m131en

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

38

1987

62. 12. 21
受付

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

序

当研究所が設立されたのは昭和24年３月のことで，人に例えれば，そろそろ不惑の年齢を迎えようとしています。この間の記録をひもといてみますと，昭和43年には立川出張所が充実され多摩支所と改称，昭和45年には毒性研究部が新設されたことなど，いろいろと組織上の変遷を経てきております。また，年齢だけでなく実質的にも，今や，東京都における衛生行政を科学的，技術的に支える試験研究機関として不惑の存在でなくてはならない時期にきているように思います。

言うまでもなく，過去における組織上の変遷はそれぞれの時代の衛生行政の緊急対策課題に即応しての業務内容の充実，強化のためでありましたが，業務の在り方の変遷としてこれを俯瞰してみますと，検査主体の受け身の体制から，先行調査や基礎的研究をも重視する積極的な体質への脱皮であったと言えるようです。公衆衛生そのものの在り方の変遷と軌を一にしています。

しかし，保健問題を取り巻く社会事情は従来にも増して急激に変化しつつあります。科学技術の急速な進歩，人口の高齢化に伴う疾病構造の変化，人や物資の国内・国際間流動の頻繁化・迅速化，食生活や食品産業構造の変化，環境汚染問題の複雑化，きめ細かい保健サービスを求める都民の期待の拡大など，数え上げれば限りがないようです。これらに即応するため，衛生研究所の在り方として，今迄以上に先見性と柔軟さが求められるに違いありません。

特に，最近の保健医療分野における技術の進歩は各種検査の複雑化をもたらしました。それに伴って検査がいろいろな機関で分散して実施される傾向も強くなってきております。検査の標準化と精度管理の問題がいよいよ重要になり，衛生研究所における研修指導業務の強化と拡大の必要性が痛感されるところであります。このことはまた，広域監視体制，公衆衛生情報組織の整備の問題とも密接に関係しております。そして，研修指導業務をつつがなく遂行するためには，検査における経験の累積のみではなく，調査研究を通じての見識の向上が不可欠であります。

調査研究，試験検査，研修指導，情報活動の四つの機能をバランス良く備えたレファレンス・サービス・センターとして，流動して止まない保健行政並びに社会需要に応えるべく，今後も一層の研鑽を重ねて行きたいと考えております。本研究年報に収録した論文は，職員一同がそれぞれの分掌分野において，上述のような意識をもって努力したきた成果の一断面であります。

忌憚のない御批判，御助言を賜われば幸であります。今後の精進の糧と致したいと存じます。

昭和62年12月

東京都立衛生研究所長　大　橋　　誠

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腸管感染症検査室情報処理・解析システムの開発
……津野　正朗，工藤　泰雄，大橋　　誠…… 1

北海道産スケトウダラ *Teragra chalcogramma*，千葉県産マサバ *Pneumatophorus japonicus japonicus* 由来 *Anisakis* Ⅰ型幼虫の保存温度，薬味，調味料および香辛料に対する抵抗性
……村田以和夫，宮沢　貞雄，國　　守利，中嶋　陽一，渋谷　智晃，中西　　弘…… 13

オゾンガスによる殺菌・滅菌に関する検討
……柏木　義勝，植田　忠彦，土屋　悦輝，市川　久次，風間　成孔…… 22

都内健康小児の酵素抗体法（ELISA）による百日咳抗体保有調査（1979～1986）
……安部　昭子，柴田　　実，大橋　　誠…… 28

東京都におけるポリオ流行予測調査
1982～1986年の5年間の調査成績
……林　　志直，関根　整治，安東　民衛，藪内　　清，寺山　　武…… 35

Pasteurella multocida の選択分離法
……丸山　　努，神崎　政子，宇佐美俊彦，水谷　　浩…… 42

血算値に及ぼす抗凝固剤と保存温度の影響
……蓑輪　佳子，大石　向江，小林　千種…… 48

各種コントロール血清における尿酸の測定例
……小林　千種，大石　向江，蓑輪　佳子…… 53

神経芽細胞腫のマス・スクリーニングに関する検討（第4報）
尿中バニリルマンデリン酸スポットテスト成績に及ぼす食餌の影響に関する統計的観察
……武士俣邦雄，高野　弘紀，一言　　広，峰岸　正子，長田　英春，長岡　常雄…… 57

神経芽細胞腫のマス・スクリーニングに関する検討（第5報）
尿中バニリルマンデリン酸スポットテストを偽似的に妨害する例
……武士俣邦雄，高野　弘紀，一言　　広…… 63

報文Ⅱ　医薬品等に関する調査研究

高速液体クロマトグラフィーによる鎮咳去痰薬中の南天実成分 O-MethyIdomesticine の定量
……瀬戸　隆子，安田　一郎，浜野　朋子，高野伊知郎，秋山　和幸…… 67

高速液体クロマトグラフィーによるアカメガシワ含有無承認無許可医薬品中のベルゲニンの定量
……浜野　朋子，安田　一郎，瀬戸　隆子，高野伊知郎，秋山　和幸…… 73

イカリソウの試験法に関する研究
フラボノイド配糖体イカリインの分析
……高野伊知郎，安田　一郎，浜野　朋子，瀬戸　隆子，秋山　和幸…… 80

FTD 検出器付ガスクロマトグラフィーによる外皮用薬中のノニル酸ワニリルアミドの定量
……宮武ノリヱ，重岡　捨身，寺島　　潔，長嶋真知子，秋山　和幸…… 85

ガスクロマトグラフィーによる鎮暈剤中の臭化水素酸スコポラミンの定量法
……高橋美佐子，中山　京子，上原　真一，鎌田国広，萩原　輝彦，秋山　和幸…… 89

HMPA によるジメチルアミノ化とリン酸エステル誘導体の生成
……高橋利恵子，瀬戸　　博，塩川恵美子，秋山　和幸…… 93

高速液体クロマトグラフ法による香粧品中の塩化ベンザルコニウムおよび塩化ベンゼトニウムの分離定量法
……池田　一夫，雨宮　　敬，伊藤　弘一，観　　照雄，中村　　弘，渡辺四男也……101

家庭用の衛生化学的研究（第20報）
ガスクロマトグラフィーによる塩化ベンザルコニウムの定量法
……中村　義昭，酒井　正美，森　謙一郎，鈴木　助治，渡辺四男也……109

家庭用品の衛生化的研究（第21報）
$LiAlH_4$還元により誘導したアルキルベンジルメチルアミンのガスクロマトグラフィーによる
塩化ベンザルコニウムの分析
……鈴木　助治，酒井　正美，森　謙一郎，中村　義昭，渡辺四男也……116

家庭用品の衛生化学的研究（第22報）
市販ぬれティシュ類中のエタノールおよび塩化ベンザルコニウムの含有量
……鈴木　助治，酒井　正美，森　謙一郎，中村　義昭，渡辺四男也，森　　由子，谷　　賢志……122

家庭用品の衛生化学的研究（第23報）
衣料用衛生加工剤・塩酸 *n*-ドデシルグアニジン定量法
……酒井　正美，森　謙一郎，中村　義昭，鈴木　助治，渡辺四男也……126

報文Ⅲ　食品等に関する調査研究

食品衛生細菌に関する研究
――一般食品（複合調理済食品）の細菌学的検査成績について――
……潮田　　弘，五十嵐英夫，藤川　　浩，工藤　泰雄……133

食肉からのサルモネラ検出のためのラパポート変法培地と他の増菌培地の比較検討
……楠　　淳，伊藤　　武……139

各種食品取り扱い者からの黄色ブドウ球菌の検出および分離菌株のコアグラーゼ型とエンテロトキシン産生性
……入倉　義久，池島　伸至，平田　一郎，新井　輝義，楠　くみ子，神　真知子，太田　建爾……145

母乳中の揮発性 N-ニトロソアミンの定量
……水石　和子，竹内　正博，山野辺秀夫，渡辺四男也，鵜沼　洋子，山梨　靖夫……150

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Ⅱ報）
養殖魚介類及び近海魚介類中の TBTO 含有量
……竹内　正博，水石　和子，山野辺秀夫，渡辺四男也……155
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Ⅲ報）
東京湾の汚染調査
……竹内　正博，水石　和子，山野辺秀夫，渡辺四男也……160

魚介類中の水銀およびセレン含有量について
……山野辺秀夫，竹内　正博，水石　和子，渡辺四男也……167

東京都におけるPCB汚染の実態について（第15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……173

残留抗生物質の微生物学的検査法の基礎的検討
……桐谷　礼子，神保　勝彦，松本　昌雄……177

高速液体クロマトグラフィーによるウナギ中のオキソリン酸，ナリジクス酸，ピロミド酸の同時定量法
……堀井　昭三，門間　千枝，松本　昌雄……182

Micrococcus luteus 突然変異株による抗生物質検出系の開発
……金西　信次，神保　勝彦，橋本　常生……185

市販食用油脂及び油脂製食品中のエルカ酸含有量
……中沢久美子，勝木　康隆，冠　　政光，二島太一郎……191

食品中の桂皮酸及び合成保存料の同時分析法
……嶋村　保洋，石川ふさ子，小川　仁志，二島太一郎……195

高速液体クロマトグラフィーによる保存料の同時分析について
……西山　良子，田村　行弘，井部　明広，中里　光男，上村　　尚，田端　節子，
橋本　秀樹，斉藤　和夫，菊地　洋子，藤沼　賢司，二島太一郎……198

清涼飲料水中の過酸化水素について
……菊地　洋子，斉藤　和夫，中里　光男，藤沼　賢司，二島太一郎……203

輸入即席麺の粉末スープ，調味料，香辛料，天然色素中のポリソルベートの分析法と実態調査
……田村　行弘，井部　明広，橋本　秀樹，上村　　尚，西山　良子，田端　節子，斉藤　和夫，
中里　光男，菊地　洋子，藤沼　賢司，勝木　康隆，冠　　政光，中沢久美子，鈴木　二郎，
安田　和男，牛山　博文，小川　仁志，嶋村　保洋，石川ふさ子，二島太一郎……209

生鮮野菜等に使用されるリン酸の分析法とその実態調査
……井部　明広，田村　行弘，上村　　尚，西山　良子，田端　節子，橋本　秀樹，斉藤　和夫，
中里　光男，菊地　洋子，藤沼　賢司，勝木　康隆，冠　　政光，中沢久美子，鈴木　二郎，
安田　和男，牛山　博文，小川　仁志，嶋村　保洋，石川ふさ子，二島太一郎……216

野菜・果実類中の残留農薬実態調査
（昭和61年度）
……永山　敏廣，真木　俊夫，飯田　真美，観　　公子，二島太一郎……222

化学物質及び自然毒による食中毒事件例（第4報）
——昭和61年度——
……真木　俊夫，観　　公子，永山　敏廣，飯田　真美，二島太一郎……229

ペクチンによるリパーゼ活性阻害
……小関　正道，只野　敬子，安野　哲子，荻野　周三，風間　成孔……233

石綿線維の経口摂取による生体への影響（第2報）
ラットにおける血中ならびに器官への移行について
……荻野　周三，福森　信隆，安野　哲子，小関　正道，佐々木美枝子，風間　成孔……235

高速液体クロマトグラフィーによる黄色4号および5号中の芳香族アミンの定量
……広門　雅子，中島　和雄，植松　洋子，高橋　　巌，松井　敬子，風間　成孔……239

高速液体クロマトグラフィーによる赤色２号，赤色102号および黄色５号中の不純物の分析
……植松　洋子，広門　雅子，中島　和雄，高橋　　巌，松井　敬子，風間　成孔……245

シカクマメ新品種「ウリズン」若さやの一般成分およびミネラル含量
……井口　正雄，菊谷　典久，友松　俊夫，道口　正雄，浦野　元幸，山下　三雄，小沢　　聖……253

マアジの脂肪酸組成およびトコフェロール含量の季節的変動
……船山　恵市，牛尾　房雄，友松　俊夫，道口　正雄……257

食品中の二酸化チタンの分析
……天川　映子，大西　和夫，西島　基弘……262

報文Ⅳ　生活環境に関する調査研究

ディーゼル排気ガス暴露ラットの肺胞マクロファージにおける Superoxide Anion 産生能の低下
……鈴木　孝人，池田　真悟，加納　堯子……267

NO_2暴露下でピレン投与されたマウス尿からの変異原物質の検出
……福田　雅夫，加納　堯子……273

尿中のヒドロキシプロリン，クレアチニン比
——尿採取時間の検討および食事運動等の影響——
……池田　真悟，大澤　誠喜，鈴木　孝人，加納　堯子，溝口　　勲……277

残留多環芳香族炭化水素測定用試料としてのホルマリン保存臓器の有用性
……瀬戸　　博，長嶋　親治，加納　堯子……282

東京湾の環境汚染モニタリング調査（第５報）
昭和60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……286

メチル水銀毒性に対する補助栄養の影響
……関　比呂伸，加納　堯子，田村　行弘，深山　智代……290

慢性呼吸器疾患有症率に関連する要因の検討
……牧野　国義……296

空調ダクト内堆積粉塵の性状について（第３報）
……佐藤　泰仁，吉川　　翠，諸角　　聖，和宇慶朝昭……304

殺虫剤によるツメダニの予防効果（Ⅱ）
……吉川　　翠……309

東京のツツガムシ相（第３報）
町田市のツツガムシ病患者宅付近で捕獲したネズミにみられたツツガムシ類
……大野　正彦，吉川　　翠，林田　　陽，三井田建城，林　　績，福本　拓夫，中島　達也，
檜谷　哲夫，長良　健次，朝倉　幸子，佐藤　秀男，佐藤　　明，藤野　守正，鵜飼　恒治，
露木　眞澄，皆川　信一，橋本　憲一，池田　　誠，長田　好弘，高野　興三，吉岡　　毅……318

水道水中に観察された微細藻類
……渡辺真利代，笹野　英雄，村松　　学……323

皇居外苑濠の植物プランクトンⅠ
……渡辺真利代，土屋　悦輝……329

飲料用タンク水中の陰性桿菌 *Protomonas extorquens* の検出用選択培地に関する検討
……古畑　勝則，松本　淳彦……333

環境試料中の酢酸2-メトキシエチルおよび酢酸2-エトキシエチルの分析方法
……中川　順一，岡本　　寛，土屋　悦輝，笹野　英雄……343

報文Ⅴ　毒性に関する調査研究

オルトフェニルフェノール-ナトリウム（OPP-Na）投与ラット肝薬物代謝酵素の免疫学的研究
……牛山　慶子，長井二三子，佐藤かな子，中川　敦子，加納　いつ……349

オルトフェニルフェノール（OPP）腎障害における微細立体構造の走査電子顕微鏡的観察
……福森　信隆，佐々木美枝子……352

チアベンダゾール（TBZ）の蛋白への不可逆結合
……米山　允子，小縣　昭夫，藤谷　知子，安藤　　弘，久保　喜一，市川　久次……361

チアベンダゾールの幼若ラットに対する影響
……小林　博義，藤谷　知子，市川　久次……363

フィチン酸およびフィチン酸ナトリウムのマウスに対する急性毒性
……藤谷　知子，米山　允子，樺島順一郎，細川奈津子，市川　久次……368

フィチン酸ならびにフィチン酸ナトリウムのラットにおける経口急性毒性
……市川　久次，大石　真之，高橋　　省，小林　博義，湯沢　勝広，細川奈津子，橋本　常生……371

マウスを用いたフィチン酸の催奇形性試験
……小縣　昭夫，安藤　　弘，久保　喜一，佐々木美枝子，細川奈津子……377

ラットおよびマウスの血液凝固に対するパラセタモールの効果
……高橋　　省，市川　久次……382

Phenylphenols の培養細胞染色体への作用
……田山寿美子，市川　久次……388

サッカリンナトリウムのヒト由来株化細胞における突然変異原性について
……鈴木　英子……392

Light, Scattering（光散乱）法による溶血検査（Ⅲ）
無機水銀（Hg^{2+}）のヒトならびにウサギの溶血に対する差異
……市川　久次，小林　博義……394

細胞膜酵素（馬腎臓 Na, K-ATPase）のモノクローナル抗体（第3報）
モノクローナル抗体を含む腹水の作製と，腹水からモノクローナル抗体の精製
……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……401

種々薬物のプロテインキナーゼCにおよぼす影響
……中川　敦子，長井二三子，加納　いつ……405

酵素阻害機構の解明
—コンピューターによる酵素阻害の模擬実験—
……深野　駿一，市川　久次……408

クロム酸カルシウムと関東ロームの混合粉体のラットによる104週間吸入実験（第1報）
呼吸器系の病理組織学的観察
……坂本　義光，神谷　信行，池田　虎雄，佐々木美枝子……413

Salmonella typhimurium TA97，TA102を用いた食品添加物の変異原性試験（第2報）
……藤田　　博，佐々木美枝子……423

SPF ウサギ KBL：JW に関する基礎生理学的研究（第Ⅱ報）
体重増加，摂餌量，血液学および血清生化学データー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……431

都衛研毒性試験システムⅡ
……神谷　信行，中川　好男，三栗谷久敏，市川　久次，佐々木美枝子……438

著書及び他誌発表……445

学　会　発　表……453

CONTENTS

REPORTS I PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

Development of a Computerized Data-processing System
for Southeast Asian Medical Information Center
..... M. Tsuno, Y. Kudoh and M. Ohashi 1

Inhibitory Effects of Partial Freezing, Several Kinds of Condiments, Spices
and Seasonings on The Activity of *Anisakis* Type I Larvae Collected
from The Codfishes and Mackerels
..... I. Murata, S. Miyazawa, M. Kuni, Y. Nakajima, T. Sibuya and H. Nakanishi 13

Studies on Sterilization with Ozone Gas
..... Y. Kashiwagi, T. Ueta, Y. Tsuchiya, H. Ichikawa and M. Kazama 22

Incidence of Antibodies agaist Bordetella, pertussis among Healthy children
in Tokyo by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (1979～1986)
..... A. Abe, M. Shibata and M. Ohashi 28

Epidemiological Survey of Poliomyelitis in Tokoy. 1982～1986
..... Y. Hayashi, S. Sekine, T. Ando, K. Yabuuchi and T. Terayama 35

Two Selective Isolation Methods for *Pasteurella multocida* from Contaminated Materials
..... T. Maruyama, M. Kanzaki, T. Usami and H. Mizutani 42

Effects of Anticoagulants and Storage Temperature on Counting Blood Cells
..... K. Minowa, H. Oishi and C. Kobayashi 48

Estimation of Control Sera for Quality Control of Uric Acid
..... C. Kobayashi, H. Oishi and K. Minowa 53

Studies on Mass-screening Methods for the Neuroblastoma (IV)
Statistical Observanions of Influnce by Diet upon the Reading
of Urinary Vanillylmandelic Acid Spot Test
..... K. Bushimata, H. Takano, H. Hitokoto, M. Minegishi, H. Osada and T. Nagaoka 57

Studies on Mass-screening Methods for the Neuroblastoma (V)
Few Instances of False Positive Interference with the Detection
of Urinary Vanillylmandelic Acid by Spot test
..... K. Bushimata, H. Takano and H. Hitokoto 63

REPORTS II PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

Determination of NANDINAE FURUCTUS Component O-Methyldomesticine in Cough Medicine and Expectrant
Preparations by High-Performance Liquid Chromatography
..... T. Seto, I. Yasuda, T. Hamano, I. Takano and K. Akiyama 67

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Bergenin
in the Pharmaceutical Preparations without Official Approvals containing *Mallotus japonicus*
..... T. Hamano, I. Yasuda, T. Seto, I. Takano and K. Akiyama 73

Studies on Examination Method of *Epimedii Folium* Analysis of Flavonol Glycoside, Icariin by High Performance Liquid Chromatography
..... I. Takano, I. Yasuda, T. Hamano, T. Seto and K. Akiyama 80

Determination of Nonanonic Acid Vanillylamine in External Applications by Flame Thermionic Detector Gas Chromatography.
..... N. Miyatake, S. Shigeoka, K. Terashima, M. Nagashima and K. Akiyama 85

Determination of Scopolamine Hydrobromide in Antiemetics by Gas Chromatography
..... M. Takahashi, K. Nakayama, S. Uehara, K. Kamata, T. Hagiwara and K. Akiyama 89

Dimethylamination and Formation of Phosphate Derivatives with Hexamethylphosphoric Triamide
..... R. Takahashi, H. Seto, E. Shiokawa and K. Akiyama 93

Determination of Benzalkonium Chloride and Benzethonium Chloride in Cosmetics by High-Performance Liquid Chromatography
..... K. Ikeda, T. Amemiya, K. Ito, T. Kan, H. Nakamura and Y. Watanabe 101

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XX)
A Method for the Determination of Benzalkonium Chloride by Gas Chromatography
..... Y. Nakamura, M. Sakai, K. Mori, S. Suzuki and Y. Watanabe 109

Hygienc Chemical Studies on Household Necessities (XXI)
Analysis of Benzalkonium Chloride by Gas Chromatography of Alkylbenzylmethylamine Derived by Reduction with $LiAlH_4$
..... S. Suzuki, M. Sakai, K. Mori, Y. Nakamura and Y. Watanabe 116

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXII)
Contents of Ethanol and Benzalkonium Chloride Used as Antiseptic Agent in Commercial Wet Wipers
..... S. Suzuki, M. Sakai, K. Mori, Y. Nakamura, Y. Watanabe, Y. Mori and K. Tani 122

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXIII)
Analysis of *n*-Dodecylguanidine Hydrochloride Used as Sanitary Finishing Agent in Textile Goods by Gas Chromatography
..... M. Sakai, K. Mori, Y. Nakamura, S. Suzuki and Y. Watanabe 126

REPORTS III PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

Bacteriological Survey of Various Commercial Foods in Tokyo
..... H. Ushioda, H. Igarashi, H. Fujikawa and Y. Kudoh 133

Comparative Studies of Modified Rappaport Medium and Other Enrichment Media for Detection of *Salmonella* from Row Meat
..... J. Kusunoki and T. Itoh 139

The Incidence of *Staphylococcus aureus* in Food Handlers and Coagulase Types and Enterotoxin Producibility of the Isolates
..... Y. Irikura, N. Ikejima, I. Hirata and T. Arai, K. Kusunoki, M. Jin and K. Ohta 145

Trace Analysis of Volatile N-Nitrosamines in Human Milk
..... K. Mizuishi, M. Takeuchi, H. Yamanobe, Y. Watanabe, Y. Unuma and Y. Yamanashi.....150

Survey of Pollution with Bis (tributyltin) oxide (TBTO) in Fish and Shellfish (Ⅱ)
TBTO Content in Cultured and Inshore fishes and Shellfishes
..... M. Takeuchi, K. Mizuishi, H. Yamanobe and Y. Watanabe 155

Survey of Pollution with Bis (tributyltin) oxide (TBTO) in Fish and Shellfish (Ⅲ)
Monitoring of TBTO Pollution in Tokyo Bay
..... M. Takeuchi, K. Mizuishi, H. Yamanobe and Y. Watanabe 160

Content of Mercury and Selenium in Fish and shellfish
..... H. Yamanobe, M. Takeuchi, K. Mizuishi and Y. Watanabe 167

Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (XV)
Concentrations of Polychlorinated Biphenyl in Foods, Tablewares and Kitchenwares
..... T. Ueta, M. Takeuchi, K. Mizuishi, H. Yamanobe and Y. Watanabe 173

Basic Studies on Biological Detection of Residual Antibiotics in Food
..... R. Kiritani, K. Jinbo and M. Matsumoto 177

High-performance Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination
of Oxolinic, Nalidixic and Piromidic Acids in Eel
..... S. Horii, C. Monma and M. Matsumoto 182

An improvement on the Antibiotic Bio-assay Systems by Segregation of *Micrococcus luteus* mutants,
..... N. Kananishi, K. Jinbo and T. Hashimoto 185

Contents of Erucic Acid in Commercial Edible Oil and Fried Foods
..... K. Nakazawa, Y. Katsuki, M. Kammuri and T. Nishima 191

Simultaneous Determination of Cinnamic Acid and Preservatives in Food
by High Performance Liqued Chromatography
..... Y. Shimamura, F. Isikawa, H. Ogawa and T. Nishima 195

Simultaneous Determination of Preservatives by High Performance Liquid Chromatography
..... Y. Nishiyama, Y. Tamura, A. Ibe, M. Nakazato, H. Kamimura, S. Tabata,
H. Hashimota, K. Saito, K. Fujinuma and T. Nishima 198

Determination of Hydrogen Peroxide in Soft Drinkes Containing L-Ascorbic Acid
by Using a Sensitive Oxygen Electrode
..... Y. Kikuchi, K. Saito, M. Nakazato, K. Fujinuma and T. Nishima 203

Detection and Survey of Polysorbate in Imported Chinese Noodle Soup, Seasonings, Spices
and Natural Colors
..... Y. Tamura, A. Ibe, H. Hashimoto, H. Kamimura, Y. Nishiyama, S. Tabata,
K. Saito, M. Nakazato, Y. Kikuchi, K. Fujinuma, Y. Katsuki, M. Kammuri,
K. Nakazuwa, J. Suzuki, K. Yasuda, H. Ushiyama, H. Ogawa, Y. Shimamura,
F. Ishikawa and T. Nishima 209

Analytical Method and Survey of the Use of Phosphate in Vegetables and Potatoes
..... A. Ibe, Y. Tamura, H. Kamimura, Y. Nishiyama, S. Tabata, H. Hashimoto,
K. Saito, M. Nakazato, Y. Kikuchi, K. Fujinuma, Y. Katsuki, M. Kammuri,
K. Nakazuwa, J. Suzuki, K. Yasuda, H. Ushiyama, H. Ogawa, Y. Shimamura,
F. Ishikawa and T. Nishima 216

Survey of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits
(1986.4~1987.3)
..... T. Nagayama, T. Maki, K. Kan, M. Iida and T. Nishima 222

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toxicants in Tokyo (IV)
—1986—
..... T. Maki, K. Kan, T. Nagayama, M. Iida and T. Nishima 229

Inhibition of lipase activity by pectin
..... M. Koseki, K. Tadano, T. Yasuno, S. Ogino and M. Kazama 233

Biological Effects of Ingested Asbestos Fibers (II)
Migration to Blood and some Organs in Rats
..... S. Ogino, N. Fukumori, T. Yasuno, M. Koseki, M. Sasaki and M. Kazama 235

Determination of Aromatic Amines in Tartrazine and Sunset Yellow FCF
by High Performance Liquid Chromatography
..... M. Hirokado, K. Nakajima, Y. Uematsu, I. Takahashi, K. Matsui and M. Kazama 239

High Perfomance Liquid Chromatographic Determination of Impurities
in Amaranth, New Coccine and Sunset Yellow FCF
..... Y. Uematsu, M. Hirokado, K. Nakajima, I. Takahashi, K. Matsui and M. Kazama 245

Nutritional Components in Pods of New Cultivar Winged Bean
(Psophocarpus tetragonolobus) "Urizun"
..... M. Iguchi, N. Kikutani, T. Tomomatsu, M. Doguchi,
M. Urano, M. Yamashita and K. Ozuwa 253

Seasonal Variations of Fatty Acid Composition and Tocopherol Contents of Horse Mackerel
..... K. Funayama, F. Ushio, T. Tomomatsu and M. Doguchi 257

Determination of Titanium Dioxide in Foods
..... E. Amakawa, K. Ohnishi and M. Nishijima 262

REPORTS IV PAPERS CONCERNING ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

Decreased Superoxide Anion Production in Alveolar Macrophages
of Rats Exposed to Diesel Engine Exhaust
..... T. Suzuki, S. Ikeda and T. Konoh 267

Detection of Mutagenic Compounds in the Urine of Mice administered
Pyrene under Exposure to NO_2
..... M. Fukuda and K. Kanoh 273

Urinary Hydroxyproline : Creatinine Ratio
— Effects of Meal, Exercise and Urinary Sampling Times—
..... S. Ikeda, M. Ohsawa, T. Suzuki, T. Kanoh and I. Mizoguchi 277

Availability of Formalin-Fixed Lung as a Sample for Determination
of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Residues
..... H. Seto, C. Nagashima and T. Kanoh 282

Survey of Chemical Pollutants in Biota from Tokyo Bay (V)
Residue Levels in Japanese Sea Bass and Gull in 1985
..... H. Seto and T. Kanoh 286

Effects of Supplementary Nutrition on Methylmercury Intoxication of Rats
..... H. Seki, T. Kanoh, Y. Tamura and T. Miyama 290

A Study on Factors related to Prevalence of Chronic Respiratory Diseases
..... K. Makino 296

Properties of Accumulated Dusts in Air-conditioning Duct (III)
..... Y. Sato, M. Yoshikawa, S. Morozumi and T. Wauke 304

Prevention of Cheyletid Mite Breeding by Treatment with Insecticides on Tatami-mats in a Concrete Apartment Building (II)
..... M. Yoshikawa 309

Trombiculid Mites of Tokyo (III)
Trombiculid Mites from Rodents Captured near the House where a Case of Tsutsugamushi Disease Occurred in Machida City
..... M. Ohno, M. Yoshikawa, Y. Hayashida, T. Miida, I. Hayashi, T. Fukumoto, T. Nakajima, T. Hinotani, K. Nagara, Y. Asakura, H. Sato, A. Sato, M. Fujino, T. Ukai, M. Tsuyuki, S. Minagawa, K. Hashimoto, M. Ikeda, Y. Osada, K. Kohno and T. Yoshioka 318

Microalgae Observed in Tap Waters
..... M. F. Watanabe, H. Sasano and M. Muramatsu 323

Phytoplankton in Outer Moats around the Imperial Palace
..... M. F. Watanabe and Y. Tsuchiya 329

A study on a Selective Medium for the Isolation and Enumeration of Gram-Negative Rod Bacterium *Protomonas extorquens* from Drinking Tank Water
..... K. Furuhata and A. Matsumoto 333

Determination of 2-Methoxyethyl Acetate and 2-Ethoxyethyl Acetate in Environment
..... J. Nakagawa, Y. Okamoto, Y. Tuchiya and H. Sasano 343

REPORTS V PAPERS CONCERNING ON TOXICOLOGY

Immunochemical Studies of Hepatic Drug Metabolizing Enzymes in Rats Administrated OPP-Na
..... K. Ushiyama, F. Nagai, K. Satoh, A. Nakagawa and I. Kano 349

Scanning Electron Microscopic Observations of Three Dimensional Architecture of *o*-Phenylphenol (OPP) -Kidney Damage in Rats
..... N. Fukumori and M. Sasaki 352

Irreversible Binding *in vitro* of Thiabendazole to Microsomal protein of Liver in Pregnant Mice
..... M. Yoneyama, A. Ogata, T. Fujitani, H. Ando, Y. Kubo and H. Ichikawa.....361

Effects of Thiabendazole on Infant Rats
..... H. Kobayashi, T. Fujitani and H. Ichikawa 363

Acute Toxicity of Phytic Acid and Sodium Phytate to Mice
..... T. Fujitani, M. Yoneyama, J. Kabashima, N. Hosokawa and H. Ichikawa 368

Studies on Acute Oral Toxicities of Phytic Acid and Sodium Phytate in Rats
..... H. Ichikawa, S. Ohishi, O. Takahashi and H. Kobayashi, K. Yuzuwa, N. Hosokawa and T. Hashimoto 371

Teratological Studies of Phytic Acid in ICR Mice
..... A. Ogata, H. Ando, Y. Kubo, M. Sasaki and N. Hosokawa 377

The Effect of Paracetamol on Blood Coagulation in Rats and Mice
..... O. Takahashi and H. Ichikawa 382

Effects of Phenylphenols on Chromosomes in CHO-Kl Cells
..... S. Tayama and H. Ichikawa 388

Mutagenicity of Sodium Saccharin in a Human Clonal Cell Line
..... H. Suzuki 392

Hemolysis Test by Light Scattering Method (III)
Difference of Hemolysis in Human and Rabbit by Inorganic Mercury (Hg^{2+})
..... H. Ichikawa and H. Kobayashi 394

Monoclonal Antibody to Horse Kidney Na, K-ATPase (III)
Production of Ascitic Fluid Containing Monoclonal Antibodies and Purification of Monoclonal Antibodies from Ascitic Fluid
..... K. Satoh, F. Nagai, K. Ushiyama, A. Nakagawa, I. Kano, H. Ichikawa and T. Nakao 401

Effects of various chemical compounds on Rat Brain Protein Kinase C
..... A. Nakagawa, F. Nagai and I. Kano 405

Mechanisms of Enzyme Inhibitions
Simulation of Enzyme Inhibitions by Microcomputer
..... S. Fukano and H. Ichikawa 408

Inhalation Experiment of Calcium Chromate mixed with Kanto Loam on Rats for 104 weeks (I)
Histopathological Observation of Respiratory System
..... Y. Sakamoto, N. Kamiya, T. Ikeda and M. Sasaki 413

Mutagenicity Test of Food Additives with *Salmonella typhimurium* TA97 and TA102 (II)
..... H. Fujita and M. Sasaki 423

Studies on the Physiological Porameters of the SPF Rabbit (KBL : JW) (II)
Body Weight Gain, Food Intake and Blood Components in one year of age
..... S. Hayashida, H. Kobayashi, S. Iiguchi and H. Ichikawa 431

Computer System used for Toxicological Study at Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
..... N. Kamiya, Y. Nakagawa, H. Mikuriya, H. Ichikawa and M. Sasaki 438

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS.....445

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS.....453

報　　文　I

感染症等に関する調査研究

REPORTS　I

PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 1-12, 1987

パーソナルコンピュータを用いた腸管感染症検査室情報処理・解析システムの開発

津野正朗*, 工藤泰雄*, 大橋誠*

Development of a Computerized Data-processing System for Southeast Asian Medical Information Center

MASAAKI TSUNO*, YASUO KUDOH* and MAKOTO OHASHI*

keywords：情報処理システム information system, 感染症 infectious diseases, パーソナルコンピューター personal computer, データベース data base

我が国では各種の国際協力事業が行われているが，財団法人日本国際医療団においては，1971年以降，その事業の一環として，東南アジア主としてASEAN諸国（インドネシア，マレーシア，フィリピン，シンガポール，タイ）および日本の間で保健医療に関する情報を交換することによって，それぞれの国における保健医療計画の向上に役立てようとする，東南アジア医療情報センター（SOUTHEAST ASIAN MEDICAL INFORMATION CENTER；「SEAMIC」と略）活動が行われている．このSEAMICは，「物」いわゆるハードウエアを通じての二国間協力或いは援助ではなく，保健医療に関する情報，すなわちソフトウエアを通じての他国間国際協力をめざすものである．保健医療には基礎から応用まで多彩なテーマが包含されるが，SEAMICにおいてはその活動をできるだけ効率的に行うために，現在のところいくつかのテーマを重点的に取り挙げている．その一つが，感染症，特に腸管感染症である．そして，感染症防疫対策には患者発生情報に加えて，患者から分離される病原体に関する精密な検査室由来情報が不可欠であるという考え方から，関係各国間でこれに係わるデータを交換し利用し合おうという事業を実施してきた．すなわちData Exchange Program on Infectious Diseases, SEAMICである．

本事業は1978年に開始され，収集されたデータは年報としてまとめられてきたところであるが，このたびこの事業を更に円滑に実施するため，またこの事業で取り扱う情報を参加各国内でより有効に効率よく使用するために，分離病原体情報管理用データベースを開発することになった。以下にそのシステムの概要を記載する．開発したシステムは，事業の名称を略して「DEPIDs」と称される．

請求要件（Requirments）

「DEPIDs」の開発にあたって呈示された主な請求要件は，次のとおりである．

- 本システムは，感染症（主に腸管感染症）由来の分離病原体（菌株）情報管理用のデータベースとし，専らSEAMIC事業参加各国のカウンターパート・ラボラトリーにおいて使用する．主要取扱情報は，分離病原体の同定成績（菌種・菌型等）および薬剤（抗菌剤）感受性試験成績である．
- 使用するハードウエアは，検査室内に設置して使用できる程度のサイズのもので，日本および加盟各国において入手可能なものとする．
- 収録予定件数は，各カウンターパート・ラボラトリーによって年間約200～10,000件とまちまちであるので，最大収録件数を5桁に設定する．
- 将来のバージョンアップを配慮し，システムはハードおよびソフトウエア共に各国において共通のものを使用することを原則とし，データファイルの構造およびデータフォーマット（カラム構成）も同一デザインとする。ただし，収集情報が参加各国それぞれによって多少異なるという事情を配慮し，入力作業時の余分な手間をできるだけ省けるよう対策を講ずる．
- プリントフォームの出力は，各国において使用する台

*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

帳類の他に，収録されたデータをSEAMIC出版物として記録に止めるための年報作成用集計フォームを用意する．

- 本システムは専ら検査担当者自身の手によって操作・運用される予定であるので，コンピュータに関する専門的な知識や技術の研修・習得を要さずに運用できるようにすると共に，できるだけ平易な用語で書かれた英文マニュアルを添付する．

ハードウエア

本システムの開発には，取り扱い情報の量などの面から検討した結果，ハードウエアは，NECのPC9800vm 2クラス相当機種と決定した．

しかし機種の選定は以下のような事情により難行した．

国際的な感染症サーベイランスの分野では，WHO（世界保健機構）関係プロジェクトにおいてはIBM社製のハードウエアが使われている背景もあり，同社系製品が最有力候補であった．すなわち当初は，IBMの5540あるいは5550などが候補に挙げられた．またIBMデータコンパチブル機ということで，NECのAPC Ⅲなども挙げられた．しかし，前者はコストの点で，また後者は（俗に「IBMコンパチブルな98」とも呼ばれたことがある機種ではあるが）他機種とのコンパチビリティが乏しい点で，それぞれ最終選定には至らなかった．これらに代わって選ばれた機種は，NECのPC9801vm2E（いわゆる「海外向仕様のPC9801vm2」）である．同機は，IBMコンパチブル機ではないが，SEAMIC事業参加各国で比較的容易かつ安価に購入出来，しかも，国内向PC9801vm2と比較して，わずかな機能の差異は認められるものの，ほぼ完全にコンパチブルな仕様となっている．このため，著者らが過去に関連領域で開発した各システムのアプリケーションプログラムのアルゴリズムやサーブルーチンを利用できる点において有利であった．

その他に必要な周辺機は，高解像のカラーディスプレイと24ピンタイプのドットマトリクスプリンタである．

著者らがシステム開発に使用した主要ハードウエアは，NECのPC9801vm2（640K RAM搭載；国内向仕様機）である．

ソフトウエアの開発方法

本システムの開発に使用したDOS（ディスク・オペレーション・システム）は，国内向MS-DOS（NEC/Microsoft）Ver 3.1，および，NEC海外コンピュータ事業推進本部販売促進部の御好意により拝借した英語版MS-DOS Ver 3.1である．

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各種の情報管理・処理システムの開発を行ってきたが，これらのシステムは，各々対象事業，取扱情報，あるいは性格，規模を異にする諸情報を対象として開発されたものである．そして，それらの各専用ソフトウエアの開発を通じて，同領域における情報管理システムの代表的なモデル（情報の入出力および処理等に関する基本的な考え方）をひと通り体験することとなった．したがって本システムの開発においては，それらの各システム用ソフトウエアの開発を通じて蓄積されたアルゴリズムやサブルーチン，さらには，コード番号や略号などをできるだけ応用または流用することができた．それらを列記すれば以下のとおりである．

1．MRFC（1983年）[1]：海外渡航者下痢症例を対象とした本所微生物部担当業務の1つ「海外旅行者健康診断」に係わる検査材料および被検者情報ならびに検査成績の管理用データベース．検査材料単位で情報を取り扱うシステムであり，各々の検査結果の陽・陰性を問わず各被検者の詳細な情報の収録を行う．

2．IRFC（1984年，未発表）：海外渡航者由来分離菌株情報管理用データベース．分離菌株単位で菌株情報およびその附帯情報の管理を行う．主要情報源は「MRFC」用のデータディスクであり，同ディスクから自動的に病原菌陽性例を検索し，これを検出菌種別に分類して各々の菌株ファイルを作成する．各ファイルには既に，「MRFC」用のデータディスクから転送された諸情報が収録されており，これに各菌株ごとに，型別，抗菌剤感受性およびその他の試験成績を追加入力することによって取扱情報が満たされる．

3．MDAシリーズ（1984年以降）[2]：「MRFC」用データ解析システム．主に海外渡航者の訪問国別病原菌検出状況などを詳細に解析する．

4．MERT（1985年）[3]：東京都・特別区の保健所および関係検査機関における微生物検出状況を月・年報として集約する「東京都微生物検出情報」用のデータベース．月別・検査機関別の検査総件数および病原微生物の検出例数（種別，群別，菌型別等の検出例数）を取り扱うもので，個別の情報は入力されない．

5．TFSJ（1985年）[4]：腸チフス・パラチフス発生情報管理用データベース．全国における同疾患の発生状況を患者あるいは保菌者に関する情報を報告例単位で管理するもので，集団発生・流行事例・再発事例などについての検索・解析が可能である．患者あるいは保菌者の個人的特性情報が入力されることを特徴とする．

DEPIDsの開発は，これらの各システム開発と同様に，

前記データ交換事業専用のソフトウエアを開発するという方針で行った.

各プログラムの開発は，まずMS-DOS上のN88BASICインタプリタ（"N88BASIC. EXE"）を利用してソースプログラム（ファイル名："●●●●●●. N88"）を作成し，これをN88BASICコンパイラ（"BASICC. COM"）でコンパイル処理してオブジェクトプログラム（ファイル名："●●●●●●. EXE"）を得るという手順で行った．その際，必要に応じて，前述のような既存自家製ソフトウエア中で用いた略号，コード番号，サブルーチン等の一部を利用した．なお，得られたオブジェクトプログラムの実行に際しては，N88BASICラン・タイム・サポーター（"N88BASIC. LIB"）を用いた.

システムおよびファイルデザイン

本システムは，基本的にはランダムデータベースとしてデザインし，システム専用ディスク（DEPIDsシステムディスク）および取扱情報の記憶専用ディスク（DEPIDsデータディスク）を各々別途に作成した.

前者のシステムディスク（各国共通）は，MS-DOSの「FORMAT B : /S」命令によるシステムファイル（"IO. SYS", "MSDOS. SYS"および"COMMAND. COM"の各ファイル）付きのフォーマットを施したフロッピーディスクを用い，これに各アプリケーションプログラム（オブジェクトプログラム）を収録して得た.

一方，後者のデータディスクは，「FORMAT B :」命令によるフォーマット処理（システムファイルなし）を施したフロッピーディスクを使用した．記憶用メディアとしては，5インチ2HD（Double-side, High-density, Double-track）タイプのフロッピーディスクを採用した.

システムディスクは，専らアプリケーションのみを利

表1．メインデータファイルの入力情報一覧

入力事項	項目割当	内　　容	割当バイト数（内訳）	変数割当
菌株番号等	年　号	西暦年号の下2桁	11(4N)	YE (1)
	番　号	年別菌株番号(1～999999,自動ナンバリング方式)	(6N)	NW(1)*
菌種別等	菌種番号	コード番号(1～95)　〔表2参照〕	16(2N)	NW(2)
	菌種名	菌種名等を文字入力　〔表2参照〕	(14A)	AW(1)
菌型等	特性等	(必要な菌種についてのみ)　〔表3参照〕	37(12A)	AW(2,3)
	菌型(血清型)等	(同上)　〔表4参照〕	(25A)	AW(4)
薬剤感受性試験成績（15剤）	薬剤名	4文字以下の略号(TC, SMなど)	120(4A×15)	AA(1～15)
	M. I. C.	コード番号(TFSJ98M用コードを流用)	(2N×15)	NM(1～15)
	阻止円径	直径の実測値(mm単位)	(2N×15)	ND(1～15)
分離年月日	分離年	西暦年号4桁(1601～3199)	8(4N)	NW(5)
	分離月	月番号(1～12, 不明＝13)	(2N)	NW(4)
	分離日	日付(1-31, 不明＝32)	(2N)	NW(3)
検査材料	材料別	由来：ヒト,動物,食品,環境　〔表5参照〕	7(7A)	AW(5)
被検者・氏名	氏　名	氏名(ヒト以外の場合は材料名等)	25(25A)	AW(6)
被検者区分	患者・保菌者等の別	2文字の略号(Pa,Pc,Hcなど)	2(2A)	AW(10)
被検者・年齢	年　齢	満年齢(0～97, 98以上＝98, 不明・無＝99)	2(2N)	NW(6)
被検者・性別	性　別	男女の略号(男＝M,女＝F,不明＝？)	1(1A)	AW(7)
地域	地域番号(1)	各国で任意に割り当て(Region等)	8(4N)	NW(7)
	地域番号(2)	同上(District等,ただし必要な場合のみ利用)	(4N)	NW(8)
混合感染-印	菌株番号	最初に登録した同時検出菌株の番号	6(6N)	NW(9)
輸入事例-印	メ　モ	"OvS"の文字(または,地域あるいは国名の略号入力可)	5(5A)	AW(8)
集団事件-印	事件名	"Outbreak"の文字(または,集団事件名の文字)	10(10A)	AW(9)

注：割当バイト数の内訳表示は，「N」が数値，「A」が文字情報であることを示す.

＊：Record-No. と共通の値であるので，データディスクには収録しない.

用するユーザーを配慮して，自動実行バッチファイル（"AUTOEXEC. BAT"）を設け，システムブート時のバッチ処理による自動起動化を計った．各アプリケーションプログラムはメインメニュープログラム（"MENU01. EXE"）と「CHAIN」コマンドで相互に連結し，起動後のシステムがメインメニューを中心に円滑に運用できる構造とした．ただし，ディスクの初期化やバックアップを行うユーティリティーは，MS-DOS のコ

表2．取扱病原体および割当コード番号一覧

Salmonella	（コード番号＝01）
S. dysenteriae	（コード番号＝02）
S. frexnerii	（コード番号＝03）
S. boydii	（コード番号＝04）
S. sonnei	（コード番号＝05）
E. coli	（コード番号＝06）
Y. enterocol.	（コード番号＝07）
Y. pseudotuber.	（コード番号＝08）
Yersinia spp.	（コード番号＝09）
V. cholerae 0-1	（コード番号＝10）
V. cholerae NAG	（コード番号＝11）
V. mimicus	（コード番号＝12）
V. fulviaris	（コード番号＝13）
V. furnissii	（コード番号＝14）
V. parahaemoly.	（コード番号＝15）
V. vulnificus	（コード番号＝16）
Vibrio spp	（コード番号＝17）
A. hydrophila	（コード番号＝18）
A. soburia	（コード番号＝19）
Aeromonas spp.	（コード番号＝20）

P. shigelloides	（コード番号＝21）
C. jejuni	（コード番号＝22）
C. coli	（コード番号＝23）
Campylo. spp	（コード番号＝24）
S. aureus	（コード番号＝25）
C. perfringens	（コード番号＝26）
C. botulinum	（コード番号＝27）
B. cereus	（コード番号＝28）
……（予備コード番号＝29～50）	
E. histolytica	（コード番号＝51）
G. lamblia	（コード番号＝52）
Cryptosporid.	（コード番号＝53）
C. philippine.	（コード番号＝54）
……（予備コード番号＝55～60）	
Rota virus	（コード番号＝61）
……（予備コード番号＝62～93）	

注：上に挙げた各病原体名の情報は，オペレーターが該当コード番号を入力し，データファイルにコード番号（2桁）および病原体名（14文字以内）が同時に収録される方式で取り扱い，オペレーターの労力の削減を計る。ただし，コード番号の割り当てがなされていない病原体名の入力を要する場合は，14文字以内の直接文字入力を許す．

V. vulnificus は，下痢症を起こす病原菌ではないが，その他の下痢原性病原ビブリオとの鑑別を要する細菌であるので，取扱病原体の中に加えた．

表3．菌型等特性情報の入力内容

菌　　種	入　力　内　容　（文字変数；5A＋7A）
Salmonella	O群（A,B,C_1…；Subspecies-1は文字,他は Subspecies 番号のみ）*
E. coli	病原性分類（EPEC, EIEC, ETEC, EHEC, OTHER を文字で）
	病原因子試験項目・成績（EIEC の組織侵入性"Inv"を「＋」，「－」で）**
	（ETEC の毒素産生性"L","S"を「＋」，「－」で）**
	（EHEC の細胞毒性"Cyt"を「＋」，「－」で）**
V. cholerae 0-1	生物型（eltor, cholerae, Unknown）*
V. parahaemoly.	耐熱性溶血毒素産生性（耐熱性溶血毒産生性"Hem"を「＋」，「－」で）**
C. botulinum	毒素型（A,B,C,D,E,F,G）*
S. aureus	毒素型（A,B,C,D,E）*

＊　：Not tested は「NT」，Untypable は「UT」と入力する．

＊＊：Not tested は「・」と入力する．

表4．菌型情報の特性等入力内容

菌　　種	入 力 内 容 (文字変数；25A)
Shigella	血清型 (文字および番号)*
Salmonella	血清型 (Subspecies-1のみ)*
	(S. typhi については，H抗原"Z_{66}"の有無を「＋」，「－」で)**
	(S. typhi, S. paratyphi-A, -B については，ファージ型を)*
E. coli	血清型 (O,H,K および番号)*
V. cholerae 0-1	血清型 (Inaba, Ogawa)*
V. parahaemoly.	血清型 (O,K および番号)*

＊ ：Not tested は「NT」，Untypable は「UT」と入力する．
＊＊：Not tested は「・」と入力する．

表5．検査材料別情報の入力内容

材 料 別	入 力 内 容 (文 字)
ヒ　　ト	Stool, Blood, Urine, Pus, Marrow, Gall の文字
動　　物	Animal の文字
食　　品	Food の文字
環　　境	Environ の文字
不　　明	Unknown の文字

注：上に挙げた各材料別情報は，オペレーターが該当コード番号を入力し，それぞれの内容が文字で収録される．ただし，その他の場合は，7文字以内の直接文字入力を許す．
例：Tissue　(Tissue)
　　C.S.F.　(cerebrospinal fluid, CS fluid)
　　Sputa　(Suputa)

表6．サブファイルの入力情報一覧

入力事項	項目割当	内　　容	割当バイト数 (内訳)	変数割当
ディスクの識別情報	国　　名	英語の国名	15(15A)	AI (1)
	割当年次	西暦年号4桁(1601～3199)	4(4N)	YE (1)
ボリューム番号 (Vol.-No.)	当該 No.	1～99の数値	4(2N)	NV
	最終 No.	1～99の数値	(2N)	CV
情報入力時の環境設定パラメータ	下記の各情報の「入力(＝1)/パス(＝0)」指定 分離菌株の特性に関する情報： 大腸菌の病原因子(EIEC の Inv, ETEC の L および S, EHEC の Hem) 腸炎ビブリオの病原因子および型(Hem および O, K) 黄色ブドウ球菌の毒素型，ボツリヌス菌の毒素型， 腸チフスおよびパラチフスのファージ型 薬剤感受性試験成績：MIC(最小発育阻止濃度)，発育阻止ゾーン径 その他：氏名，年齢，性別，所轄サブコード番号		20 (1N×20)	AE(1)～AE(20)

マンドモードから外部コマンドを直接利用する方式とした.

データディスクは，上述のフォーマット処理を行った後，さらにDEPIDsに使用するための専用化処理（使用年次の限定を含む）を要する．この処理はDEPIDsシステムディスクに収録されたアプリケーションプログラムの1つを呼び出して行う．その際，データディスク上には，以下に述べる複数のデータファイルの内，サブファイルのみが開設される．すなわち，データディスク上には，メインおよびサブ，合計2種のデータファイルを開設した.

メインファイル（ファイル名："DEP-F 1. BAS"）は，専ら分離病原体およびその他の関連情報を記憶するファイルとし，分離株単位で各株（1件）用に256バイトを割り当てて，これを1レコードとした．データディスクの記憶容量は，1枚のディスク当たり3,000レコードに制限した．ただし，年間の入力件数が3,000件を越える毎に，次のボリュームのデータディスクを追加開設できる方式とした．この方式によるボリュームの追加限度は99であり，これを記憶容量に換算すると，年間合計297,000件までの入力が許容されることになる.

メインファイルの取扱情報は，表1のとおりである．これらの内，病原体コード番号，年月日，年齢，薬剤感受性試験における発育阻止円の直径，地域コード番号などの入力情報については，キー入力した数値をそのままの形でデータファイルに記憶する．しかし，病原体名，由来，被検材料，患者の性別，薬剤感受性試験における供試薬剤（略号）および各々の薬剤に対する最少発育阻止濃度などの入力は，同様のキー操作によって行うが，各コード番号は入力作業の簡素化のために割り当てられたものであり，データファイルに記憶されるのは該当する文字情報のみである.

ファイルの記憶情報を文字にすることによって，一方で情報の検索能率等の低下を招くが，他方，コード番号の割り当てがなされていない情報（例えば新しい病原体など）入力の必要が生じた場合には，即座にかつ柔軟に対応できる点で有利である．本システムにおいては，できる限りこの利点を優先してファイルデザインを行った.

また，特性等（表3）および菌型等（表4）情報収録用に割当られた各カラムは，病原体の種類に応じてその分割状況や入力内容が変化する，いわゆるフレキシブル・カラムとしてデザインした．例えば，入力する病原体がチフス菌であった場合，菌種名は「Salmonella」と収録されて，特性等のカラムにはサルモネラのO群「09（D1）」，菌型等のカラムには血清型「bioser Typhi」に加えて鞭毛抗原Z66の有無およびファージ型別成績がそれぞれ記憶される．また，これに対して病原体が赤痢菌の場合には，後者のカラムにその血清型が入力されるだけで，前者は使用されない．また，病原体が大腸菌である場合は，前者に病原性からみた分類のみならず各々の病原因子の試験項目と成績が入力でき，後者には血清型（O:, K:, H:）が，それぞれ入力される.

サブファイル（ファイル名："DEP-ID. BAS"）には，システム名，国名，年次，入力環境設定用のパラメーター，ディスクのボリューム管理番号等を収録した．サブファイルに記憶される情報は表6のとおりである．このサブファイルは上に述べたデータディスクの専用化処理に際して自動的に開設される.

プリントフォームのデザイン

プリントフォームの出力は，各国において使用する台帳類3種（Form-A ～ C），および，SEAMIC東京へ年報編集のため送付する年報作成用集計フォーム14種（Table 1～14）を，それぞれ用意した.

台帳用の各フォーム（出力例1参照）は，データディスク単位で出力する．同一ディスクに収録された情報については，その全部または一部分を指定し，あるいは，限定出力用のパラメータによって（同時に複数の条件を設定可）に該当するレコードのみを出力することもできる．限定指定は，病原体の菌種・特性・菌型等別，分離月別，検査材料別，患者・保菌者別，年齢階層別，性別，エリアコード番号別，輸入事例，集団事例，混合感染事例に対して可能である．ただし，台帳類の出力は，データディスク単位で行うので，2枚以上のディスク（2つ以上のボリューム）に収録された情報を連続出力することはできない.

これに対して，集計フォーム（Table）は，何れも年次単位で集計結果を出力する．すなわち，同一年次の情報が2枚以上のディスクに収録されている場合は，オペレータにデータディスクの入れ替えを順次促しながら集計作業が進行し，同作業終了後にTableフォームを出力する．この際にも，台帳類の出力の場合と同様に，限定出力用のパラメータに従って，特定条件（同時に複数の条件を設定可）に該当するレコードのみを集計することができる．出力フォームの例を図1～5に示した.

オペレーション

DEPIDsシステムディスクには自動起動化処理が施されており，システムの起動は極めて簡単である.

まず，ドライブA（または1）に「DEPIDsシステム

DEPIDs (DATA EXCHANGE PROGRAM ON INFECTIOUS DISEASES, SEAMIC)

St-No. 87- (Code)	● Pathogen (type and other data) / Date isol. /Area No./ Name (Age·Sex) / Source / [Pa·Pc] / (OvS·Outbreak) / Mixed infect.	Results of Antibiotics Sensitivity Test: M.I.C. value ····· (upper line) / Diameter of definit inhibition zone (mm) ····· (lower line)														
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15
1	Salmonella O9(D1) bioser Typhi Z66+ (53-1)	CP	TC	SM	ABPC	ST	KM									
(1)	1/ 1/1987/ 101· /Linda Mandel (38·F	NT	NT	NT	NT	NT	NT									
	Blood [Pa] ([OvS]·Abott-Inn) refer:	15	17	15	13	16	21									
4	E.coli EIEC Inv:+ O:28ac H:NT K:73	CP	TC	SM	ABPC	ST	KM									
(6)	2/ 1/1987/ 101· /Daniel Houston (36·M	NT	NT	NT	NT	NT	NT									
	Stool [Hc] (·JB-hosp.) refer:	15	16	13	16	15	15									
5	P.shigelloides	CP	TC	SM	ABPC	ST	KM									
(21)	2/ 1/1987/ 101· /Daniel Houston (36·M	NT	NT	NT	NT	NT	NT									
	Stool [Hc] (·JB-hosp.) refer: 4	18	10	17	12	15	19									
7	E.coli EIEC Inv:+ O:28ac H:NT K:73	CP	TC	SM	ABPC	ST	KM									
(6)	3/ 1/1987/ 100· /C. B. Gozett (29·M	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25									
	Stool [Pa] (·JB-hosp.) refer:	18	17	18	18	17	19									
9	S.dysenteriae 2	CP	TC	SM	ABPC	ST	KM									
(2)	4/ 1/1987/ 105· /R. R. Davis (50·F	NT	NT	NT	NT	NT	NT									
	Stool [Pa] (·) refer:	10	12	9	10	9	13									
12	Salmonella O4(B) Schwarzengrund	CP	TC	SM	ABPC	ST	KM									
(1)	5/ 1/1987/ 107· /B. J. Martin (27·M															
	Stool [Pc] (·) refer:	7	18	17	16	17	18									

Printed out on 18/05/1987 DEPIDs' Form-A (Data-disk : Japan , 1987, Vol. 1)

DEPIDs (DATA EXCHANGE PROGRAM ON INFECTIOUS DISEASES, SEAMIC)

St-No. 87-	Pathogen (type and other data)	Date isolated on	Area No. Main·sub.	Source data: Specimen	Age	Sex	Pa/Pc/Hc	[OvS]·[Outbreak]	Mix. infec. (refer:)
1	Salmonella O9(D1) bioser Typhi Z66+ (53-1)	1/ 1/1987	101· 0	Blood	38	F	P.acute	[OvS]·Abott-inn	
4	E.coli EIEC Inv:+ O:28ac H:NT K:73	2/ 1/1987	101· 0	Stool	36	M	Carrier	·JB-hosp.	
5	P.shigelloides	2/ 1/1987	101· 0	Stool	36	M	Carrier	·JB-hosp.	4
6	Shigella Memo:agg. A-3,C-3	2/ 1/1987	101· 0	Stool	??	M	Unknown	·	
7	E.coli EIEC Inv:+ O:28ac H:NT K:73	3/ 1/1987	100· 0	Stool	29	M	P.acute	·JB-hosp.	
11	Salmonella O2(A) bioser Paratyphi-A (1)	5/ 1/1987	108· 0	Blood	??	M	P.conv.	·	
12	Salmonella O4(B) Schwarzengrund	5/ 1/1987	107· 0	Stool	27	M	P.conv.	·	
22	V.cholerae NAG	15/ 1/1987	32· 0	Stool	42	F	P.acute	[OvS]·	
23	V.cholerae O-1 eltor Ogawa	16/ 1/1987	32· 0	Stool	42	F	P.acute	[OvS]·	22
29	Salmonella O9(D1) bioser Typhi Z66· (UVS1)	26/ 1/1987	23· 0	Stool	49	M	Unknown	·	
30	Salmonella O9(D1) bioser Typhi Z66- (UVS3)	28/ 1/1987	23· 0	others	58	M	P.acute	·	

Printed out on 18/05/1987 DEPIDs' Form-B (Data-disk : Japan , 1987, Vol. 1)

図1 **Activity-3** によるプリントフォーム出力例（Form-A および-B）
いずれも試験運用用のサンプルデータディスク（日本用，1987年，Vol.1）を用いて出力した．

- 1ページ当たりの出力件数は，Form-A で12件，Form-B で30件である．
- 各ページ毎に，出力年月日，システム名，フォーム名，および用いたデータディスクの種類（国名，年次，ボリューム番号）が印字される．限定出力用パラメーターが入力された場合は，同じ行の端に＜Selected＞と印字される。ただし上の例はいずれも限定なしの出力である．
- St-No.（菌株番号）4，5および22，23は混合感染例，St-No.4，5，7は同一集団事例由来，St-No.22，23は，海外輸入例由来である．

ディスク」を，ドライブB（または2）に「DEPIDsデータディスク」を，それぞれ装填し，電源スイッチまたはリセットボタンを操作する．MS-DOSシステムの起動後は，自動実行バッチファイル（"AUTOEXEC.BAT"）を参照し，アプリケーションプログラム"CAX-UNI"によるシンボル画面の表示を経て，本システムのメインメニュー（Activity Menu）に至る．

システムのオペレーションは，このメインメニューを中心に行う．各Activityへの分岐後は，ファンクションを指定し，必要に応じて各種パラメーターを入力して，目的の作業を行う．このような一連のオペレーションは，専ら，オペレーターとシステムのCRT画面表示との対話形式で行われ，指定された作業が終了すると，再び元のメインメニュー表示に戻る．この際，オペレーターは，0～9のテンキーおよびリターンキーの操作によって，極一部（文字キー操作を要する患者氏名の入力等）の例外を除き，大旨目的を果たすことができる．以下，本システムにおける各Activityの主要ファンクションについて述べる．

Activity-1 は，情報の入力／訂正を行う．入力作業は段階的に行われるが，次に述べるActivity-2によって入力環境設定用パラメーターが「skip（=0）」と設定された項目については入力ステップは省略される．ただし，感染症サーベイランスに利用するために欠くべからざる情報の入力については，この入力環境設定によって省略（Skip）することができない．環境設定用の各パラメーターは，訂正のファンクションにおいても有効である．

また，本Activity開始時には，入力情報の確認を各項目毎に行うか，あるいは，1レコード分の入力完了後にまとめて行うか，何れかの方法を選択することができる．前者の確認法は入力作業に未だ慣れていない初心者のために，後者はベテランオペレータのためにデザインされたものであり，これらを適切に選択することにより，能率的に入力作業を行うことができる．この選択は，本Activityの終了まで有効である．

Activity-2 は，Activity-1用の入力環境設定を行う．各環境設定用パラメーターは，データディスク上のサブファイルに記憶され，本Activityによるパラメーター

DEPIDs (DATA EXCHANGE PROGRAM ON INFECTIOUS DISEASES, SEAMIC)

St-No. 87- (Code)	● Pathogen (type and other data) / Date isol. /Area No./ Name (Age·Sex) / Source / [Pa·Pc] / (OvS·Outbreak) / Mixed infect.	Results of Antibiotics Sensitivity Test Diameter of definit inhibition zone (mm) ····· (upper line) Resistant(R) / Sensitive(-) ····· (lower line) 01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15
1	Salmonella O9(D1) bioser Typhi Z66+ (53-1)	CP	TC	SM	ABPC	ST	KM									
(1)	1/ 1/1987/ 101· /Linda Mandel (38·F	15	17	15	13	16	21									
	Blood [Pa] ([OvS]·Abott-inn) refer:	-	-	-	-	-	-									
11	Salmonella O2(A) bioser Paratyphi-A (1)	CP	TC	SM	ABPC	ST	KM									
(1)	5/ 1/1987/ 108· /B. K. Morris (??·M	18	10	10	15	17	16									
	Blood [Pc] (·) refer:	-	R	R	-	-	-									
12	Salmonella O4(B) Schwarzengrund	CP	TC	SM	ABPC	ST	KM									
(1)	5/ 1/1987/ 107· /B. J. Martin (27·M	7	18	17	16	17	18									
	Stool [Pc] (·) refer:	R	-	-	-	-	-									
31	Salmonella O9(D1) bioser Typhi Z66· (NT)	CP	TC	SM	ABPC	ST	KM									
(1)	29/ 1/1987/ 23· / (??·?	18	19	NO-z	10	22	19									
	Environ [Uk] (·) refer:	-	-	R	R	-	-									

< Selected > Printed out on 18/05/1987 DEPIDs' Form-C (Data-disk : Japan , 1987, Vol. 1)

図2 Activity-3によるプリントフォーム出力例（Form-C）
試験運用用のサンプルデータディスク（日本用，1987年，Vol.1）を用いて出力した。

- 1ページ当たりの出力件数は12件である．
- 基本的にはForm-Aと同じである．ただし，薬剤感受性試験成績が，最少発育阻止濃度または発育阻止ゾーン径のいずれか一方を選択することによって，各々の値と耐性/感受性判定結果と共に出力される点において異なる．
- サルモネラの限定出力を行ったので，最終行に＜Selected＞の文字が印字された．サルモネラを限定指定する場合，さらにO群あるいは血清型までの限定出力が可能である．

の変更が再び行われるまでは，たとえシステムの停止および起動を繰り返しても，そのままの条件で有効である．この環境設定は，組織侵入性大腸菌（EIEC）の組織侵入性試験成績，毒素原性大腸菌（ETEC）の各毒素（LTおよびST）産生性試験成績，出血性大腸菌（EHEC）の出血因子試験成績，腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒産生性および血清型別（OおよびK型別）試験成績，黄色ブドウ球菌およびボツリヌス菌の毒素型別成績，チフス菌およびパラチフス菌（AおよびB）のファージ型別成績，薬剤感受性試験の最少発育阻止濃度および発育阻止円の直径，氏名，年齢，性別，および，担当地区サブコード番号の入力に対して各々に行うことができる．

Activity-3 は，台帳フォーム類の出力を行う．Form-Aは，各レコード毎の全収録情報を出力するフォームであり，入力情報の確認用としても利用できる．Form-Bは，分離病原体毎の主要情報のみを出力するが，それぞれが一行に印字されるので，これを一覧して，特定の病原体検出例や集団あるいは混合感染例（同一の検査材料から複数の病原体が検出された例）を検討したい場合などにも利用できる．Form-Cは，Form-Aに類似するが，薬剤感受性試験成績が耐性（R）および感受性（－）の判定結果と共に出力される点において相違する．同試験結果に特に興味を示す臨床担当者等にとっても有用な台帳フォームである．なお，各フォームの出力時には，上に述べた限定出力用パラメータの入力が可能である．

Activity-4 は，由来別病原体検出状況を集計して7種類のTableフォームを出力する．いずれのフォームも，全ての由来を網羅した集計およびヒト由来限定集計の両

FORM 2 PHAGE TYPE DISTRIBUTION OF S. TYPHI, by SOURCES

PHAGE TYPE	HUMAN SOURCES							ANIMAL	FOOD	ENVIRON.	UNKNOWN	TOTAL
	STOOL	BLOOD	URINE	PUS	MARROW	GALL	OTHERS					
C7	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
E3	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
53-1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2
UVS1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
UVS3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Vi-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2
TOTAL	2	3	-	-	-	-	-	-	-	3	1	9

Printed out on 19/05/1987 DEPIDs' Form-2 (Data-disk : Japan , 1987)

FORM 2 PHAGE TYPE DISTRIBUTION OF S. TYPHI, by SOURCES

PHAGE TYPE	HUMAN SOURCES							TOTAL (%)
	STOOL	BLOOD	URINE	PUS	MARROW	GALL	OTHERS	
C7	-	1	-	-	-	-	-	1 (20.0)
E3	-	1	-	-	-	-	-	1 (20.0)
53-1	-	1	-	-	-	-	-	1 (20.0)
UVS1	1	-	-	-	-	-	-	1 (20.0)
Vi-	1	-	-	-	-	-	-	1 (20.0)
TOTAL	2	3	-	-	-	-	-	5 (100)

Printed out on 19/05/1987 DEPIDs' Form-2 (Data-disk : Japan , 1987)

図3 Activity-4 によるプリントフォームの出力例（Form-2）
試験運用用のサンプルデータディスク（日本用，1987年，Vol.1）を用いて出力した．
- 限定指定なしに得たチフス菌の由来別ファージ型分布である．
- 全ての由来別（上）およびヒト由来のみ（下）の集計結果が連続して出される．

結果が一組として自動的に出力される．本 Activity の各ファンクションによって得られる Table は，病原菌（取扱対象となっている全ての病原菌）検出状況（Form-1），ファージ型別チフス菌検出状況（Form-2），同パラチフスA菌検出状況（Form-3），同パラチフスB菌検出状況（Form-4），血清型別赤痢菌検出状況（Form-5），生物型・血清型別コレラ菌検出状況（Form-6）および，O群別・血清型別サルモネラ検出状況（Form-7）である．これら各フォームの出力に際して，上述の Activity の場合と同様に限定出力用パラメーターの入力が可能であるので，月別，年令階層別などを指定してプリントフォームを得，さらに詳細な病原体検出状況の比較検討を行うこともできる．

Activity-5 は，主要な病原菌（すなわち，チフス菌，パラチフスA菌，その他のサルモネラ，赤痢菌，大腸菌，コレラ菌，および非O－1ビブリオ・コレレ）の各々について，薬剤感受性試験成績を耐性パターンとして分析し，集計結果を感受性菌，単剤耐性菌から多剤耐性菌へと順に分類して出力する．この分析法を手作業によって行うことは，供試薬剤の種類，対象となる株数が多ければ多い程困難であり集計に多大の時間と手間を要したところであったので，その利用価値は極めて高い．

また，限定出力機能を利用して，地域別，由来別，等々，それぞれに指定して，耐性菌の出現状況や分布傾向等の詳細な検討を行うための比較検討用資料を得ることができる．

Activity-6 は，新年次用データディスクの専用化処理および次ボリューム用データディスクの追加開設を行うためのファンクションを含む．いずれの場合も，フォーマット済みのディスクが必要である．

前者のファンクションは，新年次用データディスクの作成の場合にのみ用いる．これによって2枚以上のデータディスクの専用化処理を行った場合，たとえそれらの年次指定が同じであっても，Activity-6による連続分析・集計処理はできない．

したがって，同一年次におけるデータディスクのボ

FORM 7 SALMONELLA SEROBARS ISOLATED, by SOURCES

GROUP SEROVAR	HUMAN SOURCES							
	STOOL	BLOOD	URINE	PUS	MARROW	GALL	OTHERS	TOTAL (%)
O2(A)								
bioser Paratyphi-A	1	1	1	-	-	-	-	3 (27.3)
SUBTOTAL	1	1	1	-	-	-	-	3 (27.3)
O4(B)								
Schwarzengrund	1	-	-	-	-	-	-	1 (9.1)
Paratyphi-B	-	1	-	-	-	-	-	1 (9.1)
Heiderberg	1	-	-	-	-	-	-	1 (9.1)
SUBTOTAL	2	1	-	-	-	-	-	3 (27.3)
O8(C2-C3)								
Bobyis-morvificans	1	-	-	-	-	-	-	1 (9.1)
SUBTOTAL	1	-	-	-	-	-	-	1 (9.1)
O18(K)								
Cerro	1	-	-	-	-	-	-	1 (9.1)
SUBTOTAL	1	-	-	-	-	-	-	1 (9.1)
TOTAL	6	4	1	-	-	-	-	11 (100)

< Selected > Printed out on 19/05/1987 DEPIDs' Form-7 (Data-disk : Japan , 1987)

図4 Activity-4 によるプリントフォーム出力例（Form-7）
試験運用用のサンプルデータディスク（日本用，1987年，Vol.1）を用いて出力した（一部省略）．
- 分離月を1月と限定指定して得た Form-7（Form-2 の場合と同様に2種出力される；本文参照）の内，ヒト由来分離株の集計結果である．
- 集計結果はO群順に整理され，複数の菌型が同一のO群に属する場合はこれを検出頻度の高い順に並べなおして出力する．

リューム増設は，後者のファンクションを指定して行わなければならない．

後者のファンクションによって次ボリューム用データディスクの追加開設を行った場合，データディスクの増設ばかりでなく，既存の各データディスク（同年次用）上のサブファイルに記憶されている最終ボリューム番号の更新が行われる．Activity-6を指定して年単位の分析・集計を行う場合は，この最終ボリューム番号を参照することによって，ボリューム1から最終ボリュームまでの全ボリュームを一括処理することができる．

上に述べた各 Activity の他に，ディスクのフォーマットやバックアップを行うために使用する，ディスクユーティリティープログラムも用意されている．これらは，「Stop」キー操作によって，システムを一旦 MS-DOS のコマンドモードにした後，ファンクションキーで外部コマンドを呼び出して実行する．終了後は，ファンクションキー操作によって，DEPIDs のシステムを再起動することができる．

なお，本システムのオペレーションについては，英文マニュアル「User's Handbook for the "DEPIDs"」中に，要所に CRT 画面ダンプを添えて詳しく解説した．

システムの実務運用性について

本システムの実務運用は未だ開始されていないが，1987年3月に東京で開催された第14回 SEAMIC ワークショップ「Technical Meeting of Counterparts on SEAMIC Data Exchange Program on Infectious Diseases」に加盟各国のカウンターパート・ラボラトリーの代表を招き，各自による体験オペレーションの機会を設けることができたので，その際に得た各体験者および著者らの感想に基づいて以下にシステムの実務運用性について評価をしておく．

参加者の多くはコンピュータに関する専門的な知識や技術を持合せておらず，中にはパーソナルコンピュータに触れた経験がない者も含まれていた．体験オペレー

FORM 10　FREQUENCY APPEARANCE OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN OTHER SALMONELLA BY THEIR RESISTANCE PATTERN

RESISTNAT TO :	ANTIBIOTIC RESISTANCE PATTERN							NO. OF ISOLATES (%)	TOTAL (%)
	ABPC	CP	GM	KM	SM	TC	ST		
1 ANTIBIOTIC	-	R		-	-	-	-	1 (16.7)	1 (16.7)
2 ANTIBIOTICS	-	-		R	R	-	-	1 (16.7)	
	-	-	-		R	R	-	1 (16.7)	
	-	-	-	-	R	R	-	1 (16.7)	3 (50.0)
5 ANTIBIOTICS	R	R		R	R	R	-	1 (16.7)	1 (16.7)
6 ANTIBIOTICS	R	R		R	R	R	R	1 (16.7)	1 (16.7)
TOTAL									6 (100)

< Selected >　Printed out on 18/05/1987　DEPIDs' Form-10 (Data-disk : Japan , 1987)

	ANTIBIOTICS						
	ABPC	CP	GM	KM	SM	TC	ST
NO. OF ISOLATES TESTED	6	6	2	5	6	6	6
NO. OF ISOLATES RESISTANT TO :	2	3	-	3	5	4	1
FREQUENCY APPEARANCE OF RESISTANTS	33.3 %	50.0 %	0.0 %	60.0 %	83.3 %	66.7 %	16.7 %

図5　Activity-5 のプリントフォーム出力例（Form-10）
試験運用用のサンプルデータディスク（日本用，1987年，Vol.1）を用いて出力した．
- 患者由来株を限定指定し，発育阻止ゾーン径による分析を行った結果である．
- 耐性パターンを表わす記号は，「R」が Resistant（耐性）を，「−」が Sensitive（感受性）を，空欄が Not tested, Laboratory accident など成績が入力されていない場合を，それぞれ意味する．

ションは，1時間程度のシステム紹介とオペレーションについての解説の後に行われた．

1人当たり30～40分程度の体験オペレーションの間に，コンピュータのキー操作に馴染みがないために発生したと推察される事故が何例か認められたが，各自に，情報の入力をはじめ，プリントフォームの出力，入力環境設定の変更など，システムの主要な Activity を一通り体験してもらうことができた．さらに，翌日の会議において，近い将来に同システムを各国に供与して実務運用に備える旨の合意が得られた．

したがって，今回著者らが開発した DEPIDs は，上述の各国代表者による体験オペレーションを通じて，海外の複数国において実務運用に供され得る道が開けたものと判断する．

本システムが各国のカウンターパート・ラボラトリーに設置された場合，実務運用の第一段階として，各国で同一システムを運用し，同一フォームを用いて各々の情報集計をし，これを SEAMIC 東京で収集して年報を作成，還元されることとなる．本システムは，この段階で既に，各国における情報管理の合理化ばかりでなく，取扱情報の質的向上あるいは標準化にも貢献することが予想される．また他方，SEAMIC においては，年報の作成作業に要する時間と労力の削減が叶えられるはずである．なお，技術的には，近い将来，情報の電送（あるいはオンライン）交換を行うことも可能である．

著者らは，本システムの開発にあたっても，これまでの感染症サーベイランス領域における各システム開発の場合と同様に，対象事業専用ソフトウエアをめざした．このような場合，システムの開発担当者は，その後のバージョンアップやデバッギングなど，アフタケアをも担当せざるを得ないことが予想される．このシステム開発においては前述のように国内向けとコンパチブルな海外向仕様機を選定した．このことによって，システムソフトウエアのアフタケアが容易となり，さらにはこれまで我々が開発してきた各種のソフトウエアの応用や流用も可能である．

謝辞 本システム開発の機会を与えられた日本国際医療団および東南アジア医療情報センターの関係各位に感謝の意を表する．

参考文献

1）津野正朗，工藤泰雄，大橋誠：マイコンサーキュラー，10(8)，23-32，1985
2）津野正朗，工藤泰雄，大橋誠：マイコンサーキュラー，11(3)，2-14，1986
3）津野正朗，工藤泰雄，大橋誠：東京衛研年報，36，60-66，1985
4）津野正朗，大橋誠，中村明子：マイコンサーキュラー，11(10)，8-15，1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 13-21, 1987

北海道産スケトウダラ *Teragra chalcogramma*, 千葉県産マサバ *Pneumatophorus japonicus japonicus* 由来 *Anisakis* Ⅰ型幼虫の保存温度，薬味，調味料および香辛料に対する抵抗性

村田以和夫*，宮沢貞雄*，國守利**，中嶋陽一**
渋谷智晃**，中西弘***

Inhibitory Effects of Partial Freezing, Several Kinds of Condiments, Spices and Seasonings on The Activity of *Anisakis* Type I Larvae Collected from The Codfishes and Mackerels

IWAO MURATA*, SADAO MIYAZAWA*, MORITOSHI KUNI**, YOICHI NAKAJIMA**
TOMOAKI SHIBUYA** and HIROSHI NAKANISHI***

Keywords：アニサキスⅠ型幼虫 *Anisakis* Type Ⅰ larvae，活動抑制効果 Inhibitory effect on activity，氷温 Partial freezing，調味料 Condiments，香辛料 Seasonings

はじめに

Anisakis 亜科幼線虫による人体症例は，これまでに1,500例以上も我国で報告[1]されており，Ⅰ型幼虫によるものが極めて多く，次いで近縁種である *Terranova* による症例も北海道では比較的多く報告[1]されている．東京においても1985年に筆者[2]らが，急性 *Anisakis* 症の原因食と推定される生ザケのマリネ残物より本虫のⅠ型幼虫を発見し得た事例がある．本症多発の原因としては，海産哺乳動物を終宿主とする Anisakis 亜科幼線虫の第2中間宿主であるスケトーダラ，サバ，アジ，サンマ，スルメイカ，サケおよびマス等大衆魚介類に本虫が高率に寄生しており，また，近年魚介類の鮮度を保つ輸送方法が発達して来たため，これら大衆魚介類の生食傾向が強まっていることなどが指摘される．一方，魚介類の寄生虫に関する各種の報道がなされたことなどから消費者の寄生虫に向けられる関心が高まりつつある．市販の魚介類とその加工品の寄生虫に関する苦情受付け件数は，衛生局の集計[3]で昭和58年（1983）23件，59年（1984）28件，60年（1985）13件あって，異物混入苦情受件数（1800～1900件）の3～5％台を占めるに至っている．苦情受付けの窓口は保健所にあるが，直接電話により当研究所で対応する場合もあり，寄生虫の生死鑑別のほか，冷凍・冷蔵等，保存温度と寄生虫の人体影響および塩引き，酢じめなど家庭での調理法に対する寄生虫の抵抗性についての問い合わせも多い．しかしながら，各種寄生虫の保存温度抵抗性や各種の香辛料および調味料に対する抵抗性に関する文献[1,4,5,6]は，我国においてごく一部について散見されるにすぎない．1968年，東京都市場衛生検査所の加藤[5]らは「東京中央市場にみられる海産魚介類のアニサキス亜科線虫に関する調査研究」の中で，食酢，粉末ワサビおよび食塩の本虫殺滅効果について一部報告している。この報告書によると食酢原液中で4日間本幼虫の生存を認め，粉末ワサビでは，10～5％溶液浸漬により10分後運動を停止し，2時間で本虫殺滅効果を認めている．また，20％以上の食塩水中で24時間，10％以下の食塩水中では48時間浸漬により本虫殺滅効果があるとしているが，実際の調理・食用の段階では完全な予防効果は期待できないと結論付けている．そこで，より効果的な本虫殺滅効果を探るため，保存温度と各種調味料や香辛料等に対する *Anisakis* Ⅰ型幼虫の抵抗性について，同時同一条件下で検討した結果，いくつかの実用性のある知見が得られたので報告する．

材料および方法

材料：昭和62年度食品監視課の先行調査として，東京

*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
**東京都衛生局環境衛生部食品監視課下谷機動班
***東京都衛生局環境衛生部食品監視課

中央卸売市場足立分場より購入した北海道産スケトウダラ *Theragra chalcogramma* 44尾，千葉県産マサバ *Pneumatophorus japonicus japonicus* 67尾の内臓および腹壁（腔）より摘出したAnisakis Ⅰ型幼虫のうち，魚介類用生理食塩水（0.4% NaCℓ水）中で活発な自発的個有運動を示すものを選別して，保存温度，各種調味料および香辛料に対する抵抗性試験に供した．

方法：1）保存温度抵抗試験；*Anisakis* Ⅰ型幼虫が多数寄生するスケトウダラの内臓を1群5腹ずつビニール袋に分包し，家庭用冷蔵庫の冷凍室（−20℃），冷蔵室（＋4℃）および，氷と水および食塩混合により−1〜−3℃に調整した発泡スチロール製容器にビニール袋ごと納め，長期間温度を一定に保つため，このスチロール製容器を大型冷蔵庫内に保管した．内臓の一部を経時（日）的に分取りして得られた虫体のうち，*Anisakis* Ⅰ型幼虫のみを選別後，0.4% NaCℓ水中での活動性を肉眼および実体顕微鏡下で観察した．活動性の尺度は，活発な前進運動を示すものを（卄），自発的個有運動を示すものを（卄），微弱な巻き込み運動を示すもの（＋）および眼科用ピンセット刺戟しても動きのないものを（−）として，それぞれ表に示した．

2）調味料，香辛料の被検濃度；15%，7.5%，3.75%の食塩水を調製，しょうゆ（食塩濃度15%）と減塩しょうゆ（食塩濃度7%）は原液および蒸留水で1／2，1／4の2倍希釈したものをシャーレに分注し，それぞれに活発な個有運動を示す虫体を5虫ずつ入れて経時（日）的に運動性の変化を観察した．同様に，氷酢酸の4.2%，2.1%，1.05%液を調整し，食酢（穀物酢，酸度4.2%）の原液および1／2，1／4希釈液との比較試験に供した．また，市販のチューブ入り「ねりわさび」®，「ねりからし」®，「おろししょうが」®は，それぞれ0.4% NaCℓ水20ml当り，2g，1g，0.5gずつ混合して試験に用いた．市販の「一味唐がらし」®は，乾燥重量1g，0.5g，0.25gを0.4% NaCℓ水20mlに混合して用いた．生わさび，生しょうが，生にんにく，生玉ねぎは，おろし金でおろし，それぞれ2g，1g，0.5gを0.4% NaCℓ 20mlと混合して，それぞれのシャーレに*Anisakis* Ⅰ型幼虫5虫を投入，経時(日)的に活動性の消長を観察した．さらに生の本わさび，しょうが，にんにく，玉ねぎのしぼり汁それぞれ1容と0.4% NaCℓ水，「さしみしょうゆ」®原液，食酢原液各1容ずつの混液を調整し，Anisakis Ⅰ型幼虫に対する相乗的活動抑制効果を検討した．

成　績

1．保存温度抵抗性：表1に示されるように，−20℃で凍結保存された*Anisakis* Ⅰ型幼虫は，24時間で活動性が麻痺状態となり，48時間後は全虫体の運動性が停止された．一方，パーシャル・チルド，または氷温と店頭表示される各家電メーカーの冷蔵庫の新温度域（＋1℃〜−3℃）および＋4℃の冷蔵温度では全虫体が（卄）以上の活動性を14日間にわたり保持し得た．確かに新型家庭用冷凍冷蔵庫に設定された魚肉類の鮮度を保つための新温度域では，保存臓器の自己融解も少なく，1週後も腐敗臭も認められない状態であったが，反面*Anisakis* Ⅰ型幼虫に対する殺虫効果は期待できないことが明らか

表1．スケトウダラ由来Anisakis Ⅰ型幼虫の保存温度抵抗性

保存温度	活動性	経過時間・日数						備考
		24時間	48時間	72時間	4日	7日	14日	
−20℃	(卄) (＋) (±) (−)	5/5	⑧/⑧	⑤/⑤	⑤/⑤	⑤/⑤	⑤/⑤	冷凍 (−20℃)
−3℃〜 0℃	(卄) (卄) (＋) (−)	3/3	7/7	5/5	5/5	5/5	5/5	新温度域 氷温域　(0℃) パーシャル温度(−3℃)
＋4℃	(卄) (卄) (＋) (−)	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	冷蔵 (＋4℃)

表2．スケトウダラ由来 Aniskis Ⅰ型幼虫の調味料に対する抵抗性

種類	経過	時間	被検	濃度	15%(原液)				7.5%(1/2)				3.75%(1/4)			
		(日数)	虫体数	活動性	(卅)	(廾)	(+)	(−)	(卅)	(廾)	(+)	(−)	(卅)	(廾)	(+)	(−)
食塩	2	時間			3		2		2		3		3		2	
	18	〃					2	③		2	1	②		2	3	
	3	日	5					⑤			4	①			5	
	4	〃						⑤			4	①			5	
	7	〃						⑤				⑤			5	
	14	〃						⑤				⑤			3	②
しょうゆ	2	時間					1	④	3		2		4	1		
	18	〃						⑤				⑤	3	2		
	3	日	5					⑤				⑤			5	
	4	〃						⑤				⑤			4	①
	7	〃						⑤				⑤			2	③
	14	〃						⑤				⑤				⑤

種類	経過	時間	被検	濃度	7%(原液)				3.5%(1/2)				1.75%(1/4)			
		(日数)	虫体数	活動性	(卅)	(廾)	(+)	(−)	(卅)	(廾)	(+)	(−)	(卅)	(廾)	(+)	(−)
減塩しょうゆ	2	時間					5		4		1		4		1	
	18	〃						⑤		4	1		4		1	
	3	日	5					⑤			5			5		
	4	〃						⑤			4	1			5	
	7	〃						⑤				⑤			5	
	14	〃						⑤				⑤			4	①

対照	経過	時間	被検	濃度	スケトウダラ内臓体液混入				(生理食塩水で数次洗浄後)			
		(日数)	虫体数	活動性	(卅)	(廾)	(+)	(−)	(卅)	(廾)	(+)	(−)
0.4% 生理食塩水	2	時間			100				(10)			
	18	〃			100				(10)			
	3	日	100		100				(10)			
	4	〃	(10)			100			(3)	(6)	(1)	
	7	〃				50	50				(9)	(1)
	14	〃					60	40			(8)	(2)

となった．*Anisakis* Ⅰ型幼虫の低温域での殺虫効果は，−20℃以下で24時間以上の感作を必要とする．

2．調味料に対する抵抗性：しょうゆ原液の食塩濃度は15%，減塩しょうゆは7%に規定されている．そこで，先ず食塩低抗性を調べるために，しょうゆ原液に合わせ2倍希釈法で15%，7.5%，3.75%の食塩水を調製し，0.4% NaCℓ を対照として，*Anisakis* Ⅰ型幼虫の活動性の変化を比較した．表2に示されるように，対照のスケトウダラ内臓，体液混入0.4% NaCℓ および無混入0.4% NaCℓ 中では，ほとんどの活動性が7日浸漬後もなお持続されたのに対し，しょうゆ原液，減塩しょうゆ原液共に18時間浸漬後には全て活動性が消失した．一方，15% NaCℓ では，3日浸漬後に，また7.5% NaCℓ では7日浸漬後に完全な活動性の消失が認められた．しかし3.75% NaCℓ では対照の0.4% NaCℓ と同様の活動性を示した．食塩濃度による死滅虫体の形態学変化は，活動停止後，胃食道部の崩壊としょうゆによる褐色染，次いで脱水による外皮クチクラのシワが深くなると共に，ガラス様に虫体全体の透過性が増すことが観察された．

3．食酢および氷酢酸に対する抵抗性：市販の食酢の酸度は，酢酸濃度に換算して4.2%と規定されているため，原液と1／2，1／4希釈液および等濃度氷酢酸液に本虫を投入し，活動性を調べた．表3に示すように，食酢と氷酢酸に対する本虫の抵抗性はかなり強く，全て活動性が

表3．スケトウダラ由来 Anisakis Ⅰ型幼虫の食酢（穀物酢）および酢酸に対する抵抗性

種類	経過（日数）	被検虫体数	濃度	4.2%(原液)				2.1%(1/2)				1.05%(1/4)			
			活動性	(卅)	(廾)	(＋)	(－)	(卅)	(廾)	(＋)	(－)	(卅)	(廾)	(＋)	(－)
食酢（穀物酢）	2時間	5		4		1		5				5			
	18〃			5				5				5			
	3日				4		①		5				2	3	
	4〃				3	1	①		5				2	3	
	7〃					4	①		2	3			2	3	
	14〃					2	③		1	4				4	①
氷酢酸	2時間	5		3	2				3	2			3	2	
	18〃			5				4	1			3	2		
	3日				3	1	①			5			4	1	
	4〃					2	③			5			2	3	
	7〃					1	④			4	①			5	
	14〃						⑤			2	③			4	①

表4．スケトウダラ由来 Anisakis Ⅰ型幼虫の市販香辛料(製品)に対する抵抗性

種類	経過（日数）	被検虫体数	使用g/20ml	2g				1g				0.5g				0.25g			
			活動性	(卅)	(廾)	(＋)	(－)	(卅)	(廾)	(＋)	(－)	(卅)	(廾)	(＋)	(－)	(卅)	(廾)	(＋)	(－)
ねりわさび®	2時間	5					⑤				⑤				⑤				
	18〃						⑤				⑤				⑤				
	3日						⑤				⑤				⑤				
	4〃						⑤				⑤				⑤	(実施せず)			
	7〃						⑤				⑤				⑤				
	14〃						⑤				⑤				⑤				
和風ねりからし®	2時間	5					⑤				⑤				⑤				
	18〃						⑤				⑤				⑤				
	3日						⑤				⑤				⑤				
	4〃						⑤				⑤				⑤	(実施せず)			
	7〃						⑤				⑤				⑤				
	14〃						⑤				⑤				⑤				
おろしたて風味® おろししょうが	2時間	5			5				5				5						
	18〃				5					5				5					
	3日					1	④				5			2	3				
	4〃						⑤				5				5	(実施せず)			
	7〃						⑤				3	②			5				
	14〃						⑤					⑤			⑤				
一味唐がらし®	2時間	5							5				5				5		
	18〃									5				5				4	1
	3日									5				3	2			3	2
	4〃				(実施せず)					4	1			3	2				4 ①
	7〃									4	1			3	1	①			3 ②
	14〃										1	④				⑤			3 ②

停止し得たのは，4.2%氷酢酸浸漬14日後のみであった．

死滅虫体の構造的変化は，内部構造の全体的崩壊が序々に進行すると共に，外皮クチクラ層がシース状に膨隆剝離することが観察された．

4．市販香辛料（製品）に対する抵抗性：わさび，からしのチューブ入りねり製品とともに，しょうがのおろし製品もチューブ入りで市販されている．一方，乾燥唐がらしは粉砕されたものが「一味唐がらし」® として市販されており，これら香辛料に対する *Anisakis* Ⅰ型幼虫の抵抗性について比較検討した．表4に示すとおり，西洋わさびを主原料とする「ねりわさび」® と黒からしの種子を主原料とする「和風ねりからし」® は共に著効を示し，最低濃度（0.5g／20ml）2時間浸漬によって，全虫が活動を停止した．一方，「おろししょうが」® は，最高濃度（2g／20ml）で4日浸漬により全虫の運動停止が認められた．また，「一味唐がらし」® では0.5g／20ml 濃度以上14日浸漬でほとんど活動が停止されるなど，わさびとからしと比較して活動抑止効果は弱いことが明らかとなった．

5．市販の生香辛料に対する抵抗性：市販のわさびとからしねり製品で著効を示した本虫活動抑制効果について，生しょうが，生本わさび，生にんにくおよび生玉ねぎのおろしを用いて実験を行った．表5に示されるように，マサバ由来の *Anisakis* Ⅰ型幼虫は，おろし本わさび2g

表5．マサバ由来 Anisakis Ⅰ型幼虫の市販香辛料（生おろし）に対する抵抗性

種類	経過	時間	被検	使用g/20ml	2g				1g				0.5g			
		（日数）	虫体数	活動性	(卅)	(廾)	(＋)	(－)	(卅)	(廾)	(＋)	(－)	(卅)	(廾)	(＋)	(－)
おろししょうが	30	分	6～7			4	3				6				6	
	1	時間				4	3			1	5			1	5	
	2	〃					4	3			7				6	
	4	〃					4	3			7				6	
	17	〃						⑦			4	③			5	1(±)
	2	日						⑦				⑦			2	④
	5	〃						⑦				⑦			2	④
おろし本わさび	30	分	6～7				1	6(±)			6				6	
	1	時間						⑦			6				6	
	2	〃						⑦				⑥				6(±)
	4	〃						⑦				⑥				⑥
	17	〃						⑦				⑥				⑥
	2	日						⑦				⑥				⑥
	5	〃						⑦				⑥				⑥
おろしにんにく	30	分	5			3	2			2	3			2	3	
	1	時間				3	2			2	3			2	3	
	2	〃				3	2			2	3			2	3	
	4	〃				2	3			1	4			2	3	
	8	〃					5			1	4			1	4	
	2	日					5			1	3	1(±)		3	2	
	4	〃					5				2	③			4	1(不明)
おろし玉ねぎ	30	分	4～5			1	4			1	4			1	4	
	1	時間				1	4				5			1	4	
	2	〃					5				5				5	
	4	〃					5				4				5	
	8	〃					5				4				5	
	2	日				1	4				4				5	
	4	〃				1	4				4				5	

／20ml 濃度1時間浸漬により全虫の活動性が停止された．一方おろししょうがでは，全虫の活動停止まで，最高濃度で17時間を要し，おろしにんにくとおろし玉ねぎでは，いずれも浸漬4日後でも完全な本虫活動停止には至らなかった．生おろししょうがとチューブ入り「おろししょうが」® との比較では，生の方がやや，運動抑制効果が高いようであるが，一方，おろし本わさびと西洋「ねりわさび」® の本虫活動抑制効果は，スケトウダラとマサバという宿主の違いを越えて，ほぼ同等であると推定された．

6．各種香辛料と調味料の組み合せによる相乗的活動抑制効果：生しょうが，生本わさび，生にんにくおよび，生玉ねぎのガーゼ2枚を用いたしぼり汁1容に対し，さしみしょうゆ，0.4% NaCℓ，食酢のそれぞれ1容を加えた混合液に本虫を5～6個体浸漬し，経時（日）的に活動性を観察した．対照として0.4% NaCℓ および人工胃液（塩酸 7 ml，ペプシン1：5000　2 g，蒸留水 1,000ml）を調製して，被検虫体をそれぞれ20，6～7，15個体を投入浸漬後，経時（日）的に観察した．その結果を表6と7に示す．生の本わさび汁と生にんにく汁1容に対して「さしみしょうゆ」と0.4% NaCℓ 水のそれぞれ1容を加えた混液浸漬後7時間で本虫の活動抑制効果が認められた．玉ねぎ汁とさしみしょうゆの等量混液浸漬では8時間経過後，生にんにくと食酢の等量混液浸漬では，24時間経過後に全虫体の運動停止が認められた．各種香辛料と調味料の組み合せによる顕著な相乗効果は，食塩濃度が希釈され，また有形物除去による有効成分の持続的溶出が阻害されるなどの要因もあって認められなかった．一方，対照の0.4% NaCℓ 水と人工胃液では，前者で浸漬14日，後者で浸漬4日後まで被検虫体の約半数が活動性を持続しえた．各種香辛料による死滅虫体の形態学的変化は，「ねりしょうが」で虫体頭部の変形，外皮クチクラの膨隆が認められたほか，内部構造の全体的崩壊が観察された．

考　察

我国の食習慣である魚介類の生食嗜好は，鮮魚流通機構の発達とあいまって，タイ，マグロ等高級魚のみならず，イワシ，サバなど大衆魚介類にまで及ぶ様になって来た．イワシ，タラ，サバ，スルメイカ等は，クジラ，イルカ，アザラシ等海産哺乳動物を終宿主とする Anisakis 亜科線虫類の主要な中間宿主である．これら中間宿主の本虫寄生率は，今回著者らが行った調査では，北

表6．マサバ由来 Anisakis Ⅰ型幼虫に対する香辛料・調味料の相乗的活動抑制効果（その1）

香辛料（しぼり汁）1：調味料1	活動性	被検虫体数	経過時間・日数 30分	1時間	2時間	4時間	17時間	2日目	5日目
しょうが汁：さしみしょうゆ	(++)	7	7	1					
	(+)			6	4	4			
	(−)				③	③	⑦	⑦	⑦
しょうが汁：0.4% NaCℓ	(++)	6~7	6						
	(+)			6	7	4			
	(−)					③	⑦	⑦	⑦
本わさび汁：さしみしょうゆ	(++)	6							
	(+)		6	3					
	(±)			3	5	1			
	(−)				1	⑤	⑥	⑥	⑥
本わさび汁：0.4% NaCℓ	(++)	6							
	(+)		6	3					
	(±)			3	6				
	(−)					⑥	⑥	⑥	⑥
対照　0.4% NaCℓ	(++)	20	2	2	1	1	1		
	(+)		18	18	19	19	14	20	16
	(±)						5		
	(−)								④

表7．マサバ由来 Anisakis Ⅰ型幼虫に対する香辛料・調味料の相乗的活動抑制効果（その2）

香辛料（しぼり汁）1：調味料1	活動性	被検虫体数	経過時間・日数 30分	1時間	2時間	4時間	8時間	24時間	4日	7日	14日
にんにく汁：さしみしょうゆ	(++)										
	(+)	5	5	5	5						
	(−)					⑤	⑤	⑤	⑤		
にんにく汁：0.4% NaCℓ	(++)										
	(+)	5	5	5	5						
	(−)					⑤	⑤	⑤	⑤		
にんにく汁：食酢(穀物酢)	(++)										
	(+)	5	5	5	5	1	1				
	(−)					④	④	⑤	⑤		
玉ねぎ汁：さしみしょうゆ	(++)		2	2							
	(+)	5	3	3	5	5					
	(−)						⑤	⑤	⑤		
玉ねぎ汁：0.4% NaCℓ	(++)		2	2				5	5		
	(+)	5	3	3	5	5	5				
	(−)										
玉ねぎ汁：食酢(穀物酢)	(++)		1	1	2	1	3				
	(+)	5	4	4	3	4	2	5	5		
	(−)										
対照 人工胃液（塩酸7 ml, ペプシン2 g 蒸留水 1,000 ml）	(++)		8	10	10	10	10	5	2	2	
	(+)	15	7	5	5	5	5	4	5	5	2
	(−)							⑥	⑧	⑧	⑬
対照 魚介類用生理食塩水（0.4% NaCℓ）	(++)										
	(+)	6〜7	7	7	7	6	6	5	4	4	3
	(−)							①	②	②	③

海道産スケトウダラ100%（44／44），マダラ100%（3／3）および千葉県産マサバで82.1%（55／67）と高率であった．氷詰め鮮魚として市販される大衆魚においては，比較的安価な冷凍魚と比べ，生食または生食に近い塩じめまたは酢じめ等簡単な自家製調理法で食卓に供される傾向にある．近年，パーシャルまたは氷温と称する新温度域を設定した家庭用冷蔵庫が普及しつつあるが，魚肉の鮮度を保つという目的のほかに，ある種の寄生虫に対する損傷効果も知られている．影井[7]ら（1978）は，アユの体表に寄生する横川吸虫 *Metagonims yokogawai*（Katsurada1912）の幼虫 Metacercariae はアユを−3℃で3日間保存処理することにより，99%の幼虫の運動が不活発となり，本幼虫投与による犬への感染が成立しなかったと報告している．そこで著者らは，0〜−3℃の新温度域を中心に−20℃と＋4℃の低温保存による *Anisakis* Ⅰ型幼虫の活動性の変化を検討した．本虫感染には好適な実験動物がないため，室温でシャーレ内の0.4% NaCℓ 水における活動性を検討した．その結果，新温度帯で *Anisakis* Ⅰ型幼虫は14日間にわたり，冷蔵温度と同様，自発的個有運動を維持し，0〜−3℃保存では虫体に対し致死的損傷は見られなかった．また，本虫の致死的低温限界は−20℃以下で48時間以上を要することが明らかとなった．

次に，塩じめ，塩漬またはしょうゆ漬け等の調理方法のうち，しめサバは先ず軽く塩をふってしめ，次いで食酢でしめるという手順で作られる．また，小笠原で供される島ずしは，サワラの切身を半日ばかりしょうゆ漬けにし，ねりからしを付してにぎられる．そこで今回は，魚肉への食塩の浸透度合いは，切身の厚さと処理時間によって影響されるため，摘出虫体を裸で浸漬する方法で

食塩に対する抵抗性を検討した．その結果，しょうゆと減塩しょうゆの原液に浸漬18時間で本虫の活動が停止された．一方0.4% NaCℓ 水で数次にわたり洗浄した群とサバの内臓体液混入群の本虫の半数以上は共に，室温で浸漬14日後も活動性を維持し得た．また，食酢に対する本虫の抵抗性は加藤[5]らの成績より強く，原液（酸度4.2%）で7日浸漬までほとんどの虫体は活動性を持続することがわかった．したがって2～4時間程度の酢じめ，塩じめ，およびしょうゆ漬けでは活動抑制効果がないと推定される．食酢浸漬で本虫が一時的に活動性を増強するがその機序はまだ判明していない．本虫の神経系および代謝系に与える酸の影響については寄生虫生理学としての興味ある課題を残すこととなった．また，激症型胃アニサキス症における本虫と胃酸pHの影響についても興味がもたれるため，人工胃液浸漬による本虫の活動性についても検討を加えた．人工胃液中の本虫の活動性は，対照の0.4% NaCℓ 中と比較して，極めて自発的個有運動が強く8時間に及ぶ．また本虫の活動性は1～7日後まで，約半数に認められ，浸漬14日後にはほとんど活動性を停止することが明らかとなった．人体に感染した *Anisakis* Ⅰ型幼虫の生存期間は明らかでないが，人体で本虫が成熟虫体とはなり得ないため，常識的に4～5日と推定されている．今回の実験成績から，筆者は本虫の生存期間は1週間以上に及ぶものと推定している．次に香辛料についてみると，魚介類の「さしみ」および「すし」には古来よりわさびが添えられるが，今回実験に供した香辛料のうち，市販のチューブ入り「ねりわさび」®，「ねりからし」® の本虫活動抑制効果が特筆される．また，生おろし本わさびの本虫活動抑制効果も，ねり製品と同様2g／20m*l* 混液浸漬1～2時間後に，本虫の活動性を完全に停止できることが明らかとなった．生活の知恵として，「わさび」と「からし」が伝統的に香辛料に取り入れられて来たが，食生活の嗜好性はともかく，殺菌，殺虫効果についても興味がもたれる．H. GOI[8] *et al* (1985)，H. HITOKOTO[9] *et al* (1980) の防カビ効果に関する報告のほか，川島[11]ら，F. HAMAJIMA[12] *et al* の Anisakis に対する *iso*thiocyanate の殺虫効果についての報告もある．わさびと，からしの辛味成分[10]は共に *iso*thiocyanate の誘導体であるとされている．そこで今後は，純品としての *iso*thiocyanate およびその他の有効成分の解明に努め，寄生虫生理とのかかわりについて研究を進める必要がある．生しょうが，生にんにく，生玉ねぎおよび一味唐がらしは本わさび，「ねりわさび，からし」® に比べ，本虫に対する殺虫効果が極めて低く，これら香辛料としょうゆ，および食酢との相乗的活動抑制効果はそれ程期待できない．したがって，玉ねぎと食酢で漬け込む生ザケのマリネ程度では本虫の感染防止効果は期待できないと考えられる．さらに，辛さで定評のある「一味唐がらし」® も単味では本虫に対する殺虫効果はあまり期待できないので，甘塩の即製めんたいこ等では，本虫の人体感染もありうると思われる．本虫は魚の内臓および，腹壁筋肉内に多く見出されることから，生食にあたっては充分な注意がはらわれるべきと思われる．

ま と め

北海道産スケトウダラおよび千葉県産マサバより多数の Anisakis Ⅰ型幼虫を得て，保存温度ならびに各種調味料，香辛料の本虫活動性抑制効果について種々の検討を行った．その結果，現在急速に普及しつつある新温度帯（＋1℃～－3℃）付家庭用冷蔵庫のパーシャルフリージング（氷温）ルーム内保存では，本虫の活動性に全く影響を与えないことが明らかとなった．本虫死滅低温域は－20℃以下で，48時間以上の処理を必要とすると考察した．一方，本虫の食塩，しょうゆ，食酢等調味料に対する抵抗性は，15% NaCℓ 浸漬で3日，しょうゆ原液および減塩しょうゆでそれぞれ18時間まで持続する．また食酢に対する抵抗性は強く，7～14日浸漬によってもかなりのものが活動性を維持することが明らかとなった．香辛料では，市販のチューブ入りねり製品のうち「ねりわさび」® と「私風ねりからし」® の本虫活動性抑制効果は強く2g／20m*l*，2時間浸漬で全ての虫体活動性が消失した．「おろししょうが」® と「一味唐がらし」® では全ての虫体活動性が停止されるのに4～7日を要した．これらの成績に基づいて，生の本わさび，生しょうが，生にんにく，生玉ねぎのおろし（2g／20m*l*）に対する本虫の抵抗性を検討した．その結果，生本わさびでは，30分浸漬で本虫の運動麻痺が開始され，1時間浸漬により被検虫体の全てが活動性を失なった．一方，生しょうがでは，全虫体の活動性が消失するのに17時間を要し，生にんにく，生玉ねぎのおろしでは，14日間も本虫の活動性が持続することが明らかとなった．各種香辛料のしぼり汁と「さしみしょうゆ」® および食酢との等量混液では，食塩濃度の希釈および有形物除去により，有効成分の持続的溶出阻害の要因もあって，本虫に対する顕著な相乗的活動抑制効果は認められなかった．

（本研究は昭和61年度当所課題研究および衛生局環境衛生部食品監視課の先行調査の一環として実施したもの

で，本研究の一部は昭和62年度東京都食品衛生監視員協議会の研究発表会昭和62年7月で発表した）

文　献

1）尾崎文雄：特集Ⅱ，第11回日本臨床病理学会中国・四国地方会例会，特別講演，臨床病理，27(1)，59-65，1984

2）村田以和夫，宮沢貞雄，伊藤勝彦，松崎　修，名雪雅義：東京衛研年報，35，163-174，1984

3）食品衛生関係苦情処理集計表：東京都衛生局環境衛生部食品監視課，昭和58～60年度，（1985.3～1987.3）

4）佐野基人：食品寄生虫—その現況と排除の試み—，食品衛生研究，35(6)，469-482，1985

5）加藤孝雄，海沼　勝，伊藤勝男，三浦袈裟人：東京中央市場にみられる海産魚介類のアニサキス亜科線虫に関する調査研究，東京都市場衛生検査所，22-26，May，1968

6）村上　一，勝部泰次，影井　昇，丸山　務：人畜共通伝染病，第1刷，321-327，近代出版，東京，1982

7）影井　昇，木畑美知江，浅野和仁，内山　均，内山つね子：緩慢凍結（Partial Freezing）による寄生虫予防の試み，1-14，全国内水面漁業協同組合連合会，昭和53年2月（1978）

8）Hitoshi Goi, Shigeharu Inoue and Yozo Iwanami：*J. Antibact. Antifung. Agents*, 13, 5, 199-204, 1985

9）Hiroshi Hitokoto, Satoshi Morozumi, Tomoaki Wauke, Senzo Sakai and Hiroshi kurata：*APP. Environ. Microbiol.*,39, 4, 818-822, 1980

10）桜井芳人編：総合食品事典，第6版，1026-1028，185，同文書院，昭和61年5月（1986）

11）川島健治郎，浜島房則：寄生虫学雑誌，15，6，507-510，1966

12）Fusanori Hamajima, Chiemi Yasuhiro and Sawako Nishihara：Jap. J. Parasit., 18, 5, 498-504, 1969

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 22-27, 1987

オゾンガスによる殺菌・滅菌に関する検討

柏木義勝*, 植田忠彦*, 土屋悦輝*
市川久次*, 風間成孔*

Studies on Sterilization with Ozone Gas

YOSHIKATSU KASHIWAGI*, TADAHIKO UETA*, YOSHITERU TSUCHIYA*
HISATSUGU ICHIKAWA* and MASAYOSHI KAZAMA*

Keywords：オゾンガス Ozone gas, 細菌 Bacteria, 滅菌 Sterilization

緒　　言

オゾンの酸化力は自然界ではフッ素に次いで強く，殺菌，脱臭，脱色などにすぐれた効果を発揮することで知られている．

オゾンの利用は今世紀初期より，フランスを中心としたヨーロッパで，主として上水処理に用いられてきたが，近年になって次第にその利用法が注目され，水処理分野だけではなく，食品分野，工業分野，医療分野など多方面にわたって応用されはじめている．

過去におけるオゾン殺菌に関する研究は，そのほとんどが，オゾンガスの babbling による水中微生物の殺菌を試みたものであり[1~4]，オゾンガスによる気相での抗微生物作用のデーターはきわめて少ないのが現状である．

今回，われわれは，低濃度のオゾンガスを用いて，食品分野及び環境分野におけるフィールドでの殺菌効果試験を行う機会を得たので，その内容について報告するとともに，高濃度のオゾンガスを用いて滅菌に関する検討も行ったので，併せて報告する．

実験の部

実験　Ⅰ

実験装置：紫外線方式オゾンランプ（3W）と小型ファンが内蔵された装置

オゾン濃度計：比色分析方式オゾン濃度測定機，724-5型，MAST Development Corp., 米国

供試菌株：*Aspergillus niger* N-1株（当衛生研究所保存株），*Escherichia coli* JC-2株，*Staphylococcus aureus* IFO-12732株

供試菌の使用条件：プラスチックチューブ（ϕ12mm×100mm）の内面に，各供試菌液を一定量（*A. niger* 胞子：4.5×10^4個，*E. coli*：1.3×10^4個，*S. aureus*：1.2×10^5個）ずつ塗沫し，4℃で乾燥したもの

作用条件：オゾン濃度0.05ppm，温度20℃～25℃，相対湿度40～50%，作用時間：*E. coli* は6～72時間，*S. aureus* は3～15日間，*A. niger* 胞子は5～40日間

効果の判定：実験装置の各ガス吹出口に，各供試菌を塗沫したプラスチックチューブをそれぞれ接続し，オゾンガスを常時送風し作用させた．作用後，菌塗沫面を滅菌綿棒で充分に拭い，生理的食塩水で菌浮遊液を作成した後，さらに10倍段階希釈を行い，各希釈液について，*A. niger* はサブロー寒天培地による菌塗沫法で25℃7日間培養，*E. coli* は DHL 寒天培地，*S. aureus* はマンニット食塩培地による混釈法で，それぞれ37℃48時間培養した後，発育した集落数を算定し，対照（オゾンガス非作用のもの）との比により，各作用時点における生残率を算出した．

実験　Ⅱ

実験装置：紫外線方式オゾンランプ（30W及び100W）各2本が内蔵されたビル用空調機

オゾン濃度計：実験Ⅰと同じ

供試菌株：*A. niger* N-1株，*Bacillus subtilis* ATCC-6633株，*E. coli* JC-2株，*Legionella pneumophila* ATCC-33154株

供試菌の使用条件：供試菌液を寒天平板培地に，それぞれ一定量ずつ塗沫したもの（*A. niger* 胞子はサブロー寒天培地に1.6×10^2個，*B. subtilis* 芽胞はトリプトソイ寒天培地に2.3×10^2個，*E. coli* は DHL 寒天培地に4.2×

*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

10^2個, *L. pneumophila* はWYO培地に7.6×10^2個)

作用条件：オゾン濃度0.5ppm，温度12℃，相対湿度55%，作用時間1～9時間

効果の判定：実験装置を連続運転しておき，そのコイルボックス内に各菌塗沫平板をそれぞれセットし，オゾンガスを作用させた．作用後，*A. niger* は25℃で7日間，*B. subtilis* 及び *E. coli* は37℃48時間，*L. pneumophila* は37℃7日間それぞれ培養した後，発育した集落数を算定し，各作用時点における生残率を算出した．

実験 Ⅲ

オゾナイザー：無声放電方式オゾン発生装置（出力7.5KV，10KHz）

オゾンガスの採取：純酸素をオゾンナイザーに流し（流量1*l*／min.），発生したオゾンガス（11,000ppm）をテフロンバッグに採取し，さらに設定濃度にするために，純酸素により希釈を行った．

オゾン濃度計：紫外線吸収方式オゾン濃度計，1006-AHJ型，ダイレック株式会社，日本

供試菌株：*B. subtilis* ATCC-6633株，*B. stearothermophilus* ATCC-7953株，*A. niger* N-1株

供試菌の使用条件：供試菌の各濃度別浮遊液を市販の抗生物質検定用disc（φ 8 mm×1.5mm）に菌量が10^4個，10^5個および10^6個になるようにそれぞれ吸着させ，4℃で乾燥したもの

作用条件：オゾン濃度6,000ppm，温度：4℃，15℃，25℃，50℃，相対湿度（水添加量）：Dry（水不添加，＜10%），25%（0.12m*l*），50%（0.21m*l*），80%（0.33m*l*），飽和（1.0m*l*）

効果の判定：5*l*容量のデシケーター内を実験の場として用いた．加湿は設定相対湿度に相当する水量を器内の底に敷いたグラスファイバーろ紙に添加し，菌吸着discは分画シャーレに入れ，器内の中板上にセットした．閉蓋した後，真空ポンプにより器内を20mmHgまで脱気し，10分間，設定温度条件下に放置し，内部湿度を急速に高めた後，オゾンガスを導入し作用させた．作用後のdiscは液体培地（*B. subtilis* 及び *B. stearothermophilus* はトリプトソイブイヨン，A. nigerはブドウ糖ペプトン培地）中にそれぞれ投入し，*B. subtilis* は37℃48時間，*B. stearothermophilus* は55℃72時間，*A. niger* は25℃7日間培養した後，菌の発育の有無により殺菌効果を判定した．

結果及び考察

実験 Ⅰ

この実験は，フィールドにおける試験であり，食品導入管ともいうべきプラスチックチューブに，労働衛生基準[5]以下の濃度のオゾンガスを用いて，管内部を清浄化する目的で行ったものである．

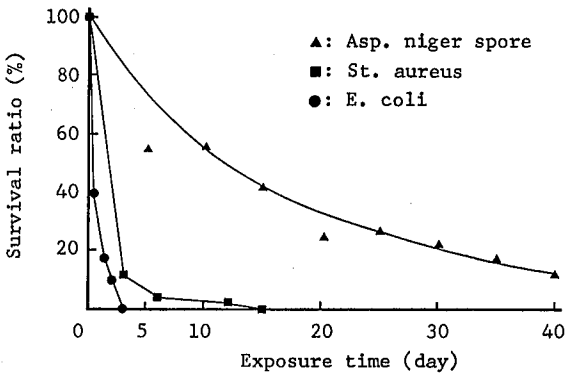


Fig. 1. Effect of O_3 gas exposure time on survival ratio of micro-organisms
Experimental conditions : O_3 gas conc.=0.05ppm, R. H. =40−50%, temp.=20−25℃

このきわめて低濃度（0.05ppm）のオゾンガスを用いて行った実験結果はFig. 1に示すごとく，*E. coli* は3日間，*S. aureus* は15日間で死滅しており，かつてElfordら[6]が空気殺菌にオゾンガスを利用し，0.05ppm程度でも栄養型菌に対して有効であると報告した結果と同様の結果を得た．また，*A. niger* 胞子に対しても，緩やかではあるが効果が現われており，作用40日目では生残率は12%まで減少している．

オゾンガス殺菌における相対湿度の効果については，実験Ⅲの項で詳述するが，この実験は冬期に行ったものであり，相対湿度が低かったために殺菌効果も比較的遅く現われたとも考えられる．しかし，0.05ppmという低濃度でのオゾンガスの殺菌性が認められたことは，今後のオゾンガス利用の面から，極めて有意義なことと思われる．すなわち，この濃度は労働衛生基準以下であるとともに，食品に限らず多くの基質に対して，ほとんど変質させることなく，緩やかではあるが確実に殺菌を行えるという利点があり，今後，多方面にわたって利用度の拡大が期待される．

実験 Ⅱ

実験Ⅱもフィールドにおけるオゾンガスの殺菌作用をみたものであり，実験に用いた装置は，ビル用空調機にオゾン発生機を装着したもので，空調のほかに空気浄化を目的に考案されたものである．

試験を行った空調機のコイルボックス内のオゾン濃度は0.5ppmであり，その殺菌効果はFig. 2に示した．

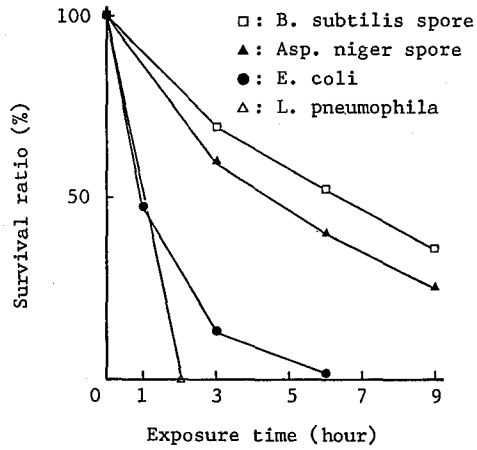


Fig. 2. Effect of O_3 gas exposure time on survival ratio of micro-organisms on plate agar medium
Experimental conditions : O_3 gas conc.=0.5ppm, temp.=12℃

栄養型菌の *L. pneumophila* は作用時間2時間で，すでに死滅し，*E. coli* も6時間後には98%の死滅率を示した．9時間後における *A. niger* 胞子の生残率は25.6%，*B. subtilis*（芽胞）の生残率は36.5%であり，真菌胞子より細菌芽胞の方にやや強い抵抗性が認められた．

Fig. 1 及び Fig. 2 に示したように，低濃度のオゾンガスに対し，栄養型菌では作用の初期に死滅率が高く現われ，その後は緩やかな減少傾向を示す．この早期に死滅する現象が菌本来の感受性であり，徐々に死滅していくのは，何らかの原因で，オゾンとの反応がブロックされるためではないかと考えられる．細菌芽胞及び真菌胞子の場合は栄養型菌とは異なり，初期効果は認められず，緩やかな減少傾向を示した．

実験 Ⅲ

近年，医療用具などの滅菌にはエチレンオキサイドガス（EOG）が広く用いられているが，滅菌後の残留EOGの毒性や二次化合物による環境汚染の問題がクローズアップされてきており，早急にこれに代るものの出現が望まれている．

われわれは，EOGに代るものとして，オゾンの殺菌力に注目し，これまでにもオゾンガスによる滅菌に関する検討を行ってきた．その結果，作用時間：3時間以内で滅菌を行うには，オゾン濃度は約6,000ppm以上を必要とすることを明らかにすることができた[7]．したがって今回は6,000ppmを基本濃度として実験を行った．特にオゾンガスの殺菌効果に影響を及ぼすと考えられる相対湿度と温度について検討した．

相対湿度の測定は，5 *l* 容量のデシケーター内で行い，温度50℃の条件下での水添加量と相対湿度の関係を検討した．水添加後，器内を20mmHgまで脱気し，10分間の放置により急速に内部湿度を高めた後，器内にガスを導入した．その経時変化を Fig. 3 に示した．また，各相対湿度条件下におけるオゾン濃度（初期濃度：6,000ppm）の経時変化を Fig. 4 に示した．湿度の高い

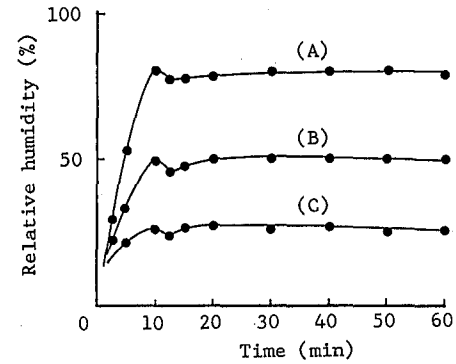


Fig. 3. Relationship between water volume and relative humidity by time
Experimental conditions : capacity of experimental box=5 liters, temp.=50℃, water volume added=(A) 0.33ml, (B) 0.21ml, (C) 0.12ml
Water was added into a experimental box warmed at 50℃ and the box was immediately decompressed until 20mmHg by vacuum pump. After warming in incubator at 50℃ for 10min., O_3 gas in a teflon bag was introduced to the box through a silicon tube.

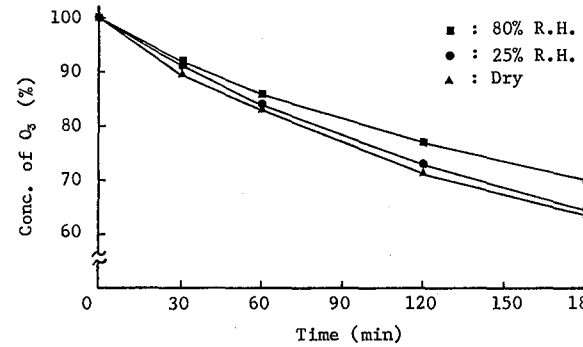


Fig. 4. Decay curves of O_3 gas concentration at different R. H. by time
Experimental conditions : O_3 gas conc.=6,000ppm temp.=50℃

程，オゾンの減衰率が少ないという結果が得られ，これは，水の分子がオゾン分子を遮断し，その反応を遅らせるためではないかと推察された．

オゾンガスによる滅菌に関する検討では，初めの実験として，各相対湿度（Dry，25%，50%，80%及び飽和）のオゾンガスの殺菌効果に及ぼす影響について検討した．実験条件はオゾンガス初期濃度：6,000ppm，温度：50℃であり，供試菌にはEOGに対し最も抵抗性のある *B. subtilis*（芽胞）と高圧蒸気滅菌の指標菌である *B. stearothermophilus*（芽胞）を用いた．

実験の結果はTable 1に示したが，滅菌レベルといわれる10^{-6}まで殺菌することができた条件は，相対湿度

Table 1. Relationship between R. H. and Sterilizing effect of O_3 gas

R. H.	Exposure time (min.)	B. subtilis (spores)			B. stearo. (spores)			B. subtilis (vegetative cells)		
		10^4	10^5	10^6	10^4	10^5	10^6	10^4	10^5	10^6
Dry	30	+	+	+	+	+	+	−	−	−
	60	+	+	+	+	+	+	−	−	−
	90	+	+	+	+	+	+	−	−	−
	120	+	+	+	+	+	+	−	−	−
	150	+	+	+	+	+	+	−	−	−
	180	+	+	+	+	+	+	−	−	−
25%	30	+	+	+	+	+	+	−	−	−
	60	+	+	+	+	+	+	−	−	−
	90	+	+	+	+	+	+	−	−	−
	120	+	+	+	+	+	+	−	−	−
	150	+	+	+	+	+	+	−	−	−
	180	+	+	+	+	+	+	−	−	−
50%	30	−	+	+	−	+	+	−	−	−
	60	−	+	+	−	+	+	−	−	−
	90	−	+	+	−	+	+	−	−	−
	120	−	+	+	−	+	+	−	−	−
	150	−	+	+	−	+	+	−	−	−
	180	−	−	+	−	+	+	−	−	−
80%	30	−	−	+	−	−	+	−	−	−
	60	−	−	+	−	−	+	−	−	−
	90	−	−	−	−	−	+	−	−	−
	120	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	150	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	180	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Saturation	30	−	−	+	−	−	+	−	−	−
	60	−	−	+	−	−	+	−	−	−
	90	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	120	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	150	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	180	−	−	−	−	−	−	−	−	−

O_3 conc.：6,000ppm, Temp.：50℃

＋：survival of micro-organisms, −：death of micro-organisms

Table 2. Relationship between Temperature and Sterilizing effect of O_3 gas

R. H.	Exposure time (min)	Temp.	B. subtilis (spores)			B. stearo. (spores)			A. niger (spores)		
			10^4	10^5	10^6	10^4	10^5	10^6	10^4	10^5	10^6
Saturation	30	4℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		15℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		25℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	90	4℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		15℃	−	+	+	−	+	+	−	+	+
		25℃	−	−	+	−	+	+	−	−	+

O_3 conc.: 6,000 ppm

+ : survival of micro-organisms, − : death of micro-organisms

80%以上で，作用時間は120分以上を要した．表に示す如く，相対湿度のオゾンガスの殺菌効果に及ぼす影響は顕著であり，オゾンガス殺菌には欠くことのできない要因であることが明らかになった．

次に，オゾンガス殺菌に及ぼす温度の影響について検討を行った．実験条件は，オゾンガス初期濃度：6,000ppm，湿度：飽和状態で，作用温度は4℃，15℃及び25℃の3段階について検討した．その結果はTable. 2に示したが，温度の上昇により殺菌効果も上る傾向がみられ，温度もオゾンガス殺菌を行う上の重要な因子であることが明らかになった．

とはいえ，内藤ら[8]は，水にオゾンガスを吹き込んで殺菌を行う場合には，低水温ほどオゾンの殺菌効果は増加すると報告しており，その理由として，水温低下は気液分配係数を増大させることになり，オゾン濃度が増加するためであると説明している．また，O'Donowan[9]，Yangら[10]も低水温ほどオゾン濃度が上昇することを報告している．これらの報告は，オゾンガスの吹き込みの際，低水温ほどオゾン濃度を高めることができるので，その結果として殺菌効果も上るということであり，気相における温度上昇により，オゾンガスの殺菌効果が上ることとは，次元の異なることであると考える．

オゾンに対し強い抵抗性を有する菌として，内藤ら[8]は，*B. coagulans*（芽胞）および*B. stearothermophilus*（芽胞）を挙げているが，今回のわれわれの実験では，そのうちの*B. stearothermophilus*（芽胞）を10^{-6}まで殺菌することができたので，オゾンガスによる滅菌も可能であると考えられる．しかし，高濃度のオゾンガスを用いて滅菌を行う場合には，滅菌対象物のオゾンによる材質の変化あるいは品質の劣化など，常に配慮せねばならない問題がある．今後さらに菌体とオゾンの反応を高める因子を明らかにし，可能な限り低濃度のオゾンガスで短時間の滅菌を行いうる条件を設定することが，今後の課題であると考える．

結　論

1．紫外線方式オゾンランプを用いて発生させた0.05ppm濃度のオゾンガスによる殺菌効果を検討した結果，栄養型菌の*E. coli*は3日間で，*S. aureus*は15日間で死滅し，*A. niger*胞子に対しても，作用40日後には生残率12%まで減少させており，効果が認められた．

2．紫外線方式オゾンランプを用いて発生させた0.5ppm濃度のオゾンガスの殺菌効果は，*L. pneumophila*は2時間で100%，*E. coli*は6時間で98%，*A. niger*胞子は9時間で74.4%，*B. subtilis*（芽胞）は9時間で63.5%の各死滅率を示し，比較的短時間での効果が認められた．

3．密閉容器内で，高濃度のオゾンガスを用いて，滅菌に関する検討を行った結果，*B. stearothermophilus*（芽胞）を10^{-6}レベルまで殺菌できた条件は，オゾンガス初期濃度6,000ppm，温度50℃，相対湿度80%以上で，作用時間120分以上を要した．特に相対湿度の上昇による殺菌効果に及ぼす影響は顕著であり，オゾンガス殺菌には欠くことのできない要因であることが明らかになった．また，温度の上昇によっても殺菌効果の上昇がみられ，温度もオゾンガスの殺菌効果を上げる因子の1つであることが認められた．

文　献

1) Burleson, G. R., Murray, T. M., Pollard, M. : *Appl. Microbiol.*, 29(3), 340-344, 1975

2) Foster, D. M., Emerson, M. A., Buck, C. E. : *Journal W. P. C. F.*,52(8), 2174-2184, 1980

3) Roy, D., Engelbrecht, R. S., Wong, P. K. Y. and Chian, E. S. K. : *Prog. Wat. Tech.*, 12, 819-836, 1980

4) Sproul, O. J., Pfister, R. M., Kim, C. K. : *Water Sci. Technol.*, 14(4), 303-314, 1982

5) 日本産業衛生学会：産業医学, 27, 195-209, 1985

6) Elford, W. S. and van den Ende, J. : *J. Hyg.*,42, 240-265, 1942

7) 柏木義勝，植田忠彦，土屋悦輝，風間成孔，林　勝宏，石井敏夫，二木鋭雄，中川茂男：医科器械学, 55（臨時号), 143-144, 1985

8) 内藤茂三，志賀一三：日本食品工業学会誌，29(1), 1-10, 1982

9) O'donowan, D. C. : *J. Amer. Water Works Assn.*, 57, 1167, 1965

10) Yang, P. P. W. and Chen, T. C. : *J. Food Sci.*, 44, 501, 1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 28-34, 1987

都内健康小児の酵素抗体法（ELISA）による百日咳抗体保有調査（1979～1986）

安部昭子*, 柴田　実*, 大橋　誠*

Incidence of Antibodies agaist Bordetella pertussis among Healty Children in Tokyo by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (1979～1986)

AKIKO ABE*, MINORU SHIBATA* and MAKOTO OHAHI*

Keywords：酵素抗体法, enzyme-linked immunosorbent assay, 百日咳 Bordetella pertussis, 疫学調査 epidemiological sarvay.

緒　言

百日咳は近年になり，その発生が激減した伝染病の一つである，これには抗生剤等の治療の進歩や生活環境の変化によるものと考えられるが，何よりも予防接種による予防接種効果に大きく依存していると思われる．

一方，百日咳予防接種は副作用事故が問題となり，1975年に一時中断した（東京都では9月～11月の間），その後接種開始年令を集団接種では0才から2才に引き上げ再開した．しかし，予防接種率の著しい低下をまねき，そのため患者発生は1975年頃より徐々に増加し，流行のきざしがみえた．（表1）

1981年10月には，副作用軽減とワクチン効果を高めるため，従来の百日咳死菌体ワクチン（旧ワクチンと略す）から菌体成分の精製分画を用いた沈降精製ワクチン（新ワクチンと略す）が用いられるようになり，接種率の回復にともない届出数から推察する患者発生は，現在では減少の傾向にある．

この新ワクチンの主成分であり，感染防御抗原と考えられている繊維状赤血球凝集素 Filamentous Hemagglutinin（F-HA）と白血球増多因子 Leukocytosis Promoting Factohemagglutinin（LPF-HA）を，抗原とする酵素抗体法（ELISA）が開発され，百日咳抗体の測定は，従来の凝集素価測定法からこの方法に移行してゆくものと思われる．東京都では，1983年よりこのELISA法を用いて抗体調査を行うようになった．

そこで，百日咳の流行状況と，新，旧ワクチンの免疫状況を知る目的で予防接種歴の明らかな保存血清を用いて1979年から1986年までの8年間の抗体保有状況を調査したので報告する．

表1．百日咳の届出患者数

年　次	東　京	全　国
1974	5	386
1975	35	1,064
1976	52	2,508
1977	106	5,420
1978	152	9,626
1979	114	13,105
1980	28	5,033
1981	33	3,368
1982	52	2,832
1983	50	2,459
1984	19	1,112
1985	30	938

（衛生年報No38　61年版）

材料および方法

材料：1979年から1986年までの都内の0～11才の健康小児血清994件を被検血清とした．調査対象とした被検血清の検体数，年令，予防接種歴を年度別に分類して表2に示した．

方法：ELISA抗体価の測定

厚生省公衆衛生局保健情報課編「伝染病流行予測調査

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

*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

表2．調査対象数

年度	検査数	年令											予防接種歴					接種率
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10≦	0	I(1)	I(2)	I(3)	II	(%)
1979	131	30	17	9	7	19	9	9	3	4	0	24	53	1	9	21	47	59.5
1980	99	14	15	7	2	9	9	12	6	2	10	13	38	3	4	11	43	61.6
1981	118	16	20	10	14	10	10	11	7	10	5	5	41	1	4	18	54	65.2
1982	116	8	27	14	13	17	8	11	7	2	4	5	51	4	5	19	37	56.0
1983	110	4	19	5	20	11	17	8	6	9	11	0	31	3	2	27	47	71.8
1984	117	3	22	15	15	13	15	4	8	11	4	7	36	2	4	21	54	69.2
1985	150	4	26	12	19	18	15	8	1	9	10	28	37	1	8	20	84	75.3
1986	153	5	22	21	10	23	8	6	10	5	11	32	41	3	5	17	87	73.2
合計	994	84	168	93	100	120	91	69	48	52	55	114	328	18	41	154	453	67.0

術式（昭和61年5月）」（術式と略す）に準じた．[1)]

百日咳 ELISA 用抗原（予研から分与）F-HA，LPF-HA（Lot-86-1）を抗原被覆用緩衝液で，各々500倍に希釈したもの（400ng／ml）を，マイクロプレート（ダイナティック社，サブストレートプレート，品番655070，M1294A）の各ウェルに50 μl ずつ分注し，一夜4℃に保存後抗原感作プレートとして使用した．

被検血清は，別のプレートで，10倍から2倍段階希釈し，標準ヒト血清（予研から分与）は，100倍から2倍段階希釈し同一の感作プレートに分注して使用した．

結果の算出の項は，術式では標準血清から作成した直線と平行性の認められた被検血清について算出する方法であるが，被検血清の抗体価の高低により一回の測定では平行性が求めにくいことと，標準直線から得られる傾斜角度により誤差が生じやすいため，本検査では一定の吸光度を終末点として求める下記の方法によった．

すなわち，標準血清の0.1u／ml 濃度の吸光度を求めAとする．次に被検血清は10倍から2倍段階希釈してAの吸光度に最も近い値を示した希釈倍数を求めて，これをBとする．

Bの希釈倍数×0.1を被検血清の ELISA u／ml とした．なお，Aを求める際に，プレート自体による反応の差があるため3点以上の段階希釈が必要であり，本検査では200倍から2倍段階希釈し，両対数方眼紙の横軸に希釈倍数を，従軸に吸光度をプロットし，0.1u／ml の吸光度を各プレート毎に求めた．

成績と考察

1．年令別，年次別抗体保有状況

感染防御抗体価は現在ではまだ決定されていないが，抗 F-HA，抗 LPF-HA 抗体はおよそ，それぞれ10，20ELISA u／ml であろうと推定されているので本調査では両抗体価共8u／ml 以上の抗体保有率について主に検討した．

8年間の8u／ml 以上の抗体保有状況を年令別と年次別にそれぞれ図1と図2に示した．

年令別に抗体保有状況をみると，0～1才では8u／ml 以上の抗体価を示すものは，両抗体共20％前後であるが，2才では F-HA，LPF-HA 抗体が各々51.6，43％と上昇し3才では64.71％と LPF-HA 抗体の上昇が著しく，4才では逆に78.3，61.6％と F-HA 抗体が急激に上昇している．その後，高年令では年令による明らかな差はなく3，4才で得た免疫をそのまゝ保持し，予防接種免疫期間の長いことが推察される．

年次別に抗体保有状況をみると，全国的に流行のあった79年では，5才以上で両抗体共75％以上の高い保有率を示し，81年も同様に高年令で90％以上の値を示した．

82年では，年令による差の少ない高い値を示した．83年と84年の4，5才は，50％前後の低い値であった．

2．予防接種歴別抗体保有状況

予防接種歴別による累積抗体保有率を表3に示した．LPF-HA 抗体の8u／ml 以上の保有率をみると，ワクチン接種では23.5％，1期1回44％，1期2回54％，1期3回64％，2期追加免疫完了では70％と接種回数が増えるに従って，保有率も増加している．F-HA 抗体については，1期1回ではほとんど一致した保有状況で，1期2回以上では，LPF より全体に8～9％高い保有率を示す同様の傾向であり，非接種では8u／ml 以上の抗体価の保有率に逆は低い値であった．

3．予防接種群と非接種群との保有率の比較

年次別に予防接種群と非接種群に分け，抗体価の分布を表4に示し，これを年次別に両群の8u／ml 以上の保有率を図3に示した．なお，1期1回接種児は予防接種

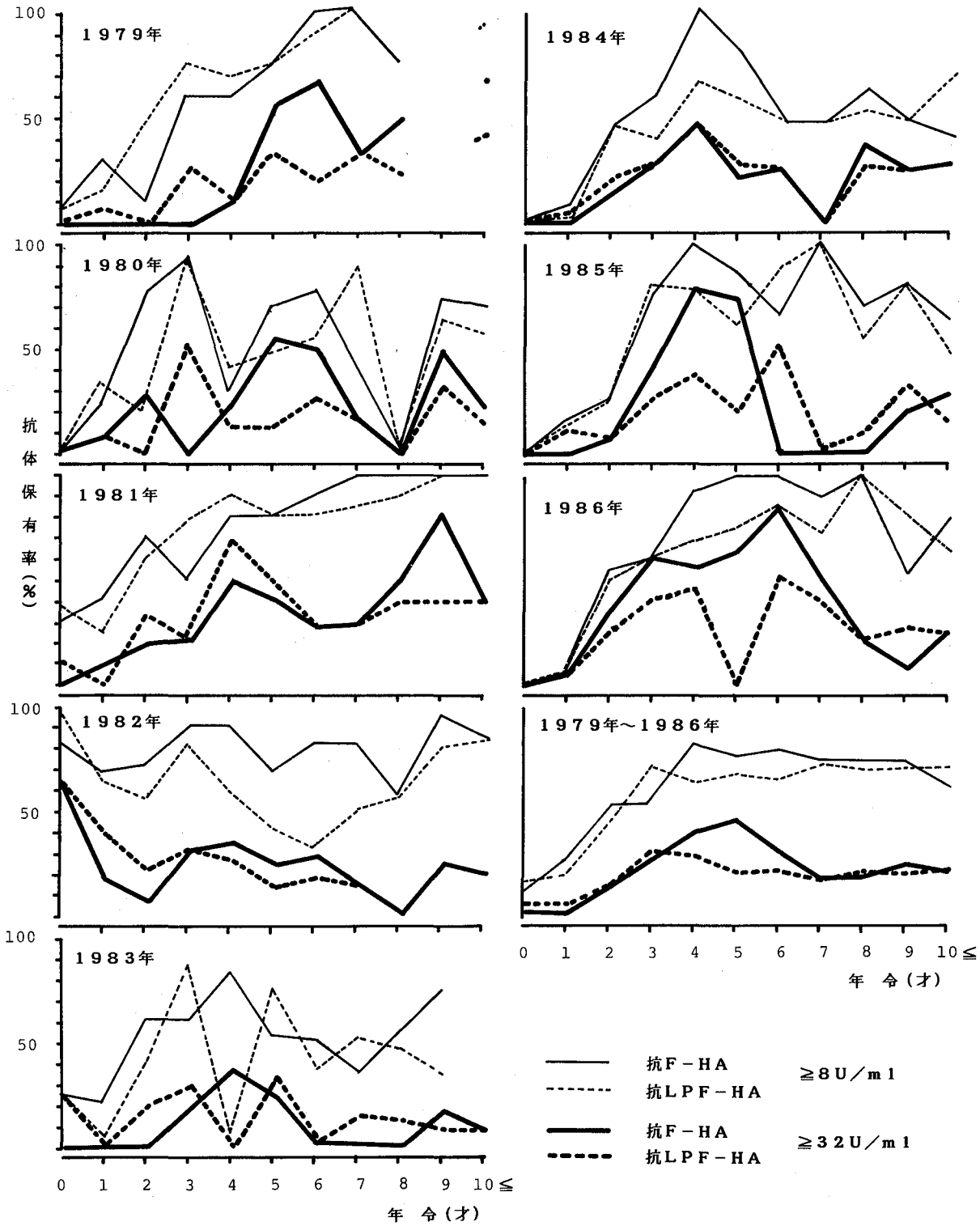


図1．百日咳 ELISA 抗体保有状況の年次推移

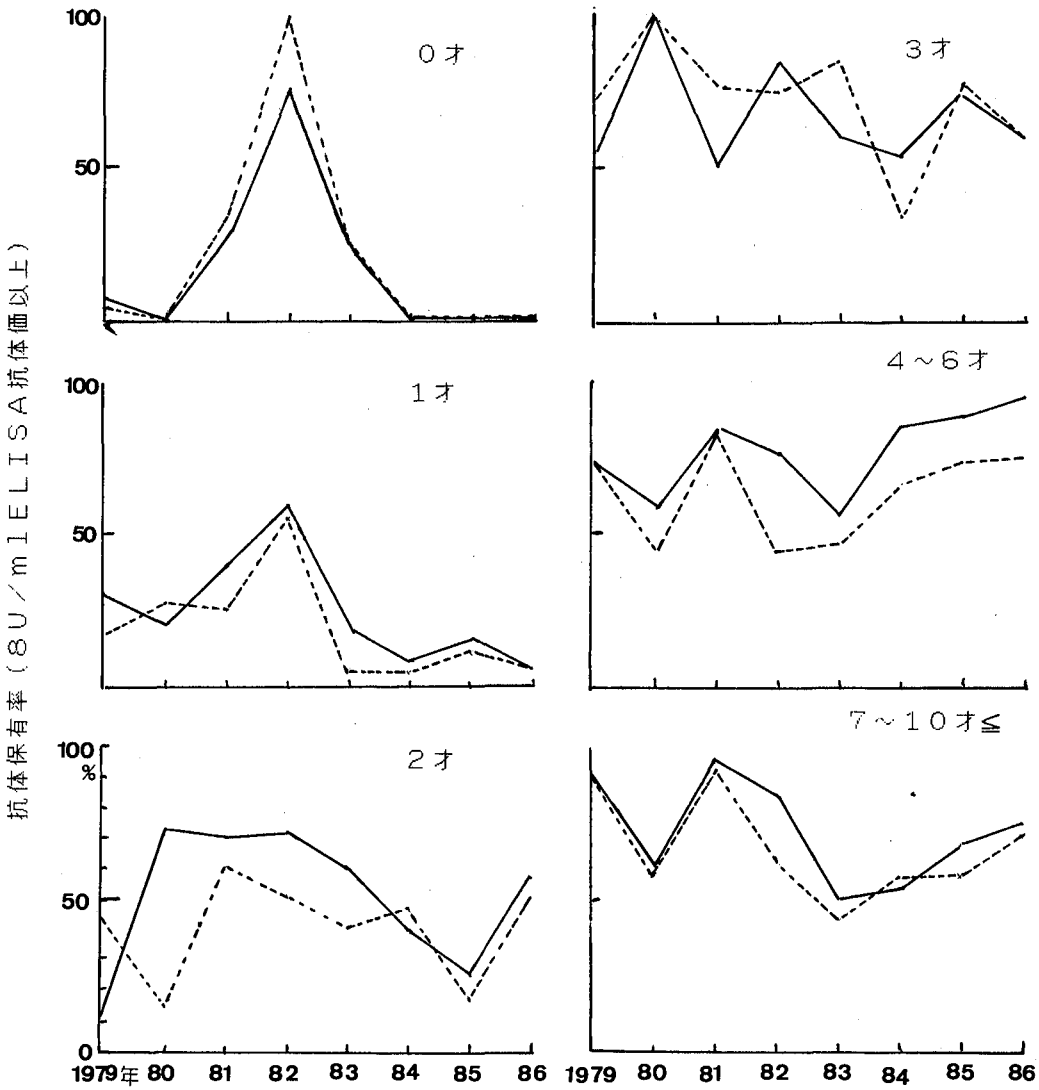


図2．年令による百日咳ELISA抗体保有状況の年度別変動

効果がないものとし接種群より除いた．図3から明らかなように，予防接種群では，当然非接種群より高い値を示し，8u／ml以上のF-HA抗体保有率は83年で61.8%とやや低値を示したのを除くと他の年では，70～80%の抗体を保有し，LPF-HAでもF-HAより10%程度低い同様の傾向を示しているが81年に際立った保有率の上昇が見られた．

非接種群についてみるとLPF-HAでは他の年が10%前後であるのに比べ，81年と82年では各々41.5%（17／41），70.6%（36／51）と高い保有率を示しこの年に限りF-HAより保有率が高い逆の現象を示している．

この81年と82年の非接種群に高い抗体保有率を示すことは，ワクチン株に対する凝集素価保有率においても同様で，1982年に結果を報告してきた[2]．

一方，2才児と3才児の接種率をみると，82年では28.6%（4／14），61.5%（8／13）で，83年の2才児では40%（2／5）と他の年より低率であった．これはワクチン切り変え時期による見合わせと，接種不可能な原因が存在したと推察される．

以上のことから，81年に顕性又は不顕性の感染があり続いて82年の非接種群に移行したと思われる．又，感染症定点観測調査による82年の都内の百日咳様疾患の報告

表3．百日咳予防接種歴別抗体保有状況（1979～1986）

予防接種回数	検数	抗F-HA抗体価（u／ml）											抗LPF-HA抗体価（u/ml）										
		<1	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	<1	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
0	328	106	40	43	54	38	25	14	5		1	2	112	53	51	35	22	21	15	12	5	2	
		(100)	(68)	(55)	(42)	(26)	(14)	(7)	(2)		(1)	(1)	(100)	(66)	(50)	(34)	(24)	(17)	(10)	(6)	(2)	(1)	
I(1)	18	3	2	4	1	3		4		1			3	1	5	1	1	4	2			1	
		(100)	(83)	(72)	(50)	(44)		(28)		(5)			(100)	(83)	(80)	(50)	(44)	(39)	(17)			(5)	
I(2)	41	3		5	7	7	9	3	3	3	1		3	3	6	7	9	6	4		2	1	
		(100)		(93)	(80)	(63)	(46)	(24)	(17)	(10)	(2)		(100)	(93)	(85)	(71)	(54)	(32)	(17)		(7)	(2)	
I(3)	154	8	1	13	21	33	33	18	11	13	2	2	8	7	16	25	35	23	16	11	4	3	6
		(100)	(95)	(94)	(86)	(72)	(51)	(29)	(18)	(11)	(3)	(1)	(100)	(95)	(90)	(80)	(64)	(41)	(26)	(16)	(8)	(6)	(4)
II	453	7	9	27	57	97	84	78	36	37	12	8	9	16	42	70	90	93	64	40	17	5	6
		(100)	(98)	(96)	(90)	(78)	(56)	(38)	(21)	(13)	(4)	(2)	(100)	(98)	(94)	(85)	(70)	(50)	(29)	(15)	(6)	(2)	(1)
計	994	127	52	92	140	178	151	117	55	54	16	12	135	80	120	138	157	147	101	63	28	12	12
		(100)	(89)	(85)	(73)	(59)	(41)	(26)	(14)	(8)	(3)	(1)	(100)	(86)	(78)	(66)	(52)	(37)	(22)	(12)	(5)	(2)	(1)

（ ）累積％

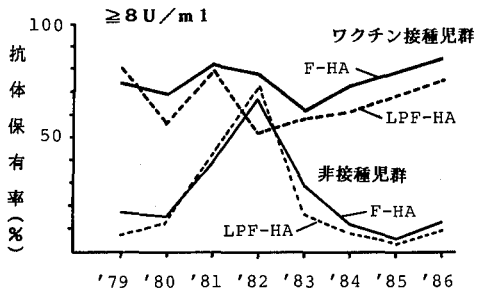


図3．百日咳ワクチン接種群と非接種群抗体保有状況の年次推移

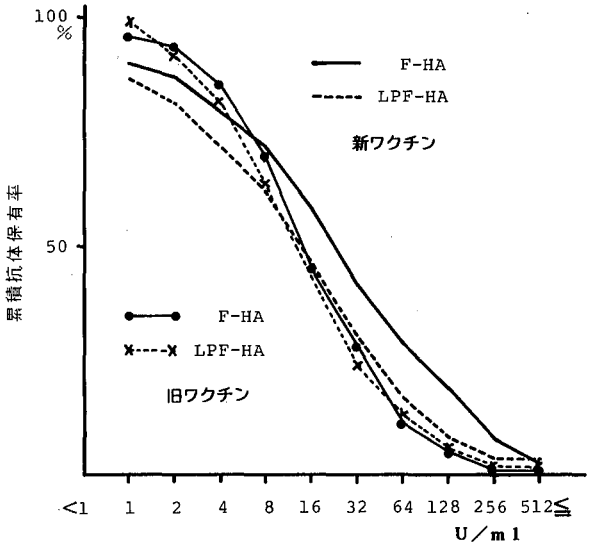


図4．百日咳の新ワクチンと旧ワクチン接種児群の抗体保有状況（1979～1986）

数は24,782（1定点当り年間12.6）と他の年より高値の報告がされている[3]．

しかし，全国的にも患者届出数から発生状況を推察する限りでは表1のように82年頃に患者の増加した形跡はみられない．このことから，抗生物質等による早期治療と，予防接種効果により，爆発的流行は防ぐことが可能になったためと考えられる．

4．新ワクチン接種群と旧ワクチン接種群との抗体保有率の比較

1981年9月より新ワクチンに切り変わっているため，新，旧ワクチン接種児が混在する可能性のある81年の対象児を除き，82年以後の接種対象児を新ワクチン群（214件）とし，81年以前を旧ワクチン群（528件）とした．図4は両ワクチン接種児群の累積抗体保有率を示した．8u／ml以上のLPF-MA抗体保有率では，新ワクチン群が62%，旧ワクチン群が63%で，F-HAではそれぞれ72.4%，70.3%の保有率を示した．又各抗件価レベルで比較すると新ワクチン群の保有率は，旧ワクチン群よりも高く，旧ワクチン群ではF-HAとLPF-HAの抗体保有率の差が少いが，新ワクチン群では明らかな保有率の差が見られた．

表4．年次別の百日咳予防接種群と非接種群の抗体価の分布

	年次	検数	F-HA 抗体価（u／ml）											8u/ml≦抗体保有率(%)	LPF-HA 抗体価（uml）											8u/ml≦抗体保有率(%)
			<1	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512		<1	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	
非予防接種群	1979	53	7	9	13	15	5	4						17.0	15	10	16	7	3	1		1				9.4
	1980	38	14	5	6	7	2	1	2			1		15.8	19	6	4	4	1	2	1	1				13.2
	1981	41	1	3	11	10	8	4	1	2			1	39.0		4	9	11	9	2	3	1	1	1		41.5
	1982	51	1	2	5	9	12	10	9	2			1	66.7	1	2	6	6	5	14	8	5	3	1		70.6
	1983	31	12	7		3	6	3						29.0	8	8	6	4	3			2				16.1
	1984	36	23	6	3		3			1				11.1	24	2	5	2		1	1	1				8.3
	1985	37	25	4	1	5	1	1						5.4	23	10	2					1	1			5.4
	1986	41	23	4	4	5	1	2	2					12.2	22	11	3	1	1	1	2					9.8
	計	328	106	40	43	54	38	25	14	5		1	2	25.9	112	53	51	35	22	21	15	12	5	2		23.5
予防接種群*	1979	77			7	13	14	13	15	8	5	1	1	74.0	3	1	3	8	21	21	10	7	2	1		80.5
	1980	58	1	1	6	10	11	7	10	6	5	1		69.0	1	3	10	11	10	12	4	6	1			56.9
	1981	76	3	1	3	6	19	16	10	9	5	2	2	82.9	1	1	5	7	17	18	9	9	5	4		81.6
	1982	61	1		5	8	20	12	9	2	4			77.1	2	9	19	10	8	7	3		1	2		34.4
	1983	76	4	2	10	13	15	19	8	1	2	2		61.8	3	5	8	16	18	11	10	3	1		1	57.9
	1984	79	3	2	6	11	16	17	10	5	5	1	3	72.2	3	6	8	14	10	15	15	4	2	1	1	60.8
	1985	112	4	3	5	12	23	22	22	8	10	3		78.6	4	4	11	17	21	21	17	6	3	2	6	67.9
	1986	109	2	1	3	12	19	20	15	11	17	5	4	83.5	5	4	10	10	27	16	12	13	9		3	73.4
	計	648	18	10	45	85	137	126	99	50	53	15	10	75.6	22	33	74	93	132	121	80	48	24	10	11	65.7

＊ 期1回予防接種を除く

結　論

感染防御抗原であり沈降精製ワクチンの主成分であるF-HAとLPF-HAを抗原とする酵素抗体法（ELISA）により，1979年から8年間の百日咳の自然感染状況とワクチン接種効果を調査し，その結果次の結論が得られた．

(1) LPF-HA抗体は，F-HA抗体に比べ全体に低い保有率であるが，感染初期には逆に高い値を示した．

(2) 1981年から82年にかけて，百日咳に感受性の高い0～1才児を7割以上含むワクチン非接種児群に著明な抗体保有率（8 u／ml 以上のF-HA抗体保有率66.7% LPF-HA70.6%）の高値が認められた．

(3) LPF-HA抗体は3才児に，F-HA抗体は4才児に高い保有率を示した．

(4) ワクチン接種回数が増えるに従って，抗体保有率も増加した．

(5) 沈降精製ワクチン接種群は，死菌体ワクチン接種群よりF-HA，LPF-HA抗体ともに保有率が高く，新ワクチンの有効性が確認された．

謝辞　本調査のため，血清採取等御協力をいただいた衛生局公衆衛生部防疫結核課，保健所関係各位に感謝致します。

文　献

1）厚生省公衆衛生局保健情報課編，伝染病流行予測調査衛式，昭和61年5月

2）東京都衛生局公衆衛生部防疫課：伝染病流行予測調査報告書，1982

3）厚生省公衆衛生局保健情報課編，昭和58年感染症サーベランヌ事業年報　昭和60年3月

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **38**, 35-41, 1987

東京都におけるポリオ流行予測調査 1982～1986年の5年間の調査成積

林　志直*, 関根整治*, 安東民衛*,
藪内　清*, 寺山　武**

Epidemiological Survey of Poliomyelitis in Tokyo, 1982 ～ 1986

YUKINAO HAYASHI*, SEIJI SEKINE*, TAMIE ANDO*,
KIYOSHI YABUUCHI* and TAKESHI TERAYAMA**

Kewords：ポリオウイルス poliovirus, ウイルス分離 virus isolation, 中和抗体 neutralizing antibody

緒　言

我が国においては1960年に5,606名のポリオ患者が発生し大きな社会問題となったが，これを契機として翌年から生ワクチン一斉投与が行われたため患者の発生は劇的に減少し[1]，それ以後国内に野生株は存在しないと考えられるまでになった[2]．しかし世界的にみると，予防接種が普及していない国では依然としてポリオ患者が多発しており，1984年の集計によれば東南アジア，西太平洋地域を中心として麻痺型ポリオは，24,775例が報告されている[3]．したがって国際交流が増加している現在では，これらの野生型強毒株が国内に持込まれる危険性は常に存在している．

ポリオ流行予測調査は，感染源であるポリオウイルスの浸淫状況や本ウイルスに対する抗体保有状況を把握するため1962年に開始され，全国の地方衛生研究所において実施されている．東京都における1981年までの調査成績は既に報告した[4,5]．今回は1982～1986年までの成績について報告する．また，感受性調査では1984年から攻撃ウイルスの変更があり，これが測定値に及ぼす影響についても考察した．

材料と方法

1．感染源調査

健康児糞便：1982年から1986年にかけて毎年5月から10月の間に三多摩地区3ブロックと23区内5ブロックの合計8ブロックを選定し，当該地区のポリオ生ワクチン投与日から2か月以上経過した時点で0～6歳の健康小児から糞便を採取した．糞便は，イーグルMEM（日水製薬）に牛胎児血清（General Scientific Laboratories）1％，L-グルタミン（大日本製薬）2 mM，ampicillin（明治製菓）300 μg／ml，streptomycin と Kanamycin（明治製菓）各400 μg／ml，amikacin（ブリストル萬有）10 μg／ml，$NaHCO_3$ 0.12％を加えた細胞維持液で10％乳剤として凍結した．融解後に3,000rpm 10分間の遠心により沈査を除き，上清に ampicillin 1.5mg／ml，streptomycin と Kanamycin 各 2 mg／ml，amikacin 0.05mg／ml を加えた．凍結融解以後の操作を再度くり返し，ウイルス分離材料とした．材料は試験まで−20℃に凍結保存した．

ウイルス分離試験：糞便からのウイルス分離試験は流行予測事業急性灰白髄炎検査術式[6]に準拠した．試験に使用した細胞はFL，Hep2，BGM（大日本製薬），Vero細胞（デンカ生研）の4種類である．イーグルMEMに牛胎児血清5％，L－グルタミン2 mM，ampicillin300 μg／ml，streptomycin と kanamycin 各400 μg／ml，amikacin10 μg／ml，$NaHCO_3$ 0.12％を加えて細胞増殖液とした．24穴プラスティックプレート（Nunc）に細胞を単層培養し，細胞維持液に交換した後，材料を接種した．ウイルス分離は，CO_2濃度を5％に調整した37℃炭酸ガス培養装置内で行い，細胞変性効果を指標に三代継代した．分離したウイルスの同定は中和試験[7]で行い，市販

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

のエンテロウイルス抗血清（デンカ生研），アデノウイルス抗血清（Ismunit）を20～100単位に調製し，試験に用いた．

2．感受性調査

健康都民血清：感染源調査と同時期に0～1，2～3，4～6，7～9，10～14，15～19，20歳以上の7区分の年齢層にわけて，一般健康都民から採血した．血清分離を行った後，検査まで−20℃凍結保存した．

中和抗体価測定：流行予測事業急性灰白髄炎検査術式[6]に準拠し，マイクロ法[7]で行った．攻撃ウイルスは，調査期間中に変更された．すなわち1982，1983年はポリオウイルス1型 Mahoney 株，2型 MEF-1株，3型 Saukett 株を使用したが，1984年からは各血清型とも Sabin 生ワクチン株である Lsc 2 ab，P712 ch 2ab，Leon $12a_1$ b 株を使用した．細胞は BGM 細胞を使用し，96穴マイクロプレート（Nunc）に倍養した．被検血清はトランスファープレート（Dynatech Laboratories）内で希釈し，$100TCID_{50}/25\,\mu l$ に調製した各ウイルスと混和し，37℃ 1時間反応させた後，細胞維持液に交換した BGM 細胞に接種した．被検血清の中和抗体価は，感染価が $100TCID_{50}/25\,\mu l$ のウイルスを中和できる最高血清希釈倍数で表示した．

結　果

1．感染源調査

1）年次別ウイルス分離成績：表1に示したように1982～1986年の5年間に合計591検体から102株（17.3%）のウイルスが分離された．検出ウイルスにはポリオウイルス4株が含まれた．それ以外の検出ウイルスでは，コクサッキーB群，アデノウイルスが多く，それぞれ全分離株の53.7%，32.4%を占めた．検出されたウイルスの型別は16種類と多彩であり，ポリオウイルス2型（1株），3型（3株），コクサッキーB群1型（2株），2型（4株），3型（17株），4型（20株），5型（7株），6型（8株），エコー7型（1株），9型（2

表1．年次別感染源調査成績（1982～1986年）

調査年次	検索例数	分離陽性例数	分離率（%）	分離ウイルス／血清型															
				Polio		Coxsackie B						Echo			Adeno				
				2	3	1	2	3	4	5	6	7	9	24	1	2	3	5	6
1982	114	21	18.4	1*	1*			6		2					5	1	3		2
1983	119	7	5.9						2					4	1				
1984	123	21	17.1					3	7	4					2	1		4	
1985	115	28	24.3					7	9		8				3	1			
1986	120	25	20.8		2*	2	4	1	2	1		1	2		3	2		2	3
合　計	591	102	17.3	1	3	2	4	17	20	7	8	1	2	4	14	5	3	6	5

*：採取時期が検査材料採取基準に不適

表2．年齢別ウイルス分離状況

年　齢	検索例数	分離陽性例数	分離率（%）	分離ウイルス／血清型															
				Polio		Coxsackie B						Echo			Adeno				
				2	3	1	2	3	4	5	6	7	9	24	1	2	3	5	6
<1	65	7	10.8	1*				1			1			1	2			1	
1	118	31	26.3		1*	2	2	5	6	2	2		1		3	2	1	2	2
2	92	18	19.6		1*			5	2	3	1		1	1	1		1	1	1
3	103	14	13.6					3	2	1	2				4	1		1	
4	98	12	12.2				2	1	1	1	1	1		1	1	1		1	1
5	75	15	20.0		1*			2	6		1			1	2		1		1
6	40	5	12.5						3						1	1			

*：採取時期が検査材料採取基準に不適

株), 24型（4株), アデノ1型（14株), 2型（5株), 3型（3株), 5型（6株), 6型（5株）であった. 年次別の分離率は1983年には5.9%と低かったが, 他の4年の成績は17.1～24.3%であった.

検出されたポリオウイルスの採取時期は, いずれも検査材料採取基準の『当該地区の生ワクチン投与日から2ケ月以上経過した時点』をはずれたものであり, 調査の主旨にそぐわなかった. しかし, 1982年に分離された3型1株については, 国立予防衛生研究所に送付してrct／40マーカー試験[8], 血清学的型内鑑別試験[8]（Wecker変法, McBride法）を依頼したところ, rctマーカーは（±), 血清学的にはワクチン様株と判定された.

表3. 感受性調査成績（1982, 1983年）

年次	年齢	件数	中和抗体価 (2^n) 1型 <2	2	3	4	5	6	7	8	9	GM	2型 <2	2	3	4	5	6	7	8	9	GM	3型 <2	2	3	4	5	6	7	8	9	GM
1982	0- 1	38	11		7	4	5	3	5	2	1	5.2	15		3	2	6	3	7	2		5.7	25		3	4	1	1	1	1	2	5.3
	2- 3	35	7		3	3	8	11	3			5.3	1		6	9	5	10	2	2		5.0	13		5	9	7		1			4.2
	4- 6	52	19		8	14	9	2				4.2	5		10	13	13	5	5	1		4.7	25		14	5	5	3				4.3
	7- 9	22	9		7	2	1	2		1		3.5	3		6	4	4	3	2			4.5	18		2	2						3.5
	10-14	36	17		6	5	3	2				4.2	8		9	10	6		3			4.2	24		9	1	2					3.4
	15-19	43	24		9	5	3	2				3.9	13		13	8	8	1				3.9	22		14	4	2	1				4.0
	20≦	40	10		7	12	4	4	2	1		4.5	5		7	13	10	3	1	1		4.5	6		8	12	6	5	3			4.5
1983	0- 1	20	7		1	2	4	2	4			5.5	7			1	2	4	3	3		6.4	14	1	2		1			2		4.8
	2- 3	25	5	3	3	2	7	3	2			4.5	1		3	3	6	5	5	2		5.5	8	3	3	7	2	2				3.8
	4- 6	21	10	3	5	2	1					3.1	1		5	3	5	5	2			4.8	10	3	3	2	2	1				3.5
	7- 9	22	12	2	4		3	1				3.7	1	1	6	3	7	4				4.3	13	4	5							2.6
	10-14	21	8	5	7	1						2.7	2	1	2	8	6	2				4.3	16	5								2.0
	15-19	24	13	5	3	3						2.8		1	13	3	6	1				3.7	10	6	3	2	2	1				3.2
	20≦	21	3	4	6	1	3	3				3.5	1	2	3	7	2	2	2	1		4.2	6	4	5	3	1		1			3.1

GM：Log_2（幾何平均値）

表4. 感受性調査成績（1984～1986年）

年次	年齢	件数	中和抗体価 (2^n) 1型 <2	2	3	4	5	6	7	8	9	GM	2型 <2	2	3	4	5	6	7	8	9	GM	3型 <2	2	3	4	5	6	7	8	9	GM
1984	0- 1	22	4		1		1	3		8	5	7.5	3			1		2	2	8	6	7.8	11	1	1		5	3	1			5.0
	2- 3	19					1	2	4	7	5	7.6	1				2	1	9	5	1	7.1	3	2	4	3	5		1	1		4.3
	4- 6	22	1			3	4	2	6	2		6.5	2					5	8	6	1	7.2	3	2	8	3	2	1	1	2		4.2
	7- 9	16	6			4	2	2	2			5.2				1	1	5	5	2	2	6.8	3	4	6	1	1			1		3.3
	10-14	27	2	4	4	8	7	1		1		4.0	4			2	8	6	6	1		5.8	8	7	9	2	1					2.8
	15-19	17	2	3	1	4	4	1	2			4.3	6			2	2	3	3	1		5.9	3	2	6	3	2	1				3.6
	20≦	25	2	3	2	4	6	5	3			4.7	14			3	2	5	1			5.4	7	2	5	5	2	1	3			4.2
1985	0- 1	19	6		1	2	4	2	4			5.5	6			1	2	4	3	3		6.4	13	1	2		1			2		4.8
	2- 3	25	5	3	3	2	7	3	2			4.5	1		3	3	6	5	5	2		5.5	8	3	3	7	2	2				3.8
	4- 6	21	10	3	5	2	1					3.1	1		5	3	5	5	2			4.8	10	3	3	2	2	1				3.5
	7- 9	22	12	2	4		3	1				3.7	1	1	6	3	7	4				4.3	13	4	5							2.6
	10-14	22	9	5	7	1						2.7	2	1	2	8	6	3				4.4	16	5	1							2.2
	15-19	24	13	5	3	3						2.8		1	13	3	6	1				3.7	10	6	3	2	2	1				3.2
	20≦	21	3	4	7	1	3	3				3.7	1	2	3	7	3	2	2	1		4.5	7	4	5	3	1		1			3.4
1986	0- 1	28	2	1	1		3	5	6	5	5	6.8	2				1	3	5	11	6	7.7	14	1		3	4	1	3	2		5.5
	2- 3	31	2			1	3	9	7	4	5	6.9	1	2		1		5	10	8	4	6.9	7		4	5	8	4	1	1	1	5.0
	4- 6	38			1	6	3	8	9	5	6	6.5				2	11	5	10	7	3	6.5	4	1	11	8	4	4	3	3		4.6
	7- 9	26	3	3	5	4	2	5	3		1	4.7				4	8	7	6	1		5.7	6	2	9	2	4	2	1			3.8
	10-14	49	10	8	10	9	5	4	3			3.9			4	9	12	9	10	3	2	5.6	16	2	12	7	3	5	3	1		4.3
	15-19	34	6	7	7	10	1		2	1		3.6		1	6	6	9	6	2	4		5.0	10	4	5	8	2	2	3			4.1
	20≦	48	12	4	10	9	7	4		1	1	4.2		3	6	8	12	6	9	3	1	5.2	10	4	9	12	6	1	2	3	1	4.4

GM：Log_2（幾何平均値）

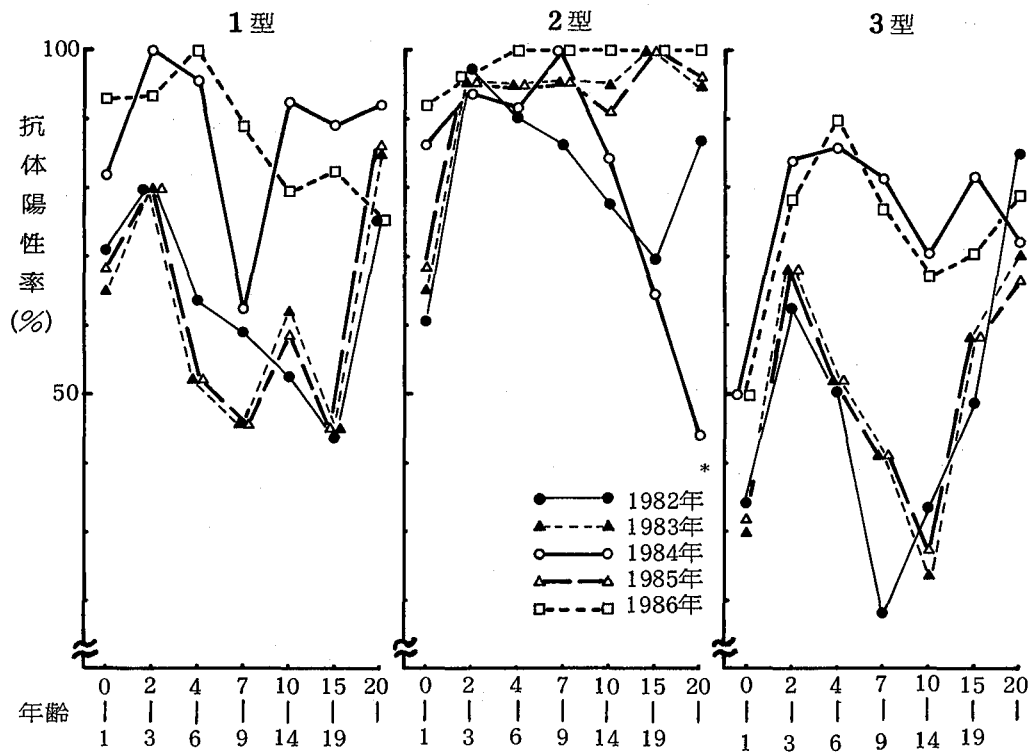


図1．ポリオウイルス中和抗体陽性率（1：4＜）
＊：1982，1983年は強毒株，1984，1985，1986年は弱毒株を使用

2）**年齢別ウイルス分離成績**：年齢別のウイルス分離成績を表2に示した．ポリオウイルスは生ワクチン投与年齢層である0～1歳から2型1株と3型1株が検出されたほか，2歳児と5歳児から3型1株ずつが検出された．年齢別の分離率は1歳の26.3%が最も高く，2歳と5歳においても20%程度の値を示した．その他の年齢層は1歳以下の10.8%から3歳の13.6%までに分布していた．コクサッキーB群ウイルスとアデノウイルスはどの年齢層においても分離されたが，1歳以下の年齢層においてコクサッキーB群ウイルスの検出頻度は低かった．

2．感受性調査

1）**年齢別抗体保有率**：ポリオウイルス中和抗体測定結果を表3，表4に集計し，1：4以上の年齢別抗体保有率を図1に示した．これらの成績から，いずれの型についても生ワクチン投与の終了する2歳までに高い抗体保有率を得ていることが明らかにされた．2～3歳の年齢層における抗体保有率は，2型において最も高く調査期間中94.7～97.1%を示し，ついで1型，3型の順にそれぞれ80.7～100%，62.8～84.2%であった．さらに2型は2歳以上の年齢層において，1982年と1984年の2年分の成績では異なるが，ほかの調査年度では90%以上の高い抗体保有率を維持していた．これに対し1型と3型では年齢層により抗体保有率の変動が認められた．1型は7～9歳と15～19歳の年齢層において，3型は10～14歳の年齢層において抗体保有率が低下していたことが多かった．

2型抗体保有率は，攻撃ウイルスが強毒株から弱毒ワクチン株に変更されてもほとんど変化なく高い値を示した．しかし1型と3型では20歳以下の年齢層において，生ワクチン株を使用した1984年と1986年の抗体保有率は他の年次の成績よりも高くなっていた．

2）**年齢別幾何平均抗体価**：1：4以上の抗体保有者について年齢別に求めた幾何平均抗体価を図2に示した．抗体保有率の解析結果と同様に，平均抗体価は2型が最も高く，ついで1型，3型の順であった．2型は加齢に伴う平均抗体価の低下は比較的少なかったが，1型はワクチン投与直後に2型と同程度の高い平均抗体価を示したものの，加齢とともに急激に低下していた．3型はワ

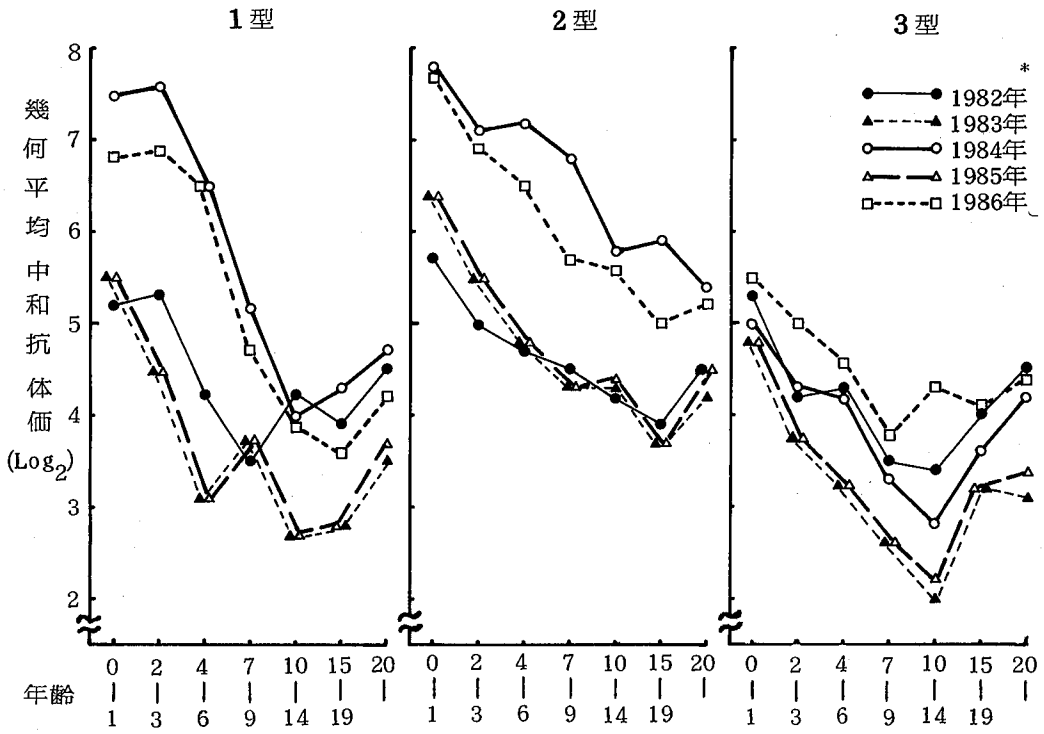


図2．年齢別幾何平均中和抗体価
＊：1982，1983年は強毒株，1984，1985，1986年は弱毒株を使用

クチン投与直後でも平均抗体価は1型，2型よりも低く，どの年齢層においても幾何平均値が5.0以上となることはきわめて少なかった．

攻撃ウイルスが変更されても，3型の平均抗体価はほとんど変化しなかった．しかし1型は10歳以下の年齢層において大きく変化し，弱毒株を用いた1984年と1986年の平均抗体価は他の年次の成績よりも高くなっていた．2型は全年齢層において，1984年と1986年の成績は他の年次のそれより高くなっていた．

考　察

今回の感染源調査においてポリオウイルス2型1株，3型3株が都内に居住する健康小児から検出された．しかし，いずれの場合も採取時期が当該地区の生ワクチン投与日から2ケ月以内であり，これらの分離株は生ワクチン由来と推測された．事実，国立予防衛生研究所において行われた血清学的試験の結果，生ワクチン様株と判定された．したがって，都内では依然としてポリオウイルス野生株の存在しない安全な環境が維持されているものと考えられる．しかし，1981年に成田において東南アジアからの国際線航空機の屎尿汚水から野生型ポリオウイルス1型が検出されたこと[9]，国内にも僅かながら定形ポリオ患者の発生が認められ，これらの患者から野生株が分離されていること[10]などから，今後も綿密な調査を継続する必要があると考えられる．

年次別ウイルス分離率は5.9～24.3%，平均17.3%であり前回報告[5]した1972～1981年の分離率5.4～16.7%，平均11.4%を上回った．微生物検査情報[11]によれば，近年無菌性髄膜炎などのエンテロウイルス感染症の流行が報告されており，これに伴って不顕性感染者の増加も当然予想される．このためウイルス分離率が上昇したのかもしれない．

感受性調査によりポリオウイルス2型に対する抗体は保有率，平均抗体価ともに高く，既報[5]と同様に良好な免疫状態を維持していることが明らかにされた．しかし，1型と3型には抗体保有率の低い年齢層の存在が示された．これは図3に示した1981年，1984年の全国的な感受性調査成績[12,13]においても同じ傾向を示した．全国調査成績において抗体保有率を比較すると，生ワクチン投与による免疫獲得が悪かった集団は，その後も抗体保有率が低いまま経過している．このような抗体保有率が低

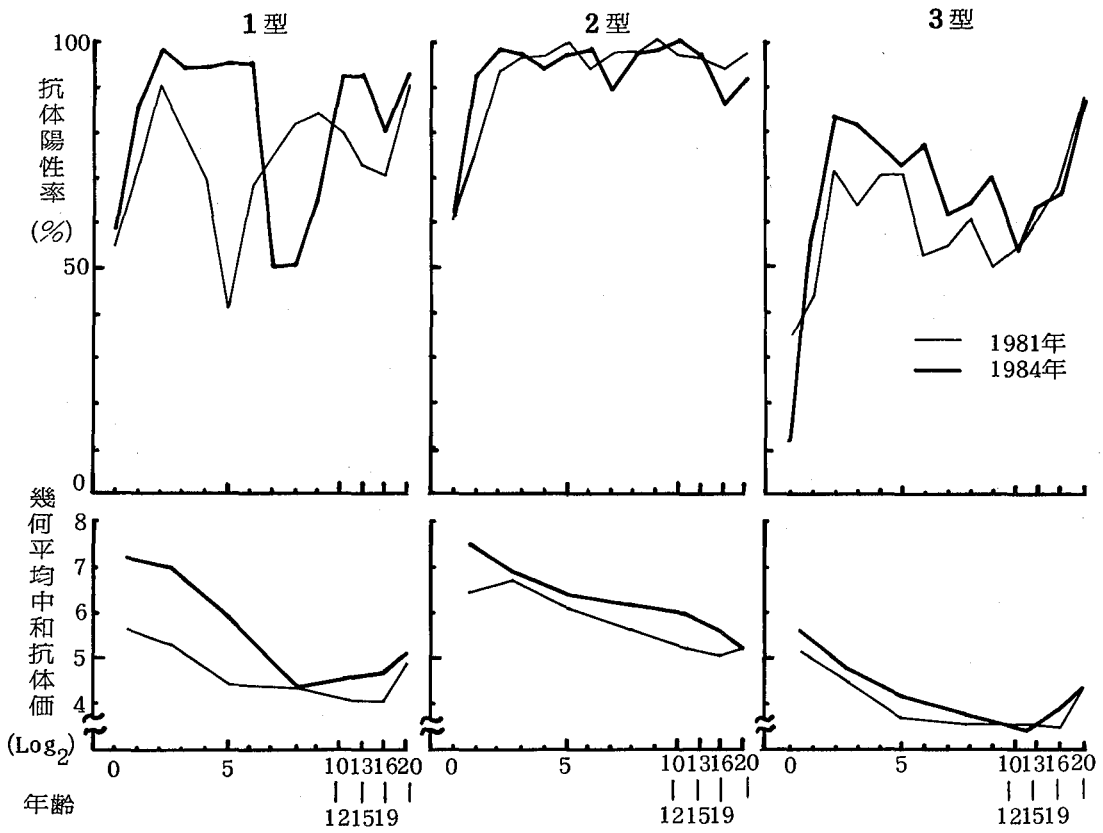


図3．ポリオウイルス抗体陽性率と平均抗体価（全国調査成績）

い年齢層をなくすには高いワクチン接種率を維持するとともに，諸外国のように追加免疫[14]や不活化ワクチンの併用[15]などワクチン投与法を検討することも必要と考えられる．

今回の感受性調査では，調査期間中に攻撃ウイルスが変更された．図3に示した全国調査成績によれば，2型の抗体保有率は攻撃ウイルスの変更前後で差が認められず，1型と3型において上昇した．平均抗体価は3型においてほとんど変化がなく，1型と2型は上昇を示し，特に若年層における1型の変化は著しかった．東京都における調査でも同様の結果が得られた．攻撃ウイルスの変更に先立って，同一血清について強毒株とワクチン株に対する中和抗体価を比較した調査成績[13]によれば，両ウイルスの抗原性が異なるため1：4よりも高い抗体価を基準とした保有率や平均抗体価を攻撃ウイルス変更前後で直接比較することはできないという．したがって今後，調査成績を集計するにあたって，この点を考慮する必要がある．

以上のようにポリオにかかわる状況は，多くの問題を抱えている．国際交流の増加に伴い国内へ野生株が持込まれる危険性，抗体陰性者が海外のポリオ流行地において感染発症する危険性は常に存在している．このため，流行予測事業のみならずポリオに関する疫学調査の重要性はより高まっているといえよう．

文　献

1）平山宗宏：臨床とウイルス，9(2)，139～147，1981
2）Takatsu, T., Tagaya, I. and Hirayama, M.：*Bull. WHO*, 49, 129～137, 1973
3）CDC：*M. M. W. R.*, 35(43), 671～674, 1986
4）藪内　清，矢野一好，柴田タツ美，林　志直，岩崎謙二：東京衛研年報，30(1)，30～34，1979
5）藪内　清，矢野一好，柴田タツ美，林　志直，岩崎謙二：東京衛研年報，33，54～58，1982
6）厚生省公衆衛生局保健情報課：伝染病流行予測事業検査術式，1978
7）井上　栄：微生物検査必携ウイルス・リケッチア検

査，第2版，柳沢　謙編，65，1978，日本公衆衛生協会，東京
8）多ケ谷　勇，原　　稔：ウイルス実験学各論，改訂2版，国立予防衛生研究所学友会編，151，1982，丸善，東京
9）甲原照子，小松俊彦，緒方もも子，北村　敬，高橋純雄，安方魁人：臨床とウイルス，13(1)，97～101，1985
10）Tagaya, I., Nakao, C., HARA, M. and Yamadera, S.：*Bull. WHO*, 48, 547～554, 1973
11）国立予防衛生研究所中央検査室：病原微生物検出情報：7(4)，61～80，1986
12）厚生省公衆衛生局保健情報課：伝染病流行予測調査報告書，1981
13）厚生省公衆衛生局保健情報課：伝染病流行予測調査報告書，1984
14）CDC：*M. M. W. R.*, 31(3)，22～35，1982
15）甲野礼作：臨床とウイルス，11(3)，230～232，1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 42-47, 1987

Pasteurella multocida の選択分離法

丸山　務*, 神崎政子*, 宇佐見俊彦**, 水谷　浩**

Two Selective Isolation Methods for *Pasteurella multocida* from Contaminated Materials

TSUTOMU MURUYAMA*, MASAKO KANZAKI*, TOSHIHIKO USAMI**
and HIROSHI MIZUTANI**

Summary

Two methods were devised to selectively isolated *P. multocida* from contaminated specimens such as oral cavity of animals or human trauma.

One is a passage through mouse utilizing high lethal toxicity of *P. multocida* for the animal. LD_{50} of mice intraperitoneally innoculated with strains derived from cat is $1.1\times10^{1}\sim3.3\times10^{2}$ cells. When intraperitoneally innoculated with the specimen, *P. multocida* undergoes selective enrichment and it was recoverable as pure culture from blood of the heart of mice which died within 48 hours.

The other method utilizes the fact that *P. multocida* is highly resistent to vancomycin and clindamycin and a selective isolation medium (VC-2 medium) was devised which was added with 25 μg/ml and 1 μg/ml of these antibiotics respectively in blood agar. The detection rate for *P. multocida* with this medium was higher than that with the other selective media, and detection of strains derived from dogs for which mice lethal toxicity was low was particularly efficient.

By using these two methods, an attempt was made to isolate *P. multocida* from oral cavities of domestic dogs (92) and cats (324) from all over Japan, and 75.0% and 97.8% of the animals were respectively confirmed positive.

Keywords: selective isolation method, *Pasteurella multocida*, lethal toxicity, vancomycin, clindamycin

緒　言

家畜の出血性敗血症や家禽コレラの起因菌である *Pasteurlla multocida* は，一方ではその非出血性敗血症型の菌がウシやブタの呼吸器疾患やウサギのスナッフル，あるいはヒトにも創傷感染や気道感染をおこすことが知られている[1]．この非出血性敗血症型菌は健康な動物の口腔や上部気道に広く分布しているといわれているが[2]，適当な選択分離培地がないために，複雑な細菌叢を形成する動物のこれら局所から本菌を分離することがきわめて困難であった．したがって，ヒトにおけるパスツレラ症の多くがイヌやネコの咬・掻傷に起因することが推定されながら感染源としてのこれら動物の保菌状態については正確な調査が行われていないのが現状である[3-5]．

著者らは，非出血性敗血症型 *P. multocida* を人畜共通感染症の起因菌としてとらえ，その疫学的背景を明らかにするには本菌の選択分離法の確立が先決であると考え，本菌の動物に対する高い致死毒性に着目したマウス腹腔内接腫による菌の回収方法（マウス通過法）と抗生物質を選択物質として添加した選択分離培地の開発について検討した．

*東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
**東京都動物管理事務所

材料および方法

1．供試菌株

P. multocida のマウスに対する LD_{50} 値の測定に用いた菌株はネコ口腔由来5株，イヌ口腔由来5株で，いずれも継代培養を重ねない新鮮株である．

2．LD_{50} 値の測定

ICR系6～8週令雌マウスを用いた．

上記菌株を Dextrose starch agar（DSA, Difco）平板に塗抹，37℃，18時間培養したものをかき取り，滅菌生理食塩水で 10^0～10^8 個/ml に階段希釈し，各希釈列の0.2mlずつをマウス腹腔内に接種した．1希釈列5匹のマウスを用い，その生死を5日間観察して記録した．LD_{50} 値の計算は Reed & Münch の法によった．

3．接種菌の回収

菌接種後死亡したマウスは死後できるだけ早い時間に，死亡しなかったマウスは2日後と5日後にその心血を採取し，血液寒天平板に塗抹して37℃，48時間培養した．発育した疑わしい集落を釣菌し，各種性状を調べて接種菌と同一であることを確認した．

4．ネコおよびイヌの口腔内ふき取り材料

東京都動物管理事務所に収容されたネコおよびイヌと全国の獣医科医院に種々の理由で来診したネコ，イヌを対象とした．これらの動物の口腔内全体，特に歯肉部分を滅菌綿棒で強く拭い取った．直ちに分離培養のできない場合は，この綿棒をキャリーブレイヤー培地に埋没して室温に保存した．

5．ふき取り材料からの *P. multocids* の分離

口腔内ふき取り綿棒を約2 ml の滅菌生理食塩水で振り出し，その0.2mlをマウス腹腔内に接種した．材料接種後48時間観察して死亡したマウスはできるだけ死亡直後，生存マウスは観察終了時点でその心血を採取し，上記「接種菌の回収」と同様な操作を行い *P. multocida* を分離した．

6．薬剤感受性試験

ネコ口腔由来株30株を用いて ampicillin, clindamycin, vancomycin 3薬剤の MIC 値を血液寒天平板で測定した．

7．選択分離培地の組成

MIC の測定値から Trypticase soy agar（Oxoid）を基礎とした5％ウマ血液寒天に vancomycin と clindamycin を添加した下記5種類の培地を試作した．

V（vancomycin 50 μg／ml），VC-1（vancomycin 50 μg／ml, clindamycin 2 μg／ml），VC-2（vancomycin 25 μg／ml, clindamycin 1 μg／ml），VC-3（vancomycin 10 μg／ml, clindamycin 1 μg／ml），C（clindamycin 2 μg／ml）

成　績

1．ネコ・イヌ由来 *P. multocida* のマウスに対する致死毒性

ネコ口腔由来株の 10^3 個以上を接種されたマウスは5株とも全例24時間以内に死亡した．10^0～10^2 個接種群でも多くは24時間以内に死亡したが48時間以上経過して死亡するものはなかった．その LD_{50} 値は log1.06～2.52であった．一方，イヌ由来株のマウスに対する致死毒性は菌株によって差が大きく，マウスを全例死亡させる菌量が 10^7 個以上の菌株もあった．この菌株では 10^5～10^6 個接種群で48～72時間で死亡するマウスもみられた．供試した10株のマウス死亡数から計算した LD_{50} 値を Table 1に示した．

Table 1．Lethal Toxicity of *P. multocida* for Mice by Intraperitoneal Challenge

Strain	Source	LD_{50} log(number or cells)
81-291	Cat, mouth	1.62
81-295	Cat, mouth	1.06
81-415	Cat, mouth	1.36
81-602	Cat, mouth	1.95
83- 97	Cat, mouth	2.52
82-138	Dog, mouth	2.26
82-623	Dog, mouth	2.53
82-765	Dog, mouth	1.82
83-731	Dog, mouth	4.61
83-802	Dog, mouth	7.00

2．接種菌の回収

死亡したマウスの心血からは血液寒天平板の直接培養で全例 *P. multocida* が分離され，それぞれの分離株は接種菌と同一性状を示した．心血から回収された菌量は 10^2～10^5 個/ml であった．菌接種後48時間経過しても生存したマウスの心血からは接種菌は1例も検出されなかった．

3．ネコ口腔からの *P. multocida* の分離

ふき取り材料の採取時期を3回に分け，計45検体をマウス通過法と血液寒天平板直接塗抹法の2法によって *P. multocida* の分離を試み，その成績を Table 2にまとめた．

Table 2. Isolation Ratio of *P. multocida* from Oral Swab of Cats by Mouse Passage Method and Direct Plating Method

Test No.	Number of tested	Number of positive	Isolation method	
			Direct	Animal passage
I	25	22	11	21
II	10	9	1	9
III	10	10	3	10
Total	45	41	15	40
(%)		(91.1)*	(33.3)	(88.9)

*note : parenthesis indicates percent positives

45検体中マウス通過法では40検体から *P. multocida* が分離されたのに対し，直接塗抹法では15検体のみ陽性であった．直接法陽性でマウス法陰性が1例あったが，直接法陰性でマウス法陽性が24例みられた．マウス法が陰性であった5例のうち4例は分離平板上に集落の発育が認められなかったものであり，残りの1例は上記直接法による陽性の検体で，材料接種後48時間で死亡せず，その心血からは Proteus 菌が回収された例である．

マウス法で分離培地上に発育する集落は上記 Proteus 菌が分離された1例を除いてすべて純培養状であり，釣菌した集落の100%が *P. multocida* と同定された．一方，直接塗抹法では疑わしい集落を各10ケ釣菌しても陽性率は33.3%であった．

4．*P. multocida* の薬剤感受性試験

ネコ口腔由来の30株について，vancomycin 対する MIC はほとんどの菌株が100 μg／ml 以上で，同様に clindamycin に対する MIC は6.3～12.5 μg／ml であった．vancomycin では50 μg／ml 以下，clindamycin では3.1 μg／ml 以下で全株が耐性を示し，また ampicillin に対する MIC は全株が0.2 μg／ml 以下であった（Table 3）．

5．試作選択分離培地塗抹法とマウス通過法との比較

ネコ口腔内ふき取りスワブ25検体を5種類の試作選択分離培地を用いて *P. multocida* の分離を試みた．対照としてマウス通過法および血液寒天平板直接塗抹法を同時に行った．

25検体中マウス通過法により *P. multocida* が分離されたものは20例で，残り5例は他の方法でもいずれも陰性であった．このマウス通過法で陽性であった20検体について5種類の選択培地と血液寒天平板からの陽性数，疑わしい集落が出現した平板の数および疑わしい集落からの同定数を Table 4 に示した．試作選択培地のうちで検出率の高かったのはV培地（90.0%）と VC-2培地（85.0%）で，VC-1，VC-3，C培地では陽性率はそれぞれ65.0%，65.0%，55.0%であった．また対照の血液寒天では25.0%であった．選択培地のうちV，VC-3，Cの3培地の平板上ではすべての検体から *P. multocida* を疑わせる集落が出現した．それに対して VC-1では3検体，VC-2では1検体，血液寒天では7検体に釣菌すべき疑わしい集落の出現は認められなかった．疑わしい集落の出現した平板から2～6ケの集落を釣菌し，その

Table 3. Antibiotic Susceptibilities on 30 Strains of *P. multocida* Isolated from Healthy Cats

Concentration of antibiotics(μg／ml)	No. of susceptibles against		
	Ampicillin	Clindamycin	Vancomycin
≧100	30	30	1
50	30	30	0
25	30	30	0
12.5	30	25	0
6.3	30	8	0
3.1	30	0	0
1.5	30	0	0
0.7	30	0	0
0.4	30	0	0
0.2	30	0	0

Table 4. Comparative Study of Five Selective Media for Isolation of *P. multocida*

Method of isolation	Number of tested	Number of positive(%)	Number of plates suspected	Number of colonies fished	Number of colonies confirmed(%)
Mouse passage	20	20(100.0)	20	40	40(100.0)
Blood agar plate directly	20	5(25.0)	13	73	10(13.7)
Selective media					
V	20	18(90.0)	20	52	41(78.8)
VC-1	20	13(65.0)	17	53	27(50.9)
VC-2	20	17(85.0)	19	54	41(75.9)
VC-3	20	11(55.0)	20	65	28(43.1)
C	20	13(65.0)	20	86	39(45.3)

同定率を求めると，確率の高いものはV培地の78.8%とVC-2培地の75.9%で，他の3培地では43.1～50.9%であり，非選択性の血液寒天では13.7%であった．マウス通過法で心血の血液寒天平板塗抹による分離では非選択性培地にもかかわらず *P. multocida* は純培養状に発育し，釣菌する集落からの同定率は100%であった．

なお，V培地とVC-2培地のうちV培地は *P. multocida* の集落が小さく，またVC-2培地の方が夾雑菌をよく抑制していた．

6．試作培地と従来からの選択培地との比較

試作培地のうちVC-2培地とこれまでに報告されている選択培地のうち村田・波岡のBYP-KB培地[8]およびGarlinghouse et al. のclindamycin培地（GC）[9]の3種類を比較した．ネコ口腔内ふき取りスワブ74検体を用いてマウス通過法を対照においたそれぞれの *P. multocida* の検出率をTable 5に示した．74検体のうち陽性数はマウス法で66，VC－2が58，GCが39，BYP-KBが40であった．マウス法が陰性で他の方法で陽性のものは1例もなかったのでこの陽性検体66に対する陽性率はVC－2が87.9%，GCが59.1%，BYP-KBが60.6%であった．また，釣菌した集落からの同定率はVC-2が61.1%，GCが33.2%，BYP-KBが28.8%であった．

7．イヌおよびネコの内腔内における *P. multocida* の保有実態

全国13都道府県の開業獣医師の協力のもとに，飼犬92例，飼猫324例について口腔内ふき取りスワブを採取し，マウス通過法とVC-2培地塗抹法を併用して *P. multocida* の検出を行った（Table 6）．陽性率はイヌで75.0%，ネコでは97.8%であった．2方法のうち1方法のみから検出された例がイヌではマウス法のみが9例，VC-2培地のみが21例で，VC-2培地のみの割合が高く，全体としては69例中30例（43.5%）であった．ネコでは1方法のみの陽性率は11.3%（317例中36例）で，VC-2培地のみよりマウス法のみの陽性率が高かった．

考　察

P. multocida はその菌名の由来が意味するように多く

Table 5. Isolation of *P. multocida* from Cats Using Mouse Passage Method and Three Selective Media

Methods	Number of tested	Number of plates suspected	Number of plates confirmed(%)	Number of colonies fished	Number of colonies confirmed(%)
Mouse passage	74	67	66(98.5)	136	133(98.5)
Selective media					
VC-2	74	70	58(82.9)	208	127(61.1)
GC	74	74	39(52.7)	223	74(33.2)
BYP-KB	74	73	40(54.7)	285	82(28.8)

Table 6. Carrier State of *P. multocida* in Dog and Cat

Animal	Number of tested	Number of positive(%)			
			Isolation method		
			VC-2 + mouse	VC-2	mouse
Dog	92	69 (75.0)	39	21	9
Cat	324	317 (97.8)	281	12	24

の動物に対して強い病原性を示し，特に家畜の出血性敗血症を起こす型ではマウスに対しては高い致死毒性のあることが知られている[6]．今回著者らの実験で非出血性敗血症型であるネコ由来株も腹腔接種法でその LD_{50} 値は log1.06～2.52であり，菌株によってはわずか数10個の菌でマウスを敗血症死させることが明らかにされた．菌量の多い場合には12時間以内に，また致死量限界菌量でもほとんどの場合48時間以内にマウスを倒し，死亡マウスの心血から大量の接種菌を回収できることも確認された．イヌ由来株のマウスに対する病原性はネコ株のそれに比較して一般に弱く，菌株によっては LD_{50} 値は 1.0×10^7 個のものもあった．しかし，イヌ株でもマウスを死亡させる時間は菌接種後48時間以内で，48時間経過して生存したマウスから接種菌が回収された事例はきわめて少なく，したがってイヌ，ネコ株とも接種菌の回収はマウスの死亡時か，生存した場合も48時間後とするのが適当と思われる．

P. multocida がマウス腹腔接種によってきわめて少量の菌でもマウス体内で増殖し，その心血から回収されることは実際の検体であるネコおよびイヌの口腔内ふき取りスワブを用いても証明することができた．さらにこのマウス通過法が高い選択性のあることも確認された．血液寒天平板の直接塗抹法に比較してマウス通過法が優れていることは今回の実験から明らかであり，前者では口腔内の各種好気性，通性嫌気性菌が発育して，これらと *P. multocida* とを鑑別することは困難で，同定のために数多くの集落を釣菌する必要がある．また，スウォーミングの性質のある菌の混在もあり，1検体につき数枚の平板を準備する必要も生ずる．これに対し，マウス法では心血を血液寒天平板を用いて分離培養した場合，出現する集落はほとんどの場合，*P. multocida* が純培養状に発育し同定操作が単純，簡便である．したがって，マウス法はその高い致死毒性と相まって優れた選択増菌の効果のある方法といえる．

P. multocida の選択分離培地についてはこれまでに Moris の培地[7]をはじめとしていくつかの試みはある[8-10]．しかし，これらはいずれも市販製品は無く，また培地組成の入手が困難であったり，調製が複雑で実用性に欠けるなどの欠点を否定できない．

P. multocida は penicillin をはじめ多くの抗生物質に感受性であるが vancomycin と clindamycin に比較的耐性であることがヒト由来株で知られているが[11]，今回ネコ由来株でも同様の成績であることを確認した．また両抗生物質は *P. multocida* の MIC 値の量で口腔内常在菌の多くを抑制しうることを見出したので，これら薬剤をウマ血液寒天に添加した培地を5種試作した．中でも vancomycin 25 μg／ml と clindamycin 1 μg／ml を添加した VC-2培地が最も実用性の高い培地であると思われた．ネコ口腔内ふき取り材料からの検出率ではV培地の方が陽性率が高かったが，混在する他菌種の抑制，*P. multocida* 集落の見やすさ等の理由から選択分離培地としては VC-2培地の方が優れていると結論される．最近，Garlinghouse ら[9]も clindamycin を添加した培地（GC）を発表し，その有効性を報告しており，また古くは BYP-KB 培地[8]もあるが，この両者と VC-2培地との比較をネコ口腔内ふき取り材料で行った結果では VC-2培地が最も陽性率が高く，選択分離培地としての有用性が確認された．なお，GC 培地は著者らが試作したC培地と clindamycin の添加量が同じ培地である．

P. multocida の選択分離法としてはマウス接種法と VC-2培地塗抹法が優れていることが結論されたので，さらに数多くのイヌおよびネコ口腔内ふき取り材料について本菌の分離を行ったところその有効性を確認することができた．全国の開業獣医師から送付されたイヌ92検

体，ネコ326検体からの陽性数はそれぞれ69（75.0%），317（97.8%）であったが，この陽性数のうち，ネコ材料ではマウス法で陽性のものが307例（96.2%）に対し，イヌ材料ではマウス法陽性が48例（69.6%）で，VC-2培地塗抹法陽性の60例（87.0%）より低かった．すなわち，ネコ材料ではマウス法がVC-2培地塗抹法より，逆にイヌ材料ではVC-2培地塗抹法がマウス法より優れているといえる．この差は菌株の由来によってマウスに対する致死毒性の違いがあらわれているものと思われる．

これまでにイヌの保菌は12～55%[12-14]，ネコでは60～90%[15-16]と研究者によって成績が著しく異なり，また著者らの成績より低率であることは分離方法に問題があったと推定される．今回のマウス法，VC-2培地塗抹法の両法を併用すれば，ネコではほぼ100%，イヌでもそれに近い率で本菌がこれら動物に保菌されていると結論できる．

結　論

動物の口腔や上部気道あるいは人の創傷局所など夾雑菌の多い材料から *P. multocida* を分離する目的で，2つの選択分離法を考案した．

1つは *P. multocida* の動物に対する高い致死毒性を利用したマウス通過法である．検査材料をマウスの腹腔内へ接種し，マウス体内で選択増菌された本菌を48時間以内にその心血から回収する方法で，特にネコ材料に有効であった．

他の1つはvancomycin25 μg／ml と clindamycin 1 μg／ml を血液寒天に添加した選択分離培地（VC-2培地）に検査材料を直接塗抹する方法で，特にマウスに対する致死毒性の低い菌が分布するイヌ材料に優れていた．

これらマウス通過法とVC-2培地を用いて全国の飼犬92例，飼猫326例についてその口腔内保菌を調査した結果イヌでは75.0%，ネコでは97.8%であった．

謝　辞

本研究の一部は厚生省による「人畜共通伝染病の実態に関する調査研究」であり，検体採取に御協力いただいた日本獣医師会ならびに関係の獣医師各位に深謝いたします．

文　献

1）Rosen, M. N.：Pasteurellosis, *In* Hubbert, W. T.(ed.), *Diseases Transmitted from Animals to Man*, 6th ed., 129-138, 1975, Charles C & Thomas Pub., Illinois.
2）Biberstein, E. L.：The pasteurellosis, *In* Stoenner, H. and Kaplan, W.（eds.）, *CRC Handbook Series in Zoonoses*, Vol. 1, 495-514, 1979, CRC Press, Florida.
3）Hubbert, W. T. and Rosen, M. N.: *Am. J. Pub. Health*, **60**, 1103-1108, 1970.
4）Bailie, W. E., Stowe, E. C. and Schmitt A. M.: *J. Clin. Microbiol.*, **7**, 223-231, 1978.
5）丸山　務，景森令克：日獣会誌，**35**，621-626，1982.
6）Carter, G. R.: 19*th Annual Proceedings of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosis*, 189-196, 1976.
7）Morris, E. J.: *J. Gen. Microbiol.*, **19**, 305-311, 1958.
8）村田昌芳，波岡茂郎：日細菌誌，**15**，1065-1066，1960.
9）Garlinghouse, J. E., DiGiacomo, R. F., Hoosier, G. L. and Condon, J.：*Lab. Ani. Sci.*, **31**, 39-42, 1981.
10）Knight, D. P., Parine, J. E. and Speller, D.：*J. Clin. Pathol.*, **36**, 591-594, 1983.
11）Oberhofer, T. R.: *J. Clin. Microbiol.*, **13**, 566-571, 1981.
12）Smith, J. E.：*J.* Comp. *Pathol.*, **69**, 231-234, 1959.
13）Hawkins, L. G.：*J. Bone Joint Surg.*, **51A**, 363-367, 1969.
14）Brennan, P. C. and Simkins, R. C.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **134**, 566, 1970.
15）Smith, J. E.: *J. Comp. Pathol.*, **69**, 239-245, 1955.
16）本間　宏，長谷川ツギ：新潟県衛生研業報　100，1-6，1961.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 48-52, 1987

血算値に及ぼす抗凝固剤と保存温度の影響

蓑輪佳子*, 大石向江*, 小林千種*

Effects of Anticoagulants and Storage Temperature on Counting Blood Cells

KEIKO MINOWA*, HISAE OISHI*, CHIGUSA KOBAYASHI*

Keywords：血算値 counting blood cells, 抗凝固剤 anticoagulants, 保存温度 storage temperature

緒　言

身体のあらゆる部分を流れている血液は，貧血，感染症その他多くの疾患の場合に，重要な診断情報を提供するものである．そこで的確な診断・治療を行うためには，血液から得られる検査結果が精度の優れたものでなくてはならない．精度の向上には測定方法，手技上の問題点を解決していくと共に，検体としての血液の取扱方法も大きく影響するものである．その中には，採血から測定までの保存温度，保存時間，検体輸送における振動等その要因は多い．

今回は，それらの中で血球数に及ぼす抗凝固剤（EDTA-2K，ACD，CPD）と保存温度（4℃，13℃，22℃，28℃）の影響を検討したので報告する．

方　法

成人健康者4名から約35m*l*づつ採血を行い，同一人の血液を等分し，それぞれを抗凝固剤であるEDTA-2K，ACD（クエン酸ナトリウム2.20g，クエン酸0.80g，ブドウ糖2.20gに注射用蒸留水を加え100m*l*とする），CPD（クエン酸ナトリウム2.63g，クエン酸0.327g，リン酸一ナトリウム0.251g，ブドウ糖2.32gに注射用蒸留水を加え100m*l*とする）と混和した．すなわち血液10m*l*に対してEDTA-2K 10mg，ACD 1.5m*l*あるいはCPD 1.4m*l*を添加しよく混和した．それぞれをシリコンコート処理済みの小試験管（テルモVT－032P，容積3m*l*）に1m*l*づつ分注後，4℃（冷蔵庫），13℃（ふ卵器），22℃（ふ卵器），28℃（ふ卵器）の4段階の温度で保存した．採血当日，1日，2日，3日，4日後に各血液を取り出し，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，アメリカ）で2回測定し，平均値を測定結果とした．なお採血当日の結果は採血後1～2時間以内に室温（25℃）で測定したものである．

指標として白血球数（WBC），血小板数（Plt），平均赤血球容積（MCV），平均血小板容積（MPV），赤血球数（RBC），ヘモグロビン量（Hb）の6項目を用いた．

結果および考察

4人から得た試料の採血当日の測定結果を表1に示した．EDTA-2K添加血液に比べ，ACD，CPD添加血液では血液が希釈されWBC，Plt，RBC，Hbで10～20％低い値を示した．平均赤血球容積（MCV）はEDTA-2K添加とACD，CPD添加との間に差はなかったが，平均血小板容積（MPV）ではEDTA-2K添加に比べACD，CPD添加血液で15～20％収縮しているのが認められた．

コールターカウンターによる測定は4日間連続して行った．なお，その間の機器の精度はコントロール血球を用いて確認した．その結果，いずれも変動係数は5％以内におさまり満足できる状態であった．

小試験管に分注された血液はゴム栓で密栓したが，検体蒸発の有無を確認するために毎回重量を測定した．4日間の変動はいずれの保存温度でも±0.3％以内におさまり，検体の蒸発は認められなかった．

図1～4はそれぞれの採血当日の測定結果を100％として，その後の測定値を換算し4名から平均値と標準偏差を求めたものである．

以下，各項目における変化について述べる．

1．白血球数（WBC）－図1

EDTA-2Kを使用した場合，保存温度の違いによる著しい変動は認められなかった．同様にACD，CPD添加

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

表1．採血当日の測定結果

抗凝固剤	検体	WBC ($\times10^3$/mm^3)	Plt ($\times10^4$/mm^3)	MCV (μ^3)	MPV (μ^3)	RBC ($\times10^4$/mm^3)	Hb (g/dl)
EDTA-2K	A	5.4	26.3	84.6	8.8	480	13.5
	B	3.7	21.4	92.3	8.2	456	14.1
	C	4.6	23.0	97.5	8.6	457	15.0
	D	4.4	26.3	91.3	7.6	446	13.6
	X ± S.D.	4.5±0.7	24.3±2.5	91.4±5.3	8.3±0.5	460±14	14.1±0.7
ACD	A	4.4	19.9	85.1	7.7	424	11.9
	B	3.1	18.2	92.6	6.7	406	12.5
	C	4.0	18.0	98.2	6.9	404	13.3
	D	4.0	23.7	91.5	6.3	395	12.0
	X ± S.D.	3.9±0.6	20.0±2.6	91.9±5.4	6.9±0.6	407±12	12.4±0.6
CPD	A	4.9	22.1	85.1	7.7	431	12.1
	B	3.2	17.3	92.1	7.1	406	12.5
	C	4.2	18.9	98.6	7.1	409	13.4
	D	3.5	20.0	91.3	6.5	398	12.2
	X ± S.D.	4.0±0.8	19.6±2.0	91.8±5.5	7.1±0.5	411±14	12.6±0.6

試料の場合でも，保存温度の違いによる差は明らかではなかった．しかしACD，CPD添加血液がEDTA-2K添加血液と異なる点は検体によりWBCの増減傾向が異なり，バラツキが大きくなった点である．それは特に4℃保存の時に顕著であった．例えばCPD添加検体（検体A～D）の4日目で比較すると検体B，DのWBCは3.3×10^3/mm^3，4.1×10^3/mm^{3}を示し，採血当日と比べると3.0%増，2.4%増であり変動はほとんど認められなかった．一方，検体Aでは3.6×10^3/mm^{3}と採血当日の26.5%減，Cでは1.9×10^3/mm^{3}と54.8%減少し，検体間

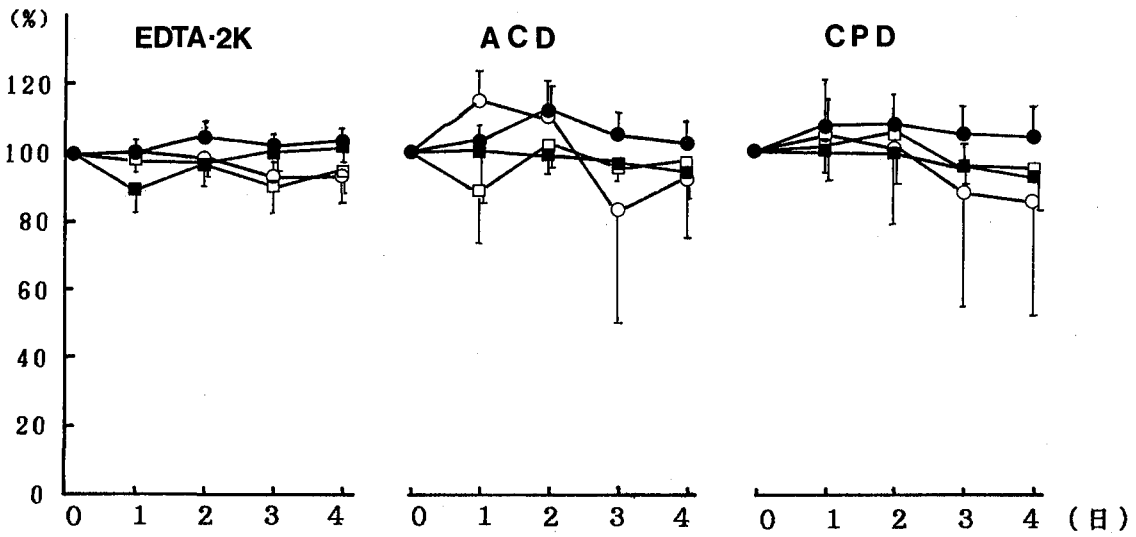


図1．白血球数に及ぼす抗凝固剤と保存温度の影響

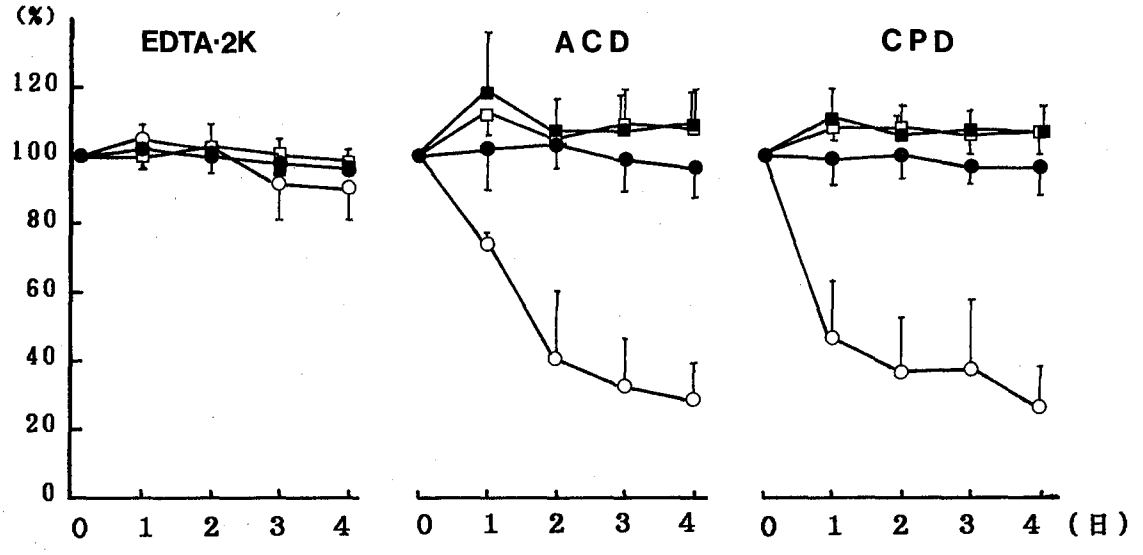


図2．血小板数に及ぼす抗凝固剤と保存温度の影響
—○— 4℃ —●— 13℃ —□— 22℃ —■— 28℃

により傾向が著しく異なる事が認められた．

顆粒球濃厚液（buffy coat）保存における抗凝固剤（CPD vs ACD）と温度（22℃ vs 4℃）の影響を検討した例では，顆粒球の数と細胞機能はACDよりCPDで，低温より室温で良く保たれた[1]との報告がある．しかし，ここでは全血保存でWBCの変化を観察したためか先の報告のような明瞭な差は認められなかった．

2．血小板数（Plt）－図2

ACD，CPD添加血液を4℃で保存するとPltは1日目で74%，47%までに減少し，変化は顕著であった．これは血小板が集塊を形成あるいは破壊によって減少したためと考えられる．EDTA-2K添加血液では4℃で他の温度より4日目で低い傾向を示したが，有意の差は認められなかった．13℃で保存した場合に4日間の変動が最も少なかった．22℃，28℃で保存した場合10%程度逆にPltが増加したが，この現象は赤血球の破壊などにより生じた砕片を誤って計数したためと思われる．このようにPltは温度により大きく影響を受けることが認められた．

液状保存の最適温度は血小板機能を維持させる場合，生体内生存時間を延長させる場合等により異なる[2,3]．現在では，抗凝固剤としてEDTA-2Kは血小板に有害作用があるため[4]ACDかCPDを使用し，室温（20～22℃）で保存するのが良いとされている[5]．しかし，血小板数の精度管理調査用試料として血液を用いる場合は，血小板の機能よりは数の安定性が問題とされる．そこで検体輸送の際に温度管理を適切に行える場合は，ACDあるいはCPD使用も可能であろうが，温度管理を正確に行うことが難しい状況下では，EDTA-2K添加血液を用いる方が，配布試料として適切と考える．

3．平均赤血球容積（MCV）－図3

MCVの変化率のバラツキは各群共に非常に少なかった．3種類の抗凝固剤はいずれも保存温度が13℃，22℃，28℃と高くなるにつれMCVが増加し，さらにこれは保存期間が長くなるにつれ顕著となった．その中でもEDTA-2K添加血液を28℃で保存した場合の変化が著しく4日目で12.5%増加していた．

4℃保存では観察期間中ほとんどMCVの変化は認められなかった．これは4℃では体謝系をある程度停止させておく[6]ことができたためと考えられる．温度が上昇するにつれて，エネルギー代謝速度が進みATPが減少する．その結果赤血球は正常の凹円形から球形に変化[5]し，MCVの増加が起きることになる．これが温度に依存している事が今回の結果から明らかになった．ACD，CPDはブドウ糖が添加されているためATPの減少が少なく[6]，赤血球の膨張度はEDTA-2K添加群に比べ低かった．

4．平均血小板容積（MPV）－図4

EDTA-2K添加血液を4℃で保存すると経時的にMPVが増加することはこれまでに述べてきたが[7]，今

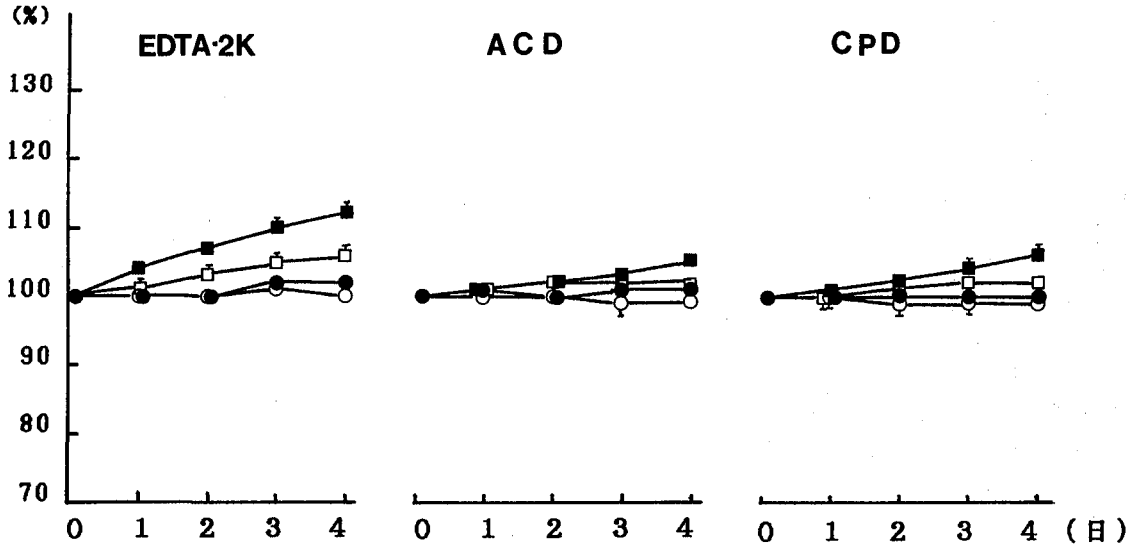


図3．平均赤血球容積に及ぼす抗凝固剤と保存温度の影響
—○— 4℃ —●— 13℃ —□— 22℃ —■— 28℃

回は温度条件，抗凝固剤の種類を変えて観察した．

EDTA-2K 添加血液の MPV の変動をみると13℃で保存した場合に膨張がもっとも大きく，4日目では18.5％の増加を示した．次いで，4℃保存で MPV の増加が認められた．22℃では期間中の変動は少なく，採血当日の MPV と同一であった．28℃では1，2日目には血小板の収縮が起こりその後膨張し，4日目には採血当日とほぼ同じ MPV（$8.6\pm0.4\,\mu^3$）となった．

ACD，CPD でも同様の傾向を示したが，4℃，28℃保存の場合，WBC と同様に検体間により変動に差がみられバラツキが大きくなった．これは MPV の変動は検体によりその傾向が異なる[8]との報告と一致するものである．

13℃で保存した場合，血小板数はいずれの抗凝固剤を

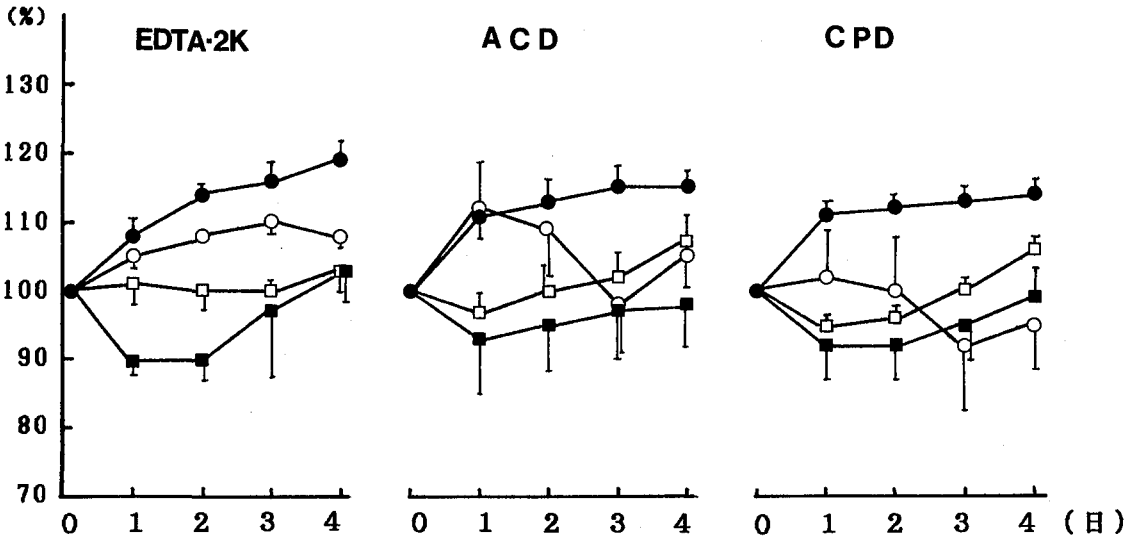


図4．平均血小板容積に及ぼす抗凝固剤と保存温度の影響
—○— 4℃ —●— 13℃ —□— 22℃ —■— 28℃

用いても安定であったが，その時の血小板の形態は他群に比べ膨張度が大きい事が示された．

5．赤血球数（RBC），ヘモグロビン量（Hb）

抗凝固剤としてEDTA-2K，ACD，CPDのいずれを使用しても，保存温度を変えても，採血当日と4日目の測定結果に有意の差は認められなかった．

要　約

成人健康者4名の白血球数，血小板数，平均赤血球容積，平均血小板容積，赤血球数，ヘモグロビン量の6項目における抗凝固剤（EDTA-2K，ACD，CPD），保存温度（4℃，13℃，22℃，28℃）の影響を4日間観察した．各項目の測定には自動血球計数装置（コールターカウンターSPLUS IV）を使用した．その結果以下の知見を得た．

1．白血球数（WBC）：EDTA-2K，ACD，CPDのいずれを使用しても，保存温度による差は認められなかった．4℃保存の際，検体間で変動の傾向が異なりバラツキが大きくなった．

2．血小板数（Plt）：ACD，CPDを添加し4℃で保存すると血小板凝集を生じ，血小板数が著減する．EDTA－2Kでは4℃保存を行うと，他の温度より4日目で低値傾向を示したが，有意の差は認められなかった．

3．平均赤血球容積（MCV）：3種類の抗凝固剤いずれも保存温度が13℃，22℃，28℃と高くなるにつれてMCVが増加し，さらにこれは保存期間が長くなるにつれ顕著となった．4℃保存では観察期間中ほとんどMCVの変化は認められなかった．

4．平均血小板容積（MPV）：EDTA-2K添加血液では13℃で保存した場合に膨張がもっとも大きく，次いで4℃保存でMPVの増加が認められた．22℃では期間中の変動は少なく，採血当日のMPVと同一であった．ACD，CPDでも同様の傾向を示した．

5．赤血球数（RBC），ヘモグロビン量（Hb）：いずれの抗凝固剤を使用しても，保存温度による差は認められず，採血当日と4日目の測定結果に有意の差は認められなかった．

文　献

1）宮本正樹，笹川　滋：*Journal of the Japan Society of Blood Transfusion*, 30(6), 465-470, 1984

2）Valeri, C. R.：*Trasfusion*, 16(1), 20-22, 1976

3）Becker, G. A., Tuccelli, M., Kunicki, T., et al：*Transfusion*, 13(2), 61-68, 1973

4）隅田幸男：冷凍血液，187，1978，日本医事新報社

5）隅田幸男：日本血液学全書，日本血液学会編，267-294，1962，丸善株式会社

6）笹川　滋：*Medical Technology*, 11(7), 609-615, 1983.

