ISSN 0082−4771
CODEN : TRENAF

K131e

東京都立衛生研究所

研究年報

ANNUAL REPORT
OF
THE TOKYO METROPOLITAN RESEARCH
LABORATORY OF PUBLIC HEALTH

40

1989

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

序

東京都立衛生研究所は，昭和24年３月，既存の６つの衛生検査機関（衛生試験所，衛生検査所，細菌検査所，獣疫検査所，製薬研究所及び血漿研究所）を統合して設立されました。それぞれの時代の要請に応え，東京都の衛生行政を科学的，技術的に支える重要な役割を果たしてきました。設立当初は，試験・検査が当所の業務の大部分を占めていましたが，その後社会情勢が大きく変貌するなかで，先行調査や基礎的な研究などに積極的な姿勢が求められるようになり，今では，試験検査，調査研究，研修指導及び公衆衛生情報活動の４つの機能を兼ね備えた，衛生問題に係わる総合的な検査室サービス・センターを目指すまでに成長しました。

当研究所では感染症予防，薬事衛生，食品衛生，栄養，環境衛生，毒性研究など様々な分野の業務と取組んでいますが，近年，いずれの分野においても取上げるべき対象がますます幅広くなり，技術も高度なものが要求されるようになってきています。今後も変遷して止まないであろう社会情勢に柔軟に，また迅速に対応できるよう，一段と機能の充実を図っていきたいと思います。幸いなことに，「第二次東京都長期計画」の中で，衛生研究所の改築，整備が具体化され，業務の効率化，高度化が図られることとなりました。基礎調査を終え，今や基本構想のまとめの時期に至っております。職員一同，21世紀に向けての衛生研究所の在り方を胸に秘めながら，業務の遂行に努めているところであります。

ここにお届けする研究年報第40号にその足跡の一端をお読みいただければ幸いであります。忌憚のない御批判，御助言を賜りますようお願い申しあげます。

1989 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

コアグラーゼⅧ型ブドウ球菌の分布とそのエンテロトキシン産生性
……潮田　弘，藤川　浩，五十嵐英夫，丸山　務，工藤　泰雄…… 1

Campylobacter jejuni のサルに対する経口感染実験
……柳川　義勢，伊藤　武，斎藤　香彦，高橋　正樹，中村　明子
鈴木　健之，藤原　徹，桑原　金治，工藤　泰雄，大橋　誠…… 6

カンピロバクター・ジェジュニとカンピロバクター・コリーの鑑別に用いられる
馬尿酸塩加水分解試験の簡易・迅速化
……飯田　孝，神崎　政子，丸山　務…… 12

食肉からのサルモネラの検出と分離菌株の薬剤感受性（1983－1987年の5年間の成績）
……金子　誠二，小久保彌太郎，丸山　務…… 16

梅毒血清反応スクリーニングテストとしての Rapid Plasma Reagin Card Test（RPR カードテスト）の評価
……鈴木　敬子，平田　一郎，榎田　隆一，伊藤　武，寺山　武…… 22

マガキに添加したポリオウイルスのカチオン性高分子化合物による回収実験
……矢野　一好，吉田　靖子，藪内　清…… 26

東京都における風疹抗体保有状況（1982－1988年）
……吉田　靖子，矢野　一好，藪内　清…… 32

東京都内のインフルエンザ検索成績（1988年11月－1989年4月）
……山崎　清，伊藤　忠彦，新開　敬行，大貫奈穂美，貞升　健志，藪内　清…… 36

東京都における麻疹抗体保有状況（1984－1988年）
……吉田　靖子，矢野　一好，藪内　清…… 41

寄生虫に対する漢方薬の有効性に関する研究（第4報）安中散抽出液および Anethole 液3時間処理
Anisakis Ⅰ型幼虫のウィスター系ラットに対する感染抑制効果
……村田以和夫，宮沢　貞雄，安田　一郎，小田　稔，渋谷　智晃…… 46

寄生虫に対する漢方薬の有効性に関する研究（第5報）香辛料の *Anisakis* Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果
……安田　一郎，高野伊知郎，浜野　朋子，瀬戸　隆子，高橋奈穂子
村田以和夫，宮沢　貞雄，小田　稔，渋谷　智晃…… 53

凍結乾燥血清の GOT，GPT 測定時の乳び，ビリルビン，ピルビン酸の影響について
……小林　千種，蓑輪　佳子，大石　向江，一言　廣…… 58

神経芽細胞腫のマス・スクリーニングに関する検討（第6報）
尿中カテコールアミン代謝終末産物の定量値と検査材料の関係
……武士俣邦雄…… 62

検査室由来情報処理に関する考察（第1報）
コンピュータシステム開発における請求要件
……津野　正朗，倉科　周介，大橋　誠…… 70

報文Ⅱ　医薬品等に関する調査研究

インドメタシン坐剤中の分解物について
……鎌田　国広，中山　京子，高橋美佐子，萩原　輝彦，上原　真一，秋山　和幸…… 77

生薬の品質評価に関する研究（第９報）
黄耆の品質
……高橋奈穂子，安田　一郎，瀬戸　隆子，浜野　朋子，高野伊知郎
秋山　和幸，鈴木　幸子，福田　達男，田中　博，飯田　修…… 84

シアン測定システムに関する研究（第５報）
めっき廃水中の遊離シアンの酢酸緩衝液・微量拡散法による分析
……奥本千代美，高橋利恵子，岩崎由美子，秋山　和幸…… 90

化粧品用色素に関する衛生化学的研究（第２報）
アルカリ熱イオン化検出器付きガスクロマトグラフィーによるアゾ系タール色素中の
3-Methoxy-6-methyl-11*H*-pyrido の定量
……伊藤　弘一，岸本　清子，鈴木　助治，中村　弘，渡辺四男也…… 96

家庭用品の衛生化学的研究（第29報）
掃除機の紙パックフィルターに使用される防虫剤および抗菌剤の定量法
……金子　正美，森　謙一郎，中村　義昭，観　照雄，渡辺四男也……101

家庭用品の衛生化学的研究（第26報）
防虫シートおよびカーペット中の防虫加工剤の定量
……中村　義昭，金子　正美，森　謙一郎，観　照雄，渡辺四男也……106

ケイ光Ｘ線分析法による酸化チタン中の鉛およびヒ素の同時定量
……雨宮　敬，鈴木　助治，渡辺四男也……111

報文Ⅲ　食品等に関する調査研究

東京都における PCB 汚染の実態について（第17報）
食品および器具容器中の PCB 汚染の推移
……植田　忠彦，渡辺四男也……115

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５報）
昭和60－63年度における調査結果
……水石　和子，竹内　正博，山野辺秀夫，渡辺四男也……121

有機スズ化合物の衛生化学的研究（第６報）
東京湾スズキ並びに海水のトリブチルスズ及びトリフェニルスズ汚染に関する一考察
……竹内　正博，水石　和子，山野辺秀夫，渡辺四男也，道口　正雄……127

豚肉中の残留チアムリンの微生物学的検査法の開発
……神保　勝彦，百瀬　礼子，丸山　務，松本　昌雄……133

高速液体クロマトグラフィーによるサルファ剤の分析
――輸入豚肉におけるスルファメサジンの残留――
……堀井　昭三，神保　勝彦，橋本　常生，井草　京子，丸山　務……137

食品の化学検査における食品衛生法違反事例（第１報）
……田村　行弘，二島太一郎……141

キャピラリーガスクロマトグラフィー及びマススペクトロメトリーによる果実中の二臭化エチレンの分析法
……石川ふさ子，斎藤　和夫，中里　光男，藤沼　賢司，守安　貴子，二島太一郎……149

野菜・果実類中の残留農薬実態調査（昭和63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……155

化学物質及び自然毒による食中毒事件例（第６報）
——昭和63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……163

輸入食品中のフマル酸第一鉄分析法
……天川　映子，大西　和夫，西島　基弘……169

天然着色料製剤中の糖類の分析
……中島　和雄，広門　雅子，平田　恵子，植松　洋子，松井　敬子，風間　成孔……175

天然着色料製剤中の色素成分の分析（第１報）
アナトー色素中のビキシン，ノルビキシンおよびウコン色素中のクルクミンの定量
……平田　恵子，広門　雅子，植松　洋子，中島　和雄，松井　敬子，風間　成孔……178

天然着色料製剤中の溶剤成分の分析
……植松　洋子，広門　雅子，平田　恵子，中島　和雄，松井　敬子，風間　成孔……183

天然着色料の品質調査（第１報）
カラメル色素の品質試験
……広門　雅子，平田　恵子，中島　和雄，植松　洋子，松井　敬子，風間　成孔……187

酵素反応を利用した食品添加物製剤中の炭酸水素塩及び炭酸塩の定量
……津田　裕子，安野　哲子，荻野　周三，小関　正道，風間　成孔……192

最近の包装食品における包装材の使用実態調査
……渡辺　悠二，金子　令子，風間　成孔……197

ろ過助剤用チタン酸カリウム繊維に関する衛生学的研究
……荻野　周三，安野　哲子，小関　正道，津田　裕子，風間　成孔……202

マサバの脂肪酸組成およびトコフェロール含量の季節的変動
……船山　恵市，牛尾　房雄，友松　俊夫……209

陰膳方式によるコレステロール，フィトステロールの一日摂取量調査
……坂牧　成恵，牛尾　房雄，川島満春美，船山　恵市，友松　俊夫……214

報文Ⅳ　生活環境に関する調査研究

水試料中のトリアジン系除草剤の分析方法
……吉田奈津子，中川　順一，高橋　保雄……219

環境における化学物質の安全性に関する調査研究（第２報）
キャピラリーガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーによる環境試料中の
1,1-bis(*t*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane の分析方法
……大橋　則雄，岡本　　寛，高橋　　巌，中川　順一，土屋　悦輝
笹野　英雄，小山　勉良，狩野　文雄，加納　堯子……223

ガスクロマトグラフィー／質量分析ーMetastable Ion Monitoringによる水中微量有機物の分析
……中川　順一，高橋　保雄，笹野　英雄……230

水中のアスベスト繊維に関する調査研究（第２報）
……小輪瀬　勉，坂本　朋子，笹野　英雄……233

皇居外苑濠の植物プランクトン　Ⅲ
——主要な緑藻——
……渡辺真利代，土屋　悦輝……236

ドライクリーニング所排水中の塩素系有機溶剤の簡易試験法としての検知管法の評価
……有賀　孝成，押田　裕子，栃本　博，西島　基弘，寺山　武……243

東京湾の環境汚染モニタリング調査（第７報）
昭和62年度スズキおよびウミネコの調査結果について
……大久保智子，瀬戸　博，加納　堯子……251

多摩川に生息するオイカワ中の残留クロルデンの年次推移
……宮崎　奉之，橋本　常生……256

商業ビルディング床面のダニ調査
……吉川　翠……259

東京都区部における部位別がん死亡率と環境的要因の統計解析
……牧野　国義，稲葉　裕……264

肺に沈着した炭粉の分析法
……瀬戸　博，大久保智子，加納　堯子……271

ディーゼル排気ガス暴露ラットにおける各種組織でのビタミンB_6含量の減少
……鈴木　孝人，熊谷　智子，小高　佳子，今村　晋，加納　堯子……274

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のマウスを用いた52週間の経口毒性試験
……三栗谷久敏，藤井　孝，米山　允子，矢野　範男
湯澤　勝廣，長澤　明道，佐々木美枝子……281

チアベンダゾールおよびオルトフェニルフェノールのマウスを用いた52週間の併用毒性試験
……三栗谷久敏，藤井　孝，米山　允子，矢野　範男
湯澤　勝廣，長澤　明道，佐々木美枝子……289

オルトフェニルフェノールおよび炭酸水素ナトリウム併用のマウスを用いた52週間の経口毒性試験
……藤井　孝，三栗谷久敏，米山　允子，矢野　範男
湯澤　勝廣，長澤　明道，佐々木美枝子……298

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併用のマウスを用いた
52週間の経口毒性試験
……藤井　孝，三栗谷久敏，米山　允子，矢野　範男
湯澤　勝廣，長澤　明道，佐々木美枝子……307

オルトフェニルフェノールナトリウム（OPP−Na）誘導
チトクロームＰ450分子種の同定：立体特異的テストステロン水酸化酵素活性測定を用いる方法
……牛山　慶子，長井二三子，佐藤かな子，加納　いつ……316

過酸化水素によるDNA損傷
……金西　信次，渡部　　真，金城　康人……319

代謝調節機構と毒性発現
Ⅰ．律速酵素の生合成による代謝調節のモデル実験
……深野　駿一……324

幼若ラットのCPC（Coil Planet Centrifuge）高張部瞬時溶血についての検討
……市川　久次，小林　博義……331

ジブチルヒドロキシトルエンのマウス次世代に及ぼす影響
……田中　豊人，大石　眞之，高橋　　省，市川　久次……337

微細構造観察のためのフリーズフラクチャー法の検討
……福森　信隆，多田　幸恵，安藤　　弘，中野　雅行……341

石綿繊維の経口摂取による生体影響（第4報）
クリソタイルの消化管内における走査電子顕微鏡的観察
……福森　信隆，荻野　周三，佐々木美枝子……349

Salmonella Typhimurium TA97，TA102を用いた食品添加物の変異原性試験（第4報）
……藤田　　博，佐々木美枝子……355

都衛研毒性試験システムⅡ（第2報）
病理試験システム
……神谷　信行，中川　好男，三栗谷久敏
市川　久次，佐々木美枝子……363

著書及び他誌発表……373

学　会　発　表……381

CONTENTS

REPORTS I PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

Distribution of Coagulase Type Ⅷ Strains of Staphylococci and their Enterotoxin Production
..... H. Ushioda, H. Fujikawa, H. Igarashi, T. Maruyama and Y. Kudoh 1

Experimental Infection of Cynomolgus Monkeys with *Campylobacter jejuni*
..... Y. Yanagawa, T. Itoh, K. Saito, M. Takahashi, A. Nakamura, K. Suzuki, T. Fujiwara, K. Kuwabara, Y. Kudoh and M. Ohashi 6

Rapid and Simple Method of Hippurate Hydrolysis Test for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*
..... T. Iida, M. Kanzaki, and T. Maruyama 12

Occurence of *Salmonella* in Meat and Drug Antimicrobial Susceptibility of the Isolates in 1983 — 1987
..... S. Kaneko, Y. Kokubo and T. Maruyama 16

Evaluation of Rapid Plasma Reagin Card Test in Serological Diagnosis of Syphilis
..... K. Suzuki, I. Hirata, T. Enokida, T. Itoh and T. Terayama 22

Polyelectrolyte Flocculation as an Aid to Recovery of Polioviruses from Oysters
..... K. Yano, Y. Yoshida and K. Yabuuchi 26

Seroepidemiological Survey of HI Antibody against Rubella Virus in Tokyo in 1982 — 1988
..... Y. Yoshida, K. Yano and K. Yabuuchi 32

Prevalence of Influenza Occurred in Tokyo (Nov. 1988 — Apr. 1989)
..... K. Yamazaki, T. Ito, T. Shinkai, N. Ohnuki, K. Sadamasu and K. Yabuuchi 36

Seroepidemiological Survey of HI Antibody against Measles Virus in Tokyo in 1984 — 1988
..... Y. Yoshida, K. Yano and K. Yabuuchi 41

Effect of Chinese Medicine for Helminth (Ⅳ) Inhibitory Effects on the Experimental Infection for Wister-Rats with Anisakis Type Ⅰ Larvae, Treated with Extract of Antyu-san and Emulsion of Anethole
..... I. Murata, A. Miyazawa, I. Yasuda, M. Oda and T. Shibuya 46

Effect of Chinese Medicine for Helminth (Ⅴ) Inhibitory Effects with Several Kinds of Spice on the Activity of Anisakis Type Ⅰ Larvae
..... I. Yasuda, I. Takano, T. Hamano, T. Seto, N. Takahashi, I. Murata, S. Miyazawa, M. Oda and T. Shibuya 53

Effect of Turbidity, Bilirubin and Pyruvate Concentration on Measurement of GOT and GPT Activity in Freeze–Dried Serum
..... C. Kobayashi, K. Minowa, H. Oishi and H. Hitokoto 58

Studies on Mass–Screening Methods for the Neuroblastoma (Ⅵ) Criticism on Sample for Quantitative Analysis of Urinary Vanillylmandelic Acid and Homovanillic Acid with High Performance Liquid Chromatography
..... K. Bushimata 62

Processing of Laboratory–Originated Information (I)
Requirement for Computerization
..... M. Tsuno, S. Kurashina and M. Ohashi 70

REPORTS II PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

Decomposition Product of Indomethacin in Suppository Formulation
..... K. Kamata, K. Nakayama, M. Takahashi, T. Hagiwara, S. Uehara and K. Akiyama 77

Studies on the Evaluation of Crude Drugs (Ⅸ) Quality of Astragali Radix
..... N. Takahashi, I. Yasuda, T Seto, T. Hamano, I. Takano,
K. Akiyama, S. Suzuki, T. Fukuda, H. Tanaka and O. Iida 84

Studies on Analytical System for Cyanide (V) Determination of Free Cyanide in Waste Water
from Metal Plating Process by Microdiffusion Method using Acetate Buffer
..... C. Okumoto, R. Takahashi, Y. Iwasaki and K. Akiyama 90

Hygienic Chemical Studies on Pigments for Cosmetics (II) Analysis of 1-phenylazo-2-naphthol
in Azo Dyes by Flame Thermionic Detector Gas Chromatography
..... K. Ito, K. Kishimoto, S. Suzuki, H. Nakamura and Y. Watanabe 96

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXIX) Determination of Mothproofing Agents
and Disinfectants in Paper Bag for Vaccum Cleaner
..... M. Kaneko, K. Mori, Y. Nakamura, T. Kan and Y. Watanabe 101

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXVI) Determination of Mothproofing Agents
in Mothproofing Sheets and Carpets
..... Y. Nakamura, M. Kaneko, K. Mori, T. Kan and T. Watanabe 106

Simultaneous Determination of Lead and Arsenic in Titanium Dioxide Powder by X–Ray Fluorescence
Spectrometry
..... T. Amemiya, S. Suzuki and Y. Watanabe 111

REPORTS III PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (XVII)
Transition of PCB Contamination in Foods, Tablewares and Kitchenwares
..... T. Ueta and Y. Watanabe 115

Survey of Pollution with Bis(tributyltin) Oxide in Fish and Shellfish (V) Results of 1985 — 1988
..... K. Mizuishi, M. Takeuchi, H. Yamanobe, and Y. Watanabe 121

Hygienic Chemical Studies on Organotin Compounds (VI) Some Consideration on the Pollution of Tokyo Bay
with Tributyltin and Triphenyltin Compounds
..... M. Takeuchi, K. Mizuishi, H. Yamanobe, Y. Watanabe and M. Doguchi 127

Bioassay Method for Residual Tiamulin in Pork
..... K. Jinbo, R. Momose, T. Maruyama and M. Matsumoto 133

High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Sulfonamides
–Residual Sulfamethazine in Imported Swine Muscle–
..... S. Horii, K. Jinbo, T. Hashimoto, K. Igusa and T. Maruyama 137

The Case of Contravention of the Food Sanitation Law in Chemical Test of Foods (I)
..... Y. Tamura and T. Nishima 141

Determination of Ethylene Dibromide in Various Fruits by Capillary Gas Chromatography and Mass Spectrometry
..... F. Ishikawa, K. Saito, M. Nakazato, K. Fujinuma, T. Moriyasu and T. Nishima 149

Survey of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits (1988.4 — 1988.3)
..... T. Nagayama, T. Maki, M. Iida, K. Kan, Y. Kawai and T. Nishima 155

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toxicants in Tokyo (VI) –1988–
..... T. Maki, K. Kan, T. Nagayama, M. Iida, Y. Kawai and T. Nishima 163

Analytical Method of Iron(II) Fumarate in Imported Foods
..... E. Amakawa, K. Ohnishi and M. Nishijima 169

Analysis of Saccharides in Natural Color Preparations
..... K. Nakajima, M. Hirokado, K. Hirata, Y. Uematsu, E. Matsui and M. Kazama 175

Analysis of Color Components in Natural Color Preparations (I) Determination of Bixin, Norbixin in Annatto Extracts and Curcumin in Turmeric Extracts
..... K. Hirata, M. Hirokado, Y. Uematsu, K. Nakazima, K. Matsui, and M. Kazama 178

Determination of Solvents as Components in Natural Food Color Preparations
..... Y. Uematsu, M. Hirokado, K. Hirata, K. Nakajima, K. Matsui and M. Kazama 183

Survey of Quality of Natural Color (I) Quality Test of Caramel Color
..... M. Hirokado, K. Hirata, K. Nakajima, Y. Uematsu, K. Matsui and M. Kazama 187

Enzymatic Determination of Bicarbonate and Carbonate in Food Additive Preparations
..... Y. Tsuda, T. Yasuno, S. Ogino, M. Koseki and M. Kazama 192

Survey of Plastic Materials Used in Food Packaging
..... Y. Watanabe, R. Kaneko and M. Kazama 197

Food Hygienic Quality of Potassium Titanate Fibers Used as Filter Aid
..... S. Ogino, T. Yasuno, M. Koseki, Y. Tsuda and M. Kazama 202

Seasonal Variations of Fatty Acid Composition and Tocopherol Contents of Mackerel
..... K. Funayama, F. Ushio and T. Tomomatsu 209

Dietary Intakes of Cholesterol and Phytosterol in Duplicate Portion Studies
..... N. Sakamaki, F. Ushio, M. Kawashima, K. Funayama and T. Tomomatsu 214

REPORTS IV PAPERS CONCERNING ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

Determination of Triazine Herbicides in Water
..... N. Yoshida, J. Nakagawa and Y. Takahashi 219

Studies on Environmental Safety of Chemicals (Ⅱ) Determination of 1,1-bis(*t*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane by Capillary Gas Chromatography/Mass Spectrometry
..... N. Ohashi, Y. Okamoto, I. Takahashi, J. Nakagawa, Y. Tsuchiya, H. Sasano, K. Koyama, F. Kanoh and T. Kanoh 223

Analysis of Trace Organic Compound in Water by Gas Chromatography/Mass Spectrometry — Metastable Ion Monitoring
..... J. Nakagawa, Y. Takahashi and H. Sasano 230

Study on Asbestos-Fibers in Water (Ⅱ)
..... T. Kowase, T. Sakamoto and H. Sasano 233

Phytoplankton in Outer Moats around the Imperial Palace III —Main Species of Green Algae—
..... M. F. Watanabe and Y. Tsuchiya 236

Evaluation of Detector Tube as a Simplified Method for Determination of Chlorinated Organic Solvents in Wastewater from Laundries
..... T. Ariga, H. Oshida, H. Tochimoto, M. Nishijima and T. Terayama 243

Survey of Chemical Pollutants in Biota from Tokyo Bay (Ⅶ) Residue Levels in Japanese Sea Bass and Gull in 1987
..... T. Ohkubo, H. Seto and T. Kanoh 251

Annual Trend of Chlordane Residues in Freshwater Fish (pale chub, *Zacco platypus*) from the Tama River
..... T. Miyazaki and T. Hashimoto 256

Survey of Mite on Floor in Atmosphere-Controlled Buildings
..... M. Yoshikawa 259

Statistical Analyses of Cancer Mortality for Selected Sites and Environmental Factors in the Ward—Area of Tokyo
..... K. Makino and Y. Inaba 264

Quantitative Analysis of Elemental Carbon Deposited in Lung
..... H. Seto, T. Ohkubo and T. Kanoh 271

Decreased Vitamin B_6 Contents of Various Tissues from Rats Exposed to Diesel Engine Exhaust
..... T. Suzuki, S. Kumagai, Y. Kotaka, S. Imamura and T. Kanoh 274

REPORTS V PAPERS CONCERNING ON TOXICOLOGY

Toxicity of *o*-Phenylphenol by Dietary Administration to Mice for 52 Weeks
..... H. Mikuriya, T. Fujii, M. Yoneyama, N. Yano, K. Yuzawa, A. Nagasawa and M. Sasaki 281

Toxicity of Thiabendazole and *o*-Phenylphenol by Simultaneous Administration to Mice for 52 Weeks
..... H. Mikuriya, T. Fujii, M. Yoneyama, N. Yano, K. Yuzuwa, A. Nagasawa and M. Sasaki 289

Dietary Toxicity Test of *o*-Phenylphenol and Sodium Hydrogencarbonate by Simultaneous Administration to Mice for 52 Weeks
..... T. Fujii, H. Mikuriya, M. Yoneyama, N. Yano, K. Yuzawa, A. Nagasawa and M. Sasaki 298

Dietary Toxicity Test of *o*-Phenylphenol,Thiabendazole and Sodium Hydrogencarbonate by Simultaneous Administration to Mice for 52 Weeks
..... T. Fujii, H. Mikuriya, M. Yoneyama, N. Yano, K. Yuzawa, A. Nagasawa and M. Sasaki 307

Identification of Cytochrome P450 Species Induced by *o*-Phenylphenol (OPP-Na): by Determination of Stereospecific Testosterone Hydroxylase Activities
..... K. Ushiyama, F. Nagai, K. Satoh and I. Kano 316

DNA Damage Induced by Hydrogen Peroxide in Mammalian Cell
..... N. Kananishi, Y. Kinjo, M. Watanabe 319

Metabolic Control and Toxicity (Ⅰ) Computer Simulation of the Metabolic Control by Biosynthesis of a Rate-Determining Enzyme
..... S. Fukano 324

Studies on the Momentary Hemolysis in High Osmotic Part of CPC (Coil Planet Centrifuge) in Infant Male Rats
..... H. Ichikawa and H. Kobayashi 331

Effects of Butylated Hydroxytoluene on F_1 Generation Mice
..... T. Tanaka, S. Oishi, O. Takahashi and H. Ichikawa 337

Examination on Ultrastructure of Rat Liver by the Freeze-Fracture Method
..... N. Fukumori, Y. Tada, H. Ando and M. Nakano 341

Biological Effects of Ingested Asbestos Fibers (Ⅳ)
..... N. Fukumori, S. Ogino and M. Sasaki 349

Mutagenicity Test of Food Additives with *Salmonella* Typhimurium TA97 and TA102 (Ⅳ)
..... H. Fujita and M. Sasaki 355

Computer System Used for Toxicological Study at Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health (Ⅱ)
..... N. Kamiya, Y. Nakagawa, H. Mikuriya, H. Ichikawa and M. Sasaki 363

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS 373

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS 381

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.*, 40, 1-5, 1989

コアグラーゼⅧ型ブドウ球菌の分布とそのエンテロトキシン産生性

潮田　弘*, 藤川　浩*, 五十嵐　英夫*,
丸山　務*, 工藤　泰雄*

Distribution of Coagulase Type Ⅷ Strains of Staphylococci and their Enterotoxin Production

HIROSHI USHIODA*, HIROSHI FUJIKAWA*, HIDEO IGARASHI*,
TSUTOMU MARUYAMA* and YASUO KUDOH*

Keywords：コアグラーゼ型別法 coagulase typing, コアグラーゼⅧ型ブドウ球菌 coagulase type Ⅷ staphylococci, エンテロトキシン産生性 enterotoxin production

緒　言

善養寺ら[1-3]により確立され，その後，潮田ら[4]により改良が加えられたコアグラーゼ型別法は，黄色ブドウ球菌の細分類法の一つとして，ブドウ球菌食中毒や各種のブドウ球菌感染症の疫学的解析に広く応用されてきている[5-9]．

著者らも，これまで本法を東京都で発生したブドウ球菌食中毒の疫学調査に応用してきた結果，このコアグラーゼ型別法が汚染源追究等に極めて有用な資料を提供すること，さらにコアグラーゼ型と食中毒起因株との間に，密接な相関のあることを明らかにした[10]．

すなわち，1967年～1986年の間に発生した食中毒事件，計391事例の原因菌のコアグラーゼ型は，Ⅱ型，Ⅲ型，Ⅵ型およびⅦ型のいずれかに該当するものであり，他の菌型が原因と考えられるものは皆無であった．しかし，1982年に至り，増子ら[11]は宮城県仙台市で発生したブドウ球菌食中毒が，潮田ら[12]によって1976年に追加されたコアグラーゼⅧ型菌によることを初めて報告，Ⅷ型菌も食中毒原性を有する可能性のあることが示唆された．

そこで，本報では，このコアグラーゼⅧ型ブドウ球菌の食中毒原性を解明する一環として，当研究所において食中毒関連材料や各種市販食品から分離した黄色ブドウ球菌におけるコアグラーゼⅧ型菌の年次別分離状況，さらにブタおよびウシ枝肉，イヌ皮毛など動物由来ブドウ球菌における本型菌の分布とそのエンテロトキシン産生性について検討を加えたので，以下にその成績を報告する．

材料および方法

1．供試菌株

1）食中毒関連検査材料由来黄色ブドウ球菌：ブドウ球菌およびその他の細菌性食中毒関連検査材料の食品，ふん便，拭取り材料などから分離された黄色ブドウ球菌である．

2）食品由来株：1970年，1979年，1983年の各年に各種市販食品から分離された黄色ブドウ球菌である．

3）動物由来株：ウシ，ブタ枝肉ならびにペットのイヌ皮毛，鼻腔および口腔から検出されたコアグラーゼ陽性ブドウ球菌である．

2．ブドウ球菌の分離培養法

3％卵黄加マンニット食塩寒天(以下 MSEY[6]と略す)平板に検査材料をそのまま塗抹する直接培養法と7.5％食塩加ブイヨン(倍濃度)で48時間増菌培養後，MSEY 平板に分離培養する2法を併用した[13]．

また，イヌ材料からのブドウ球菌の分離には，5％に食塩を加えたウマ血液寒天平板培地による分離法も併用して行なった．分離培地上の集落については，卵黄反応，マンニット分解性共に陽性のもののほか，両反応が陰性であっても，その大きさが中等度で，光沢あるブドウ球菌の疑われる集落については，コアグラーゼ試験を行ない，本試験が陽性の場合はコアグラーゼ陽性ブドウ球菌

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

として実験に用いた.

3．生化学的性状試験

1）コアグラーゼ産生：試験管法および平板法により行なった[14].

2）卵黄反応：MSEY 平板[6]によった.

3）VP 反応：市販のVP 半流動寒天培地によった.

4）マンニット分解：MSEY 平板によった.

5）マルトース分解：糖分解基礎培地(バルジコー培地)にマルトースを0.5%に添加した培地によった[14].

6）クランピング・ファクター：ウサギ血漿を用い，スライドグラス法によった[14].

4．コアグラーゼ型別法

善養寺ら[1-3]の方法および潮田ら[4]の改良法によって行なった.

5．エンテロトキシン検出法

逆受身ラテックス凝集反応(RPLA 法)[15-16]によって行なった.

成　　績

1．食中毒関連および各種市販食品由来黄色ブドウ球菌におけるコアグラーゼⅧ型菌の分布

ブドウ球菌食中毒関連の各種検査材料から分離されたコアグラーゼⅧ型黄色ブドウ球菌の年次別検出状況をTable 1．に示した．コアグラーゼⅧ型も含めた型別システムを採用した1976年以降，Ⅷ型菌が検出されたのは1978年が最初で，その後は1988年まで毎年検出されている.

本型菌の検出率は年次によって差はあるが，1983年以降は1～4.5%とそれまでの0.3～2%に比し，やゝ増加の傾向にある．一方，各種市販食品由来黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ分布を1970，1979および1983年の分離株についてみると(表2)，コアグラーゼⅧ型菌は1970年および1979年分離株の中には皆無であったが，1983年分離株では94株中3株(3.2%)に本型菌が認められた.

なお，これら食品由来株ではコアグラーゼⅦ型菌の検出率の増加が観察された.

2．ウシ，ブタ枝肉におけるコアグラーゼⅧ型黄色ブドウ球菌の分布とそのエンテロトキシン産生性

ウシ，ブタ枝肉からの検出ブドウ球菌はMSEY 平板上で卵黄反応の極めて弱い菌株も一部に認められたが，検討したコアグラーゼ，VP 反応，マンニット，マルトース，クランピングファクターの各試験いずれも陽性であり，すべて黄色ブドウ球菌に該当するものであった.

これらのウシ，ブタ枝肉由来株のコアグラーゼ型別成績はTable 3．に示すとおりである．ウシ枝肉由来株の39株はコアグラーゼⅠ型，Ⅱ型，Ⅲ型，Ⅳ型，Ⅶ型およびⅧ型のいずれかに型別され，なかではコアグラーゼⅧ型菌が全分離株の56.4%と，最も高頻度であった.

一方，ブタ枝肉由来株の51株の場合も，ウシ由来株のそれとほぼ類似したコアグラーゼ型分布を示し，同様にⅧ型菌が最も高率であった.

つぎに，ウシ，ブタ枝肉由来株90株中86株について実施したエンテロトキシン産生試験の結果をコアグラーゼ

Table 1．Distribution of Coagulase Type Ⅷ Strains of *Staphylococcus aureus* from Various Specimens related to Staphylococcal Food Poisoning

Year	No. of strains typed	No. of coagulase type Ⅷ strain (%)
1976	1,582	0
1977	1,601	0
1978	1,728	35 (2.0)
1979	761	2 (0.3)
1980	1,483	6 (0.4)
1981	1,395	9 (0.7)
1982	1,869	4 (0.2)
1983	1,960	49 (2.5)
1984	1,030	46 (4.5)
1985	1,359	61 (4.5)
1986	1,340	35 (2.6)
1987	746	8 (1.1)
1988	474	9 (2.0)

Table 2．Coagulase Types of *Staphylococcus aureus* Isolates from Various Commercial Foods

Year	No. of tested	Coagulase type							
		Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ	Ⅶ	Ⅷ
1970	108	4	11	27	17	12	16	21	—
1979	64	7	7	23	3	1	1	22	—
1983	94	7	14	21	11	3	—	35	3

Table 3. Coagulase Types of *Staphylococcus aureus* Isolates from Meats

Meat	No. of tested (%)	Coagulase type; I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	UT
Beef	39 (100)	2	4	2	4	—	—	5 (12.8)	22 (56.4)	—
Pork	51 (100)	2	1	1	11 (21.6)	2	—	1	30 (58.8)	3

UT ; Untypable

Table 4. Enterotoxin Production of *Staphylococcus aureus* Isolates from Meats by Coagulase Types

Coagulase type	No. of tested	Enterotoxin production A	B	D	Negative
I	2				2
II	5			3	2
III	3		2		1
IV	15		1		14
V	2				2
VI					
VII	5	1	2		2
VIII	51				51
UT	3				3
Total (%)	86 (100)	1 (1.2)	5 (5.8)	3 (3.5)	77 (89.5)

UT ; Untypable

Table 5. Characteristics of Coagulase Positive Staphylococci Isolates from Canine

No. of tested	% of positives Coagulase	VP	Mannitol	Clumping factor	Egg- yolk factor	Maltose
119	100	8.4	67.2	58.8	70.6	100

型とともに Table 4. に示した．コアグラーゼII型，III型およびVII型に型別された菌株では13株中8株(61.5%)とその半数以上がエンテロキシンを産生したが，VIII型を含め，他のコアグラーゼ型に属する菌株では，すべてエンテロトキシン非産生株であった．

3．イヌ材料におけるコアグラーゼVIII型ブドウ球菌の分布とそのエンテロトキシン産生性

ペットのイヌ皮毛，鼻腔あるいは口腔から検出ブドウ球菌119株の主要性状を Table 5. に示す．イヌ由来のコアグラーゼ陽性ブドウ球菌は，その菌株の多くは VP 反応陰性，またその30～40%はクランピングファクター，卵黄反応，マンニット分解性が陰性であり，これらの性状から黄色ブドウ球菌と同定されたものは119株中10株のみで，残りの109株は *Staphylococcus intermedius* と同定された．

つぎに，イヌ由来ブドウ球菌のコアグラーゼ型別成績を Table 6. に示した．黄色ブドウ球菌に同定された菌株では，10株中4株がVII型またはVIII型に，また *S. intermedius* と同定された109株では，その36株がVIII型に型別されたが，残りの菌株はいずれも既知のI～VIII型に該

Table 6. Coagulase Types of Coagulase-Positive Staphylococci Isolates from Canine

Orgaism	No. of tested	Coagulase type;			
		1－Ⅵ	Ⅶ	Ⅷ	UT
S. aureus	10	－	2	2	6
S. intermedius	109	－	－	36	73
Total	119	－	2	38	79

UT ; Untypable

当しなかった.

一方，イヌ由来株のエンテロトキシン産生性についてみると(表7)，黄色ブドウ球菌の10株ではⅧ型菌2株中1株，型別不能株6株中3株にエンテロトキシンの産生が認められたが，Ⅶ型菌2株はいずれも非産生株であった. *S. intermedius* の109株では，Ⅷ型菌が36株中18株，また型別不能の73株中30株とその約半数がエンテロトキシンを産生した.

考　　察

黄色ブドウ球菌は，わが国における細菌性食中毒の原因菌の中で腸炎ビブリオについで重要な存在で，本菌による集団食中毒も毎年200件前後に達している.

著者らも，これまで本菌食中毒の重要性に鑑み，その疫学調査に加え，食中毒発生防止の立場から，汚染源として重要な役割を演じていると考えられる食品や自然界における本菌の分布，分離株の特徴等の把握に努めてきた[5-9].

今回は，これまで実施してきた本菌の汚染源追究の一環として，1982年の増子ら[11]の報告以来，その食中毒原性が問題視されるようになったコアグラーゼⅧ型黄色ブドウ球菌を主対象に，その分布を特に食肉やペット動物を中心に調査するとともに，食中毒との関連性をエンテロトキシン産生性の面から検討した. このコアグラーゼⅧ型菌は，1976年潮田ら[12]によって従来のⅠ～Ⅶ型に該当しない新コアグラーゼ型菌として，膿痂疹患者分離株に初めて見出されたものであるが，今回実施したブドウ球菌食中毒関連材料や各種市販食品由来株についての調査では本型菌はこれらの材料にも1978年頃より分布していること，また1983年以降，その検出頻度は低率ではあるが，若干増加傾向にあることが確かめられた.

一方，ウシおよびブタの枝肉分離株について調査した成績では，そのコアグラーゼ型分布は上述の食品由来株等のそれとは趣を異にし，コアグラーゼⅧ型菌が全分離株の半数以上と極めて高率であることが判明した.

また，イヌの皮毛等の分離株の場合も，コアグラーゼⅧ型菌は全分離株の約32％に認められたが，ウシ，ブタ由来株と異なり，コアグラーゼ陽性ブドウ球菌として分離されたものの大多数は黄色ブドウ球菌ではなく，*S. intermedius* に該当するものであった. これらの動物由来株のエンテロトキシン産生性についてみると，ウシ，ブタ由来株では，コアグラーゼⅡ型，Ⅲ型，Ⅳ型およびⅦ型菌の一部に産生株が認められたものの，高率に分布するⅧ型菌でエンテロトキシンを産生するものは皆無であった. これに対し，イヌ由来株では，黄色ブドウ球菌と同定されたⅧ型菌2株中1株，また *S. intermedius* では36株中18株とその半数が毒素産生株であった. すなわち，同じコアグラーゼⅧ型菌であっても，毒素産生菌の分布はその由来によって，また菌種によってかなりその様相を異にすることが示唆された.

以上，今回の調査は，調査対象が限られたものであり，また供試した菌株数も少ないものの，ウシやブタにⅧ型菌が広く分布し，食中毒と関連性のあることを示唆するものであったが，これらの分離株は全てエンテロトキシン非産生株であった. 他方，イヌにおいてはエンテロト

Table 7. Entertoxin Production of Coagulase- Positive Staphylococci Isolates from Canine by Coagulase Types

Coagulase type	No. of tested (%)	Enterotoxin production					
		A	C	D	A, C	C, D	Negative
Ⅶ	2(2)						2(2)
Ⅷ	38(2)	1(1)	15	1	2		19(1)
UT	79(6)	4(3)	24		4	1	46(3)
Total	119(10) (100)	5(4) (4.2)	39 (32.8)	1 (0.8)	6 (5.0)	1 (0.8)	67(6) (56.3)

UT ; Untypable　＊ (　) : *Staphylococcus aureus*

キシン産生性のⅧ型菌が分布していることを示す成績が得られたが，これらの食中毒原性株もそのほとんどがこれまで食中毒の原因菌として報告のない *S. intermedius* で占められていた．これらの成績は直ちにこの種の動物に分布するコアグラーゼⅧ型菌の食中毒原性を否定するものではない．しかし，これまでのコアグラーゼⅧ型黄色ブドウ球菌による食中毒事例が前述の仙台市の例[11]が唯一のものであり，東京都における著者らの過去20年間の調査成績[10]では皆無であった点からすると，コアグラーゼⅧ型菌による食中毒は，仮に起きても，それは極めて稀なことと思われる．

文　献

1）Zen-Yoji, H., Terayama, T., Benoki, M. and Kuwahara, S.：Jap. J. Microbiol., 5，237-247，1961.

2）Zen- Yoji, H., Terayama, T., Benoki, M. and Kuwahara, S.：Jap. J. Microbiol., 5，367-374，1961.

3）Zen- Yoji, H., Terayama, T., Benoki, M. and Kuwahara, S.：Jap. J. Microbiol., 6，59-68，1962.

4）潮田　弘，寺山　武，坂井千三，善養寺浩：東京衛研年報，26-1，1-6，1962.

5）寺山　武，潮田　弘，新垣正夫，稲葉美佐子，甲斐明美，坂井千三：東京衛研年報，28-1，1-4，1977.

6）善養寺浩，寺山　武，潮田　弘，五十嵐英夫，丸山務，坂井千三：食衛誌，12，311-314，1971.

7）善養寺浩，寺山　武，潮田　弘，五十嵐英夫，丸山務：食衛誌，12，501-505，1971.

8）寺山　武，五十嵐英夫，潮田　弘，善養寺浩：食衛誌，13，549-554，1972.

9）Ushioda, H., Terayama, T., Sakai, S., Zen-Yoji, H., Nishiwaki, M. and Hidano, A.：Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Suppl., 10，77-83，1981.

10）潮田　弘，五十嵐英夫，丸山　務，寺山　武，竹重都子，斉藤維雅：日細菌誌，42，128，1987.

11）増子光子，永岡綾子，今野純夫，角田　行，三浦寿光，湯田和郎：病原微生物検出情報，30，1-2，1982.

12）潮田　弘，寺山　武，新垣正夫，坂井千三，善養寺浩：東京衛研年報，27-1，1-4，1976.

13）潮田　弘，五十嵐英夫，藤川　浩，工藤泰雄：東京衛研年報，38，133-138，1987.

14）厚生省監修，微生物検査必携，細菌・真菌検査，第2版：日本公衆衛生協会，1978.

15）新垣正夫，五十嵐英夫，藤川　浩，潮田　弘，寺山武，坂井千三：東京衛研年報，32-1，128-131，1981.

16）小田隆弘，大久保忠敬，永井　誠，西本幸一，大丸健之助：福岡市衛試報，4，33-37，1979.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 6-11, 1989

Campylobacter jejuni のサルに対する経口感染実験

柳川義勢*, 伊藤　武*, 斎藤香彦*, 高橋正樹*,
中村明子**, 鈴木健之**, 藤原　徹**, 栗原金治**,
工藤泰雄*, 大橋　誠*,

Experimental infection of cynomolgus monkeys *(Macaca fascicularis)* with *Campylobacter jejuni*

YOSHITOKI YANAGAWA*, TAKESHI ITOH*, KAHIKO SAITO*, MASAKI TAKAHASHI*,
AKIKO NAKAMURA**, KENJI SUZUKI**, TOHRU FUJIWARA**, KINJI KURIHARA**,
YASUO KUDOH* and MAKOTO OHASHI*

Campylobacter jejuni strain HP2203 from patients with diarrhea was inoculated orally into ten Cynomolgus monkeys. The organism was isolated from blood samples of seven monkeys 30 min to 24 hrs, but not 72 hrs after oral inoculation.

The organisms were isolated from liver, spleen, mesenteric lymph nodes, bile and all parts of interstinal tracts of a monkey sacrificed at 2 days after inoculation.

Catarrhal inflammation was shown in the ileum of the animal.

Slight clinical symptoms were observed in only 3 monkeys with soft stool.

Intestinal colonization was observed in 6 out of 8 monkeys for more than 10 days, and the longest case was held on for 48 days with $>10^3$ colony forming units (per gram) of the organism.

The increase of agglutination titers against *C. jejuni* HP2203 cells was observed in all infected monkeys with the highest antibody titer of 640 to 1,280 at 6 or 10 days after inoculation.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, Cynomolgus monkey, Experimental infection

Campylobacter jejuni の病原性を明らかにするために，これまでに種々の実験動物を対象とした感染実験が行われてきた[1-8]．しかし，これまでの検討の範囲では，同じ動物種を用いた場合であっても，研究者によってその成績は必ずしも一致をみておらず，まだ一定した成績が得られるほど確実性の高い感染モデルを得るまでには至っていない．

著者らも[9]，本菌の感染モデルを確立し，その発症機序を解明する一環として，これまでマウス，ラットや幼鶏(ヒヨコ)を対象に経口感染実験をすすめてきたが，これらの動物では，少なくとも投与菌の腸管内における定着・増殖が観察されるものの，下痢などの臨床症状は発現されず，またその病原性を示唆する臓器などにおける顕著な病理学的変化も認めることができなかった．

そこで，今回は自然感染もあるとされる[10-12]サルを対象に，*C. jejuni* の経口感染実験を行い，その臨床症状発現の有無，投与菌の生体内分布，排菌状況，血中抗体の消長などの面から検討を加えたので，その成績について報告する．

材料および方法

1．供試菌株

下痢症患者ふん便から分離された，*C. jejuni* HP2203 株(血清型 TCK24)を用いた．

感染実験には，本菌株の Smooth 型集落を Brain heart

*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
**国立予防衛生研究所

infusion broth(Difco 社製)(以下 BHI ブイヨンと略す)に接種し，37℃20時間，微好気条件下で振とう培養後，3,000 rpm. 30分間遠心して得た沈渣を，10%スキムミルクに再浮遊させた菌液を用いた.

2．実験動物

筑波霊長類センターにおいて育成された3才の雄カニクイザル(*Macaca fascicularis*; 体重2kg～3kg)10頭を用いた．感染実験用のサルは，菌投与14日前と8日前の2回，採取したふん便について菌検索を実施し，*C. jejuni* を保菌していないことを確認した．また，8日前に採血した血液を血液検査の対照に用いた.

3．感染実験方法

菌投与前日から絶食させたサルを，塩酸ケタミン(ケタラール，三共社製)10mg／kgの筋肉内注射により麻酔した．ついで，胃カテーテルを挿入し，このカテーテルを通じて，まず10%重曹液5 ml の胃内注入により胃酸の中和を行ない，その5分後に投与菌液10ml を同様に胃内へ接種した.

10頭のサルを5頭ずつ2群に分け，1群には3.5×10^9個，他の1群には1.3×10^{11}個の菌量を接種した.

菌接種後経日的に臨床症状の観察，排菌量の測定，また，大腿静脈より採取した血液について，血液学的検査および抗体価測定を行った．さらに，10^{11}個接種サル5頭のうち，軟便症状を呈した2頭については，菌接種2日後と6日後に各々塩酸ケタミン麻酔により殺処分し，解剖して腸管各部位を中心に細菌学的および病理組織学的検査を行った.

4．*C. jejuni* の分離および菌数測定

ふん便材料の場合は，各感染サルの新鮮な排泄便を採取，秤量して，1%食塩加グリセリン保存液と混合，均一化したのち，生理食塩液で10倍段階希釈し，その0.1ml を Skirrow の血液寒天平板の全面に塗抹，42℃48時間微好気培養した．ついで，平板上に出現した *C. jejuni* 集落を数えてふん便1g中の生菌数を算定した．剖検例の腸内容物および各実質臓器の場合も，秤量した各材料から生理食塩液を用いて調整した乳剤を試料として，ふん便の検査法に準じて菌の分離を行なった．血液および胆汁では，各試料の約1 ml を BHI ブイヨン10ml に入れ，42℃20時間微好気条件下で増菌培養したのち，Skirrow の血液寒天に分離培養した.

検出菌は，スライド凝集反応による血清型別試験により，投与菌であることを確認した.

5．投与菌に対する血中抗体価の測定

サル血清中の抗体価の測定は伊藤ら[13]の方法に従って，投与菌のホルマリン処理死菌を抗原として，試験管内凝集で行った．ただし，反応は50℃18時間とした．血清の抗体価は凝集の認められた最高希釈倍数で表した．なお対照には，各々のサルから菌投与8日前に採取した血清を用いた.

6．血液学的検査

血中抗体価の測定用に採取した血液の一部を，エチレンジアミン四酢酸塩で凝固阻止処理をした後，血球数の測定および血球像を検査した．赤血球数および白血球数の測定は，自動血球計数器(モデルS型コールター社)で行なった.

血球像はスライドグラスに塗抹した血液標本をギムザ染色後，顕微鏡により直接観察した.

7．病理組織学的検査

剖検した2頭のサルから得た腸管各部，肝臓，脾臓，腸間膜リンパ節を検査に供した．各試料を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し，パラフィン包埋ののち，常法に従い組織切片を作製，ヘマトキシリン・エオジン染色後，その組織学的変化を顕微鏡下で観察した.

成　　績

1．臨床症状

10^9個投与した5頭中1例(No. 2)が菌投与6日後に，また，10^{11}個投与群では1例(No. 6)が投与1日後に，他の1例(No. 7)が2日後と3日後にそれぞれ軟便を呈したが，激しい下痢や食欲不振，横臥などの症状を示したもの，および死亡した例はなかった.

2．投与菌の排菌状況

感染サルの排泄便につき経日的に検査した投与菌の排菌状況を表1に示した.

10^9個投与群では，5例中1例(No. 5)は1日後に10^4個／gの排菌があっただけであったが，他の4例は断続的ではあるが15日間以上にわたり10^2～10^3個／gの排菌が認められた．そのうちの1例では，菌投与30日後(10^4個／g)および，48日後の検査においても菌陽性(10^6個／g)であった．軟便を示したサルNo. 2の軟便時(6日後)の排菌量は3.4×10^3個／gであった.

一方，10^{11}個投与群では，投与2日および6日後に剖検した以外の3頭における排菌量は10^3個／g～10^7個／gで，最も長いもので20日まで排菌(10^3個／g)が認められた.

菌投与1日後に軟便症状を示したNo. 6のその時における排菌量は2.6×10^5個／g，また，2日後と3日後に軟便を示したNo. 7ではそれぞれ7.2×10^5個／g，1.5×10^5個／gであった.

Table 1. Detection of *C. jejuni* from fecal specimens in the monkeys after inoculation with the organism

Inoculum size (CFU)	Monkey No.	CFU／g of *C. jejuni* HP2203								
		Days after oral administration								
		1	2	3	6	10	15	20	24	30
3.5×10^9	1	9.7×10^3	5.4×10^4	−	2.8×10^5	6.6×10^3	2.6×10^2	3.3×10^5	2.1×10^2	−
	2	9.2×10^2	2.2×10^3	2.2×10^3	3.4×10^3*	8.6×10^3	1.4×10^2	−	−	−
	3	6.5×10^3	1.3×10^3	−	−	−	8.3×10^3	−	−	−
	4	1.8×10^5	1.8×10^5	−	−	−	1.5×10^3	2.2×10^3	4.4×10^4	3.7×10^4
	5	7.7×10^4	NT	−	−	−	−	−	−	−
1.3×10^{11}	6	2.6×10^5*	S							
	7	9.4×10^6	7.2×10^5*	1.5×10^5*	S					
	8	−	3.3×10^3	−	−	NT	−	−	−	−
	9	NT	1.3×10^7	2.4×10^5	−	2.0×10^4	9.8×10^3	1.9×10^3	−	−
	10	1.2×10^4	1.3×10^5	−	−	1.4×10^2	−	−	−	−

S : Monkey was sacrificed at 2 days (No. 6), at 6 days (No. 7) after challenge.
NT : Not tested.
* : Soft stool.

Table 2. Detection of *C. jejuni* from blood in the monkeys after inoculation with the organism

Inoculum size (CFU)	Monkey No.	Tlme after oral administration				
		30 min.	1 hr	2 hrs	24 hrs	72 hrs
3.5×10^9	1	−	−	+	−	−
	2	−	−	−	−	−
	3	+	−	−	−	−
	4	−	−	−	+	−
	5	−	−	−	−	−
1.3×10^{11}	6	−	−	−	−	S
	7	−	+	+	−	−
	8	+	+	+	−	−
	9	+	−	−	−	−
	10	−	−	+	−	−

+ : *C. jejuni* positive, − : *C. jejuni* negative.
S : Monkey was sacrificed at 2 days after challenge.

3．血液からの投与菌の検出状況

菌投与30分，1時間，2時間，24時間および72時間後に各サルの静脈血を採取し，菌検索を行なった成績を表2に示した．

いずれの投与群においても早期に採取した血液から投与菌が検出された．すなわち，2時間以内に採取した血液での陽性例は10^9個投与群で5例中2例，10^{11}個投与群では5例中4例であった．しかし，24時間後に採取した血液では10例中10^9個投与群の1例のみが陽性で，72時間後に採血した血液では全例が陰性となった．

4．腸管内容物や諸臓器からの投与菌の検出状況

軟便症状を認めたNo. 6（2日後），およびNo. 7（6日後）を対象に，胃，十二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸，直腸それぞれの内容物，そして肝臓，脾臓，腸間膜リンパ節，胆汁，血液から投与菌の菌検索を実施した（表3）．

菌投与2日後に解剖したNo. 6の例では，胃から直腸部まですべての腸管部位において10^3〜10^6個／gの投与菌が検出された．また，肝臓，脾臓，腸間膜リンパ節お

Table 3. Isolation of *C. jejuni* from oragans, bile and blood of sacrificed monkeys

Specimens tested	CFU／g *C. jejuni* HP2203	
	Monkey No. 6	Monkey No. 7
Contents of :		
Stomach	1.8×10^3	3.3×10^2
Duodenum	3.5×10^6	−
Jejunum	4.0×10^2	−
Ileum	4.4×10^4	−
Caecum	4.0×10^4	1.2×10^7
Colon	1.2×10^4	5.3×10^4
Rectum	5.0×10^2	7.8×10^4
Liver	2.0×10^4	−
Spleen	4.0×10^2	−
Mesenteric lymph node	6.2×10^2	−
Bile	+	−
Blood	−	−

Monkeys No. 6 and No. 7 were sacrificed 2 and 6 days after orally infected with 1.3×10^{11} CFU of *C. jejuni* HP2203 respectively.
NT : Not tested.

よび胆汁も菌陽性であった.

軟便を呈してから3日後(投与6日後)に解剖したNo. 7においては，胃，盲腸，結腸，直腸から投与菌が検出されたが，肝臓，脾臓，腸間膜リンパ節や胆汁，血液はすべて菌陰性であった.

5．病理組織的所見

解剖した10^{11}個投与群の2例における解剖時の肉眼所見は，菌投与後2日後のNo. 6では脾臓の軽い肥大，腸間膜リンパ節のわずかな腫脹，全腸管粘膜面における充血で，この所見は大腸部よりも小腸部に強い傾向であった．また，鏡検における病理組織所見では，カタル性腸炎を示唆する回腸部腸管内腔における多量の粘液と，粘膜上皮の剝離および多核白血球の浸潤が認められた．菌投与6日後に解剖したNo. 7においては，No. 6で認められた脾臓の肥大や腸間膜リンパ節の腫脹はみられず，腸管粘膜の充血所見も観察されなかった.

6．血中抗体価の消長

菌投与1日，3日，6日，10日，20日および30日後に測定した血中抗体価の成績を図1に示した．菌投与3日後において，8例中2例に80倍，また6日後では，全例に160倍から1,280倍と高い抗体価の上昇が認められ，30日後においても全例とも，大きな変化はみられなかった.

7．血液像

抗体価測定と平行して赤血球数および，白血球数を測定したが，菌投与30日後までその値に大きな変動は観察されなかった(表4)．一方，白血球をその種類別に観察すると，好中球では，全体に占める割合が菌投与24時間後にいったん有意に増加するが，その2日後には平常値に戻る成績が得られた．なお，観察期間を通じて，異常な血球像を示した例は全く認められなかった.

考　　察

サルはエルシニアや赤痢菌によって自然感染し，ヒトと同様な症状を呈することから，これら病原菌の感染実験にもしばしば用いられてきた[14,15]．カンピロバクターに関しても，高阪[10]は，東南アジアなどからわが国に輸入されるサルだけでなく，国内で繁殖されたサルからもカンピロバクターが高率に検出されることを，さらにこれらのサルの多くに下痢症状が認められることを報告している．他方，Tribe ら[11]は検疫期間中に死亡あるいは下痢症状を示した輸入ザルの半数以上から *C. jejuni* や *C. coli* が検出されることを指摘しており，Bryant ら[12]も同様のことを観察している．これらの成績は，サルがカンピロバクターに感受性が高く，感染実験動物としても有用であることを強く示唆するものである.

こうした点から，今回実験動物用に飼育されたカニク

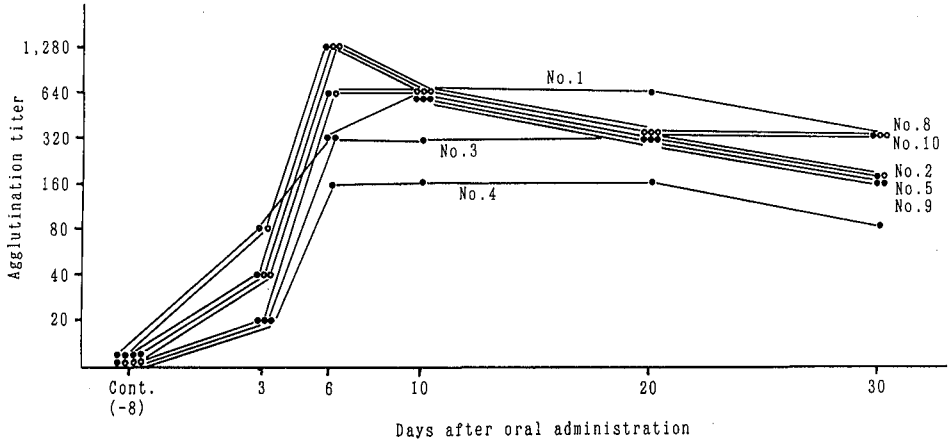


Fig. 1. Serum antibody titers of infected monkeys with *C. jejuni*
●—●: the monkeys (No. 1 ~No. 5) were orally infected with 3.5×10^{9} CFU.
○—○: the monkeys (No. 8 ~No.10) were orally infected with 1.3×10^{11} CFU.

Table 4. Hematological results of infected monkeys with *C. jejuni*

Hematology	Days after oral administration						
	Cont.(−8)	1	3	6	10	20	30
RBC ($\times10^{6}$)	6.09	5.51	5.24	5.16	5.35	5.63	5.80
	(0.39)	(0.36)	(0.23)	(0.34)	(0.36)	(0.28)	(0.35)
WBC ($\times10^{3}$)	7.50	8.59	6.68	7.53	9.58	8.29	8.35
	(1.97)	(3.59)	(2.27)	(2.42)	(3.53)	(2.25)	(3.85)
Eosino. (%)	0.6	0.6	0.8	1.9	1.9	1.5	1.5
Neutro. (%)	43.2	70.4	46.6	28.5	47.4	46.4	43.7
Lympho. (%)	52.3	25.3	49.4	65.3	47.3	50.5	51.8
Mono. (%)	3.9	3.7	3.2	4.3	3.5	1.6	2.9

Figures indicate mean values of 8 monkeys.
( ): Standard deviation.

イザルを対象に *C. jejuni* の感染実験を試みた．その成績は既述したように，典型的な水様性下痢の発現までにはいたらなかったものの，10例中3例に軽度の下痢症状を起こすことが確認された．発症したサルの解剖所見では，発症早期に軽微ではあるが脾臓の肥大，腸間膜リンパ節の腫脹および腸管粘膜の充血を認めるとともに，肝臓，脾臓，腸間膜リンパ節などの実質臓器および胆汁からも投与菌が検出され，全身性感染の様相が示された．病理組織学的には腸管にカタール性腸炎を示唆する好中球浸潤などがみられた．

菌投与した各サルにおける菌の消長についてみると，ふん便ではいずれのサルの場合も，菌投与後15～20日にわたって菌が検出されており，腸管内において *C. jejuni* が明らかに定着・増殖したことを示す成績であった．しかし，排菌量と発症との関係についてみると，非発症サルに比して，発症したサルが特に排菌が多い成績は得られなかった．発症には，菌の腸管における定着だけでなく，動物個体の感受性など生体側の要因も強く影響しているものと思われる．

一方，*C. jejuni* の経口投与により，腸管における感染だけでなく，血液中にも投与菌が侵入することが確認された．この血中への侵入は，多くは2時間から24時間の感染初期に起こるが，菌の検出される期間は比較的短く，一過性のものであった．

Fizgeorge ら[8]も *C. jejuni* のサルへの経口投与実験において，菌投与後の1日から3日程度の感染初期に，菌血症が観察されること，また，Blaser ら[7]はマウスにおける経口感染実験で，*C. jejuni* が投与後1時間以内に血液中への移行がみられるが，24時間以降では血液からの菌検出が困難であることを報告している．今回の著者らの成績も，これらの成績とよく一致するものであり，この種の感染初期における一過性の菌血症は，*C. jejuni* 感染における特徴の一つであると考えられる．この侵入機序の詳細についてはまだ明らかではないが，おそらく投与菌が腸管からリンパ組織などを介して血中へ侵入すると思われる．

ヒトの *C. jejuni* 下痢症患者においては，感染菌に対する血中抗体価の上昇が認められることがよく知られている[16,17]．また，Kohno ら[18]の報告ではサルにおいても，*C. jejuni* の自然感染にともなう抗体価の上昇を観察している．今回の実験でも菌投与3日後ですでに抗体の上昇がみられ，6日から10日後ではすべての例において抗体価の最高値を認め，その多くは640倍以上の高い値であった．感染と同時に血中に菌が侵入することから，その免疫応答も感染の比較的初期から起こり，早期から高い抗体価が観察されるものと考えられる．

謝辞 今回の実験に際して，育成サルを御供与いただいた筑波医学実験用霊長類センター本庄重男博士，ならびに貴重な病理学的ご教示，ご協力いただいた国立予防衛生研究所茅野文利博士に心から感謝いたします．

文　献

1) Field L.H., Underwood J.L., Pope L.M. and Berry L.J.: *Infect. Immunity* 33, (3), 884-892, 1981.
2) Ruiz-Palacios G.M., Escamilla E. and Torres N.: *Infect. Immunity* 34, (1), 250-255, 1981.
3) Manninen K.I., Prescott J.F. and Dohoo I.R.: *Infect. Immunity* 38, (1), 46-52, 1982.
4) Newell D.G. and Pearson A.: *J. Diar. Dis. Res.* 2, (1), 19-26, 1984.
5) Prescott J.F., Barker I.K., Manninen K.I. and Miniats O.P.: *Can. J. Comp. Med.* 45, 377-383, 1981.
6) Al-Mashat R.R. and Taylor D.J.: *Vet. Rec.* 107, (15), 459-464, 1980.
7) Blaser M.J., Duncan D.J., Warren G.H. and Wang W.L.: *Infect. Immunity* 39, (2), 908-916, 1983.
8) Fitzgeorge R.B., Baskerville A. and Lander K.P.: *J. Hyg. Camb.* 86, 343-351, 1981.
9) 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.
10) 高阪精夫：*TPC news* 4, (1), 9-11, 1985.
11) Tribe G.W. and Fleming M.P.: *Laboratory Animals* 17, 65-69, 1983.
12) Bryant J.L., Stills H.F., Lentsch R.H. et al: *Lab. Anim. Sci.* 33, 303-305, 1983.
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：感染症誌，57，(7)，576-586，1983.
14) 丸山務：日細誌，28，(5)，413-421，1973.
15) Ogawa H., Takahashi R., Honjo S., Takasaka M., Fujiwara T., Ando K., Nakagawa M., Muto T. and Imaizumi K.: *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 17, 321-332, 1964.
16) Jones D.M., Robinson D.A. and Eldridge J.: *J. Hyg. Camb.* 87, 163-170, 1981.
17) Watson K.C. and Kerr E.J.C.: *J. Hyg. Camb.* 88, 165-171, 1982.
18) Kohno A., Terao K., Takasaka M. and Honjo S.: *Lab. Anim. Sci.* 38, (6), 715-721, 1988.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 12-15, 1989

カンピロバクター・ジェジュニとカンピロバクター・コリーの鑑別に用いられる馬尿酸塩加水分解試験の簡易・迅速化

飯田　孝*, 神崎政子*, 丸山　務*

Rapid and Simple Method of Hippurate Hydrolysis Test for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*

TAKASHI IIDA*, MASAKO KANZAKI*, and TSUTOMU MARUYAMA*

Keywords：カンピロバクター・ジェジュニ *Campylobacter jejuni*, カンピロバクター・コリー *Campylobacter coli*, 馬尿酸塩加水分解 hippurate hydrolysis, 微量化 micro assay

緒　言

Campylobacter 属の中でも *C. jejuni* と *C. coli* の2菌種はヒトに対して下痢原性のあることが知られ[1]，わが国では食中毒起因菌に指定されている．そのため食品衛生の分野でこれら2菌種を対象とした検策が広く実施されている．しかし，*C. jejuni* と *C. coli* の自然界における分布がほぼ同じであることから，同一の検査法で両菌種が分離される頻度が高く，日常検査の中で両者の鑑別が要求される．

C. jejuni および *C. coli* は生化学的性状が極めて近似しているが DNA の相同性[2]，膜抗原型[2]，馬尿酸塩加水分解能などに違いがみられる．それらの鑑別性状の中で馬尿酸塩加水分解試験が他の性状試験に比較して簡便な試験であることから広く用いられている．*Campylobacter* 属菌の馬尿酸塩加水分解試験には，試験管法[3,4]，薄層クロマトグラフィ法[5]，ガスクロマトグラフィ法[6,7]，など様々な方法が試みられている．これらの試験法の中で特別な器具を必要としない試験管法が最もよく利用されている．しかし，現在各試験検査機関で広く採用されている試験管法は多量の菌体を必要とすることや，遠心操作が必要なことなどの煩雑さが指摘されている．特に多数の菌株を扱う場合は従来法では操作が繁雑であったために多くの労力を要した．そこで，*C. jejuni* と *C. coli* を鑑別するための馬尿酸塩加水分解試験を微量化，簡易化さらに迅速化を目的にマイクロプレートを用いる改良法(以下マイクロ法と略)を開発したので報告する．

実験材料および方法

1．材　料

a．供試菌株

実験に用いた菌株は，*C. jejuni* 50株，*C. coli* 50株で，すべてウシおよびブタの大腸内容物から分離したものである．マイクロ法に用いる馬尿酸塩溶液濃度などの基礎的検討には上記菌株の中から *C. jejuni* 2株(88-85, 88-86)，*C. coli* 2株(88-87, 88-88)を選んで使用した．

b．使用培地および試薬

1）増菌用培地：供試菌株の培養には Blood Ager Base No. 2 (OXOID)に7％馬脱繊維素血を添加して用いた．

2）馬尿酸塩溶液：馬尿酸ナトリウムを蒸留水に溶解し，8～0.125％の各濃度に調製した．

3）ニンヒドリン試薬：アセトンとブタノール，1：1に混ぜた溶液にマイクロ法では Hwang and Ederer[3]の方法に従って3.5％，試験管法では厚生省法[8]に従って2％になるようにニンヒドリンを加えた．

c．器　材

1）96穴　U型マイクロプレート

2）ガラス棒(直径3㎜，長さ14㎜，先端部がやや細いもの)

3）50 μl用ドロッパー

4）オートリーダー(三光純薬)

5）マルチピペット(三光純薬)

6）吸光光度計(220A日立)

*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 Reserch Laboratory of Pubulic Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

2．方　法

1）**試験管法**：厚生省法[8]を用いた．すなわち，1％馬尿酸ナトリウム溶液0.4*ml*の入った小試験管に増菌用培地に42℃，24時間微好気培養した供試菌株を白金耳でかき取って入れ濃度がマックファーランド濁度基準No.3以上になるように菌液を調製した．これを37℃，2時間好気的に培養した後1,200 ×gで20分遠心後，その上清を別の小試験管に移し，2％ニンヒドリン試薬を0.1*ml*添加して37℃で30分反応後に判定を行った．濃い青紫色を呈したものを陽性，淡い紫色を疑陽性，着色の見られなかったものを陰性とした．

2）**マイクロ法**：96穴のU型マイクロプレートに1％馬尿酸ナトリウム溶液を50 μl 分注し，そこに増菌用培地で試験管法同様に培養した供試菌株を滅菌ガラス棒でかき取り，濃厚菌液とした．これを37℃で1時間培養後，直ちに3.5％ニンヒドリン試薬を50 μl 滴下し，さらに37℃で10分間反応した後，着色の有無を判定した．判定の基準は試験管法と同様とした．

3）**マイクロ法における馬尿酸塩溶液の濃度の検討**

8～0.125％まで馬尿酸塩溶液を希釈して，それぞれの50 μl をマイクロプレートに入れた．菌液は，増菌用培地で42℃，24時間微好気培養した*C. jejuni*および*C. coli*の各2株(88-85，88-86，88-87，88-88)をガラス棒でかき取り，蒸留水中にマックファーランド濁度基準No.3以上の濃度となるよう浮遊させて調製した．この菌液50 μl を馬尿酸塩溶液がすでに注入されている穴に滴下し，よく攪拌した後37℃で2時間好気培養した．培養後，プレートは1,500 ×g 10分間遠心した後，各穴から上清50 μl を別のマイクロプレートに移し，そこに3.5％ニンヒドリン試薬50 μl を滴下した．滴下後再び37℃で10分間反応した後に肉眼で青紫色の着色の有無を判定した．

4）**マイクロ法における菌液の濃度と培養時間の検討**

1％の馬尿酸塩溶液に浮遊させた供試菌株の濃厚菌液100 μl を最初の穴に入れ，次の穴にはあらかじめ1％馬尿酸塩溶液100 μl を入れておいたところに前記濃厚菌液100 μl をマルチピペットを使って加え2倍階段希釈列を作った．この菌液の濃度をオートリーダー OD_{570} で測定して記録した．その後菌液は各0.5，1，2時間培養し，1,500 ×gで10分間遠心後に，その上清50 μl を別のマイクロプレートに移して，そこに3.5％ニンヒドリン試薬50 μl を滴下した．滴下後再び37℃で10分間培養後に，オートリーダーを用いて405nmの吸収を調べ各培養時間における菌液の希釈列のニンヒドリンの発色をオートリーダーの405nmの吸収と，肉眼でどこまで陽性となるか判定した．

結果と考察

1）**マイクロ法における馬尿酸塩溶液の濃度の検討**

マイクロ法を用いた場合のニンヒドリンの発色と馬尿酸塩溶液の濃度との関係を検討した．実験に供試した*C. jejuni*および*C. coli*の各2株を用いた成績を表1に示した．*C. jejuni*の2株はいずれも馬尿酸塩の濃度が4～0.25％の範囲で肉眼によりニンヒドリンの発色を明確に判別できた．一方，*C. coli*の2株はいずれの濃度でも陰性であったことから，馬尿酸塩溶液の濃度差は，この検査に影響しないことが分った．そこでマイクロ法でも，試験管法で用いている1％の濃度の馬尿酸塩溶液を使用できることが分った．

2）**マイクロ法における菌量と培養時間の検討**

菌量および培養時間とニンヒドリンの発色について調べるためにニンヒドリンの最大吸収を吸光光度計を用いて調べたところ約400nmにあることが分った．そこで，菌の濃度とニンヒドリンの発色反応および培養時間の関係についてマイクロプレート用吸光光度計であるオートリーダー(405nmの波長)を用いて測定した．その結果図1に示したように*C. jejuni*は菌量が多いほど，また，反応時間が長いほどニンヒドリンの発色が良くなることが分った．菌量が100 μl あたり OD_{570} で0.4以上(菌数約

表1．マイクロプレート法による馬尿酸塩溶液の濃度とニンヒドリンの発色

供試菌		馬尿酸塩溶液(％)						
		4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.062
C. jejuni	88-85	＋	＋	＋	＋	＋	±	－
C. jejuni	88-86	＋	＋	＋	＋	＋	±	－
C. coli	88-87	－	－	－	－	－	－	－
C. coli	88-88	－	－	－	－	－	－	－

＋：青紫色の発色，－：変化なし

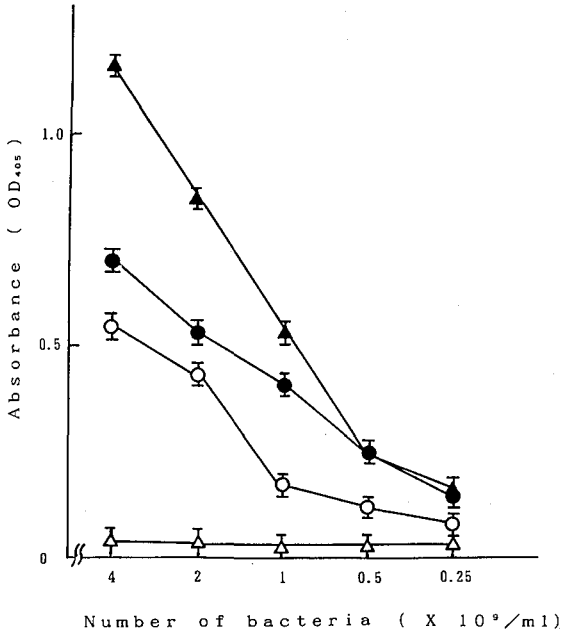


図1．*Campylobacter jejuni*, *C. coli* の馬尿酸塩加水分解試験における培養時間と菌量の変化に伴うニンヒドリンの発色

▲—▲：*C. jejuni* 2 時間培養
●—●：*C. jejuni* 1 時間培養
○—○：*C. jejuni* 0.5時間培養
△—△：*C. coli* 2 時間培養

10^9コ／*ml*)あれば1時間培養でその上清50 μl のニンヒドリンの発色は肉眼により明瞭な判定(OD_{405}で0.4以上)が可能であった．一方，*C. coli* は，いずれの菌量においても，またいずれの培養時間においてもニンヒドリンの発色するものはなかった．

以上の成績から馬尿酸塩加水分解試験はマイクロ法でも *C. jejuni* と *C. coli* を明瞭に区別することは可能であり，その試験方法は供試菌の OD_{570}(10^9コ／*ml*)以上の菌液で，馬尿酸塩溶液1％を用い，培養時間は1時間で行える可能性が示唆された．

3）マイクロ法と試験管法の比較

試験管法であらかじめ馬尿酸塩加水分解試験を行い，*C. jejuni* および *C. coli* と同定された菌株各50株を用いてマイクロ法による試験を実施した．その結果試験管法で *C. jejuni* と同定された株は，すべてマイクロ法では陽性であった．一方，*C. coli* と同定された菌株はすべて陰性であったが，そのうち疑陽性を示した株が1株認められた．本菌株は遠心操作を行った方法でも疑陽性と判定された．ニンヒドリン試薬を用いた馬尿酸塩加水分解試験では，しばしば試験管法においても不明瞭な反応が認められることや[10]，*C. jejuni* でも陽性を示さないものがあることが Pata ら[11]によって報告されていることから，不明瞭な反応が認められた菌株については，本法においても，さらに検出感度の良いガスクロマトグラフィー法による検査を行うことが必要である．

試験管法で行われている遠心操作はニンヒドリンと菌体により生じる疑似反応を最小限にする目的で実施されているが，Morris and Patton[9]は *Campylobacter* を培養後，その上にニンヒドリン試薬を静かに重層することで遠心操作が省略できることを報告している．一方マイクロ法では，ドロッパーを用いてニンヒドリン試薬を滴下するため，菌体とニンヒドリン試薬との混合による疑似反応の起こる可能性を考慮して当初は遠心操作を行ったが，この操作を省いても判定には影響しないことが分った．試験管法では，ニンヒドリン試薬を入れてから判定までの時間が30分と長く，そのために不明瞭な結果が生じやすいと考えられたが，マイクロ法では菌量を多くすることが容易であることから，比較的短い時間にニンヒドリンの発色を判定でき，そのために良好な結果が得られたと考えられた．この遠心操作とその上清液の採取は，馬尿酸塩試験のなかでも操作が煩雑で時間を要するところであるが，この操作が省かれたことで，試験時間が大幅に短縮できた．したがってマイクロ法は多数の検体を処理するためのスクリーニングとして優れた検査法と思われる．

ま と め

マイクロプレートを用いた検査は，血清学的診断やウイルス学的診断に広く応用され，周辺機器もこれにともなって開発されている．そこで，今回 *C. jejuni*，と *C. coli* の鑑別に用いられている馬尿酸塩加水分解試験にマイクロプレートを利用して微量化，簡易化および迅速性を目的に検討を行い，下記の結論を得た．

1）マイクロプレートの各穴に1％馬尿酸ナトリウム溶液を50 μl 分注する．それぞれに増菌用培地上で前培養した供試菌をガラス棒でかき取り濃厚菌液を作成した．これを37℃で1時間培養後，ただちに3.5％ニンヒドリン試薬を各穴に50 μl 滴下し，さらに37℃で10分間反応後判定した．判定は肉眼で行い青紫色に認められるものを陽性，まったく着色のみられないものを陰性とした．

2）検査にマイクロプレートを使用したことで，試験管の準備の必要がなく(ナンバリングなど)，その上マル

チピペットを使用したことで溶液の分注に要する時間が短縮できた.

3）従来，菌の回収に用いられた白金耳は使用前後の火炎滅菌が必要であったが，滅菌ガラス棒を使用することによって滅菌操作が省略でき菌液の調製が容易になった.

4）培養後のプレートにニンヒドリン試薬をドロッパーで直接滴下することによって検査時間が大幅に短縮できた.

文　献

1）伊藤　武，柳川義勢：獣医畜産新報790，279-286，1987.

2）Hebert, G.A., Hollis, D.G., Weaver, R.E., Steigerwalt, A.G., Mckinney, R.M., and Brenner, D.J. : *J. Clin. Microbiol.*, 17, 526-538, 1983.

3）Hwang, M.-N. and Ederer. G.M. : *J. Clin. Microbiol.*, 1, 114-115, 1975.

4）Harvey, S.M. : *J. Clin. Microbiol.*, 11, 435-437, 1980.

5）James Y.L., Chen, K. C.S., Hale, J., Totten, P.A. and Holmes, K.K. : *J. Clin. Microbiol.*, 23, 118-123, 1986.

6）Bar, W. and Fricke, G. : *J. Clin. Microbiol.*, 25, 1776-1778, 1987.

7）Wallace, P.L., Patton, C.M. and Moss, C.W. : *J. Clin. Microbiol.*, 25, 1766-1768, 1987.

8）厚生省レファレンスシステム研究班：カンピロバクターの分離・同定法，1985.

9）Morris, G.K. and Patton, C.M. : *American Society for microbiology, Washington, D.C.*, 302-308, 1985.

10）Morris, G.K. EL Sherbeeny, M.R., Patton, C.M., Kodaka, H., Lombard, G.L., Edmonds, P., Hollis, D.G. and Brenner, D.J. : *J. Clin. Microbiol.*, 22, 714-718, 1985.

11）Totten, A.P., Patton, C.M., Tenover. F.C. : *J. Clin. Microbiol.*, 25, 1747-1752, 1987.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 16-21, 1989

食肉からのサルモネラの検出と分離菌株の薬剤感受性（1983～1987年の5年間の成績）

金子誠二*，小久保彌太郎*，丸山務*

Occurence of Salmonella in Meat and Drug Antimicrobial Susceptibility of the Isolates in 1983－1987

SEIJI KANEKO*, YATARO KOKUBO* and TSUTOMU MARUYAMA*

During the period from 1983 to 1987, a total of 1,020 meat samples, 386 of chicken, 442 of pork, 165 of beef and 27 of other meat, were collected from meat industries and *Salmonella* contamination was investigated. *Salmonella* was detected from 79 samples (7.7%), and these were 45 of chicken (11.7%), 33 of pork(7.5%) and one of beef (0.6%). *Salmonella* isolates were classified into 18 serotypes. The most dominant serotype was *S.* typhimurium.

Sevety-nine *Salmonella* isolates were also tested for antimicrobial susceptibility by the minimum inhibitory concentration (MIC) method. All the isolates were naturally resistant to oleandomycin, lincomycin, bacitracin and erythromycin. On the other hand, 7 antimicrobial agents, i.e. penicillin G, ampicillin, cephalexin, chloramphenicol, oxytetracycline, streptomycin and kanamycin showed MIC distributions with two peaks against the isolates. Thirty-eight isolates were acquired resistance to any antimicrobiotics and 25 of them were multiple drug resistance.

Thirty eight of drug resistant isolates were tested for the presence of conjugative R-plasmids. Conjugative R-plasmids were detected in 17 isolates, and 10 of them were harboring multiple drug resistant R-plasmids.

Keywords：*Salmonella*, Meat, Antimicrobial susceptibility, Minimum inhibitory concentration, R-plasmid

緒　言

サルモネラの多くの菌種がヒトに急性胃腸炎を主要症状とする食中毒を惹き起こすことはよく知られている．これらの菌種は，家畜や家禽などの動物の腸管内に保菌され，これら動物の糞便で直接あるいは間接的に汚染された食肉などの食品を介してヒトに感染する．特に食肉は，サルモネラ食中毒の原因食品のほとんどにかかわり合いを持っていることが明らかにされている[1]．従って，食肉のサルモネラ汚染状況を日常的に把握しておくことは，本菌による食中毒の発生予防対策を立てる上で有力な資料を提供してくれる．

一方，家畜の疾病予防，治療あるいは発育促進を目的として各種抗菌性物質が畜産分野で多用され，これに伴い，家畜の腸管内で接合性Rプラスミドを介して薬剤耐性のサルモネラの増加を招いている[2]．1983年に米国において多剤耐性の *Salmonella* newport で汚染された牛の挽肉を原料にしたハンバーグを喫食して死亡した事例[3]が示しているように，この多剤耐性サルモネラの食肉汚染は，食品衛生上の注目すべき問題となっている．このような背景から，われわれは，1983年から1987年の5年間にわたって都内で流通している原料肉におけるサルモネラの汚染実態を調査するとともに分離菌株の薬剤感受性および耐性株の接合性Rプラスミド保有率について検討したので報告する．

*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, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku Tokyo, 169 Japan

材料および方法

1．材　料

検査材料は，1983年から1987年の5年間に主として都内の食肉処理業より収去された鶏肉386例，豚肉442例，牛肉165例および羊などのその他の食肉27例の計1,020例である．

2．サルモネラの検査法

各材料の25gを125mlのEEMブイヨン(日水)培地中で35℃，24時間前増菌培養し，その培養液の0.1mlをセレナイト培地(日水)に接種して35℃，18時間選択増菌培養後1白金耳をDHL寒天(日水)平板に塗抹して35℃，24時間分離培養した．DHL寒天平板上に発育した硫化水素産生の定型的集落を1平板当り3～5個ずつ釣菌してTSI寒天培地およびLIM半流動寒天培地などに接種して確認試験を実施した．サルモネラと同定された菌株は，診断用免疫血清(デンカ生研)を用いて血清型別を行なった．

3．薬剤感受性試験

対象とした薬剤は，主としてヒトの治療や家畜の飼料添加物に使われているペニシリンG(PCG)，アンピシリン(ABPC)，セファレキシン(CEX)，クロラムフェニコール(CP)，オキシテトラサイクリン(OTC)，ストレプトマイシン(SM)，カナマイシン(KM)，エリスロマイシン(EM)，オレアンドマイシン(OL)，リンコマイシン(LCM)，コリスチン(CL)，バシトラシン(BC)およびナリジキシン酸(NA)の計13種類の抗菌性物質である．これら薬剤について日本化学療法学会で提案されている方法に準じて分離菌株に対する最小発育阻止濃度(MIC)を測定した[3]．

4．接合性Rプラスミドの検出

接合性Rプラスミドの検出は*E. coli* K-12 921株にNA耐性(100 μg／ml)を付与した*E. coli* K-12 921NA^{r}を受容菌とした混合培養法で行った[5,6]．すなわち，供与菌サルモネラと受容菌*E. coli* K-12 921NA^{r}を感受性測定用ブイヨン(日水)で37℃，24時間培養後，供与菌液0.5mlと受容菌液4.5mlを混合して37℃，24時間静置培養した．1白金耳の静置培養菌液をNAと各種薬剤がそれぞれ100 μg／mlずつ含有している感性ディスク用培地(日水)平板に塗抹し，37℃，24時間培養して集落の有無を確認した．集落が確認された場合に，受容菌に接合性接合性Rプラスミドが伝達されたと判定した．

結　果

1．サルモネラの検出状況

サルモネラは，5年間を通じて79例(7.7%)から検出されたが，年次別の推移は特に認められなかった．これら陽性検体の内訳を肉種別にみると鶏肉からの検出率が最も高く45例(11.7%)，次いで豚肉33例(7.5%)，牛肉1例(0.6%)であった(Table 1)．なお，陽性例のうち鶏肉の3例は輸入肉であった．

陽性例からの分離菌計79株中66株が抗原表に記載されている18血清型に型別されたが，13株は市販血清の範囲内では型別不能であった(Table 2)．鶏肉と豚肉から最も多く分離されたのは*S. typhimurium*で，牛肉から分離された1株も*S. typhimurium*に型別された．この他に鶏肉由来株では*S. sofia*, *S. schwarzengrund*などの13血清型に型別され，豚肉由来株では*S. heidelberg*などの9血清型に型別された．

2．分離菌株の薬剤感受性

分離菌79株の薬剤感受性は，OL, LCMおよびBCの3剤には，いずれの菌株のMICも≧100 μg／ml, EMには≧50 μg／mlと高いMIC分布を示した(Table 3)．また，CLとNAにはいずれも一峰性のMIC分布を示し，

Table 1. Distribution of *Salmonella* from Meat Between 1983 and 1987

Year	Chicken		Pork		Beef		Others		Total	
	No. of Samples	No. of Positives	No. of Samples	No. of Positives	No. of Samples	No. of Positives	No. of Samples	No. of Positives	No. of Samples	No. of Positives
1983	129	8	120	5	45	0	4	0	298	13
1984	74	9	95	2	47	0	15	0	231	11
1985	38	4	144	13	12	1	0	0	194	18
1986	31	3	33	6	18	0	5	0	82	9
1987	114	21	50	7	43	0	3	0	210	28
Total	386	45 (11.7)	442	33 (7.5)	165	1 (0.6)	27	0	1,020	79 (7.7)

(　)：%

Table 2. Serotypes of *Salmonella* Isolated from Meat

Serotype	No. of Isolates from			Total
	Chicken	Pork	Beef	
S. typhimurium	14	9	1	24
S. sofia	7			7
S. infantis	3	2		5
S. schwarzengrund	4			4
S. agona	3	1		4
S. heidelberg		3		3
S. bareilly	3			3
S. derby		2		2
S. give	2			2
S. manhattan	1	1		2
S. london	1			1
S. panama		1		1
S. uganda	1			1
4 : b : -	8			8
4 : l,v : e,n		2		2
4 : l,e,n : -		1		1
8 : z_{10} : e,n	1			1
4 : g : -		1		1
Total	45	33	1	79

Table 3. Distribution of Antimicrobial Susceptibility of 79 *Salmonella* Isolates from Meat

Antibiotics	MIC(μg/ml) Percentage of Isolates								
	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100≦
PCG						79.7		2.6	17.7
ABPC				79.7	1.3	1.3			17.7
CEX					78.4	20.3			1.3
CP				26.6	62.0	1.3	1.3		8.8
OTC			56.9	1.3	2.6		3.8		35.4
SM							59.5	8.8	31.7
KM			48.1	39.2					12.7
EM								58.2	41.8
OL									100
LCM									100
CL		100							
BC									100
NA				69.6	27.8	2.6			

これら薬剤に対する耐性株は認められなかった．一方，PCG, ABPC, CEX, CP, OTC, SM および KM の７剤には，２峰性の MIC 分布を示し，耐性を獲得したと思われる菌株が認められた．

以上の MIC 分布から耐性を獲得したと思われる菌株を耐性菌として，これらの薬剤感受性パターンを由来別に Table 4 に示した．耐性株は，鶏肉の45株中25株，豚肉の33株中12株および牛肉の１株の計38株で，これら耐性菌の耐性パターンは13通りに分けられた．これらのうち２剤以上の多剤耐性株が25株を占め，最も多かったパターンは PCG, ABPC, SM, KM, OTC および CP の６剤に耐性を示すもので５株に認められた．

３．サルモネラの接合性Ｒプラスミド保有状況

耐性株38株について接合性Ｒプラスミドを検索したところ17株から検出され，２剤以上の接合性Ｒプラスミドを保有する菌株は10株であった(Table 5)．

考　　察

サルモネラは家畜などの動物の腸管内に常在している．サルモネラのヒトへの感染は，これら保菌動物から直接感染する場合と糞便で汚染された食肉などの畜産物を介

Table 4. Antimicrobial Resistance Patterns of *Salmonella* Isolated from Meat

Resistance Pattern	No. of Isolates		
	Chicken	Pork	Beef
PCG・ABPC・SM・KM・OTC・CP	2	3	
PCG・ABPC・SM・KM・OTC		1	
PCG・ABPC・SM・KM・CP	1		
PCG・ABPC・SM・OTC	2	1	1
PCG・ABPC・KM・OTC		1	
PCG・ABPC・SM・CP	1		
PCG・ABPC・CEX		1	
SM・KM・OTC	1		
PCG・ABPC		1	
SM・OTC	7	1	
OTC	8	1	
SM	2	2	
KM	1		
Sensitive	20	21	
Total	45	33	1

Table 5. Antimicrobial Resistance Patterns of Conjugative R-Plasmids in *Salmonella* Isolated from Meat

Resistance Pattern	No. of Isolates		
	Chicken	Pork	Beef
PCG・ABPC・SM・KM・OTC・CP		2	
PCG・ABPC・KM・OTC・CP	1		
PCG・ABPC・SM・CP	1	1	
PCG・ABPC・SM・OTC		1	
PCG・ABPC・CEX		1	
PCG・ABPC・SM			1
PCG・ABPC・KM		2	
PCG・ABPC	1	1	
OTC	1		
SM	2	2	
Total	6	10	1

して感染する場合とが考えられる．1987年のわが国の食中毒発生状況[7]によると，サルモネラを原因とする食中毒は発生件数や患者数が腸炎ビブリオおよび黄色ブドウ球菌を原因とする食中毒に次いで多いことが示されている．そして，原因食品の半分近くが食肉などの動物性食品である．それにもかかわらず，動物性食品全般のサルモネラの汚染状況を調べた最近の報告事例はあまり見当らない．

今回のわれわれの調査では鶏肉の11.7％を最高に，平均で7.7％の低い検出率であった．この成績は，Nakanishi らが1978～1979年に市販の豚肉と鶏肉について実施したサルモネラの汚染陽性率6～32％[8]に比較して低かった．このことは，保科ら[9]が指摘しているように，われわれが今回対象にした食肉が小売店舗へ卸される前のものであるため，市販食肉に比較して他の食肉との交差汚染の機会が少なかったためであろう．また，現在ではと畜場での枝肉の取扱いが改善されたため腸管内容物で枝肉が汚染される機会が少なくなったことも考えられる．われわれの調査で高い頻度で検出された *S.* typhimurium, *S.* sofia, *S.* schwarzengrund などの血清型はヒトの健康保菌者や食中毒患者からもよく分離されることから[10]，食肉が依然としてサルモネラのヒトへの主要な感染源であることを物語っていた．

今日，ヒトの感染症の治療薬として開発された抗菌剤は，家畜の感染症の治療だけではなく，成長促進効果と感染予防を目的とした飼料添加物としても大量に使用され，畜産業の発展に大きな役割を果たしている．しかし，一方では，このような抗菌剤の大量使用が，動物の生体内や自然環境において薬剤耐性菌を選択的に増殖させ，ひいては接合性Rプラスミドをもつ菌を増加させていることが明らかにされている[2]．今回のわれわれの調査でも，食肉から分離されたサルモネラ79株のうちほぼ半数の38株がなんらかの薬剤に対して獲得性と思われる耐性を示し，このうち，17株に接合性Rプラスミドを検出している．このように食肉を汚染するサルモネラにもヒトや家畜由来株と同様に多剤耐性の接合性Rプラスミドが分布していることが明らかになった．この種の報告が少ないため，今回の成績が食肉に一般的に適用できるかどうかは即断できないが，ヒトから分離されたサルモネラと同じ耐性型も認められることから[10,11]，多剤耐性サルモネラのヒトへの感染源として食肉が重要な役割を担っていると思われる．

今回の成績では検体数や分離菌株数が十分ではないため年次別のサルモネラの検出率，薬剤耐性菌の出現率それに接合性Rプラスミドの検出率の推移は，明確にできなかった．しかし，米国などで報告されている[3]薬剤耐性サルモネラによる危害発生防止のためにも食肉中のサルモネラ汚染の監視は今後も継続すべきであると考える．

結　論

1983年から1987年の5年間に主として都内の食肉処理業より収去された鶏肉386例，豚肉442例，牛肉165例およびその他の食肉27例の計1,020例についてサルモネラの汚染調査を行った．サルモネラは79例(7.7％)から検出され，鶏肉からは45例(11.7％)，豚肉からは33例(7.5％)，牛肉からは1例(0.6％)であった．分離菌計79株中66株が18血清型に型別され，肉種の別なく *S.* typhimurium が最も多かった．

79株の薬剤感受性は，OL, LCM および BC の3剤には，いずれの菌株の MIC も≧100 μg／ml, EM には≧50 μg／ml と高い MIC 分布を示した．PCG, ABPC, CEX, CP, OTC, SM および KM の7剤には獲得性と思われる耐性菌が認められた．このような耐性株は，鶏肉の45株中25株，豚肉の33株中12株および牛肉の1株で，このうち2剤以上の多剤耐性が25株に認められた．これら耐性株38株について接合性Rプラスミドを検索したところ17株から検出され，2剤以上の接合性Rプラスミドを保有する菌株は10株であった．

文　献

1）Cohen, M.L. and Tauxe, R.V. : *Science*, 234, 964-969, 1986.

2）寺門誠致，佐藤儀平，斉田　清，佐藤昭子，金井久：家畜由来の細菌，三橋　進，五島瑳智子，清水喜八郎編：薬剤耐性菌による環境汚染，121-151, 1985，学会出版センター，東京.

3）Spike, J.S., Waterman, S.H., Soo Hoo G.W. et al. : *N. Engl. J. Med.*, 316, 564-570, 1987.

4）三橋　進ら：CHEMOTHERAPY, 29, 76-79, 1981.

5）大前憲一：日獣会誌，35, 662-666, 1982.

6）中谷林太郎編：Rプラスミドの分子遺伝学的実験法，8-16, 1983，薬根出版，東京.

7）藤井恭治：食品衛生研究，38(7), 58-84, 1987.

8）Nakanishi, H., Murase, M., Nukina, M., Takizawa, K., Asakawa, Y., and Sakazaki, R. : *Control of the microbial contamination of foods and feeds in international trade : microbial standards and specifications*, In Kurata, H. & Hesseltine, C.W. (eds), 121-132, 1982, Saikon Publishing, Tokyo.

9）保科　健，福島　博，中村　令，伊藤義広，五明田

学：食品と微生物，3(2)，129-133，1986.
10) 堀内三吉，稲垣好夫，中谷林太郎，後藤延一，吉田洋子，楠　淳，伊藤　武，大橋　誠：感染症学雑誌，63，352-362，1989.
11) 首藤栄治，大関瑤子，山口正則，奥山雄介：埼玉県衛研年報，21，54-59，1987.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 22-25, 1989

梅毒血清反応スクリーニングテストとしての Rapid Plasma Reagin Card Test（RPR カードテスト）の評価

鈴木敬子，平田一郎，榎田隆一，
伊藤　武，寺山　武

Evaluation of Rapid Plasma Reagin Card Test in serological diagnosis of Syphilis

KEIKO SUZUKI, ICHIRO HIRATA, TAKAICHI ENOKIDA,
TAKESHI ITOH and TAKESHI TERAYAMA

Keywords：脂質抗原試験 Serologie Test for Syphilis，RPR カードテスト RPR circle card test，ガラス板法 VDRL slide test，緒方法 Wassermann reaction（Ogata's Method），トレポネーマ抗原試験 Treponemal antigen test

緒　言

近年，性に関するモラルが変わってきており，それにつれて性行為感染症も多様化してきた．従来の性病である梅毒，リン疾，軟性下疳及び第4性病に加え，最近では，非淋菌性尿道炎，性器ヘルペス，AIDS(後天性免疫不全症候群)等の種々の性行為感染症が発生し，その多発が大きな社会問題となっている．古典的性行為感染症の代表的疾患である梅毒は，ペニシリン等の駆梅療法の普及により著しく減少し，早期顕症梅毒は昭和50年頃にはほとんど見られなくなった．しかし，最近，再び早期顕症梅毒が若年層に至るまで散見されるようになり，本症の増加が懸念されている．梅毒に関しては，従来より不顕症例が多いため，臨床症状による診断は困難な場合が多く，本症の診断には血清学的診断が重要視されている．

血清学的診断法は，cardiolipin−lecithin を抗原とする脂質抗原試験(以下 STS と略す)と，梅毒トレポネーマを抗原とするトレポネーマ抗原試験(以下 TP 抗原試験と略す)に大別され，STS は主にスクリーニング試験として，TP 抗原試験は確認試験として用いられている．

著者らは，東京都多摩地区における婚姻・妊娠時検診者及び一般健康検診者を対象に梅毒血清反応検査を実施している．当所では，これまでスクリーニング試験として STS のガラス板法と緒方法の2法を実施してきたが，1988年4月より新たに Rapid Plasma Reagin Card Test (以下 RPR 法と略す)を採用し，スクリーニング試験を行うようになった．

本報では，RPR 法の実用性を評価するため，この1年間に当所で梅毒血清反応検査のために供したすべての検体について，沈降反応のガラス板法，補体結合反応の緒方法と RPR 法による試験を行い，それらの成績を比較検討したので，その結果を報告する．

材料及び方法

供試材料：1988年4月～1989年3月までの1年間に多摩地区の16保健所から当所に梅毒血清学的診断のために搬入された血清2,305件を実験に供試した．

供試試薬：RPR 法の抗原は化血研，ガラス板法の抗原は住友製薬の製品を用いた．緒方法では，抗原は住友製薬，補体と溶血素は極東製薬，緬羊脱線維血は日本生物材料センターの製品を使用した．また，TP 抗原試験の TPHA 法は富士レビオのキットを，FTA−ABS 法は栄研化学のキットを用いた．

方法：供試血清2,305件のすべてについて，STS の RPR 法，ガラス板法及び緒方法の3法と，TP 抗原試験の TPHA 法を実施した．さらに STS で陽性を示した供試血清については FTA−ABS 法を用いて，確認試験を行った．

なお，各検査法は，微生物検査必携[1)]に準じて行った．

成　績

1．STS および TPHA 法検査成績

今回実験に供した2,305件の血清について実施した RPR 法，ガラス板法，緒方法及び TPHA 法の検査成績

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

Table 1. Results of serological tests for syphilis on serum specimens from persons for health examination

No. of serum specimens tested	Test	Reactive (%)	Nonreactive (%)
2,305	RPR[1]	39 (1.7)	2,266 (98.3)
	VDRL[2]	49 (2.1)	2,256 (97.9)
	WR[3]	31 (1.3)	2,274[5](98.7)
	TPHA[4]	48 (2.1)	2,257 (97.9)

[1] Rapid Plasma Reagin Card Test
[2] Glass Plate Test (Modified VDRL Slide Test)
[3] Wassermann Reaction (Ogata's Method)
[4] Treponema Pallidum Hemagglutination Test
[5] 27 of these specimens gave abnormal reaction

を Table 1 に示した．各々の検査法における成績は，RPR 法では被検血清2,305件のうち39件(1.7%)，ガラス板法では49件(2.1%)，緒方法では31件(1.3%)，そして TPHA 法では48件(2.1%)が陽性であった．なお，緒方法では27件(1.2%)に異常反応が認められた．

2．STS の 2 法組み合わせによるスクリーニング試験の比較

Table 2 に，RPR 法とガラス板法でスクリーニング試験を実施した場合の成績を示した．

RPR 法とガラス板法の組み合わせでは，2 法とも陽性が39件，ガラス板法のみ陽性が10件，RPR 法のみ陽性はなく，結局，合計49件(2.1%)がスクリーニング試験陽性と判定された．

RPR 法と緒方法の組み合わせでは，Table 3 に示すように，2 法とも陽性が21件，RPR 法のみ陽性が18件，緒方法のみ陽性が10件，合計49件(2.1%)がスクリーニング試験陽性であった．また，従来実施してきたガラス板法と緒方法の組み合わせでは，Table 4 に示したように 2 法とも陽性が21件，ガラス板法のみ陽性が28件，緒方法のみ陽性が10件，合計59件(2.5%)がスクリーニング試験陽性であった．

3．STS と TPHA 法との比較

Table 5 に RPR 法と TPHA 法による検査成績を示した．両法の成績を比較してみると 2 法とも陽性が35件(1.5%)，TPHA 法のみ陽性が13件(0.6%)，RPR 法のみ陽性が 4 件(0.2%)，2 法とも陰性が2,253件(97.7%)であり，その一致率は99.3%(2,288／2,305)であった．TPHA 法を基準にした RPR 法の特異性は99.8%(2,253／2,257)，感度は72.9%(35／48)であった．また，RPR

Table 2. Reactivity between RPR card test and VDRL slide test on serum specimens

Serological reaction by ; RPR[1]	VDRL[1]	No. of serum specimens
+	+	39
+	−	0
−	+	10
−	−	2,256

+ : reactive, − : nonreactive
[1] See Table 1

Table 3. Reactivity between RPR card test and Wassermann reaction on serum specimens

Serological reaction by ; RPR[1]	WR[1]	No. of serum specimens
+	+	21
+	−	18
−	+	10
−	−	2,256

+ : reactive, − : nonreactive
[1] See Table 1

Table 4. Reactivity between VDRL slide test and Wassermann reaction on serum specimens

Serological reaction by ; VDRL[1]	WR[1]	No. of serum specimens
+	+	21
+	−	28
−	+	10
−	−	2,246

+ : reactive, − : nonreactive
[1] See Table 1

Table 5. Agreement between RPR card test and TPHA test

Serological reaction by ; TPHA[1]	RPR[1]	No. of serum specimens
+	+	35
+	−	13
−	+	4
−	−	2,253

+ : reactive, − : nonreactive
[1] See Table 1

法では偽陽性反応が4件に認められ，その出現率は10.2%(4／39)であった．

ガラス板法とTPHA法の検査成績を比較(Table 6)してみると，2法とも陽性が36件(1.6%)，2法とも陰性が2,244件(97.3%)であり，両法の一致率は98.9%(2,280／2,305)であった．その他，TPHA法のみ陽性が12件(0.6%)，ガラス板法のみ陽性が13件(0.6%)認められた．ガラス板法の特異性は99.4%(2,244／2,257)，感度は75.0%(36／48)であり，偽陽性反応の出現率は26.5%(13／49)であった．

また，緒方法とTPHA法の場合(Table 7)は，2法とも陽性が19件(0.8%)，TPHA法のみ陽性が29件(1.3%)，緒方法のみ陽性が12件(0.5%)，2法とも陰性が2,245件(97.4%)であり，両法の一致率は98.2%(2,264／2,305)，特異性は99.5%(2,245／2,257)であった．緒方法の感度はRPR法やガラス板法に比較して低く，39.6%(19／48)であった．また，緒方法による偽陽性反応はRPR法やガラス板法のそれより高く38.7%(12／31)であった．

Table 6. Agreement between VDRL slide test and TPHA test

Serological reaction by;		No. of serum
TPHA[1]	VDRL[1]	specimens
+	+	36
+	−	12
−	+	13
−	−	2,244

+ : reactive, − : nonreactive
[1] See Table 1

Table 7. Agreement between Wassermann reaction and TPHA test

Serological reaction by;		No. of serum
TPHA[1]	WR[1]	specimens
+	+	19
+	−	29
−	+	12
−	−	2,245

+ : reactive, − : nonreactive
[1] See Table 1

4. STS陽性血清に対するFTA−ABS法の反応性

Table 8にRPR法で陽性の39件，ガラス板法で陽性の49件，及び緒方法で陽性の31件について実施したFTA−ABS法の検査成績を示した．

RPR法では，供試した39件のうち24件(61.5%)がFTA−ABS法陽性で残りの15件(38.5%)は陰性であった．また，ガラス板法では，供試した49件のうち25件(51.0%)がFTA−ABS法陽性，24件(49.0%)が陰性であり，緒方法では31件のうち11件(35.5%)がFTA−ABS法陽性，20件(64.5%)が陰性であった．

考　察

TP抗原試験のFTA−ABS法(Hunterら[2]1964)及びTPHA法(富沢，笠松[3]1968)が実用化されて以来，それまで梅毒の血清学的診断のため汎用されてきたSTSはスクリーニング試験として活用されるようになった．なかでも，我が国では，ガラス板法，緒方法，凝集法の3法が広く実施されてきたが，それに加え最近では，術式が簡単で，迅速に検体が処理できるRPR法が広く用いられるようになった．本法は，1962年Portnoyら[4]によって開発され，その後1963年に改良された検査法[5]でRPR circle card testと呼ばれるものであり，cardiolipin-lecithin抗原を吸着させたカーボン粒子を用いる凝集反応である．

今回，著者らは，スクリーニング試験としてのRPR法の実用性を検討した．STSとしての3法の陽性率はガラス板法が2.1%で最も高く，次いでRPR法1.7%，緒方法1.3%であった．

TPHA法を基準にしてSTSの3法を比較した場合，

Table 8. Reactivity of ETA−ABS test on reactive sera in Serological Tests for Syphilis

STS	No. of reactive serum specimens by STS	Reactivity by FTA−ABS[1]	
		Reactive (%)	Nonreactive (%)
RPR[2]	39	24(61.5)	15(38.5)
VDRL[2]	49	25(51.0)	24(49.0)
WR[2]	31	11(35.5)	20(64.5)

[1] Fluorescent Treponemal Antibody−Absorption Test
[2] See Table 1

まずTPHA法との一致率ではRPR法が99.3%，ガラス板法が98.9%，緒方法が98.2%であり，RPR法が最も高い成績であった．

STSの3法の特異性は，RPR法が99.8%，ガラス板法が99.4%，緒方法が99.5%であった．大久保ら[6]は，RPR法とガラス板法の特異性についてTPHA法を基準にして検討したところ，RPR法の方が優れていると報告しており，著者らの成績と一致するものであった．

また，津上ら[7]は，大阪府の住民495,552名を対象にRPR法とTPHA法でスクリーニング検査を行った結果，RPR法陽性者の19.3%が偽陽性反応であったと報告している．著者らの成績ではRPR法で10.2%，ガラス板法で26.5%，緒方法では38.7%に偽陽性反応が認められ，偽陽性の出現率においてもRPR法が最も低率であった．

RPR法の感度については，Falcone[8]や，水岡ら[1]が，梅毒患者血清を用いて検討し，それぞれ88.1%，88.8%であると報告している．著者らの成績では，RPR法の感度は72.9%であり，上述の成績に比較して低い傾向が見られたが，これはTPHA法陽性血清を用いたことによるものと考えられる．また，ガラス板法及び緒方法の感度はそれぞれ75.0%，39.6%であり，RPR法とガラス板法の感度はほとんど同程度であることが推察された．

FTA-ABS法はSTS陽性血清のみについて実施したため，FTA-ABS法を基準にしたSTSの3法の特異性及び感度は検討できなかったが，STS陽性血清におけるFTA-ABS法との一致率は，前述のTPHA法と同様に，RPR法が61.5%と最も高い成績で，ガラス板法は51.0%，緒方法は低く，35.5%であった．

我が国の梅毒血清反応検査は性病予防法によりSTSの中から2法を組み合わせて実施するように規定されている．今回検討を行った成績からSTSの2法組み合わせによるスクリーニング試験の有用性を比較したところ，RPR法・ガラス板法の組み合わせ及びRPR法・緒方法の組み合わせでは，ともに49件が陽性，ガラス板法・緒方法では，59件が陽性であった．陽性を示したこれらの血清について，TPHA法及びFTA-ABS法による確認試験を行った結果，RPR法・ガラス板法ではトレポネーマ抗体陽性は75.5%，RPR法・緒方法では73.5%，ガラス板法・緒方法では62.7%であり，RPR法とガラス板法の組み合わせでスクリーニング試験を行うのが最も有効であると結論できた．

以上のように，RPR法はガラス板法とほとんど同様の反応性を示し，スクリーニング試験に有効な方法であると考えられる．

しかしながら，RPR試薬は類似品も含めて数社から市販されているが，製品間に反応性の差がみられるという報告[9]もあり，製品間における反応性を比較検討する必要があろう．

結　　論

1988年4月～1989年3月に当所に梅毒血清反応試験のために搬入された血清2,305検体を対象に，梅毒スクリーニング試験としてのRPR法の実用性を検討し，以下の成績を得た．

1．ガラス板法，RPR法及び緒方法それぞれのスクリーニング試験陽性率は，2.1%，1.7%，1.3%であった．

2．TPHA法とSTSの3法それぞれとの一致率は，RPR法が99.3%，ガラス板法が98.9%，緒方法が98.2%であった．TPHA法陽性血清でみた感度はRPR法が72.9%，ガラス板法が75.0%，緒方法が極めて悪く，39.6%であった

3．STS 3法の偽陽性反応の出現率は，RPR法では10.2%，ガラス板法では26.5%，緒方法では38.7%であった．

4．STS陽性血清におけるFTA-ABS法との一致率はRPR法が61.5%，ガラス板法が51.0%，緒方法が35.5%であり，RPR法の一致率が最も高い成績であった．

5．STSの2法組み合わせによるスクリーニング試験ではRPR法とガラス板法の組み合わせの成績が最も良好でありTP抗原試験との一致率は75.5%であった．

文　　献

1）厚生省監修：微生物検査必携　第3版，H-1-H-101，日本公衆衛生協会，東京．

2）Hunter, E. F., Deacon, W. E. and Meyer, P. E. : *Pub. Health Rep.*, 79, 410, 1964.

3）Tomizawa, T. and Kasamatsu, S. : *J. Med. Sci. Biol.*, 19, 305, 1966.

4）Portnoy, J., Breewer, J. H. and Harris, A. D. : *Pub. Health Rep.*, 77, 645-652, 1962.

5）Portnoy, J.: *Am. J. Clin. Path.*, 40, 473-479, 1963.

6）大久保暢夫，小林文次，平岡陸左右ら：東京都立衛生研究所研究年報，22，31-33，1970.

7）津上久弥：皮膚，24，11-18，1982.

8）Falcone, V. H., Genevieve, B. S., Stout, W. and Moore, M.B.: *Pub. Health Rep.*, 79, 491-493, 1964.

9）Fisher, G.S., Colavita, M. T., Sweimler, W. I. and Kleger, B.: *J. Clin. Microbiology*, 27, 188-189, 1989.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 26-31, 1989

マガキに添加したポリオウイルスのカチオン性高分子化合物による回収実験

矢野一好*, 吉田靖子*, 藪内　清*

Polyelectrolyte Flocculation as an Aid to Recovery of Polioviruses from Oysters

KAZUYOSHI YANO*, YASUKO YOSHIDA* and KIYOSHI YABUUCHI*

Keywords：カキ oyster, 高分子電解質 polyelectrolyte, 吸着 adsorption, 食品微生物学 food microbiology, 凝集 flocculation, ポリオウイルス poliovirus

緒　言

ヒトの腸管系ウイルスの感染経路の一つとして，水系感染が考えられる．水系における腸管系ウイルスの挙動に関しては，下水，河川水，および海水を中心に調査が進められている[1-3]．その結果，下水等を経由して河川に流入したウイルスは，海洋に流れ込み，そこに棲息している魚介類に蓄積されることが推測されている[4]．

魚介類とウイルス汚染の関連性の中で，ヒトにウイルス感染を起こさせる可能性の最も高いものは，生食の機会が多い「カキ」であると思われる．わが国においては，ヒトがウイルスに汚染された「カキ」を喫食することによって感染したと思われる健康上の問題が一部の下痢症ウイルスを除いて，それほど目立っていない[5]．その要因の一つとしては，地域住民のウイルスに対する抗体保有率(免疫力)にある．つまり，近海物の魚介類に蓄積されるウイルスのほとんどは，当該地域の住民から排泄されたものであり，すでに抗体を獲得している場合が多い[6]．しかし，食品の輸入量が多くなり，しかも魚介類が生きたまま海外から直送されるようになると，その食品を消費する地域住民が抗体を保有していないウイルスが持ち込まれ，ウイルス感染症の流行に発展する危険性がある．

このような魚介類を介した環境中でのウイルスの挙動を明かにすることは，現状では非常に困難である．その原因の一つは，「カキ」からのウイルス検出方法が確立されていないことにあると思われる．「カキ」からのウイルスの検出方法については，有機凝集法などを中心に種々検討されてはいるが[7-9]，「カキ」を乳剤にした際に生じる懸濁質が，ウイルス検出時の諸手法に妨害作用として働き，ウイルスの検出を困難にしている．

我々は，「カキ」の乳剤にポリオウイルスを添加し，乳剤からの懸濁質のみを除去してウイルスを効率よく回収する方法について検討したので，その概要を報告する．

材料と方法

1．マガキ　店頭で「加工用むき身カキ」として市販されているパック詰めマガキ(以下，カキと記載)を購入して使用した．カキは，実験に供するまで−20℃に凍結保存した．

2．ウイルス　ポリオウイルス弱毒株(Lsc, 2 ab)をBGM細胞で培養して使用した．培養方法は，常法に準拠した[10]．実験に供したウイルスの感染価は，約10^7 PFU／m*l* であった．

3．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穴のプラスチックプレート(コースター社製，3506)に培養した．ウイルス定量用の試料は，細胞維持液[10]で10倍段階希釈の系列を作り，1希釈当たり1 m*l* ずつ2穴の細胞に接種した．重層用培地等の処方は，常法[10]に準拠した．

4．カキ乳剤溶液　カキの乳剤は，以下に記載した溶液を使用して，10%乳剤とした．

1)純水　ミリポア社製逆浸透膜(RO)で処理した水道水を，さらに同社製ミリQ-ROでろ過処理した純水を用いた．

2)グリシン緩衝液　M／10濃度のグリシン溶液にM／10濃度のNaClを添加した溶液とM／10濃度のNaOH

*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 Metroporitan Research Laboratory of Public Health
24−1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

溶液または，M／10濃度の HCl 溶液を適当量混合して，所定の pH 値に調整した．

3）**リン酸緩衝液**　M／15濃度の Na_2HPO_4，KH_2PO_4，およびM／2濃度の NaOH 溶液を適当量混合して，所定の pH 値にした．

4）**ホウ酸緩衝液**　M／10濃度の KCl を添加したM／10濃度の H_3BO_3 溶液とM／10濃度の $NaCO_3$ 溶液を適当量混合して所定の pH 値にした．

5．**有機凝集剤**　以下に記載した2社の高分子有機凝集剤を使用した．

1）市川毛織株式会社製「アイケイフロックTシリーズ」のうち，9種類を純水で0.02％濃度に溶解したもの．

2）第一工業製薬株式会社製「シャロール DC シリーズ」のうち，3種類を，純水で0.2％濃度に溶解したもの．

6．**凝集剤によるカキ乳剤の清浄効果**　100グラム重量のカキを純水で10％乳剤にして，50ml ずつ分注したのち，各凝集剤を表1に記載した濃度で添加し，凝集効果と遠心分離後の上清について清浄度を判定した．判定基準は，表1に記載したとおりである．

7．**各種溶液で乳剤にしたカキに添加したウイルスの回収効果**　所定の溶液で，10％カキ乳剤を作成し，一定量のウイルスを添加後，図1に示した工程でウイルスの回収実験を実施した．

結　　果

1．**カキ乳剤の凝集剤による清浄効果**　アニオン性3種類，カチオン性9種類の凝集剤を用いて，カキ乳剤の凝集効果と清浄効果を調べた．結果は，表1にまとめたとおりで，アニオン性凝集剤は，凝集効果および，清浄効果共に認められなかった．カチオン性凝集剤は，凝集力が強く，カキ乳剤に清浄効果がみられ，特にT930とDC系列でその効果が高かった．

したがって，以下の実験は，T 930，DC-902 P，DC-303 P および DC-753 P の凝集剤を使用し，4種類の乳剤溶液を組み合わせて，ウイルスの回収効果をみた．

2．**純水で乳剤にしたカキに添加したウイルスの回収**

カキを所定の pH 値に調整した純水で10％乳剤にし，図1に示した実験工程に従って，添加ウイルスの回収率をみた．実験結果は，表2にまとめた．

凝集剤無添加の場合の回収率をみると，pH 7で9.7％しかなかった．このことから，添加したウイルスの90％近くが，カキ乳剤の固形物に吸着していることが分かった．また，pH 値を上昇させると，39.3％から56.7％まで回収率が上昇することから，pH 値の上昇が，固形物に吸着したウイルスを誘出させる重要な要因であることが判明した．しかし，pH 値の上昇のみでは，懸濁質が除去できず，上清中に細胞毒性が残存することが分かった．

凝集剤を添加すると，カキ乳剤の上清が清浄化し，かつウイルスもかなり回収できた．しかし，純水を使用す

カキ乳剤の作成
- ← カキ 100g
- ← 各種溶液 1,000ml
- ← 一定量のウイルス添加

かくはん

50mlずつ分注
- ← 各種凝集剤添加
  - T系列：200ppm
  - DC系列：1.000ppm

かくはん

遠心分離 3,000rpm 10分

上清→ウイルス量測定

図1．カキ乳剤に添加したウイルスの回収工程

表1．凝集剤によるカキ乳剤の清浄効果

凝集剤		凝集力*1	清浄度*2
アニオン	T212	0	0
	T535	0	0
	T550	0	0
カチオン	T884	2	1
	T888	4	2
	T895	3	1
	T896	3	3
	T910	3	3
	T930	4	3
	DC－902P	4	3
	DC－303P	4	3
	DC－753P	4	3

方法：カキ乳剤に凝集剤を添加し5分間かくはん後凝集力を判定した．清浄度は，3,000rpm 10分間遠心分離した上清について判定した．

凝集剤添加濃度：T系列は200ppm
　　DC系列は1,000ppm

カキ乳剤：pH 9の純水で10％乳剤とした．

＊1：凝集力を肉眼的に判断し，その強さを0（弱）～4（強）の段階で表示した．

＊2：上清の清浄度を肉眼的に判断し，0（懸濁）～4（清浄）の段階で表示した．

表2．純水で乳剤にしたカキに添加したウイルスの凝集剤による回収効果

乳剤のpH値	凝集剤	清浄度	回収ウイルス量 PFU／ml	回収率 %
7	無添加	0	560	9.7
8	無添加	0	2,260	39.3
8	T930	3	2,060	35.8
8	DC－902P	2	2,320	40.3
8	DC－303P	3	2,120	36.9
8	DC－753P	3	1,860	32.3
9	無添加	0	3,260	56.7
9	T930	3	2,910	50.6
9	DC－902P	3	3,047	53.0
9	DC－303P	2	2,850	49.6
9	DC－753P	3	2,020	35.1
10	無添加	0	3,050	53.0
10	T930	2	2,680	46.6
10	DC－902P	2	2,700	47.0
10	DC－303P	2	2,200	38.3
10	DC－753P	2	1,680	29.2

方　法：カキを所定のpH値に調整した純水で10％乳剤にし，ウイルス添加後，凝集剤を添加した．凝集剤の添加濃度は，表1に記載した．回収ウイルス量は，3,000rpm 10分間遠心分離した上清中のウイルス量で表示した．

ウイルス添加量：5,750PFU／ml一定とした．

清浄度：判定基準は，表1のとおりとした．

るかぎりでは，最高でも，pH 9でDC-902Pを使用して，53％にとどまった．

3．グリシン緩衝液で乳剤にしたカキに添加したウイルスの回収　カキの乳剤に使用する溶液をグリシン緩衝液として，前項の実験工程と同様に，添加したウイルスの回収効果をみた(表3)．グリシン緩衝液を使用すると，凝集剤無添加でも，pH値の上昇と共に，ウイルスの回収率は上昇した．回収率の最高値は，pH10で99％にも達した．しかし，上清の清浄効果は認められなかった．

一方，凝集剤DC-902PをpH 9で使用すると，清浄度4(上清が肉眼的にほとんど透明になる)，ウイルスの回収率96.2％となり，ほぼ，所期の実験目的を満足させる条件であった．

4．リン酸緩衝液で乳剤にしたカキに添加したウイルスの回収　同様の実験をリン酸緩衝液を用いて実施し，結果を表4に示した．ウイルスの回収率の最高値は，pH 9凝集剤DC-303Pの組み合わせで認められ，83.6％を示した．しかし，上清の清浄度は，グリシン緩衝液に比較すると劣った．

5．ホウ酸緩衝液で乳剤にしたカキに添加したウイルスの回収　ホウ酸緩衝液で同様の実験を行った結果を表5に示した．ホウ酸緩衝液の場合は，pH 8で上清が清浄化したが，ウイルスの回収効率はよくなかった(17.7～25.5％)．

6．カキ乳剤に添加したウイルスの濃度別回収実験

凝集剤12種類と，カキ乳剤に使用する溶液4種類について，乳剤の遠心上清の清浄効果とウイルスの回収率を指標に，効率よくカキに添加したウイルスを回収する条件検討を行った．その結果，設定した実験範囲内では，pH 9のグリシン緩衝液でカキを10％乳剤にし，凝集剤DC-902Pを1,000ppm濃度に添加すれば，カキ乳剤の懸濁質の除去とウイルスの高い回収率があることが分かった．

したがって，グリシン緩衝液と凝集剤DC-902Pの組み合わせで，カキに添加するウイルス濃度を変化させ，その実用性を検討した．

その結果，ウイルスの回収率は，表6に示したとおりで，添加ウイルス量が少なくなると，若干の低下する傾

表3．グリシン緩衝液で乳剤にしたカキに添加したウイルスの凝集剤による回収効果

乳剤の pH 値	凝 集 剤	清 浄 度	回収ウイルス量 PFU／ml	回 収 率 %
7	無添加	0	1,970	31.5
8	無添加	0	5,270	84.2
8	T930	2	3,650	58.3
8	DC－902P	3	5,450	87.1
8	DC－303P	3	5,560	88.8
8	DC－753P	3	4.270	68.2
9	無添加	0	6,150	98.2
9	T930	3	3,850	61.5
9	DC－902P	4	6,020	96.2
9	DC－303P	4	5,860	93.6
9	DC－753P	4	5,410	86.4
10	無添加	0	6,200	99.0
10	T930	3	3,340	53.4
10	DC－902P	4	4,230	67.6
10	DC－303P	4	4,780	76.4
10	DC－753P	4	4,010	64.1

方　法：カキを所定の pH 値に調整したグリシン緩衝液で10％乳剤にし，ウイルス添加後，凝集剤を添加した．凝集剤の添加濃度は表1に記載した．回収ウイルス量は，3,000rpm 10分間遠心分離した上清中のウイルス量で表示した．
ウイルス添加量：6,260PFU／ml 一定とした．
清浄度：判定基準は，表1のとおりとした．

表4．リン酸緩衝液で乳剤にしたカキに添加したウイルスの凝集剤による回収効果

乳剤の pH 値	凝 集 剤	清 浄 度	回収ウイルス量 PFU／ml	回 収 率 %
7	無添加	0	620	11.0
8	無添加	0	3,510	62.0
8	T930	1	3,650	64.5
8	DC－902P	1	2,860	50.5
8	DC－303P	1	3,960	70.0
8	DC－753P	1	3,350	59.2
9	無添加	0	3,750	66.3
9	T930	3	2,540	44.9
9	DC－902P	3	3,020	53.4
9	DC－303P	3	4,730	83.6
9	DC－753P	3	3,210	56.7
10	無添加	0	4,230	74.7
10	T930	3	3,020	53.4
10	DC－902P	3	2,930	51.8
10	DC－303P	3	4,410	77.9
10	DC－753P	3	2,380	42.0

方　法：カキを所定の pH 値に調整したリン酸緩衝液で10％乳剤にし，ウイルス添加後，凝集剤を添加した．凝集剤の添加濃度は，表1に記載した．回収ウイルス量は，3,000rpm 10分間遠心分離した上清中のウイルス量で表示した．
ウイルス添加量：5,660PFU／ml と一定した．
清浄度：判定基準は，表1のとおりとした．

表5．ホウ酸緩衝液で乳剤にしたカキに添加したウイルスの凝集剤による回収効果

乳剤のpH値	凝集剤	清浄度	回収ウイルス量 PFU／ml	回収率 %
7	無添加	0	670	13.8
8	無添加	0	2,970	61.0
8	T930	4	1,050	21.6
8	DC－902P	4	970	19.9
8	DC－303P	4	1,240	25.5
8	DC－753P	4	860	17.7
9	無添加	0	4,340	89.1
9	T930	2	3,650	74.9
9	DC－902P	1	4,020	82.5
9	DC－303P	2	3,940	80.9
9	DC－753P	2	4,180	85.8
10	無添加	0	4,450	91.4
10	T930	2	4,060	83.4
10	DC－902P	2	4,290	88.1
10	DC－303P	2	4,130	84.8
10	DC－753P	2	3,980	81.7

方　法：カキを所定のpH値に調整したホウ酸緩衝液で10％乳剤にし，ウイルス添加後，凝集剤を添加した．凝集剤の添加濃度は，表1に記載した．回収ウイルス量は，3,000rpm 10分間遠心分離した上清中のウイルス量で表示した．

ウイルス添加量：4,870PFU／ml一定とした．

清浄度：判定基準は，表1のとおりとした．

表6．カキに添加したウイルスの有機凝集剤（DC－902P）による回収効果

添加ウイルス量 PFU／ml	回収ウイルス量 PFU／ml	回収率 %
290,000	284,000	97.9
260,000	257,000	98.8
100,500	89,500	89.1
67,000	62,700	93.6
54,500	53,000	97.2
46,600	41,000	88.0
9,200	8,900	96.7
6,540	5,360	82.0
4,830	4,630	96.0
640	520	81.3
520	470	90.4
370	262	70.8
平均回収率(％)		90.2

カキ乳剤：pH9.0グリシン緩衝液（1％NaCl添加）で10％乳剤した（全容量50ml）．

凝集剤添加濃度：1,000ppm濃度に添加した．

ウイルスの回収：3,000rpm 10分間遠心分離した上清．

向が認められたが，平均回収率は，90.2％と高率であった．

考　察

カキからヒトの腸管系ウイルスを検出する方法を確立するための前段階として，カキに実験的に添加したポリオウイルスを回収する方法について検討した．

実験条件は，我々が「水中ウイルスの検査法」として検討してきた成果[11,12]を踏まえて，カキ乳剤の懸濁質を除去した状態で効率よくウイルスを回収することを目的に設定した．

つまり，水中ウイルスは，水中に混入している有機性の固形物(下水汚泥等)にそのほとんどが吸着する．そして，吸着したウイルスは，pH値を上昇させれば誘出可能である．また，凝集剤は，水中の懸濁質を速やかに凝集塊として沈降させる性質がある[11,12]．

これらの特性を利用して，実験構成は，凝集剤12種類と，カキ乳剤に使用する溶液4種類とした．

凝集剤は，無処理の自然水に添加すると，ウイルス粒子と共に，懸濁質を凝集する特性がある[13]．しかし，試料水のpHを変化させれば，ウイルス粒子を巻き込ま

ないで，懸濁質のみを凝集沈殿させる凝集剤があるはずである．

今回の実験は，そこに着目して，pH 値を上昇させてウイルス粒子を懸濁質から誘出させた状態で，懸濁質のみを凝集させるカチオン性凝集剤を見つけ出したものである．

カチオン性の凝集剤は，試料水をアルカリ側に調整すれば，ほとんどの場合，強力な凝集効果と上清の清浄効果が認められた．しかし，ウイルスの回収率は，カキの乳剤に使用する溶液の種類によって，大きな差が認められた．

このことから，カキに吸着したウイルスを効率よく誘出させるには，カキ乳剤に使用する溶液の選択がポイントであると推定された．今回の実験結果により，カキからのウイルスの誘出には，グリシン緩衝液が有効であると判明した．そのメカニズムについては，今後の研究で明らかにしたい．

実際にカキが蓄積しているウイルスを検出するには，そのウイルス量が微量であると推測されるので，カキ乳剤の上澄液をさらに濃縮する必要がある．そのための方法としては，ビーフエキストラクトによる凝集沈殿[14]，ゼータプラスフィルター法による濃縮[15]等が考えられる．このような二次濃縮方法については，引き続き検討する予定である．

今回検討した，グリシン緩衝液とカチオン性凝集剤の組み合わせによる懸濁質からのウイルス回収方法は，カキばかりでなく，ヒト由来の様々なウイルス分離用検体の前処理として有効に活用できると思われる．

たとえば，腸管系ウイルスの分離を目的として採取された糞便の処理，水中ウイルスの分離を目的として大量の試料水をフィルターにより濃縮したウイルス誘出液の二次濃縮などに応用できると思われる．

結　　論

カキからのウイルス分離方法を確立する目的で，カキ乳剤に添加したポリオウイルスを回収する方法について検討した．

その結果，pH 9 のグリシン緩衝液（M／10NaCl 添加）でカキを10％乳剤にし，カチオン性高分子凝集剤シャロール DC-902 P を1,000ppm 濃度に添加すれば，カキ乳剤の懸濁質の除去とウイルスの高い回収効果があることが分かった．

この方法により，カキ乳剤に添加したウイルス（10^2～10^5 PFU／ml）を回収した場合の回収率は，70.8～98.8％，平均90.2％となった．

（本研究は，昭和63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）矢野一好，林志直，薮内清，田口文章：用水と廃水，27(5)，489-495，1985.

2）Matsuura, K. , Hasegawa, S. et al. : *Microbiol. Immunol.*, 28(5)，575-588，1984.

3）Sanchez, P. S., Agudo, E.G. et al. : *Water Sci. Tec.*, 18(10)，61-72，1986.

4）Cole, M. T., Kilgen, M. B., Reily, L.A. and Hackney, C.R. : *J. Food* Prot., 49(8)，596-601，1986.

5）Seiji, S., Shojirou, O., Yukinao, H. et al. : *Microbiol. Immunol.*, 33(3)，207-217，1988.

6）薮内清，矢野一好，柴田タツ美，林志直，岩崎謙二：東京衛研年報，31-1，36-39，1980.

7）Sullivan, R., Peeler, J., Tierney, J. T., Larkin, E. P. : *J. Food Prot.*, 47(2)，108-110，1984.

8）Sullivan, R., Peeler, J. T. and Larkin, E. P. : *J. Food Prot.*, 49(3)，226-228，1986.

9）Kostenbader, K. D. and Cliver, D. O. : *Appl. Microbiol.*, 24(10)，540-543，1972.

10）厚生省監修：微生物検査必携ウイルス・リケッチア検査，日本公衆衛生協会，東京.

11）矢野一好，林志直，薮内清，田口文章：用水と廃水，28(2)，183-191，1986.

12）矢野一好，林志直，薮内清，田口文章：用水と廃水，28(3)，281-287，1986.

13）矢野一好，林志直，柴田タツ美，薮内清，岩崎謙二：東京衛研年報，33，47-53，1982.

14）Joan, I. P., Roderic, P. and Joost, H. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(11)，2666-2670，1987.

15）Joret, J.C. and Hassen, A. : *Water Sci. Tec.* 18(10)，133-140，1986.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 32-35, 1989

東京都における風疹抗体保有状況（1982—1988年）

吉田靖子*，矢野一好*，薮内　清*

Seroepidemiological Survey of HI Antibody against Rubella Virus in Tokyo in 1982—1988

YASUKO YOSHIDA*, KAZUYOSHI YANO* and KIYOSHI YABUUCHI

Keywords：血清疫学 seroepidemiology, HI 抗体価 HI titer, 風疹ウイルス rubella virus, 回帰分析 regression method

緒　言

風疹は，小児に好発する急性の発疹性疾患で，6～10年ごとの周期で全国的に流行を繰り返している[1]．通常，小児が罹患した場合は軽症で経過するが，妊娠初期の女性が罹患すると先天性の心臓疾患，難聴，白内障，精神運動機能障害，紫斑病などの障害を持った子供(先天性風疹症候群児，CRS)が生まれることで社会問題視されている[2-5]．

妊娠初期における風疹ウイルスの感染により，引き起こされるCRSの発生を予防するために，1977年より女子中学生を対象に風疹生ワクチンを定期接種するようになった[6]．また，成人女子に対しても任意接種が実施された．この風疹生ワクチンの接種はすぐれた効果を上げているが，接種を受ける対象が限られた年令層のため，低年令層やワクチン開発以前に成人した妊娠適令期女性での感染が依然として多くみられている[1]．

東京都内での風疹の大流行は1975年から1977年にみられた後は，5年間隔で1982年と1987年にみられた[7]．このような風疹の流行と健康人の抗体保有の挙動を明かにする目的で，東京都内に居住する健康者の風疹HI抗体保有状況を年次的に調査したので報告する．

材料と方法

1．健康者血清　被検血清は，都内に居住する生後7か月の乳児から87才までの健康者3,067名から採取した．採取期間は，1982年5月から1988年10月の間であった．供試血清は，試験時まで－20℃のフリーザー内に凍結保存した．

2．HI試験　術式は予研法(カオリン処理・がちょう新鮮血球を使用)により行った[8]．HA抗原は市販品(デンカ生研)を使用した．

3．回帰分析　回帰直線の算出は，最小二乗法により行った[9]．風疹HI抗体価別の累積抗体保有率の平方根値(Y値)は，HI価(8×2^nのn値)への回帰として考え，回帰式$Y=a+bX$を導いた．aおよびb値は常数値である．

結　果

1．年次別にみた成人層の風疹HI抗体保有率の推移

1982年から1988年に都内に居住する16才から87才までの健康者から採取した血清2,212件について風疹HI抗体保有状況を調査した．その結果を表1に示した．

各年次におけるHI価8倍以上の抗体保有率は，83.2%から97.6%の範囲にあり，高い保有率を示していた．特に，1982年から1984年の3か年においては90.5%から97.6%の高い保有率を示した．なおかつ，ここ数年におけるHI価512倍以上での抗体保有率は，高率であり，1984年においては，42.2%と高い比率を示していた．平均HI抗体価でみると，1984年はHI価$4\times2^{5.96}$(幾何平均値249倍)と高く，次いで1982年の$4\times2^{4.80}$(幾何平均値111倍)，1983年の$4\times2^{4.70}$(幾何平均値104倍)，1987年の$4\times2^{4.44}$(幾何平均値87倍)，1988年の$4\times2^{4.25}$(幾何平均値76倍)であった．

2．年令階層0～15才における風疹HI抗体保有状況

1982年，1983年と1988年に採取した7か月の乳児から15才までの健康者855名の血清について，風疹HI抗体価を測定し，その抗体保有状況を表2に示した．

*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．東京都における風疹HI抗体保有状況

年次	検査数	風疹HI抗体価（4×2ⁿのn値）										抗体保有率%		平均抗体価
		＜1	1	2	3	4	5	6	7	8	≧9	≧1	≧7	(4×2ⁿのn値)
82	619	59	10	30	86	127	128	91	50	25	13	90.5	14.2	4.80
83	918	82	32	50	122	183	188	139	68	36	18	91.1	13.2	4.70
84	336	8	2	8	20	24	47	85	103	35	4	97.6	42.2	5.96
87	179	30	1	15	25	33	33	35	7			83.2	3.9	4.44
88	160	17	4	7	31	41	36	15	9			89.4	5.6	4.25

表2．年令階層0～15才における風疹HI抗体保有状況

年次	検査数	風疹HI抗体価（4×2ⁿのn値）										抗体保有率%		平均抗体価
		＜1	1	2	3	4	5	6	7	8	≧9	≧1	≧7	(4×2ⁿのn値)
82	501	277	10	15	18	10	14	47	52	44	14	44.7	21.9	5.92
83	182	89	8	5	7	19	22	21	6	5		51.1	6.0	4.66
88	172	88	1		2	13	27	28	9	4		48.8	7.5	5.44

HI価8倍以上の風疹HI抗体保有率は，それぞれの年次で44.7%，51.1%，48.8%を示し，成人層のHI抗体保有率に比べて低率であり，調査した低年令層の50%以上は，風疹に対して感受性があることがわかった．しかし，平均HI抗体価で比較すると，成人層においては，平均HI抗体価4×2ⁿのn値が4.25から5.96(幾何平均値76～249倍)を示していたのに対して，低年令層はn値が4.66から5.92(幾何平均値101～242倍)を示しており，HI抗体を保有している者の平均HI抗体価は，成人層との間に著しい変化はみられなかった．

1988年の結果をみると，抗体をもたない88名のうち63名(71.6%)は5才以下の年令層であった．6～15才の年令層では，抗体を保有するものが84名中54名(64.3%)であった．このことは，1988年においては6～15才の年令層で風疹の自然感染が多かったことを示唆している．

3．各年次における風疹HI抗体保有率の回帰分析

15才以下の年令層のHI抗体保有状況を，回帰分析法で解析し，その結果を図1に示した．

この年令層における1982年，1983年，1988年の回帰直線は，相関係数0.9515，0.8925，0.9037を示し，1%の危険率で強い負の相関性を示していた．また，それぞれの年次における実測値も回帰直線の95%信頼限界内にあった．

回帰直線とY軸との交点であるHI抗体保有率の平方根値は小さくなっており，低年令階層に感受性者が多いことを示している．一方，X軸との交点である抗体価を

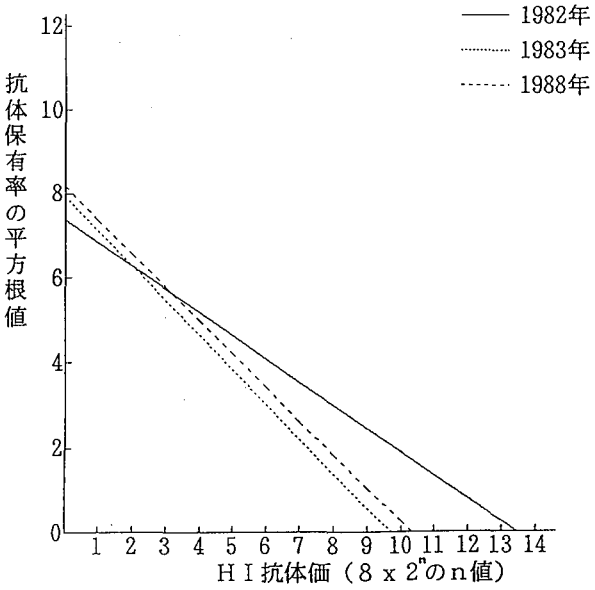


図1．各年次における15才以下の風疹HI抗体保有率の回帰直線

みると，1982年はX＝13.41，1983年はX＝9.72，1988年はX＝10.35と大きい値を示していた．特に，1982年は高い抗体価をもつ比率が大きかった．

次に，16才以上の成人層におけるHI抗体保有状況の回帰直線を図2に示した．各年次における成人層での回帰直線は，相関係数0.8888から0.9760の範囲にあり，

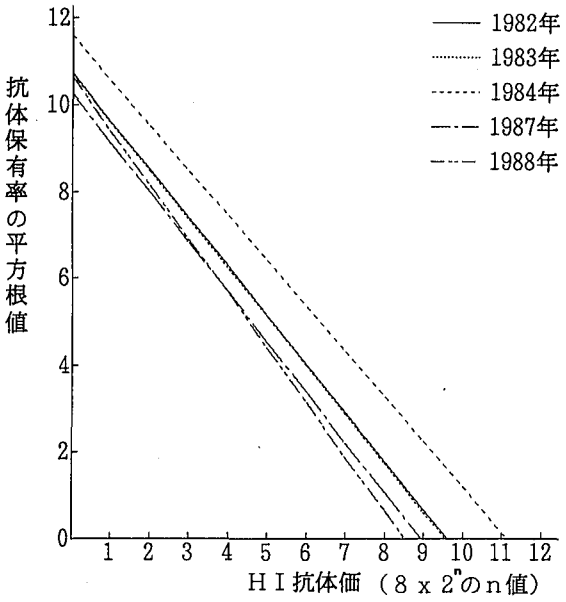


図2．各年次における成年層の風疹HI抗体保有率の回帰直線

1％の危険率で強い負の相関性を示し，すべての実測HI抗体保有率は回帰直線上の95％の信頼限界にあった．

調査した年次のHI抗体保有率の回帰直線とY軸との交点の値は，10.28から11.60を示し著明な差はみられなかった．しかし，回帰直線とX軸との交点の値は，8.49から11.20を示しており，集団での最大HI抗体価には差がみられた．1982年と1983年はほぼ同じ値であり，1984年次に大きくなり，それ以降の年次では小さくなっている傾向がみられた．

成人層での回帰直線の位置変化からみると，1984年次が，抗体保有率，および最大抗体価ともに高い値を示した．

考　　察

1977年8月以降女子中学生を対象としたワクチン接種が開始されて以来，風疹の流行は減少した．しかし，現行のワクチン接種は風疹の流行阻止ではなく，妊娠初期に風疹ウイルスに感染することによって生じる先天性風疹症候群児[4,5,10]の発生を予防することを目的として行われている．そのため妊娠可能年令の女性のみを対象にワクチン接種が実施されている．現実には毎年のように低年令層，特に幼稚園や小学校などでは流行を繰り返している[5]．大流行時には学級閉鎖や休校などで学校教育に影響を及ぼすことはもちろん，脳炎・髄膜炎などの重篤な経過をたどる場合も少なくないことがわかっている[5]．

今回の調査において，成人層におけるHI抗体保有率は，83.2％から97.6％と高率であり，風疹の生ワクチン接種の効果が目立つ結果となった．

1984年の結果をみると，8倍以上の抗体保有率が97.6％，512倍以上の抗体保有率が42.2％と高くなっていた．さらに，平均HI抗体価も高い値を示しており，成人層において両値ともに最高値を示した．しかし，東京都の結核感染症サーベイランス情報をみると1984年は風疹患者発生数が少ない年であった．このことは，風疹の流行が局所的であったため，調査した場所での抗体保有率のみが高かったことに起因するのかもしれない．この推測は，非流行期でも，患者数は少ないながら流行期と同じようなパターンで患者の発生がみられるという報告からも示唆される[11]．

15才以下の年令層におけるHI抗体保有率は，成人層と比較すると低率(50％前後)であったが，平均HI抗体価では差がみられなかった．15才以下の年令階層は，ワクチン接種の対象年令になっていない年令層であるので(一部，ワクチンの任意接種で受けている者を含むが)，抗体を保有している者の大部分は風疹の自然感染を受けた者と推測した．このことは，15才以下の年令層が風疹の好発年令層であることを示唆している．

米国においては，1969年より風疹の流行阻止を目的として，乳幼児を対象に麻疹・ムンプス・風疹(MMR)三種混合ワクチンの接種を実施している[12]．わが国においては，個々のワクチンにおいてそれぞれの感染症防止に効果を上げているが，現行の予防接種法により接種時期，接種年令などの関係で，同時に幼少児に接種するに至っていなかったが，MMRワクチンの開発に伴ない1989年より実効化されるようになった[3]．今後は，MMRワクチンの効果についても追跡調査する必要があると思われる．

結　　論

1982年から1988年の間に，東京都内に居住する健康者から採血した血清を用いて風疹HI抗体保有状況を調査し，つぎの結論を得た．

1)調査した年次における成人層での風疹HI抗体保有率は，83.2％から97.6％と高率であった．

2)1982年から1984年における風疹HI抗体保有率は，特に高かった．

3)15才以下の年令層での風疹HI抗体保有率は，50％前後と低率であったが，HI抗体を保有している者

の平均HI抗体価で比較すると成人層と差がなかった．低年齢層で抗体を保有している者は，ワクチン接種対象外の年令層であるので，自然感染によって抗体を獲得していることが示唆されたと同時に，この年令階層が風疹の好発年令であることがわかった．

文　献

1）厚生省公衆衛生局保健情報課：感染症定点観測調査成績表，1982-1988.

2）星　龍雄：臨床とウイルス，特別号，46-56，1976.

3）植田浩司，他：臨床とウイルス，16(4)，436-440，1988.

4）Rendle, S.J.: *Lancet ii*, 373-376, 1964.

5）Ueda, K., *et al*: *Am. J. Epidemiology*, 124, 807-815, 1986.

6）Shishido, A., *et al.*: *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 32, 253-268, 1979.

7）東京都結核感染症サーベイランス情報：1982-1988.

8）厚生省監修：微生物検査必携ウイルス・リケッチア検査，347-356，1978，日本公衆衛生協会，東京.

9）P.G. ホーエル：初等統計学，198-218，1979，培風館，東京.

10）CDC: *MMWR*, 33, 237-242, 1984.

11）木村三生夫：臨床とウイルス，16(3)，321-331，1988.

12）International symposium of prevention of congenital rubella infection: *Rew. Inf. Dis.*, 7 (Suppl), S 1-S 215, 1985.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 36-40, 1989

東京都内のインフルエンザ検索成績
(1988年11月～1989年4月)

山崎　清*, 伊藤忠彦*, 新開敬行*, 大貫奈穂美*,
貞升健志*, 薮内　清*

Prevalence of Influenza Occurred in Tokyo
(Nov. 1988～Apr. 1989)

KIYOSHI YAMAZAKI*, TADAHIKO ITO*, TAKAYUKI SHINKAI*, NAHOMI OHNUKI*,
KENJI SADAMASU* 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

近年のインフルエンザ(以下「イ」と略す)の流行は，同一時期にAH１型，AH３型およびＢ型の三種[1,2]あるいは二種[3-6]の異なったウイルスが混在して認められる事がたびたびあった．今冬期の東京都における「イ」の流行は，われわれが検索し得た範囲内ではAH１型ウイルスによる単一型であった．

本報では，1988年11月から1989年４月までに，東京都内で発生した「イ」様疾患による集団発生患者および渋谷区内の医療機関を個々に受診した患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　1988年11月上旬から1989年４月中旬までに，集団かぜのため学級閉鎖等の措置がとられた都内の小，中学校の計31集団146名(１集団約５名)の罹患学童および生徒を検査対象とした．また，流行予測事業の一環として，渋谷区内の数カ所の医療機関を受診した散発例の「イ」様疾患々者28名(６歳～56歳，中15歳以下19名)も合わせて検査した．

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174例をウイルス分離材料とし，発育鶏卵およびRD, Hep２，Hela, vero355，MDCKの各種培養細胞を用いて行った．検査術式は図１に示した．

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．それぞれの検査術式を図２・３に示した．

CF試験には「イ」Ａ型，Ｂ型のＳ抗原(自家製)およびアデノウイルス抗原(デンカ生研製)を，また，ＨＩ試験には下記の「イ」ウイルスを抗原株として用いた．

AH１型・Ａ／山形／120／86，Ａ／東京／1208／88
AH３型・Ａ／福岡／Ｃ-29／85，Ａ／四川／２／87
Ｂ　型・Ｂ／長崎／１／87

このうち東京／1208／88は今期分離株，他の４株は，すべて今期ワクチン株である．CF, ＨＩ試験共に回復期の抗体価が急性期のそれに対し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

患者の病因検索　集団かぜ患者の病因検索状況を表１に示した．すなわち1988年11月９集団，12月21集団，1989年４月１集団の計31集団について，ウイルス分離試験ならびに血清学的試験を行った．検索結果から16集団(患者74名中25名)より「イ」AH１型ウイルスが分離され，血清学的に明らかとなった５集団を含め31集団中21集団は「イ」AH１型ウイルスによるものであった．残りの10集団のうち１集団は血清学的にアデノウイルスによるものと判明した．９集団は病因ウイルスが明らかにされなかったが，このうち１集団(５名中１名)に，パラインフルエンザウイルス２型抗原に対するＨＩ抗体の有意上昇が認められ，同ウイルスによる感染であることが確認された．

病因ウイルスの混在が示唆される集団例として，「イ」

*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

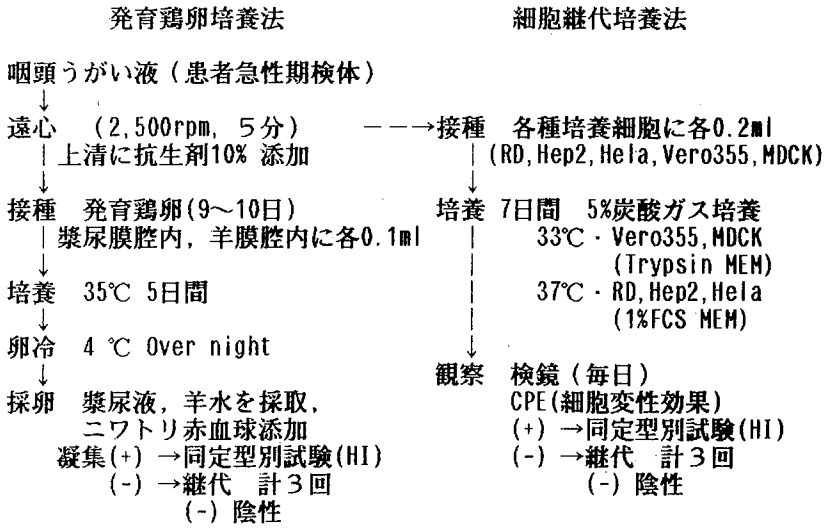


図１．発育鶏卵および培養細胞によるウイルス分離試験

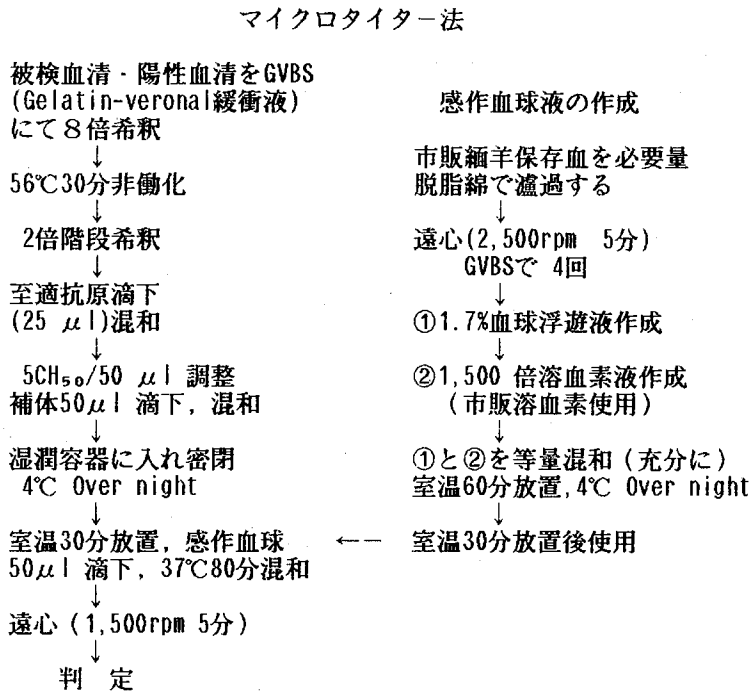


図２．インフルエンザ，アデノウイルス CF 試験術式

マイクロタイター法

被検血清・陽性血清，RDE 処理（HA抑制物質除去）
（RDE で4倍希釈）
↓
37℃ Over night
↓
56℃30分非働化
↓
赤血球25μl 滴下（自然凝集素の除去・ニワトリまたはモルモット血球）混和→ 4℃60分放置
↓
遠心(2,500rpm 5分) 上清分離
↓
2倍階段希釈
↓
至適抗原滴下(25 μl)混和→室温60分放置
↓
0.5%血球浮遊液50μl 滴下，混和→ 4℃60分静置
↓
判 定

図3．インフルエンザ，パラインフルエンザウイルスＨＩ試験術式

AH 1 型ウイルスと他のアデノウイルスの混在が1集団に，また，後述する小球形ウイルス(Small round structured virus 以下 SRSV と略す)に対する血中抗体の有意上昇が認められた2集団であった．その後これら病因不明の9集団のうち検査材料が得られた8集団については，免疫電顕法(ふん便)および WB 法(ペア血清)による SRSV の検索を行った．その結果6集団(30名中19名)の患者に SRSV の感染が認められた．このように集団かぜのうち，従来よりいわれていた下痢および嘔吐などの症状を伴う「いわゆる胃腸炎型感冒」といわれる症例の中に SRSV 感染症が含まれていることが示唆された[7,8]．

散発例患者については，1988年11月2例，12月26例の計28例の検査材料について検索を行った(表2)．この結果「イ」AH 1 型ウイルスが12株分離されたが，残り16例はウイルス分離試験陰性であり，病因を明らかにすることはできなかった．また，ウイルス分離試験陰性で，かつ回復期血清が得られなかった16例の中には急性期血清に「イ」A型，およびアデノウイルスに対してすでに

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 AH 1 型	アデノ	不明		インフル AH 1 型	アデノ	インフル AH 1 型	パラインフル 2 型	アデノ
1988. 11上	1			1	5					
中	2	1	1		10	1		4		4
下	6	4		2	30	2		14		1
12上	11	7		4	47	6		16	1	
中	10	8		2	49	14		32		
1989. 4中	1	1			5	2		4		
計	31	21	1	9	146	25		70	1	5

表2．散発例患者の病因検索状況

発生年月旬	検索件数	診断			ウイルス分離		血清学的試験	
		インフル AH1型	アデノ	不明	インフル AH1型	アデノ	インフル AH1型	アデノ
1988. 11下	2			2				
. 12上	18	8		10	8		2	
中	8	4		4	4		3	
計	28	12		16	12		5*	

*：全例ウイルス分離陽性

表3．1988年11月～1989年4月インフルエンザAH1型ウイルス分離陽性者のHI試験成績

回復期

A／山形／120／86（H1）

急性期	<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	>8	計
<1						1**					1
1								3	1	1	5
2							1			1	2
3						1		1		1	3
4							1	4	1	3	9
5									1	1	2
6									1		1
7											
計						2	2	8	4	7	23

A／東京／1208／88（H1）

急性期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	>8	計
<1					1		2	1	1		5
1						1	1		1		3
2					1		1	2			4
3						1	1	3	1		6
4							1		2		3
5							1				1
6										1	1
7											
計					2	2	7	6	5	1	23

B／長崎／1／87

急性期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	>8	計
<1											
1		1									1
2			1								1
3				5							5
4					8	1					9
5						5					5
6							2				2
7											
計		1	1	5	8	6	2				23

A／福岡／C-29／85（H3）

急性期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	>8	計
<1											
1		1									1
2			1								1
3				4							4
4					7						7
5						4					4
6							3				3
7								2			2
8										1	1
>8											
計		1	1	4	7	4	3	2		1	23

A／四川／2／87（H3）

急性期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	>8	計
<1	2										2
1		3	1								4
2			6								6
3			1	3	1						5
4					4						4
5						2					2
6											
7											
8											
>8											
計	2	3	8	3	5	2					23

*：8×2^{n}値
**：例数

高いCF抗体価を保有するものが多く認められた．このことは，これらの患者はすでにある程度病日が経過した状態で開業医を受診した結果と考えられる．

「イ」AH1型患者のHI試験成績　「イ」AH1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23例について，供試5抗原ウイルス株に対するHI抗体価の変動を表3に示した．AH1型である山形／120／86(ワクチン株)と東京／1208／88(今期分離株)両者に対する急性期および回復期におけるHI抗体価ならびに抗体保有率を比較すると，急性期にすでに高いHI価を保有している例が多く，このためこれらの例では抗体上昇率も小さいものであった．両者の急性期におけるHI抗体の保有を128倍以上で比べると前者は13／23(52.2%)後者は5／23(21.7%)と前者が約2.4倍上回っている．このことはワクチン株と分離株との間に，抗原的な差によることもあろうが，AH1型ウイルスは1977年に出現して以来，若干の抗原変異を繰り返しながら現在に至っていることから，この間の感染経験あるいはワクチン接種歴を反映し，その結果として急性期に高い抗体を保有する例が多く認められるものと考えられる．

なお，今冬期の「イ」様患者ペア血清においてAH3型およびB型ウイルス株に対してCFおよびHI抗体の有意上昇例は1例も認められなかった．

以上のように今冬期の東京都における「イ」の流行は，

AH 1 型ウイルス単一によるものであると認められ，全国的にも同ウイルスが流行の主体であった．しかし一部の県においては，AH 3 型あるいはB型ウイルスとの混合感染があったと報告されている[9]．

ま と め

1．東京都内における1988年11月上旬から1989年4月中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 AH 1 型ウイルスを主因とする流行であった．また，AH 1 型ウイルスの流行に先行してアデノウイルスによる感染が認められた．

2．「イ」AH 1 型ウイルスを病因とする集団例のうち1集団(5名中1名)に，アデノウイルスに対する CF 抗体価の有意上昇が認められ，同一集団内に「イ」AH 1 型とアデノウイルスの混在が確認された．また，病因を明らかにできなかった1集団(陽性者5名中1名)に，パラインフルエンザウイルス2型抗原に対するＨＩ抗体の有意上昇が認められた．

文 献

1）坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎 清，岩崎謙二：東京衛研年報，32-1，48-54，1981
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）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
4）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
5）坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎 清，岩崎謙二：東京衛研年報，29-1，70-74，1978
6）山崎 清，伊藤忠彦，中村清純，新開敬行，大貫奈穂美，薮内 清：東京衛研年報，39，32-34，1988
7）関根整治，安東民衛，林 志直，岡田正次郎，薮内清，三木 隆，大橋 誠：感染症誌（臨時増刊号），63，202，1989
8）林 志直，関根整治，安東民衛，伊藤忠彦，山崎清，新開敬行，大貫奈穂美，貞升健志，薮内 清，三木 隆，大橋 誠，鈴木重任，堀田義洋，小杉真紗人，田中 学：東京都衛生局学会誌，82，86-87，1989
9）厚生省保健医療局情報疾病対策課結核・感染症対策室：インフルエンザ様疾患発生報告（第21報），1989

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 41-45, 1989

東京都における麻疹抗体保有状況（1984—1988年）

吉田靖子*，矢野一好*，薮内　清*

Seroepidemiological Survey of HI Antibody against Measles Virus in Tokyo in 1984—1988.

YASUKO YOSHIDA*, KAZUYOSHI YANO* and KIYOSHI YABUUCHI*

Keywords：血清疫学 seroepidemiology, HI 抗体価 HI titer, 麻疹ウイルス measles virus, ワクチン接種 vaccination, 回帰法 regression method

緒　言

麻疹は「はしか」とも呼ばれ，麻疹ウイルスの感染によって起こる急性発疹性ウイルス疾患である．

その感染予防の手段であるワクチン接種は，1978年(昭和53年)より，定期接種として全国的に開始された．ワクチンの普及に伴ない患者発生数は年々減少してきたが，1983年末頃から1984年春にかけて同疾病の流行が確認されている[1,2]．その背景には，ワクチン接種率が全国的に60～70％に留まっており[3]，まだまだ十分とはいえない現状がある．したがって，感受性者の蓄積という新たな問題が生じている．

東京都においてはここ数年，小学校内においてすでにワクチン接種を受けている児童を含めて，集団的に麻疹に罹患した例が相次いで起きた．その原因を究明するための一環として，都内に居住する健康者，特に15才以下の乳幼児，児童を対象に麻疹ウイルスに対する HI 抗体価の保有状況を調査した．

本稿では，1984年から1988年にかけて採取した血清について年令階層別の麻疹 HI 抗体保有状況，およびワクチン接種歴と抗体保有の関係について調査した結果を報告する．

材料および方法

1．健康者血清　被検血清は，都内に居住する生後7か月から15才までの健康者452名から採取し，試験時まで－20℃のフリーザーに凍結保存した．採取年次は，1984年から1986年および1988年とし，採取月は，いずれの年次も6月から10月までとした．

2．麻疹 HA 抗原　使用した HA 抗原は，麻疹ウイルス(豊島株)を KB 細胞で培養して増殖させ，遠心分離により精製したのち Tween80・エーテル処理を行い，ウイルス粒子を分解して HA 分画のみの浮遊液とし，安定剤として牛血清アルブミンを加えて凍結乾燥した市販品(デンカ生研)である．本試験には，4凝集単位／0.025m*l* に調整した抗原を使用した．

3．HI 試験　1984年から1986年にかけて採取した血清260件については，「麻疹ウイルス HI 試験用試薬キット」(デンカ生研)を使用した．本試験に使用したミドリザルの赤血球液は，ミドリザルの新鮮赤血球液をアルデヒドで固定したのち，凍結乾燥したものを0.4％濃度の赤血球浮遊液として調整した．ヒト血清における正常凝集素を取り除くための血球液は，サルの新鮮赤血球をアルデヒドで固定したものを使用した．試験法としては，キットに記載されたマイクロタイター法の手技によりV型リジットマイクロプレートを用いて行った．

1988年に採取した192件の血清は，ミドリザルの新鮮赤血球とU型リジットマイクロプレートを用いて，常法[4]により HI 試験を行った．

4．回帰分析法　調査結果の統計処理は，調査した集団の累積抗体保有率を求め，最小二乗法により，それらの値とずれの少ない点を通る回帰直線を算出し，その直線の位置変化によって，集団の抗体保有状況の変化を分析した．グラフ上の回帰直線の位置は，Y軸(累積抗体保有率の平方根値)の交点(ここでは HI 抗体価≧ 8×2^0 の抗体保有率の平方根値)と，X軸(HI 価 8×2^n の n 値)の交点(ここでは保有率が0％になる抗体価，計算上の最大抗体価)の2つによって規制される．この2つの

*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 Metroporitan Research Laboratory of Public Health
24－1，Hyakunincho 3 chome, Shinjuku－ku, Tokyo, 169 Japan

表1．麻疹ウイルスHI抗体保有状況の年次推移

年　次	検査例	HI抗体価(4×2ⁿのn値)								抗体保有率(n≧1) %	平均HI抗体価* x̄±SD
		<1	1	2	3	4	5	6	≧7		
1984	84	23	2	4	17	9	18	5	6	72.6	4.24±1.52
1985	128	87	6	16	6	9	3	1		32.0	2.75±1.29
1986	48	8	4	12	14	6	2	2		83.3	2.90±1.24
1988	192	53	48	45	35	7	4			72.3	2.09±1.03

＊平均HI抗体価＝4×2^{n}のn値
x̄＝n値の平均値
SD＝標準偏差

値で各抗体価別の計算上の保有率は決まってしまう．この方法で解析すると，調査集団のHI価8倍以上の保有率は，流行の拡大または規模を，計算上の最大抗体価となる数値は，大きくなるほど近い過去に多くの感染者があったことを示すことがわかっている．

結　　果

1．麻疹HI抗体保有状況の年次別推移からみた麻疹の流行実態　都内に居住している7か月の乳児から15才の学童計452名から採取した血清について，麻疹HI抗体価を測定し，年次別に抗体保有状況を集計した．その結果は表1にまとめた．

1984年，1986年，および1988年においては，麻疹HI抗体価8倍以上の保有率がそれぞれ72.6%，83.3%，72.3%となっており顕著な差はみられなかった．しかし，1985年には32.0%となっており抗体保有率の一時的な低下が認められた．

年次別における平均HI抗体価で比較すると，1984年においては，$4\times2^{4.24}$(幾何平均値76倍)と高値を示したが，1985年は$4\times2^{2.75}$(同27倍)，1986年は$4\times2^{2.90}$(同30倍)，1988年は$4\times2^{2.09}$(同17倍)となっており，1984年を除いて著者な差はみられなかった．

次に，調査年次ごとの集団レベルでのHI抗体保有状況の推移を統計学的に解析した．調査年次別の累積抗体保有率から求めた回帰直線は図1に示したとおりである．求めた各年次の回帰直線の相関係数は，0.961，0.993，0.985，0.993と強い負の相関性を示しており，今回の解析に導入した統計処理の方法が適切であったことが裏付けられた．

回帰直線のY軸，X軸との交点の値を指標にして，麻疹の流行規模を推測すると，1984年の値がY＝9.41，X＝8.98で，他の年次に比べて最も大きい値を示した．このことは，1984年次に大きな麻疹の流行がみられたこと

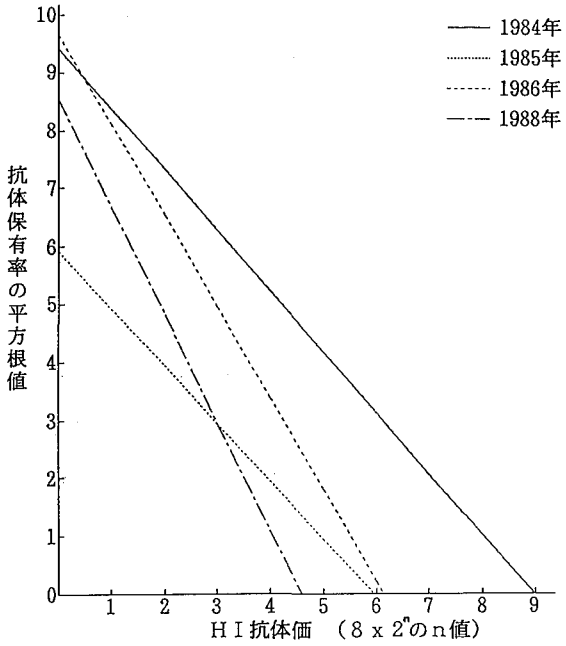


図1．麻疹HI抗体保有率の回帰分析による年次推移

を示している．

2．調査年次ごとの年令階層別HI抗体保有状況からみた麻疹の流行実態　各年次ごとの調査結果を，2才以下，2～3才，4～5才，6～10才，11～15才の5段階の年令階層に区分し，各年令階層別における抗体保有率と平均HI抗体価の年次変動をみた(図2)．

2才以下の年令階層においては，HI抗体保有率の年次変動が13.3～29.0%を示しており，他の4段階の年令階層に比較して顕著に低率であった．しかし，平均HI抗体価でみると，各年次とも他の年令階層よりも高い値を示していた(幾何平均値203倍，38倍，32倍，23倍)．

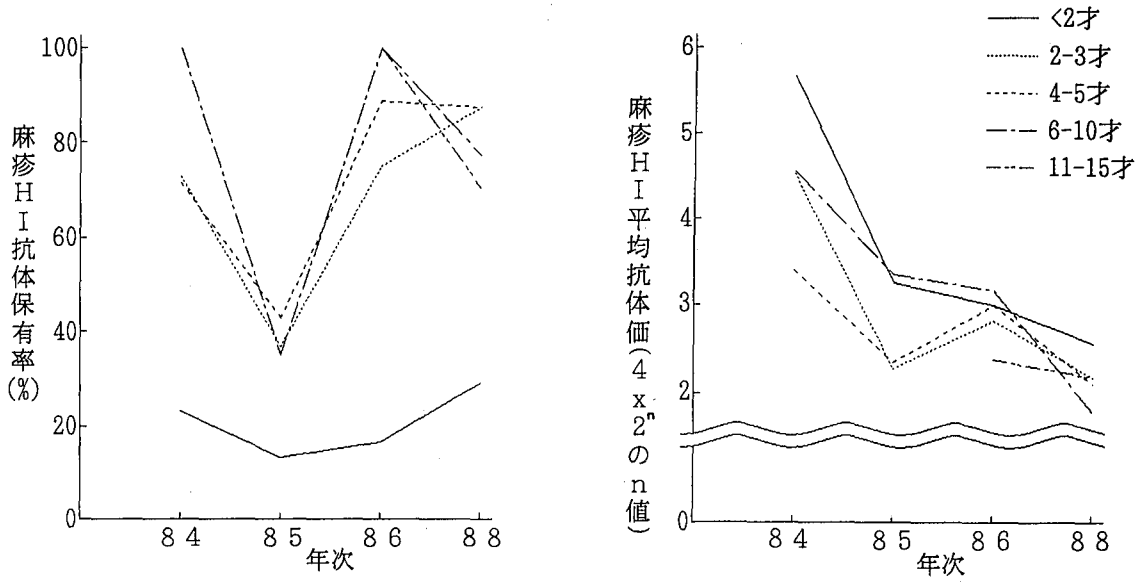


図2．年齢階層別にみた麻疹HI抗体保有率と平均抗体価の年次推移

このようにワクチン未接種者が多い集団で，他の年令階層より高い平均HI抗体価を保有しているということは，自然感染により麻疹に罹患した乳児が存在していたことを示している．

また，他の年令階層においても，1984年における平均HI抗体価は高く，麻疹がこの年次に流行したことを示唆した結果となった．

3．全調査年次をまとめて年令階層別に集計したHI抗体保有状況の推移からみた麻疹の流行実態 4年間の調査成績をまとめて，前記の5段階の年令階層に分類し，麻疹HI抗体保有状況の推移をみた(表2)．

その結果，2才以下の年令階層におけるHI抗体保有率は，21.3%と一番低かったが，他の年令階層では68.0～75.9%の範囲となり顕著な差は認められなかった．

一方，平均HI抗体価で比較すると，HI抗体保有率の一番低かった2才以下の年令階層で$4\times2^{3.29}$(32倍)と最高値を示した．この年令階層は，ワクチン接種をしていない階層であるため自然感染により高いHI抗体価を獲得した乳児が存在していたと推測された．

次に，年令階層別における麻疹HI抗体保有率を回帰分析法で解析して，年令階層別の回帰直線を図3に示した．各回帰直線の相関係数は，それぞれ，0.986，0.990，0.998，0.996，0.991と負の強い相関性を示しており，ここでも回帰分析法の有用性が確認された．

表2．年令階層別にみた麻疹HI抗体保有状況の推移

年令階層 (才)	検査例	HI抗体価(4×2^nのn値)								抗体保有率 (n≧1) %	平均HI抗体価* $\bar{x}\pm$SD
		<1	1	2	3	4	5	6	≧7		
<2	80	63	2	3	6	3	1	1	1	21.3	3.29±1.61
2～3	100	32	12	22	17	7	7	1	2	68.0	2.79±1.46
4～5	98	28	16	24	18	4	5	3		71.4	2.53±1.34
6～10	120	35	18	17	18	14	12	3	3	70.8	3.07±1.63
11～15	54	13	12	11	13	3	2			75.9	2.32±1.13

*平均HI抗体価＝4×2^nのn値
$\bar{x}$＝n値の平均値
SD＝標準偏差

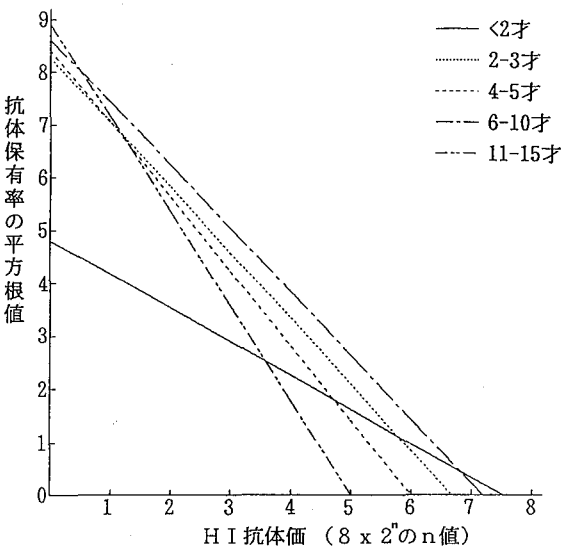


図3．年齢階層別における麻疹HI抗体保有率の回帰分析

Y軸との交点を比較すると，2才以下の年令階層においてのみ小さくなっており，この年令階層でHI抗体保有率が低下していることが判明した．また，計算上の最大抗体価であるX軸との交点の値は，X＝7.53と大きくなっており，この年令階層において，採血された時期の近い過去に麻疹罹患者があったことが示唆された．一方，他の4区分の年令階層においては，Y軸との交点の値(抗体保有率の平方根値)が8.28から8.98の範囲でほとんど同じであった．しかし，X軸との交点の値(最大抗体価)は，11～15才の年令階層において最も小さい値(X＝4.99)を示しており，この年令階層の学童が麻疹流行時に感受性者となることは少ないと思われた．

4．ワクチン歴とHI抗体保有状況の解析　ワクチン接種歴とHI抗体保有状況の関連性を，年令階層別に分類して表3に示した．2才以下の年令階層では，検査した80例中9名のみがワクチンを接種しており(接種率11.3%)，7名がHI抗体を保有(HI抗体保有率77.8%)，2名が抗体陰性でワクチンが"Take"していなかった．一方，ワクチン未接種群71名のうち10名は既に抗体を保有していた(HI抗体保有率14.1%)．この年令階層においてワクチン接種者と未接種者との抗体保有率の差を検定(χ^2検定)してみると，1%の危険率をもって両者に有意な差がみられた．

また，HI抗体保有状況を比較してみると，ワクチン接種者9名における平均HI抗体価は$4\times2^{2.43}$(21倍)を示していたのに対して，未接種者71名中抗体のある10名の平均HI抗体価は$4\times2^{3.90}$(60倍)とワクチン接種者より高い値を示していた．2～3才，4～5才の年令階層におけるワクチン接種者と未接種者のHI抗体保有率の差の検定を行うと，1%または5%の危険率で両者間に有意な差がみられた．しかし，6～10才，11～15才の年令階層においては，有意差がみられなかった．

考　察

麻疹は発熱，発疹などの症状に加えて，肺炎，脳炎，中耳炎などの合併症が知られており，2—4%の致命率があるといわれている[6]．さらに，いわゆるSlow virus infectionとして，SSPE(亜急性硬化性全脳炎)の発生が知られており[8-12]，麻疹感染後数カ月から数年して発病し，進行性で極めて予後の悪い疾患で多くの場合致死的

表3．ワクチン接種歴とHI抗体保有状況

年令階層 才	検査例	ワクチン接種者 例数	%[1]	HI抗体価 陽性	HI抗体価 陰性	抗体保有率	平均HI[2] 抗体価	ワクチン未接種者 例数	HI抗体価 陽性	HI抗体価 陰性	抗体保有率	平均HI[2] 抗体価	χ^2検定[3]
＜2	80	9	11.3	7	2	77.8	2.43	71	10	61	14.1	3.90	$\chi^2=44.15^{**}$
2～3	100	88	88.0	64	24	72.7	2.66	12	5	7	41.7	4.00	$\chi^2=8.400^{**}$
4～5	98	80	81.6	61	19	76.3	2.44	18	9	9	50.0	3.11	$\chi^2=5.476^{*}$
6～10	120	102	85.8	71	31	69.9	2.94	18	14	4	77.8	3.71	$\chi^2=0.456$
11～15	54	42	77.8	30	12	71.4	2.20	12	11	1	91.7	2.63	$\chi^2=2.526$

1）%＝ワクチン接種率
2）平均HI抗体価＝4×2^{n}のnの値，$\bar{x}\pm SD$の$\bar{x}$値
3）χ^2検定　ワクチン接種者と未接種者との抗体保有率の差の検定
　＊＊1%の危険率
　＊　5%の危険率

であり，小児にとって重篤な疾患である[13,14]．

麻疹ウイルスは極めて感染力が強いことから，予防法の一つであるワクチン接種が重要である．1978年10月から定期予防接種として実施されるようになってからは接種率が向上したものの，1984年においては全国的な麻疹の流行がみられた．麻疹のワクチン接種率と感染防御の関係については，接種率50％では麻疹の流行に関して無防備であり，70％でも流行は阻止できず，80～90％で初めて流行をある程度抑制できると報告されている[15]．

今回の調査対象者のワクチン接種率は，2才以下の11.3％を除けば，77.8～88.0％と高率であった．通常，麻疹ワクチンの接種は，1才6か月から3才までに行われている．今回調査した2才以下の年令階層の中で，ワクチン未接種者は71名であった．そのうちの10名はHI抗体を持っており，ワクチン接種前に麻疹に罹患し，高いHI抗体価を獲得していた．このことから，自然感染で獲得した抗体価は，ワクチン接種で獲得した抗体より高いことが明らかになった．

ワクチン接種歴とHI抗体保有との関係をみると，ワクチン接種者におけるHI抗体保有率は，各年令階層とも69.9～77.8％の範囲であったが，ワクチン未接種者のうち6～10才，11～15才の年令階層のHI抗体保有率はそれぞれ77.8％，91.7％であった．自然感染と思われるグループでは高い抗体保有率が認められた．しかし，2才以下では14.1％，2～3才では41.7％，4～5才では50.0％と低く，この年令階層が感受性者になることを示唆している．また，各年令階層において麻疹ワクチンを受けているもののうち，抗体を保有していない比率が22.2～30.1％みられ，麻疹ワクチンの“Take”しなかった例と考えられる．早川[16]らの報告においても，麻疹ワクチンを過去に受けていながら，後で麻疹に罹患した例がある．この原因については，ワクチンが“Take”しなかったか，ワクチンの輸送，保存，更には接種時に何らかの問題が発生したためと推測している．

結　　論

1984年から1988年にかけて採取した7か月から15才の乳幼児および児童452名の血清について，麻疹ウイルスに対するHI抗体価を測定し，その結果を基に疫学的な解析を試みた．

1．麻疹HI抗体保有率は，1985年の32.0％を除けば，72.3～83.3％と高い値を示していた．平均HI抗体価は，1984年が$4\times2^{4.24}$(76倍)と高くなっていた．

2．回帰分析法で解析すると，1984年において計算上のHI抗体保有率の平方根値，最大HI抗体価とも値が大きく，この年次における麻疹流行の規模が大きかったことを認めた．

3．5段階に分けた年令階層別にHI抗体保有率をみると，2才以下の年令階層で低率であったが，ワクチン未接種で抗体を保有していた個体の平均HI抗体価は高い値であった．

4．低年令階層(2才以下，2～3才，4～5才)では，ワクチン接種群と未接種群との間に，HI抗体保有率の有意差がみられた．

文　　献

1）東京都結核感染症サーベイランス情報，1983-1988.
2）浦野隆，中山哲夫，中川正治，佐々木繁子，牧野慧：臨床とウイルス，13(3)，306-311，1985.
3）橋本尚士：臨床とウイルス，16(3)，375-379，1988.
4）厚生省監修：微生物検査必携ウイルス・リチッチア検査，338-346，1978．日本公衆衛生協会，東京.
5）岩崎謙二，吉田靖子，関根整治：東京衛研年報，30-1，52-55，1979.
6）重松逸造：伝染病予防必携，第3版，211-214，1986，日本公衆衛生協会，東京.
7）大内正信：化学療法の領域，4(9)，1761-1765，1988.
8）Liebert, U. G., Baczko, k., Meulen, V.T. and Budka, H. : *J. Gen. Virol.*, 67(11)，2435-2444，1986.
9）Sheppard, R. D., Raine, C. S., Bornstein, M. B. and Udem, S. A. : *Science*, 228 (4704)，1219-1221，1985.
10）佐藤猛，安野みどり，森本啓介，竹田和正：神経研究の進歩，30(6)，969-977，1986.
11）Cattaneo, R., *et al* : *Virology*, 154(1)，97-107，1986.
12）Baczko, K., *et al*, : *J. Virology*, 59(2)，472-478，1986.
13）畑中武志，他：臨床脳波，28(7)，503-506，1986.
14）福山幸夫，他：日本小児科学学会誌，90(10)，2310-2324，1986.
15）深井孝之助，木村三生夫：最新予防接種の知識，78-87，1986，細菌製剤協会，東京.
16）早川泰，垣内敏孝，浜田美和子，金田治也：臨床とウイルス，13(3)，316-318，1985.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 46-52, 1989

寄生虫に対する漢方薬の有効性に関する研究（第4報）安中散抽出液およびAnethole液3時間処理Anisakis I型幼虫のウィスター系ラットに対する感染抑制効果

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 (IV) Inhibitory Efects on the Experimental Infection for Wister-Rats with Anisakis Type I Larvae, treated with Extract of Antyu-san and Emulsion of Anethole

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

Keywords：感染仰制効果 Inhibitory effect on the experimental infection, アニサキスI型幼虫 Anisakis type I larvae, 安中散抽出液 Extract of Antyu-san, アネトール液 Emulsion of anethole, ウィスター系ラット Wister-Rat

はじめに

著者らは[1-3], 1988年に寄生虫に対する漢方薬の有効性に関する研究で, Anisakis I型幼虫に対するin-vitroでの運動抑制効果を検討した結果, 漢方薬(胃腸薬)のいくつかに有効性が認められ, 安中散の構成生薬8種のうち4種に致死的または強い運動抑制効果のあることを報告した. また, 安中散の構成生薬のうち桂皮と茴香のAnisakisに対する運動抑制物質は, それぞれCinamic aldehydeとAnetholeであることを報告し, 今後, 安中散の成人1日量の頓服または鮮魚生食前後の予防内服は, アニサキス症の発症予防に期待がもたれると考察した.

