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

39

1988

長崎県
衛生公害研究所
64. 1. 5
受付

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

序

昨今の公衆衛生を取り巻く社会情勢の急激な変化に伴って，当研究所の在り方にも転換が求められているように思います。特に，業務対象範囲の拡大，技術の高度化，検査の分散化傾向に伴う精度管理の必要性，公衆衛生情報活動の充実などにどのように対応したらよいか，考えさせられることの多いこの頃です。社会情勢の変化を受動的に受け止めるのみでなく，これらがもたらす発展性を積極的に引き出して，検査室サービスの質的改善に努めたいと考えております。

幸なことに，「第二次東京都長期計画」の中で，試験検査及び調査研究の効率化・高度化を図るとともに，専門技術の研修指導及び公衆衛生情報の解析・提供等の機能を充実させることを目的として，衛生研究所の改築，整備が具体化されたところであります。長期計画のスローガン「安心して住めるまち，いきいきと暮せるまち，ふるさとと呼べるまち東京」の下に，都民の保健向上のため，21世紀へ向けて衛生研究所はどのような役割を果たすべきかを，職員一同，夢を膨らませて検討しております。関係各位の御指導，御鞭撻をお願い申し上げる次第であります。

ここに東京都立衛生研究所研究年報の第39号を発行致しました。本号には，66編の報告論文，並びに1987年7月以降1988年6月までの間の刊行著書，他誌発表論文，学会発表演題のタイトルが収録されております。何れも当研究所各分掌分野における研究面での研鑽の成果であります。忌憚のない御批判，御助言をいただければ幸いと存じます。

1988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海外旅行者下痢症の細菌検査成績処理システム（第4報）
多種病原菌同時検出例の解析システム
……津野　正朗，工藤　泰雄，大橋　　誠…… 1

Campylobacter jejuni の培養細胞に対する細胞侵入性
……柳川　義勢，伊藤　　武，稲葉美佐子，高橋　正樹，斎藤　香彦
中村　明子，鈴木　健之，山本　　実，工藤　泰雄，大橋　　誠…… 9

寄生虫に対する漢方薬の有効性に関する研究（第1報）
allyl isothiocyanate を指標とする Anisakis Ⅰ型幼虫に対する相対的活動抑制効果の伴定法
……村田以和夫，宮沢　貞雄，安田　一郎，小田　　稔，渋谷　智晃…… 15

寄生虫に対する漢方薬の有効性に関する研究（第2報）
漢方薬の Anisakis Ⅰ型幼虫の活動抑制効果
……村田以和夫，宮沢　貞雄，安田　一郎，小田　　稔，渋谷　智晃…… 19

寄生虫に対する漢方薬の有効性に関する研究（第3報）
安中散およびウイキョウに含まれる Anisakis Ⅰ型幼虫の活動抑制物質の検索
……安田　一郎，浜野　朋子，高野伊知郎，瀬戸　隆子
村田以和夫，宮沢　貞雄，小田　　稔，渋谷　智晃…… 24

In Vitro における塩化メチル水銀，塩化第二水銀の赤芽球前駆細胞（CFU-E）に及ぼす影響
……蓑輪　佳子，浦野　直子，鈴木　重任…… 28

東京都内のインフルエンザ検索成績（1987年11月～1988年4月）
……山崎　　清，伊藤　忠彦，中村　清純，新開　敬行，大貫奈穂美，薮内　　清…… 32

東京都多摩地区における野鼠の Rickettsia tsutsugamushi 汚染調査および同地区で感染発病したツツガ虫病の一症例
……新開　敬行，伊藤　忠彦，山崎　　清，中村　清純，大貫奈穂美，松井　孝輔
寺山　　武，薮内　　清，大野　正彦，吉川　　翠，山口昌彦，花岡　　暐
杉浦　英俊，福山　孝徳，渡辺　民彦，藤巻　直毅，仁科　彰則
大橋　　誠…… 35

都内保健所 AIDS 抗体検査受診者のヒト免疫不全ウイルス
抗体保有調査（1987年2月～1988年3月）
……大貫奈穂美，中村　清純，伊藤　忠彦，山崎　　清，新開　敬行，吉田　靖子
安東　民衛，矢野　一好，関根　整治，林　　志直，寺山　　武，薮内　　清
三木　　隆，大橋　　誠…… 43

マガキによるポリオウイルスの蓄積実験
……吉田　靖子，矢野　一好，薮内　　清…… 49

ドブネズミにおける腸炎ビブリオの保有
……神崎　政子，丸山　　務，平田　一郎，太田　建爾，森田　千春…… 54

報文Ⅱ　医薬品等に関する調査研究

形質転換薬用植物細胞の有用物質の産生
エビスグサの毛状根に含まれる Anthraquinone 類
……安田　一郎，浜野　朋子，高野伊知郎，瀬戸　隆子，秋山　和幸，浅水　哲也…… 61

非ピリン系かぜ薬の定量法（第4報）
抗ヒスタミン剤
……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…… 65

誘導結合プラズマ発光分析法による胃腸薬中の金属元素の定量
……上原　真一，中山　京子，鎌田　国広，萩原　輝彦，高橋美佐子，秋山　和幸…… 69

家庭用品の衛生化学的研究（第24報）
ガスクロマトグラフィーによる市販カーペット製品中の防虫加工剤・N, N-ジエチル-m-トルアミド，
ダイアジノンおよびオクタクロロジプロピルエーテルの定量
……中村　義昭，金子　正美，森　謙一郎，観　照雄，鈴木　助治，渡辺四男也…… 73

家庭用品の衛生化学的研究（第25報）
家庭用エアゾール製品中のホルムアルデヒドの定量
……鈴木　助治，中村　義昭，金子　正美，森　謙一郎，渡辺四男也…… 78

ガスクロマトグラフィーによる化粧品中のクロルキシレノールの分離定量法
……雨宮　敬，池田　一夫，岸本　清子，伊藤　弘一
鈴木　助治，観　照雄，中村　弘，渡辺四男也…… 83

高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中の防腐剤の一斉分析
……池田　一夫，岸本　清子，雨宮　敬，伊藤　弘一
観　照雄，鈴木　助治，中村　弘，渡辺四男也…… 87

報文Ⅲ　食品等に関する調査研究

ビス（トリブチル）オキシド（TBTO）による魚介類の汚染実態について（第Ⅳ報）
東京湾海水中のトリブチルスズ及びジブチルスズ化合物のモニタリング
……竹内　正博，水石　和子，山野辺秀夫，渡辺四男也…… 93

ゴム製哺乳用具に関する衛生化学的調査
乳首，おしゃぶりの中のニトロソアミン含有量（英文）
……水石　和子，竹内　正博，山野辺秀夫，渡辺四男也…… 97

東京湾産スズキ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……101

東京都における PCB 汚染の実態について（第16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……104

養殖魚中に残留する TC 系抗生物質検査法の開発
……神保　勝彦，百瀬　礼子，丸山　務，松本　昌　雄……108

無菌充填包装食品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，守安　貴子，二島太一郎……112

豆もやし及びカット野菜等中リンの溶出について
……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……116

メチル水銀毒性緩和因子に関する研究（第４報）
メチル水銀毒性に及ぼす食物繊維の影響
……田村　行弘，関　比呂伸，上村　　尚，井部　明広
西山　良子，田端　節子，橋本　秀樹，二島太一郎……121

化学物質及び自然毒による食中毒事例集（第５報）
――昭和62年度――
……真木　俊夫，観　　公子，永山　敏廣，飯田　真美，川合　由華，二島太一郎……126

野菜・果実類中の残留農薬実態調査
――昭和62年度――
……永山　敏廣，真木　俊夫，飯田　真美，観　　公子，川合　由華，二島太一郎……130

玄米中の残留農薬実態調査
――昭和52年度～昭和62年度――
……真木　俊夫，飯田　真美，観　　公子，永山　敏廣，川合　由華，二島太一郎……139

天然甘味料の実態調査（第３報）
天然甘味料製剤中のステビア甘味成分の分析
……高橋　　巌，中島　和雄，広門　雅子，植松　洋子，松井　敬子，風間　成孔……144

食品添加物製剤中の天然物の分析
……中島　和雄，高橋　　巌，広門　雅子，植松　洋子，松井　敬子，風間　成孔……147

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（第２報）
副色素の分析
……植松　洋子，広門　雅子，中島　和雄，高橋　　巌，松井　敬子，風間　成孔……151

高速液体クロマトグラフィーによるスルファニル酸中のアニリンの分析
……広門　雅子，中島　和雄，植松　洋子，高橋　　巌，松井　敬子，風間　成孔……156

食品中の微量無機成分に関する研究（第１報）
原子吸光法による粉乳中の亜鉛，銅の定量
……門間　公夫，菊谷　典久，井口　正雄，友松　俊夫……159

小笠原産パッションフルーツの栄養成分について
……菊谷　典久，門間　公夫，井口　正雄，友松　俊夫，小沢　　聖
和田　　実，青木　睦夫，登坂三紀夫，浦野　元幸……164

自動分析計による赤血球グルタチオン還元酵素活性の測定
……笠原　利英，友松　俊夫……168

各種食品における薬剤耐性腸内細菌の分布とそのＲプラスミドの検討
……新井　輝義，池島　伸至，神　真知子，楠　くみ子
入倉　善久，寺山　　武，太田　建爾，坂井　千三……173

報文Ⅳ　生活環境に関する調査研究

ディーゼル排気ガスを暴露したラビットの血清におけるプロコラーゲン・タイプⅢ・ペプチドの増加
……鈴木　孝人，加納　堯子……181

ディーゼル排ガス暴露による新生児ラットの肺の病理組織学的変化
……渡辺　伸枝，池田　真悟，大沢　誠喜，鈴木　孝人，加納　堯子，林　豊……187

ディーゼル排気ガスに暴露されたラット肺に残留する多環芳香族炭化水素
……大久保智子，瀬戸　博，大沢　誠喜，鈴木　孝人，加納　堯子……193

ATS-DLD 質問票による呼吸器症状および関連要因の情報について
……牧野　国義……198

東京都区部における部位別がん死亡率の27年間の経年変化と地理的分布
……牧野　国義，稲葉　裕……205

室内環境におけるアスベスト粉塵の実態について
……佐藤　泰仁，関　比呂伸，福森　信隆，加納　堯子，斉藤　勝，秋山　陽……212

超音波加湿器の細菌汚染に関する実験的研究
……狩野　文雄，加納　堯子……225

貸しおしぼりの洗濯消毒方法についての検討
……狩野　文雄，小山　勉良，加納　堯子……231

ダニおよびカビに対する除湿機の有効利用法の検討（英文）
……吉川　翠，和宇慶朝昭，諸角　聖……237

多摩川におけるユスリカ類の分布（予報）
……大野　正彦……245

下水処理水を水源とする２河川（野火止用水，玉川上水）で発生するユスリカ類
……大野　正彦……251

東京湾の環境汚染モニタリング調査（第６報）
昭和61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……255

水中のアスベスト繊維に関する調査研究
……小輪瀬　勉，坂本　朋子，笹野　英雄……259

皇居外苑濠の植物プランクトンⅡ
――主要な藍藻――
……渡辺真利代，土屋　悦輝……265

水環境から分離された *Yersinia* 属菌とその塩素抵抗性
……古畑　勝則，金子　誠二，松本　淳彦……271

環境における化学物質の安全性に関する調査研究（Ⅰ）
キャピラリーガスクロマトグラフィーによる環境試料中のオレイン酸アミドおよびステアリン酸アミドの分析方法
……岡本　寛，大橋　則雄，土屋　悦輝，笹野　英雄……277

多摩地区地下水中における揮発性有機塩素化合物汚染の動向
……矢口久美子，鈴木　俊也，関山　登，渡辺　学，西島　基弘，寺山　武……280

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（OPP）水酸化酵素について
抗体によるチトクロームP450分子種の同定
……牛山　慶子，長井二三子，佐藤かな子，加納　いつ……289

OPPおよびその代謝物によるDNAの塩基修飾について
……長井二三子，牛山　慶子，佐藤かな子，加納　いつ……292

ジェチレングリコールモノエチルエーテル（DEGM）のラットにおける経口急性毒性
……市川　久次，小林　博義，橋本　常生……295

細胞膜酵素（馬腎臓Na. K-ATPase）のモノクローナル抗体（第4報）
モノクローナル抗体のNa. K-ATPase活性およびウアバイン結合におよぼす影響
……佐藤かな子，長井二三子，牛山　慶子，加納　いつ，市川久次，中尾　順子……299

体細胞突然変異のオートラジオグラフィーによる検出
……金西　信次，藤田　博，佐々木美枝子……304

チアベンダゾール（TBZ）投与によるマウス尿中成分の変動
……樺島順一郎，米山允子，多田　幸恵，藤谷　知子……310

チアベンダゾールのラット膀胱発癌におけるプロモーション効果の検討
……藤井　孝，三栗谷久敏，矢野　範男，湯沢　勝広
長沢　明道，林田　志信，平賀　興吾……317

オルトフェニルフェノール，チアベンダゾールおよび炭酸水素ナトリウム同時投与におけるマウス膀胱上皮細胞の走査電子顕微鏡的観察
……三栗谷久敏，藤井　孝，中野　雅行……324

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2報）
特に呼吸器系を除いた臓器の腫瘍性および非腫瘍性病変について
……坂本　義光，神谷　信行，池田　虎雄，中野　雅行，佐々木美枝子……329

石綿繊維の経口摂取による生体影響（第3報）
クリソタイルの胃酸に対する組成および形状の変化
……福森　信隆，荻野　周三，中野　雅行，佐々木美枝子……335

Salmonella typhimurium TA97, TA102を用いた食品添加物の変異原性試験（第3報）
……藤田　博，中野　雅行，佐々木美枝子……343

JY-4モルトットの表皮メラノサイトについて
……田山　邦昭，中野　雅行，佐々木美枝子……351

著書及び他誌発表……357

学　会　発　表……367

CONTENTS

REPORTS I PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

A Computerized Data Base System for Processing Results of Bacteriological Examination of Overseas Travellers' Diarrhea (Ⅳ)
A System for Analyzing Patterns of Different Kinds of Pathogen Isolated Concurrently from Individual Cases
..... M. Tsuno, Y. Kudoh, M. Ohashi 1

Invasion of Intestine 407 Cells by *Campylobacter jejuni*
..... Y. Yanagawa, T. Itoh, M. Inaba, M. Takahashi, K. Saito, A. Nakamura, K. Suzuki, M. Yamamoto, Y. Kudoh and M. Ohashi 9

Effect of Chinese Medicine for Helminth (Ⅰ)
A Bioassay for Mortal or Inhibitory Effect on The Activity of Anisakis Type Ⅰ Larvae with allyl and Phenyl isothiocyanate as Control
..... I. Murata, S. Miyazawa, I. Yasuda, M. Oda and T. Shibuya 15

Effect of Chinese Medicine for Helminth (Ⅱ)
Mortal or Inhibitory Effects with Several Kinds of Chinese Medicine on The Activity of Anisakis Type Ⅰ Larvae
..... I. Murata, S. Miyazawa, I. Yasuda, M. Oda and T. Shibuya 19

Effect of Chinese Medicine for Helminth (Ⅲ)
Mortal or Inhibitory Components in Antyû-san and Fennel on the Activity of *Anisakis* Type Ⅰ Larvae
..... I. Yasuda, T. Hamano, I. Takano, T. Seto, I. Murata, S. Miyazawa, M. Oda and T. Shibuya 24

Effects of Methylmercuric Chloride and Mercuric Chloride on CFU-E *in vitro*
..... K. Minowa, N. Urano and S. Suzuki 28

Prevalence of Influenza Occurd in Tokyo (Nov. 1987～Apr. 1988)
..... K. Yamazaki, T. Ito, K. Nakamura, T. Shinkai, N. Ohnuki and K. Yabuuchi 32

Ecological Survey on Rickettsia tsutsugamushi in Wild Rodent and a Case of Tsutsugamushi Disease in Rural Area, Tama, Tokyo.
..... T. Shinkai, T. Ito, K. Yamazaki, K. Nakamura, N. Ohnuki, K. Mastui, T. Terayama, K. Yabuuchi, M. Ohno, M. Yoshikawa, M. Yamaguchi, K. Hanaoka, H. Sugiura, T. Fukuyama, T. Watanabe, N. Fujimaki, A. Nishina and M. Ohashi 35

Serological Survey for Antibodies Against Human Immunodeficiency Virus of Individuals Who Visited Public Health Centers in Tokyo (1987～1988)
..... N. Ohnuki, K. Nakamura, T. Ito, K. Yamazahi, T. Shinkai, Y. Yoshida, T. Ando, K. Yano, S. Sekine, Y. Hayashi, T. Terayama, K. Yabuuchi, T. Miki and M. Ohashi 43

The Accumulation of Poliovirus by the Oysters, *Crassostrea gigas*
..... Y. Yoshida, K. Yano and K. Yabuuchi 49

Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in Brown Rat (*Rattus norvegicus*)
..... M. Kanzaki, T. Maruyama, I. Hirata, K. Ohta and C. Morita 54

REPORTS II PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

Production of Useful Components by Transformed Medicinal Plant Cells Anthraquinones Contained in the Cultured Hairy Root of *Cassia obtusifolia*
..... I. Yasuda, T. Hamano, I. Takano, T. Seto, K. Akiyama and T. Asamizu 61

Determination of Non-pyrin Preparations for Common Cold (Ⅳ)
Antihistaminics
..... M. Takahashi, K. Nakayama, S. Uehara, K. Kamata, T. Hagiwara and K. Akiyama 65

Determination of Metallic Elements in Gastrointestinal Drugs by ICP-AES
..... S. Uehara, K. Nakayama, K. Kamata, M. Takahashi, T. Hagiwara and K. Akiyama 69

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXIV)
Determination of N,N-Diethyl-m-toluamide, Diazinon and Octachlorodipropylether Used as Mothproofing Agent in Commercial Carpet Products by Gas Chromatography
..... Y. Nakamura, M. Kaneko, K. Mori, T. Kan, S. Suzuki and Y. Watanabe 73

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXV)
Analysis of Formaldehyde in Household Aerosol Products
..... S. Suzuki, Y. Nakamura, M. Kaneko, K. Mori and Y. Watanabe 78

Gas Chromatographic Method for Determination of Chloroxylenol Used as Germicide in Cosmetics
..... T. Amemiya, K. Ikeda, K. Kishimoto, K. Ito, S. Suzuki, T. Kan, H. Nakamura and Y. Watanabe 83

Simultaneous Determination of Disinfectants in Cosmetics by High-Performance Liquid Chromatography
..... K. Ikeda, K. Kishimoto, T. Amemiya, K. Ito, T. Kan, S. Suzuki, H. Nakamura and Y. Watanabe 87

REPORTS III PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

Survey of Pollution with Bis (tributyltin) oxide (TBTO) in Fish and Shellfish (Ⅳ)
Monitoring of Tributyltin and Dibutyltin Compounds in Sea Water of Tokyo Bay
..... M. Takeuchi, K. Mizuishi, H. Yamanobe and Y. Watanabe 93

Hygienic Chemical Survey on Rubber Products Content of N-Nitrosamines in Nipples and Pacifiers
..... K. Mizuishi, M. Takeuchi, H. Yamanobe, and Y. Watanabe 97

Content of Mercury and Selenium in Sea-bass from Tokyo Bay
..... H. Yamanobe, M. Takeuchi, K. Mizuishi and Y. Watanabe 101

Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (XVI)
Concentrations of Polychlorinated Biphenyl in Foods, Tablewares and Kitchinwares
..... T. Ueta, M. Takeuchi, K. Mizuishi, H. Yamanobe and Y. Watanabe 104

An Improvement on the Detection Method for Residual Tetracyclines in Cultured Fish
..... K. Jinbo, R. Momose, T. Maruyama and M. Matsumoto 108

Contents of Hydrogen Peroxide in Aseptic Packaging Foods
..... Y. Kikuchi, K. Saito, M. Nakazato, K. Fujinuma, T. Moriyasu and T. Nishima 112

Studies on the Release of Phosphorus from Bean Sprouts, Taros and Vegetables in Storage
..... A. Ibe, Y. Tamura, H. Kamimura, Y. Nishiyama, S. Tabata, H. Hashimoto and T. Nishima 116

Studies on Modifying Factors of Metylmercury Toxicity (Ⅳ)
Effect of Dietary Fiber on Methylmercury Toxicity
..... Y. Tamura, H. Seki, H. Kamimura, A. Ibe, Y. Nishiyama, S. Tabata, H. Hashimoto and T. Nishima 121

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toxicants in Tokyo (Ⅴ) —1987—
..... T. Maki, K. Kan, T. Nagayama, M. Iida, Y. Kawai and T. Nishima 126

Survey of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits (1987.4～1988.3)
..... T. Nagayama, T. Maki, M. Iida, K. Kan, Y. Kawai and T. Nishima 130

A Survey of Pesticide Residues in Brown Rice (1977.4～1988.3)
..... T. Maki, M. Iida, K. Kan, T. Nagayama, Y. Kawai and T. Nishima 139

Survey of Natural Sweeteners (Ⅲ)
Analysis of Stevia Components in Commercial Natural Sweetener Products
..... I. Takahashi, K. Nakajima, M. Hirokado, Y. Uematsu, K. Matsui and M. Kazama 144

Survey on Natural Products in Food Additive Preparations
..... K. Nakajima, I. Takahashi, M. Hirokado, Y. Uematsu, K. Matsui and M. Kazama 147

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Impurities in Amaranth, New Coccine and Sunset Yellow FCF (Ⅱ)
Determination of Subsidiary Colors
..... Y. Uematsu, M. Hirokado, K. Nakajima, I. Takahashi, K. Matsui and M. Kazama 151

Determination of Aniline in Sulfanilic Acid by High Performance Liquid Chromatography
..... M. Hirokado, K. Nakajima, Y. Uematsu, I. Takahashi, K. Matsui and M. Kazama 156

Studies on Trace Minerals in Foods (I)
Determination of Zinc and Copper in Modified Milk Powder by Flame Atomic Absorption Spectrophotometry
..... K. Momma, N. Kikutani, M. Iguchi and T. Tomomatsu 159

Nutrient Composition of Passion Fruits Cultivated in Ogasawara Islands
..... N. Kikutani, K. Momma, M. Iguchi, T. Tomomatsu, K. Ozawa, M. Wada, M. Aoki, M. Tosaka and M. Urano 164

The Use of Auto Analyser System to Measure Erythrocyte Glutathione Reductase Activity
..... T. Kasahara and T. Tomomatsu 168

Distribution of Drug Resistant *Enterobacteriaceae* in Commercial Foods and R Plasmids of Them
..... T. Arai, N. Ikejima, M. Jin, K. Kusunoki, Y. Irikura, T. Terayama, K. Ohta and S. Sakai 173

REPORTS IV PAPERS CONCERNING ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

Increased Procollagen Type Ⅲ Peptide in Serum of Rabbits Exposed to Diesel Engine Exhaust
..... T. Suzuki and T. Kanoh 181

Pulmonary Effects in Newborn Rats Induced by Exposure to Diesel Engine Exhaust
..... N. Watanabe, S. Ikeda, M. Ohsawa, T. Suzuki, T. Kano and Y. Hayashi 187

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Retained in Rat Lung Exposed to Diesel Engine Exhaust
..... T. Ohkubo, H. Seto, M. Ohsawa, T. Suzuki and T. Kanoh 193

Information from ATS-DLD Questionnaire on Symptoms of Respiratory Diseases and Related Factors
..... K. Makino 198

The Trends for Twenty-seven Years and Geographical Patterns of Cancer Mortalities for Selected Sites in The Ward-area of Tokyo
..... K. Makino and Y. Inaba 205

Survey on Concentration of Asbestos Fibers in Indoor Environment
..... Y. Sato, H. Seki, N. Fukumori, T. Kanoh, M. Saito and M. Akiyama 212

Experimental Study of Bacterial Contamination in Ultrasonic Humidifier
..... F. Kanoh and T. Kanoh 225

Study of Methods for Cleaning and Disinfection of Rental Wet Towel
..... F. Kanoh, K. Koyama and T. Kanoh 231

Effects of a Dehumidifier on Mites and Fungi
..... M. Yoshikawa, T. Wauke and S. Morozumi 237

Longituditional Distribution of Chironomid Midges (Diptera) in the Tama River (Preliminary Report)
..... M. Ohno 245

Chironomid Midges Collected from Two Canals (the Nobidome and Tamagawa Canals) Originating from the Effluence of a Sewerage Plant
..... M. Ohno 251

Survey of Chemical Pollutants in Biota from Tokyo Bay (Ⅵ)
Residue Levels in Japanese Sea Bass and Gull in 1986
..... H. Seto and T. Kanoh 255

Study on Asbestos-fibers in Water
..... T. Kowase, T. Sakamoto and H. Sasano 259

Phytoplankton in Outer Moats Around the Imperial Palace (Ⅱ)
Main Species of Blue-green Algae
..... M. F. Watanabe and Y. Tsuchiya 265

Distribution of The Genus *Yersinia* in Natural Water Environments and Resistance of Isolates to Chlorine
..... K. Furuhata, S. Kaneko and A. Matsumoto 271

Studies on Environmental Safety of Chemicals (Ⅰ)
Determination of Oleamide and Stearamide in Environment by capillary Gas Chromatography
..... Y. Okamoto, N. Ohashi, Y. Tsuchiya and H. Sasano 277

The Trend of the Contamination of Volatile Chlorinated Organic Compounds in Groundwater in Tama, Tokyo
..... K. Yaguchi, T. Suzuki, N. Sekiyama, S. Watanabe, M. Nishijima and T. Terayama 280

REPORTS V PAPERS CONCERNING ON TOXICOLOGY

Characterization of OPP Hydroxylase : Identification of Cytochrome P450 Species by Antibody
..... K. Ushiyama, F. Nagai, K. Satoh and I. Kano 289

Modification of DNA Base by OPP and its Metabolite
..... F. Nagai, K. Ushiyama, K. Satoh and I. Kano 292

Studies on Oral Acute Toxicities of Diethylene Glycol Monoethyl Ether (DEGM) in the Rat
..... H. Ichikawa, H. Kobayashi and T. Hashimoto 295

Monoclonal Antibody against Horse Kidney Na, K-ATPase (Ⅳ):
Effects of Monoclonal Antibody on Na, K-ATPase Activity and Ouabain Binding
..... K. Satoh, F. Nagai, K. Ushiyama, I. Kano, H. Ichikawa and T. Nakao 299

Autoradiographic Detection of Somatic Cell Mutation
..... N. Kananishi, H. Fujita, M. Sasaki 304

Effect of Thiabendazole (TBZ) on Mice Urinary Composition
..... J. Kabashima, M. Yoneyama, Y. Tada and T. Fujitani 310

Study of Promoting Effect of Thiabendazole on Urinary Bladder Carcinogenesis in Rats
..... T. Fujii, H. Mikuriya, N. Yano, K. Yuzawa, A. Nagasawa, S. Hayashida and K. Hiraga 317

Scanning Electron Microscopic Observations of Urinary Bladder Epithelium of Mice in Simultaneous Administration of o-Phenylphenol, Thiabendazole and Sodium Bicarbonate
..... H. Mikuriya, T. Fujii and M. Nakano 324

Inhalation Experiment of Calcium Chromate mixed with Kanto Loam on Rats for 104 Weeks (Ⅱ)
Neoplastic and Non-neoplastic Lesions in Various Organs except Respiratory System
..... Y. Sakamoto, N. Kamiya, T.Ikeda, M. Nakano and M. Sasaki 329

Biological Effects of Ingested Asbestos Fibers (Ⅲ)
Chemical Composition and Structure of Chrysotile Treated by Stomach Acid
..... N. Fukumori, S. Ogino, M. Nakano and M. Sasaki 335

Mutagenicity Test of Food Additives with Salmonella typhimurium TA97 and TA102 (Ⅲ)
..... H. Fujita, M. Nakano and M. Sasaki 343

The Epidermal Melanocytes of JY-4 Guinea Pigs
..... K. Tayama, M. Nakano and M. Sasaki 351

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS 357

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS 367

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.*, **39**, 1-8, 1988

パーソナルコンピュータを用いた海外旅行者下痢症の細菌検査成績処理システム（第4報）多種病原菌同時検出例の解析システム

津野正朗*, 工藤泰雄*, 大橋　誠*

A Computerized Data Base System for Processing Results of Bacteriological Examination of Overseas Travellers' Diarrhea (Ⅳ) A System for Analyzing Patterns of Different Kinds of Pathogen Isolated Concurrently from Individual Cases

MASAAKI TSUNO*, YASUO KUDOH* and MAKOTO OHASHI*

Keywords：情報処理システム information system, 海外旅行者輸入下痢症 overseas travellers' diarrhea, 感染症 infectious diseases, データベース data base, パーソナルコンピューターpersonal computer, パターンアナリシス pattern analysis

著者らは，1975年以降，下痢症の海外からの持ち込みの実態を明らかにすべく，海外旅行者下痢症患者の細菌学的病因検索事業（以下㊥と略称）を行ってきており，1983年以後は，その検査情報の管理・処理にパーソナルコンピュータを利用している．そのために，まず被検者情報，被検材料情報および検査成績などの情報処理を行う目的で，㊥検査情報処理システム（略称「MRFC」）[1,2]を自家開発した．続いて，MRFCデータディスクに収録したデータを分析処理する目的で㊥検査情報解析システム（略称「MDA」）シリーズを開発し，情報処理機能の強化を計ってきた．

このMDAシリーズには，海外旅行者の渡航先と検出病原菌との関係を分析するための訪問国パターン別病原菌検出状況解析システム（MDA 010，MDA 110，MDA 120，MDA 130）[3,4]，同赤痢菌検出状況解析システム（MDA 220）[5]および同サルモネラ検出状況解析システム（MDA 320）[5]が含まれる．図1には㊥検査情報処理システム開発の経過を示した．

これらの各システムを利用することによって，2ヶ国以上を歴訪した旅行者をも含めて，いずれの国に旅行するとどんな病原菌に感染し易いかを推定することができるようになった．

しかし，海外旅行者下痢症患者のふん便検査を行うと，国内の集団あるいは散発下痢症患者の場合とは様相を異にし，複数菌種同時検出例にしばしば遭遇する．そこで著者らは，パーソナルコンピュータを利用して，検出病原菌パターン（検出病原菌1～5種の組合せ）の分析を試みた．本報では，用いた解析システムおよびそれによって得られた分析結果について概要を報告する．

また，㊥検査情報は，上述のMRFCの導入以前にも遡って入力し，現在では1979～1987年について各年単位でMRFCデータディスクに収録・保存されるに至っている．

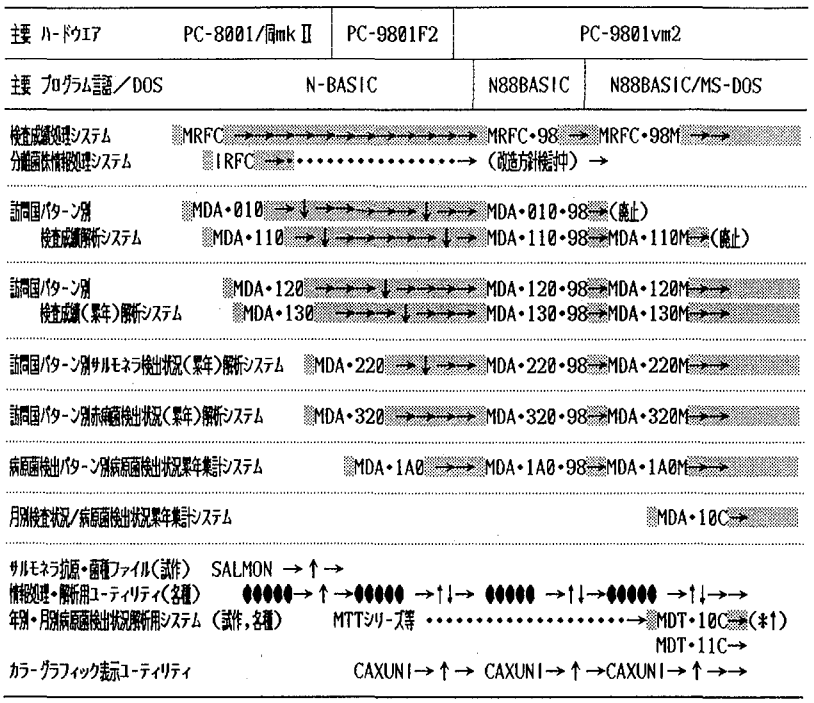
検査材料

検査対象は，1979年から1987年の9年間に㊥検査の目的で都・区保健所を通じて本所に搬入されたふん便材料であり，供試件数は，1979年以降年次別に，2,323件，2,611件，2,155件，2,181件，2,709件，2,715件，2,879件，2,713件，および2,824件の合計23,110件である．

検査の対象となった被検海外旅行者には，検疫所を通じて検疫通報があった者，医師や勤務先の管理者等から検便の要請があった者，自発的に検便を申し出た者が含まれる．

また，これらの被検者を材料採取時の下痢症状の有無によって，次の3群に分類した．すなわち，検査材料採取時に下痢症状があった下痢現症者（患者「Patient」，

*東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科　169　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, 169, Japan



↑↓：各種システムに組込み。　*↑：MRFC・98M に、Activity-18 として組込み済み。
▒：実務的使用。

図1．㊙検査情報処理システム開発系統図

「P」と略称），旅行中または帰国後に下痢症状があったが既に回復した下痢既往者（「現在健康者」，「G」と略），および，全く下痢症状がなかった健康者（「Healthy Person」，「H」と略）である．各該当件数は，「P」が3,254件，「G」が16,795件，「H」が3,061件であった．

検査方法

検査対象とした腸管系病原菌は，O-1コレラ菌（表では「V. c.」と略），非O-1コレラ菌（いわゆるNAGビブリオ；「NAG」と略），腸炎ビブリオ（「V. p.」と略），ビブリオ・フルビアリス（「V. f.」と略），赤痢菌（「Sh. A～D」と略），チフス菌およびパラチフスA菌（「Typh」と略）およびその他のサルモネラ（「Sal.」と略），毒素原性大腸菌（「ETEC」と略），組織侵入性大腸菌（「EIEC」と略），病原血清型大腸菌（「EPEC」と略），カンピロバクター・ジェジュニーおよび同コリー（「Camp」と略），プレジオモナス・シゲロイデス（「Ples」と略），エロモナス・ヒドロフィラおよび同ソブリア（「Aero」と略）の各菌である．ただし，これらの検査対象病原菌の内，カンピロバクターは1979年から，プレジオモナスは1980年から，エロモナスは1982年から，検査対象とした．また，各菌の分離・同定は，通常の腸管系病原菌検査法[6,7]に準じて行った．

処理対象情報

対象情報は，上述の9年間における㊙検査情報で，MRFCを用いて各年別にデータディスクに収録・保存されたものである．

主要入力情報は，㊙検査材料送付書から得られる被検者および被検材料に関する情報，および検査成績である．すなわち，前者は，検査年月日，検査番号，検査材料搬入保健所，年齢，性別，被検者区分別（「P」，「G」および「H」の別），出国年月日，帰国月日，材料採取病日，下痢症状の有無と下痢便の性状，下痢の最高回数，その他の症状の有無，抗生剤，その他の薬剤投与の有無などであり，後者は，検出病原菌種（同時検出菌5種まで入力可），検出菌の血清型，毒素型等である．

情報処理の方法

㊙検査情報の処理に用いた主要ハードウエアは，日本電気製パーソナルコンピュータ PC9801vm 2（640Kバイト RAM 仕様），高解像カラーディスプレイ，24ピンタイプのドットマトリクスプリンタである．また，使用したディスク・オペレーション・システムは，MS-DOS

(NEC／Microsoft) Ver3.1である.

使用したソフトウエアは次のとおりであり，いずれも自家開発によって得たものである.

1．MDT1ØC：MRFC データ･ディスク上の「MF モクジ」ファイルを参照し，年別・被検者区分別の複数菌種同時検出状況を，表またはグラフとして出力する．このシステムにおける検出病原菌（検出菌種数）の集計は，同時に検出されたのが同一病原菌種であっても血清型等を異にするごとに各々を別途に計上する方式で行われる．すなわち，コレラ菌，赤痢菌，組織侵入性大腸菌，病原血清型大腸菌および腸炎ビブリオは血清型を異にするごとに，サルモネラはO群を異にするごとに，毒素原性大腸菌は産生毒素型を異にするごとに，各々を計上する.

2．MDA1AØ・M：MRFC データディスク上のメインファイル（ファイル名：「Maru-F」）の各レコードをレコード番号順に1件ずつ読み出し，収録情報の内，被検者区分，検出菌種数，検出病原菌（1～5種）を参照し，検出病原菌1～5種の組合せを10桁のコード番号（各菌当て2桁のコード番号，5組の組合せ）のパターンとして認識し，このパターン別に病原菌の検出状況を分析する．情報処理の原理は上述の訪問国パターン別病原菌検出状況解析用の各システムと同様であり，アプリケーションプログラムの開発に当たっては，それらの情報処理の基本アルゴリズム[3]および処理手順（フロー）[4]を踏襲したので，詳細は省略する.

結果のプリント出力方法は，2種用意されている．すなわち，いずれの場合も各出現パターンを1種の病原菌のみが検出された例から同時に5種の病原菌が検出された例まで段階的に分類し，さらに各々を病原菌コード番号順に整理し（並べ換えの再処理等をして），出力する．この第1段階の処理結果をそのままプリント出力する場合の検出菌種数の計算方法は，上述の MDT1ØC と同様である.

しかし，さらに2段階目の処理を加えて，菌種を異にするものだけを計上する方法により，検出病原菌の組合せパターン別病原菌検出状況を出力することもできる．すなわち，これは異種菌種の同時検出例を分析するために用意された機能である.

分析結果および考察

1979年から1987年の9年間に㊙検査に供したふん便材料23,110件の内，合計6,878件から既知の腸管系病原菌が検出され，陽性率は29.8％であった．これを下痢症状群別に分類すると，「P」群に該当するもの3,254件中1,892件が陽性で陽性率58.1％，「G」群では16,795件中4,539件が陽性（陽性率27.0％），「H」群で3,061件中447件が陽性（陽性率14.6％）であった.

これらの陽性例を，同一検査材料から同時に検出された腸管系病原菌種の数にしたがって分類したのが表1（MDT1ØC によって出力）である．すなわち，1979年の「P」群を例に挙げると，181件の陽性例中，1種の病原菌のみ検出された例が138件，2種の病原菌が同時に検出された例が29件，3種同時検出例が12件，4種お

表1．症状群別・年次別複数菌種同時検出事例の出現状況（1979-1987）

Year	No. of pathogen-detected cases																		Total
	Patients of acute phase [P]						Converlescent patients [G]						Healthy individual [H]						
	1	2	3	4	5	total	1	2	3	4	5	total	1	2	3	4	5	total	
1979	138	29	12	1	1	181	319	54	2	-	-	375	46	4	2	-	-	52	608
1980	166	36	8	-	-	210	388	60	10	1	-	459	31	3	-	-	-	34	703
1981	135	47	6	1	1	190	407	51	7	-	-	465	40	6	-	-	-	46	701
1982	159	33	5	-	-	197	336	50	6	1	-	393	53	6	-	-	-	59	649
1983	164	42	7	1	-	214	421	65	7	-	-	493	42	2	3	-	-	47	754
1984	185	40	5	2	-	232	465	79	8	-	-	552	51	4	1	-	-	56	840
1985	150	37	7	-	-	194	532	67	9	1	-	609	51	6	1	-	-	58	861
1986	173	52	15	1	-	241	436	87	13	1	-	537	51	6	-	-	-	57	835
1987	174	44	14	1	-	233	557	95	3	-	1	656	34	4	-	-	-	38	927
Total	1444	360	79	7	2	1892	3861	608	65	4	1	4539	399	41	7	-	-	447	6,878

1　: only one pathogen was detected from each individual.
2 - 5 : two or more pathogens were detected from each individual.
total : subtotal.

よび5種同時検出例が各々1件であった．このように，各々に複数菌同時検出例が含まれるため，分離菌株数は，「P」群由来のものが2,439株，「G」群由来5,293株，「H」群由来502株，合計8,234株であった．

上記の菌検出事例の内，1種の菌検出例，2種以上同時検出例それぞれの占める頻度をプリント出力したのが表2（MDT10℃による）であり，さらにそれをグラフ化したのが図2（MDT10℃による）である．いずれを

表2．症状群別・年次別複数菌種同時検出事例の出現頻度（1979-1987）

Year	Variation of pathogen-detected cases (by per cent)														
	Patients of acute phase [P]					Converlescent patients [G]					Healthy individual [H]				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1979	76.2	16.0	6.6	0.6	0.6	85.1	14.4	0.5	-	-	88.5	7.7	3.8	-	-
1980	79.0	17.1	3.8	-	-	84.5	13.1	2.2	0.2	-	91.2	8.8	-	-	-
1981	71.1	24.7	3.2	0.5	0.5	87.5	11.0	1.5	-	-	87.0	13.0	-	-	-
1982	80.7	16.8	2.5	-	-	85.5	12.7	1.5	0.3	-	89.8	10.2	-	-	-
1983	76.6	19.6	3.3	0.5	-	85.4	13.2	1.4	-	-	89.4	4.3	6.4	-	-
1984	79.7	17.2	2.2	0.9	-	84.2	14.3	1.4	-	-	91.1	7.1	1.8	-	-
1985	77.3	19.1	3.6	-	-	87.4	11.0	1.5	0.2	-	87.9	10.3	1.7	-	-
1986	71.8	21.6	6.2	0.4	-	81.2	16.2	2.4	0.2	-	89.5	10.5	-	-	-
1987	74.7	18.9	6.0	0.4	-	84.9	14.5	0.5	-	0.2	89.5	10.5	-	-	-
Total	76.3	19.0	4.2	0.4	0.1	85.1	13.4	1.4	0.1	-	89.3	9.2	1.6	-	-

1 : only one pathogen was detected from each individual.
2-5 : two or more pathogens were detected from each individual.

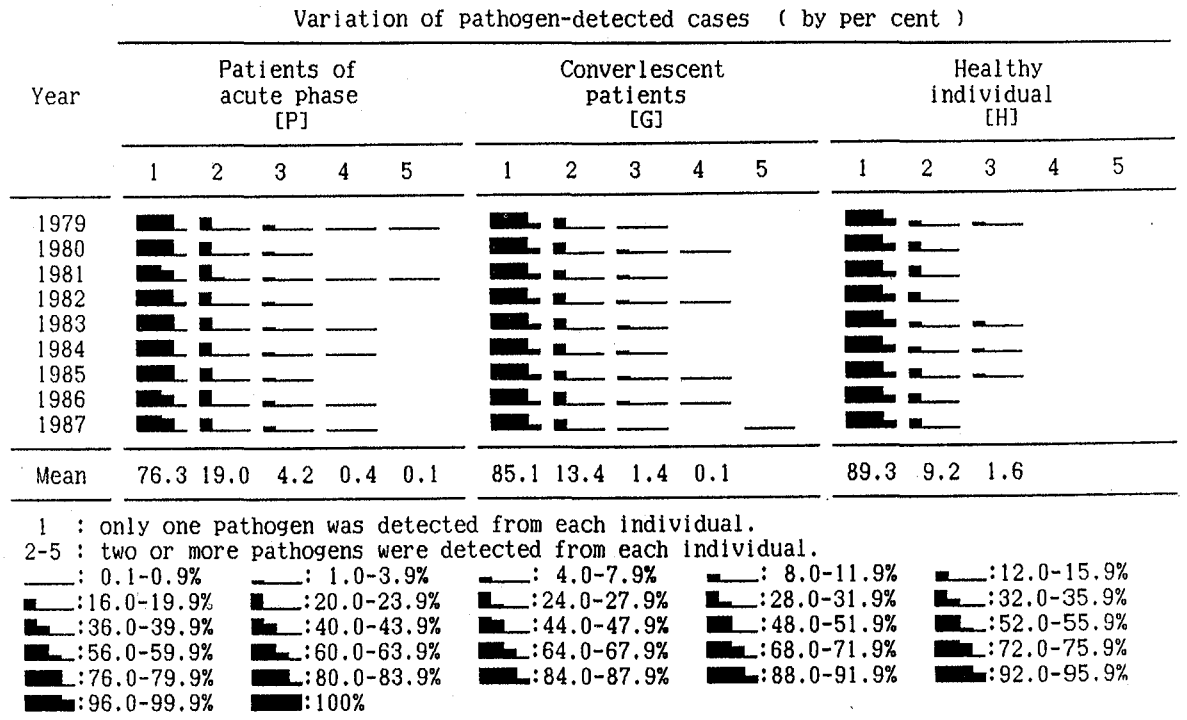


図2．症状群別・年次別複数菌種同時検出事例の出現率（1979-1987）

観察しても，「P」群で同時検出菌の数およびその出現頻度が最高であり，これに次いで，「G」群，「H」群の順であることが読み取れる．すなわち，2種以上の病原菌が同時に検出された例は，「P」群で23.7％と最も高頻度であり，次いで，「G」群14.9％，「H」群で10.8％であった．4種以上の同時検出例をみると，「P」群の0.5％であったのに対し，「G」群で0.1％，「H」群では全く認められなかった．

このような複数病原菌同時検出例の内訳をさらに詳細に検討するために，MDA1AØ・Mを用いて，検出病原菌の組合せパターン別の分析を行った．

MDA1AØ・Mには，上に述べたとおり，2種のフォームの出力機能がある．これらの内，第一段階目の処理（並べ換えの再処理のみ）をして結果を出力した場合，同一病原菌の同時検出例であっても血清型等を異にする複数の病原菌が各々計上されるため，検出病原菌の組合せパターンは，1種の病原菌のみが検出された例19パターンを含み，2種同時例82，3種同時例81，4種同時例10，および5種同時例3，合計195パターンであった．これは，例えばO群を異にするサルモネラが2種あるいは3種同時に検出された場合，それぞれに2種あるいは3種同時検出例として計上されたためである．しかし，さらに2段階目の処理を行うと（この場合，上の複数サルモネラ検出例は，いずれもサルモネラ1菌種の検出例として取り扱われる），検出病原菌種パターンは159種となった（表3）．

いずれの場合も，多彩な検出病原菌種の組合せパターンが認められ，多種病原菌同時検出例の出現傾向を明らかにすることができた．

表3を参照して高頻度出現パターンを観察すると，2菌種同時検出例77パターン（全陽性例の11.9％がこれに該当し，多種病原菌同時検出例中の61.3％を占める）中では，腸炎ビブリオとサルモネラの同時検出例が1.9％と最も高頻度に認められ，サルモネラとカンピロバクターの同時検出例（0.7％）等がこれに次いだ．これとほぼ同様の傾向は，「G」群および「H」群の両下痢症状群においても認められた．しかし，1979年から毒素原性大腸菌の検査を行った「P」群に注目すると，この毒素原性大腸菌とサルモネラの同時検出例が2.7％と最も高頻度であり，これに次いで，カンピロバクターとの同時検出例（1.6％），プレジオモナスとの検出例が（1.5％），腸炎ビブリオとの検出例（1.3％）等が高頻度に認められ，傾向を異にした．

これに比較して，3種以上の病原菌が同時に検出された例では，3菌種同時検出例が58パターン（全陽性例の1.3％がこれに該当し，多種病原菌同時検出例中の6.7％を占める），4種同時の例が4パターン（全体の0.1％，多種病原菌同時検出例中の0.5％を占める），5菌種同時の例が1パターンであった．

このように多菌種同時検出例が高頻度に認められることは，海外旅行者下痢症例では異なった病原菌による混合感染事例が含まれることを物語っている．またこれらの成績は，海外旅行者が渡航各国において下痢症に罹患する場合にその原因となっている水や食品汚染状況を反映しているものとも推察される．

別の角度からこの成績について考察を加えるとすると，これらの複数菌種検出例における病原菌の組合せパターンの中には，それぞれ発現主要症状を異にする病原菌種の組合せがあることが注目される．例えば，下痢・脱水が発現主徴であるコレラ菌と発熱・腹痛を伴うサルモネラとの同時検出例などが認められる場合があるが，各々の病原菌が同時に起病性を発揮した場合，症状は複雑に修飾を受け，臨床的な診断は必ずしも容易でないことが推察される．また，法定伝染病の起因菌が同時に検出されることもあり（例えばコレラ菌と赤痢菌の同時検出），海外旅行者下痢症の病因検索においては，各種の病原菌を対象とする精度の高い検査の必要性が示唆される．

著者らは，上に述べたような異種病原菌同時検出状況の解析もまた，海外旅行者下痢症の実態を把握するのに有用であると考える．

参考文献

1）津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：東京衛研年報，35，22-30，1984
2）津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：マイコンサーキュラー，10(8)，23-32，1985
3）津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：東京衛研年報，36，52-59，1985
4）津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：マイコンサーキュラー，11(3)，2-14，1986
5）津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：東京衛研年報，37，1-7，1986
6）工藤泰雄：臨床と細菌，6(1)，46-56，1979
7）山田澄夫：食品と微生物，2(1)，66-71，1985

表3．検出病原菌組合せパターン別病原菌検出状況（1979-1987）－1

Pathogen-detective-patterns

Pathogen-detective pattern							No. of positive cases / % in positive cases							
Pattern No.	(detected pathogen)						[P]		[G]		[H]		Total	
No.	(1	2	3	4	5	)	Cases	[%]	Cases	[%]	Cases	[%]	Cases	[%]
40	(V.c.,	—,	—,	—,	—	)	6	0.3	10	0.2	4	0.9	20	0.3
17	(NAGv,	—,	—,	—,	—	)	26	1.4	123	2.7	12	2.7	161	2.2
170	(V.m.,	—,	—,	—,	—	)	-		1		-		1	
43	(V.f.,	—,	—,	—,	—	)	5	0.3	29	0.6	4	0.9	38	0.5
3	(V.p.,	—,	—,	—,	—	)	169	8.9	698	15.4	33	7.4	900	12.3
34	(Sh.A,	—,	—,	—,	—	)	1	0.1	10	0.2	1	0.2	12	0.2
6	(Sh.B,	—,	—,	—,	—	)	48	2.5	96	2.1	9	2.0	153	2.1
62	(Sh.C,	—,	—,	—,	—	)	6	0.3	12	0.3	4	0.9	22	0.3
2	(Sh.D,	—,	—,	—,	—	)	62	3.3	164	3.6	17	3.8	243	3.3
78	(Typh,	—,	—,	—,	—	)	1	0.1	1		2	0.4	4	0.1
5	(Sal.,	—,	—,	—,	—	)	163	8.6	1,360	30.0	186	41.6	1,709	23.3
18	(EPEC,	—,	—,	—,	—	)	39	2.1	227	5.0	32	7.2	298	4.1
24	(EIEC,	—,	—,	—,	—	)	12	0.6	43	0.9	7	1.6	62	0.8
4	(ETEC,	—,	—,	—,	—	)	838	44.3	410	9.0	21	4.7	1,269	17.3
140	(E.c.,	—,	—,	—,	—	)	-		5	0.1	-		5	0.1
49	(Camp,	—,	—,	—,	—	)	91	4.8	424	9.3	34	7.6	549	7.5
118	(Aero,	—,	—,	—,	—	)	19	1.0	140	3.1	17	3.8	176	2.4
64	(Ples,	—,	—,	—,	—	)	36	1.9	218	4.8	25	5.6	279	3.8
58	(Yers,	—,	—,	—,	—	)	1	0.1	-		1	0.2	2	
Subtotal							1,523	80.5	3,971	87.5	409	91.5	5,903	80.6
42	(V.c.,	NAGv,	—,	—,	—	)	-		1		-		1	
14	(V.c.,	V.p.,	—,	—,	—	)	-		4	0.1	-		4	0.1
143	(V.c.,	ETEC,	—,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
195	(V.c.,	Aero,	—,	—,	—	)	-		1		-		1	
129	(V.c.,	Ples,	—,	—,	—	)	2	0.1	-		-		2	
111	(NAGv,	V.f.,	—,	—,	—	)	-		2		2	0.4	4	0.1
16	(NAGv,	V.p.,	—,	—,	—	)	2	0.1	11	0.2	1	0.2	14	0.2
61	(NAGv,	Sh.B,	—,	—,	—	)	1	0.1	2		-		3	
20	(NAGv,	Sal.,	—,	—,	—	)	1	0.1	26	0.6	4	0.9	31	0.4
128	(NAGv,	EPEC,	—,	—,	—	)	-		2		-		2	
8	(NAGv,	ETEC,	—,	—,	—	)	16	0.8	6	0.1	-		22	0.3
77	(NAGv,	Camp,	—,	—,	—	)	-		3	0.1	-		3	
171	(NAGv,	Aero,	—,	—,	—	)	-		3	0.1	-		3	
97	(NAGv,	Ples,	—,	—,	—	)	-		3	0.1	-		3	
106	(V.f.,	V.p.,	—,	—,	—	)	1	0.1	8	0.2	1	0.2	10	0.1
65	(V.f.,	Sh.B,	—,	—,	—	)	-		-		1	0.2	1	
63	(V.f.,	Sal.,	—,	—,	—	)	-		7	0.2	1	0.2	8	0.1
41	(V.f.,	ETEC,	—,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
158	(V.f.,	Camp,	—,	—,	—	)	1	0.1	1		-		2	
175	(V.f.,	Aero,	—,	—,	—	)	-		1		1	0.2	2	
136	(V.f.,	Ples,	—,	—,	—	)	-		1		-		1	
124	(V.p.,	Sh.B,	—,	—,	—	)	1	0.1	1		-		2	
181	(V.p.,	Sh.C,	—,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
91	(V.p.,	Sh.D,	—,	—,	—	)	1	0.1	3	0.1	-		4	0.1
13	(V.p.,	Sal.,	—,	—,	—	)	18	1.0	115	2.5	3	0.7	136	1.9
75	(V.p.,	EPEC,	—,	—,	—	)	3	0.2	4	0.1	-		7	0.1
83	(V.p.,	EIEC,	—,	—,	—	)	2	0.1	1		-		3	
7	(V.p.,	ETEC,	—,	—,	—	)	24	1.3	10	0.2	2	0.4	36	0.5
59	(V.p.,	Camp,	—,	—,	—	)	2	0.1	11	0.2	-		13	0.2
87	(V.p.,	Aero,	—,	—,	—	)	2	0.1	13	0.3	1	0.2	16	0.2
68	(V.p.,	Ples,	—,	—,	—	)	10	0.5	19	0.4	3	0.7	32	0.4
186	(Sh.A,	Sh.B,	—,	—,	—	)	-		1		-		1	
69	(Sh.A,	ETEC,	—,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
52	(Sh.A,	Camp,	—,	—,	—	)	1	0.1	1		-		2	
179	(Sh.A,	Aero,	—,	—,	—	)	-		1		-		1	
9	(Sh.B,	Sh.C,	—,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
110	(Sh.B,	Sh.D,	—,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
23	(Sh.B,	Sal.,	—,	—,	—	)	1	0.1	8	0.2	1	0.2	10	0.1

表3．検出病原菌組合せパターン別病原菌検出状況（1979-1987）－2

Pathogen-detective-patterns

Pathogen-detective pattern							No. of positive cases / % in positive cases							
Pattern No.	(detected pathogen)						[P]		[G]		[H]		Total	
No.	(1	2	3	4	5	)	Cases	[%]	Cases	[%]	Cases	[%]	Cases	[%]
193	(Sh.B,	EIEC,	—,	—,	—	)	-		1		-		1	
47	(Sh.B,	ETEC,	—,	—,	—	)	10	0.5	-		-		10	0.1
46	(Sh.B,	Camp,	—,	—,	—	)	6	0.3	5	0.1	1	0.2	12	0.2
165	(Sh.B,	Aero,	—,	—,	—	)	1	0.1	2		-		3	
95	(Sh.B,	Ples,	—,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
146	(Sh.C,	EPEC,	—,	—,	—	)	-		1		-		1	
152	(Sh.C,	ETEC,	—,	—,	—	)	2	0.1	1		-		3	
73	(Sh.C,	Camp,	—,	—,	—	)	1	0.1	4	0.1	-		5	0.1
25	(Sh.D,	Sal.,	—,	—,	—	)	6	0.3	9	0.2	-		15	0.2
100	(Sh.D,	EPEC,	—,	—,	—	)	2	0.1	-		-		2	
135	(Sh.D,	EIEC,	—,	—,	—	)	1	0.1	1		-		2	
29	(Sh.D,	ETEC,	—,	—,	—	)	11	0.6	2		-		13	0.2
115	(Sh.D,	Camp,	—,	—,	—	)	3	0.2	4	0.1	1	0.2	8	0.1
184	(Sh.D,	Aero,	—,	—,	—	)	1	0.1	3	0.1	-		4	0.1
132	(Sh.D,	Ples,	—,	—,	—	)	-		5	0.1	-		5	0.1
149	(Typh,	Camp,	—,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
72	(Sal.,	EPEC,	—,	—,	—	)	4	0.2	24	0.5	1	0.2	29	0.4
21	(Sal.,	EIEC,	—,	—,	—	)	-		6	0.1	-		6	0.1
11	(Sal.,	ETEC,	—,	—,	—	)	52	2.7	25	0.6	-		77	1.1
48	(Sal.,	E.c.,	—,	—,	—	)	1	0.1	1		-		2	
50	(Sal.,	Camp,	—,	—,	—	)	9	0.5	35	0.8	5	1.1	49	0.7
180	(Sal.,	Aero,	—,	—,	—	)	1	0.1	10	0.2	1	0.2	12	0.2
71	(Sal.,	Ples,	—,	—,	—	)	5	0.3	26	0.6	3	0.7	34	0.5
56	(Sal.,	Yers,	—,	—,	—	)	-		1		-		1	
125	(EPEC,	EIEC,	—,	—,	—	)	-		1		-		1	
105	(EPEC,	ETEC,	—,	—,	—	)	7	0.4	2		-		9	0.1
80	(EPEC,	Camp,	—,	—,	—	)	1	0.1	8	0.2	-		9	0.1
169	(EPEC,	Aero,	—,	—,	—	)	-		4	0.1	-		4	0.1
82	(EPEC,	Ples,	—,	—,	—	)	1	0.1	5	0.1	-		6	0.1
81	(EIEC,	ETEC,	—,	—,	—	)	-		-		1	0.2	1	
122	(EIEC,	Camp,	—,	—,	—	)	-		1		-		1	
182	(EIEC,	Aero,	—,	—,	—	)	-		1		-		1	
108	(EIEC,	Ples,	—,	—,	—	)	-		1		-		1	
53	(ETEC,	Camp,	—,	—,	—	)	31	1.6	8	0.2	-		39	0.5
93	(ETEC,	Aero,	—,	—,	—	)	17	0.9	4	0.1	-		21	0.3
88	(ETEC,	Ples,	—,	—,	—	)	28	1.5	12	0.3	1	0.2	41	0.6
113	(Camp,	Aero,	—,	—,	—	)	2	0.1	12	0.3	-		14	0.2
96	(Camp,	Ples,	—,	—,	—	)	6	0.3	20	0.4	1	0.2	27	0.4
176	(Aero,	Ples,	—,	—,	—	)	4	0.2	13	0.3	-		17	0.2
Subtotal							310	16.4	528	11.6	36	8.1	874	11.9
174	(V.c.,	NAGv,	Aero,	—,	—	)	-		1		-		1	
44	(V.c.,	V.p.,	Sal.,	—,	—	)	1	0.1	1		-		2	
57	(V.c.,	Sh.D,	Camp,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
134	(V.c.,	EPEC,	Camp,	—,	—	)	-		1		-		1	
22	(NAGv,	V.p.,	Sal.,	—,	—	)	4	0.2	2		1	0.2	7	0.1
154	(NAGv,	V.p.,	EPEC,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
90	(NAGv,	V.p.,	ETEC,	—,	—	)	2	0.1	-		-		2	
92	(NAGv,	V.p.,	Camp,	—,	—	)	-		1		-		1	
116	(NAGv,	Sh.B,	Camp,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
55	(NAGv,	Sh.D,	Sal.,	—,	—	)	-		1		-		1	
127	(NAGv,	Sal.,	EIEC,	—,	—	)	-		1		-		1	
38	(NAGv,	Sal.,	ETEC,	—,	—	)	1	0.1	1		-		2	
45	(NAGv,	Sal.,	Camp,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
133	(NAGv,	Sal.,	Ples,	—,	—	)	-		1		-		1	
187	(NAGv,	ETEC,	Camp,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
120	(NAGv,	ETEC,	Ples,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
94	(V.f.,	V.p.,	Sal.,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	

表3．検出病原菌組合せパターン別病原菌検出状況（1979-1987）－3

Pathogen-detective-patterns

Pathogen-detective pattern							No. of positive cases / % in positive cases							
Pattern No.	(detected pathogen)						[P]		[G]		[H]		Total	
No.	(1	2	3	4	5	)	Cases	[%]	Cases	[%]	Cases	[%]	Cases	[%]
112	(V.f.,	V.p.,	ETEC,	—,	—	)	1	0.1	1		-		2	
101	(V.f.,	V.p.,	Aero,	—,	—	)	1	0.1	1		-		2	
151	(V.f.,	V.p.,	Ples,	—,	—	)	-		-		1	0.2	1	
157	(V.f.,	Sal.,	ETEC,	—,	—	)	-		1		-		1	
160	(V.f.,	EPEC,	Ples,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
74	(V.p.,	Sh.B,	Sal.,	—,	—	)	-		1		-		1	
137	(V.p.,	Sal.,	ETEC,	—,	—	)	2	0.1	-		-		2	
131	(V.p.,	Sal.,	Camp,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
139	(V.p.,	Sal.,	Ples,	—,	—	)	2	0.1	5	0.1	-		7	0.1
104	(V.p.,	EPEC,	ETEC,	—,	—	)	-		1		-		1	
173	(V.p.,	EPEC,	Aero,	—,	—	)	-		1		-		1	
185	(V.p.,	ETEC,	Aero,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
145	(V.p.,	ETEC,	Ples,	—,	—	)	2	0.1	-		-		2	
130	(V.p.,	Camp,	Ples,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
178	(V.p.,	Aero,	Ples,	—,	—	)	-		2		-		2	
28	(Sh.A,	Sh.D,	ETEC,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
76	(Sh.B,	Sh.D,	Sal.,	—,	—	)	-		1		-		1	
147	(Sh.B,	Sal.,	Camp,	—,	—	)	-		1		-		1	
144	(Sh.B,	EPEC,	Camp,	—,	—	)	-		1		-		1	
107	(Sh.B,	ETEC,	Camp,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
148	(Sh.C,	ETEC,	Camp,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
89	(Sh.D,	Sal.,	ETEC,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
166	(Sh.D,	Sal.,	Ples,	—,	—	)	-		1		-		1	
79	(Sh.D,	EPEC,	Camp,	—,	—	)	-		1		-		1	
190	(Sh.D,	EPEC,	Ples,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
109	(Sh.D,	ETEC,	Camp,	—,	—	)	3	0.2	-		-		3	
188	(Sh.D,	ETEC,	Aero,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
33	(Sal.,	EPEC,	ETEC,	—,	—	)	2	0.1	-		-		2	
117	(Sal.,	EPEC,	Camp,	—,	—	)	-		2		-		2	
167	(Sal.,	EPEC,	Aero,	—,	—	)	-		1		-		1	
123	(Sal.,	EIEC,	Ples,	—,	—	)	-		1		-		1	
99	(Sal.,	ETEC,	Camp,	—,	—	)	3	0.2	-		-		3	
84	(Sal.,	ETEC,	Ples,	—,	—	)	2	0.1	1		-		3	
191	(Sal.,	Camp,	Aero,	—,	—	)	1	0.1	1		-		2	
119	(Sal.,	Camp,	Ples,	—,	—	)	2	0.1	-		-		2	
194	(Sal.,	Aero,	Ples,	—,	—	)	-		2		-		2	
183	(EPEC,	Camp,	Aero,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
150	(EPEC,	Camp,	Ples,	—,	—	)	1	0.1	1		-		2	
102	(ETEC,	Camp,	Ples,	—,	—	)	4	0.2	1		-		5	0.1
177	(ETEC,	Aero,	Ples,	—,	—	)	1	0.1	-		-		1	
192	(Camp,	Aero,	Ples,	—,	—	)	2	0.1	-		-		2	
Subtotal							55	2.9	38	0.8	2	0.4	95	1.3
156	(V.f.,	V.p.,	Sal.,	ETEC,	—	)	-		1		-		1	
142	(V.p.,	ETEC,	Camp,	Ples,	—	)	1	0.1	-		-		1	
86	(Sh.B,	Sh.D,	ETEC,	Camp,	—	)	1	0.1	-		-		1	
161	(Sh.D,	EIEC,	ETEC,	Camp,	—	)	1	0.1	-		-		1	
Subtotal							3	0.2	1		-		4	0.1
189	(NAGv,	V.f.,	Sal.,	Aero,	Ples	)	-		1		-		1	
Total positives (159 patterns)							1,892	[100]	4,539	[100]	447	[100]	6,878	[100]
No. of examined (Positives' ratio)							3,254	(58.1%)	16,795	(27.0%)	3,061	(14.6%)	23,110	(29.8%)

(Form-4 by MDA1A6)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 9-14, 1988

Campylobacter jejuni の培養細胞に対する細胞侵入性

柳川義勢*, 伊藤　武*, 稲葉美佐子*, 高橋正樹*
斎藤香彦*, 中村明子**, 鈴木健之**
山本　実**, 工藤泰雄*, 大橋　誠*

Cell-Invasion of *Campylobacter jejuni*

YOSHITOKI YANAGAWA*, TAKESHI ITOH*, MISAKO INABA*, MASAKI TAKAHASHI*
KAHIKO SAITO*, AKIKO NAKAMURA**,
KENJI SUZUKI**, MAKOTO YAMAMOTO**, YASUO KUDOH* and MAKOTO OHASHI*

Keywords：*Campylobacter jejuni*, 細胞侵入性 cell invasion,

Campylobacter jejuni によるヒトの急性腸炎は，その発生頻度も高く，感染性腸炎の中でも主要な位置を占めるものといってよい．この *C. jejuni* の病原性については，これまでマウス[1,2]，ウサギ[3]，ハムスター[4]など主に実験動物を感染モデルとして解析が加えられ，本菌腸炎の感染・発症と菌の組織内侵入性との間に密接な関連のあることが示唆されてきているが，まだその全貌を解明するまでには至っていない．

著者らも[5]，マウス，ラットおよびヒヨコを用いた感染実験で，本菌の腸管定着性と腸管細胞へ侵入することをたしかめたが，これらの動物は感染の成立に大量の生菌を必要とするなど概して本菌に対する感受性が低いこともあってより詳細な病原性解析を進める上では必ずしも十分なものではなかった．

一方，この種の組織侵入性における病原機序の解析には近年各種の培養細胞モデルの有用なことが赤痢菌[6]やエルシニア[7]などで確かめられてきており，*C. jejuni* においても HeLa 細胞などの培養細胞レベルでの病原解析も進みつつある[8-10]．

そこで著者らも，今回本菌の各種培養細胞に対する感受性を調べ，培養細胞を用いた感染モデルの確立を計ると共に，本実験で確立した培養細胞モデルを用いて由来を異にする多数の分離株の病原性について併せて検討したので，その成績について報告する．

材料および方法

1．供試菌株

今回実験に用いた菌株はいずれも著者らが種々の対象より分離した *Campylobacter jejuni* で，ヒト集団下痢症患者ふん便由来107株，散発下痢症患者由来55株，ウシ由来14株，イヌ由来11株，ニワトリ由来7株，ハト由来12株，食肉由来9株の合計215株である．また，細胞侵入性の基礎的実験には供試菌株のうち，集団下痢症患者由来の *C. jejuni*, CF1 株（血清型 TCK1）[11]および *C. jejuni*, CF256株（血清型 TCK7）の2株を用いた．

培養細胞への感染には，各々の供試菌株を微好気条件下で培養した後，リン酸緩衝液，pH7.2（以下 PBS と略す）で2回洗浄し，抗生物質無添加の Eagle の MEM 培地に浮遊したものを用いた．

2．供試培養細胞

当研究所ウイルス研究科において保存されている株化細胞を用いた．すなわち，ヒト細胞由来の Intestine 407 細胞，HeLa 細胞，FL 細胞，HEp2細胞，McCoy 細胞，HSG 細胞，HEL 細胞の7種，サル細胞由来の Vero 355 細胞，Vero #462細胞，BGM 細胞，GMC 細胞，CMK 細胞，MA104細胞の6種，そしてマウス細胞由来のL 929細胞の合計14種類である．各細胞はウシ胎児血清を10％加えた抗生物質無添加の Eagle の MEM 培地で 10^5／ml の浮遊液を作成し，その2 ml を 9 mm×18mm のカバースリップをいれた直径3 cm のプラスチック

*都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metoropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
**国立予防衛生研究所

シャーレに入れ，37℃20時間炭酸ガス培養装置内でカバースリップ上に単層培養したものを用いた．

3．細胞感染性の試験法

細胞を単層培養したカバースリップを被検菌液の中にいれ，37℃の炭酸ガス培養装置内で一定時間感染させた後，PBS で2回洗浄し，未感染菌を除去した．ついで，メタノールで30分固定後ギムザ染色を行い，800倍の顕微鏡下で鏡検した．細胞の観察は中村の方法[12]に準拠して行った．すなわち，カバースリップ上に250の観察視野を設定し，乱数表により無作為抽出した観察視野50視野について菌の感染像を観察した．

4．細胞感染率の算定方法

鏡検により培養細胞の細胞内にラセン状桿菌の存在を確認したものを感染細胞とし，感染率は次式により算定した．

感染率＝感染細胞数／観察した細胞総数×100

成　　績

1．各種株化培養細胞に対する感染率の比較

Table 1に今回供試した14種類の株化細胞に対する *C. jejuni*, CF1株およびCF256株の感染率を示した．両菌株はいづれの細胞にも感染性を示したが，その中で感染率が最も高率であったのはIntestine407細胞で，その感染率は約50％であった．この細胞における典型的な感染像

Table 1. Invasion of *Campylobacter jejuni* into various cell lines

Cell lines	Percentage of cells being invaded :			
	C. jejuni, CF 1		*C. jejuni*, CF 256	
	3 hrs*	5 hrs	3 hrs	5 hrs
Intestine 407	52.7	51.9	32.1	50.8
HeLa	36.5	45.1	24.1	45.3
FL	18.5	34.0	20.4	40.8
HEp 2	19.3	25.9	5.7	30.2
McCoy	19.7	18.9	23.5	25.0
HSG	5.6	25.5	35.0	32.7
HEL	14.0	24.5	17.3	20.4
Vero 355	5.9	3.8	5.5	3.7
Vero #462	17.9	23.1	25.5	41.2
BGM	36.4	38.6	20.8	28.6
GMC	16.1	38.5	30.4	49.1
CMK	10.5	41.8	17.7	25.9
MA 104	4.8	3.6	5.6	12.3
L 929	8.8	7.4	2.8	14.0

Bacterial suspension of 5×10^9／ml was challenged.
* Incubation period.

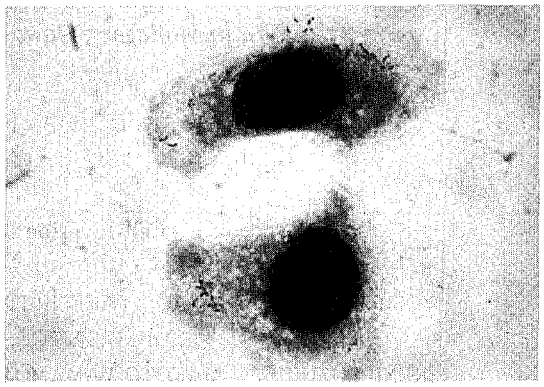


Fig. 1. Intestine 407 cell invasion by *Campylobacter jejuni*, strain CF256 (Giemsa staining)

はFig. 1に示すとおりである．以下，HeLa細胞で約45％，GMC細胞で約40％，FL細胞で約35％以上，またBGM細胞でも約30％以上と比較的高い感染率が得られた．感染率の低かった細胞はVero355細胞，MA104細胞，L929細胞であり，その感染率は概ね10％未満にとどまった．

この成績から以下の感染実験にはIntestine 407細胞を用いることとした．

2．感染菌の培養方法の検討

供試菌の培養方法により感染率に差があるか否かを明かにするために，培地および培養温度について検討を加えた成績をTable 2に示した．なお，供試した培地のうちBHIブイヨンでの培養は微好気ガスで置換後振とう培養したものである．

表から明らかなように，CF1，CF256両株の感染率は42℃培養に比し37℃培養の方が高い傾向にあった．しかし，使用した4種の培地による感染率には，大きな差は観察されなかった．

これらの成績にもとずき，培養が簡単なBHIブイヨンの37℃20～24時間培養菌を以後の実験に用いた．

3．感染菌量の検討

供試菌株のBHIブイヨン37℃20時間培養菌を10^6個／ml から10^{10}個／ml の濃度にそれぞれ調整し，Intestine 407細胞と4時間接触後その感染率を比較した．

その成績はTable 3に示すごとく，10^8個，10^7個，10^6個／ml の場合にはまったく感染は認められず，感染の成立には10^9個／ml 以上の菌量が必要であった．

4．感染時間の検討

CF1，CF256両株の各々10^{10}／ml をIntestine 407細胞にそれぞれ1時間から5時間まで接触させた後の感染率

Table 2. Invasion of *Campylobacter jejuni* into Intestine 407 cells : Effect of cultural condition of the organism

Cultural condition of the organisum			Percentage of cells being invaded after 4 hrs incubation	
Temperature	Medium	Incubation period	*C. jejuni*, CF 1	*C. jejuni*, CF 256
37℃	Blood agar	48 hrs	40.0	31.6
	BHI agar	48 hrs	59.6	61.8
	Nutrient agar	48 hrs	70.4	47.2
	BHI broth	24 hrs	58.7	49.8
42℃	Blood agar	48 hrs	57.7	29.6
	BHI agar	48 hrs	Not tested	22.6
	Nutrient agar	48 hrs	34.5	11.5
	BHI broth	24 hrs	35.5	32.4

Table 3. Invasion of *Campylobacter jejuni* into Intestine 407 cells : Effect of inoculum size

Inoculum sizes	Percentage of cells being invaded after 4 hrs incubation	
	C. jejuni, CF 1	*C. jejuni*, CF 256
10^{10}	83.4	85.1
10^{9}	40.7	55.5
10^{8}	7.5	0.0
10^{7}	0.0	0.0
10^{6}	1.8	0.0

Table 4. Invasion of *Campylobacter jejuni* into Intestine 407 cells : Effect of incubation period after challenge

Strains (Inoculum size／ml)	Percentage of cells being invaded				
	Incubation period				
	1 hr	2 hrs	3 hrs	4 hrs	5 hrs
C. jejuni, CF 1 (6.0×10^{10})	39.2	44.0	57.2	81.9	62.3
C. jejuni, CF 256 (3.8×10^{10})	39.8	85.8	89.1	91.8	92.3

の比較成績を Table 4 に示した.

両菌株とも感染時間が長くなるとともにその感染率も上昇し，ほぼ，4時間で最大に達した．また，感染した細胞に認められる菌数も4時間が最も多い結果であった.

5．細胞内増殖性についての検討

CF256株の10^{9}個／ml を3時間接触させた後，洗浄して未侵入の菌を除去した細胞を新鮮な Eagle の MEM 培地中で継続培養し，細胞内での菌数の増減を経時的に観察した.

その成績は Fig. 2 に示したように，細胞内菌数は抗生物質添加，無添加両培地の場合とも観察した24時間までの範囲内では特に明らかな細胞内増殖を示す結果は得られなかった.

6．各種由来菌株の細胞感染成績

各種検査材料から分離した *C. jejuni* の215菌株の BHI ブイヨン培養菌10^{9}個／ml をIntestine 407細胞に4時間接触後，無作為に選んだ25視野についてその感染性を検討した（Table 5）.

ヒト由来株では，集団事例由来株も散発事例由来株もその感染率は数％のものから70％台のものまで幅広い分布がみられたが，供試菌株の平均感染率は集団事例由来で27.3％，また，散発事例由来で27.2％と両由来間に特に差は観察されなかった.

ヒト以外の分離株についてみると，ウシおよびイヌ由来株では感染率が数％から30％台の間に分布し，その平均感染率もそれぞれ17.8％，10.8％とヒト由来株のそれに比べやや低い値であった．それに対しニワトリおよびハト由来株は低いものでも10％台，高いものでは70％台を示し，平均感染率もニワトリ由来で28.4％，ハト由来では41.0％とヒト由来株に比し高い傾向であった．食肉由来株ではウシやイヌ由来株とほぼ同様の成績でその平均感染率は17.7％であった.

一方，供試菌株の血清型と細胞感染率との関連についてみると，各血清型別にみた感染率には菌株により低いものから高いものまで広い範囲に分布するものの，平均感染率でみた場合特に血清型による顕著な差は観察され

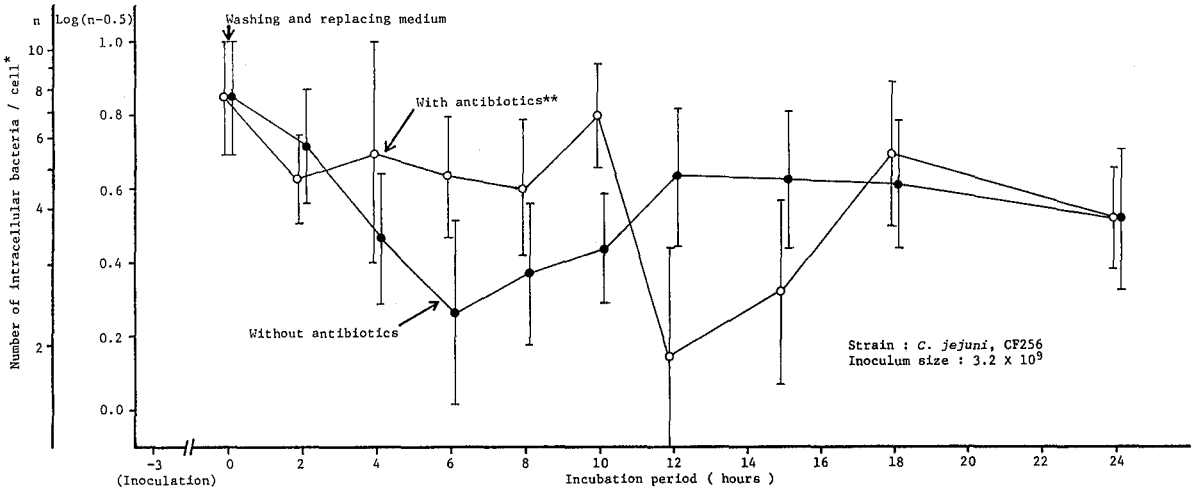


Fig. 2. Growth of *Campylobacter jejuni*, strain CF256 in infected Intestine 407 cells
*Mean value for 10-50 infected cells.
Vertical lines indicate standard deviation.
**Aminobenzylpenicillin (90 μg/ml), streptomycin (120 μg/ml), kanamycin (120 μg/ml) and amikacin sulfate (6 μg/ml) were used.

Table 5. Invasion by *Campylobacter jejuni* strains from various source into Intestine 407 cells

Sources of strains	Number of strains tested	Number of strains with an invasion rate (%) of:							
		1-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79
Human									
Outbreak cases	107	12	26	29	20	13	4	2	1
Sporadic cases	55	11	22	12	7	1	1		1
Subtotal	162	23	48	41	27	14	5	2	2
Non-human									
Cattle	14	3	3	4	4				
Dog	11	6	3	1	1				
Domestic fowl	7		2	2	1		1	1	
Dove	12		1	2	2	3	1	2	1
Meat	9	1	4	3		1			
Subtotal	53	10	13	12	8	4	2	3	1
Total	215	33	61	53	35	18	7	5	3

なかった (Table 6).

考　察

Campylobacter jejuni の急性腸炎では下痢，腹痛に加え発熱，粘血便を伴うことが多く，便中に白血球が認められるほか，血中抗体価の高い上昇も観察されることなどがその特徴とされる[13,14]．これらの臨床所見は，菌の組織侵入性が本菌腸炎の発症に密接に関与していることを強く示唆するものであるが，その病原機序の詳細についてはまだ有用な実験モデルが確立されていないこともあって十分解明されるまでに至っていない．

従来，赤痢菌，エルシニア，組織侵入性大腸菌など細胞侵入性菌の病原解析モデルとしては実験動物と培養細胞の2者がよく知られているが，後者は特に in vitro の実験系として条件設定が容易で，かつ多数の菌株を対象としたスクリーニング試験に適していることなどのため，近年広く利用されてきている[6,7,15]．こうした点から，

Table 6. Invasion of *Campylobacter jejuni* strains of various serogroups into Intestine 407 cells

Serogroup	Number of strains tested	Number of strains with an invasion rate (%) of:								Average invasion rate (%)
		1-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	
TCK 1	21		4	7	6	3	1			28.7
TCK 2	11	2	3	2	2	1	1			21.9
TCK 3	8	3	2	1	1	1				19.2
TCK 4	11	1	3	3	3	1				23.7
TCK 5	9	1	2	1	2	1		2		41.1
TCK 6	3	1	1	1						13.4
TCK 7	9	1	4	2			2			30.9
TCK 8	17	2	2	5	6	2				25.6
TCK 9	7	1	3	2	1					16.4
TCK 10	2		1	1						19.7
TCK 11	3		2	1						14.7
TCK 12	2	1	1							10.4
TCK 13	2			1	1					34.0
TCK 14	8		3	2	1	1			1	31.1
TCK 15	2		1						1	55.9
TCK 16	4		1		2			1		29.0
TCK 17	3	1		1		1				21.8
TCK 18	18	2	5	3	4	2	2			29.8
TCK 19	2	1	1							13.1
TCK 20	6		2	1	1		1	1		26.6
TCK 21	11	2	5	4						16.4
TCK 24	4			2		1	1			26.2
TCK 29	2		1	1						18.1
Others	4	1	1	1	1					19.5
UT*	46	12	13	11	4	4		1	1	14.8
Total	215	32	61	53	35	18	8	5	3	23.5

*Untypable.

今回著者らは *C. jejuni* の病原性解析の一手段として培養細胞モデルの有用性について検討を加えてみた.

培養細胞としては，赤痢菌などに汎用されているHeLa 細胞など14種の細胞を対象としたが，その成績は既述の通り，本菌は程度の差はあるもののいずれの培養細胞に対しても細胞侵入能を持つことが確認された.

本菌に細胞侵入性のあることはすでに Chick embryo 細胞[16]や HeLa 細胞[8-10]で確かめられているが，今回の著者らの成績はこれらの報告ともよく一致するものである．今回供試した14種の培養細胞の本菌に対する感染性を細胞ごとの感染率からみると，中ではヒト胎児腸管に由来する Intestine 407細胞が最も高く，この細胞が病原性のスクリーニングに有用であることが示唆された．そこで，一定の実験条件を設定して，由来を異にする多数の分離株を対象に，本細胞に対する細胞侵入性について検討を加えた．供試株にはヒト下痢症のほか，感染源として問題となる家畜，家禽，食肉などの由来株が含まれるが，いずれの由来株とも細胞侵入性が認められ，由来による細胞侵入性の強さにも大きな差は認められなかった．また，エルシニア・エンテロコリチカでは細胞侵入性と血清型との間に関連性のあることが指摘されているが[7]，*C. jejuni* では少なくとも今回検討した範囲では，細胞侵入性に対するこの種の血清型との関連性は特に観察されなかった.

以上の成績は *C. jejuni* が由来，血清型に係わりなく，いずれも細胞侵入性を持ち，その病原性に差のないことを示唆するものである．しかし，この細胞侵入性が本菌の病原性を直接反映していると結論するには，成績に示

したごとく，細胞侵入性の成立に10^9個／ml 以上の大量菌を必要とすること，また侵入菌の細胞内での確かな増殖像が観察されないなどまだ疑問の点も少なくない．この問題の解決には，分子遺伝学的レベルでの侵入性機構の解明などを含め今後検討すべき点も多い．

他方，本菌の一部の株は下痢発現に関与する因子としてある種の cytotoxin[17]や enterotoxin[18]の産生することも報告されている．本菌の腸炎発症の真の理解をするには，今後こうした点も含めた総合的な解析が必要であるといえる．

文　献

1) Madge, D. S.：Digestion, 20, 389-394, 1980.
2) Blaser, M. J., Duncan, D. J., Warren, G. H. and Wang, W. L.：Infect. Immun., 39(2), 908-916, 1983
3) Caldwell, M. B., Walker, R. I., Stewart, S. D. and Rogers, J. E.：Infect. Immun., 42(3), 1176-1182, 1983
4) Humphrey, C. D., Montag, D. M. and Pittman, F. E.：J. Infect. Dise., 151(3), 485-493, 1985
5) 柳川義勢，伊藤　武，稲葉美佐子，斎藤香彦，高橋正樹，坂井千三，大橋　誠：東京衛研年報，34，1-7，1983
6) Hale, T. L. and Bonventre, P. F.：Infect. Immun., 24 (3), 879-886, 1979
7) Une, T., Zen-Yoji, H., Maruyama, T. and Yanagawa, Y.：Microbiol. Immunol., 21, 727-729, 1977
8) Manninen, K. I., Prescott, J. F. and Dohoo, I. R.：Infect. Immun., 38(1), 46-52, 1982
9) Newell, D. G. and Pearson, A.：J. Diar. Dis. Res., 2 (1), 19-26, 1984
10) Fauchere, J. L., Rosenau, A., Veron, M., Moyen, E. N. Richard, S. and Pfister, A.：Infect. Immun., 54(2), 283-287, 1986
11) 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：日細菌誌，42(2), 499-512, 1987
12) 中村明子：細胞レベル，腸管感染研究会編，感染モデルの組み方，113-128, 1973, 近代出版，東京.
13) 伊藤　武，斎藤香彦，柳川義勢，甲斐明美，高橋正樹，稲葉美佐子，高野伊知郎，坂井千三，大橋　誠：感染症学雑誌，57(7), 576-586, 1983
14) 町井　彰，新田義朗，村上義次，相楽裕子，瀬尾威久，松原義雄：感染症学雑誌，58(4), 297-303, 1984
15) Day, N. P., Scotland, S. M. and Rowe, B.：J. Clin. Microbiol., 13(3)596-597, 1981
16) Butzler, J. P. and Skirrow, M. B.：Campylobacter enteritis, In Lambert, H. P. (ed.), Clinics in Gastroenterology 8, 737-765, 1979, W. B. Saunders, London.
17) Guerrant, R. L., Wanke, C. A., Pennie, R. A., Barrett, L. J., Lima, A. A. M. and O' brien, A. D.：Infect. Immun., 55(10), 2526-2530, 1987
18) Ruiz-Palacios, G. M., Torres, N. I., Ruiz-Palacios, B. R., Torres, J., Escamilla, E. and Tamayo, J.：Lancet ii, 250-253, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 15-18, 1988

寄生虫に対する漢方薬の有効性に関する研究(第1報) allyl および phenyl isothiocyanate を指標とする Anisakis Ⅰ型幼虫に対する相対的運動抑制効果の判定法

村田 以和夫*, 宮沢 貞雄*, 安田 一郎**, 小田 稔***, 渋谷 智晃***

Effect of Chinese Medicine for Helminth (Ⅰ) A Bioassay for Motal or Inhibitory Effects on The Activity of Anisakis Type I Larvae with allyl and phenyl isothiocyanate as Control

IWAO MURATA*, SADAO MIYAZAWA*, ICHIRO YASUDA**, MINORU ODA*** and TOMOAKI SHIBUYA**

Keywords：致死的効果判定法 bioassay for mortal effect on activity, アニサキスⅠ型幼虫 Anisakis type I larvae, アリルおよびイソチオシアン酸フェニル allyl and phenyl isothiocyanate, 粉わさび powdered roots of *Armoracia rusticana*

はじめに

著者ら(1987)は, 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について報告した. この実験成績の内, 市販のチューブ入り「ねりわさび®」,「和風ねりからし®」, および「おろし本わさび」に顕著な本虫運動抑制効果が認められた. この報告より20年程前に, 川島ら[2](1966), HAMAJIMA ら[3](1969)は, わさびの辛味成分である allyl および phenyl isothiocyanate の本虫に対する殺虫効果について報告し, アニサキス症の予防および駆虫に期待を寄せている. しかしながら, 近年になって, 食品中の天然変異原物質や発癌物質の存在が懸念される様になり, allyl isothiocyanate のハムスター細胞の染色体異常の発現やマウスおよびラットに対する発癌性の報告[4,5]がなされている. また, 1978年ごろに, からし油の成分 phenylen-diisothiocyanate 1.4 (Jonit®) が, ヒトの鉤虫および回虫駆虫薬として開発され, 本剤の服用量および副作用に関する記載[6]が見られる. しかしながら, 本剤の Anisakis に対する駆虫効果については不明である.

さらに, 本剤の副作用は下痢, 嘔吐, 腹痛など消化管刺激症状が著しいため, Anisakis 症の様な胃腸の激痛を主症状とする急性症例に対しては, 本剤の服用はかえって危険を伴なうものと思われる. そこで, さらに安全で有効な植物由来殺虫成分の検索に必要な標準的方法を開発するために既知有効成分である allyl および phenyl isothiocyanate を指標とし, 粉わさびを未知の植物由来成分の実験モデルとした実用的な効果判定法の検討を行なった.

材料および方法

1. Anisakis Ⅰ型幼虫の採取と保存：氷詰めのスケトウダラの肝臓に被のうする Anisakis Ⅰ型幼虫を眼科用ピンセットで注意深く摘出し, 脱のうさせてから, 0.4%の魚介類用生理食塩水(Na*Cl* 水)中で活発なS字状運動を示すもののみを実験に供した. 脱のう後, 本虫は Na*Cl* 水中で日毎に運動性が低下するため, スケトウダラの内臓と共にビニール袋に分包し, 冷凍冷蔵庫のパーシャル室(−3℃)に保存し, 実験の直前に本虫のみを摘出, より均一な運動性を維持するよう努めた.

2. Anisakis Ⅰ型幼虫の運動性評価基準：前報[1]に準じて, 活発なS字状運動を示すものを(卅), 静置状態ま

*東京都立衛生研究所微生物部細菌第2研究科 169 東京都新宿区百人町3−24−1
** 〃 理化学部医薬品研究科 〃
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24−1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
***東京都衛生局環境衛生部食品機動監視班小石川第1班

たはシャーレ（径9cm）に弱い衝撃を与えると自発的固有運動（巻き込み運動）を示すものを（卄），眼科用ピンセットで虫体を刺激した時のみ微弱な動きを示すものを（＋），そして全く動きを示さないものを（－）と表示した．

3．allyl および phenyl isothiocyanate（C_4H_5NS, C_7H_5NS）を指標とする Anisakis Ⅰ型幼虫に対する相対的運動抑制効果の判定基準：すでに対 Anisakis 殺虫物質として知られる allyl および phenyl isothiocyanate の10mg を乳化剤，（polyethylen glycol 600 M. W.）1g 加，100ml の NaCl 水に溶解し，これを原液として5倍希釈法で10mg ～0.08mg／100ml に調製した．同様に，allyl isothiocyanate の12.5mg／100ml を原液として，10倍希釈法で12.4mg ～0.12mg／100ml に調製し，各濃度液20ml をシャーレに分注して被検基準液とした．次いで，シャーレ内の各濃度基準液に活発なS字状運動を示す Anisakis Ⅰ型幼虫をシャーレ当り7隻ずつ浸漬後，10分，60分，24時間の3回観察して本虫の運動性の変化を記録した．同様に，対照として NaCl 水に15隻の本虫を投入して，経時的に運動性の変化を観察記録した．これらの予備的基礎実験にもとづき，allyl および phenyl isothiocyanate による本虫の経時的運動抑制パターンを求めた．次ぎに，未知植物由来殺虫成分の相対的運動抑制効果判定の実験モデルとして，粉わさびの3.0g／40ml NaCl 水混濁液を室温（15～20℃）で30分間振盪抽出し，遠心分離後その上清を未知の被検原液として，10倍希釈法で1：1～1：10,000（終末濃度，0.75mg／100ml）溶液に調製し，allyl isothiocyanate の10倍希釈基準液と同時・同一条件で Anisakis 運動抑制試験を行なって，運動抑制パターンにより相対的に基準液のどの濃度に相当するかを比較判定した．さらに，これら一連の実験成績をもとに Anisakis に対する運動抑制効果の判定基準を作成した．

実験成績

1．allyl および phenyl isothiocyanate 基準液の Anisakis Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果：表1に示すように，allyl isothiocyanate 10mg／100ml 溶液は，60分で被検虫体4／7の運動性を完全に抑制し，24時間後の判定では7隻全部の致死的効果が見られた．また2mg／100ml 溶液では，10分で7／7が（卄），60分で7／7が（＋），24時間処理で7／7が（－）と直線的な運動抑制効果が認められ，さらに0.4mg／100ml 溶液に至るまで，24時間後の判定で6／7に致死的効果が認められた．一方，phenyl isothiocyanate 10mg／100ml 溶液では，本虫の運動を60分で完全に抑制し，2mg／100ml 溶液では，allyl isothiocyanate と同様に24時間判定で，被検虫全てに致死的効果が認められた．しかし，0.4mg／100ml 溶液では，ピンセットによる損傷虫体1を除外して，1／6の致死的効果が認められたにすぎなかった．総じて，allyl および phenyl isothiocyanate の Anisakis に対する運動抑制効果に有意差は認められなかったものの0.4mg／100ml 群にのみ有意差が認められた．

2．既知の allyl isothiocyanate 10倍希釈基準液と未知の粉わさび抽出液の Anisakis に対する運動抑制効果の比較：allyl isothiocyanate の12.4mg／100ml を原液とする各10倍希釈基準液と，未知の粉わさび3.0g／40ml

表1　allyl および phenil isothiocyanate の Anisakis Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果

薬剤名	処理時間	被検虫体数	濃度 / 運動性	10mg／100ml 卄	10mg／100ml ＋	10mg／100ml －	2mg／100ml 卄	2mg／100ml ＋	2mg／100ml －	0.4mg／100ml 卄	0.4mg／100ml ＋	0.4mg／100ml －	0.08mg／100ml 卄	0.08mg／100ml ＋	0.08mg／100ml －
allyl isothicoyanate (C_4H_5NS)	10 分	7		1	6		7			7			7		
	60 分				3	④		7		7			7		
	24時間					⑦			⑦		1	⑥	4	3	
phenyl isothicoyanate (C_7H_5NS)	10 分	6～7		4	1	②	6	1		7			7		
	60 分					⑦	1	6		6	1		3	4	
	24時間					⑦			⑦	1	4	①*	5	1*	

対照	処理時間	被検虫体数	運動性 卄	運動性 ＋	運動性 －
0.4% NaCl	10 分	15	15		
	60 分		15		
	24時間		14	1	

注）＊：ピンセットによる損傷虫体を除く

表2　allyl isothiocyanate の Anisakis Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果

処理時間	被検虫体数	希釈倍数 mg／100ml	1：1 12.4mg				1：10 1.24mg				1：100 0.12mg			
		運動性	卌	卅	＋	－	卌	卅	＋	－	卌	卅	＋	－
10　分	7			5	2		5	2			4	3		
60　分	7				1	⑥			7			5	2	
24時間	7					⑦			5	②		6	1	

注）対照は，表1と同じ

表3　粉わさび（生理食塩水抽出）上清の Anisakis Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果

処理時間	被検虫体数	希釈倍数 mg／100ml	1：1 抽出原液*				1：10 750mg				1：100 75mg				1：1000 0.75mg			
		運動性	卌	卅	＋	－	卌	卅	＋	－	卌	卅	＋	－	卌	卅	＋	－
6　分	5					⑤		N.D				N.D				N.D		
10　分	7			N.D			1	4	2			5	2			4	3	
60　分	7			N.D						⑦		5	2				7	
24時間	7			N.D						⑦		3	3	①			6	**

注）　*：抽出原液3.0g／40ml・NaCl の室温振とう抽出液・遠心上清
　　**：ピンセットによる損傷虫体を除く
　　N.D：実験せず
　　対照：表1と同じ

表4　寄生虫に対する運動抑制物質の効果判定基準

記　号	判　　定	被検薬剤処理時間および寄生虫の運動性
※3	致死的効果有り	60分処理で被検虫体の過半数が（－）で、24時間後に白濁するもの
※2	強い運動抑制効果有り	24時間処理で被検虫体の過半数が（－）と（＋）を示すもの
※1	弱い運動抑制効果有り	24時間処理で被検虫体の過半数が（＋）で（－）を含まないもの
（－）	抑制効果無し	24時間処理で被検虫体の過半数が（卌）と（卅）を示すもの

注）幼虫の運動評価基準：（卌）活発なS字状前進運動を示すもの
（卅）自発的固有運動・巻き込み運動を示すもの
（＋）ピンセットで刺激して，やっと微弱な動きを示すもの
（－）全く動きを示さないもの

抽出・上清液を原液とする10倍希釈液の本虫運動抑制効果を表2と3に示した，すでに予備実験で allyl isothiocyanate 115mg／100ml 溶液は7分で，5被検虫体の全てを致死的に抑制することが判明しており，粉わさび3g／40ml NaCl抽出・上清液との比較では，6分で全虫が致死的抑制を受け，両者の効力はほぼ同等との結果が得られた．粉わさびと allyl isothiocyanate の各希釈液の本虫運動抑制効果をそのパターンで比較すると，粉わさびの750mg／100ml と allyl isothiocyanate 12.4mg／100ml 液の本虫運動抑制効果は，ほぼ同等であった．この結果，粉わさびに含まれる殺虫有効成分の濃度は，逆算により，およそ1～2％であろうと推定された．

3．allyl および phenyl isothiocyanate の本虫運動抑制パターンを指標とする未知運動抑制成分の効果判定基準：一連の実験成績から，表4に示したように，※3～※1および（－）までの判定基準を設定した．この基準により今後，漢方薬・生薬および香辛料等の抽出物質について，Anisakis をはじめ各種寄生虫に対する殺虫または運動抑制効果を *in vitro* で判定することが可能となった．

考　　察

古来から常用されて来た漢方薬，生薬および香辛料等に含まれる寄生虫の殺虫または運動抑制成分の客観的な効力試験法やその基準は確立されていない．今回著者らは，allyl およびphenyl isothiocyanate を指標とし，粉わさびを未知の植物由来寄生虫殺虫成分の実験モデルとして用いて，*in vitro* での殺虫または運動抑制効力試験法を開発し，一連の実験成績から，再現性のある効果判定基準を設定することができた．現代の医薬品とは異なり漢方薬・生薬の効能は，偏にヒトの長い試行錯誤の歴史によって培われて来たものであって，西洋医学的実験データとしてその裏付けを提示する事は極めて困難とされて来た．今回の実験の結果，わさび成分に Anisakis 殺虫効果が認められたことは，他の植物成分にも殺虫成分の存在が示唆され，今後の対 Anisakis 有効成分の検索に期待がもたれる．そこで，今回開発した試験法と効果判定基準を用いて，引き続き漢方薬および生薬のスクリーニングを行なう予定である．すでに，本虫に殺虫作用を有する allyl および phenyl isothiocyanate について，川島[2)]らは allyl に比べて phenyl の方が殺虫効果が強力であったと述べている．しかし，今回，allyl と phenyl isothiocyanate 10mg／100m*l* の高濃度基準液では，川島らの成績と同様の傾向が認められたが，0.4mg／100m*l* の低濃度基準液では，逆に phenyl より allyl isothiocyanate の方が致死的効果が有意に強いことが差の検定で明らかとなり，いずれとも断定し難い．総じて，allyl と phenyl isothiocyanate 間に，殺虫効力の有意差は認められなかったが，Anisakis に対する両剤の運動抑制パターンから運動性減衰曲線（検量線）を求める場合，allyl isothiocyanate 2 mg／100m*l* の基準液では，直線的な運動減衰曲線が得られることから，実験用基準液としては allyl isothiocyanate を用いた方が良いと思われる．

結　　論

既知の Anisakis 殺虫成分 allyl isothiocyanate の 5 ～ 10倍希釈液を基準液とし，活発な S 字状運動を示す Anisakis Ⅰ型幼虫を投入後，10分，60分，24時間の 3 回，観察を行なって，簡便に致死的または運動抑制効果を判定できる標準的試験法を開発した．この方法によって，本虫の経時的運動抑制パターンから効果判定基準を設定し，今後未知の植物由来殺虫成分のスクリーニングおよび相対的 Anisakis 運動抑制効果を 4 段階で判定することが可能となった．また，粉わさびを未知の殺虫成分の検索実験モデルとして用いた結果，この実験成績から，殺虫成分の含有濃度を逆算推定できることが明らかとなった．したがって，精油成分のような不安定な揮発性物質の器機定量分析の困難さをフォローする Bioassay として，この試験法は応用できる．

謝辞：本研究にあたり粉わさびの原末を供与されたリス食品工業株式会社の関係各位に深謝します．

（本研究は昭和62年度当研究所調査研究課題「畜水産加工食品およびその原材料における寄生虫検索ならびに各種寄生虫の保存温度および香辛料等の抵抗性に関する研究」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，その概要は，日本寄生虫学会東日本大会1988年10月で発表した．）

文　　献

1）村田以和夫，宮沢貞雄，國　守利，中嶋陽一，渋谷智晃，中西　弘：東京衛研年報，38，13-21，1987
2）川島健治郎，浜島房則：寄生虫学雑誌，15，(6)，507-510，1966
3）Hamajima F., Yasuhiro C., Nishihara S.：*Jap. J. Parasit*, 18, (5), 498-504, 1969
4）Kasamaki A., Takahashi H., Tsumura N., Niwa J. Fujita T. and Urasawa S.：*Mutation Research*, 105, 387～392, 1982
5）Bruce N. Ames：*SCIENCE*, 221, 1256-1264, 1983
6）横川　定，森下　薫，横川宗雄：人体寄生虫学提要，第16版　223-225，1978，杏林書院，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 19-23, 1988

寄生虫に対する漢方薬の有効性に関する研究（第2報）
漢方薬の Anisakis Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果

村田 以和夫*, 宮沢 貞雄*, 安田 一郎**, 小田 稔***,
渋谷 智晃***

Effect of Chinese Medicine for Helminth (Ⅱ)
Mortal or Inhibitory Effects with Several Kinds of Chinese Medicine on The Activity of Anisakis Type I Larvae

IWAO MURATA*, SADAO MIYAZAWA*, ICHIRO YASUDA**, MINORU ODA***
and TOMOAKI SHIBUYA***

Keywords：漢方薬 Chinese medicine, アニサキスⅠ型幼虫, Anisakis Type I Larvae, 運動抑制効果 Mortal or Inhibitory effect on activity, 胃腸薬 gastorointestinal drug, 寒天ゲル侵入試験 penetration test into agar gel

はじめに

著者ら[1]（1987）は，すでに 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について報告し，前報[2]では，既知の本虫殺虫物質の allyl および phenyl isothiocyanate を指標とする実用的な運動抑制効果判定法を開発し，その判定基準を設定した．この方法を用いて，未知の植物由来の Anisakis 殺虫成分のスクリーニングや本虫の運動抑制効果を4段階で判定することも可能となった．

大石ら[3-8]（1970～1975）は Anisakis 幼虫の食品衛生学的研究を行ない，冷凍，放射線照射，超音波等の物理的処理および各種食品添加物，駆虫薬，香辛料，調味料等による化学的処理など広範な実験成績を報告している．しかし，本虫の感染予防に有用性の高い手段としては，著者ら[1]の追試成績と同様，－20℃以下の冷凍，60℃以上の加熱または食品添加物のうち，sodium benzoate 1.35g／*l* と salcylic acid 0.4g／*l* 24時間処理が有効とされるのみで，他の処理法では本虫の殺虫効果は全く認められていない．また駆虫剤のうち，かつて鉤虫の駆虫薬として用いられた tetrachloroethylene 1 m*l*／*l* と tymol 0.05g／*l* の24時間処理以外には殺虫効果は期待できないと述べている．これら報告年代から十余年を経過した現在，本症の診断と治療技術はX線二重造影法や胃内視鏡や検査技術の発達により，確実性は高まったものの，胃壁に穿入する本虫を生検鉗子で摘出する以外，確実な治療法は全くないといわれている．さらに，薬物による予防法については，近年，食品中の天然変異原物質や発癌物質が問題視されるようになり，allyl isothiocyanate のハムスター細胞の染色体異常やマウス・ラットに対する発癌性の報告[9,10]もある．また，食品添加物としてはキャビアと清涼飲料水にのみ使用が許されている sodium benzoate[11]や日本酒の火落防止剤として1975年まで使用されていた salcylic acid[12]は，実際上本虫の殺虫目的には使用できない．また，かつて鉤虫の駆虫薬として使用された tetrachlorethylene は，肝毒性が強く，さらに現在，水質汚染物質[13]およびマウスの肝に対する発癌物質[14]と目されている．同様に，1975年頃ドイツで開発された鉤虫駆虫薬 phenylen-diisothiocyanate 1.4 'Jonit®'[15]も著しい消化管刺激があり，この副作用のため，胃腸の激痛を主徴とする Anisakis 症の治療に用いる事は危険を伴なう．したがって，これらの薬剤に代わり，安全かつ実用的な予防・治療薬の開発が望まれている．そこで今回，著者らはわさびで確認された急性 Anisakis 殺虫有効成分以外に，安全な

*東京都立衛生研究所微生物部細菌第2研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
**　〃　理化学部医薬品研究科　〃
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
***東京都衛生局環境衛生部食品機動監視班小石川第1班

植物由来の殺虫有効成分を検索する目的で，先ず，漢方薬に着目し，市販の漢方薬23種および生薬製剤2種，計25種のスクリーニングを行なった．その結果，数種の漢方薬と生薬製剤に Anisakis Ⅰ型幼虫に対する致死的効果が認められ，さらに，通常，成人1日当りの常用量，3時間処理によって0.65％寒天ゲルへの穿入能力が完全に消失するという注目すべき現象が認められたので，胃壁穿入能力とのかかわりについても2，3の考察を加えたので報告する．

材料および方法

被検漢方薬および生薬製剤のスクリーニング：市販の安中散3種，平胃散2種および生薬製剤（胃腸薬）2種，ならびに，各種の効能を有する胃腸薬以外の市販漢方薬18種，計25種（表1と2に表示）を試験対象にした．

1）抽出法：各被検薬は常法[21]に従い成人1日量を150ml の魚介類用生理食塩水（0.4％ NaCl 水）で室温（15～20℃）30分間振盪抽出した．**2）Anisakis Ⅰ型幼虫の採取および保存ならびに標準的運動抑制効果の判定法**：前報[2]で標準化を行なった方法および本虫の運動性評価基準ならびに被検薬剤の殺虫効果判定基準に従って実施した．

各種薬剤処理 Anisakis Ⅰ型幼虫の0.65％寒天ゲル侵入試験：0.4％ NaCl 加リン酸緩衝液（pH7.2）に0.65％となるように，J-Agar（三光）を加え，高圧滅菌器で110℃，15分加熱溶解し，径1.7cm，長さ11.5cm の試験管に約12ml ずつ分注，室温でゲル化させた．スケトウダラから摘出直後の活発なS字状運動を呈する Anisakis Ⅰ型幼虫を4～14隻この寒天ゲルの表面に置き，4回の予備実験で1～90分以内に100％穿入することを確認して本試験に備えた．

本試験は，安中散4.2g（A社散剤1日量）および朝鮮人参末15g／150ml 抽出液を20ml ずつシャーレに分注し，採取直後の本虫15隻を投入，1，3，18および24時間後に1隻ずつ1群5本の試験管の寒天ゲル上に移し，次いで毛細ピペットで0.4％ NaCl 水を3滴ずつ滴下して，各々の寒天ゲル内侵入数と所要時間を記録し，1群の平均侵入時間を求めた．同様に，対照として，phenyl isothiocyanate の1mg および0.5mg／100ml 0.4％ NaCl 溶液1時間処理群と，市販の黒酢（原液）および0.4％ NaCl 水18時間処理群を置いて，侵入数と所要時間を記録，各群の平均侵入時間を求め，安中散と朝鮮人参抽出液処理群の成績を比較した．

実験成績

各種漢方薬および生薬製剤（胃腸薬）の Anisakis Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果：漢方薬23種，生薬2種のスクリーニングを行なった結果，allyl isothiocyanate を指標とした効果判定基準と照合し，強い運動抑制効果あり（※2）と判定された漢方薬は，表1に示したとおり，安中散（A社散剤）と平胃散（B社散剤）の2剤であった．これら漢方薬は，成人1日量／150ml 抽出液で1日処理によって，被検虫体の過半数が（＋）および（－）と判定される程に運動が減弱した．次に弱い運動抑制効果あり（※1）と判定されたものは，安中散（B社散剤），安中散（C社エキス剤），平胃散（C社エキス剤），桂枝湯エキス剤，四逆散エキス剤の計5剤であった．一方，他の漢方薬には，本虫に対する運動抑制効果は全く認められなかった．

生薬製剤（胃腸薬）の Anisakis Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果：市販のS社およびT社製生薬製剤2剤について，同様に本虫に対する運動抑制効果を試験したところ，表2に示すとおり，両製剤ともに Anisakis 運動抑制パターンには差が認められず，漢方薬の安中散（A社散剤）と平胃散（B社散剤）と同様，強い運動抑制効果有り（※2）と判定された．

各種薬剤処理 Anisakis Ⅰ型幼虫の0.65％寒天ゲル侵入試験成績：本虫に対して強い運動抑制効果が認められた安中散（A社散剤）と予備実験で逆に本虫運動亢進効果が認められた朝鮮人参抽出液で，それぞれ1時間，3時間，18時間または24時間処理後に各5虫を取り出し，1群5本の寒天ゲル表面に移して，侵入虫体数とその所要時間を観察し，平均侵入時間として比較した．その結果，表3に示したように安中散抽出液1時間処理群では，被検虫5隻の全てが15～50分以内に寒天ゲル侵入能力を有していた．しかし，3時間と18時間処理群では，微弱な運動性を有していたにもかかわらず，寒天侵入能力は全く認められなかった．一方，朝鮮人参抽出液では，1時間，3時間および24時間処理群ともに，シャーレ内で活発なS字状運動を呈し，全被検虫体は1～10分で寒天に侵入する能力を有していた．さらに，平均侵入時間で比較すると，朝鮮人参抽出液処理群は，処理時間が長い程，短時間で寒天ゲル内に侵入する傾向が認められた．対照として，allyl isothiocyanate と同様，対 Anisakis 運動抑制効果が認められた phenyl isothiocyanate 1mg／100ml と0.5mg／100ml 各1時間処理群および一過性に本虫運動亢進効果が認められる市販の黒酢18時間処理群，ならびに0.4％NaCl 水18時間処理群を置いて，同様に，

表1 各種漢方薬の Anisakis Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果

漢方薬名	被検虫体数	処理時間	10分				60分				1日				2日				効果判定
		運動性	卌	卄	+	−	卌	卄	+	−	卌	卄	+	−	卌	卄	+	−	
安中散(A社散剤)	7		7					2	4	①			5	②			2	⑤	※2
〃 (B社 〃)	7		4	2	1		3	4					7			N.D			※1
〃 (C社エキス剤)	7		6	1			3	2	2			2	5			3	4		※1
平胃散(B社散剤)	7		7				3	4					2	⑤		N.D			※2
〃 (C社エキス剤)	7		6	1			4	3				2	5			2	5		※1
小青竜湯(エキス剤Ⅰ)	7		6		1		1	3	3		6		1			5	2		(−)
〃 (〃 Ⅱ)	7		7				7				6		1		3	3	1		(−)
芍薬甘草湯(〃 Ⅰ)	7		7				6	1				4	3			1	6		(−)
〃 (〃 Ⅱ)	7		7				7				1	4	2			1	6		(−)
葛根湯(エキス剤)	7		7				5	2			5	1	1			1	6		(−)
葛根湯加川芎辛夷(エキス剤)	7		5	2			4	3			7					4	3		(−)
桂枝湯(〃)	7		7				2	2	3			1	6				7		※1
小紫胡湯(〃)	7		7				3	3	1		5		2			3	4		(−)
半夏瀉心湯(〃)	7		6	1			6	1			6	1				6	1		(−)
四逆散(〃)	7		3	4			1	3	3				7				7		※1
黄連解毒湯(〃)	7		7				7				5	2			3	2	2		(−)
加味消遙散(〃)	7		7				7				6		1		3	2	2		(−)
当帰芍薬散(〃)	7		7				7					6	1			6	1		(−)
神秘湯(〃)	7		7					6	1			4	3			3	4		(−)
防風通聖散(〃)	7		7				7				7					N.D			(−)
補中益気湯(〃)	7		7				7				2	5				〃			(−)
麻黄湯(〃)	7		7				7					3	4			〃			※1?
十味敗毒湯(〃)	7		5	1	1		3	2	2		2	3	1	①		〃			(−)
防己黄耆湯(〃)	7		7				4	3				5	2			〃			(−)
茵蔯高湯(〃)	7		7				4	3				5	2			〃			(−)
対照 (0.4% NaCl)	7		7				7				7				6	1			(−)

注) 被検抽出液：20ml・大人1日量／150ml・0.4% 生理食塩水
※2：強い運動抑制効果有り・※1：弱い運動抑制効果有り・※1？：再検の要有り
(−)：運動抑制効果無し ・N.D：判定せず

表2 胃腸薬（生薬製剤）の Anisakis Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果

製剤名	被検虫体数	処理時間	10分				60分				1日				2日				効果判定
		運動性	卌	卄	+	−	卌	卄	+	−	卌	卄	+	−	卌	卄	+	−	
S社 胃腸薬	7		7				2	3	2			2	3	②			5	②	※2
T社 〃	7		7				7				7				6	1			(−)
対照 (0.4% NaCl 水)	7		7				7				7				6	1			(−)

注) 被検抽出液：20ml・大人1日量／150ml 0.4% 生理食塩水
※2：強い運動抑制効果有り
(−)：運動抑制効果無し

寒天ゲル侵入試験を行なった．その結果，phenyl isothiocyanate 0.5mg／100ml 18時間処理群では1／5隻のみが60分で寒天ゲルに侵入したが，1mg／100ml 18時間処理群では，完全に侵入能力が消失した．一方，黒酢および0.4%NaCl 水18時間処理群では，被検虫体の全てに寒天ゲル侵入能力が認められたが，平均侵入時間は黒酢で25.8分，0.4%NaCl 水で191分と，朝鮮人参抽出液に比べてはるかに長く，しかも個体差が著しかった．

表3　各種薬剤処理 Anisakis Ⅰ型幼虫の0.65％寒天ゲル侵入試験成績

薬剤名	濃度	処理時間	侵入数／被検虫体数	侵入時間	平均侵入時間
安中散（A社散剤）	1日量／150ml	1時間	5／5	15～50分	23.4分
		3時間	0／5	—	—
		18時間	0／5	—	—
朝鮮人参	1日量／150ml	1時間	5／5	1～10分	5.0分
		3時間	5／5	2～6分	3.4分
		24時間	4／4	2分	2.0分
phenyl isothiocyanate	1mg／100ml	1時間	0／5	—	—
	0.5mg／〃	〃	1／5	60分	60分
黒酢	原液	18時間	5／5	8～41分	25.8分
生理食塩水	0.4％	18時間	5／5	35～455分	191.0分

考　察

Anisakis 症の全国調査を実施した石倉らは，[16,17,18] 1981年に1,859例の症例を報告し，1988年には4,682例の症例を報告している．1病院での経験症例数は，北海道旭川市で187例（唐沢ら[18] 1969－1981），長崎県佐世保市近郊で156例（立花ら[19] 1980～1988）の報告がなされている．近年胃内視鏡の発達等により，Anisakis 症の診断・治療技術の確実性が高まり，全国各地からの症例報告は増加の一途にある．日本人の生食嗜好は，グルメブームにより増強され，また鮮魚流通機構の発達とあいまって，高級魚はもとよりアジ，サバ，イワシに至る大衆魚まで一般家庭でも生食する様になって来た．しかしながら，大石ら[3-8]（1970～1975）の広範な研究報告がなされて以来10余年を経た今日でも，本虫に対する実用性のある感染防止策は，冷凍と加熱調理以外になく，また薬物による特異療法も未確立である．そこで著者らは，わさびの本虫殺虫成分からヒントを得て，他の植物由来の Anisakis 殺虫成分の検索を行なう手がかりを得るため，先ず，複数の生薬が配合される漢方薬と生薬製剤のスクリーニングを行なった．その結果，漢方薬23種および生薬製剤2種のうち，主として，胃腸薬，健胃剤の中に常用量で有効な薬剤が見出された事は注目すべき事実と思われる．

「本草学」と呼ばれる江戸期の書に記された効能のうち解毒作用に触れてみると，1）江戸時代には，今日のように細菌性，化学性およびアレルギー性食中毒というように，病因別に食中毒が区分されていなかったこと．2）当時の食生活は獣肉食が禁じられていたため，主として動物性蛋白源は魚介類に求められていたこと．3）魚介類を介して人体に感染する寄生虫の概要が明らかとなって来たのは，寄生虫学の歴史を逆のぼっても最近のおよそ20年間であること等から，和漢薬[20]および漢方処方解説[21]の記載に見られる「魚中毒」「魚肉毒」および「黄胖病」（注：貧血，動悸，寄生虫病，萎黄病，心臓病）は，寄生虫感染も含めて，今日病因別に区分される全ての食あたりや食中毒を示すものと思われる．以上の点から，古くから常用され，その効能が経験的に認められて来た漢方・生薬の抗 Anisakis 作用は，今回初めて *in vitro* 試験によって，広義の効能に含まれることを再確認し得たものと考えられる．これら漢方・生薬の Anisakis 駆虫効果に関する臨床的な治療試験は，いずれ本症を多く手掛けている臨床側に委ねることとなろうが，今後引き続き Anisakis に対する強い運動抑制効果が認められた安中散（散剤）に着目し，有効性を示す生薬ならびに有効成分の構造を明らかにしてゆきたい．次に，各種薬剤処理 Anisakis の寒天ゲル侵入能力と本虫の胃腸壁穿入能力に関して触れてみたい．今回実験に用いた寒天ゲルの濃度は0.65％と，細菌培養に常用される寒天濃度（1.5％）の1／2より低く，半流動寒天濃度（0.3～0.5％）より濃く設定した．この濃度は胃粘膜の軟度または粘膜構造の強靱度を想定して設定したものではなく，摘出直後の活発な運動を呈する Anisakis の100％が1～90分間に寒天ゲルに侵入しうる濃度として調製したものである．しかし，粘膜構造とは異る寒天ゲルの表面はおそらく軟度，強靱度ともに胃粘膜より劣るものと推定される．

安中散抽出液3時間処理の本虫は，ピンセットで刺激した時のみ微弱な運動を示すもの（＋）が含まれるが，

対照に用いた phenyl isothiocyanate 1％溶液で1時間処理した場合と同様に，寒天ゲル内侵入能力は，全く消失することが認められた．この成績から，安中散の成人1日量を1回で服用（頓服）すれば，仮に本虫を完全に死滅させ得ないとしても胃壁侵入能を失活させ，その結果として発症回避の可能性も期待される．大石ら[8]は1％寒天ゲルを用いた Anisakis の侵入試験を行なって，ウサギの消化管壁穿入試験に比べ，寒天ゲル内侵入試験の方がバラツキも少く，一定した結果が得られ，本虫の起病力を推定するのに有効な手段であると述べている．短期日での本虫生死鑑別にはかなりの困難を伴うが，寒天ゲル侵入能力の有無を判定することは容易である．従って，今後は人体治験例と比較しながら，漢方・生薬から得られた有効成分の効力の測定のために更に検討を重ね，寒天ゲル内侵入試験の標準化に努め，Bioassay として確立してゆく必要がある．

ま と め

鮮魚を介して人体に感染し，重とくな症状を呈する Anisakis 症は，近年多発傾向にあり，本虫の感染予防法ならびに薬物による治療法は未だ確立されていない．そこで，より安全かつ人体内服可能量で，Anisakis に対して殺虫または運動抑制作用を有する植物由来有効成分を検索する目的で，手はじめに市販の漢方薬23種と生薬製剤2種，計25種のスクリーニングを行なった．その結果，安中散（散剤），平胃散（散剤）ならびに生薬製剤2種（胃腸薬）に Anisakis に対する強い運動抑制効果が認められた．今後の研究の進め方によっては，これら薬剤の成人1日量の頓服，または鮮魚生食前後の空腹時の予防内服によって，本症発症の予防，治療に期待がもたれる．また，0.65％寒天ゲル内侵入試験の標準化に努め，引き続き人体症例の治療効果について検討を進めることにより，本法は，未知の植物由来成分の効果判定法（Bioassay）として応用可能であると考察した．

謝辞：本研究にあたり漢方薬と生薬製剤を分与されたヤマヨシ薬局（我孫子市）の関係各位に深謝します．

（本研究は，昭和62年度当衛生研究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行なったもので，本研究の概要は和漢医薬学会1988年8月および，日本寄生虫学会東日本大会1988年10月で発表した．

文 献

1）村田以和夫，宮沢貞雄，國 守利，中嶋陽一，渋谷智晃，中西 弘：東京衛研年報，38，13-21，1987
2）村田以和夫，宮沢貞雄，安田一郎，小田 稔，渋谷智晃：東京衛研年報，39，15-18，1988
3）大石圭一，岡 重美，平沖道治：日本水産学会誌，37，(3)，186-191，1971
4）大石圭一，岡 重美，平沖道治：日本水産学会誌，38，(1)，69-72，1972
5）Oishi K., Hiraoki M.：*Bull. Jap. Society Scientific Fisheries*, 39, (12), 1345～1348, 1973
6）大石圭一，森 一雄，西浦康雄：日本水産学会誌，40，(12)，1241～1250，1974
7）大石圭一，平沖道治：日本水産学会誌，37，(10)，1020～1029，1971
8）日本水産学会編：水産学シリーズ，7，「魚類とアニサキス」第2刷，126-158，1981，恒星社厚生閣，東京
9）Kasamaki A., Takahashi H., Tumura N., Niwa J., Fujita T. and Urasawa S.：*Mutation Research*, 105, 387～392, 1982
10）Bruce N. Ames：*SCENCE*, 221, 1256-1264, 1983
11）日本薬学会編：衛生試験法注解，171，1973年版，1980年版，金原出版㈱，東京
12）食品添加物公定書注解編集委員会編：食品添加物公定書注解，第3版，343，1298，1974，金原出版㈱，東京
13）村田徳治：公害と対策，22，(9)，899～905，1986
14）八木正一，佐谷戸安好，真柄泰基：水道協会雑誌，54，11，(614)，34～85，1985
15）横川 定，森下 薫，横川宗雄：人体寄生虫学提要，第16版，225，1978，杏林書院，東京
16）石倉 肇：アニサキス症，初版，1972，北海タイムス社，札幌
17）石倉 肇，浅石和昭，戸塚守夫，早坂 滉：寄生虫学雑誌，37，2，(補)，83，1988
18）唐沢洋一，川上泰正，平福一郎，星 和夫，小山力：日本医事新報，3079，30～34，1983
19）立花保行，藤巻康教，嶋田雅暁，坂本 信，青木克己，坂口洋司，久保謹平，影井 昇：寄生虫学雑誌，37，2(補)，92，1988
20）赤松金芳：新訂和漢薬，第5刷，105-706，1980，医歯薬出版，東京
21）矢数道明：臨床応用，漢方処方解説，初版，148-502，1966，創元社，大阪

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 39, 24-27, 1988

寄生虫に対する漢方薬の有効性に関する研究（第3報）安中散およびウイキョウに含まれる *Anisakis* Ⅰ型幼虫の運動抑制物質の検索

安田一郎*, 浜野朋子*, 高野伊知郎*, 瀬戸隆子*,
村田以和夫**, 宮沢貞雄**, 小田稔***, 渋谷智晃***

Effect of Chinese Medicine for Helminth (Ⅲ) Mortal or Inhibitory Components in Antyû-san and Fennel on the Activity of *Anisakis* Type I Larvae

ICHIRO YASUDA*, TOMOKO HAMANO*, ICHIRO TAKANO*, TAKAKO SETO*,
IWAO MURATA**, SADAO MIYAZAWA**, MINORU ODA*** and TOMOAKI SHIBUYA***

Keywords：寄生虫 helminth, アニサキスⅠ型幼虫 *Anisakis* type Ⅰ larvae, 漢方薬 chinese medicine, 安中散 Antyû-san, 生薬 crude drugs, ウイキョウ fennel, 致死的運動抑制効果 mortal or inhibitory effect on activity, 殺虫物質 mortal principle, アネトール anethole, ケイヒアルデヒド cinnamic aldehyde

緒　言

前報[1]において，著者らは，鮮魚を介して人体に感染し，胃痛などの症状を示す *Anisakis* 症に有効な薬剤の検討を行い，漢方薬である安中散（散剤），平胃散（散剤）ならびに生薬製剤2種が，*Anisakis* Ⅰ型幼虫[2]に対し，強い運動抑制効果[3]を示すことを報告した．安中散は桂皮，茴香，縮砂，良姜，延胡索，牡蛎，甘草の各生薬より構成され，多くの場合，茯苓を加え，粉末として散剤とされるが，時には煎剤として服用される[4,5]．効能は，胃痛，腹痛，胸やけ，吐き気，食欲不振などの軽減で，古くより「中」すなわち身体の胃の部分を安んずる薬として用いられている[6]．漢方薬は，食事と食事の間，または空腹時に服用するものであり，胃液中での薬剤濃度は，食後に服用する一般薬より高いことが期待できる．

そこで，今回，安中散構成生薬の水抽出物について本虫に対する活性を調べるとともに，強い活性を示す茴香[7]に着目し，活性物質の検索を行った．

大石ら[8]は既に数種の香辛料の精油について，*Anisakis* Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果を調べ，桂皮，丁字，肉豆蔻などの精油に活性を認めている．また，その精油成分の一部について殺虫活性を調べ，cinnamic aldehyde, limonene などに殺滅効果を認めていることから，茴香より得られた活性物質Ⅰと同様，桂皮の主成分である cinnamic aldehyde（Ⅱ）についても運動抑制効果を調べた．

実験の部

1．装置および測定条件

(1) 核磁気共鳴(NMR)装置は日本電子 FX-270，測定条件は重クロロホルムを測定溶媒，テトラメチルシランを内標準物質とし，^{13}C-NMR を測定した．なお，off-resonance decoupling 実験によるデータは次の略号により記載した．s : singlet, d : doublet, q : quartet.

(2) 質量分析(MS)装置は日本電子 D-300，測定条件はイオン化電圧70eV で，直接導入法とした．

(3) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)装置は日本分光880-PU, UV-875, 分析条件はカラムに TSKgel ODS-120T，4.6mm×25cm，5 μm（東ソー製），移動相にメタノール・水(7：3)混液を用い，流量1 ml/分，検出は254nm とした．

2．試　薬

カラムクロマトグラフィーには Kieselgel 60，0.04～

*東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Reserch Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
**東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科
***東京都衛生局環境衛生部食品機動監視班小石川第1班

0.063mm，メルク社製を，NMR 測定用試薬はメルク社製，cinnamic aldehyde は東京化成製，他の試薬はすべて試薬特級を用いた．

3．生薬の活性スクリーニング

安中散構成生薬は，いずれも東京市場品を用いた．

被検液は，各生薬の粉末3.0g を量り，0.4%魚介類用生理食塩水30ml を用いて，室温で30分間振とう抽出後，遠心分離し，その上澄液20ml とした．

Anisakis Ⅰ型幼虫は，スケソウダラより採取し，活発なS字状運動を示すものを集めた．1群を5～7匹とし，被検液中で10分，60分および24時間経過後の幼虫の状態を観察した．

効果の判定については，既報[3]の判定基準に従い行った．

4．茴香からの運動抑制物質Ⅰの単離と構造解析

茴香末100g をメタノール1l でときどき振り混ぜながら室温で3日間抽出後，溶媒を減圧留去し，かっ色粘稠物（11.1g）を得た．このエキスを500ml の水に懸濁し，ヘキサン500ml で3回抽出を行い，無水硫酸ナトリウム乾燥後，溶媒を減圧留去し，淡かっ色の流動性の高いヘキサン画分（3.1g）を得た．また，水層についても，溶媒を減圧留去し，黒かっ色の粘性の高い水画分(7.6g)を得た．次に，ヘキサン画分1.2g を約5 ml のエーテルに溶かし，シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ウェットカラム，5.4×10.0 cm）に付し，溶離液にヘキサン・エーテル混液を用い，運動抑制物質Ⅰの単離を行った．

構造解析は，その^{13}C-NMR および MS スペクトルの解析により行った．

なお，活性の測定は，メタノールエキスについては500mg/100ml 0.4% NaCl 水を被検液とし，ヘキサン画分，水画分については各200mg，シリカゲルカラムにより得た各分画溶出物は50mg を1% polyethylene glycol 600を含む0.4% NaCl 水100ml に懸濁したものを被検液とした．

5．Ⅰおよび cinnamic aldehyde（Ⅱ）の運動抑制効果の測定

ⅠおよびⅡ各20mg を1% polyethylene glycol 600を含む0.4% NaCl 水100ml に懸濁し，これを原液として0.4～20mg/100ml に調製した．効果の判定は既報に従って行った．

結果および考察

1．安中散構成生薬の運動抑制効果

桂皮，茴香，縮砂，良姜，延胡索，牡蛎，甘草，茯苓の8種の構成生薬の運動抑制効果を表1に示した．桂皮の精油については，既に大石らの報告[8]があるが，既報[3]の判定基準に従い，桂皮の水抽出物の効果について調べたところ，同じように致死的運動抑制効果があると判定された．そして，桂皮以外に，弱い活性を示す甘草を含め，茴香，縮砂，良姜の4種の生薬にも運動抑制効果を認めた．数多い漢方薬の中で，安中散は活性を示す生薬が多種配合された製剤の1処方と考えられる．甘草を除いたこれらはいずれも芳香性生薬と呼ばれるもので，精油成分を多く含むものである．

2．茴香からの運動抑制物質Ⅰの単離とその構造

茴香のメタノール抽出物は，生薬のスクリーニングで用いた水抽出物より高い活性を示したので，これを用いて活性物質の検索を行った．活性の判定法は，分画

表1　安中散構成生薬の *Anisakis* Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果

生薬名	被検虫体数	処理時間	10分				60分				24時間				効果
		運動性	+++	++	+	−	+++	++	+	−	+++	++	+	−	
桂皮	(7)		4	3					7					7	*3
茴香	(5)			5			4	1						5	*2
縮砂	(7)			5	2					7				7	*3
良姜	(6)		6					6					4	2	*2
延胡索	(7)		1	6			4	3			5	2			
牡蛎	(7)		6	1			3	4			4	3			
甘草	(5)		2	3			1	4				2	3		*1
茯苓	(5)		4	1			4	1			3	2			

+++ 活発なS字状前進運動を示すもの　　++ 自発的固有運動・巻込運動を示すもの
＋ ピンセットで刺激してやっと微弱な動きを示すもの　　− 全く動きを示さないもの
*1 弱い運動抑制効果　　*2 強い運動抑制効果　　*3 致死的運動抑制効果

表2　シリカゲルカラムを用いたウイキョウ中の *Anisakis* Ⅰ型幼虫運動抑制物質の検索

分画番号	容離液 組成	容離液 容出量	容出重量	各分画50mg/100ml における抑制効果 被検虫体数	処理時間 運動性 10分 ++	10分 +	10分 −	60分 ++	60分 +	60分 −
1	ヘキサン・エーテル(10:1)	250ml	10.3%	(5)	4	1		3	2	
2	〃 (10:1.5)	200	4.8	(5)	4	1			4	1
3	〃 (10:2)	200	23.0	(5)	1	4			1	4
4	〃 (10:2)	200	10.4	(5)	1	4			2	3
5	〃 (10:3)	200	12.6	(5)	2	3			5	
6	〃 (10:3)	200	13.1	(5)	2	3			5	
7	〃 (10:4)	200	6.5	(5)	4	1		3	2	
8	〃 (10:10)	300	19.3	(5)	4	1		4	1	

50mg/100ml の濃度下で60分経過後の幼虫の動きを観察することによった．常法により液-液分配でヘキサン画分と水画分に分け，活性を測定したところ，ヘキサン画分には強い活性が現われ，一方，水画分はまったく活性を示さなかった．そこで，このヘキサン画分をシリカゲルカラムに付加したところ，分画3が最大で，次いで，分画4，分画2の順に強い活性を示した(表2)．そこで，HPLCで分画3がⅠの単一ピーク(t_R 17.4分)を示すことを確認した後，構造解析を行った．なお，分画4は，Ⅰ以外にわずかに夾雑物を含むものであった．

Ⅰは無色油状物質で，そのスペクトルデータは以下の通りである．

^{13}C-NMR(ppm)：158.7(s), 130.8(s), 130.6(d), 126.9(d), 123.2(d), 113.9(d), 55.0(q), 18.3(q).

MS *m/z*：148 (M^+, base peak), 133, 121, 117, 105, 91, 77.

その構造については上記スペクトルデータより分子式 $C_{10}H_{12}O$ が考えられ，メチル基1個，Oメチル基1個，Eタイプの二置換二重結合1個ならびに1，4置換ベンゼン1個の存在が示唆され，図1に示す anethole の構造式が推定された．anethole は茴香に多く含まれる物質[7]で，MS および HPLC の t_R を標品と直接比較したところ，完全に一致したので，Ⅰを anethole と同定した．

今回行った方法では，夾雑物のない高濃度の anethole を含む分画が得られたために，活性物質の検索が容易に行えたが，このほかの低含量の活性物質については，操作途上で損失してしまった可能性もあり，今後，これらについて実験方法も含め，検討する必要があると考えている．

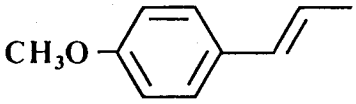


図1　Anethole の化学構造式

なお，水抽出物で認められる活性について，その本質を精査した結果，水に溶けこんだ anethole であることが判明した．

3．Ⅰおよび cinnamic aldehyde (Ⅱ) の運動抑制効果

Ⅰおよび桂皮に含まれるⅡにつき，既報[9]の allyl および phenylisothiocyanate と同様に運動抑制効果を調べたところ，allyl および phenylisothiocyanate に比較し，両者はやや弱い活性を示した．詳細な各濃度についての運動性の観察結果を表3に掲げたが，ⅠおよびⅡの各濃度で，*Anisakis* Ⅰ型幼虫は概ね同じ傾向を示した．ただ，10mg/100ml，60分において，Ⅰは5/7が(−)活性を示し，自発的な固有運動(++)を示すものがなかったのに対し，Ⅱは(++)活性を示すものが6/7あり，(−)活性を示すものがなかったこと，2 mg/100ml，24時間において，Ⅰは5/7が(++)活性を示し，(−)活性を示すものはなく，一方，Ⅱは3/7が(−)活性を示し，(++)活性を示すものはなかった．これらのことから，ⅡはⅠより低濃度で(+)または(−)の活性を示すものの，ⅠはⅡより速効性が期待できると思われる．

また，10mg/100ml，2 mg/100ml の濃度において，ⅠおよびⅡともに，幼虫の頸部が損傷し破裂しているものが多数認められた．同様の現象は，犬回虫に対し15mg/100ml 濃度のⅡで観察されている[10]．しかし，allylisothiocyanate は，*Anisakis* Ⅰ型幼虫に対し高濃度でもこ

表3 Anethole および Cinnamic aldehyde の *Anisakis* Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果

物質名	処理時間	被検虫体数	濃度(mg/100ml) 運動性	20			10			5			2			0.4		
				++	+	−	++	+	−	++	+	−	++	+	−	++	+	−
Anethole (Ⅰ)	10分	(7)		6	1		5	2		7			7			6	1	
	60分					7		2	5	4	3		6	1		5	2	
	24時間					7		4	3	3	1	3	5	2		7		
Cinnamic aldehyde (Ⅱ)	10分	(7)		7			5	2		7			5	2		7		
	60分			1	6		6	1		2	5		2	5		7		
	24時間					7			7		3	4		4	3	6	1	

のような現象は認められない．Hamajima ら[11]によると，allyl isothiocyanate の殺虫作用は，幼虫の解糖および呼吸代謝を阻害するためと考えられているが，頸部損傷の状態から，Ⅰ，Ⅱは同じような作用機序により殺虫効果が発現しているとは考察し難く，これらについては今後の検討課題と考えている．

最近，犬回虫に対し，檳榔子に含まれる脂肪酸ならびに鎖状アルコール類，あるいは天然界に広く存在するタンニン類が殺虫効果を示すことが報告[12,13]されている．これは，水可溶性成分のなかにも *Anisakis* Ⅰ型幼虫に有効な物質があることを示唆するものであり，今回致死的運動抑制効果を示した縮砂の殺虫成分も含め，引き続き生薬中の活性物質の検索を進めていきたいと考えている．

ま と め

安中散構成生薬の水抽出物のうち，*Anisakis* Ⅰ型幼虫に対し，桂皮，縮砂に致死的運動抑制効果を，茴香，良姜に強い運動抑制効果を，甘草に弱い運動抑制効果を認めた．茴香に含まれる運動抑制物質は anethole であり，その活性は，桂皮に含まれる cinnamic aldehyde とほぼ同等であった．漢方薬は，これらの生薬を複数配合した医薬品であり，単味の医薬品と異なって，多種類の成分の複合体であるため，個々の成分の活性が低くても，相加的，相乗的な有効性を示す可能性がある．

文 献

1）村田以和夫，宮沢貞雄，安田一郎，小田 稔，渋谷智晃：東京衛研年報，39，19-23，1988

2）大石圭一，平沖道治：日本水産学会誌，37，1020-1030，1971

3）村田以和夫，宮沢貞雄，安田一郎，小田 稔，渋谷智晃：東京衛研年報，39，15-18，1988

4）厚生省薬務局監修：一般用漢方処方の手引き，9-10，1984，薬業事報社，東京

5）原田正敏：210処方漢方薬物治療学，105，1985，廣川書店，東京

6）矢数道明：臨床応用漢方処方解説，5-7，1966，創元社，東京

7）日本公定書協会編：第11改正日本薬局方解説書，D-65－D-67，1981，廣川書店，東京

8）大石圭一，森 一雄，西浦康雄：日本水産学会誌，40，1241-1250，1974

9）川島健治郎，浜島房則：寄生虫学雑誌，15，507-510，1966

10）Kiuchi, F., Nakamura, N., Tsuda, Y., Kondo, K., Yoshimura, H.：*Chem. Pharm. Bull.*, 36, 412-415, 1988

11）Hamajima, F., Yasuhiro, C., Nishihara, S.：*Jap. J. Parasit.*, 18, 498-504, 1969

12）Kiuchi, F., Miyashita, N., Tsuda, Y., Kondo, K., Yoshimura, H.：*Chem. Pharm. Bull.*, 35, 2880-2886, 1987

13）Kiuchi, F., Tsuda, Y., Kondo, K., Yoshimura, H., Nishioka, I., Nonaka, G.：*Chem. Pharm. Bull.*, 36, 1796-1802, 1988

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 39, 28-31, 1988

In Vitroにおける塩化メチル水銀，塩化第二水銀の赤芽球前駆細胞(CFU-E)に及ぼす影響

蓑 輪 佳 子*，浦 野 直 子**，鈴 木 重 任***

Effects of Methylmercuric Chloride and Mercuric Chloride on CFU-E In Vitro

KEIKO MINOWA*, NAOKO URANO** and SHIGETOH SUZUKI***

Keywords：塩化メチル水銀 Methylmercuric chloride，塩化第二水銀 Mercuric chloride，赤芽球前駆細胞 CFU-E

緒　　言

塩化メチル水銀は生体に重篤な障害を引き起こす環境汚染物質として広く知られている．急性期水俣病患者では病理学的特徴として著名な骨髄障害（骨髄低形成，貧血）が見られたにもかかわらず，メチル水銀が血液や造血細胞に及ぼす影響についての報告はいまだ数少ない．

赤血球・顆粒球は，共通の幹細胞から出発していくつかの段階を経て，成熟細胞へと分化していく．そこで，血液幹細胞から赤血球へと成熟するいくつかの段階の一つで，エリトロポエチン反応性細胞の赤芽球前駆細胞（CFU-E）が赤芽球へ分化する過程において，塩化メチル水銀がどのように影響するかを今回我々は水銀濃度・培養時間・エリトロポエチン濃度を変える事によって観察した．さらに，水銀化合物の一つである塩化第二水銀についても同様の実験を行い塩化メチル水銀の影響と比較した．

方　　法

本実験では，赤芽球コロニー形成法として McLeod[1] らのプラズマクロット培養法を用いた．

動　物：マウス（C57BL／6 NCrj，日本チャールズリバーK. K.）雄，9週令～12週令．

試　薬：塩化メチル水銀（和光純薬，試薬特級），塩化第二水銀（和光純薬，試薬特級），α-medium（FLOW Lab.），エリトロポエチン（Step Ⅲ，Sheep, Connaught Labs. Ltd.），MEM Hanks 液（GIBCO），牛血清アルブミン（FractionV, SIGMA），牛胚抽出液（EE-100, DIFCO），Hanks' balanced salt solution（GIBCO），牛血漿（日本バイオテスト），牛胎児血清（GIBCO），L-アスパラギン（SIGMA），3,5,3',5'-tetramethylbenzidine（MERCK）．

培　養：1．培養細胞　マウス大腿骨より骨髄細胞を採取し，MEM Hanks 液（pH6.8）に浮遊させ，10×10^6／ml に調整する．各実験にはそれぞれマウス3匹から得た骨髄細胞をプールして使用した．

2．水銀溶液　塩化メチル水銀は炭酸緩衝液（pH9.2）に溶解し，塩化第二水銀はα-medium に溶解したのち表1に示した各濃度の水銀溶液を調製した．

3．培養方法　牛胚抽出液（BEE）0.1ml，牛胎児血清（FCS）0.2ml，10％牛血清アルブミン（BSA）0.1ml，L-アスパラギン0.1ml，エリトロポエチン（EPO）0.1ml，α-medium0.1ml および塩化メチル水銀または塩化第二水銀溶液0.1ml の混合溶液にマウス骨髄細胞（10×10^6／ml）0.1ml を加えた．さらに上記の溶液0.9ml に牛血漿0.1ml を加え，全量1.0ml とした．それらをマイクロプレート（フレキシブルタイプ，FLOW Lab.）の6 well に0.1ml づつ分注後，37℃，5％CO_2条件下で培養した．実験1～5で使用した塩化メチル水銀濃度，塩化第二水銀濃度，エリトロポエチン濃度および培養時間は表1のとおりである．

固定・染色：培養後のプラズマクロットをマイクロプレートからスライドグラス上に取り出し，5％グルタールアルデヒドで固定後，水洗した．1％ベンチジンと2.5％過酸化水素の5：1混合溶液で10分間染色，水洗後さらにヘマトキシリン液で1～2分間染色した．

コロニー数の算定：赤芽球コロニーを染色後，封入剤 Permount で封入し顕微鏡下（×100）でコロニー数を数

*東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科　169　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, 169, Japan
**帝京大学医学部公衆衛生学教室
***東京都衛生局公衆衛生部防疫結核課

Table 1. Experimental Conditions

Exp. No.	Methylmercuric Chloride (M)	Mercuric Chloride (M)	Erythropoietin (mU/well)	Incubation time (hr)
1	10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}	10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}	50	48
2	10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6}, 5×10^{-6}, 10^{-5}	10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}	50	48
3	10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6}, 5×10^{-6}, 10^{-5}	10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}	50	48
4	10^{-8}, 10^{-7}	10^{-7}, 10^{-6}	50	24, 48, 72, 96
5	10^{-7}, 10^{-6}	10^{-6}, 10^{-5}	12.5, 25.0, 50.0	48

えた．その際，ベンチジン陽性細胞8ヶ以上の集落を1コロニーとして数えた．

各条件における赤芽球コロニー数は，6 well の赤芽球コロニー数の平均値で示した．

結果および考察

1．培養液中の水銀化合物濃度による影響(実験1～3)

図1および2は，対照群の赤芽球コロニー数を基準にとり，水銀添加群の赤芽球コロニー数を%で示したものである．

ここでは同一の条件で実験を3回行ったが，いずれも同様の傾向を示し，塩化メチル水銀および塩化第二水銀による赤芽球コロニー形成の抑制が認められた．そしてその抑制は dose dependent であり，この結果は Strom[2] らの報告と傾向的に一致した．

塩化メチル水銀は10^{-5}M添加により赤芽球コロニー形成を100%阻止したが，塩化第二水銀10^{-5}Mでは対照群に比べ10～30%のコロニー数を示し，100%抑制は10^{-4}Mで認められた．すなわち CFU-E に対する毒性は，塩化メチル水銀の方が塩化第二水銀よりも約10倍強いことが認められた．

2．赤芽球コロニー形成時間に及ぼす水銀化合物の影響(実験4)

図3および4に，赤芽球コロニー形成を経時的に観察した結果を示した．

48時間後の対照群の赤芽球コロニー数は，Fig. 3 が290±43，Fig. 4 が260±36であり最高値を示した．塩化メチル水銀10^{-7}Mおよび塩化第二水銀10^{-6}M添加により，赤芽球コロニー数は対照群に比べ減少したが，赤芽球コロニー形成のピークは対照群と同様に48時間後であり，水銀化合物の添加による影響は認められなかった．

3．水銀化合物共存下における赤芽球コロニー形成に及ぼすエリトロポエチン濃度の影響(実験5)

図5および6に，赤芽球コロニー形成におけるエリトロポエチン濃度の影響を観察した結果を示した．

赤血球生成を調節し，赤血球系幹細胞の赤芽球への分化を促進するホルモン様物質であるエリトロポエチン濃度を3段階(12.5，25.0および50.0mU／well)設定し，その影響を観察した．

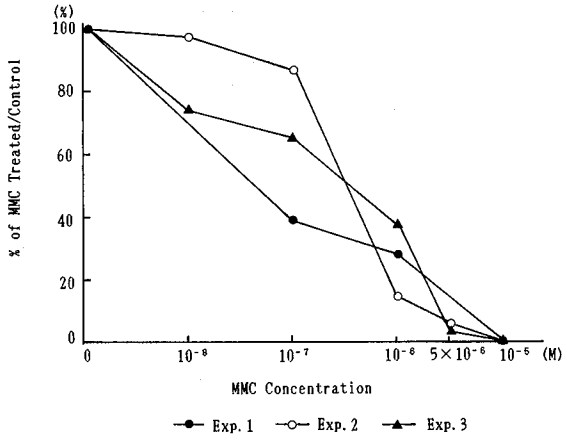


Fig. 1 Effect of Methylmercuric Chloride (MMC) on CFU-E

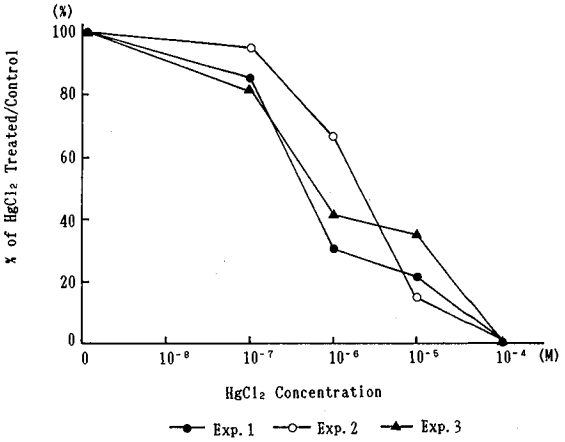


Fig. 2 Effect of Mercuric Chloride ($HgCl_2$) on CFU-E

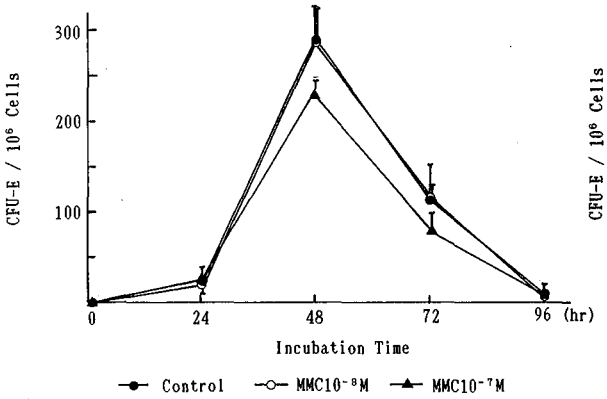


Fig. 3 Time Course of CFU-E Formation in Methylmercuric Chloride (MMC) Treated Culture

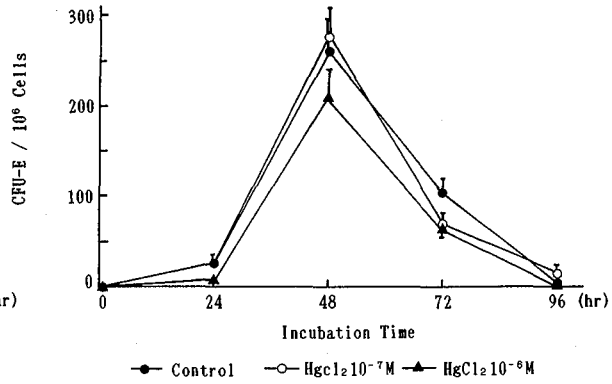


Fig. 4 Time Course of CFU-E Formation in Mercuric Chloride ($HgCl_2$) Treated Culture

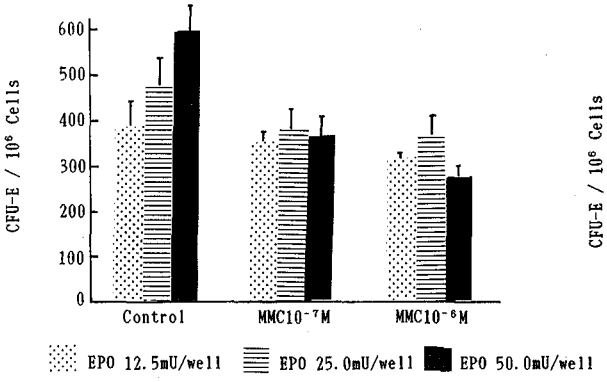


Fig. 5 Effect of Erythropoietin (EPO) Concentration on Methylmercuric Chloride (MMC) Treated Cell

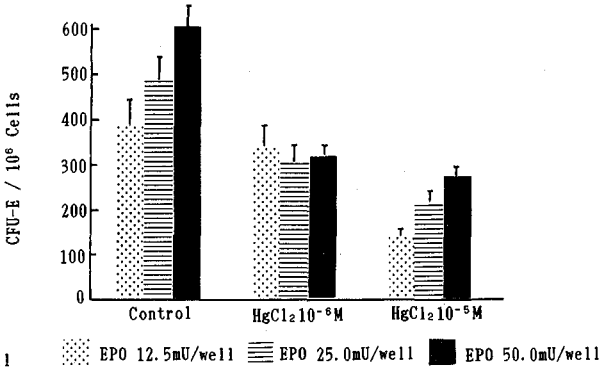


Fig. 6 Effect of Erythropoietin (EPO) Concentration on Mercuric Chloride ($HgCl_2$) Treated Cell

対照群ではエリトロポエチン濃度が12.5, 25.0および50.0mU／well と高くなるにつれて，赤芽球コロニー数は378±70, 483±55, 597±55と増加し，McLeod らの報告[2]同様 dose dependent を示した．実験5は，このように赤芽球コロニー数増加をおこすエリトロポエチン濃度範囲で水銀化合物の影響を観察したものである．

塩化メチル水銀10^{-7}M, 10^{-6}Mまたは塩化第二水銀10^{-6}M共存下においては，エリトロポエチンの濃度を高くしても塩化メチル水銀または塩化第二水銀による赤芽球コロニー数は300～400個の範囲内で，エリトロポエチン濃度に dependent ではなかった．抑制の割合は，塩化メチル水銀10^{-7}M共存下ではそれぞれ9％，21％および39％を示し，塩化メチル水銀10^{-6}Mでは23％，26％および55％，塩化第二水銀10^{-6}Mでは13％，39％および48％を示し，エリトロポエチン濃度が高くなるほどコロニー形成に対する阻害作用が強く現れた．エリトロポエチンにより赤芽球前駆細胞の分化，成熟増殖が促進される状態で，より水銀化合物による抑制を強く受けることが示唆された．しかし，塩化第二水銀10^{-5}M添加では，赤芽球コロニー形成の抑制が顕著に生じたが，エリトロポエチン添加濃度の増加につれてコロニー数は132±22, 209±32および267±27個と有意に増加し dose dependent を示した．その場合のコロニー形成抑制は，エリトロポエチン12.5mU／well で65％，25.0mU／well で57％また50.0mU／well で55％と，ほぼ一定の割合で認められ，塩化メチル水銀10^{-7}Mまたは10^{-6}M，塩化第二水銀10^{-6}Mによる抑制と異なる傾向を示した．

水銀化合物が in vitro で各種の細胞（神経細胞，肝細胞等）に対し毒性を示す報告[3-6]と同様に，今回の実験結果でも，塩化メチル水銀，塩化第二水銀共に血液細胞の一種である赤芽球前駆細胞に対して毒性を示すことが認められた．実験結果から，水銀イオンが赤芽球前駆細

胞上にあるレセプターとエリトロポエチンとの結合を阻害あるいは赤芽球前駆細胞を直接破壊することにより分化を抑制したことが推察される．しかし，塩化メチル水銀または塩化第二水銀の添加により培養条件が悪くなり細胞に影響したことも考えられることから，preincubation を行うなどの検討が必要である．

今回は in vitro で，赤芽球前駆細胞の分化・増殖の過程に水銀化合物が抑制的に作用することを明らかにした．これまでに in vivo で赤芽球前駆細胞に対する水銀化合物の影響を観察するために予備実験としてマウスに塩化メチル水銀17.5 μM／kg または35.0 μM／kg を 6 回皮下投与する予備実験を行った．その結果，in vivo では貧血と赤芽球前駆細胞の増加が認められた．in vitro と in vivo では赤芽球前駆細胞の動態が異なるが，これは in vivo ではエリトロポエチンによる調節のフィードバックが働いているためではないかと思われる．今後はさらに in vivo の実験をすすめ，血液幹細胞に対する塩化メチル水銀あるいは塩化第二水銀の影響を明らかにしていくことが必要と考える．

要　　約

赤芽球前駆細胞の分化・増殖の過程における塩化メチル水銀および塩化第二水銀の関与の様相を in vitro で観察した．なお，赤芽球コロニー形成法には，McLeod[1] らのプラズマクロット培養法を用いた．

その結果，塩化メチル水銀または塩化第二水銀による赤芽球コロニー形成の抑制が認められ，その抑制は dose dependent であった．塩化メチル水銀は10^{-4}M，塩化第二水銀は10^{-5}M の添加で赤芽球コロニー形成が完全に抑制された．次に，赤芽球コロニー形成を経時的に観察した．対照群の赤芽球コロニー数のピークは48時間後であり，塩化メチル水銀または塩化第二水銀を添加しても影響は認められず，同様に48時間後にピークを示した．最後に，水銀化合物の共存下でエリトロポエチン濃度を変え（12.5, 25.0, 50.0mU／well），赤芽球前駆細胞から赤芽球への分化過程における影響を観察した結果，エリトロポエチン濃度が高くなるほどコロニー形成に対する阻害作用が強く現れることが確認された．

文　　献

1）McLeod, D. L., Shreeve, M. M. and Axelrad, A. A.：*Blood*, 44, 517-534, 1974

2）Strom, S., Johnson, R. L. and Uyeki, E. M.：*Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, 49, 431-436, 1979

3）Choi, B. H., Cho, K. H. and Lapham, L. W.：*Environmental Research*, 24, 61-74, 1981

4）Lawrence, D. A.：*Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, 57, 439-451, 1981

5）Potter, S. D. and Matrone, G.：*Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, 40, 201-215, 1977

6）Kasuya, M.：*Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, 35, 11-20, 1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 32-34, 1988

東京都内のインフルエンザ検索成績
(1987年11月～1988年4月)

山崎　清*, 伊藤忠彦*, 中村清純*, 新開敬行*,
大貫奈穂美*, 薮内　清*

Prevalence of Influenza Occurred in Tokyo
(Nov. 1987 ～ Apr. 1988)

KIYOSHI YAMAZAKI*, TADAHIKO ITO*, KIYOSUMI NAKAMURA*, TAKAYUKI SHINKAI*,
NAHOMI OHNUKI* and KIYOSHI YABUUCHI*

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

緒　言

東京都における近年のインフルエンザ（以下「イ」と略す）は，1985年はAH3型，1986年はAH1型ウイルスによるものが主体であったが，1987年はAH3型とB型ウイルスが混在した二重流行であった．最近の混在流行は，1980年にみられたAH1型，AH3型およびB型による三重流行と1981年にみられたAH3型とB型[1,2]の流行で，今回は6年ぶりのものであった．本報では1987年11月から1988年4月までに東京都内で発生した，「イ」様疾患々者から採取した検査材料の検索成績について報告する．

材料と方法

検査対象　1987年11月初旬から1988年4月中旬までの期間に，集団かぜのため学級閉鎖等を行った都内の小、中学校のうち37集団177名（1集団約5名）および渋谷区の数ヵ所の開業医を受診した散発例の「イ」様疾患々者42名（3歳～39歳中15歳以下は32名）計219名を検査対象とした．

ウイルス分離試験　急性期に患者より得られた咽頭うがい液219例をウイルス分離材料とし，発育鶏卵およびFL，Hep 2，Vero355およびMDCKの各種培養細胞を用いて常法[3-6]に従って行った．

血清学的試験　急性期および回復期に採取したペア血清を用いて補体結合反応（以下CF試験と略す），および赤血球凝集抑制反応（以下HI試験と略す）を行った．CF試験には「イ」A型，B型S抗原およびアデノウイルス抗原を用いた．HI試験に用いた「イ」ウイルス抗原株は試験成績中に記載する．検査術式は既報[3-6]の通りである．CF，HI試験共に回復期の抗体価が急性期の4倍以上に上昇したものを有意上昇とみなした．

成績と考察

1987年11月から1988年4月までの集団かぜ発生例の病因検索状況を表1に示した．検索結果から1987年11月初旬から1988年4月中旬までに搬入された計37集団の検査材料について検査した結果，16集団は「イ」AH3型ウイルス，10集団は「イ」B型ウイルス，1集団はアデノウイルスによる感染であったことが確認されたが，他の10集団については病因を明らかにすることは出来なかった．なお，「イ」AH3型ウイルスと診断された1集団3名中1中に，「イ」B型ウイルスに対する血中抗体の有意上昇を示したものの混在が認められた．

次に散発例の「イ」様疾患々者の病因検索状況を表2に示した．1987年11月から1988年3月までの間に計42件の検査材料について検査した結果，「イ」AH3型ウイルス10株およびB型ウイルス7株を分離した．また，42件中ペア血清が得られた7件に付きCFおよびHI試験を行った結果，4件は「イ」AH3型ウイルス抗原に，1件は「イ」B型ウイルス抗原に各々抗体価の有意上昇を認めた．なお，「イ」ウイルスが分離されなかった4件中2件は，AH3型ウイルス抗原に対し4倍から16倍，1件はB型に対し16倍の有意上昇が認められたが，他の1件はCF，HI試験ともに有意上昇は認められなかっ

*東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科　169　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, 169 Japan

表1. 集団かぜ患者の病因検索状況

発生年月旬	検索集団数	診断				検索件数	ウイルス分離			血清学的試験		
		インフルエンザ					インフルエンザ			インフルエンザ		
		A 型	B 型	アデノ	不 明		AH3型	B 型	アデノ	AH3型	B 型	アデノ
1987. 11初	1				1	5						
中	1				1	3						
. 12初	2	1			1	10	2			5		
中	3	2			1	15	1			4		
下	1				1	9						
1988. 1中	1	1				5	5			5		
下	10	5	2	1	2	45	7			16	6	4
. 2初	11	6	5(1)			51	13	6		25	14	
中	2	1	1			9	2	1		4	3	
下	4		2		2	20		2			7	
. 4中	1				1	5						
計	37	16	10	1	10	177	30	9		59	30	4

（　）中はAH３型と同一集団

表2. 散発例患者の病因検索状況

発生年月	検索件数	診断				ウイルス分離			血清学的試験		
		インフルエンザ				インフルエンザ			インフルエンザ		
		AH3型	B 型	アデノ	不 明	AH3型	B 型	アデノ	AH3型	B 型	アデノ
1987. 11	3				3						
. 12	3	1			2	1					
1988. 1	6	1	3		2	1	3		1		
. 2	28	10	4		14	8	3		3	1	
. 3	2		1		1		1				
計	42	12	8		22	10	7		4	1	

た．また，回復期血清が得られなかった35件の中にはすでに急性期に「イ」B型、およびアデノウイルスに対し高い抗体価を保有するものが多く認められた．

集団発生および散発例の患者計219例のうがい液より「イ」AH３型40株，B型16株のウイルスが分離された．また，ウイルス分離試験と血清学的試験成績の結果から，71名が「イ」AH３型，38名が同B型，４名がアデノの各ウイルスによる感染と確認された．

患者血清のＨＩ試験　集団かぜおよび散発例として搬入された「イ」様患者のペア血清149例について，「イ」AH１型山形／120／86（ワクチン株），AH３型福岡／C-29／85（ワクチン株），東京／1275／87（今期分離株），B型茨城／２／85（ワクチン株），長崎／１／87（ワクチン株），東京／18／88（今期分離株）の各ウイルス株抗原を用いてＨＩ試験を行い抗体価を測定したところ，AH３型２株およびB型３株のウイルス株抗原のいずれかに抗体価の有意上昇が認められたのは73例で，AH３型50例，B型は23例であった．また，ウイルス分離がされているにもかかわらずＨＩ抗体価の有意上昇が認められない例がAH３型株で６例あったが，CF抗体価は全例上昇していた．この様な現象は過去の流行の際にも少数例認められている[3]．

「イ」AH３型患者のＨＩ試験成績　「イ」AH３型ウイルス分離陽性者のうち急性期および回復期のペア血清が得られた29例について，AH３型福岡／C-29／85（ワクチン株）とAH３型東京／1275／87（今期分離株）ウイルス抗原に対するＨＩ試験成績を表３に示した．また，この表からＨＩ価≧（8×2^1）の抗体保有率およ

表3．1987年11月～1988年4月インフルエンザAH3型ウイルス分離陽性者のHI試験成績

回　復　期

		A／福岡／C-29／85(H3)										A／東京／1275／87(H3)										A／山形／120／86 (H1)									
		<1	1	2	3	4	5	6	7	8	>8	計	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	>8	計	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	>8	計
	<1							1*				1																						
	1						1					1								1			1	1										1
急	2				1		2	2				5						1	3				4			2								2
	3					1	2	2	1			6					1	1	2			1	5				1							1
性	4					1	6	4	1			12						2	7	3		1	13					4	1					5
	5						1	1	1			3							3	2			5					1	6					7
期	6							1				1						1					1							1	3	2		6
	7																															6		6
	8																																	
	>8																																1	1
	計				1	2	12	11	3			29				1	5	15	6		2	29		1	2	1	5	8	3	8		1	29

<1：8×2ⁿ値
*：例　数

表4．インフルエンザAH3型ウイルス分離陽性者のAH3型各株に対するHI抗体の変動

株　　名	福岡／C-29／85	東京／1275／87
急　性　期	96.6*	100
	3.50(1.14)**	3.69(1.14)
回　復　期	100	100
	3.69(1.14)	6.17(1.07)
有意上昇率(%)	58.6	75.9

*：HI価≧(8×2¹)の保有率(%)
**：　〃　の平均HI価8×2ⁿ値，( )内SD

び平均HI価を算出したものを表4に示した．ワクチン株である福岡／C-29／85では急性期と回復期血清におけるHI抗体保有率および平均HI価は，大きな差は認められなかったが今期分離株の一つである東京／1275／87では，回復期血清においてHI抗体保有率の差はないが平均HI価で約2.5倍の差が認められた．また，有意上昇率において東京／1275／87株は福岡／C-29／85株に対し約20%高かった．また両株ともに急性期で既に高いHI抗体価（福岡／C-29／85・128倍以上55.2%．東京／1275／87・128倍以上65.5%）を保有しており，抗体の上昇は低率であった．この事はワクチン株と分離株の間に抗原的な差があることも示唆されるが，1968年から現在までの約20年間にAH3型ウイルスが繰返し流行している事とワクチン接種による血中抗体価の上昇と考えられる（表3）．AH1型株に対しては，CFおよびHI抗体価の有意上昇例は1例も認められなかった．

ま　と　め

1．東京都内における1987年末から1988年2月初旬にかけて流行した「イ」は，集団発生および散発例の患者検査材料の検索結果からAH3型が主体であり，さらにB型が加わった二重流行であった．

2．「イ」AH3型ウイルスが分離されてAH3型による集団かぜと診断された1集団3名中1名に，ウイルスは分離されなかったが血清試験でB型ウイルスに対し抗体価の有意上昇が認められ，同一集団内に「イ」AH3型とB型ウイルスの混在が確認された．

3．「イ」AH3型およびB型ウイルスが分離された患者の中には，急性期の血清中にすでに高い抗体を保有する者がおり，HI抗体価と感染防御能との関連が注目される．

文　　献

1）坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎　清，岩崎謙二：東京衛研年報，32-1，48-54，1981
2）坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎　清，岩崎謙二：東京衛研年報，34，60-64，1983
3）坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎　清，中村清純，薮内清：東京衛研年報，35，69-72，1984
4）矢野一好，柳沢靖子，伊藤忠彦，薮内　清，岩崎謙二：東京衛研年報，26-1，59-63，1975
5）岩崎謙二，薮内　清，伊藤忠彦，山崎　清：東京衛研年報，26-1，69-72，1975
6）岩崎謙二，伊藤忠彦，山崎　清，吉田靖子，横山庸子：東京衛研年報，27-1，58-62，1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 35-42, 1988

東京都多摩地区における野鼠の *Rickettsia tsutsugamushi* 汚染調査および同地区で感染発病したツツガ虫病の一症例

新開敬行*, 伊藤忠彦*, 山崎清*, 中村清純*,
大貫奈穂美*, 松井孝輔******, 寺山武***, 藪内清*,
大野正彦**, 吉川翠**, 山口昌彦****, 花岡暉****,
杉浦英俊****, 福山孝徳****, 渡辺民彦*****, 藤巻直毅*****,
仁科彰則*****, 大橋誠*

Ecological survey on *Rickettsia tsutsugamushi* in Wild Rodents and a Case of Tsutsugamushi Disease in Rural Area, Tama, Tokyo.