7）蓑輪佳子，笠原利英，大石向江等：東京衛研年報，34，75-81，1983.

8）岡田徳弘，織辺紀芳，林　則人等：*Sysmex Jounal*, 5, 244-255, 1982.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **38**, 53-56, 1987

各種コントロール血清における尿酸の測定例

小林千種*, 大石向江*, 蓑輪佳子*

Estimation of Control Sera for Quality Control of Uric Acid

CHIGUSA KOBAYASHI*, HISAE OISHI* and KEIKO MINOWA*

Keywords：精度管理 quality control, コントロール血清 control sera, 尿酸 uric acid

緒　言

臨床生化学領域の各検査項目においては測定方法の標準化がなされておらず，各検査機関は数種類の測定方法の中から選択して検査を実施するため，検査機関間における測定方法の統一がなされていないのが現状である．精度管理調査実施時に，調査用試料の性質が原因とみられる測定方法間の測定値の乖離という現象がしばしば報告されている[1,2]．昭和60年度に実施された都区保健衛生連絡協議会主催の生化学精度管理調査においても，尿酸の測定方法別にみた測定値の平均値で低値に測定された方法と高値に測定された方法との間に1.5～2.0倍の差が生じたことが報告されている．この原因として試料中の成分が尿酸測定時に尿酸と同一の反応を起こして高い測定値を示したことが推測された．精度管理調査を実施する上でこのような測定方法間でかけ離れた測定値を生ずることは不都合である．このような測定方法間で大きな測定値の差異を生ずる原因を解明するため，尿酸の精度管理調査用試料としての市販コントロール血清の適否について検討した．すなわち，16種類の市販コントロール血清中の尿酸値を2種類の測定方法を用いて検討を行った．

材料及び方法

試料　検討に用いた試料として市販コントロール血清16種類を用い，その性状，材料を表1に示した．

尿酸の測定方法　昭和60年度に行われた都区保健衛生連絡協議会の生化学精度管理調査で参加者が用いた測定方法であるリンタングステン酸法（除蛋白する方法）とウリカーゼ・POD法の2法を選んだ．これらの測定に用いた試薬，標準物質，機器を表2に示した．なお，リンタングステン酸法による測定では，6濃度の市販標準液（2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0mg/dl）を使用して検量線を求めた．また，ウリカーゼ・POD法にて，上記の6濃度の標準液を測定したところいずれも表示値と同一の測定値が得られたことを確認している．

実験方法　表1に示した16種類の市販コントロール血清中の尿酸をリンタングステン酸法及びウリカーゼ・POD法の2法で同一日に1試料につき5回同時測定した．凍結乾燥血清は測定日に溶解した．得られた測定値について，測定方法間での差の有無をStudentのt検定を用いて検定を行った．

結果及び考察

リンタングステン酸法及びウリカーゼ・POD法による16種類の市販コントロール血清の尿酸測定結果を表3に示した．リンタングステン酸法による測定値の方が高かったものは，No.10とNo.16の2血清のみあった．さらに両血清とも2方法間の平均値の差が他の14種類のコントロール血清の場合に比べ極端に大きくなっている．No.10とNo.16を除いたものについては，いずれもウリカーゼ・POD法による測定値の方が高かった．最も2方法間の測定値が少なかったのは，No.12で差の大きさは0.24mg/dl，次に少なかったのはNo.2及びNo.9で差の大きさはいずれも0.46mg/dlであった．t検定を用いて2方法間の測定値の差の有無を検定したところ，No.12のみが危険率5％で有意差は認められず，No.2，No.4，No.8の3種類は5％，残り12種類は1％以下の危険率で有意な差が認められた．

調査用試料として市販コントロール血清を用いた精度管理調査の例として，昭和60年度に実施された都区保健

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

表1．尿酸測定の検討に用いたコントロール血清

No.	コントロール血清		性状	材料
1	H社製	Level I	凍結乾燥血清	ヒトプール血清
2	〃	Level II	〃	〃
3	〃	Level I	〃 (溶解液付)	〃
4	〃	Level II	〃 (〃)	〃
5	O社製	Normal	〃	〃
6	〃	Abnoramal	〃	〃
7	B社製	Normal	〃	〃
8	〃	Abnormal	〃	〃
9	D社製	Level I	〃	〃
10	〃	Level II	〃	〃
11	N社製	Normal	〃	〃
12	〃	Abnormal	〃	〃
13	K社製	Level I	液状血清(冷蔵保存)	〃
14	〃	Level II	〃 (〃)	〃
15	M社製	Level 1	〃 (凍結保存)	牛血清
16	〃	Level 3	〃 (〃)	〃

表2．尿酸の測定方法

測定原理	リンタングステン酸法 (除蛋白する方法)	ウリカーゼ・POD法
試　薬	市販用手法キット(C社製)	市販自動分析用試薬(A社製)
標準物質	市販標準液(B社製) (6濃度：2.0～12.0mg/dl)	市販標準液(A社製) (20.0mg/dl)
機　器	日立220A型分光光度計(用手法)	日立705型自動分析装置 (自動分析法)

衛生連絡協議会による生化学精度管理調査における尿酸の集計結果を表4に示した．測定方法別に集計したところ，ウリカーゼ・POD法で測定したグループの平均値と比較して，リンタングステン酸法で測定したグループの平均値は試料1で2.18mg/dl，試料2で8.13mg/dlも高い結果であった．なお，この調査用試料はヒトプール血清を原料として市販の凍結乾燥血清で，表1に示されたものとは異なる製品である．

以上のことから，市販コントロール血清を用いて尿酸の精度管理を行う場合，測定方法が異なると測定値に差が生ずる場合が見られ，測定値の差の大きさはコントロール血清により異なることが明らかになった．リンタングステン酸法においては，還元性物質が試料中に夾雑物として含まれるときは正の誤差に，ウリカーゼ・POD法では負の誤差となること，また，ウリカーゼ・POD法は乳び血清のにごりより正の誤差になることが知られている[3]．市販コントロール血清中には未知の夾雑物が含まれているため，測定方法により影響をうける場合があると考えられる．試料中に還元性物質が含まれている場合はリンタングステン酸法では高値に，ウリカーゼ・POD法では低値に測定されるため，2法の測定値間で差が大きくなる可能性がある．リンタングステン酸法に

表3．2方法によるコントロール血清中の尿酸値の比較

コントロール血清(No.)	尿酸値 $\bar{X} \pm SD$(mg/dl) リンタングステン酸法(A)	ウリカーゼPOD法(B)	2法の平均値の差 (A)−(B)
1	3.38±0.18	4.68±0.04	−1.30**
2	8.14±0.30	8.60±0.00	−0.46*
3	2.88±0.08	4.28±0.04	−1.40**
4	8.50±0.37	9.28±0.04	−0.78*
5	3.28±0.08	4.52±0.04	−1.24**
6	7.38±0.24	8.48±0.04	−1.10**
7	3.68±0.04	4.58±0.04	−0.90**
8	7.70±0.31	8.38±0.04	−0.68*
9	4.54±0.05	5.00±0.07	−0.46**
10	14.02±0.08	9.18±0.04	+4.84**
11	2.22±0.08	3.54±0.05	−1.32**
12	10.18±0.11	10.42±0.08	−0.24
13	3.16±0.09	4.78±0.04	−1.62**
14	8.28±0.08	9.12±0.04	−0.84**
15	1.62±0.08	3.08±0.04	−1.46**
16	11.12±0.95	7.90±0.00	+3.22**

N＝5　　*：$p<0.05$　　**：$p<0.01$

表4．昭和60年度都区保健衛生連絡協議会による生化学精度管理調査の集計結果

測定方法	N	尿酸値 $\bar{X} \pm SD$(mg/dl) 試料1	試料2
リンタングステン酸法（除蛋白する方法）	4	6.75±0.31	16.15±0.70
ウリカーゼ・POD法	22	4.57±0.35	8.02±0.55

よる測定値が高い値を示すコントロール血清は還元性物質を含んでいることが考えられ，前記の精度管理調査の結果も試料が原因で測定方法間の測定値の差が大きくなったものと推測された．

精度管理調査では日常用いている測定方法を用いて参加者が試料の測定を行うため，方法間で測定値の差がない試料を用いることにより，別の測定方法を用いた場合にも参加者間でクロスチェックを行うことが可能となり，施設間精度管理に有用である．精度管理調査用試料として，市販コントロール血清を用いる場合，あらかじめ数種類の測定方法を用いてチェックし，測定方法間の測定値の差の極力少ないものを選択することが望ましいと思われる．

要　約

昭和60年度の都区保健衛生連絡協議会による生化学精度管理調査において，尿酸の測定方法別平均値に大きな差が現われ，調査用試料に用いた市販凍結乾燥血清に問題があると推測された．市販コントロール血清が尿酸の精度管理調査用試料として適当であるかを調べるために16種類の市販コントロール血清中の尿酸値をリンタングステン酸法とウリカーゼ・POD法の2法で測定した．2法の測定値の差は0.24～4.84mg/dlの間に分布し，2法の測定値間に有意差が認められなかったのはわずかに1種類の血清のみであった．14種類の血清はウリカーゼ・POD法の測定値の方が高かった．他の2種類の血清はリンタングステン酸法の測定値の方が高く，測定値の差は，3.22，4.84mg/dlで他よりも大きかった．血清

の種類により測定方法間の測定値の差の大きさが異なることが認められ，その原因として血清中の還元性物質等の夾雑物が測定方法により別々の影響を与えることが推測された．精度管理調査用試料として市販コントロール血清を用いる場合は測定方法間で測定値の差が極力少ないものを選択することが望ましい．

文　献

1）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.
2）日本医師会：昭和56年度（第15回）臨床検査精度管理調査結果報告書，1982.
3）北村元仕，仁科甫啓：実践臨床化学（増補版），258-276，1984，医歯薬出版.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 57-62, 1987

神経芽細胞腫のマス・スクリーニングに関する検討（第4報）尿中バニリルマンデリン酸スポットテスト成績に及ぼす食餌の影響に関する統計的観察

武士俣 邦 雄*, 高 野 弘 紀*, 一 言 広*, 峰 岸 正 子**
長 田 英 春**, 長 岡 常 雄**

Studies on Mass-screening Methods for the Neuroblastome (IV) Statistical Observations of Influence by Diet upon the Reading of Urinary Vanillylmandelic Acid Spot Test

KUNIO BUSHIMATA*, HIROKI TAKANO*, HIROSHI HITOKOTO*
MASAKO MINEGISHI**, HIDEHARU OSADA** and TSUNEO NAGAOKA

Keywords：神経芽細胞腫 neuroblastoma，判定障害 reading trouble，尿中バニリルマンデリン酸 urinary vanillylmandelic acid，スポットテスト spot test，資料解析 material analysis

著者らは，昭和58年度後半から，カテコールアミン代謝亢進性の神経芽細胞腫のマス・スクリーニングを，尿中バニリルマンデリン酸(以後 VMA と記す)を定性的に検出するスポットテスト法[1]に基づいて実施し，昭和60年度までに行った検査成績の解析結果については，すでに報告[2]した．その中において，事業開始当初は，初回検査で再検査と判定されるおよそ20％の検体のうち，検査材料を作製する時に，検査用ろ紙上に尿を1滴締り落すべきところを，尿の浸みた脱脂綿をろ紙に押し当てたり，オムツと一緒に当てたもの或は尿滴下量の多少などの色々な理由で，検査の成績判定が不能であった検査材料が約80％を占めていた。しかし，その後初回検査で再検査となる検体の出現率は5～8％台で推移し，理由別には，食べ物の制限が不完全なために偽似的な反応の現われた検体が60～80％台で，その率は検査材料の作製が悪い場合と入れ代っている．すなわち，検査材料作製方法についての保護者に対する指導効果は著明であったが，食べ物の制限に対する改善は認められなかった．

そこで，この事が如何なる理由に基づいているのかを解明する端緒にするため，検体およびそれと同時に提供された食べ物等に関する資料を集計して検討したところ，興味ある事象が認められたので報告をする．

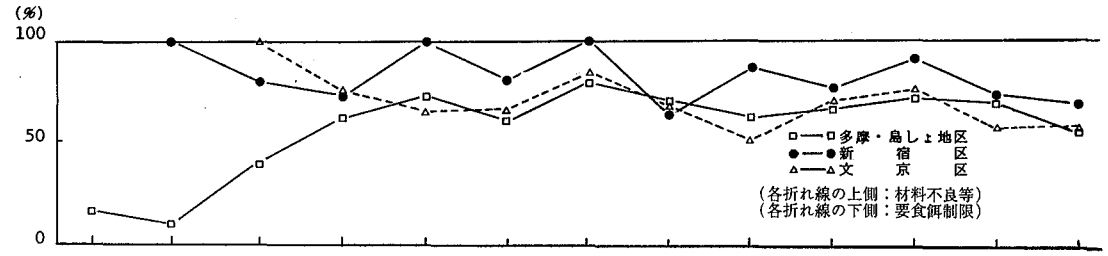
研究方法

1．検査の対象および材料：すでに報告[3]した様式に基づいて，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．なお，対象は多摩および島しょ地区ならび23特別区のうち新宿区および文京区に居住する生後6ケ月の乳児である．

2．検査方法：カテコールアミンの代謝亢進性の本腫瘍においては，その終末代謝産物の尿中排出量の増加の有無を調べる検査に基づいて，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 VMA を，化学的にジアゾ化合物として発色検出する方法のうち，Studnitz[4]らの発色試薬を用いるスポット法[1]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簡易円形展開処理[5]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[6]を用いた．

3．食餌に関する資料の収集：大まかな食事に関する資料は，新宿区の検査用ろ紙に印刷されている“ミルク，母乳，離乳食”の選択記入欄から抜粋して集計した．また，食べ物および治療薬品の具体的内容については，初回の検査を受ける際に，検体に同封されて来たメモ類を集約した．さらに，食生活の相違に基づいて，本検査で

*東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究料 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



昭和(年)(月)	59 1-3	4-6	7-9	10-12	60 1-3	4-6	7-9	10-12	61 1-3	4-6	7-9	10-12	62 1-3
多摩島しょ地区	2,014/8,445	1,355/7,983	689/7,782	525/6,738	626/8,638	389/8,082	567/7,299	516/6,763	462/7,861	580/7,715	635/7,278	349/6,519	492/7,630
新宿区		4/204	22/539	24/528	4/603	17/603	21/476	9/503	9/534	23/568	14/512	14/461	17/591
文京区			8/225	22/320	9/307	6/339	14/308	10/297	15/293	17/318	19/310	12/288	7/329

分母：初回検査件数，分子：要再検査判定数

図1．受検者数の推移と初回検査における再検被検体の理由別出現動態

偽陽性に反応する因子を調査するために，韓国人と思われる氏名を選別し，残りの氏名との間における再検査検体の出現の差異について検討を行った．

結果および考察

1．初回検査の件数および再検査検体の動向

昭和58年10月に本事業を開始して以来，昭和62年3月末日までに109,010人(行政事業としての多摩および島しょ地区の99,585人ならび受託検査である新宿区の6,115人および文京区の3,310人)の乳児について検査を実施した．これらの初回検査の受検を申請した人数および再検査検体の出現を，各年度の四半期毎に集計した結果を図1.に示す．

図1.に示したように，本事業を開始した当初は，初回検査で再検査となる概ね20％の被検体のうち，約80％は検査材料の作製が悪い[3]などのために，検査の成績判定が不能な検体であった．しかし，その後の再検査検体の出現率は，図1.の件数から明らかなように5～8％台で推移しているが，その内訳は折れ線グラフが示すように，食餌制限不良による偽似反応の出現している検体が60～80％台を示している．すなわち，すでに報告[2]した後においても，食べ物の制限に対する指導に関しては，余り効果が認められていない。

2．食事と再検査に関する検討

すでに述べたように，初回検査で食べ物の制限が悪いと思しき被検体が減少していないので，食餌制限不良による再検査被検児の食事について調査を行った．すなわち，新宿区の検査用ろ紙に印刷された食事の種類(ミルク，母乳，離乳食およびそれらの組合せ)を保護者が選択したものに基づいて，その種類における食餌制限不良検体の出現状況に関して集計した結果を表1.に示す．

表1.から明らかなように，偽似反応の出現する危険性は離乳食の6％が最も高く，次いで離乳食が関与した組合せであり，ミルクおよび母乳を単独に与えた場合は低率であった．しかし，食餌制限不良とした検体の件数から観察すると，母乳またはミルクと離乳食の組合せに次いで，ミルク単独の場合に多く見受けられた．すなわ

表1．食事と食餌制限不良判定被検体の出現関係

	食事内容								
	ミルク(M)	母乳(B)	離乳食(R)	M+B	M+R	B+R	M+B+R	不明	合計
検査人数	1,410	520	67	304	1,732	1,259	708	122	6,115
食餌制限不良検体数	30	8	4	5	48	34	21	3	153
偽似反応性(%)	2.13	1.54	6.0	1.65	2.8	2.7	3.0	2.5	2.5
食事内容別出現率(%)	19.6	5.2	2.6	3.3	31.4	22.2	13.7	2.0	100.0

表2．食餌制限不良判定被検児の食事内容例

	被検者								
	H.A.	K.I.	M.U.	H.H.	T.T.	R.T.	T.I.	U.U.	M.H.
ミルク	○		○	○	○	○		○	
牛乳					○				
卵					○	○			○
白子				○	○		○		
ヨーグルト		○					○		
豆腐						○			○
鳥肉	○								
茶わん蒸し							○		
ミートソース							○		
にぼし							○		
かつお節						○			
バナナ		○							
オレンジ							○		
りんご						○			
イチゴ								○	
フレンチトースト					○				
ペースト									○
ご飯								○	
おかゆ				○		○			○
パン			○						○
じゃがいも					○				○
かぼちゃ							○	○	
さつまいも	○								
にんじん	○			○			○		○
ほうれん草				○	○				
大根									○
きゅうり							○		
トマト							○		
しいたけ								○	

ち，ミルク或いは母乳を単独で与えた場合においても，1回の検査で陰性と確定されないものが相当数存在する事が認められた．

3．食べ物と再検査の関係

すでに記したように，離乳食の場合に本検査では偽似反応が現われるために，再検査になる傾向の高い事が認められたが，ミルクまたは母乳を与えた場合においても，必ずしも初回検査で陰性と判定されていない．そこで，検体に同封されていた食餌の内容に関する93件のメモ類を集約し，偽似反応が現われた9件の具体的種類を表2．に示す。

表2．に示したように，初回検査で食餌の制限が悪いために再検査になった被検児9人のうち，バナナを食べていた1人を除いた食べ物の平均は5.88種類であった。これに対し，初回検査で陰性と確定した84人の乳児では，ミルクまたは牛乳と離乳食を与えていた36人の場合は平均9.28種類であったが，離乳食だけを与えたいた場合は平均3.26種類と少ない結果であると共に，母乳だけというのが2例あった．このミルクまたは牛乳と離乳食を与えていた場合には，ご飯や麺類などの炭水化物を共通して摂取している事から考えると，これらを主食として与えていたものと推察された．また，この場合のタンパク質系について調べたところ，平均3.14種類であったが，離乳食だけを与えていた場合のそれは0.89種類と少なかった。

さらに，食餌制限不良と判定されて，検査を繰り返し

表3．各種治療薬品と検査成績

偽似反応	被検児				
	B.M.	M.H.	T.K.	R.I.	U.U.
弛緩剤,エビオス,ビタミン(A,C,E)	○				
心臓疾患(ジゴキシン,ラシックス)		○			
副腎皮質ホルモン			○		
川崎病治療薬(フロゲン,ジピリダモール,ユベラニュチネート)				○	
整腸剤					○

陰性判定被検者の治療薬品（重複を含む，（ ）内例数）

ジゴキシン(8)，強心剤(5)，川崎病治療薬(5)，ラシックス(4)，アスピリン(4)，
デパゲン(4)，風邪薬(3)，利尿剤(2)，抗けいれん剤(2)，慢性心疾患治療薬(2)，
ポポンS(2)，ビタミンC(2)，宇津救命丸(1)，チョコラD(1)，カルシウム(1)，
ルミナール(1)，パンビタン(1)，ポリオ生ワクチン(1)，三種混合ワクチン(1)，
ヨクイニン(1)，硫酸アトロピン(1)，フェノバール(1)，アルファロール(1)，
イユクレミン(1)，フェノバールエリキシル(1)，アトピー性皮膚炎治療薬(1)，
ネオフィリン(1)，ベネドリン(1)，エレンタール(1)，ワーファリン(1)，
ケフラールドライシロップ(1)，ボンタールシロップ(1)，フェノバルメタール(1)，
心室中隔欠損治療薬(1)，ファロー四徴治療薬(1)，乳蛋白質消化特殊粉末(1)，
気管支炎治療薬(1)，貧血治療薬(1)，イノリン(1)，ビソルボン(1)，ネオトインS(1)，
タベジールシロップ(1)，イノリンシロップ(1)，メジコンシロップ(1)，レフトーゼ(1)，
抗癌剤(1)，ペリアクチル(1)，目薬(1)

て受ける被検児の中には，ミルク，牛乳，卵，豆腐や魚などしか与えていないと云う母親もいた。そのうえ，各窓口[3]を通じて，“食餌の制限を守り，ミルクまたは母乳しか飲ませていないのに，なぜ食餌制限不良による再検査になっているのか”と云う問合せも多かった．

以上の事から，ミルクおよび母乳を含めて，タンパク質を偏食或は過剰に摂取した場合には，本検査の成績判定を紛わしくする事が推察された．この事は，離乳すると色々な食べ物を摂取するために，偽陽性の例が増えるので，離乳する前に検査する事が望ましい，という厚生省の研修指導内容[7]とは，趣を異にする結果であった．また，本腫瘍で長男を失った家庭の子供2人について追跡検査を行っているが，2歳および3歳になった現在の方が，授乳中よりも成績の判定が容易になった．すなわち，本検査は，ミルクや母乳を与えるよりも，適正な離乳食を指導して行う事によって，食餌制限不良による再検査検体の減少する事が期待される．

4．治療薬品と検査成績

各種の治療薬品が，本検査に及ぼす影響を調べるために，前項と同様に，検体に同封されて来た60枚のメモ類を集計した．すなわち，この60例について，再検査と判定した5被検体および48種類の治療薬品の重複使用を含めた服用例数について集計した結果を表3.に示す．

表3.から明らかなように，偽似反応が現われていた5件の治療薬の中には，例えば川崎病治療のように，その多くが陰性に判定されているものもあるうえ，例数も少いので，直接的な影響の有無についての判断は出来なかった．これに対し，陰性に判定した検体の中に，発色反応を妨害する薬品などが含まれている場合には，見落しの原因になるので，今後検討する必要がある．

5．喫食の相異と検査成績

本検査は，食べ物に含まれる成分およびその代謝産物によって影響を受けるので，日常の喫食例の関係から調べるために，偽似反応検体の出現差について検討を行った．すなわち，食餌制限不良と判定した検体を，日本人名と韓国人名と思われる乳児の二群に分け，両群の出現数の集計結果を，表4.に示す．

食餌制限不良による再検査と判定した検体は，日本人名よりも韓国人名の乳児の方が約2割多い事が認められた．この事から，偽似的反応の出現に関与している因子

表4．日本名および韓国名の乳児の初回検査における偽似反応の出現

		多摩・島しょ地区	新 宿 区	文 京 区	合 計
日本名乳児	検査人数	99,424	6,082	3,313	108,819
	偽似反応者数	4,410	144	100	4,654
	出現率(%)	4.44	2.37	3.02	4.28
韓国名乳児	検査人数	161	40	21	222
	偽似反応者数	10	2	0	12
	出現率(%)	6.21	5.00	0.00	5.41

として，両国民の日常の食事の質的差異が原因しているものと考えられ，今後追究する必要がある．

6．その他の観察事象

昭和58年の10月から開始した神経芽細胞腫のスポットテストにおいて，日常の検査で尿スポット部分全体または辺縁が，橙色に呈色する検体も比較的多く見受けられた．この事については，偽陰性反応との因果関係を明確にするために，今後追究する必要のある事が認められた．

また，われわれは，昭和61年度末までに本腫瘍の患児を2名発見したが，これは他の自治体における発見率[8~10]に比べて，極めて低い結果となっている．そこで，現在までの受検者のその後を，悪性新生物に対する医療費助成の資料に基づいて調べたところ，本検査を受けてから10ケ月後に診断された1例およびコリナージック型のために発見する事の出来なかった1例の2件が確認された．このように，罹患者の発見が少ないのは，日頃の母子衛生に関する保健指導が有効に作用しているか，或は医療機関が発展しているために，本スクリーニング検査を受ける以前に発見されている事も，その理由として想定された．

しかし，スポットテスト法では，神経芽細胞腫の60%以上を見落す危険があるという報告[11]もあるので，少くとも偽似反応が現われている検体については，液体クロマトグラフィーを用いる精度の高い検査法の導入も必要である．

ま と め

カテコールアミン代謝亢進性の神経芽細胞腫のマス・スクリーニングスポットテストにおいて，食餌制限の指導を厳しくするよう窓口にお願いして来たにもかかわらず，偽似反応による再検査被検体が減少しなかった．そこで，その理由を究明するために，食餌などとの関連性について，統計的に検討したところ，次のような事が判明した．

1．食事を，“ミルク・母乳・離乳食およびそれらの組合せ群”に区分し，偽似反応による再検査被検体の出現率を調べたところ，偽似反応が現われ易いのは離乳食であった．しかし，各食事群における出現率では，ミルクと離乳食・母乳と離乳食に次いでミルクだけを与えている場合の順に高かった．

2．食べ物の種類と偽似反応の出現について検討したところ，再検査と判定された被検児の食べ物は平均5.88種類であった．しかし，陰性と確定した被検児では，ミルク或は牛乳と離乳食の場合は平均9.28種類と多いが，ご飯やおかゆなどが全体に認められた．また，離乳食だけの場合は平均3.26種類と少ないうえ，おかゆなどの炭水化物が主体であった．

3．各種の治療薬品による検査反応について調べたところ，偽陽性に反応している具体的な例は確認出来なかった．なお，治療薬と偽陰性反応の関係については，具体的に検討する必要のある事が認められた．

4．食べ物による偽似反応の出現を，食生活の異なる日本人名と韓国人名に区分して比較したところ，韓国人名の方が約20%高かった．

本稿の概要は，第78回東京都衛生局学会（昭和62年5月19日）に於いて発表した．

文 献

1）佐藤辰男，吉永 馨，石田 望：最新医学，16，371，1961
2）武士俣邦雄，高野弘紀，大橋 誠，峰岸正子，石塚実，長岡常雄：東京衛研年報，37，60-68，1986
3）武士俣邦雄，鈴木重任：東京衛研年報，35，101-105，1984
4）Studnitz, W.v. and Hanson, A.：Scandinav. J. Clin. and Lab. Investigation, 11, 101, 1959
5）武士俣邦雄，東京衛研年報，35，92-100，1984
6）武士俣邦雄，東京衛研年報，36，67-72，1985

7）沢田　淳，石原由紀：神経芽細胞腫スクリーニング—研修ノート—，137，厚生省，社会福祉法人　恩賜財団　母子愛育会，1983
8）Tadashi Sawada, Munehiro Hirayama et al：The Lancet, August **4**, 271, 1984
9）森野裕子，穴沢　昭，武井　一，松本　勝，大和田操，岡部郁夫：予防医学ジャーナル，**209**，32，1986
10）青木四郎次，高橋裕一，東海林喜助，阿部　行：山形県衛生研究所報，**19**，65，1986
11）菊池和男，土田泰雄：調査報告書，全国の神経芽細胞腫マス・スクリーニング状況と問題点～特にVMA定性検査法の限界について～，1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 63-65, 1987

神経芽細胞腫のマス・スクリーニングに関する検討（第5報）尿中バニリルマンデリン酸スポットテストを偽似的に妨害する例

武士俣 邦 雄*, 高 野 弘 紀*, 一 言 広*

Studies on Mass-screening Methods for the Neuroblastoma (V) Few Instances of False Positive Interference with the Detection of Urinary Vanillylmandelic Acid by Spot Test

KUNIO BUSHIMATA*, HIROKI TAKANO* and HIROSHI HITOKOTO

Keywords：神経芽細胞腫 neuroblastoma，偽似反応例 false positive instances，尿中バニリルマンデリン酸 urinary vanillylmandelic acid，スポットテスト spot test

著者らは先に，カテコールアミン代謝亢進性の神経芽細胞腫マス・スクリーニングのスポットテスト[1]において，偽似的反応が出現する被検体が多く見受けられる事実について，報告[2]を行った．

また，この原因を究明するために，資料に基づいて統計的に検討したところ，ミルクや牛乳を含め，タンパク質を偏食あるいは過食すると，偽似的反応が現われる傾向のある事が認められた．さらに，日本人名よりも韓国人名の乳児の方が，偽似的反応の現われる率が約2割も高い事も判明した[3]．

そこで，これらの事に基づいて，食事と偽似反応に関する基礎的実験を試みたところ，興味ある結果が得られたので報告する．

研究方法

1．実験材料：飲用実験用のミルクとしては，タウリン，アルギニンおよびオリゴ糖(ガラクトシルラクトース)を配合してある乳児用調製粉乳(雪印ネオミルク Lu)を使用した．また，韓国人名乳児の方が日本人名乳児よりも偽似反応の出現率が高かった事から，食事上の特徴に基づいてキムチを想定し，一味唐辛子について実験を行った．

2．ミルク飲用実験の尿材料

前記ミルク約65gを，体重60kgの成人が飲用する前後における尿を，それぞれ1時間毎に飯用3時間後まで追跡採取し，バニリルマンデリン酸(以後 VMA と記す)およびホモバニリン酸(以後HVAと記す)の定性および定量の各種試験・検査に供した．

3．各種の検査および試験の試薬類

1） **検査用薬品**：VMA および HVA の標準物質はシグマ社(米国)製を，その他のパラニトロアニリン，無水炭酸カリウム，亜硝酸ナトリウム，水酸化ナトリウム，酒石酸(以上特級品)，酢酸エチル，アセトニトリル(以上液体クロマトグラフィー用)は，全て和光純薬の各等級品を使用した．

2） **調製試薬**：VMA 呈色検査用の発色試薬は，Studnitz ら[4]の方法に従って調製保冷し，使用時に調整順で比率混合した．また，液体クロマトグラフィー（以後HPLC と記す)用の移動相を作製するための酒石酸水溶液(0.05M，pH＝3.0)は，酒石酸の一定量を予め適当量の純水で溶解し，4 Nの水酸化ナトリウムを加えて pH を調整したのち，酒石酸の濃度が最終的に0.05Mになるように，純水で標量して調製した．さらに，HPLC に使用する移動相は，この酒石酸水溶液とアセトニトリルを，移動相(A)は90：10および移動相(B)は85：15の割合で混合し，再生セルローズ膜でろ過したのち，ヘリウムガスで脱気してから使用した．

なお，尿中クレアチニンの定量分析は，Folin-Wu の方法[5]に基づいた試薬を調製して行った．

3） **尿中 VMA および HVA 定量試料の調整**：尿100 μl に飽和塩化ナトリウム900 μl を加え，2 ml の酢酸エチルで振盪抽出後，2,000回転で5分間遠心分離した上清を，Vバイアルビンに1 ml 分取し，アルミブロック

*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

恒温槽(40℃)で加温しながら窒素ガスを噴入乾固してから，移動相(A)液を100 μl 加えて溶解した．また，標準溶液についても，5 $\mu g/ml$ 相当濃度となるように，尿と同様に処理した．

4) **唐辛子の処理操作**：一味唐辛子の純水による水溶性画分を，さらに酢酸エチルで抽出し，その濃縮液について呈色およびHPLCによる分離試験を行った．なお，呈色液は混濁したため，ゲルマンディスポーザブルフィルター（0.45 μm）でろ過して，吸光試験を行った．

4．測定装置関連

HPLCの各装置としては，ポンプ本体(LC-4A)，カラム恒温槽(CTO-2AS)およびデータ処理装置（C-R3A；いづれも島津製)と，電気化学検出器(VMD－501，柳本製)を組合せて使用した．なお，分析カラムは，ユニシルQ C_{18} の充塡カラム(10 μm，4.6mm ϕ，25cm，ガスクロ工業製)を用い，流量1 ml／min の速度で，移動相(A)から移動相(B)へ15分間直線グラジェントで展開し，その後25分まで移動相(B)で固定展開した．

また，尿中クレアチニンの定量分析および一味唐辛子の抽出物質のアゾ呈色液の吸収曲線測定は，ダブルビーム分光光度計200-20形（日立製）に同社の卓上記録計200形を接続して，測光記録した．

5．尿試料中のVMA定性検査

ミルク飲用実験時間尿のVMA定性検査は，Studnitzらの発色試薬を用いる佐藤ら[1]のスポットテスト法に従って発色させ，成績判定は沢田[6]の指導要領に基づいて行った．なお，この時に尿をスポットするためのろ紙は，研修指導[7]に習って，東洋ろ紙のNo. 2を用いた．

結果および考察

1．ミルク飲用実験

成人におけるミルク飲用実験の各時間尿の検査成績を，表1.に示す．

表1.から明らかなように，VMAスポットテストの成績は，ミルク飲用後の2時間目および3時間目に採取した時間尿で，疑陽性の判定がなされている．しかし，その時のVMAの濃度は，ミルク飲用前のそれぞれ1／4あるいは2／3程度の低い値であった．

一般に尿の検査成績は，その時の尿の濃度による影響を大きく受けるために，尿中排泄量が比較的一定であるクレアチニンの濃度を，濃淡指標として参考にする．この事に基づいて，ミルク飲用実験の飲用前後における尿の濃淡を比較したところ，尿中VMAスポットテストが疑陽性である飲用後2時間目および3時間目の方が，飲用前のクレアチニン濃度よりも低かった．すなわち，尿中VMAスポットテストが疑陽性に呈色しているのは，VMAの増量または濃厚尿による発色物の多量排出の影響ではなく，飲用ミルクに由来する偽似反応物質が尿中に出現したためと考える．

なお，神経芽細胞腫マス・スクリーニング検査において，ミルクあるいは母乳を与えて検査を受けるようにという指導にもかかわらず，偽似的反応のために再検査となる被検体が減少しなかったのは，ミルク等の継続的授乳なども1つの影響因子として関与している事がうかがわれた．

3．一味唐辛子抽出物のアゾ呈色性

一味唐辛子の純水溶出液を，尿中VMAスポットテスト[1]と同様に，ろ紙にスポットして呈色試験を行ったところ，アゾVMAと極めて類似した呈色が認められた．

さらに，一味唐辛子の酢酸エチル抽出画分と，Studnitzら[4]のジアゾカップリング試薬との反応呈色液の吸収曲線を，図1.に示す．

図1.の標準VMAのアゾ色素(実線)には，尿中VMAの純化比色定量法[8]で使用している510nmに最大吸収のある事が認められる．これに対し，波線で示した一味唐辛子の酢酸エチル画分のアゾ化合物の吸収曲線には2つのピークがあるが，長波長側のピークはアゾVMA色素の最大吸収波長に極めて近い504nm付近にある事が認められた．

この事は，すでに報告[3]した韓国人名乳児は日本人名乳児よりも，食餌制限が不完全な事に起因すると思われる再検査被検体が，20％も多く認められた事の理由の一つとして理解される．なぜならば，韓国には唐辛子を多量に用いる食品，キムチがあり，母親がこれを摂取したために，その中の唐辛子の成分が母乳を介して乳児に移

表1．ミルク飲用実験時間尿の各種検査成績

		飲用前	1時間目	2時間目	3時間目
VMAスポットテスト		－	－	±	±
定量分析	VMA($\mu g/ml$)	12.9	4.1	3.1	8
	HVA($\mu g/ml$)	43.1	32.9	13.9	13.1
	クレアチニン(mg/dl)	129.2	97.7	62.5	79.4

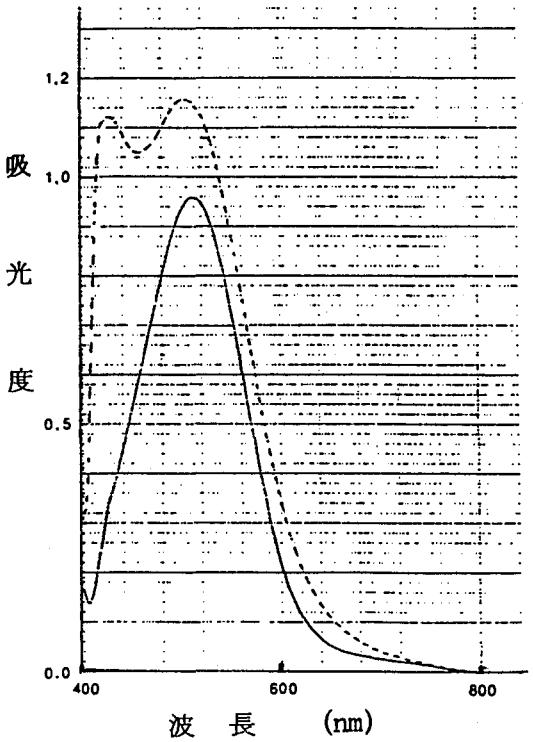


図1．標準 VMA のアゾ色素(実線)および一味唐辛子抽出物のアゾ呈色液の吸収曲線

行し，最終的に乳児の尿中に現われて類似的に発色している事が推察される．

従って，韓国など唐辛子を多食するような国において，本神経芽細胞腫のマス・スクリーニング検査を正確に行うためには，母乳ではなく，充分に配慮をした離乳食を与えて行う事が望ましい．

さらに，唐辛子の酢酸エチル画分を HPLC で分離検出したところ，標準 VMA と同じ保持時間の物質のピークは小さなものであったのに対し，標準 HVA と同一の保持時間のそれは極めて大きかった．

このように，唐辛子の中に HVA と同じ保持時間で検出される物質が含まれている事は，同様の食品の摂取を含めて，本腫瘍の約20%位存在すると云われている HVA 分泌型[9]のそれを，検査精度が高いと思われている HPLC で定量して検索する際に，偽陽性に判定する危険性のある事が認められた．

ま と め

著者らは，昭和58年10月から，カテコールアミン代謝亢進性の神経芽細胞腫マス・スクリーニング検査を，尿中 VMA をスポットテスト法で検出する方法に基づいて行っている．その中において，食餌の制限が不完全な事によると思われる再検査被検体が極めて多いので，その原因を究明するための基礎的な検討を行ったところ，次のような知見が得られた．

1. 成人が，乳児用調製粉乳を体重 kg 当り約 1 g の割合で飲用して，その前後の時間尿について各種の検査を行って検討したところ，飲用前には尿中 VMA スポットテストが陰性であったのに対し，飲用後の 2 時間目および 3 時間目のそれは，VMA およびクレアチニンの濃度が低いにも係わらず,疑陽性程度の呈色が認められた．

2. 本検査において，韓国人名乳児は日本人名乳児に比べ，食餌制限が不完全な事によると思われる再検査被検体が多い事から，その食べ物から想定した唐辛子の抽出画分について，ジアゾ発色試験および HPLC 分析パターンの検討を行った．

その結果，唐辛子の酢酸エチル抽出画分のジアゾカップリング反応液には，標準 VMAのアゾ色素の最大吸収波長510nm に極めて近い504nm 付近に吸収のある事が認められた．また，同抽出画分のHPLC 分析パターンについて検討したところ，VMA と同一の保持時間の所にごく小さなピークと，HVA のそこに極めて大きなピークのある事が認められた．

文　献

1）佐藤辰男，吉永　馨，石田　望：最新医学，16，371，1961
2）武士俣邦雄，高野弘紀，大橋　誠，峰岸正子，石塚実，長岡常雄：東京衛研年報，37，60-68，1986
3）武士俣邦雄，高野弘紀，一言　広，峰岸正子，長田英春，長岡常雄：東京衛研年報，38，57-62，1987
4）Studnitz, W.v. and Hanson, A. : Scandinav. J. Clin. and Lab. Investigation, 11, 101, 1959
5）今宿晋作，天野忠温，東道伸二郎，田中和彦：小児外科・内科，8，635，1976
6）沢田　淳：神経芽細胞腫マス・スクリーニング一研修ノートー，95，1983，厚生省，社会福祉法人　恩賜財団　母子愛育会
7）沢田　淳：神経芽細胞腫マス・スクリーニング，198，1984，社会福祉法人　恩賜財団　母子愛育会，大門出版，東京
8）今宿晋作，高田　洋，楠　智一：小児科，10，168，1969
9）沢田　淳：神経芽細胞腫マス・スクリーニング，195，1984，社会福祉法人　恩賜財団　母子愛育会，大門出版，東京

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.*, 38, 67-72, 1987

高速液体クロマトグラフィーによる鎮咳去痰薬中の南天実成分 O-Methyldomesticine の定量

瀬戸隆子*, 安田一郎*, 浜野朋子*, 高野伊知郎*, 秋山和幸*

Determination of NANDINAE FRUCTUS Component O-Methyldomesticine in Cough Medicine and Expectorant Preparations by High-Performance Liquid Chromatography

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

O-Methyldomesticine (OMD), one of the components of NANDINAE FRUCTUS, originating from *Nandina domestica* and/or *Nandina domestica* forma *leucocarpa*, together with chlorpheniramine maleate and tipepidine citrate in cough medicines and expectorant preparations were successfully determined by high performance liquid chromatography after clean-up on disposable column with ion exchange carboxylic acid silane bonded silica gel.

Determinations by the proposed method revealed that in five preparations A to E OMD values of 0.07－0.38 mg (average 0.19 mg) per 1 g of NANDINAE FRUCTUS were very low compared to OMD contents of 2.7－4.6 mg (average 3.7mg) in eight commercial NANDINAE FRUCTUS A to H, and 1.94 mg in decoction of NANDINAE FRUCTUS A.

OMD was considered not to be efficiently extracted from NANDINAE FRUCTUS in the process of manufacturing preparations. It is necessary to improve the manufacturing method and the standard including OMD content.

Keywords: NANDINAE FRUCTUS, *Nandina domestica*, O-methyldomesticine, HPLC, cough medicine preparation, expectorant preparation, determination, chlorpheniramine maleate, tipepidine citrate

緒　言

日本薬局方外生薬規格集[1]に収載される南天実は，シロナンテン *Nandina domestica* THUNB. forma *leucocarpa* MAKINO 又はナンテン *Nandina domestica* THUNB. の果実を乾燥したもので，古くから喘息，百日咳などの鎮咳薬として用いられている．現在，厚生省の一般用かぜ薬および鎮咳去痰薬の製造（輸入）承認基準[2]にも取り入れられ，鎮咳用シロップ剤などに配合されて市販されている．南天実の成分[3]としては，O-methyldomesticine（以下 OMD と略す），protopine, isocorydine の他数種のアポルフィン型アルカロイドが知られており，主アルカロイドの OMD には知覚神経と運動神経の麻痺作用[4]および鳥型結核菌とブドウ球菌に対する抗菌力[5]が認められている．

OMD の定量法としては，持田ら[6]の薄層クロマトグラフィー－デンシトメトリー（以下 TLC-DM と略す）による方法，稲葉ら[7]の電気滴法およびガスクロマトグラフィー（以下 GC と略す）による方法が報告されているが，製剤には塩酸メチルエフェドリン，リン酸ジヒドロコデイン，マレイン酸クロルフェニラミン（以下 CM と略す），クエン酸チペピジン（以下 TC と略す）のような塩基性成分が配合されるため電気滴定法は応用でき

*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

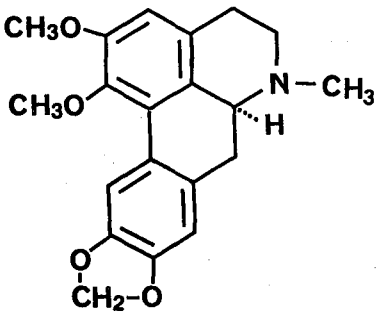


Fig. 1. Chemical Structure of O-Methyldomesticine (OMD)

ない．持田ら[6]も稲葉ら[7]も共にTLC-DMおよびGCの試料を分配法により精製しているが，鎮咳去痰薬にはシロップ剤が多く，高速液体クロマトグラフィー（以下HPLCと略す）による方法は試料調製の点で利便性があると考えられたので検討した．その結果，簡単な前処理により，CM，TCとともに，精度良く，簡便，迅速にOMDを定量する方法を確立したので報告する．

実験の部

1．機器および装置

HPLC装置：日本分光工業JASCO 880-PU，検出器875-UV，島津インテグレーターC-R3A，カラムA LiChrosorb RP-18，5 μm，4×250mm（Merck, Hibar），カラムB TSKgel ODS-120T，5 μm，4.6×250mm（東洋曹達）．分取HPLC装置：東洋曹達HLC-837，波長可変UV検出器，カラムTSKgel ODS-120T，10 μm，2.15×30cm（東洋曹達），プレカラム2.15×10cm．

2．試薬

THF：和光純薬工業HPLC用．カラム用シリカゲル：Kieselgel 60 0.04～0.063mm（Merck）．その他はJIS特級．

3．標準品および試料

OMD（Fig. 1．）標準品 市販南天実300gを粉砕器で砕き，アンモニア水－メタノール（1：9）混液500mlに一夜浸漬後ろ過する．残渣を更に2回メタノールで抽出し，抽出液を全て合わせ減圧濃縮した後，1N塩酸およびエーテルを加えて振り，水層を分取する．アンモニア水を加えてアルカリ性とした後クロロホルムで抽出，残留物を減圧濃縮しシリカゲルカラムに付す．クロロホルム－メタノール（9：1）で溶出するOMD画分をエーテルより再結晶を繰返し，無色針状晶80mgを得る．mp137～138° $[\alpha]_D^{27}$ +109.9°（C＝0.00267 $CHCl_3$）［文献値[8]mp 135～136° $[\alpha]_D^9$ +97.6°（$CHCl_3$）］．UV λ_{max}^{MeOH} nm：282，307．元素分析計算値$C_{20}H_{21}NO_4$：C，70.78；H，6.25；N，4.13，実測値：C，70.80；H，6.24；N，4.13．MS *m/z*（%）：339（M^+，90）338（100），324（39），308（34），296（25），281（20），265（23）．^{1}H-NMR($CDCl_3$) δ：2.52（3H，S，NMe），2.43－2.69（3H，m），2.93－3.20（4H，m），3.66，3.87（each 3H，s，OMe），5.95，5.96（each 1H，s；OCHO，6.59，6.75，7.93（each 1H，s．Ar H）（TMS，270 MHz）．^{13}C-NMR($CDCl_3$) δ：29.24（t），35.20（t），43.95（q），53.22（t），55.84（q），60.12（q），62.47（d），100.78（t），108.21（d），108.86（d），110.74（d），125.56（s），126.94（s），127.47（s），128.61（s），130.85（s），144.56（s），146.32（s），146.46（s），151.95（s）（TMS，67.8 MHz）．

CM 日本薬局方適合品，**TC** 日本薬局方外医薬品規格適合品．それぞれ105°で4時間乾燥して定量に用いる．

市場品南天実 A：南天実1976年市場品．B：南天実1976年市場品（奈良県産）．C：白南天1976年市場品．D：南天実1985年市場品．E：南天実1987年市場品．F：南天実1987年市場品．G：白南天1987年市場品．H：南天実1987年市場品．

市販製剤成分・分量表示 A：1日量30ml中 リン酸ジヒドロコデイン30mg，*dl*-塩酸メチルエフェドリン75mg，CM12mg，南天実流エキス1.8ml（南天実として1800mg），カンゾウエキス300mg，キキョウエキス200mg．B：1日量60ml中 リン酸ジヒドロコデイン30mg，*dl*-塩酸メチルエフェドリン75mg，CM12mg，南天実流エキス1.8ml（南天実として1800mg），カンゾウエキス300mg（カンゾウとして1200mg），キキョウエキス200mg（キキョウとして800mg）．C：1日量30ml中リン酸ジヒドロコデイン30mg，*dl*-塩酸メチルエフェドリン75mg，CM12mg，グアヤコールスルホン酸カリウム270mg，キキョウエキス105mg，南天実流エキス1.05ml，オウヒエキス16.8mg，セネガエキス42mg，無水カフェイン62.5mg．DおよびE：1日量40ml中 南天実抽出液5ml（南天実として1.333g），キキョウ抽出液5ml（キキョウとして0.667g），ソウハクヒ抽出液12ml（ソウハクヒとして1.333g），TC40mg，*dl*-塩酸メチルエフェドリン50mg．

4．配合生薬HPLC試料の調製 日本薬局方に適合するカンゾウ，キキョウ，オウヒ，セネガ，ソウハクヒ

の各粉末およびカンゾウエキス1gを取り，HPLC移動相0.015Mリン酸一カリウム（pH 2.5)ーアセトニトリル（3：1）30m*l* を加え20分間振とう抽出し遠心分離して得た上澄液を0.45 μm のフィルターでろ過して HPLC 試料液とする．注入量 20 μl.

5．定量法

試料液の調製　南天実：南天実の粉末約5gを精密に量り，ソックスレー抽出器に入れ，アンモニア水ーメタノール（1：10）混液33m*l* を加え一夜浸漬した後，4時間抽出する．抽出液を減圧濃縮した後メタノールを加えて正確に100m*l* とする．この5 m*l* を正確にとり50m*l* にメスアップし試料液とする．製剤：製剤5 m*l* を正確にとり水で50m*l* にメスアップして試料液とする．南天実煎出液：南天実の粗切5 gに水300m*l* を加え30分間弱火で煎じ，温時ろ取して得た煎出液95m*l* をそのまま試料液とする．

ディスポーザブルカラムによる前処理　試料液2 m*l* を3 m*l* のディスポーザブル Carboxylic acid カラム（以下 COOH カラムと略す，エキストラクションカラム，ベーカー）に付加し水2 m*l*，次いでメタノール2 m*l* で洗った後5 m*l* メスフラスコで受けながら4％リン酸メタノール溶液で溶出させ正確に5 m*l* とし，HPLC 試料液とする．

HPLC 条件　カラム：TSKgel ODS-120T 5 μm，4.6×250mm（東洋曹達）．移動相：0.015Mリン酸一カリウム（4％リン酸で pH2.5に調製）ーアセトニトリル（67：33），1 m*l*／min．検出：UV280nm，0.04 a.u.f.s..

検量線　乾燥した標準品 OMD（$C_{20}H_{21}NO_4$：339.39）20mg，CM20mg，TC50mg を精密に量り，メタノールに溶解し正確に100m*l* としたものを原液とし各種濃度の希釈液を作り HPLC により得られた各標準品のピークの高さ（mV）と注入量（μg）から検量線を求める．

結果及び考察

1．定量法の検討

最も簡便な試料調製法として，シロップ剤を水で希釈しただけの試料液を用い，HPLC 条件を検討した．OMD が塩基性物質であるところから，まず，カウンターイオン法で行った．ODS カラム（カラムA）に移動相は水ーアセトニトリルーリン酸ーラウリル硫酸ナトリウム混液あるいは水ーメタノールーリン酸ーラウリル硫酸ナトリウム混液とし，その組成比率を種々変えて検討したが，好結果は得られなかった．そこで，リン酸緩衝液とアセトニトリルあるいはテトラヒドロフランの混液で検討したところ，ODS カラム（カラムB）に移動相（A）

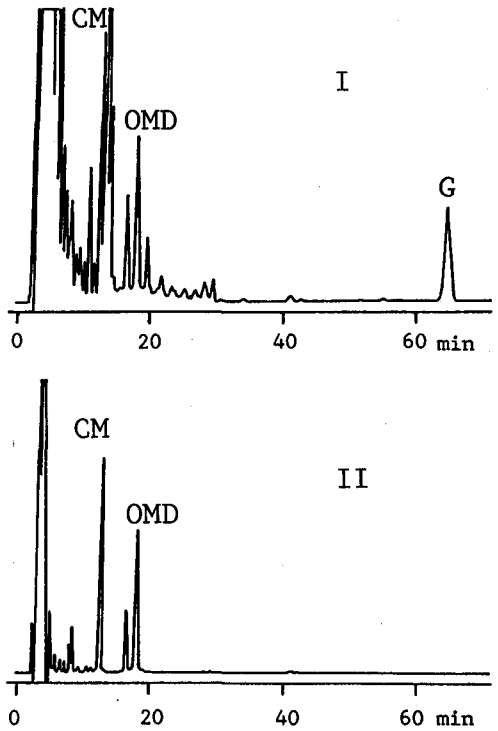


Fig. 2．Chromatograms of Preparation A
Ⅰ：No Treatment. Ⅱ：after Clean-up by Carboxilic Acid（COOH）Column.
CM：Chlorpheniramine Maleate OMD：O-Methyldomesticine G：Glycyrrhizin
HPLC conditions : column, TSKgel ODS-120T, mobile phase, 0.015 M phosphate buffer（pH2.5）
-acetonitrile（3：1), flow rate, 1m*l*／min, detection's wavelength, 280nm

0.015M リン酸一カリウム（pH2.5）ーアセトニトリル（3：1）を用いるとき，OMD ピークが保持時間（以下 t_R と略す）18分に前後のピークとの分離度がそれぞれ2.0および2.1の完全に分離したピークとして得られ（Fig. 2．-Ⅰ），また，移動相（B）0.05Mリン酸一カリウム（pH2.7）ーテトラヒドロフラン（9：1）を用いても t_R 36分に完全な分離ピークとして得られた．

これら前記2種の条件下では，製剤に南天実と同時に配合されるリン酸ジヒドロコデイン，*dl*-塩酸メチルエフェドリン，無水カフェイン，CM，TC，グアヤコールスルホン酸カリウム，カンゾウ，キキョウ，オウヒ，セネガ，ソウハクのうち，リン酸ジヒドロコデイン，*dl*-塩酸メチルエフェドリン，無水カフェインはフロントに，CM が t_R 13分と17分に，TC が25分と47分にそれぞれ溶

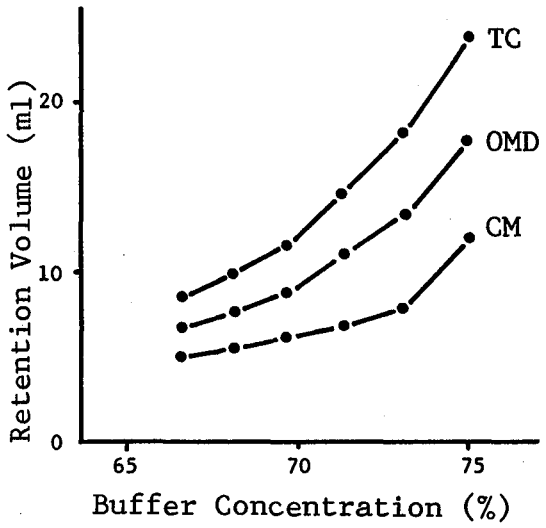


Fig. 3. Effect of the Ratio of 0.015 M Phosphate Buffer (pH2.5)and Acetonitrile in the Mobile Phase on the Retention of O-Methyldomesticine (OMD), Chlorpheniramine Maleate (CM) and Tipepidine Citrate (TC)

出する他，生薬成分の多数のピークが現れるが，いずれからも，妨害するピークは検出されなかった．更に，南天実のメタノールエキスについて，分取 HPLC を行い分取した OMD ピークについて，前記2種の条件で分析したがいずれも，単一ピークを示し，ピーク純度には問題がなかった．従って，本条件で OMD の分析は可能である．しかしながら，TC の t_R がそれぞれ25分と47分，カンゾウ中のグリチルリチンのピークが60分前後に出現するため多大な分析時間を要し，また，配合成分の CM も t_R13分であるにもかかわらず，夾雑物のため，同時測定できない．移動相（A）でアセトニトリル比率を高めていくと OMD，CM および TC の t_R は Fig. 3．のように変化するが，夾雑物が OMD ピークに重なってしまう．移動相（B）でも同様であり，迅速化には，試料の前処理が必要であると考えた．

試料前処理法の検討　鎮咳去痰シロップは，通例，pH 3 ～ 5 の水溶液で，有効成分と共に多量の糖の他エタノール，香料，可溶化剤等を含む．一般に用いられる分配法による精製は操作が繁雑で有機溶媒を多く必要とするので，操作が簡便で小規模に行えるカートリッジカラムの利用を試みた．目的成分が塩基であることに着目して，官能基 COOH のイオン交換作用を一次作用として持つカルボン酸シラン結合型シリカを詰めた COOH カラムを用いて実験した．メタノールに次いで水で調整

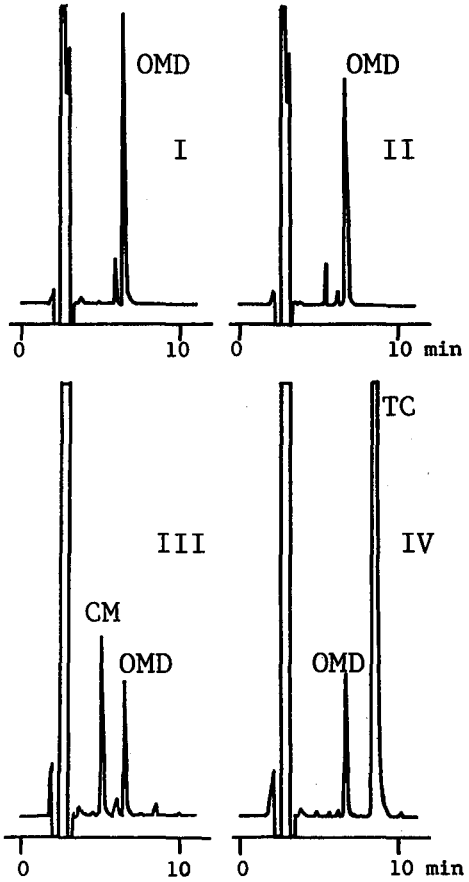


Fig. 4. Chromatograms of NANDINAE FRUCTUS and Preparation Samples after Clean-up by Carboxylic Acid Column
Ⅰ：NANDINAE FRUCTUS G　Ⅱ：NANDINAE FRUCTUS H　Ⅲ：Preparation A　Ⅳ：Preparation B
CM：Chlorpheniramine Maleate　OMD：O-Methyldomesticine TC：Tipepidine Citrate
HPLC conditions：column, TSKgel ODS-120T, mobile phase, 0.015 M phosphate buffer (pH2.5) -acetonitrile (67：33), flow rate, 1ml／min, detection's wavelength 280nm

したCOOHカラムに試料液2 ml を付加すると，OMD は保持され，水，メタノールおよび4％リン酸では溶出せず，アンモニア水メタノール溶液および4％リン酸メタノール溶液によって溶出する．したがって，試料液を付加し，水およびメタノールで洗った後，HPLC カラムを損傷しにくい4％リン酸メタノール溶液で溶出させることにした．この結果，Fig. 2．Ⅱに示す HPLC 図のように，遅く溶出するグリチルリチンその他の夾雑物も除去された．従って，移動相（A）のアセトニトリル比率を

上げることができ，33%にするとFig. 4．に例示したようにOMDがt_R 6.9分，CMがt_R5.7分，TCがt_R 9.2分に溶出し，大幅に分析時間の短縮が可能になった．そこで，次に定量性の検討を行った．

検量線 OMD 0.01～0.35 μg，CM 0.02～1.0 μg，TC 0.02～0.6 μg の範囲内で注入量（μg，x）とピーク高さ（mV，y）の間に次に示すほぼ原点を通る良好な直線関係が認められた．

OMD ：$y=61.5x+0.04$($r=1.000$，$n=7$)
CM ：$y=8.10x+0.01$($r=1.000$，$n=7$)
TC ：$y=50.7x+0.16$($r=1.000$，$n=7$)

回収率 製剤Aに OMD0.1mg，CM 2 mg，TC 5 mg を加えて求めた添加回収率は Table 1．の通りであった．OMD と TC は回収率，C.V. 値共に良好であったが，CM の回収率はやや低かった．

以上の結果から，本法は，シロップ剤中の OMD および TC の定量法として簡便，迅速で精度の良い方法であり，また，CM についても目的に応じて適用することができる．

2．定量結果について

実際に，市販の南天実8検体と南天実含有製剤5検体および南天実Aを用いて自製した煎液について OMD 含量を測定した結果は Table 2．の如くであった．南天実中の OMD 含量は，持田ら[6]の TLC-DM による値 0.35～0.45%（$n=3$，平均0.40%）および稲葉ら[7]の GC による値 0.15～0.50%（$n=11$，平均0.37%）とほぼ同等であり，生薬南天実中の OMD 含量として一般的なものと思われる．製剤では，南天実としての表示量から

Table 1．Recovery of O-Methyldomesticine, Chlorpheniramine Maleate and Tipepidine Citrate Added to 5 m*l* of Preparation A

Added Material		Runs	Recovery	C.V.
O-Methyldomesticine (OME)	0.1mg	5	98.8%	1.6%
Chlorpheniramine Maleate (CM)	2	5	92.7	2.5
Tipepidine Citrate (TC)	5	5	98.1	0.8

Table 2．Contents of O-Methyldomesticine in Commercial Crude Drugs Nandinae Fructus and Preparations

Sample		Content	per 1 g Crude Drugs
Nandinae Fructus	A	0.34 %	3.4 mg
	B	0.27	2.7
	C	0.33	3.3
	D	0.38	3.8
	E	0.46	4.6
	F	0.39	3.9
	G	0.43	4.3
	H	0.33	3.3
Average		0.37	3.7
Preparation	A	0.0023	0.38
	B	0.00043	0.15
	C	0.00093	0.28
	D	0.0026	0.08
	E	0.0024	0.07
Average		——	0.19
Decoction of Nandinae Fructus	A	0.01	1.94

換算して南天実1gに対応するOMDは，南天実のおよそ1割以下で大変低い．鎮咳去痰薬としての歴史的用法として漢方[9]では一日5～10gを煎用しているので，南天実5gから常法により煎液を製して定量したところ，煎液中には南天実中の約6割のOMDが溶出されており，これと比べても製剤の値は大変低い。持田ら[6]も製剤中のOMD含量が低いことを指摘し，抽出液製造時に南天実からアルカロイド成分が十分に抽出されていないためと推定している．以上のことから，製剤および製剤製造用製剤である「抽出液」あるいは「流エキス」などについて，OMD含量も含む製法・規格の検討が必要と思われる．

結　論

鎮咳去痰薬中の南天実成分OMDをHPLCを用いて定量する方法を検討した結果，ディスポーザブルCOOHカラム前処理により，精度良く，簡便，迅速にOMDを定量する方法を確立した．また，本法により，CMおよびTCも同時定量が可能である．

製剤5検体の南天実1g当りのOMD含量は市場生薬南天実に比べ低く（Table 2.），製造方法，規格の検討が必要である．

謝辞　OMDの元素分析をして戴いた東京薬科大学中央分析センターの諸氏に深謝致します．

（本研究は61年度当研究所調査研究課題「生薬および生薬製剤の試験法に関する研究」として実施したものである．）

文　献

1）厚生省薬務局審査課監修：日本薬局方外生薬規格集，43，1978，薬業時報社，東京
2）日本公定書協会編：医薬品製造指針，1985年版，233-243，250-257，薬業時報社，東京
3）国友順一，村上宣子：生薬誌，33(2)，84-87，1979
4）椎名泰三：薬誌，47，529-532，1927
5）大田達男，旭　新一，宮崎利夫：薬誌，72，455，1952
6）持田研秀，野口　衛：昭和48年度厚生科学研究報告，55-66，1973，東京医薬品工業協会，東京
7）稲葉　顕，中島　担，木村一馬：昭和48年度厚生科学研究報告，200-206，1973，東京医薬品工業協会，東京
8）富田真雄，犬伏康夫，石井　覚，山県正道：薬誌，71，381-385，1951
9）高木敬次郎，木村正康，原田正敏，大塚恭男編：和漢薬物学，220，1982，南山堂，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 73-79, 1987

高速液体クロマトグラフィーによる アカメガシワ含有無承認無許可医薬品中のベルゲニンの定量

浜野朋子*, 安田一郎*, 瀬戸隆子*, 高野伊知郎*
秋山和幸*

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Bergenin in the Pharmaceutical Preparations without Official Approvals containing *Mallotus japonicus*

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

The quantitative analysis of bergenin in the pharmaceutical preparations without official approvals containing *Mallotus japonicus* (THUNB.) MUELL. ARG. was investigated. By hiqh performance liquid chromatography (HPLC), bergenin was determined without interfering on the ODS column endcapped silanol residue (LiChrospher RP-18e) using 8% acetonitrile as the mobile phase. When the test solution for HPLC was prepared by shaking with the mobile phase repeated 3 times, bergenin was extracted efficiently. The peaks with the same retention time as bergenin in the preparations were isolated by preparative HPLC on the endcapped ODS column (TSKgel ODS-120T) using 13% acetonitrile, and then the substances were determined as bergenin by ^{13}C-NMR spectra. The proposed method by HPLC permitted the qualitative and quantitative analysis of bergenin in the pharmaceutical preparations with accuracy.

Furthermore, bergenin reference standard changes in weight by about 5% depending on whether it contains one molecule of crystal water or not. Therefore, the reference standard known of its composition must be used for determination.

Keywords: bergenin, *Mallotus japonicus*, quantitative analysis, HPLC, preparative HPLC, endcapped ODS, ^{13}C-NMR, crystal water

緒　言

ベルゲニンは，トウダイグサ科 *Euphorbiaceae* のアカメガシワ *Mallotus japonicus* (THUNB.) MUELL. ARG.の樹皮から単離された苦味物質で[1,2]，ユキノシタ科 *Saxifragaceae* のヤグルマソウ *Rodgersia podophylla* A. GRAY，マンサク科 *Hamamelidaceae* のトサミズキ *Corylopsis spicata* SIEB. et ZUCC. 等にも含有される成分である[3]．この物質は，胃分泌抑制作用を有するほか，著明な抗潰瘍作用を示し[4,5]，また，高用量では，フェニルブタゾンと同等の抗炎症活性を発現することが報告されている[6]．アカメガシワが，古来から胃炎，胃潰瘍等胃腸病の民間薬として用いられてきたのは，このベルゲニンの薬理作用に由来するものと考えられる．

近年，胃腸薬としてアカメガシワ含有製剤が製造されているが，一方，健康への関心が高まるなかで，アカメガシワを配合した，いわゆる健康食品も時として見受けられるようになった．しかし，その薬理作用から，アカメガシワは「専ら医薬品として使用されるもの」に該当し[7]，これを含有するいわゆる健康食品は無承認無許可医薬品とされる．

そこで，今回，著者らはアカメガシワの配合された無承認無許可医薬品をとりあげ，その薬効成分であるベル

*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

ゲニンを高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により定量する方法について検討を行った．

実験の部

1．装置および測定条件

(1)分析用 HPLC 装置：日本精密科学 NSLC-100A，波長可変 UV 検出器付．

(2)分析用 HPLC 条件：

カラム　リクロカート　LiChrospher RP-18e，5 μm，0.4×25cm，（メルク）

移動相　水・アセトニトリル(92：8)混液

流速　1.0ml／min

検出　UV 272nm

温度　室温

注入量　2.0～4.0 μl

(3)分取用 HPLC 装置：東洋曹達 HLC-837，波長可変 UV 検出器および RI 検出器付．

(4)分取用 HPLC 条件：

カラム　TSKgel ODS-120T，10 μm，2.15×30cm，（東洋曹達）

プレカラム　TSKgel ODS-120T，10 μm，2.15×10cm，（東洋曹達）

移動相　水・アセトニトリル(87：13)混液

流速　7.0ml／min

検出　UV 272nm

温度　30°

注入量　7.5ml

(5)核磁気共鳴(NMR)装置：日本電子 FX-270

(6)NMR 条件：重ピリジンを測定溶媒とし，内標準物質にテトラメチルシランを用いて，^{13}C-NMR を測定する．

2．ベルゲニン標品

アカメガシワ（東京市場品，刻み）115gを粉末とし，これにメタノール1lを加え，24時間放置して抽出する．再度この操作を繰返し，全抽出液を合して減圧濃縮する．得られたメタノール抽出エキス30gは，水に懸濁した後クロロホルムで脱脂し，水飽和ブタノールで分配する．ブタノール層を分取，濃縮し，残留物をシリカゲルドライカラム（300g，ICN）に付し，クロロホルム・メタノール（10：1），（3：1），（1：1）各500mlで順次溶出させる．クロロホルム・メタノール（3：1）で溶出したベルゲニン画分を濃縮し，エキス6.2 g を得る．これを，分取用 HPLC の移動相と同一組成の水・アセトニトリル(87：13)混液600ml に溶かした後，0.45 μm のフィルターを通し，分取用 HPLC に付加．繰返し分取を行った後濃縮して粗ベルゲニンを得，さらにアセトニトリルから再結晶し，ベルゲニン標品を得る(Fig. 1)．

3．試料

いわゆる健康食品として都内で入手した，生薬の刻み（中切～粗切）から成る茶剤2種（試料AおよびB）を用いた．これらの表示成分は，以下の通りである．

試料A：コフキ，キコブタケ，フジノコブ，サンズコン，ハトムギ，ハマヂシャ，ビワ葉

試料B：アカガシ，ハトムギ

4．標準液および試料液の調製

(1)標準液：単離精製したベルゲニン標品（$C_{14}H_{16}O_9$：328.27）約25mgを精秤し，メタノールに溶かして正確に50mlとした液を標準液とする(0.5 μg/μl)．

(2)試料液：粉末とした試料約1.0gを精秤し，8%アセトニトリル溶液40mlを加え，15分間振とうする．遠心分離後上澄を分別し，残渣には，さらに8%アセトニトリル溶液20ml を加え，同様の操作を2回繰返す．上澄を合し，正確に100ml とした後 0.45 μm のフィルターを通した液を試料液とする．

5．HPLC による定性および定量

ベルゲニン標準液を，8%アセトニトリル溶液で適宜希釈して，0.05～0.25 μg/μl の標準系列をつくる．その2.0 μl を HPLC カラムに注入し，得られたクロマトグラムのピーク高さと濃度から検量線を作製する．

試料液のクロマトグラムからベルゲニンのピーク高さを求め，検量線によりベルゲニン含量を算出する．同時に，ピークの保持時間(t_R)を比較し，ベルゲニンの同定を行う．

結果および考察

1．ベルゲニン標品

分取 HPLC を行ったクロマトグラムを Fig. 2 に示した．(a)は UV，(b)は RI により検出したもので，ベルゲニンのピークは29分後に出現し，その純度は(a)では約70%，(b)では約30%であった．

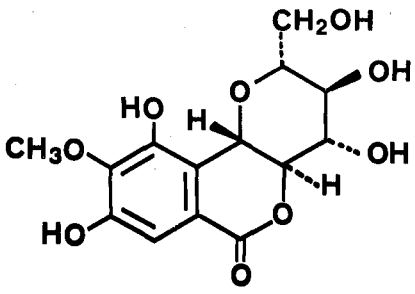


Fig. 1．Chemical Structure of Bergenin

当該ピークを25回繰返し分取し(1回注入量 7.5ml), 粗ベルゲニン515mg を得, さらにアセトニトリルで再結晶し, 無色針状結晶約400mg を得た. 物理恒数および各種スペクトルデータは, 以下の通りである.

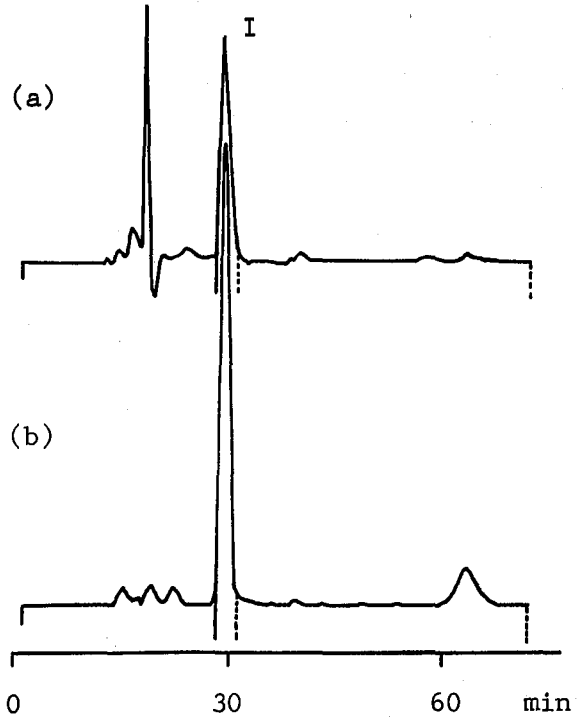


Fig. 2. Chromatograms of Bergenin Fraction by Preparative HPLC
I: bergenin
HPLC conditions : column, TSKgel ODS-120T, mobile phase, 13% acetonitrile solution, flow rate, 7.0ml/min, detection, (a) RI, (b) UV 272nm

$[\alpha]_D^{30}$: −36.7°, λ_{max}^{EtoH} ($\log\varepsilon$): 220(4.41), 276nm (3.91)

ν_{max}^{KBr}: 3500−3200, 1710, 1615, 1355, 1090, 990, 960cm^{-1}

m/z: 328 (M^+), 208 (base peak), 180, 179, 151

これらのデータが, すべて文献値[3),8−11)]と一致したことから, この物質をベルゲニン $C_{14}H_{16}O_9$ と同定した.

一方, 水, アセトニトリルから再結晶した無色柱状結晶を成すベルゲニンは結晶水を有し, 融点は131～133°であった(室温, 減圧乾燥, 6 hr). これを加熱乾燥(150°, 減圧乾燥, 6 hr)した後, 再び融点を測定したところ, 234～236°を示し, このとき, 5.32%の重量の減少を認めた. 元素分析を行った結果, 加熱乾燥によって, ベルゲニンは当初含有していた1モルの結晶水を喪失し, これが重量差5.2%に相当することが明らかになった (Table 1). このことから, 正確な定量値を得るためには, 用いる標品について, 純度のほか結晶水の有無にも留意しなければならないことが考察される. 今回の定量は, 結晶水を含有しないベルゲニンを用いて行った.

2. HPLC 条件の検討

既に, ベルゲニンの分析法として, 固定相に逆相系カラム, 移動相に水・メタノール・テトラヒドロフラン・氷酢酸混液を用いた HPLC 法が報告[12)]されているが, 繁雑な溶媒組成であること, 酢酸によるカラムの劣化を招くことなどを考慮し, 移動相について検討を行った.

逆相系カラムとして, 残存シラノール基をトリメチルシリル基で処理した無シラノール型のカラム(LiChrospher RP-18e, 5 μm, メルク)を用い, 移動相を水・アセトニトリル混液としたところ, テーリングの無い良好なクロマトグラム (テーリング係数 T = 0.95) が得られた. すなわち, ベルゲニンは, 適切なカラムを選択すること

Table 1. Ultimate Analysis and Melting Point of Bergenin Reference Standards

Reference Standards	Drying Conditions	Ultimate Analysis		Weight Loss*	m.p.
I	25°, 3mmHg, 6hr	$C_{14}H_{16}O_9 \cdot H_2O$	found : C 48.42% H 5.26	—	131～133°
			calcd : C 48.55 H 5.23		130～135°[9)]
II	150°, 3mmHg, 6hr	$C_{14}H_{16}O_9$	found : C 51.03 H 4.74	found : 5.32%	226～228°
			calcd : C 51.22 H 4.91	calcd : 5.20	224°[2)] 236～238°[9)]

* Weight loss(%) : $100\times(\text{Weight}_I - \text{Weight}_{II})/\text{Weight}_I$

によって，簡単な溶媒組成の移動相で充分に分離可能であった．次に，アセトニトリル濃度(%)と保持比(k')の関係について考察した．Fig. 3 に示したように，アセトニトリル濃度が5～10%の範囲で$\log k'$との間に直線関係が認められ，ベルゲニンの保持時間がアセトニトリル濃度に依存することが明らかとなった．そこで，t_Rが10分前後になるように，移動相の組成を水・アセトニトリル(92：8)と決定した．

また，分取用 HPLC についても，分析用 HPLC と同様，無シラノール型のカラム(TSKgel ODS-120T，10 μm，東洋曹達)を用い，移動相を水・アセトニトリル混液とした．アセトニトリル濃度と $\log k'$ との間には，アセトニトリル濃度 8 ～15%の範囲でほぼ直線関係が認められ(Fig. 3)，分取に適当と思われる t_R を選択し，水・アセトニトリル(87：13)混液を移動相として用いることにした．

3．検量線

ベルゲニン0.1～0.5 μgの範囲で，注入量(μg)とピーク高さ(mm)の間にほぼ原点を通る直線関係が得られ，相関係数は $r=0.99998$($n=5$)と良好であった．

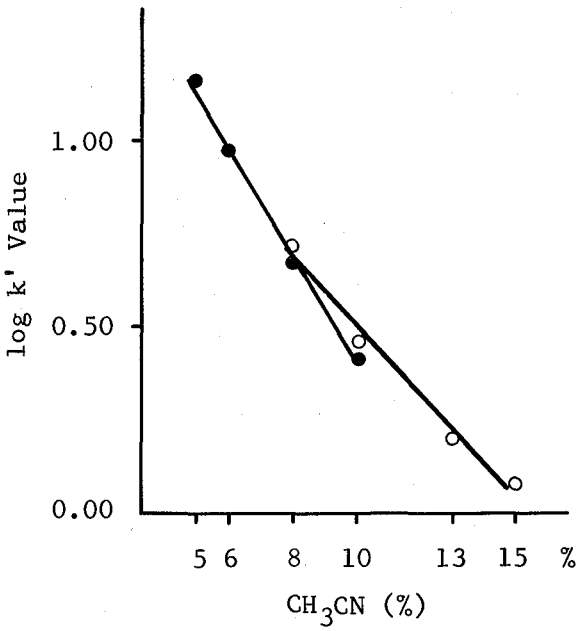


Fig. 3．Dependence of logk' Value on Acetonitrile Concentration for Bergenin
●—●：LiChrospher RP-18e Column (ϕ 4mm)
○—○：TSKgel ODS-120T Column (ϕ 21.5mm)

4．抽出条件の検討

抽出溶媒の検討　Table 2 に示した 9 種の溶媒を用い，各々の抽出効率を検討した．その結果，HPLC 移動相と同一組成の溶媒である 8 %アセトニトリルを用いた場合に，最も良い結果が得られた．

抽出方法の検討　抽出時間を15分間とし，振とう抽出，超音波抽出および還流抽出による抽出効率を比較したところ，いずれの方法においてもほぼ同等の結果が得られた(Table 3)．操作性を考慮し，抽出は振とうによる方法とした．

抽出回数の検討　繰返し振とう抽出を行い，各回毎の抽出率を求めた(Fig. 4)．2 回目でほとんどが抽出され，3 回目にはすべてのベルゲニンが抽出された．

以上の結果から，8 %アセトニトリルを抽出溶媒とし，振とう抽出を 3 回繰返して試料液の調製を行った．

Table 2．Effect* of Various Solvents on Extraction of Bergenin

Solvents	Extraction of Bergenin
8% Acetonitrile**	100.0%
Acetonitrile	3.5
50% Methanol	88.3
Methanol	48.2
50% Ethanol	91.1
Ethanol	18.7
Water	80.5
0.05N Ammonia Water	1.1
0.05N Acetic Acid	76.3

*The maximum value is indicated as 100 per cents.
**8% acetonitrile is the mobile phase for HPLC on LiChrospher RP-18e.

Table 3．Effect* of Various Methods on Extraction of Bergenin

Methods	Extraction of Bergenin
a**	98.2%
b**	96.5
c**	100.0

*The maximum value is indicated as 100 per cents.
**Each methods are as follows ; a, shaking, b, ultra sonication, c, refluxing

5．繰返し精度および添加回収実験

試料Aについて繰返しHPLCを行った結果，ピーク高さのCVは1.60%($n=5$)で，精度は良好であった．

また，添加回収実験の結果得られた回収率は，平均96.1%($n=5$，CV 2.03%)と，満足できる値であった(Table 4)．

6．試料AおよびBの分析

試料AおよびBについてHPLCを行ったところ，いずれも，そのクロマトグラム中にt_Rがベルゲニンと一致(t_R 10.2分)するピークを認めた(Fig. 5)．このピークがベルゲニン由来のものであることを確認するため，ベルゲニン標品の分取と同様の方法により，メタノールエキスを調製．脱脂後，ブタノールに転溶．シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる前処理を行い，溶出したベルゲニン含有画分をさらに分取用HPLCに付加し，ベルゲニンと同一のt_Rに出現するピークを繰返し分取した結果，ベルゲニン様物質を得た．これらの物質について^{13}C-NMRを測定したところ，164.3ppmにカルボニル炭素，152.7，149.3，141.9ppmの低磁場領域に3本のオレフィン炭素，119.4，116.5ppmの高磁場領域に2本のオレフィン炭素および111.1ppmにオフリゾナンスデカップリング実験で二重線に分枝するオレフィン炭素シグナルを認めた．また，83.4，81.2，75.5，73.9，72.1ppmに5本のメチン炭素，62.6ppmに1本のメチレン炭素ならびに60.3ppmに1本のメチル炭素シグナルが観測され，これら14本の炭素シグナルは，それぞれベルゲニン標品由来のシグナルと完全に一致し(Fig. 6)，Fig. 1の構造式をよく支持した[8),13,14)]．以上から，単離した物質を，ベルゲニンと同定した．試料AおよびBは，いずれもアカメガシワを表示成分として記載していないもので，外部形態による生薬鑑別試験を行った結果，その配合が推定されたものであるが，HPLCを行うことによって，その薬効成分であるベルゲニンを精度良く検出し，定量することができた．また，^{13}C-NMRを併用することにより，この方法が他成分の妨害を受けないことが確認された．

なお，HPLCで得られたクロマトグラムのピーク高さから求めたベルゲニン含量は，試料A 0.55%，試料B

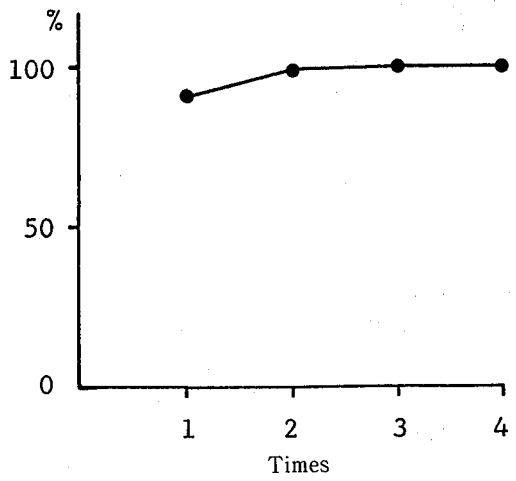


Fig. 4. Extraction Curve of Bergenin with 8% Acetonitrile Solution

Table 4. Recoveries of Bergenin added to Pharmaceutical Preparation

Runs	Recovery	CV
1	93.8%	
2	97.9	
3	95.6	2.03%
4	98.3	
5	94.8	
$\bar{X}$	96.1	

*Bergenin was added 8.99mg to sample A containing 8.25mg as bergenin.

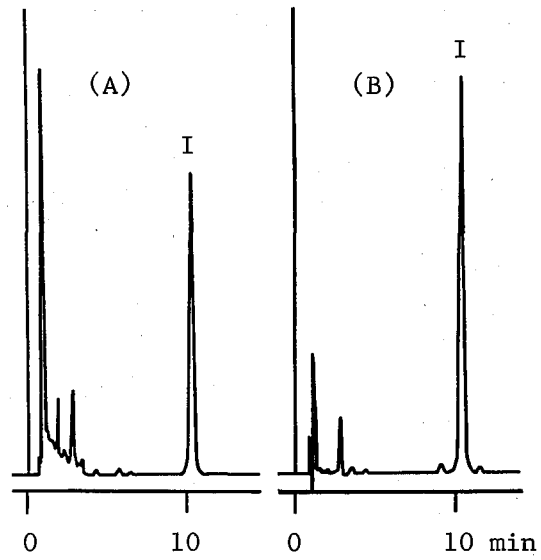


Fig. 5. Chromatograms of Sample A and B
I : bergenin
HPLC conditions : column, LiChrospher RP-18e, mobile phase, 8% acetonitrile solution, flow rate, 1.0ml/min, detection, UV 272nm

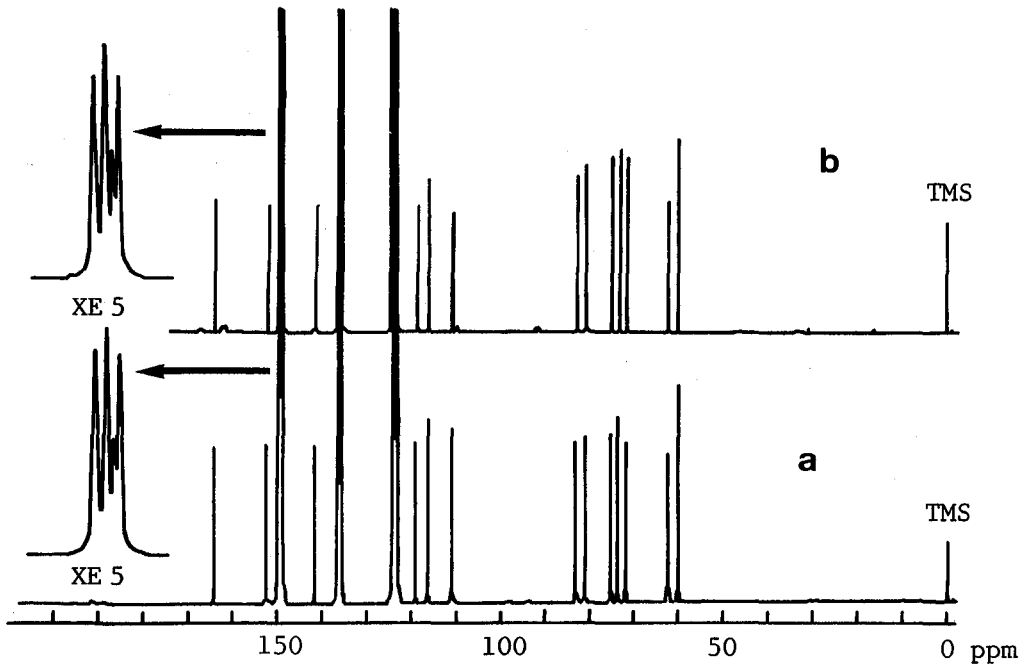


Fig. 6. ^{13}C-NMR Spectra of Bergenin in Pyridine-d_5
a : standard b : isolated from sample A
XE 5 means to expand the abscissa by five times.

1.15%であった．定量値を評価するにあたっては，アカメガシワにおける通常のベルゲニン含量の調査が必要であるが，これについては今後の検討課題と考えている．

結　論

アカメガシワを含有する無承認無認可医薬品中のベルゲニンの定量法について検討した．固定相を無シラノール型の逆相系カラム(LiChrospher RP-18e)とし，移動相を水・アセトニトリル(92：8)混液としたHPLC法を用いることにより，テーリングの無い良好なクロマトグラムが得られた．試料は，移動相で3回振とう抽出を繰返した後HPLCに供したが，ベルゲニンと同一のt_Rに出現したピークは，分取後測定した^{13}C-NMRのスペクトルデータからベルゲニンと同定された．HPLCを用いた本定量法は，多種類の生薬が配合された製剤についても，妨害を受けることなく，精度良くベルゲニンの定性，定量を行うことが可能であったことから，一般的な方法として広く適用できる方法と考えられる．しかし，生薬分析においては，常に配合成分による妨害を考えなければならず，ベルゲニンの定性については，^{13}C-NMRを併用するなどの配慮をすることが望ましい．

なお，ベルゲニンは結晶水の有無により約5％の重量差を生ずるため，用いる標品の組成には十分留意する必要がある．

謝辞　本研究にあたり，元素分析をして頂いた東京薬科大学中央分析センターの諸氏に深謝致します．

文　献

1）本間賢介：農化，15，394-396，1939
2）長谷川長八：薬誌，61，307-313，313-318，1941
3）平賀敬夫，竹本常松：明治薬科大学紀要，4，35-38，1974
4）岡田　勉，鈴木　勉，羽曽部すま，木皿憲佐：日薬理誌，69，369-378，1973
5）Abe, K., Sakai, K., Uchida, M.：*Gen. Pharmc.* 11, 361-368, 1980
6）Swarnarakshmi, T., Sethuraman, M. G., Sulochana, N., Arivudainambi. R. : *Curr. Sci.*, 53, 917, 1984
7）厚生省薬務局長通知，薬発第273号，昭和58年4月1日改正
8）Ramaiah P. Atchuta, Row L. Ramachandra, Reddy D. Sivakumar, Anjaneyulu A. S. R. : *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 9, 2313-2316, 1979
9）Ahmad, S. A., Kapoor, S. K., Asif Zaman：*Phytochemistry* 11, 452, 1972
10）Khosa R. L., Wahi A. K., Mohan Yogesh, Ray A. B.：

Indian J. Pharm. Sci., 41, 120-121, 1979
11) Hay J. Evelyn, Haynes L. J.：*J. Chem. Soc.*, 2231-2238, 1958
12) 厚生省薬務局審査第二課監修：日本薬局方外医薬品成分規格, 3-4, 1986, 薬業時報社, 東京
13) Yoshida, T., Seno, K., Takama, S., Okuda, T.：*Phytochemistry*, 21, 1180-1182, 1982
14) Taneyama, M., Yoshida, S., Kobayashi, M., Hasegawa, M.：*Phytochemistry*, 22, 1053-1054, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 80-84, 1987

イカリソウの試験法に関する研究 フラボノイド配糖体イカリインの分析

高野伊知郎*, 安田一郎*, 浜野朋子*,
瀬戸隆子*, 秋山和幸*

Studies on Examination Method of *Epimedii Folium* Analysis of Flavonol Glycoside, Icariin by High Performance Liquid Chromatography

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

A high performance liquid chromatographic (HPLC) method on an octadecyl sililated (ODS) silica column was developed for the determination of icariin (ICA) in preparation of crude drugs. The reference standard ICA, specific flavonol glycoside of *Epimedii Folium* (EF) was isolated as yellow needles at 0.1% yield using preparative HPLC. Samples were analyzed by HPLC on a silanol free ODS silica column (LiChrospher RP-18e, 10 μm, 4mm i.d. × 25cm) using 26% acetonitrile／10 mM phosphate buffer (pH 3.0) as the eluting solvent with UV detection at 270 nm. The calibration curve showed a straight line in the range of 30－450ng. Average recovery of ICA from crude drugs was 99.1% and the coefficient of variations (CV) was 2.3% (n = 6). Using this method, 12 lots of crude drugs on the market and 5 plants of *E. sempervirens* and *E. grandiflorum* were analyzed. ICA was detected in all samples, but the contents varied between 1.70 and 9.92mg／g in crude drugs. Chemical components of plants were different from each other between aerial parts and underground parts.

Keywords: crude drugs, *Epimedii Folium*, icariin, preparative HPLC, HPLC, determination, plants, on the market

緒　言

イカリソウはメギ科 (*Berberidaceae*) *Epimedium* 属の多年草[1,2]で，地上部を採取し，乾燥させたものを淫羊藿[1]と称し，古くから強精，強壮薬として用いられてきた．現在，イカリソウはドリンク剤をはじめとする多くの医薬品に配合されているが，いわゆる健康食品と称する無承認無許可医薬品にも混入される可能性のある生薬のひとつである．イカリソウは成分として糖，脂肪酸類，アルカロイドの他，フラボノイド配糖体を多く含有している．[3-16] 薬理的には制糖効果[17] (ラット)，尿分泌促進及び抑制作用[18] (ウサギ)，男性ホルモン様作用[19] (マウス)，精液分泌促進作用[20] (イヌ) などの報告がある．これらの薬効成分はいまだに明らかではないが，活性画分を加水分解すると糖が析出し，同時に精液分泌作用も消失することなどから配糖体分画と推定されている．[20] イカリソウの品質評価のための理化学試験では薄層クロマトグラフィー (TLC) 法を実施しているが，類似の構造を持つフラボノイド配糖体が数多く存在するため，TLC 上で単一のスポットが得られず，幅広いバンドとして観察されるために判定しにくいのが現状である．そこでより迅速でかつ正確な分析手段の開発が急務である．今回，イカリソウ中の特徴的な化学構造を持つフラボノイド配糖体，イカリイン (以下 ICA と略す) を指標物質に選び，生薬からの抽出，単離，精製および液体クロマトグラフィーによる分析法について検討した．また，東京市場に流通している生薬，および採集したイカ

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

リソウ属植物に含まれるICAの分析を試みた.

実験の部

1．器具，装置

TLC：シリカゲル60 F_{254}（メルク），HPLC：TWINCLE，UVIDEC100 Ⅱ（日本分光工業），分取HPLC：HLC837型（東洋曹達工業），NMR：JEOL FX270型（日本電子），融点測定器：BY-1型（矢澤科学器械工業），IR：EPI-G 3型（日立），UV：320型（日立），旋光度測定器：JASCO DIP-181型（日本分光工業）

2．試薬および標準品

試薬はすべて和光純薬特級を用いた．ICA標準品：東京市場品生薬120gから抽出，液—液分配の後，分取液体クロマトグラフィーで単離，精製した（Fig. 1）．分取条件は以下の通り．

プレカラム：TSKgel ODS-120 T（10 μm），2.15cm i.d.×10cm，カラム：TSKgel ODS-120T（10 μm），2.15cm i.d.×30cm，移動相：33%アセトニトリル／10mMリン酸緩衝液（pH3.0），流速：7.0ml／分，測定波長：270nm，温度：30°，1サイクル85分，繰り返し回数：25回，分取時間：32.0-34.9分

水—ピリジン混液から再結晶し，黄色針状晶120mgを得た．各種スペクトルデータと文献値[13]との比較からICAと同定した．

HPLC用標準溶液：ICA（SiO_2，減圧下48時間乾燥）15mgをとり，HPLC分析用移動相に溶かし，正確に500mlとした．（30 μg／ml）

3．試料

(1)東京市場品生薬：都内の生薬取扱業者7店からそれぞれ異なる12ロットを集めた．すべて輸入品で産地は中国，北朝鮮であった．

(2)イカリソウ属植物：1987年4月に採集した石川県産2件および福井県産1件，滋賀県産1件の野生品トキワイカリソウ *E. sempervirens*[2] 4件ならびに東京都内で移植栽培したイカリソウ *E. grandiflorum*[2] 1件のあわせて5件について地上部，地下部に分けて乾燥，調製して用いた．

4．HPLC用試料溶液の調製

各生薬を均一な粉末（32号ふるいを通す）とし，その100mgを正確にはかり，50ml用遠心管に移し，50%メタノール／10mMリン酸緩衝液（pH3.0）30mlを加え，10分間振とう，10分間遠心し，上清をとった．同様の操作をさらに2回繰り返し，全上清液を集め，抽出溶媒で希釈し，正確に100mlとし，その一部を0.45 μmのフィルターでろ過してHPLC用試料溶液とした．

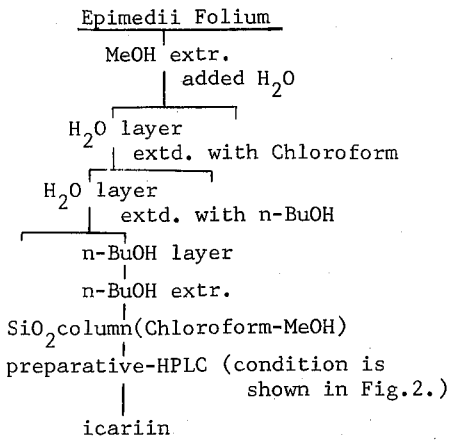


Fig. 1. Isolation Procedure of Icariin

5．HPLCによる分析

標準溶液および試料溶液の1—40 μlを以下の分析条件に従ってHPLCに注入し，ピーク高さ法によりICA含量を算出した．

HPLC条件　カラム：LiChrospher RP-18e（10 μm）4mm i.d.×25cm，移動相：26%アセトニトリル／10mMリン酸緩衝液（pH3.0），流速：1.0ml／分，測定波長：270nm，温度：室温

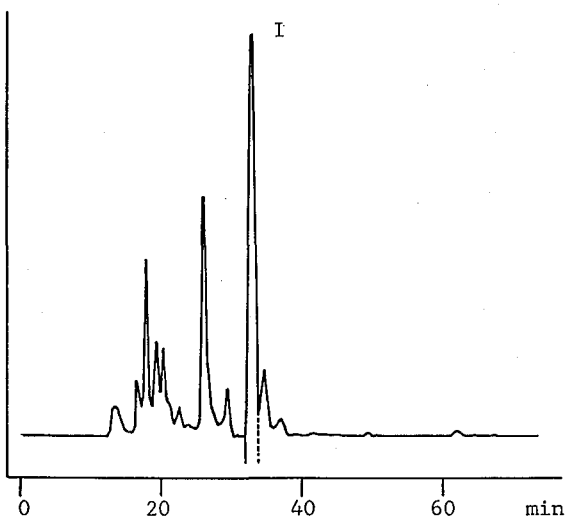
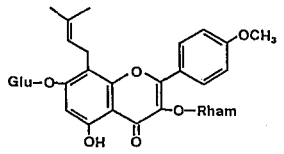


Fig. 2. Preparative HPLC Chromatograms of Icariin Fraction using 33% Acetonitrile/10mM Phosphate Bufffer(pH3.0)
I：icariin
—：preparative start time（32.0min）
…：preparative end time（34.9min）



yellow needles (H_2O-C_5H_5N), mp 244-246°
$[\alpha]_D^{22}$ -92°(C=0.73, C_5H_5N)
Anal.Calcd. $C_{33}H_{40}O_{15}\cdot 1\frac{1}{2}H_2O$
: C,56.32; H,6.15
Found: C,56.55; H,6.12
IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 3400-3000(OH), 1650(conjugated C=O), 1600,1500(aromatic C=C)
UV $\lambda_{max}^{EtOH}nm(\log\varepsilon)$:271(4.29), 316(4.04)
^{13}C-NMR δppm(C_5D_5N): 18.1, 18.3, 22.5, 25.7, 55.5, 62.3, 71.1, 71.9, 72.1, 72.5, 73.2, 74.9, 78.6, 79.0, 99.3, 102.6, 103.9, 107.0, 109.4, 114.5, 123.9, 131.2, 131.5, 136.2, 154.0, 157.7, 160.6, 161,8, 162.2, 179.5
(tetramethylsilane, 67.8MHz)

Fig. 3. Chemical Structure of Icariin

結果および考察

1. ICA の単離

逆相系の分取 HPLC を用いることにより，良好な分離が達成できた（Fig. 2）．この方法は一度条件を設定すれば，比較的簡単に再現性よく分取が行える点で優れている．また製剤中の生薬成分を分析する際にも，前処理（クリーンアップ）法として応用できるものと考えられる．なおイカリソウ120gからの ICA 収量は120mg（収率0.1%）であった．Fig. 3 に ICA の構造ならびに物理恒数を示した．

2. HPLC 条件の検討

ICA は極性が高く，順相系のカラムでは吸着やテーリングを起こしやすいと思われたので分析はカラムに逆相系，移動相にアセトニトリル／水を用いて検討した．また，若干のテーリングがみられたので適当な酸または塩基を加えて改善をはかった（Table 1）．その結果，ピークの形状（テーリング係数，T），ピーク保持比（logk'），pH およびベースラインの安定性等から26%アセトニトリル／10mM リン酸緩衝液（pH3.0）が最も適当と思われた（Fig. 4）．カラムはオクタデシル基にエンドキャップを施した粒状シリカ型の製品が分離能に優れていた．測定波長に関しては最も検出感度の高かった270nm を使用することとした．

3. HPLC 用試料溶液の抽出

抽出は繰作が簡便であることから振とう法で行うことにした．抽出溶媒および回数について検討した結果，ICA 抽出率は50%メタノール／10mM リン酸緩衝液（pH3.0）が最もよく，100mg 程度の試料量であれば，3回の抽出でほぼ完全に回収されることがわかった．（Table 2，Fig. 5）．

Table 1. Effect of Acid or Base in Mobile phase on Chromatograms of Icariin

acid and base	pH*	log k'	T
acetic acid	3.4	1.07	7.25
phosphate buffer	3.0	1.05	1.01
tartaric acid	2.5	1.06	1.14
phosphoric acid	2.2	1.02	1.04
oxalic acid	1.9	1.03	1.12
ammonium carbonate	8.9	0.69	5.88

*pH of the mobile phase.

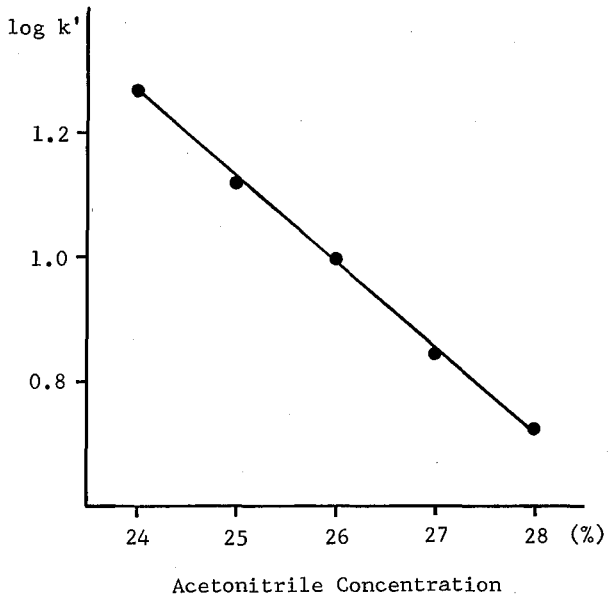


Fig. 4. Dependence of log k' on Acetonitrile Concentration for Icariin on LiChrospher RP-18e using 10mM Phosphate Buffer(pH3.0)

4. 検量線

標準溶液の1，5，10，15 μl（30—450ng）について先の HPLC 条件によりピーク高さを測定し，検量線を作成したところ，ほぼ原点を通る直線が得られた．

Y(mm)=0.4050 X (ng) +0.6667 (r=0.99999)

5. 添加回収実験および繰り返し精度

生薬粉末100mg に ICA 300 μg を添加し，定量法に従って回収実験を行った．本法における回収率は99.1%，変動係数は2.3%（n=6）であった．

Table 2. Effect of Solvent on Extraction Efficiency

solvent	relative ratio*
water	52(%)
acid	53
base	28
MeOH	69
EtOH	59
acetonitrile	58
50%MeOH	90
50%MeOH/phosphate buffer	100
40% 〃	99
30% 〃	90

*Each value is calculated from relative peak height to the maximum value.

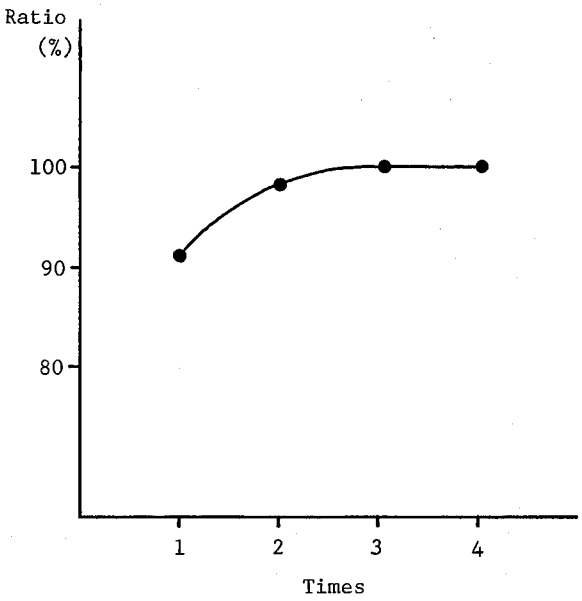


Fig. 5. Effect of Times on Extraction of Icariin from Crude Drugs

Table 3. Icariin Contents of Crude Drugs in Different Dealers A—G

dealer		contents	(mg/g)
A	3.84	3.69	3.88
B	9.50		
C	1.70		
D	6.86	2.82	
E	7.77	3.17	4.28
F	5.00		
G	9.92		

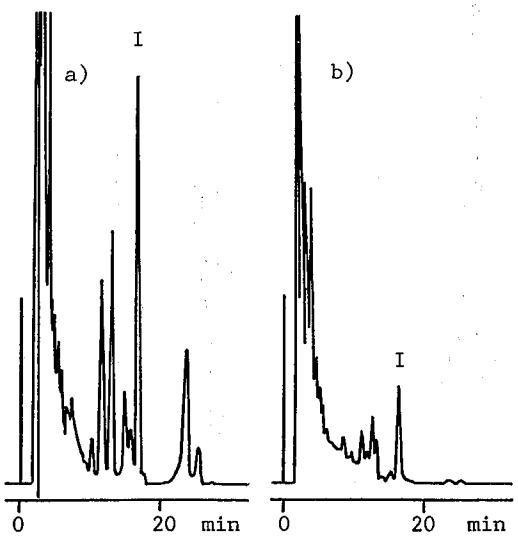


Fig. 6. Chromatograms of Crude Drugs by HPLC on LiChrospher RP-18e using 26%Acetonitrile/10mM Phosphate Buffer(pH3.0)
a : sample of dealer B, b : sample of dealer C
I : icariin

6. 試料の分析

分析の結果，東京市場品12件の生薬いずれにも ICA を検出した．しかし，その定量値に関してはメーカーあるいはロットごとに大きな差が認められた．(Table 3, Fig. 6). イカリソウ属植物を分析した結果，地上部には痕跡程度のピークを認めたのみであった．一方，地下部のクロマトパターンは地上部と異なっており，4件すべてに ICA を検出した．含量は地上部の数倍から数十倍であった（Table 4, Fig. 7）．相楽らは数種のイカリソウ栽培品について成分を検討している[14]が，フラボノイド配糖体に関しては著者らと同様，含量に差があることを指摘している．以上のことから ICA はイカリソウ定性試験の指標物質として有用であるが，定量値でイカリソウの品質を評価することは，現時点では妥当でないと思われる．ICA 含量については植物側の要因（品種，産地，採集時期など）および二次的な要因（生薬の調製法，保存状態などによる生薬成分の変化）等の影響

Table 4. Icariin Contents* of *Epimedium* spp.

	aerial part	underground part
E. sempervirens	0.11(mg/g)	13.30(mg/g)
	0.72	2.94
	0.19	1.83
	0.02	
E. grandiflorum	trace	1.60

*icariin/powder of dried plant

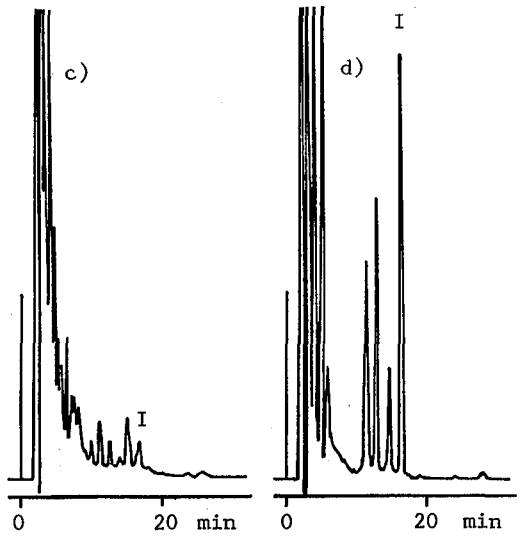


Fig. 7. Chromatograms of *E. sempervirens* by HPLC on LiChrospher RP-18e using 26% Acetonitrile/10mM Phosphate Buffer(pH3.0)
c : aerial part, d : underground part
I : icariin

をあわせて考慮する必要があり，本定量法を使って，今後さらに検討していく予定である．

結　論

生薬製剤中のイカリソウを分析する目的で，特徴的なフラボノイド配糖体のひとつである ICA に着目した．分取 HPLC を用いて精製を行い，イカリソウから ICA の黄色針状晶を0.1%の収率で単離した．定性，定量は HPLC 法によった．検量線は原点を通る直線を示し，ICA の生薬からの添加回収率は99.1%，変動係数（CV）は2.3%（n＝6）であった．本法を用いて市場品生薬および基源植物の分析をより迅速かつ正確に行うことができた．その結果，ICA は市場品生薬のいずれにも検出され，イカリソウ確認のための充分な指標物質となり得ると思われた．一方，量的には個体差が大きく現れることから ICA の定量値をそのままイカリソウの品質に結びつけることはできないと考えている．また植物に関しては地上部と地下部におけるクロマトパターンが異なり，ICA 含量も後者が著しく高い傾向にあった．

謝辞　ICA の元素分析をしていただいた東京薬科大学中央分析センターの諸氏に深謝いたします．

文　献

1）江蘇新医学院編：中薬大辞典，第1版，2250，1977，上海科学技術出版社，上海
2）大井次三郎：日本植物誌　顕花篇，第1版，642，1975，至文堂，東京
3）松浦　信，山崎　太，広瀬勝信，前田恵美子，水野端夫：生薬，25，122-124，1971
4）赤井左一郎：薬誌，55，537-599，1935
5）赤井左一郎，松川泰三：薬誌，55，705-718，1935
6）赤井左一郎，中澤浩一：薬誌，55，719-727，1935
7）赤井左一郎，中澤浩一：薬誌，55，788-799，1935
8）太田達男，宮崎利夫：東京薬科大学研究年報，8，151-152，1958
9）竹本常松，醍醐皓二，徳岡康雄：薬誌，95，312-320，1975
10）徳岡康雄，醍醐皓二，竹本常松：薬誌，95，321-325，1975
11）徳岡康雄，醍醐皓二，竹本常松：薬誌，95，551-563，1975
12）徳岡康雄，醍醐皓二，竹本常松：薬誌，95，698-705，1975
13）徳岡康雄，醍醐皓二，竹本常松：薬誌，95，825-829，1975
14）伊藤裕二，平山総良，須藤桂一，相楽和彦，吉田継親：日本薬学会第106年会議講演要旨集，176，1986 ならびに私信
15）富田真雄，石井　永：薬誌，77，114-116，1957
16）富田真雄，石井　永：薬誌，77，212-213，1957
17）平嶋禎弘，有田康弘：*The Clinical Report*，4，2953-2956，1970
18）前田　陽：千葉医学会雑誌，17，2375-2301，1939
19）三輪　卓：岐阜医科大学紀要，7，1705-1724，1959
20）橋本理作：実験薬物学雑誌，14，195-213，1937

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **38**, 85-88, 1987

FTD検出器付ガスクロマトグラフィーによる外皮用薬中のノニル酸ワニリルアミドの定量

宮武 ノリエ*, 重岡 捨身*, 寺島 潔*,
長嶋 真知子*, 秋山 和幸*

Determination of Nonanoic Acid Vanillylamide in External Applications by Flame Thermionic Detector Gas Chromatography

NORIE MIYATAKE*, SUTEMI SHIGEOKA*, KIYOSI TERASHIMA*,
MACHIKO NAGASHIMA* and KAZUYUKI AKIYAMA*

A method is described for the separation and quantitative analysis of Nonanoic Acid Vanillylamide (NVA) in external applications such as liniments and plasters by using flame thermionic detector gas chromatography (FTD-GC). FTD-GC analysis of NVA showed good sensitivity by almost 20-fold than that of flame ionization detector (FID-GC).

With or without the clean-up process, methanol extract of a sample was subjected to gas chromatography on 2% Thermon-3000 (3mm I.D. × 0.5m) at 240°.

The calibration curve based on peak height was linear in the range of 0.03～0.07mg／ml of NVA and the recovery of NVA added to a liniment was 100.4% (n =3, C.V. =1.08%). The present method is useful for the analysis of small quantitatives of NVA in commercial products.

Keywords : Nonanoic acid vanillylamide, gas chromatography, flame thermionic detector, external applications, liniments, plasters

緒　言

ノニル酸ワニリルアミド（以下NVAと略す）は，トウガラシチンキ[1]の主成分であるカプサイシンやジヒドロカプサイシンと類似の構造をもつ化学的合成品で，皮膚刺激薬として，外用液剤，パップ剤，硬膏（プラスター）剤，軟膏剤に配合されている．

一般に市販されている外皮用薬の消炎鎮痛剤には，冷感タイプと温感タイプがある．冷感タイプは，局所刺激作用を持つ *dl*-カンフル，ハッカ油あるいは *l*-メントールと，経皮吸収されて消炎鎮痛作用を現すサリチル酸誘導体が主成分を構成し，急性炎症期の疾患に広く使用されている．一方，さらにNVAを含有する製剤は，皮膚の温感点を刺激するところから，温感タイプと呼ばれ慢性疾患あるいは腫張寛解後の炎症性疾患に使用されている．

NVAは，わずかな量でその効力を発揮することから，他の薬効成分に比べてその配合量が，1／100～1／500と非常に微量である．このために今までは定量が困難とされており，製剤中のNVAの分析を報告したものは極めて少ない[2]．そこで今回，著者らは，共存する他の成分の影響を受けにくく，高感度で簡便な方法であるアルカリ熱イオン化検出器付ガスクロマトグラフィー（GC-FTD）による方法について検討し，さらに市販製剤中のNVAの定量に応用し，成果を収めたので報告する．

実験の部

1．**試料**　行政検体として衛生局薬務部より送付された外皮用消炎鎮痛薬のうち，NVAを含有する液剤（リニメント剤）およびプラスター剤を試料とした．

*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

2．試薬 NVA 標準品：mp57.8° 合成品（東洋ファルマー社製）を用いた．純度96.6%（GC 測定）

NVA 標準液：NVA 標準品を乾燥（減圧，シリカゲル，5時間）後，その50mg を精秤し，無水エタノールを加えて溶かし，正確に50m*l* とし，NVA 標準液とした．

内標準溶液：塩酸パパベリン25mg を秤取し，水 5 m*l* を加えて溶かした後，水酸化ナトリウム試液（1 N）1 m*l* を加え，エーテル30m*l* を加えて10分間振とうする．エーテル層を分取し，水 5 m*l* で洗った後減圧留去する．残留物にメタノール（MeOH）50m*l* を加えて溶かし，これを内標準原液（IS_1）とした．IS_1 を MeOH で正確に10倍希釈したものを内標準液（IS_2）とした．

その他は試薬特級を用いた．

3．装置 ガスクロマトグラフ：水素炎イオン化検出器（FID）及びアルカリ熱イオン化検出器（FTD）を装備した島津 GC-9 AM型．インテグレーター：島津 C-R 3 A 型データ処理装置．超音波洗浄器：BRANSONIC MODEL 220.

4．GC 条件 カラム：3 mmI.D.×0.5 m のガラスカラムに 2% Thermon-3000（Chromosorb W,AW-DMCS, 80～100mesh）を充填したもの．温度：カラム240°，注入部及び検出器270°．検出器：FTD．キャリアーガス：He 50m*l*／min. H_2 3.5m*l*／min. Air 155m*l*／min. 感度：10^2×4．注入量：1 μl.

5．定量法

1）検量線の作成 NVA 標準液の 5 m*l* を正確に量り MeOH を加えて正確に50m*l* とする．その 3 m*l*，5 m*l*，7 m*l* をそれぞれ正確に量り，IS_1 1 m*l* を正確に加えた後，MeOH を加えて正確に10m*l* とする．よく振りまぜたのち，その 1 μl を GC に注入する．ピーク高さによる内標準法により検量線を作成する．

2）**試料溶液の調整**

a. 液剤：NVA 0.5mg に対応する容量を10m*l* メスフラスコに正確にはかり，IS_1 1 m*l* を正確に量って加えた後 MeOH を加えて10m*l* とし，振りまぜたのち試料液とする．

b. プラスター剤（1）：NVA 0.05mg に対応する面積を正確に測り，幅 1 cmほどに細切しライナーを剝し，100m*l* の広口ナシ型コルベンに入れる．MeOH 60m*l* を加え，更に IS_2 1 m*l* を正確に量って加えた後，還流冷却管を付け水浴上で 6 時間加温抽出する．冷後 MeOH 層を別のナシ型コルベンに分取し，冷却管及びコルベンを MeOH 10m*l* で 3 回洗い，洗液を先の MeOH と合し，MeOH 減圧留去する．残留物に MeOH 1 m*l* を加えて溶かし，試料液とする．

c. プラスター剤（2）：NVA 0.05mg に対応する面積を正確に測り，幅 1 cmほどに細切しライナーを剝し，コニカルビーカーに入れる．クロロホルム70m*l* を加え15分間超音波洗浄器にかける．クロロホルム層を遠沈し，上澄を200m*l* ナシ型コルベンに分取する．更にクロロホルム40m*l*，20m*l* で同操作を行う．全クロロホルム抽出液に IS_2 1 m*l* を正確に量って加え溶媒が約30m*l* になるまで減圧留去する．冷後 MeOH 約30m*l* を加え，よく振とうしゴム質を分離させたのち綿栓ろ過する．ろ液を減圧留去した後 MeOH 1 m*l* を加えて溶かし，試料液とする．

3）**定量** 試料液 1 μl につき，先の条件で GC に注入し，IS のピーク高さに対する NVA のピーク高さの比を求め検量線により試料中の NVA の量を求める．

結果と考察

1．カラムの検討 検出器に FID を用いて NVA 定量可能なカラムの検討を行った．Sagara 等[3]の報告を参考に，3% Apiezone grease L；1 m，2% OV－1；2 m，5% SE－30; 1 m，5% OV－17; 2 m，2% OV－17; 1 m，10% SE－52;1.5 m，5% SE－52; 1 m，10% FFAP；1 m，2% Thermon-3000;0.5 m の 9 種類を検討したところ，2% OV-1 が最も良好であった．しかし，試料中の NVA の含量は液剤の場合80～120 μg/m*l*，プラスター剤は30～60 μg／1 枚（プラスター剤 1 枚＝24～40c㎡）であり，FID では感度を最大に上げても，クリーンアップ及び濃縮などの前処理を行わなければ定量出来ない．そこで NVA の窒素に着目し，検出器を FTD にしたところ，感度が20倍以上上昇し，液剤でそのまま定量するのに充分たえうる感度が得られることが判明した．しかし，カラムに OV-1 を用いると他の共存成分の影響が大きく，溶媒のテーリングも大きいことから，再度カラムを検討した結果，2% Thermon-3000が良好であった．Thermon-3000は溶媒の影響はほとんど無く，また他の共存成分の影響も比較的受けずに定量が可能であった．標準液のクロマトグラムを Fig. 1 に示す．

2．検量線 NVA 標準液を MeOH で希釈し，30 μg／m*l* ～70 μg／m*l*（IS 50 μg／m*l* 添加）の標準系列（n＝3）をつくり，GC 条件に従って操作し，IS に対する NVA のピーク高さ比及びピーク面積比を求め，検量線の作成を行ったところ共にほぼ原点を通る良好な直線が得られた．（相関係数：ピーク高さ比法＝0.9996，ピーク面積比法＝0.9990）．しかし，NVA のピークが多少テーリングするため，ピークの大きさによっては裾野で

重なり合う危険性を考慮して，定量はピーク高さ法によることにした．

3．再現性 NVA 50 μg／ml の溶液を用いて再現性の検討を行った．7回の測定から得たピーク高さ比は，0.90765～0.89439で平均0.90145（C.V.＝0.62%）であった．

4．添加回収試薬及び抽出法 市販製剤にNVAを添加して，その回収実験を試みた．使用した液剤及びプラスター剤の処方をTable 1に示す．この組成は，多少の相違はあるものの他の製品に共通した成分である．

1）液剤 液剤2.5ml を正確にはかり，NVA100 μg/ml の無水エタノール溶液2.5ml を正確に量って加え，IS_1 1 ml を正確に加えた後，MeOHで正確に10ml とし試料液として回収率を求めたところ，100.4%（n＝3，C.V.＝1.08%）であった．製剤のクロマトグラムの例として液剤のクロマトグラムをFig. 2に示す．

2）プラスター剤 NVA標準液をMeOHで希釈し50 μg/ml の溶液を用いて，定量法2）試料溶液の調製b．プラスター剤（1）の方法に準じて試験を行い，その回収率を求めたところ99.0%（n＝3，C.V.＝1.43%）であった．市販製剤についても同様に回収試験を行った結果，回収率は96.0～103.7%であり，製剤間のバラつきが多少みられた．これはプラスター剤の基剤の組成の違いによるものと思われる．そこで，値の低いものや，MeOHで還流抽出すると基剤が硬化して塊になるもの等については，C．プラスター剤（2）の方法で抽出を行った．つまりクロロホルムで基剤を分散し抽出したのち，MeOHを加えてゴム質を固まらせて分離し，溶液を濃縮して試料とする方法で行った．同方法での回収率は101.9～106.3%であった．

5．市販製剤への応用 市販製剤の定量結果はTable 2に示したとおりである．液剤は，7種いずれも規格値内であった．プラスター剤は1種は規格値内であったが，他の2種はいずれの抽出法で行っても規格値以下であった．なお，プラスター剤の抽出法は，ひき続き検討中である．

結　論

GCにより，リニメント剤とプラスター剤中の微量のNVAの定量法を検討した．その結果，2% Ther-

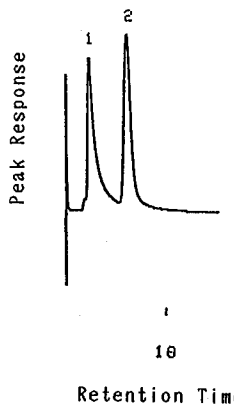


Fig. 1．Gas Chromatogram of Nonanoic Acid Vanillylamide (NVA) and Papaverine (I.S.)
Peak 1 : NVA, 2 : I.S.

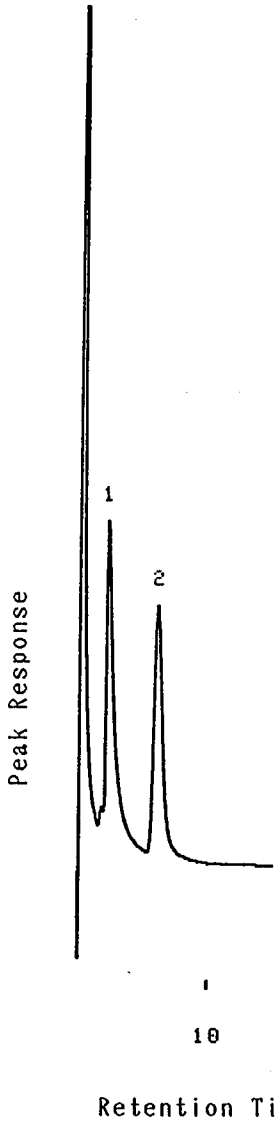


Fig. 2．Gas Chromatogram of NVA in Commercial Product
Peak 1 : NVA, 2 : I.S.

Table 1. Formula of Improved Products

	Liniment (mg/ml)	Plaster (mg/40cm²)
Ingredients		
Methyl Salicylate	50	36
l-Menthol	52	18
dl-Camphor	52	7.2
Thymol	7	—
Chlorpheniramine Maleate	1	—
Diphenhydramine	—	1.6
Tocopherol Acetate	—	2
NVA	0.1	0.04

チルが妨害になり，クリーンアップの前処理をしなくては定量できない．しかし，本法で行えばそれらの妨害はなく，特に液剤の場合には前処理をせず，試料をMeOHで希釈してそのままGCの試料として定量することができる．

本法は操作が簡単で感度も十分な分析法であり，市販製剤にも適用しうることから，行政検体の迅速分析法として，また表示成分の品質保証の方法として有用である．

文　献

1) 日本公定書協会，第十一改正日本薬局方解説書，D-657-658，1986，広川書店．

2) Jurenitsch, J.: *Sci. Pharm.*, 47, 31-36, 1979.
大西重樹，米谷　融，原　昭二：薬学雑誌，103(2) 236-239，1983.

3) Sagara, K., Kakizawa, S., Kasuya, K., Misaki, T. and Yosizawa, H.: *Chem. Pharm. Bull.*, 28(9), 2796-2799, 1980.

4) Sticher,O., Soldati, F. and Joshi, R.K.: *J. Chromatogr.*, 166, 221-231, 1978.
Jurenitsch, J., Eingler, E., Becker, H. and kubelka, W.: *Planta. medica.*, 36, 54-60, 1979.
Jurentisch, J. and Kampelmuller, I.: *J. Chromatogr.*, 193, 101-101, 1980

Table 2. Analytical Results of Commercial Product

Sample	Dosage Form	Declared Potency	Found (%)	Extration Method
1	Liniment	0.1 mg/ml	90.7	a ※
2	Liniment	0.1	94.3	a
3	Liniment	0.12	96.2	a
4	Liniment	0.1	87.7	a
5	Liniment	0.1	90.3	a
6	Liniment	0.1	96.7	a
7	Liniment	0.08	97.3	a
8	Adhesive Plaster	0.04 mg/40cm²	89.1	b ※
9	Adhesive Plaster	0.032mg/39cm²	34.1	b
			31.5	c ※
10	Plaster	0.06 mg/24cm²	24.0	b
			28.5	c

※Extraction methods of a, b and c are described in Experimental 5-2) Procedure of Sample Solution.

mon-3000をカラム充填剤とし，検出器にFTDを用い，内部標準物質にパパベリンを用いて定量する方法を確立した．

NVAの定量には液体クロマイトグラフで行う方法も報告されている[4]．その一般的条件は，ODS系の逆相カラムを用い，アセトニトリル：水：酢酸を移動相に，UV280nmで検出する方法であるが，この方法で定量分析を行うには，共存物質であるカンフルやサリチル酸メ

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 89-92, 1987

ガスクロマトグラフィーによる鎮暈剤中の臭化水素酸スコポラミンの定量法

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

Determination of Scopolamine Hydrobromide in Antiemetics by Gas Chromatography

MISAKO TAKAHASHI*, KYOKO NAKAYAMA*,
SHIN-ICHI UEHARA*, KUNIHIRO KAMATA*,
TERUHIKO HAGIWARA* and KAZUYUKI AKIYAMA*

Keywords：鎮暈剤 antiemetics, ガスクロマトグラフィー gas chromatography, 臭化水素酸スコポラミン scopolamine hydrobromide,

はじめに

鎮暈剤中に配合される医薬品としては副交感神経遮断薬，抗ヒスタミン薬，鎮痙薬，鎮吐薬，強心利尿薬，ビタミン類などがある．これらの一部医薬品の分析法については報告[1,2]済みであるので今回は臭化水素酸スコポラミン（Scop.）について検討した．

Scop.は副交感神経遮断作用，中枢抑制作用をもち，乗物酔を防止するのに有効な薬の原形として古くから繁用されている．その作用は強力で，製剤中の処方量[3]は微量であるため感度の高い分析法が必要である．一方，配合量も他成分に比較して非常に少いため，例えばサリチル酸ジフェンヒドラミン（S.Dh）と240：1，テオフィリン（Te.）と400：1，塩酸メクリジンと200：1，などその分析は困難である．

Scop.の定量分析法としては，電位差滴定法[4]，比色法[5]，螢光法[6]，ガスクロマトグラフィー[7]（GC），高速液体クロマトグラフィー[8]（HPLC）など数多く報告されている．前3者は量及び選択性の面で鎮暈剤には適用し難く，GC法ではアセチル化，TMS化などの前処理が必要であり繁雑である．そこで，今回著者らは製剤中のScop.の簡便なGCによる直接分析法について検討した結果，アセチル化，TMS化などの前処理を行うことなく，迅速かつ高精度に測定できる定量法が得られたので報告する．

実験の部

装置　GC：日立製作所K.K.製日立163型ガスクロマトグラフ，データ処理装置：島津製作所K.K.製クロマトパックR1A，超音波発振水槽：ヤマト科学K.K.製ブランソン12型，振とう器：大洋化学工業K.K.製レシプロシェーカーSR-Ⅱ，遠心分離器：久保田製作所K.K.製KN−70,

試薬，試液及び標準品　特に本文に記載のないものは日本薬局方（日局）一般試験法，または日局通則により調整したもの，および和光純薬K.K.製試薬特級を用いた．内標準（I.S.）溶液：フタル酸ジシクロヘキシル20mgをとりクロロホルム200mlに溶かし，これを内標準溶液とする．Scop.：定量値99.8%，水分定量値4.03%のものを使用した．Te, S.Dh., V.B_6, カフェイン（Cf.），ジメンヒドリナート（Dm.），*dl*−マレイン酸クロルフェニラミン（Cp.），アミノ安息香酸エチル（E.Am.）：いずれも次の条件で乾燥し定量するとき99.0%以上のものを使用した．Te（105°，4時間），S.Dh.（減圧，シリカゲル，5時間），V.B_6（減圧，シリカゲル，4時間），Cf.（80°，4時間），Dm（減圧，五酸化リン，24時間），Cp.（105°，3時間），E.Am.（シリカゲル，3時間）・

試料　医薬品製剤は行政検体として衛生局薬務部より送付された市販の鎮暈薬（素錠，糖衣錠，カプセル

*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

剤）を用いた．それぞれ10個以上とりその平均重量を算出し乳鉢でよく研和して均質な粉末とし，試料とした．

測定　日局一般試験法第6項「ガスクロマトグラフ法」の定量(1)内標準法に従い測定する．

Ⅰ．GC法

1．標準溶液の調製 Scop. 標準品約25mg を精密に量り，0.2N酢酸溶液を加えて溶かし正確に100mlとする．この液4 mlを正確に量り，水20ml塩化ナトリウム3 gおよびアンモニア試液1 mlを加え，クロロホルム20mlずつで3回抽出する．全クロロホルム抽出液を合わせ無水硫酸ナトリウム5gを加え脱水した後，ろ過する．硫酸ナトリウムはクロロホルム5mlずつで2回洗い，洗液は先のろ液に合わせた後，ロータリーエバポレーターを用いて40°以下で溶媒を留去する．残留物はデシケーター（シリカゲル）で乾燥し，これに内標準溶液2 mlを正確に加えて溶かし標準溶液とする．

2．**試料溶液の調製**　Scop. 約1.0mg に対する試料を精密に量り，0.2N酢酸溶液30mlを加え10分間振り混ぜさらに10分間超音波処理を行った後，遠心分離し，上澄液を分取する．残留物は0.2N酢酸溶液20mlずつで2回同様に操作する．全上澄液を合わせ，クロロホルム30mlずつで2回洗い，洗液は捨てて水層に塩化ナトリウム6 gおよびアンモニア試液8 mlを加え，クロロホルム40mlずつで3回抽出する．全クロロホルム抽出液を合わせ，以下標準溶液と同様に操作し試料溶液とする．

3．**GC測定条件**　GCカラム：3％OV-101／Uniport HP（67～80mesh）を内径3㎜×長さ1.0mのガラスカラムに充てんして用いる．検出器：水素炎イオン化検出器，温度：カラム（C. T.）180°，注入口（I. T.）230°，感度：16×10^2，キャリヤーガス：$N_2$30ml／min.

実験結果および考察

Ⅰ．GC法の検討

1．**測定条件**　充てん剤は次の5種類について比較検討した．極性が低い方から記すと，ⅰ）5％ silicone GE SE 30／ChromosorbW（80～100 mesh）1.0m　ii）3％ silicone OV-101／Uniport HP（60～80mesh）1.0m　iii）3％silicone OV-17／Gaschrom Q（80～100mesh）1.0m　Ⅳ）5％ Silicone DC-QF 1＋0.1% PolyA 103／gaschrom Q（80～100 mesh）1.0m　Ⅴ）2％ Silicone OV-225／Chromosorb W（80～100 mesh）1.5m，いずれも内径3㎜，である．その結果，カラムⅰ）ii）については実験の部Ⅰ．GC法のとおりでシャープなピークが得られた．iii）はややブロードなピークであった．Ⅳ）Ⅴ）は誘導体化せずに直接分析するには不適当であり，N,O-bis（trimethylsilyl）acetamide（BSA）でtrimethylsilyl（TMS）化した試料を用いた場合に良好なクロ

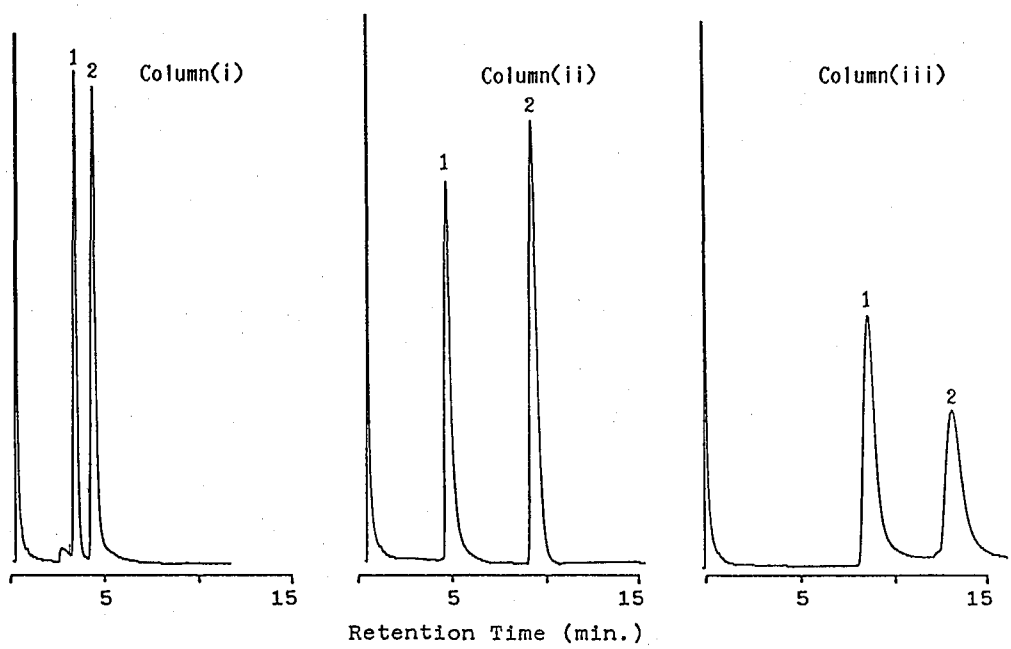


Fig. 1．Chromatograms of Standard Solution.
Peak 1：Scopolamine Hydrobromide　2: Dicyclohexyl Phthalate (I.S.)

マトグラムが得られることがわかった．固定相ⅰ）ⅱ）ⅲ）のクロマトグラムを Fig. 1 に示した．ⅰ）ⅱ）はいずれも満足な結果であったが，I.S. に対する分離度がⅰ）は2.5ⅱ）は3.3であったので本報ではⅱ）を用いて以下の検討を行った．

カラムの長さは1.0m と2.0m について実験したが，2.0m では著しく分離度が高くなることはなく，1.0m でも他の配合成分による妨害もなく良好なクロマトグラムが得られた．

温度については C. T. 150°−230°（I.T. は C.T. ＋50°とする）の範囲内でピーク高の安定性と I.S., 他の配合成分との分離度などを検討した．その結果 C. T. 180°, I.T. 230°のとき Scop. の保持時間（t_R）5.2min., I.S. の t_R. 9.1 min. となり分離も良くピーク高も一定であったのでこの条件とした．

2．検量線 Scop. の標準品を用いて0.25〜0.75mg／I. S. 1 m*l* の間で5段階の標準溶液系列から検量線を作製した．回帰式は Y＝2.2223X−0.0687（r＝0.9998）（X：濃度mg/m*l*, Y：Scop. のピーク面積／I.S. のピーク面積）でほぼ原点を通る良好な直線性を示した．再現精度も変動係数0.36％（n＝3）と良好な結果であった．

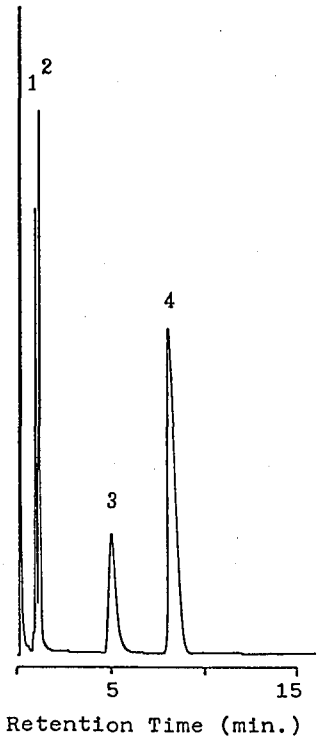


Fig. 2. Chromatogram of Pharmaceutical Preparation.
Peak 1：Caffein
2：Chlorpheniramine Maleate
3：Scopolamine Hydrobromide
4：Dicyclohexyl Phthalate (I.S.)

3．他成分の影響 鎮暈剤は混合製剤なので Scop. 以外の成分の影響を標準品を用いたモデル処方により検討した．S. Dh., V. B_6, Dm, E. Am については，前処理にクロロホルム洗浄やアンモニアアルカリ性によるクロロホルム抽出などにより除去できた．Scop. と殆ど同じ分配挙動を示す Te, Cf, Cp. のうち Cf, CP, は t_R がいずれも Scop. より早いため分析に影響はなかった．市販製剤により検討したクロマトグラムを Fig. 2 に示す．Te については t_R5.3min. となり，Scop. の t_R5.2min. と重なる為検討中である．

4．市販製剤の分析 鎮暈剤の剤型にはカプセル判，顆粒剤，丸剤，細粒剤，錠剤（素錠，糖衣錠）および内用液剤がある．本報では錠剤とカプセル剤について定量分析を行った．その結果は Table 1．に示すとおりである．同時配合成分はそれぞれ前報[2]で報告した方法で分析した．変動係数は0.06〜1.49％と良好な結果であった．

ま と め

鎮暈剤中の Scop. の分析を GC 法により検討した．5種類の固定相について実験したとき，無極性の3％ Silicone OV-101／Uniport HP（60〜80 mesh）内径3.0㎜，長さ1.0mのカラムを用いて良好な結果が得られた．又，5％ Silicone GE-SE 30／Chromosorb W（80〜100 mesh）内径3.0㎜，長さ1.0m のカラムを用いたときも殆ど同等の分析結果だった．本法は配合量の微量な Scop. についてアセチル化も TMS 化も行わず簡単な前操作で，迅速且つ精度よく定量分析ができた．この結果，一斉収去による行政検体の試験法として，じゅうぶん適用できるものと考える．

Table 1. Determination of Antiemetic Ingredients in Commercial Preparations.

Preparation	*Label(mg/Tab.,Cap)		**Found(%) (n=5)	C.V.(%)[a)]
A (Tablet)	Scop.	0.066	100.1	1.27
	Dm.	16.5	(98.3)	
	Cf.	10.0	(103.2)	
B (Tablet)	Scop.	0.12	94.9	1.05
	S.Dh.	15.0	(92.3)	
	Cf.	13.0	(104.0)	
C (Tablet)	Scop.	0.075	97.2	1.05
	Dm.	25.0	(100.8)	
	Cf.	20.0	(95.9)	
D (Tablet)	Scop.	0.05	97.9	1.49
	Cf.	10.0	(101.1)	
	$V.B_6$	5.0	(99.5)	
	Me.	12.5	(100.4)	
E (Capsule)	Scop.	0.2	99.5	0.06
	Cp.	30.0	(103.6)	
	E.Am.	50.0	(101.2)	
	Cf.	20.0	(100.9)	
	$V.B_6$	5.0	(104.5)	

*Scop.: Scopolamine Hydrobromide Dm.: Dimenhydrinate Cf.: Caffeine
S. Dh.: Diphenhydramine Salicylate Te.: Theophylline
V. B_6: Pyridoxine Hydrochloride Cp.: Chlorpheniramine Maleate
Me.: Meclizine Hydrochloride E. Am.: Ethyl Aminobenzoate
**The results in parentheses were obtained by the method described in the preceding paper[2)].
a)Coefficient of Variation.

文 献

1) 岩崎由美子，中山京子，高橋美佐子，秋山和幸：第21回全国衛生化学技術協議会年会，92，1984
2) 高橋美佐子，中山京子，上原真一，鎌田国広，萩原輝彦，秋山和幸：東京衛研年報，36，82-86，1985
3) 厚生省告示：第40号，昭和60年3月26日
4) 日本公定書協会：第十一改正 日本薬局方解説書，C-922，1986，広川書店
5) El-Masry,S., Khalil, S. A. H. : *J.Pharm. Sci.*, 62, 1332-1334, 1973
6) Laura, A. R. : *J.Pharm. Sci.*, 58, 1015-1018, 1969
7) Wyatt, D. K., Richardson, W. G., McEwan, B. : *J. Pharm. Sci.*, 65, 680-684, 1976
8) Pennington, L. J., Schmidt, W. F. : *J. Pharm. Sci.*, 71, 951-953, 1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 93-100, 1987

HMPAによるジメチルアミノ化とリン酸エステル誘導体の生成

高橋 利恵子*, 瀬戸 博**, 塩川 恵美子***, 秋山 和幸*

Dimethylamination and Formation of Phosphate Derivatives with Hexamethylphosphoric Triamide

RIEKO TAKAHASHI*, HIROSHI SETO**,
EMIKO SHIOKAWA*** and KAZUYUKI AKIYAMA*

Dimethylamination and formation of phosphate derivatives were observed when some aromatic compounds were heated in hexamethylphosphoric triamide (HMPA).

Alkylphenols gave bis(dimethylamino)phosphate, diphenoxyphosphate, triphenoxyphosphate and tris-(dimethylamino)pyrophosphate.

Nitrophenols and *p*-cyanophenol, having electron-withdrawing groups, gave the corresponding *N,N*-dimethylanilines. The reaction rates were in the following order ; trinitro- > dinitro- > mononitrophenol.

Anilines and thiophenols gave bis(dimethylamino)phosphate, diphenoxyphosphate and tris-(dimethylamino)pyrophosphate and the introduction of nitro groups suppressed the reaction.

The phosphorylation appeared to proceed by the S_N2 (P) mechanism, namely, the nucleophilic attack on P atom.

In the case of nitrophenols, it was assumed that the protonation of HMPA occurred due to the acidity of nitrophenols.

Keywords：HMPA, dimethylamination, phosphate ester, nucleophilic substitution

緒　言

ヘキサメチルリン酸トリアミド（以下HMPAと略す）は極性非プロトン溶媒として，S_N2，E2，S_{RN}反応等に広く使われている[1]，その構造的特徴，物性については次の通りである[2]．HMPAには，≡P＝O (*p-d*) π系が存在しており，この2原子π系に電子供与性のグループ $N(CH_3)_2$が結合している．また構成要素である $(CH_3)_2N-P=O$についてのHückel計算による電荷分布は，Fig. 1のように，塩基性あるいは求核性が，酸素原子に集中していることを示しており，HMPAがカチオンだけを強く溶媒和し，一方アニオンは，ほとんど裸のままで存在しているため，アニオンの反応性が高くなることとよく対応している．また，HMPAは化学的にも非常に安定であり，特に塩基，求核試薬に対して安定である．

先にわれわれは，Fig. 2のようにポリクロロジフェニルエーテル（3）を得る目的で，トリクロロフェノール（1）とテトラクロロベンゼン（2）をHMPA中水素化ナトリウムの存在下で反応を試みたところ，目的のエーテル（3）の他に，ビス（ジメチルアミノ）ホスフェート（4），ポリクロロビフェニル（5），およびテトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン（6）が得られた．これは，活性化されていない芳香族塩素の置換が，HMPA中でもかなり困難であり，フェノレートの二分子間縮合および溶媒によるリン酸化をうけたものと解釈される．そこで，このようにHMPAが反応試薬として

*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
**同環境保健部環境衛生研究科
***北里大学衛生学部化学科

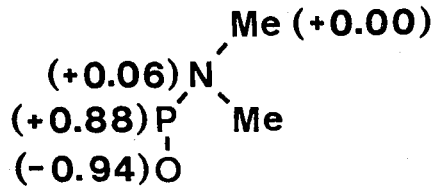


Fig. 1. Calculated Charge fo HMPA

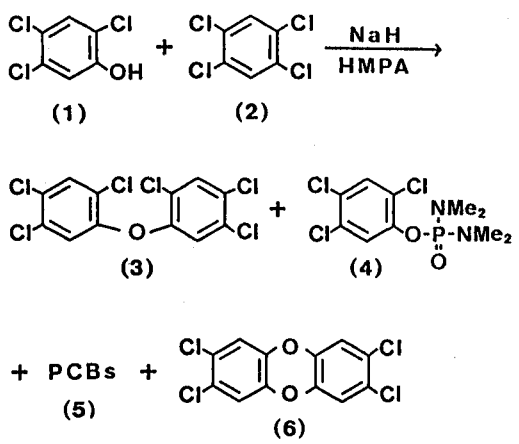


Fig. 2. Synthesis of Polychlorinated Diphenyl Ether

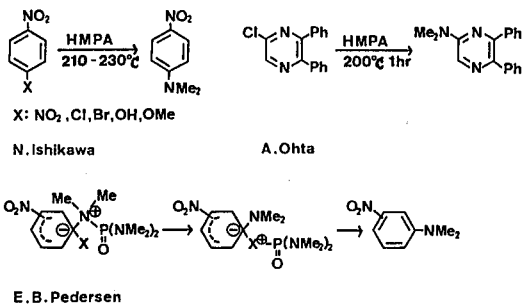


Fig. 3. Dimethylamination with HMPA

関与する反応における，芳香族の基質について，脱離基，置換基等の検討を試みた．

HMPA よるジメチルアミノ化の例を Fig. 3 に示す．石川ら[3]はクロロニトロベンゼン類からニトロジメチルアニリンが得られることを，Ohta ら[4]はピラジンやイソキノリンなど窒素異項環の塩素がジメチルアミノ基で置換されることを報告している．更に Pedersen ら[5]はこの反応が Meisenheimer complex を経由して，ビス（ジメチルアミノ）ホスフェートに転移し，最終的には加熱により，ジメチルアニリン誘導体を生成する機構を示唆している．ジメチルアミノ化に対する別の説明として，HMPA 中に混在するか，もしくは加熱等によって生成するジメチルアミンが反応する可能性も考えられる，そこで，以下の基質について行った反応の生成物を精査した．

実験の部

1 試薬

溶媒は，HMPA（半井薬品）をモレキュラーシーブ 5 A で乾燥し，使用した．

基質は，フェノール，*p*-メチルフェノール，*p*-エチルフェノール，*p-iso*-プロピルフェノール，*p-tert*-ブチルフェノール，*p*-メトキシフェノール，*p*-シアノフェノール，*p*（及び *m*，*o*）-ニトロフェノール，2，4-ジニトロフェノール，2，6-ジニトロフェノール，2，4，6-トリニトロフェノール，チオフェノール，*p*-トルエンチオール，*p*-ニトロベンゼンチオール，アニリン，*p*-ニトロアニリン，2，4-ジニトロアニリンで，東京化成の特級，またはそれに準ずるものを使用した．

2 装置と測定条件

FID-GC：島津製作所製 GC-5 A 型；カラム，2 % Silicone OV-17 Gaschrom Q 80／100 mesh 3 mmø× 2 m；カラム温度，150～260℃，6 ℃／min；キャリヤーガス，N_2 50m*l*／min

GC-MS：島津製作所製 LKB-9000型；カラム，2 % Silicone OV-17 Gaschrom Q 80／100mesh 3 mmø× 2 m（または 1 m）；カラム温度，150～240℃，6 ℃／min；キャリヤーガス，He 30m*l*／min；イオン化電圧，70 eV

3 反応と生成物の定性定量

基質の0.5 M溶液100m*l*（基質が少量の場合は50m*l*）を攪拌しながら，油浴195℃（または126℃または57℃）で加熱する．加熱開始後，15，30，45，60，90，120，180，240，300，360min に0.5m*l* をサンプリングする．サンプリング液1 μl を，そのまま GC で定量し，各ピークの成分をGC-MSで確認する．

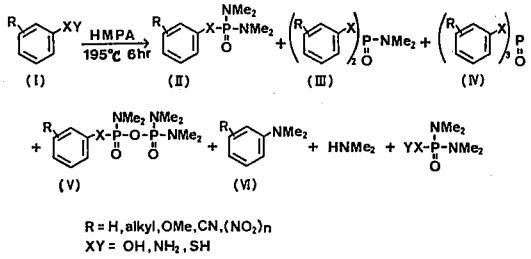


Fig. 4. Reaction of Substrate with HMPA

Table 1. Product Distribution from Reaction of Substrate with HMPA for 6 hr

Substrate	React. temp. (℃)	Substrate (%)#	$-\overset{NMe_2}{\underset{O}{\overset{\|}{P}}}-NMe_2$ (%)	$-\overset{NMe_2}{\underset{O}{\overset{\|}{P}}}-$ (%)	$-\overset{\|}{\underset{O}{P}}-$ (%)	$-\overset{NMe_2}{\underset{O}{\overset{\|}{P}}}-O-\overset{NMe_2}{\underset{O}{\overset{\|}{P}}}-NMe_2$ (%)	$-NMe_2$ (%)
phenol	195	92.7	1.0	0.4	1.5	4.4	0.0
p-cresol	195	76.5	8.6	0.2	0.9	12.2	0.0
p-ethylphenol	195	91.0	3.9	0.9	0.0	4.2	0.0
p-iso-propylphenol	195	95.0	2.4	0.7	0.0	1.4	0.0
p-tert-butylphenol	195	87.8	5.7	2.0	0.0	3.8	0.0
p-methoxyphenol	195	95.0	3.9	0.7	0.0	0.2	0.0
aniline	195	77.3	22.1	0.0	0.0	0.4	0.0
p-nitroaniline	195	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2,4-dinitroaniline	195	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
thiophenol	195	HMPA= 100.0 *	6.2	0.2	0.0	0.2	0.0
p-toluenethiol	195	HMPA= 100.0 *	10.6	0.3	0.0	0.2	0.0
p-nitrobenzenethiol	195	HMPA= 100.0 *	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
p-nitrophenol	195	6.7	2.5	0.0	0.0	0.0	90.8
	126	98.3	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0
m-nitrophenol	126	99.7	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
o-nitrophenol	126	99.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0
2,4-dinitrophenol	195	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
	126	28.6	2.1	0.0	0.0	0.0	69.3
	57	82.6	17.4	0.0	0.0	0.0	0.0
2,6-dinitrophenol	195	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
	126	68.7	30.6	0.0	0.0	0.0	0.2
	57	95.0	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2,4,6-trinitrophenol	126	14.8	0.0	0.0	0.0	0.0	60.0
	57	12.9	0.0	0.0	0.0	0.0	60.6
p-cyanophenol	195	28.7	40.1	0.0	0.0	14.2	14.8

; Calculated from the peak areas in the GC spectra.
* ; Based on HMPA as substrate was converted into dimer.

結　果

反応生成物の解析から，この反応はFig. 4のように表すことができる．各基質をグループ別に分類した結果を下記に示す．また，各項に記載した生成物は，特に記したものの他は単離は行わず，構造の確認はGC－MSのデータによる．6時間反応後の生成物の分布をTable 1に示す．

1　*p*-アルキルフェノール類

反応はあまり進んでいない．これらの基質の中で，最も反応が進んでいる*p*-クレゾールの反応の時間的推移をFig. 5に，ガスクロマトグラムをFig. 6に示す．

生成物はエステル体が主で，モノ，ジエステル体およびピロリン酸エステル体である．6時間後の反応率では*p*-CH_3 > *p*-*t*-C_4H_9 > *p*-C_2H_5 > H > *p*-*i*-C_3H_7 ～ *p*-CH_3O の順となっており，*p*-CH_3O もアルキルと同様である．クレゾールの場合は更に反応が進み，トリエステル（トリクレジルホスフェート）が生成する．これらの基質では，ジメチルアニリン体は生成しない．

2　アニリン類

アニリンではモノエステル体と極少量のピロリン酸エステル体を生成するが，ニトロ基を導入すると全く反応は進まない．アニリンの反応の時間的推移をFig. 7に，ガスクロマトグラムをFig. 8に示す．

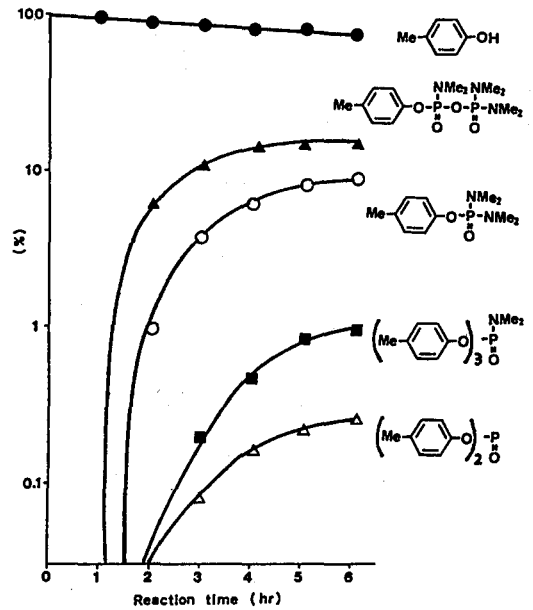


Fig. 5. Progress of Reaction of *p*-Cresol with HMPA

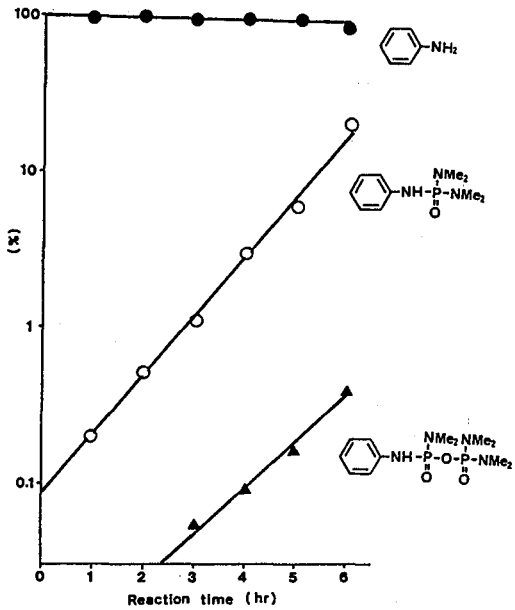


Fig. 7. Progress of Reaction of Aniline with HMPA

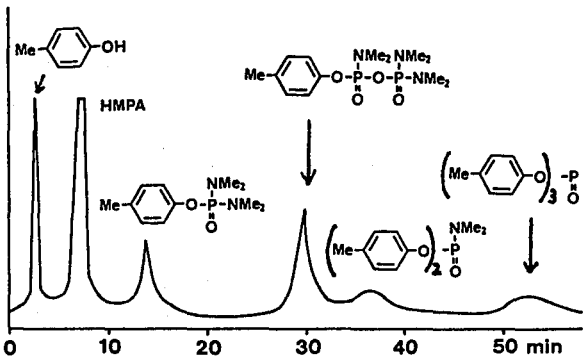


Fig. 6. Gas Chromatogram of Reaction Products of *p*-Cresol with HMPA

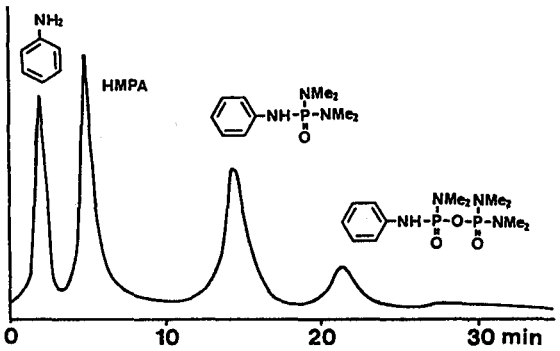


Fig. 8. Gas Chromatogram of Reaction Products of Aniline with HMPA

3 チオフェノール類

チオフェノール類の基質は，反応中にダイマーに変化したため，Table 1 の生成物の割合は HMPA を100とした時の％で示す．チオフェノールと *p*-トルエンチオールはモノ，ジエステル体とピロリン酸エステル体を生成する．反応性は *p*-トルエンチオールの方が高い．*p*-ニトロベンゼンチオールの場合は反応液中にダイマー以外のピークは検出されず，HMPA との反応性は低い．また，アルキルフェノール類，アニリン類と同様にジメチルアニリン体は生成しない．チオフェノールの反応の時間的推移を Fig. 9 に，ガスクロマトグラムを Fig.10に示す．

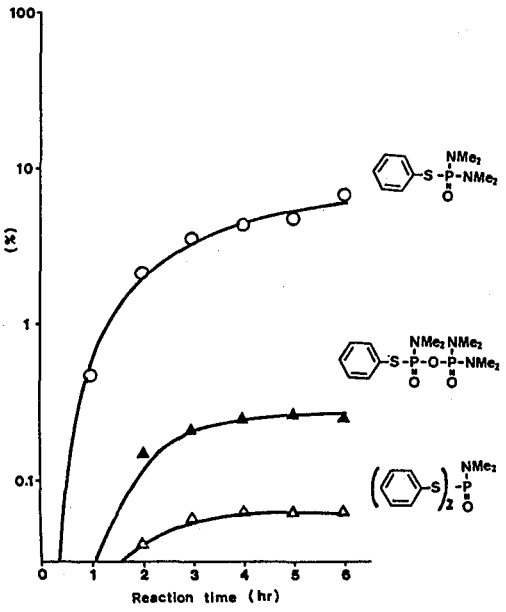


Fig. 9 . Progress of Reaction of Thiophenol with HMPA

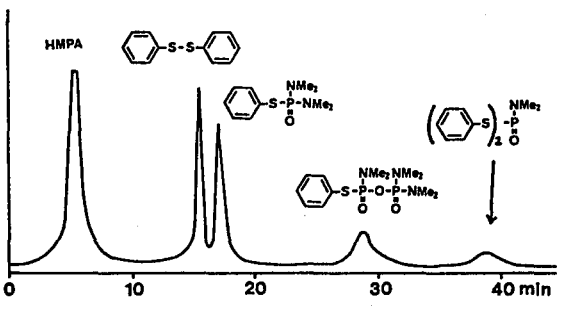


Fig.10. Gas Chromtogram of Reaction Products of Thiophenol with HMPA

4 ニトロフェノール類

ニトロフェノール類は他の基質に比べ反応が速いために加熱温度は195℃の他，126℃と57℃で反応を行った．57℃加熱の前後で反応は進んでいないが，126℃になるとエステル体とジメチルアニリン体を生成する．2，4，6-トリニトロフェノールについてみると，6時間後はアニリン体のみであり，2，6-ジニトロフェノールではエステル体の割合が多くなる．モノニトロフェノールでは少量のエステル体が得られただけである．195℃では更に反応が進み，アニリン体が圧倒的となる．

反応性は2，4，6-トリニトロ＞2，4-ジニトロ＞2，6-ジニトロ＞*p*-ニトロ＞*m*-ニトロ～*o*-ニトロの順で

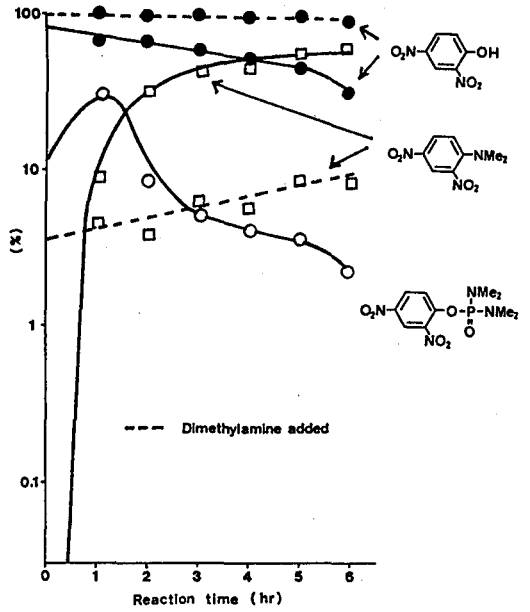


Fig.11. Progress of Reaction of 2,4-Dinitrophenol with HMPA

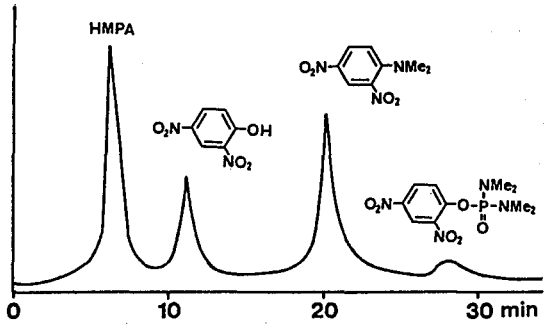


Fig.12. Gas Chromatogram of Reaction Products of 2,4-Dinitrophenol with HMPA

減少する．

代表的な基質として2，4-ジニトロフェノールの126℃での反応の時間的推移をFig.11に，ガスクロマトグラムをFig.12に示す．反応の時間的推移では，初期にエステル体生成のピークがあり，アニリン体の増加とともに徐々に減少している．このアニリン体生成については，反応系から生じるジメチルアミンが直接寄与する可能性もある．そのため，Fig.11に点線で示した通り，ジメチルアミンを反応液中に通気，添加して反応を行った．結果は，わずかのアニリン体を生成したが，ジメチルアミンを添加しない場合と比べ，はるかに少ない．従って，反応中に生成するジメチルアミンがアニリン体を形成するという可能性は極めて少ない．2，4-ジニトロフェノールと*p*-ニトロフェノールの反応生成物の確認はGC-MS以外に下記のように処理し，それぞれ，2，4-ジニトロ-*N*, *N*-ジメチルアニリン（a）と*p*-ニトロ-*N*, *N*-ジメチルアニリン（b）を分離し，確認した．

4－1　2，4-ジニトロフェノールの反応生成物

0.5M反応液（原料4.08g）を水溶液にし，エーテル抽出する．得られた粗結晶（5.50g）をエタノールから再結晶（3.38g）し，（a），mp 76～77℃を得た．これと2，4-ジニトロクロロベンゼン反応液を同様に処理して得た標品で混融試験を行い，融点降下は認められなかった．

4－2　*p*-ニトロフェノールの反応生成物

0.5M反応液（原料6.95 g）を上記と同様に処理してエタノールから再結晶（4.09 g）し，（b）は，mp170～171℃であった．（ref. 165℃[5]）

5　*p*-シアノフェノール

p-シアノフェノールはモノエステル体，ピロリン酸エステル体とアニリン体を生成する．ほとんどアニリン体のみ生成するニトロフェノール類とエステル体のみ生成するアルキルフェノール類との中間的傾向にある．*p*-シアノフェノールの反応の時間的推移をFig.13に，ガスクロマトグラムをFig.14に示す．

6　まとめ

p-アルキルフェノール類，*p*-メトキシフェノールは反応性が低く，リン酸エステル体を生成する．しかし，ニトロ基が導入されると反応性は非常に高まり，エステル体よりもアニリン体を形成する傾向がある．

チオフェノール類，アニリン類は*p*-アルキルフェノール類と同様にリン酸エステル体を生成するが，いずれも，ニトロ基が導入されると反応が進行しなくなり，ニトロフェノール類と対照的である．

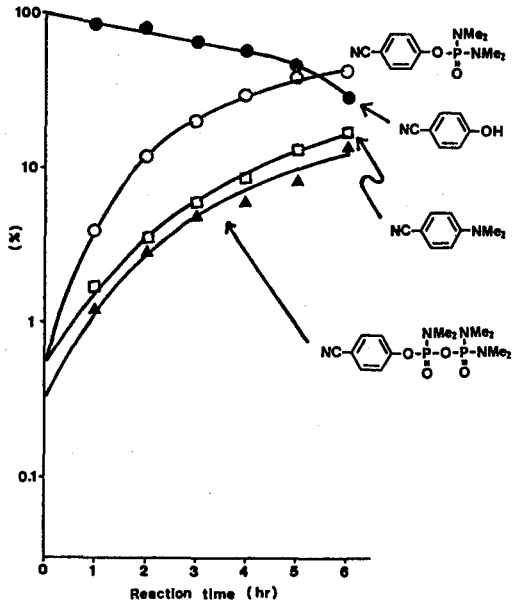


Fig.13. Progress of Reaction of *p*-Cyanophenol with HMPA

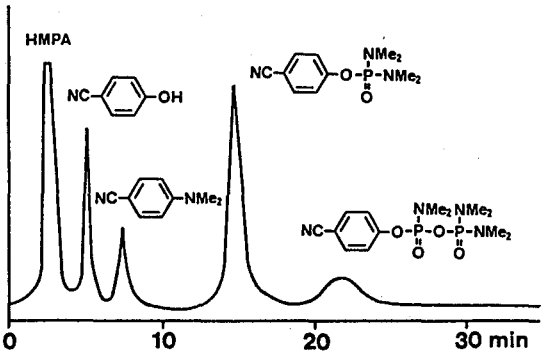


Fig.14. Gas Chromatogram of Reaction Products of *p*-Cyanophenol with HMPA

考　察

Fig. 4のように，フェノール類とHMPAによる反応では，ビス（ジメチルアミノ）ホスフェート（Ⅱ），ジフェノキシホスフェート（Ⅲ），トリフェノキシホスフェート（Ⅳ），トリス（ジメチルアミノ）ピロホスフェート（Ⅴ）およびジメチルアニリン体（Ⅵ）の各種の化合物を生成する．特に（Ⅴ）が生成することは，本研究で初めて明かとなった．またアニリン類，チオフェノール類についても（Ⅱ），（Ⅲ），（Ⅴ）のタイプの化合物を生成することが認められた．

これらの反応を生成物の分布から，リン酸エステル体（Ⅱ）～（Ⅴ）の生成とジメチルアニリン体（Ⅵ）の生

成の二点に分けて考えてみる．

各基質について，リン酸エステル体の生成は普遍的であり，ニトロフェノール類や *p*-シアノフェノールのように置換基が電子吸引性の場合には更にジメチルアニリン体が生成する．

リン酸エステル体生成の反応速度をまとめると

(1) R-C_6H_4-OH ; R =$(NO_2)_n$, CN の場合

2，4，6-$(NO_2)_3$ > 2，4-$(NO_2)_2$ > 2，6-$(NO_2)_2$ > *p*-NO_2 > *m*-NO_2 ～ *o*-NO_2 > *p*-CN >> H

(2) R-C_6H_4-OH; R =アルキルの場合

p-CH_3 > *p*-*t*-C_4H_9 > *p*-C_2H_5 > H > *p*-*i*-C_3H_7 ～ *p*-CH_3O

(3) R-C_6H_4-NH_2 ; R =H, $(NO_2)_n$ の場合

H > *p*-NO_2 ～ 2，4-$(NO_2)_2$

(4) R-C_6H_4-XY; R = H, XY = NH_2, OH の場合

NH_2 > OH

ニトロフェノール類の場合，置換基の電子吸引性が大きい程反応は速い．しかしアルキルフェノール類においても，ニトロフェノール類に比べ，はるかに反応性は低いが，*p*-CH_3 > *p*-*t*-C_4H_9 > *p*-C_2H_5 > H > *p*-*i*-C_3H_7 ～ *p*-CH_3O でエステル体を生成し，エステル化は電子供与性の場合にもある程度促進される．

炭素に結合したジメチルアミノ基は非常に脱離しがたいとされているが[6]，HMPA のリンに結合した場合は，結果的に一個のジメチルアミノ基が脱離基となるものと思われる．

また通常のリン酸エステル化剤（ホスフォリルハライド，芳香族エステル，および無水物）の反応では，正電荷の局在するリン原子に対する求核試薬の攻撃ー逆に言えば，求核試薬（R-NH_2, R-OH 等）に対するリンの親電子的置換ーであり，S_N2 (P) 機構が一般的であるが，S_N1 (P) 機構もあり得るとされている[7]．更に HMPA の場合にも，おそらく S_N2 (P) 機構であろうと推定される．その機構を Fig.15に示す．

次にリン酸エステル化反応を，ベンゾイル化反応と類以の反応として考えてみる．置換アニリンのベンゾイル化は，ハメット則（$\rho = -2.694$, ベンゼン中25℃）[8]が成立し，アニリンに電子吸引性置換基を導入すると反応は抑制されることが報告されている．これから類推すると，置換アニリンのリン酸エステル化はトリニトロアニリンが最も反応しにくく，アニリンが最も反応し易いことになる．実験ではアニリンにニトロ基が導入され，アミノ窒素の電子密度が低くなり，求核性，塩基性が低下するに従って反応は進まなくなり，予想と一致した．このことはアルキルフェノールの場合にも同様に考えることができる．しかし，上記のようにニトロフェノールの場合は傾向が逆になる．これについては，HMPA などのホスフォルアミド類が，酸性で速やかに加水分解されるという事実[9]から考えて，基質の酸強度が，かなり高いことと関係があると思われる．2，4，6-トリニトロフェノール，2，6-ジニトロフェノール，2，4-ジニトロフェノール，*p*-ニトロフェノールの pKa はそれぞれ，0.708, 3.706, 4.110, 7.149である[10]．つまりニトロフェノールでは，プロトンが付加した化学種 $(Me_2N)_3P^+OH$ が反応に関与していると考える．更に $-NR_2$ よりも $-N^+R_3$ の方が脱離基として離れやすい事実[11]が，プロトン化機構を考える推論の一つの根拠になると思われる．以上のことを Fig.16に示す．

ジメチルアミノ化についてみると，ジメチルアミンを添加して行った実験で，ほとんど反応が進まなかったことから，混在するか，もしくは反応中に生じるジメチルアミンが反応に関与する可能性は否定された．そこでジメチルアミノ化の置換基効果をみると，ニトロフェノールのリン酸エステル化と同じ傾向が認められる．（2，4

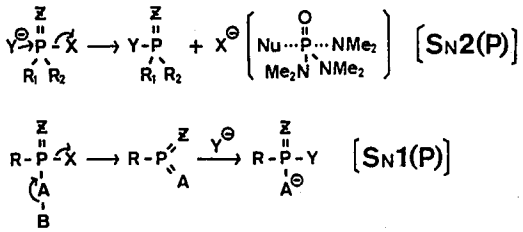


Fig.15. Mechanism of Phosphorylation

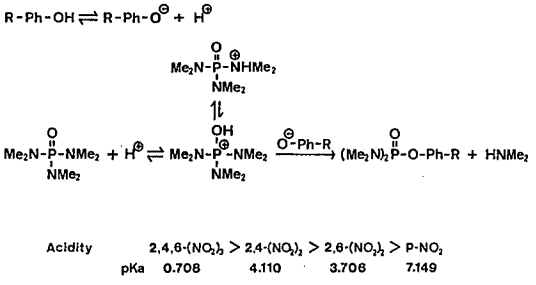


Fig.16. Protonation Mechanism of Nitrophenol

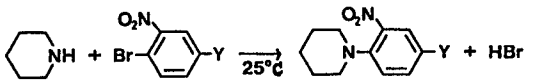


Fig.17. Reaction of Substituted 2-Nitrobromobenzene with Piperidine

, 6 -$(NO_2)_3$-C_6H_2OH > 2 , 4 -$(NO_2)_2$-C_6H_3OH > 2 , 6 -$(NO_2)_2$-C_6H_3OH > *p*- NO_2-C_6H_4OH > C_6H_5OH) 更にこの傾向は，Fig.17に示すように，ピペリジンと2-ニトロ-4-置換ブロムベンゼンの反応の置換基効果[12]とも一致することが認められた.

（本研究の概要は日本薬学会第21回関東支部大会1977年10月で発表した.）

文　献

1）田中秀興，大饗　茂：化学増刊，52，131-156，1972，化学同人

2）吉田善一，米田茂夫：化学増刊，52，3-10，1972，化学同人

3）石川延男，黒田勝彦：日化，88，1010-1011，1967

4）Ohta, A., Takahashi, N., Ohwada,T., Matsunaga, M. and Akita, Y. : *Chem. Pharm. Bull.* **26**, 1322-1325, 1978

5）Pedersen, E. B., Perregard, J., Lawesson, S. O. : *Tetrahedron*, **29**, 4211-4213, 1973

6）Gould, E. S. : *Mechanism and Structure in Organic Chemistry*, 261, 1960, Henry Hott and Company, Inc.

7）Hudson, R. F. : *Structure and Mechanism in Organophosphorous Chemistry*, 250-253, 1965, Academic Press

8）化学便覧：基礎編Ⅱ，日本化学会編，859，1966

9）篠田耕三：合成と溶解のための溶媒，224，1969，丸善

10）化学便覧：基礎編Ⅱ，日本化学会編，1056-1057，1966

11）Hudson, R. F. : *Structure and Mechanism in Organophosphorous Chemistry*, 261,1965, Academic Press

12）小方芳郎：理論有機反応，198，1970，南江堂

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 101-108, 1987

高速液体クロマトグラフ法による香粧品中の塩化ベンザルコニウムおよび塩化ベンゼトニウムの分離定量法

池田一夫*, 雨宮敬*, 伊藤弘一*, 観照雄*, 中村弘*, 渡辺四男也*

Determination of Benzalkonium Chloride and Benzethonium Chloride in Cosmetics by High-Performance Liquid Chromatography

KAZUO IKEDA*, TAKASHI AMEMIYA*, KOICHI ITO*, TERUO KAN*, HIROSHI NAKAMURA* and YOHYA WATANABE*

A simple method for the determination of benzalkonium chloride (*BzAC*) and benzethonium chloride (*BzEC*) in cosmetics by high-performance liquid chromatography is described. EtOH (20m*l*) and 2-PrOH (1 m*l*) were added to the sample (0.1-1.0g) and the solution was evaporated to dryness under reduced pressure at 40℃. $CHCl_3$ (5m*l*) was added to the residue and the solution was passed through SEP-PAK Silica cartridge. After washing the cartridge with acetone (20m*l*), the *BzAC* and *BzEC* were eluted with 5% H_3PO_4 in MeOH (5m*l*). The eluate was made up to 5m*l* with MeOH and injected on the ULTRON CN column by using a mixture of MeOH-H_2O-85%H_3PO_4 (60 : 40 : 0.2) as a mobile phase. The effluent was monitored with a UV detector at a wavelength of 215nm.

The standard concentration curves for *BzAC* and *BzEC* were linear in the range of 1-400 μg/m*l*. Recoveries of *BzAC* (C_{12}, C_{14}, C_{16}) and *BzEC* were 96-105% (CV = 0.6-11%, n = 3) and 100% (CV = 0.5%, n=3), respectively. The concentration of *BzAC* or *BzEC* in cosmetice were 0.005-0.225%

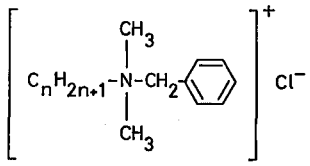
Keywords: benzalkonium chloride, benzethonium chloride, cosmetics, SEP-PAK Silica, disinfectant, high-performance liquid chromatography (HPLC)

緒　言

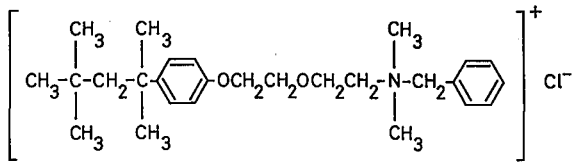
薬事法により容器等に表示することが義務づけられている塩化ベンザルコニウム (BzAC) および塩化ベンゼトニウム (BzEC) (Fig. 1) は，殺菌，防臭を目的として，シャンプー，リンス，制汗剤などの化粧品に配合されている．この成分の分析法として，分光光度法[1-4]，滴定法[5]，ガスクロマトグラフ法 (GC)[6-10]，高速液体クロマトグラフ法 (HPLC)[10-16]，レーザー質量分光光度法[17]，化学イオン化質量分光光度法[18]など数多くの報告がある．これらの報告のほとんどは単品もしくは医薬品の分析法であり，文献16のみが化粧品の分析法である．化粧品には種々の剤型があり配合成分も多様なため，目薬のように単純な組成の医薬品や標準品の分析法をそのまま適用することはできない．化粧品を分析するためには，多くの場合，これら妨害物質を除くための前処理が必要である．文献16はその前処理法としてクロロホルムによる溶媒抽出法を行っている．しかし，多量の界面活性剤を含むシャンプーなどの化粧品にこの方法を適用した場合，エマルジョンが形成され抽出が困難な場合が想起される．

BzACは，窒素原子に結合した長鎖アルキル基の炭素数が8から18より成る化合物の混合物であり，その主成分は炭素数12, 14, 16のものである．これらの化合物のうちで殺菌力の一番強いものはC_{14}であり，C_{16}, C_{12}が

*東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Sinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan



Benzalkonium chloride (n=12-16)



Benzethonium chloride

Fig. 1.

それに続くとされている[19]．化粧品原料基準では，BzAC の確認試験を分光光度法で，定量を滴定法により行っている（この際，BzAC は C_{12} と C_{14} の一対一混合物であると仮定して計算を行う）．化粧品原料基準の定量法では，これらの組成を正確に測定することはできず，殺菌性の面から問題を提起している．BzAC の組成分析を HPLC で行う場合，BzAC と同様な第四アンモニウム塩である BzEC も同時に分析することが可能である．

今回，著者らは，省資源，省力化の面から有利な SEP-PAK シリカを用いる化粧品の前処理法を開発した．さらに，HPLC の測定条件を詳細に検討することにより，BzAC の組成分析，定量分析および BzEC の定量分析も可能な測定条件を設定し，市販化粧品に適用できる分離定量法を確立したので報告する．

実験の部

1．試薬　塩化ドデシルベンジルジメチル第四アンモニウム（C_{12}）（花王株式会社製，純度97.6%），塩化テトラデシルベンジルジメチル第四アンモニウム（C_{14}）（東京化成工業製，純度95%以上），塩化ヘキサデシルベンジルジメチル第四アンモニウム（C_{16}）（東京化成工業製，純度95%以上），塩化ベンゼトニウム（BzEC）（東京化成工業製，純度96%以上），SEP-PAK シリカカートリッジ（Waters 社製），シリカゲル60 F_{254} プレート（Merck 社製），その他の試薬はすべて特級または液体クロマトグラフ用を使用した．

C_{12} 標準溶液：C_{12} を約100mg 精秤し，エタノールに溶解し正確に100m*l* とし標準溶液とした．

C_{14}，C_{16}，BzEC 各標準溶液も同様にして調製した．

2．装置　高速液体クロマトグラフ：日立製作所製665 A-12型，波長可変 UV モニタ：日立製作所製665 A-21型，データ処理装置：日立製作所製833 A 型．

3．試料　昭和60，61年に都内で購入した化粧品27検体を試料とした．

4．試験溶液の調整　試料0.1-1.0g（BzAC・BzEC として約0.25mg）を正確に秤量し，100m*l* の丸底フラスコに移し，エタノール20m*l* および2－プロパノール1 m*l* を加え，ロータリーエバポレータを用い40℃で蒸発乾固する．これをクロロホルム5m*l* に溶解し，SEP-PAK シリカに流下し，BzAC・BzEC を吸着させる．アセトン20m*l* で SEP－PAK シリカを洗浄する．ついで，5%リン酸メタノール溶液5 m*l* で SEP-PAK シリカから BzAC・BzEC を溶出する（流速はすべて1 m*l*／min）．メタノールで全量を5.0m*l* とし，これを HPLC 用試験溶液とする．

5．HPLC による定性・定量　C_{12}，C_{14}，C_{16} 混合標準溶液または BzEC 標準溶液（25，50，75，100mg／*l*）および試験溶液をそれぞれ5 μl 注入し，下記の条件により HPLC に供する．両者から得られた保持時間およびピーク高さ（またはピーク面積）により定性・定量を行う．なお，BzAC の定量値は C_{12}，C_{14}，C_{16} の合計とする．

HPLC 測定条件　カラム：ULTRON CN（7 μm，4.6mm i.d. × 25cm，クロマトパッキングスセンター，信和化工株式会社），移動相：メタノール－水－85%リン酸（60：40：0.2），流速：1.5m*l*／min，測定温度：室温，測定波長：UV 215nm，検出感度：0.04 a. u. f. s.

実験結果および考察

1．HPLC測定条件の検討

HPLC による BzAC・BzEC の分析法は分離に使用するカラムにより3種に分類することができる．すなわち，スチレン・ジビニルベンゼン共重合体よりなるポーラスポリマー充塡剤を使用する方法[11]，シリカゲルにオクタデシル（C_{18}）基を化学結合させた充塡剤を使用する方法[13]，シリカゲルにシアノプロピル（CN）基を化学結合させた充塡剤を使用する方法[10,12,14-15]の3種である．スチレン・ジビルベンゼン共重合体充塡剤で分析する場合は，0.5M過塩素酸酸性メタノールという非常に酸性度の強い移動相を使用するが，この高濃度の酸は HPLC 測定装置系に悪影響も及ぼす可能性が推察される．オクタデシル（C_{18}）基を化学結合させた充塡剤で分析する場合は，移動相に多量の無機塩類を添加する必要がある．また，CN 系のカラムで分析する場合は，解離している BzAC・BzEC とイオン対を形成する化合物を添加する必要がある．Mayer[12]は酢酸ナトリウムと酢酸

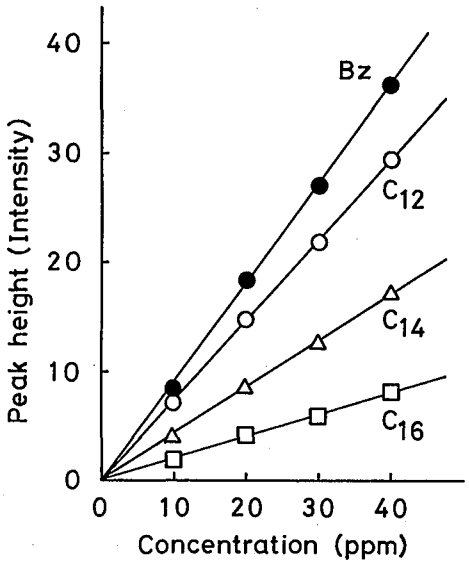


Fig. 2. Standard Concentration Curve for Benzalkonium Chloride and Benzethonium Chloride
Benzalkonium Chloride (○ : C_{12}, △ : C_{14}, □ : C_{16})
Benzethonium Chloride (● : Bz)

を，Abidi[10]は過塩素酸，1－ペンタンスルホン酸ナトリウムおよびリン酸2ナトリウムを，Marsh ら[14]はプロピオン酸ナトリウムを，佐藤ら[15]は1－ペンタンスルホン酸の酢酸溶液を添加して分析を行っている．

著者らは，単純な移動相組成で分析を行うことができるシアノプロピル（CN）基を化学結合させた充填剤を使用する分析法を検討した．CN 系のカラムとして，ULTRON CN, Nucleosil CN（10 μm,4.0mm×25cm），μ BONDASPHERE 5 μ CN-100A（3.9mm×15cm）を検討した結果，カラムとして ULTRON CN を，移動相溶媒としてメタノール－水－85％リン酸（60：40：0.2）を用い，分析を行ったところ約15分で BzAC の分析を，約10分で BzEC の分析を行うことができた．また，μ BONDASPHERE 5 μ CN-100 A でもほとんど類以の結果を得ることができた．

そこで，1－400 μg／ ml の BzAC および BzEC 標準系列（n=4）を作成し，HPLC 測定条件に従い，検量線を作成したところ，原点を通る直線関係が成り立つことが認められた（Fig. 2）．

2．試料の SEP-PAK シリカ処理の検討

試料の前処理としては，最も一般的な有機溶媒抽出法が考えられる．しかし，有機溶媒抽出法は，化粧品の種類によってはエマジョンを形成しやすく操作が煩雑であり ルーチン分析として使用するには困難が伴うことが多い．Marsh ら[14]は BzAC とメチルオレンジより成る錯体が1，2－ジクロロエタンに抽出されるということを利用し，医薬品中の BzAC の定量分析を行っている．この方法を実際の化粧品分析に応用してみたところ，エマルジョンが形成され抽出の困難な検体が存在した．また，文献16ではエマルジョンの形成を抑制するために塩化ナトリウムを添加し，クロロホルムで BzAC を抽出している．この方法は試料 5 g に対して塩化ナトリウムを50g 添加し，クロロホルムで 3 回抽出するという非常に煩雑な方法である．そこで，多様な種類の試料の前処理に利用されている SEP-PAK シリカを試料の前処理に利用することを検討した．

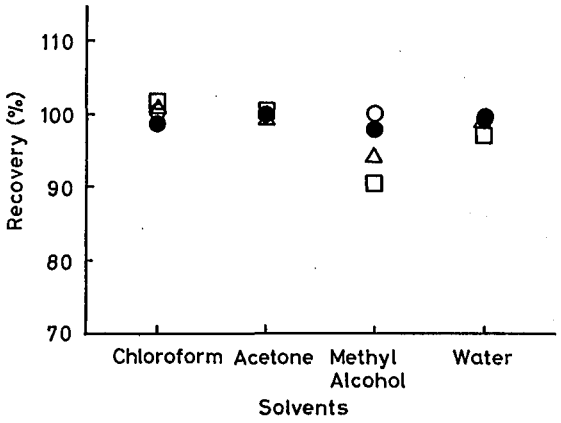


Fig. 3. Influence of Solvent on Adsorption of Benzalkonium Chloride and Benzethonium Chloride on SEP-PAK Silica Cartridge
(Symbols are the same as in Fig. 2.)

2．1 BzAC・BzEC 吸着溶媒の検討

化粧品を SEP-PAK シリカで前処理する場合，最初に BzAC・BzEC を SEP-PAK に吸着させる必要がある．そこで，BzAC・BzEC を吸着させるために最適な溶媒を検討した．BzAC・BzEC は，クロロホルム，アセトン，メタノール，水にかなり良く溶けることが知られている．そこで，この 4 種類の溶媒による BzAC・BzEC の SEP-PAK シリカ上の吸着率について検討した（Fig. 3）．メタノールを除き他の 3 種類の溶媒では BzAC・BzEC がほぼ100％保持された．以上の結果より，極性の低いクロロホルムを BzAC・BzEC 吸着溶媒とした．

2．2 BzAC・BzEC 洗浄溶媒の検討

次ぎに，SEP-PAK に吸着している夾雑物を除去するための洗浄溶液の検討をした．

BzAC・BzEC を定量する場合，妨害となる物質とし

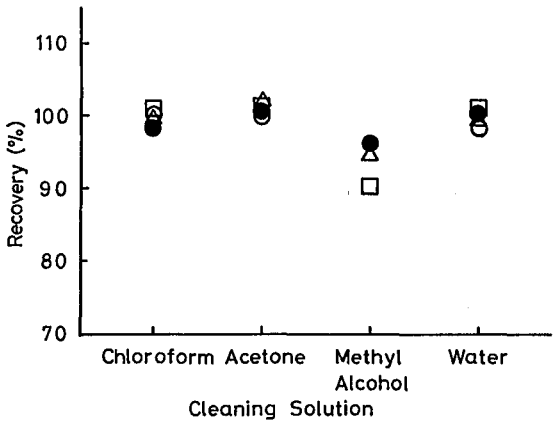


Fig. 4. Influence of Cleaning Solution on Retention of Benzalkonium Choloride and Benzethonium Chloride on SEP-PAK Silica Cartridge (Symbols are the same as in Fig. 2.)