そこで今回は, Wister系ラットを用いて, 安中散抽出液またはAnethole懸濁液3時間処理Anisakis幼虫の感染実験を行い, 対照群と共に初感染群, 2回および3回感染群のin-vivoにおける感染抑制効果について検討し, これら薬剤の使用による本虫感染予防に関するいくつかの知見が得られたので報告する.

材料および方法

材　料：中央卸売市場より購入の, 北海道羅臼産スケトウダラ32尾, 兵庫県境港および茨城県波崎港水揚のマサバ計120尾からAnisakis幼虫を採取して, 0.4%魚介類用生理食塩水(NaCl水)中で活発なS字状運動を呈するAnisakis I型幼虫のみを選別して実験に供した.

実験方法：1)感染前の予備実験；既報[1]のin-vitroでの実験方法に従い, Anisakis I型幼虫の運動性および0.65%寒天ゲル内侵入試験を行った. 被検液としては, Anethole 29.0および13.8mg／Polyethylene glycol 600, 0.5g加, 0.4% NaCl水100ml液および安中散3分包／0.4% NaCl水150ml, 室温振とう抽出・遠沈上清液を調製し, 各々20mlをシャーレに分注後, 40～50隻の虫体を侵漬, 10分, 1時間, 3時間後のAnisakisの運動性をしらべた. また, 対照として0.4% NaCl水を用いて同様に本虫の運動性を比較観察した. 各被検液3時間侵漬の虫体のうち, 対照として6隻, Anetholeと安中散抽出液から4隻ずつ, 0.65%寒天ゲル上に移して侵入数と侵入時間を観察した. 2)感染実験；Wister系ラット(8週令♂)初感染群20頭, 2回感染群6頭, 3回感染群9頭計35頭を実験に供した. 初感染群では, 安中散抽出液用6頭, 安中散懸濁液29.0mgおよび13.8mg／100mlの両濃度用各3頭および, 未処理・対照用の8頭のラッ

* 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
* The Tokyo Metroporitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho, 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169, Japan
** 東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科
***東京都衛生局環境衛生部食品機動監視班小石川第1班

トを各々軽くエチルエーテルで麻酔した後，ピンセットを用いて，各3時間処理 Anisakis 幼虫を10隻ずつ経口投与した．投与24時間後の剖検により腹腔内を精査した後，胃・消化管を切開して本幼虫の回収を図るとともに，胃・腸内容物および感染の翌日排出便からの虫体回収を行った．便中の虫体は水道水で軟化させ，4号篩を用いて流水で洗浄後回収した．2回感染群では，実験ラット6頭に対し，未処理 Anisakis 幼虫を同一ラットに初感染後74日目に再び経口投与して，2回目投与24時間後の剖検により，幼虫の回収を行った．2回目の感染実験に際して購入したサバでは，Anisakis 幼虫の寄生数(率)が少なく，実験に必要な絶対数が得られなかったため，安中散処理幼虫の感染実験を中止した．3回感染群では，安中散抽出液処理虫体の感染に5頭，未処理・対照虫体の感染に4頭，計9頭を実験に供した．安中散抽出液処理 Anisakis 幼虫は，同一ラットに初感染から21日後に2回，さらに再感染から53日後の3回，同手順によりそれぞれ1頭当り10，6，6計22隻を経口投与して，最終投与後24時間の剖検により幼虫の回収を試みた．

実験成績

感染 Anisakis Ⅰ型幼虫の in-vitro での運動性および寒天ゲル侵入試験：表1に示すとおり，初感染群ラットに投与する Anisakis 幼虫を対照と Anethole 液および安中散抽出液処理群に区分して，運動性および寒天ゲル侵入能力について比較試験を行った．その結果，対照群では，魚から採取後10分～3時間，虫体運動性に全く変化が見られず，また被検虫体全てが7～60分以内での寒天ゲル侵入能力を有していた．一方，Anethole 処理群では，10分後に運動性が低下し，1時間処理によってすべて運動性を失った．同時に3時間処理虫体は寒天ゲル侵入能力も失活した．なお，実験中，ピンセットにより損傷を受けた2虫体は除外した．安中散処理群では，10分経過後S字状運動がやや減弱し始め，1時間後に29／40が固有の巻き込み自発運動となり，3時間後には28／40が，ピンセットで刺激してやっと動きが判かる程度にまで運動性の低下が認められた．また，寒天ゲル侵入能力は，2／4に認められたが，侵入時間は3～15時間を要した．

安中散抽出液および Anethole 液3時間処理 Anisakis Ⅰ型幼虫の Wister 系ラットに対する感染実験成績：表2に示すように，安中散処理および Anethole 処理 Anisakis 幼虫のラットに対する感染実験では，初感染群と3回感染群のいずれも感染が成立せず，胃壁穿入，腹腔臓器漿膜面の生存虫体は見出されなかった．また，胃内容物と腸内容物中の生存虫体も両処理群では見出されなかった．高濃度の Anethole 処理群では，胃内容物中に投与30隻のうち13隻が死虫で見い出され，しかも内4隻は，かなり消化作用を受け形態も不明瞭であった．また，低濃度の Anethole 処理群においても，投与虫体30の内4隻が死虫として見い出されたが，高低両濃度処理群ともに，投与翌日の便中には全く虫体が見出されなかった．

安中散処理群で特に注目される点は，投与翌日の便中に見出された生存虫体が初感染群で7，3回感染群で2，死滅虫体は初感染群と3回感染群の両群共に11隻で，合計31隻と投与総数170の18.2%を示したことである．一方対照群においては初～3回感染群における感染成立ラット数は，それぞれ2／8，6／6，3／4頭と，実験に用いたラットの11／18(61.1%)であった．さらに，投与した総数のうち胃壁穿入虫体数は，各群4／80，9／120，8／120合わせて21／320(6.6%)にすぎなかった．感染成立ラットを母数とする Anisakis 幼虫の平均胃壁穿入数は1.91隻(21／11)，また胃腸壁を穿孔して腹腔，臓器漿膜面に見い出された生存虫体は，2回および3回感染群に各2隻あって，感染ラット11頭の平均胃腸壁穿孔虫数は，0.36(4／11)，穿孔頭数(%)は11例中2例(18.2%)であった．

剖検時の肉眼所見：対照の初感染群，2回および3回感染群計35頭の剖検の結果，2回感染群のラット1頭の腺胃大弯部に出血斑が認められ，肝臓と胃の間に遊離して1虫，また腹腔左背側腹膜面に1虫が離脱して徘徊しているのが認められた．さらに，小腸回盲部に粘血便の充満が認められた．また，3回感染群ラット1頭の小腸回盲部漿膜面に中等度のうっ血と，腸管腔に粘血便の充満が認められた．脾臓と膵臓接合部(血管，膵管集合部)から Anisakis 2隻が一部を突出させ，活発に動いてる様子が観察された(写真1および2参照)．

各群の切開・反転した胃および，Anisakis Ⅰ型幼虫の穿入状況については，写真3～6に示したが，感染非成立群の胃粘膜面は平滑で良好な色調を呈しているのに対し，対照の2回および3回感染群の Anisakis 穿入胃粘膜面は粗雑な分泌物または粘膜剝離物と考えられる白濁粘調物質に覆われ，生理食塩水をいれた洗浄ビンからの流水圧によって容易に剝離，流出した．しかしながら，74日間に2～3回の感染実験を繰り返したにもかかわらず，腹膜炎の主徴である腸漿膜面や腹膜の癒着および腹水の貯溜は全く認められなかった．また，前回投与の死滅虫体と思われる虫体の残骸及び好酸球性肉芽腫を想定

表1．感染 Anisakis Ⅰ型幼虫の in-vitro での運動性および寒天ゲル侵入試験

被検液	処理時間	被検虫体数	運動性 +++	++	+	−	0.65%寒天ゲル侵入試験 侵入虫体数／被検虫体数（侵入時間）
対照 0.4%NaCl 水	10 分	50	50				—
	1時間	50	50				—
	3時間	50	50				6 ／ 6 (7～60分)
Anethole ※ 13.8mg／100ml	10 分	40		3	37		—
	1時間	38				38	—
	3時間	38				38	0 ／ 4 (—)
安中散（市販） 3分包／150ml・NaCl 水	10 分	40	40				—
	1時間	40	11	29			—
	3時間	40		12	28		2 ／ 4 (3～15時間)

注）※：Anethole 13.8mg／Polyethylene 600　0.5g 加0.4%NaCl 水100ml
+++：活発なS字状運動を示すもの
++：静置状態またはシャーレ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
+：ピンセットで虫体を刺激した時のみ微弱な運動を示すもの
−：全く動きを示さないもの

表2　安中散抽出液および Anethol 液3時間処理 Anisakis Ⅰ型幼虫のウイスター系ラットに対する感染実験成績

群	処理方法	実験ラット数	経口投与虫体数	感染成立数	胃壁穿入生存虫数	腹腔・臓器生存虫数	胃内容生(死)虫数	腸内容生(死)虫数	翌日排出便中虫数 生	(死)	切断
初感染群	安中散 ※1	6	10／頭	0／6	0／60	0／60	0／60	0／60	7	11	6
	Anethole ※2	3	10／頭	0／3	0／30	0／30	(13／30)	0／30	0	0	0
	Anethole ※3	3	10／頭	0／3	0／30	0／30	(4／30)	0／30	0	0	2
	対照 ※4	8	10／頭	2／8	4／80	0／80	2／80	0／80	3	0	0
2回感染群	0.4% NaCl 水	6	10・10／頭	6／6	9／120	2／120	3／120	2／120	5・0	2・0	0・0
3回感染群	安中散 ※1	5	10・6・6／頭	0／5	0／110	0／110	0／110	0／110	0・2・0	10・1・0	2・1・5
	対照 ※4	4	10・10・10／頭	3／4	8／120	2／120	0／120	3／120	1・6・0	5・1・0	0・1・0

注）※1：安中散（散剤）3分包／150ml・0.4% NaCl 水・室温振とう抽出・遠沈上清液20ml で3時間処理
※2：Anethole 29.0mg／Polyethylene glycol 600　0.5g 加・0.4% NaCl 水100ml で3時間処理
※3：〃 13.8mg／ 〃 〃 〃 〃
※4：対照＝0.4% NaCl 水

させる腫瘤は，全く認めることができなかった．

考　　察

Anisakis の実験動物に対する感染性に関して，大石ら[4](1974)，Ruiternberg ら[4](1970)はウサギを用いた，本虫の胃・消化管穿入能力について報告している．しかしながら，これらの報告は本虫の起病力を推定するための試みであって，抗 Anisakis 作用を有する薬剤を検索する目的としては in-vitro における各種の実験成績が報告されているものの，当時動物実験による感染防禦効果を追求する試みは全くなされていない．最近，大島ら[5](1989)はメベンダゾール(mebendazole)の抗 Anisakis 作用について，in-vitro の実験では本幼虫殺滅効果は認められなかったけれども，本剤を飼料 1 kg 当り400mg 添加したものを与えたラット群では，1 頭当り10隻の幼虫を投与した対照群と比べ，強い胃壁寄生排除効果を示したことを報告している．また，本剤の in-vitro におけるグルコース摂取阻止作用により，幼虫の消化管内寄生による人アニサキス症では，幼虫排除効果が期待されると述べている．今回著者らが行った実験は，Anisakis 幼虫をシャーレ内で 3 時間薬液処理した後，ラット 1 頭当り 6 ～10隻を投与して，24時間後の剖検により，虫体の回収を試みたもので，薬剤投与による排虫効果を試みた大島らの実験とは若干意図が異なる．しかしながら，安中散および Anethole 処理方法の胃腸壁穿入能力が，完全に失活したという成績が得られたことにより，本剤の予防内服によって，本虫感染の防止という期待が一層高まったといえよう．

大島らが実験に用いた Mebendazole には，Anisakis に対する殺虫効果が無いと報告されているが，著者らが行った実験では，(未発表)Thiabendazole 208 μg／ml もまた，本幼虫に対する殺虫効果は認められていない．両剤は，人体の消化器系寄生線虫に対する広域駆虫剤として開発され，これまで広く用いられて来たものであるが，この成虫に対する駆虫剤は，Anisakis の様な幼線虫に対して殺虫効果を示さず，また作用機序も全く異なるものと推察される．これら薬剤に対し，安中散抽出液と茴香の有効成分である Anethole の対 Anisakis 殺虫効果は明らかで，安中散の成人 1 日量(3 分包)／150ml NaCl 水抽出液では24時間で本幼虫の自発運動を停止させ，また Anethole の13.8mg／100ml NaCl 水懸濁液では，1 時間で完全に本虫の運動性を停止し得た．また Anethole の最小致死濃度は250 μg／ml で，類似構造物質の Phenylpropanoid 6 種すなわち，engenol, methyleugenol, isoeugenol, safrol, cinnamic aldehyde および cinnamil alchohol の最小致死濃度は，いずれも125 μg／ml ～500 μg／ml であることが，著者ら[6](1988)によって報告されている．これら生薬由来の有効物質の作用機序は必ずしも明かではないが，少なくとも in-vitro での実験では Anisakis 幼虫の頸部損傷現象が一定の濃度と処理時間の組合せにより観察されている．本虫の頸部損傷現象は10分～ 1 時間以内で死滅する濃度の場合には認められず，24時間処理以上の長時間生存する濃度条件の場合にのみ全被検虫体に発現し，また再現性のある現象でもある．今回採用した薬剤濃度は，成人の胃の容積を 1 l と仮定して，服用可能量での感染防止効果を検討するために設定したものである．Anethole 処理虫体の多くが死滅虫体としてラットの胃内容物とともに見出されることから，本剤の殺虫効果は，安中散抽出液と比べかなり高いものと思われるので，今後さらに低濃度域の検討が必要である．

最後に，ラット対照群の Anisakis 感染率は，初感染群で25％(2／8)，2 回感染群で100％(6／6)，3 回感染群で75％(3／4)と推移しているが，肉眼的剖検所見および，前回投与した死滅虫体の残骸が見出されなかったことなどから，2 カ月半位の経過観察期間では感作回数と過敏反応にもとずく重度の炎症や肉芽腫形成および感染率の上昇との相関が認められなかったので，今後，感作と病態変化に関する実験では更に長期の観察期間が必要と思われる．

ま と め

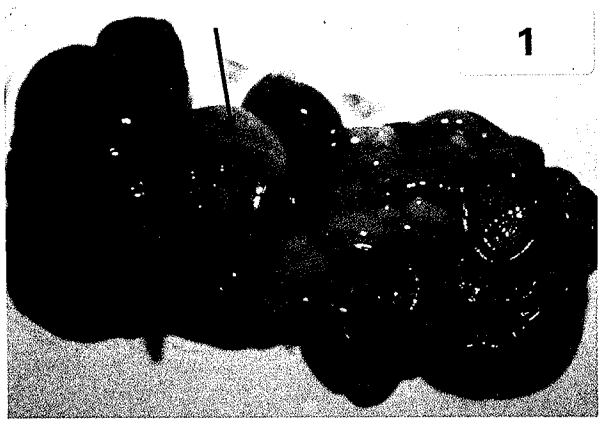
in-vitro での対 Anisakis 殺虫または運動抑制効果を有する漢方胃腸薬，安中散(散剤)抽出液と本剤を構成する生薬のうち茴香の有効物質 Anethole 懸濁液で 3 時間処理した Anisakis Ⅰ型幼虫を Wister 系ラットに投与して，対照群の本虫感染成立数，胃腸壁穿入または穿孔数，虫体回収数，および肉眼的剖検所見等について比較する目的で実験を行った．その結果，安中散抽出液と Anethole 懸濁液処理群では，全く感染が成立せず，対照群にのみ感染が成立し，虫体投与24時間後の剖検で胃壁穿入生存虫体および腹腔臓器より生存虫体を回収し得た．この成績から，安中散の予防内服により本虫が完全に死滅し得ないとしても，胃腸壁への穿入または穿孔を防止した上，翌日便中への虫体排出を促進し得るものと考察した．

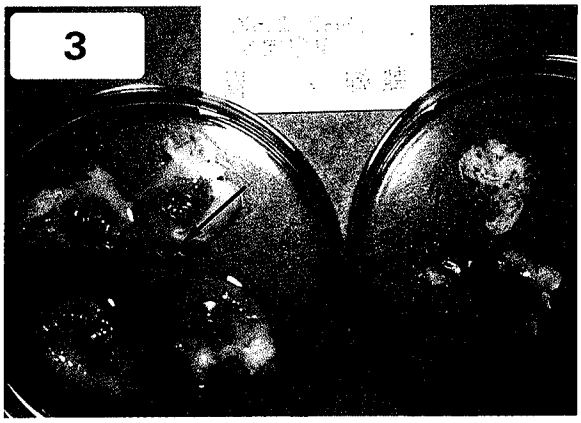
謝辞：本研究実施に際し，貴重なご示唆とご指導をいただいた，横浜市立大学医学部の大島智夫教授ならびに岐阜大学医学部の大友弘士教授に対し，深湛なる謝意を表します．

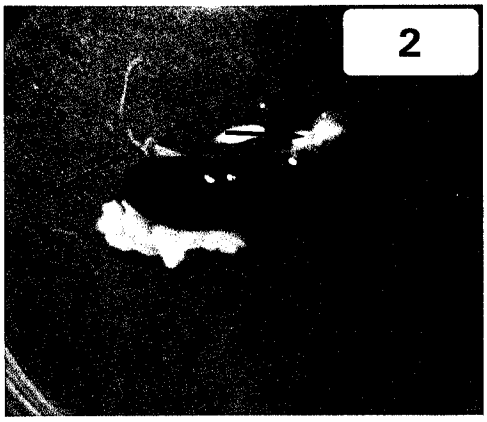
（本研究は，昭和63年度当衛生研究所課題研究および衛生局環境衛生部食品監視課の先行調査の一環として行ったもので，本研究の概要は日本寄生虫学会東日本大会1989年10月で発表した.）

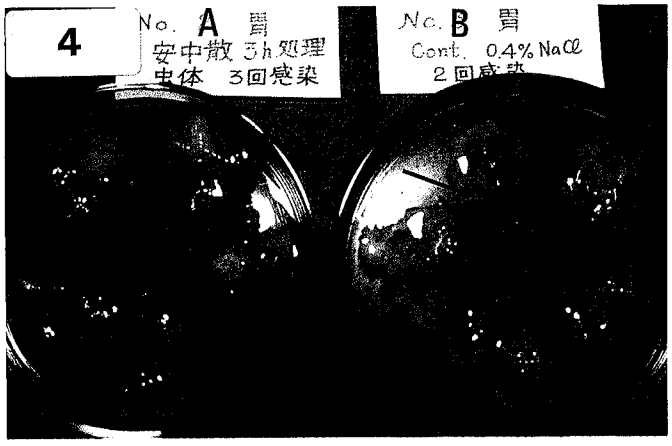
文　　献

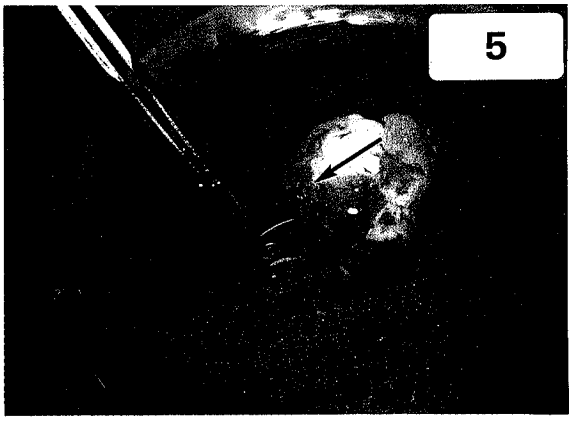
1）村田以和夫，宮沢貞雄，安田一郎，小田　稔，渋谷智晃：東京衛研年報，39，15-18，1988.
2）村田以和夫，宮沢貞雄，安田一郎，小田　稔，渋谷智晃：東京衛研年報，39，19-23，1988.
3）安田一郎，浜野朋子，高野伊知朗，瀬戸隆子，村田以和夫，宮沢貞雄，小田　稔，渋谷智晃：東京衛研年報，39，24-27，1988.
4）日本水産学会編：水産学シリーズ，7，「魚類とアニサキス」第2刷，140～141，1981，恒星社厚生閣，東京.
5）大島智夫，杉山良信：寄生虫学雑誌，38，（補），93，1989，第58回　日本寄生虫学会大会特集.
6）村田以和夫，安田一郎：寄生虫学雑誌，38，1（補），43，1989.











写真説明：No.1　ラット胃大弯部に認められた出血斑（矢印）　：対照群・3回感染
No.2　ラットの脾臓・膵臓接合部に侵入した Anisakis　：　〃　・　〃
No.3　〃　胃壁・脾・膵臓に穿入した　〃　：　〃　・　〃
No.4　A：安中散抽出液3時間処理幼虫3回感染ラットの正常胃壁
B：対照・0.4% NaCl 水3時間処理幼虫2回感染ラットの胃壁に穿入する Anisakis
No.5　初感染群：　〃　〃　〃　1回感染　〃　〃　〃　〃
No.6　2回感染群：写真No.4－Bの拡大写真：（矢印－Anisakis　Ⅰ型幼虫の穿入部位）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 53-57, 1989

寄生虫に対する漢方薬の有効性に関する研究（第5報）
香辛料の *Anisakis* Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果

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

Effect of Chinese Medicine for Helminth (V) Inhibitory Effects with Several Kinds of Spice on the Activity of *Anisakis* Type I Larvae

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

Keywords：漢方薬 chinese medicine, 香辛料 spice, 生薬 crude drugs, 寄生虫 helminth, アニサキスⅠ型幼虫 *Anisakis* Type Ⅰ Larvae, 運動抑制効果 inhibitory effect on activity, ターメリック turmeric, 鬱金 *Curcuma longa*

緒　言

既報[1,2]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，*in vitro* において安中散(散剤)をはじめとする数種の漢方薬，生薬製剤が *Anisakis* Ⅰ型幼虫に対し運動抑制効果を示すことを報告した．また，前報[3]では，ラットを用いた本虫の感染実験を行い，安中散(散剤)とそれに含まれる活性成分 anethole で処理された虫体は，胃壁穿入などを起こさないことを明らかにした．

安中散は胃痛，腹痛，胸やけ，食欲不振などに用い，茴香，桂皮，良姜などの生薬が配合された漢方薬である[4]が，これらの構成薬材中，芳香性を示す生薬は各々，本虫に対し，殺虫効果や，強い運動抑制効果を示すものが多い[5]．また，これら芳香性生薬は，フェンネル，シナモンなどとも呼ばれ，一般家庭でも香辛料として広く用いられている．一方，大石ら[6]は，一部の香辛料の精油に殺虫効果があることを報告している．そこで今回，一般家庭で用いられている各種香辛料の *Anisakis* Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果を検討した．また，強い運動抑制効果を示したターメリック(生薬名：鬱金)に着目し，各市場品の活性比較を行うとともに活性画分の分画を試みた．

実験の部

1．材　料

香辛料の一部は漢方薬にも用いられるが，その名称に混乱がある．そこで，実験材料として用いた香辛料の名称を整理し，基原植物名，使用部位とともに表1に掲げた．今回実験に用いた23種の香辛料のうち，ターメリックを除いた22種は1988年の東京市場品であり，ターメリックは，1982年及び1988年，都内で購入したインド産2ロット，1989年中国各都市で購入した中国産4ロット，計6ロットを使用した．

2．被験液の調製

*　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 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

表1　実　験　材　料

	名　称	植　物　名	使用部位
1	ジンジャー ginger 生姜	ショウガ *Zingiber officinale* Rose	根茎
2	マジョラン marjoram	ハナハッカ *Majorana hortensis* Moench	葉
3	ガーリック garlic 大蒜	オオニンニク *Allium sativum* L.F. *pekinense*	鱗茎
4	サボリー savory	キダチハッカ *Satureia hortensis* L.	全草
5	セージ sage	サルビア *Salvia officinalis* L.	葉
6	メース mace 豆蔻花	ニクズク *Myristica fragrans* Houttuyn	仮種皮
7	アニス anise	アニス *Pimpinella anisum* L.	果実
8	セロリ celery	セルリ *Apium graveolens* L.	種子
9	カルダモン cardamom 小豆蔻	カーダモム *Elettaria cardamomum* Maton	果実
10	フェネグリー fenugreek 胡蘆巴	コロハ *Trigonella foenum-graecum* L.	種子
11	コリアンダー coriander 胡荽子	コエンドロ *Coriandrum sativum* L.	果実
12	クミン cumin 馬芹	ヒメウイキョウ *Cuminum cyminum* L.	果実
13	チンピ citrus (unshiu) 陳皮	ウンシュウミカン *Citrus unshiu* Markovich	果皮
14	ローレル laurel, bay 月桂葉	ゲッケイジュ *Laurus nobilis* L.	葉
15	オレガノ origan	ハナハッカ *Origanum vulgare* L.	全草
16	オールスパイス allspice 百味胡椒	ピメント *Pimenta officinalis* Lindl.	果実
17	フェンネル fennel 茴香	ウイキョウ *Foeniculum vulgare* Mill	果実
18	グローブ clove 丁子	チョウジ *Syzygium aromaticum* Merr.et Perry	花蕾
19	ペッパー pepper 胡椒	コショウ *Piper nigrum* L.	果実
20	ナツメグ nutmeg 肉豆蔻	ニクズク *Myristica fragrans* Houttuyn	種子
21	シナモン cinnamon 桂皮	ケイ *Cinnamomum cassia* Blume	樹皮
22	タイム thyme	タチジャコウソウ *Thymus vulgaris* L.	全草
23	ターメリック turmeric 鬱金	ウコン *Curcuma longa* L.	根茎

被験液は，チンピを除いた各香辛料については，粉末3.0 g を量り，0.4%魚介類用生理食塩水(NaCl 水)30*ml* を用いて，室温で30分間振とう抽出後，15分間遠心分離し，その上澄液とした．チンピの被験液は粉末1.0 g を量り，同様の方法で調製した．

3．*Anisakis* Ⅰ型幼虫の採取

北海道羅臼産スケソウダラ，兵庫県境港および茨城県波崎港水揚げのマサバより *Anisakis* Ⅰ型幼虫を採取し，0.4% NaCl 水中で活発なS字状運動を示す虫体を実験に供した．

4．活性スクリーニング

被験液20 ml を標準とし，径9 cmのガラス製シャーレに入れ，1群5～11虫体の，10分，60分，24時間，室温処理後の各幼虫の運動性を観察した．スクリーニングの対照液としては，被験液の代わりに0.4%NaCl 水を用いた．運動性の評価は既報[7]に準じ，活発なS字状運動を示すものを(+++)，静置状態またはシャーレ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(++)，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．運動抑制効果は以下の通りである．

致死的運動抑制効果：60分処理で虫体の過半数が(−)を示す．

強い運動抑制効果：24時間処理で虫体の過半数が(−)を示す．

弱い運動抑制効果：24時間処理で虫体の過半数が(+)を示す．

5．ターメリックの活性画分の調製

東京市場品(1988年)のターメリック粉末30 g をとり，水400*ml* を加え，ときどき振り混ぜ5時間浸出し，さらに16～20時間放置した後，ろ過した．ろ液の1／10量は水抽出エキスフラクションとして活性スクリーニングの被験液とした．ろ液の残りはヘキサン300*ml* で3回，クロロホルム300*ml* で2回，さらに水飽和ブタノール300*ml* で2回抽出し，ヘキサン画分，クロロホルム画分，ブタノール画分及び水画分に分けた．それぞれの溶媒を減圧留去し，さらに24時間，減圧乾燥させ，重量を測定した．そして，それぞれの画分のターメリック3.0 g 相当分を1% polyethylene glycol 600を含む0.4% NaCl 水

20*ml* に懸濁し，試料液とした．

結果及び考察

1．香辛料のスクリーニング

ターメリックを除く香辛料22種のスクリーニングの結果は表2に示した．60分間処理で致死的運動抑制効果の現われた香辛料は，セロリ celery，カルダモン cardamon，クミン cumin，グローブ clove，シナモン cinnamon の5種であり，特にグローブは10分間処理で運動抑制効果が現われ，11／11の虫体が(＋)の運動性を示した．大石ら[6]もグローブの精油，0.01％溶液の2時間処理で殺虫効果を認めている．活性成分について考察すると，グローブには精油が15～20％含まれ，精油の70～85％が eugenol であり[7]，eugenol の0.02％溶液に活性が認められる[6]ことから，本香辛料の殺虫成分は eugenol であると推定される．強い運動抑制効果が現われた香辛料は，ジンジャー ginger，サボリー savory，アニス anise，オールスパイス allspice，ナツメグ nutmeg，タイム thyme，ペッパー pepper 及び表3に掲げるターメリック turmeric の8種であった．弱い運動抑制効果が現われた香辛料はガーリック garlic，ローレル laurel 及びオレガノ origan の3種で，全く運動抑制効果が現われない香辛料は7種であった．即ち，23種の香辛料中，運動抑制効果の現われたものは16種で，全体の約7割相当数であった．漢方製剤，生薬に比べ[2]その割合は高い．

2．各種ターメリックの運動抑制効果

ターメリックは熱帯，亜熱帯アジア，中国，台湾，九州などで栽培され，カレー粉，沢庵漬などに多く用いられる香辛料である．漢方薬では，芳香性健胃薬として使用されているが，その名称は鬱金，郁金，姜黄などさまざまであり[8]，品質的にも問題の多い生薬といわれている[9,10]そこで，日本，中国の各地で産地の異なるターメリック6種を購入し，実験材料とした．外観，性状は，

表2　各種香辛料の *Anisakis* Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果

香辛料	被検虫体数	処理時間 運動性	10分 +++	10分 ++	10分 +	60分 +++	60分 ++	60分 +	60分 −	24時間 +++	24時間 ++	24時間 +	24時間 −	判定
1 ジンジャー	(11)		5	6		10	1						11	＊2
2 マジョラン	(7)		6	1		2	5				7			
3 ガーリック	(7)			7			2	5				5	2	＊1
4 サボリー	(7)		3	4				7					7	＊2
5 セージ	(7)			7			7				7			
6 メース	(7)		3	4		4	3				4	3		
7 アニス	(7)		4	3			2	5				3	4	＊2
8 セロリ	(7)			6	1			2	5				7	＊3
9 カルダモン	(7)			7				3	4				7	＊3
10 フェネグリー	(7)		6	1		1	6			1	6			
11 コリアンダー	(7)		4	3		3	4			3	4			
12 クミン	(7)			3	4			1	6				7	＊3
13 チンピ	(7)		5	2			7				7			
14 ローレル	(7)			7			7				2	2	3	＊1
15 オレガノ	(7)		7				7					6	1	＊1
16 オールスパイス	(11)			11				11					11	＊2
17 フェンネル	(11)		11			8	3				11			
18 グローブ	(11)				11			1	10				11	＊3
19 ペッパー	(7)		3	4		2	5						7	＊2
20 ナツメグ	(11)		4	7				8	3				11	＊2
21 シナモン	(11)			11				4	7				11	＊3
22 タイム	(11)			11			1	10					11	＊2
0.4％ 生理食塩水	(11)		7	4		1	10				11			

＊3　致死的運動抑御効果
＊2　強い運動抑制効果
＊1　弱い運動抑制効果

表3　各種ターメリックのAnisakis Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果

市　場(産地)	被検虫体数	処理時間 運動性	10分 +++	10分 ++	10分 +	60分 ++	60分 +	60分 −	24時間 ++	24時間 +	24時間 −	判定
1　東京(インド)	(11)		11			3	3	5			11	＊2
2　東京(インド)	(7)		4	3		4	3				7	＊2
3　上海(浙江省)	(9)			9		1	7	1		1	8	＊2
4　昆明(広西省)	(9)			8	1	5	4				9	＊2
5　昆明(雲南省)	(9)			9		6	3				9	＊2
6　成都(四川省)	(9)			8	1	9			2	7		＊1

＊2　強い運動抑制効果
＊1　弱い運動抑制効果

いずれの切断面も黄色～黄褐色を呈するものであるが，形態はやや互いに異なる．清涼感のあるにおいも同一ではない．これらの運動抑制効果の結果は表3に示したが，6ロット中5ロットのものにほぼ同等の強い運動抑制効果を認め，残る1ロットは弱い運動抑制効果を示した．このターメリックは中国四川省産 *Curcuma longa* の塊根部分を乾燥させたもので，現地名で郁京と呼ばれる緑絲鬱金であり，他のものに比べ黄味は乏しいものであった．

3．ターメリックから活性画分の分離

ターメリックの主成分は黄色色素群で，curcumin に代表されるジアリルヘプタノイドである[9]．既報[2]で報告した *Anisakis* Ⅰ型幼虫の殺虫物質 anethole の24時間における最低致死濃度 250 μg／*ml* を基準に，curcumin の運動抑制効果を判定したが効果は全く現われなかった．そこでターメリックの活性画分の検索をすすめた．

ターメリック30 g から強い活性を示す水抽出エキス5.61 g（収率18.7％）を得，この一部を分液ロートを用いた液-液抽出によりヘキサン画分，クロロホルム画分，ブタノール画分，水画分に分けたところ，水抽出エキスの3.0，5.1，9.8，82.1％が各画分に移行した．各画分について初めのスパイス3.0 g 相当分をとり，運動抑制効果を判定したところ，表4の結果を得た．即ち，活性は水抽出エキスの3％しか移行しないヘキサン画分に集中した結果となった．ターメリックには文献上ジアリルヘプタノイドとともに turmerone，zingiberene などのセスキテルペノイド[11,12]の存在が知られている．クロロホルム画分には curcumin などのジアリルヘプタノイドが多く含まれ，一方，ヘキサン画分にはセスキテルペンなどのテルペノイドが含まれている（安田：未発表）．このことは，活性物質がこれらテルペノイドである可能性を示唆するものである．

ま　と　め

香辛料23種について *Anisakis* Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果を調べたところ，グローブ，シナモン，クミン，カルダモン，セロリに致死的運動抑制効果が現われた．強い運動抑制効果を示すターメリックに着目し，外観性状のやや異なる6ロットについて再度検討したところ，中国成都市で購入した四川省産1ロットは，他と比較してやや弱い効果を示した．天産物である香辛料には異なった品質のものがあり，*Anisakis* Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果も品種により異なる．ターメリックに含まれる *Anisakis* Ⅰ型幼虫の殺虫成分は，活性画分の検討の

表4　ターメリック・水抽出エキスと各画分の *Anisakis* Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果

画　分	重量％	被検虫体数	処理時間 運動性	10分 +++	10分 ++	60分 +++	60分 ++	60分 +	24時間 +++	24時間 ++	24時間 +	24時間 −	判定
水抽出エキス	100.0	(5)		3	2		3	2				5	＊2
ヘキサン画分	3.0	(5)			5		2	3				5	＊2
クロロホルム画分	5.1	(5)		1	4	1	3	1		4	1		
ブタノール画分	9.8	(5)		3	2	3	2		3	2			
水　画分	82.1	(5)		5		5			4	1			

＊2　強い運動抑制効果

結果，curcumin などのジアリルヘプタノイドではなく，セスキテルペンなどのテルペノイドではないかと推察された．

謝辞：本研究にあたり，ご指導いただいた国立予防衛生研究所寄生虫部　影井　昇室長，岐阜大学医学部　大友弘士教授に深謝いたします．

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）安田一郎，村田以和夫：和漢医薬学会誌，5，548-549，1988.
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，40，46-52，1989.
4）厚生省薬務局監修：一般用漢方処方の手引，9-10，1984，薬業時報社，東京
5）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：東京衛研年報，39，24-27，1988
6）大石圭一，森一雄，西浦康雄：日本水産学会誌，40，1241-1250，1974
7）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
8）難波恒雄：原色和漢薬図鑑(下)，102-104，1986，保育社，大阪
9）陳建民，陳毓亨，余竟光：中草薬，14，59-63，1983
10）陳毓亨，章菽，胡治海，陳恵莉：中薬材，6，45-47，1987
11）B. T. Golding, E. Pombo, G. J. Samuel : *J. Chem. Soc. Commun.*, 363, 1082
12）Y. Kiso, Y. Suzuki, Y. Oshima, H. Hikino : *Phytochemistry*, 596, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 58-61, 1989

凍結乾燥血清のGOT，GPT測定時の乳び，ビリルビン，ピルビン酸の影響について

小林千種*，蓑輪佳子*，大石向江*，一言　廣*

Effect of Turbidity, Bilirubin and Pyruvate Concentration on Measurement of GOT and GPT Activity in Freeze-Dried Serum

CHIGUSA KOBAYASHI*, KEIKO MINOWA*,
HISAE OISHI* and HIROSHI HITOKOTO*

Keywords：外部精度管理 external quality control, 凍結乾燥血清 Iyophilized sera, GOT, GPT

緒　言

臨床化学検査における外部精度管理では市販の凍結乾燥血清が調査試料としてよく利用されている．凍結乾燥血清は新鮮なヒト血清と比べてマトリックスが違うために，異なる測定法で検査した場合に検査値に差が認められることが知られている[1),2)]．

昭和63年度に実施された都区保健衛生連絡協議会主催の生化学精度管理調査におけるGOT，GPTの集計結果からReitman-Frankel法(以下R-F法と略す)はUV法(GOTのMDH-UV法，GPTのLDH-UV法)と比べて約2倍の平均値であったことが報告された．昭和63年度以前はこの精度管理調査でこのような現象は見られなかった．

UV法は血清の乳び，ビリルビン，ピルビン酸等による測定上の影響は除かれた方法であるのに対し，R-F法はこれらによって正の誤差を受けることが知られている[3)]．このことから，精度管理調査に用いた凍結乾燥血清の試料がこれらの妨害物質と関係していたことが推定された．

R-F法が高値に偏る測定値を出した原因として，乳び，ビリルビン，ピルビン酸がGOTとGPTの測定に及ぼす影響を検討したので報告する．

方　法

試料：昭和63年度都区保健衛生連絡協議会主催の生化学精度管理調査の試料1と2を用いた．これらと比較のため，同一商品の別ロットである凍結乾燥血清A(正常域)とB(異常域)も用いた．

GOTとGPTの測定方法：市販のR-F法による用手法試薬キット(ユニキットGOT，ユニキットGPT：C社製)，標準液に2.0 mMピルビン酸リチウム溶液(GOT. GPT標準液：和光純薬製)，日立220A型分光光度計を用いた．検体ブランクの測定は基質液に発色試薬Ⅰ(ジニトロフェニルヒドラジン溶液)と血清を同時に加え，以後の操作は添付の説明書に従った．

濁度(乳び)の測定方法：工業用水試験法(JIS K 0101)のホルマジン標準液を用いる透過光濁度により測定した．

総ビリルビンの測定方法：ミカエルソン法による市販自動分析用試薬(オートセラBIL：第一化学薬品製)，日立705型生化学自動分析装置を用いた．

ピルビン酸の測定方法：市販のUVエンドポイント法による用手法試薬キット(ピルベートテスト：　ベーリンガー・マンハイム・山之内製)，日立220A型分光光度計を用いた。

希釈試験方法：試料1と2について蒸留水で0／5から5／5まで6希釈系列を作製し，GOTとGPTの測定値及び検体ブランク値を2重測定し，直線性の有無を検討した．

妨害物質の添加試験[4)]：干渉チェックA(国際試薬製)の乳びとビリルビンC，2.0 mMピルビン酸リチウム水溶液(和光純薬製)，孔径0.22 μmのメンブランフィルターでろ過したヒトプール血清を用いた．乳び溶液はあらかじめ蒸留水で5倍に，ビリルビン溶液は2倍に希釈し，乳び，ビリルビン，ピルビン酸溶液を蒸留水で0／5から5／5まで6希釈系列を調製した．各希釈液を乳び，ビリ

*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

表1．都区保健衛生連絡協議会による生化学精度管理調査の集計結果

	G O T			G P T		
	R-F 法*	MDH-UV 法*	平均値の差	R-F 法*	LDH-UV 法*	平均値の差
昭和62年度						
N	7	25		7	26	
試料 1	75± 6	50± 7	25	45± 3	28± 6	17
試料 2	131± 9	134±21	3	107± 9	104±20	3
昭和63年度						
N	5	26		5	26	
試料 1	145± 8	62±11	82	93± 6	34± 7	59
試料 2	205± 9	134±19	72	173±10	124±22	49

* Mean ± SD

表2．R-F 法における検体ブランク値

	GOT*	GPT*
試料 1	62	55
試料 2	50	49
A	26	—
B	17	—

* Mean(N：2)
—：測定せず

ルビン溶液の場合はプール血清で10倍に，ビルビン酸溶液は8倍に希釈したものについて GOT，GPT を5重測定した．

結果と考察

昭和62年度と63年度における都区保健衛生連絡協議会による生化学精度管理調査の GOT，GPT の集計結果を表1に示した．R-F 法の平均値と UV法の平均値の差は，昭和62年度では大きな差がないのに対し，昭和63年度では GOT で72～82単位，GPT で49～59単位もの方法間の差があり，R-F 法の平均値が異常に高い結果となった．

昭和63年度の精度管理調査で用いられた凍結乾燥血清の試料1と2を R-F法で測定したときの検体ブランク値の測定結果を表2に示した．この値と表1に示した昭和63年度の2法の平均値の差を比較すると，GOTでは試料1，2とも検体ブランク値より20単位大きかった一方，GPT では2法の平均値の差と検体ブランク値はほぼ同じであった．また，試料1，2と同一商品で異なるロットの凍結乾燥血清 A と B の検体ブランク値と比べると，試料1，2は検体ブランクの高く出るロットの血清であることが考えられた．

試料1，2について R-F 法による測定の直線性の有無を希釈試験により検討した結果を図1に示した．GPT

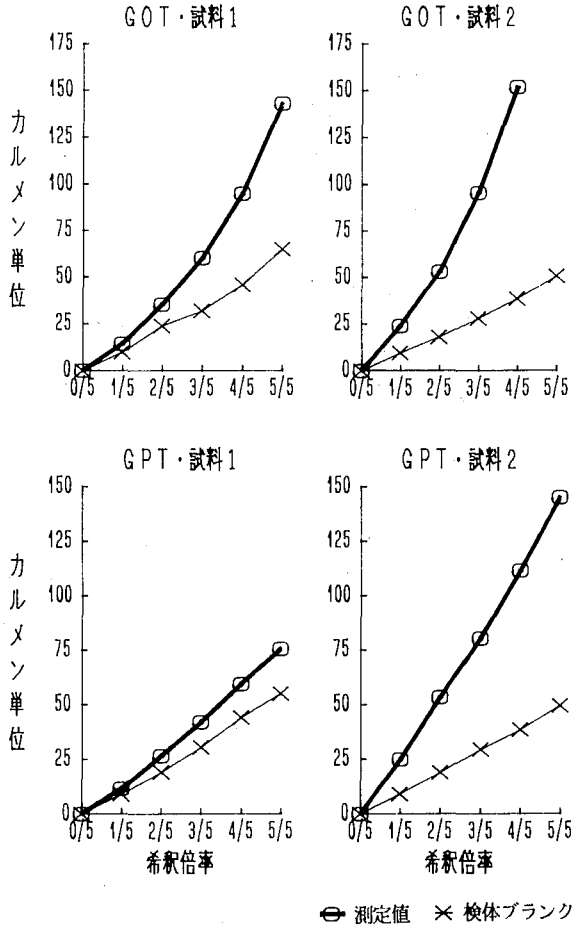


図1．R-F 法による GOT，GPT の測定における直線性

は試料1，2とも測定値，検体ブランク値は直線を示して測定の直線性が認められた．しかし，GOT に関しては測定値では試料1，2とも，検体ブランク値では試料1が上向きの曲線，試料2の検体ブランク値のみ直線であり，直線性はなく，高値に偏る傾向が認められた．精度管理調査の GOT の集計で2方法の平均値の差が検体ブランク値より20単位大きかったのはこのためであると思われた．

以上のことから，試料1，2における2つの測定法間の測定値に差がでる原因は，試料として用いたロットの凍結乾燥血清の検体ブランクがたいへん高いものであったこと，R-F 法による GOT の測定に直線性がなく高値に偏ることの2点により R-F 法による測定値が高値に偏ったためであることが確認された．

次に，R-F 法による測定の妨害物質として知られている血清中のビリルビン，ピルビン酸，乳びについての影響を添加試験により検討した結果を図2に示した．いずれの3種類の妨害物質とも添加濃度が上がるにつれて正の誤差が高くなることが認められた．凍結乾燥血清中に含まれる3種の妨害物質の濃度を測定した結果を表3に示した．これらの結果より，それぞれの妨害物質による測定値へ及ぼす誤差の大きさを添加試験の結果から推定したものを表4に示した．3種の妨害物質による誤差の合計は，GOT の場合，試料1，2それぞれ＋19単位，＋18単位に対し，表2に示された検体ブランク値と比較すると試料1，2でそれぞれ62単位，50単位であり，検体ブランク値のほうが大きかった．試料1，2の GPT の場合も同様の結果であった．一方，試料1，2と別のロットである凍結乾燥血清 A と B については，GOT の検体ブランク値はそれぞれ26単位，17単位(表2)で，3種の妨害物質による誤差の合計はそれぞれ＋27単位，＋16単位(表4)であり，両者の値はほぼ同じ大きさであった．このことから R-F 法による測定で検体ブランクとなる原因は，凍結乾燥血清中のビリルビン，ピルビン酸，

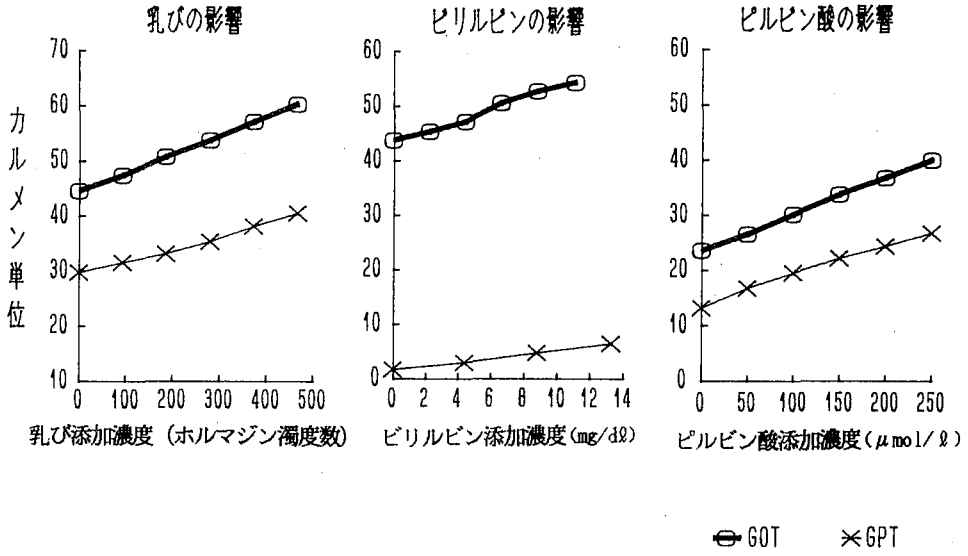


図2．R-F 法による GOT，GPT の測定値へ及ぼす妨害物質の影響

表3．試 料 の 性 状

	総ビリルビン* (mg／dl)	ピルビン酸* (μmol／l)	乳 び (ホルマジン濁度数)	吸光度(525nm)
試 料 1	1.2±0.0	142±4	283	0.894
試 料 2	3.6±0.0	107±1	228	0.883
A	1.4±0.0	105±4	592	1.652
B	4.1±0.0	75±4	239	0.898

* Mean±SD(N：5)

表4．R-F法によるGOT・GPT測定時の妨害物質による誤差の推定（カルメン単位）

	GOT				GPT			
	ビリルビン	ピルビン酸	乳び	計	ビリルビン	ピルビン酸	乳び	計
試料1	0	+10	+9	+19	0	+9	+6	+15
試料2	+3	+7	+8	+18	+1	+6	+5	+12
A	0	+7	+20	+27	0	+6	+13	+19
B	+3	+5	+8	+16	+1	+5	+5	+11

乳びの3種類の妨害物質によることが確認された．しかし，試料1，2についてはさらにそれ以外の妨害物質の存在または血清中に添加された動物臓器由来酵素の酵素反応性の違い等が考えられた．

今回行った実験により，昭和63年度のGOTとGPTにおける精度管理調査で調査試料として用いた凍結乾燥血清に問題点があることが判明した．精度管理調査を実施する上で市販の凍結乾燥血清を調査用試料として用いる場合，各測定法における測定値の差が極力小さいロットの血清を選択する必要があることを明らかにした．

要　約

昭和63年度の都区保健衛生連絡協議会主催の生化学精度管理調査のGOTとGPTにおいて，R-F法とUV法との間で測定方法別平均値に大きな差が現われた．その原因は調査試料として用いた凍結乾燥血清中の乳び，ビリルビン，ピルビン酸の3種の妨害物質によってR-F法によるGOTとGPTの測定に高値の偏りを与えたものと考えられた．

R-F法によるGOTとGPTの測定をしたところ調査試料の検体ブランク値が異常に高く，またGOTのみ調査試料の測定において直線性がなく高値に偏る傾向があることが認められた．これにより，R-F法による測定値が高値に偏り精度管理調査の集計で測定方法別平均値に差が現われたことが確認された．また，調査試料である凍結乾燥血清中の乳び，ビリルビン，ピルビン酸の3種の妨害物質がR-F法での測定上，正の誤差を与えたことを確認した．3種の妨害物質とさらに別の妨害物質あるいは血清中に添加された動物臓器由来の酵素の酵素反応性の違いなどが高い検体ブランク値となった原因であると考えられた．

精度管理調査を実施する上で市販の凍結乾燥血清を調査用試料として用いる場合，各測定法における測定値の差が極力小さいロットの血清を選択する必要があることを明らかにした．

文　献

1）東京都：昭和58年度(第2回)東京都衛生検査所精度管理調査結果報告書，1984.
2）日本医師会：昭和56年度(第15回)臨床検査精度管理調査結果報告書，1982.
3）北村元仕，仁科甫啓：実践臨床化学(増補版)，380-393，1984，医歯薬出版.
4）大久保滋夫，大久保昭行：検査と技術，17，406-408，1989.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 62-69, 1989

神経芽細胞腫のマス・スクリーニングに関する検討（第6報）尿中カテコールアミン代謝終末産物の定量値と検査材料の関係

武士俣　邦　雄*

Studies on Mass-screening Methods for the Neuroblastoma (VI) Criticism on Sample for Quantitative Analysis of Urinary Vanillylmandelic Acid and Homovanillic Acid with High Performance Liquid Chromatography

KUNIO BUSHIMATA*

Keywords：尿中のバニリルマンデル酸およびホモバニリン酸 urinary vanillylmandelic acid and homovanillic acid，検査材料の検討 criticism on sample，神経芽細胞腫 neuroblastoma，高速液体クロマトグラフィー定量分析 quantitative analysis with high performance liquid chromatography

当所では，昭和58年度から，生後6ヶ月の乳児を対象にして，神経芽細胞腫のマス・スクリーニング検査事業を，東京都衛生局実施検討委員会の答申に従って行ってきた[1]．

この検査は，尿中に排出されるカテコールアミンの代謝終末産物の1つであるバニリルマンデル酸(以後VMAと記す)を，パラニトロアニリンとジアゾ結合させ，そのアルカリ呈色々素の検出度合で，腫瘍の有無を判断する定性試験法で行っていた[2]．この化学反応を用いる検査方法は，検査材料の作製および検査手技の違いに基づいて，スポット法[3]およびディップ法[4]の二法に分けられている．

しかし，これらの化学的発色検査方法では，食餌に由来する類似呈色物質が，尿中に出現した事に起因する偽陽性のために，繰り返して検査を受ける被検児の多い事も認められた[5]．更には，カテコールアミン代謝終末産物のホモバニリン酸(以後HVAと記す)およびバニリル乳酸は，本発色検査法ではその色調が淡いために，検出が困難である．従って，これらの分泌が亢進する型の本腫瘍は，見落される危険性のある事も指摘されている[6]．

これらの事態を踏まえたうえで，厚生省は母子保健法規関係を昭和59年に改正し，本事業を国の施策として位置づけた．また，昭和62年には，その検査方法も定性発色法に替えて，高速液体クロマトグラフィー(以後HPLCと記す)装置を用い，それぞれのカテコールアミン代謝終末産物について分離定量し，その定量値に基づいて判定する方法を採る事を推奨すると共に，各自治体の検査機関を指導した．

しかし，当局の研修要網では，検体の取り扱い方および検査術式ならびに成績判定基準であるカットオフ値の設定など，全て各検査機関の独自性に任せ，体系的に手引きされていないのが実状である[7]．

そこで，各検査機関で採用している検査材料について調査したところ，原尿，尿滴下乾燥濾紙又はその打ち抜きディスクならびに尿ディップ湿潤或は乾燥濾紙およびそれらの部分切断片など，極めて多様であった[8]．

何の検査においても同様であるが，分析検査技術以前の問題として，その目的とする検査の材料が，正しくかつ安定的に提供および保管される事が要求される．

そこで，HPLC装置による尿中のVMAおよびHVAの分離分析値と検査材料の関係について検討したところ，検査材料の状況および取り扱い方の相違によって，精度に大きな影響を及ぼす事が判明したので報告をする．

実　　験

1．薬品および器材

1)VMAおよびHVA標準物質(米国シグマ社製の純品) 2)リン酸一ナトリウム，3)エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(以後EDTA-2Naと記す)，4)水酸化ナトリウム，5)L(+)-酒石酸，6)ピクリン酸(以上はいずれも和光純薬工業㈱社の特級品)，7)クレアチニン

*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

標準液(三光純薬㈱社製), 8)アセトニトリル, 9)酢酸エチル(以上は関東化学㈱社製のHPLC用), 10)濾紙; No. 2およびNo.63, 11)メンブランミクロフィルター; 再生セルロース製, 0.45μm孔, 直径47mm(以上は東洋濾紙会社製), 12)ガラス製フィルターホルダー(柴田科学器械工業㈱社製), 13)蓋付スクリュースピッツ, 14)サンプルチューブ, 15)各容量マイクロピペット(エッペンドルフ社製), 16)ヘアードライヤー

2. 調製試薬およびHPLCカラム

1)HPLC移動相:pHメーターを用いて, 4N水酸化ナトリウム水溶液でpHを2.8に調整した0.05Mの酒石酸水溶液9容とアセトニトリル1容の割合で混合し, 0.45μm孔のメンブランミクロフィルターを付けたガラス製フィルターホルダーで吸引濾過した後, ヘリウムガスで脱気して分析に供した.

2)カラム:ユニシルQC_{18}, 粒径10μm, 口径4.6mm, 長さ25cmの分析用充塡カラム(ガスクロ工業㈱社製)を使用した.

3)実験用薬品処理濾紙:2.5% EDTA-2Na水溶液および5%リン酸一ナトリウム水溶液のそれぞれに, 前記したNo. 63の濾紙を浸漬した後に, プラスチック製網上で水平に保って乾燥させた.

3. 分析装置および計測機器

1)HPLCシステム:HPLCポンプ(LC-4A), オートサンプラー(SIL-2A), カラム恒温槽(CTO-2AS), クロマトデータ処理装置(C-R3A), フロッピーディスクドライブ(FDD-1A), (以上はいずれも島津製作所製)に電気化学検出器(VMD-501型, 柳本製作所製, 以後ECDと記す)を接続して, 保持時間で同定したクロマトピークの面積を計測し, VMAおよびHVAの標準物質の絶対検量線面積との比例配分で定量値を算出した.

2)比色分析装置:マイクロプレート光度計(MTP-12型, コロナ電気㈱社製)を用いてクレアチニンの濃度を定量した.

3)pHメーター(240型, 英国コーニング社製)

4. 実験材料およびその作製方法

1)原尿(成人AおよびBの個人一時尿)

2)前記したNo.63およびその薬品処理濾紙を1cm×2cmの大きさに裁断し, それぞれの濾紙片に原尿を100μlずつマイクロピペットを用いて浸潤させ, 各片を個別の蓋付きスクリュウ試験管に入れて密栓した. それらの試験管を, 分析検査当日まで, 摂氏4度の冷蔵庫および摂氏25度ならび摂氏37度の両温度のフラン器の中に保管した.

3)前記したNo. 2の濾紙に原尿を50μlずつマイクロピペットを用いて滴下し, ヘアードライヤーを用いて急速乾燥した後に, シリカゲルを入れて湿度を30%以下まで低下させた乾燥庫(東芝ドライボックスDC-85)で, 分析検査当日まで保管した. また, 分析検査には, クロマトビューキャビネット(C-70G米国UVP社製)を用いて, 各尿滴下乾燥濾紙に尿が浸みている部分を確認し, その円周上を鉛筆でなぞり, 各部分を直径5mmで打ち抜いたディスクおよび全体を切り取って細断したものを検査材料として用いた.

5. 分析操作方法

1)尿中のVMAおよびHVA

検査材料→pH 2.8の0.05M-酒石酸水溶液1.0mlで攪拌溶出→酢酸エチル2.0mlで攪拌抽出→遠心分離(1,500 rpm/2分)→上層(酢酸エチル層)1.0mlをサンプルチューブに分取→遠心エバポレーター(佐久間製作所製EC-57C)を用いて酢酸エチル層を蒸発乾固→サンプルチューブのそれぞれに移動相液を250μl(ただしディスクの場合には100μl)ずつ注入→攪拌溶解→HPLC注入(ただし, 打ち抜きディスクを検査材料とした場合には, ディスク2枚について同様に処理し, 定量値を半分にしてディスク当りの含有量とした.)

2)HPLC稼動条件

イ)カラムおよび移動相:前述した通り.

ロ)試料注入量:10μl. ただし, 検査材料がディスクの場合は20μlを注入した.

ハ)流量:1.0ml/分

ニ)カラム恒温槽温度:摂氏40度

ホ)ECD感度:設定加電圧 +0.8ボルト
参照電極 Ag/AgCl
感 度 10ナノアンペア

ヘ)記録紙送り速度:5.0mm/分

ト)定量値テーリング処理:保持時間3~6分の間をタイムプログラムで処理した.

3)尿中クレアチニン

原尿を, pH 2.8の0.05M-酒石酸水溶液で10倍に希釈し, その100μlに0.75N-水酸化ナトリウム水溶液および0.04M-ピクリン酸水溶液の等量混合液を200μlずつ加え, 攪拌混合した後に30分間放置して比色分析を行った. なお, 吸光度の計測は, 予め前記したマイクロプレート光度計でマイクロプレートのブランク吸光度を測定したのち, 各ホールにそれぞれの呈色試験液を200μlずつマイクロピペットを用いて分注し, その計測吸光度をブランクで補正して, Jaffeの反応に基づいた濃度と

して定量した[9].

結果および考察

1．抽出法による尿中の VMA および HVA の定量分析値の再現性

前記したNo.63の濾紙の1cm×2cmの細片5枚に，成人Aの一時尿をマイクロピペットを用いて100μlずつそれぞれに浸潤させ，直に前述した方法に基づいてVMA および HVA を抽出し，保持時間による同定法で定量分析を行った．この保持時間による同定では，HPLC 分離分析の性質として，VMA および HVA のそれぞれ以外の物質も同一視して測定している事もあり得るが，以後両物質の定量値として記述して考察する．

表1．抽出法による尿中の VMA および HVA の定量分析値の再現性

	VMA（μg／ml）	HVA（μg／ml）
定量分析値	1.0577	2.1256
	1.0256	2.0797
	1.0378	2.0755
	1.0107	2.0848
	1.0274	2.026
平 均 値	1.03224	2.07832
標準偏差	0.0154596	0.0316985
変動係数	0.0149767	0.0152119

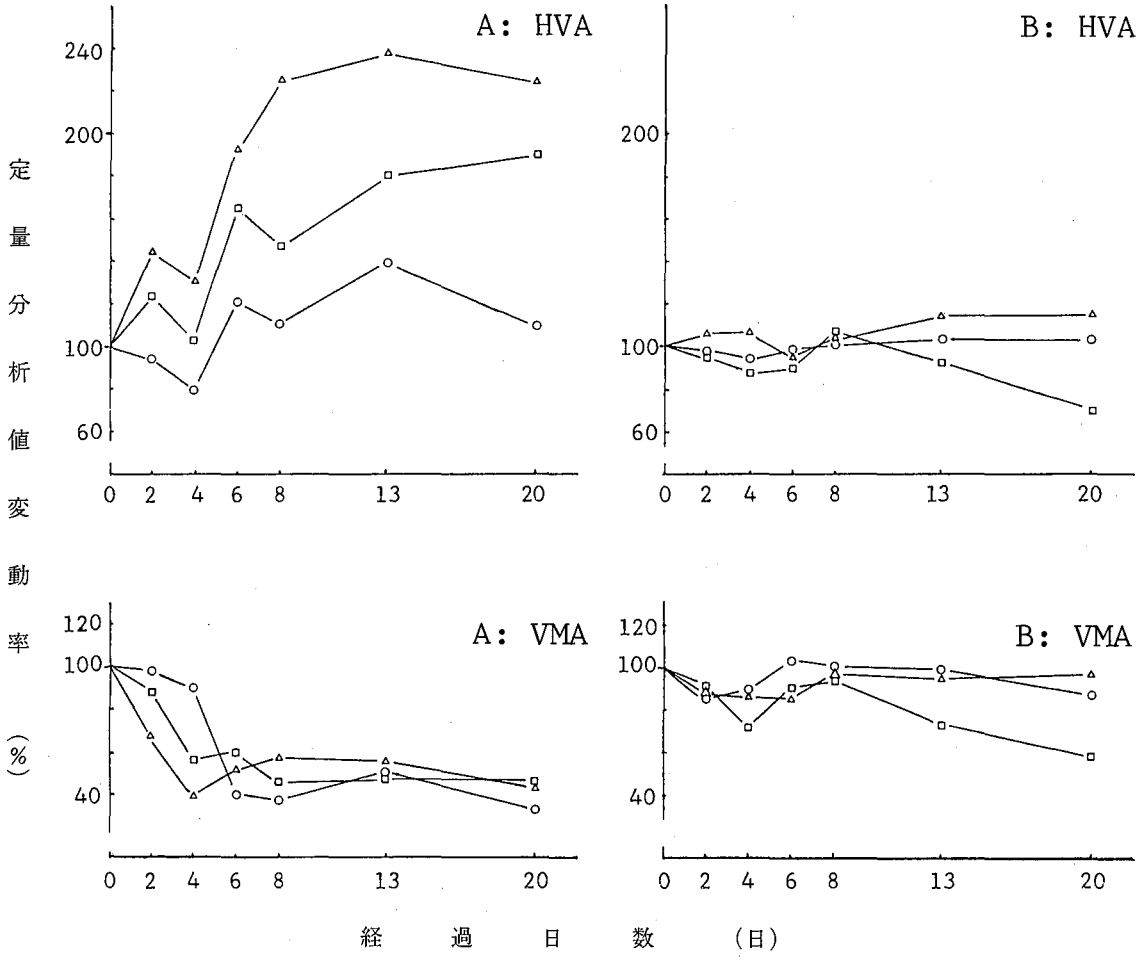


図1．採尿後の保管温度と経過日数による VMA および HVA 定量値の変動
（クレアチニン濃度：A＝112.1mg／dl，B＝200.2mg／dl）
○—○ 4℃（冷蔵庫），□—□ 25℃および△—△ 37℃（フラン器）

このようにして分析した試料5件のVMAおよびHVAの定量値を表1に示す.

表1.から明らかなように，この分析方法による尿浸潤濾紙中のVMAおよびHVAの定量値は，両者共におよそ±1.5%変動する事が認められた.

2．尿中のVMAおよびHVAの経日変化

1)保管温度の影響

成人AおよびBの一時原尿を，ネジ付スピッツ試験管に100 μl ずつ分取し，密閉してから前記した各温度で保管したものを検査材料として，採尿当日および2，4，6，8，13ならびに20日間の各経過日に，前述した分析方法に基づいてVMAおよびHVAの定量分析を行った.

これらのAおよびBの採尿当日の定量値(A：VMA＝5.3216 μg／ml，HVA ＝4.8669 μg／ml およびB：VMA＝3.1603 μg／ml，HVA ＝6.3143 μg／ml)を基準として，それぞれの保管温度における各経過日数日の定量値の増減をパーセントで算出した.

それらのVMAおよびHVAの数値に基づいて，保管温度別に折れ線グラフで表わしたものを，図1.に示す.

この図1.から明らかなように，分析値が安定しているのは，Aの尿の摂氏4度のVMAおよびBの尿の各温度のHVAの2～3日間だけであり，それ以外は経過日数が増すにつれて，AおよびBの尿共にVMAは減少しているのに対し，HVAは増加している事が認められる.また，クレアチニンの濃度で尿の濃淡を判断して比較検討したところ，クレアチニンの濃度が200.2mg／dl のBの濃い尿に比べ，その約半分の112.1mg／dl のAの薄い尿のVMAおよびHVAの変動の方が極めて大きいうえに，少い日数で急激に増減している事も認められた.

さらに，VMAおよびHVAの定量値の変動を保管温度の相違に基づいて比較検討したところ，温度の低い方が変化も遅くかつその量も少い事が判明した．特にこの

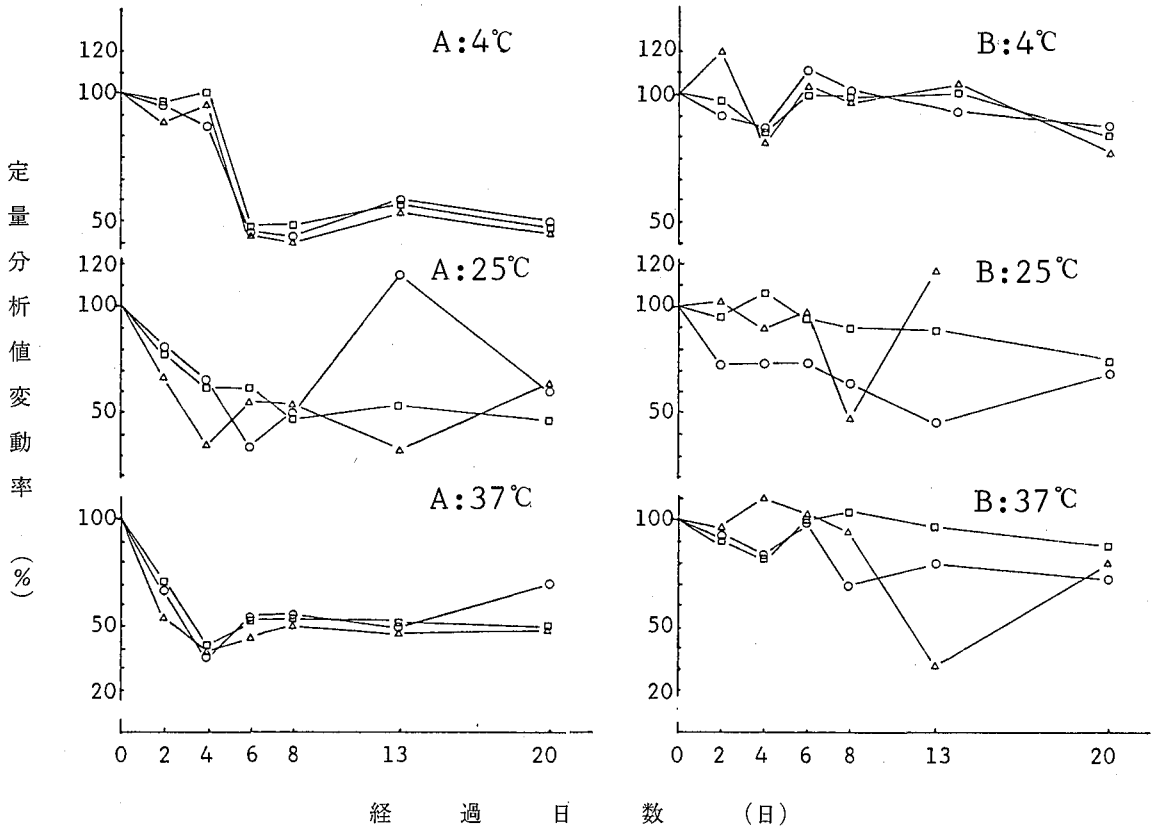


図2．採尿後の薬品処理濾紙と経過日数によるVMA定量値の変動
(クレアチニン濃度：A＝112.1mg／dl，B＝200.2mg／dl)
○—○ No.63濾紙，□—□ EDTA・2Na処理No.63濾紙，△—△ リン酸一ナトリウム処理No.63濾紙

事は，希薄なAの尿において顕著であった．しかしこの事は，中田ら[10]の，摂氏4度における尿中VMAは6日間安定であったという報告内容とは，異なった結果であった．

2)薬品処理濾紙の検討

Yoshidaら[11]は，塩酸々性下の蓄尿を，摂氏マイナス15度で保管して尿中のVMAおよびHVAを分析検査したところ，20日間経過した時点でも安定的定量値が得ら

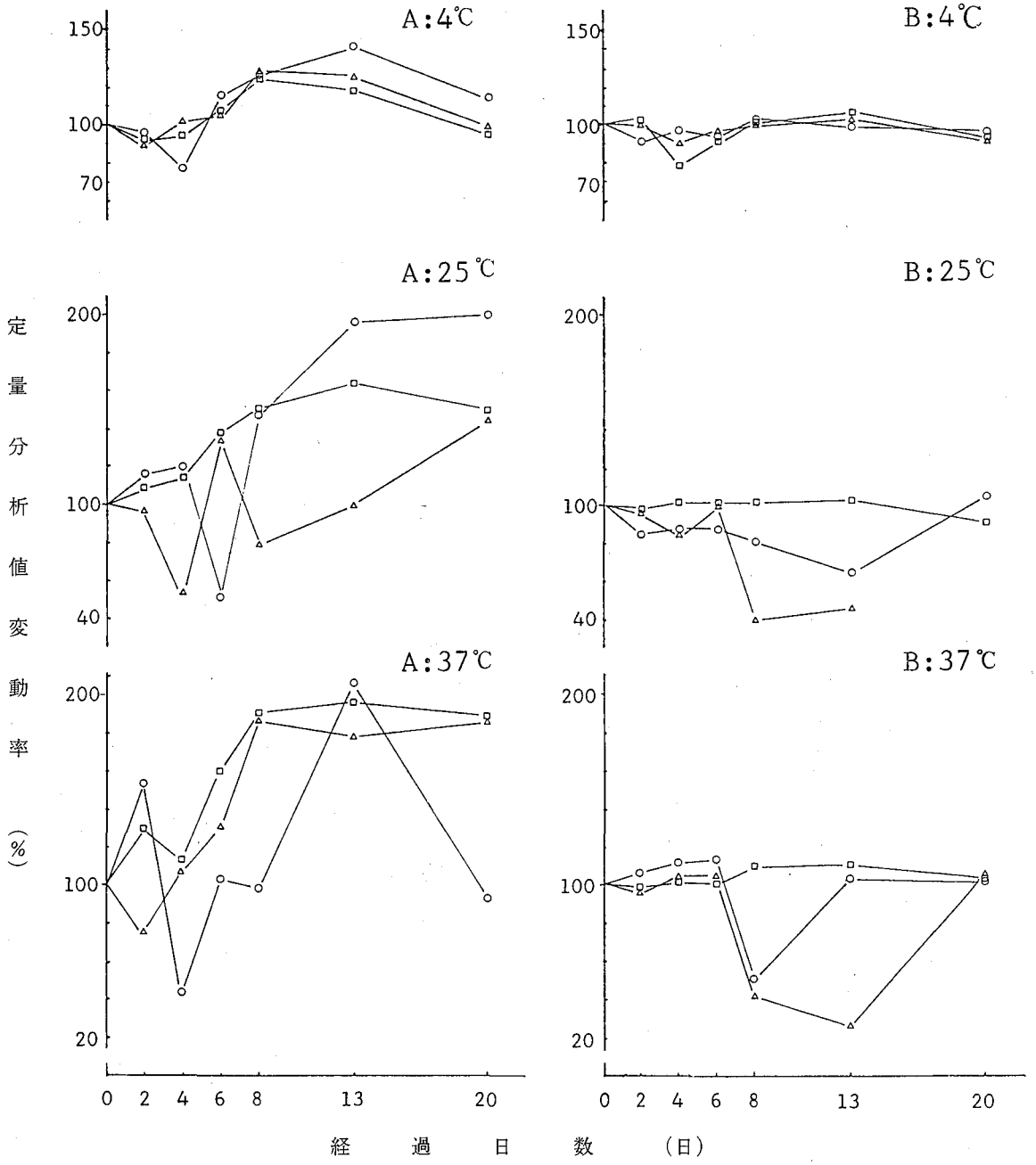


図3．採尿後の薬品処理濾紙と経過日数によるHVA定量値の変動
(クレアチニン濃度：A＝112.1mg／dl，B＝200.2mg／dl)
○—○ No.63濾紙，□—□ EDTA・2Na処理No.63濾紙，△—△ リン酸一ナトリウム処理No.63濾紙

れている事を報告している.

そこで，弱酸性物質による尿中のVMAおよびHVAの保存効果について検討を試みた.

すなわち，前項1)で使用したAおよびBの原尿を，前記したNo.63の各濾紙片にマイクロピペットを用いてそれぞれ100 μl ずつ浸潤させ，前項と同様の温度条件で保管し，同じ経過日数毎にVMAおよびHVAの定量分析を行った．それらのVMAおよびHVAの定量値に基づいて，前項と同様に，採尿当日の定量値を基準にし，それぞれの経過日数日毎の増減を，パーセントで算出した.

それらのVMAおよびHVAの数値に基づいて，保管温度および薬品処理別に，折れ線グラフで表わしたものを，図2.(VMA)および図3.(HVA)に示す．なお，Bの摂氏25度のリン酸一ナトリウムで処理した濾紙の，20日間目の経過時点では黒カビが生え，VMAおよびHVA共にその定量値は得られなかった.

図2.および図3.について検討を行ったところ，各経過日数日毎の変動は激しいものの，その総合的動態は前項1)の原尿における経日変化と同様である事が判明した.

すなわち，2.5%のEDTA-2Naおよび5%のリン酸一ナトリウムの各水溶液で処理した弱酸性化濾紙においても，尿中のVMAおよびHVAの安定化効果は認められなかった.

3．尿滴下急速乾燥濾紙の打ち抜きディスクの定量値

一般に，本腫瘍のスクリーニング検査には，尿を前記したNo.2の濾紙に滴下し，常温常湿で自然乾燥させた濾紙の尿付着各部分から，直径5㎜[12]または10㎜[13,14]の大きさで打ち抜いたディスクが，検査材料としてよく用いられている.

そこで，尿滴下濾紙の各部分のVMAおよびHVAの量を確認するために，次の様な実験を行った．すなわち，成人AおよびBの一時原尿を前記したNo.2の濾紙に，マイクロピペットを用いて50 μl または100 μl ずつ滴下し，ヘアードライヤーで急速に乾燥した後，その中心部分および中心と辺縁の中間ならびに辺縁上の各部分を，直径5㎜で打ち抜いたディスク2枚を各部位の検査材料として定量分析を実施し，その半分の値を定量値とした.

それらの各部位におけるVMAおよびHVAの定量値の関係を表2.に示す.

表2.から明らかなように，No.2の濾紙に尿をマイクロピペットで滴下して急速に乾燥させた場合，尿付着各部分の1ディスク当たりのHVAの定量値は中心部で大きかった．また，尿滴下円周上を半径とする辺縁上ディスクは，尿付着面積が半分なので，VMAおよびHVAの定量値を2倍して比較しても，中心部の方が高かった.

すなわち，尿滴下後急速に濾紙を乾燥させた場合にお

表2．急速乾燥尿滴下濾紙における打ち抜きディスク中のVMAおよびHVA含量

原尿定量分析値	尿滴下量	定量分析項目	ディスク打ち抜き位置別定量値（ng／1 Disk）		
			スポット中心	中心と辺縁の中間	スポット辺縁上
VMA：1.1362 μg／ml	50 μl	VMA	0.2231	0.1727±0.0224 (CV=0.12989)	0.1187±0.0092 (CV=0.07751)
HVA：2.7919 μg／ml		HVA	0.3895	0.2554±0.0394 (CV=0.15438)	0.1114±0.00417 (CV=0.03743)
クレアチニン：41.8mg／dl	100 μl	VMA	0.2143	0.2149±0.0261 (CV=0.12149)	0.0992±0.0077 (CV=0.07708)
		HVA	0.2978	0.3442±0.0398 (CV=0.11566)	0.0377±0.0084 (CV=0.2220)
VMA：2.4301 μg／ml	50 μl	VMA	0.5639	0.5371±0.0510 (CV=0.09503)	0.207 ±0.0153 (CV=0.07408)
HVA：5.167 μg／ml		HVA	0.7861	0.6351±0.0729 (CV=0.11469)	0.2179±0.0299 (CV=0.13725)
クレアチニン：132.3mg／dl	100 μl	VMA	0.6823	0.58 ±0.0689 (CV=0.11878)	0.164 ±0.0161 (CV=0.09829)
		HVA	0.805	0.164 ±0.01612 (CV=0.098285)	0.1845±0.0193 (CV=0.10443)

いては，VMA および HVA 共に尿付着部分に均一に分布しているわけでないことが判明した．

4．尿滴下濾紙の乾燥保管効果

尿滴下No．2の濾紙を，前述した条件の乾燥庫内で保管し，その尿付着部分全体を切り取って細断したものを検査材料として，採尿当日から1週間毎に5週間目まで，VMA および HVA を前述した方法に基づいて定量分析を行った．それらの定量値の変動を検討するために，採尿当日を基準として，各経過週日毎の値をパーセントで算出し，折れ線グラフで表わしたものを図4．に示す．

この図4．から明らかなように，尿を滴下した濾紙を強度に乾燥した状態で保管すると，VMA および HVA 共に5週間の期間内では緩やかに変化する事があるものの，全体的には両物質とも比較的定安した状態で保持される事が認められた．

この事を，すでに述べた原尿或は尿湿潤濾紙では VMA および HVA の定量値が激しく変動する事と対比して推察すると，両物質を安定的に保持し，正確な検査成績を提供する為には，検査材料を強度に乾燥させておく事も，効果的保持方法の1つとして認識する事が出来る．

以上の事から，尿中の VMA および HVA を HPLC で定量分析する際に，古い原尿や尿湿潤濾紙或は打ち抜きディスクをその検査材料として用いると，新鮮原尿におけるそれらの量を反映しないのみならず，検査精度の上からも好ましくない事が判明した．

従って，神経芽細胞腫のマス・スクリーニング検査のように，その検査材料を郵送で受け付けて行うような場合には，特に湿度(水分)や変質性反応物質[14]の存在或は採尿後の経過日数などについて，充分に注意して判定する必要がある．

なお，当所において，本スクリーニング検査を，尿滴下乾燥濾紙を用いた HPLC による定量分析値に基づいて判定するようになってから，クレアチニンがある程度検出されているにもかかわらず，採尿後2週間以上経過している場合には，特に VMA が検出されない被検体のある事が観察された．そのうえ，梅雨時の被検体の中には，採尿後10日間位でも VMA が検出され難い傾向のある事も経験している．

ま と め

神経芽細胞腫のマス・スクリーニングに，尿中のカテコールアミン代謝終末産物を HPLC 装置で定量分析した値に基づいて，腫瘍の有無を判断する方法が導入された．

ところが，この時に使用する検査の材料について詳細に検討した報文が検索されないので，検査材料の性質について検討を行ったところ，以後のような結果が得られた．

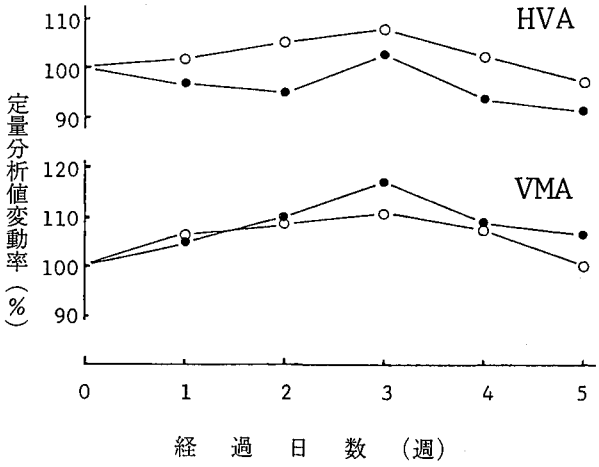


図4．尿滴下濾紙の乾燥庫保管効果
○—○ A：VMA＝1.374 μg／ml
HVA＝2.447 μg／ml
クレアチニン＝52.8mg／dl
●—● B：VMA＝1.955 μg／ml
HVA＝3.088 μg／ml
クレアチニン＝60.5mg／dl

1．今回採用した尿中の VMA および HVA の HPLC 定量分析操作における精密度は，両項目共に±1.5％の変動であった．

2．一時尿を，摂氏4度の冷蔵庫と摂氏25度および摂氏37度のフラン器内で保管して，VMA および HVA の HPLC による定量分析値の安定度について検討したところ，経日的には温度が高いほど変化が早いうえ変動も大きかった．また，尿の濃淡もクレアチニンの濃度で判断しては，VMA および HVA の変化を比較したところ，濃度の濃い方が安定的であった．なお，この時の変化としては，VMA は減少するのに対し，HVA は増加する事が観察された．

3．No.63の濾紙を，EDTA-2Na およびリン酸一ナトリウムで弱酸性化処理し，その濾紙に一時原尿を浸潤させて保管した検査材料でも，VMA および HVA の HPLC 定量分析値の経日的安定化は計れなかった．

4．一時原尿をNo．2の濾紙にマイクロピペットで滴下し，ヘアードライヤーで急速乾燥した後に，尿が付着している中心部および中心と辺縁の中間ならびに辺縁周上を，直径5㎜で打ち抜いたディスクを用いて，VMA

およびHVAの定量分析を行ったところ，各部位における平均値の差および同一箇所における変動係数は，共に大きく相違している事が判明した．

5．一時原尿の一定量をマイクロピペットを用いてNo. 2の濾紙に滴下乾燥した後，湿度30％以下の乾燥庫内で保管し，尿付着部分全体を切り取って，採尿後1週間毎にVMAおよびHVAの定量分析を行ったところ，5週間経過した時点においても，採尿当日と大差のない安定した定量値が得られた．

以上の事を総括すると，神経芽細胞腫のマス・スクリーニングの検査精度の維持向上を計るためには，その検査材料として，一時原尿および尿湿潤濾紙或は尿滴下乾燥濾紙の打ち抜きディスク等を用いずに，強度に乾燥させた尿滴下濾紙の尿付着部分全体について定量分析を行う事が，より良い手段であると考えられる．

なお，本研究の概要は，第36回日本臨床衛生検査学会大会(昭和62年5月，鹿児島市)で発表した．

文　献

1）東京都神経芽細胞腫マス・スクリーニング実施要項検討資料.
2）武士俣邦雄：東京衛研年報，35，92-100，1984
3）佐藤辰男，吉永　馨，石田　望：最新医学，16，371-374，1961
4）中田利一，石田譲治，児玉京子，三谷一憲，土平一義ほか：日本公衆衛生誌，30，227-233，1983
5）武士俣邦雄，高野弘紀，大橋　誠ほか：東京衛研年報，37，60-68，1986
6）沢田　淳：神経芽細胞腫マス・スクリーニング，55-67頁，母子愛育会編，大門出版，東京，1984
7）神経芽細胞腫検査技術者研修会資料.
8）資料.
9）柴田　進，高橋　浩：臨床化学の技術・第1版，123-125頁，金原出版，東京，1963
10）中田利一，児玉京子：神経芽細胞腫マス・スクリーニング，128-133頁，母子愛育会編，大門出版，東京，1984
11）Yoshida, A., Yoshida, M., Yamazaki, T., Sakai, T. and Tamura, Z. : Clinica Chimica Acta, 73, 315-320, 1976
12）森野裕子，穴沢　昭，武井　一，松本　勝ほか：予防医学ジャーナル，209，32-38，1986
13）佐藤泰昌，福士　勝，高杉信男，武田武夫：日本小児科学会誌，89，2665-2671，1985
14）高杉信男，佐藤泰昌：神経芽細胞腫マス・スクリーニング，109-123頁，母子愛育会編，大門出版，東京，1984
15）武士俣邦雄，植田忠彦：衛生検査，36，1219-1225，1987

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 40, 70-76, 1989

検査室由来情報処理に関する考察（第1報）コンピュータシステム開発における請求要件

津野正朗*，倉科周介*，大橋　誠*

Processing of Laboratory-originated Information 1. Requirement for Computerization

MASAAKI TSUNO*, SHIUSUKE KURASHINA* and MAKOTO OHASHI*

Keywords：情報処理 information processing, データベース data base, 検査室由来情報 laboratory-originated information

著者らは，検査室において生産されあるいは取り扱われる情報を「検査室由来情報」と総称してきた．これには，検査の結果生産される情報(いわゆる生情報)のみならず，検査材料に関する情報(例えばヒト由来材料の場合は被検者に関する情報)，手続上必要な情報，及びそれらの情報の処理によって付加される二次的情報が包含される．

ところで，著者らは，1979年以降，感染症サーベイランス領域における検査室由来情報を対象として，パーソナルコンピュータを用いた情報の処理・解析システムを開発し[1-10]，それらの試験的／実務的運用及びその後のバージョンアップ等を通じて，検査室由来情報処理のあり方について詳細な検討を行う機会を得た．

本報及び以降の続報においては，それらの経験に基づいて，コンピュータの導入を前提とした検査室由来情報の処理及びその手法等について考察し，システム開発の参考としたい．

検討対象システム

著者らがパーソナルコンピュータを用いて感染症サーベイランス領域において開発した次の各種情報処理システムを検討の対象とする．

1．MRFC：当衛生研究所微生物部担当業務の1つ「海外旅行者健康診断」に係わる検査材料，被検者情報及び検査成績の管理用データベース[1,2]
2．IRFC：海外渡航者由来分離菌株情報(及びその付帯情報)管理用データベース[3]，MRFCのサブシステム
3．MDAシリーズ：MRFC専用データ解析システムであり，その蓄積情報を歴年あるいは累年処理して，海外渡航者の訪問国パターン別の病原菌検出状況，同時検出病原菌パターンなどの解析を行う[4-7]
4．MERT：保健所など東京都・特別区の関係検査機関における微生物検出状況を月及び年報として集約し「東京都微生物検出情報」に掲載する資料を提供するためのデータベース[8]
5．TFSJ：腸チフス中央調査委員会による全国腸チフス・パラチフス発生情報管理用のデータベース[9]
6．DEPIDs：日和見感染由来をも含む分離病原体情報管理・処理用の汎用のデータベース[10]

これらのシステムは，それぞれに対象事業，取扱情報，利用目的等を異にするものであり，個別の特徴を有するモデルとして比較検討の対象となり得ると考える．

システム開発の環境

衛生研究所は主として公衆衛生の分野の各種検査及び調査を伝統的な本来業務とする．すなわち著者らは，検査情報の生産者の立場にあり，各種検査に係わる専門的な知識・技術は有するものの，情報処理やコンピュータに関する技術を本来業務とする者ではなかった．したがって，かつてのように，専ら大型コンピュータとアッセンブラ言語のみに頼って情報処理が行われていた時代には，自らの手でシステムを試験開発したり，外注開発のために必要な注文仕様書を作成する機会はほとんど皆無であった．しかし，近年のコンピュータハードウエア及びソフトウエア技術の領域における急速な技術革新の進展によって，これらを利用したシステムの自家開発が

*東京都立衛生研究所　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

可能な環境が整った.

すなわち，1970年には大幅に小型化された汎用コンピュータ(いわゆるミニコン)が世に出，1971年には現在のパーソナルコンピュータの母体である4ビットのマイクロコンピュータ(マイコン)が出現した。当初の4ビットマイコンは他のシステムの補助装置的役割をはたす程度の機能であったが，その後僅か数年にして，単体でコンピュータとして使用し得るマイコンにまで発展を遂げた．ソフトウエアについても，高度な知識がなくても比較的容易に理解できる「BASIC」等の高級言語が登場し，非専門家にとってもシステム開発が身近になった[11].

著者らは，小型のパーソナルコンピュータが市販され始めたのを機に，これを用いた検査室由来情報処理を目的としたデータベースの試験的開発に着手した．当初は，所内検査事業の1つである海外旅行者健康診断業務を対象とし，試験的なデータベースを開発して基本的な構造モデルを得ると共に，その試験的運用を通じてシステム構想を練り，市販データベースの導入あるいはシステムの外注開発等をも検討することを考慮していた.

しかし取扱対象とした病原体情報は，既存の疾病統計等と比較してさらに詳細なものであり，しかも対象病原体の如何によって利用目的のみならず，入力を要する情報も異なるという特性をもっていた．このような処理対象には，既存の汎用システムの導入や流用による限り，満足すべき情報処理機能を得ることは困難であり，また，システム開発業者へ外注するにしても，取扱情報の性格や内容，入出力方法などが余程正確かつ詳細に理解されない限り，要求する機能を備えたシステムを得ることは難しいと判断された．また，高い情報入力精度を維持するためには，検査及び取扱情報の特性や感染症及び病原微生物に関する専門的な知識を有する者がシステムを運用することが望ましいとも考えられる．このような観点から，著者らはコンピュータシステムに関する知識・技術を有する専門家に依存することなく，対象検査の担当者が同時に検査情報を取り扱うという，実用性本位のシステムを自家開発することにした.

システム開発の作業手順を役割分担

上述のような経緯でシステムを自家開発した結果，著者らは，システムの開発すなわちそのデザインやプログラミング担当者の立場とユーザとしての立場とを，体験することになった．当初の開発経過は次のとおりである.

最初に手懸けたのは，MRFC(微生物部の検査業務の1つである海外旅行者下痢症の細菌学的病因検索に係わる検査情報処理用データベースのメインシステム)である．この開発にあたっては，システム開発の手順や役割分担を事前に検討することなく作業を開始した．そのため，対象事業の検査担当者の1員で，同時にコンピュータ関連技術に関する概念的な知識を持つ研究者がアプリケーションソフトウエアのプログラミングを担当したが，これはシステム開発に対する請求要件がプログラミング作業の進行に伴って断片的に追加提示される事態を惹起し，多少の混乱を生じた，すなわち，データファイルの基本構造からオペレータに対するモニター画面上の表示内容に至るまで様々なレベルのプログラム改造を余儀なくされ，試験的運用に至るまでに数ヶ月の時間を要した.

ここに至って，作業効率を向上させるために，関係者の役割分担を明確にし，段階的な作業計画に基づいてシステム開発を行うことの必要性が強く意識されるようになった．こうした経験による改善の結果，図1に示すような開発の手順と役割分担が確立されるに至った．そして現在では，システムの機能向上・拡充を目的とした改造や支援ソフトウエアの追加開発の場合にも，同様の手順を踏むことになった.

請求要件の検討

システムの開発にあたっては，図1のごとく，まず検査担当者及び関係者がその開発に対する請求要件(Requirment)を詳細に検討して文書化する．外注開発を前提とした場合には，詳細な注文仕様書を作成する．この作業が完全に行われれば，その後は，開発したシステムの試験運用の段階までユーザの関与を要さない場合もある．したがって，請求要件の検討には特に慎重かつ綿密な作業が要求される.

自家開発と外注開発のいずれを選択するにせよ，この段階でシステムの概念設計を行うに足りる資料が整っていることが必要であろう．不完全あるいは不充分な請求要件に起因するシステムの欠陥や誤プログラミングは，その請求要件を提示した者の責任である．しかし，外注開発の場合に特にそうであるが，検査の意義や行政対応など必要以上に詳細に解説しても，システムデザインやプログラミングにはあまり役にたたないこともある．勿論，システムデザインあるいはプログラミング担当者の側においても，事前に不明あるいは不合理な点を見出した場合には，請求要件の補強や訂正あるいは適当な資料の添付を求める位の熱心さが要求されよう．いずれにせよ，この請求要件の完成度の如何によって，開発されるシステムの機能や性能が大きく左右される．それが本報において請求要件に関する考察を主題として取り上げた所以である.

図1．コンピュータシステム開発の作業手順と役割分担

STEPS（開発の段階）	FACTORS（作業内容等）	PART（役割分担）
REQUIRMENT（請求要件を得る）	necessity, needs analysis, detaile description confermation documentation	システム開発起案者 （検査担当・関係者）
SYSTEM DESIGN（システムデザイン）	(hard ware) soft ware input/output data file design record(format) design display design printing design program design, flowchart	SYSTEM DESIGNER（システムデザイナ） SYSTEM ENGINEER（システムエンジニア）
PROGRAMING（プログラミング）	programing language algorithm main- and sub-routines fool-proofing system-up	PROGRAMER（プログラマ）
TRACE RUNNING TEST RUNNING（試験運用）	test operation error detection debugging check for fool-proofing proof listing	PROGRAMER／OPERATOR
OPERATION（実務運用）	input, record, read display, printing out searching differencial count analysis (reproduction)	OPERATOR／USER（検査担当・関係者）

表1に著者らが開発した各システムにおける請求要件に係わる問題点を列挙した．

著者らが最初に手懸けたMRFCの開発においては，システムのデザイン／プログラミング担当者が関係者の意見を必要に応じて聴取しながら，これと平行してアプリケーションソフトウエアのプログラミング作業を行った．そのため，試験運用開始後に再度データファイルのフォーマット変更をするというような事態を生じたことは前述のとおりで，必要以上の手間と時間を要した．その後に開発したTFSJやDEPIDsでは，MRFCに比較して入力情報量が多く構造的に複雑であるにも拘わらず，主要アプリケーションプログラムをいずれも1ヶ月以内に開発し得た．この実績からみてMRFCでは3分の1以下の労力と時間によって目的のデータベースの開発ができたと推定される．

このシステムの開発途上，プログラム担当者自身によって請求要件のメモ記録が開始されている(図2)．このメモには，当時，検査情報のプリント出力様式が主な話題であったことを反映してか，「検査台帳用データベース開発案」のタイトルがつけられている．また，請求要件そのものの他に，プログラムのデザインに際して必要な変数割当やその取扱方法等に関するメモも記載されている．その後のシステム開発を通じてこの種の資料はより整った形式のものに改められていったが，特に入力情報に関する請求要件については，現在もほぼ同様の検討手順がとられており，有用な参考資料となっている．

これに続くIRFC等の開発においては，プログラミング作業を開始する以前に請求要件を文書化する手順をとった．そのため，ソフトウエアの開発所要時間が大幅に短縮された．

請求要件の文書化及び添付資料の作成のために，その後，次の各様式(あるいは調査表)が用意された．

1．様式-T 01001：システム開発案…起案者，対象事業(業務)，開発目的(または主旨)，収録データの概要(日別・月別・機関別・地区別等々の収録単位，収録項目数，収録予定件数，整理番号順・日付順等の収録順序，整理番号等の付け方，その他の特徴)，必要な帳票出力，集計及び出力様式，検索・解析等を要する項目(または項目の組合せ)，出力様式等の記入用

2．様式-T 01002：現用のハードウエア及び周辺機器の仕様を記入

3．様式-T 01003：入・出力データ一覧…入力項目名，項目の内容，入力の種類(実数・文字・コード番号)，各入力データの最大／最小値(または種類の総数)，例外データ(不明及びその他等々)，所要桁(文字)数等を詳細に記入

(このほかに，システムデザインの段階で利用する変数割当やフォーマット順位などの記入欄を用意．)

4．様式-T 01004：コード化データ一覧…コード化を要するデータの種類，内容，提案コード(案)を記入

以上の外，システムデザイン及びディスプレイデザイン等に使用するデザイン用紙も作成された．

いわゆる使い勝手が良いシステムを得るためには，請求要件の中に，そのシステムの運用に予定されているオペレータのコンピュータ使用歴や操作技量等を明示し，また，当該システムに関する特殊な要望事項があればそれも明記しておくのが良策である．例えば，本報で検討

表1．検査室由来情報処理システム開発における請求要件の提示と問題点

システム略称	主　要　目　的	請求要件の提示，及び改良点	システム開発の問題点	開発手順(手法)改良の効果
1.MRFC	海外旅行者の細菌学的病因検索に係わる検査情報の管理	必要に応じて逐時提示. （必要に応じてプログラム担当者が関係者の意見を聴取）	システム像はプログラミングの進行と共に明らかになった. データフォーマットから画面表示ルーチンまでプログラムの変更・改造を繰り返した.	
2.IRFC	海外旅行者下痢症由来検出病原体情報の管理	同上, ただし，プログラム担当者が必要事項をメモ記録.	病原菌のグルーピングが流動的. 複数菌同時検出例の取扱に対する意見が不確定.	プログラミング途上の基本構造改造，1回のみ. プログラミング所要時間の短縮.
3.MDA シリーズ	MRFC 蓄積情報の解析 （訪問国パターン別，病原菌検出パターン別，外）	プログラム担当者がフローチャート,データフォーマット図等を作成,基本モデルのプログラミング作業後にユーザに提示，デモ運用. 以後は，前例と比較して，パターン認識の設定等，要点のみを検討.	特に問題点なし.（プログラム担当者がシステム開発の全段階を担当したため） ただし，同上の問題が一部未解決のままであり，病原菌検出例を，陽性例数で計上するか，あるいは検出菌件数で計上するか，いずれかの判断に苦慮.	本体システムの開発資料を参照することにより，システムデザイン，プログラムデザイン，プログラミングの各作業が円滑に進行.
4.MERT	「東京都病原体検出情報」刊行用情報処理	「東京都病原体検出情報」の刊行関係者が提示. 刊行物を添付．プリント出力フォームはそれを踏襲.	特に問題点なし.（機能的にそれ程高度な請求要件は認められず，分類集計結果等のプリント出力作業のコンピュータ化に止まったため）	既存のアプリケーション・プログラムの一部を流用し，プログラミング所要時間を短縮.
5.TFSJ	全国の腸チフス・パラチフス発生情報の管理	既存カードシステムの資料一式を添付．入力情報，出力フォームはこれを踏襲. 追加要望事項等は事業担当者が文書で提示.	特に問題点なし.（30余の多彩なプリント出力フォームを出力するために，合計400Kバイトのアプリケーションプログラムを開発したにも係わらず）	請求要件の検討，1回のみでシステム開発が可. システム開発所要時間の大幅短縮.
6.DEPIDs Ver.1.10	分離病原体情報の処理・交換 （国内・海外共用システム）	SEAMIC の感染症部会関係者が提示．既存の集計フォームを添付. 将来における WHO 活動への協調を配慮することが求められた.	対象病原体の決定に相当の時間を要した. WHO プログラムとの整合性を持たせるために，当初は不明の点があった.	既存のアプリケーション・プログラムのサブルーチンを組合せて流用し,開発所要時間を短縮.
Ver.2.10	同上 （国内向け仕様）	WHO プログラムとの整合性を持たせるために，入力情報の追加及び情報処理機能の追加・拡張を提示.	予定外の改造により，当初の整然としたブロック化構造が部分的に破壊され，以後の改造及びメンテナンスに際して，多大の時間と労力を要することになった.	Ver.1.10がブロック構造化されたプログラムであったので，当初の改造は容易であった.
Ver.3.10	同上 （海外向け仕様）	WHO プログラムへの協調を配慮して，IBM バージョンへの変換. （国際的なサーベイランス情報交換活動への応用を配慮）	当初は U.S. 仕様の IBM ハードウエア及びソフトウエアが手元になく，国産のローカル仕様機を使用してソースプログラムを得，これを IBM 用に手入力変換.	IBM 用プログラム開発を先行させ，これを国内向けに変換する道が開かれた.

SEAMIC：日本国際医療団内の東南アジア医学情報センター

5）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.
6）津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：東京衛研年報，37，1-7，1986.
7）津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：東京衛研年報，39，1-8，1988.
8）津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：東京衛研年報，36，60-66，1985.
9）津野正朗，大橋　誠，中村明子：マイコンサーキュラー，11(10)，8-15，1986.
10）津野正朗，大橋　誠：マイコンサーキュラー，13(2)，8-15，1986.
11）津野正朗：ラボラトリーアニマル，4(2)，46-48，1987.

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.*, **40**, 77-83, 1989

インドメタシン坐剤中の分解物について

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

Decomposition Product of Indomethacin in Suppository Formulation

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

Summary

Indomethacin and it's impurities in commercial suppository were determined by high–performance liquid chromatography using a reversed–phase, octadecyl column (C_{18}) and an aqueous acetic acid–methanol solution as a mobile phase.

Eleven samples were assayed with a potency for indomethacin of 66.28–102.87%, and were found to contain 4–chlorobenzoic acid (0.19–1.90%), 5–methoxy–2–methyl–3–indoleacetic acid (0.07–1.12%), 4–chlorobenzoic acid–α–monoglyceride (0.03–0.76%) and indomethacin–α–monoglyceride (0.04–1.52%) as impurities.

On the other hand, a group of unknown impurities were present in some cases. The group was isolated from a sample by silicagel column chromatography. It was found that the unkown impurities were formed as a result of the interaction of indomethacin with polyethylenglycol in the suppository base.

Keywords：インドメタシン indomethacin, 坐剤 suppository, 高速液体クロマトグラフィー HPLC, 紫外部吸収スペクトル UV

緒　言

インドメタシン(IM)は，優れた非ステロイド系抗炎症剤として種々の剤型で広く繁用されている．製剤中でのIMの安定性は，剤型によって異なり，水溶液および坐剤中において特に経時変化を受け易いことが報告されてい[1-4]．IMの坐剤中での安定性について，Mcerlaneらは[3,4]，TLCおよび高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて市販IM坐剤より4–Chlorobenzoic acid, 5–Methoxy–2–methyl–3–indoleacetic acid, 4–Chlorobenzoic acid–α–monoglyceride, Indomethacin–α–monoglycerideの4種類の分解生成物を分離同定している．しかし，わが国の市販IM坐剤の安定性については，あまり報告がなされていない．そこで，著者らは，市販IM坐剤の実態を調査する目的で，紫外部吸収スペクトル(UV)法およびHPLC法を用いてIMの分析，およびMcerlaneらの報告した4種の分解生物について分析を行った結果を報告する．さらに，著者らは，4種以外の新たな分解生物がIM坐剤中に存在することを確認し，その推定構造式を提出したので合わせて報告する．

実験の部

1．試料　市販の日本薬局方製インドメタシン坐剤11種を用いた．

2．試薬　IM標準品：日本メルク萬有㈱製を用いた．

IMの分解生成物標準品：4–Chlorobenzoic acid(I)は東京化成工業製，5–Methoxy–2–methyl–3–indole-

*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 Shinjuku–ku, Tokyo, 169 Japan

Table Ⅰ Analytical Conditions

Specification	HPLC conditions		
	Condition 1	Condition 2	Condition 3
Column	LiChlosorb RP-18 (7 μm, 25cm×4.7mm)	LiChrosorb RP-18 (7 μm, 25cm×4.7mm)	LiChrosorb RP-18 (7 μm, 25cm×4.7mm)
Mobile phase	MeOH-0.1 M acetic acid (70 : 30)	MeOH-0.1 M acetic acid (50 : 50)	MeOH-0.1 M acetic acid (50 : 50)
Flow rate	1ml／min	1ml／min	1ml／min
Detection	UV 254nm	UV 280nm	UV 254nm
Column temp.	room temp.	room temp.	room temp.

acetic acid(Ⅱ)はシグマ社製をそのまま用いた．4-Chlorobenzoic acid-α-monoglyceride(Ⅲ)は Mcerlane らの方法[4]により合成した．Indomethacin-α-monoglyceride(Ⅳ)は，IM 1 g とグリセリン30ml を共栓フラスコに取り，70° で14日間反応後，反応溶液に水50mlを加え，分液ロートに移し，エーテル50ml を用いて3回抽出する．抽出液を濃縮後，Mecerlane らの方法[3]に従い TLC を用いて精製を行い標準品とした．なお，合成した分解生成物(Ⅲ)，(Ⅳ)のいずれも IR, NMR およびマススペクトルが，Mcerlane の報告と一致することを確認した[3,4]．

シリカゲル：Kiselgel 60, 230-400 mesh, ASTM (Merck 社製)を用いた．

ポリエチレングリコール類：和光純薬製試薬1級を用いた．

その他の試薬は，すべて試薬特級を用いた．

3．器具及び装置 クロマト管：長さ35cm，内径2cm の活栓付きガラス製クロマト管．

高速液体クロマトグラフ：ポンプ；日本分光工業㈱製 BIP-Ⅰ，検出器；日本分光工業㈱製 UVIDEC-100型，試料注入装置；レオダイン社製7125型，データー処理装置；島津製作所製クロマトパック CR-3 A.

分光光度計：日立制作所製320型自記分光光度計．

赤外分光光度計：日本分光工業㈱製 A-3 型．

4．IM と分解生成物(Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅳ)の定量法 IM の約50mgに相当する試料を精密に量り取り，メタノール40ml を加えて加温しながら完全に溶解させ，冷後，室温にてメタノールを加えて正確に50ml とし，試料溶液とする．この試料溶液を必要に応じてメタノールで希釈し，UV 法および HPLC 法を用いて IM と分解生成物Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅳの分析を行った．なお，UV 法による IM の定量は，日局に準じて波長320nm における吸光度により測定した．また，HPLC の測定条件として，IM および分解生成物Ⅰ，Ⅳについては，Table Ⅰに示した測定条件1，分解生成物Ⅱは，測定条件2，分解生成物Ⅲは，測定条件3を用い，試料および標準溶液5 μl 注入におけるそれぞれのピーク高さで定量を行った．検量線は，0-15 μg／ml 濃度範囲で，いずれにおいても原点を通る直線性($\gamma=0.999$)を有するものであった．なお，Fig. 1 に測定条件3で得られた IM および分解生成物Ⅰ，

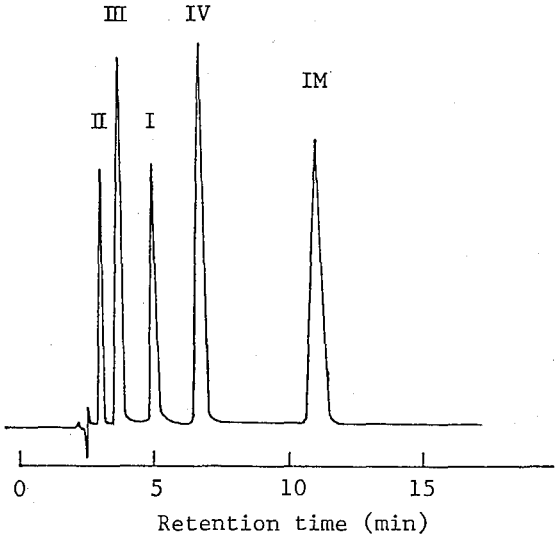


Fig. 1. HPLC of Indomethacin and Its Decomposition Products

Peaks ; Ⅰ : 4-chlorobenzoic acid
Ⅱ : 5-methoxy-2-methy-3-indoleacetic acid
Ⅲ : 4-chlorobenzoic acid-α-monoglyceride
Ⅳ : indomethacin-α-monoglyceride
IM : indomethacin

HPLC condition is the same as for the condition 3 of Table Ⅰ.

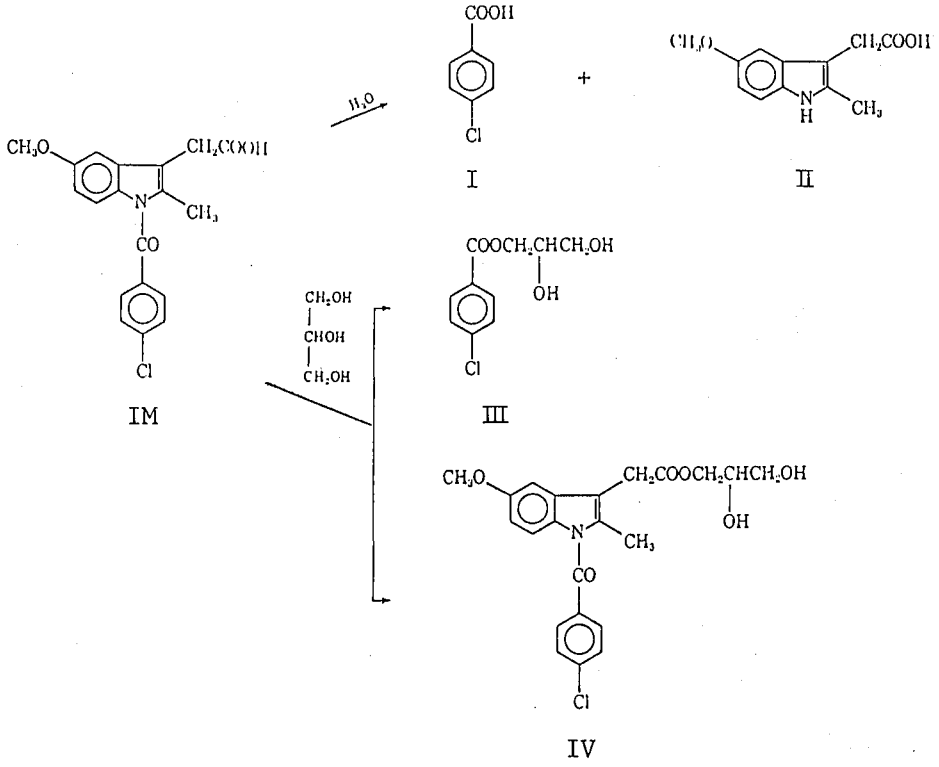
Ⅱ，Ⅲ，Ⅳのクロマトグラムを示した．

5．新たな分解生成物(Ⅴ)の単離 試料(No.10)7.8 g (IM として約0.25 g)をビーカーにとり，水200m*l* に加温して溶解後，500m*l* の分液ロートに移し，クロロホルム100，50，50m*l* で3回抽出を行う．全クロロホルム抽出液を合わせて，100m*l* の水で洗浄後，クロロホルム層を濃縮する．残査をアセトニトリル100m*l* に溶解し，分液ロートに移し，ヘキサン50m*l* を加えて振とう後，ア

Table Ⅱ Quantitation of Indomethacin in Suppository Formulation

Sample No.	Dosage level. mg／unit	Indomethacin (%) UV method[3)]	Indomethacin (%) HPLC method[b)]
1	25	97.47	85.63
2	25	105.73	101.34
3	50	102.73	85.32
4	50	97.67	93.41
5	50	101.73	100.14
6	50	103.20	86.68
7	50	96.47	86.08
8	50	97.47	92.49
9	25	101.87	101.06
10	50	95.33	66.28
11	12.5	106.27	102.87

a) UV：320nm, b) condition 1.



Scheme I Decomposition Mechanism of Indomethacin in Suppository Formulation
Ⅰ：4-chlorobenzoic acid, Ⅱ：5-methoxy-2-methyl-3-indoleacetic acid,
Ⅲ：4-chlorobenzoic acid-α-monoglyceride, Ⅳ：indomethacin-α-monoglyceride,
IM：indomethacin

セトニトリル層を分取する．この操作を3回繰り返した後，アセトニトリル層を濃縮する．ついで，濃縮液をシリカゲル30gを充塡したカラムクロマトグラフィーに付し，ヘキサン100ml，25%イソプロパノール・ヘキサン混液400ml，50%イソプロパノール・ヘキサン混液400ml，75%イソプロパノール・ヘキサン混液200ml，イソプロパノール100mlを順に流し，IMおよび分解生成物Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅳを流出後，10%エタノール・イソプロパノール混液400mlを用いて新たな分解生成物Ⅴを得た．2回の再クロマトグラフィーにより約0.5gのⅤ(黄色粘稠物)を分離精製した．

結果と考察

1．市販製剤中のIMの分析　市販IM坐剤11種についてUV法およびHPLC法を用いてIMの分析を行った．その結果，Table Ⅱに示すように，全ての試料においてUV法に比較してHPLC法による測定値が低い値をしめすことが認められた．その中でも特に試料No.10において，HPLC法による測定値がUV法の約70%と極端に差のあることが認められた．このことは，Mcerlan[3,4]および江島ら[2]の報告にあるIMの分解によるためであると考えられる．

2．分解生成物(Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅳ)の分析　坐剤中でのIMの分解について，Mcerlanらは基剤中のグリセリンとIMとが反応しScheme Ⅰに示すような分解過程を報告している[3,4]．そこで，著者らは，市販IM坐剤中の分解生成物Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅳについて分析を行った．その結果を，Table Ⅲに示す．IM標示量に対し，分解生成物Ⅰ：0.19-1.95%，Ⅱ：0.07-1.12%，Ⅲ：0.03-0.76%，Ⅳ：0.04-1.52%の濃度範囲で存在することが認められた．なお，分解生成物Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅳの合計量は，標示量に対し1.29-3.39%と試料によってほとんど差がなく低い割合を示していることが認められた．このことは，UV法とHPLC法でIMの測定値に大きな差が認められた試料において，上記以外の分解生成物が存在することが示唆される．

Table Ⅲ　Decomposition Product Levels in Indomethacin Suppository Formulation

Sample No.	Decomposition products[a)] (%)			
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
1	1.40	0.88	0.49	0.11
2	0.13	0.07	0.34	0.78
3	0.70	0.55	0.27	0.08
4	0.30	0.40	0.43	0.10
5	0.60	0.15	0.76	0.77
6	0.47	1.12	0.55	0.22
7	0.74	0.62	0.50	0.04
8	0.82	0.23	0.03	0.21
9	0.19	0.14	0.31	1.52
10	1.90	0.71	0.45	0.33
11	0.33	0.28	0.44	0.47

a) Estimated by HPLC and expressed as a percentage of the label claim of drug.

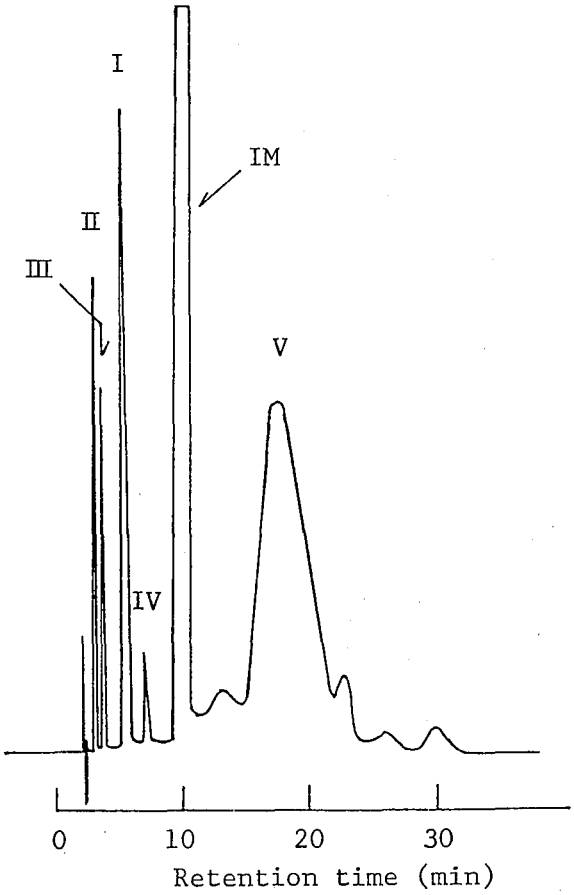


Fig. 2．HPLC of Sample No.10
Peaks；Ⅰ：4-chlorobenzoic acid
Ⅱ：5-methoxy-2-methy-3-indoleacetic acid
Ⅲ：4-chlorobenzoic acid-α-monoglyceride
Ⅳ：indomethacin-α-monoglyceride
Ⅴ：unkown peak
IM：indomethacin
HPLC condition is the same as for Fig. 1.

3．新たな分解生成物(Ⅴ)について　測定条件3で得られた試料No.10のクロマトグラムをFig. 2に示す．このクロマトグラムよりIMのピークの後に，分解生成物Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅳ以外のブロードな未知ピークⅤが存在することが認められた．さらに，UV法に比較してHPLC法で顕著にIM量の分析値が低い値を示した試料No.1,3,6,7においても，試料No.10と同様にピークⅤの保持時間(Rt)付近にブロードなピークが存在することが認められた．このことより，ピークⅤは，HPLC法とUV法によるIMの測定値の差に対する，大きな要因の一つになっているものと考えられる．

そこで，著者らは，ピークⅤを実験の項に従って分取し，構造の推定を行った．Ⅴは，黄色粘稠物質で，メタノール溶液についてUVスペクトルを測定した結果，Fig. 3に示すようにIMと同一のスペクトルを示した．また，Ⅴについて液膜法で赤外吸収スペクトルを測定したところ，1735cm^{-1}にエステルに由来すると思われるカルボニル基特性吸収が認められた．これらのことより，Ⅴは，分解生成物Ⅲ，Ⅳと同様にIMと基剤の一部とが反応し，エステルを形成したものであると推定される．

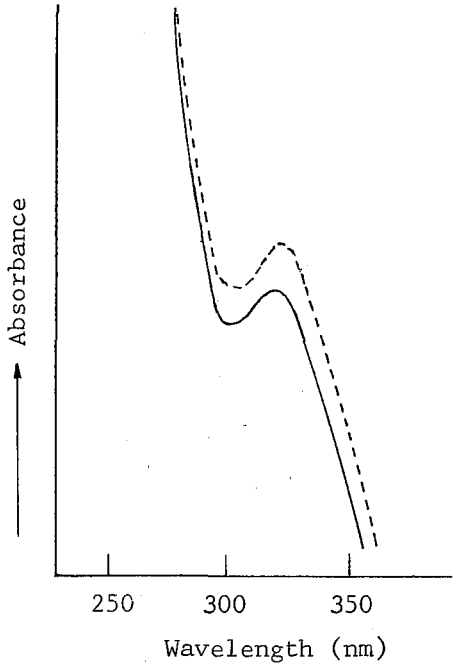


Fig. 3．UV Absorption Spectra of Indomethacin and Its Decomposition Product (Ⅴ)
——：decomposition product (Ⅴ)
------：indomethacin

そこで，Ⅴの約100mgをフラスコに取り，メタノール20ml および0.5 N NaOH 1 ml を加え水浴上で，5分間加熱けん化を行った．ついで0.1 N HCIで中和後，このメタノール混液についてHPLCを行った．この結果，Fig. 4に示すようにクロマトグラム上からピークⅤが消失し，新たにIMおよび分解生成物Ⅰ，Ⅱのピークが現れた．さらに，上記のメタノール混液を濃縮後，IMおよび分解生成物Ⅰ，Ⅱを除去する目的で，残査に水およびエーテルを加え，液一液分配をおこない水層を分取した．水層を濃縮後，残査について液膜法でIRスペクトルを測定した．その結果，けん化処理を行う前に存在したエステルに由来すると考えられる1735cm^{-1}のカルボニル特性吸収が消失していることが認められた．なお，この物質は3400cm^{-1}：ν(OH)，1110cm^{-1}：ν(c−o−c)の

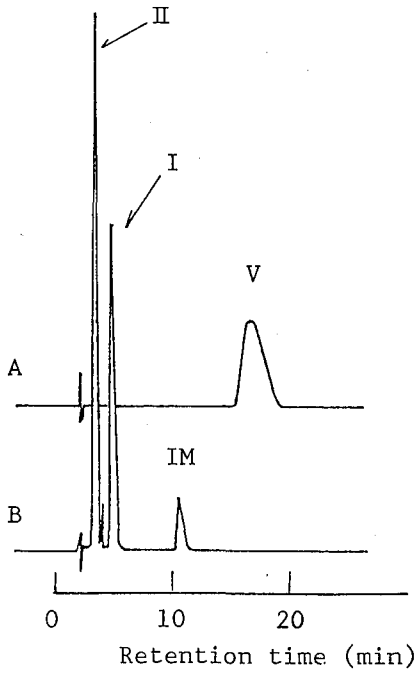
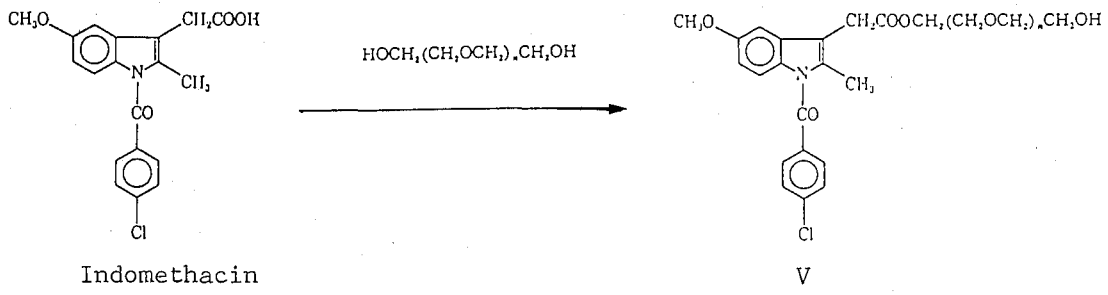


Fig. 4．HPLC of Decomposition Product (Ⅴ) and Its Alkaline Hydrolysis Product
A：decomposition product (Ⅴ)
B：alkaline hydrolysis product
Peaks；Ⅰ：4−chlorobenzoic acid
Ⅱ：5−methoxy−2−methy−3−indoleacetic acid
Ⅴ：unkown peak
IM：indomethacin
HPLC condition is the same as for Fig. 1.

特性吸収を示し，ポリエチレングリコール(PEG)の IR スペクトルと一致することが認められた．

これらの結果より，Ⅴは，Scheme Ⅱに示す様な IM と PEG のエステル化合物であると推定される．

さらに，ⅤがIMとPEGとの反応生成物であることを確認する目的で，分子量の異なる6種の PEG を用いて IM との反応を試みた．すなわち PEG 200, PEG 400, PEG 600, PEG 1000, PEG 2000, PEG 4000の 5 g をそれぞれフラスコに取り，IM 0.5 g を加えて70°で14日反応を行った．Fig. 5 に反応後のクロマトグラムを示す．



Scheme Ⅱ Structure of Decomposition Product (Ⅴ) of Indomethacin in Suppository Formulation

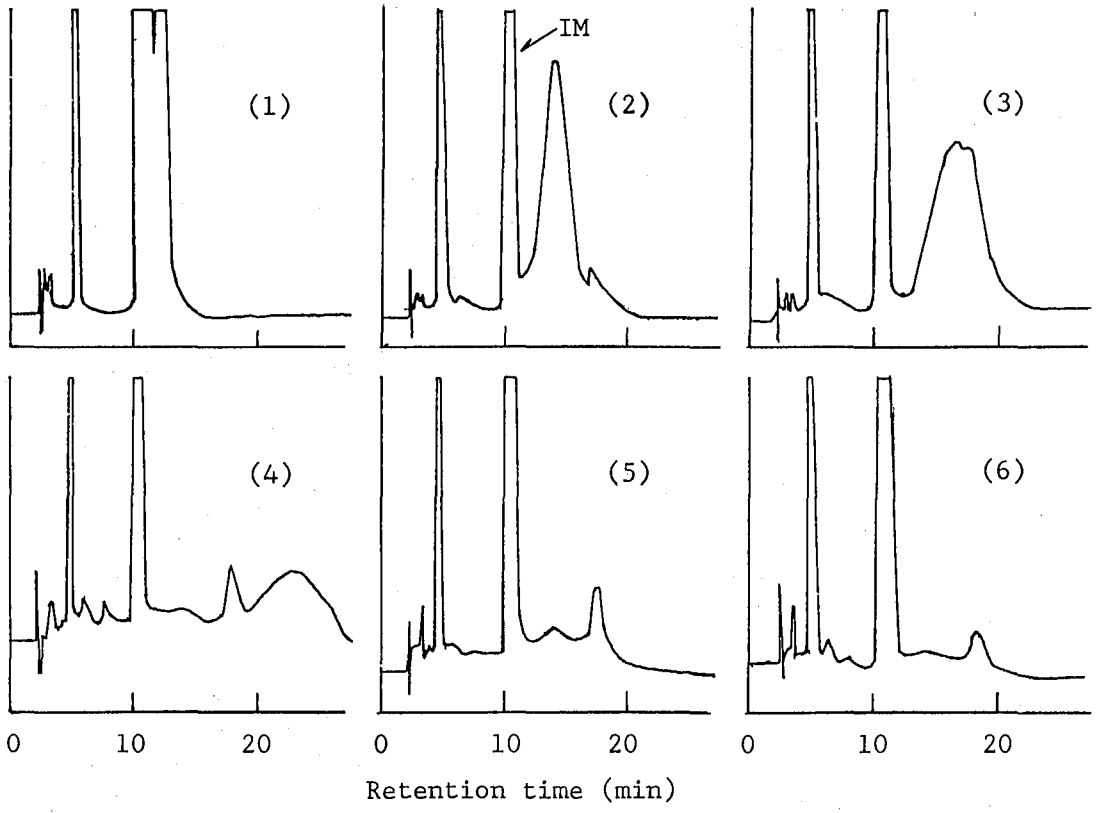


Fig. 5. HPLC of Decomposition Products of Indomethacin (IM) in Polyethylene Glycol
HPLC condition is the same as for Fig. 1.
Incubated with PEG at 70°C for 14 days.
(1) : IM+PEG 200, (2) : IM+PEG 400, (3) : IM+PEG 600,
(4) : IM+PEG 1000, (5) : IM+PEG 2000, (6) : IM+PEG 4000.

その結果，クロマトグラム上，VのRt付近に反応生成物の新たなピークが出現することが認められた．さらに，PEGの分子量の差により反応生成物の量及びRtが異なり，分子量が大きく成るに従って，生成量は少なく，またRtは長く成ることが認められた．なお，VはPEG 600の反応生成物のRtとほぼ一致することが認められた．

結　　語

坐剤中のIMの安定性について調査を行った．その結果，IMは，基剤として用いられるグリセリンおよびPEGにより経時変化を受けやすいことが認められ，製剤設計上，十分に注意を要することが示唆された．

文　　献

1）後藤　茂，曽　文榮，甲斐美智子，合沢幸子，非口定男，薬剤学，29，118-124，1969.

2）江島　昭，立沢政義，松田りえ子，医薬品研究，15，93-108，1984.

3）N. M. Curran, E. G. Lovering, K. M. Mcerlane, J. R. Watson, *J. Pham. Sci.*, 69, 187-189, 1980.

4）E. Kwong, G. R. Pillai, K. M. Mcerlane, *J. Pham. Sci.*, 71, 828-830, 1982.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 40, 84-89, 1989

生薬の品質評価に関する研究（第9報） 黄耆の品質

高橋 奈穂子*, 安田 一郎*, 瀬戸 隆子*, 浜野 朋子*,
高野 伊知郎*, 秋山 和幸*, 鈴木 幸子**, 福田 達男**,
田中 博**, 飯田 修***

Studies on the Evaluation of Crude Drugs (IX) Quality of Astragali Radix

NAHOKO TAKAHASHI*, ICHIRO YASUDA*, TAKAKO SETO*,
TOMOKO HAMANO*, ICHIRO TAKANO*, KAZUYUKI AKIYAMA*,
SACHIKO SUZUKI**, TATSUO FUKUDA**,
HIROSHI TANAKA** and OSAMU IIDA***

Two standard Astragali Radix, prepared from *Astragalus membranaceus*, were each divided into five parts according to diameter of root. The classified specimens were subjected to examinations, and the results were as follows. 7, 3′-Dihydroxy-4′-methoxyisoflavone 7-*O*-β-D-glucoside (**I**) was identified in all of the samples. The γ-amino-*n*-butyric acid(GABA) content was $(3.6-16.6)\times10^{-2}$% and the value of the lateral root were higher than those of the main root. A similar tendency was observed in the dilute ethanol extract content of 23.1－43.6%. Amounts of butanol fraction of methanol-soluble extract were 1.1－3.0%. The specifications of each sample stated in the Japanese Pharmacopoeia(JP) met the requirements.

Fifteen samples on the market were analyzed similarly, and all of them met the JP requirements. Compound **I** was identified in all cases. It was found that one of the samples, a product in Korea, collected in Tokyo, had 1.8×10^{-2}% of GABA content and 10.5% of dil. ethanol extract content. And this sample showed the different appearance and property compared to the standard crude drugs. These data sujested that the sample was not to be prepared from the correct original plant.

Keywords : Astragali Radix, *Astragalus membranaceus*, γ-amino-*n*-butyric acid, evaluation, 7,3′-dihydroxy-4′-methoxyisoflavone 7-*O*-β-D-glucoside, indicator, on the market, crude drugs, HPLC

緒　言

黄耆はキバナオウギ *Astragalus membranaceus* Bge., ナイモウオウギ *A. mongolicus* Bge. などマメ科の植物の乾燥根であり[1,2], 老人性疾患適用漢方方剤に属する黄耆建中湯, 補中益気湯, 人参養栄湯などに広く配合される[3]生薬である. その有効成分については, 血圧降下作用を有する γ-amino-*n*-butyric acid(GABA)が, わずかに報告されている[4]にすぎない. しかし, 含有成分としては, 7,3′-dihydroxy-4′-methoxyisoflavone 7-*O*-β-D-glucoside(**I**)などのフラボン類[5], astragaloside などのサポニン類[6]が明らかにされている. 生薬の規格について第11改正日本薬局方(JP XI)では, 性状の項以外に純度試験として *Hedysarum* 属植物等との鑑別試験, 灰分, 酸不溶性灰分および乾燥減量が記載されている[1]が, 成分の含量規格はない. 現在, 市場には日本産以外に中国産, 韓国産などの黄耆が多数流通している. しかし, 太さ, 側根の分枝状態, 味, においなどの性状をみる限り, 必ずしも品質的に一定の生薬とはいいがたい. そこで,

* 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, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
** 東京都薬用植物園
***国立衛生試験所筑波薬用植物栽培試験場

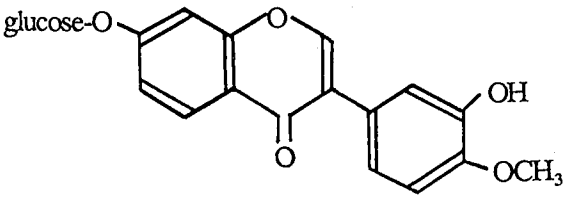


Chart 1. Chemical Structure of **I**

I : 7,3′-dihydroxy-4′-methoxyisoflavone 7-O-β-D-glucoside

今回これらのものについて，含有成分を中心に黄耆の品質を検討した．

まず，標準生薬として茨城県八郷町および東京都小平市栽培のキバナオウギの乾燥根を用い，灰分，酸不溶性灰分，乾燥減量，希エタノールエキス含量，さらにサポニン含量の評価として一般に行われているブタノールエキス含量を定量した．また，各種アミノ酸中のGABAの定量とともに，高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による**I**(Chart 1)を中心としたイソフラボン類のパターン分析も併せて実施した．そして，その結果を踏まえ，各産地の市場品生薬についても同様の試験を行ったので報告する．

実 験 の 部

1．実験材料

標準生薬(キバナオウギの乾燥根)：茨城県八郷町農家で1年間栽培し，1988年11月に掘り上げ乾燥した1年生根．黄耆として東京市場に出荷予定品(a)．東京都小平市の東京都薬用植物園で2年間栽培し，1989年4月に掘り上げ，水洗後50°以下で3日間乾燥した2年生根(b)．

市場品：1975－1988年東京市場品10検体［日本産(J) 2検体，韓国産(K) 4検体，中国産(C) 4検体］，香港市場品3検体(すべてC)，大阪市場品1検体(K)，中国内蒙古市場品1検体(C)，計15検体．100－500 g の単位で購入した全形生薬あるいは刻み生薬．

2．試料の調製

標準生薬は(a)，(b)ともに主根部と側根部に分け，さらに主根を(1)径0.7cm以上，(2)0.5－0.7cm，(3)0.5cm未満，側根を(4)径0.3cm以上，(5)0.3cm未満の5種類に分けた．これら計10サンプルを各々粗切とした後，粉末試料とした．

市場品も同様に，各々粗切とした後，その約50 g を粉末試料とした．

3．灰分，酸不溶性灰分，乾燥減量，希エタノールエキスおよびブタノールエキスの定量

灰分，酸不溶性灰分および乾燥減量はJP XI，希エタノールエキス含量はJP XI一般試験法22.生薬試験法[7]に準じ定量した．ブタノールエキス含量の定量は，常法[8,9]に従い行った．即ち，試料約5.0 g をメタノール150ml で1時間還流抽出を行った．これを再度繰り返し，抽出液を集めて，溶媒を減圧留去した．得られたエキスを水100ml に溶解し，クロロホルム100ml で2回脱脂後，水層より水飽和 *n*-ブタノール100ml で2回抽出した．得られたブタノール層の溶媒を減圧留去後，さらに室温，24時間，1.0 mmHg 以下で減圧乾燥した．そして，乾燥減量によって得た数値より乾燥物に換算した試料量に対し，エキス含量を算出した．

4．γ-amino-*n*-butyric acid (GABA) の定量

試料溶液の調製：試料約1.0 g を正確に量り，水40ml を加えて30分間振とう抽出を行った．遠心分離後，残渣に水25ml を加えて同様の操作をさらに2回繰り返した．上澄を合わせ，0.2 N 塩酸10ml を加え，水で正確に100ml とした後，0.45 μm のフィルターを通した液をGABA 分析用試料溶液とした．

標準溶液の調製および検量線の作製：GABA(和光，特級)約20.0mg を精密に量り，水に溶かして正確に50ml とした液を標準溶液とした．これを適宜希釈して(1.25－25.0)×10^{-3} μg/μl の標準系列とし，自動アミノ酸分析計に注入，得られたクロマトグラムのピーク高さと濃度から検量線を作製した．

自動アミノ酸分析計：835型日立高速アミノ酸分析システムを用いた．注入量 50 μl．

5．イソフラボノイド(I)の調製

東京市場品黄耆500 g を粉末とし，メタノール2 l で1夜冷浸した．これを再度繰り返し，得られた抽出液を集め，溶媒を減圧留去，残った褐色粘稠性残渣を水1 l に溶解し酢酸エチル2 l で分配後，水飽和 *n*-ブタノール2 l で抽出した．ブタノール層は減圧濃縮し，得られたエキスを約30ml のメタノールに溶かし，カラムクロマトグラフィー(Kieselgel, 150 g , Merck)にかけた．クロロホルム・メタノール(3：1)混液で溶出した画分を，SEP-PAK(C_{18}カートリッジ，Waters)に付加し，5％アセトニトリル溶液で溶出させた画分から，分取 HPLC 操作［カラム：TSKgel ODS-120T，10 μm，2.15×30cm (東ソー)，移動相：25％アセトニトリル溶液，流速：7.0ml /min，分取時間：22.6－24.3 min］によりⅠを単離した．MS *m/z*：446(M^+)，284($M^+-C_6H_{10}O_5$，base

peak). ^{1}H-NMR (C_5D_5N) δ ppm：3.77(3H, *s*), 7.05 (1H, *d*, J=9.0 Hz), 7.30(2H, *m*), 7.43(1H, *d*, J=2.0 Hz), 7.78(1H, *d*, J=2.0 Hz), 8.17(1H, *s*), 8.37 (1H, *d*, J=9.0 Hz). ^{13}C-NMR (C_5D_5N) δ ppm：55.9, 62.4, 71.2, 74.8, 78.4, 79.2, 101.8, 104.2, 112.4, 115.9, 117.7, 119.7, 120.4, 125.0, 125.9, 127.8, 148.0, 148.8, 153.1, 157.8, 162.3, 175.5. MSスペクトルおよび^{1}H-NMRスペクトルデータは，7,3′-dihydroxy-4′-methoxyisoflavone 7-*O*-β-D-glucoside の文献値[5]と一致する．Chart 1に，その構造を示した．

6．HPLCによるパターン分析

試料溶液の調製：試料約2.0 gをとり，メタノール40m*l*を加えて30分間振とう抽出を行った．ろ過後，抽出液にメタノールを加え正確に50m*l*とし，0.45 μm のフィルターを通したものを試料溶液とした．

標準溶液の調製：**I** 約5 mgをメタノール100m*l*に溶かしHPLC用標準溶液とした．

HPLC条件：装置はTRI ROTAR-Ⅵ system（日本分光），カラムはTSKgel ODS-120T, 5 μm, 4.6×250mm（東ソー），移動相はグラジェントによるアセトニトリル・水混液を用い，流速は1.0m*l*/min，カラム温度は40°，検出は286 nm，注入量は10.0 μl とした．

結果および考察

1．標準生薬

(1)**性状** 八郷町で栽培，調製されたキバナオウギ(a)の主根部は径0.5−2.5cm，側根部は0.1−0.5cmであった．外面は淡黄褐色，不規則なあらい縦じわと横長の皮目ようの模様がみられ，根頭部の近くは少しねじれ，横断面は繊維性で灰黄色を示した．JP XIの性状の項では，生薬の太さは径0.7−2cmといわれており，合致していない部分が多い．小平市で見本用に育種栽培されていた(b)も同様の性状を示した．

Table 1. Analytical Results of the Roots of *Astragalus membranaceus*

Sample*1	Part of the Root*2	Total Ash ≦5.0%*3	Acid-Insoluble Ash ≦1.0%*3	Loss on Drying ≦13.0%*3	Extract Content (%) dil.Ethanol	Extract Content (%) Butanol*4	GABA Content(%)
a	Main Root						
	1	2.5	<0.1	6.0	30.5	1.5	3.6×10^{-2}
	2	2.8	<0.1	5.8	32.2	1.3	5.1
	3	3.2	<0.1	6.3	32.7	1.9	6.5
	Average	2.8	<0.1	6.0	31.8	1.6	5.1
	Lateral Root						
	4	3.3	<0.1	6.6	38.0	1.4	13.4
	5	4.2	<0.1	6.7	35.7	2.0	16.6
	Average	3.8	<0.1	6.7	36.9	1.7	15.0
b	Main Root						
	1	3.4	<0.1	6.4	23.1	1.5	9.2
	2	3.2	<0.1	6.8	35.8	1.1	9.1
	3	3.2	<0.1	8.0	35.7	2.0	11.4
	Average	3.3	<0.1	7.1	31.5	1.5	9.9
	Lateral Root						
	4	3.8	<0.1	7.5	35.9	3.0	7.2
	5	4.6	<0.1	9.9	43.6	2.0	9.9
	Average	4.2	<0.1	8.7	39.8	2.5	8.6

*1 (a) was cultivated at Yasato-machi for one year and (b) at Kodaira-shi for two years.

*2 The roots are classified by diameter as follows.
1：over 0.7cm 2：0.5−0.7cm 3：under 0.5cm 4：over 0.3cm 5：under 0.3cm

*3 The values show the limit of JP XI.

*4 This column shows the amount of butanol fraction in methanol-soluble extract.

(2)灰分，酸不溶性灰分および乾燥減量 JP XI試験についての結果をTable 1に示した．灰分は，主根部(2.8%，3.3%)より側根部(4.1%，4.2%)の方が高く，(a)，(b)ともに太さと含量に相関性が認められた．また，最も値が高い(b-5)でも4.6%であり，JP XI規格値5.0%以下を越えることはなかった．酸不溶性灰分，乾燥減量についても同様であった．

(3)エキス含量 希エタノールエキス含量は，Table 1に示すように主根部(31.8%，31.5%)より側根部(36.9%，39.8%)の方が高く，(a)，(b)10サンプルの平均は34.3%であった．ブタノールエキスは，10サンプルの平均1.8%と，エキス含量の分析値としては，やや低い値を示した．本エキス含量も主根部(1.6%，1.5%)より側根部(1.7%，2.5%)の方がやや高い傾向にあった．

(4)GABA含量 GABAおよびその他のアミノ酸分析のクロマトグラムをFig. 1に示す．クロマト中No.17のGABAは，No.16のphenylalanineと保持時間差が1分程度と小さく，ピークの裾野で重なる部分があるので，ピーク高さ法により定量した．Table 1に示すように，GABA含量は(a)で主根部(5.1×10^{-2}%)より側根部(15.0×10^{-2}%)が明らかに高い値となり，GABAは太い部分より細い部分に多く含まれる傾向を示した．(b)では主根部(9.9×10^{-2}%)および側根部(8.6×10^{-2}%)ともにほぼ同等の分析値が得られた．

キバナオウギのGABA含量について，Hikinoらは($2.4-3.6)\times10^{-2}$%と報告している[4]が，(a)では($3.6-16.6)\times10^{-2}$%，(b)では($7.2-11.4)\times10^{-2}$%と変動幅は大きいものの，総じて高い分析値を示した．

(5)パターン分析 含有するフラボン類を分析するため，メタノール抽出物についてHPLCを行った．Fig. 2に示したグラジェント条件により分析した結果，保持時間20分にIが出現し，10サンプルとも，概ね同様のクロマトグラムを示した．Iはいずれの試料からも検出され，含量も高いことから，本生薬の指標成分となる可能性が示唆された．

2．市場品

(1)性状 市場品15検体のうち，10検体は刻み生薬，5検体は全形生薬として入手した．前者10検体は，太さ径

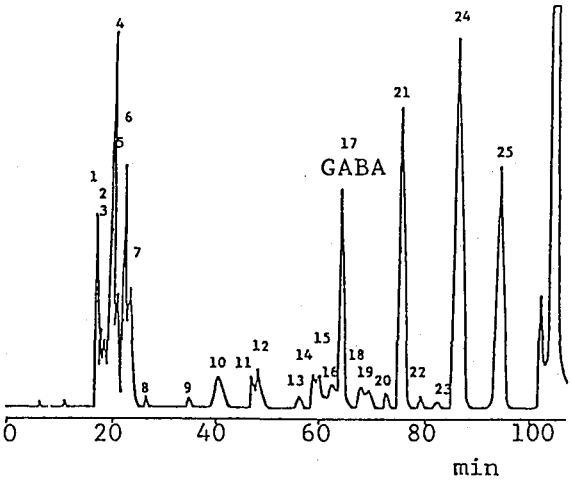


Fig. 1. Analysis of GABA and other Amino Acids in Astragali Radix(J-1)

Peak : 1=aspartic acid, 2=unknown, 3=threonine, 4=unknown, 5=serine, 6=unknown, 7=glutamic acid, 8=unknown, 9=glycine, 10=alanine, 11=cystine, 12=valine, 13=isoleucine, 14=leucine, 15=tyrosine, 16=phenylalanine, 17=γ-amino-*n*-butyric acid (GABA), 18=unknown, 19=lysine, 20=unknown, 21=NH_3, 22=histidine, 23=unknown, 24=unknown, 25=arginine

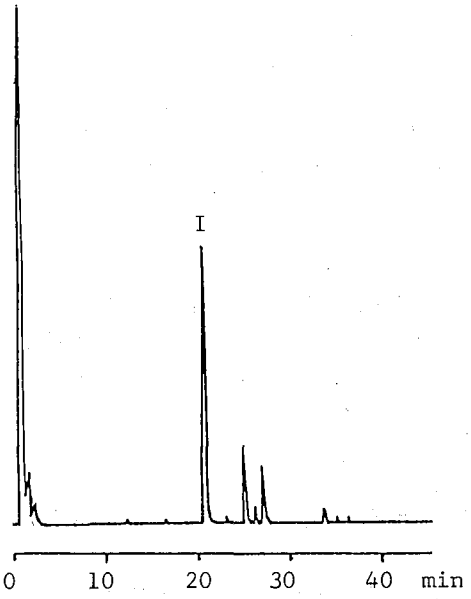


Fig. 2. HPLC Chromatogram of Astragali Radix(J-1)

HPLC conditions : column, TSKgel ODS-120T, 5 μm, 4.6 × 250mm, mobile phase, acetonitrile solution, flow rate, 1.0m*l*/min, column temperature, 40°, detection, UV 286nm, range, 0.05aufs, injection volume, 10.0 μl, linear gradient profile of acetonitrile concentration, step 1=5% hold on 5min, step 2=5 to 38% over 19min, step 3=38% hold on 16min

Table 2. Analytical Results of Astragali Radix on the Market

Sample*1 No.	Market*2	Total Ash ≦5.0%*3	Acid-Insoluble Ash ≦1.0%*3	Loss on Drying ≦13.0%*3	Extract Content (%) dil.Ethanol	Extract Content (%) Butanol*4	GABA Content(%)
J-1	T	3.1	0.2	7.4	30.2	2.0	6.7×10^{-2}
-2	T	2.8	<0.1	8.4	31.7	1.9	6.2
K-1	T	2.7	0.2	6.6	26.9	1.7	6.2
-2	T	2.8	0.2	5.9	27.4	2.3	5.5
-3	T	2.3	0.3	7.9	20.6	1.4	7.7
-4	T	3.2	0.2	8.0	10.5	1.5	1.8
-5	O	3.2	0.3	8.0	23.9	1.6	4.4
C-1	T	2.8	0.2	7.2	34.2	2.1	5.6
-2	T	2.4	0.2	6.4	33.7	2.4	8.9
-3	T	3.0	0.2	8.4	29.5	1.9	11.7
-4	T	3.1	0.3	7.6	28.4	2.3	11.4
-5	H	2.5	0.1	8.0	26.7	2.7	10.0
-6	H	3.5	0.5	8.4	14.4	1.8	4.2
-7	H	3.1	0.5	8.7	27.2	2.9	2.6
-8	M	3.9	1.0	8.3	32.5	2.3	3.6

*1 The samples were produced as follows.
J : Japan K : Korea C : China
*2 The samples were colloected as follows.
T : Tokyo O : Osaka H : Hongkong M : Inner Mongolia
*3 The values show the limit of JP XI.
*4 This column shows the amount of butanol fraction in methanol-soluble extract.

0.4−1.0cmで皮部は淡黄白色，木部は淡黄色を呈していた．後者5検体のうち，4検体は太さ径0.4−2.4cm，皮部は淡黄白色，木部は淡黄色を呈し，標準生薬(a)，(b)に類似するものであった．残り1検体（K-4）は標準生薬とやや形態が異なり，外面は淡赤褐色で，横長の皮目ようの模様はなく，においも異なり，わずかにえぐみを呈した．

(2)灰分，酸不溶性灰分および乾燥減量 JP XI試験の結果をTable 2に示す．灰分および乾燥減量は，全体で大きな変動は認められず，JP XI規格値を越えるものはなかった．酸不溶性灰分の分析値は標準生薬に比較して全体に高く，限度値を示したものも認められた．

(3)エキス含量 希エタノールエキス含量はTable 2に示すように，(J)，(C)と比較すると(K)は低い傾向にあり，特に，(K-4)については10.5%と他の韓国産4検体（平均24.7%）の約1/2量であった．

ブタノールエキス含量は，標準生薬とほぼ同様の分析値を示した．

(4)GABA含量 標準生薬(a)，(b)では(3.6−16.6)×10^{-2}%の範囲であるのに対し，市場品15検体では(1.8−11.7)×10^{-2}%であり，(a)，(b)より低含量の生薬を数種認めた(Table 2)．産地別に検討すると，(C)の一部に10.0×10^{-2}%以上の高い分析値を示すグループがあった．また，キバナオウギが基原植物と推定される(J)は，いずれも6.5×10^{-2}%前後の分析値となり，標準生薬の太さ0.7cm以下の部位(a-2)，(a-3)とほぼ等しい数値であった．

(5)パターン分析 市場品15検体については，Iはどの検体からも検出された．しかし，HPLCパターンは必ずしもFig. 1と一致するものではなかった．

3．考 察

黄耆は太いものほど品質が良いといわれ[10,11]，JP XIでも太さは径0.7-2cmと記載されている．しかし，市場品を見るかぎり，この形状に一致する生薬は少ない．中国産黄耆は栽培期間に2−6年を必要とし[11]，太いものは3cmにおよぶものがある．一方，栽培地調査を行ったところ，日本産黄耆は栽培期間1年で収穫が行われており，太さが0.3cm以下のものも出荷されている．JPを

遵守するのであれば，今後日本の栽培農家への指導も必要となろう．

血圧降下作用を持つ GABA の定量結果は，(a)の分析例から，1年生根では太いものより細いものが高い測定値を示したが，植物にとって一次代謝産物である GABA が，成長部位に高含量に存在することは理論的にも充分考えられることである．従って，GABA 含量の観点に立てば，その GABA の蓄積量の経年変化について，検討の余地は残されているが，「太いものほど良い」とされる選品は再検討を要するものと考えられる．そして，このことはサポニン含量を表わすブタノールエキス含量からも示唆され，今後，現在の選品の正当性を薬理学的に説明していく必要があると思われた．また，黄耆についての成分研究は，前述したように，いくつかの研究グループによってすでに行われている．今回著者らは，GABA が黄耆に特異的に存在する成分でないことから，特有成分，指標成分の研究を行い，**I** を明らかにしたが，今後このような成分が黄耆の有効性になんらかの形で結びついていくものと推察している．

結　　論

市場品黄耆の品質評価を行うにあたり，まずキバナオウギを基原とする標準生薬を選定し，JP XI試験，各種含量試験を行った．その結果，概ね主根部より側根部の方が GABA およびエキス含量は高い傾向を示し，JP XI 試験ではいずれも規格の範囲内の分析値であった．市場品について同様の試験を行った結果，JP XI規格にはすべての検体が適合していたものの，希エタノールエキス含量および GABA 含量において値が著しく低いものが一部認められた．その1つは韓国産のもので，これは指標成分としたイソフラボン**I**を含有しているものの，性状は標準生薬と一致せず，基原植物が異なるものと考えられる．なお，黄耆に関しては，現行のJP XIで規定される試験項目のみで一定の品質を確保することは難しい．

謝辞：本研究にあたり，標準生薬を御分与された茨城県八郷町　大図宏之進氏に深謝します．

（本研究は，平成元年度衛生局東洋医学研究事業「老人性疾患に繁用される生薬の生理活性物質を中心とした品質評価に関する研究」の一部として実施したものである）

文　　献

1）日本公定書協会：第11改正日本薬局方解説書，D-110－D-112，1986，廣川書店，東京
2）中華人民共和国衛生部薬典委員会：中華人民共和国薬典1985年版1部，272，1985，人民衛生出版社，北京
3）桑野重昭，山内和子，米田該典：コメンタリー局方生薬，457-478，1984，廣川書店，東京
4）Hikino, H., Funayama, S., Endo, K.：*Planta Med.*, 30，297-302，1976
5）桂英二，山岸蕎：北海道立衛生研究所報，37，48-52，1987
6）王恵康：中草薬，18，5-7，1987
7）日本公定書協会：第11改正日本薬局方解説書，B-169，1986，廣川書店，東京
8）名取信策，池川信夫，鈴木真信：天然有機化合物実験法，329-345，1977，講談社サイエンティフィック，東京
9）Kitagawa, I., Wang, H., Takagi, A.：*Chem. Pharm. Bull.*, 31，689-697，1983
10）一色直太郎：和漢薬の良否鑑別法及調製方（復刻版），106-107，1987，谷口書店，東京
11）李承志：日本生薬研究者第四次訪中団報告書，45-50，1983，日本国際貿易促進協会関西支部，大阪

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 90-95, 1989

シアン測定システムに関する研究（第5報**）
めっき廃水中の遊離シアンの酢酸緩衝液・微量拡散法による分析

奥本 千代美*, 高橋 利恵子*, 岩崎 由美子*, 秋山 和幸*

Studies on Analytical System for Cyanide (V)
Determination of Free Cyanide in Waste Water from Metal Plating Process by Microdiffusion Method using Acetate Buffer

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

summary

A diffusion method using acetate buffer for determining cyanide in waste water from metal plating process was developed.

A sample (2 m*l*) is adjusted to pH 5 with 0.5m*l* of acetate buffer {4 M acetic acid : 4 M sodium acetate (1 : 3)} and let to stand overnight in a microdiffusion apparatus. In this procedure as well as the official aeration method, hydrogen cyanide is liberated at pH 5 from the sample. The trapped cyanide ion in the absorbing solution (0.1M NaOH solution) is measured with pyridine–pyrazolone method.

Cyanide ion was recovered quantitatively from KCN or $Zn(CN)_2 \cdot 2KCN$ solution, partly from $Cu(CN)_2 \cdot 2KCN$ or $Ni(CN)_2 \cdot 2KCN$ solution and negligibly from $K_4Fe(CN)_6$, $K_3Fe(CN)_6$ or KSCN solution in the range of 0.1～10 $\mu g\ CN^-/ml$ levels.

Several metal ions, Hg^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+} or Cd^{2+}, lowered the recovery of cyanide ion from KCN solution, whereas, CrO_4^{2-} did not affect the recovery.

A correlation was observed between the results obtained by the diffusion method (x) and the official method (y) :

$y = 1.08x - 0.11$ ($r = 0.983$, $n = 75$).

Keywods：シアン化物イオン cyanide ion, 廃水 waste water, 微量拡散 microdiffusion, ピリジン・ピラゾロン法 pyridine–pyrazolone method

1．緒　言

廃水中のシアン化合物を対象とする公定分析法は，pH 5において遊離するシアン化水素を測定するいわゆる遊離シアンの測定法[5,6]，およびこの条件では解離しない安定な錯体シアンを含めて分解し測定するいわゆる全シアンの測定法[6]とに大別される．毒物劇物取締法施行令に定める方法(以下公定法とする)[5]は前者に属し，廃水試料を pH 5.0±0.3，40°±2°Cにおいて通気処理した時に遊離するシアン化水素を水酸化ナトリウム液に捕集し，ピリジン，ピラゾロン法により吸光光度分析を行うものである．これらの公定分析法は，いずれも手分析による複雑な操作を必要とすることから，作業効率が低く，またそのまま機械化，自動化することも困難である．

簡易分析法は多数報告されているが[7]，それらのシアン化水素の遊離条件が公定法とは異なっている．著者ら

*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 Metroporitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku–ku, Tokyo, 169 Japan

**：文献1）を第1報，2）を第2報，3）を第3報，4）を第4報とする．

はめっき廃水の公定法による検査の予試験法として，微量拡散-イオン電極法[1]およびガス拡散-フローインジェクション法[2]を報告したが，これらの方法は試料が鉄シアン錯体を含む場合に陽性の結果を与え，公定法と一致しないという問題があった．この差異はシアン化水素の遊離条件がpH 2以下の強酸性であるという事実に起因すると考えられた．

今回，前報の微量拡散-イオン電極法[1]を改変し，シアン化水素の遊離およびシアン化物イオンの測定条件を公定法の条件に近似させた酢酸緩衝液・微量拡散-ピリジン・ピラゾロン法を検討したので報告する．

2．実　験

2．1　試　薬

シアン化物イオン標準液，ピリジン・ピラゾロン溶液，クロラミンT試液および酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液：公定法に準じて調製．リン酸塩緩衝液：公定法に準じて調製した後，水で2倍に希釈する．吸収液：0.1M水酸化ナトリウム溶液．混合指示薬：0.04%ブロムクレゾールグリーン＋0.025%メチルレッド(1＋1)溶液．金属イオン標準液：硫酸水銀(Ⅱ)，塩化銅(Ⅱ)二水和物，塩化鉄(Ⅱ)四水和物，塩化鉄(Ⅲ)六水和物，塩化ニッケル(Ⅱ)，塩化カドミウムおよび硝酸亜鉛を各々水に溶かして，金属イオン濃度を1／26Mとし，Hg^{2+}，Cu^{2+}，Fe^{2+}，Fe^{3+}，Ni^{2+}，Cd^{2+}，およびZn^{2+}標準原液とする．

シアン化亜鉛，シアン化ニッケルおよびシアン化銅は高純度化学研究所製(含有量99.9%)，その他の試薬は市販の試薬特級を用いた．

2．2　装　置

シアン化物イオン電極，シアンイオンメーター，微量拡散ユニットおよびマルチサンプラー：既報[3]と同じ．

分光光度計：日立自記分光光度計　320型

2．3　標準操作法

試料および吸収液，各2 mlをマルチサンプラーによりセットし，試料に混合指示薬1滴，次に酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液0.5mlを加える．試料液が，緑色を呈している場合には，暗青色に変わるまで1M酒石酸を滴下する．直ちに粘着テープ(住友3M，スコッチアセテートテープ800)により気密にし，室温で一夜放置する．吸収液の0.25mlをマイクロピペットで取り，リン酸塩緩衝液5 mlおよびクロラミンT試液を0.05ml加えて混和した後，ピリジン・ピラゾロン溶液2.5mlを加え，室温で約40分放置後，620nmにおける吸光度を測定する．標準液は，拡散操作を省略し，同様に操作して吸光度を測定する．

3．結果および考察

3．1　微量拡散条件の検討

公定法の通気操作の条件は，蒸留法の二つの欠点，すなわち(1)低毒性であるフエロシアン，フエリシアン化合物からのシアン化水素の遊離，(2)クロム酸が共存する場合のシアン回収率の低下をさける事を考慮して設定されている[8]．本法においてもこれらの特徴を保待し，かつ公定法に近い測定値を与える条件について検討した．

1）拡散時の試料液のpH

シアン化物の加水分解およびシアン化水素の解離(解離定数Ka)が水溶液中のシアンに関する支配的な反応であるならば，溶液のpH，全シアン化物濃度［CN］，遊離シアン化水素濃度［HCN］の間には

$$[HCN]/[CN] = 1/(1 + Ka \times 10^{pH})$$

ただし，$Ka = 7.2 \times 10^{-10}$(18℃)

が成立する．したがって，公定法のpH条件，pH＝5±0.3を上式に代入すれば，遊離シアン化水素の割合は全シアンの99.99%以上と計算される．シアン化ナトリウムおよびシアン化カリウム[9]の場合は，この例に相当するが，錯体シアンの場合は必ずしも前述の仮定が成立するとは限らないと考えられる．

廃水試料は，シアン化水素の揮散を防ぐために水酸化ナトリウムを用いて，あらかじめアルカリ性に調整されている．公定法では，この試料液に指示薬としてブロムクレゾールパープル(変色域pH5.2～6.8)溶液を加え，紫色が消失するまで酒石酸溶液を加えた後，更に酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液を添加し，通気条件をpH5.0±0.3としている．実際の測定では，酒石酸の使用はごく少量であることから，Cu^{2+}やZn^{2+}など酒石酸と安定な錯体を形成する金属イオンが共存していてもその影響は少ないと考え，本法では一般操作としては酒石酸の使用を省略し，濃厚な酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液のみを加えることにした．

実際の廃水試料のpH値の分布は某年8月分行政検体の例では，11.9±1.2(平均±標準偏差，n＝400) 9月分は12.2±1.0(n＝495)，また合わせて全体の97.5%がpH13以下，最高値は13.4であった．そこでまずモデルとして0.1M-NaOH(pH＝13) 2 mlをとり，緩衝液の添加量を0.1～1 mlの範囲で検討した結果，緩衝液0.5ml以上の添加によってpH5.3以下の条件が得られた(Fig. 1)．

また，この緩衝液0.5mlは酒石酸または水酸化ナトリウムを用いてpH1.8～13に調整した溶液2 mlに対し，規定のpH域に調整することが可能であった．

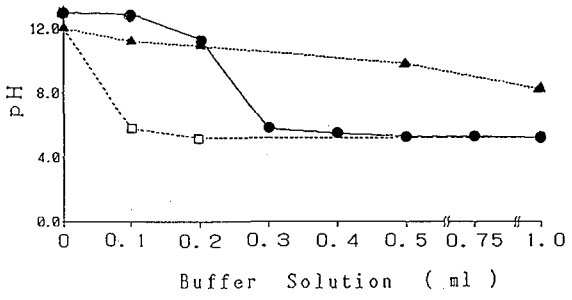


Fig. 1. Effect of Buffer Amount on pH of Sample

Sample ; 2 ml of 0.1M NaOH (●—●), a typical waste water (□---□) and an exceptional waste water (▲---▲)
Buffer solution ; 4M acetic acid : 4M sodium acetate (1 : 3)

以上の結果から，試料液2 mlに対し緩衝液の量は0.5mlとした．前述の895件の例では，880件(98.3%)が本操作でpH5.0±0.3に調整された．ただし実際の試料では，緩衝液を加えても，pHがあまり変化しない場合もみられ，共存物質の多様性がうかがわれた(Fig. 1).

また，pH調整時の判定に，指示薬法を検討し，0.04%ブロムクレゾールグリーン：0.025%メチルレッド混合指示薬1滴を試料に添加した時，暗青色が得られれば，適正なpH域に調整されたと判断できることが判明した．液が緑色を示している場合は1 M酒石酸溶液を滴加することとした．

2）シアン化水素の遊離と回収

シアン化物イオン標準液(0.1, 1.0, 10 μg/ml)について，シアン化水素の吸収液への移行をシアン化物イオン電極により経時的に調べたところ，Fig. 2に示すように，約8時間で定量的な拡散，吸収が認められた．したがって標準操作としては一夜室温で，拡散を行うこととした．

次に微量拡散の過程について考察する．

実験では，1）で考察したように試料液中の全シアンのうち99.99%以上がシアン化水素とみなすことができる．シアン化水素の拡散および回収は，①試料液から気相への放出，②試料液面から吸収液面への気相中の移動，③気相から吸収液への移動の三段階に分けて考える．また，拡散，吸収に関与する因子として，試料および吸収液面の表面積，試料液の容量即ち液深，試料液中のガス張力などを考える．実験中，表面積は一定，液深もほぼ一定と考えてよいが，試料液のシアン化水素の張力は，

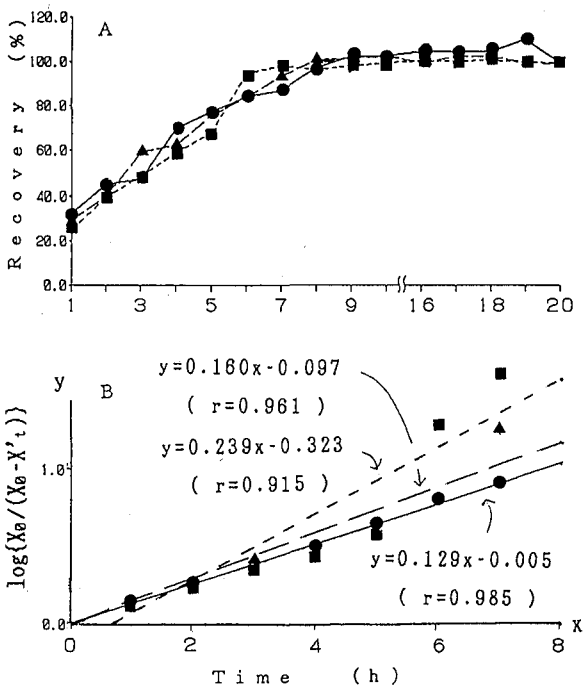


Fig. 2. Effect of Time on Recovery of Cyanide Ion
(A) Plots of recovery vs time
(B) Plots of $\log\{X_0/(X_0-X't)\}$ vs time
CN^- concentrations ; 0.1 μg/ml : ●—●, 1 μg/ml : ▲--▲, 10 μg/ml : ■---■
(X_0) : Initial concentration in sample solution
(X'_t) : Concentration in absorbing solution

気相への放出により試料液中のシアン化水素量が減少することから，時間の経過に伴い減少する．即ち，拡散時間tにおけるシアン化水素放出量Xは，試料液のシアン化水素ガス張力に比例し，このガス張力は最初のシアン化水素量をX_0とすればX_0-Xに比例して減少する．放出量Xはまた温度によっても影響を受けるが，温度を一定と仮定すれば，

$$dx/dt = k(X_0-X)$$

積分して，

$$\log\{X_0/(X_0-X)\} = k't \quad (①)$$

の関係式が得られる．吸収液への吸収行程では吸収液の能力が十分大きく，吸収液表面積が一定ならば，吸収速度が一定となるから，実験条件では一定と考えてよい．実験では，時間tにおける放出量Xではなく吸収液中の量X'を測定したが，1 μg/mlの標準液については，

$$\log\{X_0/(X_0-X')\} = 0.160t-0.097 (r=0.9614) \quad (②)$$

の実験式が得られ，一次反応式に一致する結果が得られ

た(Fig. 2). ②式が①式によく近似していることは考察で用いた仮定と推論の妥当性を示唆するものと考える. 0.1および10 μg/ml の標準液についても同様に③, ④式が得られた.

$\log\{X_0/(X_0-X')\}=0.129t-0.005(r=0.9846)$ (③)

$\log\{X_0/(X_0-X')\}=0.239t-0.323(r=0.9145)$ (④)

それぞれの標準液についての実験は同時に行ったが, ②式③式については, 左辺の値とtの間の相関が高く, ④式については②式ほどによく適合していない原因は, 相対測定誤差の違いが可能性のひとつとして考えられる.

3) 各種シアン化合物への適用

公定法は, いわゆる遊離シアンを測定対象としていることから, シアン化合物の種類により, シアン化物イオンの回収率が異なる. このことは本法においても同様なので, 鉄シアン錯体, チオシアン酸カリウム, 各種重金属シアン化物とシアン化カリウムの混合物について本法(A), 本法を公定法と同じ40℃で操作する場合(B), および公定法(C)による測定値の比較を行った.

その結果をTable 1に示すが, 以下の事がいえる.

(1) フエロシアン化カリウム, フエリシアン化カリウム, チオシアン酸カリウムについては3法ともO, あるいは極めて低い回収率でAとCはよい一致を示した.

(2) シアン化亜鉛ーシアン化カリウム(以下亜鉛化合物と略す)では例外はあるものの3法ともに定量的な回収率を得た.

シアン化銅-シアン化カリウム(以下銅化合物と略す), シアン化ニッケル-シアン化カリウム(以下ニッケル化合物と略す)では, 回収率は例外を除いて数10%, また測定値の変動は大きい. 亜鉛化合物, 銅化合物およびニッケル化合物について, 測定方法, 化合物の種類および含有量を3因子とする三元配置分散分析を行った結果, 3因子とも, 測定値に影響があった($P<0.01$). また各因

Table 1. Recovery of Cynide Ion from Various Heavy Metal Cyanides, Complex Cyanides and Thiocyanate

Cyanide	Concentration of Cyanide (μg/ml: CN^-)	Recovery (%) of Cyanide Ion					
		A Diffusion Method at r.t.		B Diffusion Method at 40℃		C Official Method	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
$Zn(CN)_2$	100	100.2	2.2	101.4	0.6**	101.4	3.8
+2KCN	10	99.4	2.5	99.9	3.3	99.1	3.5
a)	1	101.5**	2.0*	101.3**	2.6	88.3	5.7
$Cu(CN)_2$	100	59.8	4.8	64.1	3.3	67.2	4.9
+ 2 KCN	10	68.6	12.9	73.7	7.8	72.8	7.4
a)	1	72.1	13.5	74.4	9.1	74.5	9.2
$Ni(CN)_2$	100	16.6	10.5	74.7***	19.4	17.9	11.1
· 2 KCN	10	46.0	22.3	107.8**	14.8	51.3	28.8
a)	1	69.4	48.8	103.3*	22.5	66.0	21.2
$K_4Fe(CN)$	100	0.1		5.5		0.1	
	10	0.1>		0.1>		0.1>	
b)	1	0		0		0	
$K_3Fe(CN)$	100	0.1>		0.1>		0.1>	
	10	0		0		0	
b)	1	0		0		0	
KSCN	100	0		0.5		0	
	10	0		1.9		0	
b)	1	0		0		0	

a) n = 5, b) n = 2

***: significantly different from the corresponding value by the official method ($p<0.001$)

**: ($p<0.01$), *: ($p<0.05$)

子間の交互作用は，測定方法と化合物の種類の間および化合物の種類と含有量の間に認められた(いずれもP<0.01).

