ISSN 0082−4771
CODEN : TRENAF

東京都立衛生研究所

研究年報

ANNUAL REPORT
OF
THE TOKYO METROPOLITAN RESEARCH
LABORATORY OF PUBLIC HEALTH

41

1990

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

序

当研究所は，昭和24年の開設以来，東京都における衛生行政の科学的技術的な中核機関としての役割を果たしてまいりました。この間，高齢化・生活環境の向上等による疾病構造の変化，保健医療技術の進歩，健康に関する意識の高揚，食品の安全性確保への強い期待，情報化社会の進展，国際都市東京への着実な歩みなど，衛生行政を取り巻く情勢は大きく変化しております。

当研究所は、時代の要請に正しく応えていくために、精度の高い，高度な試験検査の実施，それを支える調査研究の充実強化を喫緊の課題とし，厳しい自省のもと，その達成に努めております。

平成２年度から研究計画の策定にあたりましては，念願の「研究調整会議」を設置，各研究テーマごとに，行政的視点も加え計画を練り，研究を効率的なものとするため衆智を集める体制を整備しました。学際的な研究活動を推進するため，部・科を横断したプロジェクト研究も編成いたしました。また，当研究所以外の研究機関等と積極的な研究交流の促進を図り，「研究の自由な領域」を確保するために「共同・受託・応募研究実施細則」を策定いたしました。

さらに，安全に試験検査，調査研究業務が行えるよう「病原体等並びに有害物質安全管理規程」等の規定整備も行いました。これらは当研究所における研究体制の充実，強化に大きく貢献するに違いないと考えております。

研究年報第41号は，元年度までの調査研究結果について纏めたものではありますが，研究調整会議の設置等を期に，調査研究の充実と発展を希求する職員の意欲の現れを本号からもお読み取りいただき，忌憚のない御支援御鞭撻を賜りますようお願い申しあげます。

平成２年12月20日

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

時間分解蛍光免疫法による百日咳抗体の測定
……安部　昭子，柴田　　実，高野　弘紀，一言　　広…… 1

東京都内のインフルエンザ検索成績（1989年11月～1990年２月）
……山崎　　清，伊藤　忠彦，藪内　　清…… 6

マガキに添加したポリオウイルスのセルロース吸着・凝集法による回収実験
……新開　敬行，吉田　靖子，矢野　一好，藪内　　清…… 11

HIV-１抗体検査における判定保留血清の二次元電気泳動法による検討
……大貫奈穂美，貞弁　健志，関根　大正，太田　建爾，藪内　　清
三木　　隆…… 16

Listeria monocytogenes の分離法と動物の保菌実態
……飯田　　孝，神崎　政子，本田三緒子，井上　　智，丸山　　務…… 22

動物園の鳥類に発生した *Yersinia pseudotuberculosis* による感染死亡例
……神崎　政子，丸山　　務，金子　誠二，飯田　　孝，田辺　興記
田島日出男，斉藤　和夫…… 28

腸炎起病性大腸菌の食品および井戸水における生存と増殖
……平田　一郎，鈴木　敬子，榎田　隆一，甲斐　明美，伊藤　　武
寺山　　武…… 33

Bacillus thuringiensis の鞭毛抗原による型別法と *B. cereus* の鞭毛抗原との関連について
……新井　輝義，池島　伸至，神　真知子，楠　くみ子，入倉　善久
新垣　正夫，伊藤　　武，寺山　　武…… 40

報文Ⅱ　医薬品等に関する調査研究

高速液体クロマトグラフィーによる胃腸薬中のヒヨスチアミンの定量
……宮武ノリエ，重岡　捨身，寺島　　潔，長嶋真知子，上原　真一
秋山　和幸…… 47

高速液体クロマトグラフィーによる医薬品製剤中の *DL*-塩化カルニチンの定量
……高橋美佐子，中山　京子，上原　真一，鎌田　国広，萩原　輝彦
秋山　和幸…… 51

生薬の品質評価に関する研究（第10報）
四川省産沢瀉及び本邦市場品沢瀉の品質
……安田　一郎，浜野　朋子，高野伊知郎，高橋奈穂子，瀬戸　隆子
秋山　和幸，佐藤かな子，長井二三子，牛山　慶子，市川　久次
加納　いつ，篠田　　隆、鈴木　達夫，伊藤　　寛，長谷部　浩…… 55

キャピラリーガスクロマトグラフィーによる各種当帰中の精油成分の分析
……高野伊知郎，安田　一郎，高橋奈穂子，浜野　朋子，瀬戸　隆子
秋山　和幸…… 62

高速液体クロマトグラフィーによる染毛剤中の酸化染料の定量
……鈴木　助治，池田　一夫，岸本　清子，中村　　弘，渡辺四男也…… 70

化粧品中のニッケルおよびコバルト含有量について
……雨宮　　敬，伊藤　弘一，鈴木　助治，渡辺四男也…… 75

家庭用品の衛生化学的研究（第28報）
家庭用殺虫エアゾル製品中の有効成分について
……中村　義昭，金子　正美，森　謙一郎，観　　照雄，渡辺四男也…… 78

家庭用品の衛生化学的研究（第29報）
繊維製品用防虫剤中のピレスロイド系薬剤の分析
……金子　正美，中村　義昭，森　謙一郎，観　　照雄，渡辺四男也…… 85

報文Ⅲ　食品等に関する調査研究

酵素抗体法（ELISA）キットによる食肉中の残留抗菌性物質検査法の検討
……門間　千枝，神保　勝彦，丸山　　務…… 91

国産チーズの衛生学的品質評価
……竹葉　和江，梅木富士郎，村上　文子，仲真　晶子，井草　京子
丸山　　務，松本　昌雄 …… 95

イオン対高速液体クロマトグラフィーによる食用タール色素の一斉分析法
……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 ……101

化学物質及び自然毒による食中毒等事件例（第７報）
―平成元年度―
……真木　俊夫，観　　公子，永山　敏廣，橋本　秀樹，川合　由華
飯田　真美，小林　麻紀，塩田　寛子，二島太一郎 ……108

輸入食品中の放射能濃度
―昭和63年度及び平成元年度―
……観　　公子，真木　俊夫，永山　敏廣，川合　由華，橋本　秀樹
小林　麻紀，塩田　寛子，二島太一郎 ……113

野菜・果実類中の残留農薬実態調査
―平成元年度―
……永山　敏廣，真木　俊夫，橋本　秀樹，川合　由華，観　　公子
飯田　真美，小林　麻紀，塩田　寛子，二島太一郎 ……119

輸入農産物中の残留農薬実態調査
―昭和63年度及び平成元年度―
……永山　敏廣，真木　俊夫，川合　由華，小林　麻紀，塩田　寛子
観　　公子，橋本　秀樹，二島太一郎 ……125

食品中のカンタキサンチンの分析法
……天川　映子，荻原　　勉，大西　和夫，寺山　　武……133

天然調味料の品質評価（第２報）
……中島　和雄，広門　雅子，平田　恵子，植松　洋子，松井　敬子
風間　成孔 ……140

イオンクロマトグラフィーによる食品添加物製剤中の炭酸塩及び炭酸水素塩の定量
……栗原　裕子，安野　哲子，荻野　周三，小関　正道，風間　成孔……143

食用タール色素中重金属試験法の改良
……平田　恵子，広門　雅子，中島　和雄，植松　洋子，松井　敬子
風間　成孔……148

食物繊維の一日摂取量
（給食施設の食事と国民栄養調査を基にして）
……川島満春美，牛尾　房雄，友松　俊夫，山岸　達典，道口　正雄……152

伊豆諸島産アシタバ（*Angelica keiskei*）の一般成分およびミネラル含量
……門間　公夫，菊谷　典久，笠原　利英，井口　正雄，友松　俊夫
村上　泰城，浦野　元幸……158

報文Ⅳ　生活環境に関する調査研究

浄水処理過程における非低沸点疎水性有機物群の動向
……高橋　保雄，笹野　英雄……163

ドライクリーニング所におけるテトラクロロエチレンの使用実態と溶剤蒸気回収装置の効果
……有賀　孝成，押田　裕子，栃本　博，西島　基弘，寺山　武……169

活性炭吸着式排水処理装置によるドライクリーニング排水のテトラクロロエチレン処理効果
……有賀　孝成，押田　裕子，栃本　博，西島　基弘，寺山　武……175

簡易曝気法によるドライクリーニング排水中のテトラクロロエチレン処理
……有賀　孝成，押田　裕子，栃本　博，西島　基弘，寺山　武……181

空調用冷却塔水におけるレジオネラ属菌の生息状況
……古畑　勝則，大橋　則雄，松本　淳彦……186

室内環境におけるアスベスト粉塵の実態について（Ⅱ）
電子顕微鏡による検索
……関　比呂伸，佐藤　泰仁，加納　堯子，福森　信隆，斉藤　勝……197

高層住宅床面のダニ相およびヒョウヒダニ数とヒョウヒダニアレルゲン量の相関
……吉川　翠……203

死亡率の時系列データから得られるいくつかの構成要素について
……牧野　国義……209

環境における化学物質の安全性に関する調査研究（第3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
N-ニトロソジフェニルアミンの分析法
……高橋　巌，岡本　寛，大橋　則雄，笹野　英雄……216

東京湾の環境汚染モニタリング（第8報）
昭和63年度スズキ及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……220

鳩肺中から検出された多環芳香族炭化水素及び炭粉について
……瀬戸　博，大久保智子，関　比呂伸，小野塚春吉，加納　堯子……223

ディーゼルエンジン排ガス暴露後のラット肺中の多環芳香族炭化水素及び炭粉量の変化
……瀬戸　博，大久保智子，鈴木　孝人，大沢　誠喜，池田　真悟
渡辺　伸枝，加納　堯子……226

マロンアルデヒドによるDNAの架橋反応の検討
……大久保智子，瀬戸　博，長井二三子，加納　いつ，加納　堯子……229

報文Ⅴ　毒性に関する調査研究

セラミックスのラットによる亜急性毒性試験およびオルトフェニルフェノールの膀胱発癌に対する影響
……藤井　孝，三栗谷久敏，矢野　範男，湯澤　勝廣，長澤　明道
福森　信隆，多田　幸恵，佐々木美枝子……233

チアベンダゾールおよびオルトフェニルフェノールのラットを用いた6週間の併用毒性試験
……三栗谷久敏，藤井　孝，米山　允子，嶋田　照江，佐々木美枝子……245

チアベンダゾール（TBZ）のマウスおよびラットの腎臓に及ぼす影響
……多田　幸恵，米山　允子，藤谷　知子，佐々木美枝子……255

ペリルアルデヒドのヒト由来株化細胞における突然変異原性について
……鈴木　英子，市川　久次，佐々木美枝子……265

ペリルアルデヒドの培養細胞染色体への作用
……田山寿美子，市川　久次，佐々木美枝子……267

蘇葉抽出物の変異原性試験
……藤田　博，高野伊知郎，安田　一郎，秋山　和幸，市川　久次
佐々木美枝子……270

蘇葉抽出物の細胞活性について
……佐々木美枝子，吉田　誠二，市川　久次，高野伊知郎，安田　一郎
秋山　和幸……275

人参エキス前処理がチアベンダゾール（TBZ）のマウス催奇性に及ぼす影響
……小縣　昭夫，安藤　弘，久保　喜一，神谷　信行，尾畑　浩魅
安田　一郎，佐々木美枝子……282

アスベスト繊維貪食時におけるマウスマクロファージの膜構造の電子顕微鏡的観察
……福森　信隆，荻野　周三，佐々木美枝子……289

アスベストのサルモネラを用いた変異原性試験
……藤田　博，佐々木美枝子……297

d-α-トコフェリルアセテート（ビタミンE）のラットによる13週間経口試験
……坂本　義光，安藤　弘，池田　虎雄，小縣　昭夫，神谷　信行
久保　喜一，小嶋　昭江，高橋　博，多田　幸恵，長澤　明道
林田　志信，藤井　孝，藤田　博，福森　信隆，三栗谷久敏
矢野　範男，湯澤　勝廣，吉田　誠二，市川　久次，佐々木美枝子…300

Salmonella typhimurium TA97，TA102を用いた食品添加物の変異原性試験（第5報）
……藤田　博，佐々木美枝子……315

紫外線またはγ線照射した細胞性粘菌におけるカフェイン感受性回復と突然変異誘発
……金西　信次，金城　康人，渡部　真……323

ラット肝初代培養細胞に対するアセトアミノフェンとその異性体の毒性効果
……藤谷　和正，市川　久次，佐々木美枝子……330

著書及び他誌発表……335

学　会　発　表……341

CONTENTS

REPORTS I PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

Determination of Antibodies against *Bordetella pertussis* by Time-Resolved Fluoroimmunoassay
..... A. Abe, M. Shibata, H. Takano and H. Hitokoto 1

Prevalence of Influenza Occurred in Tokyo. (Nov. 1989-Feb. 1990)
..... K. Yamazaki, T. Ito and K. Yabuuchi 6

A Recovery Experiment of Polioviruses from Oysters by Cellulose Adsorption-Flocculation Method.
..... T. Shinkai, Y. Yoshida, K. Yano and K. Yabuuchi 11

Analysis of Indeterminate Samples in HIV-1 Antibody Tests by Two-Dimensional Electropohoresis.
..... N. Ohnuki, K. Sadamasu, H. Sekine, K. Ohta, K. Yabuuchi and T. Miki 16

Isolation of *Listeria monocytogenes* from Animals in Japan
..... T. Iida, M. Kanzaki, M. Honda, S. Inoue and T. Maruyama 22

Outbreaks of *Yersinia pesudotuberculosis* Infection in Zoo Birds
..... M. Kanzaki, T. Maruyama, S. Kaneko, T. Iida, K. Tanabe, H. Tajima and K. Saito 28

Growth and Survival in Foods and Well Water of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated With Food Borne Diseases
..... I. Hirata, K. Suzuki, T. Enokida, A. Kai, T. Itoh and T. Terayama 33

Flagella Antigenic Serotyping System of *Bacillus thuringiensis* and the Antigenic Relationships with *Bacillus cereus*
..... T. Arai, N. Ikejima, M. Jin, K. Kusunoki, Y. Irikura, M. Shingaki, T. Itoh and T. Terayama 40

REPORTS II PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTCAL HYGIENE

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Hyoscyamine in Gastrointestinal Drugs
..... N. Miyatake, S. Shigeoka, K. Terajima, M. Nagashima, S. Uehara and K. Akiyama 47

Determination of *DL*-Carnitine Chloride in Pharmaceutical Preparation by High Performance Liquid Chromatography
..... M. Takahashi, K. Nakayama, S. Uehara, K. Kamata, T. Hagiwara and K. Akiyama 51

Studies on the Evaluation of Crude Drugs. (X). Quality of Alisma Rhizome Cultivated in Sichuan and Distributed in Japanese Market
..... I. Yasuda, T. Hamano, I. Takano, N. Takahashi, T. Seto, K. Akiyama, K. Satoh, F. Nagai, K. Ushiyama, H. Ichikawa, I. Kano, T. Shinoda, T. Suzuki, H. Ito and H. Hasebe 55

Analysis of Essential Oils in Various Species of Angelica Root by Capillary Gas Chromatography
..... I. Takano, I. Yasuda, N. Takahashi, T. Hamano, T. Seto and K. Akiyama 62

Determination of Oxidative Dyes in Permanent Hair Dyes by High Performance Liquid Chromatography
..... S. Suzuki, K. Ikeda, K. Kishimoto, H. Nakamura and Y. Watanabe 70

Contents of Nickel and Cobalt in Cosmetics
..... T. Amemiya, K. Itoh, S. Suzuki and Y. Watanabe 75

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities. (XXVIII). Insecticidal Components in Household Aerosol Products
..... Y. Nakamura, M. Kaneko, K. Mori, T. Kan and Y. Watanabe 78

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities. (XXIX). Analysis of Pyrethroids in Mothproofing Agents for Fabrics
..... M. Kaneko, Y. Nakamura, K. Mori, T. Kan and Y. Watanabe 85

REPORTS III PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Identification of Antimicrobial Drug Residues in Meat
..... C. Monma, K. Jinbo, and T. Maruyama 91

Estimation of Chemical and Microbiological Quality of Domestic Cheese
..... K. Takeba, F. Umeki, F. Murakami, A. Nakama, K. Igusa, T. Maruyama and M. Matsumoto 95

Simultaneous Determination of Color Additives by Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography
..... F. Ishikawa, K. Saito, M. Nakazato, K. Fujinuma, T. Moriyasu and T. Nishima 101

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toxicants in Tokyo. (VII). −1989−
..... T. Maki, K. Kan, T. Nagayama, H. Hashimoto, Y. Kawai, M. Iida, M. Kobayashi, H. Shioda and T. Nishima 108

Radioactive Contamination in Imported Foods −Apr. 1988~Mar. 1990−
..... K. Kan, T. Maki, T. Nagayama, Y. Kawai, H. Hashimoto, M. Kobayashi, H. Shioda and T. Nishima 113

Survey of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits −Apr. 1989~Mar. 1990−
..... T. Nagayama, T. Maki, H. Hashimoto, Y. Kawai, K. Kan, M. Iida, M. Kobayashi, H. Shioda and T. Nishima 119

Survey of Pesticide Residues in Imported Crops −Apr. 1988~Mar. 1990−
..... T. Nagayama, T. Maki, Y. Kawai, M. Kobayashi, H. Shioda, K. Kan, H. Hashimoto and T. Nishima 125

Determination of Canthaxanthin in Foods
..... E. Amakawa, T. Ogiwara, K. Ohnishi and T. Terayama 133

Survey on Quality of Natural Flavor Enhancers. (II)
..... K. Nakajima, K. Matsui, M. Hirokado, K. Hirata, Y. Uematsu and M. Kazama 140

Determination of Carbonate and Hydrogencarbonate in Food Additive Preparations by Ion Chromatography
..... Y. Kurihara, T. Yasuno, S. Ogino, M. Koseki and M. Kazama 143

A Modified Method for the Determination of Heavy Metal Contaminants in Food Colors
..... K. Hirata, M. Hirokado, K. Nakajima, Y. Uematsu, K. Matsui and M. Kazama 148

Daily Intakes of Dietary Fiber in Duplicate Portion and Market Basket Studies
..... M. Kawashima, F. Ushio, T. Tomomatu, T. Yamagishi and M. Doguchi 152

Proximate and Mineral Composition of Ashitaba (*Angelica keiskei*) Harvested in Izu Islands
..... K. Monma, N. Kikutani, T. Kasahara, M. Iguchi, T. Tomomatsu, Y. Murakami and M. Urano 158

REPORTS IV PAPERS CONCERNING ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

Fate of Nonvolatile Hydrophobic Organic Materials through Water Purification
..... Y. Takahashi and H. Sasano 163

Survey for Usage of Tetrachloroethylene and Effect of Vaporous Solvent Collector in Laundries
..... T. Ariga, H. Oshida, H. Tochimoto, M. Nishijima and T. Terayama 169

The Removal of Tetrachloroethylene from Wastewater by Activated Carbon Method in Laundries
..... T. Ariga, H. Oshida, H. Tochimoto, M. Nishijima and T. Terayama 175

Simple Aeration Method for Removal of Dissolved Tetrachloroethylene from Wastewater in Laundries
..... T. Ariga, H. Oshida, H. Tochimoto, M. Nishijima and T. Terayama 181

Distribution of *Legionella* Species in Cooling Tower Water
..... K. Furuhata, N. Ohashi and A. Matsumoto 186

Survey on the Concentration of Asbestos Fibers in Indoor Environment. (II). The Examination by Electron Microscopy
..... H. Seki, Y. Sato, T. Kanoh, N. Fukumori and M. Saito 197

Investigation of Mite Fauna and Correlation of Mite Numbers and Amounts of Mite Allergens in Floor Dust of Houses
..... M. Yoshikawa 203

A Study of Some Elements Deduced from Time-Serial Data on Death Rates
..... K. Makino 209

Studies on Environmental Safety of Chemicals. (III). Determination of *N*-Nitrosodiphenylamine in Environment by Capillary Gas Chromatography/Mass Spectrometry
..... I. Takahashi, Y. Okamoto, N. Ohashi and H. Sasano 216

Survey of Chemical Pollutants in Biota from Tokyo Bay. (VIII). Residue Levels in Japanese Sea Bass and Gull in 1988
T. Ohkubo, H. Seto and T. Kanoh 220

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Elemental Carbon Detected in Pigeon Lungs
H. Seto, T. Ohkubo, H. Seki, H. Onozuka and T. Kanoh 223

Clearance of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Elemental Carbon from Rat Lungs after Exposure to Diesel Engine Exhaust
H. Seto, T. Ohkubo, T. Suzuki, M. Ohsawa, S. Ikeda, N. Watanabe and T. Kanoh 226

Examination of DNA Cross-Link Induced by Malonaldehyde
T. Ohkubo, H. Seto, F. Nagai, I. Kano and T. Kanoh 229

REPORTS V PAPERS CONCERNING ON TOXICOLOGY

Subacute Toxicity Tests of Ceramics by Gavage to Rats and Influence of Ceramics on Urinary Bladder Carcinogenesis Induced by *o*-Phenylphenol
T. Fujii, H. Mikuriya, N. Yano, K. Yuzawa, A. Nagasawa, N. Fukumori, Y. Tada and M. Sasaki 233

Toxicity of Thiabendazole and *o*-Phenylphenol by Simultaneous Administration to Rats for Six Weeks
H. Mikuriya, T. Fujii, M. Yoneyama, T. Shimada and M. Sasaki 245

Effects of Thiabendazole on the Kidneys of ICR Mice and F344 Rats
Y. Tada, M. Yoneyama, T. Fujitani and M. Sasaki 255

Mutagenicity of Perillaldehyde in a Human Cell Strain
H. Suzuki, H. Ichikawa and M. Sasaki 265

Effects of Perillaldehyde on Induction of Chromosomal Aberrations and Sister–Chromatid Exchanges (SCEs) in CHO-Kl Cells
S. Tayama, H. Ichikawa and M. Sasaki 267

Mutagenicity Test of Extracts of Perilla Herb
H. Fujita, I. Takano, I. Yasuda, K. Akiyama, H. Ichikawa and M. Sasaki 270

Cytological Activities of Perilla Extracts
M. Sasaki, S. Yoshida, H. Ichikawa, I. Takano, I. Yasuda and K. Akiyama 275

Effects of Pretreatment with Ginseng on Thiabendazole-Induced Teratogenicity in Mice
A. Ogata, H. Ando, Y. Kubo, N. Kamiya, H. Obata, I. Yasuda and M. Sasaki 282

Electron Microscopy of Mouse Macrophage Cell Membrane on Phagocytosis of Asbestos Fibers
N. Fukumori, S. Ogino and M. Sasaki 289

Mutagenicity Test of Asbestos with *Salmonella*
H. Fujita and M. Sasaki 297

Thirteen-Week Toxicity Study of d-α-Tocopheryl Acetate (Vitamin E) in F344 Rats
..... Y. Sakamoto, H. Ando, T. Ikeda, A. Ogata, N. Kamiya, Y. Kubo, A. Kojima, H. Takahashi, Y. Tada, K. Tayama, A. Nagasawa, S. Hayashida, T. Fujii, H. Fujita, N. Fukumori, H. Mikuriya, N. Yano, K. Yuzawa, S. Yoshida, H. Ichikawa and M. Sasaki 300

Mutagenicity Test of Food Additives with *Salmonella typhimurium* TA97 and TA102 (V)
..... H. Fujita and Sasaki 315

Caffeine Senitive Repair and Mutation Induction on UV-or γ-Ray-Irradiated *Dictyostelium discoideum*
..... N. Kananishi, Y. Kinjo and Watanabe 323

Toxic Effects of Acetaminophen and its Isomers on Primary Cultured Rat Hepatocytes
..... K. Fujitani, H. Ichikawa and M. Sasaki 330

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS 335

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS 341

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.*, **41**, 1－5, 1990

時間分解蛍光免疫法による百日咳抗体の測定

安部昭子*, 柴田　実*
高野弘紀*, 一言　広*

Determination of Antibodies against *Bordetella pertussis* by Time - Resolved Fluoroimmunoassay

AKIKO ABE*, MINORU SIBATA*, HIROKI TAKANO*
and HIROSHI HITOKOTO*

Keywords：時間分解蛍光免疫法 time - resolved fluoroimmunoassay，イウロピウム標識抗体 Eu - labelled antihuman - IgG conjugate, 百日咳菌 *Bordetella pertussis*，抗体 antibody

はじめに

百日咳は，ワクチンの改良および接種率の向上により患者数が激減したが小児感染症としてはウイルス性疾患と並んで現在なお予断を許さない疾患の一つである．その予防対策の基礎資料として精度の良い情報が求められている．百日咳抗体の測定はELISA法を実施しているが，再現性や低抗体価の測定において満足のいく結果を得るのが難しい．そこでその要因の検討を目的として臨床診断学で既に実用化されている[1]時間分解蛍光免疫法(TR - FIA法)を百日咳抗体測定の応用に試みたので報告する．

この方法は，標識抗体に酵素を結合させたELISA法に対して，イウロピウム(Eu)キレートを結合させた蛍光免疫測定法(FIA)である．このEuキレートの蛍光寿命(10^3～10^6 μsec)は従来の蛍光物質に比べて長く，パルス励起光照射後一定時間において試料中のバックグランドの短寿命蛍光(1～10 μsec)が消失した後の蛍光強度を時間分解(400～800 μsec)測定する為，従来行なわれてきた他の方法に比べ感度がよく広い測定範囲が得られる[2,3]．

材料と方法

材　料

1．被検血清：1989年の6月から10月に都内の1才から12才までの小児から採取した血清を使用した．

2．標準血清：予研より分与されたヒト標準血清(抗PT価250 ELISA U／ml，抗FHA価400 ELISA U／ml)を小分けし，－80℃に凍結保存し使用した．

3．抗原：200 μg／ml filamentous hemagglutinin(FHA)抗原，200 μg／ml pertussis toxin(PT)抗原(生化学工業製)を希釈調整し使用した．

4．試薬：

1）炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.6)：Na_2CO_3 1.59 g，$NaHCO_3$ 2.93 g，NaN_3 0.2 gを100mlの蒸留水に溶解し，用時10倍に希釈して用いた．

以下は市販品(ファルマシア社)を使用した．

2）Eu標識ヒトIgG抗体(5 μg)を精製水500 μlで溶解し小分けして凍結保存し，用時希釈調整した．

3）増強試薬：0.1M酢酸フタル酸水素カリウム緩衝液(pH 3.2)，0.1% V／V トリトンX－100，15 μM 2－ナフトイル　トリフルオロアセトン(2－NTFA)50 μM 酸化トリ－n－オクチルホスフィン(TOPO)

4）アッセイ緩衝液(pH 7.75)：0.1 M Tris - HCl緩衝液，0.15 M NaCl，0.05% NaN_3，20 μM DTPA，0.5%BSA，0.01% Tween 40

5）洗浄液：NaCl 9 g／1，NaN_3 0.5 g／1，Tween 20　0.25 g／1

5．使用機器：マイクロストリッププレート(Flow社・第日本製薬)，マイクロプレート用シール，デルフィアマイクロプレート振とう機，アーカス蛍光光度計1230

方　法

1．TR - FIA法：

1）抗原を炭酸ナトリウム緩衝液で至適濃度に希釈調

*東京都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, Hyakunin－cho 3 choume, Shinjuku－ku, Tokyo, 169, Japan

整し，プレートの各ウエルに50 μlずつ分注し，4℃一夜静置させ固相用プレートとした．乾燥によるウエル間の反応誤差を防ぐ為反応時にはプレートをシールで覆った．

2）洗浄液を各ウエルに200 μlずつ加え3回洗浄し，あらかじめアッセイ緩衝液で段階希釈した標準血清および被検血清を50 μl加え，振とう機を用いて室温で30分振とうし反応させた．

3）次に非結合抗体を洗浄によって除去し，アッセイ緩衝液で至適濃度に希釈したEu標識ヒトIgG抗体を50 μlずつ加え，室温で2時間振とうし反応させた．

4）プレートを洗浄後，増強試薬を100 μlずつ加えた．これによりEuは標識抗体より解離し，新たに形成されたEuキレートを5分振とう混和および15分静置後，アーカス蛍光光度計で蛍光(Ex 340, Em 615)強度を測定した．

2．ELISA法：伝染病流行予測調査検査術式に従って実施した．

結果と考察

抗原の至適濃度　使用するプレートに固相する最適な抗原量を知るためにボックスタイトレーションを行なった．FHA抗原およびPT抗原を4 μg／mlから0.125 μg／mlまで6段階に希釈し，これに対して標準血清を100倍から4^4×100倍まで5段階に希釈し反応させた．その結果，FHA抗原は2～4 μg／mlでPT抗原は0.5 μg／mlで量も強い蛍光強度を示した．(図1)

段階希釈した2種の異なる血清について抗体価を求めると，この至適抗原濃度において同様に抗体価も高い値を示し，プレートに固相された抗原濃度によって測定抗体価に差がみられた．(図2)

標準曲線の勾配の傾きが大きくかつ測定する抗体価の範囲を1 U／mlから100 U／mlまでとすると，至適抗原量の最小量はFHA及びPTで各々1 μg／ml，0.5 μg／mlと考えられた．

反応時間　抗原抗体反応時間(第1反応時間)を室温30分群と2時間群に分け，それぞれ標識抗体反応時間(第2反応時間)を室温30分と2時間反応させて検量線を比較した．その結果，第1反応時間は第2反応時間に比べ短い時間で十分に反応し高い値を示した．(図3)

3種の異なる血清を用いて反応時間が抗体価に及ぼす影響について検討した．測定値は第1反応時間を長くすると上昇するが第2反応時間を長くすると逆に低下した．(表1)

これらの結果より，第1反応時間は30分で第2反応時

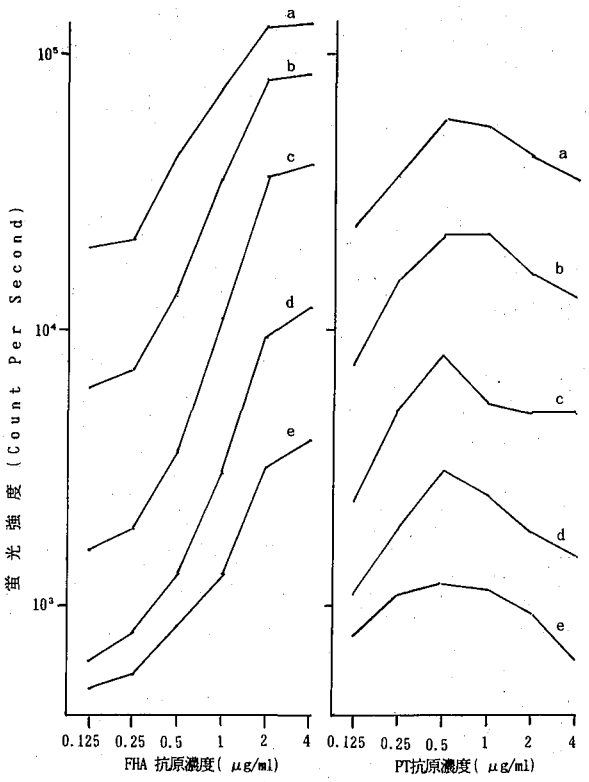


図1．抗原の至適濃度
血清希釈倍数　a:×100, b:×400, c:×1600, d:×6400, e:×25600

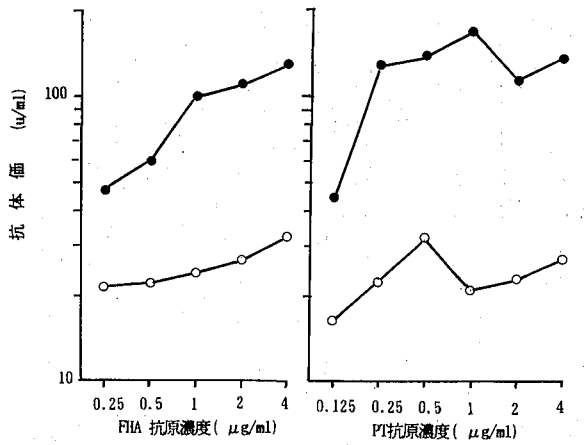


図2．抗原濃度による抗体価の測定値
●：被検血清a，○：被検血清b

表１．反応時間が抗体価に及ぼす影響

反応時間		測定抗体価（U／ml）		
抗原抗体（第１反応）	標識抗体（第２反応）	被検血清 A	B	C
30分	30分	25	36	133
	２時間	21	32	125
２時間	30分	29	40	177
	２時間	25	33	168

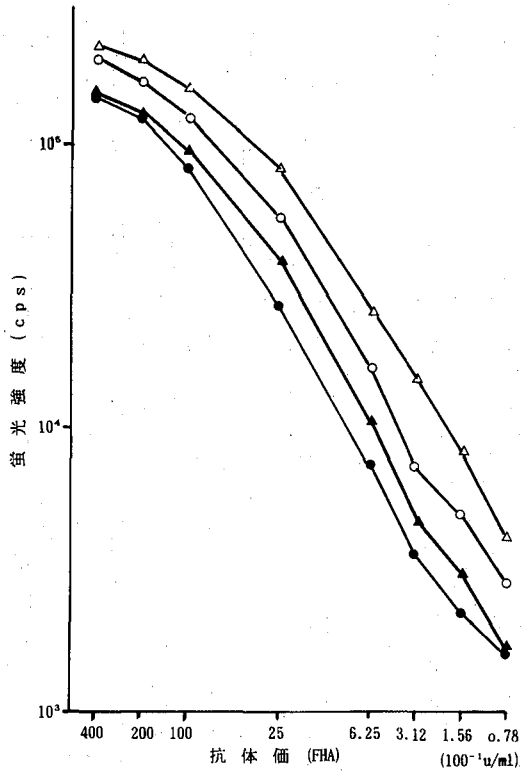


図３．反応時間の違いによる標準曲線

●：抗原抗体反応時間　３０分＋標識抗体反応時間　３０分
○：〃　３０分＋〃　２時間
▲：〃　２時間＋〃　３０分
△：〃　２時間＋〃　２時間

間は２時間が最適と考えられた．

Eu標識抗体濃度　50 ng／mlから400 ng／mlまで４段階のEu標識抗体濃度について検討した．蛍光強度は標識抗体濃度が上昇するにつれ各抗体価共にほぼ平行して上昇しているが，その上昇率は100 ng／mlを境に低下した．（図４）また同時に測定した被検血清の抗体価は標識抗体濃度によると思われる差は見られなかった．これにより至適抗体濃度は100 ng／mlと考えられた．

同時再現性および測定範囲　以上の至適濃度および条

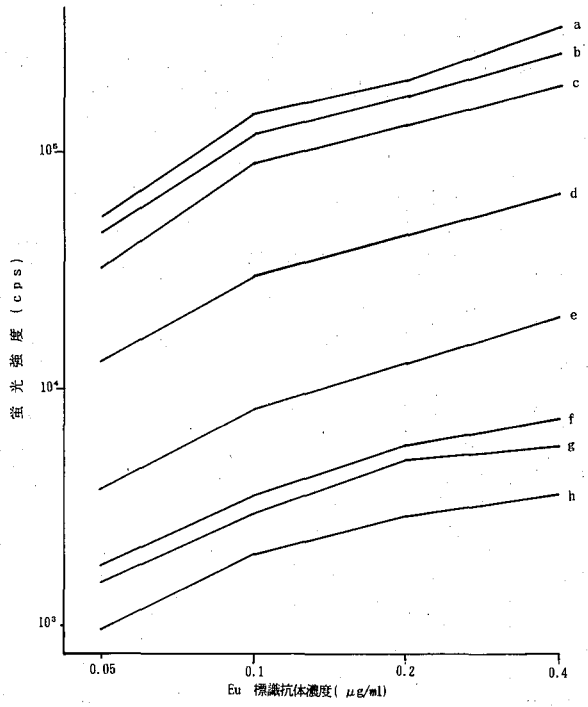


図４．イウロピウム（Eu）標識抗体の至適濃度
血清希釈倍数　a：×100，b：×200，c：×400，d：×1600，e：×6400，f：×12800，g：×25600，h：×51200

件において，標準血清(FHA 400 U／ml)を100倍から８段階希釈し，これをマイクロストリッププレートに各々６ウエルずつ分注し同時再現性を調べた．その結果変動係数は2.4～7.0％であった．

抗体過剰による反応の低下を示さず，かつ直線性がある最大の抗体価100 U／mlであった．又，検量線上で直線性があり，測定値(平均±２SD)がBlank値(平均±２SD)と重複しない測定可能な最小の抗体価は，0.78 U／mlであった．酵素標識抗体を用いたELISA法では低抗体価域で非特異的吸光度の上昇が見られるが，TR-FIA法ではそれがなく低抗体価の精度の良い測定値が得られた．（図５）

TR-FIA法は酵素を用いていないため，酵素反応時間・温度および被血清中に含まれる酵素阻害物質等による影響を受けない利点があり，安定なEuキレートの蛍光強度を時間分解測定することにより，精度が良く測定範囲が得られると考えられた．

次に３種の検体について測定した抗体価の同時再現性（n＝４）では，平均値は各々26.7 U／ml，32.75 U／ml及び119 U／mlで，変動係数は11.0％，1.5％及び6.5％であった．

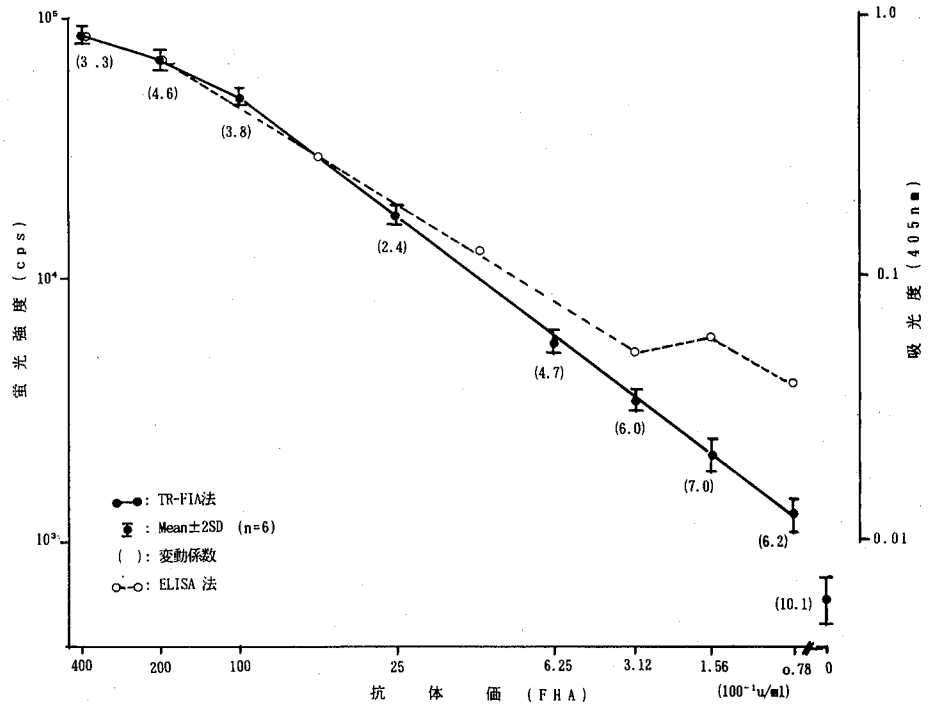


図5．TR–FIA 法による検量線および ELISA 法との比較

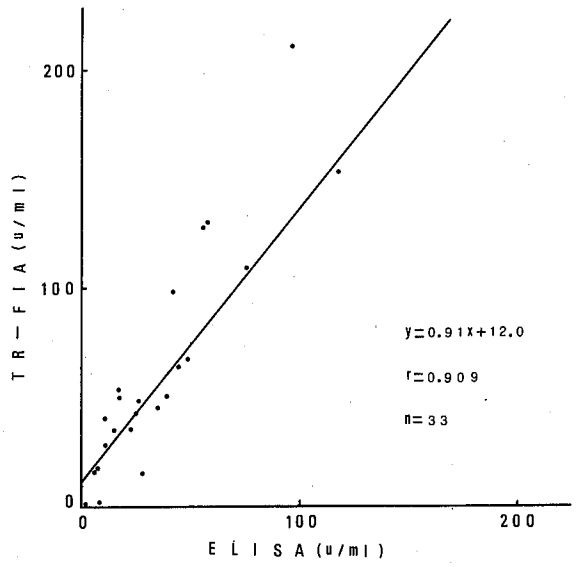


図6．TR–FIA 法と ELISA 法との相関

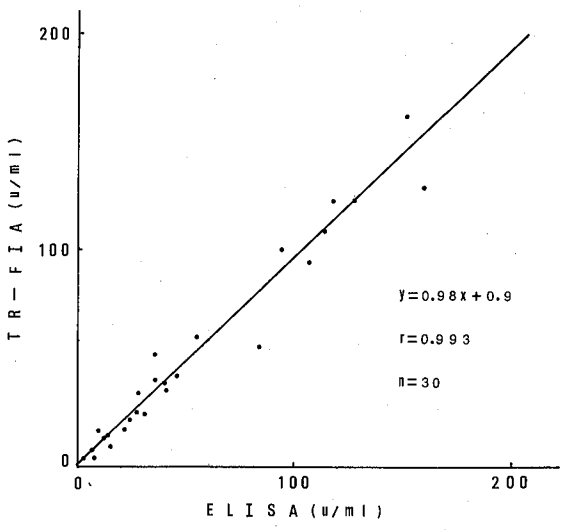


図7．同一の抗原量を各々に用いた TR–FIA 法と ELISA 法との相関

ELISA 法との相関33例の被検血清について TR–FIA 法と ELISA 法を用いて各々測定した抗体価の相関を示した．両者の間には回帰直線　$y=0.91x+12.0$であり，相関係数(γ)は0.909であった．ELISA 法測定値が低値を示しているのは抗原量に基ずいている為と考えられた．(図6)

次に同一の条件で作製した固相化プレートを用い，その各々を TR–FIA 法と ELISA 法で30例測定した抗体価の相関を示した．相関係数$\gamma=0.993$，回帰直線 $y=0.98x+0.9$と極めて良い相関が認められた．(図7)

このように抗原抗体反応にかかわる条件が，免疫測定法に測定結果に及ぼす要因の一であることが分った．同一の抗原量を用いてもプレートに物理的に吸着する抗原量はプレートの材質・Lot および抗原被覆緩衝液の pH によって異なり，客観的データをえるには抗原量を慎重にチェックする必要があると考えられた．

ま と め

百日咳の抗体測定において TR–FIA 法の至適条件と ELISA 法の問題点を検討し，下記の成績を得た．

1．TR–FIA 法における至適条件として

1）使用したマイクロプレートに対する至適抗原量は FHA 及び PT で各々 1 μg／ml，0.5 μg／mlであった．

2）抗原抗体反応時間は30分で標識抗体反応時間は 2 時間が最適と考えられた．

3）至適標識抗体濃度は100 ng／mlであった．

2．蛍光強度の再現性は変動係数2.4～7.0％と良好であった．

3．標準曲線において直線性を示した測定可能な抗体価(FHA)は0.78～100 U／mlの範囲であった．

4．酵素標識抗体を用いた ELISA 法に比較して，低抗体価域に非特異的反応が見られず精度の良い測定値が得られた．

5．抗体に対する抗原量を一定にすることにより，良い相関が得られた．抗原抗体反応にかかわる条件が抗体価に影響を及ぼす要因の一つである事がわかった．

TR–FIA 法は，ELISA 法に比べ感度および測定範囲とも良く，実用化は十分に可能と思われた．

文 献

1）河合 忠，他：時間分解蛍光免疫法(TR－FIA)に基ずくデルフィアシステムの検討．医学と薬学19：855～875，1988

2）Hemmila, I., et al.：*Anal. Biochem.*, 137：335，1984

3）Soini, E. and Kojola, H.：*Clin. Chem.*, 29(1)：65，1983.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 6-10, 1990

東京都内のインフルエンザ検索成績
(1989年11月～1990年2月)

山崎　清*, 伊藤忠彦*, 藪内　清*

Prevalence of Influenza Occurred in Tokyo
(Nov. 1989～Feb. 1990)

KIYOSHI YAMAZAKI*, TADAHIKO ITO* and KIYOSHI YABUUCHI*

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

緒　言

東京都においても毎年冬季にインフルエンザウイルスを主因とする集団かぜが発生している．その主因となるウイルスの型は年々異なっていている．近年のインフルエンザの主要流行原因ウイルスは，インフルエンザＡ型(AH1型，AH3型)あるいはＢ型ウイルスで，それぞれの単独流行[1-2]が主体である．過去12年間を振り返ってみると，1979～80年，1981～82さらに1987～88年の各冬期において，Ａ型，Ｂ型ウイルスによる混合流行[3-6]が認められている．

本報では，1989年11月から1990年2月までに，東京都内で発生したインフルエンザ様疾患の集団発生患者及び渋谷区内の医療機関を個々に受診した患者を対象に病因検索を行ったので，その結果の概略を報告する．

材料と方法

検査対象　集団例は，1989年11月上旬から1990年2月上旬までに，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35集団158名(1集団約5名)の罹患学童及び生徒を検査対象とした．また，散発事例は渋谷区内の5医療機関を受診したインフルエンザ様疾患々者21名(6歳～65歳)を検査対象とした．

ウイルス分離試験　ウイルスの分離は急性期の患者より得られた咽頭うがい液179例について，既報[2]に準じ発育鶏卵及びRD，Hep 2，Vero 355，MDCKの各種培養細胞を用いて行った．

血清学的試験　血清学的試験は急性期及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と略す)及び赤血球凝集抑制試験(以下ＨＩと略す)の2法を行った．

ＣＦに用いた抗原はインフルエンザＡ型，Ｂ型ウイルスのＳ抗原(自家製)及びアデノウイルス抗原(デンカ生研製)を，また，ＨＩには下記のインフルエンザウイルスを抗原株として用いた．

ＡＨ1型：Ａ／山形／120／86

ＡＨ3型：Ａ／四川／2／87，Ａ／東京／1068／89

Ｂ　型：Ｂ／山形／16／88，Ｂ／愛知／5／88

これらのうちＡ／東京／1068／89は今冬期に分離された株であり，他の4株は，すべて今期ワクチン株である．

ＣＦ，ＨＩ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．なお，血清学的試験の検査術式は既報[2]に準じて行った．

成績と考察

患者の病因検索　集団かぜとして搬入された，1989年11月3集団，12月17集団，1990年1月11集団，2月4集団の合計35集団例の患者材料について，ウイルス分離試験並びに血清学的試験を行いその病因検索状況を表1に示した．ウイルス分離試験の結果，13集団例(患者94名中25名)よりインフルエンザＡＨ3型ウイルスを検出した．また，ウイルス分離試験は陰性であったが血清学的試験の結果ＡＨ3型による感染と診断された集団例が6例(1989年11月中旬1集団，12月中旬5集団)認められ，この結果ＡＨ3型による集団例は合計19集団であったことが確認された．一方，Ｂ型ウイルスによる感染が明らかになった集団は，1990年1月に6集団，2月3集団と合計9集団であった．これらのうちウイルスを検出したものは8集団(患者44名中21名)で，他の1集団(1990年

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

表1．集団かぜ患者の病因検索状況（1989～1990年）

発生年月旬	検索対象		検索結果					
	集団	搬入	インフルエンザ					
	例数	件数	AH3型	B型	AH3型＋B型		AH3型＋アデノ	SRSV＊
1989. 11上	1	5	1(1)					
中	1	5	1					
下	1	5	1(2)					
. 12上	3	12	1(3)					2
中	13	58	11(10)				1(1)	1
下	1	5						1
1990. 1中	9	42	4(9)	5(12)				
下	2	8		1(4)	1(1)	(1)		
. 2上	4	18		3(5)	1(1)	(3)		
計	35	158	19(25)	9(21)	2(2)	(4)	1(1)	4

（ ）内はウイルス分離株数
＊：血清学的診断

2月）は血清学的にB型による感染が明らかとされたものであった．この他，2種のウイルスによって発生した，いわゆる混在例が3例認められた．すなわち同一集団内の患者によりAH3型及びB型ウイルスが同時に分離された2事例，及びAH3型ウイルスとアデノウイルスとの混在例が1事例認められた．以上の結果，35集団中31集団はインフルエンザウイルスが関与した事例であった．残り4集団のうちペア血清が得られた患者についてはSRSVの感染を疑いWB法[7]により，本ウイルスに対する抗体の有無を検討した結果，4集団，18名中11名にSRSVに対する血中抗体の有意上昇が認められ同ウイルスによる感染例であったことが確認された．これまで，関根ら[8]，林ら[9]はインフルエンザ様疾患の症状を呈し，かつ下痢及び嘔吐を伴なった症例の中にSRSV感染症が含まれていることを明らかにしているが，今冬期においてもその中に本症が含まれていることが確認された．

次ぎに，散発例21例のウイルス分離試験の結果，2例よりインフルエンザAH3型ウイルスを，及びB型ウイルスを2例，更に2例よりアデノウイルスを分離した．しかし残り15例はウイルス分離試験陰性であった．また，この15例のうちペア血清が得られた7例について，血清学的試験を行ったが，いずれもインフルエンザ及びアデノウイルスに対する抗体の有意上昇は認められず，病因を明らかにすることはできなかった．しかし，急性期のみ血清が得られた患者の中には，インフルエンザA型，B型及びアデノウイルスに対するCF抗体価が16倍あるいは32倍と上昇している例も認められたことから，これらの患者では既にそれぞれウイルスに感染を受け，ある程度経過した後，医療機関を受診したものと考えられる．

患者血清の血清学的試験成績　集団かぜとして搬入されたインフルエンザ様患者ペア血清134例について，血清学的試験を行った結果，インフルエンザAH3型の抗原株に抗体価の有意上昇が認められたものは70例，同じくB型株に対しては32例であった．その他1例にアデノウイルスに対する抗体価の有意上昇が認められたが，残り31例についてはいずれのウイルス抗原株に対しても，感染の診断基準となる抗体の有意な上昇は認められなかった．また，ウイルスが検出されているにもかかわらずHI抗体価の有意上昇がなかった例がAH3型で4例，B型で2例計6例認められた．そこで，これらの血清について，それぞれの患者から分離したウイルス株を抗原としてHIを行った．表2に示すごとく，HI抗体価測定用抗原4株に対する保有抗体は，急性期のそれに対し回復期では2倍の上昇にとどまりいずれも有意上昇には至らなかった．これに対し，それぞれの患者から分離した株に対するHI抗体価は，No.1及びNo.5を除きそれぞれ有意上昇が認められた．なお，これら6例の個人調査表によれば，いずれも1989年12月までにインフルエンザワクチン接種を受けており，特にNo.1の患者はAH3型ウイルスに感染する直前に第2回目のワクチン接種を受けていた．このため新たにウイルス感染を受けたものの既に血中抗体は産生されており，そのために抗体の有意上昇までには至らなかったものと考える．なお，これらの患者のCF抗体価は表2に示すごとく全例とも上

表2．ＨＩ抗体価の有意上昇が認められなかった患者由来株とのＨＩ試験

患者血清	ＨＩ抗体測定用ウイルス抗原株					患者由来ウイルス抗原株						ＣＦ反応	
	ＡＨ１	ＡＨ３	ＡＨ３	Ｂ	Ｂ	ＡＨ３	ＡＨ３	ＡＨ３	ＡＨ３	Ｂ	Ｂ	Ａ型	Ｂ型
	Ａ／山形／120／86	Ａ／四川／２／87	Ａ／東京／1068／89	Ｂ／山形／16／88	Ｂ／愛知／５／88	Ａ／東京／1249／89	Ａ／東京／1264／89	Ａ／東京／1315／89	Ａ／東京／90／90	Ｂ／東京／68／90	Ｂ／東京／152／90		
No. 1	512*	128	512	1024	−	256	−	−	−	−	−	8	16
(1249／89)	512**	256	1024	1024	−	256	−	−	−	−	−	32	16
No. 2	256	128	256	256	−	−	64	−	−	−	−	<8	16
(1264／89)	512	256	512	256	−	−	256	−	−	−	−	16	16
No. 3	512	256	512	256	−	−	−	256	−	−	−	<8	8
(1315／89)	512	512	1024	256	−	−	−	1024	−	−	−	32	8
No. 4	512	256	1024	512	−	−	−	−	512	−	−	8	8
(90／90)	512	512	2048	512	−	−	−	−	2048	−	−	32	8
No. 5	512	64	−	256	64	−	−	−	−	256	−	8	8
(68／90)	512	64	−	512	64	−	−	−	−	512	−	8	32
No. 6	1024	256	−	512	512	−	−	−	−	−	64	<8	<8
(152／90)	1024	256	−	1024	1024	−	−	−	−	−	256	8	32

*：急性期抗体価

**：回復期　〃

昇していた.