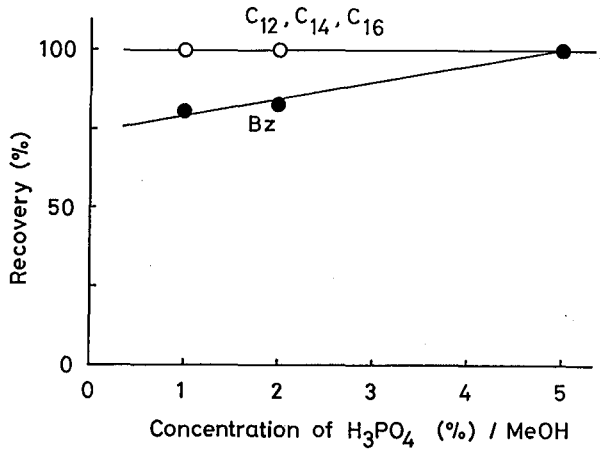


Fig. 5. Influence of Concentration of H_3PO_4 on the Recoveries of Benzalkonium Chloride and Benzethonium Chloride on SEP-PAK Silica Cartridge
○ : Benzalkonium Chloride
● : Benzethonium Chloride

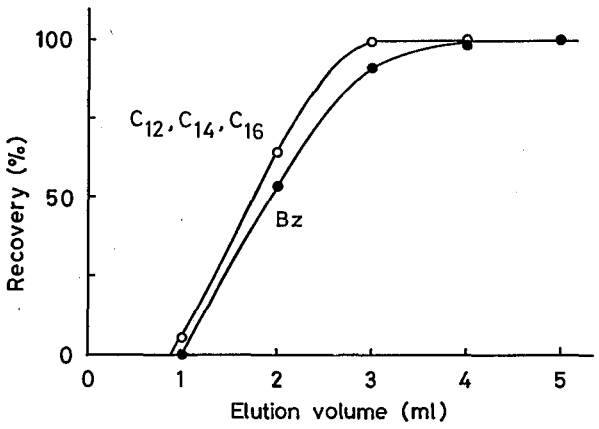


Fig. 6. Elution Profile of Benzalkonium Chloride and Benzethonium Chloride on SEP-PAK Silica Cartridge eluted with 5% H_3PO_4 in MeOH
○ : Benzalkonium Chloride
● : Benzethonium Chloride

ては，シャンプーに配合されているヤシ油脂肪酸ジエタノールアミドが考えられる．この物質は，あわの安定，増粘，起泡，洗浄性をたかめる目的で配合されている．BzAC・BzEC とヤシ油脂肪酸ジエタノールアミドの溶媒に対する挙動を調べるために，シリカゲル60 F_{254} プレートを用いる薄層クロマトグラフィーを行った．その結果，展開溶媒としてアセトンを用いることにより，ヤシ油脂肪酸ジエタノールアミドが BzAC・BzEC と完全に分離された．BzAC・BzEC を吸着させた SEP-PAK シリカをアセトン等20m*l* で洗浄したところ Fig. 4 の結果が得られた．これよりアセトンで洗浄した場合 BzAC・BzEC は溶出しないことが確認できた．TLC の結果を考慮し，洗浄溶液としてアセトンを使用することにした．さらに，クロロホルム，水，アンモニア性水溶液いずれで洗浄を行った場合にも BzAC・BzEC は溶出しなかった．

2．3　BzAC・BzEC 溶出溶液の検討

SEP-PAK をアセトンで洗浄し，夾雑物を除去した後，BzAC・BzEC を溶出させるための，溶出液について検討した．

SEP-PAK に吸着した BzAC・BzEC は，Fig. 3 および 4 で示されるように，メタノールで多少は溶出される．しかし，その溶出量は微量で溶出溶媒とはなりえない．そこで，リン酸酸性メタノールで溶出することを検討した．溶出液の液量を 5 m*l* に固定し，メタノール中のリン酸濃度を 1，2，5％と変化させ，おのおのの濃度での BzAC・BzEC の回収率を検討した．その結果，BzAC は 1％から 5％まで，いずれの場合においても，ほとんど100％の回収率を与えた．しかし，BzEC の場合，100％の回収率を得るには，5％以上の濃度を必要とした（Fig. 5）．そこで，溶出溶液のリン酸濃度を 5％とした．リン酸濃度を 5％としたときの SEP-PAK シリカからの BzAC・BzEC の溶出プロフィールを Fig. 6 に示す．

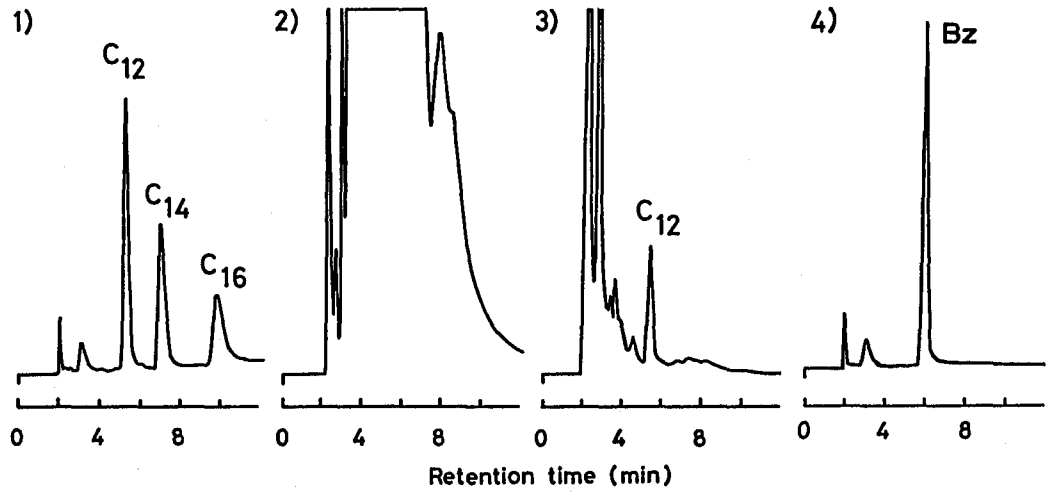


Fig. 7. HPLC Chromatograms of Benzalkonium Chloride, Commercial Cosmetics and Benzethonium Chloride
1 : Benzalkonium Chloride
2 : Body Shampoo without SEP-PAK Silica Treatment
3 : Body Shampoo with SEP-PAK Silica Treatment
4 : Benzethonium Chloride

Table 1. Recoveries of Benzalkonium Chloride and Benzethonium Chloride from Commercial Cosmetics

C_{12} Benzalkonium Chloride

Sample	Weight (g)	Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)	CV (%)
Aftershaving lotion	1.0	0.250	0.248	99.1	0.71
Antiperspirant	0.5	0.250	0.250	99.8	0.93
Hair tonic	1.0	0.250	0.249	99.5	0.30
Hair rinse	1.0	0.250	0.243	97.3	1.20
Body shampoo	0.2	0.125	0.124	99.3	2.50
	0.2	0.250	0.245	98.1	1.50
	0.2	0.500	0.508	101.6	2.50

No. of experiment =3

C_{14} Benzalkonium Chloride

Sample	Weight (g)	Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)	CV (%)
Aftershaving lotion	1.0	0.250	0.251	100.7	0.90
Antiperspirant	0.5	0.250	0.244	97.4	0.69
Hair tonic	1.0	0.250	0.250	99.9	1.20
Hair rinse	1.0	0.250	0.248	99.1	1.40
Body shampoo	0.2	0.125	0.122	97.2	4.20
	0.2	0.250	0.259	103.4	2.50
	0.2	0.500	0.517	103.4	3.20

No. of experiment =3

C_{16} Benzalkonium Chloride

Sample	Weight (g)	Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)	CV (%)
Aftershaving lotion	1.0	0.250	0.251	100.4	1.54
Antiperspirant	0.5	0.250	0.250	99.8	0.97
Hair tonic	1.0	0.250	0.247	98.9	1.90
Hair rinse	1.0	0.250	0.247	98.6	1.20
Body shampoo	0.2	0.125	0.123	98.4	11.0
	0.2	0.250	0.241	96.4	7.90
	0.2	0.500	0.526	105.3	5.50

No. of experiment =3

Benzethonium Chloride

Sample	Weight (g)	Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)	CV (%)
Lotion	1.0	0.250	0.250	100.1	0.49

No. of experiment =3

3．添加回収実験

BzAC・BzECを含む市販の化粧品を使用し，BzAC・BzECの添加回収実験を行った．BzAC・BzECの量が約0.25mgとなるように各試料を秤量し，そこに約同量のBzAC・BzECを添加し，その回収率を求めた（ボディーシャンプーの場合，BzAC添加量を0.125，0.250，0.500 mgと変化させた）．その結果，Table 1に示すように，BzAC（C_{12}，C_{14}，C_{16}）の回収率は96～105%，変動係数は0.6～11%，BzECのそれはそれぞれ100%，0.5%（3回繰り返し実験の結果）であった．

4．市販製品の分析結果

1）BzAC標準溶液，2）SEP-PAKシリカ処理を行わない場合のボディーシャンプー，3）SEP-PAKシリカ処理を行った場合のボディーシャンプーおよび4）BzEC標準溶液のクロマトグラムをFig. 7に示すFig. 7より明らかなように，このHPLC測定条件を用いることによりC_{12}，C_{14}，C_{16}各BzACおよびBzECを分離分析することができた．さらに，BzACの20倍程度ヤシ油脂肪酸ジエタノールアミドを含有する試料の分析を行うことができた．

本分析法を用い，市販の化粧品27検体の分析を行った．市販化粧品の分析結果をTable 2に示す．測定を3回行って得た変動係数は，0.6～4.2%であった．分析を行った27検体のうちBzACまたはBzECを検出したものは，10検体であった．BzAC・BzECは制汗剤，パーマネントウェーブ用剤，膣洗浄剤，アフターシェーブローション，化粧水，ヘアートニック，ヘアーリンスおよびボディーシャンプー等多種の医薬部外品および化粧品に配合されており，その含有量は0.005%～0.225%であった．BzACは化粧品品質基準（昭和42年8月8日　厚生省告示第321号）により使用後直ちに洗い落とす化粧品（石けん，シャンプー等）以外への配合量は0.05%以下と規定されている．今回，この基準を超える不適品は検出されなかった．また，表示違反の検体もなかった．さらに，医薬部外品の場合BzAC・BzECの含有量が各社の医薬部外品製造承認書に明記されているが，これに該当する制汗剤，パーマネントウェーブ用剤，膣洗剤中のBzAC含有量はいずれも規格値に適合した．

結　論

HPLCによる化粧品中の塩化ベンザルコニウム（BzAC）および塩化ベンゼトニウム（BzEC）の分離定量法を確立した．試料0.1-1.0gを秤量し，エタノール20mlおよび2－プロパノール1 mlを加え，ロータリーエバポレータを用い40℃で蒸発乾固する．これをクロロホルム5 mlに溶解し，SEP-PAKシリカに流下する．アセトン20mlでSEP-PAKシリカを洗浄する．5%リン酸メタノール溶液5 mlでSEP-PAKシリカからBzAC・BzECを溶出する（流速はすべて1ml／min）．メタノールで試料の全量を5 mlとする．カラムとしてULTRON CN，移動相溶媒としてメタノール－水－85%リン酸（60：40：0.2），検出波長215nmを用い，上記試料を5 μl注入し，HPLC分析を行う．検量線は1～400 μg／ml

Table 2. Analytical Results of Commercial Cosmetics

Sample	Benzalkonium chloride content (%)				Benzethonium Chloride Content (%)
	Total	C_{12}	C_{14}	C_{16}	
Antiperspirant-A	0.1037	0.0616	0.0421	—	—
-B	0	—	—	—	—
-C	0	—	—	—	—
Permanent waving soln.	0.0087	0.0071	0.0016	—	—
Vagina cleaning lotion	9.63	6.61	2.62	0.40	—
Aftershaving lotion-A	0.0341	0.0021	0.0321	—	—
-B	0	—	—	—	—
-C	0	—	—	—	—
Lotion-A	0	—	—	—	0.107
-B	0.0047	0.0028	0.0019	—	—
-C	0	—	—	—	—
-D	0	—	—	—	—
-E	0	—	—	—	—
-F	0	—	—	—	—
Hair tonic-A	0.0438	0.0390	0.0048	—	—
-B	0.0461	0.0013	0.0448	—	—
-C	0	—	—	—	—
-D	0	—	—	—	—
-E	0	—	—	—	—
Hair rinse-A	0.0302	0.0178	0.0124	—	—
-B	0	—	—	—	—
-C	0	—	—	—	—
-D	0	—	—	—	—
Body shampoo-A	0.225	0.126	0.099	—	—
-B	0	—	—	—	—
-C	0	—	—	—	—
-D	0	—	—	—	—

n =3 — = ND
CV =0.6−4.2

の範囲で原点を通る直線関係を得られた．本分析法の定量性・再現性はともに良好で，BzAC（C_{12}, C_{14}, C_{16}）の回収率は96～105%，変動係数は0.6～11%，BzEC のそれはそれぞれ100%，0.5%（3回繰り返し実験の結果）であった．さらに，市販化粧品の分析を行ったところ，BzAC・BzEC の含有量は0.005～0.225%であった．（本研究の概要は日本薬学会第107年会昭和62年4月で発表した．）

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）Mitchner, H. and Jennings Jr., E. C.,：*J.Pharm.Sci.*, 56, 1595-1598, 1967
7）Takano, S., Kuzukawa, M. and Yamanaka, M.：*J.Am.Oil Chem. Soc.*,54, 484-486, 1977
8）河瀬章司，鵜飼茂夫：衛生化学，27, 296-302, 1981
9）Kawase, S., Kanno, S. and Ukai, S.：*J.* Chromatogr., 247, 273-280, 1982
10）Abidi, S. L.：*J.Chromatogr.*, 213, 463-474, 1981

11) Nakae, A., Kunihiro, K. and Muto, G.：*J. Chromatogr.*, **134**, 459-466, 1977
12) Meyer, R. C.：*J. Pharm. Sci.*, **69**, 1148-1150, 1980
13) Nakamura, K. and Morikawa, Y.：*J. Am. Oil Chem. Soc.*, **59**, 64-68, 1982
14) Marsh, D. F. and Takahashi, L. T.：*J. Pharm. Sci.*, **72**, 521-525, 1983
15) 佐藤宗衛，田中誠之：分析化学，**33**，338-342，1984
16) フレグランス　ジャーナル社編：香粧品の分析・試験法と機能効果の測定法，121-128，1984，フレグランス　ジャーナル社，東京
17) Balasanmugam, K. and Hercules, D. M.：*Anal. Chem.*, **55**, 145-146, 1983
18) Daoud, N. N., Crooks, P. A., Speak, R. and Gilbert, P.：*J. Pharm.* Sci ., **72**, 290-292, 1983
19) Culter, R. A.：*Soap Chem.* Specialties, **43**, 74, 1967

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 109-115, 1987

家庭用品の衛生化学的研究（第20報）
ガスクロマトグラフィーによる塩化ベンザルコニウムの定量法

中村義昭*, 酒井正美*, 森謙一郎*, 鈴木助治*,
渡辺四男也*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XX)
A Method for the Determination of Benzalkonium Chloride by Gas Chromatography

YOSHIAKI NAKAMURA*, MASAMI SAKAI*, KEN'ICHRO MORI*,
SUKEJI SUZUKI* and YOHYA WATANABE*

A method for the determination of benzalkonium chloride by gas chromatography was investigated.

Benzalkonium chloride, C_{12}, C_{14}, C_{16} and C_{18} alkylbenzyldimethylammonium chloride, was readily decomposed by potassium *tert*-butoxide in benzene-dimethylsulfoxide (8 : 2) to yield alkyldimethylamine and 1-olefin. The decomposition reaction was pronouncedly affected by reaction temperatures to give alkyldimethyl-amine as major product by debenzylation at 0-40°C. But, under reflux at 80-90°C 1-olefin was produced by β-elimination of alkyl carbon chain of benzalkonium chloride. Thus, alkyldimethylamine derived from benzalkonium chloride at room temperature was determined by temperature-programmed gas chromatography on a column of 5% SE-30. This method could be applied to the determination of benzalkonium chloride in wet wipers.

Keywords: benzalkonium chloride, alkylbenzyldimethylammonium chloride, Hofmann degradation with potassium *tert*-butoxide, alkyldimethylamine, 1-olefin, debenzylation, gas chromatography, wet wiper

緒　　言

日本薬局方塩化ベンザルコニウム(1)は，塩化アルキルベンジルジメチル第四アンモニウム〔$C_6H_5CH_2N(CH_3)_2R^+$〕Cl^- のR（アルキル基）が n-C_8H_{17}－n-$C_{18}H_{37}$ のもので，主として n-$C_{12}H_{25}$ と n-$C_{14}H_{29}$ からなる混合物である．その分布比は C_{12} が40%以上，C_{14} が20%以上で両者合せて70%以上を含むとされている[1]．これまで報告されている1の分析は，アルキル基の分布比を測定する同族体分析が主体である[2-5]．この同族体分析をガスクロマトグラフィー（GC）を用いて行う場合，1を種々の方法で分解し，その反応生成物であるアルキルジメチルアミンを対象にGC測定するものである．例えば，GCの注入口加熱装置内で直接熱分解する方法[2,6-8]，ナトリウムメトキシドの存在下Hofmann分解する方法[9]，還元的に脱ベンジル化する方法[3,10,11]などである．

著者らは，前報[12]において1をベンゼン（Bz）中塩基としてカリウム *tert*-ブトキシド（*tert*-BuOK）を用いて加熱処理を行うと，主として1－オレフィンが生成することを報告した．しかし，この分解反応は一般に極性溶媒や温度による影響を受けることが考えられるので，今回はBz－ジメチルスルホキシド（DMSO）系の溶媒効果と反応温度に関して詳細に検討した．その結果，本反応の温度依存性は極めて高く，80°C以上の高温では，前報[12]と同様に1－オレフィン(3)を生成したが，室温（0－40°C）では優先的に脱ベンジル化反応が進行し，アルキルジメチルアミン(2)を生成することを見い出した。そこで，2をGC分析することにより1の定量法を

*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

確立し，本法をぬれティシュ中の1の分析へ適用するため，実試料からの抽出法を検討し良好な定量結果を得たので報告する．

実験の部

1．試薬 塩化ドデシルベンジルジメチル第四アンモニウム（**1a**）：花王石鹸㈱製，純度97.6%，塩化テトラデシルベンジルジメチル第四アンモニウム（**1b**）：東京化成工業製（TCI-Ep），塩化ヘキサデシルベンジルジメチル第四アンモニウム（**1c**）：東京化成工業製（TCI-Ep），塩化オクタデシルベンジルジメチル第四アンモニウム（**1d**）：Aldrich 社製 純度90%，*tert*-BuOK：和光純薬工業（特級），重クロロホルム（$CDCl_3$）：Merck 社製（99.7%），その他の試薬はすべて特級を用いた．

塩化ベンザルコニウム標準溶液：**1a**，**1b**，**1c**，**1d**の各100 mgを精秤し，それぞれDMSO 20m*l* に溶解後，Bzを加えて100m*l* 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-15 A・PF型，ガスクロマトグラフィー質量分析計（GC-MS）：HEWLETT PACKARD 5710型－日本電子社製 JMS-D 300型，核磁気共鳴装置（^1H および ^{13}C-NMR）：日本電子社製 JMN-FX 270型，^1H 269.65 MHz，^{13}C 67.8MHz．

FID-GC 測定条件 カラム：5% SE-30（Chromosorb W AW-DMCS，80-100メッシュ），3 mm i. d. × 2 mガラスカラム，試料注入口温度：250°C，カラム温度：140°→230°C，昇温速度：5 °C／min，キャリアガス：N_2 60 m*l*／min，H_2 0.5kg／cm^2，Air 0.5 kg／cm^2，Range：10^2×0.32．

GC-MS測定条件 カラム：5% SE-30（Chromosorb W AW-DMCS，80-100メッシュ），4 mm i.d.× 2 m，カラム温度110°→250°C，昇温速度：8 °C／min，キャリアガス：N_2 40 m*l*／min．

NMR 試料を $CDCl_3$ に溶かし，綿栓ろ過後，5 mm i.d. のサンプル管に入れて測定した．テトラメチルシランを基準物質として化学シフト（δ ppm）を示した．

薄層クロマトグラフィー（TLC） プレート：シリカゲル60F_{254}，Merck 社，展開溶媒：クロロホルム－メタノール－10%酢酸（5：3：1），発色：ドラーゲンドルフ試薬または20%硫酸噴霧後加熱．

3．試料 都内の小売店より購入した消毒綿を試料に用いた．

4．試験溶液の調整

4－1．抽出法 ぬれティシュ，清浄綿，消毒綿を分析対象につぎのように抽出を行った。袋状にシールされた試料は，袋ごと秤量してから開封し，その材質が綿のものはそのまま，また，紙のものは3－4 cm^2に切って200m*l* のナス型フラスコにとる．袋状の場合，その内側に塩化ベンザルコニウムが残留するため，エタノール（EtOH）5 m*l* で2回洗い内容物をフラスコに入れる．さらにフラスコに EtOH を加えて全量約100m*l* で抽出する。空袋は風乾後，秤量してその差を試料量とする．

また，1枚づつ取り出せるティッシュペーパー状の試料は，1－5枚を3－4 cm^2に切って秤量し，薬包紙ごと200m*l* のナス型フラスコにとり，EtOH 100m*l* を加えて抽出する．抽出操作は，試料が抽出中に浮上してくるのを防ぐため，フラスコ中にピンセットを入れて押え，30分間水浴中で還流しながら加熱抽出を行う．つぎにG 2のガラスフィルターを用いて抽出液を熱時吸引ろ過する．ろ過物は EtOH 20m*l* で押し洗いしてろ過し，これを2回繰り返したのち，ろ過液を合せる．ロータリーエバポレーターを用いてろ液を濃縮乾固する．

4－2．*tert*-BuOKによる分解 4－1で得た残留物に Bz-DMSO（8：2）25m*l* を加えて溶解する．これに*tert*-BuOK 約100mg を加え，密栓して直ちに15秒間激しく振とう後，室温に10分間放置する．放置後，反応溶液を100m*l* の分液ロートに移し，フラスコを Bz 5 m*l* で2回洗浄，先の分液ロートに合せる．これに10%塩化ナトリウム溶液20m*l* を加えて15秒間振とう洗浄する．Bz 層を分取し，ロータリーエバポレーターを用いて濃縮乾固する．残留物をアセトン5 m*l* に溶かし，試験溶液とする．

5．定量操作 標準溶液より**1a**，**1b**，**1c**および**1d**をそれぞれ2，4，6，8，10 mgとり，以下4－2に従って操作し，400，800，1200，1600，2000 ppm の標準系列を調整する．これらと試験溶液の5 μlを GC に注入する．GC測定条件に従って昇温分析を行い，ピーク高より検量線を作成し試験溶液中の1の濃度を求める．

実験結果および考察

1．Hofmann 分解の検討 著者らは，前報[12]において塩化ベンザルコニウムを Bz 中，*tert*-BuOK の存在下加熱還流すると，主分解物としてアルキル基に対応する1－オレフィンが生成することを見い出した．今回，さらにこの分解反応を知らべるため，Fig. 1 に示す化合物(1)について詳細に検討した．**1a**，**1b**，**1c**および**1d**の約60mg を*tert*-BuoK 存在下加熱処理（反応温度60°C）し，Bz 抽出後，分解生成物の TLC を行ったところ，い

ずれも *Rf* 0.97と0.77に2個の主スポットが認められた．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，Merck社，3g，1.5cmi. d. ×3.5 cm／Bz）に付し，Bz，ついでメタノールで溶出し，それぞれTLC上各 *Rf* 値に相当する分解生成物を分取した．Bzで溶出する *Rf* 0.97の生成物は，GC-MSにおいて分子イオンピークがm／z 168，196,224,252に観測されることから，これらはそれぞれ**1a**－**1d**の長鎖アルキル基に対応する1－ドデセン，1－テトラデセン，1－ヘキサデセンおよび1－オクタデセンであることを確認できた．また，メタノールで溶出する *Rf* 0.77の生成物は，同様にGC-MSで分子イオンピークがm／z 213，241，269，297に認められ，さらに，^{1}H-NMR（$CDCl_3$）は，δ 0.88〔(3 H, t, J = 6.6 (Hz), CH_3CH_2-〕，δ 2.21〔(6 H,S) ,$-N(CH_3)_2$〕，^{13}C-NMR（$CDCl_3$）は δ 14.1〔(q), CH_3CH_2-〕，δ 45.4〔(q) ,$-N(CH_3)_2$〕，δ 60.1〔(t), $>N-CH_2-$〕を示すことから，**1a**－**1d**のアンモニウム部位に対応するドデシルジメチルアミン，テトラデシルジメチルアミン，ヘキサデシルジメチルアミンおよびオクタデシルジメチルアミンであることがわかった．またこれら分解物の生成率は，反応温度によって強く影響を受けるが，その変化をFig. 2に示した．Fig. 2のBのガスクロマトグラムは，**1a**を60℃で処理したときのもので，そのときの1－ドデセンとドデシルジメチルアミンの生成比は20：80であった．また**1a**を90℃（還流温度，Fig. 2のC）で処理すると，その比は98：2と1－ドデセンの生成比率が高くなる．これに対して20℃（室温，Fig. 2のA）で反応を行った場合には，1：99と完全に逆転し，高選択的にドデシルジメチルアミンが生成した．以上のように本反応がきわめて高い温度依存性をもつことが判明したので，つぎに**1a**－**1d**について，反応温度の影響を検討した．

2．反応条件の検討

反応温度　**1a**，**1b**，**1c**，**1d**に対して反応温度を0°，5°，10°，20°，40°，60°，80°，90℃（還流温度）に変えて *tert*-BuOKの存在下分解反応を行い，Bz抽出後，分解生成物をFID-GCで確認した．その結果をFig. 3とFig. 4に示す．なお，GCの測定条件はFig. 2に示すとおりである．Fig. 3，Fig. 4に示すようにアルキルジメチルアミン(2)と1－オレフィン(3)の生成率は反応温度によって影響を受け，**1a**－**1d**のいずれも0－40℃程度では2の生成が極めて高く，3はわずかしか生成していない．60℃付近では2と3の生成率が接近し，70℃を越えると逆転が起こり，80－90℃の高温では2が減少して3の生成率が高くなる．従ってFig. 1に示すように，本反応は低温（0°－40°C）で脱ベンジル化反応が優先し，選択的に2を生成する．これに対して80℃以上の高温では β 位水素の脱離反応が起こり3を主成績体として与えることがわかった．すなわち，**1a**－**1d**の各10 mgを用いて20－22℃の反応温度で分解を行うと，2の生成率（n = 3）は**1a**で平均81.0%（σ = 1.2%），**1b**で89%（σ = 0.9%），**1c**で82%（σ = 2.5%），**1d**で79%（σ = 0.5%）であった．このとき3の生成は1%以下であり，またアルキルベンジルメチルアミンはガスクロマトグラム上ほとんどピークを認めなかった．以上の結果から本反応を室温で行うことにより，分解生成した2を対象にしてGC分析法を作成した．

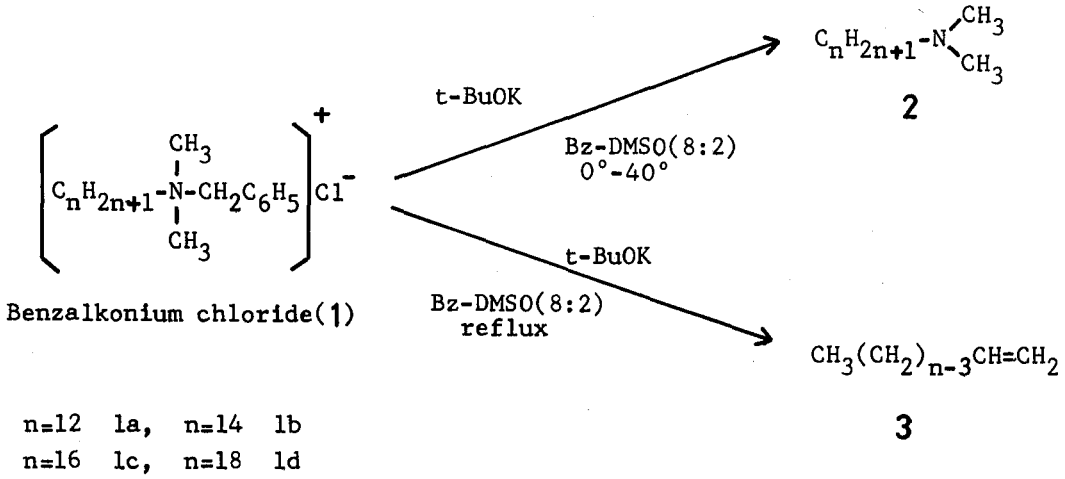


Fig. 1.

反応溶媒 前報[10]では反応溶媒としてBzを用いて加熱処理するとき，DMSOの添加量を増加すると2の生成が増大する傾向が認められた．そこで，今回は室温でBz中のDMSO濃度を0，10，20，30，40%と増加して反応を行い，2の生成に及ぼす影響をみた．その結果，Fig. 5に示すようにDMSO濃度が10%以上のとき3が減少して2が増加し，その生成率が一定になった．従ってDMSOの濃度は20%に設定した．

反応試薬 Fig. 6に示すように試薬の添加量は1 aについて検討を行ったところ，*tert*-BuOKが60 mg以上で一定となることがわかったので，前報[10]と同様に*tert*-BuOK 100mgを添加することにした．

反応時間 室温下でBz-DMSO（8：2）中*tert*-BuOK 100 mgを添加し，Fig. 7に示す如く反応時間を変えて検討したところ，短時間に反応が完了することがわかった．従って，*tert*-BuOKを添加後直ちに激しく振とうし，室温に10分間静置することにした．

3．定量法および検量線 以上，検討した反応条件に

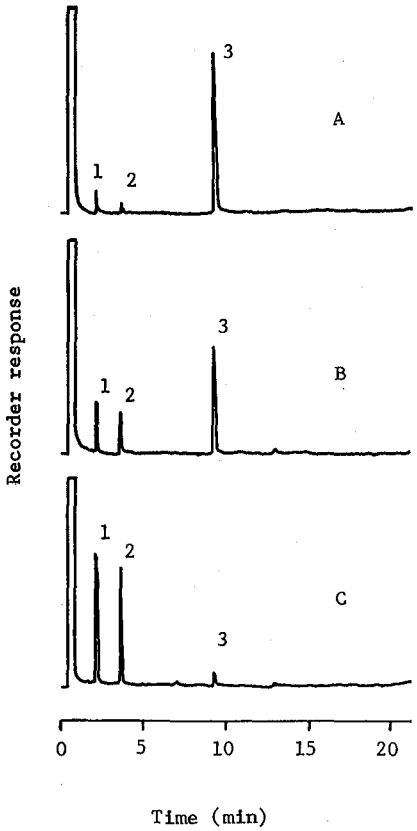


Fig. 2. Gas chromatograms of benzyldimethylamine, 1-dodecene and dodecyldimethylamine derived from **1a**
Reaction temperature: A=20℃, B=60℃, C=90℃.
Peaks: 1=benzyldimethylamine, 2=1-dodecene, 3=dodecyldimethylamine.
Conditions of GC: column, 5% SE-30/chromosorb W AW-DMCS (3mm i.d.×2m); column temp., 110→230℃, 5℃/min; injection temp., 250℃, N_2 60ml/min; range, $10^2 \times 0.32$.

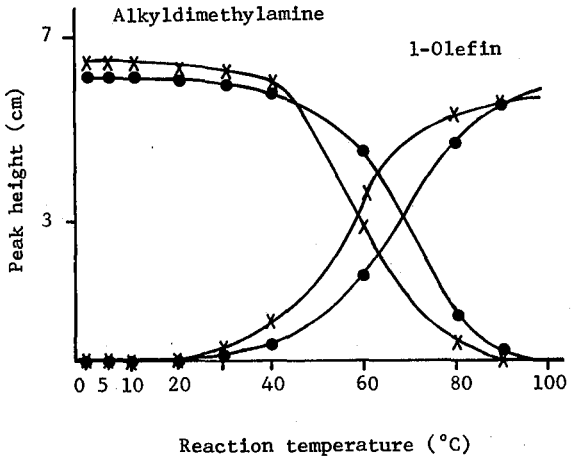


Fig. 3. Effect of reaction temperatures on the formation of alkyldimethylamine and 1-olefin from **1a** and **1b**
1a, **1b**: 10mg, -●-:**1a**, -×-: **1b**.

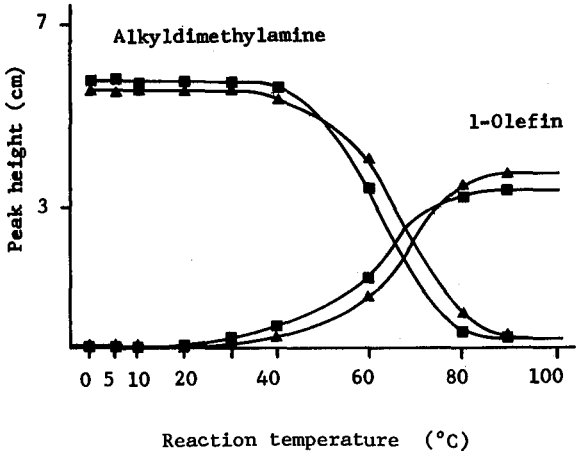


Fig. 4. Effect of reaction temperatures on the formation of alkyldimethylamine and 1-olefin from **1c** and **1d**
1c, **1d**: 10mg, -▲-: **1c**, -■-: **1d**.

基づいて定量法を「実験の部」の如く設定した．1a－1dを本法のように処理し，GC分析すると，1－オレフィンのピークはほとんど認められず，2のガスクロマトグラム（Fig. 8）が得られた．そこで，1a，1b，1c，1dの各2，4，6，8，10mgの標準系列を本法によって処理し，2のピーク高より検量線を作成したところ，Fig. 9に示すようにいずれも良好な直線関係が得られた．これより試験溶液中の1a－1dの濃度を得，その総和で1の含有量を求めた．

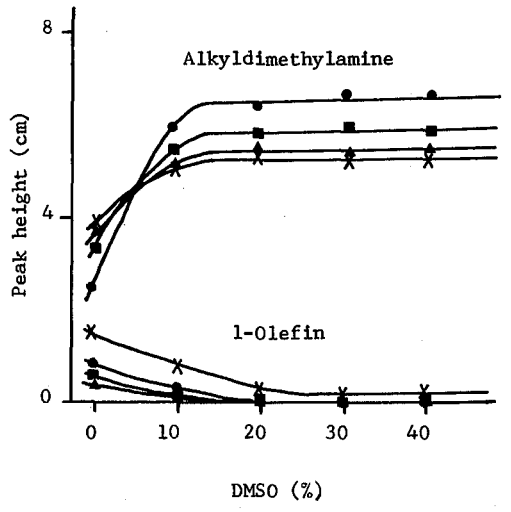


Fig. 5．Effect of concentrations of DMSO on the formation of alkyldimethylamine and 1-olefin
1a-1d: 10mg, Reaction temperature: 20℃.
Symbols are the same as Fig. 3 and Fig. 4.

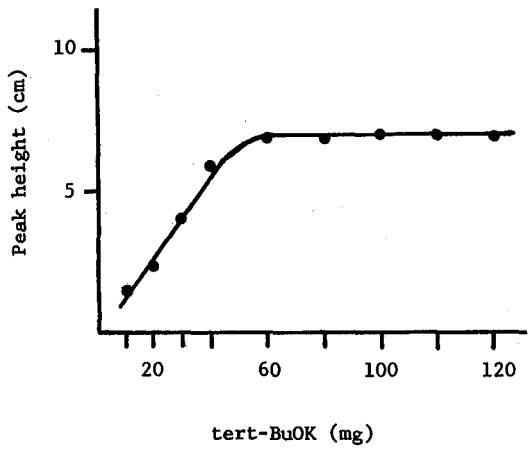


Fig. 6．Effect of the amounts of *tert*-BuOK on the formation of alkyldimethylamine
1a: 10mg, Reaction temperature: 20℃.

4．塩化ベンザルコニウム含有製品からの抽出法の検討　今回検討した定量法をぬれティッシュ，使い捨ておしぼり，お手ふき等の市販ウェットワイパー類に応用するため，1を0.1％含有する市販消毒綿を試料として抽出法の検討を行った．先に植田ら[13]が清浄綿中の1の定量に用いた0.1 N塩酸－メタノール（1：4）混合溶媒による抽出法（A法）と前報[10]のEtOHを用いて加熱還流する抽出法（B法）を比較した．Talbe 1に示すように，1aと1bの分析値に大差はないが，A法に比しB法が若干抽出率がよい．また，*tert*-BuOKは，残留する塩酸および水分で不活性化を受ける可能性を考慮する時，A法よりB法が優位であると思われる．従って，実試料からの1の抽出は，EtOHで加熱抽出するB法によって行った．

5．添加回収実験　本定量法の実試料への適用性を調べるため，回収実験を行った．すなわち，清浄綿の製造承認書[14]に準じて50mlのビーカーに日本薬局方脱脂綿1.7 gをとる．1a，1b，1c，1dをそれぞれ4および8 mgをとり，加水して全量を10mlとしたものを先の脱脂綿に吸収させる．これをアルミホイルでおおい，オートクレーブ中120°，30分間高圧蒸気滅菌する．冷後，「実験の部」に従ってGC分析したところ，Talbe 2に示すように平均回収率は92.4－104.2％，C.V.4.5％以下で塩化ベンザルコニウムを精度よく定量できた．

結　　果

塩化ベンザルコニウムは*tert*-BuOK存在下Hofmann分解を行うと，分解生成物として1－オレフィンとアルキルジメチルアミンを同時に生成するが，本反応は反応温

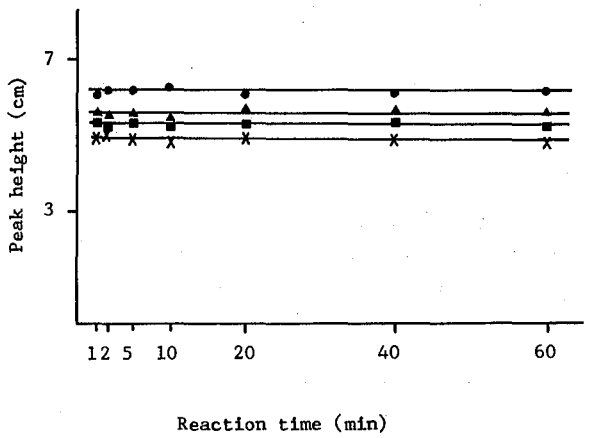


Fig. 7．Effect of reaction time on the formation of alkyldimethylamine
1a-1d: 10mg, Reaction temperature: 20℃.
Symbols are the same as Fig. 3 and Fig. 4.

度に強く影響を受け，0－40℃の低温下では選択的に脱ベンジル化反応が起り，アルキルジメチルアミンを生成した．一方，80℃以上の高温ではアルキル鎖のβ－脱離反応が優先し1－オレフィンを生成することが明らかになった．従って，今回は室温下 *tert*-BuOK 添加後10分間で反応を完了させ，生成したアルキルジメチルアミンをGCにより測定した．この種の分解法としては操作が極めて簡便であり，本法により塩化ベンザルコニウムを効率よく定量することができた．

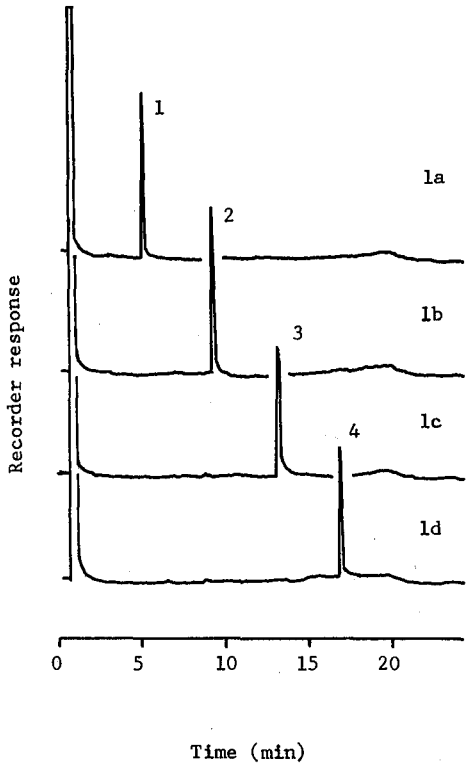


Fig. 8. Gas chromatograms of alkyldimethylamine derived from **1a**, **1b**, **1c** and **1d**
Peaks: 1=dodecyldimethylamine,
2=tetradecyldimethylamine,
3=hexadecyldimethylamine,
4=octadecyldimethylamine.
Column temp.: 140→230℃, 5℃/min.
Other conditions of GC are the same as Fig. 2.
1a-**1d**: 6mg.

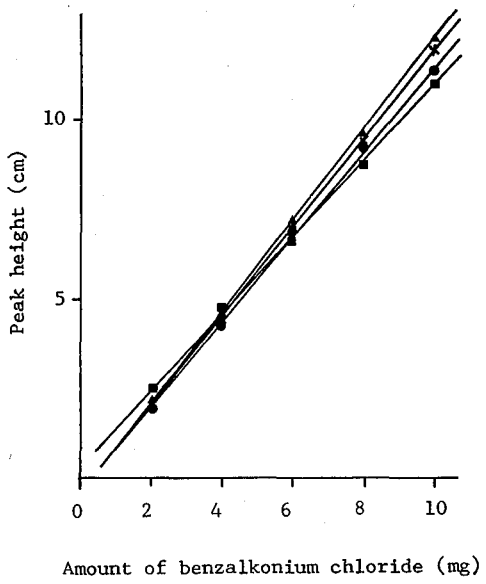


Fig. 9. Calibration curves for **la**, **lb**, **lc** and **ld**
Column temp.:140→230℃, 5℃/min.
Symbols are the same as Fig. 3 and Fig. 4.

Table 1. Extract of benzalkonium chloride, **1a** and **1b** form disposable moistened medical cotton for skin disinfection with a mixture of HCL and methanol, and ethanol.

Method	**1a**		**1b**	
	Content (mg)	S.D.[3]	Content (mg)	S.D.[3]
A[1]	2.93	0.08	1.29	0.12
B[2]	3.11	0.14	1.54	0.09

1) Extracted **1a** and **1b** by filtration with 100m*l* of 0.1N HCl-methanol (2 : 8) solvent system at room temperature.
2) Extracted **1a** and **1b** with 100 m*l* of ethanol under refux.
3) $n = 3$

Table 2. Recoveries of C_{12}, C_{14}, C_{16} and C_{18} benzalkonium chloride

Benzalkonium chloride[1)]	Added[2)] (mg)	Recovery (%)			Average recovery(%)	C.V. (%)
1 a	4	102.5	95.0	97.5	98.3	3.88
	8	105.0	101.3	103.8	103.4	1.88
1 b	4	105.0	102.5	105.0	104.2	1.39
	8	101.3	103.8	101.3	102.1	1.41
1 c	4	95.0	97.5	97.5	96.7	1.49
	8	95.0	93.1	89.0	92.4	3.32
1 d	4	100.0	100.0	95.0	98.3	2.94
	8	93.8	93.8	101.3	96.3	4.50

1) Benzalkonium chlorides (**1 a**, **1 b**, **1 c** and **1 d**) were dissolved in 10m*l* of water, added to 1.7 g of absorbent cotton (Japanese pharmacopoeia), and then autoclaved at 120°C for 30 minutes.

2) Benzalkonium chloride was not detected from the abstorbent cotton.

文 献

1) 日本公定書協会：第十一改正日本薬局方解説書, C-319-C-322, 1986, 広川書店, 東京.

2) Cybulski Z.R., *J. Pharm. Sci.*, 73, 1700-1702, 1984.

3) 河瀬章司, 鵜飼茂夫：衛生化学, 27, 296-302, 1981.

4) Nakamura K., Morikawa Y. and Matsumoto I., *J.Amer.Oil Chem. Soc.*, 205, 72-77, 1981.

5) Meyer R.C., *J.Pharm.Sci.*, 69, 1148-1150, 1980.

6) 宇野豊三, 宮嶋考一郎, 中川照真：分析化学, 15, 584-588, 1966.

7) König H., Strobel W., *Fresenius Z. Anal.Chem.*, 314, 143-145, 1983.

8) Lay-Keow N.G., Michel H., AIlan G.H., *J.Chromatogr.*, 351, 554-559, 1986.

9) Takano S., Takasaki C., Kunihiro K., Yamanaka M., *J.Amer.Oil Chem.Soc.*, 54, 139-143, 1977.

10) 小島次雄, 岡 恒：工業化学雑誌, 71, 1844-1847, 1968.

11) Abidi S.L., *J.Chromatogr.*, 200, 216-220, 1980.

12) 鈴木助治, 酒井正美, 池田一夫, 森 謙一郎, 雨宮敬, 江波戸挙秀, 渡辺四男也：東京衛研年報, 36, 115-122, 1985.

13) 植田忠彦, 風間成孔：東京衛研年報, 35, 159-162, 1984.

14) 日本清浄綿工業会：医薬部外品「清浄綿」製造承認申請要項, 1980, 東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 116-121, 1987

家庭用品の衛生化学的研究（第21報）
$LiAlH_4$還元により誘導したアルキルベンジルメチルアミンのガスクロマトグラフィーによる塩化ベンザルコニウムの分析

鈴木助治*, 酒井正美*, 森謙一郎*,
中村義昭*, 渡辺四男也*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities(XXI)
Analysis of Benzalkonium Chloride by Gas Chromatography of Alkylbenzylmethylamine Derived by Reduction with $LiAlH_4$

SUKEJI SUZUKI*, MASAMI SAKAI*, KEN'ICHIRO MORI*,
YOSHIAKI NAKAMURA* and YOHYA WATANABE*

Benzalkonium chloride, C_{12}, C_{14}, C_{16} and C_{18} alkylbenzyldimethylammonium chloride, yielded both alkyldimethylamine and alkylbenzylmethylamine as reduction products at the ratio 6 : 5 by heating with lithium aluminum hydride in dioxane. The reduction products were identified by gas chromatography-mass spectrometry, ^1H and ^{13}C-NMR spectroscopy. The resulting alkylbenzylmethylamine corresponding to the alkyl chain of benzalkonium chloride was determined by temperature-programmed gas chromatography on 2% OV-17 column(3mm i.d. × 50 cm) with the oven temperature ranging between 150° and 240°C at the rate of 10°C/min. This method was applied to analysis of homologue composition of commercial aqueous benzalkonium chloride solution.

Keywords: benzalkonium chloride, alkylbenzyldimethylammonium chloride, alkylbenzylmethylamine, lithium aluminum hydride, disinfectant, gas chromatography

緒　言

塩化ベンザルコニウムは，炭素鎖がC_8-C_{18}のアルキル基を有する塩化アルキルベンジルジメチル第四アンモニウムの混合物であり，炭素鎖の大きさによりその殺菌力に相違が認められている[1]．特にC_{12}とC_{14}のアルキル基を有する同族体が重要であり，混合物全体に対するそれらの比率は，各々40%，20%以上で両者合せて70%以上の含有量が求められる[2]．従って，塩化ベンザルコニウムの分析は，アルキル基の炭素鎖を識別し，同族体の分布比を精査する分離分析が主として行われている[3,4]．

ガスクロマトグラフィー（GC）による塩化ベンザルコニウムの分析は，難揮発性の第四アンモニウム構造を長鎖アルキル基が残存した第三アミンに化学変換し，これを測定する方法がとられている．通常は，塩化ベンザルコニウムを脱ベンジル化反応によりアルキルジメチルアミンに誘導する．この方法としては，GCの注入口加熱ブロックを利用した熱分解法[4-9]，ナトリウムメトキシドやカリウム *tert*-ブトキシドの塩基存在下で行うホフマン分解法[10-12]，水素化ホウ素ナトリウムや水素化リチウムアルミニウムを用いた還元的脱ベンジル化法[13-16]が報告されている．

水素化リチウムアルミニウム（$LiAlH_4$）還元法は，反応溶媒として通常，無水ジエチルエーテルやテトラヒドロフランが用いられるが，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の還元的脱メチル化反応に，反応溶媒として1.4-ジオキサンを用いてアルキルジメチルアミンに変換する方法を報告した[17]．本法はジエチルエーテルの場合と異なり，ジオキサンを無水物に

*東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

精製することなく，直接，脱メチル化反応に用いることができる．そこで，今回は，本法をC_{12}，C_{14}，C_{16}，C_{18}の長鎖アルキル基を有する塩化ベンザルコニウム(1)に適用したところ，脱ベンジン化反応と脱メチル化反応が同時に進行していることがわかり，前述の各種誘導化法に比べて特に1の構造的特徴を保持したアルキルベンジルメチルアミンが生成し，この分解生成物を対象にして1のGC分析法を作成することができたので報告する．

実験の部

1．試薬 塩化ドデシルベンジンジメチル第四アンモニウム（花王石鹸㈱製，純度97.6%，**1a**），塩化テトラデシルベンジルジメチル第四アンモニウム（東京化成工業製，TCI-EP，**1b**），塩化ヘキサデシルベンジルジメチル第四アンモニウム（東京化成工業製 TCI-EP，**1c**），塩化オクタデシルベンジルジメチル第四アンモニウム（Aldrich 社製，純度90%，**1d**），1.4-ジオキサン（和光純薬工業製，特級），水素化リチウムアルミニウム（和光純薬工業製），重クロロホルム（Merck 社製，99.7%，$CDCl_3$），その他の試薬はすべて特級を使用した．

塩化ベンザルコニウム標準溶液：**1a**, **1b**, **1c**，**1d**の約200 mgをそれぞれ精秤し，ジオキサンに溶解して全量100 m*l* とする．

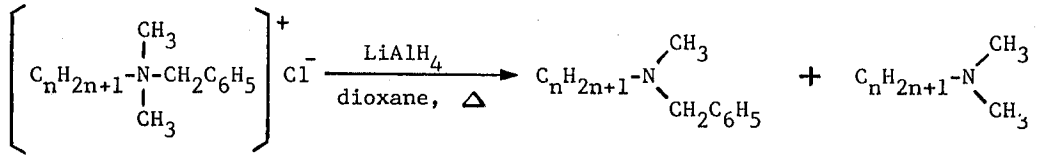
2．装置 水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ（FID-GC）：島津製作所 GC-15 A・PF 型，ガスクロマトグラフィー質量分析計（GC-MS）：HEWLETT PACKARD 社製5710型-日本電子社製D-300型，核磁気共鳴装置（^{1}H および^{13}C-NMR）：日本電子社製 JEOL FX-270型，^{1}H 269.65 MHz，^{13}C 67.8 MHz.

3．試験溶液の調製 25m*l* の目盛付共栓試験管（内径15 mm×長さ180mm）に塩化ベンザルコニウム（1－10mg）をとり，ジオキサン5 m*l* を加えて溶解する．これに$LiAlH_4$約50mgを加え，アルミニウム製ヒーティングブロック中に入れて加熱する．このときヒーティングブロックの温度は，125-130°C の範囲内に保ち，$LiAlH_4$が激しく発泡する状態で30分間加熱する．冷後，反応溶液に2%水酸化ナトリウム溶液10m*l* を徐々に加え，急激な発泡に十分注意して$LiAlH_4$を分解後，100m*l* の分液ロートに移す．さらに試験管に2%水酸化ナトリウム溶液10m*l* を加えて内容物を分液ロートに合せる．これをジエチルエーテル20m*l* で30秒間激しく振とうし，還元成績体を抽出する．静置後，下層を除去，エーテル層を水20m*l* で15秒間振とう洗浄する．上層を分取，ロータリーエバポレーターを用いて濃縮乾固し，残渣をエチルアルコール5 m*l* に溶解して試験溶液とする．

4．分析操作 塩化ベンザルコニウム標準溶液より塩化ベンザルコニウム2，4，6，8，10mgをとり，前述の試験溶液の項に従って操作し，標準濃度系列を調製する．これと先の試験溶液の5 μl をガスクロマトグラフに注入し，下記の FID-GC 測定条件でアルキルベンジルメチルアミン（**2a**，**2b**，**2c**，**2d**）を測定する．標準系列のピーク高より検量線を作成し，試験溶液中の塩化ベンザルコニウムの濃度を求める．

FID-GC 測定条件　カラム：2% OV-17（Chromosorb W AW DMCS, 80-100 メッシュ），内径3 mm×長さ50 cm，注入口温度：250°C，カラム温度：150→240°C，昇温速度：10°C／min，キャリアガス：N_2 60m*l*／min，H_2 0.6kg／cm^2，Air 0.5kg／cm^2，Range：10^2MΩ，0.64V.

GC-MS測定条件　カラム：2%OV-17（Chromosorb W AW DMCS, 80-100メッシュ），内径2 mm×長さ50cm，



Benzalkomium chloride（1） 2 3

n＝12	**1a**	**2a**	**3a**
n＝14	**1b**	**2b**	**3b**
n＝16	**1c**	**2c**	**3c**
n＝18	**1d**	**2d**	**3d**

Fig. 1.

Table 1. Physical data of 2

Compound	2a	2b	2c	2d
MS m/z	289(M^+)	317(M^+)	345(M^+)	373(M^+)
^{1}H-NMR(270 Mz, $CDCl_3$) δ ppm	0.88(3H,t,J=6.9Hz),2.18(3H,s),2.36(2H,t,J=7.5Hz),3.47 (2H,s),7.20−7.40(5H,m)			
^{13}C-NMR(68 Mz,$CDCl_3$) δ ppm	14.1(q),22.7(t),27.4(t),27.5(t),29.4(t),29.7(t),31.9(t), 42.3(q),57.6(t),62.3(t),126.8(d), 128.1(d)×2, 129.1(d),×2,139.2(s)			

注入口温度：250℃，カラム温度：120→240℃，昇温速度：8℃／min，キャリアガス：He 15m*l*／min，イオン化電圧：70eV.

NMR 試料を$CDCl_3$に溶解し，線栓ろ過後，内径5 mmのサンプル管に入れて測定した．化学シフト（δ ppm）はテトラメチルシランを基準物質にして求めた．

実験結果および考察

1．還元成績体の分離同定

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のジオキサン中$LiAlH_4$還元によって脱メチル化体が生成することを報告した[17]．そこで，Fig. 1のC_{12}-C_{18}アルキル基を有する塩化ベンザルコニウム（1）についても同様に処理し，生成した還元成績体の同定を行った．**1a**，**1b**，**1c**，**1d**（30mg）をジオキサン中$LiAlH_4$還元後，エーテル抽出し，還元成績体をGC分析したところ，Fig. 2に示すように，**1a**-**1d**はガスクロマトグラム上いずれも2個の主ピークが認められた．そこで，エーテル抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シリカゲル60，Merck，70-230メッシュ，3 g，内径2 cm×長さ2 cm／酢酸エチル）に付し，酢酸エチル−メタノール（9：1），ついでメタノールで溶出して還元成績体の分離を行った．酢酸エチル−メタノール分画よりFig. 2のピーク5，6，7，8に，また，メタノール分画よりピーク1，2，3，4に相当する還元成績体を得た．ピーク5，6，7，8は，GC-MSにおいて分子イオンピークがそれぞれm／z 289,317，345，373に現われ，さらにいずれの化合物もm／z 134〔$CH_2N(CH_3)CH_2C_6H_5$$^+$〕に基準ピークが確認された．また，Table 1に示すように^{1}H-NMRはδ 0.88（CH_3-CH_2-），2.18（N-CH_3），2.36（N-CH_2），3.47（N-CH_2-C_6H_5），7.20-7.40（C_6H_5-）ppm，^{13}C-NMRはδ 14.1（CH_3-CH_2-），42.3（N-CH_3），57.6（N-CH_2），62.3（N-CH_2-C_6H_5），126.8，128.1，129.1，139.2（-C_6H_5）ppmを示すことから各々ドデシルベンジルメチルアミン（**2a**），テトラデシルベンジルメチルアミン（**2b**），ヘキサデシルベンジルメチルアミン（**2c**），オクタデシルベンジルメチルアミン（**2d**）であることが判明した．一方，これに対してピーク1，2，3，4のGC-MSは，m/z 213,241,269,297（M^+）を示し，^{1}Hおよび^{13}C-NMRのデータが前報[12]と一致することから各々ドデシルジメ

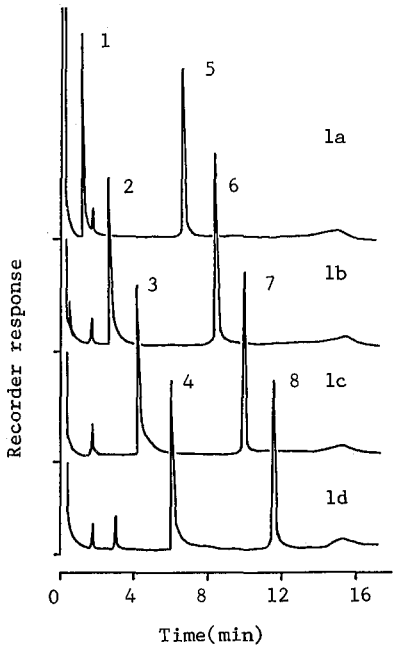


Fig. 2. Gas chromatograms of reduction products derived from **1a**, **1b**, **1c** and **1d**
Peaks: 1=**3a**, 2=**3b**, 3=**3c**, 4=**3d**, 5=**2a**, 6=**2b**, 7=**2c**, 8=**2d**
Conditions of GC: 2% OV-17/Chromosorb W AW DMCS (80-100 mesh),3mm i.d. x 50cm, Injection temp.: 250℃, Column temp.: 120→250℃, Programmed temp. rate: 10℃/min, Carrier gas: N_2 60ml/min, H_2: 0.6Kg/cm^2, Air: 0.5Kg/cm^2, Range: 10_2 MΩ,0.32V

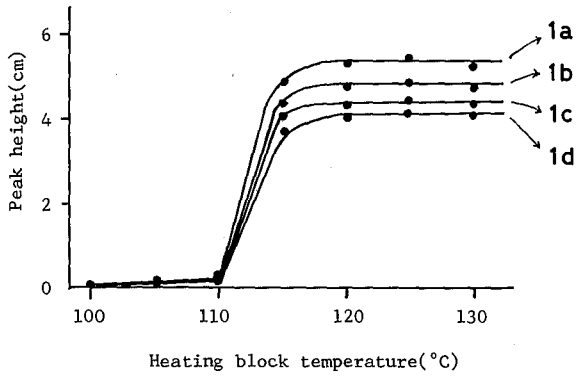


Fig. 3. Effect of reaction temperature on formation of 2 from 1**a**, 1**b**, 1**c** and 1**d**
1**a**-1**d**: 5mg, $LiAlH_4$: 50mg, Reaction time: 30 min.

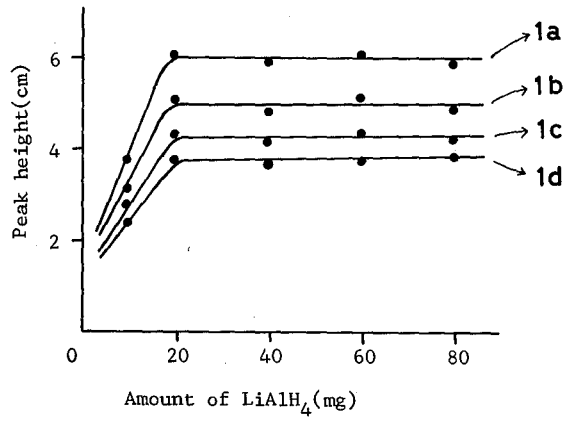


Fig. 4. Effect of amount of $LiAlH_4$ on the formation of 2 from 1**a**, 1**b**, 1**c** and 1**d**
1**a**-1**d**: 5 mg, Reaction temp. : 125°-130℃ (heating aluminum block), Reaction time: 30 min.

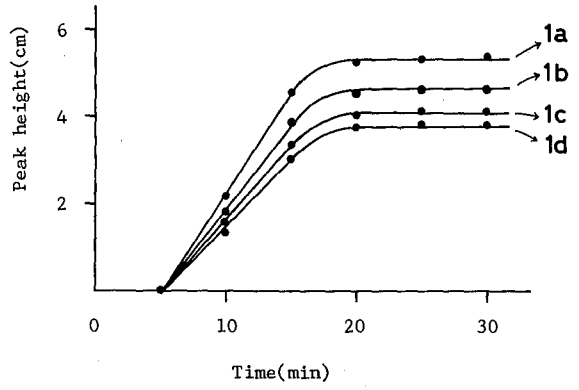


Fig. 5. Effect of reaction time on the formation of 2 from 1**a**, 1**b**, 1**c** and 1**d**
1**a**-1**d**: 5 mg, $LiAlH_4$: 50 mg, Reaction temp. : 125°-130℃ (heating aluminum block).

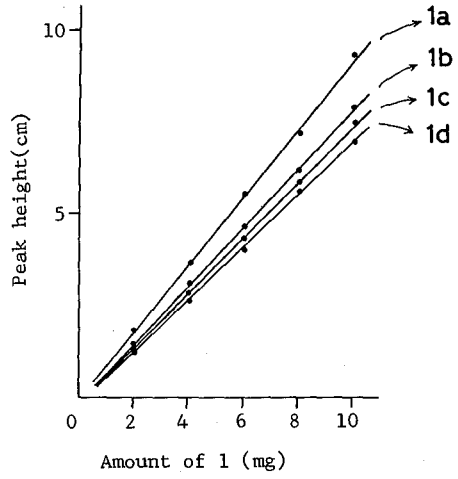


Fig. 6. Calibration curve for 1

チルアミン（3**a**），テトラデシルジメチルアミン（3**b**），ヘキサデシルジメチルアミン（3**c**），オクタデシルジメチルアミン（3**d**）であることがわかった．

以上の結果から1はジオキサン中$LiAlH_4$還元によって2と3を生成することが明らかになった（Fig. 1）．すでに，小島ら[14]は1のテトラヒドロフラン中$LiAlH_4$還元により主として3の生成を報告しているが，2の副生については詳述していない．また，水素化トリエチルホウ素リチウム，水素化ホウ素ナトリウムやパラジウム炭素による還元でも脱ベンジル化反応が進行し，3の生成が報告されている[13,15,16]．今回，著者らの反応条件では，1は脱ベンジル化のみならず脱メチル化反応も同時に進行し，化合物2と3が5：6（面積比）の比率で，1の骨格構造によく対応した脱メチル化体(2)が生成することを確認した．そこで，以下2を対象にして分析法の作成を工夫した．

2．反応条件の検討

反応温度1**a**，1**b**，1**c**，1**d**に対してジオキサン中$LiAlH_4$50mgを加え，ヒーティングブロックの温度を100°，105°，110°，115°，120°，125°，130°Cに変えて3の生成率を観察したところ，Fig. 3に示すように3はブロックの温度が120°C以上で一定の生成率を示した．また，温度が125°C以上では，$LiAlH_4$が激しく連続的に発泡するところから，特にこの状態を反応の指標にしてブ

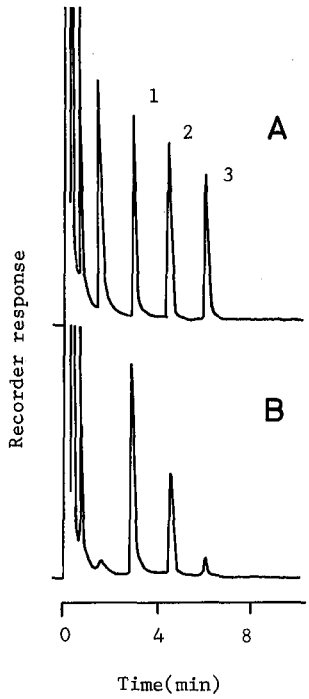


Fig. 7. Gas chromatograms of alkylbenzylmethylamines obtained from commerciral aqueous benzalkonium chloride solution
A=a mixture of **1a**, **1b** and **1c**,
B=disinfectant (10%)
Peaks: 1= **2a**, 2= **2b**, 3= **2c**.
Column temp.: 150→240℃ (10℃/min).
Other conditions of GC are the same as Fig. 2

ロックの温度を125℃から130℃の範囲に保ち還元反応を行った.

$LiAlH_4$の添加量　反応温度を125-130℃の範囲に保ち，$LiAlH_4$の添加量を10, 20, 40, 60, 80mgに増加させたところ，Fig. 4に示すように$LiAlH_4$が20mg以上で3が一定の生成率を示したので，$LiAlH_4$の添加量を50mgに設定した.

反応時間　反応時間および$LiAlH_4$の添加量を先に求めた条件に設定し，反応時間を5, 10, 15, 20, 25, 30分と変えて検討したところ，Fig. 5に示すように20分以上で反応が完了することがわかった．従って，反応時間を30分とした.

3. 定量法および検量線

以上の検討結果から設定した反応条件により，定量法を「実験の部」に示す如く作成した．本法に従って検量線を作成したところ，Fig. 6に示すように**1a**-**1b**のいずれも2-10mgの範囲において良好な直線関係が得られた.

Table 2. Recovery test for **1a**, **1b**, and **1c** from a commercial aqueous benzalkonium chloride solution

Sample	1	Added (mg)	Recoveries(%), n=5 Mean	C.V.
Aq.benzalkonium chloride sol.(10%)[1]	**1a**	2	99.3	2.0
		4	104.9	4.1
		6	99.6	4.2
	1b	2	103.6	2.3
		4	99.1	2.6
		6	94.6	4.2
	1c	2	95.3	2.8
		4	97.3	1.7
		6	97.6	4.6

1) The sample was diluted to 0.2% solution with ethanol, and taken 2ml of the diluted solution for recovery test. The contents of **1a**, **1b** and **1c** in the sample were 6.42%, 3.58% and 0.81%, respectively as result obtained by the proposed method.

4. 塩化ベンザルコニウム含有消毒薬の分析例

1を10%濃度で含有する日本薬局方・塩化ベンザルコニウム液に本法を適用し，添加回収実験と分析精度の検討を行った．消毒薬10gを精秤し，エタノールに溶解して1の濃度を2mg／mlに調製した．その2mlを所定の試験管にとり，ロータリーエバポレーターを用いてエタノールを除去後，Table 2に示すように**1a**, **1b**, **1c**をそれぞれ2, 4, 6 mg添加し，回収実験を行った．その結果，各レベルにおける平均回収率は，95.3-103.6, 97.3-104.9, 94.6-99.6%と定量性が確認された．また，消毒薬の希釈溶液を5mlとり，5回の繰り返し分析による再現性をみたところ，Fig. 7に示すようにガスクロマトグラム上**1d**は確認されず，**1a**, **1b**, **1c**が検出され，それらの含有量はそれぞれ6.4%（標準偏差σ=0.37%），3.6%（σ=0.17%），0.8%（σ=0.04%）で，総含有量は10.8%であった．また，**1a**, **1b**, **1c**の分布比は，59.3%（σ=0.51），33.3%（σ=0.30%），7.4%（σ=0.26%）であり，**1a**と**1b**の分布量は全体の92.6%であった．以上の如く，本法は市販消毒薬中の塩化ベンザルコニウムの分析に充分適用することができ

た.

結　論

塩化ベンザルコニウムは，従来，$LiAlH_4$還元においては脱ベンジル化反応が注目され，分析法に利用されてきたが，今回，ジオキサン中での$LiAlH_4$還元によって脱ベンジル化反応以外に脱メチル化反応も認められて，還元成積体としてアルキルジメチルアミンとアルキルベンジルメチルアミンが6：5（面積比）の割合で得られた．アルキルジメチルアミンを分析上の対象とした場合，他の塩化アルキルトリメチル第四アンモニウムも同アミンを生成するが，アルキルベンジルメチルアミンの場合には，メチル基1個が脱離した構造で，塩化ベンザルコニウムの化学構造を適切に反映しているため，分析法の確実性を高めるものと考えられる．そこで，本法では，この還元成績体を対象にしてGC分析法を作成した．さらに，本法で市販消毒薬を分析し，製品分析への適用が可能であることを示した．

文　献

1）E.I.Valko, A.S.DuBios：*J.Bacteriol.*, 50, 482-483, 1945

2）日本公定書協会編：第十一改正日本薬局方解説書, C-319-C-322, 1986

3）N.N.Daoud, P.A.Crooks, R.Speak, P.Gilbert：*J.Pharm. Sci.*, 72, 290-292, 1983

4）Z.R.Cybulski：*J.pharm.Sci.*, 73, 1700-1702, 1984

5）L.D.Metealfe：*J.Amer. Oil Chem. Soc.*, 40, 25-27, 1962

6）宇野豊三，宮嶋孝一郎，中川照真：分析化学，15, 584-588, 1966

7）B.W.Barry, G.M.Saunders：*J.Pharm.Sci.*, 60, 645-647, 1971

8）H.König, W.Strobel：*Fresenius Z. Anal.Chem.*, 314, 143-145, 1983

9）Lay-Keow NG, Michel Hup'e, A.G.Harris：*J.Chromatogr.*, 351, 554-559, 1986

10）S.Takano,C. Takasaki,K.Kunihiro,M.Yamanaka：*J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 54, 139-143, 1977

11）鈴木助治，酒井正美，池田一夫，森　謙一郎，雨宮敬，江波戸興秀，渡辺四男也：東京衛研年報，36, 115-122, 1985

12）中村義昭，酒井正美，森　謙一郎，鈴木助治，渡辺四男也：東京衛研年報，38, 122-125, 1987

13）H.P.Warrington：*Anal Chem.*, 33, 1898-1900, 1961

14）小島次雄，岡　恒：工業化学雑誌，71, 1844-1847, 1968

15）S.L.Abidi：*J.Chromatogr.*, 200, 216-220, 1980

16）河瀬章司，鵜飼茂夫：衛生化学，27, 296-302,1981

17）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，37, 99-104, 1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 122-125, 1987

家庭用品の衛生化学的研究（第22報）
市販ぬれティシュ類中のエタノールおよび塩化ベンザルコニウムの含有量

鈴木助治*, 酒井正美*, 森謙一郎*, 中村義昭*,
渡辺四男也*, 森　由子**, 谷　賢志**

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXII)
Contents of Ethanol and Benzalkonium Chloride Used as Antiseptic Agent in Commercial Wet Wipers

SUKEJI SUZUKI*, MASAMI SAKAI*, KEN'ICHIRO MORI*,
YOSHIAKI NAKAMURA*, YOHYA WATANABE*,
YOSHIKO MORI** and KENJI TANI**

Keywords: benzalkonium chloride, ethanol, wet wiper, wet tissue

緒　言

ぬれティシュ，使い捨ておしぼり，お手ふきは，紙，脱脂綿，不織布等に水，アルコール，殺菌消毒剤や香料を含浸させたものであり，食事前後の手，指，口もとの清浄，清拭あるいは顔などの皮膚の汚れ落とし，化粧落とし，化粧直しに繁用されている．

最近，弁当類に添付された紙おしぼりに高度に微生物汚染されたものが見つかり，衛生上の問題となった[1,2]．そのため，これを契機にしてぬれティシュ類の安全と衛生性を確保し，品質の向上を図る目的で，昭和61年7月にぬれティシュ類の安全衛生自主基準が制定された[2]．本基準には大腸菌群，一般生菌類，変色異臭，けい光，ホルムアルデヒドの微生物試験や化学試験が定められている．また，殺菌消毒剤については，主としてぬれティシュ類自体を殺菌し微生物汚染を防ぐために製品に添加されるのであるが，本基準では日本薬局方収載品目で，その濃度は保健衛生上支障のない範囲内にとどめるように指示している．医薬部外品としての清浄綿[3]では，乳幼児や粘膜へ使用するために用途，効能，殺菌消毒剤の配合濃度を規制しているが，ぬれティシュ類については，日用雑貨品として塩化ベンザルコニウム等の殺菌消毒剤の配合濃度およびそれらの表示に関する規定はなされていない．現在，ぬれティシュ類に使用される殺菌消毒剤[1]は塩化ベンザルコニウム，塩化ベンゼトニウム，グルコン酸クロルヘキシジンなどがあるとされているが，実際には殺菌消毒剤の種類やその含有量などに不明な点が多いので，実態調査が必要であると考えられる．

われわれは，すでに東京都内に市販されているぬれティシュ類について，それらに配合されている殺菌消毒剤の含有量を知るために調査を行い，その1部を報告[4]しているが，今回，さらに塩化ベンザルコニウムをはじめ，けい光，ホルムアルデヒド，メタノール，エタノール，イソプロパノール，グルコン酸クロルヘキシジンについて調査を行ったので報告する．

実験方法

1．試料　調査したぬれティシュ36種，清浄綿3種，消毒綿1種は，1986年9月から11月までの間に都内の小売店より購入した．

2．試薬　ホルムアルデヒド：和光純薬工業製，35％ホルマリン溶液，グルコン酸クロルヘキシジン：和光純薬工業製，20％溶液，塩化ベンザルコニウム：RN $(CH_3)_2CH_2C_6H_5$ の R ＝ n-$C_{12}H_{25}$ (C_{12})，n-$C_{14}H_{29}$ (C_{14})，n-$C_{16}H_{33}$ (C_{16})，n-$C_{18}H_{37}$ (C_{18}) を有する同族体については，前報[5]と同様のものを使用した．その他の試薬はすべて特級を用いた．

3．装置　水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ

*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
**東京都衛生局薬務部薬事衛生課

表1．ぬれティシュの分析結果[1)]

試料		メタノール (%)	エタノール (%)	クロルヘキシジン ppm	塩化ベンザルコニウム ppm
ぬれティシュ	1	ND[2)]	ND	ND	ND
	2	〃	〃	〃	〃
	3	〃	〃	〃	〃
	4	〃	〃	〃	〃
	5	〃	〃	〃	〃
	6	〃	〃	〃	〃
	7	0.8	〃	〃	150
	8	ND	3.7	〃	ND
	9	〃	4.7	〃	〃
	10	〃	7.5	〃	〃
	11	〃	5.0	〃	〃
	12	〃	10.1	〃	〃
	13	〃	2.5	〃	〃
	14	〃	5.6	〃	〃
	15	〃	3.2	〃	〃
	16	〃	5.0	〃	〃
	17	〃	4.2	〃	〃
	18	〃	7.7	〃	〃
	19	〃	1.5	〃	〃
	20	〃	2.8	〃	〃
	21	〃	3.7	〃	〃
	22	〃	7.7	〃	〃
	23	〃	1.8	〃	〃
	24	〃	2.0	〃	〃
	25	〃	5.2	〃	180
	26	〃	ND	120	ND
	27	〃	〃	ND	630
	28	〃	〃	〃	1130
	29	〃	〃	〃	720
	30	〃	〃	〃	2820
	31	〃	〃	〃	975
	32	〃	〃	〃	1260
	33	〃	〃	〃	1000
	34	〃	〃	〃	1260
	35	〃	〃	〃	1420
	36	〃	〃	〃	1690
清浄綿	1				73
	2				63
	3				95
消毒綿					665

1）けい光，ホルムアルデヒドおよびイソプロパノールは全試料について検出しない．2）ND：不検出．

（FID-GC）：島津製作所 GC－15 A 型，液体クロマトグラフ：日本分光製 TWINCLE HPLC PUMP 7152型，紫外部吸収検出器：島津製作所 SPD－1 型

4．試験法

けい光：マナスルライト（365nm）を用いて試料に紫外線を直接照射し，確認する．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 126-132, 1987

家庭用品の衛生化学的研究（第23報）
衣料用衛生加工剤・塩酸 *n*-ドデシルグアニジンの定量法

酒井正美*, 森謙一郎*, 中村義昭*, 鈴木助治*,
渡辺四男也*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXIII)
Analysis of *n*-Dodecylguanidine Hydrochloride Used as Sanitary Finishing Agent in Textile Goods by Gas Chromatography

MASAMI SAKAI*, KEN'ICHIRO MORI*, YOSHIAKI NAKAMURA*,
SUKEJI SUZUKI* and YOHYA WATANABE*

A method for the determination of *n*-dodecylguanidine hydrochloride used as sanitary finishing agent in textile goods was developed. The *n*-dodecylguanidine hydrochloride was converted to *n*-dodecylguanidine by treatment with sodium hydroxide and then to 2-*n*-dodecylamino-4, 6-dimethylpyrimidine by refluxing with acetylacetone in toluene. The dimethylpyrimidine derivative was measured by gas chromatography with a hydrogen flame ionization detector on a column of 5% DEGS as stationary phase. A total of 10 samples of textile goods, commercially available socks, were analyzed by this method and *n*-dodecylguanidine hydrochloride was detected at 1.2 and 1.4% in 2 samples.

Keywords: *n*-dodecylguanidine hydrochloride, 2-*n*-dodecylamino-4, 6-dimethylpyrimidine, acetylacetone, gas chromatography, sanitary finishing agent, textile goods

緒　言

衣料品等の繊維製品は，実用的な機能や美的感覚を付与するなど，品質の向上を目的として各種の化学的な処理加工が施されている．それらの処理剤には，防縮加工剤，防水剤，帯電防止剤，衛生加工剤，防炎加工剤，染色剤，染色キャリアー，界面活性剤等多種多様であり，これに使用される化学物質の中には時に皮膚障害を疑念されるものも含まれる．しかし，市場に流通する衣料品に関して，これら処理剤の使用実態は明らかにされていないのが現状である．著者らは，すでに染色キャリアーをはじめ，各種の処理剤の実態調査を行っている[1)-3)]．最近，中山ら[4)]は衣料品処理剤の皮膚毒性，特に接触アレルギーについて臨床的な立場から調査を行い，その結果抗菌抗カビ作用を有し，Biocheck60と称される衛生加工剤に強い陽性反応を認めている．その報告によると，この処理剤は一種のグアニジン系化合物であり，製品の純度が低いことからアレルギーを惹起する化学物質を明確に特定していないが，極めて可能性の高い物質として*n*-ドデシルグアニジンを提示している．

ドデシルグアニジンは，諸外国ではその酢酸塩が“dodine”という名称で果樹の病害用殺菌剤として使用されている[5)]．これに対してその塩酸塩は，最近，くつ下，下着等の繊維製品に抗菌防臭剤として使用されている[6)]．しかし，現在，これに対して市販製品中の含有量などその実態については全く不明であり，また，本物質が皮膚障害の原因物質として推察されていることから，塩酸ドデシルグアニジンの分析法を確立し，市販製品について調査を行うことは意義あるものと考えられ，本研究を行った．

ドデシルグアニジンの分析法としては，滴定法[7)]，ガスクロマトグラフ（GC）法[8,9)]が報告されているが，これらはいずれも果物に残留する微量の dodine を分析す

*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

るのに用いられる．GC法は，フッ素をもつアシル化剤やケトン試薬を反応させてフッ素化合物に誘導し，電子捕獲型検出器付きGCを用いてドデシルグアニジンを測定するものである．しかし，この方法を比較的含有量の高い繊維製品へ直接準用することは，得策ではない．そこでより操作性の簡便なFID-GCで測定する改良法を検討し，塩酸*n*-ドデシルグアニジン（1）をアセトルアセトンと反応させてピリミジンへ誘導した後，GC分析する方法を設定した．また，併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 アセチルアセトン（特級），硫酸*S*-メチルイソチオ尿素（特級），1-アミノドデカン（一級）：和光純薬工業製，その他の試薬はすべて特級を用いた．

0.5%水酸化ナトリウム溶液水酸化ナトリウム2.5gを20%含水メタノールに溶かして500m*l*とし，これを繊維製品からの抽出溶媒に用いる．

2．装置 水素炎イオン化検出器付きガスクロマトグラフ（FID-GC）：島津製作所製GC-4CM・PFE，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}H，269.65MHz；^{13}C，67.8MHz，

3．塩酸*n*-ドデシルグアニジンの合成 1-アミノドデカン4.6g（25mmol）を無水エタノール10m*l*に溶かし，ここに硫酸*S*-メチルイソチオ尿素3.5g（12.5mmol）を加え，油浴中で7時間，加熱還流を行う．次いで，室温で一晩放置し，析出した結晶をろ取する．これをメタノール-エタノールより再結晶して硫酸*n*-ドデシルグアニジン5.63g（収率82%）を得る[10]．更にこれを0.55g（1mmol）とり，クロロホルム30m*l*に溶かし，2%水酸化ナトリウム溶液30m*l*を加えて振とうして，遊離型の*n*-ドデシルグアニジンを含むクロロホルム層を分取し，ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を留去する．ここに塩酸0.3m*l*を加えて塩酸塩とし，適宜，エタノールを加えて濃縮乾固して水分を除く．残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（10g，内径2cm×長さ7cm／*n*-プロピルアルコール）に付し，*n*-プロピルアルコール100m*l*で溶出する．*n*-プロピルアルコールを濃縮乾固後，メタノール-エーテルより再結晶して塩酸*n*-ドデシルグアニジン0.43g（全行程の収率67%）を得る．本合成品は北興化学工業株式会社のドデシルグアニジン塩酸塩溶液のものと薄層クロマトグラフィー（TLC）およびNMRデータが一致したので以下標準品として用いる．^{1}H-NMR（CD_3OD）：δ 0.89（3H，t，J=6.8Hz），1.1-1.6（20H），3.14（2H，t，J=7.8Hz）ppm，^{13}C-NMR（CD_3OD）：δ 14.4（q），23.7（t），27.7（t），29.9（t），30.3（t），30.4（t），30.6（t），30.7（t），33.0（t），42.5（t），158.6（s）ppm

塩酸*n*-ドデシルグアニジン標準溶液 塩酸*n*-ドデシルグアニジン約40mgを精秤し，メタノールに溶かして100m*l*とし標準溶液とした．

4．試料 昭和61年7月から昭和62年1月までの間に都内で購入したくつ下10検体を試料とした．

5．試験溶液の調製

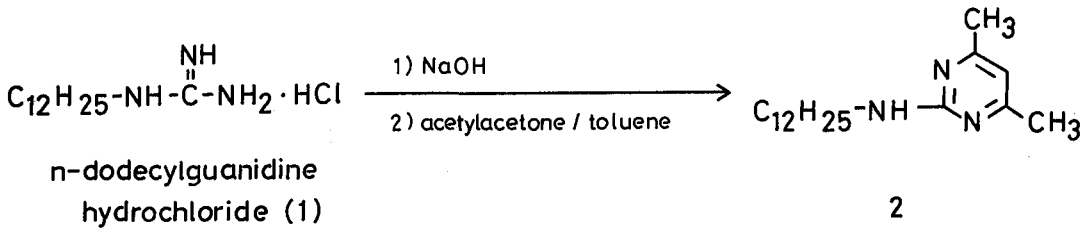
繊維製品中の塩酸*n*-ドデシルグアニジン（1）の抽出 試料を細切し，その1.0gを100m*l*のナス型フラスコに正確に量り採り，0.5%水酸化ナトリウム溶液30m*l*を加えて1時間加熱還流し，1を抽出する．抽出液はガラスろ過器（G2）で温時ろ過し，ろ液にメタノールを加えて全量50m*l*にする．この5～10m*l*をとり以下の分析を行う．

アセチルアセトン誘導体の調製 繊維製品からの抽出液を50m*l*の共栓付き遠沈管にとり，これにクロロホルム20m*l*，2%水酸化ナトリウム溶液10m*l*を加えて5分間振とうし，3000rpmで10分間遠心分離を行い，上層を除去する．更に2%水酸化ナトリウム溶液10m*l*，次いで水10m*l*で同様に処理する．上層を除去した後，クロロホルム層はロータリーエバポレーターを用いて濃縮乾固し，遊離のドデシルグアニジンを得る．これにトルエン20m*l*，アセチルアセトン50μ*l*を加えて約120℃の砂浴中で1時間，加熱還流する．反応後，ロータリーエバポレーターを用いてトルエンを濃縮乾固し，ここに得られた2-*n*-ドデシルアミノ-4,6-ジメチルピリミジンをエタノール5m*l*に溶かして試験溶液とする．

6．定性 坂口反応[11]試験溶液に0.02% α-ナフトール（20%エタノール水溶液）1m*l*，2%水酸化ナトリウム溶液5m*l*を加え，氷冷しながら次亜臭素酸ナトリウム溶液を2,3滴加える．グアニジン類が存在するとき赤色を呈する．

TLC 1．シリカゲル60 F_{254}（Merck），0.25mm，展開溶媒：*n*-プロピルアルコール，2．中性アルミナ60 F_{254}（Merck），0.25mm，展開溶媒：メタノール，発色：ドラーゲンドルフ試薬，*n*-ドデシルグアニジンの塩酸塩，酢酸塩，硫酸塩のRf値は，条件1のときは0.69，0.29，0で，条件2のときは0.51，0.45，0であった．

7．定量 塩酸*n*-ドデシルグアニジン標準溶液より



n-dodecylguanidine hydrochloride (1)

2

Fig. 1.

0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0mg相当量をとり，ロータリーエバポレーターを用いてメタノールを留去後，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条件に従って測定し，2－*n*－ドデシルアミノ－4，6－ジメチルピリミジンのピーク高より検量線を作成して試験溶液中の1の濃度を求める．

FID-GCの測定条件　カラム：5% DEGS (Chromosorb W AW, 60－80mesh)，内径3㎜×長さ1m，カラム温度：180℃，注入口および検出器温度：250℃，キャリアーガス：N_2 40ml／min.，H_2 0.7kg／㎠，Air 1.5kg／㎠

GC-MSの測定条件　カラム：2% OV－17 (Chromosorb W AW DMCS, 80－100mesh)，内径2㎜×長さ0.5m，カラム温度：150→250℃，昇温速度：8℃／min.，注入口温度：250℃，キャリアーガス：He 20ml／min.

NMR　試料を重クロロホルムおよび重メタノールに溶かし，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て化学シフト（δ ppm）を求めた．

実験結果および考察

1．市販繊維製品中のドデシルグアニジンの同定　ドデシルグアニジンは酢酸塩，塩酸塩，リン酸塩等各種の塩として用いられている．そこで，まず市販繊維製品に含有されているドデシルグアニジンの塩の同定を行った．試料（くつ下）にメタノールを加えて，1時間加熱還流して抽出後，溶媒を留去し，アルミナカラムクロマトグラフィー（塩基性アルミナ活性度Ⅰ，Woelm，内径15㎜×長さ6㎝／クロロホルム）に付し，クロロホルム：メタノール（10：1），次いでメタノールで溶出した．このメタノール分画について坂口反応を行ったところ，赤色を呈し，グアニジン類の存在が確認された．更に，ドデシルグアニジンの塩の形を決定するため，TLCを行ったところ，定性の項に示した条件1ではRf0.69，条件2ではRf0.51にスポットが認められ，これらは塩酸塩のRf値に一致した．以上のことから，市販の繊維製品には塩酸*n*－ドデシルグアニジン（1）が用いられていることが判明した．そこで，1について分析法の検討を行った．

Table 1．NMR Spectral Data of 2

^{1}H-NMR δ ppm ($CDCl_3$)	0.88(3H, t, J=6.4Hz), 1.2-1.6(20H), 2.27(6H,s), 3.39(2H,td, J=5.7Hz), 4.96(1H,br.)6.27(1H,s)
^{13}C-NMR δ ppm ($CDCl_3$)	14.1(q), 22.7(t), 23.9(q)×2, 27.0(t), 29.4(t)×3, 29.6(t)×3, 29.8(t), 31.9(t), 41.3(t), 109.4(d), 162.5(s), 167.3(s)×2

2．アセチルアセトン誘導体の分離同定　dodine（酢酸*n*－ドデシルグアニジン）の分析法としては，ヘキサフロロアセチルアセトン[8]やトリフロロ酢酸[9]を反応させてフッ素化合物に誘導し，電子捕獲型検出器付きGCによって高感度分析する方法が報告されている．しかし，繊維製品中には相当多量に含有されているため，FID-GCレベルで検出できる分析法を検討し，ヘキサフロロアセチルアセトンの代わりにアセチルアセトンを反応試薬として用いた．化合物1（50mg）を水酸化ナトリウムで遊離型とし，トルエン中でアセチルアセトンと反応させ，その誘導体をTLC（シリカゲル60 F_{254}，展開溶媒：酢酸エチル，検出：UV_{254}，ドラーゲンドルフ試薬）で観察したところ，単一のスポット（Rf0.82）が確認されたので，これ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15㎜×長さ10㎝）に付し，酢酸エチルで溶出して誘導体2を単離した．2はMSでm／z 291（M^+）を示し，Table 1に示すように，^{1}H-NMRより δ 0.88ppmにアルキル鎖の末端メチル基が認められた．δ 4.96 (br.) ppmは重水添加によりシグナルが消失し，同時に δ 3.39ppmの分裂パターンがqualtet typeのtriplet doubletからtripletに変化することからメチレン鎖に結合した2級アミノ基が存在し，ドデシルアミノ基が確認され

た．このことは^{13}C-NMRでメチル基1個，メチレン基10個，窒素原子に結合したメチレン基（δ41.3ppm）1個が存在することからも明らかである．また，^{1}H-及び^{13}C-NMRに見られるδ2.27（6H，s）ppmとδ23.9（q）ppmより2個の等価なメチル基が存在し，さらに4個のオレフィン炭素のうち，δ167.3（s）ppmより窒素原子に結合した等価な4級炭素が2個認められることから，アセチルアセトンとグアニジノ基の縮環構造は対称性をもつジメチルピリミジン骨格であることがわかった．残るδ162.5（s）ppmの4級炭素はドデシルアミノ基に結合したオレフィン炭素である．以上のデータからこの化合物は2－*n*－ドデシルアミノ－4，6－ジメチルピリミジン（2）であることが確認された．従ってFig. 1に示すように*n*－ドデシルグアニジンとアセチルアセトンを反応させると2が生成することがわかった．

3．反応条件の検討　反応温度　1（2mg）に対してアセチルアセトンを適量加え，温度を40°，60°，80°，100°，120℃に変えて1時間反応させた．Fig. 2に示すように2の生成は80℃以上で一定となったので，今回は砂浴中（120℃）で加熱還流を行うことにした．

アセチルアセトンの添加量　アセチルアセトンの添加量を20，40，60，80，100 μlに変えて1時間加熱還流したところ，Fig. 3に示すように40 μl以上で反応が十分進行することがわかったので，アセチルアセトンの添加量を50 μlとした．

反応時間　アセチルアセトンを50 μlに設定し，反応時間を20，40，60，80，100分と変えて加熱還流したところ，Fig. 4に示すように40分以上で2の生成は一定となったので，反応時間を60分とした．

4．検量線　前述の反応条件をもとに，「実験の部」に示した分析法を設定した．本法に従って操作し，GCで測定したところ，Fig. 5に示すように1が0.4～2.0mgの範囲で良好な直線関係を示した．

5．添加回収　綿布1gに1をそれぞれ3，5，7mg添加して回収実験を行った．綿布を「実験の部」の試験溶液の調製の項に従って0.5%水酸化ナトリウム溶液で抽出し，抽出液をメタノールで全量50m*l*にし，その10m*l*を分析に供した．Table 2に示すように回収率は91.6～98.6%，変動係数3.7～4.2%であり，綿布から定量的に回収できることがわかった．

6．市販製品の分析結果　市販のくつ下10検体について本法を適用したところ，Fig. 6に示すように男性用くつ下2検体から塩酸*n*－ドデシルグアニジン（1）を検出

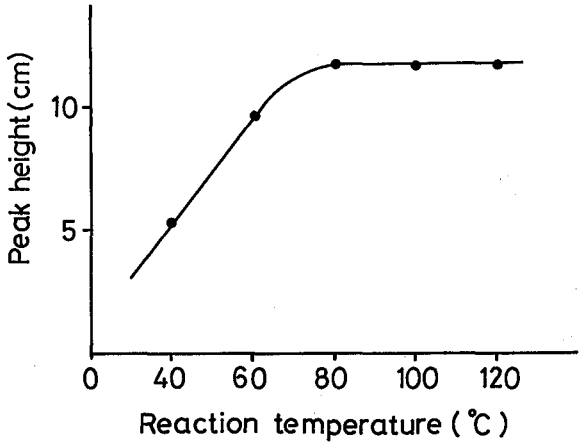


Fig. 2．The Influence of the Reaction Temperature on the Yield of 2

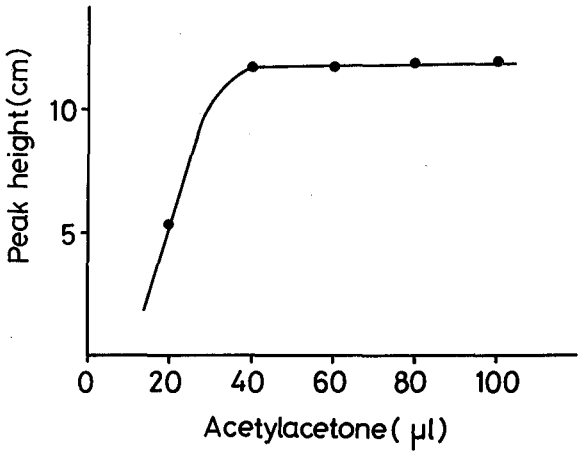


Fig. 3．The Influence of Amount of Acetylacetone on the Yield of 2

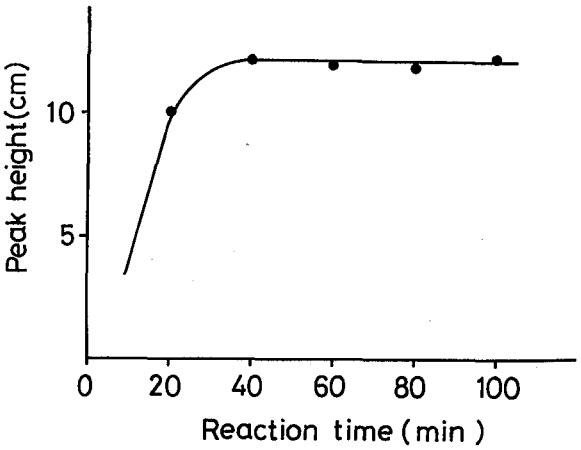


Fig. 4．The Influence of the Reaction Time on the Yield of 2

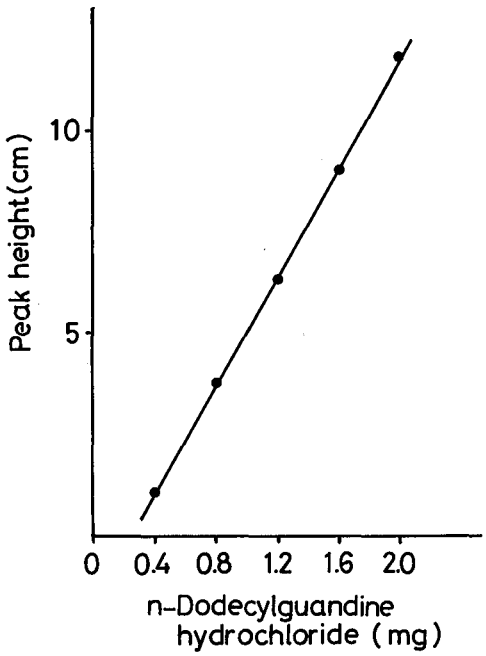


Fig. 5. Caribration Curve for *n*-Dodecylguanidine Hydrochloride

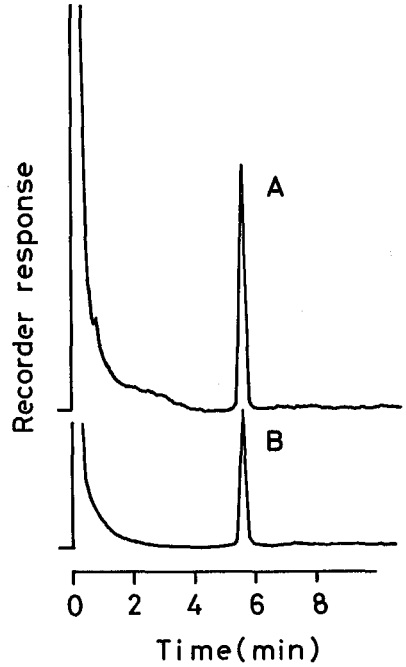


Fig. 6. Gas Chromatograms of **2** Derived from **1**
A : socks, B : **1**

Table 2. Recoveries of *n*-Dodecylguanidine Hydrochloride from Cotton Fabrics

Sample	Added(mg)	Ave. recoveries(n = 5) (%)	C. V.(%)
Cotton fabrics[1)]	3.0	97.9	4.2
	5.0	98.6	3.7
	7.0	91.6	3.9

1) The cotton fabrics were used 1 g of diaper on the market for recovery test.

し，その含有量は，それぞれ1.2%，1.4%であった．なお，くつ下の足底や甲部分で含有量に大きな差はなく，ほぼ均一であった．

結　論

衛生加工剤として繊維製品に用いられている塩酸*n*－ドデシルグアニジンの分析法を確立した．塩酸*n*－ドデシルグアニジンを水酸化ナトリウムで処理して遊離の*n*－ドデシルグアニジンを得，これをアセチルアセトンと反応させて2－*n*－ドデシルアミノ－4，6－ジメチルピリミジンに誘導し，FID-GC で測定した．検量線は塩酸*n*－ドデシルグアニジン0.4～2.0mg の範囲で直線性が得られ，回収率も良好であった．市販のくつ下10検体に適用したところ，2検体より1.2%，1.4%の塩酸*n*－ドデシルグアニジンを検出した．

謝辞　本研究にあたり塩酸*n*－ドデシルグアニジンの標品を供与して頂いた北海道立衛生研究所兼松明夫氏に深謝します．

文　献

1) 雨宮　敬，酒井正美，森　謙一郎，鈴木助治，風間成孔：東京衛研年報，35，133-137，1984.
2) 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.
3) 雨宮　敬，酒井正美，池田一夫，森　謙一郎，鈴木助治，渡辺四男也：東京衛研年報，37，94-98，1986.
4) 東京都生活文化局　日用品成分による皮膚障害の研究，1985.
5) Donald E. H. Frear, E. C. Smith and T. G. Bowery, *J. Agr. Food. Chem.*：8，465-466，1960.
6) Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 81148969（C. A., 96,

70395, 1982).
7) W. A. Steller, K. Klotsas, E. J. Kuchar and M. V. Norris, *J. Agr. Food Chem.*: 8, 460-464, 1960.
8) W. H. Newsome: *ibid.*, 24, 997-999, 1976.
9) J. Hajslova, Z. Rathouska and J. Davidek, *J. Chromatogr.*: 384, 437-440, 1985.
10) U. S. 2704710 (C. A. 49, 8019, 1955).
11) 理化学辞典, 493, 1981, 岩波書店.

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.*, 38, 133-138, 1987

食品衛生細菌に関する研究
——一般食品(複合調理済食品)の細菌学的検査成績について——

潮田　弘*, 五十嵐英夫*, 藤川　浩*, 工藤泰雄*

Bacteriological Survey of Various Commercial Foods in Tokyo

HIROSHI USHIODA*, HIDEO IGARASHI*, HIROSHI FUJIKAWA*
and YASUO KUDOH*

A total of 10,053 prepared food and vegetable samples sold in Tokyo were examined bacteriologically for the period from 1979 through 1985. The investigations brought the conclusions as follows:

1. Standard plate count and coli-form bacteria as indicator organisms were detected in various kinds of food. Especially, vegetables, unsweetened bean paste, and prepared foods such as bean curd, salad, sandwich, luncheon with rice, and rice ball were heavily contaminated by those bacteria. *Escherichia coli* was also found in those foods, but it was detected at a low rate except unsweetened bean paste.

2. *Staphylococcus aureus* was detected relatively highly in rice ball, Japanese cake, sandwich, luncheon with rice, while *Bacillus cereus* was highly found in bean curd, vegetable, dried and powdered foods, and salad. *Staphylococcus epidermidis* was detected in nearly similar foods as *Staphylococcus aureus*.

Keywords: bacterial contamination, commercial foods, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*

緒　言

食品の細菌学的安全性の評価には，現在，細菌数および大腸菌群（数），さらにふん便汚染の指標としての大腸菌検査が広く実施されており，これら汚染指標菌に対して規格・基準のある食品類については，その細菌学的安全性がかなり制御されるようになった．しかし，食品によってはまだ規格・基準のないものも多く，そのまま喫食する機会が多く，細菌性食中毒対策上も問題となる調理済食品や半製品食品などでは，その安全性がまだ十分確保されていない面がある．特に近年では，食品原材料を輸入品にたよることも多く，また食品の調理・加工法なども大きく変貌しつつある．

一方，食品添加物，なかでも殺菌剤や保存料などの規制強化[1]などもあって，これらの複合調理済食品を安全に保つことは容易でなく，その対策が種々検討されてきている[2~10]．

この種の食品の安全性についての対策を講ずるに当っては，当然のことながら，まずその細菌汚染の実態把握が基礎をなすものであり，これまでにも種々検討されてきているが，まだ必ずしも十分なものとは言い難い．

そこで，本報では，食品の安全性対策上問題となる，規格・基準のない複合調理済食品，半製品食品を主対象に，その細菌汚染の実態を汚染指標菌および食中毒起因菌の面から調査した．以下にその成績を報告する．

材料および方法

1．調査対象食品

昭和54年1月～昭和60年12月の7年間に当研究所に送付された東京都内で市販されている複合調理済食品，半製品食品および生野菜類などを細菌汚染調査の対象とした．すなわち，そう菜類1,897件，調理パン1,330件，仕出し弁当類1,178件，豆腐1,150件，洋菓子1,040件，和菓子695件，生あん667件，サラダ665件，粉末・乾燥食品592件，生野菜類442件およびにぎりめし397件，計10,053件である．

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

2．細菌数測定法

標準寒天培地を用い，食品衛生検査指針[11]に従って行なった．

3．大腸菌群（数）および大腸菌検査法

1）大腸菌群数測定：デソキシコレート寒天培地を用い食品衛生検査指針[11]に従って行った．

2）大腸菌群検出法：BGLB 培地で35℃48時間培養後，ラクトース分解によるガス産生を判定し，ガス産生，非産生とも EMB 寒天平板に分離培養を行った．ついで平板上の発育旺盛な集落で形状の異なるもの全てについて，クリグラー寒天斜面培地，LIM 培地およびシモンズ・クエン酸塩培地で確認培養し，この3種の培地の性状により大腸菌群の同定とその構成菌種（属）を決定した．

3）大腸菌同定法：上記の確認培養試験で大腸菌群と同定されたもののうち，クエン酸ナトリウムの利用性がなく，インドールを産生するものを対象に，尿素，VP，マロン酸塩培地による二次確認培養を行い，尿素分解性，アセトイン産生性およびマロン酸塩利用性陰性のものを *E. coil* と同定した．

3．ブドウ球菌検査法

1）表皮ブドウ球菌検出法：食品の10％乳剤の0.1m*l* を3％卵黄加マンニット食塩培地（以下 MSEY 寒天平板）[12]の表面全面に塗抹し，35℃48時間培養後，発育集落を観察，卵黄反応陰性で，マンニット非分解，白色光沢ある中等度の大きさの集落を *S. epidermidis* として扱った．非典型的な集落については，必要に応じ，コアグラーゼ産生性，ブドウ糖発酵能，DNase 産生性あるいは Tween80分解性などを試験した．

2）黄色ブドウ球菌検出法：MSEY 寒天平板を用いた直接培養法[13]と，7.5％食塩加ブイヨン（倍濃度）による増菌培養法[13]の2法を併用した．

即ち，直接培養法では食品の10％乳剤の0.1m*l* を MSEY 寒天平板に全面塗抹し，35℃48時間培養後，卵黄反応陽性で，マンニットを分解し，光沢ある隆起した中等度の集落は黄色色素の産生の有無にかかわらず全て *S. aureus* として扱った．

増菌培養法の場合は10％食品乳剤10m*l* を7.5％食塩加ブイヨン（倍濃度）10m*l* に注加し，35℃48時間培養後，

Table 1．Standard Plate Counts of Various Commercial Foods

Foods	Number tested (%)	Standard plate counts／g								
		<10	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
Cakes	1,040 (100)	16	54	139	245 (24)	278 (27)	204	76	25	4
Japanese cakes	695 (100)	8	64	118	155 (22)	164 (24)	116	57	13	0
Sandwichs	1,330 (100)	6	35	104	207	399 (30)	340 (26)	165	60	14
Luncheon with rice	1,178 (100)	12	51	138	259 (22)	370 (31)	217	104	22	5
Nigirimeshi (rice ball)	397 (100)	5	13	32	75	108 (27)	90 (23)	50	14	10
Sidedishes	1,897 (100)	299	326	341 (18)	378 (20)	321	143	55	30	3
Salads	665 (100)	19	14	50	129	194 (29)	187 (28)	58	12	2
Bean curds	1,150 (100)	0	10	69	193	448 (39)	320 (28)	88	18	3
Dried and powdered foods	592 (100)	73	89	140 (24)	121 (20)	115	37	10	7	0
Vegetables	442 (100)	10	10	24	30	46	110 (25)	133 (30)	69	10
Unsweetened bean paste	667 (100)	48	55	60	44	44	164 (25)	173 (26)	68	11

(1979－1985)

MSEY寒天平板に分離培養し，前記同様の集落形状をもつものを *S. aureus* と同定した．なお，疑わしい集落については，コアグラーゼ産生性，ブドウ糖発酵能，DNase産生性などを試験した．

4．セレウス菌検査法

食品の10%乳剤の0.1m*l*をマンニット卵黄ポリミキシン寒天培地（以下MYP寒天平板）[14]に全面塗抹し，35℃20時間培養後，レシチナーゼ反応が著明で，マンニット非分解，光沢がなく，灰色，R型の発育旺盛な集落を *B. cereus* とした．なお，疑わしい集落については，ブドウ糖の嫌気的分解性，アセトイン産生性，ゲラチンおよびデンプン分解性などを試験した．

5．サルモネラ検査法

倍濃度のラパポート培地30m*l*に10%食品乳剤30m*l*を注加し，35℃24時間培養後，DHL寒天平板に分離培養を行い，発育したサルモネラの疑われる集落について常法により同定した[14]．

成　績

1．細菌数

1979～1985年の7年間に調査した各種市販食品の細菌数測定成績を食品別にまとめてTable 1．に示した．

各食品別の細菌数は調査した時期や季節によっても多少の違いはあるが，一部のものを除き，総体的に高い数値であった．特に，生野菜，調理パン，豆腐，にぎりめし，サラダなどの汚染度は高く，10^4／g以上の汚染を示したものが70%前後におよんだ．

粉末・乾燥食品やそう菜類での汚染は比較的少ないものであった．ただ，そう菜類の汚染の場合はこの範疇に分類された食品の種類によってかなり様相を異にする結果であった．すなわち，検討した食品のうち天ぷら，煮豆，つくだ煮類などでの細菌数は少なかったのに対し，野菜煮物，おから，卵焼などのそう菜類では菌数の多いものがかなりの割合を占めた．

なお，東京都において食品別に設定されている食品衛生措置基準の数値を越えるものはごく一部の食品のみで

Table 2．Coli-form Counts of various Commercial Foods

Foods	Number tested (%)	Coli-form counts／g								
		0	<10	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7
Cakes	1,040 (100)	214 (21)	363 (35)	224 (22)	144	72	18	5	2	0
Japanese cakes	695 (100)	232 (33)	195 (28)	94 (14)	72	41	43	13	4	1
Sandwiches	1,330 (100)	140	174	228 (17)	345 (26)	265 (20)	120	45	11	1
Luncheon with rice	1,178 (100)	180	307 (26)	247 (21)	223 (19)	145	55	18	3	0
Nigirimeshi (rice ball)	397 (100)	62 (16)	125 (32)	69 (17)	60	31	27	16	6	1
Sidedishes	1,897 (100)	834 (44)	409 (22)	247 (13)	202	122	59	21	3	0
Salads	665 (100)	29	53	75	150 (23)	170 (26)	127 (19)	52	9	0
Bean curds	1,150 (100)	168 (15)	487 (42)	268 (23)	150	56	15	6	0	0
Dried and powdered foods	592 (100)	435 (74)	138 (23)	10 (2)	7	1	1	0	0	0
Vegetables	442 (100)	96 (22)	76 (17)	58	83 (19)	67	35	27	0	0
Unsweetened bean paste	667 (100)	200 (30)	135 (20)	113	115 (17)	58	37	9	0	0

(1979－1985)

あった.

2．大腸菌群（数）および大腸菌汚染状況

各食品別の大腸菌群数測定成績を Table 2．に示した.

大腸菌群汚染は検討した食品全体の約半数に認められたが，その菌数は当然のことながら，細菌数に比べて少なく，10^4／g 以上の高度汚染を示したものの割合も低率であった．各食品のうち比較的汚染率の高かったものは，サラダ，生野菜類，にぎりめし，調理パンなどで，これらの食品では細菌数の汚染も平行して高い食品であった．しかし，細菌数の多かった豆腐，生あんなど食品によっては必ずしも大腸菌群汚染と細菌数が平行しないものも認められた.

一方，ふん便汚染指標としてより重要とされる *E. coli* の検出状況を Table 3．に示した．表にみられるごとく，大腸菌の汚染も大腸菌群の場合と同様食品によってかなりの差がみられたが，大腸菌群以上の汚染を示す食品は1件も認められなかった．検討した食品の中では，生あん，豆腐，生野菜類，仕出し弁当，にぎりめしなどの汚染が比較的高い傾向にあったが，これらの食品は生あんを除くと大腸菌群汚染もほぼ平行して高いものであり，両者の汚染は互いによく一致する結果であった.

3．黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌の汚染状況

各食品からの *S. aureus* および *S. epidermidis* の検出状況を Table 4．に示した.

S. aureus はにぎりめし，和菓子，調理パン，仕出し弁当，サラダ，洋菓子など，いずれも比較的素手で取扱うことの多い調理済食品からの検出率が高く，直接手の触れることの少ない粉末・乾燥食品，生あん，生野菜などでは極めて低率であった.

手指の汚染指標菌として同時に調査した *S. epidermidis* の検出率も *S. aureus* のそれと大差ない傾向で，同様ににぎりめし，サラダ，仕出し弁当，調理パンなどからの検出が高率であった．なお，検討した食品の中で，特に洋菓子では *S. epidermidis* の検出率が *S. aureus* のそれに比して低率であったが，これは前者では直接分離培養

Table 3．Detection of *Eschericha coli* from Commercial Foods

Foods	Number tested	No. of positives(%)
Unsweetened bean paste	580	76 (13.1)
Bean curds	339	25 (7.4)
Vegetables	289	17 (5.9)
Luncheon with rice	538	27 (5.0)
Nigirimeshi (rice ball)	119	5 (4.2)
Salads	187	7 (3.7)
Sidedishes	937	32 (3.4)
Cakes	327	6 (1.8)
Sandwiches	437	7 (1.6)
Dried and powdered foods	187	1 (0.5)
Japanese cakes	293	0 (0)

(1982−1985)

Table 4．Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* from Commercial Foods

Foods	Number tested	No. of positives(%)	
		S. aureus	*S. epidermidis*
Nigirimeshi (rice ball)	397	71 (17.9)	67 (16.9)
Japanese cakes	695	106 (15.3)	58 (8.3)
Sandwiches	1,330	189 (14.2)	134 (10.1)
Luncheon with rice	1,178	157 (13.3)	149 (12.6)
Salads	665	88 (13.2)	99 (14.9)
Cakes	1,040	127 (12.2)	17 (1.6)
Bean curds	1,150	95 (8.3)	10 (0.9)
Sidedishes	1,897	121 (6.4)	129 (6.4)
Vegetables	442	13 (2.9)	4 (0.9)
Unsweetened bean paste	667	12 (1.8)	1 (0.1)
Dried and powdered foods	592	4 (0.7)	4 (0.7)

(1979−1985)

しか実施しなかったのに対し，後者では増菌培養も併用したことによる．

4．セレウス菌の汚染状況

各食品における *B. cereus* の検出状況を Table 5．に示した．本菌の食品中の分布は同じ食中毒菌である *S. aureus* とはかなりその様相を異にするものであった．

すなわち，本菌は *S. aureus* が比較的低率あるいはほとんど検出されなかった豆腐，生あん，生野菜類や粉末・乾燥食品に高率に認められ，それはすでに著者らなど[15-18]により高度汚染が指摘されている豆腐で特に顕著であった．これに対し，*S. aureus* の検出率が高率であったにぎりめし，和菓子，調理パンなどからの本菌の検出率はいずれも低率に止まり，食中毒の原因[19]として多いチャーハン，ピラフ，スパゲッティなどからの検出も極めて低いものであった．なお，今回の調査では，*S. aureus* と *B. cereus* と併せ，*Salmonella* の検索も実施したが，検討した食品の全てが陰性であった．

考　察

著者らは市販食品における細菌汚染状況を把握するため，これまで主に複合調理済食品，半製品食品および生野菜を対象に汚染指標である細菌数，大腸菌群（数），*E. coli* のほか，*S. aureus*，*S. epidermidis* と *B. cereus* の分布について検討を加えてきた．

本報は過去7年間に実施した調査成績をまとめたものであるが，既述のように汚染指標として検討した細菌数および大腸菌群（数）は対象各食品に広く分布し，その菌数も粉末・乾燥食品や一部のそう菜類を除くと，概して多いことが確認された．すなわち，この種の市販食品では原料あるいはその製造工程での細菌汚染の避けがたいことを強く示唆する結果であった．しかし，ふん便汚染をより反映するとされる *E. coli* についてみると，その検出率は生あんを除くと数%程度に止まっており，特に問題視するほど汚染率の高い食品は認められなかった．

生あんでは，*E. coli* の検出率は13%強と最も高率で，原料あるいは製造工程での汚染の高いことが示されたが，最終製品である和菓子からの検出は皆無で，その点からみれば，それ程大きな問題はないと思われる．

一方，汚染指標菌と平行して検討した *S. aureus*，*B. cereus* や *Salmonella* の各食中毒菌についてみると，*Salmonella* の検出された食品は皆無であったが，*S. aureus* と *B. cereus* の両者は食品によっては *E. coli* 以上に広く分布し，またその分布は概して *E. coli* 陽性食品に高い傾向が認められた．*B. cereus* による食中毒の発生は，わが国ではチャーハン，ピラフ，スパゲティなどを原因食品[19]とすることが多いが，今回の調査ではこれら食品からの本菌の検出は極めてまれで，むしろ，直接食中毒とは関係しない豆腐，生あんなど，他の食品に高い結果であった．これに対し，*S. aureus* の場合は，にぎりめし，和菓子など比較的食中毒の原因として多い食品からの検出率が高く，これらの食品が食中毒の原因となり易いことが示唆された．ただ，*S. aureus* の検出率の高い食品であっても，直接それが食中毒の発生原因に結びつくほど菌数の多いものは極めてまれであった．

周知のように，*S. aureus* や *B. cereus* の食中毒はエンテロトキシンに起因するものであり，その発生には菌の食品中での増殖と毒素の産生が必須である．食中毒発生防

Table 5．Detection of *Bacillus cereus* from Commercial Foods

Foods	Number tested	No. of positives(%)
Bean curds	1,150	747 (65.0)
Unsweetened bean paste	667	295 (44.2)
Vegetables	442	159 (36.0)
Dried and powdered foods	592	160 (27.0)
Salads	578	74 (12.8)
Nigirimeshi (rice ball)	397	50 (12.6)
Luncheon with rice	1,178	125 (10.6)
Sandwiches	1,330	120 (9.0)
Cakes	1,040	91 (8.8)
Sidedishes	1,897	143 (7.5)
Japanese cakes	695	37 (5.3)

(1979～1985)

止の面からいえば，菌の分布以上に食品中での菌の増殖と毒素産生を防ぐ，製造から消費までの食品の適正な温度管理などが対策上より重要なものといえる．

以上，今回の調査で，調理済食品，半製品食品や生野菜など，各種市販食品の細菌汚染の実態をほぼ把握することができた．この種の食品の細菌汚染は汚染指標菌に止まらず，食中毒菌にまでおよぶ広範囲にわたるものであったが，これらの細菌汚染が主にどの段階で起るのか，今回の調査では十分明らかにするまでには至らなかった．今後，これらの点についても併せて検討し，まだ細菌学的安全性が十分でない，これらの食品に対するわが国の実状にあった規格・基準の設定や検査法の確立を計らねばならないと考える．

結　論

昭和54年～60年の7年間に，東京都で市販されていた複合調理済食品，半製品食品および生野菜類など，合計10,053検体の細菌汚染の実態調査を行なった結果，次の結論を得た．

1．汚染指標菌である細菌数，大腸菌群（数）は各食品に広く認められたが，特に生野菜，生あんのほか，豆腐，調理パン，サラダ，仕出し弁当，にぎりめしなど，調理済食品に高度汚染のものが多い結果であった．*E. coli* の検出もほぼこの成績と平行したが，その検出率は生あんを除き極めて低率であった．

2．食中毒菌である *S. aureus*，*B. cereus* は食品によってかなりその分布を異にし，前者ではにぎりめし，和菓子，調理パン，仕出し弁当などに高頻度に認められたのに対し，後者では豆腐，生野菜，粉末・乾燥食品，サラダなどからの検出が高率であった．なお，これらの食中毒菌と併せて検討した *S. epidermidis* の分布も *S. aureus* のそれと大差ない成績であった．

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および特別区保健所衛生課の各職員に心から謝意を表します．

文　献

1）辺野喜正夫，粟飯原景昭，内山　充：食品衛生学，349-356，1979，朝倉書店，東京．
2）金山龍男：ニューフードインダストリー，22，10-16，1980．
3）柴田茂久：ジャパンフードサイエンス，19（4），30-36，1980．
4）加藤　明：ニューフードインダストリー，22，17-19，1980．
5）野坂宣嘉：ニューフードインダストリー，22，20-25，1980．
6）高野　修，和田安郎，板垣憲吉，矢島日男，鈴木政行，小島照郎，阿部克己：食品衛生研究，32，51-61，1982．
7）木股昌行，広畑佳宏，山本二郎，宮里　嵩，田中敏嗣：食品衛生研究，32，77-82，1982．
8）五十嵐英夫，新垣正夫，山田澄夫，潮田　弘，寺山武，坂井千三：東京衛研年報，29-1，6-12，1978．
9）五十嵐英夫，新垣正夫，高橋正樹，潮田　弘，寺山武，坂井千三：東京衛研年報，30-1，111-116，1979．
10）新井輝義，池島伸至，神真知子，入倉善久，古幡幸子，松本昌雄：東京衛研年報，32-1，143-147，1981．
11）厚生省環境衛生局監修，食品衛生検査指針Ⅰ 100-131，1973，日本食品衛生協会，東京．
12）善養寺浩，寺山　武，潮田　弘，五十嵐英夫，丸山務，坂井千三：食衛誌，12（4），311-314，1971．
13）寺山　武，五十嵐英夫，潮田　弘，斉藤香彦，稲葉美佐子，善養寺浩：東京衛研年報，24，1-5，1972．
14）善養寺浩，坂井千三，寺山　武，工藤泰雄，伊藤武：腸管系病原菌の検査法，第4版，171-265，1985，医学書院，東京．
15）潮田　弘，五十嵐英夫，高橋正樹，新垣正夫，寺山武，坂井千三：東京衛研年報，31-1，109-114，1980．
16）楠　　淳，池島伸至，新井輝義，神真知子，入倉善久，友成正臣，伊藤　武，坂井千三：東京衛研年報，28-1，11-14，1977．
17）寺山　武，新垣正夫，山田澄夫，潮田　弘，五十嵐英夫，坂井千三，善養寺浩：食衛誌，19，98-104，1978．
18）品川邦汎，国田信治，佐々木寧，岡本　晃：食衛誌，20，431-436，1979．
19）伊藤　武，甲斐明美，斉藤香彦，柳川義勢，稲葉美佐子，高橋正樹，高野伊知郎，新垣正夫，坂井千三，篠原　楷，加藤喜市，田村延一，土屋伸久，駒井嘉明：東京衛研年報，33，9-18，1982．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **38**, 139-144, 1987

食肉からのサルモネラ検出のための ラパポート変法培地と他の増菌培地の比較検討

楠　　淳*, 伊　藤　　武*

Comparative Studies of Modified Rappaport Medium and Other Enrichment Media for Detection of *Salmonella* from Row Meat

JUN KUSUNOKI* and TAKESHI ITOH*

Keywords：サルモネラ *Salmonella*, 増菌培地 enrichiment medium, ラパポート変法培地 modified Rappaport medium

緒　　言

食品のサルモネラ汚染は，一般的にその菌数が少ないことから，本菌の食品からの検出にあたっては，選択性培地などによる増菌手段を構ずる必要がある．この種の目的にはこれまでセレナイト培地，ハーナのテトラチオン酸塩培地，ラパポート培地，セレナイトブリリアントグリーン培地，セレナイトシスチン培地など各種の増菌培地が開発・利用されてきたが，これらの増菌培地はそれぞれ一長一短があり，食品の種類，培養温度，培養時間などによりその選択増菌効果の異なることが知られている[1,2]．

最近，Vassiliadis ら[3]は Rappaport 培地の組成の一部を改良した，Rappaport-Vassiliadis25培地（以下 RV-25 培地と略す）および Rappaport-Vassiliadis 10培地（以下 RV-10培地と略す）を開発，従来の培地以上に選択増菌効果のすぐれていることを報告した．また Alcaide ら[4]は，多くのサルモネラがノボビオシンに耐性のことから RV-10培地にさらに，ノボビオシンを添加した培地（以下 NB-RV 培地と略す）を開発，その有用性を報告した．そこで，著者らは，これら改良ラパポート培地の有用性を知るため，その選択増菌効果につきこれまで汎用されてきた，セレナイト培地，原法ラパポート培地，塩化ストロンチウム培地（以下 ST 培地と略す）との比較の上から検討を加えた．以下その成績について報告する．

材料及び方法

1．供試菌株

当所においてふん便から分離したサルモネラ（*S. typhimurium* 84－454）および大腸菌（*E. coli* E 83221, 055：K 59）各1株を使用した．

2．食肉

食肉店舗で市販されていた鶏肉，鶏の内臓，牛および豚のひき肉等計100件を供試した．その内訳は，鶏の手羽10件，ささみ11件，手羽元10件，とり皮12件，とりもつ13件，肝12件，砂肝13件，ひき肉13件，豚ひき肉3件および牛ひき肉3件である．

3．使用培地

前培養用培地：EEM ブイヨン（栄研）を用いた．

増菌培地：セレナイト培地（日水）とラパポート培地（栄研）はそれぞれ市販品を使用した．RV－25培地および RV-10培地は Vassiliadis ら[3]の処方に従いそれぞれ自家調製した．即ち，Bacto-Tryptone（Difco）5.0g，リン酸二水素カリウム（和光）1.6g および塩化ナトリウム（大塚）8.0g を蒸留水1,000m*l* に溶解したものを基礎培地とし，RV-25培地ではこの基礎培地1,000m*l* に対し40％塩化マグネシウム水溶液（和光）100m*l* と0.4％マラカイトグリーン水溶液（和光）25m*l* を，また RV-10培地では40％塩化マグネシウム水溶液100m*l* と0.4％マラカイトグリーン水溶液10m*l* をそれぞれ加え作成した．NB-RV 培地は Alcaide ら[4]の処方に従い，RV-10培地1,000m*l* にノボビオシン（Sigma）40mg を添

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

表1．供試したサルモネラ増菌用培地の組成

組　　成	ラパポート培地	RV-25[a)] 培　地	RV-10[b)] 培　地	NB-RV[c)] 培　地	ストロンチウム[d)] 培　地
基礎培地					
Bacto tryptone	5.0g	5.0g	5.0g	5.0g	5.0g
リン酸2水素カリウム	1.6g	1.6g	1.6g	1.6g	1.0g
塩化ナトリウム	8.0g	8.0g	8.0g	8.0g	8.0g
蒸留水	1,000m*l*	1,000m*l*	1,000m*l*	1,000m*l*	1,000m*l*
40%塩化マグネシウム水溶液	100m*l*	100m*l*	100m*l*	100m*l*	—
60%塩化ストロンチウム水溶液	—	—	—	—	60m*l*
0.4%マラカイトグリーン水溶液	30m*l*	25m*l*	10m*l*	10m*l*	10m*l*
ノボビオシン	—	—	—	40mg	—

a）Rappaport-Vassiliadis 25（Vassiliadis ら1976）
b）Rappaport-Vassiliadis 10（Vassiliadis ら1676）
c）Noboviocin-Rappaport・Vassiliadis（Alcaide ら1982）
d）Strontium-chloride enrichiment broth（lveson ら1969）

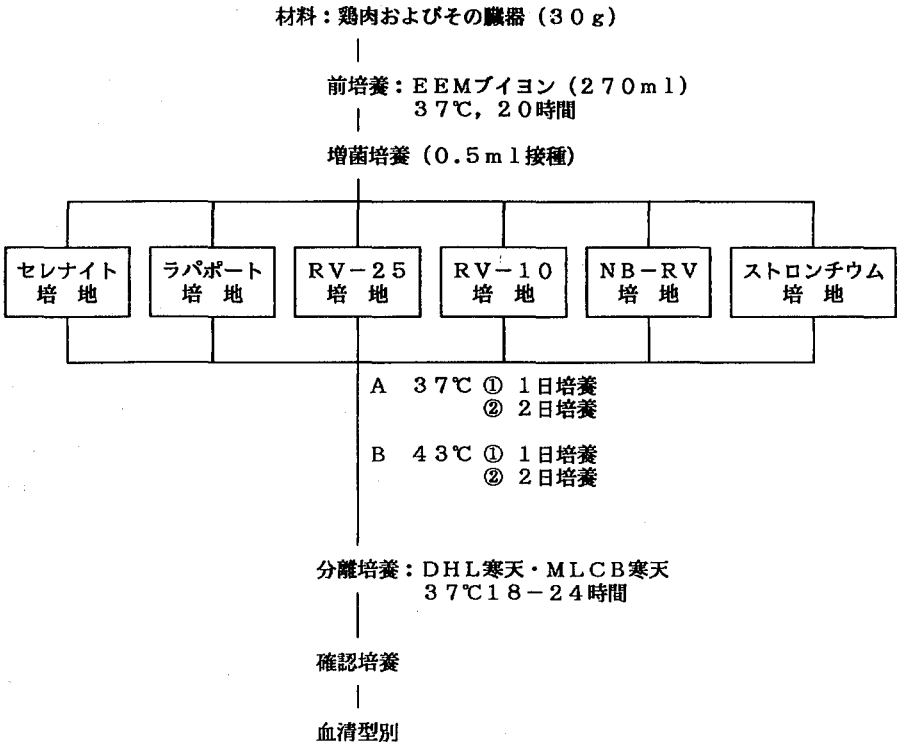


図1．実　験　方　法

加調製した．ST 培地は Iveson[5]の処方に従い，Bacto Tryptone 5.0g，リン酸二水素カリウム1.0g，塩化ナトリウム8.0g，60％塩化ストロンチウム水溶液（和光）60m*l* と0.4％マラカイトグリーン水溶液10m*l* を蒸留水1,000m*l* に加え作成した（表１），なお，RV-10培地はその後市販品（Oxoid）が入手できたので，この市販品も一部供試した．

それぞれの増菌培地は加温溶解後，10m*l* ずつ中試験管（18mm φ）に分注し使用した．

分離用培地：サルモネラの分離は DHL 寒天（日水）および MLCB 寒天（日水）の併用によった．

4．食肉からのサルモネラの検出法

食肉30g を細切し，EEM ブイヨン270m*l* とともに滅菌ポリエチレンバッグに入れ十分に混和したのち37℃，20時間前培養を行った．その0.5m*l* をそれぞれの各供試増菌培地に接種し，37℃および43℃で24時間および48時間培養後 DHL 寒天培地および MLCB 寒天培地に分離培養を行った．37℃で20時間培養後，平板上に出現した集落について常法に従いTSI 培地（日水），LIM 培地（日水）で性状を確認し，サルモネラと同定されたものについて血清型別を行った（図１）．

成　績

1．各種増菌培中におけるサルモネラの発育態度

a）サルモネラ単独培養の場合

予め普通ブイヨンで37℃，18時間純培養した *S. typhimurium* 85－454の菌液を用い，セレナイト培地，ラパポート培地，RV-25培地，RV-10培地，NB-RV 培地および ST 培地に10m*l* 当りそれぞれ1.7×10^2個，1.7×10個および1.7個になるように接種し，各増菌培地中でのサルモネラの発育に及ぼす培養温度や培養時間の影響を検討した．

表２にその成績を示すごとく，37℃培養ではラパポート培地以外の増菌培地ではいずれも少量菌接種でも１日間で充分に菌の増殖が観察された．これに対しラパポート培地では1.7個以下接種１日間培養ではサルモネラの発育が認められず，２日間培養ではじめてサルモネラの増殖が確認された．

一方43℃培養の場合，セレナイト培地，RV-10培地，NB-RV 培地の３者は37℃と同様の成績であったが，RV-25培地では1.7個で，またラパポート培地では，いずれの接種においても２日間培養でサルモネラの増殖が認められなかった．ST 培地でも１日間培養ではいずれの接種菌量でも発育が観察されなかったが，２日間培養では1.7×10個以上のところでサルモネラの増殖を認めた．

b）サルモネラと大腸菌を混合培養した場合

次に大腸菌共在時におけるサルモネラの発育態度について検討した．*E.coli* を増菌培地あたり10^6個，10^5個，10^4個および10^3個を各増菌培地にそれぞれ接種し，これに *S. typhimurium* 84－454株を1.7×10個となるように接種，37℃および43℃で培養後，大腸菌およびサルモネラの発育を観察した．

表２．各種増菌培地中でのサルモネラの発育態度

１）サルモネラを単独に接種した場合

培養温度	増菌培地	培養時間	サルモネラの接種菌量*／培地		
			1.7×10^2	1.7×10	1.7
37℃	セレナイト培地	1日	＋	＋	＋
	ラパポート培地		＋	＋	－(＋)
	ST 培地		＋	＋	＋
	RV-25 培地		＋	＋	＋
	RV-10 培地		＋	＋	＋
	NB-RV 培地		＋	＋	＋
43℃	セレナイト培地	1日	＋	＋	＋
	ラパポート培地		－(－)	－(－)	－(－)
	ST 培地		－(＋)	－(＋)	－(－)
	RV-25 培地		＋	＋	－(－)
	RV-10 培地		＋	＋	＋
	NB-RV 培地		＋	＋	＋

*使用菌株：*S. typhimurium* 84-454，＋＝サルモネラ検出（　）２日間培養の成績

表3．各種増菌培地中でのサルモネラの発育態度
2）サルモネラと大腸菌を接種した場合

培養温度	増菌培地	培養時間	大腸菌の接種菌量／培地10ml			
			10^6	10^5	10^4	10^3
37℃	セレナイト培地	1日	+	+	+	+
	ラパポート培地		−(−)	−(−)	−(−)	−(−)
	ST 培地		+*	+*	+*	+*
	RV-25 培地		−(+)	+	+	−(+)
	RV-10 培地		+	+	+	+
	NB-RV 培地		+	+	+	+
43℃	セレナイト培地	1日	+	+	+	+
	ラパポート培地		−(−)	−(−)	−(−)	−(−)
	ST 培地		+*	+	+	−(+)
	RV-25 培地		+*	+*	−(−)	−(−)
	RV-10 培地		+	+	+	+
	NB-RV 培地		+	+	+	+

供試菌株：*S. typhimurium* 84-454, *E. coli* E 83221（接種菌量は1.7×10／培地10ml）
＋＝サルモネラ検出，（ ）2日間培養の成績，
*DHL 寒天平板上に *E. coli* が優勢に発育

表4．供試各増菌培地による食肉からのサルモネラ検出数の比較

培地	培養温度	サルモネラ検出数*		
		1日間培養	2日間培養	計**
セレナイト培地	37℃	26	31	33(60.0%)
	43℃	28	27	32(58.2%)
ラパポート培地	37℃	21	15	23(41.8%)
	43℃	25	25	28(50.9%)
ST 培地	37℃	20	24	26(47.3%)
	43℃	17	17	23(41.8%)
RV-25 培地	37℃	16	9	17(30.9%)
	43℃	22	13	23(41.8%)
RV-10 培地	37℃	14	7	16(29.1%)
	43℃	21	10	21(38.1%)
NB-RV 培地	37℃	13	4	14(25.4%)
	43℃	17	16	19(34.5%)

*検査対象55件
**1日間あるいは2日間培養のいずれかで菌陽性であったものの合計

37℃培養の場合セレナイト培地，RV-10培地，およびNB−RV 培地では，大腸菌の10^6個接種においても大腸菌の発育が抑制され，サルモネラが純培養状に検出された（表3）．

ST 培地では大腸菌の発育抑制が不十分で，DHL 寒天平板上で大腸菌の発育が優勢であったが，サルモネラの分離は可能であった．これに対し，RV-25培地では大腸菌10^6個および10^3個接種時，また原法ラパポート培地ではいずれの接種時においても大腸菌だけでなくサルモネラの発育も抑制され，検出できなかった．43℃培養では

37℃の成績とほぼ同様な傾向を示し，ラパポート培地では大腸菌およびサルモネラとも発育が抑制された．RV-25培地やST培地ではサルモネラを検出しても大腸菌が優勢に発育する場合が多かった．

2．生食肉からのサルモネラ検出における各種増菌培地の増菌効果

表4に市販鶏肉，とり皮，とり臓器等計55件を対象に実施した各供試増菌培地別のサルモネラ検出成績を示した．増菌培地別にみたサルモネラの検出率は，セレナイト培地が最も高く，ついで原法ラパポート培地，ST培地の順であり，改良ラパポート培地であるRV-25培地，RV-10培地とNB-RV培地ではいずれも前3者に比べその検出率は低率に止まった．

培養温度，培養時間との関係からサルモネラの検出率をみると，セレナイト培地は検討したいずれの培養条件でも安定した結果が得られたが，なかでも37℃，2日間培養が最も高率であった．これに対し，原法ラパポート培地では43℃，1－2日間培養，ST培地では37℃2日間培養がよく，また変法ラパポート培地ではいずれも43℃1日間培養が秀れている結果であった．

3．市販RV-10培地（Oxoid）のサルモネラ増菌効果

表5に食肉等45件を対象に実施した市販RV-10培地とセレナイト培地からのサルモネラ検出状況を示す．

表から明らかなように，RV-10培地のサルモネラ検出数は計31件で，対象として用いたセレナイト培地のそれ（32件）と大差ない成績であった．ただ，本実験で検討した培養温度と前培養液からの増菌培地への接種量の点からみると，両培地間にかなりの違いがみられた．すなわち，RV-10培地での検出率は，培養温度が，37℃よりも43℃で，特に接種量0.5m*l* の場合に高率であった．他の条件下の培養はいずれもその検出率は低率に止まった．これに対しセレナイト培地の場合は，培養温度による差がなかったが，接種量ではRV-10培地と逆に0.05m*l* のときが最も高率で接種量の増加するにしたがい検出率は反対に低下する結果であった．

考　察

食品からのサルモネラ検索には，非選択培地で前培養し，ついで選択性のある増菌培地で培養する2段階の増菌培養法がよいとされ，これまで欧米では緩衝ペプトン水とテトラチオン酸塩培地，また我国ではEEMブイヨンとセレナイト培地あるいはラパポート培地の組合せによる培養法がひろく推奨されてきた．

しかし，最近Vassiliadisら[3]やAlcaideら[4]は，これら従来の培養法に変わる新しいサルモネラ検出法として，

表5．RV-10培地（市販）とセレナイト培地による食肉からのサルモネラ検出比較

増菌培地	培養温度	前培養液からの接種量	サルモネラ検出数*
RV-10培地	37℃	0.05m*l*	15
		0.1 m*l*	7
		0.5 m*l*	6
		計	16(35.5%)
	43℃	0.05m*l*	6
		0.1 m*l*	12
		0.5 m*l*	29
		計	31(68.8%)
セレナイト培地	37℃	0.05m*l*	29
		0.1 m*l*	20
		0.5 m*l*	8
		計	31(68.8%)
	43℃	0.05m*l*	31
		0.1m*l*	25
		0.5m*l*	8
		計	32(71.1%)

*検査対象45件

**接種条件のいずれかで菌陽性であったものの合計

緩衝ペプトン水とラパポート培地を改良したRV-25培地，RV-10培地あるいはNB-RV培地による培養法のすぐれていることを報告した．

著者らはこれら新たに開発された改良ラパポート培地のサルモネラ増菌効果を知る目的で，今回純培養菌と実際の食肉を対象に検討した結果，既述のように少なくとも純培養菌を用いた場合には，それらの性能は既存のセレナイト培地などに遜色なく，大腸菌に対する抑制効果も充分あることが確認された．しかし，実際の食肉からのサルモネラ検出に応用した成績では，いずれの改良ラパポート培地とも，これまでに報告されていると同様37℃に比し43℃培養での増菌効果の高いことが示されたものの，検出率の点からみると市販のRV-10培地を除いて既存の培地以上にすぐれているものは認められなかった．

選択増菌培地におけるサルモネラの増菌効果は食品中に共在する競合細菌と密接に関係して培養温度や時間だけでなく，前培養液からの増菌培地への接種量の影響も大きいとされている．著者らの今回の検討では，この接種量を市販RV-10培地を除いてはいずれもVassiliadisら[6]の0.1m*l*にたいして0.5m*l*を用いており，この前培養液の接種量の違いが今回低率に止まった検出成績に影響を及ぼした可能性も否定できない．しかし，市販RV-10培地での接種量の検討では，0.5m*l*接種，43℃培養でサルモネラ検出率が最もよい結果であり，その点からみると，接種量よりもむしろ供試した食肉材料そのものの違いや，また増菌培養後に用いた分離用培地の違いなど他の要因による影響が大きかったと思われる．

今回供試した市販のRV-10培地は，既存のセレナイト培地と比較しても十分実用性の高いことが確認された．この市販培地は原法のRV-10培地のペプトンをTryptoneからSoy peptoneに代えただけのものであるが，食肉からのサルモネラの検出率はTryptoneを用いた原法培地に比して数段すぐれているものであった．このことは既にMcGibbonら[7]も報告しているように，サルモネラの増菌にはペプトンの種類も重要であることをよく支持するものであり，そのことが今回の検出成績にもよく反映されたものと言えよう．

結　論

改良ラパポート培地としてその有用性が報告されたRV-25培地RV-10培地及びNB-RV培地を評価する目的で，そのサルモネラ増菌効果を既存のセレナイト培地，ST培地を対象に検討した．

改良ラパポート培地は，純培養菌を用いた場合はいずれも既存の増菌培地と変わらない性能を持つものであったが，食肉からのサルモネラ検出に応用した場合は，検討したいずれの培養条件下でも，既存の増菌培地に比べすぐれていることを示す成績は得られなかった．

RV-10培地については市販品につき，食肉を対象に前培養液の接種量の影響も加味して検討した結果，接種量による検出率に差は認められるものの，全体としては既存の培地と同等の性能を有するものであり，十分実用性があるものと結論された．

文　献

1）Poelma, P. L., Andrews, W. H. and Silliker, J. H.：Salmonella, *In* Speck, M. L.（ed）, *Compedium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 2nd ed., 286-319, 1984, American Public Health Association, Washington, D. C.

2）Vassiliadis, P., Mavrommati, Ch., Kalapothaki, V., Chronas, G. and Efstratiou, M.：*J. Hyg.*, **95**, 139-147, 1985.

3）Vassiliadis, P., Pateraki, E., Papaiconomou, N., Paradakis, J. A. and Trichopoilos, D.：*Annales de Microbiologie*, **127** B, 195-200, 1976.

4）Alcaide, E., Martinez-Germes, J. P. and Garay E.：*J.Appl. Bacteriol.*, **53**, 143-146, 1982.

5）Iveson, J. B. and Mackay-Scollay, E. M.：*J. Hyg.*, **67**, 457-464, 1969.

6）Vassiliadis, P., Trichopoulos, D., Papoutsakis, G. and Pallandiou, E.：*J. Appl. Bacteriol* **46**, 567-569, 1979.

7）McGibbon, L., Quqil, E. and Fricker, C. R.：*Int. J. Food Microbiol.*, **1**, 171-177, 1984.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 145-149, 1987

各種食品取り扱い者からの黄色ブドウ球菌の検出状況および分離菌株のコアグラーゼ型とエンテロトキシン産生性

入倉善久*, 池島伸至*, 平田一郎*, 新井輝義*,
楠くみ子*, 神真知子*, 太田建爾*

The Incidence of *Staphylococcus aureus* in Food Handlers, and Coagulase Type and Enterotoxin Producibility of the Isolates

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

Keywords：黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*, コアグラーゼ型 coagulase type, エンテロトキシン enterotoxin, 食中毒 food poisoning, 食品取り扱い者 food handler.

緒　言

ブドウ球菌は細菌性食中毒の起因菌として，腸炎ビブリオについで重要であり，本菌に起因する食中毒は，例年細菌性食中毒の約30％を占めている．また各種食品の細菌学的検査においても，検出頻度の高い病原細菌の一つであり，食品衛生上重要な細菌として注目されている．

本菌食中毒の予防には，各種食品における本菌の汚染実態を把握することは勿論，それら食品の製造流通過程に直接携わっている人々における本菌の保菌実態も把握しておくことが肝要であろう．

これまで，健康人を対象とした本菌の保菌状況についての報告[1-3]は散見されるが，食品取り扱い者を業種別に調査した報告はほとんど見られない．そこで我々は，黄色ブドウ球菌（以下黄色ブ菌と略す）食中毒予防の一環として，食品取り扱い者の本菌保菌状況を業種別に調査するとともに，本菌食中毒との関連性を知るために，分離した菌株のコアグラーゼ型（以下コ型と略す）およびエンテロトキシン（以下 ent と略す）産生性を検討したので報告する．

材料と方法

1）調査対象

調査期間は1985年7月から1986年7月までの約1年間である．調査対象は，東京都立川保健所管内における学校給食施設従事者325名，弁当そう菜調理人103名，すし調理人197名，食肉販売業者269名，生鮮魚介類販売業者136名，和菓子製造業者156名，洋生菓子製造業者124名，豆腐製造業者104名の合計1,414名である．調査時点で鼻前庭あるいは手指のいずれかに化膿巣や皮膚創傷を持つものはその対象から除外した．

2）分離方法

調査部位は鼻前庭および同一人の手指であり，各々スワブを採取して検査材料とした．鼻前庭は滅菌綿棒でふきとり，手指は生理食塩水をふくませた滅菌ガーゼでふきとったものである．その各々を3％卵黄加マンニット食塩培地に直接塗抹し，37℃48時間培養後，マンニット分解性及び卵黄反応陽性の集落を釣菌し確認試験を行い，そのうち D Nase およびコアグラーゼ陽性のものを黄色ブ菌とし，陽性者1名より1株を選び以下の試験に供した．

3）コアグラーゼ型別試験

分離した黄色ブ菌を，BHI broth（Difco）5 m*l*に接種し，37℃で3日間培養後，3,000rpm，15分間遠心分離し，その上清を試料とし，デンカ生研製の型別血清により，潮田ら[4]の方法に準じて型別を行った．

4）エンテロトキシン産生性および型別試験

分離した黄色ブ菌を，BHI broth（Difco）5 m*l*に接種して，37℃で2日間振とう培養（120回/分）後，3,000rpm，15分間遠心分離した上清を，さらに10,000rpm，20分間遠沈して，その上清を ent 産生性および型別試験の試料とした．ent 産生性および型別試験

*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．業種別食品取り扱い者の鼻前庭からの黄色ブドウ球菌検出

業種	被検者数	陽性者数	検出率(%)
弁当そう菜調理人	103	34	33.0
学校給食施設従事者	325	84	25.8
洋生菓子製造業者	124	32	25.8
すし調理人	197	46	22.8
食肉販売業者	269	51	19.0
豆腐製造業者	104	16	15.4
生鮮魚介類販売業者	136	20	14.7
和菓子製造業者	156	17	10.9
計	1,414	300	21.1

表2．業種別食品取り扱い者の手指からの黄色ブドウ球菌検出

業種	被検者数	陽性者数	検出率(%)
弁当そう菜調理人	103	20	19.4
学校給食施設従事者	325	42	12.9
洋生菓子製造業者	124	17	13.7
すし調理人	197	39	19.7
食肉販売業者	269	54	20.0
豆腐製造業者	104	16	15.4
生鮮魚介類販売業者	136	48	35.3
和菓子製造業者	156	6	3.8
計	1,414	242	17.1

は，試料の1,000倍希釈液を用いて，新垣ら[5]のRPLA法（デンカ生研製キット）により行った．

成　績

1）鼻前庭および手指からの黄色ブドウ球菌検出成績

鼻前庭からの黄色ブドウ菌の検出率を表1に示した．

鼻前庭スワブ1,414検体中，300検体より黄色ブドウ菌が検出され，その検出率は21.1%であった．これを業種別にみると，弁当そう菜調理人で，33.0%と最も高い検出率を示した．次いで学校給食施設従事者（25.8%），洋生菓子製造業者（25.8%），すし調理人（22.8%），食肉販売業者（19.0%），豆腐製造業者（15.4%），生鮮魚介類販売業者（14.7%），和菓子製造業者（10.9%）の順であった．

次に手指からの検出率をみると，表2に示すごとく，1,414検体中，黄色ブドウ菌が検出されたものは242検体（17.1%）で，鼻前庭よりやや低い検出率であった．業種別には前述の鼻前庭と異なり，生鮮魚介類販売業者の保菌が35.3%と最も高く，次いで食肉販売業者（20.0%），すし調理人（19.7%），弁当そう菜調理人（19.4%），豆腐製造業者（15.4%），洋生菓子製造業者（13.7%），学校給食施設従事者（12.9%），和菓子製造業者（3.8%）であった．

2）コアグラーゼ型別

分離した黄色ブドウ菌のコ型別の成績を表3に示した．鼻前庭由来黄色ブドウ菌のコ型は，供試した300株のうち131株（43.6%）がⅦ型で最も多く，次いでⅢ型97株（32.3%），Ⅱ型31株（10.3%），Ⅰ型13株（4.3%），Ⅴ型11株（3.6%），Ⅳ型8株（2.6%）Ⅵ型7株（2.3%），Ⅷ型2株（0.6%）の順であった．

手指由来の黄色ブドウ菌も表3に示すように，前述の鼻前庭由来黄色ブドウ菌とほとんど同様の傾向を示した．Ⅶ型が109株（45.0%）と最も多く，Ⅲ型86株（35.5%），Ⅱ型32株（13.2%），Ⅵ型5株（2.1%），Ⅰ，ⅣおよびⅤ型がそれぞれ3株（1.2%），Ⅷ型1株（0.4%）であった．

3）エンテロトキシン産生性およびその型別

分離した黄色ブドウ菌のent産生性およびその型別成績を表4に示した．鼻前庭由来黄色ブドウ菌のent産生株は，供試300株中195株（65.0%）であり，そのent型は，entAが80株（26.7%）と最も多く，次いでentA＋B 41株（13.7%），entB 29株（9.7%），entC 21株（7.0%），

表3．鼻前庭および手指由来黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型

由来	供試菌株数	コアグラーゼ型別菌株数(%)							
		Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ	Ⅶ	Ⅷ
鼻前庭	300	13	31	97	8	11	7	131	2
	(100.0)	(4.3)	(10.3)	(32.3)	(2.6)	(3.6)	(2.3)	(43.6)	(0.6)
手指	242	3	32	86	3	3	5	109	1
	(100.0)	(1.2)	(13.2)	(35.5)	(1.2)	(1.2)	(2.1)	(45.0)	(0.4)
計	542	16	63	183	11	14	12	240	3
	(100.0)	(2.9)	(11.6)	(33.8)	(2.0)	(2.6)	(2.2)	(44.3)	(0.5)

表4．鼻前庭および手指由来黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン産生

由来	供試菌株数	産生菌株数	エンテロトキシン型別菌株数(%)								非産生菌株数
			A	B	C	D	A＋B	A＋C	A+B+C	A＋D	
鼻前庭	300	195	80	29	21	0	41	16	6	2	105
	(100.0)	(65.0)	(26.7)	(9.7)	(7.0)	(0.0)	(13.7)	(5.3)	(2.0)	(0.7)	(35.0)
手指	242	145	71	21	12	1	27	9	4	0	97
	(100.0)	(59.9)	(29.3)	(8.4)	(4.9)	(0.4)	(11.1)	(3.7)	(1.6)	(0.0)	(40.1)
計	542	340	151	50	33	1	68	25	10	2	202
	(100.0)	(62.7)	(27.8)	(9.2)	(6.1)	(0.2)	(12.5)	(4.6)	(1.8)	(0.4)	(37.3)

表5．鼻前庭由来黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型とエンテロトキシン型

エンテロトキシン型	コアグラーゼ型別菌株数								計
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
A	6	9	30	2	2	3	27	1	80
B	—	4	10	—	—	—	15	—	29
C	—	1	6	1	—	—	12	1	21
D	—	—	—	—	—	—	—	—	0
A＋B	2	8	6	3	—	1	21	—	41
A＋C	—	1	4	—	—	1	10	—	16
A＋B＋C	—	1	—	—	—	—	5	—	6
A＋D	—	1	1	—	—	—	—	—	2
非産生	5	6	40	2	9	2	41	—	105
計	13	31	97	8	11	7	131	2	300

entA＋C 16株（5.3%），entA＋B＋C 6株（2.0%），entA＋D 2株（0.7%）であった．

手指由来黄色ブ菌は，242株中145株（59.9%）がent産生株であり，そのent型は，前述の鼻前庭由来株の場合とほとんど同じ傾向であり，entA 71株，entA＋B 27株，entB 21株，entC 12株，entA＋C 9株，entA＋B＋C 4株，entD 1株であった．

4）コアグラーゼ型とエンテロトキシン型

鼻前庭由来黄色ブ菌のコ型とent型の関係を表5に示した．分離菌株中，最も多く認められた，コVII型菌131株では，90株（68.7%）がent産生性を示し，そのent型は，entA 27株，entA＋B 21株，entB 15株，entC 12株，entA＋C 10株，entA＋B＋C 5株であった．コIII型菌では，97株中57株（58.8%）がent産生株で，VII型菌と同様にentAが30株と最も多く，以下entB 10株，entCおよびentA＋Bがそれぞれ6株，entA＋C 4株，entA＋D 1株であった．II型菌は，25株（80.6%）がent産生株であり，entA 9株，entA＋B 8株，entB 4株，entC，A＋C，A＋B＋C及びA＋Dがそれぞれ1株ずつあった．またVI型菌では，7株中5株がentを産生し，そのent型はA，A＋B，A＋Cであった．

表6に手指由来黄色ブ菌のコ型とent型の関係を示した．コVII型菌は109株のうち73株（66.9%）がent産生性を示し，III型菌では86株中39株（45.3%），II型菌では31株中22株（68.7%），VI型菌5株中4株がent産生株であった．そのent型は，いずれのコ型においても，前述の鼻前庭由来株とほとんど同様な成績であった．

考　察

我が国の細菌性食中毒のなかで，腸炎ビブリオ食中毒に次いで多いブドウ球菌食中毒は，毎年200件前後の集団発生事例が認められている．

一方，本食中毒の起因菌である黄色ブ菌は，ヒトや動物をはじめとして自然界に広く分布しており，本菌の食品への汚染防止は，食中毒予防上重要な課題である．

我々は，本菌食中毒予防の一環として，8業種，1,414名の食品取り扱い者を対象に，本菌の保菌状況を

表6．手指由来黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型とエンテロトキシン型

エンテロトキシン型	コアグラーゼ型別菌株数								計
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ	Ⅶ	Ⅷ	
A	3	11	16	1	1	1	37	1	71
B	—	5	8	—	—	1	7	—	21
C	—	1	—	—	—	2	9	—	12
D	—	—	1	—	—	—	—	—	1
A＋B	1	4	10	—	—	—	12	—	27
A＋C	—	1	4	—	—	—	4	—	9
A＋B＋C	—	—	—	—	—	—	4	—	4
A＋D	—	—	—	—	—	—	—	—	0
非　産　生	—	9	47	2	2	1	36	—	97
計	4	31	86	3	3	5	109	1	242

調査した．その結果，全体的に見ると，黄色ブ菌の検出率は，鼻前庭で21.1%，手指では17.1%であり，健康人を対象とした菊地ら[6]，善養寺，寺山ら[1,7,8]の報告とほとんど同様の成績であった．

業種別にみると，鼻前庭では弁当・そう菜調理人の検出率が33.0%と最も高率で，残りの7業種では10.9%～25.8%の間に分布していた．これに対して，手指では生鮮魚介類販売業者の35.3%を最高に3.8%～35.3%の間に分布していた．また，各業種について検査部位別の黄色ブ菌検出状況をみると，弁当・そう菜調理人，豆腐製造業者，洋生菓子製造業者等，主に加熱処理食品を扱う業種では鼻前庭から，生鮮魚介類販売業者および食肉販売業者等のように生ものを直接取り扱う業種では，手指から黄色ブ菌が高率に検出された．

これまでに，食品取り扱い者を業種別に調査した報告は見られないが，本調査結果から，業種により黄色ブ菌の検出率にバラツキがあること，また，加熱処理食品を取り扱う業種では，鼻前庭で優位に検出され，生ものを取り扱う業種では，手指の汚染度が高いことが示された．

1983年～1985年に東京都内で発生した本菌食中毒の原因食品は，にぎりめし，仕出し弁当，いなりずし，サンドイッチなどであり，数年前までは原因食品として比較的多かった洋菓子，和菓子は大幅に減少している．最近におけるブドウ球菌食中毒の原因食品と本調査の成績を照らし合わせて，本菌食中毒との係わりを考察してみると，業種別の検出率が密接に関連していることが推察される．すなわち，弁当・そう菜調理人から黄色ブ菌が高率に検出され，逆に和菓子製造業者からの検出が低率であったことは，最近発生しているブドウ球菌食中毒の原因食品における黄色ブ菌の汚染源の一因として，食品取り扱い者が関連したものであることといえよう．また，生鮮魚介類販売業者の手指が高率に汚染されているにもかかわらず，生鮮魚介類による本菌食中毒事例がみられないのは，それらの食品が低温で保存されなくてはならない性質のものであるため，本菌の増殖機会がないことによるものと推察される．

ブドウ球菌食中毒の起因菌とコ型の関係は，善養寺ら[1,9]の疫学調査等ですでに明らかにされており，Ⅱ，Ⅲ，ⅥおよびⅦ型に限られており，まれにⅣ，Ⅴ型による食中毒事例が報告されている[10,11]．近年の東京都内で発生したブドウ球菌食中毒でも，この4コ型しかみられず，さらにそのなかでもⅡ，Ⅲ，Ⅶ型による事例が90%以上となっている．特にⅦ型による事例は60%を占めている．

著者らが今回分離した黄色ブ菌は，業種別および由来別に関係なく，Ⅰ～Ⅷ型までのすべてのコ型菌が認められた．しかし，そのうちⅦ型が44%と最も多く，これにⅡ，ⅢおよびⅥ型を加えると90%以上であり，食品取り扱い者は食中毒事例の起因菌と同じコ型の黄色ブ菌を高率に保菌していた．

本菌食中毒の重要な病原因子であるentは，現在A～Eの5型が認められており，食中毒由来株では，entA産生菌が60～80%を占めている．これに対し，寺山らは食中毒に関係ない材料由来株では，約64%菌株がentを産生し，entC（33%），entA（28%）およびentD（15%）の3ent型が多く認められたと報告している[8]．著者らの成績では，供試542株中300株（63%）がent産生性を示し，そのent型は複合型も含めてentAが47%と多く，次いでentBが23%，entCが12%，entDはわずかに0.1%であり，寺山ら[8]の成績に比してentCおよび

Dの産生菌が少ない傾向にあった．なお，コ型とent産生性およびent型との間には何んら関連性は認められなかった．

今回の調査で，食品取り扱い者はいずれの業種でも，ブドウ球菌食中毒事例の起因菌と同じコ型およびent型の黄色ブ菌を保菌していることが明らかとなった．今後の本菌食中毒予防対策のひとつとして，食品取り扱い者への衛生教育を徹底させ，自らが汚染源となる可能性の高いことを認識させる必要があろう．

結　論

1985年7月より1986年7月の間に，業種別の食品取り扱い者の鼻前庭および手指を対象として，黄色ブ菌の保菌状況を調査し以下の結果を得た．

1．鼻前庭からの黄色ブ菌検出率は平均21.1%で，業種別にみると弁当そう菜調理人が高率（33.0%）であったのに対し，和菓子製造業者は10.9%と低かった．

2．手指からの黄色ブ菌検出率は平均17.1%で，特に生鮮魚介類販売業者からの検出率が35.3%と高率であった．

3．検出された黄色ブ菌のコ型は，Ⅰ～Ⅷ型までのすべての型が認められ，そのうち食中毒関連のⅦ型は44.3%，Ⅲ型は33.8%，Ⅱ型は11.6%，Ⅵ型は2.2%であった．

4．検出された黄色ブ菌のent産生性は，61.5%の菌株に認められ，そのent型は複合型も含めてAが47%，Bが23%，Cが12%，Dが0.1%であった．

謝　辞　本研究にあたり試料を賜った立川保健所衛生課の諸氏に深謝します．

文　献

1）善養寺浩，寺山　武，潮田　弘，五十嵐英夫，丸山努，食衛誌，12，6，501-505，1971.
2）高野　修，和田安郎，板垣憲吉，矢島日男，鈴木政行，小島照郎，阿部克巳；食品衛生研究，32，1，47-57，1982.
3）寺山　武；食衛誌，18，2，142-148，1977.
4）潮田　弘，寺山　武；臨床検査，23，8，779-784，1979.
5）新垣正夫，五十嵐英夫，藤川　浩，潮田　弘，寺山武，坂井千三；都衛研年報，32，128-131，1981.
6）菊地公明，清水利雄，園田忠雄；防衛衛生，10，245，1963.
7）善養寺浩，寺山　武，潮田　弘，五十嵐英夫，丸山努，坂井千三；食衛誌，12，4，311-314，1971.
8）寺山　武，五十嵐英夫，潮田　弘，善養寺浩；食衛誌，13，6，549-554，1972.
9）善養寺浩，寺山　武；モダンメディア，13，39-47，1967.
10）品川邦汎，中原正良，国田信治；公衛研所報，食品衛生編，6，13-16，1972.
11）吉田幸紀，品川邦汎；日本公衛誌，28，10，462，1981.
12）Wienke, A. A.; J. Hyg., Camb., 73, 255-262, 1974.
13）Casman, E. P., Bennett. R. W., Dorsey, A. E., Issa, J. A.; J. Bacteriol., 94, 1875-1882, 1967.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 150-154, 1987

Trace Analysis of Volatile N-Nitrosamines in Human Milk

KAZUKO MIZUISHI*, MASAHIRO TAKEUCHI*, HIDEO YAMANOBE*,
YOHYA WATANABE*, YOHKO UNUMA** and YASUO YAMANASHI**

A survey of volatile N-nitrosoamines (NAS) in human milk obtained from women living in Tokyo was casrried out. The samples were distilled under an alkaline condition, then NAs were extracted with dichloromethane from the distillate. The extract was concentrated with a Kuderna-Danish evaporator in a water bath at 70℃ under atmospheric pressure. The concentrate was submitted to gas chromatography with a thermal energy analyzer for the determination of volatile NAs. The recovery efficiency and the coefficient of variation for N-nitrosodimethylamine (NDMA), which was the only NA detected in human milk, were 97.1 and 2.0%, respectively. From 82.1% of 67 samples offered by women living in Tokyo area, NDMA was found in the range from trace to 1.8 ng/g. The daily change of NDMA level was confirmed by the mesurment of daily samples from a same woman. It was suggested that NAs in human milk varied by the influence of daily lives of individuals.

Keywords : N-nitrosamines, N-nitrosodimethylamine, human milk, thermal energy analyzer, gas chromatography

Introduction

Among many carcinogenic compounds, have been placed great importance on N-nitrosamines (NAs), since they have potent carcinogenic property and are so wide spread in the human environment. They have been found in many different foods[1], and can be formed endogenously from ordinary dietary components. Amines or amides are the precursors of NAs, which are frequently present as the constituents of foods and/or metabolites of organisms, and nitrite is another precursor, which is easily formed from nitrate contained in foods.[2,3,4] These compounds and their reaction products, NAs, have been detected in human blood,[5,6] urine[7] and faces.[8] It may be possible that the ingested or in vivo formed NAs in blood can translocated into human milk.

Recently, Lakritz et al.[9] reported that more than 0.2ng/g of N-nitorosodimethyamine (NDMA) was detected from 23.5% of human milk examined. This paper are reporting the content of volatile NAs in human milk offered by women living in Tokyo.

Experimental

Materials. N-nitrosodimethylamine (NDMA) and N-nitrosodiethylamine (NDEA) were obtained from Tokyo Kasei Co., Ltd. (Tokyo), and N-nitrosodipropylamine (NDPA) from Kanto Chemical Co., Ltd. (Tokyo). All other chemicals were of analytical reagent grade.

Instrumental. Determination was performed by a Shimadzu gas chromatograph Model GC-6A (Shimadzu, Kyoto) equipped with a Thermal Energy Analyzer Model TEA-502 (Thermo Electron Corp., U.S.A). Chromatographic conditions used were as follows ; column, a 2.6m ×3.2mm I. D. glass column packed with 10% PEG-20M +5% KOH on 100-200 mesh Chromosorb W HP ; column temp., 170℃ ; injection port temp., 200℃ ; argon gas flow rate, 50ml/min.

Samples. Sixty seven human milk samples were obtained from 25-39 years nursing women living in Tokyo from April in 1984 to March in 1985. These samples consist of 33 fore milk (colostrum) of 1-7 days post partum, 28 mature milk of more than 2 weeks post partum (25 samples ; 25-38 days, and 3 samples ; 3-10

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

months) and 6 intermidiary milk of 8 days-2 weeks post partum. All samples were stored at −25℃.

Procedure. Volatile NAs in human milk were analyzed by a modified method of Lakritz and Pensabene's.[9] The sample (15-30g) was weighed in a round-bottom flask. To the flask an internal standard (1.0m*l* of 0.2 μg/m*l* NDPA), 50m*l* of 5N NaOH aq., 8g of $Ba(OH)_2$ aq. and 25m*l* of water were added, followed by the distillation of NAs. To the distillate was added 15g of NaCl, and then extracted three times with each 100m*l* of dichloromethane. The combined extract washed with 100m*l* of 2% NaCl aq., was dehydrated by passage through a funnel packed with 10g of anhydrous Na_2SO_4. To the extract 2m*l* of ethylalcohol and several grains of carborandam (#16) were added, and the extract was concentrated to ca. 5m*l* with a Kuderna-Danish (K-D) evaporator in a water bath at 70℃ under atomospheric pressure. The concentrate tube was detached from the K-D evaporator and attached directly to a Snyder column (3 bulbs), then the solution was further cencentrated to 1 m*l* in a water bath 50-55℃ under atmospheric pressure. NAs were determined by gas-liquid chromatography with a Thermal Energy Analyzer.

Results

Recovery. The recovery efficiency of NDMA from human milk was measured using 20g of human milk spiked a known amount of NDMA (0.1ppm, 1m*l*). Determination of NAs was performed by the internal standard method in which NDPA (0.2ppm, 1m*l*) could be utilized as the internal standard because of the absence in human milk. The mean recovery and the coefficient of variation of NDMA in 5 runs repeated were 97.1 and 2.0%, respectively.

Detection limit. The minimum detectable level of NDMA in human milk (by the NAPA internal standard method) was approximately 0.1ng/g when 8 μ*l* of a sample solution was injected into the gas chromatograph. The chromatograms of NDMA, NDEA and NDPA were shown in Fig. 1. The calibration curve of NDMA was linear in the range from 0-1.2ng.

Confirmation. The level of NDMA in human milk was not so high as the identification by mass spectorometry could be carried out. Therefore, the confirmation of NDMA detected in sampies was performed by ultraviolet photolysis at 254nm for 10-60 min.[10]

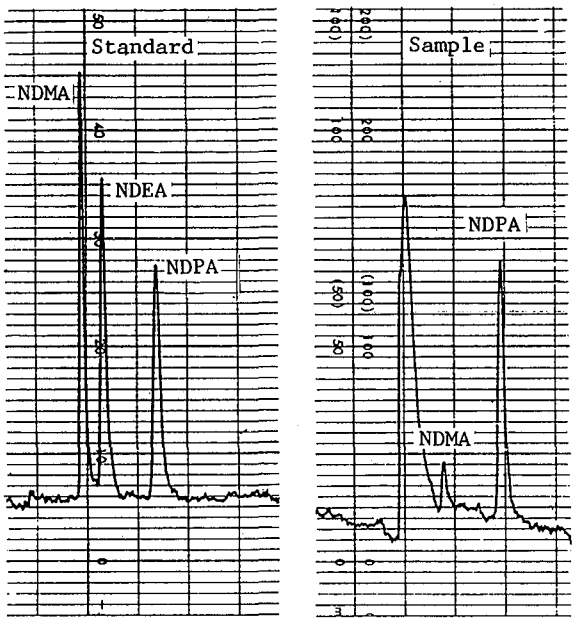


Fig. 1. TEA-GC Chromatograms of Volatile N-Nitrosamines in Human Milk
Column : 10%PEG-20M+5%KOH/Chromosorb W HP (100-120mesh) 2.6m×3.2mm i.d., 170℃
Detector : Thermal Energy Analyzer Model 502
NDMA : N-Nitrosodimethylamine
NDEA : N-Nitrosodiethylamine
NDPA : N-Nitrosodipropylamine (Internal Standard)

Artefact formation. It seemed to be possible that NAs were being formed during the storage and/or the analytical procedure of samples. Therefore, the artefact formation of NAs in the storage process and the analytical process of samples was examined.

Six samples were stored in a refrigerator at 4℃ or at-25℃ for 10 or 20 days with or without ascorbic acid (0.5mg) which reduces the formation of NAs. To a sample, moreover, 1g of dimethylamine (DMA) was added in order to ascertain whether the formation of NDMA occured during analysis or not.

As shown in Table 1, the artefact formation was not observed. The content of NAs (actually only NDMA) in the samples stored at −25℃ (A-C) and at 4℃ (D-F) were almost same as those of untreated controls, no effect of ascorbic acid added to samples was observed,

Table 1. Comparison of NDMA in Samples before and after Storage under Various Conditions

Sample	NDMA Concentration		Condition
	I	II	
A	0.40*	0.39*	10days, −25℃, added V.C
B	0.21	0.24	20days, −25℃, added V.C
C	0.24	0.22	10days, −25℃
D	0.40	0.40	10days, 0℃, added V.C
E	0.61	0.55	10days, 0℃
F	0.40	0.39	20days, 0℃
G	0.29	0.29	added dimethylamine (1ppm, 1ml)

*ng/g

Sample A-F (stored for 10-20days at 0℃ or −25℃)

I : before storage

II : after storage

A, B, D were added ascorbic acid (V.C.), 50mg.

Sample G (added dimethylamine and analyzed for NDMA)

I : before addition

II : after addition

Table 2. NDMA Content in Human Milk

Range	No. of Samples	cf.*
below 0.1	12(17.9)	(68.6)
0.1 - 0.2	2(3.0)	(7.8)
0.2 - 0.3	11(16.4)	(9.8)
0.3 - 0.4	10(14.9)	(5.9)
0.4 - 0.6	17(25.4)	(3.9)
0.6 - 1.0	9(13.4)	(2.0)
1.0 -	6(8.9)	(2.0)
(ng/g)	n =67, (%)	n =51, (%)

*from L.Lakritz,'s data

and no artefactory NDMA was detected in the spiking sample (G) of DMA. From these results, it was revealed that no artefact formation occurred during the storage and the analytical procedure of human milk.

Content of NAs in human milk. Table 2 shows the level of volatile NAs found in human milk samples. Only NDMA was detected in 82.1% of the 67 samples at the level ranging from trace to 1.8 ng/ml. NDEA was less than the detection limit (0.2ng/g).

The presence of NDMA in human milk was reported previously by Lakritz et al.[9] They have described that NDMA had not been detected (<0.1 ng/g) in 68.6% of total 51 samples analyzed, more than 0.2 ng/g had been found in the 23.6% samples, and the maximum of NDMA had been 1.1 ng/g.

The level of NDMA in this survey was seemed to be slightly higher than that reported by them.[9] NDMA was not detected (<0.1ng/g) in the 17.9% samples and more than 0.2ng/g was detected in the 79.1% samples. The most samples were there in the level of 0.4-0.6ng/g (25.4%).

Yamamoto et al.[6] have reported about NAs content in blood of Japanese that NDMA had been detected from all samples, 32 blood samples from eight donor, in the range from trace to 1.3ng/g. Their results also has showed that the level of NDMA in blood of Japanese was higher than that of U. S. A. reported by Fine et al.[5] (the maximum level : 0.8ng/g). They discussed that the high level of NAs had been related to the daily intake of Japanese diet containing high content of nitrate and secondary amines.

It was also reported that the level of NDMA in blood or human milk was not directly and significantly altered by ingestion of a high nitrate-nitrite diet.[9] However, it is possible to consider that the long term dietary habit of Japanese causes the high level of NDMA in human milk.

Table 3 shows the content of NDMA in the samples of fore milk and mature milk. NDMA content in fore milk (I) ranged from non detectable (6 samples, 18.2%) to 1.8ng/g, and the average and the standard

Table 3. Frequency in Each Range of NDMA Content in Fore Milk and Mature Milk

NDMA Content (ng/g)	Number of Sample		
	I	II	III
below 0.1	6	2	4
0.1 - 0.2	1	1	
0.2 - 0.3	6		5
0.3 - 0.4	3	1	6
0.4 - 0.6	5	2	10
0.6 - 1.0	6		3
1.0 -	6		
Min. - Max.	ND - 1.8		ND - 0.7
x	0.50		0.33
SD	0.46		0.19 (ng/g)

I ; 3-7 day (Fore Milk), II ; 8-14 days
III ; after 2 weeks (Mature Milk)

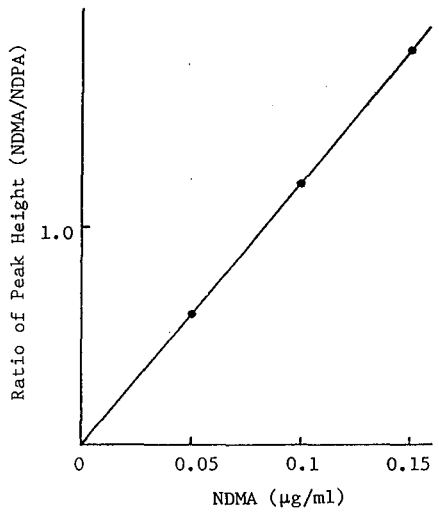


Fig. 2. Calibration Curve of NDMA

deviation were 0.50 and 0.46 ug/g, respectively. The content of NDMA in mature milk (III) ranged from non detectable (4 samples, 16%) to 0.7 ng/g, and the average and the standard deviation were 0.33 and 0.19 ng/g, respectively. The maximum and the average content of NDMA for fore milk samples were both higher than those for mature milk samples.

In comparison of NDMA content of fore and mature milk collected from 7 women, however, the values for mature milk were higher than those for fore milk, as the sample 1, 3 and 5 shown in Table 4. These indicated

Table 4. Content of NDMA in Fore Milk and Mature Milk from 7 Women

Sample	Content(ng/g)	
	I	II
1	0.2	0.4
2	0.5	0.4
3	0.1	0.4
4	0.4	0.4
5	0.3	0.6
6	ND	ND
7	1.2	ND

I : Fore milk : 4—6 days post partum
II : Mature milk : 29—31 days post partum

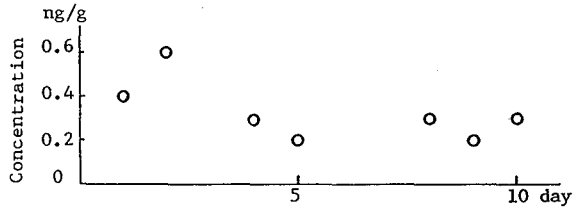


Fig. 3. Change of NDMA Concentration in Human Milk of Single Nursing Woman for 10 days

that there were differences of NDMA content among individuals.

The daily change of NDMA content in mature milk was observed for 10 days by using the samples collected from a same woman, 3 months post partum. The content did not extremely changed but varied slightly in the range of 0.2-0.6ppb from day to day, as shown Fig.3.

It is possible to conclude that the NAs content in human milk was generally affected by daily life, living environment and individual differences. It is important to elucidate what is the source of variations of NAs content in human milk.

Acknowledgement We greatefully thank Dr. Masaru Nagahashi for very kindly arranging to supply the valuable samples.

References

1) Gough, T. A., Mcphail, M. F., Webb, K. S., Wood, B. J. and Coleman, R. F.: *J. Sci. Food Agric.* 28, 345-351, 1977

2) Ishiwata, H., Boriboon, P., Nakamura, Y., Harada, M., Tanimura, A. and Ishidate, M.: *J. Fd. HYg. Soc.*,

Japan. 16, 19-24, 1975
3) Spiegelhalder, B., Eisenbrand, G. and Preussmann, R.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 14, 545-548, 1976
4) Tannenbaum, S. R., Weisman, M. and Fett, D.: *Fd Cosmet. Toxicol.* 14, 549-552, 1976
5) Fine, D. H., Ross, R., Rounbehler, D. P., Silvergleid, A. and Song, L.: *Nature Lond.* 265, 753-755, 1977
6) Yamamoto, M., Yamada, T. and Tanimura, A.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 18, 297-299, 1980
7) Kaizoe, T., Wang, T. T., Eng, V. W. S., Furrer, R., Dion, P. and Bruce, W. R.: *Cancer Res.* 39, 829-834, 1979
8) Wang, T., Kaizoe, T., Dion, P., Furrer, R., Varghese, A. J. and Bruce, W. R.: *Nature Lond.* 276, 280-281, 1978
9) Lakritz, L. and Pensaben, J. W.: *Fd Chem. Toxic.* 22, 9, 721-724, 1984
10) Doerr, R. C and Fiddler, W.: *J. Chromat.* 140, 284-287, 1977

母乳中の揮発性N-ニトロソアミンの定量

水石和子*, 竹内正博*, 山野辺秀夫*, 渡辺四男也*,
鵜沼洋子**, 山梨靖夫**

要　約

都内在住の産婦より得られた母乳中の揮発性N-ニトロソアミンの定量を行った．試料を蒸留フラスコに採取し，アルカリ性で水蒸気蒸留を行い，得られた蒸留液をジクロルメタンで抽出し，抽出液をKD濃縮器を用いて70℃の水浴上で常圧下濃縮した．濃縮液について熱エネルギー検出器付ガスクロマトグラフィーにより，揮発性N-ニトロソアミンの測定を行った．その結果，N-ニトロソジメチルアミン（NDMA）のみが検出された．母乳からのNDMAの回収率は97%，検出限界は0.1ng／gであった．測定を行った試料のうち82%から痕跡～1.8ng／gのNDMAが検出された．母乳中のNDMA量は日によってわずかに変化する傾向がみられた．

*東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
**豊島区長崎保健所

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 155-159, 1987

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Ⅱ報）養殖魚介類及び近海魚介類中の 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 (II) TBTO Content in Cultured and Inshore fishes and Shellfishes

MASAHIRO TAKEUCHI*, KAZUKO MIZUISHI*, HIDEO YAMANOBE* and YOHYA WATANABE*

A survey of the pollution with bis(tributyltin)oxide (TBTO) used as antifouling agents for fishery nets or bottom of ships has been carried out. Forty four kinds of fish and shellfishes (226 samples) consisting of 10 kinds of cultured fishes and shellfishes (39 samples) and 38 kinds of bay or inshore fishes and shellfishes (187 samples) were obtained from the Tokyo Central Market during the period from September in 1984 to February in 1986. TBTO in samples was determined as tributyltin chloride by electron capture detection gas chromatography. In the case of cultured fishes, 0.34ppm, 0.16ppm and 0.22ppm of TBTO (mean values) originated in antifouling for fishery nets were detected from Simaaji (*Preudcarantex yessoensis*), Madai (sea bream) and Hamachi (yellow tail) respectively and the maximum value of content was 0.66ppm in a Simaaji. Even in the case of the bay or inshore fishes which have no relations with culture fishery, more than 0.1ppm of TBTO (mean values) was detected from Maiwashi (sardin), Sawara (Japanese Spanish mackerel), Suzuki (sea-bass) and Tachiuwo (hairtail). This reveals that relatively high level of TBTO pollution originated from the antifouling agent for the bottom of ships has spreaded over the wide area in the sea.

Keywords: monitoring, pollution, tributyltin compound, bis(tributyltin)oxide, TBTO, cultured fish and shellfish, inshore fish and shellfish

緒　言

かねてより危惧されていた養殖用漁網防汚剤及び船底塗料として使用されるビス（トリブチルスズ）オキシド（TBTO）の魚介類への移行及び蓄積が，環境庁[1,2]の調査で明らにされ，ここ数年来魚介類及び環境の TBTO 汚染が社会的関心を呼んでいる．このため，昭和59年９月厚生省は食品衛生上の観点から TBTO の安全性を検討するために「食品中の TBTO に関する安全性評価検討委員会」を設置し，魚介類の安全性について検討した結果，60年４月 TBTO の暫定許容量を定めると共に[3]，今後の安全対策の検討及び汚染実態の把握について関係各方面に要請を行った[4]．これを契機として，全国漁業協同組合連合会は養殖魚の TBTO 汚染について検討した結果，62年４月漁網防汚剤としての TBTO の使用を全面規制する旨を発表した．これによって，養殖魚の TBTO の汚染は解決へのステップを踏み出すこととなったが，１）現段階においては TBTO に替わる漁網防汚剤が未開発であること，また２）TBTO の難分解性及び蓄積性から考えて，既にかなり広範囲の海域及び魚介類の汚染が予想されること，更に３）漁網防汚剤と並行し

*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

て船底塗料に由来するTBTO汚染が進行している兆候が認められること等いくつかの問題点が指摘される.

著者らは,このような事態を予想して昭和59年度よりTBTO汚染に関する調査を開始し,既に魚介類中のTBTOの迅速分析法の開発及び魚介類のTBTO汚染の実態調査を行っている[5].前報[6]では東京湾産魚介類のTBTO汚染について報告したので,本報では引き続き行った養殖魚介類及び市場流通の多い内湾及び近海産天然魚介類の調査結果について報告する.

実　　験

1．試料

1984年（昭和60年）9月から1986年（昭和62年）2月の間に東京都中央卸売市場に入荷した出荷地の明らかな養殖魚介類5種19検体,並びに内湾及び近海産魚介類43種207検体,計44種226検体を調査対象とした.これらの試料は昭和47年10月7日付け厚生省通達「食品中に残留するPCBの暫定的規制値設定に伴う食品等の検査等について」[7]において定められた魚介類のサンプリング法を参考にして,大型漁,中型漁,小型漁,貝類及び甲殻類の5種類に分類し,以下の方法によって,検体を調製した.

1）大型漁：ハマチ,マダイ,スズキ等体長30cm以上の試料は1匹を1検体とし,可食部（頭,内臓,皮,背骨等を除いた筋肉部）を均一化後その約150gを秤取した.

2）中型漁：カレイ,サバ,アナゴ等体長15cm以上30cm未満の試料は3匹1検体とし,それぞれの可食部を混合均一化後その約150gを秤取した.

3）小型漁：アジ,コノシロ,マイワシ等体長15cm未満の試料は5匹1検体とし,それぞれの可食部を混合均一化後その約150gを秤取した.

4）貝類：カラ付きの試料から可食部約150gを取り出し,均一化後約150gを秤取した.

5）甲殻類：本調査で対象としたクルマエビは10匹を1検体とし,それぞれ可食部を混合均一化後その約150gを採取した.

2．分析法

既報[5]に従って,試料中のトルブチルスズ化合物を塩酸酸性下において,トリブチルスズクロリド（TBTC）としてヘキサン：ジエチルエーテル（3：1, v/v）混液で抽出した.次いで,抽出液をフロリジールカラムに注入し,アセトンで洗浄後ヘキサン：エーテル：酢酸(75：25：1, v/v/v）混液でTBTCを溶出した.溶出液を濃縮後,ピーク高絶体検量線法による電子捕獲検出ガスクロマトグラフィーで定量し,TBTCとして得られた値をTBTOに換算して数値化した.

結果及び考察

1．養殖魚介類中のTBTO含有量と安全性

Table 1 A）に漁網を使用して養殖される魚類のTBTO含有量を示す.これらの中ではシマアジ,マダイ,ハマチが高く,平均値はそれぞれ0.34, 0.16及び0.22ppmで,最高値はそれぞれ0.66, 0.39及び0.49ppmであった.シマアジ,マダイ及びハマチ類はTBTOを塗布した漁網を用いてイケス中で養殖されるので,TBTOが多量に魚体に移行蓄積したものと考えられる。しかし,シマアジは別として,マダイ及びハマチの場合はTBTO含有量がかなり低いものもあり,これらの養殖魚の全てが高濃度汚染しているわけではない.以上のことはTBTOを使用しない養殖法あるいはTBTOの使用を最小限に抑えた養殖法が成り立つ可能性があることを意味しており,今後の養殖漁業のあり方を検討する上で一考に値すると考えられる.

一方,イシガレイ及びヒラメも漁網を使用して養殖される魚種であるが,この場合は先の3魚種と養殖法が全く異なりTBTOを使用する必要がないため,共に低値であった.ただし,今回の調査はそれぞれ1検体ずつであるので,さらに調査する必要がある.

次に,内湾で養殖される魚介類中のTBTO含有量をTable 1 B）に示す.カキ,アカガイ,ホタテガイ,タイラガイ等の貝類及びクルマエビは内湾で養殖されるが,漁網使用の養殖イケスを必要としないのでTBTO濃度は低い値となることが予想されたが,今回の調査においてはカキ及びホタテガイが0.1ppmを越える平均値を示した.また,カキ及びホタテガイ各1検体から0.30ppm及び0.22ppmと比較的高いTBTOが検出された.このことは,TBTOによる海水あるいは底質の汚染が進行していることを示すものであり,後述するように食品衛生より環境汚染の観点からの問題提起となる.

厚生省「食品中のTBTOの安全性評価検討委員会」はElsea[8], Schweinfurth[9],作永[10],榎本[11]及び大谷[12]らのデータからTBTOの1日許容摂取量を推定し,暫定許容摂取量を1.6 μg/kg/日とした.この値を体重50kgの成人に適用すると,暫定的1日許容摂取量は1.6 μg×50kg＝80 μgと計算される.一方,昭和57年度の国民栄養調査によれば日本人の魚介類の平均最大摂取量は110.9gである.従って,魚介類の全量を今回の調査において最高値を示した養殖シマアジ（0.66ppm）から摂取したと仮定すると,TBTOの摂取量は110.9×0.66＝

73.2 μg と計算され，暫定的1日許容摂取量（80 μg）より低くなる．従って，今回の調査結果は，「いずれの養殖魚介類についても食品衛生上直ちに問題が生ずることはない」とする厚生省の見解を支持するものである．しかし，0.66ppm の養殖シマアジから摂取される TBTO 量（73.2 μg）は暫定許容量（80 μg）にかなり近いので，これ以上の蓄積は許されない．従って，今後は関係機関による指導及び監視体制を早急に確立することが重要である．

2．内湾及び近海産魚介類の TBTO 含有量と環境汚染

Table 1 C）及び D）に内湾または内海産魚介類中の TBTO 含有量を示す．これらのうち0.1ppm 以上を示したものはスズキ，サワラ，タチウオ，アサリ及びアゲマキの5種であり，サワラを除いて他は湾内回遊性の魚類及び定着性の貝類である．これらの魚種は TBTO 使用による養殖とは直接は関係ないので，比較的狭い棲息海域の TBTO 汚染を反映しているものと推測される．従って，各地の内湾及び内海が TBTO でかなり汚染していることを示している．このことは漁網用 TBTO とは本来無関係の内湾養殖魚介類（Table 1 A）及び前報[6]において調査した東京湾産魚介類から TBTO が検出されることも明らかである．

次に，日本近海産魚類中の TBTO 含有量を Table 1 E）に示す．今回調査したいずれの魚種からも TBTO が検出されたが，その中でマイワシは特に高く，平均 0.27ppm，最高0.47ppm を示した．マイワシ中に TBTO が高濃度に蓄積する理由は明らかでないが，本結果は TBTO による汚染が内湾及び内海から近海へと広がっていることを裏付けるものである．先に指摘した内湾及び内海の汚染はこれまでの環境庁の調査[1,2]でも明らかであるが，このように近海魚からかなり高濃度の TBTO が検出されたことは，環境中に放出された TBTO による汚染がかなり進行していることを示すものであり，今後の推移を監視することが極めて重要である．

ところで，養殖魚中の TBTO は漁網防汚剤由来であることは明白であるが，天然魚中の TBTO 汚染は漁網防汚剤由来と船底塗料由来の二経路が考えられる．Fig. 1に今回調査した魚種のうちで，TBTO 含有量及び調査例数の比較的多いマイワシ，サワラ，スズキ及びタチウオについて出荷地と TBTO 含有量を示した．いずれの魚種も調査例数はそれほど多くなく，また出荷地と漁獲場所は必ずしも一致するとは限らないので，即断はできないが，マイワシの TBTO 含有量は東京湾及び瀬戸内海沿岸の出荷地が他に比べて高い値となっている．このことから，日本沿岸の TBTO 汚染は船底塗料を汚染源とする東京湾を中心とする海域と漁網防汚剤を汚染源とする瀬戸内海を中心とする海域に広がっていることが推定される．このことはサワラ及びスズキについてもほぼ当てはまる．現在のところ，TBTO 汚染は漁網防汚剤由来のみが強調されているが，船底塗料由来も無視できない．通産省の公表によれば，わが国の TBTO の年間消費量は約1200t で，そのうち船底塗料として800t，養殖用漁網防汚剤としては300t 程度が使用されている．従って，漁網防汚剤と同時に船底塗料に対しても何らかの措置をとることが必要であると考えられる．

船底塗料由来の TBTO 汚染は日本だけの問題でなくグローバルな問題である．また，TBTO 汚染は養殖漁業が日本程盛んでないアメリカ及びヨーロッパにおいてはそれほど問題になっていない．しかし，最近フランスにおいて養殖用カキの稚貝が船底塗料由来の TBTO で死滅する事故が起き，カキ養殖の保護の立場から湾奥に係留してあるヨット及びモーターボートへの TBTO 含有塗料の使用を禁止する動きが出ている．また，アメリカにおいても船舶用 TBTO 含有塗料を規制する必要性が論議されている．このようなヨーロッパ及びアメリカと共に，わが国も TBTO 汚染の防止のために適切な措置を採ることが望まれる．

ま と め

1984年（昭和60年）9月から1986年（昭和62年）2月の間に東京都中央卸売市場に入荷した出荷地の明らかな養殖魚介類5種19検体並びに市場流通の多い内湾及び近海産天然魚介類43種207検体，計44種226検体を対象として，TBTO 含有量を調査した．シマアジ，マダイ及びハマチ等の養殖魚の平均値はそれぞれ0.34ppm，0.16ppm 及び0.22ppm で，最高値はシマアジの0.66ppm であった．これらの養殖魚中の TBTO 含有量は「食品中の TBTO の安全性評価検討委員会」の提言した暫定許容摂取量から考えて，食品衛生上直ちに問題となる値ではなかった．なお，これらの養殖魚の場合において，TBTO 含有量が非常に低い値を示すものもあり，TBTO を使用しない養殖あるいは最小限に抑えた養殖の可能性が示唆された．一方，本来漁網防汚剤としての TBTO とは無関係なはずの内湾あるいは内海産の天然魚介類及び近海産の天然魚介類の TBTO 汚染が認められた．これは既に使用された漁網防汚剤及び現在使用されている船底塗料由来の TBTO による環境汚染の結果として生じたものである．特に，近海にまで至る汚染の拡大は船底塗料

Table 1. TBTO content in various kinds of fishes and shellfishes carried into the Tokyo Central Market during the period from Sept. in 1984 to Fed. in 1986.

	Samples	Number	Range	Average
A)	Hamachi (yellow tail, *Siriola quinqueradiata*)	7	0.05-0.49	0.22
	Hirame (flounder, *Paralichthys olivaceus*)	1		0.01
	Ishigarei (stone flounder, *Kareius bicoloratus*)	1		0.03
	Madai (sea bream, *Chrysophrys*)	5	0.01-0.39	0.16
	Simaaji (*Pseudcaranx dentex*)	5	0.21-0.66	0.34
B)	Akagai (*Andara* (*Scapharca*) *broughtonii*)	7	0.01-0.14	0.05
	Hotategai (*Patinopecten yessoensis*)	2	0.04-0.22	0.13
	Kaki (oyster, *Crassotrea gigas*)	4	0.05-0.30	0.15
	Kurumaebi (*Peraeus japonicus*)	6	nd-0.10	0.05
	Tairagai (*Atrina* (*Servatrina*) *penna*)	1		0.01
C)	Ainame (greenling, *Hexagrammos otakii*)	6	0.01-0.13	0.04
	Akaamadai (blanquillos, *Branchios tegidas*)	5	nd-0.04	0.01
	Akagarei (flathead flounder, *Hippoglossides duicus*)	2	0.03-0.07	0.05
	Anago (conger eel, *Astroconger myriaster*)	5	nd-0.08	0.04
	Bora (grey mullet, *Mugil cephalus*)	7	0.01-0.13	0.04
	Isaki (grunt, *Parapristipoma trilineatum*)	4	0.01-0.05	0.03
	Isigarei (stone flounder, *Kareius bicoloratus*)	2	nd-0.01	0.01
	Kisu (sillago, *Sillago sihama*)	7	0.01-0.06	0.04
	Konosiro (gizzard shad, *Clupanodon punctatus*)	7	0.01-0.11	0.06
	Kuromutu (*Scombrops gilberti*)	1		0.07
	Madai (sea bream, *Chrysophrys major*)	4	nd-0.04	0.03
	Magoti (bartail flathead, *Platycephalus indicus*)	7	nd-0.26	0.08
	Makogarei (marbled sole, *Limanda yokohamae*)	6	0.02-0.13	0.06
	Mebaru (gopher, *Sebastes inermis*)	5	nd-0.05	0.03
	Sawara (Japanese spanish mackerel, *Scomberomrus niphonius*)	5	0.02-0.43	0.23
	Suzuki (sea-bass, *Lataolabrax japonicus*)	6	0.05-0.35	0.18
	Tachiuwo (hairtail, *Trichiurus lepturus*)	2	0.21-0.50	0.35
	Torahugu (ocellate puffer, *Takifugu rubripes*)	3	0.04-0.08	0.06
D)	Hamaguri (*Meretrix lusoria*)	7	nd-0.18	0.07
	Agemaki (*Sinonovacula constricta*)	7	0.07-0.30	0.12
	Aoyagi (*Mactra chinensis*)	6	0.04-0.14	0.07
	Asari (short-necked clam, *Tapes* (*Amygdala*) *japonica*)	7	0.05-0.32	0.12
	Siromirugai (*Tresus keenae*)	6	0.01-0.04	0.02
	Tairagai (*Atrina* (*Servatrina*) *penna*)	2	0.02-0.06	0.03
E)	Aji (horse-mackerel, *Trachurus trachurus*)	6	0.01-0.09	0.05
	Hirame (flounder, *paralichthys olivaceus*)	4	nd-0.03	0.01
	Kamasu (barracuda, *Sphyraena Japonicus*)	7	0.03-0.16	0.09
	Katuo (bonito, *Katsuwonus pelamis*)	5	nd-0.06	0.03
	Kichiji (bighand thornyhead, *Sebastolobus macrochir*)	6	nd-0.05	0.03
	Madara (codfish, *Gadus macrocephalus*)	1		0.09
	Maiwasi (sardin, *Sardinos melanosticta*)	7	0.10-0.47	0.27
	Managatuo (harvest fish, *Pampus argenteus*)	1		0.18
	Masaba (mackerel, *Pneumophrus japonicus*)	6	0.02-0.18	0.08
	Nishin (herring, *Clupea pallasi*)	2	0.01-0.03	0.02
	Sanma (mackerel pike, *Cololabis saira*)	7	nd-0.11	0.03
	Sumiika (*Sepia* (*Platysepia*) *esculenta*)	6	nd-0.06	0.03
	Surumeika (saquttated calamary, *Todarades pacificus*)	5	0.03-0.13	0.07
	Tobiuwo (flying fish, *prognichthys agoo*)	5	nd-0.04	0.02

(ppm)

A) Fishes cultured in the sea surrounded with net
B) Fishes and shellfishes cultured in the sea without net
C) Fishes and shellfishes collected in bays
D) Shellfish collected in bays
E) Fishes collected in inshore areas

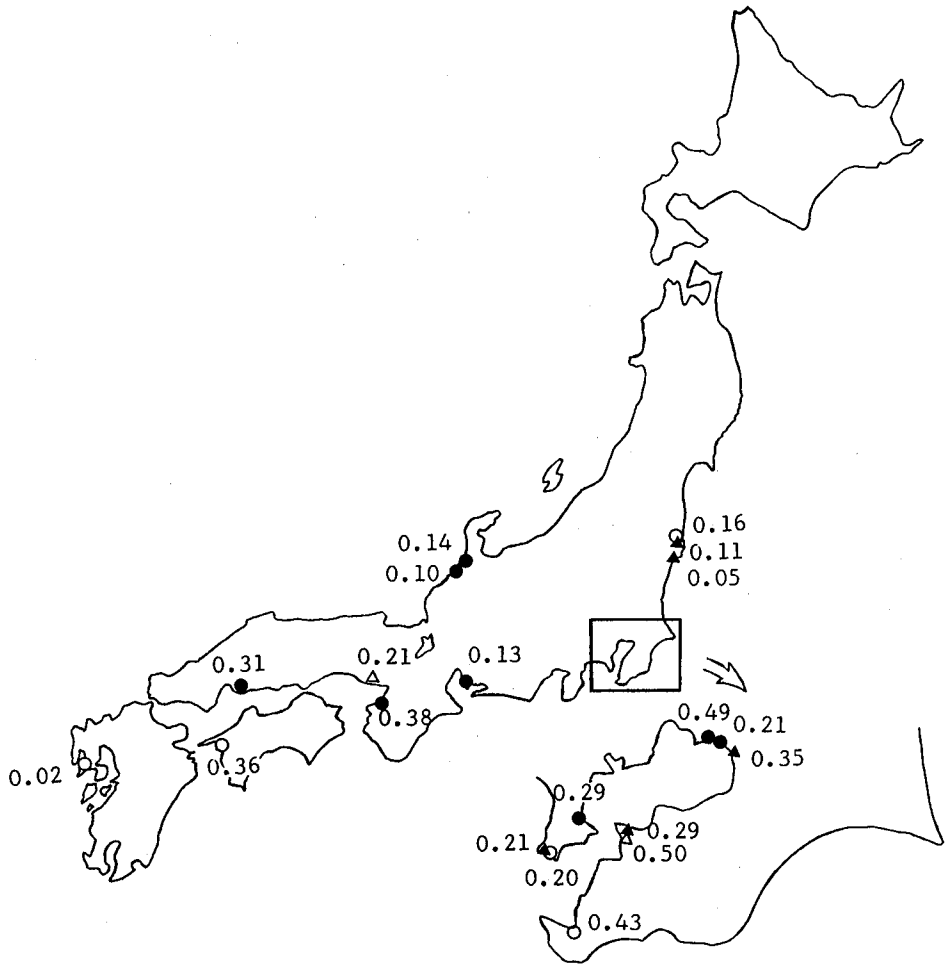


Fig. 1. TBTO content of Maiwashi (sardin ●), Sawara (Japanese Spanish mackerel ○), Suzuki (sea-bass ▲) and Tachiuwo (hairtail △), carried into the Tokyo Central Market from different fishing ports The values are on ppm.

による部分が大きいので，これについても漁網防汚剤と同様適切な措置を構ずることの必要性が認められた．

謝辞 本調査を実施するに当たり，御協力頂いた衛生局環境保健部食品監視課及び市場衛生検査所の各位に深謝致します．

文　献

1）環境庁：昭和59年版化学物質と環境
2）環境庁：昭和60年版化学物質と環境
3）食品中のビストリブチルスズオキシド（TBTO）の安全性評価に関する検討結果報告（昭和60年4月24日）
4）厚生省通達：衛乳第18号（昭和60年4月26日）
5）竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：分析化学，36，138-142，1987.
6）竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：東京衛研年報，37，154-157，1986.
7）厚生省通達：環食第442号（昭和47年8月24日）
8）Elsea, J. R., Paynter, O. E.：*Am. Med. Assoc. Arch. Ind. Health*, 18, 214-217, 1958.
9）Rosenberg, D. W., Drumnrd, H. C., Kappas, A.: *Bioche. J.*, 190, 465-468, 1980.
10）作永恭二：東京医科大学雑誌，39，1069-1081，1981.
11）湯本　薫：東京医科大学雑誌：33，157-176，1975.
12）大谷由美子：東京医科大学雑誌，39，1069-1081，1981.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 160-166, 1987

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Ⅲ報）東京湾の汚染調査

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 (III) Monitoring of TBTO Pollution in Tokyo Bay

MASAHIRO TAKEUCHI*, KAZUKO MIZUISHI*, HIDEO YAMANOBE* and YOHYA WATANABE*

To monitor the pollution with bis(tributyltin)oxide (TBTO) as antifouling agents for fishery nets and bottom of ships, two kinds of samples were analysed. One is a set of samples consisting of short-necked clam (I), sediment (II) and sea water (III) collected at five fixed sampling points in Tokyo Bay (A; Kanazawa-hakkei, B; Ohi, C; Sanmaizu, D; Gyoutoku, E; Futtsu) during the period from May to September in 1985. The other is fish or shellfish carried into the Tokyo Central Market from fishing ports near or in the bay of Tokyo during the period from September in 1984 to February in 1986. The ranges and the mean values of TBTO detected were 11-167ppb (57.5ppb) in I, ND-10.0ppb (3.1ppb) in II and ND-0.14ppb (0.023 ppb) in III respectively. Correlations between I and II, I and III and II and III were recognized at the significant levels of $p<0.001$, $p<0.01$ and $p<0.05$. The concentration ratio of TBTO calculated from the mean values was about 20 times (from II to I) and 2500 times (from III to I) respectively. The mean value of I at A, B and F were significantly higher than that at C and D ($p<0.05$). Among the samples obtained from the Tokyo Central Market, relatively high TBTO contents were detected in Maiwashi (sardin); 0.47ppm, Sawara (Japanese Spanish mackerel); 0.43ppm, Suzuki (sea-bass); 0.35ppm, Asari (short-necked clam); 0.32ppm, and Tachiuwo (hairtail); 0.50ppm.

Keywords: monitoring, pollution, tributyltin compounds, bis(tributyltin)oxide, TBTO, Tokyo bay, fish and shellfish, sediment, sea water

緒　言

養殖漁業において漁網防汚染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）の養殖魚介類への移行及び蓄積が，ここ数年来食品衛生上の問題となっている[1]．一方，TBTOは防汚剤として船底塗料にも多量に使用されていることから，内海及び内湾の環境汚染及びそれに伴う生物濃縮が懸念されており，汚染防止の立場から長期的モニタリングが必要となっている[2,3]．この様な状況から，著者らはTBTOによる東京湾の汚染調査を開始し，既報[4]において東京湾の汚染実態について一部報告した．本報では引き続き，東京湾の汚染動向を調査すると同時に，湾内及びその周辺で漁獲された魚介類中のTBTOの含有量を調査したので報告する．

実　験

1　試料

1．1　汚染モニタリング用環境試料

採取地点のTBTO汚染を直接反映していると考えら

*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

れる底質，海水及び指標生物として比較的採取の容易なアサリを試料とした．採取地点としては，(A)神奈川県金沢八景（野島公園），(B)大井埠頭，(C)葛西沖（三枚洲），(D)千葉県行徳海岸及び(E)千葉県富津（富津公園）の5定点を設定した．試料の採取は1985年5月，7月及び9月に各1回ずつ計3回行った．各定点の位置をFig. 1に示す．

アサリは約1kg採取し，10-15時間3％食塩水に浸して砂出しを行った．次いで，可食部を取り出し，水を十分切ってから均一化した後，ポリプロピレン製容器に入れ-30℃で冷凍保存した．底質はアサリ採取地点において約500gずつ5カ所から採取し混合した．ブフナーロートを用いて吸引ろ過し水分を除去した後，ポリプロピレン製容器に入れ，5℃の低温室に保存した．海水は3lのガラス瓶に採取し，5℃の低温室に保存した．

1．2　東京湾及び周辺海域産の魚介類試料

1984年（昭和60年）9月から1986年（昭和62年）2月の間に東京都中央卸売市場に入荷したもので，Fig. 1に示した東京湾沿岸及びその周辺の漁港から出荷された魚介類22種50検体を調査対象とした．本試料は前報[5]と同様大型魚，中型魚，小型魚，貝類及び甲殻類の5種類に区分してサンプリングした．試料は均一化後ポリプロピレン製容器に採取し，-30℃で冷凍保存した．

2　測定法

2．1　試薬及び装置

既報[6]と同様に行った．

2．2　試験溶液の調製

1）魚介類　試料5gを遠沈管に採り，メタノール2mlを加えてからガラス棒を用いて十分に混和した．次いで，塩化ナトリウム5g，0.3N塩酸40mlおよびヘキサン・ジエチルエーテル（3:1, v/v）混液70mlを加え，10分間激しく振とうした後3000rpmで遠心分離した．水相にヘキサン・ジエチルエーテル混液70mlを加え，先と同様に再抽出及び遠心分離した後分取した有機相を合わせてフロリジールカラムに注入し，5 ml/minの速度で滴下した．次いで，アセトン50mlを5 ml/minの流速で流してカラムを洗浄した後，ヘキサン・ジエチルエーテル・酢酸（75:25:1, v/v/v）混液30mlを2 ml/minの速度で流した．ヘキサン・ジエチルエーテル・酢酸混液の画分を50mlのナシ型フラスコに補集し，浴温20℃以下においてロータリーエバポレーターで1 ml程度まで濃縮した．濃縮液をパスツールピペットを用いて目盛り付試験管に移し，ヘキサンで定容とした後試験溶液とした．

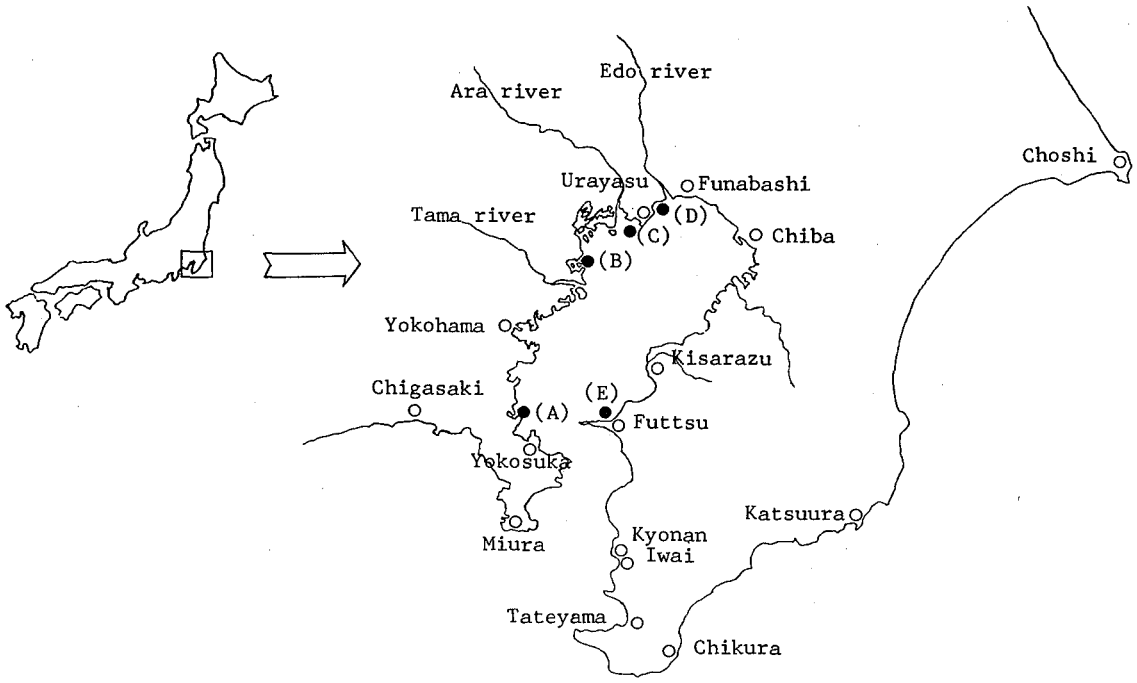


Fig. 1．Sampling points (●) and fishing ports (○) in and near Tokyo Bay
(A)：Kanazawa-hakkei, (B)：Ohi, (C)：Sanmaizu, (D)：Gyoutoku, (E)：Futtsu

2）底質　試料30gを遠沈管に採り，0.3N HCl 40mlおよびヘキサン・ジエチルエーテル（3:1）混液70mlを加え，以下魚介類の場合と同様に処理した．

3）海水　試料1000mlを分液ロートに採り，塩酸25mlおよびヘキサン・ジエチルエーテル（3:1）混液を加え，以下魚介類の場合と同様に処理した．ただし，抽出用のヘキサン・ジエチルエーテル（3:1）混液は各100ml使用した．

2．3　定量法

既報[6]と同様に，分離カラムに10% Thermon HG（AW-DMCS）を使用する電子捕獲検出ガスクロマトグラフィーでトリブチルスズクロリドを定量し，得られた値をTBTOに換算した．

結果及び考案

1　添加回収実験及び検出限界

魚介類試料（スズキ及びアサリ），底質及び海水についてそれぞれ添加回収実験を5回繰り返した．Table 1に示したようにいずれの試料ともほぼ95%以上の高回収率が得られ，その時の変動係数はスズキが3.8%，アサリが3.2%，底質が2.7%，海水が3.9%であった．また，本法の定量限界（S/N＝2）は，魚介類2 ppb，底質0.3ppb，海水0.005 ppbであった．以上から，本法は回収率及び分析精度とも良好で，また感度も高くかなり低濃度まで定量可能であるので，TBTOによる環境汚染のモニタリング用分析法として使用可能であることが確認された．

2　実際試料の分析

1）汚染モニタリング用環境試料

各定点から採取したアサリ，底質及び海水の分析結果をTable 2，3及び4に示す．また，それぞれの試料のガスクロマトグラムをFig. 2に，確認のために測定したマススペクトルをFig. 3に示す．

アサリは15検体全てから11-167ppbの範囲でTBTOが検出され，平均含有量は57.5ppb，標準偏差は44.2ppbであった．底質はNDから最高10.0ppbの範囲で検出され，平均含有量は3.1ppb，標準偏差は3.1ppbであった．海水はNDから最高0.137ppbの範囲で検出され，平均含有量0.023ppb，標準偏差は0.02ppbであった．

これらの結果を用いて，先ずTBTO含有量の試料間における相関性（アサリー底質，アサリー海水，底質－海水）を検討した．Fig. 4にそれぞれの散布図を，またTable 5に相関係数を示す．アサリと底質間，アサリと海水間及び底質と海水間にはそれぞれ$p<0.001$，$p<0.01$及び$p<0.05$において相関性が認められた．以上のことから，アサリによって底質及び海水中のTBTOが濃縮されていることが裏付けられたので，濃縮率をアサリ，底質，及び海水の平均含有量から求めたところアサ

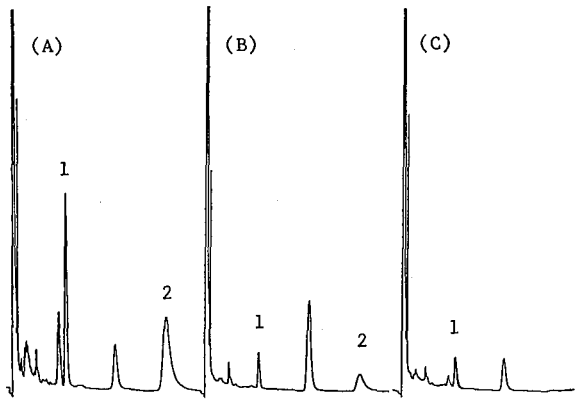


Fig. 2．Gas chromatograms of the extracts from short-necked clam (A), sediment (B) and sea water (C)
Peak 1：Tributyltin chloride (Rt：9.2min)
Peak 2：Bibutyltin dichloride (Rt：26.2min)

Table 1．Recoveries of TBTO added to fish and shellfish, sediment and sea water

Samples	Taken	added(ug)	Found(ug)	Recoveries(%)	C.V.*(%)
Sea-bass	5(g)	0	0.395	—	—
	5(g)	2.0	2.32	96.3	3.8
Short-necked clam	5(g)	0	0.032	—	—
	5(g)	2.0	2.00	98.7	3.2
Sediment	30(g)	0	0.003	—	—
	30(g)	2.0	1.89	94.5	2.7
Sea water	1000(ml)	0	0.000	—	—
	1000(ml)	0.2	0.192	96.0	3.9

* Number of repetition：n＝5

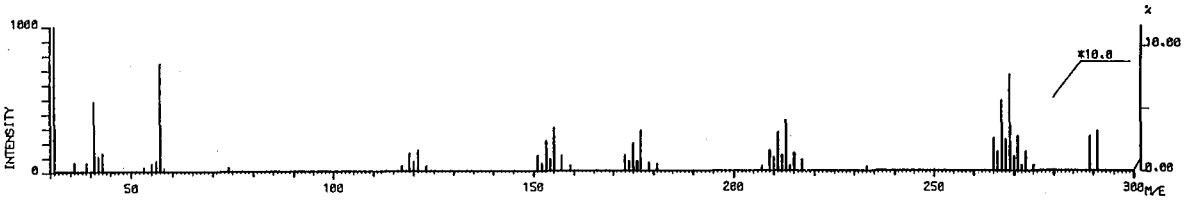


Fig. 3. Mass spectrum of tributyltin chloride extracted from short-necked clam

Table 2. Analytical results of TBTO in short-necked clam collected from Tokyo Bay in 1985

Sampling points	Sampling time			
	'85/May	July	Sept.	Mean
(A)Kanazawa-hakkei	87	54	70	70
(B)Ohi	67	53	57	59
(C)Sanmaizu	30	20	11	20
(D)Gyoutoku	32	14	12	19
(E)Futtsu	130	58	167	118
Mean	69	40	63	58

(ppb)

Table 3. Analytical results of TBTO in sediment collected from Tokyo Bay in 1985

Sampling points	Sampling time			
	'85/May	July	Sept.	Mean
(A)Kanazawa-hakkei	2.2	3.7	4.5	3.5
(B)Ohi	4.7	3.9	ND	2.9
(C)Sanmaizu	1.3	ND	ND	0.4
(D)Gyoutoku	ND	1.1	1.2	0.8
(E)Futtsu	10.0	5.2	8.5	7.9
Mean	3.6	2.8	2.8	3.1

(ppb)

ND : less than 0.3ppb, The values are on dry base.