TAKAYUKI SHINKAI*, TADAHIKO ITO*, KIYOSHI YAMAZAKI*, KIYOSUMI NAKAMURA*,
NAHOMI OHNUKI*, KOHSUKE MATSUI******, TAKESHI TERAYAMA***, KIYOSHI YABUUCHI*,
MASAHIKO OHNO**, MIDORI YOSIKAWA**, MASAHIKO YAMAGUCHI****, KIYOSHI HANAOKA****,
HIDETOSHI SUGIURA****, TAKANORI FUKUYAMA****, TAMIHIKO WATANABE*****,
NAOKI FUJIMAKI*****, AKINORI NISHINA*****and MAKOTO OHASHI*

Keywords：ツツガ虫病 Tsutsugamushi disease, リケッチアツツガムシ *Rickettsia tsutsugamushi*, 野鼠 Wild rodent, 多摩地区 Tama area

緒言

フトゲツツガムシやタテツツガムシによって媒介される“いわゆる新型ツツガ虫病[1)]”が，近年全国的に多発しており，東京都においても七島熱と呼ばれるツツガ虫病が伊豆諸島において増加している[2)]．東京都におけるツツガ虫病はこれまで島しょにのみ限局されていたが[2-6)]，1984年12月には島しょ以外では初めての患者が町田市において発生した[7)]．患者の発病前の生活歴からみて，感染は居住地あるいはその隣接地域で起こったと推定されたため，東京都では，ツツガ虫病の防疫対策の一環として衛生局関係機関（衛生研究所，公衆衛生部，環境衛生部，町田，福生，五日市各保健所）の協力により，野鼠のリケッチア汚染および吸着ツツガ虫相の実態調査を行った．本報では，これらの調査結果ならびに本調査後に確認された多摩地区での三例の患者発生について報告する．なお，二例目についてはその概要も併せて報告する．

材料と方法

1．野鼠の捕獲

1985年4月，町田保健所管轄地域内の患者発生地区を中心に野鼠の捕獲を行った．また，同年11月に町田，福生および五日市の各保健所管轄地域内で，さらに翌1986年11月に，福生，五日市両保健所管轄地域内において同様の調査を実施した．その実施地域を図1に示した．捕獲は金網式トラップ，シャーマン・アライブ・トラップおよびパンチュウトラップを用いて，主に生け捕り法で，各々4～5日間実施した．誘引餌としては甘藷に食用油を塗布したもの，ピーナッツ，油揚げなどを用いた．全

*東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科　169　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, 169 Japan
**東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科
***東京都立衛生研究所多摩支所
****東京都福生保健所
*****東京都五日市保健所
******公立阿伎留病院

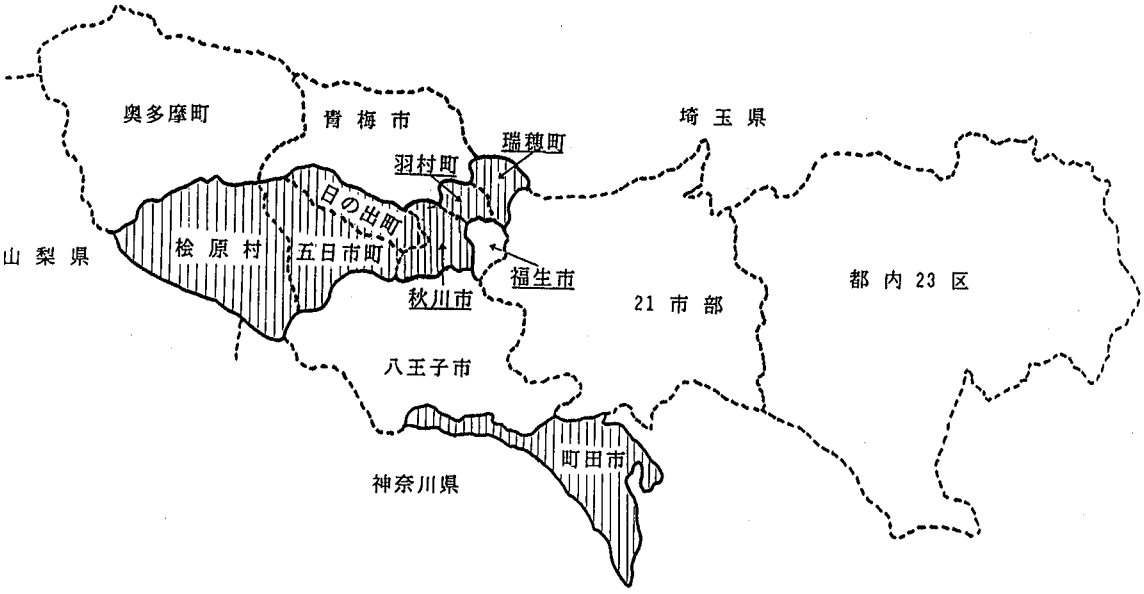


図1．野鼠のリケッチア汚染調査地域

調査期間中の使用トラップ数は延べ約2,300個であった．

2．血清学的試験

野鼠及び実験動物は心臓穿刺により採血を行った．第二例目の患者からの採血は推定20～60病日の間に計6回行われ，第三例および第四例目の患者の採血は急性期および回復期の2回行われた．分離血清は検査時まで－20℃に凍結保存した．間接蛍光抗体法（IF）[8,9]には *R. tsutsugamushi* の標準株である Karp, Gilliam および Kato 株を抗原として用いた．すなわち，これらを感染させた細胞浮遊液を12穴あるいは32穴の螢光抗体用スライドの穴に少量分注し，風乾ののち冷アセトンにより10分間固定して抗原スライドとした．二次血清には，FITC 標識抗ラット IgG（カペル社製），抗マウス IgG（ICN 社製），抗モルモット IgG（マイルス社製）ならびに抗ヒト IgM, G, A（ハイランド社製）を用いた．補体結合反応（CF）は市販の Karp, Gilliam および Kato 型の各抗原（デンカ生研製）を使用し，常法[10]に従ってマイクロタイター法で実施した．

3．リケッチア分離試験

野鼠からの分離　野鼠をクロロホルム麻酔下で採血後，開腹し脾臓と肝臓の一部を摘出し被検材料とした．被検材料を Sucrose-Phosphate-Glutamate（SPG）液にて約10％乳剤とし，その0.25ml 宛を6～7週令の BALB／c 系および ddY 系マウス2～4匹に腹腔内接種した．一部のマウスには cyclophosphamide による免疫抑制処置を行った上で被検材料を接種した．

患者からの分離　4月22日に採血され，血清診断に供した後の残余の血清と血餅をよく混和し BALB／c 系マウス3匹に0.25ml 宛腹腔内接種した．

接種後の観察は9～14日間行い，観察期間内に立毛，動作緩慢，腹部膨満を認めたマウスを開腹し，牽糸性の粘稠性腹水の貯留，リンパ節の腫脹，脾腫が認められたものを発症と判定した．さらに，腹膜塗抹スライドのギムザ染色標本を鏡検し，マクロファージ原形質内にリケッチア粒子を確認したものをリケッチア分離陽性とした．また，観察期間に発症しなかったマウスの脾乳剤を接種した継代二代目のマウスにおいても発症症状を示さず，IF 抗体陰性のものを分離陰性とした．

リケッチアの同定は，被検分離株をモルモット脳内接種して得られた免疫血清，あるいはマウスに被検分離株を皮下接種し，oxytetracycline で治療した後に得られた免疫血清の標準株抗原との IF 反応性によった．

4．吸着ツツガムシの同定

野鼠は胸，腹腔内の臓器をすべて除去し，ポリエチレン瓶に入れ70％アルコール液に浸して固定，保存した．固定した野鼠の体表からブラシ等を用いてツツガムシ幼虫を採取した．また，体表の洗浄液および固定保存瓶中のアルコールからもろ過によってろ紙上のツツガムシ幼虫を回収した．これらの幼虫をガムクローラル液で封入し，標本とした後，顕微鏡下で計数し形態を調べて同定

表1．多摩三保健所管内において捕獲した野鼠の種別リケッチア汚染状況

捕獲年月	捕獲地区	野鼠の種	供試野鼠数		Rt**陽性野鼠数		Rt**分離率(%)***	
1985年4月	町　田	アカネズミ	3(1)	13(6)	3(1)	3(1)	100.0	23.1
		ヒメネズミ	5(2)		—		—	
		クマネズミ	3(2)		—		—	
		ドブネズミ	2(1)		—		—	
1985年11月	町　田	アカネズミ	1	39(18)	—	5(3)	—	12.8
	福　生	アカネズミ	20(6)		3(1)		15.0	
	五日市	アカネズミ	18(12)		2(2)		11.1	
1986年11月	福　生	アカネズミ	26(16)*	46(23)	6(5)	8(7)	23.1	17.4
	五日市	アカネズミ	13(3)		2(2)		15.4	
		ヒメネズミ	7(4)		—		—	
計			98(47)		16(11)		16.3	

*全捕獲野鼠33匹中26匹を Rt**分離試験に供した．
**Rickettsia tsutsugamushi
***Rt 分離率（%）＝Rt 陽性野鼠数／供試野鼠数
（　）内　生体での捕獲数再掲

した．

結　　果

1．野鼠の捕獲状況およびリケッチア分離率

1985年4月，同11月，および1986年11月の計3回の野外調査において各地区から捕獲された野鼠の総数は105匹であった．捕獲された野鼠105匹のうち，リケッチア分離試験に供し得たのは98匹であった．捕獲された野鼠からのリケッチア分離成績を表1に示す．野鼠98匹中16匹（16.3%）から *R. tsutsugamushi* が分離された．地区別に分離率をみると町田地区は14匹中3匹（21.4%）で最も高く，ついで福生地区の46匹中9匹（19.6%），五日市地区の38匹中4匹（10.5%）の順であった．野鼠の生体および死体別の分離率は，生体47匹中11匹（23.4%），死体52匹中5匹（9.6%）であり，生体からの分離率が高かった．また，リケッチアが分離された野鼠の種別はすべてアカネズミであり，この種は全ての地区で捕獲された．なお，分離された *R. tsutsugamushi* はモルモットおよびマウス免疫血清を用いたIF試験によりすべてKarp近縁株と同定された（表2）．

2．野鼠から回収された吸着ツツガムシ数

捕獲野鼠105匹のうちツツガムシの回収を行った84匹の回収状況を捕獲時期別に表3に示した．被検野鼠84匹から回収されたツツガムシ幼虫の総数は7,474個体（野鼠一匹あたり平均89.0個体）で，フジツツガムシが最も多く，次いでフトゲツツガムシ，タテツツガムシの順で回収された．このうちツツガ虫病媒介種として知られる

表2．マウスおよびモルモット免疫血清を用いた間接蛍光抗体法(IF)による野鼠分離リケッチア株の同定

免疫動物	免疫血清	抗原 Karp	抗原 Gilliam	抗原 Kato
マウス				
	Karp	1280	<16	16
	Gilliam	160	1280	320
	Kato	320	640	≧2560
	M7/85*	≧2560	320	640
	F4/85*	≧2560	640	320
	I3/85*	≧2560	640	640
モルモット				
	Karp	5120	320	640
	Gilliam	640	10240	5120
	Kato	320	160	1280
	M7/85*	5120	320	640
	F4/85*	5120	320	640
	I3/85*	5120	640	1280

*分離株

フトゲツツガムシは1,791個体（24.0%），タテツツガムシ849個体（11.4%）で，いずれもアカネズミのみから回収された．また町田地区では4月と11月に捕獲されているが，いずれの時期に捕獲された個体からもフトゲツツガムシが採取された．フトゲツツガムシは3地区すべ

表3．多摩三保健所管内で捕獲された野鼠からの回収ツツガムシ数

捕獲年月	供試野鼠数	回収ツツガムシ数 ツツガ虫病媒介種 タテツツガムシ	フトゲツツガムシ	その他の種	野鼠一匹当りの数	総数
1985年4月	13	0	408	1,106	116.5	1,514
11月	39	849	789	1,558	81.9	3,196
1986年11月	32	0	594	2,170	86.4	2,764
計	84	849	1,791	4,834	89.0	7,474

てにおいて認められたが，タテツツガムシは五日市地区においてのみ認められた．

3．多摩地区で発見されたツツガ虫病患者の発病経過および検査成績

本症例は多摩地区檜原村の山林に隣接した畑地で作業中に感染したと推定されたものである．その発病経過は図2に示したとおりである．患者は，1987年3月下旬に感染したと推定され，4月上旬から微熱が続き4月11日に発熱，頭痛，全身倦怠により近所の開業医の治療をうけたが症状は改善されなかった．その後発疹が出現したため，4月18日に公立阿伎留病院に入院した．ここでも当初診断がつかないまま，何らかの感染症の疑いで，セファム系抗生物質 cefamandole の投与を受けた．しかし，症状の改善が見られなかったので minocycline の投与に切り替えられた．その後，右側胸部に刺し口が発見され初めてツツガ虫病が疑われ，4月22日に当研究所へ検査が依頼された．そして，IF 試験によってツツガ虫病と診断された．推定23病日における刺し口を写真1に示した．投与された minocycline が奏効し，患者は速やかに快方に向かった．患者血清の *R. tsutsugamushi* 各標準株抗原に対する IF および CF 抗体価を表4に示した．IF

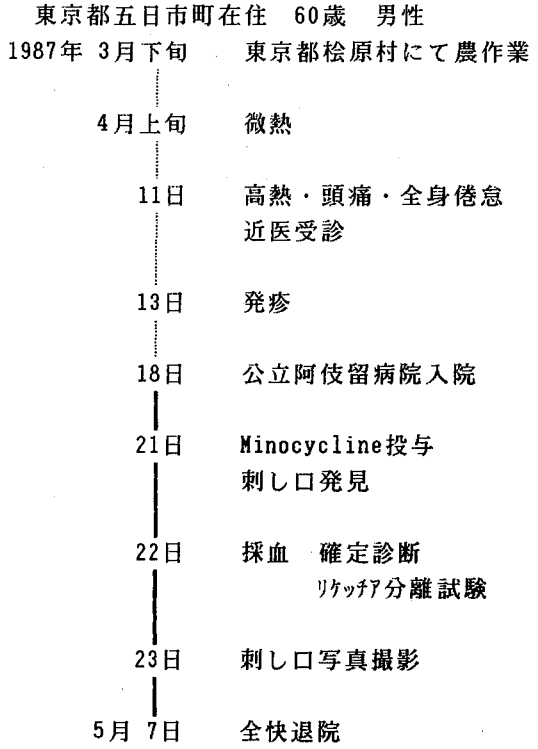


図2．多摩地区で感染発病したツツガ虫病患者の発病経過

表4．ツツガ虫病患者の R. tsutsugsmushi 標準株抗原に対する IF および CF 抗体価の推移

採血年月日	標準株抗原 Karp IF IgG	Karp IF IgM	Karp CF	Gilliam IF IgG	Gilliam IF IgM	Gilliam CF	Kato IF IgG	Kato IF IgM	Kato CF
1987年4月20日	640	80	8	40	<10	<8	80	<10	8
21日	1280	160	128	80	10	8	160	20	32
22日	2560	160	256	160	10	8	320	20	64
30日	2560	160	512	160	10	8	320	10	64
5月16日	1280	160	512	160	<10	8	160	10	16
30日	1280	160	256	80	<10	8	160	<10	16

表5．東京都秋川市および奥多摩町で感染が推定されたツツガ虫病患者のIF抗体価

感染推定地区	採血年月日	病日	標準株抗原		
			Karp	Gilliam	Kato
秋川市	1987.10.30	7	10	10	10
	11. 9	17	80	160	80
奥多摩町	1987.11.10	5	80	160	80
	11.25	20	160	640	80

試験では，IgG, IgM抗体ともに，すべての型の抗原に対して陽性であった．しかしKarp株に対して特に高い上昇を認め，22～30病日に最も高くIgGで1：2560，IgMで1：160であった．また，CF試験においても各標準株に対する抗体が陽性であり，特にKarp株に顕著な上昇が認められた．

患者血液を腹腔内接種したBALB／c系マウスは14日後に典型的な症状をもって発症し，接種初代で*R. tsutsugamushi*の分離に成功した．このマウスの腹腔細胞中のリケッチア粒子を写真2に示した．

秋川市ならびに奥多摩町において感染が推定されたツツガ虫病患者の急性期および回復期血清の各標準株抗原に対するIF（IgM, G, A）抗体価を表5に示した．秋川市および奥多摩町の患者血清はともに急性期から回復期にかけリケッチア抗原に対するIF抗体の有意上昇が認められ，血清学的にツツガ虫病と確定診断された．しかし，両患者のIF抗体はリケッチア各抗原間で交差が認められ，感染したリケッチアの型別を推定することは出来なかった．

考　　察

今回行われた多摩地区における野外調査の結果，野鼠98匹中16匹（16.3%）から*R. tsutsugamushi*が分離され，同地区の野鼠が高率に同リケッチアに汚染されていることが明らかとなった．また，野鼠84匹から合計7,474個体（平均89.0個体）のツツガムシが回収され，しかもツツガ虫病媒介種として知られるフトゲツツガムシおよびタテツツガムシが，それぞれ全体の24.0%および11.4%を占め，比較的高率に認められた．

同地区におけるリケッチアについての野外調査は，1954年に東京都立衛生研究所をはじめとする衛生局関係機関によって旧西多摩郡（現在の青梅市，福生市，西多摩郡）および旧南多摩郡の一部（現在の町田市）で行われている[11]．この調査では，野鼠70匹（内アカネズミ33匹）を捕獲しているが，*R. tsutsugamushi*は全く検出されず，回収されたツツガムシ総数も470個体（野鼠一匹あたり平均6.9個体）と比較的少なく，ツツガ虫病媒介種ではフトゲツツガムシが7個体確認されたのみであった．その後，同地区ではリケッチアについての組織的な野外調査は行われておらず，今回の著者らの調査で約30年間ぶりの実施となった．これら新旧の調査には約30年の経過があり，その間の推移が不明であるので両者の結果は単純に比較し難いにしても，野鼠からのツツガムシの回収率およびリケッチアの検出率からみて同地区では現在，リケッチアの汚染がより濃厚であると考えざるを得ない．このリケッチア浸淫の原因の一つとしては分布ツツガムシのうちフトゲツツガムシの占める割合が増加したことも考慮にいれる必要があるかも知れない．すなわち1954年の4月の調査では18匹の野鼠（内アカネズミ13匹）からフトゲツツガムシがわずか一個体認められたにすぎなかったが，今回の1985年の調査では同じく4月に捕獲されたアカネズミ3匹から408個体のフトゲツツガムシが回収されている．

多摩地区におけるこのようなツツガムシの濃厚な分布と野鼠間のリケッチア汚染の状況は当然ヒトへの感染の機会の増加として危惧されるところであった．このような矢先，1987年4月には，檜原村山間部の畑地での感染が疑われるツツガ虫病患者が発見され上述の危惧が杞憂でなかったことが示された[12]．この患者の場合，臨床症状が典型的でなく，微熱，全身倦怠が約10日間も持続したこと，浅在リンパ節を触知出来なかったことならびに発疹が紅斑様外観を呈したことなどから早期診断が困難であったが，それ以上に本症が当該地区でも発生する可能性のあることが十分認識されていなかったことが，診断の妨げとなったと思われる．本症例は，島しょを除く都内で発生した第二例目であるが，患者からのリケッチア分離に成功した症例としては，これが初めてである．検査材料である患者血液はminocyclineの投与後に採取されたものであり，検体搬入までに比較的長時間常温に置かれたことなど*R. tsutsugamushi*検出に不利な条件のものであったが，これからのリケッチア分離に成功したことは採血時の血液中にリケッチアが多数含まれていたことによるものと思われる．これまで，テトラサイクリン系抗生物質投与後の血液からは分離が極めて困難であるとされていたが患者の発症経過いかんによっては分離の可能性があることが示唆された．また，この分離株は，抗血清の各標準株に対する反応性からみて多摩地区の野鼠から分離されたものと極めて類似するリケッチアであると推測された[12,13]．なお，この患者発生後の1987年

10月，東京都秋川市で，また11月には奥多摩町で新たにツツガ虫病の患者発生があり，血清学的に確認されている．これで多摩地区での患者発生は町田市の先例を含め合計4名となった．

近年多摩地区では，畑地，山林等の宅地開発化が進み，人口も増加している．また，ハイキング，各種スポーツ，山菜取りなどのため都心から訪問する人も多い．そのため，そこに居住する人々のみでなく，他の都民もこの地を訪れてリケッチアを保有する有毒ツツガムシに刺咬される機会が増加している．ツツガムシあるいは野鼠を撲滅する根本的対策が困難である以上，ツツガムシによる刺咬の予防と患者の早期診断，早期治療を主体とせざるを得ない．都民に対するツツガ虫病についての正しい知識，医師に対しての的確な診断基準の提示などの啓蒙普及が重要と思われる．

また，今後の多摩地区におけるツツガ虫病患者の動向を知る手懸りとして，野鼠のリケッチア汚染およびツツガムシの分布を継続監視する必要があろう．

謝辞　稿を終わるにあたり，本調査の実施に協力を賜った町田市役所，町田保健所，五日市保健所，福生保健所，東京都公衆衛生部，同環境衛生部の関係各位に深謝致します．

文　献

1）川村明義：モダンメディア，30，310-337，1984
2）伊藤忠彦，中村清純，山崎　清，坂井冨士子，藪内　清，大橋　誠：東京衛研年報，35，61-68，1984
3）東京都衛生局予防課編：七島熱の研究，東京都刊，1952
4）東京都衛生局予防部編：七島熱の研究第2編，東京都刊，1953.
5）東京都衛生局予防部編：七島熱の研究第3編，東京都刊，1954.
6）東京都衛生局予防部編：七島熱の研究総括編，東京都刊，1958.
7）尾崎芳樹，五十嵐秀之，青木伸一ほか：日内会誌，75(3)，140，1985.
8）医科学研究所学友会編：細菌学実習提要，丸善，東京，1983.
9）Kawamura, A. Jr., and Aoyama, Y.,（Ed）：*Imnuno fluorescence in Medical Science*, University of Tokyo Press, Tokyo, 1982.
10）井上　栄：臨床検査，17：838-847，1973.
11）川路利順，辺野喜正夫，高山康郎，坂井千三，山口与四郎，高梨五郎：七島熱の研究第3編，40-42，1954.
12）伊藤忠彦，山崎　清，中村清純，新開敬行，寺山武，藪内　清，大橋　誠，松井孝輔：感染症誌，62，753-759，1988
13）伊藤忠彦，山崎　清，中村清純，新開敬行，坂井冨士子，寺山　武，藪内　清，大橋　誠：感染症誌，62，811-817，1988

写真１．患者のツツガムシ刺し口（推定23病日）

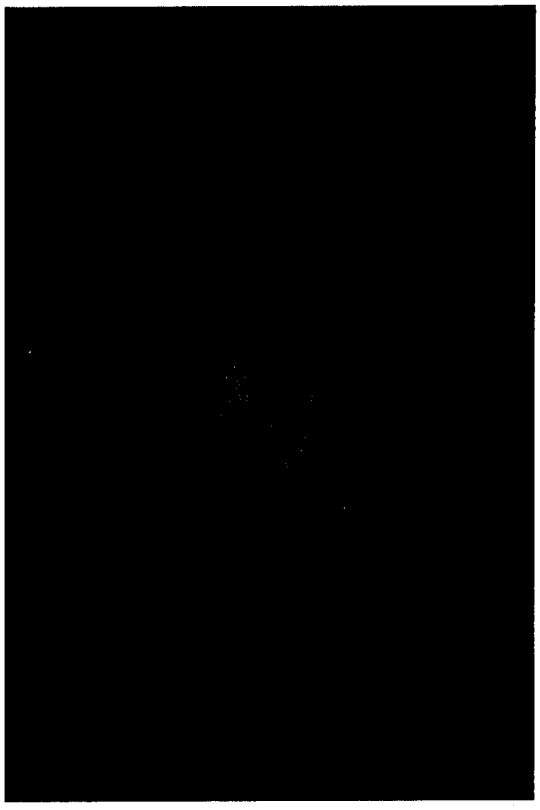


写真２．マウス腹腔細胞中のリケッチア粒子

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 43-48, 1988

都内保健所 AIDS 抗体検査受診者のヒト免疫不全ウイルス抗体保有調査（1987年２月～1988年３月）

大貫奈穂美*, 中村清純*, 伊藤忠彦*, 山崎清*,
新開敬行*, 吉田靖子*, 安東民衛*, 矢野一好*,
関根整治*, 林志直*, 寺山武**, 藪内清*,
三木隆*, 大橋誠*

Serological Survey for Antibodies against Human Immunodeficiency Virus of Individuals who Visited Health Centers in Tokyo (1987～1988)

NAHOMI OHNUKI*, KIYOSUMI NAKAMURA*, TADAHIKO ITO*, KIYOSHI YAMAZAKI*,
TAKAYUKI SHINKAI*, YASUKO YOSHIDA*, TAMIE ANDO*, KAZUYOSHI YANO*,
SEIJI SEKINE*, YUKINAO HAYASHI*, TAKESHI TERAYAMA**, KIYOSHI YABUUCHI*,
TAKASHI MIKI* AND MAKOTO OHASHI*

The serum antibodies to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and 2 (HIV-2) were examined among individuals who visited health centers in Tokyo. Of 9,280 sera screened, one was true-positive and 49 false-positive for HIV-1 antibodies. Thirty-seven of 49 false-positive and 305 sera from the population groups with risks for HIV-2 (251 homo- and bi-sexuals, 42 returnees from African countries and 19 prostitutes) were further examined for HIV-2 antibodies by Western blotting and indirect immunofluorescence. No antibodies reactive with HIV-2 were detected in the sera examined.

Serological cross-reactivity between HIV-1 and HIV-2 was examined by Western blotting assay. Rabbit anti-HIV-2 serum reacted not only with p15 and p26 of HIV-2 but also with p24 and p55 antigens of HIV-1, while rabbit anti-HIV-1 serum reacted with p18, p24 and p55 antigens of HIV-1 and also with p26 antigen of HIV-2, suggesting some epitopes common to HIV-1 and HIV-2 exist in major gag gene products (HIV-1 p24, p55 and HIV-2 p26). On the other hand, the serological specificity was observed not only in the high molecular weight glycoproteins of HIV-1 and HIV-2 but also in HIV-1 p18 and HIV-2 p15.

Keywords：AIDS, HIV-1, HIV-2

緒　言

ヒト免疫不全ウイルス１型（HIV-１）は後天性免疫不全症候群（AIDS）の原因として1983～84年に米国とフランスでそれぞれ独立に分離された[1-3]が，その後の調査により患者と感染者が全世界に広がっていることが明らかになった．現在，全世界で８万８千人の患者が確認されている[4]．厚生省の報告によると，わが国では，1988年５月18日現在，AIDS 患者は80名（うち死亡46名），感染者は1,038名に達している[5]．東京都では，神戸市で不特定多数の男性と性交渉を持った女性患者が確認され，大きな社会問題になった直後の1987年２月より都内保健所にエイズ相談窓口を開設し，当衛生研究所が受診者の抗体検査を担当することとなった．

一方，1986年に Montagnier らにより西アフリカで HIV-１の近縁ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス２型（HIV-２）が分離された[6]．また，1986年に速水らは

*東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科　169　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, 169 Japan
**東京都立衛生研究所多摩支所

ガーナ人女性よりHIV-2株を分離し，HIV-2［GH-1］と命名した[7]．HIV-2は形態およびヒトリンパ球に対する細胞変性効果においてHIV-1とほとんど変わらないが，HIV-1よりもアカゲザルから分離されたサル免疫不全ウイルス（SIVmac）により近縁のウイルスであると報告されている[6,8]．HIV-1，HIV-2およびSIVmac間の血清学的交差反応性についての検討から，HIV-2のコア蛋白はHIV-1およびSIVmacに共通の抗原決定基を持つことが明らかになっている[6,7]．しかし，HIV-1の一次スクリーニングに通常用いられる酵素抗体測定（EIA）キットでは，HIV-2抗体が検出されない場合もあるとの報告がある[9]．国際交流の盛んな現代，アフリカに滞在し，アフリカ女性と性的接触の経験のある人は多く，HIV-1スクリーニングで見落とされたHIV-2感染者がわが国に存在する可能性は完全には否定できない．しかし，現在HIV-2抗原を用いたスクリーニング試験は行われておらず，HIV-2の感染の実態は不明のままに放置されている．そこで我々は，わが国におけるHIV-2感染の有無を知る手掛かりとして，HIV-1抗体検査受診者のうちHIV-1スクリーニングで偽陽性を示した者，アフリカ滞在などの危険因子を持つ者についてHIV-2抗体検査を追加して行った．本報では，HIV-1抗体検査の結果と併せて，HIV-2抗体検査の結果およびHIV-1，HIV-2間の交差反応性について検討した結果を報告する．

材料および方法

1．検査対象

HIV-1抗体の検査対象は，1987年2月より1988年3月までの期間都内保健所でAIDS抗体検査を受診した者計9,280名である．また，HIV-2抗体の検査対象は1987年2月より12月までにHIV-1抗体検査を実施した全検体のうち，一次スクリーニングが陽性であった検体，カットオフ値に近い吸光度を示した検体，および問診表記載内容からアフリカに滞在したことが明らかなもの，あるいはAIDS感染危険因子を持つと推定された受診者の血清である．

2．抗血清

ウサギ抗HIV-2血清は東京大学医科学研究所の速水博士より分与を受けた．ウサギ抗HIV-1血清は富士レビオ社製，ヒト抗HIV-1血清はAIDS患者血清を用いた．ウサギ血清は1,000倍，ヒト血清は100倍希釈して用いた．

3．抗原

ウエスタンブロット（WB）用のHIV-1抗原は，Bio-Rad社製のものを，間接螢光抗体（IF）用のHIV-1抗原は国立予防衛生研究所から分与されたものを使用した．

また，Molt-4細胞で培養し，精製したHIV-2［GH-1］標品を速水博士から分与を受け，WB用のHIV-2抗原として使用した．IF用の抗原も同じく速水博士より分与を受けた．

4．HIV-1抗体一次スクリーニング

各保健所で真空採血管に採血した血液は，24時間以内に当研究所に搬入され，3,000rpm，5分遠心して血清を分離後，検査時まで4℃の冷蔵庫に保存された．測定は，Abbott社のHTLV-Ⅲ「EIA」を用いて行った．1回目の測定で吸光度がカットオフ値（陰性コントロール平均値＋0.15×陽性コントロール平均値）以上であった検体について再度検査し，再びカットオフ値を越えたものを一次スクリーニング陽性とした．確認試験はWB法及びIF法により行った．

5．ウエスタンブロット法

HIV-1抗体のWBアッセイは，Bio-Rad社のイムノブロットアッセイキットを用いマニュアルにしたがって行った．HIV-2抗原ストリップは精製ウイルス標品をSDSサンプル緩衝液[10]中で100℃加熱後，4-20%勾配スラブゲル（第一化学薬品）を使って電気泳動し[11]，さらに360mAで2～3時間ニトロセルロース膜（MSI）にエレクトロブロットして作製した．抗血清は，56℃30分加熱し，4℃で16時間ストリップと反応させた．ウサギおよびヒト抗体の検出にはヤギ抗ウサギIgG西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体（Bio-Rad）およびヤギ抗ヒトIgGアルカリフォスファターゼ複合体（Bio-Rad）を用いた．

6．間接螢光抗体法

IFアッセイは常法[12]に従って行った．56℃30分加熱して非働化させた被検血清をPBS（－）で10倍希釈し，IF用の感染細胞塗抹スライドグラスに10ul／wellずつのせ37℃で30分反応させた．洗浄後，FITC標識抗ヒト（IgG，IgM，IgA）ヤギ（ハイランド）と37℃で30分反応させた．

結　　果

1．HIV-1抗体検査

1987年2月から1988年3月までの都内保健所でのAIDS抗体検査の月別受診者数を図1に示した．月別にみると2月から4月の3ヶ月間の受診者が全体の55.4%をしめたが，以後漸減し，11月以降は月に200件前後で推移している．受診者9,280名の性別および年齢構成を

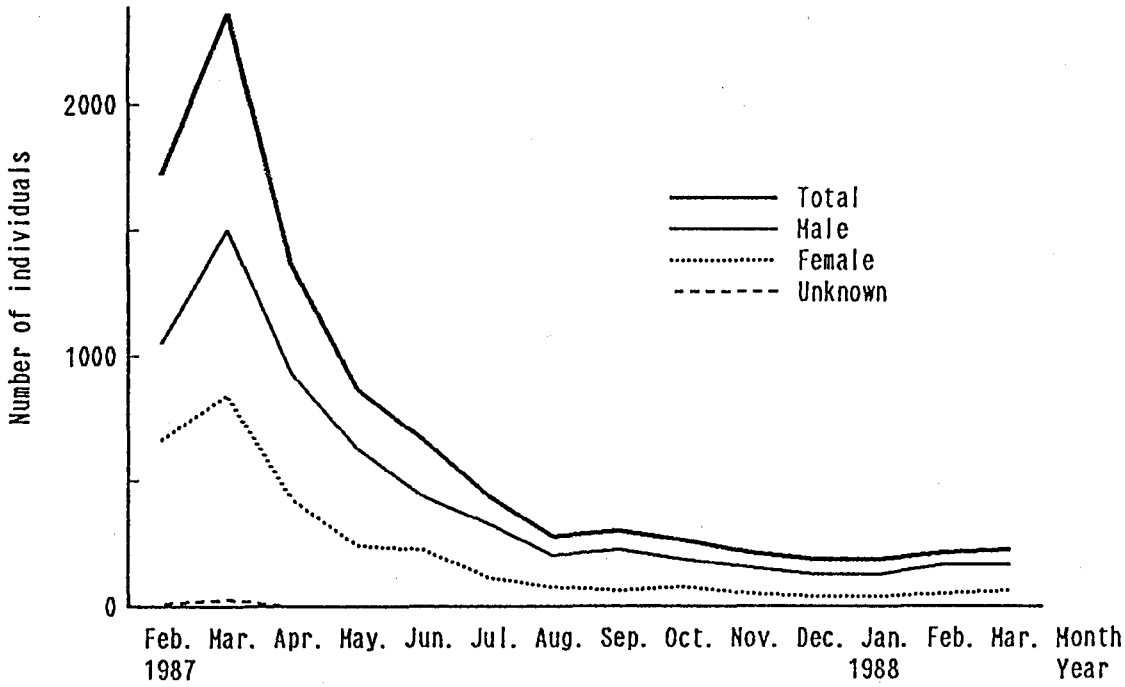


Fig. 1. Monthly shift of number of individuals who visited health centers in Tokyo for the test of HIV-1 antibody.

表1に示した．男性6,242名（67.3%），女性2,980名（32.1%），不明58名（0.6%）であった．年齢別にみると20～29歳3,511名（37.8%），30～39歳3,102名（33.4%），40～49歳1,375名（14.8%）であり，20～49歳が86%を占めている．自己申告形式の問診表の記載内容による受診の動機の内訳を表2に示した．男性同性愛及び両性愛者354名，輸血及び血液製剤投与経験者552名，アフリカ滞在経験者65名，売春婦82名，医療関係従事者559名，その他の異性愛者が7,668名であった．異性愛者の多くは不特定の異性間性行為による感染を危惧して来所していた．

EIA法によるHIV-1抗体スクリーニングにおいて吸光度が，カットオフ値以上であったのは48件（0.52%）であったが，そのうち18件（0.19%）は2回目もカットオフ値以上の吸光度を示した．これら18件についてWB法及びIF法による確認試験を実施した．確認試験で陽性と判定されたのは40歳の男性同性愛者1名のみであった．また，その他3件についてはWB法においてストリップに陽性と判定するのに必要な全てのバンドが検出されず，そのため3か月後に再検査を行うことにした．再検査の結果，1名は（－）と判定されたが，1名は再び（±）となり，3ヶ月後に再び検査することとした．また，他の1名は再検査を勧めたが受診していない．

Table 1. Grouping of the subjects by age and sex

Age group	No. of male	No. of female	Unknown	Total*
0- 9	6	8	0	14(0.2)
10-19	131	74	0	205(2.2)
20-29	2,189	1,316	6	3,511(37.8)
30-39	2,193	901	8	3,102(33.4)
40-49	980	393	2	1,375(14.8)
50-59	500	198	3	701(7.6)
60-69	160	50	1	211(2.3)
70-79	37	7	0	44(0.5)
80-89	6	2	0	8(0.1)
Unknown	40	31	38	109(1.2)
Total	6,242	2,980	58	9,280(100)

*Percentages in parenthesis.

Table 2. Grouping of the subjects by risk factors

Risk factors	No. of individuals*
Homo- and bisexuals	354(3.8)
Blood-transfusion recipients	552(5.9)
Sojourners in Africa	65(0.7)
Prostitutes	82(0.9)
Clinical technologists	559(6.0)
Others	7,668(82.6)
Total	9,280(100)

*Percentages in parenthesis.

Table 3. Serological survey for HIV-1

Number of samples	Screening test 1 st		Screening test 2 nd		Confirmatory test WB[a)]			Confirmatory test IF[b)]			Judgement		
	+	−	+	−	+	−	±	+	−	±	+	−	±[c)]
9280	48	9,232	18	30	1	14	3	1	17	0	1	14	3

a) Western blotting assay.

b) Indirect immunofluorescence assay.

c) Pending. Recall in 3 ~ 6 months.

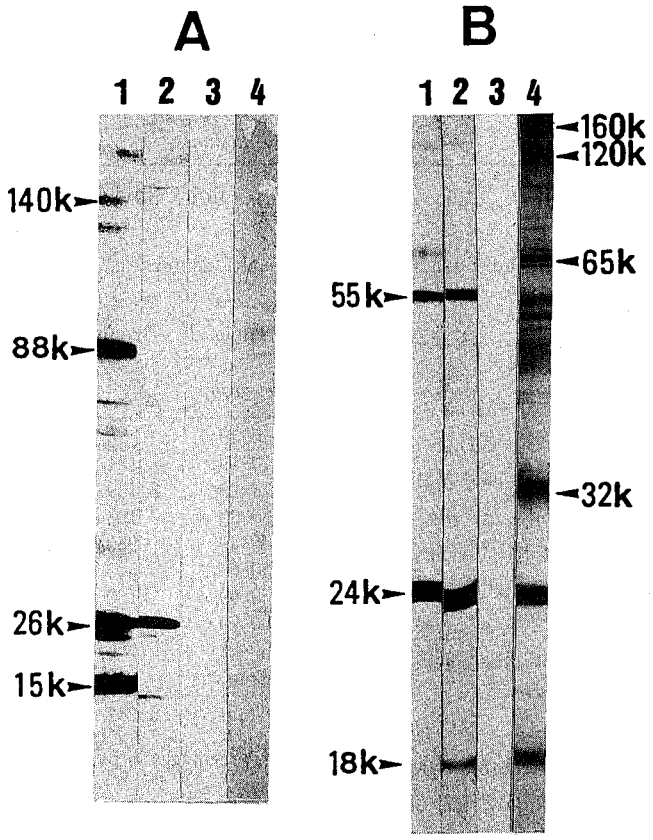


Fig. 2. Western blotting assay for HIV-2 antibodies. HIV-2 [GH-1] proteins separated by electrophoresis on 4-20% linear gradient acrylamide slab gel were electroblotted onto nitrocellulose membrane. The blotted proteins were allowed to react with sera diluted 1000-fold in rabbit anti-HIV-1 and HIV-2 sera, and 100-fold in the serum from the AIDS carrier positive to HIV-1. HIV-1 antigen-blotted strips were purchased from Bio-Rad Laboratories. Sample A, HIV-2 antigen-blotted strips; Sample B, HIV-1 antigen-blotted strips. Each lane 1, represents rabbit anti-HIV-2 serum; each lane 2, rabbit anti-HIV-1 serum; lane 3, normal rabbit serum; and lane 4, serum from the AIDS patient positive to HIV-1. The rabbit IgG-antigen immune complex (lane 1, 2 and 3) was detected by using the goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase, and the human IgG-antigen immune complex (lane 4) by the goat anti-human IgG alkaline phosphatase assay system.

2．HIV-1, HIV-2 間の交差反応性

HIV-2抗原に対するウサギ抗血清の反応性をWB法により検討した結果を図2Aに示した．レーン1からレーン4はウサギ抗HIV-2血清，ウサギ抗HIV-1血清，ウサギ正常血清，ヒト抗HIV-1血清（AIDS患者血清）をそれぞれ反応させたものである．ウサギ抗HIV-2血清はHIV-2抗原のp15，p26，p88およびgp140と反応したが，ウサギ抗HIV-1血清は同抗原のp26のみに反応した．HIV-1抗原に対する各種抗血清の反応性を図2Bに示した．ウサギ抗HIV-1血清はp18，p24，p55と反応し，ウサギ抗HIV-2血清はp24，p55に反応した．ヒト抗HIV-1血清はp18，p24，p32，p65，gp120，gp160等と反応し，特異的バンド全てが検出された．正常ウサギ血清はHIV-1およびHIV-2抗原のいずれとも全く反応しなかった．これらの実験結果から，HIV-1，HIV-2に共通の抗原決定基がHIV-1のp24，p55およびHIV-2のp26抗原中に存在すると推定された．一方，HIV-1のp18，gp160およびHIV-2のp15，gp140は特異抗原であると考えられる．

3．HIV-2 抗体検査

前述の検討結果よりHIV-1とHIV-2間に交差反応性が存在することが確認されたので，HIV-1抗体スクリーニング検査で吸光度が高かった37件を選び，HIV-2抗体検査の対象とした．さらに，HIV-2感染に対する危険因子を持っているもの（アフリカ滞在の履歴のある者42名，そのうち34名はアフリカ女性との性的接触歴あり，男性同性愛および両性愛者251名，売春婦19名）について，IFおよびWB法でHIV-2抗体を検索した．しかしながら，いずれの血清中にもHIV-2抗原と反応する抗体を検出することはできなかった（表4）．

Table 4. Serological survey for HIV-2 by Western blotting and indirect immunofluorescence assay

Sera derived from	No. of sera examined	No. of anti-HIV-2 positives by WB[a]	IF[b]
False-positives[c]	37	0	0
Risk Factors			
1)Homo- and bisexuals	251	0	0
2)Sojourners in Africa	42	0	0
3)Prostitutes	19	0	0

a) Western blotting assay.
b) Indirect immunofluorescence assay.
c) Fales-positives out of sera screened for HIV-1 antibodies.

考　　察

1987年1月に神戸市で不特定多数の男性と性交渉を持ったとされる女性AIDS患者がわが国で初めて確認され，それまで血友病患者や男性同性愛者のみの問題と考えられがちであったAIDSがにわかに身近な問題としてクローズアップされた．その結果として生じたいわゆる“エイズ・パニック”は我々の記憶に新しいところである．月別の抗体検査受診者数をみても検査を開始した1987年2～4月の3ヶ月間に全受診者数の半数以上が集中しており，当時の社会不安の状況がよくうかがえる．現在，抗体検査受診者数は月間200件前後で推移しており，問診表に記載される受診の動機からもAIDSに関する正しい知識が都民の間に普及してきたことが推察される．

わが国では，1988年5月18日現在HIV-1感染者1,038名中966名，AIDS患者80名中46名[5]が血液製剤の汚染によりもたらされたものである．しかし，血液製剤の加熱処理が行われ，それ以後新たなHIV感染はないと推定されることから，今後AIDSは主として性行為感染症として問題となると予想される．問診表でも異性愛者の多くが不特定多数の相手との性交渉を認めており，男性同性愛者や薬物乱用者への対策に加え，異性間性的接触対策とそれに伴う母子感染の防止が今後AIDSの重要な課題になろう．

EIA法による抗体検査では偽陽性の頻度が高いことが指摘され，原因としては，ウイルスをヒト由来細胞で培養するために，精製過程で細胞成分が混入し，自己免疫疾患の患者血清で偽陽性になることと，高ガンマグロブリン血症の患者で非特異的に抗原と反応することが考えられている[13]．今回の抗体調査においてもEIA法で陽性とされた検体が18件認められたが，WB法及びIF法による確認検査で1例を除き偽陽性と判定された．しかし，WB法ではp24が単独で出現した場合，感染後の経過日数が少ないことによるのか，非特異的反応に起因するのか，など典型的反応パターンを示さないものでは判定に迷う場合がある．これらの点を明らかにするのは今後の研究課題である．

HIV-1とHIV-2間の交差反応性に関しては，エンベロープ糖蛋白では少ないが，コア蛋白ではこれが認められると報告されている[7]．今回の研究でもそれは認められた．すなわち，抗HIV-1血清はHIV-2のgp120と反応せず，抗HIV-2血清もHIV-1のgp160とは反応しなかった．また，p55を前駆体とするコア蛋白である

HIV-1のp24とHIV-2のp25は交差反応性を示した．一方，今回の検討ではp24，p25と同じくコア蛋白であると考えられるHIV-1のp18とHIV-2のp15はそれぞれに特異的な蛋白であると推定された．すなわち，コア蛋白の中にも共通抗原を持つものと持たないものがあると考えられる．

現在用いられているHIV-1抗原を用いたEIA法では，p25などコア蛋白に反応性を持つHIV-2抗体は陽性になるが，西アフリカでの調査ではHIV-2 AIDS患者21人のうち16人までがHIV-1抗原を用いたEIA法で陰性であったと言う報告[9]もある．HIV-2はまだ世界的な広がりは少ないとされているが詳細は不明である．しかし，国際化が進んだ今日，HIV-2がいつまでも西アフリカのみに限局したままであるとは考え難い．今後ともHIV-1抗体検査と平行してHIV-2抗体検査を続ける必要があると思われる．また，今回の検討はWB法およびIF法でおこなったが，今後HIV-2抗原を用いたEIA法や凝集法が市販されれば，一次スクリーニングでHIV-1と併せて抗体検査を行うことも可能である．

謝辞 本研究にあたりHIV-2抗原およびウサギ抗HIV-2血清を提供された東京大学医科学研究所 速水正憲博士に深謝致します．

（本研究は東京都エイズ研究班より一部研究費の援助を受けて行った．また，本研究の概要は日本感染症学会第62回総会1988年4月において発表した．）

文　献

1）Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F. et al.：*Science*, **220**, 868-871, 1983

2）Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E. et al.：*Science*, **224**, 497-500, 1984

3）Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M. et al.：*Science*, **225**, 840-842, 1984

4）*Weekly Epidemiological Record, WHO*, **63**, 137-139, 1988

5）日本医事新報, **3344**, 111, 1988

6）Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F. et al.：*Science*, **233**, 343-346, 1986

7）Ishikawa, K., Tsujimoto, H., Nakai, M. et al.：in preparation.

8）Chakrabarti, L., Guyader, M., Alizon, M. et al.：*Nature*, **328**, 543-547, 1987

9）Clavel, F., Mansinho, K., Chamaret, S. et al.：*New Engl. J. Med.*, **316**, 1180-1185, 1987

10）Takacs, B.：*In* I. Lefkovitz and B. Pernis [eds.] *Immunological Methods*, 81-105, 1979, Academic Press, New York.

11）Hames, B. D.：*In* B. D. Hames and D. Rickwood [eds.], *Gel electrophoresis of proteins*, 1-91, 1981, IRS Press, Oxford.

12）Tsuchie, H., Kurimura, T., Hinuma, Y.：*Journal of Infection*, **10**, 272-276, 1985

13）秋月正史，岡野哲郎：昭和61年度東京都エイズ研究班研究報告書，109-115，1987

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 49-53, 1988

マガキによるポリオウイルスの蓄積実験

吉田靖子*, 矢野一好*, 薮内清*

The Accumulation of Poliovirus by the Oysters, *Crassostrea gigas*

YASUKO YOSHIDA*, KAZUYOSI YANO* and KIYOSHI YABUUCHI*

Shellfish growing seawaters may become contaminated by raw sewage which might contain large numbers of enteric viruses. And oysters, filter-feeding mollusks, can accumulate and retain enteric viruses from their overlaying seawaters. It is well known that shellfish are important vehicle for food-borne viral disease, and outbreaks of hepatitis and viral gastroenteritis caused by the ingestion of sewage contaminated shellfish are also well known. However detection methods for the causative viruses in shellfish are lacking. We examined that whether oysters, *Crassostrea gigas*, may accumlate poliovirus type 1(LSc, 2ab strain), by exporsing them to virus-seeded seawaters. When high numbers of plaque forming unit of poliovirus type 1 was inoculated into the temprature-controlled artificial seawaters(8℃ or 20℃)and inoculated for 0.5−48 hr, more higher rate of accumulation takes place in oysters within a few hours. And the level was maintained longer than the one in the surrounding waters. In this study, we determined that within 24 hr the oysters can accumulate 80% of poliovirus present in artificial seawaters.

Keywords：oyster, poliovirus, accumulation

緒　言

水系ウイルス感染症の一つの経路として，二枚貝が関与していると考えられている[1-6]．冬季に多発する急性胃腸炎の原因の一つとして，ウイルスが関与しており，そのウイルスは，カキに由来する場合があることが分かってきた[7,8]．

ヒトの腸管系ウイルスの環境中での挙動を考えると，図1に示したように，ヒトの腸管で増殖したウイルスは水洗便所を介して多量に下水に排出され，所定の下水処理過程を経て量はかなり減少するものの，生残したウイルスが河川等に放流され海洋に達する．

したがって，ウイルスの混入した海域に生息する貝類が，ウイルスを蓄積しヒトへの感染源になることが十分考えられる．事実，下水処理水が流入している海域で養殖したカキからウイルスを検出したという報告例が諸外国には多数ある[9-12]．

このような背景をもとに，ヒトの食用に供される二枚貝のうち特に生で食することが多い「カキ」と，実験上の取り扱いが容易であるポリオウイルスを用いてウイルスの蓄積実験を実施した．

材料と方法

マガキ（*Crassostrea gigas*）：市販されている殻付生食用カキ（以下カキと略記）を使用した．購入後，表1の処方で調整した人工海水（以下海水と略記）の入っている水槽（450×300×300mm，容量約40*l*）に入れ2～3日飼育し，生存を確認したのち実験を行った．飼育期間中は，散気用エアーストーン（ロング30mm）を使用してエアレーションを行った．

ウイルス：弱毒ポリオウイルス1型（LSc. 2ab株）を使用した．ウイルスはBGM細胞（ミドリザル腎継代細胞）で増殖させて，実験直前まで−20℃に保存した．ウイルスの感染価は約10^7 PFU／m*l*であった．

抗生物質混合液：滅菌したリン酸緩衝食塩液（PBS）1 m*l*に対して，Ampicillin 30mg, Kanamycin 40mg, Streptomycin 40mg, Amikacin 2 mgを無菌的に溶解させ，20m*l*ずつ分注して−20℃に凍結保存した．

*東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科　169　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, 169 Japan

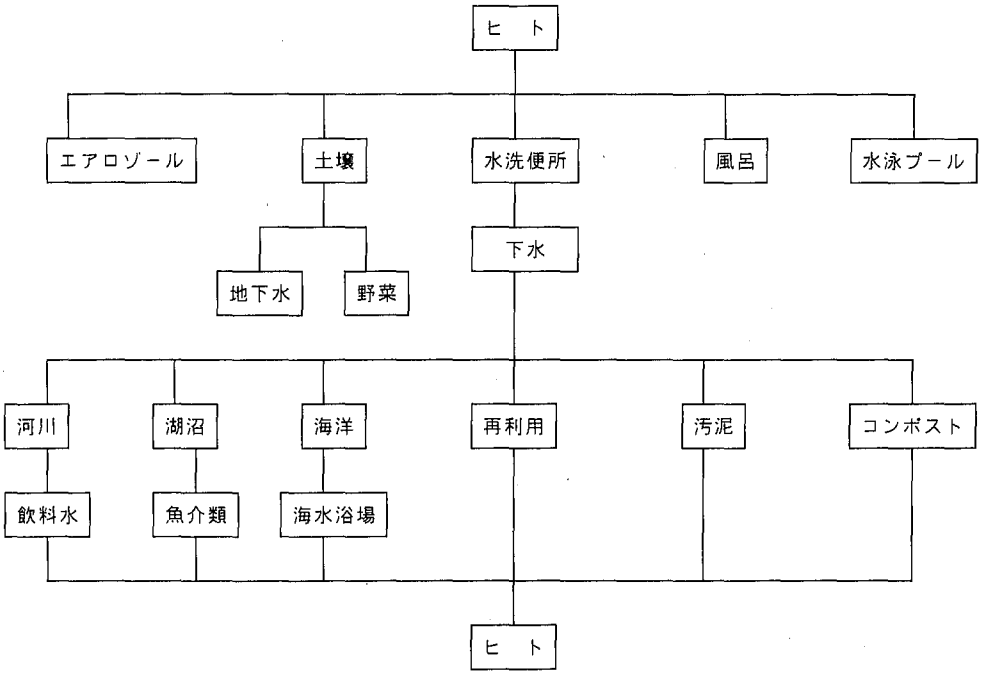


図1．環境における腸管系ウイルスの挙動

表1．人工海水の処方

試　　薬	用量 g／l
NaCl	26.75
KCl	0.75
$CaCl_2$	0.51
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	3.42
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4.29
$NaHCO_3$	0.21

Vant' Hoff による

カキによるウイルス蓄積率の経時変化：実験環境は，室温とした．実験中の水温は，ほぼ20℃一定であった．前記の水槽に30l の海水を入れ，ウイルス原液を 3 ml 添加した．十分かくはんしたのち，添加したウイルス量を確認するために水槽内の海水を10ml 採取し，抗生物質混合液を 1 ml 添加後，添加ウイルス量定量用の試料として凍結保存した．

生存が確認されたカキ（20個）をまとめて水槽に入れ，一定時間経過ごとに海水を10ml ずつ採取し，残存ウイルス量測定用の試料とした．ウイルスの蓄積量は，添加ウイルスの総量から，時間経過ごとの海水中のウイルスの総量と，あらかじめ同一条件で，測定しておいたカキ殻に付着したウイルスの総量を差し引いた値とし，PFU 単位で表示した．

添加ウイルスの濃度差とウイルス蓄積率：前記の水槽に 3 段階濃度（10^4，10^5，10^6 PFU／海水30l）のウイルスを添加し，20個のカキを18時間飼育したときの残存ウイルス量を指標にしてウイルスの蓄積率を算出した．実験時の水温は20℃に保ち，常時エアーレーションした．

水温の差によるウイルス蓄積率：カキのウイルス蓄積効率の水温による変化を調査する目的で，30l 容量の海水を入れた前記の水槽を 2 個準備し，一定量のウイルス液を添加して十分かくはんしたのち，20個ずつのカキを入れた．実験温度は，室温（水温約20℃）と低温（水温約 8 ℃）の 2 段階とした．実験中は，エアーストーンにより通気した．ウイルス蓄積量の計算は，前記の方法と同様にした．

カキの個体別ウイルス蓄積率：500ml の海水を入れた 1 l 容量のステンレス容器11個に，一定量のウイルスを添加し，カキを 1 個ずつ飼育した．水温20℃で24時間飼育したのちの海水中の残存ウイルス量を指標にして，カキの個体別ウイルス蓄積率を算出した．実験中は，エアーストーン（丸型，直径30mm）で通気した．

ウイルスの定量：BGM 細胞を用いたプラック形成法により測定し，PFU 単位で表示した．細胞は 6 穴プラスチックプレート（コースター社製，3506）に培養した．

試料は，細胞維持液で10倍段階希釈の系列を作り，1希釈当たり1 ml ずつ2穴の細胞に接種した．重層用培地等の作成は，常法[13]に準じて行った．

結　　果

カキによるウイルス蓄積率の経時変化：海水30 l に添加した3 ml のウイルス量を，実際に定量し，水槽中の総ウイルス量に換算すると1.05×10^8 PFU となった．このようにして調整した水槽中に，生存が確認されたカキ20個を入れ，30分から4時間飼育し，それぞれの時間経過ごとに海水を採取した．カキの体内に蓄積したと考えられるウイルス量は，水槽中の総ウイルス量から，経過時間ごとの残存ウイルス量と，実験に使用した量と同数のカキの殻に付着したウイルス量を差し引いて算出した．結果は，表2にまとめた．飼育2時間までのウイルス蓄積率は5.0%前後と低いのに対して，3時間では65.7%，4時間では51.4%，ウイルス量にして10^7レベルとなり，かなり高率かつ高濃度にカキがウイルスを蓄積することがわかった．

表2．カキによるウイルス蓄積率の経時変化

時間経過（時間）	海水中の残存ウイルス量[1](PFU)	カキへのウイルス蓄積量[2](PFU)	蓄積率[3]（%）
0.5	9.9×10^7	6.0×10^6	5.7
1.0	1.02×10^8	3.0×10^6	2.8
1.5	9.6×10^7	9.0×10^6	8.5
2.0	9.9×10^7	6.0×10^6	5.7
2.5	8.7×10^7	1.8×10^7	17.1
3.0	3.6×10^7	6.9×10^7	65.7
4.0	5.1×10^7	5.4×10^7	51.4

1）添加ウイルス量：人工海水30 l 中に1.05×10^8 PFU のウイルス量を添加し，カキ20個を入れて所定時間飼育したのちの，海水中の残存ウイルス総量．
2）蓄積量(T)＝(添加ウイルス総量)－(残存ウイルス総量)－(カラ付着ウイルス量)
3）蓄積率(%)＝(T)／(添加ウイルス総量)
＊　水温20℃一定

添加ウイルスの濃度差とウイルス蓄積率の変動：海水30 l に濃度の異なるウイルスを添加後，生存が確認されたカキ20個を各水槽に入れ18時間飼育した．カキへのウイルス蓄積量は前記と同様に算出し，実験結果を表3に示した．添加したウイルス量10^4～10^6レベルでは，ウイルスの濃度差による蓄積率の差が認められなかった．9回の実験結果では，いずれも76.1～89.6%の高いウイルス蓄積率を示した．

表3．添加ウイルスの濃度差とウイルス蓄積率の変動

添加ウイルス量[1]（PFU）	残存ウイルス量[2]（PFU）	ウイルス蓄積量（PFU）	蓄積率（%）
8.10×10^6	1.30×10^6	6.80×10^6	83.2
6.60×10^6	1.50×10^6	5.10×10^6	77.3
2.10×10^6	2.30×10^5	1.87×10^6	89.0
4.30×10^5	9.00×10^4	3.40×10^5	79.1
3.80×10^5	4.00×10^4	3.40×10^5	89.5
2.90×10^5	3.00×10^4	2.60×10^5	89.6
7.50×10^4	1.10×10^4	6.40×10^4	85.3
4.20×10^4	1.00×10^4	3.20×10^4	76.1
1.50×10^4	3.00×10^3	1.20×10^4	80.0

1）人工海水30 l に添加したウイルスの総量
2）20個のカキを18時間飼育したあとの，海水中の残存ウイルス総量（PFU）
＊計算方法および実験水温は表2と同様にした

水温の差によるウイルス蓄積率の変化：カキの飼育水温（8℃と20℃）とウイルス蓄積率の差を調べた．実験結果は，表4にまとめた．時間経過ごとのウイルス蓄積率を見ると，両水温とも時間経過とともに，ウイルス蓄積率が上昇した．しかし，水温の違いによって，蓄積率の立ち上がりに差があった．つまり，水温8℃では2.0, 10.1, 8.1, 22.4, 63.2, 76.9, 71.4%となり，水温20℃では6.1, 13.2, 44.8, 51.0, 61.2, 63.5, 76.8%となった．

表4．水温の差によるウイルスの蓄積率の変動

時間	ウイルス蓄積量	
	水温 8 ℃	水温 20 ℃
1	2.94×10^6 (2.0)	8.96×10^6 (6.1)
2	1.49×10^7 (10.1)	1.94×10^7 (13.2)
3	1.19×10^7 (8.1)	6.58×10^7 (44.8)
4	3.29×10^7 (22.4)	7.49×10^7 (51.0)
5	9.29×10^7 (63.2)	8.99×10^7 (61.2)
24	1.13×10^8 (76.9)	9.34×10^7 (63.5)
48	1.05×10^8 (71.4)	1.13×10^8 (76.8)

＊人工海水30 l に1.47×10^8 PFU のウイルスを添加しカキを20個入れ，水温8℃と20℃において1～48時間飼育した．
＊ウイルス蓄積量は，表2と同様に計算し PFU の単位で示した．
＊(　) 内の数値はウイルス蓄積率(%)である．

カキの個体別ウイルス蓄積率の変動：海水500ml に，1.85×10^6 PFU のウイルスを添加し，カキを1個ずつ入れ24時間飼育した．前回の実験で水温の差によるウイルス蓄積率の著名な差が認められなかったので，実験水温は20℃一定とした．個体別のウイルス蓄積率は，表5に示した．

表5．カキの個体別ウイルス蓄積率の変動

個体No.	海水中の残存ウイルス量[1](PFU)	カキ個体内へのウイルス蓄積量(PFU)	蓄積率(%)
1	4.90×10^5	1.36×10^6	73.5
2	4.05×10^5	1.445×10^6	78.1
3	5.40×10^6	1.31×10^6	70.8
4	4.50×10^5	1.40×10^6	75.6
5	3.90×10^5	1.46×10^6	78.9
6	4.70×10^5	1.38×10^6	74.5
7	6.50×10^5	1.20×10^6	64.8
8	7.25×10^5	1.10×10^6	59.4
9	4.00×10^5	1.45×10^6	78.3
10	5.00×10^5	1.35×10^6	72.9
11	3.50×10^5	1.50×10^6	81.1

1) 人工海水500ml に1.85×10^6 PFU のウイルス量を添加し，その中にカキ1個を入れ，24時間飼育したのちの海水中の残存ウイルス量．

＊計算方法および実験方法は表2と同様にした

ウイルス蓄積率をみると，59.4%～81.1%の範囲となり，カキの個体によって，ウイルス蓄積能力に若干の違いはあるものの極端な相違は認められなかった．

考　　察

カキのウイルス蓄積量は，飼育時間の増加とともに上昇し，総ウイルス量も実験当初の予想以上に多量であることが分かった．しかし，このことはカキのろ水量が31～34l／hr にもおよぶことがある[14]ということから考えて，当然かもしれない．

高濃度のウイルスを添加した今回の実験では，ウイルス濃度に関係なく蓄積率が，80%程度になった．また，今回の報告には記載しなかったが，微量のウイルスを時間をかけて点滴しても，最終蓄積率は，80%程度になる傾向があった．

カキのウイルス蓄積量が，ウイルス濃度に関係なく多量であることは，ウイルスの性状にあると考えられる．つまり，ウイルス粒子は水中で，凝集塊を形成しており，単粒子で浮遊している状態が少ない場合が多い．また，ウイルスの蓄積率が80%止まりである原因を考察すると，カキの摂餌機構がウイルス粒子よりも微小である90Åまでの微粒子を摂取するが，20時間余りの時間経過後から，摂取物の排出が始まるといわれている[15]ことにあると思われる．

カキのこのようなウイルス蓄積能は，カキを食用にするという立場から考えると，カキからウイルスを除去あるいは不活化し，清浄化する方法を開発しなければならないことになる．

一方，カキのこのような機能を水処理に活用すれば，トリハロメタンのような危険性[16]がない．安全で無公害の水処理技術に応用できるかもしれない．

1955年スエーデンにおいて，生カキが原因食と推定された2,000名を越える伝染性肝炎の大発生がみられて以来[17,18]，アメリカ[19,20]，西ドイツ[21]，オーストラリア[22]でも生カキや他の貝類を原因食とする同疾病の大流行が確認されている．特にカキは，たとえ加工をほどこしても，カキの中まで充分火を通すことがないので，カキが原因食となって伝染性肝炎ばかりでなく急性胃腸炎などの疾病なども起こすことが考えられている[8]．

諸外国の報告[17,22]では，カキ等の貝類からエコーウイルス，コクサッキーA群ウイルス，同B群ウイルス，ポリオウイルス等の腸管系ウイルスが数多く分離されている．その原因の一つを考察すると，生活排水が流入してくる下水中に混入しているヒト由来の腸管系ウイルスにあると考えられる．事実，現行の処理工程を経て河川等に放流される2次処理下水中にも，完全に除去されないウイルスが微量ではあるが生存していることが判明している[23]．これらの微量ウイルスが，河川に流入し海や湾内で養殖しているカキ等の貝類に摂取されて蓄積され，それを食したヒトがウイルス性の胃腸炎などの疾病を起こす場合が多いとされている[24]．

一方，ウイルスの蓄積部位についての研究は，Metcaff とStiles ら[24]の報告があり，多くのウイルスは消化盲嚢の中に蓄積されるのではないかと推定している．我々も，実際にカキの体内のどの部位にウイルスが蓄積しているかを確認するために，カキをホモジナイザーにかけ各種の緩衝液（蒸留水，pH8.8グリシン緩衝液，pH9.0ホウ酸緩衝液，pH10.0炭酸緩衝液）を用いて乳剤を作り，ウイルスの回収を試みたが，ウイルスの蓄積部位を確定するには至らなかった．しかし，Lie ら[25]の行った *Mercendria mercendria*（ホンビノスガイ）を用いた実験結果では，胃，hemolymph および外套膜にウイルスの存在を確認しており，おもに消化管がウイルス蓄積の部所であると報告している．

また，Kostenbader と Cliver[26]，Landry, E. F.[27]，および Joan I. Speirs[28]らによると，カキからのウイルスの誘出処理には，高分子凝集補助剤である Cat-Floc（polydimetyldiallyl ammonium chloride）の使用や，酸凝集の過程で，Beef extract powder 又は，スキムミルクを添加する方法が有効であると報告している．

我々も今後，カキに蓄積されている自然界のウイルスの誘出方法を開発し，ウイルス蓄積部位の確認とウイルスの野外株を検出する計画である．

結　論

水槽に高濃度のポリオウイルスを添加し，マガキによるウイルス蓄積効果をみた．

1）カキによるウイルス蓄積率の経時変化は，2時間経過までが10％以下であったが，その後急激に上昇し，2.5時間で17.1％，3時間で65.7％となり，24時間経過後では80％以上にもなった．また，蓄積ウイルス量もカキ1個当たり10^6 PFU に達した．

2）添加ウイルスの濃度差とウイルス蓄積率の関係をみると，海水30l に対するウイルス添加量の総量が10^4から10^6 PFU の範囲では，いずれも80％前後となり，添加ウイルス量の差によるウイルス蓄積率の変化は認められなかった．

3）水温の差によるウイルス蓄積率の変化をみたが，8℃と20℃の実験では，差が認められなかった．

4）ウイルス蓄積効果の個体差をみたが，カキ1個当たりのウイルス蓄積率が，59.4％から81.1％の範囲になり，著明な個体差は認められなかった．

（本研究は昭和62年度当研究所調査研究課題「魚介類のウイルス汚染に関する研究」として実施したものである．）

文　献

1）Charles P. G. and Sagar, M. G. : *J. Food Protec.*, 41(9), 743-754, 1978.
2）Sargar, M. G., Charles, P. G. and Joseph, L. M. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 37(3), 572-581, 1979.
3）James, M. V., Edward, F. L., Thomas J. V. and Marilyn, C. D. : *J. Food Protec.*, 43(2), 95-98, 1980.
4）Cliver, D. O., Ellender, R. D. and Sobsey, M. D. : *J. Food Protec.*, 46(4), 345-357, 1983.
5）John, T. T., Robert, S., James, T. P. and Edwerd, P. L. : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68(5), 884-886, 1985.
6）Mary, T. C., Marilyn, B. K., Lawrence, A. R. and Cameron, R. H. : *J. Food Protec.*, 49(8), 596-601, 1986.
7）Eyles, M. J., Davey, G. R. and Huntley, E. J. : *J. Food Protec.*, 44(4), 294-296, 1981.
8）Dale, L., *et al.* : *New Eng. J. Med.*, 314, 678-681, 1986.
9）Metcalf, T. G. and Stiles, W. C. : *J. Infect. Dis.*, 115, 68-76, 1965.
10）Denis, F. : *Lancet*, 1262, 1973.
11）Fugate, K. J., Cliver, D. O. and Hatch, M. T. : *J. Milk Food Technol.*, 38, 100-104, 1975.
12）Vaughn, J. M. and Metcalf, T. G. : *Water Res.*, 9, 613-616, 1975.
13）厚生省監修：微生物検査必携ウイルス・リケッチア検査，61-64，1978，日本公衆衛生協会，東京．
14）今井丈夫：浅海完全養殖，85-189，1981，恒星社厚生閣，東京．
15）Digirolamo, R., Liston, J. and Matches, J. : *Appl. Microbiol.*, 24, 1005-1006, 1975.
16）Genetelli, E. J. : *Water and Wastes Engineering*, 15(10), 46-52, 1975.
17）Lindberg-Braman, A. M. : *Am. J. Publ. Health*, 53, 1003-1011, 1956.
18）Roos, R. : *Svenska Lakartidningen*, 53, 989-1003, 1956.
19）Koff, R. S., *et al.* : *New Engl. J. Med.*, 276, 703-710, 1967.
20）Portnoy, B. L., *et al.* : *J. Am. Med. Assoc.*, 233, 1065-1068, 1975.
21）Stille, W., Kunkel, B. and Nerger, K. : *Dtsch. Med. Wschr.*, 97, 145-147, 1972.
22）Dienstag, J. L., Gust, I. D., Lucas, C. R., Wong, D. C. and Purcell, R. H. : *Lancet*, 561-564, 1976.
23）矢野一好，林　志直，薮内　清，田口文章：用水と廃水，27(5)，489-495，1985.
24）Metcalf, T. G. and Stiles, W. C. : *In G. Berg (ed) Transmission of viruses by the water route*, 439-447, 1967, Interscience, New York.
25）Lie, O. C., Seraichekas, H. R. and Murphy, B. L. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 121, 601-607, 1966.
26）Kostenbader, K. D. and Cliver, D. O. : *Appl. Microbiol.*, 24(4), 540-543, 1972.
27）Landry, E. F., Vaughn, J. M. and Vicale, T. J. : *J. Food Protec.*, 43(2), 91-94, 1980.
28）Speirs, J. I., Pontefract, R. D. and Harwig, J. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(11), 2666-2670, 1987.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 54-60, 1988

ドブネズミにおける腸炎ビブリオの保有

神崎政子*, 丸山　務*, 平田一郎**,
太田建爾***, 森田千春****

Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in Brown rat (*Rattus norvegicus*)

MASAKO KANZAKI*, TSUTOMU MARUYAMA*, ICHIRO HIRATA**,
KENJI OHTA*** and CHIHARU MORITA****

During the period from October 1985 through February 1987, a total of 131 rats, consisting of 94 *Rattus norvegicus* caught in the coastal area of Tokyo Bay and 37 *Rattus rattus* caught in the downtown building, was studied for the presence of human enteric pathogens in their intestinal contents.

Consequently, it was found that 32 (34%) of 94 *Rattus norvegicus* caught in October and February had harbored *Vibrio parahaemolyticus* in their intestine. And a few animals concurrently had harbored *V. mimicus*, *V. fluvialis* and *V. vulnificus* along *V. parahaemolyticus*, but none of *V. cholerae* 01 and non 01. However, none of the above mentioned pathogens was recovered from 37 *Rattus rattus* caught in the downtown building.

Serological studies made on the 32 isolates of *V. parahaemolyticus* revealed that they were classified into at least 17 serovars including O 4 : K 8 and O 1 : K 33 which are often isolated from food poisoning patients. Of them, 6 strains showed positive results on the producibility of Kanagawa hemolysin by the method of Reverse Passive Latex Aggulutination (RPLA).

When isolates of *V. parahaemolyticus* were experimentally administrated orally into rats, one group of animals excreted the organisms into its feces continuously from the lst day till 8th day after the administration. After the 10th day, none of the organisms could be recovered even by the enrichment culture of the feces. However, the organisms were recovered again from the intestinal contents of the animal sacrificed on the 15th day. Another group also excreted the organisms into its feces on the 5th day, and the organisms were recovered from the cecal contents of the animal sacrificed on the 7th day.

These results suggest that *V. parahaemolyticus* is stable for a certain period of time in the intestine of rats, and even likely to proliferate in it.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, *Rattus norvegicus*, Kanagawa hemolysin

緒　言

腸炎ビブリオはいわゆる海水由来菌であり，水温の高い5～9月には沿岸海水中から検出できるが，海水温度が15℃以下となる寒冷期ではほとんど検出されず，その越冬は海底の汚泥であろうと考えられている．昭和30年代にアジによる腸炎ビブリオ食中毒が全国各地で発生したことを契機として，わが国では海水や海産魚介類を中心にきわめて膨大な，かつ詳細な生態学的調査がこれまでに集積されている[1]．しかしながら本菌の分布と宿主感受性が特徴的であることからヒト以外の哺乳動物にお

*東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
**東京都立衛生研究所多摩支所
***東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科
****国立予防衛生研究所

ける保菌について調査した報告はほとんどみあたらない.

著者らは都市環境に生息するネズミにおける病原菌, 特に腸管系病原菌の保有実態調査を行っているが, 今回, 臨海地域に生息するドブネズミが腸炎ビブリオを高率に保有していることを確認した. そこで腸炎ビブリオを中心に保有状況の概要とネズミにおける腸炎ビブリオの長期保菌の可能性を想定し, 分離株のラット腸管への定着性についても実験を試みたのでそれらの概要を報告する.

材料および方法

1. 供試材料

1985年10月から1987年2月にかけて捕獲したドブネズミ94匹とクマネズミ37匹, 計131匹を対象とした (Table 1). 捕獲場所は臨海地域 (東京湾西南部埋立地) と市街地域(港区・Aビル内) の2ヶ所であり, 臨海地域の捕獲は10月と2月に各2回ずつ, 計4回にわけて行い, 市街地域は8月に1回のみ実施した. 臨海地域で捕獲したネズミはすべてドブネズミであり, ビル内で捕獲したものはすべてクマネズミであった. ネズミは捕獲時に生存していた状態のもののみを対象とし, クロロホルムで殺処分後直ちに摘出した回盲部内容物を検査材料とした.

2. 病原菌分離方法

ビブリオ属の検索は2% NaCl加アルカリ性ペプトン水で増菌後, TCBS寒天 (Oxoid), ビブリオ寒天 (ニッスイ) およびPMT寒天 (ニッスイ) を用いて分離を行い, 以下, 常法[2]に従って同定した. すなわち, 確認培地は第1段階として3% NaCl加TSI寒天培地, 3% NaCl加LIM培地を用いた. さらにチトクロームオキシダーゼ試験, 3%, 8%, 10% NaCl加ペプトン水における食塩耐容性, ブドウ糖からのガス産生性およびVP反応等の各生化学性状試験を実施した.

また, *Salmonella*, *Yersinia* および *Campylobacter* の検索についても常法[2]に従い, いずれも直接分離のみではなく増菌培養も併用した.

3. 分離腸炎ビブリオの血清型別

分離腸炎ビブリオの血清型別においてK抗原型別は市販 (デンカ生研K. K.) のK1～K71診断用抗血清を, またO群別はO1～O11の市販 (同上) 抗血清をそれぞれ用い, いずれも常法に従いスライド凝集反応により行った[3]. なお, O群別には供試菌株を2% NaCl加Tryptic soy agar (Difco) 培地で培養し, 121℃, 30分間加熱処理したものを抗原として用いた.

4. 神奈川溶血毒産生性

分離腸炎ビブリオの神奈川溶血毒産生性は我妻変法[4]およびRPLA法 (Reversed Passive Latex Agglutination Test) で検討した.

我妻変法は, 供試菌株を2% NaCl加Tryptic soy broth (Difco) で37℃, 18時間培養後, その一白金耳を, 5%ヒト血液加変法我妻培地に接種し, 37℃, 18時間湿潤箱中で培養後, 溶血の有無を観察した.

RPLA法は市販の腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒検出用キット「KAP–RPLA生研」(デンカ生研K. K.) を使用して行った.

5. 分離腸炎ビブリオのラット腸管定着実験

供試した菌株は, 分離腸炎ビブリオのうち血清型の異なる4株, すなわち溶血株の86-673 (O1：K58), 食中毒患者からしばしば分離されるものと同じ血清型の86-682 (O1：K33), 非溶血株である86-719 (O4：K8) および冬期に分離された86-710 (O5：KUT) と対照株として食中毒患者由来株2株TB 86-102 (O4：K8), 中津川 (O2：K3) の計6株である. これら供試菌株を2% NaCl加Tryptic soy brothで37℃, 15時間培養し, 遠心集菌後10%スキムミルクに10^8／mlに浮遊さ

Table 1. Specimens

No.	Date	Places	No. of tested	Rats
1	Oct., 21, 1985	Coast area, Tokyo bay	31	Brown rat (*Rattus norvegicus*)
2	Feb., 18, 1986	〃	5	〃
3	Oct., 21, 1986	〃	48	〃
4	Feb., 24, 1987	〃	10	〃
5	Aug., 31, 1986	Building, Downtown	37	House rat (*Rattus rattus*)
	Total		131	

Table 2. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and Enteropathogenic Bacteria from Rats

Places	Rats	Date	No. of tested	No. of positives (%)						
				Vibrios*				Others**		
				V. p.	V. m.	V. f.	V. v.	Yer.	Sal.	Campylo.
1. Coast area	Brown rat (*Rattus norvegicus*)	October	79	31 (39.2)	5 (6.3)	3 (3.8)	4 (5.1)	1 (1.3)	1 (1.3)	0
2. 〃	〃	February	15	1	0 (6.7)	0	0	0	0	1 (6.7)
Total			94	32 (34.0)	5 (5.3)	3 (3.2)	4 (4.3)	1 (1.1)	1 (1.1)	1 (1.1)
3. Building	House rat (*Rattus rattus*)	August	37	0	0	0	0	0	0	0

* V. p.：*V. parahaemolyticus*, *V.* m.：*V. mimicus*, V. f.： *V. fluvialis*, *V.* v.：*V. vulnificus*

** Yer.：*Y. enterocolitica*, Sal.：*Salmonella*, Campylo.：*Campylobacter*

せ，その1 mlをSD系8週令の24時間餌止めをしたラットにゾンデを用いて胃内に投与した．ラットは1株につき3匹を用い，投与当日から25日間にわたりその3匹の混合した排せつ便からの投与菌の回収を試みた．観察期間中腸炎ビブリオが陰性であったものについては殺処分し，その回盲部内容物からも投与菌の回収を試みた．

成　　績

1．ネズミからのビブリオ属およびその他の病原菌の検出成績

ネズミからのビブリオ属およびその他の病原菌の分離成績をTable 2に示した．ドブネズミの捕獲は2年間にわたり毎年10月と2月に計4回行った．Table 2にはこれらの成績を10月と2月の2つの季節に分けて示した．

腸炎ビブリオは臨海地域で捕獲したドブネズミのみから検出された．10月に捕獲したドブネズミ79匹中31匹より腸炎ビブリオが検出され，その陽性率は39.2%であった．その他，*Vibrio mimicus*，*V. fluvialis* および *V. vulnificus* も検出され，それぞれの陽性率は6.3%，3.8%，5.1%であった．また，同一地域で真冬の2月に捕獲された15匹中1匹からも腸炎ビブリオが検出された．なお，*Vibrio cholerae* O 1および non O 1はいずれのネズミからも検出されなかった．その他の対象とした病原菌は *Yersinia enterocolitica* O 3：Biotype3B, *Salmonella virchow*, *Campylobacter coli* がそれぞれ1例ずつ腸炎ビブリオ陰性のネズミより検出された．

一方，都心のビル内で捕獲したクマネズミ37匹では，腸炎ビブリオを初め今回対象とした病原菌はすべて陰性であった．

Table 3. Serological Typing of *Vibrio parahaemolyticus* Isolates from Rats

Serotype O	:	K	No. of isolates
1	:	33	1
1	:	58	5
1	:	UT	5
3	:	UT	4
4	:	8	1
4	:	64	1
5	:	26	1
5	:	UT	4
6	:	46	1
7	:	61	1
8	:	UT	1
10	:	19	1
10	:	UT	1
11	:	21	1
11	:	34	1
11	:	UT	2
UT	:	UT	1
Total			32

UT：Untypable

2．分離腸炎ビブリオの血清型別

ネズミから分離された腸炎ビブリオ，1検体から1株計32株について血清型別を行い，それらの成績をTable 3に示した．32株のうちO抗原，K抗原ともに型別されたものは14株で，O抗原のみが型別されたものが18株

あった．なお，2月に分離された1株はO5：KUTであった．

3．神奈川溶血毒産生性

分離腸炎ビブリオ32株の神奈川溶血毒産生性は我妻変法と市販の逆受身ラテックス凝集反応（RPLA法）によって検討した（Table 4）．我妻変法では分離株32株すべてが陰性であったが，RPLA法では6株が陽性であった．これらの血清型は5株がO1：K58であり，残りの1株はO10：K19であった．なお，冬期に分離されたO5：KUTの1株はRPLA法においても陰性であり本毒素非産生株であった．なお，分離株32株のうちRPLA法で陽性を示したもののみ表に示した．

4．分離腸炎ビブリオのラット腸管への定着性

ドブネズミから分離された腸炎ビブリオのラット腸管定着実験成績を表5に示した．

供試菌株4株のうち86-719株は菌投与後1日目から8日目まで連続排菌が確認された．その後は排菌が認められなかったため15日目にラット1匹を殺処分し，回盲部内容物を培養した結果投与菌が回収された．しかし，16日目および25日目に殺処分したマウスの回盲部内容物からは投与菌は回収されなかった．86-673株は5日目に排

Table 4．Production of Kanagawa Hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* Isolates from Rats

Strain No.	Serotype O：K	Modified Wagatsuma method	RPLA method*
85-1104	1：58	—	+
85-1105	10：19	—	+
85-1107	1：58	—	+
86- 673	1：58	—	+
86- 674	1：58	—	+
86- 690	1：58	—	+
Nakatsugawa (Control)	2： 3	+	+

* RPLA method：Reversed Passive Latex Agglutination Test

Table 5．Recovery of *Vibrio parahaemolyticus* from Excrements and Intestinal Contens Experimentally Infected Rats

Day after administration	Strains: Isolates				Strains: Control	
	86-673 (O1：K58)	86-682 (O1：K33)	86-710 (O5：KUT)	86-719 (O4：K8)	TB86-102 (O4：K8)	Nakatsugawa (O2：K3)
0	—	—	—	—	—	—
1	—	—	—	+[E*1]	—	—
2	—	—	—	+[D*2 E]	—	—
3	—	—	—	+[E]	—	—
4	—	—	—	+[D, E]	—	—
5	+[E]	—	—	+[D, E]	—	—
6	—	—	—	+[E]	—	—
7	—	—	—	+[E]	—	—
7[I*3]	+[E]	—	—		—	—
8	—	—	—	+[E]	—	—
10	—	—	—	—	—	—
13	—	—	—	—	—	—
15	—	—	—	—	—	—
15[I]	—	—	—	+[D, E]	—	—
16	—	—	—	—	—	—
16[I]	—	—	—	—	—	—
17				—		
21				—		
22				—		
25[I]				—		

＊1 E：Enrichment culture, ＊2 D：Direct culture, ＊3 I：Intestinal contents

せつ便から，また7日目に回盲部内容物からいずれも増菌培養によって投与菌が回収されたがそれ以外は陰性であった．他の2株（86-682，86-710）および対照株2株計4株では，16日目までの排せつ便および7日目，15日目，16日目の回盲部内容物いずれからも投与菌は回収できなかった．

考　　察

ネズミからの腸炎ビブリオ検出についてはわが国ではその報告例をみないが，Chenchittikul ら[5]は東南アジアのタイにおいてジャコウネズミで31.8%，ドブネズミで8.2%の割合に腸炎ビブリオを保有していると報告している．今回の著者らの成績を含めてこのようなネズミにおける腸炎ビブリオの保有はネズミの生息場所と食性に由来するものと思われる．すなわち，臨海地域に生息するネズミにのみ本菌が検出されたことは，おそらく腸炎ビブリオに汚染された海産物あるいは標流物を常時摂取することにより一定期間本菌を腸管に保有するようになり，排菌もされると理解してよいだろう．注目すべき点は，今回腸炎ビブリオが高率に検出されたのが本菌食中毒の発生が無くなりかける10月中旬であり，また検出率は低いが2月という食中毒発生がなく海水中からもほとんど本菌が検出されない冬期にも分離されたという事実である．これらをどのように解釈し，腸炎ビブリオの自然界における生態の中でネズミがどのような役割をするのか，著者らの今回の成績だけからは明確な回答を得ることはできない．

分離腸炎ビブリオの血清型は型別されないものも含め，少なくとも17血清型以上と多岐にわたり，なかにはO1：K33，O4：K8のような食中毒患者からしばしば分離される型[6]も含まれていた．

腸炎ビブリオの病原性を論じる場合，神奈川現象が常に問題となり，本現象にあずかる耐熱性溶血毒が病原性と密接に関連しているといわれている．Miyamoto ら[7]の報告では患者ふん便由来の腸炎ビブリオの約98%は本毒素を産生するのに対し，魚介類をはじめ自然界より分離される大部分のものは非産生性であり，本毒素を産生する株は0.1%前後に過ぎない．最近，平田ら[8]はアジ由来の腸炎ビブリオについて感度および特異性の優れたRPLA法を用い，耐熱性溶血毒産生を検討し，0.6%の菌株が陽性であったことを確認している．今回，著者らがネズミから分離した腸炎ビブリオ32株のうち，耐熱性溶血毒産生試験で我妻変法ではすべて陰性であったがRPLA法で陽性を示したものが6株（18.8%）あり，この成績は従来の自然界由来株の耐熱性溶血毒産生陽性率に比べかなり高い．

ネズミでの保菌の可能性を想定しラットを用いた感染実験の成績は，1回の投与でも菌株によって少なくとも1週間は排菌を続ける．さらに2週間は腸管内にとどまっていることが認められた．このことは本菌がネズミの腸管内に一定期間定着し，増殖することを示唆している．自然の状態では大量の菌を連続的に摂取することもあり得ると思われる．以上のことを勘案すれば，腸炎ビブリオの分布する地域では本菌に汚染された食物を常食とするネズミが生息していれば，そのネズミが本菌の増幅と散布の役割を担っていることは考えてもよいだろう．しかしながらネズミによる汚染地域の拡大や冬期にも本菌が分離されるからといえネズミとその生息する環境で腸炎ビブリオが越冬するかどうかについては著者らの今回の調査だけからは推論を導くにも資料が不十分である．今後さらに他の地域での同様の疫学的調査や多くの実験的研究の展開が必要である．

結　　論

都市環境に生息するネズミにおける病原菌，特に腸管系病原菌の保有実態調査を1985年10月から1987年2月にかけて実施し，以下の結果を得た．

1．臨海地域に生息するドブネズミ94匹中，32匹（34.0%）から腸炎ビブリオが検出された．これらのうち1例は2月に捕獲されたネズミから分離された．この他，*V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus* も検出されたが *V. cholerae* O1および non O1は検出されなかった．

一方，都心のビル内のクマネズミ37匹については，ビブリオ属およびその他の対象とした病原菌はすべて陰性であった．

2．検出された腸炎ビブリオ32株の血清型はO，K抗原ともに型別されたものが14株でO抗原のみに型別されたものが18株あった．

3．検出された腸炎ビブリオ32株の神奈川現象は我妻変法ではすべて陰性であったが，RPLA法で神奈川溶血毒を産生する株が6株（18.8%）認められた．

4．分離腸炎ビブリオ4株のラット腸管定着実験を試みたところ，1株は菌投与後8日目まで連続排菌が認められたがそれ以降認められず，15日後に殺処分した回盲部内容物より投与菌が回収された．また，他の1株は5日目の排せつ便と7日後に殺処分した回盲部内容物から投与菌が回収された．

（本研究の概要は第104回日本獣医学会1987年8月で発表した．）

文　献

1）竹田美文，三輪谷俊夫：ビブリオ感染症，1-36，1982，医歯薬出版，東京

2）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，1985，医学書院，東京

3）工藤泰雄，善養寺　浩：微生物検査，小酒井　望編，225-231，1974，医学書院，東京

4）善養寺　浩：感染症学雑誌，46，113-115，1972

5）Chenchittikul, M., Daengpium, S., Hasegawa M., Itoh, T. and Phanthumachinda, B.：*Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 14, 255-259, 1983.

6）津野正朗，太田建爾，山田澄夫，松下　秀，斉藤香彦，伊藤　武，工藤泰雄：東京衛研年報，34，15-19，1983.

7）Miyamoto, Y., Nakamura K. and Takizawa K.：*Jap. J. Microbiol.*, 6，141-158，1962.

8）平田一郎，太田建爾，池島伸至，神　真知子，新井輝義，入倉善久，坂井千三：東京都衛研年報，36，47-51，1985.

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.*, **39**, 61-64, 1988

形質転換薬用植物細胞の有用物質の産生
エビスグサの毛状根に含まれる Anthraquinone 類

安田一郎*, 浜野朋子*, 高野伊知郎*
瀬戸隆子*, 秋山和幸*, 浅水哲也**

Production of Useful Components by Transformed Medicinal Plant Cells
Anthraquinones Contained in the Cultured Hairy Root of *Cassia obtusifolia*

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

Four anthraquinones, chrysophanol (1), 8-*O*-methyl-chrysophanol (2), emodin (3) and physcion (4) were isolated from the cultured hairy roots of *Cassia obtusifolia*, which had been inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*. The origin at growth contained none of 2, but the primary plant at seedling had it specifically. The composition of hairy roots was determined by HPLC analysis of 1 ~ 4 to be relatively similar to that of the radicle at germination.

Keywords : transformed medicinal plant cell, hairy root, *Cassia obtusifolia*, anthraquinone, chrysophanol, 8-*O*-methylchrysophanol, emodin, physcion, high-performance liquid chromatography, radicle

緒　言

近年，薬用植物資源を生産するバイオテクノロジーとして，植物組織培養が注目されているが，その一手法に形質転換細胞の培養がある[1]．植物に Ri プラスミドを保持する *Agrobacterium rhizogenes* を感染させ，プラスミドの一部（T-DNA）を植物細胞に移すと毛状根組織が生じ，異常な早さで増殖することが多い．そして，形質転換の原因となった細菌感染部分を切除した後，ホルモン無添加の植物組織培養培地で毛状根組織を培養する．これが上記の培養である．最近の研究[2,3]によれば，従来のカルス誘導法で得られる脱分化細胞では産出困難な有用物質も生産可能といわれている．そこで，今回，エビスグサ *Cassia obtusifolia* 由来の毛状根に含有される有用物質の成分研究に着手した．

エビスグサは緩下，強壮薬に用いられる生薬，決明子の基原植物[4]で，その薬用部位は種子であり，成分として anthraquinone 類，naphthoquinone 類，coumarin 類などが知られている[5]．また，カルス誘導法による脱分化細胞には二次代謝産物として anthraquinone 類が多く含まれると報告[6]されている。今回の毛状根の成分研究では二次代謝産物を対象として，含量の高い物質を検索し，その構造を明らかにした．また，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用い，培養された毛状根組織と成分的に類似する植物体の部位とを比較検討した．

実験の部

1．実験材料

(1)毛状根：既報[7]に従いエビスグサより誘導し，20日間液体培地で培養した(A).

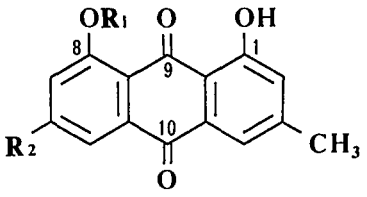
(2)幼植物：バーミキュライトにエビスグサ種子を播種し，25℃，7日間放置し，全長約2 cm となったものを材料とした．これを下から1 cm のところで切断し，幼芽，子葉を含む上部(B)と幼根を含む下部(C)とに分割した．

(3)成長根：1987年9月ほ場より堀上げたエビスグサ地下部(D).

2．装置および測定条件

(1)HPLC：装置は日本分光880-PU，波長可変紫外部可視

*東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Reserch Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
**富山県薬事研究所



	R_1	R_2
Chrysophanol (1)	H	H
8-O-Methylchrysophanol (2)	CH_3	H
Emodin (3)	H	OH
Physcion (4)	H	OCH_3

Fig. 1. Chemical Structures of Chrysophanol, 8-*O*-Methylchrysophanol, Emodin and Physcion

部検出器付を用い，分析条件は Fig. 3 に示した．

(2)分取用 HPLC：装置は東ソー HLC-837を用い，分取は以下の条件で行った．カラム：YMC-Pack ODS 60Å（山村化学研究所）5 μm，20×250mm，移動相：アセトニトリル・水（6：1～3：1）混液，流速：7.0ml/min，検出：340nm，カラム温度：35℃，試料液注入量：7.5ml．

(3)質量分析(MS)および核磁気共鳴(NMR)スペクトルの測定装置ならびに測定条件は Table 1，2 に掲げた．

3．anthraquinone 類の抽出および単離

毛状根42.7g を粉末とし，これにメタノール500ml を加え，24時間冷浸抽出を行う．再度この操作を繰返し，全抽出液を合し，溶媒を減圧留去する．得られたメタノールエキス11g は，水に懸濁した後，酢酸エチル分画，ブタノール分画および水分画に分ける．

酢酸エチル分画は溶媒を減圧留去し，得られたエキス5.4g を 2 分割する．その一方を少量の酢酸エチルに溶かし，シリカゲルカラム（100g，0.04～0.063mm，メルク社製）にかけ，ベンゼン（分画Ⅰ），ベンゼン・酢酸エチル（10：1）（分画Ⅱ），ベンゼン・酢酸エチル（4：1）（分画Ⅲ），ベンゼン・酢酸エチル（2：1）（分画Ⅳ），ベンゼン・酢酸エチル（1：1）（分画Ⅴ）各600ml で溶出させ，5 分画とする．分画Ⅱ，Ⅲ，Ⅳは，溶媒を減圧留去後，各々分取用 HPLC に付し，既報[8]と同様の操作により，分画Ⅱから 1 および 4，分画Ⅲから 2，分画Ⅳから 3 を単離した．

1～4 の物理定数および MS データを Table 1 に，1～2 の ^{13}C-NMR データを Table 2 に掲げた．化合物 1～4 の同定は，chrysophanol[9]，8-*O*-methylchrysophanol[10]，emodin[9]，physcion[9]の各物理定数およびスペクトルデータとの比較，ならびに HPLC の保持時間（t_R）を直接標品と比較することにより行った(Fig.1.)．

4．HPLC による分析

各実験材料 A～D を粉末とし，その100mg にメタノール40ml を加え，振とう抽出を行う．上澄液の溶媒を，40℃以下で減圧留去し，残渣を 5 ml のメタノールによく溶かした後，0.45 μm のフィルターを通し，HPLC 用の試料液とする．本試料液の調製は用時行った．

Table 1. Physical and Mass Data* of 1～4

Compound	m. p. (Solvent)	Mass *m/z*
1	200° (Ethanol)	254(M^+, 100%), 226(18), 198(9), 152(9)
2	194° (Benzene)	268(M^+, 100%), 251(18), 250(51), 226(66)
3	269° (Chloroform)	270(M^+, 100%), 255(22), 213(28), 189(73)
4	209° (Methanol)	284(M^+, 27%), 233(28), 167(25), 149(100)

* Mass spectra were taken on a D-300 (JEOL) Spectrometer at 70 eV.

Table 2. ^{13}C-NMR Chemical Shifts* of 1 and 2

Carbon	1	2	Carbon	1	2
C- 1	162.7	162.8	C- 9	192.5	188.5
C- 2	124.5	124.7	C-10	181.8	183.0
C- 3	149.3	147.6	C-11	115.9 1)	115.1 3)
C- 4	119.9	120.0	C-12	133.3 2)	132.6 4)
C- 5	121.3	120.2	C-13	133.6 2)	135.9 4)
C- 6	136.9	135.6	C-14	113.7 1)	120.5 3)
C- 7	124.3	118.2	-Me	22.3	22.1
C- 8	162.4	160.8	-OMe		56.7

* ^{13}C-NMR spectra were taken on a FX-270 (JEOL) spectrometer (67.8Hz) in $CDCl_3$ with TMS as an internal reference and are expressed in terms of ppm.

1)～4) The assignments may be reversed.

結果および考察

1．anthraquinone 1～4 の構造

1 は黄かっ色針状晶，m. p. 200℃，$C_{15}H_{10}O_4$の分子式

を示し，その^{13}C-NMR よりメチル基1個を含む anthraquinone 誘導体と推定された．その MS データも合わせて詳細に検討した結果，本物質を chrysophanol と考え，決明子より得た標品と HPLC 上で直接比較し，同定した．

2は黄色針状晶，m. p. 194℃，$C_{16}H_{12}O_4$の分子式を示し，その^{13}C-NMR スペクトルは Table 2 に掲げるように，1とよく類似するもので，1の monomethylether と考えられた．炭素シグナルのケミカルシフト値を調べると，C-7位で6.1ppm，C-8位で1.6ppm の高磁場シフトが，C-14位で6.8ppm の低磁場シフトが観測されたことから，O-メチル化は1の1位ではなく，8位で行われていると推察された．本物質は文献値[10]のスペクトルデータおよび HPLC による標品との直接比較により同定した．

3は黄かっ色針状晶，m. p. 269℃，$C_{15}H_{10}O_5$の分子式を示し，その MS データより emodin と推定した．同定は決明子より得た標品との直接比較により行った．

4は赤かっ色針状晶，m. p. 209℃，$C_{16}H_{12}O_5$の分子式を示し，その MS データより physcion と推定し，標品との直接比較により同定した．

anthraquinone 類は，一般に瀉下剤，整腸剤として用いられる生薬に多く含まれる化合物群であるが，抗菌作用，抗真菌作用以外にその薬理活性に関する報告[5,10]は少ない．毛状根の成分として，今回上記4種の遊離体を高い収率で単離できたが，これらの配糖体は検出することができなかった．種子である決明子の成分として，1，3以外に4が微量に含まれ[9]，カルス誘導法による脱分化細胞には3が含まれているとの報告[6]があるが，2については，根の成分として北中らの報告[10]があるのみである．

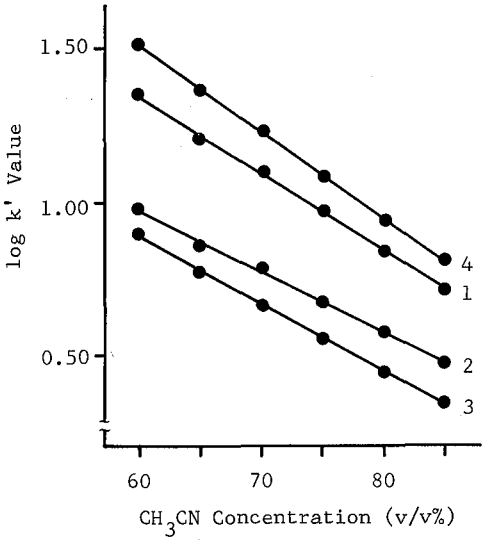


Fig. 2. Effect of Acetonitrile on the Column of YMC-Pack ODS 60Å

Mobile phase：a mixture of acetonitrile and water (X：(100-X)) containing 50mM acetic acid and 30mM triethylamine
1：Chrysophanol　2：8-*O*-Methylchrysophanol
3：Emodin　4：Physcion

2．毛状根，幼植物，成長根に含まれる anthraquinone の比較

HPLC により1～4の分析条件の検討を行ったところ，C_{18}逆相系シリカを固定相に用いた場合，移動相のアセトニトリル濃度により t_R は変化した．そこで，アセトニトリル濃度に伴う保持比（k'）の変化を求めた結果，Fig. 2 に示すデータが得られ，log k' とアセトニトリル濃度は各ピーク共，直線関係を示すことが明らかとなった。そして，比較的短時間で溶出し，かつ分離の良好な，Fig. 3 に掲げた組成を選択した．

2を含むエビスグサの部位として，北中らは根を報告[10]している．そこで，HPLC により，根の抽出物を分析したところ，Fig. 3 (D)の結果を得た．すなわち，1がわずかに検出されるものの，2～4はピークとして検出されなかった．次に，発芽期の幼植物に着目し，幼芽，子葉を含む部分(B)と幼根を含む部分(C)の成分組成を調べた．その結果，Fig. 3 (B)，(C)に示すように，毛状根は，幼根を含む部分(C)と1～4の組成，含量がほとんど変わらないものであることが判明した．一方，地上部となっていく部分(B)は，毛状根に比べ1の含量が高く，また，2の含量が少ないものであった．

以上のことから，エビスグサより誘導された毛状根は，成分的視点に立った場合，発芽時の幼根に近いものであるが，成長時の根とはかけ離れたものであると考察される．

結　論

エビスグサ毛状根の成分として，4種の anthraquinone, chrysophanol, 8-*O*-methylchrysophanol, emodin, physcion を単離，同定した．8-*O*-methylchrysophanol は，成長したエビスグサには含まれないもので，発芽期の幼植物に特異的に含まれる物質である．HPLC によりこれらの anthraquinone 類を分析したところ，毛状根は幼根部と同一のパターンを示し，成分的によく類似していることが明らかになった．

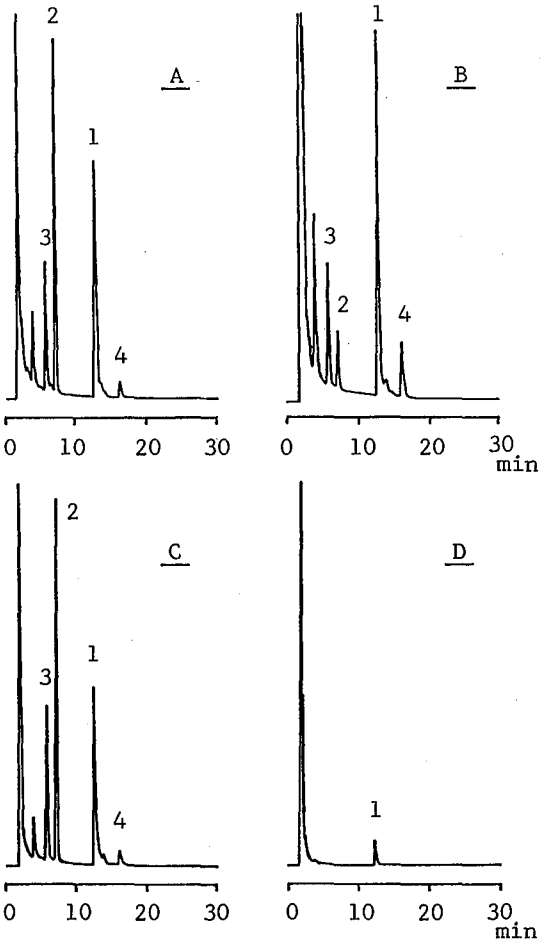


Fig. 3. HPLC of the Several Parts of *Cassia obtusifolia*

A : the Hairy Roots B : the Stems at Germination C : the Roots at Germination D : the Roots at Growth
HPLC conditions : column, YMC-Pack AM-312, 6 × 150mm, ODS 5μm, 60Å ; mobile phase, acetonitrile・water・acetic acid・triethylamine (300 : 100 : 1 : 1) ; flow rate, 1.0ml/min ; detection, VIS 420nm ; range, 0.02
1 : Chrysophanol 2 : 8-*O*-Methylchrysophanol 3 : Emodin 4 : Physcion

謝辞 本研究にあたり御指導いただいた国立衛生試験所筑波薬用植物栽培試験場 佐竹元吉場長，下村講一郎博士，8-*O*-methylchrysophanol, physcion の標品を御分与いただいた日本大学薬学部 滝戸道夫教授，北中進博士に深謝致します．

文 献

1) 古谷力：天然医薬品学，198-210，1987，朝倉書店，東京
2) Kamata, H., Okamura, N., Sakake, M., Harada, H., Simomura, K : *Plant Cell Reports*, 5, 239-242, 1986
3) Flores, H. E. : in Applications of Biotechnology to Agricultural Chemistry, ASC Symposium Series, 334, 6-86, 1987
4) 日本公定書協会編：第11改正日本薬局方解説書，D-280－D-282，1986，廣川書店，東京
5) 難波恒雄：原色和漢薬図鑑（上），226-227，1980，保育社，大阪
6) Takahashi, S., Kitanaka, S., Takido, M., Ebizuka, Y., Sankawa, U., Hosono, M., Kobayashi, M., Shibata, S : *Planta Med.*, 33, 389-392, 1978
7) 浅水哲也：富山県薬事研究所所内報，昭和60，61年合併号，1-4，1987
8) 浜野朋子，安田一郎，瀬戸隆子，高野伊知郎，秋山和幸：東京衛研年報，38，73-79，1987
9) Takido, M. : *Chem. Pharm. Bull.*, 6, 397-400, 1958
10) 北中進，滝戸道夫：薬誌，106，302-306，1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 39, 65-68, 1988

非ピリン系かぜ薬の定量法（第4報）
抗ヒスタミン剤

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 Non-pyrin preparations for Common Cold (IV)
Antihistaminics

MISAKO TAKAHASHI*, KYOKO NAKAYAMA*, SHIN-ICHI UEHARA*,
KUNIHIRO KAMATA*, TERUHIKO HAGIWARA* and KAZUYUKI AKIYAMA*

Keywords：非ピリン系かぜ薬 non-pyrin preparations for common cold, 抗ヒスタミン剤 antihistaminics, ガスクロマトグラフィー gas chromatography, 塩酸ジフェニルピラリン Diphenylpyraline hydrochloride, 塩酸トリプロリジン Triprolidine hydrochloride, フマル酸クレマスチン Clemastine fumarate

はじめに

非ピリン系かぜ薬[1]に配合される抗ヒスタミン剤として主に，エタノールアミン系化合物，モノアミン系化合物，フェノチアジン系化合物，などがある．ほかに分類上，「その他」とされる成分が数種類ある．前の二系統の分析法は前報[2]で塩酸ジフェンヒドラミンとマレイン酸クロルフェニラミンについて報告した．今回は「その他」のうち劇薬である3成分，塩酸ジフェニルピラリン（Dp），塩酸トリプロリジン（Tp）およびフマル酸クレマスチン（Cm）について定量分析法を検討した．

一般に抗ヒスタミン剤はその作用が強力で副作用も大きいため，配合量は他成分に比較して極めて少量である．そのため混合製剤の分析では他の配合薬の妨害を受け易い．よって比色分析法など官能基にもとずく定量法では妨害成分を除去するための繁雑な操作が必要となる．上記3成分の定量法としては，Dp は吸光度法[3]，Tp は HPLC 法[3]，Cm は非水滴定法[4]があるが分別定量法は報告されていない．さらに一斉収去の行政検体などでは検体ごとに，抗ヒスタミン剤の成分が異なる場合があり，それぞれ個別の試験法に従い分析するので長時間を要する．そこで今回著者らは，混合製剤中の Dp, Tp および Cm の GC による統一定量法を検討した結果，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 R 1 A, 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：大洋科学工業 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製したもの，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A：フタル酸ジ-n-ブチル100mg をとりメタノール100m*l* に溶かし内標準溶液Aとする．

I.S.B：ステアリン酸-n-ブチル80mg をとりメタノール100m*l* に溶かし内標準溶液Bとする．Tp：定量値99.8%　水分定量値3.8%，Dp：105°で2時間乾燥し定量するとき100%のもの，Cm：105°で4時間乾燥し定量するとき99.9%のものをそれぞれ使用した．

試料　医薬品製剤は行政検体として衛生局薬務部より送付された市販品および配置用のかぜ薬（糖衣錠，カプセル剤，分包顆粒剤）を用いた．それぞれ10個（包）以上をとりその平均重量を算出し，乳鉢でよく研和して均質な粉末とし試料とした．

測定　日局一般試験法第6項「ガスクロマトグラフ

*東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Reserch Laboratory of public Health
24－1，Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku,Tokyo, 169 Japan

法」の定量(1)内標準法に従い測定する.

定量操作

1．標準溶液の調製 Dp 標準品30mg, Tp 標準品40mg, Cm 標準品40mg をそれぞれ精密に量り，メタノール10ml を加えて溶かす．さらにホウ酸溶液（3→100）10ml，水酸化ナトリウム溶液（1→10）3 ml を加えた後，ヘキサンを正確に20ml 加えて10分間振り混ぜる．遠心分離後，ヘキサン層10ml を正確に量り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B 10ml 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 i）Dp と Tp の配合製剤のとき Dp 約8.0mg, Tp 約10mgにそれぞれ対応する試料を精密に量り，0.1N塩酸試液10ml を加え10分間振り混ぜ，さらに10分間超音波処理を行う．この液に水酸化ナトリウム溶液（1→10）5 ml を加えた後，ヘキサンを正確に20ml 加えて…以下標準溶液と同様に操作する．但し，内標準溶液B 2.5ml を正確に加えて溶かし試料溶液とする．

ii）Cm 配合製剤のとき Cm8.0mg に対応する試料を精密に量り，メタノール10ml を加えて溶かす．…以下標準溶液と同様に操作する．但し，内標準溶液B 2.0ml を正確に加えて溶かし試料溶液とする．

3．GC 測定条件 GC カラム：10% Silicone versilube F-50／Chromosorb W AW DMCS（60-80mesh）を内径3 mm×長さ2.0 mのガラスカラムに充填して用いる．検出器：水素炎イオン化検出器，温度：カラム（C. T.）260°，注入口（I. T.）280°，感度：8×10^2，キャリヤーガス：N_2 35ml／min.

実験結果および考察

1．測定条件の検討 GC カラムについては次の4種類について比較検討した．i）5 % Silicone GE SE-30／Chromosorb W AW DMCS（60-80mesh）2.0 m，ii）3 % Silicone OV-17／Chromosorb W AW DMCS（80～100mesh）2.0 m，iii）10% Silicone versilube F-50／Chromosorb W AW DMCS（60-80mesh），iv）iii）と同じで長さ3.0 m のもの．いずれも内径3 mm である．その結果，i）についてはI. S. との分離度は4.0～10.5であるがピークのテーリングが大きい．ii）は Dp と Tp の分離が良好ではない．iii）は定量操作のとおりでI. S. との分離度5.8～14.0でシャープなピークが得られた．iv）はiii）とほぼ同程度の分離度であった．カラムi），ii），iii）によって得られたクロマトグラムを Fig. 1．に示した．本報ではiii）を用いて以下の検討を行った．

温度については C. T. 230°，240°，250°，260°，270°についてピーク高の再現性と主成分と I. S. および他の配合成分との分離などを検討した．その結果 C. T. 260°，I. T. 290°のとき各ピーク高も一定であり，I. S. との分離も良好であった．

I. S. はフタル酸-n-ブチル，フタル酸-n-シクロヘキシル，トリデカンおよびステアリン酸-n-ブチルについて検討を行った結果，本報の条件ではフタル酸-n-ブチル(A)とステアリン酸-n-ブチル(B)が，3成分との分離が良かった．保持時間（t_R）はAが3.4min．で3成分より早く，Bは10.9min. で Dp, Tp, I. S. B, Cm の順序であった．今回は他のほとんどの配合成分が t_R が早いので I. S. B が適当と考え以下の検討を行った．

2．検量線 Dp, Tp, Cm のそれぞれ標準品を用いて，I. S. 1 ml 中に Dp 0.3～1.2mg，Tp 0.4～2.0mg，Cm0.4～2.0mg の間で5段階の濃度の標準溶液系列から検量線を作成した．回帰式は Dp… $Y=1.48X-0.032$（$\gamma=0.999$），Tp… $Y=1.219X+0.052$（$\gamma=0.999$），Cm… $Y=1.024X+0.001$（$\gamma=0.999$）（X：濃度mg／ml，Y：Dp，Tp，Cm の各ピーク面積／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（n＝4）Dp 0.5%，Tp 1.3%，Cm 1.6%と良好な結果であった．

3．他成分の影響 かぜ薬は混合製剤であり，また抗ヒスタミン剤は配合量がごく少量であるなど，分析のさい他の成分の影響が大きい．モデル処方およびモデル処方から Dp, Tp, Cm を除いた試料について I. S. を加えないで定量法にしたがい試験した結果，各被検成分および I. S. の保持時間に対応する位置に測定の障害となるピークを認めなかった．また上記合成試料に被検成分を添加した試料につき同様に操作定量した結果，回収率はいずれも98.0%以上であり，他の共存成分などによる影響は認められなかった．今回試料とした製剤には以下のような成分が配合されていた．エテンザミド（Eb），ブセチン（Bu）ノスカピン（Ns），*dl*-塩酸メチルエフェドリン（Me），アセトアミノフェン（Pa），アスピリンアルミニウム（As-Al），無水カフェイン（Cf），塩酸チペピジン（Tpp），グアヤコールスルホン酸カリウム（Gsk），ビタミン B_1, B_2（V. B_1, B_2）などである．Pa, As, Gsk, V. B_1, B_2は前処理により除かれ，他の成分はいずれも t_R が被検成分より早いため影響はなかった．市販製剤により検討したクロトグラムを Fig. 2．に示す．

4．市販製剤の分析 かぜ薬中に配合される抗ヒスタ

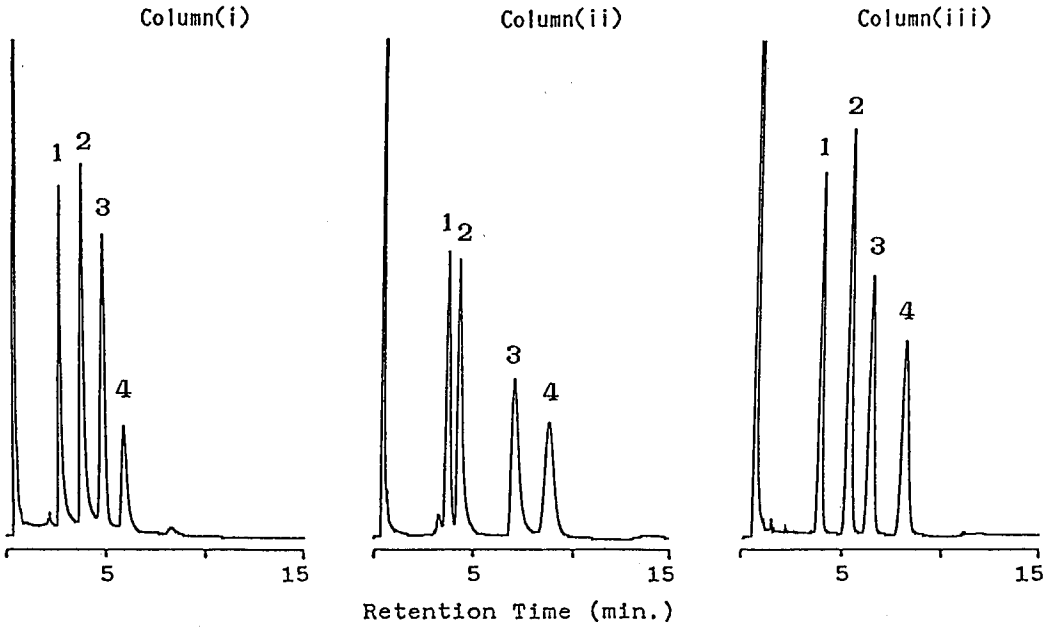


Fig. 1. Chromatograms of Standard Solution.
Peak 1 : Diphenylpyraline HCl 2 : Triprolidine HCl
3 : n-Butyl stearate 4 : Clemastine fumarate

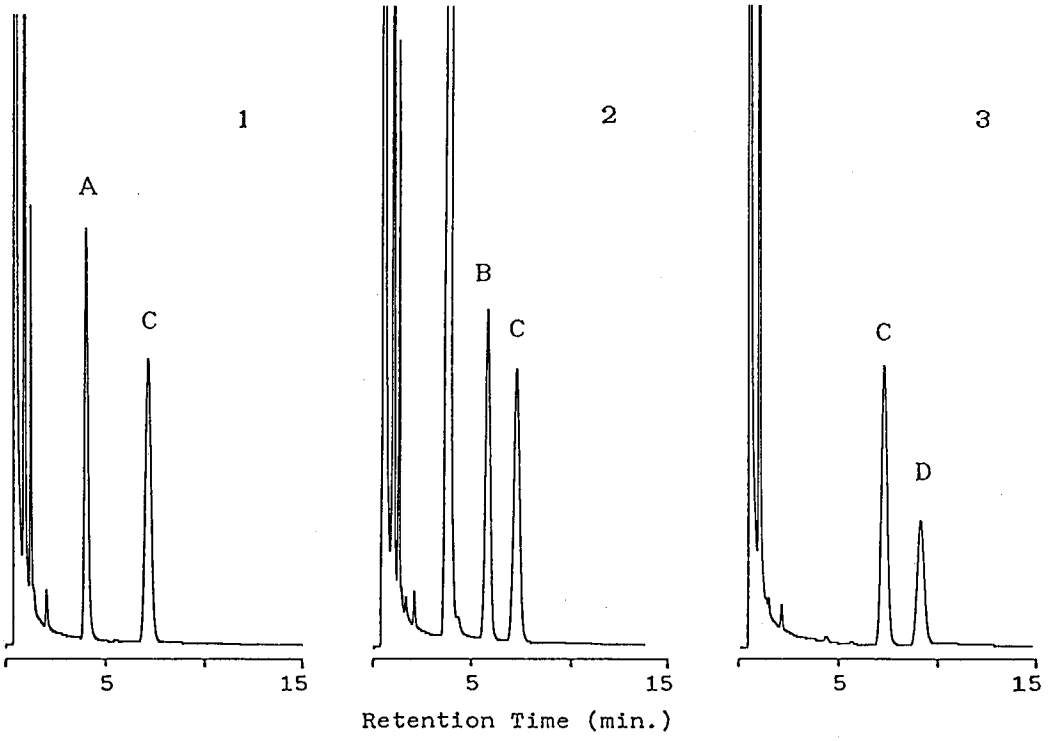


Fig. 2. Chromatograms of Pharmaceutical Preparations 1, 2, 3.
Peak A : Diphenylpyraline HCl B : Triprolidine HCl
C : n-Butyl stearate (I. S.) D : Clemastine fumarate

Table 1. Determination of Diphenylpyraline HCl, Triprolidine HCl and Clemastine fumarate in Commercial Preparations for Common Cold.

Preparation	*Label (mg/Tab., Cap., Pack)		Found (mg, %) (n = 5)		C. V. (%)[a]	**Other Ingredient
Granula	Dp.	1.5	1.49,	99.5	1.39	Pa, Eb, Ns, Me, Cf
Powder	Tp.	1.3	1.27,	97.9	1.31	As-Al, As, Eb, Me, Cf, Tpp
Tablet	Tp.	0.6	0.59,	98.6	0.99	Pa, Eb, Me, Cf, Tpp
Tablet	Cm.	0.15	0.15,	100.4	1.08	Pa, Ns, Me, Cf, Gsk, V. B_1

*Dp : Diphenylpyraline HCl, Tp : Triprolidine HCl, Cm : Clemastine Fumarate

a) Coefficient of Variation

**Pa : Acetaminophen, Eb : Ethenzamide, Ns : Noscapine, Me : Methylephedrine HCl, Cf : Caffeine, As-Al : Aspirine aluminum, Tpp : Tipepidine HCl, Gsk : Potassium guaiacol sulfonate, V. B_1 : Thiamine

ミン成分は一製剤中に配合基準[1]より一種とされている．また，その剤型には錠剤，顆粒剤，カプセル剤，シロップ剤，丸剤，細粒剤，散剤がある．本報では糖衣錠，顆粒剤，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．変動係数は約1％と良好な結果であった．

まとめ

かぜ薬中の抗ヒスタミン剤の定量法として，従来個々に比色定量法，GC 法，HPLC 法[5]が用いられてきた．今回 Dp, Tp, Cm について簡単な抽出操作で定量の特異性や精度の向上が期待できる GC 法による統一定量法を検討した．その結果，微極性の充塡剤10% Silicone versilube F-50／Chromosorb W AW DMCS (60-80 mesh) を内径3 mm×長さ2.0mのガラスカラムに充塡したものを用いて良好な結果を得られた．I. S. はフタル酸-n-ブチルまたはステアリン酸-n-ブチルいずれも内標準物質として，適当であった．

本報は配合量の微量な Dp, Tp, Cm について，迅速かつ精度良く定量分析ができ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．

文　献

1) 薬務局長通知：日薬発第280号　昭和61年3月28日
2) 中山京子，高橋美佐子，岩崎由美子，秋山和幸：東京衛研年報，35，120-126，1984
3) *The United States Pharmacoeia*, 21th Rev., *The National Formulary*, 16th Ed., 343-344, 1098-1099, 1985, United States pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD
4) 日本公定書協会：第十一改正日本薬局方解説書，C-1371，1986，広川書店，東京
5) 立沢政義，橋場茂子，江島　昭：衛生化学，25，279-283，1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 69-72, 1988

誘導結合プラズマ発光分析法による胃腸薬中の金属元素の定量

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

Determination of Metallic elements in Gastrointestinal drugs by ICP-AES

SHIN-ICHI UEHARA*, KYOKO NAKAYAMA*, KUNIHIRO KAMATA' MISAKO TAKAHASHI*,
TERUHIKO HAGIWARA* and KAZUYUKI AKIYAMA*

Kewords：誘導結合プラズマ発光分析 ICP-AES, 胃腸薬 Gastrointestinal drugs, 金属元素 Metallic elements, キレート滴定 Chelatometric titration, 比色分析 Colorimetry, 原子吸光分析 AAS

緒　言

胃腸薬には胃腸薬製造（輸入）承認基準[1]に従って，制酸剤を始めとして多種類の金属元素を含む化合物が主剤として複雑に配合されている．したがって，胃腸薬中の多様な構成元素を迅速に定量することは困難であり，その分析法の確立は，薬事行政上からも重要である．金属元素の定量法には滴定法，比色法，原子吸光法等が知られているが，いずれも一元素一分析法で，それぞれの元素毎に分析の最適条件に試料を調製する必要があり，特に多種類の製剤を処理する場合，分析は複雑となる．

近年，広いダイナミックレンジを持ち，多元素を同時に高感度，高精度に分析可能な方法として，誘導結合プラズマ発光分光分析法（ICP-AES）が開発され，様々な分野で使用されている．そこで今回，胃腸薬に主に含まれる金属元素［マグネシウム（Mg），アルミニウム（Al），銅（Cu），カルシウム（Ca）］の迅速な分析法の確立を目的として，ICP-AES 法の適応を検討した．その結果，分析原理の異なるキレート滴定法，比色法，原子吸光法（AAS）との比較等から，ICP-AES 法は胃腸薬中の金属元素の高精度，迅速な一斉分析法として十分対応できる方法であることがわかった。

実　験

1．装置

誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICP-AES）：Jobin Yvon 社製 JY48P を用いた．Table 1 に測定条件を示す．

原子吸光測定装置（AAS）：PERKIN-ELMER 社製 2380型を用いた．各元素の測定条件を Table 2 に示す．

分光光度計：日立320型を用いた．

2．試薬

マグネシウム，アルミニウム，銅，カルシウム標準液：原子吸光分析用（1000ppm）標準液（和光純薬製）．

硝酸，硫酸：有害金属測定用（和光純薬製）．

クプロイン溶液：2,2'-ビキノリンのイソアミルアルコール溶液（0.04→500）

0.01M-エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム液（EDTA），0.05M-エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム液（EDTA），pH 10.7のアンモニア・塩化アンモニウム緩衝液，エリオクロムブラックT・塩化ナトリウム指示薬，ジチゾン指示薬，NN 指示薬：第十一改正日本薬局方に従った[2]．

3．試料

水酸化アルミナマグネシウム，沈降炭酸カルシウムなどの制酸剤及び銅クロロフィリンナトリウム，アルミニウムジヒドロキシアラントイネートなどの粘膜修復剤等を成分とする市販の胃腸薬8検体について，分析検討を行った．

4．定量操作

4-1　標準溶液の調製：

ICP-AES 標準溶液　各標準液の一定量を同一のメスフラスコに取り水で希釈し Mg, Al, Cu, Ca のそれぞれ 5 ppm 溶液とし，ICP-AES 標準溶液とする．ただし標準溶液の力価は，ICP-AES によりそれぞれの元素の濃度を測定して定める．

*東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科　169　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, 169 Japan

Table 1. Operating conditions of ICP-AES

Incident Power	:	1.7 KW	
Reflect Power	:	0.0 KW	
Coolant Gas	:	15.0 l/min	3.5 kg/cm^2
Plasma Gas	:	0.0 l/min	
Nebulizer Gas	:	0.5 l/min	2.1 kg/cm^2
Observation Height	:	16 mm above Coil	
Wavelength (nm)			
Mg 279.6		Cu 324.8	
Al 308.2		Ca 422.6	

Table 2. Operating conditions of AAS

Element	Mg	Al	Cu	Ca
Wave length(nm)	285.2	309.3	324.8	422.7
Lamp Current(mA)	15	25	18	15
Slit(nm)	0.7	0.7	0.7	0.2
Flame Gases[a)]	A-Ac	N-Ac	A-Ac	N-Ac

a) A-Ac : Air-Acetylene
N-Ac : Nitrous oxide-Acetylene

原子吸光用標準溶液　各標準溶液の一定量を別々のメスフラスコに取り，Mg (0.25ppm)，Al (30ppm)，Cu (2.5ppm)，Ca (2.5ppm) となるように水で希釈する。

4-2　試料原液の調製：試料を粉末とし，その適当量を精密に量り分解フラスコに入れる．硝酸3～4 ml および硫酸1 ml を加え加熱分解，必要ならば冷後同様の操作を繰り返す．分解物は水で正確に100ml とし遠心分離，上澄液を試料原液とする．

4-3　ICP 法：試料原液を各元素の予想濃度が約5 ppmとなるように水で正確に希釈，ICP-AES 測定用試料溶液とし，分析を行う．

4-4　原子吸光法：試料原液をそれぞれ Mg (0.25ppm)，Al (30ppm)，Cu (2.5ppm)，Ca (2.5ppm)，となるように水で正確に希釈，原子吸光測定用試料溶液とし，分析を行う．

4-5　滴定法：マグネシウム (Mg)，アルミニウム (Al)，カルシウム (Ca)

マグネシウム (Mg)　試料原液の一定量 (Mg 約10mg 対応量) を正確に量り，水50ml および pH10.7のアンモニア・塩化アンモニウム緩衝液5 ml を加え，0.05M-EDTA で滴定する。(指示薬：エリオクロムブラックT・塩化ナトリウム指示薬0.04g)．同様の方法で空試験を行い補正する．

この0.05M-EDTA の消費量から下記の Ca の滴定法で得た Ca に対応する0.05M-EDTA の量を差し引く．

0.05M-EDTA 1 ml＝1.2154mg Mg

Ca 1 mg＝0.05M-EDTA0.5ml

アルミニウム (Al)　試料原液の一定量 (Al 約5 mg 対応量) を正確に量り，0.05M-EDTA10ml を正確に加え，pH4.8の酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液10ml を加えた後，5分間煮沸し，冷後，エタノール20ml を加え，0.05M-酢酸亜鉛液で滴定する．(指示薬：ジチゾン指示薬2 ml)．ただし，滴定の終点は液の淡暗緑色が淡赤色に変わるときとする．同様の方法で試験を行い補正する．

0.05M-EDTA 1 ml＝1.3491mg Al

カルシウム (Ca)　試料原液の一定量 (Ca 約4 mg 対応量) を正確に量り，水60ml 及び酒石酸溶液 (1→5) 3 ml を加え，更にトリエタノールアミン溶液 (1→5) 10ml，8N 水酸化カリウム試薬5 ml を加え，5分間放置した後，0.01M-EDTA で滴定する．(指示薬：NN 指示薬0.1g) ただし，滴定の終点は液の赤紫色が青色に変わるときとする．同様の方法で空試験を行い補正する．

0.01M-EDTA 1 ml＝0.4008mg Ca

4-6　吸光度法：銅 (Cu)

標準液：標準原液を水で希釈し Cu の2.5ppm 溶液とする．

試料液：試料原液の一定量を正確に量り，水で希釈し Cu の2.5ppm 溶液とする．

標準溶液 (S)，試料溶液 (T) 及び水 (B) のそれぞれ10ml を正確にとり，各々に塩酸ヒドロキシルアミン溶液 (1→10) 5 ml 及び酒石酸溶液 (1→10) 5 ml を加え，さらにアンモニア試液を用いて pH を5～6とする．これにクプロイン溶液10ml を正確に加え2分間振とうした後，遠心分離，上澄液について B を対照として波長545nm における吸光度 A_S，A_T を測定する．

結果および考察

1．試料溶液の調製　ICP-AES の検出限界は数 ng／ml と高感度でかつ，広いダイナミックレンジを有する測定方法であるが，その測定精度は試料濃度が高くなるにしたがって飛躍的に向上することが報告されている[3)]．胃腸薬の場合主成分として含まれる，Mg，Al，Ca，の量は数10mg／g と比較的高いことから，試料溶液は試料採取や希釈時の誤差及び測定精度等を考慮し，各元素の濃度を，ほぼ5 ppm 前後になるように調製することにした．

2．検量線　Mg，Al，Cu，Ca の各元素について0.1～20ppm の範囲で検量線を作成したところ，いずれも濃度と信号強度との間に直線が得られ，広い濃度範囲で

の測定が可能であった.

3．標準溶液の調製 ICP-AES 法は多元素同時分析を目的としているため，標準溶液は各測定元素についての混合標準溶液を用いた．しかし，調製に用いた各元素の標準液は当該元耕の濃度保証はあるが，他の金属元素の混在の程度についてはその限りではない．従って混合標準液中の各元素の実際の濃度は他の標準液からの汚染に基づく誤差が考えられる．そこで混合標準溶液中の各元素の力価（各 5 ppm）をそれぞれの元素の標準溶液に対して ICP-AES 法により求めた．その結果，Mg 5.13ppm，*Al* 5.00ppm，Cu 4.98ppm，Ca 5.10ppm と Mg と Ca が若干高い値を示した．したがって定量値は得られた力価より補正を行い，算出した．

4．原子吸光分析（AAS） ICP-AES 法によって得られた測定値から，水で試料原液を希釈して Mg 0.25ppm，*Al* 30ppm，Ca 2.5ppm，Ca 2.5ppm の溶液をそれぞれ調製し，原子吸光分析を行い比較した．

5．キレート滴定法による Mg, *Al*, Ca の定量 濃度の高かった Mg，*Al*，Ca は滴定法により分析を行った．方法は Mg，*Al* は第十一改正日本薬局方酸化マグネシウムの純度試験及び定量法に，*Al* は乾燥水酸化アルミニウムゲルの定量法に準じた[2]．

6．比色法による Cu の定量 濃度の低かった Cu は，特異性の高いクプロイン試薬による比色法を用いた[4]．

7．分析結果及び他分析法との比較 Table 3 に分析結果を示す．分析値は試料 1 g 中の元素の量（mg）で表した．ICP-AES 法とキレート滴定法（Mg，*Al*，Ca）及び比色法（Cu）を比較すると，いずれの元素も含有量の多少にかかわらず，ほぼ同一の値が得られた．また分析精度も 4 回測定の変動係数が0.1～1.55％と良好であった．特に試料 1，2 の Cu，試料 5 の Ca の場合のように，他の元素に比べ極端に少ない場合でも精度良く分析でき，本法の広いダイナミックレンジをうかがわせた．次ぎに AAS 法と比較すると，Mg 及び Cu は良く一致したが，*Al* は AAS 法が若干高い値，Ca ではかなり高い値が測定された．これは *Al*，Ca は AAS 法では測定が比較的困難な元素であることから，他元素の干渉によるものと推定され，適当な前処理の検討が必要と考えられる．以上の結果より ICP-AES 法は胃腸薬中の金属元素（Mg，*Al*，Cu，Ca）の迅速な一斉分析が可能であ

Table 3．Analytical results of Metallic elements in Commercial Gastrointestinal drugs.

Sample		Method			Sample		Method		
		ICP-AES	Titration or Colorimetry	AAS			ICP-AES	Titration	AAS
		mg/g(CV%, n=4)[a]	mg/g	mg/g			mg/g(CV%, n=4)	mg/g	mg/g
1	Mg	75.1 (0.32)	77.1	73.9	5	Mg	36.3(0.17)	38.2	37.6
	Al	48.5 (0.43)	51.1	57.9		*Al*	29.1(0.45)	31.6	34.8
	Cu	0.91(1.55)	0.89[b]	0.92		Cu	ND		
	Ca	44.6 (0.47)	44.1	53.1		Ca	3.0(0.63)	2.9	5.4
2	Mg	20.5 (0.25)	20.4	20.0	6	Mg	86.9(0.69)	85.6	89.3
	Al	20.7 (0.30)	20.8	24.0		*Al*	63.0(0.60)	62.7	66.4
	Cu	ND[c]				Cu	ND		
	Ca	47.6 (0.01)	46.5	69.7		Ca	ND		
3	Mg	6.5 (0.85)	7.0	6.5	7	Mg	100.6(0.35)	103.0	101.9
	Al	17.9 (0.45)	18.6	22.4		*Al*	51.7(0.53)	51.3	55.0
	Cu	ND				Cu	ND		
	Ca	41.0 (0.14)	40.4	51.5		Ca	ND		
4	Mg	61.0 (0.25)	64.2	61.7	8	Mg	83.5(0.18)	86.7	85.9
	Al	39.4 (0.24)	43.1	52.3		*Al*	102.3(0.12)	105.9	106.4
	Cu	0.72(0.47)	0.72[b]	0.75		Cu	ND		
	Ca	38.3 (0.10)	37.9	47.1		Ca	ND		

a）C. V：Coefficient of variation　b）Colorimetry　c）ND：Not detected

ることが結論される.

結　語

ICP-AES 法による胃腸薬中の金属元素（Mg, Al, Cu, Ca）の一斉分析法を確立した. 試料を硝酸及び硫酸で分解後, 各元素の濃度を 5 ppm を目安として水で希釈し, ICP-AES 分析を行う. 本法は操作が簡単で定量性・再現性も広い濃度範囲で良好であるため, 胃腸薬のように様々な濃度の元素を含む試料の高精度, 迅速な分析に有用である.

文　献

1）日本公定書協会編：医薬品製造指針1986年度版, 264－284, 1986, 薬業時報社, 東京
2）日本公定書協会：第十一改正日本薬局方, 1986, 廣川書店, 東京
3）二島太一郎, 江波戸擧秀, 荻野周三, 神谷伸行, 中川順一, 原口康史：東京都立衛生研究所年報, 31－1, 232－237, 1981
4）無機応用比色分析編集委員会編：無機応用比色分析 2, 170－171, 1974, 共立出版, 東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 73-77, 1988

家庭用品の衛生化学的研究（第24報）ガスクロマトグラフィーによる市販カーペット製品中の防虫加工剤・N,N-ジエチル-*m*-トルアミド，ダイアジノンおよびオクタクロロジプロピルエーテルの定量

中村義昭*，金子正美*，森　謙一郎*，
観　照雄*，鈴木助治*，渡辺四男也*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXIV) Determination of N,N-Diethyl-*m*-toluamide, Diazinon and Octachlorodipropylether Used as Mothproofing Agent in Commercial Carpet Products by Gas Chromatography

YOSHIAKI NAKAMURA*, MASAMI KANEKO*, KEN'ICHIRO MORI*,
TERUO KAN*, SUKEJI SUZUKI* and YOHYA WATANABE*

N,N-diethyl-*m*-toluamide (deet), diazinon and 2, 3, 3, 3, 2′, 3′, 3′, 3′-octachlorodipropylether (S-421) as mothproofing agents in commercial carpet products were determined by gas chromatography (GC) on fused-silica capillary column.

The recommended conditions were as follows: (1) Extracthion of the mothproofing agents : The sample was refluxed with dichloromethane for 60 minutes. (2) GC : column, SHIMADZU CBP-10, 0.53 mm i. d. x 12 m ; column temperature, 120° → 250°C, (5 °C／min); injection and detector temperature, 250°C ; detector, FID ; carrier gas, He 20ml／min ; sample size, 4 μl.

This method was applied to determination of the mothproofing agents in 20 samples of commercial carpets ; 22-650 ppm of deet was detected in 5 samples, 28-120 ppm of diazinon in 3 samples, and 250-19900 ppm of S-421 in 3 samples.

Kewords : commercial carpet products, mothproofing agent, N,N-diethyl-*m*-toluamide, diazinon, 2, 3, 3, 3, 2′, 3′, 3′, 3′-octachlorodipropylether, gas chromatography, fused-silica capillary column

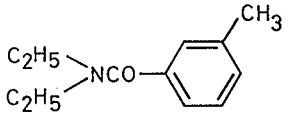
緒　言

近年，住宅の洋風化が著しく進み，じゅうたん，玄関マットなど市販カーペット製品が一般家庭内で繁用されるようになった。これらのカーペット製品には従来，防虫加工剤としてディルドリンおよびミチンLA（DTTB）等の有機塩素系化合物が用いられていたが，肝臓障害等の強い毒性を発現するため，家庭用品規制法[1]によってこれらの使用が規制された．現在，その代替品として種々の防虫加工剤が使われているが，それらの種類，使用量等実態は不明である．そこで，今回は殺虫剤指針[2]収載のN,N-ジエチル-*m*-トルアミド(以下ディートと略す)，ダイアジノンおよび2，3，3，3，2′，3′，3′，3′-オクタクロロジプロピルエーテル(以下S-421と略す）の3種類の防虫加工剤を選んで調査した（Fig. 1）．これらの分析法としては，ガスクロマトグラフィー（GC）法[3,4]が報告されているが，著者らはキャピラリーGC法による同時定量法を検討し，併せて市販カーペット製品の分析を行ったところ，若干の知見が得られたので報告する．

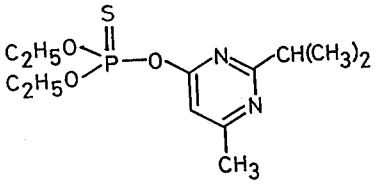
実験の部

1．試薬　ダイアジノン：和光純薬工業製（残留農薬試験用），N,N-ジエチル-*m*-トルアミド：東京化成工業製（TCI-Ep），2，3，3，3，2′，3′，3′，3′-オクタクロロジプロピルエーテル：三共化成工業製（純度98.4％），

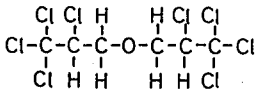
*東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1，Hyakunincho 3 chome, Shinjku-ku, Tokyo, 169 Japan



N,N-diethyl-m-toluamide
(deet)



diazinon



2,3,3,3,2',3',3',3'-octachloro-dipropylether (S-421)

Fig. 1.

その他の試薬はすべて特級を用いた。

ディート，ダイアジノン標準溶液：各100mgを精秤し，ジクロロメタンを加えて全量100mlとする。さらに，その10mlとし，100ppm標準溶液とする。

S-421標準溶液：100mgを精秤し，ジクロロメタンを加えて全量100mlとし，1,000ppm標準溶液とする.

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，クロマトパックC-R 3 A，オートサンプラーAOC 9，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JMS-D 300型.

FID-GC測定条件 カラム：キャピラリーカラムHiCap CBP-W 12-10（0.53mm i.d.×12m）島津製作製，試料注入口温度：250°C，カラム温度：120°→250°C（昇温速度：5°C／min），キャリアガス：He 20ml／min，H_2 0.4kg／cm^2，空気0.7 kg／cm^2，Range 10^2×0.2

GC-MS測定条件 カラム：1.5% OV-17／Chromosorb W AW-DMCS，（80-100メッシュ），4 mm i.d.×1 m，カラム温度120°→250°C，昇温速度：8°C／min，キャリアーガス：He 40ml／min.

薄層クロマトグラフィー（TLC）プレート：シリカゲル60 F_{254}，Merck社，展開溶媒：ヘキサン，ヘキサン－酢酸エチル（8：2）

3．試料 都内の小売店において「防虫加工」等の表示のあるカーペット製品(20検体)を購入して試料とした.

4．試験溶液の調製 試料を表面の毛の部分（以下パイル糸と略す）と基布の部分[5]とに分別し，それぞれ細切する．各試料2.0gを100mlのナス型フラスコにとり，ジクロロメタン50mlを加えて1時間加熱還流後，ガラスろ過器（G 2）で温時ろ過する．ろ液を約40°Cでロータリーエバポレーターを用いて濃縮し，残留物をジクロロメタンに溶解して全量5 mlとし，GC分析用の試験溶液とする.

5．GCによる定性および定量 ディート，ダイアジノン，S-421の各標準溶液をジクロロメタンで希釈し，ディートとダイアジノンは10-50 μg／ml，S-421は50-200 μg／mlの標準系列をつくり，それぞれ4 μlをGC装置に注入する．クロマトグラムより得られたピーク高と濃度から検量線を作成する．ついで，試験溶液についても同様にGC分析を行い，検量線よりディート，ダイアジノンおよびS-421の濃度を求め，試料中の含有量を算出する.

結果および考察

1．GC分析用カラムの検討 2% OV-1，1% OV-17，1.5% OV-225の3種類の充塡カラムと無極性ワイドボアーカラムのCBP-1（SE-30またはOV-1相当，0.53mm i.d.×12m），微極性ワイドボアーカラムのCBP-10（OV-17相当，0.53mm i.d.×12m），強極性ワイドボアーカラムのCBP-20（PEG-20M相当，0.53mm i.d.×12m）の3種類のフューズドシリカキャピラリーカラム（以下FCと略す）についてディート，ダイアジノン，S-421の検討を行った．その結果，OV-1，OV-17の充塡カラムはディートに，また，OV-225はダイアジノンおよびS-421にそれぞれ強いテーリングを示した．そのため，これら3種類の防虫加工剤を同時に分析することは困難であった.

一方，Fig. 2に示すように，FCではガスクロマトグラム上いずれも良好なピークが得られたが，CBP-1はディートに，また，CBP-20はS-421に若干のテーリングが見られた．そこで，今回は3種のFCのうち最もよい結果が得られたCBP-10をGC分析用のカラムとして用いることにした.

2．抽出条件の検討 抽出溶媒 3種類の防虫加工剤はいずれも多くの有機溶媒に可溶である．しかし，抽出条件を検討する場合，目的成分を試料に添加する時とそれらを含有する実試料とでは，しばしば有機溶媒による抽出率に相違がある．そこで，実際に各防虫加工剤を含有しているカーペット製品を（Table 3に示した検体No. 9，10および11）を選び，これらを試料として抽出条件の検体を行った．抽出溶媒としてヘキサン，ジクロ

ロメタン，メタノールを用いて1時間加熱還流し，抽出を行った．その結果をTable 1に示す．Table 1に示すように，ジクロロメタンを用いたときのピーク高を100としてメタノールとヘキサンの抽出率を求めた．ダイアジノンおよびS-421は，ジクロロメタンを抽出溶媒として用いた方がヘキサン，メタノールより高い抽出率を示した．これに対してディートではメタノールの方がジクロロメタンより約10%ほど高いが，GC分析を行った場合，ジクロロメタンに比較して夾雑物のピークが多く，同一溶媒による試料からの抽出と同時分析という省力化を考慮すると，メタノールよりジクロロメタンを用いた方が有利である．そこで，抽出溶媒としてジクロロメタンを用いた．

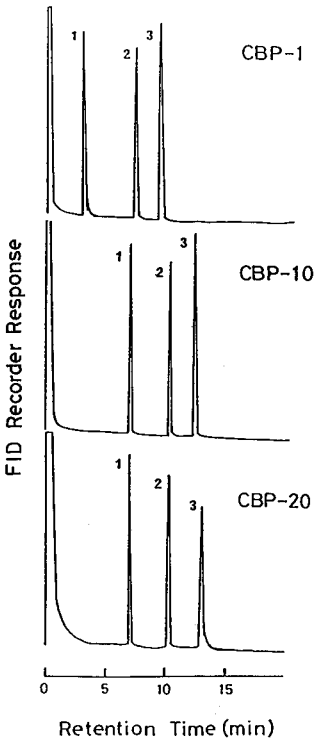


Fig. 2. Gas Chromatograms of Mothproofing agents
Peak : 1, deet ;2, diazinon ; 3, S-421

Table 1. Examination of Extraction Solvents

Solvent	Deet (Sample No.9)	Diazinon (Sample No.10)	S-421 (Sample No.11)
Hexane	66	83	76
Dicloromethane	100	100	100
Methanol	110	80	76

抽出時間　検体No. 9，10および11について抽出時間を10，30，60，120分間と変え，ジクロロメタンによる抽出率を検討した．その結果，いずれの防虫加工剤も30分間でほぼ完全に抽出され，60分以降では抽出率が一定となった．従って，抽出時間は60分に設定した．

3．検量線の作成　標準溶液をジクロロメタンで希釈し，ディートは10，20，30，40，50 μg／ml，ダイアジノンは10，30，50，70，90 μg／ml，S-421は50，100，150，200，250 μg／mlの標準系列をつくって，検量線を作成した．Fig. 3に示すようにいずれも良好な直線性が得られた．

4．添加回収実験　防虫加工剤を含有しないカーペット製品（検体No. 15）2.0gにディート，ダイアジノン，S-421をそれぞれ2 mgと4 mgを添加し，3時間室温に放置後，試験溶液の調製およびGC分析条件に従って回収実験を行った．Table 2にその結果を示す．回収率はディートが94.3-96.5%（変動係数1.2-1.4%），ダイアノジンが97.5-99.5%（変動係数1.4-3.6%），S-421が98.5-98.8%（変動係数0.9-2.3%）であり，いずれも良好であった．

5．実試料中の防虫加工剤の確認　本法を用いてGC分析し，各標準品と保持時間（t_R）が一致するピークを

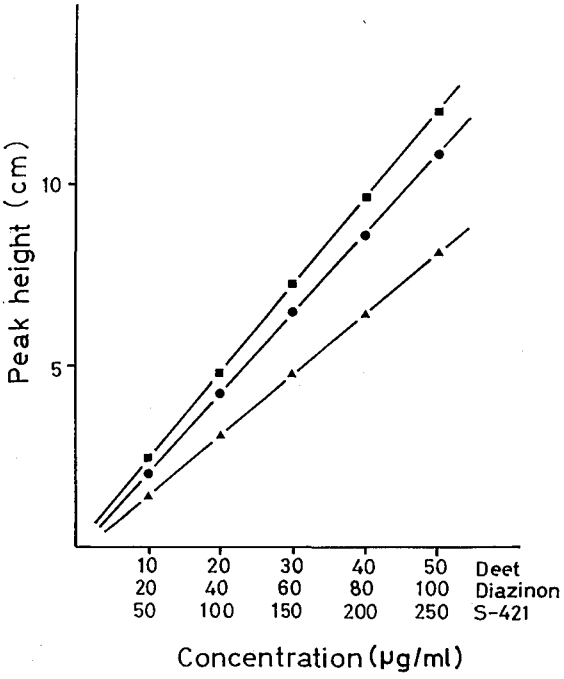


Fig. 3. Caribration Curves of Mothproofing agents
—●— deet ; —■— diazinon ; —▲— S-421

示した検体について以下の方法により防虫加工剤の確認を行った.

5-1. ディート, ダイアジノンの確認　ディート, ダイアジノンを含有する検体について, 各試験溶液をロータリーエバポレーターを用いてジクロロメタンを留去し, 残留物をヘキサンに溶かし, シリカゲルプレートに塗布後, ヘキサン一酢酸エチル (8 : 2) で展開した. UV ランプ (254 nm) により観察した Rf 0.20と Rf 0.43のバンドをかき取り, ジクロロメタンで抽出後, GC-MS を測定した. Rf 0.20を示したものは GC 分析でディートの t_R 7.3分に一致し, MS は質量数191 (M^+), 119 (ベースピーク) を確認した. また, Rf 0.43を示したものはダイアジノンの t_R 10.4分のピークに一致し, 質量数304(M^+), 179 (ベースピーク) を確認した.

5-2. S-421の確認　S-421を含有する検体についても同様に各試験溶液を TLC に塗布し, ヘキサンで展開後, ヨウ素蒸気により Rf 0.40のバンドを観察して抽出した. これは GC 分析で S-421の t_R 12.4分のピークに一致し, GC-MS を測定したところ, 分子イオンピークはみられなかったが, S-421と同じフラグメントパターン

Table 2. Recoveries of Mothproofing Agents added to Samples

Sample[1] Weight (g)	Deet Added (mg)	Deet Recovery[2] (%)	Deet C. V.[3] (%)	Diazinon Added (mg)	Diazinon Recovery[2] (%)	Diazinon C. V. (%)	S-421 Added (mg)	S-421 Recovery[2] (%)	S-421 C. V. (%)
2.0	2.0	96.5	1.4	2.0	97.5	3.6	2.0	98.5	2.3
2.0	4.0	94.3	1.2	4.0	99.5	1.4	4.0	98.8	0.9

1) Sample : No. 15 (Table 3).
2) Recovery : n=5.
3) C. V. : Coefficients of variation.

Table 3. Analytical Results of Mothproofing Agents in Commercial Carpet Product

Sample No.	Indication[1]	Deet (ppm) Pile	Deet (ppm) Base	Diazinon (ppm) Pile	Diazinon (ppm) Base	S-421 Pile	S-421 Base
1		—[2]	—	—	—	—	—
2	○	—	—	—	—	—	—
4		—	32	—	—	—	—
5		650	170	—	—	—	—
6		—	—	—	—	—	—
7		—	—	—	—	—	—
8	○	—	—	—	28	—	—
9	○	320	230	—	—	—	—
10	○	—	—	—	120	—	—
11	○	—	—	—	—	2980	2640
12	○	—	—	—	—	7320	11700
13	○	—	—	—	—	250	19900
14	○	—	—	—	—	—	—
15	○	—	—	—	—	—	—
16	○	—	—	—	—	—	—
17	○	75	22	—	—	—	—
18	○	—	—	—	37	—	—
19	○	—	—	—	—	—	—
20	○	—	36	—	—	—	—

1) Indication of Mothproofing Agents.
2) not detected (detection limit : Deet 2 ppm, Diazinon 4 ppm, S-421 10ppm).

を示した.

6．市販カーペット製品の分析結果 20検体の市販製品について分析を行った結果をTable 3に示す．防虫加工処理の表示のあるものは14検体であったが，表3に示すように，ディートを検出したものはNo. 9，17，20の3検体，ダイアジノンはNo. 8，10，18の3検体，S-421は，No. 11，12，13の3検体であった．残りの防虫加工表示のある5検体については，これら3種類の防虫加工剤は検出されなかったが，防虫加工表示のない6検体のうちNo. 4，5の2検体からディートを検出した．

カーペット製品をパイル糸と基布に分別してみると，Table 3に示すように，検体No. 5，9，17およびNo. 11，12，13はいずれもパイル糸と基布の両方からディートおよびS-421を検出している．これらは製造工程上，先にカーペット製品がつくられ，その後防虫加工処理が行なわれたものと考えられる．これに対してNo. 4，20およびNo. 8，10，18はパイル糸からは検出されず，基布よりディートおよびダイアジノンを検出している．従って，これらは基布に防虫加工剤を練り込んでからパイル糸を付けてカーペット製品としたものと考えられる．

ま と め

1．ワイドボアーカラムを用いたキャピラリーガスクロマトグラフィーによって市販カーペット製品中の防虫加工剤N,N-ジエチル-*m*-トルアミド（ディート），ダイアジノンおよび2，3，3，3，2′，3′，3′，3′ーオクタクロロジプロピルエーテル（S-421）の同時定量法を設定した．

2．前処理は抽出溶液としてジクロロメタンを用い，60分間抽出して行った．分析用カラムは微極性ワイドボアーカラム（CBP-10）を用いた．

3．市販カーペット製品20検体について分析を行ったところ，ディートは5検体（パイル糸75-650ppm，基布22-230ppm），ダイアジノンは3検体（基布28-120ppm），およびS-421は3検体（パイル糸250-7,320ppm，基布2,640ppm-19,900ppm）から検出された．

謝辞 本研究にあたり御便宜，御協力をいただいた東京都衛生局薬務部薬事衛生課家庭用品担当 森 由子氏ならびに中村 耕氏に深謝します．

文 献

1）家庭用品規制関係実務便覧，1975，第一法規出版，東京
2）殺虫剤指針解説，1976，日本薬業新聞社，東京
3）日本薬学会編：衛生試験法注解，96，1980，金原出版，東京
4）宇野正清，陰地義樹，佐々木美智子，谷川 薫：衛生化学，30，207，1984
5）繊維加工便覧，483，1970，高分子刊行会，京都

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 78-82, 1988

家庭用品の衛生化学的研究（第25報）
家庭用エアゾール製品中のホルムアルデヒドの定量

鈴木助治*，中村義昭*，金子正美*，
森　謙一郎*，渡辺四男也*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXV)
Analysis of Formaldehyde in Household Aerosol Products

SUKEJI SUZUKI*, YOSHIAKI NAKAMURA*, MASAMI KANEKO*,
KEN'ICHIRO MORI* and YOHYA WATANABE*

Keywords：ホルムアルデヒド formaldehyde，家庭用エアゾール製品 household aerosol product

緒　言

家庭用エアゾール製品は，芳香消臭，帯電防止，防水，ガラスクリーナー，ペイント，カーワックスなど多種多様のものが市販されており，その利便性により増加の一途をたどっている．最近の統計では，61年度のエアゾール製品の総生産量は約4億1千万缶で，前年度比13.4%増と云われている[1]．そのうち家庭用品関係は，塗料10.2%，自動車用品8.1%，室内消臭剤，クリーナー，ワックス，洗濯用品等14.6%で全体の33%，約1億缶に達している．従って，一般家庭で消費するエアゾール製品も，膨大なものがある．

現在，これらの家庭用エアゾール製品については，「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律施行規制」[2]によって噴射剤の塩化ビニル，溶剤のメタノール，トリクロロエチレンおよびテトラクロロエチレンが有害物質に指定され，その使用が規制されている．塩化ビニルは検出しないこと，またメタノールは5%以下，クロロエチレン類は両者とも0.1%以下と定められている[2]．しかし，ホルムアルデヒド（HCHO）に関しては，同法律よって繊維製品に対し含有量の規制がなされているが，家庭用エアゾール製品は規制の対象になっていない．

最近，著者らは一部の家庭用エアゾール製品より比較的高濃度のHCHOを検出している．しかし，エアゾール製品が一般家庭内に於て頻繁に使用されているにも係わらず，HCHOに関する調査報告は見られず，それらの含有量も明かではない．そこで今回，東京都内の店舗より家庭用エアゾール製品280検体を入手し，HCHOの実態調査を行ったので報告する．

実験の部

1．試料　昭和62年5月から63年2月までの間に東京都内で購入した家庭用エアゾール製品280検体を試料とした．

2．試薬　ホルマリン，アセチルアセトン（AA），4-アミノ-3-ヒドラジノ-5-メルカプト-1，2，4-トリアゾール（AHMT），2，4-ジニトロフェニルヒドラジン（DNPH）：和光純薬製（試薬特級），活性炭素：和光純薬（クロマトグラフ用），その他の試薬はすべて特級を用いた．

3．装置　自記分光光度計：島津製作所 MPS-2000，液体クロマトグラフ装置：ポンプ－日本分光製 JASCO TWINCLE HPLC PUMP，検出器－島津製作所 SPD-1．

4．HCHO 原液の標定　特級ホルマリン（約37%のHCHOを含む）約1gを，あらかじめ水を入れた秤量びん中に精密に秤り，水で100mlに希釈した後，ヨウ素法[2]により標定した．

5．抽出法　エアゾール缶より噴射させた試料2gを，または直接開缶後，試料2gを50mlの共栓付遠沈管にとり，以下衛生試験法[3]に従って25%硫酸ナトリウム溶液20mlを加えて5分間振とう後，水を加えて全量40mlとする．これを40°Cで約1時間抽出する．冷後，10分間遠心分離（3500rpm）を行い，上澄液を試験溶液とす

*東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metroporitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakuninchо 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169 Japan

る.

6．水蒸気蒸留法 試料2gをとり，以下公定法[2]に従って20%リン酸溶液3ml，水50mlを加えて水蒸気蒸留を行い，留液200mlを得，試験溶液とする．ただし，スプレー缶内部にある導入管のように試料量が少ないものは，その量に応じた割合で留液をとる．

7．HCHOの確認 衛生試験法[3]のDNPH法によりヒドラゾン誘導体を調製し，次の測定条件で液体クロマトグラフィー（HPLC）を行って確認した．測定条件－カラム：TSKgel ODS-80 T_M 5μm，4.6mmi.d.×150mm(東ソー株式会社製)，移動相：アセトニトリル－水(70：30)，流速1ml／min，注入量：5μl，検出器：360nm，0.32 a.u.f.s.

8．HCHOの定量 1）AHMT法 衛生試験法[3]に従って550nmで吸光度を測定し，定量を行った．2）AA法 公定法[2]に従って415nmで吸光度を測定し，定量を行った．

結果および考察

1．試験法の検討 家庭用エアゾール製品中のHCHOの有無を調べるため，抽出法で試験溶液を調製後，AHMT法を用いて全検体のスクリーニングを実施した．その結果，赤紫色に呈色したものをHCHO陽性と判定し，HCHOの含有量が15ppm以下のときは検出感度の高いAHMT法によって定量し，15ppm以上のときはAA法によって定量した．このように濃度の異なる検体に2種類の定量法を適用するため，両法の添加回収実験を行った．HCHOを含有しない試料（カビ防止スプレー）2gにHCHO 20，100，200，1000μgを加えて抽出後，測定を行った．表1に示すように，20μg添加はAHTM法で100.6%，100-1000μg添加はAA法で96.3-101.2%の回収率を得た．両法は各レベルの濃度に対し定量的に適用できることが分かった．

表1 HCHOの回収率

添加量[1] (μg)	回収率(%)[2] AA法	AHMT法
20	——	100.6±6.1
100	101.2±2.4	——
200	98.8±1.8	——
1000	96.3±2.5	——

1）試料はHCHOを含有しないカビ防止スプレーを用い，試料2gにHCHOを添加し，抽出法で回収実験を行う．
2）5回繰返しの平均値±標準偏差を示す．

表2 家庭用エアゾール製品のHCHO

検体番号	用途	内容量 (g)	HCHO含有量[1] (ppm)	噴射剤[2]	溶剤
1	皮革用つや出し	140	1,534	LPG	第一石油類
2	家具用つや出し	420[3]	319	LPG	第二石油類
3	家具用つや出し	220[3]	230	LPG	第二石油類
4	蛍光ペイント（橙色）	190	220	フロン	第二石油類
5	家具用つや出し	190	158	LPG	第二石油類
6	ペイント（金色）	180	138	フロン	アルコール
7	ゴルフグリップオイル	40	114	LPG，DME	第二石油類
8	消臭	30	54	LPG，フロン	エタノール
9	消臭	—	42	フロン	エタノール
10	消臭	—	41	フロン	エタノール
11	台所クリーナー	—	38	LPG，DME	水
12	除菌クリーナー	—	35	LPG	アルコール
13	帯電防止	—	22	フロン	アルコール
14	ゴルフグリップオイル	—	20	LPG，フロン	第二石油類
15	折り目付け	—	20	DMA	アルコール

1）HCHO含有量が20ppm以下のものは，防水スプレー13，帯電防止2，グリース2，除菌クリーナー4，芳香消臭2，その他12検体であった．
2）LPG＝液化石油ガス，DMA＝ジメチルエーテル．
3）容器上に表示された容量（ml）．

2．噴射した試料中の HCHO 各種のエアゾール製品について，缶より噴射させた試料を抽出後，AHMT 法によってスクリーニングし，その結果，HCHO 陽性と判定した検体について再度，溶出試験を行った．表2に溶出試験の結果を示す．

HCHO陽性を示した検体は，280検体中全体の18％に当たる50検体であった．なお，それらの検体の溶剤，噴射剤および pH と HCHO 陽性傾向とは特に関連性が認められない．表2に示すように，20ppm 以下の微量の HCHO を検出したものは35検体，20-100ppm のものは8検体，100ppm以上の高濃度のものは7検体であった．100ppm 以上の含有量では，つや出し用スプレーが検体 No. 1 の1534ppm，No. 2 の319ppm，No. 3 の230ppmおよび No. 5 の158ppm，塗料用スプレーが No. 4 の220ppm，No. 6 の138ppm であり，ゴルフグリップ用スプレーが No. 7 の114ppm と高い濃度を示した．なお，No. 1 - 6 の検体は，図1に示すように DNPH のヒドラゾン誘導体をつくり，HPLC 法で確認を行った．そこで，次にこのような HCHO がスプレー缶内部の構成物，例えば缶内壁の合成樹脂コーティングや噴射用導入管に由来するのか，または内容物そのものに由来するのかを調べた．

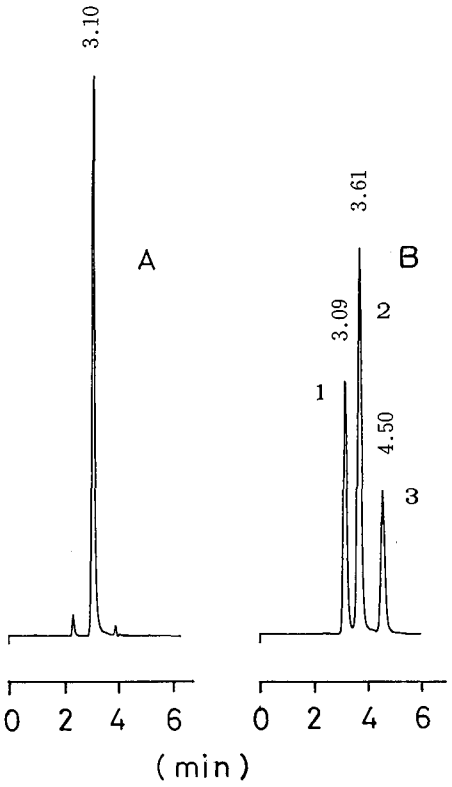


図1 HCHO-2，4-ジニトロフェニルヒドラジン誘導体の HPLC

A：検体 No. 1．No. 2 - 6 も同様のクロマトグラムが得られた．

B：1．ホルムアルデヒド，2．アセトアルデヒド，3．プロピルアルデヒド．

3．スプレー缶の HCHO スプレーの金属缶は材質のブリキや接合部のハンダから鉛，スズの溶出を防ぐため，缶内壁に合成樹脂製の被膜コーティングをほどこしたものがある．そこで，内容物を噴射させるために必要な合成樹脂製の導入管と缶壁について HCHO を調べた．No. 1 と 4 - 8 の検体を開缶，内容物を取り出し，缶壁と導入管を十分水洗したのち，水蒸気蒸留法により測定した．表3に示すように，導入管からはいずれも検出されず，缶壁についても合成樹脂のコーティングの有無に係わらず，非常に微量であり，量的には少なかった。表2の HCHO 含有量と内容量の大きさを考えると，内部に存在する1缶当りの HCHO 量は極めて大きく，これらが金属缶の構成物より溶出したものとは考えられない．従って，高濃度の HCHO は内容物に基づくものである．

4．内容物の HCHO 溶出に及ぼす温度，酸の影響と水蒸気留法の測定結果 検体 No. 1 - 6 の内容物について，水抽出時の温度条件を20，40，60°C に設定して溶出試験を行った．また，40°C で1％塩酸溶液を用いて溶出試験を行い，さらに，水蒸気蒸留法によって測定し，HCHO の濃度変化を調べた．表4に示すように，No. 1 の検体は，HCHO の濃度が1500ppm 前後を示し，温度，酸および水蒸気蒸留法で増加の傾向は認められなかった．これに対して No. 2 - 6 は20°から60°C に上昇させると HCHO の濃度が増加し，酸性条件下でもその傾向が認められた．特に水蒸気蒸留法の値は，表4の如く40°C，水抽出の値を基準にして比を求めると，No. 1 の1倍に対して No. 2，3，5 は1.7-2.4倍，No. 4，6 は7.6，11.5倍

表3 スプレー缶の HCHO (ppm)

検体番号	導入管	缶 壁	缶内壁のコーティング
1	ND[1)]	21[2)]	無
4	ND	ND	有
5	ND	9[2)]	有
6	ND	ND	有
7	ND	21[2)]	無
8	ND	ND	有

1）ND：不検出．

2）缶外壁の印刷物より溶出が考えられる．

表4　HCHOの溶出に及ぼす温度，酸の影響と水蒸気蒸留法の測定結果　(ppm)

検体番号	抽出条件				水蒸気蒸留法
	20℃，水	40℃，水	40℃，1％塩酸	60℃，水	
1	1602	1523	1446	1545	1379(0.9)[1)]
2	238	257	308	325	446(1.7)
3	234	251	313	316	450(1.8)
4	128	262	477	553	1986(7.6)[2)]
5	146	193	367	271	464(2.4)
6	97	94	181	271	1120(11.5)
7	—	118	—	—	250(2.1)

1）(　) 内の数値は，水蒸気蒸留法の40℃，水抽出法に対する比を示す．
2）検体No. 4は固形の内容物が存在するが，固形物の40℃，水抽出法の値は110ppm，水蒸気蒸留法の値は10380ppmであった．その比は94倍である．

と著しい増加を示した．なお，No. 4の蛍光ペイントは開缶時，固形物を含んでおり，これは40℃，水抽出が110ppm，水蒸気蒸留法が10380ppmで，その比は94倍に達することがわかった．以上の測定結果より，No. 1は酸，熱で高濃度化されず，加水分解を受けないことから遊離のHCHOが考えられる．これに対してNo. 4と6は，明らかに加水分解によるHCHOの放出が考えられ，メチロール基などを有する結合型HCHOの存在が推定される．

5．内容物の活性炭カラムクロマトグラフィーにおけるHCHOの挙動　No. 1（つや出しスプレー）とNo. 4（蛍光ペイントスプレー）の内容物について，活性炭カラム[4,5)]に対する溶出パターンを観察し，原因物質の考察を行った．No. 1の試料2 g（HCHOとしての約3000 μgを含有する）と標準品HCHO（2000 μg）をメタノール－クロロホルム（3：1）に溶解し，活性炭ドライカラム（5 g，2 cm i. d. × 5 cm）に吸着後，これにメタノール－クロロホルム（3：1），メタノール，メタノール－水（1：1），水を順次100 mlずつ流して分画した．AA法で各画分のHCHOを測定した結果，メタノール－クロロホルムとメタノール－水の画分にのみ検出された．HCHOはNo. 1が吸着量の60％，標準品HCHOが53％で，両者は同様の溶出挙動を示した．さらに，No. 1のメタノール－クロロホルム画分を40℃，減圧下溶媒を除去後，再度，活性カラムに充塡して水を流したところ，HCHOが直ちに溶出してくる等，標準品HCHOと同様の挙動を示した．

検体No. 4についても，試料2 g（HCHOとして約500 μgを含有する）をとり，同様に活性炭処理を行ったところ，各画分にHCHOが200-500 μg程度検出され，もとの吸着量に対して大幅に増加していた．メタノール－クロロホルム画分（HCHO，540 μg）とメタノール画分（HCHO，280 μg）を濃縮後，水蒸気蒸留法を行っても，もはやHCHOの高濃度化はみられなかった．これらのことはNo. 1の挙動と異なり，脱着時に徐々にHCHOを放出してくるものと思われる．

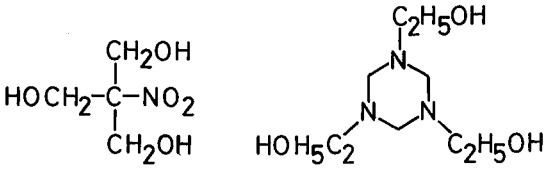


図2　ホルムアルデヒド放出化合物

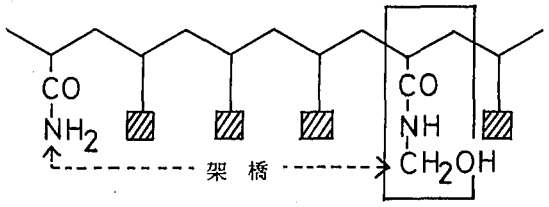


図3　アクリル樹脂
▨：アクリル酸エステル（$CH_2=CH-COOCH_3$）．
□：メチロールアクリルアミド（$CH_2=CH-CONHCH_2OH$）．

以上の活性炭に対する挙動ならびに表4の結果より今回の原因を考察すると，No. 1の検体については，例えば遊離HCHOや図2に示すような低分子のHCHO放出化合物[6)]が考えられる．それらはスプレー剤の塗膜面の防黴を目的に配合される．また，No. 4と6の検体についてはアクリル樹脂塗料の表示がみられることから，例

えば図3に示すように，樹脂加工剤としてメチロールアクリルアミド[7]のようなものの存在が考えられる．メチロール基は，樹脂が硬化する際の架橋形成に必要であり，これが加水分解してHCHOを遊離してくることになる．

まとめ

家庭用エアゾール製品のHCHOを調査したところ，280検体中15検体より20 ppm以上のHCHOを検出し，そのうち100ppm以上の高濃度のHCHOを含有するものは7検体であった．原因は防黴剤としての遊離HCHO，HCHO放出化合物，あるいは樹脂加工剤としてのメチロール基をもった化合物の配合と推定された．このような高濃度のHCHOを含有するエアゾール製品は，一般家庭内でどのような使い方をされるか，多分に予測できない面があるため，HCHO含有を表示するとか，使用上の注意を促すなど適切な対策が必要と考えられる．

文献

1）1988年度版エアゾール市場要覧，390-392，1988，エアゾール産業新聞社，東京
2）昭和49年9月26日厚生省令第34号．
3）日本薬学会編衛生試験法注解，681-683，1132-1133，1980，金原出版，東京．
4）雨宮　敬，森　謙一郎，鈴木助治，吉原武俊，東京衛研年報，34，111-114（1983）．
5）鈴木助治，雨宮　敬，森　謙一郎，吉原武俊，東京衛研年報，34，115-119，（1983）．
6）防菌防黴ハンドブック，431-433，1986，技報堂出版，東京．
7）プラスチック，94-96，1965，岩波新書，東京．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 83-86, 1988

ガスクロマトグラフィーによる化粧品中のクロルキシレノールの分離定量法

雨宮　敬*, 池田一夫*, 岸本清子*, 伊藤弘一*,
鈴木助治*, 観　照雄*, 中村　弘*, 渡辺四男也*

Gas Chromatographic Method for Determination of Chloroxylenol Used as Germicide in Cosmetics

TAKASHI AMEMIYA*, KAZUO IKEDA*, KIYOKO KISHIMOTO*, KOICHI ITO*,
SUKEJI SUZUKI*, TERUO KAN*, HIROSHI NAKAMURA* and YOHYA WATANABE*

A method for determination of Chloroxylenol (CX) used as germicide in cosmetics by gas chromatography was investigated.