インフルエンザウイルス分離患者のＨＩ試験成績　インフルエンザＡＨ３型あるいはＢ型ウイルスが分離された患者のうち急性期及び回復期のペア血清が得られた41例のＨＩ抗体価の変動を表３に示した．ペア血清における抗体の有意上昇の目途は，４～８倍以上である．表に示す如く今冬期のインフルエンザ様患者ペア血清においてＡＨ１型山形／120／86株に対するＨＩ抗体価の有意上昇例は１例も認められなかったが，ＡＨ３型並びにＢ型抗原株の両者に対してはそれぞれ抗体価の上昇が認められた．ＡＨ３型抗原株に対する有意な抗体の上昇率は，Ａ／四川／２／87株に対して73.4%，Ａ／東京／1068／89株に84.6%であった．また，Ｂ型抗原株に対しては，Ｂ／山形／16／88株に86.7%，Ｂ／愛知／５／88株に66.7%であった．しかし，これら４抗原株に対して，急性期から回復期にかけてのＨＩ抗体価の上昇が４倍以下と低く押さえられたものは，それぞれ全体の57.7%，53.8%，46.7%，60.0%と多い．ペア血清における抗体の有意上昇は，急性期のＨＩ価が高いためにそれほど大きなものとはならなかった．また，急性期血清において64倍以上の抗体を保有している例が多く認められた．このことは個人差も考慮すべきであるが，患者の急性期における高い抗体価の保有は，毎年流行するＡ型あるいはＢ型インフルエンザウイルスによる感染既往歴及びワクチン接種歴のために出現すると考えられる．

今冬期以前の1989年５月～９月の間に，集団かぜとして搬入された４事例のうち１事例よりＢ型ウイルスが検出されその動向が注目された．しかしながら，前記した結果のように東京都における今冬期のインフルエンザの流行は，ＡＨ３型ウイルスが先行し，その後Ｂ型ウイルスも加わった混在流行であったことが確認された．なお，全国的なインフルエンザの流行も1989年10月に神戸市においてＡＨ１型ウイルス検出の報告[10]があったものの，その後同ウイルスの検出情報はなく，ＡＨ３型ウイルスの流行が先行し，それにＢ型ウイルスが加わったものであったことが報告されている[11].

ま と め

１．東京都内における1989年11月上旬から1990年２月初旬にかけて流行したインフルエンザは，集団発生及び散発例とも，インフルエンザＡＨ３型ウイルスによるものが主体でこれにＢ型ウイルスによるものも加わった混在流行であった.

表３．インフルエンザウイルス分離陽性患者のＨＩ試験成績（1989年11月～1990年２月）

回復期

A/四川/2/87 (H3)

急性期	<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	計
<1	1**		2			1				4
1					2	1	1			4
2					3	2	1			6
3				1	2	3	1			7
4						2	2			4
5							1			1
6										
7										
8										
計	1		3		7	9	7			26

A/東京/1068/89 (H3)

急性期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	計
<1				1						1
1				2				2		4
2						3	2			5
3						3	2	2		7
4						1	1	1		3
5							3	2		5
6								1		1
7										
8										
計				3		7	8	8		26

A/山形/120/86 (H1)

急性期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	計
<1										
1										
2			2							2
3				2						2
4					9	1				10
5						10				10
6						1	10	1		12
7								5		5
8										
計		2	2	9	12	10		6		41

B/山形/16/88

急性期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	>8	計
<1							1				1
1				2				1			3
2							2				2
3						1			1		2
4							1		1	2	4
5							1	1			2
6								1			1
7											
8											
計				2		1	5	3	2	2	15

B/愛知/5/88

急性期	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	>8	計
<1						1					1
1				1		1					2
2			1		1						2
3				1		1			1		3
4						1		1			2
5							1	1	1	1	4
6											
7								1			1
8											
計			1	2	1	4	1	3	1	2	15

＊：8×2^n 値　　＊＊：例　数

2．同一集団においてＡＨ３型及びＢ型の２種のウイルスが同時に分離された事例が２例認められ，流行期の一時期に，両ウイルスが同時流行していたことを確認した．

3．ＡＨ３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，同一集団内にインフルエンザＡＨ３型とアデノウイルスの混在が確認された．

4．インフルエンザ様疾患として搬入された集団例のうち病因を明らかにできなかった４集団(18名中11名)の患者に，SRSV に対する血中抗体の有意上昇が認められ同ウイルスによる感染例であったことが明らかとなった．

文　献

1）坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎　清，藪内　清：東京衛研年報，35，69－72，1984
2）山崎　清，伊藤忠彦，新開敬行，大貫奈穂美，貞升健志，藪内　清：東京衛研年報，40，36－40，1989
3）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
4）山崎　清，伊藤忠彦，中村清純，新開敬行，大貫奈穂美，藪内　清：東京衛研年報，39，32－34，1988
5）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
6）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
7）宇田川悦子，山崎修道，林　志直，関根整治：臨床とウイルス，17，154－158，1990
8）関根整治，安東民衛，林　志直，岡田正次郎，藪内清，三木　隆，大橋　誠：感染症誌(臨時増刊号)，63，202，1989
9）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，藪内　清，三木　隆，大橋　誠，鈴木重任，堀田義洋，小杉真沙人，田中　学，東京衛局会誌，82，86－87，1989
10）国立予防衛生研究所：病原微生物情報，10(12)，249－272，1990
11）国立予防衛生研究所内日本インフルエンザセンター：INFLUENZA VIRUS SURBEILLANCE - JAPAN No. 2，No. 3，1990

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 11-15, 1990

マガキに添加したポリオウイルスの セルロース吸着・凝集法による回収実験

新開敬行*, 吉田靖子*, 矢野一好*, 藪内清*

A Recovery Experiment of Polioviruses from Oysters by Cellulose Adsorption-Flocculation Method.

TAKAYUKI SHINKAI*, YASUKO YOSHIDA*, KAZUYOSHI YANO* and KIYOSHI YABUUCHI*

Summary

A method for recovery of poliovirus type 1 (Lsc. 2 ab strain) was examined by inoculating oysters with high initial levels (10^4PFU／ml) of experimental virus. The polyelectrolyte method of preparing oyster samples for virus recovery is very simple and quick. Initially, the cellulose adsorption-floculation method was used to examine the direct assay of exogenously-infected oysters homogenated in glycine - saline buffer (pH 9.0) added to cationic polyelectrolyte floculant (Sharoll DC－902 P). Subsequently, supernatant was detoxified, and an average recovery efficiency of 57.5% was obtained for initial inoculated polioviruses. Virus values were then determined for the plaque assay. This was a reliable and efficient method for recovery of virus experimentally inoculated in oysters. Secondary concentrations were also examined using the cellulose adsorption-floculation method. Supernatant was adjusted to pH 7.0 by 5 N－HCl and then activated cellulose was added. This mixture was then floculated in an anionic polyelectrolyte floculant (T 212) extraction. The percent of virus adsorption to cellulose was calculated to be an average of 81.8%, indicating the increased efficiency of adsorption to cellulose. Elution efficiencies were found to very greatly depending upon the buffer extraction, and further investigation is needed. The present report described tests using two polyelectrolytes, and poliovirus recovery from homogenates of inoculated oysters. It was found that DC－902 P, cellulose and T 212 were well suited for this purpose.

Keywords：カキ oyster, 高分子凝集剤 polyelectrolyte, ポリオウイルス polio virus, 吸着 adsorption, 凝集 flocculation, 濃縮 concentration

緒　言

近年，我が国においてもカキの喫食に起因すると思われるA型肝炎ウイルス感染症例が多くなってきている[1]．しかし，現状ではカキ自体から病原ウイルスを検出することは困難である．その原因は，A型肝炎ウイルスを培養する実用的な方法がないため，酵素抗体法等による血清学的なウイルス検出手段を応用しなければならない．酵素抗体法によっても，ウイルスを検出するには，最低10^6レベルのウイルス量が必要である[2]．このレベルのウイルス量は，患者が急性期に排泄するウイルス量に匹敵するものであり，自然界のカキが蓄積しているウイルス量とは考えにくい．一方，腸管系ウイルスのヒトに対する最少感染単位は，1 PFU であるともいわれている[3]．したがって，カキに起因すると考えられているウイルス感染症[4]の原因を究明するには，カキに蓄積されているウイルス[5]を濃縮する方法を確立することが先決

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

であろう．これまでにも，種々の検出方法[6-8]が検討されているが，カキを乳剤とした際に見られる多くの夾雑物がウイルス分離操作に支障をきたすため，いまだ簡便で効率的な濃縮方法は確立されていない．

著者らは，ポリオウイルスを実験指標としてカキに添加したウイルスを回収するための濃縮処理の検討を行ってきた[9,10]．pH 9 のグリシン緩衝液でカキをホモジナイズしカチオン性有機凝集剤で処理することにより，ウイルスを効率よく分画できることを見出した．分画したウイルスを更に濃縮する方法として，DEAE－セルロースの使用(セルロース吸着・凝集法)を試みた．DEAE－セルロースにウイルスは効率よく吸着するが，セルロースからのウイルスの誘出には，難点があることを確認した．

そこで，ウイルスを吸着させたセルロースから効率よくウイルスを回収するための各種の誘出液について検討を行ったのでその結果を報告する．

材　　料

供試ウイルス　ポリオウイルス 1 型弱毒株(Lsc. 2 ab)を常法に準拠し[11]，BGM 細胞で培養したものを用いた．

カキ　市販のマガキ(生食用・加熱調理用)を用いた．カキは実験に供するまで－80℃に凍結保存した．

凝集剤　ウイルス分画用としてカチオン性有機凝集剤(シャロール DC－902 P，第一工業製薬株式会社製)を，濃縮用としてアニオン性有機凝集剤(T 212，市川毛織株式会社製)を用いた．

セルロース　DEAE－セルロース(和光純薬製スタンダードタイプ)を水酸化ナトリウム(0.1 N)と塩酸(0.1 N)で活性化処理したものを用いた．

ナイロンメッシュ　18デニールの袋状構造品(市販のハイソックス)を用いた．

ウイルス誘出液　グリシン緩衝液(M／10 Glycine)，5％ビーフエキストラクト溶液，炭酸緩衝液(M／50 Na_2CO_3：M／50 $NaHCO_3$＝1：1)，トリス緩衝液(M／5 Tris)，トリス－グリシン緩衝液(M／2 Tris＋M／2 Glycine)および3％スキムミルクを 5 N と 1 N の水酸化ナトリウム溶液でこれらの誘出液の pH を 9～10の範囲に調整したものを用いた．

方　　法

1．ウイルス添加カキ乳剤　カキ乳剤の作製は前報[9,10]に準拠し，－80℃に凍結保存したカキを37℃で融解後，カキのみをホモジナイザーで乳化した．このカキ乳剤にポリオウイルスを10^4PFU／ml 濃度に添加し，よく撹拌した．これにグリシン緩衝液を加え10％乳剤とした．

2．ウイルス分画法　ウイルス添加カキ乳剤を撹拌しながら，50％濃度に溶解したカチオン性凝集剤を除々に添加し，カキ由来の固形物が十分凝集したことを確認したのちナイロンメッシュでろ過し，ろ液をウイルス分画として回収した．

3．ウイルス分画の濃縮法　濃縮法は Fig. 1 に示すごとく前述の分画を 5 N と 1 N の塩酸で pH 7 に調整後，35ml ずつ12本に分注し，それぞれにセルロースを30％濃度以上になるように添加し撹拌しながらウイルスをセルロースに吸着させた．これに，0.02％濃度に溶解したアニオン性凝集剤を撹拌しながら徐々に添加し，セルロースの凝集塊を確認したのち3,000 rpm 5 分間遠心操作を行いセルロースを回収した．このセルロースに材料の項に示した 6 種類の誘出用緩衝液と，それらの緩衝液にそれぞれ 2 M の硝酸ナトリウム($NaNO_3$)を添加した[12]合計12種類の誘出用緩衝液をそれぞれ約10ml ずつ加えセルロースからのウイルスの誘出処理を行った．次に，この誘出液を 2 等分し，その一方に等量のクロロホルムを加え，撹拌後，再度3,000 rpm 10分間遠心操作を行い，水層をウイルス定量用の試料とした．なお，他の一方は，

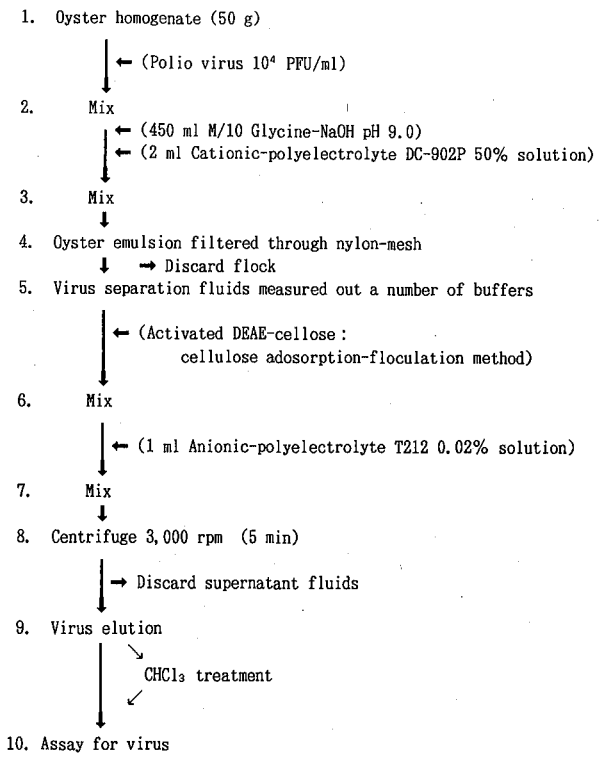


Fig. 1．Recovery virus from oyster emulsion by concentration method.

そのままウイルス定量用の試料とした.

4．ウイルスの定量 ウイルス量は，あらかじめ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BGM細胞を用いて，プラック形成法により測定し，PFU単位で表示した．3．で得られた試料の10倍段階希釈系列を細胞維持液で作成し，1希釈当り1mlずつ3穴の細胞に接種した．重層寒天培地および細胞維持液等の処方は常法に準拠した[11]

結　　果

グリシン緩衝液によるウイルス分画の作製：本実験に用いたウイルス添加カキ乳剤からの分画法による回収率を，Table 1に示した．同一条件により5回の実験を繰り返した結果，その平均回収率は，添加量に比して57.5±17.6%であり，乳剤中の約半数以上のウイルスが回収された.

誘出用緩衝液によるウイルス分画濃縮の検討：ウイルス分画を「セルロース吸着・凝集法」[13]により濃縮した．3,000 rpm 10分間遠心操作を行って回収したセルロースに，12種類の誘出用緩衝液を用いてウイルスの誘出を行った．回収ウイルス量ならびに回収率をTable 2およびTable 3に示した．なお，Table 3には，細胞毒性を除去する目的で誘出液をクロロホルム処理した結果を示した．これらの実験結果から，セルロースからのウイルス誘出用緩衝液としては硝酸ナトリウムを添加したグリシン緩衝液が有効であることが分かった．ウイルスの回収率は，クロロホルム処理を行わない場合に最

Table 1. Recovery of polio virus by floculation with glycine buffer and Cationic-polyelectrolyte from exprimentally infected oyster.

Inocculated virus dose (PFU／500ml)	Recovery virus dose (PFU／500ml)	Percentage recovery (%)
355,000	155,000	43.7
340,000	250,000	73.5
350,000	160,000	45.7
400,000	180,500	45.1
370,000	295,000	79.7
363,000	208,100	57.5±17.6

Table 2. Concentration of polio virus by cellulose adosorption-floculation method from exprimentally infected oyster.

Buffers	$NaNO_3$	Recovery dose of virus (PFU)	Recovery rate (%)
Glycine	+	71,000	28.2
	−	47,000	18.7
5 %beefextract	+	45,000	17.9
	−	35,000	13.9
Bicarbonate	+	33,000	13.1
	−	30,000	11.9
Tris	+	37,000	14.7
	−	22,000	8.7
Tris–Glycine	+	49,000	19.4
	−	42,000	16.7
3 %skimmilk	+	46,000	18.3
	−	48,000	19.0

Examination volume：Before then add in cellulose was 500ml, after it was 35ml and final concentration volume was 10ml.
Inoculated virus dose to oyster 4,325,000 PFU
Losted virus dose to oyster 725,000 PFU
(virus lost rate 16.8%)
Added virus dose in cellulose 252,000 PFU
(adosorption rate 81.8%)

Table 3. Concentration of polio virus by cellulose adosorption-floculation method from exprimentally infected oyster.

($CHCl_3$ treatment)

Buffers	$NaNO_3$	Recovery dose of virus (PFU)	Recovery rate (%)
Glycine	+	47,000	18.7
	−	42,000	16.7
5 %beefextract	+	38,000	15.1
	−	42,000	16.7
Bicarbonate	+	29,000	11.5
	−	35,000	13.9
Tris	+	34,000	13.5
	−	36,000	14.3
Tris - Glycine	+	62,000	24.6
	−	39,000	1.5
3 %skimmilk	+	56,000	22.2
	−	44,000	17.5

Examination volume : Before then add in cellulose was 500ml, after it was 35ml and final concentration volume was 10ml.
Inoculated virus dose to oyster 4,325,000 PFU
Losted virus dose to oyster 725,000 PFU
(virus lost rate 16.8%)
Added virus dose in cellulose 252,000 PFU
(adosorption rate 81.8%)

も高く，28.2%の値となった．グリシン緩衝液以外の誘出用緩衝液による最終ウイルス回収率は，最低が硝酸ナトリウム不含のトリス緩衝液の8.7%，最高は硝酸ナトリウム含有のトリス－グリシン緩衝液の19.4%となった(Table 2)．硝酸ナトリウム不含グループの緩衝液を使用した誘出では，含有の各緩衝液のものと比較して総ウイルス量におのおの10%前後の増減が認められ，1例を除きウイルス量が低減していた．また，誘出液をクロロホルム処理に供した場合の回収ウイルス総量は，同様な緩衝液の無処理のものと比較するとウイルス総量で最大33.8%の減少を認めたが，逆に63.6%増加したものもあり，使用した緩衝液によってクロロホルム処理に対する整合性に差異のあることが推察される(Table 3)．

考　察

本実験のウイルス回収行程の原理は，液体中における物質の電位差を利用したものである．具体的には，カキ乳剤中に含まれるウイルス粒子がアルカリ性溶液中では固形物から遊離した状態にある．この状態で作用範囲が中性からアルカリ性の高分子有機凝集剤を添加すると主として固形物が凝集し，遊離したウイルスを含む分画の回収は容易となる．また，ウイルス分画の濃縮に用いた「セルロース吸着・凝集法」[13]は，プラス(+)に荷電した活性化セルロースを用い，pH値を中性付近に補正したウイルス分画にセルロースを添加するとウイルス粒子が活性化セルロースに吸着する原理に基づくものである．セルロースに吸着したウイルスを誘出させる誘出用緩衝液の検討は，主成分の異なる6種類の緩衝液とそれらに硝酸ナトリウムを添加した合計12種類について実施した．その結果，硝酸ナトリウムを添加しない緩衝液ではウイルスの回収率が8.7～19.4%，硝酸ナトリウムを添加した緩衝液では11.5～28.2%となり多少の矛盾はあるものの硝酸ナトリウムの添加はセルロースからのウイルスの誘出を促進する一因子と考えられた．検討した範囲の誘出用緩衝液の中で最もウイルス誘出効果が高かったのは，硝酸ナトリウムを添加したグリシン緩衝液である．この緩衝液によるウイルスの回収率は，30%弱ではあるが過去の実験[14]で用いた5%ビーフエキストラクト(pH 9，$NaNO_3$不含)溶液での回収率が1%前後の低

値であった結果から考えると硝酸ナトリウムを添加したグリシン緩衝液はかなり効率のよい誘出液であると思われる.

硝酸ナトリウムの添加によりウイルスの誘出率が向上した理由は, ナトリウムイオンがセルロースと吸着したウイルスの遊離に有効に作用していたものであろうと推察される. 著者らは, ゼータプラスフィルターからのウイルスの誘出に塩化ナトリウムの添加(5%濃度以上)が有効であることを明らかにしたが[15], 塩化ナトリウム濃度が上昇すると細胞の浸透圧が変化しウイルスの定量が不可能となる欠点があった. 今回の実験では, ウイルス定量用の細胞への浸透圧の変化を考慮し, 塩化ナトリウムと同様のナトリウムイオンを持つ硝酸ナトリウムの使用を試みた. その結果, セルロースからのウイルスの誘出率も向上し, かつ, 細胞への悪影響も減少したと考えられる.

今後さらに誘出液の改良を重ね, より効率のよい実用的なウイルスの濃縮方法について検討していく必要があろう.

結　論

カキからのウイルス検出を目的として, ポリオウイルスを添加したカキ乳剤を凝集処理し, ウイルスを活性化セルロースに吸着させ, セルロースからウイルスを誘出させて濃縮する方法について検討し, 以下の結果を得た.

1) カキ乳剤からのウイルス分画と夾雑物の除去は, グリシン緩衝液(pH 9)の使用とカチオン性高分子有機凝集剤による処理方法が有効であった(回収率57.5±17.6%).

2) 分画したウイルスの濃縮は, 活性化DEAE-セルロースを用いた「セルロース吸着・凝集法」が高い効果を挙げた(吸着率81.8%).

3) セルロースからのウイルス誘出用の緩衝液としては, グリシン緩衝液(M/10 Glycine)に硝酸ナトリウム(2 M)を添加したものが最も効率が良かった(誘出率28.2%).

(本研究は, 平成元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) 上村朝輝, 小島秀男：医学のあゆみ, 151(13), 737-739, 1989
2) 松本一郎：臨床とウイルス, 15, 71-80, 1987
3) Katz, M. and Plotkin, S.A.：*Amer. J. Public Health*, 57, 1837-1840, 1967
4) Seiji, S., Shojirou, O., Yukinao, H. et al.：*Microbiol. Immunol.*, 33(3), 207-217, 1988
5) Cole, M.T., Kilgen, M.B., Reily, L.A., Hackney, C.R.：*J. Food Prot.*, 49(8), 596-601, 1986
6) Sullivan, R., Peeler, J., Tierney, J.T., Larkin, E.P.：*J. Food Prot.*, 47(2), 108-110, 1984
7) Sullivan, R., Peeler, J., Larkin, E.P.：*J. Food Prot.*, 49(3), 226-228, 1986
8) Kostenbader, K.D., Cliver, D.O.：*Appl. Microbiol.*, 24(10), 540-543, 1972
9) 吉田靖子, 矢野一好, 藪内　清：東京衛研年報, 39, 49-53, 1988
10) 矢野一好, 吉田靖子, 藪内　清：東京衛研年報, 40, 26-31, 1989
11) 厚生省監修：微生物検査必携ウイルス・リケッチャ検査, 日本公衆衛生協会, 東京.
12) J. Jofre, M. Blasi, A. Bosch, F. Lucena：*Water Science Technology.*, 21(3), 15-19, 1989
13) Kazuyoshi, Y., Yasuko, Y., Mitsumi, K.：*IAWPRC*, TUBINGEN SYMPOSIUM., 1-6, 1990
14) 新開敬行, 吉田靖子, 矢野一好, 藪内　清：感染症誌, 64, 132, 1990
15) 矢野一好, 林　志直, 藪内　清, 田口文章：用水と廃水, 28(2), 183-191, 1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 16-21, 1990

HIV-1抗体検査における判定保留血清の二次元電気泳動法による検討

大貫 奈穂美, 貞升 健志, 関根 大正
太田 建爾, 藪内 清, 三木 隆

Analysis of Indeterminate Samples in HIV-1 Antibody Tests by Two-Dimensional Electrophoresis

NAHOMI OHNUKI, KENJI SADAMASU, HIROMASA SEKINE
KENJI OHTA, KIYOSHI YABUUCHI and TAKASHI MIKI

Abstract

In HIV-1 antibody confirmation test by western blot, some serum samples react with antigens at positions corresponding to HIV-1 gag, but not with those corresponding to envelope antigens. Such samples are regarded as indeterminate, and a few have been reported to convert from indeterminate to positive over a two year period. To determine whether these indeterminants are infected with HIV-1, their reactivity with HIV-1 antigens separated by two-dimensional electrophoresis was examined. The indeterminate sera reacted with seven antigen spots with isoelectric points (pI) 7.50, 7.20, 7.00, 6.83, 6.75, 6.66 and 6.52, respectively, at the position of p24. HIV-1 positive serum also reacted with eight spots, including the seven spots which react with indeterminate sera at the p24 position. Six of these seven spots had the same pI values as spots which react with anti-p24 monoclonal antibody. These results suggest that some indeterminate sera are reactive with the specific p24 antigen of HIV-1.

Keywords: HIV-1, HIV-1 antibody test, p24 core protein, indeterminate sample, two-dimensional electorophoresis

緒　言

1981年にアメリカで初めてAIDS患者が報告されて以来，HIV-1(ヒト免疫不全ウイルス1型)感染者は増加の一途を辿り，1990年6月現在，全世界でAIDS患者は26万人以上に達している[1]．わが国での感染者は1,188人，患者は193人と報告されており[2]，アフリカ，欧米諸国と比較して人口当たりの感染率は低い．しかし，現在わが国の感染者，患者は血友病患者が主体という状況から，異性間性交渉による感染の型に移行するきざしが見えており，今後の感染者増大の可能性は否定できない．

HIV-1抗体検査において一次スクリーニングとしては酵素免疫測定法(EIA)または粒子凝集法(PA)が，確認検査法としては間接螢光抗体法(IFA)またはウエスタンブロット(WB)法が用いられている．WB法でウイルスのコア蛋白の位置のバンドのみが存在し，エンベロープ蛋白のバンドを欠くものがあり，これらの検体は判定保留としている．この様なコア蛋白(p24)の位置のバンドのみを示す判定保留者の中に3ないし6か月毎の再検査で抗エンベロープ抗体が陽性化し，HIV-1感染が明らかになるものがあると言われている[3]．

我々はこの様な判定保留者が将来陽性化する可能性があるか否かを早期に確認するための方法を開発する目的から，HIV-1抗原標品を二次元電気泳動法で展開し，p24の位置のみにバンドを示す判定保留血清との反応性を調べたので報告する．

材料および方法

1．HIV-1抗体検査

HIV-1抗体検査は1988年4月より1990年3月まで特

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, Hyakunin-cho 3 Chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

別区(目黒区を除く)及び東京都下の保健所を訪れた検査希望者について行った[4,5]．検査法は一次スクリーニングにEIA，確認検査にはWB法とIFAを用いた．EIAはパスツール社のパスツールエラビアを用いた．カットオフ値(OD値0.300)以上の値を示した検体はEIA(＋)と判定し，WB法とIFAを用い確認検査を行った．さらにカットオフ値未満でその値がOD値 0.100～0.299を示した検体は，EIA(－)と判定したものの，これらの検体についてもWB法による検査を行った．WBはデュポン社のデュポンHIVウエスタンブロットキットを用いた．判定基準はいかなるバンドも出現しない場合を陰性，p 24，gp 41，gp 120／gp 160のバンドのうち，いずれか2本が検出された場合を陽性とし，バンドは出現するものの陽性基準に合致しない場合を判定保留とした[6]．IFAは予研から供与を受けたHIV－1抗原スライドを使用し，常法[7]にしたがって行った．

2．二次元電気泳動

使用した抗原はデュポン社製の不活化精製HIV－1抗原である．血清はHIV－1抗体陽性患者血清，抗p 24マウスモノクロナール抗体及び，WB法でp 24の位置にバンドが認められた判定保留検体を使用した．

HIV－1抗原を9.5M尿素，2％NP 40，2％アンフォライン，5％2－メルカプトエタノールで処理後，O'Farrellの方法[8,9]に従って等電点電気泳動を行った(一次元)．一次元ゲルをSDSサンプルバッファーで平衡化した後，SDS存在下ポリアクリルアミドゲル電気泳動により抗原を分子量の違いによって分離した(二次元)．次いでスラブゲル上の抗原をニトロセルロース膜上に，210 mAで30分，次いで360 mA 2時間電気的に転写した．ニトロセルロース膜を3％Dry Milkで15分ブロッキングしたのち，200－5,000倍希釈した被検血清と4℃で16時間反応させた．抗原と反応した抗体はビオチンーアビジンーアルカリフォスファターゼ系を用いて検出した．

また，各スポットの等電点は，一次元目のゲルを平衡化する前に超小形pH複合電極(富士科学計測㈱)を用いて測定した．

結　　果

1．抗体検査

1988年4月より1990年3月までのHIV－1抗体検査受診者は計3,885名，うち陽性は1名であった．月別受診者数は150人から200人程度で推移しているが，全体的には減少傾向にある．1989年3月からは匿名検査方式を徹底させ，受診に当たっての問診表を廃止したが，それによる受診者数の増加は見られなかった(Fig. 1)．

陽性と判定された検体以外にWBを行ったのは27名(31検体)で，WBによりバンドが認められたのは18名(21検体)であった．18名中11名(61％)でp 24の位置にバンドが認められた．WBによるバンドの出現率をTable 1に示した．

2．判定保留検体のWBパターン

判定保留検体，HIV－1抗体陽性者血清及び抗p 24マウスモノクロナール抗体とHIV－1抗原ストリップとのWB反応のパターンをFig. 2に示した．抗p 24マウスモノクロナール抗体(lane 2)では，p 24，p 55にバンドが検出された．また，典型的な抗HIV－1陽性血清(lane 1)では，gp 160，gp 120，gp 41のエンベロープ糖蛋白，

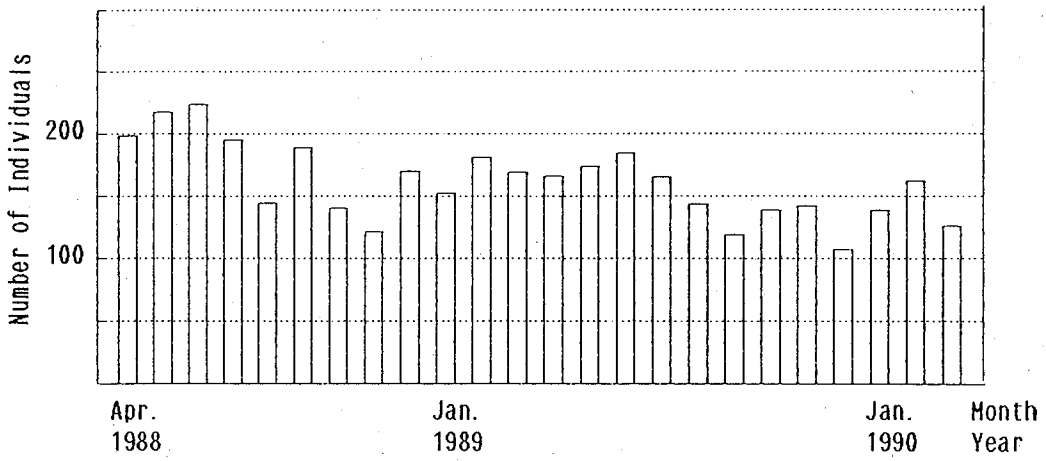


Fig. 1. Monthly Shift of Number of Individuals Who Visited Health Centers in Tokyo for the Test of HIV－1 Antibody.

Table 1. Band Patterns of Indeterminate Sera on Western Blotting (1988. 4 ～1990. 3)

Band pattern	EIA (+)	EIA (−)	No. (%)
17 only	3	2	5 (27.8)
24 only	1	8	9 (50.0)
55 only	0	1	1 (5.6)
17, 55	0	1	1 (5.6)
15, 17, 24	1	0	1 (5.6)
17, 24, 51, 55	0	1	1 (5.6)
Total	5	13	18

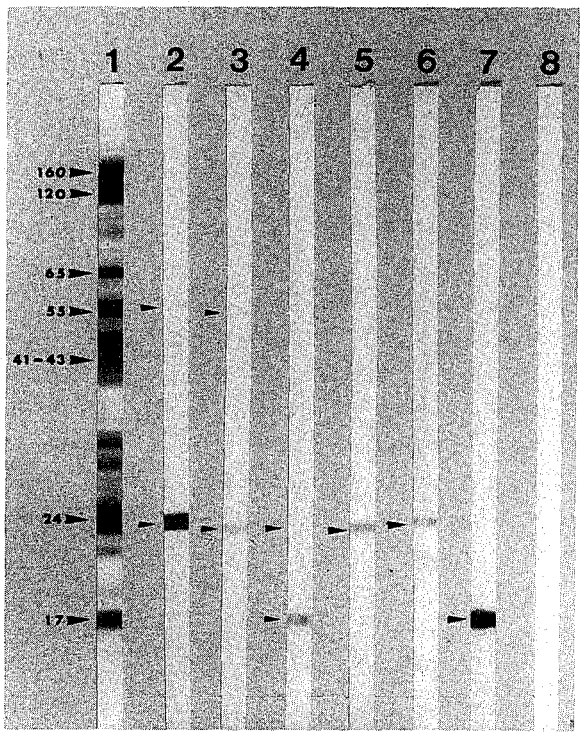


Fig. 2. Reactivity of Representative Serum Samples on WB. Lane 1, HIV−1 positive serum; lane 2, monoclonal anti-p24 antibody; lane 3 − 7, indeterminate sera; lane 8, HIV−1 negative serum.

p 17, p 24, p 55のコア蛋白質及びp 31, p 51, p 66のポリメラーゼ蛋白が検出された. 次に判定保留とされた検体(lane 3 − 7)についてみると, エンベロープ蛋白は検出されず, lane 3 ではコア蛋白の p 55, p24, lane 4 では p24, p17, lane 5, 6 では p 24, lane 7 では p17のみが検出された. 抗体陰性血清(lane 8)ではいかなるバンドも認められなかった.

3. 判定保留血清と二次元展開 HIV − 1 抗原との反応性

HIV−1 抗原を二次元展開し, WB で p 24のみにバンドを示す判定保留血清と反応させた. コントロールとして, 抗 p 24マウスモノクロナール抗体と HIV−1 抗体陽性血清を使用した.

抗 p 24マウスモノクロナール抗体を反応させると, 分子量24 kd の位置に 6 個のスポットが検出された. それらの等電点は7.50, 7.20, 7.00, 6.83, 6.75, 6.52であった. p 55の位置にはスポットは検出されなかった (Fig. 3 - A). 次に HIV−1 抗体陽性血清を反応させると, p 24の位置には 8 個のスポットが見られた. 各々の等電点は7.50, 7.33, 7.20, 7.00, 6.85, 6.75, 6.66, 6.52であった. このうち 6 個は抗 p 24マウスモノクロナール抗体で検出されたスポットと同一の等電点を持っており, さらにモノクロナール抗体では見られなかった 2 個のスポット(pI 7.33及び6.66)が新たに検出された. また, gp 120, p 55, p 31などの抗原のスポットも検出された. しかし, WB で見られた全てのバンドを分離検出することはできなかった(Fig. 3 - B).

同様に p 24にバンドを持つ判定保留検体を反応させた場合, 7 個のスポットが検出された. 各々の等電点は 7.50, 7.20, 7.00, 6.83, 6.75, 6.66, 6.52であった. このうち 6 個は抗 p 24モノクロナール抗体で検出されたスポットと同一の等電点を持っており, 等電点6.66のスポットは陽性血清で検出されたスポットと同一であった(Fig. 3 - C). 抗 p 24モノクロナール抗体, 陽性血清および判定保留血清に共通した, 等電点の等しい 6 個のスポットのパターン(大きさ, 形)に有意差は認められなかった.

判定保留血清と反応する p 24の位置にある抗原が HIV−1 感染細胞の細胞成分由来であるか否かを明らかにするために, HIV−1 増殖に用いる培養細胞の総蛋白を二次元展開して, 判定保留血清と反応させた. しかしながら, 反応性スポットは観察されず, 細胞成分由来ではないことが明らかになった.

考　　察

東京都における HIV−1 抗体検査は 4 年目に入り, 抗体検査開始時期(1987年 2 月)からの都内保健所での受診者数合計は1990年 3 月現在, 13,000件を越えた. そのうち陽性例は 2 件であり, 当初懸念されたような感染は, 現在までのところ低リスクの一般人の間には広がっていないように思える.

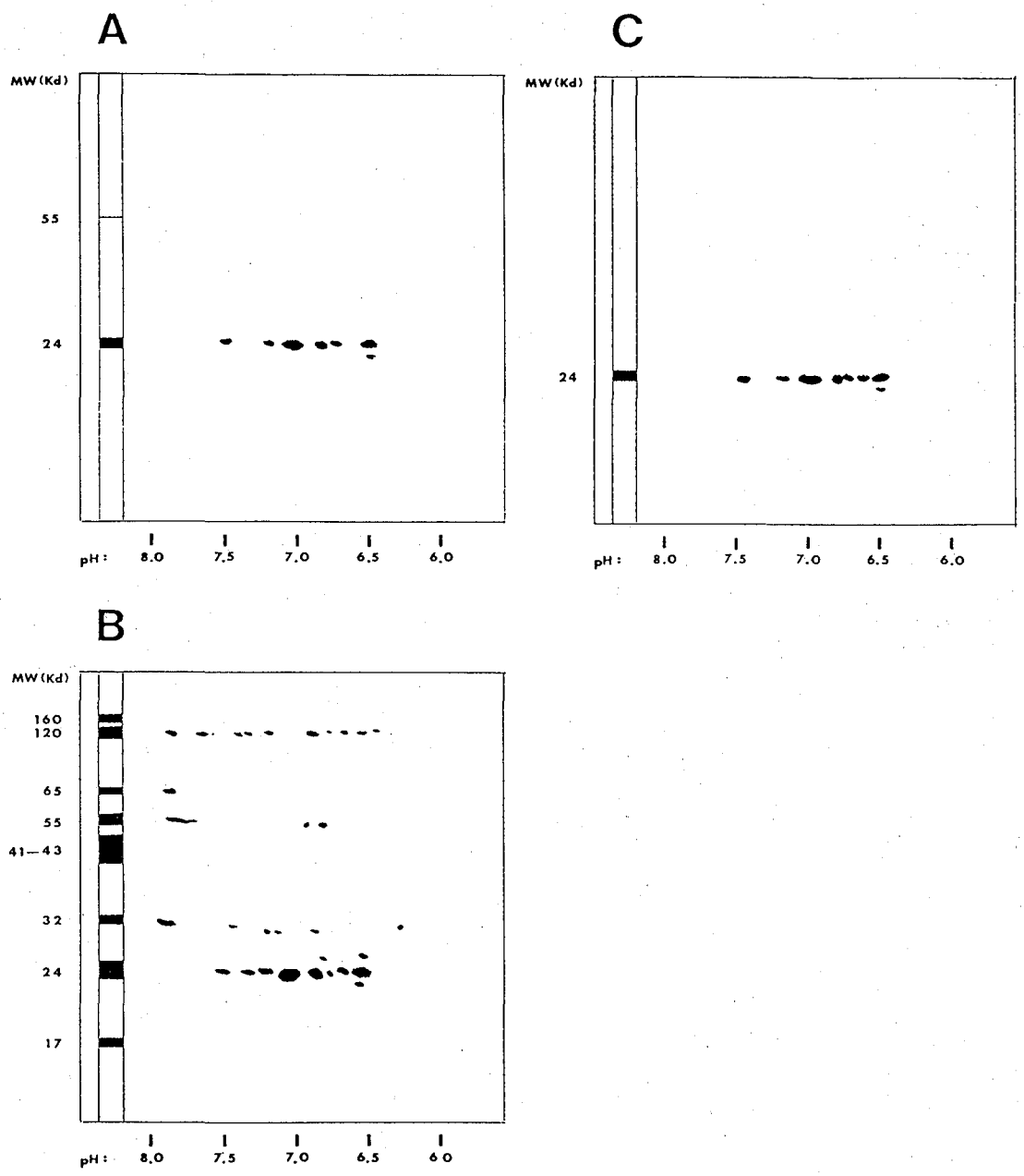


Fig. 3. Reactivity of Anti-p24 Monoclonal Antibody, HIV−1 Positive and Indeterminate Sera with HIV−1 Antigens Developed by Two-dimensional Electrophoresis. HIV−1 antigens were separated by SDS−polyacrylamide gel electrophoresis following isoelectric focussing, and electroblotted onto nitrocellulose membranes. The blotted membranes were treated with anti−p24 monoclonal antibody (A), anti−HIV−1 serum (B) and p24−reactive indeterminate serum (C). Antigen−antibody complexes on the membranes were detected by biotin−avidin alkaline phosphatase system. The isoelectric point was determined by using a micro pH meter.

1989年2月よりエイズ予防法が施行され，東京都においてもプライバシー保護の観点から，検査受診にあたっての問診表の廃止，検査の匿名化を行った．米国における匿名検査方式採用後の調査[10]では，一般受診者及びリスグファクターを持つ男性同性愛者の受診者数が増加したと報告されているが，東京都では1年を経過した時点で受診者数はむしろ減少している．都民のAIDSに関する関心は低下傾向にあると思われる．しかし，全国で新たに確認されるHIV感染者数は増加しており，特に異性間性的接触者の割合は増している．平成2年3，4月に確認された新たな感染者22名中，異性間接触によるもの9名，しかもそのうち国内での感染が3名であった．

HIV－1抗体検査において問題となるのはWB法でバンドが認められるものの陽性判定基準を満たさず判定保留とされる場合である．HIV－1感染初期においてはWBのバンドのパターンは定型的でなく，p24のバンドのみ，又はp24とp55が認められるものがある[11]．ハイリスクの献血者の場合，p24の位置にバンドが認められた判定保留者の追跡調査によると，2～8ヶ月以内に93人中4人で陽転例が認められたとの報告[3]がある．また，EIAで抗体陰性，WBで＋又は±と判定された患者の一部には，その後の追跡調査により感染が証明された例[12]もある．したがって，EIAが陰性であっても追跡調査の必要な場合があると思われる．

一方，全身性エリテマトーデス患者[13]，ある種のHLA抗体保有者[14]，他のレトロウイルス感染者[15]等においてHIV－1抗原に反応する非特異的な抗体が産生され，WBにおけるバンド出現の原因となる可能性も報告されている．

今回我々は，判定保留血清のうちp24との反応性が認められる血清を選び，二次元電気泳動によって展開したHIV－1抗原に対するその反応性を，抗p24モノクロナール抗体やHIV－1抗体陽性血清の反応性と比較して分析した．その結果，判定保留血清には抗p24モノクロナール抗体やHIV－1抗体陽性血清と全く同一の反応性のパターンを示すものがあることが判明した．

CDCのWB判定基準の試案[6]では，判定保留例で少なくとも6ヵ月間追跡検査してもバンドのパターンに変化がなく，他にリスクファクター，臨床症状，その他の所見がなければ陰性と見なし得るとしている．しかし，今回の我々の検討により，判定保留血清のあるものは，ウイルス抗原の少なくとも一部に対する特異的な抗体を含んでいることが明らかとなった．このことから，この様なp24と反応する抗体を持つ被検者はHIV－1に感染しているとは断言できないものの，バンドが消失するかまたは他の方法によりHIV－1感染の可能性が完全に否定されないかぎり，追跡調査が必要であると思われる．

追跡調査では，EIA，WBによる抗体検査と併せて，リンパ球中のプロウイルスDNAのPCR法による検出，培養によるウイルスの分離等を行い，かつ，被検者のリスクファクターも加味して総合的にHIV感染の有無を判定すべきである．

現在，著者らはリンパ球から抽出したDNA中のプロウイルスのPCR法による検出法を検討中である．この方法を用いて，判定保留例の早期確認に役立てることができると考えている．

ま と め

1．1988年4月より1990年3月までの都内保健所(目黒区を除く)でのHIV－1抗体検査受診者は計3,885名，うち陽性は1名であった．

2．WBによる確認検査でp24の位置にバンドが出現し判定保留とした血清を，二次元電気泳動法によって展開したHIV－1抗原と反応させた．その結果，p24の位置に検出された7個のスポットのうち6個のpI値は，抗p24モノクロナール抗体によって検出されたスポットのそれと同一であった．また，HIV－1抗体陽性血清も判定保留血清が反応した7個のスポットを含む8個のスポットと反応した．これらの実験結果より，判定保留血清のあるものはHIV－1のp24特異抗原と反応していると推定した．

（本研究は東京都エイズ研究班および厚生科学研究費より一部研究費の援助を受けて行った．また，本研究の概要はウイルス学会第37回総会1989年11月で発表した．）

文 献

1）*Weekly Epidemiological Record*, *WHO*, 65, 133－140, 1990
2）厚生省エイズサーベイランス委員会報告（平成2年5月22日）
3）Kleinman, S. et al.：*Transfusion*, 28, 280－282, 1988
4）Nakamura, K. et al.：*Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 40, 159－164, 1987
5）大貫奈穂美 他：東京衛研年報，39，43－48，1988
6）*MMWR*, 38, Suppl S－7, 1－7, 1989
7）Tsuchie, H. et al.：*J. Infect.*, 10, 272－276, 1985
8）O' Farrell, P. H.：*J. Biol. Chem.*, 250, 4007－4021, 1975
9）宮崎 香 他：別冊蛋白質核酸酵素，78－9，183

−196, 1978
10) Fehrs, L. J. et al. : *Lancet*, **8607**, 379−382, 1988
11) Gaines, H. et al. : *Lancet*, **8544**, 1249−1253, 1987
12) Ulstrup, J. C. et al. : *Lancet*, **8490**, 1151−1152, 1986
13) *Biotech／Dupont HIV Western blot kit insert*, 1987
14) Drabick, J. J. et al. : *J. Infect. Dis.*, **159**, 357−358, 1989
15) Gonda, M. A., et al. : *Nature*, **330**, 388−391, 1987

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 22-27, 1990

Listeria monocytogenes の分離法と動物の保菌実態

飯田　孝*, 神崎政子*, 本田三緒子**
井上　智***, 丸山　務*

Isolation of *Listeria monocytogenes* from Animals in Japan

TAKASHI IIDA, MASAKO KANZAKI, MIOKO HONDA
SATOSHI INOUE and TSUTOMU MARUYAMA

Keywords：リステリアモノサイトゲネス *Listeria monocytogenes*, 選択培地 selective medium, 動物保菌 animal carrier, 血清型 serotype

緒　言

Listeria monocytogenes は人蓄共通感染症起因菌の1つであり，動物およびヒトに流産，髄膜炎，敗血症などを起こすことが知られている[1-3]．近年欧米諸国で本菌により汚染された食品が原因でヒトの集団感染が起こり，ヒトのリステリア症の一部が食物媒介感染症であることが証明された[4-7]．こうした状況から諸外国では，特に乳・乳製品・食肉などの食品における本菌の汚染実態が次第に明らかにされつつある[8,9]．

一方，わが国におけるヒトのリステリア症は，これまでに600例以上の散発例が証明されている[10]が，その疫学的背景が明らかにされた症例はほとんどない．今回ヒトおよび家畜におけるリステリア症の感染源や感染経路を明らかにする目的の1つとして，われわれの生活と密接な関係にある動物の保菌実態調査を行った．調査を行うにあたり，動物のふん便からリステリア属菌(L. spp.)を検出するための選択分離培地の評価を併わせて行った．

材料と方法

1．検査材料

検査対象は1989年4月から1990年3月までに東京都芝浦食肉市場，多摩食肉市場に食用として搬入されたウシ162頭，ブタ193頭，都内の家庭で飼育中のイヌ375匹，ネコ117匹と動物管理事務所に収容されたイヌ52匹，ネコ44匹および東京都内のビル内で捕獲されたクマネズミ162匹である．これら動物のうち，飼育されているイヌおよびネコは排泄便(以下ふん便)それ以外は回盲部腸内容物(以下腸内容物)を検査材料とした．

培地の検討には，これらの中からウシ57頭，ブタ38頭，イヌ57頭，ネコ41匹，合計193検体を抽出して用いた．

2．使用培地

増菌培地は10 mMPBS(pH 7.4)を用い，選択分離培地には Listeria agar base(LPM：Difco)，Listeria selective agar base(OX：Oxoid)，McBride medium(MC：Oxoid)，Listeria selective agar(LS：Merck)の4種の培地を使用した．

3．増菌培養法

検査材料のふん便または腸内容物は，その1 gを9 mlのPBS(10mM，pH 7.4)に入れ良く撹拌した後，4℃で4～6週間培養した．

4．分離培養法

増菌培養後直径4 mmのガラス棒で培養液をよく撹拌し，その1ガラス棒(約15 μl)を各4種類の選択分離培地に塗抹した．LPM 培地は30℃で24時間培養後に菌の発育と斜光を確認し，他の培地は35℃で48時間培養後に判定をした．

動物の保菌実態調査には，上記4種類の分離培地の中から選択効果の優れている2種を選んで用いた．すなわち OX 培地で選択分離を行ない，発育した L. spp. と思

*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
**多摩食肉衛生検査所
***国立予防衛生研究所

われる菌をLPM培地上に画線塗抹して菌分離を行った．LPM分離培地上に発育した菌は，Tryptose agar(以下TA)を用いて純培養した．

5．L. spp. の同定法

分離菌株はグラム染色，カタラーゼ試験，VP反応，半流動培地における傘状発育と運動性，斜光法による淡青緑色の集落等を観察することによってL. spp. とした[11]．

菌種の決定はラムノース，キシロースおよびマンニトールの3種の糖分解と，5％の羊脱繊維素血を用いたβ溶血性および*Staphylococcus aureus* と *Rhodococcus equi* を用いたCAMP testで行った[11]．