Table 4. Analytical results of TBTO in sea water collected from Tokyo Bay in 1985

Sampling points	Sampling time			
	'85/May	July	Sept.	Mean
(A)Kanazawa-hakkei	0.009	0.006	0.055	0.023
(B)Ohi	0.006	ND	0.027	0.011
(C)Sanmaizu	ND	ND	ND	ND
(D)Gyoutoku	ND	ND	ND	ND
(E)Futtsu	0.008	0.018	0.137	0.052
Mean	0.005	0.005	0.044	0.023

(ppb)

ND : less than 0.005 ppb

リの底質からの濃縮率は約20倍，また海水からの濃縮率は約2500倍であった．

次ぎに，各定点のアサリの平均含有量についてt検定した結果をTable 6に示す．これらの検定結果から，1）金沢八景(A)，大井(B)及び富津(E)の3点間並びに三枚洲(C)及び行徳(D)の2点間には有意差は認められないこと，2）A，B，EグループはC，Dグループより有意に高いことが明らかとなった．すなわち，東京湾内のTBTO汚染は湾口部及び東京側が高く，湾奥部千葉県側が比較的低い傾向を示している．このような汚染の海域格差は既に1984年（昭和59年度）に行った調査でも認められていたが[4]，今回の調査で一層明確になったといえる．

最後に，採取時期によるTBTO含有量の差を検定したところ，有意差は認められなかった．

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等による汚染度は，湾奥部，特に大井付近が最も高く，湾入口付近が最も低い傾向を示している[5-9]．今回得られた結果は，これらとは明らかに異なった汚染傾向を示しており，汚染河川水の流入に由来する汚染機構とは異なることが推測される．また，東京湾の漁業の実態から判断して，漁網防汚剤由来とも考えにくい．従って，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．

2）東京湾内及びその周辺海域産の魚介類

東京湾及びその周辺海域で漁獲された種々の魚介類のTBTO含有量をTable 7に示す．今回調査した魚種の中でTBTO含有量が比較的高かったものは，アサリ（0.32ppm），サワラ（0.20ppm,0.43ppm），スズキ（0.29ppm,0.21ppm,0.35ppm），タチウオ(0.50ppm)，マイワシ(0.47ppm)等であった．これらの含有量は厚生省の暫定許容摂取量1.6 μg/kg/日及び国民栄養調査に基づく平均量最大魚介類摂取量110.9gから考えて食品衛生上は当面は問題とならないと考えられる[1]．従って，TBTOによる汚染がこれ以上進行しなければ，東京湾産魚介類の安全性に問題はない．しかし，前報においても

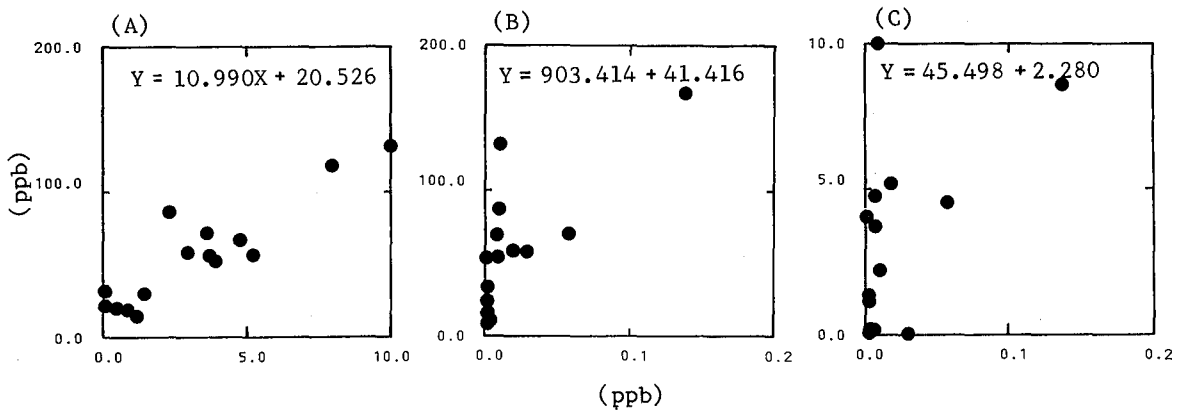


Fig. 4. Correlation among TBTO content in short-necked clam, sediment and sea water
(A) X : sediment, Y : short-necked clam
(B) X : sea water, Y : short-necked clam
(C) X : sea water, Y : sediment

Table 5. Correlation coefficients among TBTO content in short-necked clam, sediment and sea water

Samples	(B)	(C)
(A) Short-necked clam	0.9022***	0.7401**
(B) Sediment		0.5269*
(C) Sea water		

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $n = 15$

Table 6. t-Test for mean TBTO content in short-necked clam collected at each sampling point

Sampling points	(B)	(C)	(D)	(E)
(A) Kanazawa-hakkei	1.090	4.548**	4.452*	1.438
(B) Ohi		5.641**	5.218**	1.839
(C) Sanmaizu			0.119	3.018*
(D) Gyoutoku				3.034*
(E) Futtsu				

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

指摘したようにTBTOの汚染には養殖漁業において使用する防汚剤としてのTBTO及び船舶の船底塗料として使用されるTBTOの二通りの経路が考えられ，前者は全漁連によってその使用が全面的に自主規制されたので，これに由来する汚染は低減化の方向を辿るものと推測できる．しかし，後者については現在のところ全く規制されていない．従って，船底塗料由来のTBTO汚染は今後さらに拡大する可能性がある．東京湾のTBTO汚染は漁網防汚剤でなく船底塗料のTBTOであることは疑いの余地がないので楽観は許されない．

まとめ

東京湾内に設定した5定点から採取した底質，海水及びアサリ，並びに東京湾沿岸及びその周辺の漁港から出荷された市場流通の魚介類25種56検体を調査対象として，東京湾のTBTO汚染の実態を調査した．

アサリは15検体全てから11-168ppbの範囲でTBTOが検出され，平均含有量は57.5ppb，標準偏差は44.2ppbであった．底質はNDから最高10.0ppbの範囲

Table 7. TBTO content in fishes and shellfishes collected in or near Tokyo Bay during the period from May in 1985 to Feb. in 1986

Samples	Fishing ports	Content
1) Ainame (greenling, *Hexagrammos otakii*)	Futtsu	0.04
2) Asari (short-necked clam, *Tapes* (*Amygdala*) *japonica*)	Kisarazu	0.11
		0.09
		0.32
3) Aoyagi (*Mactra chinensis*)	Futtsu	0.04
	Urayasu	0.05
	Chiba	0.14
		0.11
4) Akagai (*Anadara* (*Scapharca*) *broughtonii*)	Funabasi	0.04
5) Anago (conger, eel, *Astroconger myriaster*)	Yokohama	0.04
6) Kamasu (barracuda, *Sphyraena japonicus*)	Iwai	0.06
	Miura	0.13
		0.03
7) Katuo (bonito, *Katsuwonus pelamis*)	Katsuura	0.01
8) Kisu (sillago, *Sillago sihama*)	Futtsu	0.01
		0.06
	Chigasaki	0.03
9) Konosiro (gizzard shad, *Clupanodon punctstus*)	Edo river	0.04
	Kyonan	0.04
	Futtsu	0.01
	Chiba	0.11
10) Sanma (mackerel pike, *Cololabis saira*)	Choshi	0.01
11) Sawara (Japanese spanish mackerel, *Scomberomrus niphonius*)	Miura	0.20
	Tateyama	0.43
12) Surumeika (saquttated calamary, *Todarades pacificus*)	Katsuura	0.03
		0.08
13) Sumiika (*Sepia* (*Platysepia*) *esculenta*)	Funabashi	0.05
14) Suzuki (sea-bass, *Lataolabrax japonicus*)	Futtsu	0.29
	Miura	0.21
	Chiba	0.35
15) Tachiuwo (hairtail, *Trichiurus lepturus*)	Futtsu	0.50
16) Hamaguri (*Meretrix lusoria*)	Choshi	0.02
17) Hirame (flounder, *Paralichtys olivaces*)	Chikura	0.03
18) Bora (grey mullet, *Mugil cephalus*)	Futtsu	0.13
	Urayasu	0.02
	Futtsu	0.03
		0.01
		0.05
	Chiba	0.02
19) Makogarei (marbled sole, *Limanda yokohamae*)	Urayasu	0.03
	Tokyo Bay	0.05
	Yokosuka	0.03
	Yokohama	0.08
20) Maiwasi (sardin, *Sardinos melanosticta*)	Yokosuka	0.29
	Funabashi	0.47
		0.21
21) Magochi (bartail flathead, *Platycephalus indicus*)	Yokohama	0.07
	Futtsu	0.02
	Yokosuka	0.12
	Futtsu	0.26
	Chiba	0.07
22) Mebaru (gopher, *Sebastes inermis*)	Kanagawa	0.05

(ppm)

で検出され，平均含有量は3.1ppb，標準偏差は3.1ppbであった．海水はNDから最高の0.137ppbの範囲で検出され，平均含有量0.023ppb，標準偏差は0.02ppbであった．アサリと底質間，アサリと海水間及び底質と海水間にはそれぞれ$p<0.001$，$p<0.01$及び$p<0.05$において相関性が認められた．TBTOの濃縮率は底質からアサリが約20倍，また海水からアサリが約2500倍であった．各定点のアサリの平均含有量は1）金沢八景，大井及び富津の3点が三枚洲及び行徳の2点より有意に高い結果となった．

東京湾及びその周辺から出荷された魚介類でTBTO含有量が比較的高かったものは，アサリ（0.32ppm），サワラ（0.43ppm），スズキ（0.29ppm，0.21ppm，0.35ppm），タチウオ（0.50ppm），マイワシ（0.47ppm）等であった．現状では食品衛生上は問題とならないが，東京湾において船底塗料由来のTBTO汚染は今後さらに拡大する可能性があるので，長期的に監視する必要がある．

謝辞 本調査を実施するに当たり，御協力頂いた衛生局環境保健部食品監視課及び市場衛生検査所の各位に深謝致します．

文　献

1）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.
2）環境庁：昭和59年版化学物質と環境・
3）環境庁：昭和60年版化学物質と環境.
4）竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：東京衛研年報，37，154-157，1986.
5）竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：東京衛研年報，38，155-159，1987.
6）竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：分析化学，36，138-142，1987.
7）立川　涼，脇本忠明，薬師寺積，渡辺　功：昭和47年日本海洋学会春期大会，1972.
8）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.
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，31-1，156-160，1980.
10）安野哲子，荻野周三，小野綾子，大畠敏子，遠藤英美：東京衛研年報，31-1，185-189，1980.
11）竹内正博，水石和子，岸本清子，風間成孔：東京衛研年報，35，179-183，1984.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 167-172, 1987

魚介類中の水銀およびセレン含有量について

山野辺 秀 夫*, 竹 内 正 博*, 水 石 和 子*, 渡 辺 四男也*

Content of Mercury and Selenium in Fish and Shellfish

HIDEO YAMANOBE*, MASAHIRO TAKEUCHI*,
KAZUKO MIZUISHI* and YOHYA WATANABE*

The correlation between total mercury and total selenium contents in fish and shellfish was investigated by using 166 samples obtained from the Tokyo central market. Total mercury was determined by airation and gold amalgamation atomic absorption method, and selenium by hydrogen selenide evolution-electrothermal atomic absorption method. Total mercury content ranged from 0.00ppm to 1.06ppm and the average and its standard deviation were 0.15ppm and 0.20ppm respectively. Total selenium content ranged from 0.20ppm to 1.35ppm and the average and its standard deviation were 0.62ppm and 0.25ppm respectively. Each element was distributed on logrithmic normal curves. Correlation coefficient between total mercury and total selenium in fish and shellfish was $r = 0.4010$. This result showed a significantly positive correlation ($p < 0.001$).

Keywords: total mercury, selenium, determination, correlation, fish and shellfish

緒　　言

セレンは生体にとって欠くことのできない必須元素として，また水銀を初めとする重金属に対して毒性軽減作用を有する元素として注目されている[1,2]．既に動物実験によってセレンは無機及びメチル水銀の毒性を軽減することが明らかにされており，生体内で重金属に対して拮抗物質として働いていることが指摘されている[3-5]．このことから，メチル水銀を高濃度に含むマグロを多食する漁船員及び仲買業者[6]が，血液及び毛髪中の水銀レベルが高いにもかかわらず健康障害を起こさないのは，このセレンの拮抗作用による毒性軽減作用と考えられている．マグロは高濃度のメチル水銀を蓄積しているが，一方でセレンも高濃度に蓄積しているので，マグロ中でメチル水銀が無毒化されているか，あるいは毒性の発現が抑制されるためと推定されている[3,7]．このことはマグロ以外の高水銀蓄積性の深海性魚介類及びイルカ等の一部ほ乳類[8]の場合も同様に考えられている．

ところで，高水銀蓄積性魚介類の場合セレン濃度が特異的に高くなる理由は明らかでない．しかし，セレンは単独では著しい体内濃度の上昇は認められないので，蓄積は単なる食物連鎖ではなく，水銀濃度の増加に伴って生じたものと考えられている．その根拠として高水銀蓄積性魚介類について，体内の水銀とセレン濃度の相関性を確認した報告例がある[9-12]．しかし，水銀濃度のあまり高くない魚介類については調査例は皆無であり，このような水銀とセレンの相関性が，いわゆる高水銀蓄積性生物に特異的な関係であるか，それとも魚介類一般について認められるかは明らかでない．

そこで，著者らは魚介類全体についてセレンと水銀の相関性を確認することを目的として本調査を行った．すなわち，魚介類全体を母集団として多種類の魚介類を対象として総水銀及び総セレン含有量を測定し，魚介類全体のバックグランドレベルを把握するとともに，両元素の体内濃度の相関性について検討した．

実　　験

1．試料

本調査に使用した魚介類は，昭和61年1月から6月の間に東京中央卸売市場に入荷した魚介類57種，166検体

*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. List of Analyzed Sample Name

Sample	N
1. Iwashi (sardine, *Sardinos melanosticta*)	8
2. Aji (horse-mackerel, *Trachurus trachurus*)	9
3. Hamachi (yellow tail, *Siriola quinqueradiata*)	5
4. Amadai (blanquillos, *Branchios tegidas*)	4
5. Surumeika (saquttated calamary, *Todarades pacificus*)	6
6. Matoudai (john dory, *Zeus japonicus*)	1
7. Tachiuo (hairtail, *Trichiurus lepturus*)	1
8. Sanma (mackerel pike, *Cololabis saira*)	6
9. Kaki (oyster, *Crassotrea gigas*)	3
10. Shimaaji (*Pseudocaranx dentex*)	1
11. Kurumaebi (*Peraeus japonicus*)	1
12. Kamasu (barracuda, *Sphyraena japonicus*)	6
13. Sawara (Japanese Spanish mackerel, *Scomberomorus niphonius*)	5
14. Kisu (sillago, *Sillago sihama*)	1
15. Bakagai (*Mactra chinensis*)	1
16. Kichiji (bighand thornyhead, *Sebastolobus macrochir*)	5
17. Hotategai (*Patinopecten yessoensis*)	1
18. Ishigarei (stone flounder, *Kareius bicoloratus*)	1
19. Medai (Japanese butterfish, *Hyperoglyphe japonica*)	3
20. Karasugarei (black halibut, *Reinhardtius hippoglossoides*)	1
21. Bora (grey mullet, *Mugil cephalus*)	3
22. Kuromutu (*Scombrops gilberti*)	6
23. Madai (sea bream, *Chrysophrys major*)	5
24. Managatuo (harvest fish, *Pampus argenteus*)	1
25. Makogarei (marbled sole, *Limanda yokohamae*)	1
26. Kinme (alfoncino, *Beryx splendens*)	6
27. Anago (conger eel, *Astroconger myriaster*)	2
28. Hirame (flounder, *Paralichthys olivaceus*)	2
29. Shiruba (silver warehou, *Seriolella maculata*)	1
30. Katuo (bonito, *Katsuwonus pelamis*)	5
31. Hotaruika (*Watasenia scintillans*)	1
32. Suzuki (sea-bass, *Lataolabrax japonicus*)	19
33. Mirukui (*Tresus keenae*)	2
34. Konoshiro (gizzard shad, *Clupanodon punctatus*)	2
35. Asari (short-necked clam, *Tapes* (*Amygdala*) *japonica*)	2
36. Akagai (*Anadara* (*Scapharca*) *broughtonii*)	2
37. Houbou (gurnard, *Chelidonichthys kumn*)	1
38. Okihirasu (*Seriolella brama*)	1
39. Isaki (grunt, *Parapristipoma trilineatum*)	3
40. Tobiuo (flying fish, *Prognichthys agoo*)	3
41. Namigai (*Panope japonica*)	1
42. Mebaru (gopher, *Sebastes inermis*)	3
43. Agemaki (*Sinonovacula constricta*)	2
44. Kochi (bartail flathead, *Platycephalus indicus*)	2
45. Tubodai (*Quinquarius japonicus*)	1
46. Okibin (*Allothunnus tallai*)	1
47. Hamaguri (*Meretrix lusoria*)	2
48. Nishin (herring, *Clupea pallasi*)	3
49. Gindara (black cod, *Anoplopoma fimbria*)	2
50. Mebachi (tuna, *Thunnus obesus*)	1
51. Madara (codfish, *Gadus macrocephalus*)	2
52. Ara (sawedged perch, *Niphon spinosus*)	1
53. Ainame (greenling, *Hexagrammos otakii*)	2
54. Saba (mackerel, *Pneumophorus japonicus*)	2
55. Maguro (tuna, *Thunnus albacares*)	2
56. Monkouika (*Sepia* (*Acanthosepion*) *subaculeata*)	1
57. Sumiika (*Sepia* (*Platysepia*) *esculenta*)	1
Total	166

N : number of sample

Table 2. Recoveries of Mercury and Selenium Added to Samples

	added(ng)	found(ng)	recovery(%)	C.V.(%)
Hg	0	115.6		5.0
	500	637.6	104.4	5.0
	1000	1109.6	99.4	3.7
Se	0	261.0		2.7
	100	364.4	103.4	3.2
	200	465.6	102.3	3.4

Amount of sample (Sea-bass) Hg：5.0g(n：5)
Se ：1.0g(n：5)

である．Table 1に魚種及びそれぞれの検査件数を示す．

魚類については頭，内臓及び骨を除いた筋肉部を，貝類については内臓を除いた可食部をホモジナイザーで均一化したものを試料とした．

2．試験法

1）水銀　試料5.0gを採り，硫酸硝酸還流法によって湿式分解した．分解終了後水で50mlとし，その一定量を正確に採取し，塩化第一スズ溶液を用いて還元気化一金アマルガム法で総水銀を測定した．

2）セレン　前報[13]に従って，試料1.0gを採り，硝酸過塩素酸分解後，水で20mlとし，試験溶液とした．測定は還元剤として水素化ホウ素ナトリウム溶液を用いる水素化物加熱原子吸光分析法で総セレンを測定した．

3．装置

水銀分析装置：日本インスツルメント株式会社製リガクマーキュリーSPに還元気化装置を取り付けて使用した．

原子吸光装置：日本ジャーレルアッシュ株式会社製AA-8200型に水素化物発生装置HYD-1及び水素化物加熱原子化装置HYD-2を連結したものを使用した．

結果及び考察

1．添加回収実験

試料にスズキを用い，水銀及びセレンについて添加回収実験を行った．水銀の場合は試料5.0gに500ng及び1000ngを，セレンの場合は試料1.0gに100ng及び200ngを添加し，それぞれ5回ずつ測定した．結果をTable 2に示す．水銀，セレンとも良好な回収率が得られ，そのときの変動係数も5％以下であった．従って，両試験法とも今回の調査に十分適用可能であると考えられる．

2．魚介類中の総水銀含有量

今回調査対象とした全魚介類中の総水銀の定量結果を，Fig. 1にヒストグラムで示した．最高はクロムツ1.06ppm，最低はボラの0.01ppm以下であり，平均

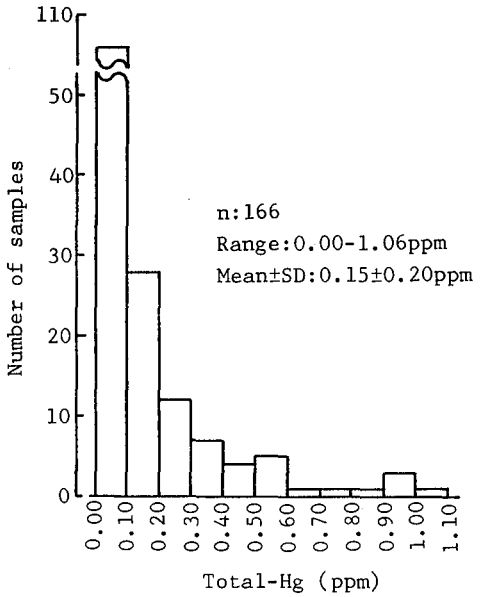


Fig. 1. Histogram of Total Mercury Contents in Fish and Shellfish

0.15ppmであった．また，0.00-0.10ppmの範囲に全体の62％に相当する103検体が含まれていた．

このヒストグラムは，裾が長く伸びた非対称形であることから対数正規分布であることが推定されるので，その測定値を対数変換後正規確率紙にプロットした．その結果Fig. 2に示したように良好な直線が得られたので，魚介類中の総水銀の測定値は対数正規分布をしていると考えられる．このときの幾何平均は0.07ppm，標準偏差0.03ppmであった．

3．魚介類中のセレン含有量

セレンの定量結果を，Fig. 3にヒストグラムで示した．最高はキンメダイの1.35ppm，最低はアナゴの0.20ppm，平均0.62ppmであった．このヒストグラムから対数正

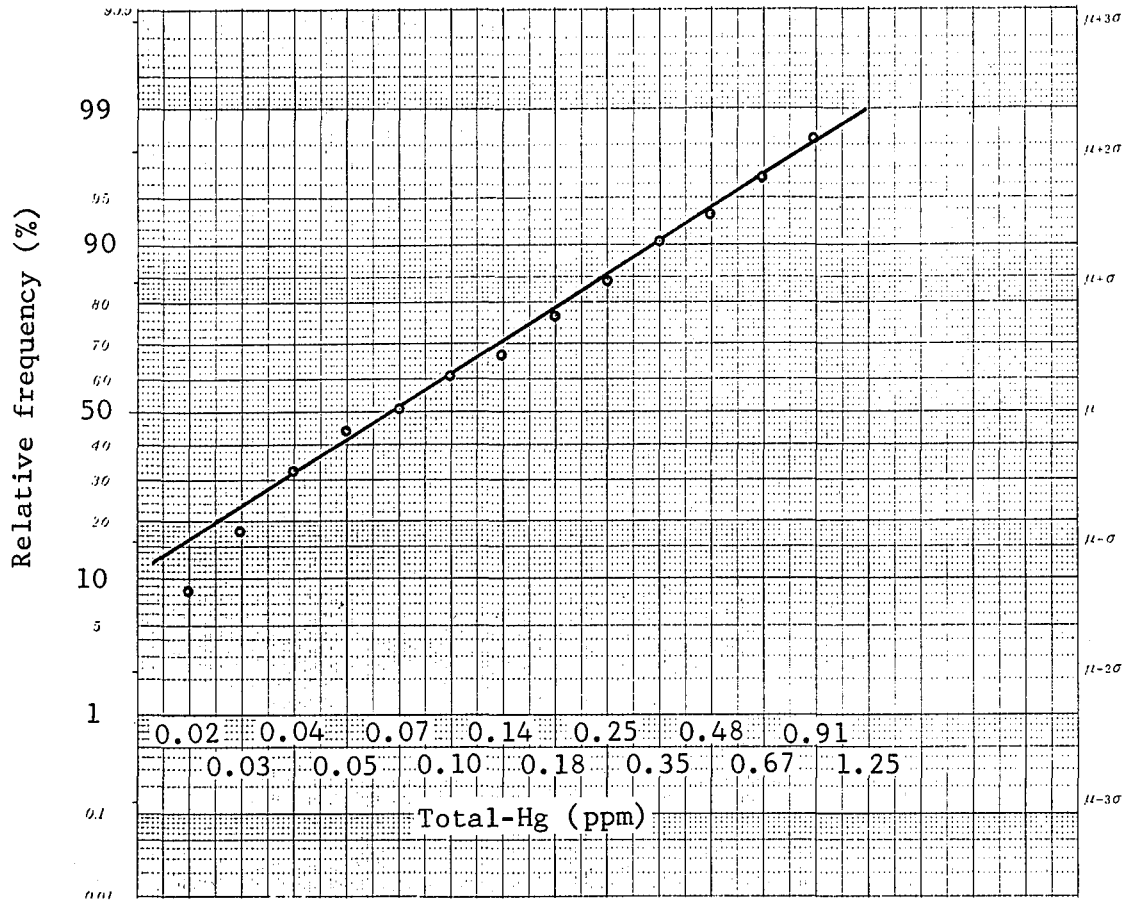


Fig. 2. Frequency of Total Mercury Concentration in Fish and Shellfish

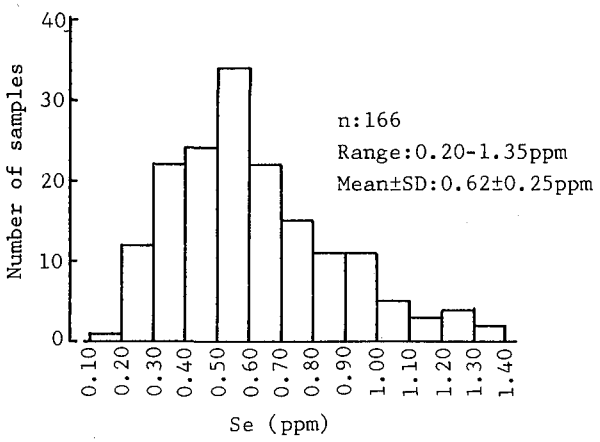


Fig. 3. Histogram of Selenium Contents in Fish and Shellfish

規分布していると考えられるので測定値を対数変換し，正規確率紙にプロットした．Fig. 4 に示したように良好な直線が得られ，対数正規分布であることが確認された．このときの幾何平均は0.57ppm，標準偏差0.02ppm であった．

4．相関性について

魚介類中の総水銀及びセレン含有量は既にそれぞれ対数正規分布が確認されているので，対数変換した値について散布図を作成した．Fig. 5 に示したように，この散布図からは直線傾向が認められ，相関係数に $r=0.4010$ ($n=166$)，回帰直線 $\log y=0.141\log x-0.083$が得られた．相関分析の結果，r は $p<0.001$において有意であった．

魚介類中の総水銀及びセレンの相関性は比較的水銀含有量の高いカジキ，マグロ等においてのみ報告例[9-12]があるが，以上の結果から，魚介類全体を母集団とした

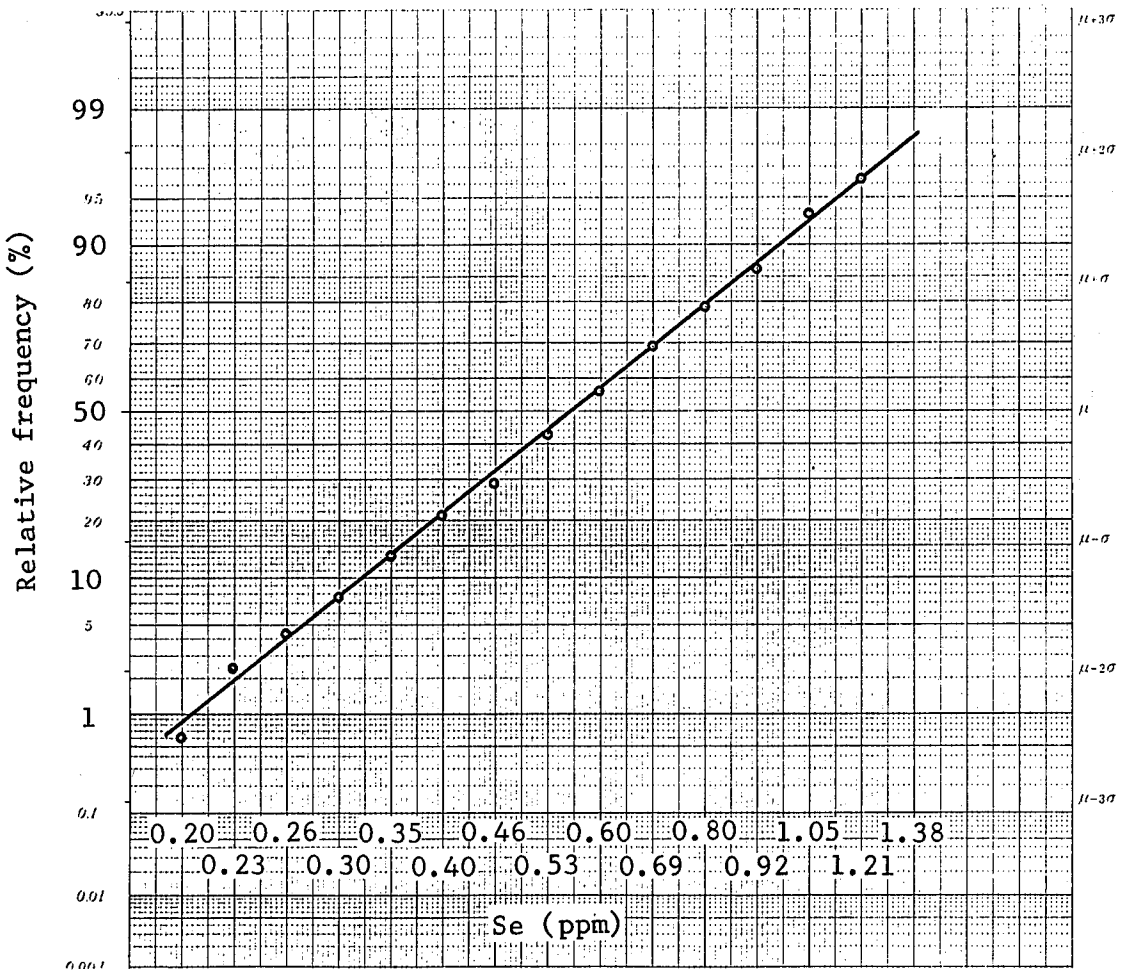


Fig. 4. Frequency of Selenium Concentration in Fish and Shellfish

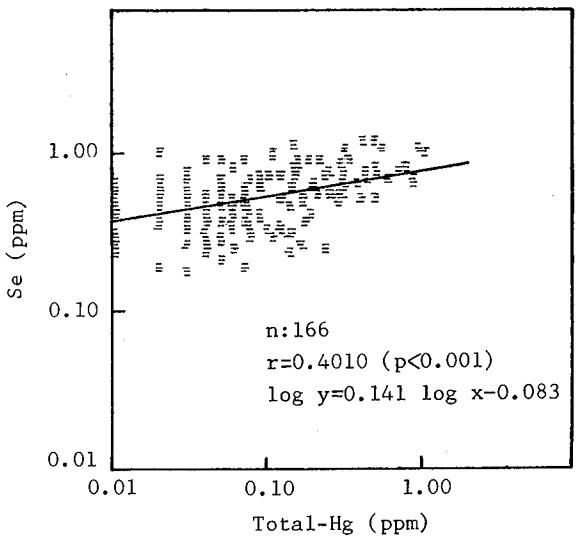


Fig. 5. Correlation Between Log Total Mercury and Log Selenium Concentration in Fish and Shellfish

場合にも水銀及びセレン含有量間には正の相関性があると考えられた.

要　約

1. 一般魚介類57種166検体について，総水銀及びセレンの含有量を測定した結果，それぞれ対数正規分布を示した.

2. 総水銀の算術平均は0.15ppm，標準偏差0.20ppm，また幾何平均は0.07ppm，標準偏差0.03ppm であった.

3. セレンの算術平均は0.62ppm，標準偏差0.25ppm，また幾何平均は0.57ppm，標準偏差0.02ppm であった.

4. 総水銀，セレンの相関を調べたところ，相関係数 $r=0.4010$ ($p<0.001$)，回帰直線 $\log y=0.141\log x-0.083$ で有意に正の相関を認める結果を得た.

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52回学術講演会，昭和61年11月，高知で発表した．）

文　献

1）Hill, J. C.：*J. Nutr.* 104, 593-598, 1974
2）Yamane, Y., Fukino, H., Aida, Y. and Imagawa, M.：*Chem. Pharm. Bull.* 26, 703-708, 1978
3）Ganther, H. E., Goudie, C., Sunde, M. L., Kopecky, M J., Wangner, P., Sang-Hwan Oh. and Hoekstra, W. G.：*Science*, 175, 1122-1124, 1972
4）Ganther, H. E. and Sunde, M. L.：*J. Food Sci.*, 39, 1-5, 1974
5）Stillings, B.：*Nutr. Reviews*, 31, 27, 1973
6）東京都衛生局：環境保健レポート，22，41-46，1973
7）Stillings, B. R., Langally, H., Bauersfeld, P. and Soares, J.：*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 30, 243-254, 1974
8）Koeman, J. H., Peeters, W. H. M., Koudstaal-Hol, C. H. M., Tjioe, P. S. and De Goeij, J. J. M.：*Nature*, 245, 385-386, 1973
9）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，25，235-239，1974
10）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，26，200-204，1975
11）中川西剛，山中英明，菊地武昭：食衛誌，17，374-380，1976
12）板野一臣，佐々木清司，岡村一弘，立川　涼：食衛誌，18，547-552，1977
13）山野辺秀夫，竹内正博，水石和子，渡辺四男也：東京衛研年報，37，149-153，1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 173-176, 1987

東京都におけるPCB汚染の実態について（第15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 (XV)
Concentrations of Polychlorinated Biphenyl in Foods, Tablewares and Kitchinwares

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，食品中に残留するPCBの規制[1]が実施されたが，以来，著者らはPCBの汚染実態を把握することを目的として，東京都内に流通する魚介類を中心とする食品ならびに器具類について調査を行っている[2]．

近年，新しい水産資源を対象とする新漁場の開発が進み，世界の様々の海域で捕獲された魚介類が市場に広く流通している．PCB汚染がヨーロッパ，アメリカ等を始めとする広範な地域で起った過去の経緯を考えるならばこれらの魚介の調査も重要と思われる．

本報では昭和60年度中に行った魚介類，各種食品ならびに調理用器具類のPCB含有量の調査結果を報告する．

調査方法

調査試料　昭和60年4月より61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60種145検体，市場外流通の輸入魚介類17種30検体，水産加工品41検体，食肉6種30検体，卵2種21検体，食用油脂3種20検体，牛乳20検体，乳製品7種20検体，ベビーフード19検体，育児用粉乳10検体，調理用器具類20検体および東京湾汚染モニタリング用として東京湾捕獲スズキ30検体の合計406検体である．

定量法　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．測定値は小数点以下3桁目を四捨五入した値である．

結果および考察

調査品目ならびに検体数は前年度[2]とほぼ同じである．Table 1に市場入荷魚介類の可食部のPCB含有量を示す．魚介類の名称は流通商品名にほぼ従い，英名，学名は日本産魚名大辞典[4]，原色日本大型甲殻類図鑑[5]，新日本動物図鑑[6]，新顔の魚[7]等を参考とした．

日本近海で捕獲された，国産魚介類の中では最高値がコノシロの0.67ppm（n＝3，$\bar{x}$=0.25ppm），次いでタチウオ0.44ppm（n＝2，$\bar{x}$＝0.42ppm），アナゴ0.41ppm（n＝1），カマス0.20ppm（n＝5，$\bar{x}$＝0.06ppm），サバ0.20ppm（n＝6，$\bar{x}$=0.06ppm）の順であった．例年，コノシロおよびタチウオのPCB含有量は高く，アナゴ一例の0.41ppmという比較的高い値が見られた以外，今年度も新しい傾向はなかった．

海水産，国産魚介97検体中0.01ppm以上のPCB検出魚介は81検体（83.5%）であり，平均値は0.07ppmであった．これらはいずれも前年度の検出率および平均値を8.0%，0.02ppm上回る値であるが，この差は調査魚種の相違により生じたものであり，汚染の進行とは考えられない．

次に，新しく水産資源を求めて開発されたニュージーランド，インド，アフリカ，アルゼンチン，アイルランド，ノルウエー等の海域の漁場において，主として，トロール漁法により捕獲され，市場に入荷する，いわゆる

*東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*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)			
Ainame(greenling, *Hexagrammos otakii*)	1		0.01
Aji(horse-mackerel, *Trachurus trachrus*)	9	0.01-0.10	0.01
Anago(conger ell, *Astrokonger myriaster*)	1		0.41
Anko(angler, *Lophiomus setigerus*)	1		0.00
Bora(gray mullet, *Mugil cephalus*)	1		0.05
Hamachi(yellow tail, *Seriola quinqueradiata*)	6	0.05-0.10	0.07
Isaki(grunt, *Parapristipoma trilineatum*)	1		0.01
Iwashi(sardine, *Sardinos melanosticta*)	8	0.02-0.17	0.09
Kaki(oyster, *Crassotrea gigas*)	4	0.02-0.03	0.03
Kamasu(barracuda, *Sphyraena japonius*)	5	0.01-0.20	0.06
Katsuo(bonito, *Katsuwonus pelamis*)	2	0.01-0.02	0.02
Kichji(*Sebastolobus macrochir*)	7	0.01-0.04	0.02
Kinme-dai(alfoncino, *Beryx splendens*)	5	0.04-0.09	0.06
Kisu(sillago, *Sillago sihama*)	1		0.01
Konoshiro(gizzard shad, *Clupanodon punctatus*)	3	0.01-0.67	0.25
Madara(codfish, *Gadus macrocephalus*)	1		0.00
Mebaru(gopher, *Sebastes inermis*)	3	0.00-0.01	0.01
Namigai	1		0.00
Nishin(herring, *Clupea pallasi*)	1		0.06
Nitari-kujira(*Balaenoptera edeni*)	1		0.09
Saba(mackerel, *Pneumotophrous japonicus*)	6	0.02÷0.20	0.06
Sanma(mackerel pike, *Cololsbis saira*)	8	0.01-0.02	0.01
Sawara(*Scomberomorus niphonius*)	6	0.02-0.12	0.08
Shiira(common dolphin, *Coryphaena nippurus*)	1		0.02
Surume-ika(saguttated calamary, *Todarades pacificus*)	7	0.00-0.01	0.00
Tachiuo(hairtail, *Trichiurus lepturus*)	2	0.40-0.44	0.42
Tobiuo(flying fish, *Prognichthys agoo*)	3		0.00
total	97	0.00-0.67	0.07
Suzuki(perch, *Lataolabrax japonicus*)*	30	0.04-2.67	0.64
(*marine fish trawled*)			
Aji(horse-mackerel, *Trachurus trachrus*)	1		0.00
Ara(sawedged perch, *Nipon spinosus*)	2		0.00
Aohirasu	1		0.00
Arotsunasu=Okibin(*Allothunnus tallai*)	1		0.00
Angorarenko-dai(*Dentex angolensis*)	1		0.00
Akauo(pacific ocean perch, *Sebastes alutus*)	1		0.00
Ebi(tiger)	1		0.00
European-madai(*Pagrus pagrus*)	2		0.00
Gin-sawara	2		0.00
Gin-dara(black cod, *Anoplopoma fimbria*)	1		0.01
Houbou(gurnard, *Chelidonichthys*)	1		0.00
Hirame(flounder, *Paralichthys olivaceus*)	1		0.01
Ishigani(*Charybdis japonica*)	1		0.12
Kamasu(barracuda, *Sphyraena japonicus*)	1		0.00
Koori-kamasu(*Champsocephalus gunnari*)	1		0.00
Kuromutsu(*Scombrops gilberti*)	3	0.00-0.01	0.01
Kurome-dai	1		0.00
Kusakaritsubo-dai(*Pentaceros richardsoni*)	1		0.00
Managatsuo(harvest fish, *Pampus argentenus*)	2		0.00
Matou-dai(black oleo dory)	1		0.00
Matsu-ika	2		0.00
Me-dai(bream, *Hyperoglyphe antarctica*)	2		0.00
Mongo-ika(*Sepia esculenta*)	3		0.00
Nishin(herring, *Clupea pallasi*)	1		0.10
Saba(atlantic mackerel, *Sconber scombrus*)	1		0.02
Tachiuo(hairtail, *Trichiurus lepturus*)	3	0.00-0.01	0.00
Tsubodai(*Quinquarius japonicus*)	1		0.00
total	39	0.00-0.12	0.01
(*Limnetic fish*)			
Ayu(ayu sweetfish, *Plecoglossus altivelis*)	2		0.01
Koi(carp, *Cyprinus carpio*)	1		0.00
Nijimasu(rainbow trout, *Salmo gairdnerii irideus*)	4	0.00-0.01	0.01
Unagi(eel, *Anguilla japonica*)	2		0.02
total	9	0.00-0.02	0.01

N : number of samples
* collected from the Tokyo-bay

外国産魚介類が増加してきている．今回28類39検体について測定したところ，最高値はアイルランド沖のイシガレイ0.12ppm，次いでノルウエー沖のニシン0.10ppmであった．また0.01ppm以上の検出魚介類は7検体（17.9%），平均値は0.01ppmであった．これらの外国産魚種のうち，日本近海においても良く見受けられるタチウオ（ニュージーランド沖0.00ppm，セネガル沖0.00ppm，ケープタウン沖0.01ppm），カマス（セネガル沖0.00ppm），アジ（ニュージーランド沖0.00ppm）のPCB含有量は国内産同魚種と比較して明らかに低い値である．

これらの事から，日本近海のPCB汚染はこれらの海域と比較して高いことが推察される．

一方，淡水魚はいずれも国内産養殖魚である．最高値はウナギの0.02ppm（n＝2，$\bar{x}$＝0.02ppm）であり，0.01ppm以上の検出魚は9検体中7検体（77.8%）であった．

従って，淡水養殖魚の検出率はやや高いが汚染は低い．

東京湾の汚染調査を目的として，湾内で捕獲したスズキ（体長73.8±5.0cm，体重3.3±0.5kg，n＝30）30検体について調査した．最高値は2.67ppm（n＝30，$\bar{x}$±S.D.＝0.64±0.62ppm）であった．これは今回行った調査魚介類中最も高い値であり，東京湾のPCB汚染の高さを示唆している．

Table 2は市場外流通の輸入魚介，水産加工品，肉類等のPCB含有量を示す．市場外流通魚介類はエビ，貝を中心とする10種30検体であり，いずれも冷凍品であった．エビの産地は主にタイ，インドネシア，台湾などの

Table 2. Concentrations of PCB in Fishes Imported, Marine Products, Meats and Others

samples	N	range(ppm)	average(ppm)
Imported fish			
shrimp	10	0.00-0.02	0.00
shell fish	9	0.00-0.02	0.00
crab	3	0.00-0.01	0.00
cattle-fish	2		0.00
conger eel	1		0.01
red-salmon	1		0.01
common brackish goby	1		0.00
whitebait	1		0.00
half beak	1		0.00
salmon roe	1		0.01
total	30	0.00-0.01	0.00
Processed marine product	41	0.00-2.17	0.17
Meat			
pork	5		0.00
pig liver	5		0.00
beef	5		0.00
cow liver	5		0.00
chicken	5	0.00-0.01	0.01
chicken liver	5	0.00-0.01	0.00
total	30	0.00-0.01	0.00
Edible fat			
lard	18	0.00-0.01	0.00
tallow	2		0.00
total	20	0.00-0.01	0.00
Egg			
quail	1		0.00
hen	20	0.00-0.01	0.00
total	21	0.00-0.01	0.00
Infant food	19		0.00
Tableware and kitchenware	20	0.00-0.01	0.00

N：number of samples

Table 3. Concentrations of PCB in Dairy Products

samples	N	range(ppm)	average(ppm)
Butter	6	0.00-0.01	0.01
Cheese	6	0.00-0.05	0.02
Powdered milk	1		0.00
Yoghurt	1		0.00
Fresh cream	2		0.00
Ice cream	4		0.00
Formulated milk	10		0.00
Milk	20		0.00
total	40	0.00-0.05	0.00

N : number of samples

東南アジアであり，貝，カニはチリー，カナダ，アメリカ，中国，ニュージーランド産が多く，産地は広範である．測定結果はノルウエー産赤エビ，チリー産アサリ（剝き身）の0.02ppm が最高値であり，30検体中0.01ppm 以上検出魚介類は8検体（26.7%），平均値は0.01ppm 以下と低い値であった．

水産加工品には比較的高い値を示すものが認められるが，今回の調査結果ではアンコウの肝臓水煮缶詰の2.17，1.70，0.49ppm（$\bar{x}$=1.45ppm），ボラの卵巣より製造したカラスミ0.88ppm，鮒寿し0.71ppm，ヒシコイワシの酢漬（ままかり）0.23，0.17ppm（$\bar{x}$=0.20ppm）などが高い値であり，カマボコ等の練製品，干物およびカニ，貝類のビンあるいは缶詰は共に低く，水産加工品の平均値は0.17ppm であった．

肉類は牛，豚，鶏の肉および肝臓各々5検体について調査したが鶏肉3検体，鶏肝臓1検体より，食用油脂（ラード，生牛脂，生豚脂）からはラード1検体より，また卵からは2検体よりいずれも0.01ppm を検出した．

ベビーフードは肉，肝臓，魚などと野菜，米などを煮てビン詰したものあるいはこれらを凍結乾燥しパッキングしたものが多種類出廻っている．今回19検体について調査したがいずれからも検出しなかった．

調理用器具類14種20検体中，紙ナプキン1検体より0.01ppm を検出したが，ストロー，紙皿，ケーキペーパー，ポリプロピレン製ファッション箱等からは検出しなかった．

Table 3に乳および乳製品の調査結果を示す．乳製品の中では輸入ナチュラルチーズから例年比較的高い値（0.13ppm[8]，0.08ppm，0.09ppm[2]）で検出されたが，今回の調査では6検体中1検体より0.05ppm，他にバターチーズより0.01ppm を検出した．

一方，バター6検体中4検体（66.7%）より0.01ppm を検出したが，アイスクリーム，生クリームなどからは検出しなかった．

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しなかった．

ま と め

昭和60年度中に東京都において入手した魚介類，水産加工品，食肉類，卵，食用油脂，ベビーフード，乳および乳製品，調理用器具類について PCB の汚染調査を行った．調査の結果，いずれからも暫定規制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 規制について」
2）植田忠彦，竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：東京衛研年報，37，158-162，1986
3）厚生省環境衛生局 PCB 分析研究班：分析法に関する研究（1972年1月）
4）日本産魚名大辞典，日本魚類学会編，1981，三省堂
5）三宅貞祥著，原色日本大型甲殻類図鑑（Ⅰ，Ⅱ），1984，保育社
6）岡田 要著，新日本動物図鑑（上，中，下）1969，北隆館
7）阿部宗明著，新顔の魚，1986，伊藤魚学研究振興財団
8）岸本清子，竹内正博，風間成孔：東京衛研年報，35，175-178，1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 177-181, 1987

残留抗生物質の微生物学的検査法の基礎的検討

桐谷礼子*, 神保勝彦*, 松本昌雄*

Basic Studies on Biological Detection of Residual Antibiotics in Food

REIKO KIRITANI*, KATSUHIKO JINBO* and MASAO MATSUMOTO*

Keywords：残留抗生物質 residual antibiotics, ディスク法 paper disk method

動物性食品中に残留する抗生物質の検査法としては，厚生省が通知した「畜水産食品中の残留物質検査法」（以下，公定法と略す）がある．このうち，第1集[1]は，残留抗生物質の個別検査法（以下，個別検査法と略す）であり，目的とする抗生物質により試験法，試験菌，培地，抽出方法などが異なる．このため，不明の残留物質を検査するには，きわめて繁雑で実用性に乏しいと言われている．一方，不明の残留物質の検査法としては第1集の5の食肉の抗菌性物質簡易検査法[2]（以下，簡易検査法と略す）がある．この方法は，試験菌2種類，抗生物質検出用培地1種類を用い，試験操作が非常に簡易であるが，目的とする抗生物質によっては検出感度が低いという欠点を有するため，日常検査法として用いるにはまだ難点がある．

そこで著者らは，個別検査法と同程度の検出感度を示し，しかも簡易検査法に近い試験操作で行える方法があれば，日常検査法として採用可能であると考え検討を重ねてきた．今回，動物用医薬品として汎用されている抗生物質14種類を対象に，試験法，試験菌，抗生物質検出用培地を整理，統合するために，個別検査法および簡易検査法をもとに基礎的検討を行った．その結果，試験法1種類，3試験菌および検出用培地1種類で対象の抗生物質を，ほぼ満足できる感度で検出できる方法を確立したので報告する．

実験材料および方法

1．供試菌株

Bacillus cereus var. *mycoides* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus stearothermophilus* var. *B. calidolactis* C-953および *Escherichia coli* NIHJ の計6株である．（以下，それぞれ *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *M. luteus*, *B. stearothermophilus*, *E. coli* と略す）

2．使用培地

1）増殖用培地：*M. luteus*, *S. epidermidis* および *E. coli* は感受性測定用ブイヨン（日水）を，*B. stearothermophilus* は公定法第1集の2[3]に記載されているM-18培地を用いた．

2）抗生物質検出用培地：Antibiotic medium 1, 2（Difco）および感性ディスク用培地N（日水）を用いた．（以下それぞれAM1培地，AM2培地，SD培地と略す）なお，AM1培地，AM2培地は個別検査法に記載されているM-8培地およびM-10培地と同じ組成であり，SD培地は，簡易検査法で使用されているものである．

これら以外の培地はすべて個別検査法に記載されているものを用いた．

3．器具

1）ペトリ皿：合成樹脂製で，内径86mmのものを用いた．

2）パルプディスク：東洋ろ紙（株）製の直径10mm，厚さ1.5mm（吸水量0.08±0.01ml）のパルプディスクを121℃15分間高圧蒸気滅菌後，十分乾燥させて用いた．

3）円筒：外径8mm，内径6mm，高さ10mmでステンレススチール製の円筒を，乾熱滅菌して用いた．

4．抗生物質標準品

実験に供した抗生物質は，テトラサイクリン系（TCs）はオキシテトラサイクリン（OTC）とクロルテ

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

トラサイクリン（CTC）の2剤，アミノグリコシッド系（AGs）はストレプトマイシン（SM），カナマイシン（KM），フラジオマイシン（FM）の3剤，マクロライド系（MLs）はタイロシン（TS），オレアンドマイシン（OM），キタサマイシン（KT）およびエリスロマイシン（EM），スピラマイシン（SP）の5剤，ペニシリン系（PCs）はペニシリンG（PCG）とアンピシリン（ABPC）の2剤，その他にノボビオシン（NB），クロラムフェニコール（CP）の合計6系統14種類で，いずれも製薬会社から分与された純品である．

5．試験菌液の調製

B. cereus および *B. subtilis* の芽胞浮遊液は公定法にしたがって調製し，これを試験菌液とした．*M. luteus*，*S. epidermidis*，*B. stearothermophilus* および *E. coli* の4株は公定法にしたがって増殖用培地で継代を行い，その3代目の培養原液を試験菌液とした．

6．抗生物質検出用平板の作成

1）二層培地：個別検査法にしたがって作成した．すなわち，ペトリ皿に検出用培地20ml を注入し，これを凝固させて基層とし，基層培地上に試験菌液を混和した培地4 ml を均一にひろげ固めて種層とした．なお，培地に混和する試験菌液の量は公定法にしたがった．

2）単層培地：簡易検査法にしたがって作成した．すなわち，試験菌液を混和した培地8 ml をペトリ皿に注入し，水平に保って凝固させた．

7．試験法

1）二層培地・円筒法：二層培地平板に4個の円筒をそれぞれ正方形の各頂点となるように配置し，円筒に抗生物質の溶液を満たした．*B. cereus* と *M. luteus* の平板については30±1℃，*S. epidermidis* は33±1℃，*B. subtilis* および *E. coli* は36±1℃，*B. stearothermophilus* は55±1℃で，それぞれ18±1時間培養した．円筒周辺に出現した阻止円の直径をノギスを用いて測定し，その直径が10mm以上のものを陽性と判定した．

2）単層培地・ディスク法：単層培地平板に抗生物質の溶液中に浸せきしたパルプディスクを置いた．培養および判定は円筒法と同様に行い，阻止円の直径が12mm以上のものを陽性と判定した．

実験結果および考察

1．二層培地・円筒法と単層培地・ディスク法の比較

二層培地・円筒法と単層培地・ディスク法を比較し，その結果を表1に示した．OTC，SM，TS，KT，PCG，CPの6剤は単層培地・ディスク法が良好な感度を示し，CTC，FM，OM，EM，SPの5剤は両者が同じ感度を示した．KMでは二層培地・円筒法の方が感度が良好であったが，その値は0.25 μg／ml と0.5 μg／ml であり差はほとんど認められなかった．

表1．二層培地・円筒法と単層培地・ディスク法の比較

抗生物質		検出感度(IU, μg／ml) 二層培地・円筒法	単層培地・ディスク法
TCs	OTC	0.5	0.25
	CTC	0.05	0.05
AGs	SM	0.5	0.25
	KM	0.25	0.5
	FM	0.5	0.5
MLs	TS	0.5	0.25
	OM	0.1	0.1
	KT	1.0	0.5
	EM	0.05	0.05
	SP	0.5	0.5
PCs	PCG	0.1*	0.01*
	ABPC	NT**	0.005
	NB	NT	0.5
	CP	5.0	2.5

* ：IU／ml
**：Not Tested

以上の結果から，単層培地・ディスク法は二層培地・円筒法と同等もしくはそれ以上の検出感度を示すことが判明した．また，単層培地・ディスク法の試験操作は，二層培地・円筒法に比べて簡易であることからも，実用的な方法であると考える．

2．試験菌の比較

個別検査法では，今回対象とした14種類の抗生物質に対して6試験菌が使用されているが，抗生物質に対する菌株の感受性[4-5]をもとに，これらの整理を行った．その結果，簡易検査法で用いている *B. subtilis* および *M. luteus* の2試験菌に *B. cereus* を加えた3菌株を試験菌とすることを試み，各菌株の感受性を調べた．その結果を表2に示した．FM は *B. subtilis* で0.5 μg／ml，NB は *M. luteus* で 0.5 μg／ml，CP は *B. cereus* および *M. luteus* で2.5 μg／ml であり，個別検査法で用いられている試験菌とほぼ同じ感受性を示した．

ABPC は *B. stearothermophilus* の検出感度0.005 μg／ml に比べて3試験菌とも悪かったが，*M. luteus* の検出感度は0.01 μg／ml であり，一般にいわれている残留抗

表2．各抗生物質に対する試験菌の感受性

抗生物質		検出感度(IU, μg／ml)			
		B. cereus	*B. subtilis*	*M. luteus*	公定法(試験菌)
TCs	OTC	0.25	1.0	2.5	0.25 (*B. cereus*)
	CTC	0.05	0.5	1.0	0.05 (*B. cereus*)
AGs	SM	1.0	0.25	2.5	0.25 (*B. subtilis*)
	KM	5.0	0.5	25	0.5 (*B. subtilis*)
	FM	10	0.5	25	0.5 (*S. epidermidis*)
MLs	TS	2.5	1.0	0.25	0.25 (*M. luteus*)
	OM	1.0	1.0	0.1	0.1 (*M. luteus*)
	KT	5.0	2.5	0.5	0.5 (*M. luteus*)
	EM	0.25	0.1	0.05	0.05 (*M. luteus*)
	SP	5.0	2.5	0.5	0.5 (*M. luteus*)
PCs	PCG	>1.0*	0.05*	0.01*	0.01* (*M. luteus*)
	ABPC	>1.0	0.05	0.01	0.005 (*B. stearothermophilus*)
	NB	5.0	5.0	0.5	0.5 (*S. epidermidis*)
	CP	2.5	10	2.5	2.5 (*E. coli*)

*：IU／ml

生物質の検出感度としては十分満足できる値であることから，FM，NB，ABPC，CP の4剤の試験菌は *B. subtilis* あるいは *M. luteus* で代替できると考える．

なお，今回選択した3試験菌のうち，*B. cereus* と *B. subtilis* は芽胞浮遊液を用いるので，その試験菌液は，凍結保存してあり，常時使用可能であることから，日常検査に用いる試験菌としては扱い易いと考える．

3．抗生物質検出用培地の検討

個別検査法で今回対象とした14種類の抗生物質を検査するには，組成および pH の異なる培地10種類を必要とする．そこで培地組成等から考慮して，個別検査法および簡易検査法の中から3種類の培地を選択して，これらの比較検討を行った．その結果は表3に示した．OTC，CTC，OM，KT，EM，ABPC，NB，CP は3培地間に検出感度の差は認められなかった．TS は AM 1 培地と SD 培地が AM 2 培地に比べ2倍高い検出感度を示し，SP と PCG は SD 培地が AM 1 培地，AM 2 培地に比べ，2倍高い検出感度を示した．SM，KM，FM は AM 1 培地，AM 2 培地で検出感度が高く，SD 培地に比べ SM は10倍，KM は5倍，FM では5倍であった．

この結果から，AM 1 培地および AM 2 培地は TCs，AGs，NB，CP の検出に，SD 培地は TCs，MLs，PCs，NB，CP の検出に適していることが判明した．さらに，AM 2 培地は AM 1 培地に比べて，TCs および AGs の阻止円が明瞭であった．また，TS，SP および PCG の AM 2 培地における感度は，SD 培地に比べて低かったが，その値は個別検査法におけるこれらの薬剤の感度と同程度であった．これらのことから，AM 2 培地が残留抗生物質検出用培地として適当であると考える．

一方，ある種の抗生物質はその抗菌力が pH の影響を受けることが知られている[6]．そこで，培地の pH を6.0，7.0および8.0に調整し，検出感度の差を検討した．その結果を表4に示した．OTC，CTC，SM，TS，PCG，ABPC，CP の7剤は培地 pH による抗菌力の差は認められなかった．しかし，TCs，PCs は pH6.0で，SM は pH8.0で明瞭な阻止円を形成した．KM，FM，OM，KT，EM，SP の6剤はいずれも pH8.0で，NB は pH6.0で高い検出感度を示した．したがって，検出用培地の pH6.0，7.0，8.0のうち，AGs と MLs は pH8.0，TCs，PCs，NB は pH6.0が適当であると考える．CP は pH6.0-8.0のいずれでも良いと考える．

4．改良法と公定法の比較

以上の基礎的検討結果から，改良法として次の検査法を考案した．すなわち，試験法として単層培地・ディスク法を用い，試験菌は *B. cereus*，*B. subtilis*，*M. luteus* を用い，検出用培地は AM 2 培地とし，その pH は TCs，PCs および NB で pH6.0，その他は pH8.0とする方法である．この改良法と，個別検査法および簡易検査法にお

表3．各培地における検出感度の比較

抗生物質		試験菌	検出感度(IU, μg/ml)		
			AM1培地	AM2培地	SD培地
TCs	OTC	*B. cereus*	0.25	0.25	0.25
	CTC		0.05	0.05	0.05
AGs	SM	*B. subtilis*	0.25	0.25	2.5
	KM		0.5	0.5	2.5
	FM		0.5	0.5	2.5
MLs	TS	*M. luteus*	0.25	0.5	0.25
	OM		0.25	0.25	0.25
	KT		0.5	0.5	0.5
	EM		0.05	0.05	0.05
	SP		0.5	0.5	0.25
PCs	PCG	*M. luteus*	0.025*	0.025*	0.01*
	ABPC		0.01	0.01	0.01
	NB	*M. luteus*	1.0	1.0	1.0
	CP	*M. luteus*	2.5	2.5	2.5

*：IU／ml

表4．培地のpHによる検出感度の比較

抗生物質		試験菌	検出感度(IU, μg/ml)		
			pH6.0	pH7.0	pH8.0
TCs	OTC	*B. cereus*	0.25	0.25	0.25
	CTC		0.05	0.05	0.05
AGs	SM	*B. subtilis*	0.25	0.25	0.25
	KM		1.0	0.5	0.5
	FM		2.5	1.0	0.5
MLs	TS	*M. luteus*	0.5	0.5	0.5
	OM		0.5	0.25	0.25
	KT		1.0	0.5	0.5
	EM		0.1	0.1	0.05
	SP		1.0	0.5	0.5
PCs	PCG	*M. luteus*	0.01*	0.01*	0.01*
	ABPC		0.01	0.01	0.01
	NB	*M. luteus*	0.5	0.5	1.0
	CP	*M. luteus*	2.5	2.5	2.5

*：IU／ml

ける検出感度を調べ，その結果を表5に示した．

改良法の検出感度はCTC，FM，TS，EM，SP，NBでは個別検査法と同程度であり，OTC，SM，KT，PCG，CPでは個別検査法より高かった．KM，OM，ABPCは逆に個別検査法の約1／2の感度であったが，MLsとPCsについては，AM2培地のかわりにSD培地を使用することにより検出感度を高くすることが可能であると考える．

表5．改良法と公定法の比較

抗生物質		検出感度(IU, μg／ml)		
		改良法	公定法	
			第1集[1]	第1集の5[2]
TCs	OTC	0.25	0.5	1.0
	CTC	0.05	0.05	0.5
AGs	SM	0.25	0.5	1.0
	KM	0.5	0.25	2.5
	FM	0.5	0.5	2.5
MLs	TS	0.5	0.5	0.25
	OM	0.25	0.1	0.5
	KT	0.5	1.0	0.5
	EM	0.05	0.05	0.25
	SP	0.5	0.5	0.5
PCs	PCG	0.01[3]	0.1[3]	0.025[3]
	ABPC	0.01	0.005	0.01
	NB	0.5	0.5	2.5
	CP	2.5	5.0	5.0

1)：個別検査法
2)：簡易検査法
3)：IU／ml

簡易検査法との比較では，改良法がTS以外の抗生物質で高い感度を示した．特にTCsではOTCが4倍，CTCが10倍であり，AGsではSMで4倍，KMで5倍，FMで5倍であった．この原因として，簡易検査法の試験菌は*B. subtilis*と*M. luteus*の2菌株で，TCsに最も感受性の高い*B. cereus*を用いていないこと，また検出用培地がAGsでは感度の低いSD培地であることが考えられる．

一方，個別検査法の試験操作は日常検査で用いるには非常に繁雑であるが，改良法の試験操作は簡易検査法とほぼ同じである．したがって，改良法は検出感度もほぼ満足できるものであり，試験操作も簡易であることから，日常検査法として実用性が高いと考えられる．

結　論

動物性食品中の残留抗生物質の個別検査法の改良を目的に，その微生物学的検査法の基礎的検討を行った．対象とした抗生物質は，動物用医薬品として汎用されている14種類であり，これらについて試験法，試験菌，抗生物質検出用培地などを整理し，次の結果を得た．

1）単層培地・ディスク法は二層培地・円筒法に比べて検出感度は同等もしくは高く，試験操作も簡易であった．

2）*B. cereus*，*B. subtilis*および*M. luteus*の3試験菌は，そのいずれかが個別検査法に用いられている試験菌とほぼ同等の感度を示した．

3）AM 1培地，AM 2培地およびSD培地はTCs，MLs，PCs，NB，CPの検出感度に大差なかったが，SD培地は前2者に比べてAGsの検出感度が低かった．AM 2培地はAM 1培地に比べてTCs，AGsの阻止円が明瞭であった．

4）検出感度は検出用培地のpH値により異なった．すなわち，pH6.0で，TCs，PCs，NBが，pH8.0でAGs，MLsがより高い感度を示した．CPはpHの変動により検出感度に差は認められなかった．

5）著者らが考案した改良法，すなわち*B. cereus*，*B. subtilis*，*M. luteus*の3試験菌を用い，AM 2培地を検出用培地として単層培地・ディスク法で行う方法は，試験操作が簡易であり，検出感度は個別検査法と同等もしくはそれ以上であった．

文　献

1）厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜水産食品中の残留物質検査法　第1集，1977
2）厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜水産食品中の残留物質検査法　第1集の5，1983
3）厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜水産食品中の残留物質検査法　第1集の2，1979
4）村上　一，神崎政子，藤本千鶴，春田三佐夫：食衛誌，12(2)，86-94，1971
5）村上　一，神崎政子，松本昌雄，神保勝彦，春田三佐夫：東京衛研年報，24，183-189，1972
6）二宮幾代治編：家畜の抗生物質と化学療法，第3版，60-97，1980，養賢堂，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 182-184, 1987

高速液体クロマトグラフィーによるウナギ中のオキソリン酸，ナリジクス酸，ピロミド酸の同時定量法

堀 井 昭 三*，門 間 千 枝*，松 本 昌 雄*

High-performance Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Oxolinic, Nalidixic and Piromidic Acids in Eel

SHOZO HORII*, CHIE MONMA* and MASAO MATSUMOTO*

Oxolinic acid (OA), nalidixic acid (NA) and piromidic acid (PA) are synthetic antibacterial agents widely used in human and piscine medicine. We have improved a simple, rapid and accurate analytical method for the residual contents of these compounds in eels using a cartridge clean-up column. The recoveries of OA, NA and PA from eels spiked at a level of 0.2 ppm were 81.8, 82.5 and 77.8% respctively, with coefficients of variation of 2.1-4.8%. And those at a level of 1.0 ppm were 93.4, 89.8 and 79.4% respectively, with coefficients of variation of 1.2-2.1%. The method has been successfully applied to the analysis of commercial eels.

Keywords: oxolinic acid, nalidixic acid, piromidic acid, quinolones, eel, high-performance liquid chromatography

オキソリン酸（OA），ナリジクス酸（NA），ピロミド酸（PA）はいずれも活性中心に4-pyridone-3-carboxylic acidの部分構造を持ち，ピリドンカルボン酸系もしくはキノロン系抗菌剤（キノロン剤）[1]と言われている合成抗菌剤である．これらキノロン剤は，ヒトのグラム陰性菌感染症の治療に用いられるほか，水産用医薬品として，ウナギのひれ赤病，マス類のビブリオ症等の治療に用いられている．

ウナギやマス等に残留するキノロン剤の分析法については，厚生省通知の「畜水産食品中の残留物質検査法」第2集の5[2]と7[3]（公定法）に示されているほか多くの報告[4~6]があるが，いずれも個別分析法であるため，三種のキノロン剤を定量する場合には，操作も煩雑でありかつ時間も要する．しかし，これまでこれら三剤の同時定量法は，春日ら[7]の報告をみるに過ぎなかったため，著者らは先に同時定量法を確立し，報告した[8]．今回抽出精製操作を簡略化すると共に，改良をほどこし，さらにこの方法を市販の活鰻の残留分析に適用した．

実験材料および方法

1 試薬および標準品 OA，NA，PAはそれぞれ田辺，第一，大日本の各製薬会社から分与されたもの，その他の試薬はいずれも市販の特級品を使用した．

2 装置 ホモジナイザーはウルトラトラックス IKA WERK社を，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は本体 TRIROTAR VI，紫外検出器 UVIDEC 100VI，オートサンプラー AS-L 350以上日本分光工業．データー処理装置 CR-3A 島津製作所を用いた．

3 HPLC測定条件 カラム Nucleosil C 18 5 μ（4.6mm ϕ ×250mm）カラム温度35℃ 流速0.8ml／min 移動相0.02Mクエン酸（0.01M臭化テトラブチルアンモニウム含有）：アセトニトリル＝6：4 測定波長 254nm（0～10min），280nm（10～15min）0.02a.u.f.s. 注入量10 μl で行った．

4 分析方法 細切した試料5gを沸騰水浴上5分間加熱後アセトニトリル20mlを加えホモジナイズし，3000rpm 5分間遠心した．沈澱物はさらに同様な操作をもう1度くり返し，上清を合せた後，突沸防止のため1

*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

Sample (minced tissue,5g)
heat (boiling water bath,5min)
homogenize (MeCN 20ml)
centrifuge (5min,3000rpm)
Supernatant
Residue
homogenize (MeCN 20ml)
centrifuge (5min,3000rpm)
Supernatant
evaporate to dryness
Residue
dissolve (1%TCA 10ml)
pass through Bond Elut C18(200mg) cartridge
wash (water 5ml,10%MeCN 2ml)
elute (MeCN 5ml)
evaporate to dryness
dissolve (mobile phase 1ml)
HPLC

Fig. 1. Analytical Method for OA, NA and PA in Eel

ープロパノール10m*l* を加え，溶媒を留去した．残渣を1％トリクロル酢酸溶液10m*l* に溶解させ，ボンドエルートC18（200mg）カートリッジカラム（B.E）に保持させ，水5m*l*，10％アセトニトリル2m*l* でカラムを洗浄後，アセトニトリル5m*l* で溶出させ，溶媒留去後，残渣を移動相1m*l* に溶かしHPLC試料とした（Fig. 1.）．

5 **添加回収実験** キノロン剤不含のウナギ筋肉5gを細切したものに，キノロン剤を各々1 μg（0.2ppm添加）及び5 μg（1ppm添加）を加えた後，前述分析方法により操作を行った．

6 **試料** 1986年7月都内の活魚店で購入した養殖ウナギ7検体を分析に供した．

結果と考察

B. E カラムからの溶出 OA，NAはアセトニトリル3m*l* により，PAは4m*l* で溶出が完了するところから溶出にはアセトニトリル5m*l* を使用した（Fig. 2.）．

検量線 OA，NA 5～25ng，PA 10～50ngを用いて検量線を作成したところ，ほぼ原点を通る直線が得られた（Fig. 3.）．（r＝0.99，n＝7）検出限界はいずれも0.5ng（0.0025a.u.f.s.）であった．

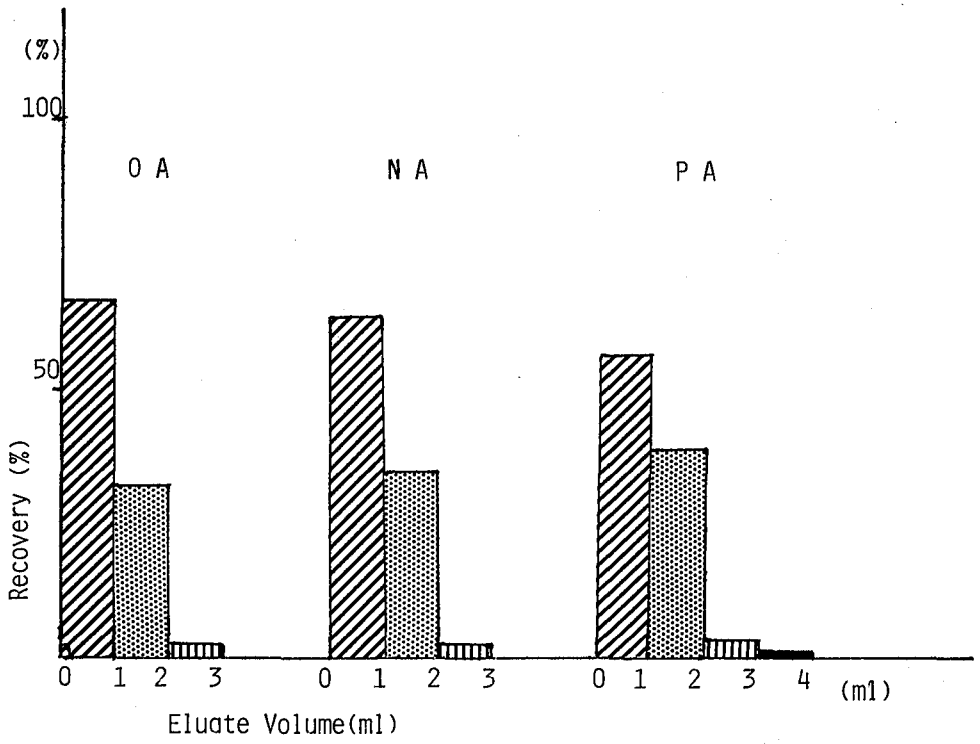


Fig. 2. Elution pattern of OA, NA and PA from Bond Elut C 18 (200mg) cartrige column with acetonitrile

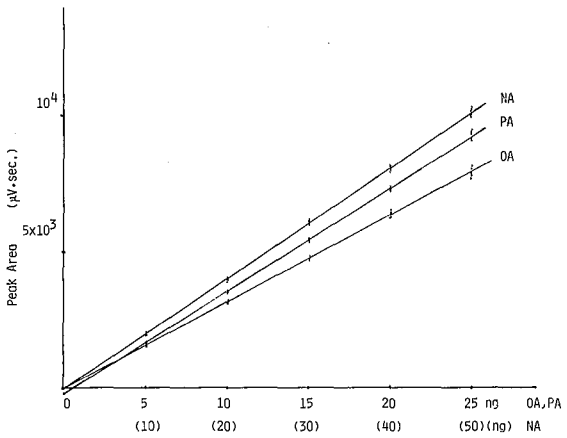


Fig. 3. Calibration Curves for OA, NA and PA

添加回収率 添加回収率は0.2ppm 添加の場合，OA81.8, NA82.5, PA77.8（%）であり，変動係数は4.8, 2.2, 2.1（%）であった．一方，1.0ppm 添加ではそれぞれ，93.4, 89.8; 79.4（%），1.2, 2.0, 2.1（%）であった（Table 1.）.

Table 1. Recovery of OA, NA and PA from Eel

Recoveries(mean, %), C. V.(%)			
Added(μg/g)	OA	NA	PA
0.2	81.8,4.8	82.5,2.2	77.8,2.1
1.0	93.4,1.2	89.8,2.0	79.4,2.1

n = 5, C. V.; coefficient of variation

HPLC 条件の検討 移動相におけるクエン酸濃度やクエン酸溶液とアセトニトリルの割合およびカラム温度について検討した結果，前述測定条件において再現性，ピーク形状等が最適であった．

養殖魚への適用 本法を実験材料で述べた試料に適用したところ，いずれの検体からもキノロン剤は検出されなかった．

公定法ではOA と NA は HPLC で定量するのに，発ガン性や爆発性のあるジアゾメタンを用いてメチル化を行っているが，人体に有害な試薬を使用するのは問題である．又，PA はメチル化はしないが，操作が煩雑である．OA, NA は254nm 付近にPA は280nm 付近に強い吸収があるため，同一波長で測定した場合感度が悪い．堀江ら[9]は UV 検出器に蛍光検出器を直列につなぎ蛍光測定も合せて行うことにより，春日ら[7]は試料量と注入量を多くすることにより感度不足を補っている．本法は，前報[8]同様タイムプログラム法を行うことにより，多量の試料を用いることもなく，又他の検出器を併用することもなく，感度および再現性よく分析可能であった．

今回著者らは，先に報告した方法の抽出精製操作を簡略化すると共に HPLC カラムおよび移動相についても検討を加え，全操作に要する時間を前報に比較し約1／3に短縮した．この理由は抽出精製のさい，液々分配をくり返す代りに B.E カートリッジカラムを使用したことによる．カートリッジカラムについても種々の製品を検討したが，B.E C18（200mg）が回収率，再現性とも良好であった．

公定法の回収率は OA が80～90%（0.4ppm 添加），NA が80%（0.4ppm 添加），PA が87.1%（1 ppm 添加）であり，今回著者らが報告した方法は十分実用化可能であると思われる．

なお，本法を用いて，実態調査も合せて行ったが，1例の残留も認められなかった．これは検体数および対象魚種が少なかった為と思われるので，今後は魚種，検体数共増加させて検討したい．

謝辞 本実験を行うにあたり，試料買上に御尽力いただいた東京都衛生局食品監視課の各位および標準品を分与された田辺，第一，大日本の各製薬会社に深謝致します．

文 献

1）古川 稔：化学と生物，24(10)，635-637，1986.
2）厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜水産食品中の残留物質検査法，第2集の5，1982.
3）同 上，第2集の7，1984.
4）春日洋二，大塚公人，杉谷 哲，山田不二造：食衛誌，22(6)，479-483，1981.
5）春日洋二，杉谷 哲，山田不二造：食衛誌，24(5)，484-487，1983.
6）Hamamoto, K.：J. Chromatogr., 381，453-456，1986.
7）春日洋二，杉谷 哲，山田不二造：食衛誌，23(4)，344-347，1982.
8）Horii, S., Yasuoka, C. and Matsumoto, M. ：J. Chromatogr., 388，459-461，1987.
9）堀江正一，斉藤貢一，星野庸二，能勢憲英，中澤裕之：日本食品衛生学会第52回学術講演会講演要旨集，41，1986.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 185-190, 1987

Micrococcus luteus 突然変異株による抗生物質検出系の開発

金西信次*, 神保勝彦**, 橋本常生***

An Improvement on the Antibiotic Bio-assay Systems by Segregation of *Micrococcus luteus* Mutants,

NOBUJI KANANISHI*, KATSUHIKO JINBO** and TSUNEO HASHIMOTO***

Keywords：*Micrococcus luteus*, 突然変異株 mutant, バイオアッセイ bioassay, ペニシリン penicillin, エリスロマイシン erythromycin.

畜水産食品中に残留する抗生物質を分別同定するには，厚生省が通知した「畜水産食品中の残留物質検査法　第1集の3」に収載される方法[1]があるが，操作法が繁雑である．桐谷らは *Micrococcus luteus* ATCC 9341（ATCC 9341と略），*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778の各寒天平板上に，抗生物質をしみ込ませたパルプディスクを載せて培養し，試験菌株の感受性パターン，並びに試料溶液のpHの差による抗菌力の変動パターンから，単剤の抗生物質を系統別に推定する検査法を開発した[2]．

さらに神保らは二剤以上が混合している場合における，マクロライド系，テトラサイクリン系，およびアミノグリコシド系の抗生物質を分別推定する検査法を開発した[3]．すなわち(1)クロロホルム抽出によりサルファ剤，マクロライド系を分離し，(2) SEP-PAK C_{10} カートリッジ吸着，メタノール溶出によりテトラサイクリン系，ペニシリン系を分離後，さらに(3)ベーカー10 SEP カラム COOH 型に吸着，リン酸緩衝液溶出によりアミノグリコシド系抗生物質をそれぞれ分離し，桐谷らの方法と組み合わせる事によって分別推定した．

これらの方法に関して，次の点が問題となった．(1)桐谷らの検査法の中で，ATCC 9341はペニシリン系およびマクロライド系抗生物質に共に感受性を示し，この方法のみでは識別できない．(2)神保らの方法によって分離検出することが可能であるが，多数の検体を同時に処理する必要性から，より簡便な方法の開発が望まれる．

今回我々は，ATCC 9341 からペニシリン抵抗性，およびエリスロマイシン抵抗性の突然変異株を分離し，ペニシリン系とマクロライド系抗生物質を分離操作を行わずに，直接バイオアッセイ法によって単剤ならびに混合剤を識別し得る系を開発した．

なお，ATCC 9341は，紫外線，N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine（MNNG と略）等の突然変異誘発剤により突然変異を誘起させることは困難であった．この菌は，*Escherichia coli* 等で報告されている SOS 修復系による突然変異誘発機構[4]を欠いているものと考えられる．そこで我々は，ATCC 9341 に対して抗生物質の濃度を徐々に増加させて培養し，これを MNNG で処理することによって突然変異株を分離した．

実験方法

試薬　penicillin-G（1595U／mg, Sigma, PCG と略），erythromycin（936 μg／mg, 大日本製薬, EM と略），spiramycin（1007 μg／mg, 協和発酵工業, SP と略），kitasamycin（980 μg／mg, 東洋醸造, KT と略），oleandomycin（850 μg／mg, 台糖ファイザー, OM と略），ampicillin（Sigma, ABPC と略），MNNG（岩井化学薬品）

培養条件　*Micrococcus luteus* ATCC 9341および分離した突然変異株は，感受性測定用ブイヨン（日水製薬, STB 培地と略），感受性試験用感性ディスク用培地N（日水製薬, SDAN 平板培地と略）を用いて，30℃で静置培養，あるいはL字管を用いて振盪培養した．

*東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
**同生活科学部乳肉衛生研究科
***現同生活科学部乳肉衛生研究科

突然変異株の分離 ATCC 9341はL字管を用いてSTB培地で培養．増殖を抑制しない濃度のPCGを添加．0.01から0.05 U／mlまで徐々にPCG濃度を上げながら培養した．0.05 U／mlのPCGの中で増殖する菌をリン酸緩衝液で洗浄，0.4 ml（約10^8個）の菌液に1 mg／mlのMNNG，0.1 mlを加え，30分間室温で静置した．希釈・遠心分離によりMNNGを除き，STB培地で菌数が10倍以上になるまで培養，0.05 U／mlのPCGを含むSDAN平板培地の上に接種した．生じたコロニーを分離し，PCG無添加培地で培養後，さらにPCGに抵抗性であることを確かめるために，最小発育阻止濃度（MICと略）を測定し，MIC値の大きい株をPCG抵抗性突然変異株とした．

EMについても同様に0.01から0.05 μg／mlの濃度で培養後，MNNG処理．その後コロニーを分離し，MIC値の大きい株をEM抵抗性突然変異株とした．

増殖曲線 L字管を用いてSTB培地に適当な濃度の抗生物質を添加して培養し，経時的に660 nmの波長の光で濁度を測定した．

最小発育阻止濃度の測定 MICの測定は日本化学療法学会の方法[5]に準拠して次の二法を用いた．

(1) 寒天平板希釈法：2倍希釈法で濃度を調整した抗生物質（PCG 0～1.0 U／ml，EM 0～10 μg／ml）を添加したSDAN平板培地に，37℃，20時間静置培養した新鮮培養菌を生理食塩水で100倍希釈し，その菌液をmulti-inoculatorで接種した．36時間培養し，菌の増殖が阻止された平板の抗生物質の最小濃度をMICとした．

(2)ディスク法：121℃，15分間高圧滅菌し，50℃に保温したSDAN培地に，1夜静置培養した菌液を混ぜ，8 mlずつシャーレに分注し，平板を作る．菌は最終濃度約10^6個／ml．平板上に適度な濃度の抗生物質を2倍希釈法で希釈し，浸み込ませた一連のパルプディスク（径10 mm）を載せて培養し，菌の増殖が阻止された径12 mm以上の阻止円をMICとした．

結　果

突然変異株の分離 (1) PCG抵抗性株：増殖中のATCC 9341株に，紫外線並びにMNNG等の突然変異誘発剤を用いて突然変異を誘起させ，PCG抵抗性株の分離を試みたが，PCG抵抗性株は得られなかった．自然突然変異によるPCG抵抗性株も分離できなかった．

そこで培養液にPCGを加えて培養し，PCGの濃度を徐々に高めて培養した．その場合の菌は0.05 U／mlのPCGが添加されていても増殖することができるが，一度PCG無添加培地で培養すると，最初の感受性に戻ってしまう．この0.05 U／mlのPCG中で増殖する菌にMNNGを作用させることによって，初めてPCG添加平板培地上に増殖するコロニーを得ることが出来た．

分離したコロニーの菌株は，PCG無添加培地で培養し，MIC測定法により菌株のPCG発育阻止濃度を測定し，PCG発育阻止濃度の高い菌株4種をPCG抵抗性突然変異株とした（PCR 6，7，12，15）．

(2) EM抵抗性株：同様な操作によって6種の菌株を得

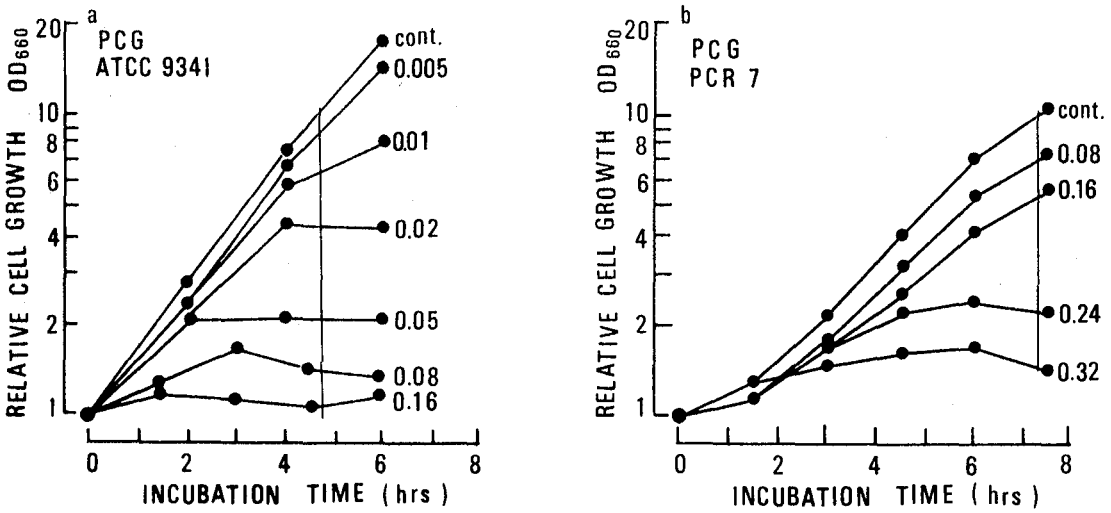


図1．a）ATCC 9341株ならびに，b）PCG抵抗性突然変異株PCR 7に対するPCGの増殖阻害効果
図中の数字はPCG濃度（U／ml）

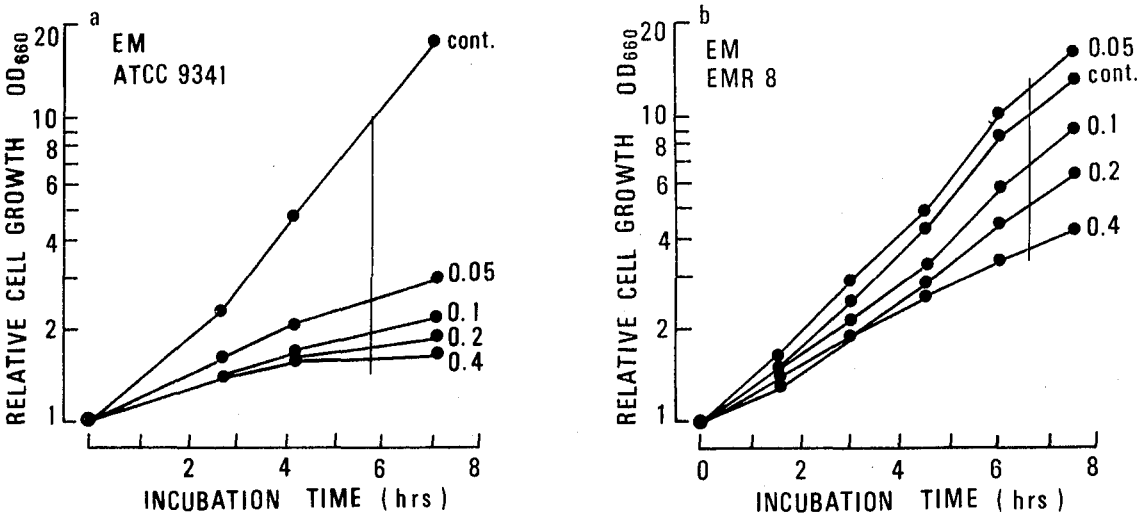


図2．a）ATCC 9341株にならびに，b）EM 抵抗性突然変異株 EMR 8 対する EM の増殖阻害効果

た（EMR 4，8，14，30，67，109）.

なお，これらの抵抗性株は，抗生物質無添加培地で，10回以上の継代培養を行っているが，この間，抵抗性は失われず安定であった.

抗生物質による増殖能阻害の測定 種々の濃度の PCG を STB 培地に添加，L 字管で培養，濁度を測定して増殖曲線を描いた．図1 a）には ATCC 9341の場合を示す．接種した時の濁度を1として相対的な濁度で示してある．0.05U／ml の PCG を加えて培養したときは，濁度は2倍になる．すなわち菌は1回は分裂する．しかしそれ以上の分裂は出来ない．図1 b）は，PCG 抵抗性株 PCR 7 の PCG 添加時の増殖曲線である．0.05 U／ml の PCG でも増殖することが出来た.

図2 a），b）は PCG と同様にして得た EM 添加時の ATCC 9341と EM 抵抗性株 EMR 8 の増殖曲線である．ATCC 9341 株が増殖することが出来ない EM 濃度0.1 μg／ml で，抵抗性株 EMR 8 は増殖することが出来た.

図3は図1 a），b）およびその他の PCG 抵抗性突然変異株の増殖曲線から得たデーターから作図したものである．各々の株の PCG 無添加時の濁度が10倍になるのに要した時間と同じ時間，種々の濃度の PCG を添加培養した時の増加倍数を，その濃度に対してプロットした

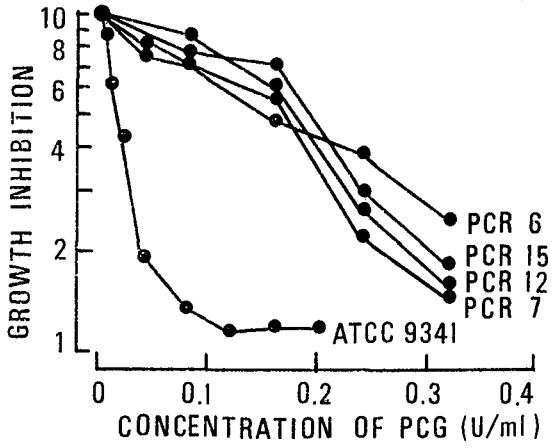


図3．ATCC 9341株及び PCG 抵抗性突然変異株に対する PCG の増殖阻害効果

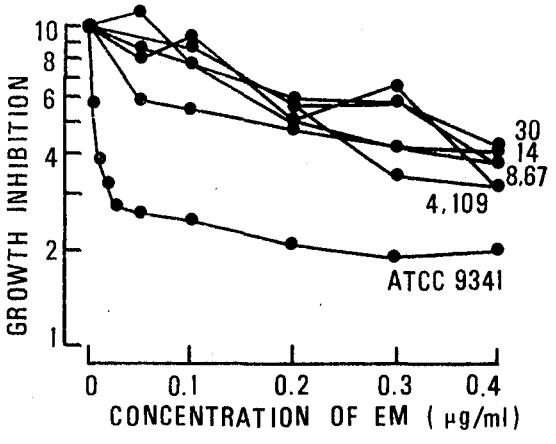


図4．ATCC 9341株及び EM抵抗性突然変異株に対する EM の増殖阻害効果，図中の数字は EM 抵抗性突然変異株の番号

ものである．すなわちATCC 9341株と4つの突然変異株との増殖に対するPCG抵抗性の程度を比較することが出来る．PCG抵抗性突然変異株は，ATCC 9341株に比べ明らかにPCG抵抗性を示す．

図4は同様にして図2 a)，b) およびその他のEM抵抗性突然変異株の増殖曲線から得たものであり，ATCC 9341株と6つの突然変異株とのEM抵抗性の程度を比較したものである．図3における傾向と同様に，EM抵抗性突然変異株は，ATCC 9341株に比べ明らかにEMに対する抵抗性を示す．

突然変異株のPCGとEMに対する感受性の比較 図5は，寒天平板希釈法により，ATCC 9341と4種のPCR系の株，6種のEMR系の株の，PCGとEMに対するMICを調べたものである．ATCC 9341は，PCGとEMの双方に対して感受性である．PCR系の株は，PCGに抵抗性であるが，EMにはATCC 9341と同様に感受性である．一方EMR系の株は，EMに抵抗性であるが，PCGについては，ATCC 9341と同様に感受性である．

突然変異株の抗生物質感受性スペクトル 図6はATCC 9341とPCR系の株PCR 7，EMR系の株EMR 8について，6つの抗生物質に対する感受性スペクトルを，ディスク法で調べたもので，MICにより各々の株の抗生物質に対する感受性を比較した．現在，食肉，水産食品に多用されている抗生物質[6]のうち，ペニシリン系としてPCGとABPCを，マクロライド系としてEM，SP，KT，OMを各々用いた．

ATCC 9341株は，用いたペニシリン系，マクロライド系の全ての抗生物質に感受性であった．PCR 7株はPCGとABPCに抵抗性を示し，EM，SP，KT，OMには感受性であった．EMR 8株はEM，SP，KT，OMに抵抗性を示し，PCGとABPCには感受性であった．他のPCR系及び，EMR系の突然変異株は，各々PCR 7，EMR 8と同様の感受性スペクトルを示した．

PCG, EMおよびその混合物の検出 MICディスク法によりPCG，EMあるいはその混合物を検出し，その結果を図9の写真に示し，表1の上段に要約した．すなわち検体の中にPCGのみが入っていれば，野性株ATCC 9341は感受性であるので，阻止円が形成され検出される．そしてEMR 8株も，PCGに対しては感受性であるから，ATCC 9341と同様にPCGを検出することが出来る．しかしPCR 7は検出できない．EMに対しては，ATCC 9341とPCR 7が感受性を示し，EMR 8株は感受性を示さない．さらにPCGとEMの両者が混入されていれば，ATCC 9341，PCR 7とEMR 8の三種の株に阻止円が検出される．すなわち，ペニシリン系とマクロライド系，あるいはこの2系統の抗生物質が混合されているか否かも識別することが可能である．

考　察

バイオアッセイ系について 我々が分離したPCGあるいはEM抵抗性の株とATCC 9341の3種の株を使うことによって，表1上段の検出パターンより，ペニシリン系とマクロライド系をそれぞれ識別することが出来，さらにペニシリン系とマクロライド系が混合しているか否かも判定することが可能である．

一方我々の方法とは異なって，感受性株を分離する方法も考えられる．表1の下段に示すように，抵抗性突然変異株を用いた場合と同様に各々を識別することが出来る．しかし感受性株は分離が一層困難であると共に，復帰突然変異が起きたり，汚染等により抵抗性株が混入した時には，抗生物質の識別が困難になってしまう．

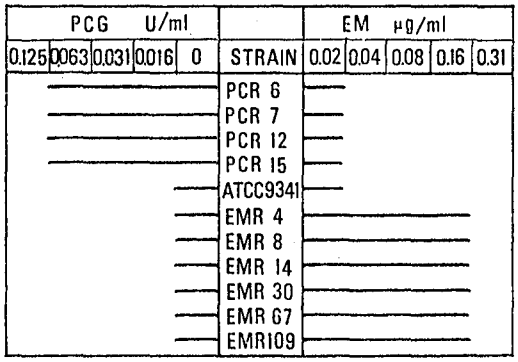


図5．PCGならびにEMに対するATCC 9341株及び突然変異株のMICの比較

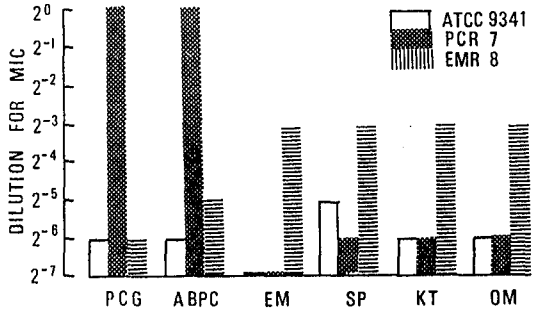


図6．MICによるATCC 9341株及び突然変異株PCR 7ならびにEMR 8の抗生物質感受性スペクトル
PCG：1.6 μg/ml，ABPC：1 μg/ml，
EM：20 μg/ml，SP：100 μg/ml，
KT：50 μg/ml，OM：50 μg/ml

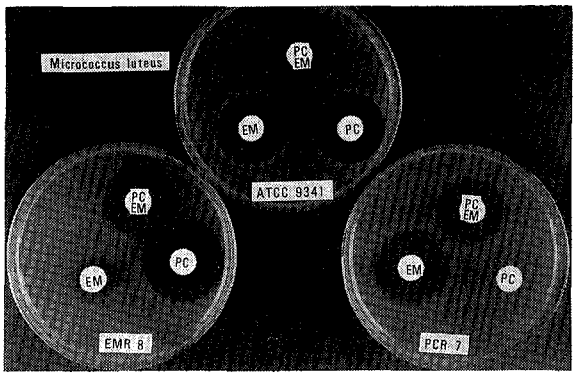


図7．PCG，EMおよびその混合物の検出

表1．PCG，EMおよびその混合物の検出

	PCG	PCG+EM	EM
wild(s)（ATCC 9341）	+	+	+
PCG(r)（PCR 7）	−	+	+
EM(r)（EMR 8）	+	+	−
wild(r)	−	−	−
PCG(s)	+	+	−
EM(s)	−	+	+

本文参照．＋は阻止円の検出をあらわす．

その点 *M. luteus* ATCC 9341は，ペニシリン系とマクロライド系抗生物質に感受性でありながら，これらの物質に抵抗性の自然突然変異はほとんど起こらず，紫外線，MNNG等の突然変異誘発剤により突然変異を誘起させることも困難で，極めて安定な株である．またこれから分離したペニシリン系並びにマクロライド系にそれぞれ抵抗性の突然変異株をもちいたバイオアッセイ系は，たとえ復帰突然変異，あるいは汚染により感受性菌が一部に混入しても，抗生物質の識別には支障をきたさない．その混合した菌の中から抵抗性株を分離することも容易である．また感受性株 ATCC 9341に我々が分離した抵抗性株が混入しても，全ての株は ATCC 9341株より増殖速度は遅いことから感受性株を再分離することも可能である．このことは，この菌の取扱にそれほど習熟していない場合でも，このバイオアッセイ系を実際の検査に応用することが出来ることを意味し，感受性株を使用するような他の系より一層良好な系といえる．

また我々の系では，まず第1の段階で ATCC 9341を用いてペニシリン系並びにマクロライド系が入っているか否かを検査し，入っていれば第2の段階で PCR 系及び EMR 系の菌を用いて検出すればよい．表1下段の系の場合は，2種の菌の使用のみでよいが，初めから感受性株 PCG（s）と EM（s）の2種の株を用いなければならない．食品検査等において，混入している抗生物質について予想がついている場合はよいが，抗生物質の予想がつかない多くの検体を処理する場合には，2段階で調べたほうがより確実な結果が得られるものと考えられる．

図6，7において PCR 7，EMR 8のデーターを示したが，他の抵抗性株も同様に使用することが出来る．

突然変異誘発について　我々は増殖中の *M. luteus* には，紫外線，並びに MNNG 処理により突然変異を誘起させることが出来なかった．これはこの菌 PCG 耐性になるような遺伝子，例えばβ-ラクタマーゼの産生遺伝子等が，本質的に欠けているか，あるいは *M.radiodurans*[7,8] や *Hemophilus influenzae*[9] と同様に，E. coli 等で報告されているような SOS 修復系による突然変異誘発機構[4]を欠いているものと考えられる．これらの菌は組換えによって突然変異を起こすと考えられている．そこで前もって抗生物質を添加して培養し，一時的な抗生物質耐性の状態を作ってから，MNNG 処理をして突然変異株を分離した．この場合，菌体内にR因子様の物質が蓄積し，その物質が DNA を含んでいれば，この DNA と菌の染色体 DNA との間で組換えを起こして，抗生物質耐性突然変異株が得られたものと考えられる．

要　約

畜水産食品中に残留する抗生物質を分別同定するために，*Micrococcus luteus* ATCC 9341株より PCG と EM に抵抗性の突然変異株を分離した．このバイオアッセイ系を使うことによって，ペニシリン系とマクロライド系をそれぞれ識別することが出来，さらにペニシリン系とマクロライド系が混合しているか否かも判定することが可能である．

謝辞　論文執筆にあたり討論に加わって戴いた都立アイソトープ研究所渡部　真博士に深謝致します．

文　献

1）厚生省通知「畜水産食品中の残留物質検査法　第1集の3」1981.
2）桐谷礼子，神保勝彦，松本昌雄：日本食品衛生学会講演要旨　15，1985.
3）神保勝彦，桐谷礼子，松本昌雄：日本食品衛生学会講演要旨　35，1986.
4）Walker,G.C., *Microbiol.Rev.*, 48, 60-93, 1984.

で一定量とし試験溶液とした.

5．GC 測定条件

①10％SE-30-GaschromQ 80～100mesh
3.2mm×1.5m
温度：カラム240° 注入口，検出器270°
N_2 流量：60ml／min

②Diasolid ZF-1 80～100mesh 3.2mm×1.5m
温度：カラム210° 注入口，検出器240°
N_2 流量：40ml／min

③10％FFAP-GaschromQ 80～100mesh
3.2mm×2.1m
温度：カラム220° 注入口，検出器250°
N_2 流量：50ml／min

試験溶液の脂肪酸組成を前記の条件で測定し，標準脂肪酸の保持時間と比較して同定した．定量値はピーク面積法により同時に作成した0.1～1.0mg／g の検量線から求めた.

結果及び考察

1．分析法の検討

1）GC カラム充填剤 GC による脂肪酸の分離は，エルカ酸を中心に炭素数16以上の脂肪酸も同時に測定できる条件を検討した.

10％SE-30では18：1，18：2，18：3は重なり測定不能であったが，エルカ酸は22：0，22：5と良く分離し他の脂肪酸とも重なり合わなかった．したがってエルカ酸のみを目的とした場合は10％SE-30で測定可能であった（図1）．Diasolid ZFでは18：3と20：1，エルカ酸と20：4は重なったが他の脂肪酸の分離は良好であった．10％FFAP では18：0と18：1，22：0とエルカ酸の飽和脂肪酸とモノエンは分離不能であったが，18：3，20：4，20：5，22：5，22：6及び24：0の分離は良好であった．他に5％OV-17も検討したが飽和と不飽和脂肪酸が分離不能であった．したがって10％SE-30，Diasolid ZF 及び10％FFAP を使用した．なおエルカ酸の分析に BHA，BHT 及びα－トコフェロールは妨害しなかった.

2）メチル化 硫酸・ベンゼン・メタノール溶液の比率は基準油脂分析試験法[9]にしたがった．少量試料の分析のため硫酸・ベンゼン・メタノール溶液の使用量を検討した．油脂 0.5g を取り硫酸・ベンゼン・メタノール溶液を10～50ml 加え各々メチル化し，本法により分析したところ，30ml で最大の回収率を得た．これは30ml 未満ではメチル化率が悪く，40ml 以上ではメタノール量が多くなるため，石油エーテル抽出時の回収率が悪くなったものと思われる．したがって30ml でメチル化を行うこととした.

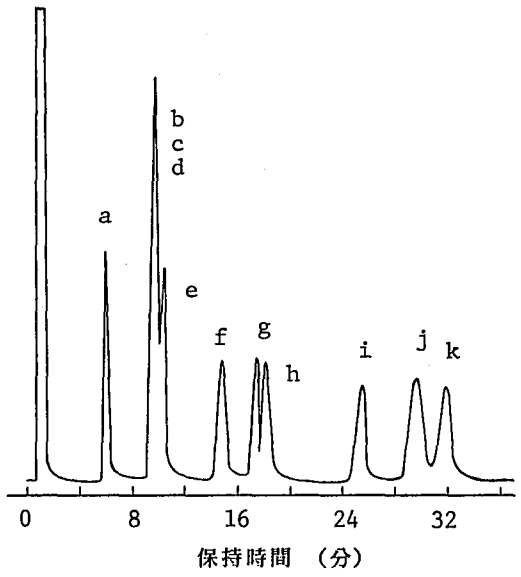


図1．脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラム
a＝16：0 b＝18：1 c＝18：2 d＝18：3
e＝18：0 f＝20：5 g＝20：1 h＝20：0
i＝22：5 j＝22：1 k＝22：0
充填剤：10％SE-30-Gaschrom Q

メチル化時間は0.5～2.5時間まで30分ごとのメチル化率を検討したところ，1.5時間以上で100％に達したため2時間を採用した

3）添加回収実験 大豆油にエルカ酸を5，20，50％となるように添加し，それぞれ3回繰り返して回収実験を行ったときの平均回収率は92～94％であった.

2．エルカ酸含有量

1）食用植物油 60年に市販されていた国産菜種油，外国産菜種油，からしな油，大豆油，綿実油，オリーブ油，とうもろこし油，ごま油，サフラワー油，米油，椿油及び調合油合計49体，また61年に市販されていた国産菜種油，外国産菜種油及び調合油合計14検体，総数63検体を調べた.

(1) **菜種油** 菜種油中のエルカ酸含有量は表1に示したとおりであり，全ての検体から検出した．国産菜種油中のエルカ酸は60年度については10検体から0.6～57％平均30％，61年度は7検体から30～48％平均39％と高濃度で検出した．17検体中15検体が20％以上であり60年2月に提示された日本油脂協会の自主基準をはるかに上まわるものを検出し，自主基準の提示された一年後もエル

表1．菜種油中のエルカ酸含有量

試料	調査年度	検体数	ND～1	～2	～5	～10	～20	～30	～40	～50	～60%	平均(%)	最高(%)
国産菜種油	60	10	1		1			4	1	2	1	30	57
	61	7						1	3	3		39	48
外国産菜種油	60	6	2	1	2	1						2.7	7.4
	61	2					2					13	14

ND：0.1%未満

カ酸含有量に変化はみられなかった．国産菜種油は改良されない従来の品種の菜種を用いているためと思われる．一方外国産菜種油については60年度に6検体から0.7～7.4% 平均2.7%，61年度には2検体から11%と14%検出した．国産品に比較して含有量の少ないものが多いが，5%を上回るものもみられた．これは近年カナダ，欧州共同体（EC）等で低エルカ酸菜種が栽培されるようになったためであり，またエルカ酸が比較的高濃度で検出されたものは，規制のない国から菜種油が輸入されており[10]，それが品種改良されていないものであったためと推察される．

また10%以上のエルカ酸を検出した菜種油は，健康食品コーナーでビタミンEが多いため成人病予防に良いなどとして売られていたものである．この高エルカ酸菜種油の脂肪酸組成の一例を示すと16：0 3.8%，18：1 17.4%，18：2 14.6%，18：3 8.1%，20：1 11.4%，22：1 44.7%であった．このような高濃度のエルカ酸含有菜種油が日常の食用油として使用された場合，エルカ酸を過剰に摂取する危険性がある．

(2) **菜種調合油** 菜種調合油のエルカ酸含有量を表2に示した．菜種油含有表示のあるサラダ油では，60年度に13検体から0.1～6.0% 平均0.8%のエルカ酸を検出した．そのうち1検体は6.0%と比較的高い値を示した．61年度には5検体から0.4～0.9% 平均0.6%検出した．菜種油含有表示のある天ぷら油は3検体からND～0.2% 平均0.1%であった．なおエルカ酸含有量0.1%未満をNDとした．菜種油の表示による混合割合が高いほどエルカ酸含有量は多い傾向を示した．

(3) **その他の食用植物油** 菜種と同じ十字花科植物のからしなの油1検体検査したところ3.8%であった．また菜種油含有表示のないサラダ油及びその他の植物油からはすべて検出しなかった．

2）**油脂製食品** 油脂製食品中の油脂含有量及び油脂中のエルカ酸含有量を表3に示した．とうふ油揚げは60年度に16検体からND～10% 平均1.1%検出し，1検体のみ10%と高い値を示した．この検体は揚げ油に国産菜種油を使用していた．61年度には33検体からND～3.8% 平均0.4%検出した．パイ，ビスケット12検体から0.1～5.5% 平均1.6%検出した．このうち9検体は18：2，18：3が少なく20：5，22：5，22：6があることから部分水添魚油と推察され，1検体から5.5%の比較的高い値が得られた．スナック菓子45検体からND～3.3% 平均0.2%検出した．揚げせんべい22検体，かりんとう5検体，即席めん9検体，食パン2検体，フライ，コロッケ3検体，ドレッシング19検体及びカレールウ15検体のそれぞれの平均値は0.1～0.4%であった．マーガリン19検体からND～2.2% 平均0.4%検出し，このうち2.2%，1.6%の2検体は部分水添魚油と推察された．

ま と め

1．国産菜種油には，エルカ酸含有量の非常に高いものが多く，日本油脂協会自主基準の5%を超えるものが17検体中15検体もみられた．ことに健康によいとして健康食品店で売られていた菜種油には，エルカ酸含有量が57%のものもみられた．外国産菜種油は国産菜種油に比

表2．菜種調合油中のエルカ酸含有量

試料	調査年度	検体数	ND	～1	～2	～5	～10%	平均（%）	最高（%）
サラダ油	60	13		12			1	0.8	6.0
	61	5		5				0.6	0.9
天ぷら油	60	3	1	2				0.1	0.2

ND：0.1%未満

表3．油脂製食品の油脂中のエルカ酸含有量

試　料	検体数	ND	～1	～2	～5	～10%	平均(%)	最高(%)	平均油脂含有量(%)
とうふ油揚げ(60年度)	16	1	14			1	1.1	10.0	32
(61年度)	33	4	28		1		0.4	3.8	32
パイ，ビスケット	12		7	2	2	1	1.6	5.5	23
スナック菓子	45	33	11		1		0.2	3.3	23
揚げせんべい	22	1	20	1			0.4	1.8	20
かりんとう	5	1	4				0.2	0.4	20
即席めん	9		9				0.1	0.3	19
食パン	2		2				0.1	0.1	3.5
フライ，コロッケ	3		3				0.2	0.3	12
ドレッシング	19	3	15	1			0.4	1.4	39
カレールウ	15		13	2			0.3	1.6	35
マーガリン	19	12	4	2	1		0.4	2.2	82

ND：0.1%未満

較しエルカ酸含有量は少ないが，自主基準を超えるものが8検体中3検体あった．また菜種調合油からも6.0%と比較的高い値を示すものがあった．エルカ酸は心臓障害をはじめとして種々の臓器に影響を及ぼすといわれていることから，菜種油及び調合油については公的な基準を設定する必要があると考える．

2．油脂製食品中のドコセン酸には，菜種油由来のエルカ酸と部分水添魚油由来のものとがある．その中でとうふ油揚げ1検体から自主基準を超える10.0%のエルカ酸を検出し，またパイ1検体からカナダの規格基準を超える5.5%のドコセン酸を検出した．このように子供が多量に食べる菓子類の中から比較的高濃度でドコセン酸が検出されたことは問題であり，菜種油のみならず二次加工品中のドコセン酸の基準も設定する必要があると思われる．

（本研究の概要は第22回全国衛生化学技術協議会1985年10月で発表した．）

文　献

1）J.L. Beare-Rogers, E.A. Nera, B.M. Craig：*Lipids*, 7 (1), 46-50, 1972.
2）J.L. Beare-Rogers, E.A. Nera, B.M. Craig：*ibid.*, 7(8), 548-552, 1972.
3）B.L. Walker, J.A.Carney：*ibid.*, 6(11), 797-804, 1971.
4）HJ. Thomasson：*J. Nutr.*, 57, 17-27, 1955.
5）金田尚志　監訳：人間の栄養における食用油脂の役割 FAO／WHO 合同専門家委員会報告，53-68, 1980，医歯薬出版株式会社，東京．
6）E. Aaes-Jorgenson, G.Holmer：*Lipids*, 4(6), 501-506, 1969.
7）B. Teige, J.L. Beare-Rogers：*ibid.*, 8 (10), 584-587, 1973.
8）*Federal Register*, Vol.50, No.18 -Monday, January 28, 1985.
9）日本油化学協会：基準油脂分析試験法　2.4.20-71, 1977.
10）大蔵省関税局：日本貿易統計，1979～1985年

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 195-197, 1987

食品中の桂皮酸及び合成保存料の同時分析法

嶋村保洋*, 石川ふさ子*, 小川仁志*, 二島太一郎*

Simultaneous Determination of Cinnamic Acid and Preservatives in Food by High Performance Liquid Chromatography

YASUHIRO SHIMAMURA*, FUSAKO ISHIKAWA*,
HITOSHI OGAWA* andTAICHIRO NISHIMA*

Keywords：桂皮酸 cinnamic acid, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography, 保存料 preservatives, ソルビン酸 sorbic acid, 安息香酸 benzoic acid, パラオキシ安息香酸エステル *p*-hidroxybenzoate esters, デヒドロ酢酸 dehydroacetic acid

まえがき

近年，食品添加物は，合成品から使用表示義務の無い天然物質系へと移り変わってきていると言われている[1)-3)]．保存性を高めるための物質についても，ソルビン酸（SOA），安息香酸（BA），パラオキシ安息香酸エステル類（PHBA-Es）やデヒドロ酢酸（DHA）等のいわゆる合成保存料から，抗微生物作用を有するある種の有機酸[4)]，アミノ酸[5)]や香辛料等[6),7)]に変化してきている．桂皮酸は香辛料として使用される桂皮の主成分であるが，保存効果を持っていることが知られ[6)]ている．この桂皮酸（CA）は保存料の分析を行う際に検出される場合があった．

食品中のCAの分析法は，紫外部吸収（UV）及びガスクロマトグラフィー（GC）が一般的に用いられている．また，食品中の合成保存料（SOA，BA，PHBA-Es，DHA）の分析法についてもUV[8)]，GC[8),9)]及び高速液体クロマトグラフ[10)]（HPLC）法等の報告がある．しかし，CA及び各合成保存料の簡便な同時分析についての報告が見当らない．そこで，これらCA及び合成保存料等を同時に分析する方法として，簡便かつ迅速性を備えたHPLC法を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

市販のみそ，しょう油，漬物，つくだ煮，ソース，清涼飲料水を試料とした．

2．　試薬

標準溶液の調製：桂皮酸，ソルビン酸，安息香酸，パラオキシ安息香酸各エステル，デヒドロ酢酸各々100mgを精秤し，水に溶解して100mlとしたものを標準原液とした．標準原液を水又は0.1%りん酸溶液で適宜希釈したものを標準溶液とした．

試薬はいずれも市販特級品を用いた．

3．　装置

高速液体クロマトグラフ：島津製作所製LC-5A型，検出器：同社製SPD-2A型紫外分光光度計

4．　試験溶液の調製

衛生試験法注解[8)]の保存料の項に準じて，水蒸気蒸留を行い，留液を0.45 μmのメンブランフィルターでろ過，ろ液をHPLC用試験溶液とした．

5．　HPLCの測定条件

カラム：MCI GEL CK08S（塩酸で遊離酸型とした）三菱化成工業製4.6Φ×250mm，移動相：0.1%りん酸，流速1.0ml／min，温度：60℃（水溶中），測定波長：250nm

結果および考察

1．　HPLC条件の検討

1）　移動相の濃度

移動相のりん酸濃度を0.05～1%に変化させたところ，いずれもCA，SOA，BA，PHBA-Es及びDHA相互の分離は特に変化がみられなかった．そこで，カラムの劣化防止及び試薬の作り易さを考え0.1%りん酸を用いるこ

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

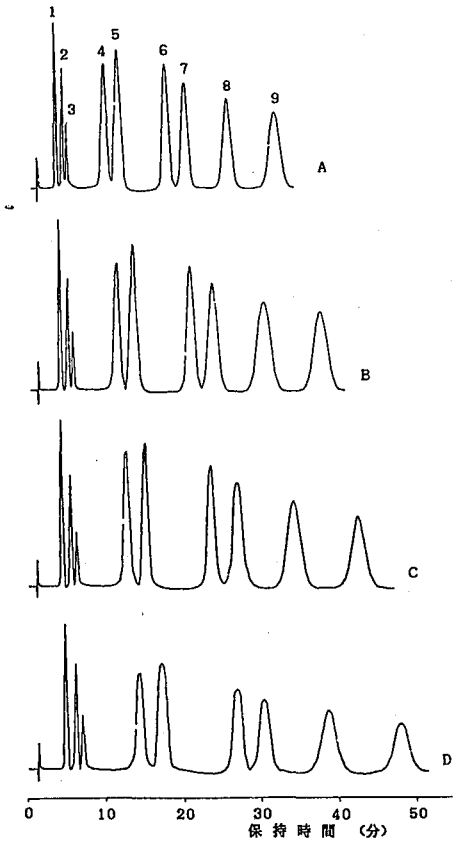


図1．カラム温度の違いによるクロマトグラム
A：70℃，B：60℃，C：50℃，D：40℃
1：ソルビン酸，2：安息香酸，3：デヒドロ酢酸，4：桂皮酸，5：パラオキシ安息香酸エチル，6：パラオキシ安息香酸イソプロピル，7：パラオキシ安息香酸ブチル，8：パラオキシ安息香酸プロピル，9：パラオキシ安息香酸イソブチル

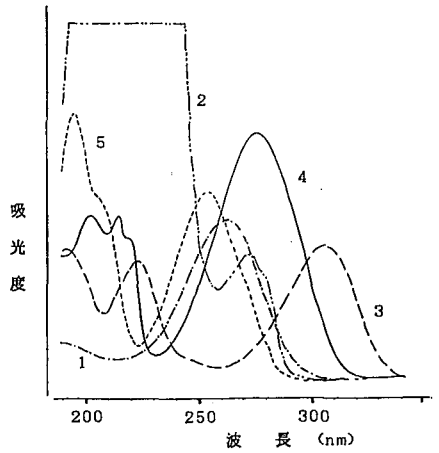


図2．　各保存料の紫外部吸収スペクトル
1　-・-　ソルビン酸　(5 μg／ml)
2　-・・-　安息香酸　(100 μg／ml)
3　——　デヒドロ酢酸　(10 μg／ml)
4　——　桂皮酸　(10 μg／ml)
5　------　パラオキシ安息香酸エステル類 (10 μg／ml)

ととした．

2）　カラム温度

カラムの温度を40～70℃まで変化させた時のCA及び各保存料の分離能を検討し図1に示した．温度を上げるに従い保持時間は早くなるが，CA及び各保存料相互の分離には大きな影響はみられなかった．また，一定流量を維持したときには，温度が高くなるに伴いカラム圧は低くなることから，水浴の温度コントロールがしやすい60℃を選んだ．

表1．添加回収率

	添加量 (g/kg)	CA	SOA	BA	PHBA				
					-Et	-isoPr	-nBu	-nPr	-isoBu
み　そ	100	96.2	102.8	101.0	99.2	96.0	99.4	94.3	94.1
	1000	96.7	102.1	99.9	98.0	95.9	97.3	96.5	95.8
つくだ煮	100	96.8	100.5	98.9	101.8	99.8	96.0	98.4	100.2
	1000	98.6	94.0	101.3	94.2	101.7	98.6	100.7	94.3
清涼飲料水	100	94.5	102.7	97.5	99.4	95.1	96.3	97.3	99.2
	1000	101.1	94.0	100.7	95.0	97.2	98.0	95.1	96.0
漬　物	100	98.4	102.6	101.8	96.5	94.3	94.3	97.4	95.1
	1000	97.2	94.3	98.5	95.2	95.8	96.9	101.5	96.7

（単位：%，n＝5）

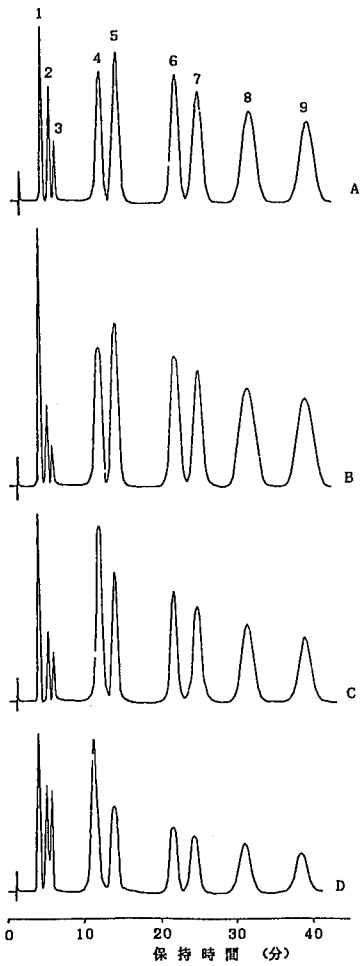


図3．検出波長の違いによるクロマトグラム
A：250nm，B：260nm，C：270nm，D：280nm
1：ソルビン酸，2：安息香酸，3：デヒドロ酢酸，4：桂皮酸，5：パラオキシ安息香酸エチル，6：パラオキシ安息香酸イソプロピル，7：パラオキシ安息香酸ブチル，8：パラオキシ安息香酸プロピル，9：パラオキシ安息香酸イソブチル

3）　測定波長

CA及び各保存料標準溶液の0.1%りん酸溶液での紫外部吸収スペクトルを図2に示した．また，波長を250から280nmまで種々変化させたときのクロマトグラムを図3に示した．図2及び図3より，CA及び各保存料の同時分析を行うときは，いずれの保存料に対しても良好な感度が得られる250nmを，またCAのみを対象にするときはCAの極大吸収波長である275nmを用いることとした．さらに本操作で適宜最適な波長を選ぶことにより，各保存料を選択的に高感度で分析できた．

2．　添加回収

あらかじめ，各保存料が検出されないことを確認した食品に，各保存料を100mg／kg，1000mg／kgとなるように添加し，本法により添加回収実験をおこない，その結果を表1に示した．

3．　市販品への応用

本法を用いて市販品70種について，CA及び保存料を分析したところ，漬物8種からCAが，漬物及びつくだ煮18種からSOAが，清涼飲料水6種からBA，5種からPHBA-Esが検出され，PHBA-Esはすべて BAとの併用であった．また，特に妨害物質は認められなかった．

要　約

前処理に水蒸気蒸留法を用い，HPLCによる桂皮酸を含む各種合成保存料の分析法を検討した．

カラムにMCI GEL CK08S，移動相に0.1%りん酸溶液を用い，水蒸気蒸留した留液を直接注入することにより，特に妨害も認められず定量できた．

また，みそ，つくだ煮，清涼飲料水，清物等に桂皮酸及び各保存料を100mg／kg，1000mg／kgになるように添加した場合の回収率はいずれも94%以上であった．本法による桂皮酸及び各保存料の定量限界は，それぞれ5mg／kg，HPLCに要する分析時間は約40分であり，本法は実用上十分適用できるものと考えられる．

文　献

1）野崎一彦：フードケミカル，1，83-85，(1987)
2）松田敏生：*New Food Industry*，25，1-8，(1983)
3）芝崎勲：*New Food Industry*，25，28-34，(1983)
4）山本泰，東和男，好井久雄：日食工誌，31，525-530，(1984)
5）角田猛，佐久間久仁子：家政学雑誌，34，118-124，(1983)
6）上田成子，山下晴美，中島真理子，桑原祥浩：日食工誌，29，111-116，(1982)
7）金井由美子，篠原雅弘，上沢佳乃，上杉祥，山下晴美：*New Food Industry*，25，22-31，(1983)
8）日本薬学会編：衛生試験法・注解，1980，金原出版
9）豊田正武，金森孝子，伊藤誉志男，慶田雅洋：衛生化学，23，100-105，(1977)
10）小林加代子，辻澄子，外海泰秀，伊藤誉志男：日食工誌，33，514-518，(1986)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 198-202, 1987

高速液体クロマトグラフィーによる保存料の同時分析について

西山良子*, 田村行弘*, 井部明広*, 中里光男*,
上村尚*, 田端節子*, 橋本秀樹*, 斉藤和夫*,
菊地洋子*, 藤沼賢司*, 二島太一郎*

Simultaneous Determination of Preservatives by High Performance Liquid Chromatography

YOSHIKO NISHIYAMA*, YUKIHIRO TAMURA*, AKIHIRO IBE*,
MITSUO NAKAZATO*, HISASHI KAMIMURA*, SETSUKO TABATA*,
HIDEKI HASHIMOTO*, KAZUO SAITO*, YOKO KIKUCHI*,
KENJI FUJINUMA* and TAICHIRO NISHIMA*

Keyword：安息香酸 benzoic acid, ソルビン酸 sorbic acid, デヒドロ酢酸 dehydroacetic acid, パラオキシ安息香酸エステル p-hydroxybenzoate-ester, 馬尿酸 hippuric acid, フルフラール furfural, ベンズアルデヒド benzaldehyde, ケイ皮酸 cinnamic acid, バニリン vanillin

緒　言

食品中の保存料は，従来より衛生試験法[1]に基づく紫外部吸収スペクトル法（UV），ガスクロマトグラフィー（GC）によって分析が行われているが，これらの操作法は多量のエーテル使用による引火等の危険，液々抽出による分離精製等の繁雑な操作，その操作過程に長時間を要すること等の難点がある．

近年，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による簡便な分析法が種々報告されている[2)3)4)5)]．著者らは食品中の保存料の検査を行ってきた中で共存物質による妨害のために同定の難しいいくつかの例に遭遇してきた．それらとの分離をできる限り可能にして更に簡便で多数の食品の検査を可能にする方法としてHPLCの応用を検討した．その結果，グラディエント法を採用することによって保存料のうち安息香酸（BA），ソルビル酸（SOA），デヒドロ酢酸（DHA），パラオキシ安息香酸エステル類（PHBA-Es 類）の8種の保存料が同時分析できる良好な分析法が得られたので報告する・

実験方法

1．試料

市販のワイン，清涼飲料水，漬物，味噌，チョコレートペーストを用いた．

2．試薬

1）BA, SOA, DHA, PHBA-Es 類，フルフラール，ベンズアルデヒド，ケイ皮酸：和光純薬工業㈱製試薬特級

その他の試薬はすべて試薬特級を用いた．

2）　標準溶液の調製：BA, SOA, DHA, PHBA-Es 類の各100mg を精秤し，70％メタノール溶液でそれぞれ溶解して100m*l* とした（各1000 μg／m*l*）．標準原液を適宜水で希釈したものを標準溶液とした．

3）クエン酸緩衝液：峯らの方法[6]に従ってクエン酸6.94g とクエン酸ナトリウム6.18gを水に溶解し1*l* とした（PH 4）．

3．装置

高速液体クロマトグラフ：日本分光　TRIROTAR-VI，検出器：日本分光　UVIDEC-100-VI，データ処理：島津クロマトパック C-R 3 A，オートサンプラー：日本分光 AS-L 350

4．HPLC 操作条件

カラム：Finepak SIL C_{18}　4.6mm×25cm（日本分光），移動相A；クエン酸緩衝液－メタノール－水（5：40：55v/v），移動相B；メタノール，グラディエント：15分まで移動相A，15分から45分まで移動相A 100％→70％，

*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

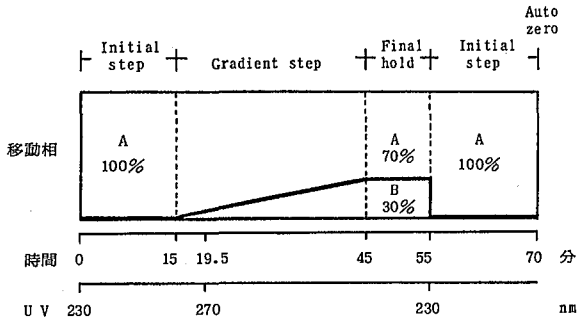


Fig. 1．グラディエントと検出波長のプログラム設定条件
移動相A：クエン酸緩衝液－メタノール－水（5：40：55）
B：メタノール

移動相B 0％→30％，45分から55分まで移動相A70％，移動相B30％，流速：1.0ml／min，カラム温度：室温，検出波長：UV 230nm（0分→19.5分），UV 270nm（19.5分→55分），感度：32×10^{-2} AUFS，注入量：10 μl

グラディエント条件と検出波長のプログラムの設定略図をFig. 1に示した．

5．試験溶液の調製と測定

衛生試験法[1]に基づいた水蒸気蒸留法に準じ，試料50gを秤取し，塩化ナトリウム約80gおよびシリコン樹脂適量を加えて15％酒石酸溶液で酸性としたのち，全量を水で150～200ml として水蒸気蒸留を行い留液を500ml とした。その留液を十分に振とう混和後ろ紙ろ過し，ろ液をHPLC用試験溶液とした．試験溶液をHPLCに注入し同時に作成した検量線により定量した．

6．検量線の作成

BA，SOA，DHA，パラオキシ安息香酸エチル（PHBA-Et），パラオキツ安息香酸イソプロピル（PHBA-iso-Pr），パラオキシ安息香酸プロピル（PHBA-n-pr），パラオキシ安息香酸イソブチル（PHBA-iso-Bu），パラオキシ安息香酸ブチル（PHBA-n-Bu）について各々2.5 μg／ml，5 μg／ml，10 μg／ml，25 μg／ml，50 μg／ml をHPLCで測定し，ピーク面積により検量線を作成した．

実験結果および考察

1．HPLCの測定条件の検討

BA，SOA，DHA，PHBA-Es類のクロマトグラムをFig. 2に示した．

分析に際しては，試料中の共存物質と各保存料の相互の分離が良く短時間内で測定することができ高感度に定量できることが望まれる・そこでそれらの点を留意して移動相，グラディエントの条件，検出波長について検討した．

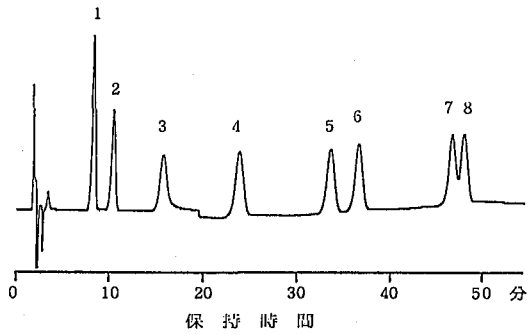


Fig. 2． 保存料標準品の高速液体クロマトグラム
1：安息香酸（BA） 2：ソルビン酸（SOA）
3：デヒドロ酢酸（DHA）
4：パラオキシ安息香酸エチル（PHBA-Et）
5：パラオキシ安息香酸イソプロピル（PHBA-iso-Pr）
6：パラオキシ安息香酸プロピル（PHBA-n-Pr）
7：パラオキシ安息香酸イソブチル（PHBA-iso-Bu）
8：パラオキシ安息香酸ブチル（PHBA-n-Bu）
各 10 μg／ml

1）移動相

BA及びSOAは，クエン酸緩衝液―メタノール―水（1：4：5 v/v）で良好なRT，分離が得られることが報告されている[6]．PHBA-Es類は，メタノールを増加していくことによって良好なRT，分離が得られることから，この2種類の移動相を用いてBA，SOAとPHBA-Es類を別々に分析していく方法を行っていた．しかし，この方法は分析する目的物質が異なる度に別の移動相に変えることになり，カラムの安定性等に問題が残されていた．この点を解決し，8種の保存料の有無が同時に確認できる手段としてグラディエント法が有効であると考え，移動相の条件を検討した．

移動相Aについては，RT 5分以内に共存する種々の極性物質のピークが多数出現することから，BAのピークとの分離を考慮する必要があるため，BAのRTが8～9分台になるようにした．またグラディエントによってメタノール量が増加していく過程でクエン酸ナトリウムの析出の危険が考えられたため，移動相A中のクエン酸緩衝液の量を減少させた．すなわち，移動相Aの混合比をクエン酸緩衝液―メタノール―水（5：40：

55v/v）とした．

移動相Bについては，当初メタノール—水（5：5）混合液を用いたところ，グラディエント開始後10数分の位置からベースラインが不安定となった．そこで移動相Bはメタノールのみとすることにより安定したベースラインを得ることができた．ベースラインが不安定になる原因は，メタノールの粘性に関係し，水との混和状態が一定とならないことにあると考えられる[7]．

2）グラディエントの条件

Fig. 1で示したように移動相は0分から15分までを移動相A単独とし，15分後から移動相Bを加えてグラディエントを開始し，45分までに移動相Aと移動相Bの%比が70%と30%となるようにし，その後10分間その状態を持続させるように設定した．

このグラディエント法では，最後にクロマトグラム上に出現するPHBA-n-BuのRTが50分近くになる．RTを短くするには，グラディエント時間を短縮すること，移動相Bの最終濃度を大きくすること等が考えられる．しかし，いずれもベースラインの上昇が見られ，定量の精度に影響をあたえることからベースラインが最も安定する本グラディエント条件を選択した．

3）検出波長

BA, SOAについては，ほぼ同じ感度で測定できる230nmを検出波長とした[6]．DHAについては，吸収波長が310nm及び230nm付近にあるが，BAとSOAとの同時分析を目的として，やや感度は下がるものの同じ230nmを検出波長とした．PHBA-Es類については，主な吸収波長が253nm付近にあるが，グラディエント開始後に253nmではベースラインが安定しないため，安定なベースラインを保つ270nmを検出波長とした．なお，検出波長を230nmから270nmに切替える時点は，ケイ皮酸ピークが出現した後とした．

すなわち，Fig. 1に示したように0分から19.5分までを230nmとし，19.5分以降を270nmに切替えるように設定した．

以上のことから本条件では同時分析の所要時間は70分を要するが，8種の保存料の相互の分離は良く，特にPHBA-Es類の分離はきわめて良好であった．

2．検量線

BA, SOA, DHA, PHBA-Et, PHBA-iso-Pr, PHBA-n-Pr, PHBA-iso-Bu, PHBA-n-Buについて検量線を作成したが，いずれも原点を通る直線を示した．RTの変動係数は0.12%から0.50%までであり，定量値の変動係数は0.50%から3.73%と良好であった．

Table 1．各測定法による定量値の比較

単位 μg/g

試料	保存料	UV	GC	HPLC
清涼飲料水	BA	0.19	0.21	0.21
	BA	0.10	0.12	0.11
	BA	0.35	0.41	0.37
	PHBA	0.03	0.03	0.02
ワイン	SOA	0.09	0.09	0.09
みそ	SOA	0.48	0.48	0.48
漬物	BA	0.10	0.12	0.11
	SOA	0.62	0.60	0.60

UV：紫外部吸収法，GC：ガスクロマトグラフ法
HPLC：高速液体クロマトグラフ法，BA：安息香酸
PHBA：パラオキシ安息香酸エステル類
SOA：ソルビン酸

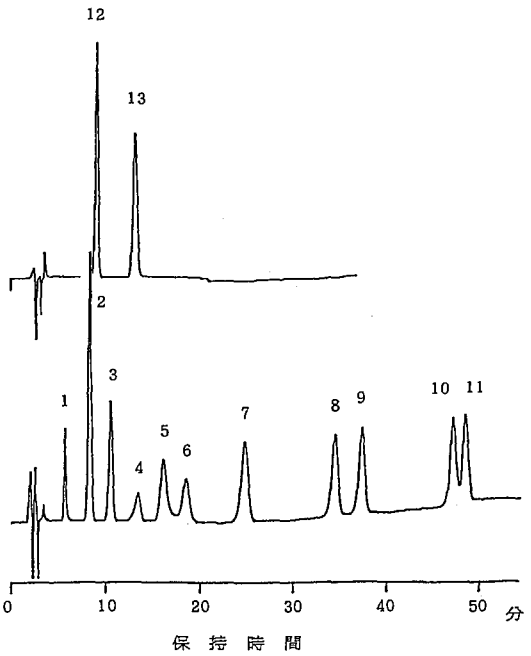


Fig. 3． 保存料標準品と主な共存物質の高速液体クロマトグラム
1：フルフラール 2：BA 3：SOA
4：ベンズアルデヒド 5：DHA
6：ケイ皮酸
7：PHBA-Et 8：PHBA-iso-Pr
9：PHBA-n-Pr 10：PHBA-iso-Bu
11：PHBA-n-Bu 12：バニリン
13：エチルバニリン
各 10 μg/ml

3．UV 法及び GC 法との比較

本 HPLC 及び UV と GC との各測定結果を Table 1 に示した．市販食品の清涼飲料水，ワイン，味噌，漬物について含有保存料の定量値を比較したところ各測定値ともよく一致した値が得られた．

4．妨害物の検討

これまでに多くの食品の検査を行ってきた中で，UV 法では保存料の検出に妨害をあたえることが明らかな共存物質について HPLC で検討し，そのクロマトグラムを Fig. 3 に示した．本 HPLC 法ではバニリン以外は共存物質と分別でき，各保存料とも影響を受けることはなかった．

1）ケイ皮酸及びベンズアルデヒド

近年，ケイ皮酸は漬物等に合成保存料の代替として多く使用され[8]，またベンズアルデヒドは杏仁豆腐等に含まれている．それらを衛生試験法に準じて過マンガン酸カリウム（$KMnO_4$）により分解すると BA になり，BA 添加と誤認される危険性がある．

ケイ皮酸については，実例として，たくあん漬の場合に $KMnO_4$ 分解による UV 法で BA として 0.01g／kg，0.02g／kg 検出されたが，HPLC 法ではいずれも BA は検出されずにケイ皮酸が検出された例が 2 件あった．

なお，ベンズアルデヒドは保存中に BA に分解することがあり，食品中にベンズアルデヒドが存在する場合には注意が必要である．

2）フルフラール

フルフラールはカラメルやビスケット等に含まれ，また糖分を多く含む食品は水蒸気蒸留の際に生成され留液に含まれる．フルフラールは 270nm 付近に極大波長があるため UV 法による定性試験では BA，SOA 及び PHBA-Es 類の存在を見逃してしまうことがある．本法ではフルフラールと各保存料を明確に区別することができた．

3）バニリン

食品の香料として使用されるバニリンは，その UV 吸収波長が DHA と近似しているため，よく誤認される．食品添加物として使用されているものはバニリンとエチルバニリンで，これまでに食品中より検出したのはバニリンのみであった．バニリンの RT は Fig. 3 に示したとおり本条件で BA に近接しているのでバニリン含有食品については UV 吸収スペクトルによる定性試験の併用が必要であった．

5．市販食品の応用について

UV 吸収スペクトル法で定性不可能なもので本法で分析できた例を Fig. 4，5，6 に示した．

1）BA 及び SOA を検出する漬物の例を Fig. 4 に示した．UV 法では SOA のスペクトルに BA が隠れてしまい BA が検出できないが，本法では両者が分離でき分析が可能となっている．

2）清涼飲料水中に BA 及び PHBA-n-Bu が使用されている例を Fig. 5 に示した．PHBA-n-Bu の含有が少量であるために，UV 法では定性不可能となるが本法では PHBA-n-Bu の定量が可能であった．

3）チョコレートペーストにバニリンが含有された例を Fig. 6 に示した．UV 吸収スペクトルでは一見 DHA の存在が疑われるが，本法によれば DHA が存在しないことが直ちに判明する．なお，UV 法では，液々抽出法による分離精製を行ってもバニリンは DHA と同じ挙動を示すために分離が不可能となり，DHA と誤認されやすいので注意が必要である．

4）その他の食品：くさやなどは UV 法で BA に類似した吸収スペクトルを示すことがあるので，その際は HPLC での分析が確認手段として有効である．

以上の食品以外に醤油，漬物，菓子，ソース，佃煮，そう菜等多数の市販食品について検討したが，本 HPLC

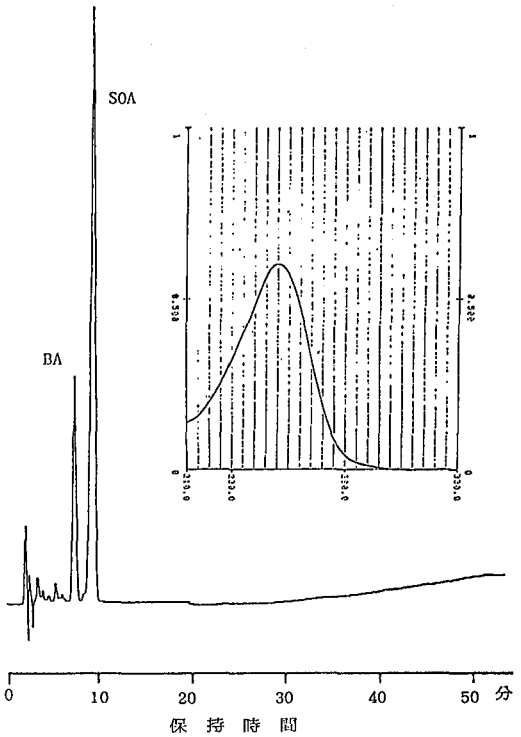


Fig. 4． 安息香酸とソルビン酸含有漬物の高速液体クロマトグラムと UV吸収スペクトル

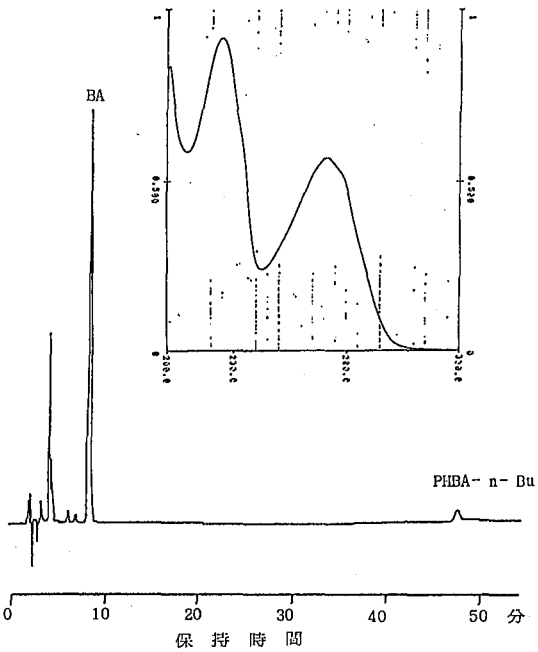


Fig. 5. 安息香酸とパラオキシ安息香酸ブチル含有清涼飲料水の高速液体クロマトグラムとUV吸収スペクトル

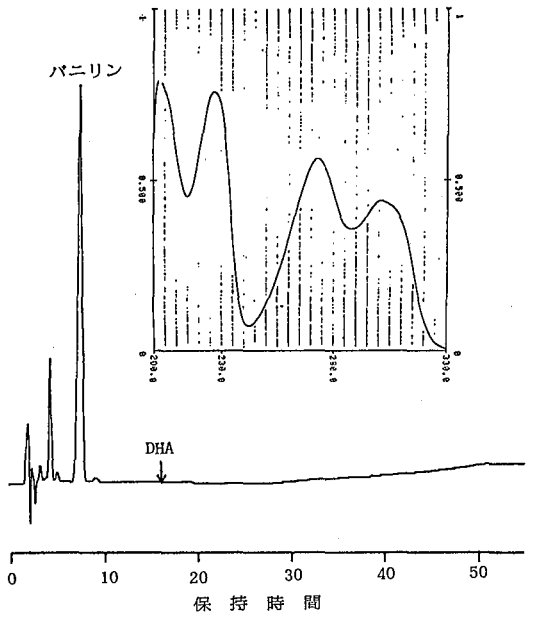


Fig. 6. バニリン含有チョコレートペーストの高速液体クロマトグラムとUV吸収スペクトル

法では妨害もなく良好な結果が得られた.

ま と め

BA, SOA, DHA, PHBA-Et, PHBA-iso-Pr, PHBA-n-Pr, PHBA-iso-Bu 及び PHBA-n-Bu の8種類の保存料について, グラディエント法による HPLC の同時分析法を作成した.

1. 本法は8種類の保存料の相互の分離が良く精度, 正確さともに良好であった.

2. カラムは Finepak SIL C_{18}, 移動相はクエン酸緩衝液－メタノール－水（5：40：55v/v）で, 15分後からメタノールとのグラディエント法を行った. 検出波長は 230 nm （0分→19.5分）から270 nm（19.5分→55分）へと移動した.

3. ケイ皮酸, ベンズアルデヒド及びフルフラールの共存物質との分離についても良好な結果が得られた.

4. 各種市販食品について本法と UV 法及び GC 法と比較したところ, それらの定量値と良く一致した. そして多数の市販食品に適用できた.

文 献

1）日本薬学会編：衛生試験法・注解, 296-304, 1980 金原出版, 東京
2）松永明信, 山本 敦, 牧野正雄：衛生化学, 31, 4 269-273, 1985
3）Puttemans, M., Dryon, L., and Massart, D. L.：*J. Assoc. off. Anal. Chem.*, 67, 5, 880-885, 1984
4）北田善三, 玉瀬喜久雄, 佐々木美智子, 西山喜孝, 谷川 薫：食衛誌, 21, 6, 480-484, 1980
5）野沢竹志, 荻原 勉, 榎田隆一, 大西和夫, 松本昌雄：東京衛研年報, 33, 259-262, 1982
6）峯 孝則, 堀内美恵：食衛誌, 26, 1, 61-64
7）横河北辰電気㈱編：HPLC 講習会テキスト, 2-18, 1987
8）上田 工, 島村保洋, 石川ふさ子, 二島太一郎：東京衛研年報, 36, 185-190, 1985
9）織田泰子, 只腰洋子, 浅川 進, 藤巻省子, 江口定衛：日本食品衛生学会第45回学術講演会講演要旨集, 21, 1983, 東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **38**, 203-208, 1987

清涼飲料水中の過酸化水素について

菊地洋子*, 斉藤和夫*, 中里光男*,
藤沼賢司*, 二島太一郎*

Determination of Hydrogen Peroxide in Soft Drinks Containing L-Ascorbic Acid by Using a Sensitive Oxygen Electrode

YOKO KIKUCHI*, KAZUO SAITO*, MITSUO NAKAZATO*,
KENJI FUJINUMA* and TAICHIRO NISHIMA*

A simple and reliable method was developed for determination of hydrogen peroxide in soft drinks containing L-ascorbic acid by using ORITECTOR® MODEL-III.

The real sample (1m*l*) was added directly into the sample cell with 1m*l* of 0.2 M phosphate buffer (pH 7), and residual hydrogen peroxide was determined under the given set of the operating conditions. The buffer used contained 0.5% $KBrO_3$ and was previously bubbled with nitrogen gas to decrease the oxygen content.

The detection limit of hydrogen peroxide in soft drinks was 0.1 μg/m*l*.

Sixty five samples of commercial soft drinks containing L-ascorbic acid were analyzed by the proposed method. Hydrogen peroxide was detected in 9 samples; 4 oolong tea in the range of 0.1-0.2 μg/m*l* and 5 lemon tea in the range of 1.4-2.2 μg/m*l*.

Keywords : hydrogen peroxide, L-ascorbic acid, method using a sensitive oxygen electrode, ORITECTOR® MODEL-Ⅲ, soft drinks

緒　言

最近，清涼飲料水においては，果汁の褐変防止，色素やフレーバーの安定化，ビタミンCの栄養強化などの目的でL-アスコルビン酸が使用されている[1-4]．また消費者の，いわゆる健康食品志向により，「スポーツ飲料」等のL-アスコルビン酸含有清涼飲料水が多種類販売されている．

従来からアスコルビン酸については，還元型が酸化されると過酸化水素が生成される[1,4-6]ことが知られているが，食品におけるL-アスコルビン酸由来の過酸化水素についての報告はみられない．しかし，1986年10月にL-アスコルビン酸を添加した清涼飲料水中に過酸化水素が検出されたという報告[7,8]があり，一部地域の新聞にもとりあげられた．

一方，1980年2月に過酸化水素の使用基準が改正され[9]，「最終食品の完成前に分解または除去しなければならない」と定められ，使用にあたっては規制が加えられている・

以上のような経過から，L-アスコルビン酸使用の表示がある清涼飲料水について，過酸化水素生成の実態を知る目的で，分析条件の検討を行うと共に市販品の調査を行った．

実験方法

1．装置　過酸化水素微量測定装置（以下酸素電極装置と略す）：オリエンタル電気㈱製 ORITECTOR® MODEL-Ⅲ，高速液体クロマトグラフ：日本分光工業㈱製 TRI ROTAR－Ⅵ，検出器：日本分光工業㈱製 UVIDEC-100-Ⅵ，データー処理装置：㈱島津製作所製クロマトパックC-R3A，pHメーター：東亜電波工業㈱製 HM-18E

*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

2．**試薬**　過酸化水素標準溶液：30％過酸化水素水（特級）1.0m*l* をとり冷水で100m*l* とし，この溶液を0.02Ｎチオ硫酸ナトリウム溶液で標定し，標準原液（3.33mg／m*l*）とする．標準原液を必要に応じてリン酸緩衝液で0.1～1.0 μg／m*l* になるように，用時希釈したものを標準溶液として用いた．

アスコルビン酸標準溶液：L-アスコルビン酸（和光純薬工業㈱製特級）を１％メタリン酸溶液に溶解し10～100 μg／m*l* になるように調製し用いた．

リン酸緩衝液：リン酸一カリウム（特級）27.2g を水で溶かし1*l* としたものと，リン酸二ナトリウム（12水塩，特級）71.6g を水で溶かし1*l* としたものとを，３：５の割合で混合し，pH を7.0に調整する．この混液に0.5％となるように臭素酸カリウム（特級）を加え溶解した後，氷冷下で１時間以上窒素ガスを通気したものを用いた．

カタラーゼ試液：オリエンタル酵母工業㈱製オリテクターⅢ型用カタラーゼを用いた．

その他の試薬：特にことわりのないかぎり試薬は特級を用いた．

3．**試料**　1986年11月～12月に都内で販売されていたL-アスコルビン酸使用表示のある市販清涼飲料水65検体を用いた．

4．**過酸化水素の測定**　酸素電極装置の試料セル内に，リン酸緩衝液1.0m*l* をとり，直ちに試料1.0m*l* を入れ密栓し，試料が泡立つ場合には消泡剤10 μ*l* を加え，スターラーで試料セル内を攪拌しながら窒素ガスを流し，以下は酸素電極装置の操作手順[10]に従って測定した．別に過酸化水素標準溶液0.1～1.0 μg／m*l* を同様に測定し，得られたピーク高さと濃度から検量線を作成し，試料中の過酸化水素量を定量した．

5．**L-アスコルビン酸の定量**　既報[11]に準じて測定した．

結果及び考察

1．過酸化水素の測定条件の検討

1）**試験溶液の pH について**　酸素電極法[10,12]は，試験溶液中の過酸化水素をカタラーゼで分解し，その際に生じた酸素による電位をピーク高さとして測定する分析法[10,12-14]である．カタラーゼの至適 pH について調べた結果，図１に示すように pH ６～８であった．しかし，清涼飲料水の多くのものは，表１に示したように pH が酸性であったため，試料をそのまま測定することができなかった．そこでリン酸緩衝液を用いて pH ６～７に調整し測定することとした．なお，試料１m*l* に対しリン酸緩衝液１m*l* の割合で混和した場合，試験溶液は pH ６～７となるため，リン酸緩衝液の添加量は試料と同量の添加で十分であった．

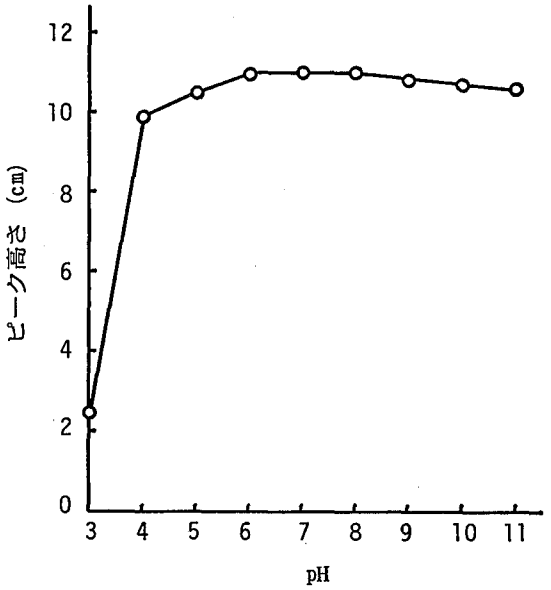


図１．酸素電極法におけるカタラーゼの至適 pH
カタラーゼ注入量：20 μ*l*
過酸化水素　　：１μg

表１．試験溶液の pH

試　料	pH	リン酸緩衝液混和後の pH*
果汁入り清涼飲料	2.9	6.6
炭酸飲料	2.4	6.5
ドリンク剤類似飲料	2.9	6.4
茶類飲料	6.2	7.1
スポーツ飲料	3.6	6.8

*：試料＋リン酸緩衝液（pH 7.0）；（１＋１）

2）**リン酸緩衝液の混和方法について**　試料とリン酸緩衝液の混和方法について，L-アスコルビン酸が添加されている清涼飲料水を用いて検討した．すなわち，酸素電極装置の試料セル内でリン酸緩衝液１m*l* と試料１m*l* を混和するセル内混和法（Ａ法），20m*l* の共栓試験管にリン酸緩衝液10 m*l* 及び試料10m*l* を加え30秒間激しく振とう混和するセル外混和法・１（Ｂ－１法），20m*l* の共栓試験管にリン酸緩衝液18m*l* と試料２m*l* を加え30秒間激しく振とう混和するセル外混和法・２（Ｂ－２法）について検討した．

表2．混和方法と放置時間による過酸化水素量の変化

試　　料	混和方法	過酸化水素（μg／ml） 放置時間（分） 0	5	10	30
果汁入り清涼飲料 (1)	A	ND	—	—	—
	B－1	ND	ND	0.1	0.2
	B－2	ND	0.2	0.5	1.1
(2)	A	ND	—	—	—
	B－1	ND	ND	0.1	0.4
	B－2	ND	ND	ND	0.7
炭酸飲料 (1)	A	ND	—	—	—
	B－1	ND	0.1	0.1	1.3
	B－2	ND	2.1	3.7	9.9
(2)	A	ND	—	—	—
	B－1	ND	0.1	0.3	1.4
	B－2	ND	2.5	2.8	4.7
ドリンク剤類似飲料(1)	A	ND	—	—	—
	B－1	ND	1.3	2.7	9.5
	B－2	ND	1.7	3.1	12.3
(2)	A	ND	—	—	—
	B－1	ND	0.6	1.7	7.4
	B－2	0.9	4.7	8.6	18.8
茶類飲料					
煎茶	A	ND	—	—	—
	B－1	ND	0.2	0.4	1.4
	B－2	ND	ND	ND	1.0
ウーロン茶	A	0.1	—	—	—
	B－1	0.3	1.1	1.8	5.9
	B－2	ND	0.8	1.5	4.3
紅茶（レモン果汁入り）	A	2.2	—	—	—
	B－1	3.2	8.6	11.6	15.7
	B－2	3.1	7.2	11.0	29.3
スポーツ飲料(1)	A	ND	—	—	—
	B－1	ND	0.5	0.9	1.9
	B－2	0.2	2.8	5.2	22.9
(2)	A	ND	—	—	—
	B－1	ND	ND	ND	ND
	B－2	ND	3.6	6.2	17.1
L-アスコルビン酸無添加炭酸飲料	A	ND	—	—	—
	B－1	ND	ND	ND	ND
	B－2	ND	ND	ND	ND

ND：0.1μg／ml 未満

なお，A法，B－1法及びB－2法についてはいずれも混和後直ちに測定した．また，B－1法及びB－2法については混和後数分間放置されることも考えられるので，これらについては，混和後5～30分間室温で放置した場合の過酸化水素量も測定した．これらの結果については表2に併せて示した．

混和直後の測定では，ドリンク剤類似飲料，スポーツ飲料及び茶類飲料の一部を除いて，A法，B－1法，B－2法のいずれの方法でも過酸化水素は検出されなかったが，B－1法及びB－2法では混和後5分以上放置すると果汁入り清涼飲料の一部を除きすべてのものから過酸化水素が検出された．すなわち，L-アスコルビン酸を含有する清涼飲料水は液性をpH 6～7に調整するとその溶液中に過酸化水素が生成され，時間の経過とともに増加する傾向を示した．従って，清涼飲料水中の過酸化水素の測定には，pH調整後直ちに測定が可能なA法を用いることとした．なお，A法で過酸化水素が検出されたウーロン茶飲料及び紅茶飲料については，試料開缶時すでに過酸化水素が含有されていたものと考えられる．

2．添加実験　清涼飲料水に過酸化水素を0.5 μg／ml になるように添加し本法に従って測定した．その結果，0.44～0.47 μg／ml の過酸化水素が検出され，添加量に対し平均回収率90.8％と良好な値を示した．なお，本法の定量限界は試料濃度として0.1 μg／ml であった．

3．市販清涼飲料水の調査結果　L-アスコルビン酸の添加が表示されている市販清涼飲料水65検体について，過酸化水素含量，L-アスコルビン酸含量及びpHを測定し，その結果を表3に示した．

L-アスコルビン酸を1.91g／kg と多量に含有するものでも，pH 2～3である清涼飲料水からはいずれも過酸化水素は検出されなかった．また，L-アスコルビン酸含量が0.09～0.13g／kg と比較的少量であっても，pH 6付近のウーロン茶飲料からは0.1～0.2 μg／ml の過酸化水素が検出された．これらの結果は，L-アスコルビン酸がpH約4以下では比較的安定であるが，pH 4以上では酸化反応が起こりやすく過酸化水素が生成されやすいという報告[1,4]とよく一致した．

また，pH4.2～4.3と弱酸性ではあったが，L-アスコルビン酸を0.74～0.75 g／kg 検出したレモン果汁入り紅茶飲料から，1.4～2.2 μg／ml の過酸化水素が検出された．この原因については，レモン果汁により弱酸性となる以前にすでに過酸化水素が紅茶中に含まれていたこと，あるいは，レモン果汁添加後の弱酸性溶液中で過酸化水素が生成されたことなどが考えられ，今後検討する予定である．

4．試料開封後の過酸化水素量の変化について　茶類飲料の一部を除き多くの清涼飲料水から，開封（あるいは開缶）直後に過酸化水素は検出されなかった．従って，

表3．市販清涼飲料水の調査結果

試　　料	試料数	pH	過酸化水素 (μg／ml)	L-アスコルビン酸 (g／kg)
果汁入り清涼飲料	11	2.6～3.1	ND*	0.10～0.53
希釈用果汁入り清涼飲料	1	2.9	ND	0.55
果肉飲料	1	3.4	ND	0.28
炭酸飲料				
無果汁	4	2.7～3.2	ND	0.02～0.21
果汁入り	5	2.6～3.2	ND	ND**～0.58
ドリンク剤類似飲料				
炭酸飲料	5	2.9～3.2	ND	0.05～1.91
非炭酸飲料	1	3.9	ND	ND
茶類飲料				
煎茶	2	6.4, 6.5	ND	0.51, 0.53
はと麦茶	2	6.4, 6.6	ND	ND
ウーロン茶	4	6.3～6.4	0.1～0.2	0.09～0.13
紅茶（レモン果汁入り）	5	4.2～4.3	1.4～2.2	0.74～0.75
スポーツ飲料	20	3.0～3.7	ND	0.14～0.99
ビール類似飲料	4	4.3～4.4	ND	ND～0.44

ND*：0.1 μg／ml 未満，ND**：0.01g／kg 未満

表4．試料開封後の過酸化水素量の変化

試料	pH	L-アスコルビン酸 (g/kg)	過酸化水素 (μg/ml) 開封経過時間（分）			
			0	30	60	120
果汁入り清涼飲料 (1)	2.8	0.51	ND*	ND	ND	ND
(2)	3.4	0.28	ND	ND	ND	ND
炭酸飲料	2.7	0.18	ND	ND	ND	ND
ドリンク剤類似飲料	2.9	0.05	ND	0.3	0.4	0.8
茶類飲料						
はと麦茶	6.4	ND**	ND	ND	ND	0.2
ウーロン茶	6.4	0.13	0.1	0.9	1.9	4.9
紅茶（レモン果汁入り）	4.2	0.74	1.4	1.9	2.4	2.4
スポーツ飲料 (1)	3.6	0.48	ND	ND	ND	ND
(2)	3.0	0.27	ND	ND	ND	ND
(3)	3.4	0.89	ND	ND	ND	ND
ビール類似飲料	4.3	0.04	ND	ND	ND	ND
L-アスコルビン酸無添加炭酸飲料	2.9	ND	ND	ND	ND	ND

ND*：0.1 μg/ml 未満，ND**：0.01g/kg 未満

清涼飲料水を開封後すぐに飲用すれば過酸化水素が摂取されることはほとんどないが，開封後時間をかけて飲用される場合も考えられることから，L-アスコルビン酸含有清涼飲料水を用いて，開封後30～120分間室温で放置した際の過酸化水素量の変化について検討した．

その結果は表4に示したように，L-アスコルビン酸が添加された，pH 2 ～ 3 の果汁入り清涼飲料，炭酸飲料及びスポーツ飲料からは，120分間室温で放置しても過酸化水素は検出されなかった．また，茶類飲料では時間の経過とともに増加する傾向を示し，120分後では，ウーロン茶飲料で4.9 μg/ml，紅茶飲料（レモン果汁入り）で2.4 μg/ml の過酸化水素を検出した．しかし，pH 3 と酸性であったにもかかわらずドリンク剤類似飲料から，30分後に0.3 μg/ml の過酸化水素が検出され，以後徐々に増加した．この過酸化水素が生成する原因については検討中である．

なお，L-アスコルビン酸が添加されていない清涼飲料水についても同様に放置したが過酸化水素は検出されなかった．

以上の結果から，L-アスコルビン酸含有清涼飲料水を普通に飲用する場合には過酸化水素が摂取される心配はほとんどないことがわかった．しかし，ウーロン茶飲料及び紅茶飲料ではわずかながら過酸化水素が検出されたことから，その生成原因について今後の検討が必要である．

まとめ

酸素電極法による過酸化水素の分析法を清涼飲料水に適用するためにいくつかの条件について検討したところ，酸素電極装置の試料セル内で試料とリン酸緩衝液を直接混和させる簡便な方法により良好な結果が得られた．

本法により，L-アスコルビン酸が添加された市販清涼飲料水65検体について調査した結果，56検体からは過酸化水素が検出されなかったが，ウーロン茶飲料4検体より0.1～0.2 μg/ml 及びレモン果汁入り紅茶飲料5検体より1.4～2.2 μg/ml の過酸化水素が検出された．

なお，pH 2 ～ 3 を示すほとんどの清涼飲料水からは，開封後室温で2時間放置しても過酸化水素は検出されなかった．

文献

1）林　建樹：日本食品工業学会誌，33，456-462，1985.
2）小谷英三：*New Food Industry*，22(3)，49-57，1980.
3）矢部恵理子：フードケミカル，12，25-27，1986.
4）矢部恵理子：フードケミカル，8，11-13，1986.
5）Counsell, J. N. and Hornig, D. H.: *Vitamin C*，130，1981，Applied Science Publishers, London.
6）重岡　成：ビタミン，56(2)，75-82，1982.
7）西岡　一，三枝　新，米沢さとみ，曽谷知弘，布柴達男：環境変異原研究，8(3)，38，1986.
8）日本消費者連盟：消費者リポート第623号，1-3，

1986.
9) 厚生省告示：第24号，昭和55年2月20日，1980.
10) 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，24-29，1982，講談社，東京.
11) 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：東京衛研年報，36，168-173，1985.
12) 豊田正武：食品衛生研究，32，5-16，1982.
13) 厚生省環境衛生局食品化学課：食品衛生研究，31，578-585，1981.
14) Toyoda, M., Ito, Y., Iwaida, M. and Fujii, M.: *J. Agric. Food Chem.*, 30, 346-349, 1982.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **38**, 209-215, 1987

輸入即席麺の粉末スープ，調味料，香辛料，天然色素中のポリソルベートの分析法と実態調査

田村行弘*，井部明広*，橋本秀樹*，上村尚*，
西山良子*，田端節子*，斎藤和夫*，中里光男*，
菊地洋子*，藤沼賢司*，勝木康隆*，冠政光*，
中沢久美子*，鈴木二郎*，安田和男*，牛山博文*，
小川仁志*，嶋村保洋*，石川ふさ子*，二島太一郎*

Detection and Survey of Polysorbate in Imported Chinese Noodle Soup,Seasonings,Spices and Natural Colors

YUKIHIRO TAMURA*, AKIHIRO IBE*, HIDEKI HASHIMOTO*, HISASHI KAMIMURA*, YOSHIKO NISHIYAMA*, SETSUKO TABATA*, KAZUO SAITO*, MITSUO NAKAZATO*, YOKO KIKUCHI*, KENJI FUJINUMA*, YASUTAKA KATSUKI*, MASAMITSU KAMMURI*, KUMIKO NAKAZAWA*, JIRO SUZUKI*, KAZUO YASUDA*, HIROFUMI USHIYAMA*, HITOSHI OGAWA*, YASUHIRO SHIMAMURA*, FUSAKO ISHIKAWA* and TAICHIRO NISHIMA*,

Keywords：ポリソルベート polysorbate，ツィーン tween，即席麺 chinese noodle，粉末スープ chinese noodle soup，パプリカオレオレジン paprika oleoresin，天然色素 natural colors，調味料 seasonings，香辛料 spices，薄層クロマトグラフィー thin layer chromatography

緒　言

激辛ブームに乗って輸入された韓国製即席麺の添付スープに，指定外添加物が使用されていることが問題となった．昭和61年11月，大阪検疫所が明らかにしたもので，A社の即席麺に添付された粉末スープの中からポリソルベート（以下PSと略す）が検出され，輸入予定の約16万食が廃棄処分となった．厚生省では国内にすでに販売されているものの中にも，PSの混入したものがあるとみて，都道府県に対し抜き取り検査を行うように指示した．

PSは，我が国では不許可の食品添加物であるが，欧米や日本薬局方では許可されている．別名ツィーンとも呼ばれる非イオン系界面活性剤で，乳化剤，分散剤，洗浄剤などとして広く使われている．欧米の食品ではパン，ケーキミックス，サラダドレッシング，ジュースなどに添加されている．食品添加物として使用されるものには，PS 20，40，60，65，80，85の6種類がある．

PSはソルビットを加熱脱水したソルビタンに脂肪酸をエステル化させ，さらに酸化エチレンを付加重合して合成する．その毒性はLD_{50}1790mg／kg，ivn-ratであり[1]，FAO／WHO食品添加物リストの分類はA(1)ランクに指定され，ADI（1日許容摂取量）は25mg／kgと評価されている．

PSの分析法は，食品を対象としたものではアルミナ[2]やシリカゲルカラム[3]により精製後，薄層クロマトグラフィー（以下TLCと略す）を用いる方法，TLCの二段展開により油脂類分離後同定する方法[4]，ケン化して得たポリオールとリンモリブデン酸との化合物の重量をはかる方法[5]などがある．TLCの検出にはチオシアン酸コバルト試薬またはドラーゲンドルフ試薬が使われる．また，洗剤などの混合乳化剤では液々分配法[6]，シリカゲル[7]などのカラム精製法と重量法[7]や比色法[8]を組み合わせた報告がある．

今回対象となった粉末スープには，油溶性色素や香辛料が多量に含まれるため，従来からの方法でPSを同定することは困難であった．そこで，シリカゲルカラム法

*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

並びにエーテル洗浄法により精製後，TLCで色素を分離し，チオシアン酸コバルト試薬あるいはドラーゲンドルフ試薬を噴霧し，ポリオキシエチレン基あるいはグリコール[2,9]を確認する方法を検討し良好な結果を得たので報告する．また，実態調査の結果並びに粉末スープに使用されたPSについて，得られた知見を加えて報告する．

実験方法

1．試料，試薬および装置

1）**試料** 昭和62年1月から3月までに，東京都衛生局食品監視課及び食品機動監視班から搬入された市販の韓国製即席麺12種36検体，韓国K社の使用したパプリカオレオレジン他香辛料5種5検体，輸入香辛料及び調味料6種6検体の計23種47検体．

2）**試薬** ①PS標準液：PS 80（半井化学薬品㈱）100mgをジクロルメタンに溶かし100mlとした． ②PS 20，40，60（半井化学薬品㈱），ポリエチレングリコール200，400，600，1000（関東化学㈱） ③発色試薬：(Ⅰ)チオシアン酸コバルト試薬；チオシアン酸アンモニウム17.5g及び硝酸コバルト・6水塩2.8gを水に溶かして100mlとした．(Ⅱ)ドラーゲンドルフ試薬；A液-塩基性硝酸ビスマス4 $BiNO_3(OH)_2BiO(OH)$ 0.85gに氷酢酸10mlを加えて溶かし，水40mlを加える．B液-ヨウ化カリウム8gに水を加えて溶かす．A液及びB液はしゃ光して保存する．用時にA液，B液及び氷酢酸の等容量を混合して用いた． ④ジクロルメタン・エタノール混液：ジクロルメタン及びエタノールの等容量混液． ⑤シリカゲルカラム：Kieselgel 60（70-230mesh, MercK社製）10gにクロロホルムを加え，ガラスカラム（内径1.5cm，高さ30cm）に充填した後，上部に少量の硫酸ナトリウムを積層する． ⑥TLC用プレート：Kieselgel 60（Merck社製）． ⑦展開溶媒：i）ジクロルメタン・メタノール・アセトン・水（55：20：15：4v／v），ii）クロロホルム・メタノール・0.1N硫酸（80：19：1v／v），iii）クロロホルム・イソプロパノール・メタノール・28%アンモニア水（80：10：10：2v／v），iv）クロロホルム・メタノール・氷酢酸・水（68：12：12：3v／v）．

3）**装置** 超音波洗浄器：VS-150H（ヤマト科学社製），分光光度計：Double Beam Spectrophotometer UV-240（島津製作所製），赤外分光光度計：日立285（日立製作所製），キャピラリーガスクロマトグラフ：GC-7Aキャピラリー使用（島津製作所製）．

2．操作

1）**抽出及び精製**

①抽出法 粉末スープは5g，香辛料及び調味料は0.1～5gを量り取り，ジクロルメタン・エタノール混液30mlを加え超音波洗浄器で3分間抽出後，ろ過する．この操作をさらに2回繰り返して，ろ液を合わせ減圧濃縮する．濃縮物に少量のクロロホルムを加え再び減圧濃縮して，残ったエタノールを除去する．この濃縮物にクロロホルム30mlを加えて溶かしたのちろ過し，残査を少量のクロロホルムで洗い，先のろ液と合わせシリカゲルカラム法用抽出液とする．また，この抽出液の半量をとりクロロホルムを留去後，残査に水20mlを加えてスクリーニング法抽出液とする．

②スクリーニング法 抽出液をエーテル30mlで2回洗浄する．エマルジョンを形成するときには遠心分離をする．洗浄した水層を減圧濃縮して，残査にジクロルメタン0.5mlを加えて溶かし試験溶液とする．

③シリカゲルカラム法 抽出液をシリカゲルカラムに充塡し，はじめにクロロホルム70ml，ついでクロロホルム・エーテル（1：1v／v）70ml及びクロロホルム・アセトン（1：1v／v）70mlで洗浄後，クロロホルム・メタノール（4：1v／v）100mlで溶出する．溶出液を減圧濃縮し，残査にジクロルメタン0.5mlを加え溶かして試験溶液とする．

2） **TLC** 試験溶液10～20 μl 及び標準溶液5 μl をプレートに塗布し，展開溶媒i），ii），iii），及びiv）を用いて展開する．展開終了後，溶媒を揮散させたのち発色試薬（Ⅰ）または（Ⅱ）を噴霧し，青色またはオレンジ色のスポットを確認する．

3） **脂肪酸の分析** 試料をシリカゲルカラムで精製後，TLCで展開溶媒i）を用いて展開し，各スポットをかきとりジクロルメタンで抽出後，それぞれを衛生試験法，食品成分試験法(7)脂肪酸の項のナトリウムメトキサイド試薬を用いる方法で，トランスメチレーション処理をし，脂肪酸の分析をした．キャピラリーガスクロマトグラフィーの条件：キャピラリーカラム（Hicap, CBP 1-M25-025，島津製作所製），カラム温度（180-300°昇温，5°／min）．

4） **PSの定量** Daniels ら[3]のチオシアン酸コバルトによる比色法に準じた．

結果及び考察

1．抽出溶媒

PSは水，メタノール，エタノールなどの極性溶媒によく溶けることから抽出溶媒の検討を行った．メタノー

ル，エタノール，ジクロルメタン，ジクロルメタン・メタノール（1：1v／v），ジクロルメタン・エタノール（1：1v／v）を用いて，粉末スープ10gからの抽出物量を調べたところ，それぞれ2.54g，0.90g，0.63g，1.44g，0.85gであった．メタノール系で抽出される多量の極性物質は，その後の精製過程でも除去できず，PSと挙動をともにし影響を及ぼした．またジクロルメタン単独ではPSの抽出効率はよいが，油溶性色素が多量に移行してきた．石綿ら[4]もジクロルメタン・エタノール等量混合溶媒が最も良い抽出率を示したと報告している．これらのことから，ジクロルメタン・エタノール混合溶媒を試料からの抽出溶媒とすることとした．

2．精製法

粉末スープ，香辛料，調味料には多量の油脂類，天然色素などが含まれ，抽出溶液をそのままTLCに用いるとPSの確認が困難になる．そこでそれらを除くために，エーテル洗浄によるスクリーニング用精製とシリカゲルカラムによる精製について検討した．

1）スクリーニング法 本法では抽出溶液中の色素はエーテルにより完全に除去されるが，回収率は75%とやや低い値であった．また水を留去した後残査に少量の水を加え薄層板上に塗布するとのり様のものが残るが，残査をジクロルメタンで溶かすと全く残ることがなかった．本法はやや回収率に難があるが，多量の溶媒を必要とせず，簡便に短時間で処理できるためスクリーニング法として便利である．

2）シリカゲルカラム法 粉末スープではクロロホルム及びクロロホルム・エーテルでほとんどの色素は溶出してしまうが，若干黄色系色素が残る．しかしながら，油脂類は完全に取り除かれた．一方，Rosen[7]はソルビタン脂肪酸エステルはクロロホルム・エーテル混合溶液中に，また酸化エチレンの付加モル数が10モル以下の界面活性剤では，クロロホルム・アセトン混合溶液中に溶出すると報告している．

このシリカゲルカラムによるPSの回収率をTable 1に示した．クロロホルム及び粉末スープの抽出溶液にPS80，300mgを加えたものについて調べた結果，いずれもクロロホルム・メタノール（19：1）で約80%が溶出し，その残りもクロロホルム・メタノール（4：1）でほとんど溶出した．そこで，クロロホルム・メタノール（19：1）では完全にPSが溶出しないため，PSの溶出にはクロロホルム・メタノール（4：1）100m*l*を用いることとした．

3．PSの確認

1）TLC

チオシアン酸コバルト試薬及びドラーゲンドルフ試薬はポリオキシエチレン基及びグリコール[2,9]との呈色反応に基ずくもので，非イオン界面活性剤の確認に広く汎用されている．しかし，両者共に特異性が乏しいことから，より確実性を期すためにTLCを行った．

PS，ポリエチレングリコール，粉末スープ及びパプリカオレオレジンなどを各展開溶媒で検討したところ，PSはPS20，40，60，80いずれも同じ挙動を示した．すなわち，展開溶媒i）～iii）ではPSは4種のスポットが得られ，そのRf値は展開溶媒i）で0.5，0.6，0.7，0.8であり，ポリエチレングリコール200，400，600，

Table 1．シリカゲルカラムからのポリソルベート回収率

溶出溶媒	PS 80（添加量300mg）		粉末スープ＋PS80（添加量300mg）		水溶性パプリカオレオレジン	
	回収量	回収率	回収量	回収率	回収量	回収率
1)$CHCl_3$	70m*l* 0	0	0	0	1.6mg	2.7%
2)$CHCl_3$：Et_2O(1：1)	70 (0.9mg)	(0.3%)	(1.3mg)	(0.5%)	1.0	1.7
3)$CHCl_3$：Acet.(1：1)	70 (1.3)	(0.5)	(1.4)	(0.5)	1.3	1.9
4)$CHCl_3$：MeOH(19：1)	70 241	86.0	264	88.0	49.1	82.8
5)$CHCl_3$：MeOH(4：1)	70 23	7.7	24	8.0	7.6	12.8
6)$CHCl_3$：MeOH(1：1)	70 (1.4)	(0.5)	(1.4)	(0.5)	0	0
7)MeOH	70 (0.8)	(0.3)	(0.8)	(0.3)	0	0
計	264mg	93.7%	288mg	96.0%	56.7mg	100%

PS 80：ポリソルベート80，$CHCl_3$：クロロホルム，Et_2O：ジエチルエーテル，
Acet.：アセトン，MeOH：メタノール
水溶性パプリカオレオレジンはPS 80が検出されたもので，128mgを本試験に供した．

1000はいずれもRf値0.6付近に，またiv）ではPS及びポリエチレングリコール共にRf値0.9付近に1種のスポットが得られ，吸湿した薄層板をつかうとPSで2～3種のスポットに分かれる．粉末スープ及びパプリカオレオレジンなど色素を含有するものでは，シリカゲルカラム法で処理した後にも淡黄色系色素が残るが，いずれも溶媒先端に移動する．またこの色素は多量に存在すると発色試薬で呈色するが，展開溶媒i）～iii）ではRf値が異なるため誤認することはなかった．

チオシアン酸コバルト試薬では，Rf値0.7，0.8のスポットが，またドラーゲンドルフ試薬では，Rf値0.5，0.6のスポットが明りょうに確認された．なお，PS量が少なく4種のスポットが確認できない場合には始めに前者を，ついで後者を噴霧すると良い結果が得られた．またRf値0.6のスポットはドラーゲンドルフ試薬では，ほかのスポットがオレンジ色であるのに対してピンク色を呈し，ポリエチレングリコールの呈色と一致した．この傾向はPS 20，40，60，80ともに同じであった．いずれの発色試薬とも確認限度は薄層板上で2 μgである．

粉末スープ及び水溶性パプリカオレオレジンから抽出されたものは，PSと同じRf値を示し，発色傾向も一致した．

2）赤外吸収スペクトルの測定

試料中に検出されたPSをTLCの展開溶媒i）で展開して各スポットに分画した後，薄膜法で赤外吸収スペクトルを測定した．Fig. 1に粉末スープの測定結果を示したが，いずれの画分のものもポリエチレン基のエーテル結合にもとずく1100cm^{-1}付近の吸収が認められた．またRf値0.7及び0.8のものでは，脂肪酸多価アルコールエステルにもとずく1720cm^{-1}付近の吸収が認められた．しかし，Rf値が0.5及び0.6のものではわずかにしか認められなかった．なお，分画前のものあるいはPS 80はRf値0.7のスペクトルグラムとよく一致していた．

3）脂肪酸の確認

2）と同様に分画したものをアルカリ性下でトランスメチレーションし，脂肪酸のメチルエステルを得た．Fig. 2に結果を示したが，Rf値0.7及び0.8のものからはオレイン酸メチルエステルが検出された．しかしRf値0.5及び0.6のものからはわずかしか検出されなかった．PS 80及びPS 20においては，それぞれオレイン酸及びラウリン酸のメチルエステルが検出された．

4）ソルビタン誘導体の確認

粉末スープ及びパプリカオレオレジンより抽出，精製したPSの脱脂肪酸画分をLH-20で脱塩し，試験溶液とした．TLCの展開溶媒i），iv）で展開し，発色試薬（Ⅰ），（Ⅱ）及び重クロム酸カリウム・硫酸混液で確認したところ，同様に処理したPS 80のポリエチレン・ソルビタン残基のRf値と一致し，同様の呈色反応を示した．

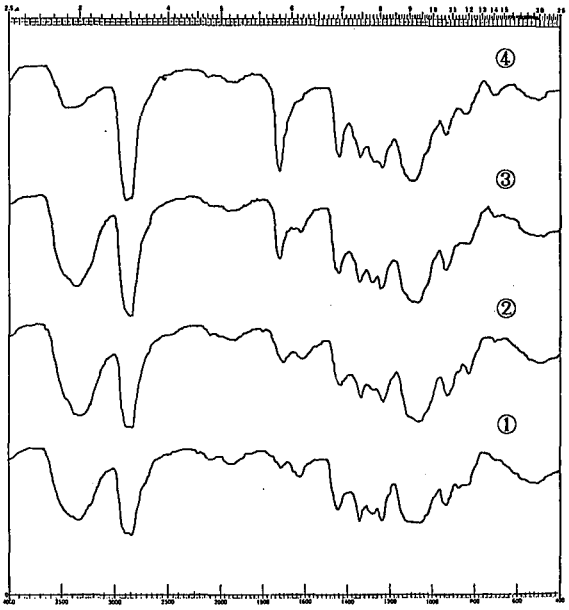


Fig. 1．粉末スープ中ポリソルベートの赤外吸収スペクトルグラム

①, ②, ③, ④：TLCの展開溶媒ジクロルメタン・メタノール・アセトン・水（55：20：15：4）により展開し，得られた各画分
①：Rf値0.5，②：Rf値0.6，③：Rf値0.7，④：Rf値0.8

以上のことから，韓国製即席麺の粉末スープ及びそれに添加した水溶性パプリカオレオレジンに使用された界面活性剤は，脂肪酸組成などからPS 80であると考えられた．また，検出されたPSや今回標準品に使用したPS 80には，赤外吸収スペクトルグラムやGCのクロマトグラムなどから，ポリエチレングリコール系化合物が混存していると考えられた．Daniels ら[3]はPS 60についてTLCの結果から同様のことを推定している．

4．韓国製即席麺の粉末スープの検査結果

市販品の韓国製即席麺の粉末スープ，K社使用のパプリカオレオレジンなどの香辛料，輸入品の香辛料及び調味料についての検査結果をTable 2に示した．PSを検出した粉末スープは12品目中7品目，36検体中17検体であり，いずれも製造者はK社かSE社であった．検出し

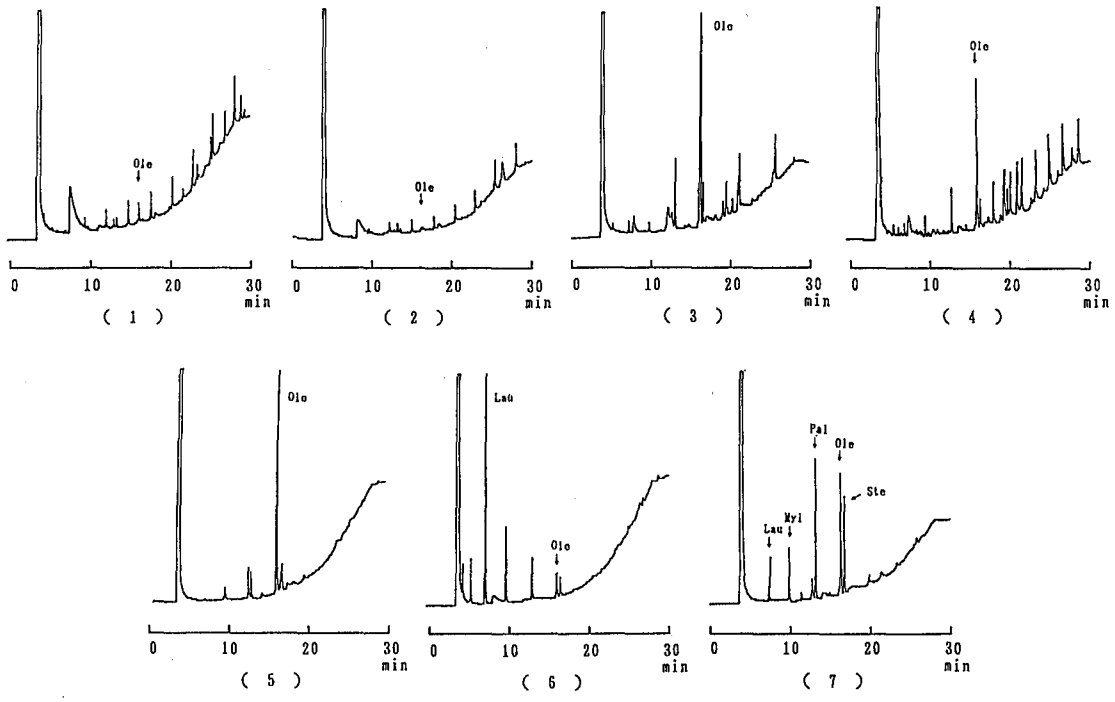


Fig. 2．粉末スープ中ポリソルベートの脂肪酸のキャピラリーガスクロマトグラム

(1), (2), (3), (4)：TLC の展開溶媒ジクロルメタン・メタノール・アセトン・水, (55：20：15：4) による展開し得られた各画分(1)：Rf 値0.5, (2)：Rf 値0.6, (3)：Rf 値0.7, (4)：Rf 値0.8をトランスメチレーションしたもの, (5), (6)：ポリソルベート80及び20をトランスメチレーションしたもの. (7)：標準脂肪酸のメチル化物 Lau：メチルラウレート, Myl：メチルミリスチレート, Pal：メチルパルミテート, Ole：メチルオレエート, Ste；メチルステアレート

Table 2．韓国産即席麺の粉末スープ中ポリソルベートの分析結果

	品　　名	輸 入 者	製 造 者	形　　態	検出数／検査数
1	スナック麺	ＭＩ社	ＳＡ社	カップ詰	0／ 5
2	即席中華麺	ＭＩ社	ＳＡ社	袋　　詰	0／ 2
3	即席中華麺	ＭＵ社	？	袋　　詰	0／ 2
4	即席中華麺(ビーフ味)	Ｃ　社	Ｋ　社	袋　　詰	4／12
5	スナック麺(ビーフ味)	Ｃ　社	Ｋ　社	カップ詰	2／ 2
6	即席中華麺	Ｃ　社	Ｋ　社	袋　　詰	3／ 3
7	スナック麺	Ｔ　社	ＳＥ社	カップ詰	1／ 1
8	スナック麺	ＫＯ社	ＳＥ社	カップ詰	2／ 2
9	スナック麺	ＫＡ社	ＳＥ社	カップ詰	1／ 1
10	スナック麺	Ｅ　社	ＳＥ社	カップ詰	4／ 4
11	即席中華麺	Ｓ　社	？	袋　　詰	0／ 1
12	即席中華麺	Ｎ　社	Ｎ　社	袋　　詰	0／ 1
	計				17／36

たPSはいずれもPS 80であり，その添加量は約1500 μg／gと500 μg／gの2種あった．またK社の袋詰即席麺の粉末スープではTable 3に示したように，製造ロットにより検出されるものとされないものがあり，品質管理のずさんさを暴露したものであった．

一方，Table 4に示したように香辛料，調味料，天然色素，11品目11検体からは，K社が粉末スープに使用していた水溶性パプリカオレオレジンの1種からPS 80が検出され，その含有量は46.3%であった．

その後の調査で，K社の粉末スープには2種あり，水溶性パプリカオレオレジンの配合割合が0.38%と0.13%であったことが明らかにされた．またこのパプリカオレオレジンはスペイン産で水溶性にするためにPSを加えたものであった．

以上のことから，PSが混入した原因は水溶性パプリカオレオレジンを使ったことにあり，その配合割合と粉末スープの定量値との結果からも明らかであった．

Table 3．K社製即席中華麺の製造年月日とポリソルベートの分析結果

	不検出のもの	検出のもの
即席中華麺	61.10.17.1	61.11.22.5
	61.10.20.3	61.12. 6.3
	61.10.30.3	61.12. 6.5
	61.11. 9.5	61.12. 6.5
	61.11. 9.5	
	61.11.22	
	61.11.22.3	
	61.12. 7.5	

ま と め

韓国製即席麺の粉末スープにポリソルベート（PS）が添加されていることが明らかになったことから，PSの分析法について検討し，同時に市販品について実態調査をし，以下の結果を得た．

1．PSの分析法は，試料からの抽出にジクロルメタン・エタノール混液（1：1 v／v）を用い，精製はエーテル洗浄法あるいはシリカゲルカラム法で行い，確認はTLCで分離後チオシアン酸コバルト試薬及びドラーゲンドルフ試薬を使うことにより良好な結果が得られた．

2．本法によるPSの検出限界は薄層板上で2 μg，試料中では20 μg／gであった．

3．韓国製即席麺の粉末スープの実態調査の結果，12品目中7品目，36検体中17検体からPSが検出された．その添加量は約1500 μg／gと500 μg／gであった．また，これら検出されたものはいずれも韓国のK社とSE社が製造したものであった．

香辛料，調味料，天然色素，11品目11検体からは，K社が粉末スープに使用していた水溶性パプリカオレオレジン1検体からのみPSを検出し，その添加量は46.3%であった．

4．検出したPSは，TLC，赤外吸収スペクトルグラム，脂肪酸及びソルビタン誘導体などの結果からPS 80であると推定した．また，使用した標準品も含めてポリエチレングリコール系化合物の混在が認められた．

Table 4．調味料，香辛料及び天然色素中のポリソルベートの分析結果

品名	内容	形態	産地	結果
1.サラダドレッシング	ニンニク,オニオン,砂糖他	粉末	アメリカ	−
2.サラダドレッシング	パプリカ,乾燥野菜,粉乳他	粉末	アメリカ	−
3.タコミックス	スパイス,オニオン,ニンニク	粉末	アメリカ	−
4.ソースミックス	スパイス,タマネギ,澱粉他	粉末	アメリカ	−
5.フレンチミックス	スパイス,ガーリック他	粉末	アメリカ	−
6.トーストオニオン	スパイス,オニオン,チーズ	粉末	アメリカ	−
7.レッドペッパー油		液体	スペイン	−
8.レッドペッパー末	枯草粉	粉末	韓国	−
9.ばい煎レッドペッパー	レッドペッパー,ペッパー油	粉末	韓国	−
10.パプリカオレオレジン	油溶性	液体	スペイン	−
11.パプリカオレオレジン	水溶性	液体	スペイン	46.3%

1～6：調味料，7～9：香辛料，10，11：天然色素．

7～11はK社が韓国産即席麺の粉末スープに使用していたもの．

文　献

1) Lewis, R.J. and Tatken, R.L., Ed. : Registry of Toxic Effect Chemical Substances, 1979 ed., p537, 1980, U.S. Department of Commerce NTIS.

2) Murphy, J.M. and Scott, C.C. : *Analyst*, 94, 481-483, 1969.

3) Daniels, H.D., Warner, R. and Selim, S. : *J.Assoc. Off. Anal. Chem.*, 65, 162-165, 1982.

4) 石綿　肇, 渡辺晴美, 林　敏夫, 谷村顕雄：食衛誌, 14, 425-430, 1973.

5) Smullin, C.F., Wetterau, F.P. and Olsanski, V.L. : *J.Am. Oil Chem. Soc.*, 48, 18-20, 1971.

6) Greff, R.A. : *J.Am. Oil Chem. Soc.*, 42, 180-184, 1965.

7) Rosen, M.J. : *Anal. Chem.*, 35, 2074-2077, 1963.

8) 日本サーファクタント工業㈱, 日本ケミカルス㈱編：ハンドブック－化粧品・製剤原料－改定版, p423-424, 1977

9) Hodda, A.E. : *J.Chromatogr.*, 124, 424-425, 1976.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 216-221, 1987

生鮮野菜等に使用されるリン酸の分析法とその実態調査

井部明広*, 田村行弘*, 上村尚*, 西山良子*,
田端節子*, 橋本秀樹*, 斉藤和夫*, 中里光男*,
菊地洋子*, 藤沼賢司*, 勝木康隆*, 冠政光*,
中沢久美子*, 鈴木二郎*, 安田和男*, 牛山博文*,
小川仁志*, 嶋村保洋*, 石川ふさ子*, 二島太一郎*

Analytical Method and Survey of the Use of Phosphate in Vegetables and Potatoes

AKIHIRO IBE*, YUKIHIRO TAMURA*, HISASHI KAMIMURA*, YOSHIKO NISHIYAMA*,
SETSUKO TABATA*, HIDEKI HASHIMOTO*, KAZUO SAITO*, MITSUO NAKAZATO*,
YOKO KIKUCHI* KENJI FUJINUMA*, YASUTAKA KATSUKI*, MASAMITSU KAMMURI*,
KUMIKO NAKAZAWA*, JIRO SUZUKI*, KAZUO YASUDA*, HIROFUMI USHIYAMA*,
HITOSHI OGAWA*, YASUHIRO SHIMAMURA*, FUSAKO ISHIKAWA* and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords：生鮮野菜等 vegetables and potatoes, リン酸及びその塩類 phosphoric acid and phosphate, リン phosphorus, オルトリン酸 orthophosphoric acid, メタリン酸 metaphosphoric acid, ピロリン酸 pyrophosphoric acid, トリポリリン酸 tripolyphosphoric acid, 比色定量 colorimetric method

緒　言

生鮮野菜等にその鮮度保持等の目的で，リン酸系添加物が使用されてきたことが最近問題となった．

厚生省は消費者保護の立場から，昭和61年6月生鮮野菜等に発色や漂白を目的として，リン酸及びその塩類（以下リン酸と略す）を使用しないよう行政指導に乗りだした．そこで，リン酸の使用実態を調査するため，試験法の検討を行なった．

従来，生鮮野菜等に使用されたリン酸の定性試験法は，東京都市場衛生検査所[1]あるいは吉田ら[2]の報告がある．しかし，適用できる野菜等が限定されていること，天然成分のリンの影響を受けやすいこと，オルトリン酸以外には適用しにくいこと，使用判定の基準が不明確などの問題が残されていた．また，米沢ら[3]はさつまいもについてふきとり方式によりリン量を測定し，定量的にリン酸の有無を判定しているが，他の野菜への応用面に難点があった．

そこで，著者らは各種の生鮮野菜等に適用でき，天然成分のリンの溶出の少ない抽出法を検討し，さらにオルトリン酸に加え，使用される可能性のあるメタ及びポリリン酸にも適用できる分析法を検討した．この方法を用い，リン酸無処理の各種生鮮野菜等から溶出するリン量を求め，その値を基にしてリン酸使用の有無を判定する基準値を設定した．さらに市販品について使用実態調査を行い，若干の知見が得られたので報告する．

実験方法

1．試料

1）使用判定基準値の設定には，リン酸無添加の野菜等（さつまいも，里いも，ながいも，やまといも，れんこん，根しょうが，ごぼう，にんじん，豆もやし）9種類57検体を用いた．

2）使用実態調査には，昭和61年6月，7月及び12月に東京都内で市販されていた野菜等（　1）と同種類及び切りごぼう，切りにんじん）250検体を用いた．

2．試薬

リン酸標準溶液：リン酸一カリウム（和光純薬工業㈱製試薬特級）439.0mgを水に溶解して100mlとし（リンとして1,000 μg／ml），これを適宜希釈して用いた．

*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

モリブデン酸アンモニウム溶液：モリブデン酸アンモニウム（和光純薬工業㈱製試薬特級）1.92gを水に溶かして200 mlとした．

アスコルビン酸溶液：L-アスコルビン酸（和光純薬工業㈱製試薬特級）10gを水に溶かして100mlとした．

酒石酸アンチモニルカリウム溶液：酒石酸アンチモニルカリウム（和光純薬工業㈱製試薬特級）0.267gを水に溶かして100mlとした．

混合試薬：アスコルビン酸溶液と酒石酸アンチモニルカリウム溶液の等容量混液

処理試験用リン酸液：I液－ダイワミンLK（大和興業㈱製・85％リン酸35％，カリミョウバン20％，クエン酸5％，天然物35％）の1％（v/v）水溶液，II液-TAIYOポリゴールドSF（太洋化学工業㈱製・メタリン酸ナトリウム40％，ポリリン酸ナトリウム6％，ミョウバン8％，クエン酸6％，天然物40％）の1％（v/v）水溶液．

メタリン酸：和光純薬工業㈱製試薬一級

ピロリン酸ナトリウム及びトリポリリン酸ナトリウム：小宗化学薬品㈱製

その他の試薬は試薬特級を用いた．

3．装置

自記分光光度計：日立製作所㈱製　220A型

pHメーター：堀場製作所㈱製　M－8AD型

4．試験溶液の調製

試料をそのまま，あるいは泥などが付着していたものは水洗した後，重量を測り，ビニール袋（32×38cm）に入れ，同量の水（きざみ野菜，豆もやしについては3倍量の水）を加え，全体を水に浸漬した．30分間放置した後，浸漬液をろ紙でろ過し，ろ液を試験溶液とした．

5．リンの定量

リンの定量は，衛生試験法のモリブデン酸による定量法[4]に準拠した．試験溶液10mlを50ml比色管に取り，4N硫酸5 ml及びモリブデン酸アンモニウム溶液5 mlを加えて混和し，沸とう水浴中に20分間加熱後，ただちに混合試薬4 mlを加え，20分間放置後水で30mlとし，880nmで吸光度を測定した．同時にリン酸標準溶液（リンとして5～60 μg）についても同様に操作して，検量線を作成した．

測定値は試験溶液中のリン量を，試料1g当りに換算して表わした．

6．pHの測定

試験溶液をそのままpHメーターで測定した．

結果と考察

1．試験法の検討

1）抽出方法　リン酸塩で処理された野菜等のリンはろ紙法[1]，水洗法[2]，ふきとり法[3]などによる抽出操作が行われている．しかし，いずれの方法も天然成分のリン等の溶出による影響は避けられないことから，著者らは簡易で，形態の異なる野菜にも適用でき，しかも常に一定の結果が得られる方法として，ビニール袋中で水に洗い出す方法を採用し，浸出時間を制限することにより，天然成分のリン等の影響をできるだけ少くした．浸す水の量は試料の重量と同量の水を用いることにより，ほとんどの野菜等を浸すことができたが，豆もやし，切りごぼう，切りにんじんについては同量の水では不足のため，3倍量の水を用いた．

図1にリン酸を使用していないごぼう，切りごぼうと，食添用のリン酸で処理したごぼう，切りごぼうを本法に従って水に浸したときのリンの溶出量を示した．

リン酸で処理していないごぼうでは，120分後でも天然成分のリンの溶出はほとんどみられないが，切りごぼうでは，わずかながら時間の経過とともにリンの溶出が認められた．一方，リン酸処理のごぼう，切りごぼうでは30分経過でほぼリンの溶出が一定となった．

この傾向は他の野菜等にも認められたことから，天然成分のリンの溶出が少なく，しかも使用されたリン酸のほとんどが溶出される30分間を浸漬時間とした．

2）呈色条件　衛生試験法のリンモリブデン酸の比色定量法を，添加物として使用頻度の高いメタリン酸，ピロリン酸，トリポリリン酸に応用したところ，いずれもほとんど呈色しなかった．

そこで，硫酸々性下でモリブデン酸アンモニウム溶液とともに加熱する操作を新たに加えて呈色させたところ，

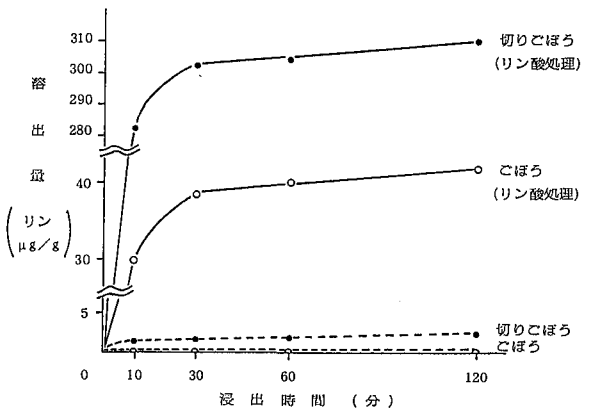


図1．リン酸の溶出パターン

これらのリン酸はオルトリン酸と同様の呈色をすることがわかった．そこで加熱時間について検討を行い，その結果を図2に示した．

各種リン酸溶液（リンとして約20 μg）10mlに4 N硫酸，モリブデン酸アンモニウム溶液各5 ml加え，加熱時間を変えてその吸光度を調べた．

いずれのリン酸類も15分以上の加熱で一定の呈色が得られたことから，加熱時間は20分間とした．

なお，試験溶液に混合試薬を加えて呈色させる際，試験溶液が冷えているといずれのリン酸も呈色はするが，定量的に安定な呈色を示すまでに60分以上の時間を要した．そこで，加熱直後試薬を加えることにより，20分後には安定した呈色が得られたことから，混合試薬は加熱直後に加え呈色させることにした．

3）吸収スペクトル 呈色させた各種リン酸類の吸収スペクトルを図3に示した．

いずれも880nmに極大吸収を示したので，測定波長は880nmとした．

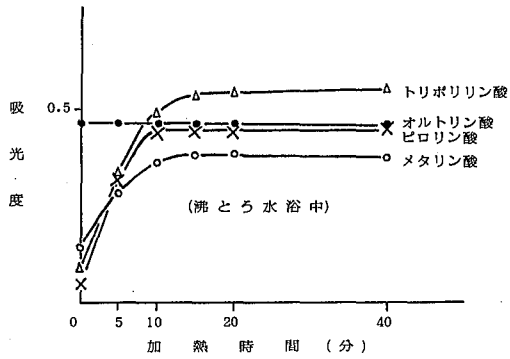


図2．加熱時間と発色の関係

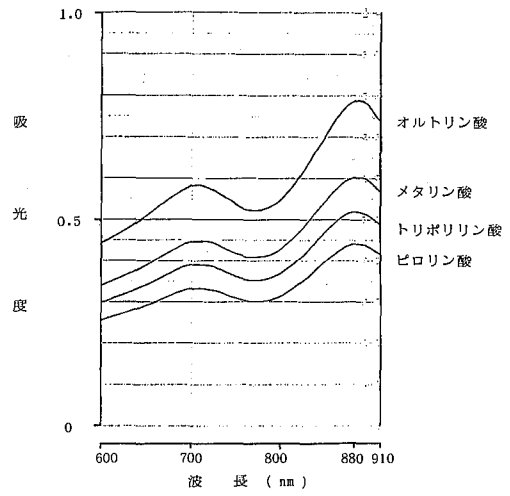


図3．各種リン酸類の吸収スペクトル

しかし，切りごぼうや豆もやしにおいては，極大吸収が低波長側にシフトする傾向がみられた．この原因は天然のリン等の溶出が多く，それら由来の呈色物質がスペクトルに影響し，合成波となって現われることによると考えられた．そこで，より真のリン酸を測るために，この場合も880nmで測定することにした．

2．使用判定基準値の設定

各種野菜等におけるリン酸使用の有無を知るためには，本法での野菜等の天然成分としてのリンの溶出量をつかみ，その値を基にリン酸使用の有無の基準とした．そこで，リン酸無添加の野菜等9種類11品目のリンの溶出量を調べ，それぞれの判定基準を設定し，表1に示した．

リンの溶出量は，切りごぼう，切りにんじん及び豆もやしを除くと，すべて1 μg／g以下で，平均値は0.5 μg／g以下であった．

一方，切りごぼうは平均値で5.0，切りにんじん1.3，豆もやしは8.2 μg／gと天然のリンの溶出量がかなり大きい結果が得られた．

そこで，これらの値から，天然由来のリン溶出量のバラツキを考慮して，それぞれの最高値の約2倍，平均値の約4倍を判定基準として設定した．

すなわち，切りごぼう20 μg／g，切りにんじん5 μg／g，豆もやし30 μg／g，それら以外のものは1 μg／gとした．

以後，この基準値以上のリンが検出されたものは，リ

表1．野菜等における天然リンの溶出量と使用判定基準値

（μg/g）

品　目	検体数	範　囲	平均値	判定基準値
さつまいも	5	<0.5～0.8	<0.5	1
ながいも	4	<0.5	<0.5	1
やまといも	5	<0.5	<0.5	1
洗い里いも	6	<0.5～0.9	<0.5	1
れんこん	5	<0.5～0.6	<0.5	1
根しょうが	5	<0.5	<0.5	1
ごぼう	6	<0.5	<0.5	1
切りごぼう	6	1.6～12	5.0	20
にんじん	5	<0.5	<0.5	1
切りにんじん	5	0.8～1.8	1.3	5
豆もやし	5	<0.5～16	8.2	30

ン酸使用の疑いのあるものと判定することとした.