The conditions for gas chromatography were as follows ; column : 3 mm i. d. x 1.5 m, 2 % OV-225 (Chromosorb G AW DMCS), column temperature : 150℃, injection and detection temperature : 250℃, detector : FID, carrier gas flow rate : N_2 60 ml／min, sample size : 5 μl.

Eighteen commercial cosmetic samples were analyzed ; CX were detected from shampoos (0.50%, 0.29%), hair conditioners (0.15%, 0.14%) and hair tonic (0.10%)

Keywords : chloroxylenol, germicide, cosmetic, silicagel column chromatography, gas chromatography

緒　言

市販化粧品には製品自体の防腐，あるいは皮膚の殺菌を目的として種々の防腐殺菌剤が配合されている[1]．クロルキシレノール（パラクロルメタキシレノール，4-クロル-3,5-キシレノール，以下CXと略す）は微生物に対してすぐれた抗菌力を有し，5％以下の濃度でシャンプー，ヘアリンス，洗顔クリーム，石けん等の化粧品に使用されている．この殺菌剤は化粧品原料基準の収載品目であり[2]，薬事法により表示成分の一つとして指定されている．したがって，化粧品に配合した場合，容器あるいは包装への表示が義務づけられている．CXの分析法については薄層クロマトグラフィー[3,4]，高速液体クロマトグラフィー[5]，ガスクロマトグラフィーによる方法[6]が報告されているが，これらの方法を市販化粧品に適用した場合，操作が煩雑等の理由から，必ずしも満足のいくものではない．そこで今回は，化粧品中の表示成分試験法開発の一環[7]として，ガスクロマトグラフィーによるCXの定量法を検討したので報告する．

実験方法

1．試薬　CX標準品は市販品（和光純薬）をエタノールで再結晶したものを用い，その0.5gをはかり，エタノール2 mlを加えて溶かし，ヘキサンを加えて100mlとし，標準原液とする．これをヘキサンで希釈して500 μg／mlの溶液を調製して標準溶液とする．シリカゲル60（メルク社），フロリジール，アルミナ（和光純薬），Sep-pacカートリッジ（シリカゲル，フロリジール，アルミナ，C_{18}）（ウォーターズ社），その他の試薬はすべて試薬特級（和光純薬）を用いた．

2．装置　ガスクロマトグラフ：島津製作所製GC-5A，ガスクロマトグラフ－質量分析計：ヒューレット・パッカード5710Aガスクロマトグラフ－日本電子JMS-D300

3．試料　東京都内において昭和62年10月から11月の間に購入したシャンプー5種，ヘアコンディショナー5種，ヘアトニック4種およびクリーム4種の計18種である．

4．試験溶液の調製　試料1.0gをビーカーにとり，飽和食塩水100mlを用いて300mlの分液ロートに移す．こ

*東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metroporitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

れに10％硫酸5 ml を加えて十分混ぜ合わす．ついで，ジクロルメタン100ml を加えて5分間振とうし，ジクロルメタン層を分取する．さらに，水層にジクロルメタン50ml を加え，同様に操作する．ジクロルメタン層を合わせ，ロータリーエバポレーターを用いて濃縮乾固し，残留物にヘキサン5 ml を加えて溶かす．つぎに活栓付きガラスカラム管（10mm×300mm）にシリカゲル3.5gをヘキサンを用いて充塡し，さらに無水硫酸ナトリウム1 g を積層したカラム柱に先のヘキサン溶液を注ぐ．カラム柱の上層の液がほとんどなくなるまで毎分2 ml の速さで流出させる．さらに，ヘキサン50ml を流して炭化水素等の脂溶性物質を除去し，酢酸エチル30ml を流してCX を溶出する．溶出液を減圧乾固してヘキサン4 ml を加えて溶かし，FID-GC用試験溶液とする．

5．FID-GC による定量　CX 標準原液をヘキサンで希釈して検量線の項に示した標準系列を調製し，FID-GC測定条件に従って操作する．得られたガスクロマトグラム上のCX のピーク高から検量線を作成する．試験溶液についても同様に操作して検量線から試料中のCX 含有量を求める．FID-GC 測定条件　カラム：2％ OV-225（Chromosorb G AW DMCS 60-80メッシュ），3 mm i. d. ×1.5m，ガラス製，カラム温度：150°，注入口温度：250°，検出器：FID，キャリヤーガス：N_2，60ml／min，注入量：5 μl

結果および考察

試験溶液調製の検討

1．抽出溶媒について　CX を試料から定量的に抽出するため，各種の抽出溶媒について検討を行った．すなわち，CX2000 μg を分液ロートにとり，飽和食塩水100ml および10％硫酸5 ml を加え，これにジクロルメタン，クロロホルム，四塩化炭素，石油エーテル，酢酸エチル，ヘキサン，ジエチルエーテルの各溶媒を100ml，ついで50ml を用いて2回抽出を行い，GC分析してCX の抽出率を比較した．その結果を Table 1 に示す．Table 1 に示すようにジクロルメタン，クロロホルムおよび四塩化炭素を溶媒として用いたときは抽出率がいずれも100％であった．その他の溶媒においては，抽出率は90％程度でやや低い値であった．しかし，クロロホルムおよび四塩化炭素では，市販化粧品を用いて抽出操作を行ったところ，特にシャンプー，ヘアリンスの一部に強固なエマルジョンの形成が認められ，実試料への適用は困難であった．一方，ジクロロメタンはほとんどエマルジョン形成を認めず，抽出溶媒として最も適していることがわかった．

Table 1．Effect of Various Solvents on Extraction of CX

Solvent	Recovery[1)] (％)
Dichloromethane	100
Chloroform	100
Tetrachloromethane	100
Petroleum ether	92.6
Ethyl acetate	89.3
Hexane	88.7
Ether	88.5

1）CX：2000 μg

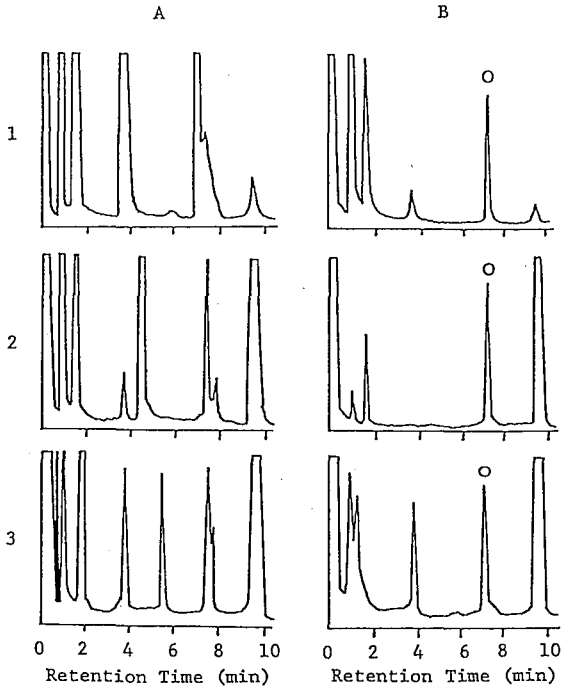


Fig. 1．Gas Chromatograms of CX in Commercial Cosmetics
A：Without clean up
B：Clean up with silicagel column chromatography
1：Shampoo
2：Hair conditioner
3：Hair tonic

2．クリーンアップについて　ジクロルメタン抽出液中には化粧品に配合されている炭化水素，脂肪酸等の基剤等が共存し，GC分析上支障をきたす（Fig. 1）．そこでこれらの共存成分の除去を目的としてクリーンアップの検討を行った．すなわち，カラムクロマトグラフィー，Sep-pac カートリッジを用いる方法およびヘキサン－ア

セトニトリルによる液ー液分配抽出法について検討を行った．まず，カラムクロマトグラフィーでは充填剤としてシリカゲル，フロリジール，アルミナ（酸性，中性，塩基性）を用い，各充填剤3.5 g をヘキサンで湿式法により充填し，CX2,000 μg をカラムに添加して試験溶液の調製の項に従って操作し，GC 分析を行った．その結果，シリカゲルを用いた場合，カラムからの回収率がほぼ100％で最もよい結果を示し，Fig. 1 に示すように実試料への適用も良好であった．これに対してフロリジール，アルミナではいずれも85％程度と回収率が低く，カラムからの回収が困難であった．つぎに，Sep-pac カートリッジはシリカゲル，フロリジール，C-18およびアルミナ（酸性，中性，塩基性）の 6 種類について検討を行った．その結果は，カラムクロマトグラフィーと同様にシリカゲルカートリッジを用いた場合が最も良好であった．しかし，シャンプー，ヘヤリンス，洗顔クリーム等に適用すると CX と他成分との分離が悪く，ガスクロマトグラム上でのベースラインの上昇が認められ，実試料の分析に耐えられないことがわかった．さらに，液ー液分配抽出法についても検討を行ったが，実試料に添加したときの回収率は，90％程度であり，シリカゲルカラムクロマトグラフィーのそれよりもかなり劣っていた．以上の検討結果から，本法ではシリカゲルカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップを実施した．

充填剤の検討　CX のガスクロマトグラフィーに最も適したカラム充填剤を選択するため，2％ OV-101，3％ OV-210，2％ OV-225，2％ PEG-20 M，2％ PEG-HT，2％ Unisole-400，2％ Silar 10 C および 2％ Thermon-3000の 8 種の液相について検討を行った．その結果，2％ OV-225を用いた場合，他成分との分離およびピークの形状が最も良好であった．また，2％ PEG-20 M，2％ PEG-HT および 2％ Silar 10 C では分離は達成されてはいるものの，2％ OV-225に比してピークのテーリングが認められた．さらに，2％ OV-101，3％ OV-210，2％ Unisole-400および 2％ Thermon 3000ではシャンプー，ヘヤリンス，クリームの一部のものに 2％ OV-225の場合よりも他成分との分離が劣る傾向がみられた．これらの結果より充填剤として 2％ OV-225を用いることとした．

検量線　CX 標準原液をヘキサンで希釈して100，200，300，400，500，1000，1500および2000ppm の標準系列を調製し，FID-GC 測定条件に従って操作して作成した．その結果，良好な直線性が得られた．

添加回収率　試料としてシャンプー，クリーム，乳液，洗顔クリーム，化粧水およびヘヤトニックの 6 種を選び，それぞれ1.0g をとり，CX 2000 μg 添加して本法による添加回収率を求めた．その結果を Table 2 に示す．実験はいずれも 3 回くり返しであり，93.7-99.2％の良好な回収率を示した．そのときの変動係数は1.8％以下であり，CX は精度よく定量的に回収された．

Table 2. Recoveries of CX Added to Commercial Samples

Sample	Sample weight (g)	Added (μg)	Recovery[1)] (％)	C. V. (％)
Sampoo	1.0	2000	96.9	1.67
Milk lotion	1.0	2000	99.3	0.39
Cream	1.0	2000	93.7	1.54
Cream soap	1.0	2000	99.2	1.15
Hair tonic	1.0	2000	96.4	1.45
Skin lotion	1.0	2000	96.9	1.67

1）Average value in triplicate

妨害物質の検討　本法を用いて GC分析を行う際，CX のピーク（保持時間，t_R＝7.60min）に対するその他の妨腐殺菌剤等の影響について検討を行った．そこで，FID-GC に直接下記の化合物を注入して t_R を求めた．これらの化合物の t_R はクロロブタノール（0.56min），ソルビン酸（1.42），チモール（2.80），BHT（2.82），安息香酸（2.88），イルガサン CF_3（2.96），イソプロピルメチルフェノール（4.36），デヒドロ酢酸（5.28），BHA（8.50），OPP（9.38），パラベンメチル，エチル，プロピル，ブチル（19.94，24.72，36.00，53.06）の順に大きくなり，CX のピークを妨害しないことがわかった．

市販化粧品の分析結果　本法を用いて市販化粧品中の CX 含有量を測定した．その結果を Table 3 に示す．調査検体はシャンプー 5 種，ヘヤコンディショナー 5 種，ヘアトニック 4 種およびクリーム 4 種の計18種である．表中の＊印は CX を配合していることを示したものである．シャンプー，ヘアコンディショナー，ヘアトニックの＊印を付した試料より CX を検出した．しかし，クリーム A においては製品のパッケージに CX 配合と表示されているにもかかわらず，CX は検出されなかった．また，パッケージ等に CX 配合を表示されていない検体については，いずれも検出しなかった．なお，CX は試験溶液をGC-MS に付し，m／z，156の分子イオンピークおよびm／z 121のフラグメントピークにより確認を行った．

Table 3. Analytical Results of CX in Commercial Cosmetics

Sample	Content (%)
Shampoo — A *[1]	0.50
— B *	0.29
— C	N.D.[2]
— D	N.D.
— E	N.D.
Hair conditioner — A *	0.15
— B *	0.14
— C	N.D.
— D	N.D.
— E	N.D.
Hair tonic — A *	0.10
— B	N.D.
— C	N.D.
— D	N.D.
Cream — A *	N.D.
— B	N.D.
— C	N.D.
— D	N.D.

1) *It was indicated on the container that the samples contained CX

2) N. D.: not detected

まとめ

1. ガスクロマトグラフィーを用いて化粧品中に防腐殺菌剤として配合されているクロルキシレノール（CX）の分析法を検討した.

2. 試料をジクロルメタンで抽出後，シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行ってヘキサンを流した後，酢酸エチルでCXを溶出してFID-GC分析を行った.

3. FID-GC分析は，充塡剤として2% OV-225（Chromosorb G AW DMCS 60-80メッシュ）を用い，カラム温度150°，注入口温度250°に設定して操作した.

4. 本法を市販化粧品に適用したところ，妨害ピークもほとんどなく，良好なガスクロマトグラムが得られ，製品分析に十分応用できることがわかった.

文献

1) 田村健夫：香粧品科学，日本毛髪科学協会，193，1986

2) 化粧品原料基準第二版注解，薬事日報社，369，1984

3) Wilson, Clifton H.：*J. Soc. Cosmet. Chem.*, 26 (2), 75, 1975

4) Kieffer, R., Scherz, H.：*Anal. Chem.*, 293 (2), 75, 1975

5) Cavazzutti, C., Gagliardi, L., Amato, A., et al：*J. Chromatogr.*, 257 (1), 166, 1983

6) Philip J. P. Lundberg J B.：*J. Pham. Sci.*, 67 (11), 1627, 1978

7) 鎌田国広，観　照雄，伊藤弘一，中村義昭，吉原武俊，原田裕文：東京衛研年報，33，115，1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 87-92, 1988

高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中の防腐剤の一斉分析

池田一夫*, 岸本清子*, 雨宮　敬*, 伊藤弘一*,
観　照雄*, 鈴木助治*, 中村　弘*, 渡辺四男也*

Simultaneous Determination of Disinfectants in Cosmetics by High-Performance Liquid Chromatography

KAZUO IKEDA*, KIYOKO KISHIMOTO*, TAKASHI AMEMIYA*,
KOICHI ITO*, TERUO KAN*, SUKEJI SUZUKI*,
HIROSHI NAKAMURA* and YOHYA WATANABE*

Simultaneous determination of disinfectants in cosmetics was performed by using HPLC method which was proposed in the 108th Annual Meeting of NIHON YAKUGAKUKAI. The number of samples was 252 and the disinfectants analyzed were six esters of p-hydroxybenzonic acid (parabens)[methyl (Me-P), ethyl (Et-P), *iso*-propyl (i-Pr-P), *n*-propyl (n-Pr-P), *iso*-butyl (i-Bu-P), *n*-butyl (*n*-Bu-P)], dehydroacetic acid (DHA), sorbic acid (SOA), benzoic acid (BA) and salicylic acid (SA).

The recoveries of parabens, SOA, BA and SA from cosmetics were 90-100% and the coefficients of variance were 0.5-5%. The recoveries of DHA were not so good except for the toothpaste.

The number of samples which contained disinfectants was 145 (58%). The means of disinfectant contents were 0.1% for parabens, DHA and SOA, 0.3% for BA, 0.2% for SA respectively.

There were 8 (3%) of samples which violated laws.

Keywords: HPLC, simultaneous determination, disinfectant, cosmetics, paraben, sorbic acid, benzoic acid, dehydroacetic acid, salicylic acid

緒　言

香粧品には製品自体の防腐を目的として多種多様な防腐剤が使用されている．防腐剤のなかで繁用されるものには，パラオキシ安息香酸エステル類（パラベン類）［メチルエステル（Me-P），エチルエステル（Et-P），プロピルエステル（n-Pr-P），イソプロピルエステル（i-Pr-P），ブチルエステル（n-Bu-P），イソブチルエステル（i-Bu-P）］，デヒドロ酢酸（DHA），ソルビン酸（SOA），安息香酸（BA），サリチル酸（SA）およびこれらの塩類がある．これらの防腐剤は，いずれも化粧品原料基準[1,2]（薬事法）に収載されており，Table 1．のとおり化粧品品質基準[3]にその使用限度が定められている．

昭和63年4月開催された日本薬学会108年会の公衆衛生協議会において，これらの防腐剤の一斉分析法[4]が提案された．今回，この分析法を用い昭和62年度に入手した市販化粧品252検体中の防腐剤の一斉分析を実施した．その調査結果および検査の際に得られた知見について報告する．

実験の部

1．試薬　パラオキシ安息香酸エステル類（Me-P, Et-P, n-Pr-P, i-Pr-P, n-Bu-P, i-Bu-P），DHA，SOA，BA および SA は東京化成工業株式会社製（特級）を使用した．シリカゲルは Kieselgel-60（メルク社製）を105°で2時間活性化し，シリカゲルデシケータ中で保存したものを使用した．その他の試薬はすべて特級もしくは液体クロマトグラフ用を使用した．

防腐剤標準原液：各防腐剤100mg ずつを精秤し，メタノールに溶解し，正確に100m*l* とし各標準原液とした．

*東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科　169　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, 169 Japan

Table 1. Maximum Quantity of Disinfectants in Cosmetics

Disinfectant	Quantity (g/100g)
Benzoates	1
Benzoic acid	0.2
Dehydroacetic acid and its salts	0.5
Paraoxybenzoic esters	1
Salicylates	1
Salicylic acid	0.2
Sorbic acid and its salts	0.5

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，クロマトグラフ用カラム：内径 2 cm，長さ15cm のコック付きガラス製のもの．

3. 試料 昭和62年度に都内で入手した化粧品252検体を試料とした．

4. 試験溶液の調製 試料0.5g を精密にはかり，約 5 ml のメタノールおよび無水硫酸ナトリウムを 5 g 加え，十分にかき混ぜ，さらにメタノール20ml を加え，40°で20分間加温する．これを氷冷したのち，3,000rpm で10分間遠心分離し，上澄液をとる．残さにメタノール 20ml を加え上記の抽出操作を行う．上澄液を合わせ，これに約 3 g のシリカゲルを加えよく分散させ，ロータリーエバポレータ（40°以下）で濃縮し，メタノールを留去する．

あらかじめシリカゲル 3 g をヘキサン・酢酸エチル（97：3）を用いて充填したカラムに，これをできるだけ密に積層させる．さらに，この混液を用いてフラスコに残留したシリカゲルをカラムに洗い込む．ついで，カラムにヘキサン：酢酸エチル（97：3）を流し，溶出液 60ml を除く．つぎにヘキサン・酢酸エチル（80：20）を 1 ml/min の速度で流し，溶出液60ml を分取し，これを溶出液 A とする．さらに，カラムにメタノールを流し，溶出液35ml を分取し，これを溶出液 B とする．A および B 両溶出液をそれぞれエバポレータ（40°以下）で約 1 ml になるまで濃縮し，メタノールで正確に20ml とし，それぞれ試験溶液 A および B とする．

なお，この場合溶出液 A にはパラベン類が溶出し，溶出液 B にはその他の防腐剤が溶出する．

5. 高速液体クロマトグラフ法（HPLC）による定性・定量 各防腐剤標準溶液系列（SA は20，40，60，80 μg/ml その他は10，20，30，40 μg/ml）および試験溶液をそれぞれ 5 μl 注入し，下記の条件で HPLC を行う．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．

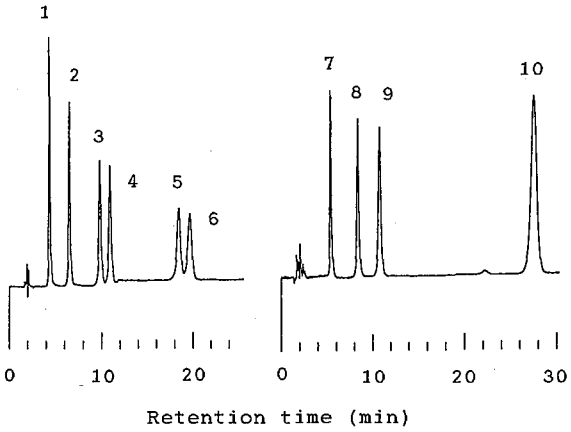


Fig. 1. Liquid Chromatograms of Disinfectans
Operating conditions：column：TSKgel ODS-80TM (5 μm, 4.6mm i. d. x 15cm), mobile phase：0.05 M sodium dihydrogenphosphate-methanol-acetonitrile (50：35：15) containing 0.002 M cetyltrimethylammoniumchloride, adjusted to pH 5.2 (phosphoric acid), flowrate：1ml/min, temperature：40°, detection：Para-bens ; 254nm, DHA etc.：235nm, sensitivity：0.08 a. u. f. s.
1：Me-P, 2：Et-P, 3：i-Pr-P, 4：n-Pr-P, 5：i-Bu-P, 6：n-Bu-P, 7：DHA, 8：SOA, 9：BA, 10：SA

HPCL 測定条件 カラム：TSKgel ODS-80T_M（5 μm, 4.6mmi. d. x 15cm，東ソー株式会社製），移動相：0.05M リン酸二水素ナトリウム・メタノール・アセトニトリル（50：35：15）に最終濃度が0.002M となるように塩化セチルトリメチルアンモニウムを添加し，リン酸で pH を5.2に調整したもの，流速：1.0ml/min，測定温度：40°，測定波長：試験溶液 A に対して254nm，B に対して235nm，検出感度：0.04a. u. f. s. に設定する．

実験結果および考察

1. HPLC 測定条件について

ODS 系カラムとして，TSKgel ODS-80T_M，CAPCELL PAK C 18（7 μm, 4.0mmi. d. x 25cm，株式会社資生堂製），Cosmosil 5 C 18（5 μm, 4.6mmi. d. x 15cm，半井化学薬品株式会社製）および Hiber LiChrosorb RP-18（7 μm, 4.0mmi. d. x 25cm，メルク社製）を検討した結果，カラムとして TSKgel ODS-80 T_M を使用した場合が最良であった（Fig. 1.）．

そこで，各防腐剤の検量線（SA は20，40，60，80 μg

Table 2. Recoveries of Parabens, DHA, SOA, BA, and SA from Cosmetics

Sample	Me-P			Et-P			i-Pr-P			n-Pr-P			i-Bu-P			n-Bu-P		
	Added (%)	Recovery (%)	CV	Added (%)	Recovery (%)	CV	Added (%)	Recovery (%)	CV	Added (%)	Recovery (%)	CV	Added (%)	Recovery (%)	CV	Added (%)	Recovery (%)	CV
Lotion-1	0.10	94.4	1.3															
Lotion-2	0.020	80.6	3.8	0.020	80.0	2.4	0.020	79.5	4.0	0.020	80.3	5.0	0.020	76.2	1.3	0.020	82.0	1.1
Milk lotion-1	0.050	97.2	1.3	0.050	97.8	1.4	0.050	95.4	1.9	0.050	96.2	2.5	0.050	96.8	0.2	0.050	95.6	1.4
Milk lotion-2	0.050	101.8	0.6	0.050	101.4	0.9	0.050	99.0	0.5	0.050	99.6	0.5	0.050	98.2	2.9	0.050	99.4	0.7
Cream-1				0.10	91.0	1.8										0.10	99.4	2.3
Cream-2	0.050	91.6	3.1	0.050	88.6	3.7	0.050	87.3	3.1	0.050	91.8	2.5	0.050	89.3	3.1	0.050	95.1	2.0
Shampoo-1				0.10	88.6	0.8												
Shampoo-2	0.050	89.4	5.2	0.050	86.6	5.0	0.050	95.2	4.9	0.050	86.4	5.7	0.050	86.3	5.8	0.050	88.6	4.5
Toothpaste	0.050	95.4	7.8	0.050	94.4	8.6	0.050	94.6	8.3	0.050	94.2	8.2	0.050	93.6	6.7	0.050	95.2	6.1

No. of experiment : 3

Sample	DHA				SOA				DHA				DHA			
	Salts	Added (%)	Recovery (%)	CV (%)	Salts	Added (%)	Recovery (%)	CV (%)	Salts	Added (%)	Recovery (%)	CV (%)	Salts	Added (%)	Recovery (%)	CV (%)
Lotion-1									Na	0.10	98.1	2.9	H	0.10	99.3	3.2
Lotion-2	Na	0.020	46.2	14.0					Na	0.040	83.9	3.1	Na	0.040	96.9	1.2
Milk lotion-1	H	0.050	49.4	9.6	K	0.050	91.4	0.9	Na	0.050	92.5	1.4	H	0.050	101.8	0.6
Milk lotion-2	H	0.10	59.0	9.6	H	0.10	94.7	1.1	H	0.10	98.2	1.1	H	0.10	102.3	2.7
Cream-1									Na	0.10	90.2	3.0	H	0.10	99.3	3.0
Cream-2	H	0.050	56.0	5.7					H	0.10	88.3	1.3	H	0.10	93.5	2.1
Shampoo-1									H	0.10	98.8	1.8	H	0.10	98.1	2.9
Shampoo-2	H	0.050	79.1	4.0	H	0.050	84.6	5.2	H	0.10	86.2	4.9	H	0.10	93.9	3.1
Toothpaste	H	0.10	86.7	9.1	K	0.10	98.8	0.4	Na	0.10	93.0	1.2				

No. of experiment : 3

Table 3. Contens of Disinfectants in Cosmetics

Disinfectant	No. of Sample	Maximum (%)	Minimum (%)	Mean (%)
Me-P	113	0.45	0.01	0.13
Et-P	9	0.15	0.01	0.11
Pr-P	40	0.25	0.005	0.10
Bu-P	37	0.50	0.02	0.13
DHA	16	0.24	0.01	0.10
SOA	3	0.22	0.01	0.12
BA	28	0.68	0.005	0.29
SA	4	0.43	0.10	0.20

Table 4. Number of Samples which contained Parabens

Parben	Non	Me-P	Et-P	Pr-P	Bu-P	Total
Non	18					18
Me-P		59				59
Et-P			1			1
Pr-P		25	1	2		28
Bu-P		18	1		8	27
Total	18	102	3	2	8	133

Me−P+Et−P+Pr−P	2
Me−P+Et−P+Bu−P	0
Me−P+Pr−P+Bu−P	6
Et−P+Pr−P+Bu−P	1
Me−P+Et−P+Pr−P+Bu−P	3

／ml その他は10, 20, 30, 40 μg/ml）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．

なお，同様の HPLC 測定条件で次の化合物を30分以内で分析することが可能であった．

レゾルシン，バニリン，フェノキシエタノール，フェノール，クレゾール，サリチル酸メチル，クロルクレゾール，トリクロロヒドロキシジフェニルエーテル（トリクロサン，イルガサン DP-300），オルトフェニルフェノール，イソプロピルメチルフェノール，クロルキシレノール，ブチルヒドロキシアニソール，チモール，オキシベンゾン，サリチル酸フェニル．

これらの化合物は，場合により，パラベン等の定量分析を妨害する恐れがあるので，分析にあたり十分注意する必要がある．

2．添加回収実験

市販化粧品に重量パーセントで各防腐剤を添加し，3回繰り返し添加回収実験を行った．その結果を Table 2．に示す．パラベン類，SOA，BA および SA の回収率は90-100％で，その変動係数は0.5－5％程度であった．DHA の回収率はハミガキを除いて良好ではなかった．

Table 5. Number of Samples which contained DHA, SOA, BA and SA

Disinfectant	Non	DHA	SOA	BA	SA	Total
Non	112					112
DHA		6				6
SOA			2			2
BA		1		20		21
SA					4	4
Total	112	7	2	20	4	145

3．市販製品の分析結果

昭和62年度に都内で入手した市販化粧品252検体を試料とし，本法を用いて防腐剤の一斉分析を実施した．その結果，145検体（58％）から Table 3．に示したように防腐剤が検出された．各防腐剤の配合量の平均値は，パラベン類，DHA および SOA で0.1％，BA は0.3％，SA では0.2％程度であった．

これらの防腐剤の使用限度は Table 1．のとおり定められているが，この基準を超える検体はなかった．

4．化粧品中の配合防腐剤の種類

4．1　パラベン類の混合配合

パラベン類はエステルの種類を2種以上使用すると一層有効であると言われている．そこで，分析した検体の場合どのような組合せでパラベン類が配合されているのかを検討した．今回の調査で防腐剤を検出した検体のみを Table 4．にまとめた．パラベン類を配合していない検体18（13％），1種類のエステルを配合している検体70（48％），2種類のエステルを配合している検体45（31％），3種類のエステルを配合している検体9（6％），4種類のエステルを配合している検体3（2％）であった．2種類のエステルを配合している場合，Me-P と Pr-P の組合せが一番多く25（17％），Me-P と Bu-P の組合せは18検体（12％）であった．

4．2　酸系防腐剤の混合配合

パラベン類と同様に酸系防腐剤の混合配合についても検討した．今回の調査で防腐剤を検出した検体のみを Table 5．にまとめた．酸系防腐剤が配合されていないものが圧倒的に多く112（77％），1種類配合されているものが32（22％），2種類配合されているものはわずかにシャンプー1検体（0.7％）であった．

DHA は，乳液・ローション・シャンプー等に配合さ

Table 6. Number of Samples which contained Disinfectants

Disinfectant	Non	Me-P	Et-P	Pr-P	Bu-P	Total
Non		97	6	32	31	166
DHA	2	5	2	4	3	16
SOA	1	1		1		3
BA	14	7	1	3	3	28
SA	1	3				4
Total	18	113	9	40	37	217

れており，BA および SA はほとんどのものがシャンプーに配合されていた．

4．3 パラベン類と酸系防腐剤の混合配合

パラベン類と酸系防腐剤がどのように混合配合されているかを Table 6．にまとめた．Table 5．および Table 6．より，BA 配合化粧品の35%（7／20），SA 配合化粧品の75%（3／4），SOA 配合化粧品の50%（1／2），DHA 配合化粧品の70%（5／7）が同時にパラベン類を配合していることが確認された．

本分析法の場合，Me-P と Et-P のピークに DHA のそれが，また Pr-P のピークと BA のそれが重なる可能性がある．そこで，本法ではシリカゲルカラムクロマトグラフィーによりパラベン類と酸系防腐剤をあらかじめ分離している．しかし，Table 6．によると DHA と Me-P（5検体），DHA と Et-P（2検体）および BA と Pr-P（3検体）が共に配合されている検体の総数は10検体（10／252＝4%）であり総検体数に比して多くはない．したがって，防腐剤のルーチン分析を行う場合は，試験溶液調製に従って抽出操作のみを行い，それを試験溶液として HPLC 分析を行った結果，ピークの分離が完全でないと確認された検体についてのみ，シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離を行えば効率的であることがわかった．

5．違反検体

昭和62年度に検査を行った252検体中，違反品は22検体（9%）であった．このうち，防腐剤に関係する違反は8検体（3%）であり，全違反検体の約36%を占めた．防腐剤の違反例は，①化粧品製造品目許可書（許可書）で許可されていないパラベン類が配合されている（1検体）②許可書で許可されているパラベンが検出されない（3検体）③許可書で許可されている以上に多量にパラベンを検出する（1検体）④許可書通りにパラベンが配合されているにもかかわらず，そのことが包装または容器に記載されていない（3検体）という理由によるものであった．

②の許可書で許可されているパラベンが検出されないという理由で違反となった検体のうち1件は，Me-P が共存する強アルカリにより加水分解を受け，パラオキシ安息香酸に分解してしまったことによるものである．液性が強アルカリの除毛剤やスクラブ洗顔料の場合，パラベン類の加水分解が起きる可能性があり，品質管理上，十分注意する必要がある．

結　論

日本薬学会108年会で提案された防腐剤の HPLC 分析法に従い，252検体についてパラオキシ安息香酸エステル類（パラベン類）[メチルエステル（Me-P），エチルエステル（Et-P），プロピルエステル（n-Pr-P），イソプロピルエステル（i-Pr-P），ブチルエステル（n-Bu-P），イソブチルエステル（i-Bu-P)]，デヒドロ酢酸（DHA），ソルビン酸（SOA），安息香酸（BA）およびサリチル酸（SA）の一斉分析を行った．化粧品からの回収実験を行ったところ，パラベン類，SOA，BA および SA の回収率は90-100%であり，その変動係数は0.5－5%程度であった．しかし，DHA の回収率はハミガキを除いて良好ではなかった．145検体（58%）からパラベン類が検出され，配合量の平均値は，パラベン類，DHA および SOA は0.1%，BA は0.3%，SA は0.2%であった．防腐剤関係の違反は8検体（3%）であった．

文　献

1）化粧品原料基準第二版：昭和57年12月27日厚生省告示第221号
2）日本公定書協会：化粧品原料基準第二版注解，1984，薬事日報社，東京
3）化粧品品質基準：昭和42年8月8日厚生省告示第321号
4）日本薬学会衛生化学調査委員会：日本薬学会第108年会公衆衛生協議会資料，26－28，1988

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.*, **39**, 93-96, 1988

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IV報）東京湾海水中のトリブチルスズ及びジブチルスズ化合物のモニタリング

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 (IV) Monitoring of Tributyltin and Dibutyltin Compunds in sea Water of Tokyo Bay

MASAHIRO TAKEUCHI*, KAZUKO MIZUISHI*, HIDEO YAMANOBE* and YOHYA WATANABE*

To monitor the pollution of Tokyo bay with tributyltin compounds (TBT) used as antifouling agents for ship bottoms and fishery farm nets, TBT and their degradation compounds, dibutyltin compounds (DBT), in sea water were gas chromatographed as tributyltin chloride (TBTC) and dibutyltin dichloride (DBTC). The sea water samples were collected at the five sampling stations fixed in Tokyo Bay (A ; Kanazawa-hakkei, B ; Ohi, C ; Sanmaizu, D ; Gyoutoku, E ; Futtsu) during the period from 1984 to 1987. The concentrations of TBTC ranged from ND (less than 5 ppt) to 284 ppt, and those of DBTC from ND (less than 3 ppt) to 114 ppt. In the case of TBTC, the annual mean values of all stations were 37.8 ppt in 1985, 24.4 ppt in 1985, 25.5 ppt in 1986 and 34.6 ppt in 1987, and the regional mean values were 31.3 ppt at Station A, 27.6 ppt at Station B, 8.8 ppt at Station C, 6.3 ppt at Station D and 78.9 ppt at Station E, respectively. In the case of DBTC, the annual mean values of all stations were 40.7 ppt in 1984, 35.3 ppt 1985, 38.9 ppt in 1986 and 41.5 ppt in 1987, and the regional mean values were 45.4 ppt at Station A, 37.1 ppt at Station B, 18.1 ppt at Station C, 22.6 ppt at Station D and 72.3 ppt at Station E, respectively. The mean values of TBTC and DBTC at Stations A, B and E were significantly higher than those at Stations C and D ($p<0.05$). The concentrations of TBTC (X) and DBTC (Y) in sea water correlated with each other ($r=0.7196$, $p<0.001$). The regression line was $Y=0.778X+17.91$.

Keywords：monitoring, environmental pollution, tributyltin compound, dibutyltin compound, tributyltin chloride, dibutyltin dichloride, Tokyo bay, sea water, gas chromatography, electron capture detector

緒　言

養殖漁網の防汚剤及び船底塗料として使用されているトリブチルスズオキシド（TBTO）による魚介類及び環境汚染が社会的関心を呼んでいる．われわれはこのような事態を予想して迅速分析法を確立して[1]，既に1984年（昭和59年）より調査を行っている．その結果，1）TBTOによる魚介類の汚染は養殖魚にとどまらず，内湾内海の天然魚から近海魚にまで広がっていること，2）環境庁の汚染調査では不検出とされている海水からも検出されている海水からも検出されることを明らかにした[2~4]．

一方，TBTO汚染はわが国だけでなくグローバルな問題としてアメリカ及びヨーロッパでも注目されている．既にフランスでは養殖用カキの稚貝が船底塗料由来のTBTOで死滅したことから，ヨット及びボートへのTBTO塗料の使用が禁止され，また，最近アメリカ及びカナダにおいても25 m以下のレジャー用ボートへのTBTO含有塗料の使用が禁止されるに至った．

現在，わが国において船底塗料へのTBTOの使用は規制されていないが，規制措置の検討のためにもTBTO

*東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

による環境汚染の実態を早急に把握する必要がある．このような背景において，著者らは前報において魚介類を中心とした東京湾の汚染調査結果を報告した[4]．本報では，1984年（昭和59年）から1987年（昭和62年）にかけて東京湾で採取した海水中のトリブチルスズ化合物及びその代謝産物であるジブチルスズ化合物を，トリブチルスズクロリド（TBTC）及びジブチルジクロリド（DBTC）としてガスクロマトグラフ分析し，それに基づいて東京湾のTBTO汚染の実態を考察したので報告する．

実　　験

1．海水試料

本実験に使用した海水は1984年（昭和59年）から1987年（昭和62年）にかけて，毎年5月，7月及び9月に各1回計3回，Fig. 1．に示す東京湾内の5定点（A：金沢八景，B：大井，C：三枚洲，D：行徳，E：富津）において採取した．試料は海面から0.5～1.0mの深度において，1回に3lずつガラス瓶に採取し，採取後塩酸を10ml/lの割合で加えて5℃で保存した．

2．装置

10mCi ^{63}Ni電子捕獲検出器（ECD）を装着した島津製GC-9AM型ガスクロマトグラフ（GC）を使用した．分離カラムには信和化工製10% Thermon-HG（Chromosorb W, AW-DMCS, 80-100メッシュ）を充填した内径3.2mm，長さ2.0mのガラスカラムを使用した．カラムは充填後，常法に従って170℃で20時間エージング後，0.1M塩酸・ジエチルエーテル溶液を10μlずつ20回注入して，更に同温度において1時間エージングしてから使用した．なお，GC条件はカラム温度170℃，注入口温度220℃，ECD温度250℃，窒素ガス流量50ml/minとした．

3．試薬

TBTC及びDBTC標準溶液：和光純薬特級TBTC及びDBTC各100mgをヘキサン・ジエチルエーテル・酢酸（75:25:1，v/v/v）溶液100mlに溶解し，適宜同溶液で希釈して使用した．

塩酸：精密分析用高純度塩酸をヘキサンで3回洗浄してから使用した．

ヘキサン：和光純薬製残留農薬分析用を使用した．

ジエチルエーテル：Cica-Merck残留分析用を使用した．

その他溶媒類は全て残留農薬分析用を使用した．

4．試験法

試料1000mlを分液ロートに採り，塩酸25ml及びメタノール5mlを加えて混和した後ヘキサン・ジエチルエーテル（3：1，v/v）各100mlで3回抽出した．抽出液を合わせ，フロリジール3gを湿式充填後その上部に無水硫酸ナトリウム2gを積層させた内径1cm，長さ

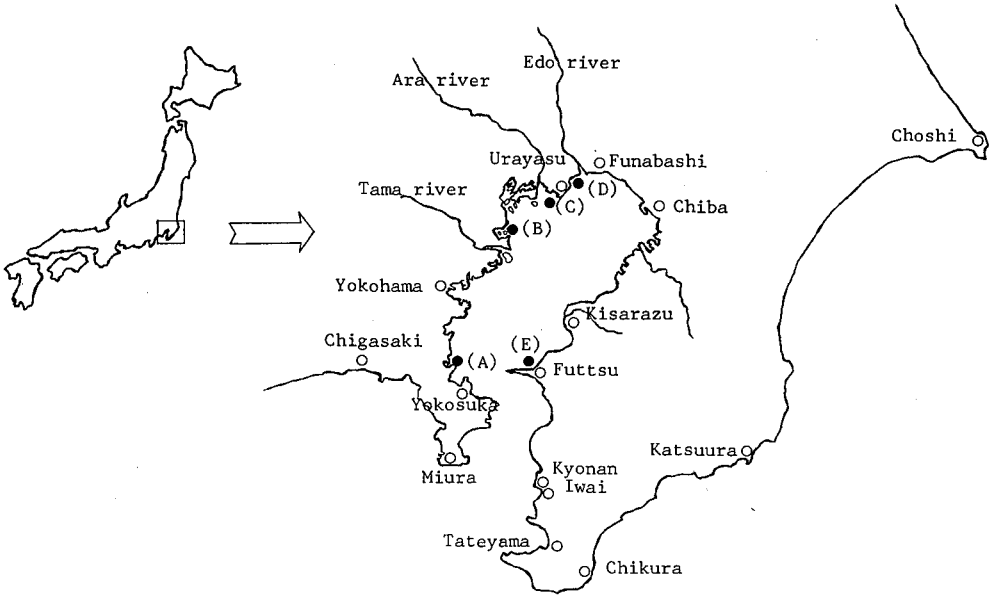


Fig. 1．Sampling points (●) and fishing ports (○) in and near Tokyo Bay
(A)：Kanazawa-hakkei, (B)：Ohi, (C)：Sanmaizu, (D)：Gyotoku, (E)：Futtsu

30cm のガラスカラムを通過させた．次いで，アセトン70ml でカラムを洗浄後，ヘキサン・ジエチルエーテル・酢酸（75:25:1, v/v/v）50ml で溶出した．溶出液をロータリーエバポレータで 1 ml 以下までに濃縮し，溶出溶媒で 1 ml に調整して試料溶液とした．ECD-GC への試験溶液の注入は，塩酸・酢酸エチル溶液同時注入法で行った．すなわち，先ず試験溶液4 μl をマイクロシリンジに採り，次いで同シリンジに0.01M 塩酸・酢酸エチル2 μl を追加してから全量を ECD-GC に注入した．

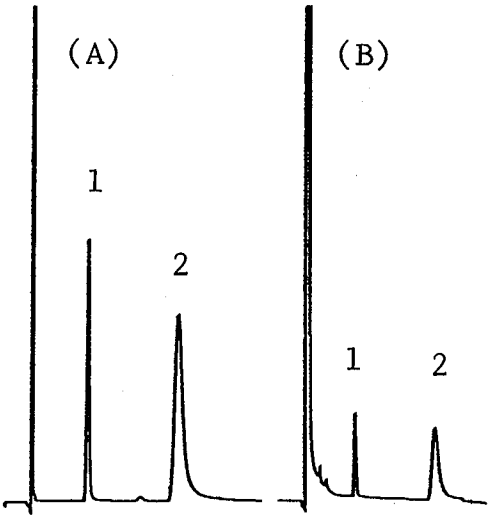


Fig. 2. Gas chromatograms of TBTC and DBTC
(A) : Standards, (B) : Etracted from sea water
Peak 1 : TBTC (t_R=6.6min), Peak 2 : DBTC (t_R=17.2min)

5．添加回収

海水1000ml に TBTC 0.2 μg, DBTC 0.1 μg を添加し，以下実験で示した試験法に従って TBTC 及び DBTC を定量した．5 回繰り返した場合の本法の平均回収率は TBTC, DBTC とも約95%，相対標準偏差は 2 %以下であり，回収率及び分析精度とも良好であった．Fig. 2 に海水から抽出した TBTC 及び DBT のガスクロマトグラムを示す．なお，本報による定量限界は S／N＝2 において，TBTCが0.005ppb, DBTC が0.003ppb であった．

結果及び考察

1．海水中の TBTC 及び DBTC 濃度

Table 1 に1984年から1987年における測定値を示す．TBTC は ND（不検出）から最高284ppb まで，DBTC は ND から最高114ppt まで検出した．全定点の各年の平均値は TBTC が37.8ppt（1984年），24.4ppt（1985年），25.5ppt（1986年）及び41.5ppt（1987年）で，DBTC が40.7ppt（1984年），34.6ppt（1985年），38.9ppt（1986年）及び41.5ppt（1987年）であった．また，1984年から1987年までの各定点の平均値は TBTC が31.3ppt（A 点），27.6ppt（B 点），8.8ppt（C 点），6.3ppt（D 点）及び 78.9ppt（E 点），DBTC が 45.4ppt（A 点），37.1ppt（B 点），18.1ppt（C 点），22.6ppt（D 点）及

Table 1. TBTC and DBTC concentration in sea water collected from Tokyo bay. (ppt)

Sampling stations		'84 May	'84 July	'84 Sept.	'85 May	'85 July	'85 Sept.	'86 May	'86 July	'86 Sept.	'87 May	'87 July	'87 Sept.	Mean
(A)	TBTC	20	53	18	11	7	58	34	29	39	59	38	10	31.3(18.7)
	DBTC	36	59	73	ND	23	ND	93	62	74	52	69	4	45.4(32.1)
(B)	TBTC	9	39	27	7	ND	29	25	20	23	38	38	76	27.6(19.8)
	DBTC	35	56	29	ND	40	56	19	19	41	20	58	72	37.1(20.9)
(C)	TBTC	12	5	9	ND	ND	ND	23	ND	6	14	22	15	8.8 (8.4)
	DBTC	21	20	21	30	23	5	19	33	6	19	10	10	18.1 (8.8)
(D)	TBTC	ND	5	10	ND	ND	ND	13	30	ND	ND	8	9	6.3 (8.9)
	DBTC	ND	28	22	32	61	50	23	37	ND	ND	14	4	22.6(20.2)
(E)	TBTC	60	16	284	87	22	145	22	44	75	77	38	77	78.9(74.0)
	DBTC	89	41	81	80	15	114	25	63	69	87	83	120	72.3(32.1)
Mean	TBTC	37.8(70.4)			24.4(41.9)			25.5(18.8)			34.6(26.8)			
	DBTC	40.7(25.5)			35.3(32.7)			38.9(27.3)			41.5(38.1)			

ND : TBTC ; less than 5 ppt, DBTC ; less than 3 ppt
The values in brackets are standard deviations.

Table 2. The results of T-test of the mean values of TBTC and DBTC at each sampling station

		DBTC A	DBTC B	DBTC C	DBTC D	DBTC E
TBTC	A		N.S.	*	*	N.S.
	B	N.S.		*	N.S.	**
	C	*	**		N.S.	***
	D	*	**	N.S.		***
	E	*	**	***	***	

Significant level : *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001
N. S. : no significance

び72.3ppt（E点）であった.

以上の結果について統計処理すると，TBTC 及び DBTC の各年の平均値には有意差は認められないことから，東京湾全体の TBTO 汚染は1984年の段階で既に現在のレベルに達しており，それ以後1987年に至るまで横ばい状態を保っているといえる.

一方，各定点の TBTC 濃度及び DBTC 濃度をそれぞれ定点間でT検定すると，Table 2 に示すように，TBTC についてはA点とB点間及びC点とD点間には有意差は認められないよのの，A点とC点，D点及びE点間は $p<0.05$で，B点とC点，D点及びE点間は $p<0.01$で，更にC点とE点間及びD点とE点間は $p<0.001$で有意差が認められた．また，DBTC についても各定点間のT検定の結果は TBTC とほとんど同様の傾向を示した．これらのT検定の結果から，東京湾の TBTO 汚染はE点（富津）が最も高く，A点（金沢八景）及びB点（大井）がこれに続き，C点（三枚洲）及びD点（行徳）が低いと結論することができる.

2．海水中の TBTC 濃度と DBTC 濃度の相関性

Fig. 3 に海水中の TBTC 濃度と DBTC 濃度の相関図を示す．相関係数は0.719（n=60, $p<0.001$）で明らかに相関性が認められた．回帰直線の式は $V=0.778X+17.91$となった．海水中の TBTC 濃度と DBTC 濃度に相関性が認められたことから，海水中の DBTC は TBTO を初めとするトリブチルスズ化合物の代謝産物または化学的分解物であり，ポリ塩化ビニルの安定剤として多量に使用されているジブチルスズ化合物に由来するものではないと結論できる.

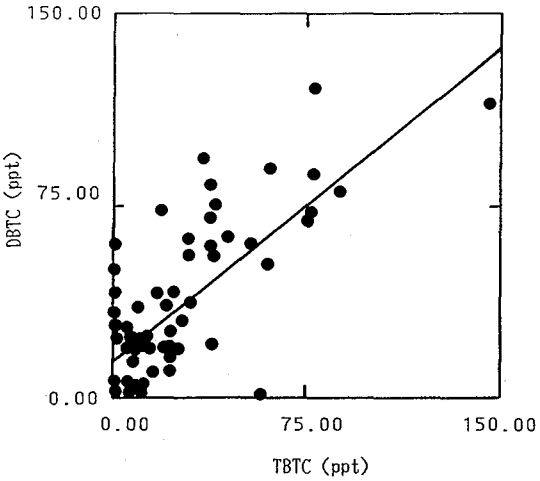


Fig. 3. Correlation between TBTC and DBTC in sea water. r=0.719 (n=60, $p<0.001$), Y=0.778X+17.91

ま と め

1984年から1987年にかけて毎年5月，7月及び9月に東京湾において採取した海水中のトリブチルスズ及びジブチルスズ化合物を TBTC 及びDBTC として ECD-GC 分析した．東京湾全体では TBTO 汚染の経年変化は認められず，1984年において既に現在の汚染レベルに達していたことが明らかとなった．一方，採取点間には TBTC 濃度及び DBTC 濃度とも有意差が認められ，三枚洲及び行徳<金沢八景及び大井<富津の順に高いことが明らかとなった．海水中の TBTC 濃度と DBTC 濃度は明らかに相関性があり，DBTC の代謝産物あるいは化学的分解物であることが結論できた.

謝辞 本調査を実施するに当たりご協力頂いた衛生局環境衛生部食品機動監視班の各位に深謝致します.

文 献

1）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）.
2）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）.
3）竹内正博，水石和子，山野辺四男也：東京衛研年報，38，155-159（1987）.
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，38，160-166（1987）.
5）竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：日本分析化学会第36年回講演要旨集，p.604（1987）.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 97-100, 1988

Hygienic Chemical Survey on Rubber Products
Content of N-Nitrosamines in Nipples and Pacifiers

KAZUKO MIZUISHI*, MASAHIRO TAKEUCHI*, HIDEO YAMANOBE* and YOHYA WATANABE*

The amounts of N-nitrosamines(NAs) and nitrosatable compounds originating from accelerators and stabilizers in rubber nipples and pacifiers were determined by the migration test method using buffer solution (simulated saliva solution containing nitrite). The survey of commercial samples purchased in Tokyo during 1982-1987 revealed the migration of N-nitrosodimethylamine(NDMA), N-nitrosodiethylamine(NDEA), N-nitrosodibutylamine (NDBA) and N-nitrosopiperidine (NPIP). Their concentrations were in the range of 0.6ppb-340ppb. In 1982, NAs and nitrosatable compounds were detected at the highest levels : migrating NA, 340ppb NDEA ; nitrosatable compound as nitrosamine, 37ppm NDEA. NAs and nitrosatable compounds have since been decreasing with a few exceptions. In 1987, NDMA and NDEA were detected at low levels, less than 10ppb, in some natural rubber products. Low level NDMA was also deteced in stylene butadiene rubber products.

Keywords : volatile N−nitrosamines, rubber nipple, pacifier,thermal energy analyzer, gaschromatography

Introduction

It has been found that the occurence of nitrosamines, a class of potent chemical carcinogens, in rubber products is directly correlated with the use of corresponding vulcanization acceralators and / or latex stabilizers added during the product in process[1]. Some studies have reported finding volatile nitrosamines in rubber nipples and pacifiers[2-4]. These toxic compounds could be ingested when an infant sucks on a rubber nipple while feeding. Then the potential exposure of infants to these toxic compounds prompted the the USA and European countries to regulate for nitrosamines. The US Food and Drug Administration set a 10ppb action level for individual nitrosamines in baby bolttle nipples and pacifiers in 1985[5], and the West German health authorities introduced regulations in 1982 on the basis of the standard migration test for rubber products[6]. This standard test allows the quantitative estimation of volatile nitrosamines as well as nitrosatable compounds (Maximum: 10ppb volatile nitrosamines and 200ppb nitrosatable compounds estimated as nitrosamines). In Japan, the Ministry of Welfare authorized the regulation on rubber nipple products except for intems of nitrosamines in 1987[7]. Consequently rubber manufactures have been requested self-imposed control on reducing the amounts of nitrosamines in rubber products. For the sake of surveying the qulity of rubber nipples, we analyzed about commercially available baby nipples and pacifiers in Tokyo during 1982 to 1987 for volatile nitrosamines and nitrosatable compounds. The results of the test were reported here.

Experimental

Materials. i) N-nitrosodimethylamine (NDMA), N-nitrosodiethylamine (NDEA) and N-nitrosodibutylamine (NDBA) were purchasaed from Tokyo kasei Co., Ltd (Tokyo), N-nitrosodipropylamine (NDPA) and N-nitrosopiperidine (NPIP) from Kanto Kagaku Co., Ltd (Tokyo). All other chemicals were of an alytical grade. Rubber products (babby bottle nipples, pacifiers and teeth-hardening rings) were purchased in department or supermarket stores in Tokyo during 1982-1987. ii) Standard solutions (100 $\mu g/ml$) of NAs were pre-

*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24− 1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

pared by disolving 20mg of NDMA, NDBA, NPIP or NDPA in ethanol and adjusting to 200m*l*. iii) Buffer solution (simulated saliva solution) was prepared by disolving 4.2g sodium bicarbonate, 0.2g potassium carbonate, 0.5g sodium chloride and 200mg sodium nitrite in distilled water and adjusting to 1l.

Instruments. The analysis of N-nitrosamines was performed by gas chromatography equipped with a thermal energy analyzer (GC-TEA). A Shimazu gas chromatograph Model GC-6A (Shimazu, Kyoto) was connected with a TEA Model 502 detector (Themo Electron Corp., U. S. A).

Chromatographic conditions used were as follows : column, a 3m x 3.2mm I. D. glass column packed with 20% Versamide 900, 60-80mesh Chromosorb WAW ; column temp., 200℃ ; injection port temp., 230℃ ; argon gas flow rate, 50m*l*/min.

Procedure. Rubber nipple samples were cut into pieces (first, cut in half, then the upper halves into 4 pieces and lower ones into 16 pieces). Five to ten grams of the pieces was soaked in 100m*l* of buffer solution containing 200ppm sodium nitrite for 24 hours at 40°C. The solution was devided in two portions, one part was extracted twice with 100m*l* of dichloromethane after adding of 10m*l* of 0.1N sodium hydroxyde solution. To the other was added 10m*l* of 0.1N hydrochloric acid solution. The mixture was permitted to stand for 30min and then extracted twice with 100m*l* of dichloromethane after addition of 20m*l* of 0.1N sodium hydroxyde solution. Each dichloromethane phase was dried by passing through a glass filter(2G) packed with 10g of anhyd. sodium sulfate. After the addition of 2m*l* of ethanol and 2-3 pieces of carborundum, the solution was concentrated to 3-5m*l* at 50-60℃ in a water bath under atmospheric pressure using a Kuderna-Danish (KD) evaporator first, then to less than 1m*l* using a Snyder column (20cm × 2cm O. D., three bulbs) at 50-55℃ in a water bath under atmospheric pressure.

Determination. The mixture solutions of NAs for calibration curves were prepared by mixing (0.5, 1.0, 1.5 or 2.0m*l*) standard solutions of NDMA, NDEA, NDBA, NPIP and NDPA. A 5-8 μl portion of each mixture was injected into GC-TEA. Caliblation curves were prepared by plotting the peak height against the concentration of each NA. Linear curves were observed in the range of the concentration prepared for all NAs (0.5-2.0 μg/m*l*). The detection limits of NAs in samples (S/N=2) were 0.5ppb for NDMA, 1ppb for NDEA, 4ppb for NDBA, 3ppb for NPIP and 3ppb for NDPA, respectively.

Results and Discussin

Rubber products purchased in Tokyo during 1982-1987 were both domestic and imported from the USA and West German. Their materials were mainly natural rubber, isoprene rubber and silicone rubber, and a few styrene butadiene rubber. The results of the migrating NAs and nitrosatable compounds analyses are shown in Table 1 . Four migrating NAs were found : NDMA, NDEA, NDBA AND NPIP. The amounts of NAs for each year are plotted as shown in Fig. 1. Nitrosatable compounds were estimated as NAs were also found as NDMA, NDEA, NDBA, NPIP and NDPA. In table II, the range of the amounts of nitrosatable compounds migrating from the samples, in which migrating NAs were not detected, is shown. In 1982 when the problem of NAs contamination of rubber products occurred in Europe, the heighest level of NDEA, 340ppb, was detected in a natural rubber product, and higher level of NPIP, 210ppb, was detected in an isoprene rubber product. The amounts of nitrosatable compounds mi-

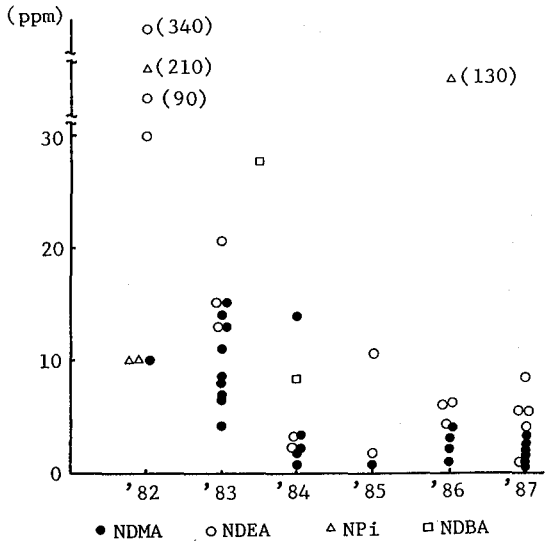


Fig. 1. Plot of amounts of N-nitrosamines in rubber products purchased in Tokyo during 1982-1987

Table 1. Content[1)] of migrating N-nitrosamines and nitrosatable compounds in commercial rubber products[2)] purchased in Tokyo during 1982-1987

material[3)]		NDMA[4)]	NDEA[4)]	NDBA[4)]	NPIP[4)]	NDPA[4)]
1982	IP	10(19ppm)	30(37ppm)			(5.4ppm)
	IP		(570)		10(10ppm)	
	IP	(30)	(2.9ppm)		10(7.9ppm)	
	IP			(24ppm)	210(19ppm)	
	NR	(70)	90(18ppm)	(9.9ppm)		(2.5ppm)
	NR	(230)	340(7.0ppm)			(870)
		sample total number=21 : IR=11, NR=4, Si[4)]=4, unkown=2				
1983	IP	7.6(33)				
	IP	11(33)	(107)			
	IP	14(35)	(173)			
	IP	6.9(20)	(15)			
	NR	4.0(49)	15(170)			
	NR	5.2(25)	(7.5)	(320)		
	NR	8.6(14)	13(39)			
	NR	13(18)				
	NR	15(18)				
	NR	8.3(17)				
	NR		24(400)	(510)		(160)
		sample total number=27 : IR=10, Si=5, SBR=2				
1984	IP	2.5	1.7			
	IP	1.3				
	NR	0.6		8.6		
	NR	14	3.3			
	NR	1.6				
	NR	2.7				
	NR			28		
		sample total number=19 : IR=5, NR=7, Si=4, SBR=3				
1985	NR	0.6(18)	(18)			
	NR	(10)	11(28)			
	NR		1.3(600)			
		sample total number=20 : IP=7, NR=10, Si=2, SBR=1				
1986	NR	2.2	6.6			
	NR	4.1	4.2			
	NR	0.9	6.5			
	NR	1.3				
	SBR				130(290)	
		sample total number=19 : IP=2, NR=15, Si=1, SBR=1				
1987	NR	1.2(0.9)	0.9(15)			
	NR	0.6(5.7)	5.7(14)			
	NR	2.6(8.6)	8.6(11)			
	NR	1.5(12)				
	NR	1.8				
	NR		5.5(22)			
	NR		4.0(5.0)			
	SBR	2.8(2.8)				
	SBR	3.4				
		sample total number=17 : IP=2, NR=10, SBR=3				

1) The values without unit are expressed as ppb in rubber samples, and those of N-nitrosamines formed under acidic condition are shown in brackets.
2) baby bottle nipples, pacifiers and teeth harding rings
3) IP=isoprene rubber, NR=natural rubber, Si=silicone rubber, SBR=styrene butadiene rubber
4) NDMA=N-nitrosodimethylamine, NDEA=N-nitrosodiethylamine, NDBA=N-nitrosodibutylamine, NPIP=N-nitrosopiperidine NDPA=N-nitrosdodipropylamine

Table 2. Range of content of N-nitrosatable compounds[1] in rubber products[2]

Year	1982	1983	1985	1987
NDMA :	20ppb -1.3ppm	5ppb-147ppb	2.5ppb-44ppb	2.1ppb-6.7ppb
NDEA :	70ppb - 25ppm	20ppb-1.3ppm	2.5ppb-19ppb	6.6ppb-8.8ppb
NDBA :	1.2ppm- 12ppm	300ppb		
NPIP :	200ppb - 15ppm	60ppb-230ppb		
NDPA :	380ppb -4.0ppm	54ppb-400ppb		

1) convertible into N-nitrosamines under acidic condition
2) Migrating N-titrosamines were not detected in these products.

grating from the samples of that year also found at high level ; the highest levels of NDMA, NDEA, NPIP, NDBA and NDPA were 19ppm, 37ppm, 19ppm, 24ppm and 5.4ppm, respectively. In 1983, there were some samples from which NAs had migrated in the range of 11-24ppb, slightly over the regulation level (10ppb) of West German, and as nitrosatable compound NDEA had migrated at the highest level of 1.3ppm, extremely over the West Germany regulation level (200ppb). After 1985, almost samples have fitted to the West Germany regulation level, except for the one sample in which 130ppb NPIP was detected in 1986, and also the reducing trend has been seen in the content of nitrosatable compounds in rubber products. In 1987, the low levels of NDMA and NDEA, less than 10 ppb, were found in only natural rubber products, and also from butadiene rubber products NDMA has become migrating at low level. The tendency of low level migration of NAs from rubber products neccesitaes further checking the quality of rubber products for the safety of babies health.

References

1) Spiegehalder, B. and Preusmann,R. : Proceeding of the 7th International Meeting on Analysis and Formation of Nitroso Compounds, p. 231 Tokyo, 1981
2) Harvery, D. C. and Fasio, T. : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66, 1500 (1983)
3) Mizuishi, K., Takeuchi, M. and Yoshiwara, T. : Tokyo-To Eiken Nenpo, 34, 146, 1983
4) Mizuishi, K., Takeuchi, M. and Kazama, M. : ibid, 35, 127, 1984
5) Food Drug Cosmetic Law Reports : 43, 446-43, 467, 1984
6) Der Bundesminister für Jugend, Familie und Gesundheit : Isolierung und Bestimmung von N-nitrosieren Stoffen aus Besarfsgegentanden nach deren Übergang in Speicheltestlösung. Bundesundheitsamt, Berlin, 1980
7) Notification No. 85 of the Ministry of Welfare, a Japanase official gazzete 1986.4.1

ゴム製品哺乳用具に関する衛生科学的調査
乳首，おしゃぶり中のニトロソアミン含有量

水 石 和 子，竹 内 正 博，山野辺 秀 夫，渡 辺 四 男 也

要　　約

乳首及びおしゃぶり中の加硫促進剤由来のN-ニトロソアミン（NA_S）及びニトロン化可能物質を，緩衝液（人工唾液）による移行試験を用いて測定した．1982-1887年における都内市販の試料について調査した結果，N-ニトロソジメチルアミン（NDMA），N-ニトロソジエチルアミン（NDEA），N-ニトロソジブチルアミン（NDBA）及びN-ニトロソピペリジンの溶出がみられた．それらの濃度は0.6-340ppb であった．1982年では，NAs 及びニトロン化可能物質とも最も高濃度に検出された．溶出 NA_S では NDEA が340ppb，ニトロン化可能物質では NDEA が37.1ppm，その後，若干の例外を除いて NA_S 及びニトロン化可能物質の量は減少してきている．1987年では，10ppb 以外の低レベルの NDMA, NDEA が天然ゴム製品から，スチレンブタジエンゴム製品からも低レベルの NDMA が検出された．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 101-103, 1988

東京湾産スズキ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 Sea-bass from Tokyo Bay

HIDEO YAMANOBE*, MASAHIRO TAKEUCHI*, KAZUKO MIZUISHI*
and YOHYA WATANABE*

The correlation between total mercury and total selenium content in sea-bass was investigated by using 102 samples captured from Tokyo Bay. Total mercury was determined by aeration and gold amalgamation atomic absorption method, and selenium by hydrogen selenide evolution-electrothermal atomic absorption method. The total mercury content ranged from 0.04 ppm to 0.36 ppm and the average and its standard deviation were 0.17 ppm and 0.07 ppm, respectively. The total selenium content ranged from 0.14 ppm to 1.23 ppm and the average and its standard deviation were 0.42 ppm and 0.18 ppm, respectively. Both elements were distributed on logarithmic normal curves. The correlation between total mercury and total selenium in the sea-bass samples was not found.

Keywords：total mercury, selenium, determination, correlation, sea-bass

緒　　言

セレンは，水銀の毒性を軽減する作用があることは既に動物実験を通して知られている[1-3]．また，水銀を高濃度に含む魚介類の多食者に水銀中毒が発症しないのは，セレンの拮抗作用による毒性軽減作用と推定されている[4]．セレンの蓄積は，水銀濃度の上昇に伴って生じたものと考えられ，高濃度水銀蓄積性魚介類中の水銀とセレンの相関性を確認した報告例[5]がある．そこで著者らは魚介類全体を母集団として，セレンと水銀の相関性を確認する調査を行ったところ，相関係数 $r=0.4010$（$P<0.001$）で相関を認める結果を得て既に報告[6]した．

今回は水銀含有量が高いために東京都が独自に出荷規制している体長60cm 以上のスズキを試料として，その筋肉中に含まれるセレンと水銀を測定し，分布，相関について検討したので報告する．

実　　験

1．試料

今回は，水銀含有量が高いために東京都が独自に出荷規制している体長60cm以上のスズキを試料とした．これらは，昭和59年7月から昭和63年1月の間に東京湾で捕獲した102検体である．試料は，頭，皮，内臓および骨を除いた筋肉部をホモジナイザーで均一にした後，−20℃で保存した．

2．試験法

1）水銀：前報[6]の如く試料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50m*l* 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：これも前報[6]に従って試料1.0g を採り，硝酸，過塩素酸で分解後水で20m*l* 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セレンを測定した．

3）試薬：標準液は和光純薬株式会社製の1000ppm の標準溶液を適宜希釈して使用した．その他使用した試薬は，すべて和光純薬株式会社製の有害金属測定用もしくは同等品を使用した．

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

*東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科　169　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, 169 Japan

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

1．総水銀含有量

今回の調査結果をFig. 1にヒストグラムで示す．最高は0.36ppm，最低は0.04ppm，平均は0.17ppmであり前報[7]とほぼ同様の結果であった.

次に体長と総水銀含有量の相関性を検討した．散布図をFig. 2に示す．体長と総水銀含有量の相関係数は $r=0.3206$ {$r(100, 0.01)=0.2540$}で前報[7]同様相関性が認められた.

2．セレン含有量

セレンの調査結果をFig. 3にヒストグラムで示す．最高値は1.23ppm，最低値0.14ppm，平均0.42ppmであった.

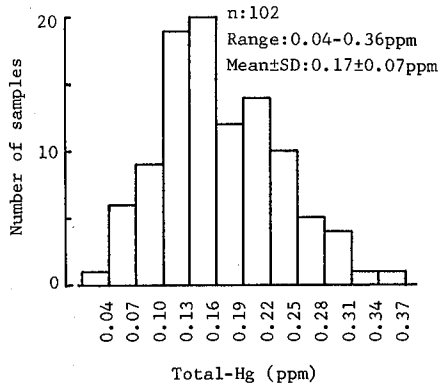


Fig. 1. Histogram of Total Mercury in Sea-bass

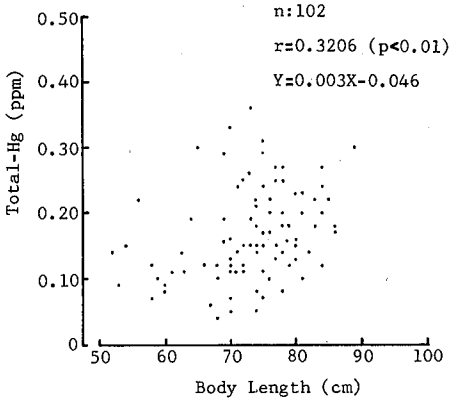


Fig. 2. Correlation Between Body Length and Total Mercury Content of Sea-bass

次いで体長とセレン含有量の相関性について検討した．散布図をFig. 4に示す．体長とセレン含有量の相関係数は，$r=-0.1517$ {$r(100, 0.01)=0.2540$}で今回の試料については相関性は認められなかった.

考　　察

体長と総水銀含有量の相関性は，カツオ，キハダ等について板野ら[8]が，マグロについてKaiら[5]が加齢すなわち体長の増加とともに水銀の蓄積量が増加する傾向が認められると報告している．また，板野ら[8]はセレンについて魚種によって相関性が認められないもの，正の相関性が認められるもの，また負の相関性が認められるもの等があると報告している．しかし，スズキについては体長とセレン含有量との相関性について明確ではない．本調査においてもスズキ中のセレン含有量と体長の相関性を明らかにすることはできなかったが，これは大型の成魚に偏ったサンプリングに問題があったと考えられ，

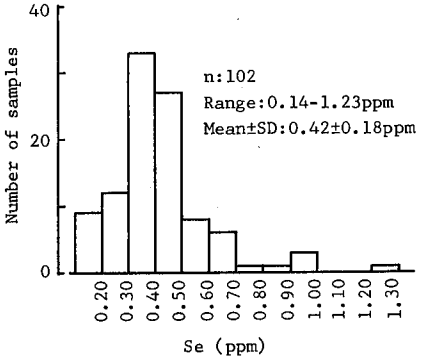


Fig. 3. Histogram of Selenium Contents in Sea-bass

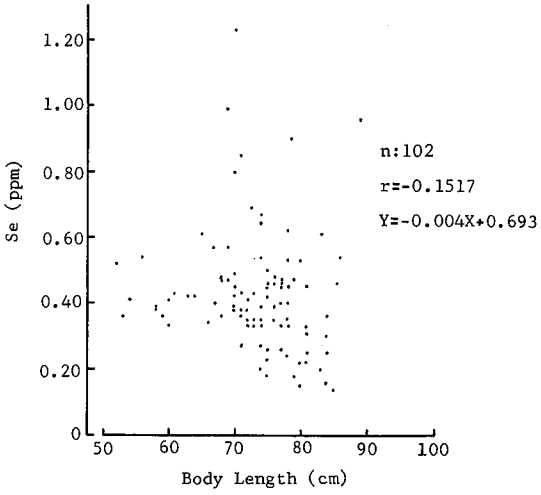


Fig. 4. Correlation Between Body Length and Selenium Content of Sea-bass

今後更に検討する必要がある．しかし，少なくとも体長60cm 以上の成魚のスズキについてはセレン含有量と体長との相関性は認められないと結論でき，また水銀については体長と総水銀含有量の相関を認める結論を得た．

さらに，スズキ中の総水銀含有量とセレン含有量の相関について検討を行った．その結果は Fig. 5．の散布図に示すとおりで，相関係数も r ＝0.1149と低く相関性は認められなかった．ただしこの結論は今回調査対象とした体長60cm 以上の成魚スズキについてのものであり，スズキの若齢魚であるセイゴ，フッコ等を含めた相関性の検討が今後の課題といえる．

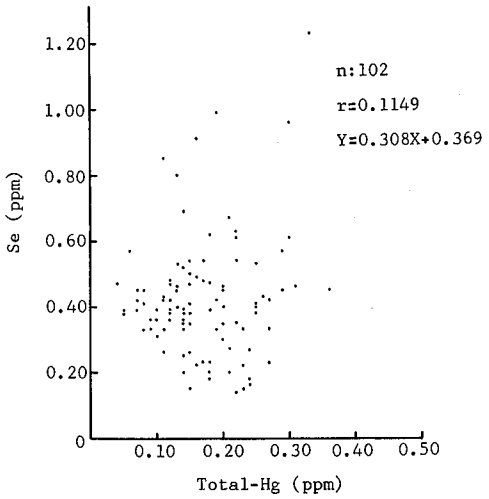


Fig. 5．Correlation Between Total Mercury and Selenium Content of Sea-bass

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．

文　献

1）Ganther, H.E., Goudie, C., Sunde, M.L., Kopecky, M.J., Wangner, P., Sang-Hwan Oh. and Hoekstra, W.G.：*Sciesce*, 175, 1122-1124, 1972

2）Ganther, H.E. and Sunde, M.L.：*J. Food Sci.*, 39, 1-5, 1974

3）Stillings, B.：*Nutr. Reviews*, 31, 27, 1973

4）Stillings, B.R., Langally, H., Bauersteld, p. and Soares, J.：*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 30, 243-254, 1974

5）Kai, N., Ueda, T., Takeda, Y. and Kataoka, A.：*Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 1967, 1987

6）山野辺秀夫，竹内正博，水石和子，渡辺四男也：東京衛研年報，38，167-172，1987

7）山野辺秀夫，竹内正博，風間成孔：東京衛研年報，35，184-186，1984

8）板野一臣，佐々木清司，岡村一弘，立川　涼：食衛誌，18，547-552，1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 104-107, 1988

東京都におけるPCB汚染の実態について（第16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 (XVI) 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41年（1966年），ヨーロッパ，アメリカ等の広範な地域における，Polychrorinated biphenyl（PCB）による魚鳥類をはじめとする環境汚染が指摘された[1]が，国内においても，昭和43年，カネミ油症事件が発生したことなどから急速に環境汚染問題についても注目される様になった．厚生省は昭和47年，米国に続き，日本におけるPCBの製造，輸入ならびに使用を禁止した[2]．

以来，著者らはこの食品中のPCB残留規制に基づいて，東京都内に流通する魚介類をはじめとする種々の食品ならびに調理用器具類のPCB汚染調査を行っている[3]．これまでの調査結果によれば，規制前に比べて汚染は明かに減少してきている．しかし，PCBの環境の中での分解は非常に遅く，いまだ，食物連鎖等を通して汚染が続いている．

本報においては昭和61年度中に行った，日本近海産魚介類をはじめ，近年，ますます増加する外国産魚介ならびに各種食品，調理用器具類中のPCB含有量の調査結果について報告する．

調査方法

調査試料　昭和61年4月～昭和62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48種172検体，水産加工品40検体，食肉6種30検体，食用油脂2種18検体，卵20検体，ベビーフード20検体，育児用粉乳10検体，牛乳20検体，バター10検体，チーズ21検体，調理用器具類10検体および東京湾汚染モニタリングのために東京都捕獲スズキ10検体の合計381検体である．

定量法　厚生省環境衛生局PCB分析班による統一分析法[4]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

Table 1に市場入荷魚介類の可食部のPCB含有量を示す．魚介類の名称は一般流通商品名にほぼ従い．英名および学名は日本魚名大辞典[5]，原色日本淡水魚類図鑑[6]，新日本動物図鑑[7]，新顔の魚[8]等を参考とした．

近海魚　日本近海で捕獲された魚介類27種118検体中最も高い値を示した魚種はタチウオの0.51ppm（n＝3，$\bar{x}$＝0.37），次いでカマスの0.28ppm（n＝5，$\bar{x}$＝0.14），イワシの0.24ppm（n＝10，$\bar{x}$＝0.06）の順であった．例年高い値を示すコノシロ[3]については本年度1検体のみであり，0.08ppmであった．養殖魚として知られるハマチは0.08ppm（n＝6，$\bar{x}$＝0.05）と経年的な変化ならびに出荷地による差異も少ない．しかし．前年度高い値を示したアナゴ（0.41ppm）[3]は0.08ppm（n＝4，$\bar{x}$＝0.05）であり，この違いは産地により生じたものと考えられる．一方，例年低い値を示すものにはイカ，イサキ，トビウオ等がある．

これらの国内産海水魚介118検体中0.01ppm以上のPCB検出魚介は100検体（84.7％）と前年度よりやや増加したが，平均値は0.05ppmであり．過去数年間，同

*東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科　169　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, 169 Japan

Table 1. Concentrations of PCB in Fishes

samples	N	range(ppm)	average(ppm)
(marine fish)			
Aji (horse-mackerel, *Trachurus trachrus*)	10	0.01-0.02	0.01
Amadai (Horse-head, *Branchiostegus japonicus*)	1		0.00
Anago (conger ell, *Astrokonger myriaster*)	4	0.02-0.08	0.05
Bora (gray mullet, *Mugil cephalus*)	1		0.05
Gindara (black cod, *Anoplopoma fimbria*)	1		0.03
Hamachi (yellow tail, *Seriola quinqueradiata*)	6	0.03-0.08	0.05
Isaki (grunt, *Parapristipoma trilineatum*)	4	0.00-0.01	0.01
Iwashi (sardine, *Sardinos melanosticta*)	10	0.02-0.24	0.06
Kaki (oyster, *Crassotrea gigas*)	3	0.02-0.04	0.03
Kamasu (barracuda, *Sphyraena japonicus*)	5	0.05-0.28	0.14
Katsuo (bonito, *Katsuwonus pelamis*)	6	0.00-0.02	0.01
Kichiji (*Sebastolobus macrochir*)	6	0.01-0.06	0.03
Kinme-dai (alfoncino, *Beryx splendens*)	4	0.01-0.05	0.03
Kisu (sillago, *Sillago sihama*)	1		0.00
Konoshiro (gizzard shad, *Clupanodon punctatus*)	1		0.08
Kuromaguro (black tuna, *Thunnus thynnus*)	1		0.03
Makogarei (marbled sole, *Limanda yokohamae*)	2	0.04-0.06	0.05
Mebaru (gopher, *Sebastes inerumis*)	5		0.01
Nishin (herring, *Clupea pallasi*)	5	0.02-0.09	0.04
Nitari-kujira (*Balaenoptera edeni*)	1		0.02
Saba (mackerel, *Pneumotophrous japonicus*)	7	0.01-0.06	0.03
Sanma (mackerel pike, *Cololsbis saira*)	10		0.01
Sawara (*Scomberomorus niphonius*)	6	0.02-0.16	0.07
Surume-ika (saguttated calamary, *Todarades pacificus*)	7	0.00-0.02	0.01
Tachiuo (hairtail, *Trichiurus lepturus*)	3	0.20-0.51	0.37
Tobiuo (flying fish, *Prognichthys agoo*)	5	0.00-0.01	0.00
Yariika (*Doyteuthis bleekeri*)	1		0.00
total	118	0.00-0.51	0.05
Suzuki (perch, *Lataolabrax japonicus*)*	10	0.11-1.12	0.41
(marine fish trawled)			
Aohirasu	5	0.00-0.01	0.00
Angorarenko-dai (*Dentex angolensis*)	1		0.00
Argentine-madai (*Pagrus pagrus*)	5	0.00-0.01	0.00
Gin-sawara	1		0.01
Gin-dara (black cod, *Anoplopoda fimbria*)	5	0.03-0.44	0.14
Houbou (gurnard, *Chelidonichthys*)	1		0.00
Karasugarei (black halibut, *Reinhardtius*)	2	0.02-0.11	0.06
Kinme-dai (alfoncino, Beryx splendens)	1		0.01
Komonwareha	2		0.00
Kuromutsu (*Scombrops gilberti*)	1		0.02
Managatsuo (harvest fish, *Pampus argentenus*)	4	0.00-0.02	0.01
Mongo-ika (*Sepia esculenta*)	7	0.00-0.01	0.00
Nishin (herring, *Clupea pallasi*)	4	0.07-0.12	0.09
Silver (Seriolella maculata)	1		0.00
Tachiuo (hairtail, *Trichiurus lepturus*)	3	0.00-0.01	0.00
total	42	0.00-0.44	0.02
(Limnetic fish)			
Ayu (ayu sweetfish, *Plecoglossus altivelis*)	3	0.00-0.01	0.01
Iwana (Japanese char, *Salvelinus pluvius*)	2	0.00-0.01	0.00
Koi (carp, *Cyprinus carpio*)	1		0.01
Nijimasu (rainbow trout, *Salmo gairdnerii irideus*)	2		0.00
Unagi (eel, *Anguilla japonica*)	3		0.02
Yamame (masu trout, *Oncorhynchus masou*)	1		0.00
total	12	0.00-0.02	0.01

N : number of samples
* collected from Tokyo-bay

じ傾向である．

外国産魚　近年，台湾，中国，フィリピン，タイ，韓国等よりエビ類，イカ，タコ，ウナギ等のいわゆる高級魚類の市場外輸入が増えており[8]，これらについては品目の一部ではあるがすでにPCB汚染調査結果を報告してきた[3]．

その他に，ニュージーランド，インド，アフリカ，アルゼンチン，カナダ，グリーンランド，ノルウェー等の海域において，主としてトロール漁法により捕獲され，市場に入荷するものがある．これらも一般市場あるいは外食産業等を通じて広く消費されている．

今回調査した外国産魚介は15種42検体であった．最高値はギンダラであり，南アメリカ産の0.44ppm，次いでアラスカ産の0.15ppm（n＝5，x̄＝0.14）であった．ノルウェー産のニシンは0.12ppm（n＝4，x̄＝0.09）と例年高く，ベーリング海のカラスガレイも0.11ppmであった．

一方，低濃度魚の捕獲地を見ると，インド（マナガツオ），モロッコ（モンゴイカ），南アフリカ（タチウオ），ニュージーランド（クロムツ，コモンワレハ＝メダイ，ホウボウ，アンゴラレンコダイ，キンメダイ，タチウオ，ギンサワラ），アルゼンチン（アルゼンチンマダイ）が挙げられるが，この事は，これらの海域のPCB汚染が低いことを示している．これらの魚介類中0.01ppm以上のものは20検体（47.6%），平均値は0.02ppmであった．

この検出率は前年の2.7倍におよぶ大巾な増加であり，平均値も2倍高い値となっている．この理由は調査魚種が約1／2に減少したことおよびニシン，ギンダラ等の汚染魚が多かったためと考えられる．

淡水魚　国内産養殖魚の6種12検体について調査した．最高値はウナギの0.02ppm（n＝3．x̄＝0.02）であり，0.01ppm以上の検出率は58.3%，平均値は0.01ppmであった．これは前年度とほぼ同じ傾向である．

東京湾の汚染調査湾内で捕獲したスズキ（体長77.3±7.2cm，体重3.9±0.8kg，n＝10）について調査した．最高値は1.20ppm（n＝10，x̄±S.D.＝0.40±0.31）であった．例年とほぼ同じく横這傾向である．

Table. 2に水産加工品，肉類等のPCB含有量を示す．

水産加工品　最も高い値はアンコウの肝臓水煮（缶詰）の0.28ppm，次いで鮒寿しの0.17ppm，数の子ニシン，ヒシコイワシの油漬（アンチョビー）の0.10ppmの順であった．各種カマボコ（n＝6，x̄＝0.00），塩辛類（n＝3，x̄＝0.01），ウニのビン詰類，ランプフイシュの卵，魚のスリ身，干物等は共に低い値であった．水産加工品の平均値は0.03ppmであった．

肉類　牛，豚，鶏の肉および肝臓各々5検体について調査を行った．豚肉3検体，牛肉1検体，鶏肉1検体，豚および牛肝臓各々2検体より0.01ppmを検出した．

食用油脂　ラードからは検出しなかったが，ガチョウ油脂（缶詰）より0.03ppmを検出した．

卵　20検体中4検体より0.01ppmを検出した．

Table 2. Concentrations of PCB in Marine Products, Meats and Others

samples	N	range(ppm)	average(ppm)
Processed marine product	40	0.00-0.48	0.03
Meat			
pork	5	0.00-0.01	0.01
pig liver	5	0.00-0.01	0.00
beef	5	0.00-0.01	0.00
cow liver	5	0.00-0.01	0.00
chicken	5	0.00-0.01	0.00
chicken liver	5		0.00
Edible fat			
lard	17		0.00
goose	1		0.03
Egg			
hen	20	0.00-0.01	0.00
Infant food	20		0.00
Tableware and kitchenware	10	0.00-0.02	0.01

N：number of samples

Table 3. Concentrations of PCB in Milk and Milk Products

samples	N	range(ppm)	average(ppm)
Butter	10	0.00-0.03	0.01
Cheese	21	0.01-0.15	0.03
Formulated milk	10		0.00
Milk	20		0.00
total	61	0.00-0.15	0.01

N：number of samples

ベビーフード　肉，肝臓，魚，卵などと野菜，米類を煮てビン詰したもの，あるいは，これらを粉砕し，凍結乾燥したのちパッキングしたものなど様々である．今回調査した20検体から検出しなかった．

調理用品　10検体中，煮だし袋，紙皿より各々0.02ppm その他2検体より各々0.01ppm を検出した．しかし，ストロー，ファッション箱等のプラスチック製品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．

牛乳20検体および育児用粉乳10検体のいずれからも PCB を検出しなかった．バターの最高値は0.04ppm であり．次いで0.02ppm のものが各1検体，0.01ppm 以上の検出率は50％であった．一方，チーズの中でナチュラルチーズには例年比較的高い値のものが認められる（0.13ppm[9]，0.09ppm[10]，0.05ppm[3]）．今回行った調査においても，ナチュラルチーズ21検体中，輸入ナチュラルチーズより0.15ppm，0.12ppm のものが各1検体認められ，調査検体の全てより0.01ppm 以上の PCB を検出した．

ま と め

昭和61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）Jensen, S., New Scientist, 32, 612, 1966
2）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」
3）植田忠彦，竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：東京都衛研年報，38，173-176，1987
4）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）
5）日本産魚名大辞典，日本魚類学会編，1981，三省堂
6）宮地傳三郎，川那部浩哉，水野信彦著，原色日本淡水魚類図鑑，1984，保育社
7）岡田　要著，新日本動物図鑑(上，中，下)，1969，北隆館
8）水産庁「昭和62年度漁業白書」
9）岸本清子，竹内正博，風間成孔：東京衛研年報，35，175-178，1984
10）植田患彦，竹社正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：東京衛研年報，37，158-162，1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 39, 108-111, 1988

養殖魚中に残留するTC系抗生物質検査法の開発

神保勝彦*, 百瀬礼子*, 丸山務*,
松本昌雄*

An Improvement on the Detection Method for Residual Tetracyclines in Cultured Fish

KATSUHIKO JINBO*, REIKO MOMOSE*, TSUTOMU MARUYAMA*
and MASAO MATSUMOTO*

Keywords：残留 TC 系抗生物質 residual tetracyclines, 養殖魚 cultured fish, SEP-PAK C_{18}カートリッジ SEP-PAK C_{18} cartridge, *Bacillus cereus*

近年，わが国の魚の養殖は著しく発展を遂げ，大規模化し，過密飼育の形態をとるようになった．その発展した要因の一つに抗菌性物質の開発応用がある．その中でテトラサイクリン系（TC系）抗生物質は過密飼育に伴って発生する疾病の治療，予防に多量に使用されていることから，養殖魚への残留が懸念されている．

残留TC系抗生物質検査法としては，厚生省が通知した「畜水産食品中の残留物質検査法」（以下，厚生省法と略す）がある．このうち，第1集[1]は残留抗生物質の個別検査法であり，各種抗生物質別に検査法が異なるために，食品中に残留する不明の抗生物質を検査するには極めて困難であり実用性に乏しいことが指摘されている．一方，第1集の5[2]の簡易検査法は簡易スクーリニングテストとして現場で応用されているが，検出感度が低いことから低濃度のものを検出できない欠点があり，特にTC系抗生物質に対する検出感度が悪い難点がある．また，第1集の3[3]の分別同定法は低濃度に残留するTC系抗生物質も分別同定することができるが，試験操作が極めて繁雑なため，日常検査法として実用性に乏しい．

そこで，著者らは厚生省法の分別同定法と同程度の検出感度を有する簡易迅速検査法について検討した．その結果，分別同定法に改良を加えた検査法を考案した．併せて，本法を用いて市販養殖魚のTC系抗生物質残留実態調査を行ったので報告する．

実験材料および方法

1．供試菌株

実験に供した指標菌の菌株は，*Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341（以下，*B. cereus*, *B. subtilis*, *M. luteus* と略す）の3株である．

2．使用培地

TC系抗生物質検出用培地として Antibiotic medium 2（Difco）を用いた[4]．

3．抗生物質標準品

実験に供した抗生物質は，水産用医薬品として使用基準が定められている塩酸オキシテトラサイクリン（OTC）および塩酸クロルテトラサイクリン（CTC）の2種類で，いずれも製薬会社から分与された標準品である．

4．0.01M EDTA-2Na マキルベン緩衝液

0.1Mクエン酸溶液12.29m*l* に0.2Mリン酸二ナトリウム7.71m*l* を加え，これに0.1Mエチレン四酢酸二ナトリウム（EDTA-2Na）を2m*l* 加え調製した．

5．pH 4.5 リン酸緩衝液

厚生省法の個別検査法に従って調製した．

6．ミニカラム C_{18} カートリッジ

ウオターズ社製の SEP-PAK C_{18} カートリッジ（SEP-PAK）をメタノール5m*l*, 蒸留水5m*l*, 飽和EDTA-2Na溶液5m*l* の順に湿潤洗浄処理して用いた[5]．

*東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科　169　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, 169 Japan

7．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㈱製の直径10mm，厚さ1.5mm（吸水量0.08ml±0.01ml）のパルプディスクを121℃，15分間高圧滅菌し，十分乾燥させてから用いた．

8．試験菌液および芽胞浮遊液の調製

厚生省法の個別検査法および簡易検査法に従って調整した．

9．試験液の調製

著者らが考案したSEP-PAK を用いる方法（以下，都衛研法[6]）に従って調製した．すなわち，図1に示したように，試料10g に0.01M EDTA-2Na マキルベン緩衝液30ml を加えホモジナイズし，3,000rpm で15分間遠心分離した．上清液にヘキサン10ml を加え振とうした後，3,000rpm で15分間遠心分離した．水層（下層）を分取し．これにクロロホルムを同量加え，振とうした後，3,000rpm で15分間遠心分離した．水層（上層）を分取し，これを1.5ml／min の流速で SEP-PAK 中を通筒させた．SEP-PAK は蒸留水10ml を通筒し洗浄した後，メタノール5 ml で TC 系抗生物質を溶出した．溶出液は40℃以下で減圧乾固し，その残渣を pH4.5リン酸緩衝液1 ml に溶解し，これを試験液とした．

試　料 10g
　| 0.01M EDTA-2Na マキルベン緩衝液 30ml
　| ホモジナイズ
　| 遠心分離 3,000rpm 15分間
上清液
　| ヘキサン 10ml
　| 遠心分離 3,000rpm 15分間
水　層（下層）
　| 同量のクロロホルム
　| 遠心分離 3,000rpm 15分間
水　層（上層）
　|
SEP-PAK C_{18} カートリッジ
　| 蒸留水 10ml
　| メタノール 5ml
溶出液
　| 減圧乾固 40℃以下
残　渣
　| pH4.5 リン酸緩衝液 1 ml
試験液
　|
パルプディスク
　|
B. cereus 平板培地

図1．養殖魚中の TC 系抗生物質検査法

10．試験法

試験液中にパルプディスクを浸漬し，これを厚生省法の簡易検査法に記載されている方法に準じて作製した平板培地に置いた．30℃，18時間培養し，出現した阻止円の直径が12mm 以上のものを陽性とした．

実験結果および考察

1．OTC および CTC に対する試験菌の感受性

厚生省法の個別検査法および分別同定法の検査法では *B. cereus* が試験菌として使用されているが，簡易検査法では *B. cereus* は試験菌でなく，*B. subtilis* と *M. luteus* が試験菌として使用されている．そこで，OTC および CTC に対するこれら3試験菌の感受性を調べ，その検量線を図2に示した．OTC に対して最も高い感受性を示したのは *B. cereus* で0.25 μg／ml，以下，*B. subtilis* が0.5 μg／ml，*M. luteus* が2.5 μg／ml であった．3試験菌の検量線勾配はほぼ同じであった．

CTC に対しても3試験菌の感受性は同様の傾向が見られ，最も高い感受性を示したのは *B. cereus* で0.05 μg／ml，以下，*B. subtilis* が0.1 μg／ml，*M. luteus* が0.5 μg／ml であった．

このことから，OTC および CTC の試験菌としては *B. cereus* が適当であることが判明した．

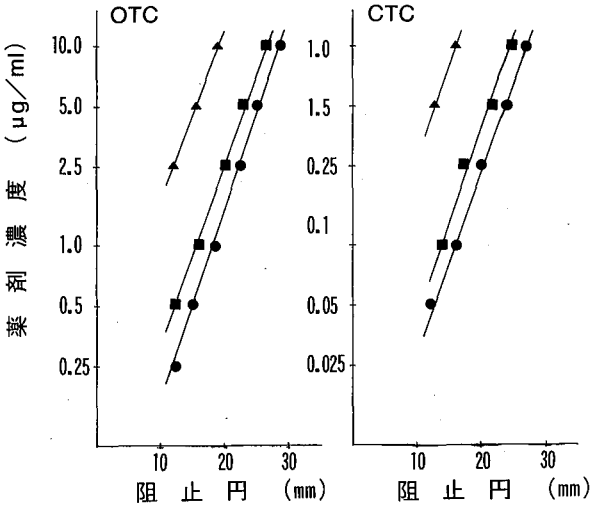


図2．OTC および CTC に対する試験菌の検量線

●：*B. cereus*　■：*B. subtilis*　▲：*M. luteus*

2．養殖魚中のOTCおよびCTCの検出

ハマチ筋肉へOTCを0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 μg／g添加し，都衛研法で回収実験を試み，同時に厚生省法の個別検査法，分別同定法および簡易検査法でも回収実験を行い，その成績を表1に示した．都衛研法の検出感度は0.05 μg／gであり，これは分別同定法とほぼ同じであった．これに対して，個別検査法の検出感度は1.0 μg／gであり，簡易検査法の検出感度は1.0 μg／g以上であった．

次に，ハマチ筋肉へCTCを0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 μg／g添加し，OTCと同様に回収実験を行い，その成績を表2に示した．都衛研法の検出感度は0.01 μg／gであり，これは分別同定法とほぼ同じであった．これに対して，個別検査法は0.5 μg／g，簡易検査法は0.5 μg／g以上であった．

このように，都衛研法の検出感度が個別検査法および簡易検査法に比べて高かったのは，分別同定法と同様に濃縮法であるためと考える．これに対して，個別検査法と簡易検査法は希釈法であり，さらに個別検査法の試験法は二層培地・円筒法であること，簡易検査法はTC系に感受性の高い *B. cereus* を試験菌としていないことなどから，検出感度が低かったものと考える．また，都衛研法の試験操作は簡易迅速であり，1回で検査できる検体数は分別同定法の10倍以上であった．

3．市販養殖魚からの残留TC系抗生物質の検出

1984年4月～1987年3月の間に，都内で採取した市販の養殖魚67検体について，都衛研法を用いてTC系抗生物質の検出を試みた．なお，エビ以外の検体は筋肉，内臓，エラの3部位を対象に検査した。その成績は表3に示した．67検体中7検体（10.4%）から抗菌性物質が検出された．その内訳は，ウナギ20検体中4検体（20.0%），ニジマス17検体中2検体（11.8%），ハマチ11検体中1検体（9.1%）であり，これら以外からは検出されなかった．なお，抗菌性物質が検出された部位は，筋肉，内臓，エラの全部位から検出されたのがウナギおよびハマチの各1検体であった．内臓，エラの2部位から検出されたのはウナギ2検体，ニジマス1検体，内臓からだけ検出されたのはウナギおよびニジマスの各1検

表1．各検査法によるハマチ筋肉からのOTC検出成績

検査法	試験菌	OTC添加量（μg／g）						
		0	0.025	0.05	0.1	0.25	0.5	1.0
都衛研法	*B. cereus*	−	−	+	+	+	+	+
厚生省法 個別検査法	*B. cereus*	−	−	−	−	−	−	+
厚生省法 分別同定法	*B. cereus*	−	−	+	+	+	+	+
厚生省法 簡易検査法	*B. subtilis*	−	−	−	−	−	−	−
	M. luteus	−	−	−	−	−	−	−

＋：12mm以上の阻止円

表2．各検査法によるハマチ筋肉からのCTC検出成績

検査法	試験菌	CTC添加量（μg／g）						
		0	0.005	0.01	0.05	0.1	0.25	0.5
都衛研法	*B. cereus*	−	−	+	+	+	+	+
厚生省法 個別検査法	*B. cereus*	−	−	−	−	−	±	+
厚生省法 分別同定法	*B. cereus*	−	−	+	+	+	+	+
厚生省法 簡易検査法	*B. subtilis*	−	−	−	−	−	−	±
	M. luteus	−	−	−	−	−	−	−

＋：12mm以上の阻止円，±：12mm未満の阻止円

表3．市販養殖魚からのTC系抗生物質の検出成績

検体名	検体数	陽性数(%)	TC系抗生物質検出部位		
			筋肉・内臓・エラ	内臓・エラ	内臓
ウナギ	20	4 (20.0)	1	2	1
ニジマス	17	2 (11.8)		1	1
その他（淡水魚）	8	0			
ハマチ	11	1 (9.1)	1		
エビ	6	0			
その他（海水魚）	5	0			
合計	67	7 (10.4)	2	3	2

体であった．抗菌性物質が検出された検体については，その試験液を用いて，厚生省法の分別同定法に記載されているバイオオートグラフィに従って同定を行った結果，全検体がOTCあるいはCTCに同定された．

現在，水産用医薬品として許可されている抗菌性物質の中で，クロロホルムに移行せず，水層に分配され，オクタデシルシラン（SEP-PAK）に吸着し，メタノールで溶出されるのはOTCとCTC以外にはないことから，都衛研法で検出される残留抗菌性物質は，TC系抗生物質である可能性が極めて高いものと考える．

また，この応用実験結果から，都衛研法は筋肉だけでなく，組織成分の影響により筋肉とは異なる抽出操作が必要とされている内臓およびエラにも十分応用できることが判明した．なお，養殖魚の中には内臓およびエラが食用とされる場合もあることから，これらの部位についても検査する必要があると考える．

結　論

養殖魚中に残留するTC系抗生物質を簡易，迅速に検出する検査法を考案した．

その検査法（都衛研法）は，厚生省法の分別同定法を改良した方法である．残留TC系抗生物質をSEP-PAKに吸着させ，その溶出液を濃縮し，これを試験液として，*B. cereus*で検査する簡易，迅速法で，1回で検査できる検体数は分別同定法の10倍以上であった．

本法の検出感度は，OTCが0.05 μg／g，CTCが0.01 μg／gであり，厚生省法の分別同定法の検出感度とほぼ同じであった．

本法を用いて，市販の養殖魚67検体を検査した結果，7検体（10.4%）からTC系抗生物質が検出された．

本法は，筋肉だけでなく，内臓およびエラにも応用することができた．

文　献

1）厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜産物中の残留物質検査法　第1集，1977
2）厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜水産食品中の残留物質検査法　第1集の5，1983
3）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3，1981
4）桐谷礼子，神保勝彦，松本昌雄：東京衛研年報，38，177-181，1987
5）竹葉和江，神崎政子，村上文子，松本昌雄：東京衛研年報，35，187-191，1984
6）神保勝彦，桐谷礼子，竹葉和江，松本昌雄：日本食品衛生学会第49回学術講演会　講演要旨集，1985

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 112-115, 1988

無菌充填包装食品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*, 守安貴子*, 二島太一郎*

Contents of Hydrogen Peroxide in Aseptic Packaging Foods

YOKO KIKUCHI*, KAZUO SAITO*, MITSUO NAKAZATO*,
KENJI FUJINUMA*, TAKAKO MORIYASU*
and TAICHIRO NISHIMA*

Contents of hydrogen peroxide in various foods were determined by the oxygen electrode method.

Hydrogen peroxide was analyzed in 43 commercial foods put into containers that had been sterilized with hydrogen peroxide or with another procedure.

Hydrogen peroxide was detected in 20 commercial foods, remarkably in coffee jellies in the range of 1.8-10.6 μg/g.

Prepared coffee and homemade coffee jellies were measured by the same method.

A cup of coffee of normal strength was found to contain 7.0 μg/ml of hydrogen peroxide and coffee jellies, made of the coffee above, were found to contain that in the range of 4.6-4.8 μg/g.

Data of this report were interpreted to mean that hydrogen peroxide in coffee jellies was derived from that contained in coffee.

Keywords: hydrogen peroxide, oxygen electrode method, aseptic packaging food, coffee, coffee jelly

緒　言

食品とその容器の殺菌[1]には，食品については現在加熱滅菌が主流であるが，容器の殺菌には，加熱，薬剤による方式，紫外線照射による方法などが用いられている．

近年特に繁用されるようになったプラスチック容器や多層式フィルム容器，紙容器などの殺菌には，過酸化水素を用いた薬剤殺菌[2]が一般的に行われている．

1987年10月，清涼飲料水の容器を殺菌する目的で使用された過酸化水素が，製品中に多量に残留したことが原因となり，異味，異臭，のどの痛みなどの苦情が発生し問題となった[3]．

これを契機に，実際に過酸化水素による無菌充填包装システムを採用している工場の製品及び過酸化水素殺菌容器に充填されたと考えられる市販食品について，過酸化水素含有量の調査を行い，若干の知見を得たので報告する．

実験方法

1．試　料　1987年11月に，都内の，過酸化水素を使用した容器殺菌方式を採用している工場で製造された製品13検体及び同年11月都内で販売されていた，過酸化水素により殺菌された容器で包装されたと推定された市販食品30検体を用いた．

2．試　薬　過酸化水素標準溶液，リン酸緩衝液：既報[4]に従って調製した．

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：すべて市販特級品を用いた．

3．装　置　過酸化水素微量測定装置：オリエンタル電気㈱製 ORITECTOR® MODEL-Ⅲ

4．過酸化水素の測定　厚生省環境衛生局食品化学課

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169　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, 169 Japan

編，食品中の食品添加物分析法[5]及び既報[4]に従って測定した．

結果及び考察

1．無菌充填包装食品中の過酸化水素含有量　殺菌の目的で過酸化水素処理した紙容器に，滅菌した内容物を充填する方式は，以前から牛乳について行われていたが，現在では，紙容器入りの清涼飲料水やポーションパックのコーヒー用クリーム，プラスチックカップに充填されたゼリーやプリンなどに広く応用されている．

これらの容器は食品を充填する直前，容器となる包材に30％以上の過酸化水素水を，浸漬，噴霧，塗沫のいずれかの方法で作用させた後，100℃以上の熱風を噴霧して滅菌，過酸化水素の除去を行うものであるが，熱風による除去が完全に行われないと製品中に過酸化水素が残留し，事故が発生する場合がある[3]．

今回は，最終製品である食品中への過酸化水素の残留性などを知る目的で，実際にこのシステムを採用している製造工場の製品（以下工場製品と略す）と，市販されている製品（以下市販品と略す）について，本法に従い試験を行った．なお，今回の調査結果は酸素電極法により測定したものであるため，カタラーゼ分解で酸素を生成するものを過酸化水素として定量した．

その結果は表1及び表2に示した．工場製品13検体及び市販品30検体について分析したところ，各種食品20検体より過酸化水素が検出された．

乳製品含有清涼飲料水で0.1 μg／ml，コーヒーゼリーを除いたゼリー菓子，プリンなどから0.3～1.3 μg／g と微量の過酸化水素が検出された．これらの多くは乳を含有する製品であった．

脂肪含量の多いしらす干しや乳及び乳酸菌を用いて製造されたヨーグルト製品などから微量ではあるが過酸化水素が検出されるという報告[6]もあることから，これらの結果はいずれも容器殺菌による残留ではなく，食品に由来するものであると考えられる．

しかし，コーヒーゼリーからは，工場製品で4.8，5.4 μg／g，市販品で1.8～10.6 μg／g と比較的高い値の過酸化水素が検出された．また微量ではあるがコーヒー飲料からも0.1，0.9 μg／ml の過酸化水素が検出された．

これらのコーヒー製品の過酸化水素について検討を行った．

2．コーヒー製品中の過酸化水素の検出原因

i）コーヒーゼリー　工場製品及び市販品のコーヒーゼリー5検体について検査した結果を表3に示した．

四社の製品について検討したところ，A社製品の2検体はロットの違いはあったがほぼ同一の値を示し，その他各社の製品はそれぞれ異なった値を示した．また，過酸化水素殺菌方式の工場製品とその他の市販品との間には過酸化水素含有量に特に有意の差は認められなかった．

これらのことから，コーヒーゼリー中の過酸化水素は

表1．工場製品の調査結果

試　　料	試料数	過酸化水素（μg／g）
コーヒー飲料	1	0.9＊
乳製品含有清涼飲料水	1	0.1＊
液状コーヒー用クリーム	1	ND
ゼリー菓子（コーヒーゼリーを除く）	2	ND
コーヒーゼリー	2	4.8，5.4
プリン類	5	ND
豆腐	1	0.4

ND：0.1 μg／g 未満
＊：μg／ml

表2．市販食品の調査結果

試　　料	試料数	過酸化水素（μg／g）
コーヒー飲料	1	0.1＊
液状コーヒー用クリーム	3	ND
ゼリー菓子（コーヒーゼリーを除く）	9	ND～1.3
コーヒーゼリー	3	1.8～10.6
プリン類	7	ND～0.6
ムース	1	ND
スープ(クリームタイプ)	3	ND～0.3
ドレッシング	1	0.7
豆腐	2	ND

ND：0.1 μg／g 未満
＊：μg／ml

表3．コーヒーゼリー製品中の過酸化水素含有量

試　料	過酸化水素（μg／g）	備　　考
工場製品 1	5.4	A社(1987.11.4製造)
2	4.8	A社(1987.11.7製造)
市販品 1	2.8	B社
2	1.8	C社
3	10.6	D社

表4．自家製コーヒー及びコーヒーゼリー中の過酸化水素含有量

試　料	過酸化水素	備　考
コーヒー	7.0 μg／ml	キリマンジャロ
コーヒーゼリー 1	4.6 μg／g	
2	4.8 μg／g	

表5．コーヒー飲料中の過酸化水素含有量

試　料	過酸化水素 (μg／ml)	備　考
コーヒー飲料 1	0.9	紙容器入り
2	0.1	〃
3	1.7	缶入り

原材料であるコーヒーに由来することが考えられたので，実際にコーヒーを入れ，このコーヒーを用いてコーヒーゼリーを作製し，これらの過酸化水素含有量について検討を行った．その結果を表4に示した．

すなわち，粉砕したキリマンジャロコーヒー豆25gと水450mlを用い，ドリップ式のコーヒーメーカーでコーヒーを入れたところ，コーヒー中から7.0 μg／ml の過酸化水素が検出された．

さらに，このコーヒー400mlに砂糖20g及び温湯15mlに溶かしたゼラチン3gを加え，100℃で3分間加熱し溶解させた後氷冷し作製したコーヒーゼリーについて分析したところ，4.6及び4.8 μg／g の過酸化水素が検出された．

藤田ら[7]はコーヒー中の過酸化水素について，インスタントコーヒーを80℃の湯を用いて通常の濃度に入れた場合5 μg／ml 程度の過酸化水素が検出されたこと，また，ローストされたコーヒー豆を使用して入れたコーヒーからも過酸化水素が検出されたことなどを報告している．さらにこの報告では，ローストされていないコーヒー豆からも，微量ではあるが過酸化水素が検出され，その含量は豆をローストすることにより増加するとしている．

コーヒー豆の量や種類，ロースト条件などにより生成される過酸化水素量は異なると考えられるが，通常の方法で入れたコーヒーからは10 μg／ml 前後の過酸化水素が検出されるものと推察される．

したがって，今回コーヒーゼリーから検出された過酸化水素は，容器の殺菌に使用されたものが残留したのではなく，原材料であるコーヒーに由来したものであることが示唆された．

なお，作製したコーヒーゼリー中の過酸化水素含有量がコーヒーの割合に比較して低く検出された原因は，砂糖及びゼラチン添加による容量の増加のほかに，加熱したことやその他の成分との反応などが考えられるが，これらの理由については今後検討する予定である．

ii）コーヒー飲料　コーヒー，ミルク，砂糖などを用いて製造されたコーヒー飲料中の過酸化水素含有量を表5に示した．

コーヒー飲料からは0.1～1.7 μg／ml の範囲で過酸化水素が検出され，0.1 μg／ml 検出されたコーヒー飲料2については，コーヒーの含有量が特に少ないものであった．

また1.7 μg／ml 検出されたコーヒー飲料3は，過酸化水素による殺菌が行われないと考えられる缶容器に入れられた製品であった．

したがって，この結果からも，コーヒー飲料より検出された過酸化水素は，原材料に使用されたコーヒーに由来するものであると推定される．

まとめ

過酸化水素殺菌容器に充填された清涼飲料水中に，過酸化水素が多量に残留していたことによる，有症苦情事件が発生した．これを契機に，容器の殺菌に使用された過酸化水素の食品中への残留を調査する目的で，都内の工場製品13検体及び市販品30検体について，酸素電極法により過酸化水素の測定を行った．

その結果，数種の食品から過酸化水素が検出され，そのうち特に，コーヒーゼリーから比較的濃度の高い過酸化水素が検出された．

この原因について検討した結果，これは原材料であるコーヒーに由来するものと推察された．

また，その他の微量に検出された過酸化水素についても，容器殺菌用の過酸化水素が残留したものではなく，食品成分由来のものであると考えられた．

文　献

1）久米仁司：ジャパンフードサイエンス，7，59-69，1987.
2）永田政令：ジャパンフードサイエンス，5，65-69，1985.
3）真木俊夫，観　公子，永山敏廣，飯田真美，川合由華，二島太一郎：東京衛研年報，39，126-129，1988.
4）菊地洋子，斉藤和夫，中里光男，藤沼賢司，二島太

一郎：東京衛研年報，**38**，203-208，1987.
5）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.
6）豊田正武：食品衛生研究，**32**，5-16，1982.
7）Fujita, Y., Wakabayashi, K., Nagao, M. and Sugimura, T.：*Mutation Research*, **144**，227-230，1985.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 116-120, 1988

豆もやし及びカット野菜等中リンの溶出について

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*

Studies on the Release of Phosporus from Bean Sprouts, Taros and Vegetables in Storage

AKIHIRO IBE*, YUKIHIRO TAMURA*, HISASHI KAMIMURA*,
YOSHIKO NISHIYAMA*, SETSUKO TABATA*, HIDEKI HASHIMOTO*
and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords：野菜 vegetables, リン phosphorus, リン酸塩 phosphate, クエン酸 citric acid, *dl*-リンゴ酸 *dl*-malic acid, フィチン酸 phytic acid, 有機酸 organic acid

緒　言

生鮮野菜等にリン酸塩の使用が禁止されて以来，著者らは生鮮野菜等を対象としてリンの試験法ならびに使用判定基準値を作成し，市販品について実態調査を行ってきた[1]．62年度の調査結果では全体に使用例が減り，検出量も低くなってきているが，洗い里芋等においては判定基準値をわずかに超えるものが多く認められた．その原因がリン酸塩の使用によるものか，あるいはリン酸に代わる他の添加物の影響によるものか明らかではない．

一方，千葉ら[2]は豆もやしを著者ら[1]の方法で測定したとき，鮮度低下によりリン量が増加することを報告している．著者らも前報[1]において特に豆もやしでは，リン酸使用の有無の判定が難しいことを指摘した．そこで，豆もやしを含め基準値を超えることの多かった洗い里芋，根しょうが及びカット野菜を対象に，実際に保存用として使用されている添加剤が，また，室温，冷蔵保存することが，リンの溶出にどのような影響を与えるかについて検討を行ったので報告する．

実験方法

1．試　料

昭和62年10月東京近郊の2地区から収穫した里芋及びしょうが，また，昭和63年4月都内で市販されていた里芋，れんこん，ごぼう及び豆もやしを用いた．

2．野菜用添加剤

リン酸塩の代替えとして野菜等に使用されていた添加剤3種を用いた．

A剤：ポリフレシュE（L-アスコルビン酸23%，*dl*-リンゴ酸ナトリウム22%，*dl*-リンゴ酸15%，無水クエン酸35%，天然物5%）

B剤：ポリフレシュT（L-アスコルビン酸8%，焼ミョウバン10%，*dl*-リンゴ酸30%，無水クエン酸39%，フマル酸5%，天然物8%）

C剤：タイヨークリンFC（クエン酸・結晶10%，*dl*-リンゴ酸25%，ミョウバン5%，天然物60%）

いずれも太洋化学工業㈱製．

3．漬け液

上記の野菜用添加剤を実際に使用される用法通りに調製し，野菜の漬け液Ⅰ～Ⅳ液とした．

Ⅰ液：A剤1gを水に溶かし1*l*とした（pH3.4）．Ⅱ液：A剤5gを水に溶かし1*l*とした（pH3.3）．Ⅲ液：B剤0.42g，C剤0.58gを水に溶かし1*l*とした（pH3.0）．Ⅳ液：B剤0.42g，C剤1.74gを水に溶かし1*l*とした（pH2.8）．

4．試験溶液の調製，リンの定量及びpH測定

前報[1]に従った．

5．実験Ⅰ

1）里芋は皮をむき，水で洗った後次の方法で処理し

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169　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, 169 Japan

て，それぞれについて1，4，6日目にリン量の測定を行った．

①：Ⅰ液に1時間浸漬後，新たなⅠ液に漬け1～6日間室温に放置した．

②：Ⅰ液に1時間浸漬後，Ⅱ液に漬け1～6日間室温に放置した．

③：Ⅲ液に1時間浸漬後，Ⅳ液に漬け1～6日間室温に放置した．

コントロール：漬け液に代えて水を用い同様に操作した．

2）しょうがは茎を切り，水で洗った後（根しょうが）次の方法で処理して，それぞれについて1，4日目にリン量の測定を行った．

④：Ⅰ液に1時間浸漬後，新たなⅠ液に24時間漬けた後，水を切り室温に放置した．

⑤：Ⅲ液に1時間浸漬後，Ⅳ液に24時間漬けた後，水を切り室温に放置した．

コントロール：漬け液に代えて水を用い同様に操作し室温に放置した．

6．実験Ⅱ

里芋は皮をむき，れんこんは皮をむいて薄切りにし（厚さ2～3mm），ごぼうはささがきにして水洗いし，豆もやしはそのままを，次の4通りの条件で放置し（豆もやしは⑧⑨のみ），それぞれについて0，1，2，3，4，7日目にリン量の測定を行った．

⑥：水に漬け，室温（20～25℃）に放置した．

⑦：水に漬け，冷蔵庫内（3℃）に放置した．

⑧：水に漬けず，ビニール袋中で室温に放置した．

⑨：水に漬けず，ビニール袋中で冷蔵庫内に放置した．

結果と考察

1．添加剤使用時のリンの溶出

実験Ⅰの結果を表1に示した．里芋，根しょうがにおいて，いずれの処理方法によっても，リンの溶出が増加する傾向は特にはみられなかった．

里芋の場合，外観では添加剤使用のものはいずれも6日目まで白色を保ち変色しなかった．それに反しコントロールは日毎に褐変が進行した．しかし，いずれの処理方法でも6日目には発酵臭を呈したことから，外観の色とは別に鮮度低下が認められた．

一方，漬け液のpHは1日目の4.2～5.8より4日目が4.5～6.5と高くなり，以後ほぼ一定になった．これは浸漬中に里芋の内部の成分が溶出し，pHを上昇させたものと考えられるが，リン量の値に変化がないことから，フィチン酸などリン酸を含む成分の内表面からの溶出はないと考えられる．このことは，次のpHによるリンの溶出実験結果からも推定される．

表1．添加剤処理した野菜のリンの溶出

試料	処理方法	1日目		4日目		6日目	
		リン量(μg/g)	pH	リン量(μg/g)	pH	リン量(μg/g)	pH
里芋A	①	<0.5	5.0	<0.5	6.5	<0.5	6.3
	②	<0.5	4.6	<0.5	5.9	<0.5	5.4
	③	<0.5	4.2	<0.5	4.5	<0.5	4.7
	コントロール	<0.5	5.8	<0.5	6.5	<0.5	6.4
里芋B	①	<0.5	5.4	<0.5	6.5	0.6	6.4
	②	<0.5	4.7	<0.5	6.2	1.4	6.0
	コントロール	<0.5	5.8	<0.5	6.4	<0.5	6.1
根しょうがA	④	<0.5	5.0	<0.5	6.4		
	⑤	0.6	4.8	<0.5	5.6		
	コントロール	<0.5	6.1	<0.5	6.3		
根しょうがB	④	<0.5	5.0	<0.5	6.5		
	⑤	0.7	4.7	<0.5	6.2		
	コントロール	<0.5	6.6	<0.5	6.7		

①④：Ⅰ液に1時間浸漬後，Ⅰ液に漬けた．
②　：Ⅰ液に1時間浸漬後，Ⅱ液に漬けた．
③⑤：Ⅲ液に1時間浸漬後，Ⅳ液に漬けた．

里芋Bの②の6日目でリン量が1.4 μg/g検出されたものは，特に他に比べ腐敗が進んだために組織が壊れ，植物内のリンの溶出量が増加した可能性の高いことが示唆された．また，根しょうがでは特に外観，臭いに異常は認められなかった．以上のことから，アスコルビン酸や有機酸を含有する添加剤の使用はリンの溶出を高める作用はないと考えられる．

2．pHによるリンの溶出

今回用いた添加剤はそのpHが3前後と低いことから，pHによる影響についても検討を行った．表2に里芋及び根しょうがを，水及び各濃度の塩酸溶液に浸したときのリン量を示した．水を用いた場合，里芋，根しょうがでは各々pH5.6及び5.7，リン量はともに1 μg/g以下であった．しかし，塩酸を用いた場合pH1.9から0.5へと下がるに従い，リン量は里芋で<0.5 μg/gから1.8 μg/g，根しょうがで1.4 μg/gから2.1 μg/gと増加し，pHが低いほどリンの溶出量が増加することがわかった．リンの溶出に関係するフィチン酸は，松永ら[3]がpH 1以下で溶出しやすいと指摘している．

以上のことから，今回使用した添加剤はpHが3付近であり，フィチン酸が溶出してリン量に影響を与えることはほとんどないと考えられる．

3．鮮度低下とリンの溶出

実験Ⅰにおいて，腐敗等鮮度低下により植物内のリンが溶出することも考えられた．そこで，添加剤を用いず保存方法を種々変えて，里芋，ごぼう，れんこん，豆もやしについて放置する実験Ⅱを行い，結果を表3に示した．

里芋では⑥～⑨のいずれの条件においてもリン量は0.5 μg/g以下であり，7日目でも増加する傾向はみられなかった．外観，臭いでは，⑥の室温放置では7日目で若干褐色し，発酵臭を呈した．これに反し，⑦の冷蔵庫放置では異常は認められなかった．⑨の水に漬けず冷蔵庫放置では，3日目から褐変が始まった．⑧の室温放

表2．浸漬液のpHによるリンの溶出

試料 ＼ 浸漬液		水	0.02NHCl	0.15NHCl	0.6NHCl
里芋	リン量(μg/g)	<0.5	<0.5	2.9	1.8
	pH	5.6	1.9	1.0	0.5
根しょうが	リン量(μg/g)	0.9	1.4	1.9	2.1
	pH	5.7	1.8	1.0	0.5

表3．種々の保存条件におけるリンの溶出

試料	処理方法	リン量 (μg/g)					
		0日目	1日目	2日目	3日目	4日目	7日目
里芋	⑥	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
	⑦	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
	⑧	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
	⑨	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
ごぼう	⑥	3.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	5.5
	⑦	3.5	0.7	0.6	<0.5	<0.5	<0.5
	⑧	3.5	0.7	0.6	<0.5	<0.5	0.8
	⑨	3.5	2.1	0.9	0.5	0.5	<0.5
れんこん	⑥	14.8	1.4	1.2	1.8	3.5	6.6
	⑦	14.8	1.8	2.4	1.8	1.6	3.0
	⑧	14.8	8.1	13.5	8.7	8.8	13.3
	⑨	14.8	19.6	19.9	12.6	9.8	24.8

⑥：室温（20～25℃）・水漬け　⑧：室温
⑦：冷蔵庫（3℃）・水漬け　⑨：冷蔵庫

置では1日目から褐変が始まり，7日目で赤褐色となりカビが発生した．以上のように⑥⑧⑨で鮮度低下が明らかに認められたにもかかわらずリン量に増加が認められなかった．このことから，里芋の場合，鮮度低下がリンの溶出に関与しないと考えられる．

ごぼうでは1日目でいずれの条件においてもリン量の減少がみられたが，⑥の7日目の5.5 μg／g を除いて以後ほぼ一定となって変化がなかった．これは漬け水に植物内部のリンが溶出したためと考えられた．しかし，⑥の7日目のものは，褐変し腐敗臭を呈していたことから，腐敗が原因と考えられた．一方，同じ室温放置である⑧の7日目のものは，赤褐色で腐敗臭を呈していたにもかかわらず，0.8 μg／g と低い結果であったことは腐敗だけでなく，さらに水漬けか否かなど保存状態がリン溶出に大きく影響を及ぼすと考えられる．

れんこんでは，水漬けの⑥，⑦とも1日目で低い値を示した．これは漬け水中に表面のリンが溶出したためと思われる．⑥で3日目以降にリン量が除々に増加したのは，腐敗臭を呈したことから，これによるものと考えられた．⑧⑨の水漬けしなかったもののうち⑧の室温放置のものは1日目から褐変が始まり，7日目では腐敗臭とネトが観察された．⑨の冷蔵庫放置のものは日毎に褐変していった．いずれにしても，リン量の経時的な増加は認められなかった．れんこんは，ごぼうの場合と同様に，水漬け状態で腐敗した場合はリン量の増加がみられ，水漬けしていない状態では，腐敗しても特にリン量に変化はみられなかった．

豆もやしでは，表4に示したように，0日目でリン量が8.4 μg／g であったものが，室温，冷蔵庫内放置にかかわらず，日毎に増加傾向を示した．また，室温放置では3日目で92.1，140 μg／g と上昇したのに対して，冷蔵庫内放置では7日目でも9.0，38.9 μg／g と低く，保存温度の影響が大きくあらわれた．室温ではすでに3日目で腐敗臭が著しかったが，冷蔵庫のものは7日目になり初めて腐敗臭を呈した．いずれにしても豆もやしの場合，鮮度低下とリン量に明らかな関連が認められた．

以上のように，ごぼうやれんこんの水漬け及び豆もやしの場合は，腐敗等，品質劣化によるリン量の増加傾向がみられたが，その他の野菜の場合は特に明確な関係はみいだせなかった．里芋のように水漬けで腐敗してもリンの溶出がみられないなど，野菜によっても異なることがわかった．今回の実験で明らかなように，鮮度低下などからリン量が増加することがあるが，それはかなり腐敗が進んだ食に供しえない状態のものであった．通常市販されている品質状態では，いずれの野菜もリン量が著者らの設定した判定基準値を上回る可能性はないと考えられる．

これらのことから，市販品の実態調査で基準値をオーバーするものが今だにみられるのは，リン酸塩を使用した野菜が出回っていることを示唆しており，今後もさらに監視を続ける必要があるものと考える．

ま と め

1．リン酸塩に代わる数種の添加剤を用いて野菜等を処理した場合，リンの溶出量が増加する現象はみられなかった．

2．里芋，ごぼう，れんこん及び豆もやしをそれぞれ温度など保存状態を変え7日間放置したところ，豆もやし，ごぼう及びれんこんのうち水漬けの場合，鮮度の低下に伴うリンの溶出がみられた．しかし，その他のものは鮮度低下によるリンの溶出量の増加はなかった．

3．漬け液の pH が低くなるほど（特に pH 1 以下），野菜中のリンの溶出量は増加したが，アスコルビン酸や有機酸を含有した添加剤の pH 3 程度の液ではほとんどリンの溶出に影響を与えないことがわかった．

4．著者らの設定した判定基準値は，これらの野菜等が通常の鮮度の範囲であれば，リン酸使用の判定に充分

表4．豆もやしの放置実験結果

処理方法	リン量（μg／g）					
	0日目	1日目	2日目	3日目	4日目	7日目
⑧	8.4	16.4	70.5	92.1		
	8.4	16.4	81.9	140		
⑨	8.4	8.0	8.3	6.5	7.8	9.0
	8.4	8.0	8.3	12.5	13.9	38.9

⑧：室温（20～25℃）
⑨：冷蔵庫（3℃）

適用できることが判明した.

謝　辞　試料収集等，多大なる御協力を頂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.

文　　献

1）井部明広，田村行弘，上村　尚，西山良子，田端節子，橋本秀樹，他：東京衛研年報，38，216-221，1987.

2）千葉　明，羽隅邦彦，荒千恵子：昭和62年度全国食品衛生監視員研修会研究発表抄録，188-190，1987.

3）松永明信，山本　敦，水上英一：日本食品衛生学会第55回学術講演会講演要旨集，44，1988.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 121-125, 1988

メチル水銀毒性緩和因子に関する研究（第4報）
メチル水銀毒性に及ぼす食物繊維の影響

田村行弘*, 関　比呂伸**, 上村　尚*, 井部明広*,
西山良子*, 田端節子*, 橋本秀樹*, 二島太一郎*

Studies on Modifying Factors of Methylmercury Toxicity (IV)
Effect of Dietary Fiber on Methylmercury Toxicity

YUKIHIRO TAMURA*, HIRONOBU SEKI**, HISASHI KAMIMURA*, AKIHIRO IBE*,
YOSHIKO NISHIYAMA*, SETSUKO TABATA*, HIDEKI HASHIMOTO* and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords：メチル水銀 methylmercury, 水銀 mercury, セレン serenium, 食物繊維 dietary fiber, グルコマンナン glucomannan, ペクチン pectin, アルギン酸 alginic acid

緒　言

メチル水銀は水俣病に見られるように，その中毒症状は激しく，典型的な神経症状を呈することが知られている．大型魚や鯨等の海産動物中には多量のメチル水銀の存在することが著者らを初め多数の報告により明らかにされている[1-5]．しかし，これらは多量に喫食しても毒性を発現しないが，その理由にはこれら海産動物中に同時に存在するセレンが関係していると報告[6-13]されている．

一方，健康食品ブームにのって食物繊維は，ダイエット食品として肥満防止，減量あるいは便秘解消効果が期待され人気をよんでいる．しかし，喫食者の中にはノンカロリー食として食事がわりに摂取するために，栄養不良になる者もいる．このことは，低カロリー，低蛋白栄養下では，化学物質の毒性が増強されより速く中毒が発現するということ[14,15]から見ても問題がある．

欧米諸国に比べてアフリカ，アジア地域の住民は，大腸ガン，糖尿病などが少なく，この原因は食物繊維の多量摂取によると報告[16,17]されている．更に，アルギン酸が放射性ストロンチウムを[18]，リグニンやセルロースがカドミウムの吸収抑制効果[19]を示すという報告がある．これとは逆に，鉛，カドミウム，コバルトにおいて効果がないという報告[20,21]もある．

そこで，メチル水銀毒性に対して食物繊維がどのような影響を及ぼすかを知る目的で，グルコマンナン，ペクチン，及びアルギン酸ナトリウムを添加した飼料をラットに投与し検討したところ，若干の知見を得たので報告する．

実験方法

4週令のウイスター系雄ラットを各群15匹に分けて，全飼料に塩化メチル水銀20ppm を添加し，A群：繊維無添加食，B群：グルコマンナン添加食，C群：ペクチン添加食，D群：アルギン酸添加食を調製し，これらを6週間自由に摂取させた．なお，飼料は日本クレアCA-1の成分から低セレン食になるように，魚粉，小麦，ふすまを除き，各食物繊維（13%）及びカゼイン（10%）を加え，残りをトウモロコシで補い調製した．

観察項目：体重，神経症状[22,23]，死亡率，飼料及び水の摂取量を週2回測定した．また，飼料投与開始後4週間目には各群5匹を卜殺し，血液，脳，肝臓，及び腎臓を採取，摘出後，凍結乾燥して，メチル水銀，総水銀，セレン，亜鉛，鉄，銅，マンガンを測定した．

分析法：メチル水銀[24]はFDA法を若干変更した方法で測定し，その値は水銀として現わした．総水銀[24]はアルコールを触媒として硫硝酸分解後，還元気化注入法によりフレームレス原子吸光法で分析した．セレン[25]は過塩素酸，硝酸で分解後，2，3-ジアミノナフタレンとのキレートを蛍光光度法により測定した．亜鉛，鉄，

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169　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, 169 Japan
**同環境保健部環境衛生研究科

銅，マンガン[26]は乾式灰化後，0.1N硝酸に溶かしフレームレス原子吸光法で測定した．なお，本報の分析値はすべて乾燥重量グラム当たりで示した．

結果及び考察

メチル水銀毒性に対する食物繊維の影響を，中毒症状に対する修飾作用，メチル水銀，総水銀，セレン，亜鉛，鉄，銅，マンガンの臓器内蓄積量，あるいはメチル水銀の無機水銀への変換などから検討した．

実験飼料中のメチル水銀，総水銀，セレンの測定値をTable 1．に示したが，メチル水銀濃度は当初の計画よりやや低めであり，その量も群間でバラツキが認められた．セレンは添加した食物繊維の影響によるバラツキと考えられる．ラットの総摂餌量はA群＞B群，C群＞D群の順であり，食物繊維を添加してないA群が最もよかった．またA群は2.5週目まで，B群，C群では2週目まで，D群では1週目まで摂餌量が増加したが，以降減少した．

1．メチル水銀中毒の発現

体重増加曲線をFig. 1に示したが，体重は摂餌量が反映しA群＞B群，C群＞D群の順であった．しかし，摂餌量と体重との最高値の間には約1週間のずれがあり，体重のそれが遅れて現れた．また4週目における体重当たりの肝臓重量比率（%）はA群3.9±0.2，B群3.4±0.2，C群3.3±0.2，D群3.2±0.2の順でA群が最も大きく，また肝臓重量ではD群2.4±0.2gはA群6.5±0.9gの1／2以下と極めて軽量であった．神経症状の全発現率をFig. 2に示したが，平均発現日をみるとC群31.4±1.0日で最も早く，次いでA群32.4±0.8日，B群33.0±1.4日，D群34.7±1.4日の順であり，摂餌量の最も少ないD群が一番遅れて発現した．Fig. 2に示した生存日数の平均ではD群，C群，B群，A群の順であり，D群が神経症状とは逆に速く現れた．

低カロリー，低蛋白栄養下ではメチルパラチオンの急性毒性が増強し，重金属では減弱すると報告[14]がある．また，森田[27]はカドミウムでは発育不良が中毒発現を速めると報告している．更に，難消化性多糖類はラットで成長抑制効果があるという報告もある．本結果ではいずれにしても群間に有意な差はないが，多量の食物繊維の摂取は，メチル水銀中毒の発現を抑制するよりもむしろ，食物繊維による発育不良が一因となり，神経症状の発現及び死亡を速める方へ作用したと思われる．

2．水　　銀

実験飼料，臓器，糞便中の総水銀，セレン，メチル水銀量及び総水銀に対するメチル水銀の割合（%）を

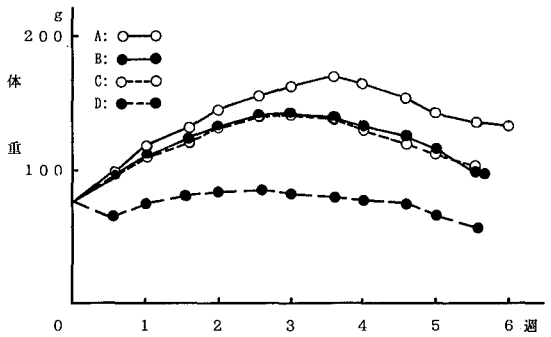


Fig. 1．ラット体重の推移
A：繊維無添加群，B：グルコマンナン添加群
C：ペクチン添加群
D：アルギン酸ナトリウム添加群

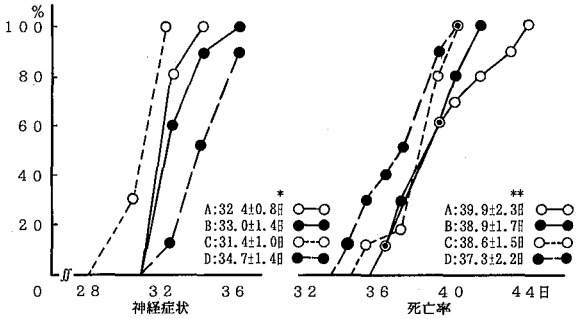


Fig. 2．ラットの神経症状の発現率及び死亡率の推移
A：繊維無添加群，B：グルコマンナン添加群
C：ペクチン添加群，D：アルギン酸ナトリウム添加群
＊　：神経症状発現までの平均日数±標準偏差
＊＊：死亡までの生存平均日数±標準偏差

Table 1に示した．

総水銀では臓器において食物繊維添加のB群，C群，D群は，無添加のA群に比べて実験飼料中での水銀が低いにもかかわらず，一部を除き高い値を示した．特にアルギン酸添加のD群では有意に（P＜0.01）高い値であった．この傾向はメチル水銀でも同様であった．

メチル水銀の取り込みが高ければ，蓄積量も多くなることが知られている．このことから，飼料中水銀濃度が最も高いA群が臓器内蓄積も高まると考えられたが，結果は逆であった．また，食物繊維添加群において糞便で3群ともA群とくらべ低い値を示したことから水銀の排泄が促進される傾向はなかった．

奥ら[28]は，食物繊維を多量に摂取すると胆汁酸の糞便中への排泄を増大すると報告している．更に，Norseth[29]はメチル水銀が胆汁中に排泄されると報告し

Table 1．飼料，血液，臓器，糞便中の水銀，メチル水銀及びセレンの濃度（μg／g）　n＝5

		A 群	B 群	C 群	D 群
総水銀	飼料	19	17	17	17
	肝臓	155±10	178±12	215±14	237±22
	腎臓	322± 5	349±29	282±12	518±29*
	血液	830±49	940±186	944±27	1172±104*
	脳	55± 3	53± 4	55± 4	72± 3
	糞便	66	34	62	41
セレン	飼料	0.23	0.22	0.13	0.17
	肝臓	2.3±0.4	2.5±0.1	1.5±0.2	3.0±0.4
	腎臓	11.5±1.8	17.6±2.4**	7.6±1.0	16.6±2.4**
	血液	1.28±0.09	1.25±0.13	0.98±0.03	1.36±0.04
	脳	0.65±0.10	0.62±0.03	0.55±0.03	0.59±0.09
	糞便	0.59	0.44	0.30	0.31
メチル水銀	飼料	18	16	16	16
	肝臓	120±10	146±22	128±27	181±47
	腎臓	236±18	236±26	239±22	412±18
	肝臓(M／T)	77±4%	82±8%	68±3%	85±3%
	腎臓(M／T)	73±5	68±12	85±5	85±6

(M／T)：メチル水銀／総水銀×100
* $p<0.01$　A，B，C群との比較，** $p<0.01$　A，C群との比較

ている．また食物繊維は腸管内の停留を短縮し，排便を速めることが知られている[30]．これらのことからメチル水銀は食物繊維により排泄が促進すると考えられたが，今回の結果では，臓器内蓄積や排泄量からみて，むしろ抑制的に働く作用を示している．これは食物繊維による胆汁酸の分泌促進に関連して，腸管内におけるメチル水銀の再吸収が促進されたとも考えられるが明らかでない．

一方，アルギン酸添加のD群は摂餌量が最も少ないにもかかわらず高い水銀の蓄積量を示した．この群は体重増加がほとんどなく，早い時期から発育の抑制が現れている．通常，水銀中毒の発現ではA群にもみられるように，20ppm メチル水銀投与で約4週目に体重減少が現れる．このことからD群における早期の発育障害はメチル水銀中毒と考えるより，添加したアルギン酸の影響のために起きたと考えられる．そして，この影響が水銀の吸収，蓄積にも反映し，更に死亡をも早める原因となったと考えられた．

ラットの神経症状発現と水銀蓄積量の間にはD群にみられるように，水銀蓄積が高いにもかかわらず発現が最も遅れたことからみて相関が認められなかった．しかし，死亡率では水銀蓄積量との間に相関があるように観察された．

メチル水銀の無機水銀への変換に腸管内で食物繊維が関与する可能性は，無機水銀の腸管からの吸収率が数％と低いことからみて，当然変換が進むならば蓄積量に減少がみられると思われるが，むしろ増加傾向であることから否定的である．しかし，グルコマンナン添加のB群の腎臓で，メチル水銀／総水銀の比率が他の群と比べて低い傾向を示したことは興味あることである．

3．セレン

セレンはメチル水銀毒性を軽減する作用があるため，本実験飼料では魚粉を除くなどして低セレン食となるように調製された．セレン濃度は肝臓，腎臓，血液において，D群が他の群より高い値を示した．またB群の腎臓においてD群と同様にA群と比べ有意に（$P<0.01$）高い値がみられたが，逆にC群の腎臓では有意に（$P<0.01$）低い値であった．

セレンの蓄積量は水銀の蓄積に伴って増加し，セレン単独投与よりもはるかに高濃度の蓄積がおこる[9,12]．これは飼料中のセレン濃度が低い場合にも現れる．今回の結果でも，水銀の蓄積量が反映し，セレン濃度に影響が現れたと推定された．

4．亜鉛，鉄，銅，マンガン

飼料，臓器，糞便中の亜鉛，鉄，銅，マンガンの濃度

Table 2. 飼料，臓器，糞便中の亜鉛，鉄，銅，マンガンの濃度（μg/g） n＝5

		A 群	B 群	C 群	D 群
亜鉛	飼料	26.9	28.6	27.3	31.3
	肝臓	61.6±9.3	55.8±2.6	64.2±5.4	56.9±4.7
	腎臓	97.4±5.0	95.4±2.9	92.7±2.7	82.5±2.5
	糞便	35.0	44.1	33.0	46.3
鉄	飼料	205	207	241	235
	肝臓	521±88	415±73	489±70	423±70
	腎臓	184±15	181±12	182±14	189±0
	糞便	1974	1360	2260	1490
銅	飼料	4.1	5.3	4.1	3.6
	肝臓	4.2±0.3	4.0±0.4	4.0±0.3	5.0±0.7
	腎臓	17.6±0.8	21.9±3.9	21.2±1.0	24.1±4.5
	糞便	21.0	14.5	25.0	9.1
マンガン	飼料	60	63	55	71
	肝臓	3.04±0.23	3.35±0.28	3.72±0.53	4.94±0.69
	腎臓	37.1±2.5	38.2±3.7	37.2±4.0	88.9±8.3
	糞便	495	444	555	439

をTable 2に示した．D群はA群に比べ亜鉛は飼料及び糞便中で高い濃度であるが，臓器中では低いレベルであり，銅は反対の傾向を示した．またマンガンでは飼料及び臓器中共に高いレベルであった．

アルギン酸添加のD群の飼料中亜鉛は臓器内蓄積に反映しなかった．森田[27]は2.5％アルギン酸飼料群でCd投与後に，またKrick[31]は飼料中の蛋白が5％のとき肝臓への亜鉛の取り込みが減少したと報告している．亜鉛は水銀毒性に対して減毒作用を有し[32]，またメタロチオネイン誘導生成に必要な元素でもあることから[33,34]，今後さらにアルギン酸については検討する必要があると思われる．

Tsai等[35]は銅欠乏食に8％セルロースを添加するとしないものより銅蓄積が高まる傾向があると報告している．この効果がアルギン酸にも期待できるとも考えられる．いずれにしても，亜鉛に見られるように臓器内の蓄積量が減少することは，亜鉛欠乏を進行させ，またミネラルのバランスを欠くことにもなると考えられる．

今回の結果では食物繊維の多量摂取は栄養素の吸収阻害や生体栄養バランスのくずれ等により，生体の抵抗力が弱まり，悪影響を招くこともあることを示唆するものであり，特にメチル水銀のような毒性の強いものに対しては注意を要すると考えられる．

まとめ

メチル水銀性に及ぼす食物繊維の影響について検討する目的で，グルコマンナン，ペクチン，アルギン酸ナトリウムを飼料に13％添加し，同時に20ppmメチル水銀を添加した実験飼料をラットに摂取させて，6週間飼育した．ラットの体重，神経症状，死亡率，総水銀，メチル水銀，セレン，亜鉛，鉄，銅及びマンガンの臓器内蓄積量等を調べた．

1．食物繊維の添加はラットの発育を遅らせ，同時にメチル水銀中毒の発現が早まり，特にアルギン酸添加群では顕著であった．

2．総水銀及びメチル水銀の蓄積は食物繊維添加で高まり，アルギン酸添加群は各臓器とも有意に高いレベルであった．また亜鉛はアルギン酸添加群で低い蓄積を示した．

3．メチル水銀の無機水銀への変換は水銀の臓器内蓄積量から認められなかった．

4．食物繊維の多量摂取は生体に対して好ましい影響ばかりでなく，逆に，悪影響を及ぼす可能性のあることが示唆された．

文献

1）西垣　進，田村行弘，真木俊夫，嶋村保洋，他：東京衛研年報，25，235-239，1974
2）田村行弘，真木俊夫，山田　洋，嶋村保洋，他：*ibid*，26-1，200-204，1975
3）近藤雅臣：衛生化学，20，47-51，1974
4）Rivers, J. B., Pearson, J. E. and Shultz, C. D.：*Bull.*

Environ. Cont. Toxicol., 8, 257-266, 1972
5) Miller, G. E., Grant, P, M., Kishore, R. and Steinkruger, F. J.：*Science*, 175, 1122, 1975
6) Ganther, H. E., Goudie, C., Sunde, M. L. Kopecky, M. J., Wagner, R., Sang-Hwang Oh and Hoekstra, W. G.：*Science*, 175, 1122-1124, 1975
7) Potter, S. and Matrone, G.：*J. Nutr.*, 104, 638-647, 1974
8) Stillings, B. R., Lagally, H., Bauerfeld, P. and Soars, J.：*Toxicol. Appl. Pharmacol.* 30, 243-254, 1974
9) Ohi, G., Nishigaki, S., Seki, H., Tamura, Y. et al.：*Enviroment. Res.*, 12, 49-58, 1976
10) 関比呂伸，田村行弘，箕輪佳子，加納堯子：東京衛研年報，35，309-315，1984
11) 西垣　進，田村行弘，真木俊夫，嶋村保洋，他：*ibid.*, 28-1, 127-133, 1977
12) 田村行弘，西垣　進，真木俊夫，嶋村保洋，他：*ibid.*, 28-1, 134-139, 1977
13) 田村行弘，西垣　進，関比呂伸，真木俊夫，他：*ibid.*, 32-1, 166-171, 1981
14) 野見山一生，野見山紘子：日衛誌，39，225，1984
15) 森田　茂，：生活衛生，27-1，22-29，1983
16) Burkitt, D. P., Walker, A. R. P. and Painter, N. S.,：*J. Am. Med. Assoc.*, 229, 1068-1074, 1974
17) Walker., A. R. P.：*Am. J. Cli. Nutr.*, 29, 1417-1426, 1976
18) Hesp, R. and Ramsbottom, B.：*Nature*, 208, 1341-1342, 1965
19) 永井鞆江，今村裕一，海老原清，桐山修八：栄養と食糧，31，161-170，1978
20) 桐山修八：化学と生物，18，95-105，1980
21) Carr, T. E. E., Nolan, J. and Durakovic, A.：*Nature*, 224, 1115, 1969
22) 武内忠男，神原　武，森川信博：熊本医学会誌，34，521-532，1960
23) 瀬辺恵鎧，伊津野吉亮：日新医学，49，607-610，1962
24) 田村行弘：水銀とセレン，鈴木継美，大井　玄，井村伸正編，p 64-67，1977，篠原出版，東京
25) Watokinson, J. H.：*Anal. Chem.*, 38, 92-97, 1976
26) 日本薬学会編：衛生試験法注解，p 66-68，1980，金原出版㈱，東京
27) 森田　茂：生活衛生，27-1，22-29，1983
28) 奥　恒行：食物繊維，印南　敏，桐山修八編，p 85，1982，第一出版，東京
29) Norseth, T. and Clarkson, T. W.：*Arch. Environ. Health*, 22, 568-577, 1971
30) 武田英敏，桐山修八：食物繊維，印南　敏，桐山修八編，p 73-79，1982，第一出版，東京
31) Kriek, N. P. J., Sly, M. R., Bruyn, D. B. and Klerk, W. A.：*Br. J. Exp. Path.*, 63, 254-258, 1982
32) 平井正巳，薛　玉梅：衛生化学，31，31-36，1985
33) 土井邦紘，松浦省明，馬場茂明：ファルマシア，17，204-208，1981
34) Sugawara, N.：*Toxicol. Appl. Parmacol.*, 42, 377-386, 1977
35) Tsai, R. C. Y. and Lei, K. Y.：*J. Nutr.* 109, 1117-1122, 1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 39, 126-129, 1988

化学物質及び自然毒による食中毒事件例（第5報）
—昭和62年度—

真木俊夫*，観　公子*，永山敏廣*，
飯田真美*，川合由華*，二島太一郎*

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toxicants in Tokyo（V）
—1987—

TOSHIO MAKI*, KIMIKO KAN*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*,
MAMI IIDA*, YUKA KAWAI*, and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords：化学性食中毒 chemical food poisoning，学校給食 school lunch，ヒスタミン histamine，ひょうたん gourd，花林糖 karinto，キノコ mushroom，過酸化水素 hydrogen peroxide

厚生省の統計によると，全国で発生する化学性食中毒は年平均250件，患者は1,500人と概算されている．しかし，我が国の食生活の水準は上がったと言われている割りには発生件数，患者数は減少していない．その理由の中には基本的な衛生概念がなおざりにされていることが考えられる．

著者らは前報[1~4]において都内で起きた化学性食中毒事件を報告してきた．今回は昭和62年度に起きた化学物質による食中毒事例6件，自然毒による事例1件について報告し，今後の食中毒発生防止の為に供する．表1に昭和62年度に発生した化学性食中毒のうち主な事例の概要を示した．

1．牛乳による有症苦情

①事件の概要　昭和62年6月，某中学校で給食時に配布された牛乳の味がおかしいと9名の生徒が先生に訴え出た．その内1名の生徒が腹痛を起こした．

②食中毒の症状　飲用4時間後から1名の女生徒が腹部膨満感を認め，軽度の腹痛を呈した．

③試　料　6月8日製造の開封牛乳残品6本及び参考品として未開封3本が搬入された．

④原因物質の検索　開封残品6本の牛乳のうち5本はヨーグルト状を呈し，臭いは微に酸臭を認めた．pHは残品が6.2～6.7，参考品が6.7，酸度は残品が0.14～0.17，参考品は0.13～0.14の範囲内であった．

⑤考　察　今回，搬入された牛乳は6月8日製造品である．当日は全部で21万本製造され，そのうち2319本が苦情地域に配布されていた．当中学校には336本持ち込まれ，9名の生徒が異常を訴えたので，各担任の先生が詳細に調査を行ったところ，さらに104人の生徒が異常を感じていたことが分かった．これら約1/3に当る牛乳がヨーグルト状に変化していたことから，保存の段階で課題が生じたのではないかと推定し，再度，この点について調査依頼を行った．その結果，給食センターの冷蔵庫の故障が原因であった．すなわち冷蔵庫内の温度が上昇し牛乳が酸敗し始めたという基本的なミスであった．

2．イワシの貝殻焼きによる食中毒

①事件の概要　昭和62年7月某大学病院医師より，当病院に入院している患者の内，8名が食中毒症状を呈した旨届出があった．

②食中毒の症状　喫食後10分から1時間にかけて8名が顔や全身に発疹を呈し，さらに吐気，嘔吐及び動悸等の症状を訴えた．

③試　料　イワシの貝殻焼き残品A，Bの2検体，検食Cの1検体が搬入された．

④原因物質の検索　患者らの訴えはヒスタミン様症状であった．そこで薄層クロマトグラフィー（TLC）によるヒスタミン及び不揮発性腐敗アミンの定性分析を試みた[5]．3検体全てから陽性スポットが得られたので，さらに高速液体クロマトグラフによる定量分析を行いA，B及びCからヒスタミン180mg%，190mg%，130mg%，

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169　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, 169 Japan

表1．昭和62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62.6	113／336	牛乳	変敗
2.	7	8／372	イワシ	ヒスタミン
3.	8	6／10	ひょうたん	ククルビタシン
4.	8	2／2	グレープジュース	界面活性剤
5.	9	1／1	花林糖	油脂の変敗
6.	10	2／2	キノコ	天然毒
7.	10	1／1	清涼飲料水	過酸化水素

カダベリン42mg%，41mg%，27mg%，チラミン15mg%，13mg%，10mg%，プトレシン29mg%，25mg%，21mg%がそれぞれ得られた．

⑤**考　察**　今回130～190mg%の範囲内でヒスタミンが検出されたが，副材料を除いたイワシそのものであったなら300mg%程度検出されたのではないかと推定される．また同時に不揮発性腐敗アミンも検出されたことから，イワシの鮮度がかなり低下していたものと考える．今回372名分の献立の中から中毒症状を呈している．入院先の患者が夕食に出された献立からヒスタミン様中毒を起こしたことは，病院側の基本的な衛生概念が欠損していたのではないかと思われる．

3．ひょうたんの酢漬による有症苦情

①**事件の概要**　昭和62年8月，某会社社員10名が幕の内弁当を喫食し，うち6名が食中毒症状を呈した．

②**食中毒の症状**　喫食直後から苦味を感じ，約1時間後に吐気，嘔吐及び下痢を呈した．

③**試　料**　患者が喫食した残品のうち5～6cmのひょうたんの酢漬数個が搬入された．

④**原因物質の検索**　ウリ科植物には苦味成分としてククルビタシン類の存在が知られている[6]．喫食した全員が苦味を感じていること，さらに嘔吐や下痢を呈していることから，ひょうたん中のククルビタシンが疑われた．TLCによる定性分析の結果，ククルビタシンDのRf値に一致するスポットが得られた．

⑤**考　察**　昭和57年にも都内でユウガオの実の水煮を食べて食中毒が発生している[3]．ククルビタシン類は極めて強い苦味を有し，時には嘔吐を誘発させることがある．

今回のひょうたんは他県で生産されたものだが，本来，飾り物として流通されていた．ところが中間業者の段階で食用として卸しをしてしまった結果，飲食店営業者は，これを幕の内弁当のおかずにして販売，今回の事件が発生してしまったものである．

4．グレープジュース缶による有症苦情

①**事件の概要**　昭和62年8月，女子中学生が自宅近くのコンビニエンスストアーでグレープジュース2缶を購入し，1時間後に1缶をコップに半分ずつあけ，夏休みの宿題をしに来ていた友達との2人でストローを用いて喫飲したところ，異常に気付き友達の母親から保健所に届出があった．

②**食中毒の症状**　飲用直後から苦味，舌先がピリピリと痺れ，気分が悪くなった．

③**試　料**　別容器に入った残品とその空缶，同ロットの参考品が搬入された．

④**原因物質の検索**　残品は外観上，濁った藤色の粘液性溶液で透明な葡萄色の参考品とは全く異なっていた．臭は石鹸様臭を有し，pHは参考品が2.7に対して残品は6.9とかなりの差が見られ，アルカリ性を有する異物の混入が疑われた．外観，臭いから混入物は界面活性剤等が考えられた．起泡試験では持続性のある微細な泡が認められた．空缶についてピンホール試験を実施したが陰性であった．そこで動物試験と界面活性剤の定性分析を併用させた．残品をマウスに体重1kg当り約9mlを経口投与させたところ，10分後に痙攣を伴い呼吸停止から死亡した．これは界面活性剤を経口投与した時の状態に酷似していた．しかし，農薬混入の懸念もあったので有機リン系農薬の分析を同時に行ったが検出されるものはなかった．TLCによる界面活性剤の定性分析から非イオン界面活性剤が検出され，ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルが推定された．このうちポリオキシエチレン6モルの標品のRf値に近似した．さらに，チオシアン酸アンモニウムによる非イオン界面活性剤の比色定量を行い，ポリオキシエチレン(6)ノニルフェニルエーテルとして1%含有していた．尚，陰イオン及び陽イオン界面活性剤は検出されなかった．

⑤**考　察**　この事件は混入物が何であるかと同時に混入経路の解明の二点に絞られた．残品が不透明な藤色の

溶液で，しかも市販合成洗剤様臭を発していたことから，界面活性剤等の異物の混入が考えられた．しかし同時に購入したもう1缶は全く異常がないことが判明した．さらに参考品と残品のpHにはかなりの差を示し，参考品が酸性に対して残品は中性付近であることから，アルカリ性を有する化合物が疑われた．種々検討の結果，混入物は非イオン界面活性剤であることを突き留めることができたが，混入経路はいぜんとして不明であった．誰かのいたずらでジュース缶にわずかな穴を開けて異物を混入した疑いが濃いとみたが，飲用した女の子らは缶ジュースの蓋を開けた時にガス圧の抜ける音を聞いていると述べていること，またピンホール試験でも異常がないことから，その推定は打ち消された．そこで製造工程の段階で界面活性剤の混入が疑われた．製造工場は他県にあったが，その工場で使用していた洗剤全てを任意提出してもらい，定性分析を行ったが混入物パターンに近似もしくは一致する洗剤は見つからなかった．さらに市販の洗剤約30種についても分析を行ったが，先の結果と同様一致するに至らなかった．混入経路については解明できなかったが，このジュース缶はストアの冷蔵庫の側に積み重ねてある箱から2缶を購入したということで，従業員の目に届かない場所で自由に取り出しが出来る保管に幾分問題が残された事件であった．

また同年9月にも炭酸飲料1缶を5～6人の学生がストローで回し飲みをし，最後の学生が飲んだところ，喉に鋭い痛みを呈する事件があかるみに出た．近くの病院で受診したところ，喉が炎症を起こしていると言われた．残っていた溶液をティシュペーパーにあけかえたところ，針状の異物が発見されたと保健所に届出があった．針状様の異物は僅かであったが，実体及び電子顕微鏡から金属様針状物質であることが判明した．そこで異物中の金属分析を実施したところ，アルミニウムが検出され含有量は24％であった．これらのことから金属様針状異物はパッキングする際のジュース缶の蓋の切り粕が混入したのではないかと推定した．両方の事件ともアルミニウム容器で中身が見えないだけに，飲み方等注意しなければならない事件であった．

5．花林糖による有症苦情

①事件の概要　昭和62年9月，タクシーの運転手が朝，花林糖，缶ジュース及びタバコを購入し，朝食代わりに花林糖を車中で喫食したところ，余りの異臭，異味に気分が悪くなった．会社に帰り同僚にも食べてもらったが，やはりおかしいとの訴えで保健所に届けてきた．

②食中毒の症状　喫食直後に臭い，味共に異常が認められ気分が悪くなった．4時間後から急に嘔吐，翌朝から3回下痢を呈した．

③試　料　残品の花林糖が搬入された．

④原因物質の検索　喫食直後から臭い，味が異常で石鹸と油を混ぜ合わせたような嫌な臭いを訴えていた．花林糖が搬入された時はビニール袋に包まれて来たが，すでにこのビニール袋を動かしている際に異臭を認めた．花林糖に使用した油脂の変敗によるものと推定し，酸価（AV），過酸化物価（POV）を分析したところ，AV＝23，POV＝390の値が得られた．

⑤考　察　厚生省通達によると衛生上の指導として菓子類は1）その製品中に含まれる油脂はAVは3，POVは30以下，2）油菓子はその製品中の油脂のAVは5，POVは50以下に規定されている．今回の花林糖はこれらの規定に照らし合わせても遙かに高い値を示した．

過去の記録では昭和53年12月，神奈川県でクッキーからAV23，POV290，昭和60年5月，福岡県内でえびせんべいからAV13，POV1,300と異常な値を呈した事件が報告[8]されている．今回の事件もほぼこれに匹敵した．この花林糖は昭和59年2月16日製造の表示がされていたことから，約3年の間，小売店に放置されていたものと推定される．さらに，昭和63年3月にも都内で，花林糖による異臭，異味を訴える有症苦情が発生している．この時のAVも0.5，POVは45と高い値を示した．製造は1年前と古い花林糖であった．食中毒防止の面から保存には充分注意を払わなくてはならない事件であった．

6．キノコによる食中毒

①事件の概要　昭和62年10月，夫婦が自宅近くの裏山で採取して来たキノコを夕食にナスと一緒にすまし汁にして喫食したところ，食中毒症状を呈し夜間の救急診療所にて診察を受けた．

②食中毒の症状　喫食後，約1時間から吐気，嘔吐及び下痢を呈した．

③試　料　患者らが採取して来たキノコのうち小分けしてゴミ箱に捨てたキノコ3本が搬入した．

④種の鑑定　食中毒症状は，吐気，嘔吐及び下痢と典型的な消化器系の症状であった．現在知られている毒キノコのうちで，この症状を呈するのはツキヨタケ，イッポンシメジ類及びカキシメジ類の三種しかない．ところが搬入されてきたキノコはこの三種のキノコとは全く別のキノコであった．外観は全体が淡紫色を呈し，傘，茎とも縦の縞模様を有していた．しかし，茎の根元の方は途中でぶっつり切れていた為，どんな原形をしていたのか不明であった．そこで胞子の顕鏡並びにヒダの付き

方[9]など詳細に検討し，このキノコはフウセンタケ属と結論づけた．

⑤考　察　鑑定の結果，フウセンタケ属の仲間であったが，種を決めるには至らなかった．実際に喫食したキノコは搬入された種と同じであったのか，また過去にフウセンタケ属の仲間で中毒が発生したことがあるのか等疑問が生じた．そこで再度，喫食者に尋ねる形で協力をしてもらった．患者らは以前からキノコに興味を持っていたので，キノコ採取に出掛ける機会が多かった．今回，採取した帰り道に近所の人に見せたところ，ヒダが紅色なので，これはウラベニホテイシメジで大変おいしい食用キノコだと教えられた．そのキノコなら聞いたことがあるので安心して帰宅したのだが，数本だけ色など異なるキノコが混じっていることに気が付いた．今回，鑑定したキノコだけを捨てたと言っており，これらから総合してみると，鑑定したキノコと同一種を喫食した可能性が少ないこと，ヒダが紅色を呈して，ウラベニホテイシメジと間違えたことから食中毒に関与したのはクサウラベニタケと推定した．

7．コーヒー入り清涼飲料による有症苦情

①事件の概要　昭和62年10月，コーヒー入り清涼飲料（カフェオレ）を小売店で購入した男性が自宅で飲用したところ，臭，味が異常であることに気付き，直ちに吐き出したが，喉の痛みが残ったと保健所に届出があった．

②食中毒の症状　喫飲した直後から臭，味が異常で喉にヒリヒリする痛みを覚えた．

③試　料　残品と同ロットの参考品が搬入された．

④原因物質の検索　残品は参考品と比較してコーヒー色が脱色して白濁していた．臭は焦げ臭く，油の古くささを呈していた．飲用した直後から喉に痛みを感じたことから刺激性物質の混入が疑われた．直ちにpHを調べたところ残品5.9，参考品6.6と差があった．残品の脱色が余りにもひどいので酸化作用の強い化合物を推定した．ほぼ同時に過酸化水素が残留したかもしれないという初期の調査報告が入ってきた．直ちに過酸化水素の定性，定量分析を手掛けた．定性分析は硫酸バナジウム及び硫酸チタン溶液で呈色反応を試み陽性反応を認めた．そこで過酸化水素微量（酸素電極）測定装置を用いて，定量を行ったところ，過酸化水素1.4％が含有されていた．

⑤考　察　厚生省告示第24号をもって，最終段階の食品に過酸化水素が残留してはならないと規制している．ところが高濃度の過酸化水素が残留した清涼飲料水が小売店に流通されていたことから，社会に極めて大きな不安を与えた．単なる故意で添加しただけでは余りにも高濃度で説明がつかない。そこで製造工場は他県にあったが，再度，調査協力を要請したところ，容器を殺菌するために過酸化水素を使用したのだが，特定の充填剤に装着しているノズル部分の故障であったことが判明した．その為，過酸化水素が高濃度に残留してしまったということである．尚，広島県内でも同様の苦情があり過酸化水素0.9％が検出されている[10]．

本事件の重大性に鑑み，今後同様の事故が発生しないように，過酸化水素を使用して容器を殺菌する食品又は飲料水には充分監視をして行く必要がある．

本報告は昭和62年度に起きた化学性食中毒のうち1．牛乳による有症苦情，2．イワシの貝殻焼きによる食中毒，3．ひょうたんの酢漬による有症苦情，4．花林糖による有症苦情，5．グレープジュース缶による有症苦情，6．キノコによる食中毒，7．コーヒー入り清涼飲料による有症苦情の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．

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）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　38，229-232，1987.

5）日本薬学会編：公衆衛生協議会資料，p 42，1983.

6）刈米達夫：植物化学，p 152，1967，広川書店

7）岡本智子，伊藤剛正，井上正秀：フレグランスジャーナル　23，58，1977.

8）食中毒事件例：食品衛生学雑誌　23，219，1978，27，589，1986.

9）今関六也，本郷次雄：原色日本菌類図鑑，p 72，1975，保育社

10）日添協会編：日添協会報6（10），25-26，1988.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 130-138, 1988

野菜・果実類中の残留農薬実態調査
(昭和62年度)

永山敏廣*, 真木俊夫*, 飯田真美*,
観公子*, 川合由華*, 二島太一郎*

Survey of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits
(1987. 4 ～ 1988. 3)

TOSHIHIRO NAGAYAMA*, TOSHIO MAKI*, MAMI IIDA*,
KIMIKO KAN*, YUKA KAWAI* 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, カーバメイト系農薬 carbamate 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，近年新しい農薬の開発が進み，種々の農薬が登録され，使用されているため，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，昭和62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　1987年4月から1988年3月にかけて東京都内に入荷した野菜・果実類等199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，ピリミホスメチル，ジアリホール，エディフェンホス（EDDP），IBP 計35種

(2) 有機塩素系農薬：総 BHC（α-，β-，γ-，δ-BHC），総 DDT（pp'-DDT，pp'-DDE，pp'-DDD），op'-DDT，ディルドリン，エンドリン，アルドリン，ヘプタクロル，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，イプロジオン，キャプタン，カプタホール（ダイホルタン）　計23種

(3) カーバメイト系農薬：カルバリル（NAC），BPMC　計2種

総計60種

3．機器

(1) ガスクロマトグラフ：（株）島津製作所製 GC-9A（検出器 ECD，FPD，FTD）

(2) 液体クロマトグラフ：（株）島津製作所製 LC-5A（検出器 UV）

4．分析方法

前報[6]に従った．

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169　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, 169 Japan

Table 1. Contens of Organophosphorus Pesticides in Vegetables

Sample	No. of sample	No. of positive	Insecticides (ppm)								Fungicides (ppm)	
			EPN	Diazinon	MEP	PAP	Malathion	Prothiofos	Salithion	Others[1)]	IBP	EDDP
Crown daisy [SHUNGIKU]	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	0.09	—
Pot herb mustard [KYONA]	4	4	—	—	—	—	—	0.02	—	—	—	—
Perilla [AOZISO]	12	10	0.83	—	0.01	—	0.24, 0.35, 0.77	0.06, 0.13, 1.31, 8, 9, 9.1	—	—	—	—
Lettuce [SANIRETASU]	16	5	—	—	—	0.06	—	0.01, 0.01, 0.03	—	Tr[2)](DDVP) Tr(CYP)	—	—
Salad [SARADANA]	7	0										
Japanese honeywort [MITSUBA]	9	0										
Celery (petiole)	29	20	—	Tr, Tr, Tr, 0.04, 0.07	—	0.04, 0.14	0.01, 0.02, 0.02, 0.03	0.04, 0.34, 0.51	Tr, 0.07, 0.10, 0.10, 0.11, 0.28, 0.31, 0.42	0.16 (chlorpyrifos-methyl) 0.23(phosalone) Tr(CYAP) 0.16, 0.17 (pirimiphos-methyl)	—	—
(leaf)	29	25	—	Tr, 0.01, 0.01, 0.01, 0.01, 0.02, 0.03, 0.06, 0.31, 0.64	Tr	0.05, 0.12, 0.57, 4.1	0.01, 0.03, 0.31, 0.60, 0.76, 1.6	Tr, 0.02, 0.11, 1.7, 4.7	0.01, 0.02, 0.03, 0.03, 0.17, 0.21, 0.22, 0.31, 0.60, 1.7, 2.2	1.6 (chlorpyriphos-methyl) 2.6(phosalone) 0.19(CYAP) 1.8, 4.8 (pirimiphos-methyl)	0.04, 0.04	—
Garden asparagus	5	0										
Radish (root)	4	1	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(leaf)	4	2	0.09, 0.15	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Turnip (root)	5	2	—	—	—	—	—	0.04, 0.06	—	—	—	—
(leaf)	5	3	—	—	—		—	0.01, 0.08	—	0.01(chlorpyrifos)	—	—
Edible burdock	5	0										
Sweet potato	5	0										
Taro	7	0										
Potato	5	0										
Garden pea (immature) [SAYAENDO]	8	3	0.06	Tr	—	—	0.06	0.06	—	—	—	—
Kidney bean (immature) [SAYAINGEN]	5	1	—	—	—	—	—	0.17	—	—	—	—
Broad bean [SORAMAME]	5	0										
Total	170	77	0.02~0.83	Tr~0.64	Tr~0.01	0.04~4.1	0.01~1.6	Tr~9.1	Tr~2.2	Tr~4.8	0.04~0.09	—

1) chlorpyrifos, CVP, DDVP, dimethoate, MPP, phosalone, DEP, disulfoton, ECP, CYAP, chlorpyrifos-methyl, DMTP, formothion, CVMP, Propaphos, EPBP, ethion, isoxathion, thiometon, PMP, pyridaphenthion, pirimiphos-methyl, CYP and dialifol are investigated.