次にAによる測定値について，Cによる測定値と対比して検討した.

亜鉛化合物の場合，Cによる1 μg/ml の値が低いほかは有意差が認められない.

銅およびニッケル化合物では，AとCの間には有意差が認められなかった.

また化合物間では，すべての測定法で亜鉛化合物は銅化合物より高い値を示した(P<0.01).

いずれの場合もシアン化物イオン標準液と異なり，測定値が大きく変動するのは，実験温度，pHなどの微少な違いが，シアン化水素の存在割合を大きく変化させることによると考える.

これらの実験結果を総括すれば，本法は公定法の近似法として位置づけることが可能と考える.

4）妨害物質

種々の金属イオンについて，シアン化物イオン標準液(1 μg/ml に，1～100倍のモル濃度になるように添加した場合の，シアン回収率に対する影響を調べた.

公定法同様，Hg^{2+}，Cu^{2+}，Ni^{2+}，Cd^{2+}の各イオンによってシアン回収率が低下し，CrO_4^{2-}は影響を与えなかった(Table 2).

3．2　ピリジン・ピラゾロン法による発色の検討

吸収液中のシアン濃度をピリジン・ピラゾロン法で測定する際のルーチン操作法を，操作性と精度の面から検討した．公定法においては，試料25ml をとり，通気処理および中和操作を経て，精製水で10倍に希釈し，発色用試験液とする．また発色操作は試験液10ml について規定している．一方，本法では拡散によって試料液の希釈は行われていない．検討の結果，吸収液の0.25ml をとり，中和操作を行わず，直接2倍に希釈したリン酸塩緩衝液5 ml を加えることとした．この操作でピリジン・ピラゾロン法に適当なpH値範囲に調整された．以後の操作は公定法に準じて行う．ただし，試薬量はサンプリング量に応じて減らし，クロラミンT試液0.05ml，ピリジン・ピラゾロン溶液2.5ml とした．この吸光光度法の変動係数は，1 μg/ml の標準液については4.1%(n＝5)であった．また定量の全操作では4.3%を示した．検液採取量を更に減少すると，操作性に問題が生じた．また，採取量0.5ml では，全操作の変動係数は，4.2%，1 ml では2.3%であった.

本操作法によって，シアン化水素の揮散がさけられない酸による中和操作を省略し，また取り扱う液量を少量化することができた.

Table 2．Effect of Metal Ions and Chromate Added to KCN Solution (1 μg CN^-/ml) on Recovery of Cyanide Ion

Metal Ion	Metal ion added*	Recovery (%) of Cyanide Ion	
		Diffusion Method	Official Method
Hg^{2+}	100	1.4	0
	10	0.3	0
	1	60.5	32.2
Cu^{2+}	100	61.1	37.0
	10	82.0	35.6
	1	92.7	54.2
Fe^{2+}	100	106.1	61.8
	10	102.0	59.6
	1	97.5	56.3
Fe^{3+}	100	103.2	70.6
	10	102.3	61.5
	1	98.4	58.2
Zn^{2+}	100	102.2	73.5
	10	103.9	77.5
	1	95.5	94.5
Cd^{2+}	100	50.2	78.6
	10	100.5	65.6
	1	102.0	69.0
Ni^{2+}	100	63.1	86.9
	10	65.4	74.8
	1	83.5	83.3
CrO_4^{2-}	100	98.9	98.0
	10	97.3	96.5
	1	98.0	98.3

*：Molar concentration ratios to cyanide ion

3．3　実際の試料における公定法との比較

実際のめっき廃水75検体について本法(X)および公定法(y)により測定したところ，両測定値間に高い相関が認められた($y=1.08x-0.11$，$r=0.983$)．前報の微量拡散-イオン電極法で陽性となる試料が，公定法では陰性になる事例もみられた．しかし，本法で陽性の検体は，公定法によっても全てプラスの結果を与えた.

これらの結果から本法は公定法を行う前のスクリーニングあるいは予試験として有用であると考えられる.

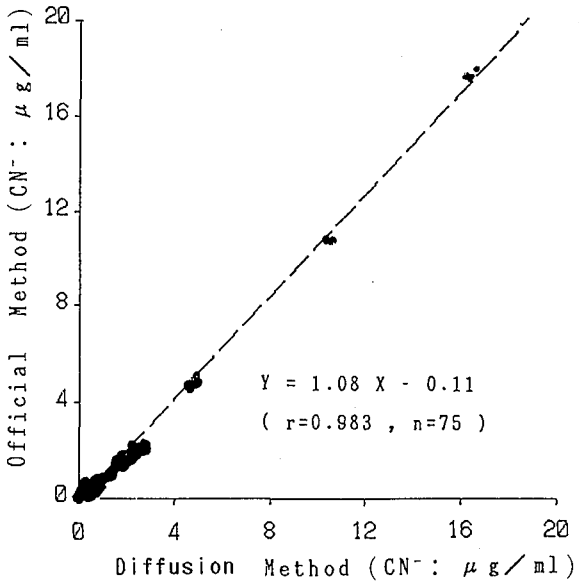


Fig. 3. Comparison between the Diffusion Method and the Official Method for Determination of Cyanide Ion in waste water Samples

ま と め

微量拡散法の公定法への近似を試みた.

酢酸-酢酸塩緩衝液を用い pH5.0±0.3に調整した試料を一夜拡散したのちピリジン・ピラゾロン法による吸光光度法を行い，公定法と高い相関を得た.

本法は操作が簡単であるため，スクリーニングあるいは予試験として有用である.

文 献

1）秋山和幸，長嶋真知子，奥本千代美，寺島潔，萩原輝彦：分析化学，31，402-404，1982.
2）奥本千代美，長嶋真知子，風間成孔，秋山和幸：衛生化学，30，7-13，1984.
3）高橋利恵子，奥本千代美，岩崎由美子，秋山和幸：東京衛研年報，37，85-89，1986.
4）奥本千代美，高橋利恵子，岩崎由美子，秋山和幸：東京衛研年報，37，79-84，1986.
5）厚生省令第46号(昭和46年12月27日)
6）JIS K 0102(1986)，工場排水試験方法.
7）野々村誠：ぶんせき，1986，97-102，1986.
8）菅野三郎，谷孝之：衛生化学，11，111-116，1965.
9）小林義隆，浦野紘平：工業用水，84，25－30，1965.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 96-100, 1989

化粧品用色素に関する衛生化学的研究（第2報）アルカリ熱イオン化検出器付きガスクロマトグラフィーによるアゾ系タール色素中の1-phenylazo-2-naphthol の定量

伊藤弘一*, 岸本清子*, 鈴木助治*,
中村　弘*, 渡辺四男也*

Hygienic Chemical Studies on Pigments for Cosmetics (II) Analysis of 1-Phenylazo-2-Naphthol in Azo Dyes by Flame Thermionic Detector-Gas Chromatography

KOICHI ITO*, KIYOKO KISHIMOTO*, SUKEJI SUZUKI*,
HIROSHI NAKAMURA* and YOHYA WATANABE*

Keywords：1－フェニルアゾ－2－ナフトール 1－phenylazo－2－naphthol, アルカリ熱イオン化検出器 flame thermionic detector, ガスクロマトグラフ法 gas chromatography, アゾ色素 azo dyes

緒　言

化粧品の安全性確保における留意点の一つは，皮膚に有害な作用を与える化学物質の混入を防止することであり，化粧品用タール色素においてはリール黒皮症の原因物質である1-フェニルアゾ-2-ナフトール(PAN)の残留があげられる．現在PANの残留量については米国のFDAが黄色5号，赤色203号，赤色204号および赤色225号に対し規制を行っている[1]，しかし我国の薬事法はPANの残留量を規制しておらず[2]，日本化粧品工業連合会が自主的に試験法および参考限度値を設けている[3]．

著者らは前報[4]において，化粧品用タール色素の安全性調査の一環として，赤色219号についてPANの残留量調査を行い報告した．しかしアニリンとβ-ナフトールを出発原料としPANを副生する可能性があるアゾ系タール色素は多数あり，これらの色素のPAN残留量を広範に調査した報告はまだない．PANの分析法としては市原らによる水素イオン化検出器-ガスクロマトグラフ法が報告されているが[5]，検出感度に難点がある．そこで本報では窒素化合物に高感度であるアルカリイオン化検出器を用いたガスクロマトグラフ法(FTD-GC法)によるPANの定量法を検討し，種々の市販アゾ系タール色素についてPAN残留量を調査したので報告する．

実　験

1．試薬

PAN標準品：前報[4]に従って東京化成製PANを精製し，その0.1%溶液についてTLC法[4]および本報のFTD–GC法により，単一スポットおよび単一ピークを示すことを確認して用いた．

β-フェニル-N-ナフチルアミン(β–PNA)：東京化成製試薬特級を用いた．

シリカゲル：　シリカゲル(Merk Silica gel 60)を130°，3時間加熱処理し用いた．

その他の試薬は全て特級を用いた．

2．試料

1970年より'89年までに製造された市販アゾ系水溶性色素7種17検体およびアゾ系油溶性色素3種19検体を調査の対象とした．なおPANおよびこれらの色素の構造式を図1に示す．

3．装置

ガスクロマトグラフには島津製作所製GC–15A型に同社製FTD–8型アルカリ熱イオン化検出器(FTD)を装着したものを用いた．試料注入には同社製AOC–9型自動試料注入装置を，データ処理には同社製クロマトパックC–R5Aを用いた．

*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 Pubric Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku–ku, Tokyo 169 Japan

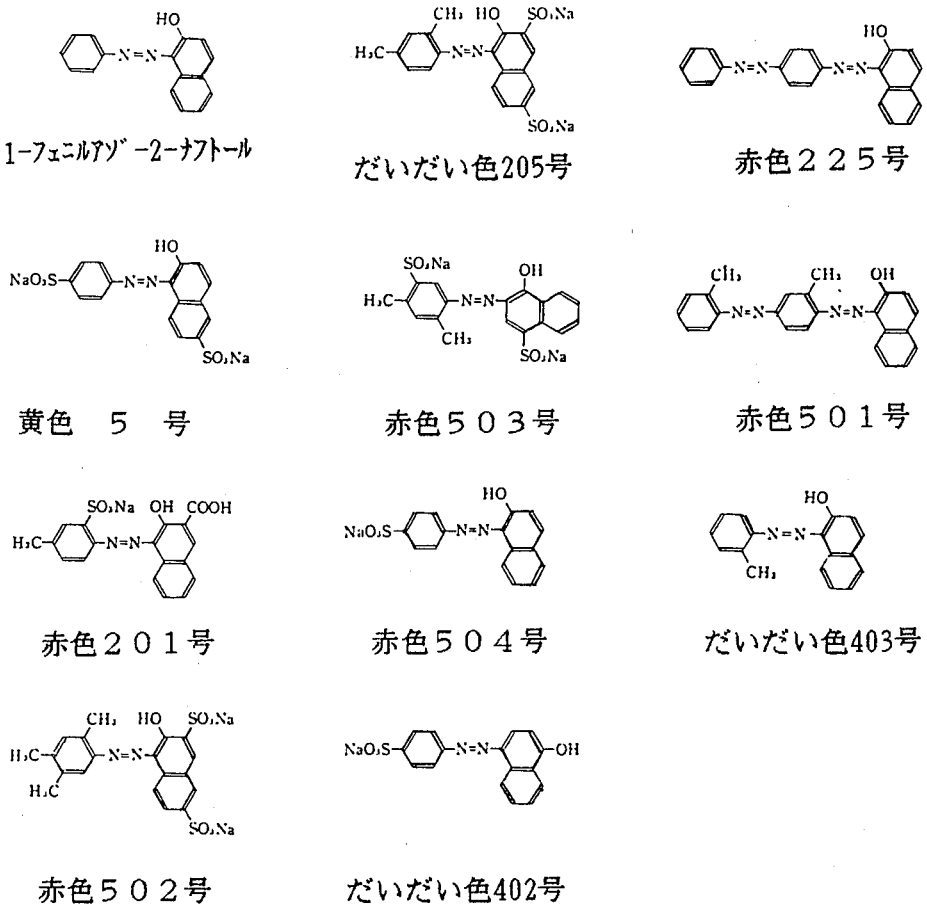


図１．１-フェニルアゾ-２-ナフトールおよび試料色素の構造式

４．GC条件

カラム：J & W社製メガボアカラム DB−17 0.53mm I.D. ×15m,

温度：カラム220°，気化室260°，検出器320°，キャリヤーガス：He20ml／min，H_2 3.5ml／min，Air 155ml／min，感度10×6

５．定量操作法

５．１ カラムの作成

シリカゲル４gをベンゼンに懸濁し，ガラスカラム管(15mm I.D. ×150mm)に充塡し，さらにベンゼン30mlを流下させて作成した．

５．２ 標準溶液の調製

PAN標準溶液：PAN 10mgを精密に量り，メタノールを加えて溶かし，正確に100mlとする．その10mlを正確にとり，メタノールを加えて正確に100mlとした．

内標準溶液：β−PNA 1mgを精密に量り，メタノールを加えて溶かし，正確に100mlとした．

検量線用標準溶液：PAN標準溶液0.5，1.0，3.0，5.0mlを取り内標準溶液2.5mlをそれぞれに加え，メタノールを加えて各々正確に10mlとした．

５．３ 試験溶液の調製

水溶性色素：試料約１gを正確に量り，水200mlに溶解し，分液ロートに移す．四塩化炭素50mlを加えて，５分間振り混ぜる．静置後，四塩化炭素層を分取する．さらに水層に四塩化炭素30mlを加え，同様の抽出操作を２回繰り返す．有機層を合わせ，ワットマン１PS沪紙を用いて脱水沪過後，ロータリーエバポレーターを用いて40°で減圧乾固する．残留物にメタノールを加え溶解した後，内標準溶液0.5mlを正確に加え，メタノールで全量を2.0mlとし試験溶液とした．

油溶性色素：試料約0.01〜1g(PANとして約15μg)を正確に量り，ベンゼン５mlに溶解後，シリカゲルカ

ラムの上端にのせ，ベンゼン－四塩化炭素(4：1)を用いて展開を行い，50mlを分取する．分取した溶離液をロータリーエバポレーターを用いて40°で減圧乾固し，残留物をメタノールに溶解後，内標準溶液1.25mlを正確に加え，メタノールを加えて全量を5.0mlとし試験溶液とした．ただし，だいだい色403号の場合はPANとの分離が困難であり，またPANが高濃度であることが多いため，試料約0.01～1g(PANとして約15μg)を正確に量り，メタノールに溶解し，内標準溶液1mlを加え，メタノールを加えて全量を5.0mlとし試験溶液とした．

5．4 定量

検量線用標準溶液1μlをGCに注入し，内標準法による検量線を作成し，つぎに試験溶液1μlを注入し検量線よりPAN残留量を算出した．

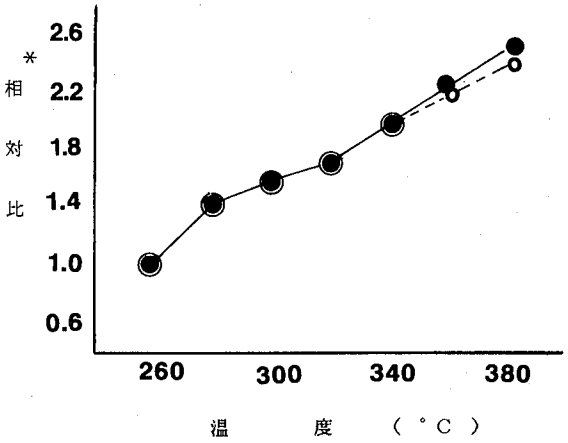


図2．検出器温度の感度におよぼす影響
＊ ：260°のピーク高および面積に対する比
—●— ：ピーク高
—○— ：ピーク面積

結果および考察

1．検出器温度と感度の関係

FTDの感度は検出器等の温度変化により変動するとされている．そこで，検出器の温度変化による感度の変動を検討するため気化室の温度を260°に設定し，検出器の温度をを260°より380°まで20°ずつ変化させ，各温度におけるピーク高およびピーク面積を測定した．その結果を260°におけるピーク高およびピーク面積に対する比として表し，図2に示した．検出感度はほぼ検出器温度に比例して上昇が認められ，380°における感度は260°の約2.3倍であった．本実験では検出器の耐久性等を考慮し，検出器の温度は320°とした．

2．GCカラムの選択

分析カラムには分離に優れ，カラム注入量が大きい口径0.53mmのキャピラリーカラムを使用することとし，OV-17相当，OV-1相当およびPEG20M相当のカラム数種を検討した．検討の結果J&W社製のメガボアDB-17が最適であった．

3．内標準物質の検討

検出器温度変化等による検出感度の変化に伴う誤差を考慮し内標準法を用いることとした．内標準物質としてスダンⅡ等スダン系色素[5]を用いた報告があるが，これらは不純物として，PANを含むため適当ではないと思われる。そこで内標準物質としてFTDで検出される物質を種々検討した結果，表1に示すようにβ－PNAが適当であった．

4．検量線の作成

PAN濃度が0.5μg／ml～5.0μg／mlの範囲で検量線を作成した．内標準とPANのピーク面積比をプロットするとき，検量線は良好な直線を示した．また検出限界は0.1μg／mlであった．

表1．内標準物質の検討

化合物	T_R(分)*	T_R／T_R(PAN)**
p-ハイドロキシアゾベンゼン	3.58	0.25
2，4-ジニトロアリニン	7.52	0.52
オレンジ G	9.87	0.68
β-フェニル-N-ナフチルアミン (β-PNA)	11.41	0.79
1-フェニル-2-ナフトール (PAN)	14.45	1.00
オレンジ SS	16.08	1.11

＊ ：保持時間
＊＊ ：PANに対する保持時間比
GC条件 ：カラム温度 100°－250°(5°/分)とし，その他の条件はGC条件の項により行った．

表2．油溶性および水溶性色素へのPAN添加回収率

試　料	添加量(μg)	回収率(%)*	変動係数(%)
赤色225号	1000	97.2	2.6
黄色5号	10	98.7	2.5

＊5回の実験による平均値

5．添加回収試験

水溶性色素である黄色5号および油溶性色素である赤色225号にPANの一定量を添加し，試験溶液の調製法に従い試験溶液を作成し，回収率を求めた．それぞれの色素のPAN残留量をを考慮し，黄色5号は10μg，赤色225号は1000μgをそれぞれ添加した．結果は表2に示す．回収率はそれぞれ97.2%，98.7%，変動係数2.5%，2.6%と良好な結果であった．

6．市販色素中のPAN残留量

本法を用いて市販アゾ系水溶性色素7種17検体およびアゾ系油溶性色素3種19検体の計36検体について分析し，その結果を表3および表4に示した．また代表的なクロマトグラムを図3に示した。PAN残留量は油溶性の色素で多く，赤色225号でN.D.～17,000ppm，赤色501号で205～339ppm，だいだい色403号で1,730～18,400ppmであり最高はだいだい色403号の18,400ppmであった．水溶性色素は油溶性色素に比べて少なく，黄色5号の15.7ppm，だいだい色205号の103ppmおよび62.3ppmが高値を示したが，その他は10ppm以下であった．またこれらPANを検出した試料についてはGC–MS分析を行い，標準PAN(ベースピークm／z 143，分子イオンピークm／z 248)とマススペクトルが完全に一致したこ

表3．水溶性アゾ色素中のPAN残留量

試　料		製造年代	PAN(ppm)	試　料		製造年代	PAN(ppm)
黄色5号	(1)	A	0.78	だいだい色205号	(1)	B	0.63
	(2)	A	3.62		(2)	B	0.84
	(3)	A	15.7		(3)	B	62.3
	(4)	B	2.19		(4)	B	103
	(5)	B	5.57	赤色502号	(1)	B	3.72
赤色201号	(1)	A	N.D.	赤色503号	(1)	B	N.D.
	(2)	B	N.D.	赤色504号	(1)	B	4.32
	(3)	B	2.98	だいだい色402号	(1)	B	2.71
	(4)	B	3.10				

N.D.：0.1ppm以下
A　：'70年代製色素
B　：'80年代製色素

表4．油溶性アゾ色素中のPAN残留量

試　料		製造年代	PAN(ppm)	試　料		製造年代	PAN(ppm)
赤色225号	(1)	A	578	だいだい色403号	(1)	A	2590
	(2)	A	835		(2)	A	5080
	(3)	A	17000		(3)	A	6090
	(4)	B	N.D.		(4)	A	7720
	(5)	B	63.3		(5)	A	18400
	(6)	B	88.3		(6)	B	1730
	(7)	B	605		(7)	B	2080
赤色501号	(1)	A	205		(8)	B	3560
	(2)	A	339		(9)	B	3790
					(10)	B	12200

N.D.：0.1ppm以下
A　：'70年代製色素
B　：'80年代製色素

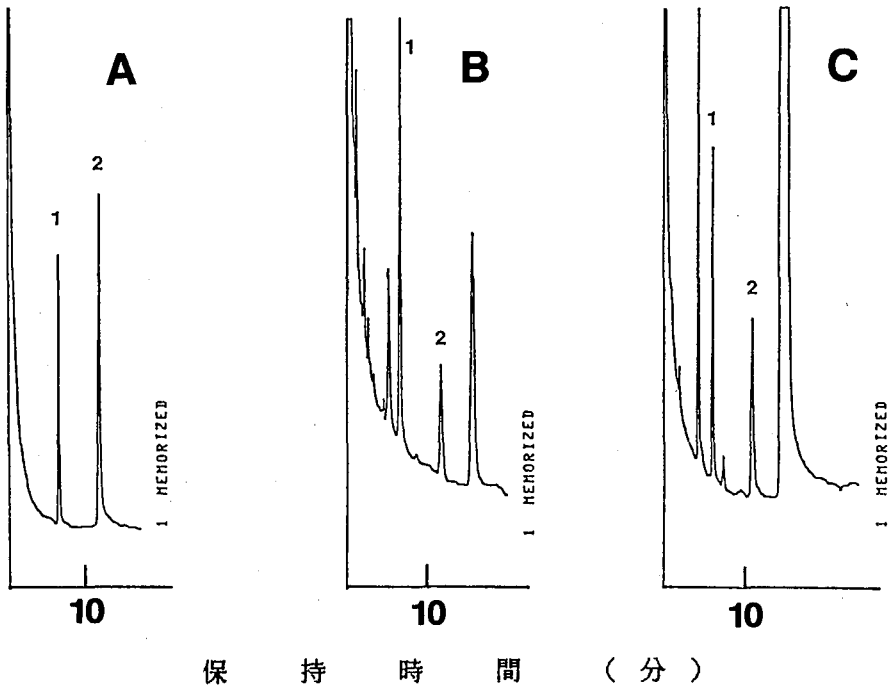


図3．PAN および試料色素のガスクロマトグラム
A：PAN 標準品　B：黄色5号　C：だいだい色403号
1：内標準　2：PAN

とにより PAN を確認した．

だいだい色403号等油溶性色素において PAN が高残留量であった理由は，PAN にそれら色素の構造が極めて近似しているため，色素の精製が困難で多量に残留するためと思われる．また水溶性色素で低値であることは，PAN が油溶性であることにより精製が容易なためと思われる．そして年代別 PAN 残留量は黒皮症が社会的問題となった'80年代初頭以降赤色225号において減少の傾向を示していた．また黒皮症は化粧品中の PAN 濃度 10^{-6}g／g[5]で発症するとの報告があり，色素の PAN 残留量を極力少なくする必要がある．

以上，FTD–GC を用いた PAN の定量法について検討し，市販されているアゾ系水溶性色素および油溶性色素中の PAN の残留量調査を行った．試料の前処理は水溶性色素については，四塩化炭素による液-液抽出法が，油溶性色素については，シリカゲルカラムクロマトグラフ法が適当であった．また本法による添加回収率は97.2～98.7％であり，変動係数は2.5～2.6％で精度よく定量を行うことができた．つぎに市販色素を分析した結果 PAN 残留量は油溶性色素に多く，特にだいだい色403号において著しかった．現在，薬事法において化粧品用タール色素規格は不純物個々については設定されていない．今回調査したアゾ系水溶性および油溶性タール色素の大半より PAN が検出されたが，黒皮症等の皮膚障害を防止するためにはだいだい色403号のように高濃度に含有している色素を製品に配合する場合，配合量は極力少なくする必要があり，また色素の化粧品への配合においては，配合した全色素中の PAN 合計量が発症濃度[5]以下となるよう十分な注意が必要である．

文　献

1）Code of Federal Regurations (1988) Title 21, 307-348, U.S. Government Printing Office, Whashington, D. C.
2）医薬品に使用することができるタール色素を定める省令　昭和41年8月31日付厚生省令第30号．
3）日本化粧品工業連合会，法定色素ハンドブック，333，1989，薬事日報．
4）伊藤弘一，江波戸擧秀，原田裕文：東京衛研年報，30-1，106-112，1979．
5）市原総子，田代実，小塚雄民，中村由美，中南元：皮膚，22，383-385，1970．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 40, 101-105, 1989

家庭用品の衛生化学的研究(第27報)
掃除機の紙パックフィルターに使用される防虫剤および抗菌剤の定量法

金子正美*, 森　謙一郎*, 中村義昭*,
観　照雄*, 渡辺四男也*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXVII)
Determination of Mothproofing Agents and Disinfectants in Paper Bag for Vacuum Cleaner

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

summary

Mothproofing agents and disinfectants in paper bag for vacuum cleaner were identified and determined.

It was ascertained that a mothproofing agent indicated as pyrethroid compound was permethrin and a disinfectant as phenol compound was 4-isopropyl-3-methylphenol (IPMP). Consequently, we made a determination of permethrin, IPMP and other indicated chemicals, 2,3,3,3,2',3',3',3'-octachlorodipropylether (S-421), α-bromocinnamaldehyde (BCA) in paper bag for vacuum cleaner.

Nine commercial paper bag samples were analyzed ; 0.15-9.48mg/g of S-421 was detected in 5 samples, 0.06-6.27mg/g of permethrin in 7 samples, 0.28-2.38mg/g of IPMP in 2 samples and 0.06-0.11mg/g of BCA in 2 samples.

Keywords：掃除機の紙パックフィルター paper bag for vacuum cleaner, 2,3,3,3,2',3',3',3'-オクタクロロジプロピルエーテル2,3,3,3,2',3',3',3'-octachlorodipropylether, ペルメトリン permethrin, 4-イソプロピル-3-メチルフェノール4-isopropyl-3-methylphenol, α-ブロムシンナムアルデヒドα-bromocinnamaldehyde

緒　言

近年，ダニによるアレルギー性の喘息，鼻炎や皮膚炎などの被害が注目を浴びるようになった．これはアパート，マンションなど保温性，気密性に富んだ住宅が増えた結果，ダニの大量発生に良好な環境が作り出されたためである．室内では畳，カーペット，寝具類が発生源であり，その対策として掃除機による吸引法が推奨されている[1]．これに呼応して，各メーカーでは掃除機内のダニやカビを殺すため，防虫抗菌処理を施した紙パックフィルターを販売している．これらの製品には，使用されている防虫抗菌処理剤の名称が表示されており，オクタクロロジプロピルエーテル(S-421)，α-ブロムシンナムアルデヒド(BCA)またはジンクピリチオンなど薬剤名の明らかなものもあるが，多くはピレスロイド系，置換フェノール系，ベンツイミダゾール系等総称名の表示であり，実際に使用されている個々の薬剤名および使用量は不明である．電気掃除機は一般家庭で広く使用されており，これら防虫抗菌剤の過剰な使用は事故につながる可能性がある．著者らはこれらの問題点に着目し，掃除機用の紙パックフィルターに使用されている防虫抗菌処理剤の分析法を検討した．その結果，ピレスロイド系処理剤使用の表示製品からはペルメトリン，置換フェノール系処理剤使用の表示製品からは4-イソプロピル-3-メチルフェノール(IPMP)が検出された．今回，表示されているS-421，BCAと併せて，ペルメトリン，IPMPの分析法を確立し，良好な結果を得たので，市販

*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

製品の分析結果と併せて報告する.

実験の部

1．試薬 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，ペルメトリン：住友化学工業製，4-イソプロピル-3-メチルフェノール：東京化成工業製，α-ブロムシンナムアルデヒド：和光純薬工業製，その他の試薬はすべて特級を用いた.

S-421，ペルメトリンおよびIPMP標準溶液：各100mgを精秤し，アセトンに溶かして全量100mlとし，それぞれ1000ppm標準溶液とする.

BCA標準溶液：BCA 100mgを精秤し，アセトンに溶かして全量100mlとする．さらに，その10mlをとり，アセトンを加えて全量100mlとし，100ppm標準溶液とする.

2．装置 水素炎イオン化検出器付きガスクロマトグラフ(FID-GC)：島津製作所製GC-15 A・PF型，高速液体クロマトグラフ(HPLC)：日本分光工業製TWINCLE，ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)：VG社製70-S

3．試料 平成元年5月に東京都内で購入した防虫抗菌処理の表示のある掃除機用紙パックフィルター9検体を試料とした.

4．試験溶液の調整 試料を内袋と外袋に分け，それぞれを細切する．その約0.5gを100mlのナス型フラスコに正確に量り採り，アセトン50mlを加えて2時間加熱還流し，ガラスろ過器で温時ろ過する．ろ液はロータリーエバポレーターを用いて30°以下で約10mlまで濃縮する。これにアセトンを加えて全量を10mlにして試験溶液とする.

5．GCによる定性・定量 S-421，ペルメトリン，IPMPの各標準溶液をアセトンで希釈し，50,100,150,200 μg／ml(IPMPは25,50,100,150 μg／ml)の濃度系列を調整する．これらと試験溶液の4 μlをGCに注入し，下記の条件でGC分析を行い，保持時間より定性を行う．また，得られたピーク高より検量線を用いて試験溶液中の濃度を求める.

FID-GCの測定条件 カラム：キャピラリーカラムDB-17(0.53mmi.d.×15m)J & W社製，注入口温度：300°，カラム温度：120°→250°(昇温速度：5°／min.)，キャリアガス：ヘリウム20ml／min，水素0.4kg／cm²，空気0.7kg／cm²

GC-MSの測定条件 カラム：キャピラリーカラムDB-17(0.32mmi.d.×30m)J&W社製，注入口温度：220°，カラム温度：60°→250°(昇温速度：10°／min.)，キャリアガス：ヘリウム1ml／min.

6．HPLCによる定性・定量 BCAの標準溶液をアセトンで希釈し，5，10，20，30 μg／mlの濃度系列を調整する．これらと試験溶液の5 μlをHPLCに注入し，下記の条件でHPLC分析を行い，GCの時と同様にして定性および定量を行う.

HPLCの測定条件 カラム：日本分光工業製Finepak SIL C_{18}(10 μm，4.6mmi.d.×250mm)，移動相：メタノール-0.05M炭酸アンモニウム(70：30)，流速：0.5ml／min，測定波長：300nm

結果および考察

1．使用薬剤の同定 Table 3に示した化合物のうち置換フェノール系，ピレスロイド系と表示のあるものについて同定を行った．これらの表示のあるNo. 1の内袋を細切し，メタノール中で加熱還流して得た抽出液のGC測定を行い，Fig. 2にそのガスクロマトグラムを示した．このうち保持時間12.9分のピークはフタル酸ジブチルであり，その他のピークについてはGC-MSを測定した．2.3分のピークはベースピーク135，M^+150を示し，各フェノール系殺菌剤を調べたところ，4-イソプロピル-3-メチルフェノール(IPMP)であることが判明した．また，25.2分のピークはGC-MSよりM^+390で塩素を2つ持つことがわかり，ピレスロイド系のペルメトリンが推定され，標準品と比較したところ，マスフラグメントおよび保持時間が完全に一致した．また，25.5分のピークも，MSが25.2分のピークと一致した．これは，ペルメトリンのシクロプロパン環の2つの炭素が不斉炭素であるため，シス型とトランス型が存在し，GC上ではこの2つの構造異性体が分離して2本のピークになったものである．この2本のピークのうち，25.2分のピークはシス型，25.5分のピークはトランス型に相当するが[2]，今回使用したペルメトリンの標準品は全てシス型であり，GC上のピークは25.2分の1本であった．なお，効力が高いのはシス型である[3]．しかし，製品に使用されているペルメトリンは，これらの混合物であるため，検体のトランス型もシス型の標準品を用いて定量し，シス型とトランス型の和として含有量を求めた．また，No. 1以外の検体でも，ピレスロイド系の表示がある製品からは，全てペルメトリンが2本のピークとして検出された.

2．S-421，ペルメトリン，IPMPおよびBCAの定量法 S-421，ペルメトリン，IPMPの定量法についてはいくつかの報告[4)-6)]があるが，本報では前報[7)]に準じてGCで行った．カラムにOV-17相当のフューズドシリ

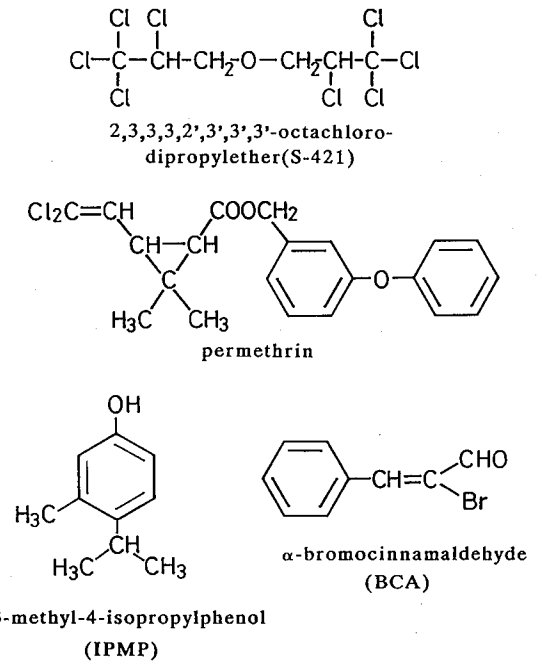


Fig. 1. Chemical Structures of Mothproofing agents and Disinfectants

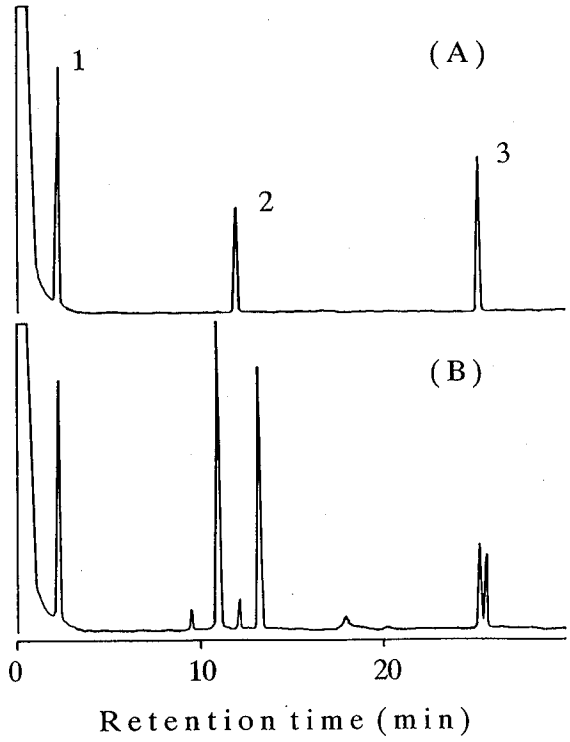


Fig. 2. Gas Chromatograms of Mothproofing agents and Disinfectants
(A) Peaks : 1,IPMP ; 2, S-421 ; 3, Permethrin
(B) Extracted from Sample (No.1)

カキャピラリーカラム DB-17(0.53mmi.d.×15m)を用いてカラム温度を120°から250°まで昇温して測定したところ，Fig. 2 に示したように各防虫剤や抗菌剤の分離は良好で，同時分析をすることができた．次に，BCA の定量法は紫外部吸収検出器付 HPLC 法を検討した．カラムに逆相カラム Finepak SIL C_{18}を，移動層に炭酸アンモニウムを加えた水-メタノール系溶離液を用いて測定したところ，良好な結果を得た．

3．抽出条件の検討 繊維製品の加工剤の成分分析では，通常，極性の強いメタノール等の有機溶媒中で加熱還流することが多い[8]．今回は紙製品の分析であるが，各防虫抗菌剤を含有する製品にそれぞれアセトン，メタノール，エタノールを用いて２時間加熱還流して抽出を行った．Table 1 にアセトンを用いたときのピーク高を100としたメタノールとエタノールの抽出率を示した．溶媒間には差がないので，今回はアセトンを抽出溶媒とした．また，繰り返し抽出を行ったとき，２回目以降はほとんど溶出されなかったので抽出回数は１回とした．

4．検量線の作成 標準溶液をアセトンで希釈し，実験の部に示した濃度系列を作って検量線を作成した．その結果いずれも良好な直線性を示した．

Table 1. Comparison of Extraction Solvents

Solvent	S-421	Permethrin	IPMP	BCA
Acetone	100*	100*	100*	100*
Methanol	102	108	97	83
Ethanol	104	105	98	86

* The value of acetone is indicated as 100 per cents.

5．添加回収実験 防虫抗菌剤を含有しない紙パックフィルター0.5 g に S-421，ペルメトリン，IPMP は0.50と2.50mg，BCA は0.05と2.50mgをそれぞれ添加して回収実験を行った．Table 2 に結果を示す．実験は５回繰り返して行い，回収率90.9-99.6%，変動係数1.0-3.0%でいずれも良好であった．

6．市販製品の分析結果 市販の紙パックフィルター９検体の分析結果を Table 3 に示した．全て防虫抗菌加工の表示があり，このうちNo. 1，2，6 の３検体は卓上クリーナー用のものであった．また，No. 2 以外は内袋と外袋の２重構造になっており，今回はそれぞれを

Table 2. Recoveries of Mothproofing Agents and Disinfectants from Paper Bag for Vacuum Cleaner

Sample Weight (g)	S-421			Permethrin			IPMP			BCA		
	added (mg)	Recovery[1)] (%)	CV (%)	added (mg)	Recovery (%)	CV (%)	added (mg)	Recovery (%)	CV (%)	added (mg)	Recovery (%)	CV (%)
0.50	0.50	95.1	2.9	0.50	91.4	2.5	0.50	96.4	2.6	0.50	90.9	1.0
0.50	2.50	93.6	2.3	2.50	96.8	3.0	2.50	99.6	2.7	2.50	95.1	2.1

1) Recovery : n = 5

Table 3. Analytical Results of Mothproofing Agents and Disinfectants in Paper Bag for Vacuum Cleaner

Samle No.	indication[1)]		S-421	Permethrin	IPMP	BCA
1	A,E,F	inner pack	9.48[2)](9.67)[3)]	—[4)]	—	—
		outer pack	3.65(11.3)	—	—	—
2	A,E,F	outer pack	5.72(7.21)	—	—	—
3	B,E,F	inner pack	3.58(10.7)	6.27(18.3)	—	—
		outer pack	0.15(1.67)	0.25(2.73)	—	—
4	B,E,F	inner pack	1.40(4.08)	3.63(10.9)	—	—
		outer pack	1.41(15.7)	0.36(3.95)		
5	B,C	inner pack	—	3.20(10.3)	2.38(7.76)	—
		outer pack	—	0.13(1.46)	0.28(3.22)	—
6	B,C	inner pack	—	3.02(3.71)	2.38(2.93)	—
		outer pack	—	0.06(0.28)	0.46(2.06)	—
7	B,E,F	inner pack	3.40(10.7)	4.47(14.0)	—	—
		outer pack	0.47(5.54)	0.30(3.51)	—	—
8	B,E,F	inner pack	—	0.15(0.55)	—	0.07(0.39)
		outer pack	—	—	—	0.06(1.11)
9	B,D	inner pack	—	0.34(1.17)	—	0.11(0.43)
		outer pack	—	0.06(0.86)	—	0.08(1.43)

1) indication of mothproofing agent and disinfectant
A=octachlorodipropylether, B=pyrethroid compounds, C=phenol compounds
D= α-bromocinnamaldehyde, E=zinc pyrithion, F=benzimidazole compounds
2) mothproofing agent and disinfectant in 1 g of packfilter (mg/g)
3) mothproofing agent and disinfectant in one packfilter(mg)
4) not detected(detction limit : S-421, permethrin 0.05mg/g, IPMP 0.03mg/g, BCA 0.01mg/g)

分けて分析し，1 g当りの防虫抗菌剤の量と共に，( ) 内に1袋当りの使用量を示した．特にNo. 5，6，7，9では，内袋にのみ防虫抗菌処理を施してあると表示されているが，全ての検体で外袋からも検出された．このうち，No. 1，4のS-421では内袋との差が少なく両方に加工を施したと考えられるが，それ以外は内袋に比べて少なく，内袋より移行したものであると考えられる．防虫剤では，S-421は表示のあるNo. 1，2以外に未表示のNo. 4，7，8からも検出された．S-421は一般にはピレスロイドの共力剤として使われるが[5)]，これらの検体でも防虫剤に使用しているNo. 1，2に比べて使用量も少ないことから，この共力効果を期待したものと考えられる．ペルメトリンは表示どおりNo. 3-9の検体で検出されたが，内袋の濃度で0.30-6.27mg／g，1袋で0.55-21.03mgとばらつきがあった．抗菌剤はNo. 5，6からIPMPが，No. 8，9からBCAが検出された．

まとめ

掃除機の紙パックフィルターに使用されている防虫抗菌剤の確認同定を行い，併せてその使用量を調査した．防虫剤はペルメトリン，抗菌剤は4-イソプロピル-3-メチルフェノール(IPMP)が使用されていた．これらと2,3,3,3,2',3',3'-オクタクロロジプロピルエーテル

(S-421)およびα-ブロムシンナムアルデヒド(BCA)の計4種の防虫抗菌剤の分析を行った．市販製品9検体を測定したところ，S-421は5検体，ペルメトリンは7検体，IPMPは2検体，BCAは2検体から検出された．

文　献

1）吉川　翠，菊田　隆：洗浄設計，34-39，秋季号，1985.

2）Jupita M.Yeung, Joseph A.Shemanchuk and Roy W. Spooner：*J. Agric. Food Chem.*, 36,1287-1290,1988.

3）吉岡宏輔，宮本純之：化学と生物，14(7)，427-434,1976.

4）Tomoyuki Miyazaki：*Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 29，566-569，1982.

5）殺虫剤指針解説，1976，日本薬業新聞社，東京.

6）大西重樹，佐藤　隆，米谷　融：分析化学，29(4)，272-275，1980.

7）中村義昭，金子正美，森　謙一郎，観　照雄，鈴木助治，渡辺四男也：東京衛研年報，39，73-77，1988.

8）厚生省生活衛生局規格課家庭用品安全対策室：第一法規出版㈱，“有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律”，1975.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 106-110, 1989

家庭用品の衛生化学的研究（第26報）
防虫シートおよびカーペット中の防虫加工剤の定量

中村義昭*，金子正美*，森　謙一郎*，
観　照雄*，渡辺四男也*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXVI)
Determinaition of Mothproofing Agents in Mothproofing Sheets and Carpets

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

Summary

Fenitrothion and diazinon as mothproofing agents in mothproofing sheet and carpet products were determineded by flame photometric detector–gas chromatography (FPD–GC).

The recommended conditions were as follows :

(1) Clean–up was performed on a silica–gel column using a mixture solvent of hexane and ethyl acetate (4 : 1).

(2) GC : column, 10% silicone DC–200, 3 mm i.d. × 2 m ; column temperature, 190 ° ; injection temperature, 250° ; detector, FPD ; carrier gas, N_2 60ml／min ; sample size, 3 μl.

This method was applied to determination of the mothproofing agents in total of 24 samples (10 samples of mothproofing sheets and 14 samples of carpets) ; fenitrothion were detected from 1 sample of mothproofing sheet (3350ppm) and 1 sample of carpet (28ppm), diazinon were detected from 1 sample of mothproofing sheet (1540ppm) and 8 samples of carpets (116-0.7ppm).

Keywords：防虫シート mothproofing sheet, カーペット carpet, 防虫加工剤 mothproofing agent, ダイアジノン diazinon, フェニトロチオン fenitrothion, 炎光光度検出器付ガスクロマトグラフィー flame photometric detector gas chromatografhy

緒　言

近年，家庭ではじゅうたん，玄関マットなど種々のカーペット製品が繁用されるようになった．これに伴いダニの発生など不快害虫による被害が社会問題となっている．すでに吉川ら[1,2]は，ダニについてカーペットがその大量発生に都合のよい環境を作り出していると指摘している．このため，これらダニ等の駆除を目的として，カーペットに防虫加工を施したり，カーペットと畳の間に防虫加工したシートを挿入するなどの処理がとられている．しかし，これら加工剤の中には，健康への影響を心配される成分の存在が懸念されている[3]．

著者らは前報[4]でカーペット中の防虫加工剤としてディート，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防虫加工剤について水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフを用いる同時分析法を確立した．その後著者らはさらに市販製品の検索を行ったところ，新たに防虫シート中に有機リン系防虫剤フェニトロチオンが使用されていることを見いだした．フェニトロチオンの検出は，リン化合物を特異的に検出し，微量分析の可能な炎光光度検出器付ガスクロマトグラフを用いる方法[5]によった．またこの方法は同時にダイアジノンの検出も可能であることから，今回市販防虫シートおよび防

*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 Labortory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjku–ku, Tokyo, 169 Japan

虫カーペット中のフェニトロチオンとダイアジノンの分析法の確立を目的に検討を加えた．すなわち試料のクリーンアップ操作としてシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い，ヘキサン-酢酸エチル(4：1)で溶出する方法を導入したところ，良好な結果が得られた．本法を用いて市販防虫シート10検体，カーペット14検体の分析を行ったので，結果を併せて報告する．

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)，フェニトロチオン(スミチオン，MEP)：和光純薬工業製(残留農薬試験用)，シリカゲル：カラムクロマト用シリカゲル60(70-230メッシュ ASTM)メルク社製．

フェニトロチオン標準溶液：フェニトロチオン100mgを精秤し，ヘキサンを加えて全量100mlとする．さらに，その10mlをとりヘキサンを加えて全量100mlとし，100ppm標準溶液とする．

ダイアジノン標準溶液：ダイアジノン100mgを精秤し，以下フェニトロチオン標準溶液と同様に操作し100ppm標準溶液を調製する．

2．装置 炎光光度検出器付ガスクロマトグラフ：日立製作所163形ガスクロマトグラフ．

ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC–MS)：HEWLETT PACKARD 5890型-VG ANALYICAL VG 70-S型．

GC測定条件 カラム：10%シリコンDC-200(Uniport HP，80-100メッシュ ガスクロ工業製)カラム管：3mm i.d.×2m，試料注入口温度：250°，カラム温度：190°，キャリアガス：窒素60ml／min，水素150ml／min，空気50ml／min，検出器：炎光光度検出器(FPD，リン用干渉フィルター)，レンジ10^4，アットネイション16．

GC-MS測定条件 カラム：メガボアカラムDB-17(0.32mm i.d.×30m)J & W SCIENTIFIC製，カラム温度130°→250°，昇温速度：10°／min，キャリアーガス：He 1ml／min．

3．試料 昭和62から63年に都内の小売店において全て「防虫加工」等の表示のある防虫シート(10検体)とカーペット(14検体)を購入して試料とした．

4．試験溶液の調製 (1) 抽出 試料のうちカーペットは前報[4]に従いパイル糸と基布の部分とに分別し，基布は約1cm²に細切する．また防虫シートも約1cm²に細切する．これらの細切した試料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60分間加熱還流後，温時ガラスろ過器(G2)を用いてろ過し，ろ液を200mlのナス型フラスコにとる．ナス型フラスコおよびろ過器内の内容物はジクロロメタンで洗い，先のろ液と合わせた後，ロータリーエバポレーターを用いて約40°でジクロロメタンを留去する．

(2) クリーンアップ 内径15mm，長さ300mmのカラムクロマト管にシリカゲル5gをヘキサンに懸濁して加え，次いで硫酸ナトリウム(無水)2gを積層させ，カラムを調製する．(1)の抽出残留物にヘキサン・酢酸エチル(4：1)の混合溶媒(以下混合溶媒と略す)10mlを加えてよく溶解させる．この溶解液を先のシリカゲルカラムに流し，1分間に4mlの流速で流出させる．ナス型フラスコを再度，混合溶媒10mlで洗い，この洗液をカラムに流す．更に混合溶媒100mlで流出を行ったのち，全流出液を合わせロータリーエバポレーターで濃縮し5mlとしたものを試験溶液とする．

5．GCによる定性および定量 フェニトロチオンおよびダイアジノンの各標準溶液をヘキサンで希釈しフェニトロチオン6ppm，ダイアジノン3ppmに調製する．調製した液の各3μlをとり，ガスクロマトグラフィーを行い，得られたクロマトグラムよりフェニトロチオンおよびダイアジノンの保持時間を求める．次に試験溶液について同様にGC分析を行い，得られた保持時間より2物質の同定をする．また，各標準溶液をヘキサンでフェニトロチオンは2，4，6，8，10ppm，ダイアジノンは1，2，3，4，5ppmの標準系列をつくり，それぞれ3μlをとりガスクロマトグラフィーを行い，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．次いで，試験溶液についても同様にGC分析を行い，検量線からフェニトロチオンおよびダイアジノンの濃度を求め，試料中の含有量を算出する．

結果および考察

1．抽出条件の検討 著者らは，前報[4]において，カーペット中の防虫加工剤の分析法を確立した．今回は，フェニトロチオンならびにダイアジノンの同時分析を目的とし，前報[4]と同じジクロロメタンを抽出溶媒に用いて，60分間加熱還流を行った．その結果，フェニトロチオン，ダイアジノンともに回収率が95.0%と良好であり，この条件を用いることとした．

2．クリーンアップの検討 カーペット製品は化学繊維，ゴム，接着剤など種々の原料が使用されている．このため，カーペットをジクロロメタンで抽出処理した液を直接GCに注入すると，妨害ピークの影響やGCカラムの劣化などが生じるため，クリーンアップを行った．クリーンアップはシリカゲルカラムを調製し，フェニト

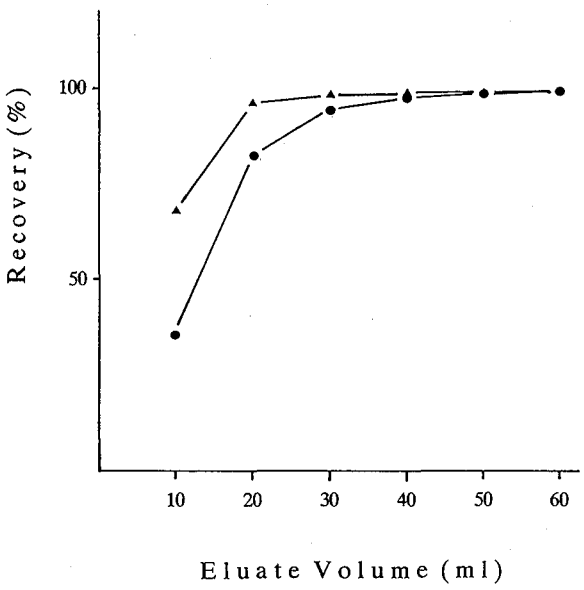


Fig. 1 Elution pattern of Fenitrothion and Diazinon from Clean-up Column with Mixture Solution.
-▲- fenitrothion ; -●- diazinon

ロチオン，ダイアジノンを各5㎎負荷した後，混合溶媒を1分間に4mlの流速で流下した．その溶離パターンをFig.1に示す．ダイアジノン，フェニトロチオンともに60mlでほぼ完全に溶出した．そこで以後の実験においては溶出に用いる混合溶媒の量は安全を期し，100mlとした．

以上の方法を用いてTable 2のSample No.12およびNo.13の試料について試験溶液を調製しGC分析を行ったところ，Fig.2に示すようなクロマトログラムが得られた．

3．検量線および定量限界 標準溶液をヘキサンで希釈し，フェニトロチオンは2-10ppm，ダイアジノンは1-5ppmの標準系列をつくって，検量線を作成したところいずれも良好な直線性が得られた．本法による定量限界はフェニトロチオン0.5ppm，ダイアジノン0.25ppmであった．

4．添加回収実験 フェニトロチオン，ダイアジノン未検出の防虫シート2.0gを取り，フェニトロチオン，ダイアジノンを各5㎎，また，未検出のカーペットには基布，パイル糸に各100μgをそれぞれ添加し，3時間室温で風乾した後，本法を用いて定量分析を行った．Table 1にその結果を示す．フェニトロチオンは防虫シート95.4%(変動係数1.4%)，カーペットのパイル糸

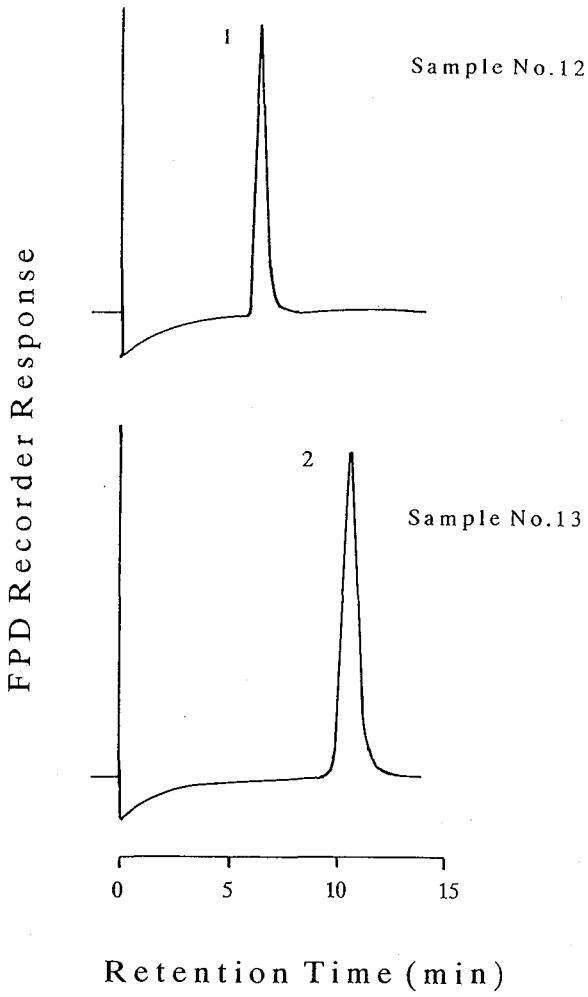


Fig. 2. Gas Chromatograms of Mothproofing agents of Samples No.12 and No.13 in Table 2.
Peak：1，diazinon：2，fenitrothion

96.0%(変動係数0.9%)，基布96.2%(変動係数1.4%)の回収率であった．またダイアジノンは防虫シートで95.8%(変動係数1.7%)，カーペットのパイル糸99.0%(変動係数0.7%)，基布94.6%(変動係数1.7%)でありいずれも良好な回収率であった．

5．実試料中の防虫加工剤の確認 本法においてフェニトロチオンおよびダイアジノンを検出した検体はさらにGC-MS法により確認を行った．検体の保持時間およびマスフラグメントは，標準品フェニトロチオンm/z 277(M^+，67%)，260(35%)，125(100%)，109(82%)，93(23%)，ダイアジノンm/z 304(M^+，67%)，199(59%)，179(100%)，152(84%)，137(93%)のそれと完

全に一致した.

6．防虫シートおよびカーペット製品の分析結果 防虫シート10検体，カーペット14検体，計24検体の分析結果を Table 2 に示す．1)．防虫シート 10検体中フェニトロチオン(Sample No. 1 3350ppm)およびダイアジノン(No. 2 1540ppm)がそれぞれ1検体検出された．残り8検体からはこれらの有機リン系の加工剤は検出さなかった．しかし，いずれの製品も「防虫加工」等と表示がなされているので，ピレスロイド系等他の加工剤が推量される．これについては次回に調査を行う予定である．

2)カーペット フェニトロチオンは14検体中1検体(No.13 28ppm)を基布から検出した．ダイアジノンは14検体中8検体(No.11 116ppm, No.12 32ppm,

Table 1. Recoveries of Mothproofing Agents Added to Samples

Mothproofing Agent	Mothproofing Sheet			Carpet					
				Pile			Base		
	Added (mg)	Recovery[2] (%)	C.V.[3] (%)	Added (μg)	Recovery (%)	C.V. (%)	Added (mg)	Recovery (%)	C.V. (%)
Fenitrothion	5.0	95.4	1.4	100.0	96.0	0.9	100.0	96.0	1.4
Diazinon	5.0	95.8	1.7	100.0	99.0	0.7	100.0	94.6	1.6

1) Sample Weight : 2.0 g.
2) Recovery : n = 5.
3) C.V. : Coefficients of Variation.

Table 2. Analytical Results of Mothproofing Agents in Mothproofing Sheet and Carpet Product

	Sample No.	Fenitrothion (A)	Fenitrothion (B)	Diazinon (A)	Diazinon (B)
Mothproofing Sheet	1	3350	172.2	—[1]	—
	2	—	—	1540	91.3
	3 – 10	—	—	—	—
Carpet (Base)	11	—	—	116	52.2
	12	—	—	32	15.0
	13	28	22.7	—	—
	14	—	—	23	9.9
	15	—	—	14	5.8
	16	—	—	9.0	3.8
	17	—	—	2.6	1.0
	18	—	—	1.6	0.7
	19	—	—	0.7	0.4
	20 – 24	—	—	—	—
Carpet (Pile)	11 – 24	—	—	—	—

1) not detected (detection limit : fenitorothion 0.5ppm, diazinon 0.25ppm).
A) Weight (μg) of mothproofing agent per 1 g of sample.
B) Weight (mg) of mothproofing agent per one tatami area of samples (90×180cm).

No.14 23ppm, No.15 14ppm, No.16 9.0ppm, No.17 2.6ppm, No.18 1.6ppmおよびNo.19 0.7ppm)を基布から検出した．さらにカーペット14検体については前報[4]に準じてFID-GC分析を行った．その結果，ディートが3検体(No.17 650ppm, No.19 318ppmおよびNo.20 32ppm)，S-421が1検体(No.21 11,700ppm)，ダイアジノンは3検体(No.11, 12, 14)を検出したが，FID-GCでは感度が低く5検体(No.15, 16, 17, 18および19)のダイアジノンは検出されなかった．このように，ダイアジノン等有機リン系加工剤の検出についてはFPD-GCを用いた本法の方が，検出感度において優れた結果を得ることができた．またSample No.17およびNo.19のダイアジノンは2.6, 0.7ppmと微量であるが，これらの検体からはディートも検出されるので複数の防虫加工剤による防虫効果を期待したものと考えられる．

今回も前報[4]と同様にカーペットのパイル糸からはフェニトロチオンとダイアジノンは検出されなかった．このことから，前報[4]と同様にこれらカーペットは製造工程において基布にフェニトロチオンやダイアジノンを加工処理してからパイル糸を植付けたものと考えられる．なお有機リン系加工剤および前報[4]の方法で検出したディート，S-421を含まない3検体は，防虫シートと同様にピレスロイド系殺虫剤による加工が考えられるので，今後調査するつもりである．

まとめ

1．FPD-GCによる防虫シートおよびカーペット製品中の有機リン系防虫加工剤フェニトロチオンおよびダイアジノンの同時分析法を確立した．

2．前処理としてシリカゲルカラムを用い，溶出液にはヘキサン・酢酸エチル(4：1)の混合溶媒を用い，試料2gに対して100mlで良好な結果を得た．

3．市販の防虫シート10検体，カーペット14検体の計24検体について分析を行ったところ，防虫シートからフェニトロチオン(3350ppm)およびダイアジノン(1540ppm)を各1検体ずつ検出した．カーペットからはフェニトロチオン(28ppm)1検体およびダイアジノン8検体(116-0.7ppm)をカーペットの基布から検出した．

文献

1）吉川　翠，菊田　隆：洗浄設計，秋季号，34-39，1985.
2）吉川　翠，大野正彦：生活と環境，29，73-78，1984.
3）朝日新聞：7月5日朝刊，1987.
4）中村義昭，金子正美，森謙一郎，観　照雄，鈴木助治，渡辺四男也：東京衛研年報，39，73-77，1988.
5）日本薬学会編：衛生試験法注解，96，1980，金原出版，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 111-114, 1989

ケイ光X線分析法による酸化チタン中の鉛およびヒ素の同時定量

雨宮　敬*, 鈴木助治*, 渡辺四男也*

Simultaneous determination of lead and arsenic in titanium dioxide powder by X-ray fluorescence spectrometry

TAKASHI AMEMIYA*, SUKEJI SUZUKI* and YOHYA WATANABE*

Simultaneous determination of microgram quantities of lead and arsenic in titanium dioxide powders used as cosmetic materials were performed by X-ray fluorescence spectrometry.

The conditions for X-ray fluorescence analysis were as follows ; target : Mo, secondary target : Mo, voltage and ampere : 50kV-55mA, fixed time : 300sec, range : 0 -20keV, path : air.

Fifteen samples of titanium dioxide powder were analysed. A large quantity of lead was contained in the rage of 29.5-40.0ppm in 3 samples. Arsenic was not detected from any of the samples examined.

Keywords : titanium dioxide powder, lead, arsenic, simultaneous determination, X-ray fluorescence spectrometry

緒　言

酸化チタンは化粧品原料として隠ぺい性，着色性などの優れた性質を有し[1]，おしろい，ファンデーション，クリーム，アイシャドーなどに広く用いられている．酸化チタンは天然鉱石を原料として製造されるため，原料によっては，有害金属である鉛あるいはヒ素を含有するおそれが十分にあり，このことが製品の品質を大きく左右することになる．従って，化粧品原料に用いる場合の酸化チタンは化粧品原料基準[2]によって鉛(50ppm 以下)およびヒ素(10ppm 以下)の含量規制がなされ，それに沿った品質管理が必要である．

現在，化粧品原料基準には，一般試験法として鉛はジチゾン法，ヒ素はグートツァイト法が採用されている[2]しかし，この方法を酸化チタンに適用すると試験溶液の調製など前処理に長時間かかること，あるいは可溶性チタンが鉛の分析に障害を与えることなど改良すべき点があり，迅速かつ精度のよい試験法の開発が望まれる．酸化チタン中の重金属分析は，原子吸光法[3,4]，ポルタンメトリー[5]，誘導結合プラズマ発光分析法[6,7]，ケイ光X線法[8]などにより鉛をはじめとして，その他の元素についても行われているが，ヒ素に関する報告はみられない．今回，著者らは，化粧品原料の品質評価の一環として酸化チタン中の鉛およびヒ素の同時定量を意図してケイ光X線分析法の検討を行い，市販酸化チタン中の鉛およびヒ素の含量調査を行ったので報告する．

実験方法

1．試薬　鉛およびヒ素標準液：市販品(和光純薬工業製1,000ppm)を用いた．

2．装置および器具　ケイ光X線分析装置：エネルギー分散型0600ウルトラトレースシステム(ケベック)，X線発生部：9265型(理学電機工業)，X線管球：モリブデン対陰極(最大負荷電力2.7kW，フィリップス)，二次ターゲット：モリブデン，データ処理システム：ユニペックシステム7000(ケベック)，加圧成型器：前川試験機M型(油圧手動式)，ケイ光X線用試料ホルダー(ホルダーと略記)：アルミ製リング(直径25mm，厚さ5mm，理学電機工業)

3．試料　昭和63年10月-11月において市販品を購入して試料とした．

4．測定用ペレットの調製　試料2gを105°の乾燥器中で1時間乾燥する．これをメノウ乳鉢に移して均一にすり混ぜる．つぎに，加圧成型器のプレスヘッドに薬

*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 Metoropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1，Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

Table 1. Operating conditions

Target	Mo
Secondary target	Mo
Voltage, Ampere (kV, mA)	50-55
Fixed time (sec)	300
Range (keV)	0-20
Path	Air

包紙をしき，その上にホルダーを乗せ，さきの試料の全量をホルダー内に表面がほぼたいらになるように充塡する．さらに，薬包紙で上から覆う．つぎに，加圧成型器を用いて5トン／㎠の圧力をかけて成型してペレットを作成する．これをケイ光X線分析用試料とする．

5．試験操作

1)定性

4の項で調製したペレットをTable 1に示した操作条件に従って測定する．得られたケイ光X線スペクトルについて，データ処理システムを用いてPbL α線：10.550 keV，PbL β線：12.211 keV，AsK α線：10.542 keVおよびAsK β線：11.722 keVを解析して定性を行う．

2)定量

鉛およびヒ素を単独で含有する場合：鉛については定性の項で用いた試料について，まず，測定時間として，30秒間ケイ光X線分析を行い，得られたケイ光X線スペクトルから使用した二次ターゲットであるモリブデンからのコンプトン散乱X線を内部標準としてケイ光X線強度を測定する．つぎに，測定時間を300秒間としてケイ光X線分析を行い，PbL β線のX線強度を求める．つぎに，さきに測定したモリブデンからの散乱X線に対するPbL β線のX線強度比を求め，別に作成した検量線から試料中の鉛含有量を求める．つぎに，ヒ素については，AsK α線のX線強度比を求め，鉛と同様にヒ素の含有量を求める．

鉛およびヒ素が共存する場合：PbL α線とAsK α線とが重なるため，鉛は重なりのないPbL β線を用いて分析を行う．得られた鉛のX線強度に係数(1.03)をかけたものを見かけのヒ素のX線強度から差し引くことにより，鉛の影響のないヒ素のX線強度を求め，さらに，内部標準に対するX線強度比から検量線によりヒ素の含有量を求める．

結果および考察

測定用ペレット調製の検討　試料中の鉛およびヒ素の検出感度と精度の向上を目的としてつぎの方法を検討した．

1．加圧によるペレット調製　粉末試料においては，しばしば，ホルダーに充塡して加圧成型を行うが，成型性をよくするため，ステリアン酸，でん粉などの有機物をバインダーとして15-20%加えて成型することが多い[9]，しかし，Li-Tong Jinら[5]の報告によると酸化チタン中の鉛含有量は低値のものが多いことから，バインダーを加えると希釈率が大きくなり，検出感度の低下が考えられるため，今回はバインダーを加えずに成型することを検討した．すなわち，あらかじめ鉛およびヒ素を検出しないことを確認した試料2 gに両者をそれぞれ50 μg加えて，105°，1時間乾燥する．つぎに，プレス圧を1，2，3，4，5，7，10，15，20および30トン／㎠と変化させて試料を調製して操作条件に従って測定して，プレス圧とX線強度比の関係を検討した．その結果，プレス圧3トン以下では成型が不十分であり，また，15トン以上ではペレットがうすくなり，わずかの衝撃によってホルダーから脱落あるいは破損しやすくなることが認められた．これに対して，4-10トンにおいては成型後のペレットの強度も十分得られ，X線強度比も一定で再現性がみられた．そこで，操作性がよいことからプレス圧を5トンとした．成型操作の際，酸化チタンは微粉末のため，試料がプレスヘッドに付着して操作が困難であったが，越智ら[10]が，試料とプレスヘッドの間に薬包紙あるいはマイラーをはさんで効果的に処理していることから，著者らも薬包紙を用いて操作することとした．

2．試料の粒度　ケイ光X線分析においては，試料のごく表面に近い部分のみを測定することから，定量分析においては，試料の粒度がX線強度に大きな影響を及ぼす．通常，粒度が200メッシュあるいはそれ以上に細かいときはX線強度に影響を与えないとされている[9]．今回用いた酸化チタンは，いずれも200メッシュ以上の微粉末であったので，粒度の影響はみられなかった．

共存元素の影響　神田ら[3]は，酸化チタン中の不純物を発光分光分析で調査して，カリウム，カルシウム，アルミニウム，マンガン，マグネシウム，鉄および亜鉛の存在を報告している．著者らもケイ光X線分析でほぼ同様の結果を得た．そこで，鉛およびヒ素に対する前記7元素の影響について検討を行った．すなわち，鉛およびヒ素を検出しない試料2 gに両者をそれぞれ20 μg添加する．さらに，7元素を200および1,000 μgの濃度段階で添加し，試料調製後，操作条件に従って測定した．その結果，いずれの元素も鉛およびヒ素のX線強度比に影

響を与えなかった．つぎに，鉛およびヒ素の相互の影響についても検討するため，20μgに対して，それぞれ一方を200および1,000μg添加したところ，いずれの濃度段階においても相互の影響は認められなかった．

鉛およびヒ素の同定 ケイ光X線強度はβ線よりα線の方が強く，定量分析には，通常，α線のX線強度を測定する[9]．しかし，Fig. 1に示すように鉛およびヒ素のPbL α線(10.550 keV)とAsK α線(10.542 keV)は非常に近接しているため，両者が共存する試料では，α線を用いて定量することは不可能である．一方，PbL β線(12.211 keV)とAsK β線(11.722 keV)とは検出電位が十分離れており，PbL β線はPbL α線に比してX線強度が若干低値を示すものの，ほぼ等しいことから，鉛の定量分析にはL β線を用いた．しかし，ヒ素においては，AsK β線のX線強度はAsK α線の約1／4と感度が低いため，ヒ素の定量分析にはAsK α線を用いることとした．そこで，両者が共存する場合は，鉛の重なりのないPbL β線のX線強度を測定し，この強度に係数(1.03)をかけてPbL α線の強度に換算し，これを見かけのAsK α線より差し引くことにより，鉛の影響のないAsK α線のX線強度を求めた[11,12]．

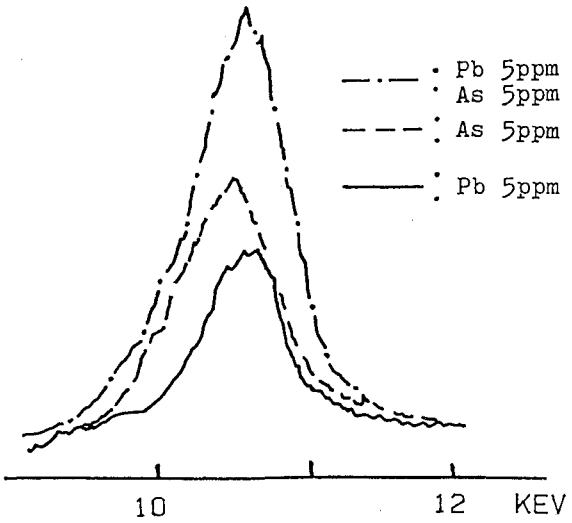


Fig. 1. X-Ray spectra of PbL α line, AsK α line and (PbL α + AsK α) line

検量線 鉛およびヒ素を検出しない試料2 gに両標準液よりそれぞれ10, 20, 60, 80, 100, 200および300μgを添加し，測定用ペレットの調製および試験操作の項に従って測定した．その結果，両者とも良好な直線性が得られた．

添加回収率および検出限界 鉛およびヒ素を検出しない試料2 gに両者をそれぞれ20, 100, 200μg添加し，測定用ペレットの調製および試験操作に従って各濃度段階においてペレットを3個調製して測定を行い，平均回収率および変動係数を求めた．その結果をTable 2に示す．鉛の平均回収率は95.3-100.7%，変動係数は2.2-4.1%，ヒ素の平均回収率は96.9-97.7%，変動係数は2.9-3.2%と良好な結果が得られた．つぎに，本法における鉛およびヒ素の検出限界(S／N＝3)を求めた．その結果，いずれも3 ppmであった．

市販品の分析結果 市販品の酸化チタン15検体について本法を適用して鉛およびヒ素の含有量を測定した．その結果をTable 3に示す．鉛については，15検体中13検体から検出された．そのうち，高値を示したものは，40.0, 30.0, 29.5ppmの3検体であった．また，鉛の平均含有量は14.0ppmであり，この結果は他の報告[5]とほぼ同様の傾向を示した．ヒ素については，いずれの試料からも検出されなかった．

今回の調査において，鉛およびヒ素は化粧品原料基準の規制値を越えたものは認められなかった．本法は酸化チタン中の鉛およびヒ素の同時定量法として簡便かつ実用的な手段であり，酸化亜鉛や酸化カルシウムなど他の粉末の化粧品原料に応用可能と考える．

Table 2. Recoveries of lead and arsenic for titanium dioxide powder*

Sample	Sample weight (g)	Added (μg)	Lead		Arsenic	
			Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
Titanium dioxide powder	2	20	100.7	2.2	97.7	2.9
		100	95.3	4.1	98.0	3.2
		200	97.3	3.0	96.9	3.2

*N＝3

Table 3. Analytical results of commercial samples*

Sample No.	Lead(ppm)	Arsenic(ppm)
1	10.0	N.D.
2	15.0	N.D.
3	40.0	N.D.
4	10.0	N.D.
5	14.0	N.D.
6	29.5	N.D.
7	N.D.	N.D.
8	N.D.	N.D.
9	30.0	N.D.
10	14.5	N.D.
11	8.0	N.D.
12	8.0	N.D.
13	11.5	N.D.
14	9.0	N.D.
15	10.0	N.D.

N.D. : not detected

まとめ

ケイ光X線分析法による酸化チタン中の鉛およびヒ素の同時定量のための検討を行い，つぎの結果を得た．

1．鉛およびヒ素の同時分析はターゲット：Mo, 二次ターゲット：Mo，印加電圧および電流：50 kV-55mA，検出範囲：0 -20 keV，X線通路：空気の操作条件によって達成された．

2．検出感度および精度の向上を目的として，試料を加圧成型した．その結果，5トン／cm²の圧力が最適条件であった．

3．試料の分析は，鉛は重なりのないPbL β線を用いた．また，両者が共存する場合は，PbL β線のX線強度に係数をかけ，見かけのAsK α線のX線強度から差し引いてヒ素の含有量を求めた．

4．酸化チタン15検体について本法を適用したところ，鉛が13検体から検出されたが，ヒ素は検出されず，いずれも化粧品原料基準の規制値を越えるものはなかった．

文　献

1）化学大辞典 3,920，共立出版，1981.

2）化粧品原料基準注解(第二版)，501，薬事日報社，1984.

3）神田正雄，堀　宜喜，松本　勲：分析化学，24，299，1975.

4）Fuller C.W.：Analyst，24，961，1976.

5）Li–Tong Jin，Jin–Rui Xi，Miwa T.，Mizuike A：Mikrochimica Acta，3，245，1983.

6）森川　久，柘植　明，飯田康夫，上蓑義則，石塚紀夫：分析化学，36，306，1987.

7）加藤明彦，大角泰章，中根正典，三宅義造：分析化学，23，1036，1974.

8）Denton C.L., Himsworth G., Whitenhead J.：Analyst, 97，461，1972.

9）X線分析：浅田栄一，貴家恕夫，大野勝美，154，共立出版，1973.

10）越智寛友，岡下英男：島津評論，44-2，69，1987.

11）田中英樹，森口祐三，山本　正，橋詰源蔵：分析化学，21，1456，1972.

12）島津アプリケーションニュース：X線分析，15，CA 141-043 A.

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.*, **40**, 115-120, 1989

東京都におけるPCB汚染の実態について（第17報）食品および器具容器中のPCB汚染の推移

植田忠彦*，渡辺四男也*

Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (17 th) Transition of PCB Contamination in Foods, Tablewares and Kitchenwares

TADAHIKO UETA* and YOHYA WATANABE*

Keywords：ポリ塩化ビフェニール Polychlorinated Biphenyl，汚染 pollution，食品 food，調理器具 kitchenware，食器 tableware

緒言

昭和41年(1966)，Soren Jensen はスウェーデン産の魚類および野生動物体内より初めてPolychlorinated biphenyls(PCB)を検出した[1]・以来，ヨーロッパ，アメリカ等において魚，動物あるいは環境試料中のPCB濃度が測定されるに従って，その環境汚染が広範に進行していることが明らかになった．

我が国においては，昭和43年(1968)にPCBによるカネミ油症事件が福岡，長崎を中心に発生し，食品監視業務の重要性が再確認されるとともに，PCBによる環境汚染問題が注目されるに至った．昭和45年からはPCB汚染調査が各地で活発に行われ，昭和46年(1971)に日本沿岸および湖沼の魚類，海水あるいは底質中のPCB濃度が報告されて以来，汚染状況が次々と明らかにされた．[2)3)]．

厚生省は昭和47年(1972)8月，アメリカでの規制実施に次いで，日本におけるPCBの製造，輸入ならびに使用を禁止すると共に，食品中に残留するPCBの暫定許容量を設定した[4)]．

著者らはこれらの規制に先だって，昭和46年5月より現在まで継続して、東京都内に流通する魚介類，肉類，水産加工品等の食品ならびに紙製品，プラスチック製品等のPCB汚染調査を行ってきた．

これまでの調査結果によれば，規制が実施されて数年の間にPCB汚染は急速に低下し，その後は僅かに減少傾向を示しながら今日に至っている．この間，一時高い汚染が認められた各種東京湾産魚の捕獲自主規制も昭和62年までにはそれぞれ解除された．しかし，PCBは非常に安定性の高い化合物であるために環境中に拡散したPCBが、食物連鎖等を通じて生態系にどの様な影響を及ぼすかは不明であり，今後とも追跡調査を行う必要があろう．また，近年，PCB異性体の中には強い毒性を示すものも認められており[5)6)7)8)]，これらに関する調査が必要と考えられる．

本報においては昭和46年(1971)5月より平成元年(1989)3月までの約18年間の魚介類を中心とするPCB調査結果をまとめるとともに，その推移について若干の考察を行った．

調査方法

調査試料　昭和46年(1971)5月より平成元年(1989)3月までの18年間に東京都内の中央卸売市場および小売店より購入した魚介類，190種，2,826検体のほか，水産加工品，食肉，食用油脂，卵，ベビーフード，育児用粉乳，牛乳，乳製品，調理用器具類および東京湾汚染モニタリングのための東京湾内捕獲のスズキ，アサリである．

定量法　厚生省環境衛生局PCB分析班による統一分析法[9)]に基づいて行った．

結果および考察

Table 1は昭和46年(1971)5月から平成元年(1989)3月までの間に市場および小売店より購入した190種，2,826検体の魚介類の可食部中のPCB濃度を年度別に示したものである．ただし，1971年の分は5月から1972年5月までの13ヶ月間のものであり，1973年以降は全てその年の4月から翌年の3月までの12ヶ月間に購入した試

*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 Concentrations of PCB in Fishes Surveied from 1971 to 1988 (ppm)

year	marine fish			imported & trawled fish			limnetic fish		
	N	range	mean	N	range	mean	N	range	mean
1971	104	0-4.70	0.362		—		8	0-0.90	0.144
1972		—			—			—	
1973	152	0-1.87	0.142		—			—	
1974	89	0-1.22	0.086		—		1		nd
1975	79	0-0.60	0.057		—		4		nd
1976	153	0-0.74	0.038		—		7	0-0.09	0.021
1977	149	0-0.55	0.026	1		0.100	7	0-0.02	0.013
1978	271	0-1.42	0.055	2		nd	27	0-0.03	0.015
1979	124	0-0.53	0.034	1		nd	14	0-0.02	0.006
1980	140	0-0.40	0.023	58	0-0.01	0.000	4	0-0.09	0.050
1981	137	0-0.28	0.029	63	0-0.33	0.010	10	0-0.14	0.030
1982	135	0-1.83	0.042	34	0-0.06	0.004	12	0-0.17	0.033
1983	140	0-0.61	0.043	31	0-0.08	0.007	10	0-0.13	0.034
1984	110	0-1.25	0.050	55	0-0.14	0.013	14	0-0.09	0.020
1985	97	0-0.67	0.070	69	0-0.12	0.005	9	0-0.02	0.010
1986	118	0-0.51	0.050	42	0-0.44	0.020	12	0-0.02	0.010
1987	118	0-0.83	0.055	41	0-0.21	0.022	15	0-0.02	0.007
1988	125	0-0.31	0.035	29	0-0.19	0.014	5	0-0.03	0.018
total	2241			426			159		

N : number of samples

料の測定値を示したものである．この間に調査した190種の中で継続して調査を行った魚種は，通常店頭でよく見受けられるアジ，サンマ，スルメイカ，イサキ，イワシ，カツオ，キンメダイ，メバル，ニシン，サワラ，トビウオ，カマス，の20種である．これらの魚種が今回調査対照とした全魚種に対して占める割合は約10%程度であり，その他の大部分の魚種は調査年度によって異なっている．魚種間の PCB 汚染濃度はその食餌性によって異なると考えられ，また，同一魚種でも，行動範囲の狭い魚種では生息環境の汚染度の違いが汚染濃度に大きな影響を与えるため，年度間の平均値には若干のバラツキが認められる．従って，単年度の汚染濃度の比較は困難であった．

(1)海水魚　日本近海で捕獲された魚介類の PCB 汚染状況の推移を見ると，規制前(～1972)に比べて規制が行われた翌年には1／2以下となり，更に1年経過した1974年には1／4に減少しており，明らかに規制の効果が現われている．これは環境への PCB の新たな排出が停止されたことにより，海域へ流入する量が急速に減少したためと考えられる．これに対して，1975年から今日までの13年間の魚介類の PCB 汚染濃度の推移を見ると，その減少傾向はゆるやかである．これは沿岸部の汚染が海流により外洋へと徐々に拡散され，希釈されたためと考えられる．

一方，近年は，エビ，イカ，タコ等の輸入魚介類が急激に増加しており，更に，新しい漁場の開拓が進むにつれて，主としてトローリング漁法による外国産の魚介類も店頭に多く出回っている．これらの魚介類は捕獲海域がほぼ特定されるため，測定結果がその海域の汚染状況を反映しているものと推定される．即ち，PCB を早くから多量に使用してきたカナダ，アメリカ，ヨーロッパ海域で捕獲された魚介類は日本近海産の魚と同程度の汚染度を示している．しかし，ニュージーランド，インド海域で捕獲された魚の汚染度は低く，北半球の汚染に比べて，南半球の汚染が少ないことを窺わせる．

PCB 汚染海域の状況は，今後しばらくの間，横ばい状態で推移するものと考えられる．

(2)淡水魚　湖，沼等で自然に生育するワカサギ，フナ等に比較的高い汚染が認められる．これは湖，沼等の生育環境が，河川に比べて，拡散などによる汚染の低下に

乏しいためと考えられ，この傾向は今後も続くものと考えられる．一方，養殖のウナギ，アユ，マス等は食餌の習性と投与飼料により汚染されると考えられるため，今日でも魚種による違いが認められる．

(3)東京湾産魚　規制が行われた当時のスズキ，ボラ，コノシロのPCB汚染度が非常に高かったために，東京都は昭和47年12月(1972)，国に先駆けてスズキの捕獲自主規制を行った．翌，昭和48年6月4日(1973)に水産庁指導通達が出されたことにより，新たに，ボラおよびコノシロが捕獲自主規制されることとなった．この時のスズキ，ボラ，コノシロ中のPCB濃度は各々3.66～0.21ppm($\bar{x}$=1.51ppm, n=41)，7.30～0.1ppm($\bar{x}$=2.01ppm, n=17)，9.60～1.80ppm($\bar{x}$=4.67ppm, n=13)であった．

この捕獲自主規制は昭和51年7月(1976)に，スズキ，ついで昭和60年2月(1985)に，ボラ，昭和62年8月に，コノシロの順で解除された．この時の各々のPCB濃度は4.0～0.3ppm($\bar{x}$=0.7ppm, n=60)，1～0.3ppm($\bar{x}$=0.7ppm, n=60)，3.0～0.3ppm($\bar{x}$=1.0ppm, n=70)であった．

このことは，東京湾の様な内湾での高濃度汚染が拡散等により低下するまでには非常に長期間を要することを示している．

(4)水産加工品　魚介類の内蔵を原料として製造された，カラスミ(ボラの卵巣)，アンコウの肝蔵，カニみそなど，あるいはママカリ(ヒシコイワシの酢漬け)，フナ寿司等の加工品は，調査開始当初より高いPCB濃度を示しているが，これらは今日でも高い値を示している．

その他，食肉，卵，食用油脂，乳製品，牛乳等は魚介類に比べて低い値であり，近年ナチュラルチーズを除きこれから検出されるPCB濃度は非常に低い．

次に，昭和46年に行った食品以外のものに関する調査によれば，日用紙製品であるパン包装紙が850ppm，ペーパータオル48.5ppm，トイレットペーパー46ppm等，高濃度汚染が認められた．これらはいずれも当時事務用品として広く用いられていたPCBを多量に含有するノーカーボン紙(30,250ppm)などが混入した再生パルプを使用したためと考えられる．しかし，PCBの使用が禁止されたために，今日では再生パルプを使用した紙製品からもほとんどPCBは検出されない．

Table 2～4に昭和62年度(1987)および昭和63年度(1988)に調査した結果を示した．

これらの結果から解るように汚染濃度はほぼ一定となり新しい傾向は認められず，今後も，同様の推移を示す

Table 2　Concentration of PCB in Fishes (ppm)

sample	1987			1988		
	N	range	mean	N	range	mean
Agemakigai (*Sinonovacula constricta*)				1		0.015
Ainame (greenling, *Hexagrammos Otakii*)				2	0.005-0.009	0.007
Aji (horse-mackerel, *Trachurus trachrus*)	8	0.006-0.013	0.009	9	0.004-0.011	0.007
Amadai (Horse-head, *Branchiostegus japonicus*)	3	0.002-0.012	0.007	1		0.008
Anago (conger eel, *Astrokonger myriaster*)	4	0.026-0.349	0.114	5	0.021-0.038	0.031
Aodai (blue fusilier, *Paracaesio caeruleus*)				1		0.001
Bora (gray mullet, *Mugil cephalus*)	3	0.009-0.176	0.066	1		0.047
Gaya (whitte-edged rockfish, *Sebastes taczanowskii*)				1		0.005
Hamachi (yellow tail, *Seriola quinqueradiata*)	10	0.034-0.127	0.074	7	0.043-0.113	0.077
Hedai (*Sparus sarba*)				1		0.010
Hotategai (*Patinopecten yessoensis*)				1		0.000
Houbou (*Chelidonichthys spinosus*)	1		0.010			
Inada (yung yellow tail, *Seriola quioqueradiata*)				1		0.017
Isaki (grunt, *Parapristipoma tririneatum*)	2	0.011-0.013	0.012	2	0.003-0.007	0.005
Ishidai (*Oplegnathus fasciatus*)				1		0.003
Iwashi (sardine, *Sardinos meianosticta*)	9	0.005-0.193	0.080	9	0.010-0.079	0.039
Kajikimaguro (marlin, *Tetrapturus audax*)				1		0.049
Kaki (oyster, *Crassotrea gigas*)	4	0.025-0.044	0.035	2	0.009-0.015	0.012
Kamasu (barracuda, *Sphyraena japonius*)	1		0.011	3	0.012-0.308	0.116

Kanpachi (*Seriola dumerili*)				2	0.033-0.066	0.050
Katsuo (bonito, *Katsuwonus pelamis*)	6	0.001-0.020	0.009	3	0.000-0.007	0.004
Kinmedai (alfoncino, *Beryx splendens*)	2	0.064-0.072	0.068	7	0.015-0.188	0.096
Kinkidai (*Sebastolobus macrochir*)	1		0.011	1		0.027
Kisu (sillago, *Sillago shiama*)				1		0.000
Konosiro (gizzard shad, *Clupanodon punctatus*)	5	0.026-0.228	0.154	4	0.034-0.173	0.086
Kurodai (*Acanthopagrus suhlegeli*)				2	0.017-0.048	0.033
Kuromutsu (*Scombrops gilberti*)	3	0.029-0.106	0.056			
Madai (sea bream, *Pagrus major*)				6	0.009-0.045	0.024
Madara (codfish, *Gadus macrocephalus*)	5	0.001-0.002	0.001	5	0.000-0.002	0.001
Makogarei (marbled sole, *Limanda yokohamae*)	2	0.007-0.062	0.035			
Managatsuo (harvest fish, *Pampus argenteus*)	1		0.002	1		0.115
Mebaru (gopher, *Sebastes inerumis*)	1		0.009	1		0.008
Medai (black rockfish, *Hyperoglyphe japonica*)				1		0.000
Nezumizame (*Lamna ditropis*)	2	0.096-0.616	0.356			
Nishin (herring, *Clupea pallasi*)	2	0.017-0.019	0.018	1		0.041
Saba (macherel, *Pneumotophrous japonicus*)	8	0.018-0.119	0.049	7	0.020-0.063	0.032
Sake (salmon, *Oncorhynchus keta*)	1		0.003	2	0.002-0.003	0.003
Sanma (macherel pike, *Colosbis saira*)	10	0.007-0.012	0.008	4	0.001-0.008	0.005
Sawara (*Scomberomorus niphonius*)	4	0.024-0.256	0.124	2	0.029-0.033	0.031
Sayori (*Hyporhamphus sajori*)				1		0.013
Siira (*Coryphaena hippurus*)	1		0.020			
Simaaji (*Pseudocaranx dentex*)				1		0.003
Sitabirame (red tongue sole, *Cynoglossus joyneri*)				3	0.000-0.008	0.003
Suketoudara (theragra chalcogramma)				3		0.000
Surumeika (saguttated calamary, *Todarades pacificus*)	9	0.000-0.004	0.002	9	0.000-0.003	0.001
Suzuki (perch, *Lataolabrax japonicus*)	6	0.144-0.834	0.323	1		0.390
Tachiuo (hairtail, *Trichiurus lepturus*)				1		0.145
Takabe (*Labracoglassa argentiventris*)				1		0.005
Tobiuo (flying fish, *Prognichthys agoo*)	2		0.000	2		0.004
Urumeiwashi (*Etrumenus teres*)	1		0.027			
yariika (*Doyteuthis bleekeri*)	1		0.002	3	0.000-0.004	0.002
total	118			125		
Asari (*Psammobia kazusensis*)*	16	0.001-0.020	0.007			
Suzuki (perch, *Lataolabrax japonicus*)*	32	0.111-1.006	0.347			
(marine fish trawled)						
Aohirasu	3	0.002-0.160	0.007	2		0.000
Argentine madai (*Pagrus pagrus*)	3	0.002-0.006	0.005			
Gindara (black cod, *Anoplopoda fimbria*)	4	0.006-0.202	0.070	4	0.009-0.188	0.077
Ginzake (silver salmon, *Oncorhynchus kisutch*)				2	0.002-0.055	0.028
Ibodai (*Psenopsis anomala*)				2	0.000-0.002	0.001
Hamadai (*Etelis coruscans*)				1		0.009
Karasugarei (black halibut, *Reinhardtius*)	2	0.032-0.040	0.036			
Kinmedai (alfoncino, *Beryx splendens*)	7	0.002-0.012	0.005	1		0.003
Managatsuo (harvest fish, *Pampus argentenus*)	6	0.000-0.007	0.002	2	0.000-0.007	0.004
Medai (*Hyperoglyphe antarctica*)	1		0.001			
Mongoika (*Sepia esculenta*)	7	0.000-0.006	0.002			
New Zealand – madai (*Pagrus auratus*)				1		0.000

Nishin (herring, *Clupea harengus*)	5	0.026-0.213	0.094	5	0.025-0.127	0.061
Saba (atlantic mackerel, *Sconber scomburus*)				2	0.028-0.070	0.049
Sake (slamon, *Oncorhynchus keta*)				3	0.003-0.032	0.016
Sawara (*Scomberomorus niphonius*)	2	0.013-0.017	0.015	2	0.038-0.052	0.045
Tachiuo (hairtail, *Trichurus leputrus*)	1		0.001	2		0.000
total	41	0.000-0.213	0.022	29	0.000-0.188	0.014
(limnetic fish)						
Ayu (ayu sweetfish, *Plecoglussus altivelis*)	1		0.005			
Iwana (japanese char, *Salvelinus pluvinus*)	1		0.011			
Koi (carp, *Cyprinus carpio*)	4	0.000-0.007	0.004			
Nijimasu (rainbow trout, *Oncorhynchus masou*)	2	0.002-0.005	0.003			
Unagi (eel, *Anguilla japonica*)	7	0.010-0.018	0.013	5	0.004-0.028	0.018
total	15	0.000-0.018	0.007	5	0.004-0.028	0.018

* : collected from Tokyo bay
N : number of samples

Table 3 Concentrations of PCB in Marine Products, Meats and Others (ppm)

sample	1987			1988		
	N	range	mean	N	range	mean
Processed marine product	40	nd-0.249	0.031	40	nd-0.822	0.43
Meat						
pork	5	nd-0.004	0.001	5	nd-0.004	0.001
pig liver	5		nd	5		nd
beef	5		nd	5	nd-0.004	0.002
cow liver	5		nd	5	nd-0.001	0.001
chicken	5	0.001-0.004	0.002	5	nd-0.002	0.001
chicken liver	5	0.001-0.002	0.001	5	0.001-0.003	0.002
Edible fat						
lard	16	nd-0.008	0.001	15	nd-0.005	0.000
tallow	4	nd-0.007	0.002	3	nd-0.006	0.002
margarine				2	0.008-0.024	0.016
Egg						
hen	20	nd-0.008	0.003	20	nd-0.007	0.002
Infant food	20	nd-0.002	0.001	20	nd-0.018	0.001
Tableware and Kitchenware	10	nd-0.069	0.007	10		nd

N : number of samples

Table 4 Concentrations of PCB in Milk and Dairy Products (ppm)

sample	1987			1988		
	N	range	mean	N	range	mean
Milk	20	nd-0.001	0.001	20	nd-0.003	0.001
Formulated milk	10		nd	10		nd
Butter	10	nd-0.036	0.011	5	nd-0.010	0.006
Cheese	20	0.001-0.024	0.011	25	0.002-0.023	0.012
total	60	nd-0.036	0.006	60	nd-0.023	0.005

N：number of samples

ものと推定される.

しかし，環境中に放出されたPCBは多量であるために，今後，生態系にいかなる影響を及ぼすかは明かでない.

また，近年，PCB異性体の中でCoplanarタイプのPCBの強い毒性が注目されており，これらに関する研究が進むにつれて，PCBを新たな視点より検討する必要性が生じることも予想される.

結　論

昭和46年(1971)5月より平成元年(1989)3月の間に東京都において入手した食品，調理用器具類中のPCB汚染の経年的な推移について考察を行った.

食品，調査器具類中のPCB濃度は規制が実施されたことにより急激に減少した.

魚介類中のPCB濃度は規制実施3年後に約1／6に低下した．しかし，その後，昭和50年(1975)より現在まではほぼ横ばい状態であった.

“食品中に残留するPCB規制”が実施されて以来，規制値を上回る食品は認められなかった.

謝辞　本調査にご協力頂いた東京都衛生局食品監視課の方々に深謝致します.

文　献

1) Jensen, S., New Scientist, 32, 612(1966).
2) 立川　涼，磯野直秀：自然，26，26-30(1971).
3) 原田裕文，観　照雄，植田忠彦，竹内正博，江波戸挙秀，鎌田国広，戸谷哲也：東京都衛研年報，23，111-122(1971).
4) 昭和47年8月24日付環食第442号厚生省環境衛生局長通知「食品中に残留するPCBの規制について」.
5) T. Sawyer and S. Safe, Toxicol. Lett. 13, 87(1982).
6) N. Kannan, S. Tanabe, T. Wakimoto, & R. Tatsukawa, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70, 451-454(1987).
7) S. Tanabe, N. kannan, An. Subramanian, S. Watanabe & R, Tatsukawa, Environmental Pollution, 47, 147-163(1987).
8) S. Tanabe, N. Kannan, T. Wakimoto & R. Tatsukawa, Intern. J. Environ. Anal. Chem., 29, 199-213(1987).
9) 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).

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 121-126, 1989

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V報）昭和60～63年度における調査結果

水 石 和 子*, 竹 内 正 博*, 山野辺 秀 夫*, 渡 辺 四男也*

Survey of Pollution with Bis (tributyltin) oxide in Fish and Shellfish (V) Results of 1985-1988

KAZUKO MIZUISHI*, MASAHIRO TAKEUCHI*, HIDEO YAMANOBE* and YOHYA WATANABE*

A survey of the pollution with bis(tributyltin)oxide(TBTO) in fish and shellfish has been carried out for the samples which were transported into the Tokyo Central Market during the period from September in 1985 to February in 1989. The samples used were sixty seven kinds of fish and shellfish(652 samples), which consisted of 13 kinds cultured fish and shellfish (116 samples), 51 kinds of bay or inshore fish and shellfish(486 samples) and 10 kinds of ocean or abyssal fish(50 samples). TBTO in the samples was determined as tributyltin chloride by electron capture detection gas chromatography. Relatively high concentrations of TBTO were detected from cultured fish and shellfish such as Simaaji(Preudcartex yessoenisis), Kanpachi(Sriola dumerili) and oyster(Crassoteea). The maximum value among cultured samples was 0.98ppm in a Hamachi(yellow tail), and the maximum of the average of each fish and shellfish was 0.38ppm(Shimaaji). From these results, it seems that TBTO has been still used as antifouling agents for culture nets. Bay fish such as Tachiuo(hairtail), Sawara(Japanese Spanish Mackerel) and Suzuki(sea bass) and inshore fish such as Maiwashi(sardin) showed high content of TBTO. It suggests that TBTO pollution originated from antifouling agents for the bottom of ships and fishery net has been spreading over the Japanese inshore.

Keywords：monitoring, pollution, bis(tributyltin)oxide, TBTO, cultured fish and shellfish, inshore fish and shellfish

緒　　言

養殖用の漁網防汚剤や船底塗料として用いられてきているビス(トリブチルスズ)オキシド(TBTO)による環境汚染が明らかにされ，魚介類への移行及び蓄積がここ数年来問題となっている．養殖漁網に関しては漁業関係業界の自粛により，昭和60年4月以降魚網へのTBTOの使用については自主規制がとられているが，船底塗料については現在のところ規制措置はない．TBTO汚染は養殖魚介類のみならず近海域内の魚介類にも及んでいることは既に報告しており[1]，広範囲な汚染が懸念されている．また，著者らはこれまでに魚介類を中心とした東京湾のTBTO汚染[2]及び東京湾で採取した海水中のTBTOの分析結果[3]について報告した．今回は，昭和60年度―昭和63年度に渡り東京都中央卸売市場に入荷した魚介類のTBTO測定を行い，TBTO汚染実態及び漁網への使用自主規制の影響について調査を行った．

実　　験

1．試料

1985年(昭和60年)9月から1989年(平成元年)2月の間に東京都中央卸売市場に入荷した魚介類67種652検体を

*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

調査対象とした．調査は (A) 1985年度(昭和60年度)，(B) 1986年度(昭和61年度)，(C) 1987年度(昭和62年度)，(D) 1988年度(昭和63年度)に分けて行った．本試料は既報と同様に大型魚，中型魚，小型魚，貝類及び甲殻類の5種類に区分してサンプリングした．試料は可食部を均一化し，ポリエチレン容器に採取し，−30℃で保存した．

2．測定法

既報に従って[4]，試料を塩酸酸性でトリブチルスズ化合物をトリブチルスズクロリド(TBTC)とし，メタノール，酢酸エチル存在下，ヘキサン-ジエチルエーテル(3：1，v／v)混液で抽出し，フロリジルカラムクロマトグラフィーでクリーンアップを行った．酢酸酸性でTBTCを溶出し，濃縮した溶出液についてピーク高絶対検量線法による電子捕獲検出ガスクロマトグラフィーで定量し，求めたTBTC値をTBTO値に換算した．

結果及び考察

1．養殖魚介類のTBTO含有量

表1に1985年(昭和60年)9月から1989年(平成元年)2月に東京都中央卸売市場に入荷した養殖魚介類(13種，116検体)のTBTO含有量を示す．

漁網を用いてイケス中で養殖するマダイ，ハマチ，シマアジ及びカンパチ等の魚類はTBTO塗布網から移行したと考えられる比較的高い濃度のTBTOが検出された．マダイ，ハマチの各年の検出最高値は，それぞれ，0.04，0.31ppm(1985年)，0.39，0.49ppm(1986年)，0.07，0.39ppm(1987年)，及び0.19，0.93ppm(1988年)で1985，1987年のマダイを除き，全てTBTOが0.1ppm以上検出されている．平均値はマダイが0.03〜0.16ppm，ハマチが0.19〜0.20ppmの範囲でハマチの方が高い．マダイ，ハマチはTBTO含有量が低いものもみられる(0.01〜0.03ppm) 反面，このように高い値が検出されることは，TBTO塗布漁網を用いる養殖が依然として行われているか，あるいは海水，底質に高濃度のTBTOが残存している可能性が考えられる．シマアジは0.03ppm(1988年)の1検体を除くと他は0.14〜0.66の範囲で各年に渡り比較的高いTBTO含有量を示した．平均値も0.10〜0.38ppmであった．カンパチも1987年，1988年の調査では，0.02ppm(1988年)を除くと0.23〜0.32ppmの範囲のTBTOを検出し，平均値もそれぞれ0.29，0.19ppmでシマアジとともに汚染の逓減傾向はみられない．貝類については，カキの1986，1988年の最高値が0.30，0.29ppm及び平均値が0.15，0.26ppmであり，汚染レベルは変化していない．ホタテ貝は0.14，0.19ppm(1988年)，0.22ppm(1987年)を検出したものがあったが，他は全てND(検出しない)〜0.08ppmの範囲で，汚染が減少している養殖場が多い傾向がみられる．他の魚介類は比較的低いTBTO含有量値を示した．

厚生省の「食品中のTBTOの安全性評価検討委員会」[5]はTBTOの1日暫定許容摂取量を1.6 μg／kgとした．体重50kgの成人の許容摂取量は80 μg (16×50)／日で汚染レベルの高い魚介類の連日摂取を避けるか，摂取量を低下しなければならない．最高値0.93ppmを検出したハマチ(1988年)では86 g (80／0.93)以上は摂取できないことになる．現在の汚染レベルは食品衛生上直ちに問題になるとはいえないが，これ以上の汚染の進行は極力阻止しなければならない段階にあると考えられる．全国漁業協同組合連合会は昭和62年4月漁網防汚剤としてTBTO使用の自主規制を発表したが，TBTOの代替魚網防汚剤が開発されていないことから未だTBTO塗布の魚網が使用されている，あるいはTBTO汚染が残存している可能性が推測できる．ハマチ，マダイ等では低レベルのTBTO含有量のものもあり，養殖法によりTBTO汚染を最小限に抑えることが可能なことを示している．今後，養殖魚介類の汚染改善のため，関係諸機関の指導，処置が望まれるところである．

2．近海産魚介類のTBTO含有量

表2に内湾，内海及び近海産の魚介類(51種，486検体)中のTBTO含有量を示す．

タチウオは1987年のND (輸入品)，1988年の2検体(0.06，0.07ppm)を除き，TBTOが0.2ppm以上の比較的高い検出値を示す検体が多く，採取地域(出荷地)の瀬戸内海及び東京湾の汚染を反映していた．内湾，内海を回遊する魚類で比較的高い値のものはスズキ(最高値は1987年の0.35ppm)，フッコ(同1988年の0.25ppm)，セイゴ(同1989年0.31ppm)やサワラ(同1986年0.43ppm)が挙げられた．マイワシは26検体中10検体，カマスは12検体中5検体から0.1ppm以上のTBTOを検出しており，最高値はそれぞれ0.47ppm(1986年)，0.26ppm(1988年)であった．他に，アイナメ，ボラ，コチ，イサキ，マナカツオ，マサバ，サンマ及びヤリイカ等で0.1ppm以上のTBTOが検出されたもの(0.10〜0.26ppm)が1あるいは2検体あったが，他は全て0.1ppm以下であった．天然産のカンパチは0.01ppmと低値であった．貝類では，アサリについては1986，1987年に0.12〜0.32ppmを検出し，1986年の平均値が0.11ppmとやや高い値を示したが，他は概ね0.1ppm以下であった．アゲマキ，ムール貝では0.1ppmを超えるものが，それぞれ，13検体中6検体(最高値0.31ppm，1987年) 4検体中3検体(最高値

Table 1 TBTO content in fishes and shellfishes[1)] cultured in the sea

samples	(A)[2)]			(B)[2)]			(C)[2)]			(D)[2)]		
	No.	Range	Average	No.	Range	Average	No.	Range	Average	No.	Range	Average
Akagai (*Andara* (*Scapharca*) *broughtonii*)	1	ND[3)]	ND	6	0.01-0.03	0.02	5	0.01-0.14	0.06			
Ginzake				1	0.13	0.13						
Hamachi (yellow tail, *Sirioia quinqueradiata*)	7	0.02-0.93	0.19	5	0.02-0.39	0.19	5	0.05-0.49	0.20	3	ND -0.31	0.19
Hirame (foulder, *Paralichthys olivaceus*)				1	0.01	0.01	1	0.01	0.01			
Hotategai (*Patinopecten yessoensis*)	6	0.02-0.19	0.09	5	ND -0.08	0.03	2	0.04-0.22	0.13			
Ishigarei (stone flounder, *Kareius bicoloratus*)							1	0.03	0.03			
Kaki (oyster, *Crassotrea gigas*)	6	0.17-0.29	0.26				4	0.05-0.30	0.15			
Kanpachi (*Seriola dumerili*)	2	0.02-0.32	0.16	2	0.23-0.29	0.26						
Kurumaebi (*Peraeus japonicus*)	4	ND -0.04	0.01	7	ND -0.04	0.01	6	ND -0.10	0.05	3	0.01-0.02	0.01
Madai (sea bream, *Chrysophrys*)	7	0.01-0.19	0.10	5	0.01-0.07	0.04	5	0.01-0.39	0.16	3	0.03-0.04	0.03
Sake (*Oncorhynchus keta*)	1	0.04	0.04									
Shimaaji (*Pseudcaranx dentex*)	3	0.14-0.59	0.37	2	0.03-0.16	0.10	4	0.25-0.66	0.38	1	0.21	0.21
Tairagai (*Atrina* (*Servatrina*) *penna*)	1	0.02	0.02				1	0.01	0.01			

1) The fishes and shellfishes were carried into the Tokyo Central Market during the period from September in 1985 to February in 1989.
2) A-D were the time when the samples were carried into the Market : A=Feb. in 1989, and Oct., Aug. and Jun. in 1988, B=Mar. in 1988, and Nov., Aug. and Jun. in 1987, C=Feb. in 1987, and Oct., Aug. and Jun. in 1986, D=Mar. in 1986, and Oct. and Sep. in 1985.
3) no detect

Table 3 TBTO content in fishes[1)] collected from ocean and abyssal zone

samples	(A)[2)]			(B)[2)]			(C)[2)]			(D)[2)]		
	No.	Range	Average	No.	Range	Average	No.	Range	Average	No.	Range	Average
Kanpachi (*Seriola dumerili*)	1	0.01	0.01									
Katuo (bonito, *Katsuwonus pelamis*)	3	ND[3)]-0.01	ND	4	ND-0.02	0.01	4	ND -0.05	0.03			
Kichiji (bighand thornyhead, *Sebastolobus macrochir*)	4	ND	ND	6	ND-0.01	ND	6	ND -0.05	0.03			
Kimejimaguro (*Thunnus albacares*)	2	0.03	0.03									
Kinmedai (*Baryx splendens*)	3	ND -0.01	ND									
Kuromebaru (*Sebastes itinus*)							1	0.02	0.02			
Meji (*Thunnus thynnus*)	1	0.01	0.01									
Sake (*Oncorhynchus keta*)				1	ND	ND						
Sukesodara (*Theragra chalcogramma*)	2	0.02	0.02									
Tobiuo (flying fish, *Prognichthys agoo*)	4	ND -0.02	0.01	4	ND-0.03	0.01	4	0.01-0.04	0.03			

1), 2), 3) : same as Table 1

Table 2 TBTO conten in fishes and shellfishes[1)]

samples	No.	(A)[2)] Range	Average
Ainame (greenling, *Hexagrammons Otakii*)	3	ND[3)]	ND
Aji (horse-mackerel, *Trachurus trachurus*)	6	ND -0.02	0.01
Akaamadai (blanquillos, *Branchios tegidas*)	2	ND	ND
Akagarei (flathead flounder, *Hippoglossides duicus*)			
Anago (coger eel, *Astroconger myriaster*)	4	ND -0.02	0.01
Aodai (*Paracaesio xanthurus*)	5	ND -0.01	ND
Bora (grey mullet, *Mugil cephalus*)	6	ND -0.01	ND
Hakatuo (*Sarda orientalis*)			
Hirame (flounder, *Paralichthys olivaceus*)	3	ND	ND
Hoshigarei (*Verasper variegatus*)			
Isaki (grunt, *Parapristipoma trilineatum*)	5	0.01-0.04	0.02
Ishigarei (stoneflouder, *Kareus bicoloratus*)	1	ND	ND
Kamasu (barracuda, *Sphyraena japonica*)	3	ND -0.26	0.11
Kasago (*Sebastiscus marmoratus*)			
Kisu (sillago, *Sillago sihama*)	4	ND -0.01	ND
Kochi (*Platy cephalus indicus*)			
Konoshiro (gizzard shad, *Clupanodon punctatus*)	6	ND -0.01	ND
Madai (sea bream, *Chrysophyrys*)			
Madara (cod fish, *Gadus macrocephalus*)	1	0.01	0.01
Maiwashi (sardin, *Sardinos melanosticta*)	7	0.03-0.13	0.06
Makogarei (marbled sole, *Limanda yokohamae*)	3	ND	ND
Managatuo (*Pampus argenteus*)	2	0.05-0.13	0.09
Masaba (mackerel, *Pneumophrus japonicus*)	6	ND -0.07	0.03
Mebaru (gopher, *Sebastes inermis*)			
Meitagarei (*Pleuronichthys cornutus*)	1	ND	ND
Mutu (*Scombrops boops*)	1	ND	ND
Nishin (herring, *Clupea pallasi*)			
Sanma (mackerel pike, *Colorabis saira*)	4	ND -0.01	ND
Sawara (*Scomberomorus niphonius*)	4	0.04-0.27	0.13
Shibaebi	2	ND -0.02	0.01
Shiroamadai (*Branchiostegus albus*)			
Sumiika (*Sepia* (*Platysepia*) *esculenta*)			
Surumeika (saquttated calamary, *Todarandes pacificus*)	3	ND -0.04	0.02
Suzuki (sea-bass, *Lataolabrax japonicus*)	3	0.02-0.31	0.13
Seigo	1	0.30	0.30
Fukko	2	0.03-0.25	0.14
Tachiuo (hairtail,*Trichiurus lepturus*)	4	0.06-0.46	0.31
Takabe (*Labracogllosa argentiventris*)	1	ND	ND
Torafugu (ocellate puffer, *Takifugu rubripes*)	2	0.02-0.06	0.04
Yariika	2	0.01-0.02	0.02
Akagai (*Andara* (*Scapharca*) *broughtonii*)	4	0.01-0.14	0.06
Agemaki (*Sinonovacula constricta*)			
Asari (short-necked clam, *Tapes* (*Amygdala*) *japonica*)	7	0.01-0.07	0.03
Bakagai (*Mactra chinensis*)	5	ND -0.07	0.05
Hamaguri (*Meretrix lusoria*)	4	ND -0.04	0.01
Hokkigai (*Spisula* (*Pseudocardium*) *sachalinensis*)	1	0.02	0.02
Mategai (*Solen strictus*)	3	0.01-0.12	0.06
Murugai (*Mytilus coruscum*)			
Sijimi (*Corbicula* (*Corbiculina*) *leana*)	4	ND -0.04	0.02
Baigai (*Anadara* (*Tegillarca*) *granosa bisenensis*)	4	ND -0.01	ND
Shiromirugai (*Tresus keenae*)	3	ND	ND
Sirotubu (*Neptunea* (*Barbitonia*) *arthritica*)	1	ND	ND
Tairagai (*Atrina* (*Servatrina*) *penna*)	2	ND -0.02	0.01

1), 2), 3) : same as Table 1

collected from bays and inshore areas

	(B)[2]			(C)[2]			(D)[2]	
No.	Range	Average	No.	Range	Average	No.	Range	Average
6	ND -0.01	0.01	6	0.01-0.13	0.04			
6	ND -0.01	0.01	7	0.01-0.09	0.05	2	ND	ND
3	ND -0.02	0.01	5	ND -0.01	0.18			
			2	0.03-0.07	0.05			
6	ND -0.04	0.02	5	ND -0.08	0.04	3	ND -0.05	0.02
1	0.01	0.01						
5	ND -0.01	0.01	7	0.01-0.13	0.05	3	ND -0.03	0.01
1	0.06	0.06						
2	ND	ND	3	ND -0.03	0.01			
1	ND	ND						
5	ND -0.12	0.04	4	0.01-0.05	0.03			
3	ND -0.01	ND	2	ND 0.01	0.01			
1	0.01	0.01	8	0.06-0.16	0.11			
1	ND	ND						
5	ND -0.02	0.01	7	0.01-0.06	0.04			
7	ND -0.03	0.01	7	ND -0.26	0.08			
4	ND -0.02	0.01	7	0.01-0.11	0.06	3	ND -0.01	ND
			1	ND	ND			
1	ND	ND						
8	0.01-0.12	0.04	8	0.13-0.47	0.25	3	0.01-0.07	0.04
5	ND -0.02	0.01	7	0.02-0.13	0.05	2	ND	ND
2	ND -0.01	0.01	1	0.18	0.18			
5	ND -0.02	0.01	6	0.02-0.18	0.08	3	ND -0.10	0.04
5	ND -0.01	ND	4	0.01-0.05	0.03			
1	ND	ND	1	0.07	0.07			
2	ND -0.05	0.03	2	0.01-0.03	0.02			
5	ND -0.01	0.01	7	ND -0.11	0.03			
2	ND -0.13	0.07	5	0.02-0.43	0.23			
1	ND	ND						
1	ND	ND	6	ND -0.06	0.03			
5	ND -0.02	0.01	6	0.03-0.13	0.06			
1	0.01	0.01	2	0.29-0.35	0.32			
1	0.01	0.01						
2	0.03-0.19	0.11	3	0.05-0.20	0.12			
2	ND -0.07	0.04	2	0.21-0.50	0.36			
3	ND	ND						
3	0.04-0.08	0.06						
3	0.06-0.15	0.10						
2	ND -0.05	0.03	2	0.03-0.04	0.04	3	ND -0.14	0.08
4	0.03-0.11	0.06	9	0.03-0.31	0.13			
8	0.01-0.12	0.05	8	0.05-0.32	0.11	3	0.01-0.06	0.03
7	ND -0.02	0.01	6	0.04-0.14	0.07	3	ND -0.03	0.02
8	ND -0.11	0.03	7	ND -0.18	0.08			
4	0.07-0.12	0.11						
4	ND -0.01	0.01	6	0.01-0.04	0.02			
1	ND	ND	2	0.02-0.06	0.04			

0.12ppm, 1987年)あり，他の貝類に比較し汚染度が高い傾向であった．

近海産の魚介類にも TBTO 含有量が高いものがあることは，先にも報告[1]したように TBTO 汚染が内海から近海に広がっていることを示唆している．

3．遠洋魚及び深海魚の TBTO 含有量

表3に比較的遠洋で獲れる魚類及び深海産魚類の TBTO 含有量を示す．ほとんどの検体が0.05ppm以下の低レベルの検出であった．

ま と め

1985年(昭和60年)9月から1989年(平成元年)2月の間に東京都中央卸売市場に入荷した養殖魚介類13種116検体，内湾及び近海産天然魚介類51種486検体及び遠洋，深海魚類10種50検体計67種652検体を対象として TBTO 含有量調査を行った．シマアジ，カンパチ及びカキ等の養殖魚介類で TBTO 検出率が高かった．シマアジでは各年の平均値が0.10ppm(1987年)～0.38ppm(1986年)の範囲で，最高値は0.66ppm(1986年)を示し，カンパチは1987年，1988年の調査のみであったが，平均値はそれぞれ0.26，0.16ppm，最高値は0.32ppm(1988年)であった．カンパチは天然産(1987年)のものは0.01ppmであることから養殖魚網由来の汚染が原因と推定される．カキは1988年の平均値がそれぞれ0.15，0.26ppmとなっており，汚染が横這いであることを示していた．マダイ，ハマチでは TBTO 含有量が低いもの(0.1ppm以下)もある反面，高い値も各年毎に検出され，1989年2月には最高0.93ppm(ハマチ)を検出しており，魚網への TBTO 使用に関する自主規制が徹底していないことがうかがえた．

内海，近海産の天然魚介類の TBTO 汚染はタチウオ，サワラ，スズキ等の内海回遊魚及びイワシ等に顕著にみられた．内海産のものは，特に瀬戸内海，東京湾近くで出荷されたもので，これらの内海，内湾における養殖魚網及び船底塗料による TBTO 汚染が考えられた．また，内海のみならず近海への汚染の広がりの兆候もみられ，適切な措置を講ずる必要性を認めた．

謝辞：本調査を実施するに当たり，御協力頂いた衛生局環境衛生部食品監視課及び市場衛生検査所の各位に深謝致します．

文 献

1) 竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：東京衛研年報，38，155-159，1987.
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，山野辺秀夫，渡辺四男也：東京衛研年報，38，160-166，1987.
4) 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.
5) 食品中のビストリブチルスズオキシド(TBTO)の安全性評価に関する検討結果報告(昭和60年4月24日).

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 127-132, 1989

有機スズ化合物の衛生化学的研究（第Ⅵ報）**
東京湾スズキ及び海水のトリブチルスズ及びトリフェニルスズ汚染に関する一考察

竹内正博*, 水石和子*, 山野辺秀夫*,
渡辺四男也*, 道口正雄※

Hygenic Chemical Studies on Organotin Compounds (VI)
A Consideration on the Pollution of Tokyo Bay with Tributyltin and Triphenyltin Compounds

MASAHIRO TAKEUCHI*, KAZUKO MIZUISHI*, HIDEO YAMANOBE*,
YOHYA WATANABE* and MASAO DOGUCHI*

A monitoring survey on tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT) pollution has been carried out in Tokyo Bay. Samples used were 32 of sea bass collected in the bay in June／1986, July／1987 and January／1988, and 15 of sea water collected at fixed five monitoring stations in May, July and September／1988. The concentrations of TBT and TPT were determined as tributyltin chloride and triphenyltin chloride by electron caputure detection gas chromatography. The TBT concentrations were in the range from ND (less than 0.01 μg／g) to 0.17 μg／g in sea bass samples, and from ND (less than 1 ng／*l*) to 110 ng／*l* in sea water samples. The TPT concentrations were in the range from 0.34 to 1.98 μg／g in sea bass samples and from ND (less than 1 ng／*l*) to 17 ng／*l* in sea water samples. On statistical consideration, it was revealed that TBT concentrations of the sea bass samples collected during summer months were higher than those collected during winter months. These seasonal variations can be attributed to the fact that antifouling paints are coated on hulls mostly in summer months. In July and September, significantly high concentrations of TBT were actually detected in the samples collected at the stations adjacent to a fishery port or marinas. To the contrary, no seasonal variations were observed on the TPT concentrations of sea bass samples. These results suggest that the degradation rate of TPT in environments and fish are much slower than that of TBT.

Keywords: monitoring, environmental pollution, tributyltin, triphenyltin, sea bass, Tokyo bay, sea water, electron capture detector, gas chromatography

緒　言

数年来，社会的関心を集めている漁網防汚剤による養殖魚介類のトリブチフスズ(以下 TBT と略す)汚染は，全漁連による自主規制(1987年２月)及び化審法での指定化学物質への指定(1988年４月15日)によって，一時期の緊迫した状態を脱し，低減化への長期的見通しも開けたように思われる．しかし，現状はあくまで横這い状態であり，また船底塗料由来の TBT 汚染についての対策は十分とは言い難く，更に最近になって TBT と同様に漁網防汚剤及び船底塗料として使用されてるトリフェニルスズ(以下 TPT と略す)による魚介類の汚染が指摘されたため[1]，事態は必ずしも楽観できる状態ではない．

*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

**前報までの大項目「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調査について」を標題に変更する．

著者らは1984年にTBT汚染に関する先行調査を開始し，これまでに東京中央市場入荷魚介類，東京湾産魚介類，東京湾海水及び底質等の環境試料についてTBTを測定し，その動向及び汚染に関する考察を行ってきた[2-7]．そこで，新たなTPT汚染が懸念されている現在，TBTとTPTを同時に調査する必要性を考え，環境及び魚介類中の同時分析法の開発と，その応用としての東京湾の経年的汚染調査を計画した．そこで，本報では計画の第1段階として行った東京湾内スズキ及び海水の分析結果，及びそれに基づく統計的考察から得られた若干の知見について報告する．なお，分析法については別誌に報告中であるので[8]，操作法のみを記載するにとどめた．

実　　験

1．試料

スズキ：1986年6月，1987年7月及び1988年1月に東京湾で捕獲した30検体を用いた．各検体の体長(Y／cm)と体重(X／kg)は，Y＝0.116 X－4.916の回帰直線式で表され，相関係数はr＝0.9708(p＜0.001)であった．各検体は解体後，可食部(体側筋)を均一化して試料とし，－40℃で冷凍保存した．

海水：東京湾に設定した汚染監視用の5定点(金沢八景，羽田，三枚洲，船橋，富津)において，1988年5月，7月及び9月に採取した15検体を試料とした．採取は水深0.5-1mにおいて行い，10ml／lの割合で塩酸を加えて5℃で保存した．

2．試薬及び器具

標準溶液：東京化成製塩化トリブチルスズ(TBTC)及び塩化トリフェニルスズ(TPTC)各100.0mgを，褐色100mlメスフラスコ中で酢酸エチルに溶解して1mg／mlの混合原液を調製した．次いで，ヘキサン-ジエチルエーテル(3：1，v／v)で希釈して，0.01-1.0μg／mlの標準溶液を調製した．これらの標準溶液に20μl／mlの割合でヘキサン-ジエチルエーテル-酢酸(75：25：1，v／v／v)を添加し，検量線用の標準系列とした．

臭化水素酸-メタノール溶液：47％臭化水素酸を100倍量のメタノールで希釈した．

溶媒類：ジエチルエーテルは関東化学製残留農薬分析用，ヘキサン，メタノール及びアセトンは和光純薬製残留農薬分析用，また酢酸は和光純薬製精密分析用を使用した．その他の試薬は全て残留農薬分析用または特級を使用した．

フロリジールカラム：Floridin社製フロリジール3gをヘキサンに懸濁させて，内径1cm，長さ30cmの活栓付にガラスカラムに充填し，その上に無水硫酸ナトリウム2gを積層させた．

3．装置

ホモジナイザー：日本精機製エクセルオートDX型，遠心分離器：久保田商事製KS-8000型，振とう器：大洋科学製SR-Ⅱ型を使用した．

GC装置：島津製GC-9A型(10 mCi ^{63}Ni定電流型電子捕獲検出器付き)をTable 1の条件で使用した．ただし，TBTC及びTPTCの吸着を防止するために，注入口内は石英製のインジェクションライナーを装着した．

4．分析操作

1）分離カラムの前処理　カラム出口を開放した状態で分離カラムをGC装置に取り付け，窒素ガスを流しながら10℃／minで室温から260℃まで昇温し，同温度で20時間空焼きした．次いで，カラム温度を150℃に下げてから，臭化水素酸-メタノール溶液を5μlずつ10回注入した．その後，10℃／minで240℃まで昇温し，同温度で2時間エージングした．

2）試料からの抽出

スズキ：試料5.0gを200ml遠沈管に採り，メタノール-酢酸エチル(1：1，v／v)10ml及び0.5M塩酸10mlを加えて，10分間激しく振り混ぜた．次いで，ヘキサン-ジエチルエーテル(3：1，v／v)50mlを加えて10分間振とう抽出後，3000 r.p.m.で遠心分離した．有機相を分取し，水相は更に2回ヘキサン-ジエチルエーテル(3：1，v／v)50mlずつで同様に抽出した．有機相を合わせノナン0.5mlを添加後，ロータリーエバポレーターで1ml以下に濃縮し，残査をヘキサン-ジエチルエーテル(3：1，v／v)5mlに溶解した．

海水：試料1000mlを分液ロートに採り，メタノール及び酢酸エチル各10mlを加えて混和後，ヘキサン-ジエチルエーテル(3：1，v／v)100mlで抽出した．有機相を分取し，水相は更に2回ヘキサン-ジエチルエーテル(3：1，v／v)100mlずつで同様に抽出し，以下スズキの場合と同様に操作した．

3）クリーンアップ

ヘキサン-ジエチルエーテル溶液を，キャピラリーピペットを用いてフロリジールカラムに注入した．カラムを先ずヘキサン40ml，次いでヘキサン-アセトン(3：1，v／v)50mlで洗浄後，ヘキサン-ジエチルエーテル-酢酸(75：25：1，v／v／v)40mlで溶出した．溶出画分を50ml褐色ナシ型フラスコに採取し，ノナン0.5mlを添加後ロータリエバポレータで1ml以下に濃縮し，ヘキサン-ジエチルエーテル(3：1，v／v)で定容(スズキは5ml，海水は1ml)とした．得られた溶液に1／2量

の1.0M水酸化ナトリウム-5%塩化ナトリウム(1：1, v／v)溶液を加えて振り混ぜ，遠心分離した後有機相を褐色試験管に採取した．中和のため，これに20 μl／ml の割合でヘキサン-ジエチルエーテル-酢酸(75：25：1, v／v／v)を添加後，無水硫酸ナトリウムで脱水して試験溶液とした．

4）測定条件

Table 1 に示した条件で GC 分析し，試料溶液中の TBT 及び TPT をそれぞれ TBTC 及び TPTC として同定及び定量した．同定は標準試料の保持時間との比較によって，また定量はピーク高法で行った．

結果及び考察

1．TBT について

Table 2 に示したように，スズキ中の TBT 濃度は1986年6月が平均値 M＝0.09 μg／g(範囲 R＝0.07-0.11 μg／g，標準偏差 S.D.＝0.02 μg／g)，1987年7月が M＝0.09 μg／g(R＝0.06-0.17 μg／g，S.D.＝0.03 μg／g)，1988年1月が M＝0.02 μg／g(R＝ND-0.05 μg／g，S.D.＝0.02 μg／g，S.D.＝0.02 μg／g)であった．全体では M＝0.07 μg／g(R＝ND-0.17 μg／g，S.D.＝0.07 μg／g)で，最高値は1987年7月の0.17 μg／gであった．これに対し，TPT 濃度は'86年6月が M＝0.85 μg／g(R＝0.34-1.18 μg／g，S.D.＝0.25 μg／g)，'87年7月が M＝1.39 μg／g(R＝0.58-1.98 μg／g，S.D.＝0.43 μg／g)，'88年1月が M＝1.3 μg／g(R＝0.74-1.41 μg，S.D.＝0.24 μg／g)であった．また，全体では M＝1.17 μg／g (R＝0.34-1.98 μg／g，S.D.＝0.51 μg／g) で，最高値は'87年7月の1.98 μg／gであった．

先ず各個体の分析値に着目し，全体及び採取年別に体長または体重と TBT または TPT 濃度の相関，及び TBT 濃度と TPT 濃度の相関を検討したところ，いずれについても相関性は認められなかった．このことは TBT 及び TPT が生体内でジ-体，モノ-体及び無機スズへと代謝分解することを考えれば当然の結果であり，代謝産物を含めて考えなければ相関性を議論しても意味が無いことが明かとなったので，本報では平均値の有意差検定に絞って統計処理し，その結果について考察した．

TBT 濃度について各年間で t 検定した結果，'86年と'87年間には有意差は認められなかったが，'88年1月が'86年6月及び'87年7月より有意に低いことが有意水準0.1%($p<0.001$)で認められた．'88年1月の TBT 濃度

Table 1．GC conditions

Column	1.0m×3.2mm i.d., glass
Packing	2 % Silicone OV-225／Uniport HP (60-80 mesh),
Temperatures	
Column	Programmed：150℃ (4 min), 10℃／min, 230℃ (6 min)
	Isothermal：150℃ (TBTC), 230℃ (TPTC)
ECD	280℃
Injector	250℃,
Carrier gas	N_2, 50ml／min

Table 2．TBT and TPT concentrations of sea bass collected in Tokyo Bay

	'86/June					'87/July					'88/Jan.			
No.	length (cm)	weight (kg)	TBTC (μg/g)	TPTC (μg/g)	No.	length (cm)	weight (kg)	TBTC (μg/g)	TPTC (μg/g)	No.	length (cm)	weight (kg)	TBTC (μg/g)	TPTC (μg/g)
1)	86	5.2	0.11	1.12	1)	54	1.5	0.17	1.68	1)	83	4.7	0.02	1.07
2)	74	3.3	0.08	0.97	2)	56	1.5	0.09	1.15	2)	79	4.6	0.02	1.29
3)	70	3.5	0.10	0.34	3)	53	1.6	0.08	1.70	3)	74	4.2	0.03	1.41
4)	70	3.2	0.11	0.87	4)	52	1.3	0.07	1.72	4)	75	4.2	0.05	1.00
5)	73	3.5	0.07	0.88	5)	60	1.7	0.06	0.58	5)	74	4.2	ND	0.75
6)	83	4.1	0.09	1.02	6)	58	1.6	0.08	1.44	6)	81	4.7	ND	1.11
7)	79	4.0	0.07	0.61	7)	61	1.8	0.06	1.98	7)	85	4.9	0.03	0.74
8)	81	4.8	0.09	1.18	8)	59	1.7	0.08	1.03	8)	84	4.8	0.01	1.30
9)	69	2.8	0.07	0.71	9)	66	2.6	0.12	1.56	9)	84	4.7	0.03	1.09
10)	89	4.6	0.08	0.80	10)	63	2.3	0.08	1.05	10)	80	4.7	0.01	0.99
Mean	77.4	3.90	0.09	0.85		58.2	1.76	0.09	1.39		79.9	4.57	0.02	1.08
S.D.	7.2	0.78	0.02	0.25		4.5	0.39	0.03	0.43		4.3	0.27	0.02	0.22

ND：<0.01 μg／g

が'86年6月及び'87年7月に比べて低くなった理由として，東京湾のTBT汚染がなんらかの原因で一次的に低減化したことも可能性としては否定できないが，これまでの調査結果からその確率は極めて低いので，以下に述べるようにスズキの採取時期による影響と考えた．

すなわち，漁網防汚剤及び船底塗料は貝類，海草等の付着を防止するためのものであるので，生物活動の最も活発な時期に使用するのが通例であり，従ってそれに由来するTBT汚染は5月，6月頃から9月頃にかけて著しくなることが推定される．このことは，Table 3に示すように東京湾の5定点で採取した海水のTBT濃度が，7月の金沢八景及び9月の富津において極端に高くなっていることからも裏付けられる．従って，'86年及び'87年はそれぞれ6月及び7月と夏期に採取したスズキであるため，TBT濃度に有意差が生じなかったのに対し，'88年は1月に採取したスズキであったため，季節差が反映したものと考えられる．以上の推定から，"スズキ中のTBT濃度は季節的に変動し，夏期が冬期より高くなる"という仮説を立て，その妥当性を今回及びこれまでの調査結果に基づいて検討した．

Table 4は，本研究の第Ⅰ報[3]として既に報告した東京湾産スズキの調査結果からt検定に必要なデータを引用したものである．なお既報においては，TBTをビストリブチルスズオキシド(TBTO)として数値化したので，本表ではそれらをTBTCに換算して示してある．そこで，Table 2及び4の値を用いて，'84年4月から'88年1月までの計6回に渡る各採取時期での平均値間でt検定を行ったところ，Table 5に示すように(1), (3), (4), (7), (8), (9), (10), (11), (14)及び(15)の組合せに有意差が認められ，その他の組合せには有意差が認められなかった．

スズキを採取時期によって夏期試料と冬期試料に2分すると，前者には'86年6月及び'87年7月採取試料が，後者には'84年4月，'84年11月，'85年1月及び'88年1月採取試料が属する．仮説によれば，平均値に有意差が生じるのは夏期試料-冬期試料間であり，その他の組合せには有意差は生じない．すなわち，有意差が生じるのはTable 5において破線で囲んだ(3), (4), (7), (8), (10), (11), 及び(14), (15)であり，有意差が生じないのは，(1), (2), (5), (6), (9), (12), 及び(13)である．

従って，Table 5に示したように全15通りの組合せの内t検定の結果が仮説と適合しないのは，(1), (9), 及び(11)の3通りだけで，その他は完全に一致している．ただし，(1)及び(9)は検出限界に近い低濃度において仮説では生じないはずの有意差が生じた場合であり，季節的要因以外の要因が作用したものと考えられること，また(11)は仮説では有意差が生じるはずであるのに，実際には有意

Table 3. TBTC and TPTC concentrations of sea water collected from Tokyo Bay in 1988

(ng/l)

Sampling points	May		July		Sept.	
	TBTC	TPTC	TBTC	TPTC	TBTC	TPTC
Kanazawa–Hakkei	ND	2.2	108.7	17.2	56.5	5.6
Haneda	8.6	15.2	4.7	6.8	4.8	2.2
Sanmaizu	17.0	5.3	7.2	4.3	1.8	4.7
Funabashi	ND	ND	4.2	5.6	ND	6.2
Futtsu	21.5	7.8	17.8	6.1	79.6	10.6

ND : < 1 ng/l

Table 4. TBT concentrations of sea bass

(μg/g)

Sampling time	'84/Apr.	'84/Nov.	'85/Jan.
Number	10	10	10
Range	ND-0.04	0.01-0.07	0-0.15
Mean	0.02	0.04	0.05
S.D.	0.01	0.02	0.05

These values were quoted from the previous report[3], and represented as tributyltin chloride.
ND : <0.01 μg/g

Table 5. Results of t test among mean values of TBT in sea bass

Sampling time	'84／Nov.	'85／Jan.	'86／June	'87／July	'88／Jan.
84／Apr.	(1)2.282＊	(2)1.861	(3)9.899＊＊＊	(4)6.000＊＊	(5)0.000
84／Nov.		(6)0.587	(7)5.590＊＊＊	(8)3.508＊＊	(9)2.236＊
85／Jan.			(10)2.349＊	(11)1.627	(12)1.762
86／June				(13)0.877	(14)7.826＊＊＊
87／July					(15)5.262＊＊＊

＊＊＊$p<0.001$, ＊＊$p<0.01$, ＊$p<0.05$

差が認められなかった場合であるが，T 値が1.627(p 値として0.1178)であり，かい離の程度は極めて小さいと考えられることから，本仮説の妥当性が結論できる．

ところで，スズキは回遊性の内湾，沿岸魚で瀬のある岩礁地帯や礫地帯に生息し，3－4年で60cm前後に成長するといわれており，甲殻類，貝類，小魚を大量に摂取する．本調査において使用したスズキは体長から推定して，ふ化後4－5年以上は経過した加齢魚であり，相当量の TBT を摂取していると考えられる．例えば，著者らが行った調査では，東京湾産のアサリから最高0.32 μg／gの TBT を検出しているので[4]，食物連鎖から単純に類推すれば数 ppm レベルまでの生体蓄積も考えられるところである．しかし，実際のスズキ中の TBT 濃度は，これに比べてかなり低い値となっており，生体内での TBT の半減期が比較的短いことを示唆している．TBT の生物学的半減期については必ずしも明確ではないが，Iwai ら[9－10]はラットの肝，腎，脳及び血液における TBT の半減期をそれぞれ4.4，3.7，6.6，4.6日と報告している．また，Waldock ら[10]によれば，カキ(*Crassostrea gigas*)の *in vivo* での半減期は10日程度であり，著者らが東京湾で採取したアサリを約2週間人工海水で飼育し，TBT 濃度の減少を測定して求めた半減期は約7日であったことから，スズキについても TBT の半減期は10日前後か，あるいはそれ以下と判断することができる．以上のことから，スズキ生体内で TBT は比較的速やかに代謝されるため，汚染の少ない冬期は夏期に比べて TBT 濃度が低くなるものと推測できる．

2．TPT について

次に，各年の TPT 濃度の平均値について t 検定を行ったところ，'87年が'86年及び'88年より有意に高くなったものの'86年及び'88年間に有意差は認められず TPT の場合は TBT の場合ほど顕著には，夏と冬の季節差は蓄積濃度に髪響を及ぼさないことが推定された．

このことは，1）船底塗料あるいは漁網防汚剤として海水中に溶出した TPT が，難分解性であるために，年間を通して同程度海水中に存在するか，あるいは／及び2）スズキ中に蓄積した TPT の代謝分解速度が非常に遅いことを示唆している．1）については TPT の環境中における分解性がほとんど分かっていないので，Table 3 に示した実測値に基づいて考察すると，海水中の TPT 濃度は TBT 濃度と異なり，5定点とも採取時期で著しい差は認められず，TPT は湾内全体に拡散し，均一化していることが推定される．

次に，2）に関連してスズキ体内における TPT の生物学的半減期を，例えば Nagamatsu ら[12]のモルモット(全体)での半減期9.4日，Manabe ら[13]のラット(肝)での半減期10.7日から推定すると，TBT より若干長いものの，著しい差は無いように考えられる．しかし，著者らが，TBT の場合と同様アサリを人工海水中で飼育して半減期を求めた結果では，半減期は30日程度と TBT よりはるかに長い結果となった．従って，TPT の生体内代謝は哺乳類では TBT より若干遅い程度であるものの，魚介類中においてはかなり遅いと考えられ，スズキの場合も TPT の代謝が極めて遅く，高濃度に蓄積することが推定される．

終　言

東京湾で採取したスズキ及び海水中の TBT 及び TPT を分析し，東京湾の汚染について考察した．スズキの TBT 濃度は採取時期の影響を受けることが推定され，夏期に採取した試料と冬期に採取した試料では，前者の濃度が有意に高かった．これは夏期に向かって船底塗料を使用するためであり，このことは7月の金沢八景及び9月の富津定点での海水中の TBT 濃度が特異的に高くなったことから推察された．一方，スズキ中の TPT は季節的要因の影響を受けないことが推定できたが，これは TPT の難分解性及び生物学的半減期が長いことに起因すると考えられた．

文　献

1）高見勝重，奥村為男，山崎裕康，中本雅雄：分析化学，37，449-454（1988）.
2）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）.
3）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）.
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，38，155-159（1987）.
5）竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：東京衛研年報，38，160-166（1987）
6）竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：東京衛研年報，39，93-96（1988）.
7）水石和子，竹内正博，山野辺秀夫，渡辺四男也：東京衛研年報，40，121-126（1989）.
8）竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也，道口正雄：分析化学，38, 522-528（1989）.
9）H. Iwai, M. Manabe, H. Matsui, T. Ono, O. Wada：J. Toxic, Sci., 5, 257（1980）.
10）H. Iwai, M. Manabe, H. Matsui, T. Ono, O. Wada：Jpn. J. Hyg., 35, 194（1980）.
11）R. D. Cardwell, A. W. Sheldon：Orceans '86 Conference Record, 4, G. Urakubo, Y. Aida, Y. Ikeda, Y. Suzuki：Jpn. J. Hyg., 33, 486-496（1978）.
13）M. Manabe, H.Iwai, T. Ono, O.Wada：J. Toxic. Sci., 4, 284（1979）.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 133-136, 1989

豚肉中の残留チアムリンの微生物学的検査法の開発

神保勝彦*, 百瀬礼子*, 丸山務*, 松本昌雄*

Bioassay Method for Residual Tiamulin in Pork

KATSUHIKO JINBO*, REIKO MOMOSE*, TSUTOMU MARUYAMA*
and MASAO MATSUMOTO*

Keywords：残留チアムリン residual tiamulin, 簡易検査法 simplified detection method, SEP–PAK C_{18} カートリッジ SEP-PAK C_{18} cartridge, *Micrococcus luteus*

フマル酸チアムリン[1](以下，チアムリンと略す)は，*Pleurotus milus* の培養ろ液から得られたジテルペン系抗生物質であるプリューロムチリンの半合成誘導体の抗生物質である．チアムリンは主にグマム陽性菌に抗菌力を示すが，とくにトレポネーマ及びマイコプラズマに対して抗菌作用が著しいことから，豚赤痢，豚流行性肺炎等の予防，治療薬として最近汎用されてきており，食用組織への移行残留が懸念されている．しかし，豚肉中に残留するチアムリンの検査法は確立されていないため，本剤の残留実態は明らかでない．そのため，食品衛生上チアムリンの迅速，簡易検査法の開発が望まれている．そこで，豚肉及びその臓器中に残留するチアムリンの検査法，特に微生物学的検査法について検討した．

実験材料および方法

1．チアムリン

実験に供したチアムリンは，日本全薬工業株式会社から分与された純品である．

2．供試菌株

実験に供した指標菌は，*Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 および *Bacillus cereus* ATCC 11778(以下，それぞれ *B.subtilis*, *M.luteus* および *B.cereus* と略す)の計3菌種である．

3．器具

1）ペトリ皿：合成樹脂製で，内径86mmの滅菌したものを用いた．

2）パルプディスク：東洋ろ紙(株)製の直径10mm，厚さ1.2mm(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．

4．試験菌，試験芽胞浮遊液の調製

厚生省が通知した「畜産物中の残留物質検査法[2](以下，厚生省法と略記)」に準じて調製した．

5．使用培地

a）継代保存用培地：普通寒天培地を用いた．

b）増殖用液体培地：*M.luteus* の増殖に感受性測定用ブイヨン(日水)を用いた．

c）検査用培地：Antibiotic Medium No.5 (Difco), Antibiotic Medium No.8(Difco)及び感性ディスク用培地N(日水)の3種類の培地を用いた．

6．検査用培地の作製

検査用培地は121℃—15分間高圧滅菌後，55℃に保持し，これに試験菌液あるいは芽胞浮遊液を所定量混和した．その8 ml をペトリ皿に注入し，水平に静置し凝固させて平板培地を作製した．

7．チアムリン抽出液

豚肉及び豚肝臓中のチアムリンの抽出には，メタノール1,000ml に1 N–HCI を1 ml 加えて調製した酸性メタノール液を用いた．

8．リン酸緩衝液

pH 4.5リン緩衝液(B–1)，pH 6.0リン緩衝液(B–12)及び pH 8.0リン緩衝液(B–5)は，厚生省法に準じて調製した．pH 7.0リン酸緩衝液は M／15 Na_2HPO_4 6 ml に M／15 KH_2PO_4 4 ml を加えて調製した．

9．ミニカラム C_{18}カートリッジ

ウオータズ社製の SEP–PAK C_{18}カートリッジ(SEP–PAK)をメタノール5 ml，蒸留水5 ml の順に湿潤洗浄処理[4,5]して用いた．

*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 Reserch Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku–ku, Tokyo, 169 Japan

試料 10g
| 酸性メタノール 20ml
| ホモジナイズ
| 遠心分離 3,000rpm 15分間
上清液
| ヘキサン 10ml
メタノール層
| n-ブタノール 5ml
| 40℃以下で減圧乾固
残渣
| pH 4.5リン酸緩衝液 20ml
SEP-PAK C_{18}
| 蒸留水 10ml
| メタノール 5ml
溶出液
| 40℃以下で減圧乾固
残渣
| pH 8.0リン酸緩衝液
試験液
|
パルプディスク
|
*M. luteus*平板培地

図1．豚肉中のチアムリン検査法

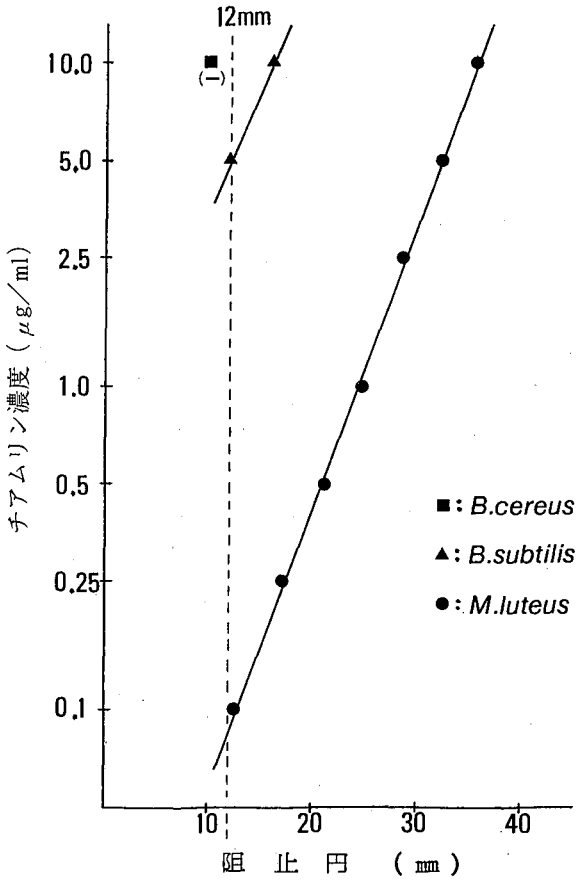


図2．チアムリンに対する試験菌の感受性

10. 試験液の調製

著者らが考案したSEP–PAKを用いる方法[8]に従って調製した．すなわち，図1に示したように，試料10gに酸性メタノール液20mlを加えホモジナイズした後，3,000rpmで15分間遠心分離した．上清液にヘキサン10mlを加えてよく攪拌した後，メタノール層を採取し，これにn-ブタノールを10ml加えてから40℃以下で減圧乾固した．その残渣をB–1液20mlで溶解し，この溶解液を1.5ml／minの流速でSEP–PAK中を通筒させた．このSEP–PAKは蒸留水10mlを通筒し洗浄した後，吸着したチアムリンをメタノール5mlで溶出した．溶出液は40℃以下で減圧乾固し，その残渣をpH 8.0リン酸緩衝液1mlで溶解して，これを試験液とした．

11. 試験法

試験液中に浸漬したパルプディスクを検査用平板培地に置き，18±1時間培養した．なお，培養温度は*B.subtilis*が35℃±1，*M.luteus*及び*B.cereus*が30℃±1で行った．パルプディスク周辺に形成した阻止円の直径が12mm以上のものを陽性と判定した．

実験結果および考察

1．チアムリンに対する試験菌の感受性

残留抗生物質検査の指標菌として，一般に用いられている*B.subtilis*，*M.luteus*及び*B.cereus*の3試験菌のチアムリンに対する感受性を調べた．それらの検量線を図2に示した．*M.luteus*が0.1μg／mlと最も高い感受性を示した．*B.subtilis*は5.0μg／mlと低く，*B.cereus*は10μg／mlに対して感受性を示さなかった．このことから試験菌として*M.luteus*が使用可能であることが判明した．

2．pHの差による抗菌力の変動

ある種の抗生物質はpHの変動により抗菌力が異なることが知られている[6,7]．そこで，試験液のpHを6.0，7.0及び8.0に調整し，これらに対するチアムリンの抗菌力を調べた．その成績は図3に示した．チアムリンの抗菌力はpHが6.0，7.0，8.0と高くなるほど強くなる傾向がみられ，pH 6.0で1.0μg／ml，pH 7.0で0.25μg／

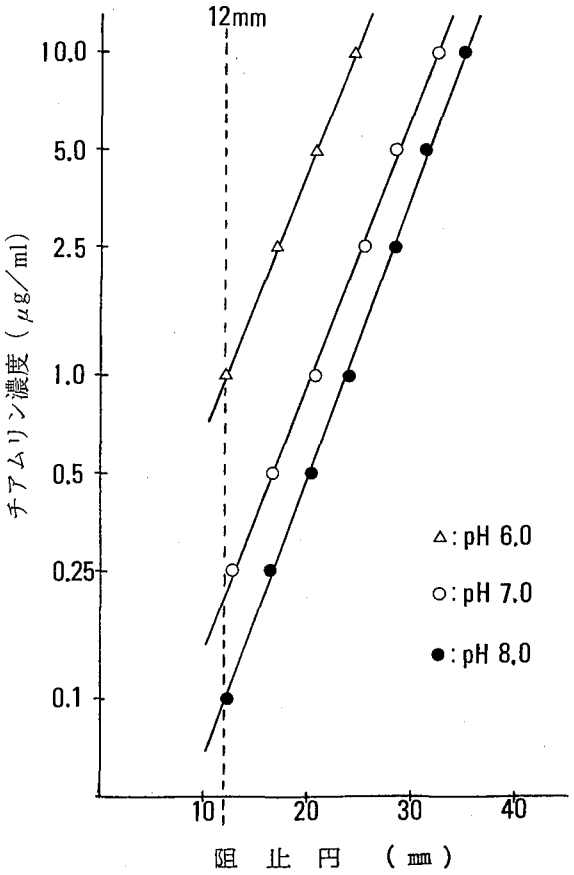


図3．試験液の比較

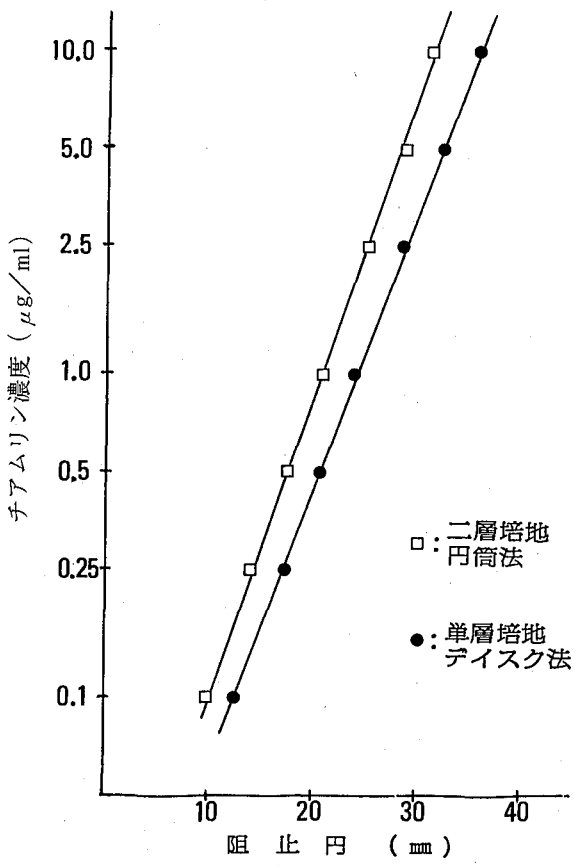


図4．二層培地・円筒法と単層培地・ディスク法の比較

ml, pH 8.0で0.1 μg／ml の感受性を示した．このことから，チアムリンの検出感度は試験液の pH を8.0とし，pH 8.0の培地を用いれば検出感度は上がることが考えられた．

3．試験法の比較

微生物学的検査法では，主に二層培地・円筒法と単層培地・ディスク法が用いられていることから，この二法の比較を行った．その成績は図4に示した．二層培地・円筒法と単層培地・ディスク法の検出感度は同じ0.1 μg／ml であった．しかし，形成される阻止円は単層培地・ディスク法の方が大きく，鮮明であったことから，チアムリンの試験法としては試験操作が簡易な単層培地・ディスク法が適当であることが判明した．

4．チアムリンの SEP-PAK への吸着

pH の異なるリン酸緩衝液(B–1, B–12, B–5)で溶解したチアムリン液(0.5 μg／ml)を対象に，SEP–PAK におけるチアムリンの吸着を調べた結果，B–1で90%，B–12で65%，B–5で45%の吸着率を示した．このことから，チアムリンの SEP–PAK への吸着は pH 4.5のB–1緩衝液が適当であることが判った．

また，SEP–PAK からのチアムリンの溶出にメタノールを使用したところ，メタノール 5 ml 中に100%溶出することが判った．

これらの結果から，チアムリンの検出には，試料中のチアムリンを SEP–PAK に吸着させ，その溶出液を減圧乾固し，pH 8.0リン酸緩衝液で溶解したものを試験液とする．試験菌は *M.luteus*，検査用培地は Antibiotic Medium No. 5，試験法は単層培地・ディスク法とすることが結論された．以下，この方法を東京都立衛生研究所法とし，以下，都衛研法と略記する．

5．豚肉および豚肝臓中のチアムリンの検出

チアムリンを実験的に添加した豚肉および豚肝臓を対象に，都衛研法と多くの残留抗菌物質を定性的に検出できるとされている厚生省法第1集の5で検出試験を行った．その成績は表1に示した．都衛研法では0.05 μg／g 添加した豚肉から検出され，残留抗菌性物質検査の検出

表1．豚肉および豚肝臓からのチアムリン検出成績

検査法	検体名	チアムリン添加量（μg／g）						
		0	0.025	0.05	0.1	0.25	0.5	1.0
都衛研法	豚肉	−	−	+	+	+	+	+
	豚肝臓	−	−	+	+	+	+	+
厚生省法	豚肉	−	−	−	−	−	−	−
第1集の5	豚肝臓	−	−	−	−	−	−	−

感度としては十分満足できる値であった．また，豚肝臓でも同様の結果が得られた．これに対して，厚生省法第1集の5では，1.0μg／g添加した豚肉及び豚肝臓から検出することができなかった．このことから，本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肝臓にも十分応用できることが判明した．これに対して，厚生省法第1集の5では，チアムリンは検出されないと考えられる．また，これまでに通知されている厚生省法にはチアムリンを対象とした個別検査法がないことから，本法はチアムリンの個別検査法として適用できると考える．

6．チアムリン以外の抗菌性物質の検出感度

各系統の代表的な抗菌性物質を添加した豚ひき肉を対象に，都衛研法におけるそれら抗菌性物質の検出感度を調べた．その成績は表2に示した．チアムリンは0.05μg／g添加した豚肉から検出された．これに対して，チアムリン以外の抗菌性物質は低濃度添加した豚ひき肉からは検出されず，検出感度は低いことが判った．すなわち，アンピシリン(ABPC)は0.1μg／g，リン酸タイロシン(TS)は5.0μg／g，塩酸オキシテトラサイクリン(OTC)は10μg／g，硫酸カナマイシン(KM)は100μg／g，スルファモノメトキシン(SMM)は10μg／g以下を添加した豚ひき肉からは検出されなかった．このように，都衛研法の検出感度はチアムリン以外の抗菌性物質に対しては極めて低かったことから，市販豚肉中に残留するチアムリン以外の微量の抗菌性物質は，本法ではほとんど検出されないものと考えられる．

結　論

豚肉中に残留するチアムリンを簡易，迅速に検出する検査法について検討し，次の結果を得た．

1．豚肉中のチアムリンは酸性メタノール液で抽出し，SEP−PAKに吸着させた後，メタノールで溶出した．溶出液は減圧乾固し，その残渣をpH 8.0リン酸緩衝液で溶解して，これを試験液とした．

2．試験液について，試験菌は*M. luteus*，検査用培地はAntibiotic medium No. 5を用いて，単層培地・ディスク法で検査する方法を考案した．

表2．各種抗菌性物質に対する都衛研法の検出感度

抗菌性物質	検出感度（μg／g）
チアムリン	0.05
ABPC	0.1
TS	5.0
OTC	10.0
KM	100.0
SMM	10.0

3．本法のチアムリンの検出感度は0.05μg／gであり，残留抗菌性物検査としては十分満足できる値であった．

4．本法のチアムリン以外の抗菌性物質の検出感度は低く，ABPCは0.1μg／g，TSは5.0μg／g，OTCは10μg／g，KMは100μg／g，SMMは10μg／gであった．

5．本法は筋肉だけでなく，肝臓にも応用することができた．

文　献

1）(財)畜産生物科学安全研究所：動薬情報 5，71−74，1981.

2）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.

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5，1983.

4）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.

5）神保勝彦，百瀬礼子，丸山　務，松本昌雄：東京衛研年報，39，108−111，1988.

6）二宮幾代治：動物の抗生物質，1988，養賢堂.

7）桐谷礼子，神保勝彦，松本昌雄：東京衛研年報，38，177−181，1987.

8）神保勝彦，百瀬礼子，丸山　務，松本昌雄：日本食品衛生学会第52回学術講演会　講演要旨集，1988.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 137-140, 1989

高速液体クロマトグラフィーによるサルファ剤の分析
—輸入豚肉におけるスルファメサジンの残留—

堀 井 昭 三*, 神 保 勝 彦*, 橋 本 常 生*,
井 草 京 子*, 丸 山 務*

High-perfomance Liquid Chromatographic Analysis of Sulfonamides
— Residual Sulfamethazine in Imported Swine Muscle —

SHOZO HORII*, KATSUHIKO JINBO*, TSUNEO HASHIMOTO*,
KYOKO IGUSA* and TSUTOMU MARUYAMA*

Residual sulfamethazine in imported swine muscle was surveyed. The compound was detected at levels of 0.05 to 1.56 ppm in 35 samples out of 268. The detected substance was identified as fruorescamine derivative by means of HPLC, and bio–assay. All samples in which sulfamethazine was detected were imported from Taiwan. Moreover, sulfadimethoxine was detected at levels of 0.05 and 0.75 ppm in 2 samples.

Keywords：サルファ剤 sulfonamides, スルファメサジン sulfamethazine, スルファジメトキシン sulfadimethoxine, スルファモノメトキシン sulfamonomethoxine, 高速液体クロマトグラフィー High–performonce liquid chromatography, 豚肉 swine muscle

サルファ剤は半世紀以上の歴史を有する代表的な合成抗菌剤であり，現在ではヒトへの使用は，減少しているが，動物医薬品として，家畜の疾病の予防，治療さらには発育促進の目的で，世界中で汎用されている．

1988年3月，厚生省は米国から輸入した豚肉にスルファメサジンが残留していることを発表し，各都道府県にこれらの調査を指示すると共に，分析法[1)]を通知した．食品中に残留するサルファ剤の分析については，化学的，微生物学的，免疫学的等多様な報告がなされており，これらを解説した，Horwitz による詳細な総説[2)]もある．今回，厚生省が通知した分析法は，アセトン抽出したものを，精製し高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で定量する方法であり，堀[3)]の報文に基ずいている．

今回著者等は，都内に流通する豚肉のうち，主として，輸入品を対象にサルファ剤の残留実態を調査するとともに，食肉中のサルファ剤の分析法についても若干の検討を加えた．

実験材料と方法

1．試料 1988年3月，都内に流通する輸入品を主とした，豚肉268検体を採取し用いた．

2．試薬 スルファメサジン，スルファジメトキシン標準品は Sigma 製，スルファモノメトキシン標準品は第一製薬製，その他の試薬は市販特級品を用いた．

3．装置 HPLC：ポンプ・880pu 検出器・UV・870-UV(日本分光工業製)，蛍光・F-1000(日立製作所製)，データー処理装置 CR-6A・(島津製作所製)

4．分析方法

HPLC 法・UV検出は厚生省通知[1)]，蛍光検出は岸原等[4)]，バイオアッセイは神保等[5)]の方法に準処した．

結果と考察

豚肉中の残留サルファ剤の分析は，厚生省通知の方法[1)]で行い，その成積を Table 1．に示した。はじめに我国を含む7カ国53検体を調査したところ，台湾産の1検体からのみ，スルファメサジンを1.2ppm 検出した。その他の国や国産のものからは，検出されなかかったため，次の調査は台湾産のものに限定し，さらに215検体を分析したところ，34検体から，0.05～1.56ppm の範囲でスルファメサジン(平均0.44±0.40ppm，検出率

*東京都立衛生研究所生活化学部乳肉衛生研究科 169 東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metroplitan Reseach Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku–ku, Tokyo, 169 Japan

Table 1. Incidence of Residual Sulfamethazine in Swine Muscle (Tokyo, 1988)

Countries	No. of Samples	Detected Numbers (%)	Concentrations (ppm)
U. S. A.	13	0	—
Denmark	9	0	—
Canada	9	0	—
Ireland	1	0	—
Korea	1	0	—
Japan	10	0	—
Taiwan (Ⅰ)	9	1(11.1)	1.2
Taiwan (Ⅱ)	215	34(15.8)	0.05～1.56 (0.44±0.40)

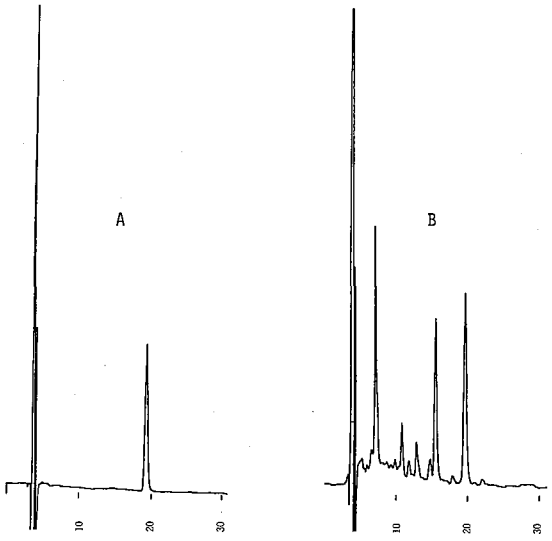


Fig. 1. Liquid Chromatograms of Sulfamethazine (A) and the Extract from Swine Muscle (B)

Table 2. HPLC Conditions

Column ; Nucleosil 100 C18, 5 μ, 4.6 ϕ ×250mm
Flow Rate ; 1 ml／min
Column Temp ; 40°C
Mobile phase ; Fig. 1. acetonitrile／acetic acid／water = 15／1／85
Fig. 2., 3. acetonitrile／10mM potassium dihydrogenphosphate = 22／78
Fig. 4. acetonitrile／phosphate buffer (pH7.0)=30／70
Wave Length ; Fig. 1.～3. UV 272nm, Fig. 4. ex. 415nm., em. 490nm

15.8%)を検出した。厚生省の調査によれば，米国産の豚肉からスルファメサジンを，0.4ppm 検出しているが，今回の著者等の調査では，米国産のものからは，一例も検出されなかった。

Fig. 1 に典型的な液体クロマトグラムを示し，その条件は Table 2. に示した。スルファメサジンは19.8分に夾雑物と分離したシンメトリックなピークとして得られた。HPLC でスルファメサジンが検出された検体は，神保等[5]の開発したバイオアッセイ法で，サルファ剤であることを確認した。HPLC でスルファメサジンが検出されなかった全検体についても同様にバイオアッセイを行なったところ 2 検体(171検体中)にサルファ剤の存在が疑われた為，HPLC による検索を続けた。厚生省法[1]による移動相では，同定不可能であったが，移動相を10 mMKH_2PO_4：アセニトリル=78：22に変えたところ，スルファジメトキシンと同一保持時間を有する物質が存在することが判明し，さらに岸原等の方法によっても，この物質がスルファジメトキシンと同一保持時間を有したことから，本物質をスルファジメトキシンと同定した(濃度0.05,0.75ppm)(Fig. 2, 4)。

Fig. 2 は移動相を，10mMKH_2PO_4とアセニトリルの混液にした時のものであるが，スルファジメトキシンは，22分前後のあまり定量に支障のない保持時間を示した。さらに，Fig. 2 によれば，ピーク形状は良好で，実用的な移動相と言える。Fig. 3 は，この移動相を使用すれば，我国で汎用されている，もう一つのサルファ剤であるスルファモノメトキシンを含め，3 種のサルファ剤の同時分析が可能となることを示している。今回の厚生省通知法はあくまでスルファメサジンの分析法であり，この移動相によればスファジメトキシンの保持時間は90分以上となり同定は，事実上不可能である。著者等は，今回の

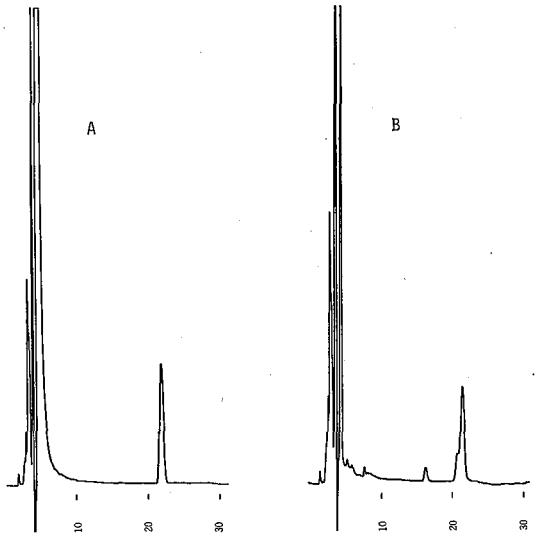


Fig. 2. Liquid Chromatograms of Sulfadimethoxine (A) and the Extract from Swine Muscle (B)

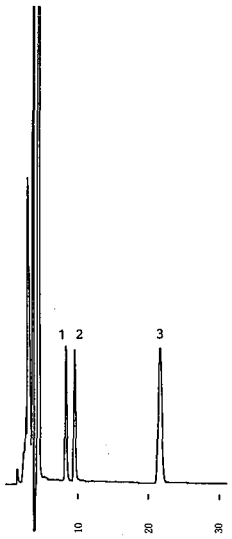


Fig. 3. Liquid Chromatogram of Sulfonamides peaks : 1 ; sulfamethazine, 2 ; sulfamonomethoxine, 3 ; sulfadimethoxine

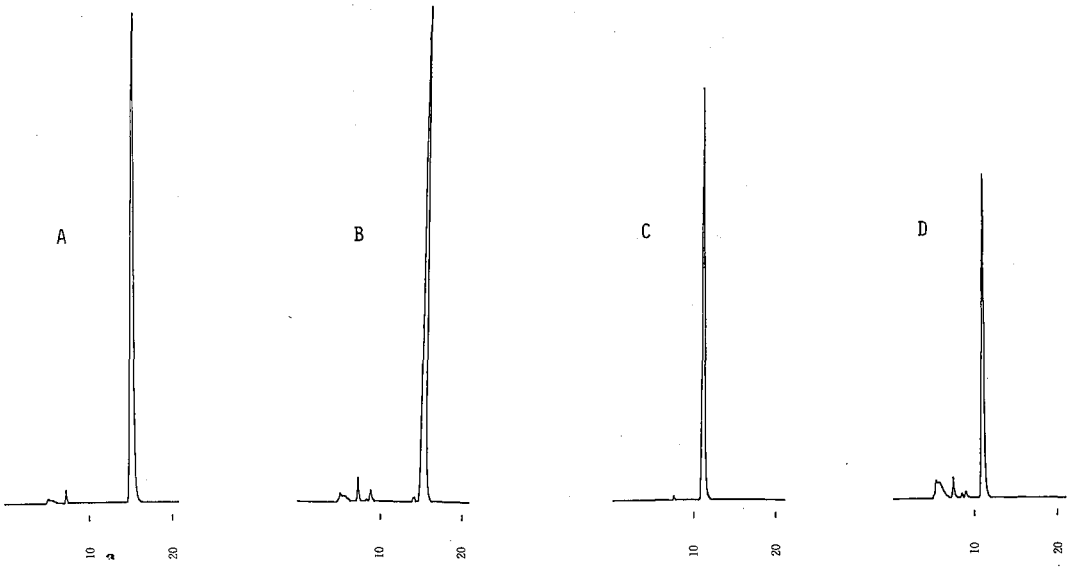


Fig. 4. Liquid Chromatograms of Sulfamethazine–fluorescamine Derivative (A), Sulfadimethoxine–fluorescamine Derivative (C) and the Extract from Swine Muscle (B,D)

輸入豚肉以外にも，日常の検査業務の中でサルファ剤を含む抗菌性物質の分析を行っているが，特定のサルファ剤に限定した分析法は実際的ではない。今回の実態調査からみても，少なくとも畜水産食品中に残留するサルファ剤を分析する際には，使用量の多いスルファメサジン，スルファモノメトキシン，スルファジメトキシンの三者の同時分析が可能とならなければならない。厚生省法では，移動相を変えても，試料由来のピークがスルファジメトキシンの直前に存在し(Fig. 2)，又，溶媒濃縮の際突沸しやすく，操作も煩雑である等，改良の余地がある。

検出されたスルファメサジン，スルファジメトキシン共に HPLC(UV)とバイオアッセイで二重に確認したが，さらに岸原等のフルオレスカミンによる蛍光誘導体化法[4]に準拠し，三重の確認を行った。サルファ剤の pka と溶解性は，それぞれかなり異なるが，Fig. 4 と Fig. 1-3では，移動相の PH の相違のためか，各サルファ剤の溶出順序が逆転している。サルファ剤を分析する際，HPLC 等化学的なある一つの方法のみで同定すれば，誤認する可能性もあり，一つの化学的検査法だけによらず他の化学的方法さらには，バイオアッセイも併せて実施することが望ましい。サルファ剤だけではなく抗菌性物質の検査には，化学的な方法と微生物的な方法の両面からのアプローチが重要である。

要　約

1．7カ国計268検体の豚肉中の残留サルファ剤を分析したところ，台湾産(225検体)のもの35検体から，スルファメサジンが0.05～1.57ppm の範囲で，スルファジメトキシンが2検体から0.05及び0.75ppm 検出された。

2．全268検体のバイオアッセイによる確認を行った。

3．サルファ剤の検出されたものは，蛍光誘導体化を行いさらに確認した。

4．食品中の残留抗菌性物質の検査は，化学的な手段と微生物な手段の両面から実施するのが望ましい。

謝辞：本調査は昭和63年度に実施した衛生局の特別監視事業によるものであり，試料採取に御協力いただいた東京都衛生局の各位に感謝致します。

文　献

1）厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜水産食品中の残留物質検査法，第2集の8，1988.

2） Horwitz, W. : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64, 104-130, 1981.

3）堀義宏：食衛誌，24，447-453, 1983.

4）岸原聡，下川千賀子，泉広栄：石川衛公研年報，20, 198-204, 1983.