3．リン酸処理と洗浄試験

本報で設定した基準値の妥当性を知るため，実際に使用されていた食添用のリン酸液に野菜等を浸漬し，さらにそれらを水洗し，リン量をそれぞれ測定した.

すなわち，オルトリン酸を主体としたⅠ液（リンとして1,240 μg／ml を含む），メタリン酸及びポリリン酸を主体としたⅡ液（リンとして1,870 μg／ml 含む）に，1時間漬けて室温で乾燥したものを用いて実験し，結果を表2に示した.

リン酸処理後の値は，表面積の大きな切りごぼう，切りにんじん，豆もやしが190～566 μg／g で，その他のものの5.1～43 μg／g と比べ高い値を示した．これらは5分間の水洗後も高い値を示した．一方，残存率では，30％以上を示したものは，洗い里いも，根しょうが，ごぼう，切りにんじんであったことから，水洗による洗浄効果は形態ばかりでなく，野菜の種類によっても異なることがわかった.

また，残存率についてⅠ液，Ⅱ液を比べてみると，いずれの野菜等でもほとんど同じ挙動を示し，使用したリン酸の種類による差はみられなかった.

以上の結果より，リン酸処理後及び水洗後もほとんど

表2．リン酸処理の試験結果

品　目	リン酸液	リン量（μg/g） 処理前	処理後*1	水洗後*2	残存率（％）
さつまいも	Ⅰ	<0.5	5.1	0.8	15.7
	Ⅱ	<0.5	10.0	0.9	9.0
ながいも	Ⅰ	<0.5	14.0	1.1	7.9
	Ⅱ	<0.5	6.4	1.2	18.8
やまといも	Ⅰ	<0.5	21.0	1.8	8.6
	Ⅱ	<0.5	20.0	2.8	14.0
洗い里いも	Ⅰ	<0.5	23.0	7.2	31.3
	Ⅱ	<0.5	26.0	9.8	37.7
れんこん	Ⅰ	<0.5	19.0	4.8	25.3
	Ⅱ	<0.5	43.0	2.3	5.3
根しょうが	Ⅰ	<0.5	33.0	12.2	37.0
	Ⅱ	<0.5	28.0	11.0	39.3
ごぼう	Ⅰ	<0.5	38.2	15.8	41.4
	Ⅱ	<0.5	35.5	29.0	81.7
切りごぼう	Ⅰ	12	372	98.0	23.9
	Ⅱ	37	566	174	25.9
にんじん	Ⅰ	<0.5	7.5	1.2	16.0
	Ⅱ	<0.5	18.0	8.7	48.3
切りにんじん	Ⅰ	0.8	250	82.0	32.6
	Ⅱ	1.5	330	150	45.2
豆もやし	Ⅰ	5.8	190	36.0	16.4
	Ⅱ	<0.5	360	66.0	18.3

*1：リン酸液Ⅰ液（1240 μg P/ml），Ⅱ液（1870 μg P/ml）に1時間浸漬後，自然乾燥
*2：流水5分間洗浄後，自然乾燥

表3．市販品のリン酸使用実態調査結果

昭和61年6，7，12月

品　目	検体数	範囲（μg/g）	基準値オーバー数	使用確認数
さつまいも	30	<0.5～6.1	2(6.7%)	1(50%)
ながいも	4	<0.5	0	
やまといも	21	<0.5	0	
洗い里いも	32	<0.5～27	12(37.5)	10(83)
れんこん	21	<0.5～10	4(19.9)	3(75)
根しょうが	35	<0.5～21	21(60.0)	20(95)
ごぼう	30	<0.5～0.6	0	
切りごぼう	24	<0.5～67	1(4.2)	1(100)
にんじん	11	<0.5	0	
切りにんじん	6	<0.5～8.9	1(16.7)	1(100)
豆もやし	36	1.4～85	4(11.1)	1(25)
計	250		45(18.0)	37(82)

の野菜等でリン量が著者らの提案した判定基準値を超えていることから，リン酸使用の有無を判定する本基準値は十分実用に供せられるものと考えられた．

さらに，pHがリン酸使用の有無の判定基準になるか否かを調査した．その結果，すべての野菜においてpHは，処理前が5.2～7.2であり，処理後が2.9～4.2と差がみられたことから，pH値もほぼ5以下であればリン酸処理について判定上参考になると考えられた．

4．市販品の使用実態調査

昭和61年6月，7月及び12月に都内で市販されていた野菜等250検体について調査を行い，その結果を表3に示した．

今回設定した基準値を超えたものの検体数を基準値オーバー数とし，そのものについてさらに生産地に問い合わせをし，使用しているとの回答が得られたものの数を使用確認数とした．

11品目中，すべてが基準値以下のものは，ながいも，やまといも，ごぼう，にんじんの4品目であった．

基準値を超えた品目の中で，特に割合の高かったのは，根しょうがの60.0%，洗い里いもの37.5%であった．

リン酸使用の疑いがもたれた基準値を超えたものは250検体中45検体（18.0%）であり，そのうち，リン酸使用の回答があったものは37検体，82%と豆もやしの25%を除いていずれも使用の事実の結果とよく一致した．また，問い合わせに対して回答のなかったものもあったことから，本法の判定基準は十分使用できるものと考えられた．

表4．基準値を超えた品目の調査結果

品　目	昭和61年6，7月	昭和61年12月
さつまいも	7.1%(1/14)	6.3%(1/16)
れんこん	11%（1/9）	25%（3/12）
根しょうが	65%（11/17）	55%（10/18）
洗い里いも	56%（9/16）	19%（3/16）
切りごぼう	7.1%(1/14)	0%（0/10）
豆もやし	15%（2/13）	8.7%(2/23)
全体	30%（25/83）	20%（19/95）

（基準値オーバー数/検体数）

5．基準値を超えた検体の調査

実態調査で基準値を超えた検体があった品目について，厚生省の指導通知直後の6，7月と半年経過後の12月にわけて，基準値オーバー数の割合を比較し表4に示した．

さつまいも，れんこん，根しょうがは12月になっても，依然としてリン酸が使用されていた．

一方，洗い里いも，切りごぼう，豆もやしは，明らかに6，7月に比べて12月では減少し，特に切りごぼうではまったく使用されなくなった．

全検体でのリン酸の使用の割合は，30%から20%と

10％の減少を示し，指導の効果が認められた．しかし，れんこんなどは使用率が高くなっていることから，今後とも監視を継続する必要があると考える．

まとめ

生鮮野菜等に使用されるリン酸の分析法の検討と使用実態を把握した．

野菜からのリン酸の抽出は，水で30分間浸漬し，その浸出液を試験溶液とした．試験溶液は硫酸存在下，モリブデン酸アンモニウムと20分間加熱した後，還元し呈色させることにより，オルト，メタ，ピロ，トリポリリン酸を同時に比色定量することを可能とした．

本法を用い，リン酸無処理の野菜のリン溶出量を求め，その値から9種11品目の野菜等について，リン酸を使用しているか否かの判定基準値を設定した．

さらに，市販品の使用実態調査を行ったところ，250検体中，基準値を超えたものは18％で，そのうちの82％は問い合わせに対して，使用との回答があったことから，本法の信頼性は高いと思われる．

以上のことから，今回提案した分析法及び判定基準値は，リン酸使用の有無を判定する方法として，十分実用に供せられるものと考えられた．

謝辞 試料の収集，生産地への問い合わせ等，多大なる御協力をいただいた東京都食品監視課及び機動班の各位に深謝いたします．

（本研究の概要は日本食品衛生学会第53回学術講演会昭和62年5月で発表した．）

文献

1）東京都市場衛生検査所編：市場衛生検査の手引 152-154, 1986 東京

2）吉田隆太郎，白井一，山田雅春，中山哲，月沢毅：食品衛生研究 33, 8, 49-53

3）米沢慶明，丸山享，藤森裕悟，田中龍彦：食品衛生研究 37, 2, 41-48

4）日本薬学会編：衛生試験法・注解 66-68, 1980, 金原出版，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 222-228, 1987

野菜・果実類中の残留農薬実態調査 (昭和61年度)

永山敏廣*, 真木俊夫*, 飯田真美*,
観公子*, 二島太一郎*

Survey of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits (1986. 4 ~ 1987. 3)

TOSHIHIRO NAGAYAMA*, TOSHIO MAKI*, MAMI IIDA*,
KIMIKO KAN* 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, 除草剤 herbicides

緒言

野菜・果実類に残留する農薬については，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．しかし，毎年新しい農薬が登録され，使用されることから，近年残留基準の設定されていない農薬が検出されることも多い[1-6]．そこで，食品の安全性を確保する上から，残留基準の設定されていない農薬も含めた種々農薬の食品中残留実態調査の必要性が唱えられている．

著者らは，生鮮野菜・果実類中の残留農薬について，毎年実態調査を続けている[1-7]．今回，61年度における調査結果をまとめ，報告する．

実験の部

1．試料　1986年4月から1987年3月にかけて東京都内に入荷した野菜・果実類等150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，エディフェンホス (EDDP)，IBP　計34種

(2)有機塩素系農薬：T-BHC (α-, β-, γ-, δ-BHC)，T-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，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22種

(3)カーバメイト系農薬：カルバリル (NAC)　1種

総計57種

3．機器

(1)ガスクロマトグラフ：㈱島津製作所製 GC-9 A (検出器 ECD, FPD, FTD)

(2)液体クロマトグラフ：㈱島津製作所製 LC-5 A (検出器 UV)

4．分析方法

前報[6]に従った．

結果及び考察

1．有機リン系農薬

野菜類114検体について，有機リン系殺虫剤32種及び有機リン系殺菌剤2種，計34種の農薬を分析し，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, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1 Contents of Organophosphorus Pesticides in Vegetables

Sample	No. of Sample	No. of Positive	Insecticides (ppm) EPN	MEP	Malathion	DMTP	Prothiofos	Others[1]	Fungicides(ppm) EDDP	IBP
Spinach	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—
KOMATSUNA	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—
Pot herb mustard [KYONA]	2	0	—	—	—	—	—	—	—	—
Cabbage	5	0	—	—	—	—	—	—	—	—
Lettuce	15	2	0.06	—	—	—	0.04	—	—	—
Japanese honeywort [MITSUBA]	2	1	Tr[2]	—	—	—	—	—	—	—
Parsley	2	0	—	—	—	—	—	—	—	—
KAIWAREDAIKON	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—
Broccoli	2	0	—	—	—	—	—	—	—	—
Cauliflower	2	0	—	—	—	—	—	—	—	—
Celery	23	10	0.04	—	0.02,0.03	—	—	0.03,0.10,0.15(diazinon) 0.02(phosalone) 0.01,0.02,0.02(chlorpyrifos-methyl) 0.19,0.22,0.24,0.43,0.50,1.3(salithion) 0.07(CYAP)		
Cucumber	5	1	0.04	—	—	—	—	—	—	—
Tomato	10	0	—	—	—	—	—	—	—	—
Radish										
(root)	11	1	—	—	—	—	Tr	—	—	—
(leaf)	11	3	0.02,0.09	—	—	—	0.15	0.19(diarifol)	—	—
Turnip										
(root)	1	0	—	—	—	—	—		—	—
(leaf)	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—
Carrot	5	0	—	—	—	—	—	—	—	—
Garden pea(immature) [SAYAENDO]	7	4	0.03,0.45	0.05,0.05	0.17	—	—	—	—	—
Kidney bean(immature) [SAYAINGEN]	2	0	—	—	—	—	—	—	—	—
Pumpkin	5	0	—	—	—	—	—	—	—	—
Total	114	23	Tr~0.45	0.05	0.02~0.17	—	Tr~0.15	0.01~1.3	—	—

1) Chlorpyrifos, CVP, DDVP, dimethoate, diazinon, MPP, PAP, phosalone, DEP, salithion, disulfoton, ECP, CYAP, chlorpyrifos-methyl, formothion, CVMP, CVMP,propaphos, EPBP, ethion, isoxathion, thiometon, CYP,PMP, pyridaphenthion and dialifor are investigated.
2) Tr : below 0.01 ppm

果を 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（検出作物名：レタス，キュウリ，ダイコンの葉）及びマラチオン（セルリー）の２種類が６検体（検出率：5.3%，以下同様）から検出されたが，いずれも基準値を超えるものはなかった．しかし，EPN は農薬取締法・農薬安全使用基準により，レタス及びキュウリ（施設栽培）には使用してはならないと指導されている．今回 EPN を検出したキュウリは施設栽培のものであり，レタス同様，農薬使用者に対し農薬取締法遵守等の注意を促す必要がある．

環境庁の定めた登録保留基準のある農薬では，プロチオホス（レタス，ダイコンの葉及び根），ダイアジノン（セルリー），ホサロン（セルリー），クロルピリホスメチル（セルリー）及びジアリホール（ダイコンの葉）の５種類が11検体（9.6%）から検出された．そのうち，セルリーから検出されたダイアジノン及びダイコンの葉から検出されたジアリホールは，それぞれの登録保留基準値0.1ppm 及び0.01 ppm を超えていた．特に，ジアリホールの残留量は基準値の約20倍であった．ジアリホールは昭和59，60年度の調査でも基準値を超えるものが見出されており[6]，その残留量も比較的高い．毒物に指定されている農薬のひとつであり，１日当りの摂取許容量（ADI）も0.0002 mg／kg と低レベルであることから，生産者に対し，使用方法や使用時期に充分注意を払い，その残留を極力抑えられるよう適切な指導が望まれる．また，ダイアジノンも ADI が0.002mg／kg の劇物（１%以下普通物）であり，その残留にも充分留意する必要がある．

一方，基準値の設定されていない農薬では，EPN（ミツバ，セルリー，サヤエンドウ），MEP（サヤエンドウ），マラチオン（サヤエンドウ），サリチオン（セルリー）及び CYAP（セルリー）の５種類が11検体（9.6%）から検出された．セルリーから検出されたサ

リチオンは1 ppmを超えるものがあった．また，EPNはナツミカンの外果皮を除き0.1ppmと残留基準が定められている．サヤエンドウについての基準値はないが，0.45ppmと比較的多量のEPNを残留するものがあった．サリチオンは劇物に，また，EPNは毒物（1.5%以下劇物）に指定されていることから，これら農薬が多量に残留することは食品衛生上好ましくないと考えられ，早急な基準値の設定が望まれる．

セルリーから種々の有機リン系殺虫剤が検出されたが，クロルピリホスメチル及びマラチオンは8月，サリチオンは10月に購入したセルリーのみから検出されており，季節により残留農薬の種類の異なる傾向が見られた．

次に，果実類及び穀類36検体についての調査結果をTable 2に示した．

残留基準のあるものはMEP（カキ）の1種類，1検体（2.8%）から検出されたのみであり，その残留量も基準値の1／4と少量であった．

登録保留基準のあるものでは，MEP（アマナツの外果皮），DMTP（リンゴ，アマナツの外果皮），プロチオホス（イチゴ），クロルピリホス（リンゴ），CYP（リンゴ）及びPAP（アマナツの外果皮）の6種類が8検体（22%）から検出された．特に，リンゴからクロルピリホスが，アマナツの外果皮からDMTPがそれぞれ3／6（50%），3／5（60%）と高い割合で検出されたが，残留量はいずれも0.1ppm以下と低かった．しかし，野菜類の場合と同様，いずれの基準値も定められていないアマナツの外果皮中にMEPが0.26ppmと比較的多く残留していた．

2．有機塩素系農薬

野菜類中の有機塩素系殺虫剤15種，有機塩素系殺菌剤6種及び有機塩素系除草剤1種計22種の調査結果をTable 3に示した．

残留基準のあるものでは，登録の抹消された殺虫剤であるディルドリン（コマツナ）及びエンドリン（キュウリ）が検出された．これらは基準値NDを超えていたが，残留量は低レベルであり，喫食上問題はないと考える．

登録保留基準のあるものでは，殺菌剤であるTPNの検出率が19%と非常に高く，特にミツバ2／2（100%），セルリー14／23（61%）及びレタス5／15（33%）の検出率が高かった．ミツバは本年度初めて，また，セルリーは昨年度から検査し始めた作物である．TPNは，昭和58年度の調査で検出したキュウリ，トマト等からは検出されなかったことから，使用対象作物の変化が推察される．さらに，基準値1.0ppmを超えて残留していたものも多く，ミツバで8.9 ppm，セルリーでも6.3ppmと高レベルのものも見出された，TPNのADIは0.015mg／kgであり，ミツバ85g以上あるいはセルリー120g以上を1日で喫食した場合ADIを超える危険性がある．しかし，野菜中のTPNは流水による洗浄により74～97%除去されるとの報告があり[8,9]，生食の場合でも喫食時における残存量は少ないと推察される．ビンクロゾリンは検出率は3.5%と低かったが，ミツバの検出率が2／2（100%）と高く，そのうち1検体から37ppmと異常に高い残留が認められた．ビンクロゾリ

Table 2．Contens of Organophosphorus Pesticides in Fruits and Cereals

Sample	No. of Sample	No. of Positive	Insecticides (ppm) EPN	MEP	Malathion	DMTP	Prothiofos	Others[1]	Fungicides(ppm) EDDP	IBP
Apple	6	3	—	—	—	0.01	—	Tr[2],0.01,0.04,(chlorpyrifos) 0.01 (CYP) 0.01 (CYAP)	—	—
Strawberry	4	1	—	—	—	—	0.03	—	—	—
Watermelon	5	0	—	—	—	—	—	—	—	—
Japanese persimmon 〔KAKI〕	5	1	—	0.05	—	—	—	—	—	—
Japanese summer orange 〔AMANATSU〕										
(flesh)	5	0	—	—	—	—	—	—	—	—
(peel)	5	4	—	0.26	—	0.04,0.05,0.10	—	0.06 (PAP)	—	—
Corn	6	0	—	—	—	—	—	—	—	—
Total	36	9	—	0.05～0.26	—	0.01～0.10	0.03	Tr～0.06	—	—

1) Chlorpyrifos, CVP, DDVP, dimethoate, diazinon, MPP, PAP, phosalone, DEP, salithion, disulfoton, ECP, CYAP, chlorpyrifos-methyl, formothion, CVMP, propaphos, EPBP, ethion, isoxathion, thiometon, CYP, PMP, pyridaphention and dialifor are investigated.

2) Tr：below 0.01 ppm

Table 3. Contens of Organochlorine Pestides in Vegetables

Sample	No. of Sample	No. of Positive	Insecticides(ppm) T-BHC[1]	Dieldrin	Endrin	β-benzoepin	Others[2]	Fungicides(ppm) TPN	Vinclozolin	Others[3]	Herbicides(ppm) CNP
Spinach	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
KOMATSUNA	1	1	—	0.006	—	—	—	—	—	—	—
Pot herb mustard 〔KYONA〕	2	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cabbage	5	1	—	—	—	Tr[4]	—	—	—	—	—
Lettuse	15	6	Tr[5]	—	—	—	—	0.009,0.015,0.025, 0.025,0.074	—	—	—
Japanese honey-wort 〔MITSUBA〕	2	2	—	—	—	—	—	0.005,8.9	0.005,37	—	0.02
Parsley	2	2	Tr, Tr	—	—	—	—	—	—	—	—
KAIWAREDAIKON	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Broccoli	2	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cauliflower	2	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Celery	23	14	Tr	—	—	—	—	0.010,0.064,0.078, 0.24,0.45,0.48,0.73, 0.77,0.87,1.4,1.5, 2.0,2.2,6.3	Tr[6]	—	—
Cucumber	5	2	Tr	Tr[6],0.006	Tr[6]	—	Tr[6](hep. ep)	—	—	—	—
Tomato	10	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Radish											
(root)	11	6	Tr,0.009	Tr	—	Tr, Tr. Tr, Tr	Tr(hep. ep.)	—	—	—	—
(leaf)	11	3	0.007	—	—	—	0.006(hep. ep)	0.064	0.007	—	—
Turnip											
(root)	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(leaf)	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Carrot	5	1	—	—	—	—	Tr[4](T-DDT)	—	—	—	—
Garden pea (immature) 〔SAYAENDO〕	7	1	—	—	—	0.03	—	—	—	—	—
Kindney bean (immature) 〔SAYAINGEN〕	2	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pumpkin	5	1	—	0.008	0.008	—	Tr(hep. ep)	—	—	—	—
Total	114	35	Tr~0.009	Tr~0.008	Tr~0.008	Tr~0.03	Tr~0.006	0.009~6.3	Tr~37	—	0.02

1) T-BHC : α-BHC, β-BHC, γ-BHC, δ-BHC
2) Total-DDT(T-DDT:pp'-DDT,pp'-DDE,pp'-DDD), op'-DDT, aldrin, heptachlor, heptachlor epoxide(hep.ep.), dicofol and α-benzoepin are investigated.
3) PCNB, procymidone, captan and captafol are investigated.
4) Tr : below 0.01ppm
5) Tr : below 0.001ppm
6) Tr : below 0.005ppm

ンは LD_{50}10,000mg／kg（ラット，経口）の普通物であり，喫食上特に問題はないと思われるが，10ppm を超ある農薬の残留は，通常の使用方法では考えにくく[5]，農薬使用者の不注意な使用によるものと思われ，厳重な注意，指導が望まれる．

有機塩素系除草剤である CNP を今年度初めて検査したが，ミツバ1検体から検出されたのみであった．残留量は0.02 ppm であり，基準値0.1ppm の1／5であった．

果実類及び穀類についての調査検果は Table 4 に示したが，残留量はいずれも低レベルであり，残留基準値及び登録保留基準値を大きく下回っていた．

有機塩素系農薬は150検体中43検体（29%）から検出された．BHC，DDT 等の使用禁止の農薬は，20検体（13%）から検出されたが，いずれも検出量は少なく痕跡程度であった．これらの農薬は昭和50年以前に使用されたものであり，その残留性が長いことから，土壌由来と考えられた．

3．カーバメイト系農薬

カーバメイト系農薬のうち NAC について調査し，その結果を Table 5 に示した．

リンゴ1検体から0.01ppm 検出されたのみであり，残留基準値1.0 ppm の1／100であった．

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 6 に示した．

Table 4. Contens of Organochlorine Pesticides in Fruits and Cereals

Sample	No. of Sample	No. of Positive	Insecticides (ppm)					Fungicides (ppm)			Herbicides(ppm)
			T-BHC[1]	Dieldrin	Endrin	β-benzoepin	Others[2]	TPN	Vinclozolin	Others[3]	CNP
Apple	6	3	—	—	—	—	—	0.005	—	Tr[4](captafol)	Tr[4]
Strawberry	4	2	—	—	—	—	Tr[4](T-DDT)	—	—	—	Tr
Watermelon	5	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Japanese summer orange [AMANATSU]											
(flesh)	5	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(peel)	5	3	Tr[5],Tr,Tr	—	—	—	—	—	—	—	—
Corn	6	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Total	36	8	Tr	—	—	—	Tr	0.005	—	Tr	Tr

1) T-BHC : α-BHC, β-BHC, γ-BHC, δ-BHC
2) Total-DDT(T-DDT;pp'-DDT,pp'-DDE,pp'-DDD), op'-DDT, aldrin, heptachlor, heptachlor epoxide(hep.ep.), dicofol and α-benzoepin are investigated.
3) PCNB, procymidone, captan and captafol are investigated.
4) Tr : below 0.01ppm
5) Tr : below 0.001ppm

Table 5. Contents of Carbamate Insecticide in Vegetables, Fruits and Cereals

Sample	No. of Sample	No. of Positive	NAC (ppm)	Sample	No. of Sample	No. of Positive	NAC (ppm)
Spinach	1	0	—	Carrot	5	0	—
KOMATSUNA	1	0	—	Garden pea(immature)	7	0	—
Pot herb mustard [KYONA]	2	0	—	[SAYAENDO] Kidney bean (immature)	2	0	—
Cabbage	5	0	—	[SAYAINGEN]	5	0	—
Lettuce	15	0	—	Pumpkin			
Japanese honeywort [MITSUBA]	2	0	—				
Parsley	2	0	—	Apple	6	1	0.01
KAIWAREDAIKON	1	0	—	Strawberry	4	0	—
Broccoli	2	0	—	Watermelon	5	0	—
Cauliflower	2	0	—	Japanese persimmon	5	0	—
Celery	23	0	—	[KAKI]			
Cucumber	5	0	—	Japanese summer orange			
Tomato	10	0	—	[AMANATSU]			
Radish				(flesh)	5	0	—
(root)	11	0	—	(peel)	5	0	—
(leaf)	11	0	—				
Turnip							
(root)	1	0	—	Corn	6	0	—
(leaf)	1	0	—				
Total					150	1	0.01

Table 6. Species and Items of the Samples Contained Some Kinds of Pesticides

Sample	No. of sample	No. of positive[1]	No.	Pesticide residue(ppm)
Japanese honeywort	2	2	1	EPN(Tr[2]), TPN(0.050), Vinclozolin(0.005), 0.02(CNP)
			2	TPN(8.9), Vinclozolin(37)
Celery	23	16	1	Diazinon(0.03), Salithion(0.22), CYAP(0.07), TPN(0.24)
			2	EPN(0.04), Salithion(0.50), TPN(2.2)
			3	Malathion(0.02), Chlorpyrifos-methyl(0.02), TPN(6.3)
			4	Malathion(0.03), Chlorpyrifos-methyl(0.01), TPN(0.48)
			5	Diazinon(0.10), Salithion(0.19), TPN(1.4)
			6	Phosalone(0.02), Chlorpyrifos-methyl(0.02), TPN(0.73)
			7	Diazinon(0.15), TPN(0.45)
			8	Salithion(0.24), TPN(1.5)
			9	TPN(0.010), Vinclozolin(Tr[3])
Radish (leaf)	11	5	1	EPN(0.09), Diarifol(0.19)
			2	TPN(Tr[3]), Vinclozolin(0.007)
Garden pea(immature)	7	4	1	EPN(0.45), Malathion(0.17)
			2	EPN(0.03), β-Benzoepin(0.03)
Apple	6	5	1	DMTP(0.01), Chorpyrifos(Tr[2]), CYP(0.01), CYAP(0.01), CNP(Tr[2])
			2	Chlorpyrifos(0.04), TPN(0.005)
Japanese summer orange (peel)	5	4	1	MEP(0.26), DMTP(0.04)

1) Except BHC, DDT and drin insecticides.
2) Tr: below 0.01ppm
3) Tr: below 0.005ppm

複合汚染はミツバ，セルリー，ダイコンの葉，サヤエンドウ，リンゴ及びアマナツの外果皮等36検体（24%）に見られた．有機リン系殺虫剤と有機塩素系殺菌剤の組合わせによる農薬の多種成分残留が多く認められた．

現在登録されている農薬を検出した検体数は150検体中53検体（35%）あった．これらの検体のうち36検体（検出検体に対する割合：68%）と多くの検体に2種類以上の農薬が残留しており，3種類以上の農薬を同時に検出したものも8検体あった．特に，ミツバ及びセルリーに多種類の農薬の同時残留が認められた．ミツバは有機塩素系殺菌剤であるTPNとビンクロゾリンの，セルリーは有機リン系殺虫剤と有機塩素系殺菌剤TPNの組合わせによる残留が多かった．また，リンゴから5種類，ミツバ及びセルリーから4種類の農薬が同時に検出され，多種類の農薬残留による複合汚染の進んでいる可能性が示唆された．

まとめ

1986年4月から1987年3月までに都内に入荷した野菜・果実類150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，MEP，マラチオン，DMTP及びプロチオホス等の殺虫剤14種類が32検体から痕跡～1.3ppmの範囲で検出された．いずれも残留基準値以下であったが，レタス及びキュウリ各1検体から農薬安全使用基準に反しEPNが検出され，また，セルリー及びダイコンの葉各1検体から登録保留基準値を超えてダイアジノン及びジアリホールが検出された．

有機塩素系農薬では，BHC，DDT等の殺虫剤が，痕跡～0.03ppmの範囲で，また，TPN及びビンクロゾリン等の殺菌剤が痕跡～37ppmの範囲で検出された．特に，ミツバからTPN 8.9ppm，ビンクロゾリン37ppmと同時に多量の農薬が検出された．

複数の農薬を検出した例としては，ミツバ，セルリー，サヤエンドウ及びリンゴ等に同一検体で2種類以上の農薬を残留したものが多かった．さらに，4種類以上を同時に検出したものとしては，ミツバ，セルリー及びリン

ゴで各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，複合汚染も増加している．これらの問題を解決するために，生産者側との情報交換を密接に行い，残留農薬による健康への影響を協力して防止するよう努力したい.

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）小関正道，嶋村保洋，真木俊夫他：東京衛研年報，31-1，170-173，1980.
2）小関正道，田村行弘，真木俊夫他：ibid.，32-1，172-176，1981.
3）永山敏廣，田村行弘，真木俊夫他：ibid.，34，165-170，1983.
4）永山敏廣，観　公子，田村行弘他：ibid.，35，210-218，1984
5）田村行弘，観　公子，永山敏廣他：ibid.，36，199-205，1985.
6）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：ibid.，37，173-183，1986.
7）西垣　進，田村行弘，鳥羽啓子他：ibid.，23，217-229，1972.
8）小屋宥三，村田宗茂，岸　幸子他：食品衛生研究，36，51-57，1986.
9）遠矢光孝，渕上虎雄：鹿衛研報，22，67-69，1986.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **38**, 229-232, 1987

化学物質及び自然毒による食中毒事件例（第4報）
— 昭和61年度 —

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(IV)
— 1986 —

TOSHIO MAKI*, KIMIKO KAN*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*,
MAMI IIDA*, and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords：化学性食中毒 chemical food poisoning, バイケイソウ Veratrum album, ニコチン酸 nicotinic acid, 異臭 nasty smell, 下痢性貝毒 Diarrhetic shellfish poisoning, ヒスタミン histamine, ホウキタケ科 Clavariaceae, フグ globefish.

ここ10年程，着実に西洋型に変化している大都会の人々の食生活から多種多様の食中毒が発生している．その食中毒発生件数の約20％は化学物質に起因していると概算されている．我々はこれら化学性食中毒について，可能な限りの情報収集を行い，科学技術を駆使してその原因究明に全力を傾けている．

著者らは前報[1-3]において都内で起きた化学性食中毒事例を報告してきた．今回は昭和61年度に起きた化学物質による食中毒事例3件，自然毒4件について報告する．今後の今中毒発生防止の為の参考に供する．

表1に昭和61年度に発生した化学性食中毒の概要を示した．

1．バイケイソウによる食中毒

①事件の概要　昭和61年5月，会社同僚17名が清里高原に山菜取りに出掛けギボウシと間違えて授取し，天ぷらにして5名が喫食したところ全員が発症した．

②食中毒の症状　喫食1時間後から嘔吐，眼のぼやけ，舌先のシビレ，血圧降下等を呈した．

③試料　患者が喫食した残品野草1本が搬入された．

③原因物質の検索　野草は外観上からもギボウシでないことが判明した．茎と葉はばらばらになっていたので，その付き方は不明であった．しかし，葉脈や症状からバイケイソウの疑いがもたれた．バイケイソウにはベラトルムアルカロイドが含まれていることから，この毒成分について TLC 分析[4]を行った．その結果，ベラトリン及びベラトリジンの Rf 値に相当するそれぞれのスポットが確認された．

表1．昭和61年度に発生した化学性食中毒の概要

No.	発生年月	患者数/喫食者数	原因食品	原因物質
1.	昭和61.5	5/5	バイケイソウ	ベラトリン
2.	5	2/5	ハンバーグ	ニコチン酸
	8	3/4	ハンバーグ	ニコチン酸
	9	2/2	ハンバーグ	ニコチン酸
3.	7	1/1	食パン	プロペタンホス
4.	8	2/2	ムール貝	下痢性貝毒
5.	9	2/2	イワシ丸干し	ヒスタミン
6.	9	3/6	コガネホウキタケ	キノコ毒
7.	62.1	1/1	赤目及びショウサイフグ	フグ毒

⑤考察　昭和57年にバイケイソウによる食中毒が東京で2件発生している．今回もまた，同じ食中毒が発生したが安易に山菜取りに出掛けて，不確実な植物を喫食するようなことは避けたい．

バイケイソウとギボウシの異なる点の一つには葉脈がある．バイケイソウの葉脈は折りたたみが出来るような深い溝が観察でき，基部はサヤ状で，茎の中部以上に付

*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

き，一方，ギボウシは葉脈がバイケイソウほど明確ではないが，葉の中心に一本の葉脈が走る．葉は根生である．

本事件の原因はバイケイソウと推定したが，有毒植物であるコバイケイソウも疑われた．しかし，その生息場所及び採集地からみてバイケイソウであると判定した．

2．ハンバーグによる有症苦情

①事件の概要 昭和61年5月（事例－1），8月（事例－2）及び9月（事例－3）の短期間に都内の小売店で購入した挽肉をハンバーグに調理し，事例－1は家族2名，事例－2は家族3名，事例－3は家族2名がそれぞれ喫食したところ，直後から全身の発疹等にみまわれ，1時間後に消失する食中毒様症状を呈した．

②食中毒の症状 事例1～3の3件共一過性の皮膚温上昇，皮膚紅潮及び発疹等がみられた．

③試料 残品及び小売店で販売していた参考挽肉など計22検体

④原因物質の検索 中毒症状はほてりや発疹等からニコチン酸（NA）様と疑われたので，高速液体クロマトグラフ（HPLC）を用いてNAの分析を行った．その結果，事例1の残品から50～206mg％，事例2の残品から22～178mg％，事例3からは90～217mg％のNAをそれぞれ検出した．しかし，いずれの参考品はnd～8mg％のNAを検出し，残品は天然に存在する量の数百倍高いNAであった．

⑤考察 残品から200mg％前後のNAを検出したことから中毒の原因は多量のNAであったと推定した．一般に天然に存在するNAは平均5mgであって，およそ15mg％以上になると肉に添加した可能性が考えられる．NAの役割からすると30～50mg％以上添加しないと本来の目的を果たさなくなるので，本件は検出量から考えて明らかに肉を赤く発色させ，新鮮に見せるために添加されたものと思われる．

短期間にほぼ同地域内で同じ原因による食中毒が3件発生したことは，食中毒発生防止の面からみて反省しなければならず，今後とも厳しい監視が必要と思われた．

3．殺虫剤による有症苦情

①事件の概要 昭和61年7月，食パンを小売店で購入した主婦1名が喫食した直後から，異味，異臭があると保健所に届出があった．

②食中毒の症状 薬品様臭を呈するという訴えであった．

③試料 残品の食パン1枚，未開封の小麦粉，製菓製パン用材料ソフトフランミックス・

④原因物質の検索 残品は食パン1枚と極めて少なかった．まず，農薬を疑い残留農薬分析の定性条件によりスクリーニングを行ったところ，FPD検出器付きガスクロマトグラフ（GC）で1本のピークを得た．直ちに，このピークを既知の農薬の保持時間とで照合してみたが，いずれも一致する農薬は存在しなかった．幸いにして，そのパン屋から製造の前夜ゴキブリ用の殺虫剤を散布したという事実をつかんだ．その成分はプロペタンホス0.3%，ジクロルボス0.2%の油剤であった．先に得られたGCピークについてGC-MC分析を行い，そのマススペクトルのパターンは標品のプロペタンホスのパターンに一致した．GCによる定量分析の結果，残品からプロペタンホス0.17ppmを検出した．しかしジクロルボスは検出されなかった．また他の試料からはいずれの農薬も検出されなかった．

⑤考察 残品は食パン1枚と少なかったが，有力な情報を基にして迅速かつ正確な結果を提出した．

プロペタンホスの毒性は，ラットに対して経口投与でLD_{50}は80mg／kgである．この患者は1枚の重さが約50gの食パンを7枚喫食していたので，約60 μgのプロペタンホスを摂取したことになる．体重50kgの人に換算するとLD_{50}の1／6～7万の量に相当する．毒性が低かったことが大きな中毒事件にならなかったと考えるが，薬品臭に気づいてもこれだけ多量の食パンを喫食してしまった珍しい例である．

4．ムール貝による食中毒

①事件の概要 昭和61年8月，2名がレストランでムール貝のマヨネーズ和え，その他を喫食し食中毒の症状を呈した．

②食中毒の症状 喫食5～7時間後から腹痛，激しい水様性の下痢及び吐気を呈した．

③試料 残品と同一品がレストランにストックされてあった中型の殻付ムール貝である．

④原因物質の検索 ムール貝のマヨネーズ和え，ピザ，スパゲッティー，ソーセージのソティー及びワイン等であったが，下痢の原因食にムール貝が疑われた．そこで厚生省法による下痢性貝毒の生物試験[5]を試みた．その結果，0.4 MU/gの下痢性貝毒を検出した．

⑤考察 1980年，下痢性貝毒を誘発する原因プランクトン，*Dinophysis fortii*, *Dinophysis acuminate* 等が見つかり[6]，その後，毒成分はディノフィシトキシン，オカダ酸などであることが相次いで報告[7]された．

下痢性貝毒の規制ラインは0.05 MU／gを設定し，これを超えるものについては，流通の禁止処置が取られている．この監視は強化の一途をたどり，かなり信頼のお

けるものと考えられていた．しかし，今回の事件は監視の網からもれて販売ルートに乗ってしまったことが原因である．

数年前までは有毒貝の出現は初春に始まり，ほぼ夏までには消滅し無毒になっていたものが，現在は毒化が一年中見られるようになった．従って消費地域でも今以上の監視強化が望まれるところである．

なお，今回の事件により，ムール貝を出荷した魚商人まで突き止めることができ，一週間の営業停止という厳しい行政処分がとられた．

5．イワシ丸干しによる有症苦情

①事件の概要 昭和61年9月，某ストアで購入したイワシ丸干しを焼いて，口に入れたとたんに舌及び上あごの部分がピリピリし，余りにもいがらっぽいのですぐに吐いた．近所の主婦1名も試食したところ，同様の症状を呈したので届出があった．

②食中毒の症状 口に入れた直後から舌や上あごの付近がピリピリし，いがらっぽくなった．しかし，本品を喫食していないので，これ以上の症状は呈さなかった．

③試料 1）生及び2）焼いた残品の計2検体．

④原因物質の検索 患者の訴えは明らかにヒスタミン様症状であった．そこでHPLCによるヒスタミン及び不揮発性腐敗アミンの分析[8]を行った．その結果，1）から450mg％，2）から428mg％と高濃度のヒスタミンを検出し，また，不揮発性アミンとして1）及び2）からガダベリン46mg%，99 mg%，チラミン14mg％，32mg％，プレトシン8mg％，13mg％をそれぞれに検出した．

⑤考察 ヒスタミンによる食中毒は，ほぼ毎年数件発生している．今回の様に410mg％前後のヒスタミンを検出したことは異常な値である．苦情者が口に入れただけで異常に気づいたのは不幸中の幸いであった．同時にガダベリンなど不揮発性アミンを比較的高濃度に含有していたことは，ストアでのイワシ丸干しの保存に問題があった・

6．キノコによる有症苦情

①事件の概要 昭和61年9月某デパートで販売していたホウキタケを購入し，ナスと一緒に油いためをして，6名が喫食したところ，3名が食中毒症状を呈した．

②食中毒の症状 喫食約3時間後から下痢及び腹痛を呈した．

③試料 患者が喫食した残品1検体，某デパートで販売していた同参考品1検体の計2検体．

④種の鑑定 残品，参考品共にホウキタケの仲間であった．特に，残品はコガネホウキタケ（*Ramaria aurea* (Fr.) Quel）である．また，参考品は2種類含まれていた．

1種は枝の短い形のホウキタケ（*Ramaria botrytis* (Fr.) Ricken）．他の1種は長い枝のもつ，*Ramaria flaviceps var. cremea* Corner, Thind et Anard で，和名を持たないキノコであることが判明した．

⑤考察 ホウキタケの仲間には軽い下痢を起こすキノコがある．コガネホウキタケ，ハナホウキタケの2種は毒キノコとして知られ，ホウキタケ，ムラサキホウキタケは食用とされている．この仲間は80種程見つかっているが，ホウキタケ科は分類上の研究が遅れているグループである．例えばホウキタケだと思われるものでも，軽い下痢を呈することがある．食用ホウキタケと毒ホウキタケにはどこか分類上異なる点があると思われるが，未だ毒成分も含めて明確にはされていない．今回の場合も食用のホウキタケが1種だけと思われていたが，鑑定の結果，他の種類も含まれていることが判った．毒性が弱いコガネホウキタケと言えども販売されていたことは注意を要する．

7．フグによる有症苦情

①事件の概要 昭和62年1月釣りに出掛けて取って来たフグを自分で調理し，まず夫婦で喫食したが異常はなかった．その翌日に夫のみが肝臓とその他を混ぜて鍋にして喫食したところフグ中毒を呈した．

②食中毒の症状 喫食2時間後に手足や口の回りが痺れ，翌朝，歩行困難になった．

③試料 いずれも残品で1）赤目フグと称する頭，2）ショウサイフグと称する身，3）トラフグと称する身と頭，4）ショウサイフグの肝臓と疑われる煮物．

④原因物質の検索 明らかにフグ中毒症状であったことから，厚生省法に準じて生物試験[9]を行った．その結果残品1）は4.1MU／g，2）及び3）は1.0MU／g以下4）からは1168MU／gを検出した．

⑤考察 最近は素人が自らフグを釣って来たものを調理し，中毒を起こすことが多い，安易にこの様な喫食をすることは慎むべきと考える．ましてやテトロドトキシンを高濃度に含有しているキモなどの臓器を食用にすることは，命をそまつにすることで，もはや食中毒の範疇を越えるものである．

しかしながら，残品1）～4）についてはいずれも完全な形態を成していなかったので種を決めるまでには至らなかった．

本報告は昭和61年度に起きた化学性食中毒事例のうち1．バイケイソウ中毒　2．ニコチン酸有症苦情　3．

殺虫剤による有症苦情　4．下痢性貝毒中毒　5．ヒスタミンによる有症苦情　6．ホウキタケ有症苦情　7．フグ有症苦情の7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　ホウキタケ類の鑑定をしていただきました滋賀大学教授　横山和正先生に深謝致します．

文　献

1）田村行弘，真木俊夫，観　公子，永山敏廣，直井家寿太，東京都衛研年報 34，171-177，1983
2）田村行弘，真木俊夫，観　公子，永山敏廣，二島太一郎：東京都衛研年報 36，191-198，1985
3）真木俊夫，観　公子，永山敏廣，飯田真美，二島太一郎：東京都衛研年報 37，163-165，1986
4）Jacobs, W. A. and Craig, L, C.; J. Biol Chem., 149, 271-279, 1943
5）下痢性貝毒の検査について：環乳第37号昭和56年5月19日
6）安元　健：食品衛生研究 31，9-16，1981
7）安元　健：同上 36，19-31，1986
8）永山敏廣，田村行弘，真木俊夫，観　公子，直井家寿太，二島太一郎：衛生化学 31，362-370，1985
9）日本薬学会編：衛生試験法．注解 p. 463，1980

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 233-234, 1987

ペクチンによるリパーゼ活性阻害

小関正道*, 只野敬子**, 安野哲子*,
荻野周三*, 風間成孔*

Inhibition of Lipase Activity by Pectin

MASAMICHI KOSEKI*, KEIKO TADANO**, TETSUKO YASUNO*,
SHUZO OGINO* and MASAYOSHI KAZAMA*

It is known that pectin has the lowering effect of cholesterol level. The reduction of pancreatic enzyme activity is suggested as one of hypocholesterolemic mechanisms. In this study, inhibition of lipase activity was examined *in vitro*,using 0.5% pectin solution and olive oil emulsion emulsified by sonic. Lipase reaction was carried out for 5 hours and its activity was measured by the colorimetric assay of copper chelated by free fatty acids by the method of Duncombe. Lipase activity was reduced to about 70% as compared with control.

Keywords: lipase, inhibtion, pectin, cholesterol

緒　言

ペクチンがコレステロール低下作用を有することが知られるようになってから，その作用機構についても関心が持たれてきた．1977年にNagyvaryらがペクチンアルミニウム複合体を用いた動物実験の結果から，ペクチンによる胆汁酸の吸着説を発表して以来，吸着機構説によって説明されてきている[1]．しかしその後の研究からペクチンによる胆汁酸の吸着量は少ないという事がわかり[2,3]．他の作用機構の解明に興味が持たれている．他の機構として考えられることには，小腸壁の攪拌されない水層をペクチンが強化する作用，消化酵素の働きを減少させる作用，小腸内容物の拡散を遅らせる作用などがある．そこで本研究ではこれらのうちで，コレステロールの上昇に対して効果の大きい栄養成分である脂質の吸収という点に着目することによって，脂質に対する消化酵素の影響，すなわちペクチンのリパーゼ反応に対する影響について検討した．

実　験

試薬　リパーゼ（Sigma Lipase Type Ⅱ），ペクチンはシグマ社製・タウロコール酸ナトリウムは半井化学㈱製・NEFA TESTキット，オリーブオイルは和光純薬製．その他の試薬は特級を使用した．バッファー：1／10M Na_2HPO_4, NaH_2PO_4：pH7.3.

方法　オリーブオイルエマルジョンの作成：オリーブオイル0.1m*l* と12.9m*l* のタウロコール酸ナトリウムバッファー溶液（バッファー1m*l* にタウロコール酸ナトリウム2.1mgを溶解したもの）を50m*l* のエルレンマイヤーフラスコにとり，氷冷しながらソニック（model SONIFLER B12, BRANSON SONIC POWER COMPANY, Conneticut, U.S.A.）で70 watts 3分間ホモジゲナイズする．酵素反応：100m*l* 容共栓付きエルレンマイヤーフラスコに，バッファーあるいは1％ペクチンバッファー溶液12m*l*，オリーブオイルエマルジョン溶液11m*l* をとり，37℃の水浴中で加温する，そこにリパーゼ溶液（リパーゼ1mgをバッファー1m*l* に溶解したもの）0.6m*l* を加え，水浴中に設置したマグネチックスターラー（model M-21,ヤマト科学㈱製）上におき，最高速度で回転させながら5時間インキューベートする．ここから経時的に50 μl サンプリングし，NEFA TESTキットを用い，リパーゼによって遊離された脂肪酸とキレートした銅の呈

*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
**現同食品研究科

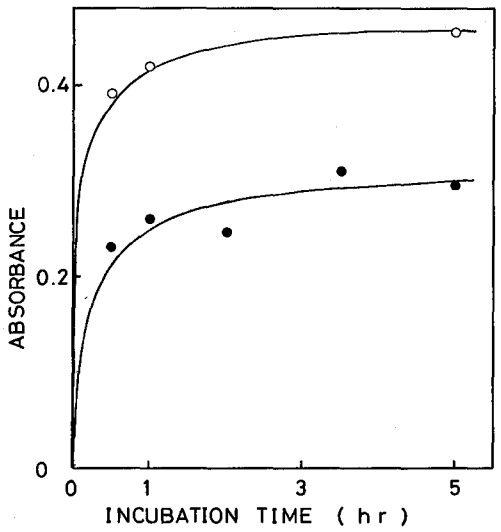


Fig. 1. Dependency of incubation time on lipase reaction. The reaction mixture containing olive oil emulsion, pectin and lipase in buffer solution was incubated at 37° C for 5 hours stirring with a magnetic stirrer at the maximum speed. Free fatty acids produced by lipase reaction were measured by the colorimetric assay by Duncombe. With pectin, ● ; without pectin, O.

する色の480nm の吸光度を測定する[4].

結果と考察

Fig. 1. に示す通りバッファー中のオリーブオイルに対するリパーゼの作用は，1時間でほぼ極大に達している．ペクチンの入った方でもやはり1時間で，5時間反応時に対して8割程度反応が進行している．しかし5時間経ってもバッファーのみのものと比べてプロダクトの生産は約7割程度に低く留まっていた．従って本実験から約0.5%濃度のペクチンによってリパーゼ反応が減少させられることがわかった．

Isaksson[5]らはペクチン濃度を1.5%とし，基質にトリブチリンを用い，また Dutta[6]らは0.5～1.5%濃度のペクチンを用い，かつ基質にはアラビアガムで乳化安定化したオリーブオイルを使用してリパーゼ反応に対する影響を検討している．それによると Isaksson らは1.5%濃度の HMペクチンがプロダクトの産生を8割減少させている（産生プロダクト量は20%）と報告している．いっぽう Dutta らによれば0.5%ペクチンではコントロールに比べプロダクトの生産が約85%，1.5%ペクチンでは約60%となっており，ペクチンがリパーゼ反応を減少させている点は Isaksson と共通しているが実験条件の違いから減少の程度が大きく異なった結果となっている．Isaksson らは，プロダクトの減少はペクチンの粘度の影響によるものであると判断している．しかしペクチンによるリパーゼ活性への影響を検討するためには，粘度の影響を極力抑えることが必要とされる前提条件となる．したがって本実験では粘度の影響を極力抑えるために基質溶液をマグネチックスターラーで高速攪拌して反応を行った．また基質には実際に人が食用にしているオリーブオイルを用い，かつ乳化にはペクチンと同様の多糖類であるアラビアガムの影響を除去するためにアラビアガムを使用せず，ソニックにて乳化を行い実験を行ったが，それでもペクチンによるリパーゼ反応の減少がみられた．今後の検討課題としてペクチンが酵素の阻害剤として働いているのか，あるいは脂肪ミセルへのリパーゼの接近を阻止しているだけに過ぎないのかを明らかにすることが必要と考える．またペクチンを含め，この様な多糖類は本来乳化安定剤として用いられるものであるから，濃度によってはリパーゼ反応を促進するようにも働きうるものと思われるのでその点も今後明らかにしていく課題であると言えるだろう．

文　献

1) Nagyvary, J. and Bradbury, E. L.：*Biochem. Biophys. Comm.*, 77, 592-598, 1977
2) Lairon, D., Lafont, H., vigne, J.L., Nalbone, G., Leonardi, J. and Hauton, J.C.：*Am. J. Clin. Nutr.*, 42, 629-638, 1985
3) 小関正道，安野哲子，荻野周三，風間成孔：東京衛研年報，37，203-205，1986
4) Duncombe, W.G.：*Clin. Chim. Acta.*, 9, 122-125, 1964
5) Isaksson, G., Lundquist, I. and Ihse, I.：*Castroenterology*, 82, 918-924, 1982
6) Dutta, S.K. and Hlasko, J.：*Am. J. Clin. Nutr.*, 41, 517-525, 1985

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 235-238, 1987

石綿線維の経口摂取による生体への影響（第2報）
ラットにおける血中ならびに器官への移行について

荻野周三*, 福森信隆**, 安野哲子*, 小関正道*
佐々木美枝子**, 風間成孔*

Biological Effects of Ingested Asbestos Fibers (II)
Migration to Blood and some Organs in Rats

SHUZO OGINO*, NOBUTAKA FUKUMORI**,
TETSUKO YASUNO*, MASAMICHI KOSEKI*,
MIEKO SASAKI** and MASAYOSHI KAZAMA*

Keywords：クリソタイル石綿 chrysotile asbestos, 経口投与 oral administration, 移行 migration

緒　言

多量の石綿の吸入が肺癌や中皮腫を発症させる[1-4]ことは周知の事実であるが，さらに近年では，石綿の経口暴露による消化器系をはじめとした各種器官の癌罹患率の上昇を示唆する疫学調査結果が報告されている[5]．石綿の経口暴露による発癌の可能性を評価するためには線維の消化管壁通過と他の器官への移行，蓄積の可能性について解明することが不可欠である．そこで著者らはラットの胃内にクリソタイル石綿を強制投与し，1日および4日経過したのちに解剖して，血液，肝，腎，腸間膜および肺組織に含有される石綿線維量を測定した．血液の測定結果については既に前報[6]で報告したが，今回さらに上記の器官の分析が終了したことから，その結果について報告する．

実験方法

実験方法の詳細は前報に述べたとおりである．ただし各対象器官の摘出は，血液の採取後にラットの門脈からあらかじめ孔径0.22 μm のメンブランフィルターでろ過した生理食塩水で灌流脱血したのちに行った．また摘出した組織は60℃で1時間真空乾燥したのちに灰化し，その残留物をアセトン1 m*l* に懸濁させた．

実験結果

血液ならびに各組織中から検出された線維数の平均値と標準誤差を Table. 1 に示した．血液および肝では投与後1日目に屠殺した群（以下，1日群と略す：Table. 1 および Table. 2 中の Test 1）と投与後4日目に屠殺した群（以下，4日群と略す：Table. 1 および Table. 2 中の Test 2）のいずれからも対照群に比較して有意に多い数の石綿線維が検出された．腸間膜では投与後の日数の経過にともなって線維数が増加する傾向が見られ，4日群と対照群との間には差が認められた．一方，腎ならびに肺については対照群といずれの投与群の間にも線維数に差は認められなかった．なお，対照群の肺からは他の組織に比較して，やや多い数の線維が検出された．

血液および各組織中から検出された線維を長さに基づいて分類した結果を Table. 2 に示した．投与に用いた UICC クリソタイルの長さの分布（Table. 2 の最下段に示した）は National Research Institute for Occupational Diseases（N.R.I.O.D.）によって報告されており[7]，これと比較した場合，1日群の血液からは0.5～1.0 μm の長さの線維が多く検出されたのに対し，4日群では0.5 μm 以下の，より短い線維が増加する傾向が見られた．腸間膜では1日群と4日群に共通して0.5～1.0 μm の長さの線維が多く，また逆に肝では0.5 μm 以下の短い線維が主体をなしていた．肺から検出された線維には比較的長いものが多く，特に4日群では2.0 μm 以上の線維が半数以上を占めた．また対照群の肺からは10 μm を超える長さの線維も検出された．

*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
**同毒性部病理研究科

Table. 1. Recovery of Fibers in Blood and Tissues gavaged a Single Dose of Asbestos

Tissue	Controls Mean‡±S.E.	Test 1* Mean§±S.E.	Test 2* Mean§±S.E.
Blood	2.8± 1.42	68.9‖ ±18.98	85.6¶± 8.01
Mesentery	18.9± 6.49	45.8 ±23.72	118.7‖ ±35.48
Lung	140.7±44.77	143.1 ±33.46	186.3 ±90.06
Liver	21.3± 7.98	213.2¶±31.66	216.6‖ ±46.00
Kidney	17.0± 3.88	13.2 ± 5.79	18.8 ± 6.87

* : Sacrificed at 1 day after administration
† : Sacrificed at 4 days after administration
‡ : Average of 10 rats
§ : Average of 5 rats
Statistical significance between control and test sample; ‖ : P<.0.5, ¶ : P<.01
(The figures in the table are number of fibers per l for blood and one of fibers per mg dry weight for others.)

Table. 2. Frequency of Length Distribution of Fibers Found in Blood and Tissues

Tissue	Rat Croup	Total Number of Fibers Found in Grid Openings	Frequency(%) Length interval(μm) 0.2~0.5	0.5~1.0	1.0~2.0	2.0<
Blood	Control	3	0(0)	2(67)	1(33)	1(0)
	Test 1*	37	7(19)	19(51)	11(30)	0(0)
	Test 2†	46	20(43)	22(48)	4(7)	1(2)
Mesentery	Control	10	3(30)	6(60)	1(1)	0(0)
	Test 1	13	2(15)	9(69)	1(8)	1(8)
	Test 2	44	7(16)	31(70)	4(9)	2(5)
Lung	Control	24	2(8)	9(38)	7(29)	6(25)
	Test 1	9	3(33)	3(33)	1(11)	2(22)
	Tesr 2	11	0(0)	2(18)	3(27)	6(55)
Liver	Control	14	9(64)	3(21)	2(14)	0(0)
	Test 1	78	54(69)	22(28)	2(3)	0(0)
	Test 2	85	59(69)	26(31)	0(0)	0(0)
Kidney	Control	13	7(54)	6(46)	0(0)	0(0)
	Test 1	5	1(20)	4(80)	0(0)	0(0)
	Test 2	7	4(57)	2(29)	0(0)	1(14)
	UICC Chrysotile Standard Reference Sample		(21)‡	(35)‡	(23)‡	(21)‡

* : Sacrificed at 1 day after administration
† : Sacrificed at 4 days after administration
‡ : by N.R.I.O.D., Johannesburg, South Africa

考　察

今回得られた実験結果は，経口摂取された石綿線維が消化管壁を通過して血中に入り，他器官，特に肝や腸間膜に移行することを示唆している．

腸間膜から検出された線維数は投与後1日目より4日目で増加する傾向を示し，腸間膜は石綿線維に対して蓄積性を有する可能性が高いものと思われる．一方肝では1日目と4日目で線維数に差が認められなかったことから，明確な蓄積性を持つとは考えがたい．

腎は取り込まれた石綿線維の体外への排出経路として最も可能性の高い器官であり，事実 Cook ら[8]は石綿を多量に含む水を飲用する人々の尿中から多数の線維が検出されたことを報告し，また Hallenbeck ら[9]はヒヒを用いた経口暴露実験で尿中から線維を回収している．さらに Patel-Mandlik ら[10]によるラットに対する長期連続投与実験では腎皮質から多数の線維が回収されている．しかし今回の実験では投与群と対照群の間で，腎から検出された線維の数に差が認められず，これらの報告と矛盾する結果となった．この原因としては投与後1日および4日の屠殺時期の設定が，線維の腎内への移行あるいは蓄積を観察するうえで適切でなかった可能性があげられる．Hallenbeck ら[9]の実験では，尿中からの線維の回収率は暴露後21日目に最大値を示していることから，線維が糸球体内に蓄積し，また糸球体壁を通過して尿細管中に排出されるには，より長い日数を要するのではないかと思われる．

肺から検出された線維には例外的に長いものが多く，しかも対照群からも比較的多数の線維を検出したことから，これらの線維は投与した UICC クリソタイルとは異なり，ラットの飼育環境，特に空気中の石綿の吸入によるコンタミネーションの可能性も考えられる．

Sebastien ら[11]は石綿を経口暴露させたラットのリンパ液を胸部リンパ管から採取して分析し，多数の線維を検出したが，線維のうちでも特に長さの長い線維の回収率が高かったことから，消化管壁を貫通する能力は長い線維ほど高いのではないかと推察している．しかし先に述べた Patel-Mandlik ら[10]の実験では腎皮質中から検出された線維のほとんどは0.5 μm 以下の短いものであり，また今回の実験においてもリンパ節が多数存在する腸間膜からは0.5 μm 以上の長さの線維が比較的多く検出されたのに対して，血管に富む肝からは反対に0.5 μm 以下の短い線維が多数検出される傾向が見られた．このように器官種によって含有される線維の長さの分布に相違が生じるのは，単に線維の長さによって消化管壁通過能力に差があるだけではなく，むしろ長い線維と短い線維では消化管壁の通過機序が異なるか，あるいは通過後の移行に際して，リンパ行性と血行性に対するそれぞれの依存度に差があるためではないかとも考えられる．

現在のところ石綿の経口暴露による発癌を明確に証明する報告はなされていない．むしろ小動物を用いた短期あるいは長期投与実験の結果[12-17]はいずれも発癌の可能性を否定している．しかし人における職業的な経気道暴露では初期暴露から肺癌もしくは中皮腫の発症に至るまでに20～40年の長い潜伏期が存在することを考えると，生存期間の短い動物を用いた実験の結果からただちに経口暴露による危険性を否定することはできない．今後は，組織内での線維の挙動ならびに毒性発現の可能性を追究し，石綿の経口暴露による生体影響の評価をさらに進めていく必要がある．

要　約

クリソタイル石綿を強制経口投与したラットの血液，肝および腸間膜からは対照群に比較して有意に多い石綿線維が回収された．摂取された線維は消化管壁を通過して一部の器官へ移行するものと考えられる．

文　献

1) Lieben, J.：*Arch. Environ. Health*, 13, 619-621, 1966
2) Mancuso, T.F. and Coulter, E.J.：*Arch. Environ. Health*, 6, 210-226, 1963
3) Selikoff, I.J., Churg, J. and Hammond, E.C.：*J.A.M.A.*, 188, 22-26, 1964
4) Wagner, J.C., Sleggs, C.A. and Marchand, P.：*Brit. J.Ind. Med.*, 17, 260-271, 1960
5) Conforti, P.M., Kanarek, M.S., Jackson, L.A., Cooper, R.C. and Murchio, J.C.：*J.Chron. Dis.*, 34, 211-224, 1981
6) 荻野周三，福森信隆，安野哲子，小関正道，佐々木美枝子，遠藤英美，風間成孔，東京衛研年報，36, 224-230, 1985
7) National Research Institute for Occupational Diseases：*Data sheets of physical and chemical properties of U.I.C.C. standard reference asbestos samples*, Johannesburg, South Africa, 1972
8) Cook, P.M. and Olson, G.F.：*Science*, 204, 195-198, 1979
9) Hallenbeck, W.H. and Patel-Mandlik, K.J.：Environ. Res., 20, 335-340, 1979
10) Patel-Mandlik, K.J. and Millette, J.：*Environ. Health*

Perspect., 53, 197-200, 1983

11) Sebastien, P., Masse, R. and Bignon, J. : *Environ. Res.*, 22, 201-216, 1980

12) Webster, I. : *Environ. Health Perspect.*, 9, 199-204, 1974

13) Cunningham, H.M., Moodie, C.A., Lawrence, G.A. and Pontefract, R.D. : *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 6, 507-513, 1977

14) Smith, W.E., Hubert, D.D., Sobel, H.J., Peters, E.T. and Doerfler, T.E. : *Environ. Pathol. Toxicol.*, 3, 277-300, 1980

15) Donham, K.J., Berg, J.W., Will, L.A. and Leininger, J.R. : *Cancer*, 45, 1073-1084, 1980

16) Hilding, A.C., Hilding, D.A. and Larson, D.M. : *Arch. Environ. Health*, 36, 298-303, 1981

17) Bolton, R.E., Davis, J.M.G. and Lamb, D. : *Environ.Res.*, 29, 134-150, 1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 239-244, 1987

高速液体クロマトグラフィーによる黄色4号および5号中の芳香族アミンの定量

広門雅子*, 中島和雄*, 植松洋子*,
高橋巖*, 松井敬子*, 風間成孔*

Determination of Aromatic Amines in Tartrazine and Sunset Yellow FCF by High Performance Liquid Chromatography

MASAKO HIROKADO*, KAZUO NAKAJIMA*, YOKO UEMATSU*,
IWAO TAKAHASHI*, KEIKO MATUI* and MASAYOSHI KAZAMA*

Keywords：芳香族アミン aromatic amine, 黄色4号 tartrazine, 黄色5号 sunset yellow FCF, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography

緒　言

合成着色料中には，付随色素，副反応生成物，中間体，および発ガン性が指摘されている芳香族アミン等，多くの有機不純物が含まれる．昭和62年4月にタール色素製剤の政府による製品検査が廃止され業者による自己認証制が導入されたが，昨今，不純物を多量に含む粗悪な色素の使用を危惧する声は，一般消費者のみならず当該添加物のユーザーである食品業者の中にも少なくない．

黄色4号および5号は，製造原料にスルファニル酸が用いられる．工業用スルファニル酸には0.1～1.2%のアニリンが含まれ[1,4]，色素の製造過程で，その酸化およびジアゾ化等により種々の芳香族アミン(発ガン性物質)が生成する[1,5](Fig. 1)．米国では，FDAにより1986年7月に食用黄色4号[6]，1986年11月に食用黄色5号[7]のCFRの規格改正が行われ，芳香族アミンの規格値が設定された(Table 1)．またFAO／WHOでは，芳香族アミンの規格値をアニリンとして0.01%以下と規定している[8]．

しかし，我が国においては，未だこれらの規格値は設定されていない．また黄色4号および5号中の芳香族アミンの分析例も見あたらないので，わが国の市販色素の実態を把握するため，Bailey等[1-3]の，クロロホルムで芳香族アミンを抽出した後，ジアゾーカップリングし，高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により定量する方法を準用し，市販色素中の3種の芳香族アミン(アニリン，4－アミノビフェニール，4－アミノアゾベンゼン)を分析し，食用色素の規格を作る際の基礎資料を得たので報告する．

実験の部

1．試料

黄色4号は10社製品22種，黄色5号は6社製品7種を用いた．黄色4号の3種および5号の2種は試薬会社より購入し，標準色素としては三栄化学工業㈱製を，その他は国立衛生試験所，ダイワ化成㈱および三栄化学工業㈱より提供されたものを用いた．

2．試薬および試液

1）ジアゾ化試液　亜硝酸ナトリウム0.1gを100mlの水に溶かした（用時調製）．

2）カップリング試液　0.5gの2-ナフトール-3.6-ジスルホン酸ナトリウム（以下R-塩と略す）（東京化成製）に0.6gの無水炭酸ナトリウムを加え水に溶かし100mlとした（用時調製）．

3）HPLC用移動相：溶離液A：アセトニトリル-水(0.5：99.5)の混液に1.5gの酢酸アンモニウムを溶解した後，ミリポアフィルターでろ過し，脱気した後用いた．溶離液B：アセトニトリル

4）芳香族アミン各標準原液：アニリン(和光純薬製アニリン点試験用)を100mg秤取し95%エタノールに溶解し100mlとした．4-アミノビフェニール(以下4-ABPと略す)(Aldrich製，純度98%以上)は50mgをメタ

*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

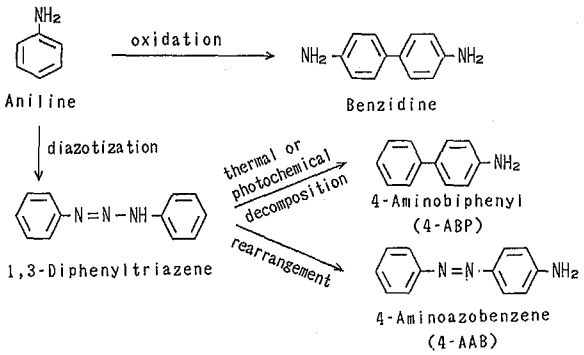


Fig. 1. Aniline and Other Aromatic Amines

Table 1. Specifications for Aromatic Amines (Carcinogenic Impurities) in FD&C Yellow No.5 and FD&C Yellow No.6 set by Food and Drug Administration

	Specification Limit	
Constituent	FD&C Yellow No.5	FD&C Yellow No.6
4-Aminoazobenzene	75 ppb	50 ppb
4-Aminobiphenyl	5 〃	15 〃
Aniline	100 〃	250 〃
Azobenzene	40 〃	200 〃
Benzidine	1 〃	1 〃
1,3-Diphenyltriazene	40 〃	40 〃
1-(phenylazo)-2-naphthalenol		10 〃

ノールに溶解し100mlとした．4-アミノアゾベンゼン(以下4-AABと略す)(Aldrich製，純度98%以上)は50mgをメタノールに溶解し100mlとした．各標準原液は冷凍保存した．

5）検量線用標準溶液：各標準原液を用時水で適宜希釈して調製した．

他の試薬は，全てJIS特級品を用いた．

3．装置および条件 1）HPLC：ポンプ；日本分光TR-IROTAR-VI，検出器；日本分光UVIDEC100-VI，感度0.04 AUFS，検出波長510nm，オートサンプラー；日本分光AS-L350，データ処理装置；島津クロマトパックC-R3A，カラム：Nucleosil（7 μm）C-18（ナーゲル社製）をステンレスカラム(25cmx4mm I.D.)およびプレカラム(5cmx4mm I.D.)に充填して用いた．2)抽出用カラム：Extrelut 20カラム(メルク製)，85mmx27mm I.D.，約53ml，充填用

4．実験操作法

1）**抽出法** 試料約10gを正確に量り，約70mlの温水に溶かし，冷後，1M水酸化ナトリウム溶液でpH 11～13とし，水を加えて正確に100mlとした．この溶液20mlをExtrelut 20カラムに注入し，10～15分間放置した後，40mlのクロロホルムを注入しアミンを溶出させた．5分後さらにクロロホルム40mlを注入し分取した後，0.005M硫酸溶液5 mlを加え，45°以下で減圧濃縮した．クロロホルムがなくなる直前で濃縮をやめ，残留クロロホルムを空気を送りゆっくりと除去した．

2）**ジアゾ化およびカップリング法** 抽出操作で得られたアミンの硫酸溶液を氷浴中で5分間冷却した後，ジアゾ化試液1 mlを加え，フラスコ壁を洗うようにかくはんし，15分間氷冷した．つぎにカップリング試液1 mlを加え，ジアゾ化と同様にフラスコ壁を洗うようにしてかくはんし15分間氷冷した．45°以下で減圧乾固した後，1.5%リン酸二水素ナトリウム溶液5 mlを正確に加え，試料液とした．

3）**HPLC分析法**：溶離液Aと溶離液Bによる濃度勾配溶出法を用いた．流速1.0ml／minで，A液を5分間流し，試料液200 μlを注入した後，B液の配合率を40分間で0%から40%に変化させた．次いで5分後，B液を100%にしカラムを5分間洗浄した後，5分間でA液を100%に戻し5分間流した．以上の操作を繰り返し行った．

4）**検量線**：検量線用各標準溶液を1 mlずつとり，0.005M硫酸溶液5 mlを加え，標準溶液中のメタノールおよびエタノールを出来るだけ除去するため，45°以下で約1／2容量まで濃縮した後，試料と同様にジアゾーカップリングし，最後に1.5%リン酸二水素ナトリウム溶液5 mlを正確に加えて溶かし，200 μlをHPLCに注入し，検量線を作成した．

結果および考察

1．Extrelut 20カラムによる抽出 Baily等は分液ロートによる液液抽出とExtrelut QEによるカラム抽出の両法を採用しているが，液液抽出はエマルジョンを起こし回収率も低かったので，カラム抽出法を採用した．Bailey等が用いたExtrelut QE(15cm×4 cm I.D.)の市販品がなかったので，Extrelut 20を用いた．その使用説明書に従って試料液の注入量を20mlとし，クロロホルム量を40mlとした．色素はすべてExtrelut 20に吸着され，芳香族アミン類は1回のクロロホルム抽出で完全に溶出

したが，確実にするために2回行った．Extrelut 20はExtrelut QEに比べ，容量が1／2.5と小さいため，検出限界が2.5倍高くなった．

2．**HPLC**による分離　アニリン，4-ABPおよび4-AABの各標準溶液のジアゾーカップリング化合物の

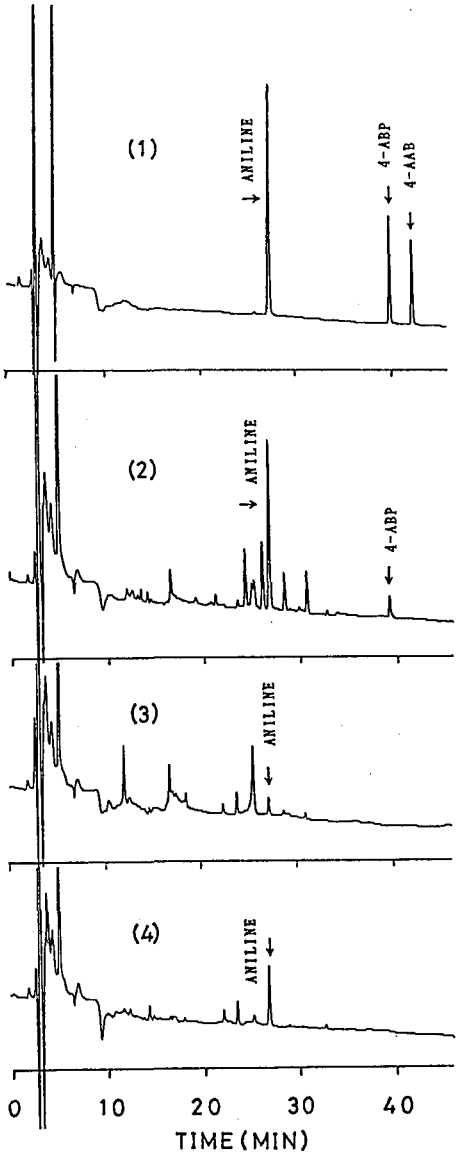


Fig. 2．HPLC Chromatograms obtained from Analysis of Samples of Commercial Tartrazine and Standards of Aromatic Amine
(1) standard
Aniline 5.2ng
4-ABP(4-Aminodiphenyl) 4.1ng
4-AAB(4-Aminoazobenzene) 3.4ng
(2) sampleM (3) sampleA (4) sampleE

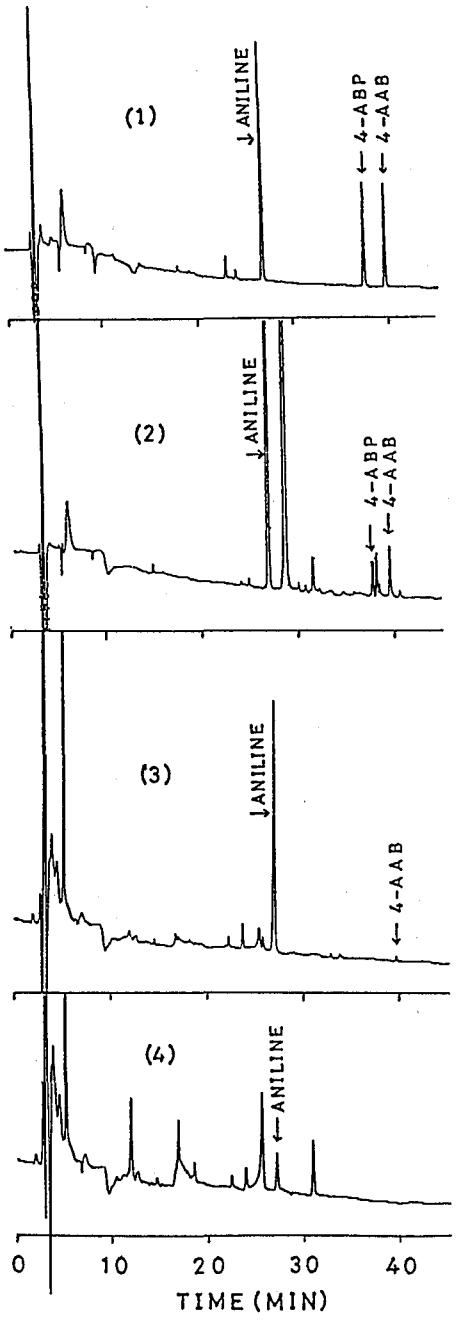


Fig. 3．HPLC Chromatograms obtained from Analysis of Samples of Commercial Sunset Yellow FCF and Standards of Aromatic Amine
(1) standard
Aniline 4.4 ng
4-ABP(4-Aminobiphenyl) 4.0 ng
4-AAB(4-Aminoazobenzene) 3.6ng
(2) sample G (3) sample B (4) sampleA

HPLC のクロマトグラムを Fig. 2 および Fig. 3 中の(1)に示した．3種の分離は良好であった．Extrelut 20で色素原体が吸着せず溶出した場合を考慮し，黄色4号および5号の保持時間を確認したところ，黄色4号は約18分，黄色5号は約24分で，3種の芳香族アミンの分析に影響しないことが判った．Bailey 等は溶離液Bの0→40%の直線グラジェントを30分で完了させているが，黄色4号の試料中，アニリンの直前にピークが確認され（Fig. 2中の(2)），分離が悪いものがあったので，40分間の直線グラジェントにしたところ分離は良好であった．

3．検量線 アニリンは0.22～49.4ng の濃度で r(相関係数)＝1.0000，4-ABP は0.40～10.3ng の濃度で r＝0.9981，4-AAB は0.36～9.7ng で r＝0.9996の直線性を示した．

定量限界はアニリンが0.1ng(0.5ng/ml 溶液，200 μl 注入)，4-ABP が0.4ng(2 ng/ml 溶液，200 μl 注入)，4-AAB が0.3ng(1.5ng/ml 溶液，200 μl 注入）であった．従って色素1 g に対する定量限界はアニリン1 ppb，4-ABP 5 ppb，4-AAB 4.5ppb であった．

4．添加回収実験

添加回収用として，芳香族アミンを含有しない色素が得られなかったので，試料量が多く比較的アニリン含量の低い黄色4号の試料Dを用いた．試料D 10g にアニリン，4-ABP および4-AAB をそれぞれ0.01～1.1ppm 添加し，試料と同様に操作し回収率を求めた．その結果を Table. 2 に示した．

低濃度添加における回収率は，0.01ppm 添加でアニリン101.4±6.4%，4-ABP 91.1±1.0%，4-AAB 87.0±1.7%，また0.10～0.11ppm 添加ではアニリン 99.0±1.7%，4-ABP 89.8±8.4%，4-AAB 88.9±10.8%であり，アニリンは極めて良好であったが，4-ABP および4-AAB の平均回収率はやや低く，バラツキも大きかった．1 ppm 以上の添加回収率は，3種とも良好であった．

5．市販黄色4号および5号中の芳香族アミンの分析結果

市販品の分析結果を Table 3 に示し，代表的な試料の HPLC クロマトグラムを Fig. 2 および Fig. 3 に示した．

1）**アニリン：** アニリンは全試料から検出され，黄色4号中より2.3～127.8ppb，黄色5号中より9.2～389.9 ppb 検出された．一般に黄色4号より黄色5号が高い値を示した．黄色4号のうち，食用14検体中には3.9～81.7ppb，工業用4検体中には6.2～23.0ppb，試薬3検体中には73.8～127.3ppb含有されていた．食用は低いものから高いものまで含量に幅があり，工業用は23.0ppb が最も高く，全体に低い値を示し，試薬は73.8ppb が最も低く，全体に高い値を示した．食用および工業用色素とも全て CFR規格値の100ppb 以下であり，100ppb を超えたのは，試薬1検体のみであった．

Table 2．Recoveries of Aromatic Amines added to Tartrazine

Aromatic Amine	Tartrazine*(g)	Added (μg)	n	Recovery(%) Mean±S.D.
Aniline	10	0.1	2	101.4± 6.4
	10	1.1	4	99.0± 1.7
	10	11.0	4	99.6± 0.5
4-ABP	10	0.1	2	91.1± 1.0
	10	1.0	4	89.8± 8.4
	10	10.2	4	95.6± 2.5
4-AAB	10	0.1	2	87.0± 1.7
	10	1.0	4	88.9±10.8
	10	10.1	4	95.5± 1.9

*Sample D in the Table 3

黄色5号においては，食用4検体中には69.9～290.5 ppb，試薬2検体中には31.3～389.9ppb 含まれ，食用で1検体および試薬で1検体が CFR 規格値の250ppb を超えた．

2）**4-ABP**：黄色4号および5号のうち，4-ABP が検出されたのは29検体中5検体(約17%)で，そのうち CFR 規格値（黄色4号5 ppb および黄色5号15ppb）を越えたものは，試薬2検体のみであった．

3）**4-AAB**：黄色4号中4-AAB が検出されたのは，22検体中わずか3検体(約24%)であり，全て CFR 規格値の75ppb 以下であった．黄色5号では7検体中4検体から検出されたが，いずれも CFR 規格値の50ppb を越えなかった．

標準色素(Table 3 中の試料A)は，アニリン含量が他の色素に比べ黄色4号2.3ppb，黄色5号9.2ppb と非常に少なく，4-ABP および4-ABP も検出されなかった．やはり高純度の色素には芳香族アミンは殆ど含まれていないことが判った．

ま と め

黄色4号および5号中の3種の芳香族アミン(アニリン，4-ABP，4-AAB)の分析を行った．分析法は，Extrelut 20カラムで色素を除去し，芳香族アミンをクロ

Table 3. Contents of Aromatic Amines in Samples of Commercial Tartrazine and Sunset Yellow FCF

Kind of Color	Sample	Maker	Use	Content of Aromatic Amine (ppb) Aniline	4-ABP	4-AAB
Tartrazine	A		SC	2.3	ND	ND
	B	1	FC	3.9	ND	ND
	C	1	FC	9.5	ND	ND
	D	2	FC	12.1	ND	8.0
	E	3	FC	14.8	ND	ND
	F	1	FC	17.5	ND	ND
	G	1	FC	27.9	ND	ND
	H	1	FC	32.1	ND	ND
	I	4	FC	32.8	ND	ND
	J	1	FC	32.9	ND	ND
	K	3	FC	39.9	ND	6.2
	L	1	FC	43.0	ND	ND
	M	1	FC	45.2	ND	ND
	N	5	FC	69.5	ND	ND
	O	6	FC	81.7	ND	ND
	P	7	ID	6.2	ND	ND
	Q	2	ID	9.4	ND	ND
	R	7	ID	14.3	ND	ND
	S	2	ID	23.0	ND	ND
	T	9	CD	73.8	ND	ND
	U	8	CD	80.3	ND	ND
	V	10	CD	127.8	14.3	ND
Sunset Yellow FCF	A		SC	9.2	ND	ND
	B	1	FD	69.9	ND	7.3
	C	6	FD	234.1	ND	ND
	D	2	FD	290.5	ND	ND
	E	4	FD	137.7	ND	6.2
	F	9	CD	31.3	ND	ND
	G	10	CD	389.9	20.1	47.5

4-ABP: 4-aminobiphenyl 4-AAB: 4-aminoazobenzene
ND: 4-ABP and 4-AAB were not more than 1 ppb,respectively
S C: standard color
F C: food color
I D: dye for industrial use
CD: dye for chemical use

ロホルムで抽出した後，ジアゾーカップリングし，HPLCにより定量する方法を用いた．

添加回収率は，0.01～0.11ppmの低濃度添加においても，アニリンは良好であったが，4-ABPおよび4-AABはやや低くまたバラツキも認められた．1ppm以上の高濃度における回収率は3種とも良好であった．

市販色素について芳香族アミンを分析した結果，アニリンは全試料から検出され，一般に黄色4号より黄色5号の方が高い値を示した．黄色4号のうち，試薬でCFR規格値の100ppbを越えたものがあったが，食用および工業用にはなかった．黄色5号では，食用で規格値の250ppbを越えたものが1検体あった．4-ABPは約17%の試料から検出され，食用でCFR規格値を越えたものはなかった．4-AABは約24%の試料から検出されたが全てCFR規格値以下であった．

特に工業用と食用色素の間に芳香族アミン含量の差は認められなかった．

謝辞 本研究に当り，色素を提供頂いた国立衛生試験所食品添加物部 神蔵美枝子室長，ダイワ化成株式会社 野崎幸男氏，三栄化学工業株式会社 中村幹雄氏に深謝致します．

文 献

1) Fratz, N.R., Bailey, J.E. and Bailey, C.J. : *J. of chromatography*, 331, 109-123, 1985
2) Bailey, J.E. : *Anal. Chem.*, 57, 189-196, 1985
3) Bailey, J.E. and Bailey, C.J. : *Talanta*, 32, 875-882, 1985
4) Marmion, D.M. : *J. Asso. Off. Anal. Chem.*, 58, 50-57, 1975
5) Hand, R.L. and Nelson, R.F. : *J. Amer. Chem. Soc.*, 96, 850-860, 1974
6) Federal Register : Vol.51, No.129, 24517-24519, 1986
7) Federal Register : Vol.51, No.223, 41782-41783, 1986
8) Joint FAO／WHO expert commitee of food additives : specifications for identity and purity of food colours : *FAO Food and Nutrition Paper*, 31／1, 131-134, 1984
9) Stavric, B., Klassen, R. and Miles, W. : *J. Asso. Off. Anal. Chem.*; 62, 1020-1026, 1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 245-252, 1987

高速液体クロマトログラフィーによる赤色２号，赤色102号および黄色５号中の不純物の分析

植松洋子*，広門雅子*，中島和雄*，高橋巖*，
松井敬子*，風間成孔*

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Impurities in Amaranth, New Coccine and Sunset Yellow FCF

YOKO UEMATSU*, MASAKO HIROKADO*, KAZUO NAKAJIMA*, IWAO TAKAHASHI*, KEIKO MATSUI* and MASAYOSHI KAZAMA*

Keywords：食用色素 food dye，アマランス Amaranth，ニューコクシン New Coccine，サンセットイエローFCF Sunset Yellow FCF，有機不純物 organic impurities，高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography，臭化テトラ-n-ブチルアンモニウム tetra-n-butyl ammonium bromide，イオンペアークロマトグラフィー ion-pair liquid chromatography

緒　言

昭和62年４月より，タール色素製剤の製品検査が廃止され，製造業者による自己認証制が導入された．タール色素は工業用にも用いられることから，不純物を多く含む粗悪な製品が食用色素製剤として出まわるおそれがあり，今後もたえず監視してゆく必要がある．しかし，現行の食品衛生法では，タール色素製剤については，ヒ素，重金属，クロム，マンガンの規制のみで，有機不純物についての規制はない．粗悪な製品を排除するためには，有機不純物についても検査する必要があると考えられるので，その分析法を検討するために，まず，食用赤色２号（アマランス，以下R-２と略す），食用赤色102号（ニューコクシン，以下R-102と略す），食用黄色５号（サンセットイエローFCF，以下Y-５と略す），のアゾ系三色素を対象に，色素そのものに含まれる有機不純物のHPLCによる分離分析法を検討したところ，実用分析として利用できる結果が得られたので報告する．

1. 食用色素の製法および不純物　わが国の食品衛生法では，食用色素原体そのものの有機不純物についても，付随する「他の色素」を規制しているのみである．一方，FAO／WHO[1-3]あるいは，FDA[4]の場合は，Table 1，２に示したように，副色素以外の有機不純物についても規制している．

R-２，R-102，Y-５は，共にモノアゾ系の色素で，いずれもジアゾ化したのち，カップリング反応を行うことによって製造される（Fig. 1）．R-２は，4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸（ナフチオン酸，以下NAと略す，Fig 1（1））をジアゾ化し，3-ヒドロキシ-２，7-ナフタレンジスルホン酸二ナトリウム塩，以下R塩またはRと略す，Fig. 1（2））とカップリングさせて製造する．R-102は，NAと7-ヒドロキシ-1，3-ナフタレンジスルホン酸ナトリウム塩（以下，G塩またはGと略す，Fig. 1（3）），Y-５は，4-アミノベンゼンスルホン酸（スルファニル酸，以下SAと略す，Fig. 1（4））と，6-ヒドロキシ-２-ナフタレンスルホン酸ナトリウム塩（シェーファー塩，以下SSと略す，Fig. 1（5））を用いて，同様に製造する．

R-２の主な不純物としては，原材料のNA，R塩，NA同志が反応してできる副色素（以下NA＋NAと略す，Fig. ２（6）），また，R塩中の不純物であるSSとNAが反応してできる副色素Fast Red E（Fig. ２（7））が考えられる．R-102の主な不純物としては，原材料のNA，G塩，また，R-２と同様，NA＋NA，Fast Red Eが考えられる．Y-５の主な不純物としては，原材料の

*東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科　160　東京都新宿区百人町３－24－１
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1，Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Specifications of Organic Impurities in Food Colors set by FAO/WHO

Colors	Impurities	Limits
Amaranth and New Coccine	4-amino-1-naphthalenesulfonic acid 3-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid 6-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonic acid 7-hydroxy-1,3,6-naphthalenetrisulfonic acid	Total not more than 0.5%
	Unsulfonated primary aromatic amines	Not more than 0.01% calculated as aniline
	Subsidiary colouring matters	Not more than 3%(Amaranth) Not more than 1% (New Coccine)
Sunset Yellow FCF	4-aminobenzenesulfonic acid 3-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid 6-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonic acid 4,4'-(1-triazene-1,3-diyl) bis (benzene-sulfonic acid) 6,6'-oxybis (2-naphthalenesulfonic acid)	Tatal not more than 0.5%
	Unsulfonated primary aromatic amines	Not more than 0.01% calculated as aniline
	Subsidiary colouring matters	Not more than 5% Not more than 2% shall be colours other than trisodium salt of 3-hydroxy-4- [(4-sulfophenyl) azo] -2,7-naphthalenedisulfonic acid

Table 2. Specification of Organic Impurities in Sunset Yellow FCF set by FDA

Impurities	Limits
sodium salt of 4-aminobenzenesulfonic acid	Not more than 0.2%
sodium salt of 6-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid	Not more than 0.3%
disodium salt of 6,6'-oxibis (2-naphthalenesulfonic acid)	Not more than 1%
disodium salt of 4,4'-(1-triazene-1,3-diyl) bis (benzenesulfonic acid)	Not more than 0.1%
Sum of the sodium salt of 6-hydroxy-5-(phenylazo)-2-naphthalene-sulfonic acid and the sodium salt of 4- [(2-hydroxy-1-naphthalenyl) azo] -benzensulfonic acid	Not more than 1%
Sum of the trisodium salt of 3-hydroxy-4- [(4-sulfophenyl) azo] -2,7-naphthalenedisulfonic acid and other higher sulfonated subsidiaries	Not more than 5%
4-aminoazobenzene	Not more than 50ppb
4-aminobiphenyl	Not more than 15ppb
aniline	Not more than 250ppb
azobenzene	Not more than 200ppb
benzidine	Not more than 1ppb
1,3-diphenyltriazene	Not more than 40ppb
1-(phenylazo)-2-naphthalenol	Not more than 10ppm

SA, SS, 4,4′-(1-トリアゼン-1,3-ジイル)ビス(ベンゼンスルホン酸)ニナトリウム塩(4,4′-(ジアゾアミノ)-ジベンゼンスルホン酸二ナトリウム塩,以下DAADBSAと略す, Fig. 2 (8)), SS同志の反応による6,6′-オキシビス(2-ナフタレンスルホン酸二ナトリウム塩(以下DONSと略す, Fig. 2 (9)), SS中の不純物であるR塩とSAが反応してできる副色素3-ヒドロキシ-4-[(4-スルホフェニル)アゾ]-2,7-ナフタレンジスルホン酸三ナトリウム塩(以下SA+R塩あるいはSA+Rと略す, Fig. 2 (10)), SS中の不純物であるG塩とSAが反応してできる副色素(以下SA+G塩あるいはSA+Gと略す, Fig. 2 (11)), SA中の不純物アニリンとSSが反応してできる副色素オレンジRN (Fig. 2 (12)), SS中の不純物2-ナフトールとSAが反応してできる副色素オレンジII (Fig. 2 (13)) などが考えられる. そこで, これらの不純物(入手できなかったDONSを除く)をHPLCを用いて分析する方法を検討した.

2. HPLCによる分析法 HPLCを用いた食用色素の不純物の分析法としては, アニオン交換型カラムを用いる方法[5-8], 逆相系のC_8カラムを用いる方法[9-12], C_{18}カラムを用いて移動相にカウンターイオンを加えるイオンペアークロマトグラフィーによる方法[13,14]等が報告されている.

これらのうち, アニオン交換型カラムを用いる方法, C_8カラムを用いる方法は, いずれもグラジェントによる溶出を行っている. 一方, イオンペアークロマトグラフィーによるLancasterら[13,14]の方法は, すべての不純物は同時に分析できないが, グラジェントを用いずに, 不純物の分離を行っている. そこで, 今後ルーチン分析として行うことも考え, グラジェントを用いないLancasterらの方法をもとに検討を行った.

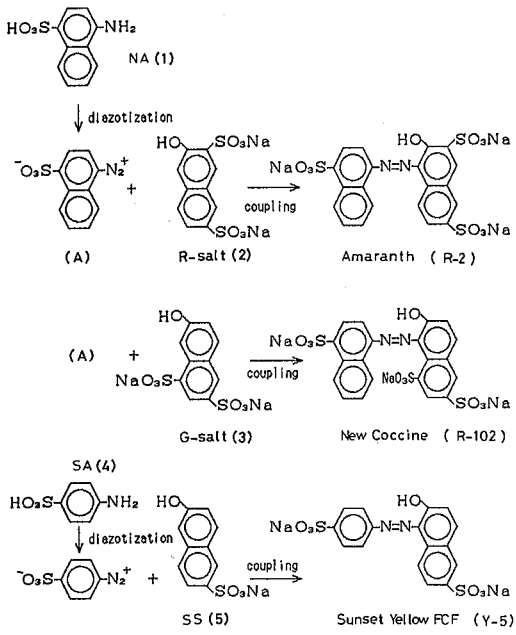


Fig. 1. Manufacturing Procedure for Synthesis of Amaranth, New Coccine and Sunset Yellow FCF
NA : 4-amino-1-naphthalenesulfonic acid (naphthionic acid)
R-salt : disodium salt of 3-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid
G-salt : disodium salt of 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonic acid
SA : 4-aminobenzenesulfonic acid (sulfanilic acid)
SS : sodium salt of 6-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid (Schaeffer's salt)

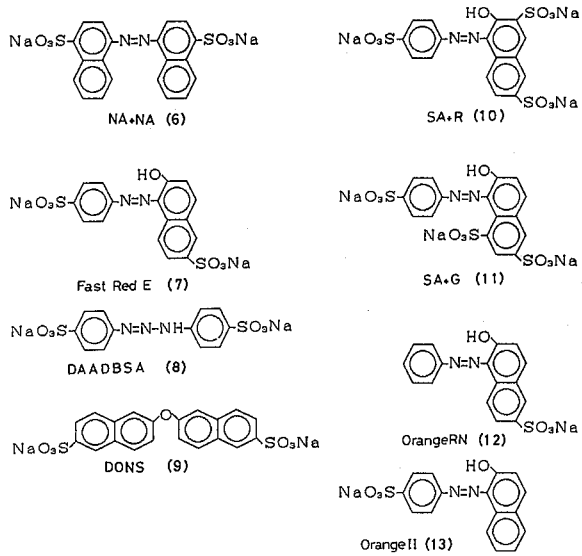


Fig. 2. Subsidiary Colors and Side Reaction Products of Amaranth, New Coccine and Sunset Yellow FCF
NA + NA : subsidiary color combined NA and NA
DAADBSA : disodium salt of 4,4'-(1-triazene-1,3-diyl) bis (benzenesulfonic acid)
DONS : disodium salt of 6,6'-oxybis (2-naphthalenesulfonic acid)
SA + R : subsidiary color combined SA and R-salt
SA + G : subsidiary color combined SA and G-salt

Lancasterらは，水酸化テトラ-n-ブチルアンモニウム40%水溶液（以下TBAHと略す）とリン酸一カリウムより調整した0.5Mリン酸テトラ-n-ブチルアンモニウム水溶液（以下TBAPと略す）を用いたイオンペアークロマトグラフィーにより，アマランス（R-2），タートラジン（食用黄色4号），サンセットイエローFCF（Y-5）の不純物の分析を行っている．そこで，試薬として，あらかじめ調整しておく必要もなく，また，より安価な，臭化テトラ-n-ブチルアンモニウム（以下，TBABrと略す）を用いて，アゾ系三色素，R-2，R-102，Y-5の不純物を分析する条件を検討した．

実験の部

1. 試料 色素：市販品および，国立衛生試験所，ダイワ化成㈱，三栄化学工業㈱より提供されたものを用いた．標準色素としては，三栄化学工業㈱製を用いた．

2. 試薬 4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム：和光純薬㈱製，一級，純度98%以上，3-ヒドロキシ-2，7-ナフタレンジスルホン酸二ナトリウム塩：東京化成㈱製，7-ヒドロキシ-1，3-ナフタレンジスルホン酸二カリウム塩：東京化成㈱製，4-アミノベンゼンスルホン酸：東京化成㈱製，純度99%以上，6-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸ナトリウム塩：和光純薬㈱製，を用いた．副色素NA+NA（純度78.9%），副色素SA+R塩（純度83.0%），副色素SA+G塩（純度78.9%），DAADBSA（純度98.9%），副色素Fast Red E（純度90.5%），オレンジRN（純度98.4%），オレンジⅡ（純度96.9%）は，ダイワ化成㈱より提供を受けたものを用いた．臭化テトラ-n-ブチルアンモニウム：半井化学薬品㈱製，その他の試薬は，すべて特級品を用いた．

3. 装置 高速液体クロマトグラフ：日本分光工業製TRIROTARⅥ，検出器：日本分光工業製UVIDEC-100-Ⅵ，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 2AおよびC-R 3A

4. 高速液体クロマトグラフ測定条件 カラム：Nucleosil 7 μm C_{18}を4㎜ϕ×250㎜のカラムに充てんした．温度：室温，流速：0.5～0.7m*l*／min，注入量：10あるいは20μl，検出波長：237nm，検出器感度：0.04AUFS，移動相：pH7.0リン酸緩衝液（リン酸-ナトリウム-リン酸二ナトリウム，0.1M，0.03M，0.01M，0.005M）：メタノール+0.005MTBABr

5. 試料および標準溶液の調製 色素の不純物の標準溶液：0.01mg／m*l*，色素：2.5mg／m*l*の水溶液とした．検量線用標準溶液は，0.1mg／m*l*の水溶液（標準原液）を調製し，これを水で適宜希釈した．

結果および考察

1. 分離条件の検討

まず，C_8カラムを用いている点が異なるが，TBABrを用いて，ニコチン酸およびニコチン酸アミドの分析を行っている北田ら[15]の方法を参考に，リン酸緩衝液濃度を0.03Mとし，緩衝液：メタノール比を変えて，分離条件を検討した（Fig. 3）．その結果，NA，R，G，SA，SS，DAADBSA，副色素SA+R，副色素SA+Gは比較的早く溶出したが，他の副色素NA+NA，Fast Red E，オレンジRN，オレンジⅡは，メタノール比を高くしないと溶出しなかった．そこで，前記の比較的早

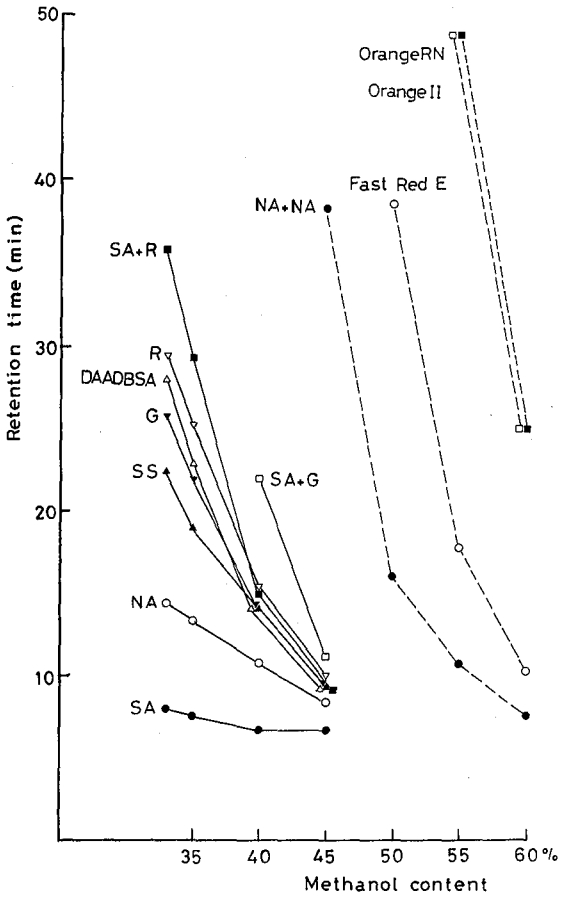


Fig. 3. Retention Times of Organic Impurities in Amaranth, New Coccine and Sunset Yellow FCF as Function of Methanol Content in Mobile Phase
phosphate buffer concentration: 0.03M
flow rate: 0.5m*l*／min
G: G-salt R: R-salt

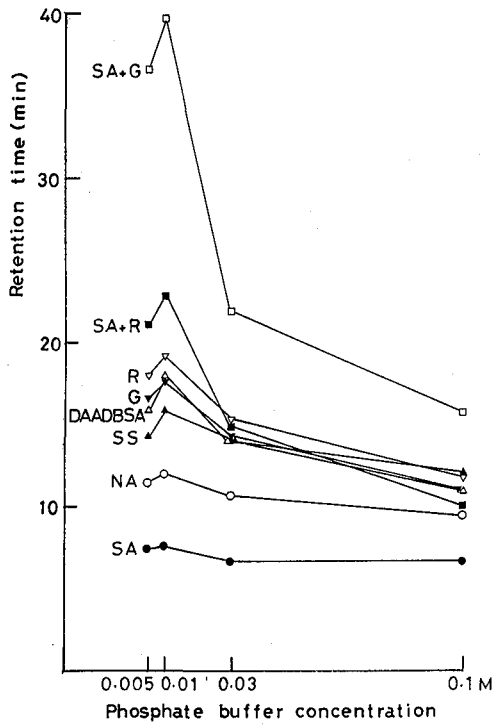


Fig. 4. Retention Times of Organic Impurities in Amaranth, New Coccine and Sunset Yellow FCF as Function of Phosphate Buffer Concentration in Mobile Phase
methanol content : 40%
flow rate : 0.5ml／min

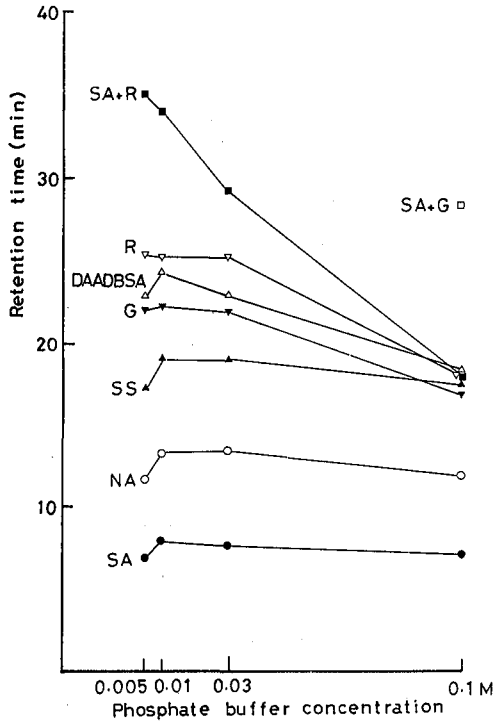


Fig. 5. Retention Times of Organic Impurities in Amaranth, New Coccine and Sunset Yellow FCF as Function of Phosphate Buffer Concentration in Mobile Phase
methanol content : 35%
flow rate : 0.5ml／min

く溶出する不純物に対象をしぼって，緩衝液濃度を変え，さらに分離条件を検討した（Fig. 4，5）．その結果，緩衝液濃度を低くした方が，全体に溶出がおそくなり，分離も良くなった．緩衝液濃度0.005M，緩衝液：メタノール＝65：35で，もっとも分離が良かったが，通常の分析では，必ずしも，これら8種の不純物が同時にはいっているわけではないので，分析時間等考慮し緩衝液濃度0.005M，緩衝液：メタノール＝62：38とした．各不純物のこの条件での分離をFig. 6，7に示した．

2. 検量および回収率

次に，これらの不純物の検量線および回収率について検討した．NAは，0.23～46.5 μg／ml の範囲で r ＝0.99988，R塩は，0.28～56.0 μg／ml の範囲で r ＝0.99999，G塩は，0.24～19.4 μg／ml の範囲で，r ＝0.99997，SAは，0.28～55 μg／ml の範囲で，r ＝0.99990，SSは，0.25～50.5 μg／ml の範囲で r ＝0.99980，DAADBSAは，0.29～114.7 μg／ml の範囲で r ＝0.99995，副色素SA＋Rは，0.43～85.9 μg／ml の範囲で r ＝0.99993，副色素SA＋Gは，0.38～76.5 μg／ml の範囲で r ＝0.99995と，いずれも直線性を示した（注入量：10 μl，流速：0.7ml／min，回収率についても同条件）．このため，定量限界を，副色素SA＋R，SA＋Gについては，0.5 μg／ml，その他は，0.25 μg／ml とした．色素に対する定量限界は，色素を0.25%水溶液とした場合，それぞれ，0.02%，0.01%となり，FAO／WHOやFDAの規格値（Table 1，2）から考えても十分であると思われる．

また，8回ずつ注入した場合の保持時間の変動係数も，NA 0.40%，R塩0.44%，G塩0.17%，SA 0.21%，SS 0.52%，DAADBSA 0.16%，副色素SA＋R 0.40%，副色素SA＋G 0.60%と良好であった．

なお，Lancasterら[13, 14]は，これらの不純物の水溶液を調整する際，pHを7にし，移動相と等モルになるようにTBAP試薬を加えている．今回，その操作を省

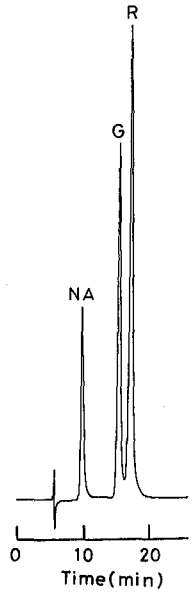


Fig. 6. Separation of Organic Impurities in Amaranth and New Coccine
HPLC conditions
column : Nucleosil 7 μ 5mC$_{18}$ 4mm ϕ × 250mm, mobile phase : 0.005M phosphate buffer (pH7.0) : methanol = 62 : 38 + 0.005M tetra-n-butyl ammonium bromide, flow rate : 0.5ml／min, wavelenghth : 237nm,
sens : 0.04AUFS, injection volume : 20 μl,
conc. of impurities : 0.01mg／ml

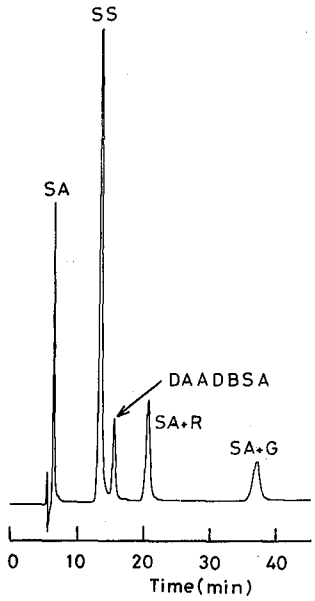


Fig. 7. Separation of Organic Impurities in Sunset Yellow FCF
HPLC conditions are shown in Fig.6

いたが，検量線はいずれも直線性を示し，また保持時間の変動も小さかったことから，この操作を省いても，実用上さしつかえないと思われる．

また，R-2に対してNAを0.19～0.83%添加したときの回収率は，102.65±1.95%，R塩を0.23～1.01%添加したときは，104.75±1.45%，R-102に対してG塩を0.20～0.73%添加したときは，102.68±2.20%，Y-5に対してSAを0.43～1.82%添加したときは，101.93±2.08%，SSを0.40～1.67%添加したときは，100.28±1.83%，DAADBSAを0.45～1.74%添加したときは，101.93±3.18%，副色素SA＋Rを0.67～2.84%添加したときは，105.72±1.68%，副色素SA＋Gを0.60～2.53%添加したときは，101.25±2.73%（いずれもn＝6）と，良好であった．

3. 市販色素の分析

次に，この方法を用いて市販色素の分析を行った．分析結果をTable 3～5に，また，代表的なクロマトグラムを，Fig. 8～10に示した（定量条件：色素濃度2.5mg／ml，注入量10 μl，流速0.7ml／min）．これらの不純物の量は，いずれもFAO／WHOおよびFDAの規格（Table 1，2）の限度以下であった．また，標準色素の不純物は少なかったが，今回分析した検体については，食用色素に比べ，工業用あるいは化学用色素に，特に不純物が多いという傾向はみられなかった．今後，さらに多くの検体について分析し，比較検討を行っていく予定

Table 3. Amounts of Organic Impurities in Commercial Amaranth

Sample	Use	NA%	R-salt%
A	SC	0.013	ND
B	FC	0.122	0.077
C	FC	0.099	0.319
D	ID	0.053	0.075
E	ID	0.028	0.344
F	CD	0.142	0.035
G	CD	0.139	0.032
average		0.085	0.126

ND : not more than 0.01%
NA : 4-amino-1-naphthalenesulfonic acid (naphthionic acid)
R-salt : disodium salt of 3-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid
SC : standard color, FC : food color
ID : dye for industrial use
CD : dye for chemical use

Table 4. Amounts of Organic Impurities in Commercial New Coccine

Sample	Use	NA%	G-salt %
A	SC	ND	0.029
B	FC	0.117	0.042
C	FC	0.050	0.174
D	ID	0.033	0.191
E	ID	0.018	0.090
F	ID	0.018	0.109
G	ID	0.059	0.125
H	ID	0.048	0.225
I	ID	0.160	0.119
J	ID	0.107	0.191
K	ID	0.050	0.247
L	CD	0.031	0.147
M	CD	0.013	0.247
average		0.054	0.149

ND : not more than 0.01%
NA : 4-amino-1-naphthalenesulfonic acid (naphthionic acid)
G-salt : disodium salt of 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonic acid
SC : standard color, FC : food color
ID : dye for industrial use
CD : dye for chemical use

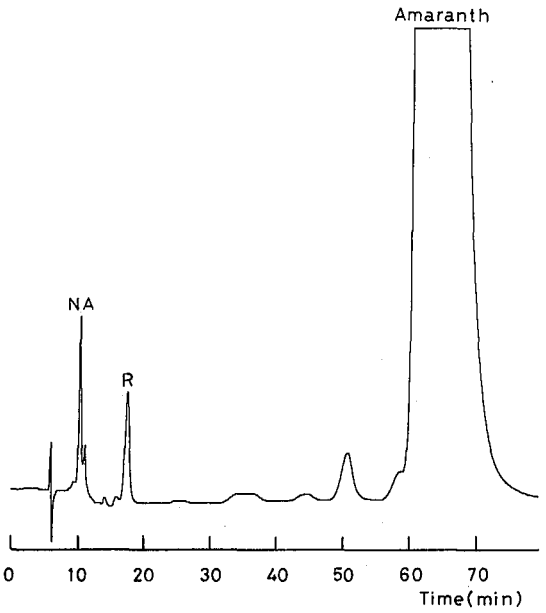


Fig. 8. Chromatogram of Commercial Amaranth on HPLC
con. of color : 2.5mg／ml, other HPLC conditions are shown in Fig.6

Table 5. Amounts of Organic Impurities in Commercial Sunset Yellow FCF

Sample	Use	SA %	SS %	DAADBSBA %	SA+R %	SA+G %
A	SC	0.019	ND	ND	ND	ND
B	FC	0.019	0.070	ND	1.212	0.265
C	FC	0.019	0.070	ND	0.270	0.379
D	FC	ND	0.057	ND	0.555	0.107
E	CD	0.021	0.054	ND	0.578	0.097
F	CD	ND	0.224	ND	0.171	ND
average		0.013	0.079	ND	0.464	0.141

ND : not more than 0.01% (SA, SS, DAADBSA)
not more than 0.02% (SA+R, SA+G)
SA : 4-aminobenzensulfonic acid (sulfanilic acid)
SS : sodium salt of 6-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid (Schaeffer's salt)
DAADBSA : disodium salt of 4,4'-(1-triazene-1,3-diyl) bis (benzenesulfonic acid)
SA+R : subsidiary color combined SA and R-salt ; trisodium salt of 3-hydroxy-4- [(4-sulfopheny) azo] -2,7-naphthalenedisulfonic acid
SA+G : subsidiary color combined SA and G-salt
SC : standard color, FC : food color, CD : dye for chemical use

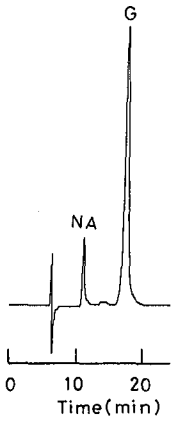


Fig. 9. Chromatogram of Commercial New Coccine on HPLC
HPLC conditions are shown in Fig.6 and Fig.8

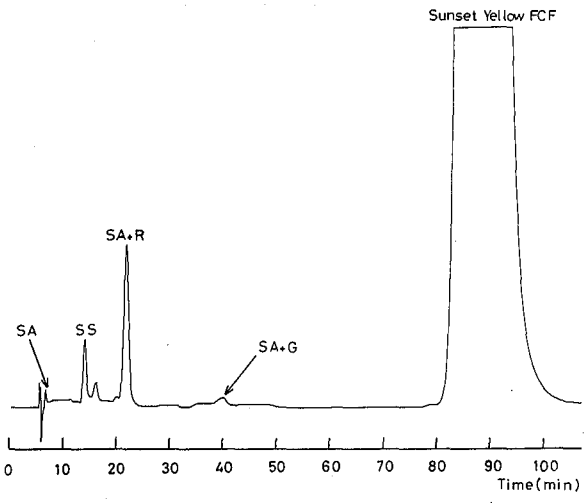


Fig.10. Chromatogram of Commercial Sunset Yellow FCF on HPLC
HPLC conditions are shown in Fig.6 and Fig.8

である.

ま と め

1. 3種のアゾ系色素，赤色2号，赤色102号，黄色5号の不純物を，TBABr をカウターイオンとするイオンペアークロマトグラフィーにより分析する方法を検討した.

2. これらの不純物の検量線は，0.25 μg／ml 以上（一部の不純物については，0.5 μg／ml 以上）で直線性を示し，回収率も良好で，保持時間の変動も小さかった.

3. この方法を用いて，市販色素26検体の分析を行ったところ，不純物の量が，FAO／WHO や FDA の規格に定められた限度を越えるものは，なかった.

謝 辞 本研究を行うにあたり，試料および標準品を提供下さった，国立衛生試験所，神蔵美枝子食品添加物部室長，ダイワ化成株式会社 野崎幸男氏，三栄化学工業株式会社 中村幹雄氏に深謝いたします.

文 献

1) Joint FAO／WHO expert committie on food additives : *Specifications for identity and purity of food colours*, FAO Food and Nutrition Paper 31／1, 9-11, 1984
2) *ibid.*, 115-116
3) *ibid.*, 131-132
4) *Federal Register*, Vol.51, No. 223, 41765-41783
5) Joint FAO／WHO expert committie on food additives : *Specifications for identity and purity of food colours*, FAO Food and Nutrition Paper 31／1, A-13, 1984
6) *Official Method of Analysis of A. O. A. C.*, 14th Ed., 641-654, 1984
7) Cox E. A. and Mcclure F. D. : *J-Assoc. Off Anal. Chem.*, 65, 933-940, 1982
8) Yasuhide Tonogai, Yoshi Ito and Masahiro Iwaida : J. Food Hyg. Soc. Japan, 24, 275-281, 1983
9) Goldberg A. L. and Calvey R. J. : *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, 65, 103-107, 1982
10) Calvey R. J. and Goldberg A. L. : *ibid.*, 65, 1080-1085, 1982
11) Cox E. A., Richfield-Frantz N., Bailey C. J. and Albert R. H. : *ibid.*, 67, 240-249, 1984
12) 外海泰秀，伊藤誉志男，原田基男：食衛誌，25, 10-18, 1984
13) Lancaster F. E. and Lawrence J. F. : *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, 65, 1305-1310, 1982
14) Lancaster F. E. and Lawrence J. F. : *ibid.*, 66, 1424-1432, 1983
15) 北田善三，井上雅成，玉瀬喜久雄，芋生真子，蓮池秋一，佐々木美智子，谷川 薫：栄養と食糧，35, 121-124, 1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 253-256, 1987

シカクマメ新品種「ウリズン」若さやの一般成分およびミネラル含量

井口正雄*, 菊谷典久*, 友松俊夫*, 道口正雄**,
浦野元幸***, 山下三雄****, 小沢　聖*****

Nutritional Components in Pods of New Cultivar Winged Bean (Psophocarpus tetragonolobus) "Urizun"

MASAO IGUCHI*, NORIHISA KIKUTANI*, TOSHIO TOMOMATSU*,
MASAO DOGUCHI**, MOTOYUKI URANO***,
MITSUO YAMASHITA****and KIYOSHI OZAWA*****

Immature pods of new cultivar winged bean "Urizun" were evaluated for their nutritional components and mineral contents. Mean values of the nutrients obtained from the samples suitable for serving as vegetables were 94.8, 2.1, 0.3, 0.8, 1.4 and 0.5g／100g wet matter for moisture, protein, lipid, crude fiber, non-fibrous carbohydrate and ash respectively. Analyses of the 6 minerals gave the following results ; calcium 33, phosphorus 31, iron 0.6, sodium 1, potassium 130 and magnesium 24 mg／100g wet matter respectively.

The nutritive composition of winged bean pods was similar to that of kidney bean pods and other leguminous plant pods available in Japan except for the lower contents of such minerals as calcium, phosphorus and potassium.

Keywords：winged bean, *Psophocarpus tetragonolobus*, Urizun, nutrients, mineral contents

緒　言

東京都の島しょである小笠原諸島などの亜熱帯地域における夏期の生鮮野菜不足を補う対策として，新品種のシカクマメ“ウリズン”の栽培が検討された[1]．この新品種“ウリズン”は日長不感応性品種で，従来種に比べ収量が著しく高く，特に夏期に高い収穫が得られることから，亜熱帯地域の夏野菜として有望視されている[1]．山下らは，このシカクマメの普及を計る目的で若さやを利用した各種調理法を模索し，試食によって好評を得ている[2]．一方，“ウリズン”は新品種であるため，栄養成分について明らかにされていない．そこで，その基礎資料を得ることを目的として調査を行った．著者らは前報[3]で，これらのビタミン分析の結果を報告したが，ひきつづき一般成分およびミネラル含量について調査を実施したのでその結果について報告する．

実験材料および方法

Ⅰ．試料　シカクマメ“ウリズン”は東京都小笠原支庁亜熱帯農業センターにおいて，1985年春まき栽培され，同年10月に収穫したもの，また従来種である“UPS-31”もほぼ同時期に収穫したものを各々試料とした．尚“ウリズン”の種子は農林水産省熱帯農業センターより現地適応性検定試験のため供与されたものである．試料は収穫後冷蔵して運搬し，搬入後直ちに分析に供した．試料は前報[3]と同一試料を用いた．すなわち“ウリズン”若さやを重量別に第一群（さやあたり平均重量4.3g，さや数51），第２群（同5.9g，同40），第３群（同7.3g，同

*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
**同理化学部
***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

30), 第4群（同9.6g, 同23), 第5群（同11.7g, 同20）および第6群（同16.0g, 同14）の6種類とした．すじおよび両端を除去した後，可食部分を細切し分析に供した．

Ⅱ．一般成分分析 ①水分の定量：減圧（100mm Hg）70℃恒量乾燥法[4]②脂質の定量：クロロホルム－メタノール混液改良抽出法[5]③たんぱく質の定量：セミミクロケールダール法による常法[6]によった．窒素・たんぱく質換算係数は従来用いられている6.25とした．④せん維の定量：ヘンネベルグストーマンの改良法[7]⑤灰分の定量：550℃による直接灰化法[8]⑥糖質（Non-fibrous carbohydrates）は水分，たんぱく質，脂質，せん維および灰分の合計量を100gから差し引いた計算値によった．

Ⅲ．ミネラル類の定量 試料を550℃で乾式灰化処理し[8]，塩酸溶液とし，以下，常法[9]により，試験した．①カルシウムの定量：干渉除去剤（塩化ランタン）添加による原子吸光法を適用した．（波長422.7nm，炎：空気－アセチレン）②リンの定量：モリブデンブルー比色法（Gomori法）（波長：640nm，フィルター）③鉄の定量：オルトフェナントロリンによる比色法（波長：520nm，フィルター）④ナトリウムの定量：炎光分光光度法（波長：589.0nm）⑤カリウムの定量：炎光分光光度法（波長：766.5nm）⑥マグネシウム：カルシウムと同様に処理し，原子吸光法を適用した．（波長285.2nm，炎：空気－アセチレン）

Ⅳ．試薬および装置 ①試薬：ナトリウム，カリウム，カルシウム，マグネシウムおよび鉄標準液；原子吸光分析用，塩酸：精密分析用，10%塩化ランタン溶液：原子吸光分析用（いずれも和光純薬工業KK製）その他の試薬はいずれも試薬特級（和光純薬工業KK製）を用いた．また，水は再蒸留水を用いた．②装置：原子吸光（炎光共用）分析装置；Nippon-Jarrel Ash社製AA-845型，電気炉；トリオサイエンス社電気マッフル炉，比色計；

Table 1. Nutritive Composition of the Immature Pods of the Winged Bean.

Sample No.		Pod Weight (g)	Moisture	Protein	Lipid	Carbohydrate		Ash
						Non-Fibrous	Fiber	
1	Winged Bean "Urizun"	4.3	94.5	2.4	0.2	1.5	0.8	0.6
2	〃 *1	5.9	94.7	2.3	0.3	1.3	0.8	0.6
3	〃 *1	7.3	94.9	2.2	0.3	1.3	0.8	0.5
4	〃 *1	9.6	94.8	1.8	0.4	1.6	0.9	0.5
5	〃	11.7	94.3	2.1	0.6	1.8	0.7	0.5
6	〃	16.0	93.9	2.0	0.6	2.2	0.9	0.4
	Mean Values of Sample No.2. 3, 4		94.8	2.1	0.3	1.4	0.8	0.5
7	Winged Bean "UPS-31"	3.5	92.2	2.8	0.2	2.7	1.2	0.9
	Kidney Beans, Pods *2		93.1	2.4	0.1	2.8	0.9	0.7
	Garden Peas, Pods *2		89.8	3.2	0.1	5.5	0.8	0.6
	Okura, Pods *2		89.3	2.3	0.1	6.3	1.0	1.0

Values were Expressed as g Per 100g Fresh Weight of Edible Portion.

*1 Suitable for Serving as Vegetables

*2 Data from Standard Tables of Food Composition in Japan. 4th Ed. 1982 by Resources Council, Science and Technology Agency, Japan.

LEITZ社ホトメーター，Model M（U.S.A）

結果および考察

シカクマメ若さやの一般成分分析結果をTable. 1に，また，ミネラル成分分析結果をTable. 2に示した．尚，他のさや類野菜の成分値と比較するために，サヤインゲン，サヤエンドウおよびオクラ（以下さや類という）について，日本食品標準成分表（4訂）から引用した値を併記した．

試料No. 1は食用可能であるが，さや形が小さく，収量も少なく，No. 5，6はさや形は大きいが，硬く，食用には不向きであり，No. 2，3，4が食味，収量などの面から食用に最適である．そこで以下，主として試料No. 2～4の結果について検討を加えた．

一般成分については，水分含量はさや重量の違いによる変動は殆んどみられなかった．また食用に適している試料No. 2，3，4の結果の平均値（以下平均値という）は94.8g／100gで，サヤインゲンのそれとほぼ同じであった．生鮮野菜のテクスチャーあるいは食味は水分含量と密接に関連することから，この点については“ウリズン”はサヤインゲンと同等であるといえる．従来種の“UPS-31”の水分含量は，この値に比べ若干低い値であった．他の一般成分について，さや類と比較すると，たんぱく質含量の平均値は2.1g／100gでほぼ同じ値であった．

脂質については，平均値0.3g／100gとサヤ類に比べ，若干高く，糖質（せん維を除く）のそれは低く，せん維は殆んど同じ値であった．近年，大腸疾患との関連から，せん維は食物せん維として注目されているが，今回の分析では従来法によるいわゆる粗せん維を定量した．食物せん維について今後検討する必要がある．灰分については，さや類とほぼ同じであった．

ミネラル含量については，さや類に比べ，カルシウム（平均値33mg／100g），リン（同31mg／100g）およびカリウム（同130mg／100g）は概ね1/2～1/3の値であった．また，鉄（平均値0.6mg／100g）はオクラの含量と，ナトリウム（平均値1mg／100g）はサヤエンドウ，サヤインゲンの含量とそれぞれ同一の値であった．マグネシウム（平均値24mg／100g）については，日本標準成分

Table 2. Mineral Content of Immature Pods of the Winged Bean.

Sample No.		Ca	P	Fe	Na	K	Mg
1	Winged Bean “Urizun”	33	37	0.7	2	127	20
2	〃 *1	34	32	0.6	1	147	25
3	〃 *1	32	32	0.7	1	123	23
4	〃 *1	32	30	0.5	1	120	23
5	〃	38	32	0.7	1	109	20
6	〃	20	28	0.5	1	109	26
	Mean Values of Sample No.2. 3, 4	33	31	0.6	1	130	24
7	Winged Bean “UPS-31”	51	51	0.8	1	207	35
	Kidney Beans, Pods *2	60	50	1.0	1	280	
	Garden Peas, Pods *2	65	65	0.9	1	220	
	Okura, Pods *2	95	60	0.6	3	320	

Values were Expressed as mg Per 100g Fresh Weight of Edible Portion.

*1 Suitable for Serving as Vegetables

*2 Data from Standard Tables of Food Composition in Japan. 4th Ed. 1982 by Resources Council, Science and Technology Agency, Japan.

表では分析値が掲載されていないが，小野[10]によるサヤエンドウ（生）の分析値30mg／100gに比べ若干低い値であった．

以上，成分分析の結果，“ウリズン”の栄養成分組成は，ミネラル成分の一部を除いてサヤインゲンなどのさや野菜とほぼ同じであり，前回[3]のビタミン分析結果を含めて，生鮮野菜に匹敵する成分を有するといえる．今後，本品種の普及により，亜熱帯地域における食生活の改善に貢献するものと思われる．

文　献

1）小笠原亜熱帯農業センター：昭和60年度野菜試験成績書，30-48，1986

2）小笠原亜熱帯農業センター：昭和60年度野菜試験成績書，50-51

3）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：東京衛研年報，37，237-240，1986

4）小原哲二郎他編：改訂食品分析ハンドブック，21-22，1982，建帛社

5）小原哲二郎他編：改訂食品分析ハンドブック，122-123，1982，建帛社

6）日本薬学会編：衛生試験法注解，153-155，1980，金原出版

7）日本薬学会編：衛生試験法注解，167，1980，金原出版

8）小原哲二郎他編：改訂食品分析ハンドブック，259-267，1982，建帛社

9）小原哲二郎他編：改訂食品分析ハンドブック，276-288，1982，建帛社

10）小野一男：最新医学，17（3），706-707，1962

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **38**, 257-261, 1987

マアジの脂肪酸組成およびトコフェロール含量の季節的変動

船山恵市*, 牛尾房雄*, 友松俊夫*, 道口正雄**

Seasonal Variations of Fatty Acid Composition and Tocopherol Contents of Horse Mackerel

KEIICHI FUNAYAMA*, FUSAO USHIO*, TOSHIO TOMOMATSU* and MASAO DOGUCHI**

Seasonal variations of fatty acid composition and tocopherol contents of horse mackerel, *Trachurus japonicus*, were examined by gas liquid chromatography and high performance liquid chromatography respectively.

The results obtained were as follows :

1. Seasonal variation of the lipid contents was not observed in the samples.

2. The compositional percentages of $C_{16:0}$, $C_{16:1}$, $C_{18:0}$ and $C_{18:1}$ acids were significantly lower in winter than in summer and autumn. On the other hand, the percentages of $\omega 3$ polyenoic acids ($C_{18:3}$, $C_{18:4}$, $C_{20:4}$, $C_{20:5}$, $C_{22:5}$ and $C_{22:6}$) were higher in winter than in the other seasons.

3. Most of the tocopherols were detected as α-tocopherol (>97%). Tocopherol contents in the edible tissues were in the range of 0.24～1.50mg／100g (1.88～31.09mg／100g lipid). Significantly low values of tocopherol contents in the edible tissues were observed in winter.

4. Significantly negative correlations were observed between tocopherol contents in the edible tissues and percentages of polyenoic acids except $C_{16:4(\omega 3)}$ and $C_{20:4(\omega 6)}$ acids.

Keywords : *Trachurus japonicus*, lipid, fatty acid composition, tocopherol contents, seasonal variation

緒　言

水産食品中に多く含まれる高度不飽和脂肪酸，とりわけイコサペンタエン酸が，心筋梗塞をはじめとした血栓性疾患と深いかかわりがあることが，Dyerbergらの疫学的調査[1,2]で明らかになって以来，魚食による血清脂質改善効果に関する多くの研究[3]がなされてきた．これらの研究により，血清トリグリセリドやコレステロール等の濃度低下が，魚油投与により起こる事が明らかにされ，魚食への関心が増々高まってきた．

魚類のうち，高度不飽和脂肪酸を比較的多く含み，一般家庭の食事に供される事の多い，マアジ（*Trachurus japonicus*）についての脂肪酸組成に関する研究は，古くから行われており，近年では，山田ら[4]，Toyomizuら[5]，上田[6]，田代ら[7~10]，大鶴ら[11]および斎藤ら[12]が報告している．また，脂質代謝と密接な関係[13]のある，トコフェロールに関する研究は，Ikedaら[14]および兼松ら[15]により報告されている．しかし，魚油中の脂肪酸組成とトコフェロール含量を，同時に調べた報告は見当たらない。

そこで，マアジ可食部の脂肪酸組成およびトコフェロール含量の季節的変動を調べ，若干の知見を得たので報告する．

実験の部

1. **試料**　本実験に使用したマアジは，神奈川県三崎港周辺の定置網で漁獲されたものである．なお，冬期は入手困難であったため，千葉県勝山周辺で釣獲されたマアジを用いた．漁獲日，尾叉長，体重，脂質含量および肥満度を，Table 1に示した．

*東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1

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

**同理化学部

Table 1. Horse mackerel used as samples

Sample (Place)	Date	Fork length (cm)	Body weight (g)	Lipid content (g/100g fresh)	Condition factor*
Spring (Misaki)	Jun.2 (1985)	18.4±0.8**	82.63±9.07	6.44±2.40	13.2±0.7
Summer (Misaki)	Aug.26 (1985)	18.5±0.6	92.06±9.94	6.86±1.04	14.5±0.4
Autumn (Misaki)	Nov.4 (1985)	17.0±0.9	68.46±9.51	6.27±1.82	13.9±0.5
Winter (Katsuyama)	Feb.23 (1987)	18.0±0.4	80.31±5.38	8.86±3.59	13.8±0.6

* : Body weight/(Fork length)^3×1000

** : Mean±S.D. (n=6)

2. 操作

1) 総脂質の抽出 試料を3枚におろした後，皮を除いた可食部を，クロロホルム・メタノールを用いたBligh and Dyer法[16]に準拠して行った．抽出脂質は，分析に供するまで窒素充てんしたアンプルに封じ，−20℃で保存した．

2) 脂肪酸メチルエステルの調整 ナトリウム・メトキシド法[17]を用いてメチルエステルを調整し，ガスクロマトグラフィー用試料とした．

3) トコフェロール測定用試料の調整 総脂質を*n*-ヘキサンに溶解し，液体クロマトグラフィー用試料とした[18]．

3. 試薬 脂肪酸同定用標準メチルエステルは，シグマ社およびフナコシ薬品㈱より購入した標準品〔$C_{13:0}$, $C_{14:0}$, $C_{15:0}$, $C_{16:0}$, $C_{16:1(\omega7)}$, $C_{17:0}$, *iso*-$C_{17:0}$, *anteiso*-$C_{17:0}$, $C_{17:1(\omega7)}$, *iso*-$C_{18:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1(\omega9,\omega7)}$, $C_{18:2(\omega6)}$, $C_{18:3(\omega3,\omega6)}$, $C_{19:0}$, $C_{20:0}$, $C_{20:1(\omega9)}$, $C_{20:2(\omega6)}$, $C_{20:3(\omega6)}$, $C_{20:4(\omega6)}$, $C_{20:5(\omega3)}$, $C_{21:0}$, $C_{22:0}$, $C_{22:1(\omega9)}$, $C_{22:2(\omega6)}$, $C_{22:3(\omega3)}$, $C_{22:4(\omega6)}$, $C_{22:6(\omega3)}$, $C_{23:0}$, $C_{24:0}$およびC$_{24:1(\omega9)}$〕を用いた．トコフェロールは，和光純薬工業㈱製ビタミンE定量用標準品を用いた．その他の試薬は，和光純薬工業㈱製液体クロマトグラフ用および特級品を用いた．

4. 脂肪酸の同定 標準メチルエステルの保持時間との比較，および，当分析で使用したキャピラリーカラムと，近似したMcReynolds' Constantsを持つキャピラリーカラムを用いた板橋ら[19]，Takagiら[20]およびKaitarantaら[21]の報告したECL値の参照およびGC-MSにより同定を行った．

5. 装置および分析条件 ガスクロマトグラフ：Hewlett Packard 5890，カラム：DB-WAX 30m×0.25mm φ，カラム温度：140℃（5min）～1℃/min～160℃（20min）～1℃/min～200℃，注入口・検出器温度：230℃，検出器：FID，スプリット比：1：60，カラムヘッド圧：142kPa，キャリアガス：ヘリウム，積分計：バリアン社製CDS 401型，GC-MS：日本電子㈱製D-300，カラム：DB-WAX 30m×0.25mm φ，カラム温度：70℃～1℃/min～200℃，注入法：スプリットレス，イオン化電圧：70eV，液体クロマトグラフ：バリアン社製LC-5000型，カラム：㈱ケムコ製Nucleosil 5 NH_2 250mm×4.6mm φ，溶離液：*n*-ヘキサン：*iso*-プロパノール=98.2：1.8，流量：1.7ml/min，螢光検出器：㈱島津製作所製RF-530，励起波長：298nm，螢光波長：325nm，積分計：㈱島津製作所製C-R 3A

結果および考察

1. 脂質含量の季節的変動

Table 1に示すように，脂質含量においては，冬期が高い平均値を示したが，個体間差も大きく，統計的に有意な差は認められなかった（$P>0.05$）．一般に，マアジは春期から夏期にかけてが旬といわれており，田代ら[7]の報告では，春期に脂質含量が最高値を示しているが，今回の結果では異なっていた．

2. 脂肪酸組成の季節的変動

脂肪酸組成値をTable 2に示した．検出された脂肪酸と推定されるピーク数は約70で，そのうち組成比で1%を越えたピークは，Table 2に示す20ピークであった．主なる脂肪酸は，$C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{16:1(\omega7)}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1(\omega9)}$, $C_{20:5(\omega3)}$および$C_{22:6(\omega3)}$であり，各季節とも同様であった．

高度不飽和脂肪酸である$C_{22:6}$酸の組成比は，秋期と冬期の間に統計的に有意な差が見られ（$P<0.01$），秋期は低い傾向に，冬期は高い傾向にあった．$C_{20:5}$酸は，冬期が夏期および秋期に対して，有意に高い値を示した（$P<0.01$）．その他の脂肪酸のうち，ω3系の$C_{18:3}$, $C_{18:4}$, $C_{20:4}$および$C_{22:5}$も，冬期に高い傾向を示し

Table 2. Seasonal variation of fatty acid composition of horse mackerel (wt%)

Fatty acid	Spring	Summer	Autumn	Winter
14:0	3.6±0.3*,a	4.0±0.4[a]	4.3±0.5[a]	5.3±0.6
16:0	20.2±0.8	22.1±0.9[a]	22.4±1.1[a]	18.0±0.4
16:1(ω7)	6.4±0.7[a,b]	6.4±0.1[a]	6.1±0.2[a]	5.4±0.4[b]
( )	0.7±0.2[a]	0.5±0.1[a]	0.4±0.1[a]	0.5±0.1[a]
16:4(ω3)	0.7±0.3[a,b]	0.4±0.1[a,c]	0.3±0.1[c]	0.6±0.0[b]
18:0	5.9±0.5[a]	7.1±0.6[b]	7.8±0.6[b]	4.7±0.9[a]
18:1(ω9)	14.0±2.3[a,b]	15.3±1.0[a]	17.7±2.8[a]	10.3±1.8[b]
18:1(ω7)	2.9±0.3[a]	3.1±0.3[a]	2.9±0.0[a]	2.9±0.0[a]
18:2(ω6)	0.7±0.1[a]	0.8±0.1[a,b]	0.9±0.1[b]	1.3±0.1
18:3(ω3)	0.4±0.1[a]	0.5±0.1[a,b]	0.6±0.1[b]	0.9±0.1
18:4(ω3)	1.0±0.2[a]	0.9±0.1[a]	0.9±0.3[a]	2.2±0.3
20:1(ω11)	0.4±0.1	0.3±0.1[a]	0.2±0.1[a]	2.3±0.4
20:1(ω9)	2.2±0.7[a]	1.0±0.5[b,c]	0.6±0.1[b]	1.6±0.2[a,c]
20:4(ω6)	1.5±0.3[a,b]	1.4±0.1[a]	1.5±0.1[b]	0.9±0.2
20:4(ω3)	0.6±0.1[a]	0.5±0.1[a]	0.5±0.1[a]	1.1±0.1
20:5(ω3)	10.0±0.9[a,b]	9.3±0.5[a]	9.1±1.1[a]	11.1±0.6[b]
22:1(ω11)	3.2±1.2[a]	1.2±0.9[b,c]	0.3±0.1[b]	2.4±0.4[a,c]
22:5(ω3)	2.5±0.2[a]	2.2±0.2[a]	2.3±0.2[a]	3.0±0.2
22:6(ω3)	17.3±3.0[a,b]	16.2±0.9[a,b]	14.5±1.5[a]	18.7±2.1[b]
24:1(ω9)	0.8±0.2[a]	0.5±0.1[b]	0.4±0.1[b]	0.8±0.1[a]

*: Mean±S.D. (n=6)

Means in the same fatty acid not sharing common superscript are significantly different($P<0.01$).

た．しかし，同じ$C_{20:4}$酸でも，ω6系のものが，冬期に低い傾向を示したことは，興味ある結果であった．

一方，$C_{16:0}$，$C_{16:1(\omega7)}$，$C_{18:0}$および$C_{18:1(\omega9)}$酸は，少なくとも夏期および秋期に対して，冬期の値は有意に低い値を示し，秋期は比較的高い値を示した．

上田[6]は，脂肪酸組成は脂質含量および季節により影響を受け，冬期には$C_{18:0}$，$C_{22:6}$および$C_{20:5}$酸が増大し，$C_{16:0}$，$C_{16:1}$，$C_{18:1}$，飽和およびモノエン酸が減少する，と報告している．また田代ら[7]は，$C_{18:1}$酸は，春期および夏期に増大し，$C_{22:6}$酸は，秋期および冬期に増大するとし，$C_{16:0}$酸は比較的変動は少ない，と報告している．

当分析結果を上田の結果と比較すると，$C_{18:0}$酸を除き良く一致した．田代らの結果とは，若干の季節的ずれを生じた．しかし，季節を1期ごとずらし，冬期を秋期として考えるならば，田代らの結果とも比較的類似した．これは，東京湾口に位置する三崎・勝山両港の，地理的条件による影響もあるのではないかと推察された．

3. トコフェロール含量の季節的変動

兼松ら[15]の報告によれば，マアジのトコフェロール同族体に占めるα-トコフェロール含量は，97.6%であり，当分析結果でも，α-トコフェロール以外の同族体は，ゼロまたは痕跡程度であったため，α-トコフェロールのみ定量を行った．

可食部当りの含量は，0.24～1.50mg／100gの範囲であった．これは，兼松らの結果（0.35～0.67mg／100g）より，高い値であった．

季節的変動を見ると，Table 3より，可食部当りおよび脂質当りの含量ともに，冬期に有意に低い値を示した（$P<0.01$）．冬期の試料は産地が異なる事から，必ず

Table 3. Seasonal variation of tocopherol contents in the edible tissues and in the lipids of horse mackerel

Sample	α-Tocopherol content (mg/100g)	
	In edible tissue	In lipid
Spring	1.17±0.20*	20.39±7.99
Summer	0.98±0.09	14.67±2.82
Autumn	0.84±0.19	13.95±3.50
Winter	0.32±0.08[a]	4.65±3.31[a]

* : Mean±S.D. (n =6)
a : Significantly different from the other groups(P< 0.01)

しも季節的変動とは断定できないが，トコフェロールの生体内での脂質抗酸化作用[13]や，脂肪酸組成の変化，索餌行動の変化等を考えると，季節的要因が大きいのではないかと推測される．なお，著者らが現在行っているマサバ脂質のトコフェロール含量分析でも，魚種は異なるものの，同様の傾向が見られている．

また，春，夏，秋の3期において，可食部当りのトコフェロール含量が，比較的近似した値を示した事は，興味深い．脂質当りのトコフェロール含量は，個体間で大きな変動を示したが，これは脂質含量の違いによるものと思われ，両者間に高い負の相関（r＝−0.73，P< 0.01）が認められた．

4. トコフェロール含量と脂肪酸組成との相関

可食部当りのトコフェロール含量と，ω3系の高度不飽和脂肪酸（$C_{18:4}$，$C_{20:4}$，$C_{20:5}$および$C_{22:5}$）は，有意な負の相関を示し（P<0.01），$C_{22:6}$酸も，同様な傾向を示した（P<0.1）．また，$C_{18:2(\omega6)}$酸および$C_{18:3(\omega3)}$酸も負の相関を示した（P<0.01）．しかし，$C_{20:4(\omega6)}$酸は正の相関を示した（P<0.01）．

以上の結果は，生体内抗酸化作用を示すトコフェロールと，不安定なポリエン酸の間に，強い関連性をうかがわせた．

要　約

マアジに含まれる脂質含量，脂肪酸組成およびトコフェロール含量の季節的変動を調べた．

1．脂質含量における季節的変動は，個体間の差が大きく，統計的に有意な差は認められなかった．

2．脂肪酸組成における季節的変動では，$C_{16:0}$，$C_{16:1(\omega7)}$，$C_{18:0}$および$C_{18:1(\omega9)}$酸において，夏期および秋期に対して，冬期は有意に低い値を示した．また，ω3系の$C_{18:3}$，$C_{18:4}$，$C_{20:4}$，$C_{20:5}$，$C_{22:5}$および$C_{22:6}$酸においては，冬期に高い傾向を示した．

3．検出されたトコフェロールの大部分は，α-トコフェロールであった（>97%）．可食部当りのトコフェロール含量は，0.24～1.50mg／100gの範囲の値を示し（脂質当り1.88～31.09mg／100g），冬期に有意に低い値を示した．

4．可食部当りのトコフェロール含量と，$C_{16:4(\omega3)}$および$C_{20:4(\omega6)}$酸を除いたポリエン酸の組成比の間に，有意な負の相関が認められた．

文　献

1) Dyerberg, J., Bang, H.O. and Hjϕrne, N. : *Am. J. Clin. Nutr.*, 28, 958-966, 1975
2) Dyerberg, J., Bang, H.O., Stoffersen, E., Moncada, S. and Vane, J.R. : *Lancet*, ii, 117-119, 1978
3) 鹿取　信：油化学，34，911-920，1985
4) 山田　実，林　賢治：日水誌，41，1143-1152，1975
5) Toyomizu, M., Nakamura, T. and Shono, T. : *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 42, 101-108, 1976
6) 上田　正：水大研報，26，146-164，1977
7) 田代勇生，伊藤真吾，露木英男：日食工誌，28，309-317，1981
8) 田代勇生，伊藤真吾，露木英男：日食工誌，28，482-490，1981
9) 田代勇生，伊藤真吾，露木英男：日食工誌，30，79-87，1983
10) 田代勇生，伊藤真吾，露木英男：日食工誌，30，235-244，1983
11) 大鶴　勝，藤井美由紀，石永正隆，鬼頭　誠：農化，58，35-42，1984
12) 斎藤衛郎，小畠義樹，田ケ谷研一，吉田武雄，山崎英也，西出英一，印南　敏：栄養学雑誌，43，301-318，1985
13) 池田郁男，菅野道廣：ビタミン，57，119-132，1983
14) Ikeda, S. and Taguchi, T. : *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 32, 346-351, 1966
15) 兼松　弘，牛草寿昭，丸山武紀，新谷　勛，松本太郎：栄食誌，36，239-245，1983
16) Bligh, E.G. and Dyer, W.J. : *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917, 1959
17) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，185-186，1980，金原出版，東京

18) 日本薬学会編：衛生試験法・注解（追補），1293-1296，1983
19) 板橋 豊，高木 徹：油化学，29，855-865，1980
20) Takagi, T., Itabashi, Y. and Kaneniwa, M. : *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 35, 517-521, 1986
21) Kaitaranta, J. K. and Linko, R.R. : *J. Sci. Food Agric.*, 30, 921-926, 1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **38**, 262-266, 1987

食品中の二酸化チタンの分析

天川映子*, 大西和夫*, 西島基弘*

Determination of Titanium Dioxide in Foods

EIKO AMAKAWA*, KAZUO OHNISHI* and MOTOHIRO NISHIJIMA*

An analytical method for the determination of TiO_2 in foods was studied.

A sample, 1-2g, weighted in a porcelain crucible was ashed at 550℃ overnight and then 5m*l* of water was added to the ash. The suspension was transferred to a Teflon beaker with water. After evaporation to dryness on a hot plate, 2m*l* of H_2SO_4 (1+1) and 1m*l* hydrofluoric acid (HF) were added to the residue. The beaker covered with a Teflon watch glass was heated for 10 minutes at 140℃ on the hot plate, and further heated without watch glass for 30 minutes to remove excess HF. The test solution was prepared by making up the digested solution to 20m*l* with 0.1N HCl. After addition of 0.2m*l* of 3% H_2O_2 to 5m*l* of the test solution, absorbance at 408 nm was measured.

The ashing of the sample was sufficiently performed in the porcelain crucible at 550℃ overnight. TiO_2 was solubilized with a little amount of HF and H_2SO_4 in a short period of time. Recoveries of TiO_2 added to cheese, white chocolate, chewing gum and suger coated beans were 97.1-102% and the detection limit was 20 μg/g.

Using this method, 36 domestic and 24 imported products commercially available in Tokyo suspected of containing TiO_2 were tested. TiO_2 was found at 21−1440 μg/g in three of chewing gums and two of candies which were imported.

This method could be efficiently applied to the determination of TiO_2 in foods.

Keywords: titanium dioxide in foods, porcelain crucible, hydrofluoric acid, sulfuric acid, colorimetric determination, hydrogen peroxide

緒　言

二酸化チタン（以下 TO と略す）は，既に諸外国では白色の着色料としてホワイトチョコレートやチーズ等に使用される他，菓子類のコーティング剤として使われていた[1]が，我が国では1983年に許可された比較的新しい食品添加物である．

現在，TO の分析には比色法[1-4]や蛍光X線法[5]が多く使用されている．比色法は，いずれもA.O.A.C.法[3]に準じたものであるが，TO が鉱酸に対して難溶なため[6]，試料灰化後の TO を溶解する際，多量の濃硫酸を必要としたり，灰化する容器として白金るつぼが必要なことや，試料の採取量が多いため灰化に長時間を要する等，日常用いる分析法としては実用性に欠けている．蛍光X線法は，試料を破壊することなく直接測定できる利点を有するが，分析感度が低いため低濃度での測定が出来ない等難点を有する．

そこで，磁製るつぼを用いて試料を一夜灰化後，少量のフッ化水素酸と硫酸で TO を短時間に溶解し，比色法により定量する方法について検討した．また，本法を市販食品に適用したのでその結果を併せて報告する．

実験方法

1　試料

昭和61年8月から62年4月の間に東京都内の小売店で購入したチーズや菓子類等，TO の使用が予想される国

*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

産品36検体，輸入品24検体合計60検体を試料とした．

2　試薬

TO標準溶液：和光純薬製原子吸光用チタン標準液を，TOとして100ppmとなるように硫酸（1＋9）で調製した．その他の試薬はいずれも市販特級品を用いた．

3　器具及び装置

1）粉砕器：トリオサイエンス製トリオブレンダー．

2）ビーカー及び時計皿：テフロン製，トリオサイエンス製50m*l*用，耐熱温度260℃．

3）自記分光光度計：島津製作所製UV240型．

4　試験溶液の調製

よく粉砕した試料1～2gを磁製るつぼに秤取しホットプレート上で乾燥後，赤外線ランプ次いでガスバーナーで順次炭化した後，550℃の電気炉で一夜灰化した．放冷後，水5m*l*を加え超音波発生器にかけながら，るつぼの壁に付着している灰分をガラス棒でよくかき落した後，少量の水でビーカーに移した．ホットプレート上で蒸発乾固後，残渣に硫酸（1＋1）2m*l*，次いでフッ化水素酸1m*l*を加え，時計皿でふたをして約140℃のホットプレート上で10分間加熱しTOを溶解した．

次に，時計皿を取り除き，更に30分間加熱して過剰のフッ化水素酸を除去した．室温まで放冷後0.1N塩酸を5m*l*加え超音波発生器に30秒間かけ0.1N塩酸で20m*l*とした後，No.5Cの口紙でろ過し得られたろ液を試験溶液とした．

5　定量

試験溶液5.0m*l*に3％過酸化水素水0.2m*l*を加えよく混和後，層長1cmのガラスセルを用いて408nmにおける吸光度を測定した．

また，検量線は，TO標準溶液0.2～2.0m*l*をそれぞれ試験管にとり0.1N塩酸を加えて5.0m*l*とした後，同様に操作して作成した．なお，対照には0.1N塩酸5m*l*を用いた．

結果及び考察

1　灰化条件の検討

試料の灰化は，A.O.A.C.法[3]では，白金るつぼを用い850℃の電気炉で行っているが，小川ら[1]は，白金るつぼを使用し600℃で行い，良好な結果を得ている．更に，可児ら[4]は，磁製るつぼを用い600℃で灰化を行い実用上問題が無い事を報告している．一般に550℃を超えると，無機成分のるつぼ上薬への吸着が大きくなり，特に灰分含有量の少ない試料では吸着が著しいといわれている[8]．このことを考慮してTOについても他の無機成分の場合[8]と同様550℃以下で灰化する事が望ましいと考える．そこでチーズ2gを磁製るつぼにとり，TOを200，2,000，及び5,000μg添加し550℃で一夜灰化したところ，回収率は97.3～103％と良好であった．以上の結果を考慮して以後の実験は磁製るつぼを用い，550℃で一夜灰化することにした．

2　TO溶解条件の検討

原ら[7]はテフロン製加圧容器内でフッ化水素酸と塩酸を用い，加熱下でチタン酸ジルコン酸鉛を溶解している．また，四塩化チタンの希塩酸溶液にフッ化水素酸と硫酸を加え，通風室内で蒸発させると塩酸とフッ化水素酸が追い出されて，硫酸チタン（IV）を生ずる[9]．

そこで，試料灰化後の灰分中のTOを出来るだけ少量のフッ化水素酸と硫酸で溶解し硫酸チタン（IV）にすることを目的にフッ化水素酸及び硫酸の必要量と加熱時間を検討した．

2．1　フッ化水素酸添加量　チーズ2gにTOを5,000μg添加して灰化後，フッ化水素酸0.3～2.0m*l*を添加して本法に従い回収率を求めた結果，0.7m*l*以上を添加した場合，98.1～103％の回収率が得られたため，以後の実験は余裕をもって1m*l*添加することにした．

2．2　硫酸添加量　豆菓子及びチーズにTOを5,000μg添加して灰化後，硫酸（1＋1）0.2～4.0m*l*を添加したものについて回収率を求めた結果をFig.1に示した．いずれも硫酸量の増加に伴い回収率が良くなり，豆菓子では0.5m*l*以上で100～101％，チーズでは1.5m*l*以上で97.3～98.7％の回収率が得られた．試料により必要とする硫酸の量が異なるのは，灰分中のカルシウム等により硫酸が消費されるためと推察される．そこで，カルシウム20～80mgにTOを5,000μg添加した場合のTOの回収率に及ぼす硫酸添加量の影響について検討し，その結果をFig.1に示した．カルシウム量が増加するに従って，TOを可溶化するために多くの硫酸を必要とすることがわかった．また，試料中の灰分量の多寡と硫酸の必要量はほぼ比例する傾向を示した．そこで，硫酸の添加量を余裕をもって2m*l*とすることにした．

2．3　加熱時間　チーズ2gにTOを5,000μg添加後灰化したものについて，原ら[7]に準じて加熱温度は約140℃とし，ホットプレート上でTOを溶解するための加熱時間を5～30分間に変化させて回収率を求めた．5分間以上でいずれも97.5～100％と良好な回収率が得られたことから以後の実験は約140℃のホットプレートで10分間加熱し，TOを溶解することにした．

また，フッ化水素酸を使用するため，ビーカー及びそのふたに用いる時計皿はテフロン製のものを用い，TO

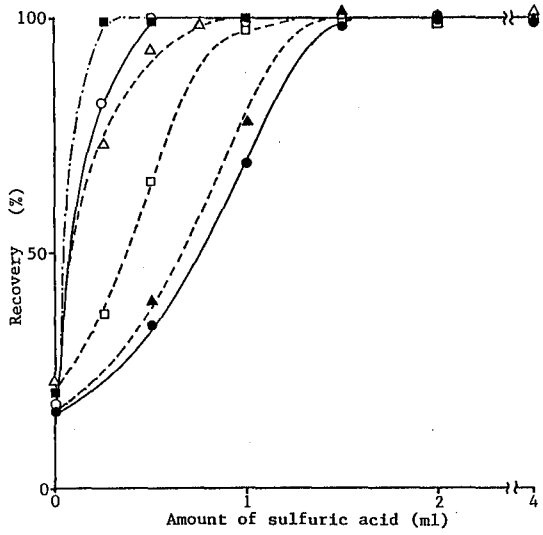


Fig. 1. Effect of Additional Amount of Sulfuric Acid (1+1) on Recovery of Titanium Dioxide under the Presence of Calcium
Mamegashi : —○—, Cheese : —●—,
Ca 20mg added : −−△−−, Ca 40mg added : −−□−−, Ca 80mg added : −−▲−−,
reference : −·−■−·−
Added amount of TiO_2 : 5000 μg

溶解後はホットプレート上で過剰のフッ化水素酸を蒸発して除くことにより，以後の操作に用いるガラス器具等のフッ化水素酸による損傷を防ぐことが出来た．

3 比色法の検討

Ti^{4+}は強酸性溶液中で過酸化水素を加えるとペルオキソチタン酸を生じ，黄～橙赤色に呈色することが知られている[9]．そこで，発色剤として用いる過酸化水素水の濃度，共存物質の影響等を検討した．

3．1 過酸化水素水の濃度 発色に要する過酸化水素水の濃度を知るため，TO を200 μg とり0.1N塩酸で5 ml とした後2～25%過酸化水素水をそれぞれ0.2ml 加え，408nm での吸光度を発色直後から20時間観察した．

その結果，上記添加量及び時間内ではいずれの場合も吸光度に変化がほとんど見られなかった．

そこで，以後の過酸化水素水濃度は，作り易さを考慮して3%とし，その0.2ml を用いることにした．

3．2 共存物質の影響 Ti^{4+}の過酸化水素水による発色反応は，CrO_4^{2-}，MoO_4^{2-}等により妨害をうけると言われている[9]．そこで，Table 1に示した種々のイオンの影響を調べた．

TO を200 μg とり，これに Table 1に示した各種イオンを添加した際の吸光度を測定し，その影響を検討した．その結果いずれの場合も特に対照と差が見られな

Table 1. Interferences of Foreign Ions

Ions	Foreign ions: Added amount(mg)	Foreign ions: Added as	Relative absorbance(%): 408nm	Relative absorbance(%): 430nm
−			100	100
Na^+	100	NaCl	99.3	98.5
Ca^{2+}	50	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	103	97.8
K^+	5	KCl	100	100
Mg^{2+}	5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	104	100
Al^{3+}	1	$AlCl_3$	100	101
Fe^{3+}	0.2	$FeCl_3$	101	99.4
Cu^{2+}	0.1	$CuCl_2$	100	100
Ni^{2+}	0.05	$NiCl_2$	99.1	100
Co^{2+}	0.05	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	99.6	99.6
Cl^-	150	NaCl	99.3	98.5
PO_4^{3-}	60	H_3PO_4	100	97.4
NO_3^-	5	KNO_3	100	98.5
CrO_4^{2-}	0.1	K_2CrO_4	102	101
MoO_4^{2-}	0.08	Na_2MoO_4	102	100
VO_4^-	0.05	NH_4VO_4	103	101

Added amount of TiO_2 : 200 μg

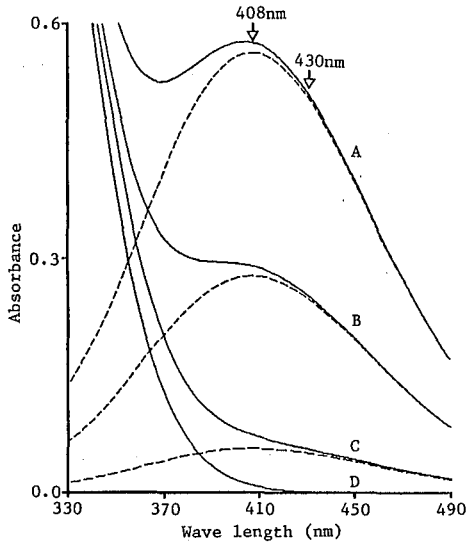


Fig. 2. Absorption Spectra of Reaction Product resulted from Titanium (IV) Sulfate and Hydrogen Peroxide under the Presence of Iron (III) ion
A, B, C and D were 200, 100, 20 and 0 μg of TiO_2, respectively
Fe^{3+}200 μg added : ——, reference : ·····

かった．しかし，Fe^{3+}は300nm 付近に強い極大吸収波長を有するため，共存すると Fig. 2 に示したような吸収スペクトルを示し，TO が20 μg 以下で，かつ Fe^{3+}が30 μg 以上共存すると 5 %以上の正誤差を与えることがわかった．

食品成分表によると，チーズ及び菓子類の鉄含有量はそれぞれ0.1～0.4[10]，0.1～3.9mg/100g[11]である．3.9mg/100g 含有している場合でも，本法によると試験溶液中の Fe^{3+}の量は19.5 μg であり，TO が10 μg 以上の時，誤差はほとんど無視しうるものであった．

しかし，海草類等鉄含有量の高いものを原料とする食品の場合には Fe^{3+}による妨害を考慮する必要がある．そこで，Fe^{3+}の吸収を無視し得る430nm で測定したところ，Fe^{3+}200 μg 共存下でも，低濃度の TO を精度良く測定することが可能になった．したがって，試験溶液中に Fe^{3+}を30 μg 以上含有する試料の場合は，430nm で測定することにした．

3．3 検量線及び検出限界 TO を20～200 μg とり本法に従い検量線を作成したところ，原点を通る直線が得られた．また，定量限界は10 μg であり試料に換算すると 1 g 当り20 μg であった．

Table 2. Recoveries of Titanium Dioxide added to Commercial Foods

Foods	TiO_2	
	Added(μg/g)	Recoveries(%)
Cheese	100	97.1
	1000	99.2
White chocolate	100	102
	1000	99.1
Chewing gum	100	98.1
	1000	100
Mamegashi	100	100
	1000	101

n = 3

4 添加回収率

TO が使用される可能性のあるチーズ，ホワイトチョコレート，チューインガム，豆菓子それぞれに TO を 1 g 当り100及び1,000 μg 添加し，本法により回収実験を行った結果を Table 2 に示した．回収率は97.1～102%，標準偏差は2.46と良好であった．

5 市販食品への適用

TO を使用している可能性のある市販食品について分析した結果を Table 3 に示した．輸入品のガム及びキャンデー 5 検体から 1 g 当り21～1,440 μg の TO が検出された．これらは，いずれも糖衣された食品で TO は，糖衣部分に含まれ，コーティング剤として用いられていたと考えられる．また，全ての試料について Fe^{3+}による妨害も予想どおりほとんどみられず408nm で十分測定出来た．

なお，TO が検出されたものは，いずれも輸入品であった．わが国において，TO は香粧品等では，かなり繁用されている[5]が，食品添加物としては歴史が浅いこともあって使用頻度は低いことが，うかがわれた．しかし，今後は輸入食品の増加に伴って，TO の使用された食品も増加することが予測される．

結 論

食品中の TO 分析法について検討した．

試料を乾式灰化した後，フッ化水素酸と硫酸を併用して TO を加熱溶解し，試験溶液を得た．試験溶液の一定量をとり過酸化水素水を用いた比色法により TO を定量した．

試料の灰化は，磁製るつぼを用い550℃の電気炉で一夜行うことで十分可能であった．また，少量のフッ化水素酸と硫酸を併用することにより約10分間で TO を可溶

Table 3. Analytical Result of Titanium Dioxide in Commercial Foods

Foods	Manufacturer(State)	N	TiO_2(μg/g)
Cheese	Japan	4	ND
	New Zealand	2	ND
	Canada	2	ND
	West Germany	2	ND
	Denmark	1	ND
	Australlia	1	ND
	Netherlands	1	ND
	England	1	ND
White chocolate	Japan	5	ND
	Switzerland	3	ND
	West Germany	1	ND
	Finland	1	ND
Chewing gum	Japan	5	ND
	Ireland	3	21,34,77
	Denmark	2	ND
Confectioneries	Japan	12	ND
(Candies etc)	Netherlands	2	ND
	England	1	637
	U.S.A.	1	1440

Detection limit：20 μg/g

化出来た．比色法での共存オインによる妨害は特にみられなかった．チーズ，ホワイトチョコレート，チューインガム及び豆菓子を用いた添加回収実験の結果，回収率は97.1～102%，標準偏差は2.46と良好であり，定量限界は1g当り20μgであった．

以上により，本法は食品中のTO分析法として実用上有効な方法であると考える．

市販食品60検体（国産品36検体，輸入品24検体）を本法により分析したところ，輸入品のガム3検体とキャンデー2検体から1g当り21～1,440μgのTOが検出された．

文　献

1）小川俊次郎，豊田正武，伊藤誉志男，慶田雅洋：食品衛生研究，28，1081-1084，1978

2）J. L. Leone：J. Assoc. Off. Anal. Chem., 56, 535-537, 1973

3）Assoc. Off. Anal. Chem.：Official Methods of Analysis of A. O. A. C., 12th ed., 459, 1975, Washington

4）可児利朗，土橋香澄，加藤文秋，湯浅由紀，宮沢文雄：衛生化学，32(1)，54-56，1986

5）中村義昭，観　照雄，伊藤弘一，岸本清子，渡辺四男也：東京衛研年報，36，98-100，1985

6）松田　勉：食品衛生研究，33，882，1983

7）原　秀夫，橋本敏雄，藤江真一，合志陽一：分化，35，T76-T79，1986

8）日本薬学会編：衛生試験法注解，401-403，1980，金原出版，東京

9）高木誠司：定性分析化学　中巻　イオン反応編，481-485，1970，南江堂，東京

10）科学技術庁自然調査会編：四訂日本食品成分表，163-164，1983，医歯薬出版，東京

11）同上，56-69，同上

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.*, 38, 267-272, 1987

ディーゼル排気ガス暴露ラットの肺胞マクロファージにおける Superoxide Anion 産生能の低下

鈴木孝人*, 池田真悟*, 加納堯子*

Decreased Superoxide Anion Production in Alveolar Macrophages of Rats Exposed to Diesel Engine Exhaust

TAKAHITO SUZUKI*, SHINGO IKEDA* and TAKAKO KANOH*

Effects of diesel engine exhaust on pulmonary defense systems were investigated by determining phagocytosis and superoxide anion (O_2^-) production by alveolar macrophages (AM) of rats.

Rats were divided into 5 groups in accordance with the concentrations of particulate matter and nitrogen dioxide : (1) L group; supplied with a low concentration of diluted whole exhaust (0.608mg／m³, 0.05ppm), (2) M group; supplied with a medium concentration of diluted whole exhaust (2.651mg／m³, 0.52ppm), (3) H group; supplied with a high concentration of diluted whole exhaust (8.316mg／m³, 1.70ppm), (4) F group; supplied with filtered exhaust (0.033mg／m³, 1.60ppm) and (5) C group; supplied with clean air (0.010mg／m³, 0.02ppm) as control. In each group 8 rats were used. Exposure was carried out for 5 days at 7 hours per day. The phagocytic activity of AM was determined by counting the number of yeast particles taken into the cells. The O_2^- production by AM was determined at rest, during phagocytosis of zymosan particles and during stimulation with phorbol myristate acetate (PMA).

No significant changes were observed in the phagocytosis of AM from rats of all groups exposed to diluted or filtered exhaust. The suppression of O_2^- production was observed in AM from rats of all groups exposed to diluted exhaust during zymosan phagocytosis and PMA stimulation. The suppression also occurred in AM from rats of M group and H group at rest. On the other hand, the O_2^- production by AM from rats exposed to filtered exhaust (F group) remained unchanged at rest, during zymosan phagocytosis and during PMA stimulation.

The results suggest that the diminution of O_2^- production by AM from rats exposed to diluted exhaust is mainly due to the particulate matter in exhaust and causes the adverse effects on the pulmonary early defense systems.

Keywords : diesel engine exhaust, pulmonary defense system, superoxide anion production, phagocytosis, alveolar macrophage, rat

緒　　言

ディーゼル自動車は高馬力を有し，経済性に富んでいるという利点から1970年代以降，ディーゼル乗用車が急速に普及し，この傾向は今後も続くと考えられている．

しかし，ディーゼル排気ガスの中には NO_x, CO, CO_2, SO_x などガス状物質をはじめ，脂肪族，多環芳香族の炭化水素類や粒子状物質などが含まれていること[1]から，ディーゼル排気ガス吸入による生体影響についての検討が最近では多方面で進められている[2~14]．

また，東京都衛生局によって発表された複合大気汚染に係る健康影響調査[15,16]によれば，幹線道路の沿道に居住する住民には，その後背地に住む住民と比べて，

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　160　東京都新宿区百人町３－24－１

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

「ひどい風邪など」を示す呼吸器疾患有症率の増加が報告されている.

我々は，先に，大気汚染物質のNO_2をラットに暴露したところ，ラットの肺胞マクロファージ（AM）にはその生存率や貪食能及びsuperoxide anion（O_2^-）産生能などの殺菌機能に係る機能低下が生じることを確認し，NO_2の暴露は易感染性を招く恐れがあることを報告した[17]．そこで，ディーゼルの排気ガスを用いてNO_2暴露の場合と同様の実験を試み，ディーゼル排気ガスに暴露されたラットのAMの生存率，貪食能，O_2^-産生能，更に，acid phosphataseなどの酵素活性に及ぼす影響について検討した．その結果，貪食能には有意な変化は認められなかったが，O_2^-産生能において有意な低下を示す知見が得られたので報告する．

実験方法

(1) 動物の暴露

実験動物は8週令の雄のF 334／DuCrjラット（日本チャールスリバー社）を用いて，ディーゼル排気ガスを希釈して濃度別に暴露した．暴露濃度としては低濃度群（L群），中濃度群（M群），高濃度群（H群）の3つの暴露群とガス状物質のみを暴露するため排気ガスから粒径0.3 μm以上の粒子を99.99%まで除くヘパフィルター（ATM-3-Q-A型，日本無機KK）を経由させた除塵群（F群）及び清浄空気を暴露した対照群（C群）に分けて5日間（7時間／日）の暴露を行った．また，暴露濃度はTable 1に示した如くである．尚，排気ガスの発生源はヤンマーディーゼルエンジン（NS40C-G-E型，特殊渦形予燃焼室式，排気量：269cc，回転速度：2400rpm）を使用し，燃料には軽油（JIS 2号相当品，日本石油）を用いた．また，暴露実験での計測機器には窒素酸化物測定機（8440型，Monitor Lobs Co）と粉塵濃度計（β線式質量濃度計BAM-102型，柴田科学器械KK）を用いた．尚，粉塵の粒径分布の計測はアンダーセン型ローブレッシャー・インパクター（LP-20型，東京ダイレックKK）を用いて行った．

Table 1. Experimental Condition in Diesel Engine Exhaust Inhalation

Group	Particle(mg／m³)	NO_2(ppm)
C	0.010±0.008	0.02±0.01
L	0.608±0.041	0.05±0.02
M	2.651±0.188	0.52±0.08
H	8.316±0.875	1.70±0.40
F	0.033±0.016	1.60±0.40

Rats were exposed to diesel engine exhaust for 5 days at 7 hrs／day.
The particle size of exhaust was below 0.5 μm more than 90% of the exposed particles.
C：Control group of clean air
L：Low concentration group of whole exhaust
M：Medium concentration group of whole exhaust
H：High concentration group of whole exhaust
F：High gas concentration group of filtered exhaust

(2) 検体の調製

AMの採取及び調製は既報[17]と同様に行い，また，細胞数のカウントは計算盤（Burker-Turk社製）を用いて行った．

(3) 生存率の測定

AMの生存率はtrypane blue dye exclusion法で測定した．

(4) 貪食能の測定

AMの貪食能はイースト粒子を用いて既報[17]と同様に行い，各ラットの200個のAMを顕鏡して，AMが1個でもイーストを貪食しているか否かを判定し，貪食細胞の割合を示す貪食率を求め，更に，1個あたりのAMによるイーストの平均貪食数を求めた．

(5) O_2^-産生能の測定

AMのO_2^-産生能は既報[17]の如くJohnstonら[18]の方法に準じて休止時，zymosan貪食時及びphorbol myristate acetate（PMA）刺激時におけるO_2^-産生能を測定した．

(6) 酵素活性の測定

採取したAMを既報[17]の如く処理後，AM中のsuperoxide dismutase（SOD）の活性は大柳[19]の方法，glucose－6－posphate dehydrogenase（G-6-PD）の活性はTaketaとWatanabe[20]の方法で，更に，acid phosphataseの活性はMussonら[21]の方法で測定した．尚，タンパク含量はLowryら[22]の方法によって測定した．

(7) AM，リンパ球及び好中球の細胞分類

O_2^-産生能の測定後，AMと好中球はYamら[23]の二重染色法で染色し，AMとリンパ球はKnowlesら[24]の方法で別々に染色して各ラットの200個の細胞を顕微鏡下でカウントして各々の細胞を分類した．

実験結果

Fig. 1に示すように，体重及び気管支－肺胞洗浄液（BALF）中の1 ml当りの細胞数は対照群に比べて各群とも有意な変化は認められなかった．細胞の生存率はL群とM群に有意な上昇が認められたが，H群とF群では変化は認められなかった．AMの貪食能は各群とも貪食

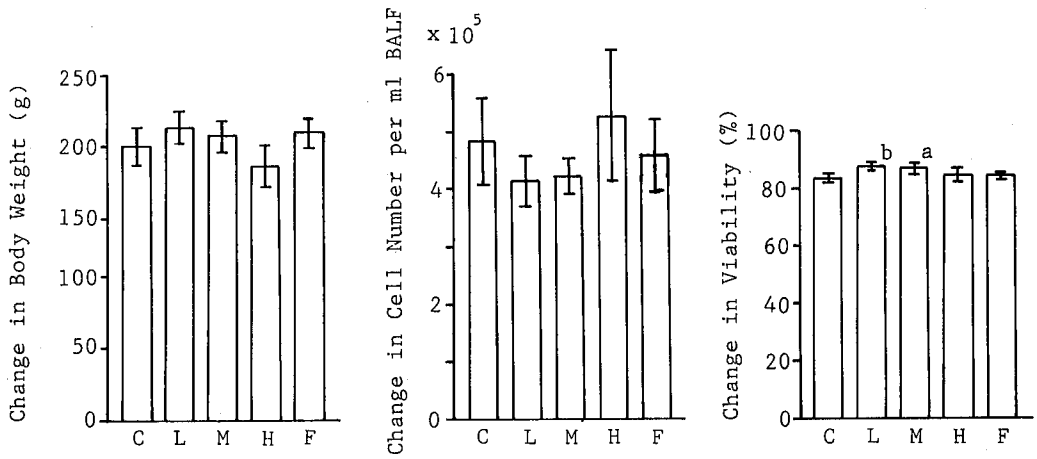


Fig. 1. Changes of body weight, cell number per ml of broncho-alveolar lavage fluid (BALF) and viability on alveolar macrophages of rats exposed to diesel engine exhaust or clean air. Data are expressed as the mean ± S.D. (n =8).
a : P <0.01, b : P <0.001

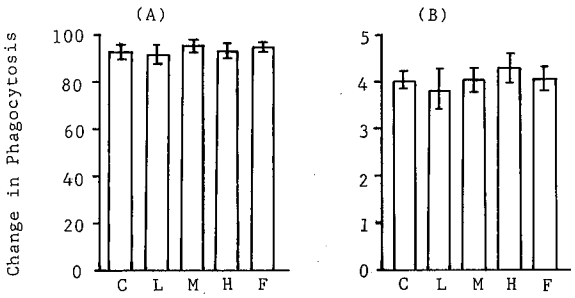


Fig. 2. Changes of phagocytosis on alveolar macrophages of rats exposed to diesel engine exhaust or clean air. Data are expressed as the mean ± S.D. (n =8). Phagocytosis A indicates the percentages of positive cells in which one or more yeast particles were phagocytized out of 200 cells tested. Phagocytosis B indicates the mean of numbers of yeast particles phagocytized by each cell.

率及び細胞1個当りの貪食数でも有意な変化は認められなかった (Fig. 2). また, Fig. 3 に示すように, AM の O_2^- 産生能は休止時ではM群とH群で有意な低下を示し, zymosan 貪食時及び PMA 刺激時ではL群, M群, H群に有意な低下が認められたが, F群ではいずれの場合にも有意差は認められなかった. 更に, Fig. 4 に示すように, AM 中の SOD 活性はL群, M群, H群で有意差は認められなかったが, F群では有意な活性上昇が認められた. また, AM 中の G-6-PD 活性はL群, M群, H群, F群において有意な上昇が認められた. 更に, Fig. 5 に示すように, AM 中の acid phosphatase 活性はM群, H群において有意な低下が認められた.

また, AM, リンパ球及び好中球の染色による細胞分類の結果, 細胞の99%は AM であり, リンパ球及び好中球は1%以下にすぎなかった.

考　察

動物実験において, Gardner ら[25]は都市大気中で長期間飼育されたマウスは対照群と比較して気管支肺炎, 間質性肺炎が生じる頻度が高くなることを報告し, Campbell ら[26]及び Lewis ら[27]はマウスにディーゼル排気ガス吸入後, B型溶血性連鎖球菌又はインフルエンザウィルスを感染させ, 死亡率を指標として比較すると排気ガス吸入群の死亡率が上昇することを報告している. これらの報告は都市大気中のディーゼル排気ガス吸入は細菌に対する感染抵抗性を弱めることを示唆している. また, ディーゼル排気ガス中に高濃度に含まれている NO_2 の吸入によって, 動物が易感染状態になることは数多くの報告があり[28~31], 我々も NO_2 (4 ppm, 10日間又は8 ppm, 7日間) に暴露したラットにおいて AM の貪食能と O_2^- 産生能の低下が起こることを既に報告している[17]. Table 1 に示す如く, 本実験における各群での NO_2 の平均濃度は, 前回行った我々の NO_2 の暴露実験に比較すると, 0.05ppm (L群), 0.52ppm (M群), 1.70ppm (H群) とより低濃度の暴露条件である. これは NO_2 による影響を出来る限り除き, 主としてディーゼル排気ガス中に含まれる粒子状物質による影響について検討を試みるためである. しかし, 本実験における NO_2

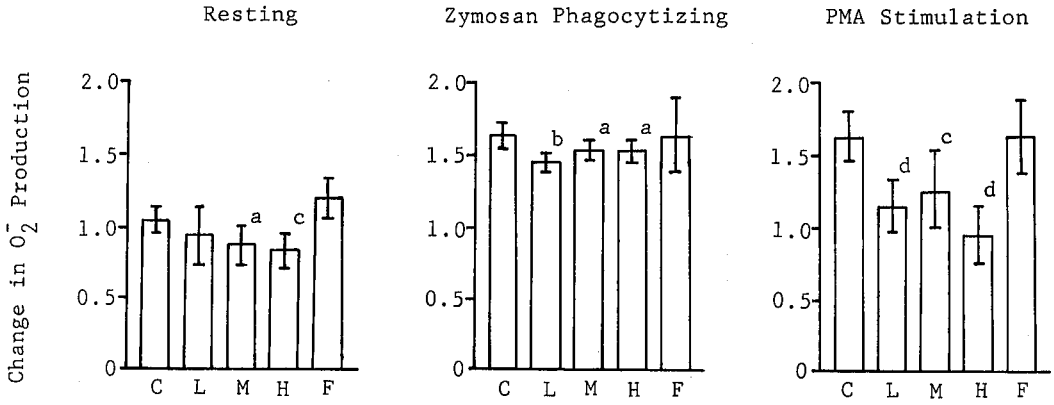


Fig. 3. Changes of superoxide anion (O_2^-) production on alveolar macrophages of rats exposed to diesel engine exhaust or clean air. Data are expressed as the mean ± S.D. (n =8) and O_2^- production by alveolar macrophages are expressed as nanomoles of cytochrome C reduced per 60 min per 10^5 cells.
a : $P<0.05$, b : $P<0.02$, c : $P<0.01$, d : $P<0.001$

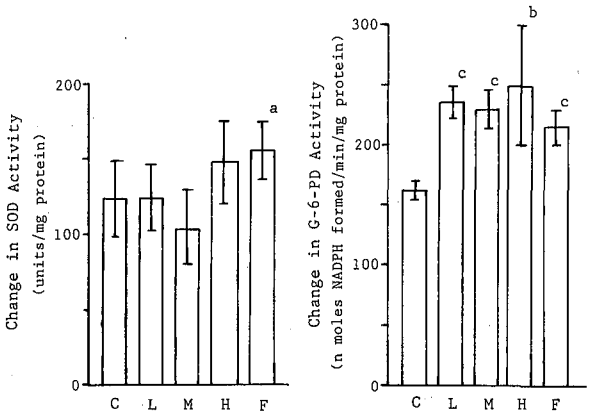


Fig. 4. Changes of enzyme activity of SOD and G-6-PD on alveolar macrophages of rats exposed to diesel engine exhaust or clean air. Data are expressed as the mean ± S.D. (n =8). One unit of SOD activity is defined as the amount of specimen required to inhibit the rate of nitrite formation from hydroxylamine by 50%.
a : $P<0.02$, b : $P<0.01$, c : $P<0.001$

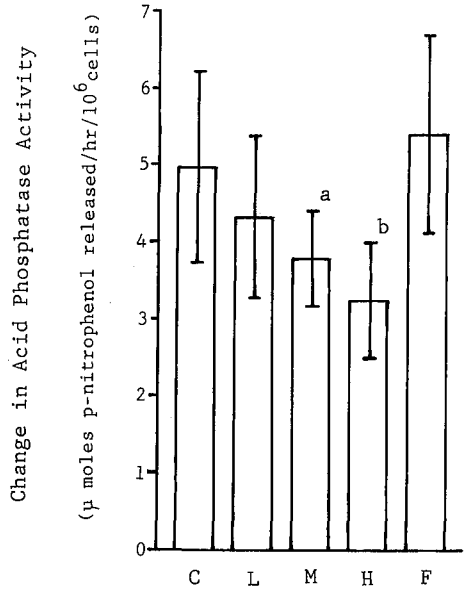


Fig. 5. Changes of acid phosphatase activity on alveolar macrophages of rats exposed to diesel engine exhaust or clean air. Data are expressed as the mean ± S.D. (n =8).
a : $P<0.05$, b : $P<0.025$

の影響を比較するためにH群と同等のガス濃度のF群（1.60ppm）を設定した．また，Fig. 3に示すように，AMのO_2^-産生能はF群及び休止時のL群を除いて，休止時，zymosan貪食時，PMA刺激時におけるL群，M群，H群ではO_2^-産生能の有意な低下が認められた．即ち，H群と同等のNO_2濃度のF群でO_2^-産生能の低下が認められず，L群，M群，H群でO_2^-産生能の低下が認められた結果から判断すると本実験条件下における濃度のNO_2やその他のガス状物質ではAMのO_2^-産生能の低下は起こらず，むしろ，排気ガス中の粒子状物質によってO_2^-産生能の低下が生じたことを示唆している．O_2^-はAMの細胞膜に局在しているNADPH oxidaseによってO_2と電子の供与体であるNADPHから産生され，また，NADPHはG-6-PDを介して産生される[32,33]．

一方，O_2^-はSODによってH_2O_2とO_2に分解され，AM中のO_2^-量が調整されている[34]．そこで，本実験でのAMのO_2^-産生能を低下させた機構について考えてみると，Fig. 4に示すように，NADPHを産生するG-6-PDがL群，M群，H群でいずれも活性上昇を生じていることから考えると，NADPHの供給が不十分なためにO_2^-産生が低下したものではないと思われる．更に，SODの活性もL群，M群，H群では有意な差は認められなかったことから，これらの群でのO_2^-のSODによる分解促進によってO_2^-産生能の低下が生じたものではないと考えられる．即ち，L群，M群，H群におけるO_2^-産生能の低下の原因は排気ガス中の粒子状物質によってAMの細胞膜上のNADPH oxidase活性が阻害されたものと思われる．同様の結果をLewisら[27]はディーゼル排気ガス（粉塵濃度1.95mg／m³，NO_2濃度1.5ppm）に2年間暴露したラットのAM中の活性酸素（O_2^-，H_2O_2，·OH，$^1O_2$）の含量をルミノールを用いた化学発光法で測定して，このAMにおける活性酸素の産生阻害，即ち，殺菌作用が低下していることを報告している．

ディーゼル排気ガス暴露の実験開始前には，我々は，L群，M群，H群では食細胞であるAMの増加を予想した．しかし，Fig. 1に示すように，各群のBALF中のAM数には有意な差は認められていない．

次に，本実験のL群，M群，H群，F群で貪食能と生存率に余り変化が認められなかったにもかかわらず，Fig. 5に示すように，lysosome酵素であるacid phosphatase活性がM群，H群のAMで有意な低下を示し，L群でも低下傾向が認められた結果についてふれたい．AM中のacid phosphataseは若いAMほどその活性値は低く，成熟するにつれてその活性値は上昇することが知られている[21]．また，Wellerら[35]はラットにディーゼル排気ガス（0.25又は1.50mg／m³）を1日間，2週間及び12ケ月間暴露し，AM中のacid phosphatase活性を組織化学的に検索した結果，対照群に比べ排気ガス暴露群では暴露を開始した1日目から活性値の低いAMの増加が認められ，それは暴露中では粒子の濃度に依存した量－反応関係を示すことを報告している．即ち，これらの結果は排気ガスを暴露したラットでは恐らく血液由来の単球の肺におけるAMへの分化が促進され，若いAMが占める割合が増加したためと考えられる．Fig. 1に示すように，L群，M群でのAMの生存率の僅かな上昇が認められることは，恐らくAMの破壊に伴って単球のAMへの分化が速くなるためと思われる．一方，H群においては，恐らくその破壊と分化の速度がL群，M群より速いために見掛け上生存率に有意差は認められなかったものと推測される．また，Fig. 2に示すように，L群，M群，H群のAMの貪食能に有意な変化が認められなかったのは若いAMの出現によって貪食能が結果的に補われてた可能性が考えられる．一方，F群でAMの貪食能や生存率に有意な差が認められなかったのは，本実験の条件下におけるNO_2濃度やその他のガス状物質ではあまりAMの貪食能や生存率に影響を与えなかったためと考えた．

東京都における環境調査報告書[36]によれば，浮遊粒子状物質濃度は昭和50年頃をピークにして，年々減少してきているが，昭和52年には浮遊粒子状物質の一日平均値の最大値として0.658mg／m³という濃度が区部の一般環境大気測定局で記録されており，また，NO_2濃度の一日平均値が0.04ppm以上から0.06ppm以下である日数が現在でも100日間を超える地区も存在している．本実験でL群に設定した暴露条件の粉塵濃度は0.608mg／m³，NO_2濃度は0.05ppmであり，比較的大気環境中に近い条件で，zymosan貪食時とPMA刺激時にO_2^-産生能の有意な低下が認められたことは，疫学調査での道路沿道に居住する住民がその後背地に居住する住民に比べて，感染症などを含む呼吸器の病気が増加するという報告[15,16]と考え合せると興味深いものと思われる．

（本研究は昭和61年度当研究所調査研究課題「大気汚染保健対策に関する研究」として実施したものである．）

文　献

1）松下秀鶴：大気汚染のレビュー（ディーゼル排出ガス），昭和59年度環境庁委託業務結果報告書，83-117，昭和60年，日本科学技術情報センター編

2）White, H. J. and Garg, B. D.：*J. Appl. Toxicol.*, 1, 104-110, 1981

3）Barnhart, M. I., Chen, S. T., Salley, S. O. and Puro, H.：*J. Appl. Toxicol.*, 1, 88-103, 1981

4）Hyde, D. M., Plopper, C. G., Weir, A. J., Murnane, R. D. and Pepelko, W. E.：*Amer. Rev. Respir. Dis.*, 127(4), 175, 1983

5）岩井和郎，宇田川忠，山岸正晴，山田博之：大気汚染学会誌，21(1)，38-51，1986

6）Chen, S., Weller, M. A. and Barnhart, M. I.：*Scanning Electron Microscopy*, 3, 327-338, 1980

7）Takemoto, K., Yoshimura, H. and Katayama, H.：*Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust*, Developments in Toxicology and Environmental Science Volume 13, Ed., Ishinishi, N., Koizumi,

A., McClellan, R. O. and Störber, W., 311-327, 1986, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford

8) Mauderly, J. L., Jones, R. K., McClellan, R. O., Henderson, R. F. and Griffith, W. C. : *Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust*, Developments in Toxicology and Environmental Science Volume 13, Ed., Ishinishi, N., Koizumi, A., McClellan, R. O. and Störber, W., 397-409, 1986, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford

9) Störber, W. : *Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust*, Developments in Toxicology and Environmental Science Volume 13, Ed., Ishinishi, N., Koizumi, A., McClellan, R. O. and Störber, W., 421-439, 1986, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford

10) Vineager, A. and Carlson, A. : *Environ. International*, 5, 369-371, 1981

11) Vineager, A., Carlson, A., Pepelko, W. E. and Orthoefer, J. O : *Fed. Proc.*, 40, 593, 1981

12) Wiester, M. J., Iltis, R. and Moore, W. : *Environ. Res.*, 22, 285-297, 1980

13) Lee, I. P., Suzuki, K., Lee, S. D. and Dixion, R. L. : *Toxicol. Appl. Phaomacol.*, 52, 181-184, 1980

14) Chen, K. C. and Vostal, J. J. : *J. Appl. Toxicol.*, 1, 127-131, 1981

15) 東京都衛生局，複合大気汚染健康影響調査検討委員会：昭和57年度複合大気汚染に係る健康影響調査症状調査中間結果報告書

16) 東京都衛生局，複合大気汚染健康影響調査検討委員会：昭和60年度複合大気汚染に係る健康影響調査症状調査総合解析報告書

17) Suzuki, T., Ikeda, S., Kanoh, T. and Mizoguchi, I. : *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 15, 733-739, 1986

18) Johnston, R. D. Jr, Godzik, C. A. and Cohn, Z. A. : *J. Exp. Med.*, 148, 115-127, 1978

19) 大柳善彦，炎症，4(1), 63-73, 1984

20) Taketa, K. and Watanabe, A. : *Biochim. Biophys. Acta*, 235, 19-26, 1971

21) Musson, R. A., Shafran, H. and Henson, P. M. : *J. Reticuroendoth. Soc.*, 28, 249-264, 1980

22) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951

23) Yam, L. T., Li, C. Y. and Crosby, W. H. : *Amer. J. Clin. Pathol.*, 55, 283-290, 1971

24) Knowles, D. M. II, Hoffman, T., Ferrarini, M. and Kunkel, H. G. : *Cell Immunol.*, 35, 112-123, 1978

25) Gardner M. B., Loosli, C. G., Hanes, B., Blackmore, W. and Teebken, D. : *Arch. Environ. Health*, 20, 310-317, 1970

26) Campbell, K. I., George, E. L. and Washington, I. S. Jr. : *Environ. International*, 5, 377-382, 1981

27) Lewis, T. R., Green, F. H. Y., Moorman, W. J., Burg, J. E. A. R. and Lynch, D. W. : *Carcinogenic and Mutagenic* Effects *of Diesel Engine Exhaust*, Developments in Toxicology and Environmental Science Volume 13, Ed., Ishinishi, N., Koizumi., A., McClellan, R. O. and Störber, W., 361-380, 1986, Elsevier Science publishers, Amsterdam, New York, Oxford

28) Ehrlich, R. : *Bacteriol. Rev.*, 30, 604-614, 1966

29) Ehrlich, R. and Henry, M. C. : *Arch. Environ. Health*, 17, 860-865, 1968

30) Henry, M. C., Findlay, J., Spanglar, J. and Ehrlich, R. : *Arch. Environ. Health*, 20, 566-570, 1970

31) Goldstein, E. and Hoeprich, P. D. : *Arch. Environ. Health*, 26, 202-204, 1973

32) 平井圭一，上野總樹，小川和朗：最新医学，35, 718-723, 1980

33) Gee, J. B. and Khandwala, A. S. : *Reticuroendothel. Soc.*, 19, 229-236, 1976

34) McCord, J. M. and Fridovich, I. : *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055, 1969

35) Weller, M. A., Chen, S. and Barnhart, M. I. : *Micron.*, 12, 89-90, 1981

36) 東京都環境保全局大気保全部：大気汚染常時測定局測定結果報告－経年報－（昭和59年度版）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 273-276, 1987

NO_2暴露下でピレン投与されたマウス尿からの変異原物質の検出

福田雅夫*, 加納堯子*

Detection of Mutagenic Compounds in the Urine of Mice administered Pyrene under Exposure to NO_2

MASAO FUKUDA* and TAKAKO KANOH*

Keywords：二酸化窒素 nitrogen dioxide, ピレン pyrene, マウス mouse, 尿 urine, 変異原物質 mutagenic compound

緒　言

近年，ディーゼル車排出ガス中から変異原性の強いニトロアレーンが検出され，その生体影響が多くの機関で検討されている．このニトロアレーンは，物質の不完全燃焼によって生じるばかりでなく，燃焼によって生成した多環芳香族炭化水素（PAH）と大気中のNO_2の反応によっても生ずると考えられている．特に有機性燃焼物に多く含まれているピレンのニトロ化反応は，微量の硝酸やNO_2の存在下でも容易に進行することをPitts[1]や常盤[2]らは報告している．

我々は前報[3]で，ピレンをNO_2暴露下でマウスに投与し，ニトロピレンの生体内生成を示唆した．今回は，生体内生成されたその他の変異原物質の分離同定を試みたのでその結果を報告する．

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．

2）暴露方法

NO_2（20ppm）を3日間吸入させたマウスの腹腔内にピレン（800mg／kg body weight）を投与し，さらにNO_2を暴露しながら24時間尿を採取した．ピレン投与量を前回の2倍に変更した他は全て前報[3]と同様である．

3）尿中変異原物質の分離・同定

12匹分のプール尿15m*l*を用い，前報に準じて抽出を行った．最終的に10倍濃縮した尿を試料とした．フォトダイオードアレイ検出素子によるUV／VISスペクトル検出器を内臓している液体クロマトグラフ（HPLC, Hewlett Packard HP 1090M）を用いて分析を行った．分析条件は，使用カラム；5-ODS-Hカラム（4.6mm×250mm，ケムコ），溶出液；65%メタノール，流速；1.0m*l*／min，カラム温度；50℃，波長；240 nm，注入量；80 μlであった．溶出液をフラクションコレクターで30秒毎に60分間分取した．分取した各々の溶出液はN_2ガス下で濃縮し，その残渣にそれぞれジメチルスルホオキサイド（DMSO）200 μlを加えAmes試験に供した．質量分析用試料は，変異原性を示した分画液を集め，HPLCを用いてくり返し部分精製を行い濃縮して調整した．質量分析計は，日立M-80Bを用いた．分析条件は，イオン源温度；270℃，注入温度；170℃，イオン化電圧；70eVであった．

4）変異原性試験

変異原性試験は*Salmonella typhimurium* TA98株を用いて，preincubation法をとり入れたAmes法[4]で測定した．

結果と考察

NO_2暴露下でピレン投与されたマウス尿には，Fig. 1に示したように強い変異原性が認められ，添加試料の濃度範囲内では添加量に比例して強い変異原性を示した．またS 9 mix存在下の方が非存在下より強い活性を示した．ピレンのみ投与されたマウス尿の変異原性は非常に弱い活性を示したが，コントロールおよびNO_2のみ暴露されたマウス尿は変異原性を示さなかった．

尿に存在する変異原物質を同定するために，試料をHPLCで30秒毎に分取し，各々の分画液をAmes試験に供した結果をFig. 2に示した．上図はピレン投与尿，

*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

下図はNO_2暴露下でピレンを投与した尿のクロマトグラムと各分画液の変異原性のヒストグラムを示した．ピレン投与尿はピークAでわずかな変異原性が認められたが，NO_2暴露下でピレンを投与した尿は4つのピーク（A，B，C，D）に変異原活性がみられた．ピークBはS 9 mix添加時に変異原性が強く，ピークA，C，DはS 9 mix非添加時の方が強かった．

これらのピークA，B，C，Dの変異原物質の同定は，各物質が示すHPLCでの保持時間，UVスペクトル，マススペクトルを標準物質と比較して行った．その結果ピークAは1-ヒドロキシピレン，Bは1-ニトロ-6-または-8-ヒドロキシピレン（以後1-ニトロ-6／8-ヒドロキシピレンと略して2異性体を表記する），Dは1-ニトロ-3-ヒドロキシピレンと同定された．ピークCは標準物質が入手出来ず未同定であるが，文献資料およびそのマススペクトルから1-ニトロ-9-ヒドロキシピレンではないかと推定した．

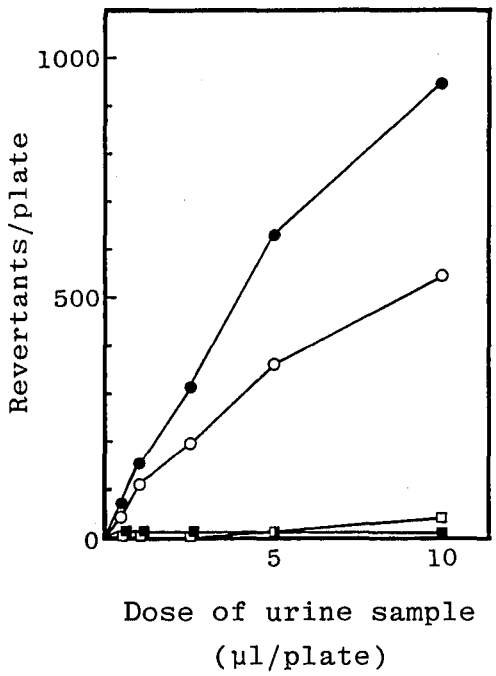


Fig. 1. Dese-response curves of mutagenicity of the urine samples
Symbols : ■, □ urine sample from pyrene-treated mice (■ : TA98 with S9 mix, □ : TA98 without S9 mix); ●, ○ urine sample from pyrene-treated mice under exposure to NO_2 (● : TA98 with S9 mix, ○ : TA98 without S9 mix)

Ballら[5]はラットの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．EL-BayoumyとHecht[6]はラット肝のS 9分画液を用いて1-ニトロピレン（1-NP）を処理し，好気的条件下では，1-NPの芳香環が酸化され，代謝産物として1-ニトロ-3／6／8-ヒドロキシピレンと1-ニトロ-4，5-ジヒドロ-4，5-ヒドロキシピレン（4，5-ジヒドロジオールと略す）が産生されることを報告している．また木内ら[7]は，無菌ラットと通常ラットを用い，1-NPを経口投与して無菌ラットの尿糞中から同じく1-ニトロ-3／6／8-ヒドロキシピレンと4，5-ジヒドロジオールを同定し，通常ラットからは1-NPのニトロ還元体の1-アミノピレン（1-AP）およびアセチルアミノ-3／6／8-ヒドロキシピレンを同定した．一方，岡本および吉田[8]はラット肝のS 9分画液を用いてピレンの代謝産物を調べた結果，1-ヒドロキシピレン，4，5-ジヒドロ-4，5-ジヒドロキシピレンおよび1-6／8-ヒドロキシピレンが検出されたと報告している．

以上の報告から考えると，NO_2暴露下でピレン投与されたマウス尿から検出されたピークB，C，D変異原物質はいずれも1-NPの代謝産物であり，ピークA変異原物質はピレンのみ投与されたマウス尿のピークA変異原物質と共に，ピレンが生体内で水酸化された代謝産物と想定された．ピレンの代謝産物1-ヒドロキシピレンがNO_2暴露下でピレン投与されたマウス尿およびピレンのみ投与された尿から検出されることは容易に考え得る結果であるが，変異原活性の強い1-NP代謝産物が検出された過程は不明である．おそらく生体内で代謝された1-ヒドロキシピレン類が，NO_2によってニトロ化されたのではないかと考えている．ちなみにNO_2暴露下でピレン投与されたマウスの24時間尿，および血液中のNO_2^-，NO_3^-濃度をイオンクロマトグラフ（Yokogawa IC-500）で測定したところ，尿中のNO_3^-濃度は515 μg／ml（コントロール：47 μg／ml），血液中のNO_3^-濃度は19.5 μg／ml（コントロール：6.4 μg／ml）を示した．NO_2^-濃度は，尿・血液とも痕跡程度であった．

NO_2，ピレンは環境中に広く分布しており，これらが生体に摂取されることによって変異原活性の強いニトロヒドロキシピレンが生体内で生成されたことは重要な問題である．これらの物質がどのような機構で生体内に生じるかは目下検討中である．

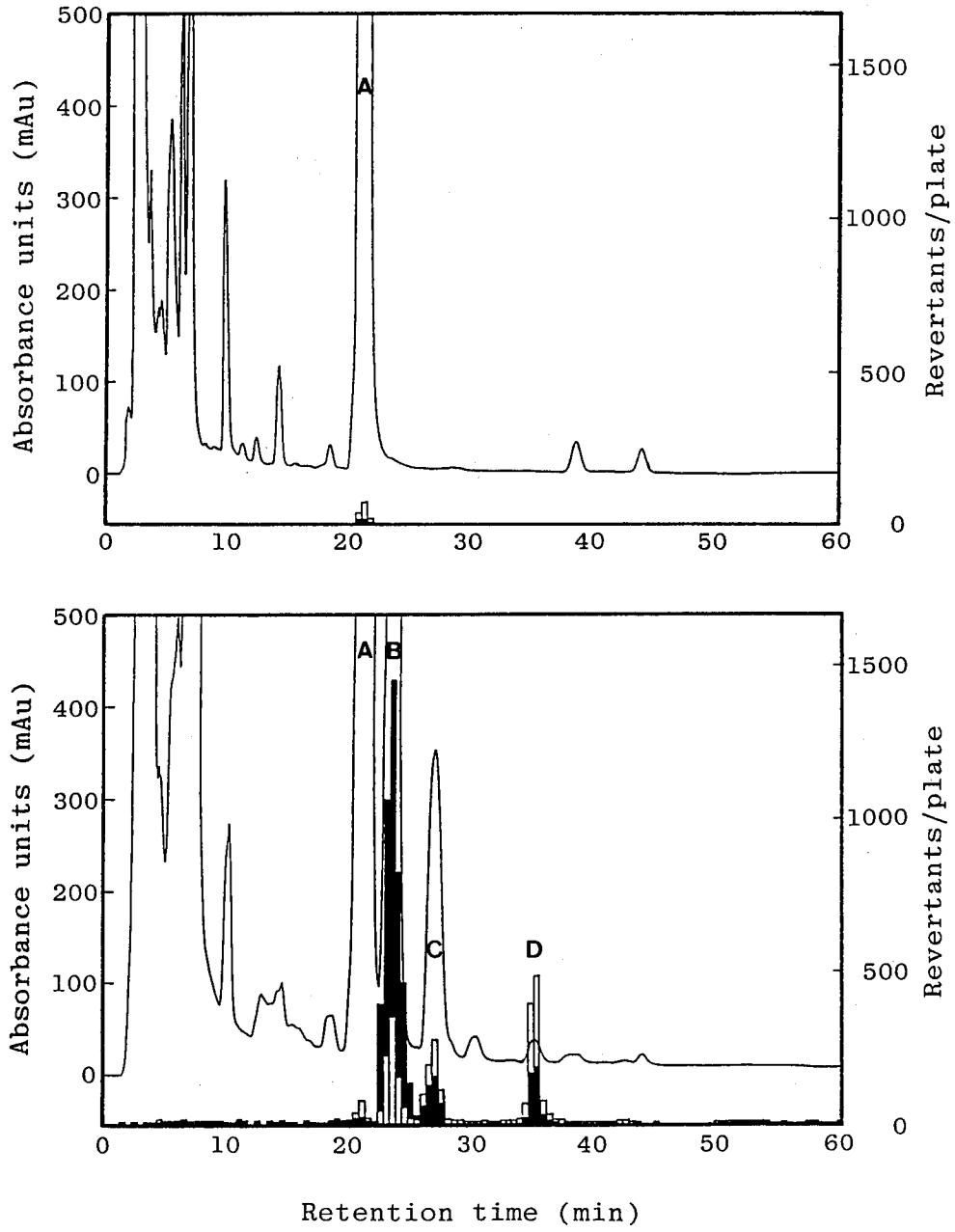


Fig. 2. HPLC profiles and mutagenicity histograms of β-glucuronidase-treated urine samples

The upper and the lower panels show UV absorption and mutagenicity of the urine samples from pyrene-treated mice and pyrene-treated mice under exposure to NO_2, respectively

A : 1-hydroxypyrene
B : 1-nitro-6, 8-hydroxypyrene
C : not identified
D : 1-nitro-3-hydroxypyrene
■ : TA98 with S9 mix
□ : TA98 wiout S9 mix

要　約

大気中に共存するNO_2，ピレンが生体内に侵入した場合，生体内で生成されると思われる変異原物質の同定を行った．20ppm NO_2 4日間暴露下でピレン投与されたマウス尿は強い変異原性を示し，その尿中から次の3物質が確認された．

1）1-ヒドロキシピレン，2）1-ニトロ-6-または-8-ヒドロキシピレン，3）1-ニトロ-3-ヒドロキシピレン

謝辞　実験にご協力いただいた徳島大学医学部大西克成教授，木内武美博士に深謝いたします．

（本研究は昭和61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）Pitts, J. N. Jr., Van Cauwenberghe, K. A., Grosjean, D., Schmid, J. P., Fitz, D. R., Belser, W. L. Jr., Knudson, G. B. and Hynds, P. M.：*Science*, 202, 515-519, 1978

2）Tokiwa, H., Nagasawa, R., Morita, K. and Ohnishi, Y.：*Mutat. Res.*, 85, 195-205, 1981

3）福田雅夫，加納堯子，溝口　勲：東京衛研年報，37, 301-305, 1986

4）Maron, D. M. and Ames, B. N.：*Mutat. Res.*, 113, 173-215, 1983

5）Ball, L. M., Kohan, M. J., Inmon, J. P., Ciaxton, L. D. and Lewtas, J.：*Carcinogenesis*, 5, 1557-1564, 1984

6）EL-Bayoumy, K. and Hecht, S. S.：*Cancer Res.*, 43, 3132-3137, 1983

7）Kinouchi, T., Morotomi, M., Mutai, M., Fifer, E. K., Beland, F. A. and Ohnishi, Y.：Jpn. J. *Cancer Res* (*Gann*), 77, 356-369, 1986

8）Okamoto, H. and Yoshida, D.：*Cancer letters*, 12, 323-327, 1981

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 277-281, 1987

尿中のヒドロキシプロリン，クレアチニン比
—尿採取時間の検討および食事運動等の影響—

池田真悟*，大澤誠喜*，鈴木孝人*，加納堯子*，
溝口勲**

Urinary Hydroxyproline : Creatinine Ratio
—Effects of Meal, Exercise and Urinary Sampling Times—

SHINGO IKEDA*, MASANOBU OHSAWA*, TAKAHITO SUZUKI*,
TAKAKO KANOH* and ISAO MIZOGUCHI**

The effects to urine sampling time, meal and exercise on urinary hydroxyproline to creatinine ratio (HOP／CRE) of healthy adults (28 males and 30 females) were investigated. Urine was sampled four times, i.e. immediately after waking up, in the morning, in the afternoon and after dinner. The HOP／CRE values measured immediately after waking up were significantly higher than those determined at other times which had no significant differences among themselves. Those results were observed irrespective of whether the subjects took normal meals or controlled meals containing no animal protein.

The subjects taking controlled meals had significantly higher HOP／CRE values than those who took normal meal. The respective values of HOP and CRE were higher in the normal meal group than in the controlled group.

The significant difference in HOP／CRE between the early-morning urine and fasting-urine was not observed.

A loading test which was conducted for 30 minutes by riding bicycle attached with an ergometer caused no effects on the urinary HOP／CRE values of the male subjects but an increase was observed in the females.

If the urinary HOP／CRE value is to be used as an indicator of disorders in health due to air pollution, especially as that of the disorder caused by nitrogen oxides, it is recommended that urine samples be taken immediately after waking up in the morning and after proper instructions are given for the meal to be taken on the previous night.