2) Tr : below 0.01ppm

結果及び考察

1．有機リン系殺虫剤及び殺菌剤

野菜類170検体について，有機リン系殺虫剤33種及び有機リン系殺菌剤2種計35種の農薬を分析し，その結果をTable 1に示した．

有機リン系農薬のうち残留基準のある農薬は，EPN（検出作物名：ダイコンの根及び葉）及びマラチオン（セルリーの葉柄）の2種類が7検体（検出率：4.1%，以下同様）から検出された．これらのうち，ダイコンの葉1検体から検出されたEPNは，残留基準値0.1ppmを超えていた．ダイコンの葉中のEPNは昭和56年度及び昭和59～61年度にも検出されており[6-8]，また，食品汚染物モニタリングによる報告例も多い[9]．EPNは，葉菜類に残留しやすく[5,9]，しばしば残留基準値を超えて検出されることから，十分な監視体制の維持拡充が必要である．

環境庁の定めた登録保留基準のある農薬では，ダイアジノン（セルリーの葉柄及び葉，サヤエンドウ），PAP（レタス，セルリーの葉柄及び葉），マラチオン（アオジソ，セルリーの葉柄及び葉，サヤエンドウ），プロチオホス（キョウナ，アオジソ，セルリーの葉柄及び葉，カブの根及び葉，サヤエンドウ，サヤインゲン），DDVP（レタス），CYP（レタス），クロルピリホスメチル（セルリーの葉柄及び葉），ホサロン（セルリーの葉柄及び葉）及びピリミホスメチル（セルリーの葉柄及び葉）の9種類が69検体（41%）から検出された．これらのうち，セルリーの葉柄から検出されたダイアジノン，ホサロン，及びピリミホスメチル，セルリーの葉柄及び葉から検出されたPAP及びクロルピリホスメチル，アオジソ，セルリーの葉柄及び葉，サヤインゲンから検出されたプロチオホスは，それぞれの登録保留基準値0.1，0.5，1，0.1，0.03及び0.1ppmを超えるものがあった．特に，アオジソからは基準値の90倍以上のプロチオホスが検出された．

プロチオホスは，近年種々の野菜・果実類から比較的多量検出されている[4-7,10-13]．LD_{50}925～966mg／kg（ラット，♂：経口）の普通物であるが，水に対する溶解度が1.7mg／l（20℃）と極めて低く，水洗により洗い流すことのできない農薬のひとつである[14]．また，アオジソは，水洗後生食されるため，残留したプロチオホスのほとんどが摂取されると考えられる．健康への危害を阻止する上で，農薬の摂取は極力抑える必要がある．そのためには，農薬の残留した食品をできる限り少なくすることが大切であり，残留基準のない農薬をも含めた尚一層広範囲な監視に基づく実態把握が必要とされる．

基準値の設定されていない農薬では，EPN（アオジソ，サヤエンドウ），MEP（アオジソ，セルリーの葉），サリチオン（セルリーの葉柄及び葉），CYAP（セルリーの葉柄及び葉），クロルピリホス（カブの葉）及びIBP（シュンギク及びセルリーの葉）の6種類が29検体（17%）から検出された．これらのうち，アオジソから検出されたEPNは，0.83ppmと比較的高濃度であった．EPNは毒物（1.5%以下劇物）に指定されており，種々農作物に0.1ppmと残留基準が定められている．生食されるアオジソに多量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．一方，稲用殺菌剤であるIBPが，シュンギク及びセルリーの葉から0.04～0.09ppm検出された．IBPは昭和59年度にもイチゴから0.01ppm検出されている[6]．このような本来の使用対象作物以外からの検出は，農薬使用者の不注意な使用によると考えられる．従って，農薬使用者が使用法等の遵守を徹底するよう十分指導することも，農薬残留を減らす大切な方策のひとつと考える．

なお，エチルチオメトンの酸化代謝物であるジスルホトンスルホンが，セルリーの葉柄及び葉，ダイコンの根及び葉の各1検体から0.02～0.13ppmの範囲で検出された．いずれも，昭和58，60年度と同様[5,6]，原体であるエチルチオメトンは検出されなかった．

次に，果実類29検体についての調査結果をTable 2に示した．

残留基準のある農薬は全く検出されなかった．

登録保留基準のある農薬では，DMTP（イヨカンの外果皮）及びクロルピリホス（リンゴ）の2種類が5検体（17%）から検出された．柑橘類外果皮中のDMTPは，検出率が4／5（80%）と高いものの，その残留量は0.06ppm以下と低レベルであった．

いずれの基準値も設定されていない農薬では，サリチオン（イヨカンの外果皮）が1検体から検出されたのみであった．

2．有機塩素系及びカーバメイト系殺虫剤

野菜及び果実類中の有機塩素系殺虫剤15種，カーバメイト系殺虫剤2種計17種の調査結果をTable 3に示した．

残留基準のある農薬では，登録の抹消された殺虫剤である総BHC（カブの葉，サトイモ），総DDT（サトイモ）及びエンドリン（ダイコンの根及び葉）の3種類が5検体（2.5%）から検出された．エンドリンの基準値はNDであることから，今回のように極微量検出された場合でも規格違反となるが，1日摂取許容量（ADI）

Table 2. Contents of Organophosphorus Pesticides in Fruits

Sample	No. of sample	No. of positive	Insecticides(ppm)		
			DMTP	Salithion	Chlorpyrifos
Apple	3	1	—	—	Tr[1)]
Pear	1	0			
Hybrid melon [PURINSUMERON]	5	0			
Loquat [BIWA]	4	0			
Japanese persimmon [KAKI]	6	0			
lyokan					
(flesh)	5	0			
(peel)	5	4	0.03, 0.03, 0.04, 0.06	0.17	—
Total	29	5	0.03～0.06	0.17	Tr

EPN, diazinon, MEP, malathion, prothiofos, CVP, DDVP, dimethoate, MPP, phosalone, DEP, disulfoton, ECP, CYAP, chlorpyrifos-methyl, formothion, CVMP, propaphos, EPBP, ethion, isoxathion, thiometon, PMP, pyridaphenthion, pirimiphos-methyl, CYP, and dialifol are not detected.
IBP and EDDP are not detected.
1) Tr : below 0.01ppm

0.0002mg／kg を超える危険性はほとんどなく，喫食上問題はないと考える．また，サトイモから0.01ppm 以上の総 BHC が検出された．昭和50年以前に使用された農薬の，いわゆる土壌由来の農薬としては比較的残留量が多かったが，昭和59年，60年度に観察されたように[6)]，輸入肥料等からの移行によると考えられる．

登録保留基準のある農薬では，α-，β-ベンゾエピン（カブの根及び葉，サヤエンドウ）及び BPMC（アオジソ）の3種類が8検体（4.0%）から検出された．サヤエンドウから0.53ppm のベンゾエピン（α-及びβ-ベンゾエピンの総和）が検出され，基準値0.5ppm を超えていた．また，今年度から検査を始めた BPMC が，アオジソ1検体のみであるが，その基準値0.3ppm の約10倍検出された．ベンゾエピンは ADI 0.008mg／kg の毒物に，BPMC も ADI は設定されていないが LD_{50}623mg／kg（ラット，♂：経口）の劇物（2%以下普通物）に指定されていることから，残留量の把握等に十分留意し，これら農薬の多量残留を防止する必要がある．

3．有機塩素系殺菌剤及び除草剤

野菜及び果実類中の有機塩素系殺菌剤7種，有機塩素系除草剤1種計8種の調査結果を Table 4 に示した．

残留基準のある農薬は，キャプタン（リンゴ）1種類が1検体（0.5%）から検出されたのみであった．

登録保留基準のある農薬では，殺菌剤である TPN（アオジソ，レタス，サラダナ，ミツバ，セルリーの葉柄及び葉，カブの根及び葉，ゴボウ，バレイショ，サヤエンドウ，サヤインゲン，リンゴ），ビンクロゾリン（アオジソ，ミツバ），イプロジオン（アオジソ，レタス，ミツバ），PCNB（レタス，サラダナ，ミツバ，セルリーの葉）及びカプタホール（カンショ，カキ）の5種類が74検体（30%）から検出された．これらのうち，TPN は検出率が33%と非常に高く，特に，ミツバ6／9（67%），セルリーの葉柄17／29（59%）及び葉20／29（69%），サラダナ4／7（57%）の検出率が高かった．さらに，基準値1.0ppm を超えて残留していたものも多く，セルリーの葉柄5.6，6.3ppm，葉11，27ppm，レタス8.0ppm，サラダナ5.5ppm と高レベルのものも見出された．ビンクロゾリンは，昭和61年度にミツバから37ppm と異常な高濃度で検出されたが[7)]，今回はアオジソから基準値5ppm を超えて検出された．イプロジオンは，今回初めて調査した農薬であるが，アオジソから基準値5ppm を超えて検出され，ビンクロゾリンと同様，検出率は低いものの，残留量の多い傾向が見られた．野菜中の TPN は水洗により74～97%除去されるとの報告がある[15)]．また，ビンクロゾリン及びイプロジオンの水に対する溶解度はそれぞれ1g／l，13mg／l であり，いずれも TPN の0.6mg／l より大きい．従って，TPN と同様水洗により除去され，生食の場合でも喫食時におけ

Table 3. Contents of organochlorine and Carbamate Insecticides in Vegetables and Fruits

Sample	No. of sample	Organochlorines (ppm)					Carbamates (ppm)		
		No. of positive	α-Benzoepin	β-Benzoepin	Dicofol	Others[1]	No. of positive	NAC	BPMC
Crown daisy	1	0					0		
Pot herb mustard	4	0					0		
Perilla	12	0					1	—	2.6
Lettuce	16	1	—	—	—	Tr[2](hep. ep.[3])	0		
Salad	7	0					0		
Japanese honeywort	9	0					0		
Celery									
(petiole)	29	1	—	—	Tr[4]	—	0		
(leaf)	29	10	—	—	0.013	Tr[2], Tr, 0.001, 0.001, 0.002, 0.002, 0.002, 0.002, 0.005, 0.005(T-BHC[5]) 0.002(hep. ep.)	0		
Garden asparagus	5	0					0		
Radish									
(root)	4	1	—	—	—	Tr[4](endrin)	0		
(leaf)	4	2	—	—	—	Tr, 0.007(endrin)	0		
Turnip									
(root)	5	2	Tr[4], 0.056	Tr[4], 0.040	—	—	0		
(leaf)	5	3	Tr, 0.031	Tr, 0.017	—	0.001(T-BHC)	0		
Edible burdock	5	2	—	—	—	0.003, 0.007(hep. ep.)	0		
Sweet potato	5	0					0		
Taro	7	2	—	—	—	0.014(T-BHC) Tr[6](T-DDT[7])	0		
Potato	5	0					0		
Garden pea (immature)	8	3	0.077, 0.33	Tr, 0.12, 0.20	—	—	0		
Kindney bean (immature)	5	0					0		
Broad bean	5	0					0		
Apple	3	0					0		
Pear	1	0					0		
Hybrid melon	5	3	—	—	—	Tr[4], 0.012(dieldrin) Tr(endrin) 0.002, 0.006, 0.026(hep. ep.)	0		
Loquat	4	0					0		
Japanese persimmon	6	0					0		
Iyokan									
(flesh)	5	0					0		
(peel)	5	1	—	—	0.014	—	0		
Total	199	31	Tr ~0.33	Tr ~0.20	Tr ~0.014	Tr ~0.026	1	—	2.6

1) Total-BHC (total of α-, β-, γ-& δ-BHC), Total-DDT (total of pp'-DDT,pp'-DDE & pp'-DDD), op'-DDT, aldrin, dieldrin, endrin, heptachlor and heptachlor epoxide are investigated.
2) Tr : below 0.001ppm
3) Heptachlor epoxide is described as hep. ep. for short.
4) Tr : below 0.005ppm
5) The amount of α-BHC, β-BHC, γ-BHC and δ-BHC residue is described.
6) Tr : below 0.01ppm
7) The amount of pp'-DDT, pp'-DDE and pp'-DDD residue is described.

Table 4. Contents of Organochlorine Fungicides and Herbicides in Vegetables and Fruits

Sample	No. of sample	Fungicides (ppm)						Herbicides (ppm)	
		No. of positive	TPN	Vinclozolin	Iprodione	PCNB	Others[1]	No. of positive	CNP
Crown daisy	1	0						0	
Pot herb mustard	4	0						0	
Perilla	12	2	0.001	8.5	13	—	—	2	0.001, 0.004
Lettuce	16	7	0.003, 0.006, 0.010, 0.21, 4.6, 8.0	—	0.30	0.006, 0.019	—	2	0.002, 0.003
Salad	7	5	0.011, 0.015, 4.0, 5.5	—	—	0.001	—	2	0.001, 0.001
Japanese honeywort	9	7	0.011, 0.041, 0.065, 2.4, 3.2, 4.4	0.13, 2.1	2.2	Tr[2], 0.001	—	0	
Celery (petiole)	29	17	0.007, 0.016, 0.037, 0.097, 0.11, 0.12, 0.15, 0.23, 0.28, 0.31, 0.63, 0.73, 0.85, 2.1, 4.1, 5.6, 6.3	—	—	—	—	1	0.002
(leaf)	29	21	0.002, 0.006, 0.015, 0.031, 0.044, 0.12, 0.26, 0.35, 0.41, 0.48, 0.54, 0.63, 0.80, 0.83, 2.0, 2.9, 4.2, 4.9, 11, 27	—	—	0.002	—	2	0.002, 0.004
Garden asparagus	5	0						0	
Radish (root)	4	0						0	
(leaf)	4	0						0	
Turnip (root)	5	2	Tr[2], 0.003	—	—	—	—	0	
(leaf)	5	2	0.036, 0.14	—	—	—	—	0	
Edible burdock	5	1	0.002	—	—	—	—	3	0.001, 0.002, 0.002
Sweet potato	5	2	—	—	—	—	Tr[3], 0.005 (captafol)	0	
Taro	7	0						4	Tr[2], Tr, Tr, 0.001
Potato	5	1	0.005	—	—	—	—	0	
Garden pea (immature)	8	4	0.009, 0.020, 0.11, 0.20	—	—	—	—	0	
Kidney bean (immature)	5	1	0.001	—	—	—	—	0	
Broad bean	5	0						0	
Apple	3	2	0.002	—	—	—	0.001(captan)	0	
Pear	1	0						0	
Hybrid melon	5	0						0	
Loquat	4	0						0	
Japanese persimmon	6	1	—	—	—	—	Tr(captafol)	0	
Iyokan (flesh)	5	0						0	
(peel)	5	0						0	
Total	199	75	Tr~27	0.13~8.5	0.30~13	Tr~0.019	Tr~0.005	16	Tr~0.004

1) CAptan, captafol and procymidone are investigated.
2) Tr : below 0.001ppm
3) Tr : below 0.005ppm

Table 5. Items of the Samples Contained Several Pesticides

Sample	No. of pample	No. of positive[1)]	No.	Pesticides residue(ppm)
Perilla	12	10	1	Malathion(0.24[2)]), CNP(0.004)
			2	Prothiofos(0.06), Vinclozolin(8.5)
			3	Prothiofos(0.13), BPMC(2.6)
			4	TPN(0.001), Iprodione(13)
			5	MEP(0.01), Malathion(0.35), CNP(0.001)
Lettuce	16	11	1	DDVP(Tr[3)]), TPN(0.010)
			2	CYP(Tr[3)]), PCNB(0.006)
			3	TPN(4.6), PCNB(0.019), [HCB(Tr[4)])]
			4	PAP(0.06), Prothiofos(0.01), CNP(0.002)
			5	Prothiofos(0.03), TPN(0.003), Iprodione(0.30)
Salad	7	6	1	TPN(0.011), CNP(0.001)
			2	PCNB(0.001), [HCB(Tr)]
Japanese buneywort	9	7	1	TPN(4.4), Vinclozolin(0.13)
			2	TPN(3.2), PCNB(Tr[3)])
			3	TPN(0.041), Vinclozolin(2.1), PCNB(0.001)
Celery (petiole)	29	25	1	Diazinon(Tr[3)]), TPN(0.85)
			2	Diazinon(0.04), Salithion(0.11)
			3	Diazinon(0.07), TPN(5.6)
			4	PAP(0.14), Prothiofos(0.04)
			5	PAP(0.04), TPN(0.007)
			6	Malathion(0.01), TPN(0.15)
			7	Malathion(0.02), TPN(0.28)
			8	Salithion(0.10), TPN(0.12)
			9	Salithion(0.31), TPN(2.1)
			10	Chlorpyrifos-methy(0.16), TPN(6.3)
			11	Pirimiphos-methy(0.17), TPN(0.23)
			12	Malathion(0.03), TPN(0.037), CNP(0.002)
			13	Prothiofos(0.51), Salithion(0.28), TPN(0.31)
			14	Diazinon(Tr), Salithion(Tr[3)]), CYAP(Tr[3)]), TPN(0.11)
			15	Prothiofos(0.34), Salithion(0.10), Pirimphos-methy(0.16), TPN(4.1)
(leaf)	29	29	1	Diazinon(0.01), TPN(0.83)
			2	Diazinon(0.64), TPN(27)
			3	Malathion(0.60), TPN(0.80)
			4	Prothiofos(0.02), TPN(4.9)
			5	PAP(0.05), Salithion(0.02)
			6	Salithion(0.21), TPN(2.0)
			7	Salithion(0.60), TPN(0.002)
			8	Salithion(1.7), TPN(2.9)
			9	TPN(0.006), [Disulfoton sulfone(0.03)]
			10	Diazinon(0.01), Malathion(0.01), Prothiofos(Tr[3)])
			11	Diazinon(Tr), Malathion(0.76), TPN(0.54)
			12	Diazinon(0.01), Malathion(0.36), TPN(0.015)
			13	Diazinon(0.03), Malathion(1.6), TPN(0.26)
			11	Diazinon(0.01), Pirimiphos-methyl(4.8), TPN(0.63)
			15	PAP(0.57), Malathion(0.03), TPN(0.35)
			16	Prothiofos(4.7), Salithion(2.2), TPN(0.48)
			17	PAP(0.12), IBP(0.04), TPN(4.2), [HCB(0.002)]
			18	Diazinon(0.31), Salithion(0.31), TPN(0.031), CNP(0.002)
			19	PAP(4.1), Prothiofos(0.11), Salithion(0.03), PCNB(0.002)
			20	Diazinon(0.06), MEP(Tr[3)]), Salithion(0.03), CYAP(0.19), TPN(0.12)
			21	Diazinon (0.02), Prothiofos (1.7), Salithion (0.22), Pirimiphos-methyl (1.8), TPN(11), CNP(0.004)
Turnip (root)	5	4	1	Prothiofos(0.04), Benzoepin[5)](0.10)
			2	Benzoepin(0.004), TPN(Tr[4)])
(leaf)	5	4	1	Prothiofos(0.01), Benzoepin(0.048)
			2	Chlorpyrifos(0.01), Benzoepin(0.04), TPN(0.036)
Garden pea (immature)	8	5	1	Malathion(0.06), Benzoepin(0.53)
			2	Prothiofos(0.06), TPN(0.020)
			3	Benzoepin(0.20), TPN(0.009)
			4	EPN(0.02), Diazinon(Tr), Benzoepin(0.003), TPN(0.20)
Apple	3	2	1	Chlorpirifos(Tr[3)]), Captan(0.001)
Iyokan (peel)	5	4	1	DMTP(0.03), Salithion(0.17), Dicofol(0.014)

1) Number of samples detected pesticides except BHC, DDT, drins, heptachlor and heptachlor epoxide is described.
2) The content of pesticides is described.
3) Tr : below 0.01ppm
4) Tr : below 0.001ppm
5) The amount of α-benzoepin and β-benzoepin is described.

る残存量は少ないと推察される．しかし，10ppm 前後あるいはそれ以上の農薬の残留は，農薬散布当初の濃度に匹敵することから[16]，農薬使用者の不注意な散布によるところが大きいと考える．

一方，PCNB の不純物として知られるヘキサクロロベンゼン（HCB）がレタス，サラダナ及びセルリーの葉各1検体から痕跡～0.002ppm 検出された．レタス及びサラダナは PCNB をそれぞれ0.019及び0.001ppm 残留していた．また，レタス及びセルリーの葉には TPN が4.6及び4.2ppm 残留していた．HCB は PCNB 製剤に0.3～0.7%，TPN 製剤に0.0001～0.05%含有していることから[17]，これら農薬の施用により，その不純物である HCB が作物中に移行したと考えられる．

除草剤である CNP は，16検体（8.0%）から検出されたが，その残留量はいずれも基準値0.1ppm の1／25以下であった．また，ゴボウ及びサトイモ等，根菜類における検出率が3／5（69%）及び7／7（57%）と高く，土壌に由来すると推察される．

4．農薬複数残留の実態

同一検体から2種類以上の農薬（BHC，DDT，ドリン剤及びヘプタクロルエポキサイドを除く）を検出した野菜・果実類についてまとめ，Table 5 に示した．

23作物48農薬（ジスルホトンスルホン及び HCB を含む）について調査したが，複数残留はアオジソ，レタス，サラダナ，ミツバ，セルリーの葉柄及び葉，カブの根及び葉，サヤエンドウ，リンゴ及びイヨカンの外果皮等9種作物61検体（31%）に見られた．ミツバは有機塩素系殺菌剤の，セルリーは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199検体中130検体（65%）あった．これらの検体のうち61検体（検出検体に対する割合：47%）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24検体あった．特に，セルリーの葉柄15／29（52%）及び葉21／29（72%），サヤエンドウ4／8（50%），アオジソ5／12（42%）の順に残留割合が高く，また，セルリーの葉柄で4種類，葉で6種類，サヤエンドウで4種類の農薬の同時残留が見られ，多種類の農薬残留による汚染の進んでいる可能性が示唆された．

ま と め

1987年4月から1988年3月までに都内に入荷した野菜・果実類199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，ダイアジノン，MEP，PAP，マラチオン，プロチオホス，サリチオン等の殺虫剤15種類が82検体から痕跡～9.1ppm の範囲で検出された．ダイコンの葉1検体から残留基準値を越えて EPN が検出された．

有機塩素系農薬では，BHC，エンドリン及びベンゾエビン等の殺虫剤7種類が31検体から痕跡～0.53ppm の範囲で，また，TPN，ビンクロゾリン及びイプロジオン等の殺菌剤が痕跡～27ppm の範囲で検出された．登録保留基準値を越えて検出された農薬も多く，特に，セルリーの葉から TPN が27ppm，アオジソからビンクロゾリンが8.5ppm，イプロジオンが13ppm と高濃度に検出された．また，除草剤である CNP が16検体から痕跡～0.004ppm の範囲で検出された．

カーバメイト系農薬では，BPMC がアオジソ1検体から検出されたのみであったが，その残留量は2.6ppm と登録保留基準値を大きく超えていた．

複数の農薬を検出した例としては，アオジソ，セルリー及びサヤエンドウ等で同一検体に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は，セルリーの葉柄及び葉，サヤエンドウに見られた．

残留農薬は年々多種多様化し，農薬使用者の不注意等によると思われる多量の農薬残留や，複数残留も増加している．食品の安全性を確保する上で，農薬の残留は極力抑えることが大切であり，生産者をも含めた総合的な対策を講じ，その実現に努力する必要がある．

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：同上，32-1，172-176，1981.
3）永山敏廣，田村行弘，真木俊夫他：同上，34，165-170，1983.
4）永山敏廣，観 公子，田村行弘他：同上，35，210-218，1984.
5）田村行弘，観 公子，永山敏廣他：同上，36，199-205，1985.
6）永山敏廣，真木俊夫，観 公子他：同上，37，173-183，1986.
7）永山敏廣，真木俊夫，観 公子他：同上，38，222-228，1987.
8）小関正道，田村行弘，真木俊夫他：日本農薬学会第

7回講演要旨集，230，1982.
9）河村葉子，高村きよみ，武田明治他：衛生試験所報告，101，138-141，1983.
10）河村葉子，武田明治，内山　充他：衛生試験所報告，104，147-151，1986.
11）小西良昌，吉田精作，今井田雅示：大阪府立公衛研所報食品衛生編，18，63-68，1987.
12）足立一彦，三橋隆夫：兵庫県立衛生研究所研究報告，22，69-71，1987.
13）竹中重幸，飯田隆雄，永瀬　誠他：食衛誌，25，268-271，1984.
14）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：第11回農薬残留分析研究会資料，41-46，1987.
15）小屋宥三，村田宗茂，岸　幸子他：食品衛生研究，36，51-57，1986.
16）後藤真康：農作物における残留農薬の問題点，山本出，深見順一編，農薬　デザインと開発指針，1125，1979，ソフトサイエンス社，東京.
17）吉沢朋子，中村幸子，鈴木洋一：栃木衛研所報，17，85-86，1987.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 39, 139-143, 1988

玄米中の残留農薬実態調査
― 昭和52年度～昭和62年度 ―

真木俊夫*, 飯田真美*, 観　公子*,
永山敏廣*, 川合由華*, 二島太一郎*

A survey of Pesticide Residues in Brown Rice
(1977. 4 ～ 1988. 3)

TOSHIO MAKI*, MAMI IIDA*, KIMIKO KAN*,
TOSHIHIRO NAGAYAMA*, YUKA KAWAI* and TAICHIRO NISHIMA

Keywords：残留農薬 pesticide residues, 玄米 brown rice, 有機リン系農薬 organophosphorus pesticides, 有機塩素系農薬 organochlorine pesticides, カーバメイト系農薬 carbamate pesticides

緒　言

我が国の水稲収穫量は毎年約1千万トン台を確保し，作付面積も全国230万ヘクタール以上を有しており，米の自給率は100％に達している．これら，米作にかかる農薬の費用は昭和60年度で，米の生産費の約5.5％を占めている[1]．米に使用する農薬については，食品衛生法に基づき厚生省が定める規格基準や，農薬取締法に基づき環境庁が定める登録保留基準がある．その他，農林水産省が定める安全使用基準と水稲用農薬の適正使用法が設定されている[2]．

近年，害虫が耐性を形成すること等から新しい農薬が開発され，種々の農薬が使用されている可能性がある．しかし，これらの農薬に関して，使用実態や残留実態は十分把握されていなく，その報告も少ない[3~7]．

そこで，著者らは玄米中の残留農薬について，昭和52年度から毎月定期的に，残留基準の設定されている12種の農薬を中心に，種々農薬の実態調査を行ってきた．過去2回中間結果を報告[3~4]してきたが，昭和52年度から昭和62年度までの調査結果をまとめ，若干の知見を得たので報告する．

実験の部

1．試　料

昭和52年4月から昭和63年3月にかけて東京都内に入荷する直前の玄米合計550検体を試料とした．これらの試料について生産地と検体数を年度ごとにまとめ表1に示した．なお，品種別にみると，ササニシキ137検体，コシヒカリ135検体の2品種で全体の49％以上を占めていた．

2．調査農薬名

(1) 有機塩素系農薬：残留基準のあるもの；総BHC（α-，β-，γ-，δ-BHCの総和），総DDT（pp'-DDT, pp'-DDE, pp'-DDDの総和），エンドリン，ディルドリン　計4種．残留基準のないもの；カプタホール（ダイホルタン），ヘプタクロルエポキサイド　計2種

(2) 有機リン系農薬：残留基準のあるもの；EPN，ダイアジノン，パラチオン，フェニトロチオン（MEP），フェンチオン（MPP），フェントエート（PAP），マラチオン　計7種．残留基準のないもの；ジクロルボス（DDVP），ジメトエート，IBP　計3種

(3) カーバメイト系農薬：残留基準のあるもの；カルバリル（NAC）計1種

(4) その他：残留基準のないもの；CNP，ベンチオカーブ　計2種

なお，これらの農薬のうち，昭和52年度は14種，昭和53年度から昭和57年度及び昭和62年度は16種，昭和58年度から昭和61年度までは19種について調査を行った．

3．機　器

(1) ガスクロマトグラフ：㈱島津製作所製 GC-1C

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169　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, 169 Japan

表1　各年度における玄米の生産地と検体数

地域	生産地	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62(年度)	計	
北海道	北海道	2	4	1	1	1	2	2	1	0	2	5	21	21
東北	青森	5	3	0	0	0	3	5	3	1	2	0	22	285
	岩手	4	5	2	2	2	2	3	2	1	3	1	27	
	宮城	5	5	8	6	5	5	8	6	7	8	7	70	
	秋田	6	3	2	2	5	4	4	2	5	1	5	39	
	山形	8	4	5	9	8	7	3	10	5	7	6	72	
	福島	4	4	7	6	5	4	5	5	4	6	5	55	
関東	茨城	4	2	3	3	5	0	1	3	4	3	4	32	92
	栃木	4	1	1	7	4	6	2	3	4	6	3	41	
	千葉	1	5	1	1	1	1	0	2	2	3	2	19	
中部	新潟	5	5	7	3	3	6	7	5	9	3	4	57	147
	富山	1	5	7	4	2	4	5	2	1	2	4	37	
	石川	0	2	2	3	4	4	3	3	4	1	2	28	
	福井	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	3	
	長野	1	1	3	3	2	1	2	2	3	2	2	22	
	その他	0	0	0	0	2	1	0	1	0	1	0	5	5
	計	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50		550

(検出器FPD)，同GC-4B（検出器ECD)，同GC-5A（検出器ECD，FPD)，同GC-R1A（検出器FTD)，同GC-9A（検出器ECD，FPD，FTD）　(2) 液体クロマトグラフ：㈱日本分光製TRIROTAR Ⅱ（検出器UV 214nm)，㈱島津製作所製LC-5A（検出器UV 214nm)
(3) 分光光度計：日立製作所UV-320型

4．分析方法

昭和48年厚生省告示第2号，第332号及び残留農薬分析法[8]，残留農薬分析法Draft[9]等に従った．また，カーバメイト系農薬については，武田らの方法[10]及び永山らの方法[11]に準じた．

結果及び考察

1．検出状況及び年次推移

過去11年間に調査した各種農薬の検出状況を表2に示した．検出した農薬は，総BHC，総DDT，ダイアジノン，MEP，IBP及びNACの6種類であった．

1）有機塩素系農薬

有機塩素系農薬については，総BHCが過去11年間で合計117検体から検出され，検出率は21％と最も高かった．総BHCは，昭和52年度に46検体（検出率92％：以下同様）から0.001～0.008ppm（検出されたものの平均値0.002ppm：以下同様）の範囲で検出された．昭和53年度に22検体（44％）から0.001～0.003ppm（0.001ppm)，昭和54年度に23検体（46％）から0.001～0.003ppm（0.001ppm)，昭和55年度に13検体（26％）から0.001～0.002ppm（0.001ppm)，昭和56年度に6検体（12％）から0.001～0.002ppm（0.001ppm)，昭和57年度に6検体（12％）から0.001～0.003ppm（0.001ppm）の範囲で検出された．検出率は年々減少する傾向がみられ，昭和58年度以降は，昭和60年度に1検体（2％）から0.001ppm検出されたのみで他からは検出されなかった．また，検出された濃度も昭和52年度に0.004ppm以上検出されるものもあったが，以降急激に減少した．

BHCは，農薬取締法で昭和44年10月に稲作に使用することが禁止され昭和46年12月20日に登録が失効された．昭和52年度の調査結果は，使用禁止後6年経過しているにもかかわらず，検出率は92％と非常に高かった．これは，BHCが稲作用殺虫剤として多量に使用されたために[12]土壌中に残留し，これが検出されたと考えられる．しかし，それ以降は検出率及び検出量が徐々に低くなっていることから，土壌中の残留量も経時的に減少していると推察され，昭和60年度以降は全く検出されなかった．

総DDTは，昭和52年度に1検体から0.007ppm検出されたのみであった．DDTはBHCと同様に土壌中での残留が比較的長いため，玄米中に残留する懸念があったが，BHCと比較し検出量も低く，また，昭和53年度以

表2　玄米中の各種農薬の検出状況

農薬名	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62(年度)	残留基準	検出限界
総BHC	0.008(1)	0.003(2)	0.003(1)	0.002(2)	0.002(1)	0.003(1)	ND	ND	0.001(1)	ND	ND	0.2	0.001
	0.005(2)	0.002(1)	0.001(22)	0.001(11)	0.001(5)	0.001(5)							
	0.004(2)	0.001(19)											
	0.003(11)												
	0.002(13)												
	0.001(17)												
総DDT	0.007(1)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.2	0.005
エンドリン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.005
ディルドリン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.005
カプタホール	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	—		0.01
ヘプタクロルエポキサイド	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		0.005
EPN	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.1	0.01
ダイアジノン	ND	ND	ND	ND	ND	0.03(1)	ND	ND	ND	ND	ND	0.1	0.01
パラチオン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01
フェニトロチオン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.02(1)	0.2	0.01
フェンチオン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.05	0.01
フェントエート	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.05	0.01
マラチオン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.1	0.01
ジクロルボス	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		0.01
ジメトエート	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		0.01
IBP	—	—	—	—	—	—	ND	ND	ND	ND	1.5 (1)		0.01
カルバリル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.02(1)	ND	ND	0.09(1)	1.0	0.01
CNP	—	—	—	—	—	—	ND	ND	ND	ND	—		0.005
ベンチオカーブ	—	—	—	—	—	—	ND	ND	ND	ND	—		0.01
検査農薬数	14	16	16	16	16	16	19	19	19	19	16		

各年度の検査検体数：50，ND：不検出，単位：ppm，(　)：検出件数

降は検出されない等，BHC の残留実態と明らかに異なっていた．これは検出限界が異なることの他に，DDT は蒸気圧は低いが圃場から速やかに水面で共蒸留する性質を有すること[13]も検出率の低かった一因であると考えられる．

エンドリン，ディルドリン，カプタホール及びヘプタクロルエポキサイドは，11年間に1検体からも検出されなかった．

米は野菜・果実類とは異なり苗から収穫までの期間が長いため，土壌由来の農薬を生物濃縮するとも思われたが，野菜・果実類に残留する濃度と酷似していた[3~4]．今回の著者らの結果は，昭和51年度から10年間の小西らの報告[5]や，昭和57年度から5年間の足立らの報告[6]，また，昭和58年度から3年間の武光らの報告[7]と一致している．

2）有機リン系農薬

有機リン系農薬については，ダイアジノンが昭和57年度に1検体から0.03ppm，MEP が昭和62年度に1検体から0.02ppm 及び IBP が昭和62年度に1検体から1.5ppm 検出された．その他の有機リン系農薬の EPN，パラチオン，MPP，PAP，マラチオン，DDVP 及びジメトエートは検出されなかった．また，足立らは，昭和61年度に MEP を0.03ppm，MPP を0.02ppm 検出している[6]．従って，近年有機リン系農薬が検出される傾向がみられ，これらの農薬の使用が増加していると考えられる．

3）カーバメイト系農薬

カーバメイト系農薬の NAC は，昭和59年度に1検体から0.02ppm 及び昭和62年度に1検体から0.09ppm が検出された．

低毒性のカーバメイト系農薬や有機リン系農薬は，かつて使用されていた有機塩素系農薬に替わり，近年好んで使用されている傾向がある．特に，今後カーバメイト系農薬の水田への空中散布回数の増加が予想されることから，この種の農薬のモニタリングは必要と考える．

4）その他の農薬

CNP 及びベンチオカーブはいずれからも検出されなかった．これらの農薬に関しては，水耕地域での河川水や魚介類への汚染に関する報告は多い[14~18]．しかし，散布時期が早く，農業排水中に流出し，水田での代謝分解が速い[19]ことから玄米への残留は，ほとんどないと考える．

2．残留基準との関係

過去11年間を通じて，食品衛生法の残留基準を超えて農薬を検出する玄米はなかった．

昭和60年度の調査結果をもとに，1人1日当りの農薬の摂取量を換算した．米の摂取量は，全国平均216.1g／人／day である[20]ことから，60kg の成人が最も農薬検出量の多かった玄米を摂取したとして，各農薬の摂取量を換算した．この摂取量と1日当りの摂取許容量（ADI）を比較し表3に示した．ADI の設定されている農薬のうち，総 BHC，総 DDT，ダイアジノン，MEP 及び NAC の最大摂取量は ADI の0.2～5.4％の範囲であった．

食品衛生法の残留基準に設定されていない IBP が1.5ppm 検出された．この玄米に関して，人での摂取量を同様に換算すると0.00547mg／kg／day であった．IBP をマウスに経口投与した時の LD_{50}は660mg／kg[21]であることから，その摂取量は LD_{50}の約1／10,000で，特に喫食上問題はないと思われる．しかし，この様な農薬残留は，農薬使用者の不注意によると考えられるため，今後，使用者側にも使用時期や使用方法を徹底させる等，生産者の指導を促す必要がある．

ま と め

昭和52年4月から昭和63年3月にかけて東京都内に入荷直前の玄米550検体について，残留農薬の実態調査を行った．

1．有機塩素系農薬は総 BHC 及び総 DDT が検出された．総 BHC は，0.001～0.008ppm の範囲で検出され，検出率は21％であった．しかし，年々減少する傾向を示

表3　検出された農薬の1日許容摂取量（ADI）との比較

農薬名	最高検出濃度 (ppm)	米216.1g 中の量 (mg)	体重60kg の人の摂取量（mg／kg）	ADI (mg／kg)
総 BHC	0.008	0.00172	0.000028	0.0125
総 DDT	0.007	0.00151	0.000025	0.005
ダイアジノン	0.03	0.00648	0.000108	0.002
フェニトロチオン	0.02	0.00432	0.000072	0.005
カルバリル	0.09	0.01944	0.000324	0.1

し，近年では検出されなくなった．

2．有機リン系農薬は，ダイアジノン，MEP及びIBPが検出された．ダイアジノン0.03ppmが1検体から，MEP0.02ppmが1検体から及びIBP1.5ppmが1検体から検出された．

3．カーバメイト系農薬は，NAC0.02ppm及び0.09ppmがそれぞれ1検体から検出された．

以上，過去11年間で玄米中から検出された農薬は，いずれも残留基準値以下であり，喫食上，特に問題はないと思われる．しかし，今後，残留基準の設定されていない農薬や，新しい農薬の残留等が考えられるため，この面での調査を進めたい．

謝　辞

本調査の遂行するにあたり，米の採取やその他の便宜を計って下さいました，生活文化局価格流通部米穀課並びに衛生局食品監視課の職員に深謝致します．また，これらの調査に関与された多くの方々に敬意を表します．

文　献

1）農林水産省農蚕園芸局植物防疫課：農薬要覧，1987，日本植物防疫協会．
2）全国農薬安全指導者協議会編：農薬適正使用ガイドブック，1985，全国農薬協同組合．
3）小関正道，田村行弘，真木俊夫他：東京衛研年報，32-1，172-176，1981．
4）田村行弘，観　公子，永山敏廣他：同上，36，199-205，1985．
5）小西良昌，吉田精作，今井田雅示：大阪府立公衆衛生研究所年報，食品衛生編，18，63-68，1987．
6）足立一彦，三橋隆夫：兵庫県衛生研究所報告，22，69-71，1987．
7）光武隆久，山口博久，井元　孝：佐賀県衛生研究所年報，14，128，1987．
8）後藤真康，加藤誠哉：残留農薬分析法，1980，ソフトサイエンス社，東京．
9）厚生省生活衛生局食品化学課編：残留農薬分析法Draft，厚生省食品化学レポートシリーズ，No. 40，1985．
10）武田明治：食品衛生研究，21，1223，1971．
11）永山敏廣，真木俊夫，飯田真美他：日本食品衛生学会第51回学術講演会講演要旨集，55，1985．
12）山本　亮：農薬学，172，1969，南江堂，東京．
13）山本　出，深見順一：農薬―デザインと開発指針―1979，ソフトサイエンス社，東京．
14）飯塚宏栄，岩撫才次郎：用水と廃水，24，(6)，13-19，1982．
15）石井吉夫：生態化学，7(2)，19-31，1984．
16）中南　元：生態化学，8(1)，3-11，1985．
17）辻沢　広，上田幸右，橋爪　崇ら：和歌山衛生公害研究センター年報，33，42-47，1987．
18）塚林　裕，四月朔日，冨司子ら：石川県衛生公害研究所年報，23，279-285，1986．
19）山田忠夫：植物防疫，30，312-317，1976．
20）厚生省保健医療局健康増進栄養課：栄養学雑誌，45(1)，41-44，1987．
21）富沢長次郎，上路雅子：最新農薬データブック，130，1982，ソフトサイエンス社，東京．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 144-146, 1988

天然甘味料の実態調査（第3報）
天然甘味料製剤中のステビア甘味成分の分析

高橋　巌*, 中島和雄**, 広門雅子**,
植松洋子**, 松井敬子**, 風間成孔**

Survey of Natural Sweeteners (III)
Analysis of Stevia Components in Commercial Natural Sweetener Products

IWAO TAKAHASHI*, KAZUO NAKAJIMA**, MASAKO HIROKADO**
YOKO UEMATSU**, KEIKO MATSUI** and MASAYOSHI KAZAMA**

Keywords：天然甘味料 natural sweetener, ステビア *stevia rebaudiana*, ステビオサイド stevioside, レバウディオサイドA rebaudioside A, α-グルコシルステビオサイド α-glucosyl stevioside, 食品添加物 food additive, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography

緒　言

ステビア甘味料は南米原産のキク科植物 *Stevia rebaudiana* Bertoni の葉部に含まれる甘味成分（数種類のステビオール配糖体）を抽出精製したもので，その主成分はステビオサイド（ST）とレバウディオサイドA（RA）である[1].

ステビア甘味料が我国で使用されてから十数年が経過した．この間，飽食の時代を迎え，栄養過多による肥満の問題，さらにはそれに伴う成人病の問題等から，安全で低カロリー，甘味質の良い甘味料が求められている．ステビア甘味料においては，より砂糖に近い甘味質の改善がなされ，数年前から ST を主成分とする抽出製品に加えて，甘味質の良好な RA を高比率で含有する製品（RA 製品）と，糖転移酵素でステビア甘味成分にグルコースを付加した α-グルコシルステビオール配糖体製品（糖転移製品）が使用されている[2].

我々は昭和54年度にステビア甘味料の使用実態調査をおこなった[3]．今回，上記の新しいステビア甘味料の使用実態を把握するため調査したので報告する．

実験の部

試　料　都食品監視課より昭和62年5月～昭和63年2月に当所に送付された天然甘味料製剤27検体（各種食品製造業からの収去品13社，15検体，天然甘味料の製造元からの買い上げ品3社，7検体，一般市場流通品4社，5検体）を用いた．

試　薬　α-グルコシルステビオール配糖体は，丸善化成㈱より提供されたものを標品とした．他の試薬は前報[3]に従った．

装　置　ガスクロマトグラフ：島津 GC-5A（検出器 FID），高速液体クロマトグラフ：ポンプ　日本分光 BIP-Ⅰ型，検出器，同 UUIDEC-100-V型

実験操作

1．定性

前報に従った．

2．定量

i）総ステビア　前報に従った．

ii）ST および RA　試料1gを水で適宜希釈し0.45 μm のフィルターでろ過後，下記の条件で高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を行い，別に作成した検量線（ST, RA：各0.25, 0.5, 0.75, 1.0mg／ml）を用いて定量した．

測定条件：カラム　Nucleosil 5 NH_2（4×300mm），移動相　アセトニトリル：水（83：17），流速　1.5ml／min，検出器　UV210nm

結果および考察

天然甘味料製剤中のステビア甘味成分の分析結果を，

*東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科　169　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, 169 Japan
**同生活科学部食品添加物研究科

表1に示した.

総ステビア，ST，RAの定量値からステビア甘味料の製品を，STがRAより多いものを抽出製品，RAがSTより多いものをRA製品，STとRAの合計値が総ステビアの値に比べ特に少ないものを糖転移製品に分類した.また，糖転移製品についてはHPLCで得られたクロマトグラムのパターン（図1－3）からも判断した.

各製品の高速液体クロマトグラムを図1に示した．図1－1は抽出製品，図1－2はRA製品そして図1－3は糖転移製品である．糖転移製品のクロマトグラムではSTとRAの他に多数のピークがみられるが，これはα-グルコシルステビオール配糖体（転移酵素の作用によりステビオール配糖体にグルコースが1～10数個付加したものの混合物）のピークである.

表1．天然甘味料製剤中のステビア甘味成分

No	総ステビア	ステビオサイド	レバウディオサイドA
1	0.8%	0.5%	0.2%
2	10.6	6.6	2.7
3	45.3	26.9	11.9
4	53.6	28.7	14.9
5	10.7	5.0	3.2
6	12.0	6.8	2.4
7	4.0	2.2	1.2
8	3.5	2.4	0.9
9	4.4	2.9	1.2
10	8.4	3.4	4.0
11	20.6	7.1	14.0
12	34.5	5.0	26.5
13	56.6	12.9	28.4
14	51.3	1.4	2.4
15	28.5	2.7	4.0
16	66.8	23.2	42.6
17	23.2	7.9	14.7
18	6.9	2.3	4.5
19	58.8	1.5	1.0
20	56.6	3.2	2.1
21	31.4	2.3	1.4
22	21.4	1.2	1.0
23	0.6	0.4	0.2
24	0.2	0.01	0.01
25	1.4	0.04	0.06
26	2.8	0.1	0.1
27	0.6	0.04	0.03

No 1～15：各種食品製造業からの収去品
No16～22：天然甘味料の製造元からの買い上げ品
No23～27：一般市場流通品

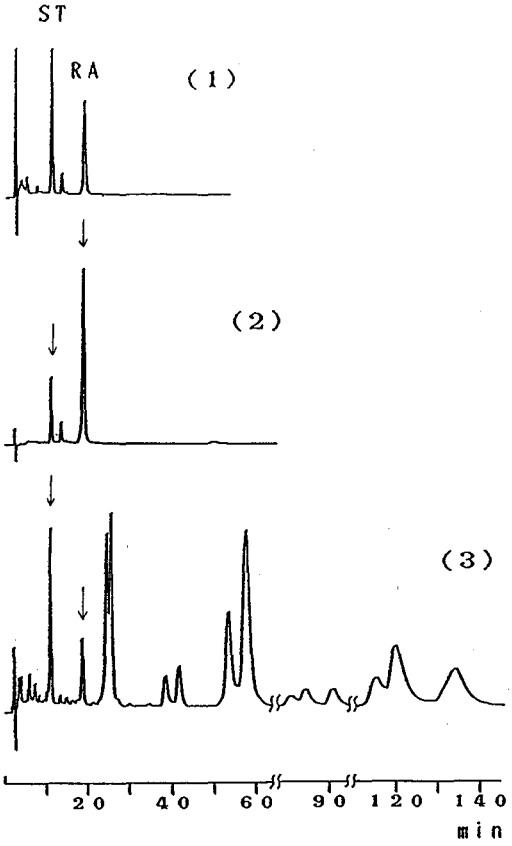


図1．ステビア甘味料の高速液体クロマトグラム
(1) 抽出製品 (2) RA製品 (3) 糖転移製品
ST：ステビオサイド
RA：レバウディオサイドA

前回の調査ではステビア甘味料として抽出製品だけが使用されていたが，今回の調査では抽出製品に加えてRA製品と糖転移製品の使用が認められた.

現在，ステビア甘味料は甘味質改善製品であるRA製品と糖転移製品の使用量の増加がみられ，とくに糖転移製品は全製品の半数近くを占めているといわれる．またその使用も雑味の多い食品に対しては抽出製品を，味質がストレートに出やすい食品には甘味質改善製品と用途分けされる傾向にある[4,5].

検体別にみると，各種食品製造業からの収去品（No 1～15）では，抽出製品9検体（No 1～9），RA製品4検体（No10～13），糖転移製品2検体（No14～15）で，使用量の多いと思われた糖転移製品が以外に少ない結果

であった．これは，今回の収去先がソース類製造業，粉末食品製造業など雑味の多い食品を扱う業者が多かったためと考えられる．

天然甘味料の製造元からの買い上げ品（No16～22）では，RA 製品 3 検体（No16～18），糖転移製品 4 検体（No19～22）で，すべて甘味質改善製品であった．

一般市場流通品（No23～27）では，抽出製品 1 検体（No23），糖転移製品 4 検体（No24～27）であった．これらの検体はいわゆるダイエット甘味料で，このタイプの商品は使用する甘味料の甘味質がストレートに出るので糖転移製品が多く使用されていると考えられる．

今回の調査でその使用が確認された甘味質改善製品は，近年高度に発展したバイオ・先端技術により生産されたものである．RA 製品はステビアの品種改良あるいは精製技術の改良により RA 含有量を高めたものであり，糖転移製品は微生物起源の糖転移酵素（サイクロデキストリン合成酵素）の作用により生産されたものである[6]．また，同様の酵素を用いてグリチルリチンの糖転移製品も開発されており，今後この分野における技術の発展を考えるとさらに新しいタイプの甘味料の出現が予想される．

ま と め

ステビア甘味料の使用実態調査を行った．

前回（昭和54年度）の調査では ST を主成分とする抽出製品の使用だけであったが，今回の調査では抽出製品に加えて甘味質を改善した RA 製品と糖転移製品の使用が確認された．

謝　辞　本調査を実施するにあたり，試料収集にご協力いただいた衛生局食品監視課の皆様に深謝いたします．

文　　献

1）Kaneda, N., Kasai, K., Yamasaki, K. and Tanaka, O.：*Chem. Pharm. Bull.*, 25, 2466, 1977
2）(財)甘味資源振興会：低カロリー甘味料実態調査報告書，昭和59・60年度
3）中嶋　巌，広門雅子，中島和雄，遠藤英美：東京衛研年報，31-1，180，1980
4）菊地啓明：フードケミカル，1，71，1988
5）内山忠生：New Food Industry, 29(3)，26，1987
6）北畑寿美雄：フードケミカル，7，31，1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 147-150, 1988

食品添加物製剤中の天然物の分析

中島和雄*, 高橋　巌*, 広門雅子*
植松洋子*, 松井敬子*, 風間成孔*

Survey on Natural Products in Food Additive Preparations

KAZUO NAKAJIMA*, IWAO TAKAHASHI*, MASAKO HIROKADO*
YOKO UEMATSU*, KEIKO MATSUI* and MASAYOSHI KAZAMA*

Keywords：食品添加物製剤 food additive preparation, 天然物 natural product, 糖 saccharide

緒　言

食品添加物製剤には，合成添加物製剤，天然添加物製剤，およびこれらの複合添加物製剤がある．これらの添加物製剤には，添加物以外に天然物が含まれていることがある．しかし，この天然物についての報告はほとんど見あたらない．そこで今回，昭和62年度に収去された添加物製剤について，天然物として含まれていると考えられる糖類，塩化ナトリウム，油脂類およびタンパク質の定性分析を行った．さらに天然物として多く検出された糖類については，近年，バイオテクノロジーの発達により種々のオリゴ糖が使用されている[1,2]ことを考慮して，各種の糖の同定および定量分析を行った．

実験方法

試料　都食品監視課より昭和62年4月～63年3月にかけて当所に送付された食品添加物製剤64検体を用いた．

試薬　すべて試薬特級品を用いた．

装置　高速液体クロマトグラフ：日本分光工業製TRIROTAR-Ⅵ，検出器：昭和電工製示差屈折計SE-51，ケイ光X線分析装置：エネルギー分散型ケベックス社0600ウルトラレースシステム，核磁気共鳴装置（^{13}C-NMR）：日本電子社製JEOL FX-270型 ^{13}C 67.8MHz，アミノ酸分析計：日立製835型

糖の定性分析　試料50mgを水1mlに溶かし，薄層クロマトグラフィー（以下TLCと略す）を行い，標準品のRf値から試料中の糖類の確認を行った．

TLCの条件：シリカゲル薄層板Merck社製Kieselgel 60，展開溶媒クロロホルム：メタノール：水（15：11.5：2），発色試薬アニスアルデヒド硫酸試薬

糖の定量分析　試料200mgを水50mlに溶かし，ミリポアフィルター0.22 μmでろ過した後，高速液体クロマトグラフィー（以下HPLCと略す）を行った．標準溶液としてグルコース，ラクトース，サッカロース，マルトースおよびフラクトースを各50mg，水50mlに溶かし，試料と同様の方法でHPLCを行った．分析カラムは，一般に使われているNH_2カラム[3]とKC-811カラムを用い2つのカラムから同定を行い，定量分析は糖相互の分離の良いカラムで行った．

HPLCの条件：カラムNucleosil 5NH_2（5 μm，4 φ×250mm），溶離液　アセトニトリル：水（80：20），流速1.0ml／min，検出器　示差屈折計　カラムShodex Ionpak KC-811（8 φ×300mm），溶離液　水，流速1.0ml／min，検出器　示差屈折計

塩化ナトリウムの定性分析　試料を粉末としたのち，試料ホルダーに入れ，ケイ光X線分析を行い塩化ナトリウムを調べた．

試料1gを550℃で灰化し，0.1NHClに溶かし，炎色反応によりナトリウムを調べた．

炎色反応で黄色となり，ケイ光X線分析で塩素による2.622KeVのKαのピークを確認したものを塩化ナトリウムとした．

油脂類の定性分析　試料1gをクロロホルム：水（1：1）混液50mlに溶かし，クロロホルム25mlで3回抽出し，蒸発乾固したのち，重クロロホルムに溶かし，^{13}C-NMRで調べた．NMRのケミカルシフト値から油脂

*東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科　169　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, 169 Japan

類の確認をした．油脂類に特徴的な，脂肪酸鎖による30ppm付近のピーク，グリセロール炭素による70ppm付近のピーク，カルボキシル炭素による170ppm付近のピークを示すものを油脂類とした．

タンパク質の定性分析　試料を水酸化ナトリウム試液で溶かし，キサントプロテイン反応で調べた．

衛生試験法注解中のアミノ酸分析計による分析法[4]に準じて，試料を加水分解し，アミノ酸分析計により分析した．

キサントプロテイン反応で黄色となり，アミノ酸分析によりアミノ酸を検出したものをタンパク質とした．

結果と考察

食品添加物製剤中の天然物の表示量　昭和62年度に収去された添加物製剤は155検体で，その表示から天然物を含む製剤は64検体（41％）であった．添加物製剤中の天然物の表示量を表1に示した．この表から，天然物が製剤中に多く含まれ，天然物を50～60％含む製剤が最も多いことがわかった．

天然物の分析結果　天然物の分析結果を表2に示した．天然物と表示されている製剤からはすべて天然物が確認された．天然物としては糖類，塩化ナトリウム，油脂類およびタンパク質が確認された．糖類を含む製剤は64検体中57検体（89％）で最も多く，ほとんどの製剤に含まれており，増量，希釈および賦形の目的で使われていた．また，天然物として糖類のみを含む製剤でも25検体（39％）であった．次に，塩化ナトリウムを含む製剤は33検体（51％）であった．これらのうち，20検体は発色剤中に使われていた．油脂類を含む製剤は，5検体（8％）であり，すべて保存料中に粉末油脂を皮膜剤でコーティングして使われていた．タンパク質を含む製剤は2検体（3％）であった．

Table 1. Natural Product Contents on Labeling in Food Additive Preparations

Content(％)	Number of Samples
0～ 10	1
10～ 20	5
20～ 30	4
30～ 40	3
40～ 50	7
50～ 60	11
60～ 70	9
70～ 80	6
80～ 90	6
90～100	4
no labeling	8
Total	64

天然物を含む添加物製剤の用途　天然物を含む添加物製剤の用途を表2に示した．発色剤が64検体中23検体（36％）で最も多かった．発色剤23検体は，すべて硝酸塩及び亜硝酸塩を含む製剤で，食肉製造業で用いられていた．次に甘味料が19検体（30％）であった．これらは清涼飲料，菓子製造業，および漬物業などに用いられていた．このほかに，天然物は保存料，色素製剤，固結防止剤，調味料，香料，酸味料，発砲剤およびイーストフードに含まれていた．

糖の定量分析　糖類の標準品のTLCによるRf値およびHPLCによる保持時間を表3に，添加物製剤中の糖類の分析結果を表2に示した．この結果から製剤中には，多糖類，グルコース，サッカロース，ラクトース，マルトースおよびフラクトースが含まれていた．しかしバイオテクノロジーでつくられるオリゴ糖は検出されなかった．単一の糖を含む製剤が，57検体中40検体（70％）で多かった．糖の種類では，多糖類を含む製剤が27検体（47％）で最も多かった．この多糖類は，ヨウ素反応を示さず，加水分解物がグルコースであることから，ほとんどがデキストリンであることが推定された．次に，グルコースは17検体（30％）で，定量値の範囲は73.6％～2.4％であった．ラクトースは16検体（28％）で，定量値の範囲は79.9％～1.6％であった．ラクトースは甘味料製剤19検体中に9検体含まれていて多かった．サッカロースは13検体（23％）で，定量値の範囲は44.3％～7.9％であった．

ま と め

食品添加物製剤は，天然物を多く使用しているので，天然物の実態を把握するために分析を行った．その結果天然物として糖類，塩化ナトリウム，油脂類およびタンパク質を確認した．糖類は，天然物を含む添加物製剤中に，64検体中57検体（89％）含まれていた．糖類としては多糖類，グルコース，ラクトース，サッカロース，マルトース，およびフラクトースを確認した．

謝辞　試料収集にあたり御協力いただきました食品機動監視班の方々に深謝いたします．

Table 2. Analytical Results of Natural Products

Functional Use	N	Natural Product	N	Saccharide	N	Content(%)
Color fixative	23	Saccharides, Sodium Chloride	15	Polysaccharide	5	
				Suc	4	17.6, 15.9, 14.3, 10.3
				Suc, Glc, Mal	3	37.3, 36.9, 36.2(Suc) 3.4, 4.5, 4.2(Glc) 2.4, 4.5, 3.5(Mal)
				Glc	2	24.6, 24.1
				Polysaccharide, Glc	1	3.1(Glc)
		Sodium Chloride	5			
		Saccharides	3	Polysaccharide	2	
				Glc	1	21.5
Sweetener	19	Saccharides	14	Polysaccharide	6	
				Lac	3	79.9, 73.9, 53.9
				Polysaccharide, Lac	2	25.9(Lac), 21.0(Lac)
				Polysaccharide, Mal	1	10.7(Mal)
				Glc, Lac	1	61.6(Glc), 26.3(Lac)
				Glc	1	73.6
		Saccharides, Sodium Chloride	5	Lac, Suc	2	67.9, 74.2(Lac), 19.4, 9.2(Suc)
				Polysaccharide, Suc, Lac	1	12.6(Suc), 64.0(Lac)
				Polysaccharide	1	
				Glc	1	69.0
Preservative	7	Saccharides, Oils and Fats	4	Glc	2	6.9, 6.5
				Suc	1	36.2
				Polysaccharide	1	
		Saccharides	2	Lac	2	22.5, 17.1
		Oils and Fats	1			
Color	4	Saccharides	3	Polysaccharide, Glc, Lev	1	2.4(Glc), 1.9(Lev)
				Polysaccharide, Mal	1	4.1(Mal)
				Lac	1	4.2
		Sodium Chloride	1			
Antistick agent	4	Saccharides, Sodium Chloride	3	Polysaccharide	2	
				Glc, Lac	1	29.6(Glc), 8.0(Lac)
		Saccharides, Protein, Sodium Chloride	1	Suc	1	44.3
Flavor enhancer	2	Saccharides, Sodium Chloride	2	Polysaccharide, Lac	2	42.8(Lac), 1.6(Lac)
Flavoring agent	2	Saccharides	2	Polysaccharide, Glc, Suc, Lev	1	16.1(Glc) 7.9(Suc), 26.6(Lev)
				Glc	1	5.4
Acidifier	1	Saccharides, Sodium Chloride	1	Glc	1	10.2
Whipping agent	1	Saccharides	1	Lac	1	15.0
Leavening agent	1	Saccharides, Protein	1	Mal	1	5.0
Total	64		64		57	

N : Number of Samples Glc : Glucose Lac : Lactose Lev : Levulose Suc : Sucrose Mal : Maltose

Table 3. Rf Value (TLC) and Retention Time (HPLC) of Saccharides

Saccharides	Rf Value	Retention Time (min)	
		Nucleosil $5NH_2$	Ionpak KC-811
Fructose	0.44	13.3	16.5
Glucose	0.43	15.8	15.6
Sucrose	0.35	25.6	14.0
Maltose	0.29	32.0	13.9
Lactose	0.25	38.3	14.1
Polysaccharide	0.00		11.4

文　献

1) 北畑寿美雄，岡田茂孝：フードケミカル，10，66-72，1985，食品化学新聞社

2) 早川幸男：フードケミカル，6，87-93，1988，食品化学新聞社

3) Damon, C. E. and Pettitt, B. C.：*J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63(3), 476-480, 1980

4) 日本薬学会編：衛生試験法注解，161-163，1980，金原出版

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 151-155, 1988

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（第２報）副色素の分析

植松洋子*，広門雅子*，中島和雄*
高橋　巌*，松井敬子*，風間成孔*

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Impurities in Amaranth, New Coccine and Sunset Yellow FCF (II) Determination of Subsidiary Colors

YOKO UEMATSU*, MASAKO HIROKADO*, KAZUO NAKAJIMA*,
IWAO TAKAHASHI*, KEIKO MATSUI* and MASAYOSHI KAZAWA*

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，副色素 subsidiary colors，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

食用赤色２号（アマランス），赤色102号（ニューコクシン），黄色５号（サンセットイエロー FCF）（以下，それぞれR-２，R-102，Y-５と略す）に含まれる不純物のうち，原材料，副反応生成物，および副色素の一部の分析については，前報[1]で報告した．今回は，前回分析を行わなかった残りの副色素について分析を行った．黄色５号中に含まれる副色素オレンジ RN および，オレンジⅡについては，FDA の規格で合計で１％以下と限度値が定められている[2]ため，これらについて分析を行った．赤色２号，赤色102号中に含まれる副色素については FAO／WHO の規格[3,4]で，赤色２号中には３％以下，赤色102号中には１％以下とされているが，副色素の種類は記されていないため，生成の予想されるボンソー６R，Fast Red E，ナフチオン酸とナフチオン酸の結合した副色素（以下 NA＋NA と略記），赤色102号中の赤色２号，およびその逆について分析を行った．これらの副色素の構造（NA＋NA は推定構造）は，前報に示した．

実験の部

１．試料　色素：市販品及び，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．試料としての標準色素は，三栄化学工業㈱製を用いた．

２．試薬　食用赤色２号，赤色102号は，国立衛生試験所標準品を用いた．副色素 NA＋NA（純度78.9％）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，ボンソー６R は，CHROMA 製を用いた．臭化-テトラ-n-ブチルアンモニウム（以下 TBABr と略記）は，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　前報に同じ．

４．高速液体クロマトグラフ測定条件　カラム，温度，検出器感度：前報に同じ，流速0.5ml／min，注入量：10 μl，移動相：A. pH7.0リン酸緩衛液（リン酸一ナトリウム－リン酸二ナトリウム，0.005M）：メタノール＝53：47＋0.005 M TBABr, B. pH7.0リン酸緩衛液（0.005M）：テトラヒドロフラン（以下 THF と略記）＝75：25＋0.005 M TBABr，検出波長：237nm および500nm（移動相A），254nm（移動相B）

５．試料および標準溶液の調製　副色素の標準溶液：0.01mg／ml，色素：2.5mg／ml の水溶液とした．検量線用標準溶液は，0.1mg／ml の水溶液（標準原液）を調製し，これを水で適宜希釈した．

*東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科　169　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, 169 Japan

結果及び考察

1．分離条件の検討

R-2，R-102中に含まれることが予測される5種類の副色素については，前報での分析条件を基本としてメタノール比を変えたところ，緩衝液：メタノール＝50：50＋0.005M TBABr で分離することができた．しかし，色素中には，分析の対象とした副色素以外にも多くの副色素やその他の不純物が含まれるためそれらとの分離も考慮し，緩衝液：メタノール＝53：47＋0.005M TBABr とした（移動相A）．

黄色5号中に含まれることが予想される2種類の副色素，オレンジRNとオレンジⅡについては，前報の条件では，メタノール比を変えても分離することができなかった．この2種の副色素は構造がきわめて似ておりこの移動相では分離できないと思われたので，Bailey ら[5]の報告を参考に，メタノールの代わりに THF を用いたところ，緩衝液：THF＝75：25＋0.005M TBABr で分離することができた（移動相B）．

Bailey らはグラジェントを用いているが，カウンターイオンを用いることによりグラジェントによらずに分析時間もそれほど長くなく分析することができた．各副色素の標準品のクロマトグラムを Fig. 1，2に示した．

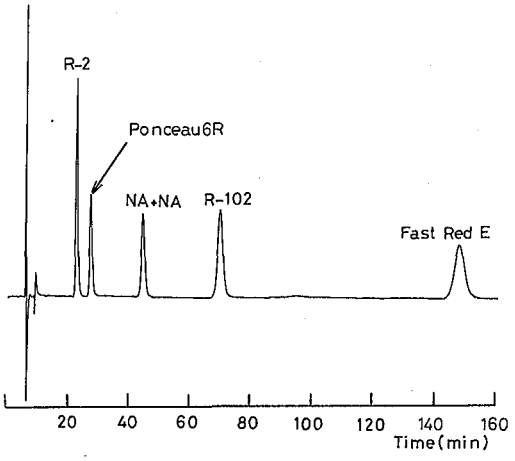


Fig. 1．Separation of Subsidiary Colors in Amaranth and New Coccine
HPLC conditions
Column：Nucleocil 7 μm C_{18} 4mm φ × 250mm, mobile phase：0.005M phosphate buffer (pH7.0)：methanol＝53：47＋0.005M tetra-n-butyl ammonium bromide, flow rate：0.5 ml/min, wavelength：237 nm, sens：0.04 AUFS, injection volume：10 μl, conc. of impurities：0.01mg/ml

Fig. 2．Separation of Subsidiary Colors in Sunset Yellow FCF
HPLC conditions
mobile phase：0.005M phosphate buffer (pH 7.0)：tetrahydrofuran＝75：25＋0.005M tetra-n-butyl ammonium bromide, wavelength：254 nm
other HPLC conditions are the same as shown in Fig. 1

2．検量線

これらの副色素の検量線は，注入量10 μl の場合，Fast Red E は，2-100 μg/ml，その他は 1-100 μg/ml の範囲で直線性を示した（R-2，R-102中の副色素については237nm，Y-5中の副色素については254 nm で検出した）．このため，定量限界を Fast Red E については 2 μg/ml，他は，1 μg/ml とした．色素に対する定量限界は，色素を0.25％水溶液，注入量を最大50 μl とすることによって，それぞれ0.016％，0.008％とすることができた．各検量線の相関係数は，ポンソー6R：0.9999，R-2：0.9999，NA＋NA：0.9991，R-102：0.9999，Fast Red E：0.9999，オレンジ RN：0.9999，オレンジⅡ：0.9999であった．

3．市販色素の分析

本法を用いて市販色素の分析を行った結果を Table 1，2に，また，代表的なクロマトグラムを Fig. 3－5に示した．R-2中には主として Fast Red E が，また R-102中には R-2，ポンソー6R，Fast Red E が含まれていた．これらの副色素の含有量の合計は，FAO/WHO の規格の限度をこえなかった．しかし，R-2，R-102中には，このほかにも同定できない多くの副色素

Table 1. Amounts of Subsidiary Colors in Commercial Amaranth and New Coccine

Sample	Use	R-2% %	Ponceau 6R %	R-102 %	NA+NA %	Fast Red E %
R2-A	SC		ND	ND	ND	ND
R2-B	FC		ND	ND	ND	0.706
R2-C	FC		ND	ND	ND	0.874
R2-D	ID		ND	ND	ND	1.147
R2-E	ID		ND	ND	ND	1.351
R2-F	CD		ND	ND	ND	0.461
R2-G	CD		ND	ND	ND	1.506
R102-A	SC	0.086	0.041		ND	ND
R102-B	FC	0.006	0.015		ND	ND
R102-C	FC	0.021	0.037		ND	0.149
R102-D	ID	0.019	0.033		ND	0.143
R102-E	ID	0.030	0.020		ND	ND
R102-F	ID	0.035	0.022		ND	ND
R102-G	ID	ND	0.029		ND	0.069
R102-H	ID	0.033	0.062		ND	0.027
R102-I	ID	ND	ND		ND	ND
R102-J	ID	ND	ND		ND	ND
R102-K	ID	0.081	0.066		ND	0.033
R102-L	CD	0.050	0.071		ND	0.202
R102-M	CD	0.048	0.024		ND	0.017

ND : not more than 0.008% (R-2, Ponceau 6R, NA+NA, R-102)
not more than 0.016% (Fast Red E)
NA+NA : subsidiary color combined naphthionic acid and naphthionic acid
SC : standard color, FC : food color
ID : dye for industrial use, CD : dye for chemical use

Table 2. Amounts of Subsidary Colors in Commercial Sunset Yellow FCF

Sample	Use	OrangeRN %	Orange II %
Y5-A	SC	ND	ND
Y5-B	FC	0.045	0.485
Y5-C	FC	0.083	0.052
Y5-D	FC	0.038	0.199
Y5-E	CD	0.065	0.497
Y5-F	CD	0.041	0.064

ND : ont more than 0.008%

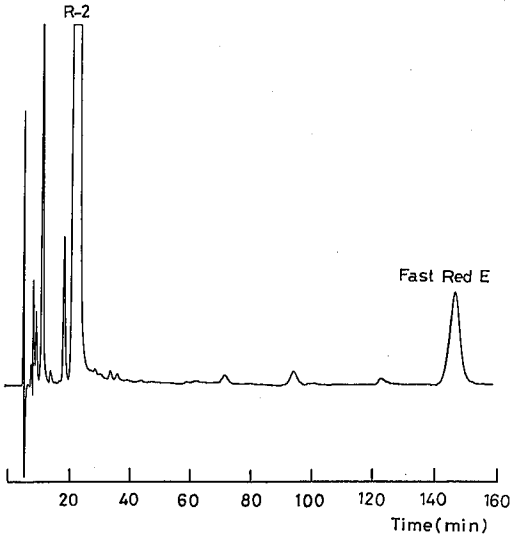


Fig. 3. Chromatogram of Commercial Amaranth on HPLC
conc. of color : 2.5mg/ml, HPLC conditions are the same as shown in Fig. 1

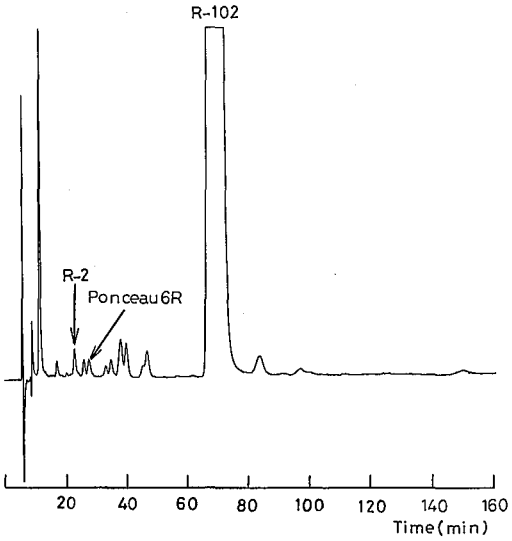


Fig. 4. Chromatogram of Commercial New Coccine on HPLC
conc. of color : 2.5mg／ml, HPLC conditions are the same as shown in Fig. 1

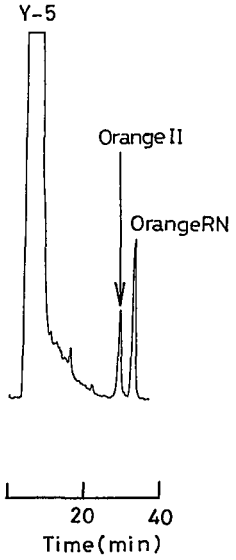


Fig. 5. Chromatogram of Commercial Sunset Yellow FCF
conc. of color : 2.5mg／ml, HPLC conditions are the same as shown in Fig. 2

のピークがみられた．R-2，R-102中の副色素の定量は237nm で行ったが参考のために500nm においても測定を行った．237nm におけるクロマトグラムの面積と500nm における面積との比が，標準品と異なるものについては，リテンションタイムが等しくても別のものである可能性もあることから，今後，これらのピークについては，フォトダイオードアレイ等を用いて検討する予定である．

Y-5中には，オレンジRN，オレンジⅡの近辺に，他のピークはほとんどみられず，またこれらの2種の副色素の含有量の合計もFDAの規格の限度をこえなかった．今回分析の対象とした副色素についても，前回行った不純物と同様，食用色素に比べ工業用あるいは化学用色素に特に多いという傾向は見られなかった．

R-2中に含まれるFast Red Eについては Lancaster ら[6]が4検体について分析した結果を報告している．その最小値は0.1%，最大値は1.5%であり，今回の分析結果と同じような値であった．Y-5中のオレンジRN，オレンジⅡについて Lancaster らは，「市販のサンセットイエロー FCF には，通常2-ナフトールとジアゾ化したスルフアニル酸のカップリングによって作られる低スルホン化色素（オレンジⅡ）が含まれている.」と述べている．また，Cox ら[7]は「中間体中の不純物についての文献[8,9]の示すところによれば，支配的な低スルホン化副色素はシェファー塩とジアゾ化したアニリンとのカップリングによるもの（オレンジRN）である」と述べている．しかし，いずれもこの2種の副色素の分離定量は行っていない．一方今回分析条件検討の参考にした Bailey らはこの2種の副色素の分離定量を行い，以下のように述べている．「市販の FD& C No. 6（Y-5）中より検出された BNSC（オレンジⅡ）のレベルは0.002から0.728%，平均0.125%；ANSC（オレンジRN）のレベルは0.002から0.521%，平均0.162%であった．この結果によれば，一方の低スルホン化色素が他方より支配的であるという傾向はみられなかった.」今回の分析において，この2種の副色素については，オレンジⅡの方が多い傾向はみられるが Bailey らの報告と同様，どちらか一方が特に多いという傾向はみられなかった．

さらに，オレンジRNがY-5の原材料であるスルファニル酸中の不純物アニリンと，シェファー塩より生成することから，アニリン含量既知のスルファニル酸[10]より製造されたY-5についてオレンジRNを測定した．その結果，アニリン含量0.0583%のスルファニル酸より製造されたY-5からは0.107%，アニリン含量0.5123%のスルファニル酸より製造されたY-5からは，0.513%のオレンジRNが検出され，原材料中のアニリンの量が約10倍多いとき，オレンジRNは約5倍多いという結果が得られた．スルファニル酸中に含まれている

アニリンがすべてオレンジRNに変わったとすれば，Y-5のオレンジRNは計算上それぞれ0.0985%，0.866%となるはずであり，アニリン含量の少ないスルファニル酸から製造された場合は，アニリンのほぼすべてが，また，アニリン含量の多いスルファニル酸から製造された場合は約6割がオレンジRNになったと考えられる．これらのY-5中から検出された遊離のアニリンの量は，それぞれ218.9ppb，175.5ppb[10]とほとんど差がみられず，また，その量も少なかったことから，スルファニル酸中のアニリン含量が多くても，Y-5中には副色素の形で残留し，遊離のアニリンとしてはほとんど残留しないと考えられる．

しかし，アゾ色素は代謝によって還元されアゾ結合が開裂する[11]．ANSC（オレンジRN）は代謝されてアニリンを遊離する[5]．Y-5の低スルホン化型の一つ（オレンジRN）は，腸内で還元されアニリンになる[12]．との指摘もあり，アメリカでは，発ガン性を理由にY-5中のアニリン含量にきびしい規制が設けられている[2]ことを考え合わせれば，この副色素の含量には，アニリン同様注意を払う必要があると思われる．

ま と め

1．前報に引続き，3種のアゾ系色素，赤色2号，赤色102号，黄色5号中の副色素をTBABrをカウン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．この方法を用いて市販色素26検体の分析を行ったところ，分析の対象とした副色素の合計量が，FAO／WHO, FDAの規格に定められた限度を越えるものはなかった．

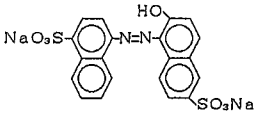
3．赤色2号，赤色102号中には，同定できない多くの副色素がみられた．

4．スルファニル酸中のアニリンは，色素製造の過程で副色素オレンジRNとなり，遊離のアニリンとしてはごくわずかしか色素中に残存していなかった．

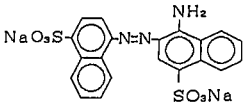
謝　辞　本研究を行うに当たり，試料及び標準品を提供くださった，国立衛生試験所食品添加物部　神蔵美技子室長，ダイワ化成株式会社　野崎幸男氏，三栄化学工業株式会社　中村幹夫氏に深謝いたします．

文献および注

1）植松洋子，広門雅子，中島和雄，高橋　巌，松井敬子，風間成孔，東京衛研年報，38，245-252，1987
2）*Federal Register*, Vol. 51, No. 223, 41765-41783
3）Joint FAO／WHO expert committie on food additives：*Specifications for identity of food colors*, FAO Food and Nutrition Paper 31／1, 9-11, 1984
4）*ibid*., 115-116
5）Bailey J. E. Jr.：*Journal of Chromatography*, 347, 163-172, 1985
6）Lancaster F. E. and Lawrence J. F.：*J. Assoc. Off. Anal. Chem*., 65, 1305-1310, 1982
7）Cox E. A., Richfield- Frantz N., Bailey C. J. and Albert R. H.,：*ibid*., 67, 240-249, 1984
8）Marmion D. M.：*ibid*.,58, 50-57, 1975
9）*ibid*.,：*ibid*., 61, 668-677, 1978
10）広門雅子，中島和雄，植松洋子，高橋　巌，松井敬子，風間成孔：東京衛研年報，39，156-158，1988
11）Kornbrust D. and Barfknecht T.：*Enviromental Mutagenesis*, 7, 101-120, 1985
12）The Rose Sheet：November 11, 1985
13）前報[1]のFast Red EおよびNA＋NAの構造式を，それぞれ以下のように訂正します．



Fast Red E



NA•NA

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 156-158, 1988

高速液体クロマトグラフィーによる スルファニル酸中のアニリンの分析

広門雅子*, 中島和雄*, 植松洋子*,
高橋　巌*, 松井敬子*, 風間成孔*

Determination of Aniline in Sulfanilic Acid by High Performance Liquid Chromatography

MASAKO HIROKADO*, KAZUO NAKAJIMA*, YOKO UEMATSU*
IWAO TAKAHASHI*, KEIKO MATSUI* and MASAYOSHI KAZAMA*

Keywords：スルファニル酸, sulfanilic acid, アニリン, aniline, 高速液体クロマトグラフィー, high performance liquid chromatography

緒　言

スルファニル酸は黄色4号及び5号の製造原料である．アニリンを不純物として含むため，そのアニリンが未反応のまま色素中に残留したり，また色素の製造過程で副反応を起こして他の発ガン性芳香族アミンに変わることが知られている[1-2]．著者らは前報[3]で我が国の黄色4号及び5号中の芳香族アミンの含量について報告したが，その結果アニリン以外の芳香族アミンはほとんど検出されず，アニリンは黄色4号より黄色5号により多く含まれていることが判った．そこでアニリンに着目し，スルファニル酸中のアニリンが色素中にどの程度残留するかを知る目的で，スルファニル酸中のアニリンの定量法を検討した．

定量法としては，色素と同時に分析を行うことを考慮し，色素中の芳香族アミンの分析法[3-5]を用いることにした．これらのうち簡便な著者等の方法[3]を採用し，Extrelut 20カラムに負荷する試料液のpHに若干の検討を加えた．この方法を用いて工業用スルファニル酸中のアニリンを定量した．

またアニリン含量既知のスルファニル酸から製造された黄色5号中のアニリンを前報[3]に従って同時に定量し，スルファニル酸中のアニリンが黄色5号中にどれだけ残留しているかを検討したので報告する．

実験の部

1．試料　工業用スルファニル酸は国立衛生試験所及びダイワ化成㈱より提供されたものを用いた．黄色5号のY5-B及びY5-Fはスルファニル酸のSA-B及びSA-Fからそれぞれダイワ化成㈱により製造され提供されたものを用いた．

2．試薬及び試液　前報[3]に同じ

3．装置及び条件　前報[3]に同じ

4．実験操作法　スルファニル酸約0.1gを正確にはかり，約70mlの温水に溶かし，冷後1M水酸化ナトリウム溶液でpH11.0～13.0とし，水を加えて100mlとした．以後の操作は前報[3]に従った．

結果及び考察

1．Extrelut 20カラムに負荷する試料溶液のpHの検討

アミン類は一般にアルカリ性でExtrelut 20カラムより抽出されるが，色素中の芳香族アミンの場合はpH11.0～13.0が抽出可能な最適pHであった．そこでスルファニル酸について，色素と同様に抽出可能な最適pHを検討した．スルファニル酸（東京化成製：アニリン含量0.6ppm）0.1gにアニリンを600ppm添加し，約70mlの温水に溶かした後，pHを1M水酸化ナトリウム溶液で10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0, 12.5, 13.0（pH13.0はカラムの使用限界）に調製した後，水で100mlとし，回収実験を行った．その結果をFig. 1に示した．pH11.0以上で回収率94.9～98.5%と良好な結果が得られた．

*東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科　169　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, 169, Japan

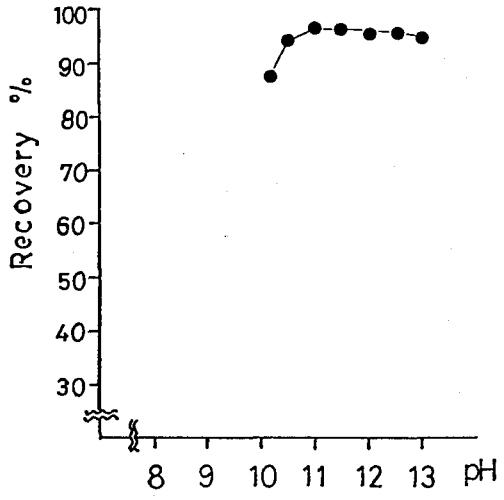


Fig. 1. Effect of pH of the Sample Solution on the Extraction of Aniline by Extrelut 20 Column

2. 工業用スルファニル酸中のアニリンの分析結果

工業用スルファニル酸中のアニリンの分析結果をTable 1に示した．工業用スルファニル酸中から566.2～5512.8ppmの高濃度のアニリンが検出された．この値は前報[3]で報告した黄色4号及び黄色5号中のアニリン含量の約700倍～100万倍に相当した．

なお，高速液体クロマトグラム上のアニリンに対する妨害ピークはどの試料液の場合も認められなかった．またスルファニル酸に対するアニリンの定量限界は0.5ppmであった．

3. スルファニル酸中のアニリンと黄色5号中のアニリン含量との関係

工業用スルファニル酸SA-B及びSA-F(Table 1)と，それらを用いてそれぞれ製造された黄色5号のY5-B及びY5-Fをダイワ化成㈱より提供頂き，それらの中のアニリン含量を分析し，比較したのがTable 2である．

Table 1. Contents of Aniline in the Sulfanilic Acid for Industrial Use

Kind of Sample	Content of Aniline (ppm)
SA-A	566.2
〃 -B	583.2
〃 -C	588.1
〃 -D	1141.4
〃 -E	4984.0
〃 -F	5122.5

Table 2. Relation between Contents of Aniline in the Sulfanilic Acid and in the Sunset Yellow FCF

SA	Content of Aniline	Y5	Content of Aniline
SA-B	583.2ppm	Y5-B	0.22ppm
SA-F	5122.5ppm	Y5-F	0.18ppm

SA : Sulfanilic Acid　　Y5-B was made from SA-B
Y5 : Sunset Yellow FCF　　Y5-F was made from SA-F

原料のSA-B中には583.2ppm，それより製造されたY5-B中には0.22ppm，またSA-F中には5122.5ppm，それより製造されたY5-F中には0.18ppm含まれ，黄色5号中のアニリンはスルファニル酸中のアニリンの約2500分の1及び約28000分の1に減少していた．この理由として，黄色5号の製造時にスルファニル酸と共にシェファー塩が使用されるため，スルファニル酸中の不純物のアニリンが大部分シェファー塩と反応し，副色素オレンジRNを生じるためと考えられる．植松等[6]は黄色5号のY5-B及びY5-F中のオレンジRNの含量を測定しているが，この値はスルファニル酸のSA-B及びSA-F中のアニリン(583.2ppm及び5122.5ppm)がすべて反応し，オレンジRNに変わったと仮定した値にほぼ近似することから，やはりスルファニル酸中のアニリンはほとんどオレンジRNになり未反応のアニリンはごく微量しか残存しないものと考えられる．また，スルファニル酸のSA-FにはSA-Bの約10倍含有されていたが，黄色5号から検出されたアニリンは，Y5-Bが0.22ppm，Y5-Fが0.18ppmで両者の間にはほとんど差が認められなかったことから，スルファニル酸中のアニリン含量とそれより製造された黄色5号中のアニリン含量との間には相関がないことが判明した．

ま と め

(1) スルファニル酸中のアニリンの定量法を検討した．「黄色4号及び5号中の芳香族アミンの定量法」[3]を準用し，Extrelut 20カラムに負荷する試料液のpHを検討した結果，pH 11.0～13.0が良好で，94.9～98.5%の回収率が得られた．

(2) 工業用スルファニル酸について測定した結果，566.2～5122.5ppmの高濃度のアニリンが検出された．これは黄色4号及び5号中のアニリンの約700～100万倍に相当した．

(3) スルファニル酸中のアニリンが黄色5号中にどれだけ残留するかを検討したところ，未反応のアニリンの

残留はごく微量であり，ほとんどが副色素オレンジRNになることが判った．またスルファニル酸中のアニリン含量と黄色5号中のアニリン含量との間に相関がないことが判明した．

謝辞　本研究に当り，試料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に深謝致します．

文　献

1）Frantz, N. R., Bailey, J. E. and Bailey, C. J.：*J. of chromatography*, **331**, 109-123, 1985

2）Hand , R. L. and Nelson, R. F.：*J. Amer. Chem. Soc.*, **96**, 850-860, 1974

3）広門雅子，中島和雄，植松洋子，高橋　巌，松井敬子，風間成孔：東京衛研年報，**38**，239-244，1987

4）Bailey, J. E. and Bailey, C. J.：*Talanta*, **32**, 875-882, 1985

5）Bailey, J. E.：*Anal. Chem.*, **57**, 189-196, 1985

6）植松洋子，広門雅子，中島和雄，高橋　巌，松井敬子，風間成孔：東京衛研年報，**39**，151-155，1988

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 39, 159-163, 1988

食品中の微量無機成分に関する研究（第1報）原子吸光法による粉乳中の亜鉛，銅の定量

門間公夫*，菊谷典久*，井口正雄*
友松俊夫*

Studies on Trace Minerals in Foods (I) Determination of Zinc and Copper in Modified Milk Powder by Flame Atomic Absorpion Spectrophotometry

KIMIO MOMMA*, NORIHISA KIKUTANI*, MASAO IGUCHI*
and TOSHIO TOMOMATSU*

A measurement method of Zinc (Zn) and Copper (Cu) in modified milk powder for infants by flame absorption spectrophotometry was studied.

Influence of the presence of several minerals at the time of measurement of Zn and Cu was examined, but interference by addition of a 100-2000-fold of minerals such as Na, Mg, Fe, Cu, K, P, Ca and Zn was not observed.

Effects of the material of ashing vessel on the recovery from the samples were examined. Ceramic crucible showed best recoveries at 97.9-102.0% (Zn) and 97.6-102.9% (Cu) respectively.

Keywords：Zinc, Copper, Modified Milk Powder, Atomic Absorption Spectrophotometry

緒　言

食品中の微量無機成分は，生体内酵素反応やホルモンの作用などに関与し，生体機能の調節，あるいは生体の維持に必要不可欠なものであり，栄養学上重要な物質である[1]．しかしながら，これらの微量成分の摂取状況については，十分に解明されているとはいえない．

微量無機成分のうち亜鉛は，不足すると皮膚炎，生殖能力の低下，成長の遅延など[1-4]が生じるとされている．また，銅は欠乏症状として成長の遅延，貧血等[1-4]が報告されている．これらの欠乏症状が起こる亜鉛および銅は，我国の調製粉乳等の母乳代替食品で育てられた乳幼児で不足していることが指摘された[5]．これらの指摘により，昭和58年厚生省は[6]，亜鉛塩類および銅塩類を強化剤として，それぞれ標準調乳濃度としたときに6mg／lおよび0.6mg／lを限度として乳児用粉乳等の母乳代替食品に使用することを許可した．このように使用基準が定められたことにより，添加された亜鉛および銅の含量を正確に測定することが必要となっている．

食品中の亜鉛，銅を定量する方法としては，比色法や原子吸光法等がある[7,8]．粉乳中の亜鉛，銅およびその他の微量金属の定量法については，見城ら[9]によって検討されている．しかし，この方法は試料を湿式分解後，目的元素をキレート化し，溶媒抽出して原子吸光分析を行うものであるが，硝酸や硫酸などの強酸を使用すること，多数の試料を処理する場合には手数がかかる等の短所がある．そこで今回，著者らは乳児用調製粉乳中の亜鉛および銅について，多数の検体を処理する場合の簡易迅速化をはかるために，乾式灰化法を用いる．フレーム原子吸光法の適応性に関する検討を行ったので以下報告する．

実験方法

1．試薬

亜鉛，銅，鉄，ナトリウム，カリウム，カルシウム，マグネシウム（以下それぞれ Zn, Cu, Fe, Na, K, Ca, Mg

*東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科　169　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 169 Japan

と略す）の標準液は和光純薬工業製の原子吸光分析用，リン（以下Pとする）標準液は和光純薬工業製の光電用，塩酸は和光純薬工業製の有害金属測定用，水は再蒸留水を用いた．

2．装置

電気炉はトリオサイエンス製の電気マッフル炉，原子吸光分析装置は日本ジャーレル・アッシュ製のAA 845型，原子吸光分析用ランプは浜松ホトニクス製のホローカソードランプL233-30NQおよびL233-29NB，記録計は島津製作所製のクロマトパックC-R6Aを使用した．

3．器具

PYREX製ガラスビーカー，磁製るつぼおよび白金皿は硝酸処理後，蒸留水および再蒸留水で洗浄したものを用い，アルミはくカップは佐藤ら[10]の方法により自製した．

4．試料　市販の乳児用調製粉乳を用いた．

5．試料の調製

衛生試験法注解[7]に準じて実施したが，灰化は500℃で16時間行った．アルミはくカップの場合の前処理等は佐藤ら[10]の方法に従った．

6．測定条件

アセチレン流量1.5l／min，空気流量8.0l／min，スリット巾0.68nm，測定波長はZnが213.8nm，Cuが324.7nm，ランプ点燈電流はZn測定の場合8 mA，Cu測定の場合5 mAとし，D_2ランプと中空陰極ランプの強度比を1：1にしたバックグランド自動補正を行い吸光度を測定した．なお，記録計は128mV／フルスケールで使用した．

結果および考察

1．バーナー位置と吸光度の関係

フレーム原子吸光法で元素を測定する場合には，最適なフレーム中の測定位置に設定することにより，再現性や測定精度の良いデーターが得られるとされている．フレーム中の原子分布は元素によって異なり，目的元素を高感度で測定するには，光源からの光束を原子密度の高いフレームの中心付近に通すようにバーナーの高さを設定する必要がある[11]．

そこで，ZnおよびCuの測定時の最適な高さを決定するために，原子吸光装置の目盛りに従って，可変可能な0～2.5cmまで0.5cmおきに6段階バーナー位置を設定し，ZnおよびCuの0.5，1.0，2.0ppm溶液について吸光度（記録計のピーク高さ）を測定することにより，適正なバーナー位置を調べた．その結果をTable 1およびTable 2に示した．

Znの測定の場合バーナー位置の目盛りが大きくなるに従って感度が上昇しバーナー位置2.5cmで最も吸光度が大きくなった．バーナー位置と吸光度の変動係数との関連についてみると，バーナー位置0 cmのとき0.5ppmおよび1 ppm溶液の測定で変動係数は6.0%および4.0%，バーナー位置0.5cmのとき0.5ppm溶液で3.8%とバーナー位置目盛りが，1.0cm以上の場合に比べ，やや大きい値を示した．バーナー位置1.0cm以上では各濃度溶液の測定において変動係数は0.7～2.4%の範囲であった．

Cuの測定の場合も，バーナー位置の目盛りの値が大きくなるに従って感度が上昇した．変動係数はバーナー位置0.5cmの0.5ppm溶液で4.1%，バーナー位置1.5cmの1.0ppm溶液で3.0%であったが，その他は0.5～

Table 1．Effect of Burner Scale on Absorption Intensity and Stability of Zn Values

(N＝5)

burner scale (cm)	Zn solution (ppm) 0.5 peak height* mean ±S. D.	C. V. (%)	1.0 peak height mean ±S. D.	C. V. (%)	2.0 peak height mean ±S. D.	C. V. (%)
0	10.0 ± 0.6	6.0	20.1 ± 0.8	4.0	37.0 ± 0.3	0.8
0.5	13.1 ± 0.5	3.8	24.9 ± 0.6	2.4	46.0 ± 0.4	0.9
1.0	17.8 ± 0.3	1.7	32.8 ± 0.5	1.5	56.7 ± 1.1	1.9
1.5	20.2 ± 0.4	2.0	37.7 ± 0.4	1.1	71.0 ± 0.5	0.7
2.0	24.1 ± 0.2	0.8	45.5 ± 0.8	1.8	84.9 ± 1.3	1.5
2.5	25.2 ± 0.6	2.4	45.7 ± 0.3	0.7	84.7 ± 0.6	0.7

*：$\times 10^3$

Table 2. Effect of Burner Scale on Absorption Intensity and Stability of Cu Values

(N=5)

burner scale (cm)	Cn solution (ppm) 0.5 peak height* mean ±S. D.	C. V. (%)	1.0 peak height mean ±S. D.	C. V. (%)	2.0 peak height mean ±S. D.	C. V. (%)
0	7.5 ± 0.2	2.7	13.2 ± 0.1	0.8	25.4 ± 0.2	0.9
0.5	7.3 ± 0.3	4.1	14.0 ± 0.3	2.1	27.3 ± 0.2	0.7
1.0	7.9 ± 0.1	1.3	14.5 ± 0.1	0.7	29.5 ± 0.5	1.6
1.5	8.9 ± 0.2	2.2	16.8 ± 0.5	3.0	32.8 ± 0.3	0.9
2.0	10.4 ± 0.2	1.9	19.2 ± 0.2	1.0	37.9 ± 0.4	1.1
2.5	11.7 ± 0.1	0.9	21.9 ± 0.5	2.3	43.1 ± 0.2	0.5

*：$\times 10^3$

2.7%であり変動は少なかった．また，バーナー位置2.5cmでZnおよびCuの検量線は，ともに相関係数r=0.9999の良好な直線性を示した．以上の結果により，以後のZnおよびCuの測定は，両者とも最も感度のよかったバーナー位置2.5cmで行うことにした．

2．Zn, Cuの測定における共存無機成分の影響

乳児用調製粉乳における栄養成分として，Feなどのミネラルが強化のため添加してあり，ZnおよびCuの測定の際に干渉をする可能性が考えられる．そこで，Znの測定時におけるNa, K, Mg, Ca, Fe, P, Cuの影響およびCuの測定時におけるNa, K, Mg, Ca, Fe, P, Znの影響について検討を行った．

さきに述べたように，調製粉乳には標準調乳濃度に調乳したときZnで6 mg／l, Cuで0.6mg／lまでの添加が認められた．土屋[12]および中山[13]の発表による乳児用粉乳中の無機成分の含量から換算すると，調製粉乳の場合，標準調乳濃度としたときにNaは196～227mg／l, Kは686～736mg／l, Mgは39～65mg／l, Caは450～580mg／l, Feは7.8～9.1mg／lおよびPは281～460mg／l程度含まれている．したがって，Znを6 mg／lになるように粉乳に添加したとすると，Na, K, Mg, Ca, Fe, Pはそれぞれおよそ40, 130, 10, 100, 2, 80倍程度存在している．また，Cuを標準調乳濃度としたとき0.6mg／lになるように粉乳に添加したとするとNa, K, Mg, Ca, Fe, Pはそれぞれ400, 1300, 100, 1000, 20, 800倍程度含まれている．そこでNa, Mg, Fe, CuがZnの100倍にCa, K, Pが500倍になるように各成分を添加して無機成分を無添加のZn溶液の吸光度と比較してその影響を調べた．Cuの場合も同様にFeおよびZnは100倍，Mgは200倍，P, Caは1500倍，Kは2000倍になるように各無機成分を添加して影響を調べた．その結果をTable 3およびTable 4に示した．各元素はZnおよびCuの定量には影響をおよぼさなかった（P>0.05）．

原子吸光分析においては，試料中に共存する元素のスペクトル線が目的の元素のスペクトル線に近接する場合やリン酸を含む試料での発光などにより，測定が影響を受けることがあるとされている[11]．妨害の可能性を検討した各元素の場合はZnおよびCuのスペクトル線に

Table 3. Interference of Various Elements on Determination of Zinc

(N=5)

elements added	peak height* mean ± S. D.	elements added	peak height* mean ± S. D.
Zn (1ppm)	45.75 ± 0.87	Zn (0.2ppm)	13.61 ± 0.07
+Mg (×100)	45.83 ± 1.04	+Ca (×500)	13.50 ± 0.14
+Na (×100)	45.52 ± 1.05	+K (×500)	13.72 ± 0.11
+Fe (×100)	44.92 ± 0.58	+P (×500)	13.76 ± 0.19
+Cu (×100)	46.18 ± 0.44		

*：$\times 10^3$

Table 4. Interference of Various Elements on Determination of Copper

(N=5)

elements added	peak height* mean ± S. D.	elements added	peak height** mean ± S. D.
Cu (1 ppm)	24.10 ± 0.55	Cu (0.2ppm)	47.44 ± 0.86
+Fe (×100)	24.04 ± 0.20	+Ca (×1500)	47.53 ± 0.98
+Zn (×100)	24.26 ± 0.19	+Na (×1500)	47.38 ± 0.30
+Mg (×200)	24.33 ± 0.22	+P (×1500)	48.69 ± 1.01
		+K (×2000)	48.69 ± 1.60

* : $\times 10^3$
** : $\times 10^2$

近接したスペクトルがないこと，Zn および Cu の測定波長はリン酸の発光波長の範囲外にあることによって，Zn および Cu の測定が影響を受けなかったと推測された．また，バックグランド自動補正により測定したことも，共存元素の影響を除去するのに効果があったと思われた．

3．灰化容器の検討

食品中の金属元素を定量する場合は，乾式灰化の際の容器として磁製るつぼ，ホウケイ酸ガラスビーカー等が使用されている．しかし，灰化容器からの金属元素の溶出や，吸着による損失で元素の種類によっては正確な定量が困難な場合がある．また，灰化に用いる容器の材質のみならず，試料と共存する元素と定量する元素との相互作用についても考慮する必要があるとされている[14]．

そこで，Zn および Cu の定量に最も適した灰化容器の検討をするために試料10g を白金皿，磁製るつぼ，ガラスビーカーおよび Na, K の定量での有用性が報告[11]されているアルミはくカップにとり，Zn は100 μg, Cu は25 μg を加えて，それぞれの灰化容器について添加回収試験を行った．その結果を Table 5 に示した．

Zn の回収率は，白金皿で100.2～100.5%，磁製るつぼでは97.9～102.0%で良好であった．しかし，ガラスビーカーとアルミはくカップにおいては，回収率がそれぞれ84.1～93.3%および75.6～85.0%と白金皿および磁製るつぼに比べ低い値を示した．その原因として Zn の容器への吸着が考えられた．

Cu の回収率は，磁製るつぼで97.6～102.9%で良好であったが，白金皿では92.9～94.3%，ガラスビーカーで91.4～95.4%，アルミはくカップでは69.4～88.8%でやや低い値であった．その原因としては，Zn の場合と同じく吸着が考えられた．

北野ら，および勝間らの報告を引用した楢崎の総説[14]によると，Zn の定量においてはシリカるつぼが適当であり，白金るつぼは不適当であるとされている．著者らの実験においても，Cu の定量の場合には白金皿での回収率がやや小さく，これは容器への吸着によるものと思われた．一方，Zn の定量の場合，著者らの実験では楢崎に引用されている報告と異なり白金皿での回収率はほぼ100%であり，良好であった．これは，用いた試料の相違によるものと推測される．

以上，乳児用調製粉乳中の Zn および Cu の定量において原子吸光分析装置のバーナー位置，粉乳中に共存する無機成分の影響および灰化容器について検討を行った．その結果，粉乳中の Zn および Cu を定量する場合は，

Table 5. Comparison for Recoveries (%) of Zn and Cu by Various ashing Vessels

	Pt			Al			PYREX			Crucible		
Zn	100.2	101.9	102.5	75.6	83.4	85.0	84.1	88.4	93.3	97.9	101.6	102.0
Cu	92.9	93.9	94.3	69.4	83.2	88.8	91.4	94.7	95.4	97.6	100.2	102.9

Pt : Platinum Dish
Al : Aluminum Foil Cup
PYREX : PYREX Glass Beaker
Crucible : Ceramic Crucible

前処理に使用する灰化容器としZnおよびCuともに回収率の良好であった磁製るつぼを使用し，バーナー位置を2.5cmに調整することによって，精度よく測定できることが明らかとなった．

要　約

フレーム原子吸光法による乳児用調製粉乳中のZnおよびCuの定量法の検討を行った．

1．ZnおよびCuの定量ともにバーナー位置2.5cmで感度，再現性ともに良い測定値が得られた．

2．Znは100倍のNa, Mg, Fe, Cuおよび500倍のK, P, Caが存在しても，Cuは100倍のFe, Zn，200倍のMg, 1500倍のNa, Ca,Pおよび2000倍のKが存在しても影響を受けなかった．

3．灰化容器に磁製るつぼを用いると，ZnおよびCuは，ほぼ100％の回収率で定量が行なえた．

文　献

1）日本化学会訳編：微量元素―栄養と毒性―，1975，丸善，東京

2）和田　攻，荒川泰昭，阿部哲昭：ファルマシア，21，407-413，1985

3）和田　攻，真鍋重夫，北川泰久，方　金福：医学のあゆみ，137，1063-1066，1986

4）土屋文安：食品と容器，28，296-304，1987

5）松田一郎，東　明正：日本小児科学会雑誌，87，710-716，1983

6）仲本典正，平山桂伸，松田　勉，山本芳子：食品衛生研究，33，831-851，1983

7）日本薬学会編：衛生試験法注解，1980，金原出版，東京

8）Assoc. Off. Anal. Chem.：*Official Methods of Analysis of A. O. A. C.*, 14th ed., 1984, Arlington

9）見城尚義，野田勝彦，高橋　強：食品衛生学会誌，15，481-484，1974

10）佐藤直子，菊谷典久，井口正雄，友松俊夫，道口正雄：東京衛研年報，37，241-243，1986

11）不破敬一郎，下村　滋，戸田昭三：最新原子吸光分析Ⅰ，1980，廣川書店，東京

12）土屋文安：食の科学，49，82-88，1979

13）中山健太郎：同上，49，88-91，1979

14）楢崎久武：分析化学，21，283-288，1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 39, 164-167, 1988

小笠原産パッションフルーツの栄養成分について

菊谷典久*, 門間公夫*, 井口正雄*, 友松俊夫*,
小沢　聖**, 和田　実**, 青木睦夫**,
登坂三紀夫***, 浦野元幸***

Nutrient Composition of Passion Fruits cultivated in Ogasawara Islands

NORIHISA KIKUTANI*, KIMIO MOMMA*, MASAO IGUCHI*, TOSHIO TOMOMATSU*,
KIYOSHI OZAWA**, MINORU WADA**, MUTSUO AOKI**,
MIKIO TOSAKA*** and MOTOYUKI URANO***

Proximate and micronutrient composition of passion fruits cultivated in Ogasawara Islands were determined. Three species, Purple (*Passiflora edulis*), Yellow (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) and the hybrid 'Tai-Non No. 1' were tested. The purple showed higher levels of protein, fat and ascorbic acid compared with those of the other species. The yellow was relatively rich in phosphorus, iron, sodium and potassium. The hybrid, which seems best suited to commercial production in Ogasawara Islands, showed remarkably higher amount of vitamin A (370-460 IU per 100g of edible portion) than those of the other species.

Keywords: passion fruit, purple passion fruit, yellow passion fruit, hybrid passion fruit 'Tai-Non No. 1', proximate composition, micronutrient composition.

緒　言

近年，為替の円高傾向などを背景に，海外からの果実輸入が大幅に増加しつつある[1]．この中で，従来より，消費者に親しまれてきた，バナナ，グレープフルーツ等に加え，最近では，食生活の多様化を反映し，パッションフルーツ，パパイア，マンゴーなどの，いわゆるトロピカルフルーツの輸入が目立っている[2]．

亜熱帯地域に位置する，東京都小笠原諸島においても，このような果実消費の現状を踏まえ，内地向けの熱帯果実の生産に力を入れており，東京都小笠原亜熱帯農業センターでは，品種改良，栽培条件の検討等が行われている．

パッションフルーツは，トケイソウ科（*Passifloraceae*）に属するブラジル原産の果実で，その果肉が多汁で芳香があるところから，果汁原料として，オーストラリア，ハワイなどで盛んに栽培が行われているが，小笠原においても，生食用として，内地向けに商業生産が始められている．

パッションフルーツの栄養成分に関しては，四訂日本食品標準成分表（科学技術庁・資源調査会編，1982年）においては，生果汁（raw juice）のみの収載にとどまっており，近時，生食での消費の拡大とともに，果実可食部全体の成分値が求められている．そこで今回，著者らは，東京都小笠原亜熱帯農業センターにて栽培された3種のパッションフルーツ（パープル種，イエロー種，交配種“台農一号”）について，果実可食部について分析を行い，あわせて，その種間での栄養成分の差違を調べた．以下，報告する．

試料および実験方法

1．試料　パッションフルーツ：東京都小笠原亜熱帯農

*東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科　169　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, 169 Japan
**東京都小笠原亜熱帯農業センター
***東京都衛生局島しょ保健所

業センターにおいて，栽培されたものを使用した．種類は，パープル種（*Passiflora edulis*），イエロー種（*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*），および交配種，“台農一号”（Tai-Non No. 1）である．各種類とも，重量により，S，M，Lの3群にわけて分析した．各群の1個あたりの平均重量は，次のとおりである．

パープル；（S）32g，（M）39g，（L）44g.

イエロー；（S）38g，（M）73g，（L）104g.

台農一号；（S）72g，（M）83g，（L）89g.

試料の調製：各々，5～10個の，可食部分である果肉と種子を採取し，高速ブレンダー（Ultra-Turrax, Janke & Kunkel，西独）にて磨砕，均一化したものを，分析試料とした．

2．実験方法 水分：常法[3]に従い，70℃，減圧（100mmHg）状態にて恒量まで乾燥し，水分含量を測定した．タンパク質：ケルダール分解法[4]によって定量した全窒素量に，換算係数6.25を乗じて算出した．脂質：クロロホルム－メタノール混液改良抽出法[5]によった．なお，色素成分除去のために，あわせて活性炭処理を行った．炭水化物：水分，タンパク質，脂質，灰分の合計量を，100gから差し引いた値を炭水化物量とした．灰分：アルミカップ改良法[6]により，500℃，16時間灰化処理を行い，測定した．

無機質の分析 カルシウム：試料灰化後（500℃，16時間），原子吸光法[7]にて分析した．リン：試料灰化後（同上），モリブデン青比色法[8]にて分析した．鉄：試料灰化後（同上），オルトフェナントロリン比色法[9]にて分析した．ナトリウム，カリウム：1％塩酸溶液で抽出を行い，原子吸光法を用いる簡易迅速法[10]にて分析した．

ビタミンの分析 レチノール：衛生試験法[11]に準じ，試験溶液を調製し，高速液体クロマトグラフィー[12]により定量した．カロチン：アセトン抽出し，ヘキサンにて分配後，アルミナカラムを用いて分離精製し，吸光光度法[13]により定量した．なお，カロチンのビタミンA効力換算方法は，四訂日本食品標準成分表によった．ビタミンB_1：試料は，酸による加温抽出，ジアスターゼ処理による酵素分解を行い，パームチットカラムにて精製した．なお，定量は，フェリシアン化カリウムを用いるチオクローム蛍光法[14]によった．ビタミンB_2：試料は，酸による加温抽出後，盲蛍光を除去するため，クロロホルムを用いて予浸を行った．定量は，ルミフラビン蛍光法[15]によった．ビタミンC：試料は，メタリン酸を添加後，乳鉢にて磨砕し抽出を行い，インドフェノール滴定法[16]により定量を行った．ナイアシン：試料は1N硫酸を加え，121℃で30分間分解を行った後，高速液体クロマトグラフィー[17]により定量を行った．

廃棄率：食用としない果皮その他の部分の重量を測定し，全果実重量に対し，その百分率を算出した．

エネルギー：可食部100gあたりのタンパク質，脂質，炭水化物の含有量をもとに，四訂日本食品標準成分表に準じ，算出した．

結果および考察

Table 1に各項目の結果を示す．

一般成分 水分は，68.7～74.7％であった．台農一号が，パープル種，イエロー種に比べ，高い値であった．タンパク質は，2.1～2.7％で，パープル種が，他の2種に比べ，高い値であった．脂質は，1.1～1.7％で，パープル種が，同様に高かった．灰分は，0.7～0.9％の範囲であった．

生食用果実の水分含量は，温州みかん（87.5％；四訂日本食品標準成分表による，以下同様），りんご（85.8％）など，多くは80％以上であり，今回のパッションフルーツの値は低い．種子を含めての分析なので，その影響とも考えられる．タンパク質は，生食用果実では，1％を越すものはまれであり，今回の分析値（2.1～2.7％）は，アボガド（2.5％）に匹敵する高い値である．脂質も同様に高く，これらも種子部分の寄与によると考えられる．なお，米国の成分表[18]では，果肉および種子の分析値として，タンパク質2.2％，脂質0.7％という値が示されている．

ミネラル成分 カルシウムは，4～8mg／100g，リンは，31～71mg／100g，鉄は，0.8～1.1mg／100g，ナトリウムは，8～17mg／100g，カリウムは，360～480mg／100gであった．3種の中では，イエロー種のミネラル含量が高い傾向がみられた．

他の生食用果実と比べると，カルシウムについては，キウイ（27mg／100g），いちご（17mg／100g），温州みかん（13mg／100g），など10mg／100g以上のものが多く，今回のパッションフルーツは，やや低い値であった．リンについては，多くの果実は，30mg／100g以下の範囲であり，本分析に供したパッションフルーツの値は高かった．ナトリウム，カリウム，鉄に関しても，比較的高い値であった．

ビタミン成分 ビタミンAは，56～460IU／100gであった．3種のなかで，台農一号の含量が極めて多かった．パープル種とイエロー種は，ほぼ同程度であった．ビタミンB_1含量は，3種類とも，0.01mg／100gに満た

Table 1. Composition of Passion Fruit (flesh and seeds)

		Purple			Yellow			Hybrid		
		S	M	L	S	M	L	S	M	L
1 Moisture	(g/100g)	70.6	70.7	73.1	68.7	71.5	72.5	74.1	74.7	74.2
2 Protein		2.7	2.6	2.7	2.2	2.4	2.2	2.1	2.4	2.4
3 Fat		1.6	1.6	1.7	1.4	1.1	1.2	1.4	1.6	1.3
4 Carbohydrate		24.3	24.3	21.7	26.8	24.1	23.2	21.7	20.6	21.3
5 Ash		0.8	0.8	0.8	0.9	0.9	0.9	0.7	0.7	0.8
6 Calcium	(mg/100g)	6	7	8	6	7	4	6	7	5
7 Phosphorus		57	31	39	71	67	68	47	54	45
8 Iron		0.8	0.8	0.8	1.1	1.1	1.1	0.9	0.8	0.9
9 Sodium		8	9	11	12	14	17	8	9	8
10 Potassium		380	400	370	450	450	480	360	400	420
11 Retinol	(μg/100g)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12 Carotene		190	160	160	210	130	100	820	670	760
13 Retinol potency	(IU/100g)	110	89	89	117	72	56	460	370	420
14 Thiamin	(mg/100g)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15 Riboflavin		0.07	0.06	0.08	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06	0.07
16 Ascorbic acid		19	19	19	11	11	12	12	11	10
17 Niacin		2.1	1.7	1.7	1.9	1.6	1.7	2.0	1.7	2.1
18 Energy	(kcal/100g)	110	110	101	116	104	101	97	96	96
19 Refuse	(%)	57	53	53	66	57	49	59	57	58

All values are expressed on fresh weight basis.

なかった．ビタミンB_2は，0.06～0.08mg/100gであり，3種間に際立った差は無かった．ビタミンCについては，今回は，インドフェノール滴定法でアスコルビン酸を測定した．3種の中では，パープル種の含量が多かった．イエロー種，台農一号は，ほぼ同量であった．ナイアシンは，1.6～2.1mg/100gで，品種による違いは，みられなかった．

ビタミンAについては，パッション生果汁で，780IU/100g（四訂成分表），果肉と種子で，700IU/100g（米国成分表）という値が示されている．今回の分析値は，これらよりも低かった．ただし台農一号では，約400IU/100g含まれており，果実の中では多い部類である．ビタミンB_2についても，他の果実に比べ，遜色の無い量である．ビタミンC量は，いちご，かき，キウイなどの1/5程度である．ナイアシン量は，他の果実では，1mg/100gを越すものは少なく，パッションフルーツは多い方である．エネルギーは，96～116kcal/100gであった．3種の中では，台農一号が，水分含量が多いために，やや低いエネルギー値になった．四訂成分表収載果実（生果）と比較すると，アボカド（191kcal）につぐ，高い値である．なお，高カロリー食品といわれるバナナは，87kcalである．廃棄率は，49～66%．生食に適さない，果皮その他の部分である．

パッションフルーツは，ブラジル原産とされているが，現在では，亜熱帯を中心に，熱帯および温帯の暖かい地域に，広く分布している．小笠原においても，1）冬期の気象条件に耐える，2）台風の来襲頻度が少ない初夏に収穫できる，3）栽培労力が少なくて済む，などの点で，パッションフルーツ栽培の有利性が認められ，あわせて，生食用果実としての市場性が高いところから，商業生産が盛んになりつつある．

パープル種は，生食用としては適当であるが，収量が少なく，耐病性に劣る．一方，イエロー種は，酸味が強いために生食用としては不適当であるが，収量が多く，耐病性にすぐれる．そこで，生食に適し，収量が多く，耐病性にすぐれたものとして台湾にて品種改良されたものが，今回の交配種“台農一号”である．

分析は，生食用ということで，果肉および種子を併せて行ったが，3種それぞれに，既述のごとく，成分について特徴がみられた．なお，小笠原での商業生産の中心

である台農一号では，特にビタミンA含量が高かった．一個あたりに換算すると，約130～160IUのビタミンAを含むところから，ビタミンA摂取源として，好適な果実の一つであると考えられる．

文　献

1）東京都中央卸売市場：東京都中央卸売市場年報，1987
2）森　隆禧：食の科学，118，6-12，1987
3）小原哲二郎他編：食品分析ハンドブック，21-22，1982，建帛社
4）日本薬学会編：衛生試験法・注解，153-155，1980，金原出版
5）小原哲二郎他編：食品分析ハンドブック，122-123，1982，建帛社
6）佐藤直子，菊谷典久，井口正雄，友松俊夫，道口正雄：東京衛研年報，37，241-243，1986
7）小原哲二郎他編：食品分析ハンドブック，282-283，1982，建帛社
8）同上，276，同上
9）同上，279-280，同上
10）堤　忠一，小泉英夫，吉川誠次，森井ふじ，小林純：食品総合研究所研究報告，34，132，1979
11）日本薬学会編：衛生試験法・注解，追補1288，1983，金原出版
12）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
13）日本ビタミン学会編：ビタミン学実験法1，33-37，1983，東京化学同人
14）日本薬学会編：衛生試験法・注解，211，1980，金原出版
15）同上，213，同上
16）同上，217，同上
17）Jandera, P. and Churacek, J.: *J. Chromatogr.*, 197，181－187，1980
18）青柳康夫他訳：米国の食品成分表，米国農務省農業研究局，80-81，1981，建帛社

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 168-172, 1988

自動分析計による赤血球グルタチオン還元酵素活性の測定

笠 原 利 英*, 友 松 俊 夫*

The Use of Auto Analyer System to Measure Erythrocyte Glutathione Reductase Activity

TOSHIHIDE KASAHARA* and TOSHIO TOMOMATSU*

We used the discrete-type auto analyser to measure erythrocyte glutathione reductase (ERG) activity and the degree of activation (AC) by in vitro addition of flavin-adenine dinucleotide (FAD), which are functional biochemical parameters for assessing the vitamin B_2 nutritional status.

The optimized conditions of analysis using the auto analyser were as follows; oxidized glutathione (GSSG), 3 mM, reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH), 0.1 mM and FAD, 0.01 mM.

Under these conditions we studied assay precision. Hemolysates from three healthy subjects were examined four times simultaneously, and repeat determinations were also made for 3 days. Within-day and between-day precisions (expressed as coefficient of variation) for measurement of EGR activity were less than 2.2% and 6.0% as means respectively and those for AC were 2.4% for both.

These data show that the auto analyser procerure has good precision and can be readily carried out in the routine laboratory.

Keyword：vitamin nutritional status, erythrocyte glutathione reductase, coenzyme activation, auto analyser

緒　　言

国民栄養調査によれば，日本人のビタミン摂取量は平均値でみる限り所要量を上回っており[1]，重篤な欠乏症は見られない．しかし，一方では食生活の多様化や不規則化に伴って，明らかな臨床症状はないが完全には健康とも云えない潜在性の欠乏状態に陥っている人々が増えていることが指摘されている[2]．さらに社会的及び身体的活力が徐々に低下している老年層においては潜在性栄養欠乏状態に陥り易く，ビタミン摂取量が所要量を下回っていることを示す報告もなされている[3,4]．これらのことは，国民栄養調査等の各種調査や食事中の栄養成分分析のように栄養摂取の側面からの評価だけでなく，個々人について人体側面から栄養状態を判定することの必要性を示している．

ビタミン栄養状態の判定の生化学的指標としては，1）尿中へのビタミンあるいはその代謝物の排泄量，2）ビタミンの血中濃度，3）ビタミン誘導体を補酵素とする酵素の活性値，および4）その酵素活性に対する補酵素の添加効果，等が用いられている[2]．

今回，我々はビタミンB_2の栄養状態判定の有効な指標である赤血球グルタチオン還元酵素(EC 1.6.1.2.;NAD(P)H：oxidized-glutathione oxidoreductase，以下，EGRと略す)について，その活性値および補酵素添加効果の測定のルーチン化を目的として，自動分析計を用いた測定の至適条件および精度について検討し，自動分析計によるルーチン化が可能であることを示す結果を得たので報告する．

実 験 方 法

溶血液の調製

ヘパリンを加えた血液から遠心分離して得た赤血球を生理食塩水で3回洗浄した後，3倍容の蒸留水を加えて溶血させた．遠心分離して細胞残屑を除いた溶血液について，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）を用いてシアンメトヘモ

*東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科　169　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, 169 Japan

グロビン法によりヘモグロビン濃度を測定した．酵素活性の測定に際しては蒸留水で4ないし8倍に希釈して用いた．また保存する場合は溶血液を−20℃に保存し，測定日に希釈して用いた．

EGR 活性の測定

1）装置　自動分析計として，日立705型自動分析装置（以下，705型分析計と略す．日立製作所，東京）を用いた．本装置の測定方式の特徴は，ディスクリート形シングルラインマルチ方式，2波長測光方式である[9]．

2）測定原理　EGR 活性は，酸化型グルタチオン（GSSG）および還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADPH）を基質として反応させた時の NADPH の減少速度から測定した．

$$GSSG + NADPH + H^+ \rightleftarrows 2GSH + NADP^+$$

また反応液にビタミンB_2の補酵素型であるフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）を添加した場合と添加しない場合の活性値の比から補酵素の添加効果（Activation coefficient, 以下，AC と略す．）を計算した．

3）試薬　用いた試薬の入手は次のとおりである．NADPH-4Na（オリエンタル酵母 KK，和光純薬扱い），GSSG（Fluka，スイス，生化学工業 KK 扱い），FAD-2Na（ヤマサ醤油 KK，生化学工業 KK 扱い）．その他の試薬は市販特級品を用いた．各試薬の調製は安田らの方法[5]を若干修正して行った．705型分析計に用いた二つの試薬系の組成と反応液中最終濃度を Table 1．に示した．

4）測定操作　705型分析計による EGR 活性測定のパラメーターを Fig. 1．に示した．すなわち試料溶血液を10 μl 採取して40秒後に，第一試薬を440 μl 添加し，その5分後に第二試薬を50 μl 添加して反応を開始した．反応開始60秒後から2分間にわたって NADPH の吸光度の減少を340nm および376nm の二波長で経時的に測定した．以上の操作はすべて自動的に行われた．また，FAD を添加した場合と添加しない場合の活性値の測定は，別々の測定項目として設定して並行して測定させ，その比（AC）も項目間演算により計算し，出力させた．さらに，FACTOR は分光光度計（SHIMAZU UV-256FS, 島津製作所）を用いて分子吸光係数に基づき標定した NADPH 溶液についての705型分析計における吸光度の実測値（$A_{340nm-376nm} = 4.05 \times 10^3 M^{-1}$）から計算した．EGR 活性の単位は U／$l$ として計算，出力させたが，必要な場合にはヘモグロビン量で補正して U／g Hb で表示した．

Table 1．Reagent Composition and Final Concentration

		vol. (μl)	conc. (mM)
1st reagent			
Phosphate buffer (0.1M, pH7.4)		400	
EDTA-2k	(75mM)	10	1.5
NADPH-4Na	(2.5mM)	20	0.1
FAD-2Na	(0.5mM)	10	0.01
2nd reagent(reaction start)			
GSSG	(32.6mM)	50	3.3

```
 6.CHEMISTRY PARAMETERS          STAND-BY
  TEST CODE          :A          TEMP 37.0
  ASSAY CODE         :RATE-19-25 S.NO    1
  SAMPLE VOLUME      :10
  R1 VOL.            :440(S)
  R2                 :50-6(S)
  R3                 :
  WAVELENGTH 1       :376NM
  WAVELENGTH 2       :340NM
  RGT.BLK.ABS        :0
  RGT.BLK.CONC       :0
  STD.CONC           :0-0-0
  FACTOR             :12346
  STD.ABS.ALLOWANCE:10%
  NORMAL RANGE L     :0
  NORMAL RANGE H     :0
  ABS.LIMIT(RATE)    :2000
  CONTROL ID.NO.     :0-0-0
**NEXT PAGE          :20                    **
**0---13 (20:COPY)                          **
```

Fig. 1．Parameters of Glutathione Reductase Measurment with HITACHI-705 Analyser

結果と考察

自動分析計における至適条件

EGR 活性の測定に関しては，多くの研究者により様々に異なった反応条件が報告されている（GSSG, 0.2～3.3mM；NADPH, 0.78～0.162mM；FAD, 0.001～0.011mM）[6]．これらはいずれも分光光度計を用いて測定した場合であり，自動分析計に適用した場合に至適条件が変化するかどうかは必ずしも明かではない．そこでまず最初に，705型分析計における EGR 活性および AC 測定の至適条件を検討した．

1）緩衝液　EGR 活性測定には通常，リン酸緩衝液およびトリス塩酸緩衝液が使用されている．緩衝液の種類及び pH の EGR 活性値に及ぼす影響を Fig. 2．に示した．どちらの緩衝液でも同程度の活性値を示し，至適 pH は7.4であった．以後は，リン酸緩衝液を使用した．

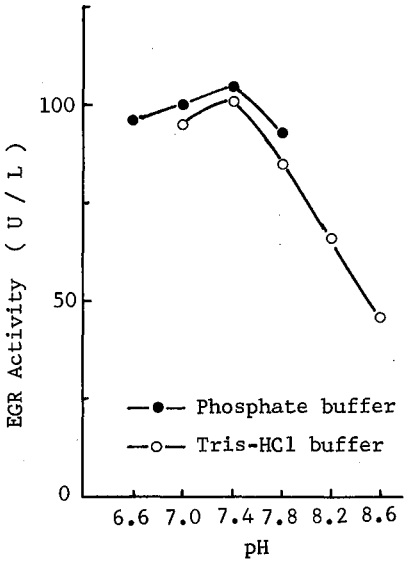


Fig. 2. Effect of pH of Buffer on Erythrocyte Clutathione Reductase Activity

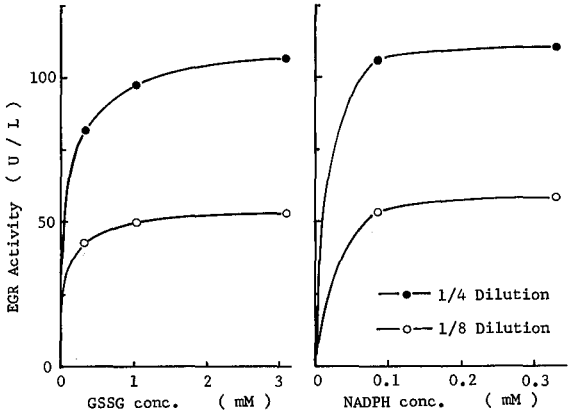


Fig. 3. Fffect of Concentration of Glutathione (left) and NADPH (right) on Erythrocyte Glutathione Reductase Activity

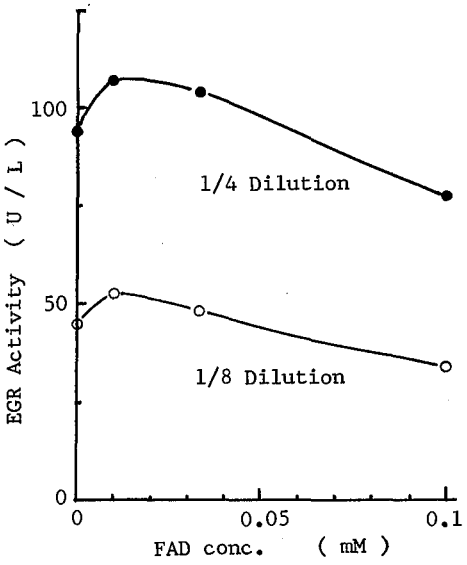


Fig. 4. Effect of Concentration of FAD on Erythrocyte Glutathione Reductase Activity

2）基質 GSSG 濃度および NADPH 濃度の EGR 活性に及ぼす影響を Fig. 3. に示した. GSSG 濃度の至適条件は 3 mM 以上であり, Beutler[7,8]の値と同程度であった. Bayoumi ら[6]が最適とした 2 mM では 1／4 希釈溶血液の場合に低すぎる傾向を示した. NADPH の最適濃度は0.01mM 以上であった.

3）補酵素 FAD の濃度の影響を Fig. 4. に示した. 0.01mM で最大活性が得られ, それ以上の濃度で酵素活性が阻害されることが示された. 従って, FAD の至適濃度は0.01mM に設定した.

このように, 自動分析計における EGR 活性測定の至適条件は, 従来の報告にみられる値[6]と同程度であった.

4）直線性 上記の EGR 活性測定条件において, 溶血液を種々の倍率に希釈して測定したときの EGR 活性を Fig. 5. に示した. 1／2 希釈溶血液（Hb 濃度にして約 2 *g*／*dl*）まで直線的に増加した. 705型分析計は対照をとっていないので, それ以上の濃度については, 吸光度オーバーで測定不可能である. 以後, 1／4 希釈で測定した.

溶血液と FAD との反応時間

FAD 存在下で EGR 活性を測定するときには, 溶血液と FAD を一定時間反応させる必要がある. 705型分析計では試料に第一試薬（FAD を含む）を添加してから第二試薬（GSSG）により反応を開始させるまでの時間は 5 分に固定されている[9]. そこで溶血液と FAD とのプレインキューベーション時間が FAD による EGR の活性化に及ぼす影響を調べたところ, Fig. 6. に示すように 5 分間の前処理で十分に活性化することが示された. 従って, 705型分析計で第一試薬に FAD を添加して EGR 活性化の程度を測定することに問題はないものと思われる.

同時再現性と日差変動の検討

上記の条件により705型分析計を用いて EGR 活性を測定するときの精度について検討した. 3 人の血液からそれぞれ溶血液を調製し, 同日に 4 回ずつ 3 日間（その間,

溶血液は−20℃に保存した.）にわたってEGR活性およびACを測定した．その時の平均値，標準偏差，および変動係数をTable 2．に示した．同時測定における変動係数はEGR活性については最大でも3.6%，平均2.2%（FAD非存下）および1.4%（FAD存在下）であり，ACについても最大3.4%，平均2.4%であった．また3日間の測定のばらつきは変動係数にしてEGR活性では平均6.0%（FAD非存在下）および5.7%（FAD存在下）と幾分大きかったが，ACでは平均2.4%と小さかった．EGR活性の日差変動が若干大きいことには保存中の溶血液の変化によるEGR活性の変化も含まれているものと思われる．この結果は，EGR活性は血球の保存により低下するが，ACは少なくとも2週間の間変化しなかったという報告[6]とも一致する．

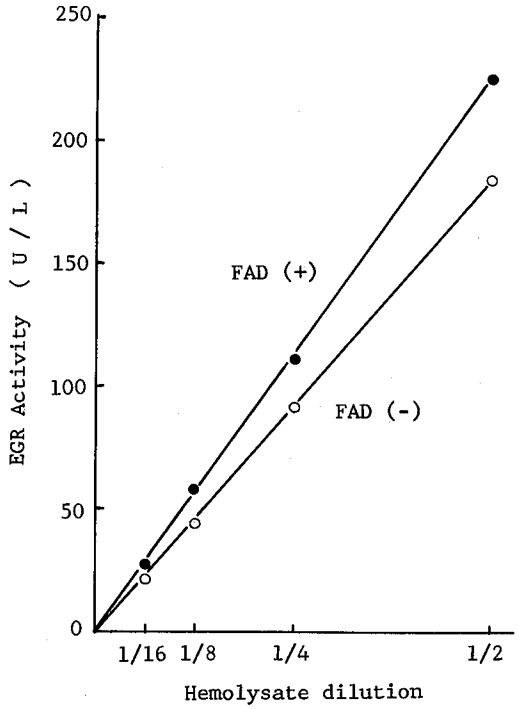


Fig. 5. Relationship between Erythrocyte Glutathione Reductase Activity and Hemolysate Dilution

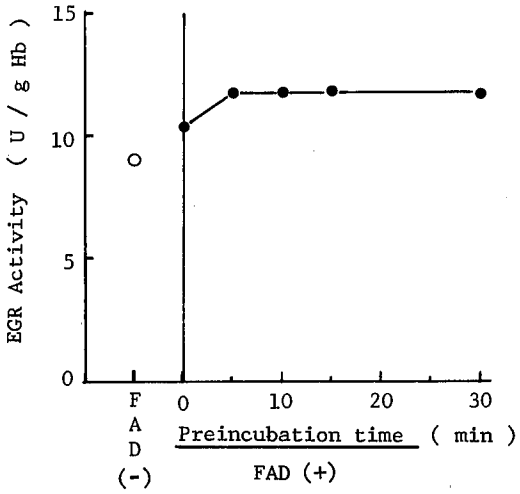


Fig. 6. Effect of Preincubation Time with FAD on Erythrocyte Glutathione Reductase Activity

Table 2. Erythrocyte Glutathione Reductase Activity and Activation Coefficient and Within-Day and Between-Day Coefficient of Variation[a)]

Hemolysate		1st Aay			2nd Day			3rd Day			Mean for 3 days		
		−	+	AC	−	+	AC	−	+	AC	−	+	AC
Subject A	Mean	7.9*	9.7*	1.22	8.7	9.9	1.14	7.7	8.9	1.16	8.1	9.5	1.17
	SD	0.13	0.18	0.03	0.22	0.12	0.04	0.18	0.04	0.03	0.54	0.53	0.04
	CV%	1.6	1.9	2.4	2.5	1.2	3.1	2.3	0.5	2.6	6.6	5.6	3.5
Subject B	Mean	8.3	10.2	1.23	8.3	10.0	1.20	7.7	9.3	1.21	8.1	9.8	1.21
	SD	0.12	0.11	0.03	0.15	0.12	0.02	0.25	0.11	0.04	0.34	0.47	0.02
	CV%	1.5	1.1	2.1	1.8	1.2	1.3	3.3	1.2	2.9	4.2	4.8	1.3
Subject C	Mean	11.8	13.5	1.14	12.9	14.1	1.09	11.2	12.3	1.10	12.0	13.3	1.11
	SD	0.43	0.30	0.04	0.13	0.18	0.03	0.26	0.20	0.01	0.87	0.91	0.03
	CV%	3.6	2.2	3.4	1.0	1.3	2.3	2.6	1.1	2.1	7.3	6.8	2.4

a）：Determinations were made four times simultaneously a day and for 3 days
*：Enzyme activity was measured with 1/4 dilution hemolysate and expressed as U/g Hb
−，＋：Enzyme activity was measured without FAD or with FAD
AC：Activation coefficient＝Activity with FAD／Activity without FAD

また，今回の測定で得られたEGR活性およびACの平均値はそれぞれ9.4±2.3U／*g* Hbおよび1.16±0.05であり，安田らが提示している正常値（EGR活性：4.5～10.7，平均7.6U／*g* Hb；AC：1.0～1.34，平均1.16）[5]に近い値を示した．

以上のように，自動分析計においてEGR活性およびACは十分な精度をもって測定できることが示された．さらにEGR活性に対する補酵素の添加効果（AC）は赤血球中に含まれるビタミンB_2量に逆相関しており，ビタミンB_2栄養状態判定の有効な指標とされているが[2]，そのACが一回のEGR測定で自動的に計算，出力されることはルーチン化にとって大きな意義をもつものと思われる．

要　　約

ビタミンB_2の栄養状態判定の有効な指標である赤血球グルタチオン還元酵素（EGR）の活性およびビタミンB_2の補酵素型であるフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）の添加効果（AC）の測定のルーチン化を目的として，自動分析計（日立705型）を用いた測定の至適条件とその精度を検討した．

EGR活性測定の至適条件は酸化型グルタチオン（GSSG），3 mM以上，還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADPH），0.1mM，FAD，0.01mMであった．

上記条件下で日立705型自動分析計を用いたEGR活性測定の同時再現性は変動係数で平均2.2%であり，日差変動は6.0%であった．また，ACの変動係数はどちらも平均2.4%と良好であった．

以上の結果，自動分析計によりEGR活性およびACは十分な精度で測定でき，ルーチン化が可能であることが示された．

謝辞　本研究にあたり自動分析計の使用および採血にご協力をいただいた当研究所細菌第二研究科精度管理室の諸氏に深謝する．

文　　献

1）厚生省：国民栄養の現状（昭和60年国民栄養調査成積），1987
2）細谷憲政他（日本ビタミン学会第38回大会シンポジウム）：ビタミン，**60**，379，1986
3）Bidlack, W. R., Kirsch, A. and Meskin, M. S.: *Food Technol.*, **40**, 61, 1986
4）Clemens, R. and Brown, R. C.: *ibid.*, **40**, 71, 1986
5）安田和人：ビタミン学実験法〔Ⅱ〕水溶性ビタミン，日本ビタミン学会編，156-158，1985，東京化学同人，東京
6）Bayoumi, R. A. and Rosalki, S. B.: *Clin. Chem.*, **22**, 327, 1976
7）Beutler, E.: *J. Clin. Invest.*, **48**, 1957, 1969
8）*idem.*:*Science*, **165**, 613, 1969
9）日立705型自動分析装置取扱説明書

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 173-180, 1988

各種食品における薬剤耐性腸内細菌の分布とそのRプラスミドの検討

新井輝義*, 池島伸至*, 神真知子*,
楠くみ子*, 入倉善久*, 寺山武*,
太田建爾**, 坂井千三***

Distribution of Drug Resistant *Enterobacteriaceae* in Commercial Foods and R Plasmids of Them

TERUYOSHI ARAI*, NOBUYUKI IKEJIMA*, MACHIKO JIN*,
KUMIKO KUSUNOKI*, YOSHIHISA IRIKURA*, TAKESHI TERAYAMA*,
KENJI OHTA** and SENZO SAKAI***

Distribution and frequency of drug resistant *Enterobacteriaceae* and other Gram negative glucose fermentative rods were examined for 413 specimens of commercial foods available in Tama district of Tokyo from 1983 to 1985. And also R plasmids of the isolates were tested.

The drug resistant microorganisms were isolated by 5 plates of BTB-lactose-agar each of which contained 25 μg/ml antimicrobials such as tetracycline (Tc), chloramphenicol (Cm), streptomycin (Sm), kanamycin (Km) and ampicillin (Ap). A total of 433 strains which were resistant to one or more antimicrobials of Tc, Cm, Sm, Km and Ap were isolated from 9 specimens out of 46 Japanese cakes, 90 out of 201 samples of sandwitches, lunches or rice balls, 34 out of 50 slices of raw fish and cooked fish, and 94 out of 116 raw meats and poultries. Most of them were identified as *Escherichia coli*, *Escherichia* sp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* sp., *Cedecea* sp., *Serratia* sp. and *Aeromonas* sp..

Most strains of *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. and *Citrobacter* sp. isolated from meat or poultry were resistant to Ap. *E. coli* isolated from meat or poultry showed resistance to Tc. Sixteen isolates (51.6%) of them bore transferable R plasmids of multiple drug resistance. Most of *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp. isolates from sandwiches, lunches and rice balls were resistant to Ap and Sm, and 8 strains (4.6%) of them bore transferable R plasmids resistant to one or two antimicrobials. None of all the isolates from Japanese cakes and sliced raw fishes and cooked fishes was found with transferable R plasmids.

Keywords: drug resistance, R plasmid, antimicrobials, Japanese cake, lunch, rice ball, sliced raw fish, meat, poultry

緒　言

各種の抗生剤に対して抵抗性を持つ耐性菌の出現頻度については，ヒトや動物由来の病原菌あるいは病巣由来細菌について綿密な検討がなされ，多くの報告がみられ

*東京都立衛生研究所多摩支所　190　東京都立川市柴崎町3－16－25
*Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, 16－25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan
**東京都立衛生研究所微生物部　169　東京都新宿区百人町3－24－1
**Department of Microbiology, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
***(財)東京顕微鏡院

る[1]．そしてこれらの臨床材料からの耐性菌の検出率は菌種や抗生剤によって大きく異なるが，近年著しく増加してきたことが指摘されている．一方，家畜や家禽あるいは養殖魚に対しては，治療を目的とした抗生剤の投与の他に，肥育または感染症予防を考慮した飼料への添加使用が行われている[2]．その結果，牛，豚，家禽の腸管内細菌は多剤耐性化し，家畜やその環境[3-7]，あるいは畜産物の耐性菌汚染[8-12]が問題視され，公衆衛生面から関心が寄せられている．これらに分布する耐性菌は水[13]や食品をも汚染していることが推察されているが，あまり検討が進められていない．そこで著者らは家畜の腸内細菌による直接汚染が予測される牛さし，牛や豚のレバさし等の生食用食肉，直接汚染の可能性の少い加熱調理された複合食品，和菓子，また大腸菌群による汚染率の高いすし種，さしみ等を対象に耐性菌の分布と伝達性Rプラスミド（以下単にRプラスミドとする）保有状況を調査した．その結果，動物などの腸内細菌汚染が推察される食肉や複合調理食品からRプラスミド保有の耐性菌が高率に検出されたので報告する．

実験材料および方法

1．供試食品

1983～1985年の間に多摩地区で市販されていた和菓子46検体，調理パン・弁当・にぎりめし等の201検体，すし種・さしみ等50検体，および牛さし・レバさし等の生食用食肉や牛，豚，家禽等の加工用食肉116検体の合計413検体を試料とした．

2．供試抗生剤

テトラサイクリン（Tc），クロラムフェニコール（Cm），ストレプトマイシン（Sm），カナマイシン（Km），アンピシリン（Ap），ナリジクス酸（Na）およびリファンピシン（Rfp）の7剤を使用した．

3．耐性菌の分離および同定

供試食品10g を90m*l* の生理食塩水を加えてホモジナイズし，その1 m*l* ずつをシャーレに採取し，Tc, Cm, Sm, Km または Ap をそれぞれ25 μg／m*l* 濃度に添加した薬剤加 BTB 乳糖寒天培地約18m*l* を加えて混釈した．本培地を35℃で1晩培養後，出現したコロニーをできる限り多数釣菌し，同種の薬剤加寒天平板で再度分離培養を行った．各分離菌をクリグラー寒天，LIM 培地，シモンズのクエン酸塩培地およびチトクローム・オキシダーゼ試験によって一次鑑別を行った．その後，VP，ウレアーゼ，IPA，アルギニン，オルニチン，マロン酸，エスクリン，アドニット，イノシット，ズルシットの性状を調べ，Ewing らの記載によって菌種や菌属の同定を行った．ただし食肉の場合は，EMB 寒天で分離した大腸菌群を対象に，Tc, Cm, Sm, Km または Ap それぞれ25 μg／m*l* 加 BTB 乳糖寒天培地に接種して，耐性菌を検出した．

4．分離菌株の薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は，日本化学療法学会標準法に準じた．すなわち，ミュラーヒントン寒天を基礎培地とした濃度の異なる Tc, Cm, Sm, Km, Ap および Na の各平板に保存菌株のトリプトソイブロス1晩培養菌の100倍希釈液をマルチイノキュレーターで接種し，35℃1晩培養し最小発育阻止濃度（MIC）を求めた．いずれかの薬剤に対し，MIC が50 μg／m*l* 以上を示す菌株を耐性菌とした．ただし，Na に対しては MIC 12.5 μg／m*l* 以上を耐性菌とした．

5．Rプラスミドの検索

一次伝達実験は，受容菌に *Escherichia coli*（以下 *E. coli* と略す）K-12 CSH2株の Na 耐性株および *E. coli* K-12 W677株の Na 耐性株を使用した．供与菌としては分離耐性株のうち Na に対する MIC が6.25 μg／m*l* 以下の368株を供試した．供与菌と受容菌をペナセーブロス（PAB：Difco 製）5 m*l* を分注した中試験管に接種し，35℃で振とう培養を行った．対数増殖期中期の培養液を各々0.1m*l* および0.5m*l* 採取し，これらを同時に新鮮な PAB 5 m*l* に混合接種し，ゆっくり振とう培養した．4～5時間培養後にその0.1m*l* を2剤加選択平板（PAB 寒天に Na 25 μg／m*l* と5抗生剤のいずれか1剤を25 μg／m*l* に添加）に塗抹し，35℃2日間培養した．出現したコロニーを単離し，Rプラスミドの伝達の有無と耐性型を調べた．

二次伝達実験では，受容菌に *E. coli* K-12 CSH2株の Rfp 耐性株および *E. coli* K-12 W677株の Rfp 耐性株を使用し，一次伝達実験と同様の条件で行った．ただし，選択平板には，Rfp 25 μg／m*l* および各薬剤25 μg／m*l* 添加 PAB 寒天平板を用いた．

結　　果

1．各種食品からの薬剤耐性菌検出状況

各種食品413検体のうち，Tc, Cm, Sm, Km または Ap いずれかの抗生剤耐性菌の検出成績を Table 1 に示した．和菓子46検体中9検体（19.6%），調理パン・弁当・にぎりめし201検体中90検体（44.8%），すし種・さしみ50検体中34検体（68.0%）および食肉116検体中94検体（81.0%）から耐性菌が検出された．これらのうち独立集落を形成し，薬剤感受性試験で耐性が確認された433株を保存し，菌種およびRプラスミドの伝達性を検討し

Table 1. Distribution of Drug Resistant Microorganisms in Various Foods

Foods	No. of specimens tested	No. of drug resistant* positives	No. of resistant strains obtained	Species of the strains (No. of strains)
Japanese cake	46	9(19.6%)	12(0)**	*Klebsiella* sp. (4), *Enterobacter* sp. (4), *Cedecea* sp.(4)
Sandwich, lunch and rice ball	201	90(44.8%)	214(9)	*Escherichia coli* (1), *Escherichia* sp.(5), *Klebsiella* spp. (129), *Enterobacter* spp. (46), *Citrobacter* sp.(2), *Cedecea* sp.(2), *Serratia* sp. (5), *Aeromonas* sp. (10), Unknowns***(14)
Sliced raw fish and cooked fish	50	34(68.0%)	65(0)	*Klebsiella* spp. (38), *Enterobacter* spp. (11), *Citrobacter* sp.(10), *Aeromonas* sp. (3), Unknowns(3)
Raw meat and poultry	116	94(81.0%)	142(21)	*Escherichia coli* (31), *Escherichia* sp.(6), *Klebsiella* spp. (44), *Enterobacter* spp. (43), *Citrobacter* sp.(14), Unknowns(4)
Total	413	227(54.9%)	433(30)	

*: Strains resistant to these drugs; tetracycline(Tc), chloramphenicol(Cm), streptomycin(Sm), kanamycin (Km) and ampicillin(Ap).

**: No. of R plasmid bearing strains.

***: Unclassified *Enterobacteriaceae*.

た.

検出された耐性菌433株の菌種は，腸内細菌科の *E. coli* 32株，その他の *Escherichia* sp. 11株，*Klebsiella* spp. 215株，*Enterobacter* spp. 104株，*Citrobacter* sp. 26株，*Cedecea* spp. 6株，*Serratia* spp. 5株，その他オキシダーゼ陰性ブドウ糖発酵性グラム陰性桿菌21株およびビブリオ科の *Aeromonas* sp. 13株であった．食品の種類ごとに検出された耐性菌の菌種をみると和菓子およびすし種・さしみからは *Escherichia* spp. は検出されず，*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. などが検出された．調理パン・弁当・にぎりめしでは *Klebsiella* spp. や *Enterobacter* spp. が多数を占め，その他 *Aeromonas* sp. 等もみられた．食肉では，*E. coli*, *Escherichia* sp., *Klebsiella* spp. および *Enterobacter* spp. が87.3%を占めていた．

2．分離菌株の薬剤耐性型

各種食品から検出された耐性菌433株の由来と菌種別の Tc, Cm, Sm, Km, Ap および Na に対する耐性頻度を Table 2 に示した．和菓子由来の *Klebsiella* sp. 等3属10株はいずれも Ap 耐性であった．調理パン・弁当・にぎりめし由来の *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. は Ap, Cm および Sm 耐性株が多かった．なお *Klebsiella* 属の47株（36.4%）は Na 耐性であり，他の食品由来の *Klebsiella* 属と異なっていた．

すし種・さしみ由来の *Klebsiella* spp. および *Enterobacter* spp. は Ap 耐性株が多く認められた．また，*Citrobacter* sp. は10株中7株が Km 耐性であった．

食肉由来株では，*E. coli* の約半数が Tc, Cm, Sm および Km に耐性を示した．*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. および *Citrobacter* sp. はほとんどの菌株が Ap に耐性を示した．

各菌株の薬剤耐性型は，Table 3 に示したように1薬剤のみ耐性が246株（56.8%）であったが，他の菌株は2～5薬剤に対して耐性を示した．由来別の菌株の耐性型は表には示さなかったが，和菓子由来の12株中2株は Sm に，10株が Ap に単独耐性であり，多剤耐性を示す菌株は認められなかった．調理パン・弁当・にぎりめし由来の214株中107株（50.0%），食肉由来の142株中76株（53.5%），さらに，すし種・さしみ由来の65株中51株（78.4%）が単剤耐性であって，しかもいずれも Ap 耐性株が多くみられた．

菌種別にみた場合，Table 3 に示すごとく，*E. coli* では複数の薬剤に対する耐性菌が多く認められた．2剤耐

Table 2. Frequency of Resistant Strains to Tc, Cm, Sm, Km, Ap and Na on the Isolates from Various Food

Foods	Japanese cake			Sandwich, lunch and rice ball									Sliced raw fish and cooked fish					Raw meat and poultry					
Species	*Klebsiella* sp.	*Enterobacter* sp.	*Cedecea* sp.	*Escherichia coli*	*Escherichia* sp.	*Klebsiella* spp.	*Enterobacter* spp.	*Citrobacter* sp.	*Cedecea* sp.	*Serratia* sp.	Unknowns**	*Aeromonas* sp.	*Klebsiella* spp.	*Enterobacter* spp.	*Citrobacter* sp.	Unknowns**	*Aeromonas* sp.	*Escherichia coli*	*Escherichia* sp.	*Klebsiella* spp.	*Enterobacter* spp.	*Citrobacter* sp.	Unknowns**
No. of resistant strains	4	4	4	1	5	129	46	2	2	5	14	10	38	11	10	3	3	31	6	44	43	14	4
Tc	0*	0	0	0	2	18	12	0	0	1	5	0	2	0	2	1	0	25	2	9	4	2	2
Cm	0	0	0	0	0	29	14	2	0	1	5	8	1	1	0	3	1	14	1	6	13	3	2
Sm	0	2	0	0	3	25	23	2	1	2	7	5	2	0	0	2	1	19	4	10	5	4	2
Km	0	0	0	0	0	7	0	0	0	2	0	0	4	0	7	0	0	13	2	4	1	1	0
Ap	4	2	4	1	1	99	28	0	2	4	6	10	32	11	5	2	3	11	3	40	41	13	3
Na	0	0	0	0	0	47	7	0	0	1	3	0	1	2	1	0	0	0	0	0	2	1	0

* : No. of strains resistant to each drug. MICs of Tc, Cm, Sm, Km and Ap against to the strains are more than 50 μg/ml and MIC of Na is more than 12.5 μg/ml.

** : Unclassified *Enterobacteriaceae*.

Table 3. Distribution of Drug Resistance Patterns of the Isolates from Various Foods

Species	No. of resistant strains	No. of strains resistant to					No. of transferable R plasmids bearing strains
		1 drugs*	2 drugs	3 drugs	4 drugs	5 drugs	
Escherichia coli	32	10	6	6	6	4	16
Escherichia sp.	11	7	1	3	0	0	1
Klebsiella spp.	215	135	54	19	5	2	8
Enterobacter spp.	104	66	21	11	5	1	3
Citrobacter sp.	26	11	13	2	0	0	1
Cedecea spp.	6	5	1	0	0	0	0
Serratia sp.	5	2	1	1	1	0	0
Unknowns**	21	7	7	6	1	0	1
Aeromonas sp.	13	3	5	5	0	0	0
Total	433	246	109	53	18	7	30

* : Drug resistant determinants are Tc, Cm, Sm, Km, Ap and Na.

** : Unclassified *Enterobacteriaceae*.

性では TcSm が，3剤耐性では TcSmKm が多く，4剤耐性では，TcCmSmKm, TcCmSmAp と TcSmKmAp が主な耐性型であった．5剤耐性株は4株認められ，そのいずれも TcCmSmKmAp の耐性型を示した．それらの由来は2株は生食用食肉，1株は加工用食肉であった．また，*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. にも多剤耐性株がそれぞれ37.2%と36.5%と多く認められた．4剤耐性は10株認められ，そのうち4株が TcCmSmAp 耐性であった．

5剤耐性では，TcCmSmApNa が1株，TcCmSmKmAp が2株であった．これらのうち2株は調理パンとにぎりめし，1株は食肉由来であった．

3．Rプラスミドの検討

Table 1に示したように，和菓子およびすし種・さしみからはRプラスミド保有菌は検出されなかった．調理パン・弁当・にぎりめしおよび食肉ではそれぞれ201検体中7検体（3.4%）から9株，116検体中18検体（15.5%）から菌種または耐性型の異なるRプラスミド保有菌株が21株検出された．各菌種ごとの耐性型とそれ

Table 4. Distribution of R Plasmids in Drug Resistant Isolates from Sandwich, Lunch and Rice Ball and Their Resistant Patterns

Species	No. of strains examined	R plasmid positive strains		Resistant patterns of transconjugants
		No. of strains	resistant patterns	
Klebsiella spp.	129	3	Sm	Sm
		1	SmAp	Sm
		1	Ap	Ap
Enterobacter spp.	46	1	CmSm	Sm
		1	TcCmSmAp	TcSm
		1	SmAp	Sm
Citrobacter sp.	2	1	CmSm	Sm, CmSm

Table 5. Distribution of R Plasmids in Drug Resistant Isolates from Raw Meat and Poultry and Their Resistant Patterns

Species	No. of strains examined	R plasmid positive strains		Resistant patterns of transconjugants
		No. of strains	resistant patterns	
Escherichia sp.	6	1*	TcCmSmKmAp	Km, SmKm, KmAp
Escherichia coli	31	1*	Tc	Tc
		1	Tc	Tc
		1	TcKm	TcKm
		1*	TcAp	Ap
		1	TcCmSm	CmSm
		1	TcSmKm	Sm
		1	TcSmKm	TcSm
		1	TcSmKm	Sm, SmKm
		1*	TcCmSmKm	Cm
		1*	TcCmSmKm	Cm, TcCmSm
		1	TcCmSmAp	TcSm, CmSmAp
		1	TcSmKmAp	TcSmAp, TcKmAp, Sm, Ap
		1	TcSmKmAp	TcSmAp
		1*	TcCmSmKmAp	TcCmSmKmAp, CmAp, Ap
		1*	TcCmSmKmAp	TcCmSmKmAp, SmKm
		1	TcCmSmKmAp	CmSmKmAp, CmKmAp, Sm
Klebsiella spp.	44	2	SmAp	Sm
		1	TcSmAp	Sm
Unknowns**	4	1*	TcCmSm	Tc, Sm

*：Strains isolated from sliced raw meat.

**：Unclassified *Enterobacteriaceae*.

らが保有するRプラスミドの耐性型を調理パン・弁当・にぎりめし由来株と食肉由来株とに分けてTable 4と5に示した．調理パン・弁当・にぎりめし由来株では，*Klebsiella* spp. 129株のうち5株（3.9%），*Enterobacter* spp. 46株のうち3株（6.5%），*Citrobacter* sp. は2株のうち1株がRプラスミドを保有していた．食肉由来株では，*Escherichia* sp. 6株のうち1株（16.7%），*E. coli* 31株のうち16株（51.6%），*Klebsiella* spp. 44株のうち3株がRプラスミドを保有し，それらの耐性型はTable 5に示したとおりである．

考　察

家畜が保菌する腸内細菌，特にサルモネラと大腸菌の薬剤耐性の分布は，家畜の感染症の治療の立場[14,15]あるいは環境や食品への耐性菌汚染拡大の危惧から詳細に検討が進められている[7,13]．家畜由来のサルモネラの50～80%は各種薬剤に耐性であるし，子牛から検出された大腸菌の53%と豚由来の大腸菌の88%，ニワトリ由来大腸菌の97%が，Sm, Tc, Km, Saなどの常用抗生剤に対して耐性であることが報告されている[16,17]．また，これらの多くの菌株がRプラスミドを保有していることも明らかにされている[9,10,15,18]．したがって，食肉が動物由来の耐性菌によって汚染される可能性が高いと推察される．今回の調査では，畜産領域で使用頻度の高い抗生剤および耐性菌研究によく用いられている薬剤を含めた6剤について検討を行った．耐性菌の検出率は和菓子が19.6%，調理パン・弁当・にぎりめしが44.8%，すし種・さしみは68.0%であったが，やはり食肉は高く81.0%であり，家畜，家禽の耐性菌汚染の影響を受けているものと考えられた．なお，佐藤[9]は豚肉における耐性大腸菌の分離頻度は季節によって大きく異なり，夏季に81%と高いことを報告している．著者らの成績でも同様の傾向が認められた．

分離された耐性菌は，*Aeromonas* sp. を除いてすべてブドウ糖発酵グラム陰性桿菌であり，分類学的には腸内細菌であった．各食品に共通して多くみられる耐性菌は *Klebsiella* spp. や *Enterobacter* spp. である．しかし，食肉から分離された *Klebsiella* spp. や *E. coli* はRプラスミド保有株が多いことから家畜や家禽の腸管由来菌と考えられる．これに対して，すし種・さしみから分離された *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., および *Citrobacter* sp. にはRプラスミド保有株がみられないことから環境由来菌と推察される．また調理パン・弁当・にぎりめしおよびすし種・さしみから検出された耐性 *Aeromonas* sp. も環境由来であろう．

各薬剤ごとに耐性菌の出現率をみると，どの食品からもAp耐性菌が多く検出されている．これは現在β-ラクタム系抗生剤がヒトや動物の感染症治療に最も多く使用されているためであろう．調理パン・弁当・にぎりめし由来のAp耐性 *Klebsiella* spp. 99株のうち約20%が，また，すし種・さしみ由来の *Klebsiella* spp. 32株の約40%がMIC 50 μg／ml の比較的弱い耐性菌であるが，Apに中等度耐性を示すヒト臨床材料由来の *Klebsiella* は染色体性の自然耐性であるとされていることから，本調査で分離されたこれら細菌のAp中等度耐性菌も自然耐性菌と推察される．

次に各食品由来株の6種の抗生剤に対する耐性型をみると，単剤耐性菌の占める割合は，和菓子由来株では100%，すし種・さしみ由来株では78.4%，調理パン・弁当・にぎりめし由来株では50.0%，食肉由来株では53.5%であった．和菓子以外の他の食品由来株には多様な耐性型がみられるが，そのなかでもSmとApを含む耐性型を示すものが多かった．

各種食品由来の耐性菌433株のうちNa感受性の368株についてRプラスミドの検索を行ったところ，調理パン・弁当・にぎりめしなど7検体由来の9株および食肉18検体由来の21株がRプラスミドを保有していた．佐藤[9]が豚肉から分離した大腸菌のRプラスミド保有率は今回の著者らの成績よりも高い42%である．佐藤は抗生剤添加培地で耐性菌を分離したが，著者らは食肉については抗生剤無添加のEMB寒天より菌株を分離したために検出率が低いものと推察される．調理パン・弁当・にぎりめし由来の耐性菌のうち，Rプラスミド保有菌は *Klebsiella* spp. 5株，*Enterobacter* spp. 3株，*Citrobacter* sp. 1株で，このうち8株はSmに対して耐性であり，Rプラスミドの耐性型もすべてSm単剤耐性またはSmを含む2剤耐性型であり，Sm耐性を特徴としている．これとは対照的に，食肉由来 *E. coli* はTc耐性株が多くみられた．このことは，牛，豚，家禽から検出される大腸菌はともにTc, Sm耐性株の多いことが明らかにされており[3-6]，その反映であると考えられる．しかも興味深いことは，Rプラスミドの保有率は *E. coli* が約50%であり，*Klebsiella* spp. のRプラスミド保有率は調理パン・弁当・にぎりめし由来の *Klebsiella* spp. と同等であった．

薬剤耐性菌の分布，耐性型あるいはRプラスミドの解析より，食品に分布する薬剤耐性菌は自然環境に由来するものと家畜などのふん便に由来するものとに区別されると考えられる．しかしこのことを立証するためには，

さらにRプラスミドの解析やプラスミドの制限酵素分析パターン等の検討が必要であろう.

ま と め

1983～1985年の間に多摩地区で市販された種々の食品413検体を対象に, Tc, Cm, Sm, KmおよびApに対する薬剤耐性の腸内細菌およびブドウ糖発酵グラム陰性桿菌の分布とそれらのRプラスミド保有状況を検討した.

和菓子46検体中9検体(19.6%), 調理パン・弁当・にぎりめし等201検体中90検体(44.8%), すし種・さしみ等50検体中34検体(68.0%)および生食用食肉を含む食肉・家禽肉116検体中94検体(81.0%)から, それぞれ, 12, 214, 65, 142株, 合わせて433株の耐性菌を分離した. 和菓子由来株はすべて単剤耐性であったが, 他の食品由来株は約20～50%が多剤耐性であった.

食肉・家禽肉由来の *Klebsiella* spp. や *Enterobacter* spp., *Citrobacter* sp. の多くはApに耐性を示した. また, *E. coli* は多くがTc耐性を示し, 31株中16株(51.6%)はTc, Smを含む1～5剤耐性のRプラスミドを保有していた. 一方, 調理パン・弁当・にぎりめし等に由来する耐性菌中, *Klebsiella* spp. や *Enterobacter* spp. 合わせて175株の多くはSmやApに耐性であり, その中の8株(4.6%)は, SmまたはAp単剤耐性のRプラスミドを保有していた.

(本研究は昭和58～60年度当研究所調査研究課題「各種食品における薬剤耐性菌の分布とR因子に関する研究」として実施したものである)

文 献

1) 中谷林太郎：日細菌誌, 27, 5-26, 1972.
2) 二宮幾代治：食品衛生研究, 20, 446-468, 1970.
3) 橋本 一, 鈴木 要, 磯貝誠吾：日細菌誌, 23, 419-422, 1968.
4) 鈴木 要, 磯貝誠吾, 橋本 一：日細菌誌, 25, 145-148, 1970.
5) 鈴木 要, 磯貝誠吾, 橋本 一：日細菌誌, 26, 488-492, 1971.
6) 鈴木 要, 磯貝誠吾, 橋本 一, 三橋 進：日細菌誌, 22, 146-149, 1967.
7) 金井 久, 鈴木 要, 清水 健：日獣会誌, 34, 62-67, 1981.
8) 佐藤昭子：食衛誌, 15, 286-291, 1974.
9) 佐藤昭子：食衛誌, 18, 328-334, 1977.
10) Babcock, G. F., Berryhill, D. L. and Marsh, D. H.：*Appl. Microbiol.*, 25, 21-23, 1973.
11) Kim, T. K. and Stephens, J. F.：*Poult. Sci.*, 51, 1165-1170, 1972.
12) 吐山豊秋：日獣会誌, 39, 285-289, 1986.
13) Holmberg, S. D. et al.：*New Eng. J. Med.*, 311, 617, 1984.
14) Grabow, W. O. K., Prozesky, O. W. and Smith, L. S.：*Water Res.*, 8, 1-9, 1974.
15) Makino, S., Ishiguro, N., Sato, G. and Seno, N.：*J. Hyg.*, 87, 257-269, 1981.
16) 佐藤儀平：北獣会誌, 25, 78-85, 1981.
17) 中村政幸, 大前憲一, 吉村治郎, 小枝鉄雄：動薬検年報, 16, 31-37, 1979.
18) 金城俊夫：日畜会報, 50, 542-548, 1979.
19) Ishiguro, N., Goto, J. and Sato, G.：*J. Hyg.*, 84, 365-379, 1980.

報　　文 Ⅳ

生活環境に関する調査研究

REPORTS Ⅳ

PAPERS CONCERNING ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 181-186, 1988

ディーゼル排気ガスを暴露したラビットの血清における プロコラーゲン・タイプ III・ペプチドの増加

鈴 木 孝 人*, 加 納 堯 子*

Increased Procollagen Type III Peptide in Serum of Rabbits Exposed to Diesel Engine Exhaust

TAKAHITO SUZUKI* and TAKAKO KANOH*

In order to find a new biochemical indicator of the effects of diesel engine exhaust inhalation on human health, levels of procollagen type Ⅲ peptide (P-Ⅲ-P) were examined in sera and broncho-alveolar lavage fluid (BALF) from rabbits exposed to diesel exhaust and control rabbits using a radioimmunoassay method.

Rabbits were exposed to a diluted exhaust containing 4.5 mg／m^3 of particulate matter, 2.2 ppm of nitrogen dioxide and 3.2 ppm of nitrogen monoxide for 7 hours per day, 5 days per week for 12 weeks.

Serum P-Ⅲ-P levels increased significantly in rabbits exposed to diesel exhaust on week 3 and 4, and they returned to the control levels on and after week 8. A significant increase of P-Ⅲ-P level in BALF was also observed on week 4, and it returned to the control level on week 12.

The results suggest that the increases of P-Ⅲ-P levels in serum and BALF are the reflection of the increased rates of type Ⅲ collagen synthesis in the lungs of rabbits exposed to diesel exhaust, because P-Ⅲ-P is an early indicator of the beginning of fibrotic tissue disarrangement.

Keywords：diesel engine exhaust, procollagen type Ⅲ peptide, serum, rabbit

緒　　言

ディーゼル車は燃費においてガソリン車より経済的であり，最近では車の性能面においてもガソリン車と比べて遜色ないことから急速に普及してきた．一方，現状ではディーゼル車はガソリン車より窒素酸化物（NOx），炭化水素類等の排気ガス規制も緩く，ディーゼル車の排気ガス対策の主眼はNOxの低減にあるが，技術的にNOxの低減は逆にススなどの粒子状物質の排出の増加をもたらす結果となるため，現在でも有効な対策が模索されている[1]．また，ディーゼル車から排出される粒子は非常に微細であり，肺胞領域にまで達し，そこに長期間沈着することが報告されている[2-4]．それ故，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行われている[5]．例えば，ディーゼル排気ガスを長期間暴露された動物においては肺癌の発生が報告されており[6-9]，また，最近東京都衛生局から発表された疫学調査でも大気汚染のひどい地区では気管・気管支及び肺の悪性新生物による死亡率が高いことが報告されている[10]．更に，ディーゼル排気ガスを吸入した動物では肺胞壁の間質の厚さが増大し，間質中のコラーゲン線維の増加による線維化も確認されている[11,12]．

コラーゲンの合成はFig. 1に示すように，線維芽細胞等によって作られた前駆体であるプロコラーゲンが細胞外に分泌され，そのプロコラーゲンはN及びC末端をプロテアーゼによって切断された後に架橋により重合されてコラーゲン線維が形成される．一方，N及びC末端から切断されたペプチドは可溶性成分としてある期間血液中に存在する[13]．近年このN末端ペプチドを測定することによりコラーゲンの増加，即ち，線維化の進行状況を診断するようになってきた．

我々は都市型の大気汚染の特徴である自動車排気ガスによる健康影響を把握する為の指標を開発することを目

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　169　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, 169 Japan

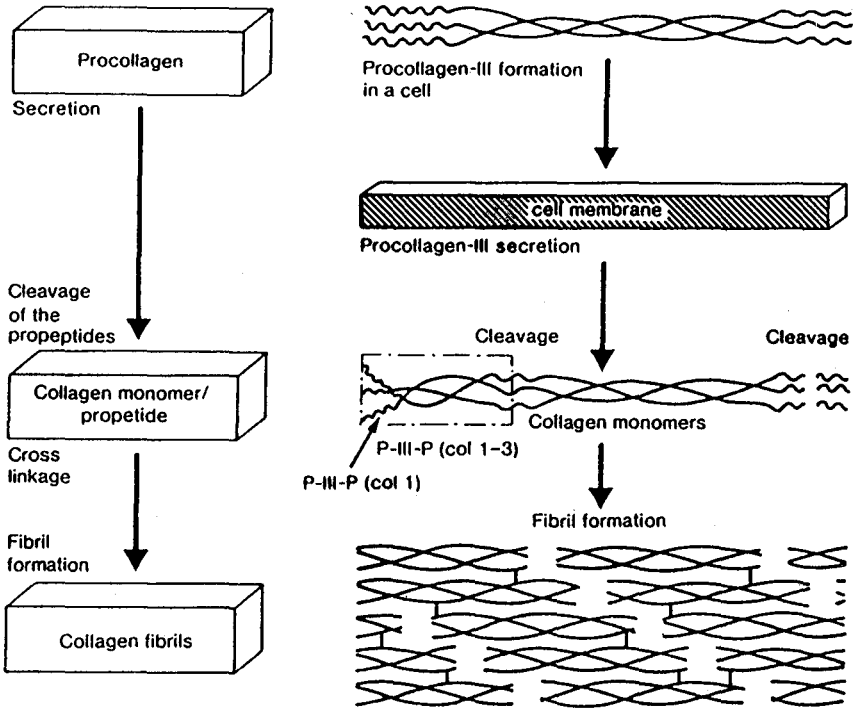


Fig. 1. Biosynthesis of Collagen Fibrils.

的として，ディーゼル排気ガスを吸入させたラビットにおいて，各種の線維症の早期発見の指標として最近注目されているⅢ型プロコラーゲンのN末端から切断されたprocollagen type Ⅲ peptide（P-Ⅲ-P）の変動について検討した結果，排気ガス暴露群で有意な増加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2.5ヶ月令の雄のニュージーランドホワイトラビット（日本生物材料センターKK）を用いて，ディーゼル排気ガスを1ヶ月間及び3ヶ月間暴露した．暴露は週に5日間，1日当り7時間行った．また，暴露濃度はNO_2は2.2±1.4 ppm，NOは3.2±1.9 ppm，粒子濃度は4.5±1.5 mg／m^3である．尚，対照群は無処置のラビットを用い，暴露群及び対照群の数は各々20羽である．排気ガスの発生源はヤンマーディーゼルエンジン（NFAD 50型，直接噴射式，排気量：309cc，回転速度：2400 rpm）を使用し，燃料には軽油（JIS 2号相当品，日本石油KK）を用いた．ディーゼル排気ガスは希釈トンネル中で空気で希釈され，電磁弁の操作で自動的に濃度コントロールしながら15回／時間で換気されているチャンバー（約1.6 m^3）内に導入された．尚，チャンバー内では温度は23±2℃，湿度は45～65％にコントロールされ，照明は午前7時から午後7時のサイクルで点灯された．また，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，柴田科学器機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プレッシャー・インパクター（LP-20型，東京ダイレックKK）を用いて行った．ディーゼル排気ガス中の粉塵は約90％以上が粒径0.5 μm以下の微細な粒子であった．

(2) 検体の調製

ラビットの耳静脈より1，2，3，4，8，12週目に各群10羽づつ採血し，遠心して血清を得た．また，ラビットは1ヶ月及び3ヶ月間の暴露終了後10羽づつ解剖した．尚，肺の一部は病理学的検索のためにホルマリン固定後保存した．肺胞洗浄は既報[14]に準じて行った．即ち，気管に固定したエラスター針に接続した注射筒に生理食塩水を自然落下により注入後，静かに注射筒のピストンを引いて肺胞洗浄液（BALF）を得た．更に，BALFから細胞成分を遠心により除き，その上清を4℃でCentriflo®（CF 25，amicon社）を用いて遠心により約1／80～1／100に濃縮した．

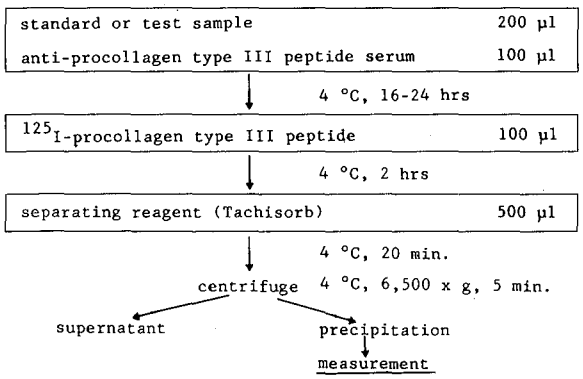


Fig. 2. Radioimmunoassay of Procollagen Type Ⅲ Peptide.

