみられた管腔側刷子縁の脱落と糸粒体の膨化，基質の崩壊は，腎毒性物質の多くで認められる．セファロリジンの家兎への筋注で刷子縁の microvilli の欠如が先行して，その後基底細胞膜の崩壊，糸粒体の膨化が起こると報告されている[7]．また，糸粒体の変化は，生化学的に腎皮質部の糸粒体でコハク酸に関与する呼吸作用を抑制する報告がある[8]．OPP で刷子縁の脱落の顕著な障害部で糸粒体の膨化，cristae の崩壊が認められたことは，糸粒体の損傷が刷子縁の脱落に関与していると思われ，糸粒体の変化が近位尿細管の刷子縁の短小化，microvilli の脱落よりも早期に起こると考えられる．刷子縁に関して，虚血性障害を起こしたラットで一度剝離脱落した刷子縁が再生される時，近位尿細管の部位により再生されない部が認められるという興味深い報告がある[9]．刷子縁の障害部位，脱落再生過程の機序など解明されていないところが多く，今後検討が必要であると思われる．

高用量の OPP で認められた腎尿細管の変化は，細胞質の水腫様状態，糸粒体の崩壊，遠位尿細管，集合管の拡張などから高張滲透圧の作用とは異なり，糸粒体の障害に基づく尿細管での刷子縁の剝離，脱落による細胞残渣の閉塞性変化に起因すると思われる．また初期から基底細胞膜の陥入が乱れ膜成分が消失することから尿細管の機能に重大な影響を与えていると推察される．今後，さらに OPP の低濃度量とも比較して障害が発生する機序を解明したい．

文　献

1）福森信隆，佐々木美枝子：東京衛研年報，36,400,1985

2）中村清純，井口重孝，池田虎雄，平賀興吾：東京衛研年報，32－2,33,1981

3）成清卓二：最新医学，39,2271,1984

4）高橋日出彦：薬の毒性，246,1973，南江堂

5）Heptinstall, R. H.: *Pathology of the Kidney*, 679,1966, Little, Brown and Company, Boston

6）酒井文徳：医学のあゆみ，119,346,1981

7）Silverblatt, F., Turck, M. and Bulger, R.: *J. Infect. Dis.*, 122,33,1970

8）Tune, B. M., Wu, K. Y., Fravert, D. and Holtzman, D.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 210,98,1979

9）Venkatachalam, M. A., Bernard, D. B., Donohoe, J. F. and Levinsky, N. G.: *Kidney Int.*, 14,31,1978

Explanation of Figures

Fig. 1. Light micrographs of the semi-thin sections stained with toluidine blue in the rat kidney cortex. x200 a) Kidney cortex of the rat administered with 1,500 mg／kg／day OPP for 3 days. Most of tubules are dilated. b) Kidney cortex of the rat injected with 50% sucrose solution for 3 days. The cytoplasms of proximal tubules are swollen.

Fig. 2. Electron micrograph from the proximal tubule of kidney cortex in the rat administered with 1,500 mg／kg／day OPP for 3 days. The brush border (Bb) at the side of lumen becomes shorter and is disappeared partly (arrow). x10,500

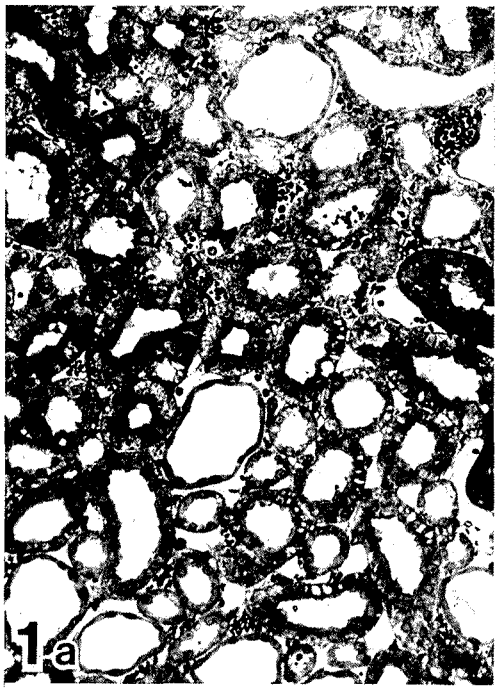
Fig. 3. A portion of the proximal tubule after the administration of OPP for 3 days. The remarkable swelling and the vacuolation (V) of substrate in mitochondria (M) are observed. And also, rough endoplasmic reticulum (RER) is dilated. The disappearance of basal intussusception in the external basement membrane (Bm) and the decrease of terminal web (arrows) around distorted brush border (Bb) are severe changes. x13,000

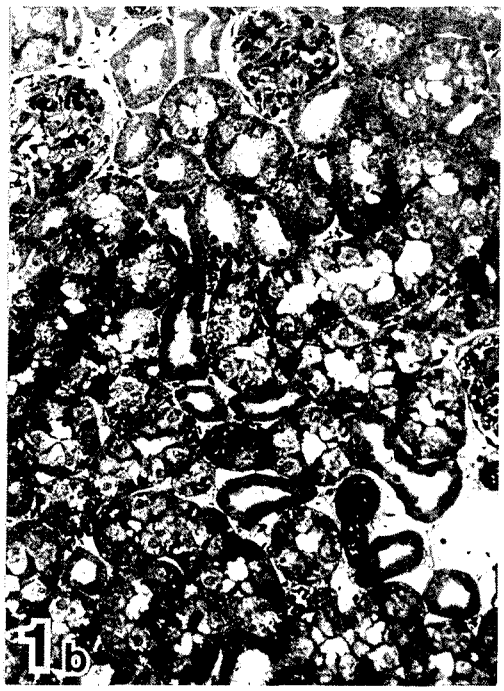
Fig. 4. A portion of the proximal tubule after OPP administration. There are some swollen mitochondria (M) and curled ribosomes in the slight enlarged cytoplasm. Numerous cristae of mitochondria tend to disappear (arrows). x12,500

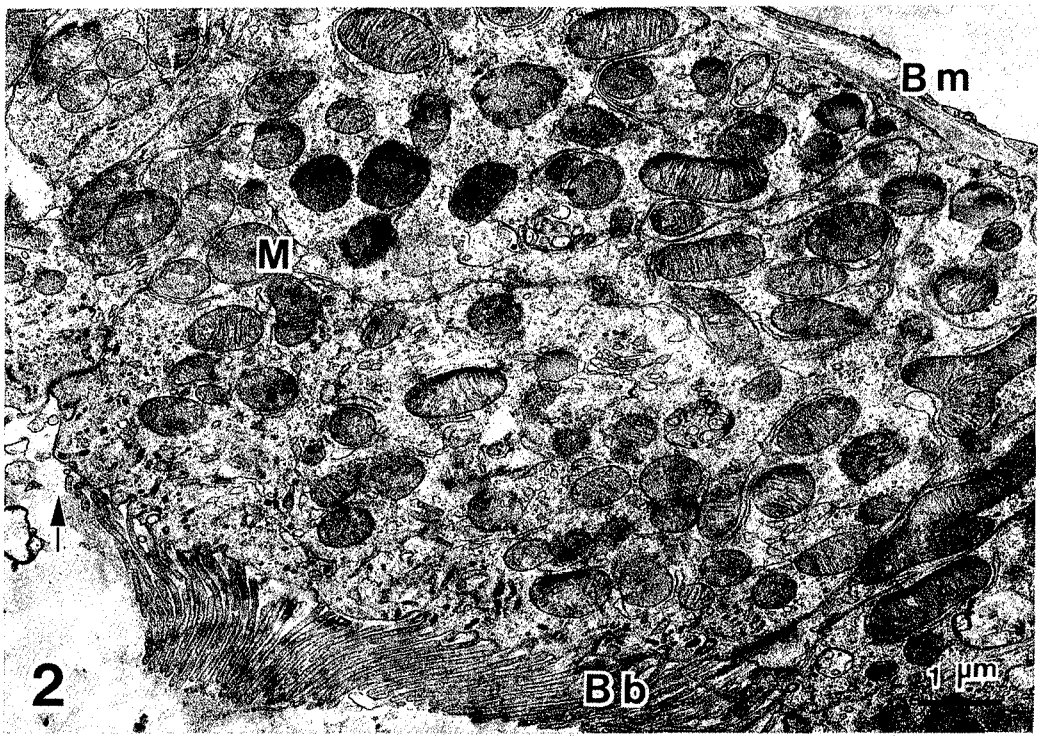
Fig. 5. A portion of slight damage in the proximal tubule after OPP administration. Most of mitochondria (M) show normal-shaped figures, but the disturbance of basal intussusception and terminal web is seen. x10,500

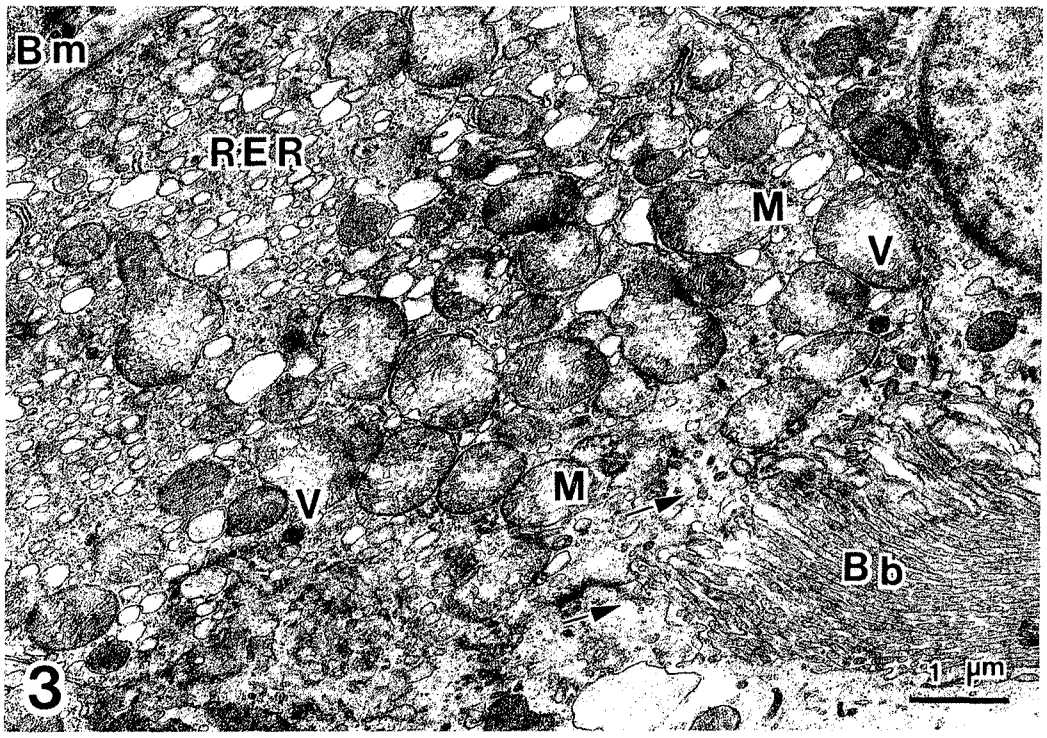
Fig. 6. 7. A portion of the proximal tubule from the rat injected intraperitoneally with 50% sucrose for 3 days. The marked swelling of cytoplasm and the disappearance of basal intussusception (arrows) are seen in a large portion of the cell. There are no changes in the form of mitochondria (M). Fig. 6. x10,000, Fig. 7. x14,000

Fig. 8. A portion of slight swelling in the proximal tubular cell after sucrose injection. The vacuoles (V) surrounding with membrane are observed scatteredly. The nucleus (N) shows irregular shape and nuclear membrane is disordered. x12,500

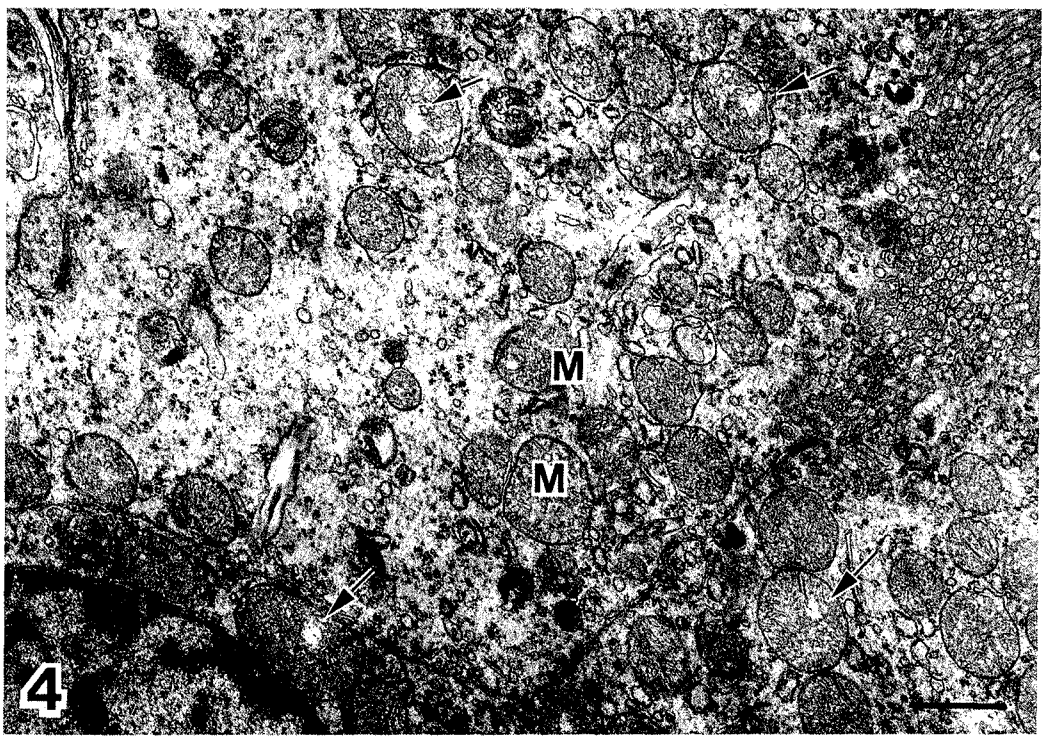

1a


1b

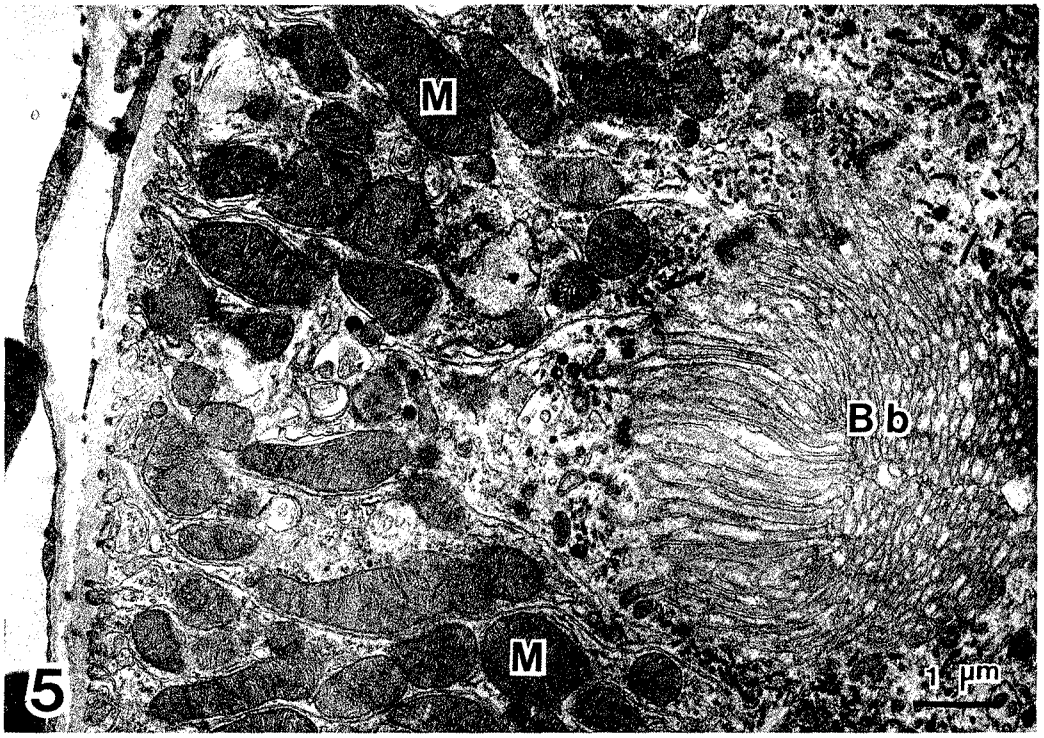

Bm
M
Bb
1 µm
2



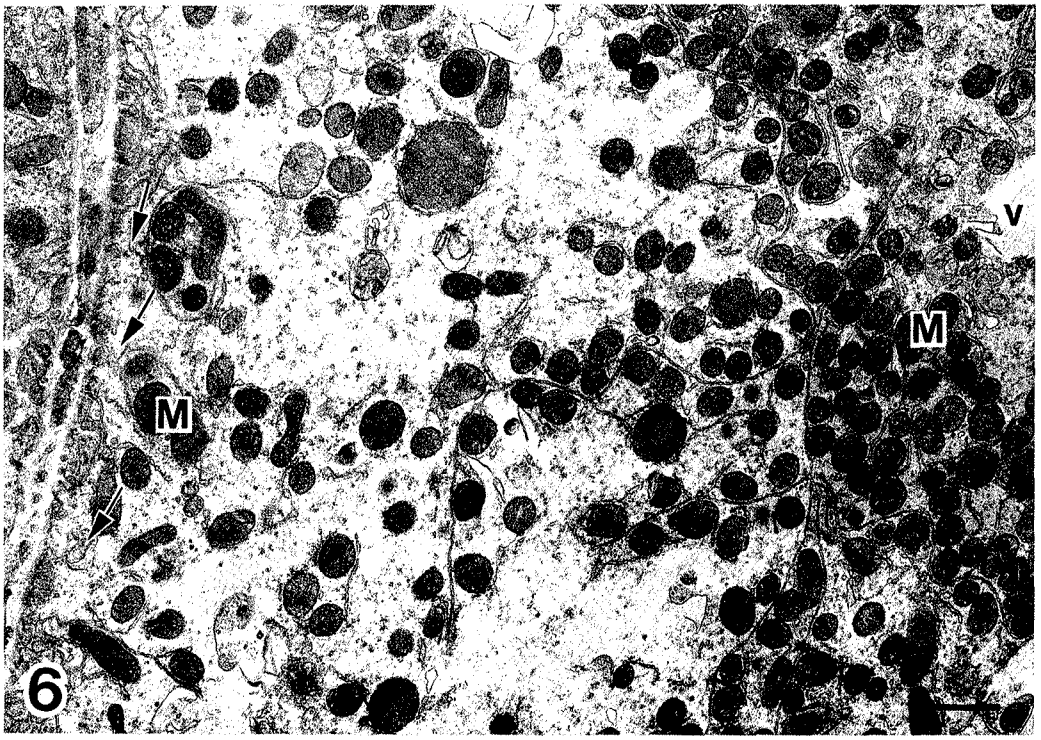
3



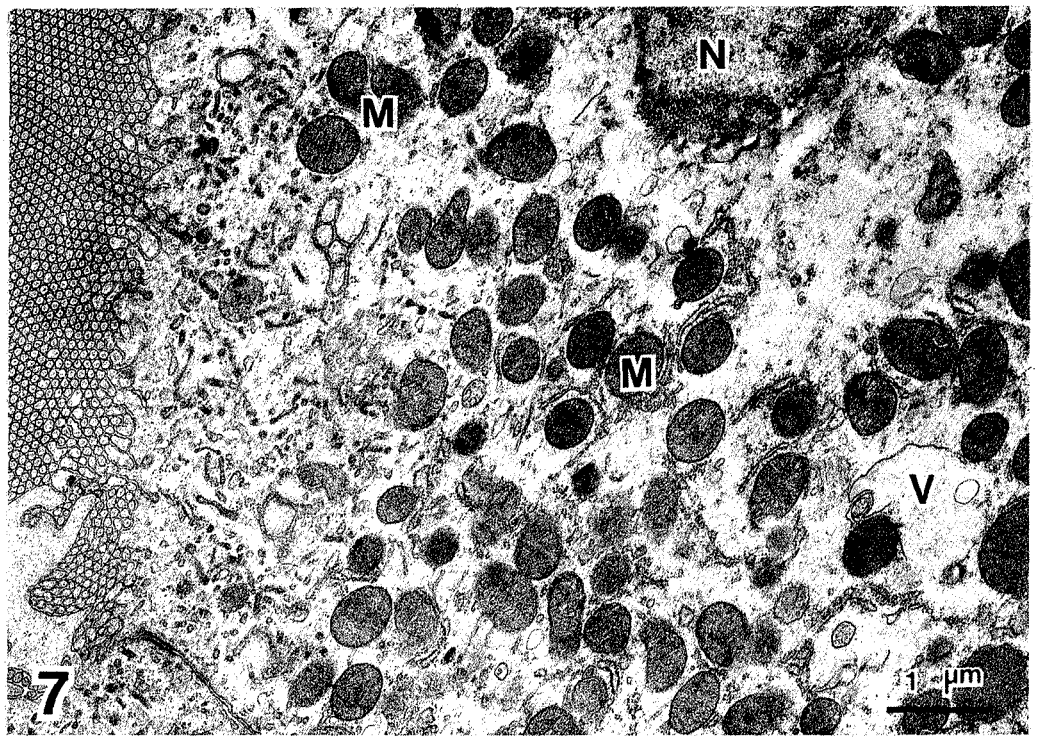
4

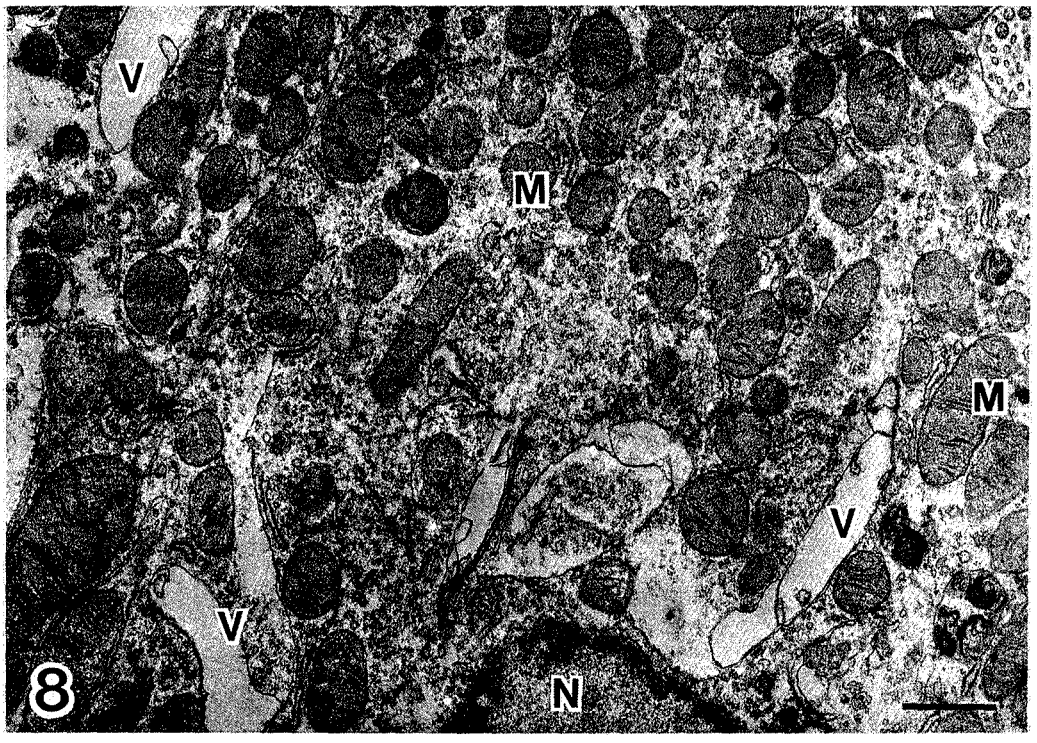


5



6


N
M
M
V
7
1 μm


V
M
M
V
V
N
8

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 407-410, 1986

オルトフェニルフェノールナトリウムによるラット膀胱発がんにおけるチアベンダゾールの用量に伴う増強効果の検討

三栗谷 久 敏*, 藤 井 孝*, 林 田 志 信*,
神 谷 信 行*, 平 賀 興 吾**

Examination of Dose-Related Enhancing Effects of Thiabendazole on Urinary Bladder Carcinogenesis by Sodium *o*-Phenylphenate in Rats

HISATOSHI MIKURIYA*, TAKASHI FUJII*, SHINOBU HAYASHIDA*,
NOBUYUKI KAMIYA* and KOGO HIRAGA**

Thiabendazole (TBZ) had the enhancing effects on urinary bladder carcinogenesis induced by sodium *o*-phenyphenate (OPP-Na) in rats.

The present study was performed to examine whether the effects of TBZ occurred with dose-related increase or not. Groups of 25 male F344/DuCrj rats were fed the basal diet (group 1), diet containing 1% OPP-Na (group 2), 0.1% TBZ (group 3), 0.2% TBZ (group 4), 0.1% TBZ plus 1% OPP-Na (group 5) or 0.2% TBZ plus 1% OPP－Na (group 6) for 13 weeks. Urinary bladder tumors, papillomas, occurred in 8/25 (32%) of group 5 and 8/24 (33%) of group 6, but not in the remaining groups. Transitional cell hyperplasia appeared in 9/25 (36%) of group 2, 14/25 (56%) of group 5 and 13/24 (54%) of group 6. Thus, TBZ also enhanced the carcinogenesis induced by OPP-Na in the rat urinary bladder, but its ennhancing effects was not dose-related in the present test conditions.

Keywords: thiabendazole, sodium *o*-phenylphenate, F344/DuCrj rat, urinary bladder, enhancement of carcinogenecity

緒　言

オルトフェニルフェノール (OPP) とそのナトリウム塩 (OPP-Na) およびチアベンダゾール (TBZ) はかんきつ類やバナナの防カビ剤として用いられている．ところが，当部ではOPP[1]，OPP-Na[2]にラット膀胱発がん作用を，TBZにマウスに対する催奇形作用[3]を認め，報告した．一方，市場調査[4]によるとこれらはオレンジやグレープフルーツなどの輸入かんきつ類，バナナに2ないし3種類同時に使用される傾向となっている．

このようなことから，われわれはOPP-NaとTBZをラットに同時投与する試験を行い，TBZがOPP-Naの膀胱発がんを増強することを明らかにした[5]．

本試験は，OPP-Naのラット膀胱発がんにおよぼすTBZの増強効果を詳細に検討する目的の一環として，TBZ濃度の差異がその増強効果へ与える影響について検討したものである．

試験材料および方法

検体：チアベンダゾール (TBZ) はMerck Sharp and Dohme International, NJ, USAのthiabendazole microfine MSD (Lot No.BZA－539, 純度98.5%) を，オルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) はDow Chemical Co., MI, USAのDowicide A (Lot No. MM 01044, 純度95.5%) を使用した．

試験動物と飼育条件：日本チャールスリバー㈱社生育のF344/DuCrjラット雄を4週齢にて購入した．動物は室温24－25°，湿度50－60%，換気 効率99.9% HEPA

*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
**東京都武蔵調布保健所

フィルター経由オールフレッシュ空気毎時10回，照明午前6時から午後6時に制御したバリア飼育室において，前面および床面が網のステンレス製ケージ（縦22，横20，高さ16cm）に個別に収容，自動給水装置（細菌ろ過器経由水道水）付ベルト式飼育架台にて飼育した．飼料は基本飼料として日本クレア㈱CE-2固型飼料を用い，水とともに自由に与えた．

投与群の設定：検体の添加濃度の設定にあたっては前報[5]の結果を参考にした．すなわち，雄ラットに1.0%または 2.0% OPP-Naと0.2% TBZを13週間時投与することにより，1.0% OPP-Na+0.2% TBZ群では1.0% OPP-Na単独群より腫瘍の発生数が多く，2.0% OPP-Na+0.2% TBZ群は2.0% OPP-Na単独群と腫瘍の発生数は同程度だが，悪性度が高くなっていた．このことより，本試験では1.0%OPP-Naと0.2% TBZの同時投与で腫瘍の発生数が多くなることに注目し，OPP-Naの濃度を1.0%とした．TBZは上述の試験で用いた0.2%と，亜急性毒性試験[6]で0.4%以上はラットに摂餌拒否がみられ，強い体重増加抑制が起ることから0.2%より低い0.1%とした．

以上より，本試験の投与群は0%（第1群，対照群），1.0% OPP-Na（第2群），0.1% TBZ（第3群），0.2% TBZ（第4群），0.1% TBZ+1.0% OPP-Na（第5群）および0.2% TBZ+1.0% OPP-Na（第6群）群と設定した．

試験方法：試験飼料は日本クレア㈱CE-2粉末飼料に0%，1.0% OPP-Na，0.1% TBZ，0.2% TBZ，0.1% TBZおよび1.0% OPP-Na，0.2% TBZおよび1.0% OPP-Naの濃度で添加し固型化したものを用いた．

使用動物数は各群25匹とした．動物はほぼ同体重の6匹づつのグループを作り，架台に横に配列し，各グループの動物に各試験飼料をランダムに割り当てた．

投与期間は13週間とし，動物が5週齢になった時点で基本飼料から試験飼料に切換え，投与を開始した．

動物の一般状態は毎日午前，午後の2回観察した．体重は毎週1回全動物を測定した．摂餌量は試験開始3週まで毎週，以後4週に1回各群10匹について測定した．薬物摂取量は摂餌量より求めた．

試験13週に尿検査を行った．動物を捕捉の際に放出する尿について，BTB（Brom-thymol-blue）pH試験紙（東洋濾紙株式会社）を用いてpHを測定した．

投与期間終了後，動物を放血致死せしめた．解剖，肉眼的観察後，主要器官・組織[7]を摘出し，10%緩衝ホルマリン液で固定した．膀胱は注射筒を用い残留尿を除去した後，10%緩衝ホルマリン液0.5mlを注入し膨張させ

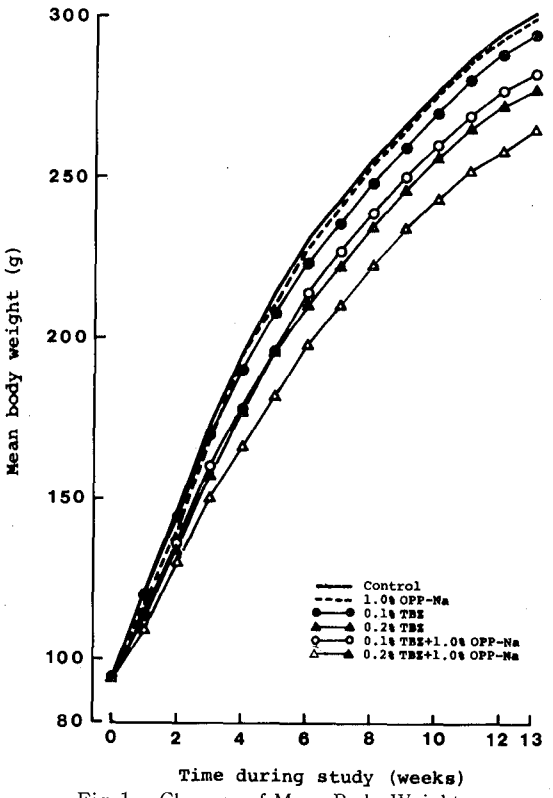


Fig. 1. Changes of Mean Body Weight

内尿道口付近を結紮，固定した．膀胱は1週間固定後，正中線で2分し，粘膜面の観察および重量の測定を行った．固定後の膀胱，主要器官・組織は定法に従ってパラフィン切片を作製し，ヘマトキシリン・エオジン重染色を行い光顕的に観察した．膀胱の組織検索にあたっては，変化を単純性過形成，乳頭状あるいは結節性過形成（PN過形成）および乳頭腫に分類した[8]．

結果の推計学的検討において，体重および膀胱重量はStudent's *t*-test用い，対照群と各投与群，OPP-NaまたはTBZ単独投与群とこれらの同時投与群について比較した．危険率は5%に置いた．

結　果

全動物とも試験期間中，行動，被毛や眼粘膜の状態などに特に変化を認めなかった．死亡動物はなかったが．試験開始直後事故のため第4群および第6群の各1匹を試験動物から除外した．

体重増加の推移をFig. 1に示した．対照群と比較して第2，第3群を除く各投与群とも全期間を通じ有意に小さかった．第2群に比べ第6群，第3群に比べ第5群は試験2週より試験終了まで有意に小さかった．第2群に比べ第5群，第4群に比べ第6群はそれぞれ試験5週よ

Table 1. Values of Body Weight, Food Intake and Chemical Intake

Group	Treatment	No. of rats evaluated[a]	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Mean food intake (g/kg/day)	Mean chemical intake (mg/kg/day) TBZ	OPP-Na
1	Control	25	93±5[b]	301±20	77	0	0
2	1.0%OPP-Na	25	92±5	300±19	76	0	758
3	0.1%TBZ	25	94±5	294±14	77	77	0
4	0.2%TBZ	24	93±6	277±13[c]	73	146	0
5	0.1%TBZ+1.0%OPP-Na	25	92±6	282±16[c,d,e]	77	77	767
6	0.2%TBZ+1.0%OPP-Na	24	93±4	265±15[c,d,f]	68	136	678

a) Number of rats survived more than 1 week.
b) Mean±SD.
c) Significant by Student's t-test as compared to value of group 1 (control) at $P<0.05$.
d) Significant by Student's t-test as compared to value of group 2 (1.0%OPP-Na) at $P<0.05$.
e) Significant by Student's t-test as compared to value of group 3 (0.1%TBZ) at $P<0.05$.
f) Significant by Student's t-test as compared to value of group 4 (0.2%TBZ) at $P<0.05$.