Keyword：urinary hydroxyproline, urinary creatinine, urinary sampling times, meal, exercise

緒　言

尿中のヒドロキシプロリン（hydroxyproline：HOP）の測定は，従来から膠原病，骨腫瘍および肺気腫など主に組織損傷にかかる疾患の補助診断の一つとして開発され測定されている。最近，春日らは[1-3]大気中の窒素酸化物も，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HOPの尿中排泄量を増加させると報告し，さらに尿中HOP値を尿中クレアチニン値（Creatinine：CRE）で補正した値は，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と報告している．我々も大気中窒素酸化物濃度の異なる都内三地区の学童尿中HOPを測定し，窒素酸化物濃度の高い地区は尿中HOP値も高く，大気窒素酸化物濃度と尿中HPO／CRE値の間には，正の相関

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Pablic Health
24－1，Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 160 Japan
**北海道大学工学部衛生工学科

（P＜0.01）があることを報告した[4]．すなわち尿中HOP量は，大気汚染物質特に窒素酸化物による健康障害の指標として有用であると考えられる．

しかし尿中HOP／CRE値は，年齢および食事などによる影響を受けることが報告されていることから，成人健康者の日常生活の中で，どの程度変化するのか，三日間に渡り随時尿を採取し，食事の内容，運動負荷の影響および早朝尿とFasting尿についても検討した．以下その報告である．

調査方法

1．検査材料

被検者は男性28名および女性30名で19～22歳の健常者である。調査期間は59年9月から61年3月までの間で，4名1組として，男性7回，女性8回に分けて調査した．被検者は4名一緒に，35m²室内に三日間居住し，初日は9時より，三日目（終日）は15時まで，随時尿を採取し，尿量を測定した。HOP, CRE測定用尿はその内の10m*l*を用い，分析時まで－20℃で保存した．

1）普通食と制限食

普通食を摂取したグループには，普通一般的な食事を自由に三日間取らせた．制限食を摂取したグループには，三日間努めて，動物性蛋白源すなわち動物，魚の肉類を除いたものを摂取させた。この制限食を受けたグループには，早朝尿とFasting尿の採取および運動負荷試験を行った．

2）早朝尿とFasting尿

実験二日，三日目の朝6時に採尿したのを早朝尿と言う．Fasting尿は起床後，飲食を禁止して普通の状態におき，9時に採尿したものを言う。

3）運動負荷

実験二日目の午後2時30分より30分間，エルゴメーターによる自転車（18km／hr）の運動負荷を実施した．

2．測定方法

1）HOPの測定

HOPの測定法としてProckop法[5]やBergman法[6]およびParekhらの[7]方法がある．著者らはこれらの方法をさらに改良し，簡便，迅速，正確な測定法を見出した．すなわち試料尿を6規定塩酸下110℃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年東京衛研年報に掲載した[8]測定法により，測定した．

2）CREの測定

CREの測定は，尿を10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[9]で測定した．

結果および考察

一日平均のHOP／CRE値は，普通食，制限食を摂取した場合，いずれも一日目，二日目，三日目と日毎に高くなる傾向を示した．男女別に比較するると，普通食を摂取した場合では女が高く，制限食を受けた場合は男が高い傾向を示した（表1）．更にHOP／CRE値を，起床直後，午前，午後，夕食後と採取時間別に区別して見ると，起床直後のHOP／CRE値は他の時間帯に比べ有意に（P＜0.01）高い値を示し，起床直後以外の時間帯のHOP／CRE値間には有意差は見られなかった（表2）．一日平均のHOP／CRE値が一日目，二日目，三日目と順次高い値を示したのは，おそらく一日目の試料にHOP／CRE値が高い起床直後尿が欠損したこと，更に三日目の試料には夕食後の尿が欠損したこと等による影響で検討を要する結果とは思われなかった．

普通食と制限食を摂取した場合のHOP／CRE，HOP，CRE値に有意差が認められ，HOP／CRE値は制限食を受けた場合に，HOPおよびCRE値は普通食を摂取した場合に高い値を示した．体重では男女共に差は無かった．更に一日（24時間）のHOP総排泄量では女性のHOP値に有意差が無く，食事による影響は認められないが，男性のHOP値は5％の危険率で有意差があり普通食の摂取の方が高い値を示した．

CRE値も同様に普通食摂取の方が高かった．CRE係数（CRE値を体重で補正した値）は，普通食の場合，男女共に正常範囲にあるが，制限食を摂取した場合は低値を示したことから，食事特に摂取した食品による影響が大きいと思われた．尿量は男女共に制限食を受けた方が多かったが，有意差は無かった．なを，小林らもHOP／CRE値について同様な報告[10]をしている．

早朝尿とFasting尿の二日目と三日目の検査結果を表4に示したが，早朝尿とFasting尿の測定値には，両者間でまた男女間共に差が認められなかった．

運動負荷実験は，二日目の午後2時30分より，エルゴメーターによる自転車乗（18km／hr）を30分実施した．この運動負荷直前，直後の尿検査の結果では，両者間のHOP／CRE値に有意差は見られない。しかしこの運動をはさんで本実験期間の前期尿と後期尿に分けて，その平均HOP／CRE，HOP，CRE値の差の検討を試みた場合，CRE値は男女共に差はなかったが，HOP，HOP／CRE値は男性の場合にのみ差がなかった．しかし女性の場合は運動後の方が高い値を示した．女性にのみ差が認められた事はこの程度の運動負荷でも，女性の場合は，

表1．尿中の HOP／CRE, HOP および CRE 値　（普通食と制限食摂取間の比較）

		一日目 HOP／CRE μg／mg	一日目 HOP μg／ml	一日目 CRE mg／dl	二日目 HOP／CRE μg／mg	二日目 HOP μg／ml	二日目 CRE mg／dl	三日目 HOP／CRE μg／mg	三日目 HOP μg／ml	三日目 CRE mg／dl
普通食	男20名	10.11±3.12	15.94±6.66	162.91±53.87	12.40±4.19	15.84±6.20	128.31±26.67	12.57±3.86	12.95±5.03	112.40±35.87
	女15名	12.25±4.47	16.95±6.87	146.09±69.96	15.58±3.44	17.87±3.89	120.73±34.22	17.77±3.74	14.66±4.41	84.17±22.42
制限食	男8名	18.50±3.83	9.38±4.57	55.93±29.72	24.74±7.10	10.15±3.70	48.60±20.75	23.23±6.61	11.31±4.36	57.46±21.97
	女15名	17.05±9.06	9.79±4.07	68.86±38.32	19.10±5.27	9.99±3.39	57.53±19.24	22.74±6.89	9.61±4.03	45.95±18.17

表2．採尿時間別の尿中の HOP／CRE, HOPおよび CRE 値

		起床直後 HOP／CRE μg／mg	起床直後 HOP μg／ml	起床直後 CRE mg／dl	午前 HOP／CRE μg／mg	午前 HOP μg／ml	午前 CRE mg／dl	午後 HOP／CRE μg／mg	午後 HOP μg／ml	午後 CRE mg／dl	夕食後 HOP／CRE μg／mg	夕食後 HOP μg／ml	夕食後 CRE mg／dl
普通食	男20名	14.1±3.8	22.2±8.3	163.1±60.3	10.8±3.4	12.2±5.4	110.1±20.3	10.8±4.3	11.6±5.0	113.4±34.8	11.3±3.6	16.2±6.1	146.5±41.9
	女15名	19.8±4.9	12.1±4.7	112.9±30.8	14.3±4.4	12.8±5.1	98.6±44.5	13.8±3.5	13.9±4.2	112.4±49.8	15.1±3.6	19.4±6.3	134.4±43.8
制限食	男8名	27.4±8.0	13.1±5.4	56.8±25.2	18.5±4.5	11.5±3.4	66.2±20.9	19.3±5.3	9.0±3.0	53.9±24.0	21.3±5.4	8.2±3.2	44.5±24.9
	女15名	23.8±8.3	12.7±6.1	60.5±25.3	17.0±5.7	10.6±4.7	64.8±38.0	16.7±3.9	7.5±2.2	52.8±18.6	16.5±3.9	8.3±2.7	55.4±16.4

表3．普通食と制限食を摂取した場合の検査結果

		HOP／CRE μg／mg	HOP μg／ml	CRE mg／dl	体重 Kg	CRE 係数	一日（24時間）の排泄量 HOP mg／day	CRE mg／day	尿量 ml／day
普通食	男20名	11.72±3.74	15.40±6.08	133.91±39.06	67.95±8.98	22.55±2.91	21.86±6.21	1464.25±283.54	1533.4±373.49
	女15名	15.48±3.99	15.52±5.08	115.79±42.21	54.20±6.95	19.68±2.34	18.64±3.79	1199.41±152.94	1210.5±387.08
制限食	男8名	21.89±5.82	10.37±3.95	55.68±23.95	63.37±12.37	13.66±3.77	16.44±5.34	843.38±187.24	1671.5±551.48
	女15名	19.06±6.24	9.79±3.86	54.92±24.91	51.07±5.43	11.71±3.36	17.03±3.30	762.20±174.91	1472.9±454.87
平均値の差の検定	男	P<0.001	P<0.05	P<0.001	N.S	P<0.001	P<0.05	P<0.001	N.S
	女	P<0.05	P<0.01	P<0.001	N.S	P<0.001	N.S	P<0.001	N.S

（N.S：no significant）

表4．早朝尿とFasting尿の結果

		HOP／CRE μg／mg	HOP μg／ml	CRE mg／dl
早朝尿	男8名	26.45±8.29	14.99±8.67	62.87±41.95
	女14名	23.66±9.04	13.79±8.66	66.38±40.10
Fasting尿	男8名	27.98±10.03	11.31±6.13	43.50±20.94
	女14名	24.51±9.65	11.31±5.45	51.05±25.89

表5．負荷運動前後の検査結果

		HOP／CRE μg／mg	HOP μg／ml	CRE mg／dl
運動負荷直前尿	男4名	16.63±9.35	7.00±0.61	50.50±21.29
	女4名	14.43±2.89	9.15±1.33	64.50±8.69
運動負荷直後尿	男4名	17.80±6.77	7.76±2.98	46.25±26.88
	女4名	13.13±3.32	6.38±1.85	48.75±10.87
平均値の差の検定	男6名	N.S	N.S	N.S
	女6名	N.S	P＜0.05	N.S
運動負荷前期尿	男4名	17.33±10.05	12.81±3.49	84.11±31.89
	女4名	16.84±2.21	7.75±0.75	51.20±25.44
運動負荷後期尿	男4名	21.57±8.92	11.83±2.83	57.97±14.39
	女4名	24.97±5.35	10.31±1.35	46.65±2.75
平均値の差の検定	男6名	N.S	N.S	N.S
	女6名	P＜0.05	P＜0.02	N.S

（N.S　no significant）

尿中HOP／CRE値に影響する事を示している．

一般に，食事のとり方は尿中HOP／CRE値に与える影響は大きく，運動ではそれ程大きくないものと思われた．

これらの結果より，大気汚染特に窒素酸化物による健康障害の指標として，HOP／CRE値を測定する時には，起床直後の朝一番尿で測定するほかに，前夜から食事の献立を指示する事が望ましいと考えた．

要　約

尿採取時間，食事内容および運動等が尿中のHOP／CREに与える影響について，成人健康者で検討した．

尿採取時間を，起床直後，午前，午後，および夕食後の四時間帯に分けて尿中のHOP／CRE値を検討した所，起床直後の値が他の時間帯の値と比較して有意に高い値を示した．起床直後以外の時間帯の値間には差は無かった．この結果は普通食と動物性蛋白源を除いた制限食を摂取した場合でも同じであった．

普通食と制限食を摂取した場合のHOP／CRE値を比較して見ると，制限食を摂取した場合の方が有意に高い値を示し，HOP値，CRE値は普通食を摂取した方が高い値を示した．

早朝尿とFasting尿中のHOP／CRE値には差は認められ無かった．

エルゴメーターによる自転車乗（18km／hr）の運動負荷を30分行った場合，尿中HOP／CRE値への影響は，男性では認められないが，女性では負荷後に高い値が認められた．

大気汚染特に窒素酸化物による健康障害の指標としてHOP／CRE値を測定する場合には，起床直後の尿を用いて検査するほか，前夜から食事を指導する事が望ましい．

文　献

1）松木秀明，逢坂文夫，春日　斉，杉田　稔：日本公衛誌，28，505-515，1981.

2 松木秀明，春日 斉，逢坂文夫，柳沢幸雄，西村肇：日本公衛誌，30，166-176，1983.
3）松木秀明，春日 斉，逢坂文夫，柳沢幸雄，西村肇：日本公衛誌，32，542-559，1985.
4）池田真悟，鈴木孝人，溝口 勲：東京衛研年報，37，288-292，1986.
5） Prockop, D. J. and Udenfriend, S. :*Anal. Biochem.* 11.228-239, 1960.
6） Bergman, I. Loxley, R. : *Clin. Chim. Acta.* 27, 347-349,1970.
7） Parekh, A. C. and Jung, D. H. :*Bio. Med.* 4, 446-456,1970.
8）池田真悟，鈴木孝人，加納堯子，溝口 勲：東京衛研年報，36，277-282，1985.
9） Cook, J. G. H.：*Clin. Chim. Acta*,32, 485-491,1971.
10）小林友美子，三浦公司，岡崎 勲，近藤東郎：日衛誌，41-1，401，1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 282-285, 1987

残留多環芳香族炭化水素測定用試料としてのホルマリン保存臓器の有用性

瀬戸　博*, 長嶋親治*, 加納堯子*

Availability of Formalin-Fixed Lung as a Sample for Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Residues

HIROSHI SETO*, CHIKAHARU NAGASHIMA* and TAKAKO KANOH*

Utilization of the formalin-fixed lung as a sample for determination of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) residues was investigated. There was no reduction of PAHs in the rabbit lung by formalin fixation for 2weeks. While the PAH contents in the human lung fluctuated, no significant loss of PAHs was recognized throughout the fixation period (1-42weeks). Obstacle peaks on the chromatogram disappeared as a result of formalin fixation. PAHs exuded from the lung into the fixing fluid were negligible. It is concluded that the formalin-fixed lung is useful for residual PAH determination.

Keyword: benzo [a] pyrene, benzo [k] fluoranthene, benzo 〔g, h, i〕perylene, formalin fixation, lung

緒　言

最近，わが国における肺がん死亡率が上昇している[1,2]が，その要因の一つとして，喫煙および大気汚染が指摘されており[3-6]，公衆衛生上大きな問題になっている。たばこ煙中および自動車排気ガス中には発がん性のある多環芳香族炭化水素（polycyclic aromatic hydrocarbons 以下 PAHs と略す）が含まれていることから，これらと肺がんとの因果関係の解明は健康対策として急務であるとされている。

環境中の化学物質の健康影響を疫学的に評価するには，まずその Dose を明きらかにすることが必要である。Dose を推定する方法には(1)大気，飲料水，食品中の化学物質濃度および個人の生活習慣などを考慮して計算する方法と，(2)血液，尿，毛髪，臓器など生体試料中の化学物質濃度を測定し，生物学的半減期などを考慮して計算する方法がある。前者は大部分の化学物質に適用できるが，個体の Dose の推定という点では間接的であるのに対し，後者はより直接的だが代謝の比較的遅い化学物質に限られるという制約がある．PAHsの場合，ディーゼル排ガス粒子と共に肺に吸入したベンゾ〔a〕ピレン（Bap と略す）は1時間以内の半減期で急速に排出される phase と約18日の長い半減期で排出される2つの phase を持つ[7]という報告があることから，肺臓中の Bap 量を測定して Dose を推定することも可能であると考えられる．

ヒトの肺臓中の Bap 濃度を測定し，肺がん，喫煙習慣および住居環境との関係を検討した報告[8,9]は若干ある．しかし，肺に残留する PAHs 量は非常に微量であることから測定精度を高く保つ必要があるが，十分なクリーンアップ，高い分離能を持つクロマトグラフィー，選択性のある検出器を使用して測定した信頼できる文献は極めて少ない．人体臓器が入手しにくいうえ腐敗，酵素の影響，凍結による水分含量の変化など，保存上にも問題があることが研究例の少ない一因であろうと思われる．

そこで今回，病理解剖に付され，ホルマリン保存された臓器を試料として，PAHs を測定する場合の問題点を検討したところ，被検材料として有用であることが確認されたので報告する．

実験方法

1．試料

ヒト肺臓：都内某病院より供与を受けた（病死した男子　64歳）．約25g ずつを精秤し，150m*l* のホルマリン固定液（3％ホルムアルデヒド）とともに遮光した広口

*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

ビンに入れ，密栓して冷暗所に保存した．ウサギ肺臓：日本白色種ウサギ（体重2.3～2.6kg）に1％プルロニックを含む生理食塩水1 m*l*中に懸濁させたベンゾ[k]フルオランテン（Bkfと略す），Bap，ベンゾ[g, h, i]ペリレン（B(ghi)pと略す）の各0.1，0.1，0.5mgを耳静脈より注入した．18時間後，頸動脈切断により放血屠殺し肺臓を取り出し重量を測定した．片肺はただちに分析に供し，残りの片肺はホルマリン処理2週間後に分析した．

2．試薬

PAHs標準溶液—Bkf：RK Chemical Co.製，Bap：和光純薬工業㈱製，B(ghi)p：Aldrich製の各50mgを100m*l*のn-ヘキサンに溶解させ0.5mg／m*l*の各標準原液を調製した後，n-ヘキサンで適宜希釈混合して調製した．その他の試薬は，市販の特級を，溶剤類は残留農薬分析用または液体クロマトグラフ用を使用した．

3．装置

高速液体クロマトグラフ：島津製作所製LC-2，けい光検出器：同 RF-500

4．分析法

肺臓中のPAHsの分析は尾花らの方法[10]に準じた．遮光するため褐色のガラス器具を使用した．ホルマリン固定液中のPAHsの分析については，100m*l*のn-ヘキサンで2回抽出後，2層カラムクロマトでクリーンアップをした．以下，臓器の場合と同様な分析操作を行った．

分析条件—カラム：Nucleosil 7 C-18，4.6mm id×25cm＋ガードカラム5cm，移動相：75％アセトニトリル／水，流速：1.5 m*l*／min，温度：40℃，注入量：50 μl，検出器：Ex 365 nm, Em 430 nm, gain：10, Range：4

添加回収実験—ホルマリン固定したヒト肺臓の細片25gにPAHsを50～500ng添加し，混和した後分析した．

結果および考察

標準物質のクロマトグラムをFig. 1に示した，3種類の物質は20分以内で溶出し，かつ完全に分離した．また，Fig. 2に示すように検量線についても良好な直線性が得られた．絶対最少検出量は，Bkf 10pg，Bap 6.4 pg，B(ghi)p 60 Pg（但しS／N2）であった．したがって，実験試料についても同様のS／Nで分析可能と考えれば，試料量50gを処理し，最終検液1 m*l*のうち50 μlを注入すれば，Bkf 4 Pg／g, Bap 2.6pg／g, およびB(ghi)p 24 pg／gまで検出できることになる．これは，日本人の肝臓中のPAHs濃度[11]から類推すると十分な感度である．

回収実験の結果をTable 1に示した．各物質共87％以上で回収された．

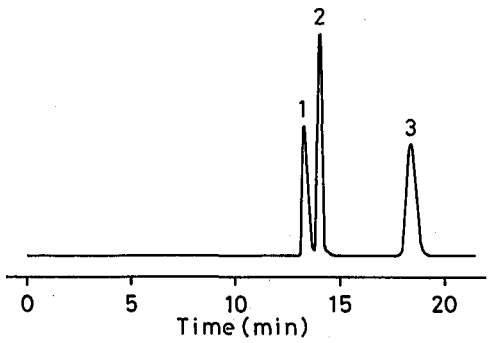


Fig. 1．HPLC Chromatogram of PAHs.
Operating conditions – column : Nucleosil 7C – 18 (4.6mm i. d. X 5 cm, 25 cm), mobile phase : acetonitrile – water (75 : 25), flow rate : 1.5 m*l*/min, temperature : 40℃, detection : Ex 365 nm, Em 430 nm.
1 : Bkf, 2 : Bap, 3 : B (ghi) p

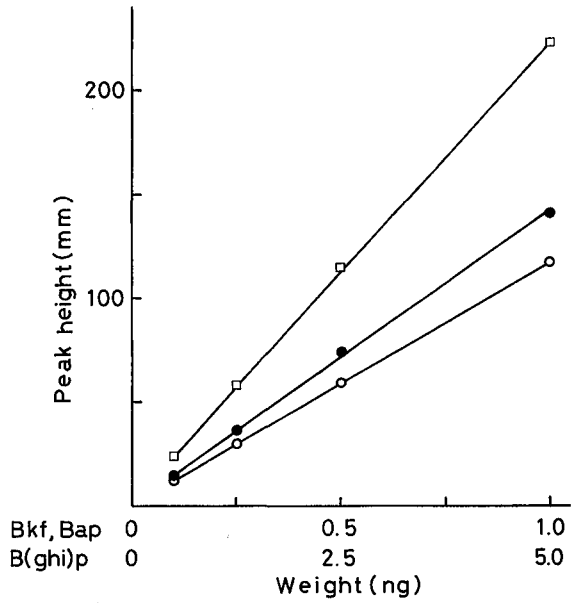


Fig. 2．Calibration Curves for the Determination of PAHs.
●：Bkf, □：Bap, ○：B (ghi) p

Table 1．Recoveries of PAHs Added to Formalin – Fixed Lung

Compound	Added (ng)	Recovery (%)	C. V. (%)
Bkf	50	87.6±3.1	3.5
Bap	50	87.8±5.4	6.2
B(ghi)p	250	93.7±4.3	4.6

Each value is mean of four determinations.

PAHs を投与したウサギの肺について，ホルマリン固定の影響を調べた（Table 2）．バラツキはあるものの2週間のホルマリン固定によって PAHs 濃度が減少する傾向はみられなかった．バラツキの原因は PAHs が肺各部に均一に蓄積しないにもかかわらず，片肺ずつを振り分けて試験に供したためと思われる．

ヒトの肺についてさらに長期間にわたるホルマリン固定の影響を調べた（Fig .3）．各物質とも42週経過しても減少する傾向はなく，一定範囲内での変動を繰り返した．ホルマリン固定液には，PAHs はまったく検出されなかった．

Table 2. Effect of Formalin Fixation on the PAH Levels in Rabbit lungs

Compound	Before fixation (ng/g)	After fixation (ng/g)
Bkf	10.8	11.6
Bap	2.3	2.0
B(ghi)P	1040	1200

Each value is the mean of double determinations (two rabbits).

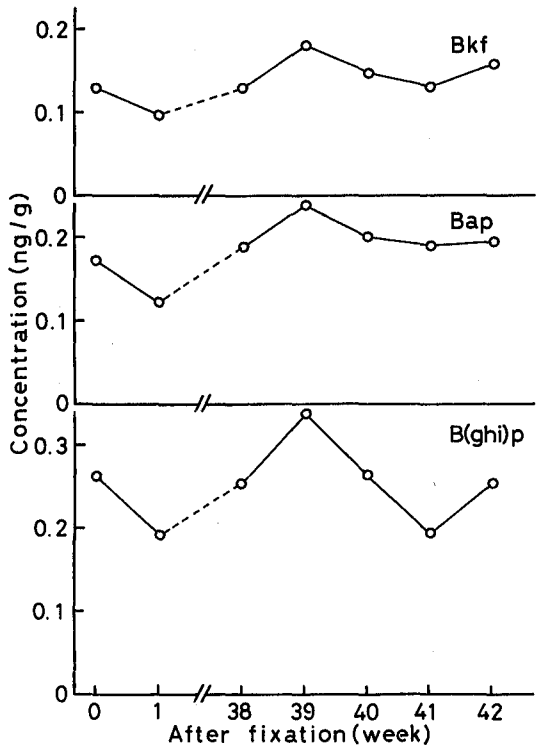


Fig. 3. Changes of PAHs Contents in the Human Lung During Formalin-Fixation.

ホルマリン固定による影響を PAHs のクロマトグラムでみたのが Fig. 4である．ピークNo. 1，2，3，の PAHs はほとんど変化がないのに対して，ピークNo. 1以前に溶出する複雑なピークの大部分がホルマリン固定期間中に消失した．その結果，ピークNo. 1，2付近のベースラインが下がり，分析上好都合であった．この効果は，ホルマリン固定1週間後の試料で認められ，42週後でも変わらず続いていた．これらの消失したピークが何かは不明だが，逆相系モードで比較的早く溶出していることから極性が強い物質であるといえる．

これらの結果は，生体膜内の物質の極性溶媒への移動の難易さがもたらしす現象として説明できる．すなわち，PAHs は典型的な非極性物質で水のような極性溶媒には親和性がなく，ホルマリン固定液にはほとんど溶解せずに臓器中の脂肪部分に残留する．しかし，低分子量の非固定極性物質は膜を介して速やかに水溶液中に拡散し臓器から排出されるものと考えられる．

ホルマリン固定のその他のメリットとして，分解酵素

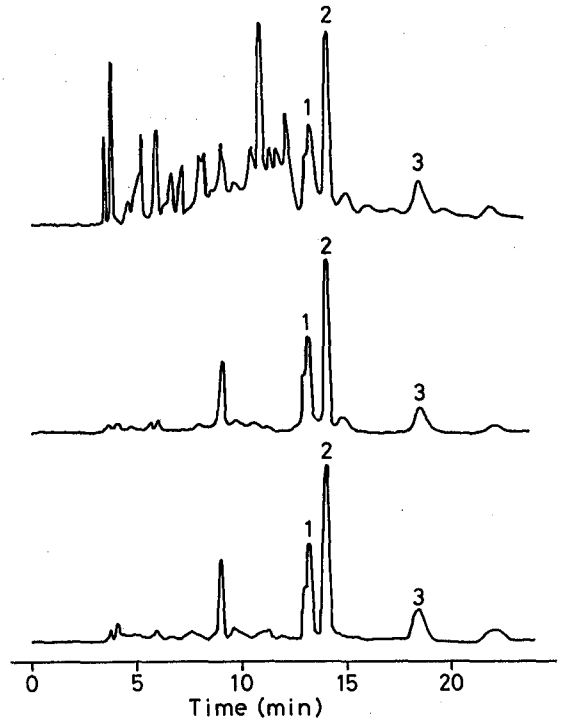


Fig. 4. Changes of HPLC Chromatograms of PAHs from Human Lung During Formalin-Fixation.
Top : before fixation, Middle : after 1 week, Bottom : after 40 weeks.
1 : Bkf. 2 : Bap, 3 : B (ghi) p

が失活すること，病原性菌が死滅すること，腐敗しないことなどがあげられる．デメリットとして　水分含量の変動があげられる．そのため，水分含量を測定し，数値を乾燥重量あたりのPAH量で表す必要がある．

保存中のPAHsの分解についてはほとんど無視できることがわかった．しかし，PAHsは光により分解する[12,13]ので遮光したり，冷暗所に保存する配慮が必要である．

以上の結果からホルマリン固定した肺臓はPAHsの分析試料として有用であり，むしろメリットが多く分析上好都合であった．さらに長期間保存の影響を調べる必要がある．また，他の臓器についてもPAHsの他，PCB等の有機塩素系物質や重金属の被検材料としての有用性を検討していく予定である．

文　献

1）厚生省編：国民衛生の動向，53-55，1986

2）加納克己，下条信弘，佐野憲一，山口誠哉：日衛誌，41，496，1986

3）清水忠彦：大気汚染研究，10，779-783，1976

4）竹本和夫：大気汚染研究，10，763-769，1976

5）Amasa F. B. and Blalik O.,：*Arch. Environ. Health*, 35, 350-359, 1980

6）Vena J. E.：*Am. J. Epidemiol.* 116, 45-56, 1982

7）Sun J. D., Wolff R. K., Kanapilly G. M., and Mc Clellan R. O.：*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 73, 48-59, 1984

8）Tomingas R.; *Roczn. Panst. Zakl. Hig.*, 36, 262-268, 1985

10）尾花裕孝，堀伸二郎，田中涼一，樫本隆：食衛誌，25，35-40，1984

11）Obana H., Kashimoto T., and Kunita N.：*Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 27, 23-27, 1981

12）環境庁編：昭和56年度化学物質分析法開発調査報告書，1982

13）環境庁編：昭和57年度化学物質分析法開発調査報告書，27-33，1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 286-289, 1987

東京湾の環境汚染モニタリング調査（第5報）昭和60年度スズキおよびウミネコの調査結果について

瀬戸　博*，加納堯子*

Survey of Chemical Pollutants in Biota from Tokyo Bay (V) Residue Levels in Japanese Sea Bass and Gull in 1985

HIROSHI SETO* and TAKAKO KANOH*

The levels of 36 chemical pollutants in japanese sea bass (*Lataolabrax japonicus*) and black-tailed gull (*Larus crassirostris* Vieillot) collected from Tokyo bay in 1985 were determined. Nineteen chemicals were detected in the fish muscle. It is noteworthy that 1,2,4-trichlorobenzene and dichlorobenzene isomers were detected in all the samples, While these compounds were not found in the sea bass from other sea areas of Japan. The most remarkable feature about the gull samples was unusual levels of DDT (0.043 ppm) and DDD (0.099 ppm), Which had been below 0.001 ppm during the past three years (1982 to 1984). This indicates that some of the gulls must have been exposed to DDT somewhere in their wintering places.

Keywords：pollution, chlorinated hydrocarbon, sea bass, gull

1978年以来，東京湾の環境汚染モニタリングが実施され，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[1-4]．

既に使用禁止措置がとられたPCB, HCH（BHC）類，DDT類，ドリン類，HCBは減少傾向が続いている．なかでもHCH類，およびHCBについては昭和59年度の調査で，スズキからはまったく検出されなかった．

一方，注意すべき汚染物質もある．本調査においても高い頻度で検出されたクロルデン類は，毒性が強く，難分解性で，生物濃縮性が明きらかになったことから，昭和61年9月に「特定化学物質」に指定された．また，東京湾産のスズキからはジクロロベンゼン，1，2，4-トリクロロベンゼンなどの塩素化ベンゼン類が高い頻度で検出されている．さらに，最近，魚網防汚剤に使用されるトリブチルスズ化合物による汚染が問題になっている．

このような新らしい環境汚染に対応し，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60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60年9月，千葉県富津沖で捕獲された20尾を重量の順に4尾ずつまとめ5検体とした．ウミネコは，昭和60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Toble 1，2に示した．

分析方法　環境庁で定めた分析法[5]により行った．詳細な操作法，分析条件は報告書[6]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．

試薬は前報[4]と同様のものを使用した．

分析装置は前報[4]のものの他，ヒューレット・パッカード社製HP-5890A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Fig. 1に示す．

PCB濃度は，0.09ppmでひきつづき漸減傾向にある．DDT類濃度は，ほぼ前年並みであった．前年検出され

*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 = 4)

Group No.	body weight (g)	length*(cm)	water (%)	fat (%)
1	814±22	37.1±0.5	75.8	2.95
2	766±20	36.9±1.0	75.8	2.91
3	699±18	35.4±0.9	75.5	3.07
4	638±34	33.6±1.3	75.6	3.19
5	594± 8	34.1±0.5	76.0	2.63
mean	702	35.4	75.7	2.95

*：not included the part of tail fin

Table 2. Constitution of the Sample (Black-Tailed Gull) and Water and Fat Contents of the Muscle. (n = 7)

group No.	sex	body weight (g)	wing length (cm)	water (%)	fat (%)
1	male	657±19	36.6±1.1	67.7	6.40
2	male	616±12	36.5±2.0	69.4	5.94
3	male	579±10	36.1±1.0	65.4	5.64
4	female	574±32	35.6±0.7	66.7	4.79
5	female	504±18	33.8±2.3	69.9	5.64
mean		586	35.7	67.8	5.68

なかったβ-HCH，ヘプタクロルエポキシド（HCE），HCBがごく低濃度で検出された．この結果は，これらの物質の汚染が進行したのではなく，今回の試料に供されたスズキの体重が，過去2～3年のスズキの約2倍とかなり大きいことから，化学物質の取り込み量が多いためと思われる．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高いレベルを示した．

東京湾の汚染程度を他水域と比較するために，ほぼ同時期にサンプリングされた他水域のスズキの分析結果[7]をFig. 2に示す．

各水域により汚染物質の蓄積パターンに特徴がみられた．PCBは瀬戸内海産のスズキが極端に高い．DDT類は瀬戸内海，四万十川河口，薩摩半島西岸で高く，農業用として過去に大量に使用されたことを反映していると考えられる．他方，主としてシロアリ駆除用として使用されているクロルデンは，大阪，東京など大都市を控えた湾のスズキから高濃度で検出されている．塩素化ベン

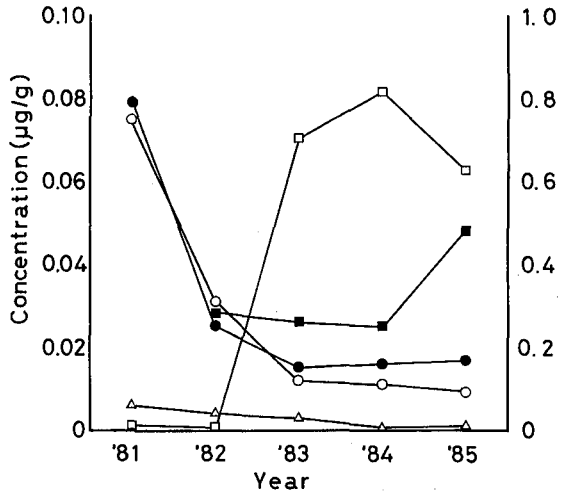


Fig. 1. Annual Changes in Concentrations of the Selected Chemical pollutants in sea Bass Collected from Tokyo Bay.
○ : PCB, right, ● : total DDTs, △ : dieldrin,
□ : total chlorobenzenes (Cl= 2 ~ 5),
■ : total Chlordanes

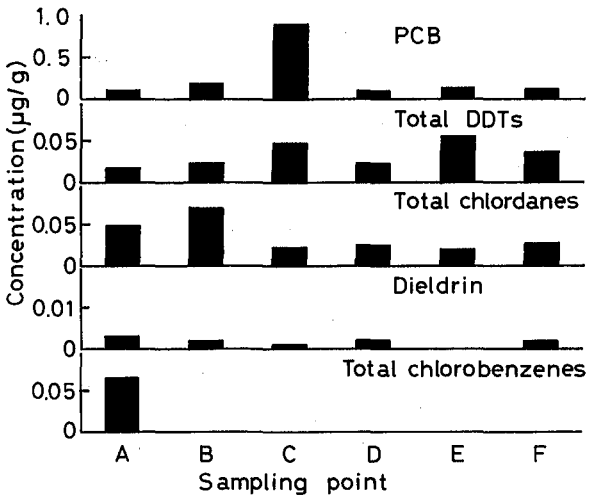


Fig. 2. Levels of the Selected Chemical Pollutants in Sea Bass Colleted from Different Areas.
A : Tokyo Bay, B : Osaka Bay, C : The Inland Sea, Seto, D : offshore of Shimane Peninsula, E : Estuary of Shimanto River, F : West Sea of Satsuma Peninsula

Table 3. Concentrations of Pollutants in Muscle Tissues of Sea Bass and Black – Tailed Gull.
(PPm on wet weight basis) compound

compound	Sea Bass		Black – Tailed Gull	
	range	mean	range	mean
PCB	0.08—0.10	0.09	1.4—2.1	1.7
PCN	nd*1	nd	nd	nd
α – HCH	nd	nd	nd	nd
β – HCH	0.001—0.002	0.001	0.029—0.043	0.037
γ – HCH	nd	nd	nd	nd
δ – HCH	nd	nd	nd	nd
aldrin	nd	nd	nd	nd
dieldrin	0.003—0.004	0.003	0.019—0.031	0.024
endrin	nd	nd	nd	nd
o, p′ – DDT	nd	nd	nd —0.022	—
p, p′ – DDT	0.001—0.003	0.002	0.001—0.043	0.011
o, p′ – DDE	nd —0.002	—	nd	nd
p, p′ – DDE	0.009—0.014	0.011	0.22—0.61	0.37
o, p′ – DDD	0.001	0.001	nd —0.031	—
p, p′ – DDD	0.003—0.004	0.003	0.001—0.099	0.023
heptachlor	nd	nd	nd	nd
HCE	0.001—0.002	0.002	0.008—0.014	0.011
t – chlordane	0.004—0.006	0.005	0.001	0.001
c – chlordane	0.013—0.018	0.015	0.013—0.017	0.016
t – nonachlor	0.016—0.023	0.020	0.10—0.15	0.13
c – nonachlor	0.006—0.007	0.006	0.027—0.054	0.038
oxychlordane	0.001—0.002	0.002	0.021—0.046	0.034
DnBP	nd*2	nd	nd	nd
DEHP	nd*2	nd	nd	nd
TBP	nd*1	nd	nd	nd
o – DCB	0.02—0.06	0.03	0.04—0.06	0.05
m – DCB	0.02—0.06	0.03	0.04—0.06	0.05
p – DCB	nd—0.02	—	0.02—0.03	0.02
1,2,3 – TrCB	nd	nd	nd	nd
1,2,4 – TrCB	0.002—0.004	0.003	0.003—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 —0.002	—
HCB	nd—0.001	—	0.009—0.014	0.011

nd : <0.001, nd*1 : <0.01, nd*2 : <0.1

ゼン類は東京湾のスズキからのみ検出されているが，発生源，環境生態系への影響については不明の点が多い．今後の多面的調査研究が必要である．

ウミネコについて ウミネコの一部の検体で DDT 類の異常な高値が記録された．前年度の *p, p′*-DDT, *p, p′*-DDD は検出限界以下だったが，今回の調査では一つの検体がそれぞれ0.043ppm, 0.099ppm を示した．一検体は7羽分の胸筋から成っていることから，中にはより高度に汚染された個体もあることが容易に想像される．

DDT は我国に於いては昭和46年に全面的が禁止され

た物質で，その環境中および生物中の残留濃度は年々低下してきた．今回の調査で突然DDTレベルが上昇した原因は明らかではないが，冬期に南方へ渡行した際の曝露が考えられる．しかし，日本国内での局地的な汚染を受けた可能性が全くないわけではない．海流または魚介類を媒介して汚染が拡散することが考えられるので日本近隣の諸外国に於ける化学物質の規制やその使用状況にも関心を払う必要がある．他の汚染物質については例年とほぼ同程度の汚染濃度で特別な変化を示すものはなかった．

なお，本調査は衛生局医療福祉部公害保健課と協力して実施したものである．

文　献

1）瀬戸　博，加納堯子：東京衛研年報，34，260-263，1983
2）瀬戸　博，加納堯子：東京衛研年報，35，316-320，1984
3）瀬戸　博，加納堯子：東京衛研年報，36，，300-303，1985
4）瀬戸　博，加納堯子：東京衛研年報，37，，331-335，1986
5）環境庁編：生物試料中化学物質系統分析法，1984
6）東京都立衛生研究所：昭和60年度生物指標環境汚染調査報告書，1986
7）環境庁編：化学物質と環境，No.12，1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 290-295, 1987

メチル水銀毒性に対する補助栄養の影響

関　比呂伸*, 加納堯子*, 田村行弘**, 深山智代***

Effects of Supplementary Nutrition on Methylmercury Intoxication of Rats

HIRONOBU SEKI*, TAKAKO KANOH*,
YUKIHIRO TAMURA** and TOMOYO MIYAMA***

On metylmercury intoxication, food intake and body weight of experimental animals decreased, the animals weakened and eventually died. We conducted studies to examine effects of milk as supplementary nutrients fed to rats.

Four weeks old Wistar strain male rats were divided into 3 groups : Group A received 20 ppm methylmercury chloride (MMC) (an experimental diet) ; group B, the combination of 20 ppm MMC, and milk ; and group C an MMC-free experimental diet and served as a control. In the milk-fed group, toxicological effects of MMC were significantly lower than the group A with respect of body weight, manifestation of neurological signs and mortality. Selenium, milk casein, vitamins, cystine, various metal elements and increased calorie intake are considered to be factors that suppress the development of methylercury intoxication.

Keywords : methylmercury, supplementary nutrition, milk, neurological signs, body weight, mortarity

緒　言

メチル水銀毒性についての動物実験は，多くの研究者によって報告されている[1-3].

また，メチル水銀の毒性緩和因子として，セレン[4-6]をはじめとして，栄養学的な面からは，実験動物に与える飼料の種類[7,8]とその組成（飼料中のタンパク源などの成分[9,10,13-16]およびその含量[9-12]の違い）および食物繊維・ビタミンE等の添加物[9,17-21]などが検討されている.

メチル水銀の毒性は subicinical な状態から，最終的には実験動物の衰弱死により判定される．その死亡はメチル水銀の直接作用による場合と，神経症状（後肢の交差・歩行マヒ）の発現などによって飼料摂取が不可能になった場合の衰弱死とがある[22-28].

今回の実験の目的は，メチル水銀含有飼料を与えた群と対比して，カロリー補給として粉乳を飲水に溶かして与えた場合のメチル水銀毒性の緩和作用，すなわちメチル水銀中毒の進展抑制による延命効果を検討した.

方法・材料

ウイスター系雄性ラット（日本クレア K.K.）56匹（体重69±3g）4週令を3群に分け，A群は塩化メチル水銀20ppm 含有飼料投与群，B群はA群の実験飼料投与とミルク飲料水投与群，C群は基本飼料投与のコントロール群で，各群とも10週間自由摂取させた.

A，B，Cの3群に使用した基本飼料は，飼料中のセレンがメチル水銀の毒性を修飾することから[10-15]，低濃度セレン含有飼料とするために日本クレア社繁殖用飼料 CA-1成分より，魚粉・フスマ・小麦を除き，代りにカゼイン25％とコーンを加えて調整した飼料である[10]. A・B群は，この基本飼料に塩化メチル水銀を水銀として20ppm となるように添加し調整した.

A・C群の飲料水は水道水を自由摂取させた．B群には飲料水にかえて，調整粉乳（520kcal／100g）15g を100ml に溶かしたミルクを10週間与えた.

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1
*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
***日本女子体育大学

実験動物室は，8時間照明で，温度22±2℃，湿度60±5％とした．

飼育は，ラット用金網ケージに5匹入れて行った．

実験期間中の観察項目は，週2回の体重測定と水の消費量・飼料摂取量の測定（エサ箱の重量変化），およびラットのメチル水銀中毒に特有な神経症状の尾の旋回現象[22,29]，後肢の交差およびマヒ[30,31]を指標として週3回観察した．

統計処理は，Welch の方法を用いた．

結　果

Fig. 1 に示したように，体重の変化は，A，B群はコントロールのC群と比べて1.5週目より有意な（$P<0.01$）体重減少が認められた．またB群は2週目からA群よりも平均体重が増加し，4週目より有意な（$P<0.05$）増加が認められた．しかし，B群は5.5週目より体重増加がプラトーに達したが，またA群は5週目にプラトーに達しその後減少していった．

エサの摂取量（Fig. 2）では，A群は3週目に一度急激な落ち込みがみられた．（この原因は不明であるが，この週の体重は前後の週と比べて低い増加率を示した．）その後4週目に最大摂取量を示し，以後再び6週目まで減少が続いた．6週目以後の摂取量の増加は，神経症状発現によりラットの手によるエサ保持能が低下し，ケージ下へ飼料の落ち込みが多くなったことによる見かけ上の摂取量増加である．B群は2週目に最大摂取量を示した後，8週目まで徐々に減少し続けた．8週目以後の増加は，A群と同様食いこぼしの増加によるものである．C群のエサ摂取量は成長とともに増加し続け，約21gでプラトーに達している．

累積摂餌量を Fig. 3 に示した．3週目まではA・B群とC群の累積摂餌量は，ほぼ同等量であったが，3週目以後はA・B群とC群との差はより広がった．A・B群間ではA群の方が多いが，ほぼ同様の累積曲線を示していた．一週間毎のエサ摂取量もA・B群間の差は（最初の6週間において）一日一匹当りの平均1.8g（0.7～3.4g）でほぼ同量であった．

飲水量（Fig. 4）は，エサの摂取量とほぼ同様の増減曲線を示していた[25]．

尾の旋回現象（Fig. 5）では，A群が先に発症し始め（39日目）100％発症日は46日目，B群は46日目より発症し始め60日目に93％発症が確認された．平均発症日は，A群：41.2±2.0日，B群：53.4±3.4日でA・B間に有意の差（$P<0.001$）が認められ，B群の発症に遅れがみられた．

後肢の交差・歩行マヒの発現（Fig. 6）は，A群が43

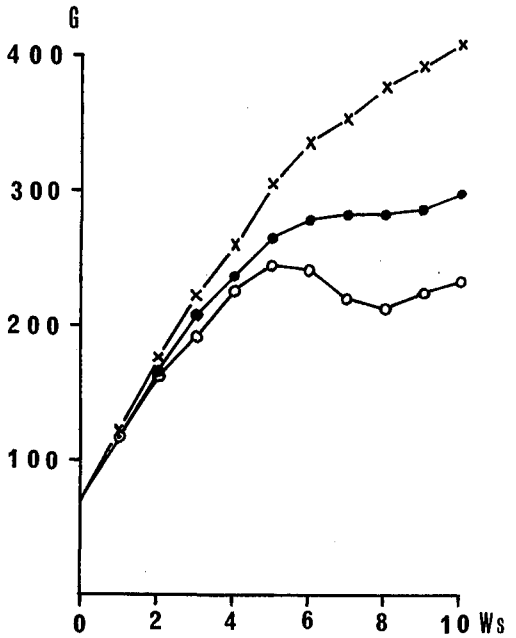


Fig. 1. Chronological Change of Body Weight
○—○：A，●—●：B，×—×：C

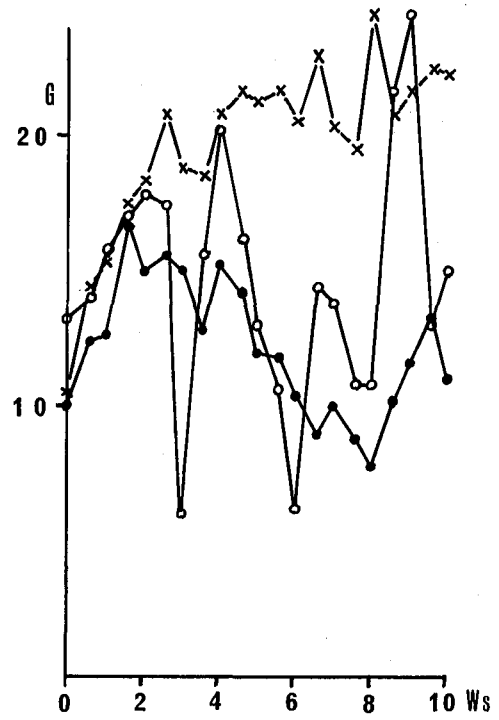


Fig. 2. Chronological Change of Food Consumption
○—○：A，●—●：B，×—×：C

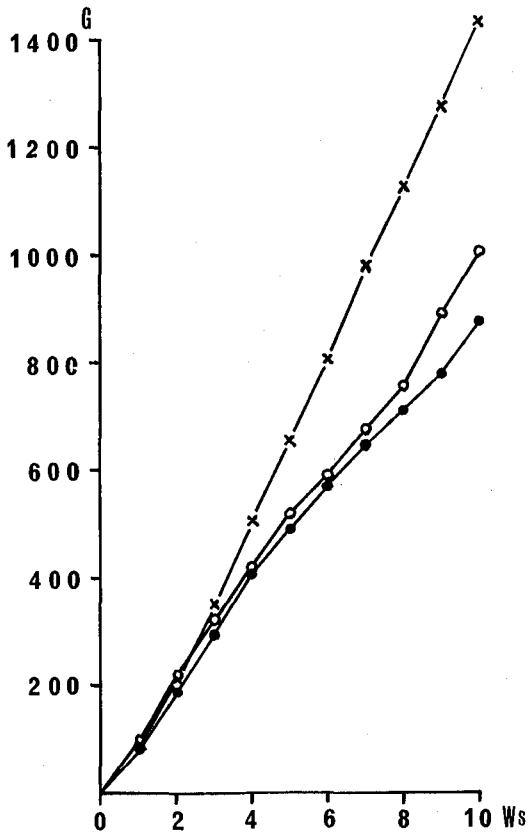


Fig. 3. Chronological Change of Cumulative Food Consumption
○—○ : A, ●—● : B, ×—× : C

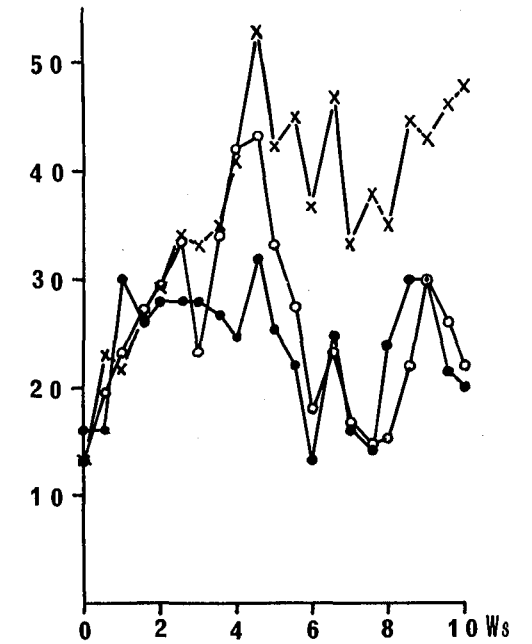


Fig. 4. Chronological Change of Water Consumption
○—○ : A, ●—● : B, ×—× : C

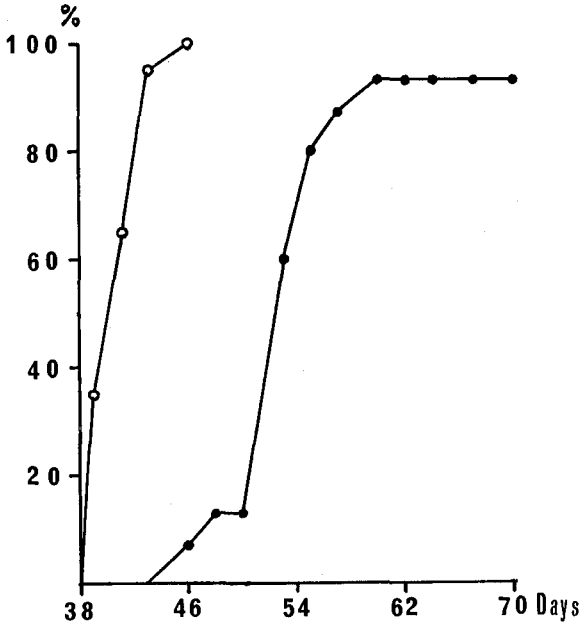


Fig. 5. Chronological Change of Tail Rotation
○—○ : A, ●—● : B,

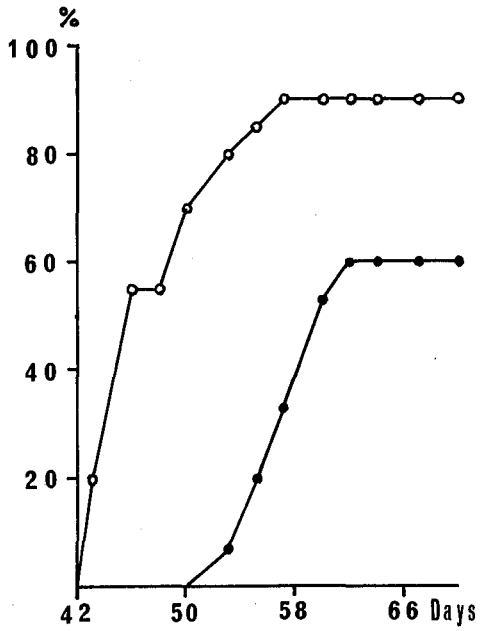


Fig. 6. Chronological Change of Cross and/or Paralysis
○—○ : A, ●—● : B,

日目より発症し始め発現率90％を示したのは57日目であった．一方，B群は53日目より発症し始め，発現率が60％を示したのは62日目であった．発症までの平均所要日数は，A群：47.9±4.4日，B群：57.7±3.0日で尾の旋回現象と同様に後肢の交差および歩行マヒも，B群の発症は有意に（$P<0.001$）遅延した．

死亡（Fig. 7）は，A群では52日目より認められ，10週目の死亡率は80％を示した．一方，B群では66日目に一匹（7％）が死亡したのみであった．すなわち，A・B群の実験期間中の生存日数（10週目まで生存していたラットの生存日数は70日として計算した）は，A群：60.5±7.4日，B群：69.7±1.0日でB群はA群より有意に（$P<0.001$）長く生存した．

考　察

今回の実験のために，補助栄養の投与方法の検討を行った．投与方法としては，飼料あるいは飲料水に補助栄養を添加する場合があるが，前者はエサの成分組成に違いが生じることから後者によることとした．また飲料水の投与は，自由飲水と経口ゾンデによる強制投与があるが，強制投与は投与による事故死があることから，自由飲水法によることとした．補助栄養には栄養価（カロリー）の高い調製粉乳のミルクを用いた．そのミルクの濃度は，粉乳の溶解状態，変性の有無，摂餌量への影響，飲水量，摂取カロリー量などの面で検討され，最終的に使用濃度は15g／100mlとした．

体重の変化では，A群とB群のエサの累積摂餌量はほぼ同等またはA群の方が多いにもかかわらず，B群がA群に比べ高い体重増加量を示したが，これはミルク飲用による摂取カロリー（Fig. 8）の増加に基因していると考えられる．

Landry等[7]やRowland等[8]は，固型飼料，ミルク飼料，液体飼料の3種類の飼料を用いてメチル水銀の蓄積，排泄への影響を観察し，ミルク飼料の方が固型飼料より蓄積率が高いことを示している．これを今回の実験にあてはめてみれば，ミルク投与のB群の方がA群よりメチル水銀の蓄積は多いものと考えられる．しかし，B群の毒性発現は遅延し，生存期間は長く逆の結果を示した．メチル水銀とセレン同時投与した時，メチル水銀のみ投与した場合よりメチル水銀の蓄積量は多いが，神経症状，死亡率は抑制されるという報告[32,33]から考えると，この逆転結果はミルク中の成分の作用あるいは高カロリー補給効果も加わった起りうる現象と考えられた．

メチル水銀中毒は重篤な神経障害を示すことから，毒性緩和因子について多くの研究がなされている[9-21,34-36]．今回の実験結果をヒトに直接外挿することは難しいものと思うが，高カロリーのミルクまたは食物の補給は良好

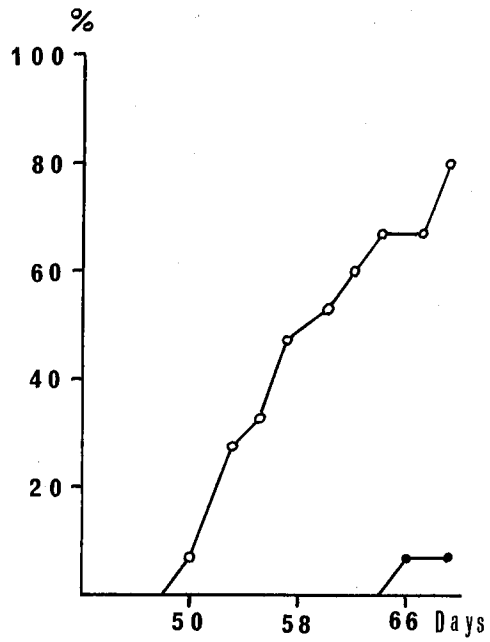


Fig. 7. Chronological Change of Mortality
○—○：A，●—●：B，

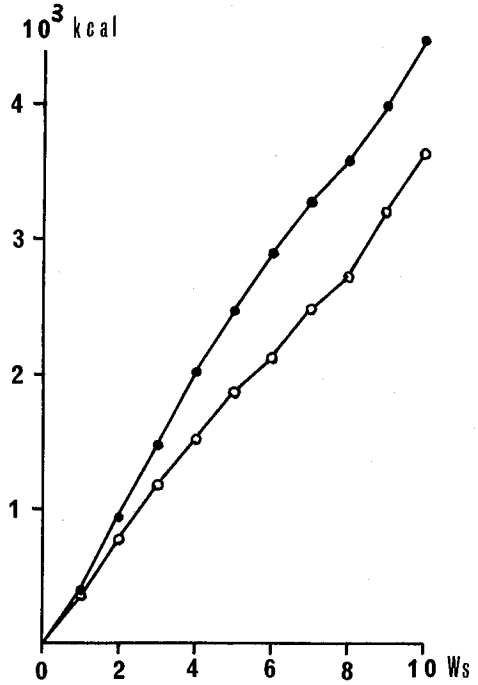


Fig. 8. Chronological Change of Cumulative Calorie Intake
○—○：A，●—●：B

なメチル水銀の毒性緩和作用を示すものと考えられる．また，延命効果が認められたことから，メチル水銀中毒患者，特に中毒初期の患者への高カロリーミルクの補給は，神経障害の進展を抑制し延命効果が期待出来る一因子ではないだろうか．

緩和因子については，ミルク中に含まれるセレン，ミルクカゼイン，ビタミン類，シスチンおよび種々の金属の成分あるいは高カロリー化によるものと考えられることから，今後これらについて検討することを考えている．

要　約

メチル水銀を投与した時，実験動物は摂餌量が減少し，体重減少を経て衰弱死に至る．

そこで，エサの他に補助栄養を与えた場合，どのような効果が認められるか検討した．

ウイスター系雄ラット4週令を3群に分け，A群は塩化メチル水銀20ppm含有飼料を，B群はA群と同じ飼料と飲料水に変えミルクを，C群はメチル水銀無添加飼料を与えた．

ミルク投与群は，体重減少の抑制，神経症状の遅延および延命効果が認められ，ミルクの補助栄養はメチル水銀中毒発現の緩和因子になりうることが明らかとなった．

この緩和因子は，ミルク中に含まれるセレン，ミルクカゼイン，ビタミン類，シスチンおよび種々の金属元素成分あるいは摂取カロリーの増加によることが考えられた．

（本研究は，昭和59年度当研究所調査課題「重金属汚染の生体影響に関する研究」として実施したものである．）

文　献

1）MacGregor, J. T. and Clarkson, T. W.：*Adv. Exp. Med. Biol.*, 48, 463-503, 1974.

2）Clarkson, T. W.：*Ann. Rev. Pharmacol.*, 12, 375-406, 1972.

3）有馬澄雄編：水俣病－20年の研究と今日の課題，1979　青林舎，東京

4）Ohi, G., Seki, H., Maeda, H. and Yagyu, H.：*Ind. Health*, 13, 93-99, 1975.

5）Ganther, H. E., Goudie, C., Sunde, M. L., et al.：*Science*, 175, 1122-1124, 1972.

6）Iwata, H., Okamoto, H. and Ohsawa, Y.：*Res. Commun. Pathol. Pharmacol.*, 5, 673-680, 1973.

7）Landry, T. D., Doherty, R. A. and Gates, A. H.：*Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 22, 151-158, 1979.

8）Rowland, I. R., Robinson, R. D. and Doherty, R. A.：*Arch. Environ. Health*, 39, 401-408, 1984.

9）Stillings, B. R., Lagally, H., Bauersfeld, P. and Soars, J.：*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 30, 243-254, 1974.

10）Ohi, G., Nishigaki, S., Seki, H., Tamura, Y., et al.：*Environ. Res.*, 12, 49-58, 1976.

11）Ohi, G., Nishigaki, S., Seki, H., Tamura, Y., et al.：*Food Cosmtics Toxicol.*, 18, 139-145, 1980.

12）Friedman, M. A., Eaton, L. R. and Bailey, W.：*Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 20, 102-110, 1978.

13）Friedman, M. A., Eaton, L. R. and Carter, W. H.：*idid.*, 19, 436-443, 1978.

14）河合正計，古山公英，黒岩　茂：昭和歯学会雑誌，3, 79-84, 1983.

15）古山公英，黒岩　茂，河合正計，立川哲彦：同上，3, 85-91, 1983.

16）田村行弘，関比呂伸：未発表資料

17）関比呂伸，加納堯子，田村行弘：日本公衆衛生雑誌，31, 687, 1984.

18）関比呂伸，加納堯子，田村行弘：同上，32, 737, 1985.

19）西田妙子，西田　宏，晴山信一：栄養と食糧，33, 375-384, 1980.

20）Fair, P. H., Balthrop, J. E., Wade, J. L. and Braddon-Galloway, S.：*J. Toxicol. Environ. Health*, 19, 219-233, 1986.

21）広田良夫：日本衛生学雑誌，33, 589-605, 1978

22）Ohi, G., Nishigaki, S., Seki, H., et al.：*Environ. Res.*, 16, 353-359, 1978.

23）関比呂伸，蓑輪佳子，鈴木　昇，大井　玄：東京衛研年報，30-1, 220-223, 1979

24）下条信弘，佐野憲一，渡辺博且，山口誠哉：日本衛生学雑誌，41, 800-806, 1986

25）Yamaguchi, S., Shimojo, N., Sano, K., et al.：*Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 32, 543-549, 1984.

26）Klein, R., Herman, S. P., Brubaker, P. E., et al.：*Arch. Pathol.*, 93, 408-418, 1972.

27）Munro, I. C., Charbonneau, S. M., Willes, R. F., et al.：*Toxicol. Appl. Toxicol.*, 22, 294, 1972.

28）田頭栄次郎，浦野知子，柳浦才三：日本薬理学雑誌，76, 169-177, 1980

29）関比呂伸，今野ヒロ子，蓑輪佳子他：東京衛研年報，27, 295-296, 1976

30）武内忠男，神原　武，森川信博他：熊本医学雑誌，34, 521-541, 1960

31) 渡辺恵鎧，伊津野吉亮：日新医学，49，607-631，1962
32) Ohi, G., Nishigaki, S., Seki, H., Tamura, Y., et al.：*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 32, 527-533, 1975
33) 鈴木助治，天川映子，山野辺秀夫他：東京衛研年報，26-1，115-122，1975
34) 原田裕文，伊藤弘一，江波戸挙秀他：同上，26-1，123-128，1975
35) El-Begearmi, M. M., Ganther, H. E. and Sunde, M. L.：*Poultry Sci.*, 61, 272-279, 1982
36) King, L. J. and Soares, J. H.：*Nutr. Rep. Int.*, 24, 39-46, 1981.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **38**, 296-303, 1987

慢性呼吸器疾患有症率に関連する要因の検討

牧 野 国 義*

A Study on Factors related to Prevalence of Chronic Respiratory Diseases

KUNIYOSHI MAKINO*

Relationship between prevalence of chronic respiratory diseases and meteorological factors or socioeconomic status were statistically analyzed by using data on prevalence of persistent cough and phlegm in published reports of three surveys. Factors used as explanatory variables in this study are $SO_{2'}$, six meteorological factors and five socioeconomic indices, The data on the prevalence in the first survey conducted between 1970 and 1974 were obtained by interviewing subjects from forty to fifty-nine in age using British Medical Research Council (BMRC) form. The data in the two other surveys conducted between 1980 and 1984 were obtained from the self-completed questionnaires for respiratory diseases (ATS-DLD) on subjects aged twenty or over.

The prevalence had a significant positive correlation with SO_2 in any of the surveys. However, since average SO_2 levels in the latter two surveys were low (11 ppb), the correlation may have resulted from the fact that different factors related to the prevalence had cross-sectionally similar variations to the SO_2 levels.

Although meteorological factors did not show more significant correlation with the prevalence than $SO_{2'}$ it was estimated that the number of rainy days and sunlight hours had a close association with the prevalence in low-SO_2 districts. This indicates that meteorological factors should also be considered as risk factors in addition to smoking, aging, and air pollution.

It was further confirmed that socioeconomic status was related to chronic respiratory diseases as a confounding factor, but it was found that socioeconomic indices associated with the prevalence charged for the decade between the surveys : the number of tatami-mats in the domicile which had not correlated significantly with the prevalence in the 1970s correlated in the 1980s. On the other hand, income showed an opposite trend to the number of tatami-mats.

Keywords : chronic respiratory disease, meterological factor, socioeconomic status

緒　　言

慢性呼吸器疾患とは慢性閉塞性肺疾患を指し，その病変は通常，気管支喘息，慢性肺気腫の3疾患を含む．しかし，現実にはこれら3疾患の区分は明確でなく，併存する場合が少なくない．さらに，3疾患のうちでは慢性気管支炎の発症が最多であること，危険因子が3疾患に共通していることから，慢性呼吸器疾患有症率は慢性気管支炎有症率と同等で，疫学的には持続性せき・たん有症率が利用される．この危険因子として，喫煙のほか，大気汚染，職業暴露，加令が知られている[1-15]．筆者らも都民の慢性呼吸器疾患有症率が上記の危険因子と密接に関連することを既に報告した[13]．さらに，慢性呼吸器疾患は抗菌的防御機構障害によっても発症し得るので，感染因子も危険因子となる．また，呼吸器特に上気道の空気調節機構は吸気の温熱条件の影響を受けることなどから，瀧島は気象条件をも危険因子に含めている

*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

が[16]，清水はその効果を疑問視し[17]，気象条件については必ずしも明確な結論は得られていない．一方，社会経済的要因に関して，Champmanらは人種差のあることを報告しているが[6]，Higginsらは明らかにできなかったと述べ[18]，鈴木らは，社会経済的分析は今後の課題と報告している[11]．本研究では3種の慢性気管支炎有症率の調査報告を通じて上記の気象条件や社会経済的要因が危険因子または交絡因子としてこの有症率に影響を及ぼしているか否かを検討した．

方　法

1．資料

慢性呼吸器疾患有症率（ここでは特に持続性せき．たん有症率）資料として3種の調査報告を利用した．最初の調査（調査1と呼ぶ）資料は3報告をまとめた資料である（①安達ら[9]，②坪田ら[12]，③鈴木ら[11]）．①は昭和46年から50年にかけての全国27地区（うち千葉県が16地区）の調査で，対象者数は男女14,884名，男性は喫煙の有無で分類されている．女性は喫煙者がごく少数のため，分類はされていない（実質的に非喫煙者）．②は昭和49，50年に岡山県で調査されたうちの11地区の資料で，対象者は男女4,218名，喫煙については①と同様である．対象者の年令は両報告とも40～59才であった．③は昭和45年から49年にかけての関東以西6地区の女性を対象とした調査で，うち昭和45年と49年の上記年令層の非喫煙者2,047名を対象とした．3報告はいずれも面接調査のBMRC法を採用している．次の調査（調査2と呼ぶ）資料は，昭和56，57年に全国17地区で調査された報告[19]中の成人に関する資料である．昭和57年に20才以上の男女27,005名を対象として慢性呼吸器疾患有症率が調査されているが，有症率は年令及び喫煙で訂正されていない．また，この調査は自己記入式のATS－DLD質問表を利用している．残る調査（調査3と呼ぶ）資料は，昭和55年から59年にかけて全国51地区で調査された報告[20]中の成人に関する資料である．20才以上の男女204,865名を対象とし，調査2同様ATS－DLD質問表を利用して年令及び喫煙で訂正した慢性呼吸器疾患有症率が調査されている．

次に，大気汚染物質は二酸化硫黄（SO_2）とした．調査1，3は各報告に記載されている値を利用し，調査2については各地区の昭和56年の年平均濃度を利用した．さらに，気象条件として，年平均気温，同湿度，同気圧，同風速，年間降水日数，同日照率を選び，有症率調査前年の値を利用した．気象観測点がない地区の場合には近傍の2ないし3観測点の値より推定した．

また，社会経済的要因として人口密度，人口1人当り所得，一般入院外医療費，人口1人当り畳数，1平方キロ当り乗用車登録台数の5指標を選び（以下，所得，医療費，畳数，乗用車登録台数のように略称する）．その調査前年値を利用した．しかし，これらの指標は各地区の調査前年値が地区により得られなかったこと，これらの短期間の数値が直接的に有症率に影響するとの根拠に乏しいことなどにより，この5指標には順序統計量を採用した．なお，調査1の所得については物価変動の影響が著しいことが考えられるので，昭和50年の各地区の値により順位化した．他の指標で該当年次の資料が得られなかった場合には前後の年次などで推定し，順位化した．ただし，調査1の医療費については調査年前後の資料が得られず，推定することができなかった．

2．解析方法

解析には相関分析を主とする統計的方法を利用した．まず，各有症率と二酸化硫黄や気象条件との相関分析を行い，続いて，有症率と二酸化硫黄とは高い相関関係を有することが推定されるので，二酸化硫黄を固定した気象条件との偏相関分析を行った．さらに，有症率への二酸化硫黄の影響が考えられる高濃度側の地区から順次除きながら残る地区（以下低汚染地域と呼ぶ）で上記の相関分析を行い，二酸化硫黄との相関係数の危険率が10％を越えた際の有症率と気象条件の相関関係を確認した．次に，低汚染地域における各気象条件のヒストグラムからその高低地区群を選び，両群の有症率を比較した．ただし，低汚染地域の大都市地区は人口流入が激しいなど別の交絡要因を含むため除外した．また，有症率と社会経済的要因との関連についてはSpearmanの順位相関分析を用いて検討した．

結　果

Table 1に各調査の地区名（同じ都市の地区が複数含まれる場合には地区名に番号を付したが，詳細は文献を参照されたい）及び調査年を示し，Table 2に各調査の有症率（％），二酸化硫黄濃度（ppb），気象条件（気温（℃），湿度（％），気圧（－1000mb），風速（m／sec），降水日数（1㎜以上の降水量の日），日照率（％））の基礎統計量と社会経済的要因（人口密度，所得，医療費，畳数，乗用車登録台数）の順序統計量（低い方から順位化）を示した．Table 2より，調査1と調査2，3とでは有症率や二酸化硫黄濃度に明らかな差がみられた．前者と後者とではBMRCとATS-DLDの調査方法の相違や調査年の約10年のずれがある．Table 3に示した有症率と二酸化硫黄及び気象条件との相関分析結果によると，

Table 1. District and the investigated year in three surveys

Survey	No.	District	Year	No.	District	Year	No.	District	Year	No.	District	Year	No.	District	Year
1	1	Ichihara1	1970	11	Aomori	1973	21	Chiba4	1974	31	Sakura2	1974	41	Bizen1	1974
	2	Sakura1		12	Akita		22	Chiba5		32	Higashiosaka2		42	bizen2	
	3	Hlgashiosaka1		13	Kashima		23	Chiba6		33	Tondabayashi2		43	Kasaoka1	
	4	Tondabayashi1		14	Mitaka		24	Chiba7		34	Okayama1		44	Kasaoka2	
	5	Fukuoka1		15	Chiba3		25	Ichihara2		35	Okatama2		45	Fukuoka2	
	6	Ohmuta1		16	Fuji3		26	Ichihara3		36	Kurashiki1		46	Ohmuta2	
	7	Chiba1	1971	17	Yokkaichi		28	Ichihara5		38	Kurashiki3		48	Kimitsu2	1975
	8	Chiba2		18	Osaka		28	Ichihara5		38	Kurashiki3		48	Kimitsu2	
	9	Fuji1		19	Matsue		29	Ichihara6		39	Kurashiki4		49	Tomitsu1	
	10	Fuji2	1972	20	Hacbinohe		30	Ichihara7		40	Tamano		50	Tomitsu2	
2	1	Maebashi	1982	4	Kawasaki1	1982	7	Tsukui	1982	10	Moriguchi	1982	13	Fukuoka	1982
	2	Chiba		5	kawasaki2		8	Yokkaichi		11	Ibaraki				
	3	Yokohama		6	Aikawa		9	Osaka		12	Habilino				
3	1	Sapporo	1980	12	Otaru	1981	22	Chitose	1982	31	Sendai4	1983	42	Sentai5	1984
	2	Sendai1		13	Sendai2		23	Sendai3		32	Akitd		43	Koriyama	
	3	Urawa		14	Meguro		24	Chuo		33	Maebashi		44	Utunomiya	
	4	Shinagawa		15	Yokohama		25	Kawasaki1		34	Minato		45	Chiyoda	
	5	Takefu		16	Niigata		26	Takahama		35	Kawasaki2		46	Yamato	
	6	Shizuoka		17	Fuji		27	Ohtsu		36	Kofu		47	Matsue	
	7	Owase		18	Tokai		28	Higashiosaka		37	Ohgaki		48	Kariya	
	8	Suita		19	Moriguchi		29	Tottori		38	Okazaki		49	Nagoya	
	9	Itami		20	Ube		30	Kagoshima		39	Yao		50	Toyonaka	
	10	Fukuoka1		21	Isahaya					40	Hiroshima1		51	Nobeoka	
	11	Fukuoka2								41	Hiroshima2				

Table 2. Elemental statistics of prevalence of chronic bronchitis, SO_2 and meteorological factors, and order statistics of socioeconomic status in three surveys

Survey	Prevalence(%) Male	Prevalence(%) Female	SO_2 (ppb)	Temp. (℃)	Hum. (%)	Air pres. (−1000mb)	Wind speed (m/sec)	Rainy days (/yr.)	Sunlight (%)	N
1	NS[a] : 3.54±3.36									38(m [b])
	S : 9.27±4.37	3.11±2.24	24.0±9.7	14.9±1.2	69.8±3.5	14.5±0.9	3.26±1.03	95.1±26.9	46.5±2.6	50(f)
2	2.22±0.85	0.94±0.63	11.3±3.4	15.0±0.7	65.1±2.6	14.2±0.9	3.07±0.17	103.5± 5.6	47.5±2.4	13
3	2.49±0.76	0.94±0.41	10.8±4.3	14.6±2.3	68.4±4.1	14.4±0.9	2.73±0.64	117.0±25.4	46.0±3.6	51

Survey	Socioeconomic index	No. of district (next line : +30)																												
		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
1	Population density (PD)	12	14	30	21	28	22	—	24	10	11	5	7	2	32	26	13	19	33	8	18	—	—	27	—	—	—	—	—	—	16
		17	31	25	—	15	—	20	—	—	9	—	3	—	6	29	23	—	1	—	4										
	Income (IN)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	6	11	23	—	21	16	17	7	5	—	—	22	—	—	—	—	—	—	15
		20	18	14	—	12	—	10	—	—	19	—	9	—	2	13	1	—	8	—	3										
	Number of tatami-mats (NT)	15	19	5	1	6	11	—	8	19	22	31	32	—	13	10	22	26	3	26	29	—	—	9	—	—	—	—	—	—	16
		22	5	3	—	23	—	19	—	—	27	—	28	—	30	7	13	—	15	—	24										
	Number of registered cars (NR)	4	1	29	12	27	15	—	17	23	25	5	10	—	31	21	26	18	32	13	9	—	—	24	—	—	—	—	—	—	8
		6	30	16	—	15	—	22	—	—	20	—	11	—	2	28	19	—	7	—	3										
2	PD	4	8	5	13	9	2	1	3	12	11	6	7	10																
	IN	5	11	10	13	9	3	1	6	4	2	12	7	8																
	Cost of medical care (CM)	7	4	3	5	5	1	2	8	13	12	11	9	10																
	NT	9	6	5	2	1	—	—	11	4	3	7	10	8																
	NR	2	6	3	10	7	—	—	1	9	11	5	4	8																
3	PD	33	28	34	50	4	6	2	43	40	44	39	14	29	51	41	25	17	26	48	15	11	1	30	45	36	27	13	42	10	3
		31	12	23	46	49	18	22	19	38	21	5	32	7	20	35	37	16	24	33	47	9									
	IN	47	37	42	45	9	21	2	40	32	44	5	7	37	48	43	24	29	30	8	12	3	22	37	49	46	27	25	17	10	6
		37	13	15	50	26	14	19	31	23	18	16	37	4	20	51	39	11	38	28	41	1									
	CM	30	38	11	31	17	3	16	43	41	26	26	49	38	29	7	22	5	20	47	24	23	12	38	39	9	45	18	33	14	7
		38	28	13	33	9	10	45	27	20	50	50	38	4	16	46	2	40	22	48	42	1									
	NT	48	22	11	5	50	20	32	16	6	12	29	47	23	19	7	46	18	15	3	38	27	41	25	8	1	30	40	4	43	31
		27	49	17	34	2	37	45	39	9	36	42	29	36	21	34	11	51	44	25	15	15									
	NR	43	23	32	47	4	17	8	34	35	38	37	10	24	51	40	14	19	22	45	11	44	2	50	49	33	3	16	42	9	26
		28	13	20	50	46	31	18	21	36	5	1	30	6	16	48	41	7	25	39	43	12									

a) NS : Non-smoker, S : Smoker, b) m : Male, f : Female

Table 3. Correlation between prevalence of chronic respiratory diseases and weather conditions or SO_2

Survey	Subject	Variable							
		SO_2	Temp	Hum	AP	WV	Rain	Sun	N
1	m−NS#	.574***	.172	−.140	.046	.108	.095	.112	38
	m− S #	.496**	.135	−.085	.376*	−.313	−.405*	.365*	38
	f	.690***	.065	.140	.293*	−.317*	.069	.240	50
2	m	.680*	−.133	−.298	−.072	.348	−.323	.122	13
	f	.683*	.187	−.225	−.033	.229	−.297	.200	13
3	m	.114	−.118	−.099	−.030	−.066	.085	−.144	51
	f	.539***	.058	−.430**	−.182	.177	−.008	.008	51

*：p<0.05, **：p<0.01, ***：p<0.001
NS：Non-smoker, S：Smoker

Table 4. Partial correlation between prevalence of chronic respiratory diseases and weather conditions in fixing SO_2

Survey	Subject	Variable						
		Temp	Hum	AP	WV	Rain	Sun	N
1	m−NS	.067	−.288	.124	.246	.073	.094	38
	m− S	.039	−.193	.299	−.206	−.483**	.387*	38
	f	.026	.007	.208	−.213	−.194	.265	50
2	m	.131	−.065	−.146	.535	−.189	.460	13
	f	.205	−.182	−.092	.472	−.151	.573	13
3	f	.028	−.235	−.030	−.034	−.034	.104	51

*：p<0.05, **：p<0.01, ***：p<0.001

Table 5. Correlation between prevalence of chronic respiratory diseases and weather conditions in lower SO_2 areas where the prevalence did not significantly correlated with SO_2 ($p>0.10$)

Survey	Subject	Variable							
		Temp	Hum	AP	WV	Rain	Sun	SO_2	N
1	m−NS	.038	−.132	.063	.069	−.014	.199	.243	31
	m− S	.109	−.203	.323	−.373	−.528**	.533**	.344	28
	f	−.119	−.042	.092	−.359	−.274	.296	.271	26
2	m	.196	−.039	.184	.212	−.125	.302	.458	9
	f	.214	−.194	.176	.026	−.154	.383	.464	9
3	f	.325	−.285	.006	.070	−.152	.198	.299	34

*：p<0.05, **：p<0.01, ***：p<0.001

有症率は調査3の男性以外いずれも二酸化硫黄と高い相関を示し，有症率への寄与が高いことを示唆した．なお，調査3の男性については二酸化硫黄との相関が低く，他の要因との関連も全くみられなかったので，以下の記述を略した．気象条件との相関では必ずしも著明な関連は認められないが，湿度や降水日数と負，日照率と正の関係にあることが推察された．二酸化硫黄の影響を排除するために行った偏相関分析結果（Table 4）によると，調査1の男性の喫煙者は降水日数と負，日照率と正の有意の高い相関が認められた．次に，低汚染地域における相関分析結果（Table 5）でも Table 4 と同傾向の結果であった．相関分析で低汚染地域を区分した二酸化硫黄の境界濃度は，調査1の男性の喫煙者，非喫煙者，女性はそれぞれ30，28，24ppb，調査2では男女とも14ppb，

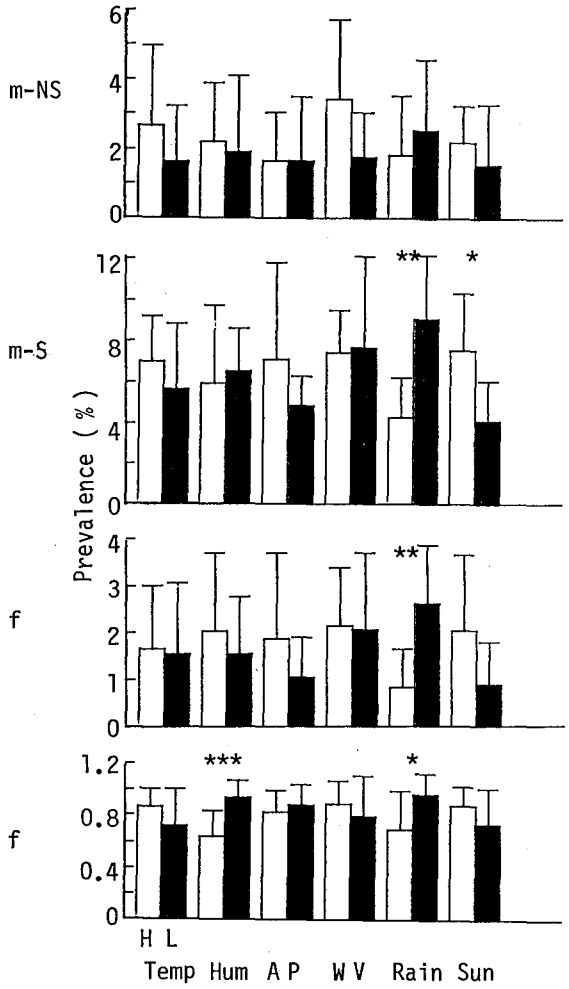


Fig. 1. Comparison of prevalences of chronic bronchitis in two area-groups (high (H) and low (L) weather cond.) from the lower SO_2 areas
AP : Air pressure, Rain : Rainy days a year, Sun : Rate of sunlight hours
*：$p<0.05$, **：$p<0.01$, ***：$p<0.001$

調査3の女性は9 ppbで，調査1と調査2，3とでは境界値が大きく異なった．次に，低汚染地域で，気象条件の高低地区群間の有症率について平均値の差の検定を行い，Fig. 1のように比較した．ただし，調査2は地区数が9地区と少なく，気象条件も明確には区分されなかったので，比較できなかった．各群の地区数は調査1の男性が8±3，調査1と調査3の女性が9±2であった．その結果，気温については，有意差は認められなかったが，どの対象も高温地区の有症率が高い傾向を示した．湿度は，調査3の女性の場合に有意差が認められたが，調査1の女性の場合と比較すると高有症率の高低湿度地区が逆になった．また，気圧，風速についても著明な特徴は得られなかった．一方，降水日数は各対象とも傾向が共通し，短い降水日数地区の方が有意に高い有症率を示した．日照率も各対象に共通した傾向が認められ，高日照率地区が高有症率であった．以上の結果を性別で比較した場合には明らかな差が認められなかったが，喫煙の有無で比較すると，Table 3～5にみられる通り，喫煙者の方がより気象条件による有症率への影響を受けるとの結果であった．

次に，Table 6に示した各有症率と社会経済的指標との相関分析結果によると，調査1では乗用車登録台数に高い有意の正相関が認められ，所得や人口密度も正相関を示した．一方，調査2，3では畳数と有意の負相関が認められ，乗用車登録台数や人口密度については調査1と同傾向であった．これらの結果では，性差はみられなかったが，喫煙の有無でみると，気象条件の場合と逆に，慢性呼吸器疾患有症率は非喫煙者の方がより社会経済的要因と関連することを示唆した．

考　察

調査1と調査2，3を比較すると，調査年が約10年異なり，その間に平均二酸化硫黄濃度は24ppbから11ppbへと減少した．また，慢性呼吸器疾患有症率も10年間で1/3程度に減少した．BMRCとATS-DLDの調査方法の相違に関して，得られた慢性呼吸器疾患有症率に差はないとする春日ら[21]，安達ら[22]の報告を考慮すると，上記有症率の減少は大気汚染物質濃度の減少と密接な関係を有することが考えられる．しかし，Table 3の通り，二酸化硫黄濃度が減少してもなお有症率との有意の相関が認められており，調査2，3の二酸化硫黄の最高濃度は16ppb，平均濃度は9 ppbであった．このことは環境基準値（1時間値40ppb，年平均値評価は12～15ppb）前後の濃度が有症率上昇に寄与すると解釈できるが，基準値の設定趣旨を考慮すればこの解釈は容認できない．寧ろ次の2つの解釈が可能であろう．1つは，二酸化硫黄と挙動を同一にする他の要因が有症率に寄与するとの解釈で，その要因には他の汚染物質も含まれる．近年二酸化窒素の呼吸器影響が認められるようになったので，その寄与についても検討したが，二酸化硫黄との相関程有意の結果は得られなかった．ただし，二酸化窒素が非線型的に有症率に寄与する仮説が立証された場合には新たな検討が必要である．もう1つは，有症率の発症が過去の二酸化硫黄濃度により生じたとの解釈である．対象者は成人であり，長期居住者が多い．調査1の約10年前，

Table 6. Rank correlation between prevalence of chronic respiratory diseases and socioeconmic index

Survey	Subject	Socioeconomic index PD[a]	IN[a]	CM[a]	NT[a]	NR[a]
1	m−NS[b]	.403(22)[c]	.619(18)**	—	−.134(21)	.593(21)**
	m−S	.341(22)	.381(18)	—	.128(21)	.295(21)
	f	.371(33)*	.376(23)	—	.013(32)	.583(32)***
2	m	.448(13)	−.165(13)	.153(13)	−.691(11)*	.436(11)
	f	.345(13)	.054(13)	.201(13)	−.627(11)*	.209(11)
3	f	.446(51)**	.121(51)	−.086(51)	−.433(51)**	−.433(51)**

a) PD : Population density, IN : Income, CM : Cost of medical care, NT : Number of tatami-mat, NR : Number of registered cars

b) NS : Non-smoker, S : Smoker

c) Number in the parenthes shows sample number

*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

昭和40の二酸化硫黄濃度は，大都市調査[23]から推定すると，平均約50ppbとなる．高濃度で継続した暴露によりある時点で発症し，現在まで症状が継続することは充分に考え得ることである．

気象条件が大気汚染物質ほど慢性呼吸器疾患有症率に影響を及ぼしていないことはTable 3より推定できる．しかし，Table 4，5，Fig. 1より，降水日数や日照率に有症率有症率への関与が認められ，気象条件が慢性呼吸器疾患の危険因子となることが推定された．他の気象条件には必ずしも著明な関与は認められなかったが，呼吸器疾患発症に気象条件が深く関与することは風邪を例示するまでもなく明らかである．さらに，慢性気管支炎は，臨床病理的立場から診断すると，気管支粘膜の広汎な発赤や腫張あるいは気管支造影による多様の変化が認められた場合であるから，外気温，呼気の温度，湿度，風で舞い上がった粒子状物質などが発症に影響を及ぼす可能性がある．これらの要因は発症原因が何かによって関連の強さや性質が異なることが考えられるので，単に気象条件の高低のみを問うことはできず，機序の解明に俟たねばならない．また，地域特有の発症原因を生じることがある．例えば，平賀らは，北海道などの寒冷地の集中暖房により生じた低湿度環境が呼吸器疾患有症率を増加させたと報告した[24]．降雪地域でも冬季は室内に閉じ込められる時間が長いために，同様の影響が生じる可能性があるので，降雪地区と同規模地区をマッチングし，有症率を比較したが，顕著な差は得られなかった．

社会経済的要因の慢性呼吸器疾患有症率への寄与は年次的に変化していることがTable 6より推察される．調査1の時期（昭和40年代後半）には有症率は人口密度，所得や乗用者登録台数と有意の正相関が認められたことから，大都市で大気汚染の著しい地域に有症率が高いことを示した．一方，調査2，3の時期（昭和50年代後半）には所得に代って畳数の関与が増大する結果を示し，生活条件が有症率に寄与することを示唆した．つまり，昭和40年代後半には発症原因に関連する社会経済的要因が有症率に寄与していたのに対し，昭和50年代後半には発症原因だけでなく，発症後の対策，生活レベル，あるいは室内汚染が寄与するに至ったとの年代的変化が推察される．また，喫煙者は社会経済的要因の影響が小さいとの結果は，換言すれば，喫煙の呼吸器疾患への影響は社会経済的要因に左右されないことを示唆し，Sandlerらの報告[25]と傾向的に一致した．

ま と め

慢性呼吸器疾患有症率に関する3種の調査（調査1：昭和40年代後半の40～59才の男女を対象としたBMRC法による面接調査（異なる3調査を混合），調査2：昭和57年，調査3：昭和50年代後半，はともに20才以上の男女を対象とした自己記入式のATS-DLD質問表に基づく調査）報告を利用し，気象条件（気温，湿度，気圧，風速，降水日数，日照率）や社会経済的要因（人口密度，所得，医療費，畳数，乗用車登録台数）が慢性呼吸器疾患有症率（持続性せき・たん有症率を利用）に影響を及ぼしているかを検討し，以下の知見を得た．

1. 調査1から調査2，3の10年間で二酸化硫黄濃度は半減し，調査2，3の平均濃度は環境基準値以下と推定されたが，二酸化硫黄は3調査とも慢性呼吸器疾患有症率と有意の正相関を示した．調査2，3のこの結果は，二酸化硫黄自体よりも他の汚染物質あるいは過去の高濃

度暴露の影響により生じたと考えられる..

2. 気象条件は直接的な有症率との関連は小さいと思われるが，二酸化硫黄の寄与を除くと，短い降水日数や長い日照時間が有症率を上昇させることが推察され，気象条件も喫煙，加令，大気汚染，感染因子などに続く危険因子であるとの結論を得た.

3. 大気汚染または大都市と関連する社会経済的要因の乗用車登録台数や人口密度は有症率と有意の正相関を示した. また，調査1では所得，調査2，3では畳数に有症率との有意の相関があり，有症率に寄与する社会経済的要因が年次的に変化し，昭和40年代後半には発症原因に関連する社会経済的要因が，昭和50年代後半には発症原因だけでなく，発症後の対策，生活レベル，あるいは室内汚染に関連する社会経済的要因が交絡要因として有症率に関与することが推察された.

謝辞 本研究の気象条件に関する資料収集や有症率との関連の検討について御協力，御助言を賜りました順天堂大学医学部衛生学教室稲葉 裕助教授，ならびに，各調査の報告や調査に携われた方々に感謝の意を表します.

付記

（本研究の一部は日本衛生学会第57回総会1987年4月で発表した.）

文 献

1) Oswald, N. C., Harold, J. T. and Martin, W. J.：Lancet, 2, 639-643, 1953

2) Higgins, I. T. T., Gilson, J. C. Ferris, B. C. Jr and Higgins, M. W., *AJPH*, 58, 1667-1676, 1968

3) Lowe, C. R. Campbell, H. and Khosia, T.：*Br Ind Med*, 27, 121-129, 1970

4) Karpick, R. J., Pratt, P. C., Asmundsson, T. and Kilburn, K. H.：*Ann Int Med*, 72, 189-197, 1970

5) Cohen, C. A., Hudson, A. R. Clsusen, T. L. et al.：*Am Rev Resp Disease*, 105, 251-261, 1972

6) Champman, R. S., Shy, C. M., Finklea, J. F. et al.：*Arch Environ Health*, 29, 138-142, 1973

7) Lebowitz, D., Knundson, R. J. and Burrows, B.：*Am J Epid*, 102, 137-152, 1975

8) 谷 修一：日本公衛誌, 22, 431-438, 1977

9) 安達元明，村井雅子，仁田善雄，岩崎明子，吉田亮：日本公衛誌, 24, 75-86,（75-86, 1977）1977

10) 常俊義三，山口泰正，中山典子，上田美代子：日本公衛誌, 24, 293-300, 1977

11) 鈴木武夫，石西 伸，吉田 亮，常俊義三：大気汚染学会誌, 13, 310-355, 1978

12) 坪田信孝，中島泰知，目黒忠道，緒方正名：日本公衛誌, 26, 333-350, 1979

13) 牧野国義，溝口 勲：東京衛研年報, 32-1, 267-273, 1981

14) Love, G. J., Lan, S. P., Shy, C. M. and Struba, R. J. *Arch Environ Health*, 36, 66-74, 1981

15) Kilburn, K. H.：*Arch Environ Health*, 39, 139-143, 1984

16) 瀧島 任：呼吸器, 11, 1983, メジカルビュー社, 東京

17) 清水 保：生気象学, 177, 1968, 紀伊国屋書店, 東京

18) Higgins, M. W., Keller, J. B. and Metzner, H. L.：*Am Rev Resp Disease*, 116, 403-410, 1977

19) 環境庁環境保健部：質問表を用いた呼吸器疾患に関する調査, 1983

20) 環境庁大気保全部：大気汚染健康影響調査報告書, 1986

21) 春日 斉，逢坂文夫，松木秀明，成田史郎：日本公衛誌, 26, 367-378, 1979

22) 安達元明，小林雅子，岩崎明子，仁田善雄，吉田亮：日本公衛誌, 29, 557-564, 1982

23) 環境庁大気保全部：日本の大気汚染状況（昭和59年版), 28, 1984, ぎょうせい, 東京

24) 平賀洋明，三上理一郎，加地正郎，溝口 勲，他：日胸疾会誌, 19, 631-640, 1981

25) Sandler, D. P., Everson, R. B., Wilcox, A. J. and Browder, J. P.：*AJPH*, 75, 487-492, 1985

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **38**, 304-308, 1987

空調ダクト内堆積粉塵の性状について(第3報)

佐藤泰仁*, 吉川　翠*, 諸角　聖**, 和宇慶朝昭**

Properties of Accumulated Dusts in Air-conditioning Duct (III)

YASUHITO SATO*, MIDORI YOSHKAWA*, SATOSHI MOROZUMI** and TOMOAKI WAUKE**

In the previous investigations, we examined mainly chemical analysis such as element components and crystal structure.

Since there are very few data on this subject, fungi, mite and insects accumulated in the air conditioning ducts were studied in order to learn how often and what kinds of these living things are collected from the ducts.

presence of fungi was checked by applying the accumulated dust to cultures, and mite and insects were filtered out of the dust. Fungi collected were mainly *Penicillium*, *Aspergillus* and *Cladosporium* that are often found in our living environment, although limited in amount. Mites and insects collected were Tarsonemidae, Acaridae and Psocoptera but again only a few in number.

The reason that few living things were collected is thought that the environment inside the ducts was not good for them (especially because of low humidity).

Keywords: Biological pollution (Fungi, Mite, Insect), Components analysis, Accumlated-dust,

はじめに

建築衛生の分野では，以前から空調用ダクトに関して特に吹出口まわりの汚れを美観上の問題として取りあげられてきた．しかし，昭和58年4月，「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)の施行規則の一部改正により，これまでほとんど注意が払われなかったビル内の空調用ダクトの清掃の必要性がもり込まれてきた[1]．また，最近建設省は建設技術評価制度の一環として，民間のダクト清掃業者にダクト清掃工法の開発を依託すると同時にダクトの清浄度の評価を目的とした判定方法等を設けた[2]．このような背景から，著者らは既に空調ダクト内の堆積塵の性状を，元素組成及びその結晶構造など主に物理化学的な面から調査を行ない，その成績を報告[3,4]してきた．今回は空調ダクト内の堆積塵について，前回同様の物理化学的な調査に加え，カビ，ダニおよび昆虫などの生物汚染についても併せて検討した．その結果，いくつかの知見を得たので報告する．

実験方法

1．試料の採取

都内に存在する6つのビルを対象に，それぞれの空調ダクト内堆積塵を採取した(試料名：A，B，C，D，E，F)．採取方法は前報[3,4]と同じであるので省略する．このうちA，BおよびCは夏期に，D，EおよびFは冬期に試料採取を行なったものである．またB，Cの試料は分析迄が採取後1年未満でありますが，その他のものは1年以上を経ております．さらに，それぞれは自社専用ビルでありますが，空調方式及び粉塵の採取場所をみると，Aは排気のみを機械で行う，いわゆる第3種換気法の排気ダクトより得たものであり，B，C，E，Fは中央空調方式による第1種換気法の給気ダクトより，Dはパッケージ型空調器使用による給気ダクトより得たものである．

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1

*The Tokyo Metroplitan Research Laboratory of Public Health

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

**同微生物部細菌第一研究科

2．カビの分離，培養および同定方法

堆積塵試料は1gを秤量し，99mlの滅菌希釈液（0.05%寒天液）と共にブレンダー（日本精機，東京）により高速で約5分間混和したのち，更に滅菌希釈液を用いて10倍毎の段階希釈系列を作成し，クロラムフェニコール100μg／ml添加ポテトデキストロース寒天培地（PDA）および25%グルコース加PDAの2種の培地に1mlずつ塗抹した．これらの平板を25℃，7日間培養し，発育した集落をPDA斜面培地に移植し，以後の操作に供した．菌の同定は常法に従って行った．

3．ダニおよび昆虫の抽出法と同定

堆積塵試料は0.5gを秤量し，少量の界面活性剤を加えた蒸留水中に入れ，スターラーにより十分に攪拌後，少量ずつ数回に分けてフィルター（TOYO，No 2）で沪過した．フィルター上のダニ，昆虫類は実体顕微鏡下で死骸等を含め同定し，計数した．

4．化学成分の分析

元素組成分析（状態分析を含む）は前報[3,4]と同じであるので省略する．今回も検出，同定された主要3物質の定量について，α-SiO_2（α-石英）は26.62°，$CaSO_4 \cdot 2H_2O$（石膏）は11.59°，$CaCO_3$（方解石）は29.39°の回折角（2θ）を用い，試料からの回折強度をそれぞれの標準物質とセルロースパウダーとの重量%で作成した検量線から求めた．

結果および考察

最初に堆積塵のカビ相をTable. 1に示した．検出されたカビの菌種は通常住居内の分布[5]と類似しており，*Aspergillus*（こうじカビ），*Penicillium*（青カビ），*Cladosporium*（黒カビ）等が多く認められた．

検出菌数は塵1g当り，少ないもので10^2，多いもので10^6程度で室内塵の結果[5]と比較しても特に多い菌量ではなかった．空中浮遊真菌の数は夏季に少なく，冬季に多いと報告[6]されているが，今回の結果においてはそのような傾向は認められなかった．また，採塵から同定の処理までの経過時間が短かい試料BおよびCから多数の菌が検出され，それ以外の試料では少なかった．この

Table. 1 Distribution of Fungi in dust–sample

	A	B	C	D	E	F
Aspergillus	2.8×10^2	1.3×10^3	0	4.0×10^2	2.8×10^3	1.0×10^3
A.flavus				5.0×10	1.6×10^3	
A.ochraceus				2.5×10		
A.versicolor	2.8×10^2			5.0×10	9.5×10^2	9.5×10^2
A.glaucus		1.3×10^3		2.5×10^2		
A.niger				2.5×10	1.3×10^2	1.0×10^2
A.candidus					2.5×10	
A.ustus					1.0×10^2	
A.nidulans					2.5×10	
Penicillium	8.0×10^2	1.3×10^3	2.5×10^3	2.3×10^2	1.7×10^3	2.6×10^3
Cladosporium		1.0×10^6	1.8×10^5	2.3×10^2	2.8×10^2	1.9×10^3
Paecillomyces						1.0×10^2
Alternalia						5.0×10
Ulocladium	2.5×10			8.0×10^2		
Chaetomium				4.5×10^2		
Rhizopus						1.8×10^2
Mucor	2.5×10					
The others			1.3×10^3			2.5×10
Total	1.1×10^3	1.0×10^6	1.8×10^5	1.4×10^3	4.7×10^3	5.8×10^3

Table. 2. Mite–fauna in dust–sample

数/0.5g

	A	B	C	D	E	F
ホコリダニ	1	3	3	2	21	11
ツメダニ	3					
ヒナダニ	1					
ハダニ	1					1
コナダニ	5	2	3	4	26	2
チリダニ	1					
イエササラダニ	1					
カザリヒワダニ	1					
ササラダニ（その他）	1	1				
計	15	6	6	6	47	14

Table. 3 Insect–fauna in dust–sample

数/0.5g

	A	B	C	D	E	F
ショウジョウバエ	1					
アブラムシ	16			5		
チャタテムシ	9	1	1	3	2	1
蚊	1					
カイガラムシ	2			2	1	1
ハエ	1					
甲虫	1		1	1		
アリ				1		
アザミウマ				2		
計	31	1	2	14	3	2

点は，採取後の経過時間の長い他の試料においては，真菌類が死滅している可能性が大きいことを示差しているものと考える．

さらに今回の4検体から，発ガン性カビ毒の産生が知られている *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. versicolor* のいずれかが検出された．空調ダクト内の堆積塵は空気中に放出される可能性が大きいと考えられ，これらの菌が食品等への汚染源になりうると推察される．この点については今後の検討が必要であろう．

次にダニ相についてみたものをTable. 2に示した．主な種類はホコリダニ，コナダニであり全て死骸である．試料Aは先述したように排気用ダクト内のサンプルであるためか，室内からのものと思われるツメダニ，チリダニが検出されている．

量的には一般の住宅環境（畳）の平均700匹／gに比べ，多くても1／10以下であり，予想に反して少ない状況であった．しかしダニ数の多少は各ビルで異なり，そのビルの特異性とも考えられ，その1つとしてビルの建築経過年数との関連の方が，季節との関連よりも強いものと想定される．

昆虫相についてみるとTable. 3のようである．チャタテムシはカビ等を好む昆虫であるためか，各ビルの試料からみられた．また，Dビルでは冬季の他のビルに比べ多種の昆虫が認められているが，これがパッケージ型空調によるものかは不明である．ゴミ中の昆虫相の量的なものを調査した報告のうち，中田ら[7]の興行場で集められたゴミ中の昆虫相では，チャタテムシ，甲虫類などが圧倒的に多いことが示されている．今回の試料からでも量的には少ないものの，チャタテムシの検出が高いことは，この昆虫があらゆる環境から検出されるということであろう．

一般にカビやダニの最適生育条件をみると，カビが相対湿度で80％以上，ダニは60％以上であり，温度よりも湿度に対しての影響の方が大きいと言われている．

したがって中央空調方式ダクトの中が季節によりどのような温湿度になっているかに関し，調査ビルを含め測定データがないため，当所の当研究室の吹出口を使い，温湿度変化を調査してみた．その結果[8]を平均値でみると，夏季（冷房時）の温度が16℃，湿度が71％であるのに対し，冬季（暖房時）の温度は31℃，湿度は34％であった．ちなみに中間期の平均温湿度は春季が25℃，59％であり，秋季は20℃，43％である．この数値が各調査ビルのダクト内温湿度ではないものの，おおよそビル内に同じような温湿度環境を保っているところから推測すると，ダクト内の温湿度条件はカビやダニの生育には好ましくない状況であると判断された．

最後に化学分析について述べると，今回の試料からも同定されたα-SiO_2（α-石英），$CaSO_4 \cdot 2H_2O$（石膏），$CaCO_3$（方解石）の3成分についての定量（重量％）結果をTable. 4に示した．α-SiO_2についてはビル毎のバラツキがみられるが，6つのビルの平均濃度をみると，α-SiO_2が2.1％，$CaSO_4 \cdot 2H_2O$が0.83％，$CaCO_3$が0.66％となり，ほとんどのビルがこの順に濃度の大小関係がみられております．これらの成分（物質）は大気塵由来と考えられるが，この分野の比較データがないので推測の域を出ません．今後，大気塵への寄与率の高い土

Table. 4 Quantity of identified crystal structure in dust–sample

(weigt %)

	A	B	C	D	E	F
α −SiO_2	3.40	2.86	1.56	1.88	1.36	1.75
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0.92	0.89	0.73	0.68	0.85	0.90
$CaCO_3$	−	0.56	0.66	−	0.98	0.42

Table. 5 Ratio of each component in dust–sample

	A	B	C	D	E	F
Inorganic Component	58%	66	55	63	53	68
Organic Component	42%	34	45	37	47	32
Tar Component	4.8%	5.2	6.5	3.5	8.6	4.3

壌についての成分分析を行ない因果関係を明らかにしたい.

さらに前回同様，無機成分（灰分），有機成分（熱灼減量）及びタール分の割合をみた結果を Table. 5 に示す．無機分と有機分の割合は今までの報告と変らず，平均6：4であったが，タール分については10%を越える濃度のところはなく，平均値でも5.5%と今までの報告（8.4%，8.1%）よりも低い値を示していた．このことはビル毎のバラツキである，あるいはダクト粉塵中のタール分は喫煙由来と考えられるため，昨今の嫌煙啓蒙による喫煙量低下の影響であるとか推察できるが，その原因については不明である.

最後にX線回折分析による物質の同定例として Fig. 1及び Fig. 2 にA，Eビルのものを示した.

ま と め

今回の調査の結果の大要は以下の如くであった

1）検出されたカビの菌種は，一般住宅内でみられるものと変らず，こうじカビ，青カビ，黒カビが大半であるが，量的には少なかった.

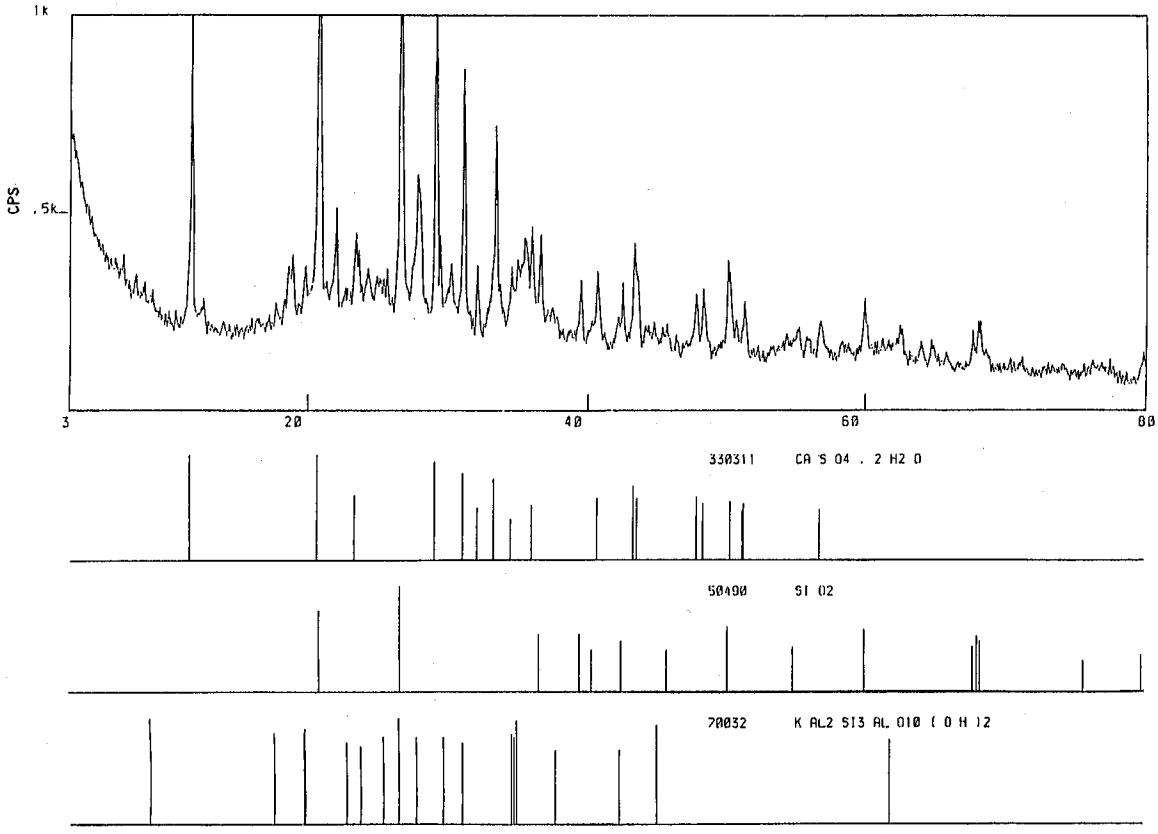


Fig. 1. Scan and search match data of dust–sample at A Building

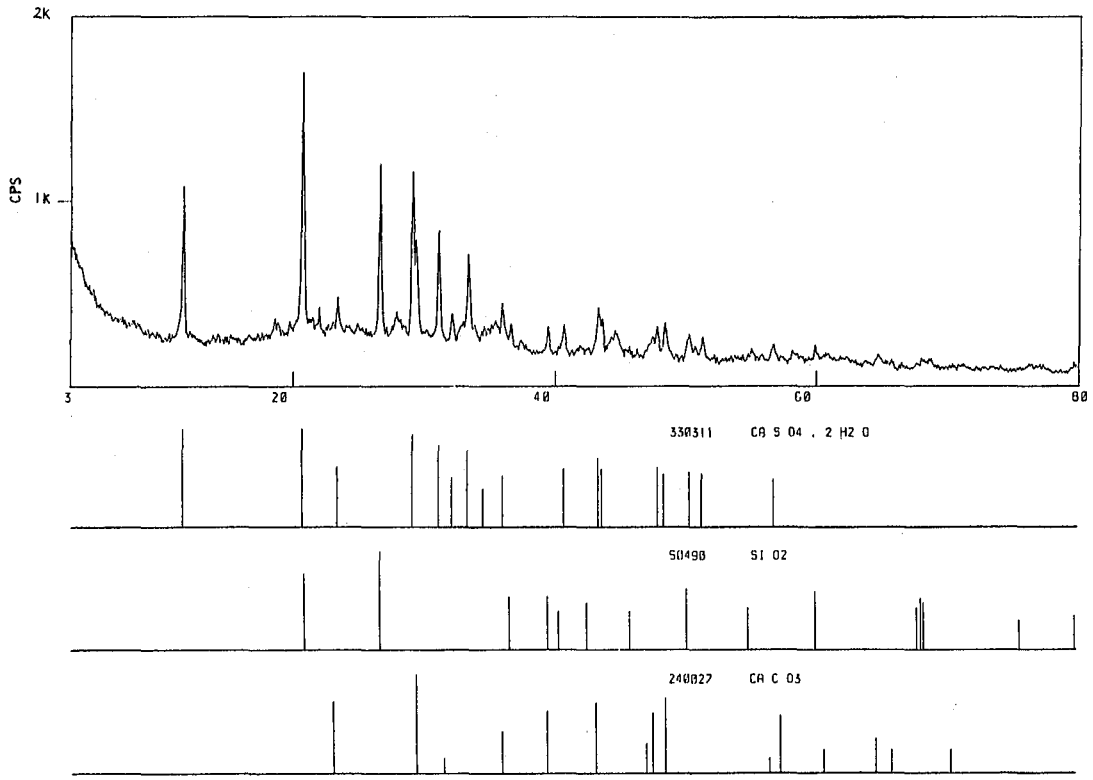


Fig. 2. Scan and search match data of dust–sample at E Building

2）4つのビルの試料より，アスペルギルス・フラバスなどの発ガン性カビ毒の産生を有する菌種がみられた．

3）検出されたダニ相は，カビ相と同じように住宅内で見られるホコリダニ，コナダニが主で，量的には畳等に比べ多くても1／10以下と少量であった．

4）昆虫類についてはカビ類を好むチャタテムシが主で，カビ，ダニ同様少なかった．

5）空調ダクト内の温熱条件（特に湿度）はカビ，ダニの生育条件に対しては好ましくない状況と推測された．

6）主要成分の濃度は平均α-SiO_2が2.1%，$CaSO_4 \cdot 2H_2O$が0.83%，$CaCO_3$が0.66%で，この順に濃度の大小関係がみられた．

7）粉塵の組成比は前報と変らないが，タール分については平均5.5%と低い割合であった．

謝辞 今回の調査試料については，㈱東亜管材，江口弘氏に御協力をいただいたことを記して深謝いたします．

（本研究は昭和61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45回大会1986年10月で発表した．）

参考文献

1）厚生省環境衛生局長通知：「建築物における衛生的環境の維持管理について」昭和58年3月18日

2）建設省建設技術評価書：「建築物の空気調和用フードの内部清掃工法の開発」1987年8月

3）佐藤泰仁：東京衛研年報，33，352-355，1982

4）佐藤泰仁：東京衛研年報，35，324-328，1984

5）一瀬直美，松田良夫：空気清浄，23(4)，9-27，1986

6）松田良夫：関西医大誌，21(4)，94-125，1969

7）中田英吉，吉川 翠：東京衛研年報，28^{-1}，234-240，1977

8）佐藤泰仁：未発表資料

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 309-317, 1987

Prevention of Cheyletid Mite Breeding by Treatment with Insecticides on Tatami-mats in a Concrete Apartment Building (II)

MIDORI YOSHIKAWA*

Three types of insecticides, those containing pyridaphenthion (group A), phoxim (group B), and propoxur (group C), were applied under tatami-mats to prevent cheyletid breeding and control lesions caused by cheyletid bites at 17 homes in a concrete building in May, 1986. At 2 other homes in the same building, tatami-mats were heated by a heating and drying machine for prevention as a control method (group D). The effects of these treatments were checked in August 1986. Results were compared in May and August (before and after treatment) as to the increase or decrease of cheyletid numbers on treated tatami-mats and skin-lesion appearance among residents of the homes.

Cheyletids decreased to less than 1/7 in number in August after the treatment compared to the number before the treatment in May in group A, 1/2 in B, but increased more than 2 times in C, and decreased to about 1/20 in D. Skin lesions appeared on the residents at 2 of the 6 homes in group A, 2 of 6 in B, 3 of 5 in C, and 0 of 2 in D. These results suggest that the best method of reducing cheyletid breeding in tatami-mats and controlling mite bites is the heating method, followed by treatment with pyridaphenthion or phoxim insecticide.

Keywords : prevention, extermination, lesion, cheyletid mite

Introdoction

Yoshikawa (1986) reported that the organophosphorus insecticide containing phoxim was more useful for preventing breeding of cheyletid mites than other insecticides containing fenitrothion or propoxur used in the previous investigation in 1985[1]. In the 5 homes where phoxim insecticide was applied, no skin lesions were found on bodies of the residents, and the number of cheyletid mites increased only in 1 home by September. However, many resident were troubled with skin lesions by September 1985 in homes where insecticides containing fenitrothion or propoxur were applied in May to prevent cheyletids.

There are several reports concerning the effectiveness of insecticides containing fenitrothion, phoxim, and propoxur[2-4]. The reports recommend these insecticides for extermination of cheyletid mites. People usually start to think about cheyletid control only when they are bitten by the mites. Therefore they think more of extermation than prevention. Besides, because of Hayashi's work, insecticides are often considered to be the best way to exterminate mites[4]. However, from our experience, there are no insecticides which can control cheyletids well except phoxim, so we recommend mechanical treatments such as a heating and drying treatment[5-6] rather than insecticides. Our point of view is that insecticides must be more useful for prevention of cheyletids than extermination, but some insecticides may not effect extermination but only prevention of cheyletids, and others the reverse. However, there are few reports concerning prevention of cheyletids and these data are needed for our discussion.

The purpose of this study is to examine : 1) which insecticides are more useful for preventing cheyletids in tatami-mats, 2) whether treatments of insecticides can decrease the appearance of skin lesions in summer, and 3) whether the control method of heating tatami-mats is effective for prevention of cheyletids compared to insecti-

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

cide treatment.

Materials and Methods

The procedure followed is the same as that reported by Yoshikawa (1986), including methods of sample collection, skin lesion checking and water content measuring ; but the investigation was undertaken in a different building and used some different insecticides[1].

A 14-story concrete apartment, built in 1983, was selected for this test. This building is surrounded by Keihin Canal to the south and west, and Tokyo Bay to the east. The 20 apartments selected for the test have the same arrangement : 2 rooms of 6 tatami-mats each, facing west ; 1 room of 4.5 tatami-mats and a wooden floored living room east of the tatami rooms ; and a wooden floored kitchen, wash room, bath room and entrance in the eastern most part. Each apartment has a floor area of about 60m².

Dust samples were collected from one room at each of 20 homes in the middle of May 1986 and again at the end of August of the same year. Residents followed their usual routine throughout the study. In May, dust samples on the surface of one of the 6-tatami-mat rooms were collected into a small paper bag using a vacuum cleaner, spending 1 minute sweeping 1 tatami-mat, without removing heavy material such as piano and funiture. Dust samples were collected for investigation of mite and insect fauna. After the collection, water content was measured at several points on tatami-mats in the room using an instrument.

Next, 3 kinds of insecticides were applied to the bottom of all tatami-mats and under the mats in 6 homes each at a rate of spraying of 100ml／m². That is, 3 kinds of insecticides were treated at 6 homes each, so that the houses treated totaled 18. The remaining 2 homes were used as a control as mentioned below. The 3 kinds of insecticides were : organophosphorus insecticide A, containing mainly pyridaphenthion (group A); organophosphorus insecticide B, phoxim (group B); and carbamate insecticide C, propoxur (group C). Heavy materials were removed from all tatami rooms, so that the insecticides could reach every nook and corner in each tatami room. The amount of raw material of these insecticides was 1.0-1.3 grams／m². As a control, the tatami-mats in all rooms of 2 homes were heated to about 90℃ for over 2 hours using a heating and drying machine (group D). After heating, insecticides B that showed the best effectiveness in our previous test was applied in the same manner as in group B.

At the end of August 1986, occurrence of skin lesion was checked by us for the residents of the 20 homes. Then dust samples were collected from the same tatami-mat as in May. Water contents were also measured for the same tatami rooms.

Mites and insects were extracted from the dust samples using a centrifuging method. Cheyletid mite numbers in May and August were compared. Mite numbers of Ascidae, Tarsonemidae, Pyroglyphidae, Haplochthoniidae, Cosmochthoniidae, others, total mites, and of Psocoptera insects which often appear with mites were also compared. Changes of cheyletids in number in August was considered in relation to appearance of skin lesions, water content of tatami-mats, and household condition : whether houses were closed continuously for over 8 hours daily due to occupation of the residents from the beginning of April through the end of August, as answered on our questionnaires.

Results

Of the 6 homes in group A, skin lesions did not appear on the bodies of the residents in 4 homes (Table 1). However, the number of cheyletid mites decreased in all 6 homes in August after treatment with insecticide A, compared to before treatment in May. In the 2 homes where skin lesions appeared, more than 10 cheyletids per 1 tatami-mat were found (Table 1). The household conditions in group A were better in August than in May because the water content of the tatami-mats was less or only slightly higher, and 4 out of 6 houses were not closed for over 8 hours every day.

By August after treatment the numbers of mites collected in group A decreased by nearly half in most of the mite families, excluding Ascidae and others analyzed with geometric mean. (Fig.1). Cheyletidae, Acaridae, Haplochthoniidae and Cosmochthoniidae especially showed great reduction in number in August.

In the 6 homes of group B, skin lesions appeared on residents of 2 homes (Table 2). In this group, skin-lesion appearance related to increase or non-change of cheyletid number in August and also to closed period in

a day except home XII (Table 2). In home XI, no residents showed any lesions by the end of August, so showed no lesions for the entire last year.

Cheyletids decreased by nearly half using geometric means in August compared to May, and the mite families of Haplochthoniidae and Cosmochthoniidae decreased by more than half, but the other families decreased or increased only slightly (Fig.2).

In group C, skin lesions appeared on residents of 3 out of 5 homes (Table 3). As for the remaining 1 home, insecticide C was used in the tested room but an another kind of insecticide was sprayed in other tatami rooms, so this home was omitted from the data. In 2 of the 3 homes, many cheyeltids were collected and the houses were often closed. The water content in August was higher than in May in the 3 homes where lesions appeared.

By August most mite families decreased in number after application of insecticide C except Ascidae, Cheyletidae, others and Psocoptera (Fig.3). Using geometric means cheyletids doubled between May and August.

In the 2 homes of the cotrol group D, no skin lesions were found and there was great reduction in cheyletid number, and water content also was slightly lower in August, even though those homes had been closed for over 8 hours every day (Table 4).

All mite families except Pyroglyphidae and others decreased in number in August compared to May using geometric means (Fig.4). The reduction was especially evident in Cheyletidae, Haplochthoniidae and Cosmochthoniidae.

Discussion

The building used for this test is surrounded by a canal and bay to the south, west, and east, a location which is best to show dramatic results of the effectiveness of insecticides used for prevention. High humidity in the surrounding air helps breeding of cheyletids and the other indoor-living mites shown on Figs. 1-4, but is worse for insecticides which lose their effectiveness faster in moist places.

The first purpose of this study is to examine which insecticides among those containing pyridaphenthion, phoxim and propoxur prevent cheyeltid breeding in tatami-mats. There were 7 homes where cheyletid number in August decreased by more than half of the number before treatment in May, even though the data were collected 3 and a half months after treatment. The air is generally dry and cool in May but wet and warm in August, so the mites can breed faster in August than in May, and in addition this location has higher humidity because of the canal and bay. The 7 homes were Nos. I, II, IV, VI in group A, VIII, XI, XII in group B, and no homes in group C (Table 1-3). There were 10 homes where the cheyletids collected in August were less than 8 which is the limit number to cause lesion appearance as mentioned below (see P. 311). These homes were II, IV, VI in group A ; VIII, IX, X, XII in group B ; and XIII, XIV, XV in group C. Thus, all 3 kinds of insecticides were useful, even though it must be remembered that the cheyletid numbers had been few in some homes in the May survey so that these homes were well taken care of and therefore the mites hardly incresed.

Insecticide A was used first in our test. There are no data to be compared with our results. Only a few personal communication showed that this insecticide might allow living cheyletids on the surface of tatami-mats and therefore promote lesion appearances when it was used on bottom of tatami-mats for extermination in homes. Our results showed that this insecticide might be useful for prevention of cheyletids. This antipodal result can be explained by the fact that this insecticide works as a repellant because of its irritating swell. Cheyletids escape from irritating odors such as nafthalin[7]. This insecticide might release its odor for over 3 months because the raw material is sealed with acrylic resins and is gradually released. This repellant-theory is proved by the result that most of mite families were reduced at least by half after treatment (Fig.1). This insecticide may be a good example to teach people that prevention of cheyletids is different from extermination. Insecticide C is another example to show that results are different in prevention and extermination. Cheyletid number in all except 1 home increased after treatment in our test (Table 3). But Hayashi (1986) reported that this insecticide could decrease cheyletid numbers down to 1/3 on the 8th day after treatment[4]. Insecticide C might be able to maintain its effective control of the mites but not for a long period. On the contrary, insecticide B containing

Table 1. Effectiveness of organophosphorus insecticide A applied to the bottom of and under tatami-mats, and household codition of each homes.

Effectiveness etc \ Home No.	I	II	III	IV	V	VI
Presence or absence of skin lesions (checked by us) in August	absence	absence	presence	absence	presence	absence
Cheyletid mite number in May/Aug.	156/12	83/2	17/10	9/2	19/12	65/3
Average water content(%) of tatami-mats in May/Aug.	10.0/9.8	9.1/8.8	9.7/9.2	8.5/9.0	10.7/9.3	9.4/11.1
Home closed or not-closed continuously for 8 hrs. every day in May/Aug.	closed/ closed	not-closed/ not-closed	not-closed/ not-closed	closed/ closed	closed/ not-closed	closed/ not-closed

Note 1) May/Aug. means values in May compared with those in August.
2) Home not-closed includes small openings of windows.

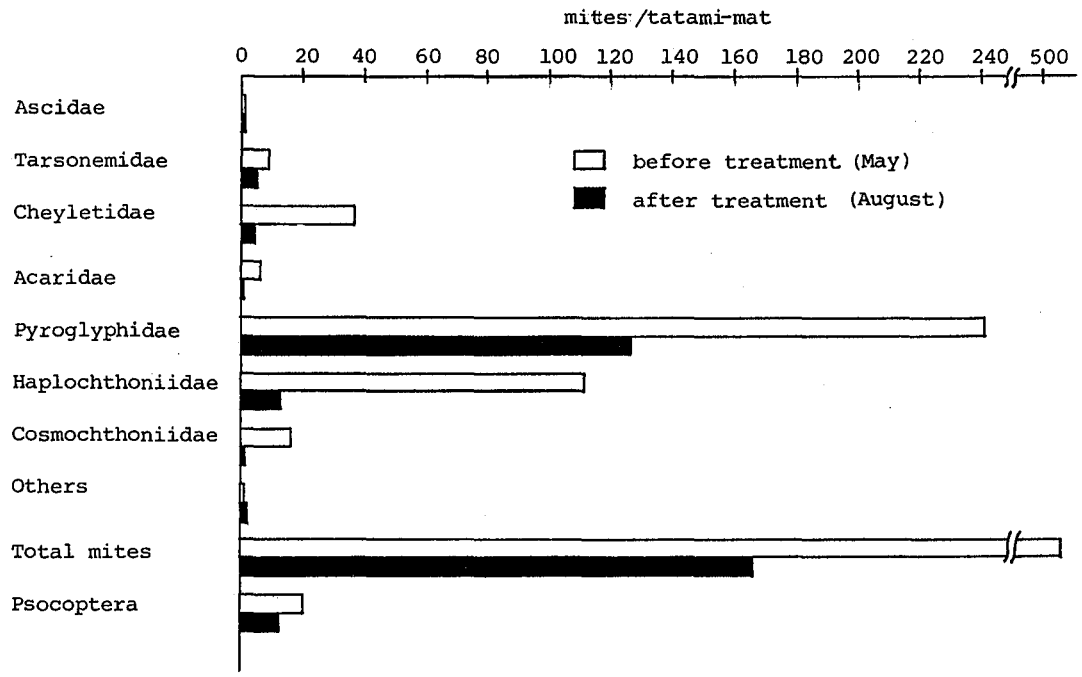


Fig. 1. Geometric means of mites collected from tatami-mats at 6 homes before (May) and after (August) application of organophosphorus insecticide A.

Table 2. Effectiveness of organophosphorus insecticide B applied to the bottom of and under tatami-mats, and household codition of each home.

Effectiveness etc \ Home No.	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Presence or absence of skin lesions (checked by us) in August	presence	absence	absence	presence	absence	absence
Cheyletid mite number in May/Aug.	11/19	8/4	3/2	5/5	75/15	8/1
Average water content(%) of tatami-mats in May/Aug.	9.4/10.5	8.5/8.8	9.5/11.2	9.4/11.1	9.4/11.2	11.2/10.9
Home closed or not-closed continuously for 8 hrs. every day in May/Aug.	closed/ closed	not-closed/ not-closed	not-closed/ not-closed	closed/ closed	not-closed/ not-closed	closed/ closed

Note 1) May/Aug. and home not-closed mean same as in Table 1.

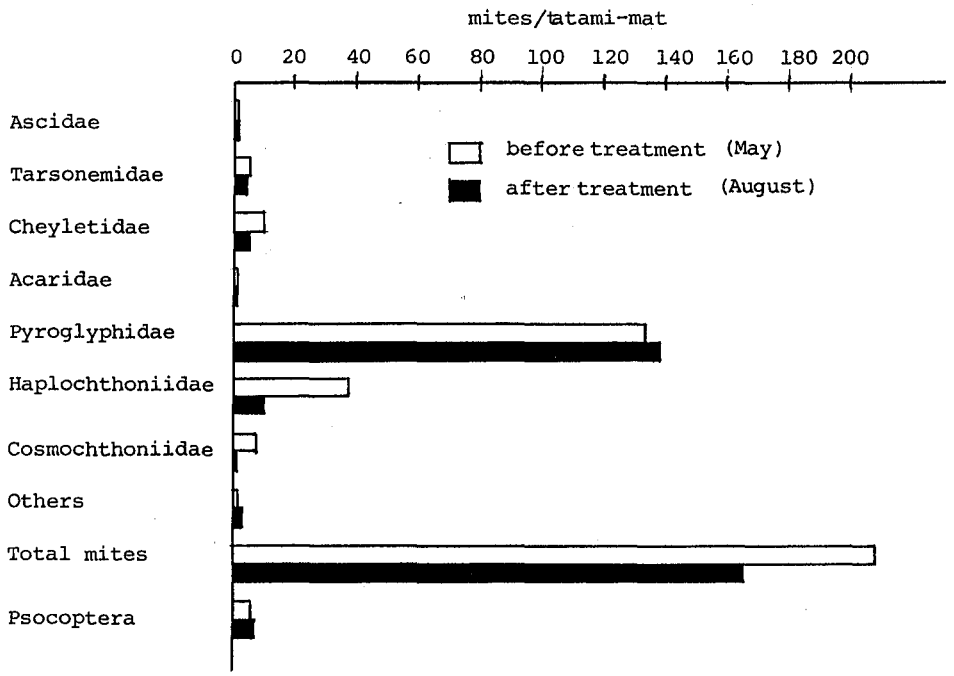


Fig. 2. Geometric means of mites collected from tatami-mats at 6 homes before (May) and after (August) application of organophosphorus insecticide B.

Table 3. Effectiveness of carbamate insecticide C applied to the bottom of and under tatami-mats, and household codition of each home.

Effectiveness etc \ Home No.	XIII	XIV	XV	XVI	XVII
Presence or absence of skin lesions (checked by us) in August	absence	absence	presence	presence	presence
Cheyletid mite number in May/Aug.	1/6	2/5	7/5	25/61	21/32
Average water content(%) of tatami-mats in May/Aug.	9.9/8.9	10.3/10.6	9.4/11.9	10.4/13.5	10.1/11.7
Home closed or not-closed continuously for 8 hrs. every day in May/Aug.	not-closed/ not-closed	not-closed/ closed	not-closed/ not-closed	closed/ closed	closed/ closed

Note : 1) May/Aug. and home not-closed mean same as in Table 1.
2) One home was omitted from data because of mistakes in insecticide treatment.

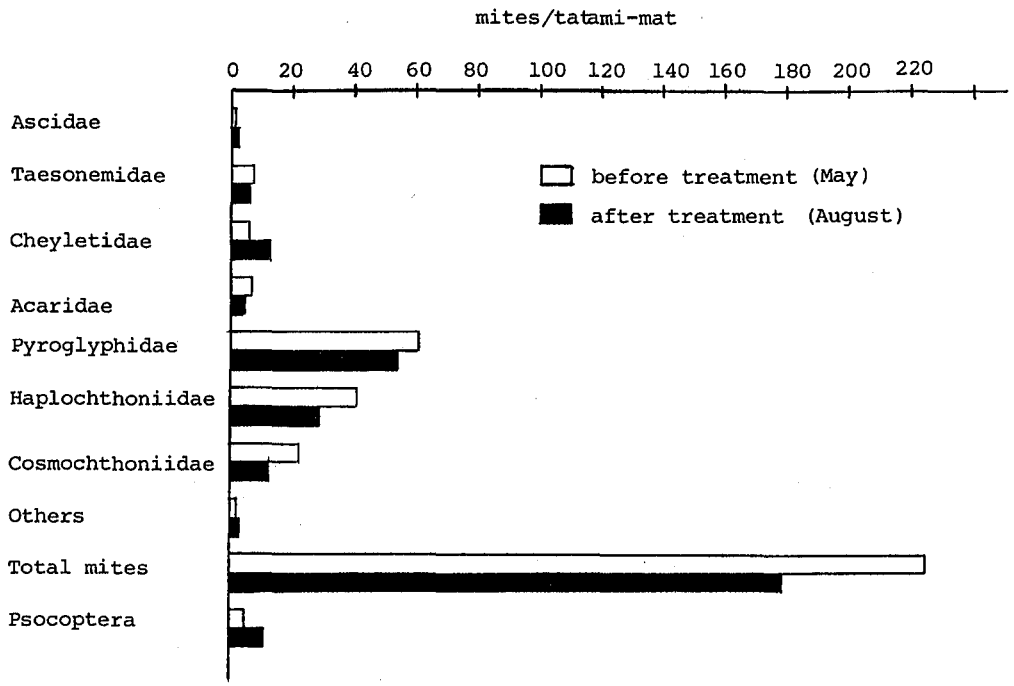


Fig. 3. Geometric means of mites collected from tatami-mats at 5 homes before (May) and after (August) application of carbamate insecticide C.

Table 4. Effectiveness of heating tatami-mats to about 90℃ for over 2 hrs. and then appling organophosphorus insecticide B to the bottom of and under tatami-mats, and household codition of each home.

Effectiveness etc \ Home No.	XVIII	XIX
Presence or absence of skin lesions (checked by us) in August	absence	absence
Cheyletid mite number in May/Aug.	73/5	113/4
Average water content(%) of tatami-mats in May/Aug.	9.1/8.9	9.4/9.1
Home closed or not-closed continuously for 8 hrs. every day in May/Aug.	closed/ closed	closed/ closed

Note : 1) May/Aug. and home not-closed mean same as in Table 1.
2) Tatami-mats were covered by a carpet in home XIX until our May survey.

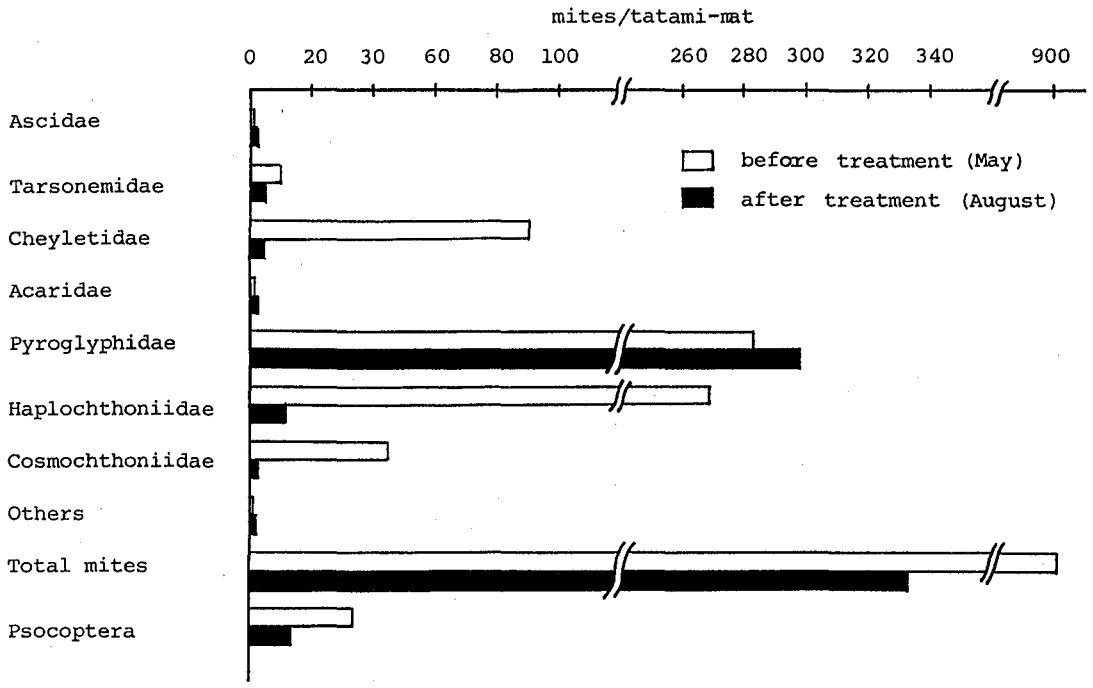


Fig. 4. Geometric means of mites collected from tatami-mats at 2 homes before (May) and after (August) heating the mats with application of organophosphorus insecticide B afterwards.

phoxim is good for prevention and extermination of cheyletids, since Ito (1986) reported that it could decrease cheyletids living on the surface of tatami-mats on the 7th day after treatment in homes where the resident had suffered cheyletid bites[3]. In the results observed this time, effective control of cheyletids was a little worse than the excellent results of the previous test, since the selected building is located in a moist place which provides favorable condition for the mites but might be severe for this insecticide.

The second purpose of this study is to examine whether insecticides can control appearance of skin lesions. The lesions were not found in homes Nos. I, II, IV, VI in group A, VIII, IX, XI, XII in group B, XIII and XIV in group C (Table 1-3). Most of the residents except those of home XI were troubled with rashes caused by cheyletid bites last year (checked by us), so during the test period they were likely to be bitten and have rashes because of allergic reactions. Of 17 homes, the residents of 10 homes showed no lesions, so it is possible that these insecticides sometimes prevented bites.

Skin lesions caused by cheyletids start to appear at 1 cheyletid／1-m^2-surface. Lesions often appear at 5 cheyletids／1-m^2-surface, reported by Yoshida[8]. Skin-lesion appearance is also strongly related to cheyletid numbers collected from tatami surfaces in our test (Table 1-4). In 10 homes in the August survey, there found no lesions and cheyletid mite numbers did not exceed 8／1-tatami-mat-surface (5 mites／m^2 × 1.6m^2 of 1 tatami-mat =8 mites). In 5 homes, lesions were found and cheyletids exceeded 8／mat. In the remaining 4 homes, lesions appeared but cheyletids were less than 7, or no lesions appeared but cheyletids exceeded 8 including home XI. So a total of 15 out of 19 homes showed a relationship between lesion appearance and cheyletid number collected from mat surface.

Cheyletid number is also related to amount of time homes are closed (Table 1-4). In the May survey, there were 10 homes where more than 8 cheyletids were collected from 1 tatami-mat and those homes were closed for over 8 hours every day, while there were 4 homes where less than 7 cheyeltids were collected and these homes were not closed. So it can be concluded that cheyletid bites increase if doors and windows are closed continuously. On the contrary, the May survey showed no relation between valuse of water cotent and cheyletid number. No relation might be caused by the fact that the needles which are inserted into a tatami-mat to measure water content inside the mat are too short (2-3cm) to measure the condition of a whole tatami-mat which has a thickness of about 6cm.

The heating method which was used as a control in the test gave the best result because no lesion appeared on the residents of the homes treated and there was a great reduction of cheyletids on tatami-mat surfaces in August using a geometric mean, even though the 2 homes in this group were closed during the year as the residents went out daily for school and work (Table 4, Fig.4). From our experience, this method is the most useful for extermination, too. Cheyletid bites could be prevented from the day that tatami-mats were heated to about 90-100℃ for over 2 hours which was reported by Yoshikawa[5,6]. All mite families decreased greatly in number except mites of Pyroglyphidae which feed on scales and are often found around the surfaces of tatami-mats or bed clothes, and are controlled mainly by frequent vacuuming.

References

1) Yoshikawa, M. : Tokyo-to Eiken Nenpo, 37, 269, 1986.
2) Mizutani, S. : Mites, Ticks and Their Control, ed. by Sasa, M., 153, 1984, Japan Environmental Sanitation Center, Kawasaki.
3) Itoh, H., Shimada, K. and Taki, H. : Annual Report of Nagoya City Health Research Institute, 32, 45, 1986.
4) Hayashi, F. : Hohto PCO News, 118, 1, 1986.
5) Yoshikawa, M. : Pest Control, 38, 1, 1982.
6) Yoshikawa, M. : The Society for Antibacterial and Antifungal Agents, 15(1), 39, 1987.
7) Yoshikawa, M. : unpublished data.
8) Yoshida, M. : Biruno Eiseikanri, 8, 29, 1984.

殺虫剤によるツメダニの予防効果（Ⅱ）

吉川　翠*

3種類の殺虫剤，すなわちピリダフェンチオン製剤（グループA），ホキシム製剤（グループB），プロポクスル製剤（グループC）をそれぞれ6世帯ずつ（グループCのみ5世帯）合計17世帯の畳の裏面と畳の下の床面にまくと，人を刺すツメダニの数が減少するのか，また，その結果としてツメダニによる刺咬症の発症が防止されうるのかを調べた．殺虫剤は，1986年5月中旬に，コンクリート住宅内の畳部屋に散布した．同じ住宅内の2世帯では，布団乾燥車で畳を加熱乾燥した（グループD）．8月末に，ツメダニ数の減少（5月に比べて）と，居住者間での皮疹発症の有無を調べ，殺虫剤散布による予防効果と，加熱処理による予防効果を比較検討した．

グループAでは，8月調査時のツメダニ数が5月時の1／7に減少していた．グループBでは1／2になったが，グループCでは逆に2倍に増加した．一方グループDでは1／20に減少した．居住者間での皮疹の発症は，グループAとBとでそれぞれ，調査世帯数6世帯のうち2世帯にみられた．グループCでは5世帯中3世帯にみられたが，グループDでは2世帯のいずれにもみられなかった．これらの結果から，ツメダニの発生を予防し，さらに，皮疹の発症をも防止できる最適な方法は加熱処理であり，その次に有効なのがピリダフェンチオンやホキシム製剤による殺虫剤処理であるといえる．

*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

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 318-322, 1987

東京のツツガムシ相（第3報）
町田市のツツガムシ病患者宅付近で捕獲したネズミにみられたツツガムシ類

大野正彦*, 吉川翠*, 林田陽**, 三井田建城**
林績**, 福本拓夫**, 中島達也***, 檜谷哲夫***
長良健次***, 朝倉幸子****, 佐藤秀男****, 佐藤明****,
藤野守正****, 鵜飼恒治****, 露木眞澄****, 皆川信一****,
橋本憲一****, 池田誠****, 長田好弘****, 高野興三****,
吉岡毅****

Trombiculid Mites of Tokyo (III)
Trombiculid Mites from Rodents Captured near the House where a Case of Tsutsugamushi Disease Occurred in Machida City

MASAHIKO OHNO*, MIDORI YOSHIKAWA*, YOU HAYASHIDA**, TATEKI MIIDA**,
ISAO HAYASHI***, TAKUO FUKUMOTO**, TATSUYA NAKAJIMA***, TETSUO HINOTANI***,
KENJI NAGARA***, YUKIKO ASAKURA****, HIDEO SATO****, AKIRA SATO****,
MORIMASA FUJINO****, TSUNEHARU UKAI****, MASUMI TSUYUKI****, SHIN-ICHI MINAGAWA****,
KEN-ICHI HASHIMOTO****, MAKOTO IKEDA****, YOSHIHIRO OSADA****, KOZO KOHNO****
and TAKESHI YOSHIOKA****

A case of Tsutsugamushi disease occurred in Machida city in December, 1984. In order to determine the vector of the disease, rodents were captured near the house where the case occurred and larval trombiculid mites found on the rodents were identified.

Two Japanese wood mice (*Apodemus speciosus*) were captured in April of 1985 and one more Japanese wood mouse in November of the same year. Five species of trombiculid mites, *Leptotrombidium pallidum*, *L. fuji*, *Neotrombicula japonica*, *N. mitamurai* and *Gahrliepia saduski* were collected from the rodents. *L. pallidum* was dominant among these mites and regarded as the vector of the disease in the locality.

Keywords: trombiculid mite, *Leptotrombidium pallidum*, *Apodemus speciosus*, Tsutsugamushi disease

1．はじめに

1985年1月17日，都内町田市で農業を営む男性（当時66才）がツツガムシ病と確認された[1]．この男性は84年12月16～20日に発熱，咳嗽，頭痛，関節痛，顔や軀幹の発疹，悪心，嘔吐などの症状が現れ[2]，同月24日杏林大学付属病院に入院した．ツツガムシ病リケッチアに対する抗体価（補体結合反応）の有意な上昇を認め，同院においてツツガムシ病と診断された[2]．患者はその時期都外へ出たことがなく[1]，もっぱら自宅近くの畑や山で草刈り作業をしており，ここでツツガムシ病に感染したと推測された[3]．東京都では伊豆七島を除き戦後初のツツガムシ病患者であった．我々（都衛生局防疫結核課，環

*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
**東京都衛生局公衆衛生部防疫結核課
***東京都衛生局環境衛生部環境衛生課
****東京都町田保健所

境衛生課，町田保健所，衛生研究所）はツツガムシ病の予防対策に資するため，その実態を知ろうと調査を行った．本報では，患者宅付近のネズミに寄生していたツツガムシ類について報告する．

2．調査方法

1985年4月8～12日，11月11～14日に患者宅の裏手の山の畑や藪（Fig. 1）でネズミの捕獲を試みた．この裏山は切り崩され，畑になり，ススキなどの二次植生が生えていた．捕獲には，4月はシャーマン式トラップ10個，金網製生け捕り篭30個を用いた．また，11月は前者を30個，後者を10個，パンチュウ式トラップ10個を用いた．捕獲用の餌として食用油を塗った甘藷を用いた．毎日，捕獲の有無を確かめた．

捕れたネズミは直ちに研究室に持ち帰り，リッケチア分離のため内臓を摘出した後，ポリエチレン瓶に入れ，消毒用アルコールに浸し保存した．その後，ネズミを取り出し，ブラシ，筆などでネズミの体からツツガムシ幼虫を丁寧に取り外した．また，ネズミをよく洗い，その洗浄液やポリ瓶中のアルコールをろ過し，ろ紙上のツツガムシ幼虫を実態顕微鏡下で拾った．採集したツツガムシ幼虫はガムクロラール液で封入し，標本を作った．形態を調べて同定し，各種個体数を算定した．

3．結果と考察

4月12日にアカネズミ（*Apodemus speciosus*）2匹，11月14日にアカネズミ1匹を捕獲した．それらに寄生していたツツガムシ幼虫の個体数をTable 1に示した．5種のツツガムシ，すなわち，フトゲツツガムシ（*Leptotrombidium pallidum*, Fig. 2），フジツツガムシ（*L. fuji*），ヤマトツツガムシ（*Neotrombicula japonica*），ミタムラツツガムシ（*N. mitamurai*），サダスクガーリエプツツガムシ（*Gahrliepia saduski*）がみられた．中でも，三浦半島や伊豆半島で新型ツツガムシ病を媒介する[4]フトゲツツガムシと，最も普通にみられる[5]がリケッチア陽性例のない[4]フジツツガムシが多かった．11月に捕獲したネズミには特にフトゲツツガムシの個体数が多く（608個体），総個体数（767個体）の約8割を占めた．それに反し，伊豆七島のツツガムシ病媒介種である[6-9]タテツツガムシ（*L. scutellare*）はみられなかった．

谷川ら[10]は，我々と同時期に町田市郊外の山野で野鼠の外部寄生虫を調べ，フトゲツツガムシ，フジツツガムシ，サダスクガーリエプツツガムシを検出した．そして，町田市のツツガムシ病はフトゲツツガムシによって起こっている可能性が高いと報じた．

以上のことから，町田市で'84年12月に発生したツツガムシ病はフトゲツツガムシによるものと思われる．

では，何故，患者宅付近で捕獲したアカネズミに多数のフトゲツツガムシが寄生していたのだろうか．アカネズミは低山，草原で極めて優勢な野鼠であるから[11]，調査地（Fig. 1）では多数のアカネズミが生息していると思われる．また，Traubら[12]によると，調査地のような人為的にかき乱された環境ではツツガムシ病媒介種がよくみられるという（その理由は不明）．4月の調査では町田市内の開発のあまり進んでいない森でネズミの捕獲を試みたところ，ヒメネズミ（*Apodemus argenteus*）5匹を捕獲したが，フジツツガムシ，ミヤジマツツガムシ（*L. miyajimai*）などの幼虫が少数付いていたにすぎず，フトゲツツガムシはみられなかった[13]（フトゲツツガムシはヒメネズミにも寄生する[14]）．一度の調査結果で言及するのは難しいが，自然に人の手が加わると媒介種が多くなるようである．また，Traubらは，ツツガムシ幼虫の多くは一般的に寄主依存性は低く，その生息場所にいる哺乳動物どれにも寄生する傾向にあると述べている．フトゲツツガムシとアカネズミの生息場所が一致し，多数のフトゲツツガムシがアカネズミに寄生したと考えられる．

フトゲツツガムシは，盛夏に幼虫が現れるアカツツガムシ（*L. akamushi*，古典型ツツガムシ病媒介種）や，晩秋から初冬に多いタテツツガムシと異なり，一般に春と秋に多くの幼虫が出現する[5]．町田市のツツガムシ病がフトゲツツガムシによるものなら，都内で春に患者が

Table 1．Species and Number of Larval Trombiculid Mites Collected from Rodents Captured near the House where the Case of Tsutsugamushi Disease Occurred in Machida City

Rodents	Date	Sex	Numbers of Larval Trombiculid Mites					Total
			L.pallidum	*L. fuji*	*N. japonica*	*N. mitamurai*	*G. saduski*	
Apodemus speciosus	April 12 '85	F	299	157		1	4	461
Apodemus speciosus	April 12 '85	F	96	385			1	482
Apodemus speciosus	Nov. 14 '85	M	608	155	2		2	767

発生しても不思議でないと思っていた．果たして，'87年4月23日，都内五日市町に住む男性（当時60才）がツツガムシ病と診断された[15]．桧原村の山林に入った際，刺されたらしく[15]，島部を除く都内での発生は町田市に次ぎ2人目であった．春に発生した，このツツガムシ病もフトゲツツガムシによるものと思われる．

Rapmund[16]は，我が国のツツガムシ病が再び流行しだしたのは，人間活動，特に土地利用の変化に一因があると述べた．山野を開発し（森林を伐採し），環境（植生）を変化させたことでネズミや媒介ツツガムシが多くなり[12]，それにつれ患者が増えたと言うのである．また，Rapmundは農民や兵士がツツガムシ病にかかり易いとも述べた．町田市の患者は農民で，家の裏手の山に畑を持ち，発病時には，その山の上が切り開かれ造成中だった．この町田市の発生例はRapmund[16]の指摘通りであった．

我が国で，ツツガムシ病と環境との関係を明確に指摘したのは矢部[17,18]の報告である．彼は，神奈川県のツツガムシ病患者が東名高速道路沿いに発生する傾向のあることから，東名道の法面（斜面）のネズミに寄生するツツガムシを調べた．この法面は東名道開通以来放置されススキやクズが生い茂り，アカネズミと，タテツツガムシ，フトゲツツガムシを主体とするツツガムシ類が採集されたという．そして，放置された法面がアカネズミのすみつきを促し，ツツガムシ類の分布を拡大させ[17]，ツツガムシ病の一因となっている可能性が高いと指摘した[18]．

都内でも三多摩地域で宅地の開発が急激に進み，ツツガムシ類の発生を助長しているように思われる．今後，ツツガムシ病に充分な注意が必要である．

謝辞　本調査で捕獲したネズミを同定していただき，ネズミおよびツツガムシの生態について御教示を賜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．

文　献

1）朝日新聞：1985年1月19日号（夕刊）
2）尾崎芳樹他：日内会誌，75，140，1985
3）毎日新聞：1985年1月19日号（夕刊）
4）浅沼　靖：臨床と細菌，10，174-179，1983
5）佐々　学：恙虫と恙虫病，1956，医学書院
6）東京都衛生局予防課：七島熱の研究，総括編，1957
7）村田道里他：感染症雑誌，54，235-241，1980
8）大野正彦：東京衛研年報，36，319-321，1985
9）大野正彦：東京衛研年報，37，259-268，1986
10）谷川　力他：第37回日本衛生動物学会東日本支部大会講演要旨集，9，1985
11）今泉吉典：原色日本哺乳類図鑑，142，1960，保育社
12）Traub, R. and Wisseman, C. L., Jr.：*J. Med. Ent.* 11, 237-303, 1974
13）東京都衛生局公衆衛生部防疫結核課：最近のつつが虫病について，19，1986
14）Tamiya, T.（ed.）：*Recent Advances in Studies of Tsutsugamushi Disease in Japan*, 227, 1962, Medical Culture Inc., Tokyo
15）サンケイ新聞：1987年4月24日号（朝刊）
16）Rapmund, G.：*J. Infect. Dis.*, 149, 330-338, 1984
17）矢部辰男：第38回日本衛生動物学会大会講演要旨集，32，1986
18）毎日新聞：1986年6月1日号（朝刊）

Fig. 1. A View of the Trapping Site
Cage-Traps and Sherman Box-Traps Baited with Sweet Potatoes were set for Rodents at the Farm and in the Scrub

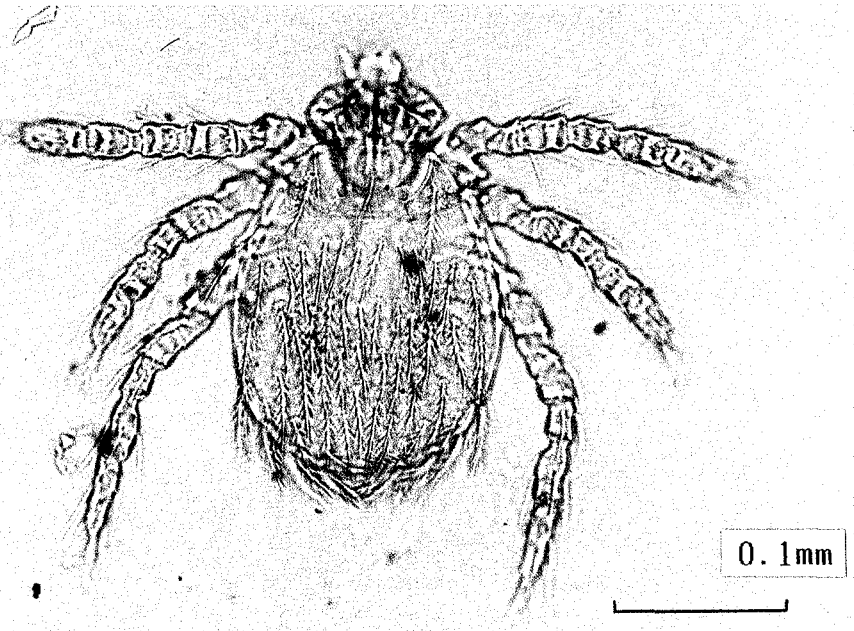


Fig. 2. *Leptotrombidium pallidum* (Larva)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 323-328, 1987

水道水中に観察された微細藻類

渡 辺 真利代*, 笹 野 英 雄*, 村 松 学**

Microalgae Observed in Tap Waters

MARIYO F. WATANABE*, HIDEO SASANO* and MANABU MURAMATSU**

緒 言

ビルやマンションなどの飲料水は，受水槽から高置水槽を経由して各階の蛇口から給水される方法がとられているが，最近この高置水槽内に藻類の繁茂する現象が多くみられ，その管理が問題になるようになった．このような背景から，著者らは特に藻類発生の多いFRP（Fiberglass Reinforced Plastics）製高置水槽について都内区における藻類の繁殖状況調査を実施した．その結果，調査施設水槽の30～50％に藻類の繁殖が観察されたことを報告した[1]．

藻類の繁殖には，種となる藻類の混入とその増殖を保障する光の存在が必要条件となる．既設FRP製高置水槽は比較的光透過性の良いものがあり藻類の繁殖条件に適しているものが多い．この件については著者らは既に藻類増殖防止に関する照度基準の検討を行い槽内照度を100 luk以下にすることで効果のあることを報告している[2]．本報では，高置水槽内における藻類増殖防止の目的で行った一連の調査の中で，藻類の由来をみるため実施した水道水中に観察された藻類種についての調査結果を報告する．

方 法

1985年および1986年の6月下旬から7月上旬にかけて都内の3水系について調査を実施した．直結栓水50～100 l を15,000rpmで連続遠心後，1 ml～5 ml に濃縮し，その一定量を検鏡した．

結果および考察

水道水中に観察された微細藻類の例を写真1に示した．大部分がプランクトン性の種類であり，塩素処理などによって細胞の一部が壊れているものや，糸状体の一部が切れたものなどがみられた．

表1には3水系の1985年の結果を示した．1 l あたりの平均細胞数はA水系で2,600，B水系で80，C水系で4,000となっており，B水系が極めて低い値を示していた．A水系では *Oscillatoria limnetica*（図1－9）と *Ankistrodesmus falcatus* が目立つ種類であり，B水系では比較的多くの種が観察され，優占種を特定できる程観察された種はなかった．C水系は *Chlamydomonas sp.*（あるいは他の緑藻種の運動性細胞）がほとんどであったが，中には細胞の一部が破壊されているものがみられた．表2には1986年の結果を示した．A水系は1 l あたりの細胞数が4,500で昨年の約1.7倍であったが，C水系は昨年の1／40以下の細胞数であった．A水系で細胞数の多かったものは，*Ankistrodesmus falcatus* および *Kirchneriella contorta* であり，次には *Oscillatoria limnetica* と同定できなかった丸型の緑藻が多くみられた．B水系は比較的種類数が多く，特に優占しているものはみられなかった．C水系は写真1－6にみられるような *Anabaena* が多かった．ここで得られた1 l あたりの細胞数は，例えばA水系の原水が10^7オーダの植物プランクトンを含むことからすると極く少い数といえる．

小島によると[3]浄水場での塩素処理に強い藻類は，ろ過池でおびただしく繁殖するという．また，原水を処理する際に存在する植物プランクトン種によって塩素処理に必要な塩素剤の注入率は異なり，*Achnanthes, Phormidium, Coccomyxa* が多い場合には高い塩素注入率となることも報告されている[4]．即ち，塩素に強い藻類が浄水場から水道配管を通り高置水槽まで運ばれる可能性は存在することになる．

これを確証するためには，直結栓水中にある藻類の生死をさらに調べて行く必要がある．この他，高置水槽中の藻類由来については通気孔から運ばれる可能性のある大気由来についても調査を併行する必要があろう．

*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
**杉並区西保健所衛生課

表1．水 系 別 藻 類（1985年）

種類	水系 A	B	C
Blue-green algae			
Chroococcus sp.		+	
Oscillatoria limnetica	1,100		
Lyngbia sp.	+		+
Anabaena sp.			
Diatom			
Cyclotella comta	+	+	+
C. meneghiniana			+
Cyclotella sp.			
Melosira distance		+	
M. variance		+	
Synedra ulna	+	+	+
Synedra acus	+	+	
Synedra spp.			+
Asterionella gracilima		+	
Roichosphenia sp.		+	
Achnanthes spp.	+	+	+
Navicula spp.	+	+	
Nitzchia acicularis	+		
Nitzchia spp.	+	+	+
Ceratoneis sp.			+
Green algae			
Ankistrodesmus falcatus	900	+	+
Kirchneriella contorta	+		
Kirchneriella sp.	+		
Crucigenia sp.	+		
Schroederia setigera	+		
Tetrastrum staurageniaforme		+	
Scenedesmus spp.	+		
Cosmarium sp.		+	
Chlamydomonas sp. (?)			3,900
平均細胞数／*l*	2,600	80	4,000

表2．水 系 別 藻 類（1986年）

種類	水系 A	B	C
Blue-green algae			
Chroococcus spp.	+	+	+
Aphanocapsa sp.			+
Anabaena sp.	+	+	25
Oscillatoria limnetica	300	+	
Phormidium sp.		+	
Diatom			
Cyclotella spp.	+	+	+
Melosira sp.		+	
Fragilaria crotonensis			+
Fragilaria sp.		+	
Achnanthes sp.		+	
Synedra acus	+		
S. ulna		+	
Synedra spp.	+	+	
Navicula spp.	+	+	+
Nitzchia acicularis	+	+	
Nitzchia spp.	+	+	+
Cymbella spp.		+	+
Green algae			
Ankistrodesmus falcatus	1,600	+	+
Kirchneriella contorta	1,900		
Crucigenia sp.	+		
Scenedesmus spp.	+	+	
Franceia tuberculata	+		
Chlamydomonas sp.	+		+
unidentified	300		
平均細胞数／l	4,500	99	86

文 献

1）前田正憲，村松 学他：東京都衛生局学会誌，75, 88-89, 1985

2）渡辺和範，村松 学他：東京都衛生局学会誌，78, 138-139, 1987

3）小島貞男：水道協会雑誌，244, 24-26, 1955

4）小島貞男：用水と廃水，15, 68-74, 1973

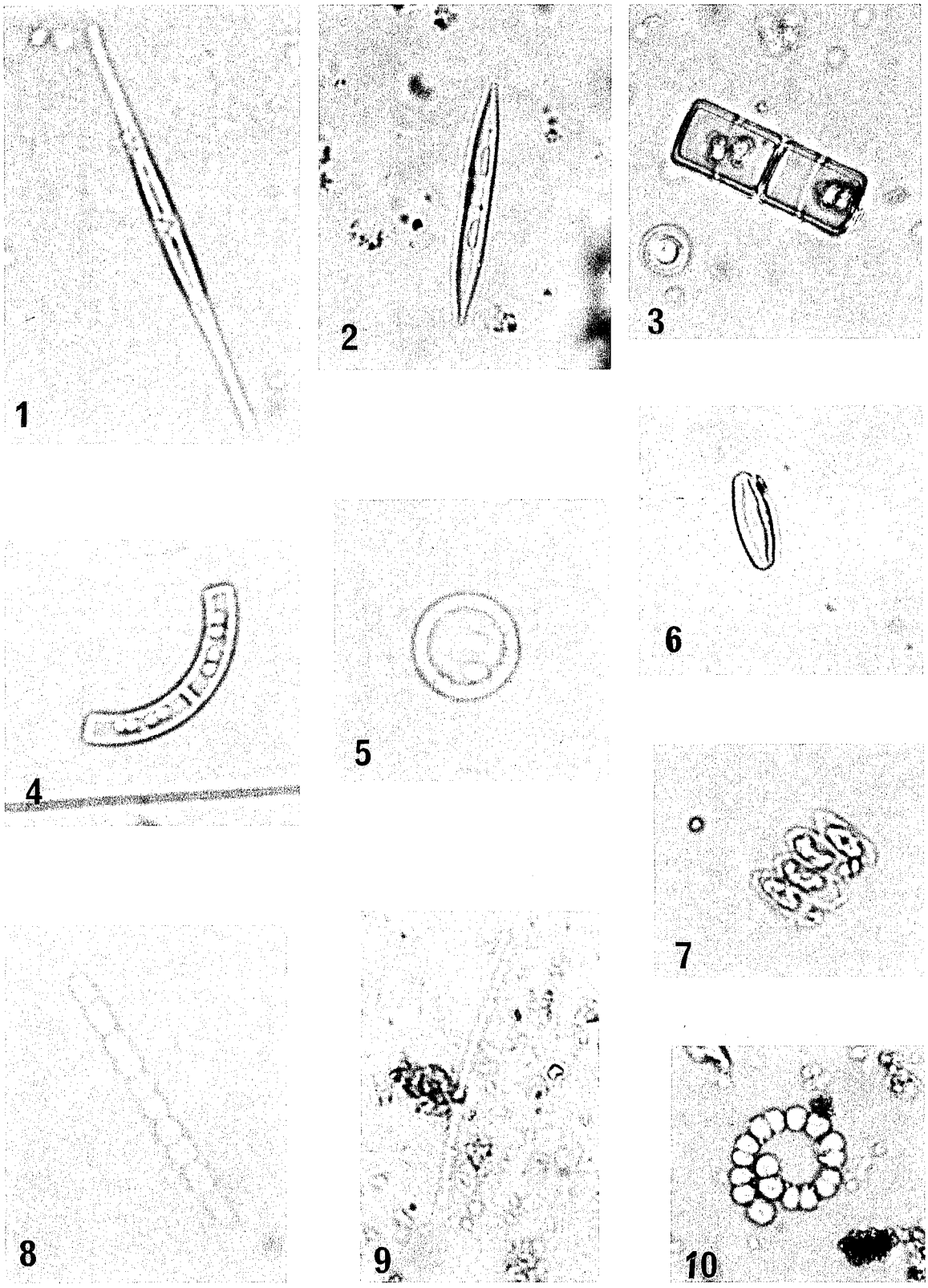


図1．水道水中の藻類の例（珪藻：1～6，緑藻：7，藍藻：8～10）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 329-332, 1987

皇居外苑濠の植物プランクトンI

渡 辺 真利代*, 土 屋 悦 輝*

Phytoplankton in Outer Moats around the Imperial Palace

MARIYO F. WATANABE* and YOSHITERU TSUCHIYA*

緒　　言

皇居外苑濠は都心にあって貴重な緑に囲まれた中にあり，周囲と調和した良好な水質が望まれると同時に，緊急時には簡便な処理によって飲料に供しえる水質であることが要求されている．

一般に水界の富栄養化あるいは汚染によって窒素や燐が増加するとともに植物プランクトン量が増加し，全燐又は全窒素量と植物プランクトン量の間には直線関係があることが示されている[1]．皇居外苑濠は1930年倉茂[2]よって水の華の出現が報告されているが，量的にはかなり少ないものである．しかしその後の富栄養化により，近年の濠水では，春先から秋期にかけて全外濠で水の華が出現している．

ここでは植物プランクトン量の最近6年間の変化と主な優占種である *Microcystis* 属の組成についてまとめた．

方　　法

採水は皇居外苑濠を左回りに一周する形で，日比谷濠（st.1及びst.2），蛤濠（st.3），桔梗濠（st.4），清水濠（st.5），牛ケ淵（st.6），千鳥ケ淵（st.7），羊蔵濠（st.8），桜田濠（st.9,10,11）の11地点で，年4回（2月，5月，8月，11月）実施した（図1）．

植物プランクトン計数用には，試水500ml をホルマリン添加後濃縮し，その一定量を顕微鏡下で計数した．*Microcystis* の種組成はプランクトンネット（メッシュサイズ xxx25）で採取した試料について，100コロニー以上の細胞を計数し，構成比を算出した．クロロフィルaはStrickland and Parsons の法[3]により測定した．

結果及び考察

〔1〕植物プランクトン量の最近6年間の変化

濠水の植物プランクトンの季節変化を概観してみると，5月には緑藻の *Pediastrum*, *Scenedesmus*, 珪藻の *Synedra*, *Melosira*, *Fragilaria*, 藍藻の *Microcystis*, *Anabaena* などが

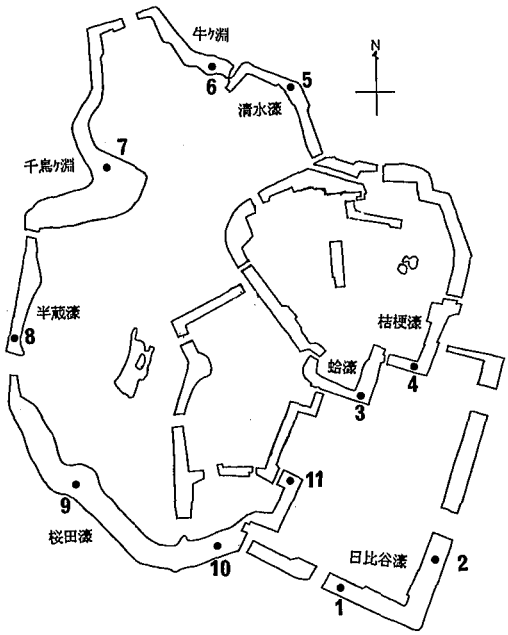


図1．外濠採水地点

同程度に混在しており，この時期に藍藻の水の華がみられる濠もある．また5月には桜田濠で緑藻 *Closterium aciculare* が水の華状態になることもある．8月にはほとんどの濠で *Microcystis* の水の華がみられ，1 ml あたり 10^4～10^6の細胞数が測定される．この時期，*Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Oscillatoria* などの他の藍藻も種類数，細胞数とも多くなる．11月には再び，緑藻，珪藻，緑藻が同程度に混在するが，珪藻類では *Cyclotella* が多い．2月には珪藻類が多く，*Cyclotella*, *Synedra*, *Fragira* などが優占種となる．しかし濠の深度がないためか，冬期でも *Microcystis* が10^3／ml 計算される所もある．

以上の植物プランクトンの季節変化は全体としてクロロフィルa（以下chl. a）量の変化で表わされる（図

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

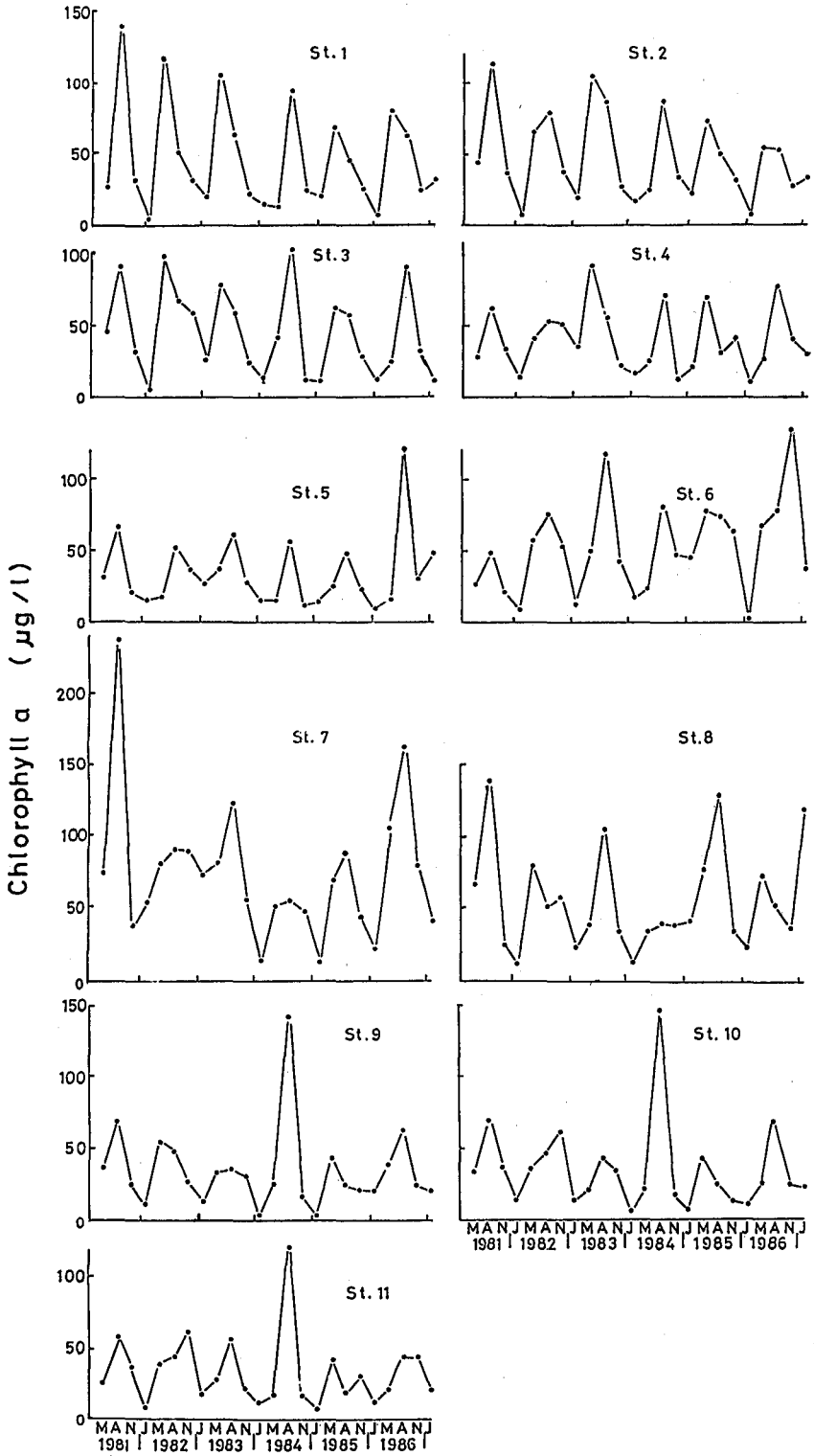


図2．クロロフィルa量の季節変化

表1．8月における *Microcystis* 4種の細胞数

年	st.1	st.2	st.3	st.4	st.5	st.6	st.7	st.8	st.9	st.10	st.11
1984	1.2×10^3	1.5×10^3	6.0×10^4	3.1×10^3	2.6×10^4	2.9×10^4	5.9×10^4	1.0×10^4	3.3×10^3	4.8×10^3	2.1×10^3
1985	1.3×10^3	9.0×10^2	3.7×10^3	9.1×10^2	3.1×10^4	1.6×10^4	1.3×10^4	2.7×10^5	1.3×10^4	1.2×10^4	9.8×10^3
1986	1.9×10^4	2.5×10^4	6.2×10^3	5.7×10^3	6.3×10^4	1.0×10^5	1.7×10^5	1.8×10^4	5.3×10^4	7.5×10^4	1.4×10^4

2）．5月や11月にch.aのその年の最高値が測定されることもあるが，一般的には8月のchl.a量が最も高く，5月，11月には中程度，2月が低い値となっている．しかし87年の2月は水温の高かったせいか，かなり高いchl.a量を示した濠が多かった．

8月のchl.a量だけを比較してもst.7の値が高いことが予想されるが，6年間分の値を単純に平均してもst.7が58.2 μg／l と高く，次にst.8の55.1 μg／l，st.6の52.8 μg／l であった．すなわちこの三か所の濠が最も富栄養化の進んだ濠といえよう．一方，外濠の中ではchl.a量が少かったのは桜田濠のst.9，st.10，st.11であった．しかし，この値もOECD[4]が示した湖沼の栄養度の値と比較するならば，富栄養をとおりこし過栄養の範囲に含まれるものであった．

〔2〕*Microcystis* の細胞数の変化と種類組成

濠水の現在の富栄養化状態を端的に示すのは *Microcystis* 類の出現である．Komárek[5]や渡辺[6]の分類に従えば，通常水の華を形成する *Microcystis* 類には *M. aeruginosa forma aeruginosa*（以下*MAA*），*M. aeruginosa f. flos-aguae*（MAF），*M. wesenbergii*（MW），*M. viridis*（MV）が存在する．MAAとMAFは通常の光学顕微鏡下ではコロニー膜がよく観察されないこと，MWとMVは明瞭なコロニー膜を持つが，MVが細胞にそうような波うったコロニー膜を持つことによって区別される．

表1には過去3年間のこれら4種をあわせた細胞数の変化を示した．1985年のst.8や1986年のst.6及びst.7では10^5／ml が細胞数の多い時で，少い濠では10^2／ml となっている年もあるが，全体としてみれば10^4／ml が平均的な値といえよう．濠としてはst.3および4の細胞数が少く，逆に細胞数の多い濠はst.6，st.7，st.8であった．また図3には，4種の *Microcystis* の構成比を示した．これまでは主要な *Microcystis* は *MAA*, *MW*, *MV* であり，*MAF* はほとんどない場合もみられた．しかし他の3種についてみるとその構成比は場所や時期で大きく変化するようであった．例えばst.10ではMVが5月には38.5%あったものが，8月には2.4%となっている一方で，8月のMWが83.0%を占めていた．またst.7では

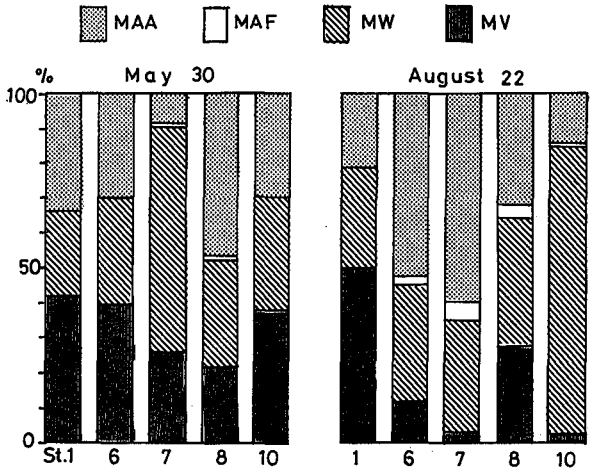


図3．*Microcystis* 4種の構成比（1986年）

逆に5月のMWが65.6%であったが，8月には32.9%と約半数に減少しその分MAAの割合が60%近くになっていた．

従来，*Microcystis* 類の消長について日本では *M. aeruginosa* として記載することがほとんどであった．しかしいくつかの湖沼について調べた我々の調査[7]でもMWやMVが優占している水域がかなりあることが判明した．更にはこれらの種類間ではマウスに対する致死毒性の有無にも差があり[8]，今後その分布，季節的消長について種間差異を明らかにしていく必要があろう．

謝辞　本研究を実施するにあたり御便宜をはかっていただいた環境庁皇居外苑管理事務所の方々に謝意を表します．

文　献

1）Sakamoto, M.：*Arch. Hydrobiol.*, 62, 1-28, 1966
2）倉茂英次郎：気象集誌，10，475-481，1932
3）Strickland, J. D. H. and Parsons, T. R.：*A Practical Handbook of Sea Water Analysis*, 1968, Fish, Res, Bd. Can.
4）日本水質汚濁研究協会：湖沼環境調査指針，1984，公害対策技術同友会
5）Komárek, J.：*Algologische Studien*, Komárek, J. and

Ettl, H. eds., pp.10-206, 1958, Academie der Wissenshaften

6) 渡辺真之，千原光雄：筑波の環境研究5 A，80-86，1980

7) 渡辺泰徳，渡辺真利代，渡辺真之：*Jpn. J. Limnol.* **47**, 87-93, 1986

8) Watanabe, M. F., Oishi, S., Watanabe, Y. and Watanabe, M.：*J. Phycol.*, **22**, 552-556, 1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 333-342, 1987

飲料用タンク水中のグラム陰性桿菌 *Protomonas extorquens* の検出用選択培地に関する検討

古畑勝則*, 松本淳彦*

A Study on a Selective Medium for the Isolation and Enumeration of Gram-Negative Rod Bacterium *Protomonas extorquens* from Drinking Tank Water

KATSUNORI FURUHATA* and ATSUHIKO MATSUMOTO*

A highly selective medium was developed for the isolation and enumeration of *Protomonas extorquens* as the indicator bacteria for contamination from drinking tank water. The new selective medium, termed LNP agar medium, consists of 5.0g of pepton, 2.5g of yeast extract, and 15g of agar per liter of distilled water. Selectivity may be obtained by aseptically adding 15 μg of lincomycin, 15 μg of nalidixic acid, and 300 units of polymyxin B per m*l* to the medium after autoclaving.

All of pink colonies which grew on this medium under the culture condition of 30℃, 5 days were identified as the strains of *P. extorquens*.

Keywords: selective medium, *Protomonas extorquens*, pink colony, drinking tank water

緒　言

ビル，マンション等の中高層建築物における飲料水は，受水槽および高置水槽を経由した，いわゆるタンク水であることが多い．このような給水施設は，1984年の統計[1]によると，都内だけでも11万ケ所にのぼっており，これらの給水施設の衛生的維持管理面については以前からしばしば問題視されてきたところである[2,3]．

水道水のみを水源とし，かつ受水槽の有効容量が20立方メートルを越える給水施設は，簡易専用水道として定期的な水質検査等の衛生管理が義務づけられているが[4]，1986年からは水道法の一部改正により，有効容量が10立方メートルにまで引き下げられて規制範囲が拡大された[5,6]．しかし，この適用を受ける施設は既述した全体の20%にすぎず，規制対象外のさらに小規模な施設が大半を占めており，これらの汚染実態は明かではない．

著者らは，残留塩素が0.1mg／*l* 以上存在しているタンク水中にも様々な細菌類を多数認めており，なかでも *Pseudomonas* 属等のグラム陰性桿菌が多く検出されることを報告した[7]．しかも，これらの細菌は残留塩素が消失したタンク水中で良好に増殖するため，受水槽等給水施設の衛生管理が重要であることも指摘してきた[8]．

タンク水から高頻度に検出される細菌は，その後の性状試験の追試から，Bergey's Manual (1984) [9]に記載されている *Pseudomonas mesophilica* であることがわかった．しかしながら Urakami と Komagata は，本菌を含む数種の細菌類，すなわち非水溶性の淡橙色色素を産生するグラム陰性桿菌で，極単毛による運動性を有し，メタノールを分解する細菌群を *Protomonas* という新しい属に分類し，その type species として *P. extorquens* を提唱した[10]．そこで既に報告した[7,8]タンク水分離保存株について性状試験を行ったところ，メタノールの分解性，菌体脂肪酸組成 $C_{18:1}$，DNA の GC 含量66.1%が確認され，*P. extorquens* 標準株（JCM2829）の性状と一致するものであった．

この *P. extorquens* が残留塩素の存在するタンク水から優占的に検出されるため，給水施設の汚染指標細菌とすべく，本菌の分布や性状等について種々検討を行ってきた[7,8]．すなわち，飲料用タンク水中の本菌を監視することにより，給水施設における衛生的維持管理の不備状況が推察できるものと考えている．

*東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科　160　東京都新宿区百人町３－24－１
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

しかし，本菌は現行の水道法水質基準に基づく一般細菌の試験方法では検出することができず，25～30℃で5～7日間の培養条件が必要である．また，従来から水中の菌数測定用として使用されている標準寒天培地やPYG（桜井）培地では，夾雑菌の発育が旺盛であるため，本菌を確認することが困難である．

そこで，*P. extorquens* をタンク水から効率よく検出するために，本菌の性状をもとにして選択培地を考案し，その実用性について検討を行った．

材料および方法

1．材料　1）供試菌株　タンク水から分離した保存株 *Protomonas extorquens* をはじめ，タンク水由来 *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Alcaligenes* sp., *Corynebacterium* sp., *Bacillus* sp. および *Micrococcus* sp. の計7菌株を使用した．

2）培地　選択培地として表1に示した組成の新培地を用いた．すなわち，ペプトン，酵母エキス（以上，Difco）の他，選択物質としてリンコマイシン（Sigma），ナリジキシン酸，ポリミキシンB（以上，和光純薬）を添加した寒天（Difco）培地である．

なお，対照培地として従来の標準寒天培地（日水）を使用した．

3）供試水　水質検査のため当研究所に搬入された都内のタンク水200試料を用いた．

2．方法　1）選択培地の調製法　まず，ペプトン，酵母エキスおよび寒天を各濃度に加えて加温溶解後，pHを7.5に修正して121℃で15分間高圧蒸気滅菌した．これを50℃に保ち，使用直前にリンコマイシン，ナリジキシン酸，ポリミキシンBをそれぞれ所定濃度添加した．各抗生物質は0.1%の水溶液とし，ポアサイズ0.22 μm のメンブランフィルターでろ過して加えた．ナリジキシン酸は0.1M水酸化ナトリウム溶液として用いた．

2）新培地の選択性の検討　*P. extorquens* と，これ以外の各供試菌株（以下，夾雑菌と称する）を標準寒天培地に画線塗抹し，25℃で一定時間（*P. extorquens* は5日間，*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* は3日間，*Alcaligenes*, *Bacillus* は24時間）培養後，滅菌生理食塩水に浮遊させて 10^8／ml の各菌液を調製した．次に，*P. extorquens* を10倍段階で 10^3～10^8／ml の菌数になるように滅菌生理食塩水で希釈し，これらを滅菌タンク水200ml が入った6個のコルベンにそれぞれ添加して6通りの実験水を作製した．これらの実験水について，あらかじめ標準寒天培地と選択培地により *P. extorquens* の菌数を測定しておき，そののちに，6種の夾雑菌の菌液をそれぞれのコルベンに1 ml ずつ加え（約 10^6／ml），十分に撹拌した．この時，別に用意した200ml の滅菌水道水に各夾雑菌を1種ずつ同様に添加して標準寒天培地により夾雑菌の菌数を測定した．これら7種の細菌を混合した各実験水1 ml について選択培地を用いて混釈培養した．25℃で7日間培養後，発育した集落を釣菌して同平板培地に塗抹し，集落の色調を観察して淡橙色を呈したものを計数した．そしてこの菌数と夾雑菌添加前の *P. extorquens* の菌数とを比較した．

3）実用性の検討　選択培地を滅菌シャーレに15～20ml ずつ分注して平板培地を作製した．平板の表面を十分に乾かしたのち，1枚の培地にタンク水0.2ml を均等に塗抹して30℃で5日間培養し，発育してきた集落を計数した．1試料当たり5枚の平板培地を用い，集落数を合計して1 ml 中の菌数とした．平板上に発育した集落のうち，淡橙色を呈する集落を *P. extorquens* と推定して計数したのち，グラム染色，0.3%半流動寒天培地による運動性およびメタノール分解性を確認した．同時に標準寒天培地を使用して同様にタンク水を培養し，*P. extorquens* の検出状況を比較した．また，選択培地上で淡橙色を示さない夾雑菌の集落（合計100株）を種々試験法[9,11-13]に準じて属レベルで同定した．

さらに，タンク水1試料当り50ml をポアサイズ0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し，これを選択培地上に乗せて30℃で5日間培養した．その後，フィルター上に発育した淡橙色集落を計数した．

表1．*Protomonas extorquens* 検出用選択培地の組成

ペプトン	5.0g
酵母エキス	2.5g
リンコマイシン	15.0mg
ナリジキシン酸	15.0mg
ポリミキシンB	300 units
寒天	15.0g
蒸留水	1000 ml
	pH 7.5

結　果

1．選択培地上の *P. extorquens* と夾雑菌の発育　夾雑菌添加前にあらかじめ測定した実験水1 ml 中の *P. extorquens* の菌数は，表2に示したように標準寒天培地と選択培地ではほとんど差がなく，1.1×10；1.5×10，2.2×10^2；2.0×10^2，2.5×10^3；2.1×10^3，1.4×10^4；1.8×10^4，2.2×10^5；1.3×10^5，1.8×10^6；2.4×10^6／ml で

表2．選択培地による夾雑菌共存水中からの *P. extorquens* の計数

初期添加菌数(1 ml 中)		混合菌液中の菌数
標準寒天培地	選択培地	(1 ml 中)
1.8×10^6	2.4×10^6	1.5×10^6
2.2×10^5	1.3×10^5	1.1×10^5
1.4×10^4	1.8×10^4	1.3×10^4
2.5×10^3	2.1×10^3	1.6×10^3
2.2×10^2	2.0×10^2	1.2×10^2
1.1×10	1.5×10	1.0×10

夾雑菌としてタンク水由来 *Pseudomonas, Flavobacterium, Alcaligenes, Corynebacterium, Bacillus, Micrococcus* をそれぞれ (1.1～3.6) $\times10^6$／ml 添加した．

P. extorquens は混釈法により測定したのち，各集落を改めて平板培地に画線塗抹して集落の色調を確認した．

あった．また，夾雑菌として添加した6菌種の菌数は (1.1～3.6) $\times10^6$／ml であった．これら7種の細菌を混合した実験水を選択培地を用いて混釈培養すると，夾雑菌の発育はまったくみられず，*P. extorquens* の淡橙色集落のみが発育し，その菌数は，1.0×10，1.2×10^2，1.6×10^3，1.3×10^4，1.1×10^5，1.5×10^6／ml であった．このように各夾雑菌が 10^6／ml オーダーの菌数で存在していても *P. extorqens* は初期添加菌数と同一オーダーでそれぞれ検出された．すなわち，この選択培地に添加した抗生物質は，タンク水由来の保存株である6種の夾雑菌の発育を阻止し，しかも *P. extoquens* の発育には影響を及ぼさないことが確認された．

2．タンク水から分離された淡橙色集落の同定　タンク水を選択培地と標準寒天培地に塗抹培養し，両培地上で淡橙色を呈した集落を同定した．選択培地上に発育した淡橙色集落148株は，いずれも空胞性のグラム陰性中型（1.7×3.3 μm）桿菌であり，0.3%半流動寒天培地で運動性が認められ，かつメタノールを分解した．したがって，これらはすべて *P. extorquens* であると推定した．

一方，標準寒天培地に発育した淡橙色集落157株のうち145株は推定 *P. extorquens* であったが，なかには空胞のないグラム陰性桿菌（0.5×1.5 μm）や運動性のないもの，あるいは酵母状真菌などが12株，7.6%に認められた．

3．タンク水中の *P. extorquens* の計数　標準寒天培地と選択培地を用いてタンク水を塗抹培養し，*P. extorquens* の検出を試みた．表3には *P. extorquens* とそれ以外の従属栄養細菌の検出状況を示した．標準寒天培地ではタンク水100試料中60試料（60%）から従属栄養細菌が検出され，その菌数は1試料当り1～3,600／ml で合計4,520であった．このうち29試料，48.3%から *P. extorquens* が検出され，菌数は1～46／ml，合計で145であった．すなわち，60試料から検出された4,520の従属栄養細菌のうち，*P. extorquens* は145であり，わずかに3.2%を占めたにすぎなかった．

一方，選択培地を使用すると，従属栄養細菌が検出される率が42%（42試料）に減少した．その菌数も1～42／ml，合計251と少なくなり，標準寒天培地の5.6%の菌数になった．このことは選択培地に添加した抗生物質が他の夾雑菌の発育を効果的に抑制しているためであり，本培地の有効性を示唆するものであった．

この42試料中の71.4%，30試料から *P. extorquens* が検出され，標準寒天培地の場合より23%増加している．これら従属栄養細菌251のうち，59%，148（1～36／ml）が *P. extorquens* によって占められ，標準寒天培地の3.2%と比較してはるかに高率であった．このように，この選択培地は実際のタンク水においても *P. extorquens* に対して優れた選択性を有していた（図2）．

表3．選択培地および標準寒天培地によるタンク水(100試料)からの従属栄養細菌と *P. extorquens* の検出状況

培　地		標準寒天培地	選択培地
従属栄養細菌	検出試料数／供試試料数	60／100	42／100
	検出率(%)	60.0	42.0
	菌数A(1試料当りの範囲)	4,520(1～3,600)	251(1～42)
P. extorquens	検出試料数／細菌類検出試料数	29／60	30／42
	検出率(%)	48.3	71.4
	菌数B(1試料当りの範囲)	145(1～46)	148(1～36)
(B／A)×100(%)		3.2	59.0

30℃，5日間の塗抹培養法による．

表4．選択培地上に発育した夾雑菌とその集落色調

集落の色調	集落数(100株)	菌　名(属)	株　数	割　合(%)
黄　色	63	*Pseudomonas*	53	84.1
		Flavobacterium	10	15.9
褐　色	29	*Pseudomonas*	23	79.3
		Alcaligenes	6	20.7
白　色	8	*Alcaligenes*	3	37.5
		その他	5	62.5

本培地における *P. extorquens* の菌数と標準寒天培地での菌数に差がないことから，タンク水中の *P. extorquens* は，この選択培地においても標準寒天培地同様良好に発育することが認められた．したがって *P. extorquens* の増殖に関しては，今回添加した各抗生物質の影響はみられなかった．

4．選択培地に発育した夾雑菌　タンク水から分離した保存菌株，*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Bacillus* を夾雑菌として使用したところ，選択培地にはすべて発育を示さなかった．しかし，実際のタンク水を培養した場合は夾雑菌の発育が少数ながら認められたため，これらについて同定を行った．その結果を各集落の色調とともに表4に列記した．これらの集落の色調は，黄色を呈したものが63株と最も多く，他は褐色が29株，白色が8株であった．これを菌種別にみると *Pseudomonas* が76株と最も多く，次いで *Flavobacterium* が10株，*Alcaligenes* が9株，その他のブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌が5株であった．また，集落の色調と菌種の関係をみると，黄色を呈した集落63株のうち，*Pseudomonas* が53株で81.4%を占め，*Flavobacterium* が10株，15.9%であった．褐色集落では *Pseudomonas* が29株中23株，79.3%，*Alcaligenes* が6株，20.7%で，白色集落では *Alcaligenes* が8株中3株，37.5%，その他は同定不能なものであった．このように夾雑菌として選択培地に発育してくるものは *Pseudomonas* をはじめとしたグラム陰性桿菌のみであり，これらの集落色調は黄色，褐色または白色であるため，*P. extorquens* の淡橙色とは容易に鑑別することができた．

5．フィルター法による *P. extorquens* の検出　選択培地を用いてフィルター法により *P. extorquens* を検出した．図3，4に示したように，フィルター上に形成された *P. extorquens* の集落は，寒天培地に塗抹培養した場合より鮮明な淡橙色の色調を呈するため鑑別がさらに容易であった．

表5にはタンク水100試料についてフィルター上に発育した全集落数と *P. extorquens* の菌数を示した．100試料すべてから従属栄養細菌が検出され，このうち96試料（96%）から *P. extorquens* が検出された．前述した塗抹法では71.4%の検出率であったが，本法では試水量を塗抹の場合の50倍にしたため，*P. extorquens* の検出率は24.6%増加している．この *P. extorquens* が検出された96試料のうち，夾雑菌がまったくみられなかったものが40試料，41.7%あり，その菌数は1～770／50ml であった．また，全集落の50%以上を *P. extorqens* が占めた試料は94試料あった．フィルター法によって100試料のタンク水から検出された全菌数は，8,668株に達したが，その94.6%，8,196株は *P. extorquens* によって占められた．

考　察

著者らは *Protomonas extorquens* をタンク水の汚染指標細菌とすべく，種々検討を行ってきた．今回はその一環として，本菌を他の夾雑菌と選別して効率よくタンク水から検出するための選択培地を考案し，その実用性について検討を行った．

P. extorquens は土壌や河川水など自然界に広く分布しており，その増殖には豊富な栄養源を必要としない，いわゆる低濃度栄養性細菌である[14]．このことも考慮に入れ，本菌の薬剤感受性成績から選択培地を考案した．培地組成はペプトン0.5%，酵母エキス0.25%をベースとし，これに選択物質としてリンコマイシン15mg／*l*，ナリジキシン酸15mg／*l*，ポリミキシンB 300U／*l* を添加した寒天培地である．

窒素源としてのペプトンおよび酵母エキスは，標準寒天培地と同濃度にした．また，*P. extorquens* は炭素源としてグルコースを分解せず，アラビノース，ガラクトースおよびメタノールを分解するが，これらを添加してもしなくても *P. extorquens* の増殖に著しい影響が認められなかったため，いずれも加えなかった．

選択物質として用いた3薬剤は，*P. extorquens* が抵抗

表5．フィルター法によるタンク水中の *P. extorquens* の計数

試料No.	全菌数[A] (50ml 中)	*P. extorquens* 数[B] (50ml 中)	(B/A)×100 (%)	試料No.	全菌数[A] (50ml 中)	*P. extorquens* 数[B] (50ml 中)	(B/A)×100 (%)
1	770	770	100.0	51	18	17	94.4
2	470	470	100.0	52	33	31	93.9
3	460	460	100.0	53	62	58	93.5
4	460	460	100.0	54	610	570	93.4
5	310	310	100.0	55	45	42	93.3
6	260	260	100.0	56	21	19	90.5
7	210	210	100.0	57	200	180	90.0
8	200	200	100.0	58	46	41	89.1
9	170	170	100.0	59	18	16	88.9
10	110	110	100.0	60	9	8	88.9
11	74	74	100.0	61	8	7	87.5
12	45	45	100.0	62	7	6	85.7
13	38	38	100.0	63	51	42	82.4
14	36	36	100.0	64	220	180	81.8
15	28	28	100.0	65	11	9	81.8
16	24	24	100.0	66	76	62	81.6
17	23	23	100.0	67	400	320	80.0
18	18	18	100.0	68	10	8	80.0
19	17	17	100.0	69	5	4	80.0
20	15	15	100.0	70	5	4	80.0
21	12	12	100.0	71	14	11	78.6
22	10	10	100.0	72	9	7	77.8
23	9	9	100.0	73	48	36	75.0
24	8	8	100.0	74	16	12	75.0
25	8	8	100.0	75	8	6	75.0
26	7	7	100.0	76	4	3	75.0
27	5	5	100.0	77	4	3	75.0
28	4	4	100.0	78	4	3	75.0
29	4	4	100.0	79	7	5	71.4
30	3	3	100.0	80	10	7	70.0
31	3	3	100.0	81	39	27	69.2
32	3	3	100.0	82	3	2	66.7
33	3	3	100.0	83	3	2	66.7
34	2	2	100.0	84	58	38	65.5
35	2	2	100.0	85	10	6	60.0
36	1	1	100.0	86	5	3	60.0
37	1	1	100.0	87	19	11	57.9
38	1	1	100.0	88	33	19	57.6
39	1	1	100.0	89	7	4	57.1
40	1	1	100.0	90	9	5	55.6
41	64	63	98.4	91	15	8	53.3
42	52	51	98.1	92	42	21	50.0
43	460	450	97.8	93	2	1	50.0
44	46	45	97.8	94	2	1	50.0
45	390	380	97.4	95	6	2	33.3
46	95	92	96.8	96	5	1	20.0
47	290	280	96.6	97	2	0	0.0
48	53	51	96.2	98	1	0	0.0
49	230	220	95.7	99	1	0	0.0
50	920	870	94.6	100	1	0	0.0

タンク水50ml を0.45 μm メンブランフィルターでろ過し，これを選択培地上で30℃，5日間培養して淡橙色を呈した集落を *P. extorquens* とした．

性を示した種々抗生物質のうち，スクリーニングを行って有効なものを選んだ．すなわち，リンコマイシンはグラム陽性菌の発育阻止剤として使用した．また，ナリジキシン酸とポリミキシンBはグラム陰性菌の発育阻止剤であるが，片方のみの添加では十分な阻止効果が得られなかったため両者を添加した．各抗生物質の添加濃度は，*P. extorquens* の感受性試験において本菌が抵抗性を示した最高濃度とした．

P. extorquens は非水溶性の淡橙色色素を特異的に産生するため，本菌を鑑別する上で重要な性状の一つと思われる．この色調は混釈培養では判別しにくいが，塗抹培養して平板の表面に集落を形成させると明瞭な淡橙色の色調を呈する（図1）．さらに，図3，4に示したように，白色のメンブランフィルター上に形成される集落は，寒天培地に塗抹した場合より鮮明な色調となるため，本菌の鑑別が一段と容易であった．

この選択培地はタンク水中の夾雑菌の発育を効果的に抑制して *P. extorquens* を効率よく検出することが可能であった．試料によっては *P. extorquens* 以外にも *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* 等のグラム陰性菌が低率ながら発育するが，これらの集落は黄色，褐色，白色を呈するため，集落色調から *P. extorquens* の淡橙色とは容易に鑑別することができた．

タンク水から高頻度に検出される *P. extorquens* は，近年になって，血液，腹水，咽喉や気管支などのスワブ，および皮膚炎や潰瘍部等，各種の臨床材料からも分離されており[15-17]，日和見感染症の原因菌として重視される傾向にある．このため，今回考案した選択培地は臨床方面にも使用できると考えられる．

結　語

飲料用タンク水における汚染指標細菌としての *Protomonas extorquens* を効率よく検出するために選択培地を考案し，その実用性について検討を行った．

本培地は，ペプトンと酵母エキスを基礎とし，リンコマイシン，ナリジキシン酸，ポリミキシンBの各抗生物質を添加した寒天培地である．

この選択培地を使用して様々なタンク水について標準寒天培地と比較検討したところ，本培地に添加した選択物質により夾雑菌の発育が効果的に抑制されるため，効率よく *P. extorquens* を検出することができた．

今回考案した *Protomonas extorquens* 検出用の選択培地を“LNP寒天培地”として提唱したい．

文　献

1）岡沢和好：水道協会雑誌，54(3)，44-45，1985
2）本多浩一，他：東京都衛生局学会誌，第74号，86-87，1985
3）前田正憲，他：東京都衛生局学会誌，第75号，88-89，1985
4）日本水道協会：水道協会雑誌，第513号，巻頭色紙，1977
5）小林康彦：水道協会雑誌，55(1)，29-32，1986
6）日本水道協会：水道協会雑誌，55(1)，33-34，1986
7）古畑勝則，松本淳彦：東京衛研年報，34，282-289，1983
8）古畑勝則，松本淳彦：東京衛研年報，35，352-362，1984
9）Krieg, N. R. and Holt, J. G.：*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1，190，1984，The Williams and Wilkins, Baltimore, London
10）Urakami, T. and K. Komagata，：*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34(2)，188-201，1984
11）Cowan, S. T.，坂崎利一訳：医学細菌同定の手びき，第2版，1974，近代出版，東京
12）藪内英子：ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌，1977，医学書院，東京
13）Weaver, R. E.，坂崎利一監訳：グラム陰性菌の同定（除・腸内細菌），1985，医典社，東京
14）服部　勉，服部黎子：化学と生物，15(8)，535-541，1977
15）Gilardi, G. L. and Faur, Y. C.：*J. Clin. Microbiol.*, 20(4)，626-629，1984
16）Smith, S. M., Eng, R. H. K. and Forrester, C.：*J. Clin. Microbiol.*, 21(3)，314-317，1985
17）Gilchrist, M. J. R., Kraft, J. A., Hammond, J. G., Connelly, B. L. and Myers, M. G.：*J. Clin. Microbiol.*, 23(6)，1052-1055，1986

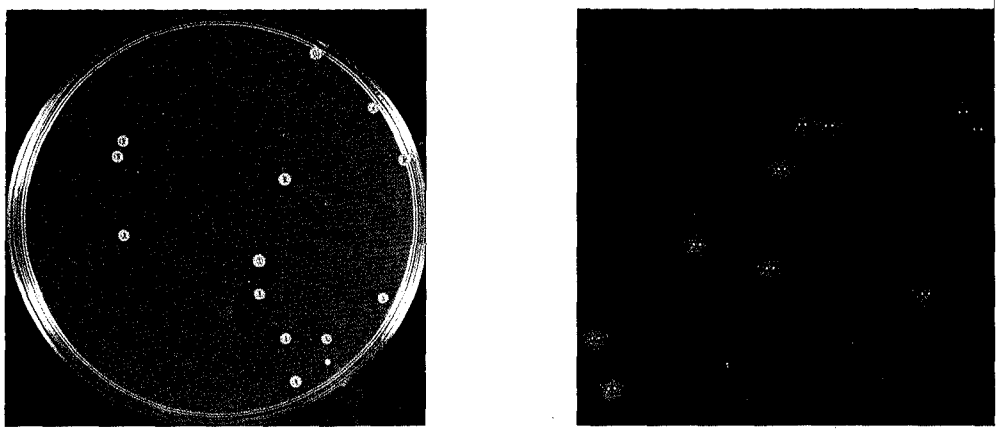


図1．選択培地上の *Protomonas extorquens* の集落（塗抹培養，30℃，5日間）

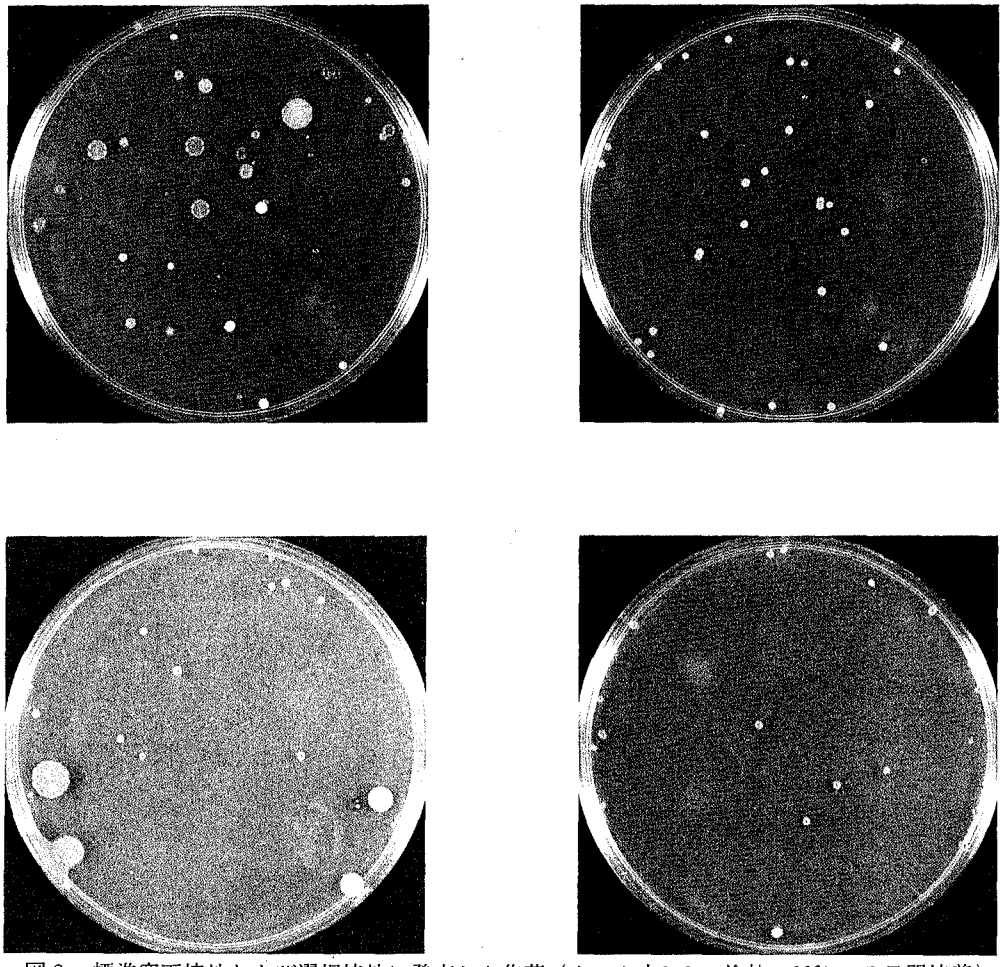


図2．標準寒天培地および選択培地に発育した集落（タンク水0.2ml塗抹，30℃，5日間培養）
左；標準寒天培地，右；選択培地

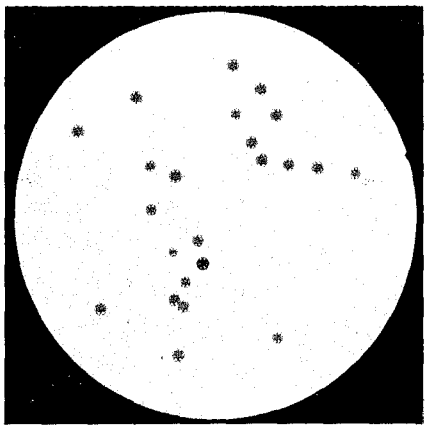


図3．フィルター上に発育した *Protomonas extorquens* の集落（選択培地，30℃，5日間培養）

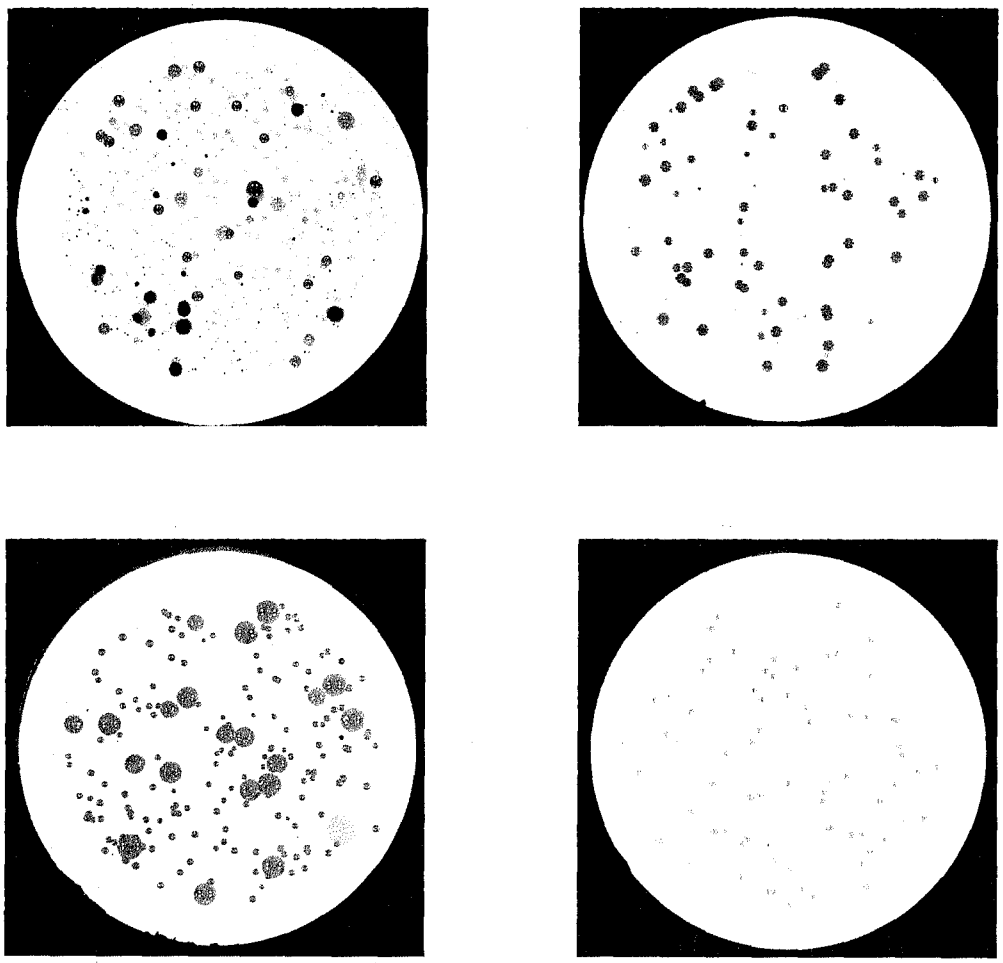


図4．フィルター上に発育した集落（タンク水50ml ろ過，30℃，5日間培養，0.45 μm フィルター）
左；標準寒天培地，右；選択培地

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **38**, 343-348, 1987

環境試料中の酢酸2-メトキシエチルおよび酢酸2-エトキシエチルの分析方法

中川順一*, 岡本　寛*, 土屋悦輝*, 笹野英雄*

Determination of 2-Methoxyethyl Acetate and 2-Ethoxyethyl Acetate in Environment

JUNICEI NAKAGAWA*, YUTAKA OKAMOTO*, YOSHITERU TUCHIYA* and HIDEO SASANO*

Keywords: determination, 2-ethoxyethyl acetate, 2-methoxyethyl acetate, Sea water, Sediment

諸　言

我々は，自覚するとしないにかかわらず多種多様な化学物質に取り囲まれて日常生活，社会生活を送っている．しかし，これら化学物質の環境中での運命，また，人体への影響，あるいは暴露濃度については，ほとんど明らかにされていない．

最近，低沸点有機化合物による環境汚染が問題視されてきている．特に，テトラクロロエチレン，トリクロロエチレンなどの有機溶剤による地下水汚染はかなり広範囲に進行している．しかし，これら低沸点の物質に対し，比較的沸点が高く，また使用方法から環境中に容易に拡散しやすい遅発性溶剤については，その実態が明らかにされていない．

そこで今回，工業用塗料の溶剤に多く使われている酢酸2-メトキシエチルおよび酢酸2-エトキシエチルを取り上げ環境中のレベルを測定するための分析方法を確立した．また，実試料として，東京湾の底質及び海水について分析を行ったので報告する．

実験の部

1．試料液の調製

1－1水質試料　試料1 *l* を分液ロートにとり，塩化ナトリウム100g，ジクロロメタン50m*l* を加え15分間振とう抽出する．この操作を2回くり返し，ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで脱水したのち，ロータリーエバポレーターで5 m*l* に濃縮し，GC／MS 試料液とする．

1－2底質試料　試料20g を1 *l* の蒸留フラスコにとり，1 M-KH_2PO_4・NaOH（pH6）溶液50m*l*，蒸留水200m*l* を加え留液が200m*l* になるまで蒸留を行う．留液を分液ロートに移し，塩化ナトリウム20g，ジクロロメタン10m*l* を加え，15分間振とう抽出する．抽出操作を2回くり返し，ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで脱水したのち，ロータリーエバポレーターで5 m*l* に濃縮したものをGC／MS 試料液とする．

2．試薬

酢酸2-メトキシエチルおよび酢酸2-エトキシエチル標準液；酢酸2-メトキシエチルおよび酢酸2-エトキシエチル（関東化学社製）をそれぞれ100mg 秤りとり，メタノールを加えて溶かし100m*l* とし，標準原液を作製した．標準原液をメタノールにより順次希釈し1 μg／m*l* の標準液を調製した．ジクロロメタンおよびメタノールは，残留農薬試験用（和光純薬製），無水硫酸ナトリウムおよび塩化ナトリウムは試薬特級（和光純薬製）を用いた．

3．装置

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型

4．測定

試料5 μl をGC／MS に注入し，得られたクロマトグラムのピークの高さから，予め作成した検量線より定量した．

（GC／MS-SIM の条件）

カラム：20% Uconoil LB550X chromosorb W AW 80-100mesh 2m，カラム温度；100℃，注入口温度；150℃，イオン化電圧；70ev，キャリヤーガス；He60m*l*／min，モニターイオン；酢酸2-メトキシエチル（m／z＝58）酢酸2-エトキシエチル（m／z＝72）

*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 Laboratroy of Public Health

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

5．簡易分解性スクリーニング試験

環境庁の定める方法に従い，pH 5，pH 7 およびpH 9 における暗所条件下と pH 7 における光照射条件下で，1時間および5日間後の濃度を測定し残存率を求めた．

最初，120m*l* のバイアルビンに pH 5，pH 7 および pH 9 の緩衝液を100m*l* 入れ，テフロンシートをのせてバイアル用ゴム栓をして，その上からアルミキャップで固定する．ついでマイクロシリンジで20 μg／m*l* の濃度になるように標準液を加え，20℃のふ卵器および室内に放置し，1時間後および5日間後にバイアルビンから直接試料液を抜きとり FID 付 GC に注入し定量した．

6．n-オクタノール／水分配係数の測定

環境庁の指示する逆相分配高速液体クロマトグラフィー法[1]における保持時間から測定した．

結果および考察

1．検量線 酢酸2－メトキシエチルおよび酢酸2－エトキシエチルの標準液（1 μg／m*l*）を1，3，5，7 μl づつ GC／MS に注入し，そのピークの高さより検量線を作成した．得られた代表的検量線を図－1に示す．

2．検出限界および定量限界 環境庁の定める検出限界および定量限界の算定方法[2]に従い求めた検出限界および定量限界を表1に示す．

3．簡易分解性スクリーニング試験の検討 分解性スクリーニング試験の結果を表2に示す．表2の結果より酢酸2-メトキシエチルおよび酢酸2-エトキシエチル共に，pH 5，pH 7 の条件下ではほとんど分解しないことが分った．しかし，pH 9 では1時間以内に速やかに分解する．

4．底質試料における添加回収実験の検討 底質試料に標準5 μg を添加し，一昼夜放置した回収率は約15～30％と低い結果であった．また，50 μg の添加回収実験

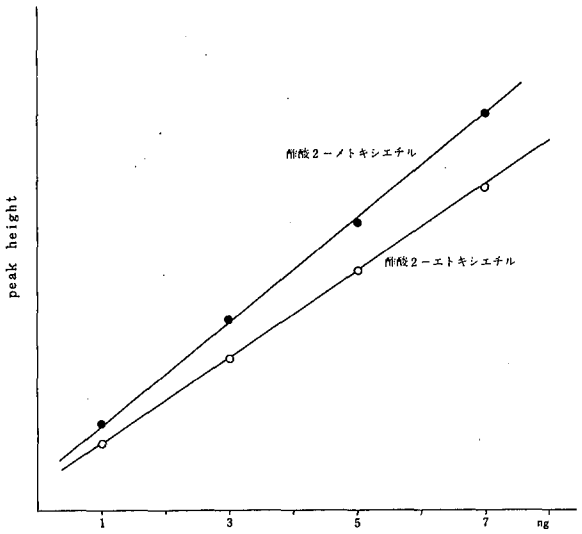


図1．検量線

でも同様の結果であった．酢酸2-メトキシエチル，酢酸2-エトキシエチルは，分解性スクリーニング試験の結果 pH 9 において，かなり速い速度で分解することが分かっていたので，底質試料の pH を測定してみた．底質試料に水を加え，その上澄液の pH を測定したところ pH8.0という結果を得た．そこで，pH 8 の緩衝液に標準液を添加し一昼夜放置したものの回収率を測定したところ，酢酸2-メトキシエチルが約70％，酢酸2-エトキシエチルが約80％の回収率でありこの結果は精製水の結果とほとんど変らない値であった．

次に，底質試料のアルカリ成分の影響を考慮し，底質試料を pH 6 の緩衝液で処理したものに標準液を添加し，一昼夜放置したものを分析したところ，約70％と回収率が向上した．また，pH 6 の緩衝液で処理したのち，高

表1．酢酸2-メトキシエチルおよび酢酸2-エトキシエチルの検出限界および定量限界

		試料量	検出限界
酢酸2-メトキシエチル	水質試料	1*l*	0.7 μg／*l*
	底質試料	20g	35 μg／kg
酢酸2-エトキシエチル	水質試料	1*l*	0.5 μg／*l*
	底質試料	20g	25 μg／kg

		試料量	定量限界
酢酸2-メトキシエチル	水質試料	1*l*	2.2 μg／*l*
酢酸2-エトキシエチル	水質試料	1*l*	1.7 μg／*l*

最終液量：5 m*l* 試料注入量：5 μl

表2．酢酸2-メトキシエチルおよび酢酸2-エトキシエチルの分解性スクリーニング試験

放置時間 / pH	酢酸2-メトキシエチル				
	1時間 (μg/ml)	5日間(μg/ml)		残存率(%)	
		暗所	光照射	暗所	光照射
5	20	19.9		99.5	
7	20	20	19.9	100	99.9
9	0	0		0	

放置時間 / pH	酢酸2-エトキシエチル				
	1時間 (μg/ml)	5日間(μg/ml)		残存率(%)	
		暗所	光照射	暗所	光照射
5	20	20		100	
7	20	19.9	19.1	99.9	95.5
9	0	0		0	

表3．酢酸2-メトキシエチルおよび酢酸2-エトキシエチルの回収率

酢酸2-メトキシエチル

試料	添加量	試料量	回収率	回収率のCV %
精製水	1μg	1l	71%	7.2
	2μg	1l	71%	8.2
	5μg	1l	81%	3.5
海水	5μg	1l	80%	2.8
底質	5μg	20g	71%*	6.3

酢酸2-エトキシエチル

試料	添加量	試料量	回収率	回収率のCV %
精製水	1μg	1l	91%	2.1
	2μg	1l	86%	8.1
	5μg	1l	93%	2.6
海水	5μg	1l	82%	5.2
底質	5μg	20g	77%*	7.6

* pH 6 の緩衝液を加えて放置後蒸留

圧滅菌した底質試料は，酢酸2-メトキシエチルが80%，酢酸2-エトキシエチルが86%の回収率であった．このことから，底質試料によっては底質中のアルカリ成分により，また，生分解により回収率が低下することがわかった．以上のことより，これらの物質の分析にあたっては，試料採取後なるべく早くpH調整し蒸留することが望ましい．

5．添加回収実験 精製水に1μg，2μgおよび5μgの標準液を添加し，各濃度について4回，また，底質試料および海水については，標準液を5μg添加したものをそれぞれ7回並びに3回の全分析を行った．この結果を表3示す．

表3より，酢酸2-メトキシエチルの平均回収率は，71～81%であり，また酢酸2-エトキシエチルの平均回

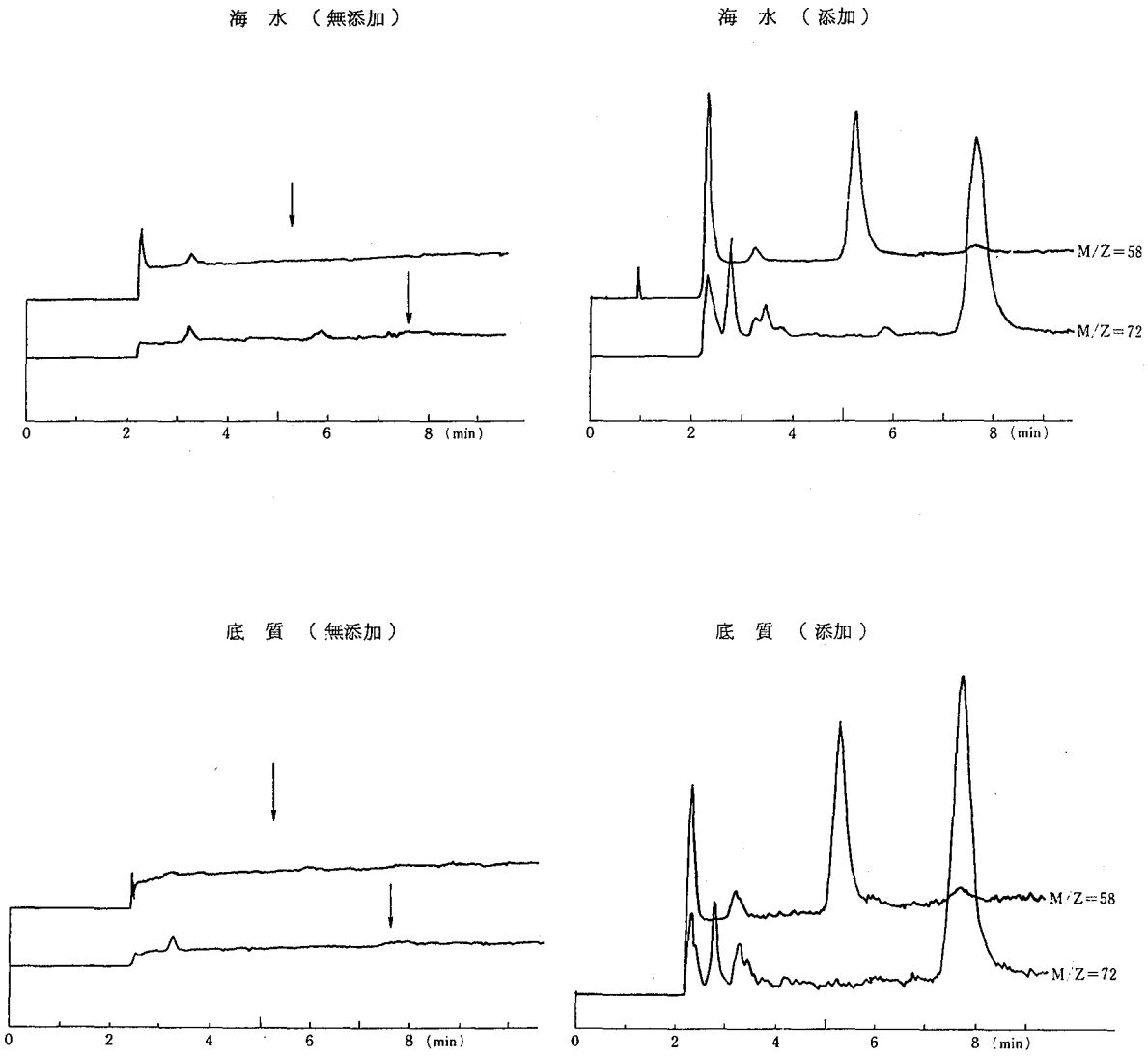


図2．海水，底質のマスフラグメントグラム

収率は，77～93％と良好な結果であった．酢酸2-エトキシエチルより酢酸メトキシエチルの方が劣ったが，その要因は水に対する溶解度が，酢酸2-メトキシエチルの方が大きいため抽出率を悪くしているためと思われる．

6．n-オクタノール／水分配係数の測定

n-オクタノール／水分配係数（Pow）は，化学物質の生体内への濃縮を推定する際の非常に重要な値とされている．また，生物濃縮係数のみならず，化学物質の水への溶解度および土壌吸着平衡定数などとも密接な関係をもっている．

酢酸2-メトキシエチル，酢酸2-エトキシエチルともに log Pow＜1 という結果であり，生体濃縮係数も小さい物質であることがわかった．

7．東京湾の海水および底質の分析

図－2に竹芝ふ頭で採水した海水および隅田川河口で採取した底質のクロマトグラム，またそれぞれの試料に標準液を添加したクロマトグラムを示した．これらの結果より，海水および底質中の酢酸2-メトキシエチル，酢酸2-エトキシエチルは，検出限界以下であった．

ま と め

水質および底質中の酢酸2-メトキシエチル，酢酸2-エトキシエチルの分析方法を確立した．この方法で，水質試料および底質試料の ppb オーダーの分析が可能である．また分解性スクリーニング試験結果より，これら

の物質はpH 9の条件で極めて速い速度で分解することが分った.