(3) N末端 procollagen type Ⅲ peptide (P-Ⅲ-P) の測定法

Rhode ら[15]によって開発され，Behringwerke 社（西独）で作製されたキット（RIA-gnost® Procollagen-Ⅲ-peptide，ヘキストジャパン社販売）を用いて P-Ⅲ-P 濃度を測定した．測定方法は Fig. 2 に示した．この測定法はウシから抽出精製され，^{125}Ⅰ標識した P-Ⅲ-P と他の動物の P-Ⅲ-P が抗ウシ P-Ⅲ-P 血清に対して免疫学的に競合反応を示すことを利用した competitive immunoprecipitation assay 法によるものである．即ち，P-Ⅲ-P を含む検体の希釈系列を作り，これに過剰の抗ウシ P-Ⅲ-P 血清を加えて P-Ⅲ-P-anti P-Ⅲ-P 複合体を作らせる．更に，^{125}Ⅰ標識ウシ P-Ⅲ-P を加えて過剰の抗ウシ P-Ⅲ-P 血清と結合させる．その後，第二抗体を加えて複合体を遠心して沈澱させる．抗体と結合しなかった過剰の^{125}Ⅰ-P-Ⅲ-P は上清中に残るので，上清を除いたのちに沈澱した P-Ⅲ-P-anti P-Ⅲ-P 複合体の放射能を測定する．標準品であるウシの P-Ⅲ-P 溶液の希釈系列から作製した標準曲線から50% intercept の濃度を求め，更に，検体による50% intercept 値から検体中の P-Ⅲ-P 濃度を計算する．この50% intercept 法を用いる理由はウシの P-Ⅲ-P と他の動物の P-Ⅲ-P による検量線が種属差により異なること，更に，この測定法では Fig. 1 に示すように triple helix をなす P-Ⅲ-P (col 1-3) だけでなく，1本鎖の P-Ⅲ-P (col 1) も測定されるので，50% intercept 法を用いればその影響が除けるためである．尚，放射能の測定には液体シンチレーションカウンター（LS 5801型，ベックマン・ジャパン KK）を用いた．

実験結果

(1) 実験動物の選択のための予備実験

この P-Ⅲ-P 測定用のキットは^{125}Ⅰ標識したウシの P-Ⅲ-P と他の動物の P-Ⅲ-P の抗ウシ P-Ⅲ-P 血清に対する免疫学的競合反応を利用しているので，暴露実験を開始する前に数匹の無処置のモルモット，ラット，ハムスター，マウス，ラビット，ウシ及びヒトの血清を用いてその競合反応の有無と強さについて検討した結果，Fig. 3 に示す如く，50% intercept 値に達するのはマウス，ヒト，ラビット，ウシであり，競合反応性が弱いモルモット，ラット，ハムスターは使用できないことが確認された．また，マウスもラビット，ウシほど競合反応性が強くなかったので実験動物として不適当と判断された．従って，既存の暴露装置（約1.6 m^3）を用いての暴露実験に使用可能な動物としてラビットを選択した．

(2) P-Ⅲ-P 濃度の変化

Fig. 4 に示すように，血清中の P-Ⅲ-P 濃度は3週目では対照群は12.1±3.5であり，排気ガス暴露群は15.2±1.8であった．また，4週目では対照群は12.1±3.6，排気ガス暴露群は18.0±5.0であった．即ち，3週目と4週目で有意な増加が認められた．しかし，8週目以降

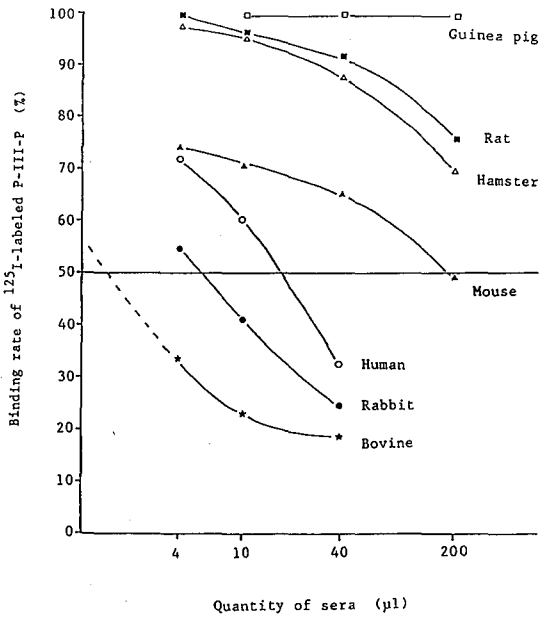


Fig. 3. Radioimmunoassay of Procollagen Type Ⅲ Peptide (P-Ⅲ-P) of Various Sera. Shown is the inhibition of binding of ^{125}Ⅰ-labeled bovine P-Ⅲ-P by increasing sample volumes from sera of human and various animals.

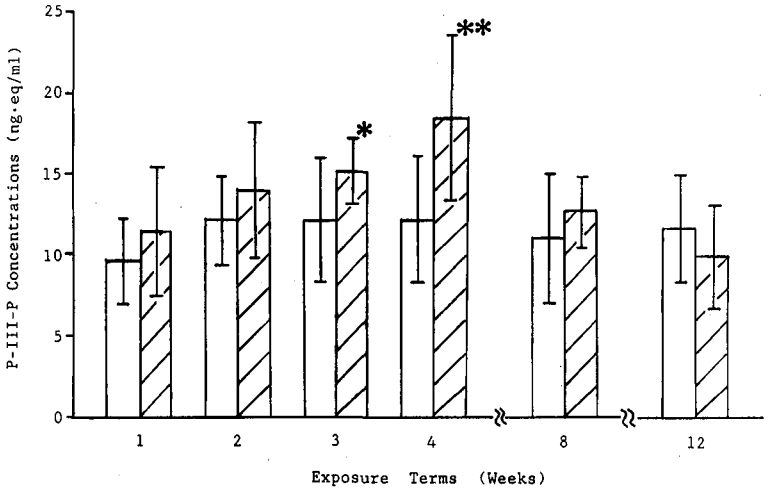


Fig. 4. Changes in Serum P-Ⅲ-P Concentrations of Rabbits Exposed to Diesel Engine Exhaust. Data are expressed as the mean ± S. D. (n=10). Symbols indicate the significant difference from control by the Student t test (* : P<0.05, ** : P<0.02). □ : Control, ▨ : Diesel Exhaust

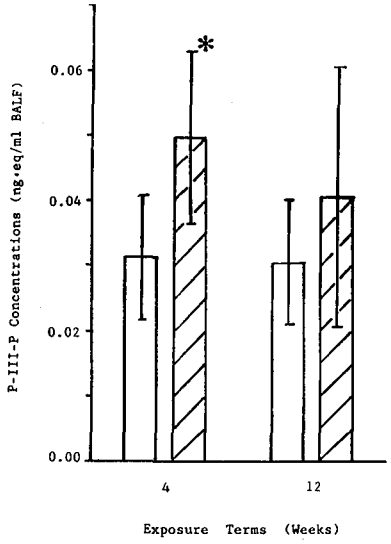


Fig. 5. Changes in P-Ⅲ-P Concentrations of Broncho-Alveolar Lavage Fluid (BALF) of Rabbits Exposed to Diesel Engine Exhaust. Data are expressed as the mean ± S. D. (n=10). Symbol indicates the significant difference from control by the Student t test (* : P<0.05).
□ : Control, ▨ : Diesel Exhaust

は対照レベルに戻った．更に，BALF 中の P-Ⅲ-P 濃度も 4 週目で対照群は0.032±0.010であり，排気ガス暴露群は0.049±0.016と有意な増加が認められた．しかし，12週目では同じく対照レベルに戻った (Fig. 5).

考　　察

コラーゲンは間質の結合組織の主成分であり，正常成人では体内の全タンパクの約11%を占め，線維芽細胞，平滑筋細胞，骨・軟骨細胞などにより産生される[16]．コラーゲンは分子構造により11種に分類されるが[17-19]，肺ではそのⅠ～Ⅴ型が存在し，乾燥重量の10～15%を占め，その約80%はⅠ型とⅢ型より成り，通常ではⅠ型とⅢ型の比率はだいたい 2 : 1 でⅠ型が多い[16]．線維化に伴い増加する結合組織の成分としては線維タンパクのコラーゲン，エラスチン，基質の糖タンパク，ムコ多糖であるがその主体をなすものはコラーゲンである．線維化が肺に生じると肺胞壁や血管壁などの間質に分布しているコラーゲン量は著しく増加する[20,21]．また，線維化の初期には Type Ⅲのコラーゲンが増加するが，やがて Type Ⅰが Type Ⅲに対して圧倒的に多くなることが報告されている[20-26]．更に，活動的な線維化が生じている初期には Type Ⅲのコラーゲンの合成が亢進するため，血液中の P-Ⅲ-P 濃度の上昇が認められるが，慢性期の線維化の状態では必ずしも血液中の P-Ⅲ-P 濃度が上昇しないことも報告されている[27-29]．即ち，線維症における血液中の P-Ⅲ-P 含量はすでに蓄積されたコラーゲン線維の量を示すのではなく，現状における線維合成の程度を表しているものと考えられている．例えば，Nerlich ら[30]は著しい線維化を生じさせるパラコートを静脈に注入されたヒツジでは肺のコラーゲン含量の増加は認められず，また，組織学的所見でも線維化像も認め

られない．しかし，肺からリンパ液中へのP-Ⅲ-Pの遊離が著しいことを報告している．このことから彼等はP-Ⅲ-Pの増加は線維化の発症を早期に発見する有効な指標であると述べている．Fig. 4に示すように，ディーゼル排気ガスを吸入したウサギの血清中のP-Ⅲ-P濃度が暴露を開始してから3週目と4週目で有意に上昇し，8週目以降ではコントロールレベルにまで戻る現象が見られた．同様に，Fig. 5に示すように，BALF中のP-Ⅲ-P濃度も4週目で上昇し，12週目ではコントロールレベルに戻る現象が認められた．これらの現象は恐らく3週目頃から肺の線維化が発生し，8週目以降はその線維化は慢性期に入った為と推測された．今後，肺のコラーゲン含量の生化学的検討と組織学的な方法で肺のコラーゲン線維を染色して，肺における線維化の程度を確認する予定である．一方，P-Ⅲ-P濃度の上昇は血清中よりBALF中の方がむしろ早期に認められるので，BALF中のP-Ⅲ-P濃度の測定は肺線維症の診断に血清中のP-Ⅲ-P測定より有効であるという報告[31,32]もあるが，肺胞洗浄は患者等に苦痛を与えるだけでなく，危険性も大きいのでBALFを採取することには慎重を期すべきと思われる．

また，ディーゼル排気ガス中にはガス成分としてはNOx，ニトロソアミン，炭素粒子に付着した多環芳香族炭化水素類のbenzo (a) pyrene，更に，多環芳香族炭化水素とNO_2との反応によって生じるnitroarene類などが数多く含まれており[33]，これらの物質はそれぞれ線維化を起こしたり，発癌性のあることが知られている．現時点では，本実験における肺の線維化をもたらした特定の物質は明らかでない．

線維化の指標を求めて，これまで種々の模索がなされてきた．尿中のhydroxyproline, hydroxylysine含量の測定[13,34-36]，血液中のprolyl hydroxylase, lysyl hydroxylase, galactosylhydroxylysyl glucosyltranseferase, collagenaseなどの酵素活性の測定[13,37-41]などが試みられたがいずれも簡単な検査法とはなり得なかった．更に，hydroxyprolineとhydroxylysine含量及びprolyl hydroxylase等の酵素活性は成長や年齢によって減少することも報告されている[13]ので広い年齢層を対象にすることは難しい．一方，血液中のP-Ⅲ-Pの測定は既にキット化されており，比較的簡単で，再現性もあり，一度に多数の検体を測定できる利点がある．また，P-Ⅲ-P濃度は年齢による変動が少なく[42]，検体は凍結保存すれば約1年間は安定であることが確められている[15]．更に血液中のP-Ⅲ-P濃度の測定は生体中のType Ⅲコラーゲンの産生を特異的に反映する検査法であり，P-Ⅲ-P測定により初期の段階での線維化が把握できる利点があるが[32,42,43]，P-Ⅲ-P値は臓器特異性に乏しく，肺の線維症のみならず肝疾患[15,38,44]や骨疾患[45]などでも上昇することが報告されている．また血液中のP-Ⅲ-Pは更に分解されて腎より排泄されるので[15]，排泄障害時すなわち腎疾患の場合にもP-Ⅲ-P濃度が上昇する可能性も考えられる．大気汚染の健康影響を把握するための疫学調査の指標としてこの血液中のP-Ⅲ-Pを利用する場合は，肺疾患以外の疾患の有無についての配慮も必要と思われる．

謝辞 本研究の実験動物を選択するための予備実験において，P-Ⅲ-P測定技術の指導及び各種の動物の血清の取得などにおいて多大な便宜を計って下さったヘキストジャパン株式会社の三野博良氏，太田京子氏，塚田俊美氏に深謝いたします．

（本研究は昭和62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）斉藤　孟：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，7-38，昭和60年日本科学技術情報センター編

2）Wolff, R. K., Kanapilly, G. M., DeNee, P. B. and McClellan, R. O.：*J. Aerosol Sci.* 12, 119-129, 1981

3）Chan, T. L., Lee, P. S. and Hering, W. E.：*J. Appl. Toxicol.*, 1, 77-82, 1981

4）Lee, P. S., Chan, T. L. and Hering, W. E.：*J. Toxicol. Environ. Health*, 12, 801-813, 1983

5）Ishinishi, N., Koizumi, A., McCllellan, R. O. and Stöber, W.：*Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust*, Developments in Toxicology and Environmental Science, vol. 13, 1986, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford

6）Iwai, K., Udagawa, T., Yamagishi, M. and Yamada, H.：*Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust*, Developments in Toxicology and Environmental Science, vol. 13, Ed., Ishinishi, N., Koizumi, A., McCllellan, R. O. and Stöber, W., 349-360, 1986, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford

7）Mauderly, J. L., Jones, R. K., McClellan, R. O., Henderson, R. F. and Griffith, W. C.：*Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust*, Develop-

ments in Toxicology and Environmental Science, vol. 13, Ed., Ishinishi, N., Koizumi, A., McClellan, R.O. and Stöber, W., 397-409, 1986, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford

8) Stöber, W. : *Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust*, Developments in Toxicology and Environmental Science, vol. 13, Ed., Ishinishi, N., Koizumi, A., McClellan, R. O. and Stöber, W., 421-439, 1986, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford

9) McClellan, R. O. : *Ann. Rev. Pharmacol, Toxicol.*, 27, 279-300, 1987

10) 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総合解析報告書

11) White, H. J. and Garg, B. D. : *J. Appl. Toxicol.*, 1, 104-110, 1981

12) Karagianes, M. T., Palmer, R. F. and Busch, R. H. : *Ann. Indust.* Hyg. *Assoc. J.*, 42, 382-391, 1981

13) Prockop, D. J., Kivirikko, K. I., Tuderman, L. *et al.* : *N. Eng. J. Med.*, 301, 13-23, 1979

14) Suzuki, T., Ikeda, S., Kanoh, T. and Mizoguchi, I. : *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 15, 733-739, 1986

15) Rhode, H., Vergas, L., Hahn, E. *et al.* : *Eur. J. Clin. Invest.*, 9, 451-459, 1979

16) Kang, A. H., Seyer, J. M., Postlethwaite, M. S. *et al.* : *J. UOEH*（産業医科大学雑誌），4 (Suppl.), 95-107, 1982

17) Bentz, H. Nicholas, P. M., Lauann, W. M. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 3168-3172, 1983

18) Sage, H., Pam, P. and Paul, B. : *Biochemistry*, 19, 5747-5755, 1980

19) Resse, C. A. and Mayne, R. : *Biochemistry*, 20, 5443-5448, 1981

20) 小林信之，村田克巳，滝沢　始 *et al.*：日胸疾会誌，26(1), 55-62, 1988

21) Butler, C. : *Arch. Pathol.*, 99, 503-507, 1975

22) Crystal, R. G., Kawanami, O., Rennard, S. I. *et al.* : *J. UOEH*（産業医科大学雑誌），4 (Suppl.), 85-94, 1982

23) Hayashi, I., Konomi, H. and Matsubara, O. : *J. UOEH*（産業医科大学雑誌），4 (Suppl.), 109-120, 1982

24) Seyer, J. M., Hutcheson, E. T. and Kang, A. H. : *J. Clin. Invest.*, 15, 1498-1507, 1976

25) Wick, G., Brunner, H., Penner, E. *et al.* : *Int. Arch. Allergy App. Immunol.*, 56, 316-324, 1978

26) Rojkind, M., Giambrone, M. A. and Biempica, L. : *Gastroent.*, 76, 710-719, 1979

27) 岡崎　勲，丸山勝也，奥野府夫 *et al.*：*J. UOEH*（産業医科大学雑誌），5(4), 461-467, 1983

28) 奥野府夫，丸山勝也，岡崎　勲 *et al.*：*J. UOEH*（産業医科大学雑誌），7(3), 291-297, 1985

29) 川上広育，中西敏夫，未盛彰一 *et al.*：肝臓，26(1), 33-40, 1985

30) Nerlich, A. G., Nerlich, M. L., Langer, I. and Demling, R. H. : *Exp. Mol. Pathol.*, 40, 311-319, 1984

31) Low, R. B., Cutroneo, K. R., Davis, G. S. and Giancola, M. S. : *Lab. Invest.*, 48, 755-759, 1983

32) Watanabe, Y., Yamaki, K., Yamakawa, I. *et al.* : *Eur. J. Respir. Dis.*, 67, 10-16, 1985

33) 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，41-117，昭和60年度日本科学技術情報センター編

34) Kivirikko, K. I. : *Int. Rev. Connect. Tissue Res.*, 5, 93-163, 1973

35) Krane, S. M., Kantrowitz, F. G., Byrne, M. *et al.* : *J. Clin. Invest.*, 59, 819-927, 1977

36) Barnes, M. J., Constable, B. J., Morton, L. F. *et al.* : *Biochem. J.*, 139, 461-468, 1974

37) Keiser, H. R., Vogel, C. L. and Sadikali, F. : *J. nat. Cancer Inst.*, 49, 1251-1255, 1972

38) Bolarin, D. M., Savolainen, E. R. and Kivirikko, K. : *Int. J. Cancer*, 29, 401-405, 1982

39) Thompson, W. D. and Trick, R. S. : *Brit. J. Exp. Pathol.*, 59, 288-291, 1978

40) Siegel,R. C., Chen, K. H., Greenspan, J. S. and Aguiar, J. M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 2945-2949, 1978

41) Gadek, J. E., Kelman, J. A., Fells, G. *et al.* : *N. Engl. J. Med.*, 301, 737-742, 1979

42) Okazaki, I., Miura, K., Kobayashi, Y. *et al.* : *Keio J. Med.*, 35, 107-115, 1986

43) Okazaki, I., Maruyama, K., Okuno, F. *et al.* : *J. UOEH*（産業医科大学雑誌），5，461-467, 1983

44) Colombo, M., Annoni, G., Donato, M. F. *et al.* : *Am. J. Clin. Pathol.*, 80, 499-502, 1983

45) Simon, L. S., Krane, S. M., Wortman, P. D. *et al.* : *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 58, 110-120, 1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 187-192, 1988

ディーゼル排ガス暴露による新生児ラットの肺の病理組織学的変化

渡辺伸枝*, 池田真悟*, 大沢誠喜*,
鈴木孝人*, 加納堯子*, 林　豊**

Pulmonary Effects in Newborn Rats Induced by Exposure to Diesel Engine Exhaust

NOBUE WATANABE*, SHINGO IKEDA*, MASANOBU OHSAWA*,
TAKAHITO SUZUKI*, TAKAKO KANO* & YUTAKA HAYASHI**

A pathological study of pulmonary response in infant rats was made by electron microscopy after continuous exposure to diluted diesel engine exhaust for 10 days.

Lung struture of 10 day old rats is immature and inhomogeneous. The septa of suckling rat's lung are rather thick and their arithmetic mean alveolar wall thickness (AMT) was 3.14 μm.

Because of edema, the septa of exposed rats became thicker than those of control rats. The AMT values were 5.70 μm and 5.14 μm, which correspond to the whole exhaust exposure group and the group exposed to exhaust were similar to those caused by exposure to filtered. Structural development was delayed by exposure. Primary septa showed a double capillary network and most of the secondary septa did not differentiate fully.

Keywords: pulmonary effects in newborn rats, exposure to diesel engine exhaust, electron microscopic study

緒　言

軽油を燃料とする，燃費の安いディーゼルエンジンは，トラックやバスはもちろん，最近は乗用車にも用いられている．ディーゼル車の排出ガスには NO_2 や SO_2 とともに粒子状物質が含まれ，この粒子状物質には各種の多環芳香族が吸着されている．その中には変異原性を示すピレン，ベンツピレン，ベンツ・アニトラセン，ニトロピレン，ジニトロピレンなどが含有されていることから，ディーゼル車排出ガスによる肺腫瘍の発生が問題となっている．

このような背景からディーゼル排出ガスによる生体影響を検討した研究の多くは，発癌性に焦点があてられており[1,2]，非腫瘍性の肺の病変の成立，及びその病変の長期にわたる持続が生体に及ぼす影響については知見が少ない．

一方，我々は低濃度の NO_2，O_3 及び SO_2 による単独及び複合暴露実験を行ない，NO_2 の単独暴露によっても暴露期間の延長に伴って，末梢気管支上皮細胞の肥大，肺胞壁間質の浮腫，肥厚などがみられ，またこのような病変は，NO_2 と O_3，あるいは NO_2，O_3 と SO_2 に複合暴露することによって増強され，肺のガス交換能の低下も生じることを報告してきた[3,4]．

本研究は，現実に近い条件に希釈したディーゼル排ガスを用いて暴露実験を行ない，ディーゼル排ガス中の粒子状物質及び NO_2 をはじめ他の有害物質の新生児ラットの肺に及ぼす影響について検討した．

また，従来の病理学的検索に，客観的評価を加える為，Weibel ら[5,6]の方法を用いて，末梢の肺胞壁厚の形態計測を試みた．

本実験は現在なお続行中であり，今回は，暴露10日目

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
**千葉大学医学部肺癌研究施設病理研究部
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

の病理学的所見に関する報告である.

方　法

暴露装置の暴露源としては，ヤンマーディーゼルエンジン（NS 40 C-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）を用いて，その排出ガスを粒子量 6 mg／m^3，NO_2 濃度を 2 ppm に希釈し，動物飼育チャンバー内に導入した．除粒子群については，ヘパフィルター（ATM-3-Q-A 型，日本無機K. K.）を通して粒子成分を除去した．チャンバー内の NO_2 及び粒子濃度の測定には，各々，窒素酸化物測定機（8440型，Monitor Lobs Co)，粉塵濃度計（β 線式質量濃度計 BAM-102型，柴田科学器機K. K.）を用いた．

実験動物は，Fischer 344／Ducrg 系（日本チャールスリバー)，SPF の妊娠ラット（妊娠14日目）を，全排ガス暴露群・除粒子暴露群・対照群の3群（各群4匹）に分け，チャンバー内で1日6時間の暴露を行いながら飼育し，出産させた．親子同居のまま，同条件で暴露を続行し，生後10日目に各群から3匹の新生児雄ラットをとりだした．

病理学的検索のため，ネンブタール腹腔内注射による深麻酔下で開胸し，気管から20cm 水柱圧で2.5％永冷グルタルアルデヒド固定液を注入し，再拡張固定を行った．電顕用試料は，左肺中央部から水平断切片を採取し，常法に従って1％オスミウム酸後固定し，Epon 包埋，薄切，錯酸鉛・ウラニル重染色を施して観察した（日立H-7000).

形態計測を行う為に，1 μの厚切り切片によって気管支を含む試料を除き，1群3匹の各個体から各々3ブロックを薄切し，メッシュ角を基準にして視野重複をさけ，一定倍率（2000倍）で，1メッシュ当り10枚撮影した．こうして得られる各群90枚の電顕フィルムと，等倍率のプリント写真を用いて，Weibel らの方法に従い，point 法で肺胞壁厚を算出した．

結　果

I．対照群

対照群の，生後10日目の肺では，部位によって発育の段階が様々で，stractural inhomogeneity のみられることが特徴であった．

まず第1に，成熟したラットの肺に比べ，厚い肺胞壁を有する部分が多くみられた．Weibel らの方法に従い，形態計測を行った結果，対照群の生後10日目の平均肺胞壁厚は，3.14±0.18（μm±S. D.）であった（Table 1）．壁厚を増している原因として，淡明な核を有し，細胞質中に脂肪滴を豊富に含む大型の線維芽細胞が，随所に存在するためと考えられた（Fig. 1）．

Table 1. Arithmetic mean alveolar wall thickness

Exposure	Values are means ± S. D.
control	3.14±0.18
whole exhaust	5.70±0.50**
filtered exhaust	5.14±0.63**

** $P<0.01$

次に，一次中隔の毛細血管の形態にも，様々な発育の過程がみられた．Fig. 1 に，より未成熟な段階である double capillary network を形成している部分を示した．Double capillary のところでは，内皮細胞の細胞質が細長くなって，両側の毛細血管を分離している場合もみられた．また，成熟したラットと同様に，毛細血管が肺の結合組織の左右どちらかに認められる，すなわち，single capillary system になっている部分がみられた．この場合には，脂肪滴を有する線維芽細胞は数少く，肺胞壁の厚さも目立たなくなっていた（Fig. 2）．

また，生後10日目の肺では，二次中隔がすでに形成されており，出生時からすでに存在している肺胞嚢の二次分裂によって肺胞数が増し，肺胞と毛細血管の表面積の急速な増大をもたらす時期であることが観察された．この二次中隔の構造にも，様々な発育の過程の形態がみられた．Fig. 3 に，発育のあまり進んでいない場合を示した．後に二次中隔となる小さな隆起が形成されており，この隆起には，毛細血管のループ，エラスチンの束，unidenticall な細胞がみられる．また，Fig. 4 に示したように，より発育の進んだ場合では，隆起の高さが増し，両側の毛細血管は狭くなり，unidentical な細胞の細胞質が伸展して毛細血管を包みこんでおり，エラスチンの束が，隆起の先端にみられた．

肺胞上皮のII型細胞は，成熟ラットの場合に比べ，形が偏平で，遊離縁の小絨毛と細胞質内の層状封入体の数が少なかった（Fig. 4）．I型細胞は，核が偏平で，細胞質が豊富であった（Fig. 3）．また，I型細胞・II型細胞ともに，成熟ラットの場合より見出される頻度が高かった．

II．ディーゼル排ガス暴露群

全排ガス暴露群及び除塵群の生後10日目のラットの肺は，両暴露群とも同様の変化がみられ，対照群に比べ，さらに厚さの増した肺胞壁が観察された．形態形測を行った結果，平均肺胞壁厚は，全排ガス暴露群では，

5.70±0.50（μm±S. D.），除塵群では，5.14±0.63（μm±S. D.）であった（Table 1）.

両暴露群で肺胞壁の厚さを増している原因として，対照群にも認められた脂肪滴を有する大きな線維芽細胞が多数存在すること，また，これらの細胞間隙がひろくなっていること，すなわち肺胞壁間質の水腫によることなどがあげられる．また，対照群では，厚い肺胞壁は主に毛細管の左右どちらか一方の結合織の部分にみられたが，暴露群では，毛細血管の周囲全体の結合織が厚くなっている場合が多くみられた（Fig. 5）．対照群でも，発育の程度は，同一個体の肺においても一様でなく，肺胞壁の厚さも不均一であったが，暴露群ではこの傾向がさらに著しく，Fig. 5のように，多数の線維芽細胞と，間質の水腫によって肺胞壁がきわめて厚い部分と，Fig. 7に示したように，比較的薄い部分がみられた.

暴露群の一次中隔にある毛細血管は，多くの場合，double capillary の構造であり，対照群にみられたような single capillary の場合は少く，発育が遅れている形態であった（Fig. 6）.

二次中隔は暴露群においてもすでに形成されはじめていたが，後に二次中隔となる部分が，一次中隔からやや隆起している状態のものが多くみられ，対照群に比べ発育が遅れていることが観察された（Fig. 7，8）.

Ⅱ型細胞は対照群と同様で，成熟ラットのものに比べ扁平で，小絨毛と層状封入体が少なかった（Fig. 8）．Ⅰ型細胞も，対照群と同様であり損傷などはみられなかった．また，Ⅰ型・Ⅱ型細胞とも，対照群と同様に成熟ラットの場合に比べ，見出される頻度が高かった.

考　　察

新生児から希釈ディーゼル排ガスを暴露する実験を行い，ラットの肺の病理学的変化について検討した.

生後10日目の対照群の肺では，成熟したラットに比べ，肺胞壁が厚く，同一個体でも肺の部位によって発育の程度が異なり，いわゆる structural inhomogeneity がみられることが特徴であった.

Burri[7] は，ラットの生後の肺の発達を形態学的に観察し，ラットは未成熟な肺の構造のまま出生し，出生時は肺胞と呼ばれるものを持たず，air channels と saccules で呼吸をしており，生後4－13日の間に，一次中隔から再分裂してくる二次中隔によって肺胞が形成されること，また，この時期には structual inhomogeneity がみられることを報告している．我々の得た生後10日目の肺の形態も同様の結果であると考えられた.

また，形態計測を行った結果，生後10日目の対照群の平均肺胞壁厚は，3.14 μm であり，Burri[8] らの報告の3.17 μm と同様であった．生後10日目の肺胞壁厚は，肺の部位によって不均一であるが，一群3匹の一定部位より各3ブロック，各10枚の写真をとり，計測した本実験の方法は，変動係数も低く，統計的に満足できるものであった.

全排ガス暴露群及び除塵群では，肺胞壁間質に著しい水腫がみられ，壁の厚さを増していた．また，一次中隔の毛細血管の様相，二次中隔の形成状態から，対照群の同一時期の肺に比べ，発育の遅延が生じていることが示唆された.

さらに暴露群の生後10日目の平均肺胞壁厚は，全排ガス群では5.70 μm，除塵群では5.14 μm であった．Burri[8] らは，正常ラットの生後1，4，7，10日目の壁厚を測定し，各々，3.45 μm，3.82 μm，3.69 μm，3.17 μm であったことを報告している．我々の得た暴露群の壁厚は，いづれの値より明らかに厚く，このことからも，暴露群の壁厚を増している原因は，発育の遅ればかりでなく水腫を伴っていることが考えられた.

成熟ラット（6週令）を1週間，本研究と同一の条件で暴露したところ，全排ガス群では肺胞上皮に，除塵群では肺胞壁間質に変化がみられ（未発表），全排ガス暴露と除塵暴露とでは影響が異なることが推定されたが，本研究では，全排ガス群・除塵群とも同様の変化が認められ，幼若ラットに及ぼすディーゼル排ガスの影響は，主に排ガス中のガス状成分の作用によるものと思われた.

加藤ら[9]は，ディーゼル排ガスを（粒子濃度4 mg／m^3），5週令のラットに6－30ヶ月間暴露し，全排ガス群では，Ⅱ型上皮と間質成分の増加が，除塵群では，気道上皮の変化のみみられたことから，ガス状成分による肺組織の変化は従来の NO_2 単独暴露の場合より弱いことを報告している．ディーゼル排ガスに限らず，大気汚染物質を新生児から暴露した報告はほとんどなく，新生児ラットを野外暴露した場合，成熟ラットより過酸化脂質の増加が短期間で現われる[10]との知見があるのみで，組織学的変化に関する詳細な研究はなされていない．一方，新生児動物では，成熟動物に比べ，血漿と肺の間質液との蛋白滲透圧の差が小さく，肺の微少循環の圧が高まると容易に水腫を生じることが知られている．幼若ラットは，排ガスに対する感受性の高いことが推定された.

排ガスの肺に及ぼす影響として，Ⅰ型細胞の損傷及びその修復機転としてのⅡ型細胞の増加が知られているが，本研究では明らかではなかった．Kauffman[11] らによっ

て，Ⅰ型細胞の数は生後21日目まで一定のスピードで増加し，Ⅱ型細胞の数は生後7日まで一定で，その後急速に増加して13日目にピークに達し，次第に減少していくと報告されている．生後10日目は，Ⅱ型細胞がⅠ型細胞に分化すると同時に，Ⅱ型細胞自体も幹細胞から急速に分化し増加していく時期あることから，暴露による影響は見出だし難いものと考えられた．

幼若ラットと成熟ラットでは，排ガス暴露による影響が異なると考えられる．肺の発育の遅延は何時まで続くのか，新生児期から暴露された場合には成熟した時期に到っても，成熟期のみに暴露された場合と比べ，影響が強くみられるのか，全排ガスと除塵暴露の場合で違いがみられるようになるのか，本研究と同系列の長期実験の結果をまって検討すべき課題と考えている．

文　献

1）岩井和郎，宇田川忠，山岸正晴，山田博之：大気汚染学会誌，21，38，1986

2）吉村博之，柏木令子，竹本和夫：第23回大気汚染学会講演要旨集，627，1983

3）寺田伸枝，池田真悟，福田雅夫，大沢誠喜，鈴木孝人，溝口　勲，林　豊：東京都衛研年報，37，293，1985

4）Terada, N., Mizoguchi, I., Kohno, T. and Hayashi, Y.：*J. Japan Soc. Air Pollut.*, 21, 512, 1986

5）Weibel, E. R., Kistler, G. S. and Scherle, W. F.：*J. Cell Biol.*, 30, 23, 1966

6）Weibel, E. R.：Stereological Techniques for Electron Microscopic Morphometry, In Principles and Techniques of Electron Microscopy, Hayat, M. A. (ed.), 237-291, 1973, Von Nostrand Reinhold Co., New York

7）Burri, P. H.：*Anat. Rec.*, 180, 77, 1974

8）Burri, P. H., Dbaly, J. and Weibel, E. R.：*Anat. Rec.*, 178, 711, 1973

9）加藤温中，桑原紀之，京野洋子：第28回大気汚染学会講演要旨集，426，1982

10）池見好昭，大森　蕉，伊藤隆明：第28回大気汚染学会講演要旨集，432，1982

11）Kauffman, S. L., Burri, P. H. and Weibel, E. R.：*Anat. Rec.*, 180, 63, 1974

Legands

Fig. 1. The lung of 10 day old rat (control group). The septa of infant lung are rather thick. The interstitial layer is rich in fibroblasts (F) whose cytoplasm contains a large amount of lipid droplets (Li). C; capillary lumen

Fig. 2. Single capillary system (control group); a small connective tissue sheet alternately lies on the left or on the right of the capillary. C; capillary lumen

Fig. 3. Secondary septa from a control rat. Small ridge forming on the primary septum (indicated by an arrow). E; the small bundle of elastic fibers, C; capillary lumen, Ep 1; type 1 alveolar epithelial cell, Ep 2; type 2 alveolar epithelial cell

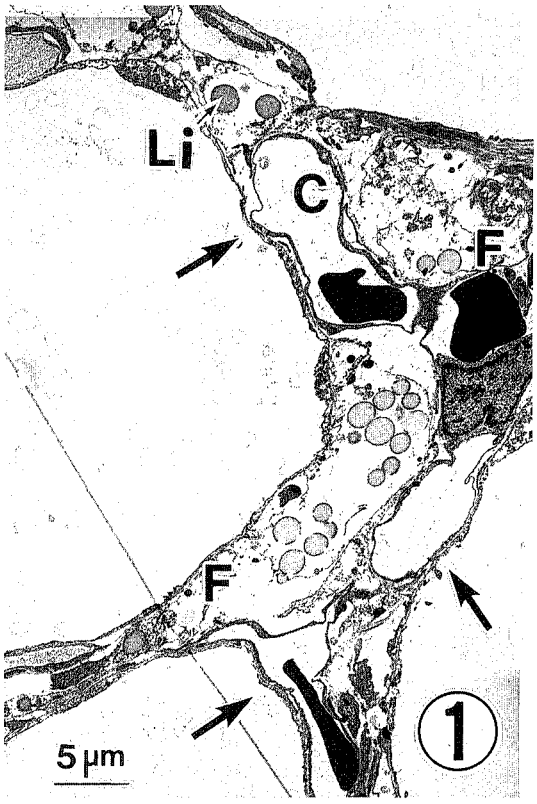
Fig. 4. Tissue from a control rat. Latter stage of secondary formation (indicated by an arrw). E; the small bundle of elastic fibers, C; capillary lumen, Ep 2; type 2 alveolar epithelial cell

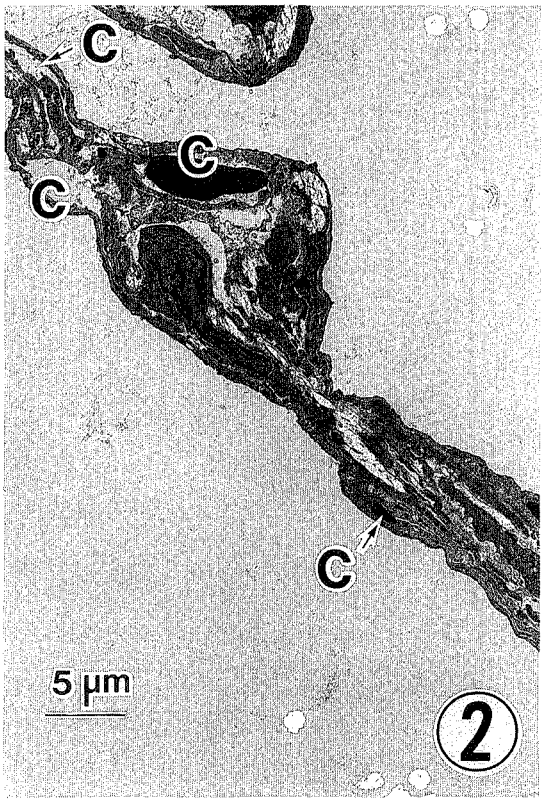
Fig. 5. After 10-day exposure to diesel engine exhaust. Thickened alveolar walls with edematous interstitial connective tissue and many fibroblasts containing lipid droplets. F; fibroblast, C; capillary lumen

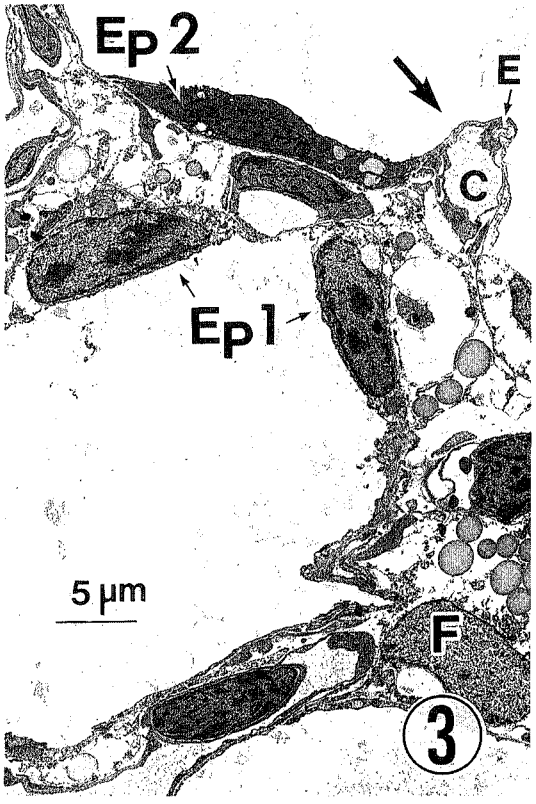
Fig. 6. After 10-day exposure to filtered exhaust. Double capillary network; capillary lumina are merely separated by parts of endothelial cells. En; endothelial cell, C; capillary lumen

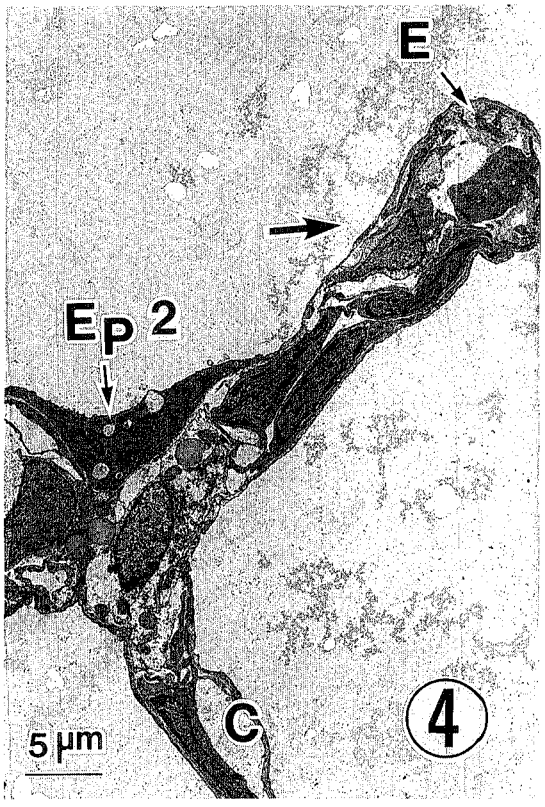
Fig. 7. After 10-day exposure to diesel engine exhaust. Small ridge forming on the primary septum (indicated by an arrow).

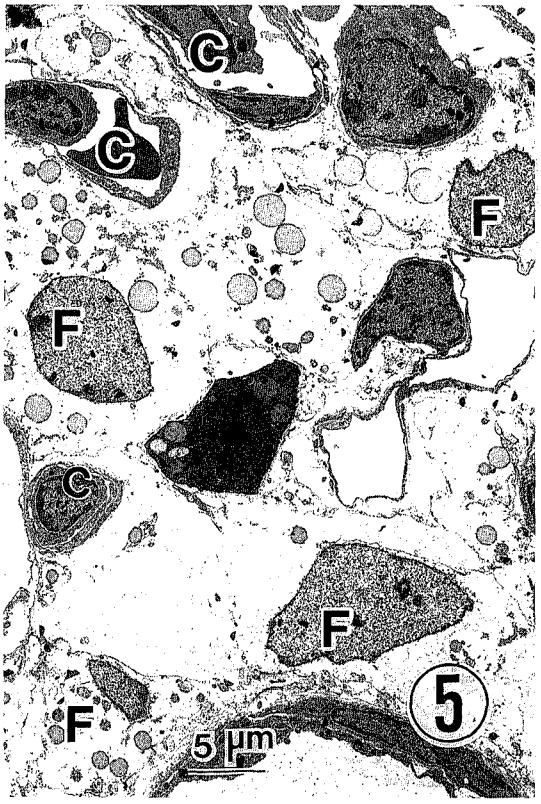
Fig. 8. After 10-day exposure to diesel engine exhaust. Latter stage of secondary septum formation (indicated by anarrow). Ep 2; type 2 alveolar epithelial cell, C; capillary lumen

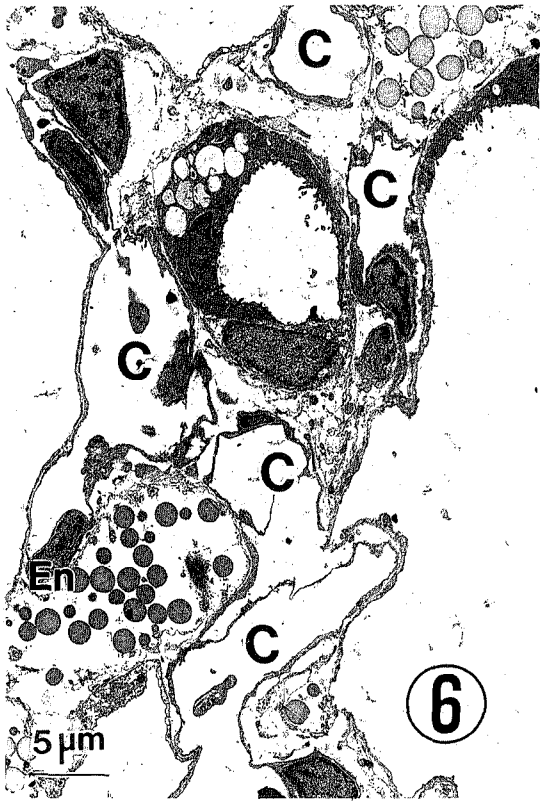

Li
C
F
F
5 µm
1

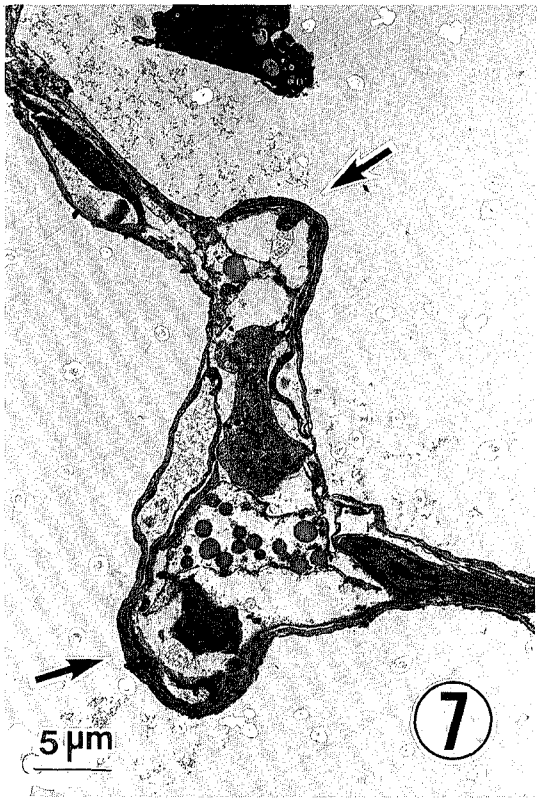

C
C
C
C
5 µm
2

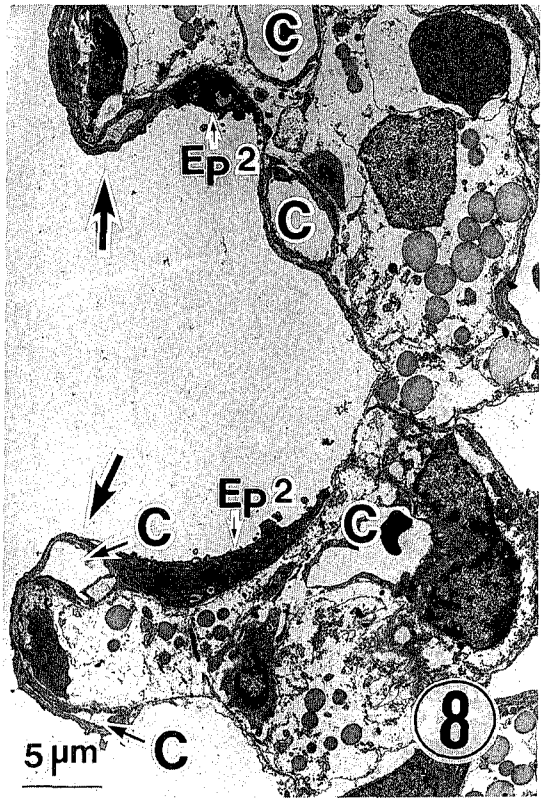

Ep 2
E
C
Ep1
5 µm
F
3


E
Ep 2
C
5 µm
4


C
C
F
F
C
F
F
5 µm
5


C
C
C
C
En
C
5 µm
6


5 µm
7


C
Ep 2
C
Ep 2
C
C
5 µm
C
8

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 193-197, 1988

ディーゼル排気ガスに暴露されたラット肺に残留する多環芳香族炭化水素

大久保 智 子*, 瀬 戸 博*, 大 沢 誠 喜*
鈴 木 孝 人*, 加 納 堯 子*

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Retained in Rat Lung Exposed to Diesel Engine Exhaust

TOMOKO OHKUBO*, HIROSHI SETO*, MASANOBU OHSAWA*
TAKAHITO SUZUKI* and TAKAKO KANOH*

The residual PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in the lungs of rats exposed (2 months) to diesel engine exhaust were determined by HPLC (high performance liquid chromatography) and spectrophotofluorometry. Significant amounts of pyrene, benzo (*e*) pyrene, benzo (*k*) fluoranthene, benzo (*a*) pyrene and benzo (*g, h, i*) perylene were detected in the rat lungs. Inhaled PAHs may be retained in the lungs for a greater period of time when these compounds are associated with diesel engine exhaust particles. Determination of the amounts of PAHs in the lungs is useful for assessment of exposure to these particle-associated compounds.

Keywords: diesel engine exhaust, polycyclic aromatic hydrocarbon, benzo (*a*) pyrene, lung cancer, particle

緒　言

最近，わが国において肺癌死亡率が上昇している[1]が，その要因の一つに，大気汚染が考えられている[2,3]．

当研究科では，大気汚染保健対策事業の一環として，希釈ディーゼル排気ガスの暴露実験，および，道路沿道付近の健康影響調査に関する環境調査などを行い，大気中の発癌要因について検討を続けている．

大気汚染物質である多環芳香族炭化水素（polycyclic aromatic hydrocarbon 以下 PAH）は，有機物が燃焼することによって容易に生成する．特に，benzo (*a*) pyrene は，動物実験において肺癌を引き起こすことが確認され[4-7]，人間にも癌を引き起こす可能性がある．大気中の発癌性 PAH が，どの程度，肺を通して暴露されているかを把握することは重要である．しかし，環境調査の結果から，集団としての暴露量を推察するにとどまっているのが現状である．そこで，大気汚染物質の発生源の一つとなっているディーゼル排気ガスをラットに暴露して，PAH の肺における残留性を検討した．その結果，強い発癌性のある benzo (*a*) pyrene を初め，benzo (*k*) fluoranthene, benzo (*g, h, i*) perylene, pyrene, benzo (*e*) pyrene が検出された．しかも，長時間肺中に留まる可能性もあることから，これらの量を測定することによって，暴露量を推定できるのではないかと考え，ここに報告する．

実験の部

1．試料

(1) 動物の暴露

動物は，8週令の雄の F344／DuCrj ラット（日本チャールスリバー社）5匹を用いて，温度23～25℃，湿度45～65%，換気回数15回／時にコントロールしたチャンバー（1.6m^3，夏目製作所製）内で，ディーゼル排気ガスを暴露した．ディーゼル排気ガスは，高濃度（Particle 8.316±0.875mg／m^3, NO_2 1.70±0.40ppm）で，2か月間（7時間／日，5日／週）暴露を行った．排気ガスの Particle size は，暴露される Particle の90%以上が0.5 μm 以下である．飼料は固形飼料（オリエン

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　169　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, 169 Japan

タル酵母 NMF）を，飲料水は水道水を自由摂食させた．なお，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（JIS2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，粉塵の粉径分布の計測は，アンダーセン型ロープレッシャー・インパクター（LP-20型，東京ダイレック KK）を用いて行った．

(2) 試料の採取

暴露されたラットは，暴露停止後16時間放置した後，ソムノペンチル腹腔内注射による深麻酔下で，放血後，全肺を採取，精秤し，直ちに分析まで冷凍保存した．

2．試薬

PAH 標準溶液－anthracene：ガスクロ工業㈱，pyrene：ガスクロ工業㈱，benz（*a*）anthracene：東京化成工業㈱，benzo（*e*）pyrene：ガスクロ工業㈱，benzo（*k*）fluoranthene：Rk Chemical Co., benzo（*a*）pyrene：和光純薬工業㈱，benzo（*g, h, i*）perylene：Aldrich, dibenz（*a, h*）anthracene：東京化成工業㈱の各50mg を 100m*l* の n-ヘキサンに溶解させ，0.5mg／m*l* の各標準原液を調整した後，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（HPLC）：日本分光工業，ポンプ880-PU，カラムオーブン860-PC，蛍光検出器：日立製作所 F-1000，レコーダー：日立製作所056-3001，データー処理：島津製作所クロマトパックC-R6A，分光蛍光光度計：島津製作所 RF-500

4．分析法

肺蔵中の PAHs の分析は，尾花らの方法[8]に準じた．遮光するため，褐色のガラス器具を使用した．

ラット肺は5匹まとめて処理し，最終溶液を 1 m*l* または100 μ*l* とした．

分析条件－カラム：Inertsil ODS-2. 4.6mm id×25cm，移動相：75％アセトニトリル／水，流速：1.3m*l*／min，温度：40℃，注入量：50 μ*l*, Sens.：0.2, Time Const.：1，レコーダー Range：1 mV

カラム：Unisil C18. 8.0mm id×25cm，流速：2.0m*l*／min，以下同様（分取および dibenz（a, h）anthracene 分析用）

蛍光スペクトル測定

PAH 標準溶液（各 5 μg），およびディーゼル排気ガスを高濃度に暴露したラットの肺の試験溶液（以下ラット試験溶液）を，HPLC を用いて各 PAH 画分に分け，75％アセトニトリル／水を対照として，分光蛍光光度計で蛍光スペクトルを測定した．

条件－分光蛍光光度計 Scan speed：50nm／min, Gain：1 mV, ATTENUATION：8，レコーダー Chart speed：40mm／min, Range：1 mV

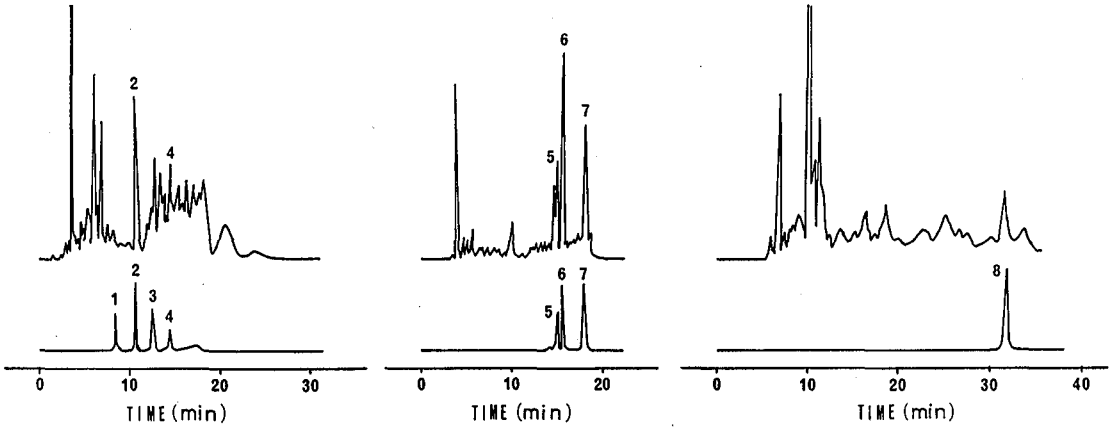


Fig. 1. HPLC chromatograms of PAHs from rat lungs and eight PAH standards
left：Ex 324nm, Em 384nm, center：Ex 365nm, Em 430nm, right：Ex 300nm, Em 393nm
Peaks：1. anthracene, 2. pyrene, 3. benz（*a*）anthracene, 4. benzo（*e*）pyrene, 5. benzo（*k*）fluoranthene, 6. benzo（*a*）pyrene, 7. benzo（*g, h. i*）perylene, 8. dibenz（*a, h*）anthracene
Upper：rat lung, Lower：PAH standards

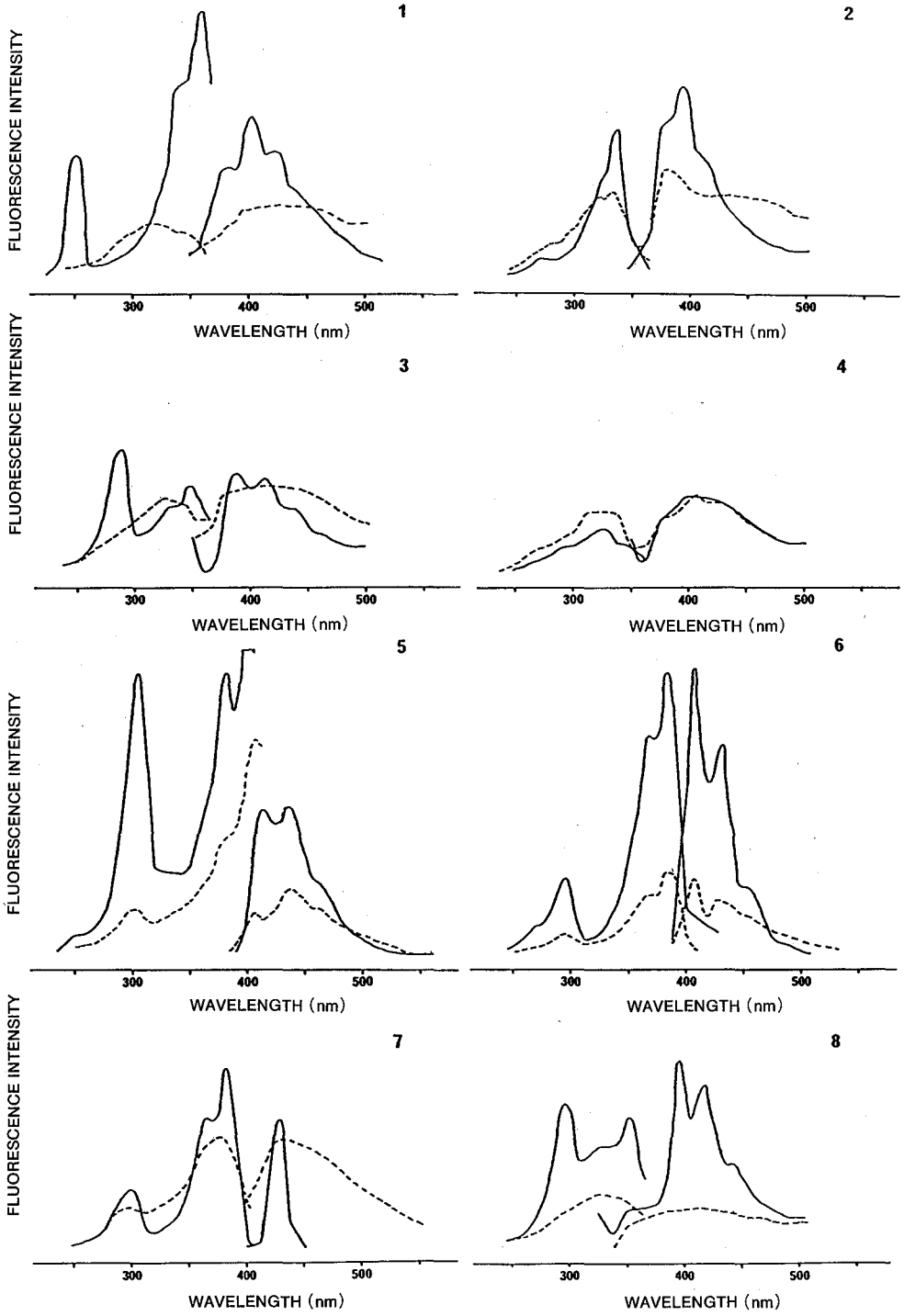


Fig. 2. Fluorescence spectra of PAH fractions isolated by HPLC
———standard,- - - - rat sample
1 anthracene, 2 pyrene, 3 benz (*a*) anthracene, 4 benzo (*e*) pyrene, 5 benzo (*k*) fluoranthene, 6 benzo (*a*) pyrene, 7 benzo (*g, h. i*) perylene, 8 dibenz (*a, h*) anthracene

anthracene, pyrene, benz（*a*）anthracene, benzo（*e*）pyrene の分析：励起（Ex）波長を334nm に固定し，蛍光（Em）波長を500～350nm まで掃引した．Em を384nm に固定し，Ex を370～230nm まで掃引した．

以下同様に

benzo（*k*）fluoranthene, benzo（*a*）pyrene, benzo(*g*, *h*, *i*）perylene：Ex を365nm にし，Em を600～400nm まで掃引した．Em を430nm にし，Ex を420～250nm まで掃引した．

dibenz（*a*, *h*）anthracene：Ex を300nm にし，Em を500～330nm まで掃引した．Em を393nm にし，Ex を370～250nm まで掃引した．

結　果

PAH 標準溶液およびラット試験溶液の HPLC クロマトグラムを示す（Fig. 1）．anthracene, pyrene, benz(*a*）anthracene, benzo（*e*）pyrene の混合標準溶液，benzo（*k*）fluoranthene, benzo（*a*）pyrene, benzo（*g*, *h*, *i*）perylene の混合標準溶液，および dibenz（*a*, *h*）anthracene の標準溶液を，それぞれの条件で分析したところ，うまく分離する結果が得られた．そこで，ラット試験溶液の中に PAH が存在するかどうか確認するため，HPLC により，PAH 画分に分け，その蛍光スペクトルを測定した．その結果は，Fig. 2 に示した．

1．**anthracene**：　標準品の蛍光強度の極大波長は，励起スペクトル（Ex）で250, 357nm，蛍光スペクトル（Em）で382, 400, 422nm にある．また，340, 440nm 付近に肩が認められる．ところが，ラット試験溶液の anthracene 画分では，このような特徴のある蛍光極大はない（Fig. 2 - 1）．したがって，今回の実験では，anthracene の存在を確認することはできなかった．

2．**pyrene**：　標準品の極大波長は，Ex335nm, Em381nm にある．また，280, 320, 380, 407nm 付近に肩が認められる．ラット試験溶液の pyrene 画分では，Ex320, 332nm, Em378nm に極大波長があり，280nm 付近に肩が認められる（Fig. 2 - 2）．ピークの保持時間も一致していることから，本画分中に pyrene は存在すると考えられる．

3．**benz（*a*）anthracene**：　標準品の極大波長は，Ex288, 347nm, Em387, 411nm にある．また，333, 433, 458nm 付近に肩が認められる．ところが，ラット試験溶液の benz(*a*）anthracene 画分では，このような特徴のある蛍光極大はない（Fig. 2 - 3）．したがって，今回の実験では，benz（*a*）anthracene の存在を確認することはできなかった．

4．**benzo（*e*）pyrene**：　標準品の極大波長は，Ex325nm, Em400nm にある．また，295, 340nm 付近に肩が認められる．ラット試験溶液の benzo（*e*）pyrene 画分では，Ex407nm に極大波長があり，325, 380, 420nm 付近に肩が認められる（Fig. 2 - 4）．ピークの保持時間も一致していることから，本画分中に benzo（*e*）pyrene は存在すると考えられる．

5．**benzo（*k*）fluoranthene**：　標準品の極大波長は，Ex303, 380nm, Em415, 435nm にある．また，255, 458nm 付近に肩が認められる．ラット試験溶液の benzo（*k*）fluoranthene 画分では，Ex302nm, Em406, 435nm に極大波長があり，380, 458nm 付近に肩が認められる（Fig. 2 - 5）．ピークの保持時間も一致していることから，本画分中に benzo（*k*）fluoranthene は存在すると考えられる．

6．**benzo（*a*）pyrene**：　標準品の極大波長は，Ex295, 366, 381nm, Em406, 430nm にある．また，272, 450nm 付近に肩が認められる．ラット試験溶液の benzo（*a*）pyrene 画分では，Ex295, 383nm, Em406, 430nm に極大波長があり，370, 450nm 付近に肩が認められる（Fig. 2 - 6）．ピークの保持時間も一致していることから，本画分中に benzo（*a*）pyrene は存在すると考えられる．

7．**benzo（*g, h, i*）perylene**：　標準品の極大波長は，Ex300, 364nm, Em429nm にある．また，272, 450nm 付近に肩が認められる．ラット試験溶液の benzo（*g*, *h*, *i*）perylene 画分では，Ex300, 377nm, Em433nm に極大波長がある（Fig. 2 - 7）．ピークの保持時間も一致していることから，本画分中に benzo（*g*, *h*, *i*）perylene は存在すると考えられる．

8．**dibenz（*a, h*）anthracene**：　標準品の極大波長は，Ex297, 352nm, Em352, 396, 418, 442nm にある．また，330, 365nm 付近に肩が認められる．ところが，ラット試験溶液の dibenz（*a*, *h*）anthracene 画分では，このような特徴のある蛍光極大はない（Fig. 2 - 8）．したがって，今回の実験では，dibenz（*a*, *h*）anthracene の存在を確認することはできなかった．

以上の結果から，ディーゼル排気ガスを高濃度に暴露したラットの肺中には，pyrene, benzo（*e*）pyrene, benzo（*k*）fluoranthene, benzo（*a*）pyrene, benzo（*g*, *h*, *i*）perylene が存在することがわかった．そこで，各 HPLC クロマトグラムより，これらを定量したところ，順に1.21, 0.28, 0.57, 0.68, 1.28ng／g wet であった．

考　　察

ディーゼル粒子に吸着されたbenzo（a）pyreneを，ラットに30分暴露した場合，benzo（a）pyreneが肺から半分排除されるのに，約18日かかるのに対し，純粋なbenzo（a）pyreneを30分暴露した場合，2時間以内に99％以上が排除される[9]．benzo（a）pyreneのみの場合は，直接血中に放出され速やかに肺から排除されるが，粒子は，気管の線毛によって粘液とともに排除されるため時間がかかる．したがって，粉塵粒子に吸着しているbenzo（a）pyreneの排除にも時間を要する[10]のだと考えられる．しかも，炭粉（6 mg／m^3）をラットに暴露した場合，肺における炭粉の半減期は，1週間暴露で57日，3週間で96日，5週間で140日であり，暴露期間を長くすると，炭粉の肺における半減期は長くなる[11]．これは，一旦肺胞中に入った炭粉は，非常に排除されにくいためである．以上のような機構により，ディーゼル排気ガスのような，微粒子に吸着して，暴露されたPAHは，長く肺に残留する．したがって，肺中のPAH量を測定することによって，暴露量を逆に推定することができるであろう．

一方，ディーゼル排気ガス暴露により，肺に粒子が沈着するが，組織学的には，終末細気管支周囲の肺実質マクロファージ内に多数の粒子が存在する．そして，非腫瘍性肺病変である線維化巣と上皮過形成が，粒子沈着の多い終末細気管支周囲肺中心に見られる[12]．また，炭粉だけを肺に投与すると，増殖性病変，腫瘍発生は認められず，線維増殖などの間質性反応は極めて弱い．ところが，benzo（a）pyreneのみの投与でも，肺腫瘍を示すが，benzo（a）pyreneに炭粉を添加して投与した場合には，肺腫瘍の発生率が上昇し，しかも炭粉沈着部位に病変が見られることが多かった．これは，炭粉単独の発癌性はなく，その存在が，benzo（a）pyreneの局所発癌性を助長していることを示唆している[6]．PAHは粒子に吸着することによって，肺中に長くとどまり暴露し続けるため，発癌率に大きな影響を与えているのだろう．

以上のことから，肺癌の要因を調べる上で，肺に残留するPAH量に加え，炭粉量を測定することもまた重要であると考えられる．

文　　献

1）厚生省編：国民衛生の動向，53-55，1986

2）Carnow, B. W.：*Arch. Environ. Health*, 27, 207-218, 1973

3）Menck, H. R., Casacrande, J. T. and Henderson, B. E.：*Science*,183, 210-212, 1974

4）Mitchell, C. E.：*Toxicology Letters*,11, 35-42, 1982

5）Grimmer, G., Brune, H., Deutsch-Wenzel, R., Dettbarn, G., Jacob, J, Naujack, K. W., Mohr, U. and Ernst, H.：*Cancer Letters*,37, 173-180, 1987

6）竹本和夫：大気汚染学会誌，10(6)，763-769，1976

7）Yamamoto, A., Inamasu, T., Hisanaga, A., Kitamori, S. and Ishinishi, N.：*J. Japan Soc. Air Pollut*, 22(1), 29-35, 1987

8）尾花裕孝，堀伸二郎，田中涼一，樫本　隆：食衛誌，25，35-40，1984

9）Sun, J. D., Wolff, R. K., Kanapilly, G. M. and Mc Clellan, R. O.：*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 73, 48-59, 1984

10）Sun, J. D., Wolff, R. K. and Kanapilly, G. M.,：*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 65, 231-244, 1982

11）Lee, P. S., Gorski, R. A., Hering, W. E. and Chan, T. L.：*Environ. Res.*, 43, 364-373, 1987

12）河端美則，宇田川忠，樋口一枝，山田博之，橋本尚子，岩井和郎：大気汚染学会誌，23(1)，32-40，1988

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 198-204, 1988

ATS-DLD 質問票による呼吸器症状および関連要因の情報について

牧 野 国 義*

Information from ATS-DLD Questionnaire on Symptoms of Respiratory Diseases and Related Factors

KUNIYOSHI MAKINO*

Change of prevalence of chronic respiratory symptoms in time, effects of subjects and areas in the survey on statistical analyses and effects of factors related to chronic respiratory diseases on respiratory symptoms were studied using the information obtained from two surveys with the ATS-DLD questionnaire.

The change of prevalence for children between 1983 and 1986 were rarely recognizable in Ohme City, Tokyo. On the other hand, differences of the prevalences between Ohme City and Nakano Ward or Chuo Ward, Tokyo were not also statistically significant. The result of hypothesis testing in a small number of districts may be varied distinctly by incredsing the number of subjects to some extent when it is a small number. According to a report of the Environmental Agency on a nation-wide survey on fifty-one districts, chronic respiratory symptoms for schoolgirls and for adult women were closely associated with the SO_2 level. The study districts included ten, eight and seven districts in the Metropolitan area and Chubu and Kansai areas respectively. As the result on the residuals, i. e., the difference of the observed and the estimated values calculated from the regression equations, were examined in the three areas, partial distributions of the positive or negative residuals were found in all the areas.

As for children, the history of past diseases on asthmatic bronchitis, asthma, urtecaria, allergic coryza or bronchitis seemed to be a confounding factor which influenced clearly the prevalences of acute respiratory symptoms. It is likely that environmental factors such as number of persons per room, non-exhaust type heating and the air-tightness of window frames in the living room were also contained in this confounding factor in a way but not areas and sex.

Keywords : ATS-DLD questionnaire, chronic respiratory disease, COPD, prevalence, risk factor, confounding factor

はじめに

大気汚染による健康影響，特に慢性呼吸器疾患を疫学的に調査する際に使用される質問票には，その質問票が標準化されていること，診断基準に即した呼吸器症状の質問やその危険因子および交絡因子（以下関連要因と呼ぶ）に関する質問が掲載されていることが必要である．1960年に英国で考案され，同国の Medical Research Council が公認した標準質問票（BMRC 質問票と呼ばれる）は，この条件を充たす質問票として，以後世界中で広く使用されるようになった．しかし，各国の慢性呼吸器疾患発症に寄与する要因は様々であり，また，調査上の諸事情により，BMRC 変法あるいは準拠の形式で使用されることが多い．10数年の経験の後，米国胸部学会肺疾患分科会（American Thoracic Society, Division of Lung Disease）は1978年に疫学標準化プロジェクトにおいて新しい標準質問票（ATS-DLD 質問票と呼ばれる）

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　169　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, 169 Japan

を公表した[1]．両質問票の相違の一つは，ATS-DLD 質問票では面接方式の調査だけでなく，自己記入方式の調査も可としている点で，同プロジェクトはこの方式でも面接方式と充分一致性が得られると認識している．McNabら[2]，Lebowitzら[3]，Mittmanら[4]はこの方式を容認する報告を発表しており，わが国でも，春日ら[5]，安達ら[6]が両方式の調査は高い一致性を有すると報告している．自己記入方式では面接者が不要であるから，経済的で大量調査が可能との利点があり，わが国では ATS-DLD 質問票の日本語版[7]が発表されて以来，この質問票が一般的となった．この10年間で ATS-DLD 質問票を使用した調査は数多くなされていると思われるが，質問票の情報自体については，安達ら[8]，Dalesら[9]の報告があるが，多くは報告されていないようである．そこで，ここでは今後の ATS-DLD 質問票の利用に関する資料として役立つよう，この質問票調査から得られる呼吸器症状有症率や関連要因の情報などについて検討した．

資料，質問票の項目および解析方法

1．資料

ATS-DLD 質問票の項目についての情報を吟味するためにこの質問票を用いた調査結果を資料として利用した．主資料は，東京都衛生局の大気汚染保健対策事業の一部として別の目的の参考資料を得るために行われた2回の調査結果である．1回目は昭和58年に東京都中野区と青梅市で同年齢の男女児童391名を対象に行った調査であり，2回目は昭和61年に同中央区と青梅市で同様の246名について行った調査である．また，調査地域の解析に及ぼす影響を調べるために，環境庁が昭和55年から59年にかけて全国51地点で大気汚染の健康影響を調査した昭和61年3月の報告書[10]を利用した．この調査は男女児童12万余名，成人約20万名の膨大な数を対象とし，数の上では上記の東京都の調査を圧倒している．ただし，東京都の資料は各項目任意のクロス集計が可能な原データであるが，環境庁資料は任意のクロス集計ができない各項目の集計データである．

2．ATS-DLD 質問票の項目

ATS-DLD 質問票は児童用と成人用が用意され，共通の質問項目と，対象の相違によるそれぞれの質問項目とがあるが，質問を大別すれば，①属性に関する項目，②呼吸器症状など疾病に関する項目，③喫煙または職業（児童用では受動喫煙）に関する項目，④住居に関する項目に分類することができる．項目①では，性，年齢，住居地域，居住歴を主に調査し，項目②では，児童と成人との年齢による症状発現の相違を考慮した質問構成であるが，せき，たん（質問票ではゼロゼロとたん，以下略記），ぜん鳴，ぜん息と生まれてからの病気（病気の種類は児童と成人で異なるが，呼吸器症状に影響を及ぼし得る疾患がそれぞれに選択されている）が含まれている．項目③では，呼吸器疾患の環境における危険因子，特に喫煙について，児童用は家族構成，受動喫煙の質問，成人用は本人の喫煙（受動喫煙は含まれない）と職業の質問がある．項目④では，住居の構造，暖房機器，台所の火器，換気扇，部屋数についての質問があり，成人用には住宅の種別（一戸建か集合住宅か）が含まれている．

3．解析方法

(1) 有症率の時間的変動

呼吸器症状の有症率については環境庁報告のように，一般的には多調査地域での大気汚染レベルや有症率の変動に着目して調査がデザインされ，有症率の時間的変動は解析効果が小さいとの判断から軽視されがちである．しかし，もし有症率が偶然変動以外の理由で時間的に変動した場合には，大気汚染の影響の可能性も考え得る（大気汚染による健康影響のサーベイランスはこの有症率や有病率などの変動や大気汚染の寄与を監視する）．ここでは，まずその変動の有無を確認するために，昭和58年と61年の青梅市での男女児童の調査結果を用いて変動を調べた．すなわち，両調査における男女の有症率（持続性せき，持続性たん，持続性せき・たん）を p_1，p_2，調査人数を n_1，n_2 として，有症率に差がない（$p_1=p_2$）との帰無仮説をたてて検定した．この場合の推定有症率 p は，

$$p=(n_1p_1+n_2p_2)/(n_1+n_2)$$

$q=1-p$，　$N=1/n_1+1/n_2$ とおくと，

$$u=(|p_1-p_2|-N/2)/(pqN)^{1/2}$$

で示した統計量 u は，N(0, 1)の標準正規分布に近似し，検定が可能である．また，東京都の2調査はいずれも2地域であるので，この方法で有症率の地域差を検討した．

(2) 調査人数や地域の解析に及ぼす影響

ATS-DLD 質問票を用いた調査は，その結果を統計処理して解析を行うことを前提にしているので，調査人数，調査地点数が解析結果に及ぼす影響は小さくない．そこで，試みとして，(1)の解析について，有症率が一定で調査人数のみを変えた場合の上記の u 値の変動を調べた．つまり，調査人数を2地域それぞれ k 倍したときの u 値を，k を変えて計算した．したがって，u 値は，

$$u=(|p_1-p_2|-N/2k)/(pqN/k)^{1/2}$$

となる．次に，環境庁の報告書の全国51地点には首都圏（埼玉，千葉，東京，神奈川）が10地点，中部圏（静岡，

愛知，岐阜）が8地点，関西圏（滋賀，大阪，兵庫）が7地点含まれており，大気汚染レベルも一応の範囲のあることから，もし全国規模の調査でなければ，各圏毎にこの調査が行われたと仮定できる．報告書では女児の持続性せきと成人女性の持続性せき・たんの有症率がSO_2と危険率0.1%以下の高い相関（それぞれ0.469，0.538）が認められた．各圏毎のこの2症状とSO_2との回帰直線（yを有症率(%)，xをSO_2（ppm）としたとき，それぞれ，$y=5.80x+0.66$，$y=0.53x+0.04$）の残差の偏りを観察して各圏，すなわち，調査地点を部分的に抽出した場合の特異性について検討した．

(3) **ATS-DLD 質問票の情報を用いた解析**

ATS-DLD 質問票は，大気汚染による慢性呼吸器疾患への影響を検討するため，2．で述べた関連要因に関する質問を多く含んでいる．これらの質問項目は解析の主対象でないため，過去の調査をみると，必ずしも全てが活用されているとは言い難い．そこで，これらを活用するために，呼吸器症状有症率に及ぼす上記の関連諸要因の影響を，東京都の資料を用いて検討した．すなわち，呼吸器症状のひどさをせきやたんで3レベルに区分し（0：せき，たんなし，1：片方あり，2：両方あり），レベル1と2の有無で分割したとき，質問票の各関連要因や地域，性別による2×2または2×3の分割表の検定を行い，両者に関連がみられるかを検討した．なお，持続性せきや持続性たんの有症者は極端に少数となるため（2%未満で607名中8名以下），この検定では不適であり，レベルを分けなかった．

結　　果

昭和58年の東京都中野区と青梅市，昭和61年の同中央区と青梅市で，ATS-DLD 質問票を用いた居住歴3年以上の調査結果より，持続性せきや持続性たんの有症者数（率）と調査人数を Table 1 に示した（持続性せき・たんは持続性たんと同一であったので省略した）．有症率の時間的変動（青梅市），地域差（中野区と青梅市，中央区と青梅市）の正規分布を利用した検定結果は，地域差の方がu値が大きかったが，有意差は認められなかった．これは有症者数が全て3名以下であったことから検出力が低下したためと考えられる．

調査人数増加によるu値への影響をみるために，男女児童の持続性せき・たんの青梅市の年度間と1986年の中央区と青梅市の有症率の差について調査人数をk倍したとき（k＝1～10）のu値の変動を Fig. 1 に示した．年度間では，それぞれ10倍としても危険率5%の有意差はなく，24倍が必要であった（そのときの調査人数合計は9,096名，実際は379名）．また，1986年の地域間では年度間よりもその倍数はかなり少なく，2.3倍で危険率5%，3.5倍で同1%，5.3倍で同0.1%の有意差であった（そのときの調査人数合計は，それぞれ497名，756名，1,145名，実際は216名）．これらの数値は，有症率を一定とする前提の下に行っているので，実際にはこの人数

Table 1. Prevalences of persisitent cough (PC) or sputum (PS) in respective two districts in 1983 and 1986

Item	Sex	Year and area in the survey			
		1 a[1)]	1 b[1)]	2 a[1)]	2 c[1)]
Prev. of PC(%)	m	1.57(2)[2)]	0 (0)	0 (0)	4.76(2)
	f	0 (0)	2.78(2)	1.33(1)	2.44(1)
	all	0.81(2)	1.38(2)	0.75(1)	3.61(3)
Prev. of PS(%)	m	0.79(1)	0 (0)	0 (0)	4.76(2)
	f	0 (0)	2.78(2)	1.33(1)	2.44(1)
	all	0.41(1)	1.38(2)	0.75(1)	3.61(3)
Number of subject	m	127	73	58	42
	f	119	72	75	41
	all	246	145	133	83

1) 1：1983, 2：1986, a：Ohme, b：Nakano, c：Chuo
2) Number in parentheses：number of subject with the chronic symptom (PC or PS)

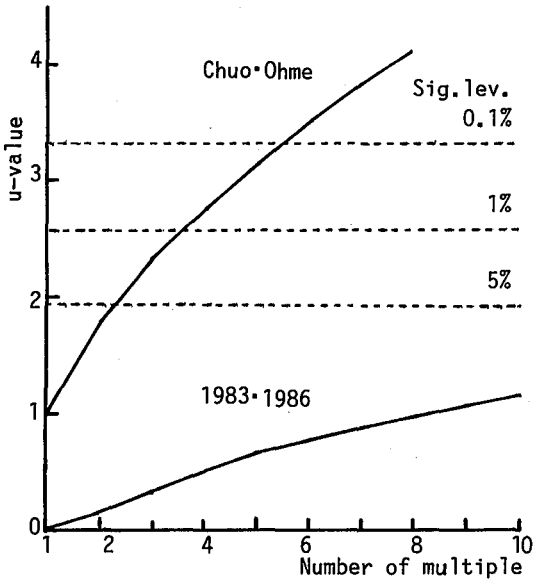


Fig. 1. Variation of u-value in testing the difference of two proportions (in Chuo and Ohme in 1986, or in Ohme in 1983 and 1986) by increasing number of subject

で調査すれば別の結果が得られると思われるが，青梅市での有症率の時間的変動に関しては余りないようである．しかし，このように少数地点で調査する場合には同じ有症率でも調査人数が変わると結果がかなり異なることが生じ得る．

環境庁報告書で，SO_2と高い相関関係が認められた女児の持続性せきと成人女性の持続性せき・たんの有症率について，全地点と首都圏，中部圏，関西圏の各有症率，およびSO_2の濃度の基礎統計量をTable 2に示した．首都圏，関西圏の平均値はいずれも全地点のそれを上回っている．中部圏は，女児やSO_2でやや低く，成人女性でほぼ同等であった．全地点における2有症率のSO_2との回帰直線について各圏の残差（観測値－推定値）を図示すると，Fig. 2のようになり，残差＋／－の分布をみると，首都圏，中部圏，関西圏は，女児の場合，それぞれ4／6，4／4，6／1，成人女性の場合，それぞれ2／8，6／2，6／1であった．標本数が少ないので，有意性の検定の適用は適当でないが，女児の回帰残差は，関西圏が＋方向，成人女性では，首都圏が＋方向，中部圏と関西圏が－方向に偏っている．したがって，大気汚染と慢性呼吸器疾患との関係を検討する場合，居住地域の相違自体が交絡因子になり得ることを示している．因みに，各圏毎に上記有症率とSO_2との相関分析を行ったところ，関西圏で成人女性の場合（相関係数は，0.886，p=0.008）のみ有意であった．

Table 2. Elemental statistics on prevalences of persistent cough (PC) for schoolgirls and persistent cough and sputum (PCS) for adult women and on SO_2 in three areas in Japan

Item	Elem. stat.	Area Metropolis	Chubu	Kansai	All
Prev. of PC (%)	Mean	1.59	1.13	1.61	1.27
	SD	0.75	0.46	0.58	0.51
	Max	2.5	1.7	2.4	2.5
	Min	0.8	0.5	0.7	0.4
Prev. of PCS (%)	Mean	1.07	0.95	1.13	0.94
	SD	0.45	0.17	0.72	0.41
	Max	2.0	1.3	2.5	2.5
	Min	0.5	0.7	0.1	0.1
SO_2 (pphm)	Mean	1.48	0.92	1.20	1.06
	SD	0.52	0.28	0.42	0.41
	Max	2.4	1.5	2.0	2.4
	Min	0.9	0.7	0.9	0.5
Sample number		10	8	7	51

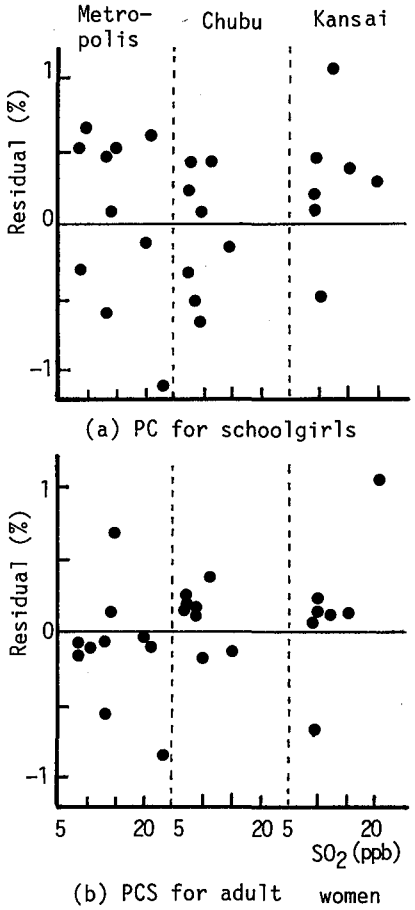


Fig. 2. Residuals between the observed and the estimated prevalences (%) of persistent cough (PC) for schoolgirls or persistent cough and sputum (PCS) for adult's women in three areas (Metropolis, Chubu and Kansai)

ATS-DLD質問票の情報を利用するために，呼吸器症状（症状レベル0／1，1／2で分割）と関連要因による分割表の検定を行った．関連要因もほとんどがはい／いいえの2値であるが，地域は3地点（青梅，中野，中央）に，1室当り人数もヒストグラムから3段階（～0.8，～1.1，～）に分割した．その結果（Table 3）によると，喘息性気管支炎や喘息の既往歴の項目での検定が最も有意水準が高く，続いて，じんましん，アレルギー性鼻炎，気管支炎の既往歴の項目，風邪などで寝込んだ経験の項目（ただし，上記既往歴の項目とかなり密接に関連）であった．この結果は，呼吸器疾患の既往症が現在でも影響していることを示唆している．受動喫煙の影響は，解析結果によると全くみられないが，質問内

Table 3. Contingency table test (Chi-square test) between levels of respiratory symptoms and these related factors (risk and confounding factors) obtained from the ATS-DLD questionnaire

No.	Risk or confounding factor	Symtom level 0/1	Symtom level 1/2	No.	Risk or confounding factor	Symptom level 0/1	Symptom level 1/2
1	Have experienced heavy cold or respiratory diseases	10.59**	19.29***	14	Smoker	0.87	0.24
2	Urtecaria	7.20**	11.89***	15	Smoker : father	2.79	0.02
3	Allergy coryza	5.48*	13.55***	16	Smoker : mother	0.04	0.89
4	Heavy cold or respiratory diseases by 2 yr old	0.29	4.16	17	Mother's milk	7.55**	3.62
5	Empyema	0.38	0.17	18	Window frames in the living room (wood or not)	10.44**	1.72
6	Bronchitis	8.11**	10.36**	19	Heating in the living room (dirty or clean)	7.30**	2.90
7	Asthmatic bronchitis	21.60***	36.24***	20	Fan in the kitchen	0.34	1.39
8	Pneumonia	1.75	8.53**	21	Number of rooms (>3 or not)	0.27	0.18
9	Whooping cough	1.04	1.04	22	Number of persons in the family (>4 or not)	2.64	0.02
10	Eczema	3.10	7.89**	23	Number of persons/rooms (~0.8, ~1.1, ~)	2.53	5.64*
11	Otitis media	0.01	0.01	24	Area (Ohme, Nakano, Chuo)	5.28	3.21
12	Tonsillitis	0.00	0.15	25	Sex	0.20	0.90
13	Asthma	16.08***	32.16***				

*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

容からは実際の児童への暴露は不明で，質問の不適切さが起因するのかもしれない．母乳使用，居間の窓が木枠，非排気型暖房の項目は，症状レベル0／1分割で有意であったが，症状レベル1／2分割では有意でなかった．逆に，1室当り人数の項目ではレベル1／2分割の場合に有意（人数が多いほど有症者多発）で，肺炎やしっしんの既往歴と2才までのひどい風邪などの項目でも同様であった．地域や性別，さらに，呼吸器疾患と直接関係の薄いちくのう，へんとう炎や感染症の百日咳の項目は両レベルとも有意ではなかった．

考　察

呼吸器疾患の中で大気汚染との関連が問題とされる疾患は慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive pulmonary disease, COPD, または chronic obstructive lung disease, COLD）と考えられる[11]．COPD は，慢性気管支炎，気管支喘息，肺気腫，びまん性汎細気管支炎の4疾患を統括し，ATS-DLD 質問票から得られる持続性せき・たんは慢性気管支炎についての ATS 基準である．一方，わが国で患者数が肺気腫なみとみられるびまん性汎細気管支炎と慢性気管支炎との診断による区別は明確でないことが臨床家により報告されており[12]，これらを質問票の中でどう区別し，また，採り入れていくかは今後充分な検討が必要と考えられる．また，慢性気管支炎の危険因子として，加令などの生物学的因子や喫煙習慣，大気汚染，職業条件，気象条件などの環境因子，さらに，感染因子などが挙げられているが[13]，有症率の変動には種々の交絡因子も報告され，Lebowitz[14]はアルコール消費量や教育水準など，Howland ら[15]は健康教育を交絡因子として採用している．喘息の実態把握を正確に行うために，Samet[16]，Burney ら[17]，Woolcock[18]が質問票を含む疫学的方法について検討し，報告しているが，これらの報告の調査手法は同一でない．質問票による調査を行う場合には対象者が回答しやすい質問内容や量であることが必要となる．回答しやすいとは，質問票が読みやすく，質問が明瞭で答えやすく，疲れないことである．現行の ATS-DLD 質問票がこれを充たしているかは疑問で，質問が飛んでいて読みにくい，量が多すぎるとの対象者の声を聞いた経験がある．また，ATS-DLD 質問票には，必ずしも妥当と思われない質問や非効果的質問が含まれている．例えば，前述した受動喫煙に関しては家庭内喫煙に質問を限定すべきであろう．さらに，関連要因については，調査方法や対象地域，年代などによって必要なあるいは質問し得る項目が変化することが考えられるので，標準質問票として調査者が取捨選択できる項

目を含めた方がより望ましく思われる．このように，診断基準が変化しつつあり，関連要因も変化し得るのであるから，ATS-DLD 質問票が公表されてから10年が経過した現在，この質問票の項目，質問文などについて充分に吟味した，回答しやすい標準質問票への改訂が期待される．

ATS-DLD 質問票を用いた調査を行う場合，調査の手間その他の諸事情もあって，調査人数については地点数に比べると案外軽視されがちであるが，2地点間の有症率の差は，Fig. 1に示した通り，地点の調査人数が変化すれば有意水準も変化し，調査人数の統計学的検出力や解析結果に及ぼす効果は必ずしも小さくない．では1地点当りどの程度の人数が最低限必要かは，地点数との関係もあるが，概ね有症率と調査人数との積（＝有症者数）が5以上であることが望ましいと思われる．持続性せき・たん有症率は1％程度が地点間で最小となることが多い（少人数では0％になることがある）ので，1地点の調査人数は500人以上が望ましいということになる．

せきやたんの急性症状に関連する要因は，Table 3にみられる通り，第1に呼吸器疾患の既往症で，この疾患の既往のある者は，ない者に比べて呼吸器症状のリスクが高い集団（high risk group）として分類することができると思われる．したがって，この集団について、もし充分な人数が得られる場合には，さらに統計学的解析が進められよう．また，既往症の罹患原因が不明の場合には大気汚染の影響の可能性があるが，この質問票では以後の追究は困難である．地域別には大気汚染レベルが異なるが，急性影響への寄与は大きくないようである．居住環境もある程度呼吸器症状発症に影響していると思われるが，それが大気汚染や室内汚染に直結するかは著明でない．なお，調査人数が多ければ慢性呼吸器疾患を含めた解析が可能となり，調査人数の重要性がこの点からも窺うことができる．

ま と め

ATS-DLD 質問票を用いた大気汚染による健康影響調査で見落とされやすい解析上の問題や有効活用されていないこの質問票からの情報について，有症率の時間的変動，調査人数や地域の解析に及ぼす影響，質問票から得られる関連要因の呼吸器症状への影響を検討した．利用資料は，東京都の調査結果（昭和58年と61年の2年度，各2地点）と環境庁の昭和61年3月の報告書（昭和55年から59年にかけての全国51地点）で，以下の知見が得られた．

1．同一地域（青梅市）における児童の持続性せき・たん有症率の3年後の変動を調べたところ，その変動はかなり小さいと推定された．また，2地点間でも有症率の差を検討したが，有意差は得られなかった．調査人数が少ないため統計学的検出力が低いことが起因したと思われる．

2．少数地点，特に2地点間の有症率の差は調査人数によって検定結果に大きく影響する．また，全国調査を首都圏，中部圏，関西圏でそれぞれ抽出し，全国調査で高い相関関係の得られた慢性呼吸器症状と SO_2 の回帰残差を比較すると，各圏で偏りがみられ，居住地域も交絡因子になり得ることを示唆した．

3．児童の急性呼吸器症状に影響を強く及ぼす交絡因子として，喘息性気管支炎，喘息，じんましん，アレルギー性鼻炎，気管支炎の既往症が認められ，呼吸器疾患の既往症が現在まで影響していると推定された．1室当り人数や窓が木枠，非排気型暖房などの環境的要因も交絡因子になり得るが，上記既往症ほど著明でない．

文 献

1）Ferris, B. G.：Epidemiology Standardization Project, Am. Rev. Respir. Dis., 118, 1-120, 1979

2）McNab, G. R., Stator, E. J. and Stewart, C. J.：Br. J. Prev. Soc. Med., 20, 181-188, 1966

3）Lebowitz, M. D. and Burrows, B.：Am. Prev. Respir. Dis., 113, 627-635, 1976

4）Mittman, C., Barbela, T., McCaw, D. and Penderson, E.：Arch. Environ. Health, 33, 151-157, 1979

5）春日　斉，逢坂文夫，松木秀明，成田史朗：日本公衛誌，26, 367-379, 1979

6）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, 557-565, 1982

7）日本公衆衛生協会：大気汚染による健康影響調査手法に関する研究，1979，日本公衆衛生協会，東京

8）安達元明，小林雅子，岩崎明子，仁田善雄，吉田亮：日本公衛誌，30, 581-588, 1983

9）Dales, E., Ernst, P., Hauley, J. A., Battista, R. N. and Becklake, M. R.：Am. Prev. Respir. Dis., 135, 817-821, 1987

10）環境庁大気保全局：大気汚染健康影響調査報告書，1986

11）宮本昭正，可部順三郎，前田和甫：大気汚染と呼吸器疾患，1984，ぎょうせい，東京

12）泉　孝英：内科，61, 404-410, 1988

13）滝沢敦夫：呼吸器，瀧島　任編，22-32，メジカルビュー社，1983，東京

14) Lebowitz, M. D. : J. Chron. Dis., **35**, 751-758, 1982
15) Howland, J. Nelson, E. C. Barlow, P. B. McHugo, G. Meier, F. A. et al. : Chest, **90**, 233-238, 1986
16) Samet, J. : Chest, **91**, 74S-78S, 1987
17) Burney, P. and Chin, S. : Chest, **91**, 79S-83S, 1987
18) Woolcock, A. J. : Chest, **91**, 89S-92S, 1987

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 205-211, 1988

東京都区部における部位別がん死亡率の27年間の経年変化と地理的分布

牧 野 国 義*, 稲 葉 裕**

The Trends for Twenty-seven Years and Geographical Patterns of Cancer Mortalities for Selected Sites in The Ward-area of Tokyo

KUNIYOSHI MAKINO* and YUTAKA INABA**

Geographical patterns and some features in cancer mortalities for eight selected sites were studied for 27 years between 1958 and 1984 in respect of 23 wards in Metropolitan Tokyo.

In drawing the patterns, 27 years were grouped into 5 periods to exclude effects of random fluctuations on the mortalities. Examining the distributions in each period revealed following results. High SMR (standardized mortality ratio) from stomach cancer was observed in the eastern area of Tokyo in the early period and in the eastern and western areas in the later periods. Similarly, high SMR from lung cancer was observed in the three wards of central Tokyo in the early period and in the neighboring wards including these three wards in the later periods. High SMRs from breast and liver cancers were found in the three wards. It is likely that cancer mortalities from the six selected sites except for leukemia and esophagus cancer in Metropolitan Tokyo exceed those in suburban area of Tama, and the difference between two areas has increased with years.

SMR from stomach cancer correlated significantly with SMRs from uterus, esophagus and liver cancers. As for SMR from lung cancer, correlations with SMRs from liver cancer and leukemia were also found.

In addition, CDRs (corrected death rates) from stomach cancer decreased obviously during the study period. Its trend was rapid for the early decade, slow for the next decade and to some extent rapid for the remaining years. CDRs from lung cancer increased throughout the study period and has rapidly increased in the recent years. Although these trends in the ward area were similar to the national trends in Japan, the trends of CDR from stomach cancer were not all uniform among the twenty-three wards of Tokyo. According to a principal component analysis, the wards were clearly divided into four groups with regard to stomach cancer.

Keywords: cancer, mortality, SMR, geographical distribution, trend

緒 言

悪性新生物（以下がんと呼ぶ）のわが国の死亡数は年々増加し，全死亡中に占める割合は，昭和30年に11.2%，昭和40年に15.2%，昭和60年には25.0%となり，昭和56年からは死因順位が第1位となっている．東京都は全国の中でもがん死亡の割合が高く，昭和52年以降第1位である．このような状況より，がん死亡に対する各種の研究が行われ，報告された．その発生要因を記述疫学的に探求するためには，まず，がん死亡の地理的分布を明らかにする必要があり，また，冨井[1)]が述べたように，死亡率の年次変化を検討することもがん対策上重要な手がかりとなり得る．このような目的で地理的分布が

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 169 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, 169 Japan
**順天堂大学医学部衛生学教室

調査され[2-11]，あるいは，年次変化が追究された[1,12-16]．地理的分布を調査する際の地域単位としては都道府県ばかりでなく，区市町村を単位とした報告もある[4,5,8,9,11]．地域単位を小さくすると，きめ細かい地域特性を推定することができ，発生要因を特定しやすくなる利点のある反面，1地域の人口サイズが小さくなり，偶然変動の影響は大きくなる．この対策として調査期間を長くする方法があるが，長過ぎると，年次変化が隠れてしまう危険がある．そこで，我々は調査期間を5年程度に区切り，各期間の地理的分布を調査し，検討した．さらに，年次変化の特徴についても検討を加えた．

方　法

1．死亡指標

昭和33年（1958年）から昭和59年（1984年）までの東京衛生年報に掲載された東京都23区のがん死亡資料を使用した．対象とした部位は，胃，気管・気管支及び肺（以下肺と略す），乳房，子宮，白血病，肝臓，食道，膵臓の8部位である．ただし，肝臓の掲載は昭和42年から，食道と膵臓の掲載は昭和48年からで，それ以前の死亡資料は入手できなかった．

上記死亡について，まず，各年の東京都人口を基準人口とした各区の標準化死亡比（SMR）を算出した．さらに，各年の東京都の粗死亡率を用いて，昭和60年の東京都人口を基準人口とした直接法による訂正死亡率を算出し，地理的分布ではSMR，年次変化では訂正死亡率を主死亡指標として検討した．

2．解析方法

偶然変動や年次変化の影響を小さくするため，調査期間の27年間を第1期から第5期に5分割（昭和33年から7年間，以降5年間）した．各期間におけるSMRは5または7年の期間平均とした．基準人口を東京都としているので，23区の平均SMRは必ずしも100とはならず，100以上の場合は区部が多摩地域よりも高死亡であることを示す．まず，各期間の地理的分布が偶然変動によらないことを確認するために，5期間相互の23区SMRによる相関分布を行った．もし，隣接期間の間の相関が低い場合には，両期間の時期に急激にSMRを変化させる要因がない限り偶然変動によると考えられ，区単位でSMRの地理的分布を表示する意味がない．東京都区部ではこのような要因は存在しないと思われるので，隣接期間の間の相関係数が一つでも0.351（$p=0.10$）以下を示した部位については，第1，2期（12年間）と第3，4，5期（15年間）に分け，旧と新の期間としてSMRを算出し直し，地理的分布を検討した．地理的分布表示は6段階とし，SMRの境界値を85，95，100，105，115として区分した．次に，各期間で，SMRによる部位間の相関分析を行い，その地理的分布に関連があるかを検討した．

さらに，訂正死亡率の年次変化のトレンドを回帰分析で求め，誤差分散を調べた．また，3年移動平均で訂正死亡率を平滑化し，昭和58年から遡って5年毎の変化率を算出し（ただし，その調査期間の初年と終年については平滑化後の資料による回帰分析で推定），この変化率から各部位の死亡率の増減の年次的緩急について検討した．

次に，各年各区のSMRを，東京都区部の人口を基準人口として算出し直し，27年間の資料のある5部位についてそれぞれ主成分分析を行って，23区のSMRの年次変化の特徴を検討した．

結　果

SMRの5期間の間の相関分析結果をTable 1に示した（肝臓，食道，膵臓のがんについては欠測期間がある）．胃，肺，乳房，肝臓，食道のがんについては隣接期間の相関が有意であった．有意でなかった子宮がん，白血病，膵がんについては第2期と第3期で2分して期間を合成し，その新旧期間で相関係数を求めると，子宮がんが，0.558（$p<0.01$），白血病が，0.747（$p<0.001$）と有意の結果が得られた（膵がんは第4期と第5期のみのデータであったので，合成して1期間とした）．この結果より，SMRの地理的分布表示として，胃，肺，乳房のがんについては第1，5期，肝がんについては第3，5期，食道がんについては第4，5期をFig. 1に，子宮がん，白血病については合成した2期間をFig. 2に示した．胃がんの場合，高いSMR地域が東部から期間の経過とともに西部に拡がる傾向であることが明らかである．また，肺がんについては，都心部からその周辺区に高SMR地域が期間経過とともに拡がった．その拡がりは西部よりも東部で顕著である．乳がんの場合，SMRは都心部から北西部にかけて高い傾向がある．肝がんのSMRも都心部に高く，北西部に低い．また，食道がんのSMRは一般に西部で低い．一方，合成された期間の子宮がんでは，東高西低の傾向がみられる．白血病の場合，北東部でSMRが低い．なお，膵がんは特徴的な傾向が認められなかった．東京都区部の白血病と食道がん以外の6部位のがんのSMRは，期間経過とともに上昇し，多摩地域との相対的死亡率差が拡がる傾向にあることが認められた．

各期間での部位間のSMRの相関分析結果（有意の場

Table 1. Correlation matrices between SMRs in the five periods of years
(1958−64, 1965−69, 1970−74, 1975−79 and 1980−84)

Site → A[1)]		Period No.				S. →C[1)]		P. No.			S. →E[1)]		P. No.		
↓B[1)]	1	2	3	4	5	↓D[1)] 1	2	3	4	5	↓F[1)] 1	2	3	4	5
P. No.															
1		*** .779	*** .908	*** .872	*** .776		* .418	.253	.080	.410		.311	-.081	.197	-.154
2	*** .679		*** .802	*** .845	*** .822	.341		.409	-.203	.347			.141	.079	-.019
3	*** .653	* .503		*** .929	*** .864	.185	.262		** .579	* .508				* .443	-.049
4	* .449	.366	*** .688		*** .897	* .509	.167	* .424		* .475			*** .773		.289
5	** .543	.272	*** .660	*** .732		* .448	* .467	.169	.394				*** .671	* .505	

S. Esophagus P. No. 4-5 .500* S. Panceas P. No. 4-5 -.386

1) →: Upper matrix, ↓: Lower matrix, A～F: Site of cancer
A: Stomach, B: Lung, C: Breast, D: Uterus, E: Leukemia, F: Liver
*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

合のみ Table 2) によると，胃がんは子宮がんと第1，2，4，5期で，肝がんと第3，5期で，肺がんは肝がんと第3，4，5期全てに有意の正相関が認められた．なお，子宮がんは5期間に分けると偶然変動が大きかったが，上記の密接な関連は両部位間に何か共通の発生要因があることを示唆している．この発生要因の共通性は肺がんと肝がんとにも推察される．

各部位の訂正死亡率の年次変化は，食道がん以外は直線性が高く，誤差分散をみても胃がんや肺がんに小さく，食道がんに大きかったが，5年間の変化率をみると (Table 3)，胃がん死亡は，昭和30年代半ばに急激に減少した (−9.2) が，昭和40年代前半には減少速度は緩くなり (−3.9)，後半から昭和50年代にかけてその中間程度に復帰し (−6.4, −6.1)，昭和50年代前半から後半にかけて幾分急となった (−6.9)．また，肺がん死亡は，昭和30年代では緩やかな増加であった (0.5) が，徐々に急となり，昭和50年代にはその傾向が強まった (2.9, 2.7)．この傾向は，昭和30年代の資料のない肝がん死亡も年次変化の類似性から同様と推察される．一方，子宮がんはこれらと異なって，減少速度がやや緩やかになった．食道がん，膵がんはそれぞれ減少または増加の傾向がみられるが，調査期間が短いため変化率の緩急は明らかでない．白血病は漸増傾向を示した．

東京都区部の人口を基準人口として算出し直したSMRの主成分分析による年次変化の特徴を第1，2主成分の因子負荷量散布図 (Fig. 3) よりみると，胃がんや肺がんでは，いくつかの区が類似した傾向を示したが，他のがんでは格別の特徴は得られなかった．胃がんの場合には4群に大別された．すなわち，年次的に減少の群 (台東，渋谷，北，板橋，練馬，江戸川)，増・減・増の傾向の群 (墨田，江東，大田，世田谷，葛飾)，これとやや類似する増・減・増・減の傾向の群 (文京，荒川，足立)，そして，ランダムまたは微小変化の群 (他の9区) であった．第1主成分軸は，調査期間の終期が減少傾向の場合に＋，第2主成分軸は，調査期間の初期が増加傾向の場合に＋と推察された．また，肺がんは胃がんほど明確な特徴は得られなかったが，SMRが年次的に増・減の傾向の群 (中野，足立)，増・減・増の傾向の群 (渋谷，杉並)，減・増・減の傾向の群 (中央，港，文京，目黒，世田谷，練馬) のように群化された．この第1主成分軸は，調査期間の終期が増加傾向の場合に＋，第2主成分軸は，調査期間中の増加傾向の期間が長い場合に＋と推察された．両部位とも，同じ群の最も近接した2つの区は地理的にも隣接しており (例えば，胃がんや肺がんの場合の板橋と北)，この2区のSMRの年次推移の類似性を示唆している．

考　　察

東京都区部における部位別がん死亡率の地理的分布は既に大久保らがメッシュデータを用いて報告しており[5)]，さらに，筆者らも東京都区部での肺がんを含む呼吸器疾患死亡について報告した[8,9)]．地域単位の細分化は，前述の利点，問題点のほかに細分化自体が妥当であるかど

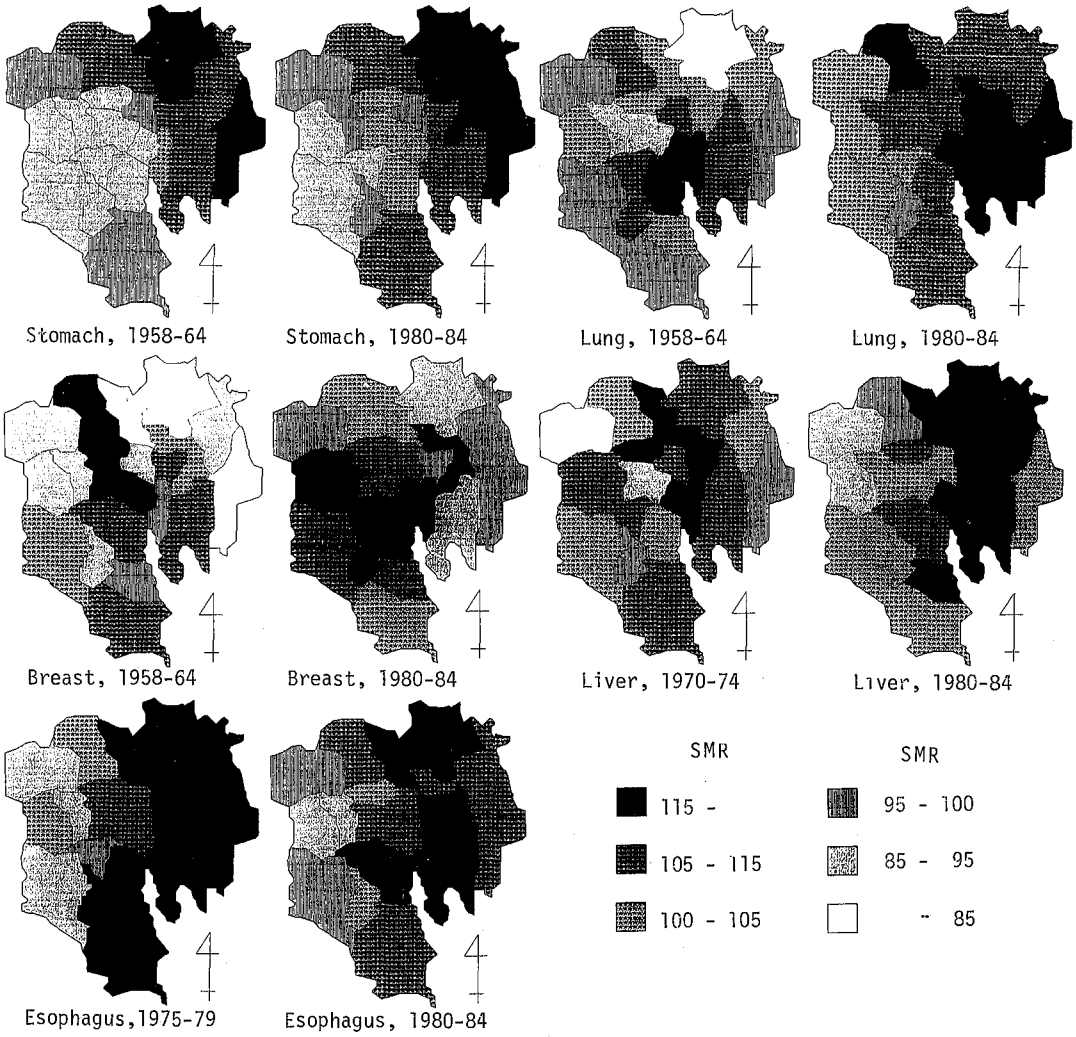


Fig. 1 Geographical SMR-patterns of cancers for selected sites in the periods from the first (1958-64) to the fifth (1980-84)

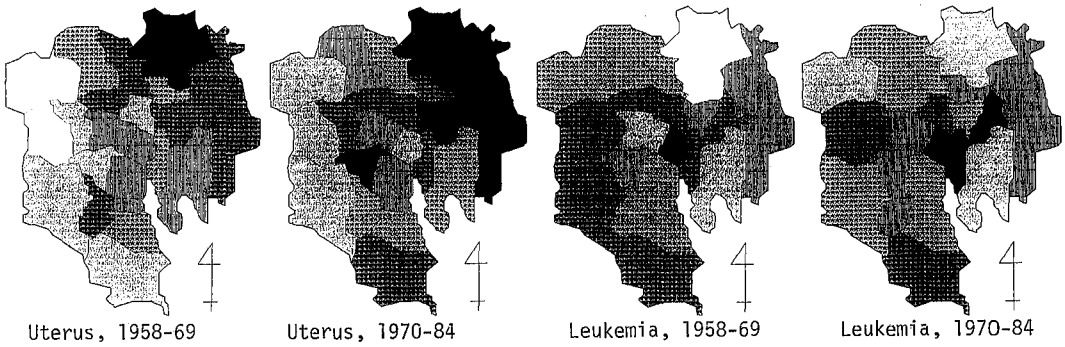


Fig. 2 Geographical SMR-patterns of cancers for selected sites in the old (1958-69) and the new (1970-84) periods

Table 2. Significant correlations between SMRs for selected sites of cancer in each of the five periods of years

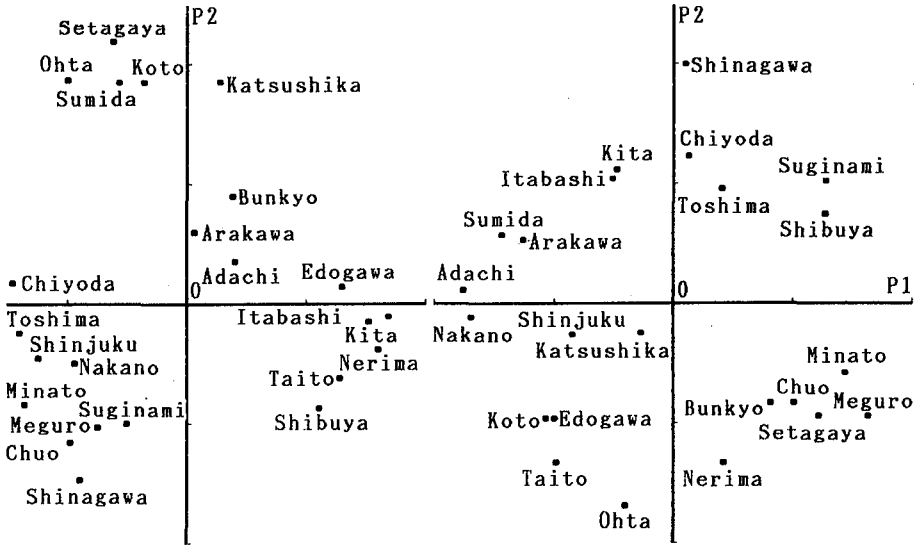
Period No.	Site	Site	Correlation
1	Stomach	Uterus	.486*
2			.589**
3		Liver	.450*
	Lung	Leukemia	.520**
		Liver	.681***
	Breast	Leukemia	.525*
4	Stomach	Uterus	.562**
		Esophagus	.599**
	Lung	Liver	.688***
		Esophagus	.417*
	Liver		.699***
5	Stomach	Lung	.562**
		Uterus	.499*
		Liver	.688***
	Lung	Leukemia	.479*
		Liver	.468*
	Uterus	Esophagus	.624**

*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

Table 3. Change of corrected death rates in every five years from 1958 to 1983

Site	Years 1963-58	1968-63	1973-68	1978-73	1983-78
Stomach	−9.2	−3.9	−6.4	−6.1	−6.9
Lung	0.5	2.3	2.3	2.9	2.7
Breast	−0.1	0.4	0.9	0.5	0.3
Uterus	−1.9	−1.5	−0.8	−1.0	−0.9
Leukemia	0.9	0.4	−0.1	0.8	−0.3
Liver			1.5	1.8	1.9
Esophagus				−0.6	−0.1
Panceas				0.8	0.7

うかが解決していない．すなわち，人の生活範囲を余りに局所的に限定することは疾病の発生要因を探求する上で適当でないとの意見がある．区を地域単位とする場合，その地域に主たる生活の場がある対象集団としては高齢の女性が最適である．ここで使用した調査の対象集団は，ほとんどが高齢者であるが，性別の区別がない．そこで，この集団の死亡が高齢の女性の死亡と地理的分布が一致するかどうかを確認するために，昭和55，65年の50才以上の女性の23区の部位別がん死亡率を調査し，相関分析を行ったところ，白血病，肝臓以外の6部位で危険率



(a) Stomach cancer (b) Lung cancer

Fig. 3 Distribution of factor loadings by the first (P1) and the second (P2) principal components

1％以下の高い正相関が得られた（有意でなかった2部位については，白血病は死亡数が少なく，女性の肝がんも男性よりかなり死亡数が少ないことから，2年間の50才以上の女性の資料のみでは充分な信頼精度が得られない）．したがって，区を地域単位とする区分に充分妥当性があると考えられる．

胃がん死亡の地理的分布に強い影響を与える一因として各区の転入住民の出身地が考えられる．日本全国の同死亡の地理的分布をみると，日本海側の北日本に高く，この地域からの東京への転入者は，旧来圧倒的に区部の東部地域に多い傾向があった．しかし，近年交通機関の発達や経済成長などにより上記傾向は徐々に変わりつつあり，これが地理的分布の変化に起因していると思われる（因みに，昭和59年の同死亡のSMRは，足立，江戸川，中央，港，葛飾の順であった）．また，肺がん死亡は都市部に多いことが知られており[17]，第1期の結果はまさにこれを実証したものである．その後の高SMR区の拡大も経済成長による都市部の経年的拡大と一致している．乳がんも都市部で多発するといわれ[11]，この研究でも概ねこれを支持する結果が得られた．また，千葉県における村田らの報告[4]でも同様の結果が得られている．

このほかに，肝がん死亡も都心部で高い結果が得られたが，全国では肝がんと肺がんや乳がんとは地理的分布が一致しなかった[18]，一方，子宮がん，食道がん，白血病は住宅区でSMRが低い傾向がみられた．住宅地域については都道府県単位では検討できないので，この点も区単位で検討する利点である．また，都道府県と23区では都市化のレベルが一致しないので，留意する必要がある．部位間の相関分析結果をみても，国別の解析[2,19]や都道府県別の解析[6]とは必ずしも一致しなかった．部位別がん死亡の年次変化は，胃，食道，子宮が減少，その他の部位が増加傾向であり，どの部位も全国の年次変化の傾向と一致した．27年間の各区の死亡率の変動割合をみると，胃がん死亡では31～51％，区部全体で44％減少した．一方，肺がん死亡の場合，27年間で50～296％，区部全体で147％の増加，つまり，1.5倍増で，甚だしい区は3倍増となったことになる．

胃がんや肺がんのSMRの年次変化で隣接区などの複数区で類似性が認められたが，隣接地域のがん死亡の集積性に関しては，大野らが隣接地域では死亡発生要因が類似するとの前提のもとに検定法を提案している[20]．ただし，23区の場合，隣接区でも地域特性は必ずしも一致せず[9]，この前提は保証されない．したがって，ここではこの検定法の利用は適当でない．発生要因に関する地域特性の解析のない現状では，土地利用状況から，従来より使用されている都心部，商業区，住宅区，商工業区などの用語で区分して述べる程度が適当と考えられる．また，区部と多摩地域とのがん死亡の差をSMRの年次変化からみると，白血病以外の7部位でその差が拡がる傾向にあることが推察されたが，笹波らは小集団の地域におけるがん死亡について土着人口のがん死亡率の高いことを報告している[21]．したがって，区部には土着人口，多摩地域には転入人口が相対的に多いことから，両地域の死亡率の差の拡大は，人口移動が一因となっている可能性があると思われる．

ま と め

昭和33年から59年の27年間における東京都23区の部位別がん死亡資料（胃，肺，乳房，子宮，白血病，肝臓，食道，膵臓の8部位を対象）を用いてその地理的分布や年次変化の特徴をSMRや訂正死亡率により検討した．

27年間を5期に分けて各期間の地理的分布をみると，胃がん死亡の場合，高いSMRは最初区部の東部地域のみであったが，期間の経過とともに西部の方向に拡がった．肺がん死亡の場合，高いSMRは最初都心部のみであったが，これも隣接区に拡がる傾向を示した．乳がんや肝がんの死亡も都心部で高いSMRであった．この肝がんや食道がんのSMRは区部の西部地域で低い分布を示した．8部位中，白血病と食道がんを除く6部位のSMRはいずれも期間経過とともに上昇し，区部と多摩地域との死亡率の差が拡がっていることを示唆した．

期間毎に部位間の死亡の関連性を検討したところ，多くの期間で，胃がんは子宮，食道，肝臓のがんと，また，肺がんは肝がんや白血病と有意の正相関がみられた．次に，各部位の訂正死亡率の年次変化をみると，減少傾向が顕著な胃がん死亡は，最初急激に，そして緩やかになり，それからやや急激と変化がジグザグであった．肺がん死亡は調査期間中増加傾向が続き，特に近年ほど増加が顕著になった．調査初期の資料のない肝がん死亡も肺がん同様の傾向と推察されたが，減少傾向の子宮がん死亡は近年ほどその割合が緩やかになった．これら部位別のがん死亡の年次変化は全国の傾向と概ね一致した．しかし，23区でみると，上記傾向は23区間では必ずしも共通せず，因子負荷量の分布によると，胃がんは4群に分類された．他の部位でも明確に群化した分布は少なかったものの，23区の年次変化の傾向はかなり異なった．

文 献

1）冨井 章：日本公衛誌，24，703-712，1977

2）栗原　登：医学のあゆみ，96，330-338，1976
3）丸地信弘，津田佳世子，田中洋一：日本公衛誌，23，489-491，1976
4）村田　紀，田中　昇，嶋村欣一，福間誠吾：千葉医学，53，229-240，1977
5）大久保利晃，安達史朗，外山敏夫：日衛誌，32，534-542，1977
6）稲葉　裕，高木広文，柳井晴夫：日本公衛誌，26，67-76，1979
7）Miller, A. B. : American Cancer Society, 50, 2533-2540, 1982
8）牧野国義，溝口　勲：日本公衛誌，31，297-303，1984
9）牧野国義，溝口　勲：日本公衛誌，32，595-601，1985
10）Leclerc, A., Goldberg, M. and Goldberg, P. : Arch. Environ. Health, 42, 315-320, 1987
11）加藤育子，富永祐民：日本公衛誌，34，619-623，1987
12）Kurihara, M. : Environ. Health Perspect., 32, 59-74, 1979
13）永田久紀，石榑清司，浅野弘明：日衛誌，37，613-617，1982
14）Marmot, M. G. and Mcdowall, M. E. : Lancet, 2, 274-276, 1986
15）渡慶次重美，住野公昭，山本良二，森　英樹，福島徹：日本公衛誌，34，717-728，1987
16）Davis, D. L. and Schwaltz, J. : Lancet, 1, 633-635, 1988
17）Carnow, B. W. : Environ. Health Perspect., 22, 17-21, 1978
18）厚生省大臣官房統計情報部：悪性新生物死亡統計，30-38，1986，厚生統計協会，東京
19）吉田　昭，原田康平，柴田　彰：日衛誌，38，598-605，1983
20）大野良之，青木国雄，青木伸雄，大谷元彦：日衛誌，34，512-520，1979
21）笹波隆文，久保利夫，中地　敬，与那嶺正盛：日本公衛誌，27，42-46，1980

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 212-224, 1988

室内環境におけるアスベスト粉塵の実態について

佐藤泰仁*, 関　比呂伸*, 福森信隆**,
加納堯子*, 斉藤　勝***, 秋山　陽***

Survey on Concentration of Asbestos Fiber in Indoor Environment

Yasuhito Sato*, Hironobu Seki*, Nobutaka Fukumori**,
Takako Kanoh*, Masaru Saito*** and Minami Akiyama***

Asbesto fiber concentration in the indoor environment of 20 establishments in which asbestos were used as ceiling or wall materials was investigated in Tokyo. Air samples were collected on membrane filter by open-face type sampler. The filter was divided into 2 positions, and one of them was submitted for counting number of asbesto fiber by means of optical microscopic method and the other of electron microscopic method. The number of fibers counted by the 2 methods were compared.

Geometric means of fiber concentration in office rooms and mashine rooms for air conditioning which were measured by the optical microscopic method were 0.89 and 1.04 fibers per one liter of air (f/l), respectively, where as that in the samples collected as control at outdoor areas near by was 0.63 f/l.

On the other hand, they were 7.5 f/l, 16.0 f/l and 11.3 f/l respectively, when they were counted by the electron microscopic method.

Keywords: asbestos, optical microscope, electron microscope, indoor pollution

はじめに

アスベストの発癌性については以前から指摘されているところであったが，昭和62年に入って建材として使用されているアスベスト製材の劣化，剥離の健康影響の問題がマスコミで取り上げられるようになった．これに対応しての東京都衛生局環境衛生部の事業の一環として，当研究科では衛生局ビル衛生検査班との連けいのもとに，アスベスト等が吹き付けられている施設（事務所を中心に興行場，店舗，学校など），20ビルを対象にアスベスト繊維による汚染状況を把握する調査を行った．今回これらの結果について検討を行ない，若干の知見が得られたので報告する．

調査方法概要

調査期間　昭和62年9月18日～11月24日

測定器具

(1) オープンフェイス型サンプラー：㈱柴田科学器械工業製，A型

(2) 吸引ポンプ：㈱日立製作所製ロータリーコンプレッサー（ローボリューム用）

(3) メンブランフィルター：ミリポア製，TypeAA（孔径0.8 μm，直径47mm）

(4) 光学顕微鏡：位相差顕微鏡（㈱日本光学工業製OPTIHOT に位相差用ターレット ph 装着）

(5) 電子顕微鏡：分析電子顕微鏡（日立製透過型H－7000型に Kevex 製 EDX（Energy Dispersive X－Ray Microanalyzer）を装着）

採塵方法

オープンフェイス型のフィルターホルダーにメンブランフィルターを装着し，これを床面上1.5mの高さに支

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　169　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, 169 Japan
**東京都立衛生研究所毒性部病理研究科
***東京都衛生局環境衛生部環境衛生課

持台で固定し，吸引速度10 l／分で4時間連続で採塵を行った．なお，採塵は東京都衛生局環境衛生課ビル衛生検査班により実施された．

分析方法

採塵したフィルター（試料）はカッターにより正確に2分割し，一方を光学顕微鏡の検査用に，もう一方を電子顕微鏡の検査用に用いた．

① 浮遊粉塵中の繊維状物質の測定（光学顕微鏡法[1)]）

①－1　観察サンプルの作成

フタル酸ジメチルとシュウ酸ジエチルが1：1の混合液にメンブランフィルターを0.05g／mlの割合で溶解する．この液を数滴，清浄なスライドグラス上に滴下し，その上に粉塵を採取したフィルターの採塵面を上方にして乗せ，フィルターがやゝ透明になってから洗浄したカバーグラスを上に乗せて固定する．フィルターが完全に透明になった後，検鏡した．

①－2　計測法

①－1で作成した試料を，位相差顕微鏡を用いて倍率400倍（対物×40，接眼×10）で計数した．検鏡はランダムに50視野を選び，繊維の長さ5 μm以上で長さと幅の比が3：1以上の繊維のみを計測した．石綿以外の繊維，例えばガラス繊維，ロックウール等は繊維の幅（通常5～15 μm）や形態の差異で石綿繊維と識別できるので計数から除外したが，繊維の幅が小さくなると光学顕微鏡では識別できなくなるので，このような場合は石綿として計数した．

繊維数濃度は次式によって求めた．

$$繊維数（本／cm^3）=\frac{A \cdot N}{a \cdot v \cdot n}$$

A：採塵した面積（mm^2）=960

N：計測した粒子の総数（個）

a：顕微鏡で計測した1視野の面積（mm^2）=0.17

v：採気量（cm^3）

n：計数した視野の数（個）=50

なお，今回の測定では繊維数が少数なため，採気量をcm^3からLに換算して示した．

② 透過型電子顕微鏡（TEM）及びEDXによる同定

②－1　TEM用サンプルの作成（ニュークリポアフィルター法[2)]）

採塵したメンブランフィルターの1/2を環境庁『アスベスト排出マニュアル』に準じてスライドグラス上にアセトンで接着し，100W，1時間の低温灰化処理を行なった後，スライドグラスと共に残渣をイソプロパノール中に入れて超音波分散を3分間行なった．更にその分散試料液をニュークリポアフィルター（孔径0.2 μm，直径25mm）でろ過し，カーボン蒸着を行なった後，その1部分を3mm角にカットして試料面を上にしてTEM用グリッド（Ni製，MAXTAFORM-H1，200メッシュ）にのせ，クロロホルム蒸気中で3日間，溶解除去を行ないTEMの観察用試料とした．なお，使用した低温灰化装置はYAMATO，PR-302型，供給O_2量は35ml／min（1kg／cm^2時）である．又，真空蒸着装置は日立HUS-4GB型，純度99.9999％のカーボンを高さ10cmより約200Åの厚さに蒸着を行なった．

②－2　計測法

試料のNi製TEMグリッドの網目の中からランダムに25ヶ所の網目を選び，1万倍の倍率で各網目内の繊維状構造物を観察し同時に，EDXでその化学組成及びスペクトルを測定し，この測定値にもとづいてアスベスト繊維を同定した．（クリソタイル繊維の場合はMg，SiおよびFe，アモサイト繊維はMg，Si，FeおよびMn）アスベスト繊維の場合はあわせて繊維の長さを計測した．

試料中のアスベスト繊維含有量は次式で求めた．

$$F（本／L）=\frac{A_1 \cdot f}{A_2 \cdot n \cdot V}$$

F：吸引空気全量中に含まれるアスベスト繊維数

A_1：ニュークリポアフィルターの有効3過面積（mm^2）=226.865

A_2：グリッドの網目の面積（mm^2）=0.01

f：計数アスベスト繊維数（個）

n：観察網目数=25

V：吸引空気量（L）

結果及び考察

今回の対象施設は，古くは昭和11年建築の学校（No.10）から，比較的新らしい昭和58年の事務所ビル（No.8）まであるが，そのほとんどは昭和45年前後に竣工したビルで，労働安全衛生法によるアスベストの吹き付けが規制された昭和50年以前のものである．アスベスト材吹き付けの状況は表1に示したが，表中－印は未使用を示し，A，B，Cはアスベスト材の劣化の程度を示す．Aは全面にわたって表面が荒れ，剝離した形跡がある，Bは部分的に表面が荒れ，剝離した形跡がある，Cは表面が安定しており劣化も進んでいないことを意味している．また，電子顕微鏡の計数値の欄の－印は未検索を示す．

表1　各施設，各測定場所におけるアスベスト繊維濃度

施設名（用途）		測定場所	検査結果 試料No	光学顕微鏡計数値（f／L）	電子顕微鏡計数値（f／L）	アスベスト材料の劣化の程度	備考
1	Aビル（興行場）	機械室	1	4.89	4.1	A	晴
		事務室	2	0.15	−	−	
		外気	3	2.83	−	−	
2	Bビル（旅館）	客室	4	1.48	−	−	晴
		機械室	5	2.01	23.1	C	
		外気	6	1.22	−	−	
3	Cビル（集会場）	映写室	7	0.99	−	A	晴
		事務室	8	1.59	43.9	−	
		外気	9	0.54	−	−	
4	Dビル（事務所）	ボイラー室	10	N.D.	−	B	雨
		事務室	11	0.61	9.0	−	
		外気	12	0.20	−	−	
5	Eビル（事務所）	外気	13	2.25	7.8	−	晴
		空調機械室	14	0.33	−	C	
		室内	15	1.58	6.7	B	
6	Fビル（事務所）	外気	16	0.80	16.2	−	晴
		事務室	17	0.47	7.5	−	
		空調機械室	18	0.81	−	B	
7	Gビル（事務所）	外気	19	0.30	−	−	晴
		空調機械室	20	2.36	−	B	
		応接室	21	1.02	22.6	−	
8	Hビル（事務所）	外気	22	0.19	−	−	晴
		機械室	23	1.98	−	C	
		事務室	24	0.61	17.3	−	
9	Iビル（事務所）	空調機械室	25	3.51	278.3	C	曇
		外気	26	0.25	−	−	
		事務室	27	0.29	−	−	
10	Jビル（学校）	事務室	28	1.27	3.6	C	晴
		研究室	29	0.98	−	C	
		屋外	30	0.45	−	−	
11	Kビル（遊技場）	機械室	31	0.97	3.8	B	晴
		ボーリング場	32	1.17	9.8	−	
		屋上	33	0.73	−	−	
12	Lビル（事務所）	事務室	34	0.77	−	−	晴
		空調機械室	35	1.65	16.4	C	
		外気	36	0.74	−	−	
13	Mビル（学校）	外気	37	0.23	−	−	雨
		教室	38	0.77	−	C	
		機械室	39	1.07	6.0	C	
14	Nビル（店舗）	事務室	40	0.96	3.9	−	雨
		空調機械室	41	2.35	−	B	
		外気	42	1.00	−	−	
15	Oビル（店舗）	空調機械室	43	2.60	−	B	曇
		アスレチックスタジオ	44	1.13	0.5	B	
		外気	45	0.76	−	−	
16	Pビル（学校）	書庫	46	0.74	9.4	C	曇
		機械室	47	0.47	27.2	C	
		外気	48	0.38	−	−	
17	Qビル（事務所）	事務室	49	0.97	−	−	晴
		OAチャンバー室	50	1.56	−	B	
		外気	51	1.46	−	−	
18	Rビル（興行場）	機械室	52	1.00	−	B	晴
		小ホール	53	1.04	9.5	B	
		屋外	54	0.81	−	−	
19	Sビル（事務所）	外気	55	0.76	−	−	晴
		空調機械室	56	0.45	−	C	
		事務室	57	1.26	4.9	−	
20	Tビル（事務所）	ボイラー室	58	2.08	−	A	晴
		事務室	59	2.96	−	−	
		外気	60	0.77	−	−	

① 光学顕微鏡法（光顕法）による検討

光顕法として位相差顕微鏡による観察と並行して生物顕微鏡による検鏡を行ない，アスベスト様繊維のみを選択する方法が環境庁のアスベスト排出マニュアル[2]に述べられているが，今回の調査では位相差顕微鏡による計測のみで行なった．したがってガラス繊維，ロックウール等，位相差顕微鏡により選別できるものは除いたが，他の繊維状のものは測定値に含まれている．そのため表1の結果は総繊維数濃度又はアスベスト様繊維濃度として評価した方がよいと思われる．大気中のアスベスト繊維数を測定した環境庁の報告[2]によると，総繊維数濃度が1 f／L未満のときは，アスベスト繊維の占める割合が最も高く（90%），総繊維数濃度が高くなるにしたがって，その含有率は低い傾向にあるとしている．同様に大気中のアスベスト繊維を測定した久永らの報告[3]でもアスベスト様繊維が総繊維中に占める比率は42～81%，平均57%であったと述べている．大気環境中と室内環境ではこれらの比率が異なるものと思われるが，光顕法による測定値をアスベスト繊維濃度として評価する場合，これらの比率は参考になると考える．また，光顕法による繊維数の計測は，検鏡者による測定誤差が生じ易いと考えられたので，検鏡者間で読み取り方法の統一（視野のとり方，繊維状物質の本数の数え方等）を行ない，測定値は平均値を用い濃度換算を行った．

今回の結果より場所別アスベスト繊維濃度を示したのが表2である．事務室等の居室内は幾何平均値で0.89 f／Lで，最高値は2.96 f／Lであった．又，アスベスト

表2　測定場所別アスベスト繊維濃度

測定場所	試料数	アスベスト繊維濃度（f／L）	
		分布濃度	幾何平均
事務室等	20	0.15～2.96	0.89
機械室	20	N.D.～4.89	1.04
外気	20	0.19～2.83	0.63

註）N.D.：未検出

を防音，防火材として使用している空調械機室は幾何平均で1.04 f／L，最高値で4.89 f／Lであり，各建物の外気の幾何平均は0.63 f／L，最高値で2.83 f／Lであった．事務室等，空調械機室とも外気環境に比べるとやゝ高い傾向を示しているが，アスベスト繊維濃度の唯一の規制基準である作業環境の評価基準としての管理基準の2000 f／Lに比べると低値を示し，今回の測定値は基準値の1／500～1／10000程度であると言えよう．又，WHOが1986年に「アスベスト及びその他の天然鉱物繊維」の報告[4]を行っており，その中で一般大気環境と室内空気環境を調査した結果，両者のアスベスト繊維数は1～10 f／Lと報告しているが，今回の値はこれに比べても1／10以下であった．ちなみに環境庁が昭和61年に報告した測定データ[2]では建築物室内の濃度は幾何平均で1.03 f／L，建築物室外が1.25 f／Lであった．

建物の用途別に測定値を示したのが表3である．サン

表3　ビル用途別アスベスト繊維濃度

（f／L）

	事務室等	空調機械室	外気
事務所	0.86*	1.27	0.56
興行場等	1.73	1.66	1.17
店舗	1.04	2.47	0.87
学校	0.90	0.79	0.33
旅館等	1.53	1.43	0.81

*数値は幾何平均値

プルの数が少なく，また同数の試料でないので単純に比較するのはむずかしいが，事務室等の居室環境では，興行場等や旅館等が学校や事務所等に比べやゝ高い傾向にある．空調械機室のデータを吹付けアスベスト材の劣化の程度と繊維濃度との関係でみると，一番劣化の著るしいA状態の濃度が幾何平均値で2.16 f／L，B状態が1.43 f／L，C状態が1.07 f／Lを示した．数値的にもA，B，Cの順に濃度差がみられたことは，吹付けアスベスト材の劣化（損傷）の著るしい室内は，やはりアスベスト繊維による汚染の程度が高い傾向にあるものと考える．

光顕法は電顕法に比べると比較的容易に行なえるが，問題点もある．すなわち，調査地点の粉塵濃度によっては，同一時間の採塵を行なうとフィルター上の粉塵量が多すぎて，フィルターの透明化をさまたげ計測しにくくなる場合もある．そのため事前に粉塵濃度を把握し，採塵時間を決める等が必要であろう．

② 電子顕微鏡法（電顕法（TEM-EDX））による検討

TEM-EDX法は現在，アスベスト繊維の同定及び濃度測定には最適な方法であると言われている．今回環境庁の電顕法マニュアル[2]を準用し，観察倍率10000倍，観察網目数25ヶ所で計測した．光顕法で測定したアスベス

ト繊維数濃度は低く，測定場所も室内環境である等から，測定方法の変更を試みた．しかし，今回のTEM観察には長時間を要し，現在まで測定した試料は全試料の約1／3（22サンプル）である．今回の結果を繊維長分布として図1に示した．図からも明らかなように長さが0.5

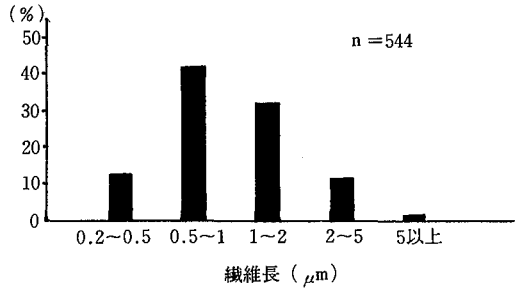


図1　TEMで観察されたアスベスト繊維の繊維長分布

～2 μmの繊維は74%を占め，光顕法での繊維長の対象である5 μm以上は1.4%にすぎなかった．言いかえれば，今回の試料中のアスベスト繊維の約99%が5 μm以下であることになる．環境庁報告の大気中浮遊アスベストの繊維長分布[2]においても，約90%が2 μm以下であった．

TEM法による結果を表1に示してあるが，TEM法の計数値を光顕法と同様に幾何平均を求めてみると，事務室等居室（n＝13）が7.5 f／L，空調械機室（n＝7）が16.0 f／L，外気（n＝2）が11.3 f／Lであった．

TEMによる室内アスベスト繊維数濃度についてのBurdettらの報告[5]によると，建物内平均アスベスト繊維数濃度は15 f／Lを越えなかったこと，また，繊維の同定の結果では5 μm以上の繊維状物質の大部分は非アスベスト繊維で，多くは硫酸カルシウム（石膏）であるとしている．今回の調査結果では事務室等居室内のアスベスト繊維濃度は7.5 f／Lと同程度であり，非アスベスト繊維の粒径域については測定しなかったが，アスベスト（主にクリソタイル）以外のものは硫酸カルシウム，ケイ酸カルシウムが多く，次いでガラス繊維，ハロイサイトが存在していることが認められた．アスベスト繊維の化学組成を検討した結果では，No. 35の試料を除いて全てが蛇紋石系のクリソタイル（温石綿）のみであった．なお，No. 35の試料はクリソタイルの他に角閃石系のアモサイト（茶石綿）が認められた．（写真4）

③　光顕法濃度と電顕法濃度の比較

今回の試料60のうち，光顕法及び電顕法によるデーターが得られたのは22サンプルであった．光顕法のデーターは対数正規型の分布を示したので，数値を対数値に変換し，電顕法の数値との単純相関を求めてみた．（図2），相関係数はr＝0.397となり危険率は10%以下で有

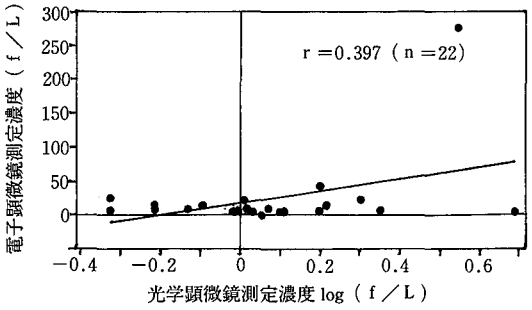


図2　アスベスト繊維濃度の光顕法と電顕法の相関関係

意ではなかった．環境庁の報告[2]でも同様な解析をしているが，両方法間の相関はほとんど認められないとしている．今回の結果から計測網目数を増加したことは，両測定値の関係を多少密接にしたものと思われる．また，光顕法と電顕法では，その使用倍率から対象となるアスベスト繊維サイズが異なるのは当然である．したがって，仮りにアスベスト繊維の長さ5 μm以上の測定値について光顕法がどの程度の信頼性を持つかを検討するには，TEMの倍率を2000倍にして光顕法の判定基準である5 μmのアスベスト繊維を計数する試みも一方法と考えている．

最後に今回の調査で観察されたアスベストのうち，試料No. 11，17，25，35の電子顕微鏡像とその繊維のEDXスペクトルを写真1～4に示し，試料No. 17，35の光学顕微鏡像を写真5に示した．

ま　と　め

今回，都内の20ビルの室内空気中アスベスト繊維について調査の結果，以下の知見が得られた．

(1)　光顕法による繊維数濃度としては，幾何平均値で事務室等が0.89 f／L，空調械機室が1.04 f／L，外気が0.63 f／Lと作業環境の評価基準値の1／500～1／10000，またWHOの室内空気中濃度の報告値に比べ1／10程度であった．

(2)　電顕法の観察から，調査試料中のアスベストの繊維は微小粒子が多く，約99%が5 μm以下の粒径域に分布していた．

(3)　今回実施した電顕法は計測に長時間（1サンプル，6～7時間）を要するが，少ない試料からもアスベスト

の同定が可能であり，観察網目数を増加したことで測定精度を高めた．

(4) TEM-EDX 分析より，アスベスト繊維以外の繊維状物質として硫酸カルシウム，ケイ酸カルシウムが多くみられた．

(5) 光顕法と電顕法による測定値の相関性は，今回 $r=0.397$（$n=22$, $p<0.1$）を得たが，標本の作成方法の違い，計数可能な粒子の粒径範囲の違いにより相関は低いと考える．

謝 辞 今回の調査で電子顕微鏡の測定について御指導，御助言をいただいた労働省産業医学総合研究所，神山宣彦氏並びに当所生活科学部，荻野周三氏に感謝の意を表します．

（本調査は昭和62年度東京都アスベスト問題プロジェクトの一部として実施し，その概要は日本公衆衛生学会第47回大会1988年9月で発表した）

参考文献

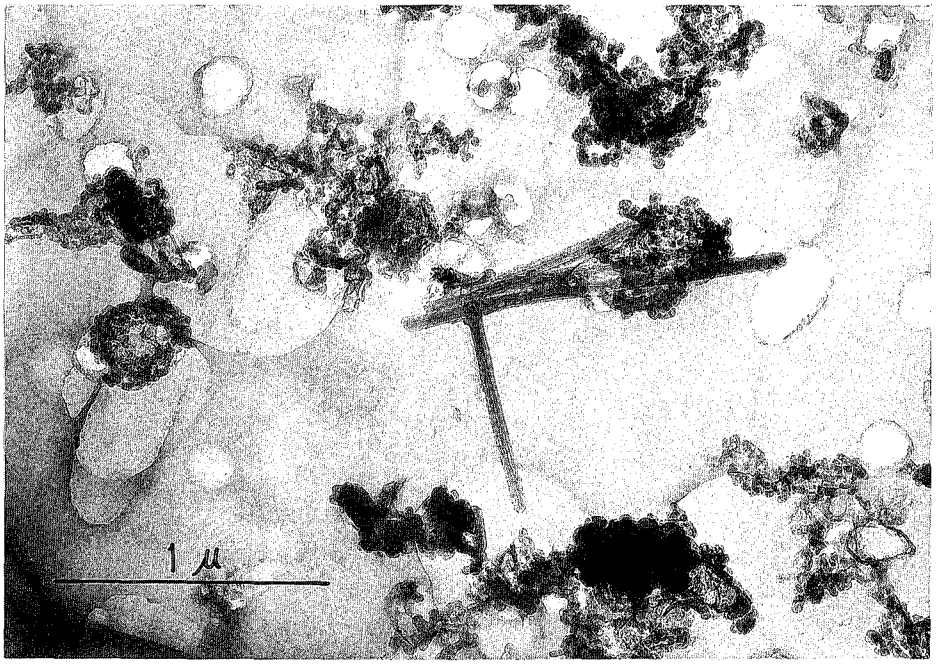
1）許容濃度の勧告（1986）：産業医学，28，229-230，1986

2）環境庁大気保全局大気規制課：アスベスト排出マニュアル，昭和60年3月10日発行，ぎょうせい

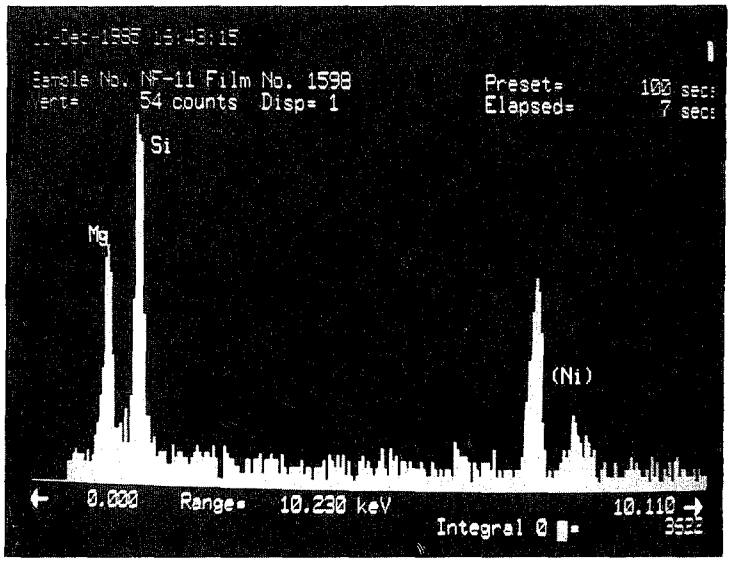
3）久永直見他：名古屋市内道路沿線空気中の石綿様繊維，産業医学，30，61，1983

4）WHO：「アスベスト及びその他の天然鉱物繊維」1986

5）Burdett, G. J. and Jaffrey, S. A. M. T.：AIRBORNE ASBESTOS CONCENTRATIONS IN BUILDINGS, Ann Occup Hyg, 30, 185-199, 1986

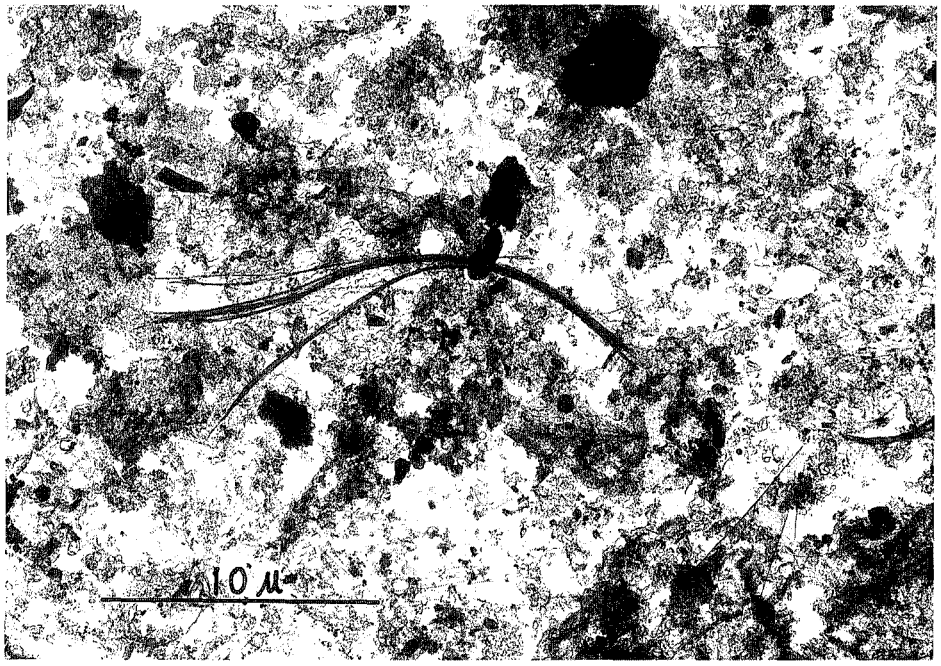


試料 No. 11の電子顕微鏡像　（×36,000）

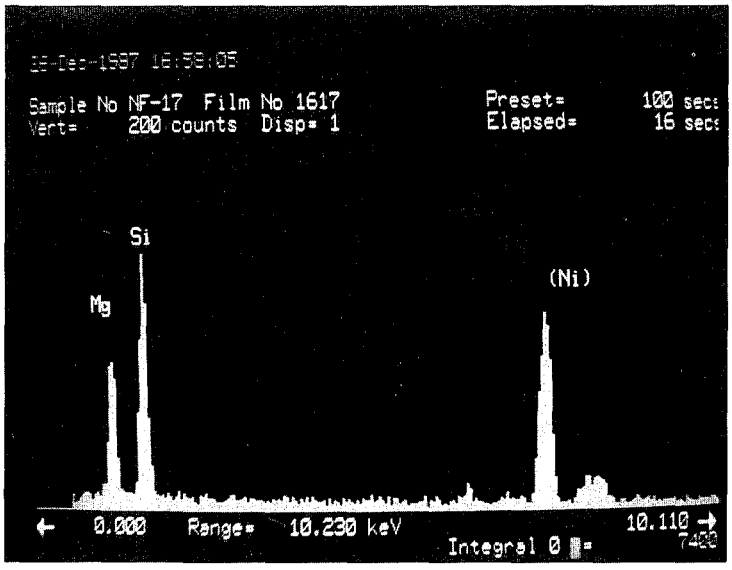


同　上　EDX スペクトル

写真　1

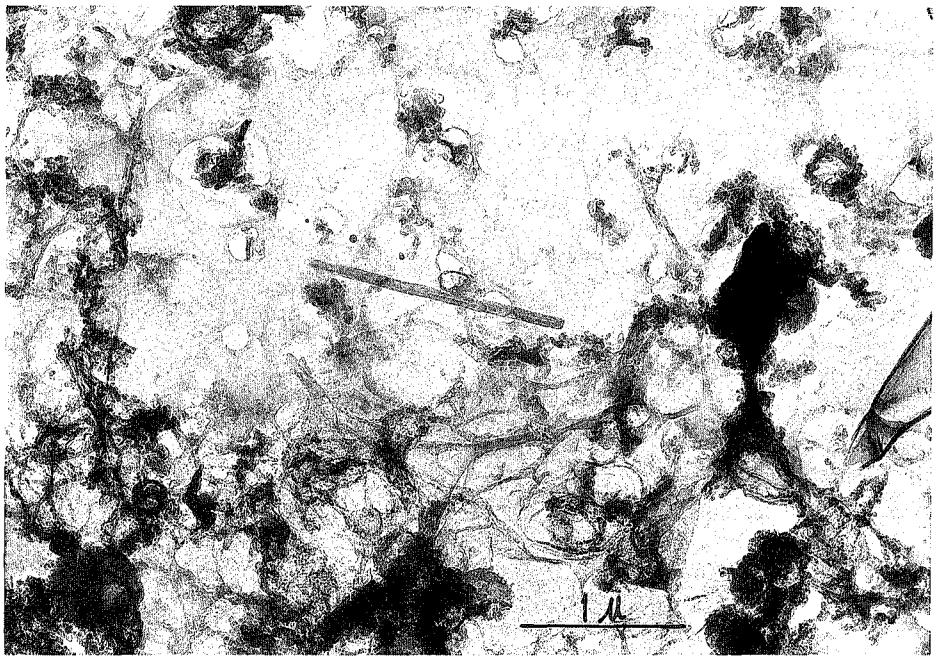


試料 No. 17の電子顕微鏡像　（×3,600）

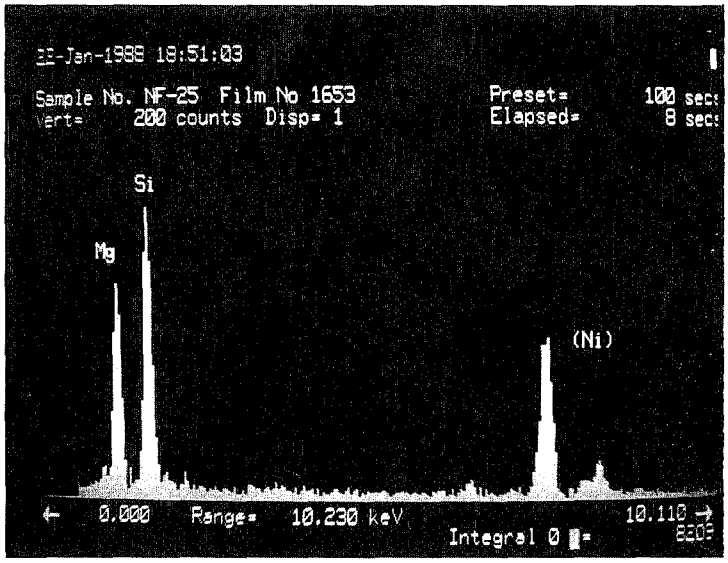


同　上　EDX スペクトル

写真　2

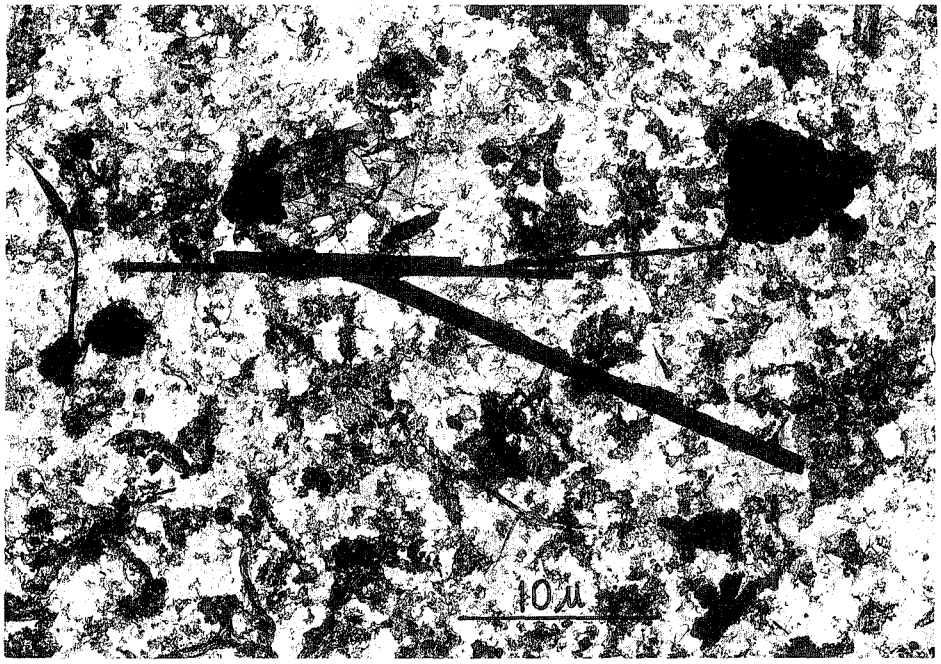


試料 No. 25の電子顕微鏡像　（×21,600）

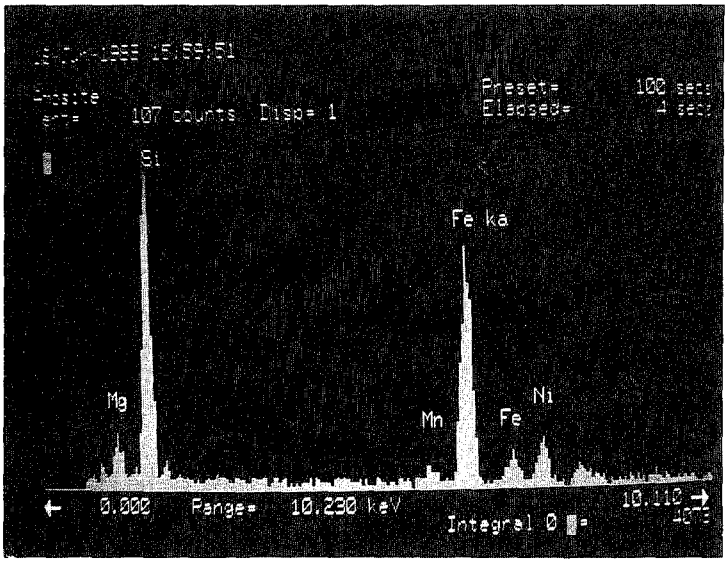


同　上　EDX スペクトル

写真　3

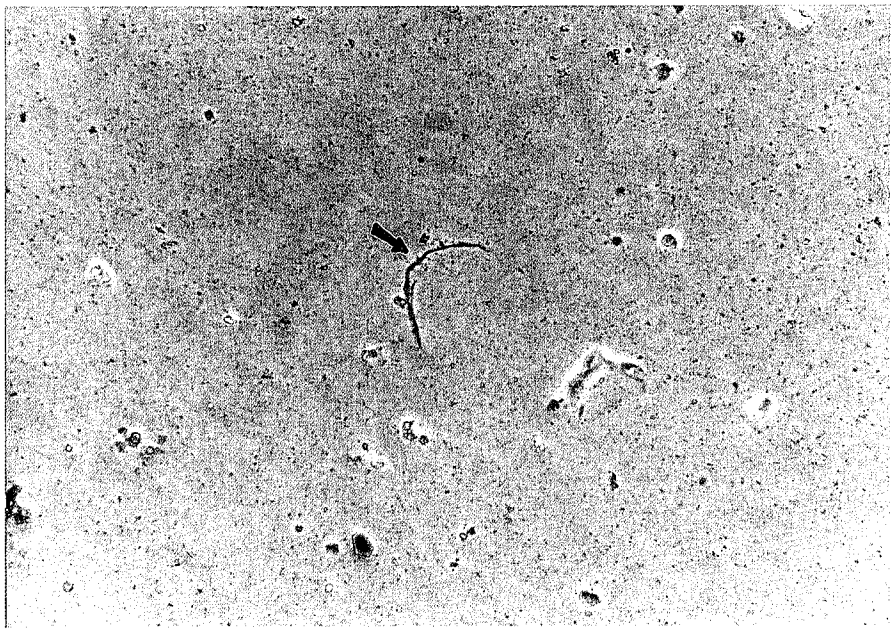


試料 No. 35の電子顕微鏡像　（×2,600）

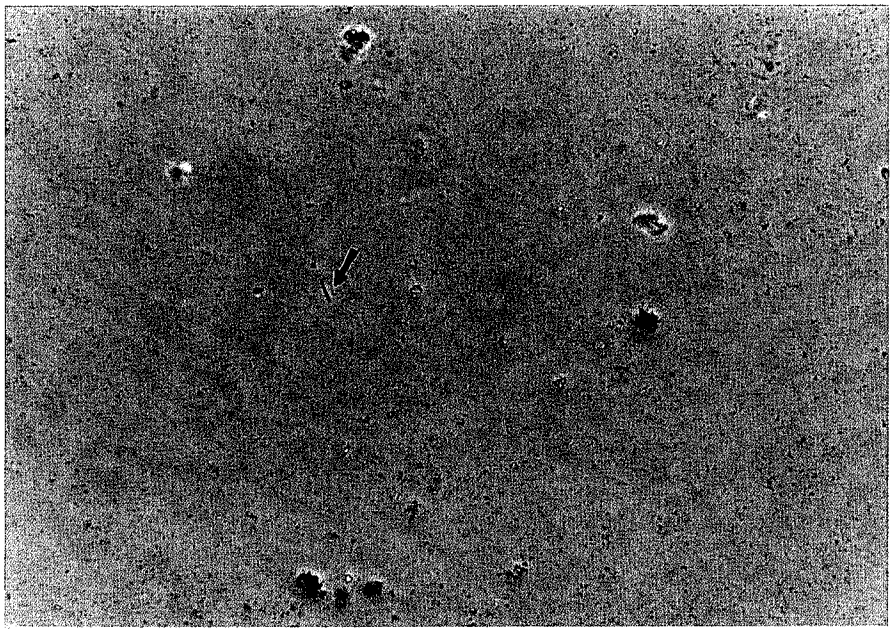


同　上　EDX スペクトル

写真　4



試料 No. 17の光学顕微鏡像　（矢印40 μ）

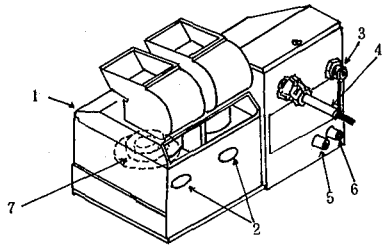


試料 No. 35の光学顕微鏡像　（矢印 5 μ）

数して，加湿水中の細菌数（cfu／ml）を求めた．

4）供試細菌の培養法

供試細菌は大腸菌 *Escherichia coli* IFO 3301およびセラチア *Serratia marcescens*（臨床分離株，順天堂大学より分与）の2菌種である．菌液はニュートリエントブロス NO. 2（OXOID 社）で10時間前培養菌液 1 ml を新しい培養液に接種し，その4時間培養菌液を希釈調整して実験に供した．浮遊細菌検出用の培地は，大腸菌はデソキシコレート寒天培地（栄研化学），セラチアは普通寒天培地（栄研化学）を用いた．なおセラチアについては実験前にあらかじめ King A培地（栄研化学）を用いて，30℃，24時間培養し色素産生能を確認した．



1：エリミホルダー　2：振動子　3：電磁弁入口
4：接続コード　5：排水管　6：オーバーフロー管
7：ヒートシンク（放熱板）

図1．超音波加湿器の構造

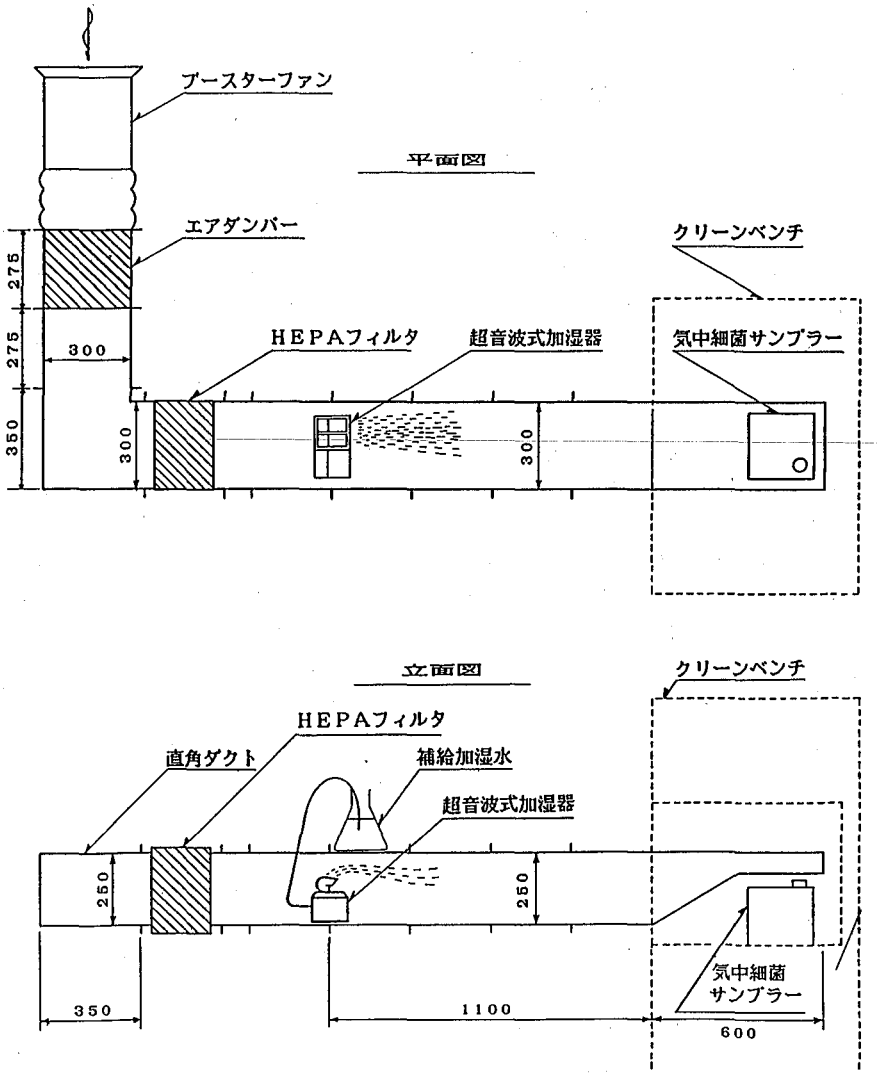


図2．実験装置図

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 225-230, 1988

超音波加湿器の細菌汚染に関する実験的研究

狩 野 文 雄*, 加 納 堯 子*

Experimental Study of Bacterial Contamination in Ultrasonic Humidifier

FUMIO KANOH* and TAKAKO KANOH*

Keywords：超音波加湿器 Ultrasonic Humidifier, 細菌検査 Bacterial test, セラチア *Serratia marcescens*, 残留塩素 residual chlorine, 殺菌作用 bactericidal action

緒　　言

冬季に室内空気の湿度を高めるために使用されている加湿器は，その構造上空気中の粉塵や微生物などの汚染を受けやすく，加湿水が空気中の粉塵や微生物などに汚染されると加湿とともに室内に細菌を飛散させる可能性があると指摘されている[1)2)]．今回我々は，空気調和機の系統内に組み込まれて使われる超音波式加湿器を用いて，加湿水からの細菌の飛散，並びに室内浮遊細菌の加湿水への移行および加湿水中の細菌数の変動などについて，モデル実験を行った．その結果，加湿器による室内空気の細菌汚染の程度とその汚染機構について若干の知見を得たので報告する．

実 験 方 法

1．実験機器

図1に示した超音波式加湿器（空調機用，WM-ENS1200タイプ）を用いて実験を行った．図の右側のユニットがコントロール水槽であり，フロートスィッチが電磁弁を作動させ，加湿水の水位を一定に調整している．左側のユニットは加湿器の霧化水槽であり，内部に装填された振動子が超音波を発生し，加湿水を霧化する．なお今回の実験で加湿水に生理食塩水を用いた場合は，加湿水槽（内容積392m*l*，面積130cm^2）へはサイホンによって，水道水を用いた場合は，加湿器の給水口と水道栓を接続させて給水した．空気はエリミネータ後方の吸い込み口から内部に直接導入され，霧化された水滴とともに，エリミネータ上方の吹き出し口から放出される．空気中に水分として放出される霧化量は，標準稼動の時，20m*l*／min である．

2．実験方法

1）実験装置

実験に当たり，吸入空気中に浮遊する細菌を除去する目的で，図2に示した実験装置を作成した．すなわち室内空気を吸入口からブースターファンによって吸引し，HEPA フィルター（集塵効率：99.99%，0.3 μ DOP，圧力損失：25.4mm H_2O 以下）を通過させて無菌の清浄空気として実験ダクト内に供給した．なお吸引空気量はファン後方のダンパーにより実際の空調機内で加湿器が稼動する時の風速2.5m／s（風量675m^3／h）に調整した．

2）実験装置の殺菌法

実験にさきだって装置内の殺菌を行った．消毒用エタノールを湿した脱脂綿により加湿器の内部および外部，ダクトの内部を拭いた．ふきとり後，HEPA フィルターで無菌化した空気で装置内部をパージさせて，アルコールを気化させた後，実験を開始した．

3）浮遊細菌および加湿水の細菌数の測定[3)]