6．血清型別

L. monocytogenes と同定された菌株の血清型別は，国立予防衛生研究所より分与を受けた血清型別用の菌株を用いて自家作成した家兎免疫抗因子血清により行った．血清型の表記はSeeligerの記載に従った．[11]．

成　　績

1．選択分離培地の評価

動物のふん便，腸内容物からL. spp.，特に *L. monocytogenes* を検出するための最も効果的な分離培地を選ぶ目的でLPM，OX，MC，LSの4種の培地の比較検討を行った．

ウシ57件，ブタ38件，イヌ57件，ネコ41件のふん便および腸内容物，計193検体をPBSの4℃で低温増菌培養した後，上記4種の培地に塗抹し，各分離培地上に集落が出現したものから，図1の検査手順に従って *L. monocytogenes* を同定した．これらの成績を表1に示し

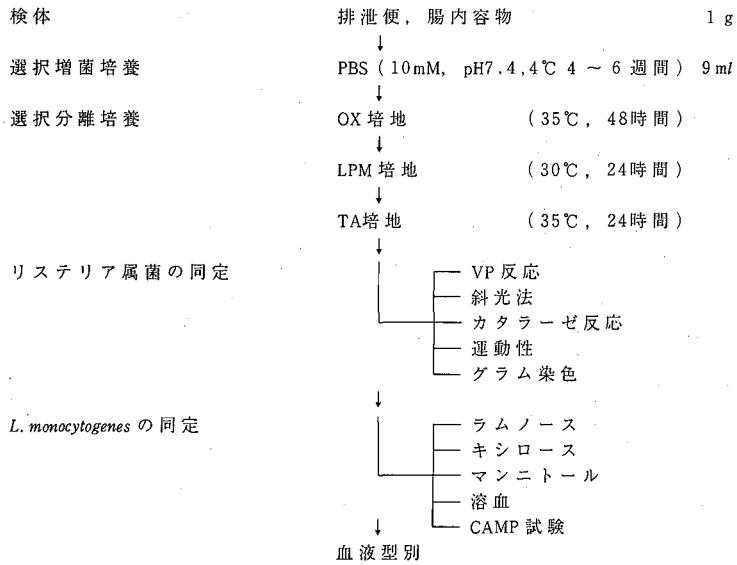


図1．リステリア属菌の検査手順

表1．動物のふん便および腸内容物を対象としたリステリア属菌の選択分離培地の評価

項目＼培地	LPM	OX	MC	LS
低温増菌した数	193	193	193	193
集落の出現した数	113	75	188	147
L. spp. が疑われた数*	25	52	174	142
L. spp. と同定された数	13	11	4	5
L. m. 陽性数	3	2	0	2

*LPMは斜光で，OXはエスクリン分解能，MCとLSは集落の形態および形状により判定

L. spp.：リステリア属菌，L. m.：*L. monocytogenes*

た．4種の培地のうち，選択力の最も強かったのはOX培地(集落の出現率75／193，38.9%)。次いでLPM培地(113／193，58.5%)であった．LPM培地では193検体中，斜光法によってL. spp.特有の淡青緑色の集落が認められた検体数は25件(12.9%)であった．これらからL. spp.と同定されたものは13件(6.7%)，そのうち*L. monocytogenes*は3検体であった．一方，OX培地上でL. spp.はエスクリンを分解し，集落周辺部が褐色化することから，これを指標とすれば集落の発育した75検体中エスクリン分解集落を認めたものは52件(26.9%)であり，これらから各種性状試験を行ってL. spp.と同定されたものは11検体(5.7%)で，このうち*L. monocytogenes*は2件であった．これに対してMCおよびLSの両培地では選択性が弱く，またL. spp.の集落の特徴を把握しにくいために疑わしい集落が多く出現した。しかし，この中からL. spp.と同定されたものは少なかった．

以上の成績から4培地のうちLPMとOXの培地がふん便の選択分離培地として優れていることが分かった．

2．LPMとOXの組み合わせによる選択効果

L. spp.の選択分離にあたって，検査効率を高めるためにLPM，OXの両培地の選択物質が異なっていることに着目して，これら2つの培地の組み合わせによる分離効果を調べた．すなわち，LPM培地を分離培地に用いた場合，斜光法によって疑わしい集落を選び，これをOX培地に画線培養する方法，OX培地で分離した場合エスクリン分解能陽性の集落を選び，これをLPM培地に画線培養して，その発育を確認する方法である．ウシ，ブタ，イヌ，ネコのふん便および腸内容物計193検体を用いてL. spp.の検出を行った．その結果，LPM培地上の集落をOX培地に画線培養する方法では，193検体のうち25件(13.0%)の要検査検体がOX培地上でさらに選択されて19件(9.8%)となった(表2)．一方，OX培地でエスクリン陽性の集落をLPMの培地に画線培養すると52件(6.9%)あった要検査検体が17件(8.8%)となった(表3)．この2つの方法のうちL. spp.とそれらの中の*L. monocytogenes*の検出率はともにOXからLPMよりLPMからOXの組み合わせがわずかに良かった．しかし，操作の簡易性や技術的な熟練度という観点からはOXからLPMの方法が優れていた．

3．各種動物における*L. spp.*の保菌状況

図1に示した方法に従って動物における保菌調査を行った．その結果，表4に示したようにウシでは162頭中9頭(5.6%)からL. spp.を検出し，そのうち*L. monocytogenes*は2件(1.2%)であった．ブタでは193頭中L. spp.が24頭，(12.4%)，そのうち*L. monocytogenes*は1頭(0.5%)であった．イヌでは437匹中L. spp.は3匹(0.7%)で，すべて*L. monocytogenes*であった．ネズミでは162匹中L. spp.は31匹(19.1%)，そのうち*L. monocytogenes*は11匹(6.8%)であった．

なお，ネコ162匹の検体からは，L. spp.を検出することは出来なかった．

4．動物から分離した*L. monocytogenes*の血清型

今回の実態調査で*L. monocytogenes*は1,115検体から17件検出された．1検体からいずれも複数の菌株を分離したが，同一検体で異なる血清型が検出されることは無かった．そこで，1検体から1株を選び動物種別に血清

表2．LPM培地とOX培地の組み合わせによる動物のふん便および腸内容物からのリステリア菌の分離成績(1)

動物種	検体数	分離培地 LPM 集落の出現した数	分離培地 LPM 斜光観察後の疑わしい数	選択，確認 OX エスクリン分解集落のある数	L. spp.	L.m.
ウシ	57	55	9	3	3	0
ブタ	38	37	13	13	7	0
イヌ	57	12	3	3	3	3
ネコ	41	9	0	0	0	0
合計	193	113(58.5)	25(13.0)	19(9.8)	13(6.7)	3(1.5)

分離培地：LPM，選択　確認：OX培地
数値は検体数を表わし（）内の数字は%を表わす
L. spp.：リステリア属菌，L. m.：*L. monocytogenes*

表3．LPM培地とOX培地の組み合わせによる動物のふん便および腸内容物からのリステリア菌の分離成績(2)

動物種	検体数	分離培地 OX 集落の出現した数	OX エスクリン分解集落のある数	⇨ 選択確認 LPM 斜光観察後の疑わしい数	L. spp.	L. m.
ウシ	57	33	16	2	2	0
ブタ	38	28	21	13	7	0
イヌ	57	4	4	2	2	2
ネコ	41	10	11	0	0	0
合 計	193	75(38.9)	52(26.9)	17(8.8)	11(5.7)	2(1.0)

分離培地：LPM，選択 確認：OX培地
数値は検体数を表わし（）内の数字は％を表わす
L. spp.：リステリア属菌，L. m.：*L. monocytogenes*

表4．各種動物におけるリステリア属菌の保菌状況

動物種	検査総数	L. spp.	L. spp. L.m.	L. spp. その他
ウシ	162	9 (5.6)	2 (1.2)	7 (4.3)
ブタ	193	24 (12.4)	1 (0.5)	23 (11.9)
イヌ	437	3 (0.7)	3 (0.7)	0
ネコ	161	0	0	0
クマネズミ	162	31 (19.1)	11 (6.8)	20 (12.3)
合 計	1,115	67 (6.0)	17 (1.5)	50 (4.5)

数値は検体数を表わし（）内の数字は％を表わす
L. spp.：リステリア属菌，L. m.：*L. monocytogenes*

型別成績を表5に示した．ウシの2件はいずれも1/2c型，ブタの1件は4b型，イヌの3件は1件が1/2c型で2件が4型，ネズミは11件検出され，それぞれ1/2a型が2件，1/2b型が3件，4ab型が4件，4b型が2件であった．

考 察

L. spp.の選択分離培地についてはこれまでにも数多くの試みがある[12,13]が，動物のふん便を対象とした評価の高いものはまだない．最近，汚染食品を介した*L. monocytogenes*の集団感染例が報告されて以来，食品を対象とした増菌および分離[14-16]の方法が各国で検討され，培地の一部は製品として市販されるようになった．これら食品用に開発された選択分離培地の中から比較的

表5．各種動物から分離した*L. monocytogenes*の血清型

動物種	件数	1/2a	1/2b	1/2c	4ab	4b	4
ウシ	2			2			
ブタ	1					1	
イヌ	3			1			2
ネコ	0						
クマネズミ	11	2	3		4	2	
合 計	17	2	3	3	1	3	2

良く用いられている4種の培地を動物のふん便および腸内容物に応用する目的で評価を行った．その結果，MC，LSは共に選択性が弱く，平板上に多種の集落が多く出現してくることと，これらの培地はL. spp.の集落を確認するための特徴に乏しいので，確認試験のために数多くの集落を釣菌しなければならなかった．これに対してOXとLPMの培地は選択力が強い上に集落の選択にOX培地[17]ではエスクリン分解を，LPM培地[18]では斜光を指標とすることが可能なためにL. spp.の選択分離に優れていた．さらに，選択性の異なる両培地を組み合わせることによって，より効率良くL. spp.を検出することができた．両培地の組み合わせの中ではLPMからOXに菌を移植する方法がOXからLPMに移植する方法よりもL. spp.の検出そのものは優れていたが，検査の難易からすれば後者の方法がはるかに実用性が高かった．すなわちLPM－OX法はLPM培地上の集落を実体顕微鏡を用いた斜光法により疑わしい集落を選択するのに対してOX－LPMではOX培地上で集落周囲が茶褐色のエスクリン分解能を肉眼で観察し，釣菌できるという利点がある．分離培地の段階でL. spp.以外の菌を高い精度で排除できる検査は確認培養以後の省力化に重要である．このようなことから特別な器材や経験を必要としないOX－LPM法が推奨される．

なお，増菌培養については，今回動物のふん便で最も確実であるといわれている4℃の低温増菌[19]のみ行ったが，最近食品を対象として25～30℃の温度域で24－48時間で行えるEB培地[20]やUVM[19]培地などの選択増菌培地が市販されるようになったので，今後こうした培地での応用も試みる必要があろう．

動物における*L. monocytogenes*の保菌実態については報告者によって，また，地域によって成績は一定ではないが，今回のウシ，ブタの検出率は諸外国に比べて低かった[21]．また，ウシとブタではL. spp.の検出率がブタで高くウシで低かったにもかかわらず*L. monocytogenes*の検出率がウシで高かったことは興味深い．

わが国におけるイヌ，ネコおよびクマネズミでの詳細な報告例は未だ無く，今回の保菌実態調査が初めてと思われる．イヌでは3例から*L. monocytogenes*が検出されたが，この3匹は同一のペットショップで飼育されていたので飼育に由来するものか，あるいは相互の感染が疑われた．ネズミにおける*L. monocytogenes*の検出率は家畜，愛玩動物に比較して高率であったことから，わが国の家住性のネズミにも本菌が広く分布していることが明らかにされた．一方，ネコからは1検体もL. spp.を分離することは出来なかった．これら家畜，愛玩動物，ネズミにおける保菌はそれぞれの動物種における健康保菌と思われるが，地域，季節，生息，飼育環境あるいは飼料等による特異性等については，さらに調査を広げなければならない．

今回分離された*L. monocytogenes*の血清型は分離菌株数が少ない割には，多岐にわたって自然界の分布の一端を示していたが，ヒトの臨症例から高頻度に分離される4b，1/2a，1/2b型[22]が含まれていたことから，動物保菌が感染源となり得ることも示唆された．

結　論

ヒトにおけるリステリア症の感染源や感染経路を明らかにする目的で，動物食品の汚染に関与することが考えられるウシ，ブタと，われわれの身近にいる愛玩動物のイヌ，ネコのふん便および腸内容物を検査材料として保菌実態調査を行った．

L. spp.とその中の*L. monocytogenes*はそれぞれ，ウシで5.6%，1.2%，ブタで12.4%，0.5%，イヌで0.7%，0.7%，ネズミで19.1%，6.8%で，ネコからは本菌を検出することはできなかった．分離された17株の*L. monocytogenes*の血清型は7菌型にわけられ，4bが2株，1/2aが2株，1/2bが3株含まれていた．

動物の腸内容物，ふん便を対象とした選択分離培地はOX培地とLPM培地が優れ，さらに，この両者を組み合わせることによって効率的に*L. monocytogenes*を検出できる方法を考察した．

謝　辞　本研究を行うに当たり検体採取にご協力を頂きました東京都動物管理事務所，芝浦食肉衛生検査所，多摩食肉衛生検査所ならびに麻布大学獣医学部獣医公衆衛生学講座の関係各位に深謝致します．（本研究の一部は第107回獣医学会総会，1989年4月で発表した．）

文　献

1）原　文男，上野八郎，白石忠昭，岡田雪男，大福静雄：日獣会誌，36，205－209，1983.
2）稲松孝思，中島敏晶，畠山　勤：感染症，20，77－79，68，1990.
3）McLauchlin，J.：*Epidemiol. Infect.*，104，181－189，1990.
4）Fleming，D，W.，Cochi，S，L.，McDonald，K，L. et al：*N. Engl. J. Med.*，312，404－407，1985.
5）James，S，M.，Fanni，S，L.，Agree，B，A.，et al.：*Morbid. Mortal. Weekly Rep.*，34，357－359，1985.
6）Schlech，W，F.，Lavigne，P，M.，Bortolussi，R，

A., et al.：*N. Engl. J. Med.*, 308, 203－206, 1983.
7) Kvenberg, J. E.：*Microbiol. Sci.*, 5, 335－358, 1988.
8) Massa, S., Cesaroni, D., Poda, G., et al.：*J. Applied, Bacteriol.*, 68, 153－156, 1990.
9) Skovgaard, N. and N ϕ rrung, B.：*International. J. Food Microbiol.*, 8, 59－63, 1989.
10) 永井龍夫：臨床と微生物, 16, 643－646, 1989.
11) Seeliger, H, P, R. and Jones, D.：Listeria. *In*, Bergey's Manual of Systematic Bacteriololgy, Krieg. N. R.(ed.), 2, 1235－1245, 1984, Williams and Wilkins, Baltimore.
12) Prentice, G, A. and Neaves. P.：*Bulletin of the International Dairy Federation*, 225, 1－16, 1988.
13) Breckett, R, E. and L, R, Beuchat.：*International J. Food Micrediol.* 8, 205－217, 1989.
14) Bannerman, E, S. and Bille, J.：*Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 165－167, 1988.
15) Loessner, M, J., Bell, R, H., Jay, j. and shelef, L, A.：*Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 3003－3007, 1988.
16) 小久保彌太郎, 飯田 孝, 金子誠二, 丸山 務：食品衛生学雑誌, 31, 51－56, 1990.
17) Curtis, G, D, W., Mitchell, R, G., King, A, F and Emma, J.：*Letters in Appl. Microbiol.*, 8, 95－98, 1989.
18) Lee, W, H. and McClain, D.：*Applied. Environ. Microbiol.*, 52, 1215－1217, 1986.
19) Ralovich, B.：*International J. Food Microbiol.* 8, 205－217, 1989.
20) Lovett, J., Francis, D, W. and Hunt, J, M.：*ibid*, 50, 188－192, 1987.
21) 丸山 務：感染症, 20, 36－40, 1990.
22) 寺尾通徳：感染症, 20, 33－35, 1990.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 28-32, 1990

動物園の鳥類に発生した *Yersinia pseudotuberculosis* による感染死亡例

神崎政子*, 丸山　務*, 飯田　孝*,
田辺興記**, 田島日出男**, 斎藤和夫**

Outbreaks of *Yersinia pseudotuberculosis* Infection in Zoo Birds

MASAKO KANZAKI*, TSUTOMU MARUYAMA*, SEIJI KANEKO*,
TAKASHI IIDA*, KOKI TANABE**,
HIDEO TAJIMA** and KAZUO SAITO**

summary

During the period between January and March 1988, a serial sudden death occurred among 2 species of birds, the Great hill myna (*Gacula religiosa*) and Wrinkled hornbill (*Aceros corrugatus*), which were being housed in adjacent cages in a zoo.

Macroscopic findings at autopsy were significant enlargement of the liver and the presence of numerous small yellowish-white tubercules, while the spleen and the mesenteric lymph nodes were almost normal. Histopathological observations of these tubercules clarified the presence of granulomatous foci with an immense bacterial colony in the center.

Y. pseudotuberculosis was isolated from the liver, spleen, mesenteric lymph nods, blood and intestinal contents of two dead birds. All of the isolates were found to be serovar 1b organisms and having 40 to 50 megadalton (Md) plasmids. They were characterized by calcium dependent growth, positive autoagglutination activity at 37℃ and negative pirazinamidase activity. The plasmids from the isolates showed restriction endonuclease digestion patterns identical to those from known pathogenic strains.

Ths is the first case of isolation of *Y. pseudotuberculosis* from dead birds in Japan, and systemic infection of the organisms was presumably the cause of death.

Keywords：仮性結核菌 *Yersinia pseudotuberculosis*, 鳥類 birds, 感染 infection, 結節 tubercle, 動物園 zoo, プラスミド plasmid

緒　言

仮性結核菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)は古くから知られた人畜共通感染症起因菌であり，最近ヒトの集団発生を含めた症例[1,2]の多いことから，公衆衛生分野でも注目されている．本菌の動物における感染宿主域は広いが，欧州諸国では特に鳥類の感染例が多く，これがヒトへの感染源となることも指摘されている[3,4]．今回，著者らは都内の1動物園で飼育されていた2種類の鳥類の突然死に遭遇し，それらの原因物質の検索を行ったところ，死体病変部から仮性結核菌を分離した．わが国では鳥類における最初の本菌による感染死亡例と思われるので，事例の発生状況と主に細菌学的検査成績についてその概要を報告する．

事例の概要

死亡した1例は雄のキュウカンチョウ(*Gracula religiosa*)で，1981年都内で保護されて後1988年1月まで動物園で飼育されていたが，同年1月15日逆毛，下痢などの徴候もなく突然死亡した．また，他の1例は雌のズ

*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
**東京都（建設局）恩賜上野動物園

グロサイチョウ(*Aceros corrugatus*)で，1983年シンガポールより輸入されて後，上記キュウカンチョウと同じ棟の鳥舎で飼育中，キュウカンチョウが発症して約2ヵ月後の3月23日に突然死亡した．これら死亡した2羽の肝臓，脾臓などについて細菌学的検索を進めた結果，いずれの事例からも *Y. pseudotuberculosis* が検出された．以後，同居あるいは同棟の鳥類からの死亡例はなく，これら鳥類10羽のふん便検索の結果もすべて陰性であった．死亡例のみられた鳥舎およびその周辺はヨード剤(リンドレス)を用いて清掃を行った．

発症鳥の剖検所見

死亡した2例の発症鳥の剖検所見は以下の通りである．

症例1．キュウカンチョウ：腹壁の一部と肝臓が癒着．肝臓が全体的にやや腫大．直径1～3㎜の黄白色結節が散発．

症例2．ズグロサイチョウ：肝臓は腫大して脂肪肝の様相を呈し，粟粒大黄白色結節が密発．

いずれも栄養状態は良好であり，これら結節は肝臓以外にはみられず，脾臓および腸間膜リンパ節に異常は認められなかった．

症例1の肝臓病変部における病理組織像をFig.1に示した．結核様小結節は組織学的には *Y. pseudotuberculosis* と思われる巨大な菌集落を中心に持つ壊死巣の像を呈していた．壊死巣周辺部の肝細胞中にはヘモジデリンの沈着が著明で，肝細胞のほとんどが正常な構造を失い繊維化が進行しており，増殖性炎の所見であった．

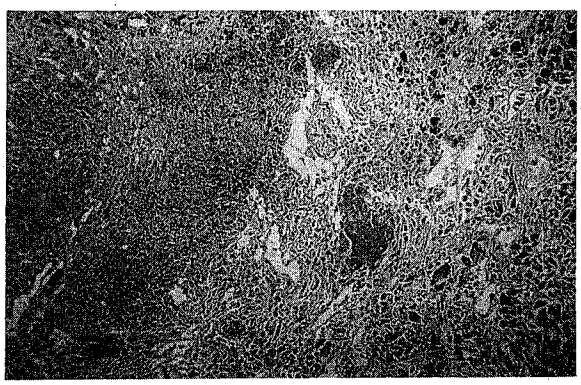


Fig. 1. Histopathological observations in the liver of the case 1. Presence of granulomatous foci with a huge bacterial colony in the center. ×100

細菌学的検査成績

死亡した2種類の鳥類については症例1は肝臓と脾臓，症例2は肝，脾，心臓貯留血，腸間膜リンパ節および腸内容物の計7検体を検査材料とした．対照として同時期に異なった鳥舎で壁への衝突などで事故死した4羽の鳥類の肝，脾，腸内容物各1の計12検体，感染源追求のため死亡例の鳥舎に同居していた健康な個体10羽のふん便

Table 1. Isolation of *Y. pseudotuberculosis* from Various Specimens of Birds and Rats

Specimens		Number of tested	Number of positive
Bird			
Died, case 1 (great hill myna)	Liver	1	1
	Spleen	1	1
Died, case 2 (wrinkled hornhill)	Liver	1	1
	Spleen	1	1
	Blood	1	1
	Mesenteric lymph nods	1	1
	Intestinal contents	1	1
Died due to accident	Liver	4	0
	Spleen	4	0
	Intestnal contents	4	0
Healthy, kept in the adjacent cage	Feces	19	0
Rats			
Healthy	Feces	4	0
Healthy, captured	Intestinal contents	1	0

19検体，また鳥舎付近で捕獲したネズミの腸内容物1および排泄便4検体，計43検体につき検索を行った(Table 1)．

細菌検査のうち *Yersinia* 属菌については，各種材料をCIN培地およびマッコンキー寒天培地への直接塗抹とpH 7.6，1／15M PBSによる4℃，21日間増菌を併用し，分離した．

発症例2羽から採取された7検体中7検体から直接培養で *Y. pseudotuberculosis* が検出された．これらのうち，腸内容物を除いた6検体では非選択性の血液寒天培地で純培養状の発育であった．直接分離培養で本菌が分離された症例1の肝臓における菌数は10^6個／ml，また症例2の心臓貯留血液中の菌数は約10^5個／mlであった．

症例以外の37検体はすべて *Y. pseudotuberculosis* をはじめ他の病原菌も陰性であった．

分離菌株の性状試験成績

症例の7検体については血液寒天および選択分離平板上の疑わしい集落を各検体から各々5～10個ずつ釣菌した．これらはすべて *Y. pseudotuberculosis* と同定され，生化学的性状，病原性指標性状がすべて同一であった．また，分離された全菌株の血清型は1bであった．各症例からの代表株，いずれも肝臓病変部由来の88-7および88-59株の性状をTable 2に示した．すなわち，生化学的性状はウレアーゼ＋，VP－，オルニチン－，レシチナーゼ－，エスクリン＋，インドール－，ラムノース＋，メリビオース＋，ピラジナミデース活性－と典型的な *Y. pseudotuberculosis* の性状を示した．病原性指標性状では37℃における自己凝集性およびカルシウム依存性が陽性であり，40～50メガダルトンの病原性プラスミドを保有していることを確認した．

症例由来 *Y. pseudotuberculosis* の保有しているプラミドの性状をみるために，制限酵素 *Bam* H1による切断パターンを調べた．本動物園では1980年にも *Y. pseudotuberculosis* によるサルの集団感染例があり，その時の分離株も血清型1bであったので，あわせて検討を行い，その成績をFig. 2に示した．今回の発症例であるトリ由来株，および前回の発症例であるサル由来株はいずれも同様の切断パターンを示した．

Table 2. Biochemical Characteristics, Virulence-associated Characteristics and serovar of *Y. pseudotuberculosis* Isolated from Birds

Characteristics	88-7 (great hill myna, liver)	88-59 (wrinkled hornhill, liver)
Oxidase	−	−
Urease	+	+
Voges-Proskauer 25℃	−	−
Lysin decarboxylase	−	−
Ornithin decarboxylase	−	−
Motility 37℃	−	−
Lecithinase	−	−
Esculin	+	+
Indole	−	−
Glucose	+	+
gas	−	−
Lactose	−	−
Sucrose	−	−
Xylose	+	+
Rhamnose	+	+
Melibiose	+	+
Pyrazinamidase activity	−	−
Autoagglutination 37℃	+	+
Calcium dependency	+	+
Plasmid (40～50 Md)	+	+
Serovar	1b	1b

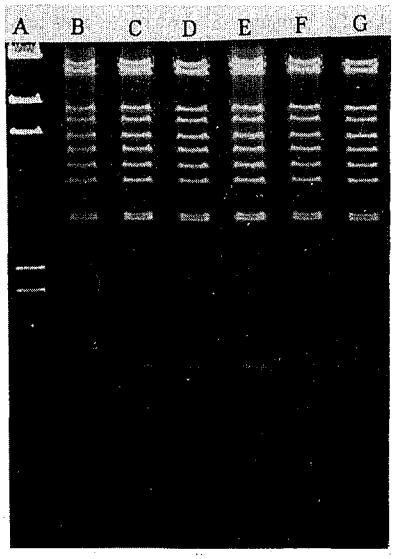


Fig. 2. *Bam* HI Digestion Patterns of Plasmid DNA from Strains of *Y. pseudotuberculosis* Isolated from Birds and Monkeys.
Lanes : A, molecular size markers (lambda DNA Cut with *Hind* Ⅲ)
(from Top to Bottom, 23.13, 9.42, 6.56, 4.36, 2.32, 2.02, 0.56 Kb) ; B and C, Liver and Spleen of Great hill myna; D, Spleen of Wrinkled hornbill; E and F, Liver and Spleen of Green monkey; G, Intestinal contents of Tuffed capuchin.

考　　察

Y. pseudotuberculosis の動物における感染宿主域は極めて広く，特に欧州諸国では鳥類での感染例が多いことから，ヒトの感染源として鳥類の重要性が指摘されている[3,4]．

わが国ではヒトの *Y. pseudotuberculosis* 感染症，特に集団発生が諸外国に比し多く発生している[1,2]にもかかわらず，鳥類での感染発症例はこれまでに1例も報告されていなかった．今回の2種類の鳥類の死亡例はその剖検所見と細菌学的検索から *Y. pseudotuberculosis* の全身感染による敗血症死であり，わが国にも本菌による鳥類の感染死亡例のあることが初めて証明された．

今回の2症例はいずれも感染源，感染経路を特定することはできなかったが，疫学的背景としては下記の2点が考えられよう．すなわち，1つはキュウカンチョウ，ズグロサイチョウがいずれも国内産ではないので出生地ですでに感染し，長期保菌の後，顕在化したとみられる考えである．この推論は本菌の鳥類に対する病原性から可能性は薄いが，個体や環境の差などによる鳥類における長期の健康保菌の存在も否定できない。最近，わが国でも野鳥における保菌が初めて明らかにされている[5]．他の1つはわが国で飼育中に感染したとする考えである．これはわが国でもネズミを初めとする小動物の本菌の保菌[6-8]があり，また食肉などの食品にも汚染がみられる[9,10]ことから環境，飼料が感染経路となることが十分考えられる．さらに，同一動物園で1980年に同一血清型，同一プラスミドパターンのサルにおける流行のあったこと[11]が動物園での飼育中における感染説を支持するものである．ただし，いずれの説も確証はない．発症，死亡時における詳細な調査が重要である．

病理所見では2例とも肉眼的特徴としては肝臓のみに腫大と小結節形成がみられ，他の臓器は正常であった．1980年に集団発生をしたサルでは結節形成は脾臓であり，さらに，肝および腸間膜リンパ節の腫大など広範なまた強度の病変がみられ，同じ死亡例でも感染動物の種類によって病変の異なることが示された．ただし，いずれの動物種でも肝あるいは脾における結節の形成，多くの死亡例では小結節が密発する所見はきわめて特徴的であり，この剖検所見は *Y. pseudotuberculosis* 感染を疑わせる確率の高い診断基準であるといえる．動物種によって結節形成のみられる臓器は異なっていても組織学的には巨大な菌塊と増殖性炎という同様の所見が観察される．

なお，剖検所見では肝臓以外には顕著な病変を認めなかったが，血液および各臓器から本菌を検出しており，本菌による敗血症が死因と推定される．また，腸内容物からも本菌を検出できたことは，これら鳥類が排菌し，菌を拡散していた可能性も考えられる．

分離株の性状は典型的な *Y. pseudotuberculosis* の性状を示し，病原性プラスミド保有株であった．血清型については，本菌の主要保菌動物としてトリを重要視している欧州の場合，トリからの検出は1aがほとんどであるのに対し今回の場合は1bである．血清型1bはわが国ではヒトの症例，他の動物保菌いずれの場合でも比較的多く検出される型であるが，1aのみでなく1bもトリに対し，強い起病性のあることが明らかにされた．

結　　論

1988年1月～3月にかけて東京都内の1動物園で飼育されている2羽のトリが突然死亡した．発症鳥からすべて同一性状の *Y. pseudotuberculosis* 1b が検出され，本菌が原因菌と推定された．死亡鳥はその剖検所見と細菌学的検査成績から *Y. pseudotuberculosis* による敗血症死であり，本菌によるトリの感染死亡例がわが国に存在する

ことが初めて証明された.

謝辞：本研究にあたり，病理標本作製にご協力いただいた当研究所環境保健部渡辺伸枝研究員に深謝いたします.（本研究の要旨は第106回日本獣医学会総会，1988年11月で発表した.）

文　献

1）坪倉　操，丸山　務：獣医学1988，105-120，1988，近代出版，東京.

2）福島　博，丸山　務，金子賢一，井上正直：日獣会誌，42，829-840，1989.

3）Daniëls, J. J. H. M.：*J. Int. College Surgeons.*, 38：397-411，1962.

4）Mair, N. S.：*J. Wildl. Dis.*, 9, 64-71，1973.

5）Hamasaki, S., Hayashidani, H., Kaneko, K.,：*J. Wildl. Dis.*, 25, 401-403，1989.

6）Kaneko, K., Hamada, S., Kasai. Y., and Hashimoto, N.：*Appl. Environ. Microbiol.*, 37：1-3，1979.

7）Kaneko, K. and Hashimoto, N.：*Appl. Environ. Microbiol.*, 41：635-638，1981.

8）Fukushima, H., Gomyda, M. Shiozawa, K., Kaneko, S., and Tsubokura, M.：*J. Clin. Microbiol.*, 26, 584-585，1988.

9）Fukushima, H.：*Appl. Environ. Microbiol*, 50：710-712，1985.

10）Shiozawa, K., Hayashi, M., Akiyama, M., Nishida T., Nakatsugawa, S., Fukushima, H., and Asakawa Y.：*Appl. Environ. Microbiol.*, 54,818-821,1988.

11）丸山　務，神崎政子，田辺興記，川崎　泉，平松廣，斉藤和夫，増井光子，東京衛研年報，34，65-68，1983.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 33-39, 1990

腸炎起病性大腸菌の食品及び井戸水における生存と増殖

平田一郎, 鈴木敬子, 榎田隆一,
甲斐明美*, 伊藤武, 寺山武*

Growth and Survival in Foods and Well Water of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Food Borne Diseases

ICHIRO HIRATA, KEIKO SUZUKI, TAKAICHI ENOKIDA,
AKEMI KAI*, TAKESHI ITOH and TAKESHI TERAYAMA*

Keywords：腸炎起病性大腸菌 diarrheagenic *Escherichia coli*, 食品 food, 井戸水 well water, 生存 survival, 増殖 growth

緒　言

大腸菌は，本来ヒト及び動物の腸管内の常在細菌である．これら大腸菌のうち，ヒトの胃腸炎や食中毒に関わるものは，一般に腸管病原性あるいは腸炎起病性大腸菌と呼ばれ，腸炎の発症機序や病像の違いによって，現在では病原性大腸菌(以下 EPEC と略す)，組織侵入性大腸菌(以下 EIEC と略す)，毒素原性大腸菌(以下 ETEC と略す)及び Vero 細胞毒素産生性大腸菌(以下 VTEC と略す)の 4 菌種に分類されている．

この一群の腸炎起病性大腸菌は腸炎ビブリオ，ブドウ球菌，サルモネラ，カンピロバクター等と並んで，我が国で発生している細菌性食中毒の起因病原菌として，公衆衛生上重要な病原菌である。また，最近では開発途上国への海外渡航者などの増加に伴い，コレラ，赤痢等と共に輸入感染症としても新たに注目されるようになってきた[1]．本菌食中毒を予防するためには，ヒトや動物，食品あるいは河川水，井戸水等の自然界における分布や感染経路に対する調査はもちろんのこと，腸炎起病性大腸菌の食品や河川等の自然界での生存性ならびに増殖態度の解明も重要である．

そこで著者らは，腸炎起病性大腸菌の食品中における増殖と生存性を明らかにするため，液体培地中での本菌の増殖に及ぼす各種温度，pH，食塩濃度の影響について検討した．また生カキや野菜等の食品中における増殖性を検討するとともに，井戸水中における生存性についても検討したので，それらの成績について報告する．

材料および方法

1．供試菌株

本実験に供試した腸炎起病性大腸菌は，東京都内で発生した集団下痢症患者及び食中毒患者から分離された ETEC O 6：H 16(LT, ST 産生株)，EIEC O 28，EIEC O 124，EPEC O 86，EPEC O 114，VTEC O 145，VTEC O 157：H 7の 7 菌株である．

2．BHI ブイヨン中における腸炎起病性大腸菌の増殖

1）**各種温度における増殖**：pH 7.2に調整した BHI ブイヨン(Difco Lab. USA)に，供試菌をそれぞれ約10^4個／ml接種した後，温度勾配振とう培養機(東洋科学，TN-112 D)を用いて10℃，15℃，20℃，25℃，30℃，35℃，42℃の温度条件で 5 日間振とう培養し，それぞれの温度における増殖をOD_{650nm}による比色法で測定した．

2）**各種 pH における増殖**：pH 4.0，pH 4.5，pH 5.0，pH 6.0，pH 7.0，pH 8.0に調整した BHI ブイヨンに，供試菌をそれぞれ約10^4個／ml 接種して，15℃および25℃温度条件下で 3 日間振とう培養を行い，各々の pH における増殖態度を検討した．増殖度の測定は前述の各種温度における検討の場合と同様に比色法によった．

東京都立衛生研究所多摩支所　190　東京都立川市柴崎町 3－16－25
Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 16－25, Shibazaki-cho 3 chome, Tachikawa,Tokyo 190 Japan
*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, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku Tokyo 169, Japan

3）**各種食塩濃度における増殖**：BHI ブイヨン(pH 7.2)の食塩濃度を0.5%，1.0%，1.5%，2.0%，3.0%，4.0%，5.0%に調整し，その各々に供試菌を約10^5個／ml 接種後，15℃の温度条件下で，前述の方法に従って供試菌の増殖態度を検討した．

3．食品中における腸炎起病性大腸菌の生存と増殖

1）**生カキ中における腸炎起病性大腸菌の増殖**：市販生食用カキを滅菌ビニール袋にそれぞれ20ｇずつ秤量し，その各々に供試菌を10^3～10^4個／ｇ接種した，接種後5℃，15℃に保存し，1，2，3日後に当該菌の生菌数をDHL 平板培養法によって測定した．すなわち，試料を10倍段階希釈した後，DHL寒天平板上に0.1ml づつ滴下し，コンラージ棒で塗沫した．この平板培地を37℃18時間培養した後，出現した腸炎起病性大腸菌の集落数を測定した．当該菌の確認はスライド凝集反応による血清型によった．

2）**キャベツ中における腸炎起病性大腸菌の増殖**：刻みキャベツを滅菌ビニール袋に10ｇずつ秤量し，その各々に供試菌を10^3～10^4個／ｇ接種し，以下生カキの場合と同様の方法で検討した．

3）**食肉中における腸炎起病性大腸菌の生存**：市販生牛肉を10ｇずつ滅菌ビニール袋に秤量し，その各々に供試菌を10^4～10^5／ｇ接種し，－20℃に保存した．保存後1，2，3，9ヵ月後に当該菌の生残菌数を生カキの場合と同様に測定した．

4．井戸水中における腸炎起病性大腸菌の生存

ろ過滅菌した井戸水および緑膿菌により汚染された(緑膿菌10^2個／ml)井戸水を試験管にそれぞれ10ml ずつ分注した．その各々に供試菌を10^2～10^4個／ml 接種し5℃，10℃，15℃，25℃，30℃の各温度に保存した後，1，2，3日後に，当該菌の生残菌数を測定した．菌数の測定は生カキの場合と同様に行った．

成　　績

1．BHI ブイヨン中における腸炎起病性大腸菌の増殖

1）**各種温度における増殖**：10℃，15℃，20℃，25℃，30℃，35℃，42℃の各温度における BHI ブイヨン(pH 7.2)中での発育を検討し，その42時間までの成績を図1に示した．ETEC O 6は10℃に培養した場合，42時間までは発育が認められなかったが，90時間の培養でわずかに発育が観察された．15℃培養では36時間頃から増殖が認められ，20℃では9時間頃から発育し始め24時間で定常期になった．25℃～35℃では発育速度が速く，3～6時間で増殖が始まり6～12時間で定常期となった．42℃では，10℃の場合と同様に42時間までは発育が認められなかったが，70時間の培養で発育が観察された．

EIEC O 124は図1に示すように，10℃，15℃，20℃，25℃，30℃，35℃及び42℃のいずれの温度においてもETEC O 6とほとんど同様の成績であった．

EPEC O 114は10℃，15℃，20℃，25℃，30℃，35℃の培養温度では，前述の ETEC や EIEC とほとんど同様の増殖態度を示したが，42℃では ETEC O 6と EIEC O 124は42時間までは発育が観察されなかったのに対し，6時間頃から増殖が確認された．

VTEC O 145は EPEC O 114と比較した場合，15℃及び42℃培養において，発育時間に多少の差異は認められるものの，いずれの培養温度においても EPEC O 114とほぼ同様の増殖態度であった．

2）**各種 pH における増殖**：25℃における各種 pH の

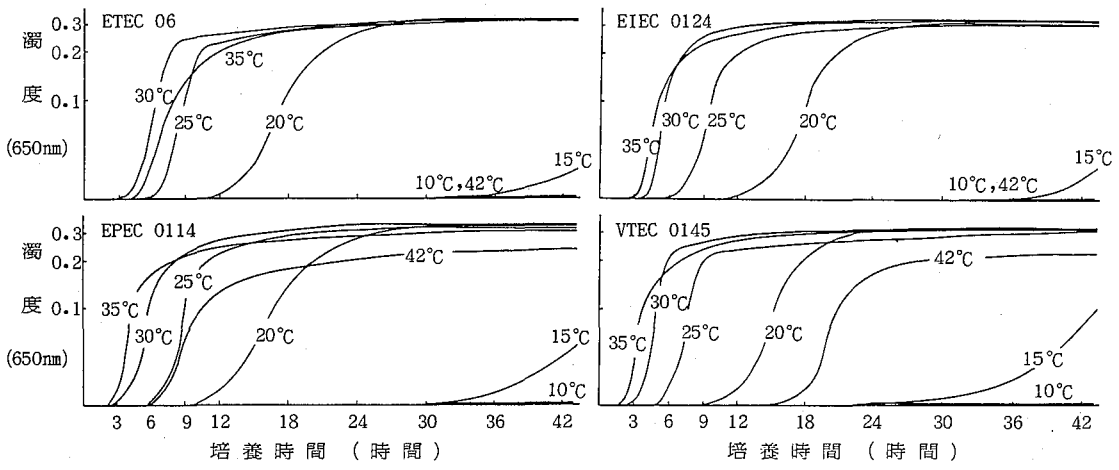


図1．各種培養温度における腸炎起病性大腸菌の増殖態度

BHI ブイヨン中での発育を図2に示した．供試したETEC O 6, EIEC O 28, EPEC O 86およびVTEC O 145の4菌株いずれも，ほとんど同様の増殖態度を示した．すなわちpH 4.0では発育が認められず，pH 4.5では13～18時間後，pH 5.0では8～10時間後に増殖が観察された．pH 6.0～8.0では発育速度が早く4～7時間後に発育が始まり，15時間で定常期となった．15℃の条件下では，供試したいずれの菌株もpH 4.0やpH 4.5の酸性条件下では発育が認められなかった．pH 5.0では35～45時間後に発育が観察され，pH 6.0～8.0では18～24時間後に発育が始まり，35～40時間で定常期になった．（図3）

3）各種食塩濃度における増殖：15℃の温度条件で，食塩濃度0.5%，1.0%，1.5%，2.0%，3.0%，4.0%，5.0%における腸炎起病性大腸菌の増殖態度を検討した．図4に示すように各食塩濃度における供試菌(ETEC O 6, EIEC O 28, EPEC O 86, VTEC O 145)の増殖態度は菌株によって誘導期の時間に多少の差は認められるが，いずれの菌株もほとんど同様であった．すなわち食塩濃度0.5%～2.0%では16～30時間の誘導期後に発育が観察され，36～45時間で定常期になった．食塩濃度3.0%では

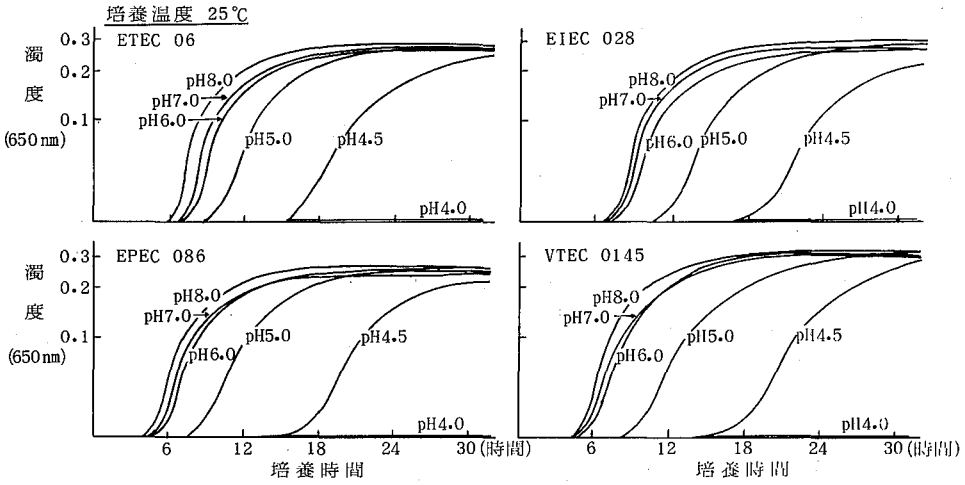


図2．各種pHにおける腸炎起病性大腸菌の増殖態度

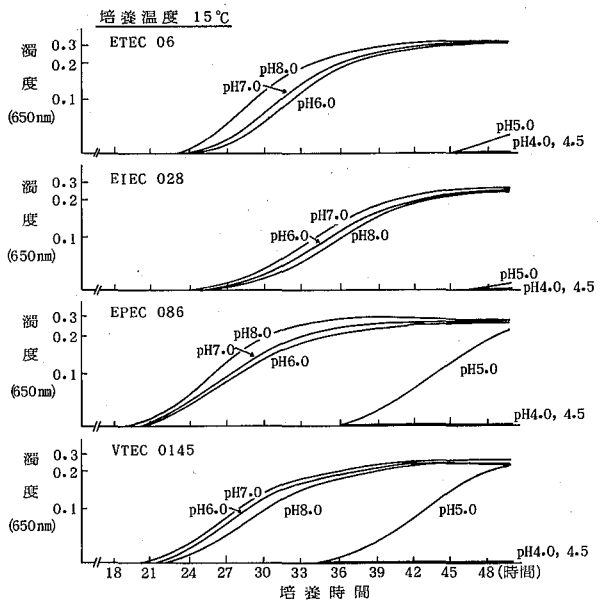


図3．各種pHにおける腸炎起病性大腸菌の増殖態度

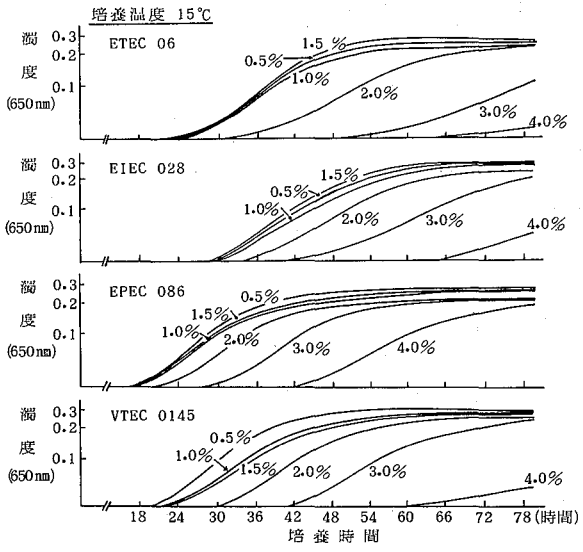


図4．各種食塩濃度における腸炎起病性大腸菌の増殖態度

に死滅したのに対して，緑膿菌汚染のある井戸水では1～3日間生存した．（図9）

考　　察

食品中における細菌の増殖や生存は，食品のpH，水分活性，酸化還元電位，有機酸，食品添加物，共存細菌等の内的要因並びに食品の保存温度や包装条件等の外的要因による相互作用に影響されていることが知られている．サルモネラ，腸炎ビブリオ，ブドウ球菌，ウェルシュ菌等の食中毒起因菌については多くの検討がなされている[2,3]が，腸炎起病性大腸菌の食品中における動態については，ほとんど検討が進められていない．著者らはBHIブイヨン中における各種培養条件下による本菌の増殖態度及び食品や井戸水における生存・増殖性について検討した．

腸炎起病性大腸菌のBHIブイヨン中での発育態度は，ETEC，EIEC，EPEC，VTECの違いあるいは血清型の違いによって顕著な差異はみられず，ほとんど同様であった．今回検討した腸炎起病性大腸菌は2日間培養の条件下では，10℃以下では発育がみられなかった．また，42℃でも発育しない菌株があった．これまでの報告[4]によると大腸菌の最低発育温度は8～10℃であることから，腸炎起病性大腸菌の最低発育温度とほとんど同じであると考えられる．ふん便由来大腸菌はその多くが45℃でも発育できるが，今回供試した4株のうち2株は42℃でも2日目まで発育が認められなかった．

腸炎起病性大腸菌の発育最低pHは，4.5であるが，15℃ではpH 5.0以上でなければ発育が観察できなかった．Krossら[5]は，大腸菌の発育可能pHは4.67～9.53であると報告しており，腸炎起病性大腸菌もほぼ同一態度であると推察される．

37℃における大腸菌の発育可能な食塩濃度は0.5～8.0%であると報告[6]されている．今回は15℃で検討した結果，腸炎起病性大腸菌は食塩濃度5.0%では発育しなかった．一方，培養中の細菌の発育は，培地中のpH，食塩濃度，添加物等の相互作用に影響される．そのためGibsonら[7]は，各種の因子の組合わせで，腸炎起病性大腸菌の発育を検討した．その結果，食塩濃度0～4.0%，pH 5.6，6.2，6.8，亜硝酸ナトリウム0～400 μg／ml，培養温度10～35℃のほとんどの組合わせで，1週間の観察においては本菌の発育が認められた．しかし，pH 5.6，亜硝酸ナトリウム200 μg／ml添加の場合は10～15℃では発育しないし，亜硝酸ナトリウム400 μg／mlの添加では20℃でも発育が抑制されており，今後は，発育に及ぼす培養条件を複数の組合わせで検討する必要があろう．

我が国における腸炎起病性大腸菌に起因する食中毒は飲料水等による水系感染が多い[8,9]ことから，井戸水中における腸炎起病性大腸菌の生存性について検討した．その結果，本菌は環境の温度条件によって影響を受け，15℃以上では早期に死滅するが，10℃以下の低温保存では10日以上にわたって生存できることを明らかにした．McFetersら[10]は，水中の大腸菌は5℃保存では4.53日で菌数が50%に減少したが，24℃では0.5日で菌数が50%減少し，環境の温度が大腸菌の生存に大きな影響を与えることを指摘している．また，水中における本菌の生存性は保存温度以外にも緑膿菌等の共存細菌による影響が認められた．

生カキにおけるEPECの汚染状況は，これまで検討された成績では10数%であり，ETECの汚染も報告されている[11～14]．また，生カキによる本菌中毒の発生も飲料水と並んで多く認められている[15]．しかしながら，生カキ中での本菌の生存性等の動態は明らかにされていない．著者らの検討では，生カキを5℃に保存した場合，本菌は3日後においても菌数が変動することなく生存し，低温保存で流通される生カキでは，腸炎起病性大腸菌が長時間生存できることが推察された．15℃保存では，1日後には接種菌量10^3個／gが10^4～10^6個／gに増殖し，本菌の発症菌量が10^6個以上である[16]ことから食中毒発生の危険性が示唆された．

刻みキャベツにおいても腸炎起病性大腸菌は生カキと同様に5℃では長期間生存すること，また，15℃以上の温度では増殖することが確認された．塩沢ら[17]が卵白中での腸炎起病性大腸菌の消長を検討した成績では，サルモネラは比較的安定で菌数の減少がみられないのに対し，腸炎起病性大腸菌は25℃保存でも増殖が抑制され，菌数の減少が認められており，食品の種類によっては，腸炎起病性大腸菌はサルモネラとは異なった増殖態度を示すことが示唆される．

－20℃の凍結食肉中では，他の食中毒起因菌と同様にEIEC，EPEC，ETEC，VTECの各腸炎起病性大腸菌も長期にわたって生存することが確認された．Doyleら[18,19]も食肉に高く汚染しているVTEC O 157：H 7を食肉に10^4個／g接種し，－20℃に保存した結果，9ヶ月後でも10^3個／g生残していることを確認しており，VTEC O 157：H 7も他の腸炎起病性大腸菌と同様に凍結食肉中では長期間生存していることは，本菌食中毒予防上留意すべきことであろう．

結　　論

腸炎起病性大腸菌に起因する食中毒を予防するための

基礎資料を得る目的で，BHIブイヨン，生カキ，キャベツ，食肉および井戸水中における生存性，増殖態度を検討し以下の成績を得た．

1．BHIブイヨン中における腸炎起病性大腸菌は，2日間の培養では10℃では発育しなかった．発育最低pHは4.5であり，食塩濃度4.0％でも発育する菌株がみられた．