また，東京湾の海水，底質中からこれらの物質を検出しなかった.

（本研究の概要は，昭和60年度環境庁の委託により分析法開発調査の一環として行った）

参考文献

1）化学物質物性研究会編：化学物質の物理化学的性状把握に関する研究 1982

2）環境庁編：検出限界等の定め方について 1985

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.*, 38, 349-351, 1987

オルトフェニルフェノール-ナトリウム（OPP-Na）投与ラット肝薬物代謝酵素の免疫学的研究

牛山慶子*, 長井二三子*, 佐藤かな子*
中川敦子*, 加納いつ*

Immunochemical Studies of Hepatic Drug Metabolizing Enzymes in Rats Administered OPP-Na

KEIKO USHIYAMA*, FUMIKO NAGAI*, KANAKO SATOH*
ATSUKO NAKAGAWA* and ITSU KANO*

Keywords：オルトフェニルフェノール-ナトリウム（OPP-Na）*o*-Phenylphenol sodium salt, チトクロームP-450 cytochrome P-450, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis, ウエスタンブロッティング western blotting

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の添加飼料での飼育で，ラットに膀胱ガンが発生する[1]．この発生は，雌に較べて雄に多いこと，OPP-Na 2％添加でとくに高率であることが報告されている．著者らは，このガンの発生との関係を調べるためOPPの代謝について検討し[2)-5)]，OPPの代謝産物である2, 5-ジハイドロキシジフェニルの尿中排泄は雌よりも雄に多く[3]，低濃度OPP投与では少なく2％の濃度で投与すると著しく多いことを報告した[4]．またOPP投与により肝薬物代謝酵素活性が誘導され，とくに2％が著しかった[5]．これらのことから，代謝物の増加と，ガンの発生とが深く関連していることが示唆される．薬物代謝活性の役割を担うチトクロームP-450には，分子多様性があり[6]，多種のチトクロームP-450の分子種が，単離，精製されている．投与した薬物や由来する動物の種差，性差などによっても，種々のアイソザイムが誘導される[7]．今回は，OPPによって誘導されたチトクロームP-450の増加を，いくつかのチトクロームP-450分子種に対する特異的抗体を用いて検討したので報告する．

方　法

薬物は，F 344／DuCrjラットのオス5週令より投与した．OPP-Naは，1％，2％を飼料に添加し，自由摂取させた．フェノバルビタール（PB）は，水溶液にして40mg／kgを毎日経口投与した．3-メチルコラントレン（MC）は，オリーブ油に溶かし40mg／kgを隔日腹腔内投与した．ラットは，投与開始後7日で断頭屠殺し，肝臓を摘出，ミクロソームを調製した．[5]

SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動は，Laemmli[8]の方法に従い，7.5％のゲルで，1レーンあたり8 μgのミクロソームを泳動した．タンパク量の測定は，Lowry[9]の方法で行った．

ウエスタンブロッティングは，Dominの方法[10]を改変して行った．転写は，Towbinの方法[11]のバッファーで行った．ミクロソームをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動をし，ゲルを，ニトロセルロース膜（Schleicher & Schuell社 BA85）に，一晩，80mA通電し転写した．無処理ウサギ血清で，40℃，15分ブロッキングし，洗浄した．洗浄は，すべて20mMリン酸バッファーpH7.4, 0.9％ NaCl, 0.05％ Tween-20で行った．それぞれ500倍に希釈した抗体を，1時間反応させた．洗浄後，2次抗体（Peroxidase conjugated Goat anti-Rabbit IgG antibody）を1時間反応させた．洗浄後，*o*-ジアニシジン25 μg／ml，過酸化水素0.01％で発色させた．

*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

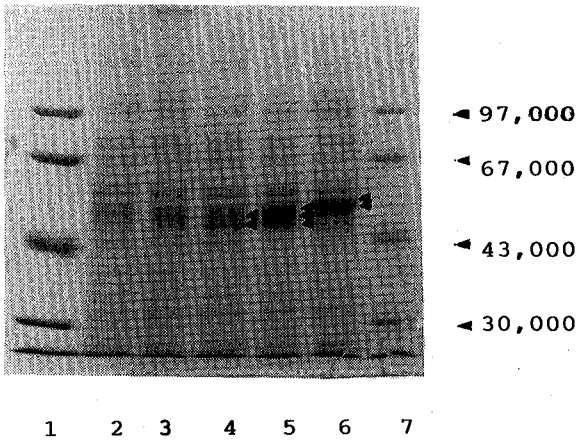


図1．ラット肝ミクロソームの7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
Coomassie Brilliant Blue R-250（CBB）でタンパク染色した．
左より，1，7：分子量のマーカー96,000：Phosphorylase b, 67,000：Bovine serum albumin, 43,000：Ovalbumin, 30,000：Carbonic anhydrase. 2：無処理ラット肝ミクロソーム．3：1％OPP投与．4：2％OPP投与．矢印の分子量は，51,000, 47,000．5：PB投与，矢印の分子量は，53,000, 51,000, 47,000．6：MC投与，矢印の分子量は，56,000, 53,000．
それぞれ1レーンあたり8 μgのミクロソームを泳動した．

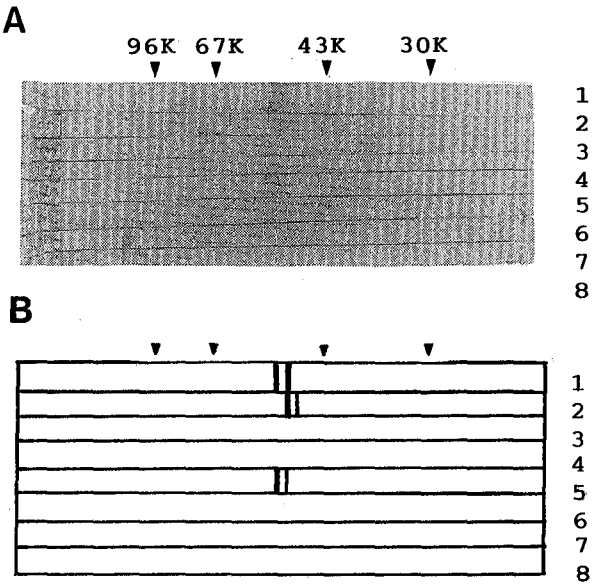


図2．2％OPP-Na投与ラット肝ミクロソームのウエスタンブロッティング
Bは，模式図
1レーンあたり80ngのミクロソームを泳動し，抗体と方法の項に記したように反応をおこなった．
抗体は，1：anti PB-Ⅰa，2：anti PB-Ⅰb，3：anti PB-Ⅰc，4：anti PB-Ⅰd，5：anti PB-Ⅱb，6：anti BNF-Ⅱa，7：anti BNF-Ⅱd，8：コントロール　ウサギ血清

抗体は，川野らが精製した[12),13)]PB誘導チトクロームP-450のPB-Ⅰa（分子量51,000），PB-Ⅰb（51,000, 47,000）PB-Ⅰc（52,000），PB-Ⅰd（52,000），PB-Ⅱb（51,000），β-ナフトフラボン（BNF）誘導のBNF-Ⅱa（53,000），BNF-Ⅱd（56,000）でウサギに免疫して作製した血清を使用した．この血清は，川野より供与された．

結果と考察

OPP 2％添加飼料で飼育したラットの肝ミクロソームのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（図1）は，Coomassie Brilliant Blue R-250（CBB）によるタンパク染色で分子量51,000, 47,000のバンドが増加した．この増加は1％OPP投与ミクロソームでも認められたが，2％投与で顕著であった．これはPB誘導での増加するバンドと等しい分子量であった．MCで誘導される主たるバンド56,000に一致するバンドは増加していなかった．

転写した膜に種々の抗体を作用させたイムノブロットと（図2），そのパターンをデンシトメーターで測定した結果より（図3），OPP-Na 2％投与のラット肝ミクロソームでは，anti PB-Ⅰaに53,000, 51,000，anti PB-Ⅰbに51,000, 47,000，anti PB-Ⅱbに53,000, 51,000の分子量のバンドが検出された．BNF誘導P-450の抗体とは，反応しなかった．これは，電気泳動のゲル上のタンパク染色で増加したバンドと対応していると解釈される．薬物代謝に関わる2種の代表的誘導剤を用いたところ，PB処理ミクロソームでは，anti PB-Ⅰa（分子量53,000, 51,000），anti PB-Ⅰb（51,000, 47,000），anti PB-Ⅰc（55,000, 52,000），anti PB-Ⅰd（55,000, 52,000），anti PB-Ⅱb（53,000, 51,000）にバンドが検出され，BNF誘導チトクロームP-450の抗体とは反応しなかった．MC処理ミクロソームでは，anti BNF-Ⅱa（56,000, 53,000），anti BNF-Ⅱd（56,000, 53,000）にバンドがみられ，PB誘導のものとは，反応しなかった．

チトクロームP-450は，45,000～57,000の間の分子量をもち，多くの分子種があり，脂溶性基質の酸素添加反応を触媒し，薬物の水酸化，脱アルキル化その他を行う．

イムノブロットの結果

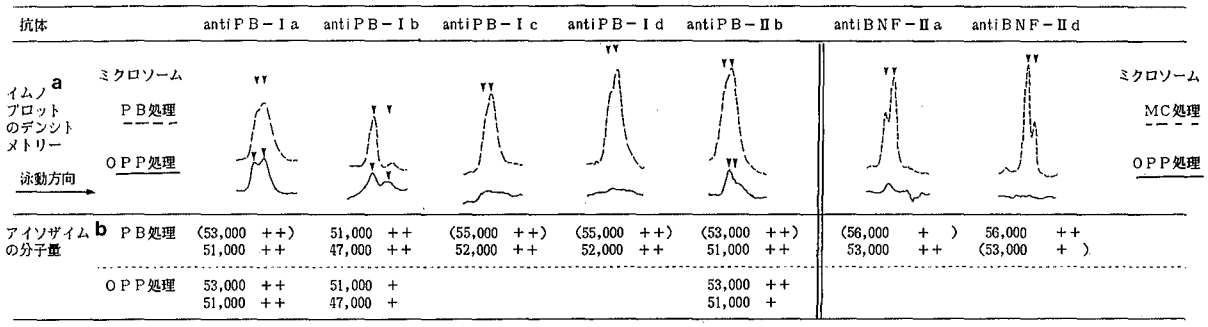


図3．ラット肝ミクロソームのウエスタンブロッティングのデンシトメトリーによる結果の比較
a．抗体との反応によって，染色されたバンドの領域のデンシトメトリーのピークを示した．実線の試料はOPP-Na投与．破線はPB，あるいはMC投与のミクロソーム
b．抗体で検出されたバンドの分子量をアイソザイムの分子量として示した．（ ）を附していない分子量は抗原として用いた精製チトクロームP-450成分の分子量を示した．分子量の後の＋，＋＋は抗原の反応性の強さ．

また一つ一つの分子種の基質特異性は明確に割り切れるものではなく，分子種間である程度重複がみられる．SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動，およびウエスタンブロッティングの結果より，OPP投与ラット肝ミクロソームで増加した，分子量51,000，47,000の顕著なバンドと53,000のバンドは，PB誘導されたチトクロームP-450の分子種のうちPB-Ⅰa，PB-Ⅰb，PB-Ⅱbと同じものであると免疫的に同定された．実験には，精製酵素ではなくミクロソームを使用したので，抗体の特異性の重複の因子や近い分子量の分子種のオーバーラップ等により明確な結論を導くのは困難であるが，CO差スペクトルでも，PBと同じ450nm付近に極大吸収があったことからOPPがMC型よりは，PB型に近いことが示唆される．さらにOPP誘導のチトクロームP-450を精製して，その性質を明らかにする必要があるが，今後は，OPP自身を水酸化する酵素に焦点を絞り検討する予定である．

謝辞　ラット肝チトクロームP-450の抗体を御供与いただいた川野澄江さんに深謝いたします．

文　献

1）Hiraga, K. and Fujii, T.：*Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 303-310, 1981
2）Nakao, T., Ushiyama, K., Kabashima, J., Nagai, F., Nakagawa, A., Ohno, T., Ichikawa, H., Kobayashi, H. and Hiraga, K.：*Fd Cosmet. Toxicol.*, 21, 325-329, 1983
3）牛山慶子，樺島順一郎，中尾順子：東京衛研年報33, 455-457, 1982
4）牛山慶子，樺島順一郎，中尾順子：東京衛研年報34, 297-298, 1983
5）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：東京衛研年報37, 371-372, 1986
6）今井嘉郎，青山俊文：生化学，54, 232-239, 1982
7）Haugen, D. A. Coon, M. J. and Nebert, D. W.：*J. Biol. Chem.*, 251, 1817-1827, 1976
8）Laemmli, U. K.: *Nature*, 227, 680-685, 1970
9）Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951
10）Domin, B. A., Serabjit-Singh, C. J. and Philpot, R. M.,：*Anal. Biochem.*, 136, 390-396, 1984
11）Towbin, H. Staehelin, T. and Gordon, J.,：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354, 1979
12）川野澄江，中尾順子，小嶋昭江，鈴木重任，鎌滝哲也，東京衛研年報，34, 255-259, 1983
13）Kawano, S., Kamataki, T., Maeda, K., Kato, R., Nakao, T. and Mizoguchi, I,.：*Fundamental and Applied Toxicology*, 5, 487-498, 1985

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 352-360, 1987

オルトフェニルフェノール（OPP）腎障害における微細立体構造の走査電子顕微鏡的観察

福森信隆*, 佐々木美枝子*

Scanning Electron Microscopic Observations of Three Dimensional Architecture of *o*-Phenylphenol(OPP)-Kidney Damage in Rats

NOBUTAKA FUKUMORI* and MIEKO SASAKI*

The early alterations of three dimensional finestructures on nephrotoxicity induced by *o*-phenylphenol (OPP), a fungicide, were observed by the two techniques of freeze cracking and cutting using a scanning electron microscopy (SEM). Male F344/DuCrj rats were administered orally with opp dissolved in olive oil at the dose levels of 0 and 1,500 mg/kg/day respectively for 3 days.

By the freeze cracking method, a sectional structure in glomerulus was exposed and a cracked face of renal tubules showed a smooth surface. On the other hand, the exterior covering of epithelial cells in glomerulus and a rugged surface of tubular cytoplasm were seen by the cutting method. The dilation of lumen space containing cellular debris in the proximal tubules was pronounced after the administration of OPP. The brush border at the side of lumen became shorter and were partly missing. These results obtained by SEM were similar to the previous findings obtained by the ultrathin section method. The slight swelling of epithelial cells connecting to lanky and disordered foot-process was revealed in the glomerulus. A number of erythrocytes in the interstitial space among the renal tubules became crenated by OPP. Hence, SEM in addition to a transmission electron microscopic studies are considered useful for observations of toxic changes.

Keywords: *o*-phenylphenol, three dimensional finestructures, early alterations, rat kidney

緒　言

オルトフェニルフェノール（OPP）は，柑きつ類等の真菌による腐敗，変質を防ぐ目的で防ばい剤として使用されている．著者らは化学物質の暴露後，速やかに発現する標的器官毒性について電子顕微鏡（電顕）的検索を用い，初期の形態変化として観察してきた．OPPの腎臓に対する影響で，13週あるいは2年の長期間摂取により腎盂腎炎を認める報告[1,2]がみられるが，短期投与による変化，特に細胞内の微細構造を観察した所見は，先の著者らの報告[3]にみられるにすぎない．腎臓の腫大は早期から認められ，近位尿細管で刷子縁の短小化，microvilliの離脱，糸粒体の膨化，崩壊が観察された．この時使用した電顕は，超薄切片法による透過型電顕であるため細胞の平面的形態変化を把握するにとどまり，広範な変化の認識に欠ける傾向があった．

今回，走査型電顕を用いて腎皮質部の断面を露出させ，組織構築を微細立体構造の変化として観察し，先に行った超薄切片像と比較検討したので報告する．

実験方法

動物は，F344/DuCrj雄性ラット（日本チャールスリバー）の体重約120g前後の成熟動物を使用し，実験前の馴化飼育は室温24～26℃，平均湿度50～60%，照明時間12時間の環境下で1群3匹ずつステンレスケージに収容して行った．飼育は，飼育用普通飼料（日本クレア，CE-2）を与え，自由にろ過水道水を摂取させた．実験は，前報[3]で変化が顕著に認められた3日間の強制経口投与のみを行い，投与量はOPP（東京化成，Lot No AT01）を日本薬局方オリーブ油（宮沢薬品）に

*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

1,500mg／kg量の割りで溶解し，ラットの体重100g当たり1 mlとして経口投与を行った．対照群は，同様な方法でオリーブ油のみを与えた．連続3日間の投与後，ネンブタールで麻酔を施し腎動脈より1％パラホルムアルデヒド固定液（0.1Mリン酸緩衝液，pH7.4）を灌流注入した後，大腿部より放血を充分に行い屠殺した．

摘出した左側腎臓は，冷3％パラホルムアルデヒド液で前固定を行い，皮質部を適当な大きさに細切し，一晩0.1Mリン酸緩衝液でアルデヒドを洗浄して試料とした．腎皮質部の糸球体および尿細管腔面を露出するために次の2方法を実施した[4]

1．凍結割断法　等張緩衝液で洗浄した試料は，固定効果と導電性を与えるため1％オスミウム酸（0.1Mリン酸緩衝液，pH7.4）で2時間の後固定を行い，エタノール系列で充分に脱水し無水エタノール中に放置した．その後，速やかに冷却した無水エタノールが入っているゼラチンカプセルに試料を入れ，液体窒素で凍結を行い，TF-1型凍結割断器（Eikoエンジニアリング）にて割断し，再度冷却エタノール中に入れ室温に戻した．割断された試料は，割断面が接触しないように注意して酢酸イソアミルに置換し臨界点乾燥器（日立HCP-2）で乾燥を行い，イオンスパッター（日立E-102）による白金，パラジウム蒸着を施した．

2．切断法　等張緩衝液で前固定液の洗浄を行い，細切した試料は，油分を除去したステンレスカミソリ刃で組織への圧迫がないように切断し，切断面を緩衝液の強力な水流で洗い妨害物を除去した．その後，1％オスミウム酸（0.1Mリン酸緩衝液，pH7.4）で2時間の後固定を行い，常法によりエタノール系列で脱水して，酢酸イソアミル置換を経て臨界点乾燥，白金，パラジウム蒸着を施し鏡検用試料とした．

観察は，走査電子顕微鏡（日立，S-800）を使用して，加速電圧15kvにて行った．

実験結果

腎皮質部の対照群の糸球体は，切断法では毛細血管を取り囲む上皮細胞の外表層構造として認められ（Fig. 1），また組織を凍結させ瞬時に割断した凍結割断法では，毛細血管内部が露出され各細胞の観察が可能であった．

OPP投与により糸球体の変化は，切断法で糸球体基底膜表面を覆う上皮細胞の軽度な腫大とそれに伴う上皮細胞足突起，特に分岐した2次突起の伸長と配列の乱れを認めた（Fig. 2，3）．足突起では，扁平化して不規則な分岐を出し融合する傾向を示す細胞が散在した（Fig. 3）．一方凍結割断法では，軽度ではあるが上皮細胞，メサンギウム細胞と思われる増生が観察され，血管腔で一部の赤血球は突出した星状外形を示す傾向にあった（Fig. 4 a）．糸球体のボウマン嚢の肥厚，ボウマン腔の変化は，明らかでなかった．

近位尿細管の対照群の凍結割断法は，破断面が平滑で，管腔内では比較的均一な微絨毛の刷子縁が起始部から腔内へ伸びて周囲に整列状に分布していた（Fig. 5）．刷子縁部の先端では帯電現象が割り合いに強く，明るく構造が不明瞭となる部もみられた．全体的に管腔の拡張は幾分少なかったが，対照群の上皮細胞の背高は高く保持されていた．さらに細胞質内では，核，糸粒体が破断面部で確認された（Fig. 5）．これに対し切断法では，断面に起伏がみられ細かな突出が多数認められた．これらの突出は細胞内糸粒体の部に一致するといわれ，尿細管上皮の線状隆起となり管腔側の刷子縁の微絨毛突起に連なっていた（Fig. 7 a）．切断面の細胞片や管腔内の妨害物を除去するためオスミウム酸後固定を行う前に水流で表面洗浄を施した切断法では，切断による断面部の残滓は取り除かれているが，管腔内にはさほど影響を与えなかった．尿細管腔内側の観察では，両方法で著しい相違が認められず，切断法による断面の隆起の影響はみられなかった．

OPPによる近位尿細管の立体構造の観察は，対照像と比較して尿細管細胞の細胞質断面に限定されずに管腔内壁での細胞構築の変化，管腔内貯留物の有無および管腔外側面での毛細血管，間質腔の状態を主に行った．OPP投与により近位尿細管は，両方法とも管腔の拡張，離開が顕著となり，刷子縁の部分的脱落，短小化が認められ不規則な乱れと管腔内への突出像を呈した（Fig. 6，8）．管腔では，それらの剝離した細胞成分，線維状構造物などの残滓がみられ，残存している刷子縁の配列は不整となり，細胞の背高は低下傾向を示した（Fig. 6，8）．凍結割断法，切断法とも，管腔内部の状態は明瞭に観察され，OPP投与で球形の細胞が刷子縁壁に付着しているのがみられ（Fig. 6，8 a），網状成分が複雑に絡まっていた（Fig. 6）．凍結割断法を行った尿細管上皮では，明確に識別された核のOPPによる変化は明らかでなく，細胞質内の刷子縁周辺で吸収空胞とは異なった小円形状の間隙が散在性に認められた（Fig. 6 a）．切断法の強拡大で，膨隆した刷子縁起始部の細胞質に小顆粒の密在がみられたが（Fig. 8 b），顆粒の性質，OPPとの関連については明らかでなかった．また透過電顕では明瞭な変化として観察されなかったが，尿細

管隣接部の間質腔では，多数の赤血球に萎縮を伴った突起を持つ星状外形を呈するものがみられた（Fig. 6）．これらの赤血球の変化は，対照群ではみられず円板状の正常構造を示していたが，特にOPPによる近位尿細管の障害の顕著な動物に多く認められた．他の尿細管の著変は，対照群と比較して認められなかった．

考　察

走査電顕を応用した形態観察は，透過電顕が平面的切片像を中心とするのに対して，広範囲の深部構築まで含めた立体構造の観察が可能である．しかし，分解能が悪く試料作製の影響も大きいため，実質細胞の観察に用いる機会は少なかった．さらに比較的良好な像が得られる凍結割断法では，割断位置を観察目的とする部位と一致させることが困難であり，量的処理にも限界があった[4]．これらのことから，走査電顕はマクロ的観察を主としたものであったが，透過電顕の切片像と対比することによって化学物質の微細形態に及ぼす生体作用がさらに明らかになると考えられる．近年，田中ら[5,6]はオスミウム酸とジメチルスルフォキシドを用い，割断された糸粒体，小胞体などの細胞小器官の立体構造を走査電顕で観察しており，今後，細胞小器官の動態，変化が立体的に把握できると微細構造の検索のため有効的手段になると思われる．切断法は，比較的目的部位に近い位置で断面を作製することが可能であるが，表面の膨隆，平滑でないなどの物理的影響が加味される．断面の隆起は，管腔に向って棒状の束となって切断されており，糸粒体の位置に対応するばかりでなく基底細胞膜陥入との関係をも推察される．従って，この部の尿細管上皮の核は不明瞭となり，細胞小器官の識別がほとんど不可能であった．しかし，切断法は糸球体上皮細胞の分布形態を観察するのに最適な方法であり，糸球体をボウマン腔から取り出して外表構造全形の観察もまた可能である[7]．凍結割断法とカミソリ刃による切断法を比較すると，糸球体の観察には上皮細胞の分布状態が明確である切断法が良く，あるいは毛細血管を含めた内部構築の変化を観察するためには，凍結割断法が目的に合致した．また尿細管では，細胞質面で切断法による人工産物と思われる隆起した断面像を呈し細胞内小器官の確認が不可能であるため，凍結割断法が適切と判断される．

OPPによる走査電顕の観察で，近位尿細管腔の著しい拡張，刷子縁の不整，短小化および管腔内のdebrisの付着が主な変化として認められた．これらの変化は，先に行った透過電顕による超薄切片像においても観察されたが[3]，特に今回広範囲で管腔周辺の立体構築が明らかとなり対照群と比較して大きな差異が認められた．刷子縁の整列状態が明示され，尿細管腔内での関連が切片像より明白に観察された．しかし透過電顕の超薄切片で認められた細胞質内糸粒体の膨化，崩壊は，凍結割断法による細胞質断面においても確認することは不可能であった．高分解能を必要とする糸粒体などの細胞小器官は，割断面の良否に影響を受けることより，固定を含めた試料作製過程あるいは検索方法の検討が必要と思われる[6]．

切片像では顕著でなかったが，尿細管間質腔，糸球体毛細血管の一部で赤血球の突起を持つ星状外形が認められた．これらの外形異常は，腎不全を伴った尿毒症時にみられる突起を持つ有棘赤血球の形成，赤血球自体の病変で認められることが知られているが，今回観察された変化は，周囲組織液の高滲透圧に関与する変形と思われる．尿細管上皮細胞内の糸粒体の障害に起因する尿細管刷子縁の脱落，管腔の拡張によるろ過液の再吸収不全が原因と考えられる．その結果，間質腔での滲透圧は高くなり赤血球の外形異常が出現したと推察される．OPPの経口摂取により，2.5%の高濃度で尿中蛋白量の減少傾向と飲水量の増加することが報告され[8]，さらにジフェニルで多尿傾向を認めること[9]などと関連して尿細管再吸収障害による間質組織液の高張化が示唆される．また滲透圧の影響のみを考慮して行った高張しょ糖投与によるしょ糖ネフローゼとの腎尿細管の形態変化における比較で，高張液ではOPPで認められた糸粒体の膨化，崩壊などの変化はみられず，強い細胞質の水腫性変化が観察されたことからOPPと異なる所見を示した[10]．これらのことからも，赤血球の外形異常は，尿細管障害にもとずく再吸収不全の二次的作用として出現したと考えられる．

糸球体で上皮細胞の腫大，足突起の融合，伸長など認められたが，尿中の蛋白量の変動も少なく，これらの変化はいずれも軽度で著しい障害ではないと思われる．先に観察した切片像においても，障害と推察される変化は認められなかった．凍結割断法による断面で毛細血管部が割断されるが，割断位置でメサンギウム細胞，内皮細胞の状態が異なるので観察の際には充分な注意を払う必要があると思われる．

今回，電顕による細胞形態の初期変化を把握する目的で，これまで行ってきた超薄切片法とは異なった微細立体構築の観察を実施した．凍結割断法，カミソリ刃による切断法とも細胞質内小器官の知見を得るには困難であるが，尿細管腔，間質腔，糸球体の変化などに広範囲か

らの観察が可能であった．OPPによる変化では，近位尿細管の透過電顕的観察を裏付けるとともに，特に尿細管腔内での短小化した刷子縁の整列の乱れ，細胞残滓の付着状態あるいは赤血球や細胞の外形異常が走査電顕で一層明白に確認された．さらに糸球体上皮の足突起の分布やボウマン腔内部の観察が容易に行うことができた．今後，走査電顕による観察は，透過電顕での切片像と比較した時，毒性発現の微細細胞の形態観察に多大な意義を与えると期待される．

文　献

1) Hodge, H. C., Maynard, E. A., Blanchet, H. J., Spencer, H. C. and Rowe, V. K.：*J. Pharmac. Exp. Ther.*, 104, 202-210, 1952

2) Hiraga, K. and Fujii, T.：*Fd. Chem. Toxic.*, 22, 865-870, 1984

3) 福森信隆，佐々木美枝子：東京衛研年報，36, 400-408, 1985

4) 日本電子顕微鏡学会関東支部編：走査電子顕微鏡の基礎と応用，1983，共立出版，東京

5) Tanaka, K. and Naguro, T.：*Biomed. Res.*, 2 Suppl., 63, 1981

6) 田中敬一：電子顕微鏡，20, 198-202, 1986

7) Masu, Y. and Tokunaga, J.：*J. Electron Microsc.*, 23, 226, 1974

8) 中村清純，井口重孝，池田虎雄，平賀興吾：東京衛研年報，32-2，33-39，1981

9) Booth, A. N., Ambrose, A. M., DeEds, F. and Cox, A. J.：*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 3, 560-567, 1961

10) 福森信隆，佐々木美枝子：東京衛研年報，37, 399-406, 1986

Explanation of Figures

Fig. 1 a. A surface of epithelial cells of renal glomerulus from the control rat treated with olive oil using a cutting method. The glomerular capillaries are overspread with large epithelial cells (podocyte) (Ep) linked to foot-process showing slender shape. X1,800

b. Higher magnification of the enclosed portion in Fig. 1 a. The secondary processes of foot-process (Fp) are arranged regularly. X9,000

Fig. 2 a. A surface of epithelial cells of renal glomerulus from the rat administered with 1,500mg／kg／day OPP for 3 days using a cutting method. Some epithelial cells (Ep) of glomerulus tend to appear slight swelling. X1,800

b. Higher magnification of the enclosed portion in Fig. 2 a. The secondary processes show elongation and become to disorder (arrow heads). X9,000

Fig. 3. A whole surface of glomerulus after the administration of OPP for 3 days by a cutting method. The fusion of foot-process is observed partly (arrow heads). Bowman's capsule (Bc) X2,800

Fig. 4 a. A surface of epithelial cells of renal glomerulus from the rat administered with 1,500mg／kg／day OPP for 3 days using a freeze cracking method. In this method, the glomerulus is possible to expose as a section. The slight enlarged mesangium-like cells and extension of a capillary vessel (V) are seen. X1,800

b. Higher magnification of the enclosed portion in Fig. 4 a. X9,000

Fig. 5. A proximal tubule of kidney cortex from the control rat by a freeze cracking method. The lumen (L) of proximal tubule is surrounded by parallel alignment of the brush border (Bb). Nucleus (N) and mitochondria (M) in the cytoplasm are clear comparatively. X7,100

Fig. 6 a. A few proximal tubules after the administration of OPP for 3 days using a freeze cracking method. The dilation of lumen space (L) is obvious change. Microvilli of brush border (Bb) become shorter or are disappear here and there. Most erythrocytes (E) in the interstitial space among the renal tubules tend to appear crenation. X1,800

b. Higher magnification of the enclosed portion in Fig. 6 a. A number of cellular debris remain in the lumen (L). X9,000

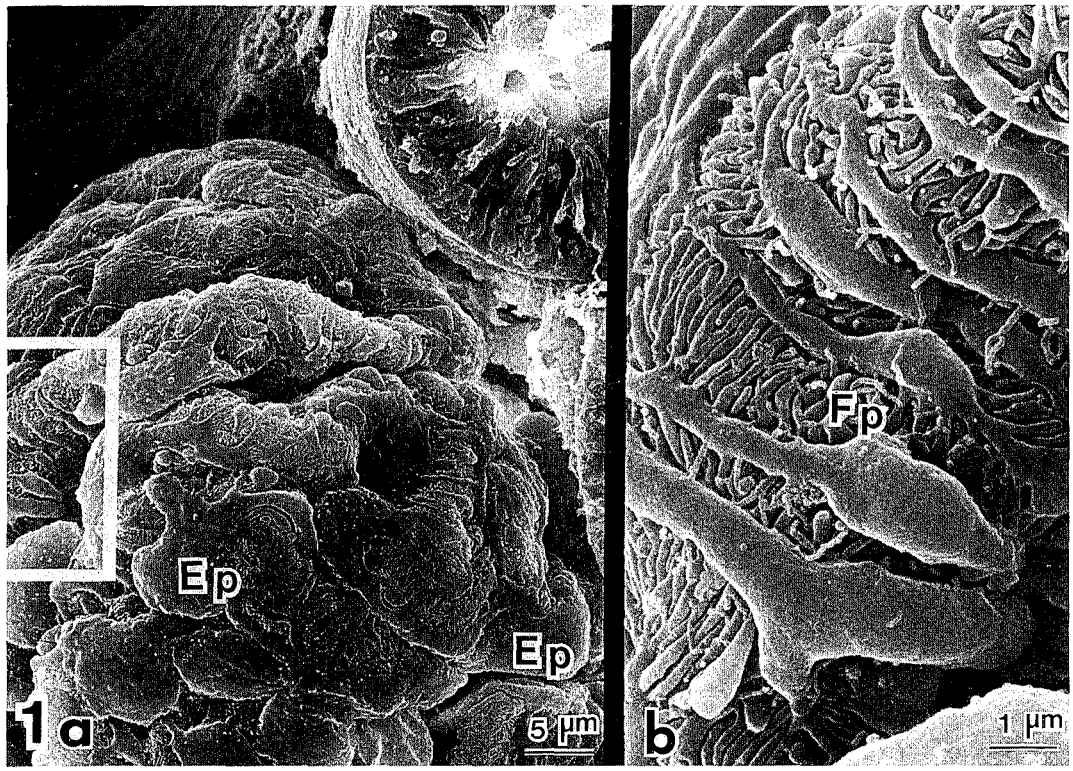
Fig. 7 a. A portion of the proximal tubule from the control rat using a cutting method. The cytoplasm cutting by thin knife edge is visible as a rugged surface. X2,400

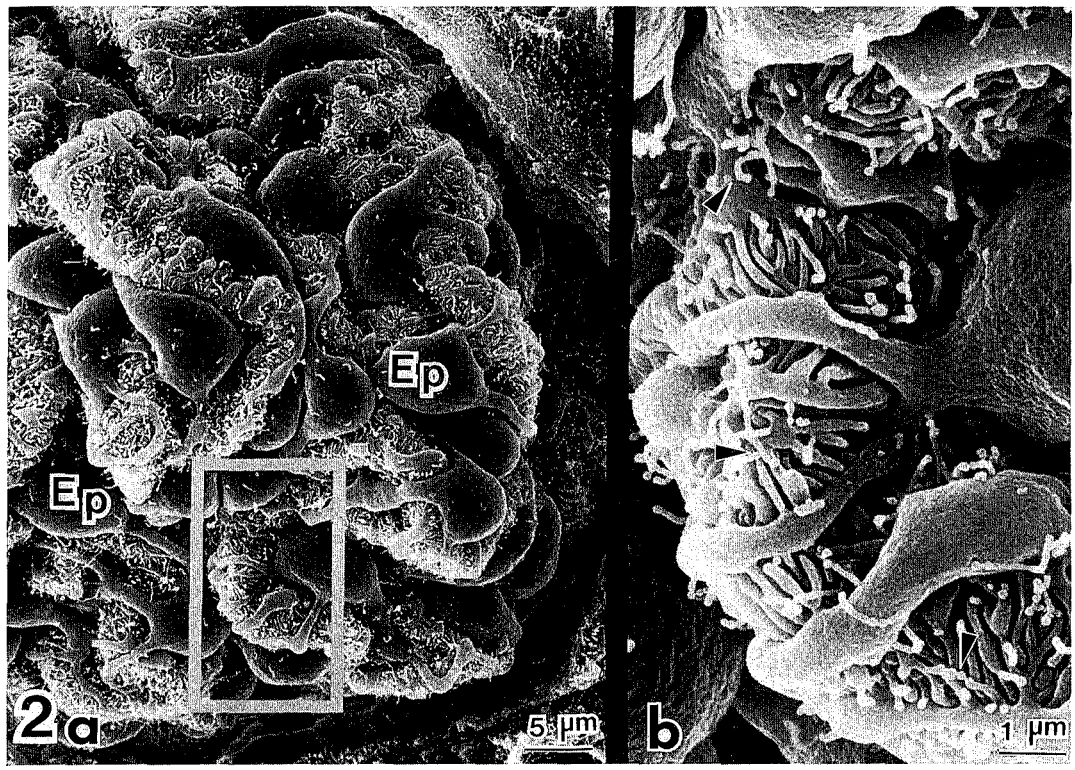
b. Higher magnification of the enclosed portion

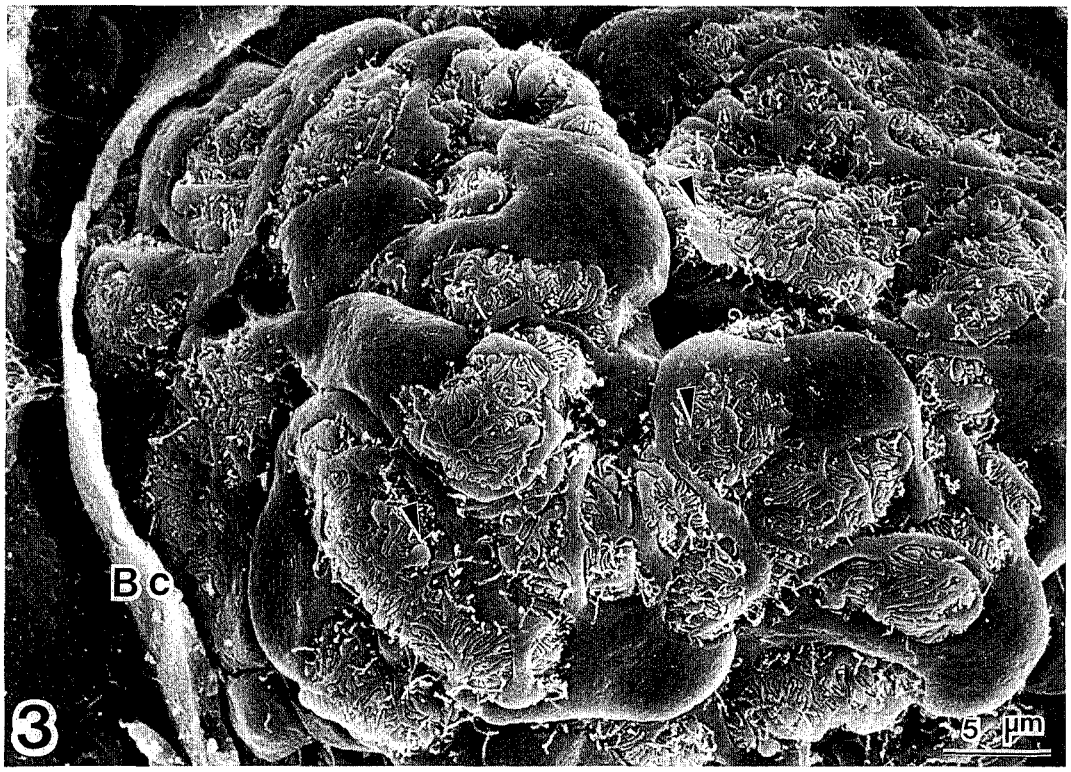
in Fig. 7 a. Microvilli (Mv) take long and regular forms. X12,000

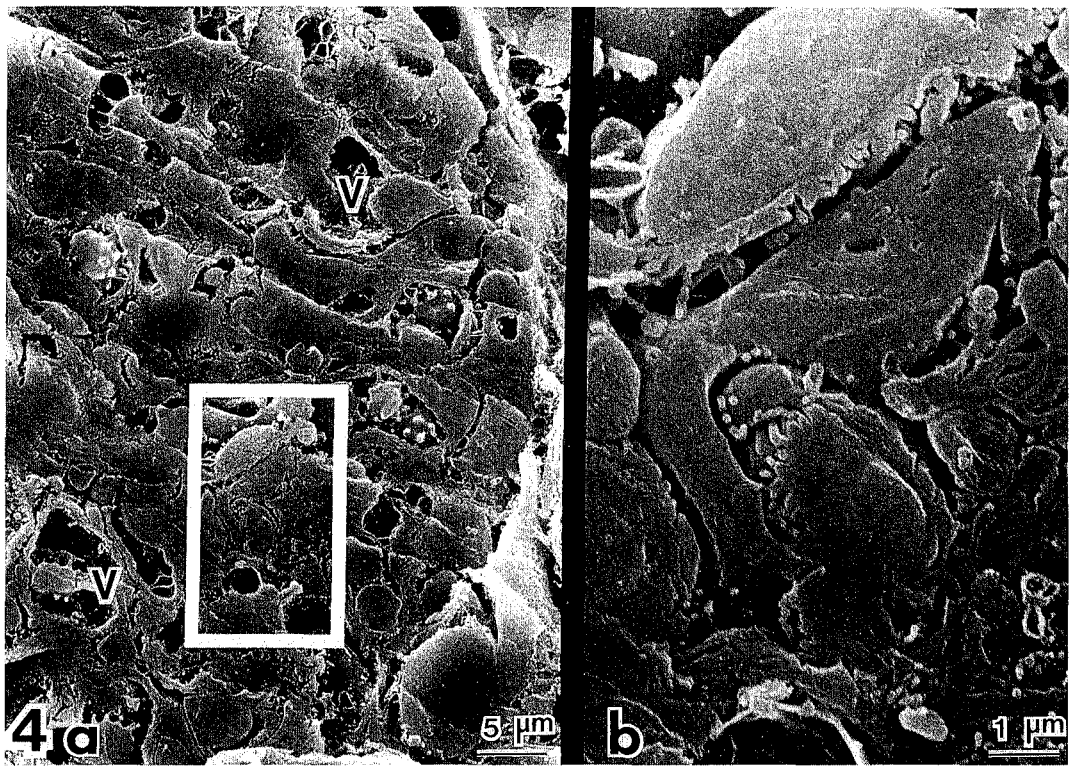
Fig. 8 a. A portion of the proximal tubule after the administration of OPP for 3 days using a cutting method. The dilation of lumen space (L) containing cellular debris is remarkable in comparison with control rat kidney. X2,400

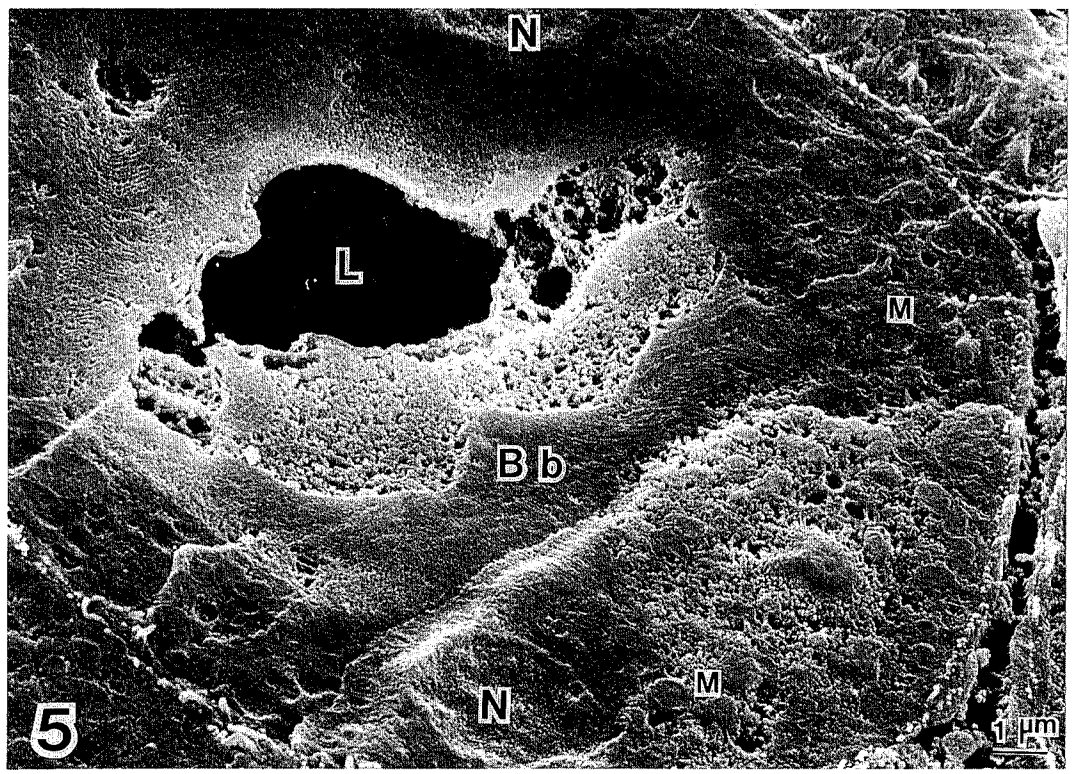
b. Higher magnification of the enclosed portion in Fig. 8 a. Short and crushed microvilli (Mv) are revealed in the expansile lumen. X12,000


Ep
Ep
1a
5 μm
Fp
b
1 μm

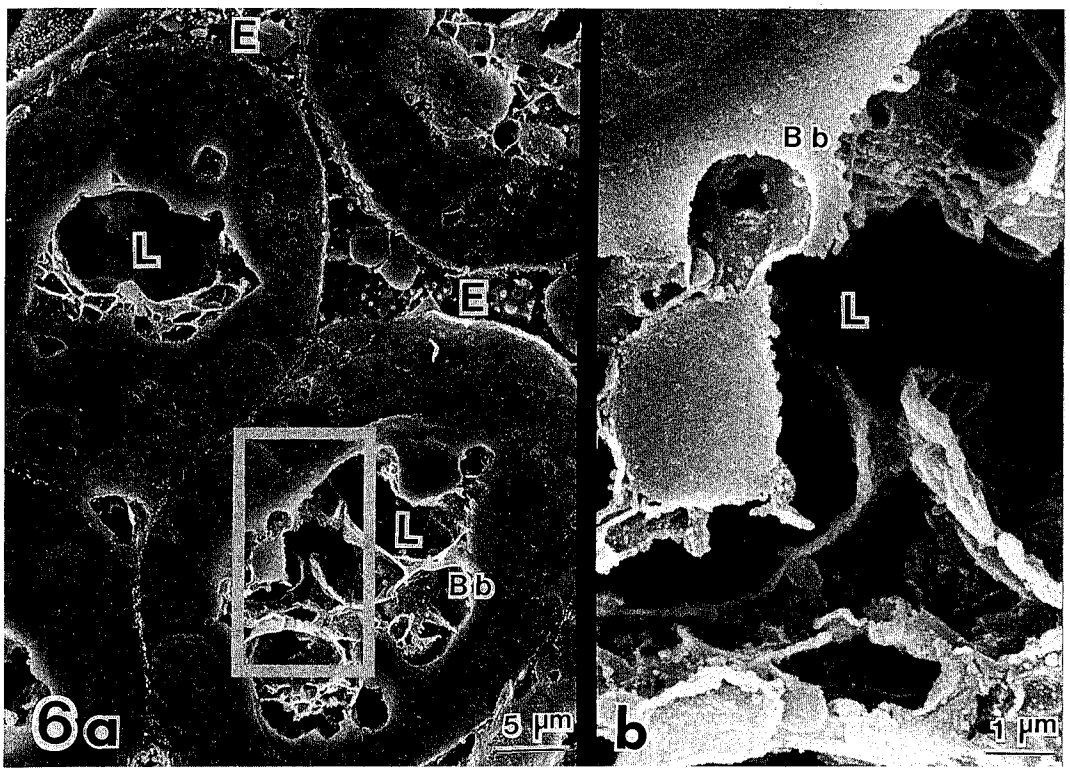

Ep
Ep
2a
5 μm
b
1 μm


Bc
3
5 µm

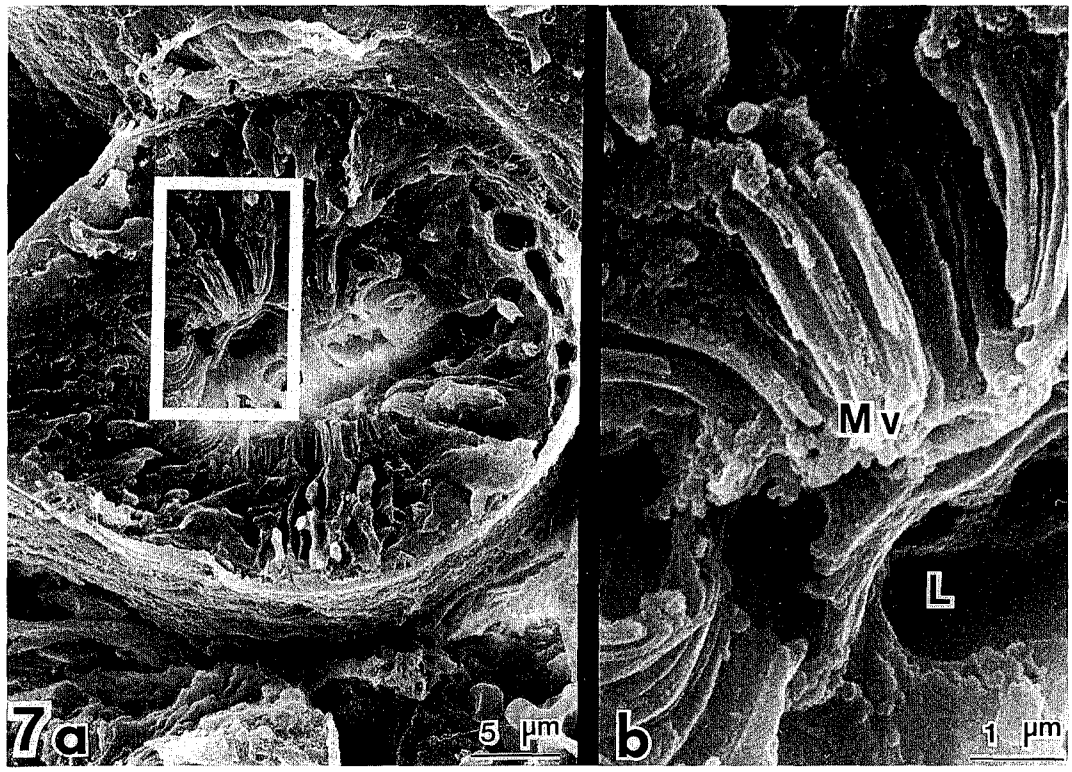

V
V
4a
5 µm
b
1 µm

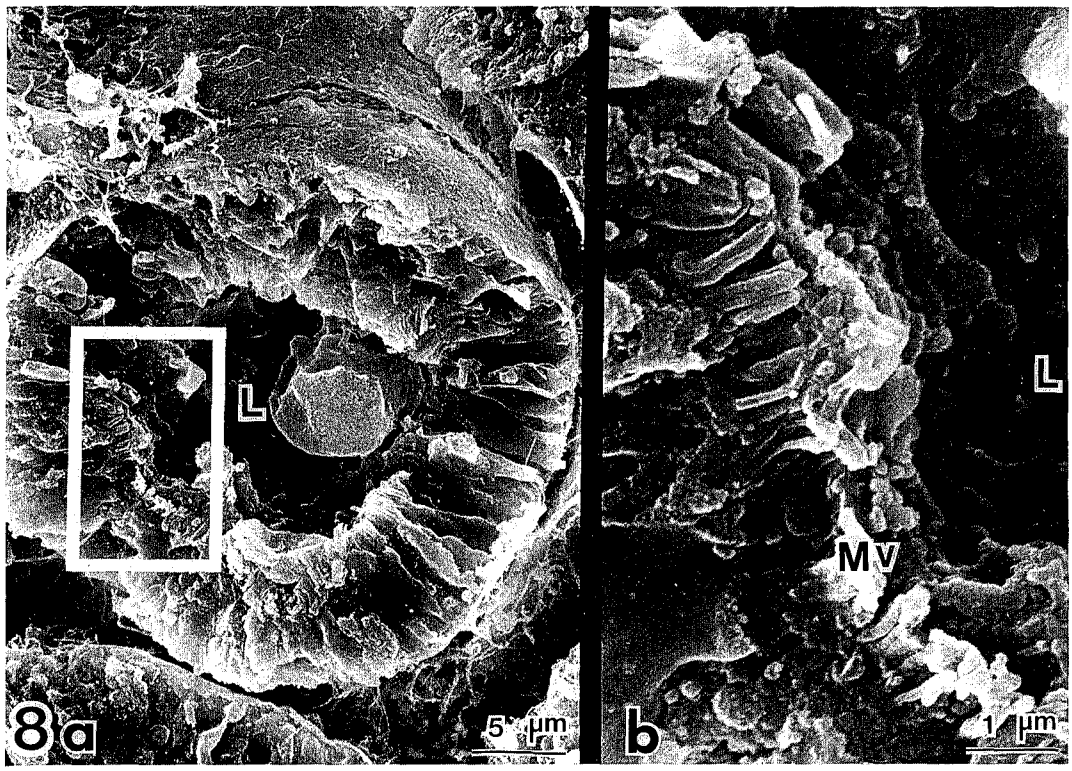


5



6a b


7a
5 µm
b
Mv
L
1 µm


L
8a
5 µm
b
L
Mv
1 µm

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 361-362, 1987

チアベンダゾール（TBZ）の蛋白への不可逆結合

米山允子*, 小縣昭夫**, 藤谷知子*, 安藤　弘**
久保喜一**, 市川久次*

Irreversiblle Binding *in vitro* of Thiabendazole to Microsomal protein of Liver in Pregnant Mice

MASAKO YONEYAMA*, AKIO OGATA**, TOMOKO FUJITANI*, HIROSHI ANDO**,
YOSHIKAZU KUBO** and HISATSUGU ICHIKAWA*

Keywords：蛋白質 protein, 不可逆結合 irreversible binding, 薬物代謝酵素 metabolic enzyme, 妊娠マウス pregnant mice

緒　言

防カビ剤チアベンダゾール（TBZ）がマウスに胎仔奇形を生じることは，小縣らによって報告されている[1]．我々は，生体に吸収されたTBZが全身に分布し，少量のTBZは，蛋白質に不可逆結合し長期間各組織に貯留することを明らかにしてきた[2)~4)]．

今回，我々は，TBZの肝ミクロゾーム蛋白質への不可逆結合と薬物代謝酵素系の関係を検討したので報告する．

実験材料と方法

（実験動物）JCL：ICRマウス雌雄を日本クレアK.Kより4週令時に購入し，8週令に達した発育良好なものを選び交配させた．交配方法は，雌雄1：1終夜同居により翌朝，腔栓の確認されたものを妊娠動物とみなし，その日を妊娠0日とした．妊娠10日目の動物にフェノバルビタール（PB）（75mg／kg）を1日1回，3日間にわたって腹腔内投与した．対照の動物には同じ量の生理食塩水を投与し妊娠13日目の動物を実験に用いた．

（試薬）〔U-^{14}C〕-TBZ（Specific activity4.68mci／mmole）は，New England Nuclearから購入した．純度は，TLC上で99%であった．

（肝ミクロゾームの調整法，蛋白結合能の測定法）既報のとおりである[5]．

結果と考察

インキュベーションの経時変化と結合量の関係をFig. 1に示した．蛋白濃度は，3 mg／ml より少い量を使用した．対照群では，時間の経過とともに結合量も増加した．薬物代謝誘導剤PB処理群でも時間の経過とともに結合量は増加し，対照群に比べ約5倍の値を示した．結合が酵素によるものかどうかを確認するためミクロゾームを反応する前に90℃で5分間熱処理した群では，結合は認められなかった．酵素反応溶液中の条件を変え

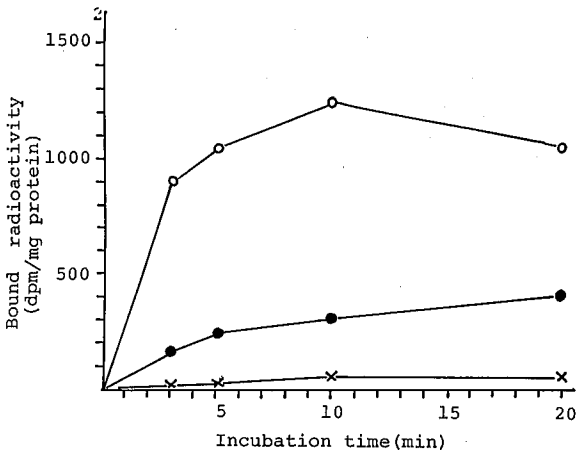


Fig. 1. Time course of the binding of [^{14}C] TBZ to liver microsomal protein from PB-Pretreated (○) and untreated (●) mice, compared with binding in a microsomal preparation heated (90℃ for 5min) before incubation (×). Each point represents the mean of three determinations.

*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
**同病理研究科

Table 1. Effect of various incubation conditions on the binding in vitro of [^{14}C] TBZ radioactivity to liver microsomes from pregnant mice

incubation conditions	Amount of bound radioactivity (dpm／mg protein／10min)	Inhibition (%)
Complete mixture	598±15*	—
− NADPH	68± 3	89
+ cysteine (1 mM)	63± 3	90
+ glutathione (1 mM)	63± 3	90
+ SKF−525A (1 mM)	74± 3	88
with CO atmosphere	61± 2	90
with N_2 atmosphere	55± 2	91

*Values represent means±SEM of three determinations for each incubation condition.

Table 2. Binding of radioactivity to microsomal preparations isolated from various mouse tissues

Tissue	Amount of bound radioactivity (dpm／mg protein／min)
Brain	47± 1
Lung	128±16
Liver	465±47
Placentas	89± 5
Foetuses	51± 0.5
Kidney	18± 0.5

Values represent means±SEM of three incubations.

て結合量の変化を検討した（Table 1）．試験管内の酵素を一酸化炭素あるいは窒素ガスで置換した時，阻害率は各々90，91%であった．NADPHが存在しない場合も阻害率は89%であった．これらのデータは，ミクロゾーム蛋白への結合がチトクロームP-450酸化酵素系を経て行われていることを意味している．SH化合物（システィン，グルタチオン）を反応溶液中に添加した時90%の阻害がみられた．肝におけるグルタチオンは，抱合による異物の解毒化に関与していることが知られている．SH化合物によって結合が阻害されることから蛋白への結合は，チトクロームP-450酸化酵素系を介して生成したTBZの活性中間代謝物によるものではないかと考えられる．Table 2に各組織のミクロゾーム蛋白への結合量を示した．肝における結合量が最大であり，胎盤や胎仔では，各々，肝の19，11%であった．

以上のデータから生体に吸収されたTBZは，肝ミクロゾームのチトクロームP-450酸化酵素系で代謝活性化され活性化された中間代謝物の一部は蛋白質と不可逆結合し，この結合は，薬物代謝系の誘導剤により増加される．さらに，TBZは胎盤や胎仔内でも結合することが解った．今後，胎盤，胎仔でのTBZの結合が肝臓の場合と同じくチトロクロームP-450酸化酵素系を介したものかどうか検討したい．

文　献

1) Ogata, A., Ando, H., kubo, Y. and Hiraga, K.：*Fd Chem. Toxem.*, 22, 509, 1984

2) Yoneyama, M., Ogata, A., Fujii, T. and Hiraga, K.：*Fd* Chem. *Toxic.*, 22, 731, 1984

3) 米山允子，小縣昭夫，藤井　孝，三栗谷久敏，矢野範夫，高橋　博，湯沢勝広，安藤　弘，久保喜一，長沢明道，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，34, 337, 1983

4) Yoneyama, M., Ogata, A. and Hiraga, K.：*Fd Chem. Toxic.*, 23, 733, 1985

5) Yoneyama, M. and Ichikawa, H. *Fd Chem. Toxic.*, 24, 1283, 1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 363-367, 1987

チアベンダゾールの幼若ラットに対する影響

小林博義*, 藤谷知子*, 市川久次*

Effects of Thiabendazole on Infant Rats

HIROYOSHI KOBAYASHI*, TOMOKO FUJITANI* and HISATSUGU ICHIKAWA*

Keword：乳汁 milk，チアベンダゾール thiabendazole，幼若ラット infant rats，毒性 toxicity

緒　言

チアベンダゾール（以下 TBZ）は防カビ剤として，かんきつ類等に用いられており，当部においても，ラットを用いて急性[1]，亜急性毒性試験[2]を，ラット，マウスで慢性毒性[3]を検討し，さらに代謝物[4,5]および催奇形性[6]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変化成長する時期であり，毒物による障害もその後の発育に多大な影響を与えるとされ，幼若期における毒物の各器官に対する生理的影響を検討することは意義あるものと考えられる．このような考えより我々は，TBZ（0.1%）を分娩直後の母ラットに投与し乳汁への移行および，その作用を検討したので報告する．

1．使用動物と飼育条件

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20匹，雄20匹，投与群　母ラット，8匹，仔ラット　雌43匹，雄31匹を用いた．動物は室温25±1℃，湿度50±5%，照明時間　午前6時より，午後6時にて，母仔をプラスチックケージに滅菌カンナクズをしいて，水は給水ビンにより自由に飲水させた．

2．TBZ 投与法

TBZ は，アメリカ，メルク社製 Thiabendazole micro-fine MSD（Lot No B2A-539）を日本クレア㈱製粉末飼料 CE-2 に0.1%濃度で添加し整形乾燥固型化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．

3．体重，飼料摂取量ならびに器官重量の測定

飼料摂取量ならびに母仔体重を毎日，午前9時～10時の間に測定した．なお，飼料摂取量は，コボシ量も含む量とした．さらに実験終了時屠殺後，胸腺，肝臓，心臓，腎臓，脾臓を摘出し，秤量した．

4．血液学的ならびに血清生化学的検査法

実験14日目に，母仔とも断頭屠殺時に放出する血液を採取し，仔は約半数を用いて，白血球数（WBC），赤血球数（RBC），ヘモグロビン量（Hgb），ヘマトクリット値（Hct），平均赤血球容積（MCV），平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）を Coulter Caunter-Model-S により測定した．

同様に母と仔の残り約半数を用いて，血清総蛋白（TP），グルコース（GLU），尿素窒素（SUN），総コレステロール（CHO），トランスアミラーゼ活性（GPT，GOT），アルカリホスファターゼ活性（ALP），α-グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT）活性について自動分析機（日立705型）を用いて測定した．

5．飼料摂取量

飼料を毎日秤量し，前日との差を摂取量として母体重100g 当り飼料摂取量をもって各群を比較した．

6．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 TBZ 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，バキュームバイヤル　キャップゴム付（日電理化硝子株式会社製）に入れ－80℃にて凍結保存した．

抽出前処理

TBZ の分析にあわせて次の前処理を行った．仔胃内ミルク500mg にメタノール10m*l* を加え，1時間，激しく混和し，2800回転15分で得た上清をとり試料1とした．さらに残査にメタノール10m*l* を加え，1時間，激しく混和し，2800回転15分で得た上清を試料2とした．試料

*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

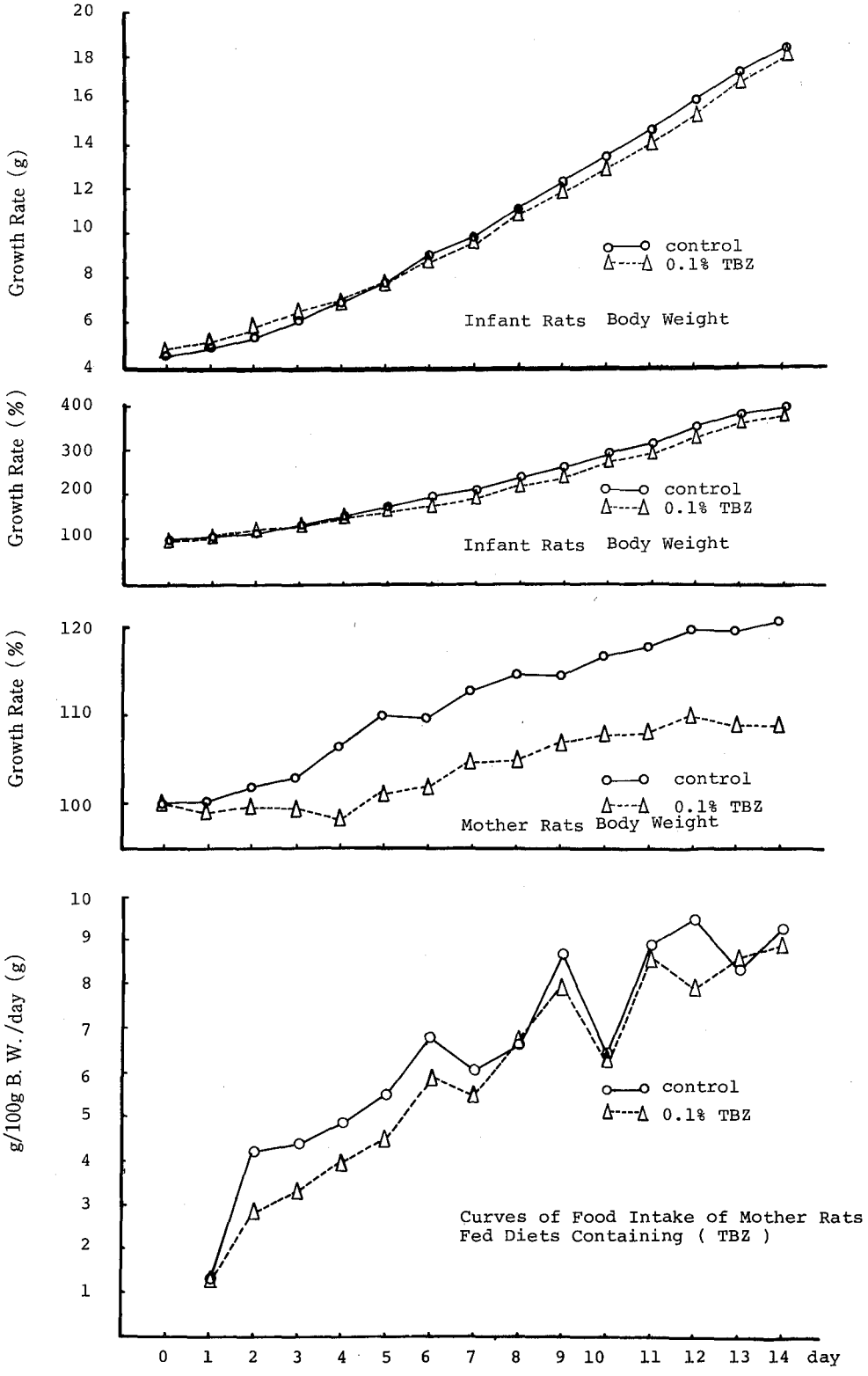


Fig. 1. Changes of Body weight in Rats and Food Intake of Mother Rats Fed Containing (TBZ)

1と2を合せて，濃縮乾固後メタノール 0.5ml を加え溶解し2800回転15分で得た上清を液体クロマトグラフィーにて分析した．

高速液体クロマトグラフィー分析

ポンプは Varian System 4200を用いた．カラムは内経45mm ×250mm カラムを用い，充てん済 Zorbax TMS（デュポン株）あるいは Chemcosorb ODS-5 ケムコ㈱を用い，移動相として，2.5mM 酢酸ナトリウム緩衝液（PH6.5）：アセトニトリル3：1 溶液を流速0.4ml／min で流し，溶出化合物は紫外部吸収計（波長310nm）で検出し，島津クロマトパック RC-1-A で記録した．

結果と考察

1）**一般状態**：TBZ0.1%群で生後14日間仔の被毛の生え始め，身ずくろい行動，哺乳動作などは，対照群との間に認められるような差異はなかった．また母ラットの哺育行動においても，両者間に認められる差はなかった．このことより0.1% TBZ においては，哺育，哺乳行動にあらわれる作用はほとんどないものと思われる．

2）**体重**：Fig. 1 に体重変化の推移を示した．母ラットは，投与4日目頃まで体重増加抑制傾向がみられたがその後は増加した．仔ラットは母親ほどの体重抑制はみとめられないが生後5日目以降でもやや仔の発育が対照にくらべ抑制された傾向を示した．その後の仔の生育は回復し，実験終了時（生後14日目）各群体重に差は認められなかった．

3）**飼料摂取量**：TBZ 群は，投与開始7日目まで，体重比摂取量がやや少ない傾向がみられた．これは林田ら[3]の慢性試験[3]においてもみられ，このことより体重抑制作用の関連性が推察されると思われる．母仔体重変化で比較すると，母親に強く体重抑制がみられるが，仔においては母親ほどつよくないもののやや抑制傾向が残った．

4）**生存率（死亡率）**：対照群，投与群とも哺育中各1匹雌が死亡したが投与との相関は認められなかった．

5）**血液学検査**：Table 1 に示した．慢性毒性試験[3]（TBZ 0.4%，0.2%）でみられた，RBC，Hb，Hct 減少および MCV 増加傾向は0.1%投与では母仔ともに認められなかった．

6）**血清生化学検査**：Table 2 に示した．母仔ともに GOT 値減少傾向がみられたが有意な差ではなかった．これは慢性毒性[3]でみられた傾向と一致した．また慢性毒性での GPT 値低下，ALP 増加[3]は認められなかった．今回の哺育試験では慢性[3]でみられない母親の CHO 増加，GGT 減少などから，慢性とは異なった哺育中特有の反応とも予想され，さらに実験をするべきものと考える．

7）**器官重量**：Table 3 に示した

母親の胸腺が絶対重量，相対重量とも増加を示したが仔では減少傾向を示した．母親肝臓では重量変化は少なく慢性結果とは異なったが，有意の差はないものの仔肝臓では重量増加傾向がみられた．慢性毒性試験[3]でみられた心臓，腎臓の重量増加はみられなかった．

8）**乳汁中の TBZ**：Fig 2 に示した

仔胃内ミルクを高速液体クロマトグラフィーにて分析したところ，ミルク500mg 当り0.6 μg のアベンダゾール（TBZ）および1.5 μg の5水酸化チアベンダゾール（5水酸化 TBZ）を検出した．仔体一匹当り乳汁量は約250mg であり，一匹当り TBZ 0.3 μg，5水酸化 TBZ

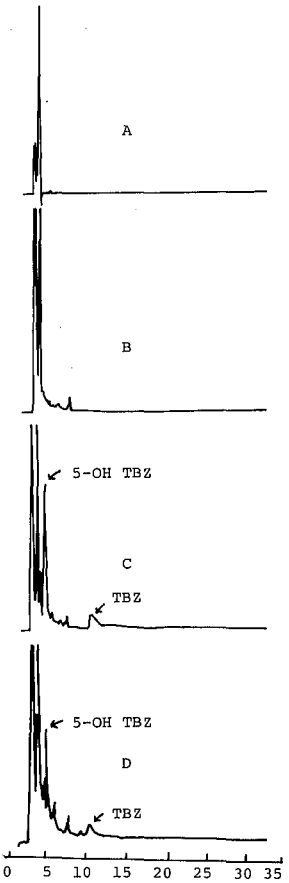


Fig. 2. HPLC. Separation of TBZ in Infant Rat Milk
A. Methanol
B. Control
C. Admimistration
D. TBZ Standard and 5-OH TBZ

は0.75 μgとなる.

ま と め

TBZ 投与群で一般症状の変化はみられなかった. 母体重は減少傾向がみられた. 血液学的変化はみられなかった. 血清生化学検査では母仔とも GOT 減少傾向がみられた. 母親で CHO 増加, GGT 減少傾向がうかがえた. 器官重量で母親の胸腺重量増加がみられた, 仔では減少傾向がうかがえた. 仔胃内ミルク中の TBZ 分析で1匹当り TBZ 0.3 μg, 5水酸化 TBZ 0.75 μg を検出した.

文 献

1) 三栗谷久敏, 林田志信, 高橋 博, 平賀興吾, 東京衛研年報, 31, 20-25, 1980
2) 三栗谷久敏, 林田志信, 高橋 博, 井口重考, 平賀興吾, 東京衛研年報, 32, 5-12, 1981
3) 林田志信, 三栗谷久敏, 神谷信行, 佐々木美枝子, 平賀興吾, 東京衛研年報, 36, 337-389, 1985
4) 藤谷和子, 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, 373-376, 1985
5) 米山允子, 小縣昭夫, 藤谷知子, 安藤 弘, 久保喜一, 市川久次, 東京衛研年報, 36, 370-372, 1985
6) 小縣昭夫, 安藤 弘, 久保喜一, 藤井 孝, 佐々木美枝子, 平賀興吾, 東京衛研年報, 36, 390-395, 1985

Table 1. Hematology

Mother Rats Infant and Young Rats

Day	Sex	Group	No.of Rat	WBC $\times10^3/mm^3$	RBC $\times10^6/mm^3$	Hgb g/dl	Hct %	MCV μ^3	MCH $\mu\mu g$	MCHC %
14	M	Cotrol	4	7.33±2.472	4.38±0.219	10.00±1.876	29.60±1.876	66.50±2.517	22.37±0.793	33.78±0.680
		TBZ(0.1%)	15	7.98±2.263	4.61±0.266	10.14±0.763	30.31±2.038	65.07±1.580	21.91±0.729	33.45±0.769
	F	Cotrol	14	7.94±2.407	4.47±0.514	10.62±0.559	30.30±3.771	67.07±2.269	24.04±4.048	35.51±6.260
		TBZ(0.1%)	23	7.01±1.771	4.75±0.217	10.63±0.648	31.53±1.608	65.35±1.434	22.17±0.842	33.63±0.881
14	F	Cotrol	5	2.64±0.230	7.72±0.405	15.74±0.971	43.28±2.279	56.00±2.550	20.24±0.397	36.10±1.463
		TBZ(0.1%)	8	3.03±1.118	8.25±0.681	16.93±1.107	45.08±3.716	54.75±1.488	20.39±0.781	34.83±5.858

Mean ± S.D. * $p<0.005$

Table 2. Biochemical Tests

Mother Rats Infant and Young Rats

Day	Sex	Group	No.of Rat	TP (g/dl)	GLU (mg/dl)	UN (mg/dl)	GPT (IU/l)	GOT (IU/l)	ALP (IU/l)	CHO (mg/dl)	GGT (U/l)
14	M	Cotrol	5	3.52±0.194	134.57±17.472	48.27±23.671	23.71±11.600	198.29±64.438	1095.00±217.939	140.50± 7.007	10.17±2.627
		TBZ(0.1%)	21	3.61±0.243	144.81±19.793	34.98± 6.062	19.52± 3.371	165.10±18.466	1056.43± 87.572	144.14±10.258	8.30±3.354
	F	Control	13	3.58±0.375	138.92±24.608	32.30± 6.120	20.38± 6.090	194.23±58.194	1099.23± 75.810	147.77±13.179	8.10±3.307
		TBZ(0.1%)	22	3.53±0.164	142.91±13.125	35.68± 5.012	21.50± 4.217	183.73±26.179	1146.41± 95.566	152.62±17.101	7.83±2.180
14	F	Cotrol	5	4.64±0.865	111.00±19.698	32.52± 6.809	43.40±12.381	124.20±41.136	941.60±137.547	81.20±18.633	4.76±0.573
		TBZ(0.1%)	8	5.33±0.654	109.12±14.817	35.63± 4.131	49.63± 8.959	110.38±20.021	997.88±173.894	117.63±17.776	3.56±0.905

Mean ± S.D.

Table 3. Organ Weights of Infant and Young Rats Fed Diets Containing (TBZ)

Infant and Young Rats / Mother Rats

Day	Sex	Group	No.of Rat	Thymus mg mg/100g	Heart mg mg/100g	Liver mg mg/100g	Kidney(L) mg mg/100g	Spleen mg mg/100g
14	M	Control	20	49.02±11.42 256.45±50.82	107.22± 17.46 569.09± 96.49	543.99± 53.16 2863.70±229.23	98.32± 8.14 518.62± 40.24	51.47± 7.04 271.14±33.24
		TBZ(0.1%)	31	44.94± 9.29 232.46±42.98	110.11± 11.41 570.19± 41.80	583.14± 62.30* 3015.28±166.67***	107.68± 19.83 558.32±104.11	53.07± 8.94 273.83±33.25
	F	Control	20	52.03±11.15 285.82±47.54	94.85± 9.43 525.92± 40.17	496.19± 47.87 2750 ±198.44	97.61± 11.72 539.19± 31.51	47.11± 9.12 260.76±44.06
		TBZ(0.1%)	43	43.24±11.48* 244.48±69.05*	99.00± 13.42 562.64±100.00	539.98± 75.39* 3042.47±428.17***	107.04± 34.57 604.40±195.44	43.21± 6.77 245.32±39.23
14	F	Control	5	166.43±51.55 78.49±29.52	700.80± 32.96 317.78± 12.77	10247.66±420.62 4648.07±188.61	780.98± 60.04 353.63± 14.03	430.76±30.64 195.59±17.01
	F	TBZ(0.1%)	8	618.75±86.23*** 278.31±90.44***	690.08± 64.32 317.38± 22.02	10587.54±858.07 4867.98±237.26	819.09± 68.31 376.61± 19.03	424.50±47.78 195.19±39.26

Mean ± S.D. * $p<0.05$ *** $p<0.001$

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 368-370, 1987

フィチン酸およびフィチン酸ナトリウムのマウスに対する急性毒性

藤谷知子*, 米山允子*, 樺島順一郎*, 細川奈津子*,
市川久次*

Acute Toxicity of Phytic Acid and Sodium Phytate to Mice

TOMOKO FUJITANI*, MASAKO YONEYAMA*, JUN-ICHIRO KABASHIMA*, NATSUKO HOSOKAWA**,
and HISATSUGU ICHIKAWA*

Keywords：急性毒性 acute toxicity, フィチン酸 Phytic Acid, フィチン酸ナトリウム Sodium Phytate, マウス mice

はじめに

食品に酸化防止剤として使われている天然添加物フィチン酸とそのナトリウム塩について，マウスを用いた急性毒性試験を行ったので報告する．

実験材料と方法

フィチン酸は東京化成工業㈱製，フィチン酸ナトリウムは半井化学薬品㈱製を用いた．マウスは日本クレア社のICRマウス（Jcl：ICR）を4週令で購入し，8～9週令で実験に用いた．

フィチン酸，フィチン酸ナトリウムは，それぞれ水溶液とし，投与容量は10ml／kg体重，投与用量は表1，3に示した量になるように濃度を調製した．投与前日の午後5時から除餌して水のみを自由に与え，当日午前9時から，胃ゾンデを用いて強制経口投与し，投与2時間後から餌を与えた．投与後8時間までは1時間おきに観察し，その後は24時間おきに観察した．死亡したマウスは，ほぼ発見するたびに剖検を行い，生存マウスは7日後に断頭屠殺して剖検した．

50％致死量（LD50）は，Litchfield-Wilcoxon法[1]およびMoving Average法[2]で算出した．

結果と考察

フィチン酸

フィチン酸の投与後死亡時間と1週間死亡率を表1に示した．雄では投与後1時間以内の死亡が多く，雌では1時間以後の死亡が多い傾向があった．一般症状として，立毛・うずまくりが見られ，一部に四肢にけいれん様の動きやまひが見られた．投与後24時間以内の死亡動物は，雌雄ともほとんどが胃壁がうすくなり，肝・腎・小腸などの臓器の胃に接している部分が白変していた．また，雄で胃の中に大量に出血しているものが一例あり，雌ではほとんどの例に胆のう肥大が見られた．24時間以後の死亡動物は，雌雄とも，腺胃・小腸に出血があり，胃壁・小腸壁がうすくなり血のまじった液やガスが充満していた．他に，雌で，胃壁がやぶれて腹腔内に大出血しているものが一例見られた．生存動物のうち，雄の一例に脾臓萎縮・消化器系ガス充満，睾丸・精細管に白斑が見られ，雌では，肝臓と胃のゆ着が3例，胃から十二指腸にかけて黄白色のしこりのあるものが5例，胃から盲腸までのガス充満と腎の赤化が1例あり，全体に胆のう肥大が見られた．

1週間死亡率から算出したフィチン酸の50％致死量を表2に示した．Litchfield-Wilcoxon法で，雄は900mg／kg体重，雌は1,150mg／kg体重，Moving Average法で，雄は900mg／kg体重，雌は1,160mg／kg体重と，よく一致している．

フィチン酸ナトリウム

フィチン酸ナトリウムの投与後死亡時間と1週間死亡率を表3に示した．雌雄とも投与後1時間以内の死亡が多く，一般症状として立毛・うずくまりが見られた．死亡動物は，雌雄とも，胃壁のびらん・腺胃出血・胆のう肥大が見られ，小腸壁がうすくなり血のまじった液やガスが充満していた．生存動物の雄に，右腎がやや水腎様

*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
**現同環境保健部水質研究科

Table 1. Mortality of Mice administered orally with Phytic Acid

Sex	Dose (mg/kg B.W.)	No. of death Time after dosing(hr) 0	1	2	3	4	5	6	7	8	24	48	72	Mortality No. of death / No. of mice
Male	2500		2	2						1				5/5
	1660						1			1		2		4/5
	1110		2								1			3/5
	740										1		1	2/5
	490		1											1/5
Female	2500		1	3			1							5/5
	1660				2	1	1				1			5/5
	1110				1						1			2/5
	740													0/5
	490													0/5
	1670				1	1						2		4/5
	1390										2	1		3/5
	1150											3		3/5
	960										2			2/6
	800		1											1/5

Table 2. The Medium Lethal Dose (LD_{50}) of Phytic Acid

	Dose Range (mg/kg B.W.)	Litchfield-Wilcoxon LD_{50} (mg/kg B.W.)	Litchfield-Wilcoxon Confidence limit ($p=0.05$)	Moving Average LD_{50} (mg/kg B.W.)	Moving Average Confidence limit ($p=0.05$)
Mele	490-2500	900	540-1490	900	520-1560
Female	490-2500	——	——	1160	930-1440
	800-1670	1150	910-1410	——	——

Table 3. Mortality of Mice administered orally with Sodium Rhytate

Sex	Dose (mg/kg B.W.)	No. of death Time after dosing(hr) 0	1	2	3	4	5	6	24	48	Mortality No. of death / No. of mice
Male	2970		2			1	1				4/5
	1980		3							1	4/5
	1320		3								3/5
	880										0/5
	590										0/5
Female	2970		2					1			3/5
	1980		1								1/5
	1320										0/5
	880										0/5
	590										0/5

Table 4. The Medium Lethal Dose (LD_{50}) of Sodium Phytate

		Litchfield-Wilcoxon		Moving Average	
	Dose Range (mg/kg B.W.)	LD_{50} (mg/kg B.W.)	Confidence limit ($p=0.05$)	LD_{50} (mg/kg B.W.)	Confidence limit ($p=0.05$)
Male	590-2970	1030	560-1910	1320	990-1770
Female	590-2970	2750	1990-3800	2680	1760-4090

になったものが1例あった.

1週間死亡率から算出したフィチン酸ナトリウムの50%致死量を表4に示した. 雄は, Litchfield-Wilcoxon 法で1,030mg／kg 体重, Moving Average 法で1,320mg／kg 体重で, 95%の信頼限界内で一致しており, フィチン酸の50%致死量ともほぼ同じであった. しかし, 雌では, Litchfield-Wilcoxon 法で2,750mg／kg 体重, Moving Average 法で2,680mg／kg 体重と, 雄の2倍以上高く, Litchfield-Wilcoxon 法による計算で雌雄間に平行性の検定で差はないが, 強度の検定で差が見られた.

まとめ

フィチン酸とフィチン酸ナトリウムの ICR マウスにおける50%致死量を調べた. フィチン酸は, 雄で900mg／kg 体重, 雌で1,150mg／kg 体重, フィチン酸ナトリウムは, 雄で1,030mg／kg 体重（いずれも Litchfield-Wiloxon 法）と, 同程度の値であったが, フィチン酸ナトリウムの雌の50%致死量は2,750mg／kg 体重と高く, 興味深い結果であった. さらに, この試験結果をもとに, 短期の連続投与による毒性試験や亜急性・慢性毒性試験も行う必要があるだろう.

50%致死量の算出に, Litchfield-Wilcoxon 法と Moving Average 法を試みたところ, 得られた値は, 95%信頼限界内でよく一致していた. 50%致死量の算出を目的とする試験では, 使用する動物数が少なくてすむ Moving Average 法が, 簡便で良いと思われる.

文献

1) Litchfield, J.T.Jr. and Wilcoxon, F. : *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **96**, 99-113, 1949.

2) Gad, S.C. and Weil, C. S. : *Principles and Methods of Toxicology*, Hayes, A.W., 299-305, 1982, Raven Press, New York.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 371-376, 1987

フィチン酸ならびにフィチン酸ナトリウムのラットにおける経口急性毒性

市川久次*, 大石真之*, 高橋　省*, 小林博義*,
湯沢勝広**, 細川奈津子***, 橋本常生****

Studies on Acute Oral Toxicities of Phytic Acid and Sodium Phytate in Rat

HISATSUGU ICHIKAWA*, SHINSHI OHISHI*, OSAMU TAKAHASHI*, HIROYOSHI KOBAYASHI*,
KATSUHIRO YUZAWA**, NATSUKO HOSOKAWA*, and TSUNEO HASHIMOTO*

Keywords：フィチン酸 phytic acid, フィチン酸ナトリウム sodium phytate, ラット rat, 急性毒性 acute toxicity

フィチン酸は天然抗酸化剤として，BHA，BHT 等の合成抗酸剤に発癌性等[1]の疑いが問題になってから多用されつつあるものの一つである．現在天然に産生するものは食品添加物として使用する場合，その使用基準等は確立されていない．フィチン酸は缶詰のストラバイト防止，缶臭防止，油脂等の酸化防止の目的で近年広く使用されつつある．そこで，フィチン酸の毒性試験の一環として，ラットを用いてフィチン酸を経口投与し，その急性毒性を検討した．また，フィチン酸そのものは酸性が非常に強く，酸としての毒性も推定されるので，その塩であるフィチン酸ナトリウムについても合せて検討を行った．

実験材料ならびに方法

1．使用動物

日本チャールス・リバー株式会社生産の SPF ラット雌雄（F 344／Ducrj 系）を 4 週令で購入し，4 週～5 週間固型型飼料 CF-2（日本クレア製）で予備飼育し，実験に供した．

2．試料

フィチン酸は東京化成製（ca. 50% in water, Lot No. AO01）をフィチンチ酸ナトリウムは半井化学製（試薬一級 Lot No. M6H 2435, $C_6H_6(PO_3Na_2)_6 \cdot xH_2O$, 水分含量11%）を使用した．なお投与にあたっては，それぞれ精製水で希釈または溶解し，試料絶対量を体重 kg 当りに換算したものを用時調製し使用した．

3．飼育条件

室温25±1℃，温度50±5％に調整された飼育室内にて，ベルト式架台において飼育した，予備飼育および投与後 2 時間以後は固型飼料 CE-2を与え，水は細菌沪過器を通した水道水を自由に摂取させた．

4．試験方法

試料の投与用量は公比1.1～1.5の割合で増量し，5～8用量を用いた，投与容量，用量は Teble 1 に示した如くであり，投与は胃ゾンデにより行った．なお動物は 1 群 5 匹とし，実験前日午后 5 時より除飼し，水のみを与え，午前 9 時30分より試料の投与を開始した．投与後 2 時間目より飼料を再び与え 7 日間にわたって症状を観察するとともに，この間の死亡率にもとづいて，Moving average 法[2]，Lichfield-Wilcoxon 法[3]により50％致死量（LD_{50}）を算定した．また死亡例については直ちに，生存例については 7 日後屠殺剖検した．

実験結果

1．症状

フィチン酸ならびにフィチン酸ナトリウムの間に顕著な症状の差は認められず，主症状はゼラチン様物質を混じたはげしい下痢と鎮静状態で，その他流涙，立毛がみられた．鎮静の状態は，じっとしているがケージをたたくとおきあがるという状態であった．

*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
**同病理研究科
***現同環境保健部水質研究科
****現同生活科学部乳肉研究科

Teble 1. Dosing Schedule for Acute Toxicity Test of Phytic Acid and Sodium Phytate in Rats

Material	Exp, No.	Vehicle	Volume ml/kg B.W.	Sex	Dose g/kg B.W. (No. of Amimals)
Phytic acid	1	pure water	1.0	M	2.50 (5) 1.66 (5) 1.11 (5) 0.74 (5) 0.49 (5)
	2		0.5	M	0.70 (5) 0.61 (5) 0.53 (5) 0.46 (5) 0.40 (5) 0.35 (5) 0.30 (5) 0.26 (5)
			0.5	F	0.70 (5) 0.61 (5) 0.53 (5) 0.46 (5) 0.40 (5) 0.35 (5) 0.30 (5) 0.26 (5)
Sodium phytate	3	pure water	0.8	M	3.04 (5) 2.03 (5) 1.35 (5) 0.91 (5) 0.61 (5)
			0.8	F	3.04 (5) 2.03 (5) 1.35 (5) 0.91 (5) 0.61 (5)
	4		0.5	M	1.51 (5) 1.38 (5) 1.25 (5) 1.14 (5) 1.03 (5) 0.94 (5)
			0.5	F	1.51 (5) 1.38 (5) 1.25 (5) 1.14 (5) 1.03 (5) 0.94 (5)

Table 2. LD_{50} of Phytic Acid and Sodium Phytate in Rats

Material	Exp. No.	Sex	Death Time (hr.) Onset	Peak	Last	Slope Function (Confidence Interval at p =0.05)	LD_{50}(g/kg) (Confidence Interval at p =0.05)
Phytic acid	1	M					0.50[1)] (0.438~0.564)[1)]
	2	M	1	3	63	1.684 (0.098~2.583)	0.405 (0.311~0.527)
		F	2	2,3	21	1.459 (1.112~1.914)	0.480 (0.396~0.581)
Sodium phytate	3	M				1.241 (0.874~1.762)	1.13 (0.935~1.365)
		F					1.672[1)] (—)
	4	M	3	7	24	1.119 (1.018~1.230)	1.03 (0.950~1.117)
		F	3	5	46	1.180 (0.594~2.346)	1.20 (0.668~2.156)

Statistically significant : phytic acid M and Sodium phytate M
phytic acid F and Sodium phytate F

1) by Moving Average method

2. LD_{50}

結果は Table 2 に示す通りである．死亡開始時間は，フィチ酸，フィチン酸ナトリウムとも1～3時間とわりに早く，最多死亡時間（peak）は，フィチン酸においては2～3時間，フィチン酸ナトリウムにおいては5～7時間であった．データは示さなかったがフィチン酸投与の雄において15時間に小さい peak が見られた．死亡例の大多数は24時間以内に致死した．LD_{50}はフィチン酸では雄（0.405～0.50g／kg B. W.），雌（0.480g／kg B. W.），フィチン酸ナトリウムでは雄（1.03～1.13g／kg B. W.），雌（1.672～1.20g／kg B. W.）であり，雌雄の間に著しい差は認められなかったが，フィチン酸とフィチン酸ナトリウムの間には統計学的に有意な差異が認められた（$p < 0.05$）．今回，dose の選択の関係上 Lich-

Teble 3. Organ Weight after 7 days Administered with Phytic Acid in Rats

Sex	Dose mg/kg PO	No. of Rat PO	B. W.(g)	Heart mg mg/100g[2)]	Liver g g/100g	Kidney mg(L) mg/100g	Kidney mg(R) mg/100g	Spleen mg mg/100g	Adrenal mg(L) mg/100g	Adrenal mg(R) mg/100g	Lung mg mg/100g
Male	0	5	201.67± 1.53[1)]	643.33±25.17	8.03±0.53	716.67±1.55	730.00±10.00	456.67±25.17	17.66±2.136	15.88±1,313	696.67±41.633
				318.96±10.19	3.98±0.24	355.36± 4.07	361.98± 3.78	226.49±13.57	8.76±1.012	7.87±0.608	345.46±20.637
	460	4	215.75±20.40	632.50±57.95	8.98±0.91	830.00±99.33	820.00±114.02	505.00±78.53	15.54±2.264	17.07±1.529	772.50±20.616*
				294.01±24.88	4.16±0.17	384.04±12.47**	379.32± 23.51	236.60±52.12	7.28±1.387	7.99±1.173	360.33±34.260
	400	2	215.50± 3.54	600.00± 0.00	9.47±0.13*	820.00±14.14**	780.00±28.28	520.00±56.57	17.34±1.612	15.35±2.008	780.00±28.284
				278.64± 4.57	4.40±0.13	380.51± 0.32**	361.89± 7.19	241.55±30.21	8.05±0.880	7.13±1.049	362.11±19.066
	384	2	219.50±21.21	665.00±21.21	8.66±0.11	840.00±14.14**	810.00±14.14**	485.00± 0.07	19.69±0.134	18.67±1.747	755.00±21.213
				303.02±12.59	3.95±0.09	382.74±10.14*	369.01± 2.88	220.98± 5.36	8.97±0.025	8.51±0.878	353.01± 6.252
	303	3	213.33± 4.16	640.00± 0.00	8.73±0.38	738.33±40.42	773.33±23.09	463.33± 5.77	16.35±2.819	17.57±1.013	746.67±40.415
				300.08± 5.51	4.09±0.13	367.35±21.95	362.46± 4.27	217.25± 5.57	7.66±1.346	8.24±0.575	350.18±22.638
	263	5	213.60±10.43	670.00±49.50	8.39±0.61	838.00±69.43*	810.00±74.50	466.00±34.35	15.92±1.384	17.86±0.726*	734.00±45.056
				313.47±11.96	3.91±0.12	391.95±16.97	378.80±23.37	218.07±10.10	7.46±0.584	8.38±0.586	343.55±10.093
Female	0	5	147.00±14.44	492.00±43.24	5.19±0.49	578.00±49.19	550.00±55.68	346.00±15.17	21.69±3.555	21.08±1.840	582.00±50.695
				335.13±12.23	3.50±0.05	393.81±16.50	374.13± 8.57	236.50±15.65	14.70±2.448	14.40±1.332	396.83±25.413
	609	2	135.00± 7.70	490.00±14.14	5.31±0.14	600.00±56.57	590.00±70.71	315.00±21.21*	22.24±4.469	22.20±2.531	620.00±28.284
				363.19± 8.55	3.94±0.31	443.96±18.65	436.26±29.53	233.24± 3.50	16.58±4.179	16.52±2.740	460.44±45.068
	529	2	137.50±10.61	500.00±28.28	5.26±0.54	590.00±42.43	580.00±28.28	325.00± 7.07**	20.71±1.308	19.09±2.036	615.00±106.066
				363.93± 7.50	3.82±0.10	429.18± 2.25	422.28±12.00	236.87±13.13	15.14±2.119	13.97±2.559	445.62±42.764
	460	2	136.50±12.02	470.00±14.14	5.32±0.72	570.00±14.14	525.00±49.50	345.00± 7.07	21.39±0.707	18.52±0.290	600.00±14.142
				345.20±20.04	3.89±0.19	419.69±47.32	387.72±70.41	253.50±17.14	15.71±0.865	13.61±0.986	440.81±28.460
	400	4	132.75± 7.18	457.50±35.00	4.90±0.29	535.00±41.23	540.00±53.54	320.00±18.26*	19.10±2.588	19.08±2.915	632.50±49.917
				344.59±15.07	3.69±0.07	403.09±23.82	406.56±30.72	241.29±13.03	14.44±2.301	14.38±2.102	476.70±31.965
	384	4	136.75± 8.78	487.50 ± 12.58	± 4.42±0.47*	557.50±49.92	555.00±33.17	335.00±30.00	21.91±2.093	19.77±2.473	702.50±49.917**
				357.19±15.20	3.22±0.14**	407.25±13.85	406.18±16.46	245.00±16.98	16.02±1.221	14.45±1.499	514.37±33.634**
	303	5	136.60±8.11	482.00±19.24	4.38±0.25*	556.00±20.02	556.00±18.17	338.00±21.68	21.96±1.297	20.93±1.280	700.00±77.136*
				353.91±26.51	3.21±0.12*	408.14±30.30	408.06±24.72	247.39± 3.58	16.16±1.824	15.39±1.657	511.68±36.426**
	263	5	131.60±12.82	468.00±19.24	4.21±0.55*	556.00±44.50	558.00±51.70	334.00±37.82	21.92±3.031	20.79±2.340	674.00±55.498*
				357.41±23.78	3.19±0.19**	423.25±14.69	424.25± 8.06	261.24± 8.18	16.65±1.440	15.83±1.495	512.96±15.265**

1) Mean ± S. D. * $p < 0.005$ ** $p < 0.001$

2) Body weight

Teble 4. Organ Weight after 7 days Administered with Sodium Phytate in Rats

Sex	Dose mg/kg po	No. of Rat	B. W.	Heart mg mg/100g[2)]	Liver g g/100g	Kidney (R)mg mg/100g	(L)	Spleen mg mg/100g	Testis(Ovary) (L)mg mg/100g	(R)	Adrenal (L)mg mg/100g	(R)	Lung mg mg/100g
Male	0	5	240.0± 7.04[1)]	762.40±33.84	9.78±0.30	800.80±37.41	828.80±38.12	518.80±32.11	1384.40±34.68	1229.00±244.24	17.78±1.84	16.06±2.20	812.60±47.36
				317.62± 8.37	4.08±0.15	333.58± 8.37	354.30±10.58	216.05± 9.02	577.17±20.30	510.93± 95.79	7.40±0.69	6.70±0.94	338.37±10.82
	460	2	208.0±9.90*	646.00±19.80**	9.03±0.58*	749.00±62.23	720.05±85.56*	495.00±43.84	1273.50±3.54**	1217.00± 1.41	20.15±0.78	18.00±1.56	747.50±10.61
				310.70± 5.27	4.34±0.07	359.79±12.79*	345.81±24.68	237.75± 9.76*	612.99±30.87	585.78±28.56	9.69±0.09*	8.65±0.35**	359.66±12.02
	400	1	200	681.00	9.05	723	718	484	1155	1220	21.70	19.30	800
				340.50	4.52	361.50	359.00	242.00	577.50	610.00	10.85	9.65	400.00
	348	5	230.6±13.94	700.00±47.27	9.55±0.69	809.60±43.38	791.40±81.04	531.00±76.79	1368.40±50.29	1328.40±57.60	18.90±0.59	16.80±0.60	819.60±26.60
				303.53± 8.37*	4.14±0.18	351.50±17.25	342.64±17.25	230.89±37.06	594.23±21.45	576.92±26.85	8.21±0.39*	7.30±0.29	356.27±21.07
Female	0	5	151.6±3.85	504.60±13.52	5.47±0.16	549.80±15.40	530.20±11.10	364.40±23.60	24.86±4.01	26.84±2.89	20.98±1.14	18.80±1.35	609.00±18.93
				332.90± 7.10	3.61±0.09	362.82±12.54	349.98±13.67	240.24±11.16	16.41±2.78	17.72±2.03	13.78±0.83	12.40±0.87	401.72± 7.72
	609	1	148.00	527	6.36	560	530	342	22.80	27.20	23.20	21.80	671
				356.08	4.30	378.38	358.11	231.08	15.41	18.38	15.68	14.73	453.38
	529	2	146.5±13.44	510.00±14.14	5.41±0.27	585.50±43.13	571.50±26.16	352.00±55.15	26.15±3.18	26.85±0.21	20.70±2.26	19.55±4.17	646.00±19.80
				349.15±22.37	3.70±0.16	399.99± 7.24**	390.93±17.99*	239.55±15.68	18.03±3.83	18.41±1.83	14.12±0.25	13.27±1.13	442.20±27.07*
	400	4	144.5± 5.20	521.75±10.05	5.62±0.17	594.25±13.23**	579.50± 6.95**	399.00±19.36	26.30±4.10	26.58±2.46	21.88±1.55	20.65±0.31**	619.25±31.87
				349.26±11.94*	3.77±0.22	397.81±14.95**	387.95±13.33**	226.67± 7.43	17.62±2.96	17.82±2.19	14.67±1.48	13.83±0.57	414.47±22.89
	348	1	143	490	5.34	582	602	363	26.9	27.8	23.6	22.4	643
				346.85	3.73	406.99	420.98	253.85	18.81	19.44	16.50	15.66	479.65

1) Mean ± S. D. * $p<0.005$ ** $p<0.001$

2) Body weight

field-Wilcoxon 法では算出できない場合があったが Moving Average 法により算定した．Table 2．に示した如く，Moving Average 法と Lichfield-Wilcoxon 法はほぼ同様な LD_{50} 値が算定できることが明らかになった．

3．剖検所見

フィチン酸，フィチン酸ナトリウムにおいて，剖検所見に大差なく，大体以下の如くであった．

死亡例では，肝臓，脾臓が暗赤色を呈し，胃はパンパンに膨張拡大し，外部から暗赤色の液体が充満しているのがよく観察できた．また，腺胃部よりの出血が認められ，十二指腸，回腸，空腸まで出血ないし血液を含んだ液体で，暗色～黒色をしていた．

生存例の7日後の剖検では，フィチン酸において心臓，脾臓，腎臓の表面が粗面を呈したものが散見され，腺胃部分に出血の跡ならびに潰瘍が散見された．

4．生存例（投与7日後）の臓器重量

生存例について，投与7日後に屠殺，臓器を摘出し，投与前日に除餌しただけのものを対照とし，臓器重量を秤量し比較検討した．各臓器の絶対重量ならびに体重比重量（体重100g当りの重量）は Table 3，4に示した如くである．全体を通じて著しい変化はなかったが，フィチン酸投与の雄の腎臓（左，右）において絶対重量，体重比重量において用量との明らかな関係はないが対照に比し重量増加ないし増加傾向が，フィチン酸ナトリウム投与の雌の心臓において，絶体重量が用量増加により重量減少を生じることが認められた（一部生存例が1例のため統計的に検定できなかったが，値は明らかに減少を示した）．その他の臓器については，一定の変化を示したものはなかった．

考　察

フィチン酸は天然食品添加物（抗酸化剤）の一つとして，今後増々使用量，範囲の増加拡大が予想される．今回，フィチン酸の毒性試験の一環としてラットを用いて経口投与により急性毒性を検討した．また，合せてフィチン酸の塩としてフィチン酸ナトリウンについても行った．

LD_{50} 値については，これまでラット経口におけるデータはほとんどなく，比較検討はできないが，フィチン酸においては雄0.405，0.50g／kg B. W，雌0.480g／kg B. W.，フィチン酸ナトリウムにおいては雄1.03，1.13g／kg，雌1.20，1.672g／kg で，Hodge[4]らのラットにおける経口毒性の程度を LD_{50} 値により分類し，ヒトへの推定致死量の算定によれば，その毒性の程度は大むね小（slightly toxic）であるといえる．今回用量の選択が狭かったために Lichfield-Wilcoxon[3]法で LD_{50} 値が算定できなかったものに対して LD_{50} 値のみ Moving Average[2]法を用いて LD_{50} 値を算定したが，両者の間に著しい差はなかった．最近の動物を使用する実験研究に対する批伴等を考えると，LD_{50} 値の算定に対しては Moving Average[3]法により算定することも一つの方法であると考える．

死亡時間については，死亡開始時刻はフィチン酸，フィチン酸ナトリウムともに早く，peak はフィチン酸は2，3時間目，フィチン酸ナトリウムは5～7時間とフィチン酸ナトリウムの方が多少遅かったが大きな差はないものと思われる．また最終死亡時刻はかなりバラツキが見られたが，ほとんどの動物は24時間以内に死亡しており，偶然生き残ったものが生存したものであり，代謝物，腸肝循環による作用の可能性はほとんどないものと思われる．

フィチン酸，フィチン酸ナトリウム投与ラットの死亡例の剖検より死因を明確に特定することはできないが，症状等より双方共適用場所の消化管への局所作用としては，刺激作用で下痢，胃腸管の出血，充血，粘膜の変性がみられた．著明ではないが投与直後より数時間にわたってみられた鎮静は中枢性のものかあるいは消化管系に対する作用の結果としての脱力によるものかは不明である．

臓器重量については，全体通して一定変化を示したものはみられなかった．

今回比較の意味でフィチン酸とその酸性を中和したフィチン酸ナトリウムを使用し検討を行ったが，症状，剖検所見等において大きな差はみられなかったが，LD_{50} 値について，雄どうし，雌どうし検討したところ，フィチン酸とフィチン酸ナトリウムの間には有意なる差が認められた．すなわちフィチン酸の方がフィチン酸ナトリウムよりも強かった．これはフィチン酸は構造上リン酸基が12ケあり強力な酸性を示すのに対し，フィチン酸ナトリウムは，その酸性が中和されているため毒性が弱くなったものと考えられる．

結　論

フィチン酸ならびにフィチン酸ナトリウムの経口急性毒性をラットを用いて検討し，次の結論を得た．

1．LD_{50} 値は，フィチン酸（雄0.405，0.50g／kg B. W.雌0.480g／kg B. W.），フィチン酸ナトリウム（雄1.03，1.13g／kg B. W.，雌1.20，1,672／kg B. W.）であった．フィチン酸，フィチン酸ナトリウムそれぞれ雌雄の間には間はなかったが，フィチン酸とフィチン酸ナ

トリウムの間には雌雄とも有意なる差が認められた（$p<0.05$）.

2．症状はフィチン酸，フィチン酸ナトリウムともに下痢と鎮静状態がみられた.

3．死亡例の肉眼的変化はフィチン酸，フィチン酸ナトリウムともに胃腸管系に強くみられた（出血，充血）.

4．以上の結果にもとづいて二三の考察を行いHodgeらの分類に従いフィチン酸ならびにフィチン酸ナトリウムの経口急性毒性の程度を小（slightly toxic）と考えた.

文　献

1）Ito, N., Fukushima, S., and Tsuda, H.：CRC Critical Reviews in Toxicology, Vol. 15, Issue 2, 109-150, 1984.

2）Lichfield, J.T.JR. and Wilcoxon. F.：*J. pharmacol. Expl, Therap.*, **96**, 99, 1949.

3）Shayne C. Gad and Carrol S. Weil：Principles and Methods of Toxicology, Ed. Hayes A. Wallace, 273-320, 1982, Raven Press, New York.

4）Hodge, H. and Stener J.H.：Deichmann W.B. and Gerace H.W. Toxicology of Drugs and Chemicals, 1969, Academic Press, New York.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 377-381, 1987

マウスを用いたフィチン酸の催奇形性試験

小縣昭夫*, 安藤　弘*, 久保喜一*, 佐々木美枝子*,
細川奈津子**

Teratological Studies of Phytic Acid in ICR Mice

AKIO OGATA*, HIROSHI ANDO*, YOSHIKAZU KUBO*, MIEKO SASAKI*
and NATSUKO HOSOKAWA**

Phytic acid (PA) used as an antioxidant of food additives was tested for teratogenicity in Jcl: ICR mice. Pregnant Jcl: ICR mice were given orally, 0, 1.6, 3.1 or 6.3% PA aqueous solution 10ml/kg/day on day 7 through day 15 of gestation. All foetuses were removed from the uterus on day 18 of gestation, and were examined for external and skeletal anomalies.

Although no clear teratogenic effect of PA was observed with external and skeletal malformations, the incidence of late resorbed foetuses increased by the repeated treatments with PA during days 7-15 of gestation, and the foetal body weight decreased significantly in a dose-dependent manner. These effects were considered as toxicities of large quantities of PA on dams. In our preliminary result, however, skeletal malformations (fusion of lumber vertebrae) were observed in five foetuses from one dam which had been given a single oral administration of 12.5% PA aqueous solution on day 9 of gestation.

A further experiment would be necessary for the assay of teratogenicity of PA, such as a single administration of large quantities (over 12.5%) of PA during the stage of organogenesis.

Keywords: phytic acid, teratogenicity, ICR mice

はじめに

フィチン酸はミオイノシトールのヘキサリン酸エステルで，広く植物界に存在する有機リン酸化合物である．植物中では，種子・穀類・胚芽・ぬかに多く含まれている．フィチン酸の性状のひとつに金属封鎖作用があり，この作用を利用して食品の変退色防止・酸化防止・ビタミンCの安定化などの目的に用いられている[1)]．

フィチン酸の催奇形性に関する報告はないが，本物質は体内でミオイノシトールとリン酸となることから，いくつかのリン酸化合物については催奇形性試験が行われており何れも陰性の結果を示している[2-4)]．

しかしながら，最近，当部吉田らの行ったフィチン酸を用いた染色体試験では，in vitro, in vivo の何れにおいても陽性の結果が示されている（未発表）．

本試験は，染色体異常誘発物質と催奇形物質とは重なり合う部分が多いことを考慮し，妊娠マウスを用いフィチン酸の催奇形性について検討した．

試験材料ならびに方法

1．実験動物　Jcl：ICRマウス雌雄を日本クレア㈱より4週齢時に購入，8-13週齢（体重28.0-37.0g）に達した発育良好なものを選び試験に供した．

2．飼育条件　温度24-26℃，湿度45-55%，照明午前6時－午後6時，換気毎時10回の飼育室にて日本クレア製固型飼料CE-2および水道水を自由に与え，試験開始（交配）時までアルミケージに10匹，交配後はプラスチックージにて1匹飼いとした．ただし雄マウスは受配前1週間より1匹飼いとした．

3．交配方法　1：1終夜同居により，翌朝膣栓の確

*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
**現同環境保健部水質研究科

認されたものを妊娠動物とみなし，その日を妊娠０日とした．

４．試料　フィチン酸（Phytic Acid（PA)），50％水溶液，Lot No. 840710は三井東圧化学㈱より供与されたものを用い，溶媒には蒸留水を使用した．

５．試料投与量および投与方法　妊娠７日より15日までの９日間毎日１回経口投与を行った．妊娠マウスを４群（１群21-24匹）に無作為に割当，高濃度群はフィチン酸6.3％水溶液10ml／kg 投与，中濃度群3.1％液投与，低濃度群1.6％液投与，対照群は蒸留水10ml／kg 投与とした．

６．観察方法　体重測定および一般状態の観察を毎日行い，妊娠18日にエーテルにより麻酔屠殺し，次の検索を行った．屠殺後直ちに開腹，子宮を開き着床痕，早・後期死亡胎児，生児数を数え，生児は体重測定，性の判別を行い外表の異常を点検，次に母体の卵巣の黄体数を数え，主要器官の重量測定と肉眼的異常の有無を検索した．生児は，95％エチルアルコールで固定後アリザリンレッドＳで骨格染色[5]を行い骨格異常の有無を調べた．

７．結果のまとめ方　西村の報告[6]に準拠して行った．

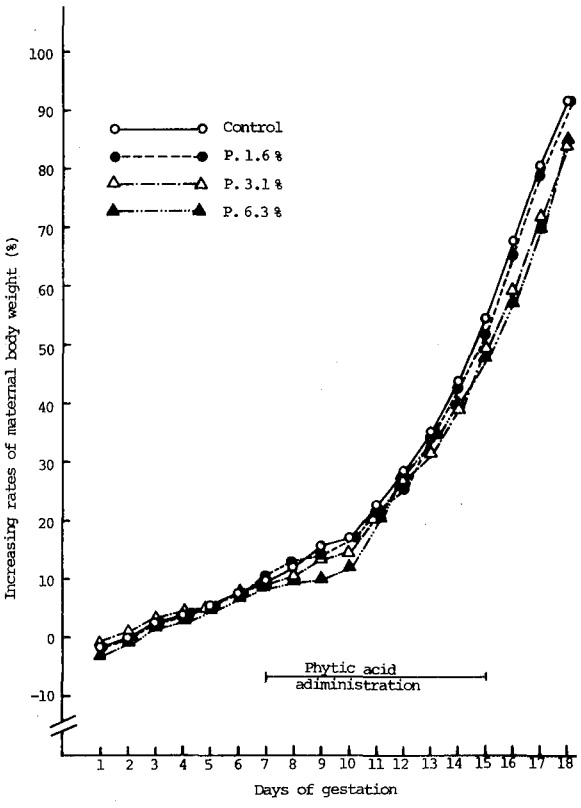


Fig. 1．Increasing Rate of Maternal Body Weight

結果および考察

１．母体の所見

１）体重および一般状態：妊娠０日の体重を100とした体重増加率の推移は図１に示す通りで，フィチン酸投与群と対照（蒸留水のみ投与）群との間に推計学的有差は認められなかった．しかし6.3％投与群では投与初期（妊娠８・９・10日）に体重の増加抑制傾向が認められ，その後回復する様子を呈したが，投与終了後の体重増加の伸びは対照群に較べ鈍かった．その傾向は3.1％投与群にも見受けられた．妊娠18日迄に死亡した母体は6.3％投与群15例，3.1％投与群２例で，6.3％群は妊娠９日１例，10日２例，11日３例，12日４例，13日２例，15日１例，16日２例が死亡，3.1％群は妊娠13日，15日に各々１例が死亡した．生存した母体の一般状態では，6.3％群に投与期間中立毛を呈する動物がみられ，行動にも活発な動きはみられなかった．

２）剖検所見および臓器重量：妊娠18日に屠殺開腹した剖検所見では，いずれの投与群にも特記する変化を認めなかった．主要臓器重量は表１に示す通りで，対照群と較べ6.3％投与群の心臓が絶対重量で軽，副腎（右）が相対重量で重，3.1％群副腎（右）が絶対・相対重量とも重，1.6％群心臓が絶対重量で軽の推計学的に有意な値を示したが，いずれの臓器においても投与との関連を明確に示す変動はみられなかった．

２．胎児に係わる所見

１）妊娠の成立：妊娠（着床）成立を確認した母体は6.3％投与群９／９（100％），3.1％群18／20（90％），1.6％群21／22（95.5％），対照群17／21（81％）で，妊娠成立した母体は6.3％群の１例（全胎児の早期死亡）を除いて総てに生児を認めた（表２）．

２）妊娠黄体数，着床数，生児数，死亡児頻度（早・後期）および性比：各投与群において妊娠黄体数，着床数，生児数および性比に推計学的有意差を示すものはなく，また用量に伴う変動傾向も認められなかった．死亡児頻度では，1.6％投与群の後期死亡児頻度が対照群に較べ推計学的に有意に高かった．また3.1％群，6.3％群でも有意ではないが，当部でのこれまでの自然発生の後期死亡児発生率（２％以下）と較べてやや高い値を示していた．

３）生児体重：フィチン酸投与群の雄生児体重では処置群すべて推計学的に有意なまた用量に関連した体重の低下が認められた．雌では3.1％投与群のみが推計学的に有意な低下であったが，他の投与群も小さい傾向を示した．

Teble 1. Organ weight of mother mice given 1.6-6.3% Phytic acid／kg／day orally on days 7-15 of gestation

Concentration	No. of dam	Liver g g/100g	Heart mg mg/100g	Spleen mg mg/100g	Kidney(L) mg mg/100g	Kidney(R) mg mg/100g
Control	17	2.9±0.3[1)] 8.8±0.8[2)]	144.4±11.9 435.9±30.3	124.3±18.1 376.6±61.2	234.7±25.3 709.0±74.3	246.1±28.4 742.9±79.3
P.A. 1.6 %	21	2.9±0.2 8.9±0.9	136.7±10.8* 417.2±45.2	117.9±24.7 361.1±87.8	227.6±20.0 692.6±61.5	236.8±19.8 720.6±59.0
P.A. 3.1 %	18	2.9±0.4 8.7±1.1	142.8±15.4 432.3±39.7	117.1±32.2 354.8±97.0	231.7±19.9 703.7±73.2	247.9±21.5 751.9±68.7
P.A. 6.3 %	8	2.7±0.4 8.5±0.9	130.6±13.2* 410.1±39.9	121.4±48.9 372.1±123.4	229.1±28.9 719.8±90.7	236.6±20.6 743.2±63.9

Concentration	No. of dam	Lung mg mg/100g	Adrenal(L) mg mg/100g	Adrenal(R) mg mg/100g	Ovary(L) mg mg/100g	Ovary(R) mg mg/100g
Control	17	187.9±16.6 567.0±37.6	3.9±0.7 11.8±2.0	3.4±0.6 10.1±1.5	11.1±1.8 33.7±5.5	12.3±2.7 37.1±7.6
P.A. 1.6 %	21	189.9±18.4 577.7±54.5	3.9±0.5 12.0±1.8	3.7±0.6 11.1±2.0	11.1±2.1 34.1±8.0	13.3±5.2 41.3±19.2
P.A. 3.1 %	18	190.2±15.0 576.0±30.3	3.9±0.6 11.9±1.7	3.9±0.7* 11.9±2.1**	11.0±2.4 33.3±7.4	11.8±1.6 35.9±4.8
P.A. 6.3 %	8	186.3±19.4 586.3±69.9	3.7±0.7 11.7±2.9	3.8±0.7 12.1±2.2*	11.3±1.7 35.3±5.5	11.1±2.4 34.8±7.0

1) Mean(absolute)±SD
2) Mean(relative)±SD
*P < 0.05 **P < 0.01

Teble 2. Effect of 1.6-6.3% Phytic acid (P. A.)／kg／day given orally to pregmant ICR mice on days 7-15 of gestation

Reproductive parameter	P.A. concentration(%)	Number, percentage or weight observed 0	1.6	3.1	6.3
Females mated‖		21	22	22	24
Females died†		0	0	2	15
Females gestated§		17	21	18	9
Females with>1 live foetus		17	21	18	8
Corpora lutea/litter#		16.7±2.1	16.9±2.6	16.2±1.9	16.0±1.1
Implantations/Litter#		15.5±2.6	15.3±2.5	15.3±2.2	15.6±1.3
Resorption of foetuses (%)#¶					
Early		6.0±7.1	2.4±4.2	3.7±5.9	4.9±4.5
Late		0.8±2.3	3.8±4.2*	4.2±7.5	3.5±6.7
Live foetuses/litter#		14.5±3.1	14.3±2.5	14.2±2.4	14.4±1.8
Body wt of live foetuses (g)#					
Male		14.4±0.08	1.37±0.07**	1.32±0.14**	1.27±0.22**
Female		1.37±0.11	1.33±0.07	1.27±0.13*	1.24±0.23

‖ No. with vaginal plug.
† No. that died before scheduled kill on day 18.
§ No. with implantation sites.
# Values given as mean ± 1 SD for litter 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 obtained 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) as determined by the following statistical tests: chi-square test (females mated, died, gestated or having > 1 live foetus);t test (corporalutea, implantations, live foetuses and foetal body weight); rank sum test (resorption).

Teble 3. Incidence of extemal malformation or anomaly in foetuses of ICR mice given 1.6-6.3% Phytic acid (P. A)/kg body weight/day orally on days 7-15 of gestation

Observation	P.A. concentration(%)	Incidence of malformation or anomaly			
		0	1.6	3.1	6.3
		External malformations			
No. litters with malformed foetuses/no.examined -(%)		2/17 (11.8)	2/21 (9.5)	1/18 (5.6)	2/8 (25.0)
Malformations (%) †		1.0±2.8	0.6±2.0	0.3±1.3	4.6±9.2
No. malformed foetuses/no.examined		3/247	2/301	1/255	6/115
No. of foetuses with:					
Cleft palate		0	1	0	5
Exencephalia		0	0	1	1
Open eyelids		3	1	0	0
		External anomalies			
No. litters with anomalous foetuses/no.examined -(%)		1/17 (5.9)	0/21 (0)	0/18 (0)	1/8 (12.5)
Anomalies (%)†		0.4±1.4	0	0	0.9±2.5
No. anomalous foetuses/no.examined		1/247	0/301	0/255	1/115
No. of foetuses with:					
Crab foot		1	0	0	1

† Calculated by averaging the percentage in each litter (i.e. no. of malformation/no. of foetuses),and shown as mean ± 1 SD.

Teble 4. Incidence of skeletal malformation, variation or ossificction in foetuses of ICR mice given'1.6-6.3% Phytic acid (P. A.)/kg body weight/day orally on days 7-15 of gestation

Observation	P.A. concentration(%)	Incidence of malformation,variation or ossification			
		0	1.6	3.1	6.3
No. litters with malformed foetuses/no.examined -(%)		0/17 (0)	1/21 (4.8)	1/18 (5.6)	0/8 (0)
Malformations (%)		0	0.3±1.4	0.4±1.5	0
No. malformed foetuses/no.examined		0/247	1/300	1/255	0/115
No. of foetuses with:					
Fusion of vertebral arches		0	1	1	0
Variation					
Type & percent variation ± SD					
Asymmetry of sternebrae		7.7±7.6	10.4±9.2	8.4±7.7	13.8±11.6
Accessory of sternebrae		15.0±26.6	11.6±13.1	3.0±5.5	5.9±7.7
Cervical rib		22.0±24.3	18.1±22.o	25.0±22.8	19.2±28.5
14th rib		36.3±32.9	37.3±27.8	19.7±24.1	24.9±23.9
Splitting & branching of atlas & axis		30.4±23.4	19.8±14.9	28.6±28.3	25.3±16.2
Abnomalities in number of pre-sacral vertebrae		0.4±1.5	0	1.2±2.9	6.0±11.6
Separation or defective development of sternebrae		7.7±17.5	1.1±3.5	3.1±3.6	19.2±33.7
Ossification					
Mean number of ossified fore limb phalanx ± SD [(Pro. Mid.)/2]					
L		3.0±0.7	2.9±0.7	2.8±0.6	2.4±1.1
R		3.1±0.7	3.0±0.6	2.8±0.6	2.4±1.2
Mean number of ossified hind limb phalanx ± SD [(Pro. Mid.)/2]					
L		2.8±0.8	2.7±0.5	2.4±0.6	2.1±1.2
R		2.9±0.7	2.7±0.5	2.5±0.6	2.1±1.3
Mean number of ossified post lumbar bertebrae ± SD		12.9±1.4	12.8±1.5	12.1±1.8	11.2±2.4

4）生児外表奇形・異常：結果は表3に示した．発現した奇形・異常の型はどれも自然発生奇形・異常としてよくみられるものであった．6.3%投与群でみられた口蓋裂奇形児5例は4例までが1匹の母体で発現していた．

5）骨格奇形・変異・化骨進行度：奇形の発現は，1.6%群，3.1%群に腰椎弓の癒合が各々1例であった．変異を有するものの発現頻度では，各投与群において対照群と較べ推計学的有意差を示すものなく，用量に関連した変動もみられなかった．化骨進行度では有意差は認められなかったが，何れの指標においても用量に依存した化骨遅延の傾向がみられた（表4）．

妊娠マウスのフィチン酸6.3%水溶液経口投与（10ml／kg）の致死毒性については，予備試験での1回投与では母体を死に至らしめる毒性効果はみられなかったが，本試験の9回連続投与では投与3回目から死亡がみられるようになり，結果として24例中15例（62.5%）が死亡した．Probit法により求めた本試験（9回投与）でのフィチン酸のLD50は，5.5%，LD1は2.1%水溶液10ml／kgであり，その回帰式はY（Probit）＝5.5X（Log dose）＋0.9となった．この式からもわかるように勾配が大きく，フィチン酸は量ー作用関係の幅が非常に狭いといえる．

本実験では，フィチン酸6.3%（LD50値以上の量）を与えた群を設けまだ報告のないフィチン酸の催奇形性について，妊娠マウスを用い臨界期連続経口投与により胎児に対する影響を調べたが，外表・骨格奇形共にフィチン酸投与によると思われる明確な結果は得られなかった．今回みられた後期死亡児の処置群における増加傾向および胎児体重の低下はおそらくフィチン酸大量連続投与による母体への毒性効果の結果と考えられる．

通常考えられている催奇形性試験では，本試験のごとく妊娠動物の器官形成期を十分に包含する期間を設けて化学物質を連続的に投与するが，一般的には，発生中の胎芽にとって慢性投与よりも急性投与計画のほうが強い催奇形的浸襲であると言われており，また連続では投与できない大量を投与できる．そこで単一投与の予備試験としてフィチン酸12.5%，および6.3%水溶液10ml／kgを各群5匹の妊娠マウスに，妊娠9日1回経口投与を行い外表および骨格奇形の発現の有無を調べた．各投与群共この投与時期に依存した外表奇形はみられなかったが，骨格奇形では12.5%投与群に5例中1例の母体で腰椎弓の癒合を持った5匹の胎児が発現した．この腰椎部の骨癒合は投与時期と相関があることまた，骨格癒合奇形の発現は外表奇形よりも薬物に対する感受性が高いとされている．吉田らの実験によれば，フィチン酸はin vivoでの投与でチャイニーズ・ハムスター骨髄細胞に染色体異常を誘発するが（私信），この投与量は，上記1回投与予備試験で用いた量よりも大量であることを考慮すると，動物種差の問題はあるとしてもフィチン酸の妊娠マウスの催奇形性の可能性については今回の連続投与試験の結果からだけでは否定出来ない．

フィチン酸の催奇形性の有無については，1回大量投与法による催奇形性試験での確認が必要と考えられる．

文　献

1）東京都生活文化局：食品添加物の安全性に関する文献調査（その7），118-120，1985
2）FDA：Teratologic Evaluation of FDA 71-46 (Sodium Tripolyphosphate, Anhydrous), NTIS, PB-221, 808, 1973
3）FDA：Teratologic Evaluation of FDA 71-61 (Sodium Acid Pyrophosphate), NTIS, PB-223, 831, 1973.
4）FDA：Teratologic Evaluation of FDA 73-3, Sodium Hexametaphosphate in Mice and Rats, NTIS, PB-245, 535, 1974
5）Dawson, A.B.: Stain Tech., 1, 123-124, 1927
6）西村秀雄：先天異常，16，175-185，1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 382-387, 1987

The Effect of Paracetamol on Blood Coagulation in Rats and Mice

OSAMU TAKAHASHI* and HISATSUGU ICHIKAWA*

Male rats and mice were administered paracetamol (*p*-acetylaminophenol) at levels of 0, 0.3, 0.6 and 1.2% in a purified diet for 7 days. The hemorrhages usually related to paracetamol administration were not observed. At day 7, plasma prothrombin index and kaolin-activated partial thromboplastin time index were elevated dose-dependently in rats, while no indices changed in mice. Platelet particle concentrations did not significantly change in rats and mice. Paracetamol slightly increased plasma glutamic-oxaloacetic or glutamic-pyruvic transaminase in rats and mice. In order to compare the hemorrhagic effect of paracetamol and butylated hydroxytoluene (BHT), rats were administered paracetamol or BHT at levels of 0, 0.6 and 1.2% in the standard diet for 7 days. Hemorrhages were observed only in rats fed 1.2% BHT. Prothrombin and kaolin-activated partial thromboplastin time indices also decreased only in 1.2% BHT group. Glutathione concentrations decreased in both rats given paracetamol and BHT. Twenty-four hours after a single administration of paracetamol, plasma glutamic-oxaloacetic transaminase levels increased and prothrombin and kaolin-activated partial thromboplastin time indices decreased. These results suggest that paracetamol does not produce the hemorrhagic effect at least up the level of 1.2% in the diet of rats and mice. If necrotic changes occur in the liver after the administration of paracetamol, these injuries may bring about the decrease in blood coagulation activities. The effects differ greatly from those induced by BHT. It is known that the active metabolite of paracetamol as well as a metabolite of BHT binds to liver protein thiols. Therefore, the non-specific random covalent binding of a hemorrhagic phenol, BHT, may not play the central role in the induction of hemorrhage.

Keywords : paracetamol, blood coagulation, rats, mice

Introduction

Paracetamol (acetaminophen, *p*-acetylaminophenol) is a widely used nonnarcotic analgesic drug. However, when administered in large doses paracetamol causes massive hepatic necrosis in man[1] and in experimental animals.[2] The hepatotoxicity is dependent upon a microsomal cytochrome *P*-450 mixed-function oxidase, which converts paracetamol to a toxic metabolite,[3] presumably *N*-acetyl-*p*-benzoquinoneimine.[4] The reactive intermediate has been clarified to react with cellular protein thiols leading to hepatic necrosis and death.[5,6] Butylated hydroxytoluene (BHT), a phenolic antioxidant, also causes hepatic necrosis in rats when administered in large doses.[7] The hepatotoxicity is thought to follow the covalent binding of reactive metabolite(s), BHT quinone methide (2,6-di-*tert*-butyl-4-methylene-2,5-cyclohexadienone) and/or BHT radical, to cellular protein thiols.[7,8]

BHT can also cause hemorrhagic death and a decrease in the prothrombin index in rats.[9] BHT quinone methide found in rat liver as a major unconjugated metabolite of BHT[10] inhibits the phylloquinone-epoxide dependent protein carboxylation[11] suggesting the inhibition of the phylloquinone-epoxide reductase. This reductase is believed to be a SH-enzyme. If the covalent binding to proteins plays a primary role in the bleeding by BHT, paracetmol must also cause hypoprothrombinemia in rats. We have attempted to examine whether or not paracetamol can cause bleeding in order to determine the role of covalent binding in the hemorrhagic

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

effects of phenolic compounds.

Materials and Methods

Animals, diets and treatments.

Four week old male Sprague-Dawley rats, and male ICR mice, obtained from CLEA Japan Inc. (Tokyo), were maintained on a standard laboratory ration (CLEA CE-2). After 1 week, groups comprising usually 5 animals of each species were placed, for 7 days, on a purified diet containing 24% casein described previously[9], spiked with 0, 0.3, 0.6 or 1.2% paracetamol (*p*-acetylaminophenol; Tokyo Kasei Kogyo Co., Tokyo). Similar groups of male rats, maintained on the standard diet, were fed diets containing either 0, 0.6 or 1.2% paracetamol or BHT (Tokyo Kasei Kogyo Co.), for 7 days. A final group of male rats were starved for 24 hours, and then administered 1200mg／kg paracetamol, or BHT, by stomach tubes. Control rats were given soy bean oil, the same solvent being used for BHT administration. Paracetamol was solubilized with NaOH(final pH ca 12).

Measurement of blood coagulation activities and platelet counting.

Body weights, food intakes and signs of intoxication were recorded daily. At sacrifice by ether anesthesia, citrated blood and livers were collected from both species. Prothrombin time and kaolin-activated partial thromboplastin time were measured according to the methods described by Quick *et al.*[12] and Proctor and Rapaport.[13] The prothrombin and kaolin-activated partial thromboplastin time indices were calculated from those coagulation times.[14] Fifty percent of kaolin-activated partial thromboplastin and prothrombin time indices are nearly comparable to 20% and 8% normal concentration of blood coagulation factors respectively. Platelet particle concentrations of platelet-rich plasma were determined microscopically according the previous method.[15]

Analytical procedures.

Glutamic-oxaloacetic and glutamic-pyruvic transaminases (GOT and GPT) activities were determined by the method of Reitman and Frankel[16]. Glutathione was determined by the Ellman's method[17] described by Aykac *et al*[18]. Lipid peroxide level was determined according the method described by Uchiyama and Mihara[19].

Statistics.

Variations in results are routinely expressed as the standard error of the mean. Significance of differences were tested by an analysis of variance by Scheffé's method or Student's *t*-test taking $P < 0.05$ as a limit of significance[20].

Results

Effects of paracetamol in the purified diet on rats and mice

Mean daily intakes of paracetamol calculated from food intakes and mean body weight gains of rats and mice given paracetamol in the purified diet are shown in Table 1. Body weight gains were depressed in both rats and mice given paracetamol at a level of 1.2%. Food intakes were also lowered in rats given 1.2% paracetamol. In rats given 1.2% paracetamol, alopecia, shortening and "red material staining" of whiskers were observed. Diarrhea, browning of hair, alopecia and blood spotting on the feeder box were noted in rats 0.6% paracetamol. Spotting of drops of blood on a feeder box and a cage was also detected in the 0.3% group. No conspicuous signs of intoxication were observed in mice.

Prothrombin index, kaolin-activated partial thromboplastin time index, platelet particle concentrations and liver weights are also shown in Table 1. Prothrombin index was significantly increased in rats given paracetamol at a level of 1.2%. Kaolin-activated partial thromboplastin time indices were significantly increased in rats given paracetamol at levels of 0.6 and 1.2%. The increases in these indices were related to the dosage of paracetamol. However, these indices were not changed in mice. Platelet particle concentrations and liver weights were unchanged in rats and mice. The higher doses of paracetamol slightly increased the plasma GOT and GPT (Teble 1).

Effects of paracetamol and BHT in the standard diet on rats

Mean daily intakes of chemical were comparable for paracetamol and BHT treated rats (Table 2). Hemorrhages in epididymus and some other organs were observed only in rats given diet containing 1.2% BHT. Prothrombin and kaolin-activated partial thromboplastin time indices significantly decreased in 1.2% BHT group.

Table 1. Effects of paracetamol in the purified diet on some hemostatic or hepatotoxic parameters in rats and mice

Paracetamol (% in the diet)	Mean body weight gain (%)	Mean daily intaka of drug(mg/kg)	Prothrombin Kaolin-PTT index (%)		Platelet particle concentration ($10^{-11}/l$)	Relative liver weight (%)	GOT (U/l)	GPT (U/l)
Rats[b]								
0	35.5	—	100±5[a]	100±6	7.4±0.75	6.27±0.81	28.2±0.1[c]	11.6±0.2
0.3	36.2	314	102±10	117±11	6.95±0.47	6.73±0.16	33.0±0.1	11.6±0.2
0.6	32.2	536	117±20	137±11[d]	12.55±0.74	6.38±0.20	31.3±0.4	15.0±0.1[d]
1.2	7.4	1005	135±7[d]	150±9[d]	6.32±0.98	6.23±0.23	36.6±1.3[d]	16.8±0.2[d]
Mice[b]								
0	14.1	—	100±1	100±11	4.76±0.73	6.19±0.12	22.7±0.3	9.0±0.2
0.3	12.0	587	104±1	85±5	6.44±1.17	6.28±0.16	24.2±0.5	9.5±0.1
0.6	12.8	1201	101±1	100±10	6.73±1.16	5.73±0.21	21.4±0.2	8.4±0.2[c]
1.2	-4.6	2470	104±3	88±9	4.70±0.68	6.03±0.21	26.7±0.9	16.5±1.0[c,d]

Abbreviations: Kaolin-PTT = kaolin-activated partial thromboplastin time; GOT = glutamic-oxaloacetic transaminase; GPT = glutamic-pyruvic transaminase.

[a] Values are mean ± S.E.

[b] N =5 except ones marked c, which are N =4.

[d] $p<0.05$ for difference versus control by the analysis of variance and Scheffé's multiple comparison test.

Table 2. Effects of paracetamol and butylated hydroxytoluene (BHT) in the standard diet on blood coagulation index and hepatotoxic parameters in rats

Chemicals (% in the diet)	Mean body weight gain (%)	Mean daily intake of drug(mg/kg)	Prothrombin Kaolin-PTT index (%)		Relative liver weight (%)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	GSH (μmol/g liver)	Lipid peroxide (nmol MDA/g liver)
0	49.8	—	100±6[a,b]	100±5	5.90±0.12	32.4±0.5	13.1±0.2	6.89±0.10	111±43[c]
Paracetamol									
0.6	43.3	718	103±5	96±5	6.71±0.19[e]	32.4±0.9	13.1±0.0	5.09±0.39[e]	101±35[c]
1.2	24.2	1214	99±8	99±3	6.14±0.14	34.4±1.0	14.0±0.0	3.85±0.11[f]	122±34
BHT									
0.6	39.8	711	77±8	86±6	7.73±0.31[f]	31.0±0.3	14.0±0.3	3.79±0.18[f]	251±18[d]
1.2	17.9	1218	29±6[f]	34±6[f]	7.85±0.22[f]	31.0±0.1	14.0±0.0	4.19±0.41[f]	107±12

Abbreviations: Kaolin-PTT = Kaolin-activated partial thromboplastin time; GOT = glutamic-oxaloacetic transaminase; GPT = glutamic-pyruvic transaminase; GSH = glutathione; MDA = malonedialdehyde.

[a] Values are mean ± S.E.

[b] N =5 except ones marked c, which are N =4.

[d] $p<0.05$ for difference versus control by the Student's *t*-test.

[e] $p<0.01$.

[f] $p<0.001$.

Relative liver weights increased in 0.6% paracetamol and 0.6% and 1.2% BHT. Liver GSH levels were reduced in all rats given paracetamol and BHT. Lipid peroxide increased in 0.6% BHT.

Effects of a single oral administration of paracetamol or BHT on rats

Prothrombin and kaolin-activated partial thromboplastin time indices decreased abnormally in 4/6 rats 24 hours after the administration of paracetamol but the averages were not significantly different. GOT increased in the same group. Liver GSH increased in rats 24 hours after the administration of paracetamol (Table 3).

Discussion

The measurement of kaolin-activated partial thromboplastin and prothrombim times are useful screeing tests for the detection of defects of intrinsic and extrinsic coagulation activities respectively. Paracetamol increased the coagulation activities in rats but not in mice in a dose-dependent manner when administered in the purified diet. This purified diet resulting in expected changes in meabolism experienced with different diets[21],

Table 3. Effects of a single oral administration of paracetamol or BHT on blood coagulation index and GOT and GPT activities of rats

Chemicals (mg/kg)	Number of rats	Mean body weight gain (%)	Prothrombin index (%)	Kaolin-PTT (%)	Relative liver weight(%)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	GSH (μmol/g liver)	Lipid peroxide (nmol MDA/g liver)
24 hrs after administration									
0	5	18	100±2[a]	100±15	6.61±0.12	43.5±0.4	14.5±0.4	6.82±0.16	70.0±16.2
1200 paracetamol	6	-5	65±14	56±14	6.27±0.18	102.6±7.5[c]	37.7±7.1	8.66±0.47[c]	69.4±21.3
1200 BHT	4	18	97±2	81±6	6.54±0.15	38.7±0.4[b]	14.0±0.1	5.91±0.77	62.5±12.5
48 hrs after administration									
0	5	30	100±1	100±5	6.33±0.27	38.7±0.2	15.5±0.4	6.36±0.22	50.0±21.7
1200 paracetamol	5	8	97±2	97±3	6.37±0.21	41.6±1.4	14.5±0.2	8.44±0.43[c]	46.7±12.2
1200 BHT	4	24	103±1	98±4	6.77±0.07	36.8±0.9	14.5±0.2	7.13±0.64	29.2±8.0

Abbreviations: BHT = butylated hydroxytoluene; K-PTT = Kaolin-activated partial thromboplastin time; GOT = glutamic-oxaloacetic transaminase; GPT = glutamic-pyruvic transaminase; GSH = glutathione; MDA = malonedialdehyde.

[a] Values are mean ± S.E.

[b] $p < 0.05$ for difference versus control by the Student's *t*-test.

[c] $p < 0.01$.

resulted in susceptability to the hemorrhagic effects of BHT[9], the hepatic cytochrome *P*-450 level being reduced, compared to rats on normal standard diet (S. Kawano, personal communication). Although hepatic GSH decreased in rats given both paracetamol and BHT in the standard diet, hemorrhages and the decrease in blood coagulation activities occurred only in rats given BHT. The effect of paracetamol, therefore, differs from that of BHT.

It is well known that paracetamol can bind to sulfhydryl groups of proteins of the liver. The putative metabolite is *p*-benzoquinoneimine[3-6]. BHT can also bind sulfhydryl groups of proteins, and the active metabolite being a corresponding quinone methide[7]. BHT and paracetamol appear to be metabolized by cytochrome *P*-450 and/or other drug-oxidation enzymes to quinoid compounds which react with the sulfhydryl group causing hepatic necrosis[7-8]. Considering the time frame for concentrations of GSH-depletion and of covalent bound paracetamol, maximum liver concentration of an active metabolite of paracetamol may be reached 2-4 hours after the administration[5,22]. Necrosis may attain a maximum at 24 hours[3] or earlier in rats if we consider the species differences in susceptibility of mice and rats. From the present results, blood coagulation activities were depressed at 24 hours, at the time when necrosis may reach a plateau. In case of BHT, maximum liver concentation of an active metabolite is estimated based on levels of GSH depletion and covalent bound BHT[7,23], to occurr at about 6 hours after dosing. However, hepatic quinone methide levels reach a maximum at 24 hours and the decrease in blood coagulation factors occurs at 48-60 hours after the administration (Takahashi, unpublished data).

Rats, especially the strain used in the present study, may be partially resistant to paracetamol-induced necrosis[5]. No necrotic effect of BHT was detected in the present experiment, in contrast to Nakagawa *et al.*'s[7] results. This is probably due to strain differences between Wistar and Sprague-Dawley. The necrotic effect of BHT has only been confirmed as a temporal one. There has been no evidence of necrosis in rats ingesting BHT for a few days to several months[24-26]. On the other hand, hemorrhagic toxicity has been observed at 3-20 days, when rats are given BHT in the diet[9].

From these results, it is suggesting that the decrease in blood coagulation activities caused by paracetamol may be the consequence of necrosis since it coincides with necrosis both in time and doses. In contrast, the BHT induced decrease in blood coagulation factors occurs at a different time and at lower doses than does necrosis. Therefore, the paracetamol induced decrease in blood coagulation activity may be a secondary effect resulting from necrosis. The BHT induced reduction of blood coagulation factors and the subsequent hemorrhages may, however, be independent of necrosis. If the

hypothesis that the necrosis caused by paracetamol and BHT is the consequence of binding between active metabolites and cellular macromolecules is accepted, it can be inferred that the covalent binding of BHT and SH-group of hepatic proteins does not play a critical role in causing hemorrhages in rats.

Recently, Mizutani *et al.*[27] reported that BHT and its structurally related compounds caused liver necrosis in GSH-depleted mice. They reported that the BHT-related compounds inducing hepatotoxicity could also cause lung toxicity. 2, 6-Di-tert-butylphenol and 2,4,6-tri-*tert*-butylphenol, which has been reported as the compounds incapable of causing hepatotoxicity, are known to be capable of inducing hemorrhages in rats.[28] Moreover 2,4,6-tri-*tert*-butylphenol, a more potent hemorrhage-inducing phenol, cannot be metabolized to the quinone methide[29] and therefore may not bind covalently to protein thiols. The inference from these results is that a group of compounds exist, capable of causing hepatotoxicity and/or lung toxicity which differ from the group of chemicals inducing hemorrhage. If the former group can cause hepatotoxicity depending on the random covalent binding with protein thiols, a different mechanism must be proposed in order to explain the hemorrhagic activity in the latter group of compounds.

References

1) Prescott, L.F., Wright, W., Roscoe, P. and Brown, S.S. : *Lancet*, 1, 519-522, 1971.
2) Boyd, E.M. and Bereczky, G.M. : *Brit. J. Pharmacol.*, 26, 606-614, 1966.
3) Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Davis, D.C., Gillette, J.R. and Brodie, B.B. : *J. Pharmacol. Exptl Ther.*, 187, 185-194, 1973.
4) Rosen, G.M., Singletary, W.V., Jr., Rauckman, E.J. and Killenberg, P.G. : *Biochem. Pharmacol.*, 32, 2053-2059, 1983.
5) Jollow, D.J., Mitchell, J.R., Potter, W.Z., Davis, D.C., Gillette, J.R. and Brodie, B.B. : *J. Pharmacol. Exptl Ther.*, 187, 195-202, 1973.
6) Streeter, A.J., Dahlin, D.C., Nelson, S.D. and Baillie, T.A. : *Chem.-Biol. Interactions*, 48, 349-366, 1984.
7) Nakagawa, Y., Tayama, K., Nakao, T and Hiraga, K. : *Biohem. Pharmacol.*,33, 2669-2674, 1984.
8) Tajima, K., Yamamoto, K. and Mizutani, T. : *Biochem. Pharmacol.*, 34, 2109-2114, 1685.
9) Takahashi, O. and Hiraga, K. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 43, 399-406, 1978.
10) Takahashi, O. and Hiraga, K. : *Fd Cosmet. Toxicol.*, 17, 451-454, 1979.
11) Takahashi, O. and Hiraga, K. : *Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 701-706, 1981.
12) Quick A.J., Stanley-Brown, M. and Bancroft, F.W. : *Amer. J. Med. Sci.*, 190, 501-511, 1935.
13) Proctor, R.R. and Rapaport, S.I. : *Amer. J. Clin. Pathol.*, 36, 212-219, 1961.
14) Takahashi, O. and Hiraga, K. : *Toxicology Lett.*, 405-408, 1981.
15) Takahashi, O. and Hiraga, K. : *Fd Chem. Toxicol.*, 22, 97-103, 1984.
16) Reitman, S. and Frankel, S. : *Amer. J. Clin. Pathol.*, 28, 56-63, 1957.
17) Ellman, G.L. : *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77, 1959.
18) Aykaç, G., Uysal, M., Yalçin, A.S., Koçak-Toker, N., Sivas, A. and Öz, H. : *Toxicolgy*, 36, 71-76, 1985.
19) Uchiyama, M. and Mihara, M. : *Anal. Biochem.*, 86, 271-278, 1978.
20) Gad, S.C. and Weil, C.S. : Statistics for toxicologists, *In* Hayes, A.W. (ed.) , *Principles and Methods of Toxicology*, 273-320, 1982, Raven Press, New York.
21) Takahashi, O. and Hiraga, K. : *Fd Chem. Toxicol.*, 21, 279-283, 1983.
22) Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Gillette, J.R. and Brodie, B.B. : *J. Pharmacol. Exptl Ther.*, 187, 211-217, 1973.
23) Nakagawa, Y., Hiraga, K. and Suga, T. : *Chem. Pharm. Bull., Tokyo*, 27, 442-446, 1979.
24) Lane, B.P. and Lieber, C.S. : *Lab. Invest.*, 16, 342-348, 1967.
25) Botham, C.M., Conning D.M., Hayes, J., Litchfield, M.H. and McElligot, T.F. : *Fd Cosmet. Toxicol.*, 8, 1-8, 1970.
26) Gilbert, D. and Golberg, L. : *Fd Cosmet. Toxicol.* 3, 417-432, 1965.
27) Mizutani, T., Nomura, H., Nakanishi, K. and Fujita, S. : *Twelfth Symposium on Environmental Pollutants and Toxicology, Abstract.* 24-25, 1985.
28) Takahashi, O. and Hiraga, K. : *Toxicol. Appl. Pharma-*

col., 46, 811-814, 1978.
29) Takahashi, O. and Hiraga, K. : *Xenobiotica*, 13, 319-326, 1983.

ラットおよびマウスの血液凝固に対するパラセタモールの効果

高橋　省*, 市川久次*

酸化防止剤のジブチルヒドロキシトルエン（BHT）を大量にラットに投与すると肝細胞壊死を惹起することが知られており，この作用はパラセタモールの毒性同様，その活性代謝物が細胞内蛋白質のSH基に共有結合することを通して生じると考えられている。一方，BHTにはラットに対して出血致死効果があり，この作用発現にもBHTの活性代謝物が関与する。本報告ではパラセタモールの出血致死効果の有無を検討し，BHTの効果と比較することにより，両者の毒性の差を検討考察した．

動物はラット，マウスを用い，パラセタモール，BHTを経飼料的あるいは胃ゾンデを用い経口投与し，出血傾向のパラメータおよび肝傷害の指標測定を行った．

その結果，パラセタモールにはBHTにみとめられるような出血致死作用はなく，肝傷害に起因する二次的な血液凝固因子の軽度低下がみとめられたにすぎない．従って，これらの物質の活性代謝物の肝臓蛋白との非特異的共有結合が出血毒性の原因となるとは考えられない．

*東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　160　東京都新宿区百人町3－24－1

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 388-391, 1987

Phenylphenolsの培養細胞染色体への作用

田山 寿美子*, 市川 久次*

Effects of Phenylphenols on Chromosomes in CHO-Kl Cells

SUMIKO TAYAMA* and HISATSUGU ICHIKAWA*

Keywords: オルト，メタおよびパラフェニルフェノール *o*-, *m*- and *p*-phenylphenol, CHO-Kl 細胞 CHO-Kl cell line, 姉妹染色分体交換 sister chromatid exchanges, 染色体異常 chromosome aberration

biphenyl の hydroxy 誘導体である phenylphenol には，*o*-, *m*- および *p*- の位置異性体（以下 OPP, MPP および PPP と略す）があり，このうち OPP は biphenyl と同様，柑きつ類の防かび剤として用いられているが，近年ラット膀胱への発癌が報告[1,2]された．また我々の *in vitro* 染色体試験[3]でも，染色体異常および姉妹染色分体交換（SCE_S）誘発作用が認められており，ヒト細胞での突然変異原性陽性の結果[4]も示されている．しかし他の2つの異性体の変異原性に関する報告はまだない．これら3者の異性体は，ラットにおける biphenyl 投与の際，抱合体として尿中より検出される[5]が，その量は3者の中では PPP が最も多く，biphenyl 代謝の main route となっている．biphenyl の毒性を考える時，その代謝産物であるこれら異性体の染色体への作用を把握しておくことは意義あることと思われた．そこで今回我々は，他の2つの異性体，MPP および PPP についても同様に *in vitro* 染色体試験を試み，先に報告した OPP の結果も含めて総括検討したので報告する．

材料および方法

試薬 *m*-phenylphenol（MPP）：関東化学，*p*-phenylphenol（PPP）：和光純薬工業，5-bromo-2′-deoxyuridine（BUdR）：SIGMA，colcemid：GIBCO，dimethylsulfoxide（DMSO）：和光純薬工業

細胞および培養 チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO-K 1 株を，10%仔牛血清添加の Ham の F-12培養液で角型培養ビンを用い37℃にて密栓培養した．

薬物調整および処理 約 5×10^5細胞を処理2日前に播種した．その細胞に培養液 5 m*l* と DMSO に溶解した被検物質溶液50 μl を加え，37℃で3時間処理した．新しい培養液で1回洗った後，培養ビンをアルミフォイルで被い，0.5 μg／m*l* の BUdR の入った培養液10m*l* を加え，27時間密栓培養した．

標本作製および染色 培養終了2時間前に colcemid 0.1 μg／m*l* を加えた．標本作製および染色は，我々が先に行った方法[3]に準じた．

観察および検定 各々の標本について，分染された細胞の割合（D.S.C.），細胞当りの SCE_S の数，染色体異常の種類と数および核内培加染色体（ERD_S）を各々250，25，100および250の細胞について観察記録し，SCE_S については Kruskal-Wallis test および Distribution free multiple comparison test，染色体異常については χ^2 test により有意差検定を行った．なお先に報告した OPP の結果についても上述の検定にて再度検討した．

結果および考察

今回得られた MPP および PPP の結果に，先に行った OPP の結果を合わせて Table 1 および Fig. 1 に示した．OPP，MPP，PPP 3者とも150 μg／m*l* まで SCE_S および染色体異常の観察が可能であった．しかしD.S.C.の割合を見ると，対照群がほぼ100%で，ほとんどすべての分裂中期細胞が2回の DNA 合成を経ていることを示したが，薬物投与群では用量依存性にD.S.C.の減少傾向が示され，最高用量150 μg／m*l* では，MPP 87%，PPP 37%，OPP 57%と PPP > OPP > MPP の強さの順で細胞分裂遅延への作用が認められた．

SCE_S 頻度は最高用量150 μg／m*l* で MPP および PPP が溶媒対照5.24／cell に対し，前者が7.88と有意ではあるが比較的低い誘発であるのに対し，後者は100，125，150 μg／m*l* で各々11.40，15.80，15.40と3用量とも前

*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

Table 1. Frequencies of Sister-Chromatid Exchanjes (SCE_S) and Chromosome Aberrations in CHO-K 1 Cells after an Expression Time of 27 h Following 3 -h Treatment with *o*- (OPP), *m*- (MPP), or *p*- (PPP) Phenylphenol

Chemicals	Dose[1] (μg/ml)	Cells with chromosome aberrations[2] (%)	Various types of chromosome aberrations (%)						ERD_S[3] (%)	SCE_S/ cell[4] (Mean ± S. E.)	D. S. C.[5] (%)
			Gaps		Breaks and fragments		Ex.	Ot.			
			C 1	C 2	C 1	C 2					
	0	5	1	0	2	0	0	2	0.4	4.48±0.45	99
	0[6]	5	3	0	1	0	1	0	0	5.24±0.44	98
MPP	50	4	1	0	0	2	0	1	0	5.40±0.45	97
	100	6	3	0	1	0	0	3	0.4	6.96±0.46	92
	125	7	2	0	3	2	0	1	1.6	7.44±0.54	87
	150	11	3	0	2	0	1	6	2.0	7.88±0.49*	87
	175	N. M.	—	—	—	—	—	—	—	—	
PPP	50	5	1	0	0	0	0	4	0.4	5.20±0.38	96
	100	5	0	0	0	2	0	3	0.4	11.40±2.00*	90
	125	18**	3	0	0	3	7	8	2.8	15.80±1.85**	74
	150	21**	7	0	8	5	8	5	8.8	15.40±1.64**	37
	175	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	0	2.5	8.5	0	0.5	0	0	1.5	0	5.52±0.52	99
	0[6]	2.0	0.5	0	0	0	0	1.5	0	5.27±0.30	100
OPP	50	3.5	1.0	0	0	1.0	0.5	1.0	0	5.47±0.42	99
	75	5.0	1.5	0	1.0	2.0	0	1.5	0.3	6.77±0.75	99
	100	6.0*	2.5	0	1.5	2.0	0.5	2.5	0.5	8.00±0.51**	98
	125	10.5**	1.5	0	2.5	0.5	4.0	4.5	2.3	9.40±0.88**	87
	150	17.5***	1.0	0	5.0	0.5	8.5	1.5	7.0	7.30±0.48	57
	175	N. M.	—	—	—	—	—	—	—	—	—

*P> 0.05, **P> 0.01, ***P> 0.001

C 1,chromatid type; C 2, chromosome type; Ex., exchanges; Ot., other aberrations (ring,dicentric) ; ERDs, endorduplications, D.S.C., differential staining sister chromatids; N.M., no metaphases

1. For each dose of MPP or PPP, 100 metaphases, and of OPP, 200 metaphases were scored.
2. Percentage of metaphases with one or more aberrations.
3, 4, 5. For each dose of MPP or PPP, 250 (3, 5) and 25 (4) metaphases were scored, respectively, and for OPP, 400 (3), 30 (4) and 120 (5) metaphases were scored, respectivery.
6. Vechicle control. Dimethylsulfoxide (DMSO) was added at final volum of 1% in medium.

者を上回る高い値となった. OPP はこの中間であり, SCE_S 誘発性に関してもその強さで PPP > OPP > MPP の傾向が見られた. なお150 μg/ml で OPP および PPP の SCE_S 頻度に低下が見られるのは, 薬物の毒性による D.S.C.割合の低下に起因するものと考えられた.

染色体異常保有細胞の出現は, PPP において125, 150 μg/ml で対照の 5 %に対し, 各々18および21%と急激な上昇を示し, Exchange, Dicentric および Ring

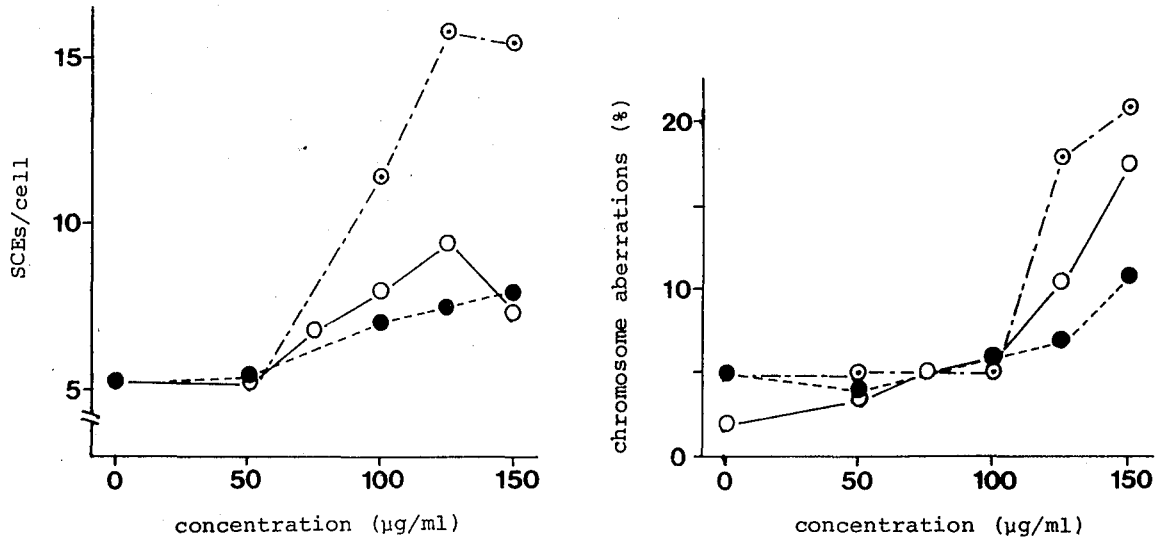


Fig. 1. Effect of *o*− (○——), *m*− (●——), *p*− (⊙——), Phenylphenol on Induction of SCE_S or Chromosome Aberrations in CHO−K 1 Cells

（後2者は，Table 1 で Ot. で示した）の交換型の異常の頻度も，合わせると両用量で各々15.30％と対照の1％に比べ顕著な増加が見られた．この交換型の異常の増加は OPP のそれ，すなわち125，150 μg／ml で各々8.5，10％とよく似ていた．MPP は最高用量150 μg／ml で染色体異常保有細胞11％であり，交換型の異常も7％とやや高かったが，対照群に比べ有意ではなかった．3者における染色体異常誘発性の強さの比較では，今回の対照群値が5％とやや高く，また異常の種類，程度など他の要因も含まれることから困難ではあるが，PPP ＞ OPP ＞ MPP の傾向は認められると思われる．

ある種の染色体障害および cell cycle の阻止に起因しておこると言われている[6] ERD_S も OPP で用量依存性に見られたが，PPP でも同様に認められた．150 μg／ml で3者を比べると，OPP, MPP, PPP 各々7，2，8.8％で，PPP が OPP に比べやや高い誘発作用を示したが，MPP ではそれらに比べ非常に低かった．このことは関連する D．S．C．および染色体異常の成績ともよく一致した．

今回 MPP および PPP には SCE_S 誘発性が認められ，特に PPP にはラット膀胱発癌の報告されている OPP と同様，明確な染色体障害作用が認められた．これら phenylphenols の細胞および染色体への作用の強さは，検索したいくつかの end point すべてにおいて PPP ＞ OPP ＞ MPP の傾向が見られたが，これら3つの異性体の化学構造と in vitro 細胞レベルにおける作用発現との関連は明らかではない．3者の中でその染色体への作用の最も強かった PPP は，ラットにおける biphenyl 代謝[5]で尿中より検出される抱合体のうち，その更に水酸化のすすんだ4，4′-dihydroxybiphenyl に次いで多く見い出されるものである．しかし biphenyl にはゲッ歯類での毒性試験で発癌および *in vivo* 染色体障害作用は認められていない．ラット膀胱発癌の認められた OPP に関しても，生体高分子との結合の際にはキノン体の形をとることが示唆[7]されており，phenylphenol 類の *in vitro* 染色体作用と発癌との関連については，それらに加えて生体内での代謝に関する要因も大きいものと思われる．biphenyl はそれ自身には染色体障害作用はない[8]が，今回の結果から *in vitro* での代謝を考慮した試験についても検討する必要があるものと考えられた．

要　旨

CHO-K 1 細胞に染色体異常および SCE_S 誘発作用を認めた食品添加物（防かび剤）*o*-phenylphenol に加えて，今回他の2つの異性体 *m*- および *p*-phenylphenol についてもそれらの試験を行った結果，後者に明確な染色体異常および SCE_S 誘発作用を認めたが，前者ではそれらの作用は弱かった．総括すると，phenylphenols の細胞および染色体への作用の強さは *p*- ＞ *o*- ＞ *m*-phenylphenol であるように思われた．

文　献

1）Hiraga, K. and Fujii, T.：*Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 303-310, 1981

2) Hiraga, K. and Fujii, T. : *Fd Chem. Toxic.*, 22, 865-870, 1984
3) Tayama, S. Yoshida, S., Nakao, T. and Hiraga, K. : *Mutation Res.*, 141, 95-99, 1984
4) Suzuki, H., Suzuki, N., Sasaki, M. and Hiraga, K. : *Mutation Res.*, 156, 123-127, 1985
5) Meyer, T. and Scheline, R. R. : *Acta pharmacol. et toxicol.*, 39, 419-432, 1976
6) Liicke-Huhle, C., : *Mutation Res.*, 119, 407-413, 1983
7) Reitz, R. H., Fox, T. R., Quest, J. F., Hermann, E. A. and Watanabe, D, G. : *Chem. Biol. Interact.*, 43, 99-119, 1983
8) 吉田誠二, 益淵正典, 平賀興吾：東京衛研年報, 29-2, 86-88, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **38**, 392-393, 1987

サッカリンナトリウムのヒト由来株化細胞における突然変異原性について

鈴 木 英 子*

Mutagenicity of Sodium Saccharin in a Human Clonal Cell Line

HIDEKO SUZUKI*

Keywords：サッカリンナトリウム Saccharin Sodium, ウアバイン Ouabain, 突然変異原性 mutagenicity

緒　　言

人工甘味料サッカリンの突然変異性に関しては，バクテリア，酵母，キイロショウジョウバエ，植物細胞，哺乳動物の培養細胞や，ゲッ歯類の生体細胞等において，試験が行われ，数多くの報告があるが，結果はまちまちで統一的見解を得るまでには至っていない[1,2]．

一方，サッカリンのラットを用いた発癌性試験において，サッカリン５％含有した飼料を与えた群に膀胱腫瘍が発生することが報告されている[3]．当毒性部での発癌性試験においても，サッカリンナトリウムを処理した雄ラットに膀胱腫瘍が認められた[4]．

今回，我々は，ヒト胎児由来株化細胞，RSa[5]，を用いて，サッカリンナトリウムの突然変異原性試験を行った結果，RSa 細胞に高率に突然変異が生じることを明らかにしたので報告する．

実験材料および方法

細胞および培養　ヒト胎児由来株化細胞，RSa[5]，を用いた．細胞は，牛胎児血清（GIBCO）10％および抗性物質としてペニシリン（100 u／ml）とストレプトマイシン（100 μg／ml）を含む，Eagles' minimum essential medium（MEM と略，GIBCO）を用い，37℃，５％ CO_2 条件下で培養した．突然変異原性の測定の場合は，培養液中の血清濃度を15％にした．

試料　サッカリンナトリウム（大東化学工業株式会社），ouabain（Sigma）を用いた．サッカリンナトリウムは，使用直前に MEM で調製した．ウアバインは，PBS に溶解した後，血清の入った培養液にて調製した．紫外線（UV）照射を陽性対照とした．

突然変異原性試験　6×10^5個の RSa 細胞を10ml の正常培地の入って培養瓶（45cm²）に播種した．24時間培養後，培地を除いて，サッカリンナトリウムを所定の濃度に添加し，37℃炭酸ガス培養器中で22時間処理した．UV 照射は，通常の殺菌灯（15W）をセットした暗箱を用いて行った．変異原処理後，正常培養液中で48時間培養した後，0.25％トリプシンを用いて細胞を培養面より剝離して，生存率と突然変異原性の測定のため，再播種した．生存率の検出のためには，1×10^3個の細胞を10ml の正常培地の入った10cm径シャーレに播種した．14日間培養した後，0.2％（W／V）メチレンブルーを含んだ30％メタノール溶液で固定，染色し，コロニーを数えた．この場合，１群３枚のシャーレを用いた．突然変異細胞検出のためには，5×10^4個の細胞を10ml の 10^{-7}M ウアバイン含有培地の入った10cm径シャーレに再播種し，選択培養を行った．７日後に培養液を交換し，14日後にコロニーを固定，染色し，ウアバイン耐性細胞のコロニー数を数えた．この場合，１群６枚のシャーレを用いた．生存率および突然変異率は次式により求めた．

$$\text{生存率}=\frac{\text{正常培養液でのコロニー数}}{\text{播種した細胞数}}$$

$$\text{突然変異率}=\frac{\text{選択培養液でのコロニー数}}{\text{播種した細胞数}}\div\text{生存率}$$

結果および考察

Table 1 に示すようにサッカリンナトリウムを処理した RSa 細胞の生存率は，サッカリンナトリウムの量の増加にともなって低下したが，突然変異率は，無処理群に比べ有意に増加し，サッカリンナトリウムの量の増加

*東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　160　東京都新宿区百人町３－24－１
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－１, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Mntagenicity of Sodinm Saccharin in RSa cells

Treatment		Survivors[a]	Resistants[b]	Mutation freq.[c]
Sodium Saccharin (mg/ml)	0	145± 7	2.7±0.3	3.7
	15.0	134± 4	6.0±1.7	9.0
	17.5	115±11	8.7±0.3	15.1
	20.0	108± 1	11.0±2.9	20.4
UV (J/m²)	5	100± 8	5.3±0.3	10.6

[a]Number of surviving colonies per dish (2×10^3 cells), mean ± S.E.

[b]Number of ouabain resistant colonies per dish (5×10^4 cells), mean ± S.E.

[c]Mutation frequencies per 10^4 surviving cells.

にともなって増加した．サッカリンナトリウム20mg／mlの処理では，突然変異頻度は，無処理群の約6倍に増加した．

陽性対照として用いたUV（5 J／m²）を照射したRSa細胞での突然変異率は，10.6であった．この場合の生存率とほとんど同じ生存率を示すサッカリンナトリウムの量（20mg／ml）を処理した場合の突然変異率と比較すると，サッカリンナトリウム処理群は，20.4で，UV処理群の約2倍の突然変異を誘発した．以上の結果は，サッカリンナトリウムはUVより強い突然変異原物質であることを示唆する．

これまで，サッカリンの *in vitro* での変異原性試験に関する報告は，数多くあるが，その多くは陰性の結果である[2,6]．一方，Batzingerらは，サッカリンを経口投与したマウスから尿をとり，サルモネラテストを行った結果，変異原性が認められたことを報告した[7]．

又，越智と外村[8]により，ヒトリンパ球培養細胞のサッカリンナトリウム低濃動処理で不定期DNA合成が観察されている．これはDNA障害を受けたことを示すものである．

今回，ヒト胎児由来化細胞，RSa，を用いサッカリンナトリウムの変異原性試験を行った結果，陽性の結果を得たことは，サッカリンナトリウムがDNAに損傷を与えていることを示唆する．よってさらにサッカリンナトリウムのDNAへの作用を検討する必要があろう．

文　献

1）Kramers, P.G.N.：*Mutation Res.*, 32, 81-92, 1975.

2）Ashby, J.：*Fd Chemical. Toxicol.*, 23(4／5), 507-519, 1985.

3）Bungard, G.：*Dtsch. Apoth.*, 25, 738-753, 1973.

4）藤井　孝，井口重孝，田山邦昭，平賀興吾：第43回日本癌学会総会記事，46，1984.

5）Suzuki, H., Suzuki, N., Sasaki, M. and Hiraga, K.：*Mutation Res.*, 156, 123-127, 1985.

6）Eckhardt, K., King, M, T., Gocke, E. and Wild, D.：*Toxicology Letters.*, 7, 51-60, 1980.

7）Batzinger, R.P., Ou, S.Y.L. and Bueding, E.：*Science.*, 198, 944-946, 1977.

8）越智尚子，外村　晶：日本環境変異原研究会第5回研究発表会要旨集，32，1976.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 394-400, 1987

Light Scattering（光散乱）法による溶血検査（Ⅲ）無機水銀（Hg^{2+}）のヒトならびにウサギの溶血に対する差異

市川久次*, 小林博義*

Hemolysis Test by Light Scattering Method (III) Difference of Hemolysis in Human and Rabbit by Inorganic Mercury(Hg^{2+})

HISATSUGU ICHIKAWA* and HIROYOSHI KOBAYASHI*

Keywords：溶血検査 hemolysis test, 光散乱法 light scattering method, ヒト human, ウサギ rabbit

我々はこれまでヒトならびにウサギの血液を用いて，より簡便で，使用血液が少なく，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）法による溶血試験法についての基礎的検討を行い，十分実用に耐え得るものを確立した[1,2]．この間得られた結果を検討したところ，PBS（リン酸緩衝液加生理食塩液，pH7.4）中における1％ Hct 赤血球液の経時的安定性においてヒトとウサギの間に著しい差があり，また無機水銀（Hg^{2+}）に対する溶血感受性にほぼ10倍の差があった．

そこで今回，ヒトとウサギの新鮮血液より調製した赤血球液について，それらの経時的安定性における差異を明らかにする目的で無機水銀（Hg^{2+}）を添加し，経時的安定性に差が認められた日における溶血の状況を形態学的に検討したところ若干の知見を得たので報告する。

実験材料ならびに方法

1．赤血球の調製法

健康な成人男子およびウサギ（北山ラベス KK 生産の SPF, KBL: JW 系，雄）より得た新鮮な静脈血（ヘパリン加）を冷却下に遠心（2000rpm, 10min）し赤血球を分離する．遠心分離により得た赤血球を2～3倍のヒト，ウサギそれぞれ用の PBS（PBS（ヒト）[1]，PBS-Rbt（ウサギ）[2,3]にて3回洗浄した後，PBS，PBS-Rbt を用いて1％ヘマトクリット（Hct）赤血球液を調製し，4℃で保存し，使用時に PBS，PBS-Rbt で0.03％ Hct に希釈して実験に供した．

2．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]の方法に準じて行った．すなわち，実験方法1で得た1％ Hct 赤血球液90 μl，無機水銀（$HgCl_2$ を PBS，PBS-Rbt に溶解）を最終濃度ヒト0.4ppm，ウサギ0.04ppm をテフロン栓付吸光度測定用キュベットにとり，さらに PBS，PBS-Rbt を加えて全量3.0m*l* とし，37℃で incubate しながら経時的に分光光度計（Cary17）を用いて700nm における吸光度を経時的に測定し，溶血曲線を得る．グラフ上にて吸光度の最高値と最低値より50％溶血値を求め，その点における経過時間を求め50％溶血時間（$t_{1/2}$, min）とする．

3．形態学的検討

実験方法2で示した方法により溶血を検討した被検赤血球液について，ヒトにおいては0，120min，ウサギにおいては0，180min（採血後0日において，それぞれ確実に0.4ppm（ヒト），0.04ppm（ウサギ）の無機水銀（Hg^{2+}）により溶血が完了する時間）の反応時間における被検赤血球の一部少量を取り，検鏡し写真撮影（ツァイス社製，フォトマイクロスコープ（Ⅲ）使用）を行った．

4．試薬

溶血毒として用いた無機水銀（Hg^{2+}，塩化第二水銀）は和光純薬製（試薬特級 Lot No. PJ1110）を使用し，抗凝固剤としてはヘパリンナトリウムを使用した．その他の試薬はすべて JIS 試薬特級を使用した．

*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

実験結果

1．1％ Hct 赤血球保存液の経時的安定性

ヒトならびにウサギより得た1％ Hct 赤血球液の4℃における経時的安定性を採血後0日目においてほぼ同一の $t_{1/2}$ を示す濃度（ヒト赤血球の場合0.4ppm，62min；ウサギ赤血球の場合0.04ppm，73min）の無機水銀（Hg^{2+}）を用いて検討を加えたところ，Table 1，2に示した如く，ヒトにおいては採血後4日までは安定であるのに対し，ウサギにおいては採血後1日目においてすでに有意なる（$p<0.001$）$t_{1/2}$ の延長が認められ，2日目ではさらに延長された，この結果を赤血球膜の溶血抵抗性という観点よりみればウサギにおいてはむしろ溶血しにくくなった，すなわち無機水銀による溶血に対し強くなったと言える結果が得られた．

2．形態学的検討結果

ヒトならびにウサギの1％ Hct 赤血球液の無機水銀（Hg^{2+}）を用いた場合の経時的安定性（$t_{1/2}$ に対する）の差異についてより詳しく検討する目的で，採血後0日目，2日目の赤血球液を用いて，無機水銀0.4ppm（ヒト）0.04ppm（ウサギ）を添加反応させ，ヒトにおいては0，120min，ウサギにおいては0，180min における被検反応液の一部少量をとり検鏡写真撮影した結果を Fig. 1，2に示した．すなわち，採血後0日においては無機水銀添加前（0 min）と溶血終了時（ヒト120min，ウサギ180min）において，ヒトとウサギの間に著しい差異はなく，双方共溶血終了時においては完全に赤血球膜が微細破片となり破片の痕跡がとらえられたにすぎなかった．しかしながら採血後2日目において，ヒトの場合には採血後0日目とほとんど変わらないのに対し，ウサギの180min においては crenation を起こし，赤血球膜が微細破片とならず，萎縮固化して行くのが認められた．

考　　察

light scattering（光散乱）法を用いて，ヒトとウサギの赤血球液の経時的安性について，採血後0日目においてほぼ同様な $t_{1/2}$ を与える無機水銀（Hg^{2+}）の濃度（ヒト：0.4ppm，$t_{1/2}$ 62min，ウサギ：0.04ppm，$t_{1/2}$ 73min）を添加し，経時的に $t_{1/2}$ の変化を検討したところ，ヒトの場合は採血後4日目まではほぼ不変であったのに対し，ウサギの場合は採血後1日ですでに有意に $t_{1/2}$ が延長しており，採血後2日目ではさらに延長していた．通常 aging により赤血球膜が弱くなり安定性がより小さくなるとすれば，$t_{1/2}$ は短縮して行くことが容易に推察できる．事実ヒトの場合は採血後5日目より有意なる $t_{1/2}$ の短縮がみられ，さらに時間の経過と共にさらに短縮されていくのが認められた．すなわち，赤血球膜の不安定性が増したということが推察された．しかしながら，ウサギの場合は逆に現象としては溶血抵抗性が増したと解釈されるような結果が得られ，aging によりヒトは異なった変化が赤血球膜に生じ，無機水銀（Hg^{2+}）が添加された時，赤血球膜が破壊され残存数が減少するということでなく吸光度を減少させるような変化（多分体積の減少）が生じたものと推定された．そこでこの変化を明らかにする目的で，ヒトとウサギの赤

Table 1．Effect of Days Elasped on Times for 50% Hemolysis（$t_{1/2}$）by 0.4ppm Hg^{2+} in 0.03% Hematocrits（Human red blood cells）

Day after Collection	50% Hemolysis Time（$t_{1/2}$, min） D1	D2
0	55.5±0.50[1](3)[2]	67.57±0.60(3)
1	59.95±3.66(4)	67.17±0.76(3)
2	56.10±2.77(5)	67.50±0.50(3)
3	52.66±1.61*(5)	65.33±0.76*(3)
4	53.57±2.69(3)	64.83±3.25(3)
5	51.17±1.89*(3)	63.43±3.86(3)
6	47.67±0.29*(3)	64.33±0.29*(3)
7	44.33±0.76*(3)	61.00±0.87*(3)
10	43.07±0.60*(3)	58.43±0.51*(3)

1）mean ± SD
2）No. of determinations
*significantly different from 0 day's value at $p<0.05$ Hemolysis was observed slightly in control samples.

Table 2．Effect of Days Elasped on Times for 50% Hemolysis（$t_{1/2}$）by 0.04 ppm Hg^{2+} in 0.03% Hematocrits（Rabbit red blood cells）

Day after Collection	50% Hemolysis Time（$t_{1/2}$, mim）
0	72.6±14.71[1](13)[2]
1	141.5±24.13(8)***
2	177.6±83.95(5)***

1）mean ± SD
2）No. of determinations
significantly different from 0 day's value
*** $p<0.001$

血球液（採血後0日目と2日目）に無機水銀を添加し反応させ，反応0 minを対照として，また比較するために採血後0日目において確実に溶血が完了している時間（ヒト，120min，0.4ppm Hg^{2+}；ウサギ，180min，0.04ppm Hg^{2+}）経過後の被検赤血球液の一部少量をとり検鏡し写真撮影をしたところ，Fig. 1に示した如く，採血0日目においてはヒト，ウサギにおいて，それぞれ120min，180min後には赤血球膜の微細破片の痕跡しか検出できなかったが，採血後2日目においては，ヒトにおいては採血後0日目とほとんど変わらなかったのに対し，ウサギにおいては（前述の如く，$t_{1/2}$の延長が起こっており）ほぼ$t_{1/2}$に近い反応時間180min（採血後0日目においては溶血が完了している）において赤血球のcrenationが起こっていることが認められた．このことよりウサギの赤血球のagingによる変化はヒトと異なり，結果として無機水銀（Hg^{2+}）と反応しcrenationを起こすような変化が推定された．この詳細については，さらに電子顕微鏡による検索により明らかにされるものと考える．

結　論

無機水銀（Hg^{2+}）添加によるヒトならびにウサギの赤血球に対する作用を，赤血球液の経時的安定性という面より検討したところ，とくに形態学的にヒトにおいてはagingにより著しい変化はなかったが，ウサギにおいてはagingにより結果として無機水銀（Hg^{2+}）と反応し，赤血球がcrenationを起こすような変化を生じた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，36，335-339，1985.
2）市川久次，小林博義：東京衛研年報，37，391-394，1986.
3）Barnes, G. and Frieden, E：*Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 115, 680, 1983.

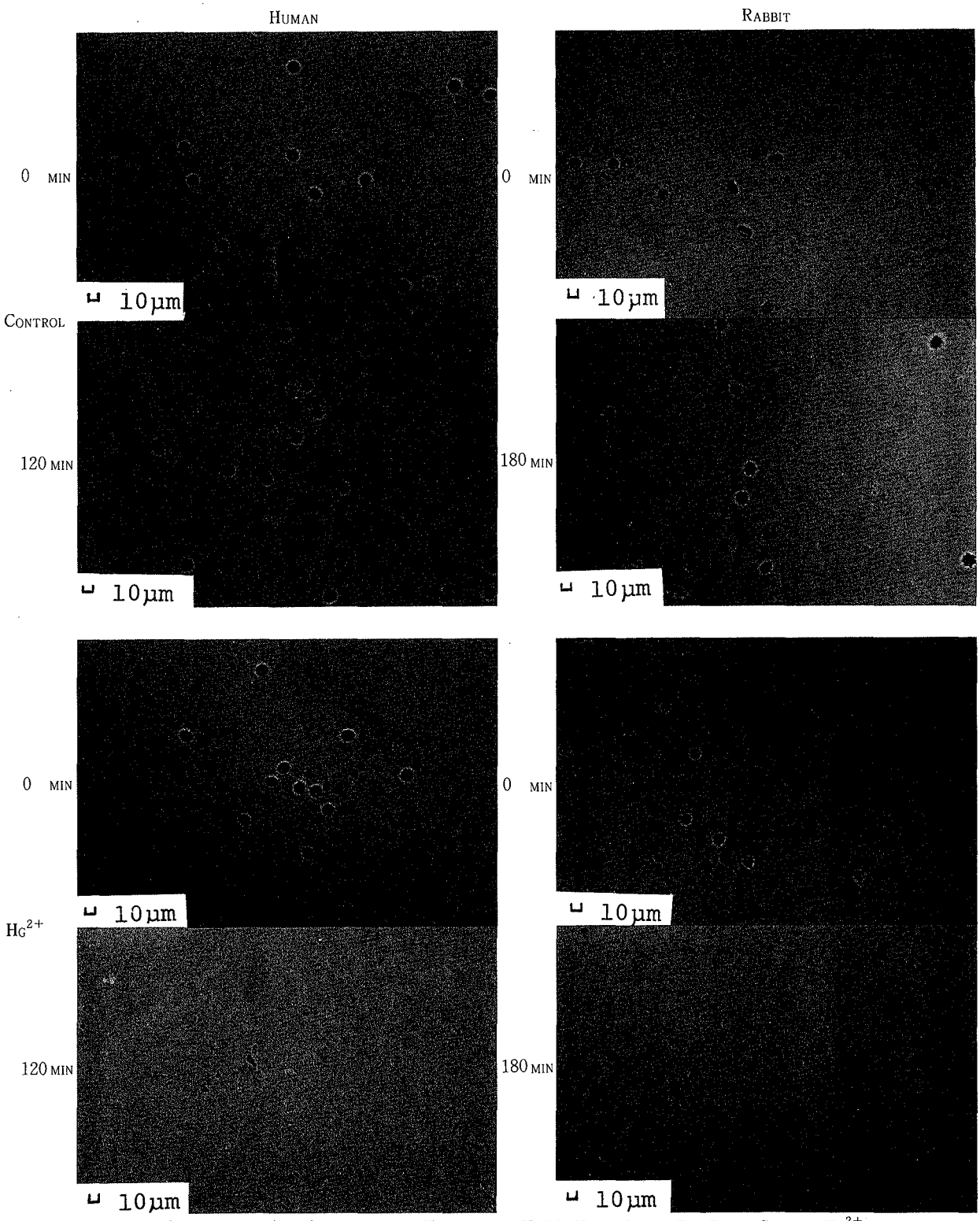


Fig. 1. MICROSCOPIDAL OBSERVATION OF HEMOLYSIS OF HUMAN AND RABBIT RED BLOOD CELLS BY Hg^{2+}
(0 DAY AFTER BLOOD COLLECTION)
Hg^{2+} CONCENTRATION: HUMAN 0.4 PPM, RABBIT 0.04 PPM

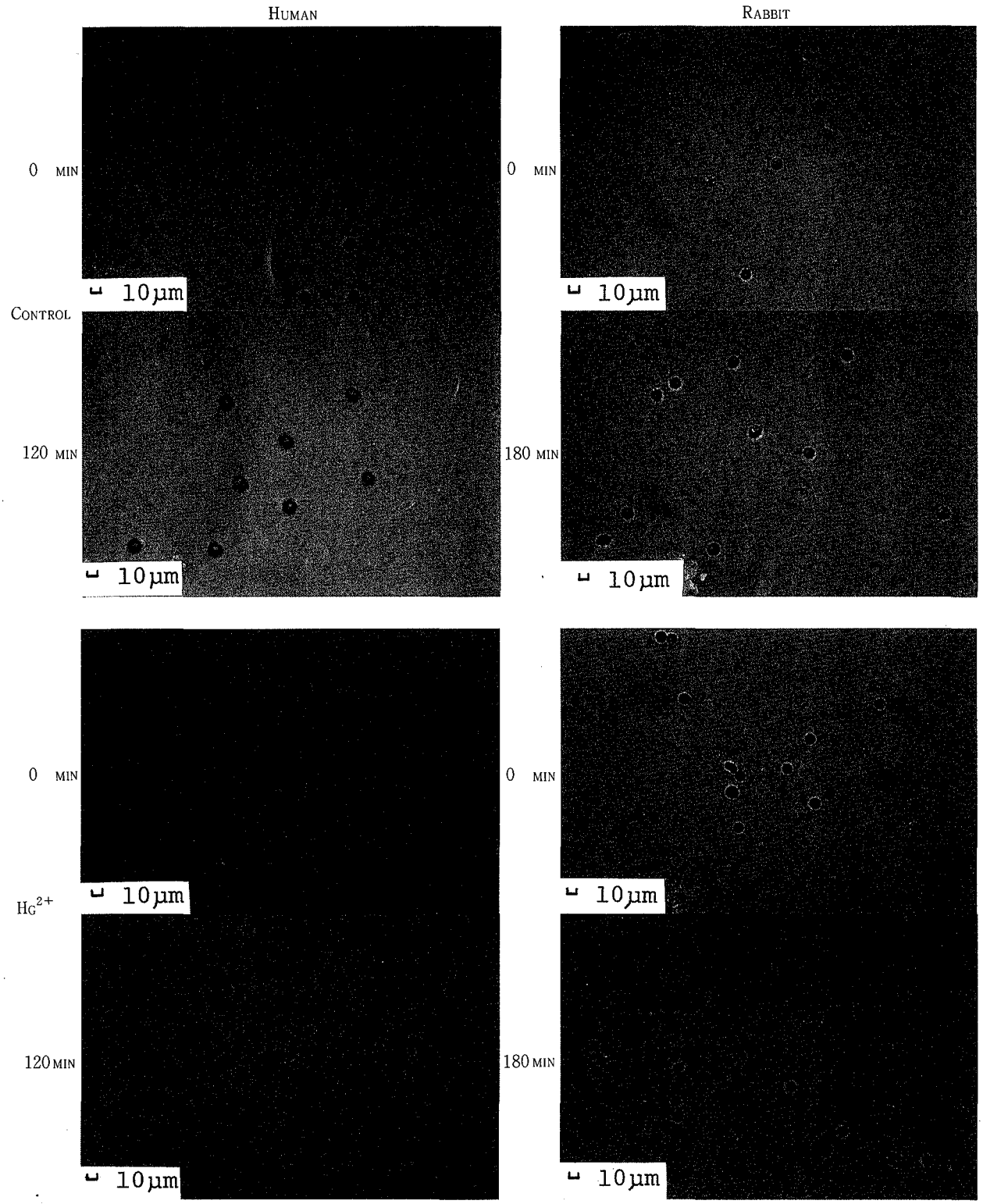


FIG. 2. MICROSCOPICAL OBSERVATION OF HEMOLYSIS OF HUMAN AND RABBIT RED BLOOD CELLS BY Hg^{2+}
(2 DAYS AFTER BLOOD COLLECTION)
Hg^{2+} CONCENTRATION: HUMAN 0.4 PPM, RABBIT 0.04 PPM

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 401-404, 1987

細胞膜酵素（馬腎臓 Na, K-ATPase）のモノクローナル抗体（第3報）モノクローナル抗体を含む腹水の作製と，腹水からモノクローナル抗体の精製

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(III) Production of Ascitic Fluid Containing Monoclonal Antibodies and Purification of Monoclonal Antibodies from Ascitic Fluid

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, 腹水 ascitic fluid

緒　言

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行なっている 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．毒物や薬物が生体内に取り込まれ，その効果を現わす時には，細胞膜上の受容体に結合することにより，細胞膜に障害が発現することがあきらかにされている[1]．今迄にも，毒物と Na, K-ATPase に関した中尾[2]，Nϕgaard[3]の報告がある．我々も，この観点に基づいて，馬腎臓髄質外帯より Na, K-ATPase を高純度に精製[4]し，それに対する各種の毒・薬物の作用を細胞膜障害より報告[5-15]してきた．これら毒性発現機序を細胞膜障害という点から，より明らかにする手段の1つとして，馬腎臓髄質外帯 Na, K-ATPase に対するモノクローナル抗体を作製したことは，前報[16,17]迄に報告した．

前報[17]に，ハイブリドーマ培養上清より，モノクローナル抗体の精製方法を報告したが，次に述べる難点があった．すなわち，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，多量のアルブミンフラクションを含んでおり，それがゲル ろ過で精製する際，抗体の分離精製能を悪くする原因となっていた．そこで，今回はハイブリドーマ細胞をマウスの腹腔内で増殖させ，腹水より，目的とする抗体を大量に，しかも高純度に精製することができたので報告する．

方　法

実験動物　BALB／c AnNCrj マウス（日本チャールス・リバー）を雌・雄とも使用した．購入時，5～7週齢で1週間飼育後，実験に用いた．

飼育条件　温度25±1℃，湿度55±5％，照明12時間の環境下飼育した．1群6～11匹ずつプラスチックケージに収容し，固型飼料 CE-2（日本クレア・株）および水道水を自由接取させた．

腹水の作製　予備飼育後の6～8週齢のマウスに，1匹当り 0.5m*l* のプリスタン（2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane, 半井 Co. LTD）を腹腔内に投与した．7～10日後，前に報告[16]した方法で作製したハイブリドーマ細胞を，血清を含まない RPMI-1640 培地（日水製薬）0.5m*l* に懸濁させ，一匹当り 4×10^6～2×10^7個腹腔内投与した．最大の抗体量が得られると推定される7～10日後の腹水が蓄積してきた時点に，0.1M EDTA（pH7.4）を入れた試験管に腹水を採取した．得られた腹水を1,000rpm で10分間遠心し，上清を－80℃で冷凍保存した．腹水より分離した細胞をマウスに投与する場合には，培養細胞と同様に，血清を含まない RPMI-1640培地に細胞を懸濁し，プリスタン処理したマウスの腹腔内に投与して，腹水を作製した．

腹水よりモノクローナル抗体の精製　前報[17]の培養

*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

上清から抗体の精製法に準じて行なった．凍結保存しておいた腹水50m*l* を解凍後，10,000×g で3分間，4℃で遠心し，表面に浮いた脂肪層を除いた．上清を集め，それを4℃で攪拌しながら，等量の冷却した硫酸アンモニウム（硫安）飽和溶液，pH7.4をゆっくり滴下した（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，pH7.4で洗い，さらに10,000×g で30分間4℃で遠心した．ここで得た沈殿を Sepharose CL-6B（Pharmacia 社）を担体として用いたゲルろ過で精製した．これ以降の遠心および透析操作などは前報[17]に従った．

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE） SDS-PAGE は，10%のアクリルアミドゲルを用いて，Laemmli[18]の方法によりおこなった．ゲルろ過により，腹水から精製した抗体の純度を，前報[17]で述べた培養上清より精製した抗体と，コントロールとして用いたマウスミエローマ IgM（Miles 社）と比較した．

結　果

方法の項で述べた，腹水作製のスケジュールに従って，プリスタンを前処理したマウスに，ハイブリドーマ細胞を投与すると，7～12日後にすべてのマウスに著明に腹水が蓄積してきた．1匹のマウスから採取できた腹水量は，雌では4群で実験した結果，0.9～3.1m*l* であった．

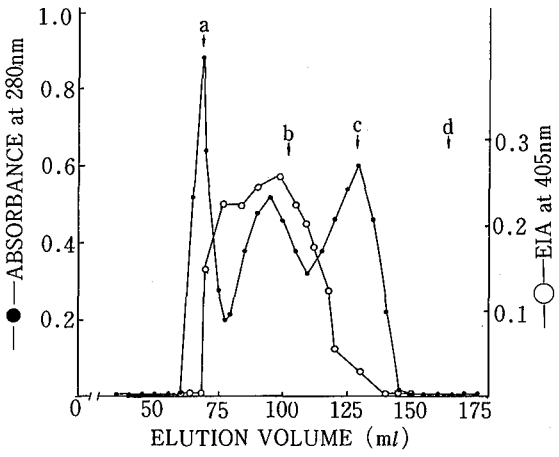


Fig. 1．マウス腹水50m*l* からモノクローナル抗体のゲル沪過による精製
—●—280nm での吸光度，—○—β-ガラクトシダーゼを用いた EIA 法による，405nm での吸光度．矢印はマーカー蛋白の流出部位を示す．a，ブルーデキストラン；b，サイログロブリン；c，アルブミン；d，ATP

また，雄では同じく4群でおこなった結果，2.5～2.9m*l* であった．腹水より得た細胞を投与した雄の1群では，腹水量が2.5m*l* であり，ハイブリドーマ細胞を投与した群と差は無かった．

腹水から抗体の分離精製を，ハイブリドーマ培養上清と同じく，Sepharose CL-6B を担体として用いたゲルろ過によりおこなった．ゲルろ過による抗体の分離精製パターンを図1に示した．これは，前報[17]に示した図2Bとほぼ同じであった．精製して得た抗体量は，腹水1m*l* 当り1.2mg であった．

ゲルろ過により精製した抗体を，Laemmli[18]の方法を用い，ゲル濃度10%の SDS-PAGE にて，その精製純度を調べた結果を図2に示した．腹水より精製した抗体は，培養上清より精製した抗体に較べると，高分子量の蛋白の混入が無く，95%以上の高純度に精製された．

考　察

抗体産生ハイブリドーマ細胞をマウスに移殖して，腹水を作製するために，マウスにプリスタンを前投与した．プリスタンは，分子量269の飽和炭化水素であり，魚肝油や動植物組織などに含まれ，動物の正常な免疫機能を

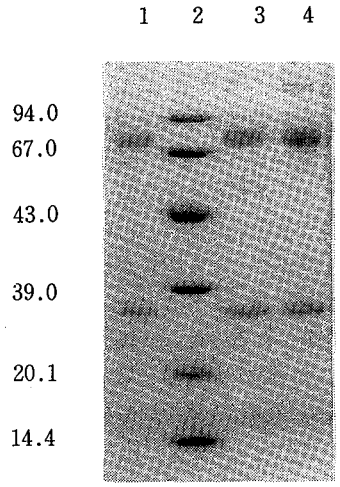


Fig. 2．マウス腹水より精製したモノクローナル抗体の SDS-PAGE（ゲル濃度10%，Laemmli[18]の方法）
1；腹水を Sepharose CL-6B カラムにて，精製して得た抗体，4 μg　2；分子量標準試料，94.0（キロダルトン）：ホスホリラーゼb，67.0：牛血清アルブミン，43.0：オブアルブミン，30.0：カルボニックアンハイドラーゼ，20.1：トリプシンインヒビター，14.4：α-ラクトアルブミン　3；マウスミエローマ IgM，4 μg　4；培養上清を Sepharose CL-6B カラムにて，精製して得た抗体，4 μg

押さえる作用をする[19]．マウス1匹当りのプリスタン投与量と，得られる腹水量の関係は，次の様に報告[20]されている．プリスタン量は，①0.05ml プリスタン投与時の腹水量は，0.1ml 投与時の1／3量．②プリスタン未投与では，固型癌のみで腹水は得られない．さらに，プリスタン投与後，ハイブリドーマを移植する時期は，10および20日後の時が，最大の腹水量．③腹水に含まれている抗体量は，10日後のが20日後の1.6倍多い．従って，我々はマウス1匹当り0.5ml のプリスタン投与後，7～10日目にハイブリドーマ細胞を移植した結果，総てのマウスに腹水を蓄積させることができた．マウス（雄）1匹より得られた腹水は，2.5～2.9ml．あり，それに含まれる抗体量は1 ml 中に1.2mg であった．これらの値は，目的とする抗体のイムノグロブリンのサブクラスが，IgM でなく IgG の場合ではあるが，腹水量は3～17ml，腹水1 ml 中の抗体量は1～10mg と報告[21,22]されている．我々の実験では，マウスの腹腔に固型癌が発生し，それ故に1匹から得られる腹水量が少なかった．一般に，ある種のハイブリドーマは，固型癌を作り易いとか，全く癌化しないというのは，そのハイブリドーマ本来の性質ではなく，ハイブリドーマの不安定さに起因している．たとえば，固型癌しか作らない，長期間培養したハイブリドーマを限界希釈法してから用いると，固型癌にはならない．という報告[20]がある．我々の実験には，5カ月間培養したハイブリドーマを使用したが，このことが腹水量の少なかった原因かもしれない．今後は，限界希釈法でリ・クローニングした直後のハイブリドーマ細胞を用いて，腹水の作製をおこなっていく予定である．

2.5×100cmのサイズの Sepharose CL-6B カラムにより，腹水に含まれる抗体の精製をおこなった．上記カラムでは，1回で精製できる培養上清の量は，最大約1.5l であった．同様に，腹水では約100ml であった．ゲルろ過により精製された腹水からの抗体量を，腹水と同容量の培養上清からのと較べる[17]と，390-2,000倍多かった．従って1回のカラム操作で，腹水は培養上清に較べて，26～133倍量の抗体が精製できた．

腹水からゲルろ過により精製した抗体の精製純度を，SDS-PAGE で比較した結果（Fig. 1．）血清を多重に含む培養上清より精製した抗体より，腹水からの抗体の純度は，95%以上と上昇した．この事と，抗体の精製の効率化を考え合わせると，マウスの腹腔内に腹水を作製させ，それより抗体を得ることは，有用でより効率的な方法である．

要　旨

Na, K-ATPase のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を，マウスの腹腔内にて増殖させ，腹水を作製することに成功した．マウスの腹水から，目的とする抗体を，ハイブリドーマ培養上清より26～133倍の効率で，かつ高純度に精製することができた．

文　献

1）Strom, D. R. and Gunsalus, R. P.：*Nature*, 250, 778-779, 1974.
2）中尾順子：モダンメディア，19, 616-623, 1973.
3）Nøgaard, A.：*Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 58, (Supplement I), 1-34, 1986.
4）長井二三子，厚井麻理，中尾順子：東京衛研年報，26-2, 143-147, 1975.
5）矢ケ崎しげ子，原　諭吉，中尾順子：東京衛研年報，25, 691-695, 1974.
6）矢ケ崎しげ子，原　諭吉，中尾順子：東京衛研年報，26-2, 148-151, 1975.
7）原しげ子，中尾順子：東京衛研年報，27-2, 161-165, 1976.
8）厚井麻理，長井二三子，中尾順子：東京衛研年報，25, 697-701, 1974.
9）厚井麻理，中尾順子：東京衛研年報，26-2, 152-157, 1975.
10）清水麻理，中尾順子：東京衛研年報，27-2, 77-81, 1976.
11）中川敦子，中尾順子：東京衛研年報，27-2, 166-170, 1976.
12）原しげ子，中尾順子：東京衛研年報，28-2, 196-200, 1977.
13）原しげ子，中尾順子：東京衛研年報，29-2, 147-150, 1978.
14）原しげ子，原　諭吉，中尾順子：東京衛研年報，30-2, 133-135, 1979.
15）大野知子，長井二三子，中尾順子：東京衛研年報，33, 477-479, 1982.
16）佐藤かな子，中尾順子：東京衛研年報，36, 366-369, 1985.
17）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：東京衛研年報，37, 395-398, 1986.
18）Laemmli, U. K.：*Nature*, 256, 495-497, 1975.
19）Lreund, Y. R. and Blair, P. B., *J. Immunol.*, 129, 2826-2830, 1982.