浮遊細菌はダクトの吹き出し口に設置した気中細菌サンプラー（柴田科学器械 IP-30L）によって採取した．加湿器とサンプラーとの距離は1.7m とした．サンプラーの吸引空気量は30*l*／min であり，吸引時間は加湿水の細菌数に応じて調整した．実験後，浮遊細菌を採取した普通寒天培地（栄研化学）を30℃，24時間培養し，培地上に生育したコロニー数（以下 cfu. と略す）をカウントして，吸引空気量で除して，浮遊細菌数（cfu／*l*, cfu／m^3）を求めた．一方，加湿水中の細菌数は，標準寒天培地（栄研化学）を用いて混釈培養法により測定した．30℃，24時間培養し，培地上に生育した指標細菌であるセラチアと大腸菌の赤色の定型的コロニーのみを計

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　169　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, 169 Japan

5）加湿水中からの細菌飛散実験

加湿水中に指標細菌の一定量菌液を添加し，加湿器を稼動させ空気中に飛散してくる細菌数を測定した．すなわち種々濃度の菌液を調製して加湿水に加え，加湿器を稼動させ，一定時間毎に加湿水を無菌的に採取して菌量の増減をチェックするとともに浮遊細菌を気中サンプラーによって採取し，浮遊細菌数を測定した．

6）浮遊細菌の加湿水移行実験

室内浮遊細菌が加湿水中にどの程度移行するかを調べるため，ネブライザーを用いて実験装置内に一定濃度の細菌を飛散させて，一定時間毎に加湿水中の細菌数を測定した．浮遊細菌として，セラチアを用いた．

ネブライザーと加湿器の配置を図3に示した．両者の距離は，あらかじめ蒸留水を噴霧して水滴の飛散距離を測定して設定した．すなわち1：3の割合で混合した色素エオシンとタルクの粉末をろ紙に塗布し，これをダクト内に一定距離間隔に置き，噴霧実験を行い，水滴が直接加湿器の内部に入らない距離（ろ紙に赤色の水滴跡が生じない）を求めた．今回の条件では1.1m であった．ネブライザーは，50ml 容量の褐色瓶を用い，二連球により圧縮空気を送風した．噴霧回数は1～2回／分とし，噴霧液の減少量を噴霧回数で除して，1回の噴霧菌数を計算した．加湿水は，滅菌生理食塩水をサイホンにより，水道水は直接水道栓に接続して給水させた．

7）加湿水中の細菌数増減実験

加湿器を通常状態で稼動させた時，加湿水中の細菌数がどのように変動するかを調べた．すなわち，加湿水槽に一定菌数のセラチアを添加して，加湿器を稼動させ，一定時間毎に水中の細菌数を測定した．加湿水の補給は上記の方法により行った．

8）加湿水中の残留塩素濃度および温度測定

加湿水として補給される水道原水および加湿器を稼動させた後の加湿水（水槽中）の残留塩素濃度を，オルト・トリジン比色法により測定した．また，水温を加湿器稼動後，経時的に温度計により測定した．

実験結果

1）加湿水からの細菌飛散実験

加湿水中の細菌数と空中浮遊細菌数との関係を，図4に示した．今回の気中サンプラーの測定条件では，加湿水中の細菌数が，10^3～10^4cfu／ml になると，空気中に浮遊細菌が検出された．空気1 m^3当たりに換算すると，気中菌数は，10^2～10^3cfu／m^3であった．図4の直線を外挿し，浮遊細菌が検出される限界菌数を2菌種で比較してみると，大腸菌では加湿水の菌数は10^3cfu／ml のオーダーであり，セラチアでは10^2cfu／ml のオーダーであった．すなわち菌の種類により飛散の程度が異なる結果が得られた．特にセラチアの場合，加湿水中の細菌数が10^4cfu／ml 以下でも飛散細菌が検出され，大腸菌に比べて飛散しやすいことがわかった．従って，以下の実験結果はいずれもセラチアを用いたものである．

2）浮遊細菌の加湿水移行実験

空中浮遊細菌が加湿水中へどのように移行するかを調べた結果を図5に示した．ネブライザーの噴霧細菌数を二段階にして，移行実験を行った結果，浮遊細菌数に比例して加湿水槽中の細菌数が多くなることがわかった．すなわち，一回当たりの噴霧菌数を，2.3×10^7cfu にし

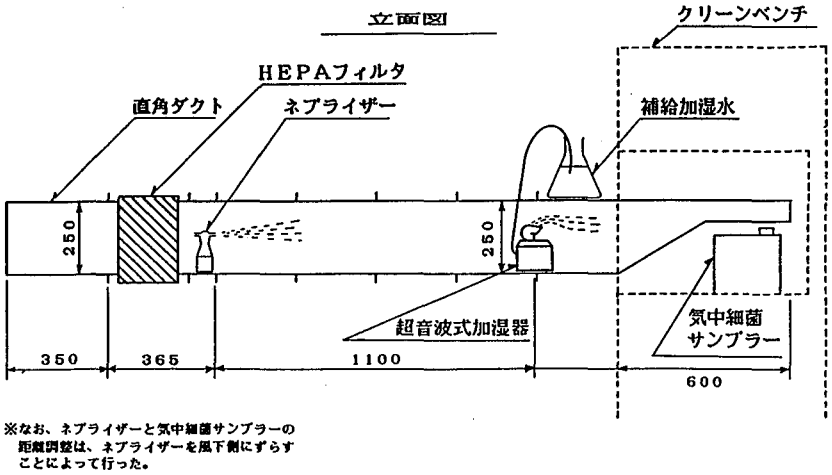


図3．実験装置図（細菌噴霧実験）

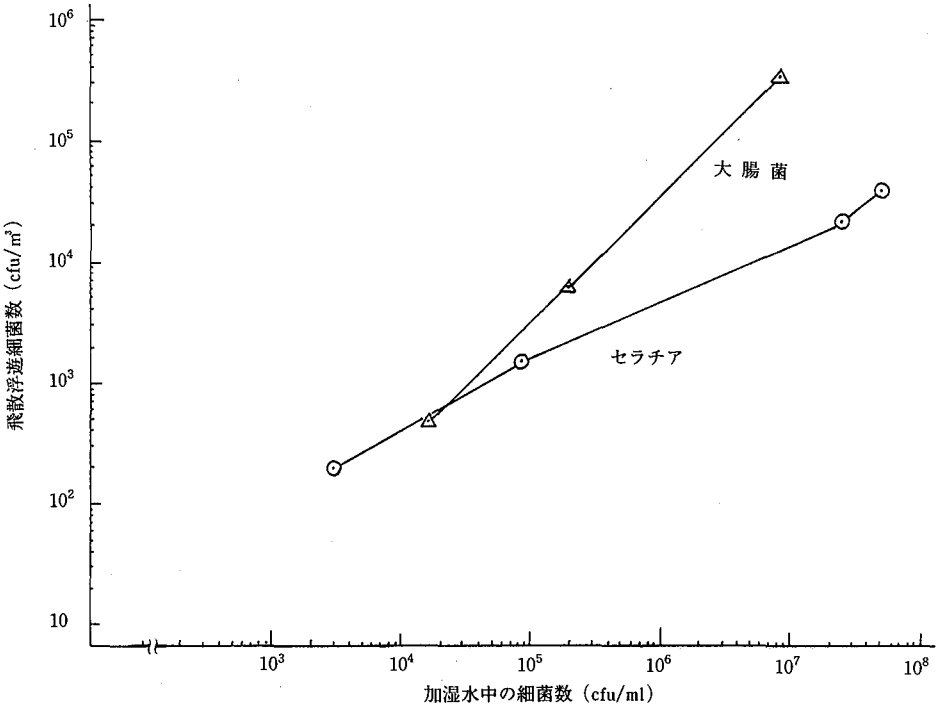


図4．加湿水中の細菌数と浮遊細菌数

た場合，経過時間15分から加湿水中に2.5×10^2cfu／mlの細菌が検出された．しかしそれ以後，加湿水中の細菌数はほぼ同レベルを維持した．噴霧菌数を1オーダー下げた場合，すなわち，8.1×10^6cfuでは，経過時間30分より，加湿水中に5.8×10cfu／mlの細菌が検出され，その後，菌数は1オーダー増加し，90分まで一定レベルに保たれた．次に滅菌生理食塩水の代わりに水道水を加湿水として補給し，噴霧菌数が1.3×10^7cfuの場合，30分経過後の加湿水の細菌数は6.5cfu／mlとなり，その後も10cfu／ml以下の一定レベルに保たれた．

3）加湿水中の細菌数増減実験

加湿水に一定量のセラチアを添加し，加湿器を稼動させて加湿水中の細菌数の変動を調べた結果を，図6にまとめて示した．図の中で，点線は加湿にともなう霧化によって減少する細菌数を希釈の項として微分方程式を計算したものである．すなわち，時間tにおける水槽中の

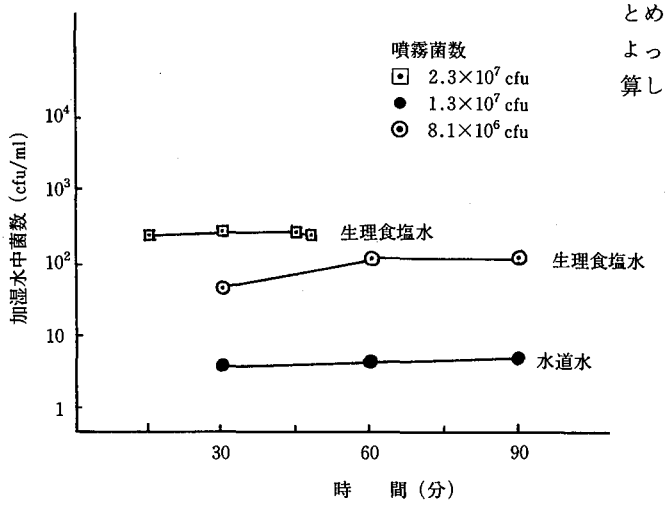


図5．浮遊細菌の加湿水への移行

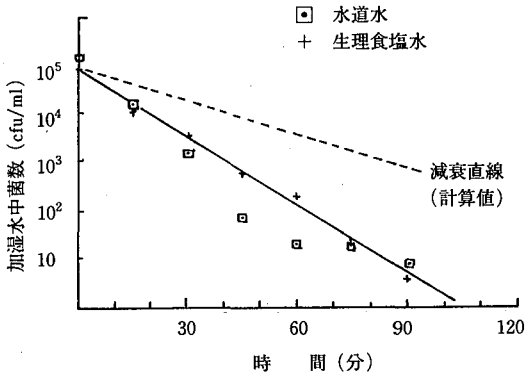


図6．加湿水中細菌数の時間変動

全菌数（cfu）Mと1 ml当たりの菌数（cfu／ml）Nとは，それぞれ次の式で表すことができる．

$$M=N_oV\times e^{-\frac{\alpha}{v}t},\quad N=N_o\times e^{-\frac{\alpha}{v}t}$$

ただし，ここで，N_o：添加菌数（cfu／ml），t：時間（分），V：水槽体積（ml），α：霧化量＝給水量（ml／min）である．

図6に見られるように，霧化による細菌数の減衰直線に比べて，実測した細菌数の減少率は，いずれの場合とも高かった．ちなみに，生理食塩水の場合，最小二乗法で直線の傾きを計算すると，lnN＝11.4－0.108tとなり，計算値lnN＝11.4－0.051tよりも勾配が約2倍急となった．一方，水道水の場合では，最小二乗法が適用できなかったが，経過時間60分で両者を減衰率で比較してみると，以下の式となった．すなわち，細菌数減衰率Z（％）は，Z_0を最初の添加菌数（cfu／ml），Z_1を時間tにおける菌数（cfu／ml）とすると，$Z=100-Z_1/Z_0\times100$となる．時間tを60分にした時，生理食塩水では53.5％，水道水では，74.6％となって，水道水の方が減衰率が高かった．

5）加湿水の残留塩素濃度および温度変化

加湿器を稼動させながら，一定時間毎に残留塩素濃度と温度を測定した結果，水道原水の塩素濃度が遊離，結合型とも0.1mg／lであったものが，30分経過後では，0.05mg／l以下となり，それ以後90分まで一定レベルであった．一方，水温は，原水が18℃であったが，加湿水槽内ではヒートシンクからの発熱により，急激に温度上昇し，15分後には26.5℃となり，それ以後は，一定レベルに安定した．

考　　察

1）加湿水からの細菌飛散について

加湿水槽中の振動子によって発生した1.7MHz（80W）の超音波は，平均粒径1ミクロン前後の水滴を発生させる[4]．この加湿器内に生じた霧（水滴）が空気の流れに運ばれて空気中の水分量を増し相対湿度を上げる働きをする．もしその時，水中に細菌が含まれていれば水滴とともに空中に飛散されることになる．今回の実験結果では飛散する細菌の気中菌数は加湿水中の細菌数に直接比例して増加することがわかった．したがって加湿器の維持管理に当たっては，加湿水中の細菌数を極力低くおさえることが重要である．

我々が過去に行った調査[5]や他の一般の事務所ビルなどの調査報告[6]によれば，人の居住する普通室内での平均浮遊細菌数は約0.1cfu／l，空調系統のフィルター通過後の下流側では約0.01cfu／lであった．これを空気1 m^3当たりに換算すると，室内の浮遊細菌数は約10^2cfu／m^3，空調系のフィルター通過後は10cfu／m^3となる．従って加湿器によって飛散される細菌数を10cfu／m^3以下に維持することが，空気の清浄化の面から望ましいものと思われた．本実験に用いた2菌種ではセラチアが大腸菌に比べ，水槽中の菌数が少なくても飛散しやすかったので，セラチアの加湿水中菌数の値を外挿して調べてみると，10～10^2cfu／mlとなり，危険率を見込んでも，加湿水の細菌数を10cfu／ml以下のレベルに保持しておけばよいことがわかった．

2）浮遊細菌の加湿水移行について

加湿水は補給する水道原水の微生物汚染の他に，空中の微生物の汚染をこうむる．今回我々が検討した結果では，図5の実験結果に見られるように，加湿水へ移行する細菌数は空中の浮遊細菌数に直接的に依存することがわかった．加湿器の構造から，空中浮遊細菌の加湿水への取り込み機構は2種類あると考えられる．すなわち吸引された空気が加湿水面上で接触する際に浮遊細菌が取り込まれる機構と加湿器内の壁部分で結露した水が浮遊細菌を水滴内に取り込み，この水滴が加湿水に滴下して加湿水を汚染する機構とが考えられる．今回一定時間毎に加湿水中の細菌数を追跡した結果では，加湿器の稼動直後（15～30分）の早い時期から細菌が検出されており，その後は経過時間にともなう加湿水中の細菌数増加は観察されなかった．菌数が一定のレベルに保たれていたのは，間欠暴露した浮遊細菌が加湿水へ継続的に取り込まれていることを示唆している．加湿水中の菌数増加が見られなかったのは，取り込まれた後，細菌が超音波による作用を受けて殺菌されていることが推測され，取り込みと殺菌との2つがバランスして，見かけ上一定レベルに保たれたものと推定された．さらに水道水を加湿水として用いた方が検出された細菌数が少なかったのは超音波の殺菌作用の他に水道水中の残留塩素による殺菌作用が加わったためであろう．また加湿器と同じ位置での浮遊細菌数は，噴霧細菌数が2.3×10^7cfuの時は17cfu／lであった．これを文献に引用されている普通室内での浮遊細菌数（10^2cfu／m^3）と比較すると，$1.7\times10^4/10^2=170$となり，今回の実験条件は室内空気の浮遊細菌数の170倍ということになる．すなわち今回の結果はかなり多量の細菌浮遊液を噴霧した実験下での成績であり，一般の室内および普通に管理された空調系統では実際はこのような高濃度の細菌汚染を受けることはないものと思われる．したがって実際の稼動状態での浮遊細菌の加湿

水への移行は考えられるものの，その数は少ないものと思われた．

3）加湿水中の細菌数変動について

加湿水中の細菌数は，計算から予測された減衰率を上回って減衰した．今回の実験から，加湿水中の細菌数の減少に，飛散および補給水により希釈される効果と超音波による殺菌効果のどちらがより効果的に作用したかについては明らかではない．しかし加湿水に細菌が補給されない限り細菌は減少することが確かめられた．ところで，超音波は細菌に対して機械的破壊作用と酸化作用を持つことが知られている[7]．それらの詳細な機構は不明であるが，細菌数の減少率は生理食塩水より水道水の方が高かったので，それらの効果に加えて残留塩素の作用が細菌減少に有効であることが推定された．

加湿水の残留塩素濃度は加湿水槽内では時間とともに減少する傾向のあることが認められた．超音波振動子による発熱による影響を受けたものと思われた．一般の水道水に比べてタンク水使用の水道水では，一般細菌以外の耐塩素性の従属栄養細菌が棲息しており，10^2～10^3 cfu／m*l* オーダーの菌が検出されている[8]．今後は，それら原水由来の細菌汚染をどのようにコントロールしていくかが加湿器の衛生管理上から問題となろう．さらに，加湿器が設置された場所のコンディションや非稼動時での維持管理などが問題となってくる．一般家庭で使用される加湿器は今回の調査機器とは構造が異なるが，類似の衛生問題が指摘されている[9]．これらの機器を含めて今後調査を継続していく予定である．

要　　約

今回我々が行った実験結果にもとづき，加湿器の衛生的管理について留意すべき点を以下にまとめる．

1．加湿水への浮遊細菌の移行は，空気中の浮遊細菌数に直接依存した．したがって加湿器の設置場所（フィルターの下流側）の空気清浄化の管理が必要である．

2．加湿水から飛散する浮遊細菌数は，加湿水中細菌数に依存する．そのため加湿水の菌数を10^2cfu／m*l* 以下にコントロールすることが重要である．そのためにはタンク水より水道水の方が望ましいものと思われる．もしタンク水を使用する場合には，給水口の前に原水の除菌対策が必要であろう．

3．加湿水中に捕捉された細菌は超音波の殺菌作用も加わって減少し，細菌数は一定のレベルに保たれたので，通常の稼動状態での細菌増殖はあまり起こらないものと思われた．しかし加湿器を長期間使用しない場合や，設置場所のコンディションの良し悪さによっては，細菌による汚染度は高くなる可能性も考えられる．従って非稼動時では，加湿水槽を空にして機器自体の汚染を防ぐなどの対策が必要であろう．

謝　辞　本実験にあたってのウェットマスター(株)研究室の山田重仁氏の多大の御協力に深謝します．

文　　献

1）菱山　仁：空気清浄，23(4)，1-8，1986．
2）滝沢敬夫，永井厚志，栗原　毅：日本医事新報，2904，9-14，1979．
3）古橋正吉：空気清浄，17(7)，19-25，1980．
4）Lang, R. J.：*J. Acoustical. Soc. America.*，34(1)，6-9，1962．
5）未発表資料
6）空調ダクト内汚染研究会：ビルメンテナンス，2，73-76，1988．
7）実吉純一，菊地喜充，能本乙彦：超音波技術便覧，844-850，1978．
8）古畑勝則，松本淳彦：東京衛研年報，34，282-289，1983．
9）尾家重治，弘長恭三，神代　昭：日本防菌防黴学会要旨集，53-54，1987．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 231-236, 1988

貸しおしぼりの洗濯消毒方法についての検討

狩 野 文 雄*, 小 山 勉 良*, 加 納 堯 子*

Study of Methods for Cleaning and Disinfection of Rental Wet Towel

FUMIO KANOH*, KATSUYOSHI KOYAMA* and TAKAKO KANOH*

Keywords：貸しおしぼり rental wet towel, 洗濯消毒法 methods for cleaning and disinfection, 次亜塩素酸ナトリウム Sodium hypochlorite, 電子レンジ microwave oven

緒　　言

貸しおしぼりの衛生的な洗濯処理およびその使用後の回収方法などに関する厚生省通達「おしぼりの衛生的処理等に関する指導基準[1)]」(以下指導基準と略す) がなされて以来，各おしぼり業者で様々な努力がなされた．その結果それらの衛生確保については一時期に比べて著しく改善されてきている．今回都内の某クリーニング業者からおしぼり検査の依頼とその洗濯方法についての相談を受けた．当業者のおしぼりは某旅客鉄道（株）が旅客サービスの一環として乗客に提供しているものである．使用後は速やかに回収され，24時間以内に洗濯処理工場へと配送される．当初，食堂車では使用していないことから，指導基準のあまり汚れのないおしぼりの洗濯方法に準じた指導を行った．しかし，その後夏季において付着細菌数の増加傾向が見られたので一部洗濯処理方法の見直しおよび竹内らの報告[2)]を参考にして，使用ずみの回収品（以下損品と略す）に付着した汚れと細菌を減少させる種々の洗濯方法を試みた．以下検討結果について報告する．

検 査 方 法

1）検体の採取

昭和61年4月から63年4月までの期間に当所に搬入された検体中，洗濯後の検体は，図1の洗濯工程の包装後から，製品は加熱処理後のものから無作為に採取したものである．損品は駅から工場へ回収されたものの中からそれぞれ無作為に採取した．期間中に搬入された総数は57枚，内訳は洗濯後検体28枚，製品13枚，損品16枚であった．

2）洗濯および消毒処理方法

洗濯は自動洗濯脱水機 WEⅢ-30V（アサヒ製作所）を用いた．当該機種の標準負荷量は29kg，おしぼりの枚数に換算すると約960枚であるが，実際は900±50枚で洗濯を行った．洗濯方法はマイコン制御のプログラムを変更し，図1に示す各方法で検討を行った．使用洗剤は非イオン系中性洗剤ランエース LP（花王）で，助剤はメタ珪酸ナトリウム9水塩（旭電化工業）を自動投入式で添加した．漂白および消毒は，12％濃度の次亜塩素酸ナトリウム液（鶴見ソーダ）の原液を希釈調整して，本洗およびすすぎ2回目に手動投入方式で添加した．図1の洗濯工程中排水後に中間脱水を行った箇所を＊で示している．また製品になる前の最終処理工程として電子レンジによる加熱処理を施した．加熱条件は庫内の製品が70℃以上に上昇する設定時間で処理した．今回の実験ではおしぼり48枚，初期温度25℃の場合，10分間であった．

3）細菌試験[3)]

採取した検体について，指導基準に準じた細菌試験を実施した．一般細菌は標準寒天培地（栄研化学）を用いた混釈培養法によった．大腸菌群は BGLB 液体培地（栄研化学）であらかじめ推定試験を行い，大腸菌群陽性のものについてはさらに確定試験を行った．すなわち大腸菌群陽性を示した BGLB 培地の1白金耳を EMB 培地（栄研化学）で分離培養後，生育した集落についてエンテロチューブⅡ（日本ロッシュ）を用いて菌種を同定した．黄色ブドウ球菌は2％卵黄添加マンニット食塩培地（栄研化学）を用いて分離したコロニーについて API STAPH システム（アスカ純薬）を用いて同定した．また2％卵黄添加 NGKG 培地（日水製薬）上に生育した

＊東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　169　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, 169 Japan

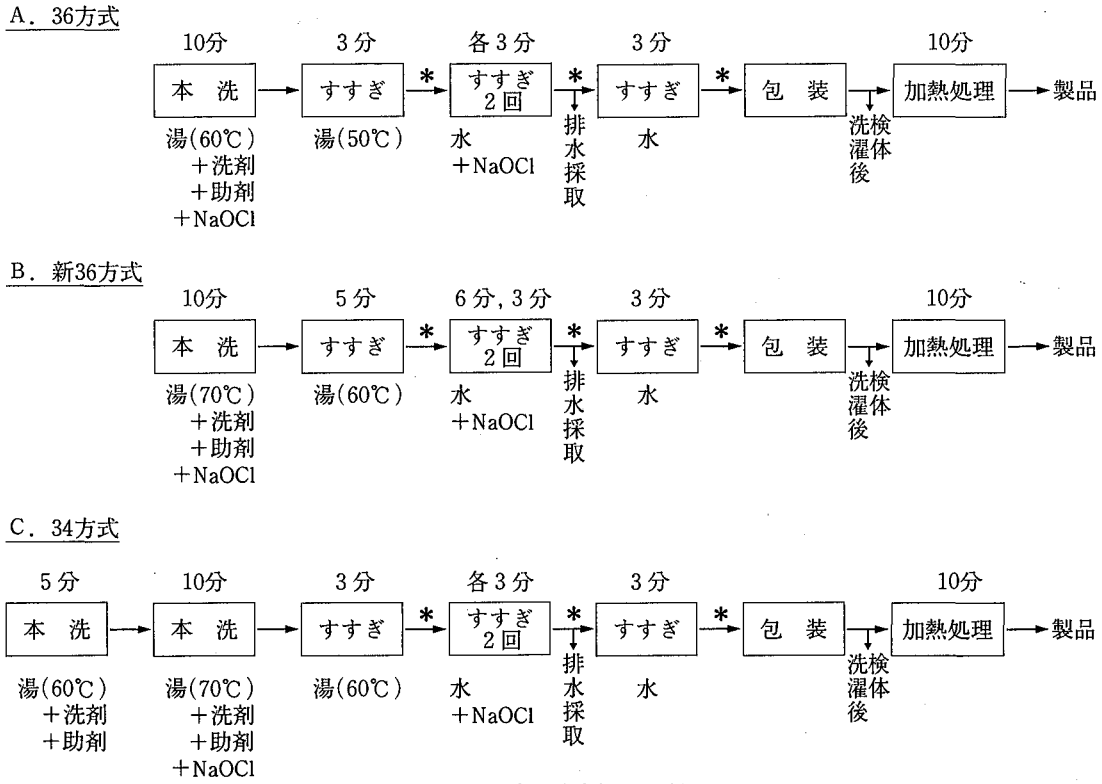


図1．洗濯消毒処理工程図

レシチナーゼ反応陽性のやや湿潤した粗型のコロニーを芽胞菌として計数した．

4）排水の遊離残留塩素濃度測定

指導基準に定められた洗濯工程中の遊離残留塩素濃度をチェックするために，洗濯機のすすぎ排水についてオルト・トリジンによる比色法を用いて遊離残留塩素濃度を測定した．検体採取はすすぎ2回後の排水より行った．

5）統計処理

洗濯消毒処理の各種方式と洗濯後検体の一般細菌数との関係を明らかにするために，分散分析の手法を用いて解析した．すなわち各要因についての一元配置分散分析表を作成し，F－分布表により得られた結果について統計的有意性を検定した．

結　　果

1）損品の一般細菌数および芽胞菌数

表1に全期間を通して見た損品の一般細菌数，芽胞菌数および大腸菌群，黄色ブドウ球菌の検出状況を示した．夏季冬季を問わず，一般細菌数は10^5個／枚を超えて多かった．次に図2に損品の一般細菌数と芽胞菌数の分布状況を示した．図を見ると夏季（6月から10月）と冬季（11月から5月）における両者の細菌数の分布状況にはあまり差が見られないことがわかった．損品の一般細菌数は夏季の幾何平均値が4.4×10^7個／枚，冬季が6.2×10^6個／枚となり平均値で夏季の方が1オーダー多かった．一方，損品の芽胞菌数は，夏季が8.0×10^5個／枚，冬季が3.3×10^4個／枚と一般細菌数よりもそれぞれ2オーダー少く，季節間では一般細菌と同様，夏季が冬季よりも多かった．なお損品の保管期間の違いにより付着細菌数に変動が見られることから[2]，今回は回収されて3日以内に検査したものの結果である．以上の結果，損品に付着している一般細菌数は年間を通じて幾何平均値で10^6～10^7個／枚であり，夏季と冬季であまり差が見られないことがわかった．

2）大腸菌群および黄色ブドウ球菌の検出率

表2に損品および製品からの両菌の検出率を示した．製品と洗濯後検体からは大腸菌群，黄色ブドウ球菌のいずれも検出されなかったが，損品からは両者とも検出された．また冬季に比べ夏季に検出率が高かった．表3に検出された大腸菌群の菌種と検出率を示した．損品の主な菌属は*Klebsiella*属，*Enterobacter*属であり，夏季の1

表1．損品の付着細菌数と各菌の検出状況

採取年月	61.5	6	7	8	9	10	11	12
一般細菌数	3.6×10^5	2.5×10^7	4.0×10^5	8.0×10^8	3.6×10^8	1.2×10^5	1.4×10^6	7.2×10^4
芽胞菌数	9.0×10^3	1.4×10^5	5.7×10^4	3.7×10^7	1.0×10^6	—	1.0×10^3	1.0×10^3
大腸菌群	検出せず	検出	検出せず	検出	検出	検出せず	検出せず	検出せず
黄色ブドウ球菌	検出せず	検出	検出せず	検出せず	検出	検出せず	検出せず	検出
採取年月	62.2	4	6	7	8	9	63.1	4
一般細菌数	7.8×10^9	5.1×10^6	1.7×10^{10}	1.3×10^6	1.3×10^8	6.1×10^8	2.5×10^5	1.0×10^9
芽胞菌数	7.2×10^6	3.1×10^4	1.9×10^6	1.0×10^5	1.9×10^6	1.5×10^6	1.3×10^5	1.6×10^5
大腸菌群	検出	検出	検出	検出せず	検出	検出	検出	検出
黄色ブドウ球菌	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず	検出	検出	検出	検出せず

表2．大腸菌群および黄色ブドウ球菌検出率

	菌名	大腸菌群		黄色ブドウ球菌	
		夏季	冬季	夏季	冬季
損品	検出枚数	6/9	4/7	4/9	2/7
	検出率(%)	66.7	57.1	44.4	28.6
製品	検出枚数	0/29	0/14	0/29	0/14
	検出率(%)	0	0	0	0

表3．大腸菌群の菌種および検出率（損品）

分離された菌種名	検出枚数/試料数	検出率(%)
Klebsiella pneumoniae	1/16	6.3
Klebsiella oxytoca	3/16	18.8
Enterobacter cloacae	5/16	31.3
Enterobacter aerogenes	2/16	12.5
Serratia liquefaciens	1/16	6.3
Escherichia coli	1/16	6.3

検体からのみ *Escherichia coli* が検出された．損品の黄色ブドウ球菌の検出率は大腸菌群に比べて低かったが，季節に関係なく検出された．分離した黄色ブドウ球菌はすべてコアグラーゼ試験は陽性で，API STAPH システムキットにより，*Staphylococcus aureus* と同定された．

3）洗濯後検体の一般細菌数および芽胞菌数

図3に全期間に採取した洗濯後検体の一般細菌数の分布状況を示した．検体数は少ないが1年の内，夏季と冬季とで細菌数の分布状況が異なることがわかった．すなわち夏季の方が一般細菌数が多く，10^5個／枚を超えるものが61年では夏季で14枚中5枚，冬季で6枚中1枚であった．その後，下記の洗濯消毒処理方法の検討結果をもとに一部方式を変更したことにより，一般細菌数が

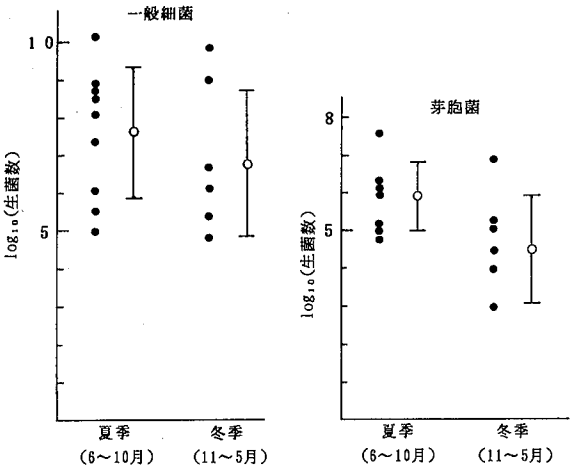


図2．損品の付着細菌数の分布

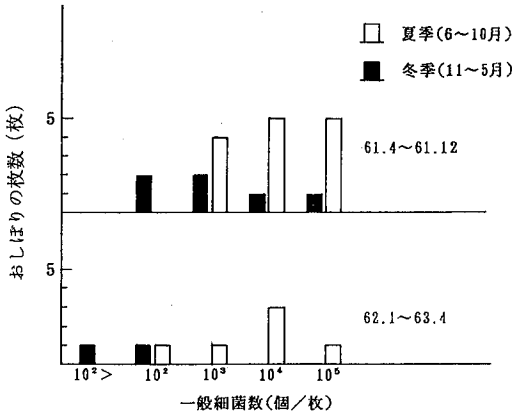


図3．洗濯後検体の付着細菌数の分布

表4．洗濯処理方法と一般細菌数との関係

一般細菌数　個／枚

処理 / 洗濯方式	遊離残留塩素220ppm 以下		遊離残留塩素220ppm 以上	
	加熱処理有	加熱処理無	加熱処理有	加熱処理無
A．36 方式	3.5×10^4 5.3×10^3 7.0×10^2	3.5×10^5 4.7×10^5 1.6×10^4		
B．新36方式	3.9×10^4 1.7×10^3 3.7×10^3	5.3×10^4 4.1×10^4 1.6×10^5 7.1×10^4	1.0×10^2 2.0×10^3 2.0×10^2	2.0×10^2 1.0×10^2 1.2×10^4
C．34 方式		4.3×10^3 8.2×10^3		1.3×10^4 1.1×10^4

ただし，検体は夏季（6月から10月）のみから採取した

10^5個／枚を超えたものは，62年以降は夏季では5枚中1枚，冬季では0枚となった．一方，表には示さなかったが，芽胞菌数は全期間を通じて10^3個／枚以下であった．

4）洗濯消毒処理方法と一般細菌数との関係

表4に61年夏季に実施した洗濯処理方式と洗濯工程後と加熱処理工程後より採取した検体の一般細菌数との関係を示した．洗濯方法は図1に示した3方式であり，消毒処理方法の有効性は，すすぎ2回目の遊離残留塩素濃度の実測値の増減で比較した．消毒に有効な塩素濃度（250ppm）を保持するために次亜塩素酸ナトリウム投与量をどの程度にしたらよいか検討した結果を図4に示した．ここの実測塩素濃度はすすぎ2回目の排水で調べた結果である．なお，従来の36方式では，本洗1，すすぎ1の割合で投与していたが，新36方式では本洗1，すすぎ2の割合に増やし，その方が消毒に有効であることがわかった．実測された遊離残留塩素濃度は220ppm を境にして以下の群と以上の群とで比較した．それとともに電子レンジ加熱処理を行ったものと行わないものとで比較した．分散分析は一般細菌数を log 変換した値〔$\log_{10}$（生菌数）〕で計算し，各要因についての有意性を検討した．表5に各要因間の分散分析表を示した．表に見られるように洗濯方式間，すなわち36，新36方式と34方式との間で5％危険率で有意の差が認められた．また遊離残留塩素濃度間では，220ppm を境にして1％危険率で有意な差があることが認められた．さらに加熱処理間で1％危険率で有意な差が認められた．

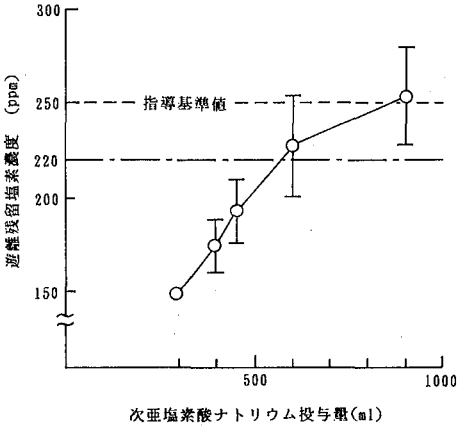


図4．消毒剤の投与量と遊離残留塩素濃度

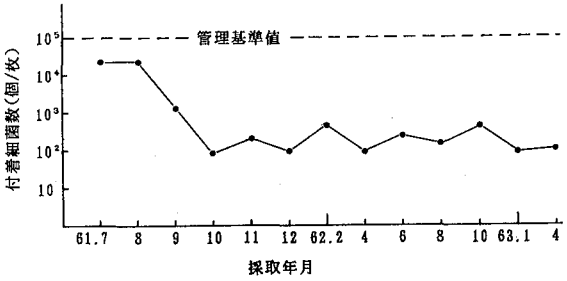


図5．製品の付着細菌数の年間変動

5）製品の一般細菌数の年間変動

当該業者のおしぼりは旅客に提供される前に必ず加熱処理されているが，そのおしぼりの一般細菌数の年間変動を図5に示した．61年の夏季に若干多かったが，上記の検討結果にもとずき，最適な条件で洗濯消毒処理を行った結果，それ以後は夏季と冬季のいずれとも，一般

表5．各要因間の分散分析表

要　因	偏差平方和	自由度	分　散	分散比	確　率
方　式　間	2.38	2	1.19	4.59*	$p<0.05$
群　　内	1.56	9	0.26		
全　　体	5.72	11			
					F^2_9 (0.05) =4.26
要　因	偏差平方和	自由度	分　散	分散比	確　率
塩素濃度間	7.22	1	7.22	13.24**	$p<0.01$
群　　内	2.73	12	0.55		
全　　体	9.94	13			
					F^1_{12} (0.01) =9.33
要　因	偏差平方和	自由度	分　散	分散比	確　率
加熱処理間	4.81	1	4.81	12.87**	$p<0.01$
群　　内	4.11	12	0.37		
全　　体	8.92	13			
					F^1_{12} (0.01) =9.33

細菌数を1.0×10^2個／枚のレベルに保つことができた．

考　　察

貸しおしぼりの衛生確保のためには，汚れの度合に応じた適切な洗濯方法と塩素消毒が行なわれなければならない．そのためには使用済みおしぼりの汚染程度，すなわち付着細菌数と細菌の栄養源である有機物質の量を把握し，それに対応した洗濯機の選択および洗濯方法と消毒処理等が適切に行なわれてはじめて衛生的なおしぼりの確保が可能となる．おしぼりの衛生管理において，これらは種々な要因で相互に関係しているばかりでなく，それらの適不適がおしぼりの品質に直接影響を及ぼしてくる．今回我々が過去2年間に渡って，実際のおしぼり洗濯工場からの検体を用い，また洗濯現場で洗濯方法について検討を行った結果，以下に示したいくつかの管理点が重要であることがわかった．

1）損品の回収および洗濯方法について

おしぼりは使用後速やかに回収され24時間後には洗濯工場へと配送されてくる．それらはただちに洗濯されるわけであるが，回収曜日により多少保管期間が延びることもありうる．損品は使用後も湿潤した状態のままで放置されているので，その段階での細菌の増加が考えられる．そのためできるだけ早く洗濯処理されることが望ましい．特に夏季では気温も高く，細菌増殖の好条件がそろっており，洗濯処理までの時間を要する場合は，冷暗所に保管するなどの細心の注意が必要となる．今回の検査結果から当該おしぼり業者の回収後損品の一般細菌数は夏季と冬季とで多少の変動はあったが，おおよそ10^6から10^7個／枚であった．従って製品の指導基準をクリアーするためには，細菌数を2～3オーダー減少させればよいことになる．

ところで，おしぼりの主たる汚れである人体からの分泌物（汗，皮脂，垢）などは細菌の栄養源であるとともに，蛋白質性の汚れが細菌を保護することともなり[4)5)]，まずそれらの汚れをいかに落とすかが塩素消毒効率の成否を左右することになる．しかもそれらの汚れは夏季のほうが冬季に比較して数倍と多いため，今回我々は夏季の洗濯方法について検討した．その結果夏季の洗濯方法としては，遊離残留塩素濃度が220ppm 以下の条件では，36方式とそれの改良方式，すなわち湯温を70℃とし，すすぎ2回目の時間を6分と長くした新36方式よりも本洗を2回とした重複方式（34方式）の方が除菌効果において優れていることがわかった．すなわち本洗を2回行って蛋白質性の汚れを落とすことの方がその後の塩素消毒に有意の効果をもたらすことがわかった．

2）除菌に有効な遊離残留塩素濃度について

今回消毒に使用した次亜塩素酸ナトリウムは従来より洗濯物の漂白と消毒との両方の目的で使用されている．本洗の漂白では洗濯物に付着している多量の有機物質の

ために塩素が消費されてしまい，消毒としては有効に働かない．すすぎ2回後の排水について遊離残留塩素濃度を調べた図4に見られるように投与量は同じでも実測される値は大きく変動している．（たとえば，次亜塩素酸ナトリウム液600ml の場合，200～250ppm）．ところですすぎの水量は高水位で210l であるので，以下の式で塩素投与量が計算できる．すなわち，$X\,ml \times 0.12 \times \frac{1000}{210} = 250ppm$，$X = 437.5ml$．すなわち有効塩素濃度を保持させるための投与量は450ml で十分であるが，夏季ではそれの2倍量に当たる900ml を投与する必要があることがわかった．以上のように損品の回収状況や汚染程度によって遊離塩素濃度は変動しているので，ある程度の危険率を見込んで高目に設定しておく必要があろう．以上の検討にもとずき，新36方式で220ppm 以上に塩素濃度を保持させた結果，除菌効果が高まり，34方式とも差が見られなくなった．従って夏季の汚れのひどい時は両者を併用して洗濯消毒処理し，細菌数を顕著に減少させることができた．

3）電子レンジ加熱処理効果について

最終処理の加熱処理は付着細菌数をかなりの程度減少させることがわかった．すなわち洗濯および塩素消毒後でもなお残存する細菌の多くは，かなりの傷害を受けていることから，電子レンジの加熱処理で容易に死滅したものと思われた．加熱による殺菌作用に加えて，洗濯物に残留している遊離残留塩素が殺菌に有効に作用すること，さらにマグネトロンの電磁波による分子振動作用の直接的な細菌破壊による殺菌も考えられる．なお電子レンジによる殺菌効果を滅菌インジケーター（栄研滅菌テスパーG，S）を用いて試験したが，結果は陰性で効果は見られなかった．実際には電子レンジの使用はあくまでも旅客に温かいおしぼりを提供することが目的であり，殺菌を考えているものではない．しかしながら，今回ある程度の除菌効果が見られたことから，何らかの方法で最終処理として加熱を行うことは有用であるものと思われた．

要　約

1，おしぼりの製品段階での一般細菌数を減少させるためには，すすぎ2回目での遊離残留塩素濃度を有効濃度（250ppm）に保持させることが重要である．

2，洗濯方式中に損品の蛋白質性の汚れを十分に落とす過程が必要であること，そのためには夏季では本洗を2回にする重複方式が有効であった．

3，加温のために使われている電子レンジ処理による除菌効果が認められた．

4，以上の結果にもとずき，洗濯消毒処理方式として，夏季には新36方式と34方式を併用し，製品段階での一般細菌数を年間を通じて1.0×10^2個／枚のレベルに保つことができた．

謝　辞　本調査にあたり多大の御協力をしていただきました中央リネン（株）横浜工場の方々，なかでも中央事業社の小川柳三郎氏に謝意を表します．

文　献

1）厚生省：環指第157号，1982
2）竹内　潮，関　春雄，大古理明：日本公衛雑誌，32 (6)，275-285，1985.
3）日本薬学会編：衛生試験法注解，1243-1269，1980.
4）墨田区本所，向島保健所報告(1)，(2)，1978-1979，.
5）村瀬　誠，加納堯子，竹内　潮：防菌防微誌，14 (9)，473-483，1986.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 39, 237-244, 1988

Effects of a Dehumidifier on Mites and Fungi

MIDORI YOSHIKAWA*, TOMOAKI WAUKE* and SATOSHI MOROZUMI*

Dehumidifiers were used to control mites and fungi in both a closed house, where they were kept running continuously for 2 weeks and cleaned at 2-3 day intervals, and 5 inhabited houses where they ran for at least 10 hours a day for 2 months and the rooms were cleaned as usual. The residents in the inhabited houses where at least one person stayed at home almost all day were told to keep the test rooms closed continuously as long as possible and not hang wet laundry there.

Mites were extracted by a floating-centrifuging method from floor dust which was collected weekly in the closed house and monthly in the inhabited houses. Fungi from floor dust in the closed house and fungi from both floor dust and air in the inhabited houses were collected at the same intervals as the mites, and were investigated by being inoculated on potato dextrose agar with chloramphenicol or with glucose.

Large reductions of mites and fungi were found in the closed house, while no changes were found in the inhabited houses in which the test rooms were sometimes open or we sometimes observed laundry haundry hanging. This data suggested that a house had to be closed for several days or several hours a day continuously in order for a dehumidifier to dry rooms enough and to cause a decrease of mites and fungi, otherwise no effects appeared as shown in the inhabited houses.

Keywords : mites, fungus, fungal spore, dehumidifier

Introduction

The mite Pyroglyphidae causes allergic asthma and rhinitis in humans by inhalation into the trachea and nasal cavity, and the mite Cheyletidae bites humans causing dermatitis when large numbers of these mites breed in a house[1-4]. Furthermore, fungi such as *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* and *Penicillium* also cause allergic asthma in humans the same way as pyroglyphid mites; and most kinds of fungi can cause spoilage of various foods[5-7]. Breeding of these mites and growth of fungi have been reported to be related to temperature and humidity. Appropriate ranges are 20-30℃ and 56-90% R. H. for mite breeding, and 5-40℃ and 60-90% R. H. for fungal growth[8-10]. Although the temperature cannot act as a definitive factor in an inhabited house since the range covers an area appropriate for humans, humidity may be controlled in an inhabited house as most mites and fungi, even pyroglyphid mites and such xenophilic molds as *Wallemia* and *Eurotium* which grow under lower humidity than other kinds, cannot survive under 50% R. H.[9-11] From these data, it seems reasonable to control mites and fungi simultaneously by keeping lower humidity in an inhabited house.

To use a dehumidifier is one way to keep humidity low in a house. However, for controlling these organisms using the dehumidifier there is a few data such as one of the authors who reported that mites decreased and dermatitis caused by Cheyletidae disappeared in a dual-income family whose house was completely closed for at least 10 hours every day during which time the dehumidifier was continuously used for a month[12]. So the authors investigated how the dehumidifier affects their reduction in an inhabited house where at least one person stayed at home daily. The investigation was performed to see : 1. changes of mites and fungi on floor surfaces while using a dehumidifier in a closed house, which was tested as a control, and 2. these and air-born fungal changes while running the dehumidifiers in 5

*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

houses where residents led ordinary lives and at least one person stayed at home every day.

Materials and Methods

1. Investigation in a closed house

A dehumidifier for a room with 6 tatami-mats ($9.9m^2$) was set in each of 3 rooms in an apartment house with a space of about 40 m^2, located on the 5th floor, 15 years after construction, in October 1985 in the Tokyo area. The apartment house had been closed for 3 years without inhabitants before this test was begun. There were 2 tatami-rooms with 4.5 (A) and 6 (B) mats, and a kitchen (C) of PVC (Poly-vinyl Chloride) tiled floor. Two sections of 1 m^2 in each room were selected for the test, such as a center section of 1 m^2 and a corner of 1 m^2. All tatami-mats were changed to new ones, and we checked for the presence of fungal colonies with our naked eyes and then all floors were cleaned by a vacuum cleaner 1 day before our test was started.

Before starting to run the dehumidifier, dust samples were collected by a vacuum cleaner from a 1-m^2 area in 3 minutes in each room, inserting a core of porous paper into the distal end of the vacuum cleaner as a repository for dust collection. These samples were used as "before". The dehumidifier started to run as soon as the first collection was finished. After this step, the rooms were cleaned at 2-3 day intervals and water absorbed from the air into the dehumidifier was removed every day. One week after the first collection, the 2nd collection was performed (1st week), followed by the 3rd collection at 1 week after the 2nd (2nd week).

Each dust sample collected from 1 m^2 was subdivided exactly into 3 by weight in order to investigate mites, fungi, dust components and environmental conditions in which only room temperature and humidity data were used in this report. For the mite test, each dust sample was mixed well with saturated NaCl and a drop of detergent, followed by centrifuging and then filtering the supernatant on a filter-paper. Mites on the paper were identified under a dissecting microscope. Mite numbers were multiplied by 3 to calculate the number collected from 1 m^2. Those numbers were compared to each other using real numbers in Tables and logarithmic numbers in Figures.

For the fungus test, 50 mg of dust was taken from 1/3 of the dust collected from 1 m^2. This was well mixed with 50 ml of physiological saline to which Tween 80 was added at concentration of 0.01% volume of the saline. The above mixture was diluted 100 and 1000 times each with the physiological saline. When dust weight was less than 50 mg, all dust was mixed with the physiological saline keeping the concentration to 1 mg dust per 1 ml of the saline.

One ml of the 100-factor dilution was inoculated both on the surface of potato dextrose agar (PDA) added chloramphenicol at concentration of 100 μg per 1-ml PDA, and on the surface of PDA added glucose at concentration of 25% volume of PDA. The same procedures were repeated with the 1000-factor dilution. The inoculated media were kept at 25% for 7 days. Fungi were then identified and counted under a dissecting microscope, and then fungal numbers were calculated for 1 m^2. The real and logarithmic numbers were used as in the mite test.

2. Investigation in 5 inhabited houses

Five houses, 3 apartments and 2 detached houses in Tokyo Metropolitan, Kanagawa, Chiba and Saitama prefectures, were selected and a dehumidifier was placed in a room of a house in August through October in 1987, where at least one person stayed at home almost all day. In each house, 2 rooms which had the same flooring materials and were about the same size (6 mats) were used for the test, 1 room with a dehumidifier and the other without. The flooring materials were tatami-mats in 4 houses and carpet in one. The rooms with the dehumidifiers were divided by motar wall round the rooms except for aluminum-glass windows shut off from the outside in 5 houses and wooden doors from the next rooms in the all houses except house 3 which was divided by 2 fusumas (sliding wooden door). Presence of fungal colonies were also checked in these houses in the same manner as Investigation 1.

Dust collection technique for mites was also the same as Investigation 1. Before starting to run the dehumidifier, dust was collected from 1 m^2 of the center section in each of 2 rooms in a house (before), then the dehumidifier was started and kept running for at least 10 hours in a day. All residents led ordinary lives except for keeping the room with the dehumidifier closed as

much possible while the dehumidifier was running and not hanging wet laundry in the test rooms. One month later, dust samples were collected again from center sections of the same rooms in each house (1st month), followed by the 3rd collection at 1 month after the 2nd (3rd month).

All dust collected from 1 m^2 was used for mite investigation. In this test, the dust was passed through 16- and 200-mesh seives before the centrifuging process shown in Investigation 1. Mite identification, calculation and comparison were performed in the same manner as Investigation 1.

For fungal investigation, dust was collected from another 1-m^2 section and processed the same way. Air-born fungi in rooms where dust was collected were also checked in this test before vacuuming any dust. The method for testing air-born fungi was that the air was imbibed into a millipore filter (MHWG-37) for 10 minutes by a mini pump (MP-2CFN type) totaling 25 liters of air. Fungus on the filter was inoculated by plac-

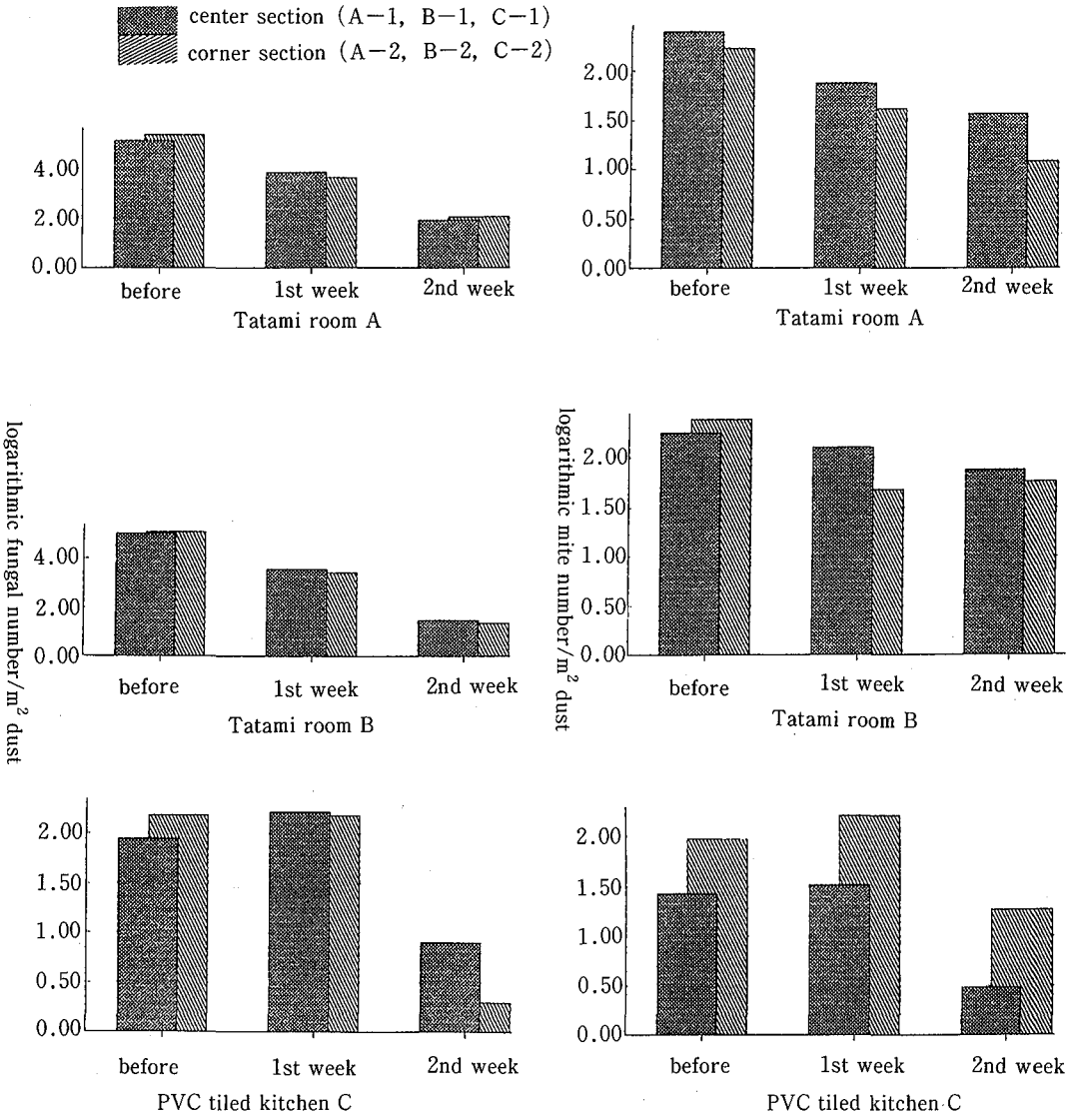


Fig. 1. Changes of Mite (right) and Fungal (left) Numbers in Center and Corner Sections of a Room before and 1-2 Weeks after running Dehumidifiers in a Closed House.

ing it on the surface of culture medium of PDA containing 25% glucose, and then the medium was kept at 25℃ for 7 days. Fungal identification, calculation and comparison were performed as same as in Investigation 1.

Results

1. Investigation in a closed house

Tatami-rooms were kept at temperature and humidity levels of 22-27℃ and 40-50% R. H., while the kitchen was under about 21-27℃ and 40% R. H. after running the dehumidifiers. Temperature became a little higher but humidity became lower than while the rooms was closed since these rooms were maintained at 23-26℃ and 60-80% R. H. when closed. No fungal colonies were found on any sections of the rooms including a wash room.

Mite and fungal numbers showed similar declines at 1st and 2nd week after running the dehumidifiers when compared with the numbers collected before the test in both the center and corner sections of tatami-rooms, while the numbers did not change or increase at the 1st week but decreased at the 2nd week in both sections of PVC tiled kitchen (Fig. 1).

Mites of Tarsonemidae, Acaridae and Others decreased dramatically in number in the tatami-rooms, and mites of Pyroglyphidae decreased to 1/40 in PVC tiled kitchen (Table 1). All genera of fungi also dramatically decreased both in tatami-rooms and PVC tiled kitchen, showing about 1/2000 reduction in real numbers in tatami-rooms and 1/45 in the kitchen (Table 1).

2. Investigation in 5 inhabited houses

No changes of mites were found in tatami (No. 1-4) and carpeted (No. 5) rooms with dehumidifiers in apartment (No. 1, 3, 4) and detached (No. 2, 5) houses except in house 2, while mite numbers including Tarsonemidae, Cheyletidae and Pyroglyphidae decreased a little in rooms without dehumidifiers (Fig. 2, Table2).

As for fungi, no fungal colonies were found in all 5 houses. Fungi in floor dust and air-born fungi in number and flora showed no change except on the floor of house 3, and besides, no changes due to seasonal variations appeared on fungi in rooms without dehumidifiers (Fig. 3, Table 2 & 3).

Discussion

Mite numbers decreased extremely in the closed

Table 1. Changes of Mite Fauna and Fungal Flora on 1-m^2 Floor Surface of Tatami-mats and PVC Tiles before and 2 Weeks after running Dehumidifiers in a Closed House.

	Tatami-mat		PVC-tile	
Mite	before	2nd week	before	2nd week
Tarsonemidae	118.5±27.9	26.3±13.8	6.0±6.0	0±0
Cheyletidae	2.3±1.3	0±0	0±0	0±0
Acaridae	40.5±8.1	4.5±1.5	3.0±3.0	7.5±4.5
Pyroglyphidae	21.8±12.3	9.0±5.6	43.5±31.5	1.5±1.5
Haplochthoniidae	12.8±3.3	3.8±3.9	6.0±6.0	1.5±1.5
Others	21.0±9.2	1.5±1.5	3.0±0	0±0
Total	216.9±31.1	45.1±23.5	61.5±34.5	10.5±7.5
Fungus				
Aspergillus	33375±17246	24±9.8	22.5±7.5	0±0
Penicillium	4500±3824	5±4.6	22.5±7.5	3±1
Cladosporium	15000±3354	32±12.4	52.5±37.5	7±5
Alternaria	3375±2880	0±0	7.5±7.5	2±2
Wallemia	66000±51701	2±1.4	15±15	0±0
Eurotium	25800±26580	10±10.4	90±90	4±4
Others	10650±4774	26±22.9	22.5±22.5	11±11
Total	158700±62887	99±13.6	232.5±82.5	27±3

Note : real numbers are used (mean±SD/m^2).

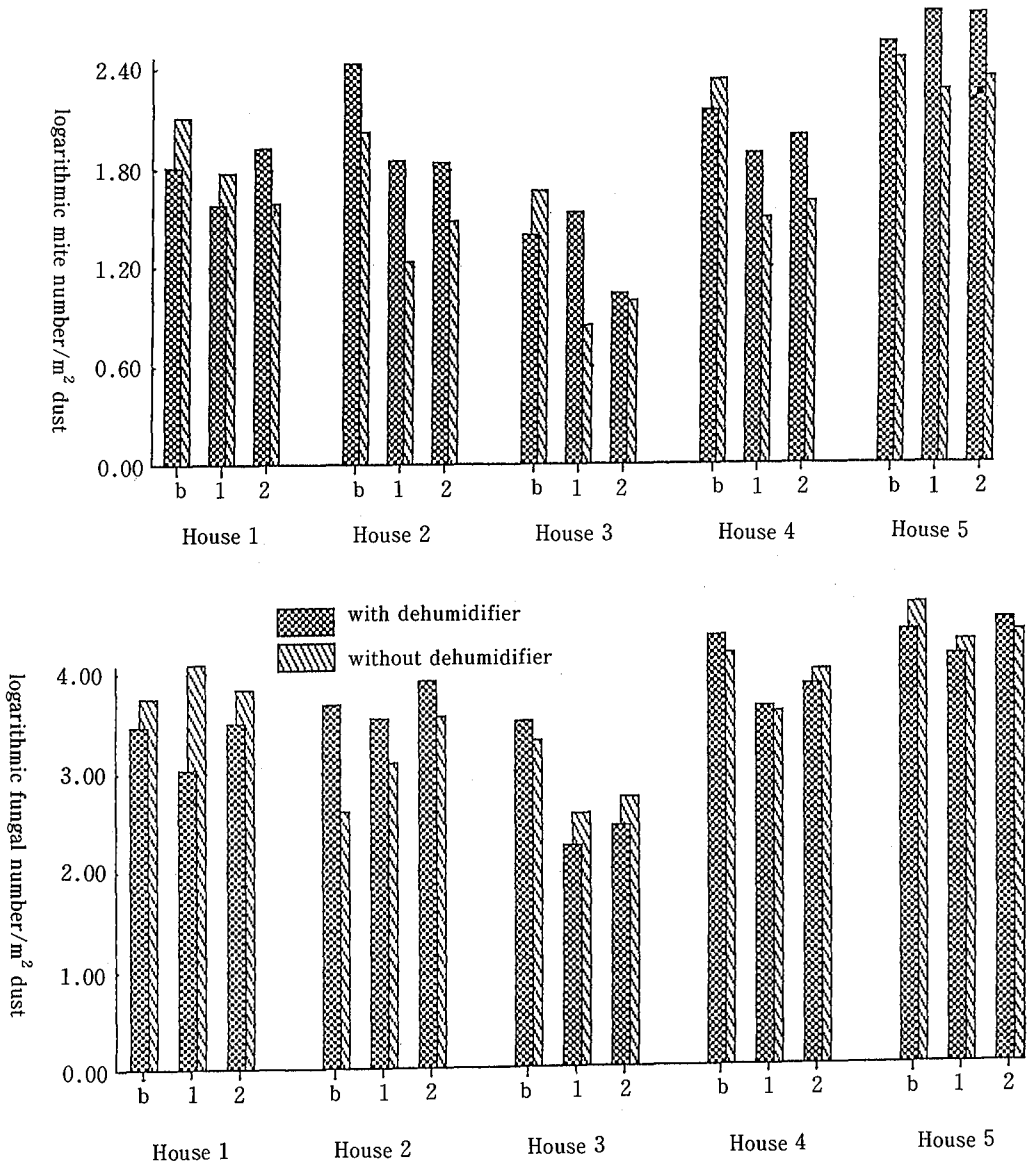


Fig. 2. Changes of Mite and Fungal Numbers in Rooms with and without, and before and after running Dehumidifiers in 5 Inhabited Houses.
b, 1, 2 : before, 1st and 2nd month after running dehumidifier

house (Fig. 1 , Table1) . In the tatami-rooms, mites which had bred in the mats before the test could not increase under low humidity such as 40-50% R. H., although temperature was adequate for mite breeding[11]. Furthermore, cleaning done at 2-3 day intervals using a vacuum cleaner could cause reduction of mites on floor surfaces. The same decreasing patterns of both the center and corner sections of the rooms were due to absence of people and furniture in the house. On PVD tiled floor, many mites might be removed when the floor was cleaned before the test as mites cannot penetrate the tiles. The small increase found on the 1st week might therefore be due to the large reduction before the test or to the fact that some mites moved in from the tatami-rooms. Mite numbers on tatami-mats and PVD tiled floor were generally reported to be 30-200/m^2 and

Table 2. Changes of Mite Fauna and Fungal Flora on 1-m^2 Floor Surface of Rooms with and without, and before and 2 Months after running Dehumidifiers in 5 Inhabited Houses.

	With dehumidifier		Without dehumidifier	
Mite	before	2nd month	before	2nd month
Tarsonemidae	5.8±3.7	5.4±8.8	5.6±2.4	1.6±0.8
Cheyletidae	9.8±8.7	8.0±10.7	5.4±5.4	1.0±1.1
Acaridae	2.2±2.3	1.0±1.1	3.6±1.6	1.2±1.9
Pyroglyphidae	129.4±125.4	138.6±190.7	137.4±84.6	62.8±77.6
Haplochthoniidae	24.2±30.5	5.0±6.2	3.4±1.9	0.4±0.8
Others	4.8±5.0	5.2±6.7	3.2±2.9	1.4±0.8
Total	176.2±128.9	163.2±195.3	158.6±87.4	68.4±78.0
Fungus				
Aspergillus	2666±4344	772±954	1714±2491	586±851
Penicillium	116±90	334±263	428±429	162±195
Cladosporium	1742±892	2984±2892	1662±1541	3196±2785
Alternaria	498±483	686±596	260±424	1006±984
Wallemia	2656±4237	4800±8634	9118±13240	2964±3725
Eurotium	134±134	180±222	36±45	248±383
Others	226±180	322±332	558±450	652±643
Total	8038±7483	10078±11125	13776±16759	8814±7780

Note : real numbers are used (mean±SD/m^2).

Table 3. Changes of Air-born Fungal Flora in 125 Liter-air Samples of Rooms with and without, and before and after running Dehumidifier in 5 Inhabited Houses.

	With dehumidifier			Without dehumidifier		
Fungus	before	1st month	2nd month	before	1st month	2nd month
Aspergillus	16	0	8	5	0	0
Penicillium	9	34	4	7	55	14
Cladosporium	27	15	29	22	20	18
Alternaria	2	2	1	3	2	1
Wallemia	46	10	6	36	8	3
Eurotium	0	1	3	4	0	4
Others	3	2	1	2	6	1
Total	103	64	52	79	91	41

Note : 1. real numbers are used (total number in 125*l* air).
2. the air was imbibed from the same rooms as those from which floor dust was collected

10-100/m^2, respectively[13-15]. So it can be said that mites collected at the 2nd week were smaller in amount (Table 1).

However, mites did not change in the rooms with dehumidifiers in 5 inhabited houses, although mites in the rooms without dehumidifiers decreased because of seasonal effects as the test was performed in August through October (Fig. 2, Table 2), and one of the authors showed successful reduction of mites in a house which was completly closed for at least 10 hours every day for a month[12]. The main reasons why no changes were found were that 4 houses (except house 2) were observed by us to have laundry hanging in the rooms with dehumidifiers since the residents were confident ab-

out the dehumidifiers or the rooms were opened in 1-2 houses whenever the authors visited for dust collections, and that from these facts, rooms would not be dried enough and then heatful rooms caused by running dehumidifiers would inversely help mite breeding.

Fungal numbers also decreased extremely in the closed house (Fig. 1, Table 1). Fungal colonies were not found and spores could not germinate under such low humidity as 40-50% R. H., although temperature was suitable for fungal germination[a]. So, cleaning the floor at 2-3 day intervals and closing the house all day would have caused a reduction of fungal spores.

On the other hand, dehumidifiers could not act to reduce fungi in the inhabited houses (Fig. 2 & Table 2). As there no colonies but only spores were found, dehumidifiers apparently did not work. But the amount of spores could be reduced by daily cleaning of the floors but then spores could increase again on the floors by invasion from outdoors, from Japanese bedding spread on the floors, from persons' clothes and so on[16-18]. These invasions might be smaller in house 3. For the same reasons as floor fungi, air-born fungi did not decrease (Table 3).

From these data, it can be concluded that a dehumidifier can control mites and fungi in floor dust in a closed house in conjunction with cleaning the floor, and it might control them in a house which is completly closed for several hours every day as reported previously. But a dehumidifier cannot control mites and fungi in an inhabited house which is not completely closed for some hours every day or where laundry is sometimes hung or where rooms are not dried enough due to the above reasons, even when the floor is cleaned.

References

1) Voohorst, H., Spieksma-Boezman, M. I. A. and Spieksma F. Th. M. : Allerg. Asthma, 10 (6), 329-334, 1964
2) Oshima, S. : Jpn. J. Sanit. Zool., 15(3), 233-244, 1964
3) Yoshikawa, M. : *J. Med. Entomol.*, 24(1), 46-53, 1987
4) Yoshikawa, M. : *J. Med. Entomol.*, 22(1), 115-117, 1985
5) Nakayama, Y. : Jpn. J. Med. Micol., 7(3), 156-166, 1966
6) Torii, S. : J. Antibact. Antifung. Agents, 14(4), 183-190, 1986
7) Morozumi, S., Yoshikawa, M., Wauke, T. and Hitokoto, H. : Jpn. J. Food Microbiology, 4(2), 133-141, 1987
8) Whaton, G. W. : *J. Med. Entomol.*, 12(6), 577-621, 1976
9) Mossel, D. A. A. : *J. Appl. Bact.*, 34(1), 95-118, 1971
10) Udagawa, S. and Tsuruta, O. : Food and Molds, 162-247, Ishiyaku Publishing Company, 1975
11) Brandt, R. L. and Arlian L. G. : *J. Med. Entomol.*, 13 (3), 327-331, 1976
12) Yoshikawa, M. : J. Antibact. Antifung. Agents, 15(1), 39-44, 1987
13) Takaoka, M., et al : Ann. Rep. Saitama Res. Lab. P. H., 17, 62-67, 1983
14) Takemoto, M. and Yoshida, M. : Life and Environ., 32, 73-79, 1987
15) Ichinose, N. and Matsuda, Y. : J. Jpn. Air Cleaning Assn., 23(4), 9-27, 1986
16) Lustgraf, B. vd. : *Mykosen*, 20(2), 101-106, 1977
17) Yugei, O. : Jpn. J. Res. Assn. Text. End-Use., 25(11), 55-57, 1984
18) Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T. and Sakai, S. : Ann. Rep. Tokyo Metro. Res. Lab. P. H., 29(1), 86-94, 1978

ダニおよびカビに対する除湿機の有効利用法の検討

吉 川 翠*, 和宇慶 朝 昭**, 諸 角 聖**

ダニとカビを同時に除湿機で防除できるのかに関して，一日中閉め切りの家と，少なくとも一人はいつも家にいる状態にある生活中の家とでその効果を調べた．閉め切りの家では2週間除湿機を運転し続け，その間2～

3日ごとに室内の清掃を行なった．生活中の家では一日に少なくとも10時間運転し，2ヶ月間その状態を続けるように家族に依頼した．また清掃や生活状況はいつもの通りとしたが，除湿機設置場所はできる限り長時間続けて閉め切ることと，除湿機設置場所に洗濯物を干さないことを留意させた．

ダニの検査方法は閉め切りの家では毎週，生活中の家では毎月一度の割でそれぞれの塵を集め，その塵から浮遊遠心分離法にてダニを抽出した．カビについては閉め切りの家ではダニと同様に塵から，生活中の家では塵からと空気中から集め，クロラムフェニコールあるいはグルコース入りのPDA培地で培養した．

その結果，閉め切りの家ではダニもカビも激減したが，生活中の家では変化が見られなかった．また生活中の家では除湿機設置部屋が開いていたり，洗濯物が干されているのも何軒かで目撃された．これらのことから，除湿機を用いてダニとカビを減少させるには，何日間か家を閉め切るか，あるいは毎日何時間か続けて部屋を閉め切った状態で使用する必要があり，今回のような生活状況下ではダニもカビも減少させられないと考えられた．

＊東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
＊＊東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 245-250, 1988

多摩川におけるユスリカ類の分布（予報）

大 野 正 彦*

Longituditional Distribution of Chironomid Midges (Diptera) in the Tama River (Preliminary Report)

Masahiko Ohno*

Chironomid imagines were collected from the dry riverbeds of the Tama River about once a month from June 1981 to March 1983 and from February 1984 to June 1986. In the upper reaches of the river, where the water was rather clean, *Parakiefferiella tamatriangulatus*, *Paracladius* sp., *Stictochironomus* sp., *Tanytarsus tamaundecimus* and Diamesinae spp. were frequently collected. On the other hand, in the lower reaches where the water was polluted, *Cricotopus bicinctus*, *Cricotopus triannulatus*, *Rheocricotopus chalybeatus*, *Nanocladius tamabicolor*, *Chironomus yoshimatsui* and *Rheotanytarsus kyotoensis* were abundant. It seems that the longituditional distribution of the chironomids is largely dependent on the water quality of the river.

Keywords：chironomid, river, longituditional distribution, water quality

1．はじめに

多摩川のユスリカはSasaら[1-3]により多数の種が記載され，水の汚濁度と種類の分布の間に高い相関が認められた．筆者は，多摩川の各種ユスリカの分布（longituditional distribution）及び水質との関連をより詳しく知るため，水質の異なる地点で年間を通してユスリカ成虫を採集してきた．今回，ユスリカの分布，成虫による水質判定方法について若干の知見が得られたので報告する．

2．調査地点

上流から鎧橋，羽村，日野橋，二子橋の水域，計4地点を選び（Fig. 1），1981年6月から1983年3月及び，1984年2月から1986年6月まで各地点で調査した．以下，鎧橋，羽村，日野橋，二子橋の調査地点をそれぞれSt. 1～4と称す．どの地点も河床は石礫で，その表面に藻類が繁殖していた．これらの河川敷は一面にイネ科の草本やススキなどで被われていた．

多摩川は下流になるにしたがい民家が多くなり，有機汚濁が進行する．調査期間中のBOD，総窒素，アンモニア性窒素の季節変化を東京都発行の水質年報[4]及び公共水域の水質測定結果[5]から引用し，Fig. 2に表した．上流部2地点（St. 1，2）に比べ下流部2地点（St. 3，4）の水は汚れていた．

3．調査方法

上記の調査期間中，ほぼ毎月1回，各調査地点の河川敷でユスリカ成虫を採集した．各地点の採集時刻はSt. 1，2，3，4で，それぞれおよそ午後3時，午後1時，午前11時，午後4時であった．

捕虫網（径360mm，ナイロン紗）で河川敷の草や樹木の葉の間を15分間振り（Sweeping），ユスリカ成虫を集めた．前期調査（1981年6月～1983年3月）では適宜，捕虫網中の成虫を吸虫管で吸い集め，ガラスビンに入れた．後期調査（1984年2月～1986年6月）では，発生する個体の季節的消長を知るため，捕虫網を厳密に15分間振り，捕虫網中の成虫を葉や枝とともにポリエチレンビンに入れた．前，後期の調査とも，試料に70％アルコールを直ちに加え，固定した．

試料を実験室に持ち帰り，実体顕微鏡下でユスリカ成虫を同定し，個体数を数えた．同定の難しい種は5％水酸化カリウムで処理した後，ガムクロラール液で封入し，プレパラート標本を作り，交尾器などの形態から種を同定した．

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　169　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，169 Japan

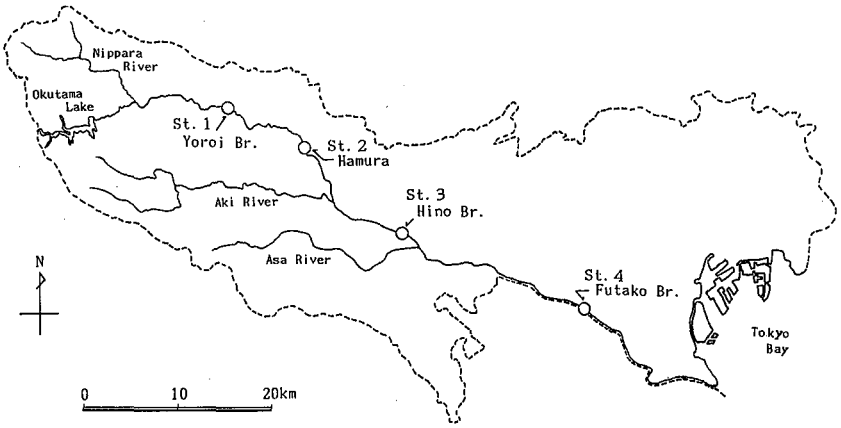


Fig. 1. Map Showing Sampling Stations in the Tama River

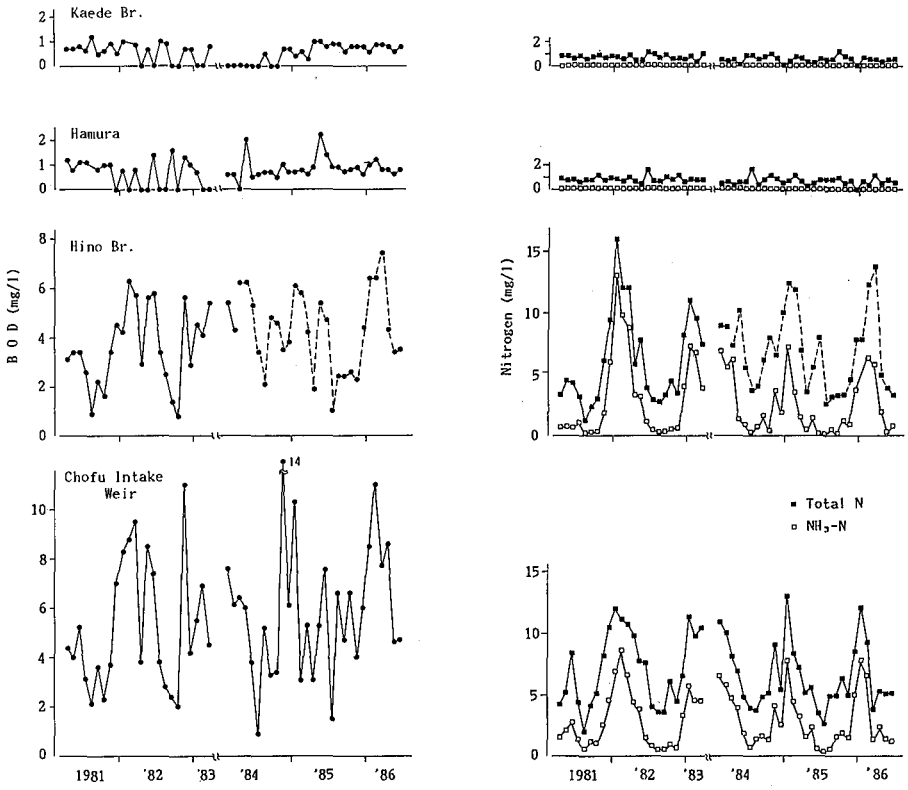


Fig. 2. Seasonal Changes in Water Quality of the Tama River.
Kaede Bridge is located 1.4km above Yoroi Bridge.
Chofu Intake Weir is 3.5km down Futako Bridge.
● : BOD, ■ : Total Nitrogen, □ : Ammonium Nitrogen
Solid line : Data from Tokyo Metropolitan Bureau of Waterworks (1983~88)
Broken line : Data from the Bureau of Environmental Protection (1986~88)

4．結果及び考察

各地点での調査はSt. 1で42回，St. 2で44回，St. 3で46回，St. 4で42回行った．

調査時の気温，水温をFig. 3に示した．気温は，図に示すごとく，各地点間の差はあまり認められなかった．それに対し，水温の差はみられ，特に夏期において上流2地点（St. 1，2）では下流2地点（St. 3，4）に比べ低かった．

各地点で1回の調査において採集した成虫は6～8,424個体で，下流部の地点での採集個体数が多い傾向にあった（Fig. 4）．

今回の調査で捕集された主な各種成虫の地点ごとの出現率［出現した（捕れた）回数／各地点の全調査回数］をTable 1に示した．上流に多く出現する種，また，その反対に下流に多く出現する種があることが判る．

すなわち，*Parakiefferiella tamatriangulatus* は調査地点

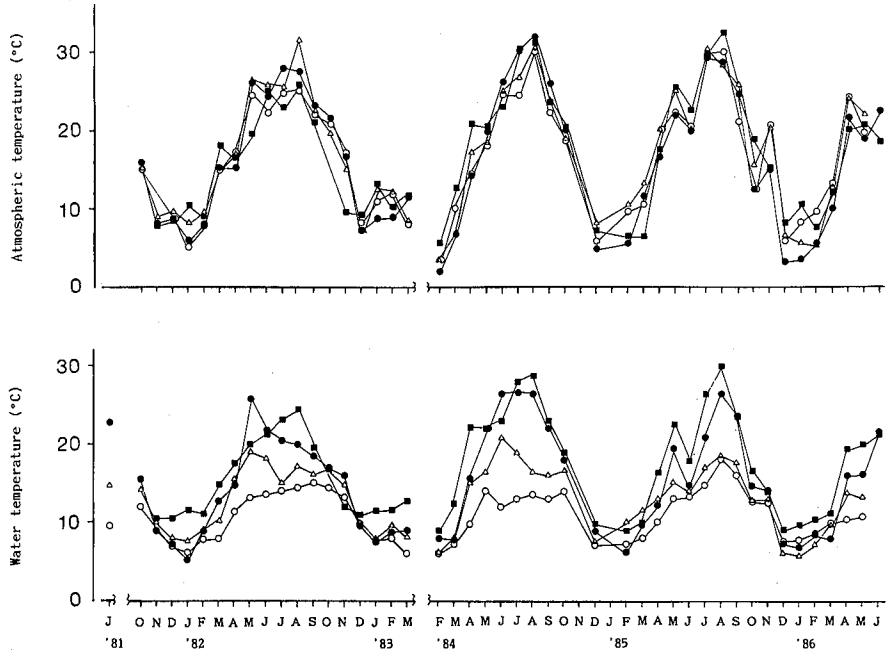


Fig. 3. Seasonal Changes in Atmospheric and Water Temperature at the Each Sampling Station
○：Yoroi Br.,　△：Hamura,　●：Hino Br.,　■：Futako Br.

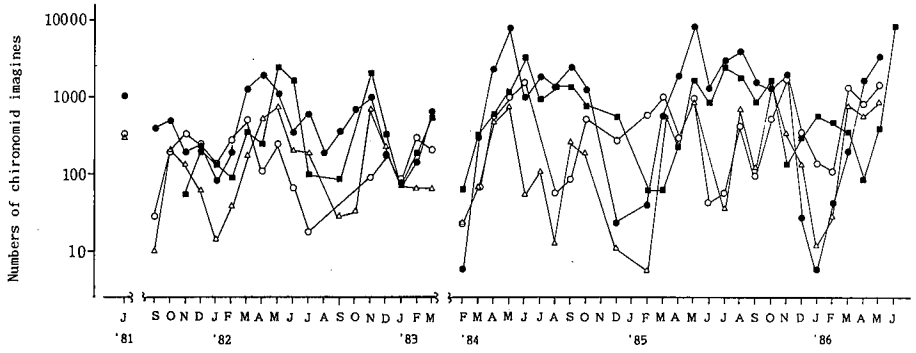


Fig. 4. Changes in the Number of Chironomid Imagines at the Each Sampling Station.
Chironomid imagines were collected from the dry riverbeds with a insect net for 15 minutes.
○：Yoroi Br.,　△：Hamura,　●：Hino Br.,　■：Futako Br.

Table 1. Collecting Rates * of Each Species of Chironomid Imagines at Four Sampling Stations in the Tama River.

Species	Yoroi Br.	Hamura	Hino Br.	Futako Br.
Orthocladiinae				
Cricotopus bicinctus	59.5 %	68.2 %	97.8 %	92.9 %
Cricotopus triannulatus	42.9	61.4	89.1	85.7
Cricotopus metatibialis	7.1	9.1	13.0	0
Cricotopus tamasimplex	0	9.1	4.3	0
Cricotopus tremulus	7.1	4.5	0	0
Cricotopus sylvestris	7.1	13.6	37.0	47.6
Cricotopus trifasciatus	2.4	11.4	26.1	2.4
Cricotopus tricinctus	2.4	0	0	0
Paratrichocladius rufiventris	92.9	93.2	89.1	90.5
Paratrichocladius sp. (*tamaater*?)	4.8	31.8	10.9	0
Rheocricotopus chalybeatus	14.3	56.8	67.4	59.5
Rheocricotopus sp.	2.4	22.7	0	0
Nanocladius tamabicolor	2.4	38.6	65.2	66.7
Paracladius sp.	59.5	72.7	0	0
Orthocladius spp.	50.0	68.2	56.5	59.5
Eudactylocladius sp.	0	2.3	34.8	4.8
Synorthocladius sp.	4.8	4.5	0	0
Psectrocladius sp.	0	0	6.5	11.9
Cardiocladius spp.	0	0	6.5	2.4
Diplocladius cultriger	14.3	20.5	0	7.1
Eukiefferiella spp.	14.3	9.1	13.0	0
Brillia japonica	7.1	2.3	2.2	0
Limnophyes tamakitanaides	9.5	29.5	54.3	19.0
Limnophyes spp.	26.2	20.5	21.7	7.1
Parakiefferiella tamatriangulatus	95.2	65.9	2.2	0
Parametriocnemus stylatus	0	9.1	2.2	0
Metriocnemus spp.	26.2	4.5	6.5	0
Chaetocladius sp.	28.6	11.4	0	0
Thienemanniella majuscula	2.4	9.1	32.6	19.0
Corynoneura spp.	16.7	36.4	21.7	4.8
Chironominae				
Chironomus yoshimatsui	0	6.8	50.0	76.2
Chironomus circumdatus	0	0	0	2.4
Chironomus samoensis	0	0	2.2	0
Chironomus kiiensis	0	2.3	6.5	4.8
Chironomus nipponensis	4.8	0	2.2	0
Stictochironomus sp.	33.3	15.9	0	0
Dicrotendipes niveicaudus	0	0	10.9	9.5
Dicrotendipes tamaviridis	0	0	10.9	0
Glyptotendipes sp.	0	0	10.9	2.4
Cryptochironomus sp.	0	0	2.2	2.4
Parachironomus arcuatus	0	0	0	2.4
Microchironomus tener	0	4.5	6.5	2.4
Polypedilum ureshinoense	2.4	2.3	17.4	16.7
Polypedilum tamagohanum	0 %	4.5 %	2.2 %	0 %
Polypedilum unifascium	0	2.3	2.2	0
Polypedilum tamagryoense	4.8	0	0	0
Polypedilum spp.	2.4	20.5	2.2	2.4
Microtendipes britteni	0	4.5	0	0
Microtendipes sp.	4.8	0	0	0
Tanytarsus tamanonus	59.5	52.3	28.3	0
Tanytarsus tamaundecimus	57.1	20.5	0	0
Tanytarsus tamaduodecimus	14.3	0	0	0
Tanytarsus tamakutibasi	0	4.5	0	0
Tanytarsus tamagotoi	0	2.3	0	0
Tanytarsus spp.	0	13.6	6.5	2.4
Rheotanytarsus kyotoensis	0	2.3	15.2	2.4
Cladotanytarsus vanderwulpi	0	2.3	0	0
Paratanytarsus spp.	4.8	0	0	0
Microspectra spp.	2.4	0	2.2	0
Cryptocladopelma sp.	0	0	2.2	0
Diamesinae				
Diamesa sp.	2.4	0	0	0
Potthastia spp.	14.3	6.8	0	0
Sympotthastia spp.	9.5	6.8	2.2	0
Prodiamesinae				
Prodiamesa sp.	0	20.5	4.3	0
Tanypodinae				
Procladius choreus	0	0	0	2.4
Ablabesmyia monilis	19.0	9.1	0	0
Rheopelopia maculipennis	4.8	4.5	0	0
Conchapelopia melanops	0	4.5	0	0

* The collections were carried out 42 times at Yoroi Bridge, 44 times at Hamura, 46 times at Hino Bridge, and 42 times at Futako Bridge.

中最上流のSt. 1で頻繁に採集され（出現率95.2%），下流になるにしたがい出現率が低下した．*Paracladius* sp., *Stictochironomus* sp., *Tanytarsus tamaundecimus* なども上流部のSt. 1でよく捕集されたが（出現率はそれぞれ59.5, 33.3, 57.1%），下流部のSt. 3，4では全く捕れなかった．ヤマユスリカ亜科成虫もSt. 1でしばしば捕れた．St. 1に多いこれらは，水のきれいな上流部に生息するものといえる．

Tanytarsus tamanonus は*T. tamaundecimus* 同様St. 1でよく捕集されたが（出現率59.5%），St. 3においても約4回に1回の割合で（同28.3%）捕集された．*T. tamanonus* は*T. tamaundecimus* に比べ下流まで分布しているといえよう．

St. 2では *Prodiamesa* sp. がよく捕れ（20.5%），St. 1ではみられなかった．St. 2に多く生息している種であろう．

一方，*Eudactylocladius* sp., *Limnophyes tamakitanaides*, *Thienemanniella majuscula*, *Dicrotendipes tamaviridis*, *Glyptotendipes* sp., *Rheotanytarsus kyotoensis* などはSt. 3を中心に出現していた．これらは，多摩川においては，水の比較的汚れているところを中心に分布するものであろう．

Cricotopus bicinctus, *Cricotopus triannulatus*, *Cricotopus sylvestris*, *Nanocladius tamabicolor*, *Polypedilum ureshinoense* などはSt. 1，2に比べSt. 3，4でよく捕れた．これらは，多摩川では水の汚れた水域で多い種と言えよう．

汚れた都市河川で大発生する *Chironomus yoshimatsui*（セスジユスリカ）はSt. 4で，76.2%と出現したが，St. 1で全く捕れなかった．この種はやはり水の汚れた所に生息するものであろう．

なお，*Paratrichocladius rufiventris* はどの地点でも頻繁に捕れ（St. 1～4でそれぞれ92.9, 93.2, 89.1, 90.5%），鎧橋以降の多摩川本流に広く分布する種であった．

Orthocladius（*Orthocladius*）属では，成虫を種まで同定することは難しい（しかし，蛹で区別のつく種がある[6]）．したがって，本報ではすべてを併せて *Orthocladius* spp. として出現率を求めた．そのため，出現率はSt. 1，2，3，4で50.0, 68.2, 56.5, 59.5%となり，数字からは地点間にあまり違いが認められなかった．しかし，表には示さなかったが，種を詳細に検討すると，地点間によって出現率に差がみられている．水の汚れているSt. 4で冬期に *Smittia aterrima* に混じって多量に発生する大型の *Orthocladius* がある．この種は *Orthocladius yugashimaensis* に似ているが，小楯板上の剛毛が一列に並んだり，不規則に配列されている[7]などの変異があるため同定できなかった．これは，多摩川では冬期の水質汚濁域に多量に発生する種[7]と思われ，同定できれば指標種となり得るだろう．*Orthocladius* 属の分類学的研究が進めば，この仲間も種特有分布を示すことが明らかになると考えられる．同様のことが *Polypedilum* 属でも言える．

以上述べたように，多摩川の河川敷でユスリカ成虫を採集することにより，この川のユスリカが種特有の分布をしていることが判った．また，その分布に水質が大きく関与していることも推測できた．

次に今回用いた捕虫網による方法について考察する．比較的最近になり，ユスリカ群集を用いて，湖沼と同様に河川を類別する試みがなされてきた[8]．生息するユスリカの種類により，河川環境を評価しようとする試み[9]で，次に述べる各成長段階のユスリカが使われている．

a）主に幼虫を調べる方法[10-12]

b）蛹の抜け殻を調べる方法[13-15]

c）幼虫や蛹を採集し，成虫を羽化させ，水域の環境を評価する方法[1-3]．

理想的には幼虫で環境を評価するのがよいが，幼虫を種まで同定するのは極めて難しい．また，同一調査地点でも河床形態が多様で，幼虫の分布（spatial distribution）も均一でなく，採集方法の検討が必要となる．

蛹やその抜け殻を調べる方法は，採集した蛹が上流のどこから流れてきたか，依然，解決できない問題がある．蛹による河川の類型化を提唱したWilsonら[13-15]は，ほとんどのユスリカを種まで同定せず，属や亜科などを指標に用いている．同じ属の中でも種により汚濁に対する耐性が異なる[12]と考えられるので，Wilsonら[13-15]の方法（属，族，亜科で水質を評価する）は厳密さに欠けるきらいがある．

一方，成虫を羽化さす方法は蛹，幼虫の頭部などが同時に集められ，最も合理的である．しかし，時間と労力がかかり，簡便な方法とは言いがたい．また，成虫を羽化さすために流水に生息するものを止水で飼うことが多く，その影響が心配される．

今回述べた捕虫網による方法にも欠点がある．成虫による方法は採集した成虫がどこに由来するか不明であるとWilson[15]は批判している．また，水の中に幼虫がいるのに成虫が発生してないこともあり，1回の調査で環

境（水質）を判定するのは難しい．調査時の天候により，結果が変動することも考えられる．

しかし，利点もある．多様な河川環境[8]（流速が一定でなく，瀬や淵があり，河床の粒径も均一でない）では，各種幼虫の分布（spatial distribution）も均一でない．今回の方法，すなわち，叢に向かって捕虫網を振って成虫を採集する方法は比較的簡単に瀬や淵に生息する多数の種をかなりの個体数採集できると思える．また，同定，個体数の算定も幼虫に比べ容易で（交尾している雌雄が捕れ，どの雌がどの雄に対応するかわかる．），種まで同定できる利点もある．

各種ユスリカの情報が蓄積されれば，捕虫網による方法で水質判定できる時代が来ると思われる．

謝　辞　この研究をする機会を与えて下さった富山医科薬科大学前学長　佐々学博士，神奈川県衛生研究所生活環境部部長　森谷清樹博士，財団法人日本環境衛生センター理事　緒方一喜博士，同環境生物部部長　田中生男博士，同部　武藤敦彦氏に深謝いたします．また，様々な御助言を賜ったカリタス女子中・高等学校　小林貞先生に深謝いたします．

文　献

1）Sasa, M. et al.：*Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud.* **13**, 1-148, 1980.
2）Sasa, M.：*ibid.*, **29**, 1-148, 1981.
3）Sasa, M. et al.：*ibid.*, **43**, 1-122, 1983.
4）東京都水道局：水質年報（昭和56～61年度），1983～88.
5）東京都環境保全局：公共用水域の水質測定結果（昭和59～61年度），1986～88.
6）佐々　学：環境衛生，**34**(1)，18-30，1987.
7）小林　貞：神奈川県立中学高等学校長協会研究論文集，35-79，1985.
8）Pinder, L. C. V.：*Ann. Rev. Entomol.*, **31**, 1-23, 1986.
9）Beck, W. M.：*Environ. Monit. Serr. US. E. P. A.* **600**／**4-77-024**, 261pp., 1977.
10）Morris, D. L. and Brooker, M. P.：An assessment of the importance of Chironomidae (Diptera) in biological surveillance, *In* Murray, D. A. (eds.), *Chironomidae*, 195-202, 1980, Pergamon Press, Oxford.
11）Rossaro, B. and Ferrarese, U.：A contribution to the knowledge of chironomids in Italy, including cluster analysis of presence absence data and factor analysis with per cent composition of species in a stream, *In* Murray, D. A. (eds.), *Chironomidae*, 203-208, 1980, Pergamon Press, Oxford.
12）Armitage, P. D. and Blackburn, J. H.：*Hydrobiologia*, **121**, 165-172, 1985.
13）Wilson, R. S. and Bright, P. L.：*Freshwater Biol* **3**, 283-302, 1973.
14）Wilson, R. S. and McGill, J. D.：*Water Res.* **11**, 959-962, 1977.
15）Wilson, R. S.：Classifying river using chironomid pupal exuviae, *In* Murray, D. A. (eds.), *Chironomidae*, 209-216, 1980, Pergamon Press, Oxford.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 251-254, 1988

下水処理水を水源とする2河川（野火止用水，玉川上水）で発生するユスリカ類

大 野 正 彦*

Chironomid Midges Collected from Two Canals (the Nobidome and Tamagawa Canals) Originating from the Effluence of a Sewerage Plant

Masahiko Ohno*

Chironomid imagines were collected from the two canals (the Nobidome and Tamagawa Canals) originating from the effluence of a sewerage plant. *Chironomus yoshimatsui*, *Glyptotendipes* sp., *Rheotanytarsus kyotoensis*, *Polypedilum ureshinoense* and *Thienemanniella majuscula* were frequently collected. As these species are indicators of polluted waters, it was concluded that the canals were polluted. The number of chironomid species in the canals was rather limited, which was probably due to the polluted waters, muddy substrata and the frequent applications of insecticides in the area.

Keywords：chironomid, river, sewerage plant

1．はじめに

東京都は「清流の復活」の事業の一環として，長らく通水されていなかった野火止用水を甦らせた．1984年8月から，多摩川上流域下水処理場の砂ろ過後の二次処理水を水源として放流し，1986年8月には玉川上水も通水した．

水を流すと必然的にユスリカが発生し，近隣住民に被害が及ぶと懸念される．筆者らは，1）どういう種が出現するか．それらが近隣住民に被害を及ぼすか　2）効果的な駆除法はなにか．薬剤散布で個体数は減少するか　3）発生する種類からみて，河川の水質の汚濁はどの程度かという3つの目的で，これら処理水放流河川のユスリカを調べてきた．

野火止用水の幼虫の種類，個体数の変動については，その一部を報告した[1]．すなわち，野火止用水ではユスリカ亜科（*Chironomus yoshimatsui*, *Glyptotendipes* sp., *Rheotanytarsus kyotoensis* など）が優占していると報じた．また，放流口付近では *Glyptotendipes* sp. が多数生息し，下流になるとエリユスリカ亜科の種が多くなるとも述べた．

ユスリカの種の同定は幼虫の形態では極めて難しく，不可能なことも多い．種をより明らかにするためには成虫，特に雄を調べる必要がある．本調査では上記の2つの処理水放流河川で発生したユスリカの成虫について同定したので，その結果を報告する．

2．調査地点，方法

調査地点として野火止用水7地点，玉川上水3地点を選び（Fig. 1），それぞれ，1984年10月から1988年1月，及び1986年12月から1988年4月にかけてユスリカ成虫の種類を調査した．両河川とも放流口付近（N1，T1）の河床では石礫が重なり合っていた．それより下流の河床は主に泥で，石が泥にはまりこんだ状態であった．各調査地点の川幅は約1～2m，水深30cm程度であった．

捕虫網（径360mm，ナイロン紗）で河川の両岸の草に止まっているものや，群飛しているものを捕集した．また，吸虫管で壁などに止まっているものも同時に集めた．各地点で約5分間にわたって採集した．

採集したユスリカは多摩川での調査[2]と同様，ポリエチレンビンに入れ，70%エチルアルコールを加え，実験室に持ち帰り，同定した．

なお，野火止用水では，昆虫成長阻害物質製剤（ディフルベンズロン，メトプレン）が春から秋にかけて頻繁

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　169　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, 169 Japan

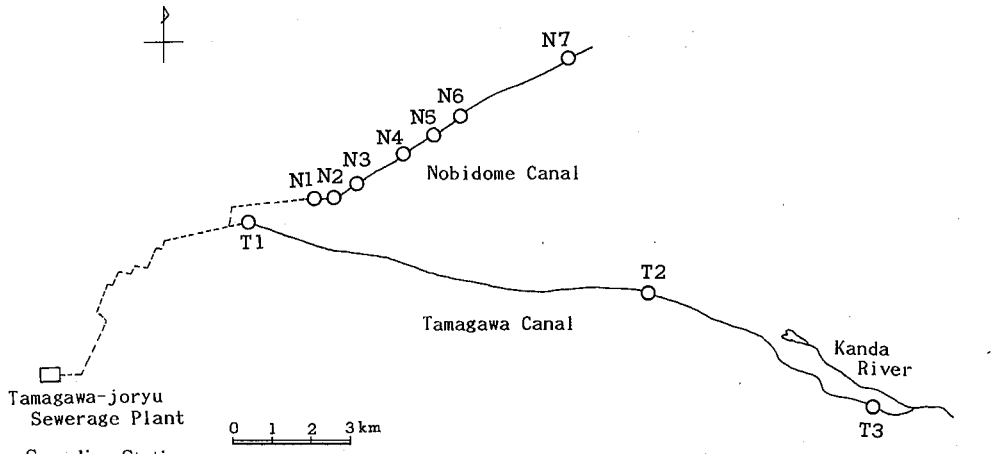


Fig. 1. Sampling Stations.
Nobidome Canal ; N1 : Outlet, N2 : Fureai Br., N3 : Do Br., N4 : Yasaka, N5 : Kumegawa, N6 : Mannen Br., N7 : Koganei Road
Tamagawa Canal ; T1 : Outlet, T2 : Sakai Br., T3 : Iwasaki Br.
Broken line is a sewer pipe from a sewerage plant.

Table 1. Species of Chironomid Imagines Collected from the Side of the Nobidome Canal

Species \ Date	'84 Oct.	'85 May	July	Sept.	Nov.	'86 Aug.	Sept.	'87 Feb.	May	July	Nov.	'88 Jan.
Orthocladiinae												
Cricotopus bicinctus	•	•	•			•	•	•	•	•	•	•
Cricotopus triannulatus				•					•	•		
Cricotopus sp.									•			
Paratrichocladius rufiventris		•				•		•	•	•		
Rheocricotopus sp.	•			•		•			•	•	•	•
Nanocladius tamabicolor									•		•	
Eukiefferiella coerulescens												•
Brillia sp.		•	•					•		•	•	•
Thienemanniella majuscula	•	•			•	•	•	•		•	•	•
Limnophyes tamakitanaides	•				•						•	
Limnophyes sp. nr *prolongatus*								•				•
Chironominae												
Chironomus yoshimatsui	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	
Chironomus circumdatus	•											
Chironomus samoensis									•			
Chironomus nippodorsalis		•										
Chironomus kiiensis						•						
Glyptotendipes sp.	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•
Polypedilum ureshinoense	•		•	•	•	•	•			•	•	
Polypedilum sp.						•						
Pentapedilum sp.	•	•			•	•	•		•	•		
Rheotanytarsus kyotoensis	•	•	•		•	•	•	•		•	•	•
Tanytarsus tamanonus												•

• : collected

に散布されていた．一方，玉川上水では，薬剤散布は行われていなかった．

3．結果及び考察

野火止用水で捕集されたユスリカ成虫の種を Table 1 に示した．表に示すように，*Cricotopus bicinctus*, *Thienemanniella majuscula*, *Chironomus yoshimatsui*, *Glyptotendipes* sp., *Polypedilum ureshinoense*, *Rheotanytarsus kyotoensis* などが調査期間を通して頻繁に捕集された．これらは多摩川では汚れた水域からやや汚れた水域に多数発生する種である[2]．また，汚濁の進んだ川に生息すると思われる *Rheocricotopus* sp.（*R. chalybeatus* に似ているが雄の交尾器の把握器の曲がりが著しくない），*Nanocladius tamabicolor*, *Limnophyes tamakitanaides* なども出現した．

玉川上水で捕集されたユスリカの種類を地点別に Table 2 に示した．モンユスリカ亜科（*Conchapelopia*

Table 2．Species of Chironomid Imagines Collected from the Side of the Tamagawa Canal

Sampling station	T1 Outlet								T2 Sakai Br.						T3 Iwasaki Br.							
Date	'86	'87					'88		'86	'87				'88	'86	'87					'88	
Species	Dec.	Jan.	Mar.	Jun.	Oct.	Dec.	Mar.	Apr.	Dec.	Mar.	Jun.	Oct.	Dec.	Mar.	Dec.	Jan.	Mar.	Jun.	Oct.	Dec.	Mar.	Apr.
Tanypodinae																						
Conchapelopia sp. nr *melanops*																		•		•	•	
Orthocladiinae																						
Cricotopus bicinctus	•		•			•	•	•														•
Cricotopus sp. nr *bicinctus*																						•
Cricotopus sylvestris																		•				
Cricotopus sp.								•														•
Paratrichocladius rufiventris	•	•	•	•														•				•
Paratrichocladius sp.（*tamaater*?）	•	•	•			•	•	•														•
Rheocricotopus sp.	•				•				•	•	•	•						•	•			•
Nanocladius tamabicolor						•					•	•										•
Orthocladius(*Eudactylocladius*)sp.															•	•						
Psectrocladius sp.	•																					
Eukiefferiella coerulescens	•	•	•	•		•	•	•						•								
Diplocladius cultriger															•	•	•				•	
Brillia sp.	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•		•	•						•	•	•
Thionemanniella majuscula									•	•	•			•				•				•
Corynoneura sp.														•				•				•
Limnophyes tamakitanaides												•							•			
Limnophyes sp. nr *prolongatus*													•	•			•				•	•
Limnophyes sp.																						•
Orthocladiinae spp.			•			•										•	•				•	•
Chironominae																						
Chironomus yoshimatsui	•			•						•	•							•	•			•
Chironomus samoensis									•													
Chironomus kiiensis	•																					
Glyptotendipes sp.	•	•	•	•	•	•	•	•														
Polypedilum ureshinoense	•				•				•		•											
Polypedilum sp.																		•				•
Pentapedilum sp.	•								•	•	•											
Chironomini sp.												•			•							
Rheotanytarsus kyotoensis	•		•		•	•	•		•	•			•	•			•	•				
Tanytarsini sp.								•														

• : collected

sp. nr *melanops*）やエリユスリカ亜科（*Cricotopus* spp., *Psectrocladius* sp., *Diplocladius cultriger* など）など，野火止用水でみられない種が捕れ，野火止用水に比べ出現したユスリカの種類が多かった．この原因は

a）玉川上水は薬剤が散布されていない．

b）流路が長い．

c）玉川上水の放流口は野火止用水に比べ，羽村取水堰から河川水を引いている導水路（玉川上水路）に近く，この導水路に生息するものが飛来し分布を広げやすい．

等が考えられる．

筆者[2]は，多摩川の汚濁域（日野橋，及び二子橋付近）において，今回捕集されたユスリカの種類に加え，*Orthocladius* 属や，多くのユスリカ亜科が生息していることを明らかにしている．また，多摩川汚濁域では野火止用水，玉川上水ほど *R. kyotoensis*, *Glyptotendipes* sp. が，高頻度に優占的に発生することもなく，様々な種がかなりの個体数をもって発生していた（大野，未発表）．これらのことから，両処理水放流河川のユスリカ群集は，現在のところ，多摩川に比べ単純であると思われた（野火止用水は玉川上水に比べより単純）．

今回の両河川の調査ではユスリカの他にコガタシマトビケラ，コカゲロウ，ミズムシなどがみられた．両河川の水質を汚濁階級[3]に照らし合わして判定すれば，両者とも β-中腐水性水域に属するであろう．これは，本調査地点の水質を調べた津久井ら[4-6]の報告（全体的に溶存酸素は 5 mg／l 以上で，魚等の生存条件としては一応良好な状態．窒素，リン濃度は一般河川に比べ高い値．硝化を抑えた BOD は平均 2 ～ 5 mg／l）に一致する．したがって，現在の野火止用水，玉川上水の流れを「清流」と呼ぶことは難しい．

ユスリカ類は汚濁水域や，単純な環境において特定の種が大発生しやすい．ユスリカの大発生を防ぐには，水質の良化に努め，薬剤散布をできるだけ少なくして，底生動物群集を単純にしないようすることが大切である．現在，両河川の河床は泥の部分が多く，河床環境が単純になりやすい状態にある．泥が入らないよう護岸を整備したり石などを入れ，多様な河床環境をつくることは群集の多様性を増す方法と思われる．また，放流水に多摩川等の河川水を入れ，水質を良くし，様々な生物を両河川に導入することも群集の多様性を増し，ユスリカの大量発生の防止につながるであろう．

謝辞　この研究をする機会を与えてくださり，様々な便宜をはかっていただいた東京都環境保全局自然保護部，同水質保全部，環境科学研究所水質部の皆様に深謝いたします．

文　献

1）若林明子，川原　浩，大野正彦，伊東戡弘，上杉俊和：東京都環境科学研究所年報，134-139，1987．

2）大野正彦：東京衛研年報，39，245-250，1988．

3）津田松苗：汚水生物学，258pp., 1964，北隆館，東京．

4）津久井公昭，菊地幹夫，紺野良子：東京都環境科学研究所年報，114-119，1986．

5）津久井公昭，菊地幹夫，紺野良子：東京都環境科学研究所年報，126-133，1987．

6）津久井公昭，菊地幹夫，紺野良子，西井戸敏夫：東京都環境科学研究所年報，116-125，1988．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 255-258, 1988

東京湾の環境汚染モニタリング調査（第6報）昭和61年度スズキおよびウミネコの調査結果について

瀬戸　博*，加納尭子*

Survey of Chemical Pollutants in Biota from Tokyo Bay (VI) Residue Levels in Japanese Sea Bass and Gull in 1986

HIROSHI SETO* and TAKAKO KANOH*

The levels of 37 chemical pollutants in japanese sea bass (*Lataolabrax japonicus*) and black-tailed gull (*Larus crassirostris* Vieillot) collected from Tokyo bay in 1986 were determined. Sixteen chemicals were detected in the fish muscle. The levels of "chlordanes" in the fish or gull were almost the same as previously observed (1983-1984). The results obtained from a correlation analysis showed that chlordanes were closely associated with nonachlors in the environment.

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調査が実施され，スズキ（*Lataorabrax japonicus*）およびウミネコ（*Larus crassirostris* Vieillot）中の化学物質濃度の変化および特徴を報告してきた[1-5]．

毒性が強く，環境残留性があるとして，既に使用禁止措置がとられているDDT，HCB，ドリン類，HCH（BHC）類の有機塩素系農薬およびPCBは減少傾向にある．

しかし，クロルデン類，トリブチルスズ化合物（TBT）はそれぞれ「特定化学物質」，「指定化学物質」に指定されたものの魚介類の汚染は依然として続いている．また，東京湾のスズキからはジクロロベンゼン，1，2，4-ノ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．さらに低濃度ではあるが，2，3，7，8-テトラクロロジベンゾ-p-ジオキシンが東京湾の魚から検出されている[6]．

社会，経済の変化は新しい環境汚染の可能性をはらんでいる．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61年度に実施した東京湾のスズキおよびウミネコにおける環境汚染モニタリング調査結果である．

試料および分析方法

試　料　スズキは昭和61年9月，千葉県富津沖で捕獲された35尾を重量の順に7尾づつまとめ5検体とした．ウミネコは昭和61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雌雄別に，採取日の順に7羽づつまとめ5検体とした．鑑定および試料の調製は既報[2]と同様に行った．試料の概要はTable 1，2に示した．

分析方法　環境庁で定めた分析法[7]により行った．詳細な操作法，分析条件は報告書[8]に記載した．

分析した化学物質は37種類である．使用した略号は既報[1,2]と同様である．

試薬，分析装置は既報[4,5]と同様のものを使用した．

結果および考察

スズキについて　スズキ可食部の化学物質濃度をTable 3に示す．本年度は16種の化学物質が検出された．PCB，HCB，DDT類，BHC（HCH）類の残留濃度が漸減傾向を示した反面，クロルデン類濃度は昭和57年以降ほとんど変わっていない．また，DCB類（検出率 *o* 体1／5，*p* 体5／5），1，2，4-TrCB（検出率1／5）も引続き検出された．

クロルデン類は難分解性で生体蓄積性があり，毒性も強いことから昭和61年9月から特定化学物質に指定され

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　169　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，169 Japan

Table 1. Constitution of the Sample (Sea Bass) and Water and Fat Contents of the Muscle. (n = 7)

group No.	body weight (g)	length* (cm)	water (%)	fat (%)
1	385±10	27.9±0.5	76.6	2.84
2	366± 3	28.1±0.6	76.6	2.43
3	347± 8	26.9±0.9	76.4	2.91
4	330± 3	26.9±0.7	76.4	2.26
5	304±11	26.3±0.4	77.0	2.40
mean	346	27.2	76.6	2.43

* : 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	581±64	37.8±3.4	70.0	6.16
2	male	621±52	35.9±1.1	68.2	5.82
3	female	524±81	33.8±1.2	68.4	5.68
4	female	506±45	34.8±1.3	70.6	6.72
5	female	540±54	34.8±1.0	68.5	7.20
mean		554	35.4	69.1	6.32

事実上使用禁止となったが，今後も汚染実態を注意深く監視する必要がある．また，塩素化ベンゼン類では前年度検出頻度が高かった *o*-，*m*-DCB にかわり本年度は *p*-DCB の検出頻度が上昇するなど他の物質に比べ年度間の変動が激しい．これは代謝が比較的早いことと，局地的な高濃度汚染があることを示唆している．塩素化ベンゼン類の発生源，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．TBT は前年度の環境庁調査[9]と同程度の濃度でスズキの全検体から検出された．東京湾のアサリの TBT を調べた結果では，富津付近が高く三枚州，行徳付近が低い[10]と報告されている．これは船底塗料由来の他，湾入口付近の沿岸で使用される漁網に由来すると考えられる．スズキのような回遊する魚類についても，湾内での採取地点によりトリブチルスズ濃度に差があるものと考えられるので，本調査の目的から採取地点を一定にする必要がある．

Fig. 1 に昭和57年度から61年度までのデータをまとめ，各物質間の相関係数を求めた結果を示した．クロルデン (CL)，ノナクロル (NC) 間および塩素化ベンゼン類

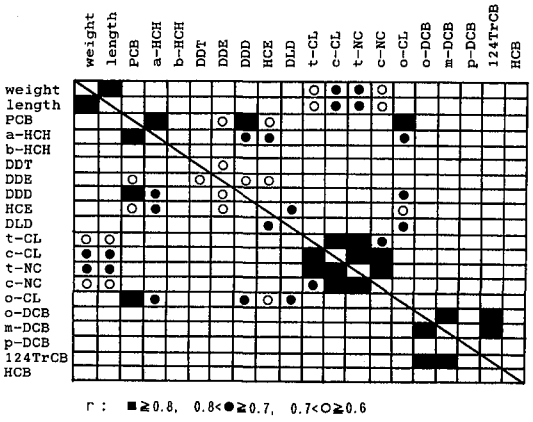


Fig. 1. Correlation Matrix (Sea Bass)

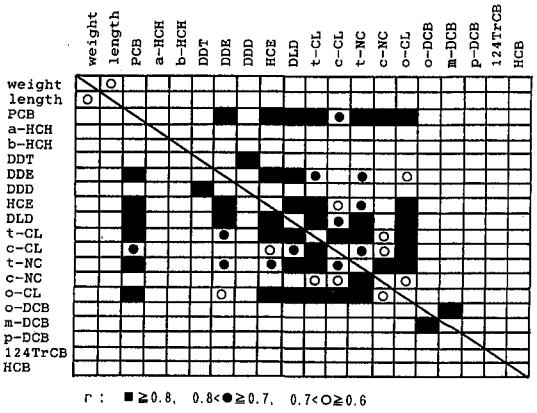


Fig. 2. Correlation Matrix (Gull)

Table 3. Concentrations of Pollutants in Muscle Tissues of Sea Bass and Black-Tailed Gull.
(ppm on wet weight basis)

compound	Sea Bass range	Sea Bass mean	Black-Tailed Gull range	Black-Tailed Gull mean
PCB	0.05−0.08	0.06	1.0−1.5	1.2
PCN	nd*1	nd	nd	nd
HCB	nd	nd	0.011−0.014	0.012
aldrin	nd	nd	nd	nd
dieldrin	0.003	0.003	0.010−0.013	0.012
endrin	nd	nd	nd	nd
o, p'−DDT	nd	nd	nd	nd
p, p'−DDT	0.001−0.002	0.001	nd −0.001	−
o, p'−DDE	nd	nd	nd	nd
p, p'−DDE	0.005−0.007	0.006	0.18−0.38	0.26
o, p'−DDD	nd	nd	nd	nd
p, p'−DDD	0.002−0.003	0.003	nd −0.001	−
t−chlordane	0.001−0.003	0.002	0.001	0.001
c−chlordane	0.004−0.009	0.007	0.008−0.021	0.013
t−nonachlor	0.007−0.012	0.010	0.12−0.26	0.17
c−nonachlor	0.003−0.006	0.004	0.030−0.080	0.050
oxychlordane	nd −0.002	−	0.035−0.055	0.041
heptachlor	nd	nd	nd	nd
HCE	nd −0.001	−	0.011−0.013	0.012
α−HCH	nd	nd	nd	nd
β−HCH	0.001	0.001	0.023−0.033	0.028
γ−HCH	nd	nd	nd	nd
δ−HCH	nd	nd	nd	nd
o−DCB	nd−0.01	−	nd−0.02	−
m−DCB	nd	nd	nd−0.02	−
p−DCB	0.01−0.05	0.03	0.02−0.03	0.02
1,2,3−TrCB	nd	nd	nd −0.004	−
1,2,4−TrCB	nd −0.001	−	0.002−0.013	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	nd
DnBP	nd*2	nd	nd	nd
DEHP	nd*2	nd	nd	nd
TBP	nd*1	nd	nd	nd
TBT	0.15−0.18	0.17	nd	nd

nd : <0.001, *1 <0.01, *2 <0.1

間の相関が高い．これは化学構造が似ているためと共通の汚染源に由来するためと考えられる．しかし，全体的に物質間相互の相関は低かった．

ウミネコについて 昭和58年以降 PCB, β-HCH, *p, p'*-DDE は減少傾向である．一方，クロルデン，HCB, 1, 2, 4-TrCB はほとんど変化がなく，環境中への放出量と分解，代謝量とのバランスが一定していることを示している．

TBT は検出されず，鳥類においては速やかに代謝されるものと考えられる．

Fig. 2 にウミネコにおける相関係数を示した．調査期間，略号はスズキの場合と同じである．化学物質間相互の相関はスズキよりもやや高い傾向がみられた．

昨年度，一部の検体の *p*, *p'*-DDT が異常に高い値を示し，冬期に南方へ渡行した際の曝露または日本国内での局地的な汚染を疑わせた[5]．しかし，本年度は全検体とも例年並の低値に回復しており，突発的で小規模の汚染源によるものと推測される．

ウミネコは成鳥と幼鳥との体重差がほとんどない．したがって体重によって試料をグループ分けするのはあまり意味がない．幼鳥は4月頃東京湾に飛来するから，採取日でグループ分けすることにより，東京湾付近での滞在期間と汚染物質の蓄積量の関係が推定できるのではないかと考えた．今回は雄では半月，雌では一ケ月の差しかなくはっきりしたデータは得られなかったが，雌の場合，後期ほど PCB, HCB, *cis*-クロルデン，*trans*-，*cis*-ノナクロル，オキシクロルデン，トリクロロベンゼンの濃度が高い傾向がみられた．したがってデータを比較する場合には，採取時期にも注意する必要がある．

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，加納尭子：東京衛研年報，34，260-263，1983
2）瀬戸　博，加納尭子：東京衛研年報，35，316-320，1984
3）瀬戸　博，加納尭子：東京衛研年報，36，300-303，1985
4）瀬戸　博，加納尭子：東京衛研年報，37，331-335，1986
5）瀬戸　博，加納尭子：東京衛研年報，38，286-289，1987
6）環境庁中央公害審議会化学物質専門委員会報告：1988年5月13日
7）環境庁編：生物試料中化学物質系統分析法，1984
8）東京都立衛生研究所：昭和61年度生物指標環境汚染調査報告書，1987
9）環境庁編：化学物質と環境，No. 12，1986
10）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

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 259-264, 1988

水中のアスベスト繊維に関する調査，研究

小輪瀬　勉*，坂本朋子*，笹野英雄*

Study on Asbestos-fibers in Water

TSUTOMU KOWASE*, TOMOKO SAKAMOTO* and HIDEO SASANO*

Keywords：アスベスト繊維 asbestos-fiber，クリソタイル chrysotile，透過型電子顕微鏡 transmission electron microscope，水道水 tap water

はじめに

アスベストによる汚染は，1930年代から既に問題になっていたが，それは作業環境上の問題に限られていた．水中のアスベスト繊維が注目されるようになったのは，Cunningham[1]らが1971年からビール，シェリー酒およびソフトドリンクの分析と同時に水道水の分析も行い，その結果，オタワ川を水源とするモントリオール市で2.4×10^6本／l（ろ過操作あり）のアスベスト繊維を検出したことに始まる．

その他，アメリカ合衆国の環境保護庁[2]（以下EPAと称する）もスペリオール湖岸のダルース市の飲料水から$1\times10^6-1\times10^8$本／lのアスベスト繊維を検出している．一方，わが国においても，アスベスト繊維は建築材，自動車のブレーキ用摩擦材や水道配水管の一部にアスベスト・セメント管（以下アスベスト管と称す）として使用されており，環境由来による水道原水汚染やアスベスト管からの剝離による給水栓水の汚染が問題になるところであるが，今までに水道水中のアスベスト繊維に関する報告は殆どされていない．

そこで著者らは都内の浄水場原水，浄水，給水栓水等のアスベスト繊維濃度の実態調査を行ったのでその結果を報告する．

実験の部

1．試料：1987年9月から11月までに採水した都内の各浄水場の水道原水，浄水，井戸水およびアスベスト管使用地域の給水栓水の24検体

2．試薬：メンブランフィルター（富士フィルム社製ミクロフィルターFM-22，孔径0.22 μm，直径47mm），フロリナートフィルター（ミリポア社製フロリナートFG，孔径0.2 μm，直径47mm），アセトン（フロリナートフィルターで吸引ろ過したもの），クロロホルム（フロリナートフィルターで吸引ろ過したもの），0.3w／v%ホルムバール液（ポリビニールホルムバール0.3gをクロロホルム100mlに溶かし，褐色共栓ビンに保存したもの），グリッド（ベコー社製銅製200メッシュのもの，常法によりポリビニールホルムバール膜を張ったもの）

3．装置：低温灰化装置（ヤマトPR-302型），真空蒸着装置（日立），透過型電子顕微鏡（日立H-7000），X線マイクロアナライザー（Kevex Corp. 製7500型）

4．分析方法

試料
↓
メンブランフィルターろ過，捕集
↓
低温灰化
↓
アセトン懸濁
↓
ホルムバールグリッド作成
↓
カーボン蒸着
↓
観察用グリッド調製
↓
電子顕微鏡による計測
↓
X線マイクロアナライザーによる繊維の同定

1）前処理：試料250-1,000mlをメンブランフィルター

*東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科　169　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，169 Japan

に捕集する．ろ過終了後ろ過器を取りはずし，フィルターをピンセットで蒸発皿に入れデシケータ中で一昼夜乾燥させる．乾燥後，蒸発皿ごと低温灰化装置にかけ，100W で3時間灰化する．灰化後，蒸発皿にアセトン1 m*l* を加え，超音波洗浄器で30秒間分散させる．この試料5 μ*l* をマイクロピペットを用いてグリッド上に滴下し，アセトンを蒸発させた後，カーボン蒸着し，電子顕微鏡用試料とする．

2）アスベスト繊維の検索，同定：1）で作成した試料を電子顕微鏡を用い，倍率10,000倍，さらに17倍のルーペを併用して200メッシュ網目のうち25グリッド升目を探査し，長さ，径および本数を測定する．アスベスト繊維の同定は，その特有構造の検鏡とX線マイクロアナライザーによる元素分析を行った．（個々のアスベスト繊維はその構造上の特徴および Si，Mg，Ca，Fe 等の元素比により種類を同定する）

3）アスベスト繊維の算出方法：繊維数は次式によって計算する

$$F=\frac{f}{N}\times\frac{1}{V}\times\frac{B}{A}\times\frac{D}{C}\times E$$

F：アスベスト繊維総数（本／*l*）

N：観察したグリッド升目数

f：計数したアスベスト繊維本数

V：ろ過水量（*l*）

A：1グリッド升目の面積7.22×10^{-5}（cm^2）

B：グリッドの面積0.07（cm^2）

C：グリッド上に滴下した試料のアセトン量5×10^{-3}（m*l*）

D：灰化試料に加えたアセトン量（m*l*）

E：電子顕微鏡試料の希釈率，通常は1

表1　水中アスベスト繊維調査結果

採水場所	試料種別	アスベスト繊維サイズ			総本数／*l*
		0.2-1.0 μm 未満	1.0-5.0 μm 未満	5.0-10.0 μm 未満	
金町浄水場	原水	7,500	175,000	＜DL	250,000
	浄水	15,000	87,500	7,500	110,000
	給水栓水	＜DL	93,000	＜DL	93,000
朝霞浄水場	原水	＜DL	46,000	＜DL	46,000
	浄水	＜DL	54,000	15,000	69,000
	給水栓水	＜DL	23,000	15,000	38,000
小作浄水場	原水	7,500	54,500	＜DL	62,000
	浄水	＜DL	87,000	23,000	110,000
	給水栓水	＜DL	54,000	＜DL	54,000
田無市浄水場	原水	＜DL	15,000	＜DL	15,000
	給水栓水	＜DL	30,500	7,500	38,000
三鷹市浄水場	原水	＜DL	＜DL	＜DL	＜DL
	給水栓水	＜DL	112,500	7,500	120,000
羽村市浄水場	原水	7,500	7,500	＜DL	15,000
	給水栓水	＜DL	77,500	7,500	85,000
昭島市浄水場	原水	＜DL	77,500	＜DL	77,000
	給水栓水	7,500	77,500	＜DL	85,000
武蔵野市浄水場	原水	＜DL	54,000	＜DL	54,000
	給水栓水	＜DL	46,000	＜DL	46,000
調布市浄水場	原水(深井戸)	15,000	62,000	＜DL	77,000
	(浅井戸)	＜DL	46,000	＜DL	46,000
	給水栓水 1	＜DL	23,000	＜DL	23,000
	給水栓水 2	＜DL	46,000	＜DL	46,000

DL：検出限界（7,500本／*l*）

表2　水中アスベスト繊維分布表

種　　別	アスベスト繊維サイズ（μm）	0.2-1.0未満（μm）	1.0-5.0未満（μm）	5.0-10.0未満（μm）	検出本数
	割合（%）	4.3%	84.2%	11.5%	184
原　　水	35.9%	7.6%	77.3%	15.1%	66
浄　　水	20.1%	5.4%	78.4%	16.2%	37
給水栓水	44.0%	1.25%	92.6%	6.2%	81

結果と考察

調査結果を表1，2に示す．

アスベスト繊維濃度の検出範囲は，原水が＜DL-250,000本／l，浄水は69,000-110,000本／l，給水栓水は23,000-93,000本／lであり，その長さは0.2-10 μm未満，径については0.02-0.04 μmであった．

アスベスト繊維の検出率を試料別にみると，原水からは35.9%が，浄水からは20.1%が，給水栓水からは44.0%が検出されており，長さ別では，0.2-1.0 μm未満が4.3%，1.0-5.0 μm未満が84.2%，5.0-10.0 μm未満が11.5%であった．そして，試料別（原水，浄水，給水栓水）にみた長さの分布も同じような傾向であった．

なお，検出されたアスベスト繊維の種類はすべてクリソタイルであった．（写真参照）

原水から検出された繊維は建築材やブレーキ用摩擦材が原因と見られ，わが国のアスベスト鉱山による影響はその分布からみてほとんど無いものと思われる．

また，浄水の繊維濃度が原水とほぼ同じ濃度を示していることから，現在の浄水処理過程ではほとんど除去されないと思われる．

今回調査したデータの中に，原水中のアスベスト繊維濃度＜DLのものが給水栓水で120,000本／lに増加している三鷹市の試料や羽村市の原水中濃度15,000本／lが給水栓水濃度85,000本／lに増加しているものがあり，この結果からはアスベスト管からの剝離が示唆される．しかし，アスベスト管から由来するものは長さが5 μm以上というEPAのMilletteらの報告[3]からみると，三鷹市や羽村市の給水栓水からは5 μm以上のものはいずれも7,500本／lしか検出されておらず，アスベスト管が明らかに剝離している確証は得られていない．その他の試料については，特に給水栓水中のアスベスト繊維が原水や浄水と比べて増加したものはなかった．

ま と め

現在，わが国には水道水中のアスベスト濃度の基準はなく，世界的にみてもEPAが米国NTP（国家化学物質毒性試験計画）の動物実験による毒性データ[4]を基に考案した提案基準（長さ10 μm以上のものが7.1×10^6本／l以下）があるのみである．今回の調査結果をこの値と比較してみると長さも短く，濃度もかなり低い値であった．しかし，わが国における水中アスベストのデータがほとんどないところから，今後も都内全域にわたるアスベスト濃度の実態を明らかにするために，さらに調査を続ける予定である．

謝　　辞

本調査，研究に多大なるご協力をいただいた福森，荻野両主任研究員に深謝します．

文　　献

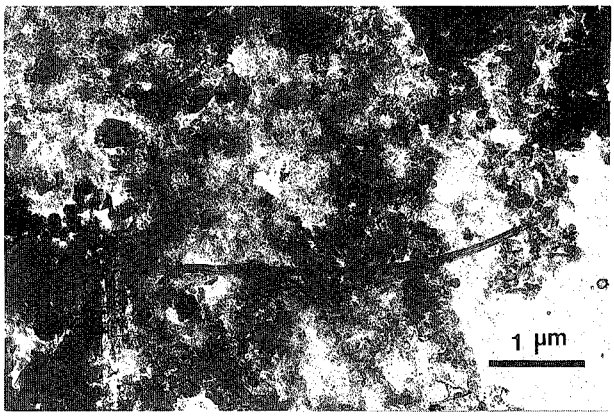
1）Cunningham, H. M and Pontefract, R. ：Nature, 232, 332, 1971
2）Kay, G. H. ：J. AWWA, 66, 513, 1974
3）Federal Register, 13, 1985
4）National Toxicology Program, ：NTP TR, 295, 1985

写真説明

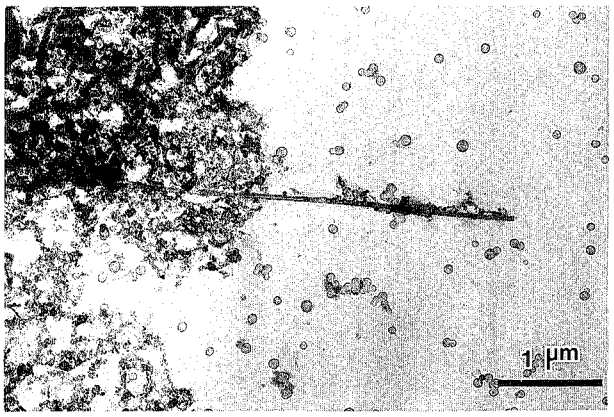
1，3．原水及び給水栓中より検出されたアスベスト繊維（クリソタイル）の電子顕微鏡写真

2，4．写真1，3のアスベスト繊維のX線マイクロアナライザーによる解析チャート

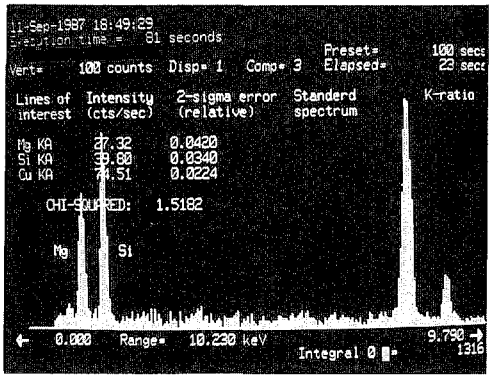
1


1 μm

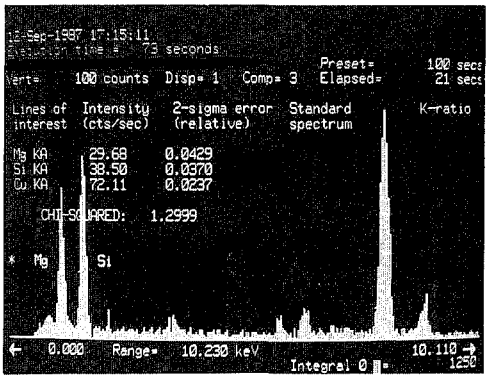
3


1 μm

2


11-Sep-1987 18:49:29
Execution time = 81 seconds
Preset= 100 secs
Vert= 100 counts Disp= 1 Comp= 3 Elapsed= 23 secs
Lines of interest
Intensity (cts/sec)
2-sigma error (relative)
Standard spectrum
K-ratio
Mg KA 37.32 0.0420
Si KA 39.80 0.0340
Cu KA 74.51 0.0224
CHI-SQUARED: 1.5182
Mg
Si
0.000 Range= 10.230 keV
9.790
1316
Integral 0

4


12-Sep-1987 17:15:11
Execution time = 73 seconds
Preset= 100 secs
Vert= 100 counts Disp= 1 Comp= 3 Elapsed= 21 secs
Lines of interest
Intensity (cts/sec)
2-sigma error (relative)
Standard spectrum
K-ratio
Mg KA 29.68 0.0429
Si KA 38.50 0.0370
Cu KA 72.11 0.0237
CHI-SQUARED: 1.2999
Mg
Si
0.000 Range= 10.230 keV
10.110
1250
Integral 0

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 265-270, 1988

皇居外苑濠の植物プランクトン（II）
—主要な藍藻—

渡 辺 真利代*, 土 屋 悦 輝*

Phytoplankton in Outer Moats around the Imperial Palace
Main Species of Blue-green Algae（II）

MARIYO F. WATANABE* and YOSHITERU TSUCHIYA*

Keywords：植物プランクトン phytoplankton, 濠 moat, 藍藻 blue-green algae

緒　　言

皇居外苑濠群は前報[1)]でも報告したように，クロロフィルa量や栄養塩量が高く過栄養の状態となっており，藍藻の“水の華”の出現がみられている．藍藻の水の華の出現は水界の富栄養化を端的に示すものであり，この出現によって水質に様々な問題が引き起こされている．そのために種々の浄化対策が施されており，ホテイアオイによる浄化[2)]もその一施策である．外苑濠群においては地下水からの水補給などが試みられている．

環境庁より依託のもとに外濠群の水質調査は1982年より実施されているが，その調査項目の一つとなっているのが植物プランクトンの種類組成である．ここでは外濠に出現する植物プランクトンのうち春から秋にかけて優占となる藍藻種について報告する．

材料と方法

材料：調査は1987年度として1987年5月，8月，11月，1988年2月の4回実施し，表面水を採取した．

方法：皇居外苑濠を一周するように，日比谷濠（Station 1，2），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），半蔵濠（St. 8），桜田濠（St. 9，10，11）の11地点より採水した．表面水500mlに対してホルマリン5mlを加えた後，室温に放置し5倍に濃縮し，血球計算盤（フークス・ローゼンタール）を用いるか，そのまま100 μl について光学顕微鏡下で同定及び計算を行った．

結果及び考察

藍藻は水温が比較的高い時期に種類数，細胞数とも多くなるので，表1には1987年8月12日に各 station で観察された主要な藍藻種の細胞数を示した．藍藻の種類数としては st. 5，7，8で多く観察された．最も多い細胞数は *Anabaena flos-aquae* の4.3×10^5／ml であり st. 6 で計数された．

Microcystis は全ての station において出現している．日本においては *Microcystis* を *M. aeruginosa* として記載することが多かったが，Komárek[3)]や渡辺[4)]の分類に従えば，日本の湖沼によくでる種類は *M. aeruginosa* forma *aeruginosa*, *M. aeruginosa* forma *flos-aquae*, *M. riridis*, *M. wesenbergii* の4種類である[5)]．ここでは前2者を *M. aeruginosa* として1つにまとめたが，この種はその寒天質のコロニー膜が光学顕微鏡下では通常みられないことで他の2種と区別する．また *M. riridis* と *M. wesenbergii* はその膜の形状によって区別され，*M. wesenbergii* ではコロニー膜がコロニー全体に沿ったものであり，*M. viridis* では細胞のへりに沿うように波うった形をしている（写真1，2，3）．また *M. aeruginosa* の細胞の直径が4～6 μm であるのに対し，*M. wesenbergii* と *M. viridis* は6～8 μm とやや大きくなっている．表1でこれら3種の出現状況をみると，*M. aeruginosa* は全ての station で観察され，st. 7 では10^4オーダーとなっていた．また st. 1，2，9のように，*M. aeruginosa* よりも *M. wesenbergii* のほうが優占している station もみられた．*Microcystis* 3種の細胞数を合計したものでは，st. 5 が3.4×10^4／ml と最も多く，次に st. 7 の2.2×10^4／ml，st. 8 の1.9×10^4／ml の順であった．

Anabaena flos-aquae は st. 6 で4.3×10^5／ml と最も多い数となっており，st. 5 及び7においても10^4オーダー

*東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 come, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

表1．皇居外濠群の主要な藍藻[a)]

藍　藻　の　種	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St.10	St.11
Chroococcus sp.					+		+	+			
Merismopedia spp.			130[b)]	+[c)]	1600		1900	9900	230	720	210
Microcystis aeruginosa	5500	4100	1600	740	28000	4800	24000	8800	680	260	1000
M. viridis	500	750	3200		1300		3600	3000	110		
M. wesenbergii	7800	6000	1100	5200	4700	3900	4600	7200	3000		
Oscillatoria limnetica				550	350						
O. rachiborskii	3500	2500		1100	19000						
Lyngbya contorta	1100				1600	4300	23000	3100	150	+	
L. limnetica						220	4400	+		+	
Anabaenopsis arnoldii					+		810				
Anabaena spiroides					13000		1000				
A. aphanizomenoides			54000	5700	+		530	1100	58000	59000	46000
A. flos-aquae					29000	430000	54000	8500			
Raphidiopsis sp.					+	1900	360	290			

a）1987年8月12日
b）1 ml 当りの細胞数
c）1 ml 当り100細胞数以下

と高い値を示していた．この種の糸状体（トリコーム）は不規則ならせん状をなしからみあう（写真4）．栄養細胞（通常の細胞）はほぼ球形で直径6 μm 前後であり，異質細胞（ヘテロシスト）も球形である．濠水においてはこの数年間でみられなかった細胞数の増加であった．

Anabaena aphanizomenoides もst. 3，9，10，11において10^4オーダー計数された種類である．この種の糸状体はほぼまっすぐであり（写真5），長さ1～2 mm になることもある．栄養細胞の巾は5 μm 前後で，6 μm 前後の球形の異質細胞をもち，休眠細胞が異質細胞のすぐ近くに作られる．毎年観察される種類であるが，通常10^2オーダー程度である．

Anabaena spiroides は *A. flos-aquae* と異り，その糸状体が規則的ならせんを作る種類である（写真6）．栄養細胞の直径は6 μm 前後であり，異質細胞は球形で直径約7 μm である．1987年の8月ではst. 5で1.3×10^4／ml となっていたが，濠としてはまれなケースである．

Lyngbia contorta はそれほど顕著に増えることがないが，10^3／ml はいずれかの station で観察されるという種類である（写真7）．糸状体は規則的ならせん状をなし，細胞の巾は1～2 μm，長さは4 μm 前後である．

Oscillatoria limnetica は表1ではst. 4及びst. 5で550／ml，350／ml とみられる程度であるが，外濠においてはしばしば観察され，多い時には10^4オーダーみられる．*Oscillatoria* は *Anabaena* とは異り休眠細胞や異質細胞はなく，この *O. limnetica* の場合にはほぼまっすぐか，わずかに曲がる糸状体を作っている．細胞の巾は1～2 μm で長さは4～7 μm であった．

O. rachiborskii はst. 5で1.9×10^4／ml という高い値を示した．今までにわずかに観察されることはあっても，これほど多くの細胞数にはなっていなかった．この種の糸状体は先が少し曲がっているのが特徴で，長いものは1 mm 以上になる．細胞の巾は8～9 μm で長さは5 μm 前後であった．

1987年の8月は例年になく多種類の藍藻が水の華状態となっており，その分 *Microcystis* は少くなっていた．*Microcystis* の形態的特徴からみると，*M. wesenbergii* でもいくつかの差異がみうけられるが，今後は更に生化学的裏付けによる分類の開発が望まれる．

結　論

1988年の8月においては *M. aeruginosa* のほかにも *O. rachiborskii*, *A. flos-aquae*, *A. aphanizomenoides*, *A. spiroides* の水の華が観察され，いずれも10^4／ml のオーダー存在した．

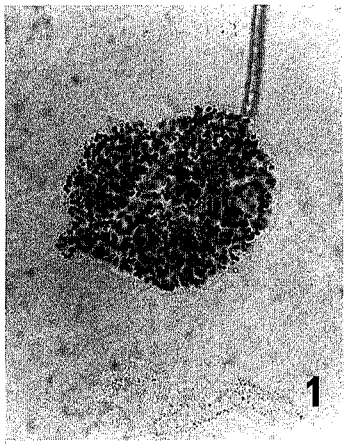
文　献

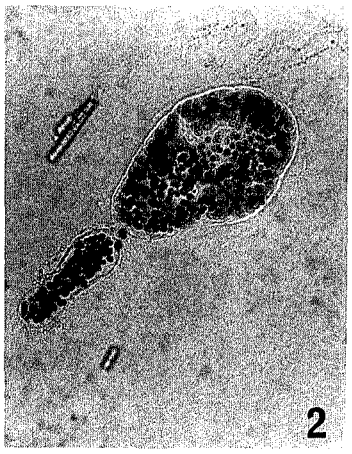
1）渡辺真利代，土屋悦輝：東京衛研年報，38，329-332，1987
2）佐藤治雄：ホテイアオイによる水質浄化の基礎理論，生嶋功編，156-169，1987，東海大学出版，東京
3）Komárek, J.：Algologische Studien, Komrek, J. and

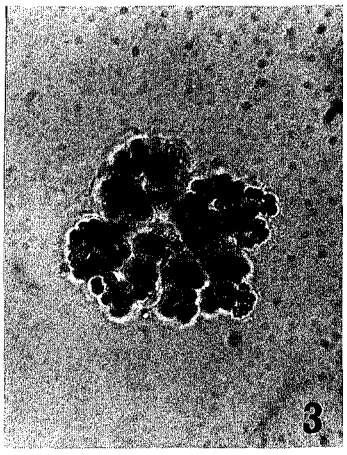
Eftl, Heds., pp. 10-206, 1958, Academie der Wissenshaften

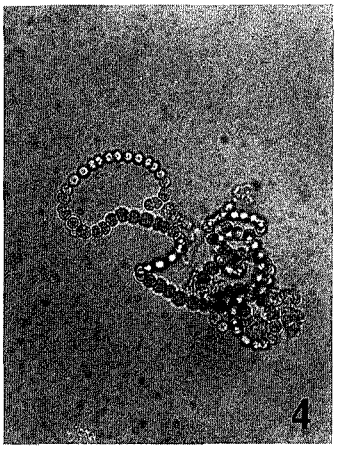
4) 渡辺真之, 千原光雄：筑波の環境研究, 5 A, 80-86, 1986

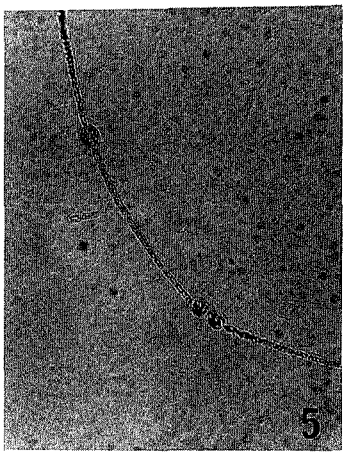
5) Watanabe, Y., Watanabe, M. F. and Watanabe, M.：*Jpn. J. Limnol.*, **47**, 87-93, 1986

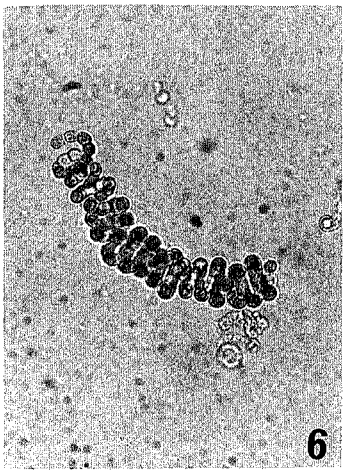


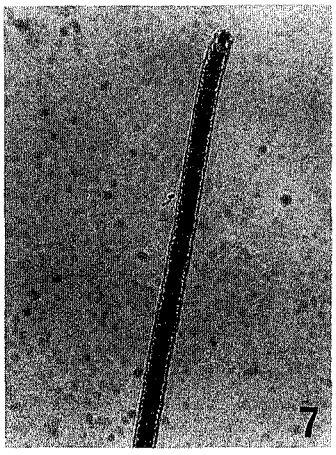


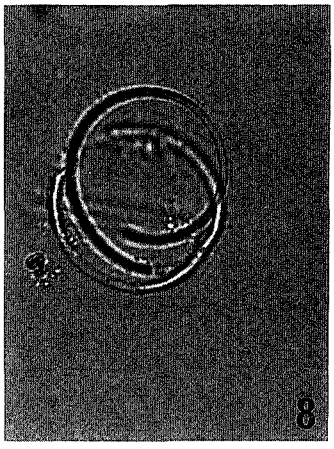












写真：外濠に出現する藍藻

1．*Microcystis aeruginosa*（5 × 10）
2．*Microcystis wesenbergii*（5 × 10）
3．*Microcystis viridis*（5 × 20）
4．*Anabaena flos-aquae*（5 × 40）
5．*Anabaena aphanizomenoides*（5 × 20）
6．*Anabaena spiroides*（5 × 40）
7．*Oscillatoria rachiborskii*（5 × 40）
8．*Lyngbia contorta*（5 × 40）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 271-276, 1988

水環境から分離された *Yersinia* 属菌とその塩素抵抗性

古 畑 勝 則*, 金 子 誠 二**, 松 本 淳 彦*

Distribution of the Genus *Yersinia* in Natural Water Environments and Resistance of Isolates to Chlorine

KATSUNORI FURUHATA*, SEIJI KANEKO**
and ATSUHIKO MATSUMOTO*

The detection of genus *Yersinia* in waste waters, river waters, pond waters and well waters was attempted during the period from July to September in 1986 and January to March in 1987. A total of 160 natural water samples were examined for these organisms.

Yersinia species were detected from 75 of 160 samples (46.9%) and were distributed as follows: 29 samples of 60 (48.3%) taken from waste waters; 36 of 40 (90.0%) from river waters; 10 of 20 (50.0%) from pond waters, and none from 40 samples of well waters. The detection ratios were higher in samples collected during the winter months (70.0%) than in summer months (23.8%). *Y. enterocolitica* was the dominant isolate among all the water samples in both seasons. Other isolates of *Yersinia* species were *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* and *Yersinia* sp.. Although a total of 231 strains of *Y. enterocolitica* isolated from these samples were tested for autoagglutination, all isolates were negative. As for resistance to free residual chlorine of some isolates, the strains of *Y. enterocolitica*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* and *Yersinia* sp. were very sensitive. That is, the cells of 10^5/ml of isolaters were killed completely at the dose of 0.1mg/*l* of free residual chlorine within 30 seconds of contact time.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, distribution, water environments, chlorine resistance

緒　　言

エルシニア (*Yersinia*) 属菌は，かつて *Pasteurella* 属の細菌として扱われていたが，1972年から腸内細菌科の独立した一属として分類されるようになった[1]. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th, ed. (1974) には，*Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* の3菌種が記載されていたが，近年，*Y. philomiragia*[2]，*Y. ruckeri*[3]，*Y. intermedia*[4]，*Y. frederiksenii*[5], *Y. kristensenii*[6], *Y. aldovae*[7], *Y. rohdei*[8] などの新たな菌種が次々に報告され，現在の Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1 (1984) には *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. ruckeri* を加えた7菌種が記載されている.

これら *Yersinia* 属菌のうち，*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* および *Y. enterocolitica* は，人畜共通感染症の原因菌として位置づけられているが，*Y. pestis* を除くとその感染源や感染経路が解明されていない.

Y. enterocolitica は，1960年代に入ってヒトの回腸末端炎や虫垂炎などからの分離例が報告されて以来，ヒトの腸管系病原菌として注目されるようになった．その後，諸外国で本菌によるヒトの感染症例が相次いで報告され，特に小児における下痢症の原因菌の一つであることがわかってきた．また，敗血症，関節炎，結節性紅斑などの起因菌となることもあり，その発現する症候は多彩であ

*東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科
**東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科
169　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, 169 Japan

る[1].

わが国における最初の *Y. enterocolitica* 感染は，1972年に Zen-Yoji らにより報告された散発例である[9]．続いて静岡県[10]，栃木県[11]，京都府[12]，宮城県[13]などで散発あるいは集団発生の報告があり，*Y. enterocolitica* 感染症に対する関心が高まってきた．このような経緯で，1982年，厚生省は *Y. enterocolitica* を食中毒原因菌として新たに追加指定した[14,15].

一方，*Y. pseudotuberculosis* は，仮性結核菌として古くから知られていたが，最近までは一部の獣医学研究者の間で研究対象にされていたに過ぎなかった．ところが，1980年代に入ってから本菌による感染症例が次々に報告されるようになり[16−20]，泉熱の原因菌として[21−23]，また川崎病との関連性などについても議論されるようになってきた[24−28].

このように，近年になって *Yersinia* 属菌は公衆衛生の分野において一段と関心が高まってきた．本属菌が人畜共通感染症の原因菌であることから，これまで *Yersinia* 属菌の検出には，主にヒトの臨床材料，動物の腸管内容物および動物性食品等が対象とされてきた[29−42]．しかし，本属菌は河川や湖沼などの自然水域にも分布していることが報告され[43−45]，特に *Y. pseudotuberculosis* 感染が，ノネズミの糞尿で汚染された井戸水を飲水したために成立したという報告もある[46]．こうしたなかで都内の水環境における *Yersinia* 属菌の分布状況を把握することは，本属菌に起因する感染症の生態学的裏付けとして重要な意義があると考え，種々の水域を対象にして調査を行った．また，表流水は上水道の原水になり得ることから，水環境から分離した菌株に対する塩素抵抗性も併せて検討した.

材料および方法

1. 供試水 浄化槽放流水は都内団地30箇所の60試料，河川水は秋川，浅川，日原川，川乗川，多摩川，江戸川，荒川，仙川，野川などの20箇所で採水した40試料，池水は新宿御苑，明治神宮，浜離宮，六義園，不忍池，武蔵関公園，石神井公園，善福寺公園，井の頭公園，千鳥ケ淵濠で採水した20試料および都内20箇所40試料の井戸水，合計160試料を用いた．いずれの試料も夏期は1986年7月から9月に，冬期は1987年1月から3月にかけて同一地点で100～500m*l* を採水した.

2. 培地および培養条件 増菌培養には PSB 培地[47]（Na_2HPO_4 8.23g, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 1.2g, NaCl 5g, D-sorbitol 10g, bile salts No.3, 1.5g, peptone 5g, 蒸留水 1,000m*l*, pH7.6）を，分離培養には CIN 培地[48]（Oxoid），マッコンキー寒天培地および SS 寒天培地（以上，日水製薬）を用いた.

PSB 培地は4℃で4週間，CIA 培地は30℃で24時間，マッコンキー寒天培地および SS 寒天培地は25℃で48時間の培養条件とした.

3. *Yersinia* 属菌の分離同定 浄化槽放流水は100m*l* を，河川水，池水および井戸水は500m*l* を0.22 μm のメンブランフィルターで濾過した．このメンブランフィルターを50m*l* の PSB を入れた三角コルベン（100m*l* 容）に入れて低温増菌培養した．この PSB 培養液0.5m*l* に0.4%水酸化カリウム加0.5%食塩水4.5m*l* を加え，ボルテックス・ミキサーで30秒間激しく混和してアルカリ処理[44]を行い，その1白金耳ずつを CIN 培地，マッコンキー寒天培地および SS 寒天培地の各平板にそれぞれ画線塗抹した．培養後，*Y*ersinia 属菌と思われる集落を各平板から3～5個ずつ釣菌して再分離した．そして，ブドウ糖に対する OF 試験を行って発酵的にブドウ糖を分解した菌株については，ブドウ糖発酵性桿菌同定用キットの ID テスト EB-20（日水製薬）を用いて生化学的性状を調べ菌種の同定を行った.

4. 分離菌株の生物型別，血清型別および自己凝集性試験 各材料から分離同定された合計231株の *Y. enterocolitica* について生物型別[45]を行うとともに，市販のエルシニア・エンテロコリチカ診断用免疫血清（デンカ生研）を用いてスライド凝集反応により血清型03，05，08，09の型別を行った．また，10%血清加ブレーンハートインフュージョンブロス（BHIB）を用いて病原性状の一つである自己凝集性を調べた．すなわち，2本の BHIB に各分離菌株を接種し，それぞれを25℃と37℃で24時間培養して凝集の有無を観察し，37℃培養でのみ凝集が認められた菌株を自己凝集性陽性と判定した.

5. 塩素抵抗性試験 各分離菌株をブレーンハートインフュージョン寒天培地で37℃，20時間培養し，これを集菌して滅菌蒸留水に浮遊させた．そして3,000rpm，15分の遠心分離を3回行って菌体を洗浄した後，再び滅菌蒸留水に浮遊させて菌数が10^5／m*l* になるように実験水を作製した．次に，実験水200m*l* に対して残留塩素濃度が0.1mg／*l* になるように次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加した．そして随時攪拌しながら室温（25±1℃）で30秒，1分，3分および5分間接触させたのち，直ちにその1m*l* をシャーレに取ってブレーンハートインヒュージョン寒天培地で混釈し，37℃で24時間培養後に生菌数を求めた．同時にオルトトリジン法により残留塩素濃度を測定した.

結　　果

1. 各水環境における *Yersinia* 属菌の検出状況

夏期と冬期における各材料からの *Yersinia* 属菌の検出状況を表1に示した．全体では160試料中75試料（46.9%）から *Yersinia* 属菌が検出され，このうち夏期では80試料中19試料で23.8%の検出率であったが，冬期には80試料中56試料，検出率70.0%と夏期よりもはるかに高率に検出された．

これを材料別にみると，浄化槽放流水では夏期に30試料中3試料（10.0%）から検出されたにすぎなかったが，冬期では26試料（86.7%）から検出され，合計で60試料中29試料（48.3%）から検出された．河川水では，夏期には20試料中16試料（80.0%）から，冬期にはすべての試料から検出され，合計で40試料中36試料（90.0%）から検出された．池水では，夏期の10試料からは検出されなかったのに対し，冬期にはすべての試料から検出された．しかし，20箇所について検査を行った井戸水では，夏期および冬期ともまったく検出されなかった．

2. 各水環境から分離された *Yersinia* 属菌の菌種

各水環境から分離された *Yersinia* 属菌の菌種とその分離率を表1に示した．いずれの水環境においても夏期，冬期を問わず，*Y. enterocolitica* が最も高頻度に分離され，その分離率は81.3～100%であった．*Y. enterocolitica* 以外の菌種として，浄化槽放流水から *Y. frederiksenii*，河川水から *Y. kristensensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* および *Yersinia* sp.，池水からは *Y. kristensenii* と *Yersinia* sp. が分離された．しかし *Y. pseudotuberculosis* は1株も分離されなかった．

各試料における構成菌種は以下のとおりであり，材料によって明かな違いがみられた．すなわち，浄化槽放流水では，すべての試料から一種が単独で分離され，29試料中28試料（96.6%）が *Y. enterocolitica* であり，残りの1試料は *Y. frederiksenii* であった．河川水では36試料中12試料（33.3%）から *Y. enterocolitica* が，4試料（11.1%）から *Y. kristensenii* が，そして1試料（2.8%）から *Yersinia* sp. がそれぞれ単独で分離された．

表1．材料別 *Yersinia* 属菌の検出状況と分離菌種およびその割合

材　料		供試試料数	検出試料数	検出率（%）	分離菌種	分離試料数	分離率（%）
浄化槽放流水	夏　期	30	3	10.0	*Y. enterocolitica*	3	100.0
	冬　期	30	26	86.7	*Y. enterocolitica*	25	96.2
					Y. frederiksenii	1	3.8
	小　計	60	29	48.3			
河　川　水	夏　期	20	16	80.0	*Y. enterocolitica*	13	81.3
					Y. kristensenii	12	75.0
					Y. intermedia	2	12.5
					Yersinia sp.	1	6.3
	冬　期	20	20	100.0	*Y. enterocolitica*	17	85.0
					Y. kristensenii	6	30.0
					Y. frederiksenii	5	25.0
					Yesinia sp.	3	15.0
	小　計	40	36	90.0			
池　　水	夏　期	10	0	—			
	冬　期	10	10	100.0	*Y. enterocolitica*	9	90.0
					Y. kristensenii	2	20.0
					Yersinia sp.	6	60.0
	小　計	20	10	50.0			
井　戸　水	夏　期	20	0	—			
	冬　期	20	0	—			
	小　計	40	0	—			
合　　計		160	75	46.9			

また，*Y. enterocolitica* と *Y. kristensenii* が同時に分離されたものが9試料（25.0%）あり，*Y. enterocolitica* と *Y. frederiksenii* は5試料（13.9%）から，*Y. enterocolitica* と *Yersinia* sp. および *Y. kristensenii* と *Y. intermedia* は，それぞれ1試料（2.8%）から同時に分離された．さらに，*Y. enterocolitica*, *Y. kristensenii*, *Yersinia* sp. が同時に分離されたものが2試料（5.6%）あり，1試料（2.8%）からは *Y. enterocolitica*, *Y. kristensenii* および *Y. intermedia* が同時に分離された．池水からは *Y. enterocolitica* が10試料中3試料から，*Yersinia* sp. が，1試料から単独で分離された．そして *Y. enterocolitica* と *Yersini* sp. が4試料から，*Y. enterocolitica* と *Y. kristensenii* が1試料から同時に分離された．残りの1試料からは *Y. enterocolitica*, *Y. kristensenii* および *Yersini* sp. が同時に分離された．

以上のように調査した水環境中には多種の *Yersinia* 属菌が広く生息していることがわかり，なかでも *Y. enterocolitica* が最も分離頻度の高い菌種であった．

3. 水環境から分離された *Y. enterocolitica* の生物型別，血清型別および自己凝集性

浄化槽放流水28試料，河川水30試料，池水9試料から分離された合計231株の *Y. enterocolitica* について血清型別および生物型別を行った結果を表2に示した．血清型別が可能であった菌株は，浄化槽放流水で16株，河川水で20株，池水では6株の合計42株（18.2%）であり，残りの189株は型別不能であった．すなわち，血清型03生物型1が1株，血清型05生物型1が17株，血清型05生物型2が1株，血清型08生物型1が17株，血清型08生物型2が4株，血清型09生物型1が1株および血清型09生物型2が1株であった．

血清型別された42株について自己凝集性を試験したところ，すべて自己凝集性は陰性を示し，非病原株であることが推察された．

4. 水環境から分離された *Yersinia* 属菌の塩素抵抗性

試験に用いた菌株は水環境から分離した *Y. enterocolitica* 血清型03，*Y. enterocolitica* 血清型05，*Y. enterocolitica* 血清型08，*Y. enterocolitica* 血清型09，*Y. intermedia*，*Y. frederiksenii*，*Y. kristensenii*，*Yersinia* sp. と病原性の明かなブタ由来の *Y. enterocolitica* 血清型03および患者糞便由来の *Y. pseudotuberculosis* 血清型4b である．また比較対照菌として *Escherichia coli* ATCC 11775を用いた．これらについて遊離残留塩素濃度0.1mg／*l* に対する塩素抵抗性を検討した．その結果，いずれの菌株も対照大腸菌と差はなく，1.6～4.9×10^5／m*l* の初期添加菌数が30秒の接触時間で100%殺菌された．

考　察

Yersinia 属菌は動物の糞便や動物性食品からヒトに感染するといわれていることから，自然界における本属菌の分布調査のほとんどが，各種動物の糞便や食肉などを対象としたものであり，水環境における報告はあまり見あたらないのが現状である．ところが，1985年に佐藤ら[46]は，*Y. pseudotuberculosis* による感染症が本菌で汚染された井戸水に原因していた例を報告して以来，水道行政においても *Yersinia* 属菌に対する関心が高まってきた．そこで，都内の種々水環境における *Yersinia* 属菌の分布状況を知るために，浄化槽放流水，河川水，池水および井戸水を対象に本属菌の検出を試みた．

今回の調査では，*Y. enterocolitica* をはじめとする *Yersinia* 属菌が，井戸水以外の水環境中に広く分布していることが明かとなり，46.9%の高い検出率であった．浅川ら[43]は静岡県下の河川水，下水，池水など213試料中68試料（31.9%）から本属菌を検出している．また，中嶋らも岡山県下の河川水や井戸水等3,902試料について調査し，594試料（15.2%）から *Y. enterocolitica* を，また同時に38試料（1.0%）から *Y. pseudotuberculosis* を検

表2．分離された *Y. enterocolitica* の血清型別と生物型別

材　料	分離株数（%）	血清型／生物型							
		03／1	05／1	05／2	08／1	08／2	09／1	09／2	型別不能
浄化槽放流水	77	0	7	0	6	3	0	0	61
河　川　水	133	1	5	1	10	1	1	1	113
池　　水	21	0	5	0	1	0	0	0	15
合　　計	231 (100)	1 (0.4)	17 (7.4)	1 (0.4)	17 (7.4)	4 (1.7)	1 (0.4)	1 (0.4)	189 (81.9)

出したと報告している[44]．さらに，米国のShayeganiらの報告では622試料の表流水のうち147試料（23.6%）から *Yersinia* 属菌を検出している[45]．これらの報告と今回我々が行なった調査結果とを比較すると，分離方法が異なるとはいえ，都内の水環境にはかなり高率に *Yersinia* 属菌が分布していることが判明した．

一般的に，水環境中の *Yersinia* 属菌は高水温時期より水温の低い冬期に多く検出されることが指摘されている[44]が，この傾向と同様な調査結果が得られた．このことは，夏期には他の菌種が優勢であるため生菌数に占める *Yersinia* 属菌の割合が低く，冬期になると低温でも発育可能である[51] *Yersinia* 属菌の割合が高くなるためと考えられる．

分離された *Yersinia* 属菌は，*Y. enterocolitica* が最も多かった．次いで *Y. frederiksenii*，*Y. kristensenii*，*Y. intermedia* および *Yersinia* sp. であった．しかし浅川らの90株の分離結果では，*Y. enterocolitica* はわずか1株であり，*Y. intermedia*（63株）と *Y. frederiksenii*（26株）が大半を占めていた[43]．また，Shayeganiらの報告[45]でも同様であり，147の分離株のうち *Y. enterocolitica* は15.6%の低率となっている．そして，やはり *Y. intermedia* が76.9%と最も高頻度に分離されていり，我々の調査結果とはかなり異なった傾向が示されている．

ヒトに対して病原性のある *Y. enterocolitica* では，その血清型と生物型との組合せが，血清型03生物型3および4，血清型05：27生物型2，血清型08生物型1および血清型09生物型2であることが知られている．しかし，最近 *Yersinia* 属菌の病原性がプラスミド保有と密接な関係にあることが明らかにされており[52]，分離株についてはプラスミド保有あるいは各種病原性状試験を行なうことが必要であるといわれる[53]．そこで，*Y. enterocolitica* と同定された分離株について血清型別と生物型別を行い，最も簡易な病原性状試験である自己凝集性を調べた．その結果，自己凝集性はすべての菌株で陰性であった．ところが，血清型05：27生物型2，血清型08生物型1および血清型09生物型2に分類された菌株があった．これらの菌株は，水環境といういままであまり調査されていなかったフィールドから分離されたものであるため，現在の生物型別には当てはまらない菌株であると思われた．

上水道の原水となる河川水中に *Yersinia* 属菌が多く分布していたため，本菌に対する残留塩素の殺菌効力を調べたところ，0.1mg／*l* 濃度でいずれの菌株も *E. coli* と同じように30秒以内に殺菌されることが明らかとなった．

結　　語

都内の水環境から *Yersinia* 属菌の検出を試みたところ，約半数（46.9%）の試料から検出され，特に冬期において高い検出率であった．なかでも *Y. enterocolitica* が最も高頻度に分離され，ほかに *Y. kristensenii*，*Y. frederiksenii*，*Y. intermedia* および *Yersinia* sp. と多種類にわたって分離された．*Y. enterocolitica* の病原性状の一つである自己凝集性はいずれも陰性であり非病原株であると思われた．また，分離株の遊離残留塩素に対する抵抗性は，*E. coli* と同程度であることが明らかとなった．

なお，本稿の要旨は第46回日本公衆衛生学会総会（1987年11月，長崎市）において発表した．

文　　献

1）坂崎利一　編集：食中毒Ⅱ－新たに認定された食中毒菌－，143-219，1983，中央法規出版，東京
2）Jensen, W. I., Owen, C. R. and Jellison, W. L.：*J. Bacteriol.*, 100(3), 1237-1241, 1969
3）Ewing, W. H., Ross, A. J., Brenner, D. J. and Fanning, G. R.：*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 28(1), 37-44, 1978
4）Brenner, D. J., Bercovier, H., UrsingJ., Alonso, J. M., Steigerwalt, A. G., Fanning, G. R., Carter, G. P. and Mollaret, H. H.：*Curr. Microbiol.*, 4, 207-121, 1980
5）Ursing, J., Brenner, D. J., Bercovier, H., Fanning, G. R., Steigerwalt, A. G., Brault, J. and Mollaret, H. H.：*Curr. Microbiol.*, 4, 213-217, 1980
6）Bercovier, H., Ursing, J., Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., Fanning, G. R., Carter, G. P. and Mollaret, H. H.：*Curr. Microbiol.*, 4219-224, 1980
7）Bercovier, H., Steigerwalt, A. G., Guiyoule, A., Huntley-Carter, G. and Brenner, D. J.：*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34(2), 166-172, 1984
8）Aleksic, S., Steigerwalt, A. G., Bockemuhl, J., Huntley-Carter, G. P. and Brenner, D. J.：*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37(4), 327-332, 1987
9）Zen-Yoji, H. and Maruyama, T：*Japan J. Microbiol.*, 16(6), 493-500, 1972
10）Asakawa, Y., Akahane, S., Kagata, N. and Noguchi, M.：*J. Hyg. Camb.*, 71, 715-723, 1973
11）Zen-Yoji, H., Maruyama, T., Sakai, S., Kimura, S., Mizuno, T. and Momose, T.：*Japan J. Microbiol.*, 17(3), 220-222, 1973
12）内田耕博，降井佐太郎，伊吹彦三：京都府衛研年報，19，25-29，1974
13）湯田和郎：医学と生物学，92(6)，493-498，1976

14) 坂崎利一：食品衛生研究，32(6)，41-50，1982
15) 坂崎利一：食衛誌，23(6)，413-421，1982
16) 井上正直，中嶋　洋，上羽　修，谷本浩一，石田立夫，田中陸男，坪倉　操：メデイヤサークル，30(8)，7-13，1985
17) 中野貴司，川口　寛，中尾宏太，高須清教：メディヤサークル，30(8)，14-18，1985
18) 田端葉子：メディヤサークル，30(8)，19-25，1985
19) 矢崎廣久：医学の歩み，138(3)，184-185，1986
20) 三瓶憲一，内村真左子，小岩井健司，高木謙二，矢崎廣久，七山悠三，太田原美作雄：感染症学雑誌，61(7)，763-771，1987
21) 佐藤幸一郎：小児科臨床，34(8)，138-142，1981
22) 佐藤幸一郎：モダンメディア，33(7)，4-13，1987
23) 佐藤幸一郎：感染症学雑誌，61(7)，746-762，1987
24) 尾内一信，佐藤幸一郎：メデイヤサークル，30(8)，40-45，1985
25) 馬場　清，瀧本哲也，武田修明，田中陸男：メディヤサークル，30(8)，46-51，1985
26) 片寄雅彦，武藤茂生，森　秀樹，鈴木　仁，川名冬彦：メディヤサークル，30(8)，52-54，1985
27) 武田修明，森美喜夫，田中陸男：メディヤサークル，30(8)，55-60，1985
28) 武田修明：モダンメディア，33(7)，14-20，1987
29) 浅川　豊，赤羽荘資，利田直子，福田文男：静岡県衛研年報，17，1-6，1974
30) 浅川　豊，赤羽荘資，利田直子：静岡県衛研年報，17，7-13，1974
31) 金子誠二，丸山　努，神崎政子，小久保彌太郎，神保勝彦，松本昌雄，竹重都子：東京衛研年報，36，158-163，1985
32) 金子誠二，丸山　努，小久保彌太郎，神保勝彦，松本昌雄：東京衛研年報，37，136-140，1986
33) 福島　博：獣医畜産新報，796，24-28，1987
34) 金子賢一：獣医畜産新報，796，29-32，1987
35) Vidon, D. J. M. and Delmas, C. L.：*Appl. Environ. Microbiol.*, 41(2), 355-359, 1981
36) Doyle, M. P., Hugdahl, M. B. and Tatlor, S. L.：*Appl. Environ. Microbiol.*, 42(4), 661-666, 1981
37) Lewis, A. M. and Chattopadhyay, B.：*J. Hyg. Camb.*, 97, 281-287, 1986
38) Toma, S.：*J. Clin. Microbiol.*,24(3), 465-466, 1986
39) Shayegani, M., Stone, W. B., DeForge, I., Root,T., Pasons, L. M. and Maupin, P.：*Appl. Environ. Microbiol.*, 52(3), 420-424, 1986
40) Zheng, X. B.：*J. Appl. Bacteriol.*, 62, 521-525, 1987
41) Punsalang, A. Jr., Edinger, R. and Nolte, F. S.：*J. Clin. Microbiol.*, 25(5), 859-862, 1987
42) Mingrone, M. G., Fantasia, M., Figura, N. and Guglielmetti, P.：*J. Clin. Microbiol.*, 25(7), 1301-1304, 1987
43) 浅川　豊，赤羽荘資，塩沢寛治：静岡県衛研年報，23，25-29，1980
44) 中嶋　洋，井上正直，中桐登喜子，石田立夫：岡山県環境保健センター年報，11，120-122，1987
45) Shayegani, M., DeForge, I., Mcglynn, D. M. and Root, T.：*J. Clin. Microbiol.*, 14(3), 304-312, 1981
46) 佐藤幸一郎，尾内一信：メディヤサークル，30(8)，66-69，1985
47) Weagant, S. D. and Kaysner, C. A.：*Appl. Environ. Microbiol.*, 45(2), 468-471, 1983
48) Schiemann, D. A.：*Can. J. Microbiol.*, 25, 1298-1304, 1979
49) 金子誠二，神保勝彦，小久保彌太郎，松本昌雄，丸山　努：食衛誌，25(5)，424-429，1984
50) Bercovier, H., Brenner, D. J., Ursing, J., Steigerwalt, A. G., Fanning, G. R., Alonso, J. M., Carter, G. P. and Mollaret, H. H.：*Curr. Microbiol.*, 4, 201-206, 1980
51) 丸山　努：日細誌，28(3)，343-349，1973
52) Gemski, L. et al.：*Infect. Immun.*, 27, 682-685, 1980
53) 金子誠二：獣医蓄産新報，796，8-11，1987

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 277-279, 1988

環境における化学物質の安全性に関する調査研究（第1報）キャピラリーガスクロマトグラフィーによる環境試料中のオレイン酸アミドおよびステアリン酸アミドの分析方法

岡本　寛*, 大橋則雄*, 土屋悦輝*
笹野英雄*

Studies on Environmental Safety of Chemicals (I) Determination of Oleamide and Stearamide in Environment by Capillary Gas Chromatography

YUTAKA OKAMOTO, NORIO OHASHI, YOSHITERU TSUCHIYA
and HIDEO SASANO

Keywords：determination, Oleamide,stearamide, seawater, sediment

緒　言

現在，少なくとも2～3万種の化学物質が生産，輸入，使用されており，その製造，使用，廃棄の過程で化学物質は環境中に放出される可能性がある．その結果，環境を汚染し，人類に脅威を与える場合がある．

これらの膨大な数の化学物質より，環境庁では有害性（LD_{50}等動物実験による毒性，労働環境における人体への毒性，発がん性，生物濃縮性，難分解性等の内外の情報に基づき有害性に一定の評価を加えたもの）のほか，生産量，用途など環境への放出という観点も考慮に入れて，環境調査を行う必要があると考えられる約2,000物質を選択し，プライオリティリストを作成している[1)]．

今回，プラスチックの滑剤として使用され，その廃棄の過程で環境中に大量に放出されると考えられるオレイン酸アミド及びステアリン酸アミド（ステアリン酸アミドは発がん性を示すことが報告されている）をプライオリティリストより選び，環境中の残留レベルを測定する為の分析法を確立した．又，実試料として東京湾の海水及び底質について分析したので報告する．

実験の部

1．試料液の調製

1）**水質試料**　試料1 *l* を分液ロートに取り，塩化ナトリウム50g を加え，ベンゼン50m*l* ずつで2回，15分間振とう抽出をする．ベンゼン層を合せ，無水硫酸ナトリウムで脱水後，KD濃縮器で5 m*l* に濃縮する．濃縮液を無水硫酸ナトリウム2 g を層積したシリカゲルカラム（1.0 ϕ ×30cm のカラムにシリカゲル5 g をベンゼンで湿式充填したもの）にのせ，容器は少量のベンゼンで洗い，洗液をカラムクロマト管に加える．続いて，酢酸エチル／ベンゼン（2：8）280m*l* を流し，初めの160m*l* を捨て，次の160m*l* ～280m*l* を KD 濃縮器に受け，5 m*l* まで濃縮した後，窒素ガスを吹きつけて乾固する．残渣をアセトン1 m*l* に溶かし，これを試料液とする．

2）**底質試料**　試料20g を100m*l* 共栓付遠沈管にとり，エタノール50m*l* を加え15分間振とう抽出後，3,000rpm で遠心分離を行ってエタノール層を分取する．再び，残渣にエタノール50m*l* を加えて同様な抽出操作を行う．エタノール層をベンゼン50m*l*，5％塩化ナトリウム水溶液100m*l* の入った分液ロートにとり15分間振とう抽出を行う．ベンゼン層を5％塩化ナトリウム水溶液50m*l* ずつで2回洗浄後，無水硫酸ナトリウムで脱水し，KD濃縮器で5 m*l* に濃縮する．以下，濃縮液を水質試料と同様に，カラムクロマトグラフィー，濃縮を行い試料液とする．

2．試薬および標準液

1）**試薬**　ベンゼン，アセトン，酢酸エチル，エタノール：残留農薬試験用，精製水，5％塩化ナトリウム溶液：ベンゼンで洗浄したもの，塩化ナトリウム：特級を

*東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科　169　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, 169 Japan

500°で加熱処理したもの，無水硫酸ナトリウム：PCB・フタル酸エステル試験用を500°で加熱処理したもの，シリカゲル：シリカゲル60（エキストラピュア）メルクを150°～160°で5時間活性化し一夜デシケーター中に保存したもの，オレイン酸アミド，ステアリン酸アミド：東京化成　一級

2）**標準液**　オレイン酸アミド，ステアリン酸アミドをおのおの正確に50mgはかり，それぞれにアセトンを加えて正確に100mlとし標準原液とする．標準原液より順次希釈して，1～10ppmの標準混合液を作製する．

3．**装置**　ムービングプレカラム式試料導入装置を装着したFTD付ガスクロマトグラフ：島津GC-9A，SPL-7

4．**測定**　試料液15 μlをガスクロマトグラフに注入し，得られたピーク面積により，予め作製した検量線より定量する．

〔キャピラリーGC／FTDの条件〕

カラム：OV-1　Bonded　0.25mm φ ×25m 膜厚0.3 μm　キャリアガス：ヘリウム　カラム入口圧1.4kg／cm^2　カラム温度：初期温度　70°，初期温度保持時間0分，昇温速度　15°／min，昇温最終温度　250°，昇温最終温度保持時間　13分，注入口および検出器温度：280°

注入法：ムービングプレカラム式試料導入装置を使用した．　プレカラム：OV-1（2％）Uniport HPS60／80 Purge（upper）：ヘリウム50ml／min　Purge（lower）：ヘリウム　1ml／min　試料液15 μlをプレカラムに付け，溶媒をUpper purgeにより除去（210sec）後，プレカラムを注入口に移動させ，加熱（300sec）して，試料をキャピラリーカラムに導入した．

結果および考察

1．**分離定量法**　オレイン酸アミド，ステアリン酸アミドの分離定量法として数種のパックドカラム（OV-1, PEG-HT, Unisole10T＋H_3PO_4等）を用いGC／MS-MFを試みた．これらの物質は吸着性が強いこと，低濃度では分離しないこと，又，お互に選択的で強度の強いフラグメントイオンがないこと等のために，パックドカラムは不適であった．更に，ビストリメチルシリルアセタミドでトリメチルシリル誘導体を調製し，パックドカラムで分析を試みたが，保持時間の再現性に問題があった．

これ等のために，キャピラリーカラムを用いて分析することとした．

2．**検量線**　1～10ppmの標準混合液15 μlをガスクロマトグラフに注入し，そのピーク面積より検量線を作製した．代表的な検量線を図1に示す．

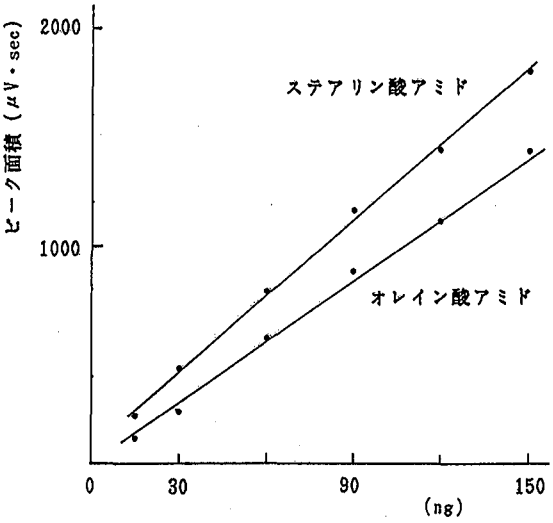


図1．検量線

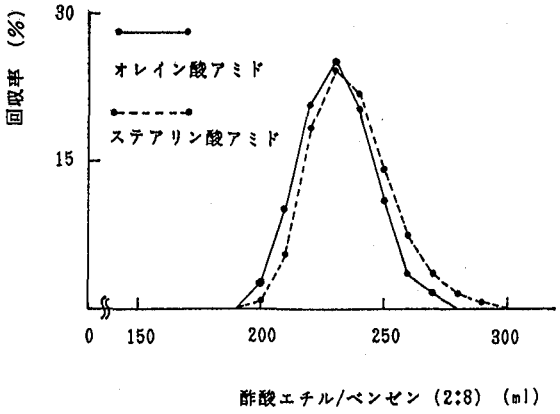


図2．シリカゲルカラムからの溶出曲線

3．**シリカゲルカラムクロマトグラフィー**　酢酸エチル／ベンゼン（2：8）によるシリカゲルカラムよりの溶出曲線を図2に示す．160ml～320mlを分取して試料液を作ると，海水試料（東京湾中瀬）でステアリン酸アミドの定量を妨害するピークが認められた為，160ml～280mlを分画することとした．

4．**添加回収実験**　蒸留水に5 μgの標準品を添加し4回，海水に10 μgを添加し2回，また底質試料に5 μg添加し7回，回収実験を行った．この結果を表1に示す．

表1より，底質試料でもオレイン酸アミドの平均回収率は83％，ステアリン酸アミドの回収率は80％と良好な結果であった．

表1．添加回収実験結果

試　料	試料量	添加量	回収率（%）		変動係数（%）		
			オレイン酸アミド	ステアリン酸アミド	オレイン酸アミド	ステアリン酸アミド	
蒸留水	1 l	5 μg	84	87	9.1	8.2	(n=4)
海　水	1 l	10 μg	94	95	—	—	(n=2)
底　質	20 g	5 μg	83	80	6.5	6.1	(n=7)

表2．検出限界および定量限界

	試料量	検出限界（μg／ml 又は g）		定量限界（μg／ml）	
		オレイン酸アミド	ステアリン酸アミド	オレイン酸アミド	ステアリン酸アミド
水 試 料	1 l	0.0015	0.00031	0.005	0.001
底質試料	20 g	0.051	0.015	……	……

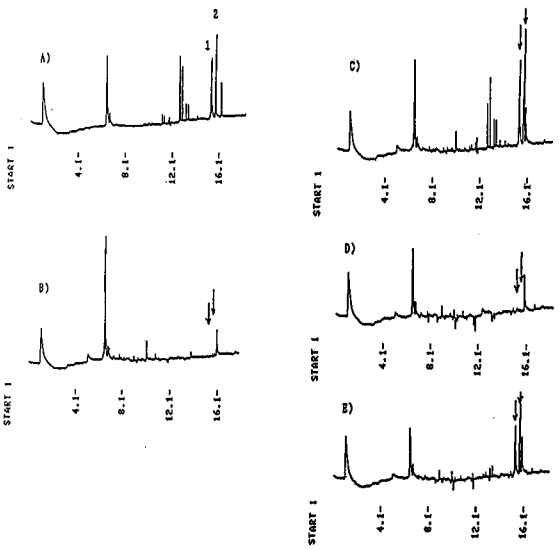


図3．酸アミドのガスクロマトグラム
A）標準液　1．オレイン酸アミド(75ng)
　　2．ステアリン酸アミド(75ng)
B）水試料(1 l)
C）水試料(1 l)＋標準品(各々10 μg)
D）底質試料(20g)
E）底質試料(20g)＋標準品(各々5 μg)

5．**検出限界および定量限界**　環境庁の定める検出限界等の算定方法に従い求めた[2]．水質および底質試料の本分析法による検出限界および定量限界を表2に示す．

6．**実試料の分析**　図3に東京湾中瀬で採取した海水および底質試料のクロマトグラム，それぞれの試料に標準品を添加したときのクロマトグラム，および標準液のクロマトグラムを示す．東京湾中瀬の水質および底質試料中のオレイン酸アミドおよびステアリン酸アミドは検出限界値以下であった．なお，標準品の純度はFIDによるクロマトグラムより90%以上と考えられるが，標準液のFTDによるクロマトグラムには不純物と対象物質のFTDに対する感度の違いにより，不純物のピークがかなり大きく現われる．

ま と め

水質および底質試料中のオレイン酸アミド，ステアリン酸アミドの分析法を確立した．本分析法により環境試料中のppbオーダーの分析が可能である．

また，東京湾中瀬の水質および底質試料中からこれらの物質は検出されなかった．

（本研究は環境庁委託事業「化学物質分析法開発調査」の一環として実施した）

参 考 文 献

1）環境庁編：化学物質と環境，1977
2）環境庁編：検出限界等の定め方について，1987

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 280-288, 1988

多摩地区地下水における揮発性有機塩素化合物汚染の動向

矢口 久美子*, 鈴木 俊也*, 関山 登*,
渡辺 学*, 西島 基弘*, 寺山 武*

The Trend of the Contamination of Volatile Chlorinated Organic Compounds in Groundwater in Tama, Tokyo

KUMIKO YAGUCHI*, TOSHINARI SUZUKI*, NOBORU SEKIYAMA*,
SATORU WATANABE*, MOTOHIRO NISHIZIMA* and TAKESHI TERAYAMA*

Keywords：地下水汚染 contamination of groundwater, トリクロロエチレン trichloroethylene, テトラクロロエチレン tetrachloroethylene, 1,1,1-トリクロロエタン 1,1,1-trichloroethane, 季節変動 seasonal changes

緒　言

著者らは，昭和56～57年に東京都多摩地区における地下水のトリクロロエチレン（TCE）等の揮発性有機塩素化合物の汚染実態を明らかにするため，井戸水を対象に調査し，その汚染が広範囲に広がっていることを報告した[1]．

一方，環境庁は昭和57年に全国的に地下水汚染調査を実施し，TCE 等の有機塩素化合物汚染が極めて広範囲に及んでいることを明らかにした[2]．

その後，厚生省は昭和59年２月に TCE，テトラクロロエチレン（PCE），1,1,1-トリクロロエタン（MC）について水道水の暫定水質基準を設定した[3]．さらに，昭和59年８月には，環境庁及び通産省などにより，TCE 等の排水濃度の管理目標値が示され[4),5),6)]，現在それに従って行政指導が進められている．

そこで今回，再度，東京都多摩地区の井戸水の揮発性有機塩素化合物の汚染調査を行い，前回の調査結果と比較して，汚染状況の推移を把握すると共に，特定の井戸について汚染の季節変動を調査したのでその結果を併せて報告する．

調査方法

1. 調査対象井戸及び調査期間

1） 井戸の深さが30m より浅い井戸（浅井戸）225件，30m より深い井戸（深井戸）231件，合計456件を対象とした．なお，それらはいずれも昭和61年９～12月に採水した．

また，昭和56年の調査で汚染が確認された多摩地区北東部の浅井戸29か所，南東部の浅井戸12か所について汚染動向調査を行った．

2） あらかじめ，TCE 等に汚染されていることを確認した浅井戸６か所と深井戸10か所について，昭和60年４月～62年３月に，このうち浅井戸４か所と深井戸５か所については昭和60年４月～63年３月まで，揮発性有機塩素化合物の季節変動を調査した．なお採水は深井戸１か所については毎月，他の井戸については隔月に行った．

2. 採水方法

採水方法はいずれも上水試験方法[7]に準じて行った．ただし，トリハロメタンの測定は行わなかったことから，採水時に亜硫酸ナトリウム及びリン酸を添加しなかった．

3. 調査項目

TCE，PCE 及び MC について汚染実態調査を行った．なお特定井戸を対象とした汚染動向調査では *cis*-1,2-ジクロロエチレン（DCE）の測定も行った．また季節変動調査では TCE，PCE，MC，pH，硝酸性窒素及び塩素イオンについて調査した．

なお，月間降水量は三鷹市水道部のデータ[8]によった．

3. 分析方法

1） 装置　ガスクロマトグラフ（GC）：島津 GC　7A ECD（^{63}Ni　10mCi），インテグレーター：島津クロマトパックC-R3A，恒温槽：小松エレクトロニクス CTE220，イオンクロマトグラフ：ダイオネックス社2010i 型，pH メータ：東亜電波工業（株）HM-10K 型

*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

2) 標準物質

TCE, PCE, MC 及び DCE の各1,000mg／l 混合標準液（関東化学，特注品）を残留農薬試験用メタノールで適宜希釈して使用した.