2．生カキ中における腸炎起病性大腸菌は，5℃に保存した場合，3日後においても菌数の変動はみられなかった．15℃保存では徐々に増殖し，10^3～10^4個／g接種したものが2日後では10^5～10^6個／gに増殖した．

3．キャベツ中における腸炎起病性大腸菌の動態は，生カキ中における動態とほとんど同様に，低温保存では菌数の変動はみられないが，15℃以上の温度では増殖した．

4．－20℃に凍結した牛肉中における腸炎起病性大腸菌は10^4～10^5個／g接種したものが，9ヶ月後でも10^3～10^4個／g生残していた．

5．井戸水中における腸炎起病性大腸菌は15℃以上の保存温度では早期に菌が死滅し，10℃以下の低温保存では10日あるいはそれ以上生存した．また緑膿菌が共存する条件では，いずれの保存温度においても生存日数が延長した．

文　献

1）山田澄夫：食品と微生物，2，66-71,1985.
2）伊藤　武，坂井千三：食衛誌，30，128-137，1989.
3）藤原喜久雄：食衛誌，9，81-90，1968.
4）相磯和嘉：食品微生物学，63-76，1976．医歯薬出版，東京
5）Kross, W. and Zuelzer, M.：*Zentralbl, Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Abt 1 oriz*, 126, 360-395, 1932.
6）Christian, J.H.B. and Scott, W.J.：*Aust. J. Biol. Sci.*, 6, 565-573, 1953.
7）Gibson, A. M. and Roberys, T. A.：*Int. J. Food Microbiol.*, 3, 183-194, 1986.
8）工藤泰雄：医学のあゆみ，131，853-857，1984.
9）伊藤　武，甲斐明美，平田一郎ら：食品と微生物，6，67-75，1985.
10）McFeters, G. A. and Stuart, D. G.：*Appl. Environ. Microbiol.*, 27, 823-829, 1974.
11）小久保弥太郎，松下　秀，甲斐明美，山田　満，小沼博隆：食衛誌，19，117-121，1978.
12）大久保忠敬：日本公衆衛生誌，16，541-548，1969.
13）佐藤昭子：食衛誌，12，473-477，1971.
14）小川博実，得能弘志，佐々木実已子，岸本敬之：食衛誌，21，5-12，1980.
15）甲斐明美，伊藤　武，斎藤香彦，柳川義勢，稲葉美佐子，高橋正樹，松下　秀，工藤泰雄，坂井千三，篠原　楷：東京衛研年報，34，121-125，1983.
16）善養寺　浩，斎藤　誠：腸炎-成因と臨床，109-122，1986，納屋書店，東京.
17）塩沢寛治，杉枝直明，半田淑明，仁科徳啓，中津川修二，赤堀港治：食品と微生物，5，113-120，1988.
18）Doyle, M.P. and Schoeni, J.L.：*Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2394-2396, 1987.
19）Doyle, M.P. and Schoeni, J.L.：*Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 855-856, 1984.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 40-46, 1990

Bacillus thuringiensis の鞭毛抗原による型別法と *B. cereus* の鞭毛抗原との関連について

新井輝義*, 池島伸至*, 神真知子*, 楠くみ子*,
入倉善久*, 新垣正夫**, 伊藤武*, 寺山武*

Flagella Antigenic Serotyping System of *Bacillus thuringiensis* and the Antigenic Relationships with *Bacillus cereus*

TERUYOSHI ARAI*, NOBUYUKI IKEJIMA*, MACHIKO JIN*,
KUMIKO KUSUNOKI*, YOSHIHISA IRIKURA*, MASAO SHINGAKI**,
TAKESHI ITOH* and TAKESHI TERAYAMA*

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, 鞭毛抗原 Flagella antigen, 血清型別法 Serotyping system

緒言

Bacillus thuringiensis は土壌に広く分布する有芽胞細菌であり，一般食品への汚染も懸念されている[1-5]．本菌は卵黄反応陽性，ブドウ糖分解，マンニット非分解，澱粉分解など生化学的諸性状が食中毒原性のある *Bacillus cereus* と極めて類似しており，日常の食品検査では両者の区別が困難である．両者の鑑別には *B. thuringiensis* が産生する殺虫性蛋白結晶が重要な指標となるが[6-7]，本結晶非形成菌株も知られており，類似した物質を産生する他の *Bacillus* 属も存在する[8]ので結晶体が絶対的なものではない．

一方，Barjac[9]は1962年に *B. thuringiensis* の鞭毛抗原について検討したところ，鞭毛抗原に型特異性のあることを明らかにすると共に，血清型が毒素の殺虫スペクトラムに関連することを指摘した．そして，14種のH血清型及びその亜群抗原から19種の血清型[10-11]に分類した．また各血清型を *B. thuringiensis* の亜種[5]として分類した．

B. thuringiensis と *B. cereus* の鑑別は殺虫性蛋白結晶の確認と共に血清型別の併用が有効であると考えられる．そこで著者らは Barjac より分与された *B. thuringiensis* の型別用標準株21株を供試し，H抗原型別用の抗血清を調製した．また，*B. thuringiensis* のH抗原の特異性を明らかにするため，*B. cereus* のH抗原との抗原関係について検討したので報告する．

材料と方法

1．免疫血清作製菌株：*B. thuringiensis* H抗原型別用の標準菌株21株は Pasteur 研究所の Barjac より分与を受けた．供試菌株の血清型と亜種名を Table 1に示した．なお結晶体の確認は供試菌株を芽胞形成培地(Nutrient broth No.2(Oxoid CM 67);6.0 g，$MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$;0.03 g，KH_2PO_4;0.25 g，寒天;12.0 g，精製水;1,000ml)に接種し，35℃，1晩培養，その後室温で1～5日保存し，経日的に Smirnoff の Buffalo black solution による染色によって行った．

2．免疫用H抗原の作製：運動性の良好な菌を選択し，その1白金耳量を5 ml の H broth(Difco Lab.,USA)の入った中試験管に接種し，35℃，6時間振とう培養後ホルマリンを0.3%になるように加え，1夜室温に静置し，3,000 rpm で15分間遠心し菌体を集め，これを0.1%ホルマリン加生理食塩水で McFarland 混濁管No.8の濁度に調製したものを免疫用H抗原液とした．

*東京都立衛生研究所多摩支所　190　東京都立川市柴崎町3-16-25
*Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 16－25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa Tokyo 190 Japan
**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, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

Table 1. Reference strains of H-antigen serotyping system for *Bacillus thuringiensis*

Reference strain (*B. thuringiensis subspecies*)	Strain No.	H-Serotype[a)]	Crystal body[b)]
thuringiensis	T 01001	1	+
finitimus	T 02001	2	+
alesti	T 03001	3a	−
sotto	T 04001	4a, 4b	+
galleriae	T 05001	5a, 5b	+
subtoxicus	T 06001	6	+
aizawai	T 07001	7	+
morrisoni	T 08001	8a, 8b	+
tolworthi	T 09001	9	+
darmstadiensis	T 10001	10	+
toumanoffi	T 11001	11a, 11b	−
thompsoni	T 12001	12	+
pakistani	T 13001	13	−
israelensis	T 14001	14	+
dakota	T 15001	15	+
indiana	T 16001	16	+
tohokuensis	T 17001	17	−
kumamotoensis	T 18001	18	+
tochigiensis	T 19001	19	+
yunnanensis	T 20001	20	+
colmeri	T 21001	21	−

a) : de Barjac,H.(1981)[5)]
b) : author's data

3．免疫血清の調製：免疫用H抗原液を体重約2.5kgのウサギに3～4日毎に4回1，2，4および4ml量を耳静脈注射した．最終注射の4日後に耳動脈より一部採血を行い，抗体価を測定し，抗体価が1,600倍以上の場合には心臓より無菌的に採血を行い，常法により血清を得た．

4．抗血清のH凝集反応：0.1%アジ化ナトリウム加生理食塩水で100倍に希釈した抗血清を2倍段階希釈し，その0.25mlにMcFarland混濁管No. 5の濁度に調製したH抗原液を0.25ml加え，50℃，2時間反応させた．反応後凝集の生じた最大希釈倍数を抗血清の力価とした．

5．吸収試験：*B. thuringiensis* および *B. cereus* のH抗原吸収試験は下記のように行った．供試菌株をH brothで35℃，6時間振とう培養後，ホルマリンを0.3%になるように添加し，1夜放置した．本菌液を3,000 rpm，20分間遠心した菌体を吸収用抗原とした．この抗原約10mgを，*B. thuringiensis* 抗血清あるいは *B. cereus* 抗血清10倍希釈液5mlと混合し，50℃，1時間反応後，4℃，1晩静置した．次いで10,000 rpm 15分間(4℃)遠心してその上清を吸収血清とした．

6．*B. thuringiensis* 分離菌株のH抗原型別法：運動性が良好な *B. thuringiensis* 分離菌株を5mlのH brothに接種し，35℃，約6時間振とう培養した．この菌液に0.6%ホルマリン加生理食塩水を等量加え凝集反応用H抗原液とした．型別用血清は終末抗体価の20倍になるように原血清を0.1%アジ化ナトリウム加生理食塩水で希釈したものを用いた．凝集反応は，H抗原液0.5mlに型用別血清を0.05ml加え，50℃，2時間反応後判定した．

7．*B. cereus* H型別用標準菌株ならびにH抗血清：TaylorとGilbertの *B. cereus* H型別用標準菌株[2)]は英国のGilbertより分与された18株(以下TG 1～TG 18と表す)を用いた．本型別用抗血清は寺山ら[12)]によって報告された抗血清を使用した．寺山らのH型別用標準菌株18株(以下T 1～T 18と表す)ならびにその抗血清は寺山ら[12)]が報告したものを用いた．

Table 2. Cross-agglutination Reaction of Reference Strains of Each H Serotype of *B. thuringiensis*

Antigen (Reference strains)	Agglutination titer of unabsorbed antisera against the reference strains																				
	1	2	3 a	4 ab	5 ab	6	7	8 ab	9	10	11ab	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	6400	— [a]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	—	6400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3 a	—	—	12800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4 ab	—	—	—	25600	—	400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5 ab	—	—	—	—	6400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	6400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—	—	25600	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8 ab	—	—	—	—	—	800	—	12800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—	—	—	—	6400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11ab	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—	400	—	—	—	—	—	6400	—	—	—	—	—	—	—	—	—
13	—	—	—	—	—	200	—	—	—	—	—	—	25600	—	—	—	—	—	—	—	—
14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	25600	—	—	—	—	1600	—	—
15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6400	—	—	—	—	—	—
16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6400	—	—	—	—	3200
17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12800	—	—	—	—
18	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6400	—	—	—
19	—	—	—	—	—	200	—	—	—	—	—	—	—	—	200	—	200	—	12800	400	—
20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3200	—
21	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	400	—	—	—	400	6400

a) Agglutination titer $<1:100$

成　績

1．*B. thuringienvsis* H抗血清と免疫菌株との交差凝集反応：供試菌株21株の結晶体形成状況はTable 1に示したように16株が産生し，5株が非産生であった．*B. thuringiensis* の1～21の抗原をウサギに免疫して得られた抗血清と各免疫に用いた抗原との交差凝集反応の成績は，Table 2に示すごとく，いずれのH血清も，対応する同種型のH抗原に対しては3,200～25,600倍の凝集価を示した．Bt 1，Bt 2，Bt 3など14の抗血清は同種型抗原とのみ凝集を示し，他の型抗原とは反応しなかった．Bt 6は同種型抗原の他にBt 4，Bt 8，Bt 12，Bt 13，Bt 19の各型抗原と200～800倍の凝集価で反応した．また，Bt 15，Bt 16，Bt 17，Bt 19，Bt 20およびBt 21の各抗血清は同種型抗原以外の型抗原とも一部反応した．

2．*B. thuringiensis* のH血清型の特異性：同種型以外の抗原と反応した抗血清，すなわちBt 6，Bt 15，Bt 16，Bt 17，Bt 19，Bt 20，Bt 21の各抗血清については吸収試験を行った．Bt 6抗血清はBt 8の抗原によって吸収試験を実施した結果，未吸収血清の場合に反応が認められたBt 4，Bt 8，Bt 12，Bt 13，Bt 19の各型抗原とは凝集反応陰性となり同種型抗原とのみ反応した．すなわち，Bt 6型血清は型特異性があることが判明した．同様に他のBt 15，Bt 16，Bt 17，Bt 19，Bt 20，Bt 21の各抗血清についても，それぞれBt 19，Bt 21，Bt 19，Bt 14，Bt 19及びBt 16の抗原で吸収試験を行ったところ，未吸収の血清で認めらめた類属反応は陰性となり，吸収操作により型特異抗体を持つことが確認された．

3．*B. thuringiensis* のH抗血清と*B.cereus* のH抗原との関係：次いでBarjacの21株に対する各H血清とTaylorとGilbertの1～18型の標準菌株及び寺山らの1～18型の標準菌株のH抗原との交差凝集反応とその力価をTable 3に示した．すなわちBt 4抗血清はTaylorとGilbertの18型抗原(以下TG 18抗原と表す)と，Bt 11抗血清がTG 10抗原と，またBt 12型血清がTG 13抗原とそれぞれ3,200～6,400倍の力価で凝集反応を示した．また，Bt 17，Bt 19，Bt 20，Bt 21型血清もそれぞれTG 11とTG 15，TG 17，TG 17及びTG 6抗原と200倍の力価で交差凝集を示した．これらの類属反応は対応する抗原で吸収したところ，Bt 12型血清以外の抗血清からは類属反応が吸収されそれぞれ型特異抗体が残った．しかしBt 12抗血清はTG 13抗原で吸収試験を行った結果，Bt 12抗原との反応性およびTG 13抗原との反応性もすべて陰性となった．すなわち，*B. thuringiensis* 1～21の各型抗原のうち，Bt 12型以外は*B. thuringiensis* のみの特異H抗原を持つことが明らかになった．一方，Bt 12型は*B. cereus* のTG 13型と同一抗原であると推察された．

次に，寺山らの血清型システム18株の型抗原との交差反応をみるとBt 13抗血清が寺山らの4型抗原(以下T 4抗原と表す)と12,800倍の力価で類属凝集を示した．また，Bt 6抗血清がT 2およびT 14抗原と，Bt 17抗血清がT 14抗原と，Bt 19抗血清がT 1抗原と，Bt 21抗血清がT 1およびT 14抗原と，いずれも200倍の力価で類属凝集を示した．しかしBt 13抗原以外の各抗原との反応は類属反応であった．Bt 13抗血清は，T 4抗原で吸収試験を行った結果，同種型抗原との反応性も陰性となり，Bt 13型はT 4型と同一抗原であることが推察された．

4．*B. cereus* のH抗血清と*B. thuringiensis* のH抗原との関連：TaylorとGilbertのTG 1～TG 18の型抗血清及び寺山らのT 1～T 18の各型抗血清と*B. thuringiensis* のH抗原との交差凝集反応をTable 4とTable 5に示した．TG 10抗血清がBt 11抗原と6,400倍，TG 13抗血清がBt 12抗原と3,200倍，TG 15抗血清がBt 17抗原と，TG 17抗血清がBt 19抗原と3,200倍で交差凝集を示した．また，T 2抗血清がBt 6抗原と6,400倍で，T 4型血清がBt 13型株と3,200倍で類属凝集を示した．TG 13抗血清とT 4抗血清以外の各型抗血清は吸収試験の結果，同種型抗原に対する特異抗体が証明された．しかしTG 13抗血清はBt 12抗原で吸収試験を行ったところ，吸収抗血清はTG 13抗原に対して400倍の凝集価を示し，極めて低い抗体価であった．T 4抗血清はBt 13抗原で吸収するとT 4抗原とも反応しなくなった．すなわちT 4型とBt 13型とは同一H抗原を持つこと，TG 13型とBt 12型とは高い共通抗原を持つがTG 13は低い凝集価ながら，特異型抗原を持っているものと考えられた．

5．*B. thuringiensis* 分離菌株のH血清型別状況：著者らが食品から分離した結晶体産生*B.thuringiensis* 8株，土壌からの分離菌株2株について今回の実験で作製した*B.thuringiensis* H抗血清を用いて型別した結果，10株中2株がBt 3型，2株がBt 12型，各1株がBt 1型，Bt 5型，Bt 13型に型別された．3株は型別不能であった．

考　察

B. thuringiensis の鞭毛抗原(H抗原)に型特異性のあることがNorrisやWolf[13-14]によって見いだされその後Barjacら[9]によって鞭毛抗原による血清型別法が開発され，国際的に承認されるようになった．

著者らはBarjacらが開発した*B. thuringiensis* の21種の型別用血清を作製し，*B. thuringiensis* のH抗原の特異性ならびに*B. thuringiensis* と生化学的性状がほとん

ど同一である *B. cereus* のH抗原との関連性について検討した.

B. thuringiensis のH抗原は, Barjac らが指摘したごとく型特異性があることが確認された. また, Taylor と Gilbert[2]によって報告された *B. cereus* の18種のH抗原および寺山ら[12]によって Taylor と Gilbert のH型に該当しない新しく追加された18種の各H抗原と, *B. thuringiensis* のH抗原との関連を検討した. その結果, Bt 12と TG 13とは共通するH抗原であると考えられ, またBt 13とT 4についても共通性の高いH抗原であることが推察された. その他の19種の *B. thuringiensis* のH抗原は *B. cereus* のH抗原とは異なっていることを明らかにした. *B. thuringiensis* と共通抗原をもつ *B. cereus* の TG 13及びT 4株については, 結晶体を持たないことから, *B. thuringiensis* とは区別されたが, *B. thuringiensis* であっても結晶体を形成しない菌株もあることから鞭毛抗原に共通性が認められているので, さらにDNA 遺伝子レベルからの検討が必要であろう.

以上の結果, *B. thuringiensis* の Bt 12と Bt 13以外のH抗原は *B. thuringiensis* に特異的な抗原であることから *B. thuringiensis* の同定の手段としての血清型別法は結晶体の検出と併せて有効な方法であると考えられる. 著者らが食品や土壌から分離した *B. thuringiensis* 10株中7株が *B. thuringiensis* のH抗血清によって型別されたが, 3株については型別できなかった. 型別できなかった菌株は八面体の結晶体が認められることから *B. thuringiensis* と同定した菌株であり, さらにH血清型の追加が必要であろう.

一方, *B. thuringiensis* は鱗翅目や双翅目, 鞘翅目などの昆虫の幼虫に毒性がある特殊な殺虫毒素を産生することから微生物殺虫剤として広く利用されている[7]. *B. thuringiensis* の芽胞あるいは本毒素を野菜や山林に散布

Table 3. Relationships between H-antisera of *B. thuringiensis* and H-antigens of *B. cereus*

B. thuringiensis H-antisera	Agglutination titer of homologous antigen	*B. cereus* reference strains (H-agglutination titers)
1	6400	
2	6400	
3a	12800	
4a, 4b	25600	TG 18[a] (6400)
5a, 5b	6400	
6	6400	T 2[b] (200), T 14 (200)
7	25600	
8a, 8b	12800	
9	6400	
10	12800	
11a, 11b	12800	TG 10 (3200)
12	6400	TG 13 (6400)
13	25600	T 4 (12800)
14	25600	
15	6400	
16	6400	
17	12800	TG 11 (200), TG 15 (200), T 14 (200)
18	6400	
19	12800	TG 17 (200), T 1 (200)
20	3200	TG 17 (200)
21	6400	TG 6 (200), T 1 (200), T 14 (200)

a) TG : Taylor & Gilbert[2]
b) T : 寺山ら[12]

Table 4. Relationships between H-antisera of Taylor & Gilbert system for *B. cereus* and H-antigens of *B. thuringiensis*

H-antisera of Taylor & Gilbert system for *B. cereus*	Agglutination titers of homologous antigen	*B. thuringiensis* reference strains (titers)
1	12800	
2	12800	
3	3200	
4	6400	
5	25600	
6	6400	
7	12800	
8	12800	
9	25600	
10	25600	Bt 11 (6400)
11	25600	
12	25600	
13	12800	Bt 12 (3200)
14	12800	
15	25600	Bt 17 (3200)
16	12800	
17	6400	Bt 19 (3200)
18	12800	

Table 5. Relationships between H-antisera of Terayama system for *B. cereus* and H-antigens of *B. thuringiensis*

H-antisera of Teylor & Gilbert System for *B. cereus*	Agglutination titers of homologous antigen	*B. thuringiensis* reference strains (titers)
1	3200	
2	6400	Bt 6 (6400)
3	3200	
4	6400	Bt 13 (3200)
5	1600	
6	12800	
7	3200	
8	3200	
9	3200	
10	6400	
11	6400	
12	12800	
13	3200	
14	1600	
15	6400	
16	6400	
17	6400	
18	6400	

しており，土壌など自然環境や食品への本菌汚染の拡大が懸念され，食品衛生の立場から本菌による食品汚染状況を監視していく必要があろう．現在農薬として散布されている *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* のH血清型が3a, 3bであることから，食品などからの分離菌株のH血清型別は，人工的に散布された菌か元来から自然環境に分布する菌であるのかを鑑別するために重要な検査法であろう．

B. thuringiensis の病原性については，多くの研究者により否定されている[15]が，最近吉村ら[4]はSpilaやGoepfertら[1]，Shinagawaら[3]によって明らかにされていた *B. cereus* のエンテロトキシンと免疫学的に共通する毒素を *B. thuringiensis* が産生していることを指摘しているので，今後 *B. thuringiensis* の食中毒原性についても検討を要する問題であろう．

まとめ

B. thuringiensis のH抗原型別用標準菌株21株のホルマリン死菌をウサギに免疫し，H抗血清を得た．いずれの抗血清も対応する抗原に対して3,200～25,600倍の凝集価を示した．ただし，7種の抗血清は，同種型抗原以外に他の型抗原とも200～3,200倍の凝集価を示したが，吸収試験の結果これらの他の型抗原との反応は類属反応であり，21種の各型はそれぞれ型特異抗原を持っていることを明らかにした．*B. cereus* のTaylorとGilbertの18株のH抗原および寺山らの18株のH抗原との交差反応を調べたところ，*B. thuringiensis* の21種の型抗血清のうち7種の型抗血清は，TaylorとGilbertのH抗原と，また5種の型抗血清は寺山らのH抗原と類属反応を示した．ただし，Bt 12型およびBt 13型は，それぞれ *B. cereus* のTG 13型およびT 4型と共通する同一抗原であることが示唆された．

一方，*B. cereus* のTaylorとGilbertの型別用血清18種及び寺山らの型別用血清18種のうち6種の抗血清は *B. thuringiensis* の抗原と類属反応を示した．またT 4型はBt 13型と同一H抗原を持つこと，TG 13型とBt 12型はかなり高い抗原共通性を持つことが示唆された．

著者らが食品や土壌から分離した *B. thuringiensis* 10株中7株が *B. thuringiensis* のH抗血清と反応し，H血清

型試験からも *B. thuringiensis* と同定された．しかし，3菌株は1～21型の抗血清とは反応しなかった．

付記：(本研究は平成元年度当研究所研究計画課題「食品の衛生細菌学的研究」として実施したものである．)

文　献

1) Spira, W. M. and Goepfert, J. M.：*Appl. Microbiol.*, 24,341-348,1972.

2) Taylor, A. J. and Gilbert, R. J.：*J. Med. Microbiol.*, 8,543-550,1975.

3) Shinagawa, K.：*Inter. J. Food Microbiol.*, 10,125-142, 1990.

4) 吉村隆二，杉山純一，寺田友次，品川邦汎：日本食品衛生学会第55回学術講演会　講演要旨集, 25,1988.

5) de Barjac, H.：Insect Pathogens in the Genus *Bacillus*. *In* Berkeley, R. C. W. and Goodfellow, M. (eds.), *Special Publications of the Society for General Microbiology*; 4 *The Aerobic Endospore Forming Bacteria*; *Classification and Identification*, 241-250, 1981, Academic Press

6) 飯塚敏彦：化学と生物，27,287-296,1989.

7) 鮎沢啓夫：天敵微生物，岡見吉郎他編，最新微生物ハンドブック，384-393,1986,サイエンスフォーラム

8) Somerville, H. J., Delafield, F. P. and Rittenberg, S. C.：*J. Bacteriol.*, 96,721-726,1968.

9) de Barjac, H. and Bonnefoi, A.：*Entomophaga*, 7, 5-31, 1962.

10) Bonnefoi, A. and de Barjac, H.：*Entomophaga*, 8, 223, 1963.

11) Lemille, F., de Barjac, H. and Bonnefoi, A.：*Ann. Inst. Pasteur*, 117,31-38,1969.

12) 寺山　武，新垣正夫，山田澄夫，潮田　弘，五十嵐英夫，坂井千三，善養寺浩：東京衛研年報, 19-1,98-104,1978.

13) Norris, J.R. and Wolf, J.：*J. appl. Bact.*, 24, 42-56, 1961.

14) Norris, J. R.：*J. appl. Bact.*, 27,439-447,1964.

15) 大島康平，加納伸晃，長谷川幸七郎，二口欣也：基礎と臨床，23,147-153,1989.

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.*, **41**, 47-50, 1990

高速液体クロマトグラフィーによる胃腸薬中のヒヨスチアミンの定量

宮武ノリエ*, 重岡捨身*, 寺島潔*
長嶋真知子*, 上原真一*, 秋山和幸*

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Hyoscyamine in Gastrointestinal Drugs

NORIE MIYATAKE*, SUTEMI SHIGEOKA*
KIYOSHI TERAJIMA*, MACHIKO NAGASHIMA*
SHIN－ICHI UEHARA* and KAZUYUKI AKIYAMA*

Keywords：ヒヨスチアミン hyoscyamine, ロートエキス scopolia extract, 高速液体クロマトグラフィー HPLC, カートリッジカラム Bond－Elut SCX cartridge, 胃腸薬 gastrointestinal drugs

緒　言

胃腸薬は，多くの人が手軽に繁用する一般薬である．その成分は，制酸剤，健胃剤，消化剤，整腸剤，止瀉剤，鎮痛鎮痙剤等，多岐にわたっている[1]，従って胃腸薬中の各種成分の分析は複雑で，特に鎮痛鎮痙効果を期待して処方されているロートエキス中の，ヒヨスチアミン(Hy)は他の成分に比較して，極めて微量であるため，その定量は煩雑であり，迅速で精度の良い分析法の開発は薬事行政上からも重要である．

製剤中の Hy の定量法としては，滴定法，蛍光法，薄層クロマトグラフィー・デンシトメトリー，ガスクロマトグラフィー(GC)[2)-4)]，高速液体クロマトグラフィー(HPLC)[5)-10)]等多くの方法が報告されているが，胃腸薬のように多種多量の共存成分を含む製剤中の定量に実際適用可能なものは，GC 法，HPLC 法である．しかし，GC 法は煩雑な前処理を必要とし，HPLC 法もなんらかのクリーンアップによる妨害物質の除去を必要とする．そこで著者らは，市販クリーンアップ用カートリッジカラムによる簡単なクリーンアップ法を検討し，Hy の HPLC 分析法を確立したので報告する．本法は同時に行った GC 分析による結果との比較からも，胃腸薬中の Hy の高精度，迅速な分析法として十分対応できる方法である．

実験の部

1．試料　市販の胃腸薬のうちロートエキス又はロートエキス散配合のもの10検体を用いた．分包剤は20包をとり，1包あたりの平均内容量を求めたのち均一な粉末とし，試料とした．錠剤は15錠以上をとり，平均重量を求めたのち均一な粉末とし，試料とした．

2．試薬及び試液　Hy 標準品：日本薬局方(日局)定量用硫酸アトロピンを用いた．(別途日局硫酸アトロピンと同様の条件で乾燥減量を測定しておく．)

カートリッジカラム：ボンドエルート® Bonded Phase SCX, Benzenesulfonic acid (Strong cation exchanges) Size 3 cc (Analytichem International)．カートリッジカラムは付属のアダプターに20ml の注射筒を付けて使用する．使用前に，メタノール10ml，次ぎに２％酢酸10ml で洗浄し，更にこの操作を２回繰り返したものを用いる．

溶出液：0.2Mリン酸二水素カリウム：アセトニトリル(１：１)混液

その他は試薬特級を用いた．

3．機器及び装置

HPLC 装置：ポンプ880－PU，検出器870－UV，恒温槽860－CO 以上日本分光工業製，試料注入器；レオダイン社製7125型，データ処理器；島津製作所製クロマトパックＣ－Ｒ６Ａ．超音波発振水槽：エルマ社製Ｔ48－Ｈ

4．定量操作

１）試料溶液の調製　Hy として約0.2mgに対応する試

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

料を精密に量り，発泡に注意しながら1N塩酸30mlを少量ずつ加える．10～15分間超音波照射したのち遠心分離し，上澄液は50mlメスフラスコに分取する．残留物は更に1N塩酸5mlで2回抽出し，全抽出液を合わせ，更に1N塩酸を加え正確に50mlとし試料液とする．試料液の20mlを正確に量り，あらかじめ用意したカートリッジカラムに流速2ml/min以下で付加する．次いでカートリッジは水20ml，メタノール10ml，0.2Mリン酸二水素カリウム溶液10mlを用いて流速2ml/min以下で順次洗浄したのち，10mlメスフラスコを受器とし溶出液9mlで溶出する．0.5N塩酸0.3mlを加えてpH約3としたのち水を加えて10mlとし試料溶液とする．

なお，試料液が混濁し付加する時目詰まりをおこす場合には，試料液をエーテルで洗浄した後その20mlについて操作を行う．

2）標準溶液の調製　Hy標準品約5mgを精密に量り0.1N塩酸にとかし正確に25mlとする．この2mlを正確に量り移動相を加えて正確に50mlとし標準溶液とする．

3）定量　試料溶液及び標準溶液50μlずつを正確にとり次の条件で分析を行う．それぞれの液のヒヨスチアミンのピーク面積を測定し，定量する．

測定条件　検出器；紫外吸光光度計(測定波長：230nm)，カラム；Shim－pack CLC－ODS 5μm 6×150mm(島津)，カラム温度；40℃，移動相；CH_3CN：0.02MKH_2PO_4［リン酸(1→4)でpH 2.8とする］(45：55)に0.005Mとなる様，ラウリル硫酸ナトリウムを加えたもの，流速；1.0ml／min，感度；Att＝5 (0.032 AUFS)，注入量；50μl.

結果および考察

1．HPLC測定条件について

オクタデシルシリル化シリカゲル(ODS)を充填した逆相系のカラムを使用し，ペアードイオンクロマトグラフィーによる分析条件を検討した結果，実験の部に記載した条件で行うこととした．この条件で，Hy標準品3～15μg／mlの範囲で検量線を作成したところ，相関係数0.9999以上の良好な直線関係が得られた．再現性も変動係数0.65%(n＝5)と良好であった．

2．試料の前処理法の検討

a）製剤からのHyの抽出　逆相系HPLC分析におけるHyは，酸性水溶液として調製するのが適当であるが，胃腸薬には炭酸水素ナトリウム等アルカリ性物質が多量に含まれているため，製剤からのHyの抽出は過量の酸で行う必要がある．従って本法では抽出効率等を考慮し，1N塩酸30ml×1回，5ml×2回で行うことにした．

b）カートリッジカラムの選択　カートリッジカラムには順相系，逆相系，イオン交換樹脂系のものが市販されており，順相系のものについては，製剤からのHy抽出液をアルカリ性下有機溶媒抽出後クリーンアップする方法が報告されているが，著者らは，抽出液をそのままクリーンアップする方法として，逆相系及びイオン交換樹脂系のものについて検討することにした．

まず逆相系のものとして，SEP－PAK C_{18}カートリッジ(Waters Associates)で検討を行ったが，Hyと同様な挙動を示す物質が多く，HPLC分析における妨害物質を除くことができず，不適当であった．

次ぎに，Hyが塩基であることに着目し，強酸性イオン交換樹脂のカートリッジへの吸着を検討した．カラムはボンドエルートSCXをもちいた．Hyの0.004mg／ml 0.1N塩酸溶液20mlをカラムに付加した後，水20ml，次ぎにメタノール又はアセトニトリル20mlを流下し，Hyの溶出を測定した．その結果，いずれの流出液からもHyを認めず，本カートリッジカラムでクリーンアップが可能であることが示唆され，以下検討を行うことにした．

c）カートリッジカラムからのHyの溶離　一般的に陽イオン交換相から溶出させるには，1）溶出溶媒のpHを高くする，2）イオン強度の高い緩衝液を流下する，3）固相に対して，より高い選択性を持つ陽イオンを含む緩衝液を使用することが要因となる[11]．そこで，まずpHの影響について検討した．0.1Mリン酸二水素カリウム(pH 4.5)，0.1Mリン酸二水素カリウムと0.1Mリン酸水素二カリウムで調製した緩衝液pH 6.0，7.0，8.0の各液10mlを流下させたが，いずれもHyの溶出はみられなかった．次ぎに，それらの各液とアセトニトリル1：1混液10mlを流下させたところ，回収率はいずれも97～99%で，アセトニトリルの添加によりpHとは関係なくHyは溶出することが明らかとなった．次ぎにイオン強度について検討した．0.025Mから0.25Mの濃度のリン酸二水素カリウム又はリン酸二水素ナトリウムの溶液とアセトニトリル1：1混液9mlを用いて溶出を試みた．図1に示す様に，0.025Mでは，いずれも全く溶出しなかったが，リン酸二水素カリウムを用いたときは0.15M以上で完全に溶出した．また，0.1Mではリン酸二水素カリウムは97%の回収率を示したのに対し，リン酸二水素ナトリウムは87%しか回収されず，0.25Mでも完全には溶出しなかった．これは固相に対する相対的選択性がナトリウムイオンよりカリウムイオンの方が

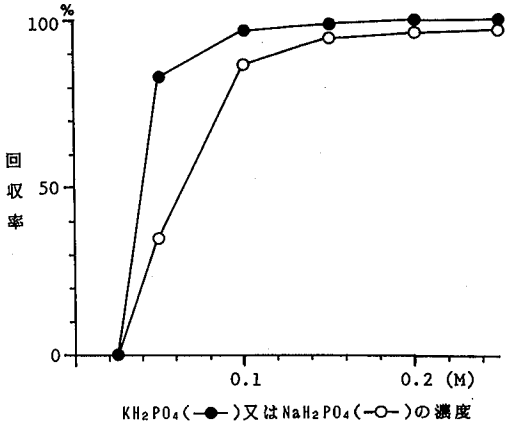


図1．ヒヨスチアミンの回収率に及ぼすリン酸二水素塩濃度の影響
—●— KH_2PO_4溶液・CN_3CN(1：1)9 ml
—○— NaH_2PO_4溶液・CN_3CN(1：1)9 ml

強いためと考えられる．以上の結果より，溶出は0.2Mリン酸二水素カリウム：アセトニトリル(1：1)で行うこととした．

d) 添加回収試験　試料液10ml に Hy 0.04mgを添加し定量操作に従って操作し回収試験を行ったところ，回収率は99.9%，98.7%と定量的な結果が得られた．

3．市販製剤の定量

市販製剤10検体につき定量を行った．標準溶液および試料溶液の代表的なもののクロマトグラムを図2に示す．

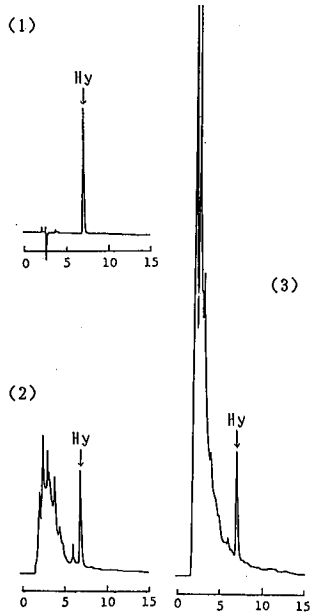


図2．ヒヨスチアミン（Hy）の HPLC
(1)標準溶液
(2)(3)試料溶液(表1の検体番号2及び7)

表1．市販製剤の定量結果

検体番号	形　　状	表示量（ロートエキスとして）*	定量値（mg／包，錠）	
			HPLC 法	GC 法
1	分包顆粒剤	10 mg／包	0.088	0.106
2	分包顆粒剤	10 mg／包	0.095	0.115
3	錠剤	2.5mg／錠	0.019	0.021
4	錠剤	2.5mg／錠	0.021	0.021
5	錠剤	5 mg／錠	0.043	0.045
6	錠剤	3 mg／錠	0.028	0.025
7	錠剤	5 mg／錠	0.047	0.051
8	錠剤	5 mg／錠	0.042	0.046
9	錠剤	3.3mg／錠	0.034	0.038
10	錠剤	3.3mg／錠	0.037	0.037

＊日局ロートエキスはヒヨスチアミンとして0.95～1.15%と含量規定している．

Hyとして0.05mg対応量
　＋0.1N塩酸10ml
　振とう10分間
　＋10%アンモニア溶液5ml
　＋I.S.10ml
　＋酢酸エチル20ml
　振とう10分間
酢酸エチル層
　減圧留去
残
　＋クロロホルム0.5ml
GC

I.S.：テトラコサン（$C_{24}H_{50}$）
0.1mg/mlの酢酸エチル溶液

GC条件：カラム　2%OV－101
（Uniport HP 60/80mesh）　3mm×1m
温度　カラム190℃
注入部250℃
キャリアーガス　N_2　40ml/min
検出器　FID

図3．GC法の操作条件

分析結果は表1の通りである．また同時に，GC法で定量した値を示したが，良く一致している．GC法は既報を参考にして図3の通り行った．

結　論

市販の胃腸薬に配合されているロートエキスのヒヨスチアミンの定量を検討した結果，市販のイオン交換カートリッジカラムを用いて前処理を行い，ODS系カラムでイオンペアークロマトグラフィーのHPLC法で定量する方法を確立し，製剤の定量に適用することが出来た．この方法でヒヨスチアミンを定量した結果，いずれも規格値内に入っており，適合であった．またGC法とも良く一致することが伴った．本法は胃腸薬中のロートエキスの有効成分であるヒヨスチアミンの定量法として精度良く定量出来，多種類の行政検体の試験法として十分適用出来るものと考える．

文　献

1）医薬品製造指針1986年度版，日本公定書協会編，264－84，1986，薬業時報社，東京．
2）Quercia. V., Cardini. C., Tucci. B.：*Boll. Chim. Farm.*, 107, 737－41, 1968.
3）南川伝憲：薬誌，90，1457－60，1970.
4）西本喜重，加藤礼子，林　信一：薬誌，100，396－401，1980.
5）Walters, M. J.：*J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 61, 1428－32, 1978.
6）Brown, N. D., Sleeman, H. K.：*J. Chromatogr.*, 150, 225－8, 1978.
7）Pennigton, L. J., Schmidt, W. F.：*J. Pharm. Sci.*, 71, 951－3, 1982.
8）岡村俊男，布浦由樹：大阪府立公衛研所報，薬事指導編，19，7－9，1985.
9）Leroy, P., Nicolas, A.：*J. Pharm. Biomed. Anal.*, 5, 477－84, 1987.
10）Oshima, T., Sagara, K., Tong, V., Zhang, G., Chen, V.：*Chem. Pharm. Bull.*, 37, 2456－8, 1989.
11）久保博昭（日本語版監修）：固相抽出法ハンドブック，27－30，1986，㈱ユニフレックス，東京．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 51-54, 1990

液体クロマトグラフィーによる製剤中の DL-塩化カルニチンの定量

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

Determination of DL - Carnitine Chloride in Pharmaceutical Preparations by High Performance Liquid Chromatography

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

Keywords：DL - 塩化カルニチン DL - carnitine chloride, 高速液体クロマトグラフィー HPLC, 医薬品製剤 pharmaceutical preparation, 示差屈折計 RI,

はじめに

DL - 塩化カルニチン(Car.)は，胃腸障害，食欲不振，栄養不良障害などの疾病に対する有効物質であり，単品，複合製剤として広く用いられている．剤型も顆粒，錠剤，注射剤，内用液剤と様々である．また滋養，強壮を目的とした栄養ドリンク剤にも配合されることが多い．

Car. の分析法としては，従来，滴定法，吸光度法[1]，ガスクロマトグラフ法[2]などがあるが，これらにはいくつかの問題点がある．例えば他の配合薬の妨害を除去するための前処理が繁雑であること，終末点が不明瞭であること，反応時間が長時間必要であることなどの点である．他に HPLC 法[3,4]も報告されている．これは誘導体にし，ケイ光検出する方法で複合製剤には，あまり適当ではない．

そこで今回著者らは，混合製剤中の Car. の定量法として，示差屈折計(RI)検出器を用いた HPLC 法を開発し検討した結果，迅速かつ高精度に測定できる定量法が得られたので報告する．

実験方法

装置　HPLC：ポンプ　日本分光 K. K. 製 BIP - 1，試料注入装置：レオダイン K. K. 製7125型，検出器：日本分光 K. K. 製830 - RI 型，日本分光 K. K. 製 UVIDEC - 100 V 型，データー処理装置：島津製作所 K. K. 製クロマトパック C－R 3 A，超音波発振水槽：ヤマト科学 K. K. 製ブランソン12型，振とう器：大洋科学工業 K. K. 製レシプロシェーカー S R－Ⅱ，遠心分離器：久保田製作所 K. K. 製 KN－70

試薬，試液及び標準品　特に本文に記載のないものは日本薬局方(日局)一般試験法，または日局通則により調製したもの，及び和光純薬 K. K. 製試薬特級を用いた．Car. 標準品：105℃で2時間乾燥し定量するとき99.0%のものを用いた．前処理用カラム：東京有機化学工業 K. K. 製強酸性イオン交換樹脂アンバーライト CG－120 2 g を希塩酸20ml で洗い，さらに中性になるまで水で洗った後，内径1 cmのガラスカラムに2 cmの高さに充塡したものを用いた．

試料　医薬品製剤は市販の Car. 含有製剤5種類を用いた．そのうち錠剤，カプセル剤，分包剤はそれぞれ10個(包)以上をとりその平均重量を算出し，乳鉢でよく研和して均質な粉末とし試料とした．

測定　日局一般試験法「液体クロマトグラフ法」の定量(2)絶対検量線法に従いピーク面積測定法により測定する．

定量操作　**1．標準溶液の調製**　Car. 標準品約40mg を精密に量り，水を加え溶かした後，水で正確に100ml とし，標準溶液とする．

2．試料溶液の調製　1）液剤のとき：表示に従い，試料を水で希釈して Car. 10mg／ml とする．2）錠剤，糖衣錠，顆粒剤のとき：試料を粉末とし，Car. 250mg対応量を量り，水10ml を加え10分間超音波処理を行い，

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

さらに10分間振り混ぜ，水で正確に25mlとする．この液を遠心分離する．1），2）とも2mlを正確に量り，調製済みの前処理用カラムに入れる．流出速度は1ml／minとする．液が樹脂層に流入した後，水20mlで洗う．次に2％アンモニア溶液10mlで溶出する．流出速度は2ml／minとする．さらに水を35ml流し，水を加えて正確に50mlとし，試料溶液とする．

3．HPLC測定条件 HPLCカラム：アサヒパックGS－320H（9±0.5 μm）7.6mm*I. D.* ×250mm*L.*，移動相：水，流速：0.8ml／min，検出器：RI，温度：35℃，注入量：10 μl

実験結果及び考察

1．HPLC測定条件の検討 **1）検出器** Car.は紫外部吸収が弱く検出波長210 nmの検出限界は，今回のHPLC条件では0.1mg／mlであった．RI検出器では0.01mg／mlであった．

そこでRI検出器を用いて検討を行うこととした．溶離液には水を用いた場合に安定なベースラインが得られたのでこの条件によることとした．

2）HPLCカラム 3種類の充塡剤について検討した．逆相分配用のオクタデシル基結合型（カラムI）では，ピークの形状が悪く，溶出も早すぎて実用に耐えなかった．次にシアノプロピル基結合型（カラムII）では，保持時間は短いがピークの形状は改良された．しかしCar.のピーク出現後にベースラインがしばらく不安定になった．これは試料液がアンモニアアルカリ性であるためと考えられる．そこで適合pH領域が2～12であり，ゲル浸透クロマトグラフィー用の高分子ハードゲル充塡剤アサヒパックGS－320H（カラムIII）で検討した結果，ピーク形状も良好で妨害ピークも無く，ベースラインも安定で，直ちに，次の試料分析が可能であった（図1．）．

2．製剤中の妨害成分の検討 製剤中には多量の糖類など多くの成分が同時に配合され，RI検出器を用いた場合は，妨害となる．そこで保持時間（t_R）を検討したところCar.（9.7 min）に対し，同時配合成分のそれは以下のようであった．矯味剤として精製白糖（10.7 min），果糖（10.1 min），D－ソルビトール（10.3 min），クエン酸（7.5 min），酒石酸（7.3 min），乳酸（8.4 min），防腐剤として安息香酸ナトリウム（8.8 min），パラオキシ安息香酸ブチル（10.9 min），着色剤としてカラメル（5.6 min）などは分析の障害となる．特にドリンク剤には多種，多量の成分が含まれ，主剤として生薬抽出成分や水溶性ビタミンも同時に配合されている．これらの成分は，Car.のピークに近く，分析を妨害したり，あるいは多量に配合されているため，影響が大きく，直接分析することは困難であった．

そこでCar.が第4級アンモニウム塩でベタイン構造を有することに着目し，イオン交換タイプの前処理カラムを用いクリーンアップすることとした．

次の3種類の前処理用カラムについて定量操作(2)項に従い検討した．(1)カートリッジ式のカラム（spe Sulfonic Acid），(2)強酸性イオン交換樹脂（アンバーライトCG－120），(3)強塩基性イオン交換樹脂（ダウエックス1，溶離液は2％アンモニア溶液の代わりに0.01 NHCl液10mlとした．）を用いて市販のドリンク剤，胃腸薬の液剤等に応用した．その結果(1)は十分にクリーンアップ出来なかった．(2)と(3)は，ほぼ同様のクリーンアップ結果が得られた．両者のうち，今回のHPLC分析カラムに適した試料溶液が得られた(2)を用いることとした．

前処理カラムからの溶出液はa）2％アンモニア溶液の他にb）10％アンモニア溶液，c）2％水酸化ナトリウム溶液，d）50 mM炭酸ナトリウム溶液，e）10 mM炭酸

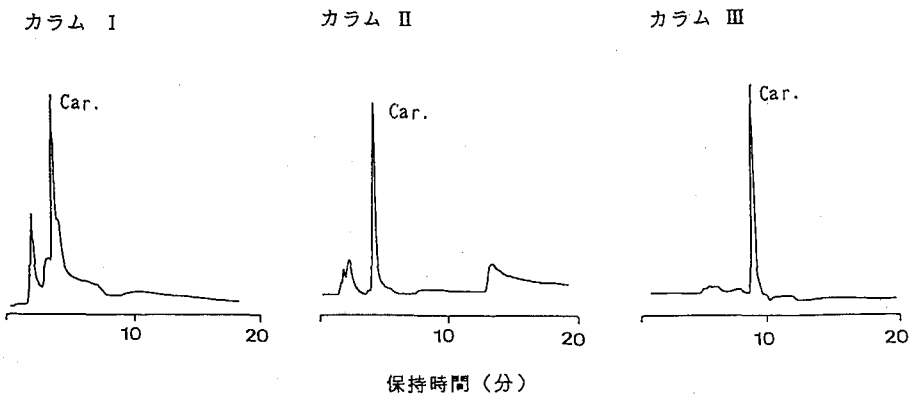


図1．標準物質のHPLCクロマトグラム

カリウム溶液，f)0.01 NHCl 溶液で検討した結果，c)とd)以外は市販製剤を用いた場合もクリーンアップは十分であった．しかしa)以外は市販製剤の繰り返し試験(n＝4)を行った結果，C. V.＝5.5～8.3%とばらつきが大きかった．そこで最も安定した結果を得られた2%アンモニア溶液を用いることとした．

図2．に各種市販製剤のクリーンアップ処理前(A，B，C)と本法によるクリーンアップ後(a，b，c)のクロマトグラムを，また，その同時配合成分を表1．に示す．

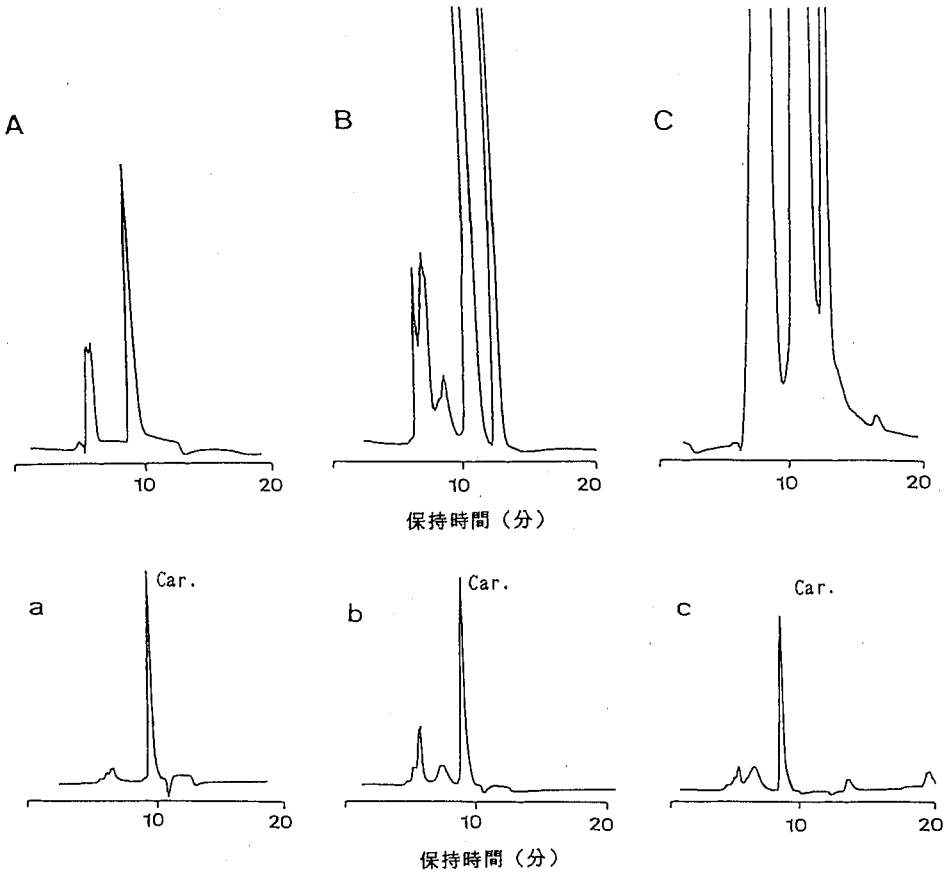


図2．市販製剤の HPLC クロマトグラム
A，B，C：クリーンアップ前のクロマトグラム
a，b，c：クリーンアップ後のクロマトグラム

表1．市販製剤中の *DL*－塩化カルニチンの定量

試料（剤型）	表　示　量	対表示量(%) (n＝3)	変動係数(%)	他の配合成分
A（カプセル）	300mg／カプセル	102.1	2.90	ビオヂアスターゼ，牛胆汁エキス
B（内服液）	80mg／30ml	95.2	2.19	生薬エキス，精油，苦味チンキ
C（ドリンク剤）	50mg／100ml	98.4	1.75	ビタミンB_1，B_2，B_6，カフェイン
D（糖衣錠）	40mg／3錠	96.1	1.59	リパーゼ，塩化ベタネコール
E（ドリンク剤）	50mg／30ml	95.9	1.97	タウリン，イノシット，パンテノール

A，B，C：図2．に示す．

3．検量線および再現性 Car. の標準品を用いて0.01～2.0mg／ml の間で5段階の標準溶液系列から検量線を作成した．回帰式は Y＝－0.142＋3.341 X (r＝0.998, X：濃度mg／ml, Y：Car. のピーク面積)でほぼ原点を通る良好な直線性を示した．

再現性は1.0mg／ml の標準溶液で，変動係数1.15％(n＝5)と良好な結果であった．

4．市販製剤の分析 本法により市販の健胃消化剤3検体(顆粒剤，錠剤，液剤)と栄養ドリンク剤2検体中の Car. の定量分析を行った．その結果は表1．に示すとおりである．変動係数は1.59～2.90％と良好な結果であった．

ま と め

製剤中の Car. の分析を HPLC 法により検討した．強酸性イオン交換樹脂を充塡したカラムで前処理を行い，妨害成分を除いた後，HPLC カラムにゲル浸透クロマトグラフィー用のアサヒパック GS－320H を用い，移動相は水として RI 検出器で分析したところ，良好な結果が得られた．本法は糖類や，防腐剤が多く配合されている内用液剤についても，迅速且つ精度良く定量分析ができた．この結果，多種類の行政検体の試験法として，十分適用できるものと考える．

文 献

1) Mehlman, M. A. and Wolf, G.：*Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 146, 1962.