20) Hoogenraad, N. J. and Wraight, C. J.：The effect of pristane on ascites tumor formation and monoclonal antibody production, *In* Langone, J. J. and Vunakis, H. V. (eds.), *Methods in Enzymology*, vol 121, 375-381, 1986, Academic press, London.
21) 大原純一，渡辺　武：ハイブリドーマ確立のために，渡辺武監修，ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体，13-53，1983，R＆Dプラニング，東京.
22) 杉本正人，藤本正雄：モノクローナル抗体生産技術，遺伝子組換え実用化技術3．402-412，1982，サイエンスフォーラム，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 405-407, 1987

種々薬物のプロテインキナーゼCにおよぼす影響

中川敦子，長井二三子，加納いつ

Effects of Various Chemical Compounds on Rat Brain Protein kinase C

ATSUKO NAKAGAWA*, FUMIKO NAGAI* and ITSU KANO*

Keywords：プロテインキナーゼC protein kinase C，発癌プロモータ tumor promoter

緒　言

化学発癌のメカニズムはイニシエーションとプロモーションの質的に異なる過程からなることがマウスの皮膚による化学発癌実験系で証明された[1]．イニシエーションは生体内で代謝活性化を受けた物質がDNAと共有結合を作りDNAに傷害を与えることが反応の本態と考えられている．一方プロモーションはイニシエーションを受けた細胞の腫瘍形成を促進する過程であるがその反応の本態はまだ不明である．プロモータには多様な生物学的活性が知られているが，細胞膜に対する活性を説明する生化学的な反応の一つとして，代表的なプロモータであるホルボールエステルによるプロテインキナーゼC（PKC）活性の増強作用がある．著者らはPKC活性増強作用がプロモータの検出法の指標となり得るかどうか，また食品添加物・環境化学物質・医薬品等身近かに存在する化学物質のなかにPKC活性を増強する物質があるかどうかを検討した．

実験方法

試薬　ホスファチジルセリン（PS）はSardary Research, ATP，ヒストンⅢ，1，2-ジオレインはシグマ社，12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート（TPA）はC. C. R社，〔γ-^{32}P〕ATPはアマーシャム，ホルボール-12-,13-ジブチレート，〔20-^{3}H(N)〕-(^{3}H-DBt）はニューイングランドヌクレアのものを使用した．

PKCの調製　ラット大脳を6倍量の20mM Tris-HCl（pH7.5），0.25M sucrose，10mM EGTA，2 mM EDTA，0.5mM phenylmethyl sulfonyl fluorideでホモゲナイズし，40000r.p.m. 60分間遠心した（Beckman 40Aロータ）．この上清を予め20mM Tris-HCl（pH7.5），0.5mM EGTA，0.5mM EDTA，10mM mercaptoethanol（以下Buffer Aとする）で平衡化したDEAEセルロースカラム（2.8cm×7 cm）に添加した．次にカラムを3倍量のBuffer A，10倍量の20mM NaClを含むBuffer Aで洗った後90mM NaClを含むBuffer AでPKCを溶出した．280 nmで検出される2種のピークのうち前のピークをPKC標品として使用した．大脳20gから約5 mgのPKC標品が得られ，その比活性は約1.5 μmol Pi／mg／10 minであった．

PKC活性の測定　Kitano等の方法[4]を改変して行った．反応溶液は50mM Tris-HCl（pH7.5），10mM Mg($CH_3COO)_2$，20 μM〔γ-^{32}P〕ATP（50-100cpm／pmol），0.2mg／ml ヒストンⅢ，5 μg PS，10^{-4}M $CaCl_2$，10^{-5}M EGTA, PKC標品（10 μg protein）で全量を100 μlとした．反応は30℃　10分間行い10% TCA 1.5mlで反応停止後ヒストンに取込まれた^{32}Pをメンブランフィルタ（アドバンテック，0.45 μ）上に吸引沪過して集めた．これを更に10% TCA 2 mlで3回洗い，フィルタを赤外線ランプで乾燥後，放射能をチェレンコフ光として液体シンチレーションカウンタで測定した．$CaCl_2$およびPSを除いて反応した値をブランク値として使用した．PSはN_2ガス下でクロロホルムを除去した後20mM Tris-HCl（pH7.5）を加え超音波処理（20W，3分間）して使用した．

^{3}H-DBt結合に対する阻害　Uchida等の方法[5]を改変して行った．反応液は25mM Tris-HCl（pH7.5），10mM $Mg(CH_3COO)_2$，4 mg／ml BSA，50mM KCl，20 μg PS，5.5×10^{-4}M $CaCl_2$，5×10^{-5}M EGTA, PKC標品（約10 μg），20mM ^{3}H-DBt（2.5×10^{4} dpm／pmol）で，全量を200 μlとした．0℃で2時間以上放置後20mM Tris-HCl（pH7.5），10mM $MgCl_2$，1 mM $CaCl_2$ 1.5mlを加え直

*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

ちにGF／Cフィルタ（Whatman glass fiber paper）で吸引沪過した．フィルタを同液2 mlで3回洗い，乾燥後液体シンチレーションカンタで放射能を測定した．反応液に^{3}H-DBtの結合を競合的に阻害する1，2-ジオレイン8 μgあるいはTPA 8 μgを加えた時の測定値を完全阻害値として使用した．

タンパクの測定はBSAを標準としてBradford法[6]に従った．

測定物質は水あるいはdimethyl sulfoxide（DMSO）にとかし，反応液中のDMSO濃度は全て2％とした．

結　果

食品添加物・環境化学物質・医薬品等のなかから下記に示す．39化合物のPKC活性に対する影響を測定した．これら化合物の濃度は全て2×10^{-4}Mと2×10^{-3}Mで使用した．　ケルセチン（和光純薬），カフェイン（和光純薬），サッカリン（育和化学工業），クルクミン（和光純薬），ガランギン（Lab. Sarget），オルトフェニルフェノール（東京化成），パラフェニルフェノール（東京化成），トコフェロール（理研ビタミンK. K），ズルシトール（和光純薬），ピペロニルブトキシド（東京化成），フロレチン（Lab Sarget），フロリジン（シグマ社），ツェアラレノン（Makor Chemical LTD），フォルスコリン（Carbio Chem），フッ化ナトリウム（小宗化学薬品），コール酸ソーダ（シグマ社），N-エチルマレイミド（和光純薬），メタバナジン酸アンモニウム（和光純薬），o-スルホ安息香酸ソーダ（和光純薬），p-アミノベンゼンスルホン酸（東京化成），α-ナフトール（東京化成），ベンジルアミン（和光純薬），硫酸銅（和光純薬），タングステン酸ソーダ（関東化学），亜砒酸ソーダ（半井化学），塩化マンガン（和光純薬），デオキシコール酸ソーダ（半井化学），アセトアミノフェン（和光純薬），アミノピリン（三晃薬品），フェノバルビタール（三晃製薬），ブチルヒドロキシトルエン（第一化学薬品），クロロキン（シグマ社），キノホルム（食品医薬品安全センター秦野研究所より分与），17β-エステラジオール（シグマ社），エピネフリン（シグマ社），バソプレンシン（シグマ社），ウアバイン（シグマ社），フィチン酸（半井化学），テオフィリン（半井化学）

上記化合物のうちフェノバルビタール（PB），ブチルヒドロキシトルエン（BHT），サッカリン，カフェイン，

表1．PKC活性および^{3}H-DBt結合に対する影響

	PKC活性に対する影響		^{3}H-DBt結合に対する影響
	2×10^{-4}M	2×10^{-3}M	2×10^{-3}M
*PB	103±11.9 (7)	108± 4.6 (3)	140±12.1 (3)
*BHT	118±13.8 (13)	149±12.4 (8)	156± 0.7 (3)
*サッカリン	104±14.7 (9)	125± 6.8 (4)	84.8± 9.5 (3)
*カフェイン	91.7± 6.4 (3)	133±36.1 (3)	120± 4.6 (3)
*AAF	102± 4.6 (6)	97± 2.6 (3)	−
*Est	58.3± 1.2 (3)	50.3±13.4 (3)	116±11.3 (3)
PBu	169±65.4 (6)	153±18.6 (6)	47.1± 6.7 (3)
p-ABS	110±20.0 (6)	125± 9.0 (7)	−
o-pp	110±8.87 (6)	107 (2)	−
テオフィリン	97± 5.4 (6)	105 (2)	−
TPA(4 μg)	350±14.7(3)	−	0
ジオレイン(1.6 μg)	286±10.1(3)	−	0

PKC活性は測定物質を入れない時の活性を100として，相対活性で表わした．^{3}H-DBt結合は測定物質を加えない時の全結合量からTPAあるいはジオレイン存在下での結合量を差引いた値を100とした相対活性で表わした．（　）内は測定回数，±は標準偏差を表わす．*はプロモータ作用が認められている化合物を表わす．o-PP：オルトフェニルフェノール．

17β-エステラジオール（Est），アセトアミノフェン（AAF）にはそれぞれラット肝癌[7]，C3H10T1／2細胞のトランスフォーメーション[10]，C3H10T1／2細胞のトランスフォーメーション[11]，チャイニーズハムスターのCHO-KI細胞の染色体異常[12]に対するプロモータ作用が報告されている．表1にこれらのプロモータ作用を有する化合物によるPKC活性への影響と，上記化合物のなかでPKC活性を増強したものについて示した．プロモータ活性が報告されている化学物質（表1．*で示した）のなかでEst．以外はPKC活性を増強する傾向を示した．またプロモータ作用の報告がないピペロニルブトキシド（PBu）p-アミノベンゼンスルホン酸（p-ABS）にもPKC活性の増強がみられた．表に記載してない化合物ではPKC増強作用はみられず，腫瘍発生のプロモーションを抑制するケルセチン等フラボノイド類はPKC活性を強く阻害した．

ホルボールエステルによるPKC活性増強作用と上記プロモータ物質の作用が同一であるかどうかを^{3}H-DBt結合に対する阻害作用で観察した．表1に示すようにサッカリンがわずかに阻害作用を示したほかは阻害作用がなくむしろ活性化作用を示した。従ってこれら物質はホルボールエステルとは異なる機構でPKC活性を増強することがわがった．

考　察

ホルボールエステルの受容体がPKCであり，受容体に結合することによりPKC活性が増強することはよく知られている[2,3]．一方PKCの活性は増強するがPKCとの結合がホルボールエステルとは異なる型のプロモータの存在も明らかにされている[13]．表1に示したなかでプロモータ作用があると言われている6化合物についてはEst．を除きPKC活性を増強する傾向がみられた．また環境化学物質でプロモータ活性を有する2，4，3′，4′-tetrachloro bipheny，2,4,5,2′,4′,5′-hexabromobiphenyl，3,4,5,3′,4′,5′-haxabrombiphenye[14]および食品添加物でプロモータ作用のあるサッカリン[15]はいずれもPKC活性を増強するが^{3}H-DBt結合の阻害は示さないことが報告されている．Nishizuka[3]およびKleine等[15]はPKC活性の増強がその活性化機構とは無関係にプロモータ作用を発現するらしいと推測しているが，ラット大脳PKCを用いた本実験でもこの傾向が観察された．

しかしマウス脳PKCでは同じ環境化学物質に対しラットPKCとは異なる結果が報告されている[14]し，プロモータ作用があるEst．にはPKC増強作用がみられなかった．またプロモータでありPKC活性を増強したBHTに発癌抑制効果があるという報告[16]もあり．現段階ではPKC活性の増強だけからプロモータ物質の検出を行うことは困難と思われる。しかしPKC活性化反応は，従来試みられているODC活性，マウス耳の発赤テスト等と組合せることによりプロモータ検索の有効な手段になりうると考えられる．発癌物質の検索および発癌作用の解明のためには発癌イニシエータとともにプロモータの問題が最近重視されているが，プロモータ活性が報告されておらず今回PKC活性を増強した化合物については今後更に詳しく検討する予定である．

文　献

1）Berenblum, I.：*Cancer Res.*, 14, 471-477, 1954.

2）Castanga, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.：*J. Biol. Chem.*, 257, 7847-7851, 1982.

3）Nishizuka, Y.：*Nature.* 306, 693-698, 1984

4）Kitano, T., Go, M., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.：Assay and purification of Protein Kinase C, In P. Michael Conn (ed), *Methods in Enzymology*, vol. 124, 349-352, 1986, Academic Press.

5）Uchida, T. and Filburg, C. R.：*J. Biol. Chem.* 259, 12311-12314, 1984

6）Bradford, M.：*Anal. Biochem.* 72, 248-258, 1976.

7）Peraino, C., Michael, R. J. F. and Staffeldt, E.：*Cancer Res.*, 31, 1506-1512, 1971.

8）Djurhuus, R. and Lilehaug, J. R.：*Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 29, 115-120, 1982.

9）Hicks, R. M., Wakefield, J. st. J. and Chowanic, J.：*Nature*, 243, 347-349, 1973.

10）Chan, G. L. and Little, J. B.：*J. Cell. Physiol.* 111, 309-314, 1982.

11）Kennedy, A. R. and Weichselbaum, R. R.：*Carcinogenesis*, 2, 67-69, 1981.

12）Sasaki, M., Yoshida, S. and Hiraga, K.：*Mutation Res.*, 122, 367-372, 1983.

13）田中知子，藤木博太，管原雅美，杉村　隆，Moore, R. E.：生化学，55，935，1983.

14）Shukla, R. R. and Albro, P. W.：*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142, 567-572, 1987.

15）Kleine, L. P., Whitfield, J. F. and Boyton, A. L.：*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 135, 33-40, 1986.

16）Rahimutula, A. D., Zachriah, R. K. and O′Brien, P. J.：*Biochem. J.*, 164, 473-475, 1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **38**, 408-412, 1987

酵素阻害機構の解明
—コンピューターによる酵素阻害の模擬実験—

深野駿一*, 市川久次*

Mechanisms of Enzyme Inhibitions
—Simulation of Enzyme Inhibitions by Microcomputer —

SHUNICHI FUKANO* and HISATSUGU ICHIKAWA*

Keywords：酵素反応論 enzyme kineticks，模擬実験 simulation，阻害剤 inhibitor，重金属 heaby metal

目　　的

生体内に毒物が取り込まれた場合，特定の酵素が阻害を受け，その代謝系が止まり生体内に大きな影響を与える。殺虫剤，薬剤には酵素阻害剤を利用したものも多い．重金属類も酵素阻害剤の一種であり近年公害の原因物質として注目されている．鉛（Pb）はヘモグロビンの合成に関与する δ-aminolevulinic acid dehydrotase（EC 4，2,1,24 以下 ALAD と略す）を強く阻害する重金属である．この酵素に対する阻害機構を知る目的で Pb の他，水銀（Hg），亜鉛（Zn），セレン（Se）など他の金属の ALAD に対する阻害作用を現在調べている．その結果，Zn で阻害を受けた ALAD は，Zn を反応系より除くだけで活性が回復し，Pb 阻害 ALAD は更に dithiothreitol（DTT）と Zn を加えると活性が回復する[1]．Hg，Se 阻害 ALAD は DTT と ethylendiaminetetraacetic acid（EDTA）で処理しても活性が半分ほど回復するのみで，それ以上の回復を示さない[1]．一方 Hg は競合型阻害剤（Competitive inhibitor）で，Pb は競合型と非競合型（Noncompetitive type）の性質を両方特つ混合型（Mixed type）であり，Zn は非競合型阻害剤であると報告されている[2-3]．例えば Hg 阻害の場合，競合型であり当然可逆的阻害を示すと思われるが不可逆的阻害を示し，矛盾が存在する．そこで不可逆的阻害剤を反応系に加えた場合どのような変化を与えるか，反応式を誘導することにより解明しようとしたが，複雑で微分方式の一般解を解くことは困難であった．そこで反応の基本メカニズムに従って酵素反応が進行するものと考え，コンピューター内に模擬実験系を構築した．この実験系に阻害剤を添加し不可逆的阻害剤がどのような結果をもたらすかを検討したので報告する．

実験方法

酵素反応理論

酵素反応速度論は既に多くの著者があり説明するまでもないが，ここで使用する定数の定義及び反応機構の説明上簡単に示すことにする．但しここで使用する記号は以下のとおりとする．

遊離酵素形；E，基質；S，反応産物；P，阻害剤；I，複合体；ES，EI，ESI など，初期濃度，E 0，S 0，I 0 など，反応速度定数；K 1，K 2，K 3など，ES が複合体の濃度かEとSの乗算か区別の付き難いときは，それぞれ［ES］又はE＊Sと区別して記す．

これらの記号を使用し，酵素反応を示すと

$$E + S \underset{K2}{\overset{K1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{K3} E + P$$

$$d[E]/dt = (K2+K3)[E3]-K1[E][S]$$
$$-d[S]/dt = K1[E][S]-K2[ES]$$
$$d[ES]/dt = K1[E][S]-(K2+K3)[ES]$$
$$d[P]/dt = K3[ES]$$
$$[E\,0] = [E]+[ES]$$
$$[S\,0] = [S]+[ES]+[P]$$

となる．

この連立微分方程式は複雑で，一定の条件下でコンピューターにより解は求められている．しかし阻害剤を加えるとさらに複雑であり，我々の理解の範囲を越えてしまう．そこでこの酵素反応を以下の基本モデルによっ

*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

て表し，このモデルに従ってコンピューター内に「仮想反応槽」を構築して反応機構を検討した．

酵素反応の基本モデル

「反応は，反応に関与する分子同士が衝突した時，その運動エネルギーの合計が一定の値以上である時に反応が成立するものとする．」この単純な仮定によって「仮想反応槽」を構築することを基本とし，如何なる理論式も使用しなかった．この反応の基本原理は，分子はMaxwellの速度分布式

$$F(u)du = const * u^2 * \exp(-mu^2/2kT)du$$

但しuは速度，kはボルツマンの定数，Tは絶体温度によって運動しており，分子が衝突した時，活性化エネルギーE以上の運動エネルギー（$mu^2/2$）を持つ時のみ反応が成立するという理論に基ずいて仮定したものである．このとき反応速度定数Kは

$$K = A\exp(-E/kT) \quad 分子数/1*sec$$

又は

$$= A\exp(-E/RT) \quad mol/1*ses$$

但しAは全衝突数，Rは気体定数によって示すことが出来る．即ち$\exp(-E/RT)$は全衝突回数に対する有効衝突回数の割合を表し，Kはこの値に比例している．

「仮想反応槽」

「仮想反応槽」はProgram 1のBASICプログラムより成り立っている．プログラム中の記号の意味は以下の通りとする．

NE, NS, NES, P1；それぞれ［E］，［S］，［ES］，［P］を示す．

T；反応時間

NR1　；1回の反応で生成する複合体ESの量（K1の反応に関与する）

AR1　；全衝突回数に対する有効衝突回数の割合に比例する値（K1の反応に関与する）

NR2　；1回の反応で解離するESの量（K2の反応に関与する）

AR2　；反応に関連する分子数に対する有効反応数の割合に比例する値（K2の反応に関与する）

NR3　；1回の反応で生成する反応産物の量（K3の反応に関与する）

AR3　；反応に関連する分子数に対する有効反応数の割合に比例する値（K3の反応に関与する）

AV　；2分子が反応し結合するときに関与する定数

AW　；1分子が反応するときに関与する定数

RND　；乱数$0 \leqq RND < 1$の範囲の値

時間（T）が1進むと（T＝T＋1　110行），基質（NS）と酵素（NE）が衝突し合い，この分子同士が有効衝突の範囲（ARI）内（RND＜ARI）であれば，酵素基質複合体（NES）をNRI量生成し（NES＝NES＋NR1）基質及び酵素はNRIだけ減少する（170行）．これはE＋S $\xrightarrow{K1}$ ESの反応に相当する．同様にしてE＋S $\xleftarrow{K2}$ ESの反応は190行で示すことが出来る．すなわち，AR2の範囲内に乱数が発生すればESがNR2解離してNEとNSがNR2増加する．ES $\xrightarrow{K3}$ E＋Pの反応は，同様に250行によって示すことが出来る．これら一連の反応をKT時間続け，出来た反応産物及び酵素，基質，複合体の変化量を反応槽より取り出す（260行）．

ここでAR1，AR2，AR3は$\exp(-E/RT)$又は速度定数（全衝突回数に対する有効衝突回数の割合に比例する値）と同一の値とすれば理解し易い．しかし実際の反応，例えばよく知られている　$H_2+I_2 \longrightarrow 2HI$の反応では$\exp(-E/RT)$の値は$3.9*10^{-13}$と非常に小さい値である．又，反応速度定数も比較的小さい値のためコンピューター内で実行すると実行速度が遅くなる．このためみかけの値としてAR1を仮定し一回の反応で出来る反応産物量をNR1（$=\sqrt{AV}*NE*\sqrt{AV}*NS$）とした．ここで$\sqrt{AV}*NE$及び$\sqrt{AV}*NS$はそれぞれ一回の反応にあずかる酵素量及び基質量とした．その他の係数についても同様に定めた．これらの係数は実験に裏づけられた値としたいが不明のため仮の値とした．

阻害剤を入れた場合

例えば競合型阻害の場合，前述の反応式に下記の式を

Program list 1.

```
100 *ST1
110 T=T+1
160 NR1=NS*NE*AV
170 IF RND<AR1 AND NES<NE0 THEN NES=NES+NR1:NS=NS-NR1:NE=NE-NR1
180 NR2=NES*AW
190 IF RND<AR2 THEN NS=NS+NR2:NES=NES-NR2:NE=NE+NR2
240 NR3=NES*AW
250 IF RND<AR3 THEN P1=P1+NR3:NES=NES-NR3:NE=NE+NR3
260 IF K=KT   THEN GOTO *EXIT2
270 GOTO *ST1
```

Program list 2.

```
100 *ST1
110 T=T+1
120 NR5=NI*NE*AV
130 IF RND<AR5 THEN NEI=NEI+NR5:NI=NI-NR5:NE=NE-NR5
140 NR6=NEI*AW
150 IF RND<AR6 THEN NEI=NEI-NR6:NI=NI+NR6:NE=NE+NR6
160 NR1=NS*NE*AV
170 IF RND<AR1 AND NES<NE0 THEN NES=NES+NR1:NS=NS-NR1:NE=NE-NR1
180 NR2=NES*AW
190 IF RND<AR2 THEN NS=NS+NR2:NES=NES-NR2:NE=NE+NR2
200 NR7=NI*NES*AV
210 IF RND<AR7 THEN NESI=NESI+NR7:NI=NI-NR7:NES=NES-NR7
220 NR8=NESI*AW
230 IF RND<AR8 THEN NESI=NESI-NR8:NI=NI+NR8:NES=NES+NR8
240 NR3=NES*AW
250 IF RND<AR3 THEN P1=P1+NR3:NES=NES-NR3:NE=NE+NR3
260 IF K=KT   THEN GOTO *EXIT2
270 GOTO *ST1
```

追加すれば良い.

$$E + 1 \underset{K6}{\overset{K5}{\rightleftharpoons}} E1$$

従ってこの反応は Program 2 の120行から150行によって示すことができる。Program 中の AR5, AR6 はそれぞれ見かけの反応速度定数K_5, K_6を, NI は阻害剤濃度 I を表す. 又, 不競合型 (un-competitive type) の場合は,

$$I + ES \underset{K8}{\overset{K7}{\rightleftharpoons}} IES$$

であるから Program 2 の200行から230行を追加すればよい. 但し, EI および IES 複合体は反応産物を生成することは出来ない. 他の阻害形式も同様にして自由に「仮想反応槽」に式を追加することにより簡単に示すことが出来る.

実験結果及び考察

通常の酵素反応における反応成分の濃度変化

Program 1 に下記の値を入れると Fig. 1 に示した各成分の Time course の図が得られる.

基質濃度 NS0 =80,000, 酵素濃度 NE0 =8,000, 測定時間 KT =480,000, その他の係数 AR1=0.800, AR2 =0.300, AR3=0.150, AV =4*10^{-9}, AW =0.00032

基質 S は反応初期に急激に減少し酵素複合体 ES を形成する. 従って複合体は初期に急激に増加する. 又, 反応産物 P は lag phase をおいて上昇している. この時の反応時間はストップドフロー装置を利用した高速反応解析では0.1秒以下といわれている. その後定常状態となり, ES 複合体の変化は非常に少なく, 過剰の基質の存在下ではほとんど一定となる. この時の反応生成物は反応時間に比例して増加する. 反応末期では基質は減少し生成される複合体量も少なく, 従って反応速度も遅くなっている.

競合型阻害剤を添加した時の反応成分の濃度変化

基質濃度 NS0=80,000, 酵素濃度 NE0=8,000, 測定時間 480,000, AR1=0.600, AR2=0.500, AR3=0.100, AV=4*10^{-9}, AW=0.00032 の酵素反応系に阻害剤濃度 NI0=40,000, 見かけの反応速度 AR5=0.550; AR6=0.100の条件の阻害剤を加えた時の各成分の濃度変化を Fig. 2 に示した。なお NE0, AR1, AR2, AR3, は以下の酵素反応の実験中全て同一の値とした。阻害剤を加えたことによる濃度変化の特徴は, 1) 反応速度が 0.6 倍に低下している。2) ES 複合体が反応初期に一旦増加し, その後低下しながら定常状態に移行している。3) この ES 複合体量は阻害剤のない場合の 0.6 倍程度に減少し反応速度と比例している。4) 反応初期の前定常状態が延びている。5) 阻害剤と酵素との複合体 (NEI) は前定常状態を過ぎると基質濃度が減少してもほとんど一定である。などであった。

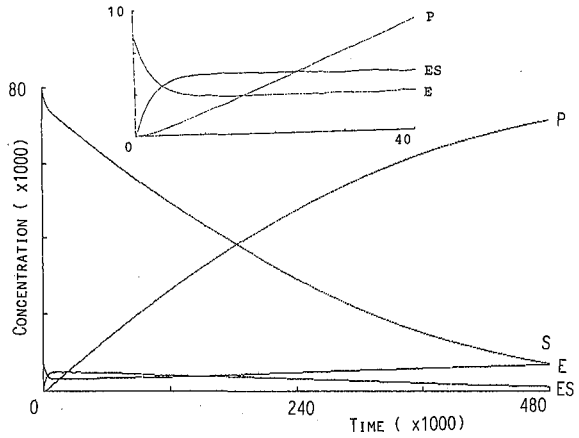


Fig. 1. Time-courses of concentrations of ES complex and other components in general enzyme reaction. The upper figure shows the magnified form of the lower chart at the initiation of the enzyme reacion.

$$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P$$

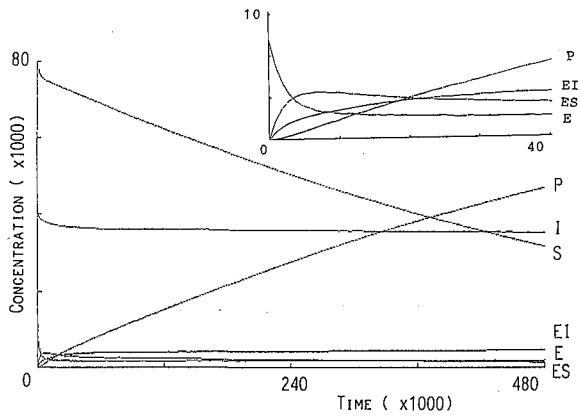


Fig. 2. Time-courses of concentrations of EI complex and other components in competitive inhibition. The upper figure shows the magnified form of the lower chart at the initiation of the enzyme reaction.

$$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P$$
$$E + I \rightleftharpoons EI$$

不可逆型阻害剤を添加した時の反応成分の濃度変化

基質濃度 NS0 ＝80,000，酵素濃度 NE0 ＝8,000，測定時間 480，000，AR1＝0.600，AR2＝0.500，AR3＝0.100，AV ＝$4*10^{-9}$，AW ＝0.00032 の酵素反応系に阻害剤濃度 NI0＝40,000，見かけの反応速度 AR5＝0.020，AR6＝0.000 の条件の阻害剤を加えた時の各成分の濃度変化を Fig. 3 に示した。不可逆であるから当然 AR6は 0 とした。不可逆のため酵素阻害剤複合体量 NEI ほぼ直線的に増加している。このため NES は定常状態がなく常に減少し，従って反応産物量の変化も直線区間がなく曲線を描いているのが特徴であった。

競合型阻害剤添加時の Lineweaver-Burk Plots

基質濃度 NS0 ＝40,000，80,000，160,000，320,000，酵素濃度 NE0 ＝8,000，測定時間 30,000，AR1＝0.600，AR2＝0.500，AR3＝0.100，AV ＝$8*10^{-8}$，AW ＝0.0064に阻害剤濃度 NI0 ＝0，2000，40,000，60,000，AR5＝0.550，AR6＝0.100の場合の Lineweaver-Burk Plots を Fig. 4 に示した。Lineweaver-Burk plots が成立するのは定常状態でしかも基質濃度と阻害濃度が共に初期濃度と同一，不変であることを条件としている。従って NS 及び NI は常に初期濃度と同一とした。また反応速度は反応時間10,000～30,000の間の定常状態における平均速度とした。図にみられるように仮想反応実験においても理論どうり y 軸に交点をもつ回帰直線が得られた。阻害剤の多い NI0 ＝60,000では酵素基質複合体 NES が減少するため反応速度が遅くなりデーターがバラツクことが観察された。

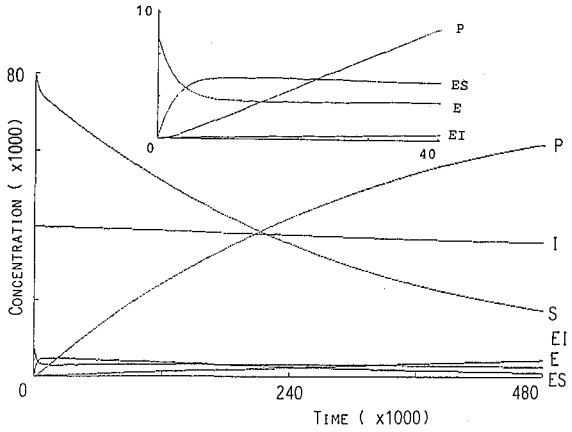


Fig. 3. Time-courses of concentrations of EI complex and other components in irreversible inhibition. The upper figure shows uhe magnified form of the lower chart at the initiation of the enzyme reaction.

$$E + S \rightleftarrows ES \longrightarrow E + P$$
$$E + I \longrightarrow EI$$

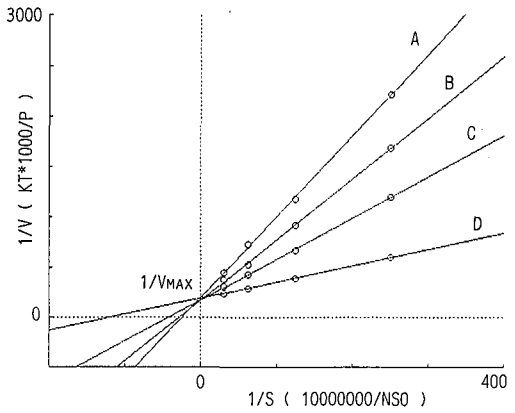


Fig. 4. Lineweaver–Burk plots of competitive inhibition.
A ; NI0 ＝60000, B ; NI0 ＝40000, C ; NI0 ＝20000, D ; NI0＝0, NI0 ; concentration of inhibitor

不可逆型阻害剤添加時の Lineweaver-Burk plots

AR5＝0.020，AR6＝0.000で他の条件は前述の競合型阻害剤と同様の条件下で実験を行い，結果を Fig. 5 に示した。図に示した様に AR5が 0.02の時 Y 軸に交点を結ぶが 0.02 以上にすると Y 軸の右に，0.02 以下にすると左に交点を結んだ，又，失活酵素量は NS0 ＝160,000，NI0 ＝40,000，反応時間 T ＝30,000で約酵素濃度の半分であった。この様に Hg のような 50％ほど不可逆に失活する阻害剤であっても競合型阻害と同一の Lineweaver-Burk Plots 与える場合があることが明かとなった。この場合は酵素と阻害剤の反応速度定数がなんらかの原因，例えば基質と阻害剤が競合するために遅くなった時に相当する。

Hg の反応速度定数が酵素によって違い，しかも競合型阻害を示す場合も考えられる。この時は Hg の結合部位によって可逆，不可逆の両方が有ると仮定すると成り立つ。例えば活性中心に結合した Hg は不可逆でありアロステリック部位に結合した Hg は可逆的であるとすれば 0.02 という狭い速度定数のみで競合型阻害が成り立つのではなく，もっと広い速度定数の範囲で，競合型でしかも不可逆という阻害が成り立つ。

酵素濃度を変えた時の Lineweavr-Burk Plots

不可逆的阻害剤の反応速度定数が非常に速いか，または酵素を不可逆的阻害剤で前処理した場合には酵素量を変えて測定した場合とほぼ同一となるはずである。そこ

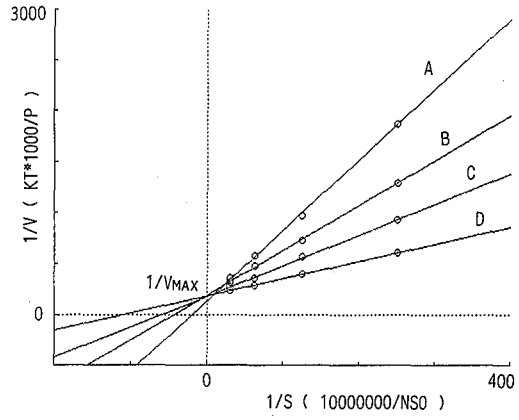


Fig. 5. Lineweaver–Burk plots of irreversible inhibition.
A ; NI0 =60000, B ; NI0 =40000, C ; NI0 = 20000, D ; NI0 =0, NI0 ; concentration of inhibitor

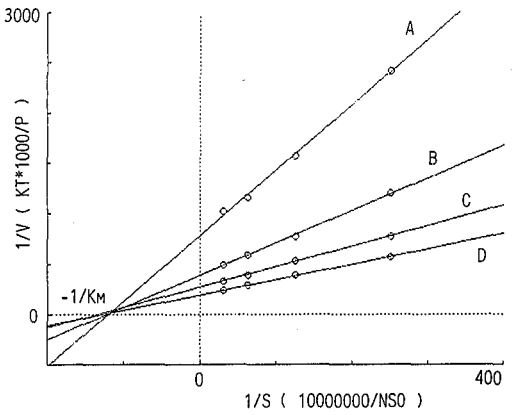


Fig. 6. Lineweaver-Burk plots of various enzyme concontrations
A ; NE0 =2000, B ; NE0=4000, C ; NE0 =6000, D ; NE0 =8000, NE0 ; concentration of enzyme

で酵素濃度を NE0 =2,000, 4,000, 6,000, 8,000と変え阻害剤無添加とし，他の条件は競合型阻害と同一とした時の結果をFig. 6 に示した。この結果は当然であるが，Km 値が一定で，非競合型阻害と同一の結果を与えた。

以上競合型阻害剤と不可逆的阻害剤について検討を行った。これら阻害形式の分類に利用される Lineweaver-Burk Plosts と Michaelis-Menten 式は基質量，阻害剤量が反応中不変であると仮定して導かれた式である。しかし実際の酵素反応はこのような定常状態ばかりではなく実験によっては定常状態をつくり出せない場合もある。特に反応初期の前定常状態の各成分の濃度変化はその反応系の性質を知る上で重要である。この前定常状態の各成分の濃度変化はストップド・フロー法などを用いた高速反応解析によって測定することが出来る。このような時，各成分の濃度変化を予測することは理論式では困難であるが，今回示した「仮想反応槽」利用すれば簡単に求めることが出来る。又，阻害剤が酵素と結合している場合前定常状態が長くなり必ずしも定常状態でない場合も考えられる。反応生成物が酵素反応を阻害する場合などは更に反応式が複雑になってくる。このような時に各成分の濃度変化を予測し，または得られたデータの解析にこの「仮想反応槽」は手軽に利用することができる。

要　約

ALAD の酵素反応系に阻害剤として塩化第二水銀を添加すると競合型阻害を示す。この時 ALAD は 50%ほど不可逆的に失活をしている。競合型阻害は酵素と阻害剤が可逆的に結合することを前提としている。この矛盾を明かにするためにコンピュータに「仮想反応槽」を構築し，酵素反応の模擬実験を行った。その結果，不可逆的阻害剤を入れ実験をし，Lineweaver-Burk Plots を描くと競合型阻害と同様の結果が得られる場合が存在した。この時の条件は阻害剤と酵素との結合反応が測定中に飽和しないような遅い反応速度定数の場合であった。

この「仮想反応槽」は，酵素，基質，阻害剤を入れ，任意に決めた見かけの反応速度定数を設定すると，それぞれの反応条件に対応した反応成分の濃度変化をプリントアウトすることが出来る。このためこの「仮想反応槽」は今後補酵素或は金属による活性化，阻害剤のアロステリック効果など，酵素反応の研究に多くの利用法が考えられる。

文　献

1）投稿中
2）Anderson P. M. and Desnik R. J. : *J. Biol. Chem.*, 254 (15), 6924-6930, 1979
3）藤本揚子，千葉百子，菊地正一：日衛誌，39(1), 498, 1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 413-422, 1987

クロム酸カルシウムと関東ロームの混合粉体のラットによる104週間吸入実験（第1報）呼吸器系の病理組織学的観察

坂本義光*, 神谷信行*, 池田虎雄*, 佐々木美枝子*

Inhalation Experiment of Calcium Chromate mixed with Kanto Loam on Rats for 104 weeks (I) Histopathological Observation of Respiratory System

YOSHIMITU SAKAMOTO*, NOBUYUKI KAMIYA*, TORAO IKEDA* and MIEKO SASAKI*

Inhalation toxicity of the mixture of calcium chromate ($CaCrO_4$) and Kanto loam dust was studied on F 344 male rats. The animals were kept in an inhalation chamber and exposed to the 1mg/m^3 of mixed dust, which contained 2, 5, 20% of $CaCrO_4$ in Kanto loam dust, for 104 weeks continuously (24hrs/day, 7 days/week). In these rats, histological changes of the respiratory system were observed.

Hyperplastic and neoplastic lesions in the lung were found in the control and dust-exposed rats. Number of hyperplastic lesion per rat increased with $CaCrO_4$ concentration. Number of rats with neoplastic lesion and number of the lesions per rat both increased in the rats exposed to the dust contained 20% $CaCrO_4$. Neoplastic lesions tended to occur in the rats which had more than two proliferating lesions including the hyperplastic and neoplastic lesions. It was suggested that $CaCrO_4$ mixed with Kanto loam dust increased the incidence of pulmonary hyperplastic and neoplastic lesions.

Keywords: calucium chromate, kanto loam, rat, 104 weeks inhalation, histopathological observation

緒　言

昭和50年東京都において，投棄されたクロム鉱さいにより，その地区の住民に健康上の不安が生じた．著者らはこれを契機に，経気道によって摂取されたクロム鉱さい粉じんの生体への影響を観察する目的で，昼夜連続の吸入曝露実験を行ってきた[1-5]．これらの実験において，組織学的に肺実質の損傷を伴う障害作用や増殖性の病変が観察された．前者は高濃度，短期間曝露実験で見られた変化でクロム鉱さいの作用と考えられた．後者は低濃度，長期間の実験でみられたが，比較対照として設定した関東ローム粉体を曝露したラットでも同様に観察され，クロムの作用とは考えられなかった．

加令ラットで肺胞・細気管支領域における上皮細胞の増殖性病変が自然発生することが知られている[6,7]．前実験では，これらの病変の発現がクロムの濃度に関係なく粉じんの曝露によって増加したものと考えられた．実験に用いたクロム鉱さいは環境中に投棄された産業廃棄物であり，関東ローム粉体は関東地方に広く存在し呼吸とともに摂取する機会の多い粉体である．日常生活環境中には種々の浮遊粉じんが存在し，またそれらの中には有害作用のあるものも存在する可能性があり，複数の粉じんを摂取する機会は多い．今回関東ローム粉体とクロム化合物の混合粉体を以上の様な環境条件を反映したモデルとして想定して，その低濃度，昼夜連続の吸入曝露実験を試みた．前実験で鉱さい中のクロムの性状には不明な点が多く，その作用も明らかでなかった．そのため本実験ではクロムの作用をより明確に観察するために6価クロム化合物であるクロム酸カルシュウム（$CaCrO_4$）

*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

を用いた．本報告では経気道によって摂取された2種の粉体による生体への影響のうち，前実験で観察された肺の増殖性病変の発現に注目した呼吸器系の組織学的観察結果について報告する．

実験材料および方法

動物　F 344／Ducrj，雄ラット，4週令（日本チャールスリバー株式会社，購入時体重50－60 g，出生日1984年3月11-12日）を1週間予備飼育した後，実験に用いた．

粉体　クロム酸カルシュウム（$CaCrO_4$：関東化学株式会社，純度95％）は，粉末をさらにボールミルで粉砕し，45メッシュの篩を通したものを用いた．水に対する溶解度は，163 g／l（20℃）で，6価クロム化合物の中では難溶性である[8]．関東ローム粉体は日本粉体工業協会の，JIS 試験用粉体（JIS Z 8901）11種，平均粒径2 μ を使用した．実験には，100℃，24時間，乾熱滅菌した後使用した．関東ロームの組成は前報[5]に示したとおりで，クロムの存在は，当部の原子吸光分析では検出限界（0.02ppm）以下であった．

吸入実験　1群20匹を用い，$CaCrO_4$ を2，5，20％の割合で混合した関東ローム粉体の粉じん曝露群（以下，各々 Cr-L, M, H 群とする）と，実験室内究気のみの対照群の4群を設定して行った．実験に用いた吸入実験装置の詳細は前報[9]に示した．粉じん濃度はいずれも1 mg／m^3で，曝露期間は昼夜連続で104週間とした．吸入チャンバー内の粉じん濃度は常時デジタル粉じん計で測定し，また毎月1回ローボリュウムエアーサンプラーにより絶対量を測定した．粉じん中の $CaCrO_4$ 濃度はローボリュウムエアサンプラーにより口紙上に集めた粉じんについて蛍光X線分析装置によって測定した．

Table 1. Particle Size Distribution of Dust in Inhalation Chamber

Samplar stage	Particle size (μ)	Group		
		Cr-L	Cr-M	Cr-H
		weight percent (％)		
0	>11.0	1.2	1.1	1.0
1	11.0－7.0	1.5	1.1	0.3
2	7.0－4.7	5.5	6.1	5.9
3	4.7－3.3	22.4	19.1	21.5
4	3.3－2.1	26.6	27.9	28.1
5	2.1－1.1	21.6	22.9	21.5
6	1.1－0.65	11.3	14.2	16.6
7	0.65－0.43	3.3	2.1	3.4
8	0.43>	6.6	5.5	1.7

実験期間中の各群のチャンバー内粉じん濃度は設定濃度1 mg／m^3に対して10％以内の変動巾であった．また $CaCrO_4$ 平均濃度は，Cr-L 群2.21±0.33，Cr-M 群5.67±0.73，Cr-H 群21.71±1.72％であった．チャンバー内の粉じん粒度分布はアンダーセンプラーを用いて測定し，Table1 に示したように，各群とも4.7以下が約90％，2 μ 以下のものが約40％の割合で存在していた．

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（W34.5×L50×H21cm）に等分して収容し，日本クレア製固形飼料 CE-2 およびチャンバー内自動給水ノズルにより水道水を自由に摂取させた．チャンバー内飼育条件は換気回数毎時15-16回，温度23-25℃，湿度40-50％であった．また検知管を用いて測定した CO_2 濃度は1000-1500ppm であり，NH_3 は実験期間を通して認められなかった．照明時間は実験室内と同じで午前6時より午後6時までとした．

体重は毎週1回測定し，一般状態の観察は，毎週の体重の測定時およびチャンバー前面のガラス窓より毎日行った．実験終了後，動物は大腿部動静脈より放血屠殺した．

組織標本の作製　解剖時，肺は気管に接続させたまま摘出し，結紮した気管より緩衝ホルマリンを10-20cm 水柱の圧で注入し，再膨張させた後，各葉を肺門部で離断し同じ固定液につけた．固定後，肺の各葉，長軸に対して直角に2-3mm の間隔で横断し，左葉からは5個，右の各葉からは3個の細片を採取し，常法によって組織標本を作製した．鼻腔は固定後脱灰し，頭部長軸に直角に全体を3-4mm の厚さに横断し，標本を作製した．気管は喉頭部より縦隔部までを甲状腺を含めて2-3mm の厚さに横断し，各細片について，標本を作製した．染色はいずれも HE 染色を行った．

結　果

体重および一般状態　Fig. 1 に各群の体重増加曲線を示した．図中の値は体重測定時生存例の平均値を示した．各粉じん曝露群の増加推移は，実験期間を通して，対照群と同様であった．またこの間，呼吸障害を思わせる特徴的な症状は見られなかった．

生存率　曝露終了時の各群の生存率は，対照群19／20（95％），Cr-L 群 14／20（70％），Cr-M 群 15／20（75％），Cr-H 群 16／20（80％）であった．各粉じん曝露群で対照群に比べ低い値を示したが，$CaCrO_4$ 濃度に比例したものではなかった．各群の途中死亡例のうち Cr-L 群 2例，Cr-M 群5例，Cr-H 1例が瀕死屠殺例で

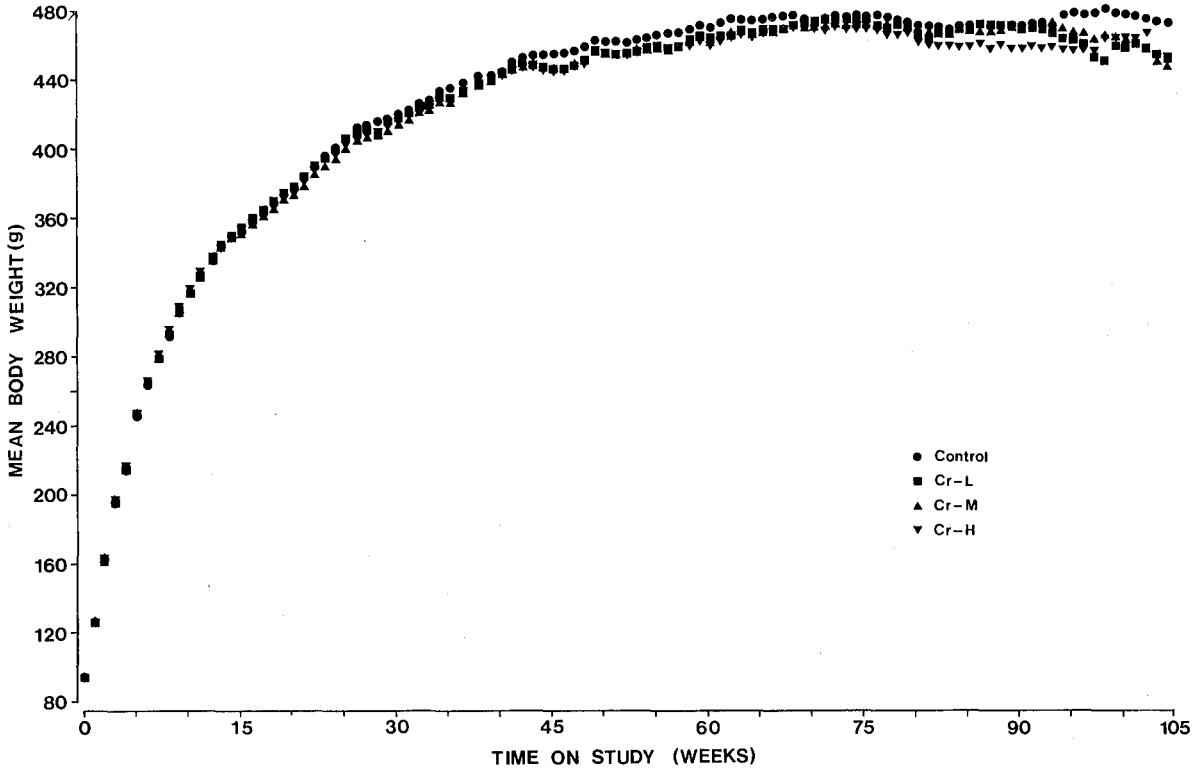


Fig. 1. Growth Curves of the Rats exposed to Calcium Chromate mixed with Kanto Loam Dust for 104weeks.
: $CaCrO_4$ 2% (■, Cr-J), 5% (▲, Cr-M), 20% (▼, Cr-H)

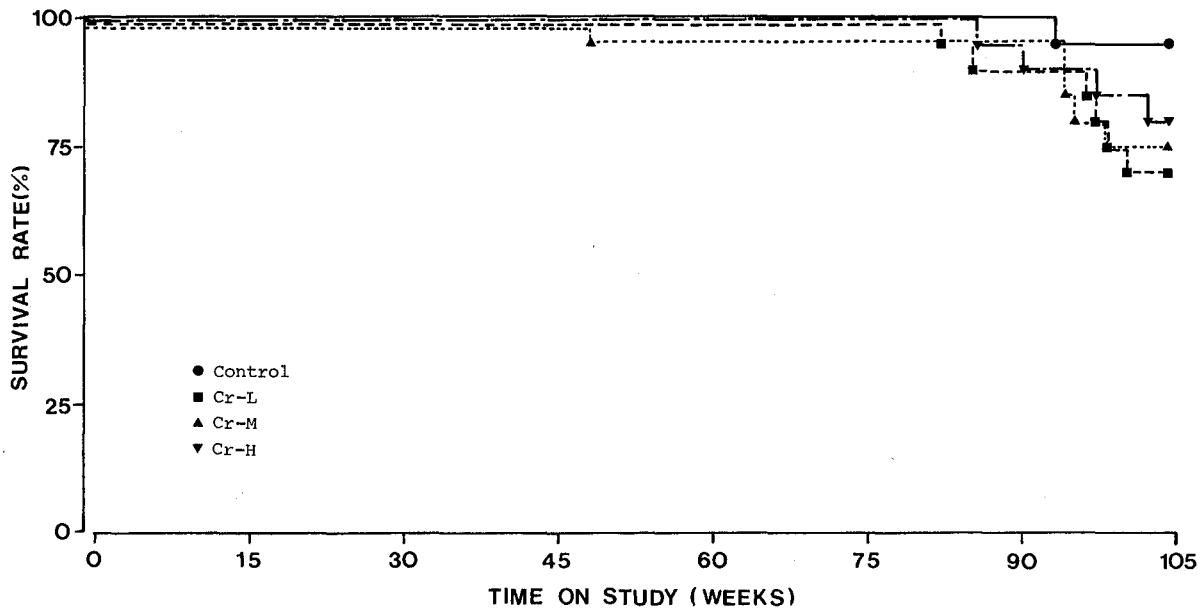


Fig. 2. Survival Curves of Rats exposed to calcium Chromate mixed with Kanto Loam Dust for 104 weeks
: $CaCrO_4$: 2% (■, Cr-L), 5% (▲, Cr-M), 20% (▼, Cr-H)

あった．Fig. 2に生存曲線を示した．

各曝露群の死亡経過の傾向は対照群と比べ差はなかった．

肉眼所見 対照群および粉じん曝露群の肺に小結節を見る例が多かった．各群で見られた結節の数は，増殖性病変としてTable 2にまとめて示した．結節は肺表面または割面に見られ，直径1-5mm大，やや硬い，白色の円盤状で，周囲の組織との境界は明瞭であった．結節は表面が盛り上がって見えるものと，平担なものとがあった．結節の見られたラット数および総結節数（Table2,A）ともに，Cr-H群で多く見られた．ラット1匹当りに見られた結節数は，対照群，Cr-L群では1個であったが，Cr-M群では2個を有するものが2例，Cr-H群では，最高5個を有するものまで見られ，Cr-H群では多発する傾向が見らめた．

組織学的所見 対照群および粉じん曝露群の肺に見られた病変を増殖性病変（Hyperplastic lesionとNeoplastic lesion）とその他の病変に分けてTable 2，3に示した．増殖性病変は細気管支一肺胞領域で細胞が増生しているもので，非腫瘍性（Hyperplastic lesion：過形成）と腫瘍性病変（Neoplastic lesion）に分類した．これらは，いずれも肉眼的に観察された小結節と一致していた．このうち立方状の上皮細胞が肺胞壁に沿って，全体的にほぼ一層に，正常な肺胞構造を保ちながら，増生している変化を非腫瘍性病変（過形成）とした．正常組織との境界部分では，細胞の増生が隣接する組織を圧迫することなく，正常な肺胞へ連続的に移行していた(Photo 1)．増生している細胞は，丸みを帯びた立方状で，正常部位に見られる肺胞Ⅱ型上皮細胞とほぼ同じ大きさであるが，核ー細胞質比がやや大きかった(Photo 2)．核は全体的に円形で，好塩基性の強いものも多く見られた．これに対して，病巣部位での細胞密度が高く，細胞が乳頭状，管状または充実性に増生し，その部分での正常な肺胞構築が失われている変化を腫瘍性病変とした．病巣は，全体的にほぼ結節状で，境界部分では隣接する組織を軽度に圧迫し，それらと明瞭に区別されるものと，過形成を示す部分に混在して見られるものとがあった．増生している細胞は，多くは丸みを帯びた立方状であるが，場合によって円柱状のものも見られた．細胞質はやや多く存在するものから，少なく，裸核状のものまで見られた．核はより大きく，円形のものが多く見られた．核の大きさや形は全体的にほぼ均一であったが，より大きく，長円形や不規則な多角形のものも散見された．核質は，多くは微細顆粒状または微細網状であり，それらに混じってクロマチン顆粒が多く，やや粗大な顆粒状を形成しているものや核膜の厚さの不均一なものも存在していた．分裂像の存在も特に多くはないが，認められた（Photo4）．過形成および腫瘍性病変の発現数をTable 2に示した．過形成は，それが見られたラット数（Table 2-B）で比較すると，各粉じん曝露群とも対照群と差がなかったが，総発現数（Table 2-B）は，$CaCrO_4$濃度に比例して増加する傾向を示し，Cr-H群ではとくに多く見られた．ラット1匹当りに見られた過形成の平均発現数は，対照群1，Cr-L群1.5，Cr-M群1.8，Cr-H群3.1個で，$CaCrO_4$濃度に比例して多発する傾向を示した．腫瘍性病変の発現数は，ラット数（Table 2-B）で示すと，各群20例中，対照群2，Cr-L群4，Cr-M群2，Cr-H群8例で，濃度に比例した発現は見られなかったが，Cr-H群では対照群に比べ有意に多かった．総発現数（Table 2-B）で比較した場合も同様で，Cr-H群で特に多く発現していた．腫瘍性病変のラット1匹当りの平均発現数は，対照，Cr-L, M群とも各1個であったが，Cr-H群では約2個と複数の発現が見られた．

過形成と腫瘍性病変を合わせ増殖性病変として，ラット1匹当りでの発現数（Table 2-B）を見ると，対照群では1個であったが，Cr-L，M群では，2個を有するものが，各々3例，6例と増加し，Cr-H群では最高5個を有するものまで見られ，$CaCrO_4$濃度の増加に伴いラット1匹当りでの増殖性病変が多発する傾向を示した．またこのうち腫瘍性病変を有するラットは複数の病変を有するラットに見られる傾向を示した．

本報で示した腫瘍性病変のうち，Tableには示さなかったが，特に細胞異型および構造異型の程度の強い，より悪性度の高い腫瘍性病変が，対照群に1例，Cr-H群に3例見られた（Photo 5，6）．Cr-H群では，そのうち1例が，その様な腫瘍を同時に2個有しており，合計4個の悪性度の高い腫瘍性病変が見られた．また対照群とCr-H群の各1例では，単発性であったが，Cr-H群の他の2例では，2個の悪性度の高い腫瘍を有したラットにさらに腫瘍性病変1個，過形成1個が見られた．

以上の病変と肉眼的に観察された結節との関係を見ると，各群で見られた結節のうち対照群では3／4個，Cr-L群4／5個，Cr-M群2／6個，Cr-H群15／22個が腫瘍性病変と，その他は過形成と一致していた．

途中死亡例について増殖性病変の発生を見ると，対照群とCr-M群では認められず，Cr-L群の6例中2例（曝露後82および96週目死亡例）に各々過形成が，またCr-H群の4例中1例（102週目死亡例）に過形成と腫瘍性

Table 2. Summary of Incidence of Hyperplastic and Neoplastic Lesions in Lung.

Group	Control	Cr-L	Cr-M	Cr-H
Number of rats	20	20	20	20
A) Gross finding				
Number of rats with nodules[a)]	4	5	4	10*
Total number of nodules	4	5	6	22
Number of nodules per rat				
1	4[b)]	5	2	4
2	0	0	2	3
3	0	0	0	1
4	0	0	0	1
5	0	0	0	1
B) Histological findings				
Number of rats with lesions				
Hyperplastic lesions	6(2)[c)]	6(1)	7(2)	6(2)
Neoplastic lesions	2(2)	4(4)	2(2)	8*(8)
Total	8	10	9	14
Total number of lesions				
Hyperplastic lesions	6(2)[d)]	9(1)	13(4)	19(8)
Neoplastic lesions	2(2)	4(4)	2(2)	15(14)
Total	8	13	15	34
Number of lesions per rat				
1	8[b)](2)[e)]	7(1)	3(1)	3(1)
2	0	3(3)	6(1)	7(3)
3	0	0	0	1(1)
4	0	0	0	1(1)
5	0	0	0	2(2)

a) : White, discoid nodule, 1-5mm in diameter.
b) : Number of rats.
c) : Number of rats with nodules observed in gross finding
d) : Number of lesions observed in gross finding as nodules.
e) : Number of rats with neoplastic lesions.
* : $p<0.05$ (Fisher exact test)
Calcium chromate concentration : Cr-L2%,Cr-M5%, Cr-H20%

Tabl 3. Histopathological Findigs of Lesions besides Hyperplastic and Neoplastic Lesions in Lung

Group	Control	Cr-L	Cr-M	Cr-H
Number of rats	20	20	20	20
Perivascular cell aggregation	3[a)]	3	3	6
Focal hemorrhage	1	1	5	3
Alveolar proteinosis	0	11	20	20
Focal fibrosis of alveolar	0	17	16	20
Mononuclear cell leukemic infiltration	0	2	1	0
Focal calcification of artery wall	19	16	17	17
Hyperplasia of epithelium of respiratory bronchiole	3	7	7	8

a) : Number of rats with lesion

Table 4. Severity of Alveolar proteinosis and Focal Fibrosis in Lung

Group		Control	Cr-M	Cr-M	Cr-H
Alveolar proteinosis	NO[a)]	20[b)]	9	0	0
	SL	0	10	18	12
	MO	0	1	2	8
Focal fibrosis	NO	20	3	4	0
	SL	0	14	12	18
	MO	0	3	4	2

a) Grades of lesions. NO : None, SL : Slight, MO : Moderate change
b) Number of rats

病変が各々1個認められた．途中死亡例における増殖性病変の発現に$CaCrO_4$濃度との関係は認められなかった．

増殖性病変以外の病変をTable 3に示した．これらのうち粉じん曝露群にのみ見られた変化は，肺胞タンパク症（Alveolar proteinosis）と局所性の線維化（Focal fibrosis）であった（Phto7, 8）．前者は肺胞内にエオジン淡染または好染性の微細顆粒状のタンパク様物質が蓄積している変化であり，後者は，肺胞内に腫大，変性した大食細胞が存在し，その部分の肺胞壁で，上皮細胞の軽度の腫大，増生及び線維の増生が見られる変化であった．これらの病変の程度と$CaCrO_4$濃度との関係を見ると，Table 4に示すように肺胞タンパク症は濃度に比例した発現数や程度の増加が認められた．局所性の線維化は各群で程度に差がなく$CaCrO_4$との関係は認められなかった．同様に気管支末端部での上皮細胞の増生が対照群に比べ粉じん曝露群で多く見られたが，$CaCrO_4$との関係は明かでなかった．

気管および鼻腔についても観察を行ったが，特に変化は見られなかった．

考　察

クロム酸カルシウムと関東ロームの混合粉体を環境モデルとして想定し，ラットを用いた1 mg／m^3の濃度で，昼夜連続，104週間の吸入曝露実験を行った．増殖性病変として肺胞／細気管支領域での過形成および腫瘍が対照群と粉じん曝露群で見られた．腫瘍は，$CaCrO_4$高濃度群で有意に多く見られた．腫瘍の発現には，$CaCrO_4$濃度との関係は見られなかったが，増殖性病変（過形成および腫瘍）の発現は$CaCrO_4$濃度の増加に伴い個体により多発化する傾向を示した．

本実験では$CaCrO_4$は関東ローム粉体と混合して用いた．実験群の結果増殖性病変の発現における関東ロームの影響について考えると，各群の粉体中に存在する関東ロームの割合は各々98，95，80％であったが，チャンバー内粉じん濃度の変動巾が設定濃度に対して±10％であるため，ほぼ同濃度と考えられ，各群における関東ロームの影響の程度は大差ないものと思われる．このことから，本実験での腫瘍および過形成の発現は$CaCrO_4$によるものと考えられた。

$CaCrO_4$の腫瘍発生作用は，胸腔，筋肉及び気管内への局所的な投与[10-13]や吸入実験[14]によって報告されている．そのうち吸入実験例は，マウスによるもので，13mg／m^3の濃度の間欠曝露によって，肺の線腫，線癌の発生が報告されている．本報で見られた腫瘍の多くは良性のものであったが，$CaCrO_4$高濃度群でより悪性度の高い腫瘍が発生しており，本実験での腫瘍の発生における$CaCrO_4$の作用がより強く示唆される．また本実験では，他の報告に比べて，低濃度での$CaCrO_4$で腫瘍が発生している．PayneとHueper[11,15,16]は種々のクロム化合物を用いた実験から，クロムによる腫瘍の発生に必要な因子として，クロム化合物の中等度の溶解性と，脂肪などを媒介物としてクロムが組織に長期間接触することをあげている．$CaCrO_4$は，やや難溶性であり，また昼夜連続の曝露によってクロムがつねに肺組織に接触している状態がつくられ，低濃度で腫瘍が発生したと思われる．さらに関東ロームと混合したことも一つの要因と考えられる．関東ローム粉体のみによる増殖性病変の発現については，今回は観察していないが，前実験[5]では対照に比べ高い割合で発現されたことから，本実験での$CaCrO_4$の腫瘍の発生には，関東ロームと混合し，粉じん量を増すことにより，増殖性病変の発現頻度が増したことが，腫瘍発生の素地になったものと思われる．

本実験では増殖性病変に加えて，肺胞タンパク症，局所性線維化，気管支末端部での上皮の増生などが$CaCrO_4$あるいは粉じんの曝露によって生じた．体重の変動などが見られないことから，104週間の曝露期間におけるこれらの病変の生体への影響は少ないものと考えられ

る．長期間の実験での非特異的な慢性的病変として考える必要がある．

労働環境を反映した間欠曝露実験と異なり，日常生活環境を反映した種々の粉じんの吸入実験は，低濃度で長期間，連続的に行う必要がある．本実験で日常生活において吸入する機会の多い関東ロームと低濃度のクロム化合物を併用することによって，腫瘍の発生が観察されたことは，複数の粉じんを同時に，長期間吸入することの危険性が示唆されたものと考えられる．

文　献

1）坂本義光，神谷信行，伊川三枝子，池田虎雄，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，142-148，1977

2）坂本義光，神谷信行，池田虎雄，平賀興吾：東京衛研年報，31-2，33-42，1980

3）坂本義光，神谷信行，池田虎雄，平賀興吾：東京衛研年報，31-2，43-50，1980

4）坂本義光，神谷信行，池田虎雄，平賀興吾：東京衛研年報，32-2，77-84，1980

5）坂本義光，神谷信行，池田虎雄，平賀興吾：東京衛研年報，33，518-526，1982

6）Coleman, G. L., Stephan, w. B., Osbaldiston, G. W., Foster, S. J. and Jonas, A. M.：*J. Gerontology*, 32, 258-278, 1977

7）Boorman, G. A.：Bronchiolar／Alveolar Hyperplasia Lung, Rat, In Jona, T. C., Mohr, U. and Hunt, R.（eds.），*Respiratoly System*, 177-179, 1985, Springer-Verlag

8）安達修一：産業医学，29，17-33，1987

9）坂本義光，調　武久，平賀興吾：東京衛研年報，28-2，135-141，1977

10）Hueper, W. C. and Payne, W. W.：*Am. Industr. Hyg. Assoc. J.*, 20, 274-280, 1959

11）Hueper, W. C. and Payne, W.W.：*Arch Environ Health*, 5, 445-462, 1962

12）Roe, F. J. and Carter, R. L.：*Br. J. Cancer*, 23, 172-176, 1969

13）Laskin, S., Kuschner, M. and Drew, R. T.：Studies in Pulmonary Carcinogenesis., *In* Hanna, M. G., Nettesheim, P. and Gilbelt, J. R.（eds）*Inhalation Carcinogenesis*, 321, 1970, AEC Symposium Series 18, Oak Ridge

14）Nettesheim, P., Hanna, M. G., Doherty, D. G., Newell, R. F. and Hellman, A.：*J. Natl. Canc. Inst.*, 47, 1129-1144, 1971

15）Payne, W. W.：*Arch Indust. Health*, 21, 530-534, 1960

16）Payne, W. W.：*Arch Environ Health*, 1，20-26, 1960

Explanation of plates

Photo 1．Hyperplastic lesion in the rat of Cr-H group. H & H, ×100

Photo 2．Hygher magnification of photo 1．H & E, ×400

Photo 3．Neoplastic lesion in the rat of Cr-H group. H & E, ×40

Photo 4．Higher magnification of photo 3. H & E, ×200

Photo 5．Neoplastic lesion with higher malignancy in the rat of Cr-H group. H & E, ×40

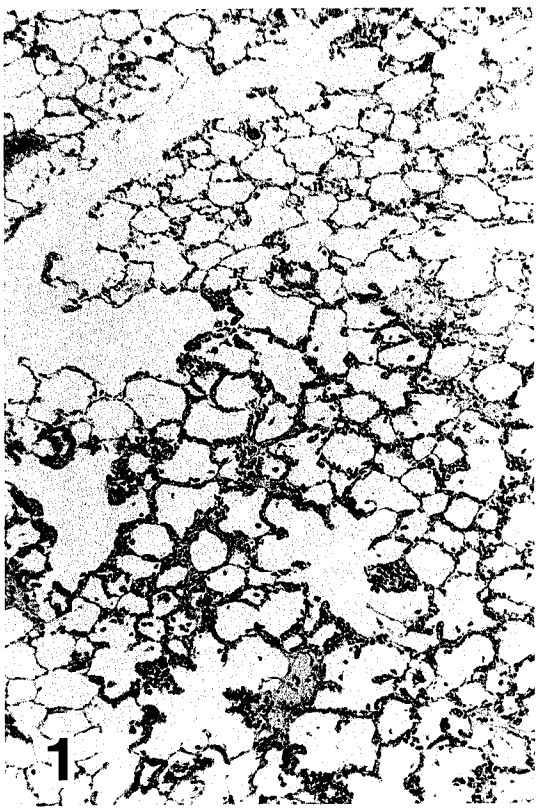
Photo 6．Higher magnification of photo 5. H & E, ×200

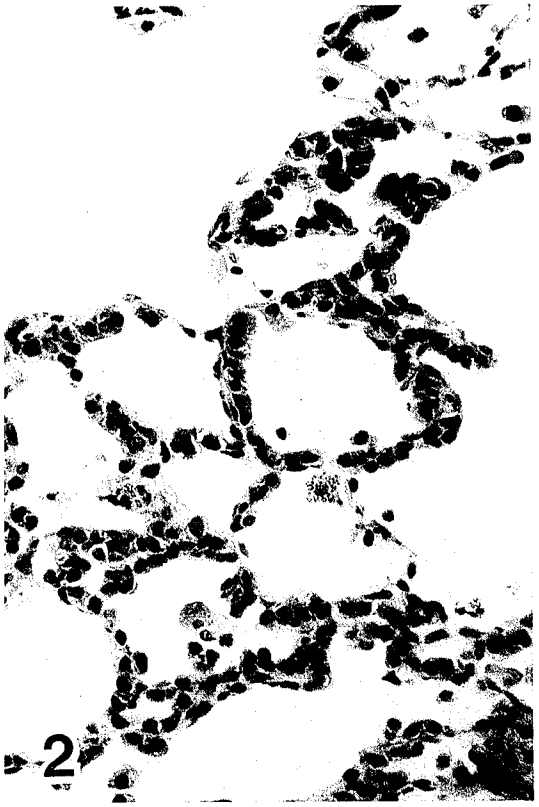
Photo 7．Alveolar proteinosis in the rat of Cr-H group. H & E, ×100

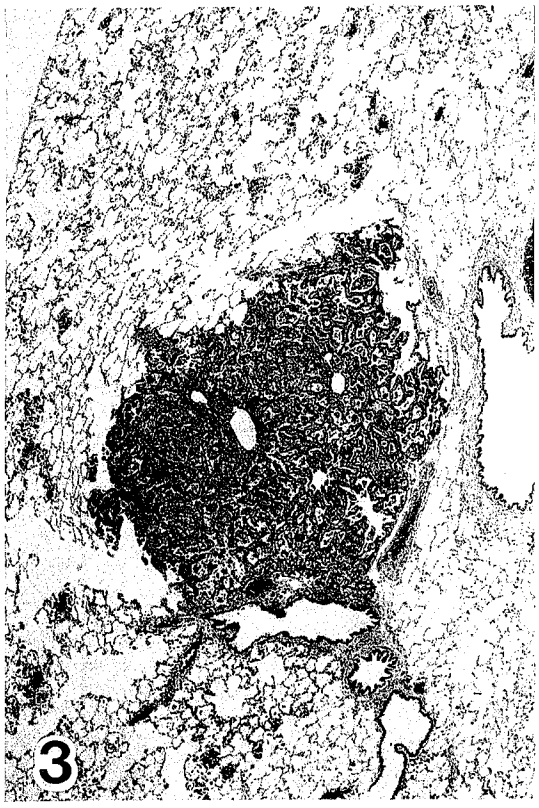
Photo 8．Focal fibrosis in the rat of Cr-L group. H & E, ×100

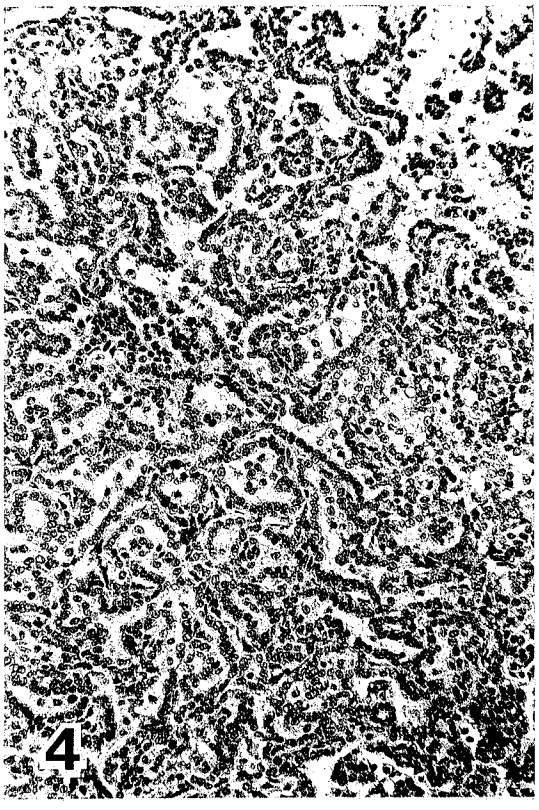
Cr-H group：Calcium chromate 20% in Kanto loam dust.

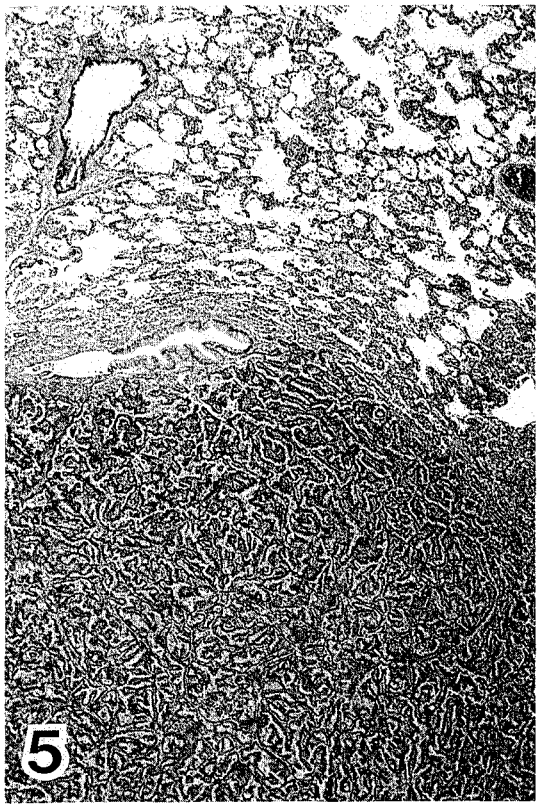
Cr-L group：Calcium chromate 2% in Kanto loam dust

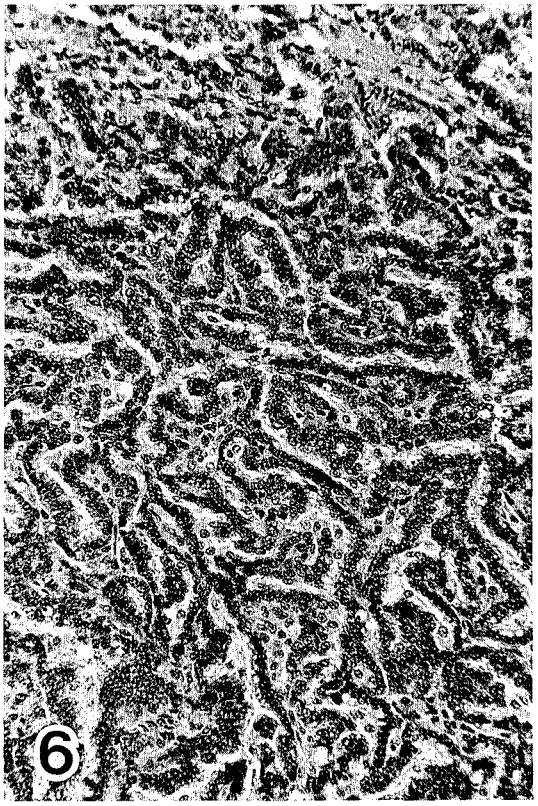

1

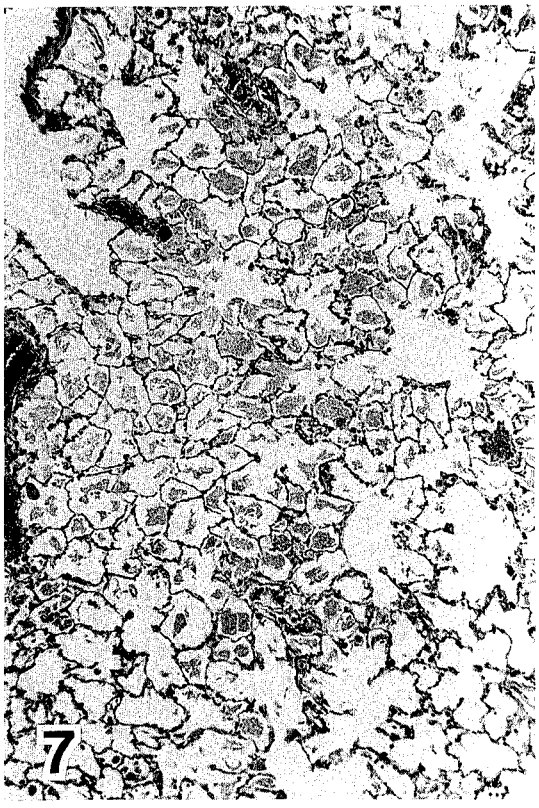

2

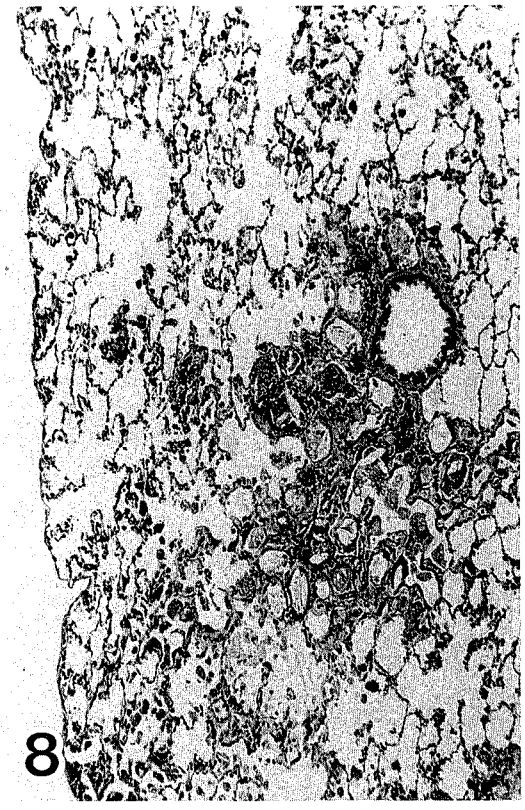

3


4


5


6


7


8

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **38**, 423-430, 1987

Salmonella typhimurium TA 97, TA 102 を用いた食品添加物の変異原性試験(第2報)

藤田　博*, 佐々木　美枝子*

Mutagenicty Test of Food Additives with *Salmonella typhimurium* TA 97 and TA 102(II)

HIROSHI FUJITA* and MIEKO SASAKI*

Mutagenicity of 29 food additives including 8 dietary supplements, 13 flavoring agents, 5 bleaching agents and 3 oxidizing agents were examined in Ames' new tester strains, *Salmonella typhimurium* TA 97 and TA 102. The mutation test was carried out by the preincubation procedure described by Ames et al. The test chemicals were preincubated with S9mix or phosphate buffer (pH 7.4) for 20 min. Potassium bromate showed weak mutagenic activity in TA97 with S9. The other 28 chemicals were not mutagenic in the new tester strains.

Keywords: mutagenicity, food additives, dietary supplements, flavoring agents. bleaching agents, oxidizing agents, *Salmonella typhimurium* TA 97, *Salmonella typhimurium* TA 102

化学物質の変異原性試験には，Amesらにより開発された *Salmonella typhimurium* TA 株[1~3]が広く利用されている．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[4]および過酸化物にも反応するTA 102[5,6]を発表し，TA 98およびTA 100にこれらの新しい株を加えた4株を試験に用いることを提案している[3]．

食品添加物の変異原性試験は，主にTA 98およびTA 100が用いられてきた．一方，新しい株は，TA 98およびTA 100では検出できない変異原性を検出することができる[4~6]．そこで，TA 98およびTA 100において変異原性が陰性であった食品添加物を含めた全食品添加物についてTA 97およびTA 102を用いて再検討を始めた．前報[7,8]までに25種の試験を行ったところ6種の食品添加物に非常に弱いが，TA 97またはTA 102に対する変異原性が見いだされた．本報告では，強化剤（8種），着香料（13種），殺菌・漂白剤（5種）および小麦粉改良剤（3種），計29種の食品添加物について試験を行った結果について述べる．

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．強化剤：炭酸カルシウム（Lot No. LAF 2535），塩化カルシウム（Lot No. DCG 7053），グリセロリン酸カルシウム（Lot No. EPF 6692），グルコン酸カルシウム（Lot No. DCK 1443），リン酸水素カルシウム（Lot No. LAL 2832），パントテン酸カルシウム（Lot No. LAK 1537），ジベンゾイルチアミン（Lot No. CDQ 7057），ビタミンP（Lot No. LAN 0542），着香料：アセトフェノン（Lot No. LAH 9748），イソチオシアン酸アリル（Lot No. DCN 2173），α-アミルシンナムアルデヒド（Lot No. EPN 5340），アニスアルデヒド（Lot No. LAG 4452），アセト酢酸エチル（Lot No. DCG 7065），ヘプタン酸エチル（Lot No. TLQ 7213），イソ吉草酸エチル（Lot No. ARO 1，東京化成），エチルバニリン（Lot No. TLQ 7214），ヘキサン酸（Lot No. LAJ 5626），イソ吉草酸イソアミル（Lot No. DCR 0678），イソオイゲノール（Lot No. DCK 4747），アントラニル酸メチル（Lot No. DCK 4823），γ-ウンデカラクトン（Lot No. EPF 7170），殺菌料：次亜塩素酸ナトリウム溶液（Lot No. TLR 3250），漂白剤：ピロ亜硫酸カリウム（Lot No. WER 3395），亜塩素酸ナトリウム（Lot No. KWF 5950），亜硫酸ナトリウム（Lot No. KIN 2331），次亜硫酸ナトリウム（Lot No. TLR 1407），小麦粉改良剤：過硫酸アンモニウム（Lot No. LAJ 7092），過酸化ベンゾイル（Lot

*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

No. DCE 2342), 臭素酸カリウム (Lot No. CDF 2729).

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, 溶解性によって蒸留水 (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.

菌株 *Salmonella typhimurium* TA 97[4] および TA 102[5,6] 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 (カリフォルニア大) 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ベーション法[3,9]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[3,9] 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, 代謝活性化する場合には S9 mix 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* を加え, さらに一夜培養した菌液を0.1m*l* 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] 2m*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[10] を行い, さらに Moore ら[11] のプログラムにより回帰分析を行った.

結果および考察

29種の食品添加物の TA 97 および TA 102 を用いた変異原性試験の結果を Table 1 に用途別に分類し示した. 10 mg/プレートを最高濃度として予備試験を行い, 致死が認められた場合または化合物が析出した場合には, それらが認められない濃度まで希釈し, 5 濃度段階で試験を行った.

臭素酸カリウムは, TA 97 +S9 において復帰コロニー数が有意に増加した. 増加量は, 10mg/プレートでもコントロールの復帰コロニー数の1.8倍 (0.03復帰コロニー/nmole) とわずかであるが, 容量相関があり, 再現性もあることから, 弱い変異原性があると判断した. その他の28種の化合物については, 復帰コロニー数に増加が認められなかったことから, TA 97 および TA 102 に対する変異原性は陰性と考えられる.

本報告で取り上げた食品添加物に関する変異原性については, 臭素酸カリウム, 次亜塩素酸ナトリウムおよび亜塩素酸ナトリウムに TA 100 +S9 および染色体異常試験陽性の報告がある[12,13]. 臭素酸カリウムは, TA 97 において変異原性が陽性となり結果が一致したが, 次亜塩素酸ナトリウムおよび亜塩素酸ナトリウムについては, TA 97 および TA 102 に対する変異原性は検出できなかった. これは菌株の変異原に対する感受性が異なるためであると考えられる. ただし亜塩素酸ナトリウムについては, TA 100 に対する変異原性は非常に弱いものであり, 生菌あたりの突然変異率を求めることにより変異原性を確認している[12]. 従って, さらに詳細な試験を実施することにより, TA 97 または TA 102 においても変異原性が検出されるかも知れない.

前報[7,8] までに試験が終わった食品添加物を加えると54種類になる. TA 97 または TA 102 において変異原性陽性となった化合物は, 7 種類であるが, いずれも弱い変異原性であった. その内, 染色体異常試験において陽性である化合物は, 4 種であり, 残り 3 種は, 染色体異常試験陰性である. 一方 TA 株では陰性であるが, 染色体異常試験で陽性の化合物は, 2 種類であった. このように両試験方法の結果が一致しない化合物が見られ, 一致しない原因の解明をしなければならないが, 食品添加物の変異原性を正確に評価するために, 一種でも多くの試験方法で調べることは必要である. 今後とも新しい TA 株を用いた食品添加物の検索は続けたい.

食品添加物の利用状況を考えると, 複数の添加物を同時に摂取しているのが実状である. 何等かの相互作用が起こる可能性は否定できない. われわれは, かび防止剤のオルトフェニルフェノールとチアベンダゾールについて, それぞれ単独では TA 98 に対する変異原性は陰性であるが, 両者を混合したとき変異原性が現われることを見いだした[14]. 現在使用されている食品添加物342種のあらゆる組合せを試験することは不可能にしても, 2 種以上の化合物を同時に混合した試験の実施も検討しなければならない. さらに, 天然添加物も近年多用されていることから, 変異原性試験を実施する予定である.

要　旨

29種の食品添加物について Ames の試験株 TA 97, TA 102 を用いて変異原性試験を行った. その結果, 臭素酸カリウムで復帰コロニーが増加した. 増加量がわずかであることから弱い変異原性である. 他の28種の食品添加物には, 変異原性は見られなかった.

文　献

1) McCann. J., Spingarn, N. E., Kobori, J. and Ames, B. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 979-983, 1975

2) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E.: *Mutation*

Table 1. Results of Mutation Test with Food Additives

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants			
			TA97		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Dietary supplements						
Calcium Carbonate	DW	1	146	181	279	382
		0.5	144	200	289	387
		0.1	135	185	279	431
		0.05	151	197	293	403
		0.01	128	193	307	443
		0	136	202	305	394
		PC[a)]	245	2,582	5,075	1,497
Calcium Chloride	DW	10	140	173	168	287
		5	141	170	230	340
		1	132	206	291	376
		0.5	140	213	286	424
		0.1	149	225	313	437
		0	146	212	325	447
		PC	205	2,292	4,930	1,428
Calcium Glycerophosphate	DW	10	154	175	266	361
		5	144	209	276	368
		1	156	227	291	435
		0.5	143	225	327	448
		0.1	157	235	319	443
		0	152	227	323	473
		PC	234	2,755	5,119	1,755
Calcium Gluconate	DW	10	161	189	—	—
		5	163	230	251	417
		1	142	230	279	391
		0.5	157	237	338	412
		0.1	157	233	299	441
		0	153	217	300	437
		PC	370	2,422	4,176	1,037
Calcium Hydrogenphosphate	DW	10	176	224	279	467
		5	160	229	295	424
		1	145	230	318	536
		0.5	182	242	349	503
		0.1	166	240	405	460
		0	155	239	400	517
		PC	222	2,219	4,045	1,131
Calcium Pantothenate	DW	10	150	195	198	274
		5	141	225	251	269
		1	161	223	266	406
		0.5	147	229	288	397
		0.1	149	246	281	431
		0	163	248	293	436
		PC	235	2,480	4,350	1,233

continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants			
			TA97		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Dibenzoyl Thiamine	DMSO	1	129	223	225	434
		0.5	139	199	269	432
		0.1	135	216	302	466
		0.05	129	206	319	387
		0.01	129	208	318	433
		0	143	209	308	468
		PC	363	2,813	4,104	964
Vitamin P	DMSO	1	134	182	243	460
		0.5	126	191	285	460
		0.1	108	194	248	488
		0.05	137	185	276	415
		0.01	122	193	276	422
		0	126	197	270	403
		PC	227	2,799	4,568	1,182
Flavoring agents						
Acetophenone	DMSO	1	140	222	244	447
		0.5	140	220	304	445
		0.1	147	241	297	508
		0.05	144	228	310	503
		0.01	138	244	315	457
		0	133	249	302	434
		PC	297	1,682	5,162	652
Allyl Isothiocyanate	DMSO	0.1	136	192	155	393
		0.05	152	207	202	443
		0.01	138	227	285	431
		0.005	136	219	285	434
		0.001	132	236	295	420
		0	127	217	291	419
		PC	256	2,378	3,350	1,399
α-Amyl Cinnamaldehyde	DMSO	1	71	95	5	335
		0.5	88	126	81	427
		0.01	111	201	99	487
		0.005	116	210	122	504
		0.001	144	214	241	475
		0	160	214	284	462
		PC	412	2,799	4,640	812
Anisaldehyde	DMSO	1	150	219	297	502
		0.5	138	246	301	441
		0.1	151	212	319	455
		0.05	177	248	342	421
		0.01	157	223	348	447
		0	160	236	364	413
		PC	420	1,450	4,510	820

continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants			
			TA97		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Ethyl Acetoacetate	DMSO	10	138	181	182	520
		5	137	226	316	539
		1	149	199	346	469
		0.5	148	238	342	493
		0.1	142	224	345	460
		0	139	251	338	420
		PC	231	2,102	4,974	1,573
Ethyl Heptanoate	DMSO	1	0	142	0	272
		0.5	0	197	0	450
		0.1	111	220	115	459
		0.05	137	247	262	479
		0.01	137	232	264	487
		0	136	254	290	481
		PC	264	2,813	4,408	1,262
Ethyl Isovalerate	DMSO	1	111	185	129	461
		0.5	138	217	241	489
		0.1	142	213	309	465
		0.05	143	215	324	442
		0.01	155	211	326	461
		0	142	210	294	427
		PC	280	3,089	4,191	1,740
Ethyl Vanillin	DMSO	1	126	192	218	443
		0.5	130	190	251	438
		0.1	124	203	267	427
		0.05	153	213	284	381
		0.01	133	220	293	417
		0	141	201	288	374
		PC	306	3,017	3,988	1,515
Hexanoic Acid	DMSO	1	1	192	1	433
		0.5	91	196	86	441
		0.1	138	177	287	440
		0.05	136	194	343	443
		0.01	136	211	348	470
		0	131	222	322	442
		PC	230	1,305	4,568	640
Isoamyl Isovalerate	DMSO	1	41	155	89	273
		0.5	55	168	35	405
		0.1	103	227	167	443
		0.05	109	223	219	469
		0.01	156	233	287	453
		0	149	223	261	484
		PC	506	1,863	4,494	1,595

continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants			
			TA97		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Isoeugenol	DMSO	0.5	82	179	28	387
		0.1	140	196	264	505
		0.05	154	215	324	504
		0.01	147	229	326	509
		0.005	152	214	279	463
		0	156	243	286	439
		PC	420	1,863	3,345	1,682
Methyl Anthranilate	DMSO	1	111	165	170	324
		0.5	136	168	266	366
		0.1	169	196	317	435
		0.05	150	217	333	440
		0.01	140	205	370	518
		0	140	220	372	501
		PC	440	1,486	5,264	677
γ-Undecalactone	DMSO	0.1	83	180	15	414
		0.05	105	185	213	384
		0.01	130	188	266	421
		0.005	138	198	283	405
		0.001	139	207	281	419
		0	144	191	276	417
		PC	294	1,740	4,176	619
Breaching agents						
Sodium Hypochlorite Solution	DW	1[b)]	125	238	282	494
		0.5	177	236	353	479
		0.1	163	232	340	482
		0.05	160	220	349	475
		0.01	171	247	370	490
		0	175	239	375	472
		PC	420	1,494	4,524	624
Potassium Pyrosulfite	DW	10	124	180	244	324
		5	126	159	288	358
		1	128	165	319	432
		0.5	122	179	302	431
		0.1	141	201	337	490
		0	143	208	341	475
		PC	340	2,639	4,495	1,044
Sodium Chlorite	DW	0.1	156	255	265	349
		0.05	171	245	245	387
		0.01	140	219	283	430
		0.005	145	239	311	424
		0.001	150	241	318	452
		0	164	249	318	429
		PC	284	2,103	4,307	906

continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants			
			TA97		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Sodium Hydrosulfite	DW	10	121	155	294	342
		5	118	159	307	394
		1	121	156	314	429
		0.5	127	195	350	466
		0.1	150	209	366	485
		0	139	239	334	520
		PC	228	1,842	4,742	686
Sodium Sulfite	DW	10	86	185	195	213
		5	112	165	253	280
		1	128	183	290	432
		0.5	135	208	311	457
		0.1	161	235	328	490
		0	155	211	330	469
		PC	213	2,074	3,799	754
Flour bleaching and oxidizing agents						
Ammonium Persulfate	DW	10	33	173	194	411
		5	134	204	270	511
		1	146	190	270	445
		0.5	166	221	332	473
		0.1	164	193	342	495
		0	151	218	331	502
		PC	326	3,045	3,988	1,530
Benzoyl Peroxide	DW	0.1	61	197	39	451
		0.05	46	208	92	424
		0.01	145	196	173	434
		0.005	143	192	301	423
		0.001	140	181	294	424
		0	133	199	275	439
		PC	226	3,089	3,915	935
Potassium Bromate	DW	10	225	355[c)]	256	460
		5	193	297	264	477
		1	150	239	258	430
		0.5	154	225	297	441
		0.1	159	206	293	404
		0	154	202	301	437
		PC	246	1,624	4,118	892

a) Positive control, TA97 ; -S9 : 9-AA 20 μg, +S9 ; 2-AA 5 μg, TA102 : -S9 ; MMC 0.5 μg, +S9 ; 2-AA 5 μg
b) μl/plate
c) Statisticaly significant difference by Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$) and dose-related incleasing by regression analysis ($P < 0.01$)

Res., 31, 347-364, 1975
3) Maron, D. M. and Ames, B. N.：*Mutation Res.*, 113, 173-215, 1983
4) Levin, D. E., Yamasaki, E. and Ames, B. N.：*Mutation Res.*, 94, 315-330, 1982
5) Levin, D. E., Hollstein, M. and Ames, B. N.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7445-7449, 1982
6) Levin, D. E., Marnett, L. J. and Ames, B. N.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 4457-4461, 1984
7) 藤田　博，小嶋昭江，佐々木美枝子，平賀興吾：東京衛研年報，36，413-417，1985
8) 藤田　博，佐々木美枝子：東京衛研年報，37，447-452，1986
9) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，20，1178-1189，1975
10) 石居　進：生物統計学入門，133-137，1975，培風館
11) Moore, D. and Felton, J. S.：*Mutation Res.*, 119, 95-102, 1983
12) 石館　基，祖父尼俊雄，吉川邦衛：変異原と毒性，4(5)，10-19，1981
13) 石館　基：染色体異常試験データ集，1983，リアライズ社
14) 藤田　博，平賀興吾：東京衛研年報，31-2，29-32，1980

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 431-437, 1987

SPF ウサギ KBL：JW に関する基礎生理学研究(第Ⅱ報)
体重増加，摂餌量，血液学および血清生化学データー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 Porameters of the SPF Rabbit(KBL:JW)(II)
Body Weight Gain, Food Intake and Blood Components in one year 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

毒性試験を行うには実験動物の外的および内的環境が実験結果に大きく影響を与えるものと考えられる．このために動物飼育室は，温湿度，空調，給餌，給水などの飼育条件の恒常化や，騒音，細菌汚染の防御など，外的環境が厳しくチェックされなければならず，また動物側からは，遺伝的要因を一定にするための純系動物や，細菌感染症による影響を除外するためのSPF（Specifc Pathogen free）動物の使用が当然要求されて来る．そのうちのウサギは実験動物として現在でも多く用いられているにもかかわらず，ラット，マウスなどの小動物に比べてSPF化が遅れていたが，最近になって近交系ウサギがSPF化され，供給が簡単に行われる様になってきた．しかしながら，その長期間飼育における基礎生理学的データは殆んどない．従って本ウサギの長期間飼育による基礎生理学データーについて蓄積することは，当部においてウサギを用いた毒性試験の基礎資料として必要なばかりでなく，系統間による比較生物学的にも意義あるものと考える．今回は前年に引き続き当部動物飼育室の飼育環境条件での，体重増加，摂餌量，血液学および血清化学検査について1年間の基礎生理学的データーを集積したので報告する．

使用動物ならびに方法

動物：SPF ウサギ KBL：JW，雌雄各5羽を生後7週間で北山ラベス㈱より購入した．

KBL：JW ウサギはクローズドコロニーとして日本白色ウサギから帝王切開によって無菌的に仔を取り出し，人工哺乳によってSPF化されたもので，*Pasteurella multocida*, *Bordetelle bronchiseptica*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pulmonis*, HVJ, Rabbit pox, *Eimeria spp.*, Ear canken, Body Mange, のう虫が保有されていないウサギである．

動物は同一飼育室において限定された実験者によって飼育管理を実施した．飼育の環境条件は，温度21±2℃湿度50±5％，換気は毎時10回（HEPA フイルタ経由清浄空気），照明時間は午前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（W35×D50×H50cm）に動物を個別に入れてベルト式自動飼育機に配置し飼育している．

飼料はオリエンタル酵母㈱製 ORC-4 固形飼料を与え，飲水は自動給水装置により細菌ろ過器を経由させた水道水を自由摂取させた．ベルト式自動飼育機は6時間毎に3分間自動洗浄させ，ケージ交換は2週間に1回行った．

方法：体重測定は搬入時から半年間は毎日．以後は1週間に2回，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．また摂餌量の測定は搬入時から2か月間は週に2回，3か月から6か月までは週に1回，以後は4週間に1回，300g の固型飼料を動物に与え，翌日その残量を測定，300g から残量を引いた値を1日あたりの摂餌量とした．採血は初めの2か月間は毎週，3か月からは月に1回，耳静脈より1.5m*l* の血液をテルモシリンジ（2 m*l*）で採

*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 Poblic Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
**同薬理研究科

取し，直ちに3000rpm 10分間遠心して血清分離を行い血清生化学検査用のサンプルとした．血清はアナライザーによって分析を行うまで−80°C ディープフリーザーに凍結保存した．血液学検査用血液は，耳静脈より血清生化学検査用の血液を採血した後に，湧出する血液を50 μl のピペットで採血し，アイトソンⅡ液10ml に直ちに混入して希釈したサンプルを Coulter Counter model S（Coulter Electric Co.）を用いて，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．また血清生化学検査は Automatic Analyzer 705（日立）により行い，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），アルカリフオスフアターゼ（ALP），総コレステロール量（CHO），尿素窒素（UN），総蛋白量（TP），アルブミン量（ALB），グルコース量（GLU）およびA／G比について測定した．

結果および考察

一般観察：動物は良好な健康状態で搬入し，飼育室および給餌，給水など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，口，皮膚，爪，生殖器および排泄器などにも異常や外傷は見られなかった．切爪は1～2か月に1度行った．毎日の観察中において，咳，鼻汁，眼脂，下痢などの異常もまったく見られなかった．また食欲も旺盛であった．

体重：搬入時（7週令）の体重は雄1.50±0.04（1.40～1.60）kg，雌1.53±0.01（1.49～1.56）kg であったが1年後の体重はそれぞれ雄3.79±0.23（3.01～4.35）kg，雌5.20±0.24（4.72～5.80）kg となった．雌雄の個体別体重変化を図1，2に，平均体重を図3に示した．各個体とも順調な体重の増加を示した．雄では17週目まではほぼ直線的な増加が，それ以後は体重増加が少なく横ばいになるが，雌では28週目まで体重の伸びが見られ，10週目から雌の平均体重は雄のそれを上まわった．

雌雄ウサギの個体別体重変化に関しては，雄では初期（15週まで）の体重の伸びが60週まで影響し，個体差となって現われており，最高体重と最低体重では1kg以上のひらきがみられたが飼育途中で体重増加が著しく抑制された個体はなく，体重増加率の個体間のばらつきはすくなかった（図1）．雌では，全体としては体重の個体差は雄より少なく，特に飼育初期（15週まで）には全個体の体重はほぼ一致していた．15～20週より体重増加のおちた個体（図2，△）と，40週より体重減少の見られた個体（図2，○）があらわれ，60週目には，最高体重と最低体重で雄と同じく1kg近い差が生じた．前述したように，体重は雌ウサギの方が個別，平均ともに大であり，体重増加率（飼育開始時の体重を100とした）も，雄233.8±12.6kg，雌308.6±18.8kg と，雌の方が高くなった．

一般に実験動物の体重は雌よりも雄で高いのが普通であるが，SPF ウサギについて本実験でみられた雌雄の体重差が何に由来するものかは調査中である．

摂餌量：個体別および雌雄別の摂餌量を図4～6に示した．餌の摂餌量は搬入時（7週令）では，雄118.2g／day（体重あたり摂餌量72.0g／kg／day），雌116.4g／day（体重あたり摂餌量68.5g／kg／day）となり，体重あたりの摂餌量は8～9週令で雄73.5g／kg／day，雌74.8g／kg／dayと最大になり，以後少なくなっている．これは飼育環境になれた事と成長時期とが関係しているものと思われる．

雌ウサギの方が餌の摂餌量は多く，雌雄群別の図表でもわかる様に差があきらかであった．これは雌雄の体重の差に原因があると思われるが，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．

血液学的検査：経時的に採血して行った血液学検査成績を表1～2に示した．初期では雌雄ともに成長に従って白血球数（WBC）がわずかに減少する傾向が見られるが変化はわずかであり，週令を追って検討して見るとほとんど変化がなかった．その他の検査成績は多少バラ付きは見られるが週令差や異常値などは見られなかった．

また，雌雄差もほとんど見られなかった．

血清生化学検査：検査成績を表3～4に示した．GPT値は週令が進むにつれてわずかではあるが雌雄ともに増加する傾向が見られ，また雌の測定値は GOT, GPT 値ともに雄にくらべて常に高目の値を示している．第Ⅰ報で ALP 値の異常に高いことを報告したが，これは測定方法の違いによるものであることが判明した．本実験で用いているベッセイ・ローリー法による ALP 値は100～280IU／l がヒト血清での正常値であるがウサギ血清ではこれより高値を示し，また週令とともに減少する傾向が見られている．その他の検査成績については，測定値，雌雄差，個体間差いずれも顕著な値は見られなかった．

実験用ウサギは，今までの長い間，一般的な家ウサギとして飼われていたウサギが使用されていたが，近年になって，近交系ウサギが SPF 化され，遺伝的制御，微生物学的制御が行われる様になって来た．最近になって

いくつかの系統が確立され，世界で数十系統が維持されている．

KBL：JW 系ウサギは1972年，平沢らによって SPF 化が成功し，現在試験機関への供給が行われている．当部でもこれからのウサギを用いた実験を行うための当部での飼育環境下における基礎生理学検査のバックデーターとしたい．

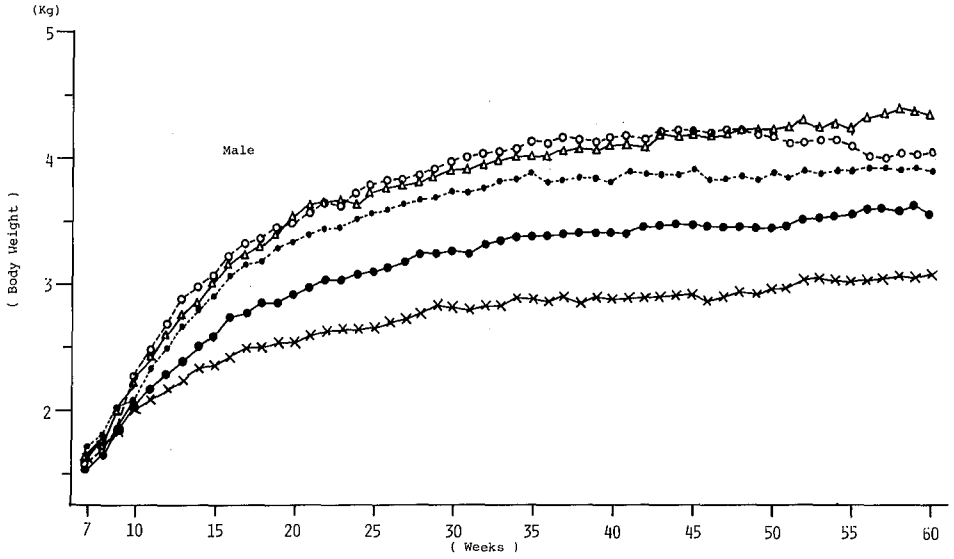


図1．雄の個体別体重
●—●：No. 1，×—×：No. 2，▲—▲：No. 3
○—○：No. 4，●—●：No. 5 の動物を表わす

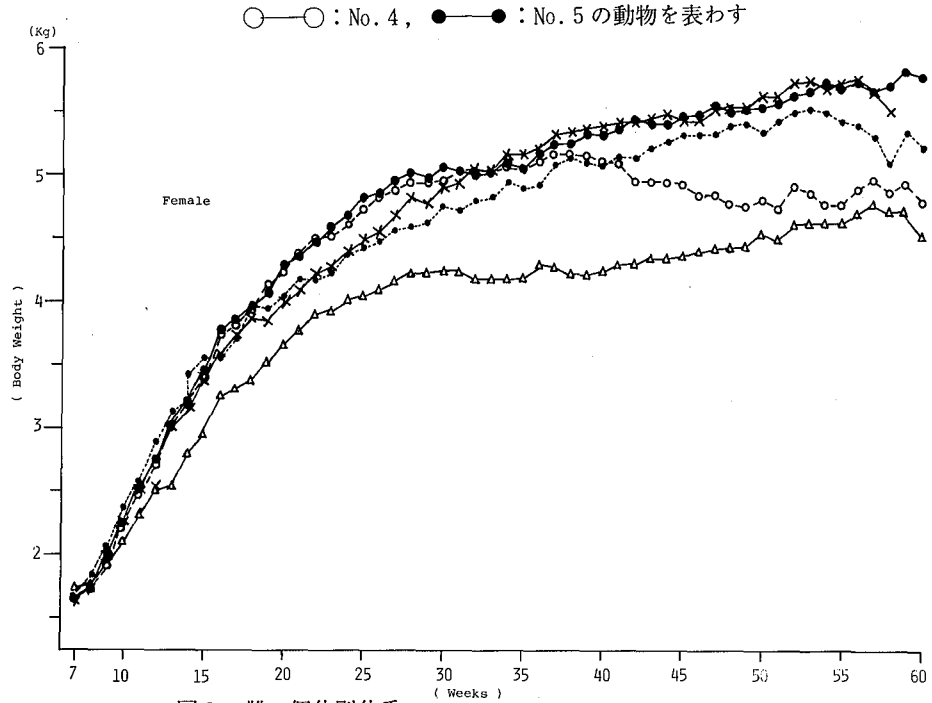


図2．雌の個体別体重
●—●：No. 1，×—×：No. 2，△—△：No. 3
○—○：No. 4，●—●：No. 5 の動物を表わす

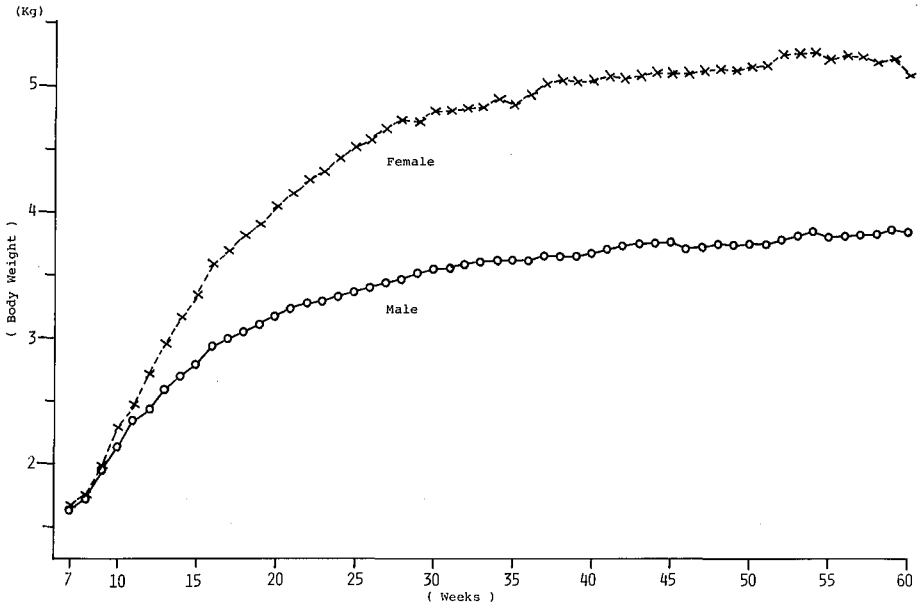


図3．雌雄各5匹平均体重

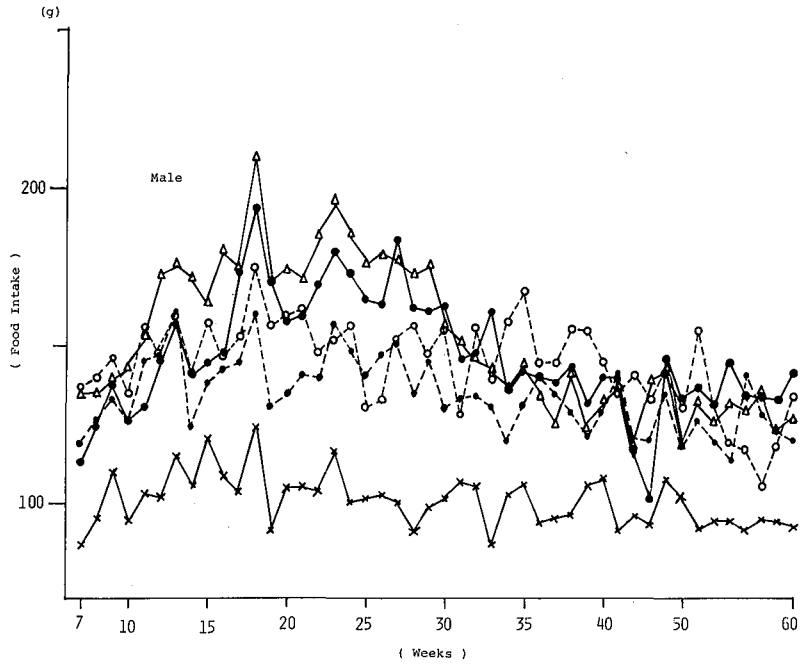


図4．雄の個体別摂餌量

●——●：No. 1，×——×：No. 2，△——△：No. 3
○——○：No. 4，●——●：No. 5の動物を表わす

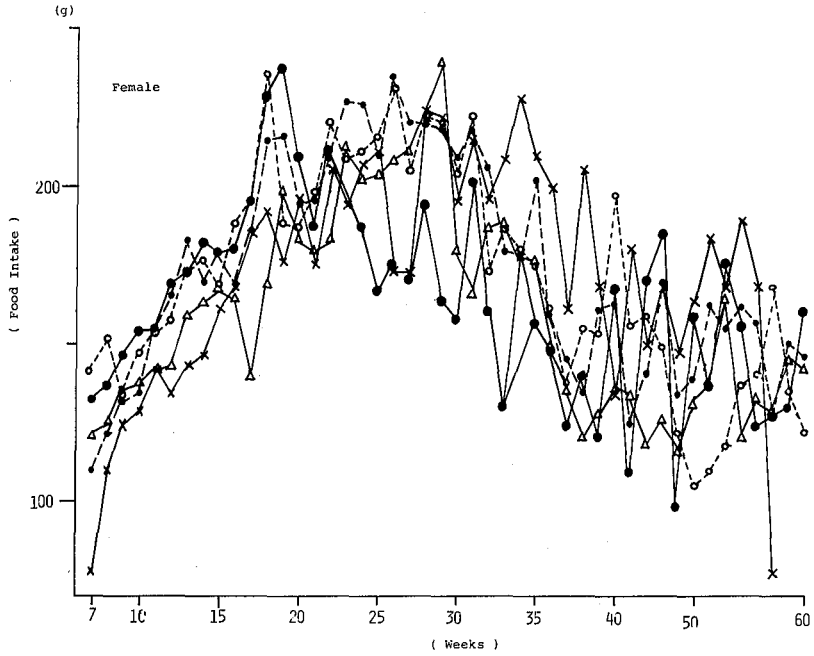


図5．雌の個体別摂餌量
●—●：No.1，×—×：No.2，△—△：No.3
○—○：No.4，●—●：No.5の動物を表わす

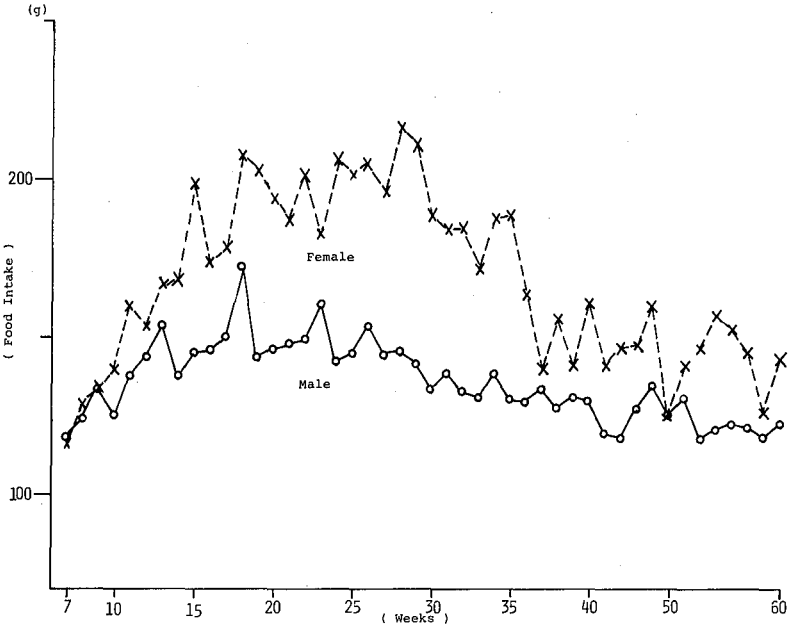


図6．雌雄各5匹平均摂餌量

表1．雄の血液学検査成積表

Week	WBC (10^3/mm)	RBC (10^6/mm)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (μ^3)	MCH ($\mu\mu$g)	MCHC (%)
7[1)]	6.56±0.69[2)]	5.99±0.16	12.58±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	14.60±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±0.26	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	30.36±0.15
11	5.56±0.76	6.56±0.16	14.10±0.34	41.06±0.78	57.6±0.60	19.10±0.26	30.56±0.23
12	6.04±0.56	6.38±0.12	13.94±0.27	39.56±0.71	57.4±0.75	19.40±0.32	31.26±0.24
13	6.44±0.74	6.07±0.11	13.52±0.38	37.60±1.12	56.6±1.03	19.78±0.26	31.98±0.21
14	5.54±0.57	6.13±0.13	13.90±0.13	37.90±0.32	56.8±0.73	20.10±0.41	32.54±0.33
15	5.96±0.66	6.35±0.09	14.14±0.33	39.38±0.97	57.2±0.80	19.74±0.30	31.96±0.17
17	6.06±0.66	5.88±0.14	14.10±0.28	36.78±0.85	57.4±0.68	21.32±0.55	34.22±0.58
19	5.75±1.04	5.83±0.24	14.33±0.66	35.36±2.42	56.8±0.75	22.35±0.46	36.20±0.98
21	7.24±0.52	5.28±0.06	14.52±0.35	32.46±0.81	56.0±0.84	24.24±0.35	39.72±0.18
23	6.06±0.68	4.26±0.23	13.60±0.69	29.06±1.78	57.8±0.86	26.26±0.95	41.92±1.53
27	6.08±0.67	6.74±0.15	15.04±0.46	43.50±0.85	59.8±0.73	19.78±0.27	30.76±0.36
31	5.48±0.24	6.62±0.19	14.68±0.40	43.40±1.15	61.0±1.10	19.74±0.27	30.08±0.56
35	6.26±0.48	6.04±0.17	14.54±0.34	38.16±1.14	55.4±0.93	20.48±0.21	33.88±0.56
39	5.78±0.57	6.91±0.15	15.12±0.49	45.42±1.45	58.8±0.80	19.38±0.24	29.58±0.15
44	5.74±0.47	6.74±0.16	14.06±0.55	44.04±1.16	58.0±0.95	18.50±0.53	28.42±0.89
48	5.98±0.73	6.79±0.45	14.58±1.00	43.23±3.06	57.0±1.05	19.06±0.45	30.00±0.27

1)：生後週令
2)：5匹平均± SE

表2．雌の血液学検査成績表

Week	WBC (10^3/mm)	RBC (10^6/mm)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (μ^3)	MCH ($\mu\mu$g)	MCHC (%)
7[1)]	7.52±0.54[2)]	6.19±0.07	12.52±0.10	37.94±0.31	56.4±0.68	18.02±0.18	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±0.23	12.84±0.42	37.48±1.12	56.4±0.51	18.48±0.22	30.44±0.10
11	6.54±0.35	5.91±0.14	12.68±0.24	36.52±0.56	56.8±0.66	19.02±0.17	30.86±0.19
12	6.70±0.68	6.00±0.24	12.72±0.43	36.82±1.50	56.4±0.75	18.82±0.21	30.70±0.14
13	6.73±0.79	5.76±0.09	12.58±0.46	35.28±0.99	56.3±1.31	19.40±0.50	31.95±0.16
14	5.92±0.72	5.93±0.18	12.86±0.38	35.96±1.03	55.6±1.12	19.22±0.28	31.76±0.29
15	5.68±0.26	6.38±0.26	13.46±0.47	38.84±1.16	56.6±1.33	18.82±0.51	30.88±0.25
17	6.28±0.76	6.25±0.24	14.12±0.42	37.90±1.12	56.0±1.14	20.08±0.57	33.16±0.27
19	5.40±0.21	5.80±0.08	13.58±0.33	34.16±1.41	55.4±0.75	21.46±0.28	35.60±0.87
21	7.73±0.49	5.40±0.12	14.20±0.31	32.60±0.83	55.5±0.65	23.25±0.10	38.65±0.33
23	4.86±0.56	4.59±0.17	13.94±0.24	30.72±0.79	57.6±0.68	25.48±0.47	40.48±1.05
27	6.26±0.19	6.32±0.15	13.94±0.38	41.02±0.97	58.2±1.07	18.98±0.38	30.22±0.15
31	7.28±0.70	6.38±0.10	13.80±0.17	40.68±0.51	59.2±0.58	19.24±0.17	30.20±0.08
35	5.60±0.53	5.88±0.39	13.28±0.78	35.38±2.16	53.0±1.05	19.38±0.44	33.48±0.12
39	5.10±0.90	7.02±0.42	14.20±0.31	43.34±0.78	55.8±2.48	18.22±1.04	29.16±0.42
44	5.66±0.43	6.82±0.36	13.96±0.57	42.06±1.39	56.8±0.37	18.28±0.75	29.48±0.36
48	5.58±0.41	6.08±0.46	13.92±0.50	41.60±1.39	55.4±2.38	18.56±0.50	30.00±0.50

1)：生後週令
2)：5匹平均± SE

表3．雄の血清生化学検査成績表

Week	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	ALP (IU/l)	CHO (mg/dl)	UN (mg/dl)	TP (g/dl)	ALB (g/dl)	GLU (mg/dl)	A/G
7[1]	16.4±2.27[2]	17.6±1.69	506.4±53.97	43.0±2.47	18.70±1.67	5.16±0.38	2.38±0.16	141.6±27.75	0.85±0.03
8	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	117.4±3.08	0.85±0.02
9	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	129.0±5.30	0.86±0.01
10	20.0±4.18	23.6±1.89	541.0±63.05	26.6±2.80	21.74±0.96	6.24±0.61	2.60±0.11	135.4±4.80	0.90±0.01
11	28.0±1.38	25.0±1.92	479.4±55.57	21.6±1.60	21.50±0.45	5.12±0.19	2.40±0.11	132.8±8.71	0.88±0.02
12	17.6±2.29	23.6±2.98	465.8±84.91	20.2±2.91	19.72±0.99	5.28±0.14	2.48±0.06	129.0±2.68	0.88±0.02
13	16.4±1.36	23.4±2.44	454.6±63.55	20.0±2.37	20.86±0.98	5.36±0.10	2.44±0.07	142.6±15.53	0.83±0.03
14	16.0±2.67	21.4±2.94	418.2±58.33	19.4±2.16	21.92±1.10	5.30±0.18	2.44±0.08	125.4±5.48	0.85±0.02
15	11.8±0.97	22.8±1.53	366.6±41.54	20.8±2.31	20.64±0.58	5.36±0.17	2.50±0.08	134.4±3.97	0.87±0.02
17	8.6±3.17	19.2±3.46	301.2±45.50	22.2±2.35	21.80±0.23	5.54±0.25	2.50±0.13	130.0±7.81	0.82±0.04
19	4.6±1.17	19.3±1.32	273.3±51.16	22.3±1.65	25.35±0.71	5.73±0.11	2.58±0.03	162.0±12.46	0.82±0.04
21	12.3±2.63	27.8±3.33	199.3±37.76	19.8±2.29	20.48±3.63	5.10±0.50	2.33±0.22	140.3±9.22	0.84±0.04
23	12.2±3.83	26.2±3.60	161.6±18.72	19.2±1.66	23.96±1.93	5.66±0.15	2.54±0.08	147.2±8.11	0.81±0.02
27	10.4±1.03	26.4±3.36	124.8±16.08	19.6±1.40	22.52±0.97	5.56±0.23	2.58±0.12	151.0±6.29	0.87±0.03
31	10.0±3.05	25.2±3.69	54.4±16.90	17.4±1.57	22.78±1.61	5.40±0.15	2.46±0.11	138.0±11.65	0.83±0.03
35	14.2±2.40	27.2±4.42	83.0±10.96	18.6±1.50	24.10±1.56	5.78±0.09	2.63±0.08	159.8±7.64	0.82±0.03
39	8.4±1.57	28.2±4.22	78.8±5.77	20.8±3.77	22.40±0.52	5.76±0.10	2.50±0.07	176.2±5.27	0.76±0.03
44	6.8±1.24	28.2±3.92	75.8±17.31	21.4±3.86	22.42±0.48	5.82±0.11	2.56±0.08	179.6±8.63	0.78±0.03

1)：生後週令
2)：5匹平均± SE

表4．雌の血清生化学検査成績表

Week	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	ALP (IU/l)	CHO (mg/dl)	UN (mg/dl)	TP (g/dl)	ALB (g/dl)	GLU (mg/dl)	A/G
7[1]	18.2±1.43[2]	22.4±2.14	562.0±53.68	50.8±6.13	18.43±1.28	5.40±0.20	2.48±0.13	130.8±5.19	0.84±0.05
8	19.3±2.46	23.5±2.33	538.8±46.76	47.3±7.74	21.15±1.92	5.20±0.20	2.40±0.11	125.5±3.10	0.85±0.02
9	22.4±3.42	26.6±0.87	503.3±46.16	38.8±4.91	21.92±0.74	4.88±0.08	2.28±0.05	121.8±4.87	0.87±0.02
10	21.2±4.85	26.0±5.23	469.4±27.06	37.2±3.71	20.84±0.47	4.94±0.19	2.30±0.11	123.0±2.81	0.86±0.02
11	33.6±4.93	33.6±2.29	465.8±54.49	37.4±4.76	21.92±1.48	4.86±0.12	2.24±0.05	126.2±6.08	0.85±0.01
12	21.8±2.13	34.8±2.99	407.2±45.18	35.4±3.39	22.36±1.30	5.16±0.48	2.40±0.21	126.6±3.53	0.87±0.01
13	17.8±1.75	23.5±1.89	413.5±69.95	41.3±5.45	23.95±1.35	5.25±0.07	2.45±0.03	168.0±2.04	0.87±0.01
14	20.6±4.05	24.8±2.15	383.8±29.96	33.0±2.95	24.26±1.59	5.18±0.21	2.30±0.12	128.2±4.95	0.81±0.06
15	22.4±6.24	38.2±9.66	369.0±27.88	38.0±3.48	24.70±1.84	5.32±0.17	2.46±0.07	137.0±8.70	0.86±0.01
17	11.0±2.45	26.8±3.48	331.0±25.16	43.0±5.62	29.84±2.12	5.46±0.01	2.52±0.06	133.0±7.83	0.85±0.02
19	9.0±1.38	30.6±3.03	233.2±18.14	42.0±4.89	30.34±1.43	5.36±0.11	2.46±0.05	137.4±8.63	0.84±0.01
21	12.6±0.60	32.4±4.39	226.0±11.51	40.5±5.84	30.70±2.32	5.62±0.20	2.55±0.10	139.2±2.58	0.86±0.02
23	15.2±3.32	33.2±3.89	167.2±17.24	37.2±5.00	29.92±1.73	5.52±0.18	2.50±0.06	154.4±11.26	0.82±0.01
27	20.2±3.93	39.2±4.79	134.2±13.24	33.8±4.74	30.00±1.44	5.60±0.15	2.78±0.29	150.8±8.96	0.85±0.03
31	12.2±2.35	36.6±6.71	79.0±15.90	34.4±4.89	28.60±1.93	5.30±0.15	2.36±0.05	152.6±4.34	0.80±0.01
35	16.4±3.97	39.2±6.33	88.8±4.04	34.6±3.23	27.32±1.83	5.68±0.06	2.52±0.02	166.2±10.81	0.80±0.02
39	18.0±6.78	36.0±6.78	72.9±5.15	27.2±3.37	27.28±1.33	5.86±0.14	2.52±0.05	181.0±19.87	0.75±0.02
44	14.8±3.87	37.0±7.27	65.2±8.35	25.8±3.94	27.70±2.31	5.78±0.13	2.48±0.05	174.8±10.38	0.75±0.01

1)：生後週令
2)：5匹平均± SE

文　献

1）田島嘉雄：実験動物学総論　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

2）田島嘉雄：実験動物学各論　第3版P71-91, 昭和48年　朝倉書店　東京

3）平沢和男，竹入修二：実験動物技術　第16版　2号　P103-109, 1981

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 38, 438-444, 1987

都衛研毒性試験システムII

神谷信行*, 中川好男**, 三栗谷久敏*,
市川久次**, 佐々木美枝子*

Computer System used for Toxicological Study at Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

NOBUYUKI KAMIYA*, YOSHIO NAKAGAWA**, HISATOSHI MIKURIYA*,
HISATUGU ICHIKAWA** and MIEKO SASAKI*

Keywords：毒性試験 toxicity test, コンピューターシステム computer system, LAN.

緒　言

毒性試験は，食品添加物や医薬品等が生体にどのような影響を与えるかを検討することを目的としている．試験の実施に際しては，多数のラットやマウスなどを用い，被爆物質は3-15濃度段階，期間は1カ月から3年におよぶものである．このような毒性試験においては，それぞれの動物から全期間にわたる体重測定値，摂餌量，摂水量，解剖時の臓器重量測定値や胎盤，胎仔重量測定値，また血液検査，血清生化学検査などの各種検査測定値，そして解剖所見，病理組織所見，奇形の種類や発生数など膨大な情報が得られ，これらの情報を集積，保存しなければならない．そして蓄積されたデータの統計解析や報告書作成を高い信頼性を以て迅速に処理するにはコンピュータシステムが必要不可決である．

当毒性部においては1973年にHIMECS-001（日立）を導入，各種測定機器をオンラインで接続した都衛研毒性試験システムを開発[1]これまでに多くの毒性試験に活用してきた．しかし，このシステムは既に使用開始後相当の年月が経過し，現状の毒性試験にあわなくなってきていること，催奇形性試験や病理試験に対応していないこと，プログラムが固定化され簡単に改良できないこと，インタフェースが特殊なため端末の増設が簡単にできないことなどいくつかの問題をかかえていた．そこで新しい毒性試験システム（都衛研毒性試験システムII）を開発することとし，1983年よりパーソナルコンピュータ（SEIKO 7500）を用いたシュミレーション[2]を開始，1986年より新システムの開発にとりかかり現在までにいくつかのプログラムが作成でき，一応システムとして稼動するようになった．本システムは一般毒性試験，催奇形性試験，病理試験の3基本システムからなるが，現在開発，改良を続行中のため本報では一般毒性試験および催奇形性試験のシステムについて報告する．

システムの概要

1．システムの構成

本システムにおける機器構成を図1に示した．コンピュータはPC-9801UV2（10台），VM2（2台），F2（1台）（日本電気）で構成され，ホストコンピュータにはPC-9801UV2に40MBのハードディスク装置を接続したものを用い，ハードディスク上のデータをバックアップするために40MBの磁気テープ装置（MT）を設置した．

動物室，解剖室に設置されたコンピュータは動物の体重や臓器重量などを測定するために電子天秤と，自動分析室に設置されたものは自動分析装置 705 AUTOMATIC ANALYZER（日立）とそれぞれRS-232Cを介して結ばれている．また研究室に設置されたものはプリンタ，XYプロッタ（1台のみ）が接続され，これらのコンピュータは伝送速度IMB／秒のBRANCHI 4670（日本電気）を介してホストコンピュータと接続されLAN（ローカルエリアネットワーク）を構成している．

オペレーションシステム（OS）にはMS-DOS V3.1（マイクロソフト）を，ネットワーク用OSにはMS-

*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
**同毒性部薬理研究科

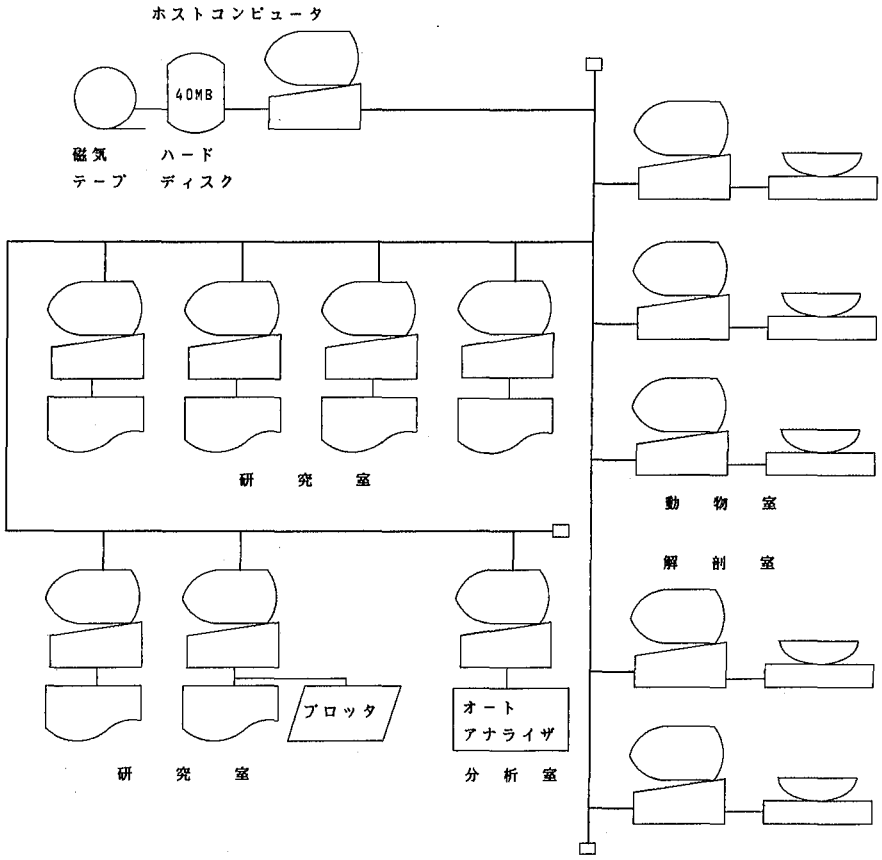


図1．システムの概要

NETWORKS（マイクロソフト）を用い，システム上のサーバーをホストコンピュータとした．プログラムの作成には N_{88}－日本語 BASIC（86）V4.0（日本電気）を使用した．

2．プログラムの構成

本システムにおけるプログラム構成を図2に示した．プログラムは一般毒性試験，催奇形性試験の各システムの下に試験管理，飼育室，解剖室，分析室および研究室の各プログラムが存在する．これらのプログラムは端末のフロッピーディスクから起動され，試験番号を入力することにより処理が開始される．天秤を使用する際には天秤の精度管理のための天秤チェックを行った後，それぞれの作業が行われる．入力，収集されたデータは一旦端末コンピュータのフロッピーディスクに蓄積され，所定の測定（入力）がすべて終了した後，フロッピーディスクにファイルされたデータがホストコンピュータに転送される．

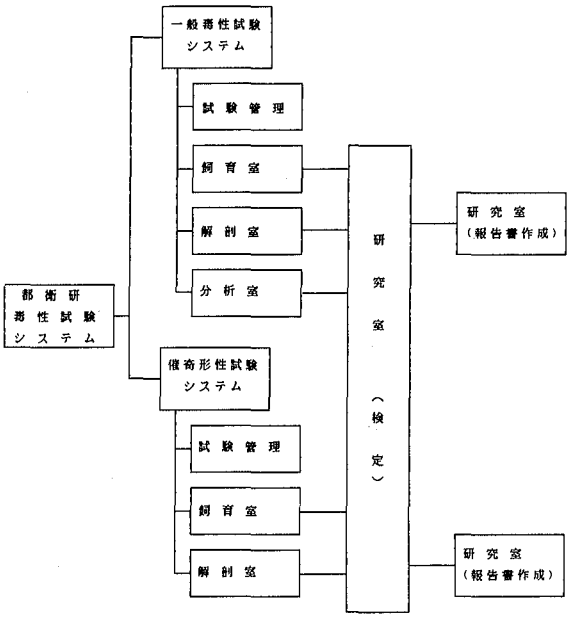


図2．プログラムの構成

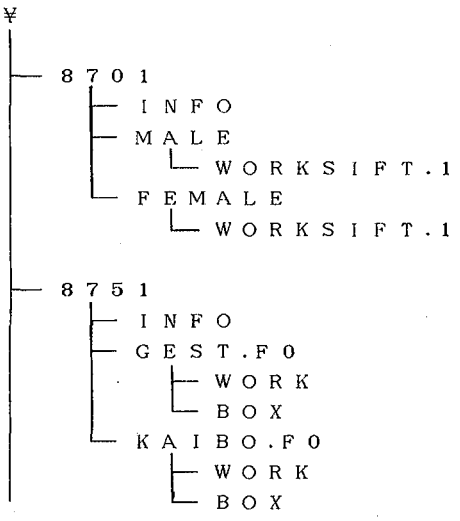


図3．ファイルの構成

3．データファイルの構成

データファイルの構成を図3に示した．一般毒性試験ではルートディレクトのもとに試験番号でサブディレクトリを作成し，その下にINFO，MALE，FEMALEの3つのサブディレクトリを作成し，INFOにはプロトコール，試験スケジュールのファイルを，MALE，FEMALEには飼育室，解剖室，分析室それぞれのデータのファイルを作成した．

なお，WORKSIFT.1には作業用の一時使用ファイルを作成した．

催奇形詩試験ではまず試験番号でサブディレクトリを作成し，その下にINFO，GEST.F0，KAIBO.F0の3つのサブディレクトリを作成し，GEST.F0，とKAIBO.F0のもとにサブディレクトリWORKとBOXを作成した．INFOには一般毒性試験と同様にプロトコールと試験スケジュールのファイルが，GEST.F0 Oには飼育室の，KAIBO.F0には解剖室のデータファイルがそれぞれBOXに作成される．WORKには作業用の一時使用ファイルが収集される．

4．システムの機能

実験動物の識別　一般毒性試験を行う場合，実験動物として主にマウスやラットが使用され，必要に応じて，イヌ，サルやウサギなども用いられる．特に小動物を多数使用する毒性試験では，同一飼育室において各動物へ作用する環境因子を平均化することを考慮しなくてはならない．そのために各動物を無作為（ランダム）に配置し，再現性，信頼性のある動物実験を行う必要がある．そこでランダムに配置された動物から体重測定や各種検査を行う際に，各動物の識別を確実にまた容易にするために，動物に連続番号SEQ. NO（Sequential number）を付し，各種データは原則としてSEQ. NOによって管理される．

このSEQ. NOは本システムの性格を決定する重要なものである．

試験管理　毒性試験を行う際のプロトコールを作成する．試験番号，試験名，被験物質名，群数，匹数，群名，担当者名等の試験情報，実施する各種検査項目の指定や体重測定日，交配日，解剖日，各種検査実施日等のスケジュールを入力し新しいファイルを作成する．また一般毒性試験では動物をラムダムに配置するための群分け処理も行う．

飼育室　体重，給餌・残餌・餌こぼし量，給水・残水量の測定を行う．天秤で測定されたデータはオンラインで端末コンピュータに転送される．また，死亡動物の登録，催奇形性試験における群分け処理も行う．

解剖室　臓器重量の測定を行う．また催奇形性試験での帝王切開時の胎仔，胎盤重量の測定および観察所見を入力する．

分析室　一般毒性試験の際の尿検査，血液検査，血清生化学検査，血液形態検査データを入力する．血清生化学検査データは自動分析装置で測定され，オンラインで端末コンピュータに入力され，その他の検査データは測定値をキーボードより入力する．

研究室　収集されたデータの統計演算，検定および報告書の出力を行う．これらのデータのうち数値データは平均値，分散，標準偏差等の統計値を計算した後，対照群に対する各濃度群の有意性を検定する．検定はまずBartlettの検定を行った後，等分散の時は一元配置分散分析を，非等分散の時はKruskal-Wallis H検定を行い，Dunnettの検定，Seffeの検定を行う．一方，類別数データについては順位和検定，累計χ2乗検定を行い，最終的に報告書に作成される．報告書（個別表，総括表，グラフ）の作成例を図4－図10に示した．

システムの効果と問題点

今回開発した毒性試験システムについていくつかの効果と問題点が明らかになった．

①コンピュータを導入した毒性試験システムでは，各実験者が何らかの形で端末装置に接するため簡単にそれらが使えなくてはならない．そこでパーソナルコンピュータ用ソフトウェアで多用されている対話形式を採用するとともにライトペン，マウスを採用し操作性の向上をはかった．

Appendix Absolute body weight (g) - male Test.No

8 day

NO	SEQ	CONTROL	SEQ	BA2.5	SEQ	PB2.4	SEQ	PB1.2	SEQ	PB0.6
1	1001	120	1011		1021	90	1031	126	1041	124
2	1002	123	1012	84	1022	87	1032	104	1042	112
3	1003	133	1013	76	1023	78	1033	119	1043	128
4	1004	129	1014	72	1024	87	1034	114	1044	124
5	1005	135	1015	82	1025	81	1035	126	1045	120
6	1006	123	1016		1026	96	1036	118	1046	113
7	1007	117	1017	86	1027	95	1037	112	1047	124
8	1008	131	1018	79	1028	92	1038	108	1048	115
9	1009	130	1019	77	1029	84	1039	105	1049	118
10	1010	113	1020	84	1030	80	1040	110	1050	126
N		10		8		10		10		10
M		125.4		80.0		87.0		114.2		120.4
V		53.44		23.14		39.31		62.88		32.04
SD		7.3		4.8 **		6.3 **		7.9		5.7
IS		100.0		63.8		69.4		91.1		96.0

図4．個別表出力例（一般毒性試験・体重）

Appendix Absolute Body weight changes of dams (P) Date : Test.no

Dose level : Unit : g

Dam ID-No.	Days of gestation																		
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
0301	27.7	26.0	26.8	27.7	28.0	28.8	29.6	30.5	31.1	31.7	32.9	34.9	37.4	38.9	41.3	43.9	47.2	51.2	55.7
0302	27.3	26.9	27.4	28.5	29.0	29.5	30.4	30.8	31.1	31.8	34.0	35.2	37.4	38.6	41.5	44.4	48.2	51.7	54.4
0303	24.7	26.5	26.8	27.2	28.0	28.7	29.4	30.8	31.2	32.0	33.9	34.7	37.0	39.1	40.4	43.6	48.2	50.3	54.5
0304	29.5	28.9	30.3	30.1	30.8	32.1	31.8	33.1	33.1	33.3	35.6	38.3	40.5	42.5	45.5	48.8	52.0	56.0	60.3
0305	27.7	28.0	28.4	29.8	29.5	30.9	30.8	31.4	32.0	33.3	34.4	36.7	38.8	40.7	43.4	47.0	49.9	53.0	56.4
0306	26.5	26.2	26.3	27.5	27.8	28.8	28.9	29.8	29.8	29.9	32.0	33.9	35.8	38.5	40.3	43.5	46.4	48.9	52.7
0307	31.7	30.8	31.4	32.1	32.1	32.7	33.3	35.2	35.1	36.1	37.5	40.3	42.4	44.5	47.7	51.9	56.3	60.3	58.3
0308	29.1	28.8	29.3	30.0	30.7	31.4	31.7	32.4	33.3	34.3	35.4	38.3	40.1	42.3	44.5	48.5	52.1	55.9	59.3
0309	28.7	28.3	28.1	28.7	29.3	29.4	30.2	31.2	31.9	32.8	35.7	38.6	40.7	43.8	47.0	51.9	55.7	60.9	65.9
0310	26.3	25.4	26.7	27.1	27.9	27.7	27.7	28.2	28.6	29.4	30.2	33.1	33.1	34.0	35.9	38.3	40.5	43.2	43.9
0311	30.5	29.9	29.7	30.6	30.9	31.4	32.7	33.2	33.8	34.7	36.4	39.2	41.9	44.4	46.7	50.4	54.5	58.6	61.1
0312	29.1	28.6	29.5	29.8	30.3	30.8	31.4	32.2	32.5	33.9	35.1	38.2	39.2	41.1	43.4	46.7	49.2	52.1	53.7
0313	28.1	28.1	28.5	29.2	30.0	30.4	31.6	32.3	32.7	33.3	34.9	37.3	39.0	41.3	43.6	45.9	50.4	54.3	57.0
0314	27.0	26.4	26.9	27.4	28.2	28.3	28.6	29.5	29.9	30.6	31.3	33.3	35.2	37.0	39.1	42.5	45.7	49.1	51.7
0315	25.9	25.9	26.9	27.3	27.7	28.6	29.8	30.0	31.1	31.8	34.2	36.1	38.6	41.3	43.4	46.9	51.0	54.6	57.5
0316	31.8	31.2	31.6	32.9	33.9	34.8	35.6	36.5	37.2	38.5	40.2	43.0	46.2	49.3	52.3	57.7	62.7	67.6	72.0
0317	30.6	29.9	30.7	31.5	31.3	31.7	32.5	31.9	32.5	33.4	34.3	37.0	39.3	41.1	43.6	47.6	50.8	54.6	57.8
0318	28.2	28.4	29.0	30.1	30.4	30.5	31.3	32.0	32.1	32.5	33.6	34.9	36.9	38.4	40.3	43.3	45.5	48.2	50.9
0319	27.4	26.7	27.7	28.4	29.2	30.0	30.7	31.3	32.1	33.8	34.7	37.9	39.8	42.0	45.0	48.8	52.6	55.2	58.9
0320	25.8	25.3	25.6	26.1	27.1	27.4	29.2	29.1	29.9	31.3	32.1	33.8	36.2	39.0	40.9	43.5	47.1	49.8	53.5
0321	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
0322	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
0323	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
0324	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
0325	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Number	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Mean	28.2	27.8	28.4	29.1	29.6	30.2	30.9	31.6	32.1	32.9	34.4	36.7	38.8	40.9	43.3	46.8	50.3	53.8	56.8
S.D.	± 2.0	± 1.8	± 1.8	± 1.8	± 1.7	± 1.8	± 1.8	± 2.0	± 1.9	± 2.1	± 2.2	± 2.6	± 2.9	± 3.3	± 3.6	± 4.3	± 4.8	± 5.4	± 5.8

図5．個別表出力例（催奇形性試験・体重）

Appendix --- male --- No. 1 - 2

GORUP=

Animl. No	WBC	RBC	Hgb	Mct	Mcv	MCH	MCHC
	x1000	x1000000	gm	%	μ3	μμg	%
9004	7.4	7.91	15.9	41.5	33	20.1	48.4
9009	6.7	8.87	16.8	45.1	40	18.9	42.0
9014	11.0	7.38	13.6	38.3	28	18.4	48.1
9015	5.8	9.70	18.4	49.8	48	19.0	38.1
9027	8.8	6.00	10.6	29.6	18	17.7	59.7
9028	6.6	8.83	16.8	46.0	41	19.0	41.4
9029	6.7	9.28	18.1	47.7	44	19.5	40.9
9030	9.1	9.49	17.1	48.0	46	18.0	37.5
9033	9.5	8.49	16.4	43.9	37	19.3	44.0
9034	9.0	9.85	19.0	52.1	51	19.3	37.0
Mean	8.1	8.58	16.3	44.2	39	18.9	43.7
S.D.	1.7	1.20	2.5	6.5	10	0.7	6.9
No.	10	10	10	10	10	10	10

図6．個別表出力例（一般毒性試験・血液検査）

Appendix Reproductive parameter Date : Test.no

Dose level :

No.	Number of Corpora	Number of Implant	RESORPTION: Implant sites (A)	(%)	No. of Early (B)	(%)	No. of (A)+(B)	(%)	No. of Late	(%)	TOTAL	(%)	LIVE: Sex ratio Male	Female	A(%)	No. of Live foetus	Body wt (g) Male	Body wt (g) Female	FOETAL: Placental wt (g) Male	Placental wt (g) Female	No. of External Malformation	(%)	No.of External Anomalies	(%)
0101	15	13	0	0.0	1	7.7	1	7.7	0	0.0	1	7.7	7	5	58.3	12	1.37	1.25	0.11	0.11	0	0.0	0	0.0
0102	15	12	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	5	7	41.7	12	1.31	1.26	0.09	0.09	0	0.0	0	0.0
0103	18	16	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	9	7	56.3	16	1.28	1.24	0.10	0.09	0	0.0	0	0.0
0104	17	16	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	6.3	1	6.3	9	6	60.0	15	1.35	1.32	0.10	0.08	0	0.0	0	0.0
0105	16	10	0	0.0	1	10.0	1	10.0	0	0.0	1	10.0	5	4	55.6	9	1.49	1.26	0.12	0.11	0	0.0	0	0.0
0106	17	14	0	0.0	1	7.1	1	7.1	0	0.0	1	7.1	6	7	46.2	13	1.39	1.30	0.09	0.08	0	0.0	0	0.0
0107	18	12	0	0.0	1	8.3	1	8.3	0	0.0	1	8.3	6	5	54.5	11	1.39	1.30	0.10	0.09	0	0.0	0	0.0
0108	15	13	0	0.0	1	7.7	1	7.7	0	0.0	1	7.7	2	10	16.7	12	1.35	1.36	0.10	0.11	0	0.0	0	0.0
0109	15	15	0	0.0	3	20.0	3	20.0	0	0.0	3	20.0	5	7	41.7	12	1.20	1.19	0.08	0.08	0	0.0	0	0.0
0110	22	16	0	0.0	1	6.3	1	6.3	0	0.0	1	6.3	10	5	66.7	15	1.11	1.10	0.09	0.09	0	0.0	0	0.0
0111	16	16	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	7	9	43.8	16	1.30	1.22	0.10	0.09	0	0.0	0	0.0
0112	14	12	0	0.0	1	8.3	1	8.3	0	0.0	1	8.3	4	7	36.4	11	1.51	1.49	0.10	0.10	0	0.0	0	0.0
0113	18	16	0	0.0	1	6.3	1	6.3	0	0.0	1	6.3	5	7	41.7	12	1.36	1.22	0.09	0.09	0	0.0	0	0.0
0114	17	14	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	8	6	57.1	14	1.28	1.18	0.10	0.09	0	0.0	0	0.0
0115	13	12	0	0.0	2	16.7	2	16.7	0	0.0	2	16.7	7	3	70.0	10	1.36	1.35	0.10	0.10	0	0.0	0	0.0
0116	16	16	0	0.0	0	0.0	0	0.0	3	18.8	3	18.8	7	6	53.8	13	1.39	1.29	0.11	0.10	0	0.0	0	0.0
0117	18	14	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	7	7	50.0	14	1.25	1.22	0.12	0.09	0	0.0	0	0.0
0118	15	14	0	0.0	3	21.4	3	21.4	0	0.0	3	21.4	5	6	45.5	11	1.39	1.29	0.10	0.10	0	0.0	0	0.0
0119	18	17	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	8	9	47.1	17	1.11	1.06	0.08	0.07	2	11.8	0	0.0
0120	14	11	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	4	7	36.4	11	1.38	1.36	0.09	0.09	0	0.0	0	0.0
Num	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
T	327	279	0		16		16		4		20		126	130		256	26.6	25.3	1.97	1.85	2		0	
Mean	16.4	14.0	·	·	0.8	6.0	0.8	6.0	0.2	1.3	1.0	7.2	6.3	6.5	49.0	12.8	1.33	1.26	0.10	0.09	0.1	0.6	·	·
S.D.	2.0	2.0	·	·		6.9		6.9		4.3		7.1			12.0	2.2	0.10	0.10	0.01	0.01		2.6	·	·

図7．個別表出力例（催奇形性試験・胎仔観察所見）

Table Absolute body weight (g) - male Test.No

Day	Group 1 CONTROL	Group 2 BA2.5	Group 3 PB2.4	Group 4 PB1.2	Group 5 PB0.6	Group 6 PB2.4 +BA2.5	Group 7 PB1.2 +BA2.5
0	91.8± 4.7(10)	94.0± 3.3(10)	93.1± 5.6(10)	94.3± 6.0(10)	94.2± 5.6(10)	93.3± 4.8(10)	90.5± 4.5(10)
1	96.4± 5.4(10)	89.7± 3.9(10)*	83.9± 5.0(10)**	90.3± 5.7(10)*	96.9± 4.9(10)	83.2± 4.1(10)**	86.5± 5.0(10)**
2	100.3± 5.5(10)	85.5± 2.8(10)**	80.1± 4.4(10)**	90.5± 5.7(10)**	98.2± 5.8(10)	79.5± 4.8(10)**	84.8± 4.7(10)**
3	104.5± 5.4(10)	83.3± 3.1(10)**	79.1± 4.8(10)**	94.1± 6.3(10)**	102.8± 5.3(10)	77.9± 4.9(10)**	86.2± 4.6(10)**
4	108.1± 5.6(10)	80.5± 4.5(10)**	78.8± 4.7(10)**	97.7± 6.6(10)**	105.3± 5.5(10)	76.2± 4.6(10)**	88.6± 4.8(10)**
8	125.4± 7.3(10)	80.0± 4.8(8)**	87.0± 6.3(10)**	114.2± 7.9(10)	120.4± 5.7(10)	81.4± 5.2(10)**	102.0± 6.6(10)**
11	135.5± 7.2(10)	79.7± 9.3(6)**	93.9± 6.3(10)**	124.2± 9.3(10)	129.8± 6.2(10)	82.3± 9.6(10)**	111.8± 7.5(10)**
15	154.3± 8.7(10)	79.8±15.3(4)**	103.6± 7.4(10)**	138.2±11.5(10)	144.6± 7.5(10)	88.3± 9.5(10)**	123.7±10.5(10)**
18	166.1±10.5(10)	74.8±19.0(4)**	109.2± 8.1(10)**	146.6±12.9(10)	153.4± 8.4(10)	91.1±13.1(10)**	132.2±12.2(10)**
22	181.1±11.5(10)	70.0±24.4(3)**	115.8± 8.7(10)**	157.6±14.4(10)	164.3±10.0(10)	93.8±14.4(10)**	143.7±15.8(10)**
25	191.0±13.4(10)	91.0± (1)	121.5± 9.2(10)**	164.6±14.5(10)*	172.4±11.0(10)	97.2±15.5(10)**	151.4±18.6(10)**
29	203.0±13.2(10)	92.0± (1)	127.2± 9.9(10)*	173.2±16.3(10)	181.2±12.6(10)	99.0±18.1(10)**	157.3±22.0(10)
32	211.2±13.7(10)	92.0± (1)	131.8±10.1(10)*	178.5±18.0(10)	188.2±14.7(10)	99.4±19.2(10)**	163.0±24.3(10)
36	221.9±13.4(10)	89.0± (1)	135.6±10.8(10)*	187.7±21.0(10)	197.4±15.9(10)	101.9±20.7(10)**	169.3±27.1(10)

Mean± S.D.
Number of animals in parentheses

図8．総括表出力例（一般毒性試験・体重）

Table Absolute organ weight (Treatment period) --- female --- (EXAM.NO 1) TEST.NO PAGE 1

Animl. No	Weight	Liver	Heart	L-Kidney	R-Kidney	Spleen	Lung	L-Ovray	R-Ovray	L-Adrenal	R-Adrenal
	g	g	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
Group 1	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Olive oil	28.2	2.66	129.3	220.8	228.7	114.8	172.3	8.9	9.6	3.7	3.4
(25)	1.6	0.26	14.5	18.2	17.6	29.0	9.4	2.0	2.5	0.5	0.6
Group 2	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
PB-L	28.3	2.83	128.6	218.6	226.9	118.3	174.5	9.5	9.2	3.1	2.8
(25)	2.3	0.28	17.9	26.6	29.0	27.8	15.4	2.3	2.3	0.6	0.4
										*	*
Group 3	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
PB-M	28.2	3.22	133.0	225.0	238.4	128.6	176.9	8.7	10.6	3.5	3.2
(25)	2.0	0.32	9.6	25.5	23.1	27.5	13.6	1.9	2.2	0.7	0.8
		**									
Group 4	20	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
PB-H	28.2	3.77	131.8	239.5	246.6	143.7	184.0	8.8	10.9	3.7	3.3
(25)	2.8	0.52	16.6	25.5	30.9	33.0	15.6	1.5	2.5	0.5	0.6
		**				*					

図9．総括表出力例（一般毒性試験，催奇形性試験・臓器重量）

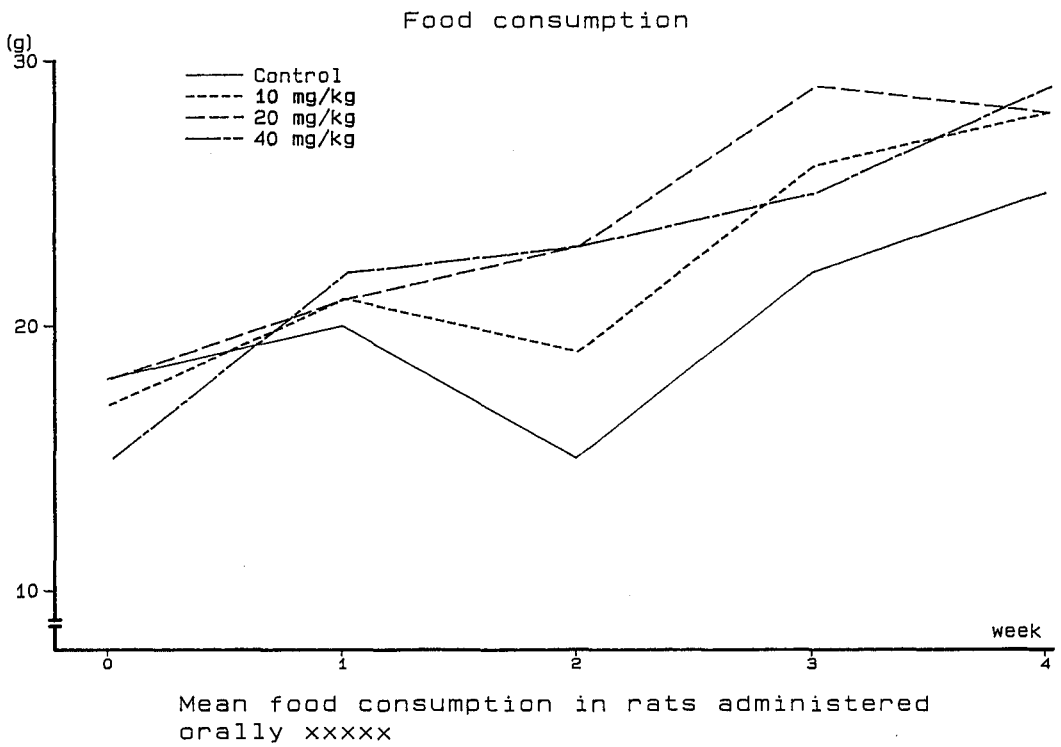


図10. グラフ出力例（摂餌量）

②プログラム言語はBASICインタプリタを用いた．これは演算速度が遅いものの，パーソナルコンピュータ用言語として広く使用されており，一般研究者によるプログラム開発が容易である．従って新たな処理が必要になった場合，また現在のプログラムに変更が生じた場合，容易に対処することができる．なおプログラムをコンパイルすることにより処理速度を向上させることも可能である．

③今回，キーボードより入力される項目がいくつか残された．キーボードによる入力は比較的入力ミスが多いため今後検査装置とのオンライン化（血液検査）やOCR装置の導入などの対策が必要と思われる．

謝辞 本システムのプログラム作成に多大な授助をいただいた㈲ヒューマンライフの奥村大地氏に感謝の意を表します．

結　語

パーソナルコンピュータによるLANを構築し，毒性試験システムの開発を行った．実際にいくつかの化合物の毒性試験にこのシステムを適用して約4か月が経過したが，初期のプログラムでは満足できない箇所が現われたり，また逆に作業量が増加した部分もあり，数度のプログラムの追加，修正を行い一応の成果を得ている．しかしまだ未解決の部分もいくつか残っており，今後これに対して検討を続け，機器やプログラムの追加，修正が順次なされ，毒性試験システム全体の機能が発揮されれば，毒性研究の発展にさらに寄与すると期待している．

また動物愛護の観点から動物に多くの苦痛を与えるこの種の動物実験が問題となっており，今後より少ない動物で精度の高い毒性試験を行えるようなコンピュータシステムの検討も必要になるものと思われる．

文　献

1）中川好男，福田向江，市川久次，藤井孝，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，25，517-525，1974

2）三栗谷久敏，藤田博，神谷信行，中村清純，佐々木美枝子，平賀興吾：東京衛研年報，34，421-129，1983

著書及び他誌発表

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1986.7—1987.6)

著　書

大橋　誠：旅行者下痢症，石神襄次，松本文夫監修，実地医家のための感染症治療指針'87，305－311，1987，スタンダード・マッキンタイヤ，東京.

中村明子，伊藤健一郎，大橋　誠：腸チフス・パラチフスとファージ型別，斎藤　誠，中谷林太郎，松原義雄編，日本の感染性腸炎，初版，151－168，1986，菜根出版，東京.

中村明子，大橋　誠：*Salmonella paratyphi* B と *Salmonella java* との鑑別，斎藤　誠，中谷林太郎，松原義雄編，日本の感染性腸炎，初版，169－173，1986，菜根出版，東京.

大橋　誠：わが国における最近のコレラ事情および分離菌株の薬剤感受性，斎藤　誠，中谷林太郎，松原義雄編，日本の感染性腸炎，初版，359－366，1986，菜根出版，東京.

川畑俊一郎，森田隆司，五十嵐英夫，岩永貞昭：コアグラーゼ，ブドウ球菌研究会編，ブドウ球菌，103－113，1986，医歯薬出版，東京.

五十嵐英夫，藤川　浩：トキシック　ショック　シンドローム，ブドウ球菌研究会編，ブドウ球菌，181－196，1986，医歯薬出版，東京.

五十嵐英夫：ブドウ球菌の毒素性ショック症候群（TSS）毒素，三輪谷俊夫，中野昌康，吉川昌之介，竹田美文編，医学細菌学，2巻，97－131，1986，菜根出版，東京.

Shun-Ichiro Kawabata, Takashi Morita, Toshiyuki Miyata, Shigenori Kaida, Hideo Igarashi & Sadaaki Iwanaga : Difference in enzymatic properties between "Staphylothrombin" and free α-thrombin, (eds) D. A. Walz, J. W. Fenton Ⅱ, & M. C. Shuman, Bioregulatory Functions of Thrombin, 27－40, 1986, The New York Academy of Sciences, New York.

橋本雅一，坂井千三，伊藤　武，藪内　清，奥脇義行，一言　広（分担執筆）：臨床検査講座　16　微生物学，第5版，1986，医歯薬出版，東京.

Ohashi, M., Kudoh, Y., Yamada, S. and Matsushita, S.: CHO-cell elongation in the absence of cyclic AMP elevation by vibrio species, In Kuwahara, S. and Pierce, N. F. (eds), Advances in Research on Cholera and Related Diarrheas, 3, 77－84, 1986, KTK Scientific Publishers, Tokyo.

Ito, T., Yokota, T., Kuwahara, S., Matsushita, S., Ohta, K. and Ohashi, M.: Production of skin permeability increasing factors by cAMP-deficient mutants of *V. cholerae*, In Kuwahara, S. and Pierce, N. F. (eds), Advances in Research on Cholera and Related Diarrheas, 3, 127－132, 1986, KTK Scientific Publishers, Tokyo.

工藤泰雄，松下　秀，大橋　誠：東京都における毒素原性大腸菌下痢症，斎藤　誠，中谷林太郎，松原義雄編，日本の感染性腸炎，初版，291－299，1986，菜根出版，東京.

伊藤　武：カンピロバクターによる集団下痢症および自然界における本菌の分布，斎藤　誠，中谷林太郎，松原義雄編，日本の感染性腸炎，初版，301－311，1986，菜根出版，東京.

坂井千三，太田建爾：新しい腸炎起因菌について，斎藤　誠，中谷林太郎，松原義雄編，日本の感染性腸炎，初版，341－348，1986，菜根出版，東京.

食肉微生物学
小久保彌太郎（分担翻訳）：建帛社，1987

家のカビ・ダニ退治法
市川栄一，吉川　翠著：主婦と生活社，1986年.

原著論文

市販ハトムギの糸状菌汚染調査
郡山洋一郎，斉藤晴美，竹田芳行，諸角　聖，和宇慶朝昭，一言　広：食品と微生物，3 (2),141－147,1986

漬物由来酵母の増殖におよぼす各種天然甘味料の影響
和宇慶朝昭，諸角　聖，一言　広，稲垣俊彦，能登尾耕二：食品と微生物，3(2),149－154,1986

近年分離されたヒト由来 *Vibrio cholerae* O-1, *V. cholerae* non O-1, *V. fluvialis* 及び *V. parahaemolyticus* の薬剤耐性と保有伝達性Rプラスミド
松下　秀，山田澄夫，工藤泰雄，大橋　誠：感染症学雑誌，61(2),109－117,1987

ヒト由来 *Salmonella typhimurium S. enteritidis, S. braenderup* のプラスミドと薬剤耐性
堀内三吉，後藤延一，中谷林太郎，小川正之，伊藤武，高橋正樹，大橋　誠：感染症学雑誌，61(2),167－177,1987

新ピリドンカルボン酸系薬剤 Norfloxacin, Ofroxacin, Enoxacin および Ciprofloxacin のコレラ菌に対する試験管内抗菌力
松下　秀，山田澄夫，工藤泰雄，大橋　誠：感染症学雑誌，61(3),292－296,1987

タンポンおよび膣分泌物より毒素産生性黄色ブドウ球菌を分離した Toxic shock syndrome の1例
石原尚志，柳瀬義男，五十嵐英夫：感染症学雑誌，61(5),619－623,1987

コレラに対する Norfloxacin の治療効果
斎藤　誠，清水長世，松原義雄，瀬尾威久，相楽裕子，田川渓子，増田剛太，根岸昌功，楊　振典，今川八束，村田三紗子，山口　剛，辻　正周，細谷純一郎，星野重二，中谷林太郎，後藤延一，大橋　誠，工藤泰雄，松下秀，横田　健：臨床と微生物，14(2),222－228,1987

ホルマリン処理菌を用いたスライド凝集反応による *Campylobacter jejuni* の血清群別法
斎藤香彦，高野伊知郎，高橋正樹，柳川義勢，伊藤武，工藤泰雄，大橋　誠：日本細菌学雑誌，42(2),499－512,1987

臨床材料由来溶血レンサ球菌の群・型別分布—特に富山県における1985年のA群3型菌の増加傾向—
児玉博英，徳満尚子，安井伊津子，刑部陽宅，柏木義勝：感染症学雑誌，61(4),482－488,1987

臨床材料および健康学童から分離されたA群溶血レンサ球菌の薬剤感受性と菌型について（1983～1985）
柏木義勝，遠藤美代子，光岡ルミ，天野裕次，小野川尊：感染症学雑誌，61(4),501－509,1987

神経芽細胞マス・スクリーニングの化学検査に関する研究—スポットテストにおけるカテコールアミン終末代謝産物の呈色性—
武士俣邦雄，植田忠彦：衛生検査，36(9),1263－1269,1986

Qualitative structure-activity relationships QSAR by ^{1}H NMR spectra of methyl benz [C] acridines
K. Kamata and N. Motohashi：Neoplasma，33(3),313－322,1986

Determination of bufexamac in cream and ointment by high-performance liquid chromatography

K. Kamata and K. Akiyama：J. Chromatogr., 370,344－347,1986

塩化ベルベリン及びタンニン酸中のベルベリンの定量

安田一郎，浜野朋子，高野伊知郎，瀬戸隆子，秋山和幸，直井家壽太：医薬品研究，18(1),146－151,1987

Tranexamic Acid の定量法（Ⅱ）

上原真一，萩原輝彦，高橋美佐子，鎌田国広，中山京子，秋山和幸，直井家壽太：医薬品研究，18(1),142－145,1987

高速液体クロマトグラフィーによるジゴキシン錠及びその溶出試験液中のジゴキシン加水分解物の定量

萩原輝彦，秋山和幸：分析化学，36(2),73－76,1987

Separation of methyl-substituted benz [c] acridines by reversed-phase high-performance thin-layer chromatography

K. Kamata and N. Motohashi：J. Chromatogr., 396,437－440,1987

Analysis of alkyltrimethyl-and dialkyldimethylammonium compounds by gas chromatography

Sukeji Suzuki, Masami Sakai, Kazuo Ikeda, Kenichiro Mori, Takashi Amemiya and Yohya Watanabe：J. Chromatogr., 362,227－234,1986

Determination of volatile N-nitrosamines in rubber nipples by gas chromatography using thermal energy analyzer

Masahiro Takeuchi, Kazuko Mizuishi, Hideo Yamanobe and Yohya Watanabe：And Sci., 2,577－580,1986

Gas chromatographic method for the determination of (trimethoxysilyl) propyloctadecyldimethylammonium chloride

Sukeji Suzuki, Kenichiro Mori, Takashi Amemiya and Yohya Watanabe：J. Chormatogr., 387,379－384,1987

電子捕獲型検出器を用いるガスクロマトグラフィーによる魚介類中のトリブチルスズ化合物の定量

竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：分析化学，36(3),138－142,1987

Incidence of clostridia in cooked meat products in Japan

Y. Kokubo, M. Matsumoto, A. Terada, M. Saito, K. Shinagawa, H. Konuma, H. Kurata：J. Food Protect., 49(11), 864－867,1986

東京都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斃死例

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，平松　廣，野瀬修史，田代和治：日本獣医師会雑誌，40(2),113－117,1987

Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* serotype O3 biotype 3 strains

S. Kaneko, T. Maruyama：J. Clin. Microbiol., 25(2), 454－455,1987

人乳，牛乳，イヌ，ネコの脂肪及び野鳥中の残留クロルデン類の成分パターン

宮崎奉之，山岸達典，松本昌雄：食品衛生学雑誌，27(5),481－486,1986

母乳中の1，2，3，4，5－テトラブロムベンゼン及びミレックスの分析法及び残留レベル

宮崎奉之，山岸達典，松本昌雄：食品衛生学雑誌，28(2),125－129,1987

High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of oxolinic, nalidixic and piromidic acids in cultured fish

Shozo Horii, Chie Yasuoka and Masao Matsumoto：J. Chromatogr. 388,459－461,1987

Conversion of Zearalenone to Zearalenone Glycoside by *Rhisopus* sp.

Hisashi Kamimura：Applied and Environmental Microbiology. 52(3),515－519,1986

食品中の銅クロロフィル及び銅クロロフィリン分析法

牛山博文，西島基弘，安田和男，上村　尚，田端節子，二島太一郎：食品衛生学雑誌，27(4),417－420,1986

高速液体クロマトグラフィーによるワイン中のアジ化ナトリウムの分析法

中里光男，斎藤和夫，菊地洋子，井部明広，藤沼賢司，二島太一郎：食品衛生学会誌，27(5),507－511,1986

高速液体クロマトグラフィーによるチーズ中のピマリシンの分析法

石川ふさ子，上田　工，嶋村保洋，二島太一郎：食品衛生学雑誌，27(6),630－634,1986

Thin Layer Chromatographic Detection and Liquid Chromatographic Determination of Stevioside and Rebaudioside A in Beverages and Foods Following Reverse Phase Column Chromatography

Kenji Fujinuma, Kazuo Saito, Mitsuo Nakazato, Yoko Kikuchi, Akihiro Ibe and Taichiro Nishima：J. Assoc. Off Anal. Chem., 69(5),799－802,1986

トリオレインの通気酸化とα－トコフェロールの酸化防止効果及びアスコルビン酸のシナージズム

勝木康隆，松本　茂，露木英男：食品衛生学雑誌，28,(3),190－195,1987

Determination of pectin in the presence of food polysaccharides

Masamichi Koseki, Tetsuko Yasuno, Shuzo Ogino, AKiko Ito and Fusayoshi Endo：J. Food Sci., 51(5),1329－1332,1986

Decreased Phagocytosis and Superoxide Anion Production in Alveolar Macrophages of Rats Exposed to Nitrogen Dioxide

I. Suzuki, S. Ikeda, T. Kanoh and I. Mizoguchi：Arch. Environ. Contam. Toxicol., 25,733－739,1986

Pulmonary Effects in Rats Induced by Prolonged Exposure to a Mixture of O_3 and NO

N. Terada, I. Mizoguchi, T. Kohno and Y. Hayashi：J. Japan Soc. Air Pollut., 21(6),512－520,1986

Reaction of Malonaldehyde with Nucleic Acid. III. Studies of the Fluorescent Substances Released by Enzymatic Digestion of Nucleic Acids Modified with Malonaldehyde

H. Seto, T. Seto, T. Takesue, and T. Ikemura, *Chem. Pharm. Bull.*, 34,5079－5085,1986

Feeding of Cheyletus malaccensis on Human Body Fluids

M. Yoshikawa：J. Medical Entomology., 24(1),46－53,1987

環境衛生関係営業とダニ対策

吉川　翠，川崎隆志，吉田　豊：生活と環境，32(4),37－41,1987

室内プールの実態調査

笹野英雄：水，12,32－36,1986

Toxic Blue-green Algae, *Microcystis* species

M. F. Watanabe and S. Oishi：IV International Congress of Toxicology（1986．7）

Acute Toxicity of Microcystis aeruginosa and Its Cardiovascular Effects

Shinshi Oishi and Mario F. Watanabe：Environ. Res., 40,518－524,1986

Testicular atrophy induced by di(2-enthylhexyl) phthalate Changes in histology, cell specific enzyme activities and zinc concentrations in rat testis

Shinshi Oishi：Arch. Toxicol., 59,290－295,1986

Irreversible in vivo and in vitro Binding of Thiabendazole to Tissue Protein of Pregnant Mice

M. Yoneyama and H. Ichikawa：Fd Chem. Toxic., 24 (12),1283－1286,1986

Effects of 1, 3-bis (2-chloroethyl) -1-nitrosourea (BCNU) on the levels of glutathione and lipid peroxidation and the activity of glutathione reductase in liver and lung

Yoshio Nakagawa：Toxicology Letters, 35(2/3),269－275,1987

Decrease in Blood Coagulation Factors II (Prothrombin), VII, IX, and X in the Rat After a Single Oral Dose of Butylated Hydroxytoluene

O. Takahashi：Fd Chem. Toxic., 25(3),219－224,1987

Effects of Pretreatment with SKF-525A or Sodium Phenobarbital on thiabendazole Induced Teratogenicity in ICR Mice

A. Ogata, M. Yoneyama, M. Sasaki, K. Suzuki and T. Imamichi：Fd Chem. Toxi., 25(2),119－124,1987

高速液体クロマトグラフィーによる食用キノコの有機酸の分析法

数野千恵子，西島基弘，天川映子，坂井千三，鴨居郁三：日本食品工業学会誌，34(1),42－47,1987

総説・解説

大腸菌胃腸炎

大橋　誠：医学のあゆみ，139(3),202－203,1986

腸管感染症・食中毒

大橋　誠：内科，59,1043－1048,1987

エルシニア菌による感染症について

潮田　弘：化学と薬学の教室，95,21－25,1986

組織侵入性大腸菌の血清学的・生化学的性状の詳細について

松下　秀，工藤泰雄：モダンメディア，32,405－408,1986

サルモネラ食中毒

伊藤　武：臨床栄養，69(4),339－343,1986

カンピロバクター食中毒

斎藤香彦：臨床栄養，69(4),349－353,1986

エルシニア・エンテロコリチカ食中毒

柳川義勢：臨床栄養，69(4),361－364,1986

食中毒予防の観点からプラスチック密封包装を考える

伊藤　武：ぴーえる，7－11,1986

カンピロバクター食中毒の感染源と鶏

伊藤　武，植村　興：鶏病研究会報，23(1),1－7,1987

オキシダーゼテストについて

甲斐明美：Medical Technology，15(1),66－67,1987

組織侵入性大腸菌

松下　秀：Medical Technology，15(2),124－125,1987

腸炎起病性細菌の検査（Ⅰ）

伊藤　武，甲斐明美：Medical Technology，15(4),313－319,1987

腸炎起病性細菌の検査（Ⅱ）

伊藤　武，甲斐明美：Medical Technology，15(6),521－530,1987

話題の感染症，カンピロバクター症

伊藤　武：微生物，3(2),22－30,1987

毒素性ショック症候群

五十嵐英夫：微生物，3(2),109－115,1987

ブドウ球菌食中毒

五十嵐英夫：微生物，3(3),241－247,1987

エンテロトキシン

伊藤　武，神中　寛，寺山　武，粟飯原景昭：微生物，3(3),281－302,1987

Reversed passive latex agglutination tests for the rapid and simple detection of bacterial toxins

Hideo Igarashi and Junichi Sugiyama：Calture 8(1),1－2,1987

Structure and function relationship of staphylocoagulase

Shun-Ichiro Kawabata, Takashi Morita, Toshiyuki Miyata, Shigenori Kaida, Sadaaki Iwanaga and Hideo Igarashi：J. Protein Chem, 6(1),17－32,1987

感染症サーベイランス領域におけるラボラトリー・コンピューターの導入／腸チフスおよびパラチフス情報管理システム

津野正朗，大橋　誠，中村明子：マイコンサーキュラー，11(10),8－15,1987

カンピロバクターに関する最近の問題

伊藤　武，柳川義勢：獣医畜産新報，790,279－287,1987

***Campylobacter jejuni* および *Campylobacter coli* の血清型分類**

斎藤香彦：獣医畜産新報，790,304－309,1987

病原微生物の特徴とその対策

太田建爾：クリニカルスタディ，8(7)，特別付録，1987

過去12年間（1975年～1986年）に臨床材料から分離されたA群溶血レンサ球菌の耐性パターンからみた耐性菌の年次的動向について

柏木義勝，遠藤美代子：レンサ球菌感染症研究会満20周年記念講演会抄録集，13,1987

発ガン性ーメチル置換ベンツ［c］アクリジン類の高速液体クロマトグラフィー

鎌田国広，本橋　登：LC Family, 21(3),3－7,1986

感染症の血清学的診断法，エルシニア
丸山　務：臨床と微生物，14(1),56－60,1987

食品衛生と人畜共通伝染病
丸山　務：臨床獣医，5(1),50－55,1987

成形パップ剤とGMP
風間成孔：Ther. Res.，6(1),334－339,1987

わが家のダニ防除
吉川　翠：婦人百科，通巻256号,88－91,1986

住まいとダニ
吉川　翠：家政学雑誌，37(8),723－727,1986

衛生害虫としてのダニ類（物理的防除法の検討）
吉川　翠：防菌防黴，15(1),39－45,1987

エロモナス食中毒
寺山　武：臨床栄養，69(4),365－369,1986

セレウス菌食中毒と本菌に関する最近の知見
寺山　武：食品衛生研究，37(6),26－42,1987

細菌性食中毒にご注意
寺山　武：学校給食広報，445,2－3,1987

高速液体クロマトグラフィーによる食用キノコの有機酸の分析法
数野千恵子，西島基弘，天川映子，坂井千三，鴨居郁三：日本食品工業学会誌，34(1),42－47,1987

学 会 発 表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1986.7—1987.6)

学 会 発 表

大橋　誠：病原細菌の取り扱いをめぐるバイオハザードの諸問題，地方衛生研究所の立場から
第60回日本細菌学会総会（1987．3）

大橋　誠：コレラ（教育シンポジウム）
第61回日本感染症学会総会（1987．4）

伊藤　武：カンピロバクター食中毒：対策と問題点，1）分離菌株の血清型別とその応用
第7回衛生微生物技術協議会研究会（1986．7）

Y. Kudoh, S. Matsushita, S. Yamada, M. Tsuno, M. Ohashi, K. Ito, A. Nakamura, and H. watanabe：**Identification of enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) by enzyme-linked immunosorbent assay and bioserological characterization of EIEC isolates**
The 22 Joint Conference, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel（1986．8）

諸角　聖，和宇慶朝昭，一言　広：食品のカビおよびカビ毒汚染に及ぼすケナガコナダニの作用
第24回マイコトキシン研究会（1986．8）

内山竹彦，鎌形有祐，河野雅子，吉岡守正，藤川　浩，五十嵐英夫，大久保充人，粟野文剛，遠藤　洋，志村嘉，厳　小傑：ブドウ球菌外毒素 toxic shock syndrome toxin-1, enterotoxin A, B, C のマイトージエン活性とインターフェロン2産生誘導活性の検討
第33回毒素シンポジウム（1986．9）

津野正朗，山田澄夫，松下　秀，工藤泰雄，大橋　誠：東京都における海外旅行者下痢症の実態
第77回東京都衛生局学会（1986.10）

山田澄夫，松下　秀，工藤泰雄，大橋　誠：Sealed mouse を用いたビブリオの病原性の検討
第20回腸炎ビブリオシンポジウム（1986.10）

工藤泰雄：Vibrio 属菌とその感染症
第20回腸炎ビブリオシンポジウム（1986.10）

潮田　弘，五十嵐英夫，丸山　務，寺山　武，竹重都子，斎藤維雅：ウシ，ブタ，イヌ由来コアグラーゼ陽性ブドウ球菌の性状
第31回ブドウ球菌研究会（1986.11）

藤川　浩，五十嵐英夫：ブドウ球菌エンテロトキシン致死感受性の増強作用
第31回ブドウ球菌研究会（1986.11）

伊藤　武：食品衛生におけるカンピロバクター
食品衛生微生物研究会第7回学術講演会（1986.11）

諸角　聖：食品のカビ汚染における含有成分の影響
食品衛生微生物研究会第7回学術講演会（1986.11）

諸角　聖，吉川　翠，和宇慶朝昭，一言　広：ケナガコナダニの真菌伝播能について
食品衛生微生物研究会第7回学術講演会（1986.11）

津野正朗，大橋　誠：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／DEPIDs の開発
第4回日本マイコン研究発表会（1987．3）

橋本　篤，本多太次郎，五十嵐英夫，清水　賢：遠赤外線照射による殺菌効果に関する研究
第34回日本食品工業学会（1987．3）

潮田　弘，五十嵐英夫，丸山　務，寺山　武，竹重都子，斎藤維雅：**ブドウ球菌食中毒に関する研究—ウシ，ブタおよびイヌ由来コアグラーゼ陽性ブドウ球菌の性状—**
第60回日本細菌学総会（1987．3）

巌　小傑，内山竹彦，打林明子，吉岡守正，五十嵐英夫，藤川　浩：**ブドウ球菌外毒素 toxic shock syndrome toxin-1の抗体産生反応の抑制作用の解析**
第60回日本細菌学会総会（1987．3）

藤川　浩，宇佐美博幸，内山竹彦，五十嵐英夫：**ブドウ球菌 toxic shock syndrome toxin-1 と enterotoxin 致死増強作用の比較**
第60回日本細菌学会総会（1987．3）

甲斐明美，伊藤　武，山田澄夫，工藤泰雄，大橋　誠：***Escherichia coli* O145：NM の産生する Verocytotoxin の精製とその性状**
第60回日本細菌学会総会（1987．3）

高橋正樹，柳川義勢，斎藤香彦，伊藤　武，大橋　誠：***Campylobacter jejuni* における鞭毛抗原の免疫学的特異性について**
第60回日本細菌学会総会（1987．3）

楠　　淳，伊藤　武，柳川義勢，高橋正樹，甲斐明美，稲葉美佐子，新垣正夫，工藤泰雄，大橋　誠，中村明子：**リジン脱炭酸反応陰性パラチフスB菌による大規模な集団食中毒について**
第61回日本感染症学会総会（1987．4）

新垣正夫，伊藤　武，高橋正樹，柳川義勢，工藤泰雄，大橋　誠，濱名元一：**逆受身ラテックス凝集反応による *Campylobacter pyloridis* のウレアーゼ検出法の検討**
第61回日本感染症学会総会（1987．4）

伊藤　武，新垣正夫，斎藤香彦，高橋正樹，柳川義勢，大橋　誠，他19名：**1981年—1986年に東京都内で下痢患者から検出されたカンピロバクターの血清型別状況と年次推移**
第61回日本感染症学会総会（1987．4）

山田澄夫，Surang Dejsirilert，松下　秀，津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：**エロモナスによる輸入感染性腸炎，特に菌の分離法と分離株の性状について**
第61回日本感染症学会総会（1987．4）

松下　秀，山田澄夫，津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：**輸入感染性腸炎患者からの組織侵入性大腸菌の検出状況と分離株の性状**
第61回日本感染症学会総会（1987．4）

山田澄夫：**「輸入感染性下痢症の細菌検査」—東京都における輸入感染性腸炎の現況—**
第36回日本臨床衛生検査技師学会（1987．5）

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-Vassilidis 培地，ストロンチウ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総会（1987．5）

T. Itoh, M. Shingaki, M. Takahashi, Y. Yanagawa, A. Kai, Y. Kudoh, M. Ohashi and G. Hamana：**Identification of *Campylobacter pyloridis* by detecting its specific urease**
The 4th International Workshop on Campylobacter Infections（1987．6）

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：**オゾンガスとオゾン水の殺菌効果の相違に関する検討**
第62回日本医科器械学会大会（1987．5）

武士俣邦雄：**神経芽細胞腫のマス・スクリーニングに関する検討（第6報）尿中カテコールアミン代謝終末産物の定量値と材料の関係**
第36回日本臨床衛生検査学会（1987．5）

武士俣邦雄，高野弘紀，大橋　誠，峰岸正子，石塚実，長岡常雄：**神経芽細胞腫のマス・スクリーニングに関する検討（第4報）尿中バニリルマンデリン酸スポットテスト成績に及ぼす食餌の影響に関する統計的観察**
第78回東京都衛生局学会（1987．5）

田苗綾子，境井光子，橋本伸子，柴田　実：**濾紙血17-OHP測定によるCAHマス・スクリーニングに関する研究**
第61年度厚生省心身障害者研究「マススクリーニングに関する研究班」（1987．2）

林　志直，関根整治，安東民衛，寺山　武，大橋　誠，岡田正次郎，薮内　清，山之内淳，島田光正，田崎達明，中村憲久，村田三紗子，小杉真紗人：**東京都におけるウイルス性胃腸炎に関する調査研究**
第77回東京都衛生局学会（1986.10）

安東民衛：**東京都におけるウイルス性急性胃腸炎の集団発生状況とその調査成績**
食品衛生微生物研究会第7回学術講演会（1986.11）

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：**高速液体クロマトグラフによるジゴキシン錠中の類縁物質の定量**
第23回全国衛生化学技術協議会年会（1986.10）

上原真一，萩原輝彦，高橋美佐子，鎌田国広，中山京子，秋山和幸：**トラネキサム酸の定量法**
第23回全国衛生化学技術協議会年会（1986.10）

高野伊知郎，浜野朋子，安田一郎，瀬戸隆子，秋山和幸：**ガスクロマトグラフィーによる生薬及び生薬製剤中のコール酸類の分析**
第23回全国衛生化学技術協議会年会（1986.10）

鈴木幸子，田中　博，安田一郎：**ウスバサイシンの発芽特性ならびに幼植物の成分について**
日本生薬学会第33回年会（1986.10）

奥本千代美，高橋利恵子，岩崎由美子，秋山和幸：**メッキ廃水中シアンの予試験における自動化**
第23回全国衛生化学技術協議会（1986.10）

安田一郎，秋山和幸，糸川秀治，竹谷孝一，佐竹元吉，M. Mochidome, G. Hashimoto：**南米産生薬スクーバの成分研究**
日本薬学会第107年会（1987．4）

田中　博，鈴木幸子，吉沢政夫，福田達男，荒金真佐子，秋山和幸，安田一郎：**ウスバサイシンの栽培研究(1)発芽特性ならびに幼植物の成分について**
第78回東京都衛生局学会（1987．5）

竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：**塩酸同時注入による塩化ブチルスズ化合物のガスクロマトグラフィー**
第35回日本分析化学会（1986.10）

水石和子，竹内正博，山野辺秀夫，渡辺四男也：**ガスクロマトグラフィーによる環境試料中のジブチルスズ及びトリブチルスズ化合物の定量**
第35回日本分析化学会（1986.10）

山野辺秀夫，竹内正博，水石和子，渡辺四男也：**魚介類中の水銀およびセレンの含有量について**
第52回日本食品衛生学会（1986.11）

池田一夫，雨宮　敬，伊藤弘一，観　照雄，中村　弘，渡辺四男也：**HPLC**による化粧品中の塩化ベンザルコニウムおよび塩化ベンゼトニウムの分離定量法
日本薬学会第107年会（1987．4）

中村義昭，酒井正美，森　謙一郎，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ザルコニウムの定量
日本薬学会第107年会（1987．4）

雨宮　敬，池田一夫，伊藤弘一，観　照雄，中村　弘，渡辺四男也：ガスクロマトグラフィーによる化粧品中の4-クロロ-3.5-キシレノールの分離定量法
日本薬学会第107年会（1987．4）

竹葉和江，松本昌雄，中沢裕之：電気化学検出高速液体クロマトグラフィーによる蜂蜜中のフェノールの分析
第52回日本食品衛生学会（1986.11）

安岡千枝，堀井昭三，松本昌雄：高速液体クロマトグラフィーによるオキソリン酸，ナリジクス酸，ピロミド酸の同時分析
第52回日本食品衛生学会（1986.11）

宮崎奉之：クロルデンを中心とした有機ハロゲン化合物汚染に関する研究
第53回日本食品衛生学会（1987．5）

安岡千枝，堀井昭三，松本昌雄：高速液体クロマトグラフィーによる養殖魚中のサルファ剤の定量
第53回日本食品衛生学会（1987．5）

金子誠二，小久保彌太郎，丸山　務：***Yersinia enterocolitica*** 血清型O3の保有するプラスミドの他の血清型における形質発現について
第102回日本獣医学会（1986．9）

金子誠二，丸山　務，小久保彌太郎，神保勝彦，松本昌雄：市販豚肉における ***Yersinia*** 属菌の分布および分離株の病原性状
食品微生物研究会第7回学術講演会（1986.11）

小久保彌太郎，金子誠二，丸山　務，神崎政子，松本昌雄：食鳥のウェルシュ菌分布と分離菌株の薬剤感受性
第52回日本食品衛生学会（1986.11）

神保勝彦，桐谷礼子，松本昌雄：バイオアッセイによる食肉中のマクロライド系，テトラサイクリン系およびアミノグリコシド系抗生物質の分別推定法
第52回日本食品衛生学会（1986.11）

桐谷礼子，神保勝彦，松本昌雄：養殖魚中の抗生物質の簡易分別推定法とその応用
第52回日本食品衛生学会（1986.11）

金子誠二，小久保彌太郎，丸山　務，松本昌雄：***Yersinia enterocolitica*** 血清型03固有プラスミドの研究1．トランスポゾン（**Tn1**）挿入変異株の作成とその病原性状
第103回日本獣医学会（1987．4）

丸山　務，神崎政子，金子誠二：***Yersinia enterocolitica*** 血清型O3生物型3の **pyrazinamidase** の活性について
第102回日本獣医学会（1986．9）

竹重都子，丸山　務，神崎政子：犬および猫の ***Pasteurella multocada*** 保有状況について
昭和61年度獣医公衆衛生学会（1986.11）

高木　裕，丸山　務，小久保彌太郎，松本昌雄他：と畜場における食肉の細菌汚染調査（第3報）豚枝肉の汚染源調査結果について
第77回衛生局学会（1986.11）

宮原美知子，三瀬勝利，和気　朗，丸山　務：***Yersinia*** **属の産生する制限酵素の特徴**
第60回日本細菌学総会（1987．3）

丸山　務，神崎政子，金子誠二，宮原美知子，三瀬勝利：***Yersinia enterocolitica*** **における制限酵素の検索**
第103回日本獣医学会（1987．4）

川本英一，沢田拓士，丸山　務：**コルチゾール投与ウサギにおける** ***Pasteurella multocida*** **（A：12型）感染の増強について**
第34回日本実験動物学会総会（1987．5）

上村　尚：**Zearalenone の毒性スクリーニング**
第25回マイコトキシン研究会（1987．1）

真木俊夫，観　公子，永山敏廣，飯田真美，二島太一郎：**オニギリによる急性中毒の一例**
第一回中毒研究会関東地方会（1987．1）

勝木康隆，松本　茂，露木英男：**トリオレインの通気酸化とα-トコフェロールの酸化防止効果およびアスコルビン酸のシナージズム**
日本食品工業学会第34回大会（1987．3）

永山敏廣，真木俊夫，観　公子，飯田真美，二島太一郎：**調理加工における有機リン系農薬の消長「イチゴ」**
日本農薬学会第12回大会（1987．3）

飯田真美，真木俊夫，観　公子，永山敏廣，二島太一郎：**化学性食中毒の一事例「ハンバーグ中のニコチン酸」**
第78回東京都衛生局学会（1987．4）

永山敏廣，真木俊夫，観　公子，飯田真美，二島太一郎：**フィールドにおける散布農薬の消長「ナス」**
日本薬学会第107年会（1987．4）

森川　肇，藤田昌彦，真木俊夫，木下　薫，高橋邦夫，柴田承二，田村明文，水野伝一：**半夏に見出される多形核白血球活性化抗腫瘍作用**
日本薬学会第107年会（1987．4）

二島太一郎，牛山博文：**馬の骨中元素含有量と力学的特性との関連性**
第57回日本衛生学会（1987．4）

田端節子，上村　尚，田村行弘，安田和男，牛山博文，橋本秀樹，西島基弘，二島太一郎：**食品のアフラトキシン汚染実態及びその推移**
第53回日本食品衛生学会（1987．5）

上村　尚，田端節子，田村行弘，安田和男，牛山博文，橋本秀樹，西島基弘，二島太一郎：**市販食品中のフザリウムマイコトキシン汚染及び調理加工による挙動**
第53回日本食品衛生学会（1987．5）

井部明広，田村行弘，上村　尚，西山良子，田端節子，橋本秀樹，二島太一郎：**生鮮野菜等に使用されるリン酸の分析法とその実態調査**
第53回日本食品衛生学会（1987．5）

吉田令子，渡辺悠二，佐藤憲一，風間成孔：**エチレン一酢酸ビニル共重合物の組成分析**
第52回日本食品衛生学会（1986.11）

中島和雄，風間成孔，内海英雄，濱田　昭：**抗酵化剤のレシチンポソーム膜に及ぼす影響**
日本薬学会第107年会（1987．4）

川島満春美，牛尾房雄，友松俊夫，山岸達典，道口正雄：**わが国の食物繊維１日摂取量の年代別変化**

第23回全国衛生化学技術協議会年会（1986.10）

川島満春美，牛尾房雄，船山恵市，山岸達典，友松俊夫，道口正雄：**わが国の食物繊維1日摂取量の年次別変化**
第77回東京都衛生局学会（1986.10）

川島満春美，道口正雄，牛尾房雄，船山恵市，山岸達典，友松俊夫：**食事からの食物繊維摂取量について**
第41回日本栄養・食糧学会総会（1987．5）

佐藤泰仁，吉川　翠：**空調ダクト内堆積粉塵の性状（第3報）**
第45回日本公衆衛生学会（1986.10）

吉川　翠：**4種の殺虫剤によるツメダニの予防効果について**
第45回日本公衆衛生学会（1986.10）

矢野栄二，東　博文，西井俊治，小泉　明，横山泰彦，池田真悟，溝口　勲：**桜島火山灰降灰地区森林作業者の呼吸機能**
第45回日本公衆衛生学会（1986.10）

佐々木憲二，寺田伸枝，池田真悟，大沢誠喜，鈴木孝人，木下真男，溝口　勲：**NO_2暴露のラットにおける呼吸機能並びに形態変化**
第27回大気汚染学会（1986.11）

鈴木孝人，加納堯子，溝口　勲：**NO_2暴露によるトリプトファン代謝産物の尿中排せつ量の変化**
第27回大気汚染学会（1986.11）

池田真悟，鈴木孝人，加納堯子，溝口　勲：**都内学童の尿中 Hydroxyproline 調査およびその測定法の検討**
第27回大気汚染学会（1986.11）

牧野国義，溝口　勲：**衛生試験実施機関の統合システムによるコンピュータ利用法の現状**
第23回全国衛生化学協議会（1986.10）

牧野国義，溝口　勲：**大気汚染による亜急性症状の量・反応関係に関する考察**
第45回日本公衆衛生学会（1986.10）

牧野国義，稲葉　裕，菊地正一：**慢性気管支炎有訴率に及ぼす気象条件の影響**
第57回日本衛生学会（1987．4）

M. Morita, A. Yasuhara, H. Seki, G. Ohi：**Chlorodibenzodioxins in pigeon tissues**
第6回ダイオキシン及びその関連物質に関する国際シンポジウム（1986．9）

杉本淳彦，土屋悦輝：**東京都利島村簡易水道の監藻に起因するカビ臭問題**
昭和61年度日本水産学会秋季大会（1986.10）

高橋保雄，笹野英雄：**塩素処理により生成するベンチオカーブ分解生成物**
第21回日本水質汚濁学会（1987．3）

Shinshi Oishi：**Age Dependent Testicular Atrophy Induced by Di（2-ethylhexyl）phthalate**
4th International Congress of Toxicology（1986．7）

Shinshi Oishi and Osamu Takahashi：**Mutagenicity of Tama River Sediments**
4th International Congress of Toxicology（1986．7）

O. Takahashi：**Hemorrhagic Toxicity of Butylated Hydroxytoluene（BHT）and Butylated Hydroxyanisole in the rat**

4th International Congress of Toxicology（1986．7）

O. Takahashi and S. Oishi：**Short-term Toxicity of Tama River Sediments in Mice**
4th International Congress of Toxicology（1986．7）

M. Yoneyama and A. Ogata：**Irreversible Binding of Thiabendazole to Macromolecules in Pregnant Mice and Its Relation to Teratogenicity**
4th International Congress of Toxicology（1986．7）

K. Ushiyama, K. Sato, A. Nakagawa, F. Nagai, J. Kabashima, I. Kano and T. Nakao：**The Metabolism of o-Phenylphenol sodium salt**
4th International Congress of Toxicology（1986．7）

Yoshio Nakagawa, Kuniaki Tayama and Kogo Hiraga：**On the Mechanism of Butylated Hydroxytoluene-induced Hepatic Toxicity in Rats**
4th International Congress of Toxicology（1986．7）

佐藤かな子，長井二三子，牛山慶子，中川敦子，加納いつ，浦山　修，原　諭吉，中尾　真，中尾順子：**馬腎 Na, K-ATPase のモノクローナル抗体（第4報）**
第59回日本生化学大会（1986．9）

牛山慶子，佐藤かな子，長井二三子，中川敦子，加納いつ，川野澄江，中尾順子：**OPP-Na 投与ラットの薬物代謝酵素**
第59回日本生化学会大会（1986．9）

市川久次，小林博義：**無機水銀（Hg^{2+}）のヒトならびにウサギの溶血に対する差異（光散乱法を用いて）**
第59回日本生化学会大会（1986．9）

大石真之，高橋　省：**多摩川底泥の変異原性について**
日本水質汚濁研究協会関東支部シンポジウム（1986.11）

中川好男，田山邦昭：**ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）によるラット腎障害**
日本薬学会第107年会（1987．4）

藤井　孝，三栗谷久敏，井口重孝，神谷信行，中村清純，平賀興吾：**オルトフェニルフェノールのラット膀胱発癌に及ぼす炭酸水素ナトリウムと塩化アンモニウムの影響**
第45回日本癌学会総会（1986.10）

田山邦昭，平賀興吾，志佐　湍：**ラット膀胱腫瘍の組織学的分類と移植成績との関連性—長期飼育における移植片の挙動—**
第45回日本癌学会総会（1986.10）

A. Ogata, M. Yoneyama, M. Sasaki, K. Suzuki and T. Imamichi：**Teratogenicity of thiabendazole in ICR mice**
4th International Congress of Toxicology,（1986．7）

M. SASAKI：**Suppressive Effect of Tumor Promoter TPA on the Antibody Production in vitro**
4th International Congress of Toxicology,（1986．7）

佐々木美枝子，金西信次：**アセトアミノフェンの変異原増強作用—DNA 修復修飾作用について**
日本環境変異原学会第15回大会（1986.10）

佐々木美枝子，高橋　省：**ラット肝初代培養細胞を用いた Phylloquinone（Vitamin K_1）epoxide reductase 活性の測定と butylated hydroxytoluene（BHT）による血液凝固異常の発症機構の解明**
第3回初代培養肝細胞研究会（1987．6）

寺山　武：**ブドウ球菌の最近の分類**
第31回ブドウ球菌研究会（1986.11）

平田一郎，太田建爾，新井輝義，山田澄夫，坂井千三：**アジ由来病原ビブリオの薬剤感受性試験**
第20回腸炎ビブリオシンポジウム（1986.10）

池島伸至，楠くみ子，新井輝義，神真知子，入倉善久，坂井千三：**コンニャクの軟化剝離現象について**
食品衛生微生物研究会第7回学術講演会（1986.11）

平田恵子，西島基弘，大西和夫，梨田智子，白石隆幸，宇田　裕：**食品中シアン配糖体の定量**
第13回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム（1986.10）

大石充男，天川映子，荻原　勉，田口信夫，大西和夫，西島基弘：**食肉中のニコチン酸及びニコチン酸アミド分析法及びそれらの食肉における挙動**
第52回日本食品衛生学会（1986.11）

宇田　裕，梨田智子，白石隆幸，平田恵子，大西和夫，西島基弘：**酵素法による食品中のシアン配糖体の定量について**
酵素法による食品分析研究会（1986.12）

田口信夫，西島基弘，斉藤行生，阿相敏明，金子幹宏，木川　寛，河村太郎，黒川達夫，西沢元仁，中沢裕之，鈴木澄子，大平知子，藤田昌彦：**生活空間中の亜硫酸ガス測定用パッシブサンプラーの開発**
日本薬学会第107年会（1987．4）

平田恵子，大石充男，大西和夫，西島基弘：**酵素を用いた食品分析法(1)食品中のホルムアルデヒド**
第53回日本食品衛生大会（1987．5）

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

藪　内　　清（委員長）
足　立　東一郎
伊　藤　　武
市　川　久　次
太　田　建　爾
風　間　成　孔
笹　野　英　雄
佐々木　美枝子
西　島　基　弘
丸　山　　務
渡　辺　四男也

昭和62年12月７日　発行

規格表　第２類
印刷番号（62）457
刊行物番号（Ｈ）24

東京都立衛生研究所研究年報第38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）