5）神保勝彦，桐谷礼子，松本昌雄：日本食衛生学会第52回学術講演会講演要旨集，35，1986.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 141-148, 1989

食品の化学検査における食品衛生法違反事例（第1報）

田 村 行 弘*，二 島 太一郎*

The Case of Contravention of the Food Sanitation Law in Chemical Test of Foods (I)

YUKIHIRO TAMURA* and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords：食品添加物 food additive，保存料 preservatives，人工甘味料 sweetening agents，漂白剤 bleaching agents，着色料 food colours，防かび剤 fungicides，酸化防止剤 antioxidants，キャリーオーバー carry over

加工食品の利便性が消費者に広く受け入れられ，その種類が豊富になると同時に，生産量も大巾に急増している．また，加工食品は製造，加工，包装等の飛躍的な技術の向上と，流通改革により一層衛生的な形で供給されるようになった．

これらの加工食品の普及には，食品添加物(以下，食添と略す)の果たす役割は大きく，食品の品質保持，食欲増進等のために広く使用されている．この食添は適正に使用される場合には問題が少ないが，ときには見せ掛けの鮮度や味を装おったり，保存性を高める等のために故意に添加することで，例えば，うどんに使用した過酸化水素[1]，中国飯店症を起こしたグルタミン酸[2]，食肉の鮮度をごまかすために使用されたニコチン酸[3]等による食中毒事件が起きている．また，食品衛生法の理解不足のために，誤った使用をして社会問題になった生鮮野菜に使ったリン酸[4]等の違反事例等もある．

一方，輸入食品の中には指定外添加物が使用されていたために，積戻し又は廃棄される食品が毎年相当量に上っている．その原因は輸入業者の事前の法的な調査が不十分なためと考えられる．

筆者らは，都内で流通している食品について，食添の適正使用，食品の腐敗や変質，あるいは有害物質の混入等の有無について，化学的な試験検査を行なっている．

今回，当科の日常業務において取り扱った年間約5万件にも及ぶ食品の化学検査の結果から，昭和59年から63年の5年間の食品衛生法に基づく違反事例についてまとめ，食品衛生向上に，また今後の検査を効率的に推進するための参考に供することとした．なお，生鮮食肉，魚介類やその加工品，及び食中毒に関するものは除いた．

また，Table 3-6に示した違反条文はいずれも食品衛生法に基づくもので，第4条2は第4条2項の略(以下同様)であり有害物質の混入による違反，第6条(指定外)は指定外添加物の使用に関するものである．更に，第7条2(過量)及び(不正)は指定食品添加物の過量使用及び対象外の食品への使用，第11条2(表示)は使用した食添の表示義務を怠ったものである．豆類成分規格は食品の規格基準の内，豆類の成分規格違反，また菓子指導不適は昭和52年11月16日付環食第248号“菓子の製造，取扱いに関する衛生上の指導について”に基づく不適に関するものである．

1．主要な違反事例

過去5年間の違反事例の内，社会的に特に注目されたもの，規模が比較的大きかったもの，あるいは他の道府県に影響が及んだものをまとめてTable 1．に示した．なお，昭和60年度のワイン[5]，61年度の激辛即席麺[6]，62年度の清涼飲料水(カフェオレ)[7]については，すでに報告したので詳細については省略する．

(1) 合成甘味料を検出した乾燥梅干・話梅

昭年59年6月に実施した「食品衛生夏期対策事業」において，収去した話梅(ホアメイ)から指定外合成甘味料と共にサッカリンが検査された．その後，広域に流通している恐れが高まったために，更に緊急監視が実施された．

これらについて検査した結果，44検体中33検体からサイクラミン酸とズルチンの指定外合成甘味料，及びサッカリンの不正使用が発見された．また，この内8割のものは3者の混合物で，サイクラミン酸1.4-36 g／kg，ズルチン0.02-3.8 g／kg，サッカリン5.1-21 g／kg(ナト

*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

リウム塩として)を検出した．違反品は赤色又は淡褐色で，いずれも砂糖様の結晶又は粉末が表面に付着しており，分析時に空気中に甘味料が漂い，口の中が甘くなるほどであった．

また，これら違反品は食品機動監視班による立入検査の結果，中華料理店及び中華材料販売業者等5,957軒の内120軒が所持しており，その総量は145kgにも達した．入手経路は台湾からの旅行者の土産等として日本に持ち込まれたもので，いずれも約600 g の合成樹脂製袋詰で，「上庄話梅」,「高級話梅」等の名称があり、15種類が確認された．これら違反品はいずれも廃棄処分となった．

(2) **指定外添加物を検出したアイスクリーム原料**

昭和60年8月8日付の新聞で，西ドイツにおいて『ジエチレングリコール類似物質がイタリア産アイスクリームから検出された』旨の報道がなされた．その後，厚生省は関係輸入業者5社の内4社が都内にあることを明らかにし，同時に業者に自主検査を要請した．その結果，1社の2検体からジエチレングリコールモノエチルエーテル(以下 DEGMEE と略す)が検出されたので，都に対して調査の要請があった．

都の調べで，昭和59年から60年8月にかけて約60種類のアイスクリーム原料が輸入され，都内では卸売業者や製造業者等13ヶ所に流通していることが明らかになった．収去された検体はアイスクリームの原料，香料及び製品であった．検査の結果，アイスクリーム香料1検体から760,000ppm，アイスクリーム原料30検体から10ppm-17,000ppm 検出された．また他科で検査した製品1検体から14ppm 検出された．

DEGMEE は香料の溶剤としてイタリアやオランダで許可されていたが，日本ではその使用が認められていないため第6条違反になる．しかし，製造工程で溶剤として数%から数10%使われた場合は第6条違反として扱うが，微量検出の場合には抽出溶媒として使用されたものの残留あるいはコンタミの可能性もあると考えられるため，使用状況を確認した上で処分する必要があるとされた．違反となったものは都全体でアイスクリーム原料が28種類1,652kg，香料が1種類，製品が16 ℓ で，各々関係区で販売禁止命令の行政処分を行なった．

(3) **リン酸塩使用の生鮮野菜**[4)]

昭和61年3月頃から報道機関や国会で生鮮野菜の化学薬品処理の問題が取り上げられた．これは消費者に対するごまかし行為であるとして，厚生省は昭和61年6月に『生鮮食品への食品添加物の使用を禁止する』旨の指導基準を定めた．リン酸塩は生鮮野菜の表面，あるいは皮剝き又は切り刻んだ際の変色防止，さつまいもの皮の発色の目的で使われたもので，これは先の昭和31年から33年にかけて，さつまいもや皮剝きさといもに使われた硫酸事例(食品衛生法通則第1203号)の再現であった．

生鮮野菜類に対する基準が定められた後の3年間の都全体の検査結果を Table 2．にまとめて示した．昭和61年当初に較べて，陽性率は減少傾向にあり，特に改善の跡がみられたものは根しょうが，さつまいも，もやしで

Table 1．最近5年間における主な違反事例

年度	品名	検出件数	違反理由
59年度	乾燥梅干・話梅（ホワメイ）	33／44件	サイクラミン酸及びズルチンの検出 サッカリンの過量使用
	はと麦，製餡用豆	4件	10 ppb 以上のアフラトキシン B_1検出
60年度	ワイン	96件	ジエチレングリコールの検出
	アイスクリームベース	31／70件	ジエチレングリコールモノエチルエーテルの検出
	ナツメッグ	7件	10 ppb 以上のアフラトキシン B_1検出
61年度	激辛即席麺の粉末スープ	24件	ポリソルベートの検出
	ナツメッグ	3件	10 ppb 以上のアフラトキシン B_1検出
	生鮮野菜類	105／390件	リン酸塩の不適正使田
62年度	果汁原料，氷菓及び清涼飲料水（グァバパルプ）	35件	アゾルビンの検出
	ナツメッグ	2件	10 ppb 以上のアフラトキシン B_1検出
	生鮮野菜類	133／571件	リン酸塩の不適正使用
	清涼飲料水（カフェオレ）	1件	過酸化水素　14 g／kg検出
63年度	グレープフルーツ	6／16件	ジフェニルの過量残存使用
	ピスタチオナッツ	4／61件	10 ppb 以上のアフラトキシン B_1検出

ある．しかし，全体的には規制されて3年を経過しているにもかかわらず，依然としてリン酸塩が使用される状態にある．これは変色せずに白い状態にあるものは商品価値が高く，また消費者に好まれることから，製造加工業者も使用せざるを得ないものと考えられる．しかし，このようなことは鮮度のごまかしであることから，今後もきびしく指導及び取り締りをする必要がある．

(4) 指定外着色料含有輸入冷凍果汁

昭和62年7月の清涼飲料水製造業の監視において，収去した清涼飲料水の原料果汁「ピンクグァバパルプ」から，指定外添加物のアゾルビン(赤系色素，C.I. 14720)が検出された．当該品は清涼飲料水や氷菓などに広く使用されていたことから，製品の販売禁止と回収が東京都から指示された．

検査の結果，原料冷凍果汁のピンクグァバパルプ，清涼飲料水，業務用氷菓(シャーベット)等，収去検体数35検体中25検体からアゾルビンが検出された．

この原料冷凍果汁は輸入業者一社から供給されたもので，卸業者，中卸業者，清涼飲料水製造業者等15社にも販売され，全国的に再加工され流通していた．また，この着色料は果汁の持つ天然色素の補正用として添加されたもので，輸入業者の事前調査及び検査が，不十分なために起きた事例であった．なお，違反した冷凍果汁は24,280kg，清涼飲料水及びシャーベット等の製品は8,432ℓであり，販売禁止及び廃棄処分された．

(5) ジフェニルが過量に残存したグレープフルーツ

昭和63年7月に輸入果実類の一斉監視を実施したところ，食品衛生法で定めるジフェニルの残存基準値(0.07g／kg)を超えたイスラエル産グレープフルーツが発見された．その結果はイスラエル産16検体中6検体からジフェニルが0.073-0.090g／kg検出された．なお，これからオルトフェニルフェノール及びチアベンタゾールが同時に検出されたが，いずれも基準値の範囲であった．

適量のジフェニルを検出したグレープフルーツは，いずれもやや小粒で，ジフェニルは果皮のみに存在し，94ppm を検出した果皮でも果肉においては検出されなかった．この傾向は前報[8]の結果と同様であった．回収したものは373カートン(6.5トン)で，イスラエル産全輸入量の0.23%に相当する量であった．我が国に輸入されるグレープフルーツは，米国産が62年度で約1,225万カートンで輸入総量の97%を占め，イスラエル産は約30万カートンで全体の2.4%にすぎないが，米国産の端境期に輸入されている．過去の同様の違反事例は昭和52年12月に米国産グレープフルーツ(12検体)が発見されているが，その後の違反事例はなかった．

(6) アフラトキシンを検出したピスタチオナッツ

昭和63年11月から12月にかけて輸入食品の衛生対策事業の一環として，輸入ナッツ類の一斉監視を実施したところ，イラン産ピスタチオナッツ1検体から規制値を超えるアフラトキシン B_1 が検出された．そこで更に緊急監視を行ったところ新たに3検体が見つかった．その内訳はアフラトキシン50検体，その他のナッツ類11検体で，10 ppb を超えてアフラトキシン B_1 を検出したものはイラン産ピスタチオナッツ4検体であり，各々12，103，107，1380 ppb のアフラトキシン B_1 を検出した．

ピスタチオナッツは，国産ピーナッツの不作と健康食品的要素を持つことの人気とが重なったために，輸入量の急増を招き，粗悪品の混入が起きたものと思われる．特にイラン産のものは通産統計によると昭和61年から63

Table 2．生鮮野菜類のリン酸塩の3年間の検査結果

品 名	昭和61年			昭和62年			昭和63年		
	陽性数	検査件数	陽性率%	陽性数	検査件数	陽性率%	陽性数	検査件数	陽性率%
洗いさといも	12	20	60.0	13	24	54.2	8	14	57.1
れんこん	3	27	11.1	34	89	38.2	14	65	21.5
根しょうが	45	66	68.2	43	115	37.4	22	110	20.0
さつまいも	12	65	18.5	34	193	17.6	6	105	5.7
もやし	13	38	34.2	7	40	17.5	0	38	0
切りごぼう	11	31	35.5	1	16	6.3	0	19	0
洗いごぼう（丸）	1	39	2.6	1	50	2.0	2	54	3.7
やまいも等	8	104	7.7	0	44	0	2	78	2.6
計	105	390	26.9	133	571	23.3	54	483	11.2

年の3年間で605 t，2,491 t，7,100 t と10倍の増加を示している．過去のピスタチオナッツの違反事例では，昭和56年9月に市販のイラン産のもの74検体中5検体から231～1,830 ppb のアフラトキシン B_1が検出され，約315kgが回収，廃棄処分されている．

また，Table 6．に示したように昭和63年4月の菓子類製造業特別監視で製菓材料のピーナッ加工品1検体から13.9 ppb，同年11月の食肉製造業一斉監視でナツメッグ1検体から10.9 ppb のアフラトキシン B_1が検出されている．以上の他に，昭和59年度にはは と麦及び製餡用豆類，更に60年度から62年度にかけてナツメッグからアフラトキシン B_1が検出されているが，既に報告[9]したので本報告では省略する．

本事例のピスタチオナッツのように輸入量が急増したり，あるいは生産量が急増するような場合には，とかく事件の起こる可能性があることから，統計面のチェックも検査するために重要な指標になる．

2．保存料，甘味料及び漂白料に関するもの

過去3年間の保存料，甘味料及び漂白料に関する違反事例を Table 3．及び4．に示した．

ソルビン酸では，漬物，餡製品，煮物，ワインに多く違反事例が認められ，漬物では過量使用が，その他のものでは表示違反が多かった．オリーブからソルビン酸が検出された事例の原因は，塩蔵時の表面カビ発生防止の目的で使われるものであり，これは輸入業者を通じて食品監視課から原産国への再三にわたる問い合わせの結果から明らかになった．21検体のオリーブのビン又は缶詰について検査を行なったが，ソルビン酸を検出したものが3検体，安息香酸を検出したものが2検体であった．この安息香酸も使用目的はソルビン酸と同じである．検査した一部のものに酢漬もあったが，酢漬製品は昭和56年9月24日付環食第214号の“つけものの衛生規範”でpH 4.0以下のものと定められており，当該品はいずれもpH 4.0以上であり，酢漬製品に該当しないものであった．

Table 3．保存料に関する違反事例

	品　　名	違反件数	検出量(g/kg)	違　反　条　文
	酢漬（生姜，大根，しば漬等）	5	0.55－0.84	第7条2（過量）
	長なす辛子漬	1	3.37	第7条2（過量）
ソ	赤じそ茶漬（醤油漬）	2	1.22，1.44	第7条2（過量）
	きゅうり甘酢漬（アメリカ）	1	0.20	第11条2（表示）
	餡，練り餡等	4	0.04－0.73	第11条2（表示）
ル	こし餡	3	1.12－1.27	第7条2（過量）
	練りきり，水羊羹等	4	1.16－3.12	第7条2（過量）
	煮豆，豆きんとん	2	0.48，0.56	第11条2（表示）
ビ	にしんの煮物	1	0.34	第7条2（不正）
	甘細こんぶ	2	1.12，1.32	第7条2（過量）
	メンマ	1	0.35	第7条2（不正）
ン	乾燥果実（プルーン）	3	0.32－1.14	第7，11条2（過量，表示）
	のしいか	2	1.36，1.29	第7条2（過量）
	ワイン（西ドイツ）	10	0.03－0.20	第11条2（表示）
酸	ホットタコソース（アメリカ）	1	0.55	第11条2（表示）
	メイプルシロップ（カナダ）	1	0.64	第7条2（不正）
	オリーブ（モロッコ，イタリア：ビン詰）	3	0.05－0.06	第7条2（不正）
安	オリーブ（アメリカ：ビン詰）	2	0.08，0.12	第7条2（不正）
息	清涼飲料水	1	0.31	第11条2（表示）
香	ジンジャエール（アメリカ）	1	0.16	第11条2（表示）
酸	ワイン（チリー）	1	0.20	第7条2（不正）
DHA	羊羹	1	0.02	第7条2（不正）
POBA	エビソース（トンカツソース）	1	0.07	第11条2（表示）
PrA	マドレーヌ	7	11，6.3－6.7	第7条2（過量）

DHA：デヒドロ酢酸，POBA：パラオキシ安息香酸，PrA：プロピオン酸

Table 4．甘味料及び漂白料に関する違反事例

	品　　名	違反件数	検出量(g／kg)	違 反 条 文
サッカリン	清涼飲料水	1	0.11	第11条2（表示）
	サラダ（野菜，ポテト）	4	0.03−0.28	第7条2（不正）
	ソース煎餅	1	0.27	第7条2（過量）
	調味味噌	1	0.14	第11条2（表示）
	剣先いか	1	0.32	第11条2（表示）
	同上	1	1.32	第7条2（過量）
二酸化硫黄	甘納豆	6	0.11−0.36	第7条2（過量）
	生あん	1	0.01	第11条2（表示）
	砂糖菓子（アンズ，ショウガ）	2	0.07，0.07	第7条2（過量）
	乾燥果実（アンズ，パイン等）	3	0.25−1.14	第11条2（表示）
	金平糖	1	0.03	第11条2（表示）
	菓子パン用クリーム状砂糖	2	0.05，0.06	第7条2（過量）
	キャンディ	6	0.02−0.04	第7条2（過量）
	（イギリス，オランダ，フランス）			第11条2（表示）
	かんぴょう	1	5.9	第7条2（過量）
	はるさめ（中国）	3	0.01−0.03	第7，11条（過量，表示）
	マスタード（フランス）	1	0.08	第7条2（過量）
	めんま	1	0.05	第7条2（過量）
	たくあん漬	1	0.11	第7条2（過量）

また，にしんの煮物からソルビン酸が0.34 g／kg検出されたが，本品の水分は32%，塩分は1.9%であった．昭和43年6月15日付環食第8197号“若だきつくだ煮の取り扱い”によれば，製品は水分70%以下，塩分5%以上であると規定されている．このことから本品は惣菜であると判断され，ソルビン酸の使用は対象外食品への不正使用とみなされ処分された．

甘味料では，漬物類に使われていたサッカリンが天然甘味料に変わったために，違反事例が減少したが，サラダ等惣菜類への不正使用が依然として少数例認められる．

漂白料では，二酸化硫黄の過量使用違反が多く，甘納豆，乾燥果実，キャンディ等に認められている．特殊な事例では菓子パンの表面に塗り，乾くと白く固まる飾りの役目をする甘味材料が挙げられる．また，キャンディでは英国産の表示がありながら，実際にはマレーシア工場で作られたものから違反品が見つかっている．このように輸入食品では産地名と製造場所が必ずしも一致しないものが出回っているので，検査する際には両国の食添の許可状況等を把握しておくことが必要である．

3．着色料に関するもの

着色料に関する違反事例をTable 5．に示した．指定着色料の違反事例では表示違反が多く，1例だけ中華麺による指定外食品の不正使用例が見つかった．一方，指定外着色料の事例ではいずれも輸入食品で，そのほとんどが菓子類であった．このうち，ジュース類では天然色素の補正用として合成着色料が使われる例が多く，その際に使用量が少ないことから，従来の検査試料の採取量や毛糸染色法に変わる試験法の検討が必要となった．

過去5年間における違反事例の中で検出頻度の高い指定外着色料は，アルラレッドAC(C. I. 16035)，アゾルビン(14720)，キノリンエロー(47005)，パテントブルーV(42051)が挙げられる．その他にはブリリアントブラックBN(28440)，ウールグリーン(44090)，グリーンS(44090)等がある．これらを検出した食品の輸出国は米国，英国，オランダ等であり，東南アジアの製品からはほとんど検出されない．

着色料は国により着色料の成分規格が異なるために，不純物である副色素の量や数が異なり，時には主色素を上回る副色素が認められることがある．また，キノリンエローのように異性体の多いものでは，原料の違いから製造メーカー間で製品中の副色素が異なり[10]，ペーパークロマト上でその相違が著しく現れる．また，製造される食品のロットにより使われる着色料の配合が異なる場合があり、しばしば分析者の頭を悩ますことがある．従って，検査においては生産国の情報を入手すると同時に，注意深く分析する必要がある．

Table 5．着色料に関する違反事例

品　　名	着　色　料　名	違反条文
もち菓子	Y 4，B 1	第11条 2（表示）
赤ねり餡（こし餡）	R 104	第11条 2（表示）
水羊羹	Y 4，B 1	第11条 2（表示）
練り餡	Y 4，B 1	第11条 2（表示）
さざえ茶漬	R 102，106，Y 4	第11条 2（表示）
中華麺	Y 4	第 7 条 2（不正）
えび煎餅材料（中国）	R 102，Y 4	第11条 2（表示）
ちょろぎ	R 102	第11条 2（表示）
あめ	R 3，102，Y 4，5，B 1	第11条 2（表示）
キャンディ（イギリス）	Y 4	第11条 2（表示）
マシュマロ（カナダ）	B 1	第11条 2（表示）
オレンジジュース（アメリカ）	Y 4	第11条 2（表示）
オレンジジュース（アメリカ）	アルラレッド AC	第 6 条（指定外）
インスタントココア（アメリカ）	同上	第 6 条（指定外）
ゼリー（アメリカ）	同上	第 6 条（指定外）
チョコレートバターフィンガー（アメリカ）	同上	第 6 条（指定外）
ゼリービーンズ（アメリカ）	同上	第 6 条（指定外）
キャンデイー（アメリカ）	同上	第 6 条（指定外）
キャンディー（イギリス）	キノリンエロー	第 6 条（指定外）
マシュマロ（オランダ）	同上	第 6 条（指定外）
グァバパルプ（オーストラリア）	アゾルビン	第 6 条（指定外）
チューインガム（オランダ）	パテントブルー	第 6 条（指定外）
ランプフィシュキャビア（デンマーク）	ブリリアントブラック BN	第 6 条（指定外）
ゼリービーンズ（アメリカ）	二酸化チタン	第11条 2（表示）

4．防かび剤，酸化防止剤，品質保持剤，その他に関するもの

防かび剤，酸化防止剤，品質保持剤，殺菌剤，乳化剤，食品の成分規格及び有害物質の混入に関する違反事例について，過去 3 年間の結果をまとめて Table 6．に示した．輸入食品では防かび剤や EDTA の表示違反，あるいは tert-ブチルヒドロキノンやポリソルベートによる指定外食添の使用違反が認められた．また，国内産の食品では餃子の皮や麺類でプロピレングリコールの過量使用，及び麺類への過酸化水素の不正使用例が多く認められた．有害物質に関しては製餡原料に使われるバター豆から，基準値の50mg／100 g を超える多量のシアン化合物が検出された．また，コーンスナックから150の高い値の過酸化物価が測定されたが，輸入品であるために油脂の変質がどの過程で起きたか明らかにできなかった．

5．キャリーオーバーに関するもの

キャリーオーバーは食添を含む食品原料から加工食品に持ち越されてくる食添をいうが，キャリーオーバーに該当するか否かについては食添の使用実態に即して判断する必要があると云われている．キャリーオーバーに関する FAO／WHO の見解では，原材料に食添の使用が認め，その量が許可量以下であり，持ち越される量より多量の当該食添を含まず，持ち越される食添が食品中で効果を発揮するより有意に少ないものと規定している．

キャリーオーバーと考えられたもの，及び天然由来と考えられるものについて Table 7．に示した．安息香酸では醤油由来と考えられるものが多数認められ，ソルビン酸では餡類，味噌由来が考えられた．

牛肉佃煮や煮豆では各々0.24，0.12 g／kgの安息香酸が検出されているが，これは次のようなモデルケース[11]から見るとほとんど使用基準量の上限に近い量であると考えられる．例えば，原料にコウナゴ，アサリを用いた場合，その歩留りは各々130％，60％である．使用される醤油の量は原料100 g 当り，各々63.5 g，31.8 g であり，醤油の安息香酸を使用基準量の上限の0.6 g／kgとすると，製品中の安息香酸は各々0.29 g

Table 6．防かび剤，酸化防止剤，品質保持剤，その他に関する違反事例

グレープフルーツ（イスラエル）	DP	0.090−0.073 g／kg	第7条2（過量）
同上	OPP	0.0013	第11条2（表示）
バナナ	TBZ	0.0001	第11条2（表示）
あわび水煮（オーストラリア：カン詰）	EDTA	81mg／kg	第11条2（表示）
マヨネーズ（アメリカ：ビン入り）	同上	77	第11条2（表示）
チューインガム（アメリカ）	BHA	0.03 g／kg	第6条（指定外）
チョコレートバターフィンガー（アメリカ）	TBHQ	検出	第6条（指定外）
餃子の皮	PG	1.8，2.0%	第7条2（過量）
生めん，手打ちそば	同上	1.2，1.6	第11条2（表示）
うどん	H_2O_2	0.03，0.09，0.16 g／kg	第7条2（不正）
清涼飲料水（カフェオレ）	同上	14 g／kg	第4条2
激辛即席麺（粉末スープ：韓国）	ポリソルベート検出		第6条（指定外）
トマトケチャップ（アメリカ）	同上		第6条（指定外）
バター豆（ビルマ）	HCN	54mg／100 g	豆類成分規格
コーンスナック（アメリカ）	過酸化物価	140（油脂）	菓子指導不適
ピスタチオナッツ（イラン）	アフラトキシン B_1	1380−12 ppb	第4条2
ピーナッツ加工品	アフラトキシン B_1	13.9 ppb	第4条2
ナツメッグ	アフラトキシン B_1	10.9 ppb	第4条2

DP：ジフェニル，OPP：オルトフェニルフェノール，TBZ：チアベンタゾール，EDTA：エチレンジアミン四酢酸カルシウム2ナトリウム，BHT：ブチルヒドロキシトルエン，TBHQ：tert−ブチルヒドロキノン，PG：プロピレングリコール，H_2O_2：過酸化水素

Table 7．キャリーオーバーと考えられるもの

品　目	安息香酸	パラオキシ安息香酸	ソルビン酸	由　来
牛肉佃煮	0.24 g／kg			醤　油
煮豆	0.12			醤　油
海鮮醤（香港）	0.05，0.10			醤　油
たまり醤油（中国）	0.17			醤　油
鯛でんぶ	0.10			醤　油
葉唐辛子	0.01	0.01 g／kg		醤　油
有味の華	0.08			醤　油
いわし甘露煮	0.05			醤　油
うの花	0.04			醤　油
きんぴら	0.05			醤　油
味めんま	0.06			醤　油
田作	0.07			醤　油
味噌漬のたれ			0.01−0.05 g／kg	味　噌
水羊羹			0.12，0.61，0.99	餡
和菓子			0.09，0.06−0.73	餡
フルーツカクテル（アメリカ）	0.02			天　然
クランベリー	0.12			天　然

／kg，0.31 g／kg含まれることになる．この例では安息香酸の揮散や分解が考慮されていないため，実際にはさらに減少するものと考えられる．このことから先の製品では理論的には問題ないが，揮散や分解を考慮に入れるとかなり高い濃度のものが使われた凝いがもたれる．従って，このような事例では食品製造現場への立ち入り検査と共に原料の検査が必要になると考えられる．

一方，天然由来ではあんず等のバラ科やクランベリー等のシャクナゲ科など，多くの植物から安息香酸が検出される[12,13]．また，近年天然添加物として漬物等によく使われるケイ皮酸は，酸化分解により安息香酸が生じる．このように天然に存在するもの，あるいは分析過程で分解し生じるものは安息香酸以外にも二酸化硫黄等もあることから，分析時に考慮する必要がある．

以上のことから，キャリーオーバーについては種々の問題を考慮に入れる必要があり，特に原料及び原料中の食添等について十分調査することなくして論じることはできない問題である．

ま と め

昭和59年から63年までの5年間における食品の化学検査の食品衛生法違反事例についてまとめた．

1．保存料，人工甘味料，漂白料，着色料等では，違反食品は多岐にわたっているが，違反理由は輸入食品に係わるもので食品衛生法第6条に関するものが多くみられた．国内で製造された食品では第7条2項に係わる違反が多くを占め，第6条に係わる違反はみられなかった．

2．野菜へのリン酸の使用のように歴史的に形を変えて現われてくる事例と共に，ピスタチオナッツのように急激に輸入量が増えたり，生産量が増えた場合に起きる違反事例があることが確認された．

3．指定外合成甘味料を検出した乾燥梅干・話梅，リン酸を検出した生鮮野菜，ジエチレングリコールモノエチルエーテルを検出したアイスクリーム，指定外着色料を検出した果汁原料及び清涼飲料水，ジフェニルが過量残存したグレープフルーツ，アフラトキシン B_1 を検出したピスタチオナッツについて，その内容と原因等について述べた．

4．キャリーオーバーについてまとめると同時に，モデルケースから検出量について比較検討した．

本報の内容は，衛生局食品監視課，食品機動監視班，各関連の保健所から送付された行政検体について，当科各研究室が日常業務として分析を行ない，その結果をもとにまとめたものである．

文　　献

1）東京都衛生局公衆衛生部：昭和46年食中毒統計表，p 158，1972.
2）西垣　進，田村行弘，山田　洋他：東京衛研年報，23，205-210，1971.
3）真木俊夫，観　公子，永山敏廣他：東京衛研年報，38，229-232，1987.
4）井部明広，田村行弘，上村　尚他：東京衛研年報，38，216-221，1987.
5）田村行弘，安田和男，上村　尚他：東京衛研年報，37，187-196，1986.
6）田村行弘，井部明広，橋本秀樹他：東京衛研年報，38，209-215，1987.
7）真木俊夫，観　公子，永山敏廣他：東京衛研年報，39，126-129，1988.
8）安田和男，西島基弘，冠　政光他：東京衛研年報，33，191-197，1982.
9）田端節子，上村　尚，田村行弘他：食衛誌，28，395，1987.
10）WHO Techn. Rep. Ser. No.710，p18，1980，WHO Geneva.
11）峰下　雄，津久井亜紀夫　編著：てがるにできる加工食品，p 9，1987，建帛社，東京.
12）永山敏廣，西島基弘，上村　尚他：東京衛研年報，23，162-170，1975.
13）永山敏廣，西島基弘，上村　尚他：東京衛研年報，24，136-140，1976.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 149-154, 1989

キャピラリーガスクロマトグラフィー及び マススペクトロメトリーによる果実中の二臭化エチレンの分析法

石川 ふさ子*, 斉藤 和夫*, 中里 光男*, 藤沼 賢司*,
守安 貴子*, 二島 太一郎*

Determination of Ethylene Dibromide in Various Fruits by Capillary Gas Chromatography and Mass Spectrometry

Fusako Ishikawa*, Kazuo Saito*, Mitsuo Nakazato*,
Kenji Fujinuma*, Takako Moriyasu* and Taichiro Nishima*

Summary

The determination of ethylene dibromide (EDB) in fruits by capillary gas chromatography with electron capture detector (capillary GC–ECD) and by capillary gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) was investigated.

EDB was extracted from fruits samples in n–hexane by continuous extraction method using essential oil distillator and determined by capillary GC–ECD.

A fused silica bonded OV–1701, 0.25mm i.d.×25m, was used as the analytical column. The temperature program of column was from 80℃ (3 min) to 200℃ (15 min), a rate of 20℃/min.

In GC–MS using electron impact, the same capillary column and temperature program described above were used, and the four ions of monobromoethlylene carbonium fragment ions (m/z 107, 109) and bromide ions (m/z 79, 81) were monitored (selected ion monitoring mode).

A few impurity peaks appeared near the EDB peak on the capillary GC–ECD and GC–MS chromatograms, however, those peaks did not interfere with the determination of EDB.

By use of the methods, 22 samples of imported various fruits (6 grapefruits, 5 lemons, 5 navel oranges, a red cherry, a pineapple, a mango, a papaya, an avocado, a litchi) were analyzed, EDB was not detected at all.

The recoveries of EDB added to fruits at level of 10 ng/g were 91～99%. The detection limit of EDB in fruits was 1 ng/g.

Keywords: ethylene dibromide, essential oil distillator, capillary gas chromatography, gas chromatography–mass spectrometry, fruits

緒　言

エチレンジブロマイド(ethylene dibromide; 1, 2-dibromoethan, 以下 EDB と略す)は土壌の殺線虫剤[1]として使用されるが，他に果実や野菜等の生産に多大の損害を与えるミバエ類に対しても極めて有効なくん蒸剤であるので，これら農作物の輸出時には産地国において繁用されている．また穀類，豆類等の貯蔵作物や家畜飼料のくん蒸にも単独，または他のくん蒸剤と併せて使用されている．しかし，1974年10月，米国 NCI(National Cancer Institute)は「EDB はラット及びマウスに対して癌原性がある」との発表を行った[2]．これを受けて我が国は，1987年5月パパイヤ及びサヤインゲンについて[3]，さら

*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 Reserch Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku–ku, Tokyo, 169 Japan

に1988年10月柑橘類及びレイシについてEDBの残留を認めない(検出限界1 ppb)と定め[4]，また小麦製品中のEDB残留規制値として小麦(玄麦)には0.1ppm，小麦粉，ケーキミックス粉等の中間製品には0.01ppm，ビスケット，クラッカー等の最終製品には検出してはならないと定めた(検出限界1 ppb)[5]．

果実中のEDBの分析法としては，Dean–Stark蒸留装置を用いEDBを留出し，これをn–ヘキサン層に移行させ，パックドカラムによるECD付きガスクロマトグラフィーで定量する方法がある[6,7]．しかしこの方法では試料由来の夾雑物のピークが多いためEDBの定性，定量は難しく，フロリジルやシリカゲルで前処理を行う必要がある．そこで著者等は，分析時間の短縮，分析法の簡易化及び定量及び確認をより一層確実にするため，キャピラリーカラムを用いたECDガスクロマトグラフィー(キャピラリーGC–ECD)及び質量分析(GC–MS)による分析方法について検討するとともに，本法を用い若干の市場調査をおこなったので合わせて報告する．

実験方法

1．試料

1988年6月～1989年5月の間に都内のスーパー，小売店で販売されていたグレープフルーツ6件，レモン5件，ネーブルオレンジ5件，レッドチェリー，パイナップル，マンゴ，パパイヤ，アボガド，レイシ各1件計22検体を試料とした．

2．試薬

1)EDB標準原液：EDB(東京化成工業㈱製)100mgをn–ヘキサンに溶解し100mlとし，これをEDB標準原液とした．

2)n–ヘキサン：和光純薬㈱製の試薬特級．

3)水：蒸留水をミリーQ(日本ミリポア・リミテッド製)で処理した超純水．

3．器具及び装置

1)粉砕器：オスター社製オスター・ブレンダー

2)精油定量器及び還流冷却器：第十一改正日本薬局方に規定されたもの．

3)GC–ECD：バリアン社製GC–3500型(ECD付)に同社製オートサンプラー8035型及びインテグレーターIBDH™型を装着したもの．

4)GC–MS：質量分析計としてフィニガンマット社製INCOS–50型にガスクロマトグラフとしてバリアン社製GC–3400型を装着したもの．

4．キャピラリーGC-ECDの測定条件

カラム：OV–1701 Bonded，長さ25m，内径0.25mm，及び膜厚1.5 μmのfusedシリカキャピラリーカラム(ガスクロ工業㈱製)，カラム温度：80℃(3 min)→200℃(15 min)20℃／minの昇温分析，注入口温度：200℃，検出器(ECD)温度：230℃，キャリヤーガス：ヘリウム1.2ml／min，注入システム：スピリットレス注入法，感度：32×10，注入量：1 μl

5．GC-MSの測定条件

キャピラリーGC：4.の条件に準じた．

MS：測定モード：EI，測定質量：79±0.5，81±0.5，107±0.5，109±0.5(測定速度は各0.1秒)，トランスファーライン温度：250℃，イオンソース温度：180℃，イオン化エネルギー：70 eV，エミッションカレント：200 μA

6．検量線の作成

EDB標準原液をn–ヘキサンで各々0.01，0.05，0.1，0.25 μg／mlとなるように希釈し，キャピラリーGC–ECDに注入して得られたクロマトグラムのピーク面積を求め，絶対検量線法により検量線を作成した．更にEDB標準液をGC–MSに注入して得られたクロマトグラムのピークのカウント数を求め，絶対検量線法により検量線を作成した．

7．試験溶液の調製

試料200gに水200mlを加えブレンダーで約5分間ホモジナイズしたものを，少量の水で洗いながら1Lの丸底フラスコに移し，n–ヘキサン10mlと沸石数個及び消泡剤1～2滴を加えた．これに精油定量器を装着し，装置のトラップ部に水約30mlを加えて側管を満たした後，加熱し，沸騰後1時間加熱還流した．放冷後トラップ内の水層に重層したn–ヘキサン層を，駒込ピペットで20mlのメスフラスコに移した．更にトラップ及び冷却管の内壁をn–ヘキサンで洗浄し同様にメスフラスコに移し，n–ヘキサンで20mlにメスアップした後，芒硝2gで脱水し，試験溶液とした．

8．定性及び定量法

試験溶液1 μlをキャピラリーGC–ECDに注入し，得られたクロマトグラム上の標準EDBの保持時間と一致するピークの面積を測定し，前項6で作成した検量線からEDBの検出量を求め，試料1g当りに換算した．またGC–MSの場合には得られたクロマトグラム上のEDBの保持時間及びスキャン回数と一致するピークのカウント数を求め，同様に検量線からEDBの検出量を求め試料1g当りに換算した．

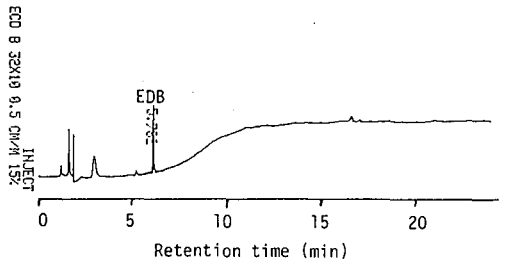


Fig. 1. Capillary Gas Chromatogram of EDB Standard

結果及び考察

1. キャピラリー GC-ECD の測定条件の検討

キャピラリーカラムは強極性である DB–WAX 及び中極性で膜厚1.5 μm の OV–1701を用い，その昇温条件を検討した．DB–WAX を用い50℃(2分)から200℃まで1分間に10℃ずつ昇温したところ EDB の保持時間は6.8分であり，夾雑ピークとの分離は良好であったが，ピークがややリーディングする傾向が認められた．またこの条件下でネーブルオレンジ，パパイアを分析する際に

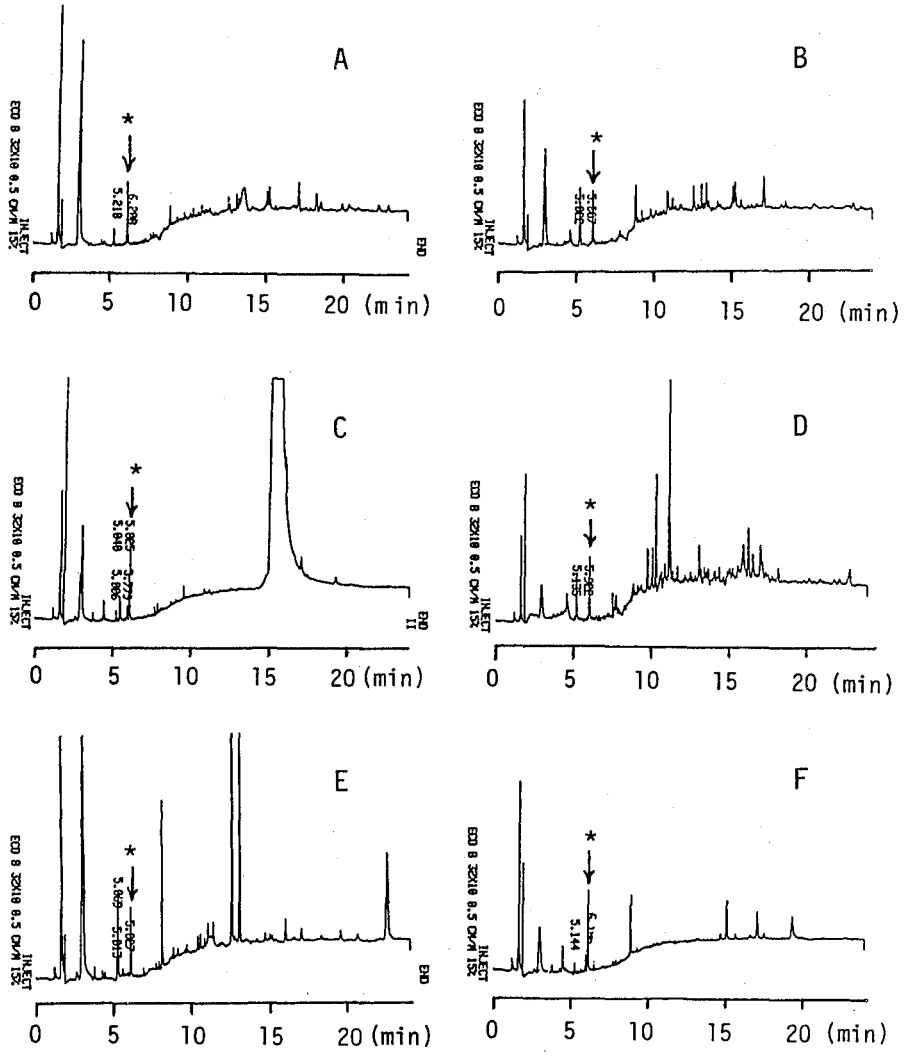


Fig. 2. Capillary Gas Chromatograms of Extracts from Various Fruits Added EDB
A : grapefruit B : navel orange C : papaya D : lemon E : avocado F : mango
* : EDB

200℃に昇温後15分経過しても夾雑物はカラムから完全に除去されず，次の分析の妨害となった．したがって夾雑物を完全に除去するためにはカラム温度を230℃まで上げる必要があるが，DB–WAX の使用限界温度に近いためカラムの寿命の点から好ましくないと考えられた．そこで OV–1701を用い，前項4に示した昇温条件下で測定したところ，EDB は保持時間6.1分で，ピークに近接するいくつかの夾雑ピークが認められたが，いずれも分離することが出来た．

本条件によりネーブルオレンジ，パパイアを始め各種の試料について分析したところ，いずれも分析時間終了までに夾雑物は完全に除去され，次の分析に影響を与えなかった．従って，以後の定量には OV–1701を用いる事とした．なお，OV–1701による EDB の検量線は0.01～0.25 μg／ml の範囲で直線性を示した．また Fig. 1 に EDB 標準品の，Fig. 2 に各種果実のクロマトグラムを示した．なお，この条件で0.1 μg／ml の標準溶液を5回繰り返し測定した際の相対標準偏差(RSD)は，2.2%であった．

2．GC-MS の測定条件の検討

キャピラリー GC–ECD の場合と同じカラム及び昇温条件下での，電子衝撃法(EI)による EDB のフルスキャン質量スペクトルを測定したものを Fig. 3 に示した．モノブロモエチレンカルボニウムフラグメントイオンに属する同位体の二つのイオン，m／z 107，109がベースピークとなり，ブロムイオンに属する同位体の二つのイオン，m／z 79，81が認められた．EI による電子エネルギーが EDB 分子(M)から M^+を生成し，更には M^+が過剰のエネルギーを受けて分解し種々のフラグメントイオンを生じるが，モノブロモエチレンカルボニウムイオンの生成率が高く，またブロムイオンも検出される．これらの四本のピークは EDB に特徴的なものと考えられる．そこで EDB の感度を高めるために，m／z 79，81，107，109を選択し，SIM 分析による試料中の EDB の同定，定量を試みた．EDB の GC–MS による SIM 分析での検量線は0.01～0.25 μg／ml の範囲で直線性が得られ，この条件下で0.1 μg／ml の標準溶液を5回繰り返し測定した際の相対標準偏差(RSD)は2.9%であった．

EDB 標準品のマスクロマトグラムを Fig. 4 に，グレープフルーツ，ネーブルオレンジ等のマスクロマトグラムを Fig. 5 に示した．GC–MS の SIM 分析においても，カラム温度の上昇に伴って大きなピークが多数出現したが，EDB の保持時間6.3分(1020スキャン)付近では夾雑ピークは小さく重複するものは認められなかった．

3．添加回収実験

EDB が検出されないことを確認したネーブルオレンジ，レモン，パパイア，マンゴ，アボガド，グレープフルーツの6種類の輸入果実に，EDB 濃度が10 ng／gとなるようにそれぞれ添加し添加回収実験を行い，その結果を Table 1 に示した．キャピラリー GC–ECD 及び GC–MS による回収率はそれぞれ93，91%以上と良好で，両法は果実中の夾雑物の影響を受けることなく精度良く分析できることが確認された．なお，キャピラリー GC–ECD は GC–MS よりも操作が簡便なため多数の検体を一度に処理する場合は極めて有用な方法であった．しかし，GC–MS は今後益々多種の果実が輸入され検査対照となる事が考えられ，キャピラリー GC–ECD において近接ピークが認められるような場合には有用な定量，確

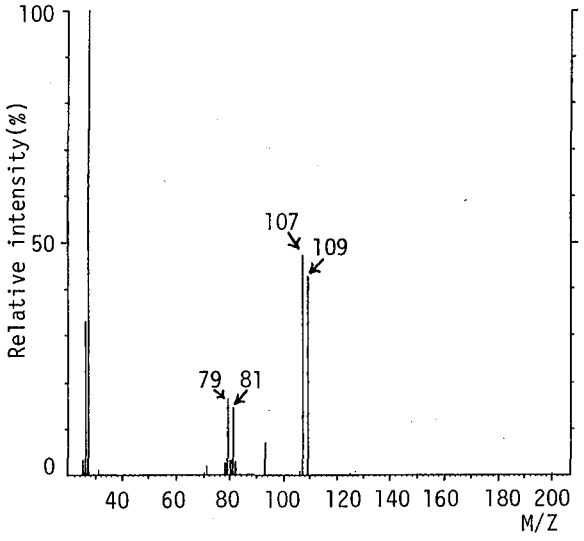


Fig. 3．Mass Spectrum of EDB Standard

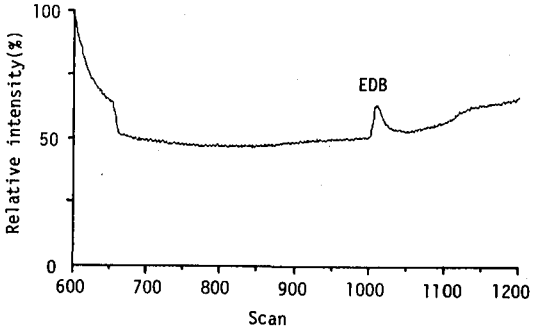


Fig. 4．Mass Chromatogram of EDB Standard

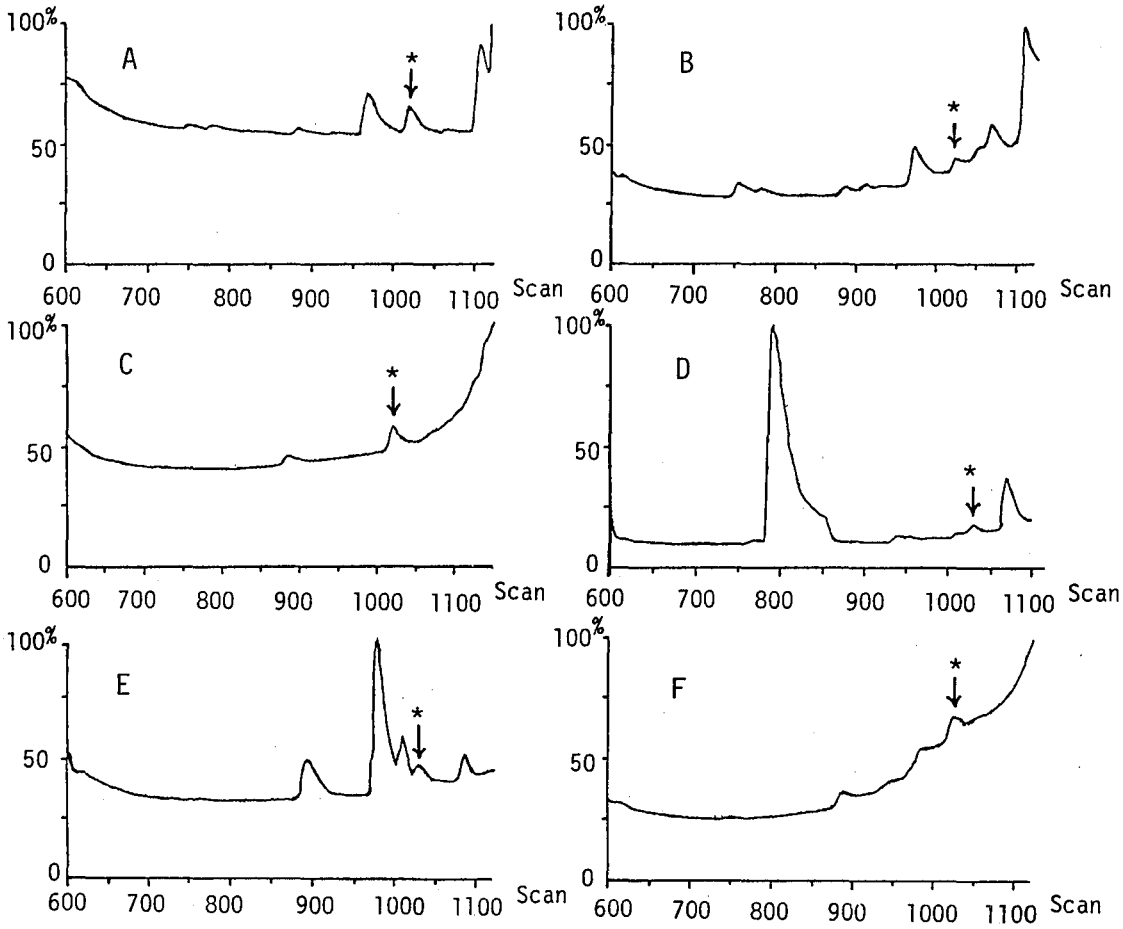


Fig. 5. Mass Chromatograms of Extracts from Various Fruits Added EDB
A : grapefruit B : navel orange C : papaya D : lemon
E : avocado F : mango
* : EDB

Table 1. Recoveries of EDB from Various Fruits

Sample	Added (μg)	Capillary GC		GC−MS	
		Found (μg)	Recovery* (%)	Found (μg)	Recovery* (%)
Grapefruit	2	1.98	99	1.90	95
Navel orange	2	1.86	93	1.90	95
Papaya	2	1.90	95	1.82	91
Lemon	2	1.96	98	1.96	98
Avocado	2	1.98	99	1.84	92
Mango	2	1.94	97	1.96	98

*average of three triales.

認法となると考えられる.

なお，本報によるEDBの検出限度は果実試料において1 ng／gであった.

4．市販品の調査

輸入果実であるグレープフルーツ，レモン，ネーブルオレンジ等22検体について市販品の調査を行ったところいずれからもEDBは検出されなかった．その原因はEDBの揮散性が強いため流通過程で大部分が消失したためと思われる.しかし，EDBは発癌性があると認められ[8,9]，その規制値もより厳しくなり検出されてはならないと改められたので，今後も監視していく必要がある.

要　約

グレープフルーツ，レモン，ネーブルオレンジ等果実中のEDBの分析法としてキャピラリーGC–ECDによる定量法及びGC–MSによる定量及び確認法について検討した．その結果，両法はクリーンアップ操作を行うことなく，精度よく，かつ短時間に測定出来た．また両法における添加回収実験での回収率は91％以上であり，検出限界はそれぞれ試料当り1 ng／gであった．なお，都内で市販されていた果実22検体からはEDBはいずれも検出されなかった.

文　献

1）福永一夫編：農薬ハンドブック，p 108，1981，日本植物防疫協会，東京.

2）“Memorandum of Alert” National Cancer Institute, U.S.A.(1974).

3）厚生省生活衛生局食品保健課長通達，衛食第79号，厚生省生活衛生局食品化学課長通達，衛化第30号(1987).

4）厚生省生活衛生局食品保健課長通達，衛食第185号厚生省生活衛生局食品化学課長通達，衛化第67号(1988).

5）厚生省生活衛生局食品保健課長通達，衛食第12号(1985).

6）武田明治：食品衛生研究，31，1073-1081(1981).

7）関田　寛，武田明治，内山　充：食衛誌，24，57-63(1983).

8）Powers, M.B., Voelker,R.W., Page,N.P., Weisburger, E.K., and Kraybill,H.F.：Toxicol. Appl. Pharmacol., 33, 171-172(1975).

9）Wong,L.C.K., Winston,J.M., Hong,C.B. and Plotnick,H.：Toxicol. Appl. Pharmacol.：63, 155-165(1982).

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 155-162, 1989

野菜・果実類中の残留農薬実態調査（昭和63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 (1988. 4 ～ 1989. 3)

TOSHIHIRO NAGAYAMA*, TOSHIO MAKI*, MAMI IIDA*,
KIMIKO KAN*, YUKA KAWAI* and TAICHIRO NISHIMA*

Thirty five of organophosphorus, twenty four kinds of organochlorine, and two kinds of carbamate pesticides in thirty eight kinds of crops have been investigated. We detected residues of nine kinds of insecticides, six kinds of fungicides and one kind of herbicide in several kinds of crops. Concentrations of organophosphorus insecticides (diazinon, fenitrothion (MEP), malathion, prothiofos, phenthoate (PAP) and methidathion (DMTP)), organochlorine insecticides (endosulfan, dicofol and pp'-DDT), carbamate insecticides (carbaryl (NAC) and BPMC), organochlorine fungicides (captan, chlorothalonil (TPN), vinclozolin, procymidone, iprodion and quintozene (PCNB)) and herbicide (CNP) were trace～1.7, 0.001～0.03, 0.001～28, 0.12～1.2 and 0.003ppm, respectively.

The identification ratio was as high as 20% for TPN, and the content of prothiofos, BPMC, procymidone and iprodion in residue was more than 1ppm in four samples. These pesticides, in particular, were at levels higher than tolerance values for pesticide registration reservation.

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

著者らは生鮮野菜・果実類について，残留基準の設定されていない農薬を含めた種々農薬の残留実態調査を行ってきた[1-8]．今回は昭和63年度における残留農薬の調査結果を報告する．

実験の部

1．試　料

1988年4月から1989年3月にかけて東京都内に入荷した野菜・果実類等88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

*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

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), キャプタン, カプタホール(ダイホルタン), クロロタロニル(TPN), PCNB, プロシミドン, ビンクロゾリン,

Table 1. Contents of Organophosphorus Pesticides in Vegetables

Sample		No.of Sample	No.of positive	Insecticides (ppm) Diazinon	MEP	Malathion	Prothiofos	Others[1)]
Spinach	[HŌRENSŌ]	3	0					
KOMATSUNA		1	0					
Crown daisy	[SHUNGIKU]	1	0					
Perilla	[AOZISO]	1	1	—[2)]	—	0.15	—	—
Lettuce		3	0					
Salad	[SARADANA]	1	1	—	—	—	1.7	—
Japanese honeywort	[MITSUBA]	3	0					
Chinese cabbage	[HAKUSAI]	3	0					
Celery								
(petiole)		3	1	0.03	—	—	—	—
(leaf)		3	2	0.09	0.01	—	—	—
Garden asparagus		1	0					
Cucumber	[KYŪRI]	3	0					
Pimiento	[PĪMAN]	3	0					
Eggplant	[NASU]	3	1	—	—	—	0.08	—
Tomato		3	0					
Radish	[DAIKON]							
(root)		3	1	—	—	—	Tr[3)]	—
(leaf)		3	2	—	—	—	0.01, Tr	—
Turnip	[KABU]							
(root)		1	0					
(leaf)		1	0					
Welsh onion	[NEGI]	1	0					
Onion	[TAMANEGI]	3	0					
Sweet potato	[KANSHO]	1	0					
Taro	[SATOIMO]	1	0					
Potato		3	0					
Pumpkin	[KABOCHA]	3	0					
Garden pea (immature)	[SAYAENDŌ]	2	1	—	—	Tr	—	—
Kidney bean (immature)	[SAYAINGEN]	1	0					
Broad been	[SORAMAME]	1	0					
Total		59	10	0.03~0.09	0.01	Tr~0.15	Tr~1.7	—

1) EPN, PAP, Chlorpyrifos, CVP, DDVP, dimethoate, parathion, MPP, phosalone, DEP, disulfoton, ECP, CYAP, salithion, chlopyrifos-methyl, DMTP, formothion, CVMP, propaphos, EPBP, ethion, isoxathion, thiometon, PMP, pyridaphenthion, pirimiphos-methyl, CYP, dialifol, IBP and EDDP are investigated.

2) — : not detected

3) Tr : below 0.01ppm

イプロジオン，CNP　計24種

(3) カーバメイト系農薬：カルバリル(NAC)，BPMC 計2種

総計61種

3．機　器

(1) ガスクロマトグラフ：㈱島津製作所製 GC－9A (検出器 ECD，FPD，FTD)

(2) キャピラリーガスクロマトグラフ：Varian Associates Inc. 製 3500(検出器 ECD)，3400(検出器 TSD, ELCD)

(3) 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．

結果及び考察

1．有機リン系殺虫剤及び殺菌剤

野菜類59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．

野菜類10検体(検出率：17%，以下同様)から有機リン系農薬を検出したが，残留基準のある農薬は全く検出されなかった．

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(検出作物名：セルリーの葉柄及び葉)，マラチオン(青ジソ，サヤエンドウ)及びプロチオホス(サラダ菜，ナス，大根の根及び葉)の3種が9検体(15%)から検出された．これらのうち，サラダ菜から検出されたプロチオホスは，基準値0.1ppm を超えていた．プロチオホスは LD_{50}925～966mg／kg(ラット，♂，経口)の普通物で

Table 2. Contents of Organophosphorus Pesticides in Fruits and Other Crops

Sample	No.of Sample	No.of positive	Insecticides (ppm) Diazinon	MEP	PAP	DMTP	Others[1]
Apple	3	1	0.02	—[2]	—	—	—
Japanese pear [NASHI]	3	1	—	0.06	—	—	—
Pear [SEIYŌNASHI]	1	1	—	0.04	—	—	—
Strawberry	3	0					
Hybrid melon [PURINSU & AMUSUMERON]	3	0					
Water melon [SUIKA]							
(flesh)	1	0					
(peel)	1	0					
Peach							
(flesh)	3	0					
Loquat [BIWA]							
(flesh)	1	0					
Grape	1	0					
Japanese persimmon [KAKI]	1	0					
Mandarin orange [UNSHUMIKAN]							
(flesh)	3	0					
(peel)	3	3	—	—	0.43	0.14,0.30,0.50	—
Chest nut [KURI]	1	0					
Corn	1	0					
Total	29	6	0.02	0.04～0.06	0.43	0.14～0.50	—

1) EPN, chlorpyrifos, CVP, DDVP, dimethoate, Parathion, MPP, phosalone, malathion, DEP, salithion, disulfoton, ECP, CYAP, chlorpyrifos-methyl, formothion, prothiofos, CVMP, propaphos, EPBP, ethion, isoxathion, thiometon, CYP, PMP, pyridaphenthion, pirimiphos-methyl, dialifol, IBP and EDDP are investigated.

2) —：not detected

あり，今回の残留量では喫食上問題はないが，毎年基準値を超えるものが見出されていることから[4~8]，使用方法の改善を含めた十分な監視体制の維持拡充が必要である．

基準値の設定されていない農薬では，MEP(セルリーの葉)が少量検出されたのみであった．

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では，ダイアジノン(リンゴ)及びMEP(ナシ，西洋ナシ)の2種が3検体(10%)から検出された．リンゴ及びナシからは有機リン系農薬が比較的高い頻度で検出されているものの[4~9]，その残留量はいずれも基準値の1／20～1／2程度と低レベルであり，喫食上特に問題はないと考える．

登録保留基準のある農薬は検出されなかった．

いずれの基準値も設定されていない農薬では，DMTP及びPAPが温州みかんの外果皮3検体(10%)から検出された．特にDMTPは柑橘類の外果皮から非常に高い頻度で検出されている[6~8]．しかし，これら外果皮はマーマレード等加熱調理されて喫食されることが多いため，その製造工程においてDMTPは速やかに減少し[10]，喫食時における残存量は非常に少ないと考える．

2．有機塩素系及びカーバメイト系殺虫剤

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，総DDTがモモの果肉1検体から極少量検出されたのみであった．しかし，昭和46年に登録が失効し農作物への使用が禁止された農薬の果実中における濃度分布は，果皮が最も高いことから[13]，今回も果皮中にはより高濃度に残留していたと推察される．登録失効後15年以上を経過し，近年はほとんど検出されなくなったBHC，DDT等が再び検出され始め，一部比較的多量の残留も見られる[6~8,11,12]．輸入肥料等からの移行によるとも考えられるが，これら農薬は残留性が非常に高く，土壌の再汚染につながる可能性もあり，その由来を調査する等慎重な対応が望まれる．

登録保留基準のある農薬では，ベンゾエピン及びジコホールがホウレン草，小松菜，イチゴ各1検体から検出されたが，いずれも基準値の1／500～1／50と低レベルであった．しかし，青ジソ1検体から検出されたBPMCは基準値0.3ppmを大きく超えていた．青ジソは生食されることが多いものの，BPMCの水に対する溶解度は610mg／ℓと高いため，水洗により大部分は除去され，喫食上問題はないと思われる．しかし，BPMCはLD_{50}623mg／kg(ラット，♂，経口)の劇物に指定されており，昨年度も青ジソから2.6ppm検出されていたことから[8]，このような多量残留を極力防止する対策が必要である．

基準値の設定されていない農薬では，ヘプタクロルの代謝物であるヘプタクロルエポキサイドがキュウリ及びメロン4検体から，また，NACがキュウリ1検体から検出された．ヘプタクロルエポキサイドはキュウリから0.002～0.080ppm検出されたとの報告もあり[11,12]，近年比較的検出率の高い農薬のひとつである．ヘプタクロルは，昭和47年に登録が失効された農薬であることから，その由来等注意深く観察していく必要がある．

3．有機塩素系殺菌剤及び除草剤

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検出されなかった．

登録保留基準のある農薬では，キャプタン(春菊，ミツバ)，TPN(レタス，ミツバ，白菜，セルリーの葉柄及び葉，キュウリ，トマト，カブの根及び葉，サヤエンドウ，西洋ナシ，スイカの果皮，モモの果肉)，ビンクロゾリン(ナス，トマト，モモの果肉)，プロシミドン(青ジソ，ミツバ，イチゴ)，イプロジオン(ミツバ，モモの果肉)及びPCNB(セルリーの葉)の6種が野菜類18検体(31%)，果実類9検体(31%)から検出された．検出率はTPNが野菜類24%，果実類14%と最も高かった．しかし，残留量は少なく，基準値1.0ppmの1／1000～1／2(検出値の平均値：0.062ppm)であり，昨年度(同：1.68ppm)に比較し，大変低いレベルであった．プロシミドンは，イチゴから0.20～0.76ppm，青ジソ及びミツバから9.9～28ppm検出された．イチゴからは昭和59年度に0.04ppm検出されたが[6]，今回の検出量はその5～20倍と比較的高く，また，青ジソ中には基準値2ppmの14倍の残留が認められた．一方，イプロジオンはミツバ中に基準値の約3倍残留していた．プロシミドン及びイプロジオンはLD_{50}6800mg／kg及び2060mg／kg(ラット，♂，経口)の普通物であり，今回の残留量では喫食上特に問題はないと推察される．これら農薬は，ビンクロゾリンと共にジカルボキシミド剤に分類され，連用による抵抗性菌の出現や交叉抵抗性が生じやすい[15]．ビンクロゾリンも昭和61,62年度に37,8.5ppmと高濃度残留した例があり[7,8]，非常に多量の散布が行われる等，農薬使用者の不注意によるところが大きいと考える．従って，これら農薬は，検出率は低いものの，多量残留しやすい農薬として留意する必要がある．

Table 3. Contents of Organochlorine and Carbamate Insecticides in Crops

Sample	No.of sample	Organochlorine (ppm)					Carbamate (ppm)		
		No.of positive	α-Benzoepin	β-Benzoepin	Dicofol	Others[1)]	No.of positive	NAC	BPMC
Spinach	3	1	0.001	–[2)]	–	–	0		
KOMATSUNA	1	1	–	–	0.03	–	0		
Crown daisy	1	0					0		
Perilla	1	0					1	–	1.2
Lettuce	3	0					0		
Salad	1	0					0		
Japanese honeywort	3	0					0		
Chinese cabbage	3	0					0		
Celery									
(petiole)	3	0					0		
(leaf)	3	0					0		
Garden asparagus	1	0					0		
Cucumber	3	2	–	–	–	0.002,0.004 (hep.ep.[3)])	1	0.12	–
Pimiento	3	0					0		
Eggplant	3	0					0		
Tomato	3	0					0		
Radish									
(root)	3	0					0		
(leaf)	3	0					0		
Turnip									
(root)	1	0					0		
(leaf)	1	0					0		
Welsh onion	1	0					0		
Onion	3	0					0		
Sweet potato	1	0					0		
Taro	1	0					0		
Potato	3	0					0		
Pumpkin	3	0					0		
Garden pea (immature)	2	0					0		
Kidney bean (immature)	1	0					0		
Broad bean	1	0					0		
Apple	3	0					0		
Japanese pear	3	0					0		
Pear	1	0					0		
Strawberry	3	1	0.005	0.005	–	–	0		
Hybrid melon	3	2	–	–	–	0.001,0.002 (hep.ep.)	0		
Water melon									
(flesh)	1	0					0		
(peel)	1	0					0		
Peach									
(flesh)	3	1	–	–	–	0.006(T-DDT)	0		
Loquat									
(flesh)	1	0					0		
Grape	1	0					0		
Japanese persimmon	1	0					0		
Mandarin orange									
(flesh)	3	0					0		
(peel)	3	0					0		
Chest nut	1	0					0		
Corn	1	0					0		
Total	88	8	0.001~0.005	0.005	0.03	0.001~0.006	2	0.12	1.2

1) T-BHC (total of α-, β-, γ-& δ-BHC), T-DDT (total of pp'-DDT, pp'-DDE & pp'-DDD), op'-DDT, aldrin, dieldrin, endrin, heptachlor and heptachlor epoxide are investigated.
2) – : not detected
3) Heptachlor epoxide is described as hep.ep. for short.

Table 4. Contents of Organochlorine Fungicides and Herbicides in Crops

Sample	No. of sample	Fungicides (ppm)							Herbicides (ppm)	
		No. of positive	Captan	TPN	Vinclozolin	Procymidone	Iprodione	Others[1]	No. of positive	CNP
Spinach	3	0							0	
KOMATSUNA	1	0							0	
Crown daisy	1	1	0.024	–[2]	–	–	–	–	0	
Perilla	1	1	–	–	–	28	–	–	0	
Lettuce	3	1	–	0.001	–	–	–	–	0	
Salad	1	0							1	0.003
Japanese honeywort	3	3	0.070	0.39	–	9.9,16	14	–	0	
Chinese cabbage	3	1	–	0.009	–	–	–	–	0	
Celery										
(petiole)	3	2	–	0.009,0.05	–	–	–	–	0	
(leaf)	3	2	–	0.18,0.24	–	–	–	0.001(PCNB)	1	0.003
Garden asparagus	1	0							0	
Cucumber	3	2	–	0.006,0.03	–	–	–	–	0	
Pimiento	3	0							0	
Eggplant	3	1	–	–	0.005	–	–	–	0	
Tomato	3	2	–	0.006	0.001	–	–	–	0	
Radish										
(root)	3	0							0	
(leaf)	3	0							0	
Turnip										
(root)	1	1	–	0.022	–	–	–	–	0	
(leaf)	1	1	–	0.045	–	–	–	–	0	
Welsh onion	1	0							0	
Onion	3	0							0	
Sweet potato	1	0							0	
Taro	1	0							0	
Potato	3	0							0	
Pumpkin	3	0							0	
Garden pea (immature)	2	2	–	0.050,0.055	–	–	–	–	0	
Kidney bean (immature)	1	0							0	
Broad bean	1	0							0	
Apple	3	0							0	
Japanese pear	3	0							0	
Pear	1	1	–	0.002	–	–	–	–	0	
Strawberry	3	2	–	–	–	0.76,0.20	–	–	0	
Hybrid melon	3	0							0	
Water melon										
(flesh)	1	0							0	
(peel)	1	1	–	0.016	–	–	–	–	0	
Peach										
(flesh)	3	3	–	0.002,0.010	0.09	–	0.02,Tr[3]	–	0	
Loquat										
(flesh)	1	0							0	
Grape	1	0							0	
Japanese persimmon	1	0							0	
Mandarin orange										
(flesh)	3	0							0	
(peel)	3	0							0	
Chest nut	1	0							0	
Corn	1	0							0	
Total	88	27	0.024~0.070	0.001~0.39	0.001~0.09	0.20~28	Tr~14	0.001	2	0.003

1) Captafol and PCNB are investigated.
2) – : not detected
3) Tr : below 0.01ppm

Table 5. Details in the Samples Contained Several Pesticides

Sample	No. of sample	No. of positive[1)]	No.	Pesticides residue (ppm)
Perilla	1	1	1	malathion (0.15[2)]), procymidone (28), BPMC (1,2)
Salad	1	1	1	prothiofos (1.7), CNP (0.003)
Japanese honeywort	3	3	1	captan (0.070), procymidone (9.9)
			2	procymidone (16), iprodion (14)
Celery				
(petiole)	3	2	1	diazinon (0.03), TPN (0.050)
(leaf)	3	2	1	diazinon (0.09), TPN (0.18), PCNB (0.001)
			2	MEP (0.01), TPN (0.24), CNP (0.003)
Cucumber	3	2	1	NAC (0.12), TPN (0.006)
Garden pea (immature)	2	2	1	malathion (Tr[3)]), TPN (0.050)
Pear	1	1	1	MEP (0.04), TPN (0.002)
Peach				
(flesh)	3	3	1	iprodion (0.02), TPN (0.002)
			2	iprodion (Tr), TPN (0.010)
Mandarin orange				
(peel)	3	3	1	PAP (0.43), DMTP (0.50)

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

除草剤であるCNPは，2検体からいずれも極少量検出されたのみであった．

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，環状ジエン剤を除く)を検出した野菜・果実類についてまとめ，Table 5に示した．

38種の作物について48種の農薬を調査した．複数残留は青ジソ，サラダ菜，ミツバ，セルリーの葉柄及び葉，キュウリ，サヤエンドウ，西洋ナシ，モモの果肉及び温州ミカンの外果皮等10種作物15検体(17%)に認められた．ミツバ及びモモの果肉は複数の有機塩素系殺菌剤による，また，セルリー，サヤエンドウ及び西洋ナシ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は38検体(43%)から検出された．これらのうち15検体(検出検体に対する割合：39%)から2種類以上の農薬が検出され，3種類の農薬を同時に検出したものが3検体(8%)あった．青ジソ及びミツバ各1検体からは，2種類の農薬が共に登録保留基準値を大きく超えて検出された．このような同時多量残留は農薬使用者の不注意な散布によって起こると考えられるため，正しい農薬使用方法の遵守等十分は配慮が望まれる．

まとめ

1988年4月から1989年3月までに都内に入荷した野菜・果実類88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，ダイアジノン，MEP，マラチオン，プロチオホス，PAP及びDMTPの殺虫剤6種類が，16検体から痕跡～1.7ppmの範囲で検出された．サラダ菜1検体から登録保留基準値を超えてプロチオホスが検出された．

有機塩素系農薬では，ベンゾエピン，ジコホール及び総DDTの殺虫剤3種が4検体から0.001～0.03ppmの範囲で，また，キャプタン，TPN，ビンクロゾリン，プロシミドン，イプロジオン及びPCNBの殺菌剤6種が27検体から0.001～28ppmの範囲で検出された．青ジソからプロシミドンが，また，ミツバからプロシミドン及びイプロジオンが登録保留基準値を超えて検出された．

除草剤であるCNPは，2検体からいずれも0.003ppm検出されたのみであった．

カーバメイト系農薬では，NACがキュウリ1検体から0.12ppm，BPMCが登録保留基準値を超えて青ジソ1検体から1.2ppm検出された．

農薬の複数残留は15検体に認められた.

作物中に残留する農薬の種類及び残留量は，農薬の使用時期や使用方法等に大きく影響される．従って，農薬の高濃度残留を防止するためには，消費地と生産地が一体となり，諸関係機関が連携して総合的な対策を講じる必要があると考える.

本調査は東京都衛生局食品監視課と共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：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）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：同上，39，130-138，1988.
9）百川和子，鈴木　滋，菊地秀明他：宮城県保健環境センター年報，6，133-135，1988.
10）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.
11）佐藤正幸，長南隆夫，堀　義宏：道衛研所報，38，31-35，1988.
12）百川和子，鈴木　滋，菊地秀明他：宮城県保健環境センター年報，6，135-138，1988.
13）吉田精作，楠野滋子，今井田雅示：日本農芸化学会誌，62，35-37，1988.
14）小屋宥三，村田宗茂，岸　幸子他：食品衛生研究，36，51-57，1986.
15）石崎　寛：農薬科学，138-139，1987，養賢堂，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 40, 163-168, 1989

化学物質及び自然毒による食中毒事件例（第6報）
—昭和63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 (VI)
—1988—

TOSHIO MAKI*, KIMIKO KAN*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*,
MAMI IIDA*, YUKA KAWAI*, and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords：化学性食中毒 chemical food poisoning，有毒植物 poisonous plant，ヒスタミン histamine，牛乳 cow milk，銅 copper，異臭味 offensive flavor，フグ pufferfish，パラコート paraquat，ジクワット diquat

著者らは前報[1~5]において都内で発生した化学性食中毒事件を報告してきたが，これまでに原因として解明された化学物質はヒスタミン，重金属等であり，我々一人一人の狭い生活圏に存在していたもので，決して特殊性のあるものではなかった．

今回は昭和63年度に起きた化学物質による食中毒事例5件，自然毒による事例2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に事例の概要を示した．

1．有毒植物混入による食中毒事例

事件の概要　事例-1：昭和63年4月親戚からもらったニラ様の葉に牛肉，玉子及び米飯を混ぜ合わせておじやを作り，昼食として家族4名が喫食したところ，全員が喫食後10分から嘔吐，倦怠感及び脱力感などの食中毒症状を呈した．

事例-2：同年12月　某県から購入した正月用のチョロギを従業員が選別していたら，異なる形の根茎を見つけた．従業員が試しに口にしたところ強い刺激を感じ，さらに粘膜から出血が認められ，胃が焼けるように痛んだと保健所に屈出があった．

①試　料　事例-1は未調理の葉．事例-2はチョロギその他の根茎を含んだ子球(キゴ)．

②原因物質の検索　事例-1の搬入された葉には長さの異なる二種類が混在していた．ニラ臭を認めたのは短い葉で，長い葉には認められなかった．そこで長い葉の形態について詳細に調べた結果，スイセン属の疑いをもった．TLCによる成分の検索[6]を行いリコリン，リコレニン及びナルシジンを検出した．事例-2は鑑定の結果，チョロギの他にコンニャクのキゴが含れていた．また検鏡によりコンニャクのキゴには多数のシュウ酸カルシウム針状結晶を認めた．

③考　察　事例-1の原因はニラに混在していたスイセン属の葉であった．TLC分析で成分が確認されたことから，先の形態的結果と合わせて本品をヒガンバナ科スイセン属の葉であると結論づけた．それぞれの植物に含有する特有の成分の確認も鑑定と同様に種を決める時の重要な情報になる．問題の葉は親戚の庭に生えていたのを子供らが無造作に刈ったものである．そのためニラと他の葉が混在する結果になってしまった．また，ニラは臭いがかなり強いので他の葉との判別ができなくなってしまったものと思われる．親戚の家ではどこかにニラを植えたという記憶だけが間違いのもとになった．昭和58年にスイセンの花単独による中毒[1]が発生しているが，過去には今回と同様にニラの葉と一緒に刈り取っての事故がいくつか報告[7]されており，充分に気をつけなくてはならない事例であった．また事例-2のサトイモ科には針状結晶が多数存在し，この結晶が喉などに刺って痛みを覚える．今回の原因はシュウ酸カルシウム針状結晶によるものと思われた．コンニャクのキゴが混入した原

*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．昭和63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63 .4	4／4	スイセン	リコリン
	.12	1／1	コンニャク	シュ酸カルシュウム
2.	.6	1／1	イワシ	ヒスタミン
	.10	1／1	イワシ	ヒスタミン
	平成元年.3	13／13	カジキマグロ	ヒスタミン
3.	昭和63 .7	1／1	牛乳	酸敗
	.8	1／1	牛乳	酸敗
4.	.9	3／4	野菜スープ	銅
	平成元年.2	4／4	塩漬タラの芽	銅
5.	昭和63 .6	1／1	メロン	エタノール，酢酸エチル
	.10	2／2	一口カツ	腐敗
	平成元年.1	3／3	ベーコン	フェノール類
6.	昭和63 .11	1／1	フグ	フグ毒
	.12	1／1	フグ	フグ毒
	.12	2／2	フグ	フグ毒
	平成元年.2	1／1	フグ	フグ毒

因を調査したところ，前年度にコンニャクを栽培したためコンニャクのキゴが残ってしまったものと判明した．

その他の事例として同年5月，八百屋で購入したセリに毒ゼリ(セリ科)が混入しているようだがという訴えが購入者からあった．枝先が三ツに分かれ，毛が生えているものは食べてはいけないという知識をもっていたためである．鑑定の結果，毒ゼリではなく有毒植物キツネノボタン(キンポウゲ科)であった．キツネノボタンの葉は3裂，托葉，刺状鋸葉，茎と葉の付き方は互生，3出複葉である．一方，セリは深裂，鋸葉，互生，2～3回羽状複葉である．この点で明確に区別がつく．毒成分はプロトアネモニン，中毒は軽症だが胃腸炎，皮膚炎を起こす[8]．誤食すると口の中が辛くピリピリし出すので通常，吐き出してしまう．この八百屋で販売していたセリは土手に生えていた植物を機械的に刈り取ったことが後の調査で分かった．キツネのボタン以外にも種々雑草が混在していたと推定する．

2．ヒスタミンによる食中毒事例

事件の概要　事例-1：昭和63年6月　大手のスーパーでウルメイワシ(生干し)1パック4尾入りを購入，夕食に焼いて1名が喫食，直後から舌がピリピリとする刺激を覚えた．さらに2時間後から水様性下痢，腹痛及び吐気を呈した．

事例-2：同年10月　米飯，ウルメイワシ(生干し)，しじみ佃煮及び漬物を夕食に1名が喫食，1時間程から顔の熱灼感，紅潮及び目の充血等を呈した．

事例-3：平成元年3月　某社員食堂でカジキマグロの照焼き定食を13名が喫食し，1時間後に顔面紅潮，ジンマシン等アレルギー様症状を呈した．

①試　料　事例-1は同一ロット品であるウルメイワシ丸干し，事例-2はウルメイワシ丸干し参考品及びしじみ佃煮，事例-3は検食，残品，検査用検体残品の3種．

②原因物質の検索　事例-1，事例-2で搬入されたイワシは，特に異常はなかったが，事例-1の場合はわずかながら鮮度低下を認めた．患者にかゆみ，発疹症状は見られなかったが，舌に刺激が認められたことからヒスタミンの生成が疑われた．そこで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行った．陽性スポットが得られたのでHPLCによる定量分析[9]を行い，事例-1の試料からヒスタミン340mg%，カダベリン26mg%，チラミン87mg%及びプトレシン24mg%をそれぞれ検出した．揮発性塩基窒素(VBN)は140mg%であった．事例-2のイワシ丸干しからヒスタミン252mg%，カダベリン63mg%及びチラミン10mg%をそれぞれ検出した．VBNは73mg%であった．しじみ佃煮からはいずれの腐敗アミンも検出されなかった．過去にグルタミン酸ナトリウムによる中国飯店症が発生[10]しているので，その確認の有無から参考に分析を行った．L-グルタミン酸ナトリウムは1.8%で正常範囲であった．事例-3の残品からヒスタミン98mg%を検出した．VBNは22mg%であった．

③考　察　ウルメイワシは小売店が大手スーパーから発泡スチロール入りを仕入れ，4尾1パックに小分けして冷蔵ショーケースに保管，販売していた．しかしいずれの事例も高濃度のヒスタミン及び不揮発性腐敗アミンが検出され，保存の状態に問題があったのではないかと推察される．昭和61年にも今回の事例と同様にイワシ丸干しによるヒスタミン中毒事件[4]が発生している．やはり保存の状態が悪くイワシの鮮度が低下していたためである．事例-1では夫婦で喫食しようとして夫の方が先に口にしたところ，異常に気づいたので妻は口にしていない．事例-3では社員食堂の残品のカジキマグロの照焼のみにヒスタミンが検出され食堂での保存状態に問題があった．

3．牛乳の腐敗による有症苦情事例

事件の概要　事例-1：昭和63年7月　コンビニエンスストアでビン入り牛乳を購入した男性1名が昼近くに飲用，直後から異味を感じ12時間後には吐気，腹痛及び下痢を呈した．

事例-2：同年8月　200ml入り紙パック牛乳を購入し，2名が喫飲したところ味が苦く，直後から嘔吐，腹痛を呈した．

①試　料　事例-1はビン入り牛乳残品と同メーカー参考品，事例-2は開封されたパック牛乳残品及び参考品．

②原因物質の検索　事例-1の牛乳ビンの壁には小粒凝固物が付着及び腐敗臭を認めた．pHは残品6.1，参考品6.7，酸度(乳酸%)は0.23，0.13と明らかに差が見られた．70%エタノールによる新鮮度試験も残品だけに凝固反応を認めた．事例-2は外観上，異常はなかったものの微に腐敗臭を認めた．pHは残品6.4，参考品6.5，酸度は0.19，0.13が得られ，残品の新鮮度試験でも陽性であった．

③考　察　残品牛乳は事故発生の4日から約2週間前の製造品のもので，スーパーで販売されていた．牛乳ビンの壁には蛋白凝固物が付着，かつ腐敗臭を認め，かなり酸敗が進んでいた．事例-1は苦情者のみが喫飲，また事例-2の場合は2名共喫飲して中毒症状が見られた．新鮮な牛乳のpHは6.4～6.8，酸度は0.13～0.15の範囲である．今回の牛乳についてはこれらの範囲を超えていた．昭和62年にも学校給食に配布された牛乳で中毒[5]が発生しているが保存状態に問題があった．今回も同様なケースと考える．

4．重金属による有症苦情事例

事件の概要　事例-1：昭和63年9月　家庭でコンソメ，人参，キャベツ及びニンニクの材料を銅鍋で煮込んで野菜スープを作り，その日の夕方家族4名が喫食した．翌日，鍋に残った野菜スープを再加熱し家族全員で喫食したところ，3名(1名は不明)が喫食後30分から吐気，嘔吐，しぶり感を伴う腹痛及び下痢を呈した．

事例-2：平成元年2月　お土産用のタラの芽の塩漬品を家族4名が塩出し後，鰹節，醤油をかけて喫食，全員が2時間後から吐気，緑色の水様性下痢を呈した．

①試　料　事例-1は夫が昼食弁当用に職場に持ってきた野菜スープ残品，事例-2は残品と未開封のタラの芽塩漬品．

②原因物質の検索　残品のスープはやや黒味がかかっていた．再加熱した野菜スープから中毒が発生したことから銅鍋を疑い重金属分析を行った．その結果，銅42ppmを検出した．事例-2は中毒症状，緑色下痢便であったことから銅を中心に分析を行い，残品及び参考品からそれぞれ26，38ppmの銅を検出した．

③考　察　事例-1は野菜スープを再加熱した2日目に中毒が発生したことから，その原材料に原因があるとは考えにくかった．1日目から2日目の間になんらかの変化があったものと推定した．しかし，特に残品が黒味がかっていたので銅鍋からの銅の溶出に疑いをもった．

事例-2のタラの芽は中国産だが某県の製造元で塩漬，漂白及び調味料を添加後，さらに天然添加物の銅クロロフィリンナトリウムを添加していたことが後の調査で判明した．昭和61年に梅に添加された銅による食中毒[2]と今回の中毒が銅を添加した点で酷似していた．

銅によるヒトの軽症中毒量は明確でないが，硫酸銅の経口摂取で60～120mgで嘔吐や下痢が見られ，多量になると腹部の激痛を訴え，胃腸炎が進行し血便が起こる[11]．二例とも検出された銅の濃度は正常範囲を極端に超えているレベルとは考えにくいが，事例-1の様に容器からの溶出で42ppmも検出されたことは，野菜スープをガラス容器等へ移し変えておかなければならない事例であった．

また，同年9月主婦が鰹節を削って，だし取りをした後に粕の鰹節を金網ですくったら，鍋の底に金属の粒が沈んでいた．水銀の様に見えるが，という訴えであった．この粒は金属光沢をしていた．この一部についてReinsch法による定性試験を行ったところ陽性を示した．本品は水銀の粒であった．その他使用した鰹節や塩について綿密な検査をしたが水銀は検出されなかった．しかし本人は体温計や温度計を使用していないと述べていることから，混入経路は不明である．

5．異臭味による有症苦情事例

事件の概要　事例-1：昭和63年6月　主婦が朝食の後にメロンを喫食したところ味が異常で野菜のような感触がした．直後から舌の先が痛み，痺れ感，上下の唇の内側がヒリヒリ，喉の奥が焼けつく様に痛んだ．

事例-2：同年10月　モモ一口カツ用豚肉を購入し，カツにして2名が喫食したところ3時間後から2名共吐気，下痢及び顔(1名)に発疹を呈した．

事例-3：平成元年1月　3名がベーコンを喫食したところ臭いがきつく12時間後に舌と喉が赤くはれあがった．

①試　料　事例-1はメロン残品，事例-2は一口カツ残品，事例-3はベーコン残品．

原因物質の検索　事例-1の搬入されたメロンは柄の部分から過熟し腐り始めていた．発酵物質の生成が考えられたのでヘッドスペース法によってこれらの物質を中心に検索を行った．その結果エタノール及び酢酸エチルが確認された．GCにより濃度はそれぞれ650ppm，420ppmであった．事例-2の一口カツ残品はすでに腐敗臭を認め，揮発性塩基窒素も29mg%を示した．事例-3のベーコンは中毒症状から刺激性物質の可能性が大きかった．搬入された残品は手作りの表示があり，通常品と比較して強いスモーク臭が認められた．水蒸気蒸留からGC-MSによる揮発性物質の検索を行い，フェノール及びその誘導体として2-メトキシ-4-メチル-，2-メトキシ-4-プロピル-，4-メチル-，2，6-ジメチル-フェノール類を確認した．GCによりフェノールは40ppmであった．

③考　察　メロンは購入してから1週間を経ていたため発酵し始めエタノールや酢酸エチルが生成したものと推定する．これらの化合物の低濃度摂取による中毒症状は明確でないが，5,600ppmのエタノールガス，400ppmの酢酸エチルガスそれぞれの暴露により眼，鼻，喉に刺激症状を起こすと報告されている[11]．いずれもガス体による症状なのでメロンを喫食した時の摂取量と直接比較することはできないが，恐らく刺激性作用を与えたものと考える．また，一口カツは搬入した時すでに腐敗を認め，VBNも高い値を示した．しかし苦情者らは臭いに関して異常を訴えていないので，症状との関係は明確でなかった．一方，食肉製品を充分に燻煙させると風味のある製品が得られ，特に手作りベーコン等には好まれている．燻煙中のフェノール画分が風味に重要な役割を果たしているからである．一般に燻煙中のフェノール類の濃度は20～30ppm程度と報告されている[12]．今回，検出されたフェノール40ppmは異常に高い値ではないが，フェノール類は刺激性，腐食性の強い化合物であることからベーコンからの経口摂取による喉など粘膜組織への刺激はある程度考えられることであった．

6．フグによる食中毒事例

事件の概要　事例-1：昭和63年11月　素人が千葉沖に行って釣ってきたショウサイフグ(本人の証言)を本人が調理して，切り身4匹分と親指大の肝臓4ヶを鍋にして喫食し，約40分後から口唇の痺れ，知覚障害，言語障害及び歩行困難などを呈した．直ちに救急車で大病院に運ばれた．2日目に担当医から管轄の保健所に屈出があった．

事例-2：同年12月　フグ刺(ナシフグの身，トラフグの皮)セットを購入，22時頃家族1名が野菜炒と一緒に喫食，1時間後から口の痺れ，歩行困難になりタクシーで病院に運ばれた．当直医からフグ中毒の疑いがある旨の連絡が入った．

事例-3：同年12月　スーパーで購入したフグ刺を主人が7割程喫食したところ30分後から舌の痺れ，首のうしろ側が硬直，妻は刺身3切れ，皮を二箸つまんだところ15分位して舌が痺れてきたので無理に吐き，その後回復した．診察した医師からフグ中毒の疑いがある連絡を受けた

事例-4：平成元年2月　大手スーパーで購入したフグチリ，フグ刺を1名が喫食，10分位から腹痛，下痢及び嘔吐症状を呈した．腹部と足が痺れ，直立が困難になった．2病院で受診し，医師からフグ中毒の疑いがあると言われ保健所に屈出があった．

①試　料　事例-1は患者血液，鍋の残品，フグの肝と思われるもの，フグむき身及びウマズラ骨付きむき身；事例-2は患者血液，フグ刺と皮のセット同ロット参考品；事例-3は患者血液，ショウサイフグ及びナシフグの身，ヨリトフグ及び種不明の皮；事例-4はフグチリ，フグ刺及び皮．

②原因物質の検索　症状から典型的なフグ中毒であった．厚生省法[13]に従って生物学的方法で検査を行った．事例-1の患者血液のフグ毒は1.0MU／g以下，残品は1.0以下～6.0MU／gであった．事例-2の患者血液は1.0MU／g以下，ナシフグ刺1.2～40MU／g，トラフグの皮2.9MU／gであった．事例-3のショウサイフグ9.8MU／g，種不明の皮7.4MU／g，ナシフグ5.4MU／g，ヨリトフグ2.7MU／g，患者血液1.5MU／g以下，フグ刺2.0～6.4MU／g，皮2.0～8.0MU／gであった．事例-4の患者血液1.5MU／g以下，フグチリ1.6～9.6MU／g，

フグ刺8.5MU／g，皮5.5MU／gであった．

③考　察　毎年，フグによる中毒が発生しているが，従来は素人が釣って来たフグを自ら調理し喫食した時に限っていた[4]．しかし今回の事例は調理品による中毒事例である．事例-1は2日目に担当医から連絡が入ってきたため，事件の探知は手遅れとなった．患者は重体に落ち入ったが懸命の治療の結果，命は助かった．患者の血液は回復した時点のため，もはやフグ毒を認めることはできなかった．残品は1.0以下～6.0MU／gの範囲を示し，無毒と言われる10MU／g以下であった．しかし鍋の残品はフグの身が骨にかろうじて付いている状態で，肝も他の残品と分けるのがやっとであった．すでにフグ毒は分散してしまったと思われる．事例-2～4は他県で調理されたフグ刺と皮の入ったセット品が都内のデパート，スーパーで販売されていたものから中毒が起きている．今回の中毒は輸入フグで占められていることが判明した．しかし，従来からナシフグ及びヨリトフグの皮は可食とされていた．我々は以前から同じ種のフグでも取れる海域によって毒化が異なると推定していた．最近，野口ら[14]も輸入ナシフグの皮に高濃度のフグ毒が分布していることを再確認している．相次いで事件が発生したことから厚生省は事態を重くみ，平成元年1月ナシフグの取り扱いに関して通知[15]を出して注意を促した．

フグ取扱業等取締条例施行規則の改正[16]が行われて，都内でもフグ刺が自由に購入できるようになった．時には予期せぬ中毒が起きることもあり監視を強化しなければならない事例であった．

7．毒物混入による事例

事件の概要　平成元年1月，ＪＲ線某駅前の自動販売機で主婦が缶コーヒーを1本のつもりで購入したら，2本の缶コーヒーが出てきた．しかし不思議とも思わず，その1本を駅の待合室で飲用した．もう1本を車中で寿司と一緒に飲んだところ，直ちに吐気をもようし喫食したものをほとんど吐いてしまった．この症状は帰宅してからも続いた．その後激しい下痢が続き，さらに口の囲りにびらんを呈した．翌日，病院で治療した後に管轄の保健所に屈けた．

①試　料　缶コーヒーの底にわずかに残った内容液．

②原因物質の検索　缶コーヒーの蓋には青緑色を認めた．わずかに残った内容液をビーカーにあけかえたが先の青緑色と同一で，しかもコーヒー色は全く失われていた．臭いは極めて強い刺激臭を認め，化学物質が混入しなければこの状態にはなり得ないと判断した．激しい嘔吐，下痢及び口の囲りのびらんの三つの症状を同時に呈する毒物で最も可能性が大きいのはパラコート類であった．そこでHPLCによる微量分析[17]を試みたところ，パラコート1％，ジクワット1.4％を検出した．

③考　察　搬入された缶コーヒーの状態から食中毒事例としての範囲を超えていた．すなわち，コーヒー色が失われて青緑色一色であること，極めて強い刺激臭が認められ毒物混入の疑いがあった．患者は嘔吐と激しい下痢を起こしていること，さらに口の囲りにびらんが見られたことから，この三つの症状を考え合わせるとパラコート類の可能性が大きかった．数年前に自動販売機の缶ジュースにパラコートを混入した事件が発生し社会に不安を与えた．それ以後，パラコートには青色，刺激臭及び催吐剤を添加して自殺や殺人事件の発生を防止してきた．しかし，今回搬入された残品の形態と中毒の症状を考え合わせた時，喫飲者の命に係わる危険性が大きいと判断した．そこで管轄の保健所から某県の警察に調査を委ねた．その結果，科学捜査研究室でも残品からパラコート及びジクワットを検出し，本人の事情聴取の結果，自らパラコートを添加した自殺未遂事件であることが判明した．本人の動機は不明瞭な点が多かったが，迅速に対応し尊い命を落とす事件にならなかったことは不幸中の幸いであった．

本報告は昭和63年度に起きた化学性食中毒のうち，1．有毒植物混入による食中毒事例，2．ヒスタミン食中毒事例，3．牛乳の腐敗による有症苦情事例，4．重金属による有症苦情事例，5．異臭味による有症苦情事例，6．フグによる食中毒事例，7．毒物混入による事例の7事例を取り上げた．これらの調査は衛生局環境衛生部食品衛生課，各関連の保健所と協力して実施したものである．

謝　辞　キツネノボタンの鑑定をしていただきました国立科学博物館植物部　金井弘夫先生に深謝致します．

文　献

1）田村行弘，真木俊夫，観　公子，永山敏廣，直井家寿太：東京都衛研年報　34，171-177，1983.
2）田村行弘，真木俊夫，観　公子，永山敏廣，二島太一郎：東京都衛研年報　36，191-198，1985.
3）真木俊夫，観　公子，永山敏廣，飯田真美，二島太一郎：東京都衛研年報　37，163-165，1986.
4）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）真木俊夫，観　公子，永山敏廣，飯田真美，川合由華，二島太一郎：東京都衛研年報　39，126-129，

1988.
6) W.Döpke : Archiv der Pharmazie **295**. Bd. 606, Nr.8 1962.
7) 中村将善：身近にある毒草100種の見分け方 p.26, 1988, 金園社
8) 奥田拓男編：天然薬物事典 p.380 1987, 広川書店
9) 日本薬学会編：公衆衛生協議会資料, p.42, 1983.
10) 西垣 進, 田村行弘, 真木俊夫他：東京都衛研年報 **23**, 211-216, 1971.
11) 後藤 稠他：産業中毒便覧増補版 p.171, 729, 899, 1984, 医歯薬出版.
12) グュエン・ヴァン・チュエン：食の科学 **129**, 43-48, 1988.
13) 日本薬学会編：衛生試験法 注解 p.463, 1980.
14) 毎日新聞：平成元年5月5日 朝刊.
15) ナシフグの取扱いについて：平成元年1月19日 衛乳第5号.
16) フグ取扱業等取締条例施行規則の全部改正について（通知）昭和61年6月21日 61衛環獣第120号.
17) Toshihiro Nagayama, Toshio Maki, Kimiko Kan, Mami Iida, and Taichro Nishima : J.A.O.A.C. **70**, 1008-1011, 1987.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 169-174, 1989

輸入食品中のフマル酸第一鉄分析法

天 川 映 子*, 大 西 和 夫*, 西 島 基 弘**

Analytical Method of Iron (II) Fumarate in Imported Foods

EIKO AMAKAWA*, KAZUO OHNISHI* and MOTOHIRO NISHIJIMA**

An analytical method of iron (Ⅱ) fumarate (FFe) in foods was studied. FFe in foods was effectively separated and cleaned up by simple sedimentation method using with carbon tetrachloride.

In qualitative analysis, FFe in the sediment was identified by infrared spectrometry (IR). When FFe should be detected on the test, next confirmatory identification was carried out. FFe in the sediment was dissociated to iron and fumaric acid with hydrochloric acid and then they were analyzed by atomic absorption spectrometry (AAS) and high performance liquid chromatography (HPLC) respectively. Detection limit of FFe by IR was 40 μg/g in sample.

In quantitative analysis, iron in sample was measured by AAS after dry ashing. Fumaric acid in sample was measured by HPLC. Recovery rates of iron and fumaric acid were 96.1－100% and determination limits were 1 μg/g in sample in either case.

This method is efficiently useful for analysis of FFe in imported foods.

Keywords：iron (Ⅱ) fumarate, imported foods, sedimentation method, IR

緒　　言

最近，加工食品の輸入増加に伴いフマル酸第一鉄(FFe)，ステアリン酸マグネシウム，酸化亜鉛などのようにわが国では指定外であるが，外国では許可されている食品添加物を使用した食品の市場にでる可能性が大きくなってきている[1-3]．しかし，現在これらの添加物に対する検査体制が十分確立されていない．その背景の一つに，これら指定外添加物の輸出国での使用状況や法的規制に関する情報量が乏しいこともあって，試験法の検討が十分行われていない事があげられる．従ってこれらの指定外食品添加物について早急に試験法を作成する必要がある．そこで著者らは，これらについて分析法を順次検討することとし，今回はFFeを対象とした．

FFeは鉄の強化剤として米国をはじめ，諸外国で許可されており[4,5]，ビスケット，ホットケーキミックスなどの小麦粉製品や粉ミルクなどに用いられている．食品に添加された鉄強化剤の分析は，通常その食品中の鉄含有量を測定することにより行われており[6,7]，個々の鉄化合物そのものについての定性分析法の報告例は少ない．しかしFFeのように指定外添加物の場合，特異性の高い定性分析法が必要である．

そこで，食品中のFFeを沈降法[8]で分離した後，赤外分光法(IR)，高速液体クロマトグラフィー(HPLC)[9]及び原子吸光法[6]により同定する方法を中心に検討した．また本法を，FFeが使用される可能性のある市販の輸入菓子類に適用したのでその結果も併せて報告する．

実 験 方 法

1　試料

昭和63年8月から平成元年5月の間に東京都内の小売店で購入した輸入菓子類20検体を試料とした．

2　試薬

FFe(含有量95.0%以上)は和光純薬㈱製無規格品，乳酸第一鉄三水和物，リン酸第二鉄，酸化第二鉄及びクエン酸第二鉄アンモニウム(褐色及び緑色)は市販無規格品，

*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
**同生活科学部

ピロリン酸第二鉄(溶性)，還元鉄及びクエン酸第二鉄水和物は市販一級品，グルコン酸第一鉄は藤沢薬品㈱製，鉄クエン酸コリン複合体はSigma Chemical Company ㈱製をそれぞれ用いた．その他の試薬はいずれも市販特級品を使用した．

3　器具及び装置

1)遠沈管：ガラス製，円錐型25ml用．

2)水流ポンプ：有機溶媒捕集用トラップ付アスピレーター．

3)赤外吸収スペクトル測定用装置：赤外分光光度計IR-810型，錠剤成形用加圧器ミニプレスMP-1型，錠剤成形器(直径3㎜)，ビームコンデンサーBC-3型及びデータ処理プログラムDP-A810／98はいずれも日本分光工業㈱製．

4)原子吸光光度計：Instrumentation Laboratory ㈱製VIDEO-22型．

5)高速液体クロマトグラフ：TWINCLE型，日本分光工業㈱製．

6)HPLC用検出器：UVIDEC-100-Ⅲ，日本分光工業㈱製．

4　HPLC測定条件

カラム：Shodex Ionpak KC811，8㎜i.d.×300㎜，50℃．移動相：0.01Mリン酸．流速：0.8ml／min．測定波長：210nm．注入量：50μl．

5　分析操作法

1)定性法

①IR測定用試料の調製：小麦粉，粉ミルクはそのまま，菓子類，パンなど水分含量の高い試料では，粉砕後100℃で約1時間乾燥した後さらにホモジナイザーでよく粉砕したものを試料とした．試料5gを遠沈管にとり，四塩化炭素20mlを加えガラス棒でよく混和した．約5分間放置した後，水流ポンプで吸引し上層の固形物と四塩化炭素を，遠沈管底部に約2mlを残して除去した．さらに沈でん物に四塩化炭素10mlを加え，同様の操作を2～3回繰り返した．次に沈でん物に水を5ml加えよく混和した後，約5分間放置した後，上層の水を除いた．同様の操作を，さらに2～3度繰り返した．次いで沈でん物にアセトンを5ml加え同様の操作を2回繰り返し，沈でん物を脱水した．最後に残ったアセトンを減圧留去して得られた褐色の粉末をIR測定用試料とした．

②IRスペクトルによる同定：IR測定用試料約1mgをとり，臭化カリウムを用いた錠剤を調製して，測定波長4000～400cm^{-1}におけるIRスペクトルを測定しFFeの分析を行った．

③原子吸光法及びHPLCによる同定：IRでFFeが確認された場合は，IR測定用試料に0.1N塩酸5mlを加え，超音波発生器に5分間かけた後，エタノール2mlを加えて溶解後，0.1N塩酸を加えて20mlにした溶液について，原子吸光法により鉄[6]を，HPLCを用いてフマル酸[9]を各々確認した．

2)定量法

定量は試料中の鉄とフマル酸を各々測定することにより行った．

鉄の場合は試料2～5gを秤取し，常法により乾式灰化した後，原子吸光法[6]により定量した．フマル酸は試料2gを200ml用三角フラスコに秤取し，0.1N塩酸10mlを加え，超音波発生器で10分間処理し，次いでエタノール5mlを加えよく混和した後，0.1N塩酸で50mlとした．静置後上澄液をミクロフィルター(0.45μm)でろ過し，得られたろ液についてHPLC[9]を行い，フマル酸を定量した．

結果及び考察

1　定性法

1)試料からのFFeの分離

FFeは鉄化合物であるため，比重が大きく，また水や有機溶媒に難溶な褐色の粉末である．これらの性質を利用して，試料から沈降法により分離する方法を検討した．

沈降法で用いる液体は，分離を目的とする物質を溶解しないことの他に，比重が大きいこと，その液体中で試料を混和した時，試料が均一に分散出来ることなどの条件を満たす必要がある．これらの条件をそなえたものとしてクロロホルム，四塩化炭素及び無機塩(塩化ナトリウムや硫酸ナトリウムなど)の溶液があり，食品中の異物の分離に用いられている[8]．今回はこれらのうち減圧下で容易に除去出来ることを考慮し，クロロホルムと四塩化炭素について検討した．またFFeが使用される食品は菓子類など小麦粉製品が多いので，小麦粉にFFeを添加したものを用いて比較した．

小麦粉に200μg／gになるように，FFeを添加した試料5gを別々の遠沈管にとりクロロホルム及び四塩化炭素を各々20ml加えよく混和した後，静置してFFeが沈降する様子を観察した．いずれも約1分間でほとんどのFFeが遠沈管底部に沈降し，小麦粉の大部分は上部に積層するのがみられた．FFeと試料との分離状況は，試料との境界面の明確さでは四塩化炭素の方が良く，また分離速度もやや速かった．これは20℃でクロロホルムの比重が，1.477～1.494であるのに比べて四塩化炭素は1.594～1.599と大きいためと考えられる．

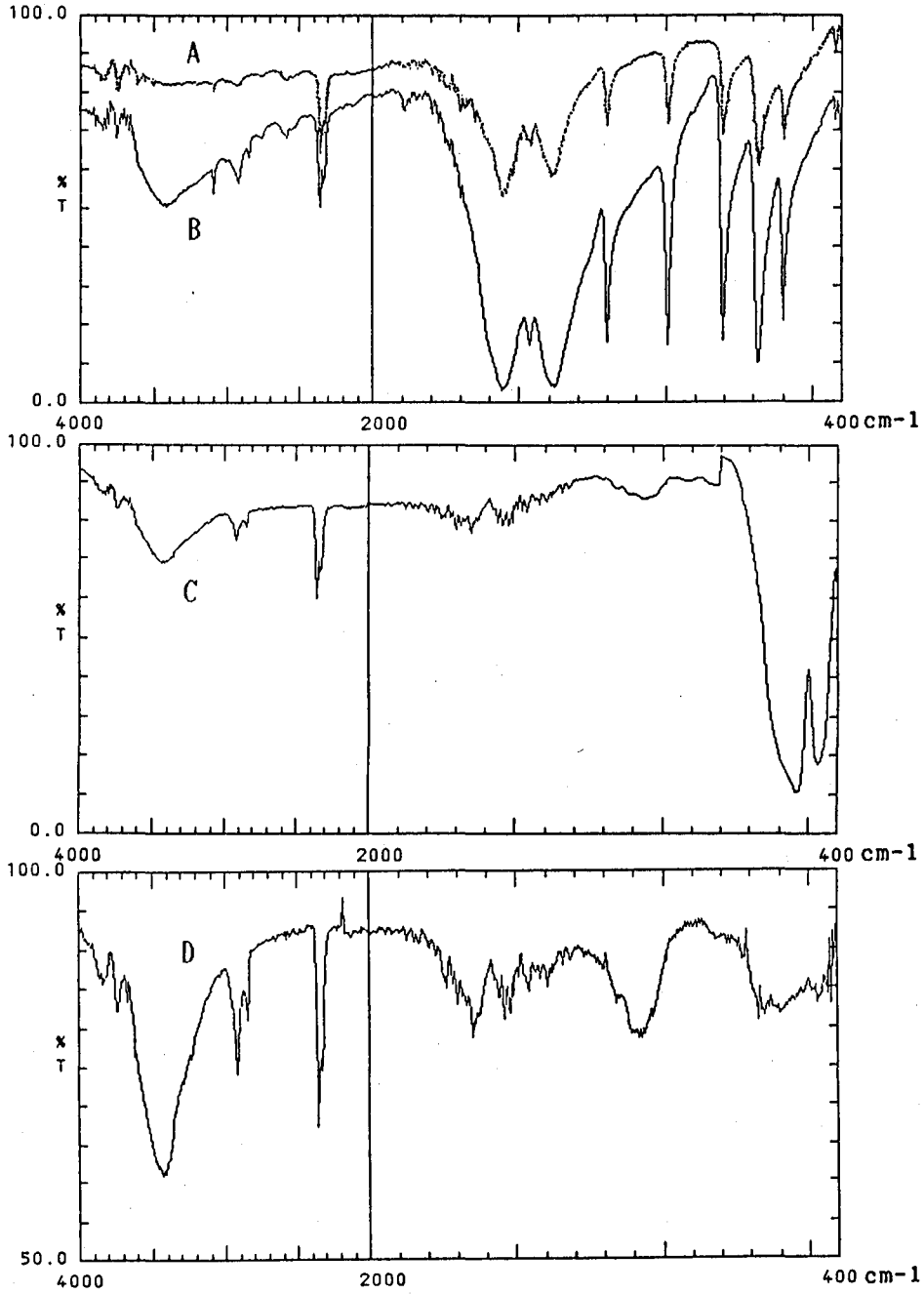


Fig. 1. IR spectrum of iron compounds
A : Iron(Ⅱ)fumarate
B : Iron(Ⅱ)fumarate added to cookie
C : Iron(Ⅲ)oxide
D : Reduced iron

以上の結果から以後の分離には四塩化炭素を用いることにした.

なお，クッキーやビスケットについても同様な検討を行った．これらに四塩化炭素を加えて混和すると試料の一部は沈降した．しかし，これに水を加えて混和すると，沈降した試料は水分を吸収して体積が増加して比重が四塩化炭素より小さくなるため，水層に移行し容易に除去出来た.

また試料を粉砕後，IR 測定用試料を調製するまでに要する時間はおおむね1時間弱であった.

2)FFe の同定

FFe の確認はまず IR スペクトルにより行った.

FFe は Fig. 1 の A に示したように1558及び1390cm^{-1}付近にブロードなピークを，1205，998，812，687及び603cm^{-1}に比較的シャープなピークを示した.

1558と1390cm^{-1}の吸収はカルボキシル基のもつ1610～1550cm^{-1}の逆対称伸縮振動，1420～1320cm^{-1}の対称伸縮振動による特性吸収[10,11]と考えられる．しかし，ニトロ基も1570～1500cm^{-1}，1370～1300cm^{-1}に吸収領域をもつ[10]など，他の官能基もこれらの領域で吸収を示すことから誤認を避けるため同定には1205～603cm^{-1}のピークも確認することとした．従って，IR でこれら1558，1390，1205，998，812，687及び603cm^{-1}のピークを認めたものについては，FFe を検出したものとした．また IR により FFe の存在が確認された場合，さらに原子吸光法により鉄を，HPLC によりフマル酸をそれぞれ確認することにした.

なお，最も検出感度の低い IR による FFe の検出限界は，試料中40 μg／g であった.

3)他の鉄化合物との判別

鉄化合物は一般に比重が大きく四塩化炭素中で速やかに沈降する．わが国で許可されている食品添加物のうち分子内に鉄を含むものとして，発色剤に硫酸第一鉄，着色料にグルコン酸第一鉄，鉄クロロフィリンナトリウム，酸化第二鉄，強化剤として乳酸第一鉄，塩化第二鉄，クエン酸第二鉄，クエン酸第二鉄アンモニウム(褐色及び緑色)，クエン酸第一鉄ナトリウム，ピロリン酸第一鉄及びピロリン酸第二鉄などがある．また，諸外国ではこれらの他にリン酸第二鉄，ピロリン酸第二鉄ナトリウム，鉄クエン酸コリン複合体，還元鉄及び炭酸第一鉄などが添加物として用いられている[12]．これらの物質が共存した場合の妨害について検討したところ，水に難溶な酸化第二鉄及び還元鉄は沈降法では FFe と分別できなかったが，他の鉄化合物は水溶性であるため水洗により容易に除去出来た．しかし，酸化第二鉄及び還元鉄は Fig. 1 に示したように，いずれも IR スペクトルにより FFe と容易に判別出来た.

2　定量法

まず，沈降法により分離した FFe を測定する方法について検討した.

小麦粉に200 μg／g になるように FFe を添加した試料5 g を秤取し定性法で述べた方法に従って FFe を分離した．得られた FFe に0.1 N 塩酸 5 ml を加えて超音波発生器に 5 分間かけた後，エタノール 2 ml を加えて溶解後，0.1 N 塩酸で20ml とした．この溶液について原子吸光法により鉄含量を測定して回収率を求めたところ，68～75％であった．これは，FFe が，わずかであるが水に溶解することと分離に用いた液体をアスピレーターで吸引除去する際，FFe の微細な粉末の一部が損失することなどに起因すると考えられる．そこで，定量分析は従来の方法と同じく試料中の鉄とフマル酸を測定することにした.

1)妨害物の影響

フマル酸を HPLC で分析する際，検出器の測定波長を210nm とするとフマル酸は，他の有機酸に比べて約100倍検出感度が高いことなど[9]から，試料抽出液について特に前処理を行わなくても，対象としたいずれの試料でもクロマトグラフ上に妨害ピークは見られなかった.

2)添加回収率

市販試料を用いて添加回収実験を行った結果を Table 1 に示した.

試料 2 g に FFe 5.0mg すなわち鉄として1.64mg／g，フマル酸として3.36mg／g を添加した時，いずれも回収率は96.1～100％と良好であった．また，定量限界はいずれの場合も 1 μg／g であった.

試料は，いずれも定性分析で FFe が検出されないことを確認したものであるが，定量操作を行うと小麦粉製品からフマル酸と鉄，粉ミルクから鉄が検出された．小麦粉には天然由来の鉄が0.2～0.6mg／100g 含まれていることは知られている[13]．小麦粉製品から検出された鉄は主に原料とした小麦粉に由来するものと思われる．粉ミルクから検出された鉄は強化剤の表示があることから添加物由来と考えられる．フマル酸は酸味料あるいは pH 調整剤として用いられる他，トリカルボン酸サイクルの構成物質として動植物に広く分布している[14-17]．測定値から推察すると検出されたフマル酸は，いずれも天然由来と思われる.

Table 1. Recoveries of iron fumarate in commercial foods

Sample	Fumaric acid			Iron		
	Added (mg/g)	Found (mg/g)	Recovery (%)	Added (mg/g)	Found (mg/g)	Recovery (%)
Bread	0	0.05		0	0.01	
	3.36	3.41	100	1.64	1.64	99.4
Wheat flour	0	0.09		0	0.01	
	3.36	3.32	96.1	1.64	1.65	100
Cookie	0	0.06		0	0.01	
	3.36	3.42	100	1.64	1.62	98.2
Milk powder	0	0.00		0	0.07	
	3.36	3.33	99.1	1.64	1.70	99.4

Added amount of iron fumarate : 5.00mg/g (3.36mg/g as fumaric acis, 1.64mg/g as iron respectively). n = 3

Table 2. Samples and their countries of origin

Samples	Countries of origin	n
Biscuits	Netherland	4
	England	3
	Korea	2
	Finland	1
	France	1
	Singapore	1
Cookies	Korea	2
	Denmark	1
	Netherland	1
	U.S.A.	1
Wafers	Korea	2
	Switzerland	1

Iron fumarate was not detected in all samples.
Detection limit>40 μg/g

3 輸入食品への適用

Table 2に示した市販の輸入菓子類20検体に本法を適用したところ，いずれの試料からもFFeは検出されなかった．

まとめ

輸入食品中のFFe分析法について検討した結果，下記のことが明らかとなった．

1)定性分析に際し，試料からのFFeの分離に沈降法を試みたところ，分離用液体として四塩化炭素を用いることで，1時間弱と比較的短時間に効率よくFFeの分離精製が出来た．FFeの同定はIRスペクトルにより行った後，さらに原子吸光法により鉄を，HPLCでフマル酸をそれぞれ確認した．IRでのFFeの検出限界は40 μg/gであった．

2)FFeの定量は試料中の鉄とフマル酸を原子吸光法とHPLCで各々測定することにより行った．小麦粉での添加回収率は鉄及びフマル酸ともに，96.1～100%と良好であり，定量限界はいずれも1 μg/gであった．

3)FFeの使用が予想される市販の輸入菓子類20検体について本法を用い分析したところ，いずれからもFFeは検出されなかった．

本法は簡便な操作により試料からFFeを分離，確認出来るため，輸入食品中のFFe分析法として有効に使用できるものと考える．また，定量法は試料中の鉄とフマル酸を各々測定する方法であるが，これらはいずれも天然に分布しているため，FFeの定量値とは厳密には言い難い．沈降法での回収率が68～75%であることから，今後，沈降法での回収率の向上をはかり，FFeとして分離したものについて鉄あるいはフマル酸含量を測定することにより，FFeを定量する方法を検討する予定である．

文 献

1) 厚生省環境衛生局食品衛生課輸入食品検討会，厚生省輸入食品衛生監視員協議会編：昭和57年輸入食品検査における不適格品一覧表，57，1983，日本食品衛生協会，東京．
2) 厚生省生活衛生局検疫所業務管理室輸入食品検討会，厚生省輸入食品衛生監視員協議会編：昭和58年輸入食品検査における不適格品の概要，65，1984，同上，同上．
3) 同上：昭和59年輸入食品検査における不適格品の概要，50，1986，同上，同上．
4) J.C. Fritz, G.W. Pla, T. Roberts, J.W. Boehne, E.L. Hove : J. Agr. Food Chem., 18, 4, 647-651, 1970.
5) B.R. Schricker, D.D. Miller : J. Food Science, 47,

723-727, 1982.
6) 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，58-62，1984，講談社，東京.
7) 石館守三，谷村顕雄監修：第5版食品添加物公定書解説書，D-700-D-703，1987，廣川書店，東京.
8) 日本薬学会編：衛生試験法注解，473-474，1980，金原出版，東京.
9) 天川映子，大西和夫，西島基弘，坂井千三：食衛誌，29，4，267-272，1988.
10) 堀口　博：赤外吸収図説総覧，214，1977，三共出版，東京.
11) S. Bassler 著，荒木　峻，益子洋一郎訳：有機化合物のスペクトルによる同定法第二版，94，1969，東京化学同人，東京.
12) 楠八重克巳編：食品添加物総覧，205-264，1987，食品化学新聞社，東京.
13) 科学技術庁資源調査会編：四訂日本食品標準成分表，40-42，1985，大蔵省印刷局，東京.
14) 化学大辞典編集委員会編：化学大辞典3，23-24，1981，共立出版，東京.
15) V.T. Turkelson, M. Richards：Anal. Chem., 50, 11, 1420-1423, 1978.
16) J.N. Mollica, M.F. Morselli：J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67, 6, 1125-1129, 1984.
17) H.S. Lee, R.E. Wrolstad：ibid., 71, 4, 789-794, 1988.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 175-177, 1989

天然着色料製剤中の糖類の分析

中島和雄*, 広門雅子*, 平田恵子*, 植松洋子*,
松井敬子*, 風間成孔*

Analysis of Saccharides in Natural Color Preparations

KAZUO NAKAJIMA*, MASAKO HIROKADO*, KEIKO HIRATA*, YOKO UEMATSU*,
KEIKO MATSUI* and MASAYOSHI KAZAMA*

Keywords：天然着色料 natural color, 糖 saccharide, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography

緒　言

天然添加物は，平成3年1月より，表示することが決まった．現在，天然添加物の規格化が進められている．しかし，天然添加物は，合成添加物と異なり単一の成分のものが少なく，ほとんどが複合成分からできている．そのため，天然添加物の規格化には検討しなければならないことが多い．その中で，天然色素は，合成色素にくらべ退色しやすいので，退色および変色の原因となる熱，光，金属イオンなどの影響を除くため，酸化防止剤および金属封鎖剤などが加えられていることがよく知られている[1,2]．一方，天然物であるので，原料由来のタンパク質，油脂類および糖類などが混入してくる．さらに増量等の目的で糖類が加えられている．しかし，これらのものについての報告は少ない．そこで，今回，天然色素中の糖類について原料由来の糖類と，増量等の目的で加えられている糖類について分析したので報告する．

実験方法

試料　東京都衛生局食品監視課より昭和63年4月から平成元年3月にかけて当所に送付された天然着色料製剤86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

糖の定性分析　試料50mg を水1 ml 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0.5ml をエタノール9 ml に溶かし，濃硫酸0.5ml および氷酢酸0.1ml を加えた試薬を，試料を展開した薄層板に憤霧し，120℃で10分間加熱した．

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．グルコース，ラクトース，サッカロース，マルトース，フラクトースおよびソルビトール，各々50mg を水50ml に溶かし，これらを標準溶液とし，試料と同様の方法で HPLC を行った．

HPLC の条件：カラム Nucleosil 5 NH_2(5 μm，4 φ×300mm)，溶離液　アセトニトリル：水(70：30)，流速 0.7ml／min，検出器 示差屈折計

結果と考察

天然色素製剤中の糖類の確認　表1に，標準品7種の糖の HPLC の保持時間と TLC の Rf 値を示した．これをもとに天然色素製剤中の糖類の確認を行った．天然色素中の糖類の HPLC による分析では，天然色素は NH_2カラムに吸着され糖の分析を妨害しなかった．また TLC による分析でも，糖は発色試薬であるアニスアルデヒドにより緑色を示したので天然色素の妨害を受けなかった．

表2に天然色素中の糖の定性分析の結果を示した．今回調査した天然色素製剤は86検体で，糖類を含むものは59検体(69％)であった．これらを，天然色素製剤の形状でみると，粉末製剤33検体中29検体(88％)，液状製剤53

*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

表1．標準品の糖類の分析結果

糖	HPLC の保持時間(分)	TLC の Rf 値
フラクトース	9.6	0.44
ソルビトール	10.2	ND
グルコース	10.7	0.43
サッカロース	13.2	0.35
マルトース	15.5	0.29
ラクトース	17.2	0.25
多糖類	ND	0.00

検体中30検体(57％)に糖類が含まれていた．一般的に，粉末製剤には，原料由来の糖類とは別に，増量等の目的で糖類が加えられていると考えられる．粉末ラック色素2検体と粉末コチニール色素2検体からは糖類は検出されなかった．これらは，天然物100％のものと考えられる．さらに，ラック色素はカイガラムシの分泌物であり，コチニール色素はエンジムシの乾燥粉末であるので原料由来の糖類もないためと考えられる．液状製剤は，粉末製剤にくらべ糖類を検出する割合が少なかった．その中でもモナスカス色素およびラック色素からは糖類が全く検出されず，また，ウコン色素からも6検体中1検体から微量の糖類が検出されただけで他の5検体からは検出されなかった．これらは，添加する対象食品を考慮しているためと考えられる．

クチナシ色素は，16検体すべてから糖類が検出された．これらの糖類は，グルコース，フラクトース，マルトースおよび多糖類であり，これらの糖類のパターンから原料由来の糖類が残留しているためと考えられる．

天然色素製剤中の糖類の定量分析　表3に天然色素製剤中の糖類の定量分析結果を示した．この表には，HPLC で分析した結果，天然色素製剤中に単糖類および二糖類を5％以上含むものを示した．また，多糖類はHPLC で分析できないので製剤中に多糖類を多量に含んでいても表に示していない．粉末製剤で5％以上の糖を含む検体は14検体で，そのうち12検体はラクトースであった．ラクトースは，牛乳からつくられるので原料由来のものではなく，すべて増量等の目的で加えられたものであると考えられる．また，製剤中の含量が90％を超えるものが3検体あった．アナトー色素の粉末1検体から93.5％のラクトースが検出されたが，アナトー色素は油溶性であるのにもかかわらず，他に脂肪酸エステル類などがないのに色素が水によく混ざることから，このラクトースは水に対して分散性をよくするために加えられていることが考えられる．液状製剤で5％以上検出され

表2．天然着色料中の糖類の分析結果

色素名	形状（検体数）		糖類を確認した検体数	
	粉末	液状	粉末	液状
アナトー色素	1	12	1	8
クチナシ色素	12	4	12	4
パプリカ色素	1	9	1	5
ラック色素	9	1	7	0
コチニール色素	4	4	2	3
ウコン色素		6		1
モナスカス色素		6		0
赤キャベツ色素	1	3	1	1
クロロフィル色素	1	3	1	2
ベニバナ黄色素		1		1
クチナシ青色素		1		1
スピルリナ色素	1		1	
カカオ色素	1		1	
β－カロチン		1		1
リボフラビン	1		1	
ノルビキシン，カラメル，モナスカス		1		1
クチナシ青，ベニバナ色素		1		1
ウコン色素，リボフラビン	1		1	
合計	33	53	29	30

表3．天然着色料製剤中の糖類の定量分析結果

色素名	形状	N	糖類	(%)
アナトー色素	粉末	1	ラクトース	93.5
クチナシ黄色素	粉末	3	ラクトース	94.9, 83.9, 50.4
	液状	1	ソルビトール	59.1
パプリカ色素	粉末	1	ラクトース	6.6
	液状	2	グルコース	15.7, 15.6
			フラクトース	12.9, 15.6
			サッカロース	13.1, 15.1
		3	ソルビトール	23.3, 10.3, 7.2
ラック色素	粉末	3	ラクトース	11.3, 10.3, 10.0
		1	フラクトース	8.9
コチニール色素	粉末	1	ラクトース	15.5
赤キャベツ色素	粉末	1	グルコース	6.3
			マルトース	5.7
クロロフィル色素	粉末	1	ラクトース	39.3
	液状	1	グルコース	14.3
			フラクトース	15.9
			サッカロース	12.9
クチナシ青色素	液状	1	グルコース	5.5
スピルリナ色素	粉末	1	ラクトース	46.7
リボフラビン	粉末	1	ラクトース	92.1
合計		22		

たものは8検体で，そのうち4検体はソルビトールを含んでいた．ソルビトールは，油溶性色素製剤であるクチナシ色素およびパプリカ色素の溶剤として使われていた．また，8検体中3検体は，グルコース，フラクトースおよびサッカロースを製剤中に約50%含むもので，これらの糖類はソルビトールと同様に溶剤の目的で使われたものと考えられる．これらの結果から，天然色素製剤に比較的多量に含まれる糖類は，ほとんどが添加されたものであることがわかった．

まとめ

天然色素製剤86検体中の糖類をHPLCとTLCで分析した．その結果，糖類は59検体(69%)から確認された．また，糖類は粉末製剤中の88%から検出された．定量分析の結果から，天然色素製剤に多量に含まれている糖類は，粉末製剤ではラクトースであり，液状製剤ではグルコース，フラクトースおよびサッカロースの混合物またはソルビトールを添加したものであった．

謝辞：試料収集にあたり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．

文献

1）柴田正美：フードケミカル，7，60-65，1988.
2）佐中　登：フードケミカル，8，55-59，1985.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 40, 178-182, 1989

天然着色料製剤中の色素成分の分析（第1報）アナトー色素中のビキシン，ノルビキシンおよびウコン色素中のクルクミンの定量

平田恵子*，広門雅子*，植松洋子*，中島和雄*，松井敬子*，風間成孔*

Analysis of Color Components in Natural Color Preparations (I) Determination of Bixin, Norbixin in Annatto Extracts and Curcumin in Turmeric Extracts

KEIKO HIRATA*, MASAKO HIROKADO*, YOKO UEMATSU*, KAZUO NAKAZIMA*, KEIKO MATSUI* and MASAYOSHI KAZAMA*

Keywords：天然着色料製剤 natural color preparations，アナトー色素 Annatto extracts，ウコン色素 Turmeric extracts，ビキシン Bixin，ノルビキシン Norbixin，クルクミン Curucumin，高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography

緒　言

わが国では，合成着色料は食品に添加された場合容器などへの表示を必要とするが，天然着色料はその対象からはずされていた．しかし，合成と天然の区別をしていない諸外国との整合化のため，わが国でも天然着色料をその対象とすることが決定されており，規格化が進められている[1,2]．そのためには，現在市販されている着色料製剤の実態を把握する必要がある．

しかし，市販の天然着色料は，使用食品も広範囲にわたっているため，色素成分が同一の着色料でも対象食品に合わせて種々の製剤が販売されており[2]，これら多数の製品について色素成分などを分析し，その実態を調査した報告は少ない[3-5]．

そこで今回，アナトー色素およびウコン色素を対象とし，その色素主成分のビキシン，ノルビキシンおよびクルクミンの分析をした．なお，合成添加物である水溶性アナトー(食品衛生法別表2に掲載)も参考として加えた．

また，分析法としてFAO／WHO規格の吸光度法[6,7]および高速液体クロマトグラフィー(以下HPLC法と略す)の適用を種々検討し，両者の値を比較した結果いくつかの知見を得たので報告する．

実験の部

1．試料　試料は，東京都衛生局食品監視課より昭和63年4月～63年12月の間に当研究室に送付された天然着色料製剤のアナトー色素(液状品12検体，粉末1検体)，アナトー色素と他色素の混合(液状品1検体)，ウコン色素(液状品6検体)，ウコン色素と他色素の混合(粉末1検体)，水溶性アナトー(液状品4検体)の合計25検体である．

2．装置　紫外可視分光光度計：島津製作所製UV-240型，高速液体クロマトグラフ：日本分光工業製BIP-1型，検出器：同870-UV型，データ処理装置：島津製作所製CR-6A型

3．試薬　(1)標準色素：ビキシンおよびノルビキシンは三栄化学工業製のビキシンパウダー(ビキシン含量90.5%)，ノルビキシンパウダー(ノルビキシン含量35.5%)を用いた．クルクミンはメルク社製(純度97%以上)を用いた．(2)HPLC用標準色素溶液：ビキシンおよびノルビキシンは，5．色素の定量(1)吸光度法により色素含量を測定した後，メタノールで50 μg／ml まで希釈しさらに移動相で1～20 μg／ml に希釈して用いた．クルクミンはエタノールで1～10 μg／ml に希釈して用いた．

*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

その他の試薬はすべて試薬特級品を用いた.

4．色素の確認試験 衛生試験法[8]を準用した薄層クロマトグラフィー(以下TLCと略す)およびHPLC法で行った. TLC条件-薄層板：シリカゲル薄層板(メルク社製シリカゲルG既製プレート), 展開溶媒：ヘキサン-ベンゼン-酢酸(6：3：1), HPLC条件は5．の(2)の定量法と同様である.

5．色素の定量 (1)**吸光度法**-色素確認後, FAO／WHO規格のANNATTO EXTRACTS[6], TURMERIC COLOUR[7]に準じ定量した.

ビキシンは試料をクロロホルムに溶解した後, $E^{1\%}_{1cm}$値を470nmにおける吸光度測定より求め, $E^{1\%}_{1cm}$=2,826(ビキシンの標準品の値)を用いて試料中の含有量(%)を算出した.

ノルビキシンは試料を0.1N水酸化ナトリウムに溶解した後, $E^{1\%}_{1cm}$値を453nmにおける吸光度測定より求め, $E^{1\%}_{1cm}$=3,473(ノルビキシンの標準品の値)を用いて試料中の含有量(%)を算出した.

クルクミンは試料をエタノールに溶解した後, $E^{1\%}_{1cm}$値を425nmにおける吸光度測定より求め, $E^{1\%}_{1cm}$=1,607(総クルクミン)を用いて試料中の含有量(%)を算出した.

(2)**HPLC法**-アナトー色素(水溶性アナトーを含む)の試料は0.5gを水で50mlとした後移動相で適宜希釈し, ウコン色素の試料は0.5gをエタノールで適宜希釈し, それぞれ0.2μmのミリポアフィルターでろ過したものを試験溶液とした.

測定条件(1)アナトー色素中のビキシンおよびノルビキシン　カラム：Nucleosil 7C18(4×250mm), 移動相：水-アセトニトリル-酢酸(30：70：1), 流速：1.5ml／min, 検出波長：455nm, 注入量：10μl　(2)ウコン色素中のクルクミン　カラム：(1)に同じ, 移動相：水-テトラヒドロフラン-酢酸(55：45：0.5), 流速：0.6ml／min, 検出波長：425nm, 注入量：10μl

結果および考察

1．色素の確認 アナトー色素13検体および同色素と他色素の混合1検体からノルビキシンが検出され, ビキシンは検出限界(0.04%)以上検出されるものはなかった. また, 水溶性アナトー4検体からはノルビキシンのカリウム塩またはナトリウム塩由来のノルビキシンが検出された.

アナトー色素の3検体については, 販売元の説明書に色素主成分はビキシンおよびノルビキシンであると記載されていたが, 検出されたのはノルビキシンのみであった. これは, 原料からのアナトー色素抽出溶媒に水または含水プロピレングリコールを用いている[9]ため, 抽出されてくるものの大部分がノルビキシンであるためか, あるいは抽出時に加水分解されビキシンがノルビキシンとなったためではないかと考える.

ウコン色素6検体および同色素と他色素の混合1検体からクルクミンを検出した.

2．HPLC用試験溶液調製法の検討 色素製剤中に添加されている色素以外の成分を当研究室で分析した結果[10,11], アナトー色素の液状のものすべてに80%以上の水を含有していることがわかった. 色素成分は水に不溶性であるにもかかわらず, 水に溶解または均一に分散する製品に造られていることが分かった. そのため分析時の希釈液にエーテルなどの有機溶媒を用いず, 水および移動相を用いることにした.

ラクトースを93%含有する[11]アナトー色素の粉末状1検体も水に均一に混合され, 液状品と同様に水および移動相で希釈することができた.

ウコン色素はエタノール, プロピレングリコールなどを溶剤として用いているものが多く[10], 希釈液にエタノールを用いると色素の溶解性は非常に良かった.

3．HPLC条件の検討 アナトー色素中のビキシンおよびノルビキシンの分析には, 西沢ら[3]の方法を準用したところFig. 1．に示すようにビキシン, ノルビキシンの分離は良好であった.

ノルビキシンのクロマトグラムには, 標準品および試料とも主ピークの直前に微少のピークが認められるが, このピークは食品から抽出したノルビキシンのピークとは[3,12]異なり, 主ピークに比べごく微少でありまた単一のピークではなかった. そのため, 本法では主ピークを用いて定量することにした.

試料のクロマトグラムはFig. 1．のbに示した. これはノルビキシンとモナスカス色素およびカラメルの混合色素であったが, 他色素の妨害は認められずノルビキシンを定量的に測定できた.

ビキシンの検量線は20～200ng, ノルビキシンでは10～100ngにおいて良好な直線性(R＝0.999)を示した. 検出限界は, ビキシンで0.04%, ノルビキシンでは0.02%であった.

ウコン色素は, クルクミンと二種のクルクミノイドが存在することが知られている[13~15]ことから, これら色素成分の分離条件を検討した. すなわち, 逆相系のNucleosil 7C18を用いSmith[14]らの溶離溶媒を参考に, 水, THFおよび酢酸の比率をそれぞれ変えて検討したところ, 水-THF-酢酸(55：45：0.5)の時Fig. 2．に示

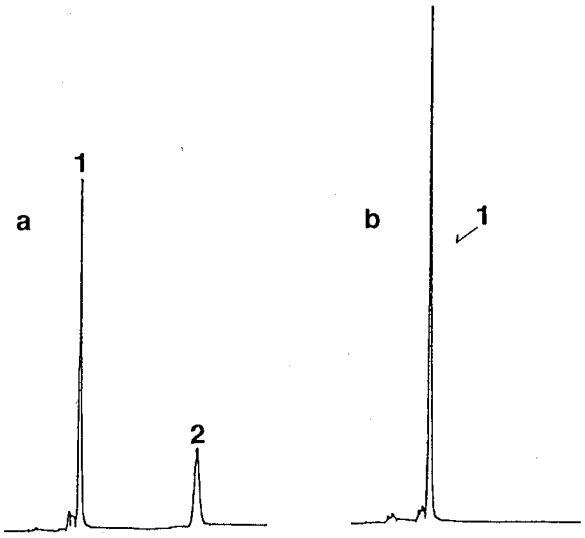


Fig. 1. Chromatograms of Bixin and Norbixin
a : Standard, b : Natural color preparation
Peak 1 : Norbixin (Rt=5.9),
Peak 2 : Bixin (Rt=14.7)
HPLC conditions;
Column : Nucleosil 7 C 18 (4 ×250mm),
Flow rate : 1.5ml／min
Mobile phase : water-acetonitril-acetic acid (30 : 70 : 1)
Detector : 455nm, Injectino volume : 10 μl

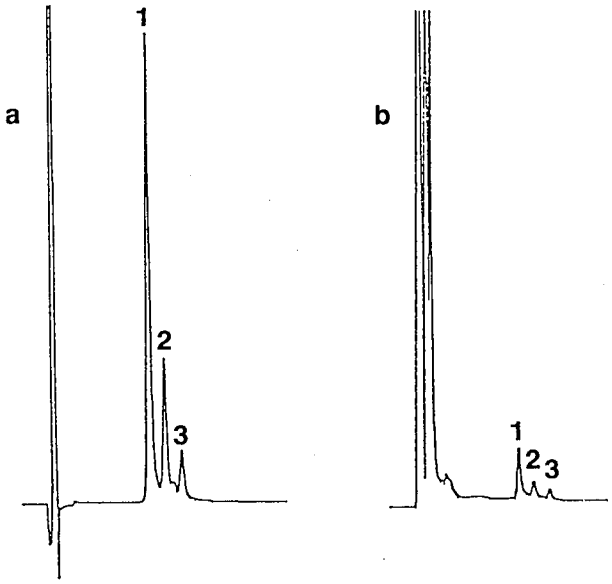


Fig. 2. Chromatograms of Curcumin and minor Curucuminoids
a : Standard, b : Natural color preparation
Peak 1 : Curcumin (Rt=17.9),
Peak 2 : Demethoxycurcumin (Rt=19.9)
Peak 3 : Bisdemethoxycurcumin (Rt=22.1)
HPLC conditions;
Column : Nucleosil 7 C 18 (4 ×250mm),
Flow rate : 0.6ml／min
Mobile phase : water-THF-acetic acid (55 : 45 : 0.5)
Detector : 425nm, Injection volume : 10 μl

すように良く分離した.

標準品のクロマトグラムには，クルクミンおよび二種のクルクミノイドによる三つのピークが認められ，また試料のクロマトグラムにも同様であった.

定量はピーク1の面積のみで行わずクルクミン(Peak 1)および二種のクルクミノイド(Peak 2～3)のピーク面積の総和で行うことにした．これはそれぞれの試料で1～3のピーク面積の比が，製品によって多少違っていたためである．クルクミンの検量線は10～100ngで良好な直線性(R＝0.999)を示し，検出限界は0.02%であった.

試料のクロマトグラムはFig. 2. bに示した．この試料はクルクミンとリボフラビンの混合色素であるが，リボフラビンの影響もなく測定できた.

合成添加物としては両色素製剤中にショ糖脂肪酸エステル，アスコルビン酸ナトリウム，ピロリン酸四ナトリウムを含有するものがあったが，分析に影響を及ぼすものはなかった.

4．市販着色料製剤中の色素分析　市販のアナトー色素13検体，混合色素1検体および水溶性アナトー4検体についてビキシンおよびノルビキシンを定量し，その結果をTable Ⅰに示した.

ビキシンは1．色素の確認の項で述べた通り，検出限界(0.04%)以下であった.

ノルビキシンの含有量は0.5～2.4%であり製品間に大きな差は見られず，またアナトー色素と水溶性アナトーとの差もみられなかった．なお，水溶性アナトーのノルビキシンカリウムはノルビキシンとして定量した.

上記結果の大部分は，アナトー色素中にビキシンを含有していないことなど水溶性アナトー，油溶性アナトー製剤について分析した西沢ら[3]の報告とは相違していた．現在のアナトー色素製剤の形態は，新しい製品化技術の開発[2]などにより多少変わって来ていることが考えられ

Table Ⅰ. Determination of Bixin and Norbixin in Annatto Extracts of Natural Color Preparations

No.	Cont. of Bixin(%)	Cont. of Norbixin(%)	
		Method A	Method B
1	ND	1.09	0.92
2	ND	1.07	0.84
3	ND	2.73	2.43
4	ND	0.84	0.75
5	ND	0.74	0.5
6	ND	1.02	0.97
7	ND	1.68	1.46
8	ND	0.78	0.78
9	ND	1.53	1.15
10	ND	1.17	1.28
11	ND	0.57	0.53
12	ND	0.88	0.86
13	ND	0.58	0.52
14	ND	—	0.64
15	ND	1.13	0.98
16	ND	1.2	1.06
17	ND	1.74	1.73
18	ND	0.95	0.84

A：Visible spectrophotometry (453nm),
B：HPLC, ND：<0.04%
1～13：Annatto extracts preparations,
14：mixed color preparation,
15～18：Annatto, water-soluble

Table Ⅱ. Determination of Curcumin in Turmeric Extracts of Natural Color Preparations

No.	Cont. of Curcumin(%)	
	Method A	Method B
1	1.41	1.35
2	0.88	0.78
3	1.23	0.75
4	28.6	25.5
5	0.82	0.69
6	0.78	0.70
7	—	0.03

A：Visible spectrophotometry (425nm), B：HPLC
1～6：Turmeric extracts preparations
7：mixed color preparation

た.

ウコン色素6検体および混合色素1検体のクルクミンの定量結果をTable Ⅱに示した.

クルクミン含有量は0.03～25.5%で製品間に差があることがわかった.

N0.4の試料は，25.5%の高濃度のクルクミンを含有する製品であり，その形態は液状品の中でも固形に近いことから，使用目的に応じて種々の濃度の製品が造られていることが分かった.

吸光度法とHPLC法で値を比較すると，Table Ⅰにおけるノルビキシンでは両法の値はほぼ近似していたが，やや吸光度法の値が高い傾向にあった．一方，クルクミンでは吸光度法の値がHPLC法より全ての検体で高かった.

これはウコン色素中にクルクミンと二種のクルクミノイド[13~15]以外にも黄色色素が存在している理由から，吸光度法では比較的高い値となったと考える.

両法の値はアナトー色素などでほぼ近似していたが，他の色素との分離等を考えるとHPLC法はFAO／WHO規格の吸光度法より有効であると考える.

ま と め

1．市販着色料製剤のアナトー色素中のビキシン，ノルビキシンおよびウコン色素中のクルクミンの分析をした.

アナトー色素13検体からは，ノルビキシンが検出され，ビキシンは検出限界(0.04%)以上検出されたものはなかった．ウコン色素6検体からはクルクミンを検出した.

2．HPLC法によるクルクミンの定量法を検討したところNucleosil 7C18のカラムで移動相を水-THF-酢酸(45：55：0.5)を用いたときクルクミンと二種のクルクミノイドは良好な分離をした.

3．アナトー色素製剤および水溶性アナトー合計18検体中のノルビキシン含有量は，0.5～2.4%であり製品間での差は少なかった.

ウコン色素製剤7検体中のクルクミンの含有量は0.03～25.5%であり製品間に差がみられた.

4．定量法としてFAO／WHO規格の吸光度法とHPLC法を用い，定量値を比較したところアナトー色素ではほぼ一致し，ウコン色素では吸光度法がHPLC法より比較的高い値であった.

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）全国衛生主管部局長会議資料：食品衛生研究，39 (4)，52，1989.

2）柴田正美：月刊フードケミカル，7，60，1988.

3）西沢　信，長南隆雄，赤城幾代，杉井高雄：道衛研所報，33，28，1983.

4）西沢　信，長南隆雄，堀　義弘：同上，34，28，1984.

5）西沢　信，長南隆雄，堀　義弘：同上，35，7，1985.

6）Food and Nutrition Paper，19，15，1981.

7）Food and Nutrition Paper，37，145，1986.

8）日本薬学会編："衛生試験法注解"追補版，1341，1986，金原出版.

9）厚生省環境衛生局食品化学課編："日本における天然食品添加物"，95，1979.

10）植松洋子：東京衛研年報，40，183-186，1989.

11）中島和雄：同上，40，175-177，1989.

12）天川映子，平田恵子，荻原　勉，大西和夫：分析化学，33，586，1984.

13）神蔵美枝子，田中幸生：衛生試験所報告，101，42，1983.

14）Hanne Hjorth, Jan Karlsen：*Journal of Chromatography*，259，367，1983.

15）Roger M. Smith, Barbara A. Witowska：*Analyst*，109，259，1984.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 183-186, 1989

天然着色料製剤中の溶剤成分の分析

植松洋子*, 広門雅子*, 平田恵子*, 中島和雄*,
松井敬子*, 風間成孔*

Determination of solvents as Components in Natural Color Preparations

YOKO UEMATSU*, MASAKO HIROKADO*, KEIKO HIRATA*, KAZUO NAKAJIMA*,
KEIKO MATSUI* and MASAYOSHI KAZAMA*

Keywords：天然着色料 natural colors, 副剤 subsidiary components, 溶剤 solvents, エタノール ethanol, プロピレングリコール propylene glycol グリセリン glycerin, 水分 water

緒　言

現在，日本においては多くの天然着色料が使われている．そのほとんどが，副剤を含んだ製剤の形であり，化学的合成品が副剤として添加されている例も多い．これらの副剤のうち，化学的合成品については表示の義務がある．しかし，天然物については表示義務がないためどのような副剤が使用されているか実態は把握されていない．また，平成3年1月より，食品に添加した場合，化学的合成品と同様に天然添加物についても，表示される予定であるが，これらの副剤はキャリーオーバーとして表示されないものと考えられる．近々天然添加物の規格作成が予定されていることもあり，その実態を早急に把握する必要がある．

そこで今回は，天然着色料の液状製剤について，副剤としての組成比が比較的高い溶剤の使用実態を把握することとした．本報では，溶剤として通常用いられる水，エタノール，プロピレングリコール，グリセリンの定量を行ったので，その結果について報告する．

実験の部

1．試料　東京都衛生局食品監視課より昭和63年4月-平成元年3月にかけて当所に送付された天然着色料製剤のうち液状のもの57検体を用いた．

2．試薬　カールフィッシャー滴定用脱水溶剤およびカールフィッシャー試薬は，三菱化成工業㈱製，その他の試薬はすべて特級品を用いた．

3．装置　ガスクロマトグラフ：島津製作所製，GC-15A(FID)，カールフィッシャー方式ディジタル自動水分滴定装置KF-01，三菱化成工業㈱製を用いた．

4．ガスクロマトグラフィー(GC)の測定条件　カラム：Unisole 10T　0.1%，担体 Gaskuropack 54，60／80mesh，3.2mm×2.1m，カラム温度：(1)エタノール 150℃　(2)プロピレングリコール　190℃　(3)グリセリン 230℃，注入口及び検出器温度：250℃，キャリヤーガス：$N_2$30ml／min，注入量：3 μl

5．試料及び標準溶液の調製　GC用標準溶液：エタノール，プロピレングリコール，グリセリン各1gをそれぞれ水またはメタノールで100ml定容とし，これを適宜希釈して用いた．

GC用試料溶液：試料1gをその溶解性に応じて水，n-ブタノール，n-ヘキサン，メタノールのいずれかに溶解し，試料溶液とした．エタノールの定量にはメタノールのテーリングピークが妨害することから，メタノール以外のものを用いた．水分散性の製剤は上記のいずれの溶媒にも溶解しないため，水に懸濁し，ろ過したのち，試料溶液とした．

6．実験操作　エタノール，プロピレングリコール，グリセリンについては，5．で調製した標準溶液及び試料溶液を用いて，ガスクロマトグラフィーにより定量した．

水分はカールフィッシャー滴定法により定量した．

結　果

結果を表1及び図1に示した．分析の対象とした溶剤

*東京都立衛生研究所食品添加物研究科　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

表1．液状天然着色料製剤中の溶剤成分

検体番号	色素の種類	エタノール	プロピレングリコール	グリセリン	水分	合計	ソルビット(%)	乳化剤等の表示
1	パプリカ色素	ND	ND	23.7	47.8	71.5	7.2	ショ糖脂肪酸エステル
2	パプリカ色素	ND	9.8	ND	54.0	63.8		
3	パプリカ色素	ND	ND	42.8	9.5	52.3	10.3	
4	パプリカ色素	ND	ND	34.2	15.3	49.4	23.3	ショ糖脂肪酸エステル
5	パプリカ色素	ND	ND	ND	20.8	20.8		グリセリン脂肪酸エステル
6	パプリカ色素	ND	ND	ND	19.4	19.4		グリセリン脂肪酸エステル　ショ糖脂肪酸エステル
7	パプリカ色素	ND	ND	ND	ND	0.0		
8	パプリカ色素	ND	ND	ND	ND	0.0		
9	パプリカ色素	ND	ND	ND	ND	0.0		
10	β－カロチン	3.7	ND	ND	55.8	59.5		
11	クロロフィル色素	35.8	ND	3.9	8.2	47.9		グリセリン脂肪酸エステル
12	クロロフィル色素	ND	ND	ND	19.1	19.1		グリセリン脂肪酸エステル
13	クロロフィル色素	ND	ND	ND	ND	0.0		
14	ウコン色素	41.2	ND	52.0	5.5	98.7		
15	ウコン色素	ND	96.8	ND	1.6	98.3		
16	ウコン色素	ND	96.1	ND	0.2	96.3		
17	ウコン色素	0.3	93.6	ND	0.9	94.8		
18	ウコン色素	59.2	ND	ND	33.7	92.9		
19	ウコン色素	ND	ND	ND	1.2	1.2		
20	アナトー色素	0.2	19.1	ND	78.3	97.7		
21	アナトー色素	0.2	17.7	ND	79.7	97.6		
22	アナトー色素	0.3	17.7	ND	77.1	95.0		
23	アナトー色素	0.2	17.2	ND	77.6	95.0		
24	アナトー色素	0.4	18.0	ND	76.4	94.7		
25	アナトー色素	ND	12.1	ND	80.3	92.4		
26	アナトー色素	12.8	ND	12.5	62.9	88.1		
27	アナトー色素	ND	ND	ND	81.2	81.2		
28	アナトー色素	ND	ND	ND	68.7	68.7		
29	アナトー色素	9.2	ND	11.6	47.1	67.9		
30	アナトー色素	16.0	ND	ND	50.2	66.2		ショ糖脂肪酸エステル
31	アナトー色素	2.2	13.9	ND	50.1	66.2		ショ糖脂肪酸エステル
32	水溶性アナトー	0.2	ND	ND	96.3	96.5		
33	水溶性アナトー	0.2	ND	ND	95.0	95.2		
34	水溶性アナトー	0.3	ND	ND	89.3	89.6		
35	水溶性アナトー	ND	ND	ND	89.2	89.2		
36	赤キャベツ色素	15.2	ND	ND	74.6	89.8		
37	赤キャベツ色素	ND	13.8	ND	75.4	89.1		
38	赤キャベツ色素	19.0	ND	ND	58.7	77.7		
39	クチナシ黄色素	17.4	ND	ND	71.4	88.8		
40	クチナシ黄色素	18.1	ND	ND	64.8	82.9		
41	クチナシ黄色素	ND	12.2	ND	64.7	76.9		
42	クチナシ黄色素	ND	ND	ND	36.7	36.7	59.1	
43	クチナシ青色素	15.4	ND	ND	49.7	65.1		
44	モナスカス色素	52.8	ND	ND	47.1	99.9		
45	モナスカス色素	0.2	58.1	ND	40.1	98.4		
46	モナスカス色素	0.2	58.6	ND	39.1	97.9		
47	モナスカス色素	46.3	ND	ND	48.7	94.9		
48	モナスカス色素	52.0	ND	ND	40.4	92.4		
49	モナスカス色素	41.2	ND	ND	42.9	84.1		
50	コチニール色素	ND	13.3	ND	73.5	86.8		
51	コチニール色素	ND	14.4	ND	71.7	86.1		
52	コチニール色素	ND	18.0	ND	56.0	74.0		
53	コチニール色素	ND	ND	ND	26.8	26.8		グリセリン脂肪酸エステル
54	ラック色素	38.8	28.0	23.5	5.6	95.9		
55	ベニバナ黄色素	14.7	ND	ND	28.1	42.8		
56	アナトー色素，カラメル モナスカス色素	14.6	ND	12.6	60.3	87.5		
57	クチナシ青色素 ベニバナ黄色素	13.2	ND	ND	33.9	47.1		

エタノール，プロピレングリコール，水分：ND<0.1%
グリセリン：ND<1%

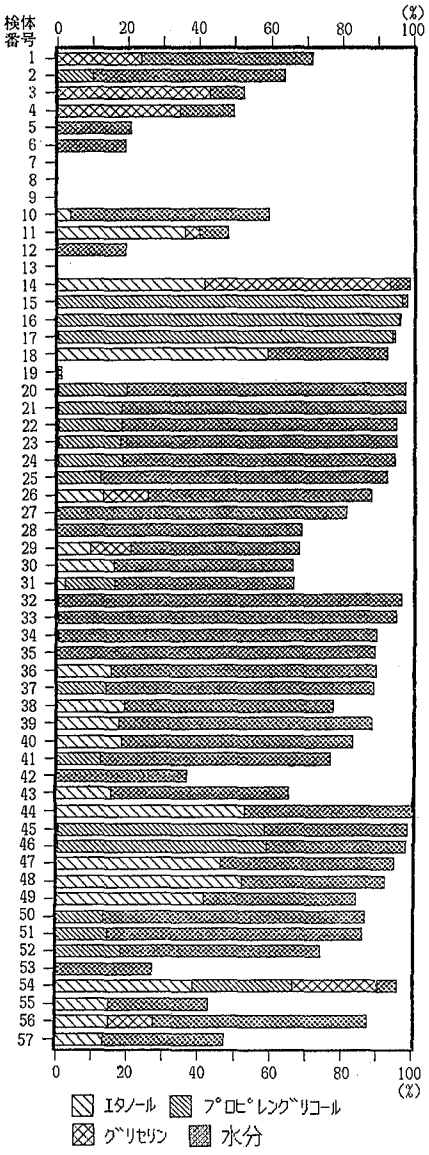


図1．液状天然着色料製剤中の溶剤成分

検体番号　1-9：パプリカ色素，10：β-カロチン，
11-13：クロロフィル色素
14-19：ウコン色素，20-31：アナトー色素，
32-35：水溶性アナトー
36-38：赤キャベツ色素，39-42：クチナス黄色素，
43：クチナシ青色素
44-49：モナスカス色素，50-53：コチニール色素，
54：ラック色素，55：ベニバナ黄色素
56：アナトー色素・カラメル・モナスカス色素，
57：クチナシ青色素・ベニバナ黄色素

の合計が50％を超えるものは57検体中43検体であり，31検体については溶剤の割合は80％以上であった．最も使用頻度の高い溶剤は水(57検体中53検体)で，ついでエタノール(21検体)，プロピレングリコール(19検体)，グリセリン(9検体)であった．

1．油溶性色素

今回分析の対象とした天然着色料製剤のうち，パプリカ色素，β-カロチン，ウコン色素，クロロフィル色素製剤の色素成分は油溶性(水不溶性)である．これらの製剤のうち，β-カロチン(1検体)は水分散性の製剤でパプリカ色素とクロロフィル色素については油溶性の製剤と水分散性の製剤があった．油溶性の製剤4検体(No.7-9，No.13)からは，今回分析の対象とした溶剤は検出されなかったがこれらの製剤はパンフレット等より溶剤として植物油を使用していると考えられた．水分散性の9検体からは，19.1-55.8％の水分が検出され，そのうちの6検体にはグリセリン脂肪酸エステル，ショ糖脂肪酸エステル等の乳化剤が含まれている旨の表示があり，当研究室においても確認された．これらの水分散性の製剤には，エタノール，プロピレングリコール，グリセリンの含まれているものも見られた．また，No.1，3，4については，ソルビットもそれぞれ7.2％，10.3％，23.3％含まれており[1]これらも溶剤としての役割を果たしていると考えられる．ウコン色素は，その色素成分がエタノール，プロピレングリコール等に可溶であり，5検体中4検体の溶剤はこれらを主体としたものであった．溶剤量の極端に少ないNo.19は粘土状であり，色素成分の定量値が他のものに比べ極めて高かった[2]．

2．アナトー色素，水溶性アナトー

アナトー色素の色素成分はすべてノルビキシンで，ビキシンの製剤はなかった[2]．ノルビキシンは水にも油脂にもほとんど不溶[3]で，製剤の性状はすべて懸濁状であり，水溶性アナトーとは異なっていた．溶剤としては水分の比率が高く，ほとんどすべての検体に50％以上含まれていた．プロピレングリコールの含まれている検体も12検体中7検体と比較的多かった．アナトー色素，水溶性アナトーについてエタノールが0.2-0.4％検出された検体がみられた．ウコン色素，モナスカス色素の一部の検体からも同様に微量のエタノールが検出されたが，これらは添加されたというより，抽出溶剤の残留ではないかと思われる．水溶性アナトーの場合は，この微量のエタノール以外には水分のみしか検出されず，水分の比率も89-96％と高かった．なお，水溶性アナトーについては合成品であるが参考のため検体に加えた．

3．水溶性色素

その他の製剤は，色素成分が水溶性で製剤そのものもNo.53の1検体を除いて水に可溶であった．赤キャベツ色素，クチナシ黄色素，クチナシ青色素，コチニール色素については，ほとんどの検体で水分の割合が50％以上であった．水分含量の少ないNo.42(クチナシ黄色素)にはソルビットが約60％含まれており[1]これも溶剤として働いていると考えられた．また，No.53は，色素成分が水溶性であるにも関わらず水に溶解しなかった．これには油溶性の表示があり，またグリセリン脂肪酸エステルが含まれていることも表示より判明した．一方，モナスカス色素の場合は水分の割合が50％を超えるものはなく，エタノールかプロピレングリコールのいずれかと水の2種類の溶剤がほぼ等量ずつ含まれていた．ラック色素(No.54)の場合，調査対象の4種類の溶剤がすべて含まれていた．

4．表示との関連

プロピレングリコールについては，表示のあった検体からのみ検出され，その量もすべて表示通りであった．しかし，グリセリン，エタノールについては，無表示のものが多く，表示のあったのはグリセリンが1検体，(No.14)エタノールが3検体(No.40, 47, 49)のみであった．これらについても定量値は表示通りであった．

考　　察

調査した57検体のうち，植物油を使用していると思われる4検体を除く全ての検体について種々の溶剤が含まれており，また製剤中の組成比も高かった．このように種々の溶剤が含まれていた理由としては，タール色素と異なり天然着色料それ自体が水に難溶または不溶であったり，水よりも有機溶剤に溶けやすかったりするものがあるため，抽出したり，製剤化したりする際，水以外の溶剤を使用していることが考えられる．これらの溶剤の中には，単なる抽出剤や希釈剤としてではなく，食品中への均質な分散や静菌作用[4]を期待して使用されたものもあると考えられる．さらに，油溶性色素の水分散性の製剤には乳化剤の表示のないものもあり，これらに添加されているプロピレングリコールやグリセリン等については製剤中の色素の分散性をよくするために用いられていることも考えられる．

一般に天然添加物については，①合成品の様に純度の高いもの②天然物から抽出したままのもので抽出溶剤，不純物等を含むもの③副剤を加え製剤化したものの3通りの形態が考えられるが，今回調査の対象とした検体の中には①はもちろん，②の抽出しただけの状態の製品すらほとんどなく，大部分の製品は副剤が添加されたものであると考えられた．このことは今後の規格作成に当たって考慮されなければならないと考えられる．また，今後天然添加物についても表示が義務づけられた場合，これらの溶剤がキャリーオーバーとして表示の対象にはならないかどうか，プロピレングリコールを98％も含む製剤もあることから，製剤中の組成比との関連で疑問が残る．また，当研究室で同時に行った他の副剤についての調査によっても天然着色料製剤中には糖類，有機酸，リン酸塩，ミョウバン，アスコルビン酸，トコフェロール等の多くの成分が副剤として添加されており，主剤より多いものもあることが判明した．

ま と め

1．液状天然着色料製剤57検体について副剤として添加されている溶剤4種類の含有量を調査したところ，分析の対象とした溶剤の合計が50％を超えるものは57検体中43検体であり，31検体については溶剤の割合は80％以上であった．

2．色素主成分が油溶性であるにも関わらず水分散性にしたり，あるいはその逆など製剤の多様化がみられた．

3．プロピレングリコールについては，すべて表示通り検出された．しかし，グリセリン，エタノールについては，ほとんど表示がなかった．

謝辞：本調査を実施するに当たり試料収集にご協力いただいた食品機動監視班の皆様に深謝致します．

文　　献

1）中島和雄，広門雅子，平田恵子，植松洋子，松井敬子，風間成孔：東京衛研年報，40，175-177，1989.
2）平田恵子，広門雅子，中島和雄，植松洋子，松井敬子，風間成孔：東京衛研年報，40，178-182，1989.
3）谷村顕雄，片山　脩，遠藤英美，黒川和男，吉積智司：天然着色料ハンドブック，207，1979，光琳，東京.
4）佐仲　登：フードケミカル，55-59，1985(8).

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 187-191, 1989

天然着色料の品質調査（第1報）
カラメル色素の品質試験

広門雅子*，平田恵子*，中島和雄*，植松洋子*，
松井敬子*，風間成孔*

Survey of Quality of Natural Color (I)
Quality Test of Caramel Color

MASAKO HIROKADO*, KEIKO HIRATA*, KAZUO NAKAJIMA*,
YOKO UEMATSU*, KEIKO MATSUI* and MASAYOSHI KAZAMA*

Keywords：天然着色料 natural color，カラメル色素 caramel color，品質試験 quality test

緒　言

近年，天然添加物の使用量の急増に伴い，規格基準の制定や食品への表示の義務化が重要となってきたことから，厚生省は昭和63年7月に，国際的整合性を考慮し，天然品にも合成品と同様に平成3年1月より表示を義務化することを決定し(昭和63年7月27日衛化第42号厚生省生活衛生局長通知)，現在，天然添加物のリスト化，安全性試験の実施及び品質規格の整備を急いでいる．

著者らは天然添加物の品質に関する市販実態調査を昭和50年度より継続して行っており，その結果をその都度規格作成の際の基礎資料として，東京都衛生局食品監視課を通し厚生省に提供してきた．昭和63年度は天然着色料を取り上げ，そのうち最も高い売上高を占めるカラメル色素について品質規格試験を実施した．その結果を日本食品添加物協会の自主規格[1]，FCC 規格[2]及び FAO／WHO 規格[3]等に定められた限度値と照合し検討したので報告する．

実験の部

Ⅰ．試薬及び試液　4-メチルイミダゾール：東京化成の試薬を40mmHg で減圧蒸留し，沸点104-105°の留分を標準品とした．

他の試薬は特にことわりのない限り，すべて JIS 特級品を用い，試液は日本食品添加物公定書第5版[4]の調製法に準じて作成した．

Ⅱ．器具及び装置　分光光度計：島津 UV-240，ガスクロマトグラフ：島津 GC-15A(検出器 FID)，水分測定装置：三菱化成製カールフィッシャー滴定装置 KF-01

その他は日本食品添加物公定書第5版に記載のものを用いた．

Ⅲ．試料　東京都衛生局食品監視課より，昭和63年4月～平成元年1月にかけて当所に送付された各種食品製造業6社の製品31検体を用いた．

Ⅳ．実験操作

1．カラメルの品質規格試験　1977年の FAO／WHO 規格[5]に準じて作成された日本食品添加物協会の自主規格[1](以後 FFAA 規格と略す)中の「カラメル(第二法)」に準じて，「アンモニウム塩」，「二酸化イオウ」，「リン酸塩」，「4-メチルイミダゾール(以後4-MeI と略す)」，「ヒ素」及び「重金属」の純度試験を行った．

2．水分測定　FFAA 規格中の「ヒ素」，「重金属」及び FAO／WHO 規格中の「リン酸塩」を除く全ての純度試験の項目は乾燥物当りのカラメルについて限度が定められているため(表1)，液状カラメルについては水分を測定した．操作法は日本食品添加物公定書第5版中の水分定量法(カールフィッシャー法)(1)直接滴定[4]を用いた．

3．色力　FFAA 及び FCC 規格[2]では「アンモニウム塩」，「4-MeI」，「二酸化イオウ」について，色力1.0当りの限度値を定めているため(表1)，全試料の色力を測定した．FFAA 規格は色力の測定にロビモンドチントメーターを用いているが，今回はこれに代わる方法として国立衛生試験所で開発した次の方法を採用した．

本品1gを精密に秤り，水に溶かして1000m*l* とし，

*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

液層の長さ1cmで波長555nmにおける吸光度(A)を測定し，次式によって色力を求めた．色力＝(A)／0.13

結果及び考察

カラメルにはFFAA(日本食品添加物協会)，FCC(米国)及びFAO／WHO(国際規格)等の規格がある．FFAA規格は第一法及び第二法から成り，FAO／WHO規格はClass Ⅰ，Class Ⅱ，Class Ⅲ及びClass Ⅳから成る(表1)．これらは表1中の定義で示したように，カラメル製造時に反応促進剤のアンモニウム塩または亜硫酸塩を加えたか否かで区別され，それぞれに規格が設定されている．

これらの規格には，FFAA規格が6項目，FCC規格が7項目，FAO／WHO規格[5]が9-12項目の純度試験項目が設定されているが，今回はこれらのうち全ての規格に共通のアンモニウム塩，4-MeI，二酸化イオウ，リン酸塩，ヒ素及び重金属の6項目について検査を実施した．その結果を表2に示す．

Ⅰ．アンモニウム塩　反応促進剤として用いられるアンモニウム塩は水酸化アンモニウム，炭酸アンモニウム，炭酸水素アンモニウム，リン酸アンモニウム，硫酸アンモニウム，亜硫酸アンモニウム及び次亜硫酸アンモニウム等であると言われている[5]．

今回調査したカラメルのうち，アンモニウム塩が使用されていないと考えられる0.01%未満のものが12検体(39%)あった．アンモニウム塩が使用されたと考えられるもののうち，FAO／WHO規格Class Ⅲの限度値0.4%(乾燥物当り)を超えたものが7検体(液体4検体No.20-23，粉末3検体No.26，28，30)あり，そのうちClass Ⅳの0.5%(乾燥物当り)を超えたものが4検体(No.20～23)あった．しかしこれらのうちFFAA規格第二法及びFCC規格の0.5%(色力1当り)を超えたものはなかった．すなわちFFAA，FCCの規格で適合してもFAO／WHO規格に適合しないものがあった．

FFAA，FCC規格では色力の高い(濃度の高い)カラメルは，使用時希釈して用いるとの理由から，限度値を色力1に対して定めている．しかしFAO／WHO規格のように乾燥物当りで定める方が，検査する立場から考えると試験法が簡便で理解しやすい．なおFAO／WHO規格も1986年以前のもの[5]は色力1当りで限度が定められていたが，1986年以後，乾燥物当りに改正されている[3]．

Ⅱ．4-MeI　カラメル製造時にアンモニウム塩が用いられた場合，その過程で多くの含窒素複素環化合物(イミダゾール，ピラジン類)が生成すると報告[6-8]されている．それらのうち4-MeIに毒性[9]があるとのことから，FFAA規格第二法，FCC規格，FAO／WHO規格のClass Ⅲ及びClass Ⅳにはこの限度が定められている．

今回調査したカラメルのうちFFAA規格第二法及びFCC規格の200μg／g(色力1当り)を超えたものはなかった．しかしFAO／WHO規格Class Ⅳの100μg／g(乾燥物当り)を超えたものが5検体(No.19-23)あり，そのうちClass Ⅲの300μg／g(乾燥物当り)を超えたものが4検体(No.19-22)あった．これらの検体のアンモニウム塩の含量は高く，すべてFAO／WHO規格Class Ⅳの0.5%を超えていた．4-MeIの場合もアンモニウム塩の場合と同様にFFAA及びFCCの規格で適合してもFAO／WHO規格に適合しないものがあった．

Ⅲ．二酸化イオウ　反応促進剤として次亜硫酸塩(アンモニウム，カリウム及びナトリウム塩)，亜硫酸塩(アンモニウム，カリウム及びナトリウム塩)等が使用されると言われており[5]，これらの塩が使用された場合に二酸化イオウが生成するため，この限度が設定されている．

今回調査したカラメルのうち，亜硫酸塩が使用されたと考えられるもので，FFAA及びFCC規格の0.1%(色力1当り)を超えたものはなかった．

FAO／WHO規格Class Ⅱ(乾燥物当り)の0.2%を超えたものが，3検体(No.20～22)あったがClass Ⅳの0.5%(乾燥物当り)を超えたものはなかった．Class Ⅱ及びClass Ⅳは共に亜硫酸塩を使用したカラメルの規格であるが，Class Ⅳはさらに亜硫酸アンモニウム等のアンモニウム塩の使用も認められた規格であるため，Class Ⅱより高く限度が設定されていると考える．今回，検体がアンモニウム塩または亜硫酸塩を使用して製造されたか否かの識別が出来なかったので，FAO／WHO規格Class Ⅱに適合していないとは判定出来なかった．今後はFAO／WHO規格に記載されている製造法の確認試験を実施し，検体の製造法を識別した後，各々の規格に適合するか否かを検討したい．

Ⅳ．リン酸塩　反応促進剤としてリン酸アンモニウム等が使用されると言われている[5]．

FFAA，FCC及びFAO／WHOの全ての規格で0.5%以下と規定されているが，この限度値を超えたものはなかった．

Ⅴ．ヒ素及び重金属　全て規格値以下であった．

まとめ

1）市販カラメル色素について品質規格試験を実施した．

2）カラメルの品質規格には，FFAA，FCC及びFAO／WHOの規格があるが，これらに共通のアンモニ

表1．カラメル規格の比較

	FFAA*1規格		FCC 規格	FAO／WHO 規格*7			
	第一法	第二法		Class Ⅰ	Class Ⅱ	Class Ⅲ	Class Ⅳ
定義：酸，アルカリなどの他にアンモニウム塩または亜硫酸塩の反応促進剤を加えたり，または加えないで，ブドウ糖などの食用炭水化物を熱処理して得られる物質である．							
アンモニウム塩使用の有無 亜硫酸塩使用の有無		アンモニウム塩使用	アンモニウム塩使用 亜硫酸塩使用		亜硫酸塩使用	アンモニウム塩使用	アンモニウム塩使用 亜硫酸塩使用
アンモニウム塩	検出しない	0.5%以下*3	0.5%以下*3	0.01%以下*2	*6	0.4%以下*2	0.5%以下*2
二酸化イオウ	0.1%以下*2	0.1%以下*3	0.1%以下*3	0.1%以下*2	0.2%以下*2	0.2%以下*2	0.5%以下*2
リン酸塩	0.5%以下	0.5%以下		0.5%以下	0.5%以下	0.5%以下	0.5%以下
ヒ素	3μg／g 以下*2	3μg／g 以下*2	3μg／g 以下	3μg／g 以下*2	3μg／g 以下*2	3μg／g 以下*2	3μg／g 以下*2
重金属	25μg／g 以下*2	25μg／g 以下*2	25μg／g 以下	25μg／g 以下*2	25μg／g 以下*2	25μg／g 以下*2	25μg／g 以下*2
4－MeI*4	検出しない	200μg／g 以下*3	200μg／g 以下*3	検出しない	検出しない	300μg／g 以下*2	100μg／g 以下*2
総窒素						1.3～6.8%*2	0.7～7.0%*2
総イオウ					0.2%以下*2	0.3%以下*2	1.4～9.5%*2
鉛			5μg／g 以下	5μg／g 以下*2	5μg／g 以下*2	5μg／g 以下*2	5μg／g 以下*2
銅				20μg／g 以下*2	20μg／g 以下*2	20μg／g 以下*2	20μg／g 以下*2
水銀			0.1μg／g 以下	0.1μg／g 以下*2	0.1μg／g 以下*2	0.1μg／g 以下*2	0.1μg／g 以下*2
THI*5						40μg／g 以下*2	

*1 日本食品添加物協会（The Federation of Food Additives Asociations in Japan）
*2 乾燥物当り　*3 色力1.0当り　*4 4－methylimidazole　*5 2－acetyl－4－tetrahydroxy－butylimidazole
*6 FAO／WHO で検討中　*7 1977年に制定の規格[5]が1986年に改正され，現在暫定規格[3]となっている．

表2．カラメルの品質規格試験の結果

検体番号 No.	形態	乾燥物当りの含量 アンモニウム塩 (%)	乾燥物当りの含量 4-MeI (μg/g)	乾燥物当りの含量 二酸化イオウ (%)	色力1当りの含量 アンモニウム塩 (%)	色力1当りの含量 4-MeI (μg/g)	色力1当りの含量 二酸化イオウ (%)	色力	水分 (%)
1	液状	0.04	ND	ND	0.15	ND	ND	0.2	29
2	〃	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.7	36
3	〃	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.7	39
4	〃	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.0	42
5	〃	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.0	41
6	〃	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.0	41
7	〃	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.1	41
8	〃	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.1	35
9	〃	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.1	41
10	〃	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.5	36
11	〃	0.02	ND	ND	ND	ND	ND	1.6	45
12	〃	0.13	ND	0.16	0.04	ND	0.05	1.9	44
13	〃	0.04	9	0.15	ND	3	0.04	1.9	45
14	〃	0.04	52	0.16	ND	15	0.05	1.9	44
15	〃	0.13	21	0.16	0.04	6	0.05	2.0	44
16	〃	0.05	12	0.14	ND	3	0.04	2.1	43
17	〃	0.31	47	ND	0.09	13	ND	2.2	38
18	〃	0.31	20	ND	0.09	5	ND	2.2	39
19	〃	0.35	304	0.11	0.08	69	0.02	2.5	43
20	〃	1.44	669	0.31	0.27	124	0.06	2.8	48
21	〃	1.48	694	0.31	0.27	124	0.06	2.9	48
22	〃	1.38	507	0.31	0.25	90	0.06	3.1	45
23	〃	0.58	213	0.17	0.09	32	0.03	3.5	47
24	粉末	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.5	
25	〃	0.34	ND	ND	0.23	ND	ND	1.5	
26	〃	0.45	ND	ND	0.28	ND	ND	1.6	
27	〃	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.6	
28	〃	0.41	7	ND	0.24	4	ND	1.7	
29	〃	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.7	
30	〃	0.41	7	ND	0.23	4	ND	1.8	
31	〃	0.13	6	ND	0.06	3	ND	2.3	

アンモニウム塩及び二酸化イオウのND：0.01%以下　4-MeI(4-メチルイミダゾール)のND：2 μg/g以下
注1）リン酸塩はNo.31の0.37%を除き全て0.05%以下
注2）全ての検体のヒ素は3 μg/g以下，重金属は25 μg/g以下である．

ウム塩，4-MeI，二酸化イオウ，リン酸塩，ヒ素及び重金属等の純度試験6項目について検査を実施した．

3）アンモニウム塩及び4-MeIの含量がFFAA規格第二法及びFCCの規格で適合してもFAO/WHO規格に適合しないものがあった．FFAA及びFCC規格では，限度値を色力1に対して定めている．FAO/WHO規格のように乾燥物当りで定める方が検査する立場からは試験法が簡便で理解しやすいが，今後，わが国の公定規格を作成する場合，乾燥物当りで限度を定める方が妥当かどうか，現段階では結論出来ない．

4）二酸化イオウの含量がFFAA規格第二法，FCC規格及びFAO/WHO規格Class Ⅳ(アンモニウム塩及び亜硫酸塩使用)の限度値を超えたものはなかった．しかしFAO/WHO規格Class Ⅱ(亜硫酸塩使用)の限度値

を超えたものがあった.

5）今回，検体がアンモニウム塩または亜硫酸塩を使用して製造されたか否かの識別が出来なかった．今後はFAO／WHO規格に記載されている製造法の確認試験を実施し，検体の製法を識別した後，各々の規格に適合するか否かを検討したい.

6）リン酸塩，ヒ素，重金属の含量は全て規格値以下であった.

7）1986年のFAO／WHOの規格には今回実施した純度試験の他に6項目が追加されているので，今後これらについても検討したい.

謝辞：本調査に当り，試料収集にご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.

文　献

1）日本食品添加物協会：天然食品添加物規格総集第2版（着色料），1981.

2）Committee on codex specifications：Food Chemicals Codex, Third Edition, 1981, NATIONAL ACADEMY PRESS.

3）Joint FAO／WHO expert committee of food additives; Specifications for the identity and purity of food colours：*FAO Food and Nutrition Paper*, 34, 29-34, 1986.

4）日本食品添加物協会：日本食品添加物公定書第5版，1986.

5）Joint FAO／WHO expert committee of food additives ; Specifications for the identity and purity of food additives including antioxidants, food colours, thickeners and others：*FAO Nutrition Report Series*, No.57, 1977.

6）河本正彦：農芸化学，36，407，1962.

7）河本正彦：農芸化学，36，461，1962.

8）Takayuki, S. and Richard, A.B.：*J. Agric. Food Chem.*, 25, 3, 1977.

9）Nishie, K., Waiss, A.C. and Keyl, A.C.：*Toxicology and Applied Pharmacology*, 14, 301, 1969.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 192-196, 1989

酵素反応を利用した食品添加物製剤中の炭酸水素塩及び炭酸塩の定量

津田裕子*, 安野哲子*, 荻野周三*,
小関正道*, 風間成孔*

Enzymatic Determination of Bicarbonate and Carbonate in Food Additive Preparations

YUKO TSUDA*, TETSUKO YASUNO*, SHUZO OGINO*,
MASAMICHI KOSEKI* and MASAYOSHI KAZAMA*

Summary

An enzymatic method for determination of bicarbonate and carbonate in food additive preparations is described. The bicarbonate (HCO_3^-) is reacted with phoshoenolpyruvate (PEP) in the presence of PEP carboxylase. The oxaloacetate formed in the above reaction is reduced to malate catalyzed by malate dehydrogenase. The resulting decrease in absorbance at 340nm is directly proportional to the amount of HCO_3^- in the sample. The analytical procedure was not time consuming (about 5 min.), and was linearly progressed in partial condition (HCO_3^- concentration ; 0－0.20mM). Analytical recovery rate was 98.8－102.3% (average 100.3%), and the detection limit was 0.4mg／g of sample. The enzymatic reaction was not inhibited by other compounds in the samples. Therefore the procedure reported here is precise and valuable method for the quantitative analysis of bicarbonate and carbonate in food additive preparations.