2) Lewin, L. M., Peshin, A. and Sklarz, B.：*Anal. Biochem.* **68**(2)531－536, 1975.

3) YOSHIDA, T., AETAKE, A., YAMAGUCHI, H. et al：*J. of Chromatogr.* **445**(1), 175－182, 1988.

4) Hayes, J. S., Alizade, M. S. and Brendel, K.：*Anal. Chem. Acta.* **80**, 361－367, 1975.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 55-61, 1990

生薬の品質評価に関する研究（第10報）*
四川省産沢瀉及び本邦市場品沢瀉の品質

安田一郎**, 浜野朋子**, 高野伊知郎**, 高橋奈穂子**,
瀬戸隆子**, 秋山和幸**, 佐藤かな子***, 長井二三子***,
牛山慶子***, 市川久次***, 加納いつ****, 篠田　隆*****,
鈴木達夫*****, 伊藤　寛*****, 長谷部　浩*****

Studies on the Evaluation of Crude Drugs (X)*
Quality of Alisma Rhizome Cultivated in Sichuan and Distributed in Japanese Market

ICHIRO YASUDA**, TOMOKO HAMANO**, ICHIRO TAKANO**, NAHOKO TAKAHASHI**,
TAKAKO SETO**, KAZUYUKI AKIYAMA**, KANAKO SATOH***, FUMIKO NAGAI***,
KEIKO USHIYAMA***, HISATSUGU ICHIKAWA***, ITSU KANO****, TAKASHI SHINODA*****,
TATSUO SUZUKI*****, HIROSHI ITO***** and HIROSHI HASEBE*****

Seven standard specimens of Alisma Rhizome cultivated at Quian Xian in Sichuan, China, were examined to evaluate quality i. e. total ash, acid-insoluble ash, loss on drying, and content of dil. ethanol, γ-aminobutyric acid (GABA) and alisol B monoacetate (ABMA). Among 10 imported samples, three were from Sichuan, three were from Fujian, three were from Taiwan and one was from Vietnam. The Vietnamese sample was found to be low in quality on the basis of the low quantity of total ash (4.8%), GABA(0.37mg/g), and ABMA (less than a detectale level). Similarly, two out of 10 lots of Alisma Rhizome on the market were found to be low in quality due to the values of total ash and contents of dil. ethanol, GABA and ABMA.

Ethanol extract of Alisma Rhizome is one of the most potent inhibitors of horse kidney Na^+, K^+-ATP-ase activity.

The inhibitory effects were not significantly different between samples (seven standards and 20 samples) examined, despite the clear distinctions in chemical composition.

Keywords: Alisma Rhizome, *Alisma orientale*, crude drugs, evaluation, on the market, alisol B monoacetate, γ-aminobutyric acid, horse kidney, Na^+, K^+-ATPase, inhibition

緒　言

沢瀉は，老人性疾患適用方剤に属する六味丸，八味地黄丸などに配合される生薬で，「水を去るを瀉(そそ)ぐといい，沢の水の瀉(そそ)ぐが如し」いわれるように，身体に溜った水分を排泄する作用，すなわち利尿作用が強いといわれる[1]．本生薬はサジオモダカ *Alisma orien-*

* 第9報，東京衛研年報，40，84-89，1989.
** 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 Reseach Laboratory of Public Health,
24－1, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan
*** 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科
**** 東京都立衛生研究所多摩支所
***** 東京都衛生局薬務部薬事衛生課

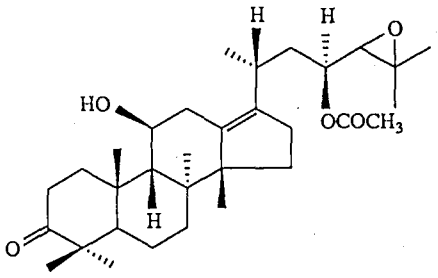


Fig. 1. Chemical Structure of Alisol B Monoacetate (ABMA)

tale (Sam.) Juzepczuk (*Alisma plantago-aquatic* L. var. *orientale* Samuelsson)(オモダカ科)の塊茎を乾燥したもので，細根はよく取り除かれている．かつてわが国でも生産されたが，現在ではその産出を見ず，本邦市場には主として中国四川省産沢瀉のほか，福建省産，台湾産のものなどが流通している．

沢瀉は，肥大し，質が重く，内部が充実して白色～淡黄白色を呈し，新しいものが良品とされている．その規格は日本薬局方[2](以下，日局と略す)で定められているが，性状の項以外の試験項目は灰分，酸不溶性灰分のみで，品質確保上甚だ不充分なものと考えられる．

主成分はトリテルペノイド alisol B monoacetate(以下，ABMA と略す)(Fig. 1)とされるが[3,4]，他に alisol A, alisol A monoacetate, alisol B, alisol C, alisol C monoacetate を含み，動物実験の結果から，これらが利尿作用に深く関与していると考えられている[5-9]．また，微量のセスキテルペノイド alismol, alismoxide など[10]のほか，水溶性成分として本態性高血圧症，腎性高血圧症に有効で，脳代謝促進剤として用いられる γ-amino butyric acid(以下，GABA と略す)[11]を多量に含有している(安田：未発表)．

今回，市場品沢瀉の品質評価を行うに当り，四川省灌県栽培の沢瀉を標準生薬とし，成分分析として ABMA 及び GABA の定量を行った．また，日局に規定された2つの試験項目に加え，一般に生薬試験に用いられる乾燥減量ならびにエキス含量を測定した．さらに，利尿作用が強いことから，水分の再吸収に関係する腎臓 Na^+, K^+-ATPase(Na^+ポンプ)の阻害を生物学的品質評価の1つとして同時に検討した．

実験の部

1．実験材料及び試料の調製

標準生薬 1989年1月，四川省灌県で収獲，調製され3段階に等級分けされた沢瀉のうち，1級品2ロット(S－1，S－2)，2級品2ロット(S－3，S－4)，3級品3ロット(S－5～S－7)の計7ロットから，各々100 g 前後を現地で無作為に抜取り，標準生薬とした．これらは粗切後，小型粉砕器及び乳鉢を用い，日局に定める粗末[12]とし，試料とした．

輸入品生薬 1988－1990年に神戸港及び横浜港に入荷した輸入品のなかから，四川省産3ロット(I－1～I－3)，福建省産3ロット(I－4～I－6)，台湾産3ロット(I－7～I－9)及びベトナム産1ロット(I－10)計10ロットを全形生薬として各々200～1,000 g，輸入業者より直接入手し輸入品生薬とした．これらは各々100 g 前後を標準生薬と同様に処理し，試料とした．

市場品生薬 1989－1990年東京市場品8ロット(M－1～M－8)を刻み生薬として，1990年大阪市場品1ロット(M－9)を全形生薬として各々500 g 入手し，本邦市場品生薬とした．また，1989年に香港市場品として入手した全形生薬1ロット(M－10)を参考品とし用いた．刻み生薬は充分に混和後その50 g を直接粗末とし，全形生薬は100 g 前後を標準生薬と同様に処理し，試料とした．

2．灰分，酸不溶性灰分，乾燥減量及び希エタノールエキス含量

灰分，酸不溶性灰分，乾燥減量及び希エタノール(50％エタノール)エキス含量は日局一般試験法 22. 生薬試験法[13]に従い測定した．

3．γ-Aminobutyric acid(GABA)の定量

試料約0.5 g を精密に量り，前報[14]と同様の方法で試料溶液を調製し，自動アミノ酸分析計で GABA の定量を行った．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，GABA 含量を算出した(Fig. 2)．

4．Alisol B monoacetate(ABMA)の定量

試料溶液の調製 試料約1.0 g を精密に量り，メタノール40ml を加え30分間振とう抽出を行った．遠心分離後，残留物にメタノール25ml を加えて同様の操作をさらに2回繰り返した．上澄を合わせメタノールで正確に100ml とした後0.45 μm のフィルターを通し，ABMA 分析用試料溶液とした．

標準溶液の調製及び検量線の作成 ABMA(和光，標準品)約10.0mgを精密に量り，メタノールに溶かして正確に50ml とし標準溶液とした．これを適宜希釈して(5.0～50.0)×10 ng/μl の標準系列とし，HPLC に注入，得られたクロマトクラムのピーク高さと濃度から検量線を作成した．

HPLC条件 既知の方法[15]に準じ，条件を設定した．

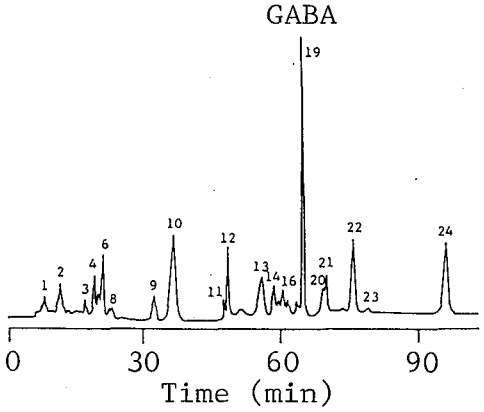


Fig. 2. HPLC Chromatogram of GABA in Alisma Rhizome (S－1)

HPLC conditions are described under experimental section.

Peak：1＝unknown, 2＝unknown, 3＝aspartic acid, 4＝threonine, 5＝unknown, 6＝serine, 7＝unknown, 8＝unknown, 9＝glycine, 10＝alanine, 11＝unknown, 12＝cystine, 13＝isoleucine, 14＝leucine, 15＝unknown, 16＝tyrosine, 17＝unknown, 18＝phenylalnine, 19＝γ-aminobutyric acid(GABA), 20＝unknown, 21＝lysine, 22＝NH_3, 23＝histidine, 24＝arginine

測定条件は Fig. 3 に掲げた.

5．腎臓Na^+, K^+- ATPase阻害の測定

試料エキスの調製 試料約2.0 g を精密に量り，無水エタノール40ml を加え30分間振とう抽出を行った．遠心分離後，残留物に無水エタノール40ml を加え同様の操作をさらに2回繰り返した．上澄を合わせろ過後，溶媒を減圧留去して得られたエキスをさらに24時間，室温，1 mmHg 以下で減圧乾燥し，試料エキスとした．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，試料エキス含量を算出した.

Na^+, K^+- ATPaseの調製 ウマ腎臓の髄質外帯より得たミクロゾーム分画を，Nakao らの方法[16]に従ってドデシル硫酸ナトリウム処理して用いた．蛋白量の測定は，Lowry ら[17]あるいは Bradford の方法[18]に従い，ウシ血清アルブミンを蛋白標準値として用いた.

Na^+, K^+- ATPase の活性測定 Satoh ら[19]の方法に従い，行った．すなわち，20%ジメチルスルホキシド(DMSO)含有エタノール10 μl に溶解した試料エキスを終濃度 3 mM ATP, 140 mM NaCl, 14 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50 mM イミダゾール−塩酸緩衝液(pH 7.2)の反応液に加えた．そして，

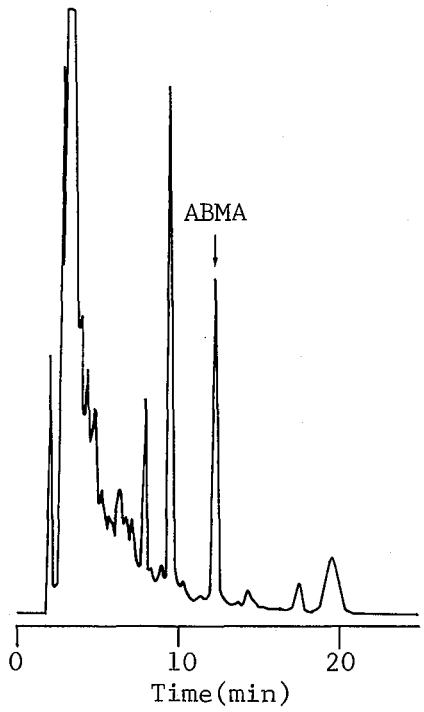


Fig. 3. HPLC Chromatogram of ABMA in Alisma Rhizome (S－1)

HPLC conditions : column, YMCA−312, ODS, 120Å,5 μm, 6 × 150mm ; mobile phase, 80% acetonitrile solution ; flow rate, 1.0ml/min ; column temperature, 40°; detection, UV 208nm ; injection volume, 20 μl

Na^+, K^+-ATPase 0.5 μg(比活性20.3 μmole Pi/mg蛋白/分)を反応液に加え，最終液量500 μl で37℃，15分間反応させ，遊離した無機リン酸を Fiske - Subbarow の方法[20]で測定した．阻害率は，20% DMSO 含有エタノール10 μl を添加して得た活性値を対照とし，試料エキス添加により減少した活性値を百分率で示した.

結果及び考察

1．標準生薬の理化学的品質評価

四川省灌県で栽培，調製された沢瀉は，大小の形状により等級が付けられており，Table 1 に示すように，1個の平均重量から1級品，2級品，3級品を区別することができた．これらの灰分は2.7～3.2%(平均 2.9%)，酸不溶性灰分は0.1～0.2%(0.1%)，乾燥減量は7.5～8.9%(8.4%)，希エタノールエキス含量は18.3～22.0%(20.2%)，GABA 含量は 1.03 ～ 2.09mg / g (1.50mg / g)，ABMA 含量は2.52～3.92mg/ g (3.33mg/ g)であったが，等級による一定の傾向は認められなかった．長尾

Table 1. Analytical Results of Alisma Rhizome Cultivated at Quian Xian in Sichuan, China*

Sample	Grade	Mean Weight (g)	Total Ash (%)	Acid-Insoluble Ash (%)	Loss on Drying (%)	Ext. Content Dil. Ethanol (%)	GABA Content (mg/g)	ABMA Content (mg/g)
S−1	1 st	40.6	2.8	0.1	8.7	18.3	1.56	2.68
S−2	1 st	33.7	2.8	0.2	8.6	20.1	1.37	3.90
S−3	2 nd	29.6	3.1	0.1	8.0	21.5	1.77	2.52
S−4	2 nd	25.3	3.0	0.1	8.1	22.0	1.16	3.22
S−5	3 rd	18.3	2.4	0.1	8.7	18.7	2.09	3.67
S−6	3 rd	17.5	2.7	0.1	7.5	20.2	1.03	3.92
S−7	3 rd	16.0	3.2	0.1	8.9	20.5	1.52	3.40

* Analytical methods are described under experimental section.
Dil. ethanol is indicated 50% ethanol.

らはサジオモダカの栽培研究のなかで，栽培品種によりABMA含量が大きく異なることを報告している[4]が，今回の結果はほぼ一定の値を示した．このことはすなわち，当地で育種栽培されている品種が同一系統種であることを示唆するものである．

2．輸入生薬の理化学的品質評価

灰分，酸不溶性灰分及び乾燥減量　灰分は四川省産，福建省産，台湾産が2.5～3.3%であるのに対し，ベトナム産(I−10)が4.8%と高い値を示した．酸不溶性灰分は0.0～0.2%とほとんど変わらず，乾燥減量も9.0～11.2%とほぼ一定の値を示した．

希エタノールエキス，GABA及びABMA含量　理化学的品質評価を行う上で重要な要素の1つと考えられる希エタノールエキス含量は，ベトナム産(I−10)が13.9%と低いのに対し，他は17.3～21.0%の分析値を示した．GABA含量についてもI−10が0.37mg/gと他の0.77～2.02mg/gに比較して低い分析値を示した．さらにABMAの分析では，他が1.19～2.82mg/gの範囲内であったのに対し，I−10は検出限界以下であった(Table 2)．

以上の分析結果から，ベトナム産沢瀉は，他と含有成分の点で大きく異なることが判明した．その性状は，1個の平均重量が5g前後と小さく，周皮に細根の痕跡が明瞭に認められるもので，利尿作用など薬理効果は不明

Table 2. Analytical Results of Imported Alisma Rhizome*

Sample	District	Total Ash (%)	Acid-Insoluble Ash (%)	Loss on Drying (%)	Ext. Content Dil. Ethanol (%)	GABA Content (mg/g)	ABMA Content (mg/g)
I− 1	Sichuan	2.7	0.1	10.3	21.0	1.92	2.82
I− 2	Sichuan	3.2	0.2	9.7	18.9	1.43	2.12
I− 3	Sichuan	2.9	0.1	9.3	18.1	1.79	1.50
I− 4	Fujian	3.2	0.0	9.9	20.8	1.99	2.03
I− 5	Fujian	3.1	0.1	10.3	17.3	1.44	1.83
I− 6	Fujian	2.6	0.0	9.2	19.8	2.02	2.12
I− 7	Taiwan	2.5	0.1	9.0	19.4	1.29	1.75
I− 8	Taiwan	2.5	0.1	9.3	20.0	0.77	2.44
I− 9	Taiwan	3.3	0.0	11.2	19.7	0.81	1.19
I−10	Vietnam	4.8	0.2	9.1	13.9	0.37	n. d.**

* Analytical methods are described under experimental section.
Dil. ethanol is indicated 50% ethanol.
** not detected

であるものの，他と同等に取り扱うには問題があると思われた．

一方，四川省産，福建省産，台湾産はそれぞれ成分的に大きな相違はないが，台湾産はややGABA含量の低い傾向を示した．また，福建省産沢瀉については，HPLC分析の結果ABMA以外のアリソール類が少ないのが特徴的であった．

3．市場品生薬の理化学的品質評価

東京市場品のM－3は，形態的には切断面が標準生薬と比較してやや淡い黄色を示すほかは，明確な相違は認められなかった．しかし，成分的には希エタノールエキス含量が10.7%，GABA含量が0.68mg/gとやや低く，ABMAを含有しない生薬であった(Table 3)．また，大阪市場品のM－9は標準生薬と同様の性状を示したが，灰分が4.4%と高いほか，GABAをほとんど含有しない(0.08mg/g)生薬であった．

流通経路を調査した結果，M－3及びM－9はいずれも香港経由で日本に輸入され，市場に出荷されたもので，生産地は不明であった．これらは，ベトナム産沢瀉と同様，成分的に正常品と同等と判断することはできないものである．しかし，参考品として調査した香港市場品M－10が本邦市場の正常品と成分的に類似したものであったことから，香港市場に流通しているものが全て異常品とは断定できない．

4．腎臓 Na^+, K^+- ATPase 阻害による沢瀉の評価

沢瀉は，東洋医学的観点から，身体に不要な水分を排除し腎臓の機能を正常化する薬能を有するといわれている[1]．腎臓 Na^+,K^+-ATPaseは，生理学的には，Na^+及びK^+の能動輸送に伴い，尿細管で原尿中の水分を再吸収する役割を担っている．すなわち，本酵素を阻害すると水分の再吸収が行われず，強い利尿作用が現われることになる．

そこで，Na^+,K^+- ATPaseの活性に及ぼす沢瀉エキスの影響を調べた．本酵素は高濃度の無機イオンにより活性阻害を受けることから，抽出溶媒は無機イオンの溶出されにくい無水エタノールを用いた．Na^+,K^+-

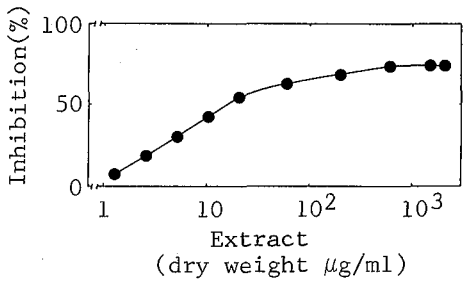


Fig. 4．Inhibition Curve of Horse Kidney Na^+,K^+-ATPase Activity by Alisma Rhizome Extract(I－1)
Horse kidney Na^+, K^+-ATPase was incubated with various amounts of absolute ethanol extracts of Alisma Rhizome (I－1)as described under experimental section. The ordinate denotes the percent inhibition of Na^+, K^+-ATPase activity. Each point is the average of three determinations. The standard deviation was $<2.0\%$.

Table 3．Analytical Results of Alisma Rhizome on the Market*

Sample	Market	Form	Total Ash (%)	Acid-Insoluble Ash (%)	Loss on Drying (%)	Ext. Content Dil. Ethanol (%)	GABA Content (mg/g)	ABMA Content (mg/g)
M－1	Tokyo	cut	2.8	0.1	7.9	23.9	1.10	1.39
M－2	Tokyo	cut	2.3	0.1	8.6	13.6	1.10	3.40
M－3	Tokyo	cut	2.3	0.0	10.0	10.7	0.68	n. d.**
M－4	Tokyo	cut	2.2	0.1	7.3	13.1	0.93	2.97
M－5	Tokyo	cut	2.6	0.2	8.7	21.0	0.96	1.68
M－6	Tokyo	cut	3.0	0.1	9.0	16.0	1.55	1.91
M－7	Tokyo	cut	3.0	0.1	7.6	14.1	0.87	1.58
M－8	Tokyo	cut	2.8	0.1	6.6	24.8	1.11	1.80
M－9	Osaka	whole	4.4	0.0	8.5	12.6	0.08	2.08
M－10	Hongkong	whole	3.0	0.1	9.3	18.7	0.91	2.61

* Analytical methods are described experimental section.
Dil. ethanol is indicated 50% ethanol.

** not detected

Table 4. Inhibition of Horse Kidney Na^+, K^+ - ATPase Activity by Alisma Rhizome Extract*

Sample	Content of Extract		Inhibition**		Sample	Content of Extract		Inhibition**	
	%	Mean±SD	%	Mean±SD		%	Mean±SD	%	Mean±SD
S－1	6.49		60.9		I－7	9.90		59.4	
S－2	6.63		55.0		I－8	9.47	8.90±1.38	60.4	59.0±1.69
S－3	7.40		59.1		I－9	7.32		57.1	
S－4	7.21	6.92±0.88	49.0	54.7±5.47	I－10	3.67	3.67	56.4	56.4
S－5	7.57		52.6		M－1	8.46		62.7	
S－6	7.89		59.6		M－2	5.87		58.9	
S－7	5.27		46.9		M－3	5.01		70.0	
I－1	8.50		56.2		M－4	5.69		59.7	
I－2	6.91	6.69±1.93	58.3	58.6±2.56	M－5	6.60	6.17±1.47	61.2	62.3±3.90
I－3	4.66		61.3		M－6	5.33		55.0	
I－4	5.67		43.8		M－7	5.41		65.8	
I－5	4.61	5.10±0.53	37.0	42.5±4.98	M－8	8.43		62.3	
I－6	5.03		46.7		M－9	3.89		62.1	
					M－10	6.98		64.7	

* The absolute ethanol extract (20 μg/ml) was incubated with horse kidney Na^+, K^+-ATPase as described under experimental section.

** Each point is the average of three determinations.

ATPase 0.5 μg に対しI－1無水エタノールエキス添加量を1.25 μg から2.00mgまで増加させたところ，その量に依存して活性は7.0～75.0%阻害された(Fig. 4)．50%阻害を表わす I_{50} 値は15.0 μg/ml で，他の生薬エキスの I_{50} 値(96 μg/ml～1.2mg/ml)と比較してかなり強い阻害を示し，沢瀉の利尿作用は本酵素の阻害により引き起こされることが示唆された．

このことから，本抽出物の酵素阻害による生物学的品質評価を試みた．無水エタノールエキス20 μg/ml に対する阻害率は，Table 4 に示すように標準生薬では46.9～60.9%(平均 54.7%)で，ロット間の差異は認められなかった．輸入生薬では福建省産のものが37.0～46.7%(42.5%)とやや低い傾向を示した．また，市場品生薬では56.0～70.0%(62.3%)とすべて50%を超える結果を示した．

そこで，成分的に正常品と異なると判断したI－10，M－3及びM－9の3検体について考察した．I－10及びM－9は標準生薬とほぼ同様の阻害率(56.4%，62.1%)を示したが，無水エタノールエキス含量(3.67%，3.89%)が低いので，生薬重量に換算すると，標準生薬より阻害は弱くなった．一方，M－3は27試料中最大の阻害率(70.0%)を示し，また，無水エタノールエキス含量(5.01%)も特に低くないことから，標準生薬より阻害が弱いとは考えにくく，理化学的品質評価とは一致しない結果となった．沢瀉の腎臓 Na^+,K^+-ATPase の活性阻害による生物学的品質評価を行うには，粗抽出物に共存する妨害物質の除去，阻害画分の精製など，試料溶液の調製法を再検討する必要がある．

ま と め

市場品沢瀉の理化学的品質評価を行うにあたり，四川省灌県栽培の沢瀉を標準生薬とし，日局各種生薬試験，GABA 及び ABMA 含量を測定した．その結果を踏まえ，輸入生薬の品質を検討したところ，ベトナム産沢瀉は灰分のみならず，GABA 及び ABMA 含量から，正常品とは同等でないと結論づけられた．また，市場品生薬では，東京市場品，大阪市場品各1ロットに，灰分，希エタノールエキス，GABA 及び ABMA 含量が正常品と大きく異なるものがあり，これらも成分的に見て同等性に欠けるものと判断された．

生物学的品質評価法として，沢瀉の無水エタノールエキスが水分代謝に関与する腎臓 Na^+,K^+-ATPase の活性を強く阻害することから，その酵素阻害率を検討したが，理化学的品質評価の結果と一部一致しないものがあり，試料溶液の調製法など，実験方法をさらに検討する

必要があった.

謝辞 本研究にあたり，栽培農家紹介の労を取られ，標準生薬を分与された四川省灌県薬材公司ならびに輸入生薬を快く分与された関係各位に深謝致します.

(本研究は，平成2年度衛生局東洋医学事業「老人性疾患に繁用される生薬の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) 細野八郎：現代東洋医学，7，58-65，1986
2) 日本公定書協会：第11改正日本薬局方解説書，D－588-D－590，1986，広川書店，東京
3) 藤岡章二，長尾弓郎，今井俊司：武田研究所報，34，351-357，1975
4) 長尾弓郎，藤岡章二，川西史郎，松岡敏郎：武田研究所報，34，449-454，1975
5) Murata, T., Imai, Y., Hirata, T., Miyamoto, M.：*Chem. Pharm. Bull.*, 18, 1347-1353, 1970
6) Murata, T., Miyamoto, M.：*Chem. Pharm. Bull.*, 18, 1354-1361, 1970
7) Kamiya, K., Murata, T., Nishikawa, M.：*Chem. Pharm. Bull.*, 18, 1362-1368, 1970
8) Murata, T., Shinohara, M., Miyamoto, M.：*Chem. Pharm. Bull.*, 18, 1369-1384, 1970
9) ヒキノヒロシ，岩川恒男，大島吉輝，西川治平，村田忠一：生薬，36，150-153，1982
10) Oshima, Y., Iwakawa, H., Hikino, H：*Phytochemistry*, 22, 183-184, 1983
11) 阿部 裕，真下啓明，三辺 謙，酒井 威，小澤光編：薬物療法の実際 第2編，140-141，1970，アサヒ興業，東京
12) 日本公定書協会：第11改正日本薬局方解説書，A－39-A－40，1986，広川書店，東京
13) 日本公定書協会：第11改正日本薬局方解説書，B－167-B－179，1986，広川書店，東京
14) 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：東京衛研年報，40，84-89，1989
15) 原田正敏編：繁用生薬の成分定量，266-272，1989，広川書店，東京
16) Nakao, T., Ohno-Fujitani, T., Nakao, M.：*J. Biochem.*, 94, 689-697, 1983
17) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.：*J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951
18) Bradford, M. M.：*Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976
19) Satoh, K., Nakao, T., Nagai, I., Nakagawa, A., Ushiyama, K., Urayama, O., Nakao, M., : *Biochim. Biophys. Acta.*, 994, 104-113, 1989
20) Fiske, C., Subbarow, Y. H.：*J. Biol. Chem.*, 66, 375-400, 1935

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 62-69, 1990

キャピラリーガスクロマトグラフィーによる各種当帰中の精油成分の分析

高野伊知郎, 安田一郎, 高橋奈穂子,
浜野朋子, 瀬戸隆子, 秋山和幸*

Analysis of Essential Oils in Various Species of Angelica Root by Capillary Gas Chromatography

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

Analysis of essential oils in various species of Angelica Root was examined by capillary gas chromatography (GC). Clear separation of constituents in an ether extract of Angelica Root was carried out using a nonpolar fused silica column (HP-1).

This method allowed the classification of various species of Angelica Root into three GC pattern groupings : (1)Ofuka, Hokkai, Nichi-touki (Japanese varieties), (2)Tou-touki (Chinese varieties) and (3)Kan-touki (Korean varities). These groups corresponded to the three classes, (1)*A. acutiloba*, (2)*A. sinensis* and (3)*A. gigas*, based on plant form. Quantitative analysis revealed that phthalides in group (2) were about 1.2% by weight, corresponding to five times the phthalide content in group (1). Another ten types of crude drugs found in *Umbelliferae* on the Tokyo market were analyzed. These crude drugs showed different GC patterns, which were distinguishable from Japanese-type Angelica Root. However, Hamaboufu and Boufu had a similar pattern, as did Tou-kyoukatsu and Tou-dokukatsu.

Keywords : capillary gas chromatography, GC patterns, Angelica Root, *A. acutiloba*, *A. sinensis*, *A. gigas*, *Umbelliferae*, crude drugs, on the market.

緒　言

当帰はトウキ *Angelica acutiloba* 及びその近縁植物(セリ科)の根を通例湯通ししたもので，漢方では強壮薬の6割，婦人用薬の8割に配合される重要生薬である[1]．

当帰は日本，中国，韓国，台湾の各地で栽培されるが，中国産，韓国産の一部には基原植物の異なるものもみられるので，これらの特徴を把握し，混用を避ける必要がある[2-3]．当帰中には各種のフタライド類，クマリン類等を中心とする多くの精油成分が含まれており，著者らはこれらの成分の蛍光検出薄層クロマトグラフ法(TLC)による当帰の確認試験を行っている[4]．しかし，同じセリ科に属する生薬の中には当帰と類似の成分組成を持つものも多く[5]，TLC上では当帰の識別が不明瞭な場合が多い．そこで今回，分離能の高いキャピラリーガスクロマトグラフィー(以下GCと略す)を検討し，精油成分のGCパターンから各種当帰及び他のセリ科生薬との識別を試みた．

実験の部

装置　GC：GC 3600システム(バリアン)，GC-MS：VG-70 Sシステム(VGアナリティカル)，TLCプレート：Kieselgel Si 60 F_{254}(メルク)．

試料　各種当帰：大深当帰(日本，奈良産及び徳島産の栽培品)，北海当帰(日本産栽培品)，日当帰(韓国産，台湾産)，韓当帰(韓国産2ロット)，唐当帰(中国，四川省産「川帰」及び甘粛省産「泰帰」の5種9ロットを用いた．

*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 Reseach Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

セリ科生薬：茴香，柴胡，蛇床子，川芎，前胡，唐羌活，唐独活，浜防風，白芷，防風の東京市場品10種10ロットを供試した．

標準品：リグスティライド(以下LGと略す)ならびにブチリデンフタライド(以下BPと略す)は，大深当帰から単離し，各種スペクトルデータの解析及び標品の文献値との比較から同定した[6-7]．LG，BP定量用内標準物質である*l*-メントールは市販品(東京化成製)を用いた．

TLCによる分析　試料粉末1 gにメタノール10mlを加えて，15分間振とう抽出を行った．抽出液をろ過後濃縮し，残留物をメタノール1 mlに溶かし，TLC用試料溶液とした．TLC操作は常法に従い[8]，展開溶液として①ヘキサン・酢酸エチル(2：1)，②ベンゼン・酢酸エチル(1：1)，③クロロホルム・メタノール(20：1)，④クロロホルム・メタノール・水(65：35：10下層)を，検出方法はUV 254，365 nm照射及び10％硫酸噴霧後加熱(120℃，5分)で行った．検出された蛍光及び発色スポットのパターンを比較し，当帰及びセリ科生薬の識別を行った．

GCによる分析

1）定性用試料溶液の調製：各試料を粉末とし，その2.0 gを100ml容量のフラスコにとり，エーテル70mlを加えて4時間加熱還流抽出を行った．冷後ろ過し，エーテルを加えて正確に100mlとした．その一部をとってSEP-PAKシリカカートリッジに通し，定性試料溶液とした．

2）定量用試料溶液の調製：同様に調製した各種当帰のエーテル抽出液を10mlとり，SEP-PAKシリカカートリッジに付し，さらにエーテル10mlを加えて流出させた．減圧下エーテルを留去後，内標準物質(以下ISと略す)*l*-メントールのエーテル(0.2mg/100ml)溶液5 mlを加えて定量用試料溶液とした．

3）GCパターンによる識別：クロマトグラム上のピークパターンを比較し，当帰及びセリ科生薬の識別を行った．GC分析条件はカラム：HP-1，2mm i.d.×25m，カラム温度：80℃(1分)→10℃/分→300℃(3分)，キャリヤーガス：He 1.2ml/分(28 psi)，注入口：スプリットレス 300℃，検出：FID 320℃で行った．特徴的なピークについては，さらにGC-MSで分析した．カラム温度：80℃(1分)→10℃/分→300℃(3分)，キャリヤーガス：He 1.0ml/分(15 psi)，注入口：スプリットレス 300℃，検出：電子衝撃型質量分析計(EI-MS)，イオン化電圧 70 eV，分解能 1000，質量範囲 m/z 50-400．

4）定量用標準溶液：LG 17.02mg及びBP 4.01mgをとり，酢酸エチルに溶かし，100mlとした．適時希釈し，LGの0.08～12.59mg/5 ml及びBPの0.02～2.63mg/5 ml溶液を調製した．

5）LG及びBPの定量：当帰中のLG及びBP含量は*l*-メントールを内標準としたピーク面積法で測定した．

結果及び考察

TLCによる分析　各種当帰は韓当帰を除いてUV 365 nm照射下，1）淡青色(各種展開溶媒におけるR_f値①0.6，②0.7，③0.8，④0.95)及び　2）濃青色(R_f値①0.2，②0.4，③0.3，④0.9)の2つの蛍光スポットを特徴とする同一のTLCパターンを示した．韓当帰中には1)の存在は確認されなかった．他のセリ科生薬のうち，蛇床子，前胡，白芷中には1）ならびに2）と重なるスポットが視察されることからTLCにおける当帰の検出を困難にするものと思われた．また川芎はTLCパターンが当帰と一致することからTLC上で両者は識別できなかった．

GC分析条件の検討　極性の異なる3種のフューズドシリカカラム(HP-1，DB-17，DB-WAX)について検討した．当帰のエーテルエキスを注入し，各カラムでのピーク分離能及びピーク保持時間(以下t_Rと略す)を比較した．いずれのカラムを用いた場合も分離度が高く，テーリング係数の小さいクロマトグラムを得ることができた．HP-1では大深当帰に16個のピークを認めた．DB-17においても同数のピークが得られたが，昇温分析におけるベースラインの変動が大きい点で問題があった．また韓当帰のピーク(24)，(25)の出現が遅いことから，限界温度でカラムを使用した分析が必要であった．DB-WAXにおいては良好な分離が得られたにもかかわらず，最後まで韓当帰のピーク(24)，(25)が吸着されたままであった．以上の結果から，対象とするすべてのピークが検出される点及び昇温条件下でのベースラインの安定性に優れている点から，カラムにはHP-1を選択した．昇温条件については 20℃/分以上でピーク分離度が2以下になるものがみられたことから，10℃/分に設定した．カラム温度についてはHP-1の使用上限温度以下である300℃で韓当帰中のピーク(24)，(25)の検出が終わるまで分析することとした．本法における1サンプルあたりの分析時間は25分であった．

定量に関しては，当帰の主精油成分であるLG及びBPを対象とした．試料の調製については，山岸らの方法[9]を準用し，さらにカートリッジによる前処理操作を加えた．ISには，HP-1以上におけるt_Rが，当帰成分の妨害とならないよう検討し，*l*-メントールを選択した．

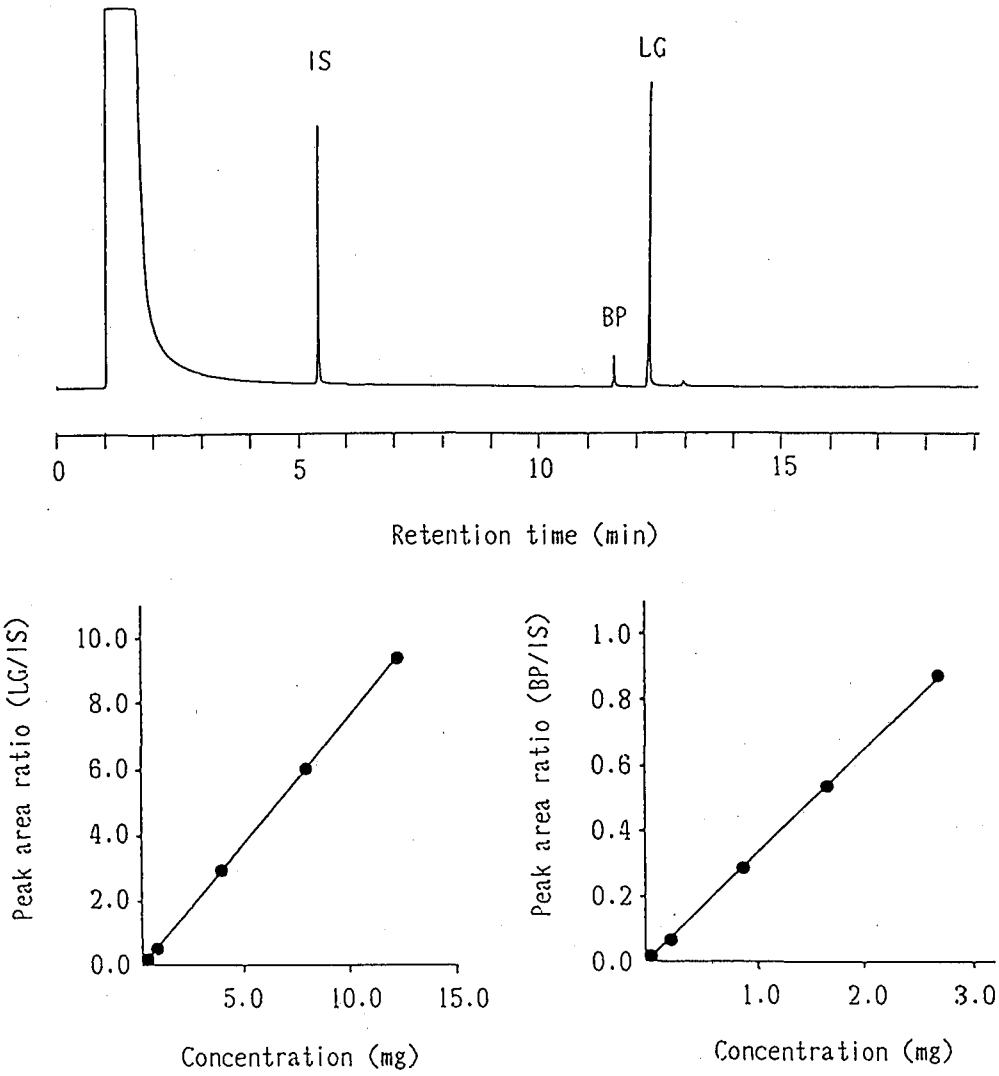


Fig. 1. Chromatogram and Calibration Curve for the Determination of LG and BP in Angelica Root
GC conditions column : HP-1 0.25mm i.d. × 30m, film thickness 0.25 μm, column temp. : 80℃ (1 min) → 10℃/min → 300℃ (3 min), injection : splitless 300℃, carrier gas : He 1.2ml/min (28psi), detection : FID 320℃.

検量線は LG 0.08～12.59mgの範囲において,

$Y = 0.7305X - 0.0724$ $r = 0.999 (n=5)$

BP 0.02～2.63mgの範囲において,

$Y = 0.3195X - 0.0006$ $r = 0.999 (n=5)$

であった(Y：IS とのピーク面積比, X：試料 0.2 g あたりのフタライド含量 mg). 添加回収実験における試料中からの LG の回収率は97.5%, 繰り返し注入精度は, C.V. 1.4% (n=8)で, 良好な定量性及び再現性が得られた(Fig. 1).

各種当帰の識別 各種当帰の GC パターンによる識別を試みた(Fig. 2).

1) *A. acutiloba* を基原植物とする大深当帰には16個のピークが検出された. GC-MS を併用して調べたところ, フタライド類として, ブチルフタライド(ピーク No.2, 以下ピークNo.を略す), BP (3), セダノイン酸ラクトン (5), LG (6), ピーク(7)を確認した. またクマリン類と思われるピーク(8), (11), (15)を確認した. その他については現在, 検討中であるが, マスス

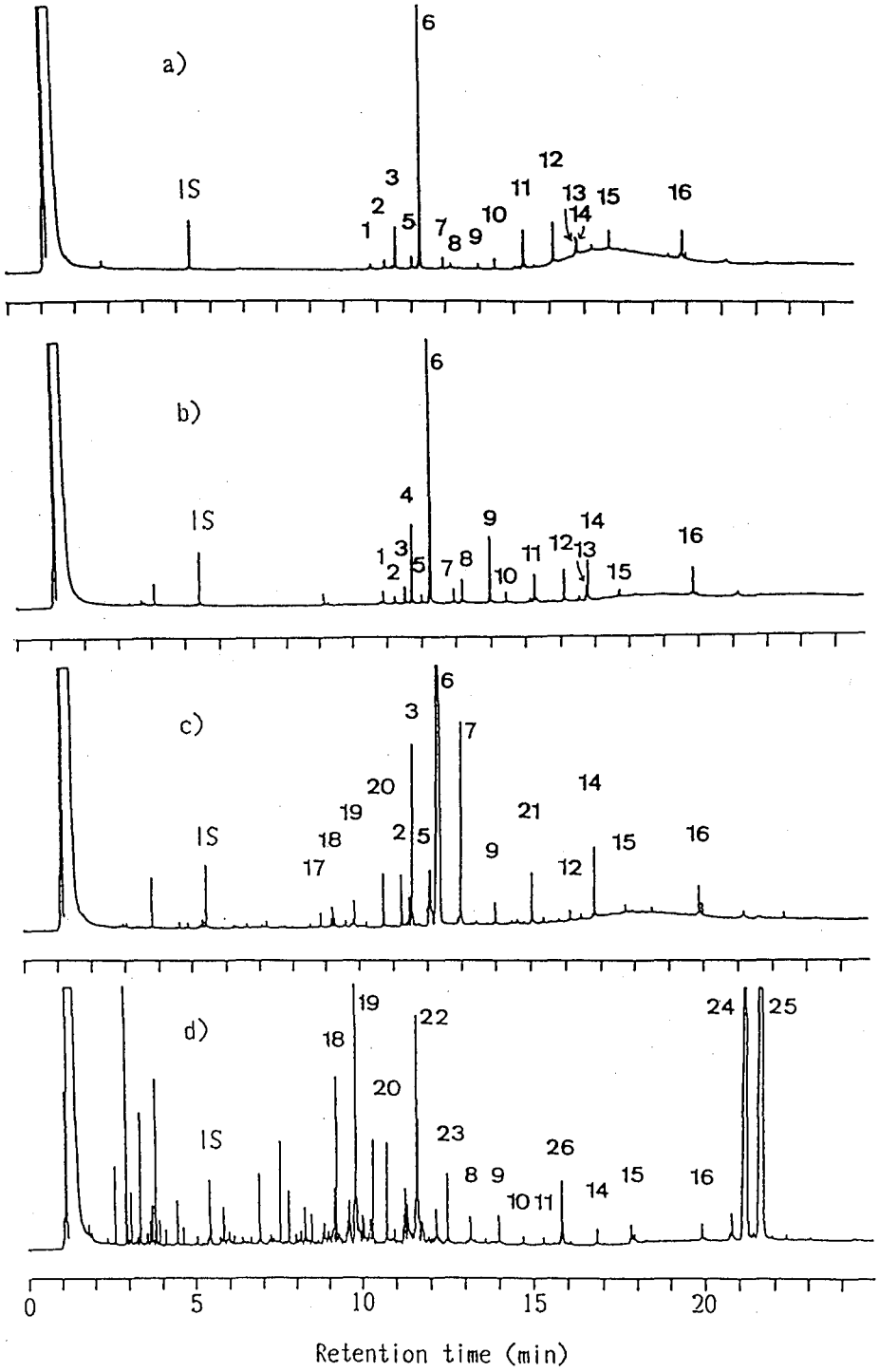


Fig. 2. Gas Chromatogram of Various Species of Angelica Root
a) Ofuka- and Nichi-touki, b) Hokkai-touki, c) Tou-touki, d) Kan-touki
GC conditions are same as Fig. 1.

ペクトルの開裂様式から脂肪酸類が考えられる．大深当帰と同じ基原植物を移植栽培したとされる日当帰(韓国産・台湾産)及び変種とされる北海当帰等は同様のピークパターンを示し，GC上で識別することはできなかった．

2) *A. sinensis* を基原植物とする唐当帰についてもほぼ同様のGCパターンであったが，別に微量成分としてピーク(17)，(18)，(19)，(20)が観察された．なお，甘粛産「泰帰」ならびに四川産「川帰」の間にパターンの違いは認められなかった．

3) *A. gigas* を基原植物とする韓当帰については全く異なるGCパターンが観察され，クロマトグラム上の面積比率で60%を占める大きな2つのピーク(24)，(25)が特徴的であった．(24)，(25)はいずれも同様のマススペクトルの開裂様式を示した．このピークについては別に検討したいと考えている．この他に韓当帰中にはピーク(22)，(23)，(26)及び中国産当帰に含まれるピーク(18)，(19)，(20)等も認められた．(22)は t_R が(3)と重なったが，マススペクトルの開裂様式から別の物質であることが確認された．

大深当帰と唐当帰ではGCパターンが酷似しているが，フタライド類の定量値からの識別が可能であると考えられた．そこで両者を中心として，LG及びBPの定量を行った(Table 1)．その結果，大深，北海，日当帰(台湾産を除く)はLGとBPの和が1.9～2.4mg/g (AVE, 0.22%)，唐当帰は12.8mg/g (AVE, 1.22%)の定量値を示した．唐当帰はフタライド含量で大深当帰の5～6倍であり，両者は明確に識別された．以上のように当帰中の精油成分はフタライド類含量を含めたGCパターンにより3つに大別され，基原植物による分類と一致することが明らかとなった．

セリ科生薬との識別　次に大深当帰(以下，当帰と略す)と他のセリ科生薬の識別に本法を適用した．東京市場品生薬を対象として，各生薬エーテルエキスのGCパターンを比較した(Fig. 3及びFig. 4)．

1) 柴胡，茴香，浜防風，防風，唐羌活，唐独活との識別：これらはTLC上でも識別可能であったが，GCパターン分析でより明確となった．柴胡には特徴的なピークが認められなかった．茴香では t_R 7.0分のアネトール(Ⅰ)が，浜防風及び防風では t_R 15.3分のベルガプテン(Ⅱ)が特徴的であった．唐羌活及び唐独活は t_R14～19分にピークが集中するパターンを示した．当帰のメインピークであるフタライド類は t_R12分前後であることから，これらは容易に識別された．なお，今回の分析条件において浜防風と防風及び唐羌活と唐独活は識別できなかった．

2) 蛇床子，前胡，白芷との識別：これらはTLC上では類似の蛍光スポットがみられるため当帰との識別が困難であったが，GCにおいては，蛇床子で t_R15～23分，前胡で t_R21～25分にピークが集中することから明確に識別された．白芷では t_R8～12分と当帰に類似した位置にピークが出現したが，GCクロマトグラムによって識別が十分可能であった．

3) 川芎との識別：両者はともに類似のフタライド類に富むためTLC上では識別できないが，GCではフタライド類のパターン比較から容易に識別された．すなわち，当帰ではLG及びBPの面積比率の和が全クロマトグラム上の70%であるのに対し，川芎ではブチルフタライド

Table 1. Ligustilide (LG) and Butylidenephthalide (BP) Cotents in Various Species of Angelica Root

(mg/g)

Samples	District	LG	BP	Total
Ofuka-touki	Japan (Nara)	1.68	0.68	2.36
〃	Japan (Tokushima)	1.53	0.61	2.14
Nichi-touki	Korea	1.61	0.28	1.89
〃	Taiwan	0.21	0.14	0.35
Hokkai-touki	Japan (Hokkaido)	1.43	0.82	2.25
Tou-touki	China (Sichuan)	10.68	2.11	12.79
〃	China (Gansu)	10.90	1.98	12.88
Kan-touki	Korea	n. d.[a)]	n. d.	—
〃	Korea	n. d.	n. d.	—

a) not detected

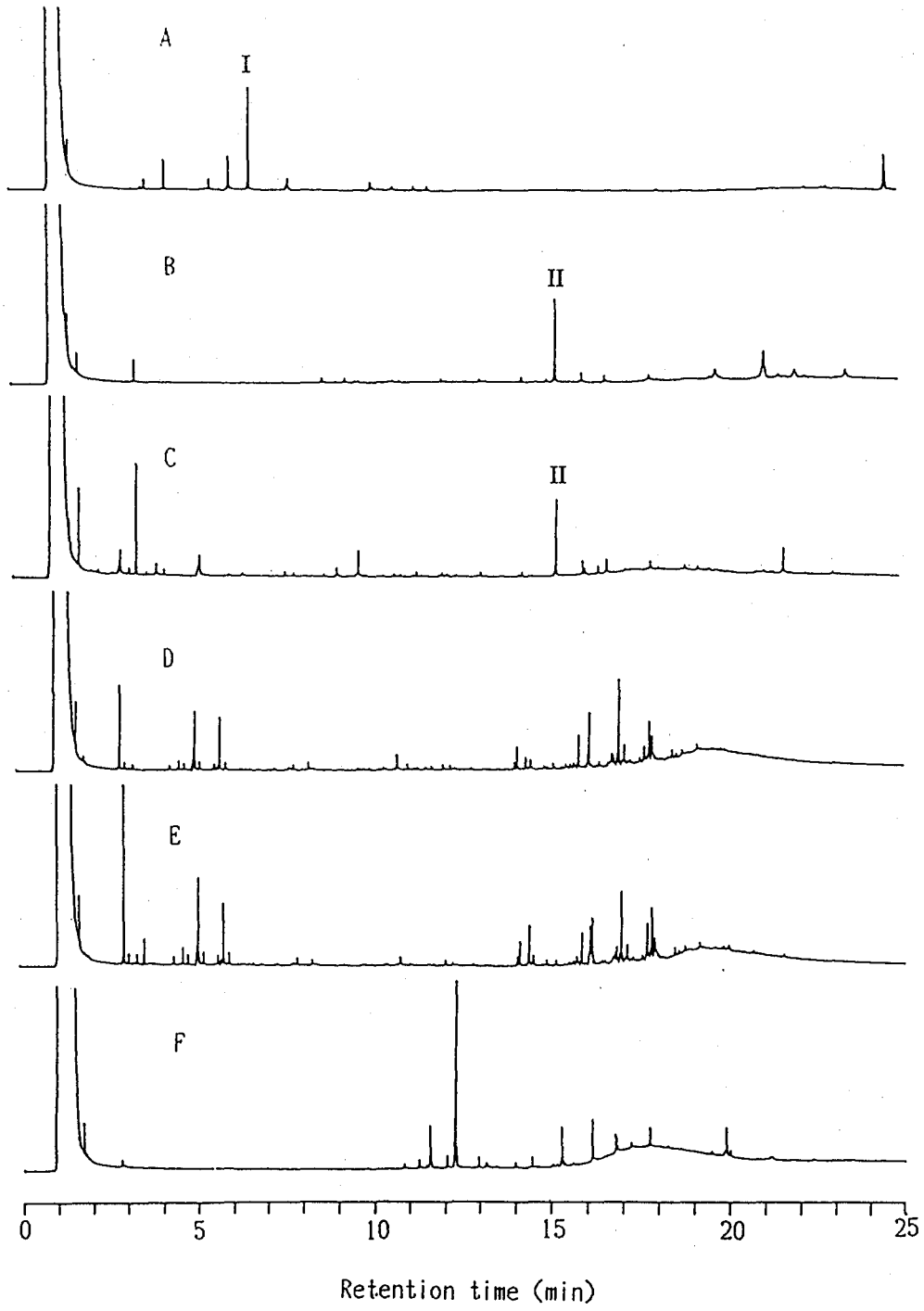


Fig. 3. Typical Gas Chromatogram of Various Crude Drugs in *Umbelliferae* (1)
A：Uikyo（茴香），B：Hamaboufu（浜防風），C：Boufu（防風），D：Tou-kyoukatsu（唐羌活），
E：Tou-dokukatsu（唐独活），F：Touki（当帰）
GC conditions are same as Fig. 1.