り試験終了時まで有意に小さかった．対照群と第3，第4群間，また対照群と第2，第5，第6群間で投与量増加に伴う体重増加抑制が認められた．

体重kg，1日当りの平均摂餌量はTable 1に示すように，対照群と比べ第4群がやや少なく，第6群は著明に少なかった．他の投与群は対照群と大差なかった．

尿検査による各群の平均pH値は対照群6.5，第2群6.9，第3群6.4，第4群6.4，第5群6.9および第6群6.7であった．

Table 2に**膀胱重量**を示した．対照群と比較して第3群を除く各投与群は絶対重量および体重比重量とも有意に大きかった．第3群に比べ第5群，第4群に比べ第6群および第2群に比べ第5，第6群は絶対重量，体重比重量いずれも有意に大きかった．対照群と第2，第5，第6群間に絶対および体重比重量とも投与量の増加に関連した増加がみられた．

膀胱上皮の組織学的所見をTable 2に記載した．乳頭腫の発生は第5群8／25（32%），第6群8／24（33%）とほぼ同じであり，対照群および第2，第3，第4群では発生しなかった．乳頭状あるいは結節性過形成（PN過形成）の発生は第2群3／25（12%），第5群11／25（44%），第6群8／25（32%）であった．第5群および第6群は第2群に比べ著明に多かった．他の群に発生はなかった．

主要器官・組織の組織学的検索において，非腫瘍性変化のうち投与群のみに発生したのは腎臓の炎症性変化であった．変化は局所性に起り，遠位尿細管および集合管上皮細胞が扁平化あるいは壊死を示し，管腔は拡張していた．これらの管およびボーマン嚢の基底膜は肥厚し，周囲には白血球浸潤も認められた．変化は第2群1例，第5群3例，第6群2例の発生で，これらの例での膀胱上皮の変化は第2群変化なし，第5群全例PN過形成，第6群単純性過形成1例，PN過形成1例であった．

考　察

OPP-Naのラット膀胱発がんに対するTBZの増強効果について検討した．

TBZはラットの体重増加を抑制することが前回までの試験で明らかになっている[6,9]．今回の試験においても第3，第4群は対照群と比べ投与量増加に伴った体重増加抑制がみられた．第2群は体重増加の推移が対照群とほぼ同様だったのに対し，第5，第6群は投与量増加に伴って体重増加が抑制されていた．これは併用によって，TBZの体重増加抑制作用が反映されたためと思われる．さらに第3群に比べ第5群，第4群に比べ第6群は有意な差をもって体重増加抑制がみられたことから，OPP-NaとTBZの併用はいわゆる相乗的に体重増加抑制効果を高めたとも考えられる．第4群および第6群は他の群と比べ摂餌量が少なかった．体重は通常摂餌量に比例して増減することが多く，第4，第6群の体重増加抑制は摂餌量が少ないことも考慮する必要があろう．

膀胱腫瘍（乳頭腫）の発生率は第2群（0%）に対し，第5群（32%），第6群（33%）にみられた如くOPP-NaおよびTBZを同時投与した群に高く，TBZはOPP-Naによる膀胱腫瘍発生を明らかに増強した．また

Table 2. Histological Appearances and Mean Weight of Urinary Bladder

Group	No.of rats examind[a)]	No. of rats with				No.of rats weighted	Mean bladder weight	
		No change	Hyperplasia S[b)]	Hyperplasia PN[c)]	Papilloma		Absolute (mg)	Relative (mg/100g body weight)
1	25	25	0	0	0	24	125±12	41± 4
2	25	16	6	3	0	24	159±18[d)]	53± 6[d)]
3	25	25	0	0	0	23	122±12	41± 3
4	23	23	0	0	0	22	139±17[d)]	50± 6[d)]
5	25	3	3	11	8	24	182±26[d,e,f)]	64±10[d,e,f)]
6	24	3	5	8	8	22	184±30[d,e,g)]	69±12[d,e,g)]

a) Number of rats examined histologically.
b) Simple hyperplasia.
c) Papillary or nodular hyperplasia.
d) Significant by Student's t-uest as compared to value of group 1 (control) at $P<0.05$.
e) Siginificant by Student's t-test as compared to value of group 2 (1.0%OPP-Na) at $P<0.05$.
f) Significant by Student's t-test as compared to value of group 3 (0.1%TBZ) at $P<0.05$.
g) Significant by Student's t-test as compared to value of group 4 (0.2%TBZ) at $P<0.05$.

第2群では単純性過形成が前がん状態と言われるPN過形成より多いのに比べ，第5，第6群ではPN過形成が単純性過形成より多く発生しており，これもTBZの増強効果によるものと考えられる．しかし，乳頭腫，PN過形成および単純性過形成とも第5，第6群間でその発生に大差なく，0.1%と0.2%間のTBZ濃度差では，その増強効果に差異を与えないものと思われる．あるいは第6群の摂餌量が第5群よりかなり少ないことから，摂取した薬物量とくにOPP-Na量が少なく，このため膀胱上皮への影響が弱かったのかもしれない．

膀胱重量は第2，第4，第5および第6群で増加しており，第2，第5，第6群の増加は組織変化を反映したものと思われる．第4群は組織変化がなく，組織液など上皮細胞以外の増加によるものと考えられるが，今後の検討が必要である．

腎臓の炎症性変化は前報[2)]でも述べた如く，OPP-Naによって惹起されるものであり，顕著な例では乳頭壊死を伴う腎盂腎炎の像を呈する．今回は投与期間が短かく，濃度も比較的低いためいずれも軽度な変化を示し，TBZ併用による増悪も明らかではなかった．またTBZの濃度段階による変化程度の差異は膀胱の変化と同様に認められなかった．

尿のpH値は第2，第5，第6群といずれも組織変化があった群に高かった．しかし，これら各群のpH値に大差がないことから，TBZがOPP-Naの膀胱腫瘍発生におよぼす増強効果に尿のpHは関与しなかった考えられる．

以上，OPP-NaとTBZのラットへの同時投与において．TBZ濃度の差異はOPP-Naの膀胱発がんに対するTBZの増強効果に，本試験条件下では影響を与えなかった．しかし，TBZの膀胱発がん増強効果は明らかに認められ，この効果に再現性のあることが確認された．

文　献

1) Hiraga, K. and Fujii, T.：*Fd Chem. Toxic.*, 22, 865, 1984
2) Hiraga, K. and Fujii, T.：*FD Chosmet. Toxicol.*, 19, 303, 1981
3) Ogata, A., Ando, H., Kubo, Y. and Hiraga, K.：*Fd Chem. Toxic.*, 22, 509, 1984
4) 安田和男，西島基弘，冠　政光：東京衛研年報，33, 191, 1982
5) Fujii, T., Mikuriya, H., Kamiya, N. and Hiraga, K.：*Fd Chem. Toxic.*, 24, 207, 1986
6) 三栗谷久敏，林田志信，高橋　博：東京衛研年報，32-2, 5, 1981
7) 藤井　孝，福森信隆，長澤明道：東京衛研年報，32-2, 16, 1981
8) Fukushima, S., Murasaki, G., Hirose, M., Nakanishi, K., Hasegawa, R. and Ito, N.：*Acta Pathol. Jpn.*, 32, 243, 1982
9) 林田志信，三栗谷久敏，神谷信行：東京衛研年報，36, 377, 1985

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 411-414, 1986

オルトフェニルフェノールナトリウムの低濃度暴露ラットにおける膀胱発癌に及ぼすチアベンダゾールの増強効果

藤井　孝*, 三栗谷久敏*, 林田志信*, 平賀興吾**

Enhancing Effects of Thiabendazole on Urinary Bladder Carcinogenesis in Rats Fed Diet Containing Low-Dose of Sodium *o*-Phenylphenate for 13 Week

TAKASHI FUJII*, HISATOSHI MIKURIYA*, SHINOBU HAYASHIDA* and KOGO HIRAGA**

Thiabendazole (TBZ) had the enhancing effects on urinary bladder carcinogenesis induced by sodium *o*-phenylphenate (OPP-Na) in rats. The present study was performed to examine the effects of TBZ in induction of bladder tumors of rats treated with low dose of OPP-Na. Groups of 25 male F 344/DuCrj rats were administered with 0.2% TBZ (group T), 0.5% OPP-Na (0.5% SO), 0.7% OPP-Na (0.7% SO), 1% OPP-Na (1% SO), 0.5% OPP-Na plus 0.2% TBZ (0.5% SO-T), 0.7% OPP-Na plus 0.2% TBZ (0.7% SO-T) or 1% OPP-Na plus 0.2% TBZ (1% SO-T) for 13 weeks. Urinary bladder tumors, papillomas, occurred in 3/25 (12%) of the 1% SO-T, but not in the remaining qroups. Transitional cell hyperplasia appeared in 2/25 (8%) of 1% SO, 1/25 (4%) of 0.5% SO-T, 2/25 (8%) of 0.7% SO-T and 14/25 (56%) of 1% SO-T groups. Thus, the incidences of proliferative lesions showed a dose-related increase in the epithelial cells of rat urinary bladder. Consequently, TBZ also enhanced the bladder carcinogenesis in rats treated with low dose of OPP-Na.

Keywords: thiabendazole, sodium *o*-phenyphenate, rat urinary bladder, enhancement of carcinogenesis

緒　言

我々はこれまで防カビ剤オルトフェニルフェノール (OPP) およびそのナトリウム塩 (OPP-Na) がラット膀胱に対し癌原性を有することを明らかにしてきた[1,2]. さらに最近 OPP-Na の膀胱発癌が同じ防カビ剤であるチアベンダゾール (TBZ) との併用によって増強されることを報告した[3]. 今回はこの増強効果を確認するため TBZ と発癌量以下の OPP-Na とをラットに同時投与し, 膀胱上皮の病理学的変化を観察した.

試験方法および材料

被験物質　OPP-Na は Dow Chemical Co. (米国) の Dowicide A, TBZ は Merck Sharp and Dohme International (米国) のものをそれぞれ用いた.

実験動物　日本チャールス・リバー社の F 344/DuCrj ラット雄を 4 週齢で購入し, ベルト式飼育架台 (自動給水装置付) のステンレス製ケージに収容した. 動物室はバリアー飼育施設内にあり, 温度24－25℃, 湿度50－60%, 換気1時間に10回, 照明6：00－18：00にそれぞれ制御されている. 水 (ろ過滅菌器経由水道水) および飼料 (日本クレア社, CE-2) はラットに自由に摂取させた.

試験方法　粉末飼料 (CE-2) に被験物質を添加し固型化したものを試験飼料とした. ラットは1群25匹ずつ, 0.2% TBZ 添加飼料摂取群 (T 群), 0.5, 0.7および1% OPP-Na 添加飼料摂取群 (0.5, 0.7および1% SO 群), 0.5, 0.7および1% OPP-Na にそれぞれ0.2% TBZ を加えた添加飼料摂取群 (0.5, 0.7および1% SO-T 群, 基礎飼料摂取群 (対照群) の8群とし合計200匹用いた. 試験飼料はラットが5週齢になった時点から13週間摂取させた.

*東京都立衛生研究所毒性部病理研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, 24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
**東京都武蔵調布保健所

Table 2. Histological Findings and Mean Weights of the Urinary Bladder

Group	No. of rats examined histologically	No. of rats with transitional cell lesions: Hyperplasia Simple	Hyperplasia Papillary or nodular	Papilloma	No. of rats weighed	Mean bladder weights Absolute (mg)	Relative (mg/100gB.W.)
Control	25	0	0	0	25	91±11[1)]	31±4
T	25	0	0	0	25	96±13	37±6[2)]
0.5%SO	25	0	0	0	20	93±12	30±3
0.7%SO	25	0	0	0	23	99±24	34±8
1%SO	25	1	1	0	24	95±10	33±4
0.5%SO-T	25	1	0	0	21	98±13	38±6[2,3)]
0.7%SO-T	25	0	2	0	22	97±10	36±5[2)]
1%SO-T	25	3	11[2,4)]	3	21	114±11[2,4)]	44±6[2,4)]

1) Mean±S.D.
2) Significantly different from the control at $P<0.05$.
3) Significantly different from 0.5%SO group at $P<0.05$.
4) Significantly different from 1 %SO group at $P<0.05$.

に起因しているとの結果を得た[10)]. 本試験では尿の pH が OPP-Na 単独群より併用群で低く. アルカリ化ないしは酸塩基平衡障害による増強とは認め難い.

ヒトは多種, 多数の化学物質に暴露されているが, それらの「相加・相乗作用」が及ぼす生体への影響の有無はその多くが明らかにされていない. そこで, この「作用」を検討する一助として TBZ と OPP-Na との併用でみられた発癌に対する増強効果の発現機序を解明するための実験を重ね, 知見を蓄積する必要があると考えている.

文　献

1) Hiraga,K. and Fujii,T. : *Fd Cosmet.Toxicol.*, 19, 303, 1981
2) Hiraga, K. and Fujii, T. : *Fd Chem. Toxic.*, 22, 865, 1984
3) Fujii, T., Mikuriya, H., Kamiya, N. and Hiraga, K. : *Fd Chem.Toxic.*, 24(3), 1986
4) Fukushima, S., Murasaki, G., Hirose, M., Nakanishi, K., Hasegawa, R. and Ito, N. : *Acta Pathol. Jpn.*, 32, 243, 1982
5) 藤井　孝, 福森信隆, 長澤明道, 三栗谷久敏, 林田志信, 高橋　博, 矢野範男, 湯澤勝廣, 平賀興吾：衛研年報, 32, 16, 1981
6) 藤田　博, 平賀興吾：衛研年報, 31, 29, 1980
7) Nakao, T., Ushiyama, K., Kabashima, J., Nagai, F., Nakagawa, A., Ohno, T., Ichikawa, H. and Hiraga, K. : *Fd Chem. Toxic.*, 21(3), 325, 1983
8) Reitz, R. H., Fox, T. R., Quast, J. F., Herman, E. A. and Watanabe, P. G. : *Chem. —Biol. Interact.*, 43, 99, 1983
9) Fukushima, S., Shibata, M., Shirai, T. Tamano, S. and Ito, N. : *Cancer Res.*, 46, 1623, 1986
10) 藤井　孝：未発表

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **37**, 415-420, 1986

アカゲザルを用いたTBZの催奇形性に関する予備試験

井口重孝*, 米山允子*, 小縣昭夫*, 多田幸恵*,
安藤弘*, 久保喜一*, 佐々木美枝子*

Preliminary Studies for Teratogenicity of Thiabendazole in Rhesus Monkey

SHIGETAKA IGUCHI*, MASAKO YONEYAMA*, AKIO OGATA*, YUKIE TADA*,
HIROSHI ANDO*, YOSHIKAZU KUBO* and MIEKO SASAKI*

Keywords：チアベンダゾール thiabendazole, 防かび剤 fungicide, 予備試験 preliminary study, 催奇形性 teratogenicity, アカゲザル rhesus monkey

当部では防かび剤チアベンダゾール（TBZ）の催奇形性をマウスを用いて明らかにしてきた[1]，しかしながら使用する動物種のすべてが与えられた催奇形因子に同じように感受性があるわけでなく，催奇性に関するヒトへの安全性を評価する際には，少なくとも2種類またはそれ以上の動物種を用いて試験を行なう[2~4]ことが適切と考えられている．当部ではマウスでみられたTBZの催奇形性がラットではどのように発現するかあるいはしないのか現在検討しておりラットでの結果の一部を報告[5]した．一方，近年霊長類を化学物質や薬の催奇形性試験に使用することが勧められており[6~8]，この論理は系統発生的にサルがヒトに近似しているという根拠の上に立っている．げっ歯類の胎盤と異なり，霊長類はヒトと同様な絨毛尿膜胎盤を有し，両種間には胎芽発生について解剖学的および時間的類似性がある[9,10]．またサルは他の動物種よりも薬物代謝経路や毒性学的性質がヒトによく似ているという報告[11,12]もある．

今回，TBZのマウスでの催奇形性試験での結果を踏まえて国立予防衛生研究所筑波医学実験用霊長類センターとの協同研究の機会を得，サルを用いたTBZの催奇形性試験を行うにあたり，TBZ投与量決定のための予備試験を当部飼育のサルを用いて行うことになった．本報告はその予備試験より得られた結果である．

試験材料ならびに方法

1．実験動物 動物：雌アカゲザル（*Macaca mulatta* 以下サルと略す）は，人畜共通伝染病（結核，細菌性赤痢，寄生虫等）について厳重な検疫を実施した後，日本クレア㈱より購入した6匹で，捕獲地はインドおよび中国，購入時推定年齢4～5才，当部において7～12年飼育しているものを使用した．試験使用時推定年齢11～17才（表1），体重は3.8～5.8kgの範囲であった．

表1 個体表

サルNo.	TBZ投与量 mg／kg	産地	入荷時推定年齢	現在推定年齢
4	0	インド	4～5	16～17
25	0	中国	4～5	11～12
22	400	中国	4～5	11～12
23	400	中国	4～5	11～12
13	800	中国	4～5	15～16
21	800	中国	4～5	11～12

2．飼育条件 動物は，温度26±1°，湿度60±5％，換気効率99.9％のHEPAフィルター経由オールフレッシュ空気 毎時10回，照明午前7時～午後7時の飼育室にて，ステンレス製個別ケージ（間口650×奥行630×高さ750mm³）にて飼育した．

飼料としては，オリエンタル酵母㈱製サル用乾パン（AB）（水7，粗タン白質26.5，粗脂肪6.8，粗灰分4.6，粗繊維1.5，可溶性無窒素物56.3g，381.2 Cal.／100g）およびバナナを1日量夫々100g与え，水（細菌ろ過器経由）は自動給水ノズルにより自由に摂取させた．

*東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 160 東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

3．試料および投与方法 TBZは，Merck Sharp & Dohme International社製 Lot No.BZA-539,純度98.5％を使用し，溶媒としてオリーブ油（局方）を使用した．

TBZはオリーブ油に懸濁し，ゾンデを用いて胃内に経口投与した．

4．投与量の設定 TBZをヒトの駆虫薬として用いる際の1日最大量3g／person[13]を参考にし，TBZを800，400mg／8 ml オリーブ油／kg／dayおよび0 mg／8 ml オリーブ油／kg／day（対照）の3群を設け，各群2匹の雌ザルに毎日定時（午前9時）の3日間連続投与とした．しかしながら，TBZの影響と思われる瀕死のサルが出た場合には，その時点で投与は中止することとした．

5．観察 投与開始日を0日とし，試験期間は1ヶ月間とした． 一般症状：対照群およびTBZ投与群のサルを投与期間中（0日から3日朝まで）は午前7時30分から午後6時まで1時間毎に，以後試験終了日まで午前と午後の1日2回の観察とした．

体重：0日から10日まで毎日，以後週1回の測定とした・

摂餌量：摂餌量＝給餌量－残餌量とし，0日から18日まで24時間給餌として毎日，18日以後1時間給餌として週1回の測定とした．

6．検査方法 TBZの血中濃度検索：1回目投与後1，3，6，9，12および24時間目，また2回目以降の投与では，投与後6，24時間目の血液を摂取し，さらに1回目投与後7日目にも伏在静脈より採血し，藤谷ら[14]，の方法にしたがって，血清からTBZを抽出し，高速液体クロマトグラフィー（ヴァリアン，LC－4200）で未変化体のTBZ量を測定した．

血液学的検索：TBZ投与群およびオリーブ油のみの（対照）群の全個体について投与3日前および1回投与後1，2，3，7日後の血液を伏在静脈より採血した．血液学的検査用血液では，塗沫標本を作製するとともに，Coulter Counter Model Sにより赤血球数（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），白血球（WBC）の測定をした．塗沫標本はMay－Grünwald－Giemsa染色後光顕的に観察した．血清生化学検査用血液では血清を分離後，日立705型自動分析装置でトランスアミナーゼ（GOT，GPT），アルカリホスファターゼ（ALP），γ－グルタミルトランスペプチターゼ（GTP），総コレステロール（CHO），尿素窒素（UN），総タンパク（TP）を測定した．

試験結果と考察

一般症状 嘔吐：結果を表2に示した．対照群（オリーブ油投与）のNo.4で1例，1回目投与後翌日の午前7時30分に嘔吐しているのを発見した．TBZ投与群では4匹中3匹のサルが1回目投与後12時間以内に嘔吐した．投与後早く嘔吐したサルは比較的元気な様子をみせたが，12時間以上嘔吐しない時にはケージ内にうずくまっていることが多かった．400mg投与群：No.23，800mg投与群：No.13のサルでは最終投与日の翌日の朝に嘔吐しているのが観察された．この結果，TBZには副作用として催吐作用があることが観察されたが用量による差は認められなかった．この症状はFood and Drug Directorate[13]の報告と同じであった．

糞：表3に投与後の糞の状態を示した．1回目投与後1日以内に下痢および軟便を呈したサルが2匹（対照群：No.4，800mg群：No.13）みられた．対照群のNo.4は投与開始より投与終了後1日までに常に下痢あるいは軟便を呈したが，No.25は投与期間中も正常な糞の排泄であった．TBZ 400mg投与群のサル2匹は投与期間中は正常な便を呈したが，投与終了後1日を経てから2匹とも下痢を呈した．800mg投与群のNo.13では軟便，下痢を呈したが，No.21は1日糞の排泄をみない日のあった他は投与期間中もすべて正常の糞であった．

その他：TBZ 800mg投与群のサル2匹に，投与終了後5日目より全身に赤味を帯び，消失後フケのような落屑が観察された．この症状にはFood and Drug Directorate[13]の報告と同じでであった．

体重 結果を表4に示した．対照群およびTBZ投与群ともに体重に大きな変動は認められなかった．

摂餌量 結果を表5に示した・対照群，TBZ投与群共に投与期間中の摂餌は少なく，主としてバナナに集中している傾向がみられた．投与終了後の摂餌量の回復は速く，TBZ投与群での用量に相関した回復時間の差はみられなかった．

血中TBZ濃度検査 結果を表6に示す．TBZ 400mg投与群のNo.22では投与後12時間目で最大値（13.2 μg／ml）を示し，2回目，3回目の投与後6時間目では1回目投与後の同時間目の値より低い数値を示した．No.23は投与後6～9時間目に最大値（24.4 μg／ml）を示し，2回目，3回目の投与後6時間では1回目投与後の6時間目の値より低い数値を示した．800mg投与群のNo.13では披与後9時間目に最大値（38.2 μg／ml）を示し，2回目投与後6時間目では1回目投与後の6時

表2 一般症状（嘔吐）

サル No.	TBZ 投与量 mg／kg	時間経過（日） 0↓	1↓	2↓	3	4	6	7	8	10	11
4	0	—[1]	7：30[2]	—	—	—	—	—	—	—	—
25	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
22	400	19：20	7：30 13：00	7：30	—	—	—	—	—	—	—
23	400	13：20 17：20	13：00	7：30	7：30	—	—	—	—	—	—
13	800	17：30	7：30	7：30	8：30	—	—	—	—	—	—
21	800	—	7：30 13：00	7：30 11：00 14：00	—	—	—	—	—	—	—

1）嘔吐なし 2）嘔吐発見時刻 ↓：TBZ(9：00)投与

表3 一般症状（糞）

サル No.	TBZ 投与量 mg／kg	時間経過（日） 0↓	1↓	2↓	3	4	6	7	8	10	11
4	0	下痢[1]	下痢	軟	下痢	正	正	正	正	正	正
25	0	正	正	正	正	正	正	正	正	正	正
22	400	正	正	正	下痢	正	正	正	正	正	正
23	400	正	正	正	下痢	正	正	正	正	正	正
13	800	軟	—[2]	下痢	—	正	正	正	正	正	正
21	800	正	正	—	正	正	正	正	正	正	正

1）糞の性状 2）なし ↓：TBZ 投与

表4 体重の継続的変化

サル No.	TBZ 投与量 mg／kg	時間経過（日） 0↓	1↓	2↓	3	4	6	7	8	10	17	24	31
4	0	3.9[1]	4.0	4.3	4.0	4.0	4.1	4.0	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2
25	0	3.4	3.9	3.9	3.8	4.0	3.8	4.0	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9
22	400	5.2	5.5	5.4	5.3	5.5	5.2	5.4	5.4	5.2	5.5	5.6	5.4
23	400	4.0	4.0	3.9	3.6	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.2	4.1
13	800	5.8	5.6	5.4	5.4	5.3	5.3	5.5	5.5	5.5	5.6	5.6	5.8
21	800	4.5	4.6	4.6	4.4	4.6	4.7	4.7	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8

1）kg ↓：TBZ投与

表5 摂餌料の経過的変化

サルNo.	TBZ投与量 mg/kg	試験前[1] 摂取量	時間経過(日) 0↓~1	1↓~2	2↓~3	3~4	5~6	6~7	7~8	9~10	10~11	12~13	17[3]	24[3]	31[3]
4	0	56/100[2]	50/100	0/100	0/70	36/100	92/100	94/100	94/100	96/100	92/100	85/100	69/100	100/100	80/100
25	0	35/100	23/100	17/80	24/100	48/100	36/100	60/100	46/100	16/100	57/100	92/100	95/100	26/100	23/100
22	400	94/100	36/60	0/80	4/85	8/100	86/100	96/100	96/100	94/100	96/100	90/100	96/100	96/100	95/100
23	400	77/100	2/0	4/0	0/60	24/100	56/100	98/100	100/100	98/100	96/100	94/100	95/100	94/100	96/100
13	800	85/100	21/30	0/0	6/30	6/20	30/100	71/100	95/100	100/100	100/100	96/100	100/100	96/100	96/100
21	800	72/100	2/60	21/0	12/40	78/100	94/100	88/100	100/100	100/100	100/100	100/100	98/100	54/100	82/100

1）試験前1週間の1日平均摂取量（g） 2）乾パン/バナナ（g） 3）1時間給餌 ↓：TBZ投与

表6 TBZ血中濃度変化

サルNo.	TBZ投与量 mg/kg	投与後日数 0 ↓1[1]	0 3	0 6	0 9	0 12	1 24	1 ↓6	2 48	2 ↓6	3 72	7 168
22	400	1.6[2]	7.7	12.3	11.9	13.2	7.8	8.8	3.1	8.4	2.9	N.D.
23	400	16.5	18.6	24.4	24.2	16.3	3.3	12.1	N.D.	9.0	2.0	N.D.
13	800	4.4	15.6	23.3	38.2	15.9	9.5	21.6	14.9	39.6	16.4	N.D.
21	800	2.0	4.8	17.3	14.6	31.9	4.9	49.8	3.3	15.1	N.D.	N.D.

1）投与後の時間を示す 2）μg/ml ↓：TBZ投与

間目の値と同程度の値を示し，3回目投与後では1，2回投与後の値より高い数値（39.6μg／ml）を示した．No.21では投与後12時間目に最大値（31.9μg／ml）を示し，2回目投与後6時間目では1回目投与の2.8倍の数値（49.8μg／ml）を示し，3回目投与後にも同程度の値を示した．以上の結果から400mg投与群では，マウスにおける催奇形発現を生じる血清TBZ濃度（40μg／ml）[15]に達せず，800mg投与群ではほぼ同程度の濃度に達した．

血液検査および血清生化学検査　血液検査：結果を表7に示す．対照群と比較し，TBZ投与群では投与後1日のサルで，WBCの増加がみられ，投与後7日のサルで，RBC, Hb, Htの減少が認められた．特に，表には示さなかったが赤血球および白血球形態には変化がみられなかった．

血清生化学検査：結果を表8に示す．GPT，ALP，GTPについては特に変動は認められなかった．GOTでは対照群が投与前に比べ投与後わずかな変動を示したのに対し，TBZ投与群では投与前に比べ1回投与後24時間目で高い活性を示し，2回目，3回目では減少の傾向を示し，7日目では投与前より低いかあるいは同レベルの活性になった．UNでは対照群は投与前もその後の変化はなかったが，TBZ投与群では投与を重ねるごとに，UN量が増加する傾向になり，7日目では投与前の量にもどった．GOTもUNもTBZ濃度による差は認められなかった．GOTの活性上昇から肝臓機能障害が推測される，しかし，No.23，No.13にみられるように投与前の活性が他のサルの活性より高い値を示している等個体間のバラツキが多い．投与前の高い活性は飼育条件ならびに環境因子等の変化によるストレスによるためと考えられる．UNの増加は腎機能障害を意味しているが，これらの変化がTBZそれ自体によるものかストレスに起因するのかを確認するためには個体数を多くしたり，採血時の環境に事前に慣しておく等再検討する必要がある．

表7　血液検査結果

TBZ投与量 mg/kg	0					400					800				
日[1)]	−3	1	2	3	7	−3	1	2	3	7	−3	1	2	3	7
サル No.	No. 4					No.22					No.13				
RBC(×10⁶/mm³)	5.9	5.8	5.7	6.0	5.8	5.0	4.4	4.6	—[2)]	4.7	5.2	5.2	5.3	5.7	4.4
Hb(g/dl)	10.9	10.8	10.6	10.8	10.4	11.7	10.5	11.0	—	10.5	12.5	12.6	12.8	13.1	10.1
Ht(%)	35.9	35.1	33.8	35.5	34.9	35.1	30.9	33.0	—	33.0	38.0	38.4	38.6	40.6	31.0
MCV(μ³)	60.0	60.0	59.0	59.0	60.0	69.0	70.0	71.0	—	70.0	72.0	73.0	72.0	71.0	70.0
MCH(μμg)	18.1	18.1	18.4	17.9	17.8	22.9	23.7	23.6	—	22.2	23.6	23.9	23.8	22.8	22.7
MCHC(%)	30.3	30.3	31.3	30.4	29.7	33.3	33.9	33.3	—	31.8	32.8	32.8	33.1	32.2	32.5
WBC(×10³/mm³)	10.6	6.6	4.9	11.8	4.5	3.6	4.8	7.8	—	3.9	4.0	14.8	6.6	7.9	7.4
サル No.	No.25					No.23					No.21				
RBC(×10⁶/mm³)	5.8	5.6	5.4	5.5	5.2	5.5	4.9	5.1	5.3	4.6	6.2	6.0	6.3	6.4	5.6
Hb(g/dl)	7.8	7.3	7.1	7.2	7.0	12.0	10.8	11.1	11.1	10.4	13.4	13.3	13.7	13.6	11.9
Ht(%)	27.9	27.3	25.5	26.2	24.9	37.4	33.9	34.6	36.1	31.8	42.7	41.6	43.1	43.1	37.7
MCV(μ²)	48.0	48.0	47.0	47.0	48.0	68.0	68.0	68.0	68.0	68.0	69.0	69.0	68.0	67.0	67.0
MCH(μμg)	13.3	12.8	13.1	12.8	13.4	21.8	21.6	21.7	20.9	22.1	21.6	22.0	21.5	21.1	21.0
MCHC(%)	27.9	26.7	28.0	27.0	28.1	32.0	31.8	32.0	30.7	32.7	31.3	31.9	31.7	31.5	31.5
WBC(×10³/mm³)	8.0	5.8	7.3	6.6	5.1	5.3	13.0	13.0	17.0	5.6	4.7	10.6	7.8	7.3	5.5

1）TBZ 投与 3 日前（−3）および投与後の時間経過を示す　2）凝血

表8　血清生化学検査結果

TBZ投与量 mg/kg	0					400					800				
日[1)]	−3	1	2	3	7	−3	1	2	3	7	−3	1	2	3	7
サル No.	No. 4					No.22					No.13				
GOT(I.U/l)	17.0	28.0	25.0	21.0	—[2)]	21.0	84.0	40.0	27.0	28.0	52.0	125.0	46.0	38.0	29.0
GPT(I.U/l)	7.0	14.0	12.0	11.0	—	15.0	37.0	27.0	25.0	20.0	19.0	30.0	26.0	22.0	32.0
ALP(I.U/l)	240.0	278.0	259.0	257.0	—	211.0	205.0	182.0	161.0	206.0	184.0	201.0	212.0	209.0	530.0
GTP(I.U/l)	33.7	33.3	32.1	30.9	—	33.2	38.3	38.1	34.7	33.9	44.1	42.6	40.1	38.1	62.0
CHO(mg/dl)	137.0	133.0	131.0	143.0	—	130.0	108.0	101.0	110.0	124.0	104.0	78.0	55.0	47.0	88.0
UN(mg/dl)	13.5	13.6	19.2	16.8	—	18.7	34.8	46.2	44.6	23.5	21.5	36.7	51.6	46.6	19.5
TP(g/dl)	7.3	7.6	7.7	7.4	—	7.0	7.6	7.7	7.6	7.0	8.0	8.6	8.5	8.2	7.5
サル No.	No.25					No.23									
GOT(I.U/l)	21.0	28.0	23.0	17.0	—	72.0	151.0	88.0	97.0	26.0	23.0	74.0	52.0	30.0	18.0
GPT(I.U/l)	6.0	9.0	13.0	7.0	—	26.0	30.0	23.0	10.0	17.0	6.0	13.0	8.0	9.0	8.0
ALP(I.U/l)	365.0	402.0	408.0	406.0	—	203.0	257.0	253.0	312.0	329.0	176.0	194.0	182.0	175.0	232.0
GTP(I.U/l)	30.7	30.3	28.6	26.6	—	42.8	46.7	41.6	45.8	42.7	38.1	34.5	36.0	35.1	34.5
CHO(mg/dl)	127.0	109.0	103.0	120.0	—	115.0	115.0	86.0	81.0	110.0	139.0	108.0	113.0	128.0	115.0
UN(mg/dl)	23.6	19.7	21.6	22.4	—	18.7	52.0	40.2	47.0	22.1	19.1	33.6	36.1	40.2	17.9
TP(g/dl)	7.2	7.0	6.8	7.0	—	6.8	7.4	6.8	7.5	7.0	7.7	7.3	7.7	7.9	7.5

1）TBZ 投与 3 日前（−3）および投与後の時間経過を示す.　2）測定せず

ま と め

防かび剤チアベンダゾール（TBZ）のアカゲザルにおける催奇形作用の予備試験を3日連続経口投与により試験した.