Keywords：酵素分析 enzymatic analysis, 炭酸水素塩 bicarbonate, 炭酸塩 carbonate, 食品添加物製剤 food additive preparations, ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ phosphoenolpyruvate carboxylase

はじめに

炭酸水素ナトリウムは合成膨脹剤に使用されるほか，多くの食品添加物製剤に配合されている[1,2]．また，炭酸ナトリウム，炭酸カリウムはかんすいの主要原料として用いられている[1,2]．これら炭酸塩類の定量は，一般に中和滴定法[2-4]，イオンクロマトグラフィー[5]，重量法[4,6]，ガスクロマトグラフィー[6]などにより行なわれている．しかし，中和滴定法，イオンクロマトグラフィーは他の配合物の影響が大きく，重量法，ガスクロマトグラフィーは操作が煩雑で分析精度があまりよくない．したがっていずれの方法も食品添加物製剤中の炭酸塩類の定量を簡便に精度良く行なうには必ずしも満足できるものとは言い難い．

Peled[7]は，血液など，体液中の炭酸水素塩含有量の定量法として，炭酸水素塩を二酸化炭素に変えず，かつ共存物の影響を受けにくい酵素法を報告している．

そこで著者らは食品添加物製剤中の炭酸水素塩および炭酸塩を簡易に定量するため，Peled[7]の方法を基本とし種々検討したのでその結果を報告する．

実験方法

1．試料　昭和63年4月～平成元年3月に収去検体として扱った合成膨脹剤5試料，およびかんすい5試料を対象とした．また，その表示成分を Table 1．に示した．

2．試薬　1）蒸留水：イオン交換した蒸留水を用時煮沸して急冷したものを用いた．

2）10mM Tris 緩衝液(以下緩衝液と略す)：Tris (hydroxymethyl)aminomethane 605.5mg を秤取し，塩化

*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

Tablel 1. Indicated Ingredients of Food Additive Preparations

Sample		Ingredients	Content (%)
Baking Powder	1	Sodium Bicarbonate	87
		Starch	13
	2	Sodium Bicarbonate	53
		Starch	18
		Calcium Carbonate	29
	3	Sodium Bicarbonate	70
		Calcium Carbonate	20
		Starch	10
	4	Potassium Bitartrate	15
		Aluminium Potassium Sulfate	5
		Ammonium Chloride	30
		Sodium Bicarbonate	40
		Starch	10
	5	Sodium Bicarbonate	22
		Disodium Dihydrogen Pyrophosphate	28
		Starch	50
Kansui	1	Potassium Carbonate	81
		Sodium Carbonate	10
		Disodium Hydrogen Phosphate	6
		Sodium Pyrophosphate	1
		Sodium Polyphosphate	2
	2	Potassium Carbonate	30
		Sodium Carbonate	57
		Disodium Hydrogen Phosphate	7
		Sodium Pyrophosphate	4
		Sodium Metaphosphate	2
	3	Potassium Carbonate	74.5
		Sodium Carbonate	17.6
		Disodium Hydrogen Phosphate	4.5
		Sodium Pyrophosphate	1.7
		Sodium Polyphosphate	1.7
	4	Potassium Carbonate	35
		Sodium Carbonate	52
		Sodium Polyphosphate	8
		Disodium Hydrogen Phosphate	3
		Sodium Metaphosphate	2
	5	Potassium Carbonate	30
		Sodium Carbonate	57
		Disodium Hydrogen Phosphate	7
		Sodium Polyphosphate	4
		Sodium Metaphosphate	2

マグネシウム73.8mgを加え，蒸留水で500mlとした後，塩酸2～3滴を加えpH8.2に調整した．

3）基質溶液：phosphoenolpyruvate tri(cyclohexylammonium)salt crystalline(SIGMA社製，以下PEPと略す)1,000mgを緩衝液に溶解し100mlとした．なお，この溶液は冷凍して保存し，2カ月以内に使用した．

4）補酵素溶液：β-nicotinamide adenine dinucleotide reduced form(SIGMA社製，以下NADHと略す)はナトリウム塩を使用した．NADH 341.8mgを緩衝液に溶解し100mlとした．なお，この溶液は冷凍して保存し，1カ月以内に使用した．

5）酵素溶液：phosphoenolpyruvate carboxylase (from wheat, [EC 4.1.1.31], BOEHRINGER・MANNHEIM社製，以下PEPCと略す)，及びmalic dehydrogenase (from porcine heart suspension in 2.8 M $(NH_4)_2SO_4$ solution pH6.0, [EC 1.1.1.37], SIGMA社製，以下MDHと略す)を，用時緩衝液に溶解し使用した．

6）その他の試薬：いずれも市販特級品を用いた．

3．器具及び装置 1）自記分光光度計：島津UV-240型

2）セル：光路長10mm，蓋付き石英標準セル

4．試験溶液の調製 試料0.5～1.5gの一定量を正確にはかり，0.001N水酸化ナトリウム溶液を加えて溶解し，全量を50mlとした．その0.5～1.0mlの一定量を25mlメスフラスコに正確に分取し，緩衝液で一定量としたものを試験溶液とした．

5．定量 あらかじめ緩衝液を2.3ml加えたセルに，基質溶液0.5ml，次いで補酵素溶液0.1ml，試験溶液0.05mlを順次加えた．さらに酵素溶液0.05mlを加えた後，セルに蓋をし攪拌した．なお反応温度は室温とし，酵素溶液を添加した時を反応開始時とした．

反応開始時の340nmにおける吸光度をA_0とし，さらに8分以内に3～4回吸光度を測定し，A_0からの減少量より吸光度が減少する速度を計算した．得られた値から空試験のそれを差し引き，試料の反応速度とした．標準溶液を試料溶液と同じ条件で測定し，得られた反応速度より，試料溶液中の炭酸水素塩及び炭酸塩濃度を求めた．

結果及び考察

酵素を用いた炭酸水素塩の定量方法の反応原理[7,8]はFig. 1．に示したとおりである．PEPCは，PEPのカルボキシル化反応を触媒し，オキザロ酢酸と正リン酸を生成する．オキザロ酢酸はMDHの存在下で，NADHによ

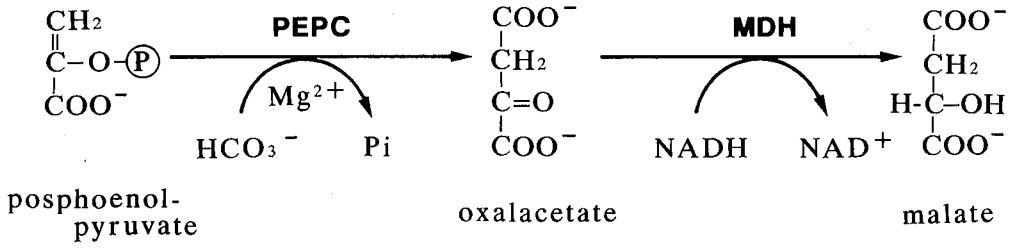


Fig. 1. Reaction Course of Enzymatic Determination of Bicarbonate
PEPC: phosphoenolpyruvate carboxylase
MDH: malate dehydrogenase

りリンゴ酸に転化される．このときNADHと等モル量のオキザロ酢酸が反応する．

NADHは約320～400nmの波長域で吸収を持ち，この波長における他の試薬の吸光度は無視できるほど小さい．したがって340nm付近における反応溶液の吸光度の減少，つまりNADHの消費量を測定することにより，リンゴ酸に転化されたオキザロ酢酸の量を間接的に知ることができる．

さらに，生成されたオキザロ酢酸がすべてリンゴ酸へ転化される条件下[7,9]では，一定時間内における340nm前後の所定波長の吸光度の減少量を比較することにより，簡単に炭酸水素塩量を知ることができる．

そこでこの原理を利用し，食品添加物製剤中の炭酸水素塩及び炭酸塩の定量を行なうため，種々の条件を検討した．

1．PEP及びNADH濃度　PEP濃度を0.1～5.0mMの範囲に調整し，濃度が反応速度に与える影響を検討したところ，3.0mM以上では反応速度に影響がみられなくなった．また，酵素に対するPEPのMichaelis定数(Km)を測定したところ0.17mMであった．Peled[7]は，PEPが反応速度に影響を及ぼさないためには，PEP濃度を酵素に対するPEPのKm値の少なくとも20倍にするべきである，と述べている．以上のことから以後のPEP濃度は3.5mMとした．

NADH濃度は0.03mM～0.3mMの範囲について，反応開始時の340nmにおける吸光度を測定した．NADHは，反応速度に影響を及ばさない一定以上の濃度とする必要がある．しかし今回利用した分光光度計の精度は吸光度が1.000以上になると定量性がなくなることから，NADH濃度は0.15mMとすることとした．

2．酵素活性　数検体を同時に測定する場合は，反応時間をずらし，かつ反応速度をある程度遅くすると操作性が良くなる．そこで検討を行い，PEP活性は0.08KU／lとし，MDH活性はその約6倍とすると良好な結果が得られることがわかった．

3．至適pH　使用した酵素の至適pHは，8.1～8.2付近であった．また，Hallら[10]によると，二酸化炭素(CO_2)，炭酸イオン(CO_3^{2-})，炭酸水素イオン(HCO_3^-)の平衡状態において，

$$CO_2+H_2O \rightleftarrows HCO_3^- + H^+ \rightleftarrows CO_3^{2-} + 2H^+$$

溶液中のCO_2，CO_3^{2-}の含有量が最も少なくなるのは，pH8.2～8.75であると報告している．これらのことから以後の反応液性はpH8.2とすることとした．

4．反応温度　操作の簡易化のため反応温度を室内温度(20.0～28.0℃)として検討したところ，いずれも満足できる結果が得られた．

5．窒素置換　本試験は炭酸水素塩及び炭酸塩の定量を目的としているため，空気中の二酸化炭素が試験結果に影響を及ぼすことが十分に考えられる．しかし，攪拌する際，セルのヘッドスペースに窒素を通気することにより反応開始時の吸光度の低下を抑えることができ，かつ空試験を同時に行い，その値を測定値から差し引くことにより，二酸化炭素の影響を妨ぐことができた．

6．検量線　本法により，標準試薬を用いて検量線を作成した結果をFig. 2．に示した．炭酸水素ナトリウムを用いて0－0.40mMの範囲で測定を行なったところ，0－0.20mMの範囲内で直線性が得られた．さらに炭酸水素カリウム，炭酸ナトリウム，炭酸カリウムについて，同様にそれぞれ0－0.4mMの範囲で測定したが，いずれも0－0.20mMの範囲で直線性を示した．また同時に炭酸水素塩と炭酸塩を測定したところ，反応速度は全く同一であった．

7．反応速度の再現性　炭酸ナトリウム0.10mMを用いて，同時に12回繰り返し定量したところ，吸光度の減

少速度平均は0.068mM／min で変動係数は2.8％であった.

8．**共存化合物の影響** 合成膨脹剤やかんすいに配合されているリン酸塩類，酒石酸水素塩類，ミョウバン類等が本酵素反応に及ぼす影響を検討した.

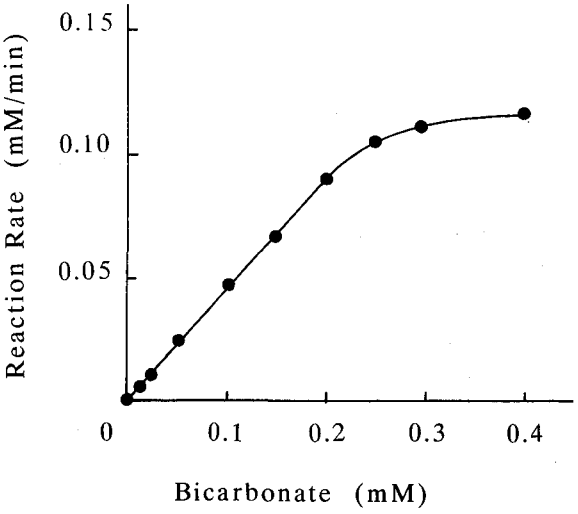


Fig. 2. Calibration Curve for Bicarbonate

合成膨脹剤の主成分として，炭酸水素ナトリウム0.10mM に対して，酒石酸水素カリウム，硫酸アルミニウムカリウム，塩化アンモニウム，でんぷんを2倍量まで加えて測定を行ったが，定量値に有意差は認められなかった.

しかし一剤式合成膨脹剤のうち，酒石酸水素ナトリウムを炭酸水素塩と等量以上含むものについては，測定値の減少が観察された．これは試料に0.001 N 水酸化ナトリウム水溶液を加え一定量としたとき，pH が5と弱酸性のままであるため，CO_2 が発生したものと考えられる．溶解液を0.01 N 水酸化ナトリウム水溶液とした場合，pH は10以上となるが，緩衝液で50～500倍に希釈しても，逆に pH を8.2に下げることができなかった．しかし，実際の試料に炭酸水素塩に対し等量以上の酒石酸水素ナトリウムを含むものは少ないため実用問題はなかった．今後アルカリ濃度等を検討し，それらの試料に対しても適用できる方法を作成する予定である.

Maruyama ら[11]は，リン酸が高濃度(0.1M)で存在すると PEP のカルボキシル化が遅くなると述べている．そこでかんすいの主成分の炭酸ナトリウム0.10mM に対

Table 2. Recovery of Bicabonate and Carbonate Intentionally Added to Food Additive Preparations

Sample		Added (g／g)	Found (g／g)	Recovery (％)	Mean±S.D. (％)
Baking Powder	1	0.00	0.86	—	100.5±1.50
		0.70	1.57	102.3	
	2	0.00	0.53	—	
		0.70	1.22	98.9	
	3	0.00	0.71	—	
		0.70	1.40	99.0	
	4	0.00	0.41	—	
		0.70	1.12	101.3	
	5	0.00	0.22	—	
		0.70	0.93	101.1	
Kansui	1	0.00	0.43	—	100.0±0.61
		0.80	1.23	100.0	
	2	0.00	0.46	—	
		0.80	1.25	99.5	
	3	0.00	0.44	—	
		0.80	1.24	100.3	
	4	0.00	0.42	—	
		0.80	1.22	100.8	
	5	0.00	0.47	—	
		0.80	1.26	99.3	

して，リン酸水素二ナトリウム，リン酸二水素ナトリウム，リン酸三ナトリウム，ピロリン酸四ナトリウム，ポリリン酸ナトリウム，メタリン酸ナトリウムの影響をそれぞれ等重量まで加えて検討したが，いずれの場合も反応速度の減少は観察されなかった．

9．炭酸水素ナトリウム及び炭酸ナトリウムの添加回収実験　合成膨脹剤及びかんすいに，炭酸水素ナトリウム及び炭酸ナトリウムを添加し回収実験を行なった．合成膨脹剤に炭酸水素ナトリウム，かんすいに炭酸ナトリウムを添加し，本法に従いそれぞれ3回ずつ測定した結果は Table 2．に示すとおりであり，いずれの試料からもほぼ100％回収率が得られた．

おわりに

食品添加物製剤中の炭酸水素塩及び炭酸塩を，酵素を用いて定量する方法を検討した．本法は試験溶液に，PEP，NADH，PEPC，MDH，及び Mg^{2+} を順次加え，経時的に吸光度を測定し，反応速度を求めるだけの簡易な操作であり，短時間で多くの試料を処理することが可能である．回収率は100.3％，確認限度は0.007mM，試料に換算して HCO_3^- として0.4mg／g であった．これらのことから本法は酒石酸水素塩が多量に配合された場合を除き，合成膨脹剤及びかんすい中の炭酸水素塩及び炭酸塩の定量法として実用上十分に利用できる方法と考える．今後，より広範囲の食品添加物製剤に適応できる方法を検討する予定である．

文　献

1）食品添加物便覧，1988年度版，食品と科学社．

2）食品添加物公定書解説書編集委員会編：第五版食品添加物公定書解説書，D-583，1987，広川書店．

3）日本分析化学改編：改訂三版分析化学便覧，丸善株式会社．

4）日本薬学会編：衛生試験法注解，金原出版株式会社．

5）Smith, F. C., Jr. and Chang, R.C. : *Practice of Ion Chromatography*, 1983, Wiley, New York.

6）日本工業規格，K 3362，1978.

7）Peled, N. : *Eur. Pat. Appl. Ep*, 76, 478, 1983.

8）丸尾文治，田宮信雄監修：酵素ハンドブック，朝倉書店．

9）Peled, N. : *Methods of Enzymatic Analysis*, 3 *rd Ed.*, 7, 572-577, 1985, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

10）Hall, N. P., Cornelius, M. J. and Keys, A.J. : *Anal. Biochem.*, 132, 152-157, 1983.

11）Maruyama, H., Easterday, R. L., Chang, H.C. and Lane, M.D. : *J. Biol. Chem.*, 241, 2405-2412, 1966.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 40, 197-201, 1989

最近の包装食品における包装材の使用実態調査

渡 辺 悠 二*, 金 子 令 子*, 風 間 成 孔*

Survey of Plastic Materials used in Food Packaging

YUJI WATANABE*, REIKO KANEKO* and MASAYOSHI KAZAMA*

Keyword：食品包装 food packaging, プラスチック plastic, 最大移行量 maximum migration

緒　　言

近年，わが国の食生活は社会構造(都市への人口集中化，核家族化，女性の社会活動への参加等)や流通機構の変化等により大きく変化し，かつ多様化してきている．これに伴い食品の販売形態も従来の計り売りはほとんど姿を消し，代わって個別包装による小分け売りが主体となってきている．また，包装素材も古くから用いられてきた紙，ガラスあるいは金属に代わって多種多様のプラスチックが汎用されてきている．プラスチックは前者に比べ安価，軽い，加工性等多くの利点を持つことから今後もニーズに合わせた製品が開発・使用されていくものと思われる．しかし，反面プラスチックは天然素材(紙，木等)やセラミック(ガラス，陶磁器等)に比べ衛生学的安全性の面で原料モノマーや添加剤の溶出等種々の問題を包合している素材でもある．

また，器具・容器包装の衛生学的安全性を考える時，最も考慮しなければならないのは食品へ移行する物質の毒性評価および最大移行量(溶出量)の推定であり，その評価を行う場合，食品と容器包装材との接触状況(期間，温度等)および接触割合が大きなファクターとなる．

そこで，最近の食品の包装形態について，食品別に包装材の使用実態調査を行うと同時に，併せて国民1人が1日に摂取する食品のプラスチックとの接触面積値の算定を試みた．

調査および実験

1．試料　昭和61年5月～昭和63年3月の期間に597検体(一般包装食品403，レトルト食品77，冷凍食品71，真空包装食品46)を収集した．

2．試験法　1)試料の調製　内容食品を取り除いた後容器・包装材を洗剤液で洗い，水すすぎ後風乾し，これを試料とする．ラミネート(貼り合わせ)材と推測される場合は，更に次の方法により個々のフィルムに剝離した後，試料とした．

イ．クロロホルム等の溶媒に浸漬する．

ロ．アルミニウム箔や紙等とのラミネートの場合は塩酸・硝酸希混液に浸漬加温する．

2）材質の鑑別

イ．赤外分光光度計を用いて，フィルム透過法または全反射法により赤外吸収スペクトルを測定し，これを標準スペクトルと比較し鑑別を行った．

ロ．熱分解ガスクロマトグラフを用いて，熱分解生成物のクロマトグラムを測定し，これを標準クロマトグラムと比較し鑑別を行った．

3）包装形態の測定

包装食品について，各食品の内容量の表示を確認し，また表示のないものについては秤量を行い，次いで食品の接触している内表面積を測定し1g(あるいは ml)当りの接触面積(cm^2／g または ml)を求めた．さらに，この値に1人1日当りの食品摂取量を乗じ，食品別の1日包装接触面積を算定した．

結果および考察

1．包装材の鑑別結果

1）一般包装食品

イ．使用されていたプラスチックは，ポリエチレン(以下 PE と略す，以下同じ)，ポリプロピレン(PP)，ポリスチレン(PS)，ポリ塩化ビニル(PVC)，ポリ塩化ビニリデン(PVDC)，ポリエチレンテレフタレート(PET)，ナイロン(Nyl)，ポリカーボネート(PC)，エチレン-酢酸ビニル共重合物(EVA)，エチレン-ビニルアルコール共重合物(EVAL)およびアクリロニトリル-アクリル酸

*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

エステル共重合物(ANA)で，プラスチック以外の素材としては，アルミニウム(Al)および紙(セロハン)が用いられていた．

以下，食品別に主なものを上げると次のようになる．なお，ラミネート(複層)フィルムの場合は最内層側より記載してある．

穀物加工製品：PP, PP／PP, PE, PP／EVAL／PP, PP／PE／PET
佃煮：PP／PET／Nyl
菓子：PP, PE／EVAL／PP, PP／PP, PP／Al／PP
水産練り製品：PP／PP, PE
大豆加工製品：PP, PS
漬物・惣菜：EVA／Nyl, EVA／PP, PE／PP, PP／PP
茶・コーヒー：PP／セロハン，PE／Al／PE, PE／PP／紙
化学調調味料：PVC, PET,PC
スープ類：PE／Al／PE／PET, EVA／Al／PE／PET
清涼飲料水：PE／紙／PE, PET
のり類：PP, PP／PP
みそ汁・コンソメ：EVA／EVAL／PP, PP／PE／Nyl
乳加工製品：PE／紙／PE, PS, PP, PE
食肉加工製品：PP／EVAL／PP, PE／PP, PE／PP, EVA／Nyl

ロ．単一層の包装材としては，8種(164検体，以下カッコ内は検体数)が認められ，内フィルム材としてはPP(99)とPE(27)の2種類が，菓子食品や穀物加工製品の包装に多用されている．PS, PVC, PET, PC, ANAおよび紙はいずれもカップ等の容器としての用途であった．

ハ．ラミネート包装材は，2層から6層のもの(239)が使用されていた．その内訳は，2層：13種(98)，3層：28種(112)，4層：14種(20)，5層：6種(8)，6層：1種(1)である．

主なものを検体数の多い順に上げると次のようになる．

2層：PP／PP(31)，EVA／Nyl(17)，EVA／PP(14)，PE／PP(9)，PE／Nyl(9)
3層：PP／EVAL／PP(33)，PE／紙／PE(25)，PP／Al／PP(9)，EVA／EVAL／PP(5)
4層：PE／Al／PE／PET(4)，PE／Al／PE／紙(2)
5層：PE／Al／PE／紙／PE(3)
6層：PE／紙／PE／Al／PE／紙(1)

ニ．ラミネート包装材の場合，食品と接触する最内層にはPP(100)，PE(82)，EVA(49)，PVDC(2)，アイオノマー(1)およびパラフィンワックス(1)が用いられており，PP, PEおよびEVAフィルムが多用されている．これらのプラスチックはヒートシール性と安全性の面から使用されているものと思われる．また，ガスバリヤー層としてEVALを用いているものが12種(49)あり，その内PP／EVAL／PP(33)が多用されている．その他Al箔(蒸着)を用いているものが22種(40)で，PP／Al／PP(9)が最も多く，4層以上ではほとんどにアルミニウムがラミネートされていた．

ト．ほとんどの包装材に印刷インキによる着色や，品名などの印刷表示が施されていたが，その印刷面は多くは中間部にあり，印刷インキが食品に溶出してくることはないものと考えられる．なお，今回の検体中印刷インキに使用する溶剤に起因する臭いを認めたものはなかった．

2）レトルト食品，冷凍食品，真空包装食品

イ．食品別に見ると，レトルト食品(4種77検体)ではPP／Al／PET(63)，PP／Nyl(7)，PP／PET(5)，冷凍食品(16種71検体)ではPP／PP(23)，PE／Nyl(13)，PE(7)，真空包装食品(14種46検体)ではPP／Nyl(14)，PE／Nyl(6)，PP／PET(5)，EVA／PP(5)などが多く用いられていた．

ロ．単一層の包装材では，PP, PE, PS, EVAの4種が使用されており，食品別にみると，冷凍食品類に多く，レトルト食品には見られなかった．

ラミネート包装材は，20種(178)が認められ，層別でみると2層：11種(103)，3層：6種(70)，4層：3種(5)であった．

主なものを検体数の多い順に上げると次のようになる．

2層：PP／Nyl(34)，PP／PP(24)，PP／PET(10)，PE／PP(9)
3層：PP／Al／PET(63)，PP／Al／PP(2)，PP／Nyl／PET(2)
4層：PE／PET／Al／Nyl(2)，PE／PVDC／セロハン／PVDC(2)

最も多かったのはレトルト食品のPP／AL／PETであり，冷凍食品にあっては単一層から4層まで多種多様のフィルムが使用されている．レトルト食品では，中間層にガスバリヤー層としてアルミニウムを使用しているものが多い．また，その他真空包装食品等では，PP／Nylが多く用いられていた．

ハ．ラミネート包装材の場合，食品と接触する最内層には一般包装食品と同じくPP, PEおよびEVAが用いられていた．また，フィルムそのものが着色されているものはなく，印刷面も中間部や外側であった．

2．食品包装接触面積値および移行量の算定

国民1人の1日当りの食品摂取量については，厚生省保険医療局が毎年栄養改善法に基づき国民の栄養調査を実施し，報告している[1]．それによると，昭和50年から昭和60年の食品総摂取量は約1.3kgから1.4kgで，年々減少傾向を示しており，昭和60年では最も少ない1,345gとなっている．一方，厚生省食品化学課では，昭和51年から国民の食品添加物の1日摂取量の実態調査を実施しているが，その中で，食品別の1日摂取量(加工食品)については，上記の国民栄養調査方式等を基に独自のマーケットバスケット方式による食品別の1日平均喫食量を算定している[2]．前者に比べ後者では食品をよりきめ細かく区分けしているので，著者等は，後者の摂取量を基に食品別の包装接触面積値を算定することとした．なお，その中で加工食品類は表に示すような食品群に分類されている．そこで，今回の調査では上記の各調査で対象となっている全食品(加工食品類179種，生鮮食品類17種)について食品毎の包装接触面積を求めたのち，食品群別に算定結果を集計した．結果を表に示してある．

1）包装材の種類

接触面積算定の対象となった食品の内で，その包装形態が1～4種類(例えばプラスチック，ガラス入り等)あるものもあるが，その場合はプラスチック包装のものを試料とした．

食品179品目中プラスチック包装のものは172品目で，その他ガラス4，ワックス1，紙1，セロハン1であった．プラスチック包装にあって食品に接触する部分(最内層)は，PP(61)，PE(40)，PS(27)，PVC(26，内缶詰3)，エポキシ樹脂塗装(17，缶詰)，EVA(10)，PET(9)，アクリル樹脂塗装(2，缶詰)，PC(1)，アイオノマー(1)であった．また，缶詰の内面塗装にはエポキシ樹脂が汎用されていたが，果実缶では缶胴部に塗装されていないことが確認された．

2）食品包装面積の算定

表1より，今回調査された食品の総摂取量は754gで，その総接触面積は950㎠であった．その内プラスチックとの接触面積は945㎠で，プラスチック別にみると，PP：447㎠(接触割合47.3%)，PE：213㎠(22.5%)，エポキシ樹脂：91㎠(9.6%)，PS：66㎠(7.0%)，PET：49㎠(5.2%)，PVC：41㎠(4.3%)，EVA：35㎠(3.7%)，PC：2.4㎠(0.3%)アイオノマー：1.1㎠(0.1%)，アクリル樹脂：0.5㎠(0.0%)となり，PPとPEで約70%を占めている．

なお，マーケットバスケット方式で収載されている食品は，いずれも食品添加物が使用されている可能性の高い加工食品等であり，生鮮食品等は対象としていない．そこで，生鮮食品等については，「国民栄養調査」に収載されている食品で包装されているものを対象として，その摂取量と接触面積を算定した．その結果を表に示してある．生鮮食品類の包装材はほとんどが単一層のもので，PVC(8)，PS(7)，PE(5)，PP(4)が用いられており，トレーあるいはストレッチフィルム包装が多い．また，1日食品摂取量は560g，包装接触面積は487㎠であった．この結果，加工食品類と生鮮食品類の総摂取量は約1.3kgで，その内プラスチックによる包装接触面積は1,437㎠となるが，水洗，洗浄する生鮮食品(野菜，果実類)を除くと1日摂取量は910g，接触面積は1,124㎠となった．

3）最大移行量の推定

以上の結果を基に，わが国の1人1日最大移行量を下記の条件で求めてみた．

接触面積(S)：1,124㎠

移行量(M)：0.06mg／㎠(食品類似溶媒2ml／㎠を用いた時の蒸発残留物規制値30ppmを挿入)

最大移行量(mg／人／日)＝S×M

＝1,124×0.06＝67.44

このように蒸発残留物量(総移行試験)が最大(規制値)の場合，最大移行量は67mg／人／日となった．また，これまでの実験結果からPVCおよびPVDC製品を除くプラスチックの蒸発残留物量はほとんどが5ppm以下であり，軟質PVCで最大約150ppm(油性食品の場合)であることが判明している．そこで，この移行濃度を基にあらためて移行量を求めてみると

PVC：91㎠×0.30mg／㎠＝27.30mg

(接触面積：加工食品41㎠，生鮮食品50㎠)

その他：1,033㎠×0.01mg／㎠＝10.33mg

移行量は約38mg／人／日となり，先の最大移行量の約2／1となる．

ここで外国における例を見ると，オランダでは1人1日の食品摂取量を2.6kg(固形食品600g，液状食品および飲食物2.0kg)と見なし，そのうち約1kgが包装され，その接触面積は600㎠であるとしている[3]．更に，プラスチック製品から溶出してくる成分の総量は60mg／人／日以下でなければならないという規制(総移行試験)を設けている．ただし，この60という規制値に格段の根拠はなく，安全や食品の純度とは直接の関係のない，規制の1つのやり方として導入されている．また，欧州会議

表　加工食品類および生鮮食品類等の包装接触面積

食品群		食品との接触割合 cm²／g (ml)	1人1日当たり 食品摂取量g(ml)	1人1日当たり 包装面積cm²
加工食品類	穀類 (17種)	34.1	119.1	272.67
	種実類 (1種)	2.9	0.2	0.58
	いも類 (3種)	9.2	10.1	13.07
	砂糖類 (1種)	0.7	1.0	0.70
	菓子類 (19種)	48.6	43.4	126.88
	油脂類 (6種)	6.3	22.2	19.01
	豆類 (6種)	14.3	69.7	70.18
	果実類 (10種)	6.6	7.1	3.41
	野菜類 (11種)	13.6	24.9	41.68
	海草類 (2種)	21.3	1.3	7.23
	調味料等 (29種)	19.6	341.9	210.90
	魚介類 (32種)	106.0	43.7	92.32
	肉類 (4種)	8.1	9.7	24.49
	乳類 (7種)	8.2	37.0	40.41
	加工食品 (4種)	3.9	7.3	6.24
	その他1 (12種)	17.4	11.3	12.64
	〃 2 (15種)	49.4	4.2	7.89
	合計 (179種)	370.2	754.1	950.30
生鮮食品類等	穀類 (米)	0.3	217.6	65.28
	〃 (小麦粉)	0.7	6.0	4.20
	いも類 (さつまいも)	1.3	10.0	13.00
	〃 (じゃがいも)	0.9	24.0	21.60
	砂糖類 (砂糖)	0.9	13.0	11.70
	果実類 (りんご)	1.0	28.0	28.00
	野菜類 (にんじん)	1.2	13.6	16.32
	〃 (ピーマン)	3.5	3.8	13.30
	〃 (トマト)	1.1	10.6	11.66
	〃 (きゅうり)	1.2	10.1	12.12
	〃 (その他)	2.4	42.4	101.76
	きのこ類 (きのこ)	1.1	9.7	10.67
	海草類 (海草)	2.7	5.3	14.31
	肉類 (牛肉)	1.4	14.0	19.60
	〃 (豚肉)	2.1	29.5	61.95
	〃 (鶏肉)	1.1	16.5	18.15
	乳類 (牛乳)	0.6	106.0	63.60
	合計 (17種)	23.5	560.1	487.22

Council of Europe: CE)の専門家会議(Committee of Experts)は「食品用プラスチック材料に使用できる物質」のagreement(協定)の中で，次のような考え方を示している[4]．すなわち，プラスチック材料で包装された食品の1日摂取量は1kgであり，プラスチック材料から食品への汚染限度は60mg／kgであるとしている．この場合，体重60kgの大人の場合1mg／kg(体重)と同等となる．

この結果，わが国におけるプラスチック包装食品の1日摂取量，プラスチック包装接触面積および最大移行量はオランダやCEの値と同程度であることがわかった．しかし，一般家庭でのプラスチック製食器・器具やラップフィルム(PVC, PVDC製)の多用[5]あるいは食品の製造工程やスーパーマーケット，飲食店等の業務上でのプラ

スチック製品の多用を考えると，食品とプラスチックとのかかわりはもっと密接な状況にあり，移行量もより多いものであろう．

したがって，プラスチック製品から食品への移行汚染物質については溶出物質の確認とその移行量に十分に注意を払っていく必要があると思われる．

ま と め

1．食品包装材の使用実態

1）一般包装食品(403検体)に使用されている包装材について，材質の実態調査を行った．

全体で70種の包装材が使用されていた．内訳は単一層8種(164)，2層13種(98)，3層28種(112)，4層14種(20)，5層6種(8)，6層1種(1)でラミネート材が約2／3を占めていた．使用頻度の高いものを上げると次の通りである．

PP(99)，PP／EVAL／PP(33)，PP／PP(31)，PE(27)，PE／紙／PE(25)，EVA／Nyl(17)，EVA／PP(14)，PE／PP(9)

また，食品と接触する最内層にはPE, PPおよびEVAフィルムが多用されており，更にガスバリヤー層としてはEVALフィルムやAlが用いられていた．

2）レトルト食品(77検体)で最も使用されていたものはPP／Al／PET(63)で，最内層はすべてPPであり，ガスバリヤー層としてAlを用いているものが多かった．冷凍食品(71)では，PP／PP(23)，PE／Nyl(13)が多く，その他PE, PE／PP等が用いられていた．また，真空包装食品等(46)では，PP／Nyl(14)が多用されていた．

2．食品包装接触面積値の算定

国民1人1日当りの食品摂取量(厚生省食品化学課算定，マーケットバスケット方式による1日平均喫食量)を基に，プラスチック包装食品別の包装接触面積(㎠／g)を求め，次いで1日摂取量を乗じて1人1日包装接触面積(㎠／人／日)を算定した．更に，プラスチック包装材から食品に移行する物質の移行濃度から1日最大移行量(mg／人／日)を求めた．

その結果，加工食品類の総1日摂取量は754gで，その容器包装材の総接触面積は950㎠であり，内プラスチックは945㎠であった．更に，生鮮食品類を合わせると，摂取量は910g，包装接触面積は1,124㎠となった．

以上の結果を基に，わが国の1人1日最大移行量を求めると(蒸発残留規制値30ppmを最大移行濃度として)，その移行量は67mg／人／日となった．なお，オランダや欧州会議(CE)のagreementでは，包装食品の摂取量を1kg(プラスチック接触面積600㎠)，食品への汚染限度を60mg／人／日としており，今回の調査の結果，わが国の最大移行量はこれと同程度になることがわかった．

謝辞：本調査は，衛生局環境衛生部食品監視課食品機動班の先行調査として共同で実施したものであり，協力いただいた監視課並びに各機動班の各位に深謝致します．

文 献

1）厚生省：国民栄養の現状，昭和62年3月．
2）厚生省：食品化学レポートシリーズ，No.45，1987．
3）ポリオレフィン等衛生協議会：技術資料，No.21，昭和53年9月．
4）塩ビ食品衛生協議会：会報，No.76，1986．9．
5）渡辺悠二，佐藤憲一，吉田令子，遠藤英美：東京衛研年報，33，232-237，1982．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 202-208, 1989

ろ過助剤用チタン酸カリウム繊維に関する衛生学的研究

荻野周三*, 安野哲子*, 小関正道*,
津田裕子*, 風間成孔

Food Hygienic Quality of Potassium Titanate Fibers Used as Filter Aid

SHUZO OGINO*, TETSUKO YASUNO*, MASAMICHI KOSEKI*,
YUKO TSUDA* and MASAYOSHI KAZAMA*

SUMMARY

Food hygienic quality of potassium titanate fiber used as a filter aid for the manufacture of Japanese sake was investigated. Two samples were tested in respect of following items : 1) morphology, 2) chemical composition, 3) elution into water and 0.5 N−hydrochloric acid, 4) loss on drying and ignition.

The sizes of fibers were ranged from 0.4 μm to 55 μm in length and from 0.1 μm to 1.8 μm in width, respectively. Samples contained a small amount of impurities (Ca, Si, *Al*, P, Fe, Cu, Zn and Sr). Samples were stable to water, however, a portion of the components (K and Ti) of fibers and impurities eluted into 0.5 N−hydrochloric acid. The loss on drying were 0.37% and 0.16%, and were almost equal to the loss on ignition.

Keywords：チタン酸カリウム繊維 potassium titanate fiber, ろ過助剤 filter aid, 食品衛生 food hygiene

緒　言

チタン酸カリウム繊維は今から約35年前に開発された比較的歴史の浅い人工鉱物繊維である[1,2]. 繊維状構造を持ち，その形状は石綿に酷似している．断熱性，耐熱性，耐化学性に優れていることから，断熱材，耐熱塗料原料として用いられる他に，熱可塑性樹脂，熱硬化性樹脂，プラスチック，セラミック等の強化材や摩擦材など，石綿代替物質として次第にその用途を広げつつある．

食品工業の分野においてもその繊維状構造の特性を利用し，清酒のろ過工程で，ろ過助剤としての応用が試みられている．一方，ろ過に用いられるチタン酸カリウム繊維は食品衛生法上は製造器具の一種であると見なされ，同様の用途で用いられるケイソウ土とは異なり，食品添加物としての品質規格は定められていない．そこで筆者らはろ過助剤として用いられるチタン酸カリウム繊維の品質について食品衛生学的な立場から検討を加え，知見を得たので報告する．

実　験

1．試料　国内においてろ過助剤としてチタン酸カリウム繊維を製造販売している2社よりそれぞれ1種類の試料［いずれも6チタン酸カリウム($K_2O \cdot 6TiO_2$)繊維，以下試料Aおよび試料Bと略す］の提供を受けた．

2．試薬　カリウム，チタン，カルシウム，リン，ケイ素，アルミニウム，鉄，銅，セレン，ニッケル，亜鉛，ストロンチウム，ナトリウム，鉛，ヒ素(以下それぞれK. Ti. Ca, P, Si, *Al*, Fe, Cu, Se, Ni, Zn, Sr, Na, Pb, As と略す)標準液：原子吸光分析用(1,000ppm)標準液(和光純薬製)を用いた．3％水素化ホウ素ナトリウム溶液：化学用水素化ホウ素ナトリウム(和光純薬製)を1％水酸化ナトリウム溶液に溶解した．その他の試薬はすべて特級品を用いた．

3．装置　走査型電子顕微鏡(以下SEMと略す)：日立製作所製S-800型，透過型電子顕微鏡(以下TEMと略す)：日立製作所製H-7000型にエネルギー分散型X線分析装置(以下EDXと略す)Kevex 7500型を付属，高周

*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

波誘導結合プラズマ発光分光分析装置(以下 ICP−AES と略す)：Jobin Yvon 社製 JY−48 P 型，原子吸光分析装置(以下 AAS と略す)：PERKIN−ELMER 社製2380型(As 分析装置 MHS−20型を付属)

4．試験方法

1）SEM による繊維の形状の観察　試料の水懸濁液をアルミニウム箔を張ったアルミニウム製試料台上に滴下し，乾燥後，白金-パラジウム蒸着を施した．これを試料として，加速電圧10kV，倍率2,000倍もしくは5,000倍で観察を行った．

2）TEM による繊維長および繊維幅の測定と元素分析　フォルムバール支持膜を張った200メッシュの銅製グリット上に試料の水懸濁液を滴下し，乾燥後，炭素蒸着を行った．このグリッドを TEM に装着し，加速電圧75kV，倍率1,000倍で TEM 像を写真撮影した．写真をさらに2倍に引き伸ばし，無作意に抽出した計100本の繊維についてその長さと幅を測定した．また EDX を用いて繊維および夾雑物の元素分析を行った．

3）組成分析　試料0.2g を白金ルツボにとり，硫酸水素ナトリウム2g を加え，穏やかに加熱し，硫酸水素ナトリウムが融解した後，さらに強熱して内容物を完全に融解させた．冷後これに0.5N-硫酸25ml を加え，水浴上で加温して溶解させた後，水を加えて100ml とし，試料原液とした．試料原液を適宜希釈した後，K については Table 1 に示す測定条件で AAS を用いて分析し，その他の元素については Table 2 に示す測定条件で ICP−AES を用いて分析した．なお K の測定試料液には AAS 分析におけるイオン化干渉を抑制する目的で塩化セシウムを1％濃度となるように添加した．

4）水可溶物量の測定　試料4g に水50ml を加えて振り混ぜ，24時間放置した後，水を加えて全量を200ml とし，ろ過した．ろ液100ml を白金ルツボにとり，水浴上で蒸発乾固した後，さらに550℃で恒量になるまで強熱して，残留物量を測定した．

5）水可溶成分の分析　上記4)におけるろ液を試料原液とし，以下，上記3)と同様に分析した．Na については K と同様に，塩化セシウムを1％濃度となるように添加した後，Table 1 に示す測定条件で AAS を用いて分析した．

6）塩酸可溶物量の測定　試料5g に0.5N-塩酸100ml を加えて水浴上で30分間加温した後，ろ過した．残留物を0.5N-塩酸10ml ずつで3回洗浄し，洗液をろ液に合わせてルツボに移し，水浴上で蒸発乾固した後，さらに550℃で恒量になるまで強熱して，残留物量を測定した．

Table 1．Operating Conditions of AAS

	Element		
	K	Na	As
Wavelength (nm)	766.5	589.0	193.7
Lamp Current (mA)	14	14	18
Flame Gases	Air- Acetylene		—
Atomization Temp.	—	—	900℃
Reaction Time	—	—	10sec.

Table 2．Operating Conditions of ICP−AES

Incident Power	：1.75KW		
Reflect Power	：0.0KW		
Nebulizer Gas	：0.4l/min		
Coolant Gas	：15.0l/min		
Observation Height	：16mm above Coil		
Element &	Ti 334.9	Ca 422.6	P 213.6
Wavelngth (nm)	Si 288.1	Al 308.2	Fe 259.9
	Cu 324.8	Se 196.0	Ni 231.6
	Zn 213.9×2	Sr 407.8	Pb 220.4

7）塩酸可溶成分の分析　上記6)におけるろ液を試料原液とし，以下，上記5)と同様に分析した．また As については，MHS-20を装着した原子吸光分析装置を用い，3％水素化ホウ素ナトリウム溶液を還元剤として，Table 1 に示す条件で分析した．

8）乾燥減量の測定　試料0.5g をとり，105℃で3時間乾燥した後，減量を測定した．

9）強熱減量の測定　試料 0.5g をとり，800℃で恒量になるまで強熱した後，減量を測定した．

なお上記4)-9)の試験方法は食品添加物公定書に収載されている「二酸化チタン」[3]の純度試験法を参考にした．

結果および考察

Fig. 2 に試料の SEM 像を示す．繊維は滑らかな表面を持ち，円柱状を呈していた．

Fig. 3 に試料の TEM 像と EDX スペクトルを示す．いずれの試料においても繊維の外観は直線状であり，しかもその末端はほぼ直角な断面を呈していた．試料Aには試料Bに比較して，より多くの塊状の夾雑物の存在が認められ，EDX による分析の結果，その多くが Si 化合物であることが確かめられたが，希に Fe 化合物も検出された．

繊維長と繊維幅に関する分布を Fig. 1 に示す．試料

Aにおける繊維長，繊維幅の範囲はそれぞれ0.4-29 μm，0.1-0.8 μm であったのに対し，試料Bでは1-55 μm，0.1-1.8 μm であり，また分布の中心は試料Aの場合，繊維長が4.3 μm，繊維幅は0.2 μm であったのに対し，試料Bではそれぞれ8.2 μm，0.6 μm といずれも大きな値を示した．試料Aに比較して試料Bの繊維は，より長く，しかも太い特徴を持つことが確かめられた．なお，繊維長の増加に比例して繊維幅も増加する傾向が認められたが，この傾向は試料Bにおいて，より顕著であった．

組成分析の結果を Table 3 に示す．6チタン酸カリウム繊維の理論上の元素組成はKが13.6%，Ti が50.1%で，残りは酸素である．試料AのTiは理論値にほぼ等しい値を示したが，Kは値が小さく，むしろ6チタン酸カリウム繊維と同様の物理特性と化学特性を持つ8チタン酸カリウム繊維($K_2O \cdot 8TiO_2$)の元素組成(K：10.7%，Ti：52.2%)に近似していた．試料BではKおよびTiともに理論上の元素組成にほぼ等しい値が得られた．夾雑成分については試料AおよびBに共通して，CaとSiがやや多く検出され，また試料AからはPが，試料BからはAlがそれぞれ検出された．チタン酸カリウム繊維は二酸化チタンを製造原料としており，この二酸化チタンの製造の過程で，結晶化の促進剤としてリン酸塩を添加する例や，また顔料特性を付与するために，AlやSiなどの可溶性塩類を添加する例があることから，試料から検出されたP，Al, Siは原料の二酸化チタンに由来する夾雑物であるとも考えられる．

水可溶物量および塩酸可溶物量を Table 4 に示す．試料Aは試料Bに比べて，水および0.5N-塩酸のいずれに対しても可溶物量がやや多い傾向が認められた．Table 5 および Table 6 に示した可溶成分の分析結果から，水に対してはKの溶出が認められ，特に試料Aでは試料Bに比べて約10倍の値を示した．これは製造方法の違いによって，繊維の安定性に差が生じるか，あるいは原料である炭酸カリウムの未反応残留物の存在を示唆するものと考えられる．0.5N-塩酸に対してはKの溶出がさらに促進されると共に，Tiの溶出も認められた．これはチタン酸カリウム繊維が塩酸に対しては完全に安定ではなく，その一部が溶解することを示唆している．また繊維の組成分析において存在が確かめられた，Ca, Si, Al, Fe, Cu, Zn, Sr の溶出も同時に認められた．Pについてはいずれの試料からも溶出が認められず，おそらく塩酸不溶性の塩類として存在するものと考えられる．ヒ素の溶出は試料Aにおいてのみ認められたが，その量は0.02 μg/g と極めて少なく，また Pb はいずれの試料

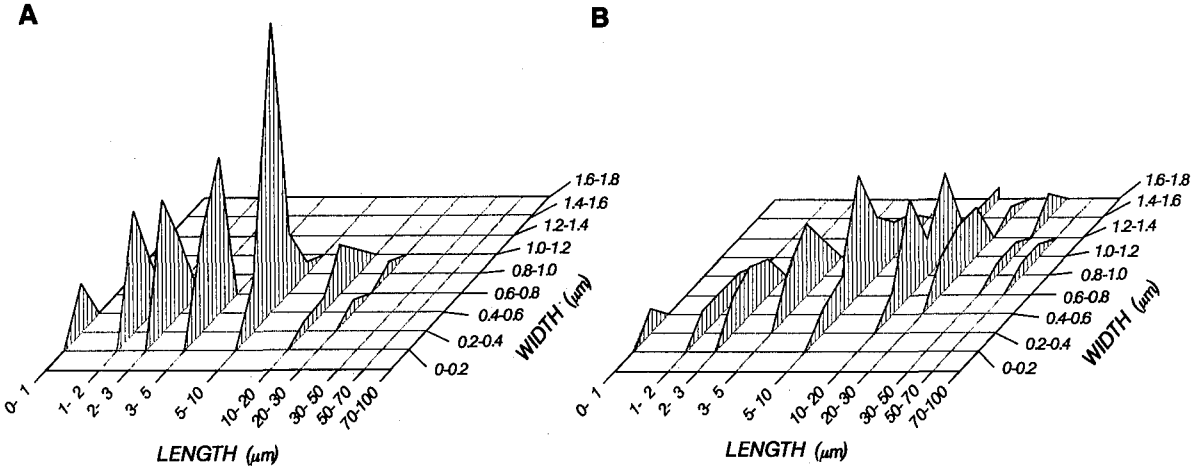


Table 3. Component Elements of Samples (%)

Sample	Element												
	K	Ti	Ca	P	Si	Al	Fe	Cu	Se	Ni	Zn	Sr	Pb
A	9.71	50.70	.0644	.0550	.0178	ND	.0015	.0012	ND	ND	.0005	.0005	ND
B	13.07	52.55	.0602	.0024	.0272	.0154	.0039	.0015	ND	ND	.0005	.0005	ND

ND：not detected

からも検出されなかった.

乾燥減量および強熱減量についての測定結果を Table 4 に示す. 結果からはいずれの試料においても付着水量がわずかであることと, 800℃の加熱条件下では付着水は離脱するが, 繊維自体に分解は生じないことが示唆された.

チタン酸カリウム繊維をろ過助剤として使用する際に派生しうる衛生学上の重要な問題点としては製品中への有害成分の溶出の可能性がまず考えられる. そこで著者らは今回この点を中心に検討を行なった. その結果, Ca, P, Si, *Al* および Fe などの夾雑成分の溶出が確かめられたが, その量はいずれも少なく, また As や Pb などのいわゆる有害元素はほとんど検出されなかったことから, 特に衛生学的な問題点は認められなかった. しかし, 原料である二酸化チタンに由来すると考えられる夾雑物が存在し, さらに試料間で酸に対する安定性に差が認められることなどから, 今後さらに検討を加える必要があると考える. なお, チタン酸カリウム繊維自体の毒性に関する報告は現在のところ極めて少なく, 安全性を十分に評価することはできない. しかし, 花岡ら[4]は *in vitro* の実験で, チタン酸カリウム繊維にクリソタイル石綿と同程度の細胞毒性があると報告し, また安達ら[5]はラットを用いた気管内投与実験の結果, 軽度の肺胞炎ならびに胸膜の変化が生じることを結告している。さらに Stanton[6] はラットの胸膜内投与実験の結果から, 長さが 8 μm 以上で, 幅が0.25 μm 以下の鉱物繊維全般に発ガン性の強いことを結告している。今回分析した試料からはこのサイズに合致する繊維も検出されている。これらの実験結果を経口的な毒性に直接結び付けることは適当ではないが, ろ過助剤として使用した際の, 繊維の製品中への混入の可能性についても今後検討を加える必要があると考える。

Table 4. Physical and Chemical Properties of Samples

	Sample	
	A	B
Water- Soluble Substances	0.96%	0.11%
0.5N－HCl- Soluble Substances	2.04%	0.33%
Loss on Drying	0.37%	0.16%
Loss on Ignition	0.39%	0.15%

謝辞：本研究を実施するにあたり, 多大なご協力をいただいた当所毒性部, 福森信隆主任研究員ならびに同生活科学部, 前木吾市氏に深謝いたします.

文　献

1) 清水紀夫：化学工業, 31(5), 503-508, 1980.
2) 清水紀夫：化学工業, 31(7), 752-756, 1980.
3) 日本食品添加物協会編集：第5版食品添加物公定書, 365-366, 1986.
4) 花岡知之, 藤波襄二, 岩根久夫, 川合ゆかり, 木村菊二, 伊藤昭好：日本産業衛生学会（青森), 1989.
5) 安達修一, 竹本和夫, 木村菊二：産業医学, 29, 741, 1987.
6) Stanton, M.F. : *J. National Cancer Institute*, 67(5), 965-975, 1981.

Table 5. Component Elements of Water- Soluble Substances (μg／sample 1 g)

Sample	Element													
	K	Ti	Ca	P	Si	*Al*	Fe	Na	Cu	Se	Ni	Zn	Sr	Pb
A	4,552	ND	ND	83	ND	ND	ND	18	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B	448	ND	48	ND	ND	ND	ND	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND：not detected

Table 6. Component Elements of 0.5–HCl Soluble Substances (μg／sample 1 g)

Sample	Element														
	K	Ti	Ca	P	Si	*Al*	Fe	Na	Cu	Se	Ni	Zn	Sr	Pb	As
A	13,360	1,068	190	ND	84	35	15	52	3	11	ND	2	1	ND	0.02
B	3,793	587	292	ND	152	57	20	50	2	ND	ND	3	2	ND	ND

ND：not detected

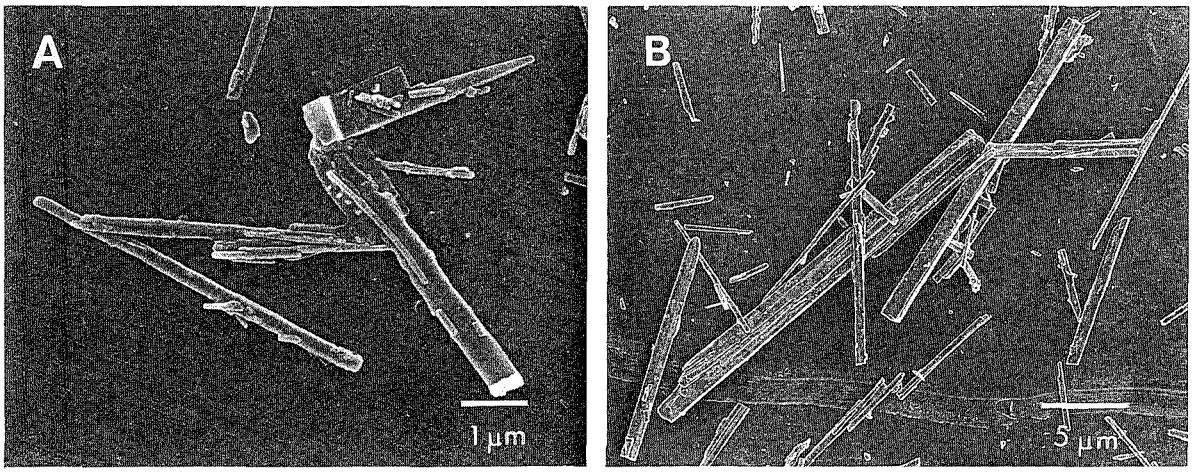


Fig. 2. SEM of Potassium Titanate Fibers
A : Sample A×10,000, B : Sample B×2,600

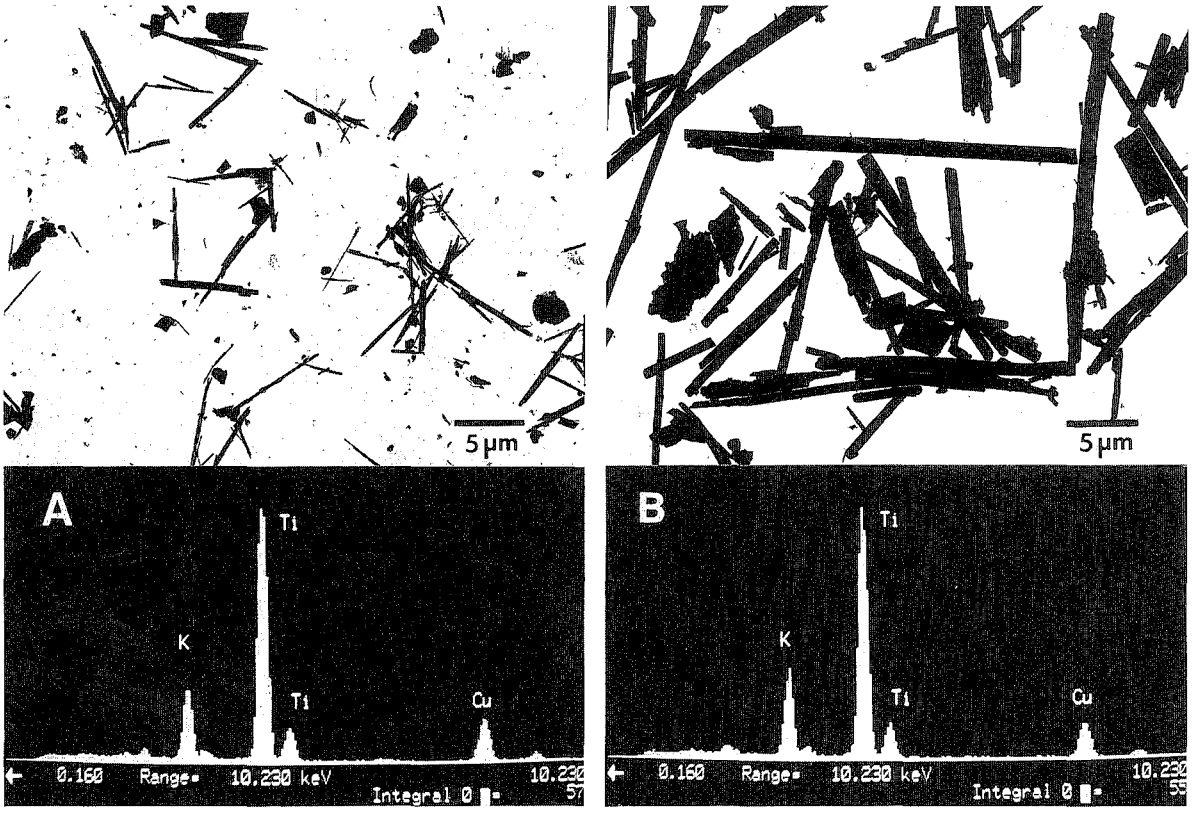


Fig. 3. TEM and EDX Spectra of Potassium Titanate Fibers
A : Sample A×2,000, B : Sample B×2,000
Peaks of K (at 3.31keV) and Ti (at 4.51keV) are observed in EDX spectra.
An appearance of Cu peak (at 8.0keV) is caused by TEM grid made of copper.

Table 1. Fork length, body weight, lipid content and condition factor of mackerel

Sample	n	Date	Fork length (cm)	Body weight (g)	Lipid content (g／100g flesh)	Condition factor*
A	5	May. 12(1985)(Sp.)	28.3±1.2**,a	276.7±28.0a	9.26±3.28a,b	12.2±0.6a
B	4	Aug. 20(1985)(Su.)	28.0±2.0a	244.6±48.5a	4.69±2.08a	11.1±0.7a
C	5	Nov. 11(1985)(Au.)	32.2±0.5b	433.7±48.5b	18.18±5.32b	13.0±1.0a
D	5	Feb. 18(1986)(Wi.)	32.5±0.9b	424.4±49.7b	15.49±4.56b	12.3±0.6a

* ：〔Body weight／(Fork length)^3〕×1000

**：Mean±S.D.

Mackerel were caught off the coast of Jogashima in Kanagawa Prefecture.

Means in the same component not sharing common superscript are significantly different（P<0.01).

に低い値を示した.

一般に，マサバは秋に脂がのるといわれているが，当分析結果も，これを支持するものである.

ただし，尾叉長が，春・夏と秋・冬間で有意差を示したことから，この間における差は，魚体の違いが影響していることも考えられる．しかし，同程度の尾叉長を示した春・夏間および秋・冬間で，それぞれ脂質含量に差が見られたことは，季節による変動を示すものであり，このことからも，春・夏と秋・冬間にも季節的変動がある，と判断される.

2．脂肪酸組成の季節的変動

当分析において，脂肪酸組成比で一期でも1％を越えたものは18種であり，そのうち16種を同定した．その組成比を Table 2 に，含量を Table 3 に，それぞれ示す.

組成比の変動を季節的に見ると，春期に増大傾向を示した脂肪酸は，$C_{16:1(\omega 7)}$，$C_{16:4(\omega 3)}$，$C_{18:4(\omega 3)}$およ

Table 2. Seasonal variation of fatty acid composition of mackerel

(wt%)

Fatty acid	Spring	Summer	Autumn	Winter
14：0	3.7±0.8*,a	4.2±0.3a	3.2±0.7a	4.5±0.5a
16：0	17.3±1.2a	17.5±1.0a	21.2±1.0	16.1±0.7a
16：1 (ω7)	5.1±0.5a	4.3±0.6a,b	4.9±0.3a	3.8±0.3b
(**)	0.7±0.1a	0.8±0.2a	0.9±0.2a	0.7±0.2a
(**)	1.1±0.3	0.4±0.2a,b	0.4±0.1a	0.1±0.0b
16：4 (ω3)	1.5±0.4	0.3±0.1a	0.3±0.2a	0.2±0.1a
18：0	5.4±0.4a,b	6.1±0.5a	5.9±0.7a,b	4.7±0.6b
18：1 (ω9)	16.3±3.0a,b	12.4±3.1a	20.5±1.8b	16.5±2.8a,b
18：1 (ω7)	3.8±0.3a	3.7±0.3a	3.9±0.3a	3.8±0.6a
18：2 (ω6)	0.6±0.1a	1.0±0.2b	0.8±0.2a,b	1.5±0.1
18：4 (ω3)	1.3±0.2a	0.9±0.3a,b	0.8±0.2b	1.8±0.5a
20：1 (ω11)	0.3±0.3a	1.1±1.4a,b	0.3±0.2a	2.4±0.7b
20：1 (ω9)	1.9±0.7a	2.0±1.0a	2.0±0.3a	2.3±0.3a
20：4 (ω6)	1.3±0.2a	2.3±0.7a	1.8±0.4a	0.9±0.1
20：5 (ω3)	10.8±1.4a	8.5±0.6a,b	7.5±0.7b	8.1±0.7b
22：1 (ω11)	1.6±1.1a,b	1.3±1.0a,b	0.4±0.2a	2.8±0.9b
22：5 (ω3)	2.3±0.3a	2.2±0.2a	2.1±0.3a	2.2±0.1a
22：6 (ω3)	14.8±1.0a	20.0±4.2a	13.2±4.5a	16.9±2.0a
others	10.1±1.1a	11.3±1.5a	9.9±1.9a	10.5±0.6a

* ：Mean±S.D.

**：Unidentified peak

Means in the same fatty acid not sharing common superscript are significantly different（P<0.01）.

Table 3. Seasonal variation of fatty acid contents of mackerel

(g／100g flesh)

Fatty acid	Spring	Summer	Autumn	Winter	Max./Min.**
14：0	0.28±0.06*,a,b	0.17±0.08a	0.50±0.17b	0.62±0.22b	3.6
16：0	1.41±0.58a	0.69±0.32a	3.40±1.17b	2.19±0.68a,b	4.9
16：1 (ω7)	0.40±0.13a,b	0.17±0.09a	0.80±0.31b	0.53±0.20a,b	4.7
(***)	0.05±0.02a	0.03±0.01a	0.14±0.07a	0.10±0.04a	4.7
(***)	0.08±0.03a	0.02±0.01b	0.06±0.03a	0.01±0.01b	4.0
16：4 (ω3)	0.11±0.03a	0.02±0.01b	0.06±0.03a,b	0.03±0.01b	5.5
18：0	0.44±0.20a,b	0.24±0.10a	0.97±0.40b	0.61±0.15b	4.0
18：1 (ω9)	1.38±0.74a,b	0.54±0.39a	3.32±1.24b	2.18±0.56b	6.1
18：1 (ω7)	0.31±0.14a,b	0.15±0.08a	0.63±0.21b	0.50±0.15b	4.2
18：2 (ω6)	0.05±0.02a	0.04±0.01a	0.12±0.03b	0.20±0.07b	5.0
18：4 (ω3)	0.10±0.03a	0.04±0.02b	0.13±0.05a,b	0.26±0.11a	6.5
20：1 (ω11)	0.02±0.01a	0.06±0.09a,b	0.04±0.02a	0.35±0.16b	17.5
20：1 (ω9)	0.15±0.06a	0.09±0.09a	0.31±0.11a,b	0.30±0.08b	3.4
20：4 (ω6)	0.11±0.03a	0.09±0.02a	0.30±0.14a	0.13±0.04a	3.3
20：5 (ω3)	0.84±0.23a	0.34±0.19	1.23±0.47a	1.14±0.40a	3.6
22：1 (ω11)	0.11±0.08a,b	0.07±0.07a,b	0.05±0.02a	0.40±0.21b	8.0
22：5 (ω3)	0.19±0.09a,b	0.09±0.05a	0.36±0.15a,b	0.31±0.09b	4.0
22：6 (ω3)	1.19±0.44a,b	0.74±0.20a	1.90±0.48b	2.36±0.81b	3.2
Total	7.23±2.66a,b	3.55±1.78a	14.31±4.64b	12.23±3.81b	4.0

* ：Mean±S.D.

** ：Maximum mean／Minimum mean

***：Unidentified peak

Means in the same fatty acid not sharing common superscript are significantly different ($P<0.01$).

び$C_{20:5(\omega3)}$酸であり，夏期に増大傾向を示したのは，$C_{18:0}$および$C_{22:6(\omega3)}$酸であった．また，秋期では$C_{16:0}$，$C_{16:1(\omega7)}$および$C_{18:1(\omega9)}$酸で増大傾向を示し，冬期では$C_{18:2(\omega6)}$，$C_{18:4(\omega3)}$，$C_{20:1(\omega11)}$および$C_{22:1(\omega11)}$酸で増大傾向を示した．

この変動を，脂質含量の変動と比較した場合，正の相関関係を示したものは，$C_{18:1(\omega9)}$酸（$r=0.62$，$P<0.01$）のみであり，負の相関関係を示したものは，$C_{22:6(\omega3)}$酸（$r=-0.58$，$P<0.01$）のみである．

上田[4,5]は，五島・対島周辺海域，山口および福岡県沖合において捕獲したマサバについて，その脂肪酸組成を検討し，脂肪酸組成は，脂質含量と季節変化によって影響されることを報告している．

すなわち，脂質含量との関係については，脂質含量の増大に伴い，$C_{16:0}$，$C_{18:1}$および$C_{20:1}$酸は増大し，$C_{18:0}$，$C_{20:3}$および$C_{22:6}$酸が減少傾向を示したとしている．これは，$C_{18:1(\omega9)}$および$C_{22:6(\omega3)}$酸を除き，当分析結果と異なるものである．

大鶴ら[6]によれば，一般魚類では，極性脂質に比べ，中性脂質中には$C_{16:0}$，$C_{18:1}$および$C_{20:1}$酸が多く含まれ，一方，極性脂質には$C_{22:6}$および$C_{20:4}$酸が多く含まれている，と報告している．上田[4,5]の報告でも，同様に，$C_{18:1}$および$C_{20:1}$酸は中性脂質に，$C_{22:6}$酸は極性脂質に，それぞれ多く含まれる傾向が見られ，さらに，極性脂質含量は，総脂質含量の増減にかかわらず一定であり，中性脂質含量の変動が，そのまま総脂質含量の変動に表われた，としている．

以上のことから，当分析試料の秋期における高脂質含量は，中性脂質含量の増大による影響が強く，それに起因して，$C_{18:1(\omega9)}$酸が増大したものと推察できる．また，夏期における総脂質含量の減少は，中性脂質含量の減少によるものであり，そのため極性脂質割合が相対的に増大し，結果として，$C_{22:6(\omega3)}$酸が増大したものと思われる．

また，季節による影響として，上田[7]は，夏期から冬期になるに従い，$C_{20:5}$および$C_{22:6}$酸が増大傾向を，$C_{16:0}$および$C_{18:1}$酸が減少傾向を示すことを報告している．しかし，この傾向は，当分析結果とは異なるか，

あるいは逆の傾向を示すものである．すなわち，夏期から冬期にかけては$C_{20:5}$酸は一定であり，$C_{22:6}$酸は減少傾向を示している．また，$C_{16:0}$および$C_{18:1}$酸は，秋期に最高値を示している．

この原因として，①上田の用いた試料と当分析試料との地域差，②試料の個体差，などが考えられる．特に，上田の試料の漁獲海域が，冬期でも暖流が流れている海域であることから，漁獲海域に起因した季節的なずれにより生じたものと思われる．

その他の脂肪酸のうち，特に異なった変動を示したものは，$C_{20:1(\omega 11)}$および$C_{22:1(\omega 11)}$酸である．両酸は，組成比において高い相関関係（r=0.79，P<0.01)を示すとともに，冬期には共に最高の含量を示した．それぞれの値は，最低値を示した季節に比較して，17.5および8倍の高値を示した．他の脂肪酸における同倍率が3.2～6.5倍の値を示し，脂肪含量における同倍率も3.9倍の値を示したことから，両酸の変動は，大きい変動であるといえる．

$C_{22:1}$酸は，心臓でリピドシスを起こすことが知られており[8]，ナタネ油の$C_{22:1(\omega 9)}$酸が有名であるが，海産動物油では，$C_{22:1(\omega 11)}$酸が主要な$C_{22:1}$酸である．なぜ$C_{22:1(\omega 11)}$酸でなければならないのか，その理由は不明であるが，今回の結果から，季節的変動に何か特別な意義があることも予想される．

3．トコフェロール含量の季節的変動

兼松ら[9]によれば，マサバのトコフェロールの98％以上はα-トコフェロールであり，可食部100g当りの含量は，0.66～1.14mgの範囲の値が報告されている．当分析結果でも，α-トコフェロール以外の同族体は，不検出または痕跡程度であったため，α-トコフェロールのみ定量を行った．

分析結果をTable 4に示す．可食部当りの含量は，0.28～4.02mg／100gの範囲であり，兼松らの報告に比べ，広範囲の値を示している．可食部当りの平均値でみると，秋期のみ有意に高い値(P<0.01)を示しているが，個々のデーターを見ると，個体差はあるものの，冬期に低い傾向が見られる．また，最高値および最低値を示したのも，それぞれ秋期および冬期である．

前報[2]において，マアジでも冬期には減少傾向が示されており，この傾向が，水温の低下する冬期特有のものである可能性が考えられる．

また，春期および夏期に比較し，秋期では，脂質含量の増大と共に可食部当りのトコフェロール含量が増大傾向を示している．

Table 4．Seasonal variation of tocopherol contents in the edible tissues and in the lipids of mackerel

	α-Tocopherol (mg／100g)	
	edible tissue	lipid
Spring	1.13±0.24*	13.2±4.2
Summer	1.21±0.25	28.0±7.2[a]
Autumn	2.77±0.79[a]	15.5±2.5
Winter	0.82±0.47	6.6±6.0

*：Mean±S.D.
a：Significantly different from the other groups (P<0.01)

脂質当りのトコフェロール含量は，1.8～36.3mg／100gの範囲であり，夏期のみ有意に高く(P<0.01)，個体差のため有意差は認められなかったものの，冬期に低い傾向を示している．また，最高値を示したのは夏期であり，最低値を示したのは冬期である．

前報[2]において，マアジでは，可食部当りのトコフェロール含量と多くのポリエン酸の組成比の間に，有意な負の相関関係が認められた．しかし，マサバにおいては，負の相関関係が認められたのは，$C_{18:4(\omega 3)}$および$C_{22:6(\omega 3)}$酸のみである(P<0.01)．この原因は不明であるが，両魚種間における，脂質含量の変動の違いによる影響が出た可能性も考えられる．

要　約

マサバに含まれる脂肪酸組成およびトコフェロール含量の季節的変動を調べた．

1．脂質含量は，秋期に高く夏期に低い値を示した．

2．脂肪酸組成における季節的変動では，秋期に$C_{16:0}$および$C_{18:1(\omega 9)}$酸が増大し，夏期に$C_{22:6(\omega 3)}$酸が増大した．また，冬期には$C_{20:1(\omega 11)}$および$C_{22:1(\omega 11)}$酸の含量が増大した．

3．検出されたトコフェロールの大部分は，α-トコフェロールであった．可食部当りのトコフェロール含量は，0.28～4.02mg／100gの範囲の値を示し，秋期に増大し，冬期に減少する傾向を示した．脂質当りのトコフェロール含量は，1.8～36.3mg／100gの範囲の値を示し，夏期に増大し，冬期に減少する傾向を示した．

文　献

1）藤田孝夫：高度不飽和脂肪酸と健康，鴻巣章二編，水産学シリーズ52“水産食品と栄養”，54-69，1984，恒星社厚生閣，東京

2）船山惠市，牛尾房雄，友松俊夫，道口正雄：東京衛

研年報, **38**, 257-261, 1987
3) Bligh, E.G. and Dyer, W.J.: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917, 1959
4) 上田　正：日水誌, **42**, 479-484, 1976
5) 上田　正：日水誌, **42**, 485-489, 1976
6) 大鶴　勝, 藤井美由紀, 石永正隆, 鬼頭　誠：農化誌, **58**, 35-42, 1984
7) 上田　正：日水誌, **42**, 557-561, 1976
8) FAO／WHO 合同専門家委員会：人間の栄養における食用油脂の役割, 金田尚志監訳, 53-67, 1980, 医歯薬出版, 東京
9) 兼松　弘, 牛草寿昭, 丸山武紀, 新谷　勛, 松本太郎：栄食誌, **36**, 239-245, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 214-217, 1989

陰膳方式によるコレステロール，フィトステロールの一日摂取量調査

坂牧成恵*，牛尾房雄*，川島満春美*，
船山惠市*，友松俊夫*

Dietary Intakes of Cholesterol and Phytosterol in Duplicate Portion Studies

NARUE SAKAMAKI*, FUSAO USHIO*, MASUMI KAWASHIMA*,
KEIICHI FUNAYAMA* and TOSHIO TOMOMATSU*

Keywords：intake of sterol, コレステロール cholesterol, フィトステロール phytosterol, カンペステロール campesterol, スチグマステロール stigmasterol, β-シトステロール β-sitosterol

はじめに

成人病の一つであるアテローム性動脈硬化症は，血清コレステロール上昇と相関があるといわれている．

食事からのコレステロールや飽和脂肪酸に富む脂質の摂取は血清コレステロールを上昇させる．一方，フィトステロールや不飽和脂肪酸を多く含む脂質(植物油脂，魚油)は血清コレステロールを低下させることが知られている．

コレステロールおよびフィトステロール摂取量に関する報告[1-8]は，現在までいくつか見られるが，その一日摂取量についてはまだ十分には把握されていない．

そこで著者らは，コレステロールおよびフィトステロールの一日摂取量を把握するため，都内集団給食施設から集めた一日分の食事を用いてコレステロール，フィトステロールの測定を行ったので報告する．また分析に際して，まず分析法の検討を行ったので，あわせ報告する．

実験方法

1．試料　昭和62年5月と昭和63年5月に都内集団給食施設20カ所より各一日分の食事を採集し，主食，副食に分け，各々を混合粉砕したものを試料とした．また分析方法の検討には，都内スーパーマーケットで購入した豚肉に同量の水を加え均一に混合粉砕したものを用いた．

2．試薬　コレステロール，カンペステロール，スチグマステロール，β-シトステロールおよび5α-コレスタンはシグマ社製を使用した．その他の試薬はすべて市販試薬特級を使用した．

内部標準物質(以下内標と略す)溶液は5α-コレスタン10mg／ml の *n*-ヘキサン溶液を調整し，さらに適宜，希釈して用いた．

混合標準溶液：内標濃度100 μg／ml とし，コレステロール，カンペステロール，スチグマステロール，β-シトステロールを各々25，50，100，200，300，400 μg／ml 含有する *n*-ヘキサン溶液を調整した．

3．操作　1)脂質抽出：クロロホルム-メタノール(2：1)を用いた方法は金田らの報告[9](以下 J.N.S.V法と略す)に従い，またクロロホルム-メタノール(1：1)を用いた方法は，A.O.A.C[10]に準拠して行った．2)ケン化および不ケン化物の抽出：基準油脂分析法[11]に準じて行った．すなわち，直接ケン化用に採取した試料ならびに J.N.S.V 法，A.O.A.C 法により抽出した脂質を1 NKOH・エタノール溶液によりケン化後エーテルで抽出し，エーテル層を水洗，脱水した後減圧留去した．残渣を *n*-ヘキサンに溶解して，内標を100 μg／ml 含有するよう加え，ガスクロマトグラフ供試試料とした．3)ステロールの定量：調整した混合標準液をガスクロマトグラフに注入し，5α-コレスタンに対する各種ステロールの重量比とピークの高さの比から検量線を作成し，定量した．

4．装置および分析条件　ガスクロマトグラフ：島津製作所製 GC-7 AG，検出器：FID，カラム：2％ OV-1　ガスクロムQ　80-100メッシュ　ガラスカラム

*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

2.6mm×2.6m，カラム温度：268℃，注入口および検出器温度：290℃，キャリアガス：窒素50ml／min，データ処理機：バリアン VISTA CDS-401

結果および考察

1．分析方法の検討 脂質の抽出には，クロロホルム-メタノール(以下C-Mと略す)系の溶媒が最もよく用いられているが，そのC-M比率は報告によりまちまちである．そこで今回，豚肉と分析対象である日常食についてJ.N.S.V法(C-M 2：1)，A.O.A.C法(C-M 1：1)および比較のため直接ケン化法(以下D.S.法と略す)によるステロールの添加回収試験を行った．

Table 1に示したように，豚肉ではJ.N.S.V法，A.O.A.C法，D.S.法ともにほぼ同程度の回収率が得られた．一方，日常食においては概してD.S.法>J.N.S.V法>A.O.A.C法の順となり，A.O.A.C法が抽出効率が低い傾向がみられた．またD.S.法の回収率がいいものの，分析試料を多く採取すると十分なケン化が行えない可能性があるため，低濃度の試料では分析法としては不適当であると判断された．

以上の結果より，本実験のステロール分析では，C-M比が2：1のJ.N.S.V法を用いて脂質を抽出した後，ケン化，エーテル抽出を行うこととした．

2．コレステロール，フィトステロール摂取量 測定結果をTable 2に示す．

コレステロールの一日摂取量は88～735mg／day，平均値310±165.8mg／dayであり，そのほとんどは副食からのものであった．主食のコレステロールは，パンを含む試料で約4～5mg／day検出され，米飯のみの主食では検出されなかった．

フィトステロールの摂取量は38～373mg／day，その平均値は190±74.1mg／dayであり，そのうち，14.8%が主食から，85.2%が副食から摂取されていた．また各種フィトステロールの構成比率は，全フィトステロール摂取量の約85%を占める副食の構成比率を反映し，カンペステロール：スチグマステロール：β-シトステロール＝約2：1：7であった．しかし主食における構成比率は，副食とは若干異なり1：8：40を示し，主なフィトステロールがβ-シトステロールであることは副食と同じであるが，カンペステロールの比率は低いことが認められた．

現在まで，コレステロール，フィトステロール摂取量についてはいくつかの報告がなされている．地方衛生研究所全国協議会が行った調査[8]では，コレステロール摂取量の全国平均値としては249±69mg／dayと報告され，またこのコレステロールの65.6%は肉，卵類，22.2%は魚介類より摂取されていることが示されている．つまり，コレステロール摂取量は肉，卵類および魚介類の摂取量により，大きく変動することが予想されている．

森田ら[5]は国民栄養調査に基づいた調査を行い，コレステロールは340mg／day，フィトステロールは201mg／dayであり，その内訳はβ-シトステロール140mg／day，スチグマステロール14mg／day，カンペステロール47mg／dayであると報告している．また日高ら[6]は各種食品のステロール含有量を測定し，国民栄養調査を基に一日摂取量を算出し，コレステロールは290mg／day，β-シトステロール160～170mg／day，スチグマステロール約6mg／dayと推定している．なおこの際の米類からのフィトステロール摂取量は20.6mg／dayとしている．一方，中島ら[7]は大学食堂の食事について調べ，コレステロールは220mg／day，フィトステロールは400mg／dayであり，そのうち主食からは60mg／dayと報告している．この中島らの報告におけるフィトステロール摂取量(400mg／day)は，本調査結果を含めたフィトステロール摂取量と比較すると約2倍程度の高値を示している．しかしこの調査で用いられた食事の平均脂肪摂取量は46.6g／dayと，昭和61年国民栄養調査56.6g／dayに比較しても低い値であり，さらにこの食事の不飽和脂肪酸(以下PUFAと略す)／飽和脂肪酸(以下SFAと略す)比率は3前後の値を示した例が多いことより，この報告においてフィトステロール摂取量が多いのは植物油脂，植物性食品を多く用いたことによると考えられる．ちなみに，本調査の食事については脂肪酸も調べているが[12]，そのPUFA／SFA比は1.41であった．

以上述べた今回の調査結果とこれらの報告より，コレステロール摂取量は肉，卵類および魚介類の摂取量により大きな変動幅を有するものの，その平均摂取量は250～350mg／dayと推定され，フィトステロール平均摂取量は，主食からは15～20mg／day，副食からは150～200mg／dayであると思われる．またフィトステロール／コレステロール比率は0.6～0.7程度と推定された．

血清コレステロールは動脈硬化性疾患発生と正の相関を有することが知られており，これら疾患につながる高コレステロール血症における血清コレステロール値のガイドラインは，220mg／dlとされている．これ以下に維持するためには，食事性コレステロールの許容摂取量は300mg／day以下が適当であるとしている[13-14]．

今回の調査結果は，平均値ではこの許容摂取量に近似した値であった．またコレステロールの腸管における吸

Table 1. Recoveries of Sterol from Food by Different Extraction Methods

Method		Cholesterol	Campesterol	Stigmasterol	β-Sitosterol
A	Pork	34.6±0.62	N.D.	N.D.	N.D.
	Pork+Sterol*	81.5±0.21	5.34±0.026	9.16±0.115	11.9±0.21
	Recovery(%)	93.8	99.1	98.8	94.4
B	Pork	34.6±2.72	N.D.	N.D.	N.D.
	Pork+Sterol*	81.8±2.20	5.30±0.088	9.10±0.172	12.0±0.35
	Recovery(%)	94.4	98.3	98.2	95.2
C	Pork	37.2±0.5	N.D.	N.D.	N.D.
	Pork+Sterol*	84.9±0.98	5.30±0.045	8.94±0.055	12.0±0.15
	Recovery(%)	95.4	98.3	96.4	95.2
A	Diet	25.8±3.03	3.62±0.323	1.57±0.023	11.8±1.24
	Diet+Sterol**	35.2±0.52	9.09±0.109	10.0±0.11	24.5±0.25
	Recovery(%)	97.5	91.3	91.9	90.5
B	Diet	22.8±0.6	3.50±0.262	1.56±0.108	10.5±0.378
	Diet+Sterol**	32.0±2.27	8.90±0.216	9.75±0.479	23.5±1.460
	Recovery(%)	92.3	90.2	89.3	93.1
C	Diet	27.7±1.03	3.84±0.04	2.08±0.021	12.9±0.2
	Diet+Sterol**	37.1±0.12	9.39±0.035	10.7±0.057	25.6±0.115
	Recovery(%)	97.5	92.7	94.0	90.9

data : Mean±S.D. (n = 3)

*Added sterol amount (/100g) : Cholesterol 50.0mg, Campesterol 5.39mg, Stigmasterol 9.27mg, β-Sitosterol 12.6mg

**Added sterol amount (/100g) : Cholesterol 9.64mg, Campesterol 5.99mg, Stigmasterol 9.17mg, β-Sitosterol 13.97mg

Method A : Lipid extracted with chloroform- methanol 2 : 1 (J.N.S.V. method) was subjected to saponification

B : Lipid extracted with chloroform- methanol 1 : 1 (A.O.A.C. method) was subjected to saponification

C : Saponification was made without extraction of lipid

Table 2. The Levels of Fat, Cholesterol and Phytosterol in Prepared Diet

n =20		Energy kcal/day	Fat g/day	Cholesterol mg/day	Campesterol mg/day	Stigmasterol mg/day	β-Sitosterol mg/day	Total Phytosterol mg/day
Principal food	mean±S.D.	1059±314.7	4.0±1.38	0.88±1.815	0.62±1.101	4.67±1.438	22.9±5.78	28.2±7.14
	nutrients/1000kcal	(1000)	(4.0±1.54)	(0.99±2.043)	(0.69±1.241)	(4.51±1.050)	(22.5±5.71)	(27.7±7.10)
	Range	662~2044	2.0~6.6	0~4.84	0~2.84	2.68~9.03	12.4~39.6	15.1~48.6
Subsidiary food	mean±S.D.	1129±376.9	57.3±20.87	310±165.6	36.6±18.65	16.0±7.97	109±49.2	162±73.3
	nutrients/1000kcal	(1000)	(50.6±8.73)	(277±123.7)	(32.8±14.67)	(14.3±6.06)	(98.5±41.83)	(145±60.1)
	Range	574~2262	24.7~90.2	88~735	3.75~88.5	2.25~39.5	9.54~221	15.5~349
Total	mean±S.D.	2188±547.1	61.7±20.83	310±165.8	37.2±18.59	20.6±8.44	132±49.9	190±74.1
	nutrients/1000kcal	(1000)	(28.1±7.19)	(144±71.22)	(17.0±7.69)	(9.37±2.918)	(60.7±21.30)	(87.1±30.49)
	Range	1310~3626	27.6~95.1	88~735	3.75~88.5	6.42~43.9	27.8~240	38.0~373

収阻害効果を有するフィトステロール摂取量は約200mg／dayを示し，さらに血清コレステロール低下作用を有するPUFAはSFAを上回り，その比率(PUFA／SFA)は1.41であった．以上のことより，本調査におけるコレステロール平均摂取量は，健常者では血清コレステロールに影響を及ぼすことはないものと判断された．

要　　約

日常食中のコレステロール，フィトステロールを定量するため抽出方法の検討を行い，次に都内集団給食施設の食事(20施設)についてコレステロール，フィトステロール含有量を測定し，一日摂取量を求めた．

1．J.N.S.V法，A.O.A.C法およびD.S.法によるステロール添加回収試験を行った．豚肉についてのコレステロール，フィトステロールの回収率は三方法とも同程度であり，96％前後であった．一方日常食では，D.S.法＞J.N.S.V法＞A.O.A.C法の順であり，A.O.A.C法の抽出効率が若干低い傾向がみられた．

2．日常食について脂質をJ.N.S.V法で抽出し，ステロールを定量した結果，一人一日当りの摂取量はコレステロール310±165.8mg／day(平均値±標準偏差)であり，そのほとんどは副食からのもので，主食からはほとんど検出されなかった．フィトステロールの摂取量は190±74.1mg／dayであり，主食から15％，副食から85％の割合で摂取していた．また各種フィトステロールの構成比率は一日摂取量でカンペステロール：スチグマステロール：β-シトステロール＝約2：1：7を示した．またフィトステロール／コレステロール比率は平均0.61であった．

文　　献

1）Hirai, K., Shimazu, C., Takezoe, R. and Ozeki, Y.: *J. Nutr. Sci Vitaminol.*, 32, 363-372, 1986.

2）平井和子，島津千佳子，藤木雅美，前田昭子：栄食誌，40(2)，145-149，1987.

3）吉田綾子，住本建夫，田中凉一：栄食誌，39(6)，506-509，1986.

4）吉田綾子，住本建夫，田中凉一：大阪府公衛研所報，食品衛生編，16，39-43，1985.

5）森田邦正，大野健治，毛利隆美：福岡県衛生公害センター年報，11，73-77，1984.

6）日高公雄，吉田宏三，井崎やゑ子，戸田和子：栄食誌，39(4)，308-320，1986.

7）中島克子，池田郁男，渕上貴美子ほか：臨床栄養，58，263-288，1981.

8）地方衛生研究所協議会編：日本人の栄養摂取量に関する研究Ⅲ，1984.

9）Kaneda, T., Nakajima, A., Fujimoto, K. *et al*: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 26, 497-505, 1980.

10）Official Method of Analysis of the AOAC, 14th ed., 884, 1984.

11）日本油化学協会：基準油脂分析試験法，No.2．4．10-71，1971.

12）川島満春美，牛尾房雄：第47回日本公衆衛生学会，札幌，1988.

13）五島雄一郎：疾病の予防と食事，阿部　裕，五島雄一郎，細谷憲政編，臨床栄養学，75-77，1982，朝倉書店，東京.

14）村勢敏郎：高脂血症，日野原重明，阿部正和編，今日の治療指針1987年版，513-515，1987，医学書院，東京.

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.*, **40**, 219-222, 1989

水試料中のトリアジン系除草剤の分析方法

吉 田 奈津子*, 中 川 順 一*, 高 橋 保 雄*

Determination of Triazine Herbicides in Water

NATSUKO YOSHIDA, JUNICHI NAKAGAWA and YASUO TAKAHASHI

Keywords：測定 determination, トリアジン系除草剤 triazine herbicides, 河川水 river water, 水道水 supply water, 水道原水 raw water

緒　　言

現在，東京都の水道水源は，その多くを河川に依存しているが，その河川水は，工場排水や家庭排水あるいは農地からの排水などにより汚染が進行し，飲料水源としての安全性が危惧されている．最近では，ゴルフ場における農薬の大量散布による水道原水への汚染が，人への健康影響上からも懸念されるようになってきている．

これらの農薬の中で，数種のトリアジン系除草剤がヨーロッパ各国，カナダ，アメリカの河川水，湖水などから検出されており，その濃度は，1 μg/*l* - 1 mg/*l* 程度で，最高時には，10mg/*l* に達したとの報告もある．

現在，アトラジン及びシマジンは，アメリカの安全飲料水法の中で指定汚染物質として取り上げられ，1989年6月までにEPA(米国環境保護庁)により，規制値が設定される予定である．そこで，アトラジン，シマジン，プロパジン，アメトリン，シメトリン及びプロメトリン，の6種のトリアジン系除草剤を取り上げ，ppb レベルでの分析法を検討した．さらに汚染実態を把握するために，水道原水，水道水について測定を行ったので報告する．

実 験 の 部

1．試料　No. 1 -No. 4：都内3浄水場の水道原水，No. 5：水道水

2．試薬　農薬標準品：シマジン，シメトリン，プロパジン，プロメトリン，アトラジン，アメトリンは，Nanogen 社製．各々の濃度は，シマジンが100 μg/*l*，他の5種については1,000 μg/*l* である．

農薬標準液：シマジンを除く，各標準品1 m*l* をメタノール又は*n*-ヘキサンで希釈して全量100m*l* とした．さらにこの標準液10m*l* とシマジンの標準品をメタノール又は*n*-ヘキサンで希釈し1 μg/m*l* となる様に調製した．

n-ヘキサン，メタノール，ジクロロメタン，酢酸エチル：残留農薬分析用(和光純薬工業)

フロリジルカラム：130℃で16時間加熱して活性化したフロリジル PR 3 g を，内径10mmのガラスカラムに*n*-ヘキサン湿式充塡法によって充塡したものを用いた．無水硫酸ナトリウム：残留農薬分析用(和光純薬工業)

塩化ナトリウム：特級(和光純薬工業)

3．装置　減圧濃縮器：クデルナ・ダニッシュ濃縮器ガスクロマトグラフ-質量分析計：Hewlett–Packard 社製5890 A 型ガスクロマトグラフ，5970 B 質量分析計(以下 GC/MS と略す)

4．分析方法

4．1　抽出法　試料1 *l* を2 *l* の分液ロートにとり，塩化ナトリウム50 g，ジクロロメタン100m*l* を加え，10分間激しく振とうする．静置後，ジクロロメタン層を三角コルベンに分取し，残りの水層には，再びジクロロメタン100m*l* を加え，同様に操作しジクロロメタン層は，先のものに合す．このジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム20 g で脱水した後，水浴を40℃以下に保ち KD 濃縮器で液量が約2 - 3 m*l* になるまで濃縮する．これに，*n*-ヘキサンを約7 m*l* 加え液量が約2 - 3 m*l* になるまで再濃縮する．この操作を2回繰り返した後，更に窒素ガスを吹きつけて濃縮し液量を1 m*l* としたものを試験溶液とする．

4．2　精製　あらかじめ調製したフロリジルカラムに試料溶液をのせて10％ジエチルエーテル－*n*-ヘキサン60m*l* を流した後，20％酢酸エチル－*n*-ヘキサン100m*l*

*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 Laboratroy of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome Shinjuku–ku Tokyo 169 Japan

を流して溶出する．この20%酢酸エチル－n-ヘキサン溶出液をKD濃縮器で濃縮し，試験溶液と同様にn-ヘキサンを加えて濃縮し正確に1 mlとしたものをGC／MS試料液とする．

4．3　測定法　GC／MSへの注入量を1 μlとし，以下のGC／MS–Selected ion Monitoring(SIM)条件で定量した．

GC／MS–SIM条件

カラム：DB–WAX，15m×0.25mm ID，膜厚0.25 μm，カラム温度：60℃ 2 min，60℃–200℃，15℃／min，200℃–240℃，10℃／min，240℃，10 min，注入口温度：220℃，イオン化電圧：70 ev，カラム入口圧力：5 PSI，モニターイオン：シマジン(m／z=201)，シメトリン(m／z=213)，プロパジン(m／z=214)，プロメトリン(m／z=241)，アトラジン(m／z=200)，アメトリン(m／z=227)

結果及び考察

1．分析方法

1．1　ジクロロメタンによる抽出率　水試料からのトリアジン系除草剤の抽出には，溶媒としてジクロロメタンを用いた．添加量5 μgの時，プロパジン，アトラジン，プロメトリン，シマジン，アメトリン及びシメトリンの抽出率は，各々98.3%，72.2%，65.2%，79.2%，70.8%，81.6%，であった．また添加量7 μgの時，各々93.3%88.4%，78.7%，93.4%，86.8%，82.9%であり，5 μg添加時のプロメトリンの65.2%を除いては70-98%と良好な結果が得られた．

1．2　フロリジルカラムクロマトグラフィー　各標準物質を50 μg添加した時のフロリジルカラムクロマトグラフィーにおける溶出パターンをFig. 1．に示した．Fig. 1．で分かるとおり，20%酢酸エチル－n-ヘキサンを展開溶媒として用いた場合シメトリン以外は30mlで，シメトリンも50mlで完全に溶出した．そのため，以後の実験には20%酢酸エチル－n-ヘキサンを展開溶媒の溶出量を余裕をもって100ml流すこととした．またフロリジルカラムクロマトグラフィーを行った時の回収率は，プロパジン，アトラジン，プロメトリン，シマジン，アメトリン，シメトリンがそれぞれ96.2%，93.4%，78.6%，95.6%，85.4%，75.6%と良好であった．

1．3　添加回収試験　蒸留水1 lに1 mg／l標準液(メタノール溶液)を2，5，7 ml各々添加し，これを試料として以下4．分析方法に従って操作して添加回収

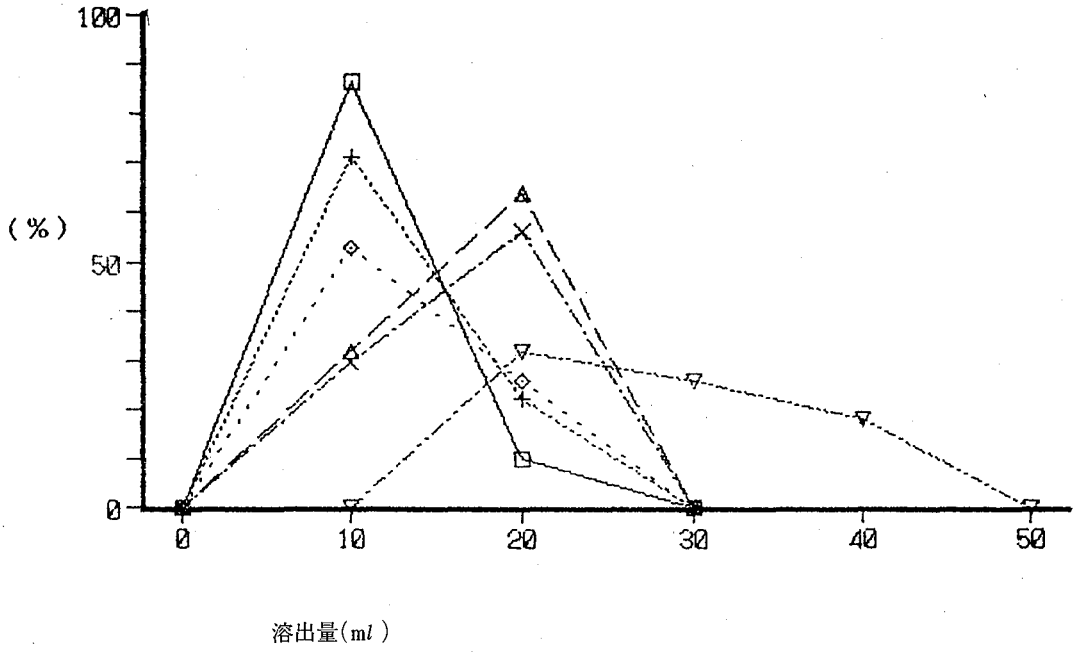


Fig. 1．Elution Patterns of Triazine Herbicides
□：Propazine　＋：Atrazine　◇：Prometrun
△：Simazine　×：Ametrun　▽：Simetryn

Table 1. Total Recoveries (%) of Triazine Herbicides added to Distillation Water

added (μg/l)	recovery (%)					
	Propazine	Prometryn	Simazine	Simetryn	Atrazine	Ametryn
2	93.2	28.0	86.8	63.4	88.0	54.2
5	93.2	31.7	81.0	67.2	87.3	57.3
7	99.7	32.9	95.6	77.2	101	62.3

Table 2. Concentration of Triazine Herbicides in River and Supply Water

Sample	Concentration (ng/l)					
	Propazine	Prometryn	Simazine	Simetryn	Atrazine	Ametryn
1	ND	ND	112	466	ND	ND
2	ND	ND	189	ND	ND	ND
3	ND	ND	174	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	98	ND	ND	ND

ND : not detect

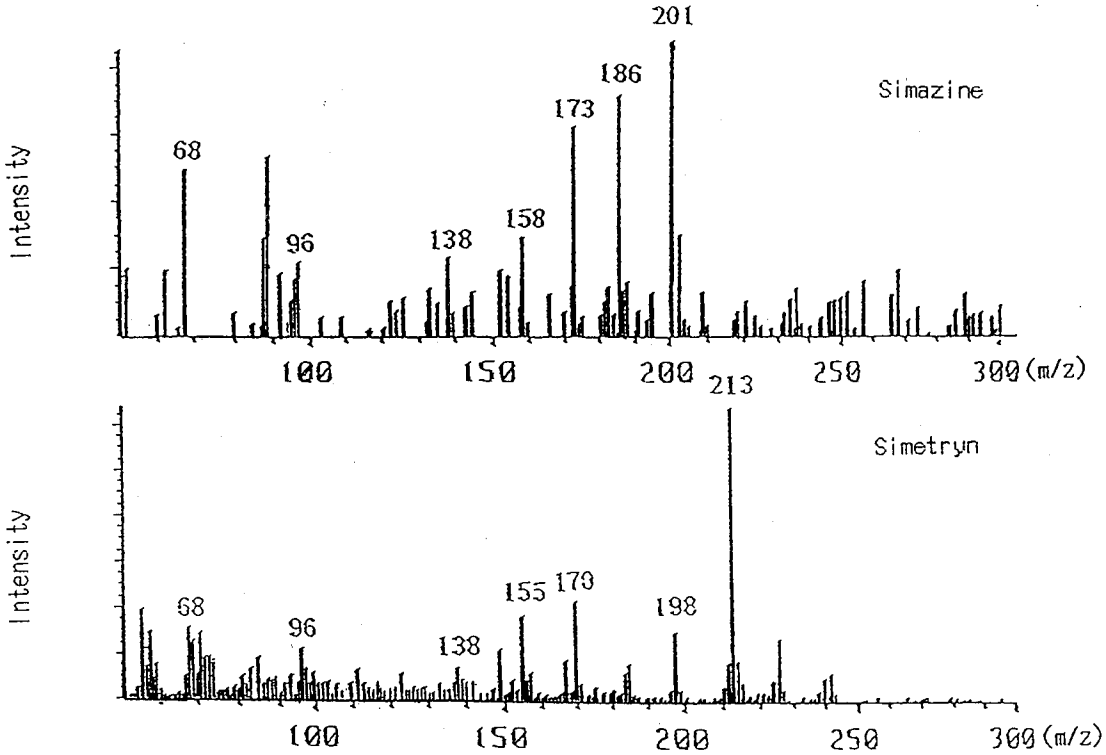
試験を行い，その結果を Table 1. に示した．プロパジン，アトラジン，シマジンの回収率は，81.0-101%と良好であるのに対して，アメトリン，シメトリンは54.2-77.2%とやや回収率が低かった．また，プロメトリンは30%前後と極めて低い回収率であった．そこで，メチルチオ基を持つプロメトリン，アメトリン，シメトリンの融点が82-118℃と極めて低いことから濃縮時の水浴の温度の違いによる回収率の差があるかどうかを検討した．その結果，水浴の温度が40℃の時，プロメトリン，アメトリン，シメトリン，各々97.9%，98.8%，86.4%であった回収率が60℃では60.4%，51.3%，39.7%と明らかに低下することが分かった．このことから水浴の温度は40℃以下に保つことが必要である．

2．試料への適用 河川水(No. 1-4)及び水道水(No. 5)の計5試料について6種のトリアジン系除草剤を測定した結果を Table 2. に示した．その結果，4試料からシマジンが98-189ng/l，1試料からシメトリンが466 ng/l 検出された．また No. 1，5の試料から得られたシマジン，シメトリンのマススペクトルは，各々の標準物質のマススペクトルと一致していたため，Fig 2. に示した．

トリアジン系除草剤の河川水，湖水，井戸水中の濃度には大きな季節変動があり，その濃度は低い時期の10-100倍程度で散布時期と汚染濃度との間に高い相関関係が得られている[2,3,4]．散布後の降雨によって農地から流出し短期間で最高値に達する．試料の No. 1，2は同じ採水地点で，6，11月に採水を行った．測定の結果，その濃度変化はシメトリンが466 ppt から不検出と激減しており，一方，シマジンには大きな変動は見られなかった．

水道水を対象とした調査データはほとんどないが，その数少ない中にアメリカの Davenport, Iowa City, Des Moines で，アトラジンがそれぞれ405 ng/l，200 ng/l，30,000 ng/l 検出された[3]という報告がある．今回，水道水中からシマジンが98ng/l 検出されたが，この濃度は水道原水のレベルと同程度であり，これは現在の浄水処理方法では除去されないことを示している．そして更に，上述したように散布後の降雨によって河川へ流出し一時的に高い濃度になるため，一過性ではあっても水道水が高い濃度で汚染される可能性のあることが示唆された．

シマジン，アトラジン，プロパジンについては ADI が定められており，それぞれ0.215，0.0464mg/kg/day である[3]．そして，体重を50kg，一日の摂水量を2 l と仮定すると，飲料水中の許容される濃度は，シマジン，アトラジン，プロパジンが，それぞれ5.375，0.537，1.160mg/l となる．これらの値に対して，今回水道水中から検出された濃度は，1/10,000以下の濃度であることから，水道水中の濃度としては人体に対する影響は少ない濃度と思われる．しかし，環境水中に含まれる農薬の濃度は，農繁期，農閑期，降雨期等による季節変動のあるところから，常時モニタリングを行い濃度の推移



を把握しておく必要がある．

ま と め

今回，トリアジン系除草剤の中からアトラジン，シマジン，プロパジン，アメトリン，シメトリン，及びプロメトリンの6種類を取り上げ，水試料中におけるこれらの6物質の分析方法を検討した．添加回収試験の結果プロパジン，アトラジン，シマジンの回収率は，81.0-101%と良好であったが，アメトリン，シメトリンは54.2-77.2%とやや低く，またプロメトリンについては30%前後と極めて低く，今後の検討が必要である．更にこの分析方法を用いて，水道原水(No.1-4)及び水道水(No.5)中の6種のトリアジン系除草剤の濃度を測定した．その結果，4試料(No.1，2，3，5)からシマジンが98-189 ng／l，1試料(No.1)からシメトリンが466 ng／l 検出された．

文 献

1) Richard Frank, George J. Sirons and Brian D. Ripley, : Pesticides Monitoring J., 13(3), 120-127, 1979.
2) W. D. Hormann, J.C.Tournayre, and H. Egli, : Pesticides Monitoring J., 13(3), 128-131, 1979.
3) National Academy of Sciences, : Drinking Water and Health, 533-539, 1977.
4) R. Frank, G. J. Sirons : Sience of the total environ., 12, 223-239, 1979.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 40, 223-229, 1989

環境における化学物質の安全性に関する調査研究（第2報）キャピラリーガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーによる環境試料中の1, 1-bis (t-butylperoxy) 3, 3, 5-trimethylcyclohexane の分析方法

大橋則雄*, 岡本　寛*, 高橋　巌*, 中川順一*, 土屋悦輝*,
笹野英雄*, 小山勉良**, 狩野文雄**, 加納堯子**

Studies on Environmental Safety of Chemicals (II) Determination of 1, 1-bis (t-butylperoxy) 3, 3, 5-trimethylcyclohexane by Capillary Gas Chromatography / Mass Spectrometry

NORIO OHASHI*, YUTAKA OKAMOTO*, IWAO TAKAHASHI*,
JYUNICHI NAKAGAWA*, YOSHITERU TSUCHIYA*, HIDEO SASANO*,
KATSUYOSHI KOYAMA**, FUMIO KANOH** and TAKAKO KANOH**

Keywoeds：分析 determination, 有機過酸化物 organic peroxide, 海水 seawater, 底質 sediment, 魚 fish, エームステスト Ames test

緒　言

環境庁は昭和49年以来毎年化学物質環境安全性総点検調査を実施している．調査対象物質は原則として昭和53年度に作成したプライオリティリストに収載された化学物質であり，既存化学物質名簿，各国の優先汚染物質リスト，毒性データ，通商産業省分解性・濃縮性リストなど9つの物質リストに記載されている物質から選定されている[1]．その中で，ゴムの架橋剤，スチレンなどの重合開始剤及び不飽和ポリエステルの硬化剤として使用されている1,1-bis(t-butylperoxy)3,3,5-trimethylcyclohexane(以下 TMP と略す)[2]は，昭和62年の通産省公報で蓄積性が高い化学物質と判定された[3]．

現行の TMP 分析法は，還元剤としてヨウ化カリを用いるヨード滴定塩酸法[4]を適用しているが，妨害物質の多い環境試料中の TMP の微量分析法としては不適当である．そこで著者らは，環境試料(海水，底質，魚)中の TMP 分析法開発のために，キャピラリーガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー(以下 GC／MS と略す)による分析法の検討を行った．その結果，当法は，再現性が良く TMP の定量が可能であることを確認した．さらに，この方法で東京湾の海水，底質及び魚の TMP 含有量調査を行い結果を得たので，TMP の変異原性試験の結果とあわせて報告する．

実験の部

1．試料液の調製

1）**水試料**　試料1 ℓ を分液ロートにとり，*n*-ヘキサン100m*l* ずつで2回，10分間振とう抽出する．*n*-ヘキサン層を合わせ，無水硫酸ナトリウムで脱水後，ロータリーエバポレーター(30℃の湯浴中，以下同様)で約5 m*l* に濃縮する．濃縮液に窒素ガスを吹きつけて1 m*l* としたものを測定用試料液とする．

2）**底質試料**　試料20 g を100m*l* 共栓付遠沈管にとり，アセトン50m*l* を加え10分間振とう抽出後，2,500 rpm で遠心分離を行いアセトン層を分取する．再び，残さにアセトン50m*l* を加えて同様な抽出操作を行う．アセトン層を5％硫酸ナトリウム水溶液500m*l* の入った分液ロートにとり，*n*-ヘキサン100m*l* ずつで2回，10分間振とう抽出を行う．*n*-ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水後，ロータリーエバポレーターで5 m*l* に濃縮する．濃縮液に窒素ガスを吹きつけて少量に濃縮し，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3 g を *n*-ヘキサンで湿

*東京都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
**東京都衛生研究所環境保健部環境衛生研究科

式充塡したもの)にのせ，容器は少量の*n*−ヘキサンで洗い，洗液はカラムに加える．初めに*n*−ヘキサン50m*l*をカラムに流し，この液は捨てる．次に，5％エーテル含有*n*−ヘキサン50m*l*を流し，この液をロータリーエバポレーターで約5m*l*に濃縮し，窒素ガスを吹きつけて1m*l*としたものを測定用試料液とする．

3）**生物試料**　粉砕した試料20gを100m*l*共栓付遠沈管にとりアセトン50m*l*を加えホモジナイズした後，2,500rpmで遠心分離を行いアセトン層を分取する．再び，残さにアセトン50m*l*を加えて同様な抽出操作を行う．アセトン層を5％硫酸ナトリウム水溶液500m*l*の入った分液ロートにとり，*n*−ヘキサン100m*l*ずつで2回，10分間振とう抽出を行う．*n*−ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水後，ロータリーエバポレーターで約5m*l*に濃縮する．濃縮液に窒素ガスを吹きつけて少量に濃縮し，無水硫酸ナトリウム2gを層積したフロリジルカラム(1.5φ×30cmのカラムにフロリジル20gを乾式充塡したもの)にのせ，容器は少量の*n*−ヘキサンで洗い，洗液はカラムに加える．カラム上部に加えた*n*−ヘキサンがフロリジルに浸透し乾いたら，5％エーテル含有*n*−ヘキサン100m*l*を流す．この液をロータリーエバポレーターで約5m*l*に濃縮し，窒素ガスを吹きつけて少量に濃縮する．以下，底質試料と同様にシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い測定用試料液とする．

2．**試薬及び標準液**

1）**試薬**　*n*−ヘキサン，アセトン，エチルエーテル：残留農薬分析用試薬，無水硫酸ナトリウム：PCB・フタル酸エステル試験用，フロリジル：Floridin社製フロリジル60〜80メッシュ(130℃1夜活性化)，シリカゲル：和光純薬ワコーゲルC−200(130℃1夜活性化)，標準

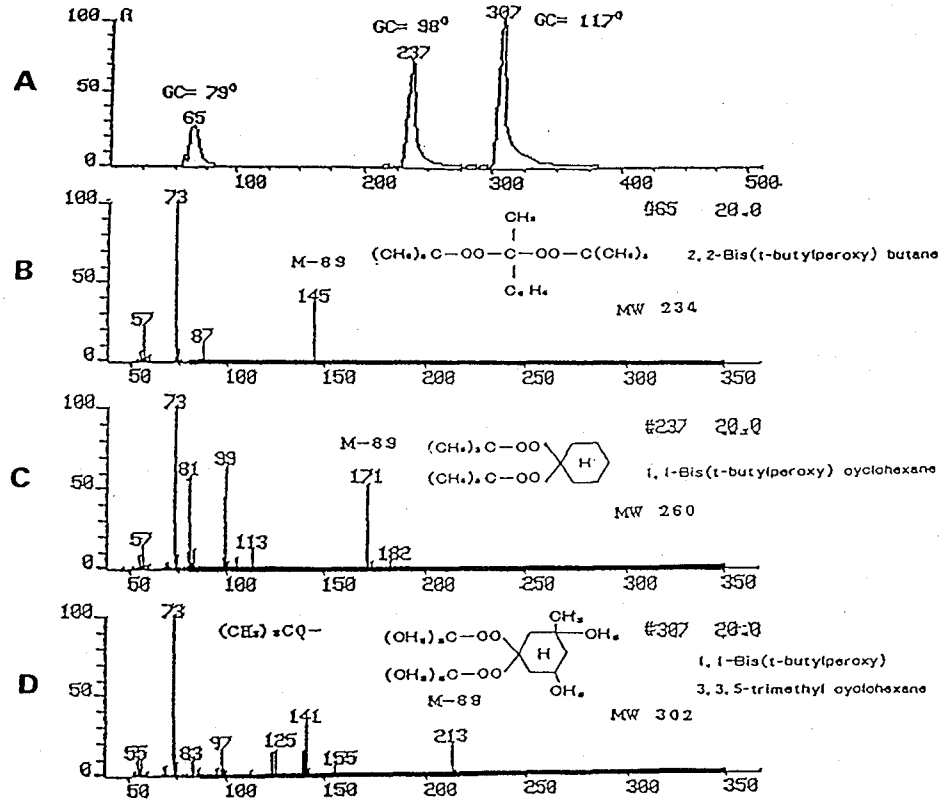


図1．GC／MSにより得られた有機過酸化物パーオキシケタールのマススペクトル
A）有機過酸化物パーオキシケタールのトータルイオンクロマトグラム（M／Z 50〜400）
B）2，2−bis（t−butylperoxy）butaneのマススペクトル
C）1，1−bis（t−butylperoxy）cyclohexaneのマススペクトル
D）1，1−bis（t−butylperoxy）3，3，5−trimethylcyclohexaneのマススペクトル

品：三建化工株式会社製(純度95％)

2）**標準液の調製** TMP 50mgを正確にはかり，*n*−ヘキサンを加えて50ml とし，1,000 μg／ml の標準原液とする．これを希釈して0.1〜1.0 μg／ml の標準溶液とする．

3）**装置** ヒューレットパッカード社製 GC／MS 5890 A，5970 B

4）**測定** 試料溶液 1 μl を GC／MS(SIM)法で測定し，得られたピーク面積により，予め作成した検量線より定量した．

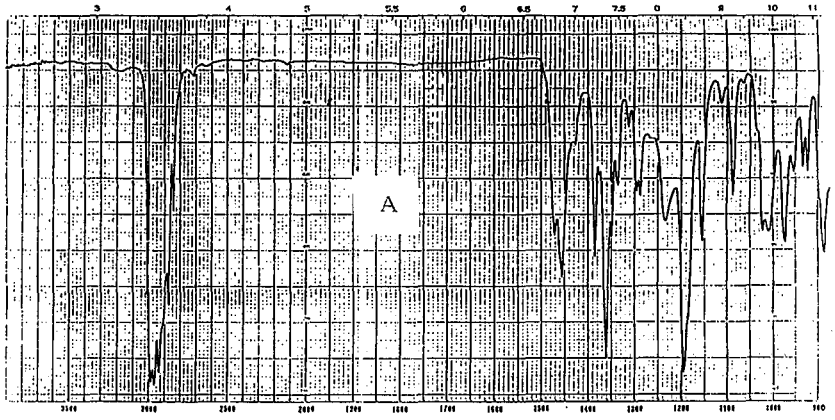
〔キャピラリー GC／MS 条件〕

カラム：DB−1 0.25 mm φ ×15 m 膜厚0.1 μm，キャリアーガス：ヘリウム，カラム入口圧：5 psi，カラム温度：初期温度50℃，初期温度保持時間 1 分，昇温速度10℃／min，最終温度120℃，最終温度保持時間 5 分，注入方法：スプリットレス，注入口温度及びインターフェイス温度：120℃，イオン化電圧：70 eV，モニタリングイオン：m／z 73，83

結果及び考察

1．TMP の GC マススペクトル

TMP とその類似物質 2 種類の GC／MS により得られたマススペクトルを図 1 に示す．3 物質とも m／z 73，57 {$(CH_3)_3CO$-，$(CH_3)_3C$-と推定} のフラグメントを持つ．また，各物質のマススペクトルを20倍に拡大する



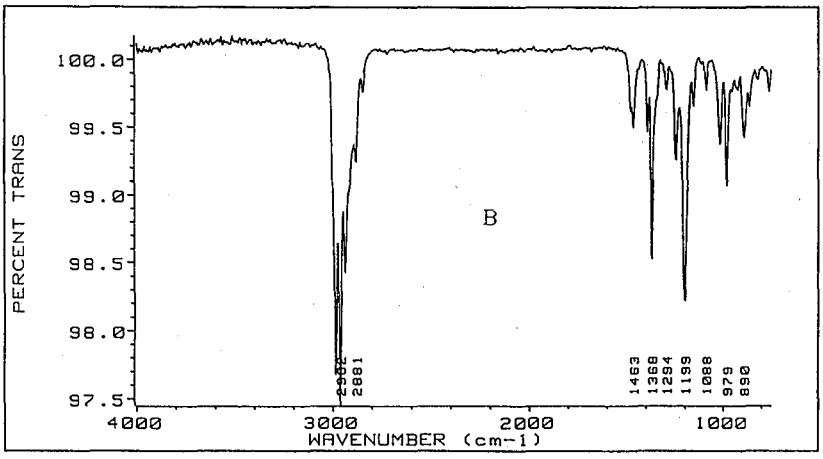


図 2．TMP の IR と GC／FTIR により得られたスペクトルの比較
A）TMP 標準品の IR スペクトル
B）GA−FTIR により得られた TMP の赤外スペクトル
注入口・インターフェイス・フローセル温度：120℃，GC 温度条件：50℃（1 分保持）〜120℃（5 分保持）毎分10℃昇温

と，分子量Mから89をひいたフラグメントが観察される．これは$(CH_3)_3COO$-の解裂と推定した．TMPは，m／z 83(イオン強度はm／z 73の12％)のフラグメントを持つ．これは，イオン源で分解して生じた3，3，5－トリメチルシクロヘキサノンのフラグメント(m／z 55，69，125，140も同様)に由来すると推定した．

よって，測定にはm／z 73のピーク面積を求め，m／z 83は確認イオンとして使用した．なお，カラムの液相であるジメチルポリシロキサンはバックグラウンドとしてm／z 73のフラグメントをもつが，測定上支障はなかった．

2．TMPのGC・フーリエ変換赤外スペクトロメトリー(FTIR)による赤外スペクトル

TMPは熱に不安定な性質からガスクロマトグラフィーによる分析法は不適当とされている[4]．そこで，キャピラリーGCで検出されるピークはTMPが熱分解したものかどうか確認するために，物質を非破壊で検出可能なGC／FTIRによりIRスペクトルを測定した．図2に示すように温度条件はGC／MSと同一条件とし，フローセル温度を120℃で測定したスペクトルは，標準品のスペクトルとほぼ一致した．よって，検出されるピークは分解物ではないと推定した．しかし，注入口温度を250℃，インターフェイス温度及びフローセル温度200℃とした場合，図3に示すように波長1740cm^{-1}にカルボニール基の吸収が現われ，TMPの熱分解が観察されることから，注入口温度及びインターフェイス温度は，120℃とかなり低い温度に設定する必要があることが確認された．

3．検量線

0.1～1 μg／mlのTMP標準溶液1 μlをGC／MSに注入し，M／Z 73のマスフラグメントのピーク面積より検量線を作成したところ，図4に示すとおり良好な直線性を示した．

4．TMPのシリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲルカラムクロマトグラフィーの結果を図5に示す．TMPは5％エーテル含有*n*－ヘキサンで溶出し，それ以上極性の強い溶媒を流しても溶出しなかった．そこで，溶離液は最初*n*－ヘキサンを50ml流しこれは捨て，5％エーテル含有*n*－ヘキサンを50ml流すことにした．

5．魚試料の脱脂の検討　アセトニトリル分配はTMPの*n*－ヘキサン層への分配率が低く脱脂には効果的でなかった．また，硫酸処理はTMPが分解するため，不適当であった．そこで乾式カラムクロマトグラフィーを検討した．シリカゲル20gを充填した場合，脂肪分と

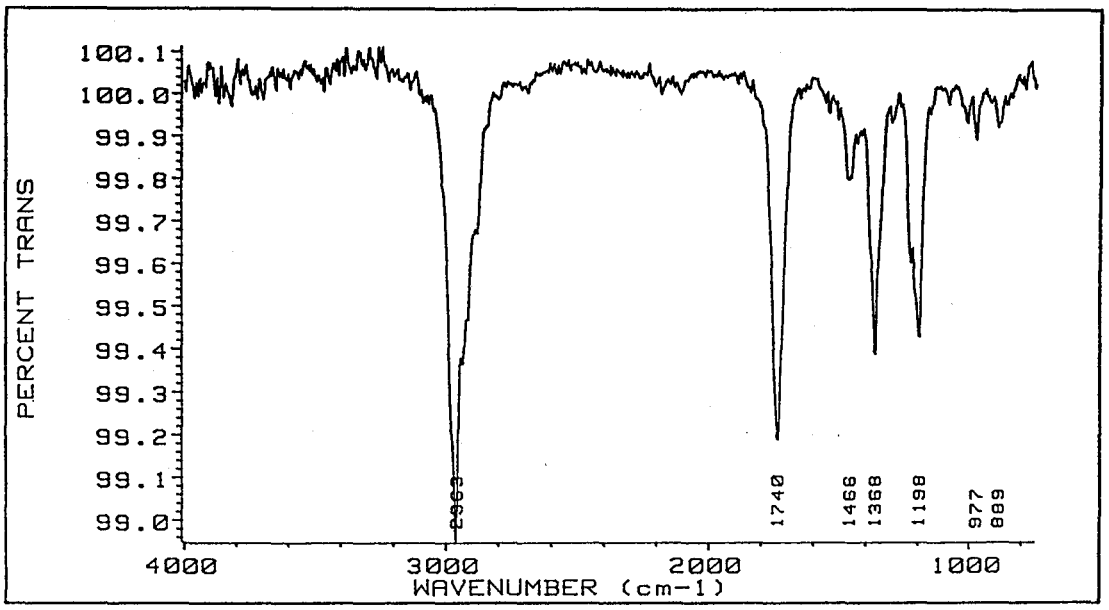


図3．GC–FTIRにより得られたTMPの熱分解スペクトル
注入口温度：250℃，インターフェイス及びフローセル温度：200℃，GC温度条件：50℃(1分保持)～120℃(5分保持)毎分10℃昇温

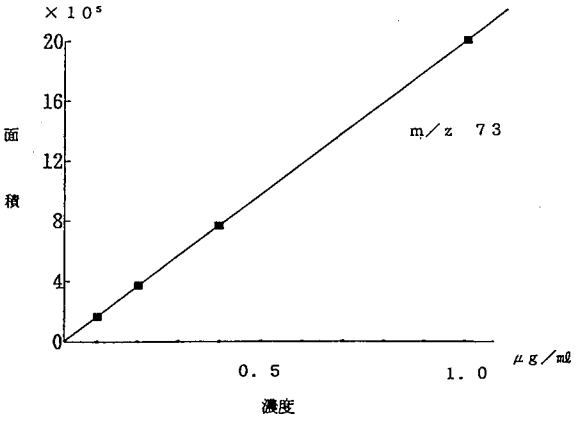


図4．TMPの検量線
（m／z 73のピーク面積により作成）

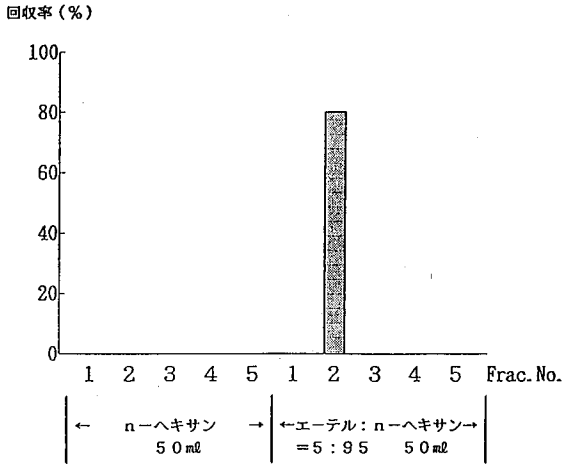


図5．TMPのシリカゲルカラムクロマトグラフィー

の分離は不十分であったが，同量のフロリジルではかなりの脱脂効果があったので，検討した．しかし，これだけでは脱脂は十分ではなく，さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーを併用することにより，良好なクロマトグラフムが得られた．図6に各クロマトグラフィー処理後のトータルイオンクロマトグラム（m／z 73及びm／z 83の合計）を示す．

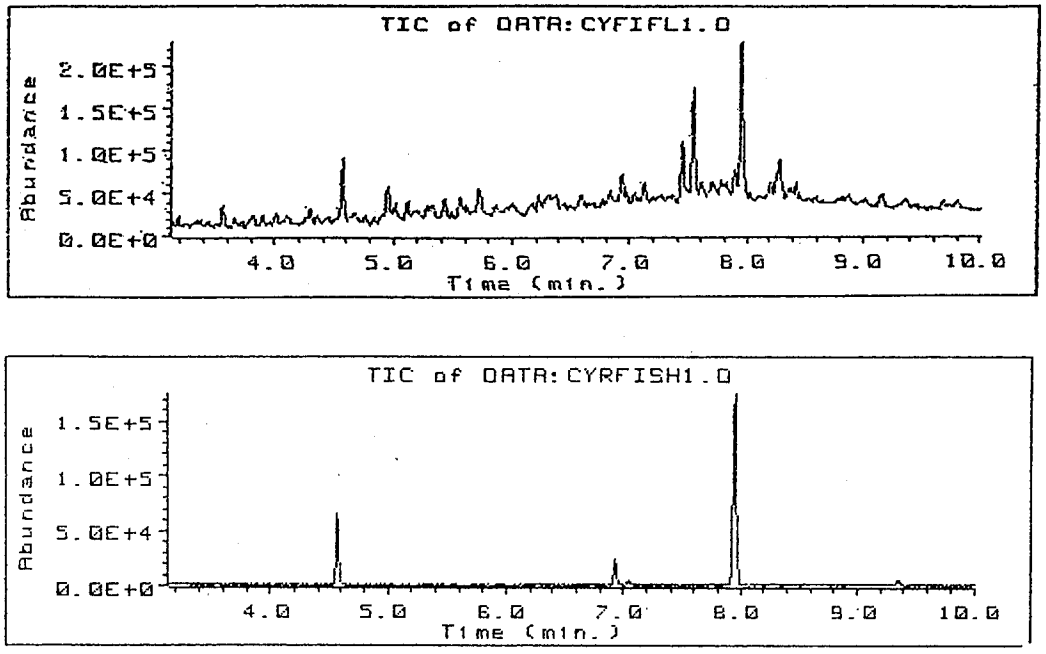


図6．魚試料の各カラムクロマトグラフィー後のGC／MSトータルイオンクロマトグラム
（M／Z 73とM／Z 83の合計）
上段：フロリジルカラムクロマトグラフィー後
下段：シリカゲルカラムクロマトグラフィー後

表1．1′,1−bis（t−butylperoxy）3,3,5−trimethylcyclohexane の添加回収率

試　料	添加量(ng)	n	回収率(%)	変動係数(%)
精製水	0.1	4	78.8	12.2
	0.2	4	82.9	10.6
	0.4	4	84.3	7.5
海　水	1.0	2	85.6	……
底　質	0.5	7	83.6	4.4
生　物	1.0	7	72.0	6.2

表2．1,1−bis（t−butylperoxy）3,3,5−trimethylcyclohexane の環境試料分析における各試料の検出限界及び定量限界

試　料	試料量	検出限界	定量限界
海　水	1 ℓ	0.10 μg／ℓ	0.34 μg／ℓ
底　質	20 g	5.73 μg／kg	…
生　物	20 g	7.10 μg／kg	…

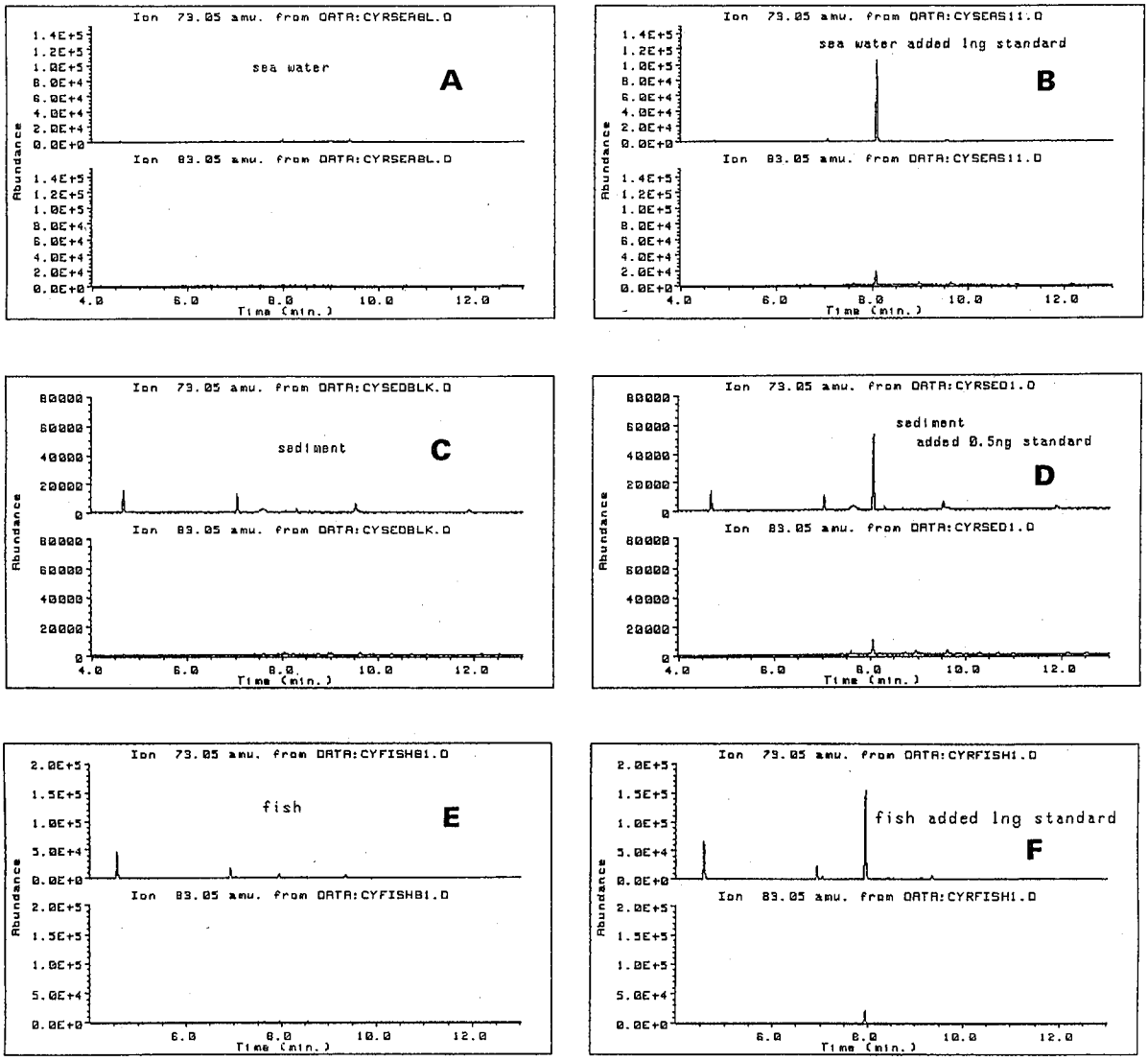


図7．実試料の GC／MS トータルイオンクロマトグラム（M／Z73とM／Z83の合計）
A）海水試料　B）海水試料＋標準品（1 ng）
C）標準底質　D）標準底質＋標準品（0.5ng）
E）生物試料(スズキ)　F）生物試料(スズキ)＋標準品（1 ng）

表3．1，1－bis（t－butylperoxy）3，3，5－trimethylcyclohexane の変異原性試験

1プレートあたりの量	復帰変異コロニー数（個／プレート）			
	TA 98 S9－	TA 98 S9＋	TA 100 S9－	TA 100 S9＋
対照 CH_3OH	21	44	81	106
105 μg	26	25	126	123
210 μg	29	46	123	115
525 μg	38	39	90	118
1050 μg	33	41	109	95

6．添加回収実験

海水，底質及び魚の各試料ともに，回収率は72～85％であった．結果を表1に示す．

7．検出限界及び定量限界

環境庁の定める算定方法[5]による結果は表2に示したとおりである．

8．環境試料の分析

本法により環境試料の分析を行った．図7にA)海水試料，B)海水試料＋標準品，C)標準底質，D)標準底質＋標準品，E)生物試料(スズキ)，F)生物試料(スズキ)＋標準品の各イオンクロマトグラムを示す．東京湾中瀬の海水，底質及び魚(スズキ)試料のTMPはいずれも検出限界以下であった．

9．変異原性試験

有機過酸化物であるハイドロパーオキサイドは変異原活性が見られることが確認されているが，パーオキシケタールであるTMPの変異原性試験のデータは見当らない．そこでエームズ試験を実施した[6]．TMPはメタノールに溶解し，菌株はSalmonella typhimurium TA 100及びTA 98を用いた．表3に示すように活性は見られなかった．TMPは有機過酸化物であるが，室温ではかなり安定で，ジアルキルパーオキサイドと同様にラジカルは生じにくいためと推定された[7]．

ま と め

キャピラリーGC／MSによるTMPの分析法を検討した結果，温度条件を可能な限り低くすることにより分解を最小限に押さえることができ，再現性も良好であった．その結果，本分析法の検出限界は，海水，底質及び魚で，それぞれ0.1 μg／ℓ，5.7 μg／kg，7.1 μg／kgであった．(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．)

謝辞：製品及び資料を提供して頂いた三建化工㈱と日本油脂㈱に感謝いたします．また，助言を頂いた三建化工㈱研究部藤井正雄主任研究員ならびにGC／FTIRの測定に協力頂いた横河電気㈱科学機器事業部PMK部アプリケーション開発課に感謝します．

参 考 文 献

1）環境庁編：化学物質と環境，1988.
2）化学工業日報編：10889の化学商品，466，1989.
3）通産省公報：既存化学物質の微生物等による分解性及び魚介類の体内における濃縮性について，1987.
4）榊原重郎：有機過酸化物の分析法，有機過酸化物研究グループ，有機過酸化物，132–148，1972，化学工業社.
5）環境庁編：検出限界等の定め方，1988.
6）狩野文雄，加納堯子，高尾精一，溝口 勲：東京衛研年報，36，294，1985.
7）Yamaguchi, T. and Yamaguchi, Y.：*Agric. Biol. Chem.*, 44, 1675–1678, 1980.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 230-232, 1989

ガスクロマトグラフィ／質量分析-Metastable Ion Monitoringによる水中微量有機物の分析

中川順一*, 高橋保雄*, 笹野英雄*

Analysis of Trace Organic Compound in Water by Gas Chromatography / Mass Spectrometry-Metastable Ion Monitoring

JUNICHI NAKAGAWA, YASUO TAKAHASHI and HIDEO SASANO

Keywords：ガスクロマトグラフィ／マススペクトロメトリー gas chromatography／mass spectorometry, メタステイブルイオンモニタリング metastable ion monitoring, selected ion monitoring (SIM)

緒　言

環境試料及び生体試料中の微量有機化合物を測定する方法として，ガスクロマトグラフィ／マススペクトロメトリー(GC／MS)は，極めて有効な手段である．とくに，GCにより分離された化合物をMSに導きイオン化したのち，測定化合物の特徴的なイオンを連続的にモニターするSelected Ion Monitoring(SIM)は，化合物の保持時間とMSの化学構造に関する特性の両者に応答するものであり，選択性に優れ感度の高い方法である．さらに，近年高い分離能を有するキャピラリーカラムを用いることにより，一段と精度高い分析が可能となった．

しかし，キャピラリーGC／MS–SIMを用いて環境試料中の微量有機化合物を分析する場合，クリーンアップを重ねた試料であっても，測定化合物と挙動をともにする環境試料由来の化合物が混入し，測定上妨害となるケースがある．

今回，この問題を解決する方法の一つとして，水試料中の一塩化ジベンゾフラン(MCDF)を測定対象物質として，低分解能SIMより選択性に優れている高分解能SIM及び，Metastble Ion Monitoring(MIM)法による分析方法を検討した．

実験方法

1－1．GC／MS測定条件

GC／MSは，VG–70 S質量分析計にヒュレットパッカード社製5890 Aガスクロマトグラフを接続した装置を用いた．

MS条件　イオン化電圧35eV，トラップ電流200 μA，加速電圧8KV

GC条件　カラム：25m, methyl 50% phenylsilicone 0.25mm ID, 膜厚0.1 μm

カラム温度：60℃　2 min　20℃／min　210℃　5 min　SIMモードでは，モニターイオン　m／z202.0185, 204.0156の二つのイオンを同時に測定した．また，MIMモードでは，モニターイオンはm／z202から生成する娘イオンm／z139を測定した．

1－2．試料液の調製　水道水4 *l* を分液ロートに取り，n–ヘキサン400m*l* を加え，15分間振とうし，30分間静置後水層を捨て，水道水4 *l* を加えた．この操作を25回くり返し，全部で100 *l* の水道水についてn–ヘキサン抽出を行った．得られたn–ヘキサン抽出液に無水硫酸ナトリウムを加え脱水後，KD濃縮器で5 m*l* に濃縮した．ついで，濃縮液を150℃で18時間活性したシリカゲル5 gをn–ヘキサンで湿式充てんした300mm×10mmガラスカラムにつけ，n–ヘキサン100m*l*，10%ジクロロメタン–n–ヘキサン80m*l* で展開し，10%ジクロロメタン–n–ヘキサン分画をKD濃縮器で5 m*l* まで濃縮し，さらに窒素ガスを吹きつけて100 μ*l* にしたものをGC／MSの試料液とした．

結果及び考察

1．高分解能SIMとMIM

MCDFは，塩素の置換位置により4種類の異性体が存在するが，そのうち2–，3–，4–MCDFの3つの異性体を用いてGC／MSによる定量方法を検討した．

図1に分解能5,000におけるMCDFの標準品と水道水

*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 Laboratroy of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku–ku, Tokyo, 169 Japan

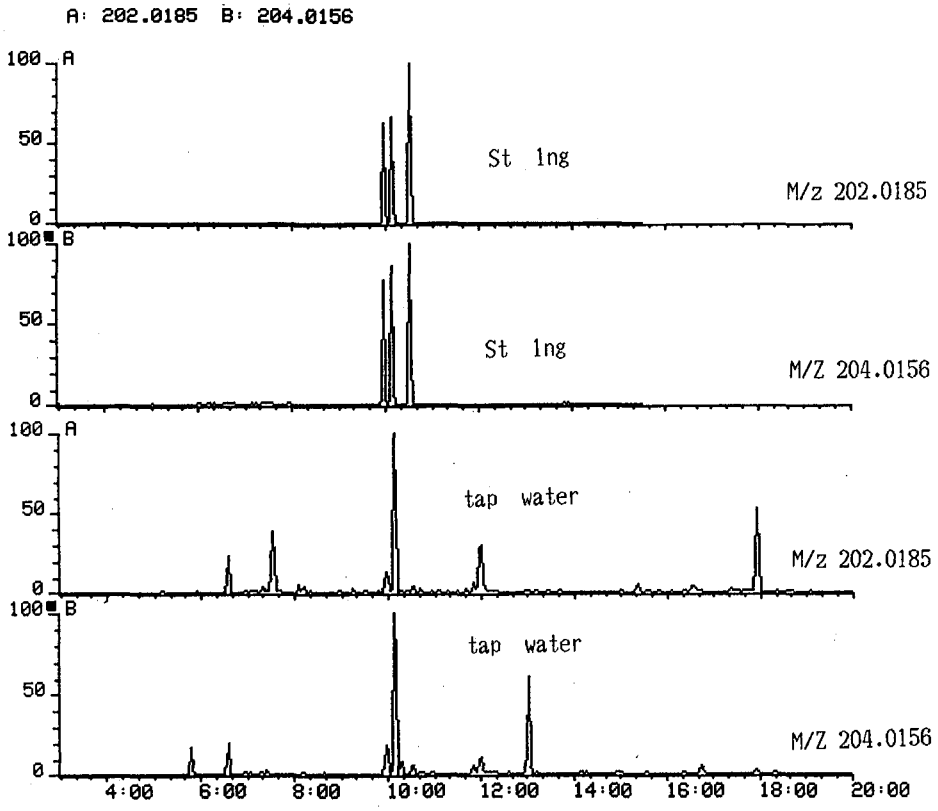


図1．高分解能 GC／MS—SIM による MCDF のクロマトグラム

抽出液の SIM クロマトグラムを示した．

現在，キャピラリーカラムを用いた高分解能 SIM は，環境試料中のポリ塩素化ダイオキシン，ポリ塩素化ジベンゾフランなど，極めて低濃度で，高い精度を必要とする分析に使われている．この方法は，従来広く行われている1,000程度の低分解能での SIM 測定から，分解能5,000-10,000に上げて SIM を行う方法である．一般的には，分解能を1,000から5,000に上げることにより，イオン透過率は約20％に低下する．すなわち，感度も約20％に低下するわけであるが，分解能を上げれば，測定する化合物のモニターイオンの純度も上がるため，バックグランドを極めて低く抑えられる．その結果，高分解能での測定は S／N 比が向上し，全体として高感度分析ができることを意味している．

しかし，図1の結果は，分解能5,000においてもバックグランドノイズが高くクロマト上に MCDF 以外のピークが認められ，MCDF のピーク上にも試料由来のきょう雑物の影響があると考えられる．このことより，この試料の場合，分解能5,000の SIM では，完全に試料由来のきょう雑物を除去するには至らないということであり，更に分解能を上げて測定をするか，クリーンアップの検討が必要である．

しかし，今回はこの試料のまま，Gaskell[1-2]らが，生体試料の分析に用いたメタスティブルイオンモニタリングによる手法を使い MCDF の分析を試みた．具体的には，MCDF の $M^{+}202 \rightarrow (M-COCL)^{+}139$ の娘イオンを B／E スキャンで検出し，モニターする方法である．

図2に MIM(分解能1,000)による標準品と水道水抽出液のクロマトグラムを示した．この結果，高分解能 SIM で除くことのできなかったバックグランドノイズを極めて低くすることができた．このことより，親イオンから生成するメタスティブルイオンである娘イオンをモニターする MIM 法は，高分解能 SIM と違った意味で極めて選択性の高い方法であり，水道水中の MCDF 分析のためには，高分解能 SIM より有効な方法であるといえる．しかし，この結果から，MIM 法の方が高分解能 SIM より優れた分析法であるとは断定できない．サンプルの種類により2つの方法を使い分けることにより精度

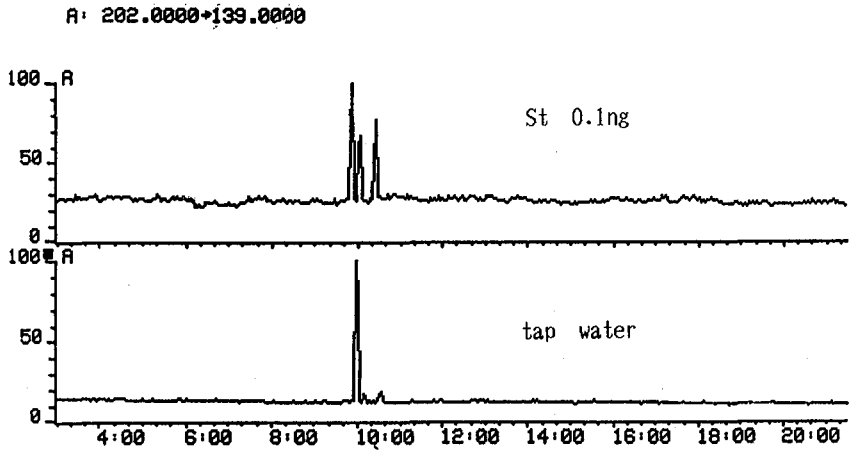


図2．GC／MIMによるMCDFのクロマトグラム

表1．河川水，水道水及び海水中のDF及びMCDF

	採水日	DF	2－MCDF	3－MCDF	4－MCDF (ppt)
A 河川水	88.11.21	1.2	ND	0.004	0.004
A浄水場系水道水	88.11.21	2.2	0.044	0.009	ND
B 河川水	88.11.25	1.8	0.006	0.005	0.004
B浄水場系水道水	88.12. 1	3.7	0.030	0.010	0.004
C 河川水	88.11.30	1.0	0.002	0.002	0.002
C浄水場系水道水	88.11.30	3.9	0.022	0.010	ND
海水	88.10. 5	2.1	ND	ND	ND

の高い分析を行っていく必要があると思われる．

2．水中のMCDF及びジベンゾフラン(DF)

都内の3つの浄水場系統の水道水と浄水場の取水口付近の河川水についてGC／MS–MIMによりDF及びMCDFの定量を行った．その結果を表1に示した．この結果より，DFの河川水濃度は1.0-1.8pptであり，水道水濃度は2.2-3.9 pptの範囲にあった．

Shiraishiら[3]は，水道水中のDF及びMCDFの濃度を報告しているが，今回の結果は，Siraishiらの約1／10の濃度であった．また，MCDFの中では2－MCDFが最も高く，ついで3－MCDF，4－MCDFの順であった．河川水と水道水との比較では，2－MCDF，3－MCDFについては，河川水より水道水の方が高い傾向を示した．水道原水と比較して水道水の方が高い原因は，水道原水にもともと存在しているDFと水道管から溶出したDFが，塩素処理の過程で注入される残留塩素により塩素化されてMCDFが生成したと思われる．また，水道管からのDFの溶出は，水道原水より水道水の方がDFの値が高いことより説明できる．なお，海水中のDFは水道水，河川水と同じレベルであり，MCDFは，検出限界以下であった．

文　献

1）Gaskell S. J., Finney R.W. and Harper M. E.; *Biomed. Mass Spectrom.*, 6, 113-116, 1979.

2）Gaskell S. J. and Pike A.W.; *Biomed. Mass SPectrom.*, 6, 78-81, 1979.

3）Shiraishi H., Pilkington N.H., Otsuki A. and Fuwa K.: *Environ. Sci. Technol.*, 19, 585-590, 1985.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 233-235, 1989

水中のアスベスト繊維に関する調査研究（第2報）

小輪瀬　勉*，坂本朋子*，笹野英雄*

Study on Asbestos-Fibers in Water (II)

TSUTOMU KOWASA*, 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，侵食指数 aggressiveness index

はじめに

著者らは，前年度に都内各浄水場の原水，浄水等のアスベスト繊維による汚染の実態調査[1)]を実施した．本年度はさらに島しょ及び多摩地域の水道用原水，浄水，給水栓水等の調査を行った．

また，浄水及び給水栓水については侵食指数(以後AI値と称す)を測定し，アスベスト繊維の測定結果と併せてアスベストセメント管(以後アスベスト管と称す)の崩壊状況を検討し，若干の知見を得たのでその結果を報告する．

実験の部

1．**試料**：1988年4月から6月までに採水した島しょ及び多摩地域の水道用原水，浄水及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，口径0.2 μm,直径47mm)アセトンおよびクロロホルム(フロリナートフィルターで吸引ろ過したもの)，0.3 W／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(ベコー社製ニッケル製200メッシュのもので，常法によりポリビニールホルムバール膜を張ったもの)，0.1 N–H_2SO_4規定液

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)，イオンクロマトグラフィー(横河IC–500型)

4．**分析方法**

4－1）アスベスト繊維

4－1）－1：前処理

前報[1)]に従った．

4－1）－2：アスベスト繊維の検索

前報[1)]に従った

4－1）－3：アスベスト繊維の算出方法

前報[1)]に従った

4－2）AI値

4－2）－1：カルシウム硬度(mg／l)(以後CaHと称す)の算出方法

イオンクロマトグラフィーによりカルシウムイオンを測定し，その値に2.469を乗じてCaHを算出した．

4－2）－2：総アルカリ度(mg／l)(以後MAHと称す)の算出方法

上水試験方法[2)]に従い測定した．

4－2）－3：pH値

ガラス電極法により測定した．

4－2）－4：AI値の算出方法

AI値は次式によって計算した．

$$AI = pH + \log(CaH \times MAH)$$

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，原水が検出限界(以後DLと称す7,500本／l)未満～120,000本／l，浄水は22,500～45,000本／l，給水栓水は7,500～45,000本／lであり，その長さは0.2～5.0 μm未満，径は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53.1％，浄水からは13.5％，給水栓

*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 Metroporitan Research Laboratory of public Health
24－1，yakunincho 3 chome, Shinjuku–ku, Tokyo, 169 Japan

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	侵食指数
		0.2-1.0μm未満	1.0-5.0μm未満	5.0-10.0μm未満		(AI値)
大島	原水	15,000	15,000	<DL	30,000	−
	給水栓水	30,000	15,000	<DL	45,000	10.97
利島	原水	<DL	<DL	<DL	<DL	−
	給水栓水	37,500	<DL	<DL	37,500	9.81
三宅島	原水	37,500	37,500	<DL	75,000	−
	給水栓水	7,500	15,000	<DL	22,500	10.90
新島	原水	<DL	<DL	<DL	<DL	−
	給水栓水	15,000	30,000	<DL	45,000	10.35
小笠原	原水	<DL	<DL	<DL	<DL	−
(父島)	浄水	45,000	30,000	<DL	75,000	9.48
	給水栓水	7,500	22,500	<DL	29,500	9.48
小笠原	原水	22,500	22,500	<DL	45,000	−
(母島)	浄水	22,500	<DL	<DL	22,500	10.13
	給水栓水	<DL	7,500	<DL	7,500	10.10
奥多摩町	原水	37,500	75,000	<DL	112,500	−
	給水栓水	<DL	15,000	<DL	15,000	10.35
檜原村	原水	75,000	45,000	<DL	120,000	−
	給水栓水	7,500	30,000	<DL	37,500	10.79

注）DL：定量限界（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（本／l）
	割合(%)	50%	50%	0%	96
原水	53.1	52.1	54.2	0	51
浄水	13.5	18.7	8.3	0	13
給水栓水	33.3	29.2	37.5	0	32

水からは33.3%が検出されており，長さ別では，0.2～1.0μm未満が50%，1.0～5.0μm未満が50%で，5.0μm以上の繊維は検出されなかった．また試料別(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．

原水から検出されたアスベストは5.0μm以下の短いものが多く，建築材やブレーキ用摩擦材等から由来する2次的な汚染と思われる．

浄水のアスベスト濃度は，原水とほぼ同じ値を示したものと，増加しているものがあったが有意な差はみられなかった．

今回の調査においては，浄水，給水栓水の侵食性を表すAI値[3]を測定した．

その結果，小笠原・父島の検体のAI値が9.48と低く，

しかも給水栓水のアスベスト繊維数の増加しているものもみられたが，その増加数も有意差を示すまでには至らなかった．なおアスベスト管由来と言われている5 μm以上の繊維は検出されていない．利島の検体もAI値が10以下を示したものがあったが，小笠原と同じような結果であった．その他の検体は，AI値も10以上で繊維数もほぼ同じであり，長さも5 μm以下と短いことから，検出された水中のアスベスト繊維がアスベスト管剝離繊維由来であるという確証は得られなかった．

引き続き，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．

文　献

1）小輪瀬　勉，坂本朋子，笹野英雄：東京衛研年報，39，259-263，1988.
2）上水試験方法，　日本水道協会，1985.
3）J. R. Millette,et al.：Environmental Health Perspectives, Vol.34，1980.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 40, 236-242, 1989

皇居外苑濠の植物プランクトンⅢ
―主要な緑藻―

渡 辺 真利代*, 土 屋 悦 輝*

Phytoplankton in Outer Moats around the Imperial Palace III.
Main Species of Green Algae

MARIYO F. WATANABE* and YOSHITERU TSUCHIYA*

Keywords：植物プランクトン phytoplankton, 緑藻 green algae, 種類組成 species composition, 濠 most

緒　　言

湖沼は長い年月の間には富栄養の状態となり，水中に有機物が蓄積し，ついには浅くなり陸地化するといわれる．しかし，この湖沼の富栄養化は近年の様々な人為作用により加速され，日本の多くの湖沼やダム湖等において植物プランクトンの異常増殖が引き起こされている[1]．その典型的例が藍藻の“水の華”（アオコ）であり，皇居外苑濠においては1930年の倉茂の報告[2]に既に“水の華”の出現が記載されている．また，ここ数年間は毎年アオコが観察されている．

皇居外苑濠の水質は周囲の環境と調和するような良好な水質が望まれている．また，緊急に際しては簡便な処理後飲料水としても利用可能な水質を確保する必要がある．そのため環境庁から委託され，我々は1982年以降年4回水質調査を実施してきている．前報[3,4]では植物プランクトン全体としての経年変化及び主要な藍藻について報告したので，ここでは主要な緑藻についてまとめた．

方　　法

採水は皇居外苑濠を左回りに一周するように，日比谷濠(station 1及びst. 2)，蛤濠(st. 3)，桔梗濠(st. 4)，清水濠(st. 5)，牛が淵(st. 6)，千鳥が淵(st. 7)，半蔵濠(st. 8)，桜田濠(st. 9，10，11)の計11地点で，年4回実施した．実施日は1986年5月30日，8月22日，11月13日，1987年2月13日，5月27日，8月12日，11月19日，1988年2月10日，5月26日，8月10日，11月9日，1989年2月15日であった．

採水は表面水について実施した．その一定量をとりグラスファイバーろ紙(Whatmann GF／C)で濾過したのち，その残渣をアセトン中で磨砕し，Strickland and Persons の法[5]によりクロロフィルa量を測定した．また試水500m*l* はホルマリン添加後静置して濃縮し，その一部について植物プランクトンの同定及び定量を行った．

結果及び考察

［1］クロロフィルa量の季節変化

図1には過去3年間のクロロフィルa量値の変動を示した．この値は植物プランクトンの全体量(現存量)の変化を示すものである．全ての地点で5月又は8月のクロロフィルa量が高く，11月及び2月は低く，特にst. 9，10，11の2月の値は10 μg／m*l* 以下になることもあった．極めて高い値が1987年の8月にst. 5と6で測定されているが，これは藍藻の“水の華”によるもので，st. 5では *Microcystis aeruginosa*(2.8×10^4／m*l*)，*Oscillatoria rachiborskii*(1.9×10^4／m*l*)，*Anabaena flos-aquae*(2.9×10^4／m*l*)の出現による．st. 6では主に *Anabaena flos-aquae*(4.3×10^5／m*l*)によるものと考えられる．しかし，1988年では藍藻の“水の華”は少なく，最も高いクロロフィルa値でもst. 7の8月の174 μg／m*l* であり，ほとんどの地点で88年の最高値は前年の値よりも低くなっている．1988年の *Microcystis* の細胞数は極端に少なく，10^4／m*l* 観察されたのはst. 8のみであった．

通年してみるとst. 5，6，7のクロロフィルa値が高く，st. 9，10，11の値が低くなっていた．1988年の値は全般的に1987年の値よりも低くなっているが，これは1986年レベルであるとも言え，全体として顕著な変化はみられていない．

*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, 160 Japan

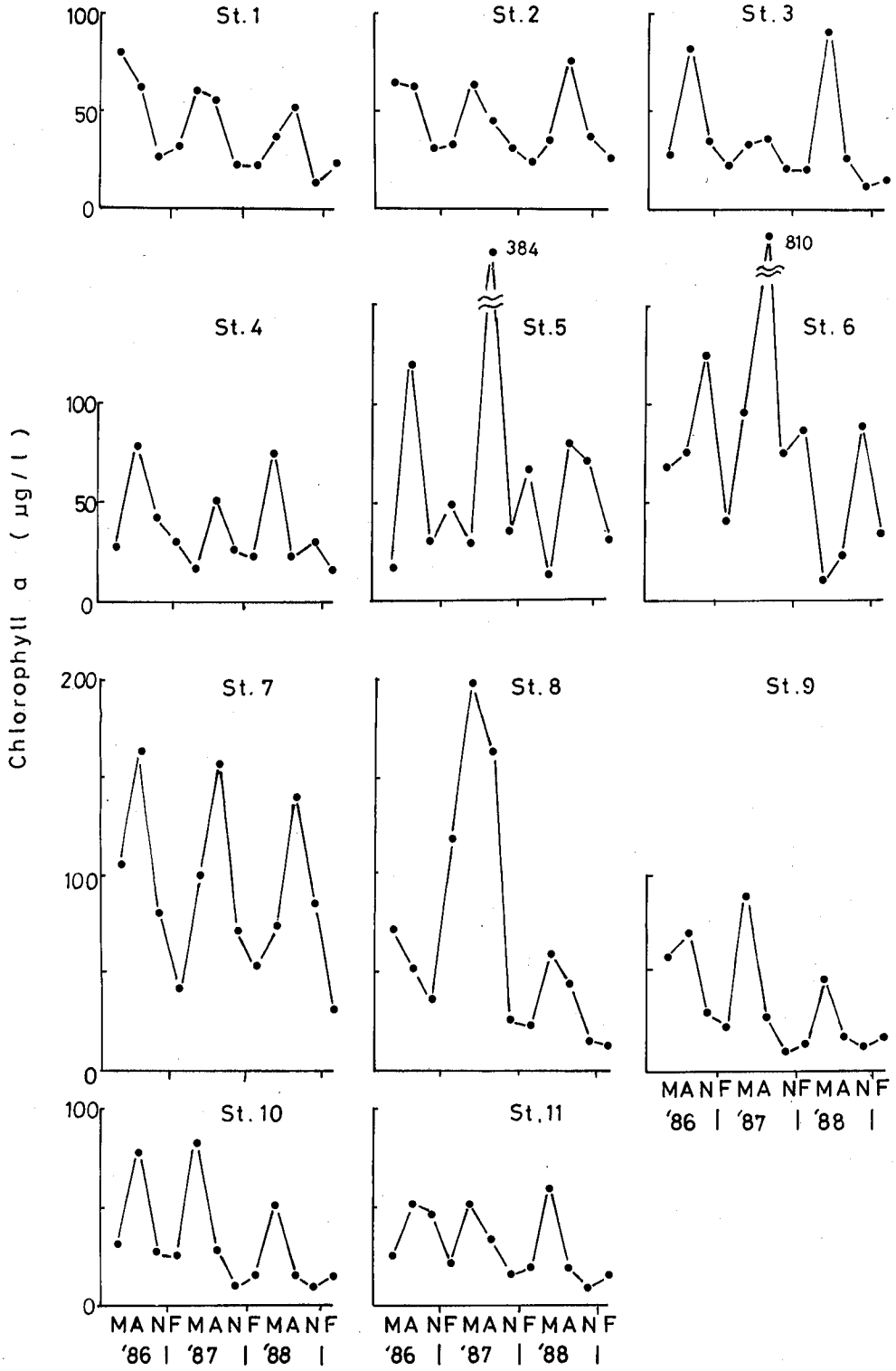


図1．クロロフィルa量の季節変化

表1．緑藻 *Koliella* sp. の細胞数

採水時期	st. 1	st. 2	st. 3	st. 4	st. 5	st. 6	st. 7	st. 8	st. 9	st.10	st.11
May 1988	4.7×10^{3} [a]	7.5×10^{3}	4.2×10^{3}	3.1×10^{3}	+ [b]	+	1.1×10^{3}	3.5×10^{5}	7.3×10^{5}	6.1×10^{5}	7.0×10^{5}
Aug. 1988	2.4×10^{2}	+	3.4×10^{4}	1.1×10^{4}	− [c]	+	+	+	1.6×10^{4}	1.5×10^{4}	3.8×10^{4}
Nov. 1988	1.8×10^{4}	1.7×10^{4}	9.9×10^{3}	1.4×10^{4}	−	−	8.9×10^{3}	1.5×10^{5}	+	+	1.4×10^{4}
Feb. 1989	4.2×10^{3}	6.2×10^{3}	7.5×10^{3}	3.6×10^{3}	5.2×10^{2}	2.6×10^{3}	3.9×10^{3}	7.0×10^{3}	6.0×10^{3}	3.4×10^{3}	5.8×10^{3}

a）1 m*l* 当りの細胞数

b）1 m*l* 当り100以下

c）検出されず

表2．主 要 な 緑 藻[a]

種　　類	st. 1	st. 2	st. 3	st. 4	st. 5	st. 6	st. 7	st. 8	st. 9	st.10	st.11
Planktosphaeria gelatinosa	7000 [b]	7700	650	180	−	1200	250	+ [c]	200	5700	15000
Hyaloraphidium sp.	− [d]	−	−	−	−	−	2300	−	−	−	−
Kirchneriella contorta	−	−	−	−	−	−	7200	−	−	−	−
Tetraedron minimum	+	+	+	+	−	+	+	−	−	+	−
Oocystis sp.	510	300	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Pediastrum tetras	+	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−
Pediastrum symplex	+	+	−	170	130	290	600	450	−	−	−
Pediastrum symplex var. duodenarium	4300	3300	3000	3400	1700	1000	−	770	1800	430	650
Pediastrum symplex var. sturmii	210	130	+	+	130	400	300	260	−	+	−
Pediastrum boryanum	1100	890	+	400	260	800	600	2500	560	+	180
Coelastrum sp.	3100	2100	250	720	+	+	−	+	−	−	−
Scenedesmus quadricuada	7700	8700	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Scenedesmus abundans	−	+	−	+	+	+	400	21000	+	+	−
Scenedesmus acuminatus	−	−	−	−	+	+	2400	−	−	+	−
Scenedesmus bijuga	1300	760	+	−	−	−	−	−	+	−	−
Scenedesmus bicaudatus	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	+
Scenedesmus perforatus	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Scenedesmus sp.	−	−	−	−	16000	52000	36000	74000	−	−	−

a）1987年5月27日

b）1 m*l* 当りの細胞数

c）1 m*l* 当り100以下

d）検出されず

［2］主要な緑藻

1988年度の植物プランクトンの種類組成で特徴的なことは，*Microcystis* の細胞数の減少と緑藻 *Koliella* sp.[6]の増加であった．皇居外苑濠における植物プランクトンの季節変化の中で，緑藻は一般的には5月，8月に多くなるが，藍藻の“水の華”ほど高い濃度にならないのが通例である．しかし，*Koliella* sp. は5月の st. 9，st. 10，st. 11でそれぞれ7.3×10^5／ml，6.1×10^5／ml，7.0×10^5／ml もの細胞数になっていた(表1)．この種類(写真1)は幅2-4 μ の細長い細胞で，長さは50-70 μ が普通であるが，100 μ 以上のものもあった．*Koliella* sp. は87年にも観察されてはいたが，多くても st. 7の5月で150／ml, st. 9の11月の160／ml 程度であった．

Koliella sp. 以外の他の緑藻の中で比較的多く出現するものを表2にまとめた．皇居外苑濠に見られる緑藻類の特徴は *Pediastrum* 類と *Scenedesmus* 類の種類が多いことである．*Pediastrum* 類では，*P. symplex* var. *duodenarium* (写真2)は数も多く，多くの station で出現する．この種は2月においても10^2オーダーはみられるものである．*P. boryanum*(写真3)は st. 1及び8で10^3オーダー観察された．*Scenedesmus* 類は特に種類が多く，この表に挙げている以外にも未同定のものが数種以上はある．この表で *Scendesmus* sp. として表しているもの(写真6)が数としては多く，st. 5，6，7，8で10^4オーダーも観察された．*Scenedesmus* 類はこれまでの調査結果では st. 6，8で多く出現している．

濠水の植物プランクトンの季節変化のなかで，1988年は“水の華”を作る藍藻の細胞数が減少し，新たに別種の緑藻が出現した．このことが水質の改善を意味するのかあるいは一時的減少なのか，今後の植物プランクトン量の変化及び種組成の変化を監視していく必要があろう．

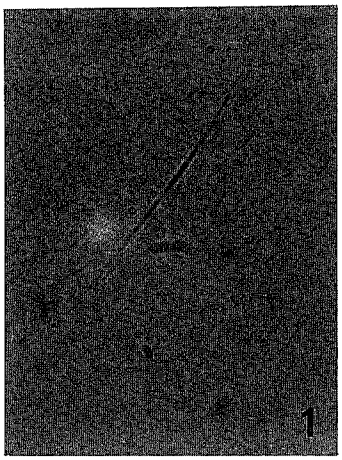
ま と め

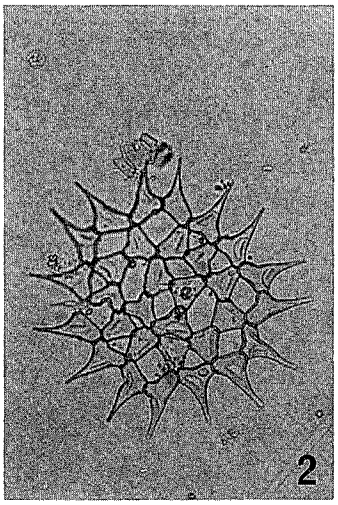
皇居外苑濠に出現する植物プランクトンのうち主要な緑藻についてまとめた．1988年は *Koliella* sp. が数多く出現し，特に5月の桜田濠では st. 9で7.3×10^5／ml, st. 10で6.1×10^5／ml，st. 11で7.0×10^5／ml 観察された．*Koliella* sp. 以外の種類では *Pediastrum* や *Scenedesmus* の類が多くみられた．

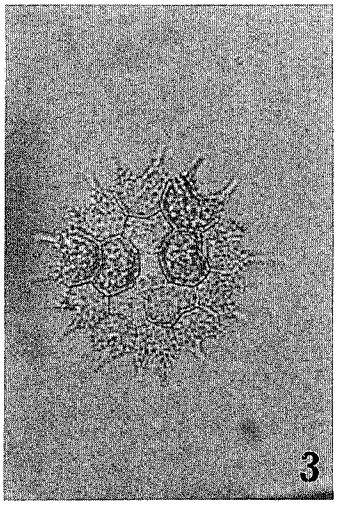
謝辞：植物プランクトンの同定にあたり御教示願った国立科学博物館の渡辺真之博士とチェコ科学アカデミー植物学研究所の J. Komárek 博士に謝意を表します．

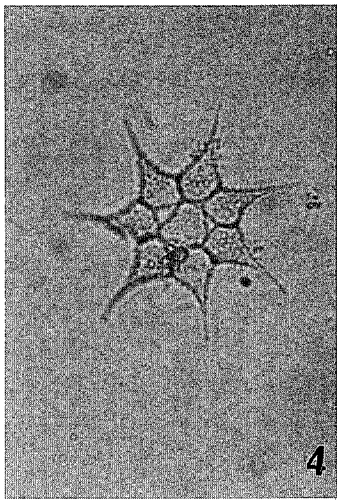
文 献

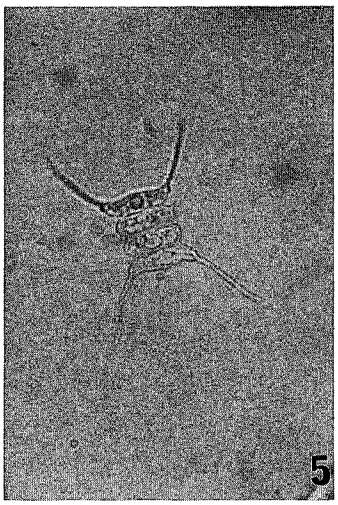
1）生嶋 功：水の華の発生と制御，東海大学出版会，1987.
2）倉茂英次郎：気象集誌，10，475-481，1932.
3）渡辺真利代，土屋悦輝：東京衛研年報，38，329-332，1987.
4）渡辺真利代，土屋悦輝：東京衛研年報，39，265-270，1988.
5）Strickland, J.D.H. and Parsons, T.R.: *A Practical Handbook of Sea Water Analysis*, 1968, Fish. Res. Bd. Can.
6）Hindak, F.: Preslia, Praha, 56, 1-11, 1984.

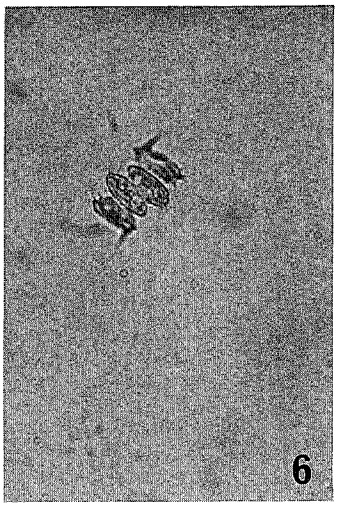


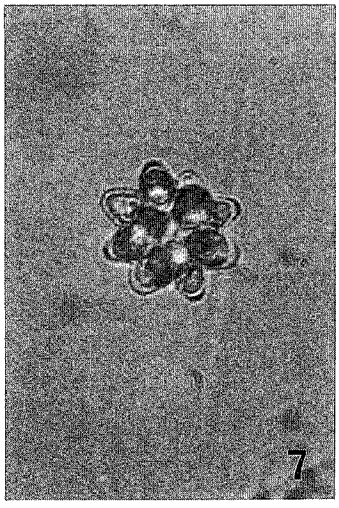












写真．皇居外苑濠主要な緑藻

1．*Koliella* sp.（10×40）
2．*Pediastrum symplex* var. *duodenarium*（10×20）
3．*P. boryanum*（10×20）
4．*P. symplex* var. *sturmii*（10×40）
5．*Scenedesmus quadricauda*（10×40）
6．*Scenedesmus sp.*（10×40）
7．*Coelastrum* sp.（10×40）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 243-250, 1989

ドライクリーニング所排水中の塩素系有機溶剤の簡易試験法としての検知管法の評価

有賀孝成*, 押田裕子*, 栃本　博*,
西島基弘**, 寺山　武*

Evaluation of Detector Tube as a Simplified Method for Determination of Chlorinated Organic Solvents in Wastewater from Laundries

TAKANARI ARIGA*, HIROKO OSHIDA*, HIROSHI TOCHIMOTO*,
MOTOHIRO NISHIJIMA** and TAKESHI TERAYAMA*

Keywords：検知管 detector tube, 簡易試験法 simple method, 塩素系有機溶剤 chlorinated organic solvent, テトラクロロエチレン tetracloroethylene, 1,1,1-トリクロロエタン 1,1,1-trichloroethane, ドライクリーニング dry-cleaning, 排水 wastewater

緒　言

我国におけるテトラクロロエチレン(PCE)及び1,1,1-トリクロロエタン(MC)の年間総出荷量(昭和62年)はそれぞれ，68,000及び135,400トンに達している[1]．そのうち，PCE の35％及び MC の２％程度がドライクリーニング用の洗浄剤として使用されている[2]．これら塩素系有機溶剤による地下水や河川水等の汚染が社会問題としてクローズアップされて以来，厚生省はドライクリーニング所の排水について，PCE 及び MC の管理目標値をそれぞれ0.1mg／l 及び３mg／l 以下と定め[3]，これを達成するために排水処理装置の設置を義務づける等の行政指導を進めている[4]．また，環境庁は PCE 及びトリクロロエチレン(TCE)を水質汚濁防止法で公共用水域への排出を規制する有害物質に追加指定し，その排水基準をそれぞれ0.1mg／l 及び0.3mg／l と定めた[5]．

水中の塩素系有機溶剤の分析は従来よりガスクロマトグラフ法(GC法)で行われている[6,7]．しかし，ドライクリーニング所における排水処理装置の自主管理あるいは環境衛生監視員による適切な監視，指導を実施するためには，現場で簡易に実施できる分析法が必要である．近年，ガス検知管を利用する簡易試験法(検知管法)が考案され[8,9]，現在，光明理化学工業(Ｋ社)及びガステック(Ｇ社)の２社から“簡易測定セット”として市販されている．

この検知管法は操作が簡単であり，携帯が可能であるため現場で溶剤濃度の測定ができ，利便性が高いこと，また，測定セット及び検知管が比較的低廉であること等から，塩素系有機溶剤の簡易試験法として各方面から推奨されている[10,11]．しかし，現在までのところこれら検知管法の性能や実用性に関する詳細な調査報告は見られない．

著者らは，ドライクリーニング所排水を対象とする有機溶剤の簡易試験法としての検知管法の有用性を知るため，測定時の温度の影響，繰り返し精度，検出限界，妨害物質の影響等について検討したのでその結果を報告する．

実験方法

１．試薬

１）PCE, MC 及び TCE 標準溶液：250ml 容の共栓付きメスシリンダーに水200ml を取り，それぞれに標準物質を約１ml 加えてよく混和した．静置後，PCE は150ml, MC 及び TCE は50ml の上澄液を分取し，それぞ

*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, Sibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan
**東京都立衛生研究所生活科学部　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

れ，水で1lとしたものを標準原液とした．本液のPCE，MC及びTCE濃度はそれぞれ約20，45及び50mg／lであった．用時，標準原液を水で希釈したものを標準溶液とし，GC法で濃度を確認した．

2）GC用標準溶液：水質試験用有機ハロゲン化物標準液B-2（PCE 4 mg／l，MC 4 mg／l，TCE 15mg／l）を適宜ヘキサンで希釈して使用した．

3）次亜塩素酸ナトリウム溶液：食品添加物用（有効塩素濃度12％）を水で希釈して使用した．

4）洗剤："ライポンF"（ライオン油脂）を適宜水で希釈して使用した．

5）油分：食用大豆油（豊年製油）及びコンプレッサー用オイル（日立純正品）を等量ずつ混和したものを使用した．

特にメーカー名，品質を記載していないその他の試薬はいずれも試薬特級品（和光純薬）を用いた．

2．器具及び装置

1）検知管：表1．に示したPCE用3種類，MC用2種類，計5種類の検知管を実験に供した．

2）ガス採取器：両社の検知管に共用できるAP-1型（光明理化学工業）を使用した．

3）ガスクロマトグラフ：GC-7A型（島津製作所）電子捕獲型検出器（ECD）付を使用した．

3．PCE及びMCの測定方法

1）検知管法：それぞれの測定セットに添付されている取扱説明書に準じた．すなわち，試料200mlを500ml容のポリエチレン製丸型細口瓶に分取し，口元をポリエチレン製フィルムと輪ゴムで密封した．約1分間手で振とうした後，あらかじめ両端をカットし，ガス採取器にセットした検知管の先端をポリエチレンフィルムに突き刺し，K社製検知管では100ml，G社製では50mlの気相を吸引した．ハンドルをロックし，そのままの状態で1～2分間放置後，検知管の呈色層の先端部の目盛りを読み取り，次いで試料の水温を測定した．水中の溶剤濃度はここで得た検知管の読みと水温から，それぞれの説明書に記載されている換算表を使用して求めた．また，1回の吸引で呈色層の先端が検知管の最小目盛りに達しない場合には，再度同量の気相を吸引し，その時の目盛りから得られた換算値を2で除した値を水中濃度とした．なお，この換算はあらかじめ換算表を記憶させた計算機で行った．

2）GC法：溶媒抽出-GC法に従った[7]．

結果及び考察

1．水温及び気温の影響

PCE及びMCの各標準溶液を用い，春，夏及び冬季に屋外で測定し，測定値に及ぼす水温と気温の影響を検討した．なお，測定時の水温及び気温はそれぞれ10℃，20℃及び30℃付近であった．

検知管法及びGC法による測定結果を図1．に示した．但し，ここでは2回の吸引によっても着色層の先端が検知管の最小目盛りに達しないものは成績から除いた．

検知管法による測定値はいずれもGC法による測定値と高い相関を示し，相関係数は0.94～0.98の範囲であった．

検知管法の正確度を，GC法による測定値に対する検知管法による測定値の比率（検知管法／GC法）でみると，PCEでは，K社製高濃度用検知管は温度による差が比較的小さく，春，夏及び冬季を含めた全体で0.32～1.97（平均1.02）の範囲であった．G社製検知管は春季には0.89～1.49（平均1.15），夏季には0.91～1.09（平均1.03）と良好であった．しかし，冬季では0.22～0.58（平均0.34）と春及び夏季に比較してかなり低い値を示した．また，K社製低濃度用検知管もG社製検知管と同様に，春季には0.90～1.66（平均1.26），夏季には0.82～2.01（平均1.21）と良好であったが，冬季には0.36～0.65（平均0.51）と低い値を示した．

MCに関してはK社製及びG社製ともに温度による違いは特に見られなかった．GC法との比率をみるとK社製検知管は0.68～1.74（平均0.96）と良好であったが，G社製検知管は0.37～1.09（平均0.65）と測定値が全体的に

表1．調査対象とした検知管の概要

測定対象	メーカー	型　式	目盛りの範囲	測定範囲（mg／l）*
PCE	K社	135SA（高濃度用）	5～300	0.14～8.2
		135SB（低濃度用）	1～10	0.03～0.27
	G社	133M	5～100	0.1～6
MC	K社	160S	30～400	0.67～9.0
	G社	135L	20～200	1～14

*：カタログの記載値（水温20℃）

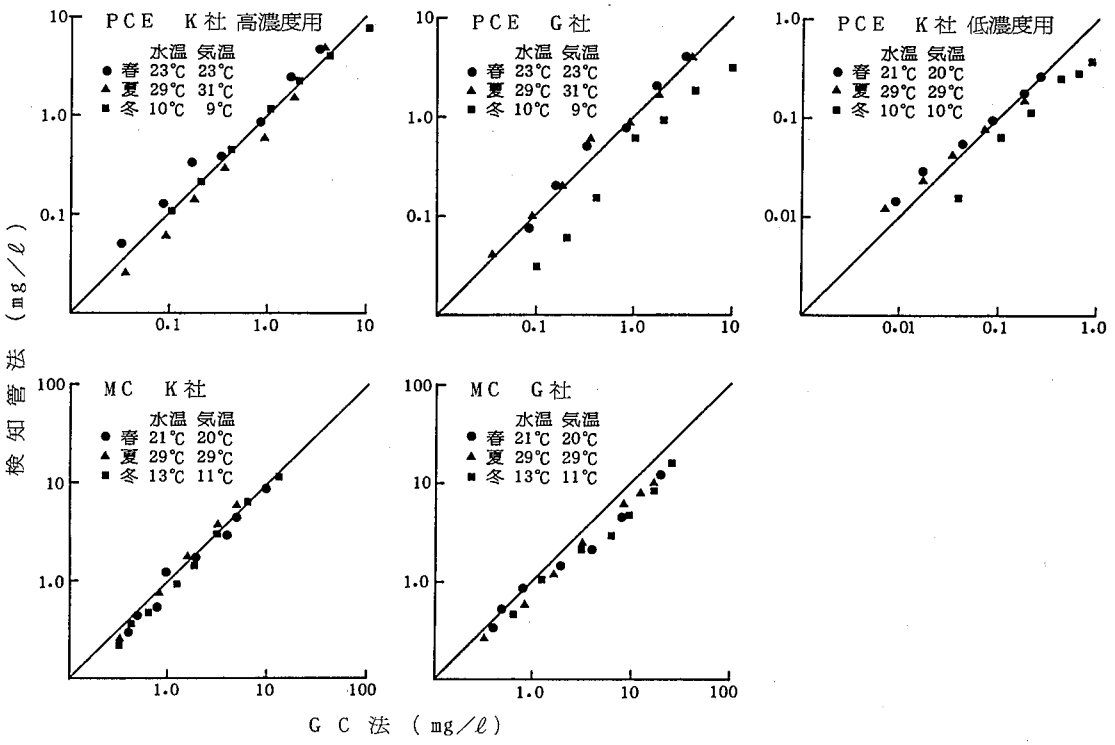


図1．検知管法に及ぼす測定時の水温と気温の影響

やや低い傾向を示した．

測定値に対する温度の影響度は検知管の種類によって異なったが，G社製PCE用及びK社製PCE低濃度用の2種類の検知管は低温下で明らかに低い値を示した．また，GC法との比較から，検知管の読み取りに際して注意すべきこととして，呈色層の先端が斜めになったものはその最上端で読み取ること，また，低濃度域でごく薄く呈色したものは十分な照明下で未使用の検知管を対象にして，かすかに呈色した部分まで読み取る必要がある等があげられる．

2．繰り返し精度

同一濃度の標準溶液を10回繰り返し測定した結果を表2．に示した．なお，標準溶液の濃度は管理目標値付近としたが，K社製PCE高濃度用検知管及びG社製PCE用検知管では，0.1mg／l付近での呈色域が検知管の最小目盛り付近になるため，K社製では0.28mg／l，G社製では0.50mg／lとした．

5種類の検知管はいずれも同程度のバラツキを示し，測定値の最高値は最低値の1.32～1.73倍の範囲であった．また，変動係数はPCEが10.1～12.4%，MCが15.9～

表2．検知管法の繰り返し精度

対象物質	濃度（mg／l）	検知管の種類	測定値（mg／l）		変動係数(%)
			範　囲	平均値	
PCE	0.281	K社製高濃度用	0.304～0.502	0.383	12.4
	0.500	G社製	0.50～0.70	0.580	10.1
	0.102	K社製低濃度用	0.103～0.138	0.125	10.5
MC	3.10	K社製	2.05～3.3	2.47	15.9
	2.72	G社製	1.49～2.59	1.92	17.3

水温：22℃，気温：22℃
n＝10

17.3%であった.