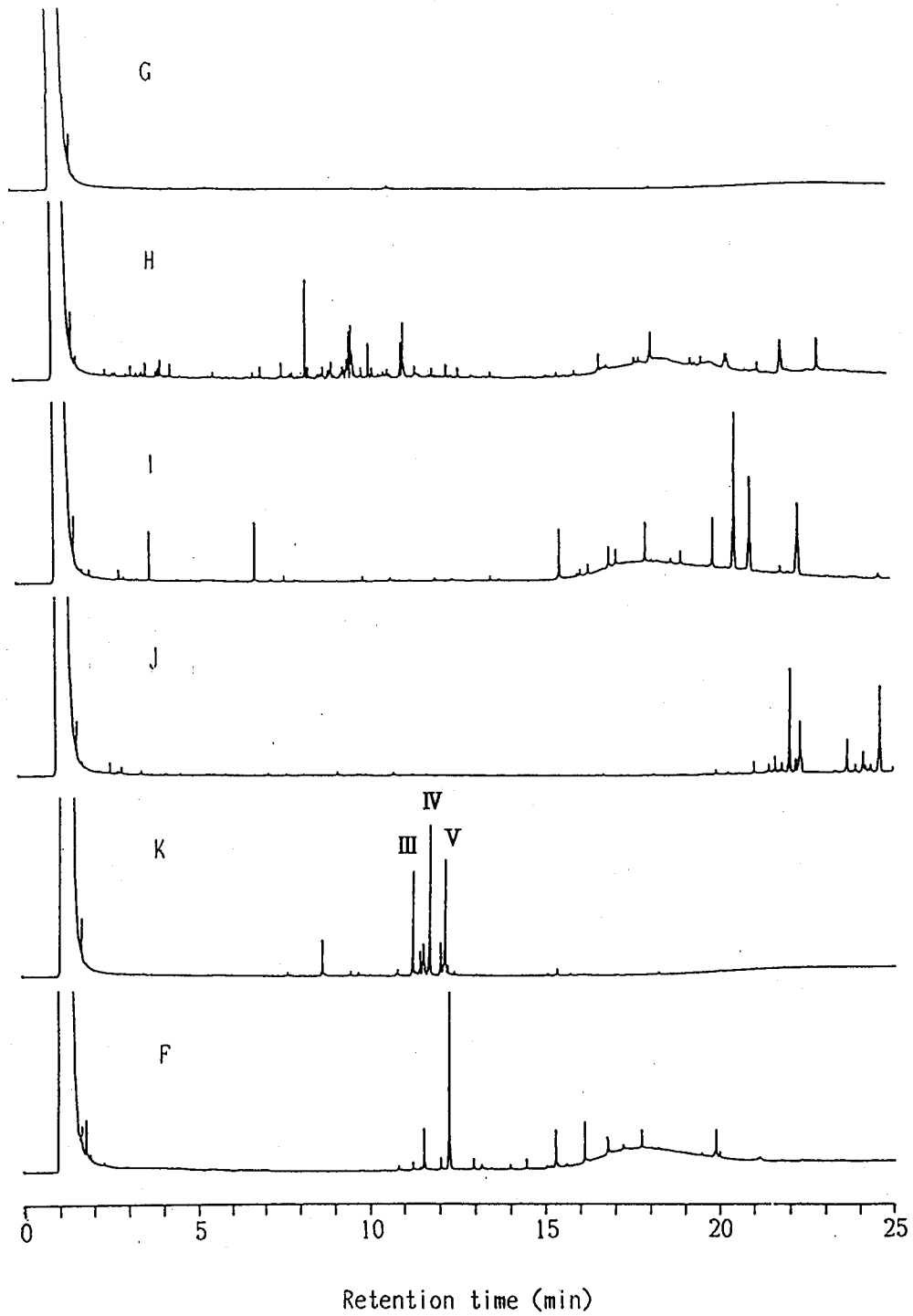


Fig. 4. Typical Gas Chromatogram of Various Crude Drugs in *Umbelliferae* (2)
G : Saiko (柴胡), H : Byakushi (白芷), I : Jashousi (蛇床子), J : Zenko (前胡), K : Senkyu (川芎), F : Touki (当帰)
GC conditions are same as Fig. 1.

(Ⅲ), クニディライド(Ⅳ), ネオクニディライド(Ⅴ)等の面積比率の和が90%を占めていた. さらに当帰では t_R13～17分に川芎には現れないピークが観察された.

以上のように従来TLC上で困難であった各種当帰及びセリ科生薬の識別がGCパターン分析手法によって可能となった. 今後さらに検討を進め, 本法を漢方処方及び生薬製剤中の生薬の確認に適用したいと考えている.

まとめ

各種当帰精油成分のGCパターン分析を試みた. キャピラリーGCにより精油成分の良好な分離が得られた. 当帰は大きく3つに分類された. すなわち 1) 大深当帰, 北海当帰及び韓国産, 台湾産の日当帰(日本型), 2) 唐当帰(中国型)及び 3) 韓当帰(韓国型)である. 1) と 2) においては 2) のフタライド含量が 1) の約5倍である他は, 同様な精油組成であった. 3) は全く異なるパターンを示し, 成分的に明らかに異なる生薬であった.

さらに本法は従来TLC上での確認が困難であった当帰と川芎, 唐独活をはじめとする他のセリ科生薬との識別にも適用できることが明らかとなった.

謝辞 本研究にあたり, 試料の入手に御協力いただいた東京農業大学 頼宏亮修士, 茨城県常陸生薬栽培組合ならびに国産生薬(株)に感謝いたします.

引用文献

1) 原田正敏：210処方漢方薬物治療学, 185, 1985, 廣川書店, 東京.
2) 日本公定書協会編：第11改正日本薬局方解説書, D-660－D-664, 1979, 廣川書店, 東京.
3) 難波恒雄：原色和漢薬図鑑(上), 59-62, 1980, 保育社, 大阪.
4) 未発表
5) 三橋博, 田中治, 野副重男, 永井博編：天然物化学, 改訂第2版, 225-231, 1987, 南江堂, 東京.
6) 山岸喬, 金島弘恭, 木下良裕, 森三佐雄：道衛研所報, 24, 47-51, 1974.
7) 山岸喬, 金島弘恭：薬誌, 97, 237-243, 1977.
8) 日本公定書協会編：第11改正日本薬局方解説書, B-292－B-298, 1979, 廣川書店, 東京.
9) 山岸喬, 本間正一：道衛研所報, 29, 40-43, 1979.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 70-74, 1990

高速液体クロマトグラフィーによる染毛剤中の酸化染料の定量

鈴木助治*, 池田一夫*, 岸本清子*
中村弘*, 渡辺四男也*

Determination of Oxidative Dyes in Permanent Hair Dyes by High Performance Liquid Chromatography

SUKEJI SUZUKI*, KAZUO IKEDA*, KIYOKO KISHIMOTO*
HIROSHI NAKAMURA* and YOHYA WATANABE*

Keywords：染毛剤 hair dye, 酸化染料 oxidative dye, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography

緒　言

染毛剤には，白毛を黒く染めるもの以外に，最近では毛髪をいろいろな色調に染色する“おしゃれ染め”など各種の製品が市販されている．このうちカラースプレーやカラースティック等は，単純に着色料を配合したもので，使用後，洗髪で簡単に洗い落せる一時染毛剤である．これに対して酸化染料を配合したものは，持続的な染毛効果を有する永久染毛剤である．現在，毛髪に対する染毛性や持続性などから後者の酸化染毛剤が広く利用されている[1]．これらの染毛剤は，主として第1液に酸化染料として芳香族アミノ化合物が，第2液に酸化剤として過酸化水素が用いられ，両者を混合してアミンを酸化し，永久的な染毛を起こさせるものである[1]．

酸化染料には，フェニレンジアミン類やアミノフェノール類など多くの種類があり[2]，いずれも反応性に富み，空気酸化を受け易く，皮膚への安全性の面からもそれらを使用した染毛剤は医薬部外品に規定されている．さらに，製品の容器や外箱に指定成分と使用期限の表示が義務付けられている[3]．従って，行政試験に於ける品質評価を遂行するために，染毛剤中の酸化染料の分析法を確立する必要がある．

酸化染料の分析法としては，薄層クロマトグラフィーを利用した定性が衛生試験法[4]に収載されたが，公定法としての定量法はない．定量法としてはガスクロマトグラフィーによる方法[5,6]があるが，最近，高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた分析法[7-11]が報告されており，簡単な前処理で酸化染料を分析できる利点がある．今回，著者らもオクタデシル基(ODS)の逆相系カラムを用いたHPLCにより，レゾルシノール(RES)，p－アミノフェノール(PAP)，2－アミノ－5－ニトロフェノール(2A5NP)，m－アミノフェノール(MAP)，o－アミノフェノール(OAP)，o－ニトロ－p－フェニレンジアミン(ONPPD)，p－ニトロ－o－フェニレンジアミン(PNOPD)，m－フェニレンジアミン(MPD)，p－フェニレンジアミン(PPD)，硫酸トルエン－2,5－ジアミン(T 25 D)，p－アミノ－o－クレゾール(PAOC)の11種の酸化染料について分析法を検討したので報告する．

実験の部

1．**試薬**　RES, PAP, 2A5NP, MAP, OAP, ONPPD, PNOPD, MPD, PPD, T25 D, PAOC およびイオン対クロマトグラフィー用の1－ヘキサンスルホン酸ナトリウム(SHS)，1－オクタンスルホン酸ナトリウム(SOS)，1－デカンスルホン酸ナトリウム(SDS)は東京化成工業製を使用した．アセトニトリル(CH_3CN)は液体クロマトグラフィー用を使用した．その他の試薬はすべて特級を用いた．

2．**装置**　島津製作所高速液体クロマトグラフーポンプ：LC－6 AD型，システムコントローラ：SCL－6 B型，オートインジェクタ：SLL－6 B型，検出器：紫外－可視波長可変SPD－6 AV 型，データ処理装置：クロマト

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

パック C−R 6 A 型.

3．試料 平成元年度の都内で購入したジャンプータイプの液状染毛剤5検体を試料とし，酸化染料を含有する第1液を分析した.

4．試験溶液の調製 20ml の共栓付試験管に試料約1 g を精密に量り，CH_3CN／水(1：1)を加えて溶解し全量10ml とする．この液に亜硫酸水素ナトリウム100mg を加え，密栓して十分に振り混ぜる．静置後，上澄液を試験溶液とする．なお，このとき必要ならば遠心分離(3500 rpm，10分間)を行いて上澄液を得る.

5．標準溶液の調製 11種の各酸化染料を約500mgずつ精密に量り，以下試験溶液の調製の項と同様に操作して1％溶液を調製する．さらに CH_3CN／水(1：1)の混液を用いて10倍希釈し，0.1％溶液を調製する．これらの標準原液より20,40,80,120ppm および200,400,800,1200ppm の標準溶液系列を調製する.

6．分析操作 酸化染料の標準溶液系列および試験溶液の各5 μl を HPLC に注入し，下記の測定条件で得られたピークの保持時間(t_R)と面積より定性と定量を行う.

HPLC 測定条件 カラム：TSKgel ODS−80T_M(5 μm，4.6mmi.d.×150mm，東ソー製)，移動相：CH_3CN／水(16：84)に SOS を0.01 M 添加し，リン酸で pH 2.5に調製した溶液，流速：1.0 ml／min，カラム温度：40℃，検出波長：254 nm(0.04または0.16 a.u.f.s.)

結果および考察

1．HPLC の測定条件

市販染毛剤は RES，アミノフェノール類，フェニレンジアミン類など各種の酸化染料を配合しているので，今回は，使用頻度の高い11種の酸化染料(Fig.1)を対象にして HPLC の分離条件を検討した．カラムは逆相系の TSKgelODS −80 T_Mを用い，カラム温度40℃，流速1 ml／min の条件下で CH_3CN／水系移動相の最適化を行った．まず，CH_3CN／水(20：80)の混液を移動相として検討したところ，2 A 5 NP，ONPPD，PNOPD の t_Rが5～10 min であり，若干保持されたが，その他の酸化染料は5 min 以内に溶出して相互の分離はできなかった．このような比較的極性の高い化合物の分離を達成するためには，酸性条件下でアミノ基を陽イオン化し，これに負イオンをもつアルキル硫酸塩等の対イオンを付加させ，逆相カラムに対する親和性を高めて分離を行うイオン対クロマトグラフィーが考えられる.

1—1．対イオンの種類

CH_3CN／水(20：80)の混液に対イオンとして SHS，SOS および SDS を0.01Mの濃度に添加し，pH をリン酸で2.5に調整した溶液を移動相として各酸化染料のカラム保持能(capacity factor，K')を調べた．Fig.1にその結果を示す．Fig.1に示すように，対イオンの種類を変えても RES と2A5NP のK'に影響が認められず，イオン対の生成能が低いことがわかった．このことは RES が2価フェノールであり，また，2 A 5 NP はニトロ基の存在

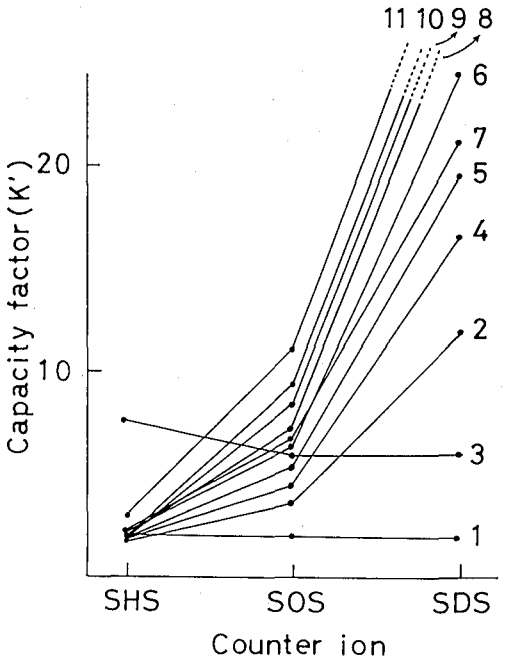


Fig. 1． Effect of Counter Ions on Capacity Factor (K') of Oxidative Dyes
1：Resorsinol (RES), 2：p−Aminophenol(PAP),
3：2−Amino−5−nitrophenol (2A5NP),
4：m−Aminophenol(MAP),
5：o−Aminophenol(OAP),
6：o−Nitro−p−phenylenediamine(ONPPD),
7：p−Nitro−o−phenylenediamine(PNOPD),
8：m−phenylenediamine(MPD),
9：p−phenylenediamine(PPD),
10：Toluene−2,5−diamine(T25D),
11：p−Amino−o−cresol(PAOC),
SHS：sodium 1−hexanesulfonate,
SOS：sodium 1−octanesulfonate,
SDS：sodium 1−decanesulfonate
HPLC conditions−column：TSKgel ODS−80 T_M(4.6mm i. d. ×150mm), mobile phase：CH_3CN/water (20：80) contained 0.01M of each counter ion and pH adjusted to 2.5 with phosphoric acid. column temperature：40℃, flow rate：1.0ml /mn, detection：254nm.

でアミノ基の塩基性が弱まって両者とも陽イオン化が困難なためと考えられる．その他の酸化染料は，炭素数の少ないSHSではK'は小さいが，SOS，SDSと炭素数が多くなると著しくK'が増加し，明らかにイオン対の生成が認められた．従って，SOSの付加によってODSカラムでの分配クロマトグラフィーが成立することがわかった．以下，対イオンとしてSOSを用いて分離条件の検討を行った．

1—2．SOSの濃度 Fig.2に示すようにCH_3CN／水(20：80)の混液に対してpH 2.5でSOSの濃度を0.005～0.03Mまで増加させてK'への影響を観察した．RESと2A5NPは，SOS濃度を増加してもK'に変化はなく，イオン対の生成は認められなかった．その他の酸化染料については，SOS濃度を0.01から0.03Mへ濃度を増すと，K'の増加がかなり認められるが，PAP，MAP，OAP，ONPPD，PNOPDの相互分離にはそれ程大きな効果がみられなかった．SOSの移動相への高濃度添加は，カラムの劣化を早めると考えられるので，SOSの濃度を0.01Mとした．

1—3．pH

CH_3CN／水(20：80)の混液に0.01MのSOSを添加し，pHを2～5に変えてK'への影響を観察した．Fig.3に示すように，RESと2A5NPについてはK'に変化はみられない．このことは酸性度を高めてもプロトン化されず，いずれも陽イオンになっていないことを示している．

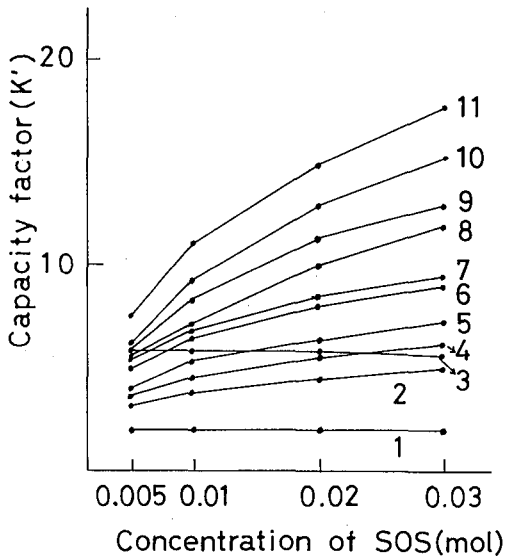


Fig. 2． Effect of SOS Concentration in Mobile Phase on K' of Oxidative Dyes
HPLC conditions were the same as Fig.1.

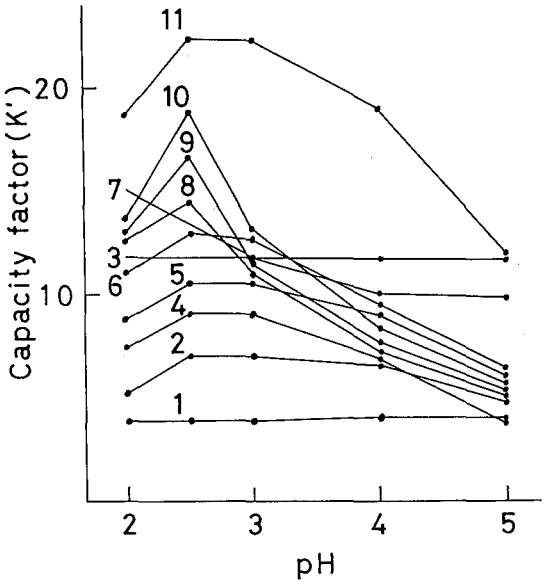


Fig. 3． Effect of pH on K' of Oxidative Dyes
Mobile phase：CH_3CN／water (20：80) contained 0.01 M of SOS. Other conditions of HPLC were the same as Fig.1.

その他の酸化染料はpHによって大きな影響を受け，特にpH 2～3の低い範囲ではK'の増加が著しく，各酸化染料の相互の分離が良好になっている．従って，移動相のpHは2.5に設定した．

1—4．CH_3CNの影響

0.01 MSOS，pH 2.5の条件で移動相中のCH_3CN濃度を10～30%まで増加させてK'の変動を観察した．Fig.4に示すように，20%以下の濃度範囲ではK'の著しい増加が認められた．15%以下ではRES，PAP，2A5NP以外はカラムへの保持力が強く，適正な溶出時間が得られない．11種の酸化染料の溶出時間が約30分間以内で比較的相互の分離が良い条件は16%程度であった．以上の検討結果から今回の分離条件としては，CH_3CN／水(16：84)に0.01MのSOSを添加し，pH 2.5に調整した移動相を用いることにした．Fig.5に代表的なクロマトグラムを示す．この条件でも2A5NPとMAP，PNOPDとONPPDの完全な分離は達成できなかった．しかし，Fig.4の結果からCH_3CNの含有量を変化させれば，相互分離は可能である．また，市販製品中にそれらが同時に配合された例はほとんどなく，実際の製品分析では支障がないと思われる．

2．検量線

市販染毛剤は，多種多様の酸化染料が使用されており，

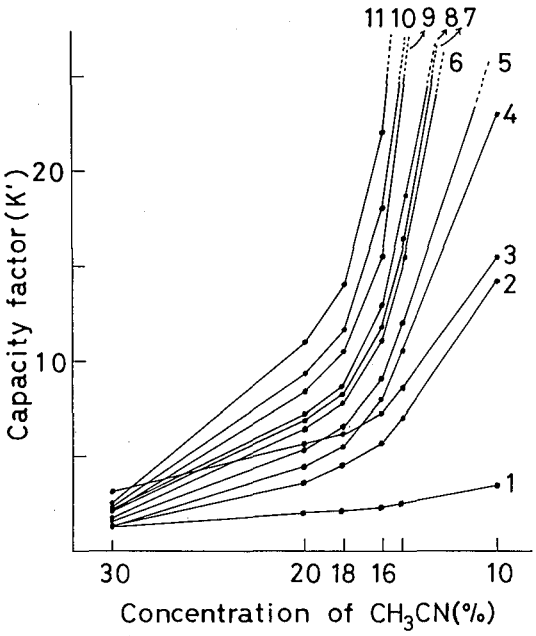


Fig. 4. Effect of CH_3CN Concentration in Mobile Phase on K' of Oxidative Dyes
HPLC conditions were the same as Fig.1.

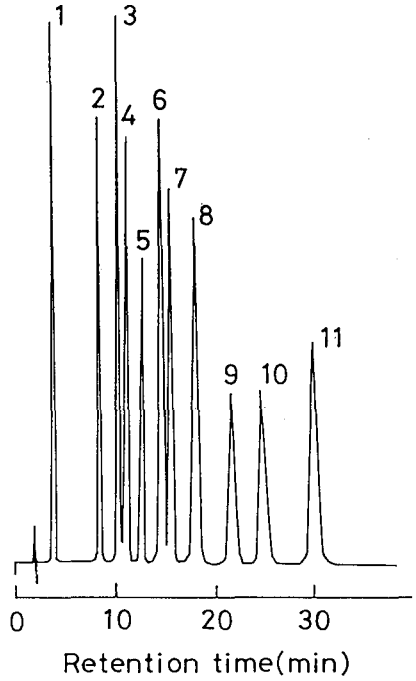


Fig. 5. Chromatogram of Oxidative Dyes
HPLC conditions—mobile phase : CH_3CN／water (16 : 84) contained 0.01M of SOS (pH 2.5). Other conditions were the same as Fig.1.

その配合量は0.02%～3%と広い範囲に及んでいる．そこで，各酸化染料について0.02～0.12%と0.2～1.2%の標準溶液の濃度系列を調整して検量線の作成を行った．各酸化染料の濃度とピーク面積の間に直線性が認められ，良好な検量線が得られた．

3．回収率

今回検討したHPLC法の精度と正確さを調べるために，3種類の市販染毛剤(製品A，B，C)に各酸化染料を1%の濃度に添加して回収受験を行った．その結果をTable 1に示す．各製品に添加する酸化染料の種類は，実験に供した製品A，B，Cに配合されている酸化染料を考慮して決定した．すなわち，製品AにはRES, PNONP, PPD, 製品BにはPAP, 2A5NP, ONPPD, PAOC, 製品CにはMAP, OAP, MPD, T 25 Dを添加した．Table 1に示すように，回収率は89～109%，変動係数1.2～4.4%とほぼ満足できる結果であった．

4．市販製品の分析結果

Table 2に市販染毛剤5種の分析結果を示す．試料は

Table 1. Recovery of Oxldative Dye Added to Permanent Hair Dyes

Compound	Added (%)	Ave.recovery[4] (%)	CV (%)	Compound	Added (%)	Ave.recovery[4] (%)	CV (%)
RES[1]	1	104.8	1.4	PNOPD[1]	1	94.6	1.7
PAP[2]	1	107.0	2.3	MPD[3]	1	100.7	4.4
2A5NP[2]	1	94.4	1.3	PPD[1]	1	106.7	1.2
MAP[3]	1	109.2	1.0	T25D[3]	1	103.7	2.1
OAP[3]	1	89.6	1.7	PAOC[2]	1	94.9	2.0
ONPPD[2]	1	98.6	2.0				

1) Sample A(1 g), 2) Sample B(1 g), 3) Sample C(1 g), 4) n=5.

Table 2. Analytical Results of Commercial Permanent Hair Dyes (%)

Sample	A	B	C	D	E
RES	0.25	0.85	0.52	0.44	1.03
PAP	0.91	—	0.18	—	0.78
MAP	0.07	0.38	—	0.80	0.08
OAP	0.56	—	—	0.92	—
PPD	—	—	0.73	3.10	—
T25D	1.33	3.78	—	—	1.23
PAOC	0.07	—	—	—	0.02

シャンプータイプの液状染毛剤(第1液)である．共存物質としては界面活性剤，乳化剤，アンモニア水など紫外部吸収をもたない成分が多く，今回の分析では酸化染料のクロマトグラムに妨害するものは少なかった．以上の結果，本法は製品分析に適用できるものと考る．また，粉末状染毛剤は液状製品より組成が単純であり，本法の適用は充分に可能である．

まとめ

永久染毛剤として使用頻度の高い酸化染料11種について，HPLC の分離条件の検討を行った．最適条件は，ODS カラムに於て pH 2.5で CH_3CN／水(16：84)の混液に0.01M の SOS を添加した移動相を使用した場合であった．配合例の異なる代表的な市販染毛剤を用いて，本法が製品分析に適用できることを示した．

文献

1) 化粧品科学研究会編，最新化粧品科学，113—120，1981，薬事日報社，東京．
2) 日本ヘアカラー工業会編，染毛剤原料規格，1985．
3) 厚生省告示第166号および第167号，昭和55年9月26日．
4) 日本薬学会編，衛生試験法・注解，867，1990．
5) Choudhary, G. : *J. Chromatogr.*, 193, 277-284, 1980.
6) Tokuda, H., Kimura, Y. and Takano, S. : *J. Chromatogr.*, 367, 345-356, 1986.
7) 山田貞二，大島晴美，野田直希，早川順子，宇野圭一：衛生化学，28，335-340，1982．
8) 木嶋敬二，斉藤恵美子，手代木直子，本田真理：衛生試験所報告，101，32-37，1983．
9) 田代圭介，小島 彰，奥田吉則：粧技誌，16，125-135，1983．
10) 松下秀鶴，塩崎卓哉，半田 隆，田辺 潔：分析化学，36，244-249，1987．
11) Dowle, C. J. and Malyan, A. p. : *Analyst*, 115, 105-107, 1990.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 75-77, 1990

化粧品中のニッケルおよびコバルト含有量について

雨宮　敬*, 伊藤弘一*, 鈴木助治*
渡辺四男也*

Contens of Nickel and Cobalt in Cosmetics

TAKASHI AMEMIYA*, KOHICHI ITOH*, SUKEJI SUZUKI*
and YOHYA WATANABE*

Keywords：化粧品 cosmetic, ニッケル nickel, コバルト cobalt, ケイ光X線分析 x－ray fluorescence spectrometry, 原子吸光分析 atomic absorption spectrophotometry

緒　言

ニッケルが，アレルギー性接触皮膚炎の起因物質であることは古くから知られており，これはニッケル含有のイヤリング，ネックレス等の装身具の着用によるものであることがすでに解明されている[1)]．

最近，外国では，化粧品のうちニッケル含有のアイシャドーの使用によるアレルギー性接触皮膚炎の症例が報告されている[2)]．また，西ドイツにおいて，Forckは各種の化粧品のうちヘアケア剤及びコールドパーマ剤にはニッケルを含有している場合が多いので，アレルギーの素質を有する者の理美容師への就業を止めるよう勧告している[3)]．

わが国の市場には，近年特に輸入化粧品が多数市販されている．化粧品中のニッケル含有量については，諸外国で2，3の報告[1,4)]はあるが，わが国では殆どみられない．

そこで，今回，化粧品の安全性を調査する目的で都内に流通する国産化粧品と輸入化粧品についてニッケル及びニッケルと同様に接触アレルギーが懸念されるコバルト[5)]の含有量を調査したので報告する．

実験方法

1．試薬　ニッケル及びコバルト標準溶液：1,000 ppm 原子吸光分析用標準液(和光純薬工業製)を適宜希釈して用いる．硫酸，硝酸，過塩素酸及びアンモニア水：精密分析用

2．装置及び器具　原子吸光分析装置：AA－8200型(日本ジャーレルアッシュ製)，ホローカソードランプ：ニッケル及びコバルト(浜松フォトニクス製)，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(ケベック製)，X線発生部：9265型(理学電機工業製)，X線管球：モリブデン対陰極(最大負荷電力2.7kW，フィリップス製)，二次ターゲット：モリブデン，ケイ光X線用試料ホルダー：富士写真工業製ハーフ判スライドマウント(固体及び乳液状試料用)，液体用試料ホルダー：理学電機工業製，データ処理システム：ユニペックシステム7000(ケベック製)

3．試料　平成元年10月から11月にかけて都内で購入した市販品である．うちわけは，国産化粧品については，ファンデーション20，ほお紅15，アイシャドー10，口紅20，クリーム7，リンス15，シャンプー10，パーマネントウェーブ液(1剤10，2剤10)，パック剤5，ヘアトニック20，マスカラ10，除毛クリーム5及び化粧水10の167検体である．さらに，輸入化粧品については，ファンデーション10，アイシャドー5，乳液5，化粧水5，口紅5，ムース剤3及び除毛クリーム3の計36検体である．

4．試料の採取　化粧水，乳液，クリーム等の試料はよく混和して採取し，また，金属製容器に充填された一部のファンデーション，アイシャドー，ほお紅は，金属部を削り込まないよう注意しながら採取する．

5．試料溶液の調製　試料0.2－10 g を300ml ケルダールフラスコにとり，硝酸5 ml を加え，発泡に注意しながらおだやかに加熱する．つぎに，硫酸3 ml を加え加熱還流したのち，硝酸10ml 及び過塩素酸2 ml を用

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

いて以下常法通り灰化を行う．灰化後，ガラスろ過器でろ過し，水で全量を25mlとして試験溶液とする．

6．測定方法

6－1 **ケイ光X線分析による定性** 試料を灰化することなく，直接成分元素を把握する目的でケイ光X線分析を行った．すなわち，ファンデーション，ほお紅等の固形試料及びクリーム，リンス等の乳液状の試料については試料ホルダーとしてハーフ判スライドマウントを用い，片側にマイラー膜をはりつけ，その上に試料をできるだけ平滑になるように乗せ，さらに，上からマイラー膜で覆い，試料をはさみ込むようにして装填する．しかし，ヘアトニック，コールドパーマ液のような液体試料については，この方法が適用できなかったので液体用試料ホルダーを用いた．測定は表1に示した測定条件に従って操作する．各元素の同定には，Ni(Kα7.471 keV，Kβ8.263 keV)，Co(Kα6.924keV，Kβ7.648 keV)の各スペクトル線を用いた．

6－2 **原子吸光分析による定量** 表2に示した測定条件に従って，試験溶液を直接原子吸光分析装置に導入し，別に標準溶液を希釈して作成した検量線により定量を行う．

表1．ケイ光X線分析の測定条件

X線管球	Mo
二次ターゲット	Mo
印加電圧，電流（kV，mA）	50,55
測定時間（秒）	300
測定範囲（keV）	0－20
X線通路	空気

表2．原子吸光分析の測定条件

元　素	Ni	Co
波長（nm）	230.0	240.7
電流（mA）	10	10
燃料ガス流量（kg／cm²－1／min）	C_2H_2	(0.5－2.5)
助燃ガス流量（kg／cm²－1／min）	Air	(1.5－8.0)

＊バーナーヘッド：水冷式ワンスロット

結果及び考察

1．分析法の検討

1－1 **共存元素の影響** 化粧品及び医薬部外品には，ベンガラ，黄酸化鉄等の無機顔料あるいはクロム，ビスマス等無機成分を主体とした化粧品原料を用いることが多い．これらの無機成分が原子吸光分析法によるニッケル及びコバルトの測定値に与える影響について検討した．すなわち，ニッケル，コバルトそれぞれ20 μgに鉄，クロム，亜鉛，マンガン，銅，ビスマス，ナトリウム，カリウム，カルシウムをそれぞれ50倍，100倍，500倍，1,000倍，5,000倍量を添加して6－2の項に従って操作した．その結果，ファンデーション，アイシャドー等に多量に含有されている鉄，クロム，亜鉛及びビスマスはいずれの濃度段階においても影響は与えなかった．また，ナトリウム，カリウム及びカルシウムについても同様に影響がなかった．

1－2 **検量線** ニッケル及びコバルト標準液を希釈して0.2，0.5，1.0，2.0及び4.0 ppmの標準系列を調製し，6－2に従って操作した．その結果，いずれの元素とも原点を通る直線性を示した．また，その時の検出限界は両者とも0.1 ppmであった．

1－3 **添加回収率** 今回，分析の対象としたニッケル及びコバルトを含有しないファンデーション，アイシャドー，リンス，口紅の4種を選び，それぞれ1.0 gをとり，ニッケル及びコバルトを25，50，100 μg添加し，実験方法の4及び6－2に従って操作した．その結果を表3に示す．回収率，変動係数ともいずれの濃度段階においてもほぼ満足すべき結果が得られた．

分析結果

2－1 **ケイ光X線による定性分析** 原子吸光分析に先だって試料を非破壊でかつ重金属の同時分析が可能なケイ光X線分析を行い，各試料について重金属の定性的スクリーニングを行った．その結果，殆どのファンデーション，ほお紅，アイシャドー及びマスカラからはチタン，鉄，亜鉛，マンガン，ビスマス，銅，クロム等が検出された．また，ファンデーションの1検体からはコバルトが確認され，ファンデーション及び口紅のそれぞれ1検体からはニッケルが確認された．つぎに，リンス1検体からニッケルが確認された．以上のことから固形，乳液状あるいは液状化粧品には，ケイ光X線による定性分析が有効であることがわかった．なお，各元素の同定には，Ti(Kα4.508 keV，Kβ4.931 keV)，Fe(Kα6.398，Kβ7.057)，Zn(Kα8.630，Kβ9.570)，Mn(Kα5.894，Kβ6.489)，Bi(Lα10.837，Lβ13.021)，Cu

表3．ニッケル及びコバルトの添加回収率

試　料	採取量 (g)	添加量 (μg)	Ni 回収率 (%)	Ni C. V. (%)	Co 回収率 (%)	Co C. V. (%)
ファンデーション	1.0	25	95.7	3.1	96.7	2.8
		50	94.8	3.9	97.7	2.8
		100	95.5	3.8	94.9	3.2
アイシャドー	1.0	25	94.6	3.0	97.7	2.8
		50	95.5	2.7	95.0	2.8
		100	93.6	4.1	94.0	3.9
リンス	1.0	25	98.9	1.2	97.6	1.7
		50	98.0	1.5	98.8	1.3
		100	99.0	1.2	99.0	1.7
リップカラー	1.0	25	97.8	2.5	95.8	3.0
		50	98.5	1.8	95.1	2.9
		100	95.0	3.8	94.2	3.0

測定値は3回繰り返しの平均値

(Kα8.040, Kβ8.904), Cr(Kα5.411, Kβ5.946), K(Kα3.312, Kβ3.589), Ca(Kα3.690, Kβ4.012)の各スペクトル線を用いた．しかし，コバルトKα線のスペクトルは，鉄が多量に含有される場合，鉄Kβ線のスペクトルに完全に吸収され，ピークとして出現しない．このため，コバルトの定性はKα線に比してX線強度が低いが，他のスペクトルの妨害のないKβ線のスペクトルを用いて行った．

2－2　市販化粧品の測定結果　今回の調査に用いた試料は，国産化粧品167検体，輸入化粧品36検体である．これらを実験方法の4，5及び6－2に従って操作した．その結果，リンス，ファンデーション，口紅から1検体づつではあるが，ニッケルが検出され，それぞれ87.7 ppm，15.0 ppm，9.7 ppmであった．これらについては，いずれもコバルトは検出されなかった．さらに他のファンデーションからは，コバルトが200 ppm検出された．他のものはすべて検出限界(0.1 ppm)以下であった．つぎに，輸入化粧品については，すべて検出限界以下であった．

ま と め

1．市販化粧品のうち国産化粧品は，ファンデーション，アイシャドー等167検体，輸入化粧品は，36検体についてニッケル及びコバルトの含有量を調査した．

2．試料を硫硝酸湿式灰化後，水で一定量として原子吸光分析によって定量を行い，ケイ光X線分析によって定性を行った．

3．国産化粧品については，リンス，ファンデーション及び口紅からは1検体づつではあるが，ニッケルが検出され，それぞれ87.7 ppm，15.0 ppm，9.7 ppmであった．さらに，コバルトについては，ファンデーション1検体から200 ppmと比較的高い値が認められた．他のものは全て検出限界(0.1 ppm)以下であった．輸入化粧品はすべて検出限界以下であった．

文　献

1）環境汚染物質の生体への影響3ニッケル：長橋　捷，和田　攻，東京化学同人，300，1977
2）C. L. Goh, S. K. Ng, S. F. Kwok：Cotact Dermatitis, 20, 381, 1989
3）Forck：Kosmetik International, No. 9, 1988
4）W. G. van Ketel et al.：Contact Dermatitis, 21－5, 355, 1989
5）皮膚と免疫・アレルギー：谷奥喜平，三浦　修，野口義圀，旗野　倫，金原出版，355，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 78-84, 1990

家庭用品の衛生化学的研究（第28報）*
家庭用殺虫エアゾル製品中の有効成分について

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 (XXVIII)*
Insecticidal Components in Household Aerosol Products

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

Summary

Insecticidal components in 52 samples of household aerosol products (20 sprays for annoying pests, 18 garden spray, 14 sprays for sanitary pests) were determined by gas chromatography (GC) on a fused silica capillary column.

The recommended conditions of GC were as follows: a 0.53 mmi. d.×30 m column (J&W SCIENTIFIC DB-1); column temperature, 130°→250℃, (5℃／min); injection temperature, 300℃; detector, FID; carrier gas, He 20ml／min; H_2 30ml／min; air 600ml／min; sample size, 4 μl.

Pyrethroid pesticides (phthalthrin, permethrin, resmethrin, allethrin, pyrethrin and phenothrin) were detected in 46 samples (0.01-3.42%). Organophosphate pesticides (fenitrotion (MEP), diazinon, phenthoate (PAP) and acephate) were detected in 22 samples (0.05-2.15%). Other pesticides (tetrachloroisophthalonitrile (TPN), propoxur (PHC), petroleum oils and captan) were detected in six samples (0.06-1.45%). Repellents (β-naphthol and deet (N,N-diethyl-m-toluamide)) were detected in seven samples and synergists (S-421 (2,3,3,3,2',3',3',3'-octachlorodipropylether), piperonyl butoxide and synepirin 222) were found in five samples.

Keywords：殺虫エアゾル insecticidal aerozol, ピレスロイド殺虫剤 pyrethroid insecticidal compound, 有機リン殺虫剤 organophosphoros insecticidal compound, 忌避剤 repellent, 効力増強剤 synergist, ガスクロマトグラフィー gas chromatography, ヒューズドシリカキャピラリーカラム fused-silica capillary column

緒　言

従来，家庭で使われる害虫駆除用のエアゾル製品は，ハエ，カ，ゴキブリ，ダニ等衛生害虫に対する用途が主であった．これらの殺虫剤は医薬品，医薬部外品として薬事法[1]の規制を受けている．最近は，家屋内外でハチ，アリ，シロアリ等の人体に直接健康被害をおよぼすことはないが，不快感を与える不快害虫用の殺虫エアゾルが使用され始めている．しかし，不快害虫用エアゾル製品は薬事法や農薬取締法[2]の規制対象外であり，その殺虫成分等の使用実態はほとんど不明である．著者らは，以前よりなんらの法規制を受けない雑貨品である防虫カーペット，防虫シート及び掃除機用防虫紙パックなど，防虫加工処理された製品の殺虫成分について，試験法の開発と使用実態調査を行い報告してきた[3,4,5]．今回は，衛生害虫用殺虫剤をはじめ不快害虫用殺虫剤(平成元年3月不快害虫用殺虫剤協議会は自主基準を作成した[6])

---

*第27報，東京衛研年報，40，101－105，1989.

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

及び類似製品である家庭園芸用殺虫剤の各種エアゾル製品に配合されるピレスロイド系，有機リン系等の殺虫成分14種類，忌避剤2種類及び効力増強剤3種類の計19種類の有効成分について調査を行ったので報告する．

実験の部

1．試薬 標準品①ピレスロイド系殺虫剤 フタルスリン(ネオピナミン)，ペルメトリン(エクスミン)，アレスリン(ピナミン)，フェノトリン(スミスリン)，レスメトリン(クリスロン)は住友化学工業製，ピレトリンは大日本除虫菊製．②有機リン系殺虫剤 ダイアジノン，フェニトロチオン(スミチオン，MEP)，アセフェート(オルトラン)，ペントエイト(ジメチルジチオホスホリルフェニル酢酸エチル，PAP)は和光純薬工業製(残留農薬試験用)③カーバメート系殺虫剤 プロポクスル(PHC)は和光純薬工業製(残留農薬試験用)．④その他の殺虫剤 キャプタン(オーソサイド)，テトラクロロイソフタロニトリル(クロロタロニル，TPN)は和光純薬工業製(残留農薬試験用)，マシン油は三笠化学工業製．⑤忌避剤 β－ナフトールは和光純薬工業製，ディート(N,N-ジエチル-*m*-トルアミド)は東京化成工業製．⑥効力増強剤 2，3，3，3，2'，3'，3'，3'，-オクタクロロジプロピルエーテル(S-421)は三共化成工業製，ピペロニルブトキサイドは和光純薬工業製，サイネピリン222は吉富製薬製をそれぞれ用いた．

各標準原液：各標準品100mgを精秤し，ジクロロメタンを加えて全量100mlとする(1000 μg／ml)．

各標準溶液：各標準品の GC 感度に応じて標準原液を適宜ジクロロメタンで希釈して調製し標準溶液とした．

2．装置 ガスクロマトグラフ：島津製作所製 GC-15 A 型水素炎イオン化検出器付，インデグレーター：クロマトパック C-R 3 A，自動注入装置 AOC-9.

ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)：VG 社製70- S 型．

3．試料 平成元年7月から9月までの間に都内の小売店において不快害虫用(20検体)，家庭園芸用(18検体)及び衛生害虫用(14検体)の殺虫エアゾル製品(計52検体)を購入したものを試料とした．

4．試験溶液の調製 殺虫エアゾル製品には有効成分が有機溶剤に透明に溶解している溶解型試料と，有効成分が有機溶剤，界面活性剤，水等と乳化状態で分散している乳化型試料の2種類のタイプの製品がある．

(1)溶解型試料は森[7]らの方法に準じ，試料エアゾル罐のノズルをステンレスパイプ付きノズル(10cm)に交換し，試料エアゾル罐全体の重量(W_1)を測定する．エアゾル罐を約10秒間振とうし，50mlメスフラスコ中に液量が約2 gになるまで噴霧し採取を行った後ジクロロメタンで一定量とし，試験溶液とする．試料エアゾル罐は再秤量し試料採取後のエアゾル罐全体の重量(W_2) を測定する．つぎに(W_1)から(W_2)の重量差を求め，噴射重量(W_S)を求める．

(2)乳化型試料は(1)と同様にエアゾル罐全体の重量(W_1)を測定後，エアゾル罐を振とうし50mlの遠沈管に長いノズルで液量が約2 gになるまで噴霧し試料を採取する．ジクロロメタン10mlを加え，遠沈管に共通栓をし5分間振とう後3000 rpm で5分間遠心分離する．水層を別の遠沈管に移しジクロロメタン層は50mlのメスフラスコに入れる．水層はさらにジクロロメタン10mlで抽出し，このジクロロメタン層も先のメスフラスコに入れる．この操作を更に2回繰り返した後メスフラスコをジクロロメタンで一定量とし，試験溶液とする．試料のエアゾル罐は再秤量し(1)と同様に噴射重量(W_S)を測定する．

5．GC による定性及び定量 殺虫剤，忌避剤及び効力増強剤に各標準溶液をジクロロメタンで希釈し50，100，150，200，250 μg／ml(S-421は100，200，300，400，500 μg／ml，アセフェートは200，400，600，800，1000 μg／ml)の濃度系列を調製する．これら調製した溶液と試験溶液の各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．また得られたクロマトグラムのピーク面積より作成した検量線を用いて試験溶液中の濃度(C)を求める．濃度(C)を試料溶液の調製で求めた(W_S)で除することにより製品中の各有効成分含有量(%)を求める．

FID-GC 測定条件 カラム：DB-1 J&W SCIENTIFIC 製0.53㎜×30m，注入口温度：300℃，カラム温度：130→250℃，5℃／min，キャリアーガス：ヘリウム20ml／min，水素30ml／min，空気600ml／min，検出器：水素炎イオン化検出器(FID)，レンジ10^2，アットネイション3．

GC-MS 測定条件 カラム：DB-17 J&W SCIENTIFIC 製0.32 mmi.d.×30m，カラム温度60°→260℃，昇温速度：20℃／min，キャリアーガス：ヘリウム1ml／min，イオンモード：電子衝撃イオン化法(EI)，イオン電圧：70 eV.

結果及び考察

1．GC 分析用カラムの検討 無極性ワイドボアーカラム DB-1(0.53 mmi.d.×30m)，微極性ワイドボアーカラム DB-5(0.53 mmi.d.×30m)及び中極性ワイドボ

Table 3. Analytical Results of Household Aerosol Products (%)

SA. No.[1]	indi.[2]	Insecticidal Components: Pyrethroid[3]	Organophosphrus[4]	Other Components[5]	Repellent[6]	Synergist[7]
1	◎	RE 0.25	FE 0.22			
		PH 0.08				
2	○	RE 0.16				
		PH 0.30				
3	○	PH 0.25	FE 0.77			
4	○	PH 0.23	FE 0.76			
5	○	PH 0.23	FE 0.75			
6	○	AL 0.22				SF 0.48
		RE 0.24				
		PH 0.09				
7	○	AL 0.08	DI 0.58		NA 0.02	SF 0.30
8	○	AL 0.09	DI 0.58		NA 0.03	SF 0.27
9	○	PH 0.09	FE 1.89		DE 2.03	
10	○		FE 0.40			
11	○	PH 0.20	DI 0.42			
12		RE 0.18				
		PH 0.37				
13		PH 0.11	FE 0.34			
14		PH 0.25	FE 0.58			
15		PH 0.07	FE 2.15			PB 0.23
16		RE 0.16	FE 1.24			SF 0.61
17		AL 0.28				SF 0.74
		RE 0.01				
		PH 0.08				
		PE 0.40				
18		RE 0.17				
		PH 0.54				
19		RE 0.06				
		PH 0.12				
20	○	AL 1.37	FE 1.11		NA 0.10	PB 0.04
21#		RE 0.03				
22#		AL 0.14		TP 0.58		
23#		AL 0.14		TP 0.63		
24#		AL 0.21				
25#		AL 0.25				
26#		AL 0.28				PB 0.53
27		PY 検出				PB 0.41

SA. No.	indi.	Insecticidal Components: Pyrethroid	Organophosphrus	Other Components	Repellent	Synergist
28		PY 検出				PB 0.35
29			AC 0.28			
			FE 0.16			
30			AC 0.24			
			FE 0.18			
31			AC 0.24			
			FE 0.19			
32		AL 0.10	DI 0.05	CA 0.60		PB 0.50
33		AL 0.17	AC 0.27			PB 0.26
33		AL 0.04	FE 0.11			
35		PY 検出				PB 0.57
36#		RE 0.10	FE 0.44			
37#				MO 検出		
38			PA 0.11	MO 検出		
39*		PH 0.14		RR 1.45		
40*		PE 3.42				
40**		RF 0.03				
		PH 0.23				
42**		PH 0.28				
		PE 0.82				
43**		RE 0.03				
		PH 0.24				
44**		RE 0.34				
		PE 0.11				
45**		RE 0.03				
		PH 0.23				
46**		PT 0.70			DE 2.28	
		PE 0.07				
47**		PH 0.46				
		PE 0.42				
48**		RE 0.03				
		PH 0.21				
49**		PH 0.24				
		PE 0.67				
50**		AL 0.17			DE 1.20	SY 1.02
51**		AL 0.11			DE 4.86	SY 1.02
52	○	RE 0.49				

1) SA. No. (Sample No.) : No. 1～18 ; Displeasure Pest Aerosol for Ant, White ant, Pill bug. No.36 ; Gardening Aerosol for Caterpillar.
No.19 ; Displeasure Pest Aerosol for Bee, Horse fly, Spider. No.37～38 ; Gardening Aerosol for Scale.
No.20 ; Displeasure Pest Aerosol for Slug, Snail. No.39～52 ; Sanitary Pest Aerosol for Cockroach, Mite, Fly.
No.21～35 ; Gardening Aerosol for Ant cow, Spider mite.
; Samples of emulsion type.