3) 操作方法

揮発性有機塩素化合物：上水試験方法のヘッドスペース法[7]に準じて行った．ただし平衡温度は20℃で行い，GC への気相のガス注入量は100 μl とした.

ガスクロマトグラフィーの分析条件：カラム 20% Silicone DC550 chromosorb W AW 80～100メッシュ 3mm×3m ガラスカラム，カラム温度 90℃，注入口温度 250℃

塩素イオン及び硝酸性窒素：イオンクロマトグラフィーにより測定した．すなわち試料50 μl を直接注入し電気伝導度検出器により測定した.

イオンクロマトグラフィーの分析条件：分離カラム HPIC AS4A，ガードカラム：HPIC AG4A，溶離液：22mmol Na_2CO_3 及び7.5mmol $NaHCO_3$ の混合液，再生液：0.01N H_2SO_4

pH 値：上水試験方法のガラス電極法[7]及び比色法[7]に従い測定した.

結果及び考察

1. 揮発性有機塩素化合物による地下水汚染の実態

1) 昭和56，57年（前回）及び昭和61年（今回）の調査結果の比較

調査した井戸を浅井戸，深井戸別に分類し，地域別に整理して表1に示した.

また TCE，PCE 及び MC の検出率を浅井戸，深井戸に分けて表2に示した．今回と前回の調査結果を比較すると，浅井戸においてはいずれの化合物も検出率が上昇した．深井戸では TCE 及び PCE の検出率はやや上昇したが，MC は変化がみられなかった．しかし，これらの化合物濃度と水道法の暫定基準値（TCE30 $\mu g/l$，PCE10 $\mu g/l$，MC300 $\mu g/l$）を比較した場合，それを

表1．揮発性有機塩素化合物の調査対象井戸数及び採水地域

浅井戸			深井戸		
採水地域	調査井戸		採水地域	調査井戸	
	昭和56，57年	昭和61年		昭和56，57年	昭和61年
東久留米市	47	63	府中市	43	18
八王子市	24	2	八王子市	34	28
保谷市	18	21	昭島市	23	16
田無市	17	12	三鷹市	19	9
府中市	17	8	日野市	17	12
狛江市	14	5	小平市	17	13
清瀬市	13	3	東村山市	12	12
町田市	11	29	調布市	12	9
三鷹市	7	12	町田二	12	19
小平市	4	0	多摩市	6	6
武蔵野市	3	1	武蔵村山市	5	7
その他	6	69	その他	34	82
計	181	225		234	231

表2．井戸水中の揮発性有機塩素化合物の検出率

井戸の種類	調査の年	検出率（%）		
		TCE	PCE	MC
浅井戸	昭和56，57年	50	29	44
	昭和61年	66	41	58
深井戸	昭和56，57年	33	6	17
	昭和61年	38	10	17

表3．井戸水中の揮発性有機塩素化合物が暫定基準値を超える比率

井戸の種類	調査の年	基準値*を越える比率（%）		
		TCE	PCE	MC
浅井戸	昭和56，57年	20	13	0
	昭和61年	6	7	0
深井戸	昭和56，57年	9	3	0
	昭和61年	4	3	0

＊暫定基準値：TCE 30 μg／l，PCE 10 μg／l，MC 300 μg／l

上回ったものの比率は，表3に示すように，浅井戸ではTCE，PCE共に減少し，深井戸ではTCEは減少したがPCEは同じであった．MCには暫定基準値を上回るものはなかった．

これらの井戸水における各化合物の濃度分布を図1に示した．浅井戸，深井戸共に各化合物の高濃度汚染の比率は減少しているが，2～10 μg／l の低濃度汚染の比率はむしろ増加していることがわかった．特に浅井戸において，この傾向が顕著であった．

これらのことから，前回の調査から約5年の間に，TCE等の揮発性有機塩素化合物の地下水汚染は，低濃度ではあるが依然として拡散が続いていると推察される．また各化合物の暫定基準値を超える井戸水が減少したのは，高濃度に汚染されていた地下水が，自然浄化されていること，あるいは高濃度汚染の判明した井戸水が使用されなくなったためであるとも考えられる．

浅井戸においてTCE，PCE及びMCが同一の井戸から検出される組み合わせとその検出率を図2に示した．1つの化合物のみ，あるいは2つの化合物のみの同時検出率は減少し，逆に3つの化合物の同時検出率が上昇したことからも汚染の拡大が推察される．

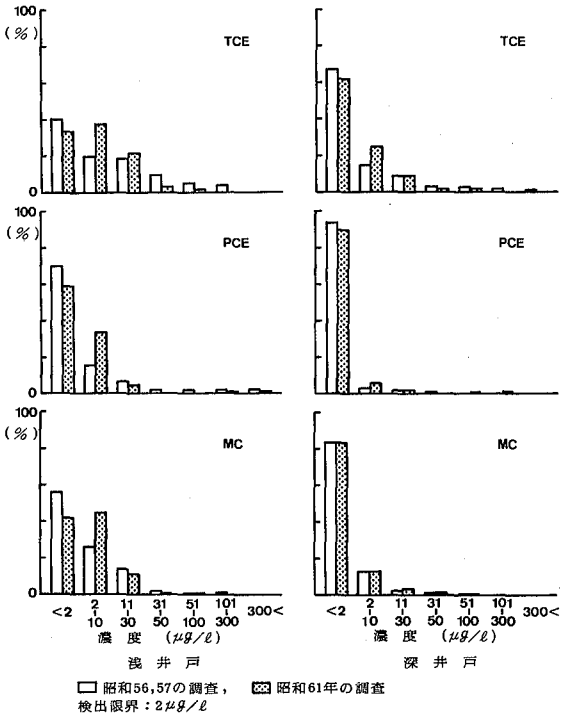


図1．多摩地区の井戸における揮発性有機塩素化合物の濃度分布

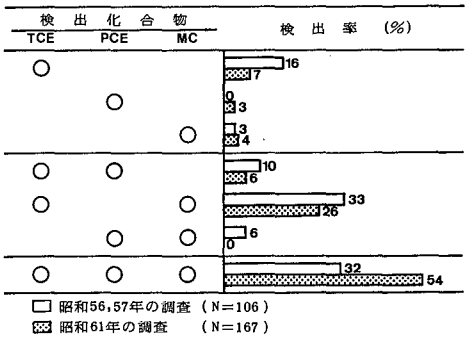


図2．浅井戸における揮発性有機塩素化合物の検出状況

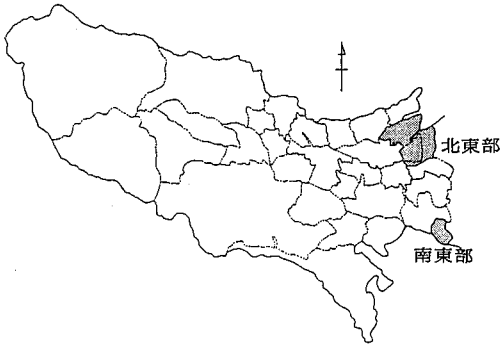


図3．同一井戸における揮発性有機塩素化合物の調査地域

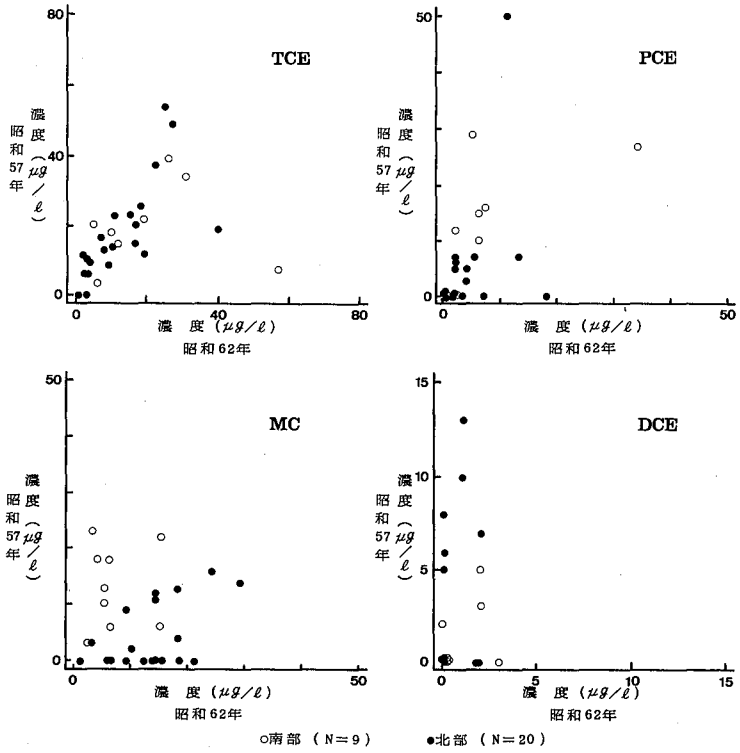


図4．多摩地区北東部浅井戸における揮発性有機塩素化合物の濃度分布

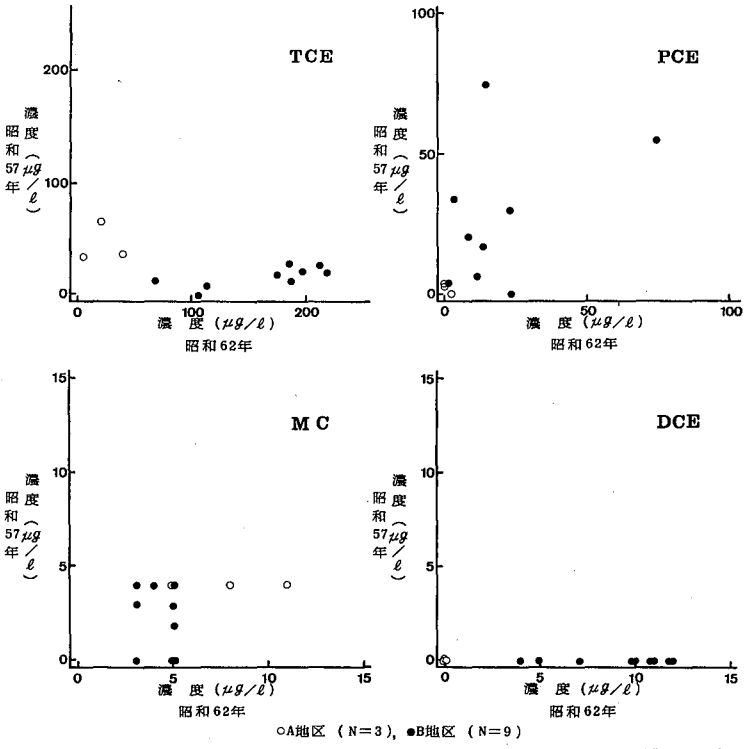


図5．多摩地区南東部浅井戸における揮発性有機塩素化合物の濃度分布

2) 同一井戸における昭和57年と62年の汚染調査の比較

TCE 等の揮発性有機塩素化合物による地下水汚染の変化をさらに詳細に検討するため，前回の調査で有機塩素化合物が検出され，かつ比較的サンプル数の多かった多摩地区北東部及び南東部の浅井戸について TCE, PCE, MC の他に DCE を加えて昭和62年に再調査を行った．調査地域の略図を図3に示した．

北東部浅井戸における各化合物の濃度分布を，昭和57年（前回）と62年（今回）とを対比して図4に示した．前回と今回の結果を比較すると，大部分の井戸で TCE 及び DCE 濃度は減少し，PCE も前回の調査で高濃度に検出された井戸においては著しい減少が認められた．MC については地域差がみられ，北部では減少し，南部では増加を示した．

多摩地区南東部における同様の濃度分布を図5に示した．この地区においてはPCE 濃度の減少傾向がみられるが，TCE, MC 及び DCE 濃度は逆に著しい増加がみられた．また南東部においても揮発性有機塩素化合物の濃度分布に地域特性がみられ，その特性によりA地区とB地区に分けた．A地区は前回の調査では TCE の高濃度汚染地域であったが，今回の調査ではその濃度が減少し，かわって MC の汚染濃度がやや上昇した．一方B地区は，PCE の高濃度汚染地域であったが，今回の調査では検出濃度の低下が認められ，かわって TCE 濃度が著しく上昇した．また MC, DCE においても上昇した．

北東部，南東部の同一井戸における5年間のこれら化合物の汚染濃度を比較すると，地域により変動幅に差はあるが，いずれの地域においても PCE 濃度は減少した．これは PCE が頻繁に使用され，かつ排水処理法があいまいであったクリーニング業に対して，厚生省が管理目標値[6]を示したこと，また保健所等の指導が開始されたこともあって，PCE 排出量が減少したことによるものと考えられる．しかし一方では，TCE がさらに高濃度に検出された地域がみられ，また徐々にではあるが MC の濃度が増加を示す等，汚染の拡散も認められた．MC の暫定基準値は TCE の10倍の300 μg／l と高濃度であることから，TCE からMC へ需要が移り変わっており[9]，汚染の拡大が懸念される．MC よりも古くから使用されている TCE[9]の汚染が広範囲にわたっていることを考えると，MC についてもこれ以上の汚染の拡散を防ぐよう関係機関の努力が一層必要であると考える．

2. 地下水中の揮発性有機塩素化合物の季節変動

地下水中の TCE 等有機塩素化合物濃度の1年間の挙動を明らかにするために，浅井戸6か所，深井戸10か所について季節変動を調査した．

1) 浅井戸　いずれからも TCE が検出され，調査期間中の変動の幅が小さい井戸では1 μg／l，大きい井戸

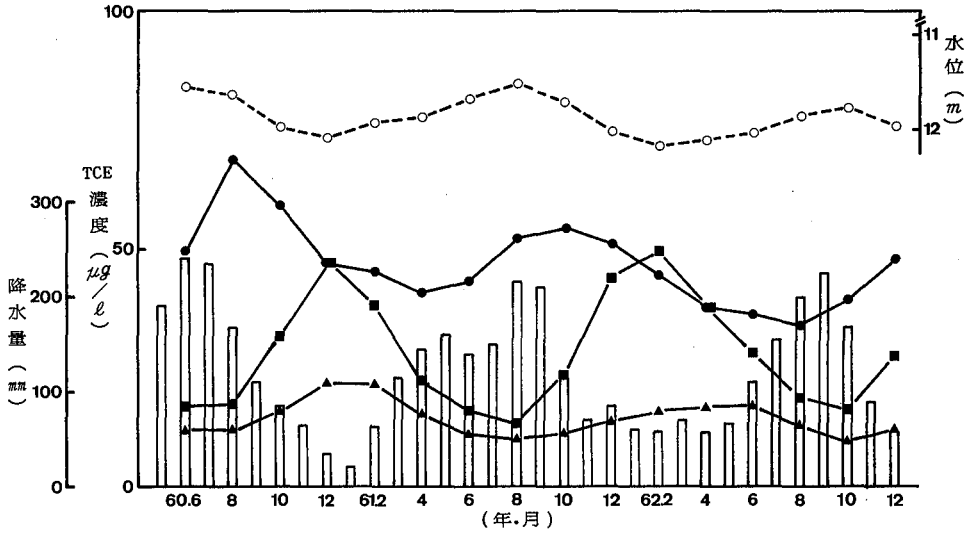


図6．浅井戸におけるトリクロロエチレンの季節変動と降水量及び水位

●—●浅井戸A，■—■浅井戸B，▲—▲浅井戸C，○…○浅井戸Aの水位

□月間降水量

いずれのデータも2回の調査の移動平均値

では58 μg／l であった．そのうち3か所の井戸で季節変動が認められたが，他の3か所ではほとんど認められなかった．

PCE は4か所の浅井戸から検出され，変動が認められたのは2か所で，その変動幅は1 μg／l と7 μg／l であった．調査期間を通して，いずれも変動幅に周期的な規則性はみられなかった．また他の2か所ではほとんど変動はみられなかった．

MC はいずれの井戸からも検出され，変動幅は1～95 μg／l と個々の井戸で変動幅に大差がみられた．このうち季節変動を示した井戸及び不規則な変動を示した井戸が各々1か所ずつ，他の4か所の井戸においてはほとんど変動が認められなかった．

TCE 濃度の季節変動が認められた3か所の浅井戸A，B及びCにおける TCE 濃度，月間降水量並びに浅井戸Aの水位の変動を2回の測定値の移動平均値で図6に示した．移動平均値 X_n は次式により求めた．

$$X_n = \{x_n + (x_{n-1} + x_{n+1})/2\}/2$$

x_n：n 回めの測定値

浅井戸Aでは降水量の多寡から2～4か月遅れて TCE 濃度の増減が認められた．この井戸の水位は降水量に相関して変動を示した．一方，浅井戸B及びCでは降水量の増減と逆の周期，すなわち夏期に TCE の濃度が低く冬期に高い傾向を示した．

ところで，雨水が地下に浸透する場合，土壌中に存在している TCE 等の汚染化合物を帯水層へ運搬する作用と，地下水が高濃度に汚染されている場合は，それを希釈する作用の2つが考えられる．今回調査の浅井戸Aでは前者の運搬の作用が大きく，浅井戸B及びCでは後者の作用が大きいと推察される．

2）深井戸　10か所の井戸すべてから TCE が検出され，調査期間中の変動幅は小さい井戸で8 μg／l，大きい井戸では120 μg／l であった．このうち，2か所の井戸で季節における変動が顕著に認められた．その他は不規則な変動が1か所，増加の傾向が1か所，残りの6か所の井戸ではほとんど変動が認められなかった．

PCE は3か所の井戸から検出され，変動幅は1～60 μg／l であった．1か所の井戸で季節変動が認められた．

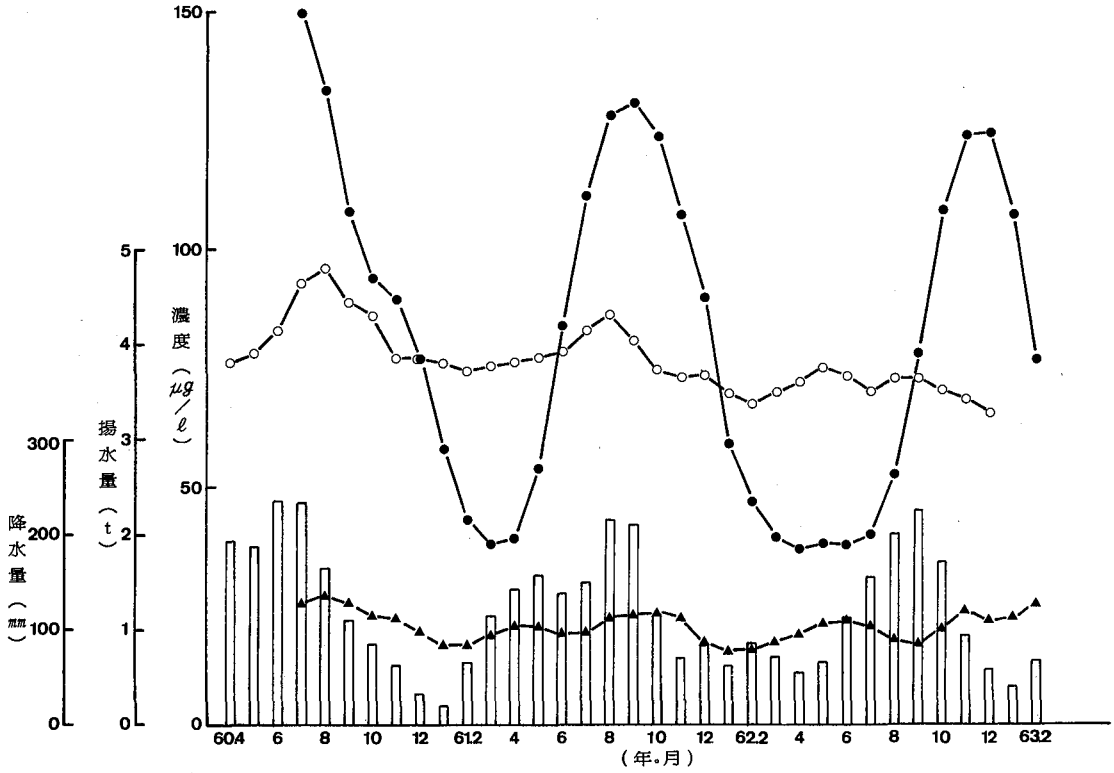


図7．深井戸Dにおける揮発性有機塩素化合物の濃度変動と揚水量及び降水量

●—●TCE，▲—▲PCE，○—○月間揚水量，□月間降水量

いずれのデータも2回の調査の移動平均値

その他増加の傾向を示した井戸が1か所，ほとんど変動を示さない井戸が1か所であった．

MC は7か所の井戸から検出され，変動幅は1～21 μg／l であった．そのうち1か所の井戸で季節変動を示したが，他の6か所の井戸では変動は認められなかった．

深井戸Dにおける TCE，PCE 濃度の季節変動と降水量及び揚水量との関係を図7に示した．TCE 濃度は降水量の変動に約2か月遅れて相関した挙動を示したが，揚水量との関係はみられなかった．PCE は TCE のように顕著な変動は認められなかった．調査期間中の無機イオン濃度の平均値は硝酸性窒素9.0mg／l，塩素イオン24.2mg／l，pH6.4であった．いずれも年間を通して大きな変動は認められなかった．これらの成績は当地区の浅井戸について著者らが別途に測定した成績と類似していることから，深井戸Dでは年間を通して不圧地下水の揚水量の多いことが考えられる．そのため深井戸Dと先に示した浅井戸の TCE 濃度の季節変動パターンが類似したと推測される．

深井戸Eにおいて TCE の濃度変動と降水量及び無機イオン濃度との関係を図8に示した．この場合の TCE 濃度は月間降水量の変動に約10か月遅れて類似の変動パターンを示した．同時に測定した硝酸性窒素及び塩素イオン濃度は TCE 濃度と同様の変動を示し，pH は TCE 濃度が高くなった時に下がり，逆に低くなった時に上がる傾向がみられた．

一般に不圧地下水の水質は被圧地下水のそれと比較すると，pH は低く[10]硝酸性窒素及び塩素イオン濃度は高い（著者未発表データ）．したがって深井戸Eでは TCE 濃度が高くなる時期に不圧地下水からの揚水量が増えていると考えられる．

ま と め

東京都多摩地区地下水における TCE 等の有機塩素化合物汚染の変動について，前回の調査すなわち昭和56，57年の調査と昭和61年の調査結果を比較し，さらに季節による変動を検討し次の結果を得た．

1．昭和61年に456か所の井戸水を対象とした調査では，昭和56，57年に比較し，浅井戸，深井戸共に TCE，PCE，MC の3化合物ともに水道水の暫定基準値を超え

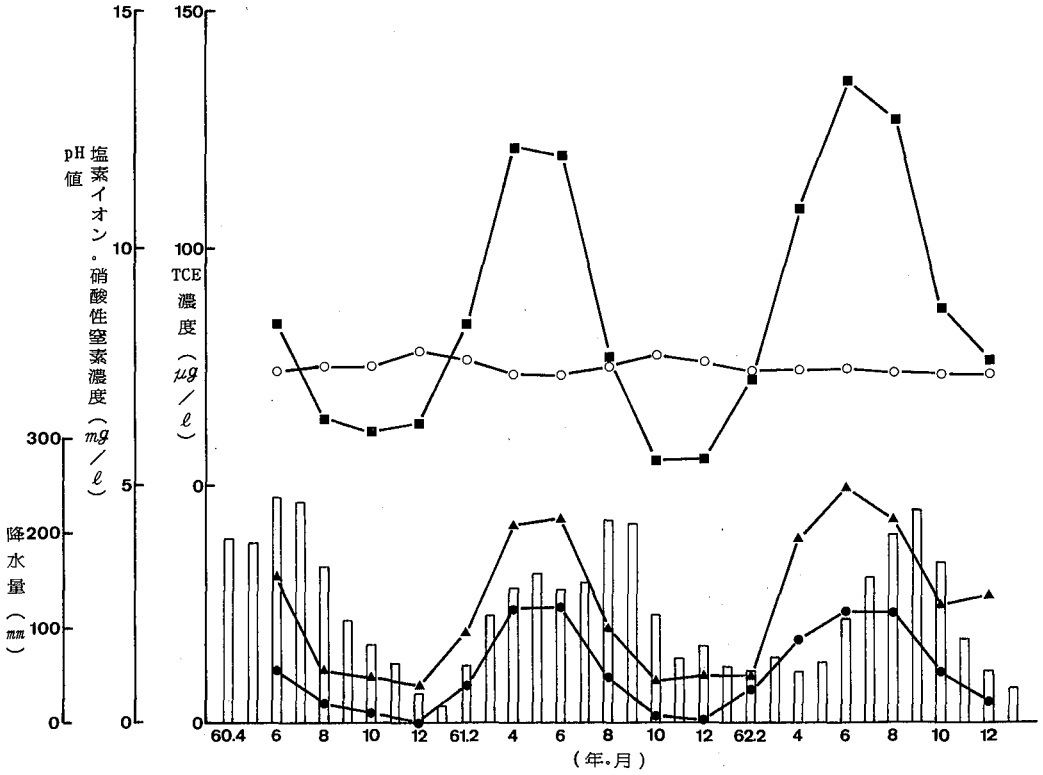


図8．深井戸Eにおける TCE の濃度変動と無機イオン濃度及び降水量

●—●TCE，■—■塩素イオン，▲—▲硝酸性窒素，○—○pH 値，□月間降水量

いずれのデータも2回の調査の移動平均値

る井戸は減少したが，検出される井戸の比率は増加し，特に浅井戸ではその傾向が顕著であった．

2．41か所の浅井戸について，昭和57年と62年の調査を比較した結果，化合物及び地域によって汚染の変動様式は異なっていた．

3．浅井戸6か所，深井戸10か所について年間の有機塩素化合物汚染の変動を調査した結果，TCE についてはいずれの井戸からも検出され，浅井戸3か所，深井戸4か所で何らかの変動のあることが確認された．そのうち季節変動を示したのは浅井戸3か所，深井戸2か所であった．その変動は降水量と関係が深いと思われる．

謝辞 本調査にあたり，調査井戸の確保に御協力下さった府中保健所，小平保健所並びに各保健所の衛生課の方々に，またデータの整理に御協力いただいた麻布大学環境保健学部の菊地文枝さんに心から謝意を表します．

文　献

1）矢口久美子，大橋則雄，渡辺学，関山登，中村弘，坂井千三：東京衛研年報，35，363-370，1984
2）杉戸大作：水道協会雑誌，589，53-61，1983
3）厚生省環境衛生水道環境部長通知，昭和59年2月18日付環水第15号
4）環境庁水質保全局長通知，昭和59年8月22日付環水管第127号　環水規第148号
5）通商産業省立地公害局長，昭和59年8月22日付59立局第504号
6）厚生省生活衛生局指導課長，昭和59年8月23日衛指第20号
7）厚生省生活衛生局水道環境部監修：上水試験方法，1985年版　水道協会
8）三鷹市水道部：気象観則月報，昭和60年3月～昭和63年3月
9）通商産業大臣官房調査統計部編：化学工業年報，昭和55年版～昭和61年版
10）山本荘毅：新版地下水調査法，1983，古今書院

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.*, 39, 289-291, 1988

オルトフェニルフェノール（OPP）水酸化酵素について（抗体によるチトクロームP 450分子種の同定）

牛山慶子*, 長井二三子*, 佐藤かな子*
加納いつ*

Characterization of OPP Hydroxylase : Identification of Cytochrome P 450 Species by Antibody

KEIKO USHIYAMA*, FUMIKO NAGAI*, KANAKO SATOH*
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P450 cytochrome P450. 抗体, antibody

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]．著者らは，OPPの代謝産物について検討したところ，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た[2-5]．OPP投与により肝薬物代謝酵素活性が誘導され[5]，これにより代謝物が増加し，ガンが発生すると考え，薬物代謝酵素について調べている．前報[6]は，OPPによって誘導されたチトクロームP450の増加を，いくつかのチトクロームP450分子種に対する特異的抗体を用い免疫化学的方法で検討した．今回は，OPPを代謝するOPP水酸化酵素について，その性質とそれを担うチトクロームP450の分子種を抗体を用いて検討した．

方法

OPP水酸化酵素標品は，PBミクロソームとOPPミクロソームを用いた．PBミクロソームは，ラットF344に4週令より1週間，フェノバルビタールナトリウムを80mg／kg毎日経口投与し，1日絶食後，断頭屠殺し，肝臓ミクロソームを調製した[5]．OPPミクロソームは，同種のラットに4週令より1週間，OPP-Naを2％飼料中に添加して投与し，PBミクロソームと同様に調製した．

NADPH, NADHはオリエンタル酵母，BSA（bovine serum albumin), Trisはsigma, MOPS（3-(N-Morpholino) propane-sulfonic acid）はドータイトのものを使用した．

OPP水酸化反応は，NADPH 1.2mM, NADH 0.9 mM, BSA 0.7mg／ml, $MgCl_2$ 3mMの終濃度で50mM Tris-塩酸緩衝液総量250 μlで行った．反応後，反応液を塩酸酸性でエーテル抽出し，内部標準としてビフェニルを添加し，高速液体クロマトグラフィーで分析した．HPLCの条件は，カラムはTSKgl ODS-80TM（粒径5 μm）4 mm×25cm，移動相は，アセトニトリル：水（9：1）を流速1 ml／minで流した．検出は，紫外部254nmの吸収を測定した．タンパク量の測定は，Lowry[7]の方法で行った．

抗体は，精製したPB誘導チトクロームP450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）[8,9]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[6]．OPP水酸化活性を至適条件：Tris緩衝液pH7.5，反応時間10分，基質OPP, 500 μMで測定し，抗血清との反応は4 μlを反応液に加え，室温で予備反応を1時間行い，基質を加えて酵素反応を開始した．

結果

この酵素の性質を調べるための基礎的実験は，PBミ

*東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　169　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, 169 Japan

クロソームを酵素として使用した．まず，pH による酵素活性の変化は（図１），Tris-塩酸緩衝液 pH7.0～pH9.0，MOPS 緩衝液 pH6.5～8.0の範囲で検討した．Tris-塩酸緩衝液，MOPS 緩衝液とも pH7.5～7.75が至適であった．反応時間による酵素活性の変化は（図２），少なくとも20分までは直線性を示したが，25分以後は直線性がなかった．ミクロソームのタンパク量を変えたものについての酵素活性の変化は（図３），１反応あたり20 μg～500 μg のタンパク量で測定したが，200 μg までは直線的に上昇した．基質濃度による活性の変化は（図４），基質である OPP が30 μM までは活性の立ち上がりにラグがあり，それより濃度を上げると活性は急に上昇し，60 μM 以上では活性の上昇はみられなかった．低濃度での立ち上がりのラグは，疎水性の薬物を基質としたときの酵素反応でよくみられるが[10]，OPP も疎水性であるので同様の結果がみられた．図４より，この反応の最大活性の１／２は約40 μM であった．

表１は OPP 水酸化酵素に対する精製チトクロームP450の特異的抗体の影響を，上記検討による至適条件で測定したものである．OPP ミクロソームの OPP 水酸化活性は抗 PB-Ⅰa，抗 PB-Ⅰb，抗 PB-Ⅱb によりそれぞれ60%，58%，47%に阻害された．PB ミクロソームの OPP 水酸化活性は60.5nmol／mg prot／min で，OPP ミクロソームの比活性9.5nmol／mg prot／min の約６倍高かった．PB ミクロソームの OPP 水酸化活性は抗 BNF 型で阻害しなかったが，５種のすべての抗 PB 型に

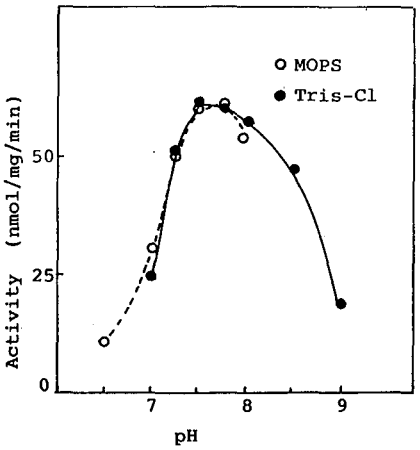


図１．pH による OPP 水酸化活性の変化

酵素は PB 処理ラット肝ミクロソームを20 μg 使用し，10分間反応させた．基質は OPP を500 μM 使用した．

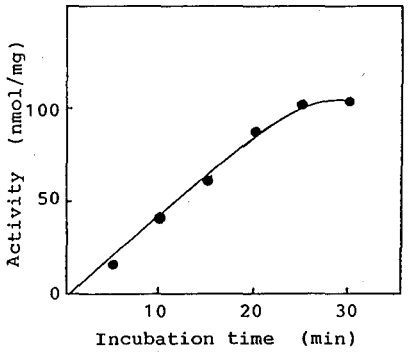


図２．反応時間による OPP 水酸化活性の変化

酵素は PB 処理ラット肝ミクロソームを20 μg 使用し，10mM，Tris 塩酸緩衝液 pH7.5で反応させた．基質は OPP を500 μM 使用した．

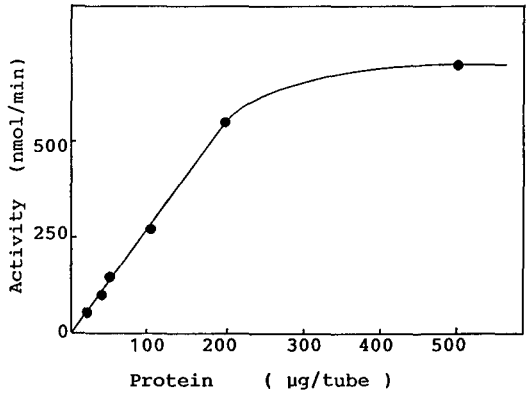


図３．酵素タンパク量による OPP 水酸化活性の変化

酵素は PB 処理ラット肝ミクロソームを使用し，10mM，Tris 塩酸緩衝液 pH7.5で10分間反応させた．基質は OPP を500 μM 使用した．

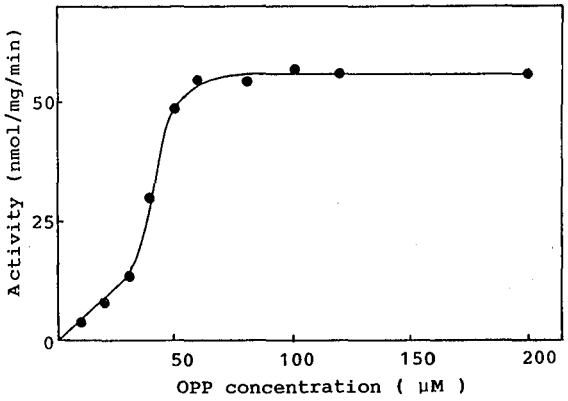


図４．基質濃度による OPP 水酸化活性の変化

酵素は PB 処理ラット肝ミクロソームを20 μg 使用し，10mM Tris 塩酸緩衝液 pH7.5で10分間反応させた．

表1．チトクロームP450の特異的抗体によるOPP水酸化活性の阻害

Antibody	Activity (%)	
	PB induced microsome	OPP induced microsome
preimmune serum	100	100
anti PB-Ⅰa	65.8±12.1	60.2±12.2
anti PB-Ⅰb	65.4±11.6	57.8± 9.4
anti PB-Ⅰc	72.0± 2.0	111.0±10.5
anti PB-Ⅰd	51.0± 7.8	96.0±10.8
anti PB-ⅠⅠb	68.7± 9.5	46.5± 3.6
anti BNF-ⅠⅠa	95.0± 3.0	118.1±16.6
anti BNF-ⅠⅠd	97.5±10.0	106.5±12.0

酵素はPB処理ラット肝ミクロソーム（60.5nmol／mg prot／min）を20 μg，OPP処理ラット肝ミクロソーム（9.5nmol／mg prot／min）を60 μg使用し，10mM, Tris塩酸緩衝液 pH7.5で10分間反応させた．基質はOPPを500 μM使用した．抗血清は，4 μl使用した．
活性の数字は，免疫をしていない無処理のウサギ血清を同量添加したときの値を100とした数値である．

より51～72%に阻害された．

考　　察

前報[6]のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とイムノブロットにおいて，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P450の分子種のうちPB-Ⅰa，PB-Ⅰb，PB-Ⅱbに相当することを報告した．

抗体による酵素活性の阻害は，酵素の同定あるいは性質を確認する一つの手段である．OPPミクロソームのOPP水酸化反応は，抗PB-Ⅰa，抗PB-Ⅰb，抗PB-Ⅱbで阻害された（表1）．OPP水酸化反応を担う酵素とこの抗体が結合したことによって，活性が低下したと考えられる．ある変異原物質を精製P450を使って代謝させると，Amesテストで変異原性が増加したり，減弱したりするが，この3種のP450は，ほぼ等しい変異原活性の増減傾向を示した[9]．また，この3種のP450に対する抗体は互いに交叉反応性がある[9]．これらのことから，OPPにより誘導されたOPP水酸化反応は，チトクロームP450 PB-Ⅰa，PB-Ⅰb，PB-Ⅱbのいずれか，あるいはこれらの抗体と交叉反応をする他のP450が関わっていると考えられる．

ま と め

1．OPP水酸化酵素反応の基礎的性質を調べるため，至適反応条件を検討した．

2．OPP投与ラット肝ミクロソームのOPP水酸化活性は，精製チトクロームP450の抗体，抗PB-Ⅰa，抗PB-Ⅰb，抗PB-Ⅱbで阻害された．この結果からこれらのP450分子種または，これと免疫学的に類似するものがOPP水酸化活性を担っていることを示唆し，前報のSDS-PAGEゲル上のOPP誘導タンパクのバンドの出現および，そのバンドがイムノブロットで上記3種の抗体と反応した結果[6]と対応している．

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）牛山慶子，長井二三子，佐藤かな子，中川敦子，加納いつ，：東京衛研年報38, 349-351, 1987

7）Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.：*J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951

8）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

9）Kawano, S., Kamataki, T., Maeda, K., Kato, R., Nakao, T. and Mizoguchi, I.,：*Fundamental and Applied Toxicology*, 5, 487-498, 1985

10）Dixon, M. and webb, E. C.：*Enzymes*, 2nd ed., 91-92, Longman, London.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 292-294, 1988

OPPおよびその代謝物によるDNAの塩基修飾について

長井 二三子*, 牛山 慶子*, 佐藤 かな子*,
加納 いつ*

Modification of DNA Base by OPP and its metabolite

FUMIKO NAGAI*, KEIKO USHIYAMA*, KANAKO SATOH*
and ITSU KANO*

Keyword：OPP, DNA 塩基修飾 modificabion of DNA

緒　言

o-Phenylphenol Na (OPP-Na) 2％含有飼料で飼育した雄ラットに膀胱ガンが発生する[1]. 尿中の主たる代謝物は, 2,5-dihydroxybiphenyl (PHQ) [2]であるが, 尿中のPHQの増加と膀胱ガン発生傾向には相関関係がみられる[3]. 発ガン性を有する化学物質は直接またはその代謝物がDNAと反応すると考えられている. 著者らは以前^{14}C-OPPとCalf thymus DNAが肝ミクロソーム存在下で反応すると, 結合することを報告した[4]. DNAとの結合物はOPP自体ではなく, その代謝物であることが示唆されたが, DNAの結合部位等についてはまだ明らかにはされていない. ^{32}P-ラベル化DNAを用いて種々の化学物質とDNAとの反応性から発ガン性を予知した報告がある[5-9]. 今回著者らは^{32}P-ラベル化DNAを用いてOPPおよびその主たる代謝物であるPHQとDNAとの反応性について, その塩基修飾部位, 切断点等を中心に検討した.

材料および方法

OPPは関東化学㈱ PHQは東京化成㈱の製品を購入して用いた. γ-^{32}P-ATPはNEN製 (3,000ci／mmol) を用いた. Calf thymus DNAはシグマ社のものを用いた. 制限酵素のEco RI, Bgl Iはニッポンジーン㈱のものを使用した. Bacterial Alkaline Phosphatase (BAP) はTOYOBO, T4ポリヌクレオチドキナーゼ (PNK) はTOYOBO, ファルマシア, タカラより入手した.

pUC18DNAの精製

pUC18が導入された大腸菌JM83株をアンピシリン50 μg／ml含有L培地を用いて37℃, 1晩培養した. 培養後, 遠心して菌体を集め, リゾチーム, アルカリ処理を行い, 粗プラスミドを得た. これをベックマンType 50Tiローターを用いて45,000rpm, 36時間, 塩化セシウム, エチジウムブロミド (EtBr) 平衡密度勾配遠心 (n＝1.3860) を行い, 環状DNA分画を回収した. n-ブタノールでEtBrを除去し, 透析により塩化セシウムを除去し, 精製pUC18DNAを得た[10].

5′-末端^{32}P標識DNA (^{32}P-DNA) の調製

精製pUC18DNA 5～10pmolを図1に示したように, EcoR Iで切断し, 直鎖pUC18DNAを得た. フェノール処理後, BAP処理によりDNA断片の5′-末端リン酸基を除去し, 再度フェノール処理を行い, PNK, γ-^{32}P-ATP (3,000Ci／mmol) を用いて5′-突出末端を^{32}Pで標識した. フェノール処理後, ファルマシアカラムNAP25を用いて溶出液 (150mM NaCl, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH8.0) でDNAと未反応γ-^{32}P-ATPを分離した.

^{32}P標識DNAを制限酵素Bgl Iを用いて3つのDNA断片 (1,300塩基対, 1,100塩基対, 206塩基対) に切断し, アガロースゲル電気泳動により分離した. EtBrで染色したあと, 206塩基対の部分を電気泳動法により, アガロースゲルから溶離し[10], 2-ブタノールにより濃縮[10], スパンカラムにより脱塩[10]を行って, 5′-末端^{32}P DNA (^{32}P-DNA) を得, TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH7.4) に溶解した.

OPPおよびPHQと^{32}P-DNAとの反応

OPPおよびPHQはエタノールで0.1Mに溶解して用いた. 反応は50mM Tris-HCl (pH8.0), 5 mM EDTA,

*東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　169　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, 169 Japan

担体として5 μg Calf thymus DNA, 2,500～5,000cpm ^{32}P-DNA, 4～20mM OPPまたはPHQを含む25 μlの組成で37℃30分間行った．エタノール沈殿により反応した薬物を除き，DNAを回収し，乾燥した．一部分のDNAについてはさらに1Mピペリジン60 μlを加え，90℃，30分間反応し，ピペリジンを減圧除去したあと，各々0.05%キシレンシアノール，0.05%ブロムフェノールブルーを含んだ90%ホルムアミド液（色素液）に溶解した．90℃，2分間，加熱処理したあと，塩基配列決定用ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った．DNAの注入量は1レーン当り，1,500～2,000cpm／2 μlに調製した．アクリルアミドゲルは富士フィルム製FUJI GENSOR GEL SHEET S0802（8%アクリルアミド）を用いた．ゲルバッファー，0.8×TBE（0.1M Tris Borate, 2mM EDTA, pH8.0）を用いた．2,300V，70分間泳動後，ゲルを固定，乾燥し，－80℃で数日間オートラジオグラフィーを行った．また薬物によるDNAの修飾部位について検討するために，この^{32}P-DNAの塩基配列の確認をMaxam Gilbert法[12]により行った．

結果ならびに考察

作製した基質とした^{32}P-DNAの塩基配列を図2に示した．EcoR I認識部位（図2参照）塩基対の上段1番目のアデニンモノフォスフェイトを^{32}Pで標識した．

OPPおよびPHQとDNAを反応したものについて，塩基配列決定用ゲル電気泳動をし，オートラジオグラフィーを行った．（図3）95番附近の塩基対は切断が生じやすく，基質調製中に生じたものと考えられる．図3レーンaからjまではピペリジン処理をしていないDNAについての電気泳動パターンであり，反応中に薬物あるいはその他の影響により切断が生じたか否かを見ることができると考えられる．レーンd,e,fはOPPとの反応，レーンg, h, iはPHQと反応した^{32}P-DNAのパターンであるが，レーンjの薬物無処理DNAと比較して有意な変化を見ることができなかった．OPPおよびPHQによるDNA切断は明らかに観察されなかった．レーンa, bは陽性対照としてDNAを切断することがよく知られているブレオマイシン[13]とDNAを反応したもの，cはジメチル硫酸（DMS）とDNAを反応したものである．

薬物により修飾を受けたDNA塩基部位はピペリジン処理により多くの場合切断が生じる．Maxam Gilbert法によるDNA塩基配列の決定はこの性質を利用したものである．OPPあるいはPHQと反応したあと，ピペリジン処理をして切断の状況を観察した．図3のレーンk～

```
Closed circular pUC18 DNA (5-10 pmol)
    |
    EcoRI
    |
    phenol treatment
    |
    Bacterial Alkaline Phosphatase (BAP)
    |
    phenol treatment
    |
    5'labeling: γ-32P-ATP, 50 μCi (3,000 Ci/mmol)
                T4 Polynucleotide Kinase (PNK)
    |
    phenol treatment
    |
    Sephadex G25 column (NAP-25)
    |
    BglI
    |
    2% agarose gel electrophoresis
    |
    Electroelution
    |
    Spun column
    |
    Ethanol ppt
    |
    TE solution
```

図1．基質DNAの調製方法

EcoR I, BAP, PNK, Bgl Iの反応は市販品の組成を適用した．

sはピペリジン処理をしたDNAについての泳動パターンである．レーンk, l, mはOPP（各々4，10，20mM）との反応，レーンn, o, pはPHQ（各々4，10，20mM）と反応した結果である．レーンqは無処理DNA，レーンrはアデニン(A)＋グアニン(G)の部位[12]，レーンsはグアニンの部位[12]を示す．OPPと反応したDNA（レーンk, l, m）はレーンqの無処理DNAに比べて有意な変化は認められなかった．PHQと反応したDNA（レーンn, o, p）に関してはピペリジン処理によりレーンsのグアニン(G)の位置での切断と比較的類似した切断が生じた．OPP代謝物のPHQはOPPでは観察できなかったグアニンを修飾している可能性が強いと考えられる．森本ら[11]はPHQが酸化した2-Phenyl-1, 4 benzo-

```
 *        10        20        30        40        50        60
5'AATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA
      GCTCGAGCCATGGGCCCCTAGGAGATCTCAGCTGGACGTCCGTACGTTCGAACCGT

          70        80        90       100       110       120
CTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGC
GACCGGCAGCAAAATGTTGCAGCACTGACCCTTTTGGGACCGCAATGGGTTGAATTAGCG

         130       140       150       160       170       180
CTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGC
GAACGTCGTGTAGGGGGAAAGCGGTCGACCGCATTATCGCTTCTCCGGGCGTGGCTAGCG

         190       200
CCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAA 3'
GGAAGGGTTGTCAACGCGTCGGA
```

図2．5′未端^{32}P標識DNA（^{32}P-DNA）の塩基配列

EcoR IとBgl Iで切断されたpUC18フラグメントは5′側が^{32}Pで標識され，電気泳動では上段の塩基配列が確認できる．＊は^{32}P標識部位を示す．

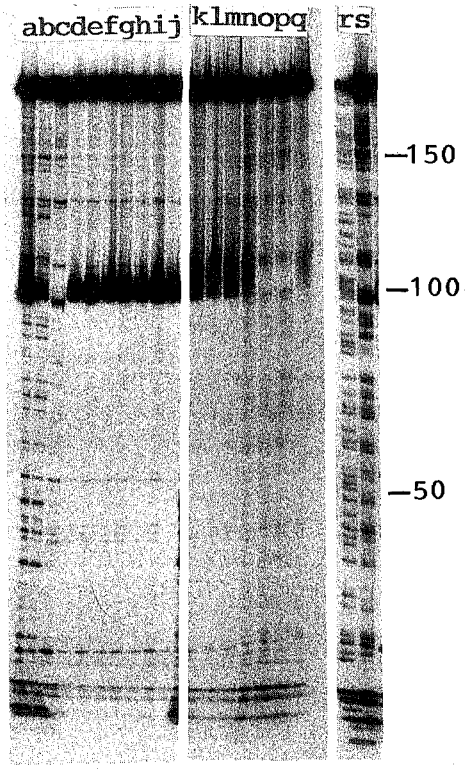


図3．^{32}P-DNA と OPP および PHQ との反応

FUJI GENSOR GEL SHEET S0802を用いて電気泳動を行い，ゲルを乾燥し，－80℃，7日間露光したオートラジオグラムである．1レーン当り^{32}P-DNA を1,500cpm 注入した．各レーンについての説明は下表に示した．右横の数字はヌクレオチドの部位を示す．（図2．参照）

レーン	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r	s
ビペリジン処理	(−)										(+)								
薬物	プレオマイシン			DMS	OPP			PHQ			(−)	OPP			PHQ			(−)	ギ酸 (A+G)	DMS (G)
					mM 4	10	20	mM 4	10	20		mM 4	10	20	mM 4	10	20			

qinone をF344ラットの膀胱上皮細胞に注入することにより DNA 切断が生じることをアルカリ溶出法により示している．しかし OPP の代謝物による DNA の塩基修飾に関してはいまだ報告はなく，OPP 投与による膀胱ガン発生のメカニズムを考える上で，この結果は重要な知見であり，今後くわしく検討する予定である．

ま と め

1）OPP は直接 DNA を修飾しなかった．

2）OPP の代謝物の PHQ はグアニンを比較的特異的に修飾した．

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34, 297-298

4）牛山慶子，樺島順一郎，長井二三子，市川久次，加納いつ，中尾順子：生化学55(8), 1018, 1983

5）Kawanishi, S., Inoue, S. and Sano, S.：*J. Biol. Chem.*, 261, 5952-5958, 1986

6）川西正祐，倉迫和幸，佐野晴洋：日本衛生学会誌, 40(1), 95, 1985

7）井上純子，川西正祐，佐野晴洋：日本衛生学会誌, 40(1), 96, 1985

8）川西正祐，井上純子，佐野晴洋，日本衛生学会誌, 41(1), 109, 1986

9）川西正祐，井上順子，佐野晴洋：日本衛生学会誌, 42(1), 169, 1987

10）Maniatis, T., Fritsch, E. and Sambrook, J.,：*Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 88-94, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982

11）Morimoto, K., Fukuoka, M., Hasegawa, R., Tanaka, A., Takahashi, A. and Hayashi, Y.：*Jpn. J. Cancer Res*, (*Gann*) 78, 1027-1030, 1987

12）Maxam, A.M. and Gilbert, W.：*Mothods in Enzymology*, 65, 499-560, 1980, Academic Press

13）Giloni, L., Takeshita, M., Johnson, F., Idenc, and Grollman, P.：*J. Biol. Chem.* 256, 8608-8615, 1981

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 295-298, 1988

ジエチレングリコールモノエチルエーテル（DEGM）のラットにおける経口急性毒性

市 川 久 次*, 小 林 博 義*, 橋 本 常 生**

Studies on Oral Acute Toxicities of Diethylene Glycol Monoethyl Ether (DEGM) in the Rat

HISATSUGU ICHIKAWA*, HIROYOSHI KOBAYASHI* and TSUNEO HASHIMOTO**

Keywords：ジエチレングリコールモノエチルエーテル diethylene glycol monoethyl ether, ラット rat, 経口急性毒性 oral acute toxicity

ジエチレングリコールモノエチルエーテル（以下DEGMと略）は別名カルビノールといわれ，工業溶剤，化粧品，皮フ外用基剤として広く使用されている．食品添加物としては，その安全性の面よりFAO／WHO合同食品企画委員会（CCFA）はB群[1]に分類し，各国政府及び関係の国際機関にコメントを求めている．我国ではDEGMの食品添加物としての使用許可はされておらず，イギリスでは色素可溶化剤，イタリアでは香料等の溶剤として添加が許可されている等，その対応は各国で異なっている．また，最近DEGMは輸入アイスクリーム等で検出され社会問題化もした．一方DEGMの急性毒性に関する報告は比較的古いものが多く（1939－59），用いた動物等についての記載も不備な点が見られる[2]．そこで今回，F344／Ducrij系ラットを用いて，DEGMを経口投与しその急性毒性を検討したので報告する．

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（F344／DuCrj）を4週令で購入し，5匹ずつステンレスケージに入れ5週間固型試料（CE-2）で予備飼育し，一般状態の良好なものを実験に供した．

2. 試料

DEGMは，和光純薬製試薬一級（Sp, Gr20／4℃ 0.985-0.995, Lot No. LAN 4074）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し試料ml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℃，湿度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．予備飼育期間および投与後2時間以後は固型試料CE-2を自由に摂取させ，水は細菌濾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1.2の割合で精製水で希釈し，8用量を用いた．投与容量，用量等はTable 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，実験前日午後5時より除餌し，水のみを与えた．試料の投与は午前9時50分より開始した．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，Lichfield-Wilcoxon 法[3]，Moving Average 法[4]により50％致死量（LD_{50}）を算出した．また，死亡例については直ちに，生存例については投与7日後に屠殺剖検した．

実験結果

1. 症状

主症状は投与直後よろよろと歩くものが多くみられ運動失調をうかがわせた．その他，下痢便，外陰部被毛赤褐色，鼻部の汚れが散見された．

2. 50％致死量（LD_{50}）

結果はTable 2に示す通りである．死亡時間の分布において雌雄の間に差異が見られた．死亡開始時間

*東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　169　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, 169 Japan
**現同生活科学部乳肉衛生研究科

Table 1. Doesing Schedule for Oral Acute Toxicities Test of Diethylene Glycol Monoethyl Ether (DEGM)

Vehicle	Volume ml／kg B. W.[1]	Sex	Dose ml／kg B. W.[1] (No. of Animals)							
Pure	15.0	M	15.0 (5)	12.5 (5)	10.4 (5)	8.7 (5)	7.2 (5)	6.0 (5)	5.0 (5)	4.2 (5)
Water		F	15.0 (5)	12.5 (5)	10.4 (5)	8.7 (5)	7.2 (5)	6.0 (5)	5.0 (5)	4.2 (5)

1) Body Weight
M：male F：female

(onset) は，雌雄ともに3時間と比較的早く，また雌雄の間に差異が無かったが，最多死亡時間 (peak) は雌雄の間に差異が見られた．すなわち，雄においては最多死亡数を示した時間が3回にしかも，7－12時間間隔をおいて分かれたのに対し，雌においては13時間で peak は1回であった．死亡終了時間において，雌雄の間に大きな差異が見られ，雄においては32時間であったのに対し，雌においては17時間で，全体的にみると，データは示さなかったが，雄においては投与後32時間まで少数ながら間断なく死亡が続いたのに対し，雌においては比較的短時間 (投与後17時間) のうちに死亡は終了し，体内動態に差異があることをうかがわせた．50％致死量 (LD_{50}) は雄6.1，雌5.0ml／kg (Lichfield-Wilcoxon 法)，雄5.9，雌4.9ml／kg (Moving Average 法) で，雌雄の間には危険率5％において統計学的な有意差が認められた (Lichfield-Wilcoxon 法)．なお，Lichfield-Wilcoxon 法と Moving Average 法による LD_{50}値の差は殆どなかった．

3. 剖検所見

死亡例においては，注目すべき所見としては，投与後12時間以後の雄において膀胱に出血ないし血液を含んでいると考えられる尿の充満が19例中12例に見られたことである．その他，雌雄ともに消化器系統の障害が著しく，腺胃部よりの出血，および十二指腸，小腸にわたっての出血ないし血液を含んだ液体の充満が殆どの死亡例で見られた．

生存例の投与7日後の剖検では，腎皮質割面が粗のものが雌に一例であったが見られた．

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，臓器を摘出秤量し，投与前日に除餌しただけのものを対照とし，比較検討した．各臓器の絶対重量，体重比重量 (体重100g 当りの重量) はTable 3 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，雄の腎臓 (左，右) においては絶対重量，体重比重量において用量との明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認められた．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．

Table 2. LD_{50} of Diethylene Glycol Monoethyl Ether (DEGM)

Sex	Death Time (hr) onset	peak	last	Slope Function (confidence interval)	LD_{50} ml／kg B. W.[1] (confidence interval)
M	3	6,18,25	32	1.20 (1.003～1.436)	6.1 (5.35～6.94) 5.9 (5.37～6.54)
F	3	13	17	1.20 (1,003～1.436)	5.0 (4,41～5.72) 4.9 (4.47～5.44)

1) Body Weight
M：male F：female

Table 3. Organ Weights of Survival Rats at 7th Day After Administration of Diethylene Glycol Monoethyl Ether (DEGM)

Sex	Does ml/kg B.W.[1]	No. of Rat	B.W.[1](g)	Heart mg / mg/100g[2]	Liver mg / mg/100g	Kidney(L) mg / mg/100g	Kidney(R) mg / mg/100g	Spleen mg / mg/100g	Adrenal(L) mg / mg/100g	Adrena(R) mg / mg/100g	Lung mg / mg/100g
M	0	3	201.7± 1.5[3]	643.3±25.17	8.0±0.53	716.7±11.55	730.0± 10.0	456.7±25.17	17.7±2.14	15.9±1.31	696.7± 41.63
				319.0±10.20	4.0±0.24	355.4± 4.07	362.0± 3.78	226.5±13.57	8.8±1.01	7.9±0.61	345.5± 20.64
	4.2	5	227.0±13.7	720.0±32.40	9.3±0.88	874.0±47.75**	852.0± 57.62*	482.0±31.15	20.0±1.39	18.2±2.19	800.0± 67.08
				317.6±12.65	4.1±0.40	385.5± 1.96*	376.0± 29.0	212.7±15.47	8.8±0.25	8.0±1.08	353.4± 35.75
	5.0	5	226.6±10.1	708.0±35.64	9.1±0.65	862.0±55.86**	848.0± 41.47**	474.0±35.78	20.6±0.93	20.1±2.32	792.0± 52.63*
				312.4± 6.69	4.0±0.11	380.3±19.91*	374.4± 16.41	209.0± 7.33	9.1±0.59	8.9±0.75	349.8± 23.64
	6.0	2	226.6± 9.9	67510± 7.01	9.5±0.45	895.0±35.36**	870.0± 84.85	465.0± 7.07	18.9±0.04	18.2±4.94	925.0±176.78
				297.6± 9.86	4.2±0.02	394.3± 1.62**	382.8± 20.69	205.0± 5.82	8.3±0.38	8.0±1.83	406.2± 60.16
F	0	5	147.0±14.4	492.0±43.24	5.2±0.49	578.0±49.19	550.0± 55.68	346.0±15.16	21.7±3.56[4]	21.1±1.84	582.0± 50.70
				335.1±12.23	3.5±0.05	393.8±16.50	374.1± 8.57	236.6±15.65	14.7±2.45[4]	14.4±1.33	396.8± 25.41
	4.2	5	139.8± 5.5	506.0±39.75	5.1±0.25	568.0±31.15	564.0± 23.00	332.4±25.88	22.1±1.79	21.2±1.36	562.0± 37.68
				362.3±30.58	3.7±0.21	407.1±33.27	403.8± 20.23*	241.7±14.72	15.8±1.48	15.2±1.36	402.3± 27.31
	5.0	2	136.5± 5.0	505.0±65.64	5.0±0.01	550.0±70.71	595.0±120.21	330.0±14.14	23.2±3.06	21.1±1.09	595.0± 35.36
				369.3±33.23	3.7±0.14	402.3±37.22	434.6± 72.31	241.7± 1.60	17.0±1.62	15.5±0.24	435.7± 10.10

1) Body Weight
2) 100g of body Weight
3) Mean ± SD *$p<0.05$ **$p<0.01$
4) No. of animal used was four.
M : male F : female

考　察

ジエチレングリコールモノエチルエーテル（DEGM）のラット経口によるLD_{50}値はHanglikら[2]（6.5cc／kg），Smythら[3]（8.69cc／kg）等による報告はあるが，年代が古く，使用動物（ラット）についての由来も不明である．またDEGMの安全性について，FAO／WHOはBリストに分類し確認していないのが現状である．そこで，確立した系統の動物を用いて急性毒性試験を行うことは意義深いものと考え，F344／DuCrj系ラットにDEGMを胃ゾンデを用いて経口投与し，その急性毒性を検討した．50％致死量（LD_{50}）は，雄6.1，雌5.0ml／kg（Lichfield-Wilcoxon法[5]），雄5.9，雌4.9ml／kg（Moving Average法[6]）で，Lichfield-Wilcoxon法[5]により雌雄のLD_{50}値について検定したところ危険率5％において有意差があった．また，Moving Average法[6]によりLD_{50}値を算出しLichfield法により算出したLD_{50}値と比較したところ殆んど差はなかった．

死亡時間についてはTable 2に示した如く，死亡開始時刻は雌雄ともに比較出早く投与後3時間で差異はなかったが，死亡時間の分布に差異が見られた．すなわち，雄においては少数ながらpeakが3回（投与後6，18，25時間），終了時間は投与後32時間で，その間間断なく死亡が続き低い台形様分布を示した．一方，雌においては，peakは投与後13時間1回，終了時間は投与後17時間で，peak一つの山様分布を示し，DEGMの体内動態に雌雄の差があることをうかがわせた．このLD_{50}値及び死亡時間における雌雄の差異は非常に興味深いものがあり，今後の研究に期待するところ大である．DEGM投与ラットの死亡例の剖検より明確に死因を特定することはできないが，症状，剖検所見より，雌雄ともDEGMの適用部位である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，粘膜の変性が見られた．また，注目すべきは，雄の投与後12時間以後の死亡19例中12例の膀胱に出血ないし血尿と考えられる赤ー暗赤色の尿の充満が見られたことである．このことは尿路系への作用を示唆するものであり非常に興味深い．

臓器重量については，全体として一定の変化を示したものはなかった．

なお，Hodge[7]らのラットにおける経口急性のLD_{50}値に基づく，ヒトへの推定致死量の算定によれば，その毒性の程度は小（slightly toxic）ないし極小（practical ly nontoxic）であるといえる．

結　論

ジエチレングリコールモノエチルエーテル（DEGM）の経口急性毒性をラット（F344／DuCrj）を用いて検討し次の結論を得た．

1．50％致死量（LD_{50}値）は雄6.1，5.9雌5.0，4.9ml／kg体重（Lichfield-Wicoxon法，Moving Average法）で，Lichfield-Wilcoxon法で検定したところ雌雄の間に有意な差が認められた（$p=0.05$）

2．症状は雌雄共に下痢が主であった．

3．死亡時間の分布において雌雄の間に差が認められ，雄は低い台形（投与後3－32時間），雌は1 peakの山様（投与後3－17時間）分布を示した．

4．死亡例の肉眼的変化は雌雄ともに胃腸管系に強く見られた（出血，充血）．また，投与後12時間以後に死亡した雄19例中12例の膀胱に出血ないし，血尿がみられたのは注目すべき変化であった．

5．以上の結果にもとづいて二三考察を行いHodgeらの分類に従いジエチレングリコールモノエチルエーテル（DEGM）の経口急性毒性の程度を小（slightly toxic）ないし極小（practically non-toxic）と考えた．

文　献

1）山本芳子，松田勉，中川久雄，丹治敏英，藤井正美：海外生活情報（世界の食品添加物：その1），32-44，1982，厚生省環境衛生局食品化学課

2）Leweis, Sr. Richard J. and Tatken, Rodger L.：*Registry of Toxicic Effects of Chemical Substances*, 1979 Ed. vol. 1, p645, 1980, Natinal Institute for Occupational Safety and Health

3）Hanzlik, P. J., Luduena, F. P., Lawrence, W. S. and Hanzlik, Harold：*J. Indust. Hyg. Toxic.*, 29, 190-195, 1947.

4）Smyth, JR. Henry F. and Carpenter Charles P.：*J. Indust. Hyg. Toxic.*, 30, 63-68, 1948.

5）Lichfield, J. T. JR. and Wilcoxon, F.：*J. Pharmacol. Expl. Therap.* 96, 99-113, 1949.

6）Shayne, C. Gad and Carrol, S. Weil：*Princip les and Method of Toxicology*, Ed. Hays, A Wallace, 273-320, 1982, Raven Press New York.

7）Hodge, H. and Stener, J. H.：Deichman, 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.*, **39**, 299-303, 1988

細胞膜酵素（馬腎臓 Na, K-ATPase）のモノクローナル抗体（第4報）モノクローナル抗体の Na, K-ATPase 活性およびウアバイン結合におよぼす影響

佐藤 かな子*, 長井 二三子*, 牛山 慶子*
加納 いつ*, 市川 久次*, 中尾 順子**

Monoclonal Antibody against Horse Kidney Na, K-ATPase (IV): Effects of Monoclonal Antibody on Na, K-ATPase Activity and Ouabain Binding

KANAKO SATOH*, FUMIKO NAGAI*, KEIKO USHIYAMA*
ITSU KANO*, HISATSUGU ICHIKAWA* and TOSHIKO NAKAO**

Keywords：Na, K-ATPase, モノクローナル抗体 monoclonal antibody, ウアバイン ouabain

緒　言

生物がその環境と境を接する細胞膜は，栄養物，ホルモン，毒物などあらゆる物質が生体と反応する際に最初に接触する部位である．毒物が細胞膜に作用することによって障害が起ることは明らかにされており[1]，この作用機作についての研究は，生体での毒性発現機序解明に有用である．すべての動物細胞膜に存在する Na, K-ATPase は，細胞膜の脂質2重層を貫通して存在し，細胞の内，外のイオンの能動輸送を担う酵素である．毒物・薬物等と Na, K-ATPase に関して報告が蓄積されている（総説[2,3]）．我々も，馬腎髄質外帯より Na, K-ATPase を高純度に精製し，それにおける各種の毒物・薬物・化学物質の作用を報告してきた[4-14]．これら細胞膜障害で明らかにされた毒性発現機序をより明確にするために，精製した馬腎臓 Na, K-ATPase に対するモノクローナル抗体を作製した[15]．

今回，我々はハイブリドーマ培養上清[16]，およびマウスの腹水[17]より，ゲル沪過を用いて高純度に精製したモノクローナル抗体（M45-80）の Na, K-ATPase におよぼす影響を調べた．更に，M45-80が Na, K-ATPase のウアバイン結合におよぼす影響について調べた．ウアバインは，数多く見い出されている Na, K-ATPase の阻害剤[18]の中でも代表的な阻害剤で，ジギタリスの葉の強心剤の成分，強心配糖体である．

方　法

Na, K-ATPase の精製法　馬腎臓の髄質外帯より，長井等[19]の方法により得たミクロゾーム分画を，更に中尾等[20]の方法に従って SDS 処理した．ここで得られた馬腎臓 Na, K-ATPase の酵素活性は，25～52 μmoles Pi／mg／min であり，以下に述べる実験に用いた．蛋白量の測定は Lowry 等[21]又は，Bradford[22]の方法で，ウシ血清アルブミンを蛋白標準値として用いた．

Na, K-ATPase 活性の測定法　Na, K-ATPase 活性は，中尾等[23]の方法に従った．Na, K-ATPase（0.5 μg）を，種々の量の抗体（M45-80），もしくはコントロールマウスミエローマ IgM（Miles 社）と，終濃度140 mM NaCl，14 mM KCl，5 mM $MgCl_2$，0.5 mM EDTA，50 mM imidazole-HCl（PH7.2）を含む反応液中で，4℃で一晩前反応させた．反応は ATP 濃度 3 mM，反応液量 500 μl と最終的になるように，ATP を加えて開始した．37℃で10分間反応後，遊離してきた無機リン酸を Fiske-Subbarow の方法[24]で測定した．M45－80のウアバインの Na, K-ATPase 活性阻害に及ぼす影響は，ATP による本反応開始前に，終濃度 5×10^{-11}～5×10^{-5} M のウアバインを加えておこなった．

Na, K-ATPase の ^{3}H-ウアバイン結合　Na, K-ATPase のウアバイン結合におよぼす，M45-80の影響を Matsui と Schwartz[25]の方法に従って測定した．Na, K-

*東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　169　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, 169 Japan
**東京女子医科大学生化学教室

ATPase (2.5 μg) と，12.5 μg の M45-80もしくはコントロールマウスミエローマ IgM を 50mM Tris-HCl (pH7.4) 緩衝液中に，(A) 5 mM $MgCl_2$＋100mM NaCl, (B) 5 mM $MgCl_2$を含む，2種類の反応液中で前反応させた．4℃で1晩の前反応後，反応液(A)には5 mM ATP を，反応液(B)には5 mM のPi を加えた．反応は，ウアバイン濃度0.5 μM，反応量200 μl と最終的になる様に，〔^{3}H〕ウアバイン (2 nCi, NEN) を加えて4℃で開始した．冷却した50 mM Tris-HCl (pH7.4) 2 ml を加えて希釈することにより，反応を停めて，速やかに，143,000×g で4℃，12分間遠心した．沈殿を300 μl の 0.2M NaOH に溶かして，シンチゾール EX-H (同仁化学) 中で，液体シンチレーションカウンター (Beckman LS-3801) を用いて，その放射能を測定した．値は，非放射性の3 mM ウアバインを反応液中に加えて得た値を，非特異的結合値として差し引いたものを用いた．

結　　果

抗体による Na, K-ATPase 活性の阻害　Na, K-ATPase 活性におよぼす0.03～3.5 μg 量の M45-80の影響を図1に示す．Na, K-ATPase 0.5 μg に対して，M45-80の量を増加して反応させる程，酵素活性は阻害された．酵素0.5 μg に，M45-80の1.5 μg を反応させた時には，最大阻害約50％を得た．この最大阻害率約50％は，M45-80の量をこれ以上増加しても変らなかった．コントロールマウスミエローマIgM は，酵素活性に影響を与えなかった．

抗体がウアバインの Na, K-ATPase 活性阻害に及ぼす影響　最大の酵素活性阻害率を示した，酵素 (0.5 μg) と抗体 (1.5 μg) 量を用いて実験をおこなった．ウアバインが存在しない時の M45-80 の酵素活性阻害率は44％であった．ウアバイン濃度の上昇により，抗体が存在する場合，しない場合共に，活性は阻害を受けた (図2a)．図2a を変換して得た，Hill プロット (図2b) は次のことを示した．最大活性阻害効果の半分を与えるのに必要なウアバイン濃度 (K_i) は，抗体が存在する場合5.7×10^{-7}M で，コントロールマウスミエローマ IgM が存在する場合，6.2×10^{-7}M とほぼ同じ値を示した．Hill 係数は，共に n＝2.3と変らず，ウアバインの酵素活性の阻害に，M45-80は影響が無かった．

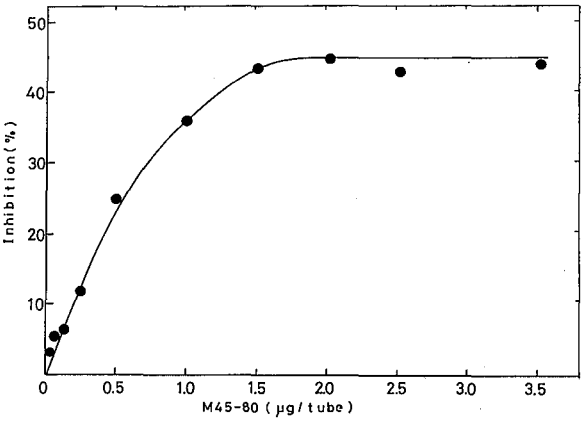


図1．M45-80による馬腎臓 Na, K-ATPase の阻害．0.5 μg Na, K-ATPase (S.A. 33 μmoles Pi／mg／min) と M45-80を方法の項に従って反応させた．縦軸は，酵素活性の阻害率 (％) で示す．各値は，4回の実験の平均値を示す (SD＜5％)．

抗体が Na, K-ATPase と〔^{3}H〕ウアバインとの結合におよぼす影響　Na, K-ATPase の〔^{3}H〕ウアバインの結合速度は，4℃で調べた結果，リガンド条件A (5 mM ATP＋5 mM Mg^{2+}＋100 mM Na^+) より，リガンド条件B (5 mM Mg^{2+}＋5 mM Pi) の方が速かった．コントロールマウスミエローマ IgM が存在する場合，〔^{3}H〕ウアバインの酵素に対する最大結合量の半分量を結合するのに要する時間は，リガンド条件Aで40分，リガンド条件Bで7分であった．M45-80が存在する場合に，それに要する時間は，リガンド条件Aでは20分，リガンド条件Bでは3.5分と短くなった．抗体は，酵素とウアバインの結合初速度を上昇させた．この際，抗体は，酵素に対するウアバインの最大結合レベル (4.8 nmoles／mg 蛋白) は変えなかった (図3)．

考　　察

ATPase 反応機構と，カチオン輸送特性の研究によって築かれた，Na, K-ATPase の反応機構は，少くとも次の4つのステップに大別される．ステップ1)細胞の内側に Na^+ に高親和性の結合部位をもっているコンフォメーション E_1は，ATP と Mg^{2+}の存在下，リン酸化され，ADP が遊離して E_1～P・Na の形成，2)これが E_2－P 中間体に遷移する時，イオンの輸送部位を細胞外に向け，同時に K^+に対する親和性が増し，Na^+と K^+を交換し，E_2-P・K の形成，3)これが，K^+の結合によって Pi が遊離して E_2・K を形成，4)これに，ATP が結合すると酵素は E_1 型に戻り，イオンの輸送部位を細胞内に向け，K^+を離し，代わりに Na^+と結合 (図4)．

M45-80は，140 mM NaCl，14 mM KCl を含む反応液中で最大約50％ Na, K-ATPase 活性を阻害した．

ウアバインは，酵素が E_2P 型もしくは E_2型の時，細胞膜の外側から結合して酵素の活性を阻害するといわれている[26,27]．酵素のウアバインの K_i 値を，M45-80が変

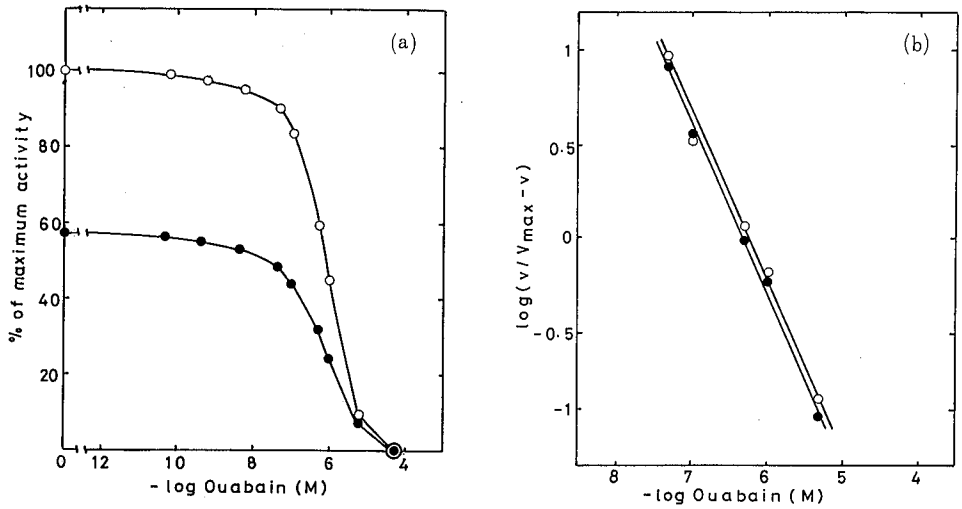


図2．M45-80がウアバインの Na, K-ATPase 活性阻害に及ぼす影響.
(a) 0.5 μg Na, K-ATPase と，1.5 μg M45-80，もしくは1.5 μg のコントロールマウスミエローマ IgM を，方法の項に従って反応させた．本反応開始前に，終濃度 5 × 10^{-11}～5 ×10^{-5}M のウアバインを加えた．縦軸は，ATPase 活性（42 μmoles Pi／mg／min）を100として換算した値を示す．(b) 図2 a で示した値を，Hill プロットに変換した．各値は，4回の実験の平均値を示す（SD< 5 %）.
●：M45-80，○：コントロールマウスミエローマ IgM

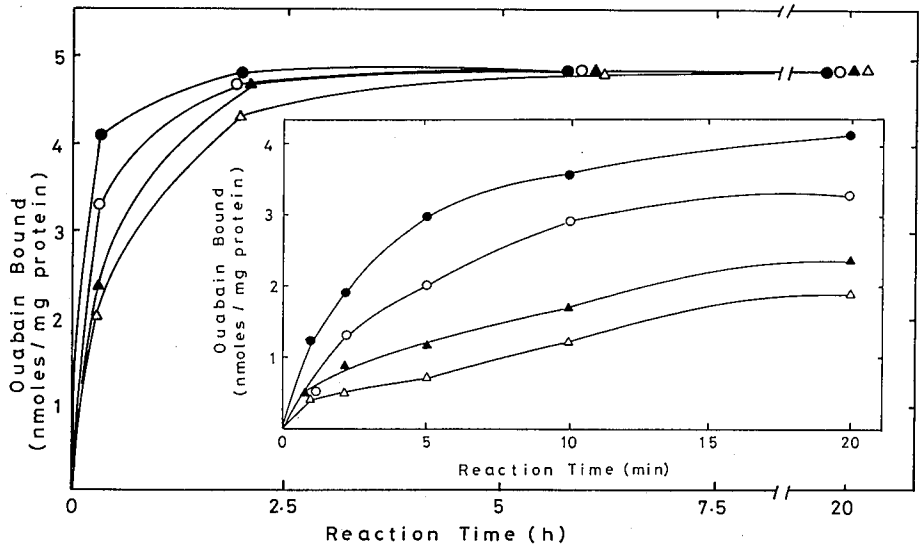


図3．M45-80の Na, K-ATPase と〔^{3}H〕ウアバインとの結合におよぼす影響.
2.5 μg の Na, K-ATPase（33 μmoles Pi／mg／min）と，12.5 μg の M45-80もしくはコントロールマウスミエローマ IgM を方法の項に従って，2種類のリガンド条件下で反応させた．最大結合値は，4.8 nmoles／mg 蛋白である．短時間での反応の結果は，図に挿入する．各値は，4回の実験の平均値を示す（SD< 5 %）.
▲ and △：ATP＋Mg^{2+}＋Na^+，● and ○：Mg^{2+}＋Pi，▲ and ●：M45-80，△ and ○：コントロールマウスミエローマ IgM

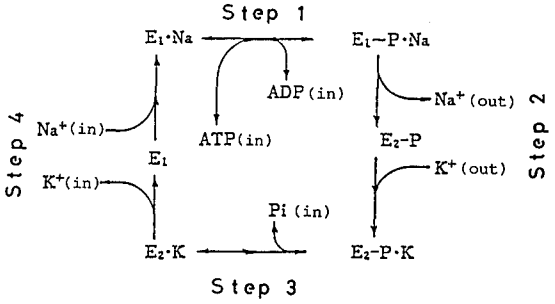


図4．Na, K-ATPase 反応のカチオン輸送の共役機構
結合する Na^+ と K^+ の数は考慮せず，Mg^{2+} の関与は省略した．E は Na, K-ATPase 分子である．(Post[26] より改変して引用)

化させなかったことは，酵素活性を阻害するウアバインの作用に抗体は影響していないことを示した．このことは，M45-80の Na, K-ATPase の結合部位は，ウアバインのそれとは異なっていることを示唆した．〔^{3}H〕ウアバインをもちいて，抗体の酵素へのウアバイン結合におよぼす影響を調べた．Na, K-ATPase が E_2-P 型となる(A) ATP＋Mg^{2+}＋Na^+（ステップ1から回る正反応），(B) Mg^{2+}＋Pi（ステップ4から回る逆反応）の2種類のイオン条件下でおこなった．M45-80はウアバインと Na, K-ATPase との結合初速度（initial rate）を上昇させた．しかも Na, K-ATPase に結合する〔^{3}H〕ウアバインの最大レベルは変えなかった．

これらの結果は，M45-80の結合が酵素のコンホメーションの平衡関係を E_2・K もしくは E_2-P の状態に傾けていることを示唆していると考えられる．しかしウアバインの結合部位は，細胞膜の外側のどこであるかは，未だ明らかにされていない．最近，Na, K-ATPase のアミノ酸配列より，この酵素の三次元構造が推定され，細胞膜の外側に位置する部分についても明らかにされつつある[28]．また，我々は M45-80の結合部位は，ウアバイン同様細胞膜の外側であることを明らかにしている[29]．今後 M45-80の酵素の結合部位を明らかにするとともに，酵素とウアバインの結合部位の検策にも利用できると考えられる．さらに，細胞膜に障害を与える，毒物，薬物についても，M45-80の利用は，その作用機序を解明するために有効な手段であると考える．

要　　約

馬腎臓 Na, K-ATPase のモノクローナル抗体（M45－80）は，1)Na, K-ATPase 活性を約50％阻害した 2)Na, K-ATPase 活性のウアバインの Ki 値には影響しなかった 3)ウアバインと Na, K-ATPase との結合初速度（initial rate）を上昇させた．しかしウアバインと Na, K-ATPase との最大結合量は変えなかった．これらの結果より，M45-80の Na, K-ATPase との結合部位は，ウアバインのそれに影響を与える位置であることを示唆した．

謝辞　馬腎臓の採取に，御協力いただきました東京都多摩食肉衛生検査所八王子出張所の方々に感謝致します．

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) Nørgaard, A.：*Acta Pharmacol, et Toxicol.*, 58 (Supplement Ⅰ), 1-34, 1986.
4)矢ケ崎しげ子，原諭吉，中尾順子：東京衛研年報，25，691-695，1974.
5) 矢ケ崎しげ子，原諭吉，中尾順子：東京衛研年報，26-2，148-151，1975.
6) 原しげ子，中尾順子：東京衛研年報，27-2，161-165，1976.
7) 厚井麻里，長井二三子，中尾順子：東京衛研年報，25，697-701，1974.
8) 厚井麻里，中尾順子：東京衛研年報，26-2，152-157，1975.
9) 清水麻里，中尾順子：東京衛研年報，27-2，77-81，1976.
10) 中川敦子，中尾順子：東京衛研年報，27-2，166-170，1976.
11) 原しげ子，中尾順子：東京衛研年報，28-2，196-200，1977.
12) 原しげ子，中尾順子：東京衛研年報，29-2，147-150，1978.
13) 原しげ子，原諭吉，中尾順子：東京衛研年報，30-2，133-135，1979.
14) 大野知子，長井二三子，中尾順子：東京衛研年報，33，477-479，1982.
15) 佐藤かな子，中尾順子：東京衛研年報，36，366-369，1985.
16) 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.
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，38，401-404，1987.
18) Schwartz, A., Lindenmayer, G. E. and Allen, J. C.：

Pharmacol. Rev., 27, 3-134, 1975.

19) 長井二三子，厚井麻里，中尾順子：東京衛研年報，26-2, 143-147, 1975.

20) Nakao, T., Ohno-Fujitani, T. and Nakao, M. : *J. Biochem.* 94, 689-697, 1983.

21) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.

22) Bradford, M. M. : *Anal. Biochem.* 72, 248-254, 1976.

23) Nakao, T., Nakao, T., Mizuno, N., Komatsu, Y. and Fujita, M. : *J. Biochem.* 73, 609-619, 1973.

24) Fiske, C. and Subbarow, Y. H. : *J. Biol. Chem.* 66, 375-400, 1935.

25) Matsui, H. and Schwartz, A. : *Biochim. Biophys. Acta* 151, 655-663, 1968.

26) Post, R, L., Kume, S., Tobin, T., Orcutt, B. and Sen, A. K. : *J. Gen Physiol.* 54, 306-326, 1969.

27) Karlish, S. J. D. : *J. Bioenerg. Biomembr.* 12, 111-136, 1980.

28) Ovchinikov, Y. A., Luneva, N. M., Gevondyan, N. M., Arzamazova, N. M., Kozhich, A. T. and Nesmeyanov, N. N. : *FEBS Lett.* 227, 230-234, 1988.

29) Satoh, K., Nagai, F., Ushiyama, K., Kano, I., Nakagawa, A. and Nakao, T. : *JUC Pharm. Sci'* 87, S 55, 1987.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 304-309, 1988

体細胞突然変異のオートラジオグラフィーによる検出

金 西 信 次*, 藤 田 博*, 佐々木 美枝子*

Autoradiographic Detection of Somatic Cell Mutation

NOBUJI KANANISHI*, HIROSHI FUJITA*, MIEKO SASAKI*

Keyword：体細胞突然変異 somatic cell mutation, 6チオグアニン6TG, オートラジオグラフィー autoradiography, エチルニトロソウレア ENU, V79, マウス脾リンパ球 mouse spleen lymphocyte.

哺乳動物個体の体細胞の突然変異を検出することは，環境変異原による発ガン，あるいは生殖細胞レベルにおける次世代への影響，もしくはこれらの発現機構を調べる上で重要である．

現在，in vivo で体細胞に生じた突然変異を検出することは，胎児の細胞を用いて in vitro で培養する系[1)]を除いて，コロニー形成能が極めて悪い等の理由で困難である．

我々は突然変異の観察終末点をコロニー形成能ではなく，DNA 合成として検出することを考えた．すなわち突然変異によって選択培地中でも DNA 合成が可能となった細胞に^{3}H-thymidine（^{3}H-TdR と略）を取り込ませ，DNA が標識された細胞をオートラジオグラフィー（ARG と略）によって突然変異細胞として検出する．一方培養細胞で最も広く用いられる突然変異検出法として hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase（HGPRT と略）欠損を見る6-thioguanine 抵抗性の突然変異検出系があり，ARG 法とこの突然変異細胞選択の系とを組み合わせた．これによって，いままで困難であった in vivo 体細胞突然変異をマウスやラットの成獣における臓器で検出しうる可能性がある．そのための基礎実験として，培養細胞をもちいて，コロニー形成による方法と ARG による方法とを比較し，更にマウスの脾臓リンパ球での in vivo 突然変異を ARG によって測定した．

実験方法

化学物質：N-ethyl-N-nitrosourea（半井化学，ENU と略），6-thioguanine（Sigma, 6TG と略）

実験動物：5～8週令の Jcl：ICR 雄マウス（日本クレア）

細胞：横浜市立大学梅田博士より分与され，当部において維持しているチャイニーズハムスター肺由来V79細胞株（V79株と略，6TG に対して感受性），およびV79株より分離した6TG 抵抗株（V79-6TG^r 株）を用いた．

培養液：V79株に対して，10％牛胎児血清（FCS と略）を添加した enriched MEM（minimum essential medium, GIBCO F-11に必須アミノ酸，非必須アミノ酸，ピルビン酸ナトリウムを添加）培養液．マウス脾臓細胞に対して，20% FCS を添加した RPMI-1640培養液（GIBCO）を用いた．

コロニー形成による培養細胞の6TG感受性：V79株並びにV79-6TG^r 株をディッシュあたり100細胞播種し，種々の濃度の6TGを添加して培養，2日毎に6TG添加培地を交換し，1週間後にメタノール固定，ゲンチアナバイオレット液で染色してコロニーを計数した．

培養細胞の突然変異検出：通常の突然変異検出法で，V79細胞による6TG抵抗性細胞のコロニー形成能による検出である．10^6細胞の V79株を培養液10ml を入れた培養瓶中で，1夜培養後実験に供した．対数増殖期の細胞10^5／ml を0～400 μg／ml の ENU で2時間処理．培養液で洗浄，細胞の1部を取って生存率を測定した．残りの細胞は新しい培地で培養し，5日目に再播種した．9日目の細胞を0.05％のトリプシンで処理（37℃，15min），単一細胞の懸濁液とし，ディッシュあたり100細胞を播種し，生存率を測定した．また同時に2～5×10^5細胞を播種し，25 μg／ml の6TGを添加した培養液中で2週間培養し，6TG抵抗性コロニーを数えた．なお6TG添加培地は2日間毎に液交換を行った．

*東京都立衛生研究所毒性部 169 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, 169 Japan

ARGによる培養細胞の6TG感受性の測定：ARGのためにV79細胞をラブテックチェンバー（マイルス社製，チェンバーと略）を用いて培養した．チェンバーに10^3～10^5個の細胞を播種，4時間の前培養後，培地に種々の濃度の6TGを加えて培養，培養の最後の16時間に1 μCi／ml の^{3}H-TdRを加えた．培養後，培地を除き，燐酸緩衝生理食塩水（PBSと略）で洗浄，カルアノア液（MeOH：CH_3COOH; 3：1）で固定，ギムザ染色の後，ARGを行った．

ARGによる培養細胞の突然変異検出：コロニー法と同様に処理し，9日目の細胞を25 μg／ml の6TG添加培養液中で40時間培養，^{3}H-TdR添加，ARGを行った．

In vivoにおけるENU誘発突然変異のARGによる検出：マウス脾臓のリンパ球を用いた．マウスの腹腔内に0～120mg／kgのENUを投与した．12日後マウスをエーテルで麻酔し，体表面をアルコールで消毒，心臓採血により脱血後，無菌的に脾臓を摘出，培養液をいれたシャーレに入れて氷冷，脾臓の上部より注射器で少量の培養液を注入後，ピンセットでしごいて，脾実質細胞を培養液中に放出し，ステンレスメッシュ（150G）で細胞塊を取り除いて，単一細胞懸濁液とした．0.83% NH_4Cl-Tris液pH7.56で1分間処理して赤血球を溶解除去．脾細胞は1000rpmで遠心洗浄後，細胞数を血球計算盤で計測し，1×10^6／ml の濃度に調整し，PHA（phyto-hemagglutinin）10 μl／ml，20～40 μg／ml の6TGを加えて48時間培養．培養の最後の16時間に1 μCi／ml の^{3}H-TdRを添加した．培養後PBSで遠心洗浄，カルノア液で固定，パラフィンで線画したスライドグラス上に滴下，風乾し，ARGをおこなった．

ARG：ARG用乳剤（Sakura NR-M2）1容に水2容を加え，45℃に加温，溶解する．溶解した乳剤の中に，細胞が固定されたスライドグラスを10秒間浸した．余分な乳剤を拭い去って，永冷した金属板の上に置いて冷却した後，室温で風乾した．乾燥剤と共に遮光した容器にいれ，冷蔵庫に1～2週間保存後，現像，顕微鏡で多数の黒化銀粒子の観察された細胞を^{3}H-TdR標識細胞即ちDNA合成能を有する細胞として計測した．

結　　果

培養細胞の6TG感受性について：

V79細胞（6TG感受性）ならびにV79-6TG^{r}株（6TG抵抗性）の6TGに対する感受性について，コロニー形成ならびにARGによる方法とを用いて調べ比較し，図1にその結果を示した．横軸に6TGの濃度を，縦軸にコロニー形成あるいは標識された細胞の頻度を示してある．白丸はコロニー形成能で調べたV79細胞の6TGに対する感受性曲線で，この株は6TG感受性が高く，0.1 μg／ml 以上の濃度の6TGで細胞増殖が阻害され，コロニーは形成されない．黒丸はV79-6TG^{r}株の6TG感受性曲線でV79株の2000倍の濃度である200 μg／ml の濃度の6TGで初めてコロニー形成が阻害される．

これに対して，ARG法によって調べた6TG感受性株の感受性曲線を白三角と四角の印で示した．白三角は6

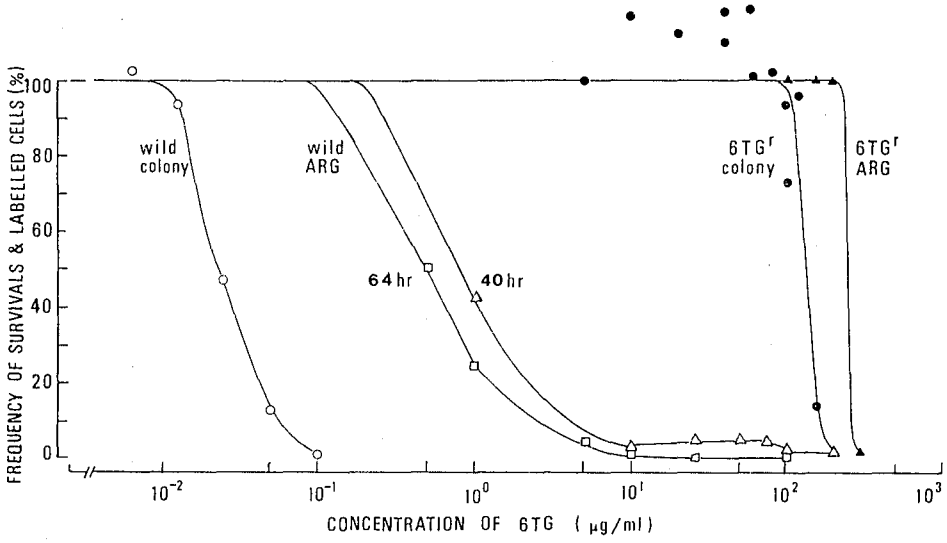


図1　V79並びにV79-6TG^{r}株に対する6TG感受性のコロニー形成法とARG法の比較

TG 感受性株を40時間 6 TG を含む培地中で培養，四角は64時間 6 TG を含む培地中で培養し，培養の最後の16時間に^{3}H-TdR を添加培養して，ARG により 6 TG 中での DNA 合成能を持つ細胞の割合を調べたものである．黒三角は V79-6TG^r 株を同様に ARG により 6 TG 感受性を調べたものである．V79株は 6 TG 中で40時間培養した場合は10 μg／ml 以上の濃度の 6 TG でほとんどの細胞は DNA 合成能を失ってしまう．しかし 1 ～ 3 %の細胞は 6 TG 中であっても DNA 合成能を持っていた．更に長時間の培養である64時間 6 TG 中で培養した場合は，より低い濃度で DNA 合成が阻害されるようになり，高濃度での DNA 合成細胞の数も減少する．しかし長時間の 6 TG 中での培養は，6 TG 中で DNA 合成可能な細胞が分裂し，コロニー様に細胞数が増加してしまい，播種時の DNA 合成可能細胞との区別が不明確となってしまう．同様に ARG 法では V79-6TG^r 株は 3 ×10^2 μg／ml の濃度の 6 TG で，はじめて DNA 合成細胞が減少する．ARG 法ではコロニー形成法に比較して，高濃度の 6 TG を必要とするが，6 TG 感受性細胞と抵抗性細胞との間に，約60倍の差があり，コロニー形成法と同様に，6 TG 感受性細胞と 6 TG 抵抗性細胞を区別することが出来る．この結果から以下の実験では 6 TG 中での培養は40時間とし，6 TG の濃度は20 μg／ml 以上とする．

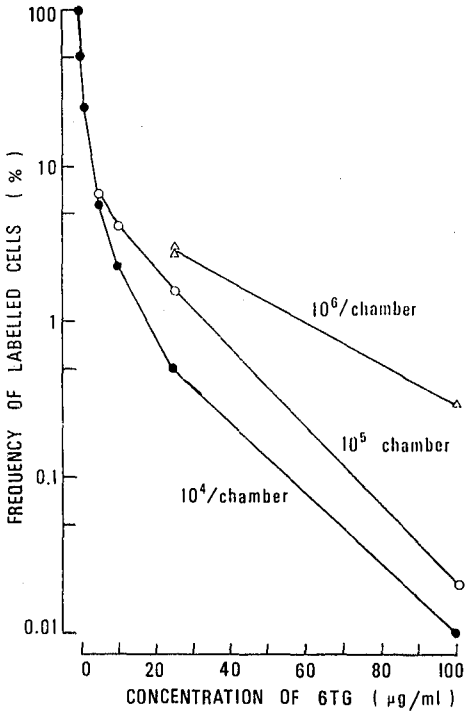


図 2　ARG 法による V79株中の 6 TG 抵抗性細胞検出の細胞密度による影響

細胞密度による影響：

チェンバーに播種する細胞の数によって 6 TG 中での DNA 合成細胞の頻度に影響するか否かを知ることを目的として，チェンバー当り10^4，10^5，10^{6}の細胞を蒔き，6 TG と共に培養して標識された細胞の頻度を調べた．図 2 に示すように 6 TG の濃度が高くなっても，チェンバー当りの播種細胞数が多くなると，標識される細胞の頻度は増加した．チェンバー当りの細胞数は出来る限り少ない方がよく，10^3～10^{4}細胞が適当である．

ARG 法による染め分けと再構成実験：

6 TG 感受性細胞に突然変異が誘起されて 6 TG 抵抗性細胞が生成される．即ち多数の 6 TG 感受性細胞の中に少数の 6 TG 抵抗細胞が混合しているという状態になる．そこで 6 TG 感受性細胞と 6 TG 抵抗性細胞を混合して培養し，ARG によってそれぞれの細胞の染め分け識別することが可能かどうかを調べた．またその時の混

表 1　V79株と V79-6TG^r 株の混合培養における ARG による染め分け

混合率 %	V79-6TG^r 細胞数	標識細胞数	平均値	回収率	コロニー数	平均値	回収率	コロニー当り細胞数
0		26						
		33	31					
		34						
1	30	286			38			
		394	324	$\frac{293}{30}=9.8$	82	58	$\frac{58}{30}=1.93$	$\frac{293}{58}=5.1$
		291			55			
5	150	1422			575			
		1195	1309	$\frac{1278}{150}=8.5$	190	383	$\frac{383}{150}=2.55$	$\frac{1278}{383}=3.3$

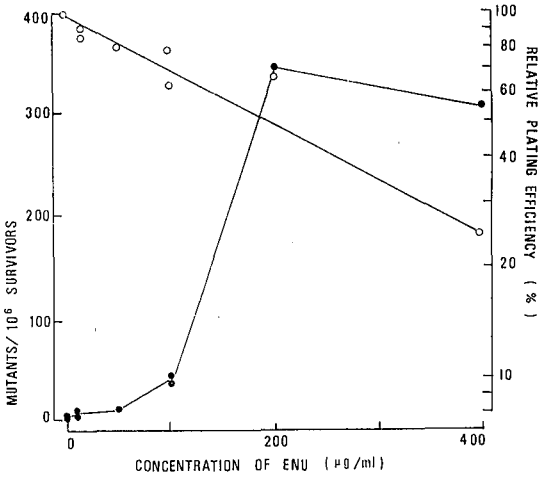


図3 コロニー形成法による ENU 感受性と ENU 誘発 6 TG 抵抗性突然変異

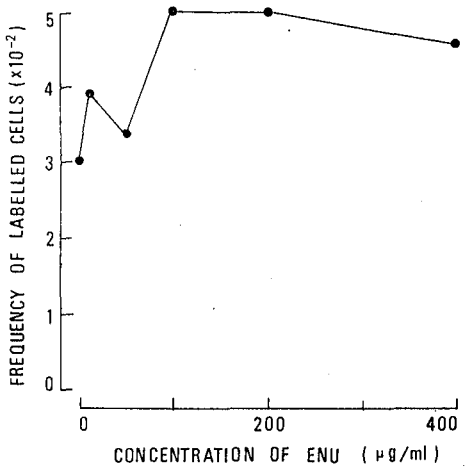


図4 V79株の ENU によって誘発された 6 TG 抵抗性細胞の ARG 検出

合した 6 TG 抵抗性細胞と標識細胞数とからこの ARG 法の再現性を回収率として調べた．すなわち，V79 株の中に V79-6TG^r 株を 0，1，5 %の割合で混合し，チェンバーに3000個の細胞を播種し，25 μg／ml の濃度の 6 TG を含む培養液で38時間培養，6 TG 培地を文換し，更に^{3}H-TdR を加えて16時間培養，ARG を行った．

ARG によるスライドグラスを顕微鏡で観察したところ，V79 株と V79-6TG^r 株は，その^{3}H-TdR の取り込みの結果である黒化銀粒子の存在で明確に識別できた．再構成実験の結果を表 1 に示した．V79-6TG^r 株が混合し

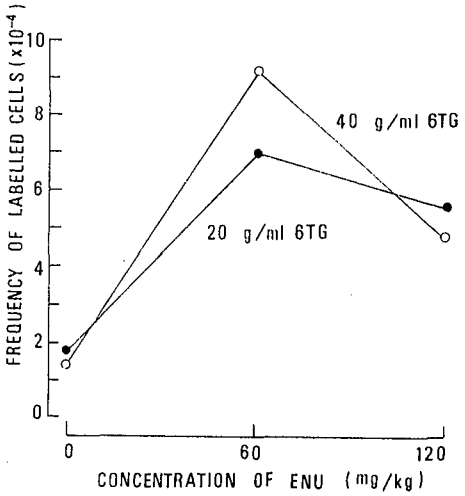


図5 In vivo マウス脾リンパ球の ENU によって誘発された 6 TG 抵抗性細胞の ARG 検出

表2 ARG によって検出された脾臓細胞の 6 TG 耐性突然変異の頻度

6 TG μg／ml	ENU mg／kg 0	60	120
20	1.75×10^{-4}	6.90×10^{-4}	5.63×10^{-4}
40	1.43×10^{-4}	9.20×10^{-4}	4.82×10^{-4}

ていないときは，3000の播種細胞に対して約 1 %，31個の細胞が標識された．V79-6TG^r 株を 1 %で混合したとき，植え込んだ30個の V79-6TG^r 株に対して324個の細胞が標識された．しかし V79-6TG^r 細胞はコロニー状となって増殖していた．平均5.1個の細胞で 1 つのコロニーを形成しており，培養時間が長すぎたためと考えられる．コロニー数より求めた回収率は混合率が 1 %の時は1.93であり，5 %の時は2.55であった．

ENU による 6 TG 抵抗性突然変異の誘発：

増殖中の細胞 V79株に ENU を作用させ，生存率，コロニー法による突然変異率，ならびに ARG 法による細胞標識率の測定を行った．結果は図 3 と 4 に示した．図 3 の白丸はこの細胞の ENU に対する生存曲線であり，0 ～400 μg／ml の ENU 処理に対して片対数グラフで直線性を示した．LD_0（平均致死量）は270 μg／ml であった．黒丸はコロニー法による突然変異誘発率を測定したものであり，10^6生存細胞当りの 6 TG 抵抗性突然変異数で示した．ENU が200 μg／ml の濃度までは誘発突然変異は容量に依存して増加した．しかしそれ以上の濃度では飽和傾向にあり増加しなかった．一方，図 4 は ARG

法で調べた結果で，標識された細胞の頻度を示す．コントロールで 3×10^{-2}であり，100 μg／ml の ENU 処理で 5×10^{-2}と増加した．それ以上の濃度では飽和し，増加しなかった．

In vivo 突然変異細胞の ARG による検出：

マウスの腹腔内に ENU を投与し，脾臓を摘出，リンパ球を分離，培養，ARG により DNA 合成細胞数を測定した．図5ならびに表2に結果を示した．20 μg／ml（黒丸）と40 μg／ml（白丸）の2つの濃度の6TG での選択を行った．標識された細胞の頻度は10^{-4}のオーダーであったが，コントロールに較べ60mg／kg 投与でそれぞれ3.9倍と6.4倍とに増加した．120mg／kg 投与では3.2倍と3.4倍であったが，60mg／kg の場合より標識頻度は少なかった．

考　　察

我々は突然変異終末点をコロニー形成能ではなく，DNA 合成能として検出することを試みた．細胞が分裂し，可視コロニーとなるためには，5回以上の細胞分裂が必要であり，in vivo の体細胞はコロニー形成能が極めて悪い．例えコロニーを形成しなくとも，細胞が分裂してコロニーを形成する初期の段階である DNA 合成によって突然変異細胞の有無を検出することが出来れば，より効率的に突然変異細胞を検出しうることになるであろう．また培養に必要な時間が短時間であることも利点になると考えられる．

我々は先ず始めにこの方法の基礎的データーを得るために，培養細胞を用いて実験し，次いでマウスでの in vivo の実験をおこなった．

培養細胞の6TG 感受性について：6TG 中での40時間の培養は，始めの24時間で細胞が約2回分裂する時間であり，正常細胞は HGPRT で，6TG をヌクレオチドに変換して DNA に取り込み，それ以後の生育が阻害されるための代謝過程に必要とされるであろう時間に十分な時間であり，その後^{3}H-TdR を添加して16時間培養したとき，正常な細胞はもはや DNA 合成が出来ず，突然変異により HGPRT が不活性化された細胞のみが^{3}H-TdR の取り込みをおこなうと考え，ARG による実験をおこなった．

図1に示したようにコロニー形成法によれば V79株は6TG に高感受性であり，それより分離された6TG 抵抗性突然変異株 V79-6TG^r と大きな差がある．6TG による突然変異細胞の選択に有効であることが分かる．ARG 法ではコロニー形成法に比較して，高濃度の6TG を必要とするが，V79株と V79-6TG^r との間に，約60倍の差があり，コロニー形成法と同様に，6TG 感受性細胞と6TG 抵抗性細胞を区別することが出来る．

細胞密度による影響：図2に示したように，チェンバー当りの細胞数が多くなると，6TG の濃度が高くなっても標識される細胞の頻度は増加した．チェンバー当りの細胞数は出来る限り少ない方がよく，10^3～10^4細胞が適当であると考えられる．

6TG の突然変異検出の実験における，いわゆる細胞密度効果は代謝協同 metabolic-cooperation[2]と関係があり，それは正常細胞によって作られた毒性を持つ薬物代謝産物が変異細胞に移行するためで，突然変異頻度が減少する現象であるが，今回の実験の結果は逆に，密度が大きくなると，標識細胞即ち突然変異細胞数が多くなる．これは細胞数が増加することによって，6TG が分解されるため正常細胞が DNA 合成をおこなう．或は細胞の接触によって HGPRT が不活性化される等が考えられるが，原因は不明である．

ARG 法による染め分けと再構成実験：ARG によって V79株と V79-6TG^r 株は，その^{3}H-TdR の取り込みの結果である黒化銀粒子の存在で明確に識別できる．表1に示すように，標識細胞数による再現性は細胞が分裂増加したため，混合した細胞数より大きくなった．V79-6TG^r 株を1％混合したとき，平均5.1個の細胞で1つのコロニーを形成していた．コロニー数より求めた回収率は混合率が1％と5％でそれぞれ1.93と2.55であった．培養時間が長すぎたことが問題であり，実験方法の改良によって解決できるものと考えられる．

ENU による6TG 抵抗性突然変異の誘発：コロニー法において ENU 処理によって突然変異が増加したように，ARG 法において ENU 処理で標識細胞数はコントロールより増加した．しかし，コロニー法では10^6生存細胞当りの6TG 抵抗性突然変異率であり，これと異なって ARG 法では10^2細胞当りのオーダーの標識率であった．Amneus[13]らがヒトの末梢血を用いた実験で示しているが，我々の系で10^{-2}のオーダーで分裂サイクルの極めて遅い細胞が存在し，それが分裂サイクルに入って来るためであるかも知れない．

In vivo 突然変異細胞の ARG による検出：ヒトの Lesch-Nyhan 症候群の患者は HGPRT 酵素の欠損による遺伝病である．そして HGPRT はヒト[3]，チャイニーズハムスター[4]，マウス[5]のX染色体上の長腕に位置する1つの遺伝子であることが知られている．最近，ヒトの場合女性のX染色体の一本は不活性であり，HGPRT 活性も一本のX染色体によって発現され，従って HGPRT

酵素欠損の突然変異率は男女で同率であることが示されているが[6]，我々は半接合であることを考慮にいれて，雄（マウス）を用いた．またリンパ球は分化した細胞であるがPHA等の刺激によりDNA合成並びに細胞分裂が誘発されることが知られており，脾臓は多量のリンパ球を分離し得ることから，この実験をおこなうのに格好の材料であると考えた．

実験の結果，ENU処理で標識細胞数はコントロールより増加した．しかし，標識された細胞の頻度はコントロールで10^{-4}のオーダーであり，in vitro培養細胞の場合と同様に，他の方法で求められた自然突然変異頻度[7]より高かった．

このようにコロニー形成法とARG法の結果に大きな隔たりがあるということは，我々の行ったARG法では真の突然変異を観察していない可能性がある．今後この点について検討して行かなければならない．なお，この実験の経験より，ARGを用いることによって，あるいは更にこの方法を発展させて，^{3}H-TdRの代わりにブロムディオキシウリジンで標識し，flow cytofluorometerを用いることによって，変異原で処理した細胞における初期損傷から突然変異細胞への変化の経緯を解明する手がかりが得られる可能性が示唆された．

Strauseら[8]，Albertiniら[9]を始めとする若干の研究者によって，ヒトの末梢血リンパ球の自然突然変異率，制ガン剤を投与された患者，あるいはLesch-Nyhan症候群の患者の6-TG抵抗性突然変異が，我々と同様なARGで検出する方法を用いて調べられている．そしてより効率的[10,11]にあるいは，より正確[12,13]に自然突然変異率を測定するために種々な工夫がなされている．しかし最近は，ヒトにおける環境変異原による暴露の評価をするのに末梢血リンパ球のマイクロタイトレイション法による培養・突然変異測定がおこなわれており[14]，plating efficiencyを高める工夫がなされることによって正確な突然変異率が測定されている．Gockeら[15]はin vivoでENUを投与したマウスの脾臓細胞を用いて，我々と同様にARG法をおこなっている．またJonesら[7]（1985）は同じくマイクロタイトレイション法による6TG抵抗性突然変異とSCEの頻度について調べている．

この実験は1984年の第13回日本環境変異学会で発表したものである．

要　　約

In vivoにおける体細胞突然変異を検出することは，胎児の細胞を用いる以外，コロニー形成能が極めて悪い等の理由で困難である．我々は突然変異の観察終末点をコロニー形成ではなくDNA合成能とし，これをオートラジオグラフィーによって検出することを検討した．一方，培養細胞で最も廣く用いられている突然変異検出法としてHGPRT欠損を見る6TG抵抗性の検出系があり，ARGとこの系を組み合わせた．基礎実験として，培養細胞をもちいて，コロニー形成による方法とARGによる方法とを比較した．ARG法はより高い濃度の6TGを必要としたin vitro培養細胞ならびにマウス脾リンパ球を用いたin vivoのARGによる測定データーは自然突然変異頻度は高く，突然変異測定法として使うためにはさらに検討が必要である．

謝辞　チャイニーズハムスター肺由来V79細胞株，および6TG抵抗性株（V79-6TG^{r}株）を分与して戴いた横浜市立大学梅田博士に深謝致します．

文　　献

1）Inui, N., M. Taketomi, Y. Nishi, *Mut. Res.*, 41, 351-360, 1976
2）Bridges, B. A., J. Hunckle, *Mut. Res.*, 10, 141-151, 1970
3）Shows, T. B., J. A. Brown, *Pro. N. A. S.*, 72, 2125-2129, 1975.
4）Rosenstraus, M., L. A. Chasin, *Proc. N. A. S.*, 72, 493-497, 1975
5）Chapman, Y., T. Shows, *Nature*, 259, 665-667, 1976
6）Hakoda, M., M. Akiyama, S. Kyoizumi, K. Kobuke, A. A. Awa, M. Yamakido, *Mut. Res.*, 197, 161-169, 1988
7）Jones, I. M., K. Burkhart-Schultz, A. V. Carrano, Mut. Res., 143, 245-249, 1985.
8）Strauss, G. H., R. J. Albertini, *Mut. Res.*, 61, 353-379, 1979
9）Albertini, R. J., *Banbury Report*, 2, 359-376, 1979
10）Amneus, H., P. Matsson, G. Zetterberg, *Mut. Res.*, 106, 163-178, 1982
11）Zetterberg, G., H. Amneus, P. Matsson, *Banbury Reprt*, 13, 413-421, 1982
12）Dempsey, J. L., A. A. Morley, *Mut. Res.*, 119, 203-211, 1983
13）Amneus, H., B. Sjogren, G. Zetterberg, *Mut. Res.*, 139, 41-44, 1984
14）Morley, A. A., K. J. Trainor, R. Seshadri, R. G. Ryall, *Nature*, 302, 155-156, 1983
15）Gocke, E., K. Eckhardt, M. T. King, D. Wild, *Mut. Res.*, 113, 455-465, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 39, 310-316, 1988

チアベンダゾール（TBZ）によるマウス尿中成分の変動

樺島 順一郎*, 米山 允子*, 多田 幸恵**,
藤谷 知子*

Effect of Thiabendazole (TBZ) on Mice Urinary Composition

JUN-ICHIRO KABASHIMA*, MASAKO YONEYAMA*,
YUKIE TADA** and TOMOKO FUJITANI*

Keywords：チアベンダゾール thiabendazole, 防かび剤 fungicide, マウス mouse, 尿 urine, 腎臓 kidney, 短期投与 short term administration

緒　言

チアベンダゾール（以下 TBZ と略す）は，日本では1978年にかんきつ類の防かび剤として使用が許可されている．TBZ の毒性については，Robinson ら[1]によってラットやマウスに顕著な毒作用がないと報告されているが，小縣らは[2-6]は，催奇形性があることを報告している．我々は，TBZ の一般毒性試験の一環として，今回21日間までの，強制経口投与実験を行い，尿を中心とした検査と血清中の腎機能に関連した成分についての検査を行ったので報告する．

実験材料及び方法

1．実験動物　Crj：CD-1（ICR）マウス雌雄を，日本チャールスリバー社より4週令で購入し，1週間予備飼育後，実験を開始した．

2．飼育条件　温度25±1°，湿度55±5％，照明午前6時～午後6時，換気毎時10回の飼育室において，プラスチック代謝ケージに一匹ずつ収容して飼育した．飼料は日本クレア社製固型飼料 CE-2 を，水は細菌ろ過器を経由した水道水を自由摂取させた．

3．試　料　TBZ は Merck Sharp & Dohme International 社製 Lot. No. BZA-539，純度98.5％を日本薬局法のオリーブ油に懸濁して用いた．

4．試料投与量及び投与方法　TBZ500mg，250mg／kg 体重を胃ゾンデを用いて強制経口投与した．対照群にはオリーブ油を投与した．投与期間は，1，3，5，7，21日で，連続投与の翌日に屠殺した．

5．採尿方法　個体別に24時間尿を採取し，尿は低温室中でビスキングチューブを用いて，再蒸留水3 *l* に対して2回，一夜透析を行った．透析後約5°の低温で3000rpm の遠心分離を行い，上澄と沈査を－50°で保存した．

6．測定方法

臓器重量　屠殺時に肝臓と腎臓を摘出し，その重量を測定した．なお体重は，投与と屠殺の直前に測定を行った．

臨床検査用試薬による検査　試薬はいずれも和光純薬㈱の市販品を用いた．尿酸は炭酸ナトリウム法[7]，尿素窒素はウレアーゼ・インドフェノール法[7]，クレアチニンとクレアチンは Jaffé 法[7]で測定した．尿については，尿酸，クレアチニン，クレアチンを7日間投与マウスについて測定した．血清については，尿素窒素，尿酸，クレアチニンを測定した．

尿試験紙による検査　尿試験紙 Labstix Ⅲ（マイルス三共社製）により，pH，Protein, Glucose, Occult Blood を，7日間連続投与マウスについて測定した．

尿中タンパクの電気泳動　－50°で保存した尿の透析上澄を Brodford の方法で[8]タンパク濃度を測定し，タンパク量が約35 μg 前後となるように濃度を調製し，Laemmli の方法[9]にしたがい，0.1％ SDS 存在下に9％アクリルアミドを用いて，SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行った．標準タンパクとして Pharmacia 社製低分子量カリブレーションキットを用いた．電気泳動は，

*東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　169　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, 169 Japan
**東京都立衛生研究所毒性部病理研究科

低温室（室温7～8°）で，160Vの定電圧で行った．泳動先端はブロムフェノールブルーを用いてしるした．染色は0.25%ブリリアントクマジブルーで1時間行い，酢酸・メタノール・水（7：5：87.5）で脱色した．

結　　果

体重の変化は，Table 1．に21日間投与したマウスの測定結果を示した．投与開始3日目の雌の高濃度投与郡で有意差があったが，全体的にはほとんど差がなく，体重変化もほとんど認められなかった．肝臓は，雌では投与5日目以後に重いものがあり，相対重量（体重100g当り）では，2日目以後の投与群に有意に重いものがあった．雄では投与21日目のもので有意に重く，相対重量では投与7日目以後で有意に重くなった．腎臓の重量では有意な差が認められず，相対重量で雌雄とも片側の重量に有意な増加が認められるものがあった．

血清生化学検査はTable 3．に示した．血清尿素窒素は雌では低濃度投与群では3日目以後，高濃度投与群では5日目以後，雄でも5日目の低濃度と高濃度の両投与群で，有意な減少が認められ，全体として減少傾向があった．尿酸は，雌では低濃度投与群の1日目と7日目以後，高濃度投与群では1日目と5日目以後，雄では低濃度と高濃度の両投与群の1日目と3日目に，有意な減少が認められた．血清中尿酸も全体としては減少傾向であった．クレアチニンは，雌では低濃度投与群で1日目と21日目に，高濃度投与群では1日目，3日目，21日目に有意な減少が認められ，雄でも有意差はないが減少傾向が認められた．

尿検査は，7日間投与マウスの結果をTable 4．に示した．尿量は，低濃度投与群では雌の1日目と雄の3日目で有意に増加し，高濃度投与群では雄で1日目から6日目まで有意な増加が見られた．雄の高濃度投与群の尿量は3日目までが特に多く4日目からは増加の抑制傾向が認められた．尿酸量は，雌では低濃度と高濃度の両投与群ともに有意な増加が認められるものが多く，雄でも低濃度投与群で3日目に，高濃度投与群では全測定時に有意な増加が認められた．クレアチニン量は雄の高濃度投与群の1日目と2日目でのみ有意な増加が認められた．クレアチン量は，雌の高濃度投与群の1日目と雄の高濃度投与群の2日目と3日目に有意な増加が認められ，全体的には投与群の方が対照群より高い傾向であった．

尿試験紙ラブスティックスⅢによる結果はTablb 5．に示した．強制排尿のため，尿量にばらつきがあり，採尿できなかったものもあるため，検査項目数も検査匹数も一定ではない．pHは5～8の範囲で，潜血反応は陰性であり投与による差は認められなかった．尿中タンパクにも投与による差は認められなかったが，マウス尿では，人尿と異なりラット尿と似て，正常尿でも30～100mg／100ml程度のタンパクが排泄されていた．尿中グルコースは，1回目の投与後6時間の検査で，雌では低濃度と高濃度の両投与群，雄でも高濃度投与群で反応が陽性であった．

尿の透析上澄のSDSポリアクリルアミド電気泳動の結果はFig. 1．に，1回投与後24時間尿について示した．雌では高濃度投与群で，雄では低濃度投与群でも分子量67000のアルブミンバンドの位置に，かなり大量のタンパクバンドが見られ，少し小さい分子量43000のオブアルブミンバンドの位置付近まで，かなり明確ないくつかのタンパクバンドが見られるものがある．また雌雄とも投与群と対照群の両方で，分子量14100のラクトアルブミンと分子量20100のトリプシンインヒビターの位置に尿中タンパクのバンドが見られ，マウスでは正常尿でもかなり多量の低分子タンパクが尿中に排泄されているこ

Table 1．Changes in Body Weight of Mice Administered with Thiabendazol

Sex	Dose (mg/kg)	Administration period (Days) 0	1	3	5	7	14	21
Female	0	27.0±1.10	27.0±1.10	26.0±0.63	26.5±1.05	26.3±1.03	27.0±1.55	27.4±1.50
	250	26.2±1.17	26.2±1.17	26.3±0.82	26.0±1.26	26.5±1.64	26.0±1.26	26.2±0.9
	500	27.8±1.25	27.1±1.25	27.9±1.55*	27.4±1.06	27.1±1.13	26.5±0.93	27.3±1.70
Male	0	33.8±1.64	33.4±1.52	32.8±1.64	33.0±1.58	33.0±1.58	33.4±1.95	34.3±2.41
	250	33.0±1.00	33.0±1.00	33.8±0.84	33.6±0.55	33.0±1.22	33.2±0.84	33.6±1.20
	500	33.2±1.47	33.2±1.47	34.7±1.37	34.7±1.37	34.0±1.55	34.0±1.41	34.0±2.80

＊＝0.05

Table 2. Effect of Thiabendazol on Liver and Kidney Weight

Sex	Administration Period(Days)[a]	Dose (mg/kg)	Body Weight (g)	Liver Weight(g) Absolute	Liver Weight(g) /100g B.W.	Kidney Weight(g) (R) Absolute	Kidney Weight(g) (R) /100g B.W.	Kidney Weight(g) (L) Absolute	Kidney Weight(g) (L) /100g B.W.
Female	1	0	24.0±1.5	1.31±0.11	5.47±0.15	0.166±0.015	0.689±0.015	0.153±0.012	0.636±0.031
		250	23.8±1.7	1.43±0.24	5.97±0.81	0.156±0.008	0.657±0.076	0.155±0.013	0.657±0.099
		500	22.6±1.3	1.30±0.07	5.77±0.36	0.157±0.010	0.697±0.050	0.151±0.011	0.669±0.064
	3	0	23.3±1.2	1.28±0.06	5.54±0.14	0.163±0.011	0.670±0.040	0.158±0.009	0.680±0.036
		250	22.2±1.0	1.29±0.07	5.80±0.14**	0.163±0.012	0.736±0.044	0.159±0.010	0.725±0.029
		500	22.8±1.4	1.37±0.13	6.01±0.21****	0.166±0.022	0.735±0.089	0.167±0.015	0.734±0.054
	5	0	23.2±1.3	1.20±0.10	5.17±0.19	0.177±0.046	0.768±0.227	0.148±0.017	0.639±0.049
		250	23.9±2.2	1.29±0.13	5.43±0.30	0.173±0.016	0.726±0.047	0.166±0.021	0.693±0.040*
		500	23.3±1.6	1.51±0.13***	6.48±0.40***	0.163±0.016	0.700±0.067	0.164±0.013	0.706±0.055*
	7	0	23.4±1.8	1.33±0.15	4.83±0.51	0.160±0.011	0.684±0.053	0.173±0.027	0.739±0.096
		250	23.9±1.5	1.26±0.21	5.25±0.64	0.169±0.021	0.703±0.061	0.167±0.014	0.698±0.035
		500	23.3±1.8	1.30±0.12*	5.58±0.25***	0.186±0.011	0.799±0.086*	0.180±0.014	0.774±0.093
	21	0	27.4±1.5	1.27±0.15	4.63±0.37	0.197±0.014	0.718±0.034	0.185±0.029	0.674±0.077
		250	26.2±0.9	1.30±0.17	4.98±0.62	0.190±0.009	0.727±0.037	0.182±0.010	0.696±0.065
		500	27.3±1.7	1.49±0.14**	5.49±0.53***	0.200±0.013	0.738±0.084	0.191±0.016	0.702±0.048
Male	1	0	26.8±2.6	1.66±0.34	6.14±0.60	0.208±0.023	0.775±0.021	0.202±0.024	0.754±0.049
		250	28.0±1.2	1.96±0.09	6.30±0.29	0.227±0.020	0.812±0.061	0.230±0.022	0.820±0.066
		500	27.1±1.4	1.86±0.16	6.86±0.45*	0.240±0.028	0.885±0.103*	0.226±0.029	0.835±0.102
	3	0	27.2±1.5	1.71±0.19	6.27±0.48	0.229±0.016	0.846±0.075	0.218±0.017	0.802±0.054
		250	26.1±1.8	1.75±0.90	6.58±0.29	0.229±0.016	0.565±0.112	0.234±0.017	0.88 ±0.116
		500	26.4±0.9	1.78±0.13	6.74±0.38	0.236±0.014	0.897±0.065	0.235±0.071	0.890±0.077*
	5	0	30.5±2.6	1.86±0.19	5.95±0.30	0.256±0.035	0.818±0.060	0.256±0.033	0.818±0.049
		250	29.9±3.0	1.89±0.26	6.30±0.43	0.269±0.013	0.923±0.116	0.256±0.051	0.855±0.126
		500	29.1±2.8	1.88±0.30	6.43±0.62	0.255±0.030	0.876±0.077	0.250±0.032	0.859±0.087
	7	0	33.3±1.7	1.66±0.11	4.98±0.29	0.272±0.023	0.816±0.081	0.265±0.023	0.196±0.073
		250	32.3±3.7	1.64±0.24	5.08±0.36	0.280±0.049	0.862±0.079	0.268±0.043	0.830±0.089
		500	32.4±2.2	1.75±0.14	5.38±0.33*	0.301±0.042	0.928±0.111	4.300±0.039	0.926±0.118*
	21	0	34.3±2.4	1.50±0.12	4.38±0.09	0.263±0.025	0.969±0.103	0.270±0.034	0.776±0.113
		250	33.6±1.2	1.59±0.12	4.74±0.24*	0.276±0.017	0.822±0.053	0.266±0.022	0.791±0.064
		500	34.0±2.8	1.77±0.14**	5.21±0.30***	0.286±0.053	0.822±0.109	0.280±0.041	0.823±0.084

a) Mice were administered thiabendazol orally once a doy for several doys
*0.05 **0.02 ***0.01 ****0.001

Table 3. Effect of Tiabendazol on Serum Corcentration of Urea Nitrogen, Uric Acid and Creatinine of Mice

Sex	Administration period(Days)[a]	Dose (mg/kg)	Urea Nitrogen (μg/ml)	Uric Acid (μg/ml)	Creatinine (μg/ml)
Female	1	0	222.8±26.5	31.0± 4.6	5.5±0.3
		250	235.1±26.5	26.5± 2.5*	4.9±0.5*
		500	210.3±29.4	22.3± 3.9***	5.0±0.5*
	3	0	186.2±48.9	23.0± 4.0	6.2±0.3
		250	134.7±32.2*	23.2± 6.0	5.8±0.5
		500	143.0±20.0	21.2± 3.7	5.6±0.3***
	5	0	220.3±28.2	32.0± 2.6	—
		250	180.1±30.0*	29.8± 4.1	—
		500	153.0±15.7***	28.2± 3.4*	—
	7	0	360.1±102.9	67.3±16.3	8.6±0.7
		250	232.3±30.3*	42.6±12.5*	9.2±0.5
		500	225.1±27.5	44.8± 4.6*	8.4±0.5
	21	0	258.6±58.0	51.1±14.6	8.0±0.1
		250	143.0±34.0**	36.4± 6.8*	6.9±0.5***
		500	163.8±25.8**	31.5± 6.4**	6.5±0.6**
Male	1	0	233.8±19.5	39.3± 5.2	5.1±0.5
		250	232.5±18.1	30.5± 7.0*	5.0±0.3
		500	217.1±36.7	22.2± 2.3***	4.9±0.7
	3	0	165.4±30.5	26.4± 1.6	5.9±0.4
		250	156.3±34.0	23.0± 2.7*	5.9±1.1
		500	151.1±36.7	21.6± 4.2*	5.9±0.6
	5	0	233.7±28.8	29.6± 3.7	—
		250	190.6±25.7*	26.8± 5.0	—
		500	190.6±25.7*	36.0± 4.8	—
	7	0	302.7±75.4	56.6± 8.8	8.9±0.6
		250	293.7±25.6	49.7±14.2	8.6±0.6
		500	284.5±38.0	47.3± 8.2	8.8±0.9
	21	0	241.2±36.5	38.9± 9.5	8.9±0.9
		250	199.8±24.0	35.2± 5.7	7.3±0.7
		500	196.1±32.3	31.9± 6.1	7.5±1.4

a) Mice were administered thiabendazol orally once a day for saveral day.
*0.05 **0.02 ***0.01 ****0.001

とが確認された．なお投与6日目の尿では，分子量の大きい方のタンパクバンドはかなり減少するが，アルブミンの位置のバンドだけは残るものも多かった．

考　察

SDS ポリアクリルアミド電気泳動によってマウス尿には，分子量15000から20000位のタンパクが正常動物でも排泄されていることが確認された．人間では低分子タンパクの尿中への排泄は尿細管の障害によって起こることが知られている．また分子量の比較的大きいアルブミンなどと低分子量のタンパクの両方の尿中への排泄は腎不全などで起こることが知られている．TBZ 投与マウスの尿中には尿酸の増加が見られ，尿細管での再吸収が阻害されているようである．また血清中の尿素窒素，尿酸，クレアチニン濃度の上昇は認められないので，重大な腎機能の低下は考えにくい．以上のことから腎臓では排泄機能よりも再吸収機能になんらかの障害を受けていることが示唆される．人間の場合，尿量の増加は糖尿病，浮腫等の吸収期，神経系統の疾患など様々の原因が考え

Table 4. Effet of Thiabendazol on Urine Volume and Urinary Concentrations of Uric Acid, Creatinine and Creatin of Mice

		Female			Male		
	day	Control	250mg/kgB.W.	500mg/kgB.W.	Control	250mg/kgB.W.	500mg/kgB.W.
Volume	1	0.668± 0.339(6)	1.302± 0.505(5)*	1.209± 0.536(8)	0.818± 0.558(6)	0.801± 0.303(7)	4.009± 1.145(8)***
(ml/day)	2	0.720± 0.460(3)	0.825± 0.511(6)	1.200± 0.810(7)	0.808± 0.382(5)	1.082± 0.366(6)	4.156± 1.245(8)***
	3	0.475± 0.035(3)	0.787± 0.434(3)	1.220± 0.670(6)	0.794± 0.107(5)	1.587± 0.466(7)**	2.851± 1.015(8)***
	4	0.425± 0.149(2)	0.634± 0.255(5)	1.063± 0.491(4)	0.980± 0.416(5)	1.102± 0.657(6)	2.206± 0.665(8)**
	6	0.895± 0.715(2)	1.254± 0.734(5)	0.999± 0.494(7)	1.110± 0.448(6)	1.250± 0.328(6)	2.205± 0.669(8)**
Uric acid	1	49.78 ± 17.65	104.61 ± 20.26***	135.41 ± 35.24***	75.40 ± 39.29	111.96 ± 39.90	215.67 ± 56.81***
(μg/day)	2	66.58 ± 32.80	106.15 ± 43.71	147.20 ± 62.70	108.11 ± 53.44	166.06 ± 54.66	312.95 ± 59.65***
	3	33.04 ± 16.98	86.85 ± 26.24*	182.24 ± 70.46*	97.87 ± 23.07	192.20 ± 44.14**	272.66 ± 79.99***
	4	30.10 ± 4.55	85.54 ± 11.36*	95.20 ± 45.21	55.02 ± 14.68	71.93 ± 32.62	116.29 ± 19.73***
	6	63.49 ± 40.15	173.91 ± 21.72*	175.39 ± 49.94*	108.42 ± 56.96	190.86 ± 45.78*	256.53 ± 48.45***
Creatinine	1	152.0 ± 71.9	181.4 ± 25.9	208.9 ± 98.9	147.3 ± 63.1	167.6 ± 45.9	266.5 ± 55.0**
(mg/day)	2	212.7 ± 75.6	191.8 ± 87.0	201.7 ± 86.3	257.8 ±114.8	269.7 ± 98.4	397.6 ± 51.7*
	3	90.7 ± 67.0	173.0 ± 50.0	269.6 ±118.4	267.8 ± 54.6	324.3 ± 85.0	381.1 ±125.5
	4	103.5 ± 3.5	146.6 ± 29.4	119.3 ± 93.5	161.2 ± 42.8	106.2 ± 43.9	156.8 ± 38.0
	6	223.7 ±148.5	193.4 ± 47.5	175.5 ± 50.6	269.1 ±129.4	302.8 ± 79.2	323.2 ± 98.6
Crcatine	1	179.2 ±107.1	270.6 ± 34.9	371.7 ± 97.2**	317.0 ±198.8	211.4 ± 72.6	464.3 ±130.7
(mg/day)	2	307.7 ±162.1	322.0 ±105.4	312.3 ±148.9	327.8 ±216.9	437.0 ±156.9	929.8 ±198.4***
	3	207.3 ±196.7	259.0 ±134.0	333.2 ±115.5	375.0 ± 89.5	509.9 ±166.9	620.8 ±209.4*
	4	176.0 ± 5.7	237.4 ± 32.7	208.3 ±130.0	224.6 ± 51.9	244.7 ±132.0	334.0 ± 94.8*
	6	155.6 ± 30.8	273.0 ±118.6	298.6 ±153.0	275.3 ±182.7	352.2 ±110.9	430.6 ±155.5

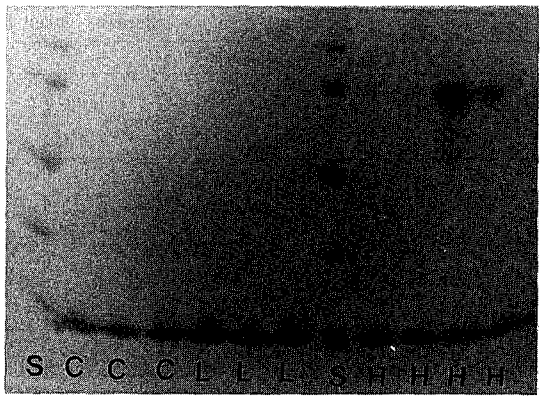
*0.05 **0.02 ***0.01 ****0.001

Table 5. Effect of Tiabendazol on Various Urinary Paramaters of Mice

Sex	Administration Period(Days)	Dose (mg/kg)	pH 5−6	pH 6−7	pH 7−8	Protein 30mg/dl>	Protein 30mg/dl	Protein 100mg/dl	Protein 300mg/dl	Glucose −	Glucose +	Occult Blood −	Occult Blood +
Female	0	0	1[1)]	2	3		3	3		6		6	
		250	2	3	2	1	6			7		7	
		500	1	4	3		4	4		8		8	
	(6hr)	0	6				4	2		6		6	
		250	4			1	2	1		2	2	4	
		500	8				3	5		4	4	8	
	1	0	2	4			3	2	1	6		6	
		250	7	5		1	4	2				7	
		500	4	2	1	2	3	2		7		7	
	2	0	3	1	1		2	3		5		5	
		250	1	5	1	1	1	4	1	7		7	
		500	5	1	1	5	1	1		6		6	
	3	0					4	2		3		3	
		250	2	5		1	3	3		7		7	
		500	1	6	1	1	5	2		8		8	
	4	0	2	4									
		250											
		500											
	5	0											
		250											
		500											
	6	0	1	3	1	2	3					3	
		250	2	3			3	2		3		2	
		500	3	2	2	1	5	1		4		4	
Male	0	0		3	2		1	4		5		5	
		250	2	3	1		5	1		6			
		500			4	1	4	3		8			
	(6hr)	0	1				1			1		1	
		250	3	2			2	3		5			
		500		2	4		1	4	1	3	2		
	1	0	2	2		2	3			3		4	
		250	3	2			3	2		5			
		500	6	1			5	2		7			
	2	0	1		1		2			2		2	
		250		1		1	1			2			
		500	2	1			3			3			
	3	0	1	1	1			3					
		250	2	1			2	1		3			
		500	1	2		1	2			3			
	4	0											
		250											
		500											
	5	0											
		250											
		500											
	6	0	2				2			1		1	
		250	1	3			2	2		4		4	
		500	1	4	1	1	4	1					

1) No. of mice

Femnle



Male

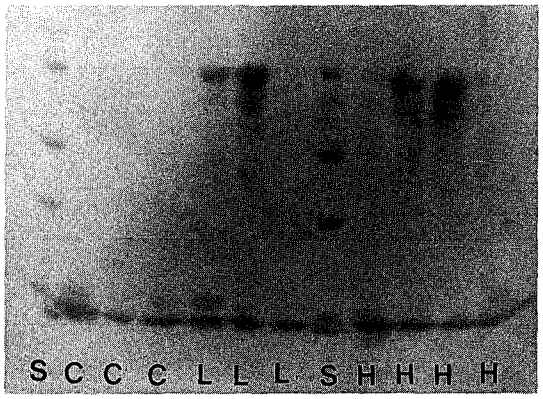


Fig. 1. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Urinary Protein of Mice Administered Thiabendazol
S：Standard C：control L：250mg/kg
H：500mg/kg

られる．また特発性一過性糖尿は，精神的ストレス，諸種の中毒，ステロイド剤等の過剰投与などにより起こるとされている．これらのことから，今回の実験での，マウスの尿量増加や一時的糖尿の出現は，大量の TBZ を強制経口投与した影響とも考えられる．

以上の結果から，TBZ の投与は腎臓の再吸収機能に影響することが考えられ，この影響による変化が TBZ の投与を中止することによって回復するか否かは興味のあるところである．この点については形態学的な検索も含めて今後検討を加えたい．さらにラットやマウスでは，正常動物でも低分子量のタンパクが排泄されており，化学物質の投与によって分子量の大きいタンパクも容易に排泄されやすくなることも考えられる．今後毒性学的立場から，化学物質の投与とラットやマウスの尿中タンパクの変動との相関性についての検討も行ってみたい．

文　献

1）Robinson, H. J., Sterk, H. C. and Graessle, O. E.：*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 7, 53, 1965

2）小縣昭夫，安藤　弘，久保喜一，平賀興吾：東京衛研年報，29-2，112-115，1978

3）小縣昭夫，安藤　弘，久保喜一，平賀興吾：東京衛研年報，33-2　495-499，1982

4）小縣昭夫，安藤　弘，久保喜一，平賀興吾：東京衛研年報，33-2，500-505，1982

5）Ogata, A., Ando, H., Kubo, Y., and Hiraga, K.：*Fd. Chem. Toxic.*, 22-7, 509, 1984

6）小縣昭夫，安藤　弘，久保喜一，佐々木美枝子，平賀興吾：東京衛研年報，37，421-425，1986

7）金井　泉：臨床検査法提要，第29版，1983，金原出版，東京

8）Bradford, M. M.：*Anal. Biochem.*, 72, 248, 1976

9）Laemmli, U. K., *Nature*, 227, 680, 1970

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 317-323, 1988

チアベンダゾールのラット膀胱発癌における プロモーション効果の検討

藤井　孝*, 三栗谷 久敏*, 矢野範男*, 湯澤勝廣*,
長澤明道*, 林田志信*, 平賀興吾**

Study of Promoting Effect of Thiabendazole on Urinary Bladder Carcinogenesis in Rats

TAKASHI FUJII*, HISATOSHI MIKURIYA*, NORIO YANO*, KATSUHIRO YUZAWA*,
AKEMICHI NAGASAWA*, SHINOBU HAYASHIDA* and KOGO HIRAGA**

Promotion effect of thiabendazole (TBZ) on urinary bladder carciongenesis in male F344 rats initiated with sodium *o*-phenylphenate (OPP-Na) was investigated. Rats were fed diet containing 2 % OPP-Na for 8 weeks, and then diet containing 0 or 0.2% TBZ for 5 weeks (Exp. Ⅰ), and 0, 0.05, 0.1, 0.2 or 0.4% TBZ for 30 weeks (Exp. Ⅱ) respectively. Transitional cell hyperplasia of the urinary bladder was seen in 5/10 (five out of 10 rats) of the 0.2% group and 3/10 of the 0 % group in the Exp. Ⅰ, and in 2/28 of the 0.2% group and 1/29 of the 0.4% group in the Exp. Ⅱ. No urinary bladder tumor was observed in these two studies, and retardation of growth and anemia were observed in the 0.2% and the 0.4% groups in the Exp. Ⅱ. It is not clear from these results whether TBZ has promoting activity toward the urinary bladder carcinogenesis induced by OPP-Na in rats. Further study is needed.

Keywords: thiabendazole, potential promotion activity, urinary bladder carcinogenesis, rats.

緒　言

チアベンダゾール（以下，TBZと略す）は駆虫ならびに防かび作用を有することが知られている[1-5]．わが国では1978年に柑橘類およびバナナのみを対象とした防かび剤として食品添加物に指定された[6]．Robinsonらは種々の毒性試験でTBZには顕著な害作用が認められなかったと報告している[7]．これに対し，当部で行った防かび剤の安全性を検討する一連の毒性試験のなかで，TBZは小懸らがマウスに対する催奇形作用を確認し[8,9]，著者らは高用量投与によってラットで骨髄の萎縮，腎臓尿細管上皮細胞の軽度な過形成などを観察している[10]．また，TBZに先行して検討した防かび剤で，食品添加物に指定されているオルトフェニルフェノール（以下，OPPと略す）およびそのナトリウム塩オルトフェニルフェノールナトリウム（以下，OPP-Naと略す）はともにラット膀胱に腫瘍を誘発することを著者らが認めている[11-13]．さらに，当所の安田らは輸入柑橘類ではTBZとOPPまたはOPP-Naとが併用されている例が多いと報告しており[14]，当部の藤田らはAmes試験でTBZおよびOPPはともに単独では陰性であるが両者を併用すると軽度に陽性になることを認めている[15]．そこで，OPPよりも短期間の投与でラットに膀胱癌を誘発するOPP-Naを用い，これとTBZとを同時にラットに投与したところ，OPP-Na単独投与に比べ膀胱発癌が増強されることが明らかになった[16]．この発癌の増強は①TBZが発癌のプロモーターである，②TBZにも癌原性があり両物質の発癌作用が相加または相乗的に現れた，③両物質の同時投与により新たな物質あるいは代謝物が生じた，などによって起こると考えられた．

そこで，今回はTBZが膀胱発癌のプロモーターであ

*東京都立衛生研究所毒性部病理研究科　169　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, 169 Japan
**東京都武蔵調布保健所

るか否かを明らかにすることを主な目的として実験を行った.

実験材料および方法

被検物質

TBZ は microfine MSD (Lot No. BZA-539, 純度98.5%, Merck Sharp and Dohm International：アメリカ) を用い, イニシエーターとしては OPP-Na (Dowicide A, Lot No. MMO1044, Dow Chemical：アメリカ) を選んだ.

実験動物および飼育管理

動物は F344／DuCrj ラット雄 (日本チャールスリバー：神奈川) を4週齢で購入し, 前面と床が網の飼育用ステンレス製ケージ (横22×奥行き20×高さ16cm) に1匹づつ収容, ケージは自動給水装置付きのベルト式自動飼育機に懸垂した. ラットは環境への馴化と疾病の有無を観察するため1週間予備飼育し, この期間および実験期間とも飼料と水は自由に摂取させた. 動物室はバリアー飼育区域内にあり, 温度24-25℃, 湿度50-60%, 給気は2枚のフィルター (空気中の浮遊塵除去効率：85および99.9%) を通して行われ, 換気回数は1時間に10回, 照明は午前6時から午後6時までの12時間に, それぞれ制御されている.

実験の設定

OPP-Na の2%添加飼料をラットに13週間摂取させると確実に膀胱腫瘍が誘発されることから[11], イニシエーション効果の発現の条件は濃度2%で8週間の投与と推定した. Table 1 に示す如く, 実験Ⅰでは OPP-Na 曝露後に5週間0.2% TBZ 添加飼料を摂取させる群, 基礎飼料を摂取させる群, OPP-Na を曝露せずに TBZ を投与する群の3群を設けた. プロモーションとは, 細胞が可逆性増殖を始め, 最終的には不可逆性の自立増殖能をもつ (腫瘍化) に至るまでの過程を表現する用語であり[17], その作用発現または活性には用量依存性があるとされている[18]. そこで, 実験Ⅱでは TBZ 添加飼料の摂取期間を実験Ⅰよりも長く30週間とし, 飼料中の濃度を0.05, 0.1, 0.2および0.4%の4段階とした. OPP-Na 曝露後に, これらの TBZ 添加飼料のうちの1つを摂取させる4群, 基礎飼料を摂取させる1群, また対照として OPP-Na を曝露せずに終始基礎飼料を摂取させる1群の合計6群を設けた. 両実験ともラットが5週齢になった時点から基礎または添加飼料を飲料水とともに自由に摂取させ投与を開始した.

臨床検査法

実験Ⅰでは剖検直前の体重測定, ホルマリン固定後の膀胱重量の測定ならびに膀胱および腎臓を中心にした病理学的検索を行い, その他の検査は割愛した. 実験Ⅱでは体重は毎週1回, 飼料摂取量は15週目までは2週間毎, それ以後は4週間毎に各1回全ラットについて測定した. 血液学的検査は屠殺・剖検時に大腿動・静脈を切断して得た血液をヘパリン処理試験管に採り, 自動血球計数装置 (Coulter Counter Model S：Coulter Electric Inc., アメリカ) で赤血球数, 白血球数, ヘモグロビン量, ヘマトクリット値, 平均赤血球容積を測定した. 尿検査は37週目に試験紙を用い, 潜血反応 (Labstix Ⅲ：マイルス・

Table 1. Experimental Design

Group	No. of rats[1]	Treatment & its period[2]
Exp. Ⅰ		
T	10	Untreated for 8 wks and then 0.2% TBZ for 5 wks
SO	10	2 % OPP-Na for 8 wks and then untreated for 5 wks
SO-T	10	2 % OPP-Na for 8 wks and then 0.2% TBZ for 5 wks
Exp. Ⅱ		
Control	30	Untreated for 38 wks
SO	30	2 % OPP-Na for 8 wks and then untreated for 30 wks
SO-0.05T	30	2 % OPP-Na for 8 wks and then 0.05% TBZ for 30 wks
SO-0.1T	30	2 % OPP-Na for 8 wks and then 0.1% TBZ for 30 wks
SO-0.2T	30	2 % OPP-Na for 8 wks and then 0.2% TBZ for 30 wks
SO-0.4T	30	2 % OPP-Na for 8 wks and then 0.4% TBZ for 30 wks

cf. 1) Initial numbers of male F344／DuCrj rats.
2) Rats fed diet containing TBZ or OPP-Na in each concentration and period.

三共，東京)，pH の測定（BTS：東洋濾紙，東京）を行った．

病理学的検査法

実験Ⅰでは膀胱および腎臓を摘出した．実験Ⅱでは，この他に脳，肺，脾臓，心臓，肝臓，副腎，精巣，前立腺を摘出し，秤量した．さらに，下垂体，胸腺，脊髄（頸，胸および腰髄），眼球，ハーデリアン腺，耳下腺，大舌下腺，甲状腺，（上皮小体を含む），気管，食道，胃，十二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸，直腸，膵臓，精嚢，精巣上体，包皮腺，大腿筋，縦隔および腸間膜リンパ節さらに肉眼的に異常が認められた部位の組織を摘出した．摘出した器官・組織は10％緩衝ホルマリン液で固定した．膀胱は実験Ⅰ，Ⅱとも同様に処置した．すなわち，尿道経由で腔内の残尿を抜き取り，次にラットの週齢に応じて0.6-1.0ml のホルマリン液を注入し膨張させ，内尿道口で結紮，腹側正中線上に2箇所マーキュロクロムで小点をつけた後離断，ホルマリン液に浸漬した．膀胱は1週間固定後，小点を結ぶ線で2分し粘膜の異常および結石の有無を実体顕微鏡で観察した後，秤量した．固定完了後の器官・組織は定法に従ってパラフィン包埋し，薄切後ヘマトキシリン・エオジン重染色標本を作製した．必要に応じ，PAS 反応および脂肪染色標本も作製，これらの組織標本によって病理組織学的に検索した．膀胱における腫瘍性変化の診断には Mostofi[19]および Hicks ら[20]の，過形成の変化程度を細分化するために Nakanishi ら[21]および Fukushima ら[22]の基準をそれぞれ用いた．

本実験における成績の統計学的検討に際しては危険率を5％においた（$P<0.05$）．

結　　果

実験Ⅰ，Ⅱとも投与期間終了まで全ラットが生存した．

実験Ⅰ

Table 2 に示す如く，最終体重は SO 群，T 群，SO-T 群の順に低くなっていたが，各群間に有意差はなかった．SO-T 群の膀胱重量の平均値は SO 群に比べ絶対値は高く，体重比では有意に高くなっていた．

組織学的検索では，SO-T 群で膀胱上皮細胞が局所的に3-4層になり，やや大型になっている単純性過形成が4例，細胞が4-6層になり腔内に突出して前腫瘍性変化と見做される乳頭状または結節性過形成が1例認められ，合計5例の発生であった．これに対し，SO 群では単純性過形成が3例観察されたのみであった．また，これらの群の膀胱では上皮の過形成に加えて粘膜下組織（固有層，下層）で軽度な水腫およびうっ血が認められた．なお，T 群では膀胱の組織学的変化はみられなかった．腎臓では各群とも投与に関連した組織学的変化は認められなかった．

実験Ⅱ

Table 3 に示す如く，最終体重の平均値は対照群および SO 群に比べ，SO-T 群はいずれも有意に低く，TBZ の投与濃度に比例して低下した．体重変化の推移をみると，OPP-Na 投与の8週間では各群間で大差なく増加していたが，その後の TBZ 投与期間に入ると SO-T 群の増加は鈍り始め，投与濃度に比例した抑制が徐々に顕著

Table 2. Group Mean Values of Body Weight and Urinary Bladder Weight, and Histological Findings of Urinary Bladder in Experiment I

Group	No. of rats[1]	Mean values of: Body weight[2] (g)	Mean values of: Bladder weight[3] (mg)	Histological findings[4]: No change	Histological findings[4]: Simple hyperplasia	Histological findings[4]: PN hyperplasia[5]
T	10	274.2±16.5	99± 8 (36± 2)	10	0	0
SO	10	289.1±27.1	93±12 (32± 3)	7	3	0
SO-T	10	268.5±22.8	110±25 (42±11*)	5	4	1

cf. 1) No. of male F334／Ducrj rats weighed and examined histopathologically.
2) Final weight (Mean ± SD).
3) Absolute weight, and in parenthesis, relative weight (mg／100g), Mean ± SD.
4) No. of rats with each change in transitional cell of the urinary bladder.
5) Papillary or nodular hyperplasia.
Values marked with asterisks differ significantly from those for SO group ($P<0.05$).

Table 3. Group Mean Values of Body Weight and Urinary Bladder Weight, and Histological Findings of Urinary Bladder in Experiment II

Group	No. of rats[1)]	Mean values of Body weight[2)] (g)	Mean values of Bladder weight (mg)	Histological findings[3)] No change	Simple hyper-plasia	PN hyper-plasia[4)]
Control	30	384±23	101±12(29)[5)] (27± 4)[6)]	30	0	0
SO	30	379±20	111±18(27)* (30± 5*)	30	0	0
SO-0.05T	30	369±22*#	106±13(26) (29± 4)	30	0	0
SO-0.1T	30	352±21*#	105±14(22) (30± 4*)	30	0	0
SO-0.2T	30	348±22*#	117±24(20)* (34± 7*#)	28	1	1
SO-0.4T	30	292±26*#	118±18(28)* (41± 8*#)	29	1	0

cf. 1) No. of male F334/DuCrj rats weighed and examined histopathologically.
2) Final weight (Mean ± SD).
3) No. of rats with each change in transitional cell of the urinary bladder.
4) Papillary or nodular hyperplasia.
5) Absolute mean weight ± SD, and no. of organs weighed in the group showed in parenthesis.
6) Relative mean weight ± SD (mg/100g body weight).
Values marked with superscripts differ significantly from those for * the control or # SO group ($P<0.05$).

になった．とくに，SO-0.4T群では体長増加も抑制され小型のラットが多くみられるようになった．

Table 3に示す如く，膀胱重量は対照群に比べ，投与各群の絶対値は高く，SO群，SO-0.2T群およびSO-0.4T群は絶対および体重比重量とも有意に高かった．SO-0.2T群およびSO-0.4T群はSO群に比べ，絶対値ではやや高く，体重比では有意に高かった．SO-0.4T群はSO-0.2T群に比べ，絶対重量では大差なかったが，体重比では高かった．

Table 3に示す如く，膀胱の組織学的検索では移行上皮の過形成がSO-0.2T群で2例，SO-0.4T群では1例みられ，このうちSO-0.2T群の1例は乳頭状または結節性過形成で，他は単純性過形成であった．この他の各群では変化が認められなかった．

投与期間を通しての1日平均飼料摂取量はラット当りでは対照群21.7g，SO群21.8g，SO-0.4T群18.1gで，他のSO-T群は20.7-21.3gであった．これを体重100g当りでみてみると対照群56.5g，SO群57.5g，SO-0.4T群62.0gで，他のSO-T群は57.8-59.7gであった．このようにSO-T群の飼料摂取量は対照群およびSO群と比べ絶対値ではやや低く，体重比では高くなっているが，SO-0.4T群を除いて大きな差はなかった．TBZ投与期間中の各SO-T群の飼料効率（体重増加量／飼料摂取量）は対照群およびSO群よりも低く，とくにSO-0.4T群は顕著であった．1日平均検体摂取量を体重kg当りでみると，OPP-Naは各投与群とも1835-1854mgでほぼ同じであり，TBZはSO-0.05T群24mg，SO-0.1T群59mg，SO-0.2T群101mg，SO-0.4T群214mgで添加飼料の濃度比とほぼ同じく2倍づつ増加していた．

Table 4に示す如く，対照群およびSO群に比べ，SO-0.4T群の赤血球数，全てのSO-T群のヘモグロビン量は有意に低かった．SO-T群のヘモグロビン量はTBZ濃度に依存した減少であった．このように，SO-T群は貧血傾向を示しており，とくにSO-0.4T群で顕著であった．病理組織学的検索ではSO-0.4T群の脾臓でヘモジデリン沈着，赤色および白色脾髄の軽度な減少，骨髄で赤色骨髄の軽度な萎縮が認められたが，他に著明な異常はなく，体内外の出血も認められなかった．

Table 4. Hematology in Experiment Ⅱ

Group	No. of rats[1)]	WBC (10^3／mm^3)	RBC (10^6／mm^3)	HGB (g／dl)	HCT (%)
Control	30	6.4±0.9[2)]	9.24±0.52	17.4±0.3	45.5±2.5
SO	30	6.5±0.1	9.21±0.67	17.4±0.4	45.4±3.4
SO-0.05T	30	6.4±1.0	9.34±0.49	17.1±0.4*#	45.8±2.7
SO-0.1T	30	6.1±0.7	9.20±0.53	17.0±0.4*#	44.8±2.8
SO-0.2T	30	6.2±0.6	9.19±0.41	16.5±0.4*#	44.7±2.2
SO-0.4T	30	6.1±1.2	8.15±0.47*#	15.3±0.4*#	41.3±2.5

cf. 1) No. of male F344／DuCrj rats examined.
2) Mean ± SD.
WBC = White blood cell count, RBC = Red blood cell count, HGB = Hemoglobin, HCT = Hematocrit.
Values marked with superscripts differ significantly from those for *the control or #SO group ($P<0.05$).