3．検知管の読み及び換算の個人差

検知管の呈色層の読み取り及び手作業による換算を3人でそれぞれ行い，その個人差を検討した．PCE検知管での結果を表3．に示した.

検知管の読み取りには明らかな個人差が認められたが，比較的高く読むかあるいは低く読むかは個人によって常に一定している傾向であった．しかし，その差はあまり大きなものではなく，K社製検知管では10目盛以上，G社製検知管では5目盛り以上の値を示す場合には，最大でも20%程度以内であった．検知管の読み取りにおける個人差はG社製検知管の方がK社製より小さい傾向を示した．これは，G社製の検知管は呈色層の先端が明瞭であるのに対して，K社製では呈色の色調が先端部で徐々に変化し，低濃度域では呈色が全体的に薄くなること，また，目盛が対数になっている等のために読み取りの誤差が大きくなりやすいと考えられる.

換算表を使用して，検知管の読みと水温から水中のPCE濃度を求める作業を手作業で行ったときの個人差を，計算機による換算値に対する手作業による換算値の割合(手作業／計算機)でみると，K社製では最低値の0.79を除くと0.88～1.19の範囲であった．また，G社製でも最高値の1.66を除くと0.83～1.2の範囲であった．G社製は2段階の読み替えが必要であるため，バラツキが大きいことが予想されたが今回の調査ではK社製とほとんど変らない成績を得た．しかし，2段階の換算は相当繁雑であり，数値の取り違え等の初歩的な誤りを犯す原因となりかねない．あらかじめK社製のような1段階の換算表を作製しておくと便利である.

K社製低濃度用及びMC用検知管についても同様に調査した結果，検知管の読み取り及び換算の個人差はここで述べたPCE検知管とほぼ同じ傾向であった.

以上のことから，検知管法は一定の条件下では良好な繰り返し精度を有している．しかし，GC法に対する検知管法による測定値の比率は，測定時の温度条件や検知管の種類別の特性を考慮すると，おおむね0.5～2.0の範囲にあった．すなわち，試料中の溶剤濃度は検知管による測定値の1／2から2倍の範囲内にあると考えられる．また，手作業による換算は繁雑であり相当の労力を要する．しかも，いかに精密に換算しても測定値の正確度を高めることにはならない．これらのことから，現場では詳細な換算は行わず，換算表に示された数値をそのまま用い，成績はその範囲で示すのが実際的であると考える.

4．検出限界

標準溶液による低濃度域でのPCE及びMCの測定例をそれぞれ表4．及び表5．に示した.

PCE及びMCのいずれも，2回の吸引によって得た値は1回の吸引で得た値よりも高く，GC法の値により近くなる傾向があった．特に，G社製MC用検知管は，1回の吸引で呈色が確認できないときでも，2回吸引することで確実に呈色することが多かった.

検出限界は検知管の種類及び温度条件で若干の差がみられ，PCEではG社製が冬季に低い値を示す難点があった他は，K社製高濃度用及びG社製ともに管理目標値の0.1mg／lまで測定が可能であった．すなわち，K社製高濃度用及びG社製ともに2回の吸引によっても呈色層が最小目盛りに達しない場合には，水中のPCE濃度は0.1mg／l以下程度と判断してさしつかえないと考える．また，MCの検出限界は管理目標値が3 mg／lであるのに対して，K社製では0.5mg／l，G社製では1 mg／l程度であった．これらのことから，1回の吸引で呈色が認められないか，あるいは呈色層が最小目盛りまで達しない時には必ず再度吸引し，呈色の有無の確認・読み取りを行う必要がある.

表3．PCE検知管の読み取り及び手作業による換算の個人差

水温 (℃)	濃度 (mg／l)	K社製高濃度用 検知管の読み	K社製高濃度用 換算値 (mg／l) 手作業(A)	K社製高濃度用 換算値 (mg／l) 計算機(B)	K社製高濃度用 (A)／(B)	G社製 検知管の読み	G社製 換算値 (mg／l) 手作業(A)	G社製 換算値 (mg／l) 計算機(B)	G社製 (A)／(B)
8	0.150	3～ 5	0.15～0.21	0.126～0.21	1.0 ～1.19	1～2	0.03～0.1	0.03～0.06	1.0 ～1.66
14	0.258	3～ 10	0.11～0.36	0.106～0.215	0.79～1.03	2～4	0.05～0.15	0.06～0.15	0.83～1.0
10	0.519	8～ 10	0.35～0.46	0.36 ～0.46	0.97～1.0	4～5	0.18～0.2	0.15～0.2	1.0 ～1.20
20	0.950	35～ 45	1.0 ～1.4	0.98 ～1.26	1.02～1.11	14～15	0.80～1.0	0.82～0.88	0.91～1.13
14	1.90	60～ 70	2.3 ～2.8	2.42 ～2.83	0.95～0.99	20～23	1.2 ～1.5	1.43～1.69	0.83～0.94
18	5.91	200～220	5.6 ～7.0	6.36 ～7.0	0.88～1.0	44～45	3.0 ～3.1	2.88～3.0	1.0 ～1.07

表4．PCE の検出限界

水温（℃）	気温（℃）	濃度（mg／l）	K社製高濃度用		G社製	
			検知管の読み	測定値(mg／l)	検知管の読み	測定値(mg／l)
10	9.5	0.206	5*	0.21	2−5	0.06−0.1
		0.103	ND−5**	ND−0.11	Tr−2	Tr−0.03
		0.041	ND−ND	ND−ND	ND−ND	ND−ND
23	22	0.115	3−10	0.077−0.125	3−5	0.1−0.1
		0.084	5	0.128	Tr−4	Tr−0.075
		0.0334	ND−4	ND−0.05	ND−Tr	ND−Tr
30	32	0.183	7	0.14	5	0.2
		0.091	3−8	0.061−0.074	3−5	0.1−0.1
		0.0365	2−3	0.041−0.031	ND−3	ND−0.05

ND：不検出，Tr：痕跡
＊：1回の吸引による結果
＊＊：2回の吸引による結果

表5．MC の検出限界

水温（℃）	気温（℃）	濃度（mg／l）	K社製高濃度用		G社製	
			検知管の読み	測定値(mg／l)	検知管の読み	測定値(mg／l)
12	11	1.84	45*	1.56	10−30	0.98−1.47
		1.22	30	1.01	ND−20	ND−0.98
		0.615	10−30**	0.336−0.504	ND−10	ND−0.44
19	21	1.55	70	1.49	10−30	0.679−1.18
		0.777	20−50	0.429−0.53	ND−25	ND−0.85
		0.388	10−28	0.214−0.301	ND−10	ND−0.339
29	29	1.62	100	1.58	20	1.02
		0.812	45	0.714	7−20	0.358−0.501
		0.324	15−40	0.226−0.269	ND−10	ND−0.256

ND：不検出，Tr：痕跡
＊：1回の吸引による結果
＊＊：2回の吸引による結果

低濃度試料の測定に際しては，実験器具からの汚染に留意する必要がある．特に，高濃度の試料を測定した後の振とう容器の洗浄は水で軽くゆすぐ程度では不十分である．洗剤を使用して十分洗浄するか，あるいは未使用の容器を用いる必要がある．また，測定場所周辺の空気中の溶剤濃度にも留意する必要がある．操業中のドライクリーニング所では屋内の PCE 濃度が50ppm を越えることもある[12]．このため，現場では通風の良い屋外で測定する等の十分な配慮が必要である．

5．妨害物質の検討

1）油分，洗剤及び残留塩素：検知管法で採用しているヘッドスペース法は測定値に対する油分の影響が指摘されている[13]．そこで，標準溶液に油分を0.1ml(試料の0.05％)から1ml(0.5％)添加し，検知管法に及ぼす影響を検討した．K社製高濃度用検知管，G社製検知管及びK社製低濃度用検知管での PCE 濃度はそれぞれ，0.56，1.0及び0.1mg／l とした．また，MC 濃度はK社製6.2mg／l，G社製5.4mg／l とした．

PCE 及び MC の測定値はK社製，G社製ともに油分の増加に反比例して低下した．PCE の測定においては，油分を0.05％添加した時の測定値は添加しない時の測定値の67～73％に低下した．さらに0.25％の添加では34～36％に，0.5％では19～22％にまで低下した．MC は PCE より影響は小さかったが，油分0.05％の添加では

82～84%，0.25%では61～65%，0.5%では47～49%に低下した．しかし，ドライクリーニング所排水中の油分は0.05%以下であったことから，実際上は特に問題とならないことがわかった．

洗剤及び残留塩素についても油分と同様に検討した．その結果，洗剤はABSとして5 mg／l以下，残留塩素は遊離残留塩素として5 mg／l以下ではK社製，G社製ともにPCE及びMCの測定値に影響を認めなかった．

これらのことから，測定容器の洗浄には手近かな洗剤や水道水を使用することができ，それらがある程度残存しても測定値に影響しないことがわかった．

2）他の塩素系有機溶剤：PCEの測定値に及ぼすMCの影響を図2．に示した．PCE濃度はK社製高濃度用検知管及びG社製検知管では0.96及び0.19mg／l，K社製低濃度用検知管では0.19及び0.096mg／lとし，それぞれに適宜MCを添加して測定した．

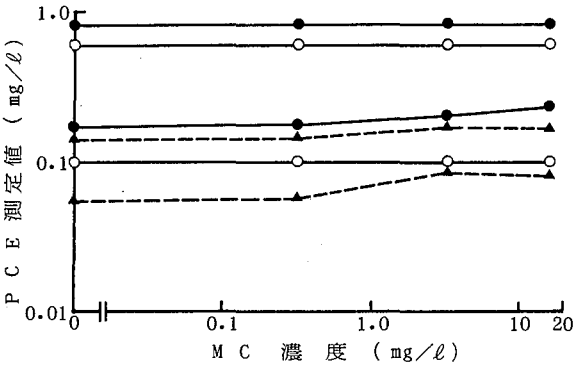


図2．PCEの測定値に及ぼすMCの影響
水温：20℃，気温：20℃
—●—：K社高濃度用，—○—：G社，
—▲—：K社低濃度用

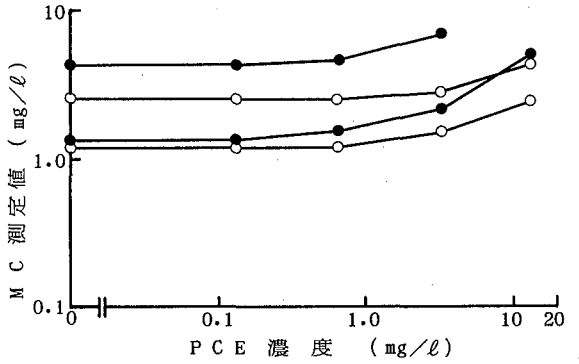


図3．MCの測定値に及ぼすPCEの影響
水温：23℃，気温：25℃
—●—：K社，—○—：G社

K社製高濃度用及びG社製のPCE検知管はともにMCを15.8mg／l添加してもその測定値はMCを添加しない時と全く同じであった．また，K社製低濃度用はMC濃度が3.16mg／lで0.03mg／l程度高くなったが，MCが15.8mg／lとなってもその増加量は同程度であった．

同様に，PCE濃度0.096mg／lの標準溶液を用いてTCEの影響を検討した．その結果，TECを添加しない時の測定値はK社製高濃度用検知管では0.14mg／l，G社製検知管では0.06mg／lであったが，TCE濃度を0.15mg／lとした時のPCEの測定値は，それぞれ0.41及び0.2mg／lとなり，TCE 3.8mg／l存在下では，それぞれ6.1及び2.1mg／lとなった．

MCの測定値に及ぼすPCEの影響を図3．に示した．標準溶液のMC濃度は3.0と0.67mg／lで行った．K社製及びG社製検知管ともにPCE 3.2mg／lの添加でMCの測定値は明らかな増加を示し，PCE 15mg／lの存在下ではPCEを添加しない時の測定値がK社製では1.32mg／lであったものが4.9mg／lとなり，G社製では1.19mg／lであったものが2.38mg／lとなった．

次に，MC濃度2.6mg／lの標準溶液を用いてTCEの影響を検討した．K社製及びG社製検知管のTCEを添加しない時の測定値はそれぞれ，1.5mg／l及び1.4mg／lであった．TCE 0.15mg／lの添加では測定値は全く変化しなかったが，TCE 0.75mg／lではそれぞれ，2.7及び2.1mg／lとなり，TCE 7.5mg／lではそれぞれ，6.6及び5.6mg／lとなった．

K社製及びG社製のPCE検知管はともにMCが15mg／l程度存在しても測定値に変化はなかった．しかし，MC検知管はPCE濃度が3 mg／l程度以上になると測定値が明らかに高くなった．また，TCEが存在する場合には，その濃度がPCE検知管では0.1mg／l程度，MC検知管では1 mg／l程度であっても大きく影響された．特に，測定の対象であるPCEあるいはMCの濃度が低い場合にその影響が顕著となった．

これらのことから，ドライクリーニング所排水のように，使用されている溶剤の種類が明かな試料では問題とならないが，河川水や土壌等，溶剤の種類が特定できない場合や多種類の溶剤が含まれている可能性のある試料への検知管法の適用には十分な配慮が必要である．

6．ドライクリーニング所排水への適用

ドライクリーニング所の排水について，検知管法及びGC法により測定した結果を図4．に示した．なお，PCEのK社製高濃度用検知管及びG社製検知管については水温11℃付近でも測定した．また，高濃度の試料は水で希釈して測定し，結果は希釈後の濃度で示した．

検知管法による測定値は5種類の検知管ともにGC法による測定値と高い相関を示し，相関係数は0.97～0.99の範囲であった．また，GC法との比率はPCEのK社製高濃度用検知管では0.59～1.69(平均1.05)で，温度による差は見られなかった．しかし，G社製検知管では0.37～1.16(平均0.76)の範囲であり，低温下で低い値を示す傾向があった．また，K社製低濃度用検知管では0.98～1.27(平均1.10)の範囲であった．

MCに関しても，K社製検知管とGC法による測定値の比率は0.57～1.22(平均1.01)の範囲であったのに対してG社製検知管のそれは0.51～0.98(平均0.77)とやや低い値を示す傾向があった．

これらの結果は，標準溶液を使用した場合と同じ傾向を示している．このことから，クリーニング所排水には検知管法に特に妨害となる物質は含まれていないと推察された．

以上のことから，現在市販されている簡易測定セットはそれぞれ，検知管の特性をふまえて使用すれば，クリーニング所排水を対象とする現場でのPCEおよびMCの簡易試験法として十分使用できるといえよう．

要　　約

水中の塩素系有機溶剤の簡易測定セットとして市販されている2社の製品について，標準溶液及びドライクリーニング所排水を用いてGC法と比較検討し，その実用性を検討した．

1）PCE及びMCの検知管法による測定値はGC法による測定値と高い相関を示し，相関関係は0.94～0.98の範囲であった．

2）検知管法は一定の測定条件下では比較的良好な再現性を示し，ドライクリーニング所排水の管理目標値に対して必要な検出限界を有していた．

3）正確度は検知管の種類及び測定時の温度条件によって異なったが，検知管による測定値はGC法による測定値のおおむね1／2から2倍の範囲にあると考えられる．

4）PCE及びMCの測定値は油分の増加とともに低

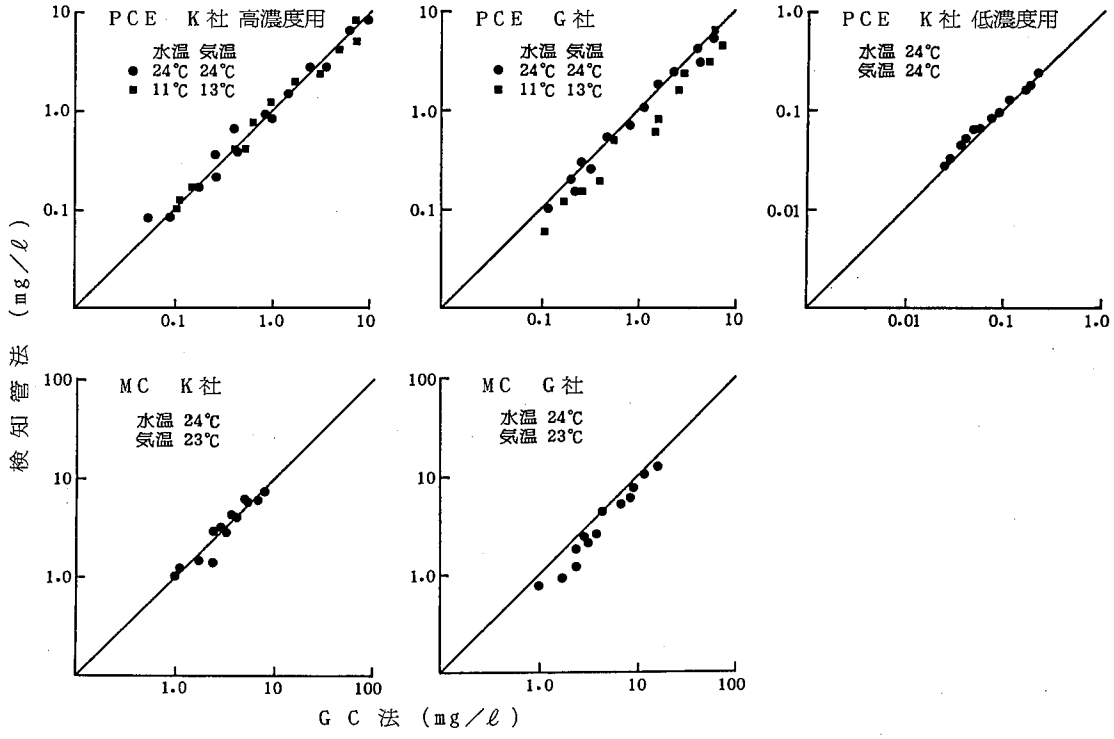


図4．検知管法及びGC法によるドライクリーニング所排水中のPCE及びMCの測定値の比較

下したが，洗剤及び残留塩素は妨害とならなかった．

5）PCE の測定では MC が15mg／l，MC の測定では PCE が 3 mg／l 程度存在しても測定値に大きな影響はなかった．しかし，TCE の存在下ではその濃度が PCE では0.1mg／l，MC では 1 mg／l 程度であっても PCE 及び MC の測定値に大きな影響を与えた．

6）ドライクリーニング所排水中の PCE 及び MC の測定に適用し，GC 法による測定値と比較検討した結果，標準溶液での測定結果と同じ傾向を示したことから，ドライクリーニング所排水中には検知管法を妨害する物質はないと考えられた．

調査した 2 社の測定セットはそれぞれ，検知管の種類によって性能に若干の相違はみられたが，簡易測定法としての基本的な性能は備えており，ドライクリーニング所排水を対象とする PCE 及び MC の簡易試験法として有効であると考える．

文　献

1）通商産業大臣官房調査統計部編：化学工業統計年報昭和63年版，1988，通省産業調査会，東京．
2）化学工業日報社：化学工業年鑑昭和63年版，1988．
3）厚生省通知：衛指第20号，昭和59年 8 月23日．
4）厚生省通知：衛指第127号，昭和62年 6 月16日．
5）総理府令：第19号，平成元年 4 月 3 日．
6）厚生省通知：環水第15号，昭和59年 2 月18日．
7）日本工業標準調査会：JIS K 0125用水・排水中の低分子量ハロゲン化水素試験方法，1987，日本規格協会，東京．
8）竹田一郎：分析化学，34，203-204，1985．
9）竹田一郎：分析化学，35，47-49，1986．
10）厚生省生活衛生局指導課監修：クリーニング業で使用するパークロロエチレン等の適正使用について，38-41，1987，日本クリーニング公害予防センター，東京．
11）通産省基礎産業局監修：トリクロロエチレン等適正利用マニュアルの解説，48-54，1986，クロロカーボン衛生協会，東京．
12）佐藤泰仁，多田宇宏，青木　実，小谷野彰，吉儀弘史：東京衛研年報，33，271-276，1982．
13）中室克彦：公害と対策，22，628-636，1986．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 40, 251-255, 1989

東京湾の環境汚染モニタリング調査（第7報）昭和62年度スズキおよびウミネコの調査結果について

大久保 智 子*, 瀬 戸 博*, 加 納 堯 子*

Survey of Chemical Pollutants in Biota from Tokyo Bay (VII) Residue Levels in Japanese Sea Bass and Gull in 1987

TOMOKO OHKUBO*, HIROSHI SETO* and TAKAKO KANOH*

The levels of 37 chemical pollutants in japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) and black-tailed gull (*Larus crassirostris* Vieillot) collected from Tokyo bay in 1987 were determined. Fifteen chemicals were detected in fish muscle and sixteen chemicals in gull muscle. The levels of PCB, dieldrin and DDTs in the fish and the gull in the year 1987 were the same as in the last year but the levels of chlordanes were the highest since 1981. It should be necessary to investigate carefully the actual conditions of environmental pollution by chlordanes.

Keywords：汚染 pollution, 有機塩素系化合物 chlorinated hydrocarbon, スズキ sea bass, ウミネコ 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(*Lateolabrax 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[1-6].

自然には分解しにくい，生物体内に濃縮され易い，並びに毒性が強いことから特定化学物質に指定され，現在使用禁止のPCB, ディルドリン，DDT類など，有機塩素系化合物の蓄積量は，年々減少傾向であったが，その減少速度もゆるやかになった.

昭和61年9月に特定化学物質に指定されたクロルデン類は，使用禁止後，今回が最初の調査となるが，今後の推移が注目されるところである.

化学物質は，その製造，使用，廃棄処分という一連の過程の中で環境を汚染する可能性を持っている．そこで，人間の健康への影響を未然に防ぐために，本調査の内容を充実し，継続的に監視していく必要がある.

本報告は，昭和62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62年9月千葉県富津沖で捕獲された25尾を重量の順に5尾ずつまとめ5検体とした．ウミネコは，昭和62年5月から7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5羽ずつまとめ5検体とした．鑑定および試料の調製は既報[2]と同様に行った．試料の概要はTable 1，2に示した.

分析方法 環境庁で定めた分析法[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，また一部の物質の年次推移をFig. 1，2，Table 4に示す．PCB濃度は，前年度まで漸減していたが，今年度は0.15 μg/gと上昇した．しかし，これは昨年度の検体の脂肪分が平均2.43%であったのに対し，本年度は3.92%と多く，脂肪換算すれば昨年度と同程度のレベルである．DDT類濃度はほぼ平年並みであった．61，62年度に極めて低濃度で検出されたβ-HCH, HCEは検出されなかった．塩素化ベンゼン類は，昭和59年度を境に減少していたが，本年度は増加し，検出率も

*東京都立衛生研究所環境保健部衛生研究科 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 = 5)

group No.	body weight (g) mean±SD	length* (cm) mean±SD	water (%)	fat (%)
1	497±21	30.6±1.0	70.0	3.56
2	456±4	29.5±0.6	72.2	4.21
3	432±12	29.0±0.4	71.1	4.38
4	390±11	28.2±0.5	73.1	3.45
5	343±19	26.8±0.9	72.0	3.99
mean	424	28.8	71.7	3.92

*: 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 = 5)

group No.	sex	body weight (g) mean±SD	wing length (cm) mean±SD	water (%)	fat (%)
1	male	620±48	35.9±0.8	66.5	5.93
2	male	637±45	35.3±1.1	65.9	6.47
3	male	583±20	33.8±2.1	66.5	5.73
4	male	630±15	34.8±1.8	65.3	6.34
5	female	494±20	34.4±0.9	61.1	8.18
mean		593	34.8	65.1	6.53

o-DCB 5／5，*m*-DCB 4／5，*p*-DCB 5／5，1，2，4-TrCB 5／5と高率であった．主にシロアリ駆除用に使用されていたクロルデン類は，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月に特定化学物質に指定され，事実上使用禁止となったが，その濃度は調査開始以来，最高の値を示した．*trans*, *cis*-クロルデン，*cis*-ノナクロルは昨年度に比べ2倍に，*trans*-ノナクロルは3.9倍にもなった(Table 4)．しかし，環境庁の調査では，その汚染濃度は全国的には昨年度に比べ同程度もしくは減少しており，東京湾における特徴的な汚染上昇であった[9]．今後も汚染実態を注意深く監視する必要がある．TBT は，昨年度と同程度の濃度であった．TBT は殺菌，防汚等の作用を有することから，船底塗料，漁網防汚剤等に使用されていたが，生物への影響が報告されたことから，漁協等は自主的に使用禁止措置をとっている．TBTO を除く TBT(8物質)については昭和63年4月に指定化学物質に指定されている．しかし，まだかなりの量の TBT が使用されていると考えられる．TBT は分解性も悪いことから，汚染の進行を防止するために一刻も早い全面的な使用禁止と環境汚染対策を推進し，汚染実態を監視する必要がある．

ウミネコについて ウミネコ胸筋の化学物質濃度を Table 3に，また一部の物質の年次推移を Fig. 3，4，Table 5に示す．昭和58年度以降 PCB，β-HCH, *p*, *p*′-DDE は減少傾向にあったが，これらの今年度の濃度レベルは昭和59年度のレベルに相当し，減少傾向が鈍くなった．クロルデン類は，調査開始後，年々その濃度が増加し，本年度は昨年度の約2倍であった．また，総クロルデンにおける各クロルデン類の構成比を見ると，*trans*-ノナクロルの割合は70%で，*cis*-ノナクロルを含めるとノナクロルは85%になる．これは，鳥類においては，ノナクロルがクロルデンに比べて代謝されにくいことを示している．HCB はほとんど変化がなかった．1，2，4-TrCB は減少傾向が見られる．TBT は今年度も検出されず，鳥類においては速やかに代謝されるものと考えられる．

ウミネコの検体No. 3は，他の4つの検体と比較して，次のような特徴がある．すなわち，PCB，ディルドリン，*trans*, *cis*-ノナクロル，オキシクロルデンの濃度が高く，逆に，*p*, *p*′-DDD はNo. 3のみ検出されず，また，体重はNo. 5の雌の次に軽かった．これは，今年度の場合，ウミネコは性別，採取日順に5羽ずつまとめ1つの検体として用いたが，No. 3は5羽とも7月14日に採取したウミネコであった．つまり，7月14日に採取したウミネコ

Table 3. Concentrations of Pollutants in Muscle Tissues of Sea Bass and Black-Tailed Gull.
(μg/g on wet weight basis)

compound	Sea Bass		Black-Tailed Gull	
	range	mean	range	mean
PCB*1	0.12−0.18	0.15	1.4−2.8	2.0
PCN*2	nd	nd	nd	nd
HCB	nd	nd	0.009−0.020	0.017
aldrin	nd	nd	nd	nd
dieldrin	0.002−0.003	0.002	0.013−0.031	0.021
endrin	nd	nd	nd	nd
o, p'−DDT	nd	nd	nd	nd
p, p'−DDT	0.001−0.002	0.001	nd	nd
o, p'−DDE	nd	nd	nd	nd
p, p'−DDE	0.009−0.013	0.011	0.23−0.32	0.29
o, p'−DDD	nd	nd	nd	nd
p, p'−DDD	0.003−0.005	0.004	nd−0.011	−
trans−chlordane	0.003−0.006	0.004	nd	nd
cis−chlordane	0.011−0.022	0.016	0.008−0.018	0.014
trans−nonachlor	0.031−0.050	0.039	0.16−0.47	0.32
cis−nonachlor	0.007−0.012	0.009	0.033−0.11	0.065
oxychlordane	0.001−0.002	0.002	0.030−0.079	0.055
heptachlor	nd	nd	nd	nd
HCE	nd	nd	0.007−0.010	0.009
α−HCH	nd	nd	nd	nd
β−HCH	nd	nd	0.034−0.053	0.042
γ−HCH	nd	nd	nd	nd
δ−HCH	nd	nd	nd	nd
o−DCB*1	0.01−0.02	0.02	nd−0.02	−
m−DCB*1	nd−0.02	−	nd−0.02	−
p−DCB*1	0.01−0.08	0.03	0.01−0.02	0.01
1,2,3−TrCB	nd	nd	nd	nd
1,2,4−TrCB	0.001−0.004	0.002	0.001−0.003	0.002
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−0.001	−
PeCB	nd	nd	nd	nd
DnBP*3	nd	nd	nd	nd
DEHP*3	nd	nd	nd	nd
TBP*1	nd	nd	nd	nd
TBT*4	0.13−0.16	0.15	nd	nd

*1 : nd<0.01, *2 : nd<0.02, *3 : nd<0.1, *4 : nd<0.05, others : nd<0.001

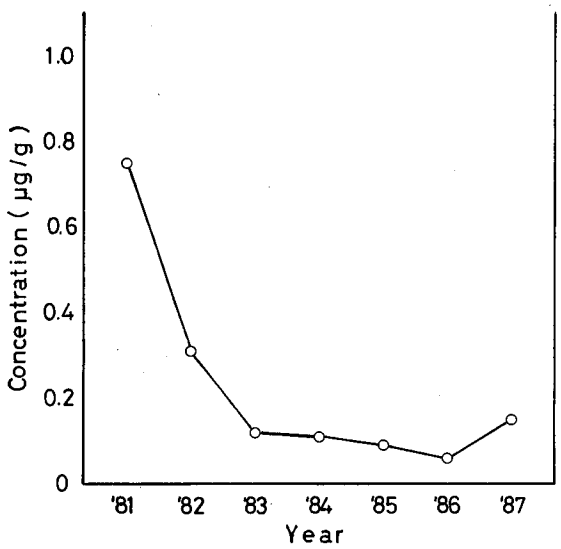


Fig. 1. Annual Change in Concentration of PCB in Sea Bass Collected from Tokyo Bay.

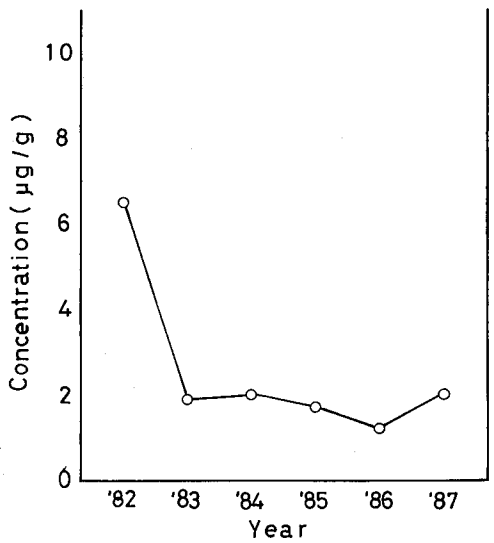


Fig. 3. Annual Change in Concentration of PCB in Black-Tailed Gull Collected from Tokyo Bay.

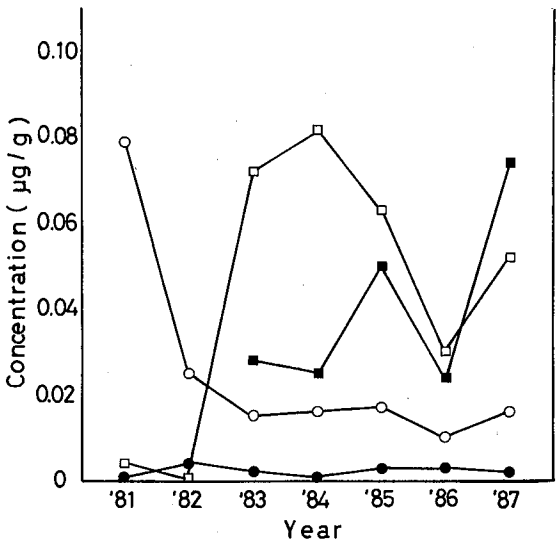


Fig. 2. Annual Changes in Concentrations of the Selected Chemical Pollutants in Sea Bass Collected from Tokyo Bay.
○ : total DDTs, ● : dieldrin,
□ : total chlorobenzenes (Cl= 2 ~ 5)
■ : total chlordanes

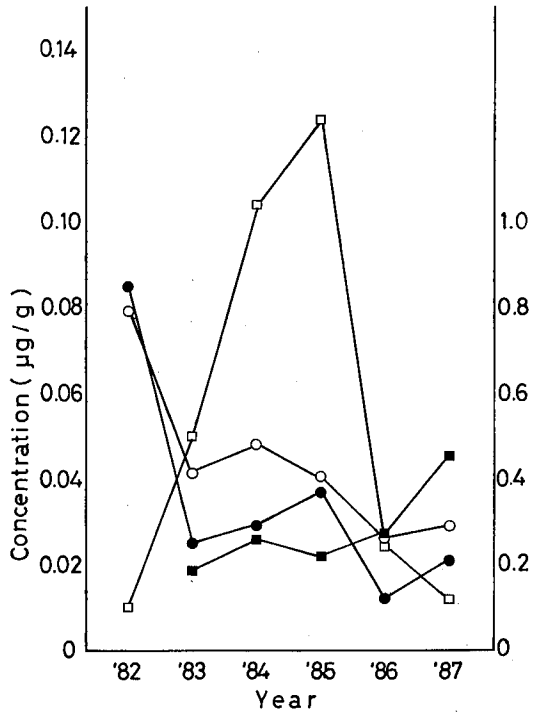


Fig. 4. Annual Changes in Concentrations of the Selected Chemical Pollutants in Black-Tailed Gull Collected from Tokyo Bay.
○ : total DDTs, ● : dieldrin,
□ : total chlorobenzenes (Cl= 2 ~ 5)
■ : total chlordanes

Table 4. Trends in Chlordanes Residues in Sea Bass Collected from Tokyo Bay.

(μg/g on wet weight basis)

compound	1983	1984	1985	1986	1987
trans−chlordane	0.003	0.003	0.005	0.002	0.004
cis−chlordane	0.007	0.007	0.015	0.007	0.016
trans−nonachlor	0.012	0.010	0.020	0.010	0.039
cis−nonachlor	0.004	0.004	0.006	0.004	0.009
oxychlordane	0.001	0.001	0.002	nd−0.002	0.002

Table 5. Trends in Chlordanes Residues in Black-Tailed Gull Collected from Tokyo Bay.

(μg/g on wet weight basis)

compound	1983	1984	1985	1986	1987
trans−chlordane	0.001	0.001	0.001	0.001	nd
cis−chlordane	0.013	0.008	0.016	0.013	0.014
trans−nonachlor	0.107	0.17	0.13	0.17	0.32
cis−nonachlor	0.029	0.041	0.038	0.050	0.065
oxychlordane	0.036	0.038	0.034	0.041	0.055

は，他の日に採取したウミネコとはまるで異なった暴露，汚染を受けた可能性がある．ウミネコは，スズキの様に一度に採取できず，今年度の場合，3カ月のずれがあった．採取地点が同一でも，ウミネコは数十～数百羽の集団で移動しており，その集団によってそれぞれ移動地点が異なるため，この様な差が出てしまうのではないかと考えられる．

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，加納堯子：東京衛研年報，34，260-263，1983.
2）瀬戸　博，加納堯子：東京衛研年報，35，316-320，1984.
3）瀬戸　博，加納堯子：東京衛研年報，36，300-303，1985.
4）瀬戸　博，加納堯子：東京衛研年報，37，331-335，1986.
5）瀬戸　博，加納堯子：東京衛研年報，38，286-289，1987.
6）瀬戸　博，加納堯子：東京衛研年報，39，255-258，1988.
7）環境庁編：生物モニタリング調査マニュアル，昭和62年5月.
8）東京都立衛生研究所：昭和62年度生物指標環境汚染調査報告書，1988.
9）環境庁編：化学物質と環境，No.14，1988.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 256-258, 1989

多摩川に生息するオイカワ中の残留クロルデンの年次推移

宮 崎 奉 之*, 橋 本 常 生*

Annual Trend of Chlordane Residues in Freshwater fish (pale chub, *Zacco platypus*) from the Tama River

TOMOYUKI MIYAZAKI* and TSUNEO HASHIMOTO*

Although, chlordane had been used for wood protection from termites in Japan, the use of chlordane has been banned in 1986. Then, to survy chlordane contamination in the environment, freshwater fish (pale chub, *Zacco platypus*) as a biological indicator were collected at Noborito of the Tama River. Chlordane residues were detected in all samples, and the mean levels gradually decreased since 1985. In the freshwater fish at this sampling station during 1986 and 1988, the half-life period of total chlordane calculated by the least-squares method was estimated to be 4.3 years.

Keywords：クロルデン chlordane, 多摩川 Tama river, 淡水魚 freshwater fish, 年次推移 annual trend

緒　　言

我が国において，クロルデンはシロアリ駆除剤として用いられていた[1]が，著者らが東京湾に生息する魚介類からクロルデンを検出し，その汚染状況を報告[2,3,4,5]して以来，全国的にクロルデンによる汚染が問題になった．環境庁はクロルデンを1986年9月11日に「化学物質の審査及び製造などの規制に関する法律」(以下化審法と略す)に基ずく「第一種特定化学物質」に指定し，その製造，輸入及び使用を禁止した．しかし，クロルデンは分解されにくい有機塩素化合物であるため，環境中から急速に消滅するとは考えられない．そこで，クロルデンが禁止された後，どのような減少パターンを示すかを指標生物を用いて調査することとした．指標生物として，淡水魚のオイカワ(*Zacco platypus*)を用い，採取場所は多摩川水系の登戸で，1985年から1988年までの4年間について測定した．

材料及び方法

1．試　料

分析に供したオイカワは1985年から1988年(6月～8月)の間，多摩川の登戸付近で採取したものである．試料は年度毎に区分し，体長約10cm(推定1年未満)のものを抽出し，魚体全体を使用して3回繰り返し測定した．

2．試薬及び標準品

有機溶媒(ヘキサン，ジエチルエーテル，ジクロロメタン，アセトン，石油エーテル)及び無水硫酸ナトリウムはいずれも残留農薬分析用，シリカゲル：キーゼルゲル60(メルク社，Art 7734)を450℃で3時間加熱，放冷後，水を加え(10%)12時間放置後，使用した．活性フロリジル：フロルジル PR(Floridin Co.製，60～100mesh)を120℃で一夜(15時間)活性化し，1時間放冷した後，使用した．クロルデン類の標準品は既報[6]に準じた．

3．クロルデン類の分析

1)抽出：細切した試料(20g)にアセトン25ml，ヘキサン50mlを加えてホモジナイズし，3000rpmで10分間遠心分離し，抽出液を得た．再度，アセトン20ml，ヘキサン50mlで抽出し，得られた抽出液を合わせ，2%硫酸ナトリウム溶液30mlで洗浄した後，無水硫酸ナトリウムで脱水し，減圧下濃縮乾固した．

2)シリカゲルドライカラムクロマトグラフィー：15gのシリカゲルを乾式充填して作成したカラム(内径1.5cm)に，上記の残留物を少量のジクロロメタン・石油エーテル(20：80)で溶解して負荷した．さらに同混液で溶出して，計130mlを分取，濃縮してヘキサンで約2mlとした．

*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

3)分画：活性フロリジル10gをヘキサンで湿式充填し，そのベット上に硫酸ナトリウム3gをのせてカラム(内径1.2cm)を作成した．このカラムに上記濃縮液を負荷し，合計60mlのヘキサンで溶出した(第一分画：α－，β－，γ－chlordene, *trans*-nonachlor, compound C, K, 6を含む)．次に，4％エーテル・ヘキサン80mlで溶出した(第二分画：*trans*－, *cis*-chlordane, *cis*-nonachlor, oxychlordane, compound 1, 2, 7, 8を含む，なお，compound 5, 7は第一及び第二分画の両方に溶出した)．続いて，80mlの15％エーテル・ヘキサンで溶出した(第三分画：heptachlor epoxideを含む)．それぞれの分画を濃縮し，ヘキサンで2mlに合わせ，ガスクロマトグラフィーの測定溶液とした．

4．装置及び測定条件

1)ガスクロマトグラフ：Hewlett Packard 5890 A(電子捕獲型検出器付)にオートインジェクターHP-7673 Aを装着した．カラムはウルトラ#1(Cross-linked methylsilicone, 膜厚0.33μm, 0.20mm i. d.×25m, Hewlett Packard社製)を用いた．

2)測定条件：注入口温度250℃，検出器温度300℃，カラム温度60℃(1 min)～20℃／min～200℃(1 min)～5℃／min～250℃(15min)．注入量：1μl(スプリットレス法)．キャリヤーガスにヘリウム(流速1ml／min)，メイクアップガスに窒素(流速40ml／min)を用いた．
定量は絶対検量線法により行った．総クロルデンはα－，β－，γ－chlordene, *trans*－, *cis*-nonachlor, *trans*－, *cis*-chlordane, compound C, K, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, oxychlordaneの合計濃度値である．

結果及び考察

1．クロルデン類の添加回収実験

脂肪分の多い試料中の有機塩素系農薬やクロルデン類の分析法として，その脂肪分を除去する操作として主にアセトニトリル／ヘキサン分配が用いられてきた[7]．最近，食肉中の農薬の分析で脂肪の除去操作としてシリカゲルドライカラム法[8,9]が報告されてることから，本操作法を用い，さらにこれまでパックドカラムを用いて測定したものを，分離の良好なキャピラリーカラムを用いて測定することを検討した．

材料及び方法の項の分析操作に準じて，アサリを用いてクロルデン類の回収実験を試みた．本来はオイカワを用いるべきであったがクロルデン濃度の低いオイカワの試料が手元にないことから，クロルデン濃度の極めて低いアサリを用いた．クロルデン類各10ngをアサリ20gに添加した時の回収率をTable 1に示す．クロルデン類の平均の回収率は82.6～114.6％であり，標準偏差は最大19.3であった．しかし，アサリ中の各クロルデン類の添加濃度として0.5ppbと極めて低いことから，概ね良好な結果と考えられた．そこで，本分析法によりクロルデン類を測定することとした．

2．オイカワにおけるクロルデンの年次推移

試料は，多摩川の登戸付近で1985年から1988に，毎年6月から8月の間に採取したオイカワ(淡水魚)を用いた．オイカワはクロルデン類を魚体中に蓄積し，その地点の汚染を反映[4]する．そして，この多摩川水系に広く分布しており，採取も比較的容易なこと．登戸は多摩川の中流域にありこれまでの調査から，そこに生息する魚中のクロルデン濃度は高い地点[4]であるところから，それぞれ設定した．

Table 1. Recovery of chlordanes from short-necked clam

Compound	Recovery(%)*1	C.V.	Compound	Recovery(%)*1	C.V.
α－chlordene	96.3	4.6	*trans*-chlordane	103.4	12.5
β－chlordene	106.2	4.5	*cis*-chlordane	114.6	15.2
γ－chlordene	82.6	1.8	*trans*-nonachlor	100.9	2.0
Compound C	105.6	3.3	*cis*-nonachlor	114.6	15.2
Compound K	104.6	19.3	oxychlordane	104.1	3.4
Compound 1	101.1	8.2	Compound 6	108.3	9.4
Compound 2	96.8	3.9	Compound 7	100.7	13.0
Compound 3	112.8	11.0	Compound 8	93.7	6.6
Compound 5	112.8	9.4			

compounds were spiked at the levels of 0.5ng/g
*1 Mean of 3 experiments

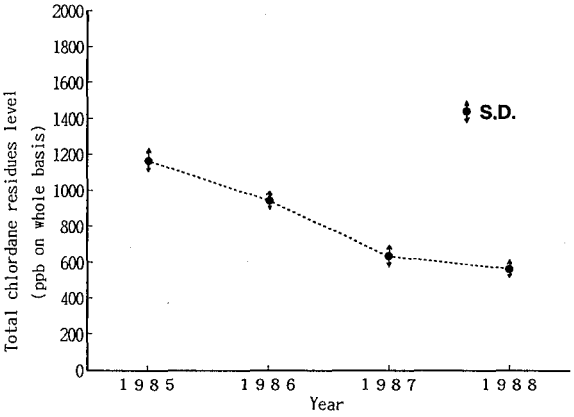


Fig. 1. Annual Trend of Chlordane Residues in Freshwater fish from the Tama River

Fig. 1にオイカワ中の総クロルデン類濃度の年次推移を示す．平均クロルデン濃度は1985年に1170ppb，1986年に948ppb，1987年に639ppb，1988年に572ppbと減少した．1986年にクロルデンは「化審法」により使用禁止になり，それ以降新たな環境中への投入はなくなったものと考えられるが，このように，1987年以降もクロルデンは依然検出された．このデータから1986年から1988年の間における半減期を最小自乗法により試算した．クロルデン濃度及び年度とも両対数の方が相関係数($r=0.987$)が高く，これによると，半減期は4.3年と算出された．この半減期はあくまでもこの環境における半減期であり，また年数，試料数も少ないため，大きな誤差を含んでいることが推定される．しかしながら，クロルデンの環境中での残留性の高さを証明するものである．この点からも，さらに長期的なモニタリング調査が必要である．

オイカワ中のクロルデン類の残留成分量の比率は既報[10]と極めて類似し，*trans*-nonachlor, *trans*-, *cis*-chlordane, compound 5などの化合物の割合が高く，各年度毎による，残留成分のパターンの違いは余り認められなかった．

謝辞：試料の収集をいただいた衛生局食品監視課沢田明彦氏及び実験に協力戴いた麻布大学環境保健学部環境保健学科石橋幹夫氏に感謝致します．

文　献

1) 廣瀬忠爾：日本農薬学会誌，2，187-200，1977.
2) Miyazaki, T., Akiyama, K., Kaneko, S., Horii, S., and Yamagishi, T.：*Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 23, 631-635, 1979.
3) Miyazaki, T., Akiyama, K., Kaneko, S., Horii, S., and Yamagishi, T.：*Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 24, 1-8, 1980.
4) 宮崎奉之，秋山和幸，金子誠二，堀井昭三，山岸達典，村上　一：東京衛研年報，31-1，161-165，1980.
5) Yamagishi, T., Miyazaki, T., Akiyama, K., Kaneko, S., Horii, S.：*J. Food Hyg. Soc. Japan* 22(4), 270-278, 1981.
6) 宮崎奉之，山岸達典，松本昌雄：食衛誌，26(4)，371-379，1985.
7) FDA：Pesticide Analytical Manual, 1968.
8) Steinwandter, H.：*Fresenius Z. Anal. Chem.* 312, 342-345, 1982.
9) 佐々木久美子，鈴木隆之，斎藤行生：食衛誌，29(3)，205-209，1987.
10) 宮崎奉之，山岸達典，松本昌雄：食衛誌，27(1)，49-58，1986.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 259-263, 1989

商業ビルディング床面のダニ調査

吉川　翠*

Survey of Mite on Floor in Atomosphere-controlled Buildings

MIDORI YOSHIKAWA*

Mite kinds and numbers were investigated on carpeted and Poly-vinyl Chloride (PVC) -tiled floors in buildings where the temperature and humidity had been maintained at 24-26℃ and 30-60% R.H. for one year. Five areas selected as test sites : carpeted and PVC-tiled floors of offices, a PVC-tiled passage way, carpeted or PVC–tiled floors of machine rooms and ladies' dressing rooms. The dust which was collected was weighed and then the mites were extracted by a floating-centrifuge method using saturated sodium chloride. Mites were classified by family.

The dust-weights ranged from 0.01-1.55g／m² and averaged 0.47g／m² on the carpeted floor and 0.11g／m² on PVC-tile. The average number of mites collected from the carpeted floor was 20.5／m² and 4.9／m² from PVC. There was no significant difference between the mite numbers on the carpeted floor and the PVC. However, there was significant difference between mite numbers on the floor of the dressing rooms and on the passage way since mites might be dropped when employees changed their cloths, and dandruff and cloth fibers might fall when they combed their hair. This fiberous dust containing dandruff would give the mites places to hide as well as food and sometimes moisture absorbed from the air when humidity was higher than usual in the buildings.

Pyroglyphid mites accounted for 89.9% of the test mites, followed by acarids 5.4%, ascids 1.5% and cheyletids 0.6%. Among the five tested areas, pyroglyphids were found mainly in the ladies' dressing rooms where they were 93.7% of the total. Pyroglyphids also accounted for 93.8% of the mites collected from the carpeted floors and 79.7% from PVC-tiled floors.

Keywords：チリダニ Pyroglyphidae, 相対湿度 relative humidity, 餌 food, 塵埃 house dust, 潜れる場所 place to hide

緒　言

家屋内生息性ダニ類の繁殖条件は，温度20～30℃と湿度60%R.H. 以上が必要であり[1,2]，餌としての塵中有機成分(フケ・アカ・カビなど)が存在し[4,5]，人による殺ダニや除去行動を回避しうる場所が存在すること[6,7]が報告されている．

上記3条件のうち，餌としての塵と，繁殖場所としての畳，絨毯，寝具が存在する一般家屋内では，家屋内が高温多湿になる7～9月に，床材表面のダニ数がピークになることが多く[8,9]，また，高温多湿の7～9月の調査では，人の駆除行動を回避できる「潜り込める場所」，すなわち畳・絨毯・寝具類で多数検出されるが，潜り込めない板材では，夏期も冬期もダニ数はあまり変化しない[10-12]．さらに，高温多湿の条件と繁殖場所が揃った築後数年経た家屋内では，人の使用頻度の高い場所，例えば部屋の中央部分，あるいは使用頻度の高い部屋，例えば居間や寝室などにダニ数が多くなる[13,14]．

一方，年間を通して温湿度をコントロールされている商業ビル内では，塵埃中に有機成分も潜って繁殖する絨毯も存在するが，ダニに至適な温湿度が制限される．こ

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生科　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

のような環境下での家屋内生息性ダニ類調査は報告が少なく[15]，結論ずけるには至らないため，東京都内の商業ビルで夏期にダニ調査を行った．

この調査の目的は：1）絨毯とPVC（Poly-vinyl Chloride）タイルの床材別ダニ相とダニ数および，2）部屋の使用目的別にダニ相とダニ数を比較する．これらの結果から，室内温湿度を制限するとダニ相・ダニ数はどのように変化するのかを，一般家屋と比べて考察する．

方　法

1988年7月に，東京都内の10箇所のビル（A～F）で，床面のダニを調べた．10ビルはいずれも5000m²以上の床面積を持つ自社ビルで，築後5年以上を経ている．これらのビルはいずれも年間を通して空調されており，温度24～26℃で，湿度30～60％R.H.に保たれていた．

ダニ調査は，各ビルの部屋を床材別・使用目的別に5箇所に分けた．すなわち，床面に絨毯を敷き込んだ事務室，PVCタイルの事務室，PVCタイルの廊下，PVCタイルあるいは絨毯敷きの女子更衣室である．

これらの部屋の中央部分1m²をビニールテープで囲み，200Wの掃除機で3分間ずつ和紙袋内に塵を集めた[16]．塵量を計量後，飽和食塩水懸濁遠沈法にて塵からダニを抽出した[17]．

結　果

各ビル各部屋の1m²当りの塵埃量は，0.01～1.57gで，平均0.25gとなり，絨毯1m²で平均0.47g，PVCタイルで平均0.11gであった．

各ビル各部屋の1m²当りのダニ数は0～241匹で，平均すると10.8匹であった（表1）．

床材別でのダニ数は，PVCタイルで平均4.9匹／m²，絨毯で平均20.5匹／m²となった．絨毯は，Fビルのダニ数のみ極めて多かった．PVCタイルと絨毯のダニ数を平均値の差の検定で比べると，有意差はみられなかった．

部屋の使用目的別のダニ数は，廊下1.8匹，PVCタイルの事務室3.3匹，絨毯敷き事務室5.0匹，OA機器室6.0匹，女子更衣室38.1匹であった（表1）．廊下と女子更衣室1m²当りのダニ数は，平均値の差の検定で有意差がみられ，女子更衣室のダニ数が有意に多かった．

ダニ科別ではチリダニ科 Pyroglyphidae が一番多く487匹（構成比率89.9％）で，コナダニ科 Acaridae 29匹（5.4％），マヨイダニ科 Ascidae（1.5％），ツメダニ科 Cheyletidae 3匹（0.6％）であった（表2）．

部屋の使用目的別に分けたダニ相では，いずれの場所でもチリダニ占有率が60％を越えていた（表3）．女子更衣室のチリダニ占有率が一番高く93.7％を示し，OA機器室88.3％，事務室（絨毯）86.0％，事務室（PVCタイル）69.7％，廊下61.1％となった．

床材別で比べると，絨毯でのチリダニ占有率は93.8％となり，PVCタイル79.7％よりも多かった（表4）．

表1．10ビルの床面1m²当りの塵埃量とダニ数

調査室	ビル名 / 塵埃量(g)，ダニ数(匹)	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	合計
事務室	塵埃量	0.02	0.04	0.19	0.05	0.13	0.05	0.02	0.02	0.14	0.03	0.69
(PVCタイル)	ダニ数	5	1	12	2	1	2	1	4	1	4	33
事務室	塵埃量	0.44	0.40	0.15	1.02	0.41	0.22	0.14	0.15	0.39	0.09	3.41
(絨毯)	ダニ数	2	6	3	3	7	13	4	3	2	7	50
廊下	塵埃量	0.56	0.01	0.07	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.76
(PVCタイル)	ダニ数	0	4	1	2	2	2	1	3	1	2	18
OA機器室	塵埃量	0.10	㋭0.84	㋭0.71	0.03	㋭0.38	㋭0.26	0.04	㋭0.33	0.02	㋭0.10	2.81
(PVCタイル)	ダニ数	2	3	6	0	19	19	4	1	1	5	60
女子更衣室	塵埃量	㋭1.04	0.83	0.15	0.06	0.30	㋭1.57	㋭0.36	0.34	0.05	0.02	4.72
(PVCタイル)	ダニ数	33	30	15	7	8	241	12	25	7	3	381
合計	塵埃量	2.16	2.12	1.27	1.18	1.24	2.12	0.57	0.85	0.62	0.26	12.39
	ダニ数	42	44	37	14	37	277	22	36	12	21	542

注）1）㋭：絨毯
2）空調による温湿度調整は年間を通して，温度24～26℃，湿度30～60％R.H.に保たれている．
3）塵埃は1m²当り3分間吸引して集めた．

表2．10箇所のビルの床面1㎡当りのダニ相

ビル名 / ダニ(科名)	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	合計	構成比率(%)
マヨイダニ	2	1			1		1	2		1	8	1.5
ホコリダニ		1	1			2		1			5	0.9
ツメダニ	1							1	1		3	0.5
ヒメハダニ						2	1			1	4	0.7
マルニクダニ										1	1	0.2
コナダニ	4	2		3	4	3	4	6	1	2	29	5.4
チリダニ	35	39	36	11	31	268	16	26	10	15	487	89.9
イエササラダニ						2				1	3	0.5
そ の 他		1			1						2	0.4
合 計	42	44	37	14	37	277	22	36	12	21	542	100

表3．部屋の使用目的別にみたダニ相

調査場所 / ダニ(科名)	事務室(絨毯)	事務室(PVCタイル)	廊 下	O A 機器室	女 子 更衣室	合 計
チリダニ	43	23	11	53	357	487
コナダニ	5	9	5	3	7	29
そ の 他	2	1	2	4	17	26
合 計	50	33	18	60	381	542
チリダニ占有率(%)	86.0	69.7	61.1	88.3	93.7	89.9

表4．床材別のダニ相

床 材 / ダニ(科名)	絨 毯	PVCタイル	合 計
チリダニ	365	122	487
コナダニ	10	19	29
そ の 他	14	12	26
合 計	389	153	542
チリダニ占有率(%)	93.8	79.7	89.9

考 察

商業ビル内の年内温湿度を，ダニ数が多く検出されたA，Fビルと，やや少ないJビルで確認すると，3ビルとも温度は23～30℃の範囲でありダニの繁殖には至適温度であったが，湿度は34～64%R.H.で，夏期にAとFビルで60%R.H.を越える以外は，ほとんどの期間は55%R.H.に保たれていた(図1)．家屋内生息性ダニ類が繁殖するには，商業ビル内の湿度は低すぎた．

一般家屋内では，絨毯表面1㎡当りのダニ数は500～10000匹で，板表面1㎡のダニ数10～100匹と比べると，絨毯表面のダニ数は有意に多い[6,9,10,12,17,18]．しかし年間湿度がいずれの季節においても55%R.H.以下に保たれている商業ビル内では，絨毯1㎡当り平均20.5匹に対しPVCタイル1㎡平均4.9匹となり，有意差はみられなかった(表1)．この理由として，絨毯の内部まで空調がゆきとどき，家屋内生息性ダニ類の繁殖に影響を与えたからと考えられた．ただし，チリダニ科占有率では絨毯で多くPVCタイルで少なかったが，清掃の容易度による差とも考えられた(表4)．

今回の調査は7月に行なわれており，前述のように一般家屋では7-9月に畳や絨毯で多数検出されている[8-10,12-14,16-17]．また，餌となるべき塵埃量は絨毯1㎡平均0.47g，PVCタイルで平均0.11g捕集されており，一般家屋での1㎡当りの絨毯表面0.19g(新しい絨毯での平均)～7.46g(古い絨毯)の範囲であるし，一般家屋の板表面でも1㎡当り0.05～1.50gで，PVCタイルもこの範囲である[16-20]．これらから，繁殖3条件の餌としての

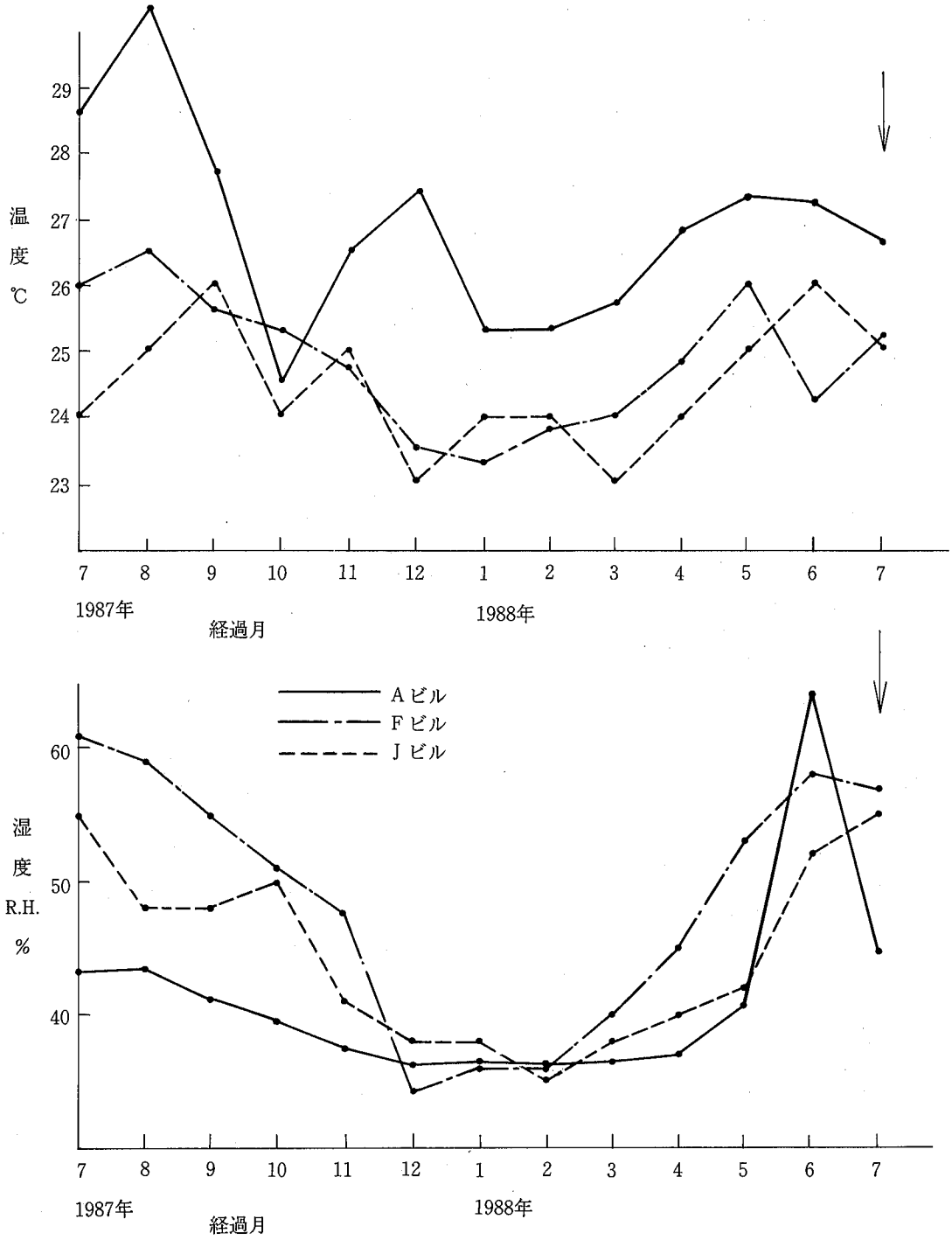


図1．A，F，Jビルの月別平均温湿度
（矢印はダニ調査時点）

塵埃も，潜って繁殖できる絨毯も揃い，また，季節的には至適温湿度を提供できる7月の調査でも，ダニが生息する室内の湿度を60%R.H.以下に保つと繁殖できず，商業ビル内でのダニ数は少ないという結果になった．

部屋の使用目的別で比べると，女子更衣室でのチリダニ科占有率は93.7%で，廊下61.1%より高かった(表3)．女子更衣室での床材が10箇所中6箇所でPVCタイルであったにもかかわらず，ダニ数が他室より多かったし，廊下に比べ有意に多かった(表1)．この理由として，①女子更衣室では女子が衣服を替えるので，衣服に付着したダニが落ちることもある[21]，②床面に落ちた布地繊維は，ビル内湿度がやや高い時に吸湿し，一時的にでも，ダニに潜れる場所と(PVCタイルの場合)湿度を提供しうるし，繊維質を含んだ培地でチリダニを飼育すると繊維質を含まない培地より早く繁殖するとの報告もある[22]，③女子更衣室で頭髪をすく時に，頭髪やフケが床面に落ち，チリダニの餌になる，などが考えられる．女子更衣室は，床材の種類にかかわらず，一時的に生息環境を提供するのであろうと考えられ，これは学校内でのダニ調査で裁縫室にダニ数特にチリダニ数が多いことと共通すると思われた[23]．

謝辞　調査の機会を与えて下さった社団法人東京ビルメンテメンス協会ならびに同協会清掃管理委員会の方々に感謝致します．

文　献

1) Wharton, G. W.：J. Med. Entomol., 12, 577-621, 1976.
2) 脇　誠治，松本克彦：衛生動物，23, 159-163, 1973.
3) Bronswijk, van J.E.M.H. & Sinha, R.N.：Environ. Entomol., 2, 142-145, 1973.
4) Samson, R.A. & Lustgraaf, B.v.d.：Mycopathologia, 64, 13-16, 1978.
5) Lustgraat, B.v.d.：Recent Advances in Acarology VolⅡ, Acad. Press, New York, 1979.
6) 吉川　翠：環境管理技術，3，4-9，1985.
7) Bronswijk, van J.E.M.H.：Recent Advances in Acarology VolⅡ, Acad. Press, New York, 1979.
8) Yoshikawa, M., Hanaoka, K. & Yamada, Y.：Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H., 33, 299-306, 1982.
9) 吉田政弘：環境管理技術，3，9-26，1985.
10) SIC Vポート：データ・シリーズ44，生活科学情報センター，1986.
11) Arlian, L.G., Bernstein, I.L. & Gallagher, J.S.：J. Allergy Clin. Immunol., 69, 527-532, 1982.
12) 一瀬直美，松田良夫：空気清浄，23，9-27，1985.
13) 吉川　翠，芦沢　達，山田雅士：住まいQ&Aダニ・カビ・結露，井上書院，1989.
14) 村上周三，入江建久，吉川　翠他：高層住宅での環境調査，文部省報告，1989.
15) 伊藤秀子，須藤千春，内川公人：名古屋市衛研年報，26, 68-73, 1974.
16) Yoshikawa, M.：Jpn. J. Public Health, 28, 141-150, 1981.
17) 吉川　翠：ダニと駆除(佐々学編著)，日環センター，川崎，1984.
18) 吉川　翠，菊田　隆：建築保全，36, 43-46, 1985.
19) 東京ビルメンテナンス協会清掃委員会：ビルディング内の塵埃量とダニ・昆虫の調査報告書，東京ビルメンテナンス協会，1988.
20) 森谷清樹：生活と環境，30, 75-85, 1985.
21) 大島司郎：衛生動物学の進歩(佐々学，青木淳一編)，学術書出版会，東京，1971.
22) George-Gridelet, D de Saint：Acarologia, XXVⅢ, 345-353, 1987.
23) 大島司郎：衛生動物，15, 233-244, 1964.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 264-270, 1989

東京都区部における部位別がん死亡率と環境的要因の統計解析

牧 野 国 義*, 稲 葉 裕**

Statistical Analyses of Cancer Mortality for Selected Sites and Environmental Factors in The Ward-area of Tokyo

KUNIYOSHI MAKINO* and YUTAKA INABA**

This paper describes the statistical association between the standard mortality ratio (SMR) of cancer from selected sites and environmental factors during five periods of 1958 to 1984 in the ward-area of Tokyo as a sequel to the previous report which mentioned the trends of the SMR and the geographical distribution. Sulfuric dioxide, an index of air pollutants, showed higher positive correlation with SMR for lung cancer after ten years of exposure to high levels. On the other hand, environmental factors such as low income, medical care aid and rate of skilled laborers correlated closely with SMR for stomach cancer in every period. Furthermore, some close associations were found between SMR for lung or breast cancer and population ratio of age 65 and more or population density in day time and between SMR for stomach or breast cancer and the number of hospitals and clinics. Time dependency of the relative situation among these variables was not observed except for SMRs for lung and breast cancer during the study periods. In addition, adequate estimates of SMRs for stomach and lung cancer were obtained by using the optimal multiple regression equations in each period. These explanatory variables were selected from among the factors related to risk factors for stomach or lung cancer. As the result, the combination of the selected factors for lung cancer changed depending in the periods.

Keywords：cancer, mortality, SMR, environmental factor, correlation

はじめに

がんについての記述疫学では，がんによる死亡が地域により，あるいは年次により，差または変化が生じているか否か，また，どのような原因で差や変化を生ずるかを究明することが重要である．前者について筆者らは，東京都区部においての部位別がん死亡率の経年変化や地理的分布を既に報告した[1]．後者についてその原因となる危険因子については部位毎にいくつか知られているが，がんによる実際の死亡の要因に関しては未だ不明な部分が少なくない．一方，発がんしても発症，進行の過程での加療によって全快することもあり，近年には医療技術などの進歩により治癒したがん患者の数が増加している[2]．したがって，死亡要因を地理的分布により統計学的に検討する場合，危険因子だけでなく交路因子をも考慮する必要がある．本報では危険因子や交路因子となり得るいくつかの環境的要因について，東京都区部の部位別がん死亡率との関連性を統計学的手法を用いて検討した．

方　法

1．指　標

1958年から1984年までの東京衛生年報に掲載された前報[1]同様の東京都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1967年から，食道と膵臓の掲載は1973年から)．上記死亡について，まず，各年の東京

*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

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，5期(最初7年，以後5年毎)に区分した．

次に，環境的要因(以下要因と略記する)に関する指標(以下括弧内は略称)として，まず，肺がん死亡への大気汚染の影響を考慮して，この第2期に相当する1966年から1970年の SO_2 を選択した(東京の SO_2 濃度は1966年から1970年頃までが特に高く，以後急速に減少した)．さらに，各期毎に，65才以上人口割合(65～才人口比)，昼間人口密度，人口1人当りの1人世帯数(1人世帯)，男の完全失業者率(失業率)，納税義務者1人当りの所得(所得)，医療扶助世帯率(医療扶助)，人口1万人当りの病院，診療所数(病院診療所数)，50才以上の全労働者中の生産工程作業者割合(労務職者率)などを選択した(所得と病院診療所数は順序統計量)．なお，昭和30年代の東北地方と全国との各区への転入数比をも参考指標とした．この比は，住民の出身地を表現するには精度が低いため要因としての採択は困難であるが，東北地方は全国の中で高塩分摂取の食習慣の傾向が強いので，胃がんの危険因子である食習慣に関して参考となる．

2．解析方法

大気汚染物質(SO_2 で代表)と肺がん死亡との関連性をみるために，潜伏期間を考慮して，SO_2 濃度と2～5期の肺がんSMRとの相関，回帰分析を行い，両者の分布，相関係数や回帰直線の4期間による変化を調べた．また，期間毎の部位別SMRと各要因とについても同様に検討し，5期全てのデータの完備した5部位のがんSMRと SO_2 および8要因による主成分分析で，第1～5期の各部位のSMRと要因間の統計的関係の変化をも解析した．さらに，死亡数の多い胃がんと肺がんについてはそれぞれのSMRへの寄与が推察される要因(胃がんは，所得，医療扶助，病院診療所数，肺がんは，SO_2，昼間人口密度，労務職者率)との重相関分析や自由度調整済みの同分析，誤差分散で最適組合わせの説明変数を選び，重回帰分析で量的な関係を求めた．また，その際の誤差の特徴についてもダービン・ワトソン比(該差項の系列相関の存在を確認する統計量)の算出や5期の残差の相関分析などを行って検討した．

結　　果

東京都区部での2～5期の肺がんSMRと SO_2 との分布や回帰直線はFig. 1の通りで，相関係数は，それぞれ0.400，0.666，0.722，0.710であった．同期間の第2期では有意でなかったが，第3期以降は危険率0.1%以下の有意の正相関があり，10年以上経過した第4，5期で高い相関を示した．この第2～5期の回帰直線をみると，勾配は第4，5期の方が第2，3期よりも急となった．また，第3，4期では直線的よりも2次曲線的な分布を示した．次に，Table 1に有意水準で示したように，各要因と8部位のSMRとの関係は，胃がんは5期を通じて医療扶助，労務職者率と正，1人世帯，所得と負の有意の相関を示し，病院診療所数とも第1～4期で有意の負相関を示した．同様に，肺がんは昼間人口密度，65～才人口比と正，1人世帯と負の有意の相関であった．乳がんは病院診療所数と5期全てに，昼間人口密度や65～才人口比とも3期間以上で有意の正相関がみられた．5部位，9要因の全変数間の関係をみる主成分分析の第1，2因子負荷量散布図によると(Fig. 2，第2主成分

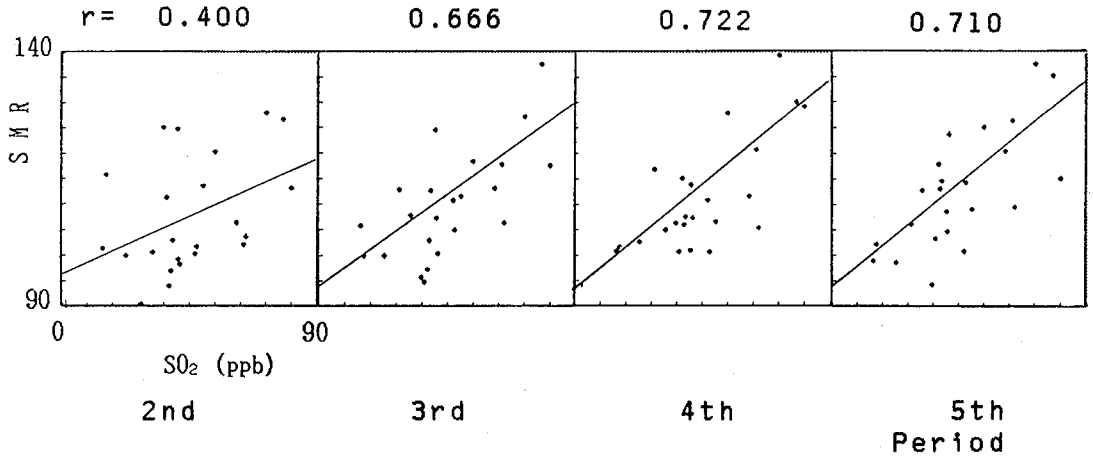


Fig. 1. Levels of SMR for Lung Cancer and SO_2 including the Regression Lines
(r=Correlation Coefficient)

Table 1. Correlations of SMR for Selected Sites and Environmental Factors (Significance Level only)

Period		1st	2nd	3rd	4th	5th	1st	2nd	3rd	4th	5th
Site	Factor	Population ratio of age 65 and more					Population density in day time				
Stomach		−**	−	−*	−	−	−		−	−	−
Lung			**	**	*		***	**	***	**	*
Breast		−		***	**	**	**		**	*	*
Uterus		−*	−	−	−			−	−	−	
Leukemia		−		***	*		−	−	**	*	
Liver		×			**		×		*	***	
Esophagus		×	×	×		−	×	×	×		
Pancreas		×	×	×			×	×	×		−
Site	Factor	One-person household					Rate of unemployment				
Stomach		−*	−**	−**	−***	−***					
Lung		−	−	−*	−**	−**	−***	−***	−	−	−
Breast							−	−	−	−	−
Uterus		−	−	−	−	−				*	
Leukemia			−	−		−		−	−*	−*	−
Liver		×			−*	−*	×		−	−	
Esophagus		×	×	×	−**	−	×	×	×	−	
Pancreas		×	×	×			×	×	×	−	
Site	Factor	Income					Medical care aid				
Stomach		−***	−***	−***	−***	−***	***	***	**	***	**
Lung			*				−	−		*	
Breast				**		*	−	−	−	−	−*
Uterus		−**	−*		−**	−					
Leukemia				*		−	−	−	−	−	
Liver		×		−	−	−	×		*		***
Esophagus		×	×	×	−	−	×	×	×	*	
Pancreas		×	×	×		−	×	×	×	−	−
Site	Factor	Number of hospitals and clinics					Rate of laborers in the manufacturing sector etc.				
Stomach		−***	−*	−**	−**	−	*	*	***	***	**
Lung		*	**	*			−	−	−		
Breast		*	*	***	**	*	−	−	−*	−	−*
Uterus		−	−	−	−*		*	*		***	
Leukemia			−	***		−	−	−	−*	−	
Liver		×					×				**
Esophagus		×	×	×			×	×	×	*	
Pancreas		×	×	×		−	×	×	×	−	

− : Negative correlation, × : Unknown

* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$

までの固有値の累積寄与率は5期で64.4〜69.4%), 第1主成分軸は所得と医療扶助が対極に位置することから, 住民の経済レベルを示唆し, 第2主成分軸は, 第1主成分軸ほど明らかでないが, 地域の産業活動レベルを示唆するように思われる. 胃がんや子宮がんと SO_2, 65〜才人口比以外の7要因は概ね5期とも類似した位置関係にあったが, 肺がん, 乳がんや SO_2 などは期間の経過とともに多少の位置関係の変動がみられ, 特に肺がんは低

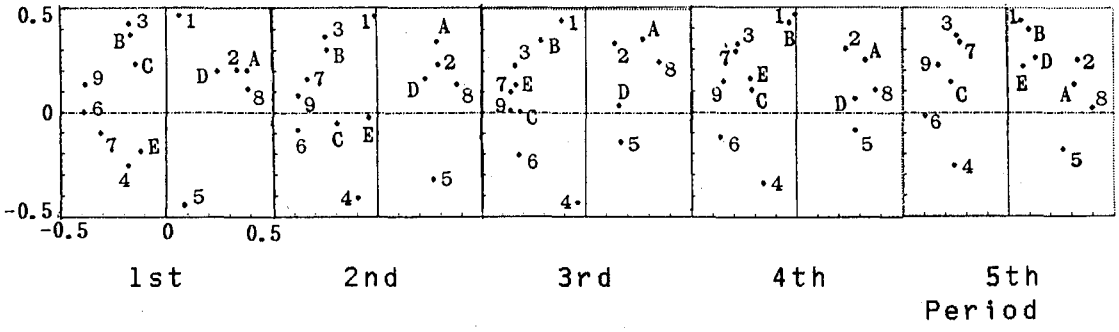


Fig. 2. Distribution of Factor Loadings of the First (Horizontal Axis) and the Second (Vertical Axis) of Principal Components
A～E：Selected cancer SMR, 1～9：Environmental factors
A：Stomach, B：Lung, C：Breast, D：Uterus, E：Leukemia
1：SO_2, 2：Medical care aid, 3：Population density in day time,
4：One-person household, 5：Rate of unemployment, 6：Income,
7：Population ratio of age 65 and more,
8：Rate of laborers in the manufacturing sector etc.,
9：Number of hospitals and clinics

経済レベルの方向に移動する傾向を示した．各部位や要因間では，胃がん，子宮がん，医療扶助，労務職者率が5期を通じて1群となり，肺がんと SO_2 は第3～5期に1群となる傾向であった．次に，胃がん，肺がんのSMRと各3説明変数との相関，重相関分析の結果をTable 2に，観測値と最適説明変数による推定値との分布をFig. 3に示した．胃がんでは3説明変数中5期を通じて最も相関が高い変数は所得で，次に医療扶助，病院診療所数の順であった．表中各期間で説明変数の組合せが最適の場合に下線を付した．最適の組合せは自由度調整済み重相関係数から決定される(誤差分散でも同様の結果となる)．推定値はいずれも60%以上の寄与率を得て良好であったが(Fig. 3上段)，ダービン・ワトソン比を計算すると，必ずしも受容域でなかった．また，残差の隣接期間の相関係数は，第1～5期でそれぞれ，0.142, 0.385, 0.717, 0.774で，後半は危険率0.1%以下で有意であり，適切な説明変数の不足を示唆した．この結果は，胃がん死亡の重要な危険因子である食習慣に関する良好な指標が利用できなかったことなどによると考えられる．なお，残差が5期とも正の区が4(千代田，中央，墨田，江戸川)，負の区が4(新宿，中野，杉並，豊島)認められた．この原因は食習慣に関係すると考えられるので，1955，60年の東北地方と全国との転入数比を両群の区で比較した．その結果，正の4区はそれぞれ，17.1, 17.4, 23.6, 20.5%であったのに対し，負の4区はそれぞれ，15.5, 14.7, 13.7, 16.9%で，明らかに正の4区の方が東北地方からの転入割合が高いことが判明した．一方，肺がんの場合，多くの期間で SO_2 との分布は2次曲線に近く，相関係数も2乗値の方が高かったことから2乗値を利用した．最適説明変数(Table 2下段の下線部)での寄与率は，第2期に40%を切ったが，第3～5期には60%を越える良好な寄与率を示した(観測値との分布はFig. 3下段)．3説明変数では5期全てに高い変数はなく，第1，2期では昼間人口密度，第3期にはこれと SO_2 2乗値の組合せ，第4期は SO_2 2乗値，第5期には昼間人口密度と労務職者率の組合せが最適で，期間の経過とともにSMRに密接な要因が変化することを示唆した．なお，ダービン・ワトソン比はいずれも受容域であった．残差の5期の相関でも有意でなかったが，残差が5期とも正または負の区がそれぞれ2区(中央，江東)と3区(台東，大田，足立)認められた．

考　　察

がん死亡率の地域差からその差を生ずる要因を究明しようとする検討手法では，対象地域の広さ，人口移動状況などが問題となるが，既に報告したように[1]，東京の胃，肺，乳房，子宮などの部位の5年間のがん死亡率については区単位で充分統計量として利用できるとの結果を得ている．ただし，危険因子であっても対象とした地域間で差がない場合，その因子による影響は解析上では認められない可能性が高くなる．例えば，肺がんや胃が

Table 2. Results of Correlation or Multiple Correlation Analysis between SMR of Stomach or Lung Cancer and Environmental Factors(Explanatory Variable)

Site	Explan. var.	Period	1st	2nd	3rd	4th	5th
Stomach	Income	→A	-.820＊＊＊	-.762＊＊＊	-.796＊＊＊	-.852＊＊＊	-.762＊＊＊
	Medical care aid	→B	.699＊＊＊	.718＊＊＊	.605＊＊＊	.676＊＊＊	.636＊＊
	Number of H. & C.[1]	→C	-.716＊＊＊	-.445＊	-.594＊＊	-.573＊＊	-.333
	A・B		.872＊＊＊	.831＊＊＊	.846＊＊＊	.884＊＊＊	.784＊＊＊
	adjusted by DF[2]		(.858＊＊＊)	(.815＊＊＊)	(.829＊＊＊)	(.872＊＊＊)	(.759＊＊＊)
	A・C		.823＊＊＊	.784＊＊＊	.808＊＊＊	.852＊＊＊	.804＊＊＊
	adjusted by DF		(.803＊＊＊)	(.759＊＊＊)	(.786＊＊＊)	(.836＊＊＊)	(.782＊＊＊)
	B・C		.782＊＊＊	.731＊＊＊	.785＊＊＊	.808＊＊＊	.650＊＊
	adjusted by DF		(.757＊＊＊)	(.698＊＊＊)	(.760＊＊＊)	(.786＊＊＊)	(.604＊＊)
	A・B・C		.873＊＊＊	.852＊＊＊	.865＊＊＊	.887＊＊＊	.814＊＊＊
	adjusted by DF		(.851＊＊＊)	(.826＊＊＊)	(.842＊＊＊)	(.868＊＊＊)	(.781＊＊＊)
Lung	SO_2[2]	→A	.524＊	.438＊	.696＊＊＊	.754＊＊＊	.693＊＊＊
	PD[3]in day time	→B	.698＊＊＊	.596＊＊	.728＊＊＊	.617＊＊	.517＊
	Rate of laborers[4]	→C	-.187	-.340	-.060	.129	.298
	A・B		.699＊＊	.596＊	.778＊＊＊	.773＊＊＊	.703＊＊＊
	adjusted by DF		(.661＊＊)	(.539＊)	(.752＊＊＊)	(.747＊＊＊)	(.666＊＊＊)
	A・C		.620＊＊	.619＊＊	.724＊＊＊	.754＊＊＊	.725＊＊＊
	adjusted by DF		(.568＊＊)	(.567＊＊)	(.690＊＊＊)	(.725＊＊＊)	(.692＊＊＊)
	B・C		.700＊＊	.616＊＊	.771＊＊＊	.758＊＊＊	.840＊＊＊
	adjusted by DF		(.663＊＊)	(.563＊＊)	(.744＊＊＊)	(.729＊＊＊)	(.822＊＊＊)
	A・B・C		.700＊＊	.633＊	.783＊＊＊	.790＊＊＊	.842＊＊＊
	adjusted by DF		(.640＊＊)	(.553＊＊)	(.743＊＊＊)	(.751＊＊＊)	(.814＊＊＊)

1) H. & C.：hospitals and clinics, 2)DF：degree of freedom, 3)PD：population density, 4)Skilled laborers, employees in the manufacturing sector, etc.

＊：$p<0.05$, ＊＊：$p<0.01$, ＊＊＊：$p<0.001$

ん死亡の重要な危険因子である喫煙習慣は，区部ではその率の差が小さいと言われ，そのために喫煙の影響を検出することが困難になる．一方，経済面などの地域特性は狭い地域の方が差を生じやすい．したがって，死亡率だけでなく，影響を及ぼす要因に関しても対象地域の広さが解析結果に関係する点に留意が必要である．

ここで利用した要因のうち，がんの危険因子にあげられるものは肺がんについての大気汚染物質だけである．ただし，SO_2は発がん物質とは見なされておらず，この濃度は同一発生源から排出される発がん性の3.4ベンツ(a)ピレン(BaP)などの物質の濃度を代表すると考えられている。この大気汚染と肺がん死亡との関係については肯定する報告[3-9]が多いが，大気汚染の影響を疑問視する報告もないではない[10,11]．しかし，いずれも本報のような時間的なずれを考慮した解析を行っていない．暴露から死亡までには10年以上の潜伏期間が予想されるので，暴露濃度の経年分布と関連性の時間的変化の追究が必要であろう．高濃度暴露があっても，その後の人口移動などで量・効果関係は時間経過とともに希薄化しやすい．にもかかわらず，第3～5期で統計的関連性がみられたことは，両者の関係が密接であることを示唆している．また，第4期と第5期とでは第4期の方がより密接であるとの結果を得たが，時間的希薄化を考慮すれば，実質的影響がこの結果通りであるかは必ずしも明らかでなく，これを解明するには高濃度時期の暴露を受けた集団の追跡調査が必要である．さらに，大気汚染物質と喫煙との相乗効果があるとの報告[12]もある．区部では喫煙率の差が小さいとしても肺がんSMRとSO_2が2次曲線的な分布を示した背景には喫煙の影響の可能性がある．

また，がんの危険因子に関係のある他の要因として，1人世帯(胃がんの危険因子，不規則な食生活[13])と労務職者率(肺がんの危険因子，職業暴露[14])があげられるが，この2要因は括弧内の危険因子を代表し得る程親密でなく，解析結果でもその部位のがんSMRとの関連

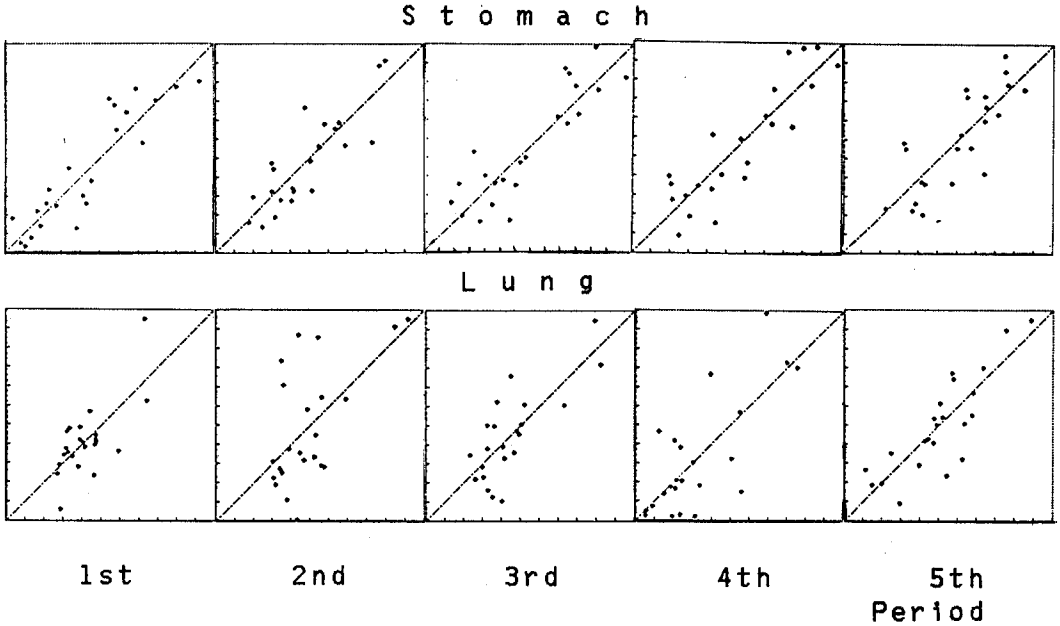


Fig. 3. Display of Observed and Estimated SMR_s for Stomach or Lung Cancer between 90 and 140
Horizontal axis : Observed SMR, Vertical axis : Estimated SMR
Oblique line : Two values of SMR are equal

性を見いだすに至らなかった．ただし，労務職者率は肺がんの重回帰分析で第5期の最適説明変数の一つとなった点から全く軽視はできない．

胃がんが高塩分摂取などの食習慣と深く関係することはよく知られている[13]が，これを区単位で指標としての情報を得ることは実質的に困難である．この指標が利用されなかったにもかかわらず，重回帰分析による推定では良好な結果が得られた．また，残差が正または負の各4区の東北地方からの転入割合の比較により食習慣の影響を示唆したことは，この解析での食習慣指標を利用しなかった影響が強くはないとしても無視できないことを示している．さらに，食生活は所得などの経済的要因と関係することは容易に推知される．ただし，低経済レベルの食生活が消化器系がんの死亡の危険性を高めるかは明らかでなく，むしろ，低経済レベルは医療や衛生面での知識や行動性の欠如に関係することが考えられる．したがって，経済的要因は危険因子にならないとしても胃がん死亡率への影響は大きいと推察され，これを裏付ける結果が得られた．同様のことを Miller ら[15]も述べている．また，肺がん死亡率への経済的要因の影響は小さいと考えられるが，主成分分析結果にみられたように，期間の経過とともに影響が現われつつあるように思われる．これは近年がん生存率が上昇し始めたことと関係があるかもしれない．既に，肺がん死亡率が社会経済的要因と関連するとの Blot ら[16]，Sympson ら[17]の報告もある．

ま と め

東京都区部における27年間(5期)の部位別がん死亡率と環境的要因との関連性を統計手法を用いて地理的に検討した結果，以下のような知見が得られた．

1．SO_2 濃度で代表される大気汚染物質は暴露から10年後以降の肺がん死亡率とより高い正相関を示した．

2．低所得，医療扶助，労務職者率といった経済的色彩の強い要因はどの期間においても胃がん死亡率と密接に関連することを示した．

3．65～才人口比や昼間人口密度の高い地域では肺がんや乳がんの死亡率が高いことを示し，病院診療所数も胃がんや乳がんの死亡率と密接に関連することを示唆した．

4．部位別がん死亡率と要因との関係の時間的変化は全体としては大きくないが，肺がんや乳がんなどに若干の期間による変化が認められた．

5．胃がんや肺がんの死亡率はいくつかの環境的要因により良好な推定値を得ることができた．胃がんについ

ては，食習慣に関する指標が得られれば推定値の精度はさらに高くなる．肺がんについては，5期で密接な関連要因が変化した．

文　献

1）牧野国義，稲葉　裕：東京衛研年報，39，205-211，1988.

2）加藤育子，富永祐民：日本公衛誌，34，619-623，1987.

3）Carnow, B.W.：*Environ. Health Perspect.*，22，17-21，1978.

4）清水弘之，富永祐民，中川宣子：大気汚染誌，8，324-333，1979.

5）Ford, A.B. and Bialik, O.：*Arch. Environ. Health*，35，350-359，1980.

6）Speizer, F.E.：*Environ. Health Perspect.*，47，33-42，1983.

7）Jedrychowski, W.：*NEOPLASMA*，30，603-609，1983.

8）富永祐民：呼吸，4，1373-1377，1985.

9）青木　毅，高木弘巳，安藤達志，他：民医連医療，151，32-40，1985.

10）Buell, P. and Dunn, J.E.：*Arch. Environ. Health*，15，217-227，1967.

11）Trichopoulos, D., Hatzakis, A., Wynder, E. and Kalandidi, A., *Environ. Res.*，44，169-178，1987.

12）Vena, J.E.：*Am. J. Epidemiol.*，116，42-56，1982.

13）加美山茂利：食事と発癌，林　裕造，黒木登志夫編，新しい発癌のメカニズムと評価，308-330，1984，サイエンスフォーラム社，東京.

14）Swanson, G.M., Schwartz, A.G. and Burrows, R.W.：*AJPH*，74，464-467，1984.

15）Miller, A.B.：*American Cancer Society*，50，2533-2540，1982.

16）Blot, W.J. and Fraumeni, J.F.：Am. J. Epidemiol.，103，539-550，1976.

17）Sympson, S.G. and Comstock, G.W.：*Arch. Environ. Health*，38，248-251，1983.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 271-273, 1989

肺に沈着した炭粉の分析法

瀬戸　博*, 大久保 智子*, 加納 堯子*

Quantitative Analysis of Elemental Carbon Deposited in Lung

HIROSHI SETO*, TOMOKO OHKUBO* and TAKAKO KANOH*

Keyworeds：炭素 elemental carbon, 肺 lung, 元素分析 elementary analysis, 多環芳香族炭化水素 polycyclic aromatic hydrocarbon, ディーゼルエンジン排ガス diesel engine exhaust

緒　言

ディーゼルエンジン車は経済的有利性のため，現在主要な陸送手段となっているが，一方で多量に排出するガスによる沿道付近住民への健康影響が懸念されている．エンジン排ガス中には発ガン性の多環芳香族炭化水素(PAH)やそのニトロ化物などが粒子状炭素の表面に吸着した形で存在している[1]．このような粒子は一旦吸入すると排出されにくく肺中に長く留まる[2]ため，PAH等の化学物質が炭素粒子表面から長期間にわたって徐々に放出されることになる．我々は，先にディーゼルエンジン排ガスを暴露したラット肺におけるPAHの蓄積について報告したが，本来，代謝の早いPAHが肺に蓄積する要因として炭粉の役割が大きいことを指摘した[3]．しかし，大気浮遊粉塵中の元素状炭素の測定は試みられている[4-5]が，肺に沈着した炭粉の測定例は殆どなく知見が乏しい．今回，肺臓中のPAH分析[6]の際，得られるアルカリ分解後の水溶液中に炭粉が残ることに着目し，分析法を検討したのでその結果を報告する．

実　験

試料肺臓は都立病院との共同研究による大気汚染物質の蓄積調査のために供与されたものである．

試薬　活性炭はダルコ G-60(和光純薬工業扱い)，エタノール，*n*−ヘキサンは残留農薬分析用，その他の試薬は市販の特級を使用した．

装置　元素分析装置 MT-2(柳本)

分析方法　操作：(1)肺臓の乾湿重量比を求める．試料約1gを正確に秤量し，100℃で5時間乾燥させ，放冷後重量を秤量し，乾燥重量／湿重量を求め，これを乾湿重量比(R)とする．(2)試料約50gを正確に秤量し(Lg)，200mlのエタノール中で乳化した後，300mlナス型フラスコに移す．16.8gの水酸化カリウムを加え，よく振とうし，溶かした後，2時間加熱還流させる．水200mlを加え，*n*−ヘキサン150mlで1回，100mlで2回有機物の抽出をする．下層のアルカリ画分を500mlのナス型フラスコに取り，1時間加熱還流する．全液量(a ml)をメスシリンダーで求めた後，一部(b ml)をろ過(ワットマン GF／C 47mm)する．ろ紙を塩酸，水，アセトンで洗浄後，100℃で1時間乾燥する．

定量法1．活性炭標準系列による比色法：良く乾燥させた活性炭を20mg／10mlの濃度になるよう1％の界面活性剤を含む蒸留水中に均一に懸濁させる．これを順次倍数希釈し(＞1／512)，標準系列液を得る．各10mlに，エタノール10mlを加え，ろ過し，塩酸，水，アセトンで洗浄後，乾燥する．試料ろ紙の黒色程度を活性炭標準系列ろ紙と比較し，ろ紙上の炭粉重量(Cf mg)を求める．肺臓中の炭粉濃度(XまたはY mg／g)は次式により計算する．

wet base　$X = (Cf \times a / b) / L$

dry base　$Y = X / R$

定量法2．元素分析法：元素分析装置を用いて試料ろ紙を加熱燃焼(ろ紙は融解する)させ炭素量を読み取る．参考値として水素，窒素量も記録しておく．

回収試験　操作(2)の試料のかわりに10mgの活性炭を10mlの水に懸濁させた液をとり，水酸化カリウム／エタノール中でアルカリ処理する．以下，定量法1，2と同様の操作を行ない全操作終了後の活性炭の回収率を求める．

*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

結果および考察

回収率　元素分析法で求めた全操作終了後の活性炭の回収率は平均66.3±3.3%(n=5)であった．やや低い回収率の原因は明らかではないが，使用する容器の器壁への吸着の他，長時間，濃厚なアルカリ溶液で加熱処理することによる微細化，分解による損失が考えられる．回収率はやや低く改良の余地があるものの，変動係数は約5%で安定しており十分使用できると思われる．

ろ紙の捕集効率　上記試料についてバックアップをとったところ2枚目のろ紙で捕集された炭素量は1%以下で，99%以上が1枚目のろ紙で捕集されることがわかった．実試料の場合でも同様の結果が得られた．

比色法と元素分析法の比較　活性炭標準系列ろ紙(X)について元素分析(Y)を行なった結果を図1に示す．勾配は約1.1(回帰式 Y=1.145 X−0.152)，相関係数は0.999と良好な結果が得られた．実試料について比色法(X)と元素分析法(Y)を比較した結果を図2に示す．勾配は約0.8(回帰式 Y=0.812 X+0.126)，相関係数は0.951であった．活性炭標準に比べると，ややばらつきがある．これは，比色のための標準系列が倍数希釈で構成されているため，読みとり誤差が大きいことに加えて，実試料ではろ紙上の色調が微妙に異なるために判定を誤り，誤差となるためと考えられた．アルカリ処理が不充分の場合ろ紙上の捕集物は黄かっ色となり，元素分析では異常に高い炭素量を示す．この場合水素，窒素も異常に高い値を示すので有機物の残存を容易に気付くことができる．したがって水素，窒素量のモニターは元素分析法の信頼度を高めるために不可欠である．しかし今回の元素分析で水素，窒素はほとんど検出されず，本分析法による一連の操作で有機物はほぼ完全に分解・除去されているものと思われる．比色法は簡便で定量範囲もろ紙の炭素量として0.04-10mgと広い．また多少黄かっ色の試料でも，炭素量が求められる利点がある．しかし数量化に難があり，半定量法である．一方，元素分析は，測定法としての信頼性は高いがやや繁雑で時間がかかる．定量範囲は本分析装置の場合0.04-2mg程度である．他に重量法，透過光度測定法が考えられるが選択性が劣り，測定範囲が限られる等の欠点がある．結局，肺臓中の炭粉量の検出法としては，元素分析法を標準とし，参考として比色法により確認することが望ましい．

本分析法は肺臓中のPAHを分析する際得られるアルカリ分解後の水溶液を利用し沈着した炭粉量を測定する方法である．PAHと炭粉濃度の関係をみたところ当初予想されたように正の有意な相関が得られた[7]．詳細については逐次発表する予定である．

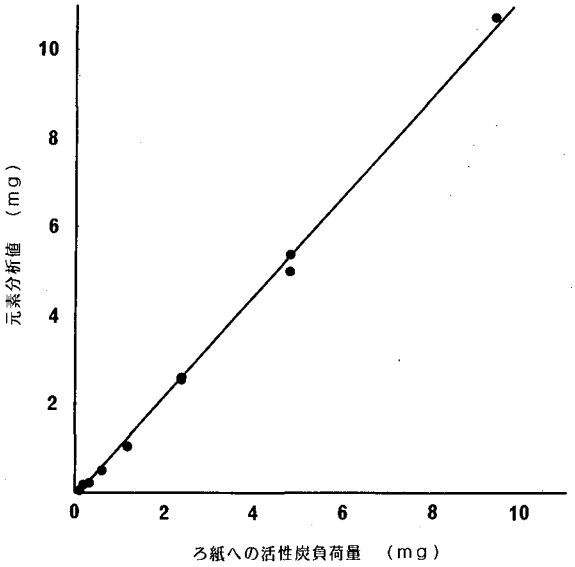
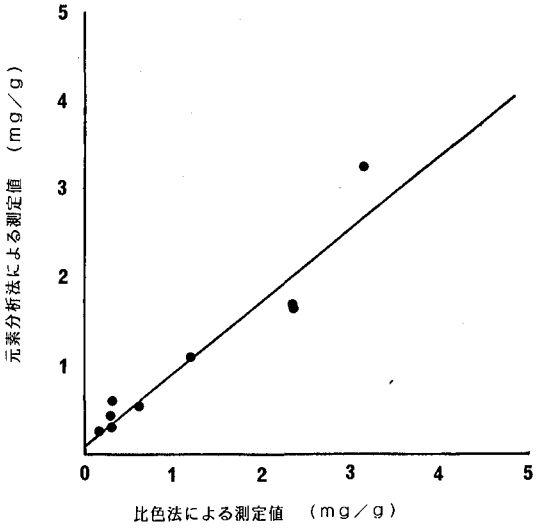


図1．活性炭標準系列ろ紙の元素分析結果



なお，本研究は東京都大気汚染保健対策事業の一環として，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) Tong, H. Y., Sweetman, J. A., Karasek, F. W., Jellum, E., and Thorsrud, A. K., : *J. Chromatogr.*, 312, 183-202, 1984.

2) Sun, J. D., Wolff, R. K., Kanapilly, G. M., and Mc-

Clellan, R. O.,：*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 73, 48-59, 1984.

3）大久保智子，瀬戸　博，大沢誠喜，鈴木孝人，加納堯子：東京衛研年報，39，193-197，1988.

4）林　久緒，井上康明，早坂孝夫，黒沢芳則，佐藤静雄：大気汚染学会誌，20，349-361，1985.

5）坂井洋一，角脇　怜：大気汚染学会誌，21，396-401，1986.

6）瀬戸　博，長嶋親治，加納堯子：東京衛研年報，38，282-285，1987.

7）瀬戸　博：未発表データ.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 274-280, 1989

ディーゼル排気ガス暴露ラットにおける各種組織でのビタミンB_6含量の減少

鈴木孝人*, 熊谷智子**, 小高佳子**,
今村　晋**, 加納堯子*,

Decreased Vitamin B_6 Contents of Various Tissues from Rats Expoed to Diesel Engine Exhaust

TAKAHITO SUZUKI*, SATOKO KUMAGAI**, YOSHIKO KOTAKA**,
SUSUMU IMAMURA** and TAKAKO KANOH*

Effects of diesel engine exhaust on vitamin B_6 (VB_6) metabolism were investigated by determining the VB_6 contents in various tissues and urine of rats.

Rats were classified into four groups in accordance with the concentrations of particulate matter, nitrogen dioxide and nitrogen monoxide : (1) L group; supplied with a low concentration of diluted whole exhaust, (2) H group; supplied with a high concentration of diluted whole exhaust, (3) F group;supplied with filtered exhaust and (4) C group; supplied with clean air as control. Eight rats were used in each group. Exposure was carried out for two months at 7 hours／day and 5 days／week. The concentrations of VB_6 were analyzed by the high-performance liquid chromatography (HPLC).

Total VB_6 contents of lungs, kidneys, small intestine and large intestine decreased in L and H groups and also decreased in the livers of H group, In F group, total VB_6 contents of kidneys decreased. Pyridoxal phosphate (PLP) contents of VB_6 group mainly decreased in various tissues, except kidneys, from rats exposed to diesel engine exhaust. Urinary VB_6 contents excreted for 24 hours decreased in H and F groups.

The results suggest that exposure of diesel engine exhaust will influence considerably VB_6 metabolism and cause adverse effects on VB_6 dependent metabolisms, because PLP is a co-enzyme for many amino acid metabolisms.

Keywords：ディーゼルエンジン排気ガス diesel engine exhaust, ビタミンB_6代謝 vitamin B_6 metabolism, ピリドキサールリン酸 pyridoxal phosphate, 液クロ分析 HPLC analysis,肺 lung, 肝 liver, 腎 kidney, 腸 intestine, 尿 urine, ラット rat

緒　言

ビタミンB_6(VB_6)は哺乳動物のような高等動物では生合成されず，外来性または腸内細菌により合成されたVB_6に依存している．通常，主に食物よりVB_6群中のpyridoxine(PN)やpyridoxamine(PM)が摂取され，Fig. 1に示したように，これらは代謝され最終的には尿中へ4-pyridoxic acid(4 PA)として排泄される．なかでもpyridoxal phosphate(PLP)は生体内でアミノトランスフェラーゼ(アミノ基転移)，アミノ酸デカルボキシラーゼ(脱炭酸)，ラセマーゼ(ラセミ化)など，多くのアミノ酸代謝に関与する酵素群のリジンの ε-アミノ基とシッフ塩基を形成し，それらの酵素反応における補酵素として働く最も重要なVB_6群のリン酸エステル化合物である[1]．

*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
**日本女子大学家政学部食物学科

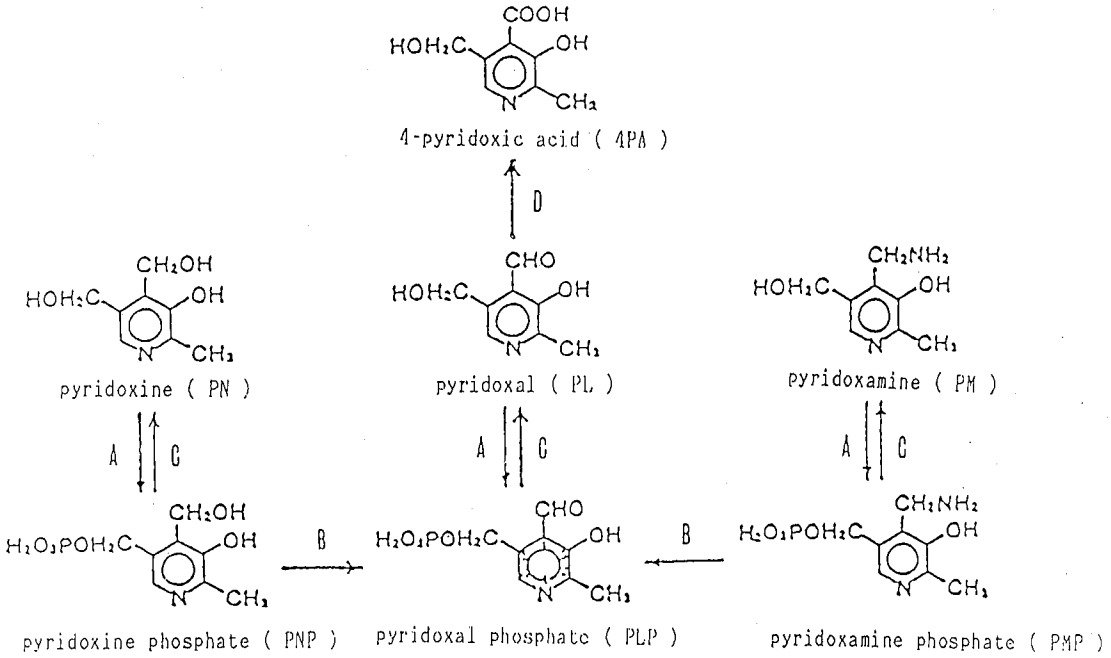


Fig. 1. Metabolic pathway of Vitamin B_6 in Mammals
A : pyridoxal kinase　　B : pyridoxine phosphate oxidase
C : phosphatase　　D : aldehyde oxidase

ディーゼル自動車は，燃費においてガソリン車より経済的であり，最近では性能面においても遜色ないことから急速に普及してきた．しかし，現状ではディーゼル車はガソリン車に比べNO_x，炭化水素類などの排気ガス規制も緩い．ディーゼル車の排気ガス対策の主眼はNO_xの低減にあるが，技術的にNO_xの低減は逆にススなどの粒子状物質の排出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[2]．

Nizhegorodov と Markhotskii[3,4]は nitrogen pentaoxide (N_2O_5, 1.3 ppm)に104-113日間暴露されたラットではVB_6含量の減少が生じることを報告し，更に，彼らは nitrogen dioxide(NO_2,1.1 ppm), carbon monoxide(CO, 18.3 ppm)と ammonia(NH_3, 23 ppm)の混合ガスに139-149日間暴露されたラットでも組織中のVB_6含量と4 PA の尿中排泄量の減少を報告している．即ち，大気汚染物質の暴露はVB_6代謝に影響を及ぼすことを示している．従って，NO_x, CO 以外にも著しいガス状物質を含むディーゼル排気ガス暴露によってもVB_6代謝に影響が及ぶことが予想される．本実験では2ヶ月間ディーゼル排気ガス暴露したラットにおける各種の臓器と尿中のVB_6含量を逆相系カラムによる液体クロマトグラフィーを用いて分析した．その結果，ディーゼル排気ガス吸入の影響は第一の標的の呼吸器である肺臓のみならず他の臓器にまで及んでいることを示す所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5週令の雄のF 344／DuCrj ラット(日本チャールスリバー KK)を用いて，ディーゼル排気ガスを希釈して濃度別に暴露した．1群8匹として，清浄空気を暴露した対照群(C 群)及び希釈ディーゼル排気ガスの低濃度群(L 群)と高濃度群(H 群)，更に，ガス状物質のみの影響をみるため排気ガスから粒径0.1 μm以上の粒子を99.99%まで除くヘパフィルター(ATM- 3 -Q-A 型，日本無機 KK)を経由させた除塵群(F 群)の4群に分けた．動物は温度を23± 1 ℃，湿度45-65%，換気回数を10回／時間にコントロールしたチャンバー(1.6 m^3)内で，1日に7時間，週に5日間で2ヶ月間暴露した．各群における暴露条件は Table 1 に示した．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，排気量309cc)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．暴露実験での計測機器には窒素酸

Table 1. Experimental Conditions in Diesel Engine Exhaust Inhalation

Group	Particle (mg／m³)	NO_2 (ppm)	NO (ppm)
C	0.010±0.008	0.02±0.01	0.04±0.02
L	0.494±0.311	0.10±0.05	0.20±0.05
H	5.626±1.942	4.10±0.40	8.10±0.40
F	0.027±0.019	3.90±0.50	7.80±0.40

Rats were exposed to diesel engine exhaust for 2 months at 5 day／week, 7 hours／day.
The particle size of exhaust was below 0.5 μm for more than 90% of the exposing particles.
C : Control group of clean air
L : Low concentration group of whole exhaust
H : High concentration group of whole exhaust
F : High gas concentration group of filtered exhaust

化物測定機(8840型, Monitor Lobs Inc)と粉塵計(β線質量濃度計 BAM-102型, 柴田科学機械 KK)を使用した. また, 粒子と粒径分布の計測に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, 東京ダイレクック KK)を用いた. 尚, 飼料にはオリエンタル酵母社製の NMF 飼料を用い, 飲料水には水道水を用いて共に動物に自由に摂取させた.

(2) 検体の調製

排気ガスを2ヶ月間暴露後, ガラス製のケージ(杉山元医理器 KK)内にラットを移し, 絶食させて24時間に排泄した尿を集めた. 尿量を測定後, 300 xg, 4℃で20分間遠心して毛などの不純物を除いた. 採尿後, 動物は解剖して肺臓, 肝臓及び腎臓を採取し, 更に, 小腸と大腸の消化器系の組織については内容物を除いてから, 生理食塩水で残存する消化物を除くためすばやく洗浄した.

尿および各種の組織は Fig. 2 に示した手順で, VB_6 抽出のために前処理を行った. すなわち, 1 N 過塩素酸を加え Ultra-Turrax(TP18／10S2型, Janke & Kunkel Co)を用いて約2分間ホモジナイズ後, 遠心し上清(A)と沈渣に分離し, 更に, その沈渣に0.2N 過塩素酸を添加後充分に混和してから再度遠心し, 上清(B)と沈渣に分離した. 上清(A)と上清(B)を混合し, その混合液を5N水酸化カリウムで pH を2-3に調整し, その際に生じた微細な過塩素酸カリウムを除くため35,000 xg, 4℃で30分間遠心した. 検体は−20℃で保存し, 分析時に解凍して, 各検体をフィルター(DISMIC-25, ADVANTEC TOYO Co)で濾過後, その濾液を高速液体クロマトグロフィー(HPLC, 860-CO 型, 日本分光 KK)で分離定量した.

(3) ビタミン B_6(VB_6)の測定

VB_6群の分析には森田と水野[5]の方法に従って逆相系

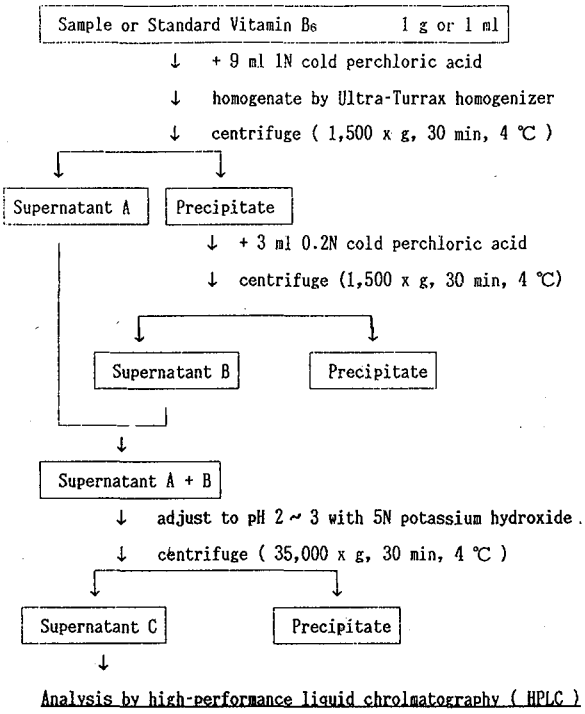


Fig. 2. Analytical Procedure for Vitamin B_6 in Various Tissues from Rats

のカラムである Finepack SIL C_{18} T(4.6×250mm, 日本分光 KK)を用い, プレカラムとして Finepack SIL C_{18} TP(4.6×50mm, 日本分光 KK)を用いた. 移動相は0.2% NaH_2PO_4と0.085% H_3PO_4の混合液(10 : 11, pH 2.5)を用い, 流速は 2 ml／min, カラム温度は40℃, 励起波長は296 nm, 蛍光波長は391 nmで蛍光検出器(F 1000, 日立 KK)を用いて測定した, 尚, 市販の6種類の VB_6

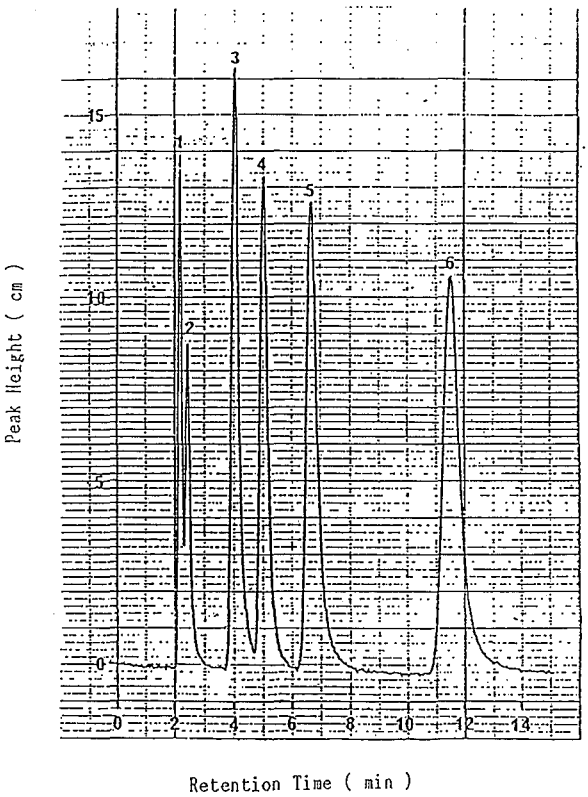


Fig. 3. HPLC Chromatogram of Standard Vitamin B_6
Sample 1 : pyridoxamine phosphate (PMP)
2 : pyridoxamine (PM)
3 : pyridoxal phosphate (PLP)
4 : pyridoxal (PL)
5 : pyridoxine (PN)
6 : 4-pyridoxic acid (4PA)

標準品(Sigma 製品)を混合し，Fig. 2 の操作手順に従って前処理後，HPLC で分析したクロマトグラムを Fig. 3 に示した.

実験結果

Table 2 に示すごとく，対照群と比べて，体重は H 群で有意な減少が認められた．肺重量は L 群と H 群で有意な低下を示し，肝重量は H 群で有意な低下が認められた．更に，小腸重量は L 群と H 群で有意な低下を示し，大腸重量は H 群で有意な低下が認められた.

各組織の 1 g 当りの VB_6含量の変化は，Fig. 4 に明かなように対照群と比べて L 群では肺臓，腎臓，小腸及び大腸で，H 群では肝臓，腎臓，小腸及び大腸で，更に，F 群では腎臓と小腸で有意な減少が認められた.

肺臓中の全組織当りの VB_6含量の変化は Fig. 5 に示すごとく C 群と比較して L 群，H 群に有意な減少が認められた．尚，L 群と H 群における VB_6含量の減少は主に PLP 含量の変化に依存するものであった($P<0.01$).

肝臓中の全組織当りの VB_6含量の変化は H 群に有意な減少が認められた(Fig. 5)．H 群での減少は pyridoxamine phosphate(PMP)と PLP の減少($P<0.01$)によるものであった.

腎臓中の全組織当りの VB_6含量の変化は L 群，H 群，F 群で有意な減少が認められた(Fig. 6)．それは L 群では pyridoxal(PL)と PMP の減少($P<0.01$)，H 群では PMP と PM の減少($P<0.05$)，F 群では PMP の減少($P<0.01$)が影響した.

小腸の全組織当りの VB_6含量の変化は，Fig. 6 に示すごとく，L 群と H 群で有意な減少が認められ，特に，PLP の減少($P<0.01$)が著しかった.

大腸中の全組織当りの VB_6含量の変化は L 群と H 群に有意な減少が認められた(Fig. 7)．その原因は PLP の減少($P<0.01$)によるものであった.

24時間蓄尿した尿中の VB_6含量の変化は，Fig. 7 に示すように，H 群と F 群に有意な減少が認められ 4PA の減少($P<0.01$)によって生じた結果であった.

Table 2. Changes in Weights of Body, Lungs, Livers, Kidneys, Small Intestine and Large Intestine from Rats Exposed to Diesel Engine Exhaust for 2 months

Group	B.Wt. (g)	Lung (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Small Intest. (g)	Large Intest. (g)
C	267±11	0.987±0.083	6.810±0.379	1.726±0.114	2.519±0.310	1.944±0.136
L	255±14	0.860±0.051**	6.489±0.446	1.717±0.089	2.079±0.086**	1.808±0.124
H	245±20*	0.823±0.049***	6.166±0.506*	1.638±0.094	2.161±0.282*	1.641±0.293*
F	263±10	0.976±0.041	6.526±0.441	1.715±0.086	2.653±0.354	2.039±0.172

Each data is expressed as the mean ± S.D.(n=8). Asterisks indicate significant differences from control by the Student t test (* : $P<0.05$, ** : $P<0.01$, *** $P<0.001$).

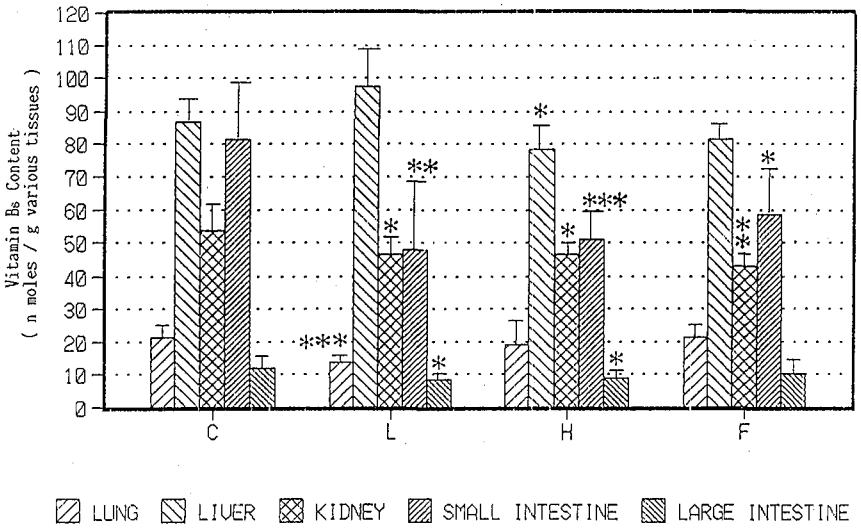


Fig. 4. Changes in Vitamin B_6 Content per g of Various Tissues from Rats Exposed to Diesel Engine Exhaust for 2 Months

Each data is expressed as the mean ± S.D.(n= 8). Asterisks indicate significant differences from control by the Student t test (＊：P<0.05, ＊＊：P<0.01, ＊＊＊：P<0.001).

考　　察

本実験で得られた結果は Nizhegorodov と Markhotskii[3,4] による NO_2, N_2O_5 などを暴露されたラットの組織中の VB_6 含量が減少するという報告と一致している.

肺臓における全組織当りの VB_6 含量の減少はL群とH群に認められた(Fig. 5). 尚, 肺臓重量の低下(Table 2)によって VB_6 含量の減少が見かけ上生ずる可能性も考えられるが, Fig. 4 に示すように, 肺臓の1g組織当りの VB_6 含量もL群では有意な減少(P<0.001)を示したことからも, L群ではディーゼル排気ガス暴露が VB_6 代謝に影響を及ぼすことを示している. 一方, H群では1g組織当りの VB_6 含量に有意な変化はなく, 肺重量の減少も認められることから(Fig. 4, Table 2), 見かけ上全組織当りの VB_6 含量が減少したとも考えられる. しかし, H群における肺臓以外の他の組織において, 1g組織及び全組織当りの VB_6 含量が有意に減少した結果(Fig. 4-7)から考えると, 呼吸器である肺臓に排気ガス吸入の影響がないとは考えにくい. むしろ, 高濃度暴露のH群の肺臓では VB_6 代謝において生体側の補償作用が働いた結果, 1g組織当りの VB_6 含量の変化が認められなかった可能性が強いと思われる. 更に, 単にガス状成分のみの影響をみるためにH群のガス濃度と同程度の暴露条件を設定したF群では VB_6 含量に有意差が認められなかったこと(Fig. 4, 5)から考えると, この VB_6 含量の減少, 特に PLP 含量の減少は排気ガス中のガス成分によるものではなく, スス及びこれに付着した粒子状成分によって生じた可能性が高い. 即ち, 吸入された粒子状成分は肺胞マクロファージによって貪食された後, 肺臓内に沈着し, 肺臓での VB_6 代謝に影響することが推測される.

肝臓は全組織当りでも1g組織当りでも VB_6 含量はH群で有意な減少が認められた(Fig. 4, 5). 即ち, これらの結果は単にH群で肝臓重量の減少(Table 2)によって見かけ上全組織当りの VB_6 含量が減少したものではないことを示している. 腎臓中の VB_6 含量は, Fig. 4 と 6 に示したごとく, 1g組織当りでも全組織当りでもL群, H群及びF群において有意な減少が認められた. このことは排気ガス中の粒子状成分及びガス状成分が血液やリンパ液などの循環系を介して各組織へ運搬され, そこで VB_6 の代謝系に何らかの影響を及ぼした可能性が考えられる. しかし, 本実験では Fig. 1 に示すような VB_6 群の代謝に関与する酵素群の活性測定を実施していないので, これらの酵素系のどの酵素に影響を与えたのかは判断することは出来ない.

消化器である小腸と大腸における全組織当りでも,

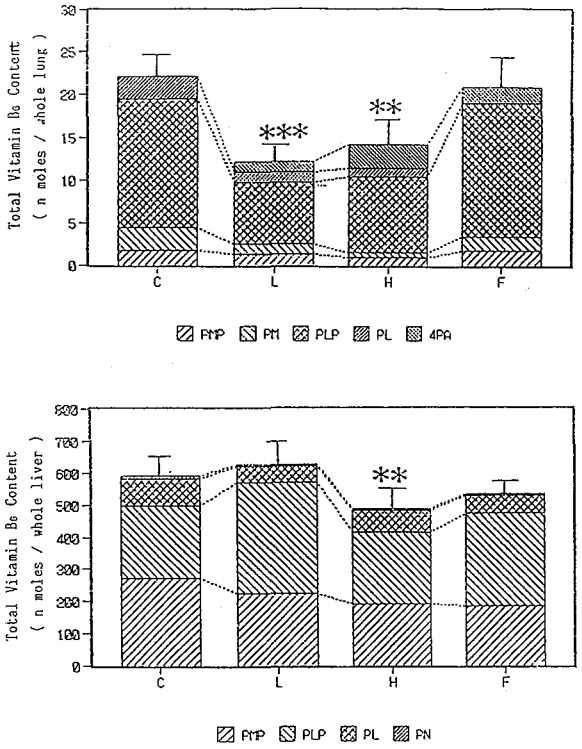


Fig. 5. Changes in Total Vitamin B_6 Content of Lungs and Livers from Rats Exposed to Diesel Engine Exhaust for 2 Months

Each data is expressed as the mean ± S.D.(n=8). Asterisks indicate significant differences from control by the Student t test(＊：P<0.05, ＊＊：P<0.01, ＊＊＊：P<0.001).

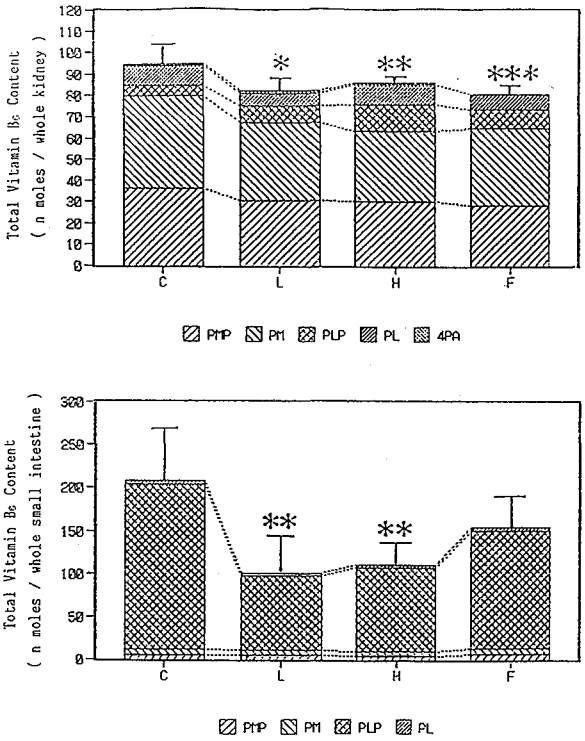


Fig. 6. Changes in Total Vitamin B_6 Content of Kidneys and Small Intestine from Rats Exposed to Diesel Engine Exhaust for 2 Months

Each data is expressed as the mean ± S.D.(n 8). Asterisks indicate significant differences from control by the student t test(＊：P<0.05, ＊＊：P<0.01, ＊＊＊：P<0.001).

1 g組織当りでも VB_6含量はL群とH群において有意な減少が認められた(Fig. 4, 6, 7). これらの結果から, L群とH群では小腸及び大腸における VB_6代謝には排気ガス暴露による影響は明らかである. 一方, F群では小腸において1 g組織当りの VB_6含量に有意な減少が認められ, 全組織当りでも減少傾向を示したが(Fig. 4, 6), 大腸では有意差は認められなかった(Fig. 4, 7). これらの消化器系の組織におおる VB_6含量の減少した原因は排気ガス中の成分の循環系を介した影響も考えられるが, その他にも, Table 2に示したごとく, L群とH群の体重, 小腸重量及び大腸重量の有意な低下または低下傾向が生じている結果から考えると, 排気ガス吸入による不快感から餌の摂取も少なくなり, そのため消化器からの VB_6の吸収量が減少した可能性も考えられる. 更に, PLPの腸管吸収については細胞膜に存在するalkaline phosphatase(ALP)により, PLPが脱リン酸されPLとして吸収されるが[6], このALPが活性阻害された可能性も考えられる. 尚, ディーゼル排気ガス暴露ラットでは尿中に過酸化脂質の一種であるmalondialdehyde (MDA)排泄量が増加することも報告されている[7]. 即ち, ALPはセリンを活性中心にもつ酵素であり[8], また, セリンは過酸化脂質によって傷害を受け易いことも知られていることから[9], VB_6の消化器による吸収阻害の可能性も無視できない.

VB_6は最終的には, Fig. 1に示すように, 尿中への4 PAとして大部分排泄される. 尿中への VB_6排泄量, 特に4 PA排泄量, はH群とF群において有意な減少が認められた(Fig. 7). この原因としては腎臓における再

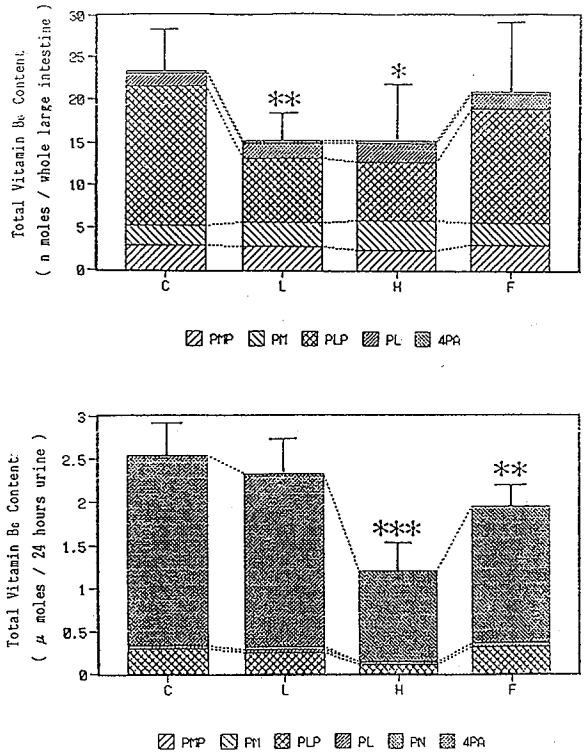


Fig. 7. Changes in Total Vitamin B_6 Content of Large Intestine and Urine from Rats Exposed to Diesel Engine Exhaust for 2 Months

Each data is expressed as the mean ± S.D.(n=8). Asterisks indicate the significant difference from control by the Student t test (＊：P<0.05, ＊＊：P<0.01, ＊＊＊：P<0.001).

吸収や排泄などの機能的変化が排気ガス吸入によって生じる場合と生体内の組織中に含まれる VB_6 含量の減少が反映した場合とが考えられる．しかし，腎機能に対するディーゼル排気ガスの影響については現在未解明で，尿中への 4 PA 排泄量の減少の主な原因は不明であるが，組織中の VB_6 含量の減少の影響が大きいと考えた．

東京都の環境報告書[10]によれば，浮遊粒子状物質濃度は昭和47年頃をピークにして，年々減少してきているが，昭和47年には一日平均値の最大値として0.958 mg／m^3という濃度が区部の一般環境大気測定局で記録されている．尚，昭和59年度でも0.470 mg／m^3と記録されている．また，NO_2濃度の環境基準値は一日平均値が0.04 ppm から0.06 ppm の範囲内にあるようにと制定されているが，0.06 ppm を超える日数が現在でも区部で年間250日間も存在している．また，NO濃度も一日平均値で0.2 ppm を示すことは稀ではない．本実験で設定したL群の暴露条件は粒子濃度は0.494 mg／m^3であり，NO_2濃度は0.10 ppm，NO 濃度は0.20 ppm であるので(Table 1)，道路沿道やトンネル内では発生する可能性も高いと思われる．一方，補酵素として PLP を必要とするピリドキサール酵素が数多く存在し，現在の栄養状態では VB_6の不足症は特殊な条件を除いて少ないと考えられるが，VB_6代謝自体の変化は，健康保持に悪影響をもたらす可能性がある．また，臨床的には VB_6依存症として種々な疾患が知られていることなどから考えると，L群における肺臓，腎臓，小腸及び大腸における VB_6含量の減少が生じた結果は留意する必要があると思われる．

(本研究は昭和63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) 谷　吉樹：ビタミン B_6，ビタミン学会編，ビタミンハンドブック・2 水溶性ビタミン，29-45，1988，化学同人．
2) 斉藤　孟：大気汚染のレビュー(ディーゼル排気ガス)，日本科学技術センター編，昭和59年度環境庁委託業務報告書，7-38，昭和60年．
3) Nizhegorodov, V.M. and Markhotskii, Y. L.: *Hig. Sanit.*, 34, 272-274, 1969.
4) Nizhegorodov, V.M. and Markhotskii, Y.L. : *Hig. Sanit.*, 36, 137-139, 1971.
5) 森田恵美子，水野亘恭：ビタミン，58，597-601，1984.
6) 下山　孝，菊池弘明，伊藤　隆，佐藤　東，佐々木義楼，里見匡迪：最新医学，26，169-174，昭和46年．
7) 瀬戸　博，大久保智子，大沢誠喜，鈴木孝人，加納堯子：第29回大気汚染学会講演要旨集，407，1988.
8) Schwartz, J.H., Crestfield, A.M. and Lipman, F. : *Proc. Nati. Acad. Sci.*, 49, 722-729, 1963.
9) Desai, I.D. and Tappel, A.L. : *J. Lipid Res.*, 4, 204-207, 1963.
10) 大気汚染常時測定結果報告—経年報—，東京都環境保全局大気保全部編．

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.*, 40, 281-288, 1989

オルトフェニルフェノールのマウスを用いた52週間の経口毒性試験

三栗谷 久 敏*, 藤 井 孝*, 米 山 充 子*,
矢 野 範 男*, 湯 澤 勝 廣*
長 澤 明 道*, 佐々木 美枝子*

Toxicity of *o*-Phenylphenol by Dietary Administration to Mice for 52 Weeks

HISATOSHI MIKURIYA*, TAKASHI FUJII*, MASAKO YONEYAMA*,
NORIO YANO*, KATSUHIRO YUZAWA*, AKEMICHI NAGASAWA* and MIEKO SASAKI*

Summary

o–Phenylphenol (OPP), rat urinary bladder carcinogen, was given as pelleted diets at dietary levels of O (control), 0.65, 1.3 and 2.6% to group of 20 male Crj : B6C3F$_1$ mice for 52 weeks.

Mean body weights of 1.3% and 2.6% group were significantly lower throughout the study than that of the control.

The average daily food intake was 4.6g, 5.0g, 5.2g and 4.7g in 0%, 0.65%, 13% and 2.6% group, respectively.

There were no dose–related effect on clinical signs or urinary pH.

Serum urea nitrogen activity in 2.6% group was significantly higher than that in the control.

The kidney weight of the treated groups was significantly lower than that of the control, and the decrease of these kidney weights was dose–related.

Both incidence and severity of necrosis in liver cells and tubular epithelium of the kidney showed a dose–related increase in the treated groups. There was not the increase of occurrence of tumors in the treated groups, comparing with the control group.

Keywords: *o*–phenylphenol, fungicide, Crj : B6C3F$_1$ mouse

緒　言

当部ではこれまでに防かび剤オルトフェニルフェノール(OPP)およびそのナトリウム塩(OPP–Na)がラット膀胱に対し発癌性を有することを明らかにしてきた[1,2]. これに対して，動物種を異にするマウスを用いた実験で奥田[3]，HAGIWARAら[4]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. OPP に関してはマウスによる実験報告が現在までのところみられない.

そこで，今回著者らは OPP のマウスに対する腫瘍誘発や他の影響について検討するため，52週間の経口毒性試験を行った.

実験材料および方法

被検物質：OPP は Dow Chemical Co., M J, USA の Dowicide 1(Lot No.MM01040)を用いた.

実験動物・飼育管理：日本チャールスリバー㈱社生育の Crj：B6C3F$_1$マウス雄を 4 週令で購入した. マウスは室温22–24°，湿度50-60%，換気 1 時間に10回(効率99.9%HEPA フィルター経由)，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(チップ床じき)に 5 匹づつ収容，環境への馴化と疾病の有無を観察するために 1 週間予備飼育し，この期間飼料(日本クレ

*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

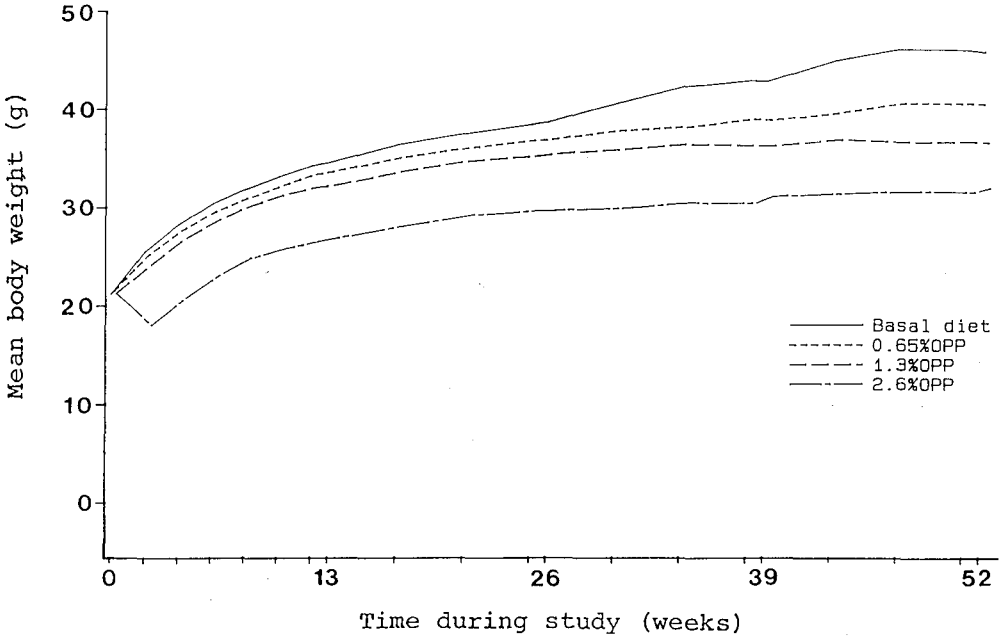


Fig. 1. Changes of Mean Body Weights

ア社，CE-2)と水道水(細菌ろ過器経由)を自由に摂取させた．

実験方法：粉末飼料(CE-2)に被検物質を添加し，固形化したものを実験飼料とした．マウスは1群20匹ずつ，0.65，1.3および2.6% OPP 添加飼料摂取群，基礎飼料摂取群(対照群)の4群を設定し，合計80匹用いた．マウスが5週令になった時点から添加および基礎飼料を水道水とともに52週間自由に摂取させた．

なお，被検物質濃度の設定に当たっては，ラットの実験を参考にした[1]．

動物の一般状態は午前，午後の2回観察した．体重，摂餌量および摂水量は実験開始後13週間は隔週，以後4週間(一部5週間)毎に全匹数を測定した．薬物摂取量は摂餌量から求めた．尿検査は実験開始前と実験1，5，9，13，26，39および52週(実験開始週を実験0週とする)にマウスを捕捉の際放出する尿について BTB (Brom-thymol-blue)pH 試験紙(東洋濾紙，東京)を用い，pH の測定を行った．血清生化学的検査は断頭，屠殺時に得た血液を遠心管にとり，3000ppm で10分間遠心，上清を分離し，Automatic Analyzer 705(日立)を用いて，グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ活性(GOT)，グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性(GPT)，γ-グルタミルトランスペプチダーゼ活性(γ-GTP)，乳酸デヒドロゲナーゼ活性(LDH)および尿素窒素(UN)を測定した．

動物は投与期間終了後，断頭・屠殺し，解剖，肉眼的観察を行い，心臓，肺，肝臓，腎臓，脾臓および精巣を摘出，秤量した．摘出した臓器は10%緩衝ホルマリン液で固定した．膀胱は注射筒を用い残留尿を除去した後，10%緩衝ホルマリン液0.2%-0.3m*l* を注入し膨張させ内尿道口付近を結紮，固定した．膀胱は1週間固定後，正中線で2分し，粘膜面の観察および重量の測定を行った．固定後の各臓器は定法に従ってパラフィン・エオジン重染色を行い，光顕的に観察した．

推計学的分析：

体重，摂餌量，摂水量，血清生化学的検査および臓器重量値の検定は，Bartlett 検定法を用い，分散の均一性について検定し，分散が一様であれば一元分散分析および Sheffe の多重比較検定を行い，分散が非一様であれば Kruskal-Wallis 検定および Sheffe 型の順位和検定を行った．危検率は5%に置いた．

結　　果

実験期間中，実験40週に1.3%群に一匹死亡がみられたほか，対照群，投与群とも異常な行動や特異な症状を呈すものは認められなかった．

体重は Fig. 1 に示したように，全期間を通して投与量

Table 1. Food Consumption

		Dietaly level of OPP (%)			
		0[1]	0.65	1.3	2.6
Wk on study	No.of mice	20	20	20	20
0		3.6±0.1[2]	3.7±0.1	2.7±0.1*	1.5±0.1*
2		4.2±0.2	3.9±0.3	4.0±0.3	3.1±0.1*
4		4.5±0.1	4.3±0.3	4.6±0.2	3.4±0.3
6		5.1±0.1	5.1±0.3	5.3±0.3	3.9±0.1*
8		5.2±0.2	5.5±0.2	5.7±0.2	5.6±1.1
10		5.0±0.1	5.2±0.3	5.3±0.2	4.1±0.1*
12		5.1±0.3	5.6±0.1	5.8±0.3	5.9±0.8
17		5.1±0.1	5.4±0.4	6.0±0.3	8.8±1.9*
21		5.5±0.3	5.5±0.3	6.1±0.2	7.8±1.6*
25		5.3±0.2	5.0±0.5	6.1±1.1	5.0±0.2
30		4.4±0.3	4.5±0.3	4.7±0.3	4.3±0.3
34		4.2±0.2	4.1±0.5	4.1±0.2	4.8±0.5
38		4.3±0.2	4.2±0.3	4.1±0.2	4.5±0.3
43		4.0±0.2	4.3±0.5	4.4±0.2(19)[3]	4.1±0.3
47		4.0±0.2	4.1±0.2	4.3±0.4(19)	4.2±0.4
51		4.0±0.4	4.6±0.2	4.8±0.3(19)*	4.1±0.3
Daily mean consumption (g)		4.6	5.0	5.2	4.7
(g/100g B.W.)		13.2	14.1	15.2	17.2

1) Basal diet (control). 2) Mean± SD (g/mouse/day). 3) No.of mice examined.
* Significantly different from control at $p<0.05$.

の増加に伴った増加抑制がみられ，1.3%群および2.6%群では対照群に比べ全期間有意に小さかった．特に2.6%群では実験2週まで体重が減少し，その後増加に転じたが，実験終了時まで強い増加抑制がみられた．

摂餌量を Table 1に示した．投与開始直後は1.3%群および2.6%群で対照群に比べ有意に少なく，2.6%群では対照群の1／2以下であった．その後1.3%群は対照群と大差がなかったが，2.6%群では実験2，6，10週で有意に少なく，実験 17，21週で有意に多かった．一日平均摂餌量は絶対値で各群とも大差なく，体重比では投与量に比例して多くなる傾向がみられた．

摂水量を Table 2に示した．0.65%群では対照群に比べ，実験38週以後有意に多かった．1.3%群は対照群に比べ，投与開始直後は有意に少なく，実験10週以降，有意に多かった．2.6%群では投与開始直後，対照群に比べ約1／2と有意に少なく，その後も対照群より少ない状態が続いたが，実験21週以降一転して対照群より多くなり，実験30週からは有意に多くなった．一日平均摂水量は，絶対量，体重比とも対照群に比べ1.3%群で多かった．

被検物質の総摂取量は0.65%群 8.3g，1.3%群17.4gおよび2.6%群 35.6gで投与濃度比に比例してほぼ2倍になっていた．

尿検査における尿 pH 値の分布は，各測定週とも対照群と投与群の間に著明な差は認められなかった(Table3).

血清生化学検査の結果を Table 4に示した．各測定項目とも投与量に関連した変化は認められなかったが，2.6%群では対照群に比べ UN 値が有意に低く，GOT，GPT および LDH 値がやや高かった．

臓器重量を Table 5に示した．肝臓の0.65，1.3%群および膀胱を除く投与群の各臓器重量は，対照群と比較して小さく，0.65%群の左右腎臓，1.3%群の心臓，左右腎臓，2.6%群の心臓，左右腎臓および左右精巣は有意に小さかった．特に腎臓は左右とも投与群増加に伴う重量の減少が著明にみられた．膀胱は各投与群とも対照群より大きく，1.3%群では有意に大きかった．肝臓は1.3%群で有意に大きかった．体重比重量は，2.6%群の脾臓を除く各測定臓器で対照群より大きく，さらに

Table 2. Water Consumption

		Dietaly level of OPP (%)			
		0[1]	0.65	1.3	2.6
Wk on study	No.of mice	20	20	20	20
0		5.8±0.3[2]	5.6±0.5	4.6±0.5*	2.7±0.1*
2		7.2±0.4	6.2±1.0	6.5±1.2	4.8±0.1*
4		7.4±0.6	6.5±1.0	7.3±0.9	5.1±0.3*
6		7.4±1.0	7.2±0.7	7.7±0.9	5.5±0.2*
8		7.0±0.9	7.7±1.0	8.3±0.5	5.9±0.3
10		7.1±0.6	7.5±0.7	8.6±0.7*	6.3±0.3
12		6.9±0.7	7.3±0.6	8.4±0.4*	6.3±0.5
17		6.9±0.2	6.9±0.6	8.6±1.0*	6.8±0.4
21		6.7±0.7	7.0±0.6	9.2±1.0*	7.0±0.3
25		6.2±0.5	6.3±0.6	8.5±0.3*	7.1±0.5
30		5.3±0.4	6.2±0.9	7.6±0.2*	6.7±0.4*
34		4.8±0.6	6.0±0.8	7.6±0.6*	7.0±0.6*
38		4.7±0.2	5.7±0.2*	7.8±0.2*	7.2±0.6*
43		4.1±0.4	5.8±0.7*	8.0±0.8(19)[3]*	6.9±0.3*
47		3.9±0.2	5.4±0.4*	8.0±0.6(19)*	7.0±0.3*
51		4.2±0.4	5.8±0.7*	8.4±0.7(19)*	7.1±0.1*
Daily mean consumption (g)		6.0	6.4	7.8	6.2
(g/100g B.W.)		17.8	19.6	24.3	21.5

1) Basal diet (control). 2) Mean± SD (g/mouse/day). 3) No.of mice examined.
* Significantly different from control at $p<0.05$.

0.65%群の膀胱，0.65%および1.3%群の脾臓，2.6%群の心臓以外はいずれも有意に大きかった．

病理解剖学的検索では著明な変化は認められなかった．

組織学的検索では Table 6に示す如く肝臓および腎臓で明らかな変化が観察された．

肝臓では肝細胞に軽度の腫大を伴う核の大小不同性が1.3および2.6%群の全例に見られた．この変化は2.6%群の3例が軽度であったが，他は何れも極く軽度なものであった．肝細胞の限局性の巣状壊死が1.3%群で2/20(20例中2例に変化が見られたの意，以下同様)および2.6%群で13/20に認められ，2.6%群の8例が軽度，他は極く軽度な変化であった．肝細胞あるいは貪食細胞に黄色微細顆粒の沈着が見られた．変化は1.3%群で8/20，2.6%群で17/20に発生し，1.3%群の1例および2.6%群の7例が軽度，他は極く軽度な変化であった．肝臓でのこれらの変化は対照群では見られず，OPP投与群(濃度)に比例して発生頻度および変化程度とも高くなっていた．腎臓では尿細管上皮細胞の小型化，核の軽度膨化，細胞質の好塩基性化および基底膜の肥厚が投与群で見られた．変化は0.65%群で13/20，1.3および2.6%群では全例に発生し，このうち軽度な変化は0.65%群で6例，1.3%群で9例および2.6%群で15例で，さらに中等度な変化が2.6%群で1例に認められた．尿細管上皮細胞の壊死は極く軽度および軽度に1.3%群で5例および2.6%群で8例にそれぞれ観察された．集合管上皮の萎縮および乳頭管上皮細胞のエオジン好染化・腫脹，核の膨化などの変化が1.3%および2.6%群で見られ，2.6%群では乳頭管上皮細胞の壊死が4例認められた．乳頭移行上皮細胞の壊死および腎盂内に壊死細胞とその落屑塊が見られる例が2.6%群で10/20に発生した．腎臓におけるこれらの変化は対照群では見られず，OPP投与群(濃度)に比例して発生頻度および変化程度とも高くなっていた．この他，投与群では脾臓および精巣の萎縮が見られた．脾臓では赤および白脾髄ともに構成成分が減少していた．変化は極く軽度で，0.65%群で4/20，1.3%群で8/20，2.6%群で9/20に認められた．精巣では一部の精細管の精上皮の萎縮あるいは壊死が認められた．変化は極く軽度で1.3%群で1/20，2.6%群で2

Table 3. Distribution of Urinary pH Values

pH*		<5.8	·	·	·	6.2	·	·	·	6.6	·	·	·	7.0	·	·	·	7.4<
Before treatment																		
Ⅰ[a]	10[b]	2				1		2	1	2		1		1				
Ⅱ	10	1				2		3		3				1				
Ⅲ	10	2				1	2	1		3		1						
Ⅳ	10	3			1	3		1			1	1						
Wk 1																		
Ⅰ	10	5				1		2				1						1
Ⅱ	10	5				4		1										
Ⅲ	10	4				2		1		1				1				1
Ⅳ	10	8				1				1								
Wk 5																		
Ⅰ	10	2				4		1		3								
Ⅱ	10	1				2			1	3	1		1		1			
Ⅲ	10				1	1		3	1		1	1		1	1			
Ⅳ	10		1	1	2	1	2			2	1							
Wk 9																		
Ⅰ	10			2	1	1		2		1		2	1					
Ⅱ	10					6				2	2							
Ⅲ	10	1		2		6		1										
Ⅳ	10			3		2		2		2		1						

pH		<5.8	·	·	·	6.2	·	·	·	6.6	·	·	·	7.0
Wk 13														
Ⅰ	10				2	4		2		1	1			
Ⅱ	10	7				3								
Ⅲ	10				6	2					1	1		
Ⅳ	10	2		1	2	1	1	1		2				
Wk 26														
Ⅰ	10	1			2	3		1		3				
Ⅱ	10	3			1	3				3				
Ⅲ	10	2			1	5		1		1				
Ⅳ	10	2		2	1	1		2		2				
Wk 39														
Ⅰ	10	7		1		1				1				
Ⅱ	10	1		3	1	2		1		2				
Ⅲ	10	6		1	1	1				1				
Ⅳ	10	3			1	5				1				
Wk 52														
Ⅰ	10	5			3	2								
Ⅱ	10	1		4		2		1		2				
Ⅲ	10	4		4	1	1								
Ⅳ	10	5		1		2				2				

a)Group Ⅰ : Basal diet(control), Group Ⅱ : 0.65% OPP in diet, Group Ⅲ : 1.3% OPP in diet, Group Ⅳ : 2.6% OPP in diet.

b)No.of mice examined.

* Each division represent 0.1 on pH value.

Table 4. Blood Biochemistry

Group	No.of mice examined	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	γ-GPT (IU/L)	LDH (IU/L)	UN (mg/dl)
Basal diet(Control)	7	167.6±46.4[1)]	16.3±3.5	5.36±0.78	1312.0±395.3	28.80± 2.14
0.65% OPP	7	158.4±40.7	18.0±5.0	4.76±0.81	1136.9±390.8	31.24±12.35
1.3% OPP	7	151.9±23.4	16.3±5.1	4.77±0.49	1199.1±157.3	24.19± 2.06
2.6% OPP	5	189.6±31.2	23.4±2.7	4.56±0.67	1475.0±274.4	22.40± 1.94*

1) Mean±SD

* Significantly different from control group at $p<0.05$.

Table 6. Histopathological Findings of Liver and Kidney in Mice Treated with *o*-Phenylphenol(OPP) for 52 Weeks

Treetment[1)]		Control	0.65% OPP	1.3% OPP	2.6% OPP
No. of mice examined[2)]		20	20	20	20
Liver	[3)]				
Anisonucleosis of liver cells	−	20	20	0	0
with enlargement	±	0	0	20	17
	+	0	0	0	3
Focal necrosis of liver cells	−	20	20	18	7
	±	0	0	2	5
	+	0	0	0	8
Deposit of pigment in liver	−	20	20	12	3
cells and phagocytes	±	0	0	7	10
	+	0	0	1	7
Kidney					
Degeneration of tubular	−	20	7	0	0
epithelium	±	0	7	11	4
	+	0	6	9	15
	++	0	0	0	1
Necrosis of tubular epithelium	−	20	20	15	12
	±	0	0	4	6
	+	0	0	1	2
Dilatation of tubules	−	20	20	20	15
	±	0	0	0	1
	+	0	0	0	3
	++	0	0	0	1
Degeneration of ductular	−	20	20	19	17
epithelium	±	0	0	1	3
Necrosis of ductular epithelium	−	20	20	20	16
	±	0	0	0	4
Necrosis of transitional cells	−	20	20	20	10
in papilla and/or	±	0	0	0	1
cell debris in pelvis	+	0	0	0	8
	++	0	0	0	1

1) Mice fed diets containing each concentration of OPP.

2) No.of mice survived till wk 26 and examined histopathologically.

3) − : no change, ± : very sight changes, + : slight changes, ++ : moderate changes.

Table 5. Mean Values of Organ Weight

Group	No. of mice[1]	Body weight(g)	Liver (g)	Heart (mg)	Kidney(L) (mg)	Kidney(R) (mg)	Spleen (mg)	Testis(L) (mg)	Testis(R) (mg)	Bladder (mg)
Basal diet (control)	20	45.9±2.5[2]	2.18±0.17[2] (4.75±0.19)[3]	185.6±11.3 (404.7±17.3)	288.1±19.1 (628.3±30.1)	308.2±22.0 (672.2±38.9)	110.3±19.6 (241.0±43.8)	114.1± 4.8 (249.2±14.1)	117.5± 5.6 (256.6±13.6)	38.8± 7.3 (84.6±15.4)
0.65% OPP	20	40.6±2.2	2.28±0.24 (5.61±0.38*)	178.8±10.5 (441.6±27.0*)	266.8±14.2* (658.7±34.7*)	286.2±16.4* (706.5±34.7*)	97.9±21.5 (241.4±51.9)	111.6± 7.5 (275.8± 2.7*)	115.6± 7.6 (285.7±22.2*)	40.4± 7.3 (99.7±18.0)
1.3% OPP	19	36.7±1.9*	2.42±0.19* (6.60±0.31*)	172.8± 9.7* (471.5±24.3*)	248.6±15.3* (677.8±27.9*)	268.8±17.7* (732.8±30.9*)	96.6±14.5 (262.8±33.6)	110.0± 5.1 (300.4±19.1*)	112.8± 5.6 (308.2±19.8*)	53.0±22.7* (143.7±56.7*)
2.6% OPP	20	32.1±1.2*	2.15±0.16 (6.69±0.41*)	133.4± 6.6* (416.1±16.1)	214.1±13.7* (667.6±34.2*)	235.0±11.5* (733.4±34.0*)	72.4± 7.4* (225.7±20.0)	106.6± 5.3* (332.7±16.7*)	111.0± 4.9* (346.6±20.0*)	43.3±21.9 (134.6±64.8*)

1) No.of organs weighted.
2) Absolute mean weight ±SD.
3) Relative mean weight ± SD.
* Significantly different from control group at $p<0.05$.

／20と低頻度の発生であった．膀胱での上皮細胞の過形成あるいは腫大などの変化はみられなかった．

腫瘍は肺腺腫が対照群で1例，肝臓腺腫が0.65%および2.6%群で各1例，1.3%群で2例それぞれ観察された．

考　　察

OPP のマウスに対する影響について検討した．

体重は全期間を通して投与量に関連した増加抑制がみられた．これは2.6%群の実験初期を除いて，各投与群の摂餌量は対照群と大差がないことから，OPP 摂取の影響で摂餌効率が悪化したのではないかと思われる．2.6%群は実験2週まで摂餌量の低下とともに体重が減少していることから，この期間の体重減少は OPP の作用に加えて，OPP の味，刺激性等による摂餌忌避が大きく関与していると考えられる．

臓器重量をみると，肝臓は投与群で体重が小さくなっているにも拘らず，絶対重量は対照群と大差ないかあるいは大きくなっていた．これは体重比重量がいずれも大きいことから，OPP の作用によるものと思われる．膀胱重量も肝臓と同様の傾向を示し，OPP によるものと思われるが，後にも述べるように組織学的に変化はなく，今後の検討が必要である．投与群の他の臓器はは投与量に関連した減少が見られた．この重量減少は腎臓では障害との関連も考えられるが，いずれも体重減少と連動してみられ，体重比重量が大きいことを考慮すると，体重増加あるいは成長抑制に関連したものと思われる．

組織学的検索では，投与群に肝臓および腎臓の変化が発生頻度，変化程度とも用量，反応関係を持って認められた．肝臓は肝細胞の限局性の壊死，肝細胞核の大小不同などが認められ，これらの変化は対照群にはみられないことから OPP の作用によるものと思われる．マウスでの OPP による肝障害に関しては報告はなく，OPP–Na では2年間投与で肝細胞癌の発生が観察されている[3,4]．本実験では上記の変化とともに GOT，GPT および LDH 値が2.6%群で上昇傾向を示しており，肝障害について今後さらに検討する必要があると思われる．

腎臓では尿細管上皮細胞の変性や壊死，乳頭移行上皮細胞の壊死等が観察された．OPP，OPP–Na による腎障害はラットの実験[1,2,5]でも指摘されており，本実験でもOPP によることは明らかである．腎障害の一つの指標となる UN 値が2.6%群で有意に低かった．一般に腎障害では UN 値が上昇するといわれているが，今回の低下の意味するところは明らかでない．投与群で実験後半から摂水量が対照群に比べ多くなる傾向がみられた．これは OPP 排出のためあるいは腎障害によるものなどが

考えられ，尿量の測定などさらに検討が必要と思われる．

膀胱は絶対，体重比重量とも対照群に比べやや大きかったものの，組織学的に変化がみられなかった．ラットではHIRAGAら[1]がOPPの13週間投与で乳頭腫の発生を観察しており，OPPによる膀胱腫瘍の発生には種差があると考えられる．

以上，OPPはマウスの体重増加を抑制し，肝臓および腎臓障害を惹起した．また，OPP投与に関連した腫瘍の発生は認められず，OPPによる膀胱腫瘍の発生には種差があることが明らかとなった．ラットでは膀胱腫瘍の誘発物質がOPPあるいはOPP−Naの代謝産物である2−phenyl−1, 4−benzoquinone(PBQ)であろうという報告[6]もあり，今後種差による代謝系や代謝産物の相違などについてさら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) 奥田宗久　：名市大医誌，37, 157-186, 1986.

4) Hagiwara, A., Shibata, M., Hirose, M., Fukushima, S. and Ito, N.：*Fd Chem Toxic.*, 22, 809-814, 1984.

5) Hodge, H.C., Maynard, E. A., Blanchet, H. J., Jr., Spencer, H. C. and Rowe, V. K.：*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 104, 202-210, 1952.

6) Morimoto,K., Fukuoka, M., Hasegawa, R., Tanaka, A., Takahashi, Y.：*Jpn. J. Cancer Res.* (*Gann*), 78, 1027-1030, 1987.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 40, 289-297, 1989

チアベンタゾールおよびオルトフェニールフェノールのマウスを用いた52週間の併用毒性試験

三栗谷 久 敏*, 藤 井 孝*, 米 山 允 子*,
矢 野 範 男*, 湯 澤 勝 廣*, 長 澤 明 道*,
佐々木 美枝子*

Toxicity of Thiabendazole and *o*-Phenylphenol by Simultaneous Administration to Mice for 52 Weeks

HISATOSHI MIKURIYA*, TAKASHI FUJII*,
MASAKO YONEYAMA*, NORIO YANO*,
KATSUHIRO YUZAWA*, AKEMICHI NAGASAWA*
and MIEKO SASAKI*

Summary

Thiabendazole (TBZ) had the enhancing effect on urinary bladder carcinogenesis induced by sodium *o*-phenylphenate (OPP-Na) in rats.

The present study was performed to examine the combined effects of simultaneous administation of TBZ and *o*-phenylphenol (OPP) in mice.

Groups of 20 male Crj : B6C3F$_1$ mice were fed the basal diet (control, group Ⅰ), diet containing 0.2% TBZ (group Ⅱ), 0.2% TBZ plus 0.65% OPP (group Ⅲ), 0.2% TBZ plus 1.3% OPP (group Ⅳ) or 0.2% TBZ plus 2.6% OPP (group Ⅴ) for 52 weeks.

The survival rates at week 52 were 100% (20/20) of group Ⅰ, 90% (18/20) of group Ⅱ, 90% (18/20) of group Ⅲ, 75% (15/20) of group Ⅳ and 70% (14/20) of group Ⅴ.

Mean body weights of the treated groups were significantly lower throughout the study than that of group Ⅰ.

The average daily food intake was 4.7 g, 4.9 g, 4.8 g, 4.5 g and 4.6 g in group Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ, respectively.

There were no dose-related effects on clinical signs, urinary pH or blood biochemistry.

A dose-related decrease in the kidney weight was observed in group Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ. The spleen weight of the treated groups was significantly lower than that of group Ⅰ.

Both incidence and severity of necrosis of liver cells, tubular and ductular epithelium and transitional cells of papilla in the kidney showed a dose-related increase in group Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ. There were increased incidences of atrophy and hemosiderosis of the spleen in group Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ. No increase in tumor incidenece were observed in the treated groups.

Keywords : thiabendazole, *o*-phenylphenol, Crj : B6C3F$_1$mouse, simultaneous administration

当部ではこれまでに防かび剤であるオルトフェニルフェノール(OPP)およびそのナトリウム塩(OPP-Na)がラット膀胱に対して癌原性を有することを明らかにしてきた[1,2]. さらにOPP-Naのラット膀胱発癌が, 同じ防

*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 Metoropolitan Resedrch Laboratory of Publice Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

かび剤であるチアベンタゾール(TBZ)との併用によって増強されることを確認した[3-5]．一方，マウスを用いた実験では現在までOPP，OPP-Naに膀胱を含む他の器官，組織に腫瘍の誘発が認められていない[6,7]．

このようなことから，今回著者らはTBZとOPPをマウスに同時に投与し，腫瘍発生の有無やその他の影響について検討することとし，52週間の同時投与試験を行った．

実験材料および方法

被検物質：TBZはMerck Sharp and Dohme International, NJ. USAのthiabendazole microfine MSD (Lot No. BZA-539)を，OPPはDow Chemical Co., MJ, USAのDowicide 1 (Lot No. MM 01040)を用いた．

実験動物・飼育管理：日本チャールスリバー㈱社生育のCrj：B6C3F$_1$マウス雄を4週令で購入した．マウスは室温22－24°，湿度50-60%，換気1時間に10回(効率99.9%HEPAフィルター経由)，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(チップ床じき)に5匹づつ収容，環境への馴化と疾症の有無を観察するために1週間予備飼育し，この期間飼料(日本クレア社，BE-2)と水道水(細菌ろ過器経由)を自由に摂取させた．

実験方法：粉末飼料(CE-2)に被検物質を添加し，固形化したものを実験飼料とした．マウスは1群20匹ずつ，基礎飼料摂取群(Ⅰ群)，0.2%TBZ添加飼料摂取群(Ⅱ群)，0.2%TBZに0.65%，1.3%および2.6%OPPをそれぞれ加えた添加飼料摂取群(Ⅲ，ⅣおよびⅤ群)の5群を設定し，合計100匹用いた．マウスが5週令になった時点から添加および基礎飼料を水道水とともに52週間自由に摂取させた．

なお，被検物質濃度の設定に当たっては，これまでのラットの実験を参考にした[1,3-5]．

動物の一般状態は午前，午後の2回観察した．体重，摂餌量および摂水量は実験開始後13週間は隔週，以後4週間(一部5週間)毎に全匹数を測定した．薬物摂取量は摂餌量から求めた．尿検査は実験開始前と実験1，5，9，13，26，39および52週(実験開始週を実験0週とした)に，マウスを捕捉の際放出する尿について，BTB (Brom-thymol-blue)pH試験紙(東洋濾紙，東京)を用い，pHの測定を行った．血清生化学的検査は断頭，屠殺時に得た血液を遠心管にとり，3000 rpmで10分間遠心，上清を分離し，Automatic Analyzer 705(日立)を用いて，グルタミン酸オキザロ酢酸トラスアミナーゼ活性(GOT)，グルタミン酸ピルビン酸トラフアミナーゼ活性(GPT)，γ-グルタミルトラスペプチターゼ活性(γ-GTP)，乳酸デヒドロゲナーゼ活性(LDH)および尿素窒素(UN)を測定した．

動物は投与期間終了後，断頭・屠殺し，解剖，肉眼的観察を行い，心臓，肺，肝臓，腎臓，脾臓および精巣を摘出，秤量した．摘出した臓器は10%緩衝ホルマリン液で固定した．膀胱は注射筒を用い残留尿を除去した後，10%緩衝ホルマリン液0.2-0.3mlを注入し膨張させ内尿道口付近を結紮，固定した．膀胱は1週間固定後，正中線で2分，粘膜面の観察および重量の測定を行った．固定後の各臓器は定法に従ってパラフィン切片を作成し，ヘマトキシリン・エオジン重染色を行い，光顕的に観察した．

推計学的分析：体重，摂餌量，摂水量，血清生化学的検査および臓器重量値の検定は，Bartlett検定法を用い，分散の均一性について検定し，分散が一様であれば一元分散分析およびSheffeの多重比較検定を行い，分散が非一様であればKruskal-Wallis検定およびSheffe型の順位和検定を行った．危険率は5%に置いた．

Table 1. Values of Body Weight and Chemical Intake

Group	Teatment	No. of mice	Initial body weight(g)	Final body weight(g)	Total chemical intake(g/mouse)	
					OPP	TBZ
Ⅰ	Basal diet (control)	20	21.3±0.7[1)]	45.9±2.5(20)[2)]	0	0
Ⅱ	0.2% TBZ	20	21.2±0.9	35.5±1.1(18)*	0	2.6
Ⅲ	0.2% TBZ+0.65% OPP	20	21.6±1.0	35.1±1.2(18)*	8.3	2.7
Ⅳ	0.2% TBZ+1.3% OPP	20	21.7±1.0	33.1±1.4(15)*	17.1	2.6
Ⅴ	0.2% TBZ+2.6% OPP	20	21.3±1.1	30.1±1.8(14)*	32.9	2.5

1) Mean±SD.
2) No. of mice survived.
*Significantly different from group Ⅰ at $p<0.05$.

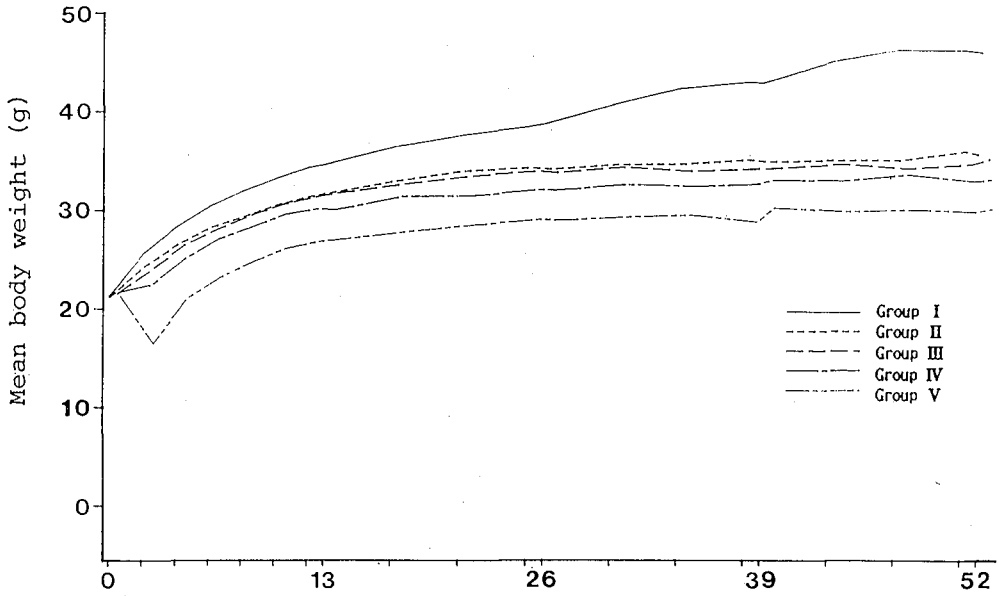


Fig. 1. Changes of Mean Body Weights
Group I : Basal diet (control).
Group II : 0.2% TBZ in diet,
Group III : 0.2% TBZ plus 0.65% OPP in diet.
Group IV : 0.2% TBZ plus 1.3% OPP in diet.
Group V : 0.2% TBZ plus 2.6% OPP in diet.

結　　果

投与期間中，II群2例(実験34，41週に各1例)，III群2例(実験30，51週に各1例)，IV群5例(実験21，24，35，37，51週に各1例)，V群6例(実験0週)の死亡がみられた．剖検によると，V群を除く他の群の死亡動物の多くは尿道にタンパク塊様のものがつまり，膀胱が尿によって膨満していた．V群は死亡時に“痩せ”が目立った．生存したマウスは対照群，投与群とも異常な行動や特異な症状を呈するものは認められなかった．

体重の推移をFig. 1に示した．各投与群とも全期間を通して投与量に関連した増加抑制がみられ，I群(対照群)に比べ全期間有意に小さかった．II，III，IV群は，実験21週前後まで僅かながら増加していたが，その後は小幅な増減を繰り返した．V群は実験2週まで体重が減少し，その後増加に転じたが，強い増加抑制を受け，他の投与群と同様の推移をした．

摂餌量はIV群で実験2週まで，V群で実験6週までI群に比べ有意に少なかったほか，各群とも大差なかった．投与期間中を通しての一日平均摂取量は，絶対値で各群とも大差なく，体重比ではOPPの投与量(濃度)に比例して多くなる傾向がみられた(Table 2)

摂水量をTable 3に示した．II群はI群に比べ実験8週以降，実験51週を除き有意に多かった．III群ではI群に比べ実験10週以降，有意に多かった．IV群はI群に比べ実験0週で有意に少なく，実験10週以後有意に多かった．V群では実験0週でI群に比べ約1／2と有意に少なかったが，その後除々にI群に近づき，実験10週からはI群より多くなり，実験25週以降有意に多くなった．投与期間中を通しての一日平均摂水量は，絶対値，体重比とも投与群が多かった．

被検物質の総摂取量はTable 1に示した如く，TBZが各投与群で大差なく，OPPは濃度比に比例してほぼ2倍ずつ増加していた．

尿検査における尿pH値の分布をTable 4に示した．各群とも測定週によって分布の変動が大きく，投与量に関連した変化は特に認められなかった．全体的には各群とも実験39週以降低い範囲に分布する傾向が認められた．

血清生化学検査の結果をTable 5に示した．各測定項目とも投与量に関連した変化は認められなかったが，V群でGOT，GPTおよびUN値がI群に比べやや高

Table 2. Food Consumption

Wk on study Group	I	II	III	IV	V
0	3.6±0.1(20)[2)]	3.7±0.1(20)	3.2±0.1(20)	2.0±0.1(20)*	2.1±0.4(20)*
2	4.2±0.2(20)	3.9±0.1(20)	4.1±0.2(20)	3.7±0.2(20)*	3.1±0.1(14)*
4	4.5±0.1(20)	4.4±0.4(20)	4.5±0.2(20)	4.6±0.1(20)	3.5±0.3(14)*
6	5.1±0.1(20)	5.0±0.3(20)	5.3±0.2(20)	5.2±0.2(20)	4.3±0.3(14)*
8	5.2±0.2(20)	5.5±0.3(20)	5.6±0.2(20)	5.6±0.3(20)	3.0±4.2(14)
10	5.0±0.1(20)	5.2±0.3(20)	5.3±0.1(20)	5.3±0.1(20)	4.9±0.5(14)
12	5.1±0.3(20)	5.4±0.3(20)	5.9±0.5(20)	6.1±0.5(20)	7.0±3.9(14)
17	5.1±0.1(20)	5.7±0.4(20)	5.8±0.5(20)	5.4±0.3(20)	6.1±3.2(14)
21	5.5±0.3(20)	5.4±0.3(20)	6.0±0.7(20)	5.7±0.3(19)	7.2±2.9(14)
25	5.3±0.2(20)	5.3±0.2(20)	5.3±0.1(20)	5.0±0.2(18)	4.5±1.0(14)
30	4.4±0.3(20)	4.6±0.1(20)	4.5±0.3(20)	4.8±0.2(18)	4.0±0.4(14)
34	4.2±0.2(20)	4.5±0.1(19)	4.6±0.3(19)	4.4±0.2(18)	4.5±1.0(14)
38	4.3±0.2(20)	4.5±0.1(19)	4.6±0.3(19)	5.6±2.1(16)	4.2±0.2(14)
43	4.0±0.2(20)	4.4±0.2(18)	4.6±0.1(19)	5.1±0.8(16)	4.5±0.7(14)
47	4.0±0.2(20)	4.3±0.1(18)	4.5±0.4(19)	4.3±0.3(16)	4.3±0.4(14)
51	4.0±0.1(20)	4.1±0.2(18)	4.3±0.6(19)	4.1±0.4(16)	4.4±0.2(14)
Daily mean consumption (g)	4.6	4.7	4.9	4.8	4.5
(g/100g B.W.)	13.2	15.3	15.8	16.1	16.9

1) Group I : Basal diet, Group II : 0.2%TBZ in diet (control), Group III : 0.2%TBZ plus 0.65%OPP in diet, Group IV : 0.2%TBZ plus 1.3%OPP in diet, Group V : 0.2%TBZ plus 2.0%TBZ plus 2.6%OPP in diet.
2) Mean±SD (g/mouse/day), and no. of mice examined in the group showed in parenthesis.
* Significantly different from group I at $p<0.05$.