2) indi. (indication) : ○ ; Pyrethroid insectide and Organophosphrus insectide. * ;drogs
◎ ; not indicated. ** ; quasi drugs

3) Pyrethroid Components : PH ; Phthalthrin, PE ; Permethrin, RF ; Pesmethrin, AL ; Allethrin,PY ; Pyrethrin, PT ; Phenothrin

4) Organophosphrus Components : FE ; Fenitorotion (MEP), DI ; Diazinon, PA ; Phenthoate (PAP), AC ; Acephate

5) Other Insecticidal Components : TP ; Tetrachloroisophthalonitrile (TPN), PR ; Propoxur (PHC), MO ; Petroleum oils, CA ; Captan,

6) Repellent : NA ; β-Naphthol, DE ; Deet (N, N—dlmethyl—*m*—toluamide)

7) Synergist SF ; S-421 (2,2,3,3,2',3'-octachlorodipropylether), PB ; Piperonyl butoxide, SY ; Synepirin 222

えられる．有機リン系は22検体(全体の42%)から0.05-2.15%検出された．殺虫剤として有機リン系が単独で使用されているのは6検体で，残り16検体はピレスロイド系との併用であった．これはピレスロイドの強い速効性と有機リンの遅効性及び残効性の殺虫作用を加味させたものと考えられる．その他の殺虫剤としては有機塩素系のTPNが2検体0.63及び0.58%，カーバメート系のプロポクスルが1検体1.45%，マシン油が2検体及びキャプタンが1検体0.06%用いられていた．また，殺虫剤のほかには忌避剤としてβ-ナフトール3検体0.02-0.10%，ディート4検体1.20-4.86%の計7検体が，また効力増強剤としてS-421 5検体0.27-0.74%，ピペロニルブトキサイド8検体0.35-0.62%，サイネピリン222　2検体1.02%の計15検体が検出された．有効成分の配合量は，殺虫剤，忌避剤，効力増強剤のいずれも0.1-0.8%の濃度の検体が多く，1%を超えるものは，検体番号9，15，16，20，39，40，46，50，51の9検体であった．殺虫剤ではピレスロイド系のレスメトリンが番号40の1検体から3.42%，有機リン系のフェニトロチオンが番号　9，15，16，20の4検体から1.11-2.15%，有機塩素系のプロポクスルが番号39の1検体から1.45%検出した．このうちレスメトリン及びフェニトロチオンは薬事法[1]，農薬取締法[2]の毒薬，劇薬の対象品ではない．しかし，プロポクスルを1%以上含有する製品は薬事法で，劇薬として扱われており，番号39の検体は1%以上であったが，表示は医薬品となっていた．またダイアジノンを5%以上含有する製品も薬事法で，劇薬として扱われているが，今回ダイアジノンを検出した番号7，8，11，32の4検体は，いずれも1%以下なので問題がなかった．

(2)用途別による分類　検体番号1から20のアリ，シロアリ，ワラジムシ，ハチ，アブ，クモ，ナメクジ，カタツムリ等の不快害虫用エアゾルではフタルスリン(PH)とレスメトリン(RE)のピレスロイド系の併用が主で，これに有機リン系のフェニトロチオン(FE)とダイアジノン(DI)を配合した製品が多くみられた．番号21から36のアリマキ，ハダニ，毛虫等の家庭園芸用エアゾルでは，使用されたピレスロイド系殺虫剤は不快害虫用エアゾルと異なり，アレスリン(AL)及び天然ピレスロイドであるピレトリン(PY)が主であった．これらのピレスロイドは他のピレスロイドに比べ殺虫効力がやや劣るものの，アリマキ，ハダニに対しては充分効果があるものと考えられる．また番号37及び38のカイガラムシ駆除用の家庭園芸用エアゾルからは殺虫成分としてマシン油が検出された．これらは，マシン油がカイガラムシの体表に付着することにより，窒息させ駆除するものと考えられる[13]．番号39から52のゴキブリ，ダニ，ハエ等の衛生害虫用エアゾルより，有機リン系は検出されなかった．今回調査を行ったいずれの製品も殺虫剤の配合量に差がみられなかった．しかし，不快害虫用エアゾルと家庭園芸用のエアゾルからは衛生害虫用のエアゾルに含有されていない有機リン系殺虫剤を確認した．一般に衛生害虫用エアゾルは主として室内で使用するもので，不快害虫用及び家庭園芸用製品は室外で使用するものである．調査した不快害虫用及び家庭園芸用製品に配合された有機リンは本来，毒物及び劇物取締法[14]により劇物として指定されているものが多く，ピレスロイド系に比べ残効性や哺乳動物に対する毒性も高いことから[12]，有機リン系成分を含有するこれらの製品を室内で使用することは，充分注意が必要と考えられる．調査を行った衛生害虫用エアゾル製品は，Table 3＊印の医薬品が2検体，＊＊印の医薬部外品が11検体で，これらの製品は薬事法により成分名，分量の表示が義務づけられている．不快害虫用，家庭園芸用エアゾル製品は，表示の義務など法的な規制はないが，家庭園芸用製品は，全て成分名，分量が記載されていた．しかし，不快害虫用20検体では○印の11検体がピレスロイド系，有機リン系殺虫剤使用の表記であり，◎印の1検体が無表示であった．消費者の健康確保及び適正な使用からも，これら製品への成分名，分量の表示が必要であると考える．

ま と め

殺虫エアゾル製品(不快害虫用20検体，家庭園芸用18検体，衛生害虫用14検体)計52検体中の殺虫剤，忌避剤，効力増強剤などの有効成分の分析を行った．殺虫剤ではフタルスリン，ペルメトリン，レスメトリン，アレスリン，フェノトリン及びピレトリンのピレスロイド系が46検体から0.01-3.42%，を，MEP，ダイアジノン，PAP及びアセフェートの有機リン系が22検体から0.05-2.15%を，TPNの有機塩素系が2検体0.58及び0.63%を，PHCのカーバメイト系が1検体1.45%を，マシン油が2検体，キャプタンが1検体0.06%検出した．またβ-ナフトール及びディートの忌避剤を7検体，S-421，ピペロニルブトキサイド及びサイネピリン222の効力増強剤を5検体検出した．

文　献

1）薬事法：昭和35年法律第145号
2）農薬取締法：昭和23年法律第82号
3）中村義昭，金子正美，森謙一郎，観　照雄，鈴木助

治，渡辺四男也：衛研年報，39，73-77，1988
4）中村義昭，金子正美，森謙一郎，観　照雄，渡辺四男也：衛研年報，40，106-110，1989
5）金子正美，森謙一郎，中村義昭，観　照雄，渡辺四男也：衛研年報，40，101-105，1989
6）家庭用不快害虫用殺虫剤の自主基準，1989，不快害虫用殺虫剤協議会
7）森謙一郎，中村義昭，金子正美，観　照雄，渡辺四男也：衛研化学，35，347-353，1989
8）殺虫剤指針解説，1976，日本薬業新聞社，東京
9）Glenn H.Oliver F.：J.Agric.Food Chem.,26，395-398，1978
10）殺虫剤指針解説，1990，日本薬業新聞社，東京
11）吉岡宏輔，宮本純之：化学と生物，14(7)，427-434，1976
12）梅津剛吉：家庭用化学薬品の知識，139-151，1982，南山堂，東京
13）香月繁孝：新版農薬便覧，第5版，.275-280，1974，農山漁村文化協会，東京
14）毒物及び劇物取締法：昭和25年法律第303号

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 85-89, 1990

家庭用品の衛生化学的研究（第29報）*
繊維製品用防虫剤中のピレスロイド系薬剤の分析

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

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXIX)*
Analysis of Pyrethroids in Mothproofing Agents for Fabrics

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

Summary

Pyrethroids, synergists and repellents in mothproofing agents for fabrics were examined. We analyzed 21 samples (12 samples of impregnated papers, three samples of mothproofing sheets, two samples of mothproofing covers for clothes, two samples of liquid or gel products and two samples of aerosol products). Results showed that empenthrin, allethrin, resmethrin phthalthrin and permethrin were used as pyrethroids, diethyl phthalate and 2,3,3,3,2',3',3',3'-octachlorodipropylether as synergists and N,N-diethyl-*m*-toluamide as repellents. In particular, empenthrin was detected in 19 samples; 20－480mg／g in impregnated papers, 3.5 and 14mg／g in mothproofing sheets, 0.7 and 1.0mg／g in mothproofing covers for clothes, 95 and 20mg／g in liquid or gel products and 1.8% in aerosol products.

Keywords：繊維製品用防虫剤 mothproofing agent for fabrics, エムペントリン empenthrin, ピレスロイド系薬剤 pyrethroid, 共力剤 synergist, 忌避剤 repellent

緒　言

衣料用防虫剤としては以前より，パラジクロロベンゼン，樟脳及びナフタリンが使われてきた．しかし，これらは「衣服への臭いの移行，併用による成分の液化」という使用上の欠点に加え，最近は市場の大半を占めるパラジクロロベンゼンによる室内大気の汚染が報告されて以来[1,2,3]，これらの欠点を克服し，「ピレスロイド系薬剤使用」と表示された新しい防虫剤が市販されるようになった．一般にピレスロイド系薬剤は光，熱，空気に不安定で蓄積性が無く，人体に対する毒性も低いといわれ，家庭用の殺虫エアゾル剤や蚊取線香に多く使用されているものである[4]．この防虫剤に配合されているピレスロイド系薬剤の主成分は，合成ピレスロイドの一つである「エムペントリン」(Fig. 1)であり，いろいろな剤型の製品として広く繊維製品に使用されている．たとえば紙に含浸させた製品として，これをプラスチック等のケースに入れて洋服タンスや引出しに置くもの(以下含浸紙と略す)，防虫シートや防虫衣類カバー製品として使用するもの，また液体やゲル状のまま容器に入れて洋服タンスに置くもの，エアゾル製品として使用するものなどである．今回は，これらの種々の剤型の防虫剤について，主としてエムペントリンをガスクロマトグラフによる分析法を用いてその使用量を調査した．更に，併用されている他のピレスロイド，共力剤及び忌避剤についても分析したので，併せて報告する．

実験の部

1．試薬　エムペントリン，アレスリン，フタルスリン，ペルメトリン，レスメトリン：住友化学工業製，

---

*第28報，東京衛研年報，41，　，1990．

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

2,3,3,3,2',3',3',3'-オクタクロロジプロピルエーテル(S-421)：三共化成工業製，N，N-ジエチル-*m*-トルアミド，ジエチルフタレート，ステアリン酸メチル：東京化成工業製

殺虫剤，共力剤及び忌避剤の標準溶液：各100mgを正確に採り，ジクロロメタンに溶かして100mlとし，標準溶液とする．

内部標準溶液：ステアリン酸メチル1gを採り，ジクロロメタンに溶かして100mlとする．

2．装置　水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ(FID-DC)：島津製作所製GC-15A・PF型，ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)：VG Analytical社製70-S

3．試料　平成元年5－6月に都内で購入した「ピレスロイド系薬剤」の表示のある衣料用防虫剤16検体，防虫シート3検体及び防虫衣類カバー2検体を試料とした．

4．試験溶液の調製

(1)含浸紙，防虫シート及び防虫衣類カバー　試料0.2－1.0gを細切して精密に量り採り，100mlのナス型フラスコに入れ，ジクロロメタン50mlを加えた後，50℃の水浴中で30分間加熱還流する．次にこの液をガラスろ過器で温時ろ過し，ろ液に内部標準溶液4.0mlを加えてジクロロメタンで全量100mlとし，試験溶液とする．

(2)液体又はゲル状の防虫剤　一包装の全量の重量を測定し，これをジクロロメタンに溶かした後，内部標準溶液4.0mlを加えてジクロロメタンで100mlとし，試験溶液とする．

(3)エアゾル剤　エアゾル製品全体の重量を測定した後，よく振とうして約2gを100mlのメスフラスコに噴射する．軽く振り混ぜて噴射ガスを追い出した後，内部標準溶液4.0mlを加えてジクロロメタンで全量100mlとし，試験溶液とする．更に製品は再び重量を測定し，噴射前の重量との差を採取量とする．

5．GCによる定性及び定量　各標準溶液及び試験溶液の4 μlをGCに注入し，得られたピークの保持時間を比較して定性を行う．また，各標準溶液をジクロロメタンで希釈し，50－500 μg／mlの濃度系列をつくり，定性の場合と同一条件でGC分析し，得られたクロマトグラムの各防虫剤，共力剤及び忌避剤と内部標準物質のピーク高比から試験溶液中の濃度を求める．

FID-GCの測定条件　カラム：DB-17(0.53 mmi. d.×15 m)J&W社製，注入口温度：300℃，カラム温度：120→250℃(昇温温度5℃／min.)，キャリアガス：ヘリウム20ml／min. 水素30ml／min.)，空気700ml／min.

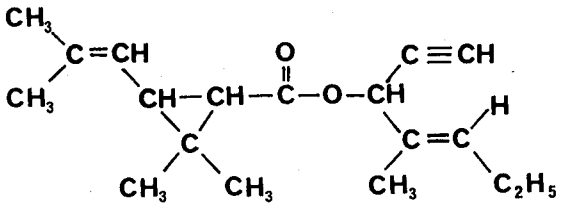


Fig. 1．Chemical Structure of Empenthrin

GC-MSの測定条件　カラム：DB-17(0.32 mmi. d.×30 m)J&W社製，注入口温度：300℃，カラム温度：60→250℃(昇温温度20℃／min.)，キャリアガス：ヘリウム1ml／min. イオン化電圧：70 eV，イオンモード：電子衝撃イオン化法(EI)

結果及び考察

1．使用薬剤の検索　試料に用いた検体について，エムペントリンとその他のピレスロイド系薬剤，共力剤及び忌避剤の検索を行った．含浸紙，防虫シート及び防虫衣類カバーはジクロロメタン中で加熱還流して抽出し，その他はジクロロメタンで希釈してGC及びGC-MSを測定した．その結果，エムペントリン以外にピレスロイド系薬剤はアレスリン，レスメトリン，フタルスリン及びペルメトリン，共力剤はDEPとS-421，忌避剤はディートの使用が認められ，今回はこれらの薬剤についても分析を行った．

2．定量法の検討　確認された8種の薬剤についてGCによる分析法を検討した．我々は前報[5,6]でペルメトリン，S-421及びディートを，カラムにフューズドシリカキャピラリーカラムDB-17を用いて測定し，良好な結果を得た．今回もこの方法に準じてGC測定を行ったところ，Fig. 2に示したようにエムペントリンは保持時間6.5分にシャープなピークが得られ，その他のピークも分離は良好であった．また，ペルメトリンは製品中ではシス，トランスの2つの異性体に分離するので，前報[6]と同様に定量を行った．他のピレスロイド系薬剤は，今回のGC条件では異性体は分離せず，それぞれ1本のピークであった．更に，内部標準物質にはステアリン酸メチルを用いることにした．

3．抽出条件の検討　含浸紙，防虫シート及び防虫衣類カバーについてエムペントリンの抽出を検討した．これらは紙や不織布に薬剤をしみ込ませたもので，前報[6]と同様に有機溶媒中で加熱還流して抽出した．Table 1に含浸紙と防虫シートをそれぞれジクロロメタン，メタノール及びアセトン中で30分間抽出したときの抽出率を示した．溶媒間の優位性及び操作性を考慮し，今回は

ジクロロメタンを用いることにした．また，その他のタイプの防虫剤は，採取した試料をジクロロメタンで希釈してGC測定すると，妨害なく分析することができた．

4．添加回収実験 含浸紙，防虫シート及び防虫衣類カバーについて，エムペントリンを含め8種の薬剤の回収実験をした．その結果，Table 2に示したように回収率93.0−102.0%，変動係数0.8−2.3%と良好であった．

5．市販製品の測定結果 市販の防虫剤の分析結果をTable 3に示した．No. 20，21はエアゾル剤で(W／W)%を，その他は1 g当りの量と共に，( )内に製品1個当りの含有量を示した．No. 1 −12は含浸紙の防虫剤で，このうちNo. 1 − 6は500−900 lの洋服タンス用，No. 7 −12は50 lの引き出しや衣装箱用であり，それぞれ1 − 3個置いて半年間有効であると表示されていた．これらには全てエムペントリンが含まれており，表示に従えば半年間で洋服タンスでは400−1080mg，引き出しや衣装箱では170−222mgのエムペントリンが揮散されることになる．No. 13−15は防虫シートで，引き出しや衣装箱に敷いたり，繊維製品を直接包んで使用すると表示されており，エムペントリン以外にもペルメトリン，アレスリン，レスメトリンが検出された．また，No.16，17は防虫衣類カバーで，これらは前面がビニル，後面は不織布でできており，エムペントリン，フタルスリン，S-421が両面から検出された．No. 18，19は液体，ゲル状の防虫剤で洋服タンスに使用するものであるが，エムペントリンの含有量は650，1000mgと含浸紙と同じであった．No. 20，21のエアゾル剤は衣類に直接噴霧せず，

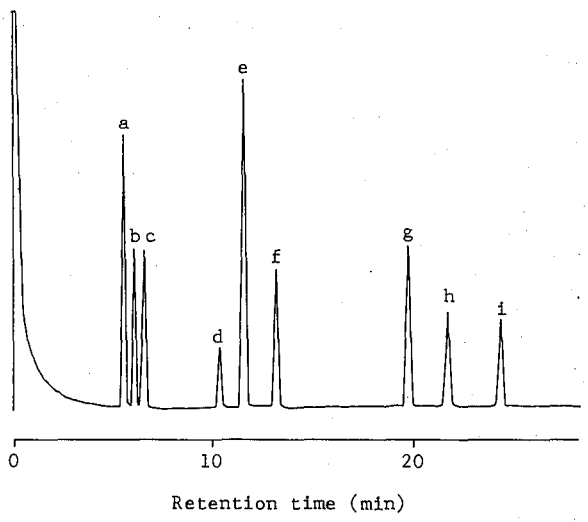


Fig. 2． Gas Chromatogram of Pyrethroids, Synergists and Repellents
a：deet, b：DEP, c：empenthrin, d：S-421, e：methyl stearate (I. S.), f：allethrin, g：resmethrin, h：phthalthrin, i：permethrin

Table 1． Comparison of Extraction Solvent

	Impregnated Paper	Mothproofing Sheet
Dichloromethane	100[1)]	100[1)]
Acetone	101	100
Methanol	91	100

1) The value of dichloromethane is as 100 per cents.

Table 2． Recoveries of Pyrethroids, Synergists and Repellents

Chemical		Added (mg)	Recovery (%)[1)]	C. V. (%)
Empenthrin	A[2)]	10	97.5	2.3
	A	100	95.8	1.7
	B[3)]	5	93.0	0.9
	B	50	96.7	2.2
Allethrin	B	5	99.4	1.0
Resmethrin	B	5	96.1	0.8
Phthalthrin	B	5	95.7	1.3
Permethrin	B	5	101.9	1.4
DEP	A	5	99.7	1.2
S-421	B	5	102.0	1.9
Deet	A	20	100.5	0.8

1) Recovery：n＝5
2) Chemicals were added to filter paper.
3) Chemicals were added to kraft paper.

Table 3. Analytical Results of Pyrethroids, Synergists and Repellents in Mothproofing Agents for Fabrics

Sample	Empenthrin	Pyrethroids, Synergists and Repellents	
1. Impregnated Paper	92[1] (450)[2]		—[3]
2. Impregnated Paper	120 (290)		—
3. Impregnated Paper	42 (370)	DEP	21 (180)
4. Impregnated Paper	120 (590)		—
5. Impregnated Paper	480 (640)		—
6. Impregnated Paper	310 (990)		—
7. Impregnated Paper	400 (170)		—
8. Impregnated Paper	71 (62)		—
9. Impregnated Paper	22 (230)		—
10. Impregnated Paper	38 (87)		—
11. Impregnated Paper	370 (170)	Deet	70 (31)
12. Impregnated Paper	20 (74)		—
13. Mothproofing Sheet	14 (240)		—
14. Mothproofing Sheet	3.5(83)	Permethrin	4.0(95)
15. Mothproofing Sheet	—	Allethrin	2.6(69)
		Resmethrin	11 (290)
16. Mothproofing Cover for Clothes	—	Phthalthrin	A[4] 1.3, B[5] 1.3 (30)
		S-421	A 2.8, B 2.0 (53)
17. Mothproofing Cover for Clthes	A 0.7. B 1.0 (24)	Phthalthrin	A 0.5, B 1.0 (21)
		S-421	A 3.9, B 2.9 (94)
18. Liquid or Gel Product	20 (650)		—
19. Liquid or Gel Product	95 (1000)	Deet	110(1200)
20. Aerosol Product	1.8%[6]		—
21. Aerosol Product	1.8%[6]		—

1) Pyrethroid, synergist and repellent in 1 g of mothproofing agent (mg／g)
2) Pyrethroid, synergist and repellent in one mothproofing agent (mg)
3) —: Not detected (detection limit: deet 0.05mg／g, DEP, empenthrin, allethrin, resmethrin 0.1mg／g, phthalthrin, permethrin 0.2mg／g, S-421 0.5mg／g)
4) A: Part of nonwoven fabric
5) B: Part of vinyl resin
6) Aerosol product (W／W) %

洋服タンスや引き出しに噴霧するよう表示されており，今回はエムペントリンだけが1.8%検出された．このようにエムペントリン含有防虫剤は，パラジクロロベンゼンやナフタリンのように薬剤をそのまま使用するのではなく，紙等に含浸させたり，エアゾル剤にして使用し，臭いもないため，防虫剤を使っているという感覚もない．しかし，実際は1回の使用量が1000mgになるものもあり，安易な使用は考えるべきである．また，エムペントリンは分解性は良いものの，持続して揮散させて用いるものであり，今後各家庭での使用も増えることが予想されるため，室内環境中での残存量の把握も必要であると考える．

ま と め

「ピレスロイド系薬剤使用」と表示された繊維製品用防虫剤について，主成分である「エムペントリン」とその他のピレスロイド系薬剤，共力剤及び忌避剤を調査した．市販製品21検体を調べたところ，ピレスロイド系薬剤はエムペントリン以外にアレスリン，レスメトリン，フタルスリン及びペルメトリン，共力剤はジエチルフタレートとオクタクロロジプロピルエーテル，忌避剤はN, N-ジエチル-*m*-トルアミドが使用されていた．このうちエムペントリンは19検体から検出され，含浸紙の防虫剤は20—480mg／g，防虫シートはそれぞれ3.5, 14mg／g，防虫衣類カバーは0.7, 1.0mg／g，液体，ゲル状の防虫剤は各95, 20mg／g，エアゾル剤は1.8%の含有量で

あった.

文　献

1）森田昌敏，西沢恒幸，三村秀一，大石真之，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，26－1，329－332，1975.
2）花井義道，加藤龍夫，神馬高彦，野村かおる：横浜国大環境研紀要，12，31－39，1985.
3）消費者リポート：第613号，1986. 6. 7.
4）梅津剛吉：家庭用化学薬品の知識，1982，南山堂，東京.
5）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.
6）金子正美，森　謙一郎，中村義昭，観　照雄，渡辺四男也：東京衛研年報，40，101－105，1989.

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.*, 41, 91-94, 1990

酵素抗体法(ELISA)キットによる食肉中の残留抗菌性物質検査法の検討

門間千枝*, 神保勝彦*, 丸山務*

The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Identification of Antimicrobial Drug Residues in Meat

CHIE MONMA*, KATSUHIKO JINBO* and TSUTOMU MARUYAMA*

Keywords：酵素抗体法 enzyme-linked immunosorbent assay，残留抗菌性物質 antimicrobial drug residues，同定 identification，食肉 meat

食肉中に残留する抗菌性物質の同定法としては，抗菌性物質に感受性のある細菌を指標とする微生物学的方法や高速液体クロマトグラフィー等の機器を用いた理化学的方法が従来から採用されている[1)]．

最近，これらの方法とは全く原理の異なる免疫学的方法で抗菌性物質を同定しようとする試みがなされている．この方法は，放射能や酵素で標識された抗菌性物質に対する特異抗体を用いて残留抗菌性物質を同定するものであり，原理的には，微生物学的方法や理化学的方法よりも，特異性，感度，迅速性に優れていると言われている[1)]．しかしながら，各種抗菌性物質に対する特異抗体が得にくいことが大きな理由で実用化が遅れていた．ところが，最近，数種の抗菌性物質を対象に特異抗体を作製し，より取り扱いが容易である酵素を抗体に標識した酵素抗体測定法(enzyme-linked immunosorbent assay，以下 ELISA と略す)による同定法が開発され[2-6)]，おもに血清，尿等を検査対象とした同定用キットが市販されるようになった．

そこで，今回，著者らは，市販 ELISA キットが食肉等の残留抗菌性物質の検出，同定に日常検査として応用できるかどうかを検討した．

実験材料および方法

1．抗菌性物質標準品

実験に供した抗菌性物質は，サルファ剤はスルファジメトキシン(SDM)，スルファメサジン(SDD)，スルファモノメトキシン(SMM)，スルファキノキサリン(SQ)，スルファメラジン(SMR)の5種類，アミノグリコシド系抗生物質はゲンタマイシン(GM)，カナマイシン(KM)，フラジオマイシン(FM)，ジヒドロストレプトマイシン(DSM)の4種類，マクロライド系抗生物質はタイロシン(TS)，エリスロマイシン(EM)，キタサマイシン(KT)，スピラマイシン(SP)，ジョサマイシン(JM)の5種類，その他にクロラムフェニコール(CP)とチアンフェニコール(TP)の合計16種類である．いずれも製薬会社から分与された純品である．

2．ELISA キット

実験に供試した市販 ELISA キットは，ENVIRONMENTAL DIAGNOSTICS 社の EZ スクリーン(SDM, SDD, TS, CP, GM の5種類)である．

3．抗菌性物質標準溶液の調製

供試抗菌性物質を MIC 法[7)]に従って調製した．

4．食肉からの試験溶液の調製

食肉からの試験溶液の調製は，著者らが開発した簡易系統別検査法[8)]，厚生省が通知した食肉の抗菌性物質簡易検査法の抽出法[9)](以下，厚生省法と略す)で行った．

5．ELISA キットの試験方法

試験方法は ELISA キットの使用説明書に従った．すなわち，抗菌性物質標準溶液，または，食肉から調製した試験溶液を検査用カードのサンプルサイトに，同様に，陰性コントロール液をコントロールサイトに，キット付属の試料用ピペットを用いてそれぞれ1滴ずつ滴下した．それらが完全に吸収されてから，両方のサイトに，酵素液，陰性コントロール液の順にそれぞれ1滴ずつ滴下した．両方のサイトの回りにはみ出した液をティッシュ

*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 Reseach Laboratory of Pubulic Health
24－1，Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

ペーパー等で軽く拭き取った後，両サイトに基質液をそれぞれ2滴ずつ加え，5分後に，判定を行った．

6．ELISAキット判定法

検査用カードのコントロールサイト及びサンプルサイトの両方が青紫色を呈した場合は陰性と判定し，コントロールサイトが青紫色を呈し，サンプルサイトが発色しない場合は陽性と判定した．

実験結果

1．ELISAキットの交差反応

ELISAキットが特異的反応を示すかどうか各種抗菌性物質標準溶液を用いて交差反応を調べた．その結果を表1に示した．SDMおよびSDDの2種類のサルファ剤のキットは，供試した他の4種類のサルファ剤および抗菌性物質との交差反応はみられなかった．

TSキットは，KT，SP，JMに対しては発色が不鮮明なことから判定が困難であった．この場合は，反応時間を使用説明書の2倍～3倍長くすることによって陽性，陰性の明瞭な判定が可能であった．

CP，GMの2種類のキットは供試した他の15種類の抗菌性物質との交差反応はみられず，特異性が確認できた．

2．ELISAキットの検出感度

抗菌性物質標準溶液および食肉からの抽出液に対するELISAキットの検出感度を調べた．その結果を表2に示した．

a）抗菌性物質標準溶液に対するELISAキットの検出感度

ELISAキットの検出感度を抗菌性物質標準溶液を用いて調べた．SDMとSDDは共に0.01 μg／ml，TSとGMは共に0.05 μg／ml，CPは0.005 μg／mlであった．

b）食肉からの抽出液に対するELISAキットの検出感度

抗菌性物質を添加した食肉を対象にして，簡易系統別検査法と厚生省法に示された方法によって試験溶液を調製し，ELISAキットの検出感度を調べた．簡易系統別検査法による試験溶液ではELISAキットの検出感度は，SDMとSDDは共に0.1 μg／g，TSは0.5 μg／g，CPとGMは共に1.0 μg／gであった．

表1．各キットに対する抗菌性物質との交差反応

ELISAキット	抗菌性物質																
	SDM[a]	SDD[a]	SMM[a]	SQ[a]	SMR[a]	CP[a]	TP[a]	GM[b]	KM[b]	DSM[b]	FM[b]	TS[b]	EM[b]	KT[b]	SP[b]	JM[b]	対照
SDM	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
SDD	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
TS	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	±	±	±	－
CP	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
GM	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	－

[a]：0.1 μg／ml 添加　[b]：1.0 μg／ml 添加　＋：陽性　－：陰性　±：偽陽性

表2．ELISAキットの検出感度

ELISAキット	検出感度		
	標準溶液[a]	食肉抽出法[b]	
		簡易系統別検査法	厚生省法
SDM	0.01	0.1	>1,000
SDD	0.01	0.1	>1,000
TS	0.05	0.5	5
CP	0.005	1.0	50
GM	0.05	1.0	25

[a]：μg／ml　[b]：μg／g

表3．検出されたサルファ剤の種類の同定

検　体	簡易系統別検査法サルファ剤検出数	同定法	
		ELISA キット	HPLC
牛　筋肉	1	SDM	SDM
豚　筋肉	2	SDD	SDD
		SDD	SDD
鶏　筋肉	1	SDM	SDM

これに対して，厚生省法による試験溶液ではELISAキットの検出感度は，SDMとSDDは共に1,000 μg／g を添加した場合でも検出されず，TSは5 μg／g，CPは50 μg／g，GMは25 μg／g であった．

3．市販食肉中の残留抗菌性物質検査への応用

1988年1月から1989年12月に都内で採取した市販食肉181検体を対象にして残留抗菌性物質の調査を行った．その結果，簡易系統別検査法によって，牛筋肉1検体，豚筋肉2検体，鶏筋肉1検体，合計4検体に，サルファ剤の残留が推定された．

これらの4検体に対し，簡易系統別検査法に用いた抽出液を試験溶液として，ELISA キットを用いてサルファ剤の種類の同定を行った．その結果を表3に示した．牛筋肉1検体と鶏筋肉1検体はSDM，豚筋肉2検体はSDDと同定された．なお，これらの検体については，高速液体クロマトグラフィー(HPLC)[10-12]で，それぞれ，SDM，SDDと確認された．

考　察

今回，実験に供したELISA キットは，抗菌性物質に対する特異抗体を固定させた検査用カードの上で，酵素抗体反応を行わせるものである．この方法は培養が必要な微生物学的方法や，試験溶液の再抽出と精製，機器やカラムの調製が必要な理化学的方法と比べて同定に要する時間や操作の簡便性，特異性において非常に優れていると考えられる．

ELISA の原理の基礎をなしているのは，酵素で標識された抗体とそれに対応する抗原との間に起こる極めて特異的な抗原抗体反応である．しかし，時に，特異抗体を作製するための抗原の調製法や免疫に用いる動物種，得られた抗体の精製法等の原因で交差反応を示すことがある[13]．そこで，ELISA キットの交差反応を，主要な抗菌性物質を対象にして調べた．特に，SDD キットについては，SDDとメチル基の数が1つ違うだけで，構造が類似しているSMRとの交差反応が懸念された．Fleeker ら[3]および Singh ら[5]は，彼らの作製した抗SDD抗体はそれぞれ約30%，12%の割合でSMRとの交差反応がみられたことを報告している．しかし，本SDDキットについて検討した成績ではSMRをはじめ主要な抗菌性物質との交差反応はみられなかった．同様に，SDM，CP，GMのそれぞれのキットに対しても検討したが，主要な抗菌性物質との交差反応はみられなかった．以上のことから，これらのキットの特異性は高いといえる．しかし，TSキットは，KT，SP，JMに対して反応性が弱く，製品のロットによりバラツキが認められた．

ELISA の検出感度は，微生物学的方法及び理化学的方法に比べて高いといわれている[1,13]．著者らが行った成績においても，前2者[14]よりも，検出感度が10倍から500倍高かった．

次に，おもに血清や尿の抗菌性物質の検査を対象として開発された本キットを食肉の残留抗菌性物質の検出に応用するために，食肉からの抽出方法を検討した．抽出方法としては簡易系統別検査法と厚生省法について行った．抗菌性物質を添加した食肉を対象とした場合のELISA キットの検出感度は抗菌性物質標準溶液そのものを対象とした場合と比べ低くなることが示され，抗菌性物質の抽出法が検出感度に著しく影響することがわかった．すなわち，簡易系統別検査法で試験溶液を調製した場合のELISA キットの検出感度は，抗菌性物質標準溶液と比べて，200分の1から10分の1であった．しかし，これらの値は，厚生省が通知した「畜水産食品中の残留物質検査法」の値[15,16]とほぼ同じであり，日常検査に十分適用が可能であると考える．これに対して，厚生省法を用いて試験溶液を調製した場合のELISA キットの検出感度は，簡易系統別検査法で試験溶液を調製した場合と比べて，100,000分の1から20分の1という低い値しか得られなかった．このことから，精製，濃縮操作がなく試料からの抗菌性物質の抽出が悪い厚生省法で調製した試験溶液をELISA キットに用いることはできないこ

とがわかった.

これらのことから，簡易系統別検査法を用いて試験溶液の調製を行えば，本ELISAキットは食肉の残留抗菌性物質の検査にも十分応用可能であることがわかった．実際に，市販食肉の残留抗菌性物質調査に本ELISAキットを応用した．その結果，簡易系統別検査法でサルファ剤の残留が推定され，本キットによりSDM，SDDと同定された検体は，HPLCでもSDM，SDDと確認された．以上のことから，このELISAキットは残留抗菌性物質の日常検査に十分用いることができると考える．しかしながら，現在市販されているELISAキットはSDM，SDD，TS，CP，GMの5種類であるため，応用範囲が限定されているのが欠点である．今後，テトラサイクリン系抗生物質のような我が国の畜水産領域で汎用されている抗菌性物質に対するキットが開発されるならば，さらに実用価値が高いものとなるであろう．

結　論

食肉中に残留する抗菌性物質を同定するために，ELISAの原理を応用して開発された残留薬剤同定用の市販キットを用い，日常検査に応用できるか否かを検討し，以下の結果を得た．

1．ELISAキットに対する交差反応を主要な抗菌性物質を対象にして調べた．SDM，SDD，CP，GMのそれぞれのキットに対する交差反応はみられなかった．TSキットは，KT，SP，JMに対して，陰性，陽性が不鮮明で，判定が困難であった．しかし，この場合は，反応時間を使用説明書の2～3倍長くすることにより，明瞭な判定が可能であった．

2．抗菌性物質標準溶液に対するELISAキットの検出感度は，SDMとSDDは共に0.01 μg／ml，TSとGMは共に0.05 μg／ml，CPは0.005 μg／mlであった．

3．抗菌性物質を添加した食肉を対象としたELISAキットの検出感度は，試験溶液の調製を簡易系統別検査法で行った場合は，SDMとSDDは共に0.1 μg／g，TSは0.5 μg／g，CPとGMは共に1.0 μg／gであり，厚生省法で行った場合は，SDMとSDDは共に1,000 μg／gを添加した場合でも検出できなかった．TSは5 μg／g，CPは50 μg／g，GMは25 μg／gであった．

4．簡易系統別検査法で市販食肉から検出されたサルファ剤4検体について，ELISAキットを用いてサルファ剤の種類の同定を行った結果，SDMが2検体からSDDが2検体から同定された．

5．本ELISAキットは，試験溶液の調製を簡易系統別検査法で行えば，残留抗菌性物質の同定に十分使用可能であった．

（本研究の概要は，第59回　日本食品衛生学会 1990年5月で発表した.）

文　献

1）㈶畜産生物科学安全研究所編：動物用医薬品・飼料添加物の畜・水産物への残留とその分析法，130-131，183-184，1985，近代出版，東京.

2）Campbell, C.S., Mageau, R.P., Schwab, B. and Johnston, R.W.：*Antimicrob. Agents Chemother.*, 25, 205-211, 1984.

3）Fleeker, J.R. and Lovett, L*J.*：*J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68, 172-174, 1985.

4）Dixon—Holland, D. E. and Katz, S. E.：*J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 1137-1140, 1988.

5）Singh, P., Ram, B. P. and Sharkov, N.：*J. Agric. Food Chem.*, 37, 109-114, 1989.

6）藤田政之，小林真紀，河井明夫，島原恭子，伊佐山康郎：日本獣医学会第109回学術講演会講演要旨集，183-184，1989.

7）三橋進ら：*CHEMOTHERAPY*, 29, 76-79, 1981.

8）神保勝彦，門間千枝，丸山務，松本昌雄：食衛誌，投稿中.

9）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.

10）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.

11）堀井昭三，神保勝彦，橋本常生，井草京子，丸山務：東京衛研年報，40，137-140，1989.

12）岸原聡，下川智賀子，泉広栄：石川衛公研年報，20，198-204，1983.

13）石川栄治，河合忠，宮井潔編：酵素免疫測定法(第2版)，1-16，1982，医学書院，東京.

14）桐谷礼子，神保勝彦，松本昌雄：東京衛研年報，38，177-181，1987.

15）厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜水産食品中の残留物質検査法　第1集の3，1981.

16）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3，1979.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 95-100, 1990

国産チーズの衛生学的品質評価

竹葉和江*, 梅木富士郎*, 村上文子*, 仲真晶子*
井草京子*, 丸山務*, 松本昌雄*

Estimation of Chemical and Microbiological Quality of Domestic Cheese

KAZUE TAKEBA*, FUJIO UMEKI*, FUMIKO MURAKAMI*,
AKIKO NAKAMA*, KYOKO IGUSA*, TSUTOMU MARUYAMA*
and MASAO MATSUMOTO*

Keywords：国産チーズ domestic cheese, pH, 水分 water content, 塩分 concentration of sodium chloride, 揮発性塩基窒素 volatile basic nitrogen (VBN), チラミン tyramine, 保存料 preservatives, 成分規格 official standards, 品質評価 quality assurance, 細菌汚染 bacterial contamination

緒　論

食生活における嗜好の多様化及び農産物の自由化を背景に，わが国のチーズの総消費量は年々増加を続け，この10年間で約2倍も伸び，現在年間15.4万トンとなっている[1]．特にナチュラルチーズの増加が著しく，昭和63年度にはナチュラルチーズの消費量が，プロセスチーズを初めて上回るようになった．

一方，わが国では，農林水産省が余剰生乳の需要拡大のためにナチュラルチーズの生産を助成した．その効果もあって，現在全国の約60ヶ所に大小の工場があり，年間約2.6万トン生産している．

わが国の乳及び乳製品の衛生学的品質評価は，主として「乳等省令」による成分規格試験検査に基づいておこなわれている．この省令によると，プロセスチーズにのみ乳固形分及び大腸菌群の成分規格があるが，ナチュラルチーズについては何の成分規格も定められていないのが現状である．

そこで今回，主として国産ナチュラルチーズの食品衛生上の品質を把握することを目的として理化学的及び細菌学的試験検査を行った．

実験方法

1．試料

1985－1988年の間に国内で生産されたナチュラルチーズ142検体及びプロセスチーズ46検体，合計188検体である．ただし，検査項目によってはこれらの一部を検査対象とした．

2．試験検査項目

理化学的項目はpH，水分，塩分，揮発性塩基窒素(VBN)，チラミン，保存料，細菌学的項目は大腸菌群，大腸菌と食中毒菌としてサルモネラ，黄色ブドウ球菌，セレウス菌及びリステリア菌である．

3．試験方法

3－1．理化学的試験方法

pH，水分，揮発性塩基窒素及び保存料(ソルビン酸，デヒドロ酢酸，プロピオン酸，安息香酸)は衛生試験法注解[2]及び乳製品試験法注解[3]に準拠した．塩分はIDFの示した方法[4]に準拠した．チラミンは著者らが開発した方法[5]を使用した．

3－2．細菌学的試験方法

大腸菌群，大腸菌，サルモネラ及び黄色ブドウ球菌の試験は食品衛生検査指針(1)[6]に準拠した．セレウス菌はNGKG培地を用いる方法[7]，リステリア菌は厚生省が1988年2月2日通知した方法[8]及びIDF暫定法[9]に準拠した．

結　果

1．pH，塩分及びVBN

チーズ188検体のpH，塩分及びVBNの測定結果をTable 1，2及び3に示した．ナチュラルチーズのうち

*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 Reseach Laboratory of public Health
24－1，Hyakunin-cho 3 Chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

Table 1. pH of Domestic Cheese

Cheese	Number of sample	pH	
		Range	Average±SD
Natural			
Cottage	6	4.9-5.0	4.9±0.04
Cream	19	4.8-5.3	4.9±0.20
Camembert	52	5.7-7.9	6.8±0.74
Brie	1		7.0
Blue	1		6.6
Gouda	45	5.1-5.9	5.4±0.23
Edam	6	5.5-5.7	5.6±0.06
Cheddar	7	5.3-5.8	5.4±0.18
Parmesan	5	5.2-5.3	5.3±0.05
Processed	46	5.5-6.2	5.9±0.16

Table 2. Concentration of Sodium Chloride in Domestic Cheese

Cheese	Number of sample	Sodium chloride (%)	
		Range	Average±SD
Natural			
Cottage	6	1.2-1.4	1.3±0.06
Cream	19	0.5-0.9	0.7±0.11
Camembert	52	0.7-2.0	1.4±0.34
Brie	1		0.9
Blue	1		2.6
Gouda	45	0.9-2.7	1.6±0.56
Edam	6	1.2-1.4	1.3±0.06
Cheddar	7	1.4-1.8	1.6±0.13
Parmesan	5	3.1-3.2	3.2±0.04
Processed	46	0.9-1.9	1.6±0.21

Table 3. Volatile Basic Nitrogen (VBN) of Domestic Cheese

Cheese	Number of sample	VBN (mg/100 g)	
		Range	Average±SD
Natural			
Cottage	6	11- 20	13± 3
Cream	19	7- 34	15± 6
Camembert	52	22-686	220±183
Brie	1		151
Blue	1		350
Gouda	45	3- 64	27± 15
Edam	6	20- 42	24± 8
Cheddar	7	10- 80	26± 23
Parmesan	5	31- 35	33± 1
Processed	46	6- 70	21± 11

カッテージやクリームを含めた乳酸菌発酵型のチーズのpHは，4.9～5.9の範囲でやや酸性を示した．カマンベール，ブリー及びブルーのようなカビ発酵型のチーズのpHは5.7～7.9の範囲で，熟成が進んだものほど強いアルカリ性を示した．プロセスチーズのpHは平均値で5.9とやや酸性であった．

チーズの塩分は，最も低いのがクリームチーズの0.7%，最高はパルメサンの3.2%で全体の平均値は1.4%であった．

VBN値はカッテージ及びクリームのように非熟成型のチーズや，ゴーダ，エダム及びチェダーのように乳酸菌熟成型のチーズでは低く，カマンベール，ブリー及びブルーのようにカビ熟成型チーズでは非常に高くなるものがあった．同種チーズでもVBN値はかなりの変動幅がみられた．

2．水分

水分はナチュラルチーズ33検体のみについて行い，その結果をTable 4に示した．カッテージ及びクリームチーズの水分は50%以上で，カマンベール，ブリー，ブルー，ゴーダ及びエダムの各チーズの水分は40－50%の範囲にあり，チェダーチーズは35%であった．

3．チラミン

チーズ188検体のチラミンの測定結果をTable 5に示した．非熟成型のカッテージ及びクリームチーズからチラミンは検出されなかった．カマンベールチーズで最高416.7 μg／ml含有しているものもあったが，全体の平均値は39.2 μg／mlであった．プロセスチーズは検出率100%で，平均値は16.2 μg／mlであった．

4．保存料

保存料についてはナチュラルチーズ142 検体中42，プロセスチーズ46検体中17検体について測定し，その結果

Table 4．Water Content of Domestic Cheese

Cheese	Number of sample	Water content (%)	
		Range	Average±SD
Natural			
Cottage	1		68.1
Cream	4	49.1-57.6	53.7±3.8
Camembert	13	41.5-53.7	48.6±3.5
Brie	1		44.7
Blue	1		42.9
Gouda	10	36.1-43.5	40.9±2.2
Edam	1		42.0
Cheddar	2	34.7-35.8	35.3

Table 5．Tyramine Content of Domestic Cheese

Cheese	Number of sample	Tyramine content (μg／g)	
		Range	Average±SD
Natural			
Cottage	6		ND*
Cream	19		ND
Camembert	52	ND-416.7	34.1±75.9
Brie	1		97.1
Blue	1		3.7
Gouda	45	ND-346.6	58.8±91.4
Edam	6	ND- 4.4	2.4± 0.9
Cheddar	7	ND-126.4	61.2±36.6
Parmesan	5	0.3- 0.5	0.4± 0.2
Processed	46	0.4- 80.6	16.2±21.0

*ND：Not detectable

Table 6. Sorbic Acid, Dehydroacetic Acid and Benzoic Acid Content of Domestic Cheese

Cheese	Number of sample	Sorbic acid (g/kg)		Dehydroacetic acid (g/kg)		Benzoic acid (g/kg)	
		Range	Average±SD	Range	Average±SD	Range	Average±SD
Natural							
Cottage	6		0.89	0.10-0.16	0.13±0.02	0.002-0.018	0.009±0.006
Cream	9	1.1-1.6	1.32±0.20		ND	0.010-0.022	0.013±0.004
Camembert	13		ND*		ND	ND -0.009	0.004±0.003
Brie	1		ND		ND		0.006
Blue	1		ND		ND		ND
Gouda	9		ND		ND	0.002-0.010	0.004±0.002
Edam	1		ND		ND		0.005
Cheddar	2		ND		ND	0.002-0.005	0.004
Processed	17		ND		ND	0.004-0.013	0.008±0.003

*ND : not detectable

Table 7. Bacteria of Domestic Cheese

Cheese	Number of sample	Number of positive					
		Coliforms	*E.coli*	*Salmonella*	*S.aureus*	*B.cereus*	*Listeria*
Natural							
Cottage	15	0	0	0	0	1	0
Cream	18	1	0	0	0	2	0
Camembert	37	23	4	0	0	3	0
Brie	2	2	1	0	0	0	0
Blue	4	0	0	0	0	0	0
Gouda	29	18	0	0	0	4	0
Edam	6	5	0	0	0	2	0
Cheddar	5	2	0	0	0	1	0
Parmesan	2	1	0	0	0	0	0
Processed	25	0	0	0	0	0	0

をTable 6に示した．カッテージチーズ6検体中1例にソルビン酸0.89 g／kg，4例にデヒドロ酢酸0.10－0.16 g／kgの範囲で検出し，クリームチーズ9検体中4例にソルビン酸1.1－1.6 g／kgの範囲で検出した．プロピオン酸はいずれからも検出されなかった．

安息香酸はカマンベール1例，ブルー1例以外すべてのチーズに検出され，最高値はクリームチーズの0.022 g／kgであった．

5．細菌学的検査成績

細菌学的検査はナチュラルチーズ142検体中118及びプロセスチーズ46検体中25合計143検体について行い，その結果をTable 7に示した．大腸菌群は7種類のナチュラルチーズの52例から検出した．主なものはカマンベールが23例，ゴーダが18例及びエダムが5例であった．プロセスチーズはすべて陰性であった．大腸菌は5例から検出し，カマンベールが4例及びブリーが1例であった．

セレウス菌はナチュラルチーズ118検体中13例から検出した．カッテージが1例，クリームが2例，カマンベールが3例，ゴーダが4例，エダムが2例，チェダーが1例であった．

今回の調査では食中毒菌であるサルモネラ，黄色ブドウ球菌及びリステリア菌はいずれのチーズからも検出さ

れなかった.