TBZ 800, 400および0 mg／8 ml オリーブ油／kg を投与し一般症状, 血液学的および血中濃度を検索した.

800mg／8 ml オリーブ油kg 投与ではマウスにおける催奇形発現を生じる TBZ 濃度（40 μg／ml）と同程度の血中 TBZ 濃度を得た. 以上の成績から, アカゲザルは TBZ 催奇形試験において, 使用可能であることが示唆された.

文 献

1) Ogata, A., Ando, H., Kubo, Y. and Hiraga, K.：*Fd. Chem. Toxic.* 22,509,1984
2) EPA：*Pesticide Programs, Federal Register*, Part Ⅱ, Vol.43,No.163,：37382,1978
3) EPA：*Toxic Substances Control Act Test Rules*,ibid., Part IV,Vol.44,No.145,：44087,1979
4) OECD Short Term and Long Term Groups：OECD Guidelines for Testing of Chemicals,Tokyo, 1980：大森義仁監修：OECD 化学物質毒性試験指針, 化学工業日報社：491,1980
5) 小縣昭夫, 安藤 弘, 久保喜一, 佐々木美枝子, 平賀興吾：東京衛研年報, 37,421,1986
6) Lister, R. E., *Biochem Soc. Trans.*, 2,695,1974
7) Warkany, J., Report, in Conference on Prenatal Effects of Drugs, Commission on Drug Safety, Chicago, 1,1963
8) W. H. O. Scientific Group, Principles for the testing of drugs for teratogenicity, W.H.O. *Tech. Rep. Ser.*, No.364,1,1967
9) Wilson, J. G., *Acta Endocrinol. Copenhagen Suppl.*, 71, (166),261,1972
10) Wilson, J. G., Frodkin, R. and Hardman, A. A., *Teratology*, 3,59,1970
11) Peters, J. H., *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 14,72,1971
12) Smith, C. C., *Predicting drug metabolic pathways in man,in Use of Nonhuman Primates in Drug Evalution*, Vagtborg, H., ED., University of Texas Press, Austin, pp. 469,1968
13) Food and Drug Directorate, Canada (1970). Product Monograph, Mintezol, Thiabendazole. Rx. Bull. 1,7
14) 藤谷知子, 米山允子, 小縣昭夫, 安藤 弘, 久保喜一, 市川久次：東京衛研年報, 36,373,1985
15) 米山允子：未発表

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 421-425, 1986

チアベンダゾール（TBZ）のラットを用いた催奇形性試験

小縣昭夫*, 安藤　弘*, 久保喜一*,
佐々木美枝子*, 平賀興吾**

Teratologigal Studies of Thiabendazole (TBZ) in Rats

AKIO OGATA*, HIROSHI ANDO*, YOSHIKAZU KUBO*,
MIEKO SASAKI* and KOGO HIRAGA**

Thiabendazole (TBZ), widely used as food additive, preservative, pesticide or anthelmintic, was tested for teratogenicity using SD rats. TBZ suspended in olive oil was given orally to pregeant rats in a stage of organogenesis. All foetuses were removed from the uterus on day 20 of gestation, and were examined for external and skeletal anomalies.

(1) Rats were given daily doses of 296, 444, 667 or 1,000mg TBZ/kg body weight from days 8－15 of gestation. Repeated treatment with TBZ during 8－15 of gestation significantly increased the incidence of resorbed foetuses and significantly decreased the number of live foetuses and foetal weight in a dose-dependent manner. The incidence of external anomalies, mainly edema, was also increased by TBZ ingestion in a dose-dependent fashion.

(2) Rats were given a single dose of 1,000mg TBZ/kg body weight on one day during days 8－15 of gestation. The foetuses with edema was not observed in the groups treated with TBZ on any one of days 8－15 of gestation. However, the foetuses with reduction deformity of limbs and short or absent tail were found in the groups treated with TBZ on day 10, 11 or 13 of gestation,though the incidence was not so high. Such malformations had also been previously observed in mice treated with TBZ.

These results may indicate that TBZ has teratogenic effect on the rat foetuses.

Keywords：チアベンダゾール　thiabendazole, 防かび剤　fungicide, ラット　rat, 催奇形性　teratogenicity

はじめに

われわれは，防かび剤チアベンダゾール（TBZ）のマウスにおける催奇形性を明らかにしてきた[1,2]が，その成績はTBZをオリブ油に懸濁経口投与して得たものである．オリブ油で懸濁経口投与したと同じTBZ量を0.5%アラビアゴム水溶液に懸濁し，マウスに経口投与した催奇形性試験ではTBZの催奇形性を明確に出来なかった[3]．

両懸濁媒体によるマウスで認められたTBZでの奇形発現の差については，〔^{14}C〕TBZを用い，両懸濁媒体での吸収・分布・排泄について比較検討した米山らの実験により考察がなされている[4,5]．すなわち〔^{14}C〕TBZをオリブ油に懸濁し，妊娠マウスに経口投与した場合の各臓器でのTBZ放射活性は，アラビアゴム水溶液に懸濁経口投与した場合でのそれと較べ血液，胎盤，胚子などのいずれにおいても4～7倍の高値を示した．両者での奇形発生の差はTBZの吸収速度の差による胚子内でのTBZ濃度差に起因するものと推測される．

一方，TBZのラットを用いた生殖学的および催奇形学的実験がいくつか報告[6,7]されている．TBZを飼料中に添加し，ラットに摂取させた実験では陰性結果[6]が認められており，蒸留水に懸濁して経口投与した実験では

*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
**東京都武蔵調布保健所

明確な成績が得られていない[7].

著者らはTBZのラットに対する催奇形性を明らかにするため，これまでマウスで得られた成績を参考にして実験を行ない，TBZがマウス同様，ラット胎児にも催奇形性効果のあることが示唆されたので報告する.

試験材料ならびに方法

1．実験動物　膣内に精子の存在を確認した日を妊娠0日として起算し，妊娠2日に8週齢のCD（SD）ラット雌を日本チャールズ・リバー社より購入，試験に供した.

2．飼育条件　温度25±1°，湿度55±5%，照明午前6時～午後6時，換気毎時10回（HEPAフィルター経由）の飼育室にて日本クレア製固型飼料CE-2および水道水を自由に与え，プラスチックケージ（265×425×150mm³，チップ床敷）にて1匹飼いとした.

3．試料および投与方法　チアベンダゾール（TBZ）はMerck Sharp & Dohme International社製Lot NO.BZA−539，純度98.5%を使用し，局方のオリブ油に懸濁して経口投与した.

臨界期連続投与試験ではTBZ 1,000 mg／10 ml オリブ油／kgを最高に667mg，444mg，296mg（公比1.5）および0 mg／10ml オリブ油／kg（対照）を妊娠8～10日まで1日1回定時に胃ゾンデにより投与した.

臨界期単一投与試験ではTBZ 1,000mg／10ml オリブ油／kgを妊娠8日より15日までの各妊娠日に1回のみ胃ゾンデにより投与した.

4．観察方法　体重測定および一般状態の観察を毎日行ない，妊娠20日にエーテルにより麻酔屠殺し，次の検索を行なった．屠殺後直ちに開腹，子宮を開き着床痕，早．後期死亡児，生児数を記録した．次いで母体主要臓器の重量測定と肉眼的異常の有無を検索し，卵巣の黄体数を数えた．生児については体重測定，性の判別，外表異常の観察を行なった後，95%エチルアルコールで固定し，アリザリンレッドSで骨格染色を行ない骨格異常の有無を調べた.

5．結果のまとめ方　西村の報告[9]に準拠して行なった.

結　果

臨界期連続投与試験

図表には示さなかったが，母体重は対照群に較べ処置群で投与期間中TBZ用量に関連して有意に増加が抑制され，解剖時の母臓器重量では肝・心・脾臓でTBZ用量に相関して有意な絶対および相対重量の減少がみられた．途中死亡例はTBZ投与の全ての群で観察され1,000mg／kg群14例中8例，667mg／kg群23例中6例，444mg／kg群25例中6例，296mg／kg群25例中4例であった．対照（オリブ油）群に死亡はみられなかった（表1）．妊娠成立雌数は1,000mg／kg投与群で有意に減少し，生児の認められた母体数も1,000mgおよび667mg／kg投与群で有意な減少がみられ，1,000mg／kg

Table 1．Effects of 296−1000mg thiabendazole（TBZ）／kg body weight／day given orally to pregnant rats on days 8−15 of gestation

Reproductive parameter	Number, percentage or weight observed				
	TBZ 1000 mg/kg	667mg/kg	444 mg/kg	296mg/kg	0 (olive oil)
Females mated †	14	23	25	25	28
Females died Ψ	8***	6 *	6*	4	0
Females gestated §	3*	15	18 .	19	28
Females with ≥ 1 live foetus	1*	11 **	17	19	28
Corpora lutea / litter #	14	15.6±2.1	15.8±2.3	15.1±1.5	15.7±1.4
Implantations / litter #	14	11.6±3.1*	14.1±1.5	14.0±1.4	13.7±1.9
Resorption of foetuses (%)#¶					
Early	14.3	50.5±29.6***	27.8±29.9***	8.0±12.4	2.9±5.4
Late	21.3	8.1±12.9*	3.5±12.9	0	0.2±1.3
Live foetuses / litter #	9	4.5±2.9***	9.7±4.4***	12.9±2.3	13.3±2.0
Body wt of live foetuses(g)#					
Male	1.48	1.75±0.26***	2.22±0.61***	3.07±0.31***	3.92±0.42
Female	1.56	1.74±0.16***	2.16±0.52***	2.89±0.30***	3.68±0.42

† No. with vaginal plug.
Ψ No. that died before scheduled kill on day 20.
§ No. with implantation sites.
# Values given as mean±1SD for litters having one or more live foetuses.
¶ 'Early' defined as cases showing implanted sites and amorphous germinal mass, 'late' defined as cases showing the head and limbs. Values for per cent resorption and foetal body weight were by averaging the value for each litter.
Values marked with asterisks are significantly different from the corresponding control value (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001) as determined by the following statistical tests : chi-square test(females mated, died, gestated or having≥1 live foetus); t test(corpora lutea, implantations, live foetuses and foetal body weight); rank sum test(resorption).

投与群では1例のみとなった．死亡児頻度は用量に伴って上昇し，平均生児数も用量に伴って減少し667mgおよび444mg／kg投与群ではいずれも有意な増減であった．平均生児体重は雌雄ともに用量相関をもって低下がみられた（表1）．

胎児の外表観察では，奇形児は全くみられなかったが，異常として全身性浮腫胎児が用量相関をもって発現した．浮腫胎児をもった母体の発現頻度は1,000mg／kg投与群1／1（100%），667mg／kg投与群8／11（72.7%），444mg／kg投与群3／17（17.7%），296mg／kg投与群1／19（5.3%），対照0／28（0%）となった（表2）．

骨格の観察では化骨進行度において用量相関をもって抑制がみられた以外，特に意味のある変化はみられなかった（表3）．

臨界期単一投与試験

TBZ 1,000mg／kgを臨界期における各妊娠日に1回投与した結果，妊娠11日から13日と15日投与群に途中死亡例がみられた．死亡例を除き全群全例妊娠が成立し，全例生児が認められた．平均生児数および平均生児体重も群間に大差は認められなかった（表4）．

胎児の外表観察では，奇形児として外脳症が妊娠10日投与群に1例，開眼が妊娠12日投与群に1例，脊椎裂が

Table 2. Incidence of anomalies in foetuses of rats given 296−1000mg TBZ／kg body weight／day orally on days 8−15 of gestation

Observation	Incidence of anomalies				
	TBZ 1000 mg/kg	667mg/kg	444mg/kg	296mg/kg	0 (olive oil)
No. litters with anomalous foetuses / no. examined - (%)	1/1 (100)	8/11 (72.7)	5/17 (29.4)	2/19 (10.5)	3/28 (10.7)
Anomalies (%)#	66.7	63.1±47.7	12.8±26.9	0.6±1.9	0.9±2.7
No. anomalous foetuses / no. examined	6/9	26/48	23/163	2/290	4/373
No. of foetuses with :					
Edema (no. dams; %)	6(1;100)**	23(8;72.7)***	18(3;17.7)	1(1;5.3)	0
Bent tail	0	0	0	0	1
Subcutaneous hemorrhage	0	3	5	1	3

Calculated by averaging the percentage in each litter (i.e. no. of anomalies/no. of foetuses), and shown as mean ± 1SD.
Values marked with asterisks are significantly different(rank sum test) from the corresponding control value (**p< 0.01 ; ***p< 0.001).

Table 3. Incidence of skeletal malformation,variation or ossification in foetuses of rats given 296−1000mg／kg body weight／day orally on days 8−15 of gestation

Observation	TBZ 1000mg/kg	667 mg/kg	444 mg/kg	296 mg/kg	0 (olive oil)
No. of litters examined	1	11	17	19	28
No. of foetuses examined	9	48	163	290	373
Malformation					
No. of litters with malformed foetuses - (%)	0(0)	1(9.1)	1(5.9)	0(0)	1(3.6)
Percent malformation±1SD #	0	5.0±15.8	0.5±1.9	0	0.3±1.5
No. of foetuses with:					
Fusion of vertebral arches	0	1	1	0	0
Fusion of ribs	0	0	0	0	1
Variation #					
Asymmetry of sternebrae †	0	0	5.8±10.1	3.1±6.7	0.3±1.6
Cervical rib	0	0	0	0.4±1.9	0.2±1.3
Lumbar rib §	0	0	0	1.2±3.7	10.8±16.1
Abnormalities in number of pre-sacral vertebrae ¶	0	0	0	0.8±3.3	0
Ossification					
Mean number of ossified fore limb phalanx±1SD [(Pro.+Mid.)/2]					
L	0	0	0	0.002±0.010	0.14±0.35
R	0	0	0	0.003±0.012	0.14±0.37
Mean number of ossified hind limb phalanx±1SD [(Pro.+Mid.)/2]					
L	0	0	0	0	0.02±0.07
R	0	0	0	0	0.02±0.06
Mean number of ossified post lumber vertebrae±1SD	1.89	3.07±1.51***	5.32±2.30***	7.45±0.50***	8.14±0.60

Calcurated by averaging the percentage in each litter, and shown as mean 1SD.
† Cases showing deviation over 1/2 of length of maximum sternal nucleus between left and right nuclei.
§ Definition of lumbar rib was based on Kimmel and Wilson (Teratology, 8, 309-316, 1973).
¶ Cases showing abnormality in sum of numbers of cervical, thoracic and lumbar vertebrae.
Values marked with asterisks are significantly diferrent(t-test) from corresponding control value (***p< 0.001).

妊娠10日投与群に1例（この胎児は外脳症の1例と同一個体），四肢減形成が妊娠11日投与群に1例，短尾が妊娠10日に，無尾が妊娠13日投与群に各1例みられたのみであった（表5）．その他の異常としては皮下出血が妊娠13日と15日投与群に各1例みられたのみで，全身性浮腫の発生はなかった．

骨格の観察では骨格癒合奇形児が妊娠8日投与群にのみみられ，各母体単位での値を平均した発生頻度は2.6%，奇形児をもった母体の発生頻度は3／12（25.0%）であった（表5）．その他の観察項目で妊娠日別投与群間に意味ありとみられる差はなかった．

考　察

今回行なったラットでの臨界期連続および単一投与試験の結果を先に行なったマウスでの結果[2]と比較した．

臨界期連続投与試験でのTBZがおよぼすマウス・ラットに対する生児数・死胚数・雌雄生児体重への影響は同様な傾向を示した．すなわちマウス・ラット共に生児数の減少，死胚数の増加がみられ，雌雄生児体重の減少が観察された．しかしながら外表異常の観察ではマウスに口蓋裂をもった奇形児が用量相関をもってみられた

Table 4. Effects of 1000mg thiabendazole／kg body weiqht given orally to pregnant rats on one days 8−15 of gestation

Reproductive parameter	Number, percentage or weight observed							
	8 day	9 day	10 day	11 day	12 day	13 day	14 day	15 day
Females mated †	12	12	12	11	11	13	12	12
Female died Ψ	0	0	0	2	3	1	0	3
Females gestated §	12	12	12	9	8	12	12	9
Females with ⩾ 1 live foetus	12	12	12	9	8	12	12	9
Corpora lutea / litter #	16.6±1.7	15.4±1.9	17.0±2.3	15.3±1.7	17.0±1.5	15.6±1.5	15.2±1.5	15.3±1.7
Implantations / litter #	13.7±1.7	13.8±1.5	14.2±2.0	13.6±1.2	15.6±1.6	14.3±1.3	12.3±3.3	13.9±1.5
Resorption of foetuses (%) # ¶								
Early	9.8±18.0	5.5±5.3	11.1±14.8	7.6±9.5	2.4±3.4	6.3±5.7	8.8±12.0	3.0±3.6
Late	0.6±1.9	0	0	0	0	0	0	0
Live foetuses / litter #	12.4±3.1	13.0±1.7	12.7±2.5	12.7±1.9	15.3±1.7	13.5±1.4	11.3±3.5	13.4±1.2
Body wt of live foetuses(g)#								
Male	3.35±0.32	3.48±0.28	3.19±0.19	3.25±0.17	3.21±0.26	3.24±0.26	3.11±0.29	3.15±0.31
Female	3.10±0.24	3.25±0.16	3.00±0.21	3.10±0.20	3.05±0.25	3.03±0.25	2.95±0.24	3.01±0.27

† No. with vaginal plug.
Ψ No. that died before scheduled kill on day 20.
§ No. with implantation sites.
# Values given as mean±1SD for litters having one or more live foetuses.
¶ 'Early' defined as cases showing implanted sites and amorphous germinal mass, 'Late' defined as cases showing the head and limbs. Values for per cent resorption and foetal body weight were by averaging the value for each litter.

Table 5. Incidence of malformations in foetuses of rats given 1000mg thiabendazole／kg orally on of days 8−15 of gestation

Observation	Incidence of malformation							
	8day	9day	10 day	11 day	12 day	13day	14day	15 day
External malformations								
No. litters with malformed foetuses / no. examined - (%)	0/12 (0)	0/12 (0)	2/12 (16.7)	1/9 (11.1)	1/8 (12.5)	1/12 (8.3)	0/12 (0)	0/9 (0)
Malformations (%)#	0	0	1.7±4.0	0.9±2.6	0.7±2.1	0.7±2.4	0	0
No. malformed foetuses / no. examined	0/149	0/156	2/150	1/112	1/122	1/160	0/135	0/121
No. of foetuses with :								
Exencephalia	0	0	1	0	0	0	0	0
Reduction deformity of limbs	0	0	0	1	0	0	0	0
Short or absent tail	0	0	1	0	0	1	0	0
Open eyelids	0	0	0	0	1	0	0	0
Spina bifida	0	0	1	0	0	0	0	0
Skeletal malformations								
No. litters with malformed foetuses / no. examined - (%)	3/12 (25.0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/9 (0)	0/8 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/9 (0)
Malformations (%)#	2.6±5.3	0	0	0	0	0	0	0
No. malformed foetuses / no. examined	4/149	0/156	0/150	0/112	0/122	0/160	0/135	0/121
No. of foetuses with :								
Fusion of vertebral arches	2	0	0	0	0	0	0	0
Fusion of ribs	3	0	0	0	0	0	0	0

Calculated by averaging the percentage in each litter (i.e. no. of malformation/ no. of foetuses) and shown as mean±1SD

のに対し，ラットでは口蓋裂の発現は全くみられず，かわって全身性浮腫胎児が用量相関をもって観察された．また骨格奇形の観察ではマウスに骨格癒合奇形児の発現が多くみられ用量相関も伺われたのに対し，ラットでは667mgおよび444mg／kg投与群に各1例を観察したのみであった．Khera ら[7]はWistarラットの妊娠6～15日（精子存在確認日を妊娠1日として起算）にTBZ 500mg／kgを投与した群において156匹の観察胎児中2例の小胎児と7例の胸骨核化骨遅延胎児を報告している．Khera らのいう小胎児（runted foetus）がどのような状態を差しているかは不明だが，本実験においてもTBZ用量に相関した発育遅延胎児がみられ，それに伴う化骨遅延も認められている．

臨界期単一投与試験の結果では，マウスの妊娠11日および13日投与群に連続投与試験でみられた口蓋裂奇形児の発現がみられたのに対し，ラットでは連続投与でみられた全身性浮腫胎児はいずれの投与日群でも発現しなかった．またマウスの妊娠9日投与群に多く発現した四肢減形成および短・無尾奇形児はラットでは妊娠10日（短尾），11日（四肢減形成），12日（無尾）投与群に夫々1例ずつ発現した．骨格奇形ではマウス妊娠7～9日投与群に多く発現した骨格癒合奇形児は，ラットでは妊娠8日投与群に4例みられたのみで他の投与日群には観察されなかった．

以上，TBZの催奇形性はラットにおいてはマウスの場合ほど明確ではなかった．しかしながら，一般にマウスは催奇形因子に感受性が高く，ラットでは低いといわれており，われわれの試験結果はそれをよくあらわしているといえる．むしろ発現例数は少ないが臨界期単一投与試験において，マウスでみられた四肢減形成および短・無尾奇形児がラットにおいても発現したことはTBZの影響を示唆していると考えられる．

一方，臨界期連続投与試験のラットで発現した用量相関のある全身性浮腫胎児については，臨界期単一投与試験で発現しなかったことを考慮し，それが真にTBZの影響によるものかあるいは妊娠母体へのTBZ大量投与による損傷からくる二次的作用によるものか否か，現在検討中である．

今後さらに例数を増し，投与時期などを考慮しながらTBZのラットでの催奇形性の有無を明らかにしたい．

要　旨

チアベンダゾール（TBZ）のラットを用いた催奇形性試験を行なった．TBZ 1,000mg，667mg，444mgおよび296mg／kgをオリブ油に懸濁，妊娠8～15日に毎日1回連続経口投与した．用量に相関した全身性浮腫胎児が発現した．TBZ 1,000mg／kgを妊娠8～15日の各妊娠日に1回のみ経口投与した試験では全身性浮腫胎児の発現はみられなかったが，マウスで発現したと同様な四肢減形成および短・無尾奇形児が発現し，TBZの影響が示唆された．

文　献

1）小縣昭夫，安藤　弘，久保喜一，平賀興吾：東京衛研年報，29—2,112,1978
2）Ogata, A., Ando, H., Kubo, Y. and Hiraga, K.：Fd Chem. Toxic. 22, 509, 1984
3）小縣昭夫，安藤　弘，久保喜一，平賀興吾：東京衛研年報，33,495,1982
4）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
5）Yoneyama, M., Ogata, A., Fujii, T. and Hiraga, K.：Fd Chem. Toxic. 22,731,1984
6）Food and Drug Directorate, Canada：Rx Bull. 1,7, 1970
7）Khera K. S., Whalen C., Trivett G. and Angers G.：J. Environ. Sci Health, B14(6),563,1979
8）Dawson, A. B.：Stain Tech., 1,123,1927
9）西村秀雄：先天異常，16,175,1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 426-429, 1986

クロム鉱さい粉じんのラットによる2年間持続吸入実験（第3報）
臓器中クロムの分析

神谷信行*, 坂本義光*, 佐々木美枝子*

Inhalation Experiment of Chromite Ore Residue Dust to Rats for 2 Years (III)
Analysis of Chromium in Rat Tissuses

NOBUYUKI KAMIYA*, YOSHIMITSU SAKAMOTO* and MIEKO SASAKI*

Keywords：クロム chromium, クロム鉱さい chromite ore residue, 粉じん dust, 吸入毒性 inhalation toxicity, ラット rat

緒　言

粉じんとして経気道により摂取されるクロム鉱さいの生体におよぼす影響を観察する目的で吸入実験装置[1]を用いたラットによる7日間，1か月間，3か月間吸入実験および1か月間吸入後終生飼育実験を行いその結果はすでに報告した[2-5]．前実験において鉱さい粉じんを曝露したラットの臓器中クロム濃度は，肺，腎臓，脾臓で特に高い値を示し，次いで肝臓，血液で高い値を示した[2-4]．また臓器中クロム濃度は曝露を中止することにより減少したが，曝露停止1年目で肺には曝露終了時の30%，腎臓，脾臓には11%のクロムがなお残留しており[5]，これら臓器に対しクロムが蓄積することが示された．本報ではより長い曝露期間における変化を観察するため，2年間にわたって吸入曝露した際の肺，脳，肝臓，腎臓，脾臓および血液中のクロム濃度について報告する．

実験材料および方法

動物　F 344/DuCrj ラットの雄を4週令で購入し，1週間予備飼育した後実験に用いた．実験開始時の体重は82～83gであった．

粉体　クロム鉱さい粉じんは鉱さい塊をボールミル（Alfrad Fritsch Co.）で約8時間粉砕後，分篩して調製した．原粉体の比重は2.97，平均粒径は3.3μmであった．粉体の組成はTable 1に示すようにカルシウムが最も多く，クロムは水溶性のものが1.2%，不溶性のものが1.6%の割合であった．

吸入実験　実験は1群20匹としてクロム鉱さい粉じんの0.2mg/m³，1 mg/m³の粉じん曝露群と実験室内空気のみの対照群の3群を設定し，昼夜連続で105週間行った．実験に用いた装置の詳細は前報[1]に示した．

実験期間中の各群の粉じん濃度は設定濃度に対して±10%以内の変動幅に保たれていた．また粉じんの粒径分布はTable 2に示したように両群とも4.7μm以下の粒子が90%，また2μm以下は0.2mg/m³で56.5%，1 mg/m³で45%の割合であった．

実験期間中動物は吸入チャンバー内の2個のステンレス製金網ケージに等分に収容し，飼料はCE－2（日本クレア）を，飲料水は水道水をそれぞれ自由に摂取させた．

チャンバー内飼育条件は，温度23～25°，湿度40～50%，換気回数12～14RPHで，照明時間は実験室内と同様午前6時より午後6時までとした．

曝露終了後，各群それぞれ7例の動物を大腿部動静脈の切断により採血し，屠殺後，肺，脳，肝臓，腎臓，脾臓の各臓器を摘出，秤量後これら臓器および血液中のクロム濃度を原子吸光法で測定した．

分析方法　摘出臓器および血液は洗浄済ビーカー[3]に入れ，ホットプレート上約90°で乾燥，放冷後硝酸を加えて1日放置したのち，硝酸，過酸化水素水で分解した．分解終了後さらに加熱して乾固し，0.1N硝酸で一定量として試験溶液とした．別に試薬のみを用いて同様に操作した空試験溶液を調製し，これら試験溶液中のクロムを原子吸光法で測定した．測定条件および機器はTable 3に示した．

*東京都立衛生研究所毒性部病理研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Composition of Chromite Ore Residue Dust

	(%)
Ca	21.2
Fe	6.1
Cr	2.8(1.2)*
Si	2.4
Al	1.8
Na	0.4
Ni	0.3
Mn	0.08
Ti	0.04
Zn	0.03
Sr	0.005

( ) *: Water soluble Cr
Atomic Absorption Spectrophotometry

Table 3. Analytical Condition for Chromium by Atomic Absorption Spectrophotometry

Instrument			
PERKIN-ELMER AA-4000			
Graphite Furnace HGA-400			
Instrumental Parameters			
Wavelength	357.9 nm		
Spectral Bandwidth	0.7 nm		
Light Source	Hollow Cathode Lamp		
Lamp Current	10 mA		
Background Correction	W Lamp		
HGA Parameters			
Step	DRY	CHAR	ATOM
Temp	110	1100	2300
Ramp(sec)	40	30	0
Hold(sec)	10	20	6
Gas Flow(ml/min)	300	300	60

結果と考察

Table 4 に臓器および血液中の湿重量あたりのクロム濃度を示した．ただし肺はμg/g，脳，肝臓，腎臓，脾臓，血液は ng/g で示した．肺，肝臓，腎臓，脾の各臓器は対照群と比較して，0.2mg/m^{3}群，1 mg/m^{3}群ともに高い値を示し，両曝露群との間にも明かな差が認められた．

Table 2. Particle Size Distribution in Inhalation Chamber

Sampler Stage	Diameter μm	Weight percent 0.2mg/m^3	Weight percent 1 mg/m^3
0	>11.0	0	0
1	11.0 − 7.0	0	0.4
2	7.0 − 4.7	2.0	2.8
3	4.7 − 3.3	9.3	15.9
4	3.3 − 2.1	31.2	35.9
5	2.1 − 1.1	42.7	31.7
6	1.1 − 0.65	13.8	11.7
7	0.65− 0.43	0	1.6
8*	0.43>	0	0

8*: Filter

特に肺は直接曝露をうけるため他の臓器に比べて非常に高い値で，0.2mg/m^{3}群で6.2μg/g，1 mg/m^{3}群で87.7 μg/g に達した．腎臓は279.2ng/g，1780ng/g，脾臓は56.9ng/g，382.9ng/gで肝臓はこれら臓器より比較的少なく8.9ng/g，35.4ng/g で以上４つの臓器は血液濃度以上であった．血液は0.2mg/m^{3}群で8.5ng/g，1 mg/m^{3}群で15.1ng/g，脳は4.3ng/g，5.1ng/g と対照群に比べ高い傾向を示したが，血液１mg/m^{3}群をのぞいて有意な差は認められなかった．