Table 3. Water Consumption

Wk on study Group	I[1)]	II	III	IV	V
0	5.8±0.3(20)[2)]	5.1±0.3(20)	5.6±0.6(20)	3.7±0.5(20)*	2.5±0.4(20)*
2	7.2±0.4(20)	6.7±0.6(20)	6.5±0.9(20)	6.2±0.4(20)	5.4±0.5(14)*
4	7.4±0.6(20)	7.4±1.0(20)	7.3±0.7(20)	6.9±0.2(20)	6.0±0.4(14)*
6	7.4±1.0(20)	8.0±1.1(20)	8.0±0.2(20)	7.8±0.7(20)	6.6±0.6(14)
8	7.0±0.9(20)	8.3±1.0(20)*	8.3±0.3(20)	8.1±0.4(20)	7.0±0.5(14)
10	7.1±0.6(20)	8.3±0.6(20)*	8.4±0.3(20)*	8.4±0.5(20)*	7.4±0.5(14)
12	6.9±0.7(20)	8.3±0.9(20)*	8.3±0.7(20)*	8.3±0.4(20)*	7.3±0.7(14)
17	6.9±0.2(20)	8.3±0.3(20)*	8.2±0.5(20)*	8.6±0.5(20)*	7.3±0.6(14)
21	6.7±0.7(20)	8.3±0.3(20)*	7.8±0.1(20)*	8.7±0.2(19)*	7.5±0.4(14)
25	6.2±0.5(20)	7.7±0.4(20)*	7.6±0.3(20)*	8.8±0.4(18)*	7.3±0.4(14)*
30	5.3±0.4(20)	6.7±0.6(20)*	6.7±0.4(20)*	8.8±0.4(18)*	7.3±0.4(14)*
34	4.8±0.6(20)	6.7±0.3(19)*	6.8±0.4(19)*	8.3±0.3(18)*	7.5±0.6(14)*
38	4.7±0.2(20)	6.2±0.6(19)*	6.7±0.3(19)*	8.7±0.4(16)*	7.3±0.3(14)*
43	4.1±0.4(20)	6.3±0.8(18)*	6.8±0.6(19)*	8.7±0.8(16)*	7.4±0.6(14)*
47	3.9±0.2(20)	5.8±0.3(18)*	6.7±0.7(19)*	8.2±0.7(16)*	7.0±0.3(14)*
51	4.2±0.4(20)	5.4±0.3(18)	6.0±0.6(19)*	7.6±1.2(16)*	7.2±0.6(14)*
Daily mean consumption (g)	6.0	7.1	7.2	7.9	6.8
(g/100g B.W.)	17.8	23.0	23.6	26.3	25.6

1) Group I : Basal diet, Group II : 0.2%TBZ in diet, Group III : 0.2%TBZ plus 0.65% OPP in diet, Group IV : 0.2%T BZ plus 1.3% OPP in diet, Group V : 0.2% TBZ plus 2.6% OPP in diet.
2) Mean±SD (g/mouse/day), and no. of mice examined in the group showed in parenthesis.
* Significantly different from group I at $p<0.05$.

Table 4. Distribution of Urinary pH Values

pH*		<5.8				6.2				6.6				7.0				7.4<
Before treatment																		
I[a]	10[b]	2				1		2	1	2		1		1				
II	10	1		1		1	1			3				3				
III	10	1				3		1		4		1						
IV	10	1				4		1						3				1
V	10	2				2				2		1		2		1		
Wk 1																		
I	10	5				1		2				1						1
II	10	6				2		1		1								
III	10	3				3		2		1		1						
IV	10	2				4		3		1								
V	7	4				2						1						
Wk 5																		
I	10	2				4		1		3								
II	10					4		1		1		3		1				
III	10	1	2	1		2					1		1					2
IV	10			2	1	4						2		1				
V	7	1				4		1	1									
Wk 9																		
I	10			2	1	1		2		1		2	1					
II	10	1		2		3				3		1						
III	10			1		2		2		2	1	1		1				
IV	10	2				1		2		1	1	2			1			
V	7	5			1			1										

pH		<5.8				6.2				6.6				7.0	
Wk 13															
I	10				2	4		2		1	1				
II	10	1				5		1		2		1			
III	10	1	1		1			1		4			1		1
IV	10	2				3				5					
V	7	4				1		1				1			
Wk 26															
I	10	1			2	3		1		3					
II	10	2				2		2			1	1		2	
III	10				1	2		1		6					
IV	10	2		2		3		2		1					
V	7	1				1		2		2		1			
Wk 39															
I	10	7		1		1				1					
II	10	7		1		2									
III	10	5		2		1		1				1			
IV	10	1		4	1	1				2		1			
V	7	1		1		5									
Wk 52															
I	10	5			3	2									
II	10	4		3		2				1					
III	10	4		2				1		1		2			
IV	10	4		2		4									
V	7	4		2		1									

a) Group I : Basal diet, Group II : 0.2% TBZ in diet, Group III : 0.2% TBZ plus 0.65% OPP in diet, Group IV : 0.2% TBZ plus 1.3% OPP in diet, Group V : 0.2%TBZ plus 2.6% OPP in diet.

b) No. of mice examined.

* Each division represent 0.1 on pH value.

Table 5. Blood Biochemistry

Group[1)]	No. of mice examined	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	γ-GTP (IU/L)	LDH (IU/L)	UN (mg/dl)
Ⅰ	7	167.6±46.4[2)]	16.3±3.5	5.36±0.78	1312.0±395.3	28.80±2.14
Ⅱ	7	150.7±38.0	20.7±3.9	4.20±0.41	1149.6±241.3	24.97±3.07
Ⅲ	7	209.1±65.5	20.6±6.5	5.27±1.41	1664.3±648.1	26.66±6.17
Ⅳ	6	160.0±23.7	15.7±1.5	5.05±0.82	1103.3±294.2	24.30±4.68
Ⅴ	6	223.3±19.1	23.0±3.9	4.82±0.59	1341.8±105.5	33.32±5.94

1) Group Ⅰ : Basal diet (control), Group Ⅱ : 0.2% TBZ in diet, Group Ⅲ : 0.2% TBZ plus 0.65% OPP in diet, Group Ⅳ : 0.2% TBZ plus 1.3% OPP in diet, Group Ⅴ : 0.2% TBZ plus 2.6% OPP in diet.
2) Mean±SD.

かった.

臓器重量を Table 6 に示した. 肝臓のⅣ, Ⅴ群, および膀胱を除く各投与群の臓器重量は, いずれもⅠ群と比較して小さく, Ⅱ群の右腎臓, Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ群の心臓, 左右腎臓, Ⅲ, Ⅴ群の左右精巣および各投与群の脾臓は有意に小さかった. 左右腎臓および心臓は投与量増加に伴う重量の減少がみられた. 肝臓はⅡ群で有意に小さく, Ⅴ群で有意に大きかった. 膀胱はⅤ群でやや大きかった. 体重比重量は, Ⅱ, Ⅲ, Ⅴ群の脾臓およびⅤ群の右腎臓を除く各測定臓器でⅠ群より大きく, Ⅱ, Ⅲ群の左右腎臓, Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ群の肝臓, Ⅳ, Ⅴ群の膀胱および各投与群の心臓, 左右精巣はいずれも有意に大きかった.

病理解剖学的検索では著明な変化は認められなかった.

組織学的検索では Table 7 に示す如く肝臓, 腎臓および脾臓で明らかな変化が観察された. 肝臓では肝細胞の軽度な腫大を伴う核の大小不同性が投与群で全例に認められた. 変化はやや不鮮明ながら小葉中心から中間帯に起こり, そのうち軽度なものはⅡ群で25%(5/20 : 20例変化が見られ, そのうち5例が軽度な変化があったの意, 以下同様), Ⅲ群で37%(7/19), Ⅳ群で50%(8/16), Ⅴ群で64%(9/14)であり, 他は何れも極く軽度なものであった. 肝細胞の限局性の巣状壊死がⅡ群で10%(2/20 : 20例中2例に変化が見られたの意, 以下同様), Ⅲ群で26%(5/19), Ⅳ群で31%(5/16), Ⅴ群で64%(9/14)それぞれ認められた. 肝細胞あるいは貧食細胞に黄色微細顆粒の沈着が見られた. 変化はⅡ群で5%(1/20), Ⅲ群で21%(4/19), ⅣおよびⅤ群では100%(16/16, 14/14)の発生があった. このうちⅣ群の半数, Ⅴ群の全例が軽度あるいは中等度の変化があり, 他は極く軽度な変化であった. 肝臓でのこれらの変化は対照群では見られず, OPP と TBZ 併用投与群では OPP 投与量(濃度)に比例して発生頻度および変化程度とも顕著になっていた.

腎臓では尿細管上皮細胞の核の軽度膨化および細胞質の好塩基性化が投与群で見られた. 変化はⅡ群で35%(7/20), Ⅲ群で74%(14/19), ⅣおよびⅤ群では100%(16/16, 14/14)の発生であった. このうち軽度な変化はⅡ群で43%(3/7), Ⅲ群で21%(3/14), Ⅳ群で50%(8/16), Ⅴで64%(9/14)であり, 他は極く軽度な変化であった. 尿細管上皮細胞の壊死はⅡ群で20%(4/20), Ⅲ群で11%(2/19), Ⅳ群で38%(6/16), Ⅴ群で88%(12/14)の発生であった. このうち軽度な変化はⅣ群で50%(3/6), Ⅴ群で33%(4/12)であり, 他は極く軽度な変化であった. 集合管上皮細胞の萎縮および乳頭管上皮細胞のエオジン好染化・腫脹, 核の膨化などの変化像がⅡ群で5%(1/20), Ⅳ群で13%(2/16), Ⅴ群で29%(4/14)に見られ, そのうち軽度および中等度の変化は各1例づつⅤ群で認められたのみで, 他は極く軽度な変化であった. 集合管および乳頭管上皮細胞の壊死がⅡ群で5%(1/20), Ⅲ群で11%(2/19), Ⅳ群で25%(4/16), Ⅴ群で64%(9/14)それぞれ観察された. これらのうち軽度な変化はⅤ群の1例のみで, 他は極く軽度な変化であった. 乳頭移行上皮細胞の壊死および腎盂内に壊死細胞とその落屑塊が見られる例がⅡ群で10%(2/20), Ⅲ群で11%(2/19), Ⅳ群で38%(6/16), Ⅴ群で88%(12/14)に認められた. このうち軽度および中等度の変化はⅡ群で50%(1/2), Ⅳ群で50%(3/6), Ⅴ群で75%(9/12)であり, 他は極く軽度な変化であった. 腎臓におけるこれらの変化は対照群では見られず, OPP と TBZ 併用群では OPP 投与量(濃度)に比例して発生頻度および変化程度とも高くなっていた. 脾臓では萎縮がみられ, 白脾髄より赤脾髄の赤血球の減少がやや強かった. 変化はⅡ群で45%(9/20), Ⅲ群で58%(11/19), Ⅳ群で50%(8/16), Ⅴ

Table 6. Mean Values of Orgen Weight

Group[1]	No. of mice[2]	Body weight(g)	Liver (g)	Heart (mg)	Kidney(L) (mg)	Kidney(R) (mg)	Spleen (mg)	Testis(L) (mg)	Testis(R) (mg)	Bladder (mg)
Ⅰ	20	45.9±2.5[3]	2.18±0.17[3] (4.75±0.19)[4]	185.6±11.3 (404.7±17.3)	288.1±19.1 (628.3±30.1)	308.2±22.0 (672.2±38.9)	110.3±19.6 (241.0±43.8)	114.1± 4.8 (249.2±14.1)	117.5± 5.6 (256.6±13.6)	38.8± 7.3 (84.6±15.4)
Ⅱ	18	35.5±1.1*	1.99±0.11* (5.62±0.31)	168.8± 6.9 (476.5±18.9*)	263.8±13.4 (744.8±42.0*)	284.9±14.9* (803.8±37.5*)	79.6± 8.2* (224.7±23.7)	107.2± 7.6 (302.7±23.6*)	112.0± 6.9 (316.2±22.0*)	37.5±12.7 (105.8±36.4)
Ⅲ	18	35.1±1.2*	2.13±0.15 (6.06±0.34*)	160.9± 6.2* (458.5±17.2*)	238.1±12.5* (678.2±34.0*)	264.5±17.7* (752.8±39.5*)	78.1± 9.5* (222.5±26.6)	105.9± 8.7* (302.1±28.1*)	108.2± 8.9* (308.1±28.4*)	40.6±14.0 (115.7±40.4)
Ⅳ	15	33.1±1.4*	2.23±0.13 (6.75±0.54*)	150.3±13.0* (454.1±27.8*)	220.6±18.7* (668.4±67.3)	232.3±14.7* (699.8±41.1)	84.6±21.0* (257.7±76.3)	107.4± 5.9 (325.1±15.3*)	110.1± 6.5 (333.1±14.1*)	38.3± 7.5 (116.3±26.0*)
Ⅴ	14	30.1±1.8*	2.48±0.16* (8.25±0.62*)	128.6± 5.5* (427.6±17.1*)	189.8± 7.8* (631.6±28.8)	201.6±10.8* (670.5±32.0)	58.6± 7.0* (194.6±19.1*)	103.0± 8.8* (342.8±31.6*)	105.1± 7.7* (350.1±30.0*)	42.2± 9.5 (140.6±33.7*)

1) Group Ⅰ：Basal diet (control), Group Ⅱ：0.2% TBZ in diet, Group Ⅲ：0.2% TBZ plus 0.65% OPP in diet, Group Ⅳ：0.2% TBZ plus 1.3% OPP in diet, Group Ⅴ：0.2% TBZ plus 2.6% OPP in diet.
2) No. of organs weighed.
3) Absolute mean weight±SD.
4) Relative mean weight±SD.
* Significantly different from group Ⅰ at $p<0.05$.

群で100%(14／14)に認められた．このうち軽度な変化はⅢおよびⅤ群で各2例であり，他は極く軽度な変化であった．ヘモデジリン沈着はⅡ群で45%(9／20)，Ⅲ群で63%(12／19)，ⅣおよびⅤ群で100%(16／16，14／14)に認められた．このうち軽度な変化はⅢ群の2例であり，他は極く軽度な変化であった．これら脾臓での変化は投与群のみに見られ，OPP 投与量(濃度)の増加に伴う発生頻度および変化程度の上昇もやや認められた．

また，Ⅴ群で膀胱上皮の軽度な過形成が1例観察された．

この他，精巣の萎縮が投与群で見られ，精細管の管径の短縮あるいは精上皮の壊死などが認められた．変化はⅣ群で13%(2／16)，Ⅴ群で21%(3／14)に観察された．

腫瘍の発生は肝臓腺腫がⅡ群で2例，Ⅲ群で3例，Ⅳ群で1例それぞれ認められた．

考　　察

TBZ と OPP の同時投与によるマウスへの影響について検討した．

Ⅴ群の死亡が実験0週に集中して6例みられた．この時死を免れた動物は実験終了時まで全て生存したことから，死亡の原因は TBZ，OPP 併用による直接の毒作用，摂餌量，摂水量の減少による栄養障害など，多くの要因が考えられる．

体重は各投与群とも全期間を通してⅠ群より有意に小さかった．TBZ はこれまでのラットの実験から，体重の増加を抑制することが明らかになっており[8,9]，今回の実験のⅡ群でマウスに対しても同様の傾向が認められた．Ⅲ，ⅣおよびⅤ群では OPP の投与量(濃度)の増加に伴う増加抑制が認められ，これら併用群の体重増加抑制はⅡ群より強くみられることから，併用投与による効果，特に OPP の作用が強く働いているものと考えられる．Ⅴ群は実験2週まで体重が減少していた．これは TBZ，OPP 併用による直接の毒作用とともに，この期間の摂餌，摂水量がかなり少なかったことが，大きく影響していると思われる．ラットでは TBZ の投与初期に摂餌忌避がみられるが[8,9]，今回Ⅱ群ではそのような傾向はみられず，マウスはラットに比べ TBZ の味，刺激性などに対する感受性が鈍いように思われる．したがって，ⅣおよびⅤ群に認められた投与初期の摂餌忌避は OPP，特に添加濃度に起因していると考えられる．

臓器重量をみると，肝臓は併用群で体重が対照群より小さくなっているにも抱らず，絶対重量は対照群と大差ないかあるいは大きくなっていた．これは体重比重量がいずれも対照群より大きいこと，Ⅱ群(TBZ 単独)で絶

Table 7. Histopathological Findings of Liver, Kidney and Spleen in Mice Treated with *o*-Phenylphenol (OPP) and Thiabendazole (TBZ) for 52 Weeks

Group[1)]		I	II	III	IV	V
No. of mice examined[2)]		20	20	19	16	14
Liver	[3)]					
Anisonucleosis of liver cells with enlargement	−	20	0	0	0	0
	±	0	15	12	8	5
	+	0	5	7	8	9
Focal necrosis of liver cells	−	20	18	14	11	4
	±	0	2	2	4	7
	+	0	0	3	1	2
	++	0	0	0	0	1
Deposit of pigment in liver cells and phagocytes	−	20	19	15	0	0
	±	0	1	4	8	0
	+	0	0	0	8	9
	++	0	0	0	0	5
Kidney						
Degeneration of tubular epithelium	−	20	13	5	0	0
	±	0	4	11	8	5
	+	0	3	3	8	9
Necrosis of tubular epithelium	−	20	16	17	10	2
	±	0	4	2	3	8
	+	0	0	0	3	4
Dilatation of tubules	−	20	20	19	15	13
	±	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	1	1
Degeneration of ductular epithelum	−	20	19	19	14	10
	±	0	1	0	2	2
	+	0	0	0	0	1
	++	0	0	0	0	1
Necrosis of ductular epithelium	−	20	19	17	12	5
	±	0	1	2	4	8
	+	0	0	0	0	1
Necrosis of transitional cells in papilla and/or cell debris in pelvis	−	20	18	17	10	2
	±	0	1	2	3	3
	+	0	1	0	3	6
	++	0	0	0	0	3
Spleen						
Atrophy	−	20	11	8	8	0
	±	0	9	9	8	12
	+	0	0	2	0	2
Hemosiderosis	−	20	11	7	0	0
	±	0	9	10	16	14
	+	0	0	2	0	0

1) Group I : basel diet, group II : 0.2% TBZ in diet, group III : 0.2% TBZ plus 0.65% OPP in diet, group IV : 0.2% TBZ plus 1.3% OPP in diet, group V : 0.2% TBZ plus 2.6% OPP in diet.

2) No. of mice survived till wk 26 and examined histopathologically.

3) − : no change, ± : very slight changes, + : slight changes, ++ : moderate changes.

対重量が小さいことから，OPPの作用によるものと思われる．膀胱重量も肝臓とほぼ同様の傾向を示し，OPPによるものと考えられるが，後にも述べるようにV群の1例を除くと組織学的に変化はなく，今後の検討が必要である．脾臓の併用群は対照群より絶対重量が小さく，体重比重量も同程度か小さかった．この変化は被験物質によるものと考えられ，IIIおよびIV群とほぼ同様の値を示したことから，主にTBZによるものと思われる．V群はII群より絶対重量，体重比重量とも小さくTBZ，OPP併用による作用と思われる．併用群の他の臓器重量も対照群より小さくなっており，腎臓では腎障害との関連も考えられるが，いずれも体重減少と連動してみられ，体重比重量が大きいことを考慮すると，体重増加あるいは成長抑制に関連した変化であると思われる．

組織学的検索では，投与群の肝臓，腎臓および脾臓に明らかな変化が観察された．肝臓では肝細胞核の大小不同が投与群全例にみられた．この変化は併用群で変化程度がOPPの投与量(濃度)に比例して高くなっており，OPP影響が強く現れたと思われる．また，併用群での肝細胞の限局性の壊死，肝細胞あるいは貪食細胞内の黄色微細顆粒の沈着はII群にはほとんどみられないことから，主にOPPの作用によるものと考えられる．

腎臓では投与群に尿細管上皮細胞，集合管上皮細胞の変性や壊死，乳頭移行上皮細胞の壊死等が観察された．これらの変化は併用群でいずれも発生頻度，変化程度がOPPの投与量(濃度)に比例して高くなっていることから併用投与，特にOPPによるものであると考えられる．

脾臓は投与群で重量が小さくなっており，これを反映するように組織学的に萎縮がみられた．さらにヘモデジリン沈着が認められた．いずれもII群より併用群で発生頻度や変化が高くなっており，TBZとOPPの併用による作用と思われる．また，ヘモデジリン沈着は赤脾髄の赤血球減少と関連していると考えられる．

膀胱はV群で上皮の軽度な過形成が1例観察されただけで，TBZとOPPの併用は本実験条件下においてマウス膀胱に特に影響を与えなかった．

以上，TBZとOPPの併用はOPPの投与量(濃度)に比例した作用として，マウスの体重増加を抑制し，肝臓，腎臓および脾臓に障害を与えた．また，TBZ，OPP併用によると思われる腫瘍の発生は認められなかった．OPPまたはOPP−NaはラットP膀胱腫瘍を誘発し[1,2]，TBZはOPP−Naによる腫瘍の発生を増強する[3−5]．これらのメカニズムは明らかでないが，最近，OPPあるいはOPP−Naの代謝産物である2−phenyl−1，4−benzoquinone(PBQ)がラット膀胱腫瘍の誘発物質であろうという報告もあり[10]，今回の結果はラットとマウスの種差による代謝産物の相違，OPP，OPP−Naあるいはその代謝産物とTBZの相互作用の相違などによるものと考えられ，今後それらについて比較検討していく必要があると思われる．

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., Mikuriya, H., Kamiya, N. and Hiraga, K.：*Fd Chem Toxic.*, 24, 207-211, 1986.
4) 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.
5) 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.
6) 奥田宗久：名市大医誌，37，157-186，1986.
7) Hagiwara, A., Shibata, M., Fukushima, S. and Ito, N.：*Fd Chem. Tixic.*, 22, 809-814, 1984.
8) 三栗谷久敏，林田志信，高橋　博，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，32，5-15，1981.
9) 林田志信，三栗谷久敏，神谷信行，佐々木美枝子，平賀興吾：東京衛研年報，36，377-389，1985.
10) Morimoto, K., Fukuoka, M., Hasegawa, R., Tanaka, A., Takahashi, A. and Hayashi, Y.：*Jpn. J. Cancer Res.* (*Gann*), 78, 1027-1030, 1987.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 298-306, 1989

オルトフェニルフェノールおよび炭酸水素ナトリウム併用のマウスを用いた52週間の経口毒性試験

藤井　孝*, 三栗谷 久敏*, 米山 允子*,
矢野 範男*, 湯澤 勝廣*, 長澤 明道*,
佐々木 美枝子*

Dietary Toxicity Test of *o*-Phenylphenol and Sodium Hydrogencarbonate by Simultaneous Administration to Mice for 52 Weeks

TAKASHI FUJII*, HISATOSHI MIKURIYA*,
MASAKO YONEYAMA*, NORIO YANO*,
KATSUHIRO YUZAWA*, AKEMICHI NAGASAWA*,
and MIEKO SASAKI*

o-Phenylphenol (OPP), a urinary bladder carcinogen in rats and sodium hydrogencarbonate ($NaHCO_3$), an alkalizer,were given simultaneously to male Crj : B6C3F$_1$ mice for 52 weeks.Groups of 20 mice were given basal diet (group Ⅰ and Ⅱ), 0.65% OPP in diet (group Ⅲ), 1.3% OPP in diet (group Ⅳ), 2.6% OPP in diet (group Ⅴ). Mice of the group Ⅰ was given tap water and mice of the other groups were given water containing 0.8% $NaHCO_3$. No increases in tumor were observed in dosed group. In groups of Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ, a dose-related increase was found in both the incidence and the severity of necrotic changes in ductular epithelium and transitional cell of the kidney,of zonal degeneratinn and focal necrosis in liver cells and pigmentation of the liver.

Keywords : *o*-phenylphenol, sodium bicarbonate, Crj : B6C3F$_1$ mice, simultaneous administration

緒　言

著者らは，これまでに防かび剤で，わが国では食品添加物として認可されているオルトフェニルフェノール(OPP)およびそのナトリウム塩(OPP-Na)がラット膀胱に対し癌原性を有することを明らかにしてきた[1,2]．また，この膀胱発癌はアルカリ化薬である炭酸水素ナトリウム($NaHCO_3$)との併用によって増強され，酸性化薬である塩化アンモニウムで抑制されることを観察した[3]．一方，現在までマウスを用いた実験ではOPPおよびOPP-Naともに膀胱をはじめ他の器官・組織に腫瘍を誘発したとの報告はみられない[4,5]．

そこで，今回はOPPおよびその膀胱発癌に増強効果をもつ$NaHCO_3$を併用して52週間にわたってマウスに摂取させ，腫瘍発生ならびにその他の毒性の発現の有無を検索した．

実験材料および方法

被験物質：OPPはDow Chemical Co.,MIUSAのDowicide 1(Lot No.MM01040)を，$NaHCO_3$は和光純薬(東京)の炭酸水素ナトリウム(JIS試薬特級)をそれぞれ用いた．

実験動物および飼育管理：Crj：B6C3F$_1$マウス雄を4週齢で日本チャールスリバー(神奈川)より購入した．マウスは室温22-24℃，湿度50-60%，換気1時間に10回(効率99.9% HEPAフィルター経由)，照明6：00-18：00にそれぞれ制御された飼育室において，アルミニウム製ケージ(チップ床敷)に5匹づつ収容，環境への馴化と疾病の有無を観察するために1週間予備飼育した．この期間は基礎飼料CE-2(日本クレア：東京)と水道水(細菌ろ過器経由)とを自由に摂取させた．

*東京都立衛生研究所毒性部病理研究科　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：粉末飼料 CE-2に OPP を0.65%，1.3%および2.6%の濃度に添加し，固形化した3種類の実験用飼料を作成した．これらの OPP 濃度はラットの実験に準拠している[1-3]．$NaHCO_3$水溶液の濃度は予備実験において尿 pH に上昇のみられた最低濃度0.8%とし，溶媒は水道水を用いた．実験用飼料は3ヵ月に1回，$NaHCO_3$水溶液は2日に1回それぞれ作成した．マウスは1群20匹とし，Table 1に示す如く基礎飼料 CE-2と水道水摂取群(Ⅰ群：対照群)，基礎飼料 CE-2と$NaHCO_3$水溶液摂取群(Ⅱ群)，0.65%，1.3%および2.6% OPP 添加の実験用飼料と $NaHCO_3$水溶液摂取群(Ⅲ，ⅣおよびⅤ群)の5群を設定した．マウスが5週齢になった時点から実験用または基礎飼料を水道水あるいは$NaHCO_3$水溶液とともに52週間自由に摂取させた．

マウスの一般状態は午前，午後の2回観察した．体重，摂餌量および飲水量は実験開始後13週間は隔週，以後4週間(一部は5週間)毎に全マウスについて測定した．OPP 摂取量は摂餌量から，$NaHCO_3$摂取量は飲水量からそれぞれ換算して求めた．尿検査は pH の測定のみで，実験開始直前，実験1，5，9，13，26，39および52週に実施した．強制排尿法で得た尿を，BTB(Bromthymol-blue)pH 試験紙(東洋濾紙)を用いて測定した．血清生化学的検査は解剖時に得た血液を遠心管にとり，3000 rpm で10分間遠心，上清を分離し，Automatic Analyzer 705(日立)を用いて，グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ活性(GOT)，グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性(GPT)，γ—グルタミルトランスペプチダーゼ活性(γ-GTP)，乳酸デヒドロゲナーゼ活性(LDH)および尿素窒素(UN)を測定した．

マウスは投与期間終了後，断頭，屠殺し，解剖，肉眼的観察を行い，心臓，肺，肝臓，腎臓，脾臓および精巣を摘出，秤量した．摘出した臓器は10%中性緩衝ホルマリン液で固定した．膀胱は注射筒を用い経尿道的に針を内腔に入れ残留尿を除去後，ホルマリン液0.2-0.3mℓを注入，膨張させ内尿道口付近を結紮，次いで腹側正中線上にマーキュロクロム液で印をつけた後，離断，固定液に入れた．膀胱は1週間固定後，正中線で2分し，実体顕微鏡にて粘膜面を観察し，その後重量測定を行った．固定後の各臓器は定法に従ってパラフィン切片を作製し，ヘマトキシリン・エオジン重染色を施し，光学顕微鏡にて組織学的検索を行った．

推計学的分析：体重，摂餌量および飲水量，血清生化学的検査および臓器重量測定等の値の検定は，Bartlett 検定法を用い，分散の均一性について検定し，分散が一様であれば一元分散分析および Sheffe の多量比較検定を行った．また，分散が非一様であれば Kruskal-Wallis 検定および Sheffe 型の順位和検定を行った．危険率は全て5%に置いた．

結　　果

実験期間中，Ⅱ群で1例(40週：投与開始後40週目の意，以下同様)，Ⅲ群で1例(40週)，Ⅳ群で3例(9，33，41週に各1例)，Ⅴ群で4例(10,36,36,40週に各1例)がそれぞれ死亡した．これらの剖検では小型で腹腔内脂肪が見られない例が多く，とくにⅤ群では削痩が目立った．

体重増加の推移を Fig. 1に，投与開始および終了時の平均値を Table 1にそれぞれ示した．全投与期間を通して，ⅡおよびⅢ群に増加はⅠ群よりやや鈍い程度であったが，ⅣおよびⅤ群は終始明らかに増加が鈍かった．とくにⅤ群は5週までは体重が減少し続け，その後も軽度な増加に留った．Ⅲ，ⅣおよびⅤ群の間では OPP 添加濃度に比例した増加抑制の推移を示した．平均体重値はⅠ群に比べⅡ群およびⅢ群は5週まで，ⅣおよびⅤ群は全期間を通してそれぞれ有意に低かった．投与終了時のⅠ群の平均体重値を100とすると，Ⅱ群は95，Ⅲ群は

Table 1. Values of Body weight and Chemical Intake

Group	Teatment	No. of mice	Initial body weight(g)	Final body weight(g)	Total chemical intake(g/mouse) OPP	TBZ
Ⅰ	Basal diet (control)	20	21.3±0.7[1)]	45.9±2.5(20)[2)]	0	0
Ⅱ	0.8% $NaHCO_3$	20	21.1±0.9	43.7±4.7(19)	0	13.5
Ⅲ	0.8 $NaHCO_3$+0.65% OPP	20	21.0±0.9	43.1±3.7(19)	8.2	13.3
Ⅳ	0.8% $NaHCO_3$+1.3% OPP	20	21.6±0.8	35.5±2.0(17)*	16.4	15.0
Ⅴ	0.8% $NaHCO_3$+2.6% OPP	20	21.4±0.9	30.9±2.1(16)*	29.8	11.9

1) Mean±SD.
2) No. of mice survived.
* Significantly different from group Ⅰ at $p<0.05$.

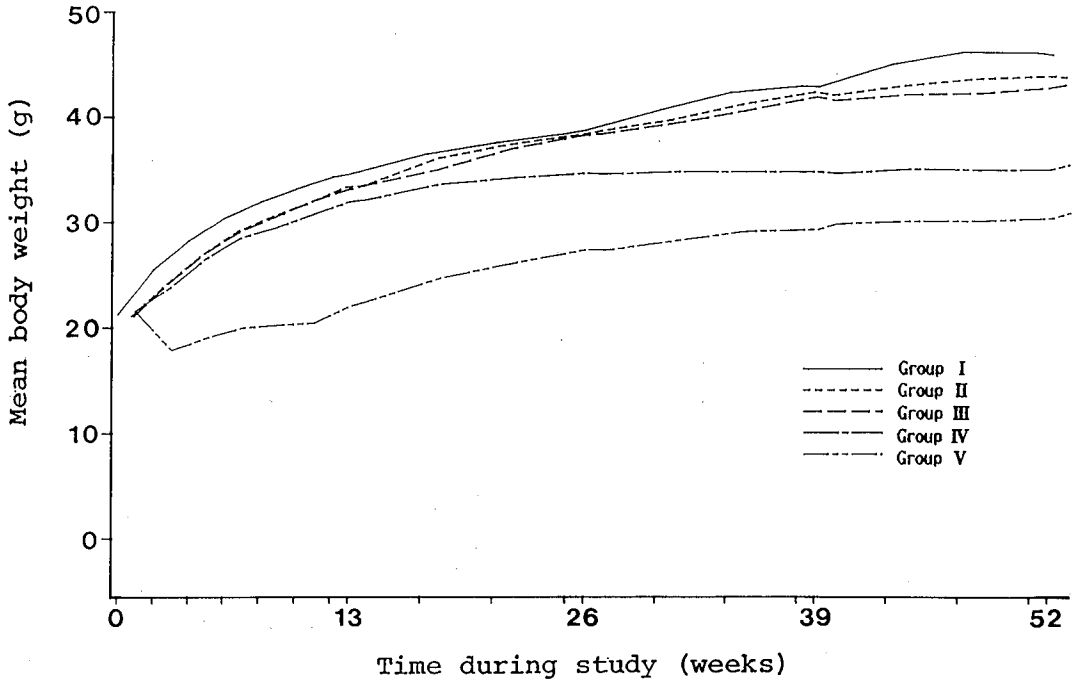


Fig. 1. Changes of Mean Body Weights
Group Ⅰ : Basal diet (control).
Group Ⅱ : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water.
Group Ⅲ : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.65% OPP in diet.
Group Ⅳ : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 1.3% OPP in diet.
Group Ⅴ : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 2.6% OPP in diet.

94, Ⅳ群は77, Ⅴ群は67で, Ⅲ, ⅣおよびⅤ群間にはOPP濃度に伴う低下が認められた.

摂餌量はTable 2に示す如く, Ⅰ群に比べⅡ群は3週で, Ⅲ群は39週で, Ⅳ群は1週で, Ⅴ群は1から7週までと35および39週でそれぞれ有意に少なかった. 実験期間中の1日平均摂取量は, 絶対値ではⅠ群に比べⅤ群がやや少なく, 他の各群では差はみられなかった. しかし, これを体重比でみてみると, Ⅴ群が最も多く, Ⅲ, ⅣおよびⅤ群の間ではOPP添加濃度に伴う増加となっていた.

飲水量はTable 3に示す如く, Ⅰ群に比べⅡ群は4週まで, Ⅲ群は6週まで, Ⅳ群は12週まで, Ⅴ群は25週まで, それぞれ少なかったが, これ以後は同じかあるいは多くなった. 実験期間中の1日平均飲水量は, 絶対値ではⅣ群が多くⅤ群がやや少なく, 他の各群間に大差はみられなかった. しかし, これを体重比でみてみると, Ⅰ群に比べ投与各群は何れも多くなっており, Ⅳ, Ⅴ群間に差はなく, 両群ともⅡ, Ⅲ群よりやや多かった.

被検物質の総摂取量をTable 1に示した. OPP摂取量はⅢ, ⅣおよびⅤ群の間では濃度比に比例してほぼ2倍づつ増加していた. $NaHCO_3$摂取量はⅣ群が最も多くⅤ群がやや少なく, Ⅱ, Ⅲ群はその中間で両群間に差はなかった.

尿pHの測定結果をTable 4に示した. 測定値は同一群内でのバラツキが大きいため, 平均値による表現は妥当ではないと判断し, 個体毎に値を示した. 各群とも測定週毎の変動も大きかったが, 一定の傾向は認められた. Ⅰ群のpHは6.4以下に多く分布し, 実験期間に比例して, より低い範囲に移行したが, 投与群のpHはこれより高い値の範囲に分布する例が多かった. ⅣおよびⅤ群では1週にⅠ群と同じ範囲に多数が分布したが, その後は各投与群と同様にⅠ群より高い範囲に分布し続けた. 1週を除き投与群間での著明な差は認められなかった.

血清生化学検査の結果をTable 5に示した. GOTは

Table 2. Food Consumption

Wk on study	Group	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
0		3.6±0.1(20)[2)]	3.4±0.1(20)	3.4±0.3(20)	2.7±0.1(20)*	1.4±0.1(20)*
2		4.2±0.2(20)	3.5±0.3(20)*	3.8±0.1(20)	3.8)±0.2(20)	3.0±0.2(20)*
4		4.5±0.1(20)	4.4±0.2(20)	4.2±0.2(20)	4.3±0.2(20)	3.1±0.1(20)*
6		5.1±0.1(20)	4.9±0.2(20)	4.9±0.3(20)	5.1±0.2(20)	3.5±0.6(20)*
8		5.2±0.2(20)	5.0±0.2(20)	5.0±0.4(20)	5.3±0.6(19)	3.6±0.8(20)
10		5.0±0.1(20)	5.0±0.1(20)	5.0±0.3(20)	4.9±0.8(19)	3.5±0.5(19)
12		5.1±0.3(20)	5.0±0.3(20)	5.3±0.3(20)	5.1±1.1(19)	5.5±1.3(19)
17		5.1±0.1(20)	5.2±0.4(20)	5.7±0.7(20)	5.4±0.6(19)	6.4±0.9(19)
21		5.5±0.3(20)	5.3±0.1(20)	5.5±0.4(20)	5.6±0.1(19)	6.4±2.4(19)
25		5.3±0.2(20)	5.0±0.1(20)	5.0±0.3(20)	5.2±0.4(19)	4.1±0.4(19)
30		4.4±0.3(20)	4,6±0.1(20)	4.6±0.5(20)	4.7±0.4(19)	3.7±0.4(19)
34		4.2±0.2(20)	4.4±0.4(20)	3.9±0.4(20)	4.2±0.4(18)	3.5±0.4(19)*
38		4.3±0.2(20)	4.4±0.4(19)	3.8±0.3(19)*	4.1±0.1(18)	3.7±0.1(17)*
43		4.0±0.2(20)	4.3±0.4(19)	4.3±0.3(19)	4.1±0.2(17)	4.1±0.6(16)
47		4.0±0.2(20)	4.1±0.3(19)	4.2±0.8(19)	4.3±0.1(17)	4.3±0.2(16)
51		4.0±0.4(20)	4.1±0.3(19)	4.3±0.2(19)	4.4±0.4(17)	4.1±0.4(16)
Daily mean consumption (g)		4.6	4.5	4.6	4.6	4.0
(g／100g B.W.)		13.2	13.4	13.6	14.6	16.3

1) Group Ⅰ：Basal diet, Group Ⅱ：0.8% $NaHCO_3$ in drinking water, Group Ⅲ：0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.65% OPP in diet, Group Ⅳ：0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 1.3% OPP in diet, Group Ⅴ：0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 2.6% OPP in diet.

2) Mean ± SD (g／mouse／day), and no. of mice examined in the group showed in parenthesis.

* Significantly different from group Ⅰ at $p<0.05$.

Ⅰ群とⅡ群とは同じであるが，Ⅲ群は高く，Ⅲ，ⅣおよびⅤ群の間ではOPP添加濃度に比例して上昇した．これに対してGOTはⅢ，ⅣおよびⅤ群でやや高いが，OPP濃度に比例した増加ではなかった．GOT／GPT比はⅠ群10.28，Ⅱ群10.85，Ⅲ群10.16，Ⅳ群13.74およびⅤ群13.46であった．Ⅰ群に比べγ-GTPは投与各群とも低く，LDHはⅣおよびⅤ群で高かった．

臓器重量をTable 6に示した．Ⅰ群と比較して，絶対重量で低く，体重比重量で同じかあるいは高い値を示したのがⅣおよびⅤ群の心臓，腎臓，精巣およびⅤ群の脾臓であった．Ⅰ群に比べ，投与群の肝臓は絶対重量は同じかあるいは高く，体重比は高く，Ⅱ群を除き有意であった．膀胱はⅠ群に比べ，絶対重量ではⅡ群がやや高く，Ⅲ群が低く，他はほぼ同じであった．体重比重量ではⅣおよびⅤ群が高い値を示した．

病理解剖学的検索では著明な変化は認められなかった．組織学的検索ではTable 7に示す如く肝臓，腎臓および脾臓で明らかな変化が観察された．肝臓では肝細胞の軽度な腫大を伴う核の大小不同性がⅡ群を除く各投与群で認められた．変化はやや不鮮明ながら小葉中心から中間帯に起こり，Ⅲ群で11%(2／19：19例中2例に変化がみられたの意，以下同様)，Ⅳ群で67%(12／18)，Ⅴ群で94%(17／18)の発生で，Ⅲ群の1例，Ⅳ群の2例，Ⅴ群の6例は軽度な変化であり，他は何れも極く軽度であった．肝細胞の巣状壊死が散在性にみられ，Ⅲ群で5%(1／19)，Ⅳ群で39%(7／18)，Ⅴ群で67%(12／18)に認められた．このうち，Ⅳ群の1例，Ⅴ群の5例は軽度は変化で，他は何れも極く軽度なものであった．肝細胞あるいは貪食細胞に黄色微細顆粒の沈着が見られた．変化はⅣ群で33%(6Z18)，Ⅴ群で(56%(10／18)の発生であった．このうちⅤ群の3例が軽度な変化であり，他は極く軽度な変化であった．肝臓でのこれらの変化はⅠ群およびⅡ群ではみられず，OPPと$NaHCO_3$との併用投与群ではOPP濃度に比例して発生頻度，変化程度とも顕著になっていた．

腎臓では尿細管上皮細胞の小型化，核の軽度膨化，細

Table 3. Water Consumption

Wk on study	Group	I	II	III	IV	V
0		5.8±0.3(20)[2)]	5.4±0.3(20)	5.5±0.3(20)	4.5±0.2(20)*	2.6±0.3(20)*
2		7.2±0.4(20)	5.8±1.6(20)	6.3±0.4(20)	6.4±0.4(20)	5.3±0.2(20)*
4		7.4±0.6(20)	7.3±1.0(20)	6.6±1.1(20)	6.5±0.5(20)	4.7±0.4(20)*
6		7.4±1.0(20)	7.7±0.7(20)	7.7±0.9(20)	7.2±0.4(20)	4.5±0.4(20)*
8		7.0±0.9(20)	7.8±1.0(20)	7.7±0.6(20)	6.8±1.2(19)	3.6±0.6(20)*
10		7.1±0.6(20)	7.9±1.0(20)	7.5±0.6(20)	6.5±0.5(19)	4.4±0.5(19)*
12		6.9±0.7(20)	7.5±0.9(20)	7.4±0.6(20)	6.9±1.3(19)	4.7±0.6(19)*
17		6.9±0.2(20)	6.8±0.8(20)	6.5±0.8(20)	7.3±0.9(19)	4.8±0.3(19)*
21		6.7±0.7(20)	6.9±0.9(20)	6.6±0.2(20)	7.1±0.6(19)	5.7±0.3(19)
25		6.2±0.5(20)	6.8±1.7(20)	6.0±0.5(20)	7.2±0.4(19)	6.2±0.3(19)
30		5.3±0.4(20)	5.9±1.0(20)	5.4±0.5(20)	7.0±0.5(19)*	6.2±0.3(19)
34		4.9±0.6(20)	5.3±1.3(20)	5.1±0.5(20)	7.0±0.6(18)*	6.3±0.4(19)*
38		4.7±0.2(20)	5.3±1.3(19)	5.0±1.1(19)	6.9±0.4(18)	7.0±0.6(17)
43		4.1±0.4(20)	4.8±0.7(19)	5.0±0.6(19)	6.8±0.3(17)*	6.3±0.3(16)*
47		3.9±0.2(20)	4,6±0.6(19)	5.0±0.4(19)*	7.0±0.8(17)*	6.5±0.5(16)*
51		4.2±0.4(20)	4,6±0.7(19)	5.0±0.7(19)	7.0±1.0(17)*	6.5±0.3(16)*
Daily mean consumption (g)		6.0	6.3	6.1	6.8	5.3
(g/100g B.W.)		17.8	19.0	18.7	21.5	21.6

1) Group I : Basal diet, Group II : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water, Group III : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.65% OPP in diet, Group IV : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 1.3% OPP in diet, Group V : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 2.6% OPP in diet.

2) Mean ± SD (g/mouse/day), and no. of mice examined in the group showed in parenthesis.

* Significantly different from group I at $p<0.05$.

胞質の好塩基性化および基底膜の肥厚などが投与群でみられた．変化はII群で37%(7/19)，III群で79%(15/19)，IV群で83%(15/18)，V群では78%(14/18)の発生であった．このうち軽度な変化はII群で4例，III群で3例，IV群で14例，V群で3例みられ，他は極く軽度な変化であった．尿細管上皮細胞の壊死はII群で5%(1/19)，III群で16%(3/19)，IV群で83%(15/18)，V群で50%(9Z18)に認められた．このうち軽度な変化はIV群で13例，V群8例であり，他は極く軽度な変化であった．集合管上皮細胞の萎縮および乳頭管上皮細胞のエオジン好染化・腫大，核の膨化などの変化がIII群で11%(2/19)，IVおよびV群で11%(各2/18)にみられ，そのうち軽度な変化はIII群で1例認められたのみで，他は極く軽度な変化であった．集合管および乳頭管上皮細胞の壊死がIVおよびV群で28%(各5/18)に観察された．これらは全て極く軽度な変化であった．乳頭部の移行上皮細胞の壊死さらに壊死細胞とその落屑塊が腎盂内に貯留している例がIV群で17%(3/18)，V群で22%(4/18)に認められた．このうち軽度な変化はIV群の2例，V群の4例で，極く軽度の変化はIV群の1例であった．腎臓におけるこれらの変化はI群では見られず，II群よりIII群でやや多発し，III群に比べIVおよびV群は発生頻度ならびに変化程度は顕著であった．しかし，IV群とV群とを比べると，移行上皮細胞の壊死・落屑塊はV群がやや強いが，その他の変化，とくに尿細管上皮細胞の変性・壊死はIV群に強く現れている．

脾臓では萎縮がみられ，白脾髄のリンパ球系細胞よりも赤脾髄での赤血球の減少がやや強くみられた．変化はIII群で26%(5/19)，IV群で28%(5/18)，V群で56%(10/18)に認められた．このうち軽度な変化はIVおよびV群で各2例であり，他は極く軽度な変化であった．ヘモジデリン沈着はすべて極く軽度な変化であり，IIおよびIII群で21%(各4/19)，IV群で56%(10/18)，V群で44%(8/18)の発生であった．

膀胱での上皮細胞の過形成あるいは腫大などの変化は観察されなかった．この他，精巣の萎縮が投与群で見ら

Table 4. Distribution of Urinary pH Values

pH*		<5.8				6.2				6.6				7.0				7.4<
Before treatment																		
I[a]	10[b]	2				1		2	1	2		1		1				
II	10	1				3				3		2		1				
III	10	1				1	1	2		1		2		1		1		
IV	10			2	1					2		2		1		1		1
V	10	1						2		1		4				2		
WK 1																		
I	10	5				1		2				1						1
II	10	2				1		2		1		1		2		1		
III	10			3		1				1		2		3				
IV	10	6		1	1	1												1
V	10	7		1				2										
WK 5																		
I	10	2				4		1		3								
II	10			1				1			2		1	2	2			1
III	10							1			1	1			2	3		2
IV	10										2		2	1	1	1	1	2
V	10	1						1		1		1	1	1	3		1	
WK 9																		
I	10			2	1	1		2		1		2	1					
II	10					2			2			2		1	1	2		
III	10			2	1			1		2	2	1	1					
IV	10	2		2		2				1		3						
V	10	2						1	1		1		1	2	1		1	

pH		<5.8				6.2				6.6				7.0				7.4<
WK 13																		
I	10				2	4		2		1	1							
II	10			1					1		2	4	1		1			
III	10			1		1			2		1	2	1	2				
IV	10				1	2		1	1	1		1	1	1	1			
V	9			1		1			1	1	1	1		2				1
WK 26																		
I	10	1			2	3		1		3								
II	10			1		3				1		4				1		
III	10			1		2		1		2	3			1				
IV	10			2		3			1	2		1		1				
V	10					1		1		2		1		3	1		1	
WK 39																		
I	10	7		1		1				1								
II	10	1		2		3		3			1							
III	10			2		3		2			2			1				
IV	10	2		2		1		1	1			1	2					
V	10					2		2		1	2	1		1	1			
WK 52																		
I	10	5			3	2												
II	10					1		1	1	2		4			1			
III	10	2		3						4					1			
IV	10			1		2		1			4	1						1
V	10					1		2		1	2	1	1	1				

a) Group I : Basal diet, Group II : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water, Group III : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.65% OPP in diet, Group IV : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 1.3% OPP in diet, Group V : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 2.6% OPP in diet.

b) No. of mice examined.

* Each division represent 0.1 on pH value.

Table 5. Blood Biochemistry

Group[1)]	No. of mice examined	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	γ-GTP (IU/L)	LDH (IU/L)	UN (mg/dl)
Ⅰ	7	167.6±46.4±[2)]	16.3± 3.5	5.36±0.78	1,312.0±395.3	28.80±2.14
Ⅱ	7	167.1±23.4	15.4± 3.4	5.14±0.48	1,141.6±262.5	30.96±2.48
Ⅲ	7	213.4±40.8	21.0±11.7	5.16±0.66	1,223.7±330.7	32.70±2.61
Ⅳ	6	236.3±28.6	17.2± 6.4	4.58±0.49	1,447.0±265.8	31.83±3.27
Ⅴ	7	288.0±55.1*	21.4± 4.7	4.74±0.36	1,875.0±294.2*	28.64±3.49

1) Group Ⅰ: Basal diet, Group Ⅱ: 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water, Group Ⅲ: 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.65% OPP in diet, Group Ⅳ: 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 1.3% OPP in diet, Group Ⅴ: 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 2.6% OPP in diet.

2) Mean ± SD.

*Significantly different from group I at $p<0.05$.

れ，精細管の管径の縮小あるいは精上皮の変性壊死などが認められた．変化はⅡおよびⅣ群で各2例，Ⅴ群で3例にみられ何れも軽度なものであった．

腫瘍の発生は肝臓腺腫がⅡおよびⅢ群で各3例，Ⅳ群で2例それぞれ認められた．

考　察

ラットに膀胱腫瘍を誘発するOPPとその発癌作用を増強するアルカリ化薬$NaHCO_3$とを併用してマウスに52週間投与し，これに関連して腫瘍性および非腫瘍性変化が発生するか否かを検討した．

被験物質の摂取量のうち，OPPは設定濃度に比例した増加を示し，$NaHCO_3$は体重比摂取量では投与群間に著明な差はみられなかった．このことから，投与群と対照群との間で明らかな差異を生じた反応は被験物質に起因し，OPPと$NaHCO_3$併用群の間で用量-反応関係をもってみられた反応は併用による作用の増強・減弱，新たな代謝または代謝物の産生を考慮しても，OPP摂取に強く依存したものと考えることができる．

投与期間中の死亡例は1.3および2.6% OPP群の9,10週での発生を除いて，第3四半期後半(36-41週)に集中し何れも削痩がみられ，出現頻度はOPP投与量に伴なって上昇している．従って死亡の多くはOPPを主体とした併用投与による比較的慢性のあるいは間接的な毒作用，消化・吸収の不良による栄養状態の悪化，各種の平衡失調，恒常性維持の乱れ，さらに消耗性疾患の発症など多くの要因が複合して作用した結果と考えられる．

投与に関連してみられた体重増加抑制は対照群と投与群との間に摂餌量に大きな差がないことから，死亡発生と同じ要因が軽度に，遷延性に働いたと推定できる．すなわち，体重増加抑制はOPPの慢性毒性の効果，成長の不良・遅延，種々の失調によって起こり，毒性が顕著な場合は死に至ることを示唆していると思われる．

投与群の尿pHの上昇は軽度であり，個体間のバラツキも大きかったが，対照群との差は明らかであった．また，投与群間での差はなかったことから，$NaHCO_3$投与によるアルカリ化効果は各投与群に均等に現れたと考えられる．

血清生化学検査では1.3および2.6% OPP併用群のGOT，GPT，GOT/GPT比およびLDH値が高くなっていたことから，両群に肝臓障害発生の疑いがある[6)]．

臓器重量のうち1.3および2.6% OPP併用群の心臓，腎臓，脾臓の変化は絶対重量では低下しているが，体重比重量では対照群と同じかまたは上回っており，体重増加抑制の程度を越える重量低下ではない．従って，これらの臓器の重量変化は体重増加抑制と同じく成長の不良または抑制に起因していると推定される．肝臓重量は体重比ではOPP投与量に比例して高くなっており，絶対値では対照群より高いかまたは同じであった．このことから，肝臓は体重増加抑制を反映した重量増加抑制が起こらず，むしろOPP投与によって増加する方向を示したと考えられる．膀胱重量は体重比ではOPP投与量に比例した増加であったが，絶対値では対照群と投与群間に差はなかった．このことから，膀胱は体重増加抑制に連動する重量増加抑制が起こらなかったと考えられる．すなわち，体重比での増加傾向は体重増加抑制に伴う「見せかけ」の反応であると思われる．

病理組織学的検索で認められた投与群，とくに1.3および2.6% OPP併用群の肝臓にみられた小葉中心性の肝細胞の軽度な腫大，核の大小不同，色素沈着は上記の肝臓重量の増加に関連づけることができる．また，変化は

Table 6. Mean Values of Orgen Weight

Group[1]	No. of mice[2]	Body weight(g)	Liver (g)	Heart (mg)	Kidney(L) (mg)	Kidney(R) (mg)	Spleen (mg)	Testis(L) (mg)	Testis(R) (mg)	Bladder (mg)
Ⅰ	20	45.9±2.5[3]	2.18±0.17[3] (4.75±0.19)[4]	185.6±11.3 (404.7±17.3)	288.1±19.1 (628.3±30.1)	308.2±22.0 (672.2±38.9)	110.3±19.6 241.0± 43.8)	114.1± 4.8 (249.2±14.1)	117.5± 5.6 (256.6±13.6)	38.8± 7.3 (84.6±15.4)
Ⅱ	19	43.7±4.7	2.21±0.22 (5.08±0.41)	187.5±16.9 (431.1±37.4)	299.8±37.5 (687.5±61.16*)	319.1±28.8 (733.4±59.3*)	121.7±54.9 287.7±165.6)	109.9± 6.4 (253.9±27.7)	114.7± 6.5 (264.9±27.2)	41.3± 5.6 (95.0±13.0)
Ⅲ	19	43.1±3.7	2.65±0.42* (6.14±0.79*)	184.5±11.4 (430.4±36.4)	281.1±25.4 (654.7±55.9)	297.7±23.2 (693.6±56.8)	98.6±14.9 (230.0±38.0)	111.1± 7.9 (259.0±22.7)	113.6± 9.3 (264.5±22.0)	37.7± 5.6 (87.9±14.9)
Ⅳ	17	35.5±2.0*	2.33±0.18 (6.56±0.47*)	161.6±10.5* (456.2±27.1*)	257.0±20.3* (726.0±58.7*)	259.3±30.5* (731.5±80.4)	107.2±28.5 (302.3±77.6)	104.1± 3.7* (294.4±20.7*)	108.4± 3.7* (306.5±19.2*)	39.2± 7.8 (111.3±24.8*)
Ⅴ	16	30.9±2.1*	2.17±0.18 (7.03±0.31*)	129.7±11.1* (419.5±21.6)	208.9±18.6* (677.0±56.4)	218.6±26.4* (705.9±64.4)	70.8±11.6* (228.7±31.9)	104.7± 6.6* (339.7±26.1*)	107.1± 6.6* (347.5±27.9*)	38.8± 9.5 (125.2±27.9*)

1) Group Ⅰ：Basal diet, Group Ⅱ：0.8% $NaHCO_3$ in drinking water, Group Ⅲ：0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.65% OPP in diet, Group Ⅳ：0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 1.3% OPP in diet, Group Ⅴ：0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 2.6% OPP in diet.
2) No. of organs weighed.
3) Absolute mean weight ± SD.
4) Relative mean weight ± SD.
* Significantly different from group I at $p<0.05$.

現時点では変性像のみであることから，OPP 投与に対する可逆的適応現象と思われる．限局性の肝細胞壊死は巣状で散在性に発生し，小葉の周辺部にもみられたことから，上記の変性に続くものとは断じ難いが，OPP 投与量に伴い増強されたことから，OPP の毒作用の結果像であると推定される．これら肝臓において観察された変化は血清生化学検査の結果と一致しているが，全体としては重篤なものではないと考えられる．

腎臓では尿細管および集合管・乳頭管の変性・壊死が何れも1.3%群が2.6%群より強いかあるいは同程度であったことから，用量-反応関係が鮮明ではなかった．しかし，移行上皮細胞の壊死・落屑塊の貯留などの変化の発生および変化程度は2.6%群が1.3%群よりやや顕著であったことから，変化が OPP 用量に依存して惹起されたことは明らかである．

脾臓の萎縮はおもに赤血球減少，貧血によるもので変化は軽度ながら OPP の投与用量に応じた発生となっている．これは臓器重量の項で述べた如く，体重増加抑制に連動した反応と考えられる．

膀胱は投与群で「見せかけ」の重量増加がみられたが，組織学的にも移行上皮細胞の増殖性変化は認められず，ラットでの実験とは異なる結果となった．

腫瘍は肝臓腺腫が散発的に発生したのみであり，投与との関連は窺うべくもない．

以上の如く，今回のマウスを用いた実験では $NaHCO_3$ と OPP 併用投与に関連した種々の変化が観察されたが，ラットでみられた膀胱発癌は認められなかった．OPP によるラット膀胱発癌の最終癌原物質は尿中代謝物の 2-phenyl-1,4-benzoquinone（PBQ）ではないかとの報告[7]もあることから代謝の相違が今回の結果となったと考えられる．今後は，この PBQ を含め代謝物をマウスに与える実験を企画し，腫瘍発生の有無およびその他の毒性について，さらに検討を加えたいと考えている．

文　献

1) Hiraga, K. and Fujii, T.：*Fd Chem. Toxic.*, 22, 865-870, 1984.
2) Hiraga, K. and Fujii, T.：*Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 303-310, 1981.
3) Fujii, T. Nakamura, k. and Hiraga, K.：*Fd Chem. Toxic.*, 25, 359-362, 1987.
4) 奥田宗久：名市大医誌, 37, 157-186, 1986.
5) Hagiwara, A., Shibata, M., Hirose, M., Fukushima, S. and Ito, N.：*Fd Chem. Toxic.*, 22, 809-814, 1984.
6) 柴田　進：臨床生化学診断法, 第5版, 104-106,

Table 7. Histopathological Findings of Liver, Kidney and Spleen in Mice Treated with *o*-Phenylphenol (OPP) and Thiabendazole (TBZ) for 52 Weeks

Group[1)]		I	II	III	IV	V
No. of mice examined[2)]		20	20	19	16	14
Liver	[3)]					
Anisonucleosis of liver cells	−	20	19	17	6	1
with enlargement	±	0	0	1	10	11
	+	0	0	1	2	6
Focal necrosis of liver cells	−	20	19	18	11	6
	±	0	0	1	6	7
	+	0	0	0	1	5
Deposit of pigment in liver	−	20	19	19	12	8
cells and phagocytes	±	0	0	0	6	7
	+	0	0	0	0	3
Kidney						
Degeneration of tubular	−	20	12	4	3	4
epithelium	±	0	3	12	1	11
	+	0	4	3	14	3
Necrosis of tubular epithelium	−	20	18	16	3	9
	±	0	1	3	2	1
	+	0	0	0	13	8
Dilatation of tubules	−	20	19	19	18	18
	±	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	1
	++	0	0	0	0	2
Degeneration of ductular	−	20	19	17	16	16
epithelium	±	0	0	1	2	2
	+	0	0	1	0	0
Necrosis of ductular epithelium	−	20	19	19	13	13
	±	0	0	0	5	5
Necrosis of transitional cells	−	20	19	19	15	14
in papilla and/or	±	0	0	0	1	0
cell debris in pelvis	+	0	0	0	2	4
Spleen						
Atrophy	−	20	19	14	13	8
	±	0	0	5	4	9
	+	0	0	0	1	1
Hemosiderosis	−	20	15	15	11	10
	±	0	4	4	7	8

1) Group I : Basal diet, Group II : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water, Group III : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.65% OPP in diet, Group IV : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 1.3% OPP in diet, Group V : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 2.6% OPP in diet.

2) No. of mice survived till wk 26 and examined histopathologically.

3) Severity : − no change, ± very slight changes, + slight changes, ++ moderate changes.

1972, 金芳堂, 東京.

7) Morimoto, K., Fukuoka, M., Hasegawa, R., Tanaka, A., Takahashi, A. and Hayashi, Y. : *Jpn. J. Cancer Res.*, 78, 1027-1030, 1987.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 307-315, 1989

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併用のマウスを用いた52週間の経口毒性試験

藤井　孝*，三栗谷　久　敏*，米　山　允　子*，矢　野　範　男*，
湯　澤　勝　廣*，長　澤　明　道*，佐々木　美枝子*

Dietary Toxicity Test of *o*-Phenylphenol, Thiabendazole, and Sodium Hydrogencarbonate by Simultaneous Administration to Mice for 52 Weeks

TAKAHASHI FUJII*, HISATOSHI MIKURIYA*, MASAKO YONEYAMA*, NORIO YANO*, KATSUHIRO YUZAWA*, AKEMICHI NAGASAWA* and MIEKO SASAKI*

Summary

o–Pheylphenol (OPP), a urinary bladder carcinogen in rats, sodium hydrogencarbonate ($NaHCO_3$), an alkalizer, and thiabendazole (TBZ), a fungicide, were fed simultaneously to male Crj: B6C3F$_1$ mice for 52 weeks. Groups of 20 mice were given basal diet (group Ⅰ), 0.65% OPP plus 0.2% TBZ in diet (group Ⅱ), 1.3% OPP plus 0.2% TBZ in diet (group Ⅲ), 2.6% OPP plus 0.2% TBZ in diet (group Ⅳ). Mice of the group Ⅰ was given tap water and mice of the other groups were given water containing 0.8% $NaHCO_3$. No increases in tumor were observed in dosed groups. A dose- related increase was observed in both the incidence and severity of necrotic changes in tubular and ductular epithelium and transitional cell of the kidney, of enlargement in liver cells and pigmentation of the liver.

Keywords：*o*–phenylphenol, thiabendazole, sodium bicarbonate, Crj : B6C3F$_1$ mice, simultaneous administration

緒　言

著者らは，これまでに防かび剤で，わが国では食品添加物として認可されているオルトフェニルフェノール(OPP)およびそのナトリウム塩(OPP-Na)がラット膀胱に対し癌原性を有することを明らかにしてきた[1,2]．また，同じ防かび剤であるチアベンダゾール(TBZ)とOPP-Naとの併用投与ではラット膀胱発癌が増強されることを認め，報告した[3]．さらに，OPPとアルカリ化薬である炭酸水素ナトリウム($NaHCO_3$)との併用によって同様に発癌が促進されることを観察した[4]．一方，現在までマウスを用いた実験ではOPPおよびOPP-Naともに膀胱をはじめ他の器官・組織に腫瘍を誘発したとの報告はみられない[5,6]．

そこで，今回はOPPおよびその膀胱発癌に増強効果をもつTBZと$NaHCO_3$の3種の化学物質を併用して52週間にわたってマウスに摂取させ，腫瘍発生ならびにその他の毒性の発現の有無を検索した．

実験材料および方法

被検物質：OPPはDow Chemical Co., MI, USAのDowicide 1(Lot No. MMO1040)を，TBZはMerck Sharp and Dohme International, NJ, USAのthiabendazole microfine MSD(Lot No. BZA-539)を，$NaHCO_3$は和光純薬(東京)の炭酸水素ナトリウム(JIS試薬特級)をそれぞれ用いた．

実験動物および飼育管理：Cri：B6C3F$_1$マウス雄を4週齢で日本チャールスリバー(神奈川)より購入した．マウスは室温22-24℃，湿度50-60%，換気1時間に10回(効率99.9% HEPAフィルター経由)，照明6：00-18：00にそれぞれ制御された飼育室において，アルミニウム製ケージ(チップ床敷)に5匹づつ収容，環境への馴化と疾病の有無を観察するために1週間予備飼育し，この期間は基礎飼料CE-2(日本クレア：東京)と水道水(細菌

*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

ろ過器経由)とを自由に摂取させた.

実験方法：粉末飼料 CE-2 に OPP を0.65%，1.3%および2.6%の濃度に添加し，さらにそれぞれに TBZ を0.2%の割合で加え，固形化した3種類の実験用飼料を作成した．これらの OPP および TBZ の濃度はラットの実験に準拠している[1-3]．$NaHCO_3$ 水溶液の濃度は予備実験において尿 pH に上昇のみられた最低濃度0.8%とし，溶媒は水道水を用いた．実験用飼料は3カ月に1回，$NaHCO_3$水溶液は2日に1回それぞれ作成した．マウスは1群20匹とし，Table 1．に示す如く基礎飼料 CE-2 と水道水摂取群(Ⅰ群：対照群)，0.65%，1.3%および2.6% OPP にそれぞれ0.2% TBZ を添加した実験用飼料と $NaHCO_3$水溶液摂取群(Ⅱ，Ⅲ，およびⅣ群)の4群を設定した．マウスが5週齢になった時点から実験用または基礎飼料を水道水あるいは $NaHCO_3$ 水溶液とともに52週間自由に摂取させた．マウスの一般状態は午前，午後の2回観察した．体重，摂餌量および飲水量は実験開始後13週間は隔週，以後4週間(一部は5週間)毎に全マウスについて測定した．OPP 摂取量は摂餌量から，$NaHCO_3$ 摂取量は飲水量からそれぞれ換算して求めた．尿検査は pH の測定のみで，実験開始直前，実験1，5，9，13，26，39および52週に実施した．強制排尿法で得た尿を，BTB(Brom-thymol-blue)pH 試験紙(東洋濾紙)を用いて測定した．血清生化学的検査は解剖時に得た血液を遠心管にとり，3000rpm で10分間遠心，上清を分離し，Automatic Analyzer 705(日立)を用いて，グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ活性(GOT)，グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性(GPT)，γ-グルタミルトランスペプチダーゼ活性(γ-GTP)，乳酸デヒドロゲナーゼ活性(LDH)および尿素窒素(UN)を測定した．

マウスは投与期間終了後，断頭・屠殺し，解剖，肉眼的観察を行い，心臓，肺，肝臓，腎臓，脾臓および精巣を摘出，秤量した．摘出した臓器は10%中性緩衝ホルマリン液で固定した．膀胱は注射筒を用い経尿道的に針を内腔に入れ残留尿を除去後，ホルマリン液を0.2-0.3ml 注入，膨張させ内尿道口付近を結紮，次いで腹側正中線上にマーキュロクロム液で印をつけた後，離断，固定液に入れた．膀胱は1週間固定後，正中線で2分し，実体顕微鏡で粘膜面を観察後，重量の測定を行った．固定完了後の各臓器は定法に従ってパラフィン切片を作成し，ヘマトキシリン・エオジン重染色を施し，光学顕微鏡にて組織学的検索を行った．

推計学的分析：体重，摂餌および飲水量，血清生化学検査および臓器重量測定等の値の検定は，Bartlett 検定法を用い，分散の均一性について検定し，分散が一様であれば一元分散分析および Sheffe の多重比較検定を行った．また，分散が非一様であれば Kruskal-Wallis 検定および Sheffe 型の順位検定を行った．危険率は全て5%に置いた．

結　果

実験期間中，Ⅱ群で2例(47，52週：投与開始後47および52週目の意，以下同様)，Ⅲ群で2例(9，38週)，Ⅳ群で5例(1，2，2，2，11週)がそれぞれ死亡した．これらの剖検では小型で腹腔内脂肪が見られない例が多く，とくにⅣ群では削痩が目立った．

体重増加の推移を Fig. 1．に，投与開始および終了時の平均値を Table 1．にそれぞれ示した．全期間を

Table 1．Values of Body Weight and Chemical Intake

Group	Treatment	No. of mice	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Total chemical intake(g/mouse) OPP	$NaHCO_3$	TBZ
Ⅰ	Basal diet (control)	20	21.3±0.7[1)]	45.9±2.5(20)[2)]	0	0	0
Ⅱ	0.8% $NaHCO_3$+0.2% TBZ +0.65% OPP	20	21.5±0.6	33.9±1.0(18)*	8.7	15.5	2.7
Ⅲ	0.8% $NaHCO_3$+0.2% TBZ +1.3% OPP	20	21.1±0.7	32.9±1.5(18)*	16.3	14.5	2.5
Ⅳ	0.8% $NaHCO_3$+0.2% TBZ +2.6% OPP	20	21.0±1.1	29.6±4.0(15)*	31.2	11.7	2.4

1) Mean±SD.
2) No. of mice survived.
* Significantly different from group Ⅰ at $p<0.05$.

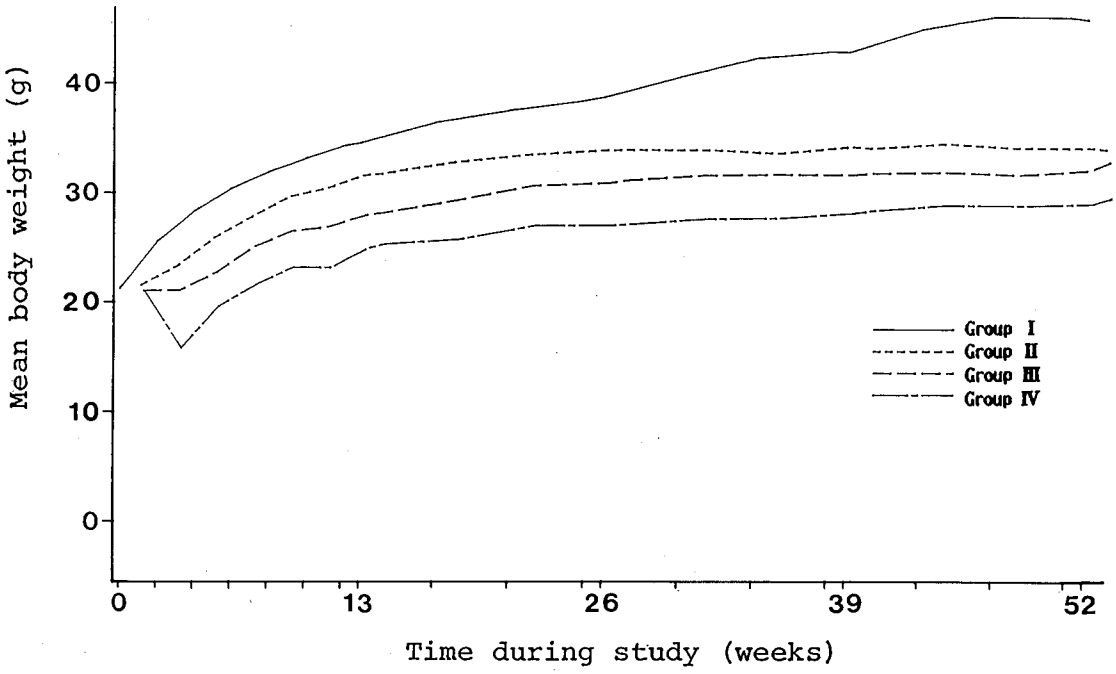


Fig. 1. Changes of Mean Body Weights
Group Ⅰ : Basal diet (control).
Group Ⅱ : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.2% TBZ plus 0.65% OPP in diet.
Group Ⅲ : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water pius 0.2% TBZ plus 1.3% OPP in diet.
Group Ⅳ : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.2% TBZ plus 2.6% OPP in diet.

通して，投与群の体重増加はⅠ群(対照群)より明らかに鈍く，とくにⅣ群は4週までは体重が減少し，その後緩やかに増加した．投与群間ではOPP添加濃度に比例した抑制となっていた．平均体重値はⅠ群に比べⅡ群では6週から，ⅢおよびⅣ群は全期間を通してそれぞれ有意に低かった．投与終了時のⅠ群の平均体重値を100とすると，Ⅱ群は74，Ⅲ群は72，Ⅳ群は64であった．

摂餌量はTable 2．に示す如く，Ⅰ群に比べⅢ群では1週と48週，Ⅳ群では9週までと48週でそれぞれ有意に少なかった．実験期間中の1日平均摂餌量は，絶対値ではⅣ群がやや少ないものの，体重比でみてみると，Ⅱ，ⅢおよびⅣ群の間ではOPP添加濃度に比例して多くなっていた．

飲水量はTable 3．に示す如く，Ⅰ群に比べⅡ群は5週，Ⅲ群は18週，Ⅳ群は26週までは少なかったが，これ以後は同じかあるいは多くなった．実験期間中の1日平均飲水量は，Ⅰ群に比べ絶対値ではⅡおよびⅢ群は多く，Ⅳ群は低いものの，体重比では投与群が多かった．絶対値および体重比とも投与群間ではOPP添加濃度に比例して少なくなっていた．

被検物質の総摂取量をTable 1．に示した．OPP摂取量は添加濃度比に比例してほぼ2倍ずつ増加していた．TBZおよび$NaHCO_3$の摂取量は濃度比に比例してやや減少しており，$NaHCO_3$摂取はⅣ群で少なかった．

尿pHの測定結果をTable 4．に示した．測定値は同一群内でのバラツキが大きいため，平均値による表現は妥当ではないと判断し，個体毎に値を示した．各群とも測定週毎の変動が大きかったが，Ⅰ群に比べ各投与群のpHは終始高い値の範囲に分布しており，とくに5週では，それが顕著に認められた．投与群間の比較では5週でpHの高い例がOPP添加濃度に伴って少なくなっているのがみられたが，この他の週で明らかではなかった．

血清生化学検査の結果をTable 5．に示した．GOTおよびGPTはⅠ群に比べ投与群で高く，OPP添加濃度に比例して上昇した．GOT／GPT比はⅠ群10.28，Ⅱ群10.68，Ⅲ群10.38，Ⅳ群9.34で，他の各群に比べⅣ群は低かった．γ-GTPはⅠ群に比べ投与各群とも低く，とくにⅡおよびⅢ群では有意であった．LDHは投与各群

Table 2. Food Consumption

Wk on study	Group	Ⅰ[1)]	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
0		3.6±0.1(20)[2)]	3.0±0.2(20)	1.9±0.1(20)*	1.7±0.4(20)*
2		4.2±0.2(20)	4.1±0.2(20)	3.7±0.4(20)	2.8±0.6(16)*
4		4.5±0.1(20)	4.6±0.3(20)	4.1±0.6(20)	3.5±0.4(16)*
6		5.1±0.1(20)	5.4±0.3(20)	4.8±0.6(20)	4.0±0.6(16)*
8		5.2±0.2(20)	5.7±0.4(20)	5.0±0.8(19)	4.1±0.5(16)*
10		5.0±0.1(20)	5.4±0.2(20)	4.9±0.6(19)	4.0±0.2(16)
12		5.1±0.3(20)	5.8±0.5(20)	6.4±1.1(19)	6.5±3.0(16)
17		5.1±0.1(20)	5.8±0.4(20)	5.2±0.3(19)	6.0±2.2(15)
21		5.5±0.3(20)	5.9±0.4(20)	5.5±0.7(19)	7.0±1.2(15)
25		5.3±0.2(20)	5.3±0.3(20)	4.7±0.7(19)	4.5±0.9(15)
30		4.4±0.3(20)	4.6±0.4(20)	4.5±0.4(19)	5.0±2.0(15)
34		4.2±0.2(20)	4.4±0.3(20)	4.2±0.4(19)	3.6±0.5(15)
38		4.3±0.2(20)	4.5±0.1(20)	4.7±0.6(18)	4.5±2.0(15)
43		4.0±0.2(20)	4.3±0.3(20)	4.7±0.2(18)	3.7±0.5(15)
47		4.0±0.2(20)	4.3±0.3(19)	4.4±0.1(18)*	3.3±0.1(15)*
51		4.0±0.4(20)	4.4±0.4(19)	4.7±0.1(18)	4.2±1.4(15)
Daily mean consumption(g)		4.6	4.9	4.6	4.3
(g/100g B.W.)		13.2	15.8	16.2	17.2

1) Group Ⅰ : Basal diet, Group Ⅱ : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.2% TBZ plus 0.65% OPP in diet, Group Ⅲ : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.2% TBZ plus 1.3% OPP in diet, Group Ⅳ : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.2% TBZ plus 2.6% OPP in diet.

2) Mean±SD (g/mouse/day), and no. of mice examined in the group showed in parenthesis.

* Significantly different from group Ⅰ at $p<0.05$.

とも高かったが投与濃度に伴う上昇は認められなかった.

臓器重量を Table 6. に示した. Ⅰ群と比較して, 絶対重量, 体重比重量ともに低かったのはⅣ群の心臓, 腎臓, ⅢおよびⅣ群の脾臓であり, 絶対重量が低く, 体重比重量は高かったのがⅡおよびⅢ群の肝臓, 心臓, 腎臓, Ⅱ群の脾臓および全投与群の精巣であった. Ⅰ群に比べ, 絶対および体重比重量ともに高かったのはⅣ群の肝臓ならびに全投与群の膀胱であった. これらの変動のうち OPP 投与濃度に伴う増加がみられたのは肝臓の体重比重量のみであった.

病理解剖学的検索では著明な変化は認められなかった. 組織学的検索では Table 7. に示す如く肝臓, 腎臓および脾臓で明らかな変化が観察された. 肝臓では肝細胞の軽度な腫大を伴う核の大小不同性が小葉中心から中間帯にかけて認められた. 変化は投与群の全例にみられ, このうち軽度な変化はⅡ群で39%(7/18:変化を示した18例中7例が軽度な変化であったの意, 以下同様), Ⅲ群で67%(12/18), Ⅳ群で87%(13/15)にみられ, Ⅳ群では中等度の変化も1例発生した. 他は何れも極く軽度な変化であった. 細胞質のエオジン好染均質化, 好塩基性物質の消失, 腫大などを示す肝細胞がおもに小葉中心性に, 上記の変化と混在して観察された. 変化はⅢ群で22%(4/18:18例中4例に変化が認められたの意, 以下同様), Ⅳ群で100%(15/15)にみられ, このうち軽度な変化がⅣ群で8例, 中等度の変化がⅣ群で3例, 他は極く軽度な変化であった. 肝細胞の巣状壊死が散在性にみられた. 変化はⅡ群で17%(3/18)Ⅲ群で33%(6/18), Ⅳ群で60%(9/15)にそれぞれ認められ, このうちⅢ群の1例およびⅣ群の5例が軽度な変化で, 他は何れも極く軽度な変化であった. 肝細胞あるいは貪食細胞に黄色微細顆粒の沈着が見られた. 変化はⅡ群で11%(2/18), Ⅲ群で56%(10/18), Ⅳ群で100%(15/15)観察され, このうち軽度な変化がⅢ群で3例, Ⅳ群で13例, 中等度の変化がⅣ群で2例で, 他は極く軽度な変化であった. 肝臓でのこれらの変化はⅠ群では見られず, 投与群では OPP 添加濃度に比例して発生頻度および変

Table 3. Water Consumption

Wk on study	Group	Ⅰ[1)]	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
0		5.8±0.3(20)[2)]	4.8±0.7(20)	3.8±0.5(20)*	2.4±0.6(20)*
2		7.2±0.4(20)	7.0±1.2(20)	6.0±0.5(20)	5.4±0.9(16)*
4		7.4±0.6(20)	7.0±0.8(20)	5.9±1.0(20)*	5.4±0.7(16)*
6		7.4±1.0(20)	7.9±0.6(20)	6.4±1.3(20)	5.7±0.9(16)
8		7.0±0.9(20)	7.9±0.8(20)	5.9±1.8(19)	3.7±2.2(16)*
10		7.1±0.6(20)	8.0±0.5(20)	6.4±1.9(19)	5.2±0.7(16)
12		6.9±0.7(20)	8.3±0.6(20)	6.0±1.8(19)	5.1±0.9(16)
17		6.9±0.2(20)	7.4±0.9(20)	6.6±1.7(19)	5.5±1.8(15)
21		6.7±0.7(20)	8.6±0.7(20)	7.3±1.6(19)	5.3±0.9(15)
25		6.2±0.5(20)	7.4±1.1(20)	6.9±1.8(19)	5.2±1.1(15)
30		5.3±0.4(20)	6.9±1.1(20)*	7.4±0.7(19)*	5.6±0.8(15)
34		4.8±0.6(20)	6.7±0.9(20)*	6.8±0.4(19)*	6.0±0.4(15)*
38		4.7±0.2(20)	6.8±0.5(20)*	7.5±0.5(18)*	6.0±0.3(15)*
43		4.1±0.4(20)	6.4±0.5(20)*	7.1±0.5(18)*	5.5±0.6(15)*
47		3.9±0.2(20)	6.1±0.3(19)*	7.0±0.5(18)*	6.1±0.5(15)*
51		4.2±0.4(20)	5.9±0.6(19)*	7.2±0.4(18)*	5.7±0.3(15)*
Daily mean consumption(g)		6.0	7.1	6.5	5.2
(g/100g B.W.)		17.8	23.2	23.1	21.4

1) Group Ⅰ : Basal diet, Group Ⅱ : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.2% TBZ plus 0.65% OPP in diet, Group Ⅲ : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.2% TBZ plus 1.3% OPP in diet, Group Ⅳ : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.2% TBZ plus 2.6% OPP in diet.

2) Mean±SD (g/mouse/day), and no. of mice examined in the group showed in parenthesis.

* Significantly different from group Ⅰ at $p<0.05$.

化程度とも顕著になっていた.

腎臓では尿細管上皮細胞の小型化, 核の軽度膨化, 細胞質の好塩基性化および基底膜の肥厚などが投与群でみられた. 変化はⅡ群94%(17/18), ⅢおよびⅣ群では全例に認められ, このうちⅡ群で6例, Ⅲ群で15例, Ⅳ群で9例が軽度, Ⅳ群の4例が中等度, 他は極く軽度な変化であった. 尿細管上皮細胞の壊死はⅡ群で39%(7/18), Ⅲ群で61%(11/18), Ⅳ群で80%(12/15)の発生で, このうちⅡ群の3例, Ⅲ群の6例, Ⅳ群の7例が軽度, Ⅳ群の2例が中等度, 他は極く軽度な変化であった. 集合管および乳頭管上皮細胞の壊死がⅡ群で6%(1/18), Ⅲ群で33%(6/18), Ⅳ群で40%(6/15)観察され, このうち軽度および中等度の変化はⅣ群の各1例で, 他は極く軽度な変化であった. 乳頭部の移行上皮細胞の壊死さらに壊死細胞とその落屑塊が腎盂内に貯留している例がⅢ群で6%(1/18), Ⅳ群で73%(11/15)に認められた. このうちⅢ群の1例, Ⅳ群の9例が軽度, Ⅳ群の1例が中等度, 他は極く軽度な変化であった. 腎臓におけるこれらの変化はⅠ群では見られず, 投与群ではOPP添加濃度に比例して発生頻度および変化程度とも顕著になり, とくにⅣ群で強かった.

この他, 脾臓では投与群で萎縮およびヘモジデリン沈着がみられ, 変化程度および発生頻度ともにⅢ群が顕著であり, Ⅱ群とⅣ群はほぼ同程度であった. 膀胱では上皮細胞の過形成または腫大などの変化は観察されなかった.

腫瘍の発生は肝臓腺腫がⅡ群で2例, 肺腺腫がⅣ群で1例それぞれ認められた.

考 察

ラットに膀胱腫瘍を誘発するOPPとその発癌作用を増強するTBZおよびアルカリ化薬である$NaHCO_3$とを併用してマウスに52週間投与し, 発生する腫瘍性および非腫瘍性変化との関連を検討した.

被験物質の総摂取量および1日摂取量をみると, OPPは設定濃度に比例した増加を示し, TBZは各投与群間で大差はなかった. また, $NaHCO_3$も体重比摂取量で差

Table 4. Distribution of Urinary pH Values

	pH* <5.8	·	·	·	6.2	·	·	·	6.6	·	·	·	7.0	·	·	·	7.4<
Before treatment																	
I[a]	10[b]	2				1		2	1	2		1		1			
II	10	1			1	1		2	1	2		1		1			
III	9					3		1	1			3				1	
IV	10	2				1		3		2		1					1
WK 1																	
I	10	5				1		2				1					1
II	10	1				1		1		2		3				1	1
III	10					3		1				3				2	1
IV	10	1				2		1		4		1					1
WK 5																	
I	10	2				4		1		3							
II	10							1							3	2	4
III	10												1	2	2	2	3
IV	10									1		1		4		2	2
WK 9																	
I	10			2	1	1		2		1		2	1				
II	10														1		1 8
III	10				1			1		1		3		1	3		
IV	10			1		1			2	1		1				1	3

	pH <5.8	·	·	·	6.2	·	·	·	6.6	·	·	·	7.0	·	·	·	7.4<
WK 13																	
I	10				2	4		2		1	1						
II	10										1	1	1		1	1	5
III	10									1	1	1	1	3	1	1	1
IV	8					1							1	1	2	1	2
WK 26																	
I	10	1			2	3		1		3							
II	10							1			1	1		2	3		1 1
III	10											3		2	1	1	1 2
IV	10							2		1		1		2	1	2	1
WK 39																	
I	10	7		1		1				1							
II	10							1						1	3	3	2
III	10			1							3	4	1			1	
IV	10							1		11				2	2	1	2
WK 52																	
I	10	5			3	2											
II	10					1				2	1	2			1	1	1 1
III	10			1		1								3	2	2	1
IV	10			1		1				2	1	1		1		1	2

a) Group I : Basal diet, Group II : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.2% TBZ plus 0.65% OPP in diet, Group III : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.2% TBZ plus 1.3% OPP in diet, Group IV : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.2% TBZ plus 2.6% OPP in diet.

b) No. of mice examined.

* Each division represent 0.1 on pH value.

Table 5. Blood Biochemistry

Group[1)]	No. of mice examined	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	γ−GTP (IU/L)	LDH (IU/L)	UN (mg/dl)
Ⅰ	7	167.6±46.4[2)]	16.3±3.5	5.36±0.78	1312.0±395.3	28.80±2.14
Ⅱ	7	220.1±37.3	20.6±6.6	4.39±0.30*	1472.6±305.3	27.49±12.85
Ⅲ	7	250.3±38.2*	24.1±4.3	4.33±0.28*	1663.3±362.1	23.86±3.41
Ⅳ	3	271.0±22.3*	29.0±9.5*	4.60±0.56	1510.0±368.8	28.23±2.36

1) Group Ⅰ : Basal diet (control), Group Ⅱ : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.2% TBZ plus 0.65% OPP in diet, Group Ⅲ : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.2% TBZ plus 1.3% OPP in diet, Group Ⅳ : 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.2% TBZ plus 2.6% OPP in diet.

2) Mean±SD.

* Significantly different from group Ⅰ at $p<0.05$.

がなかった．このことから，投与群と対照群との間で差異を生じた反応は被験物質のそれぞれ単独，相加あるいは相乗作用に起因すると考えられる．また，投与群間で用量-反応関係をもって発生した変化は併用による作用の増強・減弱，新たな代謝および代謝物の出現などを考慮に入れても OPP 摂取に強く依存したものであるとして誤りではないと考えられる．

投与期間中の死亡例には何れも削痩がみられ，出現頻度は OPP 投与量に伴って増加していた．死亡時期をみると2.6%群では5例全例が1-11週に，1.3%群では1例が9週と早期にみられたが，その他の群では40週以後と遅く，しかも各群1，2例の発生であった．このことから，2.6%群の死亡は投与の比較的急性の直接的作用，その他の群では被験物質の慢性の毒作用，消化・吸収の不良による栄養状態の悪化，各種の平衡失調，恒常性維持の乱れ，さらに消耗性疾患発症など多くの要因が複合して働いた結果と考えられる．

投与に伴ってみられた体重増加抑制は，投与群と対照群との摂餌量に差がないことから，死亡発生に関連した要因のうち遷延性あるいは慢性的毒作用が関与したと考えられる．すなわち，抑制は被験物質の慢性毒性の効果，成長の不良・遅延，種々の失調などに原因の多くを求めることができよう．

投与群の尿 pH の上昇は軽度であり，個体間のバラツキも大きかったが，対照群との差は明らかであった．また，投与群間での差異は顕著ではなかったことから，$NaHCO_3$ 投与によるアルカリ化効果は各投与群に均等に現れていたと考えられる．

血清生化学検査では GOT および GPT 値が OPP 投与に伴って上昇し，2.6%群では GOT／GPT 比の低下も認められたことから肝臓障害を疑うべきと思われる[7)]．

臓器重量のうち1.3および2.6% OPP 併用群の心臓，腎臓，脾臓は，対照群に比べ絶対重量では低下しているが，体重比では対照群と同じか上回っており，体重増加抑制の程度を越えるものではない．従って，これらの臓器重量変化は体重増加抑制と同じく成長の遅延または不良に起因していると推定される．肝臓重量は絶対値で同じかまたは高く，体重比では明らかに高く，しかも OPP 投与量に比例した変化であった．このことから，肝臓は上記の各臓器での変化とは異なり，体重増加抑制に連動せず，OPP 摂取に伴い増加傾向を示したと考えられる．膀胱は絶対および体重比重量ともに対照群より高いが，OPP 投与量に比例した増加ではないことから OPP, TBZ, $NaHCO_3$ の何れの影響によるか判断し難い．

病理組織学的検索で1.3および2.6% OPP 併用群の肝臓で小葉中心性にみられた肝細胞のエオジン好染・均質化，腫大などの変化は，投与各群にみられた肝細胞の軽度な腫大，核の大小不同，色素沈着の変化と混在しており，一元的に連続する，より進行した変化と考えられる．こられの変化は OPP の用量に伴って増強されていることから，おもに OPP に依存した変化で，現時点では変性像のみであることから可逆的適応現象の段階にあると推定される．限局性の肝細胞壊死も OPP 投与量に比例して増強されており，投与に関連した変化である．しかし，壊死は巣状に散在性に発生していることから，上記の小葉中心性変性に続発する，あるいは直結するか否かは即断できない．これら肝臓における変化は2.6% OPP 併用群で顕著であり，同群は血清生化学検査でも GOT より GPT の増加が強く GOT／GPT 比が低下していたことから，この濃度での52週間併用投与は肝臓障害を惹起すると言えよう．

腎臓における尿細管，集合管上皮細胞および移行上皮

Table 6. Mean Values of Organ Weight

Group[1]	No. of mice[2]	Body weight(g)	Liver (g)	Heart (mg)	Kidney(L) (mg)	Kidney(R) (mg)	Spleen (mg)	Testis(L) (mg)	Testis(R) (mg)	Bladder (mg)
Ⅰ	20	45.9±2.5[3]	2.18±0.17[3]	185.6±11.3	288.1±19.1	308.2±22.0	110.3±19.6	114.1±4.8	117.5±5.6	38.8±7.3
			(4.75±0.19)[4]	(404.7±17.3)	(628.3±30.1)	(672.2±38.9)	(241.0±43.8)	(249.2±14.1)	(256.6±13.6)	(84.6±15.4)
Ⅱ	18	33.9±1.0*	2.15±0.15	164.3±8.7*	247.4±22.0*	264.9±16.6*	89.1±21.2	102.6±7.5*	106.3±8.8*	45.7±14.5
			(6.33±0.36*)	(484.3±22.8*)	(728.4±53.2*)	(780.6±44.8*)	(262.2±59.1)	(302.6±23.5*)	(313.5±27.0*)	(134.2±40.7*)
Ⅲ	18	32.9±1.5*	2.12±0.16	150.8±8.3*	212.7±35.8*	230.4±26.2*	77.6±12.9*	100.4±8.6*	106.0±7.1*	41.4±15.4
			(6.45±0.45*)	(459.0±16.8*)	(645.7±99.6)	(701.4±77.5)	(236.6±40.4)	(305.5±27.3*)	(322.8±19.5*)	(126.2±48.0*)
Ⅳ	15	29.6±4.0*	2.31±0.30	114.5±16.0*	170.6±31.7*	187.2±41.8*	54.6±10.9*	101.7±7.5*	103.7±7.3*	46.2±11.0
			(7.83±0.42*)	(387.1±12.5*)	(580.9±105.3)	(635.6±139.4)	(184.1±24.1*)	(348.7±42.3*)	(356.0±45.9*)	(156.9±32.2*)

1) Group Ⅰ：Basal diet (control), Group Ⅱ：0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.2% TBZ plus 0.65% OPP in diet, Group Ⅲ：0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.2% TBZ plus 1.3% OPP in diet, Group Ⅳ：0.8% $NaHCO_3$ in drinking water plus 0.2% TBZ plus 2.6% OPP in diet.
2) No. of organs weighed.
3) Absolute mean weight±SD.
4) Relative mean weight±SD.
* Significantly different from group Ⅰ at $p<0.05$.

細胞の壊死，さらに腎盂内に落屑塊が見られるなどの変化の発生および変化程度は何れも OPP 投与量に比例して顕著になっており，投与に関連した変化であることは明らかである．すなわち，OPP, TBZ, $NaHCO_3$ の併用，とくに OPP 投与は腎臓では尿細管より集合管系上皮細胞あるいは移行上皮細胞に強く影響を与えると考えられる．これら腎臓における変化は2.6% OPP 併用群で顕著であり，この濃度での52週間併用投与は肝臓と同様に腎臓にも障害を招来することは明らかである．

投与群の膀胱重量は増加したが，組織学的変化はみられず，ラットを用いた実験とは異なる結果であった．

腫瘍は肝臓および肺腺腫が散発的に発生したのみであり，投与との関連は窺うべくもない．

以上の如く今回のマウスを用いた実験で OPP, TBZ および $NaHCO_3$ 併用投与に関連した種々の変化が観察され，とくに OPP 2.6%併用投与での肝臓および腎臓障害が顕著であった．しかしラットでみられた膀胱発癌は認められなかった．OPP による発癌の最終癌原物質はラットにおける尿中代謝物の 2-phenyl-1, 4-benzoquinone(PBQ)ではないかと報告[8]もあることから，ラットとマウスでの種差とくに代謝の相違が今回の結果となったと考えられる．今後は，PBQ を含め代謝物による発癌，その他の毒性について，さらに検討を加えたい．

文　献

1) Hiraga, K. and Fujii, T. : *Fd Chem. Toxic.*, 22, 865-870, 1984.
2) Hiraga, K. and Fujii, T. : *Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 303-310, 1981.
3) Fujii, T., Mikuriya, H., Kamiya, N. and Hiraga, K. : *Fd Chem. Toxic.*, 24(3), 207-211, 1986.
4) Fujii, T., Nakamura, k. and Hiraga, k. : *Fd Chem. Toxic.*, 25, 359-362, 1987.
5) 奥田宗久：名市大医誌，37, 157-186, 1986.
6) Hagiwara, A., Shibata, M., Hirose, M., Fukushima, S. and Ito, N. : *Fd chem. Toxic.*, 22, 809-814, 1984.
7) 柴田　進：臨床生化学診断法，第5版，104-106, 1984, 金芳堂，東京.
8) Morimoto, K., Fukuoka, M., Hasegawa, R., Tanaka, A., Takahashi, A. and Hayashi, Y. : *Jpn. J. Cancer Res.*, 78, 1027-1030, 1987.

Table 7. Histopathological Findings of Liver and Kidney in Mice Treated with *o*-Phenyl-phenol (OPP) Thiabendazole (TBZ) and Sodium Bicarbonate ($NaHCO_3$) for 52 Weeks

Group[1)]		I	II	III	IV
No. of mice examined[2)]		20	18	18	15
Liver[3)]	−	20	0	0	0
Anisonucleosis of liver cells	±	0	11	6	1
with enlargement	+	0	7	12	13
	++	0	0	0	1
Enlargement of liver cells	−	20	18	14	0
with eosinophilic change	±	0	0	4	4
	+	0	0	0	8
	++	0	0	0	3
Focal necrosis of liver cells	−	20	15	12	6
	±	0	3	5	4
	+	0	0	1	5
Deposit of pigment in liver	−	20	16	8	0
cells and phagocytes	±	0	2	7	0
	+	0	0	3	13
	++	0	0	0	2
Kidney	−	20	1	0	0
Degeneration of tubular	±	0	11	3	2
epithelium	+	0	6	15	9
	++	0	0	0	4
Necrosis of tubular epithelium	−	20	11	7	3
	±	0	4	5	3
	+	0	3	6	7
	++	0	0	0	2
Dilatation of tubules	−	20	18	18	10
	±	0	0	0	1
	+	0	0	0	2
	++	0	0	0	2
Degeneration of ductular	−	20	17	15	12
epithelium	±	0	1	3	2
	+	0	0	0	1
Necrosis of ductular epithelium	−	20	17	12	9
	±	0	1	6	4
	+	0	0	0	1
	++	0	0	0	1
Necrosis of transitional cells	−	20	18	17	4
in papilla and/or	±	0	0	0	1
cell debris in pelves	+	0	0	1	9
	++	0	0	0	1

1) Group I : basal diet, group II : 0.2% TBZ plus 0.65% OPP in diet and 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water, group III : 0.2% TBZ plus 1.3% OPP in diet and 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water, group IV : 0.2% TBZ plus 2.6% OPP in diet and 0.8% $NaHCO_3$ in drinking water.

2) No. of mice survived till wk 26 and examined histopathologically.

3) Severity : −no change, ±very slight changes, +slight changes, ++moderate changes.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 40, 316-318, 1989

オルトフェニルフェノールナトリウム（OPP-Na）誘導 チトクロームP450分子種の同定：立体特異的テストステロン水酸化酵素活性測定を用いる方法

牛山慶子*，長井二三子*，佐藤かな子*，加納いつ*

Identification of Cytochrome P450 Species Induced by *o*-Phenylphenol (OPP-Na): by Determination of Stereospecific Testosterone Hydroxylase Activities

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, テストステロン水酸化酵素, testosterone hydroxylase, 立体特異的水酸化反応, stereoselective hydroxylation

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．動物実験ではOPP−Naの添加飼料で，ラットに膀胱ガンが発生する[1]．OPPの尿中代謝産物はOPPの水酸化物である2,5-ジヒドロキシビフェニル(PHQ)が多く検出された[2]．またOPP投与によりOPPをPHQに生体内反応で変換するための肝薬物代謝酵素活性が誘導され[3]，OPP水酸化酵素により代謝物が増加すると考えられる．このこととガンの発生との関わりについて検討するため，薬物代謝酵素の性質をしらべた[3-5]．OPP−Na投与によりラットの肝臓のチトクロームP450量は20%上昇し[3]，肝ミクロソームタンパクのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では，分子量47kd(キロダルトン)と51kdのバンドが増加し，これらのバンドはイムノブロットでチトクロームP450の分子量のうち，PB-Ⅰa，PB-Ⅰb，PB-Ⅱbに対する3種の抗体と反応することを報告した[4]．また，OPP水酸化酵素はPB-Ⅰa，PB-Ⅰb，PB-Ⅱbの抗体によって阻害されるため，PB-Ⅰa，PB-Ⅰb，PB-ⅡbがOPP水酸化酵素活性に関わっているものと思われた[5]．

薬物で誘導された多くのチトクロームP450は，ステロイドを基質とする特徴のある立体特異的水酸化反応を示すことが報告されている[6]．これは，チトクロームP450の分子種を特定するのに役立つ．今回は，OPP−Naを投与したラットの肝ミクロソームのステロイドの立体特異的水酸化活性を，テストステロンを基質として測定することにより，OPP−Na投与で誘導されるP450分子種について，抗体を用いて得られた結果と比較し確認するため，検討を行った．

方法

1．酵素標品および動物の処理

F344／DuCrjラット(日本チャールズリバー)に5週令より，2%OPP−Naを添加した飼料を1週間摂取させ，肝を摘出した．ラットは対照群，投与群それぞれ5匹ずつ用い，個々の動物について，それぞれミクロソーム分画を調製し[5]，以下の実験に用いた．タンパク質の測定は，Lowryら[6]の方法で行った．チトクロームP450の測定は，Omuraらの方法[7]に従った．

2．テストステロン水酸化酵素活性の測定

Katoらの方法[8]に従った．反応は，1mlで行い，組成はEDTA 0.1mM, テストステロン2mM, NADP 0.8mM, グルコース6リン酸(G6P)8mM, グルコース6リン酸脱水素酵素(G6PDH)1 I.U., 塩化マグネシウム6mM, ミクロソーム0.25mg, Tris緩衝液(pH 7.4)0.05Mであった．37°，15分間反応後，内部標準物質として，17α-メチルテストステロンを3μg加え，ジクロロメタン2mlで抽出した．有機層を蒸発乾固させ，メタ

*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

表1．テストステロン水酸化酵素活性（nmol／min／mg protein）

	7α-テストステロン水酸化活性	6β-テストステロン水酸化活性	16α-テストステロン水酸化活性	16β-テストステロン水酸化活性
オス				
対照群	6.05± 3.48	67.87±27.81	23.94±10.04	16.29±8.61
OPP-Na 投与群	12.81± 3.83*	107.32±26.46*	38.19±10.99	28.12±13.22
メス				
対照群	9.86± 4.45	6.06± 5.04	1.45± 1.17	5.76± 7.94
OPP-Na 投与群	17.46± 3.61*	12.25±4.38*	2.44± 2.35	7.81± 6.88
対応するチトクロームP450分子種				
Wood et al[9].	P-450 a	P-450 c, P-450 d	P-450 b, P-450 e	
Yamazoe et al[10].		PB-Ⅱ b		
Kawano et al[11]**.	PB-Ⅰ b	BNF-Ⅱ a, BNF-Ⅱ d	PB-Ⅰ c, PB-Ⅰ d	

データは，5検体 duplicate assay の平均値±SD で表す．
*Student T test で5％の危険率での有意差あり．
**Wood ら[9]の結果を Kawano ら[11]の分類で表した．

ノール50 μl に溶解し，HPLC で分析した．HPLC の条件は，TSKgel ODS-80TM（粒径5 μm）4 mm×25cm（東ソー製）のカラムを用い，50℃，溶媒の流速0.9ml／min で行った．メタノール・水の溶媒を用い，メタノールの割合ははじめ35％で，30分までリニアーグラジエントで65％にし，65％で10分間保持，そのあと5分間かけてグラジエントで35％の濃度にもどした[8]．検出は，紫外部240nm の吸収を測定し，標準物質の分析結果と比較して同定，定量を行った．

結　　果

HPLC で測定したテストステロン水酸化酵素活性の結果は，表1に示した．7α-テストステロン水酸化酵素活性および6β-テストステロン水酸化酵素活性は対照群で性差はあるが，オス，メスとも投与群で約2倍の上昇があり，それぞれ5％の危険率で有意差が認められた．16α-テストステロン水酸化酵素と16β-テストステロン水酸化酵素活性も OPP-Na 投与群でわずかに上昇しているが，ばらつきがあり有意差があるとは解釈されない．

表1の下段に Wood ら[9]および Yamazoe ら[10]が報告した，それぞれのテストステロン水酸化反応を担っているP450分子種と，これらの分子種に対応する Kawano ら[11]の分類を示した．OPP–Na 投与によって誘導された7α-テストステロン水酸化酵素と6β-テストステロン水酸化酵素は，それぞれ PB-Ⅰb，PB-Ⅱb が担っていると考えられる．前報に SDS-PAGE ゲル上の OPP 誘導タンパクの47kd, 51kd のバンドの出現[4]とそれらが免疫学的に PB-Ⅰa，PB-Ⅰb，PB-Ⅱb の分子種に由来すること[5]を報告したが，OPP-Na 投与により PB-Ⅰb，PB-Ⅱb が誘導されることが，テストステロン水酸化酵素の種類によっても証明された．Kawano ら[11]の PB-Ⅰa は Wood ら[9]の命名法による分子種との対応が明確ではないので，この誘導の有無は再確認する必要がある．

考　　察

薬物誘導ミクロソームのモノオキシゲナーゼを，テストステロンを基質とする立体特異性から識別した Wood らの報告[9]によると，フェノバルビタール(PB)投与は，主として16α-テストステロン水酸化と16β-テストステロン水酸化酵素を多く誘導する．一方3-メチルコラントレン(MC)は7α-テストステロン水酸化酵素を誘導し，6β-テストステロン水酸化活性を下げる．表1の活性値は個体差が大きいためばらつきはあるが，OPP-Na 投与では7α-テストステロン水酸化酵素と6β-テストステロン水酸化酵素の活性は確実に誘導されている．7α-テストステロン水酸化活性は Kawano ら[11]の PB-Ⅰb にあり，これは Wood らの P-450 a に[9]，また Guengerich らの P450 UT-F に相当する[12]．また Yamazoe らによると，PB-Ⅱb には，6β-テストステロン水酸化活性があり[10]，これは Guengerich らの P450 PB／PCN-E に相当する[12]．PB-Ⅰa，PB-Ⅰb，PB-Ⅱb の抗体が OPP 水酸化酵素活性を阻害した結果から，これら3種の分子種が OPP 水酸化酸素活性を担う可能性があることを報告した[5]．しかし抗 PB-Ⅰa と抗 PB-Ⅰb

は抗原精製の過程で夾雑しやすい関係にあるので，抗体が交叉反応する可能性があり，OPP 水酸化酵素活性への PB-Ⅰa の関与についての確認は他の方法によらなければならない．

OPP–Na 投与によるラットの膀胱ガンの発生は，飼料中 OPP–Na 濃度の高いものに顕著であり[1]，尿中代謝物 PHQ 濃度は飼料中 OPP–Na 濃度が一定以上に上がると急激に高くなること[13]がわかっている．OPP–Na 投与によって薬物代謝酵素(OPP 水酸化酵素)が誘導され，OPP を PHQ に変換する代謝が促進される．このことは生じた PHQ またはその関連物質が発ガンに深く関わっていることを示唆する．

表1の対照群のデータでオスとメスを比較してみると6β-テストステロン水酸化酵素，16α-テストステロン水酸化酵素と16β-テストステロン水酸化酵素はオスのほうがメスより10倍ほど活性が高く，7α-テストステロン水酸化酵素は反対にメスのほうが活性が高い．これは Kato らの結果[9]と一致した傾向で，性依存のステロイド水酸化反応である．

ま と め

OPP–Na 投与により，ラット肝ミクロソームに前報では SDS–PAGE ゲル上の OPP 誘導タンパクのバンドの出現と免疫学的方法により[4,5]，チトクローム P450の分子種のうち PB-Ⅰa，PB-Ⅰb，PB-Ⅱb の誘導が示唆された．今回テストステロン水酸化酵素活性を測定した結果，7α-テストステロン水酸化酵素および6β-テストステロン水酸化酵素活性の上昇を認め，上記3種の分子種のうち OPP–Na 投与により PB-Ⅰb，PB-Ⅱb が誘導されることを確認した。

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，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.

4) 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.

5) 牛山慶子，長井二三子，佐藤かな子，加納いつ：東京衛研年報39, 289-291, 1988.

6) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*,193, 265-275, 1951.

7) Omura, T. and Sato, R.: *J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2378, 1964.

8) Kato, R. Yamazoe, Y. Shimada, M. Murayama, N. and Kamataki, T.: *J. Biochem.*, 100, 895-902, 1986.

9) Wood, A.W., Ryan, D.E., Thomas, P.T. and Levin, W.: *J. Biol. Chem.*, 258, 8839-8847, 1983.

10) Yamazoe, Y., Shimada, M., Murayama, N., Kawano, S. and Kato, R., *J. Biochem.*, 100, 1095-1097, 1986.

11) Kawano, S., Kamataki, T., Maeda, K., Kato, R., Nakao, T. and Mizoguchi, I.,: *Fundamental* and *Applied Toxicology*, 5, 487-498, 1985.

12) Guengerich, F.P., Dannan, G.A., Wright, S.T., Martin, M.V. and Kaminsky, L.S.: *Biochemistry*, 21, 6019-6030, 1982.

13) 牛山慶子，樺島順一郎，中尾順子：東京衛研年報34, 297-298, 1983.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 319-323, 1989

過酸化水素による DNA 損傷

金西信次*, 渡部　真**, 金城康人**

DNA damage induced by hydrogen peroxide in mammalian cell

NOBUJI KANANISHI*, YASUHITO KINJO** and MAKOTO WATANABE**

Keywords：過酸化水素 hydrogen peroxide, アルカリ溶出法 alkaline elution, DNA 単鎖切断 DNA single strand break, L 5178 Y 細胞　L 5178 Y cell,

目　的

過酸化水素(H_2O_2)は殺菌，漂白作用を有することから，かって食品添加物として広く使用されていた．しかし弱い発ガン性がある[8-10]ことから「最終食品の完成前に分解または除去しなければならない」とされている[1]．また生体内の代謝過程においても生成・分解されている．一方種々の生物で H_2O_2 は細胞致死とともに，DNA 損傷[3-5,7,16,17,21,22]，突然変異[13,20,26,28]，染色体異常[19,20,25,27]，姉妹染色分体交換[4,14,20,23,24]を誘起することが知られている．我々は哺乳動物細胞におけるこれらの H_2O_2 の作用を分子レベルで解明するために，DNA 損傷，特に DNA 単鎖切断を高感度で検出することができるアルカリ溶出法を応用して，H_2O_2 による DNA 損傷ならびにその修復について調べたので報告する．

方　法

試薬：H_2O_2(関東化学)，catalase(Sigma)，Fischer 培地(GIBCO)，馬血清(Flow Laboratories)，N-lauroylsarcosin sodium salt (sarkosyl, 東京化成工業)，tetraethylammonium-hydroxide(東京化成工業)，3，5-diaminobenzoic acid (半井薬品)，albumin (Sigma)，trichloroacetic acid(Sigma)，H_2O_2 は血清を添加しない培地で希釈した．

細胞：マウス白血病リンパ細胞 L 5178 Y は10％馬血清を添加した Fischer の培地で培養．1～5×10^5／ml に増殖中の細胞を用いた．

アルカリ溶出法と DNA の定量：DNA 損傷の検出にはアルカリ溶出法(alkaline elution)を，DNA の定量にはミクロ蛍光法を用いた[29]．細胞は血清無添加培地で洗浄し，0℃で種々の濃度の H_2O_2 で処理した．1×10^6細胞をメンブランフィルター(Millipore, BSWPO2500，孔径 2 μm)上に広げ，洗浄後，0.2% sarkosyl, 0.02 M EDTA, pH 10.2の細胞溶解液を流して細胞を溶解．0.02 M EDTA pH 10.2で洗浄後，0.06 M tetraethylammonium- hydroxide, 0.02 M EDTA pH 12.3の DNA 溶出液をペリスタポンプにより0.1ml／min の流速で流して DNA を溶出．1 ml づつ分取．各溶出画分を沈澱，洗浄，乾燥後，3，5-diaminobenzoic acid と反応させ蛍光を測定した．溶出曲線の縦軸はフィルター上に乗せた細胞の DNA 量を100％とし，溶出した DNA を減ずることによってフィルター上に残留した DNA 量の％をプロットした．

結果と考察

DNA 単鎖切断の誘起：H_2O_2 は細胞内の DNA の単鎖の切断を誘起する．図 1 に示すように H_2O_2 処理していない細胞の DNA のアルカリ溶出はほとんど無いが，0℃，10分間，H_2O_2 で処理した細胞において，処理濃度の増大と共にアルカリ溶出曲線の勾配は大きくなった．これは細胞内に DNA 単鎖切断が生じ，DNA が低分子化した結果，メンブランフィルターから溶出した DNA が多くなったことを示している．僅か0.1 μg／ml(3 μM)のH_2O_2 でも哺乳動物細胞内に DNA 単鎖切断を生じ，それをアルカリ溶出法は検出できる．ちなみに突然変異，染色体異常の検出には10 μg／ml(0.3mM)以上のオーダーの H_2O_2 の処理が必要である．

*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
**東京都立アイソトープ総合研究所

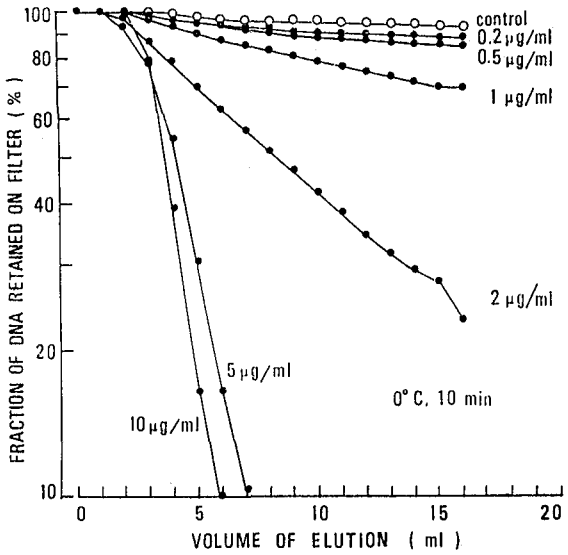


図1．過酸化水素処理細胞のアルカリ溶出曲線

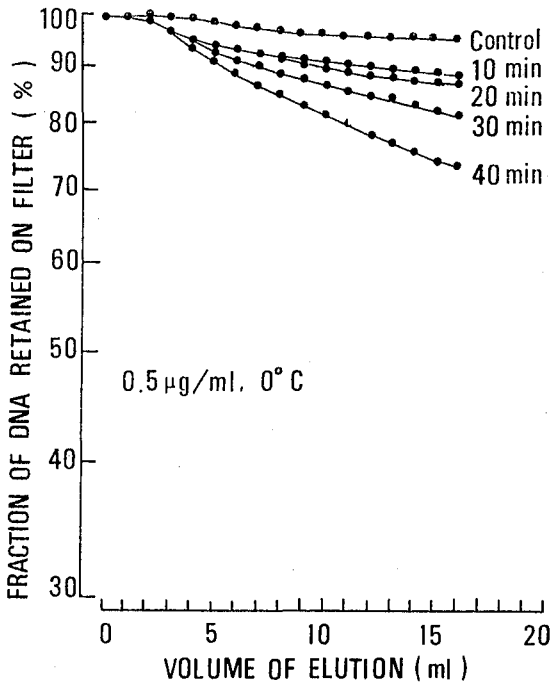


図2．低濃度過酸化水素の処理時間を変えたとこのアルカリ溶出曲線

5 μg／ml(0.15mM)までは濃度と共に勾配が大きくなるが，それ以上の濃度では勾配が急峻で，飽和する傾向にある．

第2図は比較的低濃度0.5 μg／ml の H_2O_2(15 μM)の処理時間を変えたときで，処理時間の増加と共に溶出曲線の勾配は大きくなる．0℃における低濃度 H_2O_2 処理の場合，片対数グラフ上にプロットしたものは直線性の溶出曲線を示し，DNA 単鎖切断量は処理時間あるいは濃度との間に正の相関関係が成立する．

しかし，第3図に示すように高濃度10 μg／ml の処理の時は，処理時間が長くなると，急峻な初期勾配とその後の DNA 溶出が減少した二相性の曲線となる．それとともに，低濃度処理の時とは異なって，処理時間が長くなるとアルカリ溶出が減少する．

溶出曲線が二相性を示す理由は不明であるが，急峻な初期勾配から多量の DNA 単鎖切断が生じていることが示唆される．多量の DNA 単鎖切断端はアトランダムに再結合し，DNA-DNA あるいは DNA-タンパク質との架橋により高分子化し，溶出が減少するという可能性がある．処理時間の増加と共に溶出が減少することからもこのことが示唆される．また架橋形成とともにクロマチン構造の変化，メンブランフィルター上に残る DNA 量の不足等が考えられる．

突然変異，染色体異常等の実験において比較的高濃度の H_2O_2 が使用されており，これらとの関連については今後検討していかなければならない．H_2O_2 による DNA-蛋白，あるいは DNA 内部の架橋については，形成されないという報告が多い[3,4,17]．唯，分離されたクロマチンに1 mM 以上の H_2O_2 処理したとき，架橋が形成されたという報告があるのみである[12]．架橋形成がないという報告に関しては，我々と実験条件が異なる可能性がある．我々の実験系では0℃で処理し，細胞溶解まで保持した．DNA 単鎖切断は37℃において以下の実験の結果で示すように，極めて短時間で修復してしまう．それゆえ切断端がアトランダムに再結合し架橋を形成する前にリガーゼ等により正常に修復し，架橋を検出することが困難であったと考えられる．

カタラーゼ処理：次に H_2O_2 によって生じた DNA 単鎖切断の修復を調べるためには，H_2O_2処理した細胞懸濁液より H_2O_2 を除去することが必要である．その方法として，遠心分離により洗浄除去する方法と，カタラーゼによって H_2O_2 を不活性化する方法とがある．

H_2O_2 はカタラーゼ処理により容易に不活性化されることが知られている．そこでカタラーゼ処理によって H_2O_2 を不活性化し，DNA 単鎖切断が生じるか否かを調べた．5 μg／ml(0.15mM)の H_2O_2 溶液に，0℃または25℃で10分間，100U／ml のカタラーゼを作用させた後，その H_2O_2 溶液で処理した細胞では，アルカリ溶出を示

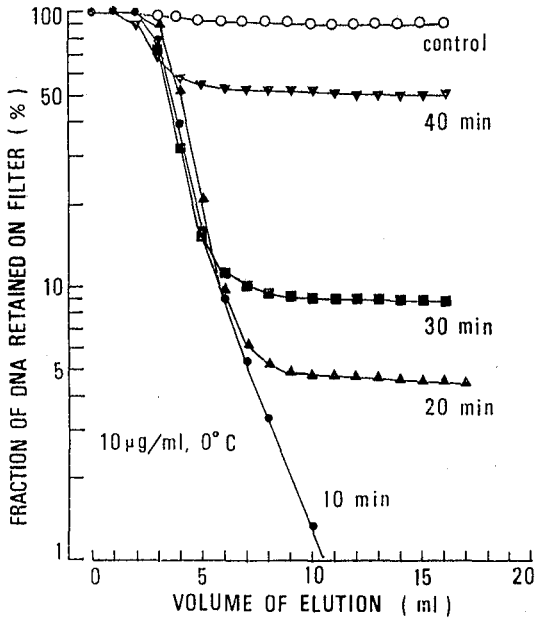


図3．高濃度過酸化水素の処理時間を変えたときのアルカリ溶出曲線

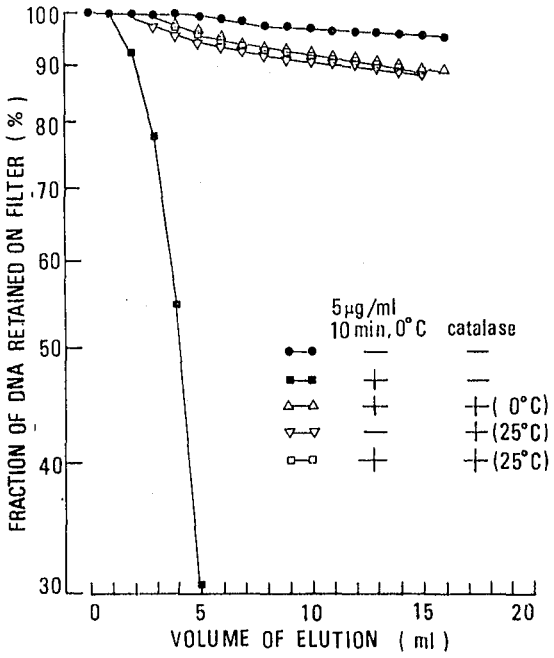


図4．過酸化水素のカタラーゼ処理による不活性化

さない(第4図)．データーは示さないが37℃でも同じ結果が得られた．

即ちカタラーゼ処理によって H_2O_2 を不活性化し，H_2O_2 によるDNA単鎖切断を停止させ，その後の培養における切断されたDNA単鎖の修復を調べることが出来る．この量のカタラーゼは0℃においても37℃と同様に H_2O_2 の不活性化に作用する．即ち，我々の実験条件の0℃での H_2O_2 処理の際に，カタラーゼを添加し，H_2O_2 を不活性化することが出来る．その不活性化後に，種々の条件で細胞を培養することによってDNA単鎖切断の修復を調べることが出来る．

DNA単鎖切断の修復：第5図はDNA単鎖切断の修復について調べたものである．2 μg／ml の H_2O_2 溶液によって，0℃で10分間処理した細胞では，勾配の急な溶出曲線(0 min)を描くが，処理後カタラーゼを添加して H_2O_2 を分解，37℃で培養した細胞では短時間(5-20min)で勾配がなだらかとなり，DNA溶出が減少する．即ち37℃の培養によって，切断された単鎖DNAは再結合により高分子化(修復)し，DNA溶出が減少したことを示す．20minの培養で，ほぼ非処理の溶出曲線と同様となり，極めて短時間の単鎖切断の修復がおこなわれる．

遠心分離による H_2O_2 除去後の単鎖切断の回復もカタラーゼによる方法とほぼ同様な結果が得られた．しかし遠心分離による H_2O_2 除去は，遠心分離のために時間がかかり，短時間の修復効果を調べるには不適当である．

この修復は0℃の培養では起こらない(第6図)．2 μg／ml の H_2O_2 溶液，0℃で10分間処理し，カタラーゼを添加して H_2O_2 を分解，0℃で10分間，或は20分間培養した細胞では，37℃で培養した時とは異なり，溶出曲線の勾配はほとんど減少しなかった．即ち，このDNA単鎖切断の修復は0℃の培養では起こらない(第6図)．

H_2O_2 によって生じたDNA単鎖切断は修復されることが報告されている．初期勾配の減少によるDNA単鎖切断の50％修復時間($T_{1/2}$)は6分で，Bradley等[3]によって報告された6.8分，電離放射線によるDNA単鎖切断の $T_{1/2}$=5.0分とほぼ等しい．

第7図にDNA単鎖切断の修復における薬剤の効果を示した．2 μg／ml の H_2O_2，0℃で10分間処理し，カタラーゼを添加して H_2O_2 を分解，37℃で20分間培養，この修復培養に，培養液に複製後修復等の修復阻害剤であるカフエイン，あるいは蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキシミドを添加した．培養後のアルカリ溶出曲線は非添加の場合と同様であり，これらの薬剤はDNA単鎖切断の修復を阻害しなかった．今後DNA単鎖切断の修復機構を解明するために種々の化学物質について調べていかねばならない．

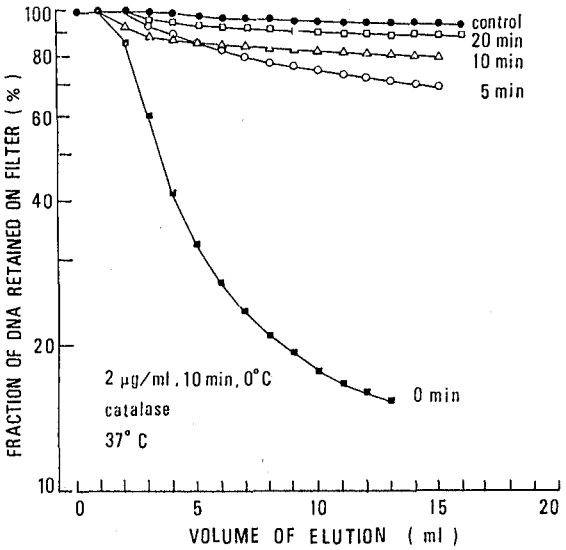


図5．37℃における DNA 単鎖切断の修復

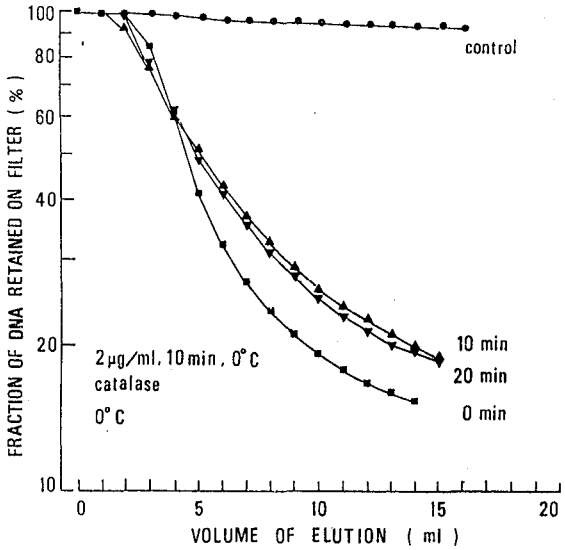


図6．0℃における DNA 単鎖切断の修復

H_2O_2 によって単鎖切断は生じ，容易に再結合される．H_2O_2 によって DNA の二重鎖切断は生じにくく[5,17]，単鎖切断との割合は1：2000であると Bradley 等[5]によって報告されている．H_2O_2 による DNA 単鎖切断と細胞死との間に相関があるという報告もあるが[4,15,16]，電離放射線では細胞死は DNA 単鎖切断よりむしろ二重鎖切断との間に相関があると一般に考えられている．哺乳動物細胞では H_2O_2 によって DNA 単鎖切断が生じるがその作用濃度から細胞死に直接関与しないであろう．今後二重鎖切断とともに DNA-DNA，DNA-蛋白架橋との関係についても調べる必要がある．

H_2O_2 によって突然変異が誘発されるという報告はあるが，誘発されないという報告もある[3,4,23,25,27]．現在突然変異が誘発されないという報告の方が多い．細菌においても突然変異を検出した報告は少なく，細菌の系で突然変異検出が困難であったのは，H_2O_2 による突然変異誘発前に H_2O_2 が細胞に致死的に作用するからであると考えられる．哺乳動物細胞を用いた系では H_2O_2 による突然変異が誘発されないという報告がある．しかし染色体異常，姉妹染色分体交換は検出されている．

化学物質ならびに放射線によりクロマチン・染色体に誘起された初期損傷の定量化に，DNA アルカリ溶出法が有効であるとこと，ならびに初期損傷の量にクロマチン高次構造の違いが影響することを我々は以前から研究し，突然変異誘発化学物質のモデルとしてトリチウム水の効果について本年報に報告した[29]．今回の研究により我々は H_2O_2 が，トリチウム水と同様突然変異誘発化学物質のモデルとして使用しうるのではないかと考えている．

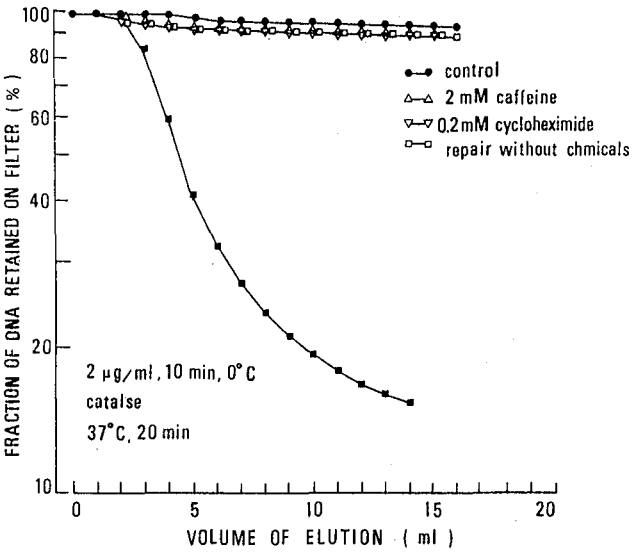


図7．DNA 単鎖切断の修復

結　　論

1．H_2O_2 処理したマウス白血病リンパ細胞L5178YにDNA単鎖切断が生じることをアルカリ溶出法によって高感度で検出した．0℃，10分間処理において H_2O_2 の濃度とDNA単鎖切断量との間に明らかな相関があった．

2．低濃度処理では処理時間の増加とともにDNA単鎖切断量は多くなった．一方高濃度処理では二相性の曲線となり，処理時間の増加と共にアルカリ溶出分画は減少した．DNA内部ないしは，蛋白との架橋形成，あるいはクロマチン構造の変化等が考えられる．今後細胞致死，突然変異及び染色体異常との関連が検討されねばならない．

3．カタラーゼは H_2O_2 のDNA単鎖切断能を極めて短時間で不活性化する．カタラーゼは0℃においても37℃と同様に作用する．

4．H_2O_2 処理後，H_2O_2 を遠心分離，またはカタラーゼにより除去後，細胞を37℃で培養することにより切断されたDNA単鎖は短時間に修復される．この修復は0℃では起きない．また2mMカフェインあるいは0.2mMサイクロヘキシミドによって修復は阻害されない．

5．H_2O_2 がトリチウム水と同様突然変異誘発化学物質のモデルとして使用することが出来る．

文　　献

1）厚生省告示：第24号，昭和55年2月20日，1980

2）Ananthaswamy, H.N., A. Eisenstark, *J. Bacteriol.*, 130, 187-191, 1977.

3）Bradley, M.O., L.C. Erickson, *Biochim. Biophys. Acta*, 654, 135-141, 1981.

4）Bradley, M.O., I.C. Hsu, C.C. Harris, *Nature*, 282, 318-320, 1979.

5）Bradley, M.O., K.W. Kohn, *Nucleic Acids Res.*, 7, 793-804, 1979.

6）Hartman, P.S., A. Eisenstark, *J.Bacteriol.*, 133, 769-774, 1978.

7）Hoffmann, M.E., A.C. Mello-Filho, R. Meneghini, *Biochim. Biophys. Acta*, 781, 234-238, 1984.

8）Ito, A., H. Watanabe, M. Naito, Y. Naito, K. Kawashima, *Gann*, 75, 17-21, 1984.

9）Ito, A., H. Watanabe, M. Naito, Y. Naito, *Gann*, 72, 174-175, 1981.

10）Ito, A., M. Naito, Y. Naito, H. Watanabe, *Gann*, 73, 315-322, 1982.

11）Laval, F., *Mutat. Res.*, 201, 73-79, 1988.

12）Lesko, S.A., J.-L. Drocourt, S.U. Yang, *Biochemistry* 21, 5010-5015, 1982.

13）Levin, D.E., M. Hollstein, M.F. Christman, E.A. Schwiers, B.N. Ames, *Pro. N.A.S.*, 79, 7445-7449, 1982.

14）MacRae, W.D., H.F. Stich, *Mutat. Res.*, 68, 351-365, 1979.

15）Mello-Filho, A.C., R. Meneghini, *Biochim. Biophys. Acta*, 781, 56-63, 1984.

16）Mello-Filho, A.C., M.E.Hoffmann, R. Meneghini, *Biochem. J.*, 218, 273-275, 1984.

17）Olson, M.J., *J.Toxicol. Environ. Health*, 23, 407-423, 1988.

18）Oya, Y., K. Yamamoto, A.Tonomura, *Mutat. Res.*, 172, 245-253, 1986.

19）Parshad, R., W.G. Taylor, K.K. Sanford, R.F. Camalier, R. Gantt, R.E. Tarone, *Mutat. Res.*, 73, 115-124, 1980.

20）Phillips, B.J., T.E.B. James, D.Anderson, *Mutat.* Res., 126, 265-271, 1984.

21）Repine, J.E., O.W. Pfenninger, D.W. Talmage, E.M. Berger, D.E. Pettijohn, *Pro. N.A.S.*, 78, 1001-1003, 1981.

22）Singh, N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, *Exp. Cell Res.*, 175, 184-191, 1988.

23）Speit, G., *Mutat. Res.*, 174, 21-26, 1986.

24）Speit, G., W. Vogel, *Mutat. Res.*, 93, 175-183, 1982.

25）Stich, H.F., L. Wei, P. Lam, *Cancer Lett.*, 5, 199-204, 1978.

26）Thacher, J., *Mutat. Res.*, 33, 147-156, 1975.

27）Tsuda, H., *Jpn. J. Genet.*, 56, 1-8, 1981.

28）Xu, J., W. Whong, T. Oog, *Mutat. Res.*, 130, 79-86, 1984.

29）金西信次，金城康人，渡部　真，代谷次夫，田中信徳：東京衛研年報，34，399-405，1983.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 324-330, 1989

代謝調節機構と毒性発現
I．律速酵素の生合成による代謝調節のモデル実験

深 野 駿 一*

Metabolic Control and Toxicity
I. Computer Simulation of the Metabolic Control by Biosynthesis of a Rate-determining Enzyme

SHUNICHI FUKANO*

Keywords：模擬実験 simulation, 制御機構 regulation mechanism, 代謝 metabolism, 阻害剤 inhibitor, 酵素 enzyme

生体内に毒物が取り込まれたとき，必ずしも摂取量に比例して毒性が発現するわけではない．毒物の暴露方法，吸収率，生体内での貯留状況，あるいは排せつ方法により毒性が大きく異なるのは当然であるが，毒物の最終の標的である酵素を直接阻害しても毒性が発現しない場合が観察される．例えば合成系の2番目に位置する δ-Aminolevulinic acid dehydratase は，鉛暴露によりその末梢血液中の活性が数分の1に減少しても貧血などの症状が発現しない．血中鉛濃度は上昇し酵素阻害を明らかに起こしているにもかかわらず，ヘマトクリット値は変わらずヘモグロビンの減少による貧血はみられない．鉛暴露量を増やせば貧血となるが，酵素活性に対し相当の許容量が存在するようである．このような毒性発現の有無を解釈するために，従来，物質の構造変化や生物活性が研究の中心であり，物質の時間的，動的変化からとらえようとする研究は少なかった．またシミュレーションにより生体内の反応結果を予測しようとする試みはあるが[1-3]極めて少ない．そこで本報では生体の動的変化，すなわち生体の恒常性を保つ制御機構が毒性の発現にいかに係わっているか検討することを試みた．恒常性を保つための方法はフィードバック阻害をはじめ多数存在し，各々の代謝サイクルによって異なっているが，ここでは第一段階として律速段階にある酵素の生合成調節による代謝サイクルモデルを構築して，この代謝系に酵素阻害剤を入れシミュレーション実験を行い，毒性発現に至る過程を検討した．

実験方法

1．代謝制御モデル

ここで使用した代謝モデルを Fig. 1 に示した．これはヘム合成系の一部をモデル化したものであるが，他の代謝系に充分応用できるものと思われる．

この代謝モデルはある組織内で，一定の速度(NPROU)で消費されている最終産物(PRO1)を生合成するためのサイクルで，PRO1の量を一定に保つように調節し，PRO1のプールを維持しているものとする．PRO1はこの反応系における律速酵素(E1)の量を3ケ所のフィードバックにより調節している．第1はE1の合成のための DNA の転写調節であり，第2は m-RNA の翻訳調節で，第3は合成された前駆体 E1(PE1)がミトコンドリアに取り込まれる時における輸送調節である．PRO1がある一定量(NPROPL：Nは量を示す接頭語とする．)を越えるとその量に比例して DNA のオペレイター部分に結合するリプレサー又は RNA のスタートコドンに結合するサブユニット，あるいはミトコンドリアの膜を PE1が通過に関与するサブユニットの3種類の(あるいは同一の)タンパクが合成されるものとする．例えば転写調節はリプレサー(NREC)が DNA に結合し DNA 量(NDNA，複数の細胞の DNA を想定している．)を調節するものとし，この反応を(1)式に示した．

$$\mathrm{NDNA} + \mathrm{NREC} \underset{}{\overset{\mathrm{ARD\ 9}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{NDNARC} \qquad (1)$$

$$\mathrm{NDNA0} = \mathrm{NDNA} + \mathrm{NDNARC} \qquad (2)$$

*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

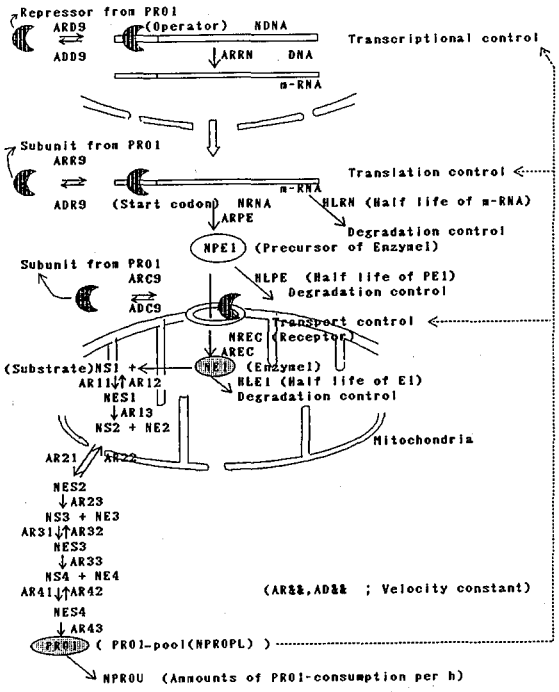


Fig. 1. A tentative model of the regulation for a biosynthesis cycle.

ここでARD9, ADD9は反応速度定数を示す(AR, ADは速度定数を示す接頭語とする.). NRECが結合したNDNARCはRNA合成能力はなく，残りのNDNAは合成能力がありその全体量(NDNA0)は変化しないものとした．その他の調節反応も同様にして負の調節をするものとした．またDNAからmRNAを合成する速度定数をARRNとし，mRNAとE1は一定の半減期(HLRN：HLは半減期を示す接頭語とする.)で常に減少し，分解調節をしているとした．E1はミトコンドリア内に輸送され初めて活性を発現し，この時の輸送調節は3つの調節の内，主な調節方法とした．E1は基質(S1)と反応式(3)により反応して生成物(S2)を合成し，以下同様にして酵素反応が進行しPRO1を生成するものとした．

$$\mathrm{NE1+NS1} \underset{\mathrm{AR12}}{\overset{\mathrm{AR11}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{NES1} \xrightarrow{\mathrm{AR13}} \mathrm{NE1+NS2} \qquad (3)$$

ここで最初の基質は常に一定量(NS1)存在するとした．またその他の酵素については，E2は酵素活性が最も高く，E3は活性がE1の次に弱いとし，E4はE2の次に活性が高いとした．E2～E4の酵素量は反応中変わらないものとした．以上の条件を満足させる係数値を設定し，Table 1に示した．

2．シミュレーション方法

例えば一次反応において反応速度定数をkとすれば基質濃度aにおける反応速度vは

$$v = k * a$$

xを生成物量とすれば

$$v = \lim_{\Delta t \to 0} \frac{\Delta x}{\Delta t}$$

$$\therefore \lim_{\Delta t \to 0} \frac{\Delta x}{\Delta t} = k * a$$

ここでΔtをシミュレーションの実行においては反応時間の$1/(5*10^5)$以下と小さくとり

$$\frac{\Delta x}{\Delta t} \fallingdotseq k * a$$

$$\therefore \Delta x \fallingdotseq k * a * \Delta t$$

として反応を進めた．

Δtを小さくとると精度は上がるが長いシミュレーション時間を要する．最適のΔtを求めるにはΔtを順に小さくしていき，結果が変わらなければその値が最適である．またΔtが小さい場合は有効数字16桁の倍精度実数型変数を使う必要がある．

結果及び考察

1．正常状態における代謝

Table 1に示した反応条件を正常状態とし，シミュレーションした結果をFig. 2に示した．正常状態においてはPRO1あるいはNDNA, NS2などの初期濃度がどのような値であっても原則的にはFig. 2の濃度に収束し安定することを示している．例えばPRO1は40nmol/hで消費されるが常に一定の値122nMに安定しており，またNRNA濃度も1.58nMに安定していることを示している．図には見やすくするため，反応成分中の主なものを示した．

このような代謝系に出血又は薬物投与により，PRO1の消費が一時的に高まった場合の変化をFig. 3．に示した．PRO1が50時間目にPRO1がトータルで40nmol余分に消費されたとすると，調節機構により自動的に3時間後に元の安定状態に戻ることを示している．例えば輸送調節においては，ミトコンドリアに結合するサブユニット量がPRO1の消費により減少し，それに伴いNRECに結合しているサブユニット量が減少しNRECが増加することが観察される．NRECの増加によりミトコンドリアへのNPE1の流入量が高まりNPE1が減少し，逆にNE1が増加し，したがってNES1が増加していることが観察される．このようにして順次NS2, NES2,

Table 1. Kinetic prameter values in the model.

Parameter	Value		Parameter	Value	
NDNAØ	1.000	nmol	NE10	regulated	
ARD9	0.002	h^{-1}	NE20	2.00	nmol
ADD9	0.040	h^{-1}	NE30	1.00	nmol
ARRN	3.000	h^{-1}	NE40	1.00	nmol
ARR9	0.010	h^{-1}	AR11	8.00	h^{-1}
ADR9	0.050	h^{-1}	AR12	8.00	h^{-1}
HLRN	1.000	h	AR13	40.00	h^{-1}
ARPE	1.500	h^{-1}	AR21	100.00	h^{-1}
HLPE	2.000	h	AR22	100.00	h^{-1}
NRECØ	1.000	nmol	AR23	500.00	h^{-1}
ARC9	0.100	h^{-1}	AR31	20.00	h^{-1}
ADC9	0.900	h^{-1}	AR32	20.00	h^{-1}
AREC	2.500	h^{-1}	AR33	100.00	h^{-1}
HLE1	0.500	h	AR41	100.00	h^{-1}
NPROU	40.000	nmol/h	AR42	100.00	h^{-1}
NS1	40.000	nmol	AR43	500.00	h^{-1}

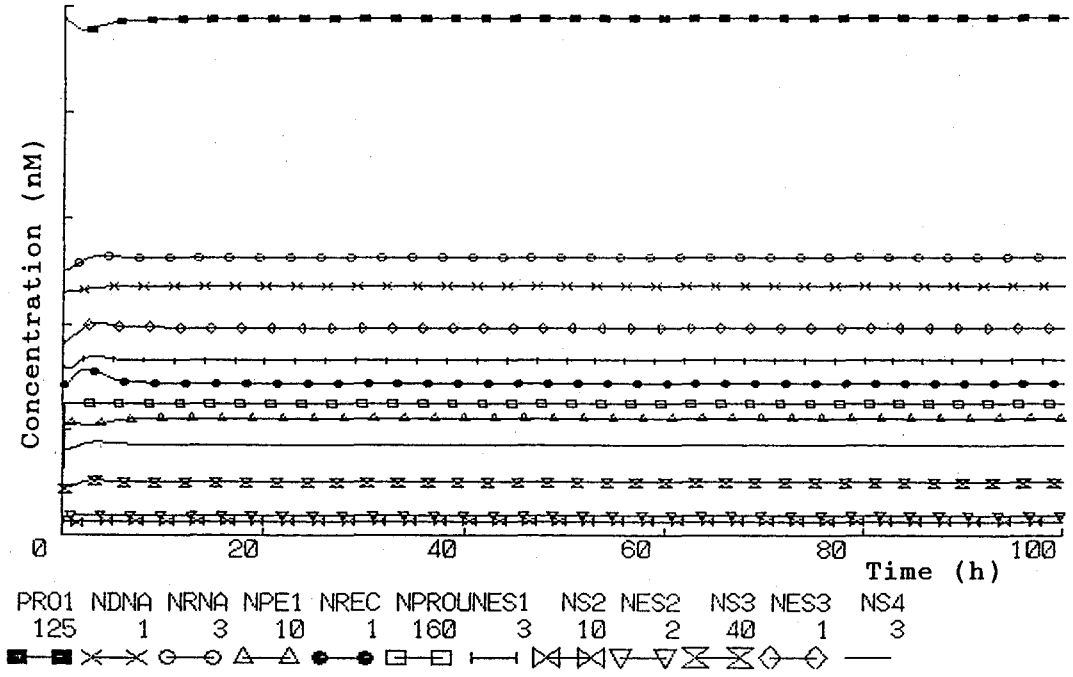


Fig. 2. Various metabolite concentration-time cources in the normal conditions. Symbols are the same as those in Fig. 1. Numebers (125, 1, 3 ···), respectively, are the concentrations at the full scales of the metabolites (PRO1, NDNA, NRNA···).

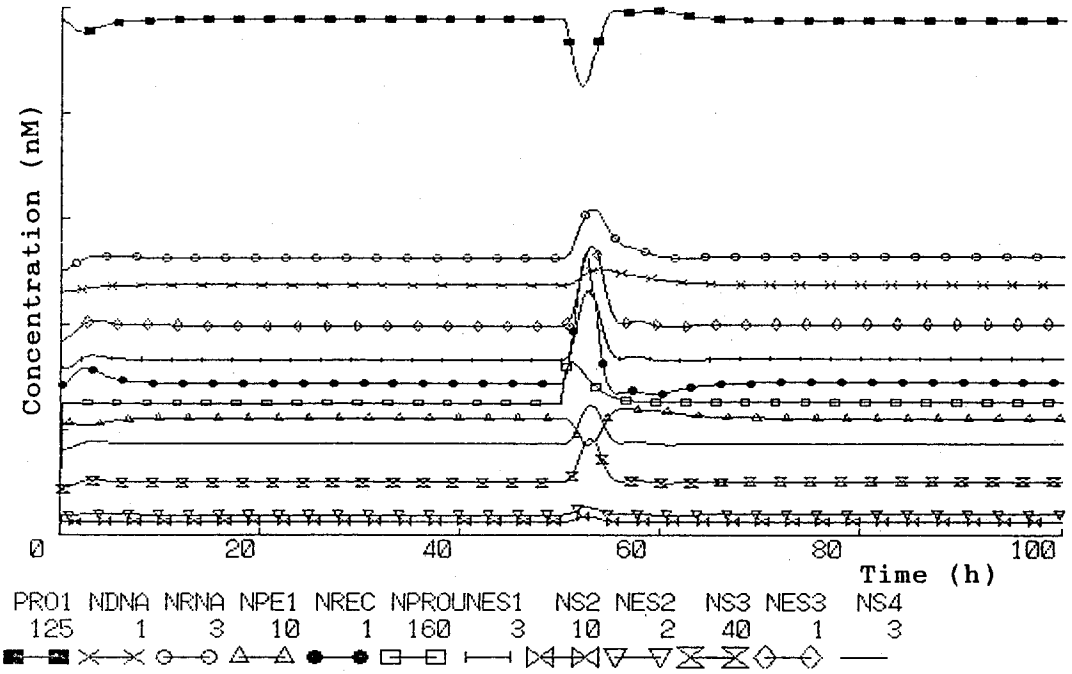


Fig. 3. Various metabolite concentration-time cources following an temporary increasing in the consumption of PRO1 in the normal conditions. The consumption (NPROU) was increased 40 nmol from 50 h to 58 h.

NS3…PRO1が増加し，PRO1を調節している．このシミュレーションにおいて数値を人為的に変化させたのはPRO1の消費量(NPROU)の値のみで他の値PRO1，NDANAなどは故意に変化させているわけではない．

このような正常な人が病気などにより連続的にPRO1の消費量が高まった場合の各成分変化をFig. 4．に示した．50時間目以降連続的にPRO1の消費量が正常時の50%増した(NPROU＝60nmol/h)とすると，約27時間後に安定状態に達し，正常にもどることが観察された．安定後，最終目的生成物であるNPRO1は平常時より，わずかに減少し安定しているが，NDNAは0.47から0.59nMへNE1は0.99から1.49nMへ増加しており，その他の成分も代謝活性が高まり濃度が増加していることが観察された．

2．酵素E2が阻害を受けた場合の代謝

酵素E2が25時間目に阻害を受け，反応速度定数AR23が1/5に減少した場合の成分変化をFig. 5に示した．その他の条件はFig. 4と同一である．E2は律速酵素E1より相対活性が25倍も高いため，活性が1/5に減少してもPRO1の量は変化しなかった．また50時間以降NPROUの消費が高まっても正常時の場合と変わらず，27時間後にはPRO1は安定しており正常人と全く変わらない反応を示した．ただしAR23が阻害されているためにNS2が0.25nMから25時間以降は0.50nMの2倍に増加し，これに従いNES2は5倍に増加した．基質NS2が生体にとって有害ではないかぎり，酵素活性が1/5に阻害されても全く生体にとって影響がないことを示している．

3．酵素E3が阻害を受けた場合の代謝

酵素の相対活性が低いE3が25時間目に阻害を受け，反応速度定数AR33が100/hから70/hにわずか30%減少した場合の成分変化をFig. 6に示した．阻害によりNS3，NES3は1.4倍程度増加しているが，正常時とPRO1は変わらず，阻害を受けても正常人と全く変わらなかった．しかし，50時間以降，病気等によりNPROUの消費量が高まるとPRO1は正常人と比べなかなか安定せず，その他の成分の変動も大きく危険な状態であることを示している．このように相対活性が律速酵素(AR13＝40/h)に近い酵素は，わずかな阻害でも生体に強い影響を与えることが予想される．

4．酵素E3の阻害により基質S2が増加する場合の代謝

E3が阻害を受け，基質S3が増加すると，当然，前段

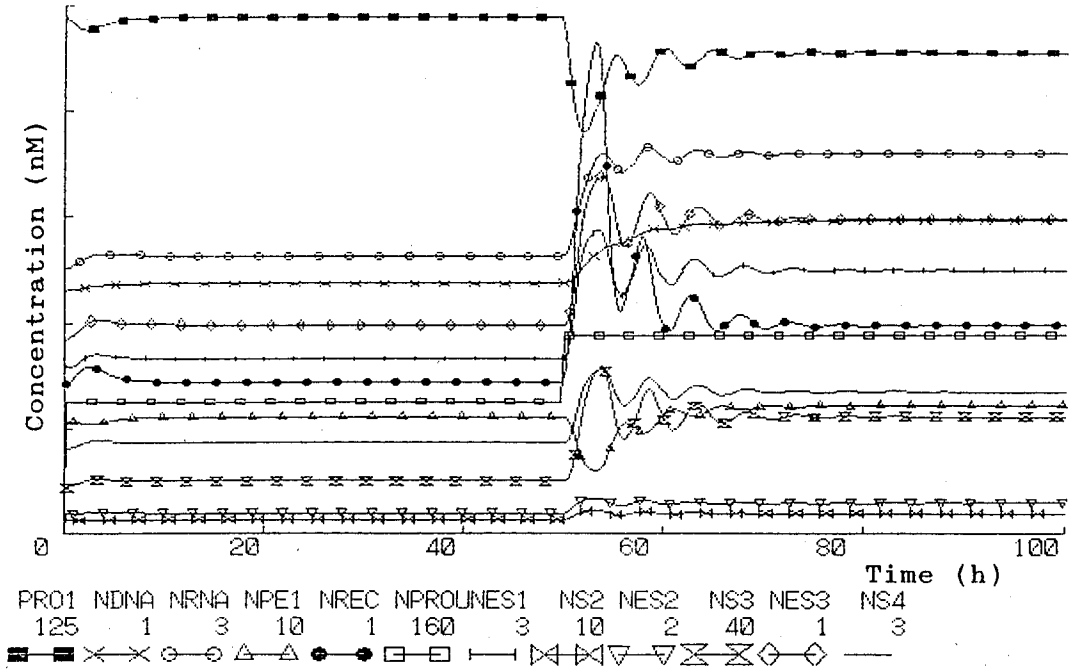


Fig. 4. Various metabolite concentration-time coures followlng an increasing in the consumption of PRO1 in the normal conditions. NPROU was increased from 40 nmol/h to 60 nmol/h after 50h.

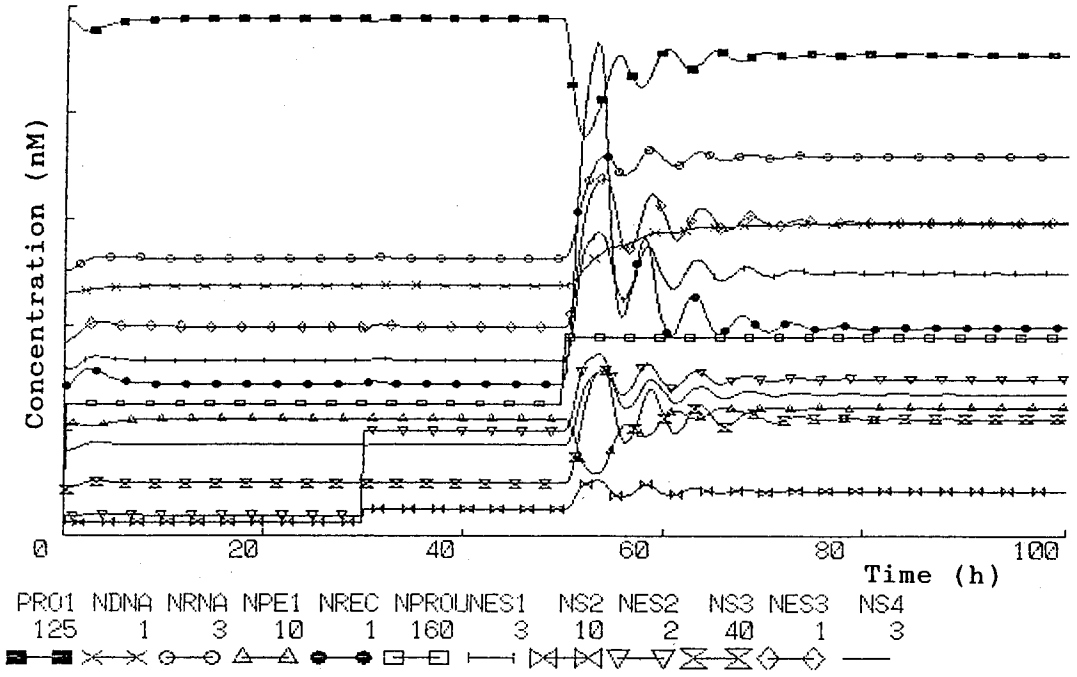


Fig. 5. Various metabolite concentration-time cources following an increasing in the consumption of PRO1 in the inhibition of the enzyme (E2). E2 was 80% inhibited after 25h. NPROU was increased from 40 nmol/h to 60 nmol/h after 50h.

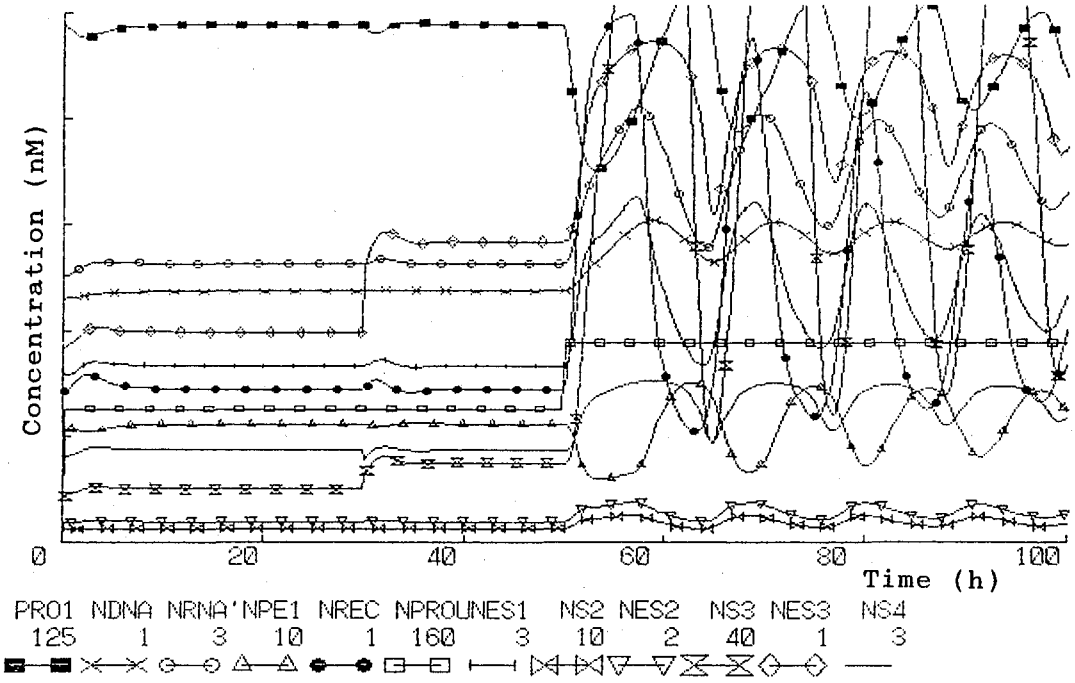


Fig. 6. Various metabolite concentration-time cources follwing an increasing in the consumption of PRO1 in the inhibition of the enzyme (E3). E3 was 30% inhibited after 25h. NPROU was increased from 40 nmol/h to 60 nmol/h after 50h.

階反応の基質S2も増加すると思われるが，Fig. 6に示したようにS2の量は全く変化していない．50時間以降で代謝活性が高まるためNS2が増加しているがその量は多くない．しかしE3の阻害によりS3ばかりでなく，S2も増加することが生体では観察される．そこでこのような結果を解釈するために通常の(4)の反応ではなく(5)の反応により代謝が連行すると仮定した(ここではNES2をNE2S2として示した．またAR43＝AR45＝500h^{-1}，AR46＝100h^{-1}とした)．

$$NE2+NS2 \rightleftharpoons NE2S2 \longrightarrow NE2+NS3 \qquad (4)$$

$$NE2+NS2 \overset{AR43}{\rightleftharpoons} NE2S2 \longrightarrow NE2S3 \underset{AR46}{\overset{AR45}{\rightleftharpoons}} NE2+NS3 \qquad (5)$$

すなわちNE2S3という中間体をへてS3が合成されるとした．この時の各成分の濃度変化をFig. 7に示した．平常時ではE3の阻害によりNS2が，わずか1.2倍増加したのみであるが，病気などによりNPRO1の消費量が高まるとNS2の値は平常時の最高で28倍にもなりE3の阻害によりNS3ばかりでなくNS2が増加することが観察された(Fig. 7ではNS2，NS3共に最大値はオーバーフローして示されている．)

ま と め

酵素が阻害され活性が数分の1に低下し，ある中間代謝物が検査の結果増加したからといって以上の結果が示すように生体に直接影響を与えるわけではない．最終産物の消費が高まった場合にも正常人と変わらない反応を示す場合もある(Fig. 5)．しかし酵素によっては，わずかな阻害でも生体に影響することがある．このような阻害を受けた人はその時点では一部の基質がわずかに増加するのみで正常人と全く変わらず最終産物も正常であるが，しかし病気，思春期あるいは薬物投与により代謝活性が高まった場合には，酵素阻害による疾病が誘発され危機的状態になることが予想される(Fig. 6)．酵素阻害が強いときには当然その時点で代謝系が乱れ影響が出るわけであるが，これらの結果は阻害を受けた時点では全く症状を呈さないが何等かのきっかけで症状が現れる場合もあることを示している．

酵素が阻害されるとそれに対応する基質が体内に蓄積してくるが，シミュレーションによればその酵素の前段階の反応基質が増加するわけではない．しかし生体では，

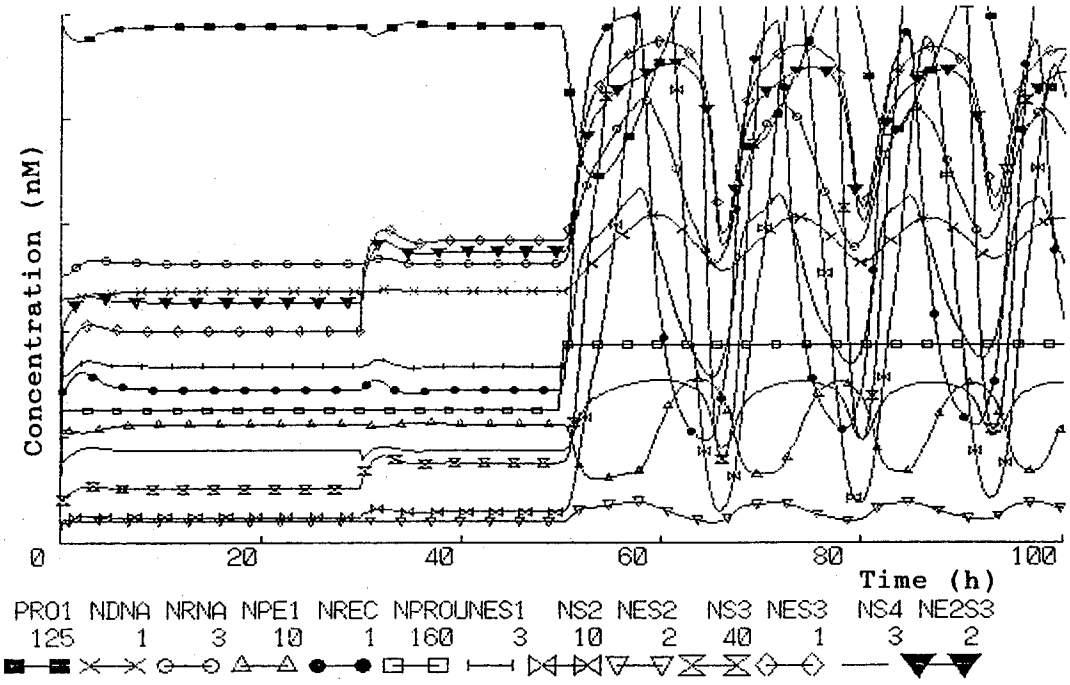


Fig. 7. Various metabolite concentration-time cources in the case of the inhibition of the enzyme (E3) affecting the concentration of the substrate (NS2). Other conditions are the same as in Fig. 6. A tentative reaction equation: $E2+S2 \rightleftharpoons E2S2 \longrightarrow E2S3 \rightleftharpoons E2+S3$

前段階の反応基質が増加することも観察される．このような結果を得るためには何等かの別の反応機構が予測されなければならない(式(5), Fig. 7).

以上の結果は直観である程度予測できるが，代謝物の変化を定量的に把握することはできない．シミュレーションにより定量的に把握するには，生体内の反応をより忠実に再現する必要がある．今回示した代謝制御系は，制御機構の基本を含んでいるが実際の生体系とは異なっている．例えばミトコンドリアと細胞質の容積比を考慮していない．また，臓器1g中の代謝サイクルを想定し，濃度(nM)と絶対量(nmol)を一致させている．このような点を考慮しても生体の全てを再現できるわけではない．しかし生体内の色々な反応の中で調節機構にとって何が最も影響しているかを把握し，シミュレーションの中へ組入れていくことにより目的とする結果を再現することはできる．今後，これらの点を考慮しつつ生体における実際の代謝系を構築して，毒物により阻害を受けたとき，あるいは遺伝病等により酵素活性が低い場合の発症予測等を定量的に行っていく予定である．

文　献

1) Mcintyre L.M., Thorburn D.R., Bubb W.A. and Kuchel P.W.: *Eur. J. Biochem.*, 180, 399-420, 1989.

2) Pettersson G. and Ryde-Pettersson U. : *Eur.J. Biochem.*, 175, 661-672, 1989.

3) Achs M.J. and Garfinkel D.: *Am. J. Physiol.*, 255, E189-E200, 1988.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 331-336, 1989

幼若ラットのCPC (Coil Planet Centrifuge) 高張部瞬時溶血についての検討

市 川 久 次*, 小 林 博 義*

Studies on the Hemolysis in the High Osmotic Part of CPC (Coil Planet Centrifuge) in Infant Male Rats

HISATSUGU ICHIKAWA* and HIROYOSHI KOBAYASHI*

The present study was designed to examine the mechanisms of the momentary hemolysis in the high osmotic part of CPC (Coil Planet Centrifuge) coil in infant male rats. The examinations were carried out from the aspects of effect of serum exchange and amount of of ATP in red blood cells. We used infant (at the 2nd week after birth) and adult (at the 12th week after birth) male rats for comparison.

And the following results were obtained. No effect of serum exchange on the hemolysis was shown. Amount of ATP in the hemolysate of the high (280-250mOsM) osmotic part of CPC coil was 8 times higher than in the low (250-30mOsM) one. It was suggested that the cause of the hemolysis was not in serum but in red blood cell itself including amount of ATP.

Keywords：幼若ラット infant rat, コイルプラネット遠心CPC (Coil Planet Centrifuge), 溶血 Hemolysis, アデノシン三リン酸ATP

著者ら[1-3]は，これまで従来とは異なる浸透圧勾配溶血という原理に基づく，新しく考案されたCoil Planet Centrifuge(CPCと略)法を用いた赤血球膜浸透圧抵抗測定法の毒性試験研究への応用を目的として，マウス，ラットを用いて基礎的検討を行ってきた．その過程において，とくにラットの幼若期においてのみ出現する高張部瞬時溶血を見いだした．今回その溶血の作用機構解明の一端として血清交換による変化，赤血球中のATP含量の検討を行ったところ若干の知見を得たので報告する．

実験方法

1．使用動物

静岡県実験動物農場生産のF344系ラット(妊娠8日目)を購入飼育し，出産させた後，生後4週までは，親と共に透明プラスチックケージにカンナクズを入れて，生後4週以後はステンレス製金網ケージにて飼育した．幼若ラットとして生後2週，成熟ラットとして生後12週のものを実験に供した．

2．採血方法ならびに赤血球サンプルの調製法

幼若ラット(生後2週)からの採血は断頭により頸部動静脈より放出される血液を，成熟ラット(生後12週)からの採血は，無麻酔下背位に固定し，大腿部を剪毛後切開し，伏在静脈を露出させ，静脈用注射針1／4にて穿刺し，噴出する血液をヘパリン処理したヘマトクリット測定用ガラスキャピラリー(以下ヘマトクリット管と略-Propper社製)を用いて，管の3／4程採血し，直ちに固化を防ぐために20回程転倒し，ヘマトクリット管の一端を専用のパテで封じ氷冷下に保存し，採血終了後遠心分離(900rpm, 5 min)し，固化した血液，フィブリン，白血球，血小板の集合部分であるバフィーコート部分より2-3㎜下の位置で切断し，残余の固化しない赤血球部分(血泥)を赤血球サンプルとして実験に供した．

3．連続濃度勾配食塩液の作製法

CPCコイル中への連続濃度勾配をもつ食塩溶液の充塡は，CPCコイル充塡器(三鬼エンヂニアリング製)にて高張液に373(1.2%), 280(0.9%), 170(0.55%) mOsMNaCl溶液，低張液に30(0.096%)mOsMNaCl滴液を用いて，市川ら[1]の方法に従って行い，使用時まで密封して冷蔵庫内に保存した．

*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

4．CPC コイルへの赤血球サンプルの注入法ならびに CPC による溶血検査

前記ヘマトクリット管を用いて，調製した血液サンプル(血泥)を使用し，市川ら[1]の方法に従って行った．

5．血清交換反応の方法

幼若ラット(生後2週)および成熟ラットの断頭により採血分離した血清を用いて行った．血清60 μl を試験管にとり赤血球サンプル(血泥)60 μl を加え，37℃，30分加温した．反応終了後直ちに，赤血球サンプルを調製し，CPC による溶血検査を行った．

6．CPC による溶血物中の ATP 含量の測定

生物発光(バイオルミネッセンス)に基づく測定法を用いて，市川ら[4]の方法に従って測定し，ATP 量を求めた．

7．ヘモグロビン量の測定

試料(溶血物)10 μl を取りシアノメトヘモグロビン呈色液(日本商事製)2.5ml を加え，室温にて5分放置後，分光光度計(Cary 17)を用いて420nm における吸光度を測定し，別に作製した検量線よりヘモグロビン量を求めた．

実験結果

1．血清交換の高張部瞬時溶血に対する影響

幼若(生後2週目)および成熟(生後12週目)ラットより採取調製した赤血球サンプルと血清とを交互に反応させ，CPC 高張部瞬時溶血に対する血清交換の影響を検討した．その結果 Fig. 1 に示したごとく，CPC 高張部末端の浸透圧が373mOsM(1.2% NaCl)，280mOsM(0.93% NaCl)，170mOsM(0.56%NaCl)のいづれの場合においても，血清交換前後において変化は殆どみとめられなかった．これらのことは幼若ラットにおいてのみ出現する CPC 高張部瞬時溶血を起こす原因が，血清側ではなく赤血球側に存在することを推察させた．

2．CPC 高張部瞬時溶血を起こした赤血球の ATP 含量について

幼若ラットにおいてのみ出現する CPC 高張部瞬時溶血の原因は，前述した血清交換による検討結果より赤血球側にあることが推察されたので，CPC 高張部(280-250mOsM)溶血物と低張部(250-30mOsM)溶血物に分け，各部分の赤血球中の ATP 含量を測定し比較検討した．その結果，Table 1 に示したごとく，高張部で溶血を起こした赤血球中の ATP 含量(0.34mg／gHb)と低張部で溶血を起した赤血球中の ATP 含量(2.76mg／gHb)には8倍以上の差があり，本溶血の原因の一つとして，赤血球中の ATP 含量低下による脆弱性の増加が推察された．

Table 1. Amounts of ATP in the Hemolysate of High (280−250mOsM) and Low (250−30mOsM) Part of CPC Coil in Male Rats at 2 Weekth After Birth

	ATP (mg／gHb)
Whole blood	3.76±0.251[b] (6)[c]
280−250 mOsM	0.34±0.057* (6)
250−30 mOsM	2.76±0.447 (6)
Hemolytic Rate[a]	20.9±1.30 (16)

a) (280-250 mOsM)／(280−30 mOsM) ×100 (%)
b) mean±SE
c) No. of experiments
*Significantly different from 250-30 mOsM at P<0.01

考　察

著者らは[1-3]，これまで CPC 法による動的赤血球膜浸透圧抵抗性の測定について，毒性試験研究への応用，導入を目的として，小動物(マウス，ラット)を用いて基礎的検討を重ねてきた．その過程において，幼若ラットにおいてのみ出現する CPC 高張部瞬時溶血を見いだした．そこで，本溶血の機構を解明する目的で，まず，その原因が血清側にあるか，赤血球側にあるのかを明らかにするために，本溶血を起こす幼若ラット(生後2週)の赤血球と成熟ラット(生後12週)の血清，成熟ラットの赤血球と幼若ラットの血清を反応させ，血清交換の影響を検討したところ，Fig. 1 に示したごとく，血清交換前後において殆ど変化はみとめられなかった．このことより血清交換による効果はなく，本溶血の原因は血清側にはないことが明らかとなった．なお，本実験で用いた高張液の1.2%NaCl 液は，生理的等張(0.9%NaCl 液)より，かなり高浸透圧であるが，ヒトの遺伝性球状赤血球症(浸透圧抵抗が非常に弱い)の検査において(0.9%NaCl 液では溶血が起きてしまうことがあるので1.2%NaCl 液における溶血を0%溶血とすることになっている)使用される濃度である[5]．

一方，赤血球膜浸透圧脆弱性と関連性の深いものとして，赤血球中の ATP 含量が報告されている[7]．そこで，本溶血(高張部瞬時溶血)の機構の解明の一つとして，高張部瞬時溶血を起こす赤血球と低張部で溶血を起こす赤血球中の ATP 含量を検討したところ，Table 1 に示したごとく両者の間には ATP 含量において8倍以上の差があることが明らかとなった．Weed と Laulle[8]によれば ATP レベルが30%以上減少すると膜の可変形性が減少すると述べている．結果としてであるが，本溶血の一

因はATPの減少による赤血球膜機能の低下であると推察された．今後本溶血の作用機構について，ATP含量減少による赤血球膜の変化の他，CPCコイルの内壁と赤血球膜との反応の面よりも注目し検討を加える予定である．

結　論

幼若ラットにおいてのみ生ずるCPC高張部瞬時溶血の機構解明の一環として，血清交換による影響，ATP含量の面より検討した結果次の結論を得た．

1．血清交換の影響は殆ど認められず，本溶血の原因は血清側ではなく，赤血球膜側にあることが推察された．

2．高張部(280-250mOsM)瞬時溶血を起こす赤血球と低張部(250-30mOsM)で溶血を起こす赤血球中のATP含量に8倍以上の差があり，ATP含量の低下は本溶血の一因であると推察された．

文　献

1）市川久次，小林博義，中尾順子：東京衛研年報，26-2，203，1975.

2）市川久次，小林博義，中尾順子：東京衛研年報，27-2，53，1976.

3）市川久次，小林博義，中尾順子：東京衛研年報，28-2，230，1977.

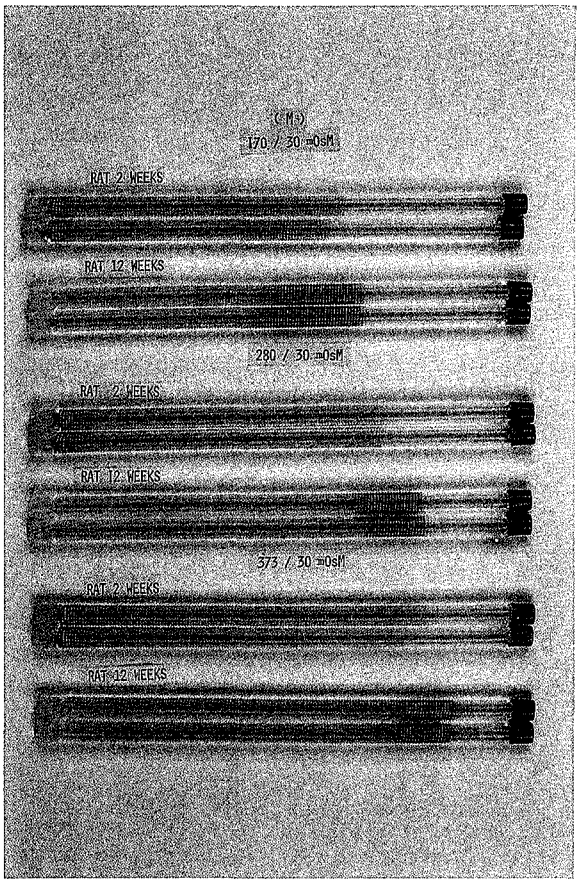
4）市川久次，小林博義，中尾順子：東京衛研年報，32-2，107，1981.