膀胱を除く器官重量をTable 5に示した．SO-T群の各器官重量は対照群およびSO群と比軽して絶対値が低く，SO-0.1T群およびSO-0.2T群の脾臓，SO-0.4T群の脳，心臓および脾臓はそれぞれ有意に低かった．これに対し，体重比ではSO-T群が高く，とくにSO-0.4T群は全測定器官が有意に高かった．絶対重量が低かった各器官の組織学的検索では前述した如く，SO-0.4T群の脾臓の軽度な萎縮が認められた．

腎臓の組織学的検索では，主部尿細管上皮内のリポフスチン沈着，エオジン淡染または濃染の円柱がびまん性に認められたが，明らかな炎症像はなかった．この変化は対照群およびSO群にもみられたが，SO-T群ではより強く，発現頻度も高く，TBZの投与濃度に依存した増強が認められた．

尿検査では各群とも潜血反応はみられず，pHはSO群が6.0，対照群，SO-0.05T群およびSO-0.1T群が6.2，SO-0.2T群およびSO-0.4T群が6.3で対照群と投与各群間に差はなかった．

考　　察

ラット膀胱発癌における完全型癌原物質のOPP-Naを用いてTBZのプロモーション作用を検討した．

実験Ⅰの結果から，TBZをOPP-Naの曝露後に投与すると膀胱上皮の増殖性変化を増強するが，OPP-Naを曝露せずに投与しても増強効果は現れないことが分かった．すなわち，TBZはOPP-Naによる膀胱腫瘍誘発においてプロモーション作用を有する可能性があると考えられる．

一方，実験Ⅱでは膀胱上皮の過形成の発生頻度および変化程度ともSO-0.2T群とSO-0.4T群の間で逆転していた．さらに，他のSO-T群には発生しなかった．また，腫瘍は出現せず，過形成の発生も実験Ⅰに比べ軽度であった．すなわち，実験Ⅱでは膀胱の過形成に用量相関がみられず，TBZ投与期間の延長に伴って可逆性変化（過形成）から不可逆性変化（腫瘍）の過程に進行する傾向も認められない．従って，この結果からは実験Ⅰで述べた「TBZは膀胱発癌に対しプロモーション作用をもつ可能性がある」との推論を積極的には支持できないと考えられる．

ラットに2％OPP-Na添加飼料を13週間摂取させると，膀胱腫瘍が極めて高率に誘発される[11)]．今回2％OPP-Na添加飼料を8週間摂取させたところ，膀胱では過形成のみで腫瘍は発生しなかった．また，過形成は摂取終了から5週間後（実験Ⅰ）に比べ30週間経過後（実験Ⅱ）のラットで軽度になっており，これらの膀胱上皮細胞の増殖が可逆性変化であったことを示している．従って，OPP-Naによるラットの膀胱発癌において，本実験で採用した濃度2％および8週間の投与はイニシエーション作用のみを現したと考えられる．

実験Ⅱで各投与群の検体摂取量（mg／kg体重）をみると，OPP-Naはほぼ同じであり，TBZは投与濃度に一致した増加であった．従って，投与各群に対するOPP-Naの影響は均等であり，各群間で発生率および程度に差異がみられた変化は，TBZの用量に依存した発生であると表現してよいと考えられる．

TBZ投与に関連して実験ⅠおよびⅡでは体重増加抑制がみられ，実験ⅡのSO-0.4T群は成長阻害とも言える顕著な変化であった．さらに，実験Ⅱでは貧血，膀胱を除く器官重量（絶対値）の低下および腎臓の組織学的変化が観察された．体重増加抑制または成長阻害は実験

Table 5. Mean Values of Organ Weights besides Urinary Bladder in Experiment II

Group	No. of rats[1)]	Brain (mg)	Heart (mg)	Lung (mg)	Liver (g)	Spleen (mg)
Control	30	2072±38[2)]	1002±69	1039±53	12.26±0.89	665±42
		(552±34)[3)]	(266±18)	(276±19)	(3.26±0.25)	(177±12)
SO	30	2069±46	990±59	1046±62	11.98±0.89	647±35
		(554±24)	(265± 9)	(280±13)	(3.20±0.13)	(173± 5)
SO-0.05T	30	2066±33	971±56	1038±59	12.23±1.13	629±47*
		(569±35)	(267±11)	(285±14*)	(3.35±0.14#)	(173± 6)
SO-0.1T	30	2062±37	973±57	1017±57	12.02±1.16	598±46*#
		(593±36*#)	(280±12*#)	(292±13*#)	(3.44±0.16*#)	(171± 7*)
SO-0.2T	30	2077±31	984±58	1065±58	12.98±0.97#	594±43*#
		(602±32*#)	(285±10*#)	(308±14*#)	(3.75±0.16*#)	(172± 8)
SO-0.4T	30	2023±61*#	874±53*#	1039±70	12.54±1.35	579±52*#
		(708±40*#)	(305±15*#)	(363±26*#)	(4.38±0.54*#)	(203±25*#)

Kindney(R) (mg)	Kidney(L) (mg)	Adrenal(R) (mg)	Adrenal(L) (mg)	Testis(R) (mg)	Testis(L) (mg)	Prostate (mg)
1097±65	1120±74	20.6±2.0	22.2±2.2	1568±86	1641±86	317±72
(292±19)	(298±19)	(5.5±0.7)	(5.9±0.8)	(417±32)	(437±56)	(84±18)
1111±79	1123±75	21.1±1.7	23.5±2.1*	1508±189	1625±76	321±52
(297±12)	(300±10)	(5.6±0.5)	(6.3±0.6*)	(404±52)	(435±18)	(86±15)
1092±76	1104±63	20.8±1.8(29)[4)]	23.3±2.0(29)	1548±62	1587±61#	313±67
(300±11)	(303±11)	(5.7±0.6)	(6.4±0.6*)	(426±26#)	(437±22)	(86±19)
1087±11*#	1093±79	21.0±1.8	23.2±1.9	1521±122	1591±71	335±65
(308±11*#)	(314±11*#)	(6.0±0.5*#)	(6.7±0.5*#)	(437±37*#)	(458±31#)	(96±18*#)
1140±81*	1162±83*	20.7±2.1	22.9±1.7	1591±118#	1626±71	330±74
(330±15*#)	(336±13*#)	(6.0±0.7*#)	(6.6±0.6*)	(461±36*#)	(471±27*#)	(96±21*#)
1044±166	1068±178	21.3±2.5	23.5±3.1	1606±203	1598±78	275±71
(366±75*#)	(374±80*#)	(7.5±1.1*#)	(8.3±1.4*#)	(561±64*#)	(558±24*#)	(95±23*)

cf. 1) No. of organs weighed.
2) Absolute mean weight ± SD.
3) Relative mean weight ± SD.
4) In parenthesis, no. of organs weighed in the group.
Values marked with superscripts differ significantly from those for *the control or #SO group ($P<0.05$).

IIでTBZ投与群の飼料効率が低下していることから，先ず消化吸収能の低下による栄養障害に起因していると考えられ，代謝障害あるいは消耗性疾患も関与していると思われる．貧血傾向は造血系組織の萎縮あるいは血球破壊亢進の像が軽度にみられたことから，成長阻害に加えてこれらの基質的変化も誘発要因として考えられる．器官重量，とくにSO-0.4T群の脳，心臓および脾臓重量の低下がみられたが，この変化も体重増加または成長の阻害に関連したものと言えよう．腎臓の変化は著明な障害像ではないが，明らかに用量-反応関係をもって顕著になった．以上の変化はラットを用いた前回のTBZ単独試験でも0.4%投与群で認められており[10)]，再現性のあるものであった．従って，これらの変化はTBZのもついわゆる「毒作用」であると思われる．

化学物質の発癌実験において用量（濃度）-反応関係をみる場合，「発癌量」と「毒作用量」とは区別して把握する必要があろう．著者らが行ったOPPおよびOPP-Naのラットを用いた13週間実験で，1.25% OPPと2% OPP-Naとは膀胱腫瘍を高率に誘発するが，これらの2倍の濃度である2.5% OPPと4% OPP-Naとは誘発しないか，または極く低率の発生であった．しかし，腎盂腎炎は2.5% OPPおよび4% OPP-Naにのみ高率に認めら

れた[11,12]．このように，両薬物には作用機序は不明ながら，膀胱腫瘍または腎盂腎炎を惹起する用量域が区別されて存在していた．このことから，TBZにもプロモーション作用または毒作用の一方が強く発現してくる特定の用量域がある可能性は十分に考えられる．今回，実験Ⅱは実験ⅠよりもTBZ投与期間が長く，SO-0.4T群はSO-0.2T群よりもTBZ投与量が高かったためにTBZの総投与量は多くなり，ともに毒作用の用量域に達していたと思われる．すなわち，膀胱上皮の過形成の発生が実験Ⅰよりも実験Ⅱで軽度になり，実験Ⅱでは用量相関がみられなかった要因は両実験におけるTBZ投与量の相違にあったと推定できる．

今後は，TBZの投与濃度と期間とを様々に設定した実験を行い，TBZの膀胱発癌に対するプロモーション作用あるいは毒作用を発現させる用量域を検索するとともに，プロモーション作用の有無を明確にすべきと考えている．

文　献

1) Brown, H. D., Matzuk, A. R., Lives, I. R., Peterson, L. H., Harris, S. A., Sarett, L. H., Egerton, J. R., Yakstis, J. J., Cambell, W. C. and Cuckler, A. C. : *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 1764, 1961

2) Cuckler, A. C. : *J. Parasitol.*, 47,, 36-37, 1961

3) Allen, P. H., Park, S. E., Ames., E. R., Zeissig, A. and Green, D. F. : *J. Animal Sci.*, 21, 1038, 1962

4) Ames, E. R., Cheney, J. M. and Rubin, R. : *Am. J. Vet. Res.*, 24, 295-299, 1963

5) Robinson, H. J., Phares, H. F. and Graessel, O. E. : *J. Invest. Dermatol.*, 42, 479-482, 1964

6) 石館守三監修：食品添加物公定書・解説書，B-625, 1979，広川書店

7) Robinson, H. J., Stoerk, H. C. and Craessle, O. E. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 7, 53-63, 1965

8) Ogata, A. Ando, H., Kubo, Y., Takahashi, H. and Hiraga, K. : *Teratology*, 24, 24A, 1981

9) Ogata, A., Ando, H., Kubo, Y. and Hiraga, K. : *Fd Chem. Toxic.*, 22, 509-519, 1984

10) 藤井　孝，福森信隆，長沢明道，三栗谷久敏，林田志信，高橋　博，矢野範男，湯沢勝広，平賀興吾：東京衛研年報，33-2，16-24，1981

11) Hiraga, K. and Fujii, T. : Fd Cosmet. Toxicol., 19, 303-310, 1981

12) Hiraga, K. and Fujii, T. : *Fd. Chem. Toxic.*, 22, 865-870, 1984

13) Fujii, T. and Hiraga, K. : *J. Saitama Med. School*, 12, 277-287, 1985

14) 安田和男，西島基弘，冠　政光，斉藤和夫，中沢久美子，上村　尚，中里光男，菊池洋子，井部明広，藤沼賢司，永山敏広，牛山博文，直井家寿太：東京衛研年報，33，191-197，1982

15) 藤田　博，小嶋昭江，平賀興吾：東京衛研年報，33，484，1982

16) Fujii, T., Mikuriya. H., Kamiya, N. and Hiraga, K. : *Fd Chem. Toxic.*, 24, 207-211, 1986

17) Slaga, T. J. : *Environ. Health Perspect.*, 50, 3-14, 1983

18) Borek, C. and Troll, W. : Proc. *Natl. Acad. Sci.*, 80, 1304-1307, 1983

19) Mostofi, F. K. : *International Histological Classification of Tumours*. No. 10., p 13-34, 1973, World Health Organization

20) Hicks, R. M., Wakefield, J. St. J., Vlasov, N. N. and Pliss, G. B. : *Pathology of Tumours in Laboratory Animals*. Vol. 1. 1., p 103-104, 1976, International Agency for Research on Cancer

21) Nakanishi, K., Hirose, M., Ogiso, T., Hasegawa, R., Arai, M. and Ito, N. : *Gann*, 71, 490-550, 1980

22) Fukushima, S., Murasaki, G., Hirose, M., Nakanishi, K., Hasegawa, R. and Ito, N. : *Acta Path. Jap.*, 32, 243-250, 1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 324-328, 1988

オルトフェニルフェノール，チアベンダゾールおよび炭酸水素ナトリウム同時投与におけるマウス膀胱上皮細胞の走査電子顕微鏡的観察

三栗谷 久 敏*，藤 井 孝*，中 野 雅 行*

Scanning Electron Microscopic Observations of Urinary Bladder Epithelium of Mice in Simultaneous Administration of *o*-Phenylphenol, Thiabendazole and Sodium Bicarbonate

HISATOSHI MIKURIYA*, TAKASHI FUJII* and MASAYUKI NAKANO*

Ultrastructural changes in the urinary bladder epithelium of male mice treated with *o*-phenylphenol (OPP), thiabendazole (TBZ) or sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) for 1 and 3 weeks were observed by scanning electron microscope.

In 3-week study, both short uniform microvilli and ropy or leafy microridges appeared in a few cells of the luminal surface of mice fed 2.6% OPP alone in the diet. The cells showed this change increased in number, moreover these cells had cobble stone-like appearance in mice fed 2.6% OPP in the diet and drunk 0.8% $NaHCO_3$ in water, simultaneously.

Furthermore, the cells of luminal surface in mice fed both 2.6% OPP and 0.2% TBZ in the diet and drunk 0.8% $NaHCO_3$ simultaneously, were irregular in size, and some of these cells showed hemispherical appearance.

These results indicate that addition of $NaHCO_3$, or TBZ and $NaHCO_3$ enhanced the severity of the changes caused by OPP.

Keywords：*o*-phenylphenol, thiabendazole, sodium bicarbonate, urinary bladder, Crj : B6C3F$_1$mouse, scanning electron microscopy

緒　　言

当部では防かび剤の安全性を検討する目的でこれまで各種の実験を行ってきた[1-9]．このなかで，ラットを用いた実験でオルトフェニルフェノール（OPP）とそのナトリウム塩（OPP-Na）は膀胱に対して発がん性を有し[1,2]，さらにOPPの発がん性はアルカリ化剤の同時摂取により増強される[3]ことを明らかにしてきた．また，OPP-Naの膀胱発がんが，同じ防かび剤であるチアベンダゾール（TBZ）との併用によって増強されることを確認した[4-6]．これに対して，動物種を異にしたマウスを用いた実験で奥田[10]，HAGIWARAら[11]が，OPP-Naは膀胱を含め他の器官，組織に腫瘍を誘発しなかったと報告している．一方，OPPに関する実験報告は現在までのところみられない．

そこで著者らは，OPPのマウス膀胱に対する影響を検索するとともに，OPPとTBZあるいはアルカリ化剤とを同時に摂取させ，その効果を検討することにした．

今回はOPPの単独投与およびOPPとTBZ，アルカリ化剤との併用投与によるマウス膀胱粘膜の変化を形態学的に観察する実験で，とくに表層細胞の初期変化像を走査電子顕微鏡的（走査電顕的）に観察した結果を報告する．

*東京都立衛生研究所毒性部病理研究科　169　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, 169 Japan

実験方法および材料

被検物質：OPP は Dow Chemical Co., MJ, USA の Dowicide 1（Lot No. MM01040），TBZ は Merk Sharp and Dohme International, NJ, USA の thiabendazole microfine MSD（Lot No. BZA-540），アルカリ化剤としては和光純薬㈱の炭酸水素ナトリウム（$NaHCO_3$，試薬特級）をそれぞれ用いた．

実験動物：日本チャールスリバー㈱社生育の Crj：B6C3F$_1$マウス雄を4週齢で購入した．マウスは室温22－24°，湿度50-60%，換気1時間に10回，照明6：00-18：00に制御された飼育室においてアルミ製ケージ（チップ床敷）に4匹づつ収容，飼料（日本クレア社，CE-2）と水道水（ろ過器経由）を自由に摂取させた．

実験方法：本実験での被検物質濃度はこれまでのラットの実験を参考にして[1,3,4]，OPP 2.6%，TBZ 0.2%および$NaHCO_3$ 0.8%とした．実験群は control（対照群），OPP 単独（O群），TBZ 単独（T群），$NaHCO_3$単独（Na群），OPP＋TBZ（O・T群），OPP＋$NaHCO_3$（O・Na群）および OPP＋TBZ＋$NaHCO_3$（O・T・Na群）群の7群を設定した．OPP と TBZ は単独あるいは同時にそれぞれの濃度を粉末飼料（日本クレア社，CE-2）に添加し固型化したものを，$NaHCO_3$は水道水に溶解したものを実験に供した．対照群には無添加の CE-2を用いた．

1群4匹のマウスを用い，5週齢時から添加飼料および添加飲料水を摂取させ実験を開始した．投与後1および3週間の時点で1群2匹づつ放血屠殺した．膀胱は尿道から注射針で残存尿を除去した後，2%グルタールアルデヒド固定液（0.1Mリン酸緩衝液，pH7.4）を0.2～0.3m*l* 注入し膨張させ内尿道口付近を結紮，摘出した．膀胱は約30分後正中線に沿って2分割し，さらに1時間同固定液で前固定した．一晩冷蔵庫内にて0.1Mリン酸緩衝液（pH7.4）で洗浄後，1%オスミウム酸（0.1Mリン酸緩衝液，pH7.4）で後固定した．その後定法に従い，エタノール系列で脱水し，酢酸イソアミル置換を経て日立 HCP-2型臨界点乾燥器で乾燥した．乾燥した試料はアルミニウム製試料台に接着し，日立E-102型イオンスパッターで白金，パラジウム蒸着を施した．

観察は日立S-800型走査電子顕微鏡を用い，加速電圧10kv にて行った．

結果および考察

対照群における膀胱粘膜の内腔面は1および3週間投与とも全体的に平滑で，5～6角形の辺縁の明瞭な細胞が敷石状に配列していた．高倍率でその表面を観察すると，小堤防状に突出した部分と陥没した部分が網目状に連っている小堤防様突起 microridge が認められた（Fig. 1）．

T群，Na群およびO・T群の粘膜表層細胞は1および3週間投与とも対照群と同様の表面微細構造を呈していた．すなわち，粘膜表層細胞に投与に伴う走査電顕的変化は生じないことが分った．

O群では，1週間投与で粘膜表層細胞の一部に短い切株状の小絨毛様突起 short uniform microvilli またはロープ状あるいは葉状の小堤防様隆起からなる ropy or leafy microridges が認められた．これらの細胞は対照群に比べ，形状がやや不整になっていた．このような所見は3週間投与でも同程度に観察された（Fig. 2）．このことは，OPP 単独投与は TBZ との併用投与に比べ，軽微な差ではあるが，投与に伴う変化を示したと考えられる．

O・Na 群では，1週間投与で short uniform microvilli または ropy or leafy microridges からなる粘膜表層細胞がO群に比べやや広範囲に認められた．3週間投与では，粘膜表層細胞に大小不同がみられ，ややふくらみを帯びた細胞が敷石状の配列をしているのが散見された．これら細胞の表面は大部分 short uniform microvilli または ropy or leafy microridges で占められていた（Fig. 3）．このことから，OPP と $NaHCO_3$の併用投与は OPP 単独投与に比べ変化部位が広がっており，変化が増強されたと考えられ，これはアルカリ化剤 $NaHCO_3$の関与によるものと思われる．

O・T・Na 群の粘膜表層細胞は，1週間投与では O・Na 群と同様の変化を呈していた．3週間投与では粘膜内腔面に凹凸が散見され，これらの部位では対照群でみられた5～6角形の表層細胞が全体的に多角形から半球状になり，不規則な配列を示していた．また，O・Na 群の3週間投与に比べると，細胞の大小および形状の不同が著明になっていた．これらの表層細胞は short uniform microvilli あるいは ropy or leafy microridges で占められていた．このようなことから，OPP，TBZ および $NaHCO_3$併用投与は，OPP および TBZ 併用投与に比べ，1，3週間投与とも粘膜表層細胞の形態的変化が顕著になっていた．すなわち，この変化は O・Na 群と同様にアルカリ化剤 $NaHCO_3$が関与しているものと思われる．さらに，O・Na 群よりも変化の程度がやや強くみられることから，TBZ による影響も考慮する必要があると考えられる．

膀胱の発がん物質として OPP よりも強い作用をもつことが知られている N-butyl-N(4-hydroxybutyl) nitrosamine(BBN)や N-〔4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl〕for-

mamide (FANFT) をラットまたはマウスに投与し走査電顕的に粘膜表層細胞を観察すると，投与2週では細胞の形がやや不整になる程度である[13]．加えて投与4～6週では細胞表面に short uniform microvilli や ropy or leafy microridges がみられ，さらに投与を続けると長さが不揃いな小絨毛様突起 pleomorphic microvilli が出現することが報告されている[12-14]．これら粘膜表層細胞の変化のうち，short uniform microvilli および ropy or leafy microridges は投与を中止すれば元の状態にもどる可逆性変化である．一方，pleomorphic microvilli は不可逆性変化であり，腫瘍発生に至ると考えられている[15]．今回，O群，O・Na群および O・T・Na群では plemorphic microvilli は観察されず，OPP 単独あるいは OPP と TBZ，$NaHCO_3$の併用の1週間投与での変化はいずれも可逆性変化であった．また，3週間投与でも同様であった．

このように今回の観察では，OPP 投与によるマウス膀胱表層細胞の変化は軽微なものであったが，$NaHCO_3$ あるいは $NaHCO_3$，TBZ と併用することにより，その変化は増強されていた．したがって，今後 OPP と TBZ を始めとする他の薬物との併用実験をマウスを用いて行い，膀胱上皮細胞に対する影響，とくに発がんの増強，抑制などについて走査電顕的に検討していきたい．

文　献

1) Hiraga, K. and Fujii, T.：*Fd Chem. Toxic.*, 22, 865-870, 1984
2) Hiraga, K. and Fujii, T.：*FD Chosmet. Toxicol.*, 19, 303-310, 1981
3) Fujii, T., Nakamura, K. and Hiraga, K.：*Fd Chem. Toxic.*, 25, 359-362, 1987
4) Fujii, T., Mikuriya, H., Kamiya, N. and Hiraga, K.：*Fd Chem. Toxic.*, 24, 207-211, 1986
5) 藤井　孝，三栗谷久敏，林田志信，平賀興吾：東京衛研年報，37, 411-414, 1986
6) 三栗谷久敏，藤井　孝，林田志信，神谷信行，平賀興吾：東京衛研年報，37, 407-410, 1986
7) Ogata, A., Ando, H., Kubo, Y. and Hiraga, K.：*Fd Chem. Toxic.*, 22, 509-519, 1984
8) Yoneyama, M., Ogata, A., Fujii, T. and Hiraga, K.：*Fd Chem. Toxic.*, 22, 731-735, 1984
9) Yoneyama, M., Ogata, A. and Hiraga, K.：*Fd Chem. Toxic.*, 23, 733-735, 1985
10) 奥田宗久：名市大医誌，37, 157-186, 1986
11) Hagiwara, A., Shibata, M., Hirose, M., Fukushima, S. and Ito, N.：*Fd Chem. Toxic.*, 22, 809-814, 1984
12) Arai, M., Kani, T., Sugihara, S., Matsumura, K., Miyata, Y., Shinohara, Y. and Ito, N.：*Gann*, 65, 529-540, 1974
13) Jacobs, J. B., Arai, M., Choen, S. M. and Friedell, G. H.：*Cancer Res.*, 36, 2512-2517, 1976
14) Shirai, T., Murasaki, G., Tatematsu, M., Tsuda, H., Fukushima, S. and Ito, N.：*Gann*, 68, 203-212, 1977
15) Jacobs, J. B., Arai, M., Choen, S. M. and Friedell, G. H.：*Cancer Res.*, 37, 2817-2821, 1977

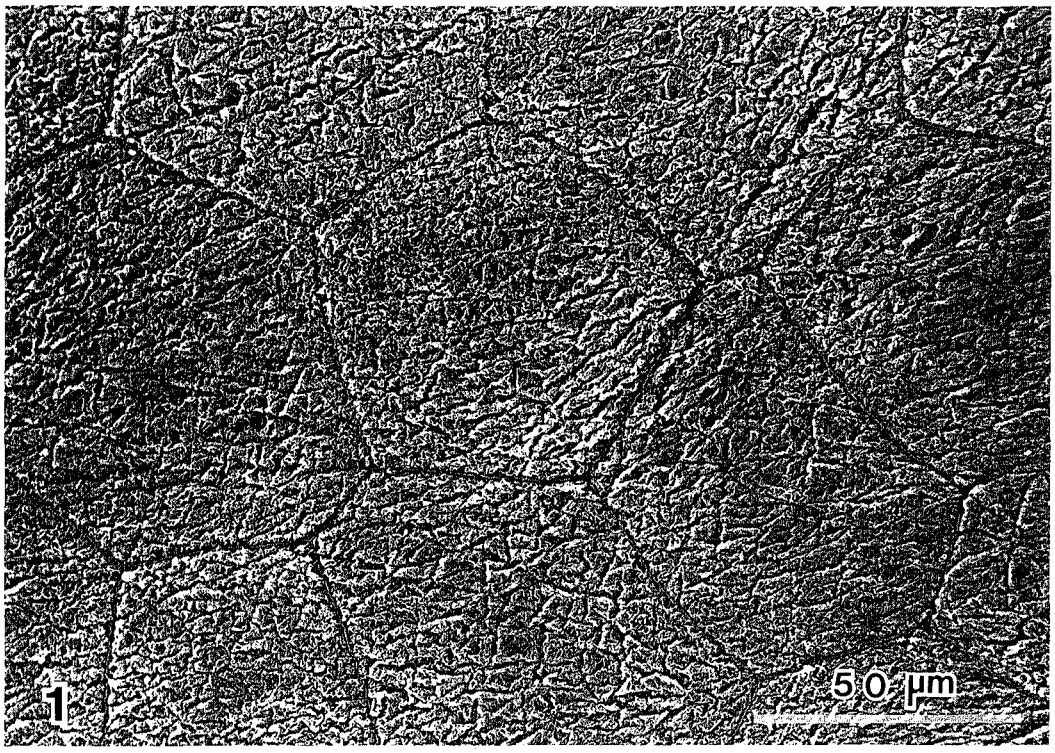
Explanation of Figures

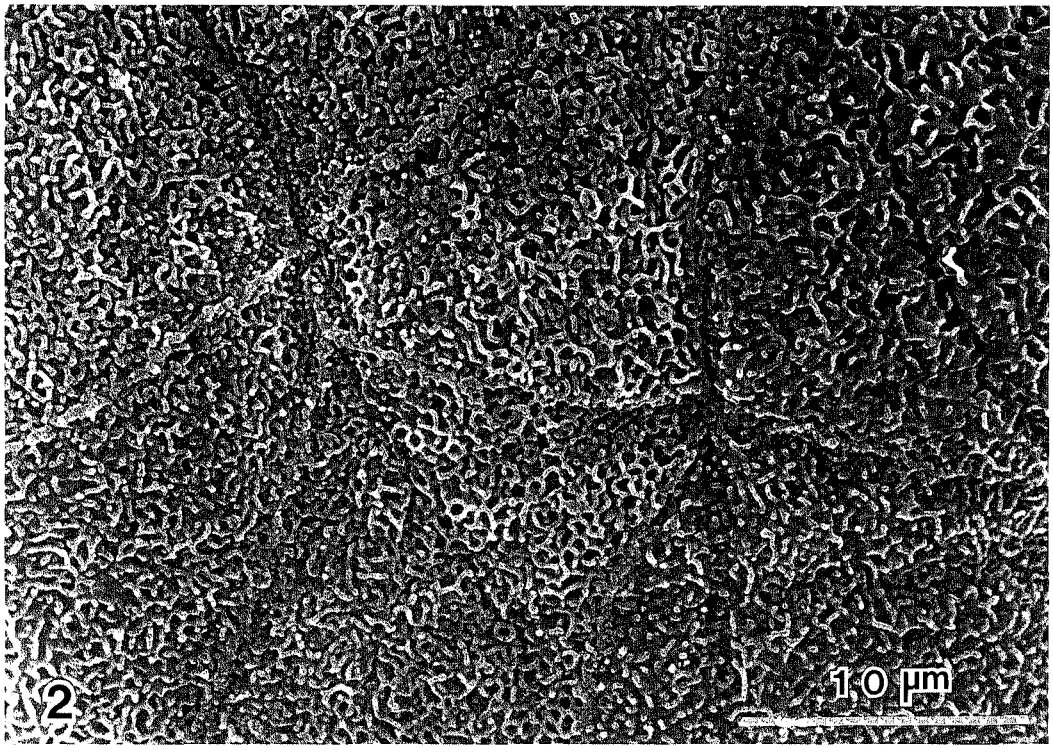
Fig. 1. Luminal surface cells of urinary bladder of a control mouse.

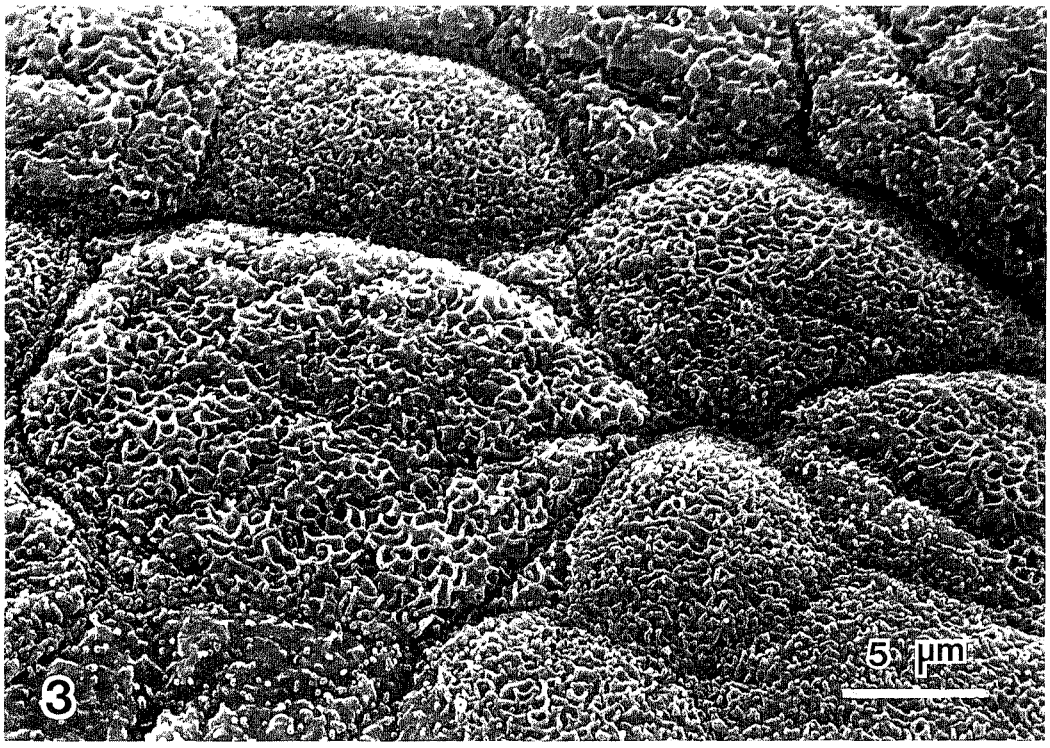
Fig. 2. Luminal surface cells of urinary bladder of a mouse fed 2.6% OPP for 3 weeks, showing short uniform microvilli and ropy or leafy microridges.

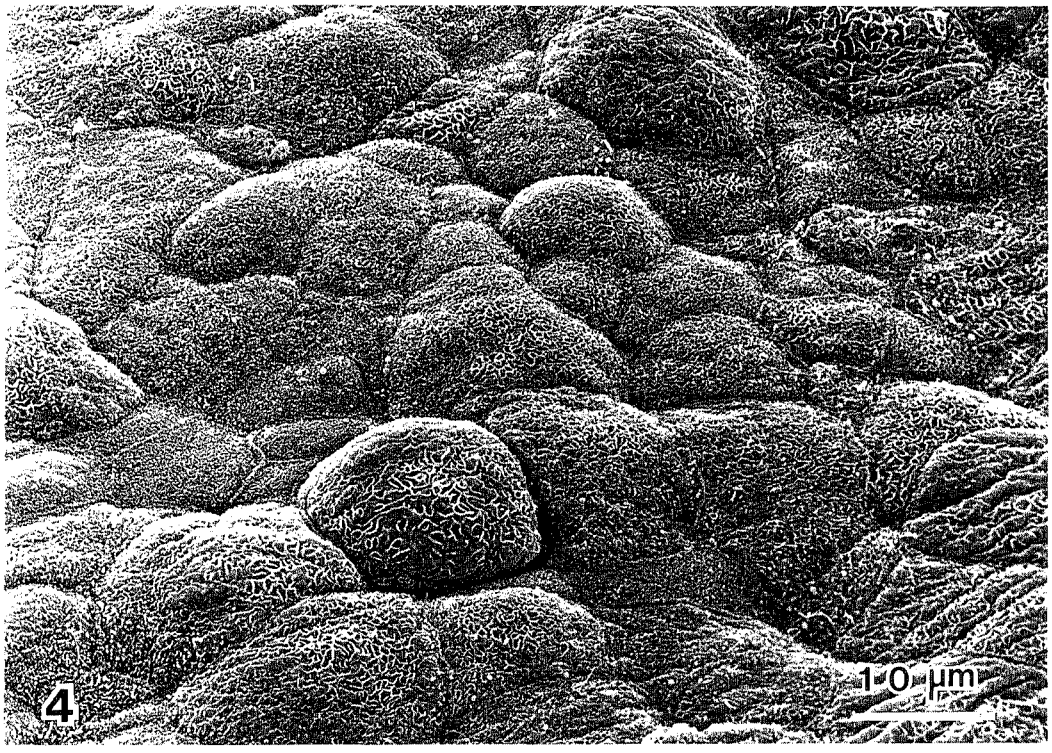
Fig. 3. Luminal surface cells of urinary bladder of a mouse treated with 2.6% OPP and 0.8% $NaHCO_3$ for 3 weeks, showing cobble stone-like appearance.

Fig. 4. Luminal surface cells of urinary bladder of a mouse treated with 2.6% OPP, 0.2% TBZ and 0.8% $NaHCO_3$ for 3 weeks, showing hemispherical in shape and irregular in size.


1
50 μm


2
10 μm


3
5 μm


4
1·0 μm

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 329-334, 1988

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2報）特に呼吸器系を除いた臓器の腫瘍性および非腫瘍性病変について

坂本義光*，神谷信行*，池田虎雄*，
中野雅行*，佐々木美枝子*

Inhalation Experiment of Calcium Chromate mixed with Kanto Loam on Rats for 104 Weeks (II) Neoplastic and Non-neoplastic Lesions in Various Organs except Respiratory System

YOSHIMITSU SAKAMOTO*, NOBUYUKI KAMIYA*, TORAO IKEDA*,
MASAYUKI NAKANO* and MIEKO SASAKI*

Inhalation toxicity of the mixture of calcium chromate ($CaCrO_4$) and Kanto loam dust was studied on F344 male rats. The animals were kept in an inhalation chamber and exposed to the 1 mg／m^3 of mixed dust, which contained 2, 5, 20% $CaCrO_4$ in kanto loam dust, for 104 weeks continuously (24 hrs／day, 7 days／week). In these rats, histopathological changes caused by $CaCrO_4$ were examined in various organs except respiratory system. Many types of neoplastic and non-neoplastic lesions, so called spontaneous lesions in aged rat, were observed commonly in animals of all the groups. The incidence and severity of these lesions in the rats exposed to the dust containing $CaCrO_4$ were similar to those of control rats. In this study, neoplastic and non-neoplastic lesions suspected to have been caused by $CaCrO_4$ were not observed.

Keywords：calcium chromate, rats, 104 week inhalation, neoplastic and non-neoplastic lesion

緒　言

クロム酸カルシウム（$CaCrO_4$）と関東ロームとの混合粉体（$CaCrO_4$濃度，2，5および20％）のラットによる1 mg／m^3，104週間昼夜連続の吸入曝露実験を行い，経気道摂取された2種類の粉じんの生体への影響を観察した．得られた結果のうち，体重，生存率および呼吸器系の組織学的観察結果については，既に報告した[1]．体重，生存率には粉じん曝露による影響は見られなかったが，肺では粉じん中の$CaCrO_4$の濃度に比例して増殖性病変の発現が多く見られ，不溶性の関東ロームはそれらの病変の素因になったと考えられた．今回は粉体中のクロムの作用に注目し，呼吸器系以外の諸臓器に見られた腫瘍性および非腫瘍性病変について報告する．

実験材料および方法

動物　F344／Ducrj，雄ラット，4週令（日本チャールスリバー㈱，購入時体重50-60g，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　実験にはクロム酸カルシウム（$CaCrO_4$）を2，5および20％の割合で関東ロームに加えて調製した混合粉体を用いた．$CaCrO_4$（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．関東ローム粉体は，日本粉体工業協会のJIS試験用粉体（JIS，Z8901，11種，平均粒径2 μ）を使用した．$CaCrO_4$および関東ロームの性状，化学的組成は前報[2,3]に示した．

吸入実験　1群20匹を用い，$CaCrO_4$を2，5および20％含む混合粉体の各粉じん曝露群（以下各々Cr-L，Cr-M，Cr-H群とする）と実験室内空気のみの対照群の4群を設定して行った．粉じん濃度はいずれも1 mg／m^3とし，曝露期間は昼夜連続で104週間とした．実験期

*東京都立衛生研究所毒性部病理研究科　169　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, 169, Japan

間中の吸入チャンバー内の粉じんの濃度変動および粒度分布，飼育条件の詳細は前報[1-3]に示した．実験終了後，動物は大腿動静脈の切断により放血屠殺した．

組織標本の作製　剖検後摘出した各臓器は10％緩衝ホルマリンで固定し，常法により組織標本を作製した．組織学的観察にはHE染色のほか，必要に応じてAzan，鍍銀，脂肪染色を行った．

検索した組織は，肝，腎，心，脾，胃，大・小腸，膵，唾液腺，膀胱，精巣，前立腺，下垂体，甲状腺，副甲状腺，副腎，脳，脊髄，大腿骨，皮膚，包皮腺，耳垢腺，乳腺，眼球である．

結　　果

本実験では前報[1]で示したように実験終了時の生存数は各群20例中，対照群19，Cr-L群，Cr-M群，Cr-H群16例であり，今回はこれらの実験終了時生存例の呼吸器系を除いた各臓器で観察された腫瘍性および非腫瘍性病変について報告する．

腫瘍性病変　Table 1に各群のラットに見られた腫瘍性病変の種類と発生例数（腫瘍を有したラット数）を示した．Table 1に示すように各群のラットになんらかの腫瘍の発生が見られた．このうち同時に2種類以上の腫瘍を有するものは，対照群13／19（腫瘍を有した動物数／観察動物数）（68％），Cr-L群9／14（64％），Cr-M群11／15（73％），Cr-H群9／16（56％）であった．粉じん曝露群にのみ見られた腫瘍は，包皮腺腺腫，乳腺線維腫種，甲状腺濾胞上皮腺腫，単核球白血病，皮脂腺腺腫，線維肉腫，耳垢腺腺腫，扁平上皮乳頭腫，膵外分泌腺腺腫，脳星細胞腫であった．

これらは粉じん曝露群のいずれかに単発性にみられ，$CaCrO_4$濃度に伴った発現は見られなかった．その他の腫瘍は対照群と共通して見られたものであった．このうち特に多発したものは，精巣の間質細胞腫でCr-H群の1例を除いた各群の全例にみられた．そのほか，下垂体腺腫，甲状腺C細胞腫，副腎褐色細胞腫，膵臓ラ氏島腺腫，皮下線維腫などが多く見られた．皮下線維腫は対照群の3例，Cr-L群の2例，Cr-M群の2例，Cr-H群の3例はいずれも乳腺部に見られたものであった．これらの腫瘍はいずれもF 344ラットおよびその他の系統のラットで自然発生腫瘍として知られているものであった[4-7]．これらの腫瘍のうち精巣の間質細胞腫はF 344ラットで特徴的に多く，また下垂体，副腎および甲状腺の腫瘍や単核球白血病も比較的多く発生することが知られている．本実験において，これらの腫瘍の粉じん曝露群での発生例数は対照群と顕著な差は見られず，またその発生傾向には$CaCrO_4$濃度との関係は認められなかった．

非腫瘍性病変　各臓器に見られた病変の種類と発生例数（病変の見られたラット数）をTable 2に示した．Table 2に見られるように$CaCrO_4$を含む粉じん曝露群にのみ特徴的に多発した病変は見られなかった．対照群に共通して多発した病変は肝の胆管の増生と線維化（cholangio fibrosis），小肉芽腫，肝細胞の小変性巣（focal degeneration），小増殖巣（cell altered foci），局所性の類洞拡張，膵臓の腺房の萎縮，心筋の変性と線維化および慢性腎障害であった．これらの病変はいずれもF 344ラットおよびその他の系統のラットで，加令に伴って生じることが知られているいわゆる自然発生病変と同様の変化であった[4-8]．このうち肝の小変性巣はSquireら[9]によって分類されている小増殖（Cell altered foci）のうちの好塩基性増殖巣（Basophilic foci）と性状が似ているが，変化を示す部位の細胞に，核の濃縮や崩壊像および細胞質の空胞化などの変性が見られ，一過性に増生した細胞が二次的に退行性変化を示したものと考え本報では局所性の小変性巣として分類した．これらの病変の粉じん曝露群での発生例数は対照群と比べ顕著な差は見られなかった．さらに$CaCrO_4$による作用が自然発生病変により隠ぺいされている可能性も考えられ，これを各群の個々のラットでの病変の程度の現れ方から検討した．各群で特に多く見られた肝，腎，心の病変について，個々のラットでの程度を分類，比較し，Table 3－5に示した．各病変の変化の強さは病変の大きさや切片上に見られる存在数の多少により分類したが，腎についてはColemanら[4]の分類を参考にした．Table 3－5に示したように各病変とも，個々のラットでの程度の現れ方には対照群および粉じん曝露群で同様な傾向であった．以上示した病変のほかに，前立腺，下垂体，甲状腺，副甲状腺，副腎，膵，肝，脾にもTable 1－2に示したような種々の変化が見られたが，いずれも発生例数が少ないか，または軽度な変化であり，粉じん曝露群での発生の傾向には$CaCrO_4$濃度との関係も見られなかった．

そのほか，精巣では各群の全例で精細管の変性，萎縮が見られたが，間質細胞腫の存在によってその程度が修飾されているためTable 2には示さなかった．Table 2に示したCr-M群の1例は腫瘍を見ずに精巣の萎縮が見られた例である．またTable 2には示さなかったが，粉じん曝露群のラットで縦隔部リンパ節で粉じん粒子の存在が見られた．粉じん粒子は大食細胞に貪食された状態で集簇巣として存在していた．これらは不溶性粉じん粒子に対する排除作用の結果で，生理的反応と考えられる．

Table 1. Summary of neoplastic lesions

Group	Control	Cr-L	Cr-M	Cr-H
Concentration of $CaCrO_4$ in dust(%)	0	2	5	20
No. of rats observed	19	14	15	16
No. of rats with tumor(s)	19	14	15	16
No. of rats with more than 2 tumors	13	9	11	9
Site and classification of tumors				
Genital system				
Testis : interstitial cell tumor	19[a]	14	15	15
Prepeutial gland : adenoma	0	0	1	0
Mammay gland : fibroadenoma	0	0	0	1
adenoma	0	1	0	0
Endocrine system				
Pituitary gland : adenoma	4	0	4	1
Thyroid gland : follicular cell adenoma	0	0	1	0
C-cell adenoma	3	2	4	2
Adrenal gland : pheochromocytoma	2	2	4	2
Pancreas : insuloma	2	0	2	3
Hematopoietic system				
Hematopoietic organ : mononuclear cell leukemia	0	1	0	2
Integument				
Skin : sebaceous adenoma	0	0	1	0
Subucutis : fibroma	6	3	4	3
fibrosarcoma	0	1	0	0
hemangioma	1	0	0	0
Ear duct : Zymbal's gland adenoma	0	1	0	0
squamous cell papilloma	0	1	0	0
Digestive system				
Parotid gland : adenoma	1	0	0	0
Liver : neoplastic nodule	2	0	1	0
Urinary system				
Kindey : adenoma	1	0	0	1
Nervous system				
Brain, spinal cord : astorocytoma	0	0	1	0
Body cavity				
Peritoneum : mesothelioma	1	0	0	0
malignant mesothelioma	0	0	1	0
Total	42	26	39	31

a) Number of rats with tumor (s)

$CaCrO_4$の2および5%群では20%群にくらべてリンパ節がやや大きかったが，各群とも線維化のような病変は見られなかった．

考　　察

クロム酸カルシウムと関東ロームの混合粉体のラットによる104週間昼夜連続の吸入曝露実験を行った．経気道摂取された，粉じん成分の呼吸器系以外の臓器への作用としては，粉体中の可溶性成分である$CaCrO_4$の作用が考えられた．しかし観察された各臓器の病変は，いずれも加令にともなって生じる自然発生病変と同様な変化であり，$CaCrO_4$に特徴的な病変の発現は見られなかった．種々のクロム化合物の作用の観察を目的とした実験例は多いが，そのうち Nettesheim ら[10]は$CaCrO_4$粉体を13mg／m^3の濃度で間欠，終生曝露したマウスで，腎，

Table 2. Summary of non-neoplastic lesions

Group	Control	Cr-L	Cr-M	Cr-H
Concentration of $CaCrO_4$(%) in dust	0	2	5	20
No. of rats with lesions	19	14	15	16
Site and classification of non-neoplastic lesions				
Genital system				
Testis : atrophy	0	0	1	0
Prostate : concretion in acinar lumen	10	5	5	8
inflammation	5	4	2	4
Prepeutial gland : inflammation	1	1	1	1
Mammary gland : hyperplasia	1	0	0	0
Endocrine system				
Pitritary gland : hypbrplasia	2	4	3	3
cyst	0	0	0	1
angioectasis	1	3	3	2
Thyroid gland : C-cell hyperplasia	1	3	1	4
Parathyroid gland : hyperplasia	2	1	2	3
Adrenal gland : medullary hyperplasia	4	3	1	6
angioectasis	2	1	0	1
focal vacoulation	5	1	1	0
Pancreas : islet cell hyperplasia	4	2	1	2
Digestive system				
Salivary gland : atrophy	3	1	2	3
Liver : cholangiofibrosis	19	14	15	16
granuloma	14	11	12	11
facal necrosis	3	3	6	3
fatty change (zonal)	6	4	4	3
cell altered foci	7	4	7	5
cell altered area	0	1	0	1
focal degeneration	15	13	14	14
focal cystic dilatation of sinusoid	18	12	10	13
Pancreas : acinar atrophy and fibrosis	14	12	10	15
acinar hyperplasia	3	3	0	0
Hematopoietic system				
Spleen : infarct (fibrosis or scar)	0	1	2	3
hemosiderosis	1	2	0	1
extramedullary hematopoiesis	4	1	3	2
Cardiovascular system				
Heart : myocardial degeneration and fibrosis	14	12	13	14
Urinary system				
Kidney : chronic nephropaty	19	14	15	16
Integument				
Skin : epidermal inclusion cyst	1	0	2	1
Zymbal's gland : hyperplasia	1	0	0	0

a) Number of rats with lesions

Table 3. Severity of hepatic lesions

Group		Control	Cr-L	Cr-M	Cr-H
Concentration of $CaCrO_4$ in dust(%)		0	2	5	20
No. of rats observed		19	14	15	16
Cholangiofibrosis	None	0 [a)]	0	0	0
	Slight	6	4	4	3
	Moderate	11	9	10	9
	Marked	2	1	1	4
Granuloma					
	None	5	3	3	5
	Slight	11	10	10	9
	Moderate	3	1	2	2
Focal cystic dilatation of sinusoid	None	2	2	4	3
	Slight	11	10	8	7
	Moderate	5	2	2	3
	Marked	1	0	1	3
Focal degeneration	None	4	2	1	2
	Slight	6	2	8	7
	Moderate	9	10	6	7

a) Number of rats with lesion

Table 4. Severity of chronic nephropathy

Group	Control	Cr-L	Cr-M	Cr-H
Concentration of $CaCrO_4$ in dust(%)	0	2	5	20
No. of rats observed	19	14	15	16
Grade Ⅰ	1 [a)]	1	1	1
Ⅱ	7	7	6	6
Ⅲ	8	6	7	7
Ⅳ	3	0	1	2
End stage	0	0	0	0

a) Number of rats with lesion

Table 5. Severity of lesions in pancreas and heart

Group		Control	Cr-L	Cr-M	Cr-H
Concentration of $CaCrO_4$ in dust(%)		0	2	5	0
No. of rats observed		19	14	15	16
Pancreatic acinar atrophy and fibrosis	None	5 [a)]	2	5	1
	Slight	9	8	8	12
	Moderate	4	3	1	1
	Marked	1	1	1	2
Myocardial degeneration and fibrosis	None	5	2	2	2
	Slight	7	8	7	10
	Moderate	5	4	6	4
	Marked	2	0	0	0

a) Number of rats with lesion

脾の萎縮性の変化および消化管の潰瘍などが生じることを報告している．また高濃度の3価のクロム化合物の曝露によりラット肝，腎に萎縮性の変化[11]や，皮下および腹腔内注射など経気道以外の経路で投与されたクロム化合物によるラット腎尿細管の変性[12,13]，ウサギの肝，腎および心臓での変性，壊死[14,15]，精細管内の精子の消失[11]などの種々の障害作用が知られている．以上の様なクロムによる変化が自然病変の発生に及ぼす影響を観察するために，多発した肝，腎，膵，心の変化について，個体別に変化の程度を比較した．粉じん曝露群の各個体での病変の程度は，対照群と同様であり，自然発生病変の程度を修飾する$CaCrO_4$の作用はななかったものと考えられた．著者ら[16]の行ったクロム鉱さい粉じん（クロム，2.8%含有）を105週間曝露したラットにおいても同様な結果であった．Steffee ら[17]はクロム鉱さいと6価クロム化合物を総クロム濃度として3-4 mg／m^3で間欠，終生曝露したラットで呼吸器以外の臓器の組織変化を観察しているが，いずれもクロムによるものではなかったとしている．本実験において設定した粉体中の$CaCrO_4$濃度2，5および20%は，粉じん濃度として20，50および200 μg／m^3に相当するが，他の実験と比べ，はるかに低い濃度であった．

この条件下で経気道摂取されたクロムによる呼吸器系を除いた諸臓器への障害作用の可能性はないものと考えられた．

文　献

1）坂本義光，神谷信行，池田虎雄，佐々木美枝子：東京衛研年報，38，413-422，1987

2）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

3）坂本義光，調　武久，平賀興吾：東京衛研年報，28，(2)，135-141，1977

4）Coleman, G. L., Barthold, S. W., Osbaldiston, G. W., Foster, S. J. and Jonas, A. M.：*J. Gerontology*, 32, 258-278, 1977

5）Goodman, D. G., Ward, G. M., Squire, R. A., Chu, K. C. and Linhart, M. S.：*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 48, 237-248, 1979

6）Maekawa, A., et. al.：*Gann*, 74, 365-372, 1983

7）Maekawa, A., et. al.：*J. Toxicol. Sci.*, 8, 279-290, 1983

8）真坂敬三：*J. Toxicol. Sci.*, 12, 526-535, 1987

9）Squire, R. A. and Levitt, M. H.：*Cancer Res.*, 35, 3214-3223, 1975

10）Nettesheim, P., Hanna, M. G., Doherty, D. G., Newell, R. F. and Hellman, A.：*J. Nat. Cancer Inst.*, 47, 1129-1144, 1971

11）Tandon, S. K.：*Biological and Environmental Aspects of Chromium*, 209-219, 1982, Elsevier Biochemical Press, Netherland

12）Baines, A. D.：*Am. J. Pathol.* 47, 851, 1965

13）Biber, T. U. L., Mylle, M., Baines, A. D., Gottschlk, C. W., Oliver, J. R. and MacDowell, M. C.：*Am. J. Med.*, 44, 664-705, 1968

14）Mathur, A. K., Chandra, S. V. and Tandon, S. K.：*Toxicology*, 8, 53, 1977

15）Tandon, S. K., Saxena, D. K., Gaur, J. S. and Chandra, S. V.：*Environ, Res.*, 15, 90, 1978

16）坂本義光，神谷信行，池田虎雄，平賀興吾：東京衛研年報，35，436-442，1984

17）Steffee, C. H. and Baetjer, A. M.：*Arch. Environ. Health*, 11, 66-75, 1965

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 335-342, 1988

石綿繊維の経口摂取による生体影響（第3報）クリソタイルの胃酸に対する組成および形状の変化

福森信隆*，荻野周三**，中野雅行*
佐々木 美枝子*

Biological Effects of Ingested Asbestos Fibers (III) Chemical Composition and Structure of Chrysotile Treated by Stomach Acid

NOBUTAKA FUKUMORI*, SHUZO OGINO**, MASAYUKI NAKANO*
and MIEKO SASAKI*

Keywords：クリソタイル石綿 chrysotile asbestos，人工胃液 simulated stomach acid，ラット胃 rat stomach，組成と形状 chemical composition and structure，分析電子顕微鏡 analytical electron microscope

緒　言

アスベストは，耐熱性，柔軟性，紡織性，耐摩擦性などのすぐれた特性と利便性から周辺領域で広範囲に使用されているが，作業環境汚染と関連し中皮腫，肺癌の原因物質として社会問題化しつつある．一方近年，非職業性の生活環境中でのアスベストの曝露が重要視され，安全性に対する確認が要求されている[1]．経口摂取に関しては，米国やカナダで飲料水中に混在するアスベストが消化器系癌の多発を誘因させるという報告がみられる[2,3]．しかしこれらの報告は，疫学的推計に多くの因子が存在するため発癌の明確な相関性が十分に解明されていない．また，動物を用いた長期間の経口摂取実験では発癌性が認められていないが[4,5]，経口的には消化管を貫通して種々の器官，組織への移行，分布が確認されている[6-8]．消化管からの体内侵入と分布に関する報告では，侵入の可能性および組織内局在に対する見解の一致がみられず，侵入後の移行経路も明らかでない．

さらに，アスベストのうちクリソタイルは，酸性液中で組成元素のマグネシウム（Mgと略）が溶出することが知られている[9]．この知見は，主に生体組織中のアスベスト繊維を分析する際に行う酸処理の過程でMgの著しい溶出を認めたことに基づいている．またMg成分の減少は，クリソタイルの毒性を減弱させる報告[10]がみられることから，酸により繊維の性状の変化が生じることも考えられる．

これらの点を考慮に入れ，飲料水，食品あるいは気管から嚥下されたアスベストの経口摂取による生体影響を調べる研究の一環として本実験を行った．クリソタイル繊維が胃内に到達し，一定時間胃液と混在する時の形状および組成の変化を検索する目的で，試験管内での人工胃液とそれに対する制酸剤の効果，さらにラットの胃内での繊維の動態について経時的に比較した．

実験方法

1．*In vitro* 実験

クリソタイルは，UICC（Union Internationale Contre Le Cancer）の標準品 Chrysotile A[11]を用いた．胃酸による影響を調べるために，1）精製水，2）酸および3）酸に加えた制酸剤処理の3群を設定した．精製水は脱イオン蒸留水（pH6.5）を使用し，酸処理では日本薬局方の崩壊試験法の第1液をpH1.5に調製して用いた[12]．また，制酸剤として，炭酸水素ナトリウム（和光純薬）を第1液の酸液に添加してpH5.7に調製したものを制酸剤処理液として実験に供した．はじめにクリソタイル繊維を秤量びん（三立SU型）に約50mg取り，105℃で5時間乾燥させた後，一晩デシケーター中で保管し正確に繊維重量を測定した．設定した3群に対し，1，3，6時間および1，4日間後の変化を調べるために秤量びんに2 mlの各処理液を入れ，30秒間超音波分

*東京都立衛生研究所毒性部病理研究科　169　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, 169 Japan
**同生活科学部食品添加物研究科

散を施し蜜栓して38℃の恒温槽で保温した．処理時間の経過後，あらかじめ正確に秤量しておいたニュクリポアーフィルター（孔径0.2 μm，野村マイクロサイエンス）上に吸引ろ過装置を用いてクリソタイル繊維を集めながら精製水50ml で十分に洗浄し，その後ニュクリポアーフィルターを105℃で5時間乾燥させ，一晩デシケーター中に保管して処理後のクリソタイルの重量を測定した．重量の変化は，処理前の乾燥重量と経時処理後の重量の増減率で示した．

処理後のクリソタイル繊維は，形状と組成元素の変化を電子顕微鏡（電顕と略）で調べるため一部を採取し希釈分散した後，再度ニュクリポアーフィルターで吸引ろ過した．フィルターにカーボン蒸着を施し，その一部をニッケルグリッド（200メッシュ）上にのせ，クロロホルム蒸気でフィルターを溶解させ薄膜試料とした．電顕は，加速電圧75kv でエネルギー分散型X線分析装置（Kevex-7500型，EDX と略）の付属した H-7000型分析電顕および HU-12A 型透過電顕を用いて繊維の形態の変化を観察し，また EDX 分析時間を50秒に設定して元素分析を行った．EDX の分析に際して，金属およびカーボンホルダーを使用し，分析点の位置の移動がないことを確認して測定した．分析結果は，ケイ素（Si と略）に対する Mg のカウント比（Mg／Si 比と略）を百分率で表し，Mg の溶出の指標とした．鉄への影響は少ないため，Si と Mg の比較分析を行い，Mg／Si 比の百分率の平均値の差を t-検定によって検定した．

繊維の分析は，走査透過像（STEM）で倍率を5万倍とし，任意のグリッド網目から7点を選択して単繊維について EDX 分析を行った．さらに繊維の径により Mg の溶出に差異が認められると思われることから，酸処理での任意の5点を選び単繊維のうち0.05 μm の巾以下を細径，以上を太径と区別するとともに，単繊維が集合して束となっている繊維束（径約0.3 μm）とに分別して比較した．

2．*In vivo* 実験

胃内での胃酸に対する変化を調べるために，ラット（Jcl：SD 系雄性，日本クレア）を用いて実験を行った．ネンブタールで軽度に麻酔した体重約400g のラットに，内径を太く長めに加工した特殊ゾンデを用いて UICC の Chrysotile A を分散懸濁後，20mg／kg の割り合いで経口投与した．投与後1，3，6時間および1，4日後の各群3匹ずつの胃を摘出して，胃底部を7mm 四方に切り出し中性緩衝ホルマリン固定液（pH7.2）に浸漬した．1週間後，切り出した胃の表面に注射筒で精製水を噴射して3匹の洗浄総量が5 ml となる様にし，胃粘膜表面に付着したクリソタイル繊維を回収した．回収液の5 μl をホルムバール膜をはったニッケルグリッド（200メッシュ，VECO 製）上に載せ，カーボン蒸着を行って繊維の飛散を防止した．繊維数の計測は，グリッド網目の10ヶまで行い前報[13]の式に従って繊維数と長さを算出した．

次に胃内でのクリソタイル繊維の性状を調べるため，胃内6時間までの形態と組成の変化を1の電顕手法に基づいて分析した．一部は走査電顕により胃内に繊維が存在することを確認した．対照としてクリソタイルを精製水中に分散させたものを，またホルマリンの1週間浸漬後の繊維を比較として用いた．使用した精製水は，すべて0.1 μm のフィルターでろ過したものを実験に供した．

実験結果

1．*In vitro* 実験

クリソタイル繊維の酸および酸に対する制酸剤添加での重量変化を図1に示した．時間は対数表示で表し，経時処理前の重量を基準として増減率で推移を比較した．精製水，制酸剤添加とも，4日間までの重量の変動はほとんど認められなかったが，酸処理では，すでに1時間で7.8％の減少がみられ，4日間で22.2％の大きな減少率を示した．なお酸処理試料をろ過する時，他群と比較して吸引ろ過に若干時間を要した．

表1は各処理による Mg／Si 比の百分率を示し，対照として UICC の Chrysotile A を無処理のまま使用した．単繊維の精製水，制酸剤処理とも有意差を認めないが，酸処理では Mg／Si 比の減少傾向がみられ1日以降で有意な減少を示した．

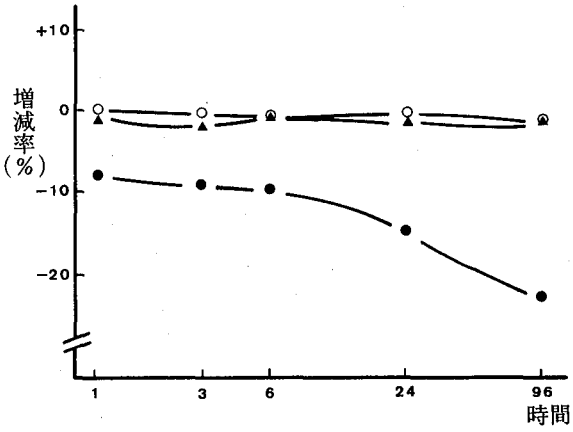


図1．クリソタイル繊維の処理による重量変化
○精製水，　●酸処理，　▲酸＋制酸剤処理

表1．クリソタイル繊維の処理時間による Mg／Si 比の変化

時間	精製水 (%)	酸処理 (%)	酸＋制酸剤処理 (%)
無処理	74.5± 5.67	74.5±5.67	74.5±5.67
1	80.9± 6.33	71.0±8.14	77.9±5.95
3	79.5±12.68	72.6±8.21	71.5±5.85
6	69.3± 3.50	69.5±6.86	73.9±8.25
24	79.2± 6.67	59.1±9.24**	75.3±5.23
96	79.4± 2.70	44.9±6.14***	78.1±8.94

数値は7点での平均値±標準偏差を示す．
** p＜0.01，*** p＜0.001

表2．酸処理時のクリソタイル繊維の太さによる Mg／Si 比の経時変化

時間	単繊維 細 (%)	単繊維 太 (%)	繊維束 (%)
対照	81.8± 6.10	77.8±3.66	82.6± 5.81
1	64.1± 7.26**	71.7±3.57*	74.3± 5.04*
3	64.3± 6.98**	69.1±6.87*	66.8± 3.60***
6	53.8± 4.15***	61.2±5.53***	66.6± 3.77***
24	53.4±10.19***	54.8±3.83***	57.0±10.85**
96	31.7± 2.01***	39.6±5.28***	39.2± 1.84***

単繊維の径は0.05 μm 以下を細，以上を太とし，繊維束は径約0.3 μm を分析した．
数値は5点での平均値±標準偏差を示す．
* p＜0.05，** p＜0.01，*** p＜0.001

酸処理で繊維径に対する Mg／Si 比の変動は，単繊維，繊維束とも対照に比べ有意に減少しており，径に起因する顕著な差は認められなかった．しかし，全般的に細い繊維ほど減少が強くみられる傾向を示した（表2）．

クリソタイル繊維の形状の変化を高倍率の透過電顕で経時的に観察すると，全群とも繊維の溶解，変形は認められず，クリソタイル特有な管状構造の識別が可能であった（図2－4）．しかし酸処理が長時間におよぶに従い，平滑な外形に軽度な不整面を観察した（図3）．

2．*In vivo* 実験

表3から経口摂取後の胃内のクリソタイル繊維の動態は，およそ6時間までに残留繊維数の消失を認めた．繊維長を加味した繊維数でもほぼ比例的に減少するが，3時間で残留する繊維の長さは2－5 μm が最も多く，6時間では1－2 μm の短繊維が多く認められた．1回投与の1日以降では，胃内での残留はほとんどみられなかった．

6時間までの Mg／Si 比を検索すると，対照に比べ胃内のクリソタイル繊維は減少傾向が有意に認められた（表4）．試料作製にあたり，ホルマリンの浸漬を行ったため，その影響を調べたところホルマリンでの減少もみられた．ホルマリン浸漬後の Mg／Si 比を基準として差を比較すると，胃内6時間のみで有意な差を認めた．

胃内6時間までの形状の変化は，管状構造，外形とも著変が認められなかった（図5，6）．

表3．経口摂取によるラット胃内のクリソタイル繊維数の経時変化

時間	繊維数（千本／ml） 繊維長（μm） 0.2−0.5	0.5−1	1−2	2−5	5−10	10−25	25−50
1	582	5,817	7,950	9,889	4,460	4,849	1,745
3	194	1,034	2,327	3,555	1,487	1,163	194
6	ND	58	78	19	19	ND	ND
24	ND	19	ND	ND	ND	ND	ND
96	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND：No detection

表4．ラット胃内におけるクリソタイル繊維の Mg／Si 比

対照 (%)	ホルマリン浸漬 (%)	胃内1時間 (%)	胃内3時間 (%)	胃内6時間 (%)
76.9±3.88	65.1±5.00**	61.6±8.04**	58.4±6.00***	52.2±6.32***

数値は5点での平均値±標準偏差を示す．
** p＜0.01，*** p＜0.001

考　　察

1971年，Cunninghamらがアスベストの飲料水，酒類への混入を報告[14]して以来，経口摂取と発癌との関係に多くの調査が行われてきたが今だ相関性が明らかでない．実験動物を用いた長期経口毒性試験においても，発癌性が認められないことから，経気道曝露とは作用を異にすると思われる．経口摂取されたアスベストに対して，毒性を減弱させたり，あるいは生体への侵入を低下させる因子の存在が考えられる．今回は，最初の貯留部位である胃での胃酸との影響について繊維の形状，組成元素の変化などに着目し検討を加えた．

胃内におけるクリソタイルは，消化酵素，飼料分など複雑に影響しあうため，実験を *in vitro, in vivo* の2系列に分割して行った．*In vitro, in vivo* 系ともクリソタイルの酸処理に対して，Mg／Si比の減少など6時間までほぼ同様な傾向を示したことから，全体として両系での顕著な相違はないと思われる．

In vitro 実験から酸処理6時間までの重量は，軽度な減少を示し，1日以降著しい減少を認めた．このことは，EDX分析でMg／Si比の低下と密接に関連がみられ，明らかにMgの溶出が原因であると判断された．繊維径の差異は明瞭ではなく，単繊維の細い径0.05 μm以下の繊維でMgの溶出がやや多い傾向を示している．この傾向は，処理液の浸透と流出が容易に行われたためと思われ，同様の推測が他の報告でも散見される[15,16]．Mgの溶出があるが，繊維の形状への影響は少なく管状構造，外形とも正常像に近似していた．しかし酸処理4日で外形の不明瞭部が観察された．これは，吸引ろ過に時間を要することと合わせて考えると何らかの形態変化が生じたと推察される．酸処理後の形状の観察は，ほとんど報告されていない．また，本実験に用いた酸濃度は弱く，処理時間も短かったことから，形態での顕著な変化の把握は困難と思われる．使用した酸液は約0.15Nの塩酸で，哺乳動物の胃酸のpH1.5に該当している．通常の人工胃液に加えるペプシンは，酸との反応を妨害したり，処理後の精製水での洗浄に影響をおよぼすと思われることから使用しなかった．酸に制酸剤を添加した処理液では，重量，Mg／Si比とも精製水と比較して変化がみられなかった．このことは，pHがMgの溶出に重要な意味を持つと考察される．

In vivo 実験の経口投与した胃内のクリソタイル繊維数は，6時間後に急激に減少し，以降胃内での残留は認められなかった．従って消化等の機能をも考慮して，胃酸に曝露される時間はおよそ6時間以内と示唆される．胃内でのMg／Si比は，*in vitro* 実験と比べ若干低下しているが，これはホルマリン単独でも低下が有意に認められたことから，試料作製に使用したホルマリンによるMg溶出が加わったものと考えられる．

形態的にほぼ正常構築を呈するクリソタイル繊維は，*in vitro, in vivo* 実験とも酸でMg／Si比の減少が認められたが，胃内に貯留すると考えられる6時間までの胃酸による溶解は少ないと推察される．クリソタイルの酸に対する溶出は，酸の高濃度や酸液の加熱によって増加することが知られているが[9]，生体影響での実際の胃酸に即した報告は少ない．Seshanは，1N塩酸とペプシンを含む人工胃液中で8時間の浸漬により繊維表面のzeta電位の反転を認め，Mgの減少が伴っていることを報告した[15]．また同時に0.1N塩酸の5日間処理で，あるいは蒸留水の10年間の浸漬でzeta電位の反転，Mgの溶出を確認している．

毒性に関しては，しゅう酸処理でMgの溶出量を各段階に分け，ラットへの胸腔内投与で肺癌と中皮腫の発生を検索した結果，無処理および10.2%のMg溶出で発癌率は高率を示すのに対して，Mgの43.7%以上の溶出では急激に発生が減少するという意味深い報告がある[10]．用いた0.1Nしゅう酸は，10.2%の溶出に17時間，43.7%の溶出に5日間，89.1%の溶出に22日間を要している．他の報告では，1N塩酸処理でMg溶出率が95%の時に中皮腫の発生が抑制され，50%溶出では未処理と同程度の発癌を認める知見がみられる[18]．Mgの溶出程度により発癌の抑制率に差異がみられることから，発癌を抑制するには少なくとも50%以上のMgの溶出が必要と思われる．赤血球の溶血作用では，0.1Nしゅう酸でMg溶出を行った時，クリソタイルは減少を示すのに比べ，アモサイト，クロシドライトでは逆に増大がみられた[17]．これらの報告はクリソタイル繊維のMg溶出で発癌率および細胞障害の低下を示唆しているが，いずれも酸濃度が高かったり処理過程に長時間を要するなど生体での反応に直接結びつく結果とは考えられない．今回の *in vivo* 実験から推察すると，胃内でのMg溶出は25%前後であり，著しいMg溶出は期待できなかった．しかし，必ずしも報告にみられた胸腔内投与などの投与形式と経口摂取とを作用過程の点において同一に比較することはできない．

アスベスト繊維は，通常消化管からの吸収がほとんどないと思われているが，先に我々が報告[8]した経口摂取でのクリソタイル繊維の臓器内分布や，多くの研究者らの報告[19]から体内への移行，各臓器への分布は明らか

で，何らかの方法で生体内に侵入することはほぼ間違いないと思われる．今後，消化管からの貫通様式，移行方法，蓄積など考慮に入れクリソタイル繊維の組織，細胞内での消長を追求する方向である．

結　論

クリソタイルの経口摂取による胃酸の影響を調べるため，人工胃液，ラット胃内での繊維の形態および組成元素を分析電顕を用いて経時的に検索した．胃酸で繊維重量の減少，Mg／Si 比の低下が漸次みられたが，繊維の形状の変化はほとんど認められず，胃内では溶解の少ないことが示唆された．

文　献

1）*Environmental Health Criteria for Asbestos and Other Natural Mineral Fibres*, 1986, World Health Organization, Geneva

2）Conforti, P. M., Kanarek, M. S., Jackson, L. A., Cooper, R. C. and Murchio, J. C.：*J. Chron. Dis.*, 34, 211-224, 1981

3）Wigle, D. T.：*Arch. Environ. Health.*, 32, 185-190, 1977

4）Cunningham, H. M., Moodie, C. A., Lawrence, G. A. and Pontefract, R. D.：*Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, 6, 507-513, 1977

5）Chouroulinkov, I. and Truhaut, R.：IARC 国際シンポジウム　リヨン会議，1987

6）Patel-Mandlik, K. J. and Millette, J. R.：*Scanning Electron Microsc.*, 1, 347-354, 1980

7）Sebastin, P., Masse, R. and Bignon, J.：*Environ. Res.*, 22, 201-206, 1980

8）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：東京衛研年報，38，235-238，1987

9）Speil, S. and Leineweber, J. P.：*Environ. Res.*, 2, 166-208, 1969

10）Monchaux, G., Bignon, J., Jaurand, M. C., Lafuma, J., Sebastin, P., Masse, R., Hirsch, A. and Goni, J.：*Carcinogenesis*, 2, 229-236, 1981

11）Timbrell, V. and Rendall, R. E. G.：*Powder Technol.*, 5, 279-287, 1971

12）第十一改正日本薬局方，崩壊試験法，1986

13）荻野周三，小関正道，安野哲子，福森信隆，伊東昭子，遠藤英美：東京衛研年報，34，178-184，1983

14）Cunningham, H. M. and Pontefract, R.：*Nature*, 232, 332-333, 1971

15）Seshan, K.：*Environ. Health Perspect*, 53, 143-148, 1983

16）酒井　潔，久永直見，竹内康浩：産業医学，30，134-135，1988

17）Jaurand, M-C., Magne, L., Boulmier, J-L. and Bignon, J.：*Toxicology*, 21, 323-342, 1981

18）Morgan, A., Davies, P., Wagner, C., Berry, G. and Holmes, A.：*Br. J. exp. Path.*, 58, 465-473, 1977

19）Cook, P. M.：*Environ. Health Perspect*, 53, 121-130, 1983

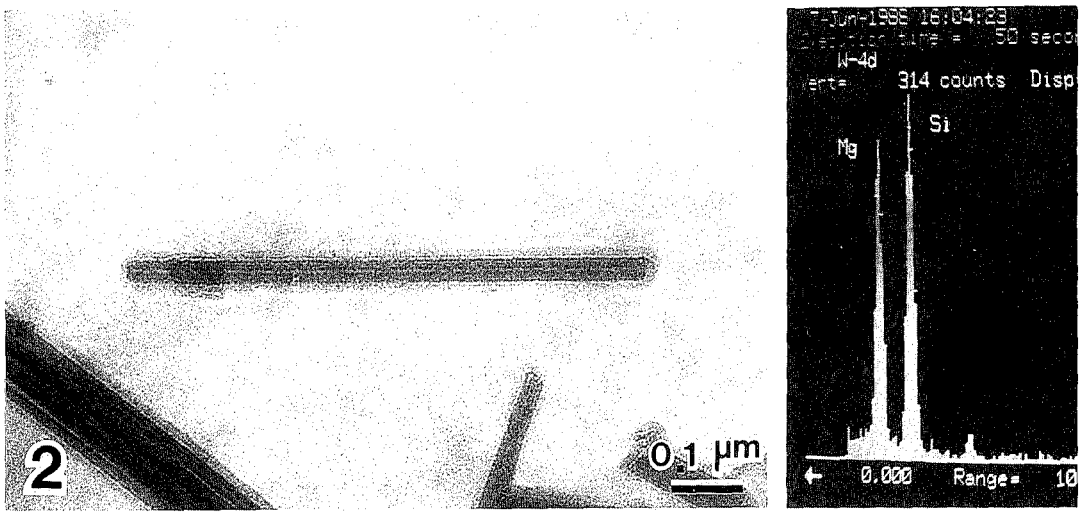


図2．精製水4日間浸漬後のクリソタイル繊維とEDXスペクトル（×93,500）

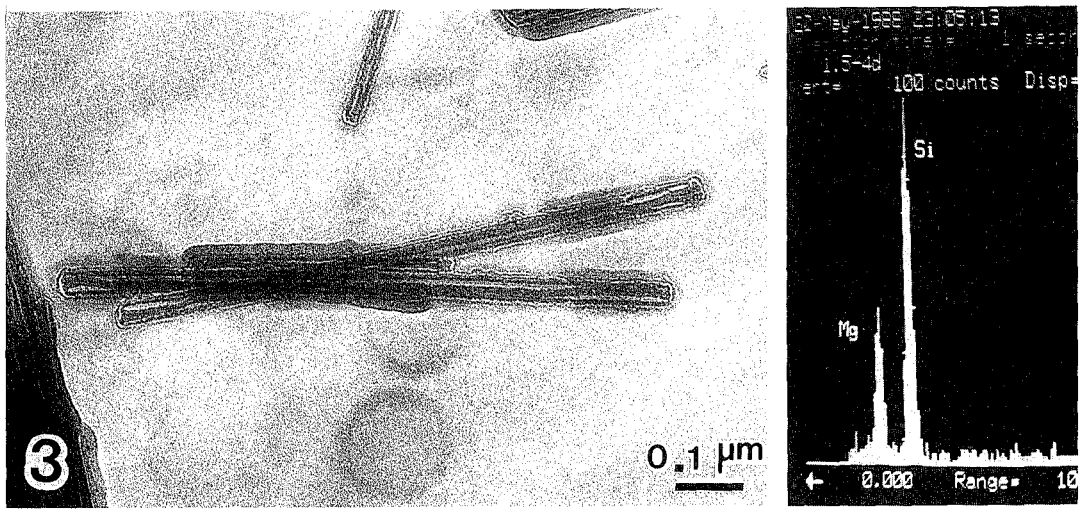


図3．酸処理（pH1.5）4日間後のクリソタイル繊維とEDXスペクトル（×86,000）

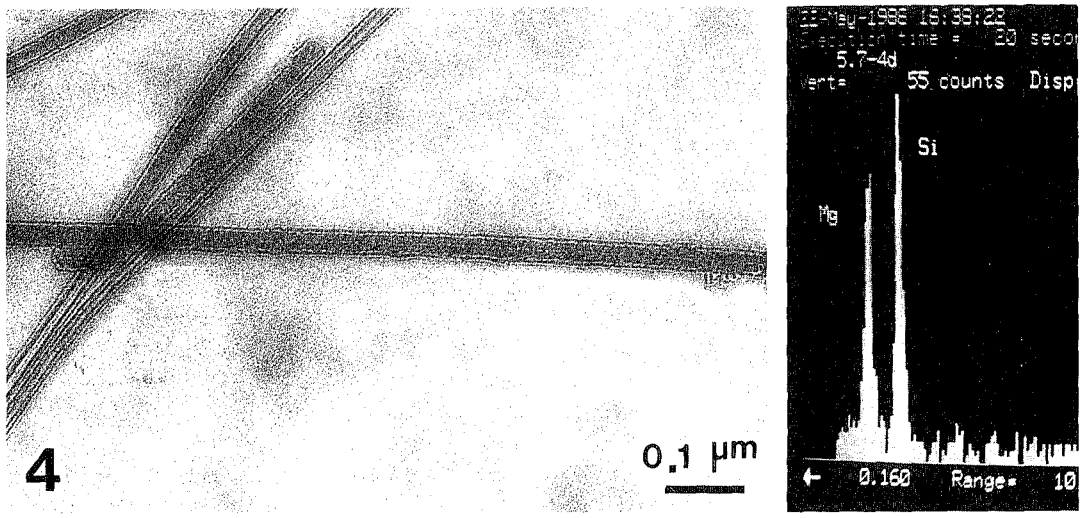


図4．制酸剤添加処理（pH5.7）4日間後のクリソタイル繊維とEDXスペクトル（×98,500）

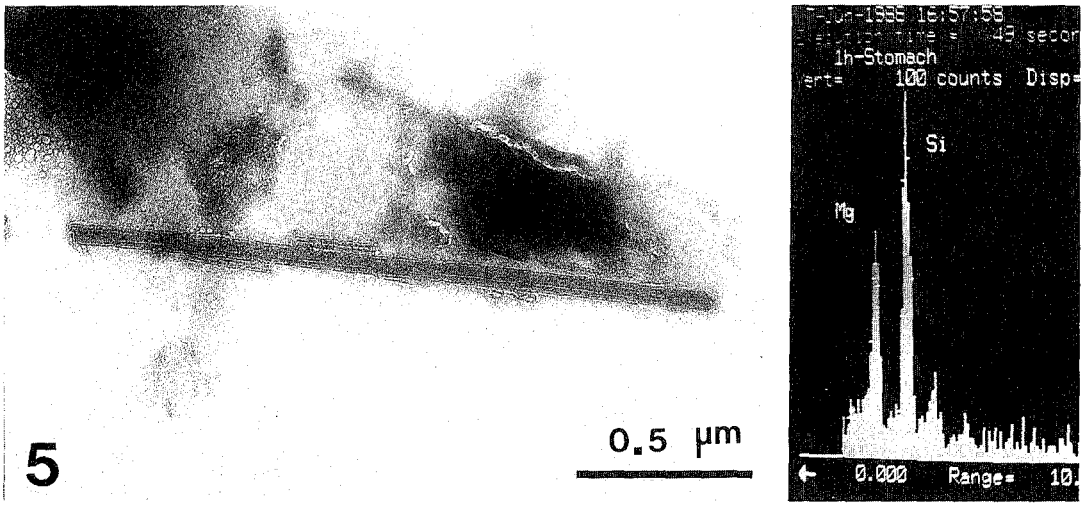


図5．ラット胃内1時間のクリソタイル繊維とEDXスペクトル（×47,800）

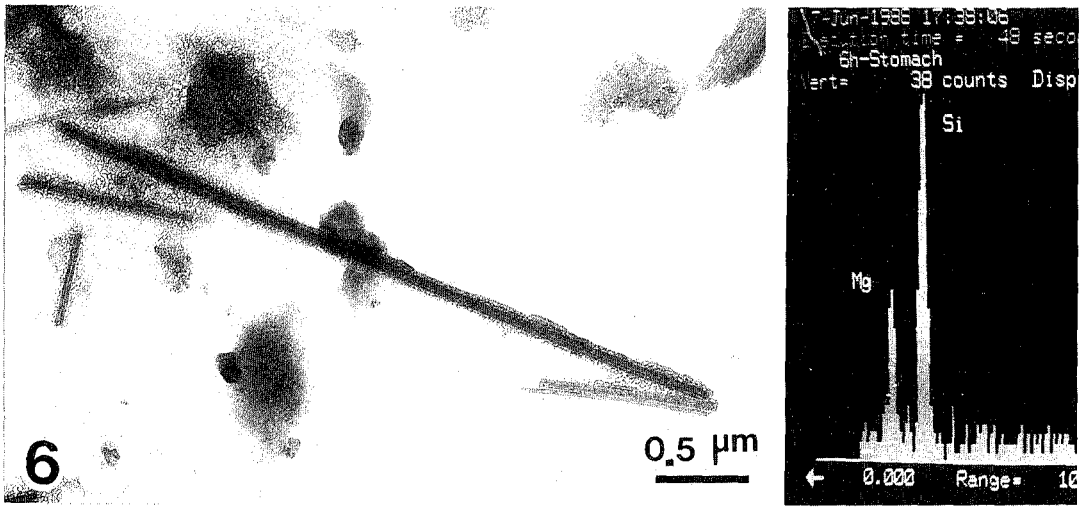


図6．ラット胃内6時間のクリソタイル繊維とEDXスペクトル（×23,200）

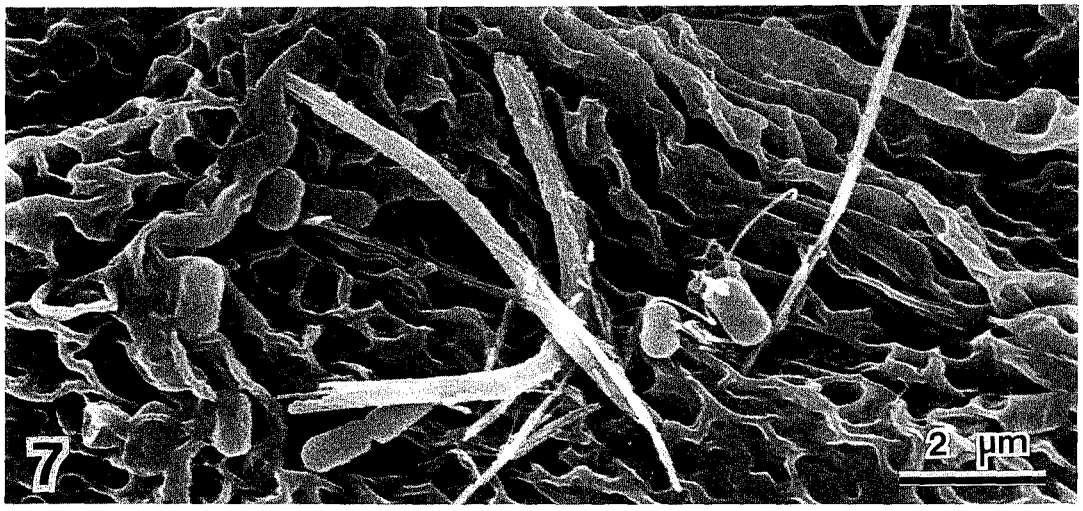


図7．経口投与によるラット胃内でのクリソタイル繊維（×9,500）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **39**, 343-350, 1988

Salmonella typhimurium TA97, TA102を用いた食品添加物の変異原性試験（第3報）

藤田　博*，中野雅行*，佐々木美枝子*

Mutagenicity Test of Food Additives with *Salmonella typhimurium* TA97 and TA102 (III)

HIROSHI FUJITA*, MASAYUKI NAKANO* and MIEKO SASAKI*

Mutagenicity of 28 food additives including 7 dietary supplements, 7 free flowing agents, 5 antioxidants, 3 thickening agents, 3 food colors, 2 color fixatives, and an anticaking agent were examined in Ames' tester strains, *Salmonella typhimurium* TA97 and TA102. 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 (pH7.4) for 20 min. Weak mutagenic activity was detected with propyl gallate in TA102 with and without S9. The other 27 chemicals were not mutagenic in TA97 and TA102.

Keywords：mutagenicity, food additives, dietary supplements, free flowing agents, antioxidants, thickening agents, food colors, color fixatives, anticaking agent, *Salmonella typhimurium* TA97, *Salmonella typhimurium* TA102

化学物質の変異原性試験には，Amesらにより開発された*Salmonella typhimurium* TA株[1-3]が広く利用され，多くの変異原の検出に貢献してきた．Amesらは，開発した多くの菌株の内TA97，TA98，TA100およびTA102の4株を試験に用いることを提案している[3]．TA97およびTA98はフレームシフト型の変異原に，TA100およびTA102は塩基置換型の変異原に良く反応する．特に後から開発されたTA97はTA98では検出できないフレームシフト型の変異原を検出でき[4]，TA102は過酸化物に良く反応する[5,6]特徴がある．

食品添加物の変異原性試験は，主にTA98およびTA100が用いられており，TA97およびTA102を用いた試験の報告は少ない．一方，TA97およびTA102は，TA98およびTA100では検出できない変異原性を検出することができる[3-6]．このことから，我々はTA98およびTA100において変異原性が陰性の報告がある食品添加物も含めた全食品添加物についてTA97およびTA102を用いて再検討を始めた．前報[7-9]までに54種の試験が終了し，7種の食品添加物に非常に弱いが，TA97またはTA102に対する変異原性が見いだされた．本報告では，さらに強化剤（7種），食品製造用剤（7種），酸化防止剤（5種），糊料（3種），色素（3種），発色剤（2種）および粘着防止剤（1種），計28種の食品添加物について行った追加試験の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：クエン酸カルシウム Lot No. WEL3231，乳酸カルシウム Lot No. WEF1629，リン酸三カルシウム Lot No. WEM1838，硫酸カルシウム Lot No. WEN2419，グルコン酸銅（II）Lot No. TLM6346，硫酸銅 Lot No. IPM2576，硫酸亜鉛 Lot No. PDP3971，食品製造用剤：ベントナイト Lot No. WEH1005，ケイソウ土 Lot No. WEK0437，酸性白土 Lot No. TLM6454，炭酸マグネシウム Lot No. WEH1068，酸化マグネシウム Lot No. WEL3179，シュウ酸 Lot No. AWR5873，タルク Lot No. TLJ1820，酸化防止剤：エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム　同仁化学製 Lot No. WH285，エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム　同仁化学製 Lot No. WA195，グアヤク脂 Lot No. LAK9271，クエン酸イソプロピル　東京化成製 Lot No. FEZ01，没

*東京都立衛生研究所毒性部病理研究科　169　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, 169 Japan

食子酸プロピル Lot No. ALN7820，糊料：カルボキシメチルセルロースナトリウム Lot No. WEH1109，アルギン酸プロピレングリコール Lot No. LAK1507，ポリアクリル酸ナトリウム（重合度15,000-20,000）Lot No. WEJ7758，色素：アナトー色素 Lot No. LAH1879，β-カロチン Lot No. WEK5756，銅クロロフィリンナトリウム Lot No. WEK0550，発色剤：硝酸カリウム Lot No. AWP7864，硝酸ナトリウム Lot No. AWQ7096，粘着防止剤：D-マンニトール Lot No. TLF4865.

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．ただし，食品製造用剤のベントナイト，ケイソウ土，酸性白土およびタルクは，どちらの溶媒にも溶解しないため100mg／ml の懸濁液を最高濃度として用いた.

菌株 *Salmonella typhimurium* TA97[4] および TA102[5,6]を普通ブイヨン（Nutrient broth No. 2，OXOID 製）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[3,10]により行った．代謝活性化には，アロクロール1254（三菱モンサント化成）により薬物代謝酵素を誘導した SD 系ラット（jcl：SD 日本クレア）雄の肝臓ホモジネートから得た S 9[3]を用いた．S9mix[3,10]中の S9 量は，10%（50 μl／プレート）とした.

試料溶液0.1ml を小試験管に入れ，代謝活性化する場合には S9mix0.5ml，代謝活性化しない場合にはリン酸緩衝液（pH7.4）0.5ml を加え，さらに一夜培養した菌液を0.1ml 加え，37°で20分間の前培養を行った．これに45°に保温した軟寒天[3] 2 ml を加え混合後，最少グルコース寒天培地[3]に重層した．37°で 2 日間培養後，プレートに生じた復帰コロニーを計数した.

一濃度にプレート 3 枚を用い，結果は，平均値で示した．統計解析は，Kruskal-Wallis 検定[11]を行い，さらに Moore ら[12]のプログラムにより回帰分析を行った.

結果および考察

28種の食品添加物の TA97および TA102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．10mg／プレートを最高濃度として予備試験を行い，バクテリアの増殖が認められない場合には増殖が認められる濃度まで希釈し，5 濃度段階で試験を行った．水に不溶または難溶の試料では，プレート中に試料が分散あるいは析出している場合があったが，出きる限り高濃度での試験をめざし，バクテリアの増殖が認められれば，その濃度で本試験を実施した.

酸化防止剤の没食子酸プロピルは，S9 の添加に関わらず，TA102において復帰コロニー数が有意に増加した．＋S9　100 μg／プレートでコントロール復帰コロニー数の2.2倍（1.08復帰コロニー／nmole），－S9　100 μg／プレートでコントロールの復帰コロニー数の1.4倍(0.30復帰コロニー／nmole）であった．＋S9 での値は 2 倍以上であることから変異原の慣例的判断に従っても陽性である．しかし，復帰コロニー数の増加量は，多くの変異原と比較すると少なく，変異原としては弱いものである．S9 を添加することにより復帰コロニー数が大きくなることから，代謝されることにより，変異原性が強まるようであるが，代謝物質についての解析が必要である.

その他の27種の試料については，復帰コロニー数に増加が認められなかったことから，TA97および TA102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，没食子酸プロピルおよび硝酸ナトリウムには染色体異常試験陽性の報告がある[13,14]．没食子酸プロピルについては，TA98または TA100を用いた Ames 試験では陰性であるが[13,14]，TA102において変異原性が陽性となり染色体異常試験の結果に一致した．硝酸ナトリウムについては，TA98または TA100を用いた Ames 試験では陰性[13]であるが，TA97および TA102においても変異原性は検出できず，染色体異常試験の結果とは一致しない.

TA97または TA102を用いた変異原性試験が終了した食品添加物は，前報[7-9]に報告した食品添加物（54種類）を加えると82種類となる．TA97または TA102において変異原性陽性となった化合物は，アスコルビン酸，オルトフェニルフェノール，チアベンダゾール，塩酸ピリドキシン，ニコチン酸アミド，リボフラビン，臭素酸カリウムおよび没食子酸プロピルの 8 種類である．これまでに良く用いられてきた TA98および TA100での結果と比較すると，これらは臭素酸カリウムを除き全て TA98および TA100では変異原性が検出されていない．一方，残る74種類の TA97および TA102で陰性の化合物のうち，TA98および TA100で陽性の化合物はなかった．この様に TA97あるいは TA102によっていくつかの化合物に変異原性が検出できたのは，この二株の感受性が TA98および TA100に比べ高いからであり，過酸化物に

Table 1. Results of Mutation Test with Food Additives

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate TA97 −S9	TA97 +S9	TA102 −S9	TA102 +S9
Dietary supplements						
Calcium Citrate	DW	10	109	185	199	348
		5	136	189	253	419
		1	130	204	292	491
		0.5	158	196	302	476
		0.1	144	200	313	460
		0	154	210	303	450
		PC[a)]	215	3,118	4,524	1,233
Calcium Lactate	DW	10	138	171	252	314
		5	157	183	299	323
		1	150	205	285	415
		0.5	134	193	300	475
		0.1	143	187	321	484
		0	148	197	308	475
		PC	219	3,393	4,060	1,189
Calcium Phosphate Tribasic	DW	1	126	172	197	395
		0.5	122	165	230	420
		0.1	114	179	287	429
		0.05	119	179	265	396
		0.01	124	175	270	372
		0	130	178	305	377
		PC	208	2,455	3,546	1,363
Calcium Sulfate	DW	1	122	174	207	356
		0.5	109	195	197	320
		0.1	153	191	226	360
		0.05	119	184	210	339
		0.01	130	199	226	384
		0	128	192	212	375
		PC	237	3,085	4,095	1,673
Copper (II) Gluconate	DW	1	105	106	82	205
		0.5	108	127	114	317
		0.1	120	121	220	396
		0.05	116	133	266	394
		0.01	135	139	253	389
		0	124	173	238	432
		PC	179	2,523	4,105	1,668
Copper (II) Sulfate	DW	1	107	73	44	50
		0.5	111	121	96	113
		0.1	132	194	215	417
		0.05	136	177	255	400
		0.01	140	188	303	401
		0	149	187	296	407
		PC	205	3,681	4,234	2,353

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate TA97 −S9	TA97 +S9	TA102 −S9	TA102 +S9
Zinc Sulfate	DW	10	137	146	58	104
		5	118	152	87	136
		1	117	138	127	208
		0.5	132	159	179	277
		0.1	144	167	282	378
		0	123	141	318	443
		PC	185	2,527	3,828	1,559
Free flowing agents						
Bentonite	DMSO	10	112	158	232	420
		5	105	166	255	403
		1	110	179	247	441
		0.5	118	177	260	423
		0.1	117	163	258	433
		0	125	187	262	448
		PC	210	2,537	4,147	1,059
Diatomaceous Earth	DMSO	10	116	151	223	394
		5	101	157	279	435
		1	109	177	294	473
		0.5	94	161	288	470
		0.1	104	180	290	469
		0	119	171	288	513
		PC	179	2,414	4,538	1,218
Japanese Acid Clay	DMSO	10	115	155	267	467
		5	132	173	268	471
		1	119	144	286	502
		0.5	133	182	265	528
		0.1	140	174	261	476
		0	112	176	282	502
		PC	242	1,921	4,350	1,450
Magnesium Carbonate, Basic, Heavy	DW	1	123	160	227	419
		0.5	114	167	219	454
		0.1	103	166	210	391
		0.05	98	182	192	440
		0.01	100	169	234	403
		0	115	175	245	416
		PC	175	1,997	3,187	2,112
Magnesium Oxide, Heavy	DW	10	111	148	216	469
		5	108	185	193	461
		1	103	187	183	460
		0.5	101	182	179	425
		0.1	119	178	192	445
		0	118	179	205	461
		PC	178	3,987	3,576	1,820

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate TA97 −S9	TA97 +S9	TA102 −S9	TA102 +S9
Oxalic Acid	DW	1	139	180	303	435
		0.5	137	197	302	469
		0.1	141	184	319	455
		0.05	134	164	324	493
		0.01	145	162	325	472
		0	148	188	336	481
		PC	199	2,219	3,161	1,856
Talc	DMSO	10	128	191	314	466
		5	135	181	299	485
		1	134	188	326	467
		0.5	133	203	320	486
		0.1	135	201	341	488
		0	129	194	303	487
		PC	199	2,973	4,553	1,138
Antioxidants						
Ethylene diamine Tetraacetic Acid Disodium Calcium Salt	DW	10	87	147	1	0
		5	112	155	0	3
		1	64	142	28	94
		0.5	110	153	121	209
		0.1	108	136	233	281
		0	107	162	249	438
		PC	167	2,974	2,954	1,760
Ethylene diamine Tetraacetic Acid Disodium Salt	DW	1	161	155	48	104
		0.5	155	151	235	425
		0.1	143	164	298	442
		0.05	138	168	291	451
		0.01	140	187	241	474
		0	155	179	250	492
		PC	196	3,034	3,425	2,645
Guaiac Gum	DMSO	0.5	101	137	40	496
		0.1	95	138	62	505
		0.05	92	115	107	437
		0.01	102	142	198	468
		0.005	98	117	229	443
		0	95	155	248	461
		PC	189	2,485	3,421	2,103
Isopropyl Citrate	DMSO	10	123	174	161	400
		5	108	179	228	498
		1	108	166	227	433
		0.5	108	162	220	386
		0.1	104	175	233	421
		0	92	167	220	421
		PC	161	2,399	3,285	2,752

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate TA97 −S9	TA97 +S9	TA102 −S9	TA102 +S9
Propyl Gallate	DMSO	0.1	60	136	462[b)]	945[b)]
		0.05	117	155	434	757
		0.01	117	177	323	497
		0.005	129	188	308	451
		0.001	138	200	335	461
		0	140	190	322	438
		PC	215	2,364	3,843	1,370
Thickening agents						
Carboxymethyl Cellulose Sodium Salt	DW	10	136	173	301	365
		5	121	187	297	376
		1	131	191	298	340
		0.5	114	180	301	364
		0.1	116	189	320	454
		0	139	197	302	413
		PC	199	3,393	4,350	2,198
Propylene Glycol Alginate	DW	10	163	169	309	400
		5	148	217	290	424
		1	128	196	220	405
		0.5	144	184	237	415
		0.1	123	183	268	419
		0	147	212	224	440
		PC	226	3,058	3,619	2,063
Sodium Polyacrylate	DW	10	131	183	330	560
		5	118	187	343	568
		1	122	163	320	473
		0.5	112	202	320	510
		0.1	130	177	313	466
		0	132	177	307	469
		PC	183	3,431	4,420	2,343
Food colors						
Annatto Pigment	DMSO	10	113	141	133	452
		5	114	136	212	525
		1	93	143	288	499
		0.5	99	127	278	464
		0.1	105	146	290	497
		0	96	135	306	507
		PC	190	2,465	4,640	1,610
β-Carotene	DMSO	10	145	167	315	507
		5	141	172	285	464
		1	134	203	287	460
		0.5	137	200	290	475
		0.1	128	194	327	435
		0	121	196	331	454
		PC	222	2,277	4,596	1,588

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg／plate	No. of Revertants／plate TA97 −S9	TA97 +S9	TA102 −S9	TA102 +S9
Sodium Copper Chlorophyllin	DW	1	117	136	185	412
		0.5	115	169	243	481
		0.1	125	158	323	435
		0.05	132	155	319	452
		0.01	143	176	295	437
		0	134	185	318	465
		PC	229	3,118	4,162	2,646
Color fixatives						
Potassium Nitrate	DW	10	149	187	267	403
		5	150	204	267	437
		1	143	214	278	429
		0.5	147	187	304	475
		0.1	134	208	306	449
		0	152	212	297	456
		PC	197	1,958	4,147	1,660
Sodium Nitrate	DW	10	123	174	276	388
		5	119	157	290	413
		1	130	172	286	433
		0.5	120	158	297	417
		0.1	133	175	285	402
		0	161	173	297	467
		PC	193	3,538	4,495	2,625
Anticaking agent						
D-Mannitol	DW	10	130	159	315	470
		5	144	163	350	510
		1	142	181	326	475
		0.5	134	178	299	483
		0.1	133	185	331	449
		0	139	177	315	485
		PC	186	3,321	3,596	1,305

a) Positive control TA97＝−S9：9-AA 30 μg, +S9：2-AA 5 μg, TA102＝−S9：MMC 0.5 μg, +S9：2-AA 5 μg

b) Statisticaly significant defference by Kruskal-Wallis test ($p<0.05$) and dose-related incleasing by regression analysis ($p<0.01$)

も反応する特徴のためであろう．

8種類のうち，オルトフェニルフェノール，ニコチン酸アミド，リボフラビン，臭素酸カリウムおよび没食子酸プロピルの5種類は，染色体異常試験において陽性である[13,14]．TA97およびTA102を用いることにより，TA98およびTA100のみの結果よりも染色体異常試験との一致性が高まることがわかる．ただし両試験で結果が一致しない化合物があり，これらについてはなお検討が必要である．変異原性試験には，いくつもの方法が開発されており，いくつかの方法による結果を総合的に判断する必要があると言われている．そこで食品添加物の変異原性を正確に評価するためには，一種でも多くの試験

方法で調べることが必要であり，今後ともTA97およびTA102を用いた食品添加物の試験は続けたいと考えている．

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．我々は，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が，それぞれ単独ではTA98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れることを見いだした[15]．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であるが，選択的に取り上げた2種以上の化合物を混合した試験もはじめている．これらについては別に報告するつもりである．

要　旨

28種の食品添加物についてAmesの試験株TA97，TA102を用いて変異原性試験を行った．その結果，没食子酸プロピル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27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 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) Leven, 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) 藤田　博，佐々木美枝子：東京衛研年報，38，423-430，1987
10) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，20，1178-1189，1975
11) 石居　進：生物統計学入門，133-137，1975，培風館
12) Moore, D. and Felton, J. S.：*Mutation Res.*, 119, 95-102, 1983
13) 石館　基，祖父尼俊雄，吉川邦衛：変異原と毒性，4(5)，10-19，1981
14) 石館　基：染色体異常試験データ集，1983，リアライズ社
15) 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.*, **39**, 351-356, 1988

JY-4 モルモットの表皮メラノサイトについて

田 山 邦 昭*, 中 野 雅 行*, 佐々木 美枝子*

The Epidermal Melanocytes of JY-4 Guinea Pigs

KUNIAKI TAYAMA*, MASAYUKI NAKANO* and MIEKO SASAKI*

Keywords：黒色モルモット black guinea pig, 表皮メラノサイト epidermal melanocyte, ドーパ反応 dopa reaction

種々の化学物質中には，人や動物の皮膚や毛を褪色させたり，逆に色素沈着を起こすなど皮膚毒性上問題となるような作用を有するものがある．我々は柑橘類の防かび剤であるオルトフェニルフェノールおよびそのナトリウム塩（OPP および OPP-Na）が，C57BL マウスへの経口投与でその被毛を脱色素することを報告した[1,2]．有色成熟マウスでは，一般に皮膚あるいは被毛の有色化に働くL-β-3，4-dihydroxyphenylalanine（DOPA）陽性メラノサイトが毛球内[3]や表皮の一部の特定部位を除いてごくわずかしか存在しない[4]．従ってこれらのマウス皮膚ではメラノサイトの数的減少を定量的に捕えにくく，また被毛においても hair cycle が複雑であることなどから，欧米では脱色素検定用動物として，表皮に DOPA 陽性メラノサイトを多数持つ有色モルモット皮膚が比較的多く用いられている[5-9]．我々は，国立予防衛生研究所において確立された黒色モルモット JY-4 を導入し，これらの検定を試みることとした．

今回は，皮膚毒性試験の基礎データとして JY-4 モルモットの表皮メラノサイトを組織化学的手法により定性的および定量的に観察したので報告する．

材料および方法

実験動物　当部動物舎において兄妹交配により繁殖・維持している JY-4 モルモット雌雄（13週齢，52週齢）を用いた．

飼育条件　温度24±1℃，湿度55±5％，照明午前6時～午後6時，換気毎時10回の飼育室内でステンレスケージ（W28×L40×H17cm）に1～2匹飼いし，㈱船橋農場製固型飼料 GBW-1 および水道水を与えた．

標本作製　動物をエーテル屠殺後，皮膚断面のメラノサイト観察用および表皮メラノサイト数の計測用に各々，皮膚の垂直面（凍結切片）および水平面（表皮剥離）での標本を作製した．

凍結切片：剪毛した背部皮膚を採取し，10％中性緩衝ホルマリン液で1時間固定後，クリオスタットで凍結切片標本を作製した．0.1％L-β-3，4-dihydroxyphenylalanine（DOPA）溶液（pH 6.8 in PB）または対照として phosphate buffer 中で37℃，8時間インキュベートした後，ホルマリン液で再固定し，水洗，Kernechtrot 染色を行った．またインキュベート前の凍結切片について Fontana-Masson 銀染色を行い，これらを常法により脱水，封入した．

表皮剥離：背部皮膚を直径5mmのトレパンで動物1匹当り6ヶ所（6標本）採取した．表皮剥離片作製および その DOPA 反応は Staricco らの方法[10]により行った．

DOPA 陽性メラノサイト数の計測は毛嚢濾胞口付近を除き1標本当り顕微鏡倍率400倍下で10視野（1視野0.01平方ミリメートル）観察し，動物1匹（6標本）の平均値を求め，1平方ミリメートル当りの動物3匹分の平均値と標準偏差を算出した．

結果および考察

JY-4 モルモットの外観は被毛だけでなく皮膚も黒色であり（Fig. 1），この皮膚の黒色の程度は雌においてやや強かった．モルモット背部皮膚垂直面の標本において，DOPA 反応を行わない場合では，その表皮全般に微小な黒～黒褐色の顆粒が認められ，特に基底層では顆粒が粗大となっていた（Fig. 2）．これらの顆粒はメラニン証明に用いる Fontana-Masson 銀染色に陽性であり，メラニン顆粒であると推定された．DOPA 反応により基

*東京都立衛生研究所毒性部病理研究科　169　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, 169, Japan

Table 1. The Melanocyte Population in the Dorsal Skin of JY-4 Guinea Pigs

Age	Sex	No. of animals	Body weight	No. of melanocytes per 1 mm^2 of epidermis
13-wk-old	Male	3	617±24[1)]	621±41[2)]
	Female	3	490±65	723±48
52-wk-old	Male	3	935±35	608±23
	Female	3	797±25	856±74

1) Mean±SD (g).
2) No. of melanocytes in the split-dopa preparation±SD.

底層に樹枝状突起を持ったDOPA陽性細胞であるメラノサイトが認められた（Fig. 3）．表皮剝離標本ではメラノサイトはアメーバ様の形を呈し，その分布は比較的一様にみられたが，毛嚢濾胞口周辺（Fig. 4 ＊印）ではやや粗な状態であった．高倍像では細長い樹枝状突起が細胞当り約3～6本みられた（Fig. 4 白枠内）．背部表皮メラノサイトの分布密度はTable 1に示すように1平方ミリメートル当り13週齢の雄で621個，雌で723個，52週齢の雄で608個，雌で856個であった．これらには各週齢で雌雄差がみられた（Student t 検定，危険率5％）．

黒色モルモット背部の表皮メラノサイト数については1平方ミリメートル当り，Snellは雄で241-370個[5)]と報告している．その他の報告では雌雄は明確にされていないが，Bleehenらは434個[6)]，Frenkらは356-434個[7)]および533個[8)]，Jimbowらは471-1374個[9)]としている．今回の結果はこれらの報告よりもやや多かった．これまでの報告における表皮メラノサイト数と我々のそれとを比較することは，使用動物の系統が異なることや他の報告では確立した系統を使用しておらず個体差が想定されること，また皮膚の伸縮等標本作製上の問題点や、我々の観察からはメラノサイトの分布が比較的粗な毛嚢濾胞口付近が除かれていること等計測上の違いがあることなどから実際は難しいと思われる．表皮メラノサイト数の性差および週齢差については，Bischitz と Snell[11,12)]が腹部等で雌雄の幼若と成熟動物を比較しているが，背部での比較の報告はみられない．我々の背部観察では13週齢と52週齢共に雄より雌の方が多く，これは皮膚色調の観察における黒色の程度とも一致していた．また雌では13週齢に比べ52週齢の方が多く，雄では両週齢でほとんど変化はみられなかった．これら性差および週齢差については，例数が3例と少ないためさらに例数を増やして検討する必要があると考えられる．

一般に食品添加物，医薬品等の毒性試験ではアルビノ動物が多く用いられるために，それらの中に色素異常誘発作用があっても発見されずに見過ごされてしまう可能性がある．またこれらの作用検出を目的とした皮膚毒性試験はほとんど行われていないのが現状である．我国では化学物質の脱色素作用等の検定に黒色モルモットを使用した例はまれであり，今後JY-4モルモットはこれらの検定やその発生機序解明に役立つものと思われる．現在，我々は食品添加物，医薬品等の化学物質について，JY-4モルモットを用いて，脱色素作用等の検討作業を進めている．

謝辞 JY-4モルモットを分与して頂いた国立予防衛生研究所，中川雅郎博士に深謝いたします．

文　献

1) 田山邦昭，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，32-2，40-50，1981
2) 田山邦昭，平賀興吾：東京衛研年報，35，401-406，1984
3) Fitzpatrick, T. B., Brunet, P. and Kukita, A.：*The Biology of Hair Growth*, 255-303, 1958, Academic Press, New York
4) Gerson, D. E. and Szabo, G.：*Am. J. Phys. Antrop.*, 31, 363-382, 1969
5) Snell, R. S.：*Arch. Derm.*, 90, 63-70, 1964
6) Bleehen, S. S., Pathak, M. A., Hori, Y. and Fitzpatric K. T. B.：*J. Invest. Derm.*, 50, 103-117, 1968
7) Frenk, E., Pathak, M. A., Szabo, G. and Fitzpatrick, T. B.：*Arch. Derm.*, 97, 465-477, 1968
8) Frenk, E. and OTT, F.：*J. Invest Derm.*, 56, 287-293, 1971
9) Jimbow, K., Obata, H., Pathak, M. A. and Fitzpatrick, T. B.：*J. Invest. Derm.*, 62, 436-449, 1974
10) Staricco, R. J. and Pinkus, H.：*J. Invest. Derm.*, 28, 33-45, 1957

11) Bischitz, P. G. and Snell, R. S. : *J. Anat.*, 93, 233-245, 1959

12) Snell, R. S. and Bischitz, P. G. : *Z. Zellforsch.*, 51, 225-242, 1960

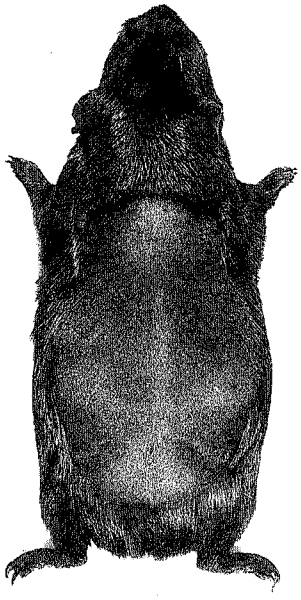
Explanation of Figures

Fig. 1. Dorsal skin of a 13-wk-old female JY-4 guinea pig.

Fig. 2. Vertical section of the back skin of a 13-wk-old male guinea pig. Show melanin granule situated in the basal layer of the epidermis. Kernechtrot stain. X 300.

Fig. 3. Vertical section of the back skin of a 13-wk-old male guinea pig. Show the melanocytes situated in the basal layer of the epidermis. Dopa reaction and Kernechtrot stain. X 400.

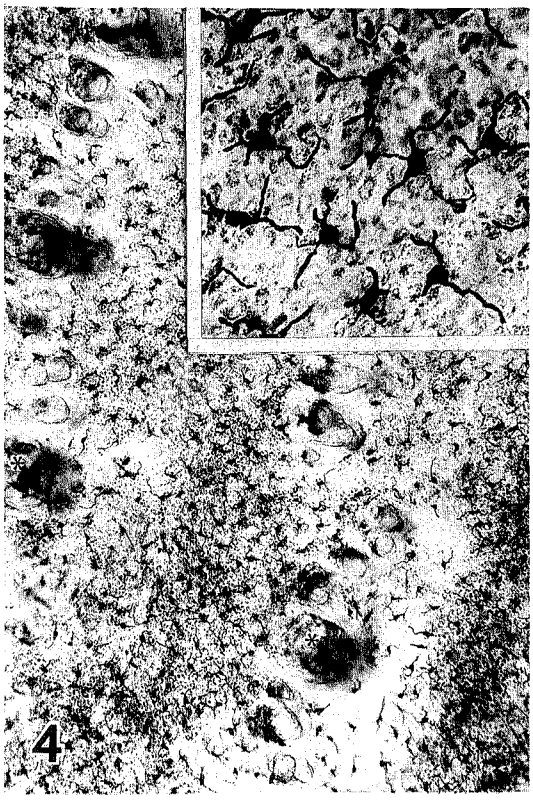
Fig. 4. Skin sheet by split-dopa preparation of the dorsal wall of a 13-wk-old male guinea pig. Show dopa-positive melanocyte. X 100. The higher magnification (inset) X 400. Asterisk is the hair-follicle pore.



1

3

2



4

著書及び他誌発表

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1987.7—1988.6)

著　　書

大橋　誠：**輸入細菌感染症の現状**，竹田美文，工藤泰雄，倉田　毅，高田季久編，輸入感染症，3-16，1987，近代出版，東京

工藤泰雄：**コレラ**，竹田美文，工藤泰雄，倉田　毅，高田季久編，輸入感染症，17-28，1987，近代出版，東京

工藤泰雄，山田澄夫：**コレラ以外のビブリオ下痢症**，竹田美文，工藤泰雄，倉田　毅，高田季久編，輸入感染症，76-88，1987，近代出版，東京

工藤泰雄，松下　秀：**腸管系病原菌の薬剤耐性**，竹田美文，工藤泰雄，倉田　毅，高田季久編，輸入感染症，95-103，1987，近代出版，東京

工藤泰雄，津野正朗，大橋　誠：**一般的検査体系**，厚生省監修，金井興美他編，微生物検査必携，細菌・真菌検査，第3版，B 2-13，1987，日本公衆衛生協会，東京

大橋　誠，津野正朗：**検査情報**，厚生省監修，金井興美他編，微生物検査必携，細菌・真菌検査，第3版，B 2-13，1987，日本公衆衛生協会，東京

坂井千三，太田建爾：**一般検査体系**，厚生省監修，金井興美他編，微生物検査必携，細菌・真菌検査，第3版，D 2-13，1987，日本公衆衛生協会，東京

工藤泰雄：**腸管病原性大腸菌**，厚生省監修，金井興美他編，微生物検査必携，細菌・真菌検査，第3版，D 30-42，1987，日本公衆衛生協会，東京

津野正朗，大橋　誠：**コレラ菌**，厚生省監修，金井興美他編，微生物検査必携，細菌・真菌検査，第3版，D 83-96，1987，日本公衆衛生協会，東京

五十嵐英夫：**toxic shock syndrome**，新内科学大系，年刊版，87-B，249-260，中山書店，東京

潮田　弘，河端俊治，春田美佐夫，細貝祐太郎共編，：**黄色ブドウ球菌による食中毒事例－実務－食品衛生**，1987，中央法規，東京

金子精一，太田建爾：**腸炎ビブリオ**，坂井千三編，食中毒菌の制御－データと文献抄録，3-37，1988，中央法規，東京

太田建爾：**NAG ビブリオ**，坂井千三編，食中毒菌の制御－データと文献抄録，112-114，1988，中央法規，東京

富山朔二，安東民衛：**単クローン抗体実験マニュアル**，1987，講談社サイエンティフィク，東京

丸山　務：**人畜共通伝染病**，中村良一他編，新編獣医ハンドブック，339-363，1988，養賢堂，東京

丸山　務：***Yersinia pseudotuberculosis* 感染症の疫学**，伊沢久夫編，獣医学1988，105-120，近代出版，東京

吉川　翠共著：**ビル設備・衛生管理チェックリスト**，設備と管理編集部編，1988，オーム社，東京

吉川　翠：**家屋内に生息するダニ類と防除法**，疑問に答える家庭の医学，1988，硯友出版，東京

吉川　翠：**わが家のダニ防除法事例研究**，ハウスクリーニングにおける問題点とその解決法，1987，ヒューマンリサーチ，東京

吉川　翠監修：**こうすればダニは退治できる**，1988，日本文芸社

Makoto Nakao, Osamu Urayama, Hideaki Nagamune, Toshiko Nakao, Kanako Satoh, Fumiko Nagai and Itsu Kano：**PERSPECTIVES OF BIOLOGICAL ENERGY TRANSDUCTION**, 1987, Academic Press.

Azuma, R. and Itoh, T：**Avian botulism**, Eklund, M. W. and Dowell, V. R. eds, Botulism in waterfowl and distribution of *Clostridium botulinum* type C in Japan, 167-187, 1987, Charles C Thomas Publisher, Springfield, USA

伊藤　武：**細菌の抗菌薬剤感受性ーグラム陰性菌，カンピロバクター・腸炎ビブリオ**，山中学，村地孝，林康之編　薬剤感受性試験　178-185，1987，金原出版，東京

伊藤　武：**経口感染カンピロバクター**，微生物検査必携編集委員会編　微生物検査必携細菌・真菌検査法第3版　D118-D132，1987，日本公衆衛生協会，東京

刑部陽宅，伊藤　武：**経口感染ウェルシュ菌**，微生物検査必携編集委員会編　微生物検査必携細菌・真菌検査法第3版　D153-D165，1987，日本公衆衛生協会，東京

寺山　武，五十嵐英夫：**経口感染ブドウ球菌**，微生物検査必携編集委員会編　微生物検査必携細菌・真菌検査法第3版　D133-D142，1987，日本公衆衛生協会，東京

寺山　武，五十嵐英夫：**創傷感染ブドウ球菌**，微生物検査必携編集委員会編　微生物検査必携細菌・真菌検査法第3版　J15-J24，1987，日本公衆衛生協会，東京

伊藤　武：**サルモネラ症**，竹田美文，工藤泰雄，倉田毅，高田季久編　輸入感染症44-54，1987，近代出版，東京

伊藤　武：**カンピロバクター腸炎**，竹田美文，工藤泰雄，倉田毅，高田季久編　輸入感染症66-75，1987，近代出版，東京

寺山　武：**サルモネラ食中毒**，日本食品衛生協会編　わかりやすい食中毒　25-36，1987，日本食品衛生協会，東京

寺山　武：**セレウス食中毒**，日本食品衛生協会編　わかりやすい食中毒　85-96，1987，日本食品衛生協会，東京

伊藤　武：**カンピロバクター食中毒**，日本食品衛生協会編　わかりやすい食中毒　47-60，1987，日本食品衛生協会，東京

伊藤　武，中溝保三：　**新看護学1，微生物**　1988，医学書院，東京

伊藤　武，徳丸雅一：**カンピロバクター**，坂井千三編　食中毒の制御ーデータと文献抄録ー38-52，1988，中央法規出版，東京

小久保彌太郎，金子精一，伊藤　武：**ウエルシュ菌**，坂井千三編　食中毒菌の制御ーデータと文献抄録ー60-71，1988，中央法規出版，東京

伊藤　武：**ボツリヌス菌**，坂井千三編　食中毒菌の制御ーデータと文献抄録ー　72-85，1988，中央法規出版，東京

尾上洋一，寺山　武，品川邦汎：**黄色ブドウ球菌**，坂井千三編　食中毒菌の制御ーデータと文献抄録ー　14-25，1988，中央法規出版，東京

寺山　武，塩沢寛治：**病原大腸菌**，坂井千三編　食中毒菌の制御ーデータと文献抄録ー　53-59，1988，中央法規出版，東京

T. Itoh, M. Shingaki, M. Takahashi, Y. Yanagawa, A. Kai, Y. Kudoh, M. Ohashi and G. Hamana：**Identification of *C. pyloridis* by detecting its specific urease,** Kaijser, B. and Falsen, E. eds Campylobacter IV 428-429, 1988, University of Gothenburg, Sweden

原　著　論　文

食品の真菌汚染における含有成分の影響
諸角　聖，和宇慶朝昭，一言　広：食品と微生物，4(1)，56-61，1987

ケナガコナダニの食菌性と真菌伝播能
諸角　聖，吉川　翠，和宇慶朝昭，一言　広：食品と微生物，4(2)，133-141，1987

苦情食品における真菌の食品損傷と喫食事故
一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭：食品と微生物，4(2)，149-155，1987

菌株保存におけるダニの食害
諸角　聖：防菌防黴誌，15(7)，351-355，1987

Nucleotide sequence of the staphylocoagulase gene：Its unique COOH-Terminal 8 tandem repeats
Kaide. S., Miyata. T., Yoshizawa. Y., Kawabata. S., Morita. T., Igarashi. H. and Iwanaga. S.：J. Biochem. 102 (5)，1177-1186，1987

Study of the biological activities of toxic shock syndrome toxin-1：II. Induction of the proliferative responce and the interleukin 2 production by T cells from human periferal blood mononuclear cells stimulated with the toxin
Uchiyama. T., Kamagata. Y., Yan. X-J., Kohno. M., Yoshida. M., Fujikawa. H., Igarashi. H., Okubo. M., Awano. F., Saito-Taki. T. and Nakano. M：Clin. exp. Immunol. 68，638-647，1987

救命し得た toxic shock syndrome（TSS）の1例
三原純司，朝倉　斌，森内正人，小島弘之，牧　正裕，斎藤　顥，白土寿晨，五十嵐英夫：日本内科学会雑誌，77(1)，92-94，1988

Toxic-shock-syndrome Toxicn-1（TSST-1）によるマウス脾臓細胞からのマクロファージ活性化因子の産生
鎌形有祐，岡　光夫，内山竹彦，吉岡守正，藤川　浩，五十嵐英夫：感染症学雑誌，61(8)，907-913，1987

Toxic shock syndrome toxic-1（TSST-1）の生物活性の研究：Ⅲ，TSST-1の前投与によるマウスの抗体産生反応の抑制作用の解析
厳　小傑，内山竹彦，河内　章，吉岡守正，五十嵐英夫，藤川　浩：感染症学雑誌，62(5)，483-489，1988

Laboratory aspects of gastrointestinal infections in Japan. In proceedings of the International Symposium on infectious diseases
Ohashi. M.：J. Japan. A. Inf. D. 62（Suppl）. 87-96，1988

Small-scale DNA preparation for rapid genetic identification of *Campylobacter* species without radioisotope

Ezaki. T., Takeuchi. N., Lin. S., Kai. A., Yamamoto. H. and Yabuuchi. E.：Microbiol. Immunol, 32(2), 141-150, 1988

カキによる急性胃腸炎と Small Round Virus. 東京都における集団発生状況とその調査成績

安東民衛，関根整治，林　志直，寺山　武，大橋　誠，岡田正次郎：食品と微生物，4(2)，103-114，1987

A serological survey for human immunodeficiciency virus type 1 and 2 of individuals who visited health center in Tokyo

Kiyosumi Nakamura, Yasuko Yoshida, Tamie Ando, Kiyoshi Yamazaki, Naomi Ohnuki, Tadahiko Ito, Kazuyoshi Yano, Seiji Sekine, Yukinao Hayashi, Takayuki Sinkai, Mikio Hori, Takeshi Terayama, Kiyoshi Yabuuchi, Takashi Miki, Kohichi Ishikawa, Masanori Hayami and Makoto Ohashi：Japan. J. Med. Sci. Biol, 40 (4), 159-164-1987

水中ウイルスの実態

田口文章，矢野一好：防菌防黴誌，16(5)，233-247，1988

Diarylheptanoids from the Rhizomes of *Curucuma xanthorrhiza* and Alpinia officinarum

Shin-ichi Uehara, Ichiro Yasuda, Kazuyuki Akiyama, Hiroshi Morita, Koichi Takeya and Hideji Itokawa：Chem. Pharm. Bull, 35(8), 3298-3304, 1987

日局トラネキサム酸の定量法（Ⅲ）

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，西垣　進：医薬品研究，19(1)，98-102，1988

電気化学的検出器付高速液体クロマトグラフィーによるフロセミドの定量

鎌田国広，高橋美佐子，上原真一，萩原輝彦，中山京子，秋山和幸，西垣　進：医薬品研究，19(1)，103-106，1988

New solvent system for extraction of tocopherols from biological specimens for HPLC determination and the evaluation of 2, 2, 5, 7, 8-pentamethyl-6-chromanol as an internal standard

T. Ueda, O. Igarashi：J. Micronutr. Anal., 3, 185-198, 1987

ガスクロマトグラフィーによる繊維製品中の衛生加工剤・塩酸 *n*-ドデシルグアニジンの定量

鈴木助治，酒井正美，森謙一郎，中村義昭，渡辺四男也：衛生化学，34，225-230，1988

Plasmid-Associated Properties and Biotypes of *Yersinia enterocolitica* Serotype 03 Strains

S. Kaneko, T. Maruyama：Contr. Microbiol. Immunol., 9, 195-200, 1987

***Yersinia enterocolitica* Infection in Humans and Isolation of the Microorganism from Pigs in Japan**

T. Maruyama：Contr. Microbiol. Immunol., 9, 48-55, 1987

Widespread Occurence of the Restriction Endonuclease *Yen* I, an Isoshizomer of *Pst* I, in *Yersinia enterocolitica* Serotype O8

M. Miyahara, T. Maruyama, A. Wake, K. Mise：Appl. Environ. Microbiol., 54, 577-580, 1988

食用油脂中のクエン酸イソプロピル分析法

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，28(3)，200-204，1987

食品中のグリチルリチン酸の分析法

藤沼賢司，斉藤和夫，中里光男，菊地洋子，井部明広，二島太一郎：食品衛生学雑誌，29(3)，210-215，1988

市販食品中の Fusarium マイコトキシン汚染および調理加工による挙動

上村　尚，田端行弘，安田和男，牛山博文，橋本秀樹，西島基弘，二島太一郎：食品衛生学雑誌，28(5)，322-329，1987

輸入即席めん添付粉末スープ中のポリソルベート分析法および市販品の調査

斉藤和夫，中里光男，菊地洋子，藤沼賢司，二島太一郎：食品衛生学雑誌，28(5)，372-377，1987

アフラトキシンの食品汚染実態とその推移

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：食品衛生学雑誌，28(5)，395-401，1987

トリオレインおよびトリリノレインの揮発性通気酸化生成物

勝木康隆，松本　茂，露木英男：食品衛生学雑誌，28(6)，466-472，1987

市販食品のマイコトキシン汚染および調理加工並びに食品製造時における除去

上村　尚：マイコトキシン，26，13-16，1987

An Anti-Emetic Principle of Pinellia Tuber

T. Maki, K. Takahashi and S. Shibata：Planta Medica 53(5)，410-414，1987

Reverse-Phase Liquid Chromatographic Determination of Paraquat and Diquat in Agricultural Products

T. Nagayama, T. Maki, K. Kan, M. Iida and T. Nishima：J. Asso. Off. Anal. Chem. 70(6)，1008-1011，1987

半夏の化学

柴田承二，真木俊夫：現代東洋医学，9(2)，49-53，1988

Binding of taurocholate by pectin in the presence of calcium ions

Masamichi Koseki, Naofumi Kitabatake, Etsushiro Ooi, Tetsuko Yasuno, Shuzo Ogino, Masayoshi Kagama and Masao Doguchi：J. Food Sci. 52(6)，1744-1745，1987

熱分解ガスクロマトグラフィーによるエチレン-酢酸ビニル共重合体中の酢酸ビニルの定量

吉田令子，渡辺悠二，佐藤憲一，風間成孔：分析化学，36(12)，862-866，1987

Detection of Mutagenic Compounds in the Urise of Mice Administered Pyrene during Exposure to NO_2

Takako Kanoh, Masao Fukuda, Isao Mizoguchi, Takemi Kinouchi, Keiko Nishifuji and Yoshinari Ohnishi：Jpn. J. Cancer Res.（Gann），78，1057-1062，1987

Increased Usinary Excretion of Tryptopbon Metabolites in Rato Exposed to Nitrogen Dioxide

Takahito Suzuki, Takako Kanoh and Isao Mizoguchi：Bull. Environ. Contam. Toxicol., 40，139-146，1988

A Study of the Effects of Weather Conaitions on Mortality from Circulatory Diseases

Kuniyoshi Makino and Yutaka Inaba：Behavirmetrika, 23，21-32，1988

Chlorodibenzo-p-dioxicins in the Feral Pigeon

Masatoshi Morita, Akio Yasuhara, Hironobu Seki and

GEN Ohi：Chemosphere, 16, 1749-1752, 1987

羽毛布団使用による刺咬被害とダニ・昆虫相変化
吉川　翠：家屋害虫，33，41-46，1988

防虫紙の表面施工法によるダニ相変化
野崎喬生，吉川　翠：家屋害虫，33，37-40，1988

人体に寄生するシラミの学名について
大野正彦：家屋害虫，33，19-25，1988

チオバルビツール酸反応検出器付高速液体クロマトグラフィーによるマロンアルデヒドおよびピリミドプリノン類の分析
瀬戸　博：衛生化学，33(6)，436-441，1987

Hemagglutinating activity of Microcystis aeruginosa
Mariyo F. Watanabe, Yukie Ozawa and Shinshi Oishi：Nippon Suisann Gakkaishi, 53(9), 1643-1646, 1987

Isolation of two toxins from the blue-green alga Microcytis aeruginosa
Attaya Kungswan, Tammao Noguchi, Mariyo F. Watanabe Shigeki Matsunaga, Shugo Watabe and Kanehisa Hashimoto：Nippon Suisan Gakkaishi, 53(11), 2051-2054, 1987

Properties of two toxins from the blue-green alga Microcystis aeruginosa
Attaya kungstan, Tamao Noguchi, Mariyo F. Watanabe Shigeki Matsunaga, Shugo Watabe and Kanehisa Hashimoto：Toxicon, 26, 119-125, 1987

家庭用浄水器の細菌検査に関する一考察
古畑勝則，松本淳彦，水道協会雑誌，56，12(639)，31-39，1987

水中の有機化合物に関する研究（Ⅱ）水道水の非低沸点ヘキサン可溶中性有機ハロゲン化合物
高橋保雄，森田昌敏：水質汚濁研究，11(2)，93，1988

水中の有機化合物に関する研究（Ⅱ）水道水および水道水中の有機農薬および有機リン酸トリエステル
高橋保雄，森田昌敏：水質汚濁研究，11(3)，161，1988

高純度の水の中の生菌数測時における培養条件の検討
古畑勝則，松本淳彦：工業用水，356，28-33，1988

Effects of buthionine sulfoximine and cystein on the hepatotoxicity of butylayted hydroxytoluene in rats
Yoshio Nakagawa：*Toxicol. Letters*, 37(3), 251, 1987

Mutagenicity of Tama River Sediments
Shinshi Oishi and Osamu Takahashi：*Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 39(4), 696-700, 1987

Inhibition of Calmodulin Stimulation of Phosphodiesterase and Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase Activities and Shape Change of Erythrocyte Ghosts by Chloroquine
Fumiko Nagai, Keiko Ushiyama, Itsu Kano, Atsuko Nakagawa, Toshiko Nakao and Akira Nakajima：*Biochemical Pharmacology*, 36(20), 3433-3437, 1987

Lipid peroxidation is not the cause of lysis of human erythrocytes exposed to inorganic or methylmercury
Hisatsugu Ichikawa, Kasia Ronowicz, Mark Hicks and Janus M. Gebicki：*Arch. Biochem. Biophys.*, 259(1), 46-51,

Nephrotoxicity of butylated hydroxtoluene in phenobarbital-pretreated male rats

Yoshio Nakagawa and Kuniaki Tayama：*Arch. Toxicol.*, 61(5), 359, 1988

アルコール性肝線維症の形態学的特異性

中野雅行，中沢　功，弓野明彦，高松正人：肝臓，28(9)，1265-1266，1987

結節内出血を呈し肝切除により救命し得た非硬変肝の多発性結節性過形成病変の1例

山本雅一，高崎　建，斉藤明子，武藤晴臣，磁部義憲，済陽高穂，田中精一，富松昌彦，小林誠一郎，中野雅行：肝臓，29(1)，98-103，1988

自己免疫性肝炎の3男性例

土屋公明，清沢研道，袖山　健，宜保行雄，今井明彦，古田　清，早田卓郎，古田精市，赤羽賢浩，加藤正裕，中野雅行：信州医誌，36(2)，267-277，1988

母児ともに救命しえた急性妊娠性脂肪肝の2症例

植村一幸，吉沢　要，田中栄司，須原　聡，袖山　健，宜保行雄，今井康晴，土屋公明，依田英俊，大池淑元，薮　剛爾，清沢研道，古田精市，中野雅行，北原毅人，冨田和彦，福田　透：信州医誌，36(2)，279-288，1988

アルコール性肝線維症の形態学的特徴ー特に非A非B肝炎と比較して

中野雅行，中沢　功，弓野明彦，高松正人：アルコール代謝と肝，7，203-211，1988

Thermophilic Campylobacter in seagulls and DNA-DNA hybridization test of isolates

C. Kaneuchi, T. Imaizumi, Y. Sugiyama, Y. Kosako, M. Seki, T. Itoh and M. Ogata：The Japanese Journal of Veterinary Science, 49(5), 787-794, 1987

市販食肉および食肉店舗や食鳥処理場の環境における Campylobacter の汚染状況ならびに分離菌株の血清型に関する研究

伊藤　武，高橋正樹，斉藤香彦，柳川義勢，甲斐明美，大橋　誠：感染症学雑誌，62(1)，17-25，1988

食中毒起因細菌に及ぼすクエン酸のコール酸共存下における抗菌作用

能勢征子，平田一郎，新井輝義，太田建爾，坂井千三：食品衛生学雑誌，29(1)，38-46，1988

食肉中のニコチン酸及びニコチン酸アミド分析法およびそれらの保存中の変化

大石充男，天川映子，荻原　勉，田口信夫，大西和夫，西島基弘：食品衛生学雑誌，29(1)，32-27，1988

総説・解説

下痢症の細菌検査

工藤泰雄：モダンメディア，33，386-398，1987

腸炎ビブリオ

工藤泰雄：臨床と微生物，15，79-82，1988

海外旅行と細菌性食中毒

工藤泰雄：MEDICO，19，8164-8166，1988

市販そう菜での食中毒の心配

太田建爾：食べもの通信，207，24，1988

ハンカチは毎日とりかえさせよう

潮田　弘：保健教材ニュース，1238，1-2，1988

身近な食品にもある食中毒の危険性
潮田　弘：学校保健ニュース，793，1-3，1988

食品汚染カビの検査法
一戸正勝，諸角　聖：フードケミカル，5，48-57，1988

市販食品のカビ汚染とその防除対策について
諸角　聖：フードケミカル，5，30-39，1988

食品衛生検査におけるクロストリジア測定用培地について
小久保彌太郎：メディヤサークル，32(11)，473-479，1987

Yersinia enterocolitica および ***Yersinia pseudotuberculosis*** の培養特性と病原性状
金子誠二：獣医畜産新報，No. 796，8-11，1987

人における ***Yersinia pseudotuberculosis*** 感染症と疫学
丸山　務，坪倉　操：モダンメディア，33，333-335，1987

病原性エルシニア菌の生態と感染症
丸山　務：獣医畜産新報，No. 796，5-7，1987

食品衛生からみた食鳥および食鳥肉の問題点
丸山　務：フォーナス，7，1-4，1987

エルシニア属菌の型別
丸山　務：臨床と微生物，15，75-78，1988

成形パップ剤の GMP と安定性試験
風間成孔：Ther. Res. 8(1)，259，1988

大気汚染による生体影響
加納堯子：都薬雑誌，9(11)，9-19，1987

カワウにおける重金属汚染ーとくに**Pb. Cd** および **Cr** について
佐藤孝二，関比呂伸：応用鳥学集報，7，65-69，1987

清流の復活に関する研究（その3）野火止用水の水生生物
若林明子，川原　浩，大野正彦，伊東戡弘，上杉俊和：東京都環境科学研究所年報，134-139，1987

ツメダニの発生をいかに予防するか
吉川　翠：Tokyo Pest Control, 14(4)，9-16，1988

暖房設備とダニの発生
吉川　翠：住宅設備，9(3)，32-36，1988

家屋内のダニ
吉川　翠：月刊消費者，343(3)，15-16，1988

安全な水を飲むために
笹野英雄：都薬雑誌，10(6)，21-27，1988

一般生活環境汚染と肝障害，身近に存在する肝毒性物質
中野雅行：医学のあゆみ，145(10)，681-683，1988

食品衛生におけるカンピロバクター
伊藤　武：食品と微生物，4(1)，10-24，1987

カンピロバクターの血清型別試験
伊藤　武，新垣正夫，高橋正樹，斉藤香彦：臨床と微生物，15(1)，88-96，1988

新しく発見された**Campylobacter pylori**と消化性潰瘍・胃炎との関連について
伊藤　武：モダンメディア，33(2)，661-671，1987

新しく認識された**Verocytotoxin**産生大腸菌による感染と本菌の病原性に関する研究の現況
伊藤　武，甲斐明美：モダンメディア，34(5)，240-251，1988

食品工場における衛生管理
池島伸至：食品と科学，30(6)，118-123，1987

黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型別
寺山　武：臨床と微生物，15(1)，10-15，1988

診断が困難な食中毒(2)エルシニア・エンテロコリチカ食中毒
寺山　武：日本医師会雑誌，99(1)，1897-1900，1988

学　会　発　表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1987.7—1988.6)

学会発表

海田茂典，宮田敏行，川畑俊一郎，森田隆司，吉沢幸夫，五十嵐英夫，岩永貞昭：**黄色ブドウ球菌（BB株と213株）のスタフィロコアグラーゼ遺伝子のフローニングと構造解析**
第34回毒素シンポジウム（1987.7）

A. Kai, T. Itoh, S. Yamada, Y. Kudoh and M. Ohashi：**Purification and characterization of verocytotoxin produced by *Escherichia coli* O145：NM**
An International symposium and workshop on verocytotoxin producing Escherichia coli infection（1987.7）

T. Itoh, A. Kai, Y. Kudoh, M. Ohashi and K. Fukai：**Experimental infection of rabbits with verocytotoxin producing *Escherichia coli* O145：NM**
An International symposium and workshop on verocytotoxin producing Escherichia coli infection（1987.7）

Y. Kudoh, A. Kai, S. Yamada, T. Itoh and M. Ohashi：**Detection of verocytotoxin produced by *Escherichia coli* O145：NM with reversed passive latex agglutination test**
The 23rd Joint Conference, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel（1987.11）

諸角　聖，和宇慶朝昭，工藤泰雄，一言　広：**トリコテセン系赤カビ毒産生用合成培地の検討**
第8回食品衛生微生物研究会学術講演会（1987.10）

M. Ohashi：**Laboratory aspects of gastrointestinal infections in Japan**
International Symposium on Infectious Diseases（1987.11）

宇都宮啓，大橋　誠：**郵送調査法によるわが国伝染病統計の実情について**
第46回日本公衆衛生学会総会（1987.11）

潮田　弘，五十嵐英夫，藤川　浩，工藤泰雄，寺山武：**黄色ブドウ球菌の各種性状とコアグラーゼ型との関連性**
第32回ブドウ球菌研究会（1987.11）

H. Igarashi, H. Fujikawa and H. Usami：**Effects of drugs on pyrogenicity and capacity to enhance host susceptibility to lethal endotoxin shock in rabbits by TSST-1**
International Symposium on Toxic Shock Syndrome（1987.11）

H. Igarashi, H. Fujikawa and H. Ushioda：**Studies on *S. aureus* isolated from TSS and suspected TSS patients in Japan**
International Symposium on Toxic Shock Syndrome（1987.11）

M. Ohashi：**Current status of antimicrobial resistance, antibiotic sensitivity testing and information system in Japan**
Meeting of Working Group on Regional Information Network on Antimicrobial Resistance（1987.12）

M. Ohashi：**Development of computer-supported surveillance systems for infectious disease control and the role of SEAMIC**
The 15th SEAMIC Workshop "The Computer-Supported Surveillance System in Infectious Disease Control（1988.2）

山田澄夫，甲斐明美，伊藤　武，工藤泰雄，大橋　誠：**大腸菌0145：NMの産生するVerocytotoxinの性状について（続）**
第61回日本細菌学会総会（1988.4）

甲斐明美，山田澄夫，伊藤　武，工藤泰雄，大橋　誠：**大腸菌が産生する Verocytotoxin の逆受身ラテックス凝集反応による検出法の検討とその応用**
第61回日本細菌学会総会（1988.4）

新垣正夫，伊藤　武，高橋正樹，柳川義勢，工藤泰雄，大橋　誠：***Yersinia enterocolitica* の産生するウレアーゼの免疫学的特異性について**
第61回日本細菌学会総会（1988.4）

大橋　誠：**細菌学領域における国際交流ーSEAMIC 感染症データ交換事業ー**
第61回日本細菌学会総会（1988.4）

工藤泰雄：**食中毒細菌の自然界における分布とその病原性ー病原ビブリオを中心としてー**
第61回日本細菌学会総会（1988.4）

潮田　弘，五十嵐英夫，藤川　浩，工藤泰雄，寺山武：**黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型と各種性状との関連性について**
第61回日本細菌学会総会（1988.4）

大谷　剛，中島良平，石田佳久，采　猛，五十嵐英夫，長田恭明：***Staphylococcal enterotoxin* A の感染抵抗性増強作用の解析**
第61回日本細菌学会総会（1988.4）

内山竹彦，青塚新一，斉藤慎二，厳　小傑，今西健一，荒明美奈子，打林明子，河内　章，藤川　浩，五十嵐英夫，熊沢義雄：**Toxic shock syndrome toxin-1 によるヒト末梢血細胞からのインターロイキン1産生の誘導**
第61回日本細菌学会総会（1988.4）

厳　小傑，内山竹彦，今西健一，斉藤慎二，打林明子，河内　章，藤川　浩，五十嵐英夫：**Toxic shock syndrome toxin-1（TSST-1）のマウス抗体産生反応に及ぼす影響**
第61回日本細菌学会総会（1988.4）

藤川　浩，高山博夫，内山竹彦，五十嵐英夫：**Toxic shock syndrome toxin-1 およびブドウ球菌エンテロトキシン A, B, C のウサギリンパ球に対する生物学的作用**
第61回日本細菌学会総会（1988.4）

松下　秀，山田澄夫，工藤泰雄，大橋　誠：***Shigella dysenteriae* の新血清型**
第61回日本細菌学会総会（1988.4）

高橋正樹，柳川義勢，甲斐明美，斎藤香彦，伊藤　武，工藤泰雄，大橋　誠：***Campylobacter fetus* ssp *fetus* の菌体表層抗原の免疫学的検討と同定への応用**
第62回日本感染症学会総会（1988.4）

熊坂一成，工藤泰雄，大橋　誠，河野均也：**微生物学検査外部精度管理の現状と問題点ー東京都精度管理調査の紹介を中心にー**
第62回日本感染症学会総会（1988.4）

北原　弘，田中久夫，斉藤和雄，金光岳文，丹羽伊知郎，横田隆夫，山下亮子，小佐野　満，五十嵐英夫：**入院患児鼻前庭黄色ブドウ球菌の変動に対する病棟スタッフ鼻前庭黄色ブドウ球菌と抗生物質の影響**
第62回日本感染症学会総会（1988.4）

松下　秀，山田澄夫，津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：**血清型 O121：H- をもつ組織侵入性大腸菌による輸入下痢症例**
第62回日本感染症学会総会（1988.4）

大橋　誠：**東南アジアにおける腸管感染症の現況**
第58回日本細菌学会関東支部総会（1988.4）

楠　淳，伊藤　武，高橋正樹，柳川義勢，太田建爾，工藤泰雄，大橋　誠，堀内三吉，中谷林太郎：***Salmonella typhimurium*** **の保有プラスミッドとその疫学解析への応用**
第62回日本感染症学会総会（1988.4）

宮原美知子，三瀬勝利，工藤泰雄，大橋　誠：***Salmonella thompson*** **と** ***Salmonella infantis*** **からの制限酵素検出とその精製**
日本薬学会108年会（1988.4）

橋本　篤，寺内　敦，本多太次郎，五十嵐英夫，清水賢：**寒天平板上の細菌と乾燥状態における細菌に及ぼす遠赤外線による殺菌効果の比較**
第35回日本食品工業学会（1988.4）

橋本　篤，寺内　敦，本多太次郎，清水　賢，五十嵐英夫：**遠赤外線照射による殺菌効果ー照射距離および放射体の種類の影響ー**
化学工学協会第53年会（1988.4）

和宇慶朝昭，諸角　聖：**東京都における真菌による苦情届出食品について**
日本菌学会関東支部昭和63年度大会（1988.4）

村田以和夫：**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**
昭和62年度日本獣医公衆衛生学会年次総会（1988.2）

林　志直：**東京都におけるエンテロウイルス分離状況**
関東甲信静地研第2回ウイルス研究会（1987.7）

矢野一好，吉田靖子，寺山　武：**河川水からのエンテロウイルス検出方法**
関東甲信静地研第2回ウイルス研究会（1987.7）

伊藤忠彦，山崎　清，中村清純，新開敬行，坂井冨士子，寺山　武，藪内　清，大橋　誠，松井孝輔：**東京都多摩地区に発生したツツガ虫病の一症例および同地区における野鼠の Rt 汚染状況**
第36回日本感染症学会東日本地方会（1987.11）

山崎　清，伊藤忠彦，中村清純，新開敬行，坂井冨士子，寺山　武，藪内　清，大橋　誠，林　績，林田　陽，三井田建城，村田三紗子，中島達也，松井孝輔：**多摩地区における野鼠のツツガ虫病リケッチア汚染状況およびツツガ虫病の一症状**
第79回東京都衛生局学会（1987.11）

山上哲史，鈴木理香，磯田政恵，杉山公宏，梅田昌樹，伊藤忠彦：***Rickettia tsutsugamushi*** **の病原性に関する研究（古典的及び新型ツツガムシ病分離株のマウスに対する病原性の比較）第1報血液学的考察**
第3回日本獣医畜産大学学会（1987.11）

岩崎辰夫，南谷幹夫，今川八束，山口　剛，新田義郎，杉浦昌也，杉本　裕，三木　隆：**東京地方における HIV-1 抗体陽性者の疫学的調査研究**
エイズ研究会第1回学術集会（1987.12）

中山哲夫，浦野　隆，林　志直，関根整治，安東民衛，牧野　慧：***Coxsackie virus B3*** **の施設内流行**
第62回日本感染症学会総会（1988.4）

大貫奈穂美，中村清純，藪内　清，三木　隆，大橋誠，石川晃一，速水正憲：**都内保健所 AIDS 抗体検査受診者における HIV-2 抗体保有調査**
第62回日本感染症学会総会（1988.4）

渡辺民彦，藤巻直毅，仁科彰則，橋本憲一，福山孝穂，花岡　暐，杉浦英俊，長良健次，吉川　翠，大野正彦，伊藤忠彦，山崎　清：**五日市，福生保健所管内の野ネズミとツツガムシの実態調査（第2報）**
第80回東京都衛生局学会（1988.5）

関根整治：**東京都でウイルス性胃腸炎が疑われた事件の発生状況**
関東甲信静地研第3回ウイルス研究会（1988.5）

林　志直，関根整治，安東民衛，岡田正次郎，宇田川悦子，山崎修道：**Western Blott 法による Small round structured virus（SRSV）関連蛋白質の検出**
第29回日本臨床ウイルス学会（1988.6）

宇田川悦子，山崎修道，安東民衛，林　志直，関根整治，岡田正次郎：**Western Blott 法を用いた Small round structured virus（SRSV）抗原の血清学的研究**
第29回日本臨床ウイルス学会（1988.6）

瀬戸隆子，安田一郎，浜野朋子，高野伊知郎，秋山和幸：**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 O-Methyldomesticine の定量**
第24回全国衛生化学技術協議会年会（1987.10）

浜野朋子，高野伊知郎，安田一郎，瀬戸隆子，秋山和幸：**無承認無許可医薬品中の生薬成分ベルゲニンの試験法について**
第24回全国衛生化学技術協議会年会（1987.10）

安田一郎，浜野朋子，高野伊知郎，瀬戸隆子，秋山和幸：**無承認無許可医薬品中の生薬成分マトリンの試験法について**
第24回全国衛生化学技術協議会年会（1987.10）

高野伊知郎，安田一郎，浜野朋子，瀬戸隆子，秋山和幸：**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**
第24回全国衛生化学技術協議会年会（1987.10）

糸川秀治，竹谷孝一，泉　宏昌，渡辺謹三，森田博史，佐竹元吉，安田一郎，三川　潮，持留万里夫，塩田哲夫，橋本悟郎：**南米の生薬市場とその抗腫瘍活性スクリーニング**
日本生薬学会第34回年会（1987.10）

安田一郎：**ビャクジュツ，ソウジュツの化学**
日本生薬学会関東支部会（1987.10）

浅水哲也，安田一郎：**Agrobacterium rhizogenes の保持する Ri プラスミドによる薬用植物の形質転換及び有用物質の生産**
日本薬学会北陸支部第73回例会（1987.11）

浜野朋子，高野伊知郎，安田一郎，瀬戸隆子，秋山和幸：**アカメガシワにおけるベルゲニンの分布と季節変動**
日本薬学会第108年会（1988.4）

上原真一，安田一郎，竹谷孝一，糸川秀治：**インドネシア産生薬 Temu Lawak の成分研究（Ⅳ）ービサボラン型セスキテルペノイドー**
日本薬学会第108年会（1988.4）

浅水哲也，安田一郎，秋山和幸，下村講一郎，佐竹元吉：**Agrobacterium rhizogenes の保持する Ri プラスミドによる薬用植物の形質転換および有用物質の生産**
日本薬学会第108年会（1988.4）

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，道口正雄：**ジゴキシン錠の溶出試験・水溶出-HPLC 法の試み**
日本薬学会第108年会（1988.4）

鎌田国広，萩原輝彦，高橋美佐子，上原真一，中山京子，秋山和幸：**インドメタシン坐剤の分解物について**
日本薬学会第108年会（1988.4）

浅水哲也，秋山和幸，安田一郎：**形質転換薬用植物の有用物質の生産　エビスグサの毛状根培養と Anthra-**

quinone 類の生産
日本植物学会北陸支部63年度例会（1988.5）

植田忠彦，五十嵐脩：**高速液体クロマトグラフィーによるビタミン E 定量における試料中脂質の影響**
第36回日本分析化学会（1987.10）

竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：**電子捕獲検出ガスクロマトグラフィーの応答のガス流量特性**
第36回日本分析化学会（1987.10）

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海水中のトリブチルスズ化合物の定量**
第36回日本分析化学会（1987.10）

鈴木助治，金子正美，森謙一郎，中村義昭，渡辺四男也：**家庭用エアゾール製品中のホルムアルデヒドの定量**
日本薬学会第108年会（1988.4）

中村　弘，観　照雄，岸本清子，雨宮　敬，池田一夫，伊藤弘一，渡辺四男也：**アロエ配合化粧品中のアロエ成分の分離確認**
日本薬学会第108年会（1988.4）

植田忠彦，五十嵐脩：**d-α-Tocopherol の経飼料投与によるラット臓器内濃度**
第42回日本栄養食料学会（1988.5）

M. Takeuchi, K. Mizuishi, H. Yamanobe and Y. Watanabe：**Determination of Tributyltin Compounds in Sea Water**
The 8th International Symposium on Envirinmental Pollution（1988.6）

金子誠二，小久保彌太郎，丸山　務：**イムノドットブロッティングを用いた病原性 *Yersinia* 属菌の迅速検出法**
第104回日本獣医学会（1987.8）

神崎政子，丸山　務，平田一郎，太田建爾：**ドブネズミにおける腸炎ビブリオの保菌について**
第104回日本獣医学会（1987.8）

福田　豊，竹重都子，島崎秀雄，斉藤維雅，神崎政子，丸山　務：**犬および猫におけるエルシニア菌の保菌状況と糞便中での生存について**
昭和62年度日本獣医公衆衛生学会（1987.9）

橋口　衛，久山登美雄，佐藤　剛，丸山　務，神崎政子：**ネコの咬傷に起因する化膿巣から分離される病原菌について**
昭和62年度日本臨床獣医学会（1987.9）

竹葉和江，村上文子，松本昌雄，中沢裕之：**市販チーズ中のチラミンの高速液体クロマトグラフィーによる分析**
第54回日本食品衛生学会（1987.10）

桐谷礼子，神保勝彦，松本昌雄：**バイオアッセーによる残留抗生物質検査法の基礎的検討**
第54回日本食品衛生学会（1987.10）

嶋田　暁，沢田明彦，斉藤　修，安部勇三，金子誠二，小久保彌太郎：**ローストビーフの製造加工時におけるウェルシュ菌の制御について**
第 8 回食品衛生微生物研究会（1987.10）

金子誠二，丸山　務：**病原性プラスミド保有 *Yersinia enterocolitica* および *Yersinia pseudotuberculosis* の酵素抗体法による検出について**
第58回日本細菌学会関東支部総会（1987.10）

金子誠二，小久保彌太郎，丸山　務：**酵素抗体法を用いた病原性 *Yersinia* 属菌のウシおよびブタからの分離について**
第105回日本獣医学会（1988.4）

梅木富士郎，神崎政子，丸山　務：**乳，乳製品を対象としたリステリア菌検査法の基礎的検討**
第55回日本食品衛生学会（1988.5）

小久保彌太郎，金子誠二，丸山　務，松本昌雄，中嶋誠，中島誠人：**牛および豚におけるウェルシュ菌の保菌実態と分離菌株の薬剤感受性**
第55回日本食品衛生学会（1988.5）

神保勝彦，百瀬礼子，丸山　務，松本昌雄：**畜水産食品中における残留抗菌性物質の簡易分別推定法とその応用**
第55回日本食品衛生学会（1988.5）

丸山　務：**腸管系病原菌：近年の展望，Yersinia**
第59回日本細菌学会関東支部総会（1988.6）

Hisashi Kamimura：**Simple and Rapid Cleanup Method for Analysis of Mycotoxins, and Fate of Mycotoxins Oil-Refining Process**
The First China-Japan International Congress of Mycology（1987.8）

上村　尚：**市販食品のマイコトキシン汚染および調理加工並びに食品製造時における除去**
第26回マイコトキシン研究会（1987.9）

藤沼賢司，斉藤和夫，中里光男，菊地洋子，井部明広，二島太一郎：**HPLC の食品分析への応用ーステビア甘味料およびグリチルリチン酸ー**
第24回全国衛生化学技術協議会年会（1987.10）

永山敏廣，真木俊夫，飯田真美，観　公子，二島太一郎：**HPLC の食品分析への応用ー穀類中のカーバメイト系農薬ー**
第24回全国衛生化学技術協議会年会（1987.10）

永山敏廣，真木俊夫，観　公子，飯田真美，二島太一郎：**野菜類及び果実類の調理，加工に伴う残留農薬の消長**
第11回農薬残留分析研究会（1987.10）

真木俊夫，観　公子，永山敏廣，飯田真美，二島太一郎：**過去17年間のキノコ中毒事例**
第２回中毒研究会東日本部会（1988.1）

斉藤和夫，西島基弘，宮崎利夫：**雷丸の水不溶グルカンの構造について**
日本薬学会第108年会（1988.4）

安田和男，別府正敏，菊川清見：**脂質過酸化に対するラクトフェリンの促進作用**
日本薬学会第108年会（1988.4）

守安貴子，斉藤和夫，中里光男，菊地洋子，藤沼賢司，二島太一郎：**食品中の甘味料に関する研究（第４報）清涼飲料水中のアセスルファムＫ，サッカリンおよびアスパルテームの同時分析法**
日本食品衛生学会第55回学術講演会（1988.5）

観　公子，真木俊夫，永山敏廣，飯田真美，川合由華，二島太一郎，吉沢政夫，田中　博：**有毒植物花粉の電顕的検索法**
第55回日本食品衛生学会（1988.5）

中島和雄，風間成孔，内海英雄，濱田　昭：**トコフェロールによるレシチンリポソーム膜の相変化**
第60回日本生化学会（1987.10）

中島和雄，風間成孔，内海英雄，濱田　昭：トコフェロールによるモデル膜のヘキサゴナル相の誘導
第108回日本薬学会（1988.4）

広門雅子，中島和雄，植松洋子，高橋　巌，松井敬子，風間成孔：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
第54回日本食品衛生学会（1987.10）

植松洋子，広門雅子，中島和雄，高橋　巌，松井敬子，風間成孔：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
第24回全国衛生化学技術協議会年会（1987.10）

平田恵子，大西和夫，西島基弘，梨田智子，宇田　裕：酵素法による食品中シアン配糖体の定量
第108回日本薬学会（1988.4）

川島満春美，牛尾房雄，船山恵市，笠原利英，坂牧成恵，友松俊夫，臼井史生，椎野　功，鶴見田鶴子，田中明：日常食における栄養摂取量について
第80回東京都衛生局学会（1988.5）

加納堯子，福田雅夫，溝口　勲，木内武美，西藤佳子，大西克成：NO_2 暴露下でピレンを投与されたマウス尿からの変異原物質の検出
第28回大気汚染学会（1987.10）

鈴木孝人，池田真悟，加納堯子：ディーゼル排気ガスによる肺胞マクロファージの防御機能におよぼす影響
第28回大気汚染学会（1987.10）

渡辺伸枝，大沢誠喜，池田真悟，鈴木孝人：ディーゼル排気ガス暴露の新生児ラットの肺におよぼす影響
第28回大気汚染学会（1987.10）

牧野国義，池田真悟，鈴木孝人，加納堯子：ATS-DLD 質問票から得られた学童の呼吸器症状有症率の関連要因について
第28回大気汚染学会（1987.10）

佐々木憲二，木下真男，渡辺伸枝，池田真悟，大沢誠喜，鈴木孝人，溝口　勲：ラットにおける希釈ディーゼルエンジン排ガス暴露のガス交換への影響
第28回大気汚染学会（1987.10）

大野正彦：多摩川の河川敷で採取したユスリカ成虫相
第47回日本昆虫学会（1987.10）

関比呂伸，加納堯子，大井　玄：鳩を生物指標とした東京都の鉛汚染のモニタリング
第46回日本公衆衛生学会（1987.11）

吉川　翠：殺虫剤散布法および加熱乾燥法によるツメダニの予防効果（Ⅱ）
第46回日本公衆衛生学会（1987.11）

大野正彦：東京都町田市で捕獲したネズミに寄生していたツツガムシ類
第46回日本公衆衛生学会（1987.11）

牧野国義，稲葉　裕：東京都区部における部位別がん死亡率の地理的分布および時系列に関する検討
第58回日本衛生学会（1988.3）

山岡和枝，牧野国義，山本幹夫：中高年者受療率の都道府県較差について
第58回日本衛生学会（1988.3）

瀬戸　博：ホルマリン固定肺臓中の残留多環芳香属炭化水素および沈着炭素粉の測定
第58回日本衛生学会（1988.3）

渡辺真利代，大石真之，原田健一，松浦憲治，鈴木真言：**Microcystis 属の毒素**
日本陸水学会第52回大会（1987.10）

大橋則雄，西島基弘，渡辺　学，及川直子，新井富子，小島康平：**渓流水中のトリハロメタン（THM）前駆物質の研究　I　緩速ろ過砂中の THM 前駆物質の性状**
日本陸水学会第52回大会（1987.10）

A. Matumoto and Y. Tsuchiya：**Earthy-musty odor prducing cyanophytes isolated from six water sites in Tokyo**
Second International Symposium on Off-flavours in The aquatic Environment（1987.10）

Y. Tsuchiya and A. Matsumoto：**Identification of Volatile Metabolites produced by Blue-green Algae Second International**
Symposium on Off-flavours in The Aquatic Environment（1987.10）

松本淳彦，笹野英雄：**飲料用高置水槽（FRP）に増殖する藻類とその対策**
第46回日本公衆衛生学会（1987.11）

古畑勝則，松本淳彦：**水環境から分離される Yersinia 属菌について**
第46回日本公衆衛生学会（1987.11）

高橋保雄，笹野英雄，森田昌敏：**浄水処理過程における疎水性有機物群の動向**
第22回水質汚濁学会（1988.3）

土屋悦輝，渡辺真利代：**藍藻 Microcyctis の産生する揮発性物質について**
日本薬学会第108年会（1988.4）

原田健一，松浦憲治，鈴木真言，渡辺真利代，A. M. Dahlem, V. R. Beasley, W. W. Carmichael：**Toxic peptides from four different Microcystis strains**
第16回天然物化学国際会議（1988.6）

Hisatsugu Ichikawa, Hiroyoshi Kobayashi and Tadahiko Ueta：**Effects of Oleamide on the Hemolysis in Young Rats**
Xth International Congress of Pharmacology（1987.8）

牛山慶子，中川敦子，長井二三子，佐藤かな子，加納いつ：**オルトフェニルフェノール水酸化酵素について**
第60回日本生化学会大会（1987.10）

中川敦子，長井二三子，佐藤かな子，牛山慶子，加納いつ：**アデニレートシラーゼに対するタングステンの作用**
第60回日本生化学会大会（1987.10）

Kanako Satoh, Fumiko Nagai, Keiko Ushiyama, Itsu Kano, Atsuko Nakagawa and Toshiko Nakao：**A Monoclonal Antibody Against Horse Kidney Na^+, K^+-ATPase**
The Japanese-United States Congress of Pharmaceutical Sciences 1987（1987.12）

Yoshio Nakagawa, Kuniaki Tayama, Sumiko Tayama Hisatsugu Ichikawa：**Hepatotoxic or nephrotoxic potential of orthophenylphenol（OPP）in male rats**
2nd International ISSX Meeting "Xenobiotic Metabolism and Disposition"（1988.5）

神谷信行，中川好男，三栗谷久敏，中野雅行，市川久次，佐々木美枝子：**都立衛生研究所毒性試験システム**
第79回東京都衛生局学会（1987.11）

富松昌彦，橋本悦子，奥田博明，斉藤明子，久満薫樹，

小幡　裕，中野雅行：**肝線維症に発生した肝血管肉腫と肝細胞癌の重複腫瘍の1例**
第22回日本肝臓学会東部会（1987.10）

天川映子，大西和夫，西島基弘：**食品中の二酸化チタン比色定量法の改良**
第54回日本食品衛生学会（1987.10）

田口信夫，天川映子，大西和夫，西島基弘，鈴木雅子，宮沢文雄：**生鮮野菜等に使用されたリン酸の簡易検査法**
第54回日本食品衛生学会（1987.10）

栃本　博，有賀孝成，押田裕子，西島基弘：**河川の重金属汚染の指標としてのヒゲナガカワトビケラに関する研究（第3報）Stenopsyche marmorata およびその生息環境中の重金属含有量**
第52回日本陸水学会（1987.10）

大橋則雄，西島基弘，渡辺　学，及川直子，新井富子，小島康平：**渓流中のトリハロメタン前駆物質の研究1 緩速ろ過砂中のトリハロメタン（THM）前駆物質への性状**
第52回日本陸水学会（1987.10）

人見達雄，山口昌彦，宇田川隆男，牧　倫郎，有賀孝成，押田裕子，上原一途，大関哲也，高木真一，山下征洋，平田二郎：**テトラクロロエチレン排水の簡易測定法の検討**
第79回東京都衛生局学会（1987.11）

矢口久美子，渡辺　学，伊藤　武，平田一郎，内海英雄，浜田　昭：**テトラクロロエチレンの生分解**
第22回水質汚濁学会（1988.3）

大石充男，大西和夫，西島基弘，中込和哉，滝沢美保子，中澤裕之：**ショ糖脂肪酸エステルの抗酸化作用および抗酸化剤との相乗効果**
日本薬学会第108年会（1988.4）

近藤　透，坂本　毅，横田忠郎，木村豊彦，中島貞夫，吉岡　毅，有賀孝成，栃本　博，押田裕子：**クリーニング所排水に含まれるテトラクロロエチレン等塩素系有機溶剤の簡易曝気装置による低減化**
第80回東京都衛生局学会（1988.5）

宇田川隆男，人見達雄，山口昌彦，高木　真，上原一途，平田二郎，有賀孝成，栃本　博，押田裕子：**ドライクリーニング機排水の実態調査（その2）活性炭式排液処理装置の問題点と改善例**
第80回東京都衛生局学会（1988.5）

高木真一，上原一途，平田二郎，宇田川隆男，人見達雄，山口昌彦，有賀孝成，栃本　博，押田裕子：**ドライクリーニング機排水の実態調査（その1）テトラクロロエチレンの使用実態とその挙動**
第80回東京都衛生局学会（1988.5）

T. Itoh, M. Shingaki, M. Takahashi, Y. Yanagawa, A. Kai, Y. Kudoh, M. Ohashi and G. Hamana：**Identification of C. pyloridis by detecting its specific urease**
Fifth International Workshop on Campylobacter Infections（1987.6）

楠くみ子，新井輝義，平田一郎，池島伸至，太田建爾，坂井千三：**コンニャクの軟化剝離現象に関する細菌学的検討**
第8回食品微生物研究会（1987.10）

伊藤　武，神真知子，鈴木敬子，入倉善久，榎田隆一，柳川義勢：**カンピロバクターの生存増殖に及ぼす有機酸の影響**
第8回食品微生物研究会（1987.10）

平田一郎，鈴木敬子，榎田隆一，入倉善久，太田建爾

：東京都下の河川における病原ビブリオの分布
第21回腸炎ビブリオシンポジウム（1987.10）

伊藤　武：シンポジウム　食肉微生物管理　食肉・肉製品と細菌性食中毒
食肉生産技術研究会（1988.2）

伊藤　武，新垣正夫：シンポジウム　病原微生物の評価をめぐって　**Campylobacter pylori** の細菌学
第61回日本細菌学会総会（1988.4）

堀内三吉，稲垣好雄，中谷林太郎，楠　淳，伊藤　武，大橋　誠：ヒト由来サルモネラ（1966～1986）の薬剤耐性と接合性 **R** プラスミド　特に1984～1986年分離株について
第62回日本感染症学会総会（1988.4）

堀内三吉，稲垣好雄，中谷林太郎，楠　淳，伊藤　武，大橋　誠：最近分離される **Salmonella typhimurium** の **R** プラスミドの耐性型と **DNA** の制限パターンの特徴
第62回日本感染症学会総会（1988.4）

鈴木敬子，平田一郎，伊藤　武，寺山　武，太田建爾：過去10年間の東京都多摩地域における梅毒血清反応検査成績
第62回日本感染症学会総会（1988.4）

T. Itoh, M. Shingaki, M. Ohashi and G. Hamana：**Human antibody response to the urease of Campylobacter pylori in the patients with gastritis and peptic ulcers**
The First Tokyo International Symposium on Campylobacter pylori（1988.5）

伊藤　武：シンポジウム　腸管病原菌，近年の展望 **Campylobacter**
第59回日本細菌学会関東支部総会（1988.6）

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

藪内　清（委員長）
木村純一
太田建爾
渡辺四男也
丸山　務
風間成孔
西島基弘
笹野英雄
市川久次
中野雅行
伊藤　武

1988年12月2日　発行

規格表　第2類
印刷番号(63)543
刊行物番号(H)24

東京都立衛生研究所研究年報第39号

編集
発行　：　東京都立衛生研究所
〒169 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)