一般に経気道により摂取された粉じんの肺内への進入は，粒子径によって大きく影響される．本実験における粒度分布は Table 2 に示したが，肺胞内まで達する粒子は２μm 以下といわれており[6]，0.2mg/m^{3}群で56.5％が，1 mg/m^{3}群で45％が肺内まで達したと考えられる．ただし昼夜連続の全身曝露であるため，体外部や飼育ケージに附着した粉じんがある程度経口摂取された可能性があり，その点を考慮する必要がある．

本実験の結果のうち１mg/m^{3}群の臓器，血液中クロム濃度と，すでに行った１か月間および３か月間持続吸入実験で１mg/m^{3}の鉱さい粉じん濃度で行った実験の結果[3,4]をまとめて Fig. 1 に示した．肺，腎臓，脾臓，肝臓でクロム濃度が増加する傾向を示し，これらの中では腎臓が最も高い増加割合を示し，２年目で１か月目の約25倍となり，次いで脾臓，肺がそれぞれ8.3倍，7.2倍で，肝臓は3.5倍であった．脳，血液では１か月目から２年目にかけて差がなかった．

腎臓中のクロム濃度の増加はクロムが主に尿へ排泄さ

Table 4. Chromium Concentration in Lung, Liver, Kidney, Spleen, Brain and Blood of the Rats exposed to Chromite Ore Residue Dust at 0.1mg/m³ and 1 mg/m³ for 2 Years

	Control	0.2mg/m³	1 mg/m³
Lung	0.0017±0.005	6.2±6.2	87.7±7.4
Liver	4.1±3.2	8.9±2.4	35.4±6.7
Kidney	14.5±5.8	279.2±46.3	1780±320
Spleen	12.1±5.7	56.9±15.1	382.9±68.9
Blain	3.8±2.3	4.3±2.5	5.1±2.4
Blood	5.0±2.7	8.5±4.7	15.1±5.5

mean±SD ng/g (lung μg/g)

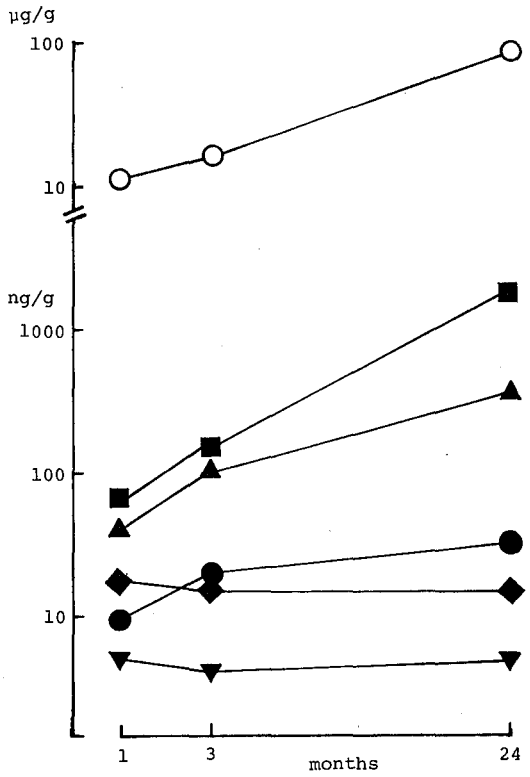


Fig. 1. Chromium Concentration in Lung, Liver, Kidney, Spleen, Brain and Blood of the Rats exposed to Chromite Ore Residue Dust at 1 mg/m for 2 Years

○—○ Lung, ●—● Liver, ▲—▲ Spleen,
▼—▼ Blain, ■—■ Kidney, ◆—◆ Blood

れることからその排泄経路として理解されるが，犬の場合血中クロムは糸球体でろ過され，その63%が尿細管で再吸収されるという報告があり[7]，ラットについても同様に糸球体でろ過された血中クロムはその一部が尿細管で再吸収され腎臓に蓄積されるものと思われる．また腎臓の病変に関しては，クロム化合物が尿細管の病変をおこすことが知られており[8,9]，すでに報告したクロム鉱さい20mg/m³，1か月間持続吸入実験[10]では臓器中クロム濃度は857ng/gで腎障害の程度が強く現われたラットの例が対照群より多くみられたが，本実験の1 mg/m³群では1780ng/gと約2倍の濃度であるにもかかわらず，特に鉱さい曝露群に特徴的な変化はみられず，曝露濃度および曝露期間と病理組織学的変化との関連については今後の検討が必要である．

経気道摂取により肺内へ吸入された粉じん粒子は大食細胞に貪食された状態で肺胞内に存在しているほか，肺内リンパ組織，気管支および血管周囲の結合組織内に大量に存在しており[11]，鉱さい中の不溶性クロム化合物が他の臓器へほとんど移行することなく蓄積されたと考えられる．鉱さい中の不溶性のクロム化合物はおもに酸化第二クロム（Cr_2O_3）である[12]が，この生物学的半減期は200日以上といわれている[13]．

脾臓は腎臓に次いで高い増加割合であったが，これは赤血球の破壊による血球成分の残留や，網内皮系の食作用による蓄積のためと考えられる．しかしクロムの蓄積によると思われる病理組織学的変化は肝臓とともに認められなかった[1]．

ま と め

クロム鉱さい粉じんを0.2mg/m³および1 mg/m³の濃度で，ラットに昼夜連続で2年間曝露し，クロム鉱さい粉

じんの低濃度，長期間の吸入曝露による生体への影響を調べる目的で臓器および血液中のクロム濃度について検討した．臓器では肺，腎臓，脾臓，肝臓で高い値を示し，脳が最も低く，対照群と差がなかった．血液は1 mg/m³で対照群より高い値を示したが，0.1mg/m³群では差がなかった．

文　献

1）坂本義光，調　武久，平賀興吾：東京衛研年報，28－2,135,1977

2）神谷信行，坂本義光，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，32－2,85,1981

3）神谷信行，坂本義光，伊川三枝子，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，29－2,64,1978

4）神谷信行，坂本義光，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，31－2,51,1980

5）神谷信行，坂本義光，佐々木美枝子，平賀興吾：東京衛研年報，34,379,1983

6）Baetjer,A.M., Lowry, J. F., Steffee, H. and Budacz, V. : *A. M. A. Arch. Ind. Health*, 20,124,1959

7）Collins, R. J., From, P. O. and Coolings, W. D. : *Amer. J. Physiol.*, 201,795,1961

8）Hunter, W. C. and Roberts, J. M. : *Am. J. Path.*, 9, 133,1933

9）Simonds, J. P. and Helper, D. E. : *Arch. Path.*, 39,103, 1945

10）坂本義光，神谷信行，池田虎雄，平賀興吾：東京衛研年報，34,369,1983

11）坂本義光，神谷信行，池田虎雄，平賀興吾：東京衛研年報，33,518,1982

12）坂本義光，神谷信行，池田虎雄，平賀興吾：東京衛研年報，31－2,33,1980

13）Morrow, P. E., Gibb, F. R., Davies, H. and Fisher, M. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 12,372,1968

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 430-435, 1986

F344ラットの加齢に伴う血液性状の変化

多田幸恵*, 佐々木美枝子*

Changes of Hematological Findings with the Aging in F344 Rats

YUKIE TADA* and MIEKO SASAKI*

Keywords：F 344ラット F 344 rat, 加齢 Aging, 血液性状 Hematological Finding

緒　言

Fischerラットは小型で扱い易いなどの理由で，近年，NCI（National Cancer Institute）および我国の発がん性試験に多用されている．当所においても，毒性試験および発がん性試験にFischerラットを用いており，試験と併行して，Fischerラットの平均寿命，体重の推移，血液性状，組織性状などを観察し，背景データの集積を進めている．血液性状に関しては著者らが初期の経時的な変化を観察し，バリア飼育と一般飼育，個別飼育と集団飼育，雄と雌とにおける比較を行い結果を報告した[1]．

今回は，Fischerラットを当所のバリア飼育施設に終生飼育し，経時的に採血し，加齢に伴う血液性状の変化を観察した．

実験方法

実験動物　日本チャールスリバー㈱生育のF 344／DuCrjラット（以下F 344ラットと略す）雌雄各10匹を生後4週齢で購入（平均体重±SD：雄61.0±3.0g，雌58.0±1.6g），1週間馴化飼育後実験に用いた．前・底面が網のステンレスケージ（幅28×奥行40×高17cm）をベルト式飼育架台に設置し，ラットを1ケージに5匹づつ入れ，室温22－25°，湿度50－60%，照明12時間，換気回数毎時10回のバリア飼育室で飼育した．飼育用固型飼料はCE－2（日本クレア：水分8%，粗蛋白質24.5%，粗脂肪4.5%，粗線維4%，粗灰分6.6%，可溶性無窒素物52.4%，348.1Cal／100g）を用い，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．体重測定を週一度午前9：00－10：00に行った．

血液学的検索　5週齢より15週齢までは2週間ごと，それ以降は4週間ごとに採血し，血液検索を行った．

採血日の午前9：30－10：30にラットをプラスチック製ホルダーに入れ，尾を微温湯であたため，鋭利なカミソリを軽くあて[2]，尾静脈より湧出する血液約0.3m*l*を，EDTA－2Kを分注し蒸発乾固させた小試験管に採取した．Coulter Counter Model S（Coulter Electric INC）を用い，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）を測定した．精度管理には4 C® NORMAL（コールターカウンター用血球コントロール）を用いた．また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像を観察した．

結果および考察

平均体重の推移をFig.1に，血液性状の推移をTable 1およびTable 2に，白血球百分比の推移をTable 3に示した．

体重および平均寿命　平均体重は雌雄ともに，当所で以前，毒性試験に供したF 344ラットの無処置群[3]と同様の推移を示した．平均寿命は雄が114－145週齢（平均122週齢），雌が105－147週齢（平均129週齢）で当所におけるF 344ラットの無処置群[4]とほぼ同じであった．

くり返し採血がラットに与える影響を懸念したが，体重の推移および平均寿命からはその影響は認められなかった．

血液学的検索

WBC　雄では100週齢まで加齢に伴った変化がみられず9.5～13.1×10^3／mm^3の範囲で増減をくり返し，100週齢以降増加した．

雌では5週齢より52週齢まで増減をくり返しながら徐々に減少し，60週齢以降は7.3～8.8×10^3／mm^3の値を

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

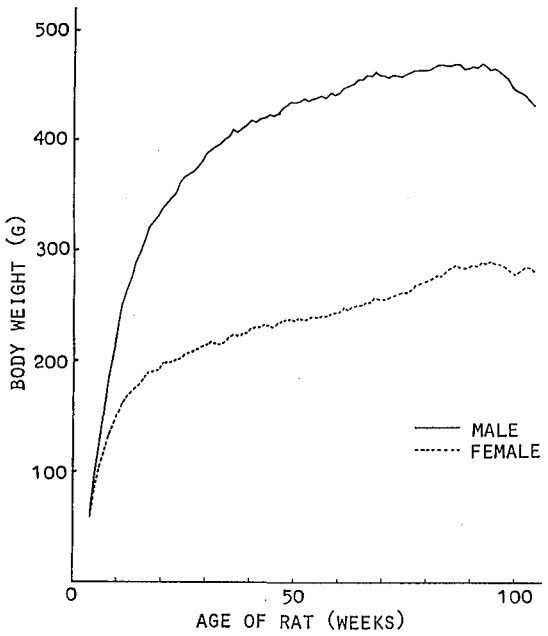


Fig. 1. Changes of Mean Body Weight in F 344/DuCrj Rats

示し，100週齢以降徐々に増加した．雌雄差が11週齢よりみられ雄は雌よりも高い値を示した．

RBC 雄では19週齢まで増加し，以降72週齢まで8.5～9.0×10^6/mm^3の値を示し，76週齢以降個体間のバラツキが大になり徐々に減少した．雌では11週齢まで増加し以降100週齢まで8.0×10^6/mm^3前後の値を示した．100週齢以降減少した．雌雄差が13週齢よりみられ，雄は雌よりも0.6～1.0×10^6/mm^3高い値を示した．76週齢以降，この差は減少し0.3～0.6×10^6/mm^3となった．

Hb 雌雄とも19週齢まで増加し，以降76週齢までほぼ一定の値を示し，以降徐々に減少した．雌雄差は認められなかった．

Ht 測定時によりバラツキがみられたが雌雄とも19週齢まで増加し，以降41～45％の値を示した．雌雄差は認められなかった．

MCV 雄では15週齢まで減少し，以降48週齢まで51 μ^3前後の値を示した．52週齢より72週齢までは49 μ^3とやや低い値を示し，76週齢以降個体間のバラツキが大となり徐々に増加した．雌では15週齢まで減少し，以降48週齢まで55 μ^3前後の値，52週齢より72週齢までは52～53 μ^3とやや低い値を示し，96週齢以降徐々に増加した．雌雄差が9週齢よりみられ，雌は雄より3～4 μ^3高い値を示した．RBCと同様雌雄差は76週齢以降減少した．

RBCとMCVの推移を併せてFig.2に示した．雄ではRBCの増加が19週齢まで，MCVの減少が15週齢までみられ，以降安定期を経て，RBCの減少およびMCVの増加が76週齢より認められた．雌ではRBCの増加およびMCVの減少が11週齢までみられ，雄と同様安定期を経た後，RBCの減少が100週齢より，MCVの増加が96週齢より認められた．以上のようにRBCとMCVの変化する時期はほぼ一致しており，血球の数と大きさの調整により血液中のヘモグロビン濃度の恒常性が保たれるような機構が働らいていると考えられた．

MCH 雌雄とも23週齢まで減少し，以降ほぼ一定の値を示した．11週齢より雌雄差がみられ，雌が1～2 $\mu\mu$g高い値を示した．

ラットの成熟期は7～9週齢，閉経期は65～77週齢であり[5]，血液性状に雌雄差が出現および減少する時期は成熟期および閉経期にほぼ一致し，RBC，MCV，MCHにみられた雌雄差は，76週齢以降減少した．ヒトでは月経開始時より女性のRBC, Hbに低下がみられ性差が出現し，閉経期以後差が消滅するとされている[6]．しかしラットでは72週齢以降血球値に変化がみられたのは雄の方で，雌は11週齢以降ほぼ一定の値を示しており，血球値における性差発現の機構がヒトとラット同一であるか否か明らかでなかった．

MCHC 測定時によりバラツキがみられたが，週齢に伴った変化および雌雄差はみられなかった．

赤血球および白血球像 赤血球像および白血球像には週齢に伴った変化がみられなかった．白血球百分比では，雌雄とも週齢に伴い好中球の比率が増加し，リンパ球の比率が減少した．単球および好酸球の比率には変化がみられなかった．

104週齢（2年間）経過後，白血病が雄に10匹中4例，雌に10匹中5例みられた．白血病はいずれもF 344ラットに好発するMononuclear cell leukemia（単核細胞白血病）[7,8]であった．

老齢期の血球値を個体別に観察すると，ほとんどのラットで，雄は76週齢以降，雌は100週齢以降にWBC・MCVの増加およびRBC・Hbの減少が認められた．
これらは加齢に伴う生理的な変動であると思われる．この変化にひき続き貧血，白血球増多症，白血病細胞の出現など，疾病に起因すると思われる血液性状の変化が，個体により観察された．

実験動物の血液性状に関しては多数の報告がされている[9-22]．Gordonらは Fischer ラットの血液性状を検討し，雌では週齢に伴ったMCVの変化がみられなかったと報告[11]，Vondluskaらは CD ラットで雄の MCV が雌の

Table 1. Changes of Hematological Values with the Aging in F 344/DuCrj Rats[1)]
—Male—

Age[2)] (weeks)	No. of[3)] Rats	WBC $\times 10^3/mm^3$	RBC $\times 10^6/mm^3$	Hb g/dl	Ht %	MCV μ^3	MCH $\mu\mu g$	MCHC %
5	9	10.4± 1.7[4)]	6.77±0.31	15.0±0.6	39.9± 2.1	59.0± 0.8	22.1±0.2	37.5±0.7
7	10	10.8± 0.8	7.34±0.29	15.8±0.5	41.5± 1.6	56.6± 0.7	21.5±0.3	38.1±0.7
9	10	11.9± 0.9	7.82±0.27	16.4±0.4	42.0± 1.7	53.8± 0.7	21.1±0.5	39.2±1.1
11	10	11.1± 0.7	8.02±0.29	16.1±0.6	41.3± 1.6	51.6± 0.7	20.1±0.3	39.1±1.0
13	9	11.0± 1.0	8.19±0.32	16.5±0.3	41.9± 1.8	51.2± 0.4	20.2±0.8	39.4±1.7
15	9	11.9± 0.9	8.37±0.30	16.2±0.3	41.8± 1.6	50.0± 0.5	19.4±0.4	38.9±0.8
19	9	13.0± 1.1	8.93±0.33	17.2±0.4	45.7± 1.7	51.2± 0.4	19.3±0.3	37.8±0.8
23	9	11.7± 1.5	8.74±0.24	16.4±0.5	44.6± 1.1	51.1± 0.6	18.8±0.6	36.9±1.3
27	10	12.2± 1.4	8.75±0.23	17.0±0.2	44.6± 1.1	51.0± 0.6	19.4±0.3	38.1±0.6
32	10	13.1± 1.4	8.67±0.37	16.9±0.5	44.5± 2.0	51.4± 0.5	19.5±0.4	38.0±0.9
36	9	12.0± 0.9	8.72±0.29	16.8±0.3	44.6± 1.8	51.1± 0.6	19.3±0.4	37.8±1.3
40	10	10.6± 2.0	8.67±0.37	16.8±0.3	44.1± 2.1	50.9± 0.7	19.4±0.8	38.2±1.9
44	9	9.5± 0.7	8.88±0.31	17.2±0.3	45.8± 1.8	50.8± 0.7	19.4±0.6	38.1±1.2
48	10	11.4± 1.4	8.83±0.32	17.0±0.4	44.9± 1.7	50.9± 0.5	19.3±0.7	37.9±1.2
52	10	11.0± 1.3	8.89±0.29	16.5±0.4	43.0± 1.7	49.2± 0.7	18.6±0.3	37.8±0.7
56	9	11.3± 1.5	8.60±0.30	16.5±0.3	42.7± 1.6	49.6± 0.7	19.2±0.4	38.8±0.8
60	10	10.7± 1.3	9.00±0.47	17.0±0.4	43.7± 2.1	48.6± 0.7	18.9±0.6	38.9±1.2
64	10	11.2± 1.3	8.77±0.33	16.8±0.4	43.1± 1.6	49.2± 1.1	19.1±0.3	39.0±0.9
68	10	11.3± 0.9	8.98±0.33	16.9±0.5	44.0± 1.5	49.1± 1.1	18.8±0.3	38.3±0.4
72	10	11.4± 1.4	8.88±0.38	16.9±0.4	43.7± 1.2	49.3± 1.6	19.1±0.5	38.7±0.6
76	8	10.1± 1.5	8.25±0.48	16.3±0.3	41.5± 1.2	50.5± 1.9	19.8±1.1	39.2±1.1
80	10	12.1± 1.3	8.64±0.51	16.0±1.1	43.3± 1.7	50.3± 1.8	18.6±1.1	37.0±2.5
84	10	11.8± 1.4	8.59±0.50	16.1±0.7	43.0± 1.9	50.2± 1.6	18.8±0.5	37.5±0.8
88	10	12.4± 2.0	8.39±0.63	17.2±0.8	42.7± 2.5	51.0± 1.5	20.6±0.6	40.5±1.0
92	10	12.5± 3.0	8.42±0.78	16.6±1.2	44.2± 3.2	52.6± 1.1	19.7±0.5	37.5±0.5
96	10	12.4± 4.0	8.52±0.73	16.2±1.2	44.5± 3.0	52.4± 1.3	19.0±0.4	36.3±0.3
100	9	16.3± 3.7	8.24±1.20	15.5±1.7	43.1± 5.0	52.5± 2.0	18.9±1.0	35.9±0.9
104	9	16.8± 3.8	8.12±1.19	15.4±2.3	42.0± 5.9	51.8± 2.4	18.9±0.9	36.6±0.8
108	9	15.4± 5.1	8.15±0.94	15.5±1.9	41.6± 4.7	51.1± 2.2	19.0±0.9	37.3±1.1
112	9	17.4± 5.9	7.90±1.68	14.7±2.5	41.2± 7.4	52.5± 2.7	18.8±1.1	35.8±1.8
116	6	17.0± 4.8	7.31±1.86	13.9±3.2	38.9± 8.5	53.6± 2.5	19.1±0.8	35.6±1.2
120	4	16.3± 6.2	7.06±2.80	13.3±5.2	37.5±13.4	54.2± 3.4	18.8±0.4	34.8±2.1
124	4	20.7± 5.3	7.09±1.75	13.7±7.2	39.4± 5.2	57.2± 9.1	19.8±2.6	34.7±1.2
129	3	25.7±16.9	6.24±2.28	11.9±3.3	34.9± 7.8	59.3±15.5	19.8±3.8	33.7±2.2

1) Blood were collected from tail vein without anesthesia
2) Age of rat
3) Number of examined rats (Except rats having leukemic cells in peripheral blood)
4) Mean±SD

Table 2. Changes of Hematological Values with the Aging in F 344/DuCrj Rats[1)]
—Female—

Age[2)] (weeks)	No. of[3)] Rats	WBC $\times 10^3/mm^3$	RBC $\times 10^6/mm^3$	Hb g/dl	Ht %	MCV μ^3	MCH $\mu\mu g$	MCHC %
5	9	10.3± 1.3[4)]	7.24±0.24	15.9±0.7	42.0±1.6	58.0±0.7	22.0±0.5	37.9±1.0
7	10	11.0± 1.1	7.47±0.37	16.4±0.6	42.0±1.7	56.3±0.6	21.9±0.6	39.0±1.0
9	9	11.5± 0.9	7.82±0.27	16.9±0.4	43.5±1.4	55.6±0.7	21.6±0.4	38.8±0.8
11	10	10.8± 1.0	8.03±0.30	16.6±0.5	43.6±1.5	54.3±0.4	20.7±0.4	38.2±0.9
13	10	9.4± 1.0	7.87±0.18	16.6±0.3	43.0±1.7	54.7±1.5	21.1±0.3	38.7±1.3
15	9	10.8± 1.1	7.90±0.13	16.6±0.4	42.6±0.8	54.0±0.5	21.0±0.3	39.0±0.6
19	10	10.0± 1.6	8.10±0.24	17.2±0.4	44.5±1.3	55.0± 0	21.2±0.2	38.6±0.4
23	9	9.3± 1.6	8.19±0.27	16.6±0.1	44.8±1.7	54.6±0.5	20.2±0.6	37.1±1.4
27	9	10.1± 3.5	7.98±0.26	16.9±0.4	44.2±1.3	55.4±0.5	21.1±0.6	38.2±1.0
32	9	9.3± 1.8	7.88±0.14	16.6±0.2	43.4±0.7	55.1±0.6	21.1±0.4	38.4±0.5
36	10	9.4± 2.3	8.12±0.34	17.0±0.6	45.0±1.8	55.5±0.7	21.0±0.4	37.9±0.7
40	9	8.6± 2.1	7.84±0.24	16.8±0.5	42.9±1.1	54.7±0.4	21.4±0.8	39.1±1.3
44	9	7.4± 1.8	8.11±0.22	17.1±0.2	44.6±0.9	55.0±0.7	21.1±0.5	38.4±0.9
48	9	8.1± 0.7	8.05±0.32	17.2±0.4	43.8±1.7	54.4±0.7	21.4±0.9	39.3±1.9
52	10	7.8± 1.2	8.07±0.23	16.6±0.5	43.4±1.3	53.8±0.6	20.6±0.2	38.3±0.6
56	10	10.0± 3.4	7.89±0.25	16.7±0.4	42.2±1.4	53.5±0.5	21.1±0.2	39.6±0.6
60	9	7.3± 0.5	8.13±0.20	17.2±0.2	42.6±1.1	52.4±0.5	21.0±0.3	40.0±0.8
64	9	7.9± 0.6	8.06±0.22	16.8±0.3	44.2±1.3	52.4±0.7	20.8±0.5	39.8±1.1
68	9	8.6± 1.1	8.40±0.23	16.8±0.3	44.2±1.0	52.6±0.7	20.1±0.4	38.1±0.8
72	9	8.8± 1.0	8.11±0.29	16.9±0.3	42.4±1.2	52.3±0.7	20.9±0.5	39.9±0.7
76	8	7.6± 0.9	7.82±0.28	16.7±0.4	41.6±1.1	53.2±0.7	21.4±0.4	40.2±0.7
80	10	8.7± 0.3	8.21±0.28	16.7±0.5	43.4±1.3	52.9±0.3	20.4±0.2	38.6±0.3
84	10	8.5± 1.3	8.07±0.20	16.4±0.4	42.5±0.9	52.7±0.6	20.3±0.3	38.6±0.6
88	10	7.5± 0.6	7.97±0.28	17.8±0.5	42.9±1.2	53.9±0.8	22.3±0.5	41.4±0.3
92	9	8.1± 1.4	7.93±0.23	16.3±0.3	42.8±1.1	54.1±0.7	20.6±0.3	38.0±0.4
96	10	7.9± 1.9	7.83±0.28	15.9±0.4	42.6±1.4	54.5±0.7	20.4±0.2	37.4±0.4
100	9	8.5± 1.8	7.85±0.25	16.2±0.4	42.8±1.6	54.5±0.8	20.6±0.3	37.8±0.7
104	9	9.4± 2.1	7.75±0.85	16.2±1.2	42.4±3.1	55.0±3.0	21.0±0.8	38.2±0.9
108	9	9.3± 2.6	7.60±0.82	15.6±1.4	40.8±3.3	54.0±2.0	20.5±0.5	38.1±0.7
112	7	10.5± 5.1	7.42±1.04	15.0±2.0	40.5±4.4	54.8±2.3	20.3±0.5	37.1±1.6
116	8	8.7± 3.0	7.23±1.55	14.6±3.3	39.0±7.3	54.3±2.5	20.1±0.8	37.1±2.5
120	8	18.2±17.7	6.67±1.56	13.7±3.2	37.6±7.0	57.2±4.5	20.6±0.9	36.1±2.7
124	6	14.0± 4.0	5.54±0.69	14.7±1.1	41.6±3.1	55.3±1.2	19.6±0.4	35.4±0.3
129	5	14.7± 6.9	6.51±1.67	13.6±3.0	37.3±6.8	58.8±6.9	21.2±1.3	36.2±1.9

1) Blood were collected from tail vein without anesthesia
2) Age of Rat
3) Number of Examined rats (Except rats having leukemic cells in peripheral blood)
4) Mean±SD

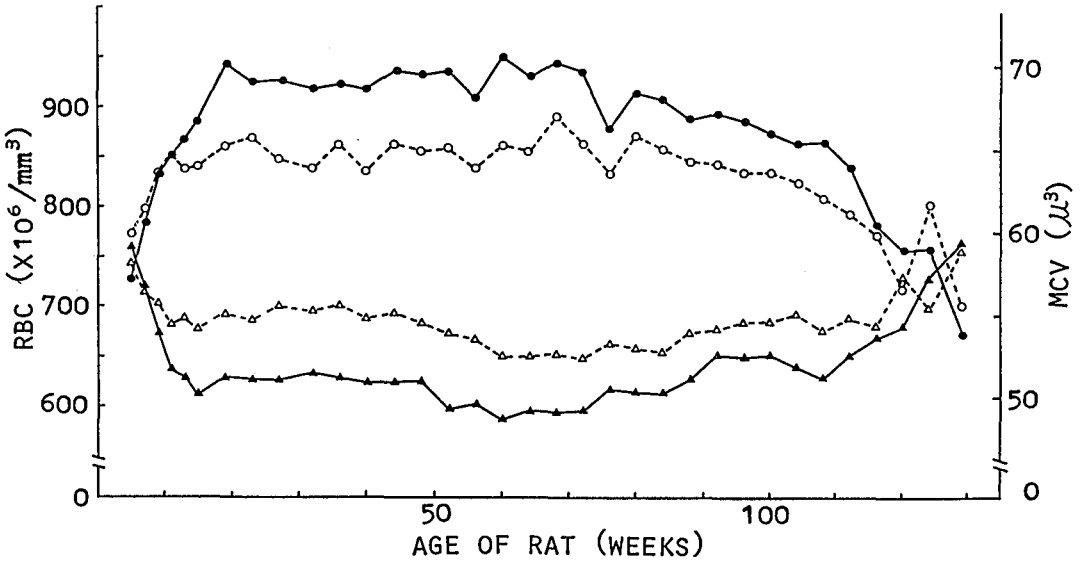


Fig. 2. Changes of Red Blood Cell Counts and Mean Corpuscular Volume with the Aging in F 344/DuCrj Rats

R B C : ●——●Male, ○- - -○Female

M C V : ▲——▲Male, △——△Female

Table 3. Changes of Differential Leukocyte Distribution with the Aging in F 344/DuCry Rats[1)]

Age of Rat (weeks)	No. of[2)] Rats	Percentages of Neutrophils	Lymphocytes	Monocytes	Eosinophils	Basophils
Male						
5	9	9.5± 3.7[3)]	90.1± 4.0	0.3± 0.5	0.1± 0.3	0
11	10	15.7± 7.0	84.3± 7.1	0.2± 0.4	0.8± 0.8	0
27	10	20.2± 9.1	77.6± 9.7	0.8± 1.0	1.4± 1.6	0
52	10	30.3± 8.9	66.7± 9.3	0.9± 0.9	2.1± 0.7	0
76	8	28.8± 7.0	68.4± 8.2	1.5± 1.1	1.3± 1.3	0
104	9	45.9±11.7	51.2±10.8	1.8± 1.7	1.1± 1.3	0
129	2	63.0± 8.4	35.5± 9.1	0.5± 0.7	1.0± 0	0
Female						
5	9	8.8± 2.6	89.9± 3.4	0.9± 1.0	0.4± 0.7	0
11	10	14.1± 3.7	85.2± 4.1	0.1± 0.3	0.6± 0.7	0
27	9	21.0± 8.4	76.9± 8.5	0.6± 0.7	1.6± 1.0	0
52	10	26.0± 8.9	66.7± 9.3	0.9± 0.9	2.1± 1.7	0
76	8	33.5± 6.8	62.6± 6.8	1.9± 1.5	2.0± 1.4	0
104	9	41.4±10.4	56.2±10.4	1.0± 1.1	0.9± 0.9	0
129	4	33.7± 8.4	64.2± 9.7	0.2± 0.5	1.7± 1.7	0

1) Blood were collected from tail vein withont anesthesia

2) Number of examined rats (Except rats having leukemic cells in peripheral blood)

3) Mean±SD

MCV より高かったと報告している[21]．また Kozma らは Long Evan ラットで週齢・性による差がなかったと報告している[14]．これらは今回の著者らの実験結果とは異なった報告である．一方週齢による血液性状の変化，WBC および MCV における性差の出現など今回の結果と同様の報告も多数みられる．ラットでは系統による差異はあまりないとされているが，各々の報告間にはかなりの相違が認められた．これらは，実験動物の供給源の相違により生じたものか，各研究室における飼育環境，飼料，採血法および測定法などの相違により生じたものと考えられる．

ま と め

F 344ラットの加齢に伴う血液性状の変化を知るため，当所のバリア飼育施設に雌雄ラットを終生飼育し，経時的に血液検索した．

RBC，Hb，Ht は加齢に伴い増加，MCV，MCH は加齢に伴い減少し，以降老齢期における変動がみられるまでほぼ一定値を示した．MCHC は加齢に伴った変化を示さなかった．

老齢期における生理的な変動として，RBC・Hb の減少および WBC・MCV の増加が認められた．

若齢期における RBC の増加と MCV の減少，老齢期における RBC の減少と MCV の増加は，ほぼ同週齢に認められた．

白血球百分比では，加齢に伴い好中球の比率が増加し，リンパ球の比率が減少した．

雌雄差が，RBC で13週齢，MCVで 9 週齢よりみられ，76週齢以降減少した．MCH で11週齢，WBC で13週齢よりみられた雌雄差は老齢期まで継続した．

文 献

1）多田幸恵，佐々木美枝子，平賀興吾：東京衛研年報，35,448,1984

2）関 正利，平嶋邦猛，小林好作：実験動物の血液学，331,1981,ソフトサイエンス社

3）高橋 博，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，32−3,121,1981

4）高橋 博，井口重孝，田山邦昭ら：東京衛研年報，33,552,1982

5）Henry, J.B., Russell, L. J. and Steven, H.W. : *The Laboratory Rat*, 154,1979,Academic Press, New York

6）長谷川弥人，日野志郎：臨床血液学，1966，医学書院

7）Moloney, W.C., Boschetti, A.E. and King, V.P. : *Cancer Res.*, 30,41,1970

8）Moloney, W.C., Boschetti, A.E. and King. V.P. : *Cancer Res.*, 29, 938,1969

9）Burns, K.F., Timmons, E.H. and Poiley, S.M. : *Lab. Anim.* Sci., 21,415,1971

10）Everitt, A.V. and Webb, C. : *J. Geront.*, 13,255,1958

11）Gordon, C.R., Kurabatov, B.A., Gustabo, G.H. et al : *J. Geront.*, 19,352,1964

12）Godwin, K.O., Fraser, F. J. and Ibbotson, R.N. : *Brit. J. Exp. Path.*, 45,514,1964

13）Hulse, E.V. : *Acta Haemat.*, 31,50,1964

14）Kozma, C.K., Weithbroth, S.H., Stratman, S.L. et al : *Lab. Anim. Care*, 19,746,1969

15）Mitruka, B.M. and Rawnsley, H.M. : *Clinical Biochemical and Hematological Reference Value in Normal Experimental Animal and Normal Humans*, 2nd Edi., 1981, Masson Pub. USA

16）Rigdon, R.H. and Richardson, L.R. : *Texas Reports on Biology and Medicine*, 480,1960

17）Russell, E. S., Neufeld, E.F. and Higgins, C.T. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 78,761,1951

18）Schalm, O. W., Jain, N.C. and Carroll, E. J. : *Veterinary Hematology*, 3rd Edi., 1975, Lea and Febiger, Philadelphia

19）Schermer, S. : *The Blood Morphology of Laboratory Animals*, 1967,Davis F.A. Co., Philadelphia

20）Sherman, H. : *Lab. Anim. Care.*, 13,793,1963

21）Vondruska, J.F. and Greco, R.A. : *Bull. Am. Soc. Vet. Clin. Pathol.*, 2,3,1973

22）Zingg, W. : *Lab. Anim. Sci.*, 21,740,1971

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 436-441, 1986

SPF ウサギ KBL：JW に関する基礎生理学研究（第1報）
体重増加，摂餌量，血液学および血清生化学データの週令変化について

林田志信*，小林博義**，井口重孝*，市川久次**

Studies on the Physiological Parameters of the SPF Rabbit (KBL : JW) (I)
Body Weight Gain,Food Intake and Blood Components in 7—10 Weeks of age.