5）金井　泉，金井正光：臨床検査法提要，第29版，p 298，金原出版，東京.

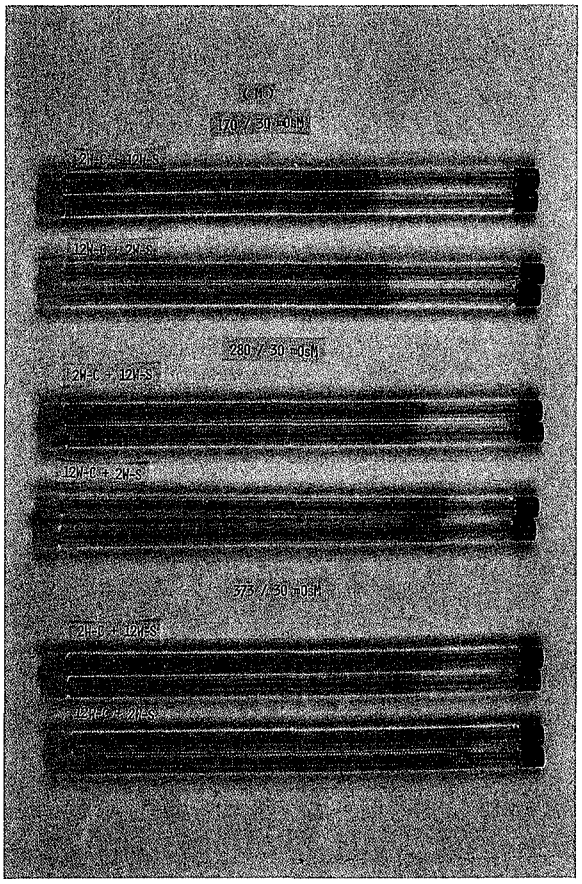
6）Cohen, N.S., Ekkolm, J.E., Luther, M.G and Hanahan, D.J.：*Biochem. Biophys. Acta*, 419, 229, 1976.

7）荻田幸雄，大西賢哲，石河　修，志村研太郎，安藤哲史，須川　佶，日本産科婦人科学会誌，30(10)，1308，1978.

8）Weed, R.I. and Lacelle, P.L.：In Red Cell Membrane Structure and Function (ed. G.A. Jamieson & T.J. Greenwalt), p 318, Lippincott, Philadelphia, Pennsylvenia, 1969.



before exchange



after exchange

Fig. 1. Effect of Serum Exchange on the Momentary Hemolysis in High Osmotic Part of CPC in Infant (at the 2nd week After Birth) and Adult (at the 12th week After Birth) Male Rats.
C : Red blood cells, S : Serum

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 337-340, 1989

ジブチルヒドロキシトルエンのマウス次世代に及ぼす影響

田中豊人*, 大石眞之*, 高橋　省*, 市川久次*

Effects of Butylated Hydroxytoluene on F_1 Generation Mice

TOYOHITO TANAKA*, SHINSHI OHISHI*, OSAMU TAKAHASHI*
and HISATSUGU ICHIKAWA*

Butylated hydroxytoluene (BHT) was given in the diet to F_0 generation mice from 5 weeks of age to weaning of the F_1 generation (growth period to age 7 week, gestation period, and lactation period) and subsequence to F_1 animals until 21 days of age.

Body weight of F_0 animals was recorded, and the influence on the F_1 generation was examined. Litter size, pup weight and litter weight in F_1 generation were recorded.

A significant adverse effect on body weight in both F_0 and F_1 animals was shown in the applied dose of BHT.

Dosage-dependent differences in the evaluated parameters were found in the offspring of the BHT exposed adults when compared to the offspring of control.

Significant differences in litter size, pup weight and litter weight were particularly evident.

Keywords：ジブチルヒドロキシトルエン butylated hydroxytoluene, 産仔数 litter size, 仔体重 pup weight, 一腹仔の重さ litter weight, マウス mouse

緒　言

ジブチルヒドロキシトルエン(以下 BHT と略す)は酸化防止剤として，マーガリン，ショートニングなどの食品及び食品容器などに添加されている[1].

現在，WHO(世界保健機関)は，ラットの BHT の最大無作用量25mg／kg／day に基づき，ヒトの一日許容摂取量を 0 ～0.25mg／kg と定めている.

日本での BHT の使用量は，食品添加物使用基準によると，生食用を除く魚介冷凍品，鯨冷凍品の浸漬液に対して 1 g／kg 以下，油脂，バター，魚介乾製品，魚介塩蔵品，乾燥裏ごしいもに0.2g／kg 以下，チューイングガムに0.75g／kg 以下と定められている[2].

著者らは今回，BHT の後世代への影響を調査することを目的として，マウスを用いて，BHT の高濃度投与による次世代への影響について，主に出生時のパラメーターについて測定した.

材料と方法

マウスは，日本チャールズ・リバー㈱ Crj：CD- 1 (ICR)の SPF を 4 週齢で購入し，1 週間の予備飼育の後に，一般状態の良好なマウスを実験に供した. BHT は東京化成工業製のものを用い，実験飼料は，粉末飼料 CE- 2 (日本クレア製)に BHT を乳鉢ですりつぶして混合し，加湿成型した後，乾燥させて使用した.

実験群は，BHT 0.875%，1.75%，2.5%及び対照群の 4 群で，各群は雌雄各10匹で構成され，雌雄各40匹合計80匹を実験に供した.

マウスは，プラスチックケージで 1 匹ずつ飼育し，ケージ及び給水瓶の交換，そして体重及び摂餌量の測定を週 1 回行った.

5 週齢から実験飼料の投与を開始し，7 週齢から 9 週齢までの 2 週間，雌雄各 1 匹ずつを同居交配させ，9 週齢時に雄と雌を分離し，雄を処分解剖した. F_1動物の測定項目は，出生時の産仔数，仔体重，一腹仔の重さ，

*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

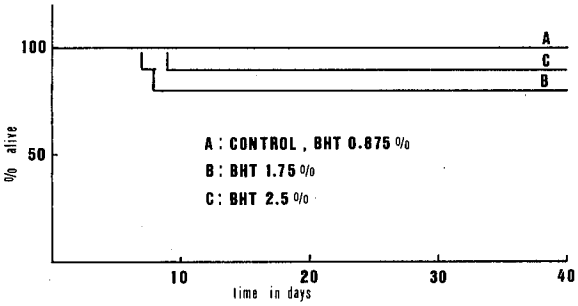


Fig. 1. Survival Curve of Female Mice of F_0 Generation administerted BHT.

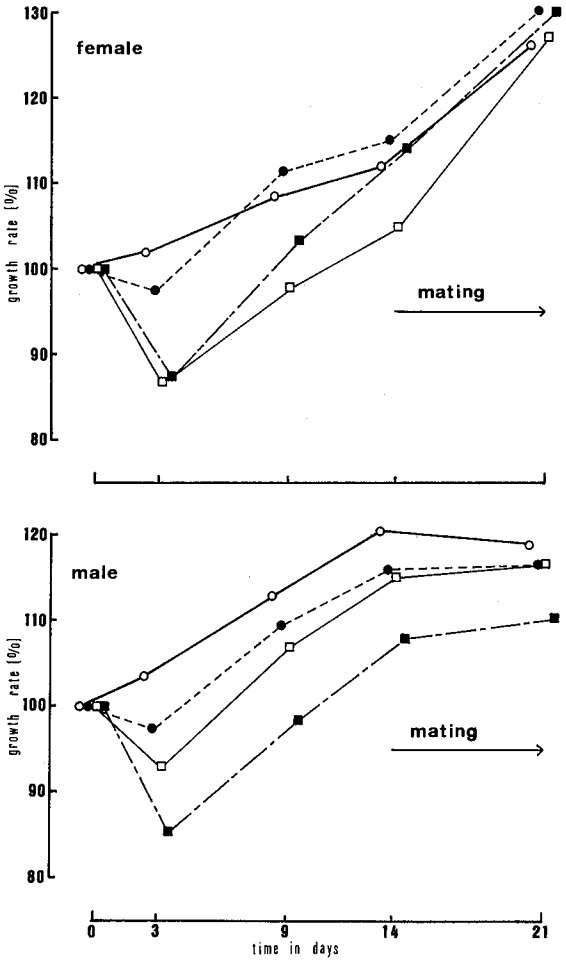


Fig. 2. Growth Curve of F_0 Generation Mice administerted BHT.
(○——○) : Control,
(●……●) : 0.875% BHT,
(□——□) : 1.75% BHT,
(■—·—■) : 2.5% BHT.

3週齢時の性比及び3週齢生存率であった．産仔数は生存仔数のみを測定し，仔体重は1匹ずつ測定した．3週齢生存率は次の式により算出した．3週齢生存率＝(3週齢生存数／産仔数)×100.

結　　果

実験期間中の死亡例は，BHT 1.75%投与群2匹，2.5%投与群1匹の計3匹であり，いずれも雌であった．BHTの投与開始から出産までの，F_0動物の雌の生存曲線をFig. 1に示した．

BHTの投与開始から同居交配1週間目までの，F_0動物の体重増加率をFig. 2に示した．投与開始直後の体重の減少は，摂餌量の減少(投与群は雌雄とも対照群に較べて15～35%減少)を伴っていることから，新奇刺激である実験飼料に対する拒否反応によるものと思われる．

妊娠出産した雌は，対照群＝10／10，BHT 0.875%＝10／10，同1.75%＝8／8，同2.5%＝8／9であった．F_1動物の出生時の産仔数，仔体重，一腹仔の重さをTable 1及びFig. 3～5に示した．Fig. 3～5に示した一次回帰直線の相関係数は，BHT投与量と産仔数については$P<0.05$，仔体重及び一腹仔の重さについては$P<0.01$で有意であった．

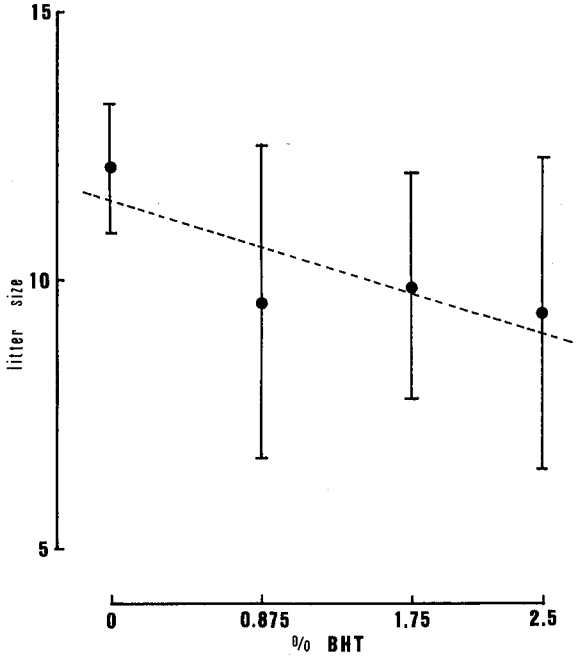


Fig. 3. Litter Size of F_1 Generation Mice administerted BHT.
$n=36$, $r=-0.368$, $y=11.47-0.98x$.

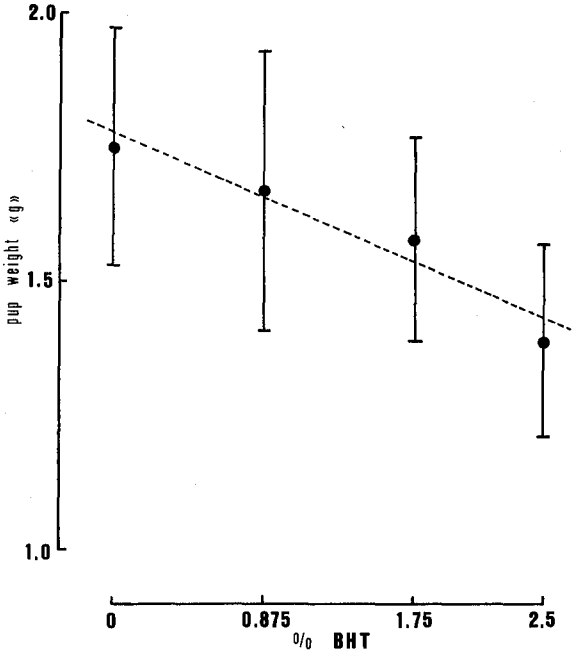


Fig. 4. Pup Weight of F_1 Generation Mice administerted BHT.
n =371, r =−0.494, y =1.766−0.132 x.

3週齢時における各群の性比(雄／雌)は，対照群＝0.97(58／60)，BHT 0.875％＝0.68(36／53)，同1.75％＝0.77(33／43)，同2.5％＝1.21(35／29)であった．また，3週齢生存率は対照群＝97.5％(118／121)，BHT 0.875％＝92.7％(89／96)，同1.75％＝96.2％(76／79)，同2.5％＝85.3％(64／75)であった．

3週齢時におけるF_1動物の外表の異常は，曲尾が対照群で雌雄各1匹，BHT 0.875％で雌1匹，同2.5％で雄1匹の計4匹に観察された．また発達の遅延は，耳介未開展の個体がBHT 1.75％で雌1匹，同2.5％で雌雄各3匹の計7匹に，眼瞼未開裂の個体がBHT 2.5％で雄1匹の計1匹に見られた．これらの発達の遅延は，その後正常な状態に達した．

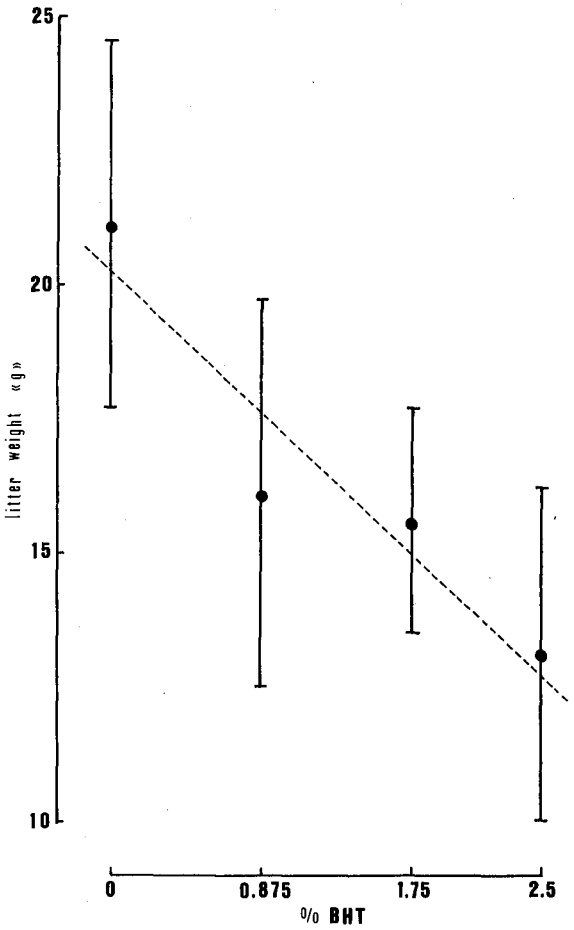


Fig. 5. Litter Weight of F_1 Generation Mice administerted BHT.
n =36, r =−0.665, y =20.24−2.98 x.

考　　察

Table 1及びFig. 3～5に見られるように，産仔数，仔体重及び一腹仔の重さの3つのパラメーターは，それぞれ対照群に対してBHTの各投与群に有意差が認めら

Table 1. Summary of Data of Litters in a F_1 Generation Study of BHT administerted to Mice.

Dose Level (%)	Litter size n	Litter size mean±SD	Pup weight(g) n	Pup weight(g) mean±SD	Litter weight(g) n	Litter weight(g) mean±SD
0	10	12.1±1.20	121	1.75±0.218	10	21.12±3.350
0.875	10	9.6±2.91*	96	1.67±0.263*	10	16.06±3.577**
1.75	8	9.9±2.10*	79	1.58±0.192***	8	15.61±2.117***
2.5	8	9.4±2.88*	75	1.39±0.175***	8	13.06±3.121***

Significantly Different from Controls : * P<0.05 ; ** P<0.01 ; *** P<0.001

れ，かつそれぞれが有意な負の相関を示した．このように，BHT の投与量と 3 つのパラメーターの間に，それぞれ用量依存関係が成立するので，BHT 投与群に見られる産仔数，仔体重及び一腹仔の重さの減少は，BHT の影響によるものであることが示唆される．

今回の実験では，高濃度投与群のみを扱っているので BHT の，マウスの繁殖性に対する最大無作用量を推定することはできなかった．しかしながら，今後化学物質の後世代影響試験を行うにあたって，必要な検査項目のいくつかが示唆された．すなわち，形態分化(眼瞼開裂，耳介開展，毛生の時期など)，初期行動発達(正向反射，背地走性，嗅覚性指向反応など)及び自発行動量などが，今後の実験では検査項目として付け加わるであろう[3-6]．また，BHT の次世代への影響に対する最大無作用量の推定のために，低濃度投与による影響について，今後検討する予定である．

文　献

1）食品添加物公定書注解編集委員会：第三版食品添加物公定書注解，386-389，1974，金原出版，東京．

2）厚生省：第五版食品添加物公定書，506-507，1986．

3）Fox, W.M.：*Anim. Behav.*，13，234-241，1965．

4）Meyer, O. and Hansen, E.：*Toxicology*，16，247-258，1980．

5）北谷照雄，赤池雅司，高山和雄，小林孝好：*J. Toxicol. Sci.*，13，Suppl.I，191-214，1988．

6）Pantaleoni, G., Fanini, D., Sponta, A.M., Palumbo, G., Giorgi, R. and Adams, P.M.：*Fundamental and Applied Toxicology*，11，440-449，1988．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 341-348, 1989

微細構造観察のためのフリーズフラクチャー法の検討

福森信隆*, 多田幸恵*, 安藤　弘*, 中野雅行*

Examination on Ultrastructure of Rat Liver by the Freeze-Fracture Method

NOBUTAKA FUKUMORI*, YUKIE TADA*, HIROSHI ANDOU* and MASAYUKI NAKANO*

Keywords：急速凍結 rapid freezing, ディープエッチング deep etching, ラット肝 rat liver, 微細構造 ultrastructure

緒　言

細胞の微細構造を観察するためには，電子顕微鏡(電顕と略す)の貢献が大きい．目的に応じて，細胞断面は透過電顕で，細胞表面は走査電顕を用いて，細胞構造を観察することが可能である．近年，細胞内で構造を支えている細胞骨格の変化を把握することが，細胞内小器官の変動と密に関与することから重要視されてきた．細胞骨格の構成要素は，微小管，マイクロフィラメント及び中間径フィラメントの線維成分であり，相互に関連して細胞内の支持を行っている[1]．これまで線維成分の立体的構築は，主に走査電顕で観察してきたが，解像度が悪く高倍率の像を得ることが困難であった．さらに，化学固定による人工的変化を少なくするために，極低温下で組織を凍結させる方法が開発され，多くの新しい細胞レベルでの変化を生存時に近い状態で把握することが可能となった[2,3]．それは，凍結した試料にフリーズフラクチャーを施し，レプリカ膜を作成して，高分解能の透過電顕で観察する方法で，さらに水分，可溶性蛋白を除去したい場合には，エッチング操作を加えると鮮明に細胞構築が認められる．

しかし，この一連の操作を実施するに際して，いくつかの難関があり，良好な像を得るには諸般の検討が必要である．今回，ラット肝組織でフリーズフラクチャー法の標本作製について，フラクチャーの角度及び凍結防止剤の種類，エッチング時間の検討を行い，細胞骨格，細胞小器官の像が得られたので報告する．

実験方法

動物は，ラットを用いネンブタール麻酔下で開腹し，肝臓を門脈より生理食塩水で血液の灌流を行った後，2％パラホルムアルデヒド(0.1M燐酸緩衝液，pH 7.3)の灌流固定を実施した．試料は，脱血及び良く灌流された肝臓の一部を細切して，固定を短時間に留め，蒸溜水で速やかに固定液の洗浄を行った．その後，氷晶を防ぐため，凍結防止剤として①10％メタノール，②20％グリセリン，③10％メタノールに溶解した10％グリセリンの各液に約5分間の浸漬を行った後，凍結操作を実施した．急速凍結とフリーズフラクチャーは，大野らが行っている方法を採用した[4]．凍結には，液体窒素中でイソペンタン・プロパン混合液を用い，充分に凍結液を除去した後，液体窒素に浸した状態でメス刃によるフラクチャーを行った．フラクチャー時のメスの操作は，組織面に対して高あるいは低角度で行い，フラクチャー面の広さを比較した．

フラクチャーした組織は，フリーズフラクチャー装置(エイコー・エンジニアリング，FD-5A型)の－185℃の高真空(2-8×10^{-7}Torr)中に入れ，昇温してディープエッチングを約－95℃の条件で行った．エッチング時間は，30分あるいは60分行って比較した．終了後，一定の厚さで白金と炭素の回転蒸着を施してレプリカ膜を作成し，漂白剤で組織を溶かした後，透過電顕(日立，HU-12A型)の加速電圧75kv で観察した．

結果と考察

本法で生に近い状態の生体組織を観察する際に妨害と

*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

なることは，氷晶の出現である．氷晶は，組織内の水分が凍結するときに形成され，同時にこの部の微細生体成分をも押し広げるために組織構築の破壊を伴う．そのため，極低温下で，氷晶の形成が起こる前に，いわゆる硝子様凍結が完全に行われることが望ましい[1]．組織表面からの良好な凍結は，一般に液体窒素でフラクチャー深度5 μm，凍結温度のさらに低い液体ヘリウムで20 μm前後といわれている．従って，フラクチャーの深度が氷晶を避けるための重要な要件となる．

図1と図2は，10%メタノール浸漬，30分のエッチング操作を行った後，レプリカ膜を検鏡すると，全く組織面が認められず砂漠の様な状態を示した例である．この一面に広がった模様の出現の理由は明らかでないが，組織がみられないことから，エッチング後に表層面で再凍結が行われたため，人工的な被膜が形成されたと考えられる．図2の円形状構造は，ミトコンドリアと思われるが，他の細胞小器官の存在が確認できないため不確実である．これらの2図は，蒸着に長時間を要したなどの試料作製過程で実際に出現した人工産物の形成像である．

図3は，図1，2と同様の10%メタノール浸漬，30分のエッチングを行った肝細胞で，比較的に細胞小器官の識別が可能と思われる．粗面小胞体の層板状構造やそれらを一定の間隔で配列している細胞骨格が認められる．また，ミトコンドリアや核，滑面小胞体の区別ができるが，微細な氷晶によりミトコンドリアのクリステなどの不明瞭となっている部位が多く存在する．

図4は，10%メタノール浸漬，60分のエッチング条件で，若干氷晶の大型部位を示した．細胞構築は，識別可能であるが，エッチングが過度のためかえって細胞内の構造の破壊が認められる．凍結保護剤として，メタノールを用いた場合，氷晶の出現が大きく，フラクチャーの深く入っていない組織表面からの浅い部位を捜すことが不可欠である．また，エッチングの効果が大きく現れるため60分の長いエッチング時間は，必要ないと考える．

図5は，20%グリセリン浸漬，30分のエッチングを行った像で，氷晶形成は全く認められず，細胞小器官の配列が識別可能である．しかし，昇華が少ないためエッチングが浅くて，立体的様相は示さなかった．グリセリンは，不揮発性のため，細胞内の水分の昇華を妨げてエッチング効果を弱めている[1]．細胞小器官の割断面を観察するのには，氷晶形成が少なくて最適な方法であるが，細胞骨格を調べる目的では，さらに深いエッチングが微細構造の検索のため必要であると思われる．

図6は，20%グリセリン浸漬，60分エッチングを実施した細胞で，エッチング30分時と比較して僅かに昇華が多くなされたため，立体感がみられる．氷晶は，ほとんどみられないが，ミトコンドリアなどの内部構造の識別が不明瞭である．グリセリンを使用した2図では，氷晶の形成は少なかったが，エッチングがかかり難いという弱点を持っている．

図7は，10%のメタノールに溶解した10%グリセリン浸漬，30分エッチングを施した像で，グリセリン濃度を下げメタノールと併用で氷晶形成を抑制した．氷晶の出現は，やや低下しているが，エッチングが弱く，像は図6の処理と近似している．これは，グリセリンの影響が大きく現れたためと思われる．

図8は，10%メタノール浸漬，30分エッチングした時のミトコンドリアの強拡大部で，基質にクリステが散見され，ミトコンドリア内の氷晶の少ない状態を示した．周囲の細胞質では，氷晶のため一部に構築の離開がみられる．氷晶は，細胞質，核で形成されやすく，細胞小器官では比較的少なかったが，細胞全体に出現した氷晶では，細胞小器官の識別が困難である．

メス刃の角度による影響は，それぞれの条件で組織面の広さ，深さに関して顕著な差異として認められなかった．

今回，液体窒素領域での液化プロパン浸漬急速凍結，メス刃による割断を試みた．液体ヘリウムと比較して，凍結温度が高いため，組織細胞内で氷晶の形成が多くみられ，良好な部位つまり表層面に接近して氷晶のない部位を捜すのが困難であった．極低温凍結が完全に行われると，微細な三次元構造が観察され，組織や浮遊細胞での未知な所見が得られると期待される[5-7]．さらに，条件の検討を進めて，良好な像を得るようにしたい．

結　語

ラットの肝臓を用いて，液体窒素領域の液化プロパン浸漬急速凍結，メス刃による割断を行った．凍結保護剤として10%メタノール，エッチング時間30分の条件が比較的良好であったが，全体に氷晶形成が顕著に認められた．

文　献

1）月田承一朗：形態学的研究法，電顕，石川春律編，細胞骨格，25-38，1985，講談社，東京．
2）赤堀　宏，臼倉治朗：電子顕微鏡，19(2)，135-138，1984．
3）赤堀　宏，臼倉治朗：電子顕微鏡，19(3)，214-220，1985．
4）大野伸一：日本電子顕微鏡学会　第43回講演会予稿

集, 150, 1988.
5) 廣川信隆：電子顕微鏡, 18(2), 105-110, 1983.
6) 廣川信隆：電子顕微鏡, 20(2), 109-125, 1985.
7) Pele, J.P., Dunnigan, J. and Calvert, R.：*Environ. Res.*, 31, 152-163, 1983.

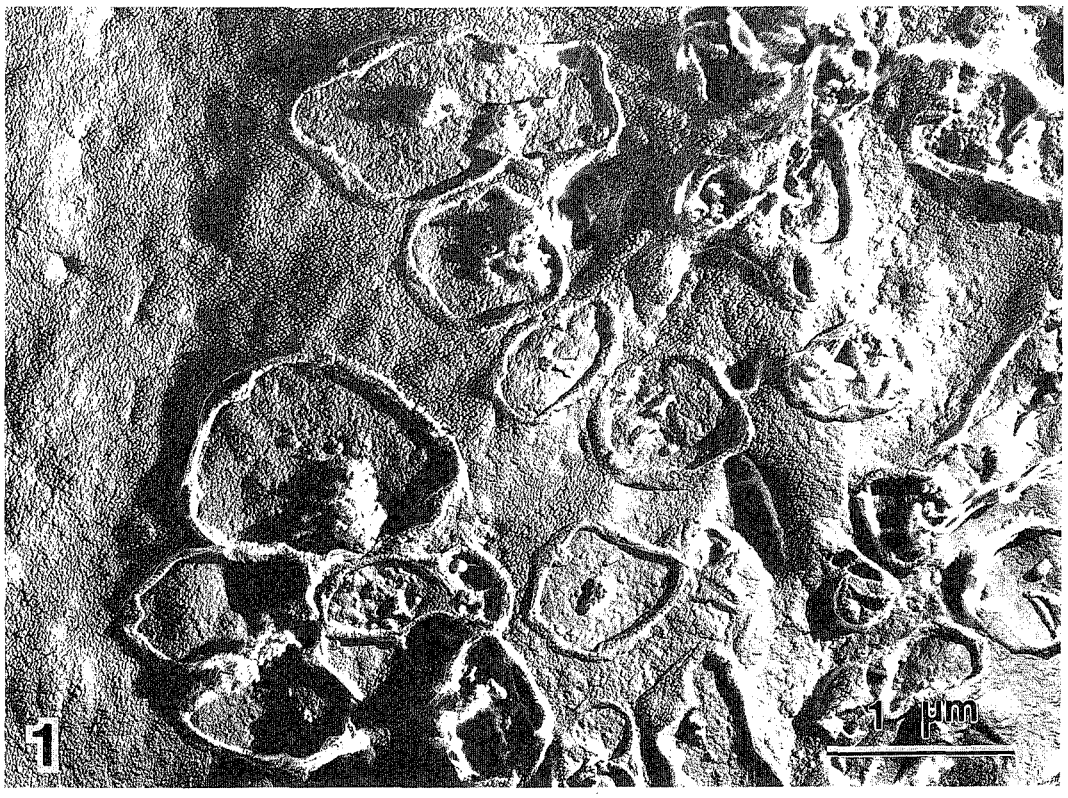


図１．組織表層面でみられた砂丘状の人工的産物像（×24,700）

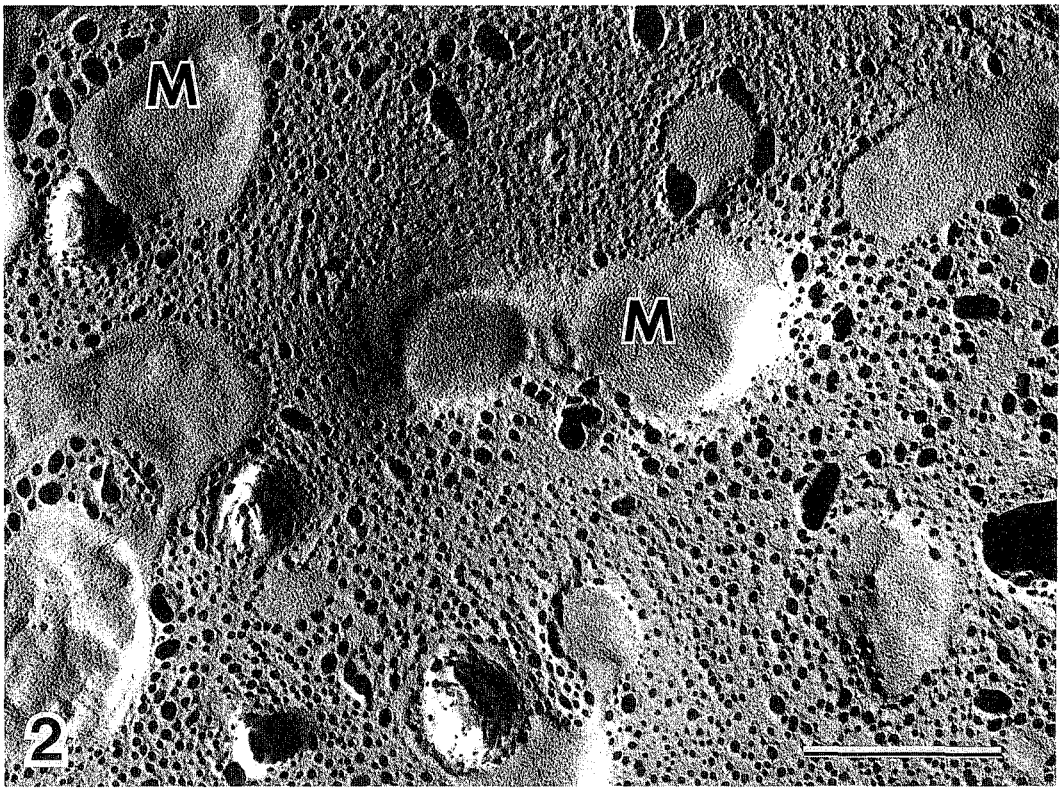


図２．氷晶形成を伴った人工的被膜とミトコンドリア様構造(M)（×25,800）

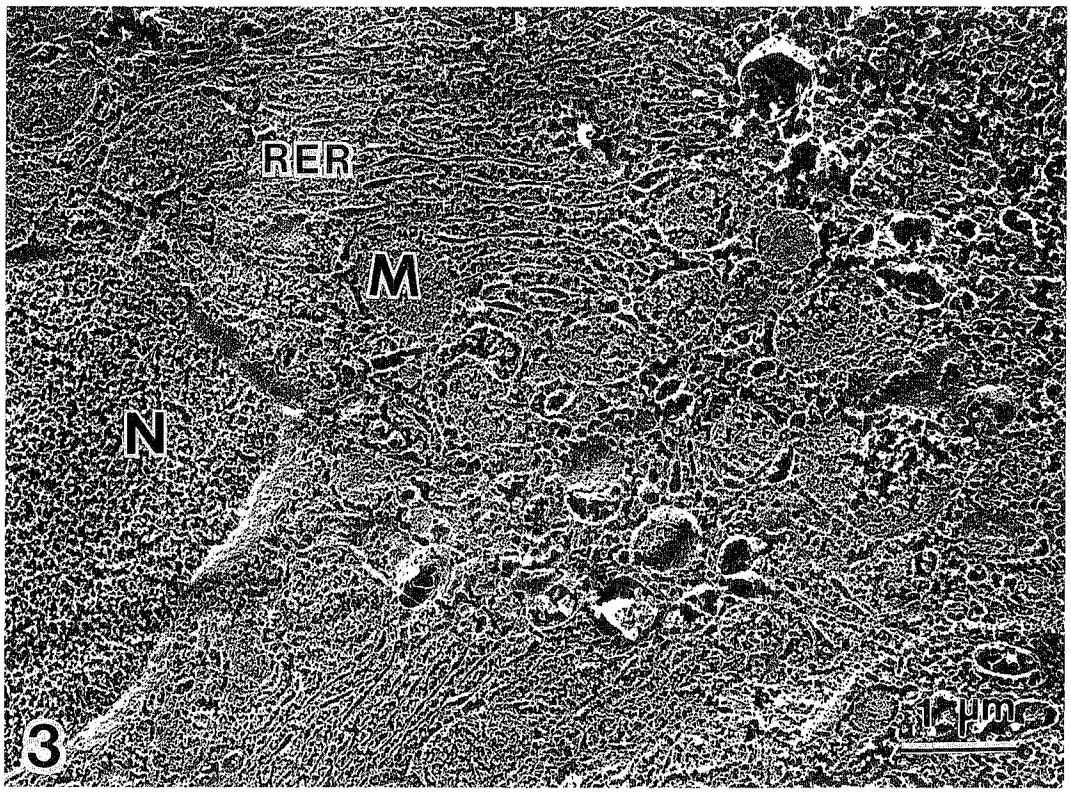


図3．10%メタノール浸漬，30分エッチングの肝細胞，層板状の粗面小胞体（RER）や核（N），ミトコンドリア（M）が識別できる．（×14,500）

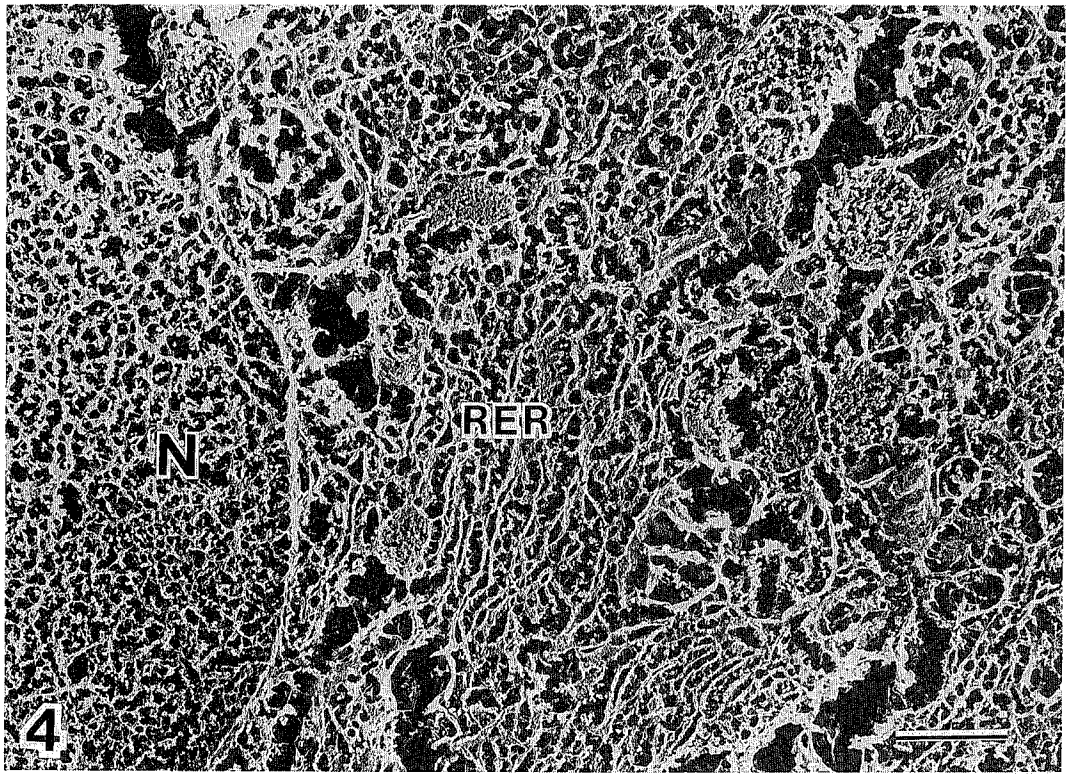


図4．10%メタノール浸漬，60分エッチングの肝細胞．エッチングが強く，細胞小器官の破壊がみられる．（×14,500）

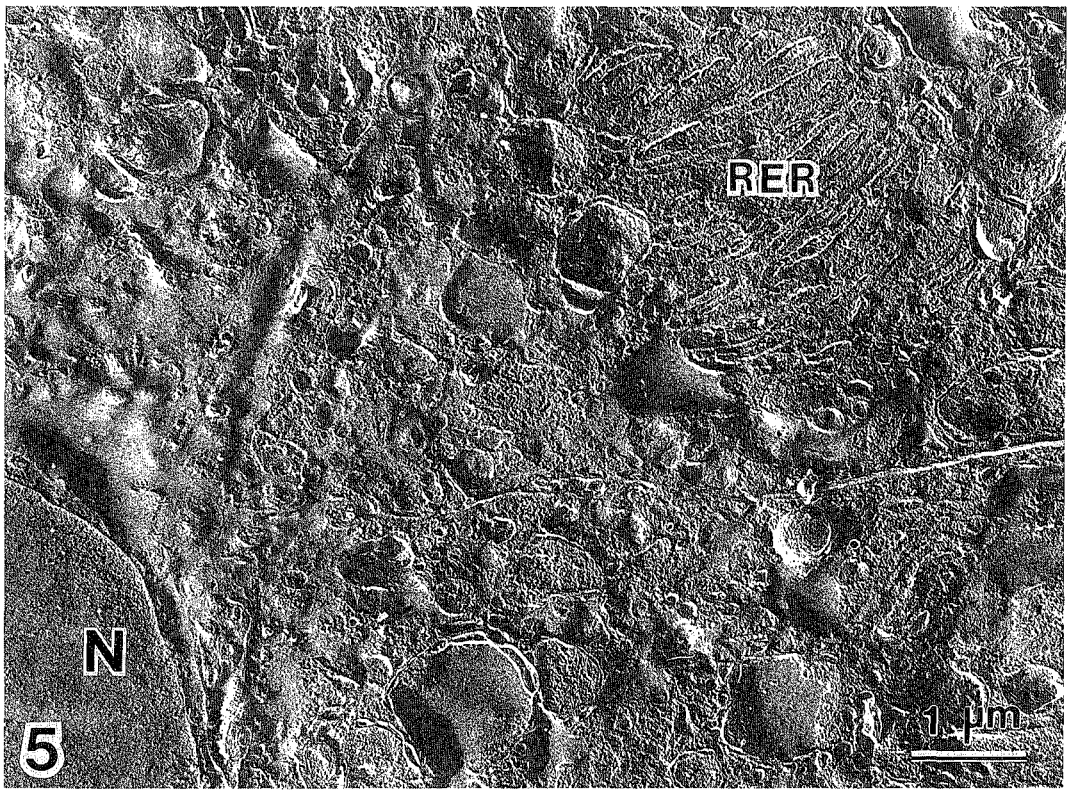


図5．20％グリセリン浸漬，30分エッチングの肝細胞．氷晶は少なく，細胞小器官の区別が可能である．しかしエッチングの効果が弱く，細胞骨格は不明瞭である．（×14,500）

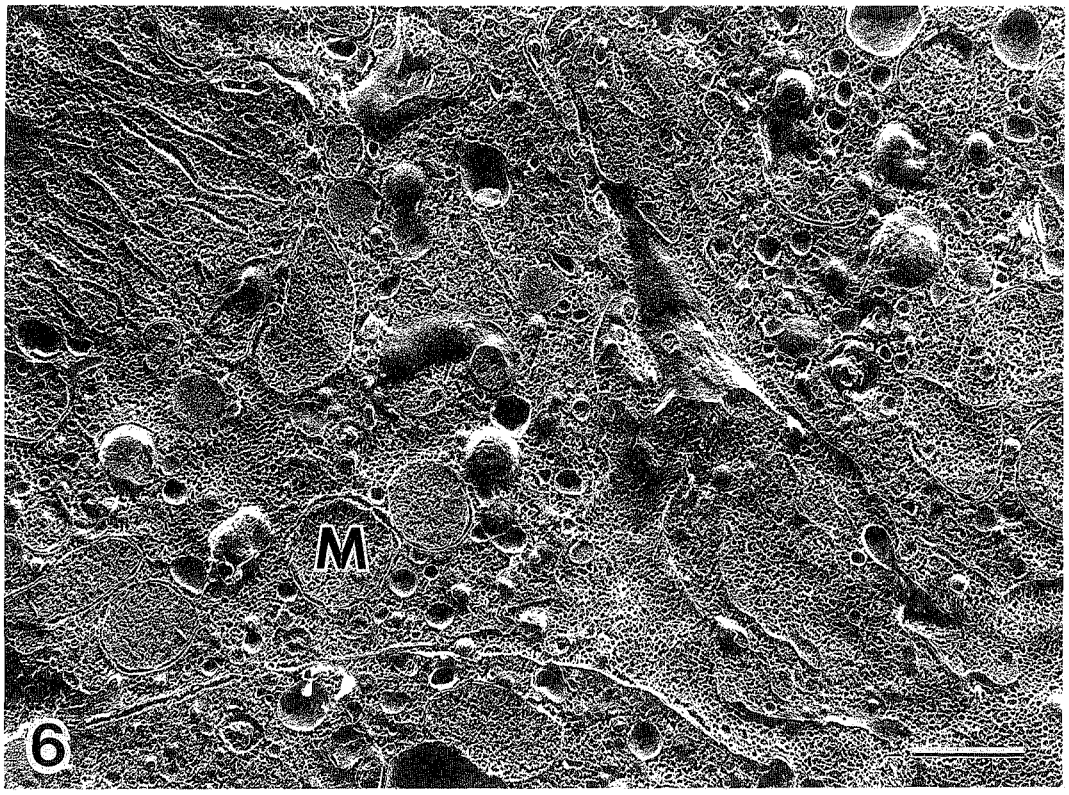


図6．20％グリセリン浸漬，60分エッチングの肝細胞．氷晶は少なく立体感がみられるが，エッチングの不足がある．（×14,500）

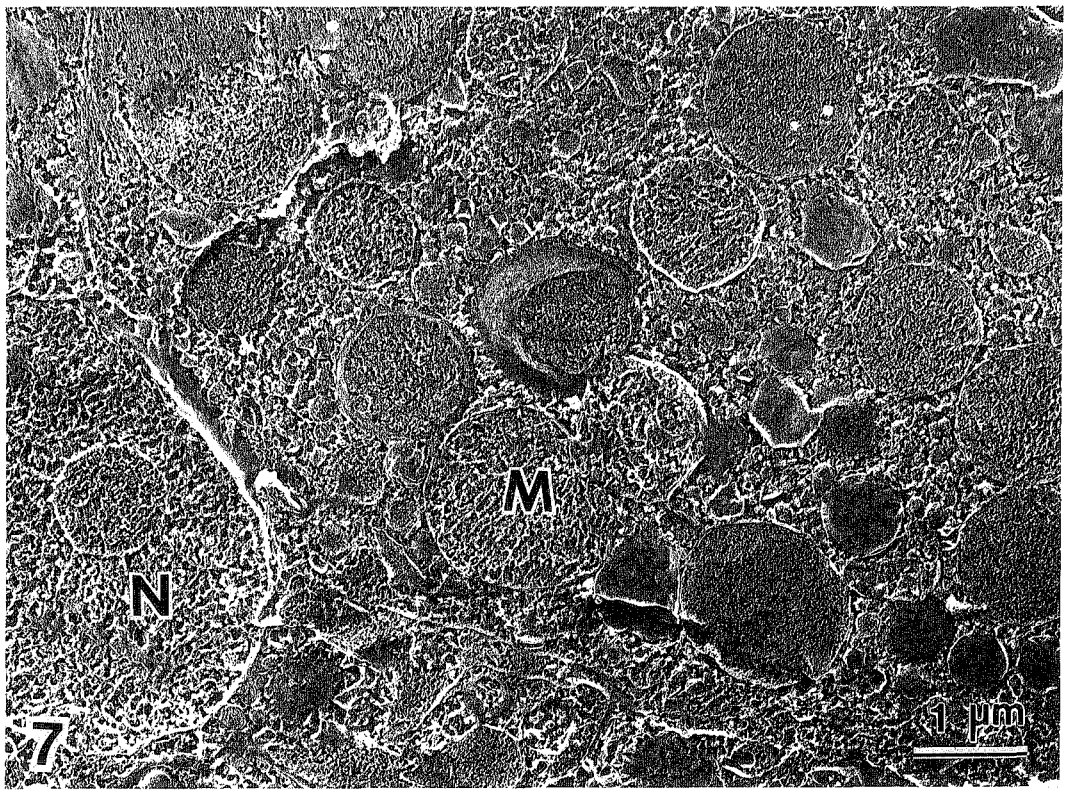


図7．10％メタノールに溶解した10％グリセリン浸漬，30分エッチングの肝細胞．氷晶は少ないが，エッチングが弱く平滑な像である．（×14,500）

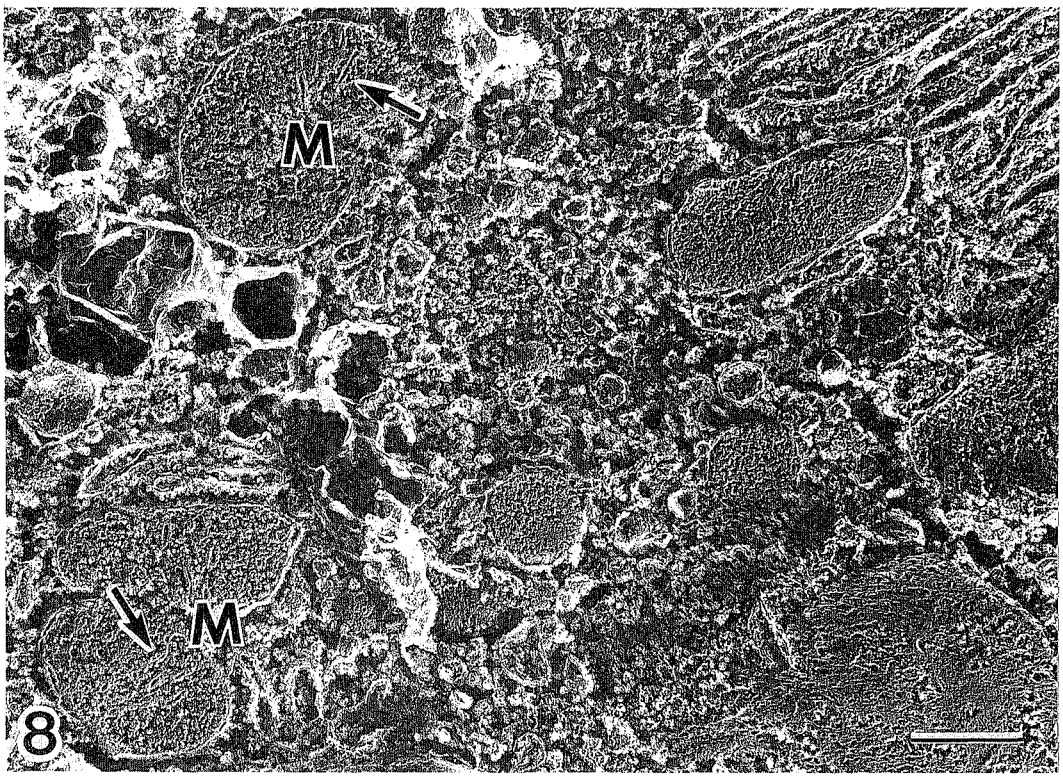


図8．10％メタノール浸漬，30分エッチングの肝細胞．ミトコンドリア（M）の保存が良好で，クリステ（矢印）がみられる．周囲細胞質では，氷晶が散見される．（×23,500）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 40, 349-354, 1989

石綿繊維の経口摂取による生体影響（第4報）クリソタイルの消化管内における走査電子顕微鏡的観察

福森信隆*，荻野周三**，佐々木美枝子*

Biological Effects of Ingested Asbestos Fibers (IV) Observation of Chrysotile Fibers in Rat Digestive Tract Using Scanning Electron Microscopy

NOBUTAKA FUKUMORI*, SHUZO OGINO** and MIEKO SASAKI*

Chrysotile asbestos fibers suspended in the distilled water were administered p.o. to rat with the sound. Isolated segments of rat stomach and jejunum were taken for the examination by scanning electron microscopy. Just a few fibers were seen protruding the epithelial surface of the gastrointestinal mucosa in rats exposed to the chrysotile suspension. Most fibers showed the form of curling on the mucous epithelium. Some macrophage-like mass in the intestinal tract appeared to have intracellularly included small fibers.

Keywords：クリソタイル石綿 chrysotile asbestos, 消化管 digestive tract, ラット rat, 走査電子顕微鏡的観察 observation by scanning electron microscopy

緒　言

アスベストの周辺環境での汚染は，飛散防止，使用量の抑制，曝露実態の把握など多くの問題を含んでいる．また，分解され難いという性質から，廃棄後の処理に対して監視を続けることが必要である．一般環境における曝露は，著しい量ではないが，健康影響について充分な注意を払うことも重要である．

経口摂取によるアスベストの安全性については，一定の評価が得られていない[1]．Selikoff らは，断熱作業従事者の職業的曝露に関する調査で，呼吸器系の肺癌や中皮腫のほかに，消化器系癌の多発を指摘した[2,3]．さらに，気管へ吸入されたアスベスト繊維は，粘膜上皮の線毛運動により排除され，異物として咽喉部から嚥下し食道へ移動するといわれている．Lee によると25から50％が消化管へ移行し[4]，また，放射線ラベルしたアスベストでは，吸入後30日以内に73％が消化管を経由して排泄される[5]と報告している．従って，飲料，食品を経て消化器系に侵入する可能性とともに，環境空気からの経口的曝露をも考慮に入れる必要がある．しかし，これまでの疫学調査[6]，実験的証明[7]では，経口曝露と消化器系癌の関係を明らかにできず，むしろ否定的見解が多くみられる[8]．

これらの報告では，機序に関する基礎的データが少なく，消化管内でのアスベスト繊維の動態の把握も充分でない．先に，生体影響に対する基礎的研究の一環としてアスベストの中でも摂取可能性が高いと予測されるクリソタイル繊維の胃酸に対する影響を調べた．その結果，マグネシウム(Mg と略す)／ケイ素(Si と略す)比の減少が若干認められたのみで，形状に対し顕著な変化はみられなかった[9]．本報では，経口摂取後の消化管壁でのクリソタイル繊維の動態を走査型電子顕微鏡(走査電顕と略す)により，壁粘膜上皮との関連について形態学的に表面観察した．

実験方法

実験は，一晩絶食を行った体重約400g のJcl：SD 雄性ラットを使用し，ネンブタールで軽度に麻酔した後，内径1.8㎜に特殊加工した経口ゾンデを用いて強制投与を実施した．投与は，UICC(Union Internationale Contre

*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

Le Cancer)の標準品 Chrysotili A を0.1 μm のフィルターでろ過した精製水に分散懸濁後，20mg／kg 体重の割り合いで行った．強制投与の終了後，自由に飼料を与えて飼育した．投与後1，3，6時間，及び1，4日後に各群3匹の消化管を摘出し，前胃，腺胃部は約4㎜四方に空腸部では5㎜の長さを管腔に沿って縦に割断して，生理食塩水で表面粘液を落とし走査電顕用の試料とした．試料は，3％パラホルムアルデヒド(0.1M燐酸緩衝液，pH 7.3)と1％オスミウム酸(0.1M燐酸緩衝液，pH 7.3)で二重固定を施し，エタノール脱水，酢酸イソアミル浸漬を行い，臨界点乾燥後，白金・パラジウムで金属蒸着した．

観察は，加速電圧10kv の電界放射型走査電顕(日立S-800)を用いて，図1に示す方法ではじめ組織面を2,000倍の倍率に拡大し CRT-1で観察した後，CRT-1での5倍あるいは10倍の部分拡大を CRT-2に併用画像で表示した．組織からの最終倍率は，20,000倍となり，一定の面積を移動しながら細部にわたり検索した．消化管内のクリソタイル繊維と他の繊維状構造物との識別のため，一部を顕微鏡下で取り出し分析電子顕微鏡のバルクホルダーに装着して，エネルギー分散型X線分析装置(Kevex-7500，EDX と略す)で組成元素の同定を行った．

また，前報[9]でホルマリン固定液によるクリソタイル繊維の Mg の溶出が認められたため，浸漬時間を長く設定して，Mg／Si 比に与える影響を同様な方法で EDX を用いて分析した．

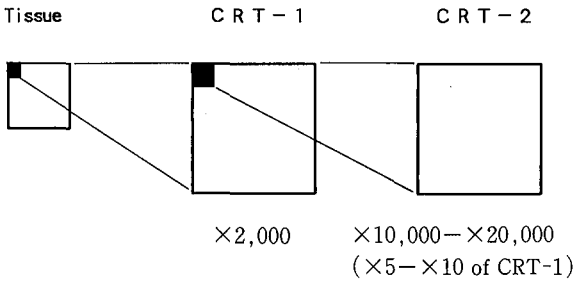


Fig. 1. Scheme of Observation in Dual Magnification by Scanning Electron Microscopy

実験結果

各群とも，強制投与による消化管での出血，組織破壊などの損傷は，認められなかった．観察に際して，主に繊維の長さ，太さ，外形構築あるいは末端切断部の構造などを識別の判断とした．末端が丸く，非常に太い繊維は，クリソタイル繊維束とも異なるために対象から除いた．また洗浄されずに残存した粘液は，乾燥時に糸を張るように伸張するため，末端部が広がっていることからアスベスト繊維とは区別された．図2に，胃内で認められた繊維状構造物の一例である動物の体毛を示した．組織から採取した繊維状物質は，実体顕微鏡下で支持膜の張られたグリッドに載せ，あるいは組織の一部をバルクホルダーに保持して EDX 分析を行うと Mg／Si 比が約80％のクリソタイルに特有な元素ピークを認めた．

表1は，投与後のクリソタイル繊維が消化管壁に付着して，残存する量的変化を概略で示した．3匹の平均から，繊維の残留程度を経時的に捉えると，胃部では，投与後3時間まで多くみられ，1日以後ではかなり消失していた．胃部の前胃と腺胃での差異は，顕著には認められなかったが，繊維塊が腺胃部に多くみられた．4日後の胃部では，対照群と同様にクリソタイル繊維はみられなかった．小腸では，胃部と反対に3時間まで認めることが少ないが，6時間でやや多めにみられ，4日までに漸次減少した．胃部に比較して，腸管内の繊維の付着は全体に少量であった．

投与したアスベスト繊維の動態を走査電顕で観察すると，単繊維より繊維束が多く認められた．1時間後では前胃，腺胃とも著しいクリソタイル繊維が胃壁に付着して，比較的分散した様態(図3)やクリソタイル繊維の特徴であるカールを呈して丸く集合した塊状がみられた(図4)．多くは，粘膜上皮の突出部よりひだの間に残留していた．極めて少例ではあるが，壁に突き刺さった様子を呈する繊維がみられた(図5)．3時間後の胃壁では，前胃で付着量の減少が軽度にみられるが，多量の繊維が

Table 1. Degree of Attached Chrysotile Fibers in Rat Digestive Tract

Site	Cont	1 hr	3 hr	6 hr	1 d	4 d
Stomach						
Pars proventricularis	ND	＋＋＋	＋＋	＋	＋	ND
Pars glandularis	ND	＋＋＋	＋＋＋	＋	＋	ND
Jejunum	ND	＋	＋	＋＋	＋	＋

ND：Not detectable，＋：Slight，＋＋：Moderate，＋＋＋：Severe

残留し，その分布様式，形状は，1時間後と同様であった．6時間後では，径巾の広い繊維束が散見された．1日後でも，僅かに残留している太い繊維がみられたが，4日後では，観察されなかった．空腸部では3時間後まで，繊維量は少なく大きい繊維が散見されたが，6時間後でも投与後短時間の胃内でみられたような繊維量の顕著な増加は認められず，壁に繊維束末端から分かれた単繊維が，張り付いている様子を示した(図6)．多量の繊維が残留している近辺では，小腸微絨毛の間に陥入している繊維像がみられた．しかし，この現象は稀であり，腸管組織に貫通しているか，表層面からの観察では明らかではなかった．壁の絨毛面で，短い繊維を中に入れたマクロファージ様の固まりが6時間後以降に比較的多く観察された(図7)．

クリソタイル繊維のホルマリンによるMgの溶出を再検討したところ，若干の変動があるものの，3ケ月の長期間においてもMg／Si比の有意な減少はみられなかった(表2)．

考　　察

経口摂取によるアスベストの生体内への取り込みに関して，多くの見解がある[1]．アスベストに接触する機会の多い地域での疫学調査，あるいは動物実験により生体組織への蓄積，尿中への排泄などから消化管を経て侵入すると考えられているが，繊維の貫通の機序については未だ明らかでない．消化管を経由して，組織内に多く分布が認められたとしても，移行過程が明らかでないため貫通の確証は得られていない．特に，アスベスト繊維が化学物質と異なり，生体内で繊維の状態で存在することから，形態学的方法を駆使することによって解明される可能性が想定される．今回，摂取された繊維が消化管の物理的固有運動やあるいは繊維と生体膜との表面荷電に起因する細胞膜との接着により貫通すると考えられる，いわゆる「突き刺さり現象」を高分解能の走査電顕で観察した．同時に，消化管壁に付着した繊維の動態を経時的に検索した．

投与量から推量して，観察された繊維が比較的少なかったことから，壁粘膜に残留しているクリソタイル繊維は非常に少量であり，大部分は飼料と共に消化管を通過したと考えられる．消化管内の繊維量の変動は，投与後，漸次胃から小腸へと移行していくが，先に報告[9]した消化管壁の洗浄液での量的変化と合致している．しかし，粘膜上皮への付着のためか，洗浄後に残留した繊維は，量的変動が少なかった．

胃内でのクリソタイル繊維は，均一に分散するより集合して絡み合っている像が多くみられた．これは，クリソタイル繊維のカールした形状特性によると考えられ，直線性を持つ他の角閃石アスベストの動態と異なると思われる．極めて僅かではあるが，胃壁から突き出た繊維がみられた．これは単繊維より，太い繊維束を呈していた．走査電顕での表面構造の観察は，広範囲の検索に便利であるが，組織内部の確認が困難なため，繊維の組織への貫通に関しては確証を得難い．これらを明らかにするためには，透過電顕で切片像を作成し細胞の断面を観察して，繊維末端の位置を確認する必要がある．侵入する移行過程の初期段階を確認することは重要であるが，この現象を正確に述べた報告は，みられない．繊維が組織から突き出た像は小腸でも観察されたが，単に微絨毛の間隙に挟まれている状態か明らかでない．走査電顕で角閃石系のアモサイトをラットに経口投与し，空腸を観察した実験では，5例中3例から粘膜上皮に繊維が突き刺さった像がみられたとの報告がある[10]．径が0.4から1.4 μm の太い繊維が多く，細い単繊維は，パイノサイトージスにより生体内に取り込まれると推測している．さらに，腹腔内投与したクリソタイル，クロシドライト及びアモサイトが腹膜中皮に突き刺さる現象を捕え，繊維の形状と生体組織の固有運動に起因しているとの説明がみられる[11]．これらの報告は，表面観察のみであり細胞内の態様について触れていない．また別にWestlakeらは，クリソタイルの経口投与した動物の結腸を透過電顕の切片法で検索し，粘膜上皮，固有層から短い繊維を検出している．繊維長が1 μm 以下で，細胞内部への侵入がみられることは意義ある所見であるが，腸管

Table 2. Change of Mg／Si Ratio in Chrysotile Fibers by Formalin Fixative

Division	Mg／Si ratio (%)			
	Cont	1 wk	1 m	3 m
Single	74.2±3.05	68.7±2.82	74.5±3.51	71.9±2.94
Bundle	73.2±3.06	73.3±6.59	65.9±2.57	64.4±2.73

Values represent the mean±S.E. of 5-6 points by Student's t-test.

壁から一貫して突き出た像でないため壁を貫通しているか理解し難い．加えて杯細胞に繊維の局在が認められたことから，腸管への侵入は，杯細胞の関与が大きいと考察している[12]．しかし一般に，杯細胞が分泌腺のため，繊維の侵入や取り込みの機能を考慮することは難しい．

今回の観察で，小腸絨毛の表面に繊維を含んだマクロファージに似た固まりが散見された．その中の繊維は短繊維が多く，数本の繊維が同じ固まりに存在していることから，集合したものと推察される．少例みられた消化管壁から突き出た繊維はやや太く，固まりにみられた繊維は，細く短い傾向を示した．繊維の大きさによって侵入の機序が異なることも考察される．別に腸管壁で集められた大部分の繊維は，固まりとなり侵入せずに飼料とともに消化管を通過して，糞便中へ排泄される可能性が大きいと思われる．投与量と比較して，突き出た繊維の観察された量は極めて少なかった．特にクリソタイルでは繊維束を形成し，太い繊維はカール状を呈することから，貫通現象の起こる機会が少ないと考えられる．今後，透過電顕と対比させて，形態的局在を証明することが重要であると示唆される．

結　語

クリソタイルの経口摂取によるラット消化管内での繊維の動態を，走査電顕で観察した．胃及び空腸では，繊維の粘膜上皮への付着がみられたが，突き出た像は極めて少例でほとんど認められなかった．腸管では，短繊維を含んだマクロファージ様の固まりが粘膜上皮表面で観察された．

文　献

1) *Environmental Health Criteria for Asbestos and Other Natural Mineral Fibres*, 1986, World Health Organization, Geneva

2) Selikoff, I.J., Churg, J. and Hammond, E.C.：*J. A. M. A.*, 188, 22-26, 1964.

3) Selikoff, I.J., Hammond, E.C. and Seidman, H.：*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 330, 91-116, 1979.

4) Lee, D.H.：*Environ. Health Perspect.*, 9, 113-122, 1974.

5) Evans, J.C., Evans, R.J., Holmes, A., Hounam, R.F., Jones, D.M., Morgan, A. and Walsh, M.：*Environ. Res.*, 6, 180-201, 1973.

6) Marsh, G.M.：*Environ. Health Perspect.*, 53, 49-56, 1983.

7) Haseman, J.K., Crawford, D.D., Huff, J.E., Boorman, G.A. and McConnell, E.E.：*J. Toxicol. Environ. Health*, 14, 621-639, 1984.

8) Edelman, D.A.：*Br. J. Industr. Med.*, 45, 75-82, 1988.

9) 福森信隆，荻野周三，中野雅行，佐々木美枝子：東京衛研年報，39, 335-342, 1988.

10) Storeygard, A.R. and Brown, A.L.：*Mayo. Clin. Proc.*, 52, 809-812, 1977.

11) Winkler, G.C. and Ruttner, J.R.：*Expl. Cell. Biol.*, 50, 187-194, 1982.

12) Westlake, G.E., Spjut, H.J. and Smith, M.N.：*Lab. Invest.* 14, 2029-2033, 1965.

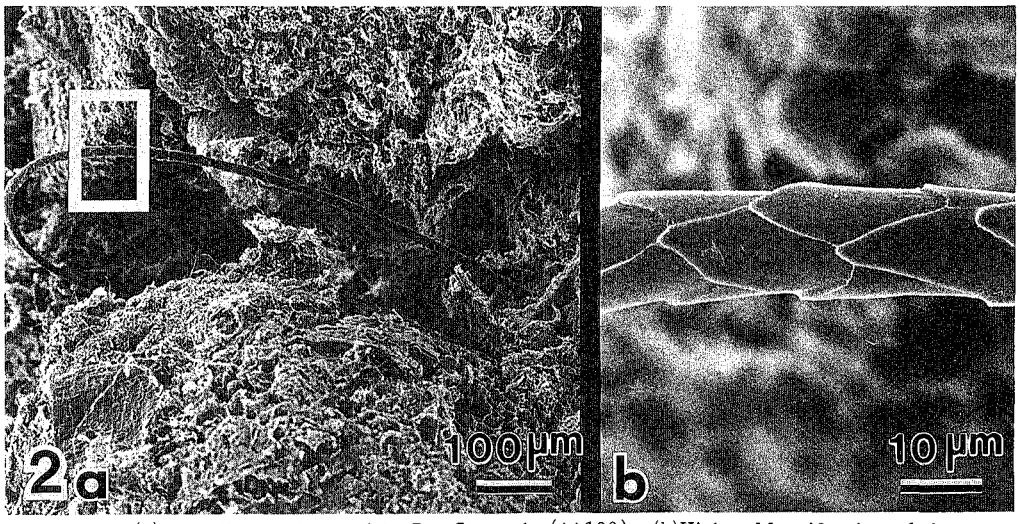


Fig. 2. (a)Wide Fiber observed in Rat Stomach (×100). (b)Higher Magnification of the Enclosed Portion in (a). Non-Asbestos Fiber of Gnarled Fur (×1,000)

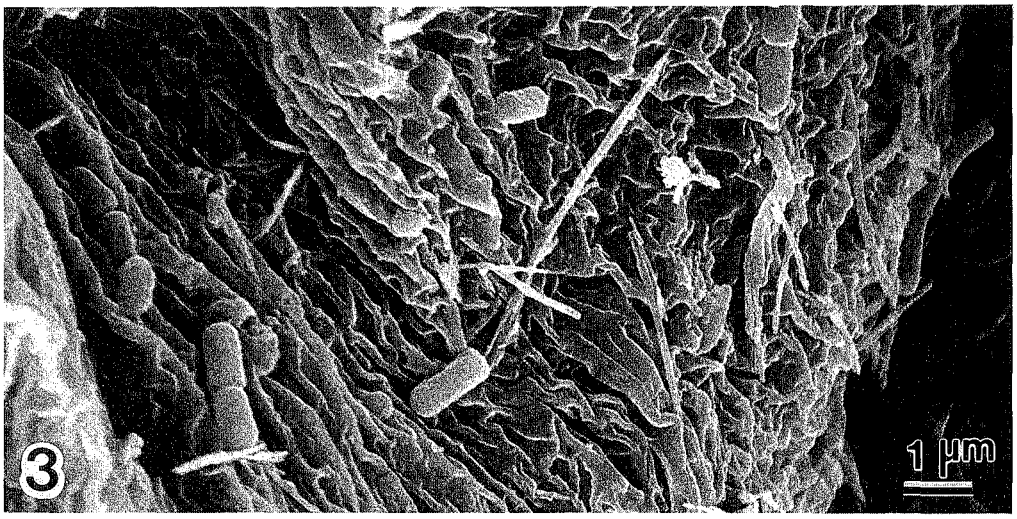


Fig. 3. Scattered Chrysotile Fibers attaching Mucosal Surface of Stomach after 1 hr (× 8,500)

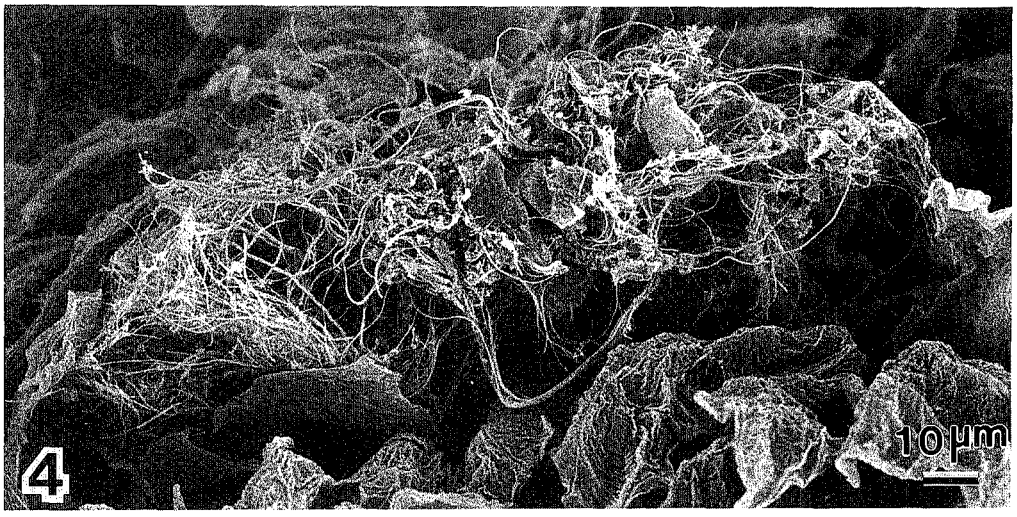


Fig. 4. Cluster of Chrysotile Fibers in Pars Glandularis of Rat Stomach after 1 hr (×700)

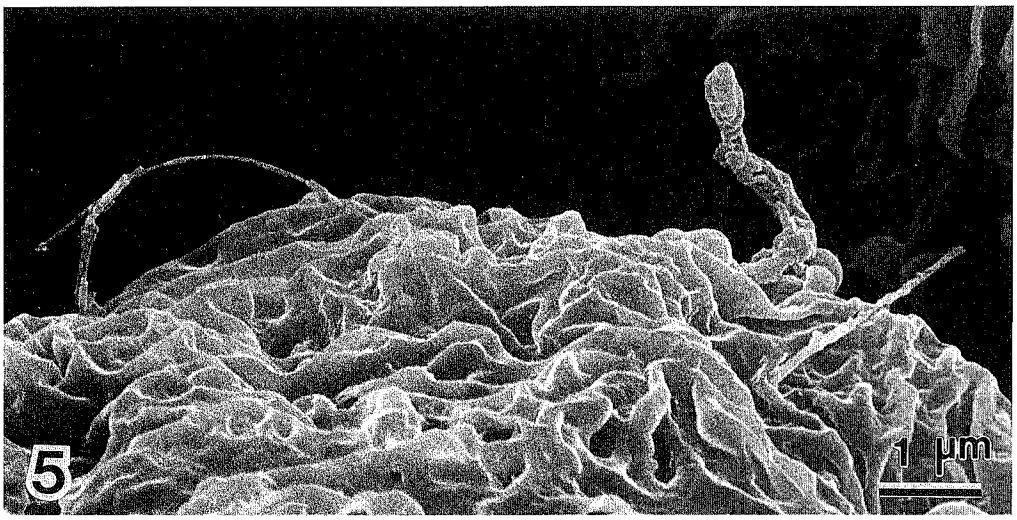


Fig. 5 . Some Protrudent Fibers on Mucous Epithelium of Rat Stomach after 1 hr (×13,000)

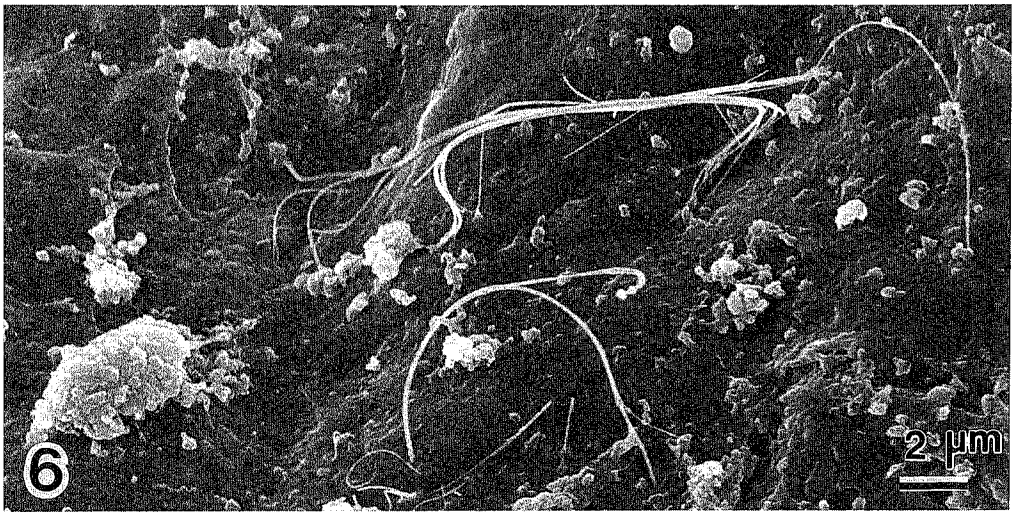


Fig. 6 . Separated Fibers in End Points of Chrysotile on Jejunal Villi after 6 hr (×4,200)

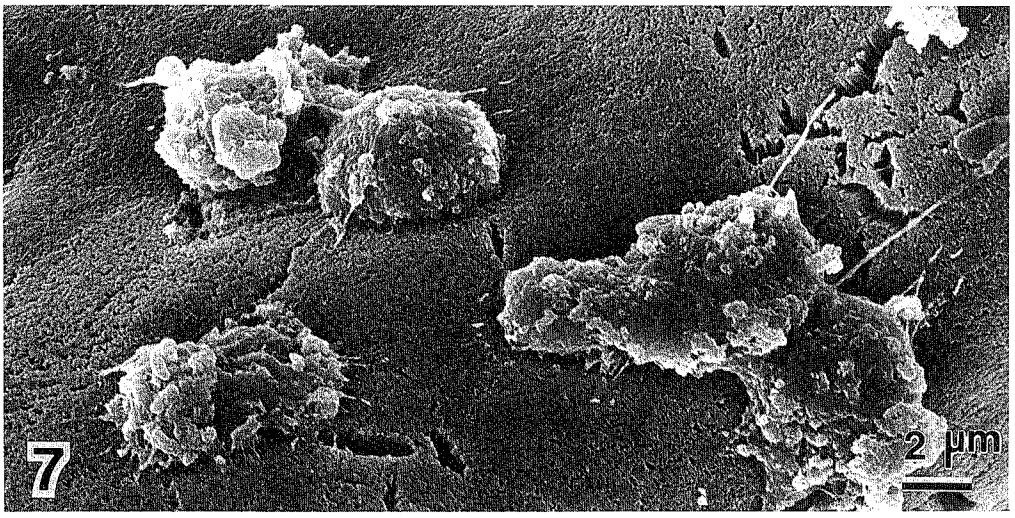


Fig. 7 . Macrophage-like Structures included Short Fibers after 6 hr (×4,500)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **40**, 355-362, 1989

Salmonella Typhimurium TA97, TA102を用いた食品添加物の変異原性試験（第4報）

藤田　博*, 佐々木　美枝子*

Mutagenicity Test of Food Additives with *Salmonella* Typhimurium TA97 and TA102 (IV)

HIROSHI FUJITA* and MIEKO SASAKI*

Mutagenicity of 30 food additives including 15 flavoring agents, 3 film-forming agents, 2 dietary supplements, 2 leavening agents, an antioxidant and so forth 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 S9 mix or phosphate buffer (pH 7.4) for 20 min. L-Cysteine monohydrochloride showed mutagenic activity in the two tester strains with and without S9. Weak mutagenic activity was detected with sodium erythorbate in TA97 without S9 and TA102 with and without S9. The other 28 chemicals were not mutagenic in TA97 and TA102.

Keywords：mutagenicity, food additives, flavoring agents, film-forming agents, dietary supplements, leavening agents, antioxidant, *Salmonella* Typhimurium TA97, *Salmonella* Typhimurium TA102

Amesらにより開発された*Salmonella* Typhimurium TA株[1-3]は化学物質の変異原性試験に広く利用され，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中から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．TA97およびTA102は後から開発された株であり，特徴としてはTA97はTA98では検出しにくいフレームシフト型の変異原を検出することができ[4]，TA102は過酸化物に良く反応する[5,6]．

食品添加物の変異原性試験は，TA98およびTA100を用いた報告はあるが，TA97およびTA102を用いた試験の報告は少ない．TA97およびTA102が，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]ことから，我々はTA98およびTA100において変異原性試験結果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[7-10]までに82種の試験を終了し，8種の食品添加物に非常に弱いが，TA97またはTA102に対する変異原性を見いだした．本報告では，着香料(15種)，被膜剤(3種)，強化剤(2種)，膨張剤(2種)，品質改良剤(2種)，酸化防止剤(1種)，甘味料(1種)，糊料(1種)，殺菌料(1種)，保水乳化安定剤(1種)および品質保持剤(1種)の計30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報告する．

実験材料および方法

試料　以下の試料化合物は，全て和光純薬製である．着香料：シンナムアルデヒド(Lot No.AWK3807)，ケイ皮酸(Lot No.PDG8646)，酢酸シンナミル(Lot No.EPQ5165)，酢酸シトロネリル(Lot No.EPQ5150)，酢酸シクロヘキシル(Lot No.KWN3820)，ケイ皮酸エチル(Lot No.AWM1855)，オクタン酸エチル(Lot No.AWL3140)，オイゲノール(Lot No.KWG5169)，ゲラニオール(Lot No.AWH5292)，酢酸ゲラニル(Lot No.TLM6872)，ギ酸ゲラニル(Lot No.AWF2067)，酢酸イソアミル(Lot No.AWH5036)，ケイ皮酸メチル(Lot No.AWL3251)，オクタナール(Lot No.DCK5621)，酢酸

*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

テルピニル(Lot No.KPR7706)，被膜剤：オキシエチレン高級脂肪族アルコール(Lot No.KIE6648)，オレイン酸ナトリウム(Lot No.PDH0447)，酢酸ビニル樹脂(Lot No.PDH4174)，強化剤：水酸化カルシウム(Lot No.PDJ3734)，リン酸二水素カルシウム(Lot No.PDK3361)，膨張剤：硫酸アルミニウムアンモニウム(Lot No.PDK3335)，硫酸アルミニウムカリウム(Lot No.PDG2327)，品質改良剤：L-システイン一塩酸塩(Lot No.EPL3401)，ナトリウムメトキシド(Lot No.KPR7212)，酸化防止剤：エリソルビン酸ナトリウム(Lot No.CDG0315)，甘味料：サッカリン(Lot No.PDL1451)，糊料：メチルセルロース(Lot No.AWH4966)，殺菌料：さらし粉(Lot No.AWH4979)，保水乳化安定剤：コンドロイチン硫酸ナトリウム(Lot No.PDM1193)，品質保持剤：プロピレングリコール(Lot No.KPR7967).

陽性対照物質：2-アミノアントラセン，9-アミノアクリジン，マイトマイシンC(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，同仁化学，吸収スペクトル用)に溶解した.

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[3,11]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S9[3]を用いた．S9 mix[3,11]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S9 mix 0.5ml，代謝活性化しない場合にはリン酸緩衝液(0.25M，pH 7.4)0.5mlを加え，さらに一夜培養した菌液を0.1ml加え，37°で20分間のプレインキュベーションを行った．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[12]を行い，さらにMooreら[13]のプログラムにより回帰分析を行った.

結果および考察

30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用途別に分類しTable 1に示した．10mg／プレートを最高濃度とした予備試験を行い，バクテリアの増殖が認められる濃度を決めた．その濃度を最高濃度にして希釈し，5濃度段階で試験を行った．着香料には致死性が強く，100 μg／プレートからの化合物が多い.

品質改良剤のL-システイン一塩酸塩は，TA97およびTA102において，S9の有無にかかわらず復帰コロニー数が有意に増加した．最も著しい増加を示したのは，TA102＋S9における5 mg／プレートでコントロールの復帰コロニー数の7.1倍(0.06復帰コロニー／nmole)であった．これらの値はコントロールの復帰コロニー数の2倍以上増加という変異原の慣例的判断に従っても陽性である．この変異原性は復帰コロニー数の増加に比較的高濃度を必要とすることから，多くの変異原の中では比較的弱いものである.

酸化防止剤のエリソルビン酸ナトリウムは，TA97－S9，TA102－S9およびTA102＋S9において復帰コロニー数が有意に増加した．TA102＋S9 10mg／プレートでコントロール復帰コロニー数の1.4倍(0.002復帰コロニー／nmole)であった．この増加量は非常にわずかであることから陰性の可能性もあるが，増加に再現性があることから，非常に弱いが変異原性は陽性と判断した.

その他の28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.

陽性と判断されたL-システイン一塩酸塩は，TA100に対する変異原性陽性の報告[14]および培養細胞に対する染色体異常試験陽性の報告[14]があり，変異原として知られている化合物である．L-システインの場合も，TA100に対して変異原性を示すにはS9が必要である[15]．ところが，今回のL-システイン一塩酸塩の結果ではTA97およびTA102に対してはS9を添加しない場合にも変異原性が見られた．これはこれらの二菌株が高い反応性を持つことによると思われる．さらに，L-システインの変異原性は，S9を遠心分画して用いた実験[15]から，ミクロソームの薬物代謝酵素よりも上清分画にある酵素による酸化反応によって生じるラジカルが原因であると考えられている．我々の結果も，酸素ラジカルを生成する化合物に良く反応するTA102で高い値が見られたことから，ラジカル生成を原因とする仮説を支持すると考えられる.

陰性と判断された28種類の食品添加物の中でシンナム

Table 1. Results of Mutation Test with Food Additives

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate[a]			
			TA97		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Flavoring agents						
Cinnamaldehyde	DMSO	0.1	143	197	91	353
		0.05	132	210	188	361
		0.01	137	196	231	361
		0.005	148	205	230	365
		0.001	148	219	240	364
		0	156	256	256	379
Cinnamic Acid	DMSO	1	102	194	94	191
		0.5	123	184	121	221
		0.1	158	209	187	298
		0.05	162	224	195	343
		0.01	157	238	235	354
		0	150	229	248	359
Cinnamyl Acetate	DMSO	0.1	129	216	197	363
		0.05	134	220	216	361
		0.01	141	216	218	373
		0.005	134	224	224	365
		0.001	149	236	235	353
		0	146	225	245	362
Citronellyl Acetate	DMSO	0.1	84	196	13	338
		0.05	86	193	17	366
		0.01	130	231	199	347
		0.005	130	200	186	352
		0.001	135	227	198	334
		0	121	209	203	352
Cyclohexyl Acetate	DMSO	0.1	148	207	235	392
		0.05	146	212	236	390
		0.01	137	219	234	367
		0.005	164	230	238	388
		0.001	137	235	250	347
		0	159	238	258	380
Ethyl Cinnamate	DMSO	0.1	129	176	145	411
		0.05	130	192	203	430
		0.01	135	198	191	377
		0.005	123	188	255	460
		0.001	122	212	221	432
		0	124	209	202	449
Ethyl Octanoate	DMSO	0.1	41	205	0	418
		0.05	98	240	41	411
		0.01	150	216	234	428
		0.005	150	200	222	396
		0.001	157	226	223	440
		0	139	221	234	423

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate[a)] TA97 −S9	TA97 +S9	TA102 −S9	TA102 +S9
Eugenol	DMSO	0.5	105	123	66	242
		0.1	112	151	165	296
		0.05	146	177	178	282
		0.01	146	173	197	278
		0.005	129	192	197	311
		0	149	192	181	312
Geraniol	DMSO	0.1	133	180	140	314
		0.05	122	203	224	337
		0.01	143	193	232	338
		0.005	150	229	228	329
		0.001	149	213	245	308
		0	140	190	241	326
Geranyl Acetate	DMSO	0.1	38	163	0	342
		0.05	35	177	8	327
		0.01	142	192	197	308
		0.005	129	182	187	307
		0.001	115	184	174	304
		0	119	181	202	341
Geranyl Formate	DMSO	0.1	55	226	0	404
		0.05	108	238	49	401
		0.01	167	230	234	404
		0.005	155	241	206	391
		0.001	172	236	208	386
		0	145	221	253	417
Isoamyl Acetate	DMSO	1	44	178	0	267
		0.5	116	177	119	404
		0.1	137	199	174	423
		0.05	121	197	191	419
		0.01	128	202	199	430
		0	128	198	222	456
Methyl Cinnamate	DMSO	0.1	149	196	209	358
		0.05	163	212	235	384
		0.01	171	210	269	415
		0.005	164	241	246	406
		0.001	161	222	255	376
		0	152	215	270	379
Octanal	DMSO	0.1	0	158	0	138
		0.05	119	212	127	363
		0.01	152	197	274	394
		0.005	153	196	258	403
		0.001	153	203	241	367
		0	146	196	259	397

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate[a] TA97 −S9	TA97 +S9	TA102 −S9	TA102 +S9
Terpinyl Acetate	DMSO	0.1	0	219	0	321
		0.05	112	197	15	347
		0.01	131	205	171	360
		0.005	123	227	162	314
		0.001	140	193	179	313
		0	149	188	181	326
Film-froming agents						
Oxyethylen Higher Aliphatic Alcohols	DMSO	1	119	177	244	403
		0.5	109	186	250	469
		0.1	124	229	211	408
		0.05	114	189	215	398
		0.01	119	179	214	391
		0	122	200	223	397
Sodium Oleate	DW	10	90	156	0	154
		5	104	172	0	203
		1	144	193	0	214
		0.5	142	176	0	264
		0.1	131	222	2	398
		0	134	207	178	314
Polyvinyl Acetate	DMSO	0.1	147	221	229	388
		0.05	153	211	221	400
		0.01	146	230	230	377
		0.005	138	215	224	363
		0.001	144	217	255	376
		0	133	236	238	374
Dietary supplements						
Calcium Hydroxide	DW	1	151	191	211	240
		0.5	134	193	231	345
		0.1	149	220	222	364
		0.05	163	214	222	389
		0.01	153	211	245	408
		0	151	213	219	390
Calcium Phosphate, Monobasic	DW	1	175	244	159	325
		0.5	165	216	173	326
		0.1	175	234	218	351
		0.05	169	225	188	334
		0.01	158	203	172	332
		0	179	215	164	352
Leavening agents						
Aluminium Ammonium Sulfate	DW	10	146	198	210	354
		5	154	188	261	388
		1	158	212	252	400
		0.5	165	221	262	403
		0.1	153	222	247	412
		0	164	228	260	416

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate[a]			
			TA97		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Aluminium Potassium Sulfate	DW	10	140	190	160	138
		5	138	175	183	174
		1	144	178	176	295
		0.5	129	194	210	305
		0.1	165	200	198	319
		0	144	191	218	309
Antioxidant						
Sodium Erythorbate	DW	10	196[b]	235	276[b]	422[b]
		5	176	237	240	382
		1	150	197	225	314
		0.5	138	221	217	304
		0.1	140	203	195	288
		0	144	219	204	309
Sweetner						
Saccharin	DMSO	10	131	174	205	363
		5	144	198	200	369
		1	153	214	194	334
		0.5	136	194	203	369
		0.1	135	199	198	336
		0	137	189	202	372
Thickening agent						
Methyl Cellulose	DW	10	161	247	243	435
		5	159	241	268	432
		1	167	238	252	423
		0.5	148	224	304	415
		0.1	175	232	254	413
		0	167	232	240	386
Bleaching agent						
Calcium Hypochlorite	DW	0.05	99	241	88	358
		0.01	214	216	256	358
		0.005	184	232	221	346
		0.001	163	217	208	379
		0.0005	176	253	237	337
		0	169	239	232	354
Carrier						
Propylene Glycol	DW	100	152	201	254	301
		50	156	223	282	338
		10	163	207	250	293
		5	164	213	246	306
		1	169	201	235	294
		0	145	213	280	309
Stabilizer						
Sodium Chondroitin Sulfate	DW	10	155	199	210	329
		5	172	198	216	349
		1	147	208	251	313
		0.5	145	187	225	338
		0.1	147	216	200	348
		0	150	207	197	327

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg／plate	No. of Revertants／plate[a] TA97 −S9	TA97 +S9	TA102 −S9	TA102 +S9
Miscellaneous						
L-Cysteine Monohydrochloride	DW	10	776[b]	769[b]	944[b]	1,638[b]
		5	588	684	656	2,016
		1	234	239	228	293
		0.5	191	221	199	287
		0.1	126	227	174	289
		0	120	238	179	282
Sodium Methoxide	DW	0.5	149	209	251	373
		0.1	170	206	247	344
		0.05	158	203	238	353
		0.01	150	218	251	351
		0.005	164	227	246	304
		0	172	222	234	352
Positive controls						
9-Aminoacridine		0.05	300±48[c]			
Mitomycin C		0.0005		2,370±170		
2-Aminoanthracene		0.005	3,110±520		1,450±370	

a) Mean of three plates.
b) Statisticaly significant difference by Kruskal-Wallis test ($P<0.05$) and dose-related increasing by regression analysis ($P<0.01$).
c) Mean and standard deviation ($n=30$).

アルデヒドおよびさらし粉は，TA100に対する変異原性および培養細胞に対する染色体異常誘発性の報告[14]がある．さらにオイゲノールおよびプロピレングリコールについても染色体異常誘発性の報告[14]がある．今回，TA97およびTA102に対する変異原性は検出できなかったことから，これらの化合物の変異原性については，試料あるいは試験法などに着目して検討を加えて行きたい．

TA97またはTA102を用いた変異原性試験を行った食品添加物は，前報[7-10]までに報告した82種類の食品添加物を加えると112種類となる．Ishidateら[14]が報告しているTA98およびTA100での結果との関係をまとめてみると，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[7]，オルトフェニルフェノール[7]，チアベンダゾール[7]，塩酸ピリドキシン[8]，ニコチン酸アミド[8]，リボフラビン[8]，臭素酸カリウム[9]，没食子酸プロピル[10]，L-システイン一塩酸塩およびエリソルビン酸ナトリウムの10種類である．これらの中でTA100においても陽性の報告がある化合物は，臭素酸カリウム[14]およびL-システイン一塩酸塩[14]の2種類である．一方，TA97およびTA102で陰性であった102種類の化合物のうち，TA100で陽性の報告がある化合物は，次亜塩素酸ナトリウム[14]，亜塩素酸ナトリウム[14]，さらし粉[14]およびシンナムアルデヒド[14]の4種類である．この様にどの菌株にも反応する化合物は少なく，TA97あるいはTA102を用いることにより，いくつかの化合物にTA98およびTA100では検出できない変異原性を検出できたが，反対にTA97およびTA102においては検出できない変異原もある．このことから，食品添加物の変異原性試験を続けるには，Amesが提案[3]しているように，これらの四試験株を用いる必要があるだろう．TA98およびTA100についての報告がない食品添加物もあることから，今後，その様な食品添加物については，TA98およびTA100での試験も試みたい．

要　旨

30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，L-システイン一塩酸塩およびエリソルビン酸ナトリウムで復帰コロニーが増加した．増加量がわずかであることから弱い変異原性である．他の28種の食品添加物には変異原性は見られなかった．

文　献

1) McCann, J., Spingarn, N.E., Kobori, J. and Ames, B.N.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 979-983, 1975.
2) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.：*Mutation*

Res., **31**, 347-364, 1975.

3) Maron, D.M. and Ames, B.N.：*Mutation Res.*, **113**, 173-215, 1983.

4) Levin, D.E., Yamasaki, E. and Ames, B.N.：*Mutation Res.*, **94**, 315-330, 1982.

5) Levin, D.E., Hollstein, M. and Ames, B.N.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7445-7449, 1982.

6) Levin, D.E., Marnett, L.J. and Ames, B.N.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4457-4461, 1984.

7) 藤田　博，小嶋昭江，佐々木美枝子，平賀興吾：東京衛研年報，**36**，413-417，1985.

8) 藤田　博，佐々木美枝子：東京衛研年報，**37**，447-452，1986.

9) 藤田　博，佐々木美枝子：東京衛研年報，**38**，423-430，1987.

10) 藤田　博，中野雅行，佐々木美枝子：東京衛研年報，**39**，343-350，1988.

11) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，**20**，1178-1189，1975.

12) 石居　進：生物統計学入門，133-137，1975，培風館.

13) Moore, D. and Felton, J.S.：*Mutation Res.*, **119**, 95-102, 1983.

14) Ishidate, M. Jr, Sofuni, T. and Yoshikawa, K.：*Fd Chem. Toxic.*, **22**, 623-636, 1984.

15) Glatt, H., Protic-Sabljic, M. and Oesch, F.：*Science*, **220**, 961-963, 1983.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 40, 363-372, 1989

都衛研毒性試験システムII（第2報）病理試験システム

神谷信行*, 中川好男**, 三栗谷久敏*,
市川久次**, 佐々木美枝子*

Computer System used for Toxicological Study at Tokyo Metropolitan Reserch Laboratory of Public Health (II)

NOBUYUKI KAMIYA*, YOSHIO NAKAGAWA**, HISATOSHI MIKURIYA*,
HISATSUGU ICHIKAWA** and MIEKO SASAKI*

Keywords：毒性試験 Toxicity test, 病理試験 Pathologic examination, パーソナルコンピュータ Personal Computer, LAN

緒　言

毒性試験は，食品添加物や医薬品等が生体にどのような影響を与えるかを検討することを目的としている．この毒性試験から得られる情報は膨大な量となり，これらの情報を処理するため，1973年に都衛研毒性試験システム(I)[1]が導入され，1986年に都衛研毒性試験システム(II)[2,3]に更新され，現在まで多数の毒性試験に利用されている．

本システムは一般毒性試験，催奇形性試験，病理試験の3基本システムからなり，このうち一般毒性試験，催奇形性試験については前報[2,3]で述べた．本報では病理試験システムについて報告する．

システムの概要

1．システムの構成

毒性試験システムにおける機器構成は前報[2]で述べたが，ホストコンピュータをPC-9801VX21(日本電気)に変更，ハードディスク装置(40MB)を1台追加した．また端末コンピュータとしてPC-9801UV11を2台追加し，システムの機能の向上をはかった．

オペレーションシステム(OS)はMS-DOS V3.3(マイクロソフト)に，プログラム記述言語はN_{88}-日本語BASIC(86)V6.0(日本電気)にそれぞれバージョンアップを行った．

2．プログラムの構成

病理試験システムにおけるプログラム構成を図1に示した．プログラムは数カ月程度の短期試験システムと2-3年におよぶ長期試験システムに大別される．これらのもとに剖検所見および組織所見データの処理システムが存在し，各システム下に試験管理(プロトコール転送)，病理辞書保守，所見データ入力，帳票出力の各ルーチンが存在する．

これらのプログラムは端末のフロッピーディスクから起動され，試験番号を入力することにより処理が開始される．入力，更新されたデータは一旦端末コンピュータのフロッピーディスクにファイルされ，各ルーチンが終了した後，ホストコンピュータに転送される．フロッピーディスク上のファイルされたデータはホストコンピュータ上のデータのバックアップとなる．

3．システムの機能

試験管理　一般毒性試験システム[2]で作成されたプロトコールに基づき，試験番号，試験名，被験物質名，群数，匹数，群名，担当者名等の試験情報やランダムに配置された動物番号と群との対応データの転送を行うとともに死亡動物，途中解剖動物の動物番号および動物個体の初期体重，最終体重の転送も行う．また，組織所見入力で検査する臓器をあらかじめ絞って登録しておくプロ

*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
**同毒性部薬理研究科

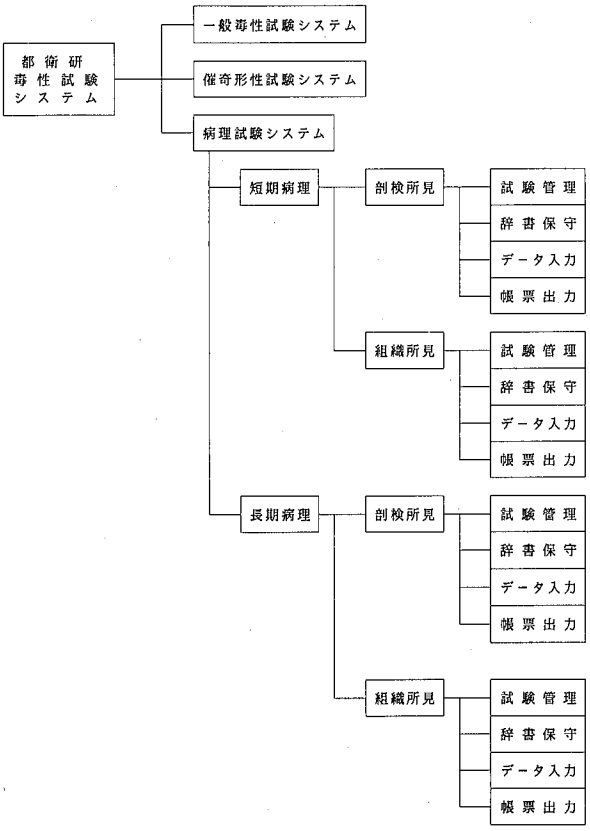


図1．プログラムの構成

トコール臓器の登録も行う．

病理辞書保守　臓器(臓器辞書)および剖検所見，組織所見(所見辞書)の登録，修正を行う．臓器では和名と英名の，所見では和名，英名に略名の登録を行う．また，1つの臓器で観察する所見は限られており，この限られた所見を臓器ごとに登録する臓器所見辞書の作成も行う．辞書の内容例を図2-3に示した．

所見データ入力　剖検所見，組織所見の観察データをキーボードより入力する．動物番号，臓器を選択した後，所見の選択入力を行い，グレード，色，形状，位置等を備考として入力する．任意の文字例をコメントとして入力することもできる．なお，組織所見入力時には剖検所見の内容を画面上で参照することが可能である．

入力にはテンキーを使用することとし，画面にキーに対応する動物番号，臓器，所見等を表示し，該当するテンキーを入力することによって簡単にデータを入力することができる．

帳票出力　入力されたデータの統計演算および出力を行う．短期病理剖検所見では動物番号別，臓器別，所見別出力と総括表を和文で，組織所見では個体別出力と個別表，総括表を和文と英文で出力される．個体別出力では剖検所見の内容も併せて出力される．長期病理では剖検所見，組織所見ともに個体別表，所見別表，所見別頻度表が和文と英文でそれぞれ出力される．帳票の出力例を図4-15に示した．

システムの効果と問題点

コンピュータは膨大な情報を収集し，それを演算，整理しかつ必要なときにそれを引き出すという情報処理機能において大きな力を発揮する．コンピュータを導入した毒性試験システムでは，各実験者が何らかの形で端末装置に接するため，簡単にそれらが使えなければならない．そこで一般毒性試験，催奇形性試験[2)]での運用の実積を踏まえ，本システムの作成を検討した．

①パーソナルコンピュータ用ソフトで多用されている対話形式を引続き採用した．実験者はメニュー画面から処理を選択し，画面に表示された指示に基づいて作業を進めることができる．

②入力はマウス，ライトペンの使用を取りやめ，キーボード，主にテンキーで行うこととした．実験者が端末のキーボード操作に慣れてきたため，キーボードでの入力の方が早いこと，またマウスについては操作する場所が必要になるなどの理由による．

③プログラム言語は本システムでもBASICインタプリタを用いた．処理速度が遅いことについては，ディスクに対する入出力を除いて通常の運用では特に問題になるような点はなかった．そこでこのことを改善するためにファイルの形式をランダムファイルにすることとした．

BASIC(インタプリタ)は新たな処理が必要になった場合や現在のプログラムに変更が生じた場合，容易に対処できるため今回も採用した．今後は他機種への移植あるいはミニコンピュータの利用も考えられるところから汎用性のある言語の採用も必要になると思われる．

結　　語

パーソナルコンピュータによるLANを構築し，短期および長期病理試験システムの開発を行った．病理試験のデータ処理をコンピュータ化した例は少なく，辞書に登録した所見の表現やデータの集計方法など不十分な点がいくつか残されている．今後これらに対して検討を続け，機器やプログラムの追加，修正が順次なされ，毒性試験システム全体の機能が発揮されれば毒性研究の発展にさらに寄与するものと期待している．

謝辞：本システムのプログラム作成に多大な援助を頂いた㈲ヒューマンライフに深謝します．

病理所見一覧表（組　織）

試験番号：0002
日付　　：89/06/08　　PAGE 1

（所見 CODE）所見略名

(1)再疎通	(51)細網細胞過形成	(101)筋萎縮	(151)肝細胞腫脹
(2)血管狭窄	(52)肥満細胞過形成	(102)腺上皮過形成	(152)肝細胞硝子的変化
(3)血管周囲炎	(53)褐色色素沈着	(103)舌炎	(153)類同拡張
(4)細胞浸潤	(54)膿瘍	(104)顆粒状膨大部萎	(154)肝細胞褐色色素
(5)全身性骨硬化症	(55)上皮性細網細胞	(105)腺上皮萎縮	(155)星細胞褐色色素
(6)全身性石灰沈着	(56)洞内リンパ球系	(106)腺上皮変性	(156)小肉芽腫
(7)尿路系炎症	(57)のう胞	(107)腺上皮空胞化	(157)総胆管上皮化形
(8)副生殖腺炎	(58)コレステリン	(108)顎下腺炎	(158)胆管上皮過形成
(9)全身性造血亢進	(59)ろ胞萎縮	(109)腺腔拡張	(159)胆管拡張
(10)アミロイド症	(60)洞拡張	(110)導管拡張	(160)胆管炎
(11)全身性動脈炎	(61)骨髄球系細胞集	(111)舌下腺炎	(161)間質褐色色素沈着
(12)心筋変性	(62)洞内泡沫細胞集	(112)耳下腺炎	(162)胆管増生
(13)心筋壊死	(63)リンパ腺炎	(113)腺管増生	(163)間質線維化
(14)心筋萎縮・線維	(64)形質細胞過形成	(114)導管増生	(164)被膜線維化
(15)心筋石灰化	(65)うっ血（充血）	(115)線維増生	(165)総胆管炎
(16)心筋線維空胞化	(66)単核細胞浸潤	(116)食道炎	(166)被膜炎
(17)心筋炎	(67)萎縮	(117)腔拡張	(167)総胆管腔拡張

登録所見リスト（組　織）

試験番号：0002
日付　　：89/06/08　　PAGE 1

登録番号	所見 CODE	正式名称 英語名称	（略名）
434	(434)	骨肉腫 Osteosarcoma	(骨肉腫)
435	(435)	軟骨肉腫 Chondrosarcoma	(軟骨肉腫)
436	(436)	悪性神経鞘腫 Malignant shcwannoma	(悪性神経鞘腫)
437	(437)	神経性維肉腫 Neurofibrosarcoma	(神経性維肉腫)
438	(438)	悪性組織球腫 Nalignant histiocytoma	(悪性組織球腫)
439	(439)	悪性線維性組織球腫 Malignant fibrous histiocytoma	(悪性線維性組織)
440	(440)	悪性リンパ腫（リンパ球型） Profileration of malignant Iymphoma cells（lymphocy	(悪性リンパ腫リ)
441	(441)	悪性リンパ腫（組織球型） Proliferation of malignant lymphoma cells（histiocy	(悪性リンパ腫組)
442	(442)	悪性リンパ腫（混合型） Proliferation of malignant lymphoma cells（mixed）	(悪性リンパ腫混)
443	(443)	悪性リンパ腫（未分化型） Proliferation of malignant lymphoma cells	(悪性リンパ腫未)

図２．辞書の内容例(1)

登録臓器リスト（組　織）

試験番号：0002
日付　　：89/06/08　　PAGE 1

登録番号	臓器名	英語名称
1	心臓	Heart
2	大動脈	Aorta
3	骨髄（大骨髄）	Bone marrow（femur）
4	骨髄（胸骨）	Bone marrow（sternum）
5	骨髄（推骨）	Bone marrow（vertebra）
6	骨髄（全身）	Bone marrow（whole）
7	胸腺	Thymus
8	リンパ節（頚部）	Lymph node（cervical）
9	リンパ節（腸間膜）	Lymph node（mesenteric）
10	リンパ節	Lymph node
11	リンパ節（全身）	Lymph node（all）
12	リンパ節（近傍）	Lymph node（neighbor）
13	脾臓	Spleen
14	鼻腔	Nasal cavity
15	副鼻腔	Paranasal sinus

臓器別所見リスト（組　織）

試験番号　0002
日付　89/06/08
臓器 CODE　40
臓器名（和）腎臓
　　（英）Kidney

（所見 CODE）所見略名

(1)石灰沈着	(5)初期慢性腎症	(9)尿細管上皮過形	(13)尿細管萎縮
(2)線維化	(6)慢性腎症	(10)尿細管上皮壊死	(14)皮質のう胞
(3)壊死	(7)近位尿細管上皮	(11)尿細管上空胞化	(15)髄質のう胞
(4)うっ血（充血）	(8)尿細管上皮腫大	(12)尿細管拡張	(16)尿円柱
(17)糸球体硬化症	(21)アミロイド腎症	(25)線維腫	(29)血管平滑筋腫
(18)糸球体メサンギ	(22)腎盂炎・腎盂腎	(26)脂肪腫	(30)リンパ管腫
(19)ボーマンのう拡	(23)のう胞腎	(27)血管腫	(31)正滑筋腫
(20)糸球体アミロイ	(24)腎結石	(28)血管周皮腫	(32)横紋筋腫
(33)骨腫	(37)組織球腫	(41)乳頭腫	(45)線維肉腫

図３．辞書の内容例(2)

剖検所見（動物番号指定）

試験番号　0002
被験物質　TEST－M
試験系（性別）Rat（雄）
系統　F 344/DuCrj
投与経路　経口　餌

動物番号	臓器	所　見	備　考
3010	肺	出血点	右葉
3015	肺	うっ血（充血）	
	肝臓	黄色化	
3016	肺	うっ血（充血）	
	肝臓	暗調化	
3003	肺	うっ血（充血）	
3020	脾臓	黒色化	
3042	肝臓	黄色化	
3019	肺	出血点	
3052	脾臓	暗調化	
3013	腎臓	出血	右
3018	脾臓	暗調化	
	腎臓	結石	左
3045	脾臓	暗調化	
3007	肺	うっ血（充血）	
	腎臓	出血点	
3036	肺	気腫	外側左葉
3041	脾臓	暗調化	
3054	脾臓	硬化	
	肺	粘膜出血点	内側右葉・点状
3061	心臓	心室壁肥厚	
3064	肝臓	黄色化	
3001	腎臓	結節	右
3029	肺	出血点	外側右葉
	肝臓	黄色化	
3040	腎臓	結石	左右
	肝臓	黄色化	
3048	肺	うっ血（充血）	
	肝臓	黄色化	
3056	脾臓	暗調化	
	腎臓	出血	右
	肝臓	暗調化	
3068	肺	出血点	

[1]

図4．動物番号別剖検所見出力例

剖検所見（臓器指定　その1）

試験番号　0003
試験物質　TEST－K
試験系（性別）Rat（雄）
系統　F 344/DuCrj
投与経路　強制経口

動物番号	臓器	所　見	備　考
心臓	3061	心室壁肥厚	
脾臓	3020	黒色化	
	3018	暗調化	
	3045	暗調化	
	3041	暗調化	
	3054	硬化	
肺	3010	出血点	内側右葉
	3005	うっ血（充血）	
	3031	出血点	外側左葉
	3065	うっ血（充血）	
	3036	気腫	外側左葉
	3054	粘膜出血点	内側右葉・点状
	3029	出血点	外側右葉
	3048	うっ血（充血）	
	3068	出血点	
腎臓	3067	出血点	左
	3013	出血	右
	3018	結石	左
	3001	結節	右
	3040	結石	左右
	3056	出血	右
肝臓	3015	黄色化	
	3016	暗調化	
	3040	黄色化	
	3048	黄色化	
	3056	暗調化	

[1]

図5．臓器別剖検所見出力例

剖検所見（臓器指定　その２）

試験番号　0002
被験物質　TEST－M
試験系（性別）Rat（雄）
系統　F 344/DuCrj
投与経路　経口　餌

動物番号	臓器	所　見	備　考
心臓	心室壁肥厚	3061	
脾臓	黒色化	3020	
	暗調化	3018	
		3045	
		3041	
	硬化	3054	
肺	出血点	3010	内側右葉
		3031	
		3029	外側右葉
		3068	
	粘膜出血点	3054	内側右葉・点状
	うっ血（充血）	3005	
		3065	
		3048	
	気腫	3036	外側左葉
腎臓	出血	3013	右
		3056	右
	出血点	3067	左
	結石	3018	左
		3040	左右
	結節	3001	右
肝臓	暗調化	3016	
		3056	
	黄色化	3015	
		3040	
		3048	

[1]

図６．臓器別剖検所見出力例

剖検所見（所見指定）

試験番号　0003
被験物質　TEST－K
試験系（性別）Rat（雄）
系統　F 344/DuCrj
投与経路　強制経口

動物番号	臓器	所　見	備　考
出血	腎臓	3013	右
		3056	右
出血点	肺	3010	内側右葉
		3031	
		3029	外側右葉
		3068	
	腎臓	3067	左
粘膜出血点	肺	3054	内側右葉・点状
うっ血（充血）	肺	3005	
		3065	
		3048	
気腫	肺	3036	外側左葉
黒色化	脾臓	3020	
暗調化	脾臓	3052	
		3018	
		3045	
		3041	
	肝臓	3016	
		3056	
黄色化	肝臓	3015	
		3040	
		3048	
肥大	肝臓	3068	
心室壁肥厚	心臓	3061	
結石	腎臓	3018	左
		3040	左右

[1]

図７．所見別剖検所見出力例

病理剖検所見総括表

試験番号 0005
被験物質 TEST－L
試験系（性別）Rat（雄）
系統 F 344/DuCrj
投与経路経口 餌

所見	GROUP 1 N＝10	GROUP 2 N＝10	GROUP 3 N＝10	GROUP 4 N＝10	GROUP 5 N＝10	GROUP 6 N＝10	GROUP 7 N＝10
心臓							
心室壁肥厚	0	0	0	0	0	1	0
脾臓							
黒色化	0	0	1	0	0	0	0
暗調化	0	0	0	1	2	1	1
硬化	0	0	0	0	0	1	0
肺							
出血点	1	1	0	1	0	0	2
粘膜出血点	0	0	0	0	0	1	0
うっ血（充血）	0	4	2	1	1	1	1
気腫	0	0	0	0	0	1	0
腎臓							
出血	0	0	0	0	1	0	1
出血点	0	0	0	1	0	1	0
結石	0	0	0	0	1	0	1
結節	0	0	0	0	0	0	1
肝臓							
暗調化	0	1	0	0	0	0	1
黄色化	0	1	1	0	0	1	4
肥大	0	0	0	0	0	0	1

図８．剖検所見総括表出力例

病理剖検，組織所見（動物番号指定）

試験番号 0007
被験物質 TEST－M
試験系（性別）Rat（雄）
系統 F 344/DuCrj
投与経路 経口 餌
群名称 GROUP 7

動物番号	剖検 臓器	剖検 所見	剖検 備考	組織 臓器	組織 所見	組織 備考
3029	肺	：出血点	外側右葉	肺	：出血	（－）
	肝臓	：黄色化			：線維化	（＋＋）
					：壊死	（＋＋）
					：うっ血（充血）	（－）
				肝臓	：細胞浸潤	（－）
					：壊死	（－）
					：肝細胞萎縮	（－）
					：肝細肪空胞変性	（－）
3040	肝臓	：黄色化		肺	：出血	（－）
	腎臓	：結石	左右		：線維化	（－）
					：壊死	（－）
					：うっ血（充血）	（－）
				肝臓	：細胞浸潤	（－）
					：壊死	（－）
					：肝細胞萎縮	（－）
					：肝細肪空胞変性	（＋）
					：間質褐色色素沈	（－）
					：肝細胞癌	（＋）
				腎臓	：壊死	（－）
					：うっ血（充血）	（－）
					：近位尿細管上皮	（－）
					：腎結石	（－）
3048	肺	：うっ血（充血）		肺	：出血	（－）
	肝臓	：黄色化			：線維化	（＋＋）
					：壊死	（－）
					：うっ血（充血）	（－）
				肝臓	：細胞浸潤	（－）
					：壊死	（－）
					：肝細胞萎縮	（＋＋）
					：肝細肪空胞変性	（－）
					：間質褐色色素沈	（＋）
					：肝細胞癌	（－）
				腎臓	：壊死	（－）
					：うっ血（充血）	（＋）

入力担当者：　　入力担当者：
確認　：　　確認　：

図９．組織所見個体別表出力例（和文）

付表　　病理組織所見個別表

試験番号　0002
被験物質　TEST－M
試験系（性別）Rat（雄）
系統　F 344/DuCrj
投与経路　経口　餌
群名称　GROUP 7

所見	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
肺										
出血	－	－	－	－	－	－	－	－	－	?
線維化	＋	＋	－	＋	＋＋	－	＋＋	±	±	?
壊死	－	－	＋	＋	＋＋	－	－	±	＋	?
うっ血（充血）	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	?
肝臓										
細胞浸潤										
壊死										
肝細胞萎縮										
肝細胞空胞変性										
間質褐色色素沈着										
肝細胞癌										
腎臓										
壊死	－	－	－	＋	＋	－	－	－	－	*
うっ血（充血）	－	－	－	－	－	－	＋	－	±	*
近位尿細管上皮褐色色素沈	± a	＋	＋＋	－	－	－	－	＋	－	*
腎結石	－ a	－	－	－	－	－	＋	－	－	*

－：著変なし　±：ごく軽度な変化　＋：軽度な変化　＋＋：中等度な変化　＋＋＋：高度な変化
?：判定不能
*：組織なし
a：備考記入

1：3001　2：3002　3：3006　4：3024　5：3029
6：3040　7：3048　8：3056　9：3058　10：3068

図10. 組織所見個別表出力例（和文）

病理組織所見総括表

試験番号　0009
被験物質　TEST－M
試験系（性別）Rat（雄）
系統　F 344/DuCrj
投与経路　経口　餌

所見	GROUP 1					GROUP 2					GROUP 3					GROUP 4					GROUP 5				
	－	±	＋	＋＋	＋＋＋	－	±	＋	＋＋	＋＋＋	－	±	＋	＋＋	＋＋＋	－	±	＋	＋＋	＋＋＋	－	±	＋	＋＋	＋＋＋
肺																									
出血	9	1	0	0	0	9	1	0	0	0	9	0	1	0	0	8	1	1	0	0	10	0	0	0	0
線維化	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	8	0	2	0	0
壊死	10	0	0	0	0	9	1	0	0	0	9	1	0	0	0	9	0	1	0	0	9	1	0	0	0
うっ血（充血）	9	1	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	7	2	1	0	0	7	1	2	0	0
肝臓																									
細胞浸潤	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
壊死	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
肝細胞萎縮	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	9	0	0	0	0	10	0	0	0	0
肝細胞空胞変性	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
間質褐色色素沈着	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
肝細胞癌	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
腎臓																									
壊死	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	9	1	0	0	0	10	0	0	0	0	9	1	0	0	0
うっ血（充血）	10	0	0	0	0	9	1	0	0	0	9	1	0	0	0	9	1	0	0	0	8	2	0	0	0
近位尿細管上皮褐色色素沈着	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
腎結石	9	0	1	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0

－；著変なし　±；ごく軽度な変化　＋；軽度な変化　＋＋；中等度な変化　＋＋＋；高度な変化

図11. 組織所見総括表出力例（和文）

Necropsy, Histopathological Finding per Animal

Study no. 0006
Medicin TEST－M
Animal species (Sex) Rat (Male)
Strain F 344/DuCrj
Path Diet
Group name GROUP 7

Animal. no	Necropsy FINDINGS	Necropsy COMMENT	Histo FINDINGS	Histo COMMENT
3029	Lung		Lung	
	Petechia		Hemorrhage	(－)
	Liver		Fibrosis	(＋＋)
	Yellow in color		Necrosis	(＋＋)
			Congestion	(－)
			Liver	
			Cell infiltration	(－)
			Necrosis	(－)
			Hepatocellular atrophy	(－)
			Interstitial brown pigment	(－)
			Hepatocellular carcinoma	(－)
			Kidney	
			Necrosis	(＋)
			Congestion	(－)
			Increased brown pigment	(－)
			Nephrolithus	(－)
3048	Lung		Lung	
	Congestion		Hemorrhage	(－)
	Liver		Fibrosis	(＋＋)
	Yellow in color		Necrosis	(－)
			Congestion	(－)
			liver	
			cell infiltration	(－)
			Necrosis	(－)
			Hepatocellular atrophy	(＋＋)
			Interstitial brown pigment	(＋)
			Hepatocellular carcinoma	(－)
			Kidney	
			Necrosis	(－)
			Congestion	(＋)
			Increased brown pigment	(－)
			Nephrolithus	(＋)

図12. 組織所見個体別表出力例（英文）

Appendix table Histopathological indivisual table of findings

Study no. 0004
Medicin TEST－K
Animal species (Sex) Rat (Male)
Strain F 344/DuCrj
Path Diet
Gropu name GROUP 5
Findings

所見	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Lung										
Hemorrhage	－	－	－	－	－	－	－	－	－	?
Fibrosis	＋	＋	－	＋	＋＋	－	＋＋	±	±	?
Necrosis	－	－	＋	＋	＋＋	－	－	±	＋	?
Congestion	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	?
Liver										
Cell infiltration	－	±	－	－	－	－	－	－	±	±
Necrosis	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
Hepatocellular atrophy	＋	－	－	－	－	－	＋＋	－	－	＋
Interstitial brown pigment depositio	－	＋	－	－	－	－	＋	＋	－	－
Hepatocellular carcinoma	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－
Kidney										
Necrosis	－	－	－	＋	＋	－	－	－	－	*
Congestion	－	－	－	－	－	－	＋	－	±	*
Increased brown pigment deposition	± b	＋	＋＋	－	－	－	－	＋	－	*
Nephrolithus	－ a	－	－	－	－	－	＋	－	－	*

NORMAL ORGANS :
－ : Normal ± : Minimal ＋ : Slight ＋＋ : Moderate ＋＋＋ : Marked
? : Not available
* : Not in section
a : comment
b : comment

1 : 3001 2 : 3002 3 : 3006 4 : 3024 5 : 3029 6 : 3040
7 : 3048 8 : 3056 9 : 3058 10 : 3068

図13. 組織所見個別表出力例（英文）

Histopathological summurized table

Study no. 0002
Medicin TEST－M
Animal species (Sex) Rat (Male)
Strain F 344/DuCrj
Path Diet

Findings	GROUP 1					GROUP 2					GROUP 3					GROUP 4					GROUP 5				
	－	±	＋	＋＋	＋＋＋	－	±	＋	＋＋	＋＋＋	－	±	＋	＋＋	＋＋＋	－	±	＋	＋＋	＋＋＋	－	±	＋	＋＋	＋＋＋
Lung																									
Hemorrhage	9	1	0	0	0	9	1	0	0	0	9	0	1	0	0	8	1	1	0	0	10	0	0	0	0
Fibrosis	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	8	0	2	0	0
Necrosis	10	0	0	0	0	9	1	0	0	0	9	1	0	0	0	9	0	1	0	0	9	1	0	0	0
Congestion	9	1	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	7	2	1	0	0	7	1	2	0	0
Liver																									
Cell infiltration	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	8	1	2	0	0
Necrosis	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	9	1	0	0	0	10	0	0	0	0
Hepatocellular atrophy	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	9	0	1	0	0
Interstitial brown pigment depositio	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	7	0	1	1	0
Hepatocellular carcinoma	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Kidney																									
Necrosis	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	9	1	0	0	0	10	0	0	0	0	9	1	0	0	0
Congestion	10	0	0	0	0	9	1	0	0	0	9	1	0	0	0	9	1	0	0	0	8	2	0	0	0
Increased brown pigment deposition	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
Nephrolithus	9	0	1	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0

－：Normal　±：Minimal　＋：Slight　＋＋：Moderate　＋＋＋：Marked

図14. 組織所見総括表出力例（英文）

文　献

1）中川好男，福田向江，市川久次，藤井　孝，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，25，517-525，1974.

2）神谷信行，中川好男，三栗谷久敏，市川久次，佐々木美枝子：東京衛研年報，38，438-443，1987.

3）神谷信行，三栗谷久敏，中川好男，中野雅行，市川久次，佐々木美枝子：東京都衛生局学会誌，79，242-243，1987.

著書及び他誌発表

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1988.7—1989.6)

著　　書

Ohashi, M. : **Typhoid fever**, *In* Balows, A., Hausler, W. J. Jr., Ohashi, M. and Turano, A. (eds.), *Laboratory diagnosis of infectious diseases, principle and practice*, vol. 1, 525-532, 1988, Springer-Verlag, New York.

Kudoh, Y. : **Vibrioses other than cholera**, *In* Balows, A., Hausler, W., J., Jr., Ohashi, M. and Turano, A. (eds.), *Laboratory diagnosis of infectious diseases, principle and practice*, vol. 1, 533-539, 1988, Springer-Verlag, New York.

Ohashi, M. : **A new horizon for cholera control**, *In* Takeda, Y. and Kuwahara, S. (eds.), *Vibrio cholerae and cholera*, 47-56, 1988, KTK Scientific Publishers, Tokyo.

工藤泰雄：**食中毒細菌**，斉藤行生，豊田正武，山口迪夫編，**講座・簡明栄養学必携，第6巻食品衛生学，食品加工学**，19-23，1988，技術出版KK，東京.

工藤泰雄：**消化器系伝染病**，斉藤行生，豊田正武，山口廸夫編，**講座・簡明栄養学必携，第6巻食品衛生学，食品加工学**，46-48，1988，技術出版KK，東京.

太田建爾：**滅菌および消毒**，斎藤行生，豊田正武，山口廸夫編，**講座・簡明栄養学必携，第6巻食品衛生学，食品加工学**，81-85，1988，技術出版KK，東京.

太田建爾：**飲料水検査**，斎藤行生，豊田正武，山口廸夫編，**講座・簡明栄養学必携，第6巻食品衛生学，食品加工学**，130-132，1988，技術出版KK，東京.

安東民衛：**ワクチンの分子設計**，三浦謹一郎編，**タンパク質工学**，172-193，1988，啓学出版，東京.

松本昌雄：**細菌性食中毒**，日本包装技術協会編（刊），**食品包装便覧**，85-90，1988，東京.

丸山　務：**エルシニア**，春田三佐夫，細貝裕太郎，宇田川俊一編，**目で見る食品衛生検査法**，40-41，1989，中央法規出版，東京.

小久保彌太郎：**汚染指標菌ほか**，春田三佐夫，細貝裕太郎，宇田川俊一編，**目で見る食品衛生検査法**，1989，中央法規出版，東京.

Kamimura, H. : **Removal of mycotoxins during food processing**, *In* Natori, S., Hashimoto, K. and Ueno, Y. (eds.). ***Mycotoxins and Phycotoxins '88***, 169-176, 1989, Elsevier, Amsterdam.

倉科周介：**エイズ外史**，丸山工作編，**ノーベル賞ゲーム**，127-147，1988，岩波書店，東京.

吉川　翠，芦沢　達，山田雄士：**ダニ・カビ・結露**，1989，井上書院，東京.

吉川　翠，館野幸治，高岡正敏，水谷　澄，松尾大邑：**ダニ汚染の実態と最新防止法**，1988，日本技術経済センター，東京.

吉川　翠：**最近問題になったダニ・昆虫類とその防御**，日本家屋害虫学会編，**家屋害虫**，302-338，1988，井上書院，東京.

伊藤　武：**食中毒ほか**，春田三佐夫，細貝祐太郎，宇田川俊一編，**目で見る食品衛生検査法**，1989，中央法規出版，東京.

伊藤　武：カンピロバクター腸炎，三輪谷俊夫編，医学細菌学，4巻，139-164，1989，菜根出版，東京.

Itoh, T., Shingaki, M., Ohashi, M. and Hamana, G. : **Human antibody response to the urease of *Campylobacter pylori* in the patients with gastritis and peptic ulcers,** *In* Takemoto, W., Kawai, K. and Shimoyama, T. (eds.), *Campylobacter pylori and gastroduodenal diseases*, vol. 1, 112-115, 1989, Organizing committee of Tokyo International Symposium on *Campylobacter pylori*, Tokyo.

他誌発表論文

Kai, A., Lambert, M. A. and Moss, C. W. : **Cellular fatty acid composition and isoprenoid quinone content of *Vibrio cholerae* and related vibrios.** (Kuwahara, S. and Piece, N. F. eds.), *Advances in Research on Cholera and Related Diarrheas*, 4, 45-55, 1988.

Kudoh, Y., Matsushita, S., Ohashi, M., Phan-Urai, R. and Supawat, K. : **O/129 resistance and R plasmids in *Vibrio cholerae* O-1 isolated from human sources.** (Kuwahara, S. and Pierce, N. F. eds.), *Advances in Research on Cholera and Related Diarrheas*, 4, 95-102, 1988.

Yamada, S., Matsushita, S., Kudoh, Y. and Ohashi, M. : **Purification and characterization of hemolysin produced by *Vibrio fluvialis*.** (Kuwahara, S. and Pierce, N. F. eds.), *Advances in Research on Cholera and Related Diarrheas*, 4, 111-121, 1988.

Itoh, T., Kai, A., Saito, K., Yanagawa, Y., Inaba, M., Takahashi, M., Kudoh, Y., Yamada, S., Matsushita, S., Terayama, T. and Ohashi, M. : **Gastroenteritis due to cytotoxin-producing *Escherichia coli* O145:H-,** (Kuwahara, S. and Pierce, N. F. eds.), *Advances in Research on Cholera and Related Diarrheas*, 5, 21-28, 1988.

Kudoh, Y., Matsushita, S., Yamada, S., Ohashi, M., Itoh, K., Nakamura, A. and Watanabe, H. : **Identification of enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and bioserological characterization of EIEC isolates.** (Kuwahara, S. and Pierce, N. F. eds.), *Advances in Research on Cholera and Related Diarrheas*,6, 121-128, 1988.

Fujikawa, H. and Igarashi, H. : **Rapid latex agglutination test for detection of staphylococcal enterotoxins A to E that uses high-density latex particles,** *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2345-2348, 1988.

諸角　聖，和宇慶朝昭，一言　広，工藤泰雄：トリコテセン系カビ毒産生用合成培地の検討，食品と微生物，5，131-136，1988.

Igarashi, H., Fujikawa, H. and Usami, H. : **Effects of drugs on the pyrogenicity of toxic shock syndrome toxin 1 and its capacity of enhance susceptibility to the lethal effects of endotoxic shock in rabbits,** *Rev. Infect. Dis.*, 11, Suppl, 1, S210-S213, 1989.

Igarashi, H., Fujikawa, H. and Ushioda, H. : **Studies on *Staphylococcus aurueus* isolated from patients with suspected or confirmed toxic shock syndrome in Japan,** *Rev. Infect. Dis.*, 11, Suppl. 1, S326, 1989.

Uchiyama, T., Kamagata, Y., Yan, X-J., Kawachi, A., Fujikawa, H., Igarashi, H. and Okubo, M. : **Relative strength of the mitogenic and interleukin-2-production-inducing activities of staphylococcal exotoxins presumed to be causative exotoxins of toxic shock syndrome : toxic shock syndrome toxin-1 and enterotoxins A, B, and C to murine and human T cells,** *Clin. Exp. Immunol.*, 75(3), 239-244, 1989.

Fujikawa, H., Takayama, H., Uchiyama, T. and Igarashi, H. : **Bindings of toxic shock syndrome toxin-1 and staphylococcal enterotoxins A, B, and C to rabbit spleen cells,** *Microbiol. Immunol.*, 33 (5), 381-390, 1989.

楠　淳，伊藤　武：**食肉からのサルモネラ検出のためのBio-EnzaBead酵素抗体法の評価**，JARMAM，1 (2), 191-199，1989.

堀内三吉，稲垣好雄，中谷林太郎，後藤延一，吉田洋子，楠　淳，伊藤　武，大橋　誠：**東京都で1966～1986年にヒトから分離されたサルモネラの血清型，薬剤耐性，および接合性Rプラスミド**，感染症雑誌，63, 352-362，1989.

松下　秀，山田澄夫，工藤泰雄，大橋　誠：**海外旅行者下痢症由来組織侵入性大腸菌O29：H-について**，感染症学雑誌，63，228-233，1989.

児玉博英，林美千代，刑部陽宅，安井伊津子，柏木義勝，遠藤美代子：**富山県における溶血レンサ球菌の推移ーA群3型（1985）から再びA群12型（1986）へー**，感染症学雑誌，62，878-885，1988.

伊藤忠彦，山崎　清，中村清純，新開敬行，寺山　武，薮内　清，大橋　誠，松井孝輔：**東京都多摩地区で感染発病したツツガ虫病の一症例**，感染症学雑誌，62，753-759，1988.

伊藤忠彦，山崎　清，中村清純，新開敬行，坂井冨士子，寺山　武，薮内　清，大橋　誠：**東京都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**，感染症学雑誌，62，811-817，1988.

伊藤忠彦，寺山　武，薮内　清，山上哲史，杉山公宏，磯田政恵，石崎良太郎：**ツツガ虫病リケッチアの病原性に関する研究（古典的および軽症型ツツガ虫病由来*Rickettsia tsutsugamushi*のマウス感染におけるVirulenceの比較検討）**，日本獣医蓄産大学研究報告，34，54-63，1988.

Sekine, S., Okada, S., Hayashi, Y., Ando, T., Terayama, T., Yabuuchi, K., Miki, T. and Ohashi, M.: **Prevalence of Small Structured Virus Infection in Acute Gastroenteritis Outbreaks in Tokyo,** *Microbiology and Immunology*, 33(3), 207-217, 1989.

Sekine, H., Fuse, A., Inaba, N., Takamizawa, H. and Shimizu, B. : **Detection of the Human Papillomavirus 6bE2 Gene Product in Genital Condyloma and Laryngeal Papilloma Tissues,** *Virology*, 170, 92-98, 1989.

浅水哲也，秋山和幸，安田一郎：**エビスグサの毛状根培養とAnthraquinone類の生産**，薬学雑誌，108, 1215-1218，1988.

安田一郎，村田以和夫：**寄生虫症に有効な和漢薬の研究（第1報），安中散に含まれるアニサキスⅠ型幼虫運動抑制物質**，和漢医薬学会誌，5，548-549，1988.

鎌田国広，大貫奈穂美，秋山和幸，道口正雄：**振動式密度計法による医薬品の比重測定法について**，医薬品研究，20，674-678，1989.

萩原輝彦，中山京子，秋山和幸，道口正雄：**ジゴキシン錠の溶出試験・水溶出ーHPLCの試み**，医薬品研究，20，679-684，1989.

上原真一，高橋美佐子，秋山和幸，道口正雄：**光学活性なシフト試薬を用いた^{1}H-NMRによるカンフルの光学純度測定**，医薬品研究，20，685-688，1989.

Uehara, S., Yasuda, I., Takeya, K. and Itokawa, H. : **New Bisabolane sesquiterpenoids from the rhizomes of *Curcuma xanthorrhiza* (Zingiberaceae),** *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 237-240, 1989.

Suzuki, S., Nakamura, Y., Kaneko, M., Mori, K. and Watanabe, Y.: **Analysis of benzalkonium chlorides by gas chromatography,** *J. Chromatogr.*, 463, 188-191, 1989.

中村　弘，観　照雄，岸本清子，池田一夫，雨宮　敬，伊藤弘一，渡辺四男也：**ガスクロマトグラフィー及びマススペクトロメトリーによる化粧品中のアロエ成分の確認と定量**，衛生化学，35，219-225，1989.

Fukushima, H., Maruyama, K., Omori, I. and Kaneko, S. : **Isolation of sucrose-negative *Yersinia enterocolitica* biotype 3 serotype 03 strains and their pathogenicity,** *Curr. Microbiol.*, 17, 199-202, 1988.

Fukushima, H., Gomyoda, M., Shiozawa, K., Kaneko, S. and Tsubokura, M. : ***Yersinia pseudotuberculosis* infection contracted through water contaminated by a wild animal,** *J. Clin. Microbiol.*, 26, 584-585, 1988.

Shibuya, H., Ando, M., Naoe, S. and Maruyama, T. : **Fetal *Yersinia enterocolitica* septicemia complicated by unique hemosiderosis a case report,** *Acta Pathol. Jpn.*, 38, 1461-1479, 1988.

Nakano, T., Kawaguchi, H. and Maruyama, M. : **Two outbreaks of *Yersinia pseudotuberculosis* 5a infection in Japan,** *Scand. J. Infect. Dis.*, 21, 175-179, 1989.

Kaneko, S. and Maruyama, T. : **Evaluation of enzyme immuno assay for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains,** *J. Clin. Microbiol.*, 27, 748-751, 1989.

Tsubokura, M., Otsuki, K., Sato, K. and Maruyama, T. : **Special features of distribution of *Yersinia pseudotuberculosis* in Japan,** *J. Clin. Microbiol.*, 27, 790-791, 1989.

Tabata, S. and Kamimura, H. : **A survey of aflatoxin contamination in Tokyo's commercial foods and foodstuffs,** *Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology*, Suppl. 1, 63-64, 1988.

Ichinoe, M., Kamimura, H., Koizumi, S. and Kato, H.: **Pathogenicity and mycotoxigenicity of *Fusarium* spp. in wheat,** *Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology*, Suppl. 1, 208-211, 1988.

中里光男，斉藤和夫，菊地洋子，井部明広，藤沼賢司，二島太一郎：**イオン対高速液体クロマトグラフィーによる柑橘類及びバナナ中のチアベンダゾール，ジフェニル及びオルトフェニルフェノールの分析**，衛生化学，34，401-407，1988.

永山敏廣，真木俊夫，観　公子，飯田真美，田村行弘，二島太一郎：**市販茶中有機リン系農薬の残留実態と茶湯中への移行**，日本農薬学会誌，14，39-45，1989.

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：**清涼飲料水中のアセスルファムK，サッカリン及びアスパテームの同時分析法**，食品衛生学雑誌，30，164-169，1989.

平田恵子，大石充男，大西和夫，西島基弘：**酵素を用いた食品分析に関する研究(第1報)，食品中ホルムアルデヒドの簡易定量法**，衛生化学，34，555-559，1988.

Ogino, S., Fukumori, N., Yasuno, T., Koseki, M. and Kazama, M.: **Asbestos Fibers in Sake,** *J. Food Protect.*, 51, 737-739, 1988.

佐藤孝二，関比呂伸：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，応用鳥学集報，7, 65-69, 1987.

大井　玄，関比呂伸：ハトを指標とした東京都の鉛染汚の経年変化，医学のあゆみ，147, 119, 1988.

吉川　翠：ダニの検出法，算定法，アレルギーの臨床，98, 53-57, 1988.

吉川　翠：寝具とダニ，衣生活，5(10), 10-16, 1988.

吉川　翠：ツメダニは何故問題になるのか，東京ペストコントロール，16, 25-39, 1989.

Ubom, G. A. and Tsuchiya, Y. : **Determination of iodine in natural water by ion chromatography,** *Water Research*, 22, 1455-1458, 1988.

Tsuchiya, Y. and Matsumoto, A. : **Identification of volatile metabolites produced by blue-green algae,** *Water Sci. Tech.*, 20, 149-155, 1988.

Watanabe, M. F., Oishi, S., Harada, K., Matsuura, K., Kawai, H. and Suzuki, M.: **Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green algae),** *Toxicon*, 26, 1017-1025, 1988.

高橋保男，森田昌敏：水中の有機化合物に関する研究(第4報)水道原水及び水道水中の環状イオウ分子のイオウ(S_8)，水質汚濁研究，11, 710-714, 1988.

Takahashi, O. : **2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylene-2,5-cyclohexadienone (BHT-quinone methide) : an active metabolite of BHT causing haemorrhages in rats,** *Archives of Toxicology*, 62, 325-327, 1988.

Nakao, T., Sato, K., Nagai, F., Kano, I and Nakao, M. : **A monoclonal anti-horse kidney Na^+, K^+-ATPase antibody inhibiting ATP hydrolysis and Rb^+ transport and activating K^+-pNPPase activity,** *Energy Transduction in ATPase (Yamada Conference XI)*, 439-440, 1988.

Suzuki, H. and Suzuki, N. : **Mutagenicity of saccharin in a human cell strain,** *Mutation Research*, 209, 13-16, 1988.

Takahashi, O. : **Inhibition of phylloquinone epoxide reductase by BHT quinone methide, salicylic acid and α-Tocopherolquinone**, *Biochemical Pharmacology*, 37, 2857-2859, 1988.

Satoh, K., Nakao, T., Nagai, F., Kano, I., Nakagawa, A., Ushiyama, K., Urayama, O., Hara, Y. and Nakao, M. : **A monoclonal antibody against horse kidney (Na^++K^+)-ATPase inhibits sodium pump and E_2K to E_1 conversion of (Na^++K^+)-ATPase from outside of the cell membrane,** *Biochim. Biophs. Acta*, 994, 104-113, 1989.

Nakagawa, Y. and Tayama, K. : **Effect of buthionine sulfoximine on orthophenylphenol-induced hepato- and nephrotoxic potential in male rats,** *Archives of Toxicology*, 62, 452-457, 1988.

Nakagawa, Y. and Tayama, S. : **Formation of orthophenylphenol glutathion conjugates in the rat liver**, *Xenobiotica*, 19, 499-507, 1989.

Satoh, K., Nagai, F., Kano, I., Ushiyama, K., Hara, Y., Urayama, O., Nakao, M., and Nakao, T. : **A monoclonal antibody against horse kidney Na, K-ATPase**, *J. Pharmacobio-Dyn.*, 12, s-128, 1989.

Tayama, S., Kamiya K. and Nakagawa Y. : **Genotoxic effect of *o*-phenylphenol metabolites in CHO-K1 cells**, *Mutation Res.*, 223, 23-33, 1989.

Oishi, S. : **Enhancing effects of luteinizing hormone-releasing hormone on testicular damage induced by di(2-ethylhexyl) phthalate in rats**, *Toxicology Letter*, 47, 271-277, 1989.

Kano, I., Nagai, F., Satoh, K., Ushiyama, K., Nakao, T. and Kano, K. : **Structure of α_1 subunit of horse Na, K-ATPase gene**, *FEBS Lett.*, 250, 91-98, 1989.

Ogata, A., Fujitani, T., Yoneyama, M., Sasaki M. and Suzuki, K. : **Glutathione and cysteine enhance and diethylmaleate reduces thiabendazole teratogenicity in mice**, *Fd. Chem. Toxic.*, 27, 117-123, 1989.

伊藤　武，神真知子，鈴木敬子，入倉善久，榎田隆一，平田一郎，池島伸至，寺山　武，：***Campylobacter jejuni*** および ***Campylobacter coli*** の生存および増殖に及ぼす低 **pH** の影響について，食品と微生物，5(2)，137-143，1988.

伊藤　武，平田一郎，池島伸至，神真知子，入倉善久，寺山　武，楠　　淳：抗鞭毛多価抗体を感作したラテックス試薬 **"Serobact Salmonella"** によるサルモネラの迅速同定法の評価，最新検査，6，351-355，1989.

大橋　誠，伊藤　武，斎藤香彦，高橋正樹，新垣正夫，他：***Campylobacter jejuni/coli*** の血清型別に関する研究，全国レファレンス・システム設立の試行，感染症学雑誌，62，818-825，1988.

小野川尊，柿市徳英，鎌田信一，内田和夫，寺山　武：サルモネラ健康保菌者とカメの関係に関する調査，家畜衛生研究会報，25，11-16，1987.

能勢征子，平田一郎，新井輝義，西島基弘，坂井千三，宮崎利夫：民間伝承薬梅肉エキスの腸炎ビブリオに対する抗菌作用及びその有機酸組成，食品衛生学雑誌，29，402-407，1988.

福山正文，上村知雄，伊藤　武，村田元秀，光崎研一，原　元宣，田淵　清：運動性 ***Aeromonas*** 感染症に関する研究：河川土壌，河川水および淡水魚からの運動性 ***Aeromonas*** 属の分布状況，感染症学雑誌，63，565-574，1989.

Kaneuchi, C., Ashihara, M., Saito, K. and Itoh, T. : **Serogrouping of Thermophilic *Campylobacter* from Gulls by Slide Agglutination Based on Heat-labile Antigenic Factors.** *Jpn. J. Vet. Sci.* 51, 431-433, 1989.

Tada, Y., Yoneyama, M., Kabashima, J., Fujitani, T. and Nakano, M.: **Effects of Thiabendazole on the Kidneys of ICR Mice**, *Fd. Chem. Toxic.*, 27, 307-315, 1989.

総説・解説

工藤泰雄，大橋　誠：我が国における感染性腸炎の変遷，医学のあゆみ，147，419-422，1988.

Ohashi, M.：**Imporatance of laboratory findings in surveillance of infectious diseases,** *In Gastrointestinal Infections in Southeast Asia* (*V*), 1-9, 1988, SEAMIC, Tokyo.

Miyamura. K., Kato, N., Yamadera, S., Akatsuka, M., Yamashita, K., Nakamura, A., Kudoh, Y. and Ohashi, M. : **Epidemiological surveillance of gastrointestinal infections based on laboratory findings in Japan,** *In Gastrointestinal Infections in Southeast Asia* (*V*), 32-51, 1988, SEAMIC, Tokyo

Tsuno. M., Kudoh, Y. and Ohashi, M. : **Development of a computerized data-processing system for the use in Data-Exchange Progarm on infectious diseases. Southeast Asian Madical Information Center.,** *In Gestro intestinal Infections in Southeast Asia* (*V*), 135-142, 1988, SEAMIC, Tokyo.

大橋　誠：東南アジアにおける細菌性腸管感染症：東南アジア医療情報センター（SEAMIC）感染症データ交換事業の成果から，モダンメディア，34，438-453，1988.

五十嵐英夫：トキシックショック症候群，*Laboratory and Clinical Practice*, 6(2)，15-17，1988.

太田建爾：***Vibrio fluviaris*** と ***V. furnissii***，臨床と微生物，15，577-582，1988.

松下　秀，工藤泰雄：組織侵入性大腸菌の同定に有用とされる酵素抗体法（ELISA）について，モダンメディア，34，461-464，1988.

大橋　誠：明日の地方衛生研究所，衛生微生物検査におけるファレンス・サービス・システムの整備，公衆衛生，53(1)，47-50，1989.

太田建爾：輸入感染症，看護技術，35(11)，100，1989.

松下　秀：輸入大腸菌下痢症，日本臨床，47，40-44，1989.

甲斐明美，工藤泰雄：腸管出血性大腸菌（Vero 細胞毒素産生性大腸菌）とその診断について，モダンメディア，35，240-243，1989.

津野正朗，工藤泰雄，大橋　誠：感染症サーベイランス領域におけるパーソナルコンピュータの活用，海外旅行者下痢症の実態の解析，マイコンサーキュラ，14(6)，31-45，1989.

林　志直，関根整治，安東民衛，薮内　清：Echo14 と SRV が同時に検出された食中毒様事例について，病原微生物検出情報，9(6)，105，1988.

安東民衛，薮内　清：東京都における今冬季の SRSV 流行状況：病原微生物検出情報，10(3)，48－49，1989.

丸山　務：病原低温細菌と食品衛生，食品衛生研究，38，19-26，1988.

宮崎奉之：クロルデン汚染と指標生物，*New Food Industry*, 30(9)，10-16，1988.

金子誠二：***Yersinia enterocolitica*** および ***Yersinia pseudotuberculosis*** の病原性状試験について，メディアサークル，33(8)，312-317，1988.

丸山　務：乳・乳製品におけるリステリア菌汚染と食品衛生，乳技協資料，38，25-42，1989.

嶋田　暁，沢田明彦，安部勇三，斉藤　修，小久保彌太郎，金子誠二：食肉製品製造業におけるローストビー

フ製造加工時のウェルシュ菌の制御について，食品衛生研究，39(1)，39-75，1989.

松本昌雄：動物性食品中の残留サルファ剤について，食品衛生研究，39(4)，83-96，1989.

西島基弘：食品分析ー食品中の食品添加物分析法，ぶんせき，137-144，1989.

寺山　武：水産食品の衛生上の問題と対策，*New Food Industry*, 30(8)，8-15，1988.

伊藤　武，平田一郎，新垣正夫，浜名元一：***Campylobacter pylori***，臨床と微生物，15(5)，7-15，1988.

伊藤　武，坂井千三：主な食中毒起因細菌の食品中における増殖について，食品衛生学雑誌，30，123-137，1989.

伊藤　武，平田一郎，新垣正夫：***Campylobacter pylori*** の検査法，*Medical Technology*，17，21-27，1989.

伊藤　武，平田一郎：最近の法定伝染病，検査と技術，17，675-680，1989.

伊藤　武：海外旅行者とカンピロバクター腸炎，日本臨牀，47，45-51，1989.

伊藤　武：消化性潰瘍とカンピロバクター・ピロリ，健康と環境，3，90-94，1989.

学　会　発　表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1988.7—1989.6)

学 会 発 表

厳　小傑，斉藤慎二，内山竹彦，五十嵐英夫，藤川浩：**Toxic shock syndrome toxin (TSST-1)** のマウス抗体産生に及ぼす影響，第35回毒素シンポジウム(1988. 7).

Morozumi, S., Wauke T., Hitokoto, H. and Kudoh, Y.: **Antifungal effects of selected food components,** The 7th International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins (1988. 8).

工藤泰雄：海外由来下痢起因菌とその薬剤耐性（シンポジウム：熱帯性感染症と薬剤），第30回日本熱帯医学会総会（1988. 10).

五十嵐英夫，藤川　浩，宇佐美博幸：黄色ブドウ球菌および化膿レンサ球菌の産生する発熱性毒素の精製および性状，第33回ブドウ球菌研究会（1988. 10).

内山竹彦，厳　小傑，今西健一，斉藤慎二，荒明美奈子，藤川　浩，五十嵐英夫：ブドウ球菌外毒素 **toxic shock syndrome toxin-1** のマウスリンパ球に及ぼす作用，第33回ブドウ球菌研究会（1988. 10).

Ohashi, M. and Kudoh, Y.: **Guidlines for the laboratory diagnosis of bacterial diarrhoeal diseases**, Regional workshop on the quality control of laboratory diagnosis and surveillance on antimicrobial resistance (1988. 11).

Ohashi, M.: **Quality control procedures for the microbiological laboratory**, Regional workshop on the quality control of laboratory diagnosis and surveillance on antimicrobial resistance (1988. 11).

Ohashi, M.: **External quality assessment schemes for clinical microbiology and information network on antimicrobial resistance in Japan**, Regional workshop on the quality control of laboratory diagnosis and surveillance on antimicrobial resistance (1988. 11).

Kudoh. Y., Kai, A., Yamada, S., Matsushita, S., Itoh, T., Ohta, K. and Ohashi, M.: **Epidemiological surveys on *Escherichia coli* diarrheas in Tokyo**, The 24th Joint Conference, U. S.–Japan Cooperative Medical Science Program. Cholera Panel (1988. 11).

和宇慶朝昭，諸角　聖，工藤泰雄，一言　広：食品汚染カビに対する有機酸の影響，第28回マイコトキシン研究会（1989. 1).

五十嵐英夫：黄色ブドウ球菌と化膿レンサ球菌が産生する発熱性毒素の性状の比較，第62回日本細菌学会総会（1989. 3).

五十嵐英夫，藤川　浩，宇佐美博幸，川端俊一郎，今西健一，内山竹彦：A群レンサ球菌が産生する発熱性毒素の精製とその諸性状について，第62回日本細菌学会総会（1989. 3).

今西健一，内山竹彦，宗像孝子，藤川　浩，五十嵐英夫：**Mitogen** によるT細胞の活性化における **accessory** 細胞の係わり，第62回日本細菌学会総会（1989. 3).

内山竹彦，加藤秀人，今西健一，荒明美奈子，厳　小傑，斉藤慎二，河内　章，小幡文弥，柏木　登，藤川浩，五十嵐英夫：ブドウ球菌外毒素 **toxic shock syndrome toxin-1** のヒトT細胞の活性化による毒素のアクセサリー細胞に表現される **HLA** クラスII分子への結合が要求される，第62回日本細菌学会総会（1989. 3).

打林明子，内山竹彦，多田隈卓史，今西健一，荒明美奈子，厳　小傑，斉藤慎二，河内　章，小暮晃子，藤川浩，五十嵐英夫，山浦　昇：**マウスリンパ球上に表現されるブドウ球菌外毒素 toxic shock syndrome toxin (TSST-1) 結合分子の解析**，第62回日本細菌学会総会（1989. 3）.

斉藤慎二，内山竹彦，猪子英俊，五十嵐英夫：**ヒトリンパ球上のブドウ球菌エンテロトキシンA結合部位の解析**，第62回日本細菌学会総会（1989. 3）.

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：**ブドウ球菌外毒素 toxic shock syndrome toxin-1 によるマウスリンパ芽球（T細胞とT除去細胞）からのインターロイキン-2産生**，第62回日本細菌学会総会（1989. 3）.

甲斐明美，山田澄夫，松下　秀，伊藤　武，太田健爾，工藤泰雄，大橋　誠：**ラテックス凝集反応による大腸菌 Verocytotoxin 1及び2の検出とその応用**，第62回日本細菌学会総会（1989. 3）.

山田澄夫，松下　秀，工藤泰雄，大橋　誠：**ヒト由来 *Aeromonas* のSealed mice における腸管内液体貯留活性**，第62回日本細菌学会総会（1989. 3）.

Kimura, F., Koizumi, N., Yoshida, K., Nakajima, S., Itoh, T., Takahashi, M., Kai, A. and Yanagawa, Y. : **Rapid identification of *Campylobacter jejuni/coli* by latex agglutination test using monoclonal antibody**, The 5th International Workshop on *Complobacter* Infections (1989. 3).

Itoh, T., Yanagawa, Y., Takahashi, M., Kai, A., Saito, K., Ohashi, M., Nakamura, A. and Mutoh, T., **Characterization of new thermophilic *Campylobacter* isolated from rabbit**, The 5th International Workshop on *Campylobacter* Infections (1989. 3).

熊坂一成，工藤泰雄，大橋　誠，河野均也：**グラム染色外部精度管理の現状と問題点—東京都精度管理調査の紹介をかねて—**，第63回日本感染症学会総会（1989. 4）.

楠　淳，高橋正樹，松下　秀，太田健爾，工藤泰雄，大橋　誠，伊藤　武：***Salmonella* ser. Hadar による集団発生例と本菌保有プラスミドの疫学解析への応用**，第63回日本感染症学会総会（1989. 4）.

松下　秀，山田澄夫，楠　淳，稲葉美佐子，工藤泰雄，大橋　誠：**海外及び国内由来サルモネラ血清型 Blockley の性状比較**，第63回日本感染症学会総会（1989. 4）.

蛭田徳明，日守満里子，羽布津雅子，岡村　登，小川正之，松下　秀，工藤泰雄：**組織侵入性大腸菌O121：H－による海外旅行者下痢症の1例**，第63回日本感染症学会総会（1989. 4）.

高橋正樹，柳川義勢，甲斐明美，伊藤　武，木村文男，中島祥吉：***Campylobacter jejuni* に対するモノクロナール抗体の免疫学的性状及び特異性について**，第63回日本感染症学会総会（1989. 4）.

新垣正夫，伊藤　武，工藤泰雄，大橋　誠：***Campylobacter pylori* の産生するウレアーゼの細胞毒性**，第63回日本感染症学会総会（1989. 4）.

宮原美知子，三瀬勝利，箕輪由理，鈴木　昭，工藤泰雄：***Salmonella* infantis と *Salmonella* thompson の制限酵素の解析**，日本食品衛生学会第57回学術講演会（1989. 5）.

柏木義勝，柴田　実，大久保暢夫，永瀬金一郎，飯村達，平石　浩：**猩紅熱患者分離溶血レンサ球菌の薬剤受性の変遷（1956～1978）—特に菌型との関係について—**，

第37回日本感染症学会東日本地方総会（1988. 11）.

遠藤美代子，柏木義勝，奥野ルミ，一言　広：**1986～1988年分離A群溶血レンサ球菌の薬剤感受性と菌型について**，第63回日本感染症学会総会（1989. 4）.

柏木義勝，植田忠彦，市川久次，石井敏夫，中川茂男：**水中オゾンの殺菌発現濃度に関する検討**，第64回日本医科器械学会大会（1989. 5）.

安東民衛：**最近話題の腸管感染症（ノーウォーク様ウイルスの疫学とウイルスの性状）**，第9回衛生微生物技術協議会研究会（1988. 7）.

関根整治，安東民衛，林　志直，岡田正次郎，薮内　清，三木　隆，大橋　誠：**「集団かぜ」と報告される事例に混在するSRSV感染症**，第63回日本感染症学会総会（1989. 4）.

竹谷俊樹，山南貞夫，土井庄三郎，吉池信男，松井猛彦，石田東生，奥起久子，林　志直，安東民衛：**新生児室におけるエコー21型による無菌性髄膜炎の流行**，第63回日本感染症学会総会（1989. 4）.

林　志直，関根整治，安東民衛，伊藤忠彦，山崎　清，新開敬行，大貫奈穂美，貞升健志，薮内　清，三木　隆，大橋　誠，鈴木重任，堀田義洋，小杉真紗人，田中　学：**都内の小・中学校における「集団かぜ」事例に混在するSRSV感染症**，第82回東京都衛生局学会(1989. 5).

渡辺民彦，仁科彰則，橋本憲一，山口昌彦，福山孝徳，花岡　晫，藤巻直毅，長良健次，杉浦英俊，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虫の実態態調査（第3報）ツツガ虫の季節変化**，第82回東京都衛生局学会（1989. 5）.

吉田靖子，矢野一好，林　志直，関根整治，薮内　清，渡辺悌吉，大久保さつき，小野正恵：**東京都における発疹性疾患患児からのウイルス分離状況（1979～1988年）**，第30回臨床ウイルス学会（1989. 6）.

矢野一好，吉田靖子，新開敬行，薮内　清：**セルローズ凝集法による水中ウイルスの検出**，第4回関東甲信静地研ウイルス研究会（1989. 6）.

新開敬行，矢野一好，吉田靖子，薮内　清：**マガキに添加したポリオウイルスのアニオン性有機凝集剤による回収**，第4回関東甲信静地研ウイルス研究会（1989. 6）.

Yasuda, I. and Murata, I.: **Mortal principles for Anisakis type Ⅰ larvae in the roots of *Asiasarum sieboldii* F. MAEKAWA**, International Congress on Natural Products Research (1988. 7).

安田一郎，村田以和夫：**寄生虫症に有効な和漢薬の研究（第1報），安中散に含まれるアニキサスⅠ型幼虫活動抑制物質**，第5回和漢医薬学会（1988. 8）.

高橋美佐子，上原真一，秋山和幸，道口正雄：**^{1}H-NMRによる光学異性体を有する医薬品の光学純度測定（Ⅰ），*d, dl*-カンフル**，第25回全国衛生化学技術協議会年会（1988. 9）.

鎌田国広，大貫奈穂美，秋山和幸，道口正雄：**振動式密度計法による医薬品の比重測定法について**，第25回全国衛生化学技術協議会年会（1988. 9）.

飯田　修，長南明夫，浜野朋子，安田一郎：**ムラサキの生育とシコニン類含量におよぼす温度の影響**，日本生薬学会第35回年会（1988. 9）.

瀬戸隆子，安田一郎，浜野朋子，高野伊知郎，秋山和幸：**市場品営実の瀉下活性と Mulutiflorin A・B 含量**，日本生薬学会第35回年会（1988. 9）.

高野伊知郎，安田一郎，浜野朋子，瀬戸隆子，秋山和幸：**キャピラリー GC-MS による蘇葉中のペリラケトンの分析**，日本薬学会第109年会（1989. 4）.

浅水哲也，秋山和幸，安田一郎：**形質転換薬用植物細胞の有用物質の生産Ⅱ，オウギの毛状根培養とγ-aminobutyric acid の生産**，日本薬学会北陸支部第77回例会（1989. 6）.

中村義昭，酒井正美，森謙一郎，観　照雄，鈴木助治，渡辺四男也：**市販カーペット製品中の防虫加工剤・ディート，ダイアジノンおよび S-421の定量**，第25回全国衛生化学技術協議会年会（1988. 9）.

竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：**アルキルスズクロリド及びフェニルスズクロリドの電子捕獲検出ガスクロマトグラフィー**，日本分析化学会第37年会（1988. 10）.

水石和子，竹内正博，山野辺秀夫，渡辺四男也：**環境試料中のトリフェニルスズ化合物の定量**，日本分析化学会第37年会（1988. 10）.

伊藤弘一，池田一夫，岸本清子，雨宮　敬，鈴木助治，中村　弘，渡辺四男也：**FTD-GC によるアゾ系タール色素中の Sudan I の定量法**，日本薬学会第109年会（1989. 4）.

森謙一郎，中村義昭，金子正美，観　照雄，渡辺四男也：**家庭用エアゾル製品中のフロンの分析法**，日本薬学会第109年会（1989. 4）.

岸本清子，池田一夫，雨宮　敬，伊藤弘一，鈴木助治，中村　弘，渡辺四男也：**高速液体クロマトグラフィーによるセンブリ配合育毛剤中の swertiamarin の定量法**，日本薬学会第109年会（1989. 4）.

池田一夫，岸本清子，雨宮　敬，伊藤弘一，鈴木助治，中村　弘，渡辺四男也：**HPLC および GC による化粧品中の紫外線吸収剤の分離定量法**，日本薬学会第109年会（1989. 4）.

中村　弘，岸本清子，池田一夫，雨宮　敬，伊藤弘一，鈴木助治，渡辺四男也：**化粧品中の植物成分の分析，GC/MF によるスキンケア化粧品中の微量アロエ成分の分析**，第50回分析化学討論会（1989. 6）.

堀井昭三，門間千枝：**HPLC による鶏肉中のラサドシドの定量**，第25回全国衛生化学技術協議会年会（1988. 9）.

丸山　務：**食品衛生におけるリステリア菌**，食品衛生微生物研究会第9回学術講演会（1988. 10）.

金子誠二，小久保彌太郎，丸山　務：**食肉からのサルモネラの検出と分離菌株の薬剤感受性—1983～1987年の5年間の成績**，食品衛生微生物研究会第9回学術講演会（1988. 10）.

山下己知夫，佐竹浩之，竹重幸次，塩見久章，秋山陽，神崎政子，丸山　務：**特定動物等における人畜共通感染症起因菌（食中毒起因菌を含む）保有実態調査**，第81回東京都衛生局学会（1988. 10）.

Kaneko, S. and Maruyama, T.: **Evaluation of enzyme immuno assay for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis* strains,** US–Japan Cooperative Program on Development & Utilization of Natural Resources, Joint panel on toxic

microorganisms, celluar and molecular mode of action of selected microbial toxins in food and feeds (1988. 10).

金子誠二，小久保彌太郎，丸山　務，福島　博：**ヒトおよび動物由来 *Yersinia pseudotuberculosis* のプラスミドプロファイル**，第106回日本獣医学会（1988. 11).

神崎政子，金子誠二，丸山　修，田辺興記，斉藤和夫，田島日出男：***Yersinia pseudotuberculosis* 感染による鳥の死亡例**，第106回日本獣医学会（1988. 11).

神保勝彦，百瀬礼子，丸山　修，松本昌雄：**食肉中の残留チアムリン検査法**，日本食品衛生学会第56回学術講演会（1988. 11).

竹葉和江，村上文子，松本昌雄，中沢裕之：**高速液体クロマトグラフィーによる牛乳中の肝蛭駆除剤の分析**，日本食品衛生学会第56回学術講演会（1988. 11).

橋本常生，宮崎奉之，松本昌雄：**高速液体クロマトグラフィーによる牛肉中のホルモン剤の分析法**，日本食品衛生学会第56回学術講演会（1988. 11).

飯田　孝，神崎政子，梅木富士郎，丸山　務：**動物の糞便を対象とした *Listeria monocytogenes* 選択分離培地の検討**，第107回日本獣医学会（1989. 4).

井上耕博，田村和満，坂崎利一，丸山　務，神崎政子：**ヒト，イヌおよびネコから分離された "*Pasteurella multocida*" の再検討**，第107回日本獣医学会（1989. 4).

福島　博，丸山　務，金子賢一，井上正直：**ヒトのエルシニア感染症及び原因菌の菌学的ならびに生態に関する研究**，第107回日本獣医学会（1989. 4).

江成唯子，戸塚恭一，熊田徹平，清水喜八郎，丸山務：**健康人糞便中の *Listeria monocytogenes* の検索**，第63回日本感染症学会総会（1989. 4).

村松紘一，宮坂たつ子，丸山　務：**仮性結核菌（*Y. pseudotuberculosis*）集団発生例から分離した菌株の諸性状**，第63回日本感染症学会総会（1989. 4).

宮崎奉之：**Polyhalogenated anisole による着臭**，日本水産学会平成元年春期大会（1989. 4).

渡部健二朗，木川　寛，河村太郎，宮崎奉之，橋本常生，丸山　務，松本昌雄，中澤裕之，藤田昌彦：**牛肉中の蛋白同化ホルモン剤の分析—カラムスイッチング法を用いたHPLC の応用**，日本薬学会第109年会（1989. 4).

小久保彌太郎，金子誠二，飯田　孝，丸山　務：**食肉を対象としたリステリア菌の検査法の検討**，日本食品衛生学会第57回学術講演会（1989. 5).

神保勝彦，堀井昭三，門間千枝，百瀬礼子，丸山　務，松本昌雄：**市販養殖魚における抗菌性物質の残留実態調査**，日本食品衛生学会第57回学術講演会（1989. 5).

橋本常生，宮崎奉之，丸山　務，松本昌雄，中澤裕之：**EIA キットによる牛肉中のプロゲステロンの測定法**，日本食品衛生学会第57回学術講演会（1989. 5).

宮崎奉之，橋本常生，丸山　務，松本昌雄，中澤裕之：**UV-HPLC 及び GC/MS による牛肉中のホルモン剤の分析法**，日本食品衛生学会第57回学術講演会（1989. 5).

Kamimura, H. : **Decontamination of mycotoxins in food processing**, IUPAC 7th International Symposium

on Mycotoxins and Phycotoxins (1988. 8).

Tabata, S. and Kamimura, H.: **A survey of aflatoxin contamination in Tokyo's commercial foods and foodstuffs**, IUPAC 7th International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins (1988. 8).

安田和男，別府正敏，菊川清見：**ラクトフェリンの脂質過酸化促進効果**，第61回日本生化学会（1988. 10).

中里光男，諸角　聖，斉藤和夫，藤沼賢司，二島太一郎，河西信彦：**数種の糸状菌による Aflatoxicol から Aflatoxin B_1 への変換について**，第28回マイコトキシン研究会（1989. 1).

守安貴子，斉藤和夫，中里光男，石川ふさ子，藤沼賢司，二島太一郎：**食品中の甘味料に関する研究（第5報）清涼飲料水中のアセスルファムK，サッカリン及びアスパルテームの同時分析法**，日本食品衛生学会第57回学術講演会（1989. 5).

上村　尚，田端節子，田村行弘，井部明広，西山良子，橋本秀樹，二島太一郎：**食品製造時におけるマイコトキシンの除去**，日本食品衛生学会第57回学術講演会（1989. 5).

井部明広，田村行弘，上村　尚，西山良子，田端節子，橋本秀樹，二島太一郎：**市販味噌及び醤油中の不揮発性アミン含有量**，日本食品衛生学会第57回学術講演会（1989. 5).

吉田令子，渡辺悠二，佐藤憲一，風間成孔：**熱分解ガスクロマトグラフィーによるスチレン系樹脂の組成分析**，第25回全国衛生化学技術協議会年会（1988. 9).

中島和雄，風間成孔，内海英海，浜田　昭：**脂溶性ビタミンによるリポソーム膜の構造変化**，第61回日本生化学会大会（1988. 10).

小関正道，北畠直文，土井悦四郎，安野哲子，萩野周三，津田裕子，風間成孔：**ペクチンによるリパーゼ活性の抑制**，1989年度日本農芸化学会大会（1989. 4).

川島満春美，牛尾房雄：**日常食の栄養摂取量について**，第47回日本公衆衛生学会総会（1988. 8).

井口正雄，友松俊夫：**高速液体クロマトグラフィーによる乳製品中のビタミンA立体異性体（9-*cis*，13-*cis*）の定量**，第43回日本栄養・食糧学会（1989. 5).

入江建久，吉沢　晋，池田耕一，井上　栄，阪口雅弘，菅原文子，吉川　翠，福部覚俊：**室内アレルゲンの挙動と制御(1)**，第7回空気清浄研究会（1988. 7).

吉川　翠：**ダニに対する除湿機の駆除効果について**，第47回日本公衆衛生学会総会（1988. 9).

二宮保男，吉川　翠，花岡　暐：**簡易検査法を用いたツメダニ刺咬被害調査**，第47回日本公衆衛生学会総会（1988. 9).

関比呂伸，佐藤泰仁，加納堯子：**室内環境におけるアスベスト汚染の実態調査（その2），電子顕微鏡による検索**，第47回日本公衆衛生学会総会（1988. 9).

佐藤泰仁，関比呂伸，加納堯子：**室内環境におけるアスベスト汚染の実態態調査（その1），光学顕微鏡による検索**，第47回日本公衆衛生学会総会（1988. 9).

牧野国義，稲葉　裕：**東京都区部における部位別がん死亡率と環境的要因**，第47回日本公衆衛生学会総会（1988. 9）.

佐々木憲二，木下真男，大沢誠喜，鈴木孝人：**ラットの恒常状態法肺拡散能力測定の試み**，第25回臨床生理学会（1988. 10）.

鈴木孝人，加納堯子：**ディーゼル排気ガスを暴露したウサギの血清と肺胞洗浄液中のプロコラーゲン・タイプⅢ・ペプチドの変化**，第29回大気汚染学会（1988. 11）.

瀬戸　博，大久保智子，大沢誠喜，鈴木孝人，加納堯子：**ラット尿中チオバルビツール酸反応性物質に及ぼすディーゼルエンジン排ガス暴露の影響**，第29回大気汚染学会（1988. 11）.

大久保智子，瀬戸　博，大沢誠喜，鈴木孝人，加納堯子：**ディーゼルエンジン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**，第29回大気汚染学会（1988. 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と環境的要因の多変量解析**，第59回日本衛生学会（1989. 5）.

Watanabe, M. F., Harada, K., Oishi, S. and Suzuki, M.: **Comparative studies of toxins contained in *Microcystis* species,** Water Quality Symposium (1988. 8).

Watanabe, M. F., Harada, K., Matsuura, K., Oishi, S. and Suzuki, M. : **Cyclic peptide toxins contained in the strains and natural samples of *Microcystis***, 7th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins (1988. 8).

渡辺真利代，原田健一，松浦憲司，大石真之，鈴木真言：***Microcystis* の野外試料に見出された毒素**，第53回日本陸水学会（1988. 10）.

高橋保男，笹野英雄，森田昌敏：**水道原水及び水道水中の環状イオウ分子のイオウ**，第23回水質汚濁学会，(1983).

高橋保男，笹野英雄，森田昌敏：**水道水中の非低沸点有機物**，第23回水質汚濁学会（1989. 3）.

土屋悦輝，渡辺真利代：**藍藻 *Microcystis* の産生する揮発性物質について（Ⅱ）**，日本薬学会第109年会（1989. 4）.

大橋則男，土屋悦輝，笹野英雄，内海英雄，濱田　昭：**Capillary gas chromatography による飲料水中有機リン系農薬分析法の検討**，日本薬学会第109年会（1989. 4）.

長井二三子，牛山慶子，佐藤かな子，加納いつ：**OPP およびその代謝物による DNA の塩基修飾について**，第61回日本生化学会大会（1988. 10）.

加納いつ，長井二三子，佐藤かな子，牛山慶子，中尾順子：**ウマ Na, K-ATPase α サブユニットの遺伝子構造**，第61回日本生化学会大会（1988. 10）.

市川久次，小林博義，植田忠彦：**脂肪酸アミドの幼若ラットにおける溶血作用**，第61回日本生化学会大会（1988. 10）.

佐藤かな子，長井二三子，加納いつ，牛山慶子，原諭吉，浦山　修，中尾　真，中尾順子：**馬腎臓 Na, K-ATPase のモノクローナル抗体**，第10回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム（1988. 11）

長井二三子，牛山慶子，佐藤かな子，加納いつ，佐々木美枝子：**OPP およびその代謝物による DNA の塩基修飾について**，第82回東京都衛生局学会（1989. 5）.

深野駿一，千葉百子：**金属による δ-Aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) の阻害機構の解明**，第4回金属の関与する生体内関連反応シンポジウム（1989. 6）.

小縣昭夫，米山允子，藤谷知子，久保喜一，安藤　弘，佐々木美枝子，鈴木勝士：**Thiabendazole の催奇形作用に対する glutathione, cysteine, diethylmaleate の効果**，第28回日本先天異常学会学術集会（1988. 7）.

小縣昭夫，米山允子，藤谷知子，安藤　弘，久保喜一，松本信雄：**全胚子培養法を用いたチアベンダゾール（TBZ）の催奇形性と TBZ の胚子内変化**，第5回哺乳類全胚培養研究会（1989. 1）

平田一郎，入倉善久，神真知子，池島伸至，伊藤　武，寺山　武，楠　淳：**"Serobact Salmonella latexagglutination Kit" によるサルモネラの迅速同定法について**，食品衛生微生物研究会第9回学術講演会（1988. 10）.

榎田隆一，平田一郎，楠くみ子，池島伸至，新井輝義，伊藤　武，寺山　武：**"Equate" ELISA 法による食肉からのサルモネラ検出に関する検討**，食品衛生微生物研究会第9回学術講演会（1988. 10）.

平田一郎，鈴木敬子，榎田隆一，新井輝義，入倉善久，伊藤　武，寺山　武，太田健爾：**病原ビブリオの生存性に及ぼすキチンの影響**，第22回腸炎ビブリオシンポジウム（1988. 11）.

伊藤　武，平田一郎，寺山　武，新垣正夫，高橋信一，中野正美，石山業弘，赤嶺郁子：***Campylobacter pylori* のサル投与実験と胃粘膜における菌の定着について**，The 2nd Tokyo International Symposium on *Campylobacter pylori*（1989. 3）.

伊藤　武，平田一郎，寺山　武，新垣正夫，高橋信一，中野正美，石山業弘，赤嶺郁子，武藤　健：**サルからの *Campylobacter pylori* の検出とサルによる感染実験の試み**，The 2nd Tokyo International Symposium on *Campylobacter pylori*（1989. 3）.

新井輝義，池島伸至，伊藤　武，寺山　武：**嘔吐型食中毒由来セレウス菌の HEp-2 細胞に対する空胞化変性について**，第62回日本細菌学会総会（1989. 3）.

平田一郎，鈴木敬子，榎田隆一，入倉善久，神真知子，楠くみ子，伊藤　武，寺山　武，太田健爾：**病原ビブリオの生存性に及ぼすキチンの影響**，第62回日本細菌学会総会（1989. 3）.

伊藤　訊，平田一郎，寺山　武，新垣正夫，高橋信一，中野正美，石山業弘，赤嶺郁子：***Campylobacter pylori* のサル投与実験と胃粘膜における菌の定着について**，第63回日本感染症学会総会（1989. 4）.

池島伸至，新井輝義，平田一郎，伊藤　武，寺山　武：**はちみつ及び土壌における *Bacillus thuringiensis* の分布と本菌同定法について**，日本食品衛生学会第57回学術講演会（1989. 5）.

田口信夫，大西和夫，西島基弘，及川美帆子，宮沢文雄：**梅干に添加された糖アルコールについて**，日本食品衛生学会第56回学術講演会（1988. 11）.

宇田川隆男，木ノ内良治，山口昌彦，高木真一，上原一途，青山勝世，人見達雄，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3）ガス回収装置からのテトラクロロエチレン排水実態につ**

いて，第81回東京都衛生局学会（1988．11）．

高木真一，上原一途，青山勝世，宇田川隆男，木ノ内良治，山口昌彦，人見達雄，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4）排水量と処理方法**，第81回東京都衛生局学会（1988．11）．

矢口久美子，平田一郎，渡辺　学，伊藤　武，内海英雄，濱田　昭：**テトラクロロエチレンの分解にかかわる細菌の培養条件とその分解活性**，第23回水質汚濁学会（1989．3）．

大石充男，池島伸至，入倉善久，古川裕季子，大西和夫，寺山　武，西島基弘，中澤裕之：**食肉中のニコチン酸アミドからニコチン酸生成に関与する細菌の検討**，日本食品衛生学会第57回学術講演会（1989．5）．

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

道口正雄（委員長）
帆刈祥弘
五十嵐英夫
秋山和幸
渡辺四男也
西島基弘
加納堯子
土屋悦輝
市川久次
加納いつ
伊藤　武

1989年12月　発行

規格表　第 2 類
印刷番号（元）564
刊行物番号（H）24

東京都立衛生研究所研究年報第40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）