SHINOBU HAYASHIDA*, HIROYOSHI KOBAYASHI**
SHIGETAKA IGUCHI* and HISATSUGU ICHIKAWA**

Keywords：SPFウサギ SPF Rabbit，生理学的所見 Physiological findings

緒　　言

毒性試験の施行には実験動物の外的および内的環境が試験結果に大きな影響を及ぼす．このため動物飼育室は温湿度，空気，給餌，給水など飼育育条件の恒常化や，騒音，細菌汚染の防御など，外的環境が厳しくチエックされ，また動物の側からは，遺伝的要因を一定にするための純系動物や，微生物感染症による影響を除外するためのSPF（Specific Pathogen free）動物の使用が要求される．　ウサギは実験動物として広く用いられているにもかかわらず，マウス，ラットなどの小動物に比べSPF化が遅れていたが，最近，近交系SPFウサギの供給が行われるようになった．ウサギを用いた毒性試験の基礎資料として利用するために，SPFウサギの基礎生理学的なデーターを集積し，雌雄のSPFウサギの当部動物飼育室の飼育条件での体重増加，摂餌量，経時的な血液学および血清生化学検査について調べているが，7～10週令までの途中経過について報告する．

使用動物ならびに方法

動物：SPFウサギKBL：JW，雌雄各5匹を7週令で北山ラベス㈱より購入した．

KBL：JWウサギはクローズコロニーとした日本白色ウサギから帝王切開により無菌的に仔をとり出し，人工哺育することによりSPF化されたもので[1)]，*Pasteurella multocida*, *Bordertella bronchiseptica*, *Salmonlla* spp., *Staphylococcus aeureus*, *Mycoplasma pulmonis*, HVJ, Rabbit pex, *Eimeria* spp., Earcanken, Body Man-ge, のう虫等が保有されていないものである．

動物は同一飼育室において限定された実験者により飼育管理した．飼育室の環境条件は，温度21±1℃，湿度50±5%，換気毎時10回（HEPAフイルター経由清浄空気），照明午前6時から午後6時までの12時間である．

前面および床面が網目のアルミ製ウサギ用ケージ（W 35×D 50×H 50cm）に動物を個別に収容し，ベルト式自動飼育架台に配置した．

飼料はオリエンタル酵母㈱製ORC－4固型飼料を与え，水は自動給水装置により細菌ろ過器経由の水道水を与えた．飼料および水は自由摂取させた．ベルト式自動飼育架台は6時間毎に3分間自動洗滌運動させ，ケージ交換は2週間に1回行った．

方法：体重測定は毎日午前8時30分から9時までの間に行った．体重測定と同時に動物の一般状態の観察も行った．摂餌量の測定は，週2回，300gの固型飼料を各動物に与え，翌日その残量を測定し，300gから残餌量を減じた量を一日当りの摂餌量とした．採血は週1回，耳静脈より1.5mlの血液を採取し，直ちに2500 rpm 10分間遠心して血清分離を行った．血清はアナライザーによる分析を行なうまで－80℃ディープフリザーに凍結保存した．また血液学検査用の血液は，耳静脈より採血後に湧出する血液を50 μl のピペットに採取し，アイソトンII液10mlに直ちに混入して希釈した．

血液学検査はCoulter Counter model S（Coulter Electric Co.）を用いて行ない，白血球数（WBC），赤血球数

*東京都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 Rasearch Laboratory of Public Health
241,Hyakunincho 3 Chome,Shinjuku-ku,Tokyo,160 Japan
**同薬理研究科

(RBC), ヘモグロビン量 (Hb), ヘマトクリット値 (Ht), 平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH), 平均赤血球容積 (MCV), および平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC), を測定した. 血清生化学検査は, Automatic Analyzer 705 (日立) を用いて行い, グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性 (GPT), グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ活性 (GOT), アルカリフォスファターゼ (ALP), 総コレステロール量 (CHO), 尿素窒素 (UN), 総タンパク量 (TP), アルブミン量 (ALB), A/G 比およびグルコース量 (GLU), について測定した.

結果および考察

一般観察：動物はすべて良好な健康状態で入荷し, 搬入後の飼育室および給餌, 給水器具への馴化も順調であった. 一般症状観察では, 毛並は良好で, 眼, 耳, 鼻, 口腔, 皮膚および生殖器, 排泄器に異常および外傷もなく, 経過観察中に, せき, 鼻汁, 眼脂および下痢などの異常所見はまったく見られず, 食欲も旺盛であった.

体重：搬入時 (7週令) の体重は雄1.5±0.04 (1.40±1.60) kg, 雌1.53±0.01 (1.49±1.56) kg であったが, 各個とも順調な体重の伸びを見せた. 1ケ月後の11ケ週令にはそれぞれ2.41±0.10kg(雄), 2.69±0.06kg(雌)となった.

個体別および雌雄別の体重増加を図1～3に示す. 雄では個体差が週令とともに増す傾向がみられたが, 雌では個体間のばらつきも少なく, 体重の伸びは雄よりも良好であった.

今回の測定では雌ウサギの平均体重が雄ウサギのそれを上まっているが, これは10週令頃より雄の体重が雌よりも大きくなる SPF でない一般飼育ウサギでの所見と異なっている. 例数も少なく, 観察週令もまだわずかであるが, この傾向が持続するものなのか, さらに経過観察中である.

摂餌量：個体別および雌雄群別の摂餌量を図4～6に示した. 餌の摂餌量は搬入直後 (7週令) の雄118.2g/day (体重あたり摂餌量72.0g/kg/day), 雌116.4g/day (体重あたり68.5g/kg/day) からいくらかのばらつきはあるがしだいに増加し, 11週令では, それぞれ145.5/day (雄), 173.8/day (雌), となった. 体重あたりの摂餌量は8～9週令頃に最大となった. これは飼育環境への馴化と成長時期とが関係すると思われる. 雄 No. 2 の個体は餌の摂餌量も他の4匹に比べて少なく, 体重も低いが体重増加は順調で, 一般症状にも変化はなかった. 雌ウサギの方が餌の摂餌量は多く, 雌雄群別の摂餌量では雌雄差が明らかとなった. 餌の摂取の差が雌雄の体重の原因と思われるが, これは餌箱の不備など人為的なものではないことは確認している.

血液学検査：7, 8, 9, 10週令時の4回, 経時的に採血して行った血液学検査の結果を表7に示す. 雌雄とも成長に従って白血球数 (WBC) がいくらか減少する傾向がみられるが, 変化はわずかであり, さらに週令を追って検討を続けたい. すべての検査結果に異常値はなく, また個体間のばらつきも少なかった.

血清生化学検査：7, 8および9週令時に行った検査の結果を表8に示す. GOT および GPT 値は週令が進むにつれてわずかに増加する傾向がみられ, また, 雌の測定値は常に雄よりも高かった. ALP 値については, 一般飼育ウサギのそれよりも異常に高い値を示したが, この原因については, 未だ判明していないので, 以後さらに検討を続けてゆきたい. その他の検査結果については, 測定値, 雌雄差, 個体間差いずれも顕著なものはなかった.

実験用ウサギは長い間, 家畜ウサギは長い間, 家畜ウサギが転用され, 遺伝的制御, 微生物学的制御がほとんど行われていない状態であったが, 近年になっていくつかの系統が確立されるようになり, 世界で数十系統の群が維持されているいると思われる[2,3].

KBL：JW系は1972年, 平沢らによって SPF 化が成功し[1], 現在試験研究機関への供給が行われている.

本報告は, 当部で飼育管理をはじめてごく初期の結果であるが, さらに経時的な観察を続け, SPF ウサギの基礎生理学検査のバックデーターとしたい.

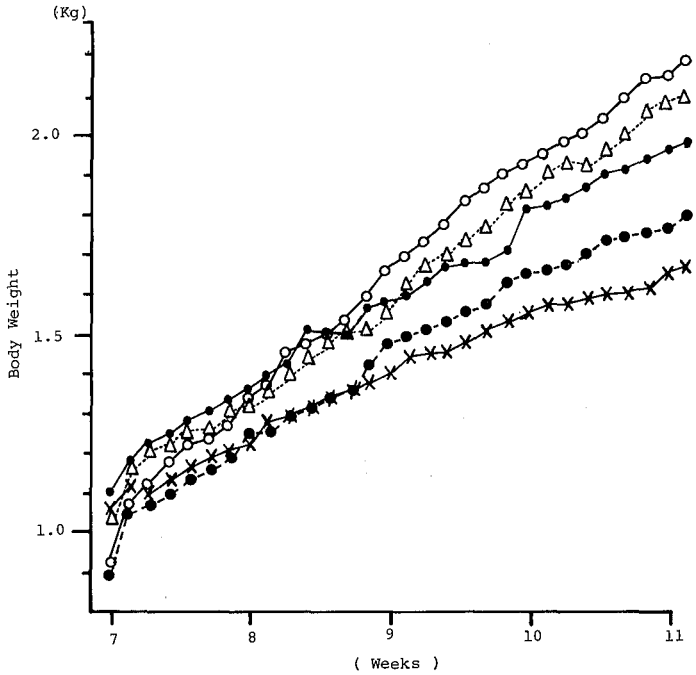


図1　雄の個体別体重
●——●：No.1, ×——×：No.2, △——△：No.3,
○——○：No.4, ●－－●：No.5の動物を表わす.

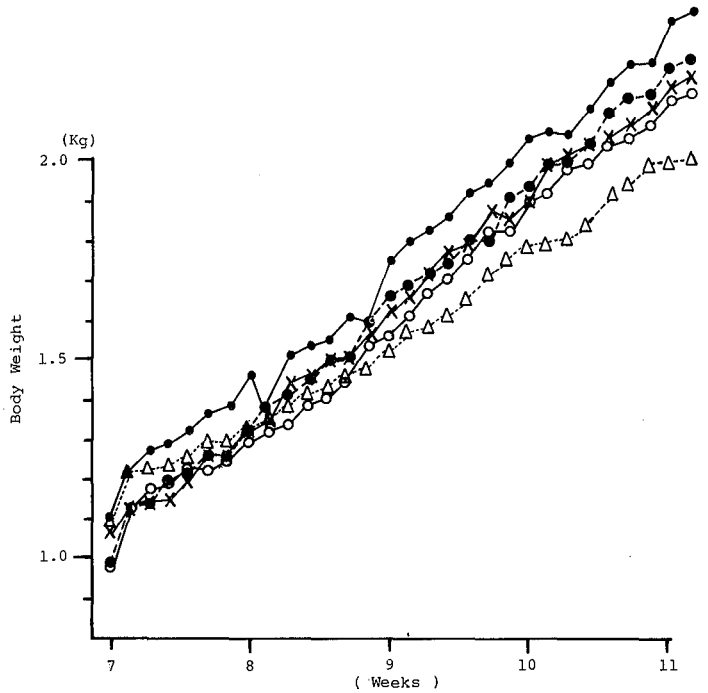


図2　雌の個体別体重
●——●：No.1, ×——×：No.2, △——△：No.3,
○——○：No.4, ●－－●：No.5の動物を表わす.

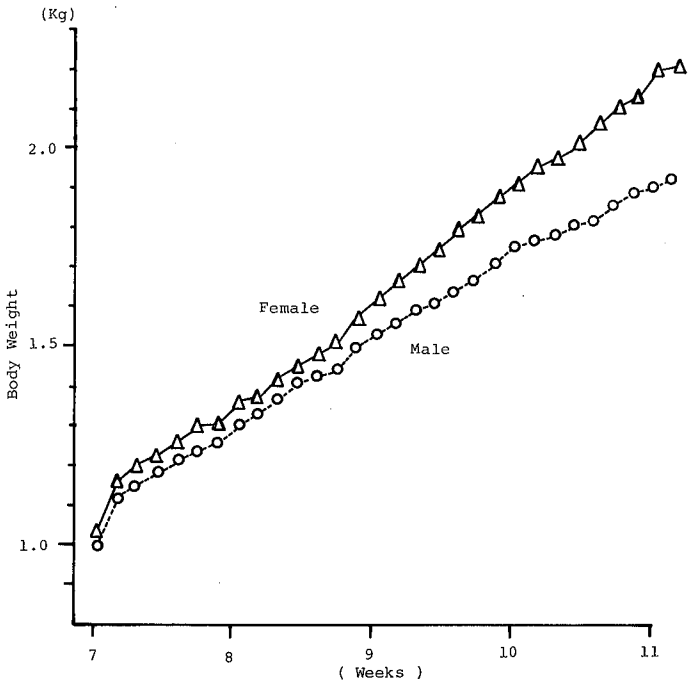


図3　雌雄各5匹平均体重

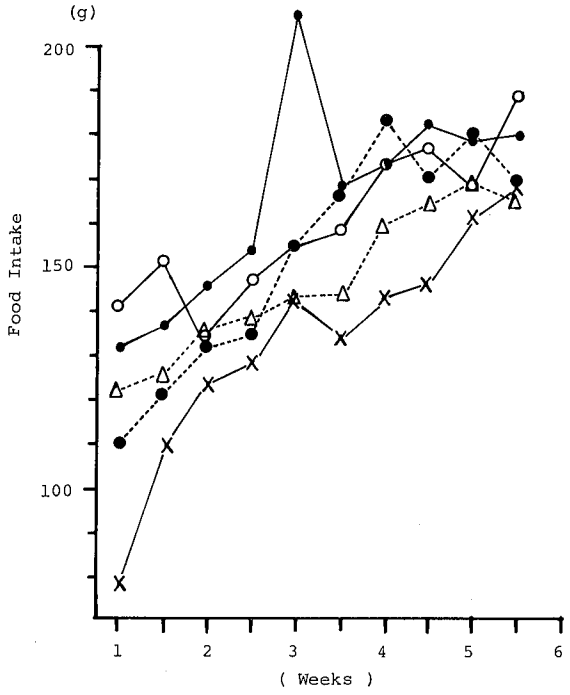


図4　雄の個体別摂餌量
●——●：No.1, ×——×：No.2, △——△：No.3,
○——○：No.4, ●－－◕：No.5の動物を表わす.

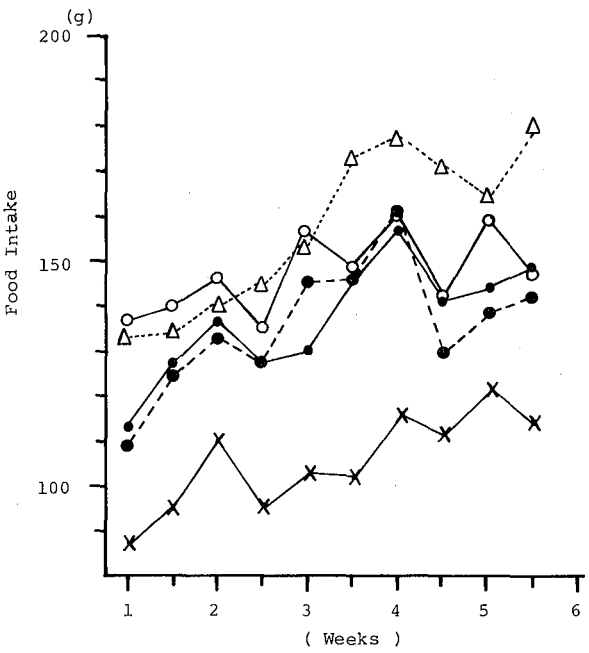


図5　雌の個体別摂餌量
●——●：No.1, ×——×：No.2, △——△：No.3,
○——○：No.4, ●－－●：No.5の動物を表わす.

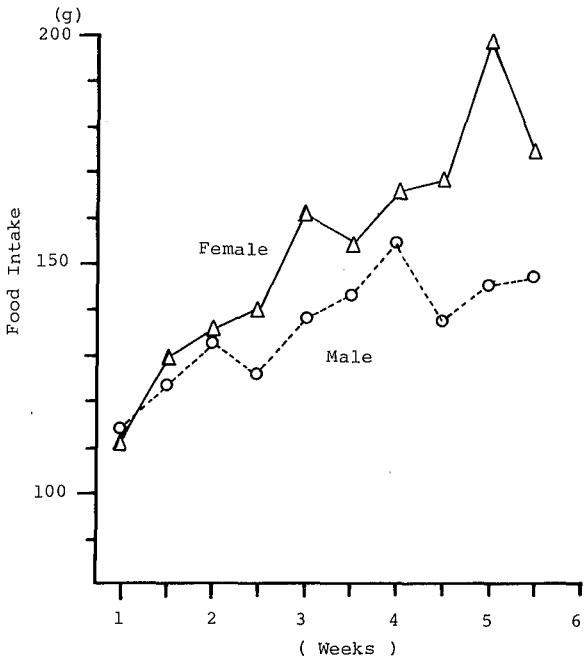


図6　雌雄各5匹平均摂餌量

表7. 血液学検査成積表

Weeks	WBC ($\times 10^3$/mm)	RBC ($\times 10^6$/mm)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (μ^3)	MCH ($\mu\mu$g)	MCHC (%)
7[1)]	6.56±0.69[2)]	5.69±0.16	14.58±0.48	37.34±1.08	57.2±0.37	18.58±0.25	29.90±0.25
8	6.90±1.04	6.34±0.33	14.06±0.94	41.18±2.17	58.0±0.32	18.96±0.25	29.16±0.37
9	6.32±0.27	6.11±0.06	13.08±0.26	37.46±0.43	57.4±0.40	19.02±0.25	30.62±0.30
10	5.60±0.32	5.94±0.29	12.62±0.54	37.02±1.65	57.4±0.40	18.90±0.21	30.39±0.15
7	7.52±0.54	6.19±0.07	12.52±0.10	37.94±0.31	56.4±0.68	18.02±0.68	29.34±0.21
8	7.20±0.29	6.50±0.10	13.46±0.20	41.18±0.58	56.4±0.68	18.52±0.22	29.18±0.21
9	6.72±0.20	6.28±0.27	13.02±0.41	38.18±1.46	56.0±0.55	18.26±0.22	30.04±0.15
10	6.38±0.31	6.16±0.07	12.84±0.43	37.48±1.12	56.4±0.51	18.48±0.22	30.44±0.10

1）：生後週令
2）：5匹平均±SE

表8. 血 清 生 化 学 検 査 成 積 表

Weeks		GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	ALP (IU/l)	CHO (mg/dl)	UN (mg/dl)	TP (g/dl)	ALB (g/dl)	A/G	GLU (mg/dl)
7[1)]	M	16.4±2.27[2)]	17.6±1.69	506.4±53.97	43.0±2.45	18.74±1.67	5.16±0.38	2.38±0.16	0.85±0.02	141.6±7.75
	F	18.2±1.43	22.4±2.14	562.0±53.68	50.8±6.13	18.43±1.28	5.40±0.20	2.48±0.13	0.84±0.05	130.8±5.19
8	M	13.6±1.63	19.2±1.93	499.4±42.31	31.8±1.99	16.90±0.83	4.76±0.14	2.20±0.08	0.85±0.02	117.4±3.08
	F	19.3±2.46	23.5±2.33	538.8±46.75	47.3±7.74	21.15±1.92	5.20±0.20	2.40±0.11	0.85±0.02	125.5±3.10
9	M	17.0±0.95	21.6±1.89	519.4±49.14	27.4±1.72	19.64±0.81	5.18±0.19	2.40±0.08	0.86±0.03	129.0±0.50
	F	22.4±3.42	26.6±0.88	503.3±46.16	38.8±4.91	21.92±0.74	4.88±0.08	2.28±0.05	0.87±0.02	121.8±4.87

1）：生後週令

2）：5匹平均±SE

参 考 文 献

1）北沢和男，竹入修二：実験動物技術　第16巻2号　P103～109，1981

2）田島嘉雄：実験動物総論　第3版　P14, 19, 62, 67, 125, 129, 130, 153, 160, 167, 177, 210, 211, 238, 昭和48年　朝倉書店，東京

3）田島嘉雄：実験動物各論　第3版　P71～91，昭和48年　朝倉書店，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 442-446, 1986

Diethylene Glycolの変異原性試験

吉田誠二*, 藤田博*, 佐々木美枝子*

Mutagenicity Tests of Diethylene Glycol

SEIJI YOSHIDA*, HIROSHI FUJITA*and MIEKO SASAKI*

Keywords：Diethylene Glycol,染色体分析 Chromosome Analysis,変異原性試験 Mutagenicity Tests

緒　言

近年，Diethylene glycolが国産・外国産の両ワインに相当量の添加がなされていると言う事実が本研究所において報告されて以来，その安全性が問題となった．

この，Diethylene glycolは無色・無臭の粘調な液体であり甘味を有する．我が国においては，セロファン柔軟剤およびブレーキ油の不凍液として工業界では頻繁に用いられているものである[1]．

一方，Diethylene glycol等の工業界で用いられているものについての毒性に関する資料は少なく，今回のDiethylene glycolについても，マウス・ラットの急性毒性試験より得られるLD50値の報告[2]等があるぐらいである．

しかし，その中でDiethylene glycolの人に対する毒性で，事故例ではあるが，Diethylene glycolの大量摂取による死亡例の報告[3]もある．また，当然の事ながら大量摂取ではないにしても本物質の少量を長期間摂取し，その影響をうけた場合の危険性に関する毒性資料は全くなく，Dietylene glycolが無害であるという充分な確信はほとんど持てない．

これらの事を考え，我々は問題となったDiethylene glycolの毒性の検討を急務と考え毒性試験の一環である変異原性試験をサルモネラを用いた変異原性試験と哺乳動物の染色体異常誘発性試験の二種の試験系で行い，Diethylene glycolの変異原性の有無を検討したので報告する．

材料及び方法

1．試験物質：Diethylene glycol（以下DGと略す）は関東化学社製の純度95％以上のもので，LotNo.004R 1162を用いた．

2．急性試験：動物は当部動物舎において繁殖させたチャイニーズハムスターの雄（16週令）を用いた

DGを蒸留水にて溶解し種々濃度のDG溶液を作製した．投与用量は全て10ml／kgとし，経口投与及び腹腔内注射をそれぞれ一回行った．各実験群のいずれも4匹の動物を用いた．

3．連続投与試験：動物は前述の実験2．と同じLotのものを用いた．

DGを水道水にて溶解し種々濃度のDG溶液を作製して吸水瓶に分注し，日本クレア製の固型飼料CE－2とともに自由摂取させた．

4．サルモネラを用いた*mutation test*

菌株は，*Salmonella typhimurium* TA 97a,TA 98,TA 100,及びTA102[4]を用いた・

これらの菌株は，B.N.Ames教授（カルフォルニア大）より分与を受けたものである．

*mutation test*は，Ames法[4]の変法である，プレインキュベーション法[5,6]により行った．

代謝活性化には，Arochrol 1254（三菱モンサント）により薬物代謝酵素を誘導したSD系の雄ラット（日本クレア）の肝ホモジネートから得たS9[4]を用いた．

S9 mixのS9量は10％(50μl／plate）とした．

DGの各用量につき，3枚のplateを用いた．この際の陽性対照として既知変異原物質である，9－Aminoacridine(東京化成)，2－Aminoanthracene（和光純薬），Mytomycin C（協和発酵），4－Nitroquinoline－1－oxide（岩井化学）を用いた．一方，陰性対照は溶媒である蒸留水のみである．

結果は，3枚のPlateの平均値で示し，その統計処理として，Kruskall－Wallis検定[7]およびMooreら[8]のプ

*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 Japn

ログラムによる回帰分析を行った.

5．染色体試験：1回投与試験

動物は前述の実験2．と同じLotのものを用いた.

DGを蒸留水にて溶解し，種々濃度のDG溶液を作製した．投与用量は全て10 ml／kgとし，経口投与及び腹腔内注射をそれぞれ一回行った．なお，陰性対照は溶媒である蒸留水のみを同用量投与したものとした．投与後，6,24,48時間目に動物を屠殺し，常法により染色体標本を作製した．染色体分析は実験群・陰性対照群とも1群2匹の動物について行い，1匹について50個のよく拡がった中期細胞を調べた.

6．染色体試験：飲水による連続投与試験

DGを水道水にて溶解し，種々濃度のDG溶液を作製して吸水瓶に分注し，日本クレア製固型飼料CE－2とともに自由摂取させた．なお，陰性対照は水道水のみを上記飼料とともに自由摂取させたものとした．投与後，1,2,3週間目に動物を屠殺し，染色体標本を作製した。染色体分析及び分析に用いた動物数は上記5．と同様である.

7．染色体試験：添加飼料による連続投与試験

DGを日本クレア製粉末飼料に混ぜ，種々濃度のDG添加飼料を作製した．これを水道水とともに自由摂取させた．なお，陰性対照は日本クレア製の固型飼料CE－2のみを水道水とともに自由摂取させたものとした．摂取後，4,8,12週間目に動物を屠殺し染色体標本を作製した。染色体分析及び染色体分析に用した動物数は上記5．と同様である.

Table 1．Acute Toxicity of DG in Chinese hamsters

Dose (mg／kg)	Route P.O	i.p
7500	1／4 *	N.D **
5000	0／4	0／4
2500	0／4	0／4
1250	0／4	0／4
612.5	0／4	0／4
306.3	N.D	0／4

* dead／treated

** Not Done

Table 2．Subacute Toxicity of DG in Chinese hamsters

Dose (%)	Exp. 1	Exp. 2
5	4／4	4／5
4	N.D	3／5
3	N.D	3／5
2	0／4	N.D
1	0／4	N.D

Table 3．Mutagenicity Test of DG in *Salmonella*

Chemical	Dose mg	TA 97 a		TA98		TA100		TA102	
		−[1]	+[2]	−	+	−	+	−	+
DG	100	147[3]	211	16	24	140	175	317	468
	10	154	250	15	22	159	193	356	470
	1	165	249	18	24	153	163	358	494
	0.1	178	261	21	24	163	167	384	509
	0.01	167	267	14	22	172	187	403	464
Control	0	182	251	18	25	175	185	387	505
9－Aminoacridine	20 μg	274							
2－Aminoanthracene	5 μg		1,399		2,697		3,132		834
Mytomycin C	0.5 μg							5,597	
4—Nitroquinoline－1－oxide	0.5 μg			452		2,697			

1)：Without S 9　　2)：With S 9　　3)：No.of revertants

Table 4. Frequency of Chromosome Aberrations Induced by Diethylene Glycol- 6h-Treatment.

Dose (mg/kg)	Route	NCA	TA	Type of Aberrations C1g	C2g	C1b	C2b	Ot
7500	p.o	100	4	2	0	2	0	0
7500	ip	N.D						
5000	p.o	100	2	1	0	1	0	0
5000	i.p	100	7	5	0	2	0	0
2500	p.o	100	2	2	0	0	0	0
2500	i.p	100	4	1	0	3	0	0
1250	p.o	100	1	1	0	0	0	0
1250	i.p	100	3	3	0	0	0	0
625	p.o	100	2	1	0	1	0	0
625	i.p	100	2	2	0	0	0	0
312.5	p.o	N.D	N.D					
312.5	i.p	100	2	1	0	1	0	0
0	p.o	100	2	2	0	0	0	0
0	i.p	100	2	1	0	1	0	0

NCA : No. of cells Analysed, TA: Total Aberrations
Ot : Other Aberrations

Table 5. Frequency of Chromosome Aberrations Induced by Diethylene Glycol- 24 h-Treatment

Dose (mg/kg)	Route	NCA	TA	Type of Aberrations C1g	C2g	C1b	C2b	Ot
7500	p.o	100	3	1	0	2	0	0
7500	i.p	N.D						
5000	p.o	100	1	0	0	1	0	0
5000	i.p	100	5	4	0	1	0	0
2500	p.o	100	1	0	0	1	0	0
2500	i.p	100	7	6	0	1	0	0
1250	p.o	100	1	1	0	0	0	0
1250	i.p	100	6	5	0	1	0	0
625	p.o	100	2	2	0	0	0	0
625	i.p	100	1	1	0	0	0	0
312.5	p.o	N.D						
312.5	p.o	100	1	1	0	0	0	0
0	i.p	100	1	0	0	1	0	0
0	i.p	100	2	1	0	1	0	0

結果及び考察

DGの経口投与及び腹腔内1回投与における死亡率をTable 1に示す.

経口投与群における最高濃度7500 mg／kg で一匹が投与後20時間目に死亡したが，他の群での死亡は一例も見られなかった.

次に，飲水による連続投与試験の結果をTable 2に示す.

1回目の実験では，5％，2.5％，1.25％の3種の実験群を設けた.

DG摂取後48時間目に5％群で4匹中3匹が死亡した. また，残りの一匹についても，120時間目に死亡した. しかし，2.5％と1.25％の両群での死亡は一例も見られなかった.

この結果をもとに，2回目の実験では，5％，4％，3％の実験群を設け，一群の動物数を5匹に増やして行った. DG摂取後48時間目に5％群で4匹，4％群で一匹が死亡した. 次いで，72時間目に4％群が一匹，さらに，120時間目に一匹が死亡した. また，144時間目に5％群の一匹も死亡した. しかし，3％群での死亡は一例も見られなかった.

次に，サルモネラを用いた *mutation test* の結果をTable 3に示す.

TA 97 a，TA 100，TA 102の代謝活性化しない場合及びTA 97 a の代謝活性化した場合に高濃度で復帰コロニー数が減少した. これは，DGによる致死作用と考えられる. よって，これ以上の高濃度での実験は行なわなかった.

これらの事を考えると，本実験条件下では，復帰コロニー数に増加が見られないことから，DGのサルモネラに対する変異原性は陰性であると考えられた.

次に，DG 6時間処理の染色体分析の結果をTable 4に示す.

経口投与群の全てにおける染色体異常細胞の頻度は陰性対照に比し，増加を認めなかった.

一方，腹腔内投与群の最高濃度5000 mg／kg において，gap を主とする異常細胞が，100細胞に7例見られた. しかし，以下の2500～312.5 mg／kg においては陰性対照群の自然誘発異常の頻度と同様であった.

次に，DG 24時間処理の結果をTable 5に示す.

経口投与群の全てにおいて異常は見られなかった. 一方，腹腔内投与群で，5000～1250 mg／kg 間で，それぞれ，5％，7％，6％の異常細胞が見られた.

次に，48時間処理の結果をTable 6に示す.

Table 6. Frequency of Chromosome Aberrations Induced by Diethylene Glycol- 48 h-Treatment

Dose (mg/kg)	Route	NCA	TA	Type of Aberrations C1g	C2g	C1b	C2b	Ot
7500	p.o	100	4	1	0	3	0	0
7500	i.p	N.D	1	1	0	0	0	0
5000	p.o	100	1	1	0	0	0	0
5000	i.p	100	7	6	0	3	0	0
2500	p.o	100	2	1	0	1	0	0
2500	i.p	100	2	2	0	0	0	0
1250	p.o	100	2	1	0	1	0	0
1250	i.p	100	3	1	0	2	0	0
625	p.o	100	2	0	0	2	0	0
625	i.p	100	2	2	0	0	0	0
312.5	p.o	N.D						
312.5	i.p	100	2	1	0	1	0	0
0	p.o	100	2	2	0	0	0	0
0	i.p	100	2	1	0	1	0	0

Table 7. Fiequency of Chromosome Aberrations Induced by Diethylene Glycol- Drink

Dose (%)	Duration (Weeks)	NCA	TA	Type of Aberrations C1g	C2g	C1b	C2b	Ot
2.0	1	150	6	5	0	2	0	0
2.0	2	100	5	3	0	2	0	0
2.0	3	100	2	1	0	1	0	0
1.0	1	100	2	1	0	1	0	0
1.0	2	100	4	2	0	2	0	0
1.0	3	100	1	1	0	0	0	0
0.5	1	100	2	1	0	1	0	0
0.5	2	100	4	2	0	2	0	0
0.5	3	100	1	1	0	0	0	0
0	1	100	2	1	0	1	0	0
0	2	100	1	1	0	0	0	0
	3	100	2	1	0	1	0	0

経口投与群の全群において，異常細胞の増加を認めなかったが，腹腔内投与群では，6，24時間処理と同様に，5000 mg／kg で異常細胞の増加が見られた．

Table 8. Frequency of Chromosome Aberrations Induced by Diethylene Glycol- Diet

Dose (%)	Duration (Weeks)	NCA	TA	Type of Aberrations C1g	C2g	C1b	C2b	Ot
5	4	100	2	2	0	0	0	0
5	8	100	2	2	0	0	0	0
5	12	100	1	1	0	0	0	0
2.5	4	100	1	0	0	1	0	0
2.5	8	100	2	1	0	1	0	0
2.5	12	100	1	0	0	1	0	0
1.25	4	100	1	1	0	0	0	0
1.25	8	100	1	1	0	0	0	0
1.25	12	100	1	1	0	0	0	0
0	4	100	2	1	0	1	0	0
0	8	100	1	1	0	0	0	0
0	12	100	1	1	0	0	0	0

次に，飲水による連続投与の結果を Table 7 に示す．

2％～0.5％の間に3群を設け，それぞれ，1～3週間の処理を行ったが，いずれの群においても染色体異常細胞の増加は見られなかった．

次に，DG 添加飼料による長期摂取試験の結果を Table 8 に示す．

添加飼料5％～1.25％で4週から12週間の処理を行った．結果は，いずれの群においても染色体異常細胞の増加は認められなかった．

毒性試験を行うには被検物質の大量を一回あるいは少量を，ある期間連続して動物に投与した場合に，どの様な生物反応を誘起するかどうかと言う一般毒性試験と変異原性及び催奇形性の検索等を目的とする特殊毒性試験の二通りがあるが，我々は変異原性試験を中心に行い，DG の変異原性を検討した．

まず，*in vivo* 染色体試験の用量設定を検討するために行った，DG 一回投与の結果で，経口投与において最高濃度7500 mg／kg で一匹が死亡した以外は全て生存した．しかし，DG を飲料水に混じて連続投与した試験の結果では顕著な毒性が認められた．すなわち，DG 5％で80～100％，4％・3％の両者で60％の死亡が見られており，DG の低濃度連続投与における危険性を示唆する結果であった．

これらの結果をふまえ，経口及び腹腔内一回投与及び飲水・添加飼料による連続投与を行い，腹腔内投与の6

,24,48時間の高濃度処理において染色体異常細胞においては，5000～1250 mg／kg 間で増加していた．

一般的には陽性の指標を10％以上の異常頻度としているが，我々は，これまで，チャイニーズハムスターを用いて多くの物質の試験を行って来たが，いずれにおいても溶媒単独処理の陰性対照を設けており，その自然誘発異常頻度のバックグランド値は，０～２％と低く安定しており，今回の DG が誘発した７％の頻度は染色体異常誘発性有りと考えられる．しかし，他の投与ルート，つまり経口一回，飲水及び添加飼料による連続投与のいずれにおいても異常細胞の増加を認めていない事を考えると DG は生体内濃度の最も高い条件においてのみ陽性であるので，その染色体異常誘発性は弱いものと考えられる．

一方，４種のサルモネラ菌を用いて行った *mutation test* の結果で，DG 高濃度処理において致死作用と思われる復帰コロニー数の減少を認めたが，いずれにおいても変異原性を示す指標である復帰コロニー数の有意な増加はなく，DG の変異原性は無いものと思える．

今回，我々の行った試験項目は，サルモネラを用いた *mutation test* と *in vivo* 染色体試験の組み合わせであり，化学物質の変異原性を決定するためには有効なセットであるが，DG の安全性の評価にあたっては，なるべく多くの，しかも，指標の異なった試験系を追加させ，信頼性のあるデータを蓄積させての総合判断が必要であると思われる．

文　献

1）既存化学物質データー要覧，海外技術資料研究所
2）Smyth, F. H., J. Seaton and L.Fischer : *J. of Indust. Hyg. and Toxicology*, 23,259,1941
3）産業中毒便覧・増補版，医歯薬出版株式会社
4）Maron, D. M and B. N. Ames : *Mut. Res.*, 113, 173, 1983
5）矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，20,1178,1975
6）藤田　博，小嶋昭江，佐々木美枝子，平賀興吾：東京衛研年報，36,413,1985
7）石居　進：生物統計入門，133,1975,培風館
8）Moore, D. and J. S. Felton : *Mut. Res.*, 119,95,1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 447-452, 1986

Salmonella typhimurium TA97a, TA102 を用いた食品添加物の変異原性試験（第1報）

藤田　博*, 佐々木　美枝子*

Mutagenicity Test of Food Additives with *Salmonella typhimurium* TA97a and TA102 (I)

HIROSHI FUJITA* and MIEKO SASAKI*

Mutagenicity of seventeen food additives, including 4 preservatives, 4 sweeteners and 9 dietary supplements were examined in Ames's new tester strains, *Salmonella typhimurium* TA 97a and TA 102. These chemicals had been reported to be negative in the test using old tester strains, TA 98 and TA 100. The mutation test was carried out by the preincubation procedur described by Ames et al. The test chemicals were preincubated with S9mix or phosphate buffer (pH 7.4) for 20 min. Weak mutagenic activities were detected with pyridoxine hydrochloride in TA 97a with and without S9, nicotinamide in TA 102 without S9 and ribofrabin in TA 102 wih S9. The other 14 chemicals were not mutagenic in the new tester strains.

Keywords：mutagenicity, food additives, preservatives, sweetners, dietary supplements, *Salmonella typhimurium* TA 97a, *Salmonella typhimurium* TA 102

食品添加物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TA 98およびTA 100[1]が主に用いられ，いくつかの食品添加物で陽性の報告がある[4,5]．1983年にAmesらは，フレームシフト型の変異原によく反応するTA 97[6]および過酸化物にも反応するTA 102[7,8]を発表し，TA 98およびTA 100を加えた4株を試験に用いることを提案している[3]．

新しい株は，これまでのTA 98およびTA 100では変異原性陰性であった化合物の変異原性が検出できる[6-9]ことから，TA 98およびTA 100などを用いた試験において陰性であった食品添加物について，TA 97aおよびTA 102を用いた再検索を計画した．本報告では，保存剤（4種），甘味料（4種）および強化剤（9種），計17種の食品添加物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　以下の試料のうち製造所の記載のない化合物は，和光純薬製である．保存剤：安息香酸（Lot No. SPROS 18），ソルビン酸カリウム（Lot No. EPL6795），デヒドロ酢酸カリウム（Lot No. EPM2420），プロピオン酸ナトリウム（Lot No. EPP6136）．甘味料：D-キシロース（Lot No. STL4245），グリチルリチン酸アンモニウム（Lot No. STP7370），サッカリンナトリウム（育和化学工業，Lot No. 23021），D-ソルビトール（Lot No. EPH 5784），強化剤：塩酸チアミン（Lot No. STM6600），塩酸ピリドキシン（Lot. No. STK0472），ニコチン酸（Lot No. EPM6645），ニコチン酸アミド（Lot No. EPM6614），パントテン酸ナトリウム（Lot No. STM6648），ビタミンAアセテート（油性）（Lot No. STM6556），ピロリン酸第二鉄（Lot No. STP1513），葉酸（Lot No. STH0813），リボフラビン（Lot No. CDE7573）．

陽性対照物質：2-アミノアントラセン（2-AAと略す），9-アミノアクリジン（9-AAと略す），マイトマイシンC（MMCと略す，協和発酵）．試料は，その溶解性によって蒸留水（以下DWと略す）またはジメチルスルホキシド（DMSOと略す，吸収スペクトル用）に溶解した．どちらを用いたかは，表中に記載した．

菌株　*Salmonella typhimurium* TA 97a[6]およびTA 102[7,8]を普通ブイヨン（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（カルフォルニア大）より分与を受けた．

変異原性試験　Ames法の変法であるプレインキュ

*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, Sinjuku-ku, Tokyo. 160 Japan

Table 1. Results of Mutation Test with Preservatives

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of revertants			
			TA97a		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Benzoic acid	DMSO	10	2	1	19	1
		5	8	120	134	246
		1	120	168	246	354
		0.5	124	200	270	409
		0.1	147	191	285	421
		0	143	214	266	426
		Positive control[a)]	223	2,219	3,770	1,305
Potassium sorbate	DW	10	4	7	76	229
		5	5	119	238	380
		1	134	202	326	430
		0.5	154	224	316	432
		0.1	148	212	335	449
		0	164	227	348	453
		Positive control	260	1,581	6.293	740
Sodium dehydroacetate	DW	10	0	0	6	90
		5	0	98	26	329
		1	135	210	160	401
		0.5	146	205	191	438
		0.1	141	222	312	442
		0	169	240	359	453
		Positive control	264	1,559	4,988	921
Sodium propionate	DW	10	144	173	151	235
		5	126	197	219	334
		1	136	195	277	400
		0.5	140	201	304	442
		0.1	137	210	325	443
		0	154	220	329	473
		Positive control	294	1,160	4,200	834

a) TA 97a：−S9＝9-AA 20 μg, +S9＝2-AA 5 μg, TA 102：−S9＝MMC 0.5 μg, +S9＝2-AA 5 μg

ベーション法[3,10]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．S9 mix[3,10]中のS9量は，10%（50 μl／プレート）とした．

試料溶液0.1m*l*を小試験管に入れ，S9mix 0.5m*l*，代謝活性化しない場合にはリン酸緩衝液（pH 7.4）0.5m*l*および菌液0.1m*l*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 m*l*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．

一濃度にプレート3枚を用い，結果は，平均値で示した．統計解析は，Kruskal-Wallis検定[11]を行い，有意の場合はDunnett型の順位和検定[12]により対照との比較を行った．さらに，Mooreら[13]のプログラムにより回帰分析を行った．

結果および考察

17種の食品添加物のTA 97aおよびTA 102を用いた変異原性試験の結果は，保存剤（4種），甘味料（4種）および強化剤（9種）の用途別にTable 1，2および3に示した．4種の保存剤（Table 1）は，いずれも5 mg／プレート以上の濃度で致死性による復帰コロニー数の

Table 2. Results of Mutation Test with Sweetners

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of revertants			
			TA97a		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Glycyrrhizic acid monoammonium salt	DW	1	130	180	282	393
		0.5	118	186	282	403
		0.1	131	196	281	414
		0.05	119	182	265	424
		0.01	123	192	289	422
		0	127	206	293	416
		Positive control[a)]	197	1,117	3,480	514
Sacchrin sodium	DW	50	109	120	248	317
		10	184	237	285	418
		5	198	260	310	443
		1	195	257	347	430
		0.5	208	245	330	438
		0	196	247	342	444
		Positive control	334	1,885	4,582	913
D-Sorbitol	DW	50	150	216	346	422
		10	140	198	314	463
		5	126	202	321	437
		1	155	201	311	445
		0.5	145	193	317	418
		0	144	206	314	455
		Positive control	386	1,269	2.987	786
D-Xylose	DW	50	150	194	275	440
		10	139	183	285	441
		5	156	196	282	389
		1	137	186	272	397
		0.5	139	194	268	381
		0	137	210	289	399
		Positive control	288	1,421	3,132	592

a) TA 97a：−S9= 9-AA 20 μg, +S9= 2-AA 5 μg, TA 102：−S9=MMC 0.5 μg, +S9=2-AA 5 μg

減少が見られた．これ以下の濃度では対照に比べ変化は見られなかった．次に，4種の甘味料（Table 2）では，サッカリンナトリウムが50mg／プレートで致死性による復帰コロニー数の減少が見られた場合を除き，これ以下の濃度および他の3化合物では復帰コロニー数は，対照に比べ最高濃度までほとんど変化がなかった．さらに，9種の強化剤（Table 3）では，塩酸ピリドキシンのTA97a，−S9および+S9において，ニコチン酸アミドのTA 102，−S9において，およびリボフラビンのTA 102，+S9において復帰コロニー数が有意に増加し，いずれも，その増加は，用量相関をもっていた．他の6化合物では，対照と比べほとんど変化がなかった．

化合物の変異原性を判断する方法としては，Amesらにより提案された，復帰コロニー数が化合物nmoleあたり0.01を越えた場合[14]，あるいは自然復帰コロニー数（対照）の2倍以上に増加した場合[15]陽性とする一種の経験的判断が用いられてきた．一方では，復帰コロニー数の用量相関を統計学的理論を元に様々な回帰式によって推定する試みもなされている[13,16−18]．そこで結果の判断の統計解析の一つの試みとして，今回の試験結果に対しては，MooreらのTA系株を用いた変異原性試験データの回帰分析プログラム[13]を利用すると共に，

Table 3. Results of Mutation Test with Dietary Supplements

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of revertants			
			TA97a		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Folic acid	DMSO	1	110	160	198	344
		0.5	116	159	202	328
		0.1	98	173	201	321
		0.05	111	173	211	332
		0.01	113	187	206	346
		0	118	172	212	374
		Positive control[a)]	296	1,399	3,292	560
Iron (Ⅲ) pyrophosphate	DW	10	144	218	325	465
		5	172	237	334	472
		1	155	211	343	441
		0.5	147	212	351	418
		0.1	160	204	326	433
		0	141	227	318	468
		Positive control	206	1,175	4,075	773
Nicotinamide	DW	10	138	176	412	474
		5	163	207	423**	511
		1	155	215	420	475
		0.5	160	219	386	453
		0.1	173	199	367	448
		0	155	209	318[b)]	440
		Positive control	323	1,276	4,930	734
Nicotinic acid	DMSO	10	113	124	279	393
		5	124	171	299	444
		1	143	198	296	397
		0.5	148	177	289	396
		0.1	142	194	293	419
		0	125	194	259	532
		Positive control	295	2,218	3,828	
Pyridoxine hydrochloride	DW	10	202	298**	321	508
		5	191	258*	331	500
		1	151	224	280	493
		0.5	158	232	290	492
		0.1	144	235	293	459
		0	140[b)]	213[b)]	276	447
		Positive control	219	1,552	3,132	870
Riboflavin	DW	5	147	173	242	497
		1	151	175	274	542*
		0.5	137	176	263	525*
		0.1	143	194	265	470
		0.05	140	219	264	416
		0	143	191	263	389[b)]
		Positive control	181	1,929	4,843	1,039

Continued on

Table 3. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of revertants			
			TA97a		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Sodium pantothenate	DW	10	105	185	262	403
		5	113	193	267	358
		1	116	185	298	368
		0.5	111	174	269	402
		0.1	111	194	276	444
		0	140	170	251	421
		Positive control[a)]	182	1,700	3,400	770
Thiamine hydrochloride	DW	10	102	174	195	310
		5	97	147	178	361
		1	86	152	208	312
		0.5	96	161	183	327
		0.1	95	163	185	322
		0	96	156	200	338
		Positive control	266	1,010	2,400	652
Vitamin A acetate, in oil	DMSO	10	143	182	263	468
		5	145	165	320	539
		1	123	174	321	510
		0.5	140	159	306	478
		0.1	131	178	315	495
		0	135	204	309	447
		Positive control	267	1,573	3,045	725

a) TA 97a：−S9= 9-AA 20 μg, +S9= 2-AA 5 μg, TA 102：−S9=MMC 0.5 μg, +S9=2-AA 5 μg

b) Statisically signnificant defference by Kruskal−Wallis test ($P<0.05$) and dose-related incleasing by regreesion analysis ($P<0.01$)

*, **：Significantly defferent from control (Dunnett's test with runk sum, *;$P<0.05$, **;$P<0.01$)

データの分布型を問わないノンパラメトリック法の中から Kruskal-Wallis 検定[11]と多重比較をするための Dunnett 型の順位和検定[12]を採用した．その結果，塩酸ピリドキシン，ニコチン酸アミドおよびリボフラビンで用量相関をもった増加が確認された．さらに，いずれの化合物においても増加に再現性が見られることから，これらの化合物の TA 97a あるいは TA 102に対する変異原性は，陽性であると判断した．ただし，多くの変異原との比較および増加に要する濃度が高いことから，これらの化合物の変異原性は，非常に弱いものであると考えられる．

変異原性試験には，いくつかの方法があるが，TA 系株を用いた試験と染色体異常試験がよく対比される．デヒドロ酢酸ナトリウム，サッカリンナトリウム，ニコチン酸アミドおよびリボフラビンについては，これまでの TA 系株での試験では陰性[4,5]に対し，CHL 細胞を用いた染色体異常試験では陽性[4,5]であり，両試験による結果が一致していない．本試験において，ニコチン酸アミドおよびリボフラビンは，TA 102に対する変異原性が見られ，両試験法による結果が一致した．しかし，デヒドロ酢酸ナトリウムおよびサッカリンナトリウムについては，新しい TA 株を用いてもなお陽性の結果は見られなかった．一方，塩酸ピリドキシンは，TA 系株による試験および染色体異常試験共に陰性である[4,5]が，本試験において，TA 97a に対する変異原性が見られ，染色体異常試験との不一致が生じた．試験方法の改良も行いつつ試験をくり返すことによって両試験の結果は一致するものなのか，しないとしたらその原因まで含めた検討が必要であると考えられる．

塩酸ピリドキシン，ニコチン酸アミドおよびリボフラ

ビンに見られたTA 97aあるいはTA 102に対する変異原性は，非常に弱いものであった．新しい株の高い感受性によって検出されたものと思われる．より高い反応の出現する試験条件を検討すると共に，弱い変異原性を判断する方法を確立して行きたい．また，その様な弱い変異原性の意味するところを明らかにして行くためにも，より多くの化合物について，より多くの試験方法での検索を続けて行くことが良いと思われる．

要　旨

17種の食品添加物についてAmesの新しい試験株TA 97a，TA 102を用いて変異原性試験を行った．その結果，塩酸ピリドキシン，ニコチン酸アミドおよびリボフラビンで復帰コロニーが増加した．再現性はあるが，増加量がわずかであり，高濃度を必要とするところから非常に弱い変異原性であると考えられる．

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）石館　基，祖父尼俊雄，吉川邦衛：変異原と毒性，4(5), 10,1981
5）石館　基：染色体異常試験データ集，1983，リアライズ社
6）Levin, D. E., Yamasaki, E. and Ames, B. N.：*Mutation Res.*, 94,315,1982
7）Levin, D. E., Hollstein, M. and Ames, B. N.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79,7445,1982
8）Levin, D. E., Marnett, L. J. and Ames, B. N.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81,4457,1984
9）藤田　博，小嶋照江，佐々木美枝子，平賀興吾：東京衛研年報，36,413,1985
10）矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，20,1178,1975
11）石居　進：生物統計学入門，133,1975,培風館
12）広津千尋：統計的データ解析，65,1983,日本規格協会
13）Moore, D. and Felton, J. S.：*Mutation Res.*, 119,95, 1983
14）McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B. N.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72,5135,1975
15）Chu, K. C., Patel, K. M. and Lin, A.H.：*Mutation Res.*, 85,119,1981
16）Margolin, B. H., Kaplan, N. and Zeiger, E.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78,3779,1981
17）Sted, A. G., Hasselblad, V., Creason, J. P. and Claxton, L.：*Mutation Res.*, 85,13,1981
18）Bernstein, L., Kaldor, J., McCann, J. and Pike, M. C.：*Mutation Res.*, 97,267,1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 453-456, 1986

天然酸化防止剤のAmes試験における変異原性について

小嶋昭江*, 藤田博*, 佐々木美枝子*

Mutagenicity of Natural Antioxidants in the Ames Test

AKIE KOJIMA*, HIROSHI FUJITA* and MIEKO SASAKI*

Keywords：変異原性 mutagenicity, 天然酸化防止剤 natural antioxidants

はじめに

近年，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)などの合成酸化防止剤の安全性の見なおしが行われ，BHAについては，発がん性があることから使用禁止となった．また包装食品に合成添加物を使用する場合には，使用の表示が義務づけられるようになった．その結果，合成酸化防止剤に代って，天然酸化防止剤の使用が増大しつつある．しかし，天然の添加物のほとんどに対して，成分規格も使用基準も定められておらず，安全性についても不明の部分が多い．

当毒性部においては，BHTその他の合成酸化防止剤の安全性について検討を行ってきたが，天然酸化防止剤についても検討をはじめた．今回，東京都食品監視課が収去した天然酸化防止剤6種について，サルモネラ菌を用いて変異原性を試験したのでその結果を報告する．

実験材料および方法

試料　1983年に東京都食品衛生監視課が収去した市販の天然酸化防止剤であるγ-オリザノール，没食子酸2種，タンニン酸，クェルセチンおよびルチンを用いた．試料が水溶性の場合は滅菌精製水に溶解し，水に難溶の場合はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解して試験に用いた．

試験菌株　*Salmonella typhimurium* TA100[1]，TA98[1]およびAmesらが近年開発したTA97a[2]とTA102[3]の4種の菌株を使用した．

Mutation test　Amesの原法[4]に20分間のプレインキュベーションを加えた方法[5]で変異原試験を行った．代謝活性化に用いる肝S9は，Jcl-SDラットの5週令の雄を用いて調製した[5]．薬物代謝酵素誘導剤は，ポリ塩化ビフェニール(PCB，500mg／kgを腹腔内に投与)，またはフェノバタビタール(PB，飲水中に1％溶解して投与)を用いた．S9の濃度は，PCB-S9については50μl／プレートとした．PB-S9の濃度は，TA100およびTA98の場合は150μl／プレート，TA97aおよびTA102の場合は50μl／プレートとした．

試料の用量は，予備実験の結果から致死性がわずかに認められる用量を最高濃度にしてその10倍希釈の4段階とした．各用量についてプレート3枚を用いて試験を行い，結果は平均値で示した．得られた結果について，Kruskal-Wallisの検定[6]を行い，有意な差を認めた場合には，Dunnett型の順位和検定[7]を行った．また，用量相関についての検定[8]も行った．

結果および考察

表1にTA100，TA98，TA97aおよびTA102を用いて6種の天然酸化防止剤の変異原性試験を行った結果を示した．γ-オリザノールおよびタンニン酸は代謝活性化の有無にかかわらず，全菌株で変異原性は認められなかった．

クェルセチンおよびルチンは，使用した合菌株で代謝活性化の有無にかかわらず，変異原性が認められた．両者による復帰変異体数はTA98を用いてS9で代謝活性化した場合において一番多く，クェルセチン；300μg(PCB-S9)が5,538，ルチン；10mg(PB-S9)が1,539であった．

クェルセチンは植物中に存在するフラボノイドの一種であり，TA98[9,10,11]，TA100[9,10]で変異原性は陽性であると報告されている．今回の試験では，TA98，TA100に加えてTA97a，TA102でも陽性であった．ルチンはクェルセチンとルチノーズが結合した構造を持ち，TA98[10,11]，TA100[10]で陽性であるという報告がある．

*東京都立衛生研究所毒性部病理研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表1　天然酸化防止剤のサルモネラ菌に対する変異原性

酸化防止剤（溶媒）	用量（mg/プレート）	復帰変異体数/プレート											
		TA 100			TA 98			TA 97a			TA 97a		
		S9−	PB-S9	PCB-S9	S9−	PB-S9	PCB-S9	S9−	PB-S9	PCB-S9	S9−	PB-S9	PCB-S9
γ-オリザノール（DMSO）	0	278	262	283	39	61	27	140	196	206	311	413	422
	0.1*	320	265	286	35	56	27	127	186	201	293	420	413
	1*	301	258	292	39	51	27	132	181	199	309	425	442
	10*	260	249	282	31	45	29	137	194	192	248	467	437
	100*	250	305	287	26	54	−	151	175	193	−	−	−
	陽性対照	1,421[a)]	2,755[b)]	1,189[c)]	486[a)]	7,359[b)]	282[c)]	199[d)]	3,524[e)]	1,059[e)]	1,486[h)]	754[c)]	1,189[c)]
没食子酸−1（DMSO）	0	240	241	219	42	64	62	139	195	179	271	345	345
	0.001	244	235	230	43	46	53	136	180	173	259	365	408
	0.01	244	229	237	46	56	66	131	170	178	253	363	412
	0.1	265	237	222	45	49	59	138	177	185	285	371	432
	1	264	231	224	20	51	52	119	156	153	337	383	419
	陽性対照	1,436[a)]	3,625[b)]	914[c)]	744[a)]	5,612[b)]	355[c)]	244[d)]	3,202[e)]	1,110[e)]	1,139[h)]	682[c)]	726[c)]
没食子酸−2（DMSO）	0	240	241	219	42	64	62	127	182	194	249	412	392
	0.01	229	236	230	42	46	55	116	184	193	261	393	385
	0.01	264	246	227	42	48	74	113	194	191	306	410	415
	0.1	246	252	240	47	57	75	147	170	191	302	407	390
	1	280	249	205	24	45	54	154	167	165	330	397	392
	陽性対照	1,436[a)]	3,625[b)]	914[c)]	744[a)]	5,612[b)]	355[c)]	943[f)]	1,131[g)]	458[g)]	1,850[h)]	608[c)]	782[c)]
タンニン酸（DMSO）	0	270	245	274	36	46	53	140	196	206	311	413	422
	0.01	260	253	270	38	49	56	142	173	165	304	393	423
	0.1	247	247	246	38	69	62	117	160	157	276	411	423
	1	255	243	238	42	49	40	129	151	164	253	356	357
	10	150	171	103	21	35	44	104	139	137	189	306	304
	陽性対照	921[a)]	770[b)]	928[c)]	444[a)]	5,300[b)]	256[c)]	199[d)]	3,524[e)]	1,059[e)]	1,486[h)]	754[c)]	1,189[c)]
クェルセチン（DMSO）	0	229	214	270	34	50	62	127	182	194	249	412	392
	0.03	285	311	288	70	86	117	147	209	204	266	419	421
	0.03	444	680	600	420	873	1,057	468	871	791	415	684	676
	0.3	1,564	1,269	1,147	2,054	4,457	5,538	1,656	2,542	2,231	501	694	715
	3	1,083	1,364	1,525	1,462	2,586	2,214	1,610	2,071	2,192	520	755	728
	陽性対照	1,508[a)]	2,900[b)]	1,102[c)]	472[a)]	5,771[b)]	283[c)]	943[f)]	1,131[g)]	458[g)]	1,850[h)]	608[c)]	782[c)]
ルチン（DMSO）	0	278	262	283	39	61	27	139	195	179	271	345	345
	0.01	271	236	276	52	74	28	144	185	198	283	419	321
	0.1	293	283	264	58	65	33	158	207	196	313	402	438
	1	317	499	448	135	390	199	292	560	592	322	544	588
	10	375	886	902	492	1,539	1,009	567	1,707	1,788	482	1,066	780
	陽性対照	1,421[a)]	2,755[b)]	1,189[c)]	486[a)]	7,395[b)]	282[c)]	244[d)]	3,202[e)]	1,110[e)]	1,139[j)]	682[i)]	726[i)]

*μl/プレート　a）AF-2　0.1μg　b）アセチルアミノフルオレン　10μg　c）ベンツ(a)ピレン　5μg　d）9-アミノアクリジン　10μg　e）2-アミノフルオレン　10μg　f）9-アミノアクリジン　50μg　g）2-アミノアントラセン　2μg　h）マイトマイシンC　0.1μg　i）ベンツ(a)ピレン　1μg　j）マイトマイシンC　0.5μg

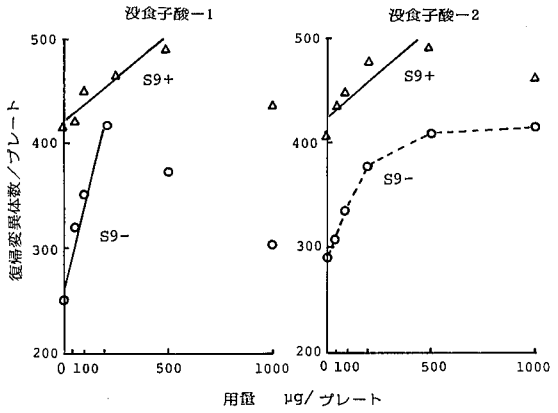


図1　TA102を用いた没食子酸の用量－復帰変異体数の関係

Hardigree[11]は精製したルチンはS9－では陰性で，S9を加えた場合は弱い陽性を示し，このルチンの変異原性はS9中の酵素の作用により糖との結合が切れて，クェルセチンが遊離したためであると報告している．今回用いたルチンは精製されていないため，2％以下のクェルセチンを含んでいる(私信)．そのためS9－でも変異原性陽性の結果を示したと考えられる．TA98，S9－におけるnmoleあたりの復帰変異体数は，クェルセチン(30μg)が3.89，ルチン(1mg)が0.05であった．このルチンの復帰変異体数の増加がクェルセチンによるものとすれば，クェルセチン15μgに相当する．PCB-S9を添加した場合のnmoleあたりの復帰変異体数は，クェルセチンについては10.02でS9－の場合の2.5倍であり，ルチンについては0.20でS9－の場合の4倍であり，S9添加による効果はルチンの方が大きかった．これは不純物のクェルセチンに，S9によって遊離したクェルセチンが加わったためであろう．

没食子酸はTA100，TA98，TA97aでは変異原性は陰性であった．TA102を用いた場合，有意ではないが2種とも1mg／プレートで増加傾向が認められたため，用量を細かくとって再度試験を行った．図1に結果を示した．対照に対する復帰変異体の増加の程度は低く，没食子酸－1は，S9－で1.67倍(200μg)，S9＋で1.19倍(500μg)，没食子酸－2は，S9－で1.45倍(1mg)，S9＋で1.22倍(500μg)であった．Dunnett型の順位和検定で両没食子酸ともS9の有無にかかわらず有意であり，没食子酸－2，S9－の場合を除いて用量相関についても認められた．これらの検定の結果から判断して，没食子酸は変異原活性は弱いが変異原性陽性であると考えられる．Amesら[12]はnmoleあたりの誘発復帰変異体数が0.01を越える化合物は，変異原性陽性と判断する方法を示している．用量相関の傾きからもとめたnmoleあたりの復帰変異体数は，没食子酸－1の場合，S9－で0.15，S9＋で0.03であり，没食子酸－2の場合，S9＋で0.03であった．なおS9－の場合は直線性が認められなかったので，500μgにおける復帰変異体数を用いて算定すると0.04であった．これらの結果からも没食子酸は弱い変異原物質であると考えられた．

没食子酸の誘導体である没食子酸プロピルについては，54～57年度厚生省食品化学課による遺伝毒性と発がん性スクリーニング試験において，Rec-assayおよび染色体異常試験の結果は陽性で，Ames試験の結果は陰性とされているが，この試験ではTA102は用いられていない．TA102は過酸化水素，ホルムアルデヒドなどのこれまでの菌株では検出できなかった化合物の変異原性を検出できる[8]．没食子酸もTA102を使用した場合にのみ変異原性が検出される化合物の1つであると考えられる．

要　約

天然酸化防止剤であるγ-オリザノール，没食子酸，タンニン酸，クェルセチンおよびルチンの変異原性を*Salmonella typhimurium* TA100，TA98，TA97aおよびTA102を用いて試験した．その結果，クェルセチンおよびルチンは使用した合菌株で陽性であった．また，没食子酸はTA102を用いた場合，弱い変異原性を示した．

文　献

1) Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. and Lee, F.D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70,2281,1973
2) Levin, D.E., Yamasaki, E. and Ames, B.N.: *Mutation Res.*, 94,315,1982
3) Levin, D.E., Hollstein, M. and Ames, B.N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79,7445,1982
4) Maron, D.M. and Ames, B.N.: *Mutaltion Res.*, 113, 173,1983
5) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，20,1178,1975
6) 石居進：生物統計学入門，133,1975,培風館
7) 廣津千尋：統計的データ解析，65,1985,日本規格協会
8) Moore, D. and Felton, S.: *Mutation Res.*, 119,95,1983
9) Sugimura, T., Nagao, M., Matsushima, T., Yahagi, T., Seino, Y., Shirai, A., Sawamura, M., Natori, S., Yoshihira, K., Fukuoka, M. and Kuroyanagi, M.: *Proc. Japan Acad.*, 53(B), 194,1977

10) MacGregor, J.T. and Jurd, L. : *Mutation Res.*, **54**, 297, 1978

11) Hardigree, A.A. and Epler, J.L. : *Mutation Res.*, **58**, 231, 1978

12) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B.N. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 5135, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 37, 457-462, 1986

Ames試験における増菌用液体培地の検討
—— Nutrient broth と合成液体培地の比較 ——

小嶋 昭江*, 藤田 博*, 佐々木 美枝子*

Studies on the Liquid Medium for Bacterial Growth in the Ames Test
—— Comparison of Nutrient Broth with Synthetic Liquid Medium ——

AKIE KOJIMA*, HIROSHI FUJITA* and MIEKO SASAKI*

Keywords：変異原性 mutagenicty, Ames 試験 Ames test, 普通ブイヨン nutrient broth, 液体培地 liquid medium

はじめに

Ames 試験に用いる試験菌液は，試験日前日に保存菌液少量を液体培地に接種して一夜増殖させることによって作成する．この増菌用液体培地としては，通常，市販のブロースが使用されている．

Ames らの初期の報告[1,2]によれば，この増菌用液体培地として，Difco 製の nutrient broth が使用されていた．その後，Difco 製のブロース中に変異原物質が存在し，これが肉エキスに由来することが報告された[3,4]ため，Ames らは Difco製のブロースに代えて，自然復帰変異体数の少ない Oxoid 製の nutrient broth No. 2 の使用を推奨している[5]．

アミノ酸や蛋白を加熱処理することにより変異原性を持つ化合物が生じることが報告されている[6]．市販のほとんどのブロースには加熱調製した肉エキスが使用されているため，Difco 製以外のブロースにも変異原が含まれている可能性がある．そこで，われわれはブロースの代りに肉エキスを含まない合成培地を使用することによって，変異原の混入を防ぐことでできると考え，現在広く使用されている Oxoid 製の nutrient broth No. 2 と合成液体培地を用いて Ames 試験を行い，菌の増殖程度，自然復帰変異体数および変異原を加えた場合の復帰変異体数を比較する実験を行ったので報告する．

実験材料および方法

ブロース 1．nutrient broth No. 2 （以下OX-2とする．Oxoid Limited)

2．合成液体培地 synthetic liquid medium （以下，SLM とする）Ames 試験に用いる最少培地から寒天を除いた組成で調製した．1*l* 中に硫酸アンモニウム 1 g，リン酸二水素カリウム10g，硫酸マグネシウム0.1g，クエン酸ナトリウム0.5g，水酸化カリウム適量（pH 7.0に調整），グルコース20g，ヒスチジン100mg，ビオチン100mg を含む，グルコース，ヒスチジンおよびビオチンは，別に滅菌後，混合した．

変異原物質 2-アミノフルオレン（2 AF），N-メチル-N′-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（MNNG），ニトロフルオレン（NF）は Ardrich chemical 製，2-アミノアントラセン（2 AA），ベンツ(a)ピレン（BP），ジエチルニトロソアミン（DEN），ジメチルニトロソアミン（DMN），トリプ P-1 は，和光純薬工業製，マイトマイシン C（MMC）は生化学工業製，4-ニトロキノリン-N-オキシド（4 NQO）は岩井化学薬品製，9-アミノアクリジン（9 AA）は東京化成工業製，AF-2 は上野製薬製，過酸化水素は関東化学製を用いた．

試験菌株 *Salmonella typhimurium* TA 100[1]，TA 98[1]，TA 97a[7]，TA 102[8]および TA 104[8]を用いた．

Mutation test Ames の原法[5]に20分間のプレインキュベーションを加えた方法[9]で行った．代謝活性化に用いる肝 S 9は，フェノバルビタール（PB）あるいはポリ塩化ビフェニール（PCB）で薬物代謝酵素を誘導した Jcl：SD ラット雄（5 週令）より調製した．S 9の濃度は50 μl／プレートとした．

−80°に凍結保存した保存菌液（OX-2 で調製）約 0.05m*l* を10m*l* の OX-2あるいは SLM に接種し，一夜（約18時間）37°で振とう培養を行い，試験菌液を調製した．被験物質0.1m*l* を入れた小試験管に，緩衝液あるい

*東京都立衛生研究所病理研究科 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

はS9-Mix 0.5mlおよび試験菌液0.1mlを加え，20分間37°でプレインキューベーションを行った後，軟寒天2mlを加え，最少培地に重層した．37°で48時間培養後，復帰変異体数を計数した．各用量について3枚のプレートを用いて試験を行い，結果は平均値で示した．

結　果

1．SLM中のヒスチジン量の決定

SLM中に加えるヒスチジンの濃度について検討を行った．図1にTA 100，TA 98およびTA 102を用いて，SLM 1ml中のヒスチジンを1 μgから1 mgに変えて変異原性試験を行った結果を示した．自然復帰変異体数はいずれの菌株においても，ヒスチジン1 μgから200 μg／mlの間でほとんど差は認められなかった．変異原を加えた場合の復帰変異体数はMNNG (TA 100)，MMC (TA 102)については，ヒスチジン10 μg／mlから500 μg／mlの間でほぼ一定であったが，NF (TA 98)の場合はヒスチジン100 μg／ml以上で急激な上昇を示した．生菌数については図に示さなかったが，各々の菌株についてヒスチジン10 μg～1mg／mlの間でほぼ一定であった．TA 98においてNFによる復帰変異体数が，ヒスチジン100 μg／ml以上で上昇したが，ヒスチジン100 μg／mlにおけるNFの復帰変異体数がOX-2を使用した場合の復帰変異体数に匹敵すること，およびMNNG, MMCの結果から，以下の実験ではSLM 1ml中のヒスチジンの濃度は，100 μg／mlとした．

2．Ames試験における増菌培地としてのSLMとOX-2の比較

SLMとOX-2で調製した試験菌液を用いてAmes試験を行い，菌数，自然復帰変異体数および既知変異原を加えた場合の復帰変異体数の比較を行った．菌数については，各菌株ともSLMを用いた場合，OX-2に比較して3～4倍高く，自然復帰変異体数については，同等かあるいはわずかにSLMを用いた場合の方が高かった(データには示していない)．2 AA，9 AA，2 AF，AF-2，BP，DEN，DMN，過酸化水素，MMC，MNNG，NF，4 NQOおよびトリプP-1を用いて行った試験の結果を表1に示した．その結果，DEN，DMNおよび過酸化水素を除いた変異原による復帰変異体数については，SLM，OX-2培養による差はほとんど見られなかった．

SLMとOX-2で復帰変異体数に差の見られたDMNの変異原性について，TA100，TA102およびTA104を用い，SLMとOX-2の詳細な比較を行った結果を図2に示した．DMNによる復帰変異体数はいずれの菌株を用いた場合にも，SLMの方が高く，特にTA100において差が著しかった．また，DENについても同様の結果が得られた．

さらに，過酸化水素の変異原性について，TA102を用い，SLMとOX-2の比較を行ったが，この場合もSLMの方が復帰変異体数が高かった(図3)．過酸化水素による復帰変異体数は，10～20 μgの濃度で最高となり，

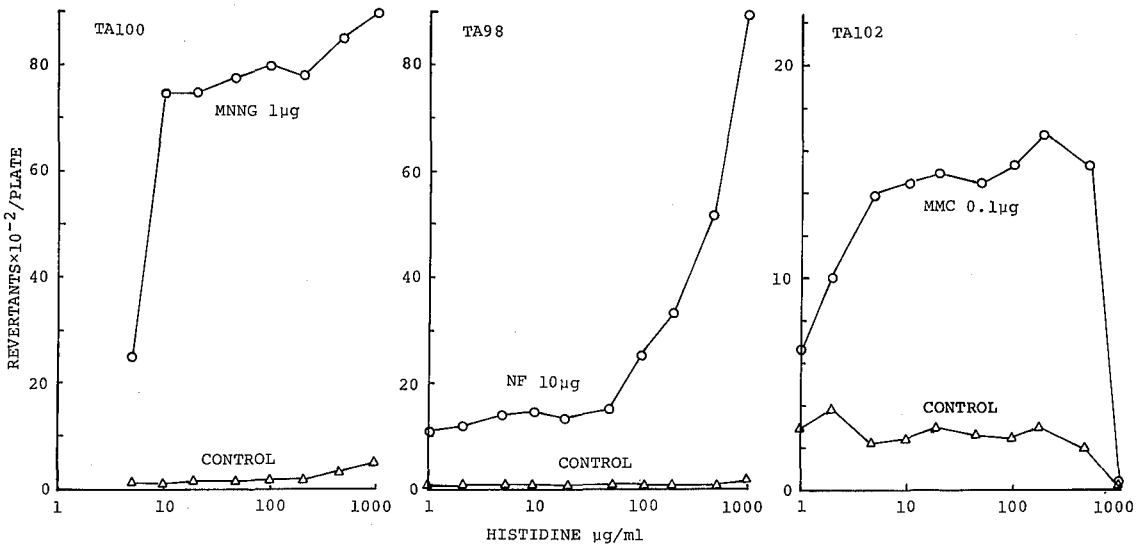


図1　変異原による復帰変異体数および自然復帰変異体数と合成液体培地中のヒスチジン量との関係

表1　合成液体培地(SLM)と Oxoid nutrient broth No.2 (OX-2)を用いた Ames 試験における復帰変異体数の比較

変異原(μg/プレート)	菌株	復帰変異体/プレート	
		SLM	OX-2
2AA(2 μg) [a]	TA 100	1,851	1,254
	TA 98	1,810	6,158
9AA(20 μg)	TA 97a	401	272
2AF(2 μg) [a]	TA 100	1,825	1,828
	TA 98	3,949	3,345
AF-2 (0.05 μg)	TA 100	1,765	1,576
	TA 98	275	273
BP(5 μg) [b]	TA 100	1,079	853
	TA 98	261	236
	TA 97a	928	905
DEN(5 mg) [b]	TA 100	684	264
	TA 102	5,229	3,538
DMN(5 mg) [b]	TA 100	4,640	650
(2 mg) [b]	TA 104	2,006	1,240
	TA 102	3,635	1,054
過酸化水素水(10 μg)	TA 102	1,700	522
MMC(0.5 μg)	TA 102	4,809	4,302
MNNG(2 μg)	TA 100	8,173	8,777
	TA 102	8,120	8,773
NF(10 μg)	TA 100	3,384	4,041
	TA 98	2,555	2,359
4NQO(0.5 μg)	TA 100	1,895	1,697
トリプP-1(1 μg) [b]	TA 100	673	524
	TA 98	6,327	5,128
	TA 102	460	432

a) PB-S 9　50 μl/プレート　b) PCB-S 9　50 μl/プレート

OX-2 の場合の最高値は20 μg で526，SLM の場合は10 μg で1,700であった．Ames[8] らによれば，TA102を用いて検出される過酸化水素による復帰変異体数は，100 μg で745と報告されているが，今回の実験において，低い濃度(10 μg)で高い復帰変異体数が得られた．

3．SLM と OX-2 を用いた試験における DMN の変異原性の差についての検討

SLM を使用した場合に DMN によって高い復帰変異体数が得られた原因について，TA100を用いて検討を試みた．SLM によって調製した菌液の菌数は，OX-2 に比較して3～4倍高いため，菌数の違いが復帰変異体数に影響をおよぼしている可能性が考えられる．そこで，SLM と OX-2 菌液の菌数をほぼ同数となるように調製し，DMN の実験を行った．表2に結果を示した．SLM 菌液と OX-2 菌液の菌数の差を少なくすることにより，両菌液に見られた DMN での復帰変異体数の差は，図2に示した実験の場合より少なくなった．従って，両菌液に見られた差は少くとも菌数の差が原因となっていると考えられる．しかしながら，菌液調製時とプレインキュベーション時に SLM を使用した場合の DMN の復帰変異体数が932であるのに対し，OX-2 の場合は336と約1/3であり，まだ差があると考えられた．またプレインキュベーション時に OX-2 を使用した場合の DMN による復帰変異体数は，SLM の場合のそれぞれ60%，66%に減少した．この結果から，DMN による復帰変異体数の差は，主に菌数の差によるが，菌液調製時およびプレインキュベーション時の培地の違いも復帰変異体数の減少に関与していると考えられた．

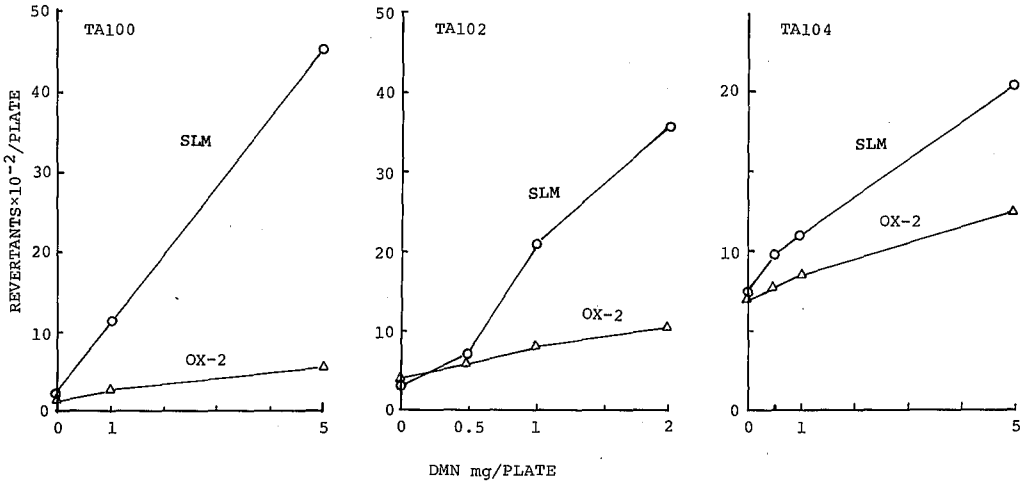


図2　ジメチルニトロソアミン(DMN)の量と復帰変異体数の関係―合成液体培地(SLM)と Oxoid nutrient broth No. 2 (OX-2)の比較
代謝活性化のために，PCB-S 9 50 μl/プレートを加えた．

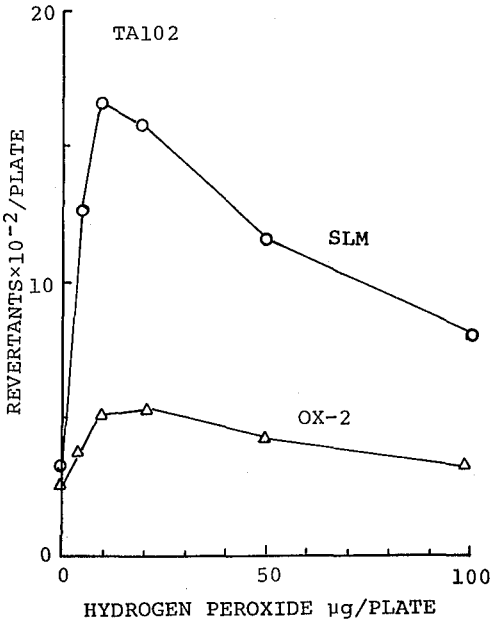


図3 TA 102を用いた過酸化水素の量と復帰変異体数の関係—合成液体培地(SLM)と Oxoid nutrient broth No. 2 (OX-2)の比較

表2 DMN の変異原性におよぼす菌液調整時およびプレインキュベーション中の液体培地の影響

液体培地の種類		菌数/ml	復帰変異体/プレート	
菌液調製	プレインキュベーション		control	DMN 5 mg
SLM	SLM	1.8×10^8	179	932
	OX-2	1.7×10^8	180	566
OX-2	SLM	1.1×10^8	173	336
	OX-2	1.1×10^8	159	222

次に，プレインキュベーション時に OX-2 を添加し，DMN による復帰変異体数に対する OX-2 の影響を調べる実験を行った．SLM で培養した菌液に，菌培養後ろ過除菌した OX-2 培養液を加え，プレインキュベーションを行った．結果を表3に示した．SLM 単独の場合の DMN による復帰変異体数が4,046であるのに対し，OX-2 の培養液0.025ml を加えた場合は2,700で68%に，0.1ml を加えた場合は2,195で54%に減少した．これらの結果から，OX-2 培養液は DMN の変異原性を減少させる効果を持っていると考えられる．

Negishi[10]らは，Ames 試験における DMN の変異原性はプレインキュベーション中の pH によって影響を受け，pH 5.2～6.2の間では高く，pH 7.2以上では非常に低い

表3 SLM を用いた Ames 試験における DMN の変異原性におよぼす OX-2 添加の影響

菌液調製に用いた培地	OX-2 添加量 (ml)	復帰変異体/プレート	
		control	DMN 5 mg
SLM	0	224	4,046
SLM	0.025	268	2,270
SLM	0.1	297	2,195
OX-2	0	193	267

ことを報告している．SLM と OX-2 の培養菌液および S 9-mix を加えたインキュベーション混合液の pH を測定した結果，培養菌液の pH は SLM の場合5.14，OX-2 の場合は8.03であった．インキュベーション混合液の pH は，SLM の場合7.19，OX-2 の場合は7.43であった．インキュベーション中の pH が OX-2 の場合，SLM よりわずかに高いことが，DMN による復帰変異体数の減少に関与している可能性が考えられる．

考　察

液体培地の良否は，一般的には，菌の増殖の程度と一定の増殖までに要する時間によって判定される．Ames 試験に用いる液体培地の条件としては，その他に，自然復帰変異体数が少いこと，変異原を加えた場合の誘発復帰変異体数が高いことなどがあげられる．

Ames 試験に用いる増菌用液体培地には，通常，肉エキスを含む市販のブロースが使用されている．しかし，ほとんどのブロースには，加熱調製した肉エキスが含まれているため，蛋白やアミノ酸の加熱処理によって生じる変異原物質を含んでいる可能性がある．ただし，Oxoid 製の nutrient broth には冷浸出した肉エキスが用いられているため，変異原性物質が含まれている可能性は少い．OX-2 を用いた場合，自然復帰変異体数が少ないのはこのためであると考えられる．

また，蛋白やアミノ酸の熱分解産物中には，ハルマン，ノルハルマンなど変異原性を増強する物質が存在することが知られている．加熱調製した肉エキスを含むブロースを用いて Ames 試験を行う場合，自然復帰変異体数が増加するだけではなく，このような物質が，被験物質の変異原性に影響を与える可能性がある．これらの点から，Ames 試験に肉エキスを含まない合成液体培地を使用することにより，より良い試験結果が得られると考えられる．

今回，13種の変異原を用いて OX-2 と SLM を比較する実験を行った結果，増殖菌数は SLM が高く，自然復帰変異体数は同程度か SLM の方がわずかに高かった．

10種の変異原による復帰変異体数は同程度であったが，DMN，DENおよび過酸化水素については，SLMを用いた方が高い復帰変異体数が得られた．この結果から，Ames試験における増菌用液体培地として，合成液体培地が十分使用できると考えられる．

なお，SLMを用いた場合，OX-2に比べてDMNによる復帰変異体数が高い原因について検討した結果，SLM菌液の菌数がOX-2に比べ3～4倍高いことが主な原因であることが判明した．しかし，菌数だけでは説明できない復帰変異体数の差が残ったこと，OX-2培養液を加えることにより，DMNの復帰変異体数が減少することから，OX-2培養液がDMNの変異原性を減少させる作用を持っていると考えられる．この減少作用については，OX-2菌液でのインキュベーション中のpHがSLMよりわずかに高いことからpHが関与している可能性，あるいはOX-2培養液中にDMNの変異原性を減少させる物質が存在する可能性が考えられる．

要　約

Ames試験においては，液体培地で一夜増殖させた菌液を用いて試験を行う．この増菌用の液体培地の検討を行った．Oxoid製のnutrient broth No. 2と合成液体培地を用いて調製した菌液でAmes試験を行い，菌数，自然復帰変異体数および変異原を加えた場合の復帰変異体数を比較した．その結果，菌数は合成液体培地で高く，自然復帰変異体数は同等か合成液体培地でわずかに高かった．2-アミノアントラセン，9-アミノアクリジン，2-アミノフルオレン，AF-2，ベンツ(a)ピレン，マイトマイシンC，N-メチル-N′-ニトロ-N-ニトロソグアニジン，ニトロフルオレン，4-ニトロキノリン-N-オキシドおよびトリプP-1を加えた場合の復帰変異体数は，ほぼ同等であった．ジメチルニトロソアミン，ジエチルニトロソアミンおよび過酸化水素による復帰変異体数は，合成液体培地を用いた場合に高い結果が得られた．

文　献

1) Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. and Lee F.D.：*Proc. Natl. Acad, Sci. USA*, 70,2281,1973
2) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.：*Mutation* Res., 31,347,1975
3) Vithayathil, A. J., Commoner, B., Nair. S. and Madyastha, P.：*Toxicol. Environ Health*, 4,189,1978
4) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N.：*Mutation Res.*, 88,343,1981
5) Maron, D.M. and Ames, B.N.：*Mutation Res.*, 113, 173,1983
6) Sugimura, T., Kawachi, T., Nagao, M., Yahagi, T. and Seino, Y.：*Proc. Jpn. Acad.*, 53,58,1977
7) Levin, D.E., Yamasaki, E. and Ames, B.N.：*Mutation Res.*, 94,315,1982
8) Levin, D.E., Hollstein, M., Chritman, M.F., Schwiers, E.A. and Ames, B.N.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7445,1982
9) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，20,1178,1975
10) Negishi, T. and Hayatsu, H.：*Mutation Res.*, 79,223, 1980
11) Nagao, M., Yahagi, T., Kawachi. T., Sugimura, T.：*Proc Jpn Acad.*, 53,95,1977

他 誌 発 表

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1985.7—1986.6)

原 著 論 文

Staphylococcus aureus 産生Toxic shock toxinの生理用タンポン内における産生性

藤川 浩，五十嵐英夫：感染症学雑誌，59(7)，674，1985

Detection of Staphylococcal enterotoxins in food poisoning outbreaks by reversed passive latex agglutination

Hideo Igarashi, Masao Shingaki, Hiroshi Fujikawa, Hiroshi Ushioda, Takeshi Terayama : Zbl.Bakt,Microbiol.Hyg., Suppl. 14, 255, 1985

Immunological differentiation of staphylocoagulase produced by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*

Hideo Igarashi, Masao Shingaki, Hiroshi Ushioda, Hiroshi Fujikawa, Takeshi Terayama, Junichi Kawano, Akira Shimizu : Zbl. Bakt. Microbiol. Hyg., Suppl. 14, 337, 1985

Purification and characterization of an enterotoxin from *Staphylococcus aureus* associated with toxic shock syndrome

Hideo Igarashi, Hiroshi Fujikawa, Hiroyuki Usami, Shinichiro Kawabata, Takashi Morita : Zbl. Bckt. Microbiol. Hyg., Suppl. 14, 343, 1985

腸炎ビブリオの酸性化における生存に及ぼす胆汁酸とクエン酸の影響

能勢征子，風戸実香，坂井千三：食品衛生学雑誌，26(6)，579，1985

Shinichro Kawabata, Takashi Morita, Sadaki Iwanaga, Hideo Igarashi : J.Biochem. 96(6), 1603, 1985

Toxic shock syndromeの1例

柳岡正範，名出頼男，平野 功，小川 忠，藤田民夫，五十嵐英夫：感染症学雑誌，60(2)，183，1986

The amino acid sequence of the procoagulant-and prothrombin-binding domain isolated from staphylocoagulase

Shun-ichiro Kawabata, Toshiyuki Miyata, Takeshi Morita, Sadaaki Iwanaga, Hideo Igarashi : J. Bio.Chem., 261(2), 527, 1986

Isolation and characterization of staphylocoaglase chymotryptic fragment

Shunichiro Kawabata, Takeshi Morita, Toshiyuki Miyata, Sadaaki Iwanaga, Hideo Igarashi : J.Biol-.Chem.,261(3), 1427, 1986

Latex agglutination test for staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1

Hideo Igarashi, Hiroshi Fujikawa, Masao Shingaki, Merlin S. Bergdoll : J. Clin. Microbiol., 23(3), 509, 1986

***Enterobacter asburiae* sp. nov., a New Species Found in Clinical Specimens,and Reassignment of *Erwinia dissolvens and Erwinia nimipressuralis* to the Genus Enterobacter as *Enterobacter dissolvens* comb. nov. and *Enterobacter nimipressuralls* comb. nov.**

D.J.Brenner, A.C.Mcwhorter, A.Kai, A.G.Steigerwalt and J.J.Farmer Ⅲ : J.Clin. Microbiol., 23(6), 1114, 1986

Clearance of endotoxin from blood of rabbits injected with staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1

Hiroshi Fujikawa, Hideo Igarashi, Hiroyuki Usami, Shigenori Tanaka, Hiroshi Tamura : Infect. Immun., 52(1), 134, 1986

Study of the biological activities of toxic shock

S.Kaneko, T.Maruyama ： Japan. J. Vet. Sic.,48 (2) , 205,1986

電子顕微鏡写真について

前木吾一：日本医学写真学会雑誌，23(4),168(1986)

***Aspergillus Flavus* 及び *Aspergillus parasiticōs* *Aflatoxicol* 生成について**

中里光男，斉藤和夫，菊地洋子，井部明広，藤沼賢司，西島基弘，二島太一郎，諸角　聖，和序慶朝昭，一言広：食品衛生学雑誌，26(4),380,1985

魚貝類の腐敗に伴う不揮発性アミン類の生成とその消長

永山敏廣，田村行弘，真木俊夫，観　公子，直井家壽太，二島太一郎：衛生化学，31(6),362,1985

ハシリドコロによる食中毒

真木俊夫，二島太一郎，食品衛生学雑誌，26(5),548,1985

食用油のマイトコトキシン汚染実態及び製造工程による除去

上村　尚，西島基弘，田端節子，安田和男，牛山博文，二島太一郎，食品衛生学雑誌，27(1),59,1986

いわゆる健康食品の衛生学的調査（Ⅱ）

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，直井家壽太，二島太一郎：食品衛生学雑誌，27(3),302,1986

農産食品及び各種加工食品中の安息香酸

永山敏廣，西島基弘，安田和男，斉藤和夫，上村　尚，井部明広，牛山博文，直井家壽太，二島太一郎：食品衛生学雑誌，27(3),316,1986

Isolation of Vomiting Principles from the Mushroom Rhodophyllus rhodopolius

T.Maki, K.Takahashi, and S.Shibata ： J.Agric.Fd. Chem.,33, 1204,1986

Decomposition of VitaminA by NO_2

T.Ohta, T.Suzuki, and T.kanoh ： Chemistry Letters,811,1986

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（Ⅱ）

牧野国義，溝口　勲：日本公衆衛生雑誌，32, 595, 1986

Reaction of Malonaldehyde with Nucleic Acid. . Formation of Fluorescent Pyrimido 〔1,2−a〕 **purin** 10(3H) **One Mononucleotide**

H.Seto. T.Takesue and T.Ikemura ： Bull, Chem.Soc. Jpn.,58, 3431,1985

Effects of Environmental Factors on Toxicity of a Cyanobacterium (Microcystis aeruginosa) under Culture Conditions

M.F.Watanabe, and S.Oishi ： Appl. Environ. Microbiol. 49(5),1342,1985

糞便汚染指標細菌としての大腸菌群に関する検討（Ⅰ）

古畑勝則，松本淳彦：水道協会雑誌，54(9),32,1985

水道原水の水質と癌死亡率に関する研究

笹野英雄：日大医学雑誌，45(1),47,1986

水質・底質中の酢酸2−メトキシエチル及び酢酸2−エトキシエチルの分析法

中川順一，岡本　寛，土屋悦輝，西垣　進：昭和60年度化学物質分析法開発調査報告書（環境庁），17,1986

生物中のジメチルナフタレン及びイソプロピルナフタレンの分析法

岡本　寛，中川順一，土屋悦輝，西垣　進：昭和60年度化学物質分析法開発調査報告書（環境庁），195,1986

Irreversible IN VIVO binding of Thiabendazole to macromolecules in pregnant mice and its relation to teratogenicity

M.Yoneyama, A.Ogata and K.Hiraga：Fd Chem. Toxic., 23(8),733,1985

Lung hemorrhagic toxicity of butylated hydroxyanisole in the rat

O.Takahashi, Y.Sakamoto and K.Hiraga：Toxicology Lett., 27(1−3),15,1985

Reduced aggregation capacity of washed platelets and dysfibrinogenaemia in rats given butylated hydroxytoluene

O.Takahashi：Fd Chem. Toxic., 23(10),937,1985

Feeding of butylated hydroxytoluene to rats caused a rapid decrease in blood coagulation factors II (prothrombin), VII, IX and X

O.Takahashi：Arch.Toxicol.,58(3),177,1986

Enhancing Effect of Thiabendazole on Urinary Bladder Carcinogenesis Induced by Sodium o-Phenylphenate in F Rats

T.Fujii, H.Mikuriya, 344 N.Kamiya and K.Hiraga：Fd Chem Toxic.,24(3),207,1986

F344ラットとSIe：Wistarラットとの性状の比較
——Slc：Wistar ラットは F344系由来である——

田山邦昭，藤井　孝，平賀興吾：Exp. Anima., 35(1),65,1986

病原微生物

太田建爾：看護学生，33(9),33−44,1985

生活と衛生微生物（春田三佐夫，宇田川俊一編）

太田建爾，坂井千三（分担執筆）：南山堂，1985

総説・解説

第14回国際化学療法学会シンポジウムのハイライト，アジアにおける薬剤耐性腸管病原菌の問題

大橋　誠：薬事日報，第6874号，19,1985

東風西風

国際化時代のコレラ大流行，先進国のエゴをやめ相互協力に基いた対策を

大橋　誠：中央公論，第1194号，278,1985

海外帰国者の病原菌保菌者の現状

山田澄夫：食品と微生物，2(1),66,1985

コーヒー豆のカビ汚染に及ぼす含有成分の影響について

諸角　聖，和宇慶朝昭，一言　広，小原哲二郎：食品と微生物，2(2),80,1985

食品中におけるブドウ球菌の増殖とエンテロトキシン産性におよぼすグラム陰性菌の影響

池亀公和，持永泰輔，寺田　厚，徳重　進，高野浩子，内田和夫，五十嵐英夫，潮田　弘，坂井千三：食品と微生物，2(2),92,1985

本邦市販食品の汚染真菌相からみた食品の安全性の評価

一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，倉田　浩：食品と微生物，2(2),102,1985

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
津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：マイコンサーキュラー，10(8)，23，1985

ポアメディアエッグヨーク食塩寒天培地の評価
潮田　弘，寺山　武：最新検査，3(5)，31，1985

スタヒロコッカス属とミクロコッカス属を鑑別したいとき
潮田　弘：Medical Technology，13(11)，1204，1985

コレラの発生状況と今後の対策
大橋　誠：公衆衛生，49(11)，761，1985

腸炎ビブリオ
工藤泰雄，太田建爾：公衆衛生，49(11)，845，1985

感染症サーベイランス情報，赤痢
大橋　誠：医学のあゆみ，133(9)，624，1985

カンピロバクター腸炎の発生状況
伊藤　武：医学のあゆみ，135(12,13)，1072，1985

健康保菌者検索により発見されたサルモネラ陽性者の健康状態アンケート調査成績
小野川尊，天野祐次，市瀬正之，稲葉恵子，小林淑子，黒沢大介，松江隆之，岡田尚子，平石　浩，斎藤　誠，村上勝美，岡田義治，福田ジュン，寺山　武：予防医学ジャーナル，198号，30，1985

ボツリヌス中毒とその予防
坂井千三：予防医学，173号，3，1985

カンピロバクター食中毒とその疫学
伊藤　武，斎藤香彦，柳川義勢：北里メディカルニュース，No371，2，1985

ボツリヌス食中毒の予防
伊藤　武，坂井千三：微生物，1(2)，31，1985

セレウス菌食中毒とその予防
寺山　武：食品衛生，No.9，10，1985

毒素性ショック症候群
五十嵐英夫：臨床医，11，増刊号，470，1985

最近認識された病原ビブリオによる下痢症
工藤泰雄：臨床と微生物，12，251，1985

ヒトの下痢症の原因として問題となるビブリオとその検査について
工藤泰雄：モダンメディア，31，555，1985

食べ物と食中毒菌
寺山　武：東京都予防医学協会年報，72，1986

カビの食品汚染―食品汚染カビの検査
一言　広：微生物，2(3)，32，1986

細菌の型別法(2)ブドウ球菌
寺山　武：検査と技術，14(2)，141，1986

カンピロバクター感染症に関する研究のその後の発展，第3回カンピロバクター国際学会について
伊藤　武：モダンメディア，32(2)，62，1986

トキシックショック症候群
五十嵐英夫：Medio，3(1)，16，1986

細菌性食中毒の現状
工藤泰雄：Medfcal Tribune,19(24),24,1986

ブドウ球菌食中毒
五十嵐英夫：Medical Tribune,19(24),27,1986

ブドウ球菌食中毒の近況について
五十嵐英夫：Medical corner,77(2),7,1986

感染症サーベライン領域におけるラボラトリー・コンピュータの導入/海外旅行者の訪問国パターン別病原菌検出状況解析システム
津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：マイコンサーキュラー，11(3),2,1986

高速液体クロマトグラフィーによる化粧品分析
鎌田国広：LC Family, 21(2),1,1986

成形パップ剤のサリチル酸エステルの安定性
風間成孔：Therapeutic Reserch,3(6),974,1985

著　書

海外で健康にくらすための手引（第二版）
渡辺義一，大橋　誠：近代出版，1985

Antibiotic Resistance in Enteric Pathogen in Japan
M.Ohashi, Y.Kudoh, S.Matsushita and A.Nakamura：University of Tokyo Press, 1985

カンピロバクターの病原性
伊藤　武，柳川義勢：獣医学とその成果と研究の展望，日本獣医学会，1985

腸管系病原菌の検査法
善養寺浩，坂井千三，寺山　武，工藤泰雄，伊藤　武：医学書院，1985

生活と衛生微生物
坂井千三，太田建爾，寺山　武，工藤泰雄，伊藤　武（分担執筆）：南山堂，1985

臨床検査講座16，微生物学
坂井千三，伊藤　武，藪内　清，一言　広（分担執筆）：医歯薬出版，1986

プロテインエンジニアリング
安東民衛（分担執筆）：シーエムシー，1985

スーパークリーンテクノロジーマニュアル先端技術
産業をささえる超純水・超清浄空気—
宇佐見博幸（分担執筆）：環境技術研究会，1986

生活と微生物
丸山　務（分担執筆）：南山堂，1985

血液・尿化学検査・免疫学的検査，その数値をどう読むか
二島太一郎（分担執筆）：日本臨床社，1985

THE SODIUM PUMP
Toshiko Nakao, Makoto Nakao, Itsu Kano and Kanako Sato：[Eds] Ian Glynn and Clive Ellory,The Company of Biologists Ltd.,1985

Enhancing Effect of Acetaminophen on Mutagenesis
Mieko Sasaki：in Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, ed. by C.Ramel, B.Lambert & J.Magunsson, 365～372 pp., ALAN R.LISS, INC., New York, 1986

学　会　発　表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1985.7—1986.6)

学 会 発 表

内山竹彦，若井真理子，鎌形有祐，吉岡守正，藤川浩，五十嵐英夫：**Toxic shock syndrome toxin（T S S T）のリンパ球におよぼす作用の解析——Interleukin 2産生について**
第32回毒素シンポジウム（1985．7）

川畑俊一郎，森田隆司，宮田敏行，岩永貞昭，五十嵐英夫：**血栓毒スタフィロコアグラーゼの構造と機能**
第32回毒素シンポジウム（1985．7）

T.Itoh, A.Kai, K,Saito, Y.Yanagawa, M.Inaba, M.Takahashi, Y.Kudoh, S.Yamada, S.Matsushita, T.Terayama, and M.Ohashi : **Gastroenteritis associated with cytotoxic *Escherichia coli* 0145 : NM**
The 21st Joint Conference, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel（1985．10）

能勢征子，風戸実香，坂井千三：**食品の腐敗細菌に及ぼす有機酸とコール酸の相乗効果**
第50回日本食品衛生学会（1985．10）

rome toxin-1 や Enterotoxin A. B. C のヒトやマウス T リンパ球活性化作用の解析
第30回ブドウ球菌研究会（1985．10）

五十嵐英夫，藤川　浩，潮田　弘，寺山　武：**Toxic shock syndrome（TSS）患者および TSS 様患者由来黄色ブドウ球菌の Toxic shock syndrome toxin-one およびエンテロトキシン産生性とコアグラーゼ型について**
第30回ブドウ球菌研究会（1985．10）

津野正朗，工藤泰雄，山田澄夫，松下　秀，寺山　武，大橋　誠：**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・解析システムの開発**
第75回東京都衛生局学会（1985．10）

潮田　弘，五十嵐英夫，藤川　浩，寺山　武：**食品衛生における大腸菌に関する研究——食品およびふん便由来大腸菌の各種性状について——**
第6回食品衛生微生物研究会（1985．11）

伊藤　武，高橋正樹，斎藤香彦，柳川義勢，甲斐明美，稲葉美佐子，新垣正夫，楠　　淳，黒沢淑郎，平尾芙紗子，松山亘孝，鈴木昭四郎，山之内淳，佐藤忠治：**食鳥処理場の器具・器材および生肉におけるカンピロバクターの汚染状況について**
第6回食品衛生微生物研究会（1985．11）

伊藤　武，稲葉美佐子，坂井千三：**真空包装辛子蓮根の保存温度とA型ボツリヌス菌の増殖および毒素産生**
第6回食品衛生微生物研究会（1985．11）

和宇慶朝昭，諸角　聖，一言　広：**食品由来酵母の増殖に及ぼす各種天然甘味料の影響**
第6回食品衛生微生物研究会（1985．11）

郡山洋一郎，斉藤晴美，竹内芳行，諸角　聖，和宇慶朝昭，一言　広：**市販ハトムギの糸状菌汚染調査**
第6回食品衛生微生物研究会（1985．11）

山田澄夫：***Vibrio fluvialis* の病原因子について**
第54回日本細菌学会関東支部総会（1985．11）

伊藤　武，柳川義勢，新垣正夫，高橋正樹，甲斐明美，稲葉美佐子，楠　　淳，寺山　武，大橋　誠，濱名元一：**ヒト胃粘膜からの Campylobacter-like organism の検出状況と分離菌の性状について**
第54回日本細菌学会関東支部総会（1985．11）

山田澄夫，津野正朗，松下　秀，工藤泰雄，大橋　誠：**海外旅行者下痢症由来病原ビブリオの性状**
第19回腸炎ビブリオシンポジウム（1985．12）

松下　秀，工藤泰雄，山田澄夫，大橋　誠：近年分離されたコレラ菌の諸性状について
第19回腸炎ビブリオシンポジウム（1985．12）

津野正朗，大橋　誠，中村明子：感染症サーベイランス領域におけるパーソナルコンピュータの活用／腸チフスおよびパラチフス情報管理システム
第3回日本マイコン研究発表会（1986．3）

潮田　弘，五十嵐英夫，藤川　浩，寺山　武：食品衛生における大腸菌に関する研究――市販食品および健康人ふん便由来大腸菌の各種性状について――
第59回日本細菌学会総会（1986．3）

鎌形有祐，内山竹彦，河野雅子，若井真理子，吉岡守正，藤川　浩，五十嵐英夫：**Toxic shock syndrome toxin-1（TSST－1）**のマウスにおける作用機序の解明
第59回日本細菌学会総会（1986．3）

吉沢幸夫，五十嵐英夫：黄色ブドウ球菌コアグラーゼ遺伝子のクローニングとその大腸菌での発現
第59回日本細菌学会総会（1986．3）

藤川　浩，宇佐美博幸，五十嵐英夫：**Toxic shock syndrome toxin-1**の発熱および**Endotoxin**致死増強作用の機序解明の試み
第59回日本細菌学会総会（1986．3）

甲斐明美，伊藤　武，柳川義勢，稲葉美佐子，寺山　武，大橋　誠，深井孝治：**Cytotoxin**産生性***Escherichia coli*** 0145：**NM**の下痢原性に関する感染実験
第59回日本細菌学会総会（1986．3）

堀内三吉，後藤延一，中谷林太郎，伊藤　武，高橋正樹，大橋　誠：ヒト由来サルモネラのプラスミドと薬剤耐性性
第59回日本細菌学会総会（1986．3）

斎藤香彦，高橋正樹，新垣正夫，楠　　淳，伊藤　武，大橋　誠：カンピロバクターの血清型別に関する研究：都衛研型別システムと**Lior**らの型別システムとの比較検討
第59回日本細菌学会総会（1986．3）

松下　秀，山田澄夫，津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠，渡辺治雄，伊藤健一郎，中村明子：組織侵入性大腸菌の同定――組織侵入能と病原プラスミド，血清型，性状との関連――
第59回日本細菌学会総会（1986．3）

伊藤健一郎，中村明子，渡辺治雄，松下　秀，工藤泰雄，大橋　誠：酵素抗体法（**ELISA**）を用いた組織侵入性大腸菌の同定について
第59回日本細菌学会総会（1986．3）

柳川義勢，伊藤　武，稲葉美佐子，高橋正樹，寺山　武，大橋　誠：***Campylobacter jejuni***の病原性に関する研究4）マウスにおける本菌の腸管定着性の検討
第101回日本獣医学会（1986．4）

五十嵐英夫，藤川　浩，潮田　弘，寺山　武：我が国における**Toxic shock syndrome（TSS）**および**TSS**様患者の発生状況とこれらの患者由来黄色ブドウ球菌の毒素産生性とコアグラーゼ型について
第60回日本感染症学会総会（1986．4）

伊藤　武，柳川義勢，新垣正夫，高橋正樹，甲斐明美，稲葉美佐子，楠　　淳，寺山　武，大橋　誠：ヒト胃粘膜から検出された***Campylobacter pyloridis***の細菌学的特徴について
第60回日本感染症学会総会（1986．4）

伊藤　武，斎藤香彦，柳川義勢，高橋正樹，甲斐明美，

新垣正夫，稲葉美佐子，大橋　誠：カンピロバクターによる集団下痢患者および散発下痢患者の血中抗体に関する検討
第60回日本感染症学会総会（1986．4）

松下　秀，山田澄夫，津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：新血清型赤痢菌の検出された輸入下痢症例
第60回日本感染症学会総会（1986．4）

津野正朗，山田澄夫，松下　秀，工藤泰雄，大橋　誠：海外旅行者下痢症の病因検索成績（1980—1984年）
第60回日本感染症学会総会（1986．4）

福見秀雄，平石　浩，今川八束，加藤貞治，松原義雄，中村明子，乗木秀夫，大橋　誠，斎藤　誠，善養寺浩，津野正朗：腸チフス・サーベイランス・システムの20年の歩み　1．情報管理システムについて
第60回日本感染症学会総会（1986．4）

福見秀雄，平石　浩，今川八束，加藤貞治，松原義雄，中村明子，乗木秀夫，大橋　誠，斎藤　誠，善養寺浩，伊藤健一郎：腸チフス・サーベイランス・システムの20年の歩み　2．分離菌のファージ型および薬剤感受性
第60回日本感染症学会総会（1986．4）

福見秀雄，平石　浩，今川八束，加藤貞治，松原義雄，中村明子，乗木秀夫，大橋　誠，斎藤　誠，善養寺浩：腸チフス・サーベイランス・システムの20年の歩み　3．流行事例の解析
第60回日本感染症学会総会（1986．4）

楠　　淳，伊藤　武，斎藤香彦，寺山　武：食肉からのサルモネラ検出のための増菌培地の再検討，特に **Rappaport** 培地，**Rappaport-Vassiliadis** 培地，ストロンチラム培地およびセレナイト培地の増菌効果の比較
第51回日本食品衛生学会（1986．5）

稲葉美佐子，伊藤　武，寺山　武：水産加工食品の保存温度条件とボツリヌス毒素の産生について
第51回日本食品衛生学会（1986．5）

諸角　聖，和宇慶朝昭，上原真一，一言　広，鈴木輝康，星野健雄：本邦食品の糸状菌汚染に関する研究柑橘類果皮中の抗真菌物質について
第51回日本食品衛生学会（1986．5）

能勢征子，風戸実香，坂井千三：腸炎ビブリオの酸損傷からの回復増殖に及ぼす胆汁酸とクエン酸の影響
第51回日本食品衛生学会（1986．5）

遠藤美代子，柏木義勝，光岡ルミ，鈴木重任：1984～1985年分離A群れんさ球菌の薬剤感受性と菌型について
第60回日本感染症学会総会（1986．4）

柏木義勝，鈴木重任，大橋　誠：サンドイッチが原因と推定されたA群れんさ球菌咽頭炎の集団発生
第60回日本感染症学会総会（1986．4）

柏木義勝，植田忠彦，土屋悦輝，市川久次，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2報）
第61回日本医科器械学会大会（1986．5）

柴田　実，安部昭子，鈴木重任：先天性副腎皮質過形成の **ELLSA** によるスクリーニングの検討
第75回東京都衛生局学会（1985．11）

武士俣邦雄，植田忠彦：カテコールアミン代謝産物のジアゾ反応性とその化合物
第22回関東甲信臨床衛生検査学会（1985．9）

村田以和夫：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成績

第45回日本寄生虫学会東日本支部大会（1985．10）

村田以和夫，近藤　聡，浦野元幸：**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**

第75回東京都衛生局学会（1985．11）

武士俣邦雄，高野弘紀，鈴木重任，大橋　誠，峰岸正子，石塚　実，丸山　脩：神経芽細胞腫マス・スクリーニングの検査成績と発見例

第76回東京都衛生局学会（1986．5）

山之内淳，横尾俊憲，安部勇三，田崎達明，森　　清，安東民衛，関根整治，林　志直，藪内　清，伊藤　武，小杉真紗人，戸田正和，丸山　脩：**ウイルスに起因すると推定される食中毒事例について**

昭和60年度東京都食品衛生監視員協議会研究発表会（1985．7）

山之内淳，横尾俊憲，安部勇三，田崎達明，森　　清，安東民衛，関根整治，林　志直，藪内　清，伊藤　武，小杉真紗人，戸田正和，丸山　脩：**ウイルスに起因すると推定される食中毒事例について**

第25回全国食品衛生監視員協議会関東ブロック大会研修会（1985．8）

関根整治，林　志直，安東民衛，藪内　清，大橋　誠，岡田正次郎：**都内において集団発生した非細菌性急性胃腸炎のウイルス学的検索**

第33回日本ウイルス学会総会（1985．11）

山之内淳，横尾俊憲，安部勇三，田崎達明，森　　清，安東民衛，関根整治，林　志直，藪内　清，伊藤　武，小杉真紗人，戸田正和，丸山　脩：**ウイルスに起因すると推定される食中毒事例について**

第25回全国食品衛生監視員協議会研修会（1985．11）

渡辺悌吉，石原　祐，大久保さつき，小野正恵，関根整治，林　志直，矢野一好，吉田靖子，安東民衛，藪内清：**小児の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**

第60回日本感染症学会総会（1986．4）

安東民衛：**プロテインデザインにおけるモノクローナル抗体**

昭和61年度繊維学会第１回バイオテクノロジーに関するシンポジウム（1986．5）

山之内淳，横尾俊憲，安部勇三，田崎達明，花澤孝悌，安東民衛，関根整治，林　志直，藪内　清，伊藤　武，小杉真紗人，戸田正和，村田三紗子：**ウイルスに起因すると推定される食中毒事例について**

第76回東京都衛生局学会（1986．5）

林　志直，関根整治，安東民衛，藪内　清，大橋　誠，岡田正次郎：**非細菌性胃腸炎患者から検出された small round virus の抗原性について**

第27回日本臨床ウイルス学会総会（1986．6）

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 によるジゴキシン製剤中のギトキシンの定量法**

第22回全国衛生化学技術協議会年会（1985．10）

安田一郎，浜野朋子，高野伊知郎，瀬戸隆子，秋山和幸：**医薬品製剤中のベルベリンの定量**

第22回全国衛生化学技術協議会年会（1985．10）

浜野朋子，安田一郎，高野伊知郎，瀬戸隆子，秋山和幸：**紫雲膏の変質について**

第22回全国衛生化学技術協議会年会（1985．10）

安田一郎，上原真一，浜野朋子，高野伊知郎，瀬戸隆子，秋山和幸，竹谷孝一，糸川秀治：**南米産生薬ミルオ**

ンブレのリグナンについて
日本生薬学会第32回年会（1985．10）

飯田　修，佐竹元吉，浜野朋子，安田一郎，秋山和幸：ムラサキの栽培における寒冷紗の被覆効果とシコニン類含量
日本生薬学会第32回年会（1985．10）

正木宏幸，徳丸雅一，岩崎久夫，宇佐美博幸，村田元秀：河川水中の発熱性物質と細菌数および**BOD**との関連性
第101回日本獣医学会（1986．4）

高野伊知郎，安田一郎，浜野朋子，瀬戸隆子，秋山和幸：各産地牛黄の成分比較について
日本薬学会第106年会（1986．4）

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：電気化学的検出器付高速液体クロマトグラフィーによる複合ビタミン製剤中のビオチンの定量法
日本薬学会第106年会（1986．4）

上原真一，安田一郎，秋山和幸，森田博史，竹谷孝一，糸川秀治：インドネシア産、生薬**Temu Lawak**の成分研究（Ⅲ）――ジアリルヘプタノイドの構造について――
日本薬学会第106年会（1986．4）

山野辺秀夫，竹内正博，水石和子，渡辺四男也：水素化物発生法による魚介類中のセレンの分析
第50回日本食品衛生学会（1985．10）

水石和子，竹内正博，山野辺秀夫，渡辺四男也：ゴム製哺乳用具中の揮発性**N**－ニトロソアミンの溶出試験――測定値の変動要因について――
第50回日本食品衛生学会（1985．10）

池田一夫，酒井正美，森謙一郎，雨宮　敬，鈴木助治，渡辺四男也：ガスクロマトグラフィーによる塩化ベンゼトニウムの定量法
日本薬学会第106年会（1986．4）

酒井正美，池田一夫，森謙一郎，雨宮　敬，鈴木助治，渡辺四男也：**GC**による塩化オクタデシルトリメチルおよびジオクタデシルジメチル第四アンモニウム塩の定量法
日本薬学会第106年会（1986．4）

雨宮　敬，酒井正義，池田一夫，森謙一郎，鈴木助治，渡辺四男也：ポリエステルおよびその混紡衣料品中のキャリアの残留量について
日本薬学会第106年会（1986．4）

伊藤弘一，岸本清子，中村義昭，観　照雄，中村　弘，渡辺四男也：**HPLC**による緑色204号（ピラニンコンク）中のピレンの分離定量
日本薬学会第106年会（1986．4）

江波戸擧秀，福島一郎：酢酸カドミウム経口投与による臓器中カドミウムの蓄積と体毛への排泄
第56回日本衛生学会総会（1986．4）

植田忠彦，柏木義勝，土屋悦輝，風間成孔，市川久次，林　勝宏，石井敏夫，二木鋭雄，中川茂男：水溶解オゾンによる殺菌効果
第61回日本医科器械学会大会（1986．5）

神崎政子，丸山　務，今泉　清：イヌ，ネコにおける***Pasteurella multocida***の保有実態
昭和60年度日本臨床獣医学会（1985．7）

丸山　務，神崎政子，川本英一，沢田拓士：イヌ，ネコ由来***Pasteurella multocida***の生物性状と血清型
第100回日本獣医学会総会（1985．8）

金子誠二，丸山　務：***Yersinia enterocolitico*** の **Congo Red 吸着能と病原性との関係**
第100回日本獣医学会（1985．8）

Y.Kokubo, M.Matsumoto, A.Terada, M.Saito, K.Shinagawa, H.Konuma, H.Kurata : **Incidence of Clostridium in cooked meat product in Japan**
The 9th International Symposium on World Association of Veterinary Food Hygienists（1985．8）

S.Kaneko, Y.Kokubo, K.Jinbo, M.Matsumoto, T.Maruyama, K.Takeshige : **Isolation of Yersinia enterocolitica and related species from swine and meats in Japan**
The 9th International Symposium on World Association of Veterinary Food Hygienists（1985．8）

桐谷礼子，神保勝彦，松本昌雄：バイオアッセーによる食肉中の残留抗生物質の系統別推定法
第50回日本食品衛生学会学術講演会（1985．10）

神保勝彦，小久保彌太郎，金子誠二，桐谷礼子，松本昌雄：食鳥処理場および市販鶏肉のカンピロバクター・ジェジュニ汚染状況
第50回日本食品衛生学会学術講演会（1985．10）

竹葉和江，村上文子，桐谷礼子，松本昌雄：バイオオートグラフィーによる鶏肉中の残留ポリエーテル系抗生物質の簡易検出法について
第50回日本食品衛生学会（1985．10）

高木　裕，中嶋　誠，塩見久章，龍田桂吉，山本陽子，伊藤英夫，荻原孝三，秋山　陽，畑野逸輿，丸山　務，小久保彌太郎，松本昌雄：と畜場における食肉の細菌汚染調査　第1報　豚の細菌汚染実態調査
第75回東京都衛生局学会（1985．10）

山本陽子，中嶋　誠，塩見久章，高木　裕，龍田桂吉，石本博夫，荻原孝三，秋山　陽，畑野逸輿，丸山　務，小久保彌太郎，松本昌雄：と畜場における食肉の細菌汚染調査　第2報　牛の細菌汚染実態調査
第75回東京都衛生局学会（1985．10）

小久保彌太郎：カラシレンコンによるボツリヌス食中毒事件――包装食品における嫌気性菌検査の必要性
第6回食品衛生微生物研究会学術講演会（1985．11）

大塩正子，佐藤節子，森本　薫，池村謙吾，丸山　務：急性腸炎からの ***Yersinia enterocolitica*** 08の分離例について
第34回日本感染症学会東日本地方会総会（1985．11）

梅木富士郎，丸山　務，神崎政子，松本昌雄，関　昌明，波多野裕通，木下茂信，佐藤幸弘，新島恭樹：ワンポイント **MCA-LS** 法の動物レプトスピラ症への応用
第23回レプトスピラシンポジウム（1986．3）

小久保彌太郎，丸山　務，金子誠二，神崎政子，松本昌雄，増井光子，田代和治：上野不忍池で発生したC型ボツリヌス菌による水禽類の集団へい死例について
第101回日本獣医学会（1986．4）

丸山　務，神崎政子，高島郁夫，橋本信夫，萩原敏且：わが国のイヌ，ネコにおける ***Chlamydia psittaci*** の抗体保有状況
第101回日本獣医学会（1986．4）

神崎政子，丸山　務，高島郁夫，橋本信夫：市販の ***Chlamydia psittaci*** 抗原および **CF** キットによるオウム病の血清学的診断法の比較検討
第101回日本獣医学会（1986．4）

丸山　務：わが国における ***Yersinia enterocolitica*** 感染症の発生状況と本菌の動物保菌の実態について

第60回日本感染症学会（1986．4）

T.Maruyma：***Yersinia enterocolitica* infection in human and isolation of the oroanisms from pias in Japan**

4 th International Symposium on *Yersinia*（1986．5）

長沢冬樹，坂上正人，中西　弘，中村　仁，梅木富士郎，井草京子，松本昌雄：ナチュラルチーズの衛生学的調査

第76回東京都衛生局学会（1986．5）

梅木富士郎，井草京子，松本昌雄：ナチュラルチーズの細菌汚染について

第51回日本食品衛生学会（1986．5）

上田　工，島村保洋，石川ふさ子，二島太一郎：つけものの保存性に関与する物質及び要因の実態調査

第22回全国衛生化学技術協議会（1985．10）

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

第22回全国衛生化学技術協議会（1985．10）

中沢久美子，勝木康隆，冠　政光，二島太一郎：市販食用油脂および油脂製食品中のエルカ酸含有量

第22回全国衛生化学技術協議会（1985．10）

二島太一郎，森本敬三，羽里幸彦：各種元素のヒト胎盤透過性について――その３――

第44回日本公衆衛生学会（1985．10）

永山敏廣，田村行弘，真木俊夫，観　公子，飯田真美，二島太一郎：日本茶中の残留農薬実態調査

第50回日本食品衛生学会（1985．10）

斉藤和夫，西島基弘，宮崎利夫：真菌多糖の研究――レイシのアルカリ抽出水溶性多糖，酸性画分について

日本薬学会第106年会（1986．4）

永山敏廣，真木俊夫，観　公子，飯田真美，二島太一郎：加工調理における有機リン系農薬の消長

第51回日本食品衛生学会（1986．5）

永山敏廣，真木俊夫，飯田真美，観　公子，二島太一郎：高速液体クロマトグラフィーによるカーバメイト系農薬の一斉分析法

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(4)梅核製品中の杏仁について

第51回日本食品衛生学会（1986．5）

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：食品中のアミン類の一斉分析――ワインについて――

第51回日本食品衛生学会（1986．5）

藤沼賢司，斉藤和夫，中里光男，菊地洋子，井部明広，二島太一郎：食品中のグリチルリチン酸の分析

第51回日本食品衛生学会（1986．5）

上村　尚：アフラトキシンの簡易分析法及び食用油製造工程におけるアフラトキシンの挙動

第20回 UJNR 有毒微生物専門部会

中里光男：市販食品中のアフラトキシコールの汚染調査及びその汚染原因について

第20回 UJNR 有毒微生物専門部会

牛尾房雄，道口正雄：人血液中の PCT，PCB，DDE

濃度の推移
第44回日本公衆衛生学会（1985．10）

川島満春美，友松俊夫，道口正雄：献立栄養量の計算値と実測値の比較検討
第75回東京都衛生局学会（1985．10）

井口正雄，道口正雄：イシナギ肝臓中のビタミンA長鎖脂肪酸エステルについて
昭和61年度日本水産学会春季大会（1986．4）

鈴木孝人，池田真悟，加納堯子，溝口　勲：NO_2の肺胞マクロファージのSuperoxide Amion産生能と貪食能に及ぼす影響
第26回，大気汚染学会（1985．11）

狩野文雄，加納堯子，溝口　勲：都内幹線道路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
第26回，大気汚染学会（1985．11）

小山勉良，狩野文雄，佐藤泰仁，多田宇宏，加納堯子，溝口　勲：ビル空調系粉塵の変異原活性と多環芳香族炭化水素濃度
第26回，大気汚染学会（1985．11）

佐藤泰仁，加納堯子：室内浮遊粉塵の質に関する調査（空調系における汚染質の動態）
第44回，日本公衆衛生学会（1985．10）

牧野国義，溝口　勲：東京都における呼吸器疾患死亡時系列の検討
第44回，日本公衆衛生学会（1985．10）

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性繊維の影響（第2報）　繊維源およびAgingの違い
第44回，日本公衆衛生学会（1985．10）

福田雅夫，加納堯子，溝口　勲：NO_2暴露したピレン投与マウスの尿中変異原性
第26回，大気汚染学会（1985．11）

矢口久美子，大橋則夫，渡辺　学：FID-GCによる飲料水中の低沸点有機塩素化合物
第44回日本公衆衛生学会（1985．10）

大橋則夫，矢口久美子，渡辺　学：緩速ろ過処理によるフミン酸の除去効果
第44回日本公衆衛生学会（1985．10）

野沢竹志，大石充男，平田恵子，大西和夫，西島基弘，坂井千三：ワイン中の多価アルコール類の分析
第50回日本食品衛生学会（1985．10）

田口信夫，平田恵子，天川映子，大西和夫，西島基弘，坂井千三：イオンクロマトグラフィーによる食品中の総臭素分析法
第50回日本食品衛生学会（1985．10）

栃本　博，有賀孝成，押田裕子：河川の重金属汚染指標としてのヒゲナガカワトビケラに関する研究（第2報）カドミウムの取り込みと排泄
第50回日本陸水学会（1985．10）

太田建爾，平田一郎，池島伸至，神真知子，新井輝義，入倉善久，楠くみ子，坂井千三：生食用アジの病原ビブリオ汚染
第19回腸炎ビブリオシンポジウム（1985．12）

天川映子，大西和夫，西島基弘，坂井千三：高速液体クロマトグラフィーによる食品中の有機酸分析法
第51回日本食品衛生学会（1986．5）

渡辺真利代，大石真之，渡辺真之：**Microcystis の毒性——有毒株と無毒株Ⅱ——**
第50回陸水学会大会（1985．10）

渡辺真利代，大石真之，渡辺真之：**藍藻 *Microcystis* 属と毒性**
61年度水産学会大会（1986．4）

F.Nagai and T.Nakao：**SHAPE CHANGE OF ERYTHROCYTES GHOSTS AND INHITION OF CALMODULIN STIMULATED Ca^{2+} -ATPase BY CHLOROQUINE**
13th International Congress of Biochemistry, August25－30, 1985 Amsterdum The Netherlands

佐藤かな子，長井二三子，加納いつ，中尾順子，浦山修，中尾　真：**馬腎 Na.K-ATPase のモノクローナル抗体（第3報）**
第58回日本生化学会大会（1985．9）

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，中島　章：**キノホルム投与による肝 P－450と薬物代謝酵素活性化の変化**
第58回日本生化学会大会（1985．9）

長井二三子，牛山慶子，中川敦子，加納いつ，中尾順子，中島　章：**カルモデュリン依存性ホスジエステラーゼ活性に対するクロロキンの阻害作用**
第58回日本生化学会大会（1985．9）

市川久次，M.Hicks, J.M.Gebicki：**無機ならびにメチル水銀による溶血への酸素ならびに脂質過酸化の関与**
第58回日本生化学会大会（1985．9）

大石真之：**ジー2－エチルヘキシルフタレートによる精巣毒性の生化学的指標としての精巣酵素活性**
第59回日本薬理学会総会（1986．4）

高橋　省：**ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の単一投与によるラット血漿血液凝固第Ⅱ（プロトロンビン），第Ⅶ，第Ⅸおよび第Ⅹ因子の低下**
第59回日本薬理学会総会（1986．4）

坂本義光，高橋　省：**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 *t*－ブチルヒドロキノン（TBHQ）のラット肺におよぼす影響**
第12回日本毒科学会学術年会（1985．7）

小縣昭夫，安藤　弘，久保喜一，藤谷和子，米山允子，佐々木美枝子，平賀興吾：**チアベンタゾール（TBZ）のマウスにおける催奇形性に及ぼす SKF－525およびフェノバルビタール（PB）の影響について**
第25回日本先天異常学会学術集会（1985．7）

藤井　孝，三栗谷久敏，神谷信行，平賀興吾：**オルトフェニルフェノールナトリウム（OPP-Na）のラット膀胱発癌に対するチアベンダゾール（TBZ）の増強効果について**
第44回日本癌学会総会（1985．10）

神谷信行，坂本義光，佐々木美枝子，平賀興吾：**クロム鉱さい粉じんのラットによる吸入実験**
第12回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム（1985．10）

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

坂井千三（委員長）
志村昌之
伊藤武
中村弘
丸山務
友松俊夫
加納堯子
笹野英男
市川久次
佐々木美枝子
太田建爾

昭和61年12月5日　発行

規格表　第2類
印刷番号（61）560
刊行物番号（H）24

東京都立衛生研究所研究年報第37号

編集
発行　：　東京都立衛生研究所
〒160 東京都新宿区百人町3－24－1
電話 03（363）3231（代）

印刷所　：　大東印刷工業株式会社
〒131 東京都墨田区向島3－33－5
電話 03（625）7481（代）