考　察

1．理化学的検査

チーズのpHが5.5以上になると，スタータ及び熟成に使用された細菌以外の腐敗菌の増殖が活発になると言われる．今回の結果では，大腸菌はpHが弱酸性から中性域の白カビ発酵型のカマンベールとブリーチーズから検出された．そのため，これらのチーズでは特に製造行程での衛生的な注意が必要であることを示している．

チーズ製造工程での加塩は，塩味をつけて風味をよくするだけではなく，異常発酵の抑制や有害菌の発育を阻止する防腐効果，カードの収縮硬化を促進し熟成のコントロール，最終製品の水分調整などの目的のために行われている．このため輸入チーズの一部にはその製法からかなり高塩分の製品も見られるが，国産品では国民の嗜好あるいは社会的要求からナチュラル，プロセスチーズともに低塩分であった．

チーズの成熟度を判定する方法については，最近IDFにおいてもいくつか提案されている[10]．チーズのVBN値に関してはこれまで報告されたものはほとんどないが，各種チーズのVBN値はチーズの熟成度の指数となるのではないかと考えられる．今後データの蓄積も必要であるが，極端に未熟なものや熟成の過ぎたものあるいは異常発酵したものの判定に応用できるのではないかと考えられる．

チラミンはカゼイン中のチロシンが．チーズ成熟中に生成されるアミンで多量に摂取すると血圧上昇等の生理作用を呈することが知られている．健常者では普通チラミンは体内のモノアミン酸化酵素(MAO)により分解されるが，抗結核剤や抗鬱剤の中にはMAOの作用を阻害するものがある．これらの薬剤とチラミンを同時に摂取すると，著しい血圧上昇をもたらす結果，ヨーロッパ諸国ではその事故例が報告されている[11-12]．

今回分析した国産チーズ中のチラミン含有量はいずれも外国チーズ[13-18]に比べ低かった．また，わが国における一人当たり消費量も欧米人の1／10～1／20であることなどから現在のところ問題となることはないと考えられる．

チーズには保存料としてソルビン酸，デヒドロ酢酸及びプロピオン酸の使用がそれぞれ3 g／kg，0.5 g／kg及び3 g／kg認められている．今回の分析ではソルビン酸及びデヒドロ酢酸がカッテージ及びクリームチーズに使用されていた．しかしながら，いずれも使用基準の範囲内ではあった．この種のチーズは水分が高くカビ，酵母等の問題[19]が生じやすいために保存料として使用したものであると考えられる．

安息香酸はわが国では，キャビア他4種類の食品を対象に保存料として使用が認められているが，乳及び乳製品への使用は認められていない．しかし，安息香酸は天然物として広く植物界に分布しており，また乳及び乳製品にも自然由来の安息香酸が微量存在している[20-21]．外国産チーズについてはナチュラルチーズの安息香酸の自然含有量は100－400mg／kgである[22-23]．しかしこれまで国産チーズの安息香酸含有量は不明であった．今回の分析結果．国産チーズの安息香酸は最高値でも22mg／kgであり，輸入チーズに比べ低く，現在のところ食品衛生上問題となるものはないと考えられる．

2．細菌学的検査

今回の細菌学的検査でプロセスチーズの大腸菌群はすべて陰性で，規格違反のものはなかった．しかし，ナチュラルチーズに関しては，チーズの種類に関係なく大腸菌群が検出された．さらに，カマンベールとブルーチーズの中には大腸菌が検出されたものも認められた．国産ナチュラルチーズの製造には，低温殺菌処理された原料乳を使用している．そのため，これらチーズへの大腸菌群及び大腸菌の汚染は製造行程で二次的に汚染し，それらの菌がチーズ内部に取り込まれ生存していたものと思われる．したがって，これらのチーズの製造には衛生的配慮が必要である．

食中毒起因菌である黄色ブドウ球菌及びサレモネラはすべて陰性であったが，セレウス菌の陽性率は約10％であった．これは，セレウス菌が芽胞形成菌で熱低抗性であり，また他の食中毒菌に比較して自然環境中に広く分布していることに原因があるものと思われる．

最近，欧米でナチュラルチーズによる集団感染症例が報告されているリステリア菌は全く検出されなかった．しかし，リステリア菌は，著者らが[24]輸入ナチュラルチーズを調査したところ6.1％から検出しており，欧米でも主としてソフトタイプのチーズからの検出例が報告されているので，今後わが国で製造されるナチュラルチーズについてもリステリア菌の監視が必要と思われる．

ま と め

国産チーズを対象にpH，水分，塩分，揮発性塩基窒素，水分，チラミン，保存料，大腸菌群，大腸菌，サルモネラ，黄色ブドウ球菌，セレウス菌及びリステリア菌の各項目について試験検査を行った．

理化学的項目では，特に食品衛生上問題となるものはなかった．細菌学的項目では大腸菌群が143検体中52例

に検出された．このうち大腸菌は143検体中5例に検出された．セレウス菌は143検体中13例に検出された．

サルモネラ，黄色ブドウ球菌及びリステリア菌はいずれのチーズからも検出されなかった．

文　献

1）農林水産省畜産局牛乳乳製品課：チーズの需給動向，1988.

2）日本薬学会編：衛生試験法注解1980版，昭和55年，金原出版，東京.

3）日本薬学会編：乳製品試験法注解，昭和59年，金原出版，東京.

4）日本国際酪農連盟：国際連合FAO／WHO乳及び乳製品基本法並びに関連規格・検査法.

5）竹葉和江，村上文子，松本昌雄，中沢裕之：食衛誌，31，137-143，1990.

6）厚生省環境衛生局監修：食品衛生検査指針(1)，検査法別，1973，日本食品衛生協会，東京.

7）神保勝彦，松本昌雄，村上一：東京衛生年報，29-1，158-162，1978.

8）厚生省乳肉衛生課：食品衛生研究，38，115-122，1988.

9）International Dairy Federation：Provisional IDF recommended method milk and milk products detection of Listeria，1988.

10）日本国際酪農連盟：第73回国際酪農連盟年次会議報告，資料第64号，1990.

11）Asatoor, A, M., Levi, A. J. and Miline, M. D.：Lancet, 2, 733-734, 1963.

12）Blackwell, B.：Lancet, 2, 849-851, 1963.

13）Yamamoto, S., Wakabayashi, S. and Makita, M.：*J. Agric. Food Chem.*, 28, 790-793, 1980.

14）Lehtanen, P.：*Lebensm. Unters. Forsch.*, 183, 177-181, 1986.

15）Sen, N. P.：*J. Food Sci.*, 34, 22-26, 1969.

16）Marley, E. and Blackwell, B.：*Adv. Pharmacol. Chemother.*, 8, 185-239, 1970.

17）Spettoli, P.：*Industrie Agravie*, 9, 1-5, 1971.

18）Yen, G, C. and Chandra, T.：*J. Sci. Food Agric.*, 44, 273-280, 1988.

19）内藤毅，鈴木敬彦：*New Food Industry*, 30, 47-59, 1988.

20）西本孝男，上田雅彦，田植栄：食衛誌，10，410-413，1969.

21）栗崎純一，笹子謙治，津郷友吉，山内邦夫：食衛誌，14，25－30，1973.

22）日本国際酪農連盟：昭和55年度牛乳・乳製品の規格成分分析検討事業報告書，資料第42号，1980.

23）慶田雅洋：食品衛生研究，31，291-300，1981.

24）丸山務：感染症，20，36-40，1990.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 101-107, 1990

イオン対高速液体クロマトグラフィーによる食品中のタール色素の一斉分析法

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*

Simultaneous Determination of Color Additives by Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography

FUSAKO ISHIKAWA*, KAZUO SAITO*,
MITSUO NAKAZATO*, KENJI FUJINUMA*,
TAKAKO MORIYASU* and TAICHIRO NISHIMA*

Summary

A method for the simultaneous determination of 17 color additives by ion-pair high performance liquid chromatography(HPLC) using a gradient elution system was established.

A sample was dissolved in water and adjusted to a pH 3 ~ 4 with acetic acid. The solution was passed through a Sep-Pak NH_2 cartridge column. The column was washed with 20ml of water and 10ml of methanol. Color additives were eluted with 50% ethanol containing 1 % ammonia, and the eluate was neutralized with acetic acid.

The colors in eluate were determined by HPLC. Operating conditions of HPLC were as follows:

The column was a Cosmosil 5 C18-AR and the mobile phase of the gradient elution system was consisted of acetonitrile and 0.015M tetrabutylammoniumhydroxide solution. Detection wavelengths were 550nm for determination of blue and red colors and 450nm for determination of yellow colors. Recoveries of color additives from a soft drink and a candy added at 20 μg/g were more than 95% and 92%, respec-tively. The detection limits of color additives were 0.1~0.5 μg/g of sample.

This method enabled determination of color additives in soft drinks and candies without interference.

Keywords: color additives, high performance liquid chromatography, ion pair chromatography, gradient elution, Sep-Pak NH_2 cartridge, simultaneous determination, soft drinks, candies

緒　言

近年，輸入食品の増加に伴い，食品の安全性への関心が消費者の間に高まってきている．特に食品添加物の使用の有無についての関心は高く，なかでも食品に添加される色素はそれぞれの国で使用基準が異なっているため，わが国でその使用が認められていない許可外色素が検出される事例が多くなっている．そこでわが国での許可色素に加え，米国やEC諸国などの許可色素を同時に一斉分析する方法が必要となってきた．

タール色素の分析については，定性試験としてペーパークロマトグラフィー(PC)及び薄層クロマトグラフィー(TLC)[1,2]があるが，これらの方法は共存物質の影響を受け易く判定困難な場合がある．最近では高速液体クロマトグラフ(HPLC)[3-10]による方法が数多く報告されており，それらは性質の異なる色素を数種類の移動相を用いて別々に分析する方法[3,4]，移動相の組成を変化させてグラジェント溶離を行い一斉分析する方法[5-9]などである．しかし，これらの方法のなかには紫外部で

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

検出しているため，試料の分析において色素のピーク以外にも多くの夾雑物のピークが出現し，判定が困難な例もある．また，クリーンアップが煩雑であったり十分でないものもあり，実際に食品を分析する際に適していないものもある．

そこで，著者らは色素の検出に選択性の高い可視部検出器を用い，許可色素11種と輸入食品から検出される頻度の高い許可外色素6種の計17種のタール色素について，イオンペアーモードを用いたグラジェントによるHPLCの分離条件及び前処理法として簡易なクリーンアップ法であるカートリッジカラムを導入して検討したので，その結果を報告する．

実験方法

1．試料

都内の小売店で販売されていた清涼飲料水6検体，キャンデー4検体を試料とした．

2．試薬

色素標準液：

許可色素：食用赤色2号(R2)，同3号(R3)，同102号(R102)，同104号(R104)，同105号(R105)，同106号(R106)，食用黄色4号(Y4)，同5号(Y5)，食用青色1号(B1)，同2号(B2)，食用緑色3号(G3)の11種は国立衛生試験所標準品を用い，各々50mgを水50mlに溶解した．

不許可色素：パテントブルーV(PBV)，アゾルビン(AZO)，アルラレッドAC(ALR)，ポンソー6R(P6R)は東京化成㈱製，グリーンS(GS)はシグマ社製，ファーストレッドE(FRE)は国立衛生試験所から分与されたものを使用し，各々50mgを水50mlに溶解した．

前処理用カラム：ウォーターズ社製セップパックNH_2カートリッジカラム

その他の試薬は和光純薬工業㈱の液体クロマトグラフ用あるいは試薬特級品を用いた．

3．装置

高速液体クロマトグラフ：ポンプは日本分光㈱製のTRI ROTAR-Ⅵ，検出器は同社製UVIDEC-100-Ⅵと島津製作所製のSPD-6AVを接続し，データー処理装置は同社製C-R3A，オートサンプラーは日本分光㈱製のAS-L350を用いた．

4．HPLCの測定条件

カラム：Cosmosil 5C 18-AR Packed Column. 4.6mm i.d. ×250mm(ナカライテスク㈱製)

移動相：A液はリン酸でpH6.8に調整した0.015M水酸化テトラブチルアンモニウム(TBA)溶液とアセトニトリルの(7：3)混液，B液はアセトニトリルのみとし，B液0％から40％のグラジェント溶離(Fig. 3)を行った．

検出波長：色素の分離条件の検討には254nm，定量法の検討及び試料の分析には赤系，青系色素は550nm，黄系色素は450nmでモニターした．

流速：1ml／min，感度：0.16AUFS，注入量：10μl

5．試験溶液の調製

清涼飲料水は10gに2倍量の水を加え，10％酢酸でpH3～4に調整した．濃縮ジュースは10gに水を加えて50mlとし，その10mlに2倍量の水を加えた後同様にpHを調整した．キャンデーは2～10gに5倍量の水を加え，水浴上で温めて溶解し同様にpHを調整した．これらをあらかじめ水5mlで洗浄したセップパックNH_2に負荷し色素を吸着させ，水20ml次いでメタノール10mlで洗浄した後，1％アンモニア含有50％エタノール8mlで溶出した．直ちに溶出液に20％酢酸約1mlを加えて中和して水で10mlにメスアップし，これをHPLC用試験溶液とした．

6．検量線の作成

色素標準液をそれぞれ5μg／ml，10μg／ml，25μg／ml，50μg／mlに希釈し，各10μlをHPLCに注入してピーク面積法により検量線を作成した．

実験結果及び考察

1．HPLCの測定条件の検討

性質の異なるタール色素を逆相カラムで同時に分離定量するためには，イオン抑制のみによる分析ではキサンテン系色素のうちR3，R104，R105などは強く保持され溶出されにくく，またイオンペアモードによる分析でもこれらは強く保持され分析に長時間を要した．そこで17種の色素を比較的短時間に溶出させるために，移動相の濃度グラジェントを用いることとし，逆相系カラムの選択，移動相のイオン対試薬の濃度，pH，グラジェント溶離条件及び検出波長について検討した．

1）カラムの選択

逆相系カラムとしてFinpak SIL C18 T5及びCosmosil 5C18-ARを用い，移動相にはpH6.8に調整した0.015M TBA溶液とアセトニトリルの(7：3)混液(A液)とアセトニトリル(B液)とのグラジェント溶離を用い，17種の色素の分離，保持時間について検討した．分析時間はCosmosil 5C 18-ARの方が若干長かったが，各色素の分離の点で優れていたためCosmosil 5C18-ARを分析用カラムとした．

また，移動相のアセトニトリルはメタノールに比べよりシャープなピークが得られたため，これを用いること

とした.

2）**TBA の濃度**

イオン対試薬としては TBA を用いることとし，各色素の TBA 濃度による保持時間に与える影響について検討し結果を Fig. 1 に示した．なお，移動相は pH6.8に調整した TBA 溶液とアセトニトリルの(7：3)混液とアセトニトリルのグラシェント溶離により行った．TBA を添加しない場合色素はほとんど保持されず，キサンテン系色素(R 3，R104，R105，R106)は0.001M で保持時間が10～20分となり，0.010M 以上でほぼ一定となった．アゾ系色素(R 2，R102，Y 4，Y 5，P 6 R，ALR，FRE，AZO)，トリフェニルメタン系色素(G 3，B 1，PBV)及びインジゴイド系色素(B 2)は0.005M からカラムへの保持が強まり0.010M 以上でほぼ一定となった．以上のことから TBA 濃度はすべての色素に対して0.010M 以上あれば十分なことがわかったが，17種の色素の相互分離が最もよい0.015M とした．

3）**pH の影響**

移動相の pH により色素の解離状態が異なるため，イオンペアの形成やイオン抑制によるカラムへの保持に影

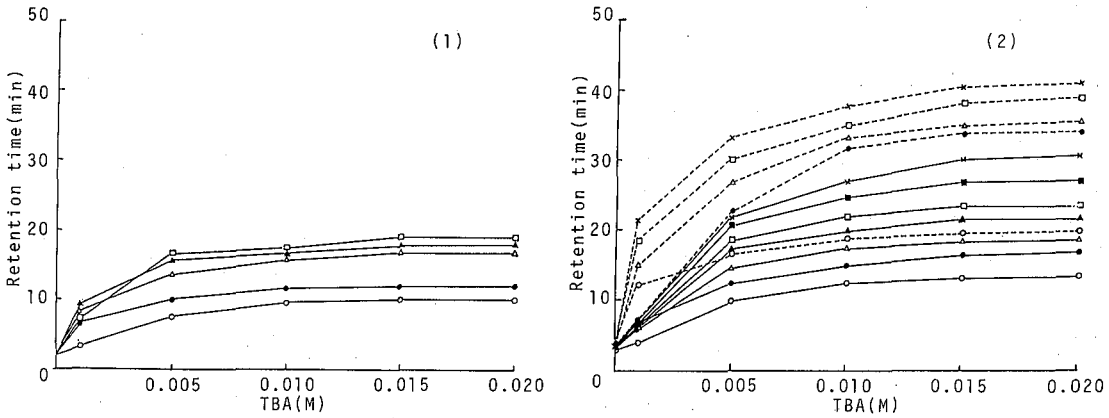


Fig. 1. Effect of TBA Concentration in Mobile Phase on the Retention Time of Color Additives
Symbols of Colors : (1)—○—B 2 ; —●—GS ; —△—G 3 ; —▲—PBV ; —□—B 1
(2)—○—Y 5 ; —●—ALR ; —△—Y 4 ; ···○···R106 ; —▲—FRE ; —□—R 2 ; —■—AZO ; —×—R102 ; ···●···P 6 R ; ···△··· R 3 ; ···□···R104 ; ···×··· R105
Operating conditions were same as described in Fig. 3 except TBA concentration.

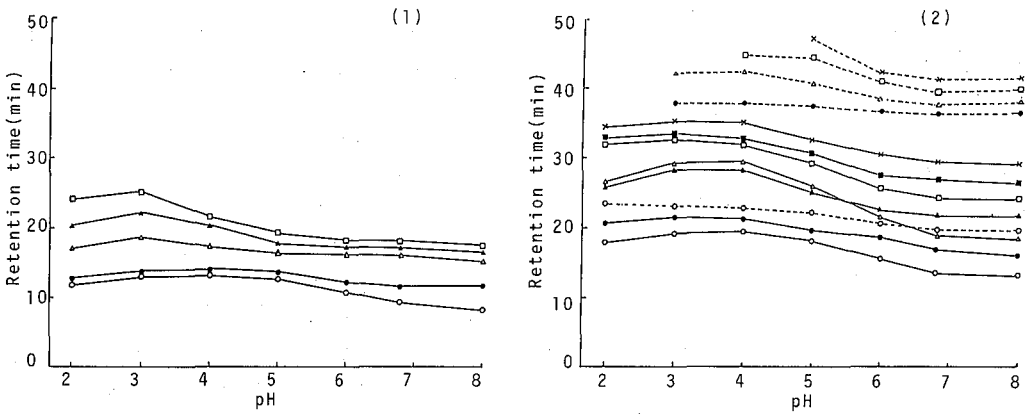


Fig. 2. Effect of pH of TBA Solution in Mobile Phase on the Retention Time of Color Additives
Symbols of colors were same as described in Fig. 1. Operating conditions were same as described in Fig. 3 except pH of TBA solution in mobile phase.

響を与えることが考えられる．そこで移動相のpHによる色素の保持時間に及ぼす影響について検討し，結果をFig. 2に示した．なお，移動相はpH 2～8に調整した0.015M TBA溶液とアセトニトリルの(7：3)混液とアセトニトリルとのグラジェント溶離により行った．

キサンテン系色素（R3，R104，R105）及びP6RはpH2.0ではカラムに強く保持され，50分以内に溶出しなかった．一方，アゾ系色素（R2，R102，Y4，Y5，ALR，FRE，AZO）とトリフェニルメタン系色素（B1，G3，PBV）はpH 3～4で最も良く保持され，pHの上昇に伴って色素の保持時間は短くなった．以上の結果から，移動相A液中のTBA溶液のpHは分析時間と分離能を考慮し6.8とした．

4）グラジェント溶離条件

17種の色素の最適溶離条件を見いだすためにグラジェント溶離条件について検討した．A液に0.015M TBA溶液，B液にアセトニトリルを用いてグラジェント溶離を行ったところ，各々の色素の分離は良好であったが再現性及びベースの安定性が若干悪かった．次にA液をpH6.8に調整した0.015M TBA溶液とアセトニトリルとの（7：3）混液とし，B液にアセトニトリルを用いてB液の混合比を0％から40％まで直線的に増加させたところ，15種の色素は良好に分離できたがY4とR106との分離が悪かった．そこでこの点を改良するためにB液を0分から10分まで直線的に増加させ，10分から20分までは10％に維持し，20分から35分の間で40％に再び直線的に増加させた後45分まで40％に維持したところ，Y4とR106の分離も良くキサンテン系色素（R3，R104，R105）の保持時間も短縮され，45分以内に17種全ての色素を分離できた．検出波長254nmにおけるこの時のHPLCのクロマトグラムをFig. 3に示した．

5）検出波長の選定

検出波長254nmにおいてはソルビン酸，ケイ皮酸及びサッカリンナトリウムは17種の色素と分離できたが，果汁入り清涼飲料水等では試料由来の成分により分離定量が困難なものがあったので可視部で測定することにした．すなわち，赤系色素は500～550nm，黄系色素は400～450nm，青系色素は600nm付近に極大吸収を有するため，青系，赤系色素は550nm，黄系色素は450nmでモニターしたところ17種の色素は感度良く検出されたため，450nmと550nmの二波長を検出波長として用いることにした．この際のHPLCのクロマトグラムをFig. 4に示した．なお，GS，R3，R104，R105及びR106は副色素のピークが検出されたが，他の色素への影響は認められなかった．また検量線は5～50 μg／mlの範囲で原点を通る直線となった．

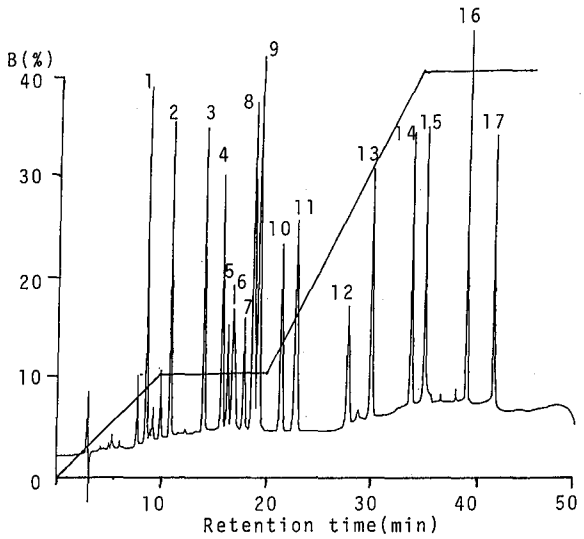


Fig. 3. Chromatogram of 17 Color Additives on HPLC
Operating conditions : column, Cosmosil 5 C18-AR(4.6mm i. d. ×250mm) ; mobile phase, (A) 0.015M TBA solution (pH6.8) -acetonitrile (7 : 3)(B)acetonitrile ; gradient profile, 0 -10 % B 1 %／min , 10% B 10min, 10-40% B 2 %／min, 40% B 10min ; flow rate, 1ml／min ; detection wavelength,254nm ; injection volume, 10 μ l ; concentration of each color additives, 10 μ g／ml.
Color additives : 1 , B 2 ; 2 ,GS ; 3 ,Y 5 ; 4, ALR ; 5 ,G 3 ; 6 ,PBV ; 7 ,B 1 ; 8 , Y 4 ; 9 ,R106 ; 10,FRE ; 11, R 2 ; 12,AZO ; 13,R102 ; 14,P 6 R : 15, R 3 ; 16,R104 ; 17,R105.

2．前処理法の検討

色素の前処理法としてはポリアミドを用いる方法[2,3]，イオン対試薬を用いセップパックC_{18}に保持させる方法[3,9]などが報告されている．しかし，ポリアミド法では一部の色素の定量的な溶出が困難な場合があり，セップパックC_{18}を用いた場合ではイオン対試薬の添加やpHの調整を行う必要があり操作も煩雑である．

そこで，本研究においてはカラムの調整も簡便で試料もpHの調整を行うだけで簡単に負荷でき，しかも色素の溶出のよいセップパックNH_2カートリッジカラムを用いることとし，負荷，洗浄及び溶出条件について検討した．

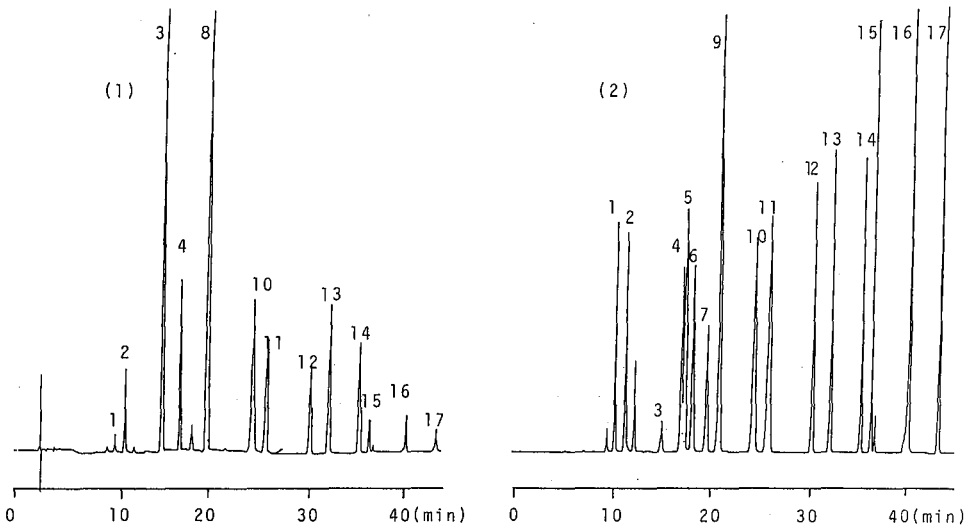


Fig. 4. Chromatograms of 17 Color Additives on HPLC
Operating conditions were same as described in Fig. 3 except detection wavelength.
Detection wavelenghths were 450nm (1) and 550nm (2).
Number of peaks were same as described in Fig. 3.

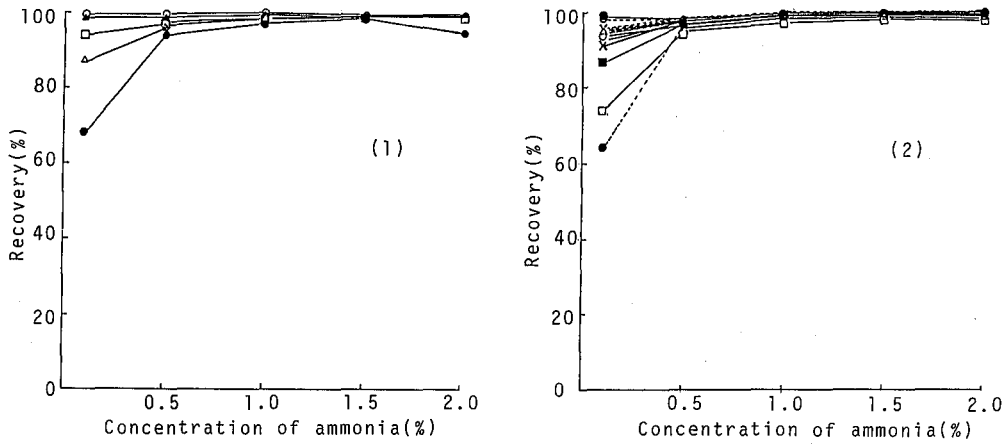


Fig. 5. Effect of Ammonia Concentration of Eluent on the Elution of Color Additives from Sep-Pak NH_2 Cartridges
Symbols of colors were same as described in Fig. 1.
Eluent was 50 % ethanol.

タール色素の検出されないことを確認した清涼飲料水10gに2倍量の水を加えた後，各色素200 μ gを添加し，10%酢酸を数滴加えてpH 3～4に調整した．この試料溶液をあらかじめ水5 mlで洗浄したセップパック NH_2 に負荷したところ，いずれのタール色素もよく吸着された．しかし，キャンデーは糖濃度及び粘ちょう度が高いためにカラムへの色素の負荷量が減少する傾向がみられたので，試料を5倍量の温水で溶解して，冷後カラムへ負荷することとした，次いで水20ml，メタノール10mlで順次洗浄し糖質やカロチンなどの夾雑物の除去を行った．

次に溶出液として10%塩化ナトリウム溶液を用いて色素の溶出を試みたが完全に溶出しない色素があった．またpH 8～10の塩化アンモニウム緩衝液を用いた場合で

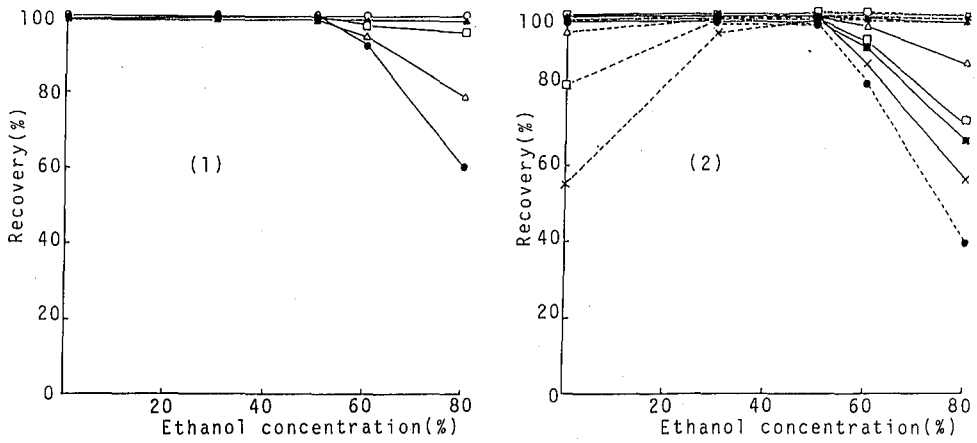


Fig. 6. Effect of Ethanol Concentration in Eluent on the Elution of Color Additives from Sep-Pak NH_2 Cartridges. Symbols of colors were same as described in Fig. 1. Eluent included 1 % ammonia.

も保持された色素をカートリッジカラムから定量的に溶出させることはできなかった．そこで，ポリアミドからの溶出に用いられる[2,3]アンモニア含有エタノールを用いたところ，少量で溶出できた．そこで，この溶出溶媒のアンモニア濃度，エタノール濃度及び溶出液量の最適条件について検討を行った．

アンモニア濃度による色素の溶出は，0.1～2％のアンモニアを含有する50％エタノール溶液で検討した．結果はFig. 5に示すように0.1％の場合，GS，P6R，R2の溶出率は60～80％と低くG3，AZOも90％以下であったが，0.5％以上ではすべての色素の溶出率は95％以上であった．なお，B2はアルカリ性で不安定であるが，溶出液をただちに20％酢酸で中和することにより分解を防ぐことができた．次いで，エタノール濃度について検討した結果はFig. 6に示すように，1％アンモニア水のみではキサンテン系色素(R3，R104，R105)の溶出率は低く，またエタノール濃度が80％ではアゾ系色素(R2，R102，Y4，P6R，Azo)及びG3，GSの溶出率が低かった．そこで，50％エタノールで溶出したところ，各色素が95％以上と最も良く溶出された．なお，溶出の際の必要液量は4～6 mlであった．

以上の結果からセップパック NH_2 からのタール色素の溶出は1％アンモニア含有50％エタノール8 mlとし，溶出液を20％酢酸約1 mlで中和後，水で10mlにメスアップし，これを濃縮操作なしにそのままHPLC用試験溶液とした．

Table 1. Recoveries of 17 Color Additives Added to a Soft Drink and a Candy[1].

Color additives	Recovery %[2]	
	Soft drink	Candy
B2	95.1	97.0
GS	98.1	95.9
Y5	99.5	97.7
ALR	101.0	97.0
G3	99.9	97.7
PBV	98.2	92.8
B1	99.7	97.9
Y4	99.4	97.3
R106	99.0	98.2
FRE	100.2	100.1
R2	99.6	95.5
AZO	102.5	100.8
R102	99.1	96.5
P6R	98.9	94.9
R3	95.7	92.0
R104	95.5	92.2
R105	99.1	96.0

1) Colors (each 200 μg) were added to 10 g of soft drink and candy.
2) average of three trials.

3．添加回収実験

タール色素が検出されないことを確認した市販の清涼飲料水及びキャンデーに各タール色素が20 μg／g になるように添加して，本法による添加回収実験を行った．結果は Table 1に示したように，清涼飲料水では95%，キャンデーで92%以上と良好な回収率が得られた．

本法による検出限界はR104，R105，R106，Y4及びY5は0.1 μg／g，その他の色素は0.5 μg／gであった．

4．市販品への応用

本法を市販の清涼飲料水6件及びキャンデー4件に適用したところ，いずれも妨害なく分析でき，日常の検査業務に十分応用できた．Fig. 6に市販のキャンデーよりY4，アルラレッドACを検出したもののクロマトグラムを示した．

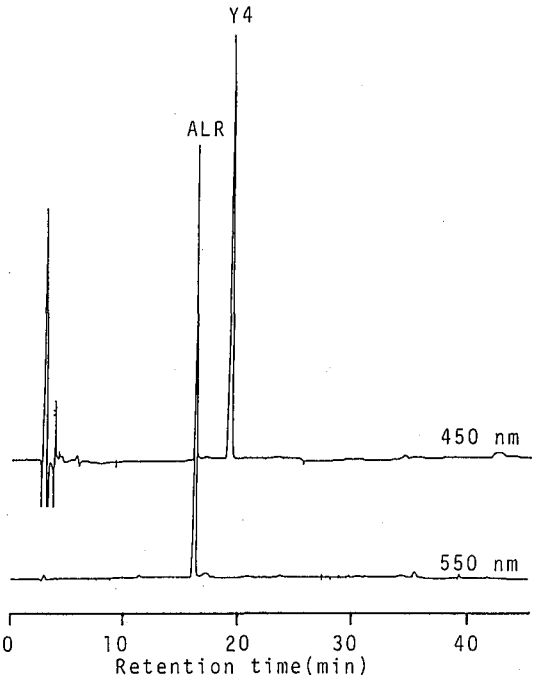


Fig. 7． Chromatograms of Color Additives Extracted from a Candy．
Operating conditions were same as described in Fig. 3．

ま と め

許可色素11種に許可外色素6種を加え，計17種の酸性タール色素の一斉分析法について検討した．前処理カラムにセップパック NH_2 カートリッジカラムを用い，移動相に濃度グラジェントを用いたイオン対HPLCで簡便に分離定量でき，食品中の酸性タール色素の分析に十分使用出来た．なお，清涼飲料水及びキャンデーへの添加回収率はそれぞれ95%，92%以上であり，検出限界はR104，R105，R106，Y4及びY5では0.1 μg／g，その他の色素は0.5 μg／gであった．

文 献

1）厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針，142-167，1989，日本食品衛生協会，東京．
2）日本薬学会編：衛生試験法・注解，545-547，1990，金原出版株式会社，東京．
3）長南隆夫，堀義宏：北海道立衛生研究所報，36，1-8，1986．
4）Lawrence, J. F., Lancaster, F. E., and Conacher, H. B. S. : *J. Chromatogr.*, 210, 168-173, 1981.
5）Hann, J. T., and Cilkison, I. S. : *J. Chromatogr.*, 395, 317-322, 1987.
6）外海泰秀，伊藤誉志男，原田基夫：食衛誌., 25, 10-18, 1983.
7）伊藤誉志男，外海泰秀他：分析化学，32，47-54，1983.
8）桑野和民，三田村敏男：食衛誌., 27, 278-282, 1986.
9）Puttemans, M. L. *et al* : *J. Assoc. off. Anal. Chem.*, 64, 1-8, 1981.
10）大戸幹也，松永明信也：食衛誌., 29, 192-198, 1988.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 108-112, 1990

化学物質及び自然毒による食中毒等事件例（第7報）*
―平成元年度―

真木俊夫**, 観　公子**, 永山敏廣**, 橋本秀樹**,
川合由華**, 飯田真美**, 小林麻紀**, 塩田寛子**,
二島太一郎**

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toxicants in Tokyo (VII)
― 1989 ―

TOSHIO MAKI**, KIMIKO KAN**, TOSHIHIRO NAGAYAMA**,
HIDEKI HASHIMOTO**, YUKA KAWAI**, MAMI IIDA**,
MAKI KOBAYASHI**, HIROKO SHIODA**
and TAICHIRO NISHIMA**

Keywords：化学性食中毒 chemical food poisoning, 仔牛レバー calfliver, ヒスタミン histamine, フグ pufferfish, 異物 alien substances, 異臭 offensive smell, 苦味 bitter taste

著者らは前報[1~6]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.

今回は平成元年度に起きた化学物質による食中毒等事例11件，自然毒による事例3件について報告し，今後の食中毒発生防止の為の参考に供する．表1．に事例の概要をまとめて示した.

1．仔牛レバーによる有症苦情事例

事件の概要　平成元年5月　教師2名が某レストランで昼食に仔牛レバープロバンス風のランチを喫食したところ，1名は4時間後，他の1名は7時間後から吐気，激しい嘔吐，下痢及び頭痛さらには目の奥の痛みを訴える等特異的な中毒症状を呈した．1名は当日医師の診察を受けた．2名とも2日後になって顔の皮膚がむけているのに気付き，管轄の保健所に届出た.

①試　料　喫食した仔牛レバーと同ロット参考品及び調理に使用していたバター.

②原因物質の検索　2名とも目の痛み，顔の皮膚がむけるなど特異な症状であった．過去の食中毒事例を検討し，イシナギ肝臓によるビタミンA(V. A)の過剰症に似ていることが判明した[7]．そこで高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるレバー中のV. Aの分析[8]を試みたところ，13,000IU／gが得られた．バターの酸価(A. V)は0.1 過酸化物価(POV)は3であった.

③考　察　2名の共通食は昼食に喫食した仔牛レバーのみであった．メニューは仔牛レバーの他にプチトマトとキノコオリーブ和え，ブロッコリー，ポテトフライ，レタス，カイワレのサラダ，かぼちゃのスープ，米飯及びコーヒーであった．これら野菜類の調査は中毒症状からみて2次的な調査と判断し，仔牛レバーを中心に検討を行った．中毒症状からみて，レバー中のV. Aによる中毒と思われたので，これらに関する文献調査を行ったが報告例は見当らなかった.

このレバーは臭みを取り除き，調味してからフライパンで妙めるもので，特別な物を添加したりすることはなかった．しかし，仔牛の成長補助剤としてV. Aの投与が行われることや，この種の仔牛の中には成牛まで飼育させずに，市場に出す場合のあることが判明した．今回，V. Aを投与したという事実を明らかにすることは出来なかったが，高濃度のV. Aが蓄積していたのは，V. A投与休止時期と屠殺時期があまりにも接近していたから

---

*第6報，東京衛研年報，40，163-168，1989.

**東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1

**The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1，Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

表1．平成元年度に発生した化学性食中毒等の事例概要

No.	発生年月	患者数／喫食者数	原因食品	原因物質
1	平成元年5月	2／2	仔牛レバー	ビタミンA
2	7月	1／1	ウルメイワシ	ヒスタミン
	9月	2／2	ウルメイワシ	ヒスタミン
	9月	3／4	マグロ味噌漬照り焼き	ヒスタミン
	同 2年3年	29／不明	バチマグロ	ヒスタミン
3	9月	4／4	ヤマゴボウ属	フィットッラカシン等
4	同 元年11月	1／5	フグ	フグ毒
5	同 元年4月	1／1	パンケーキ粉	コナヒョウヒダニ
	6月	1／4	チョコレートソフト	油脂の変敗
	6月	1／1	アンデスメロン	ククルビタシン類
	8月	2／2	キャナリーメロン	エタノール等
	同 2年1月	2／10	グラニュー糖	タバコの吸い殻
	2月	1／1	豚肩肉	不明

ではないかと推定した．1切れ約60gのレバーが2切れで1人前であることから，患者らのV.Aの摂取量は130万IUと推定した．イシナギ肝臓によるV.A中毒摂取量が約95万IU以上と言われていることから，本事例は発症量には充分達していると考えられる．

脂溶性VAの過剰摂取は，本事例にも明らかなように体内蓄積により嘔吐，頭痛，皮膚の剝離等の副作用が起こるので充分に気をつけなければならない事件であった．

2．ヒスタミンによる食中毒等事例

事件の概要 事例－1：平成元年7月 某デパートで販売されていたウルメイワシ丸干し12匹を購入し，翌日4匹を焼いて喫食した．残りは冷凍保存し8日後にそのうちの2匹を焼いて喫食した．10分程してから下唇の内側が痺れ腫れた．

事例－2：同年9月 某スーパー内の魚介類販売店でウルメイワシを購入，同日20時頃に主婦が焼いて喫食したところ，上唇が痺れた．次いで息子も口にしたが同じように痺れと腫れを感じ，上唇が弛緩して口角が下がったようになった．

事例－3：同年9月 某食堂にて3名が昼食に焼魚定食(マグロ味噌漬の照焼き)を喫食したところ，1時間後から顔面紅潮，嘔吐，下痢等の食中毒症状を呈した．

事例－4：同2年3月 某社員食堂で仕出し弁当を喫食し，社員29名が30分から1時間後に頭痛，じん麻疹等の食中毒症状を呈した．

①試 料 事例－1，2はウルメイワシ丸干し(焼いたもの，生，同ロット品，翌日仕入品)．事例－3はマグロ味噌漬，参考品として刺身用鮭，ネギトロ，しめあじ，マグロ及びハマチ．事例－4は揚げ油，捨てた魚30切程．弁当(てんぷら残品)，バチマグロ(仕入先の冷凍保管品)．

②原因物質の検索 事例全ては典型的なヒスタミン様食中毒症状を示した．そこで薄層クロマトグラフィー(TLC)による定性分析を実施し，いずれからもヒスタミン及び不揮発性腐敗アミンが検出された．さらにHPLCによる定量分析[9]を行い，事例－1のウルメイワシ，焼いたものからヒスタミン410mg%，カダベリン220mg%，チラミン29mg%，プトレシン10mg%，同ロット品からヒスタミン460mg%，カダベリン230mg%，チラミン54mg%，参考品からヒスタミン110mg%，カダベリン43mg%，チラミン8mg%が得られた．事例－2のイワシ丸干し焼いたものヒスタミン339mg%，生475mg%，販売店にあった苦情品と同ロット品507mg%，翌日仕入品525mg%，プトレシン34～56mg%，カダベリンは155～205mg%，チラミン29～41mg%であった．事例－3マグロ味噌漬はヒスタミン448mg%，カダベリン19mg%，チラミン16mg%であった．参考品のマグロ及びその他からはヒスタミン及び不揮発性腐敗アミンは検出されなかった．事例－4は捨てた魚30切程を任意に4区分してそれぞれを分析した．ヒスタミン7～678mg%，カダベリンn.d.～18.1mg%，仕入先のバチマグロはヒスタミン200mg%，カダベリン8.7mg%，てんぷらから抽出した油脂はAV0.1，POV1未満であった．

③考 察 ヒスタミン中毒は毎年発生して一向に減少

する気配がない．昭和61年度から3年[3-5]連続でイワシ丸干しによるヒスタミンの有症事件が発生している．いずれの事件も高濃度の不揮発性腐敗アミンが検出されたことから，イワシの鮮度がかなり低下していたものと考えられるので保存状態に問題があったと言えよう．特に，事例－1のように購入後8日間も保存しておくのは，冷蔵庫の過信にほかならないと思われる．その他の事例も保存状態の改善を必要とする事件であった．

3．果実酒による有症苦情事例

事件の概要　平成2年9月　自家製の果実酒を水道工事作業員4名が喫飲したところ，1－2時間後に吐気，謳吐等の食中毒症状を呈し病院に運ばれた．その後，救急隊から管轄の保健所に事件の通報が入った．

①試　料　果実酒(グレープフルーツ，甘夏の輪切り，カラスウリ及びヤマゴボウと称する根)．

②原因物質の検索　中身はグレープフルーツ，甘夏，カラスウリ及び長さ20cm，径2cm程に切った根が入っていた．この根以外は外観的に問題になるものはなかった．発生状況から中毒は，この根による可能性があり，鑑定を行った．その結果，ヤマゴボウ *P. esculanta* あるいはヨウシュヤマゴボウ *Phytolacca americana* に近似していた．

③考　察　当該品は自家製の果実酒で数種の果物等が漬け込まれ，その中に20cm程の根が認められた．この根の外観は淡黄色を呈し，表面はヒゲ根が少なく，しわの多い根であった．外観上からもヨウシュヤマゴボウに極めて近似していることが分かった．しかし搬入品は枝や葉一枚の残品もないことから確実に種までを同定するには至らなかった．果物は小売店で購入し，カラスウリとヤマゴボウは山で採集したものであることが分かった．前回もヤマゴボウを加えて果実酒を作り喫食したが問題がなかったので，今回も同様に加えて新しい果実酒を御馳走したという．前回の根がどんな種類のものか判断はつかないが，少なくとも今回の中毒事件は誤採によると思われる．昭和57年に茨城県でもヤマゴボウの誤採による中毒が発生している[11]．全国の観光地でヤマゴボウの漬物として販売されているモリアザミ *Cirsium dipsacolepis* の根と間違えやすいので注意が必要である．ヤマゴボウはフィットラッカシン等の毒成分が単離され，その中毒症状[12]は嘔吐，下痢が主徴で，重症の時は痙攣から死亡に至る．前回採集した根が，今回必ずしも同一品とは限らないところに大きな問題点を残した事件である．

4．フグによる食中毒事例

事件の概要　平成元年11月　友達仲間の1人が釣って来たフグ等を家庭でフグ刺，肝刺及び皮に分け5名が喫食し，1名が約1時間半後から口，手指の痺れ，喉，胸部の不快感及び歩行困難になった．直ちに救急車で大病院に入院し，担当医師からフグによる食中毒の疑いがある旨保健所に連絡ば入った．

①試　料　患者血液，吐物(ごみ捨て場から拾ってきた吐物と残品)．

②原因物質の検索　患者の中毒症状は典型的なフグ中毒であった．事件の通報にはかなりの時間が経過していたが，念のために患者血液のフグ毒検査を実施した．その結果，血液中のフグ毒は認められなかった(1.5MU／g以下)．吐物中には48MU／gと高濃度のフグ毒が認められた．

③考　察　フグ中毒には中毒発症後，約12時間を経過した患者は命が助かるという経験をもとにしたクリニカルタイムが存在する．患者は，かなり重症で病院に担ぎ込まれたが，すでにこの時間を過ぎていたので死亡することはないと判断した．事件の通報には長時間を経過していたので，患者血液の採取は可能であるが，残品は全くない旨の連絡が入った．血液中の毒力だけを分析したが，その毒力は低くて患者の激しい症状を説明することはできなかった．そこで喫食残品がないか，再度問い合わせたところ，ごみ箱に捨てた吐物，喫食残品等が見つかった．分析の結果，その毒力は48MU／gと比較的高い値が得られ，患者の中毒症状を端的に表していた．残品の中には肝を喫食した形跡があり，十分に注意をしなければならない事件であった．

5．異物・異臭・苦味等による有症苦情事例

事件の概要　事例－1：平成元年4月　数年前に購入し，そのまま家庭で保存していたパンケーキ粉を焼いて主婦1名が喫食したところ，30分程してから全身に発疹，かゆみ，真赤に腫れるアレルギー様症状を呈した．

事例－2：同年6月　家族4名がバニラ及びチョコレートソフトクリームを喫食，娘2名が4時間後から気持ちが悪くなり，さし込む様な腹痛を呈し油汗をかいた．

事例－3：同年6月　友達が3個購入したアンデスメロンのうち1個をもらい喫食したところ，非常に苦く，直ちに吐き出してしまった．あまりの苦さで毒物が付着しているのではないかと保健所に届出があった．

事例－4：同年8月　カリフォルニア産のキャナリーメロンを某店で購入し自宅冷蔵庫に保管し，3日後の夜にそのうちの1個を夫婦で喫食したところ，2人とも舌

に刺激があって，慌てて水を飲んで一部を吐き出した．その後2名とも腹痛，下痢を呈した．

事例－5：同2年1月　某喫茶店にて8名の女性がコーヒーを喫飲していたところに，遅れて仲間2名が加わり同じくコーヒーを注文し，容器に入ったグラニュー糖と共に運ばれたコーヒーを喫飲した．30分程してからこの2名が吐気，頭痛，胃痛，7時間後に下痢を呈した．グラニュー糖に黒い異物が見えたが，これが原因ではなかったかと保健所に届出た．

事例－6：同2年2月　肉屋で豚肩肉を購入した主婦が2時間後の夕食にイカ，玉葱とともに妙めたら異臭を感じた．喫食した息子は味がおかしいので，直ちに吐き出したが，父親は全て喫食してしまった．父親は1時間後から吐気，嘔吐，翌朝までに下痢3回を呈した．朝には下腹中央部が痛んだ．

①試　料　事例－1は使用したパンケーキ粉(ベルギアン・ワッフルミックス，アメリカ産)とワッフル残品，事例－2はコーティングしたチョコレート(残品)と保管中の品．コーンカップ，バニラソフトクリーム．事例－3はアンデスメロンの喫食残品．事例－4はキャナリーメロンの喫食残品及び参考品．事例－5は容器ごとのグラニュー糖．事例－6は密閉型容器に入った豚肩肉の一部．

②原因物質の検索　事例－1の苦情者は急性アレルギー様症状であった．いつもは他のメーカーのホットケーキミックスを使用するのだが，今回は当該製品を用いたと本人は述べていることから，このパンケーキ粉に疑いを持った．中身の粉をシャーレに移しかえたところ，極微小の灰黒色の異物が出てきた．検鏡により生きているダニが認められた．このダニはチリダニ科コナヒョウヒダニであった．事例－2の苦情者は，喫食直後からコーンが古く感じられ，しかもチョコレートが石鹸液様臭がしたと言う．外観はいずれも問題はなかったが，残品と保管品は微に油脂の変敗臭を認めた．AV は8.1，8.0 POV は15，15をそれぞれ得た．またいずれからも非イオン系，陰イオン系界面活性剤は検出されなかった．事例－3の苦情者の訴えは苦味以外にないことから，TLC 法によるククルビタシン類の定性分析を行い，陽性スポットを得た．事例－4はメロンが発酵し過ぎてエタノール等が生成し，特に舌に対する刺激があったと推定した．ヘッドスペース法を用いて GC 分析を行い，苦情品はエタノール578ppm，酢酸エチル106ppm，参考品は106ppm，57ppm をそれぞれ得た．事件－5の異物は黒色を呈し，電子顕微鏡を用いて詳細に調べたところ，植物のみに存在する気孔が認められた．さらに GC 分析によりニコチンが4 ppm 検出された．事例－6の豚肩肉は苦情者の訴えどおり微に下水臭を認めた．この種の臭気成分に関してはインドール誘導体生成の疑い，さらにはn-ペンタンの関与が考えられた．GC-MS による検索を実施したが，それぞれに相当するピークは得られなかった．

③考　察　事例－1のパンケーキ粉は数年前に購入して自宅の台所に保管してあったものであった．湿気等保管環境の不衛生さがダニの発生に結びついたものと思われる．発生したダニはアレルギーを引きおこす代表例である．長期間保存の製品を用いる時は充分な注意が必要である．事例－2のチョコレートソフトクリーム原料油脂の AV，POV 値は高い値を示した．長時間，太陽光線や空気等にさらされていたためと推定される．保管場所には特に気をつけなくてはならない．事例－3のアンデスメロンは友達から頂戴した品物であるが，毒物による苦味なら他に激しい症状が見られるはずである．単に苦味だけの訴えであることから，ククルビタシン類を考える方が自然であった．事例－4のメロンは熟し過ぎていたもので，搬入品はすでに一部カビを認めた．昭和61年にも同様な有症苦情が発生し[3]，参考品のエタノールや酢酸エチルの生成量とは明らかな差が認められている[13]．事例－5の砂糖は，その都度カウンターから運ばれていた．周辺環境から考えてグラニュー糖がテーブルの上にある時にタバコの吸い殻が入ったと思われる．気孔が認められたことで，動物性異物の可能性は否定された．さらにニコチンが検出されたことからタバコの吸い殻とほぼ断定した．故意に異物を混入させたとは考えにくいが，使用する時には注意が必要な事件であった．事例－6の豚肩肉は蓋付き密閉型パックに入れてあった．異臭には一般にインドール系化合物やn-ペンタンが原因であると指摘した報告[14]もなされているが，当該品からこれらの化合物は検出されなかった．しかし異臭は日々経過するごとに強くなっていくことを認めた．これは恐らくカビ様臭を発する真菌類によるとの疑いも考えられた．

本報告は平成元年度に起きた化学性食中毒等のうち，1．仔牛レバーによる有症苦情事例，2．ヒスタミンによる食中毒等事例，3．果実酒による有症苦情事例，4．フグによる食中毒等事例，5．異物，異臭，苦味等による有症苦情事例の13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　ヤマゴボウの鑑定にご助言を戴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）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，40，163-168，1989.
7）橋本芳郎：魚貝類の毒　118，1978　学会出版センター，東京.
8）日本薬学会編：衛生試験法・注解　追補　1318，1986.
9）日本薬学会編：公衆衛生協議会資料，42，1983.
10）中井将善：身近にある毒草100種の見分け方，50，1988，金園社，東京.
11）矢萩信夫：有毒植物，89，1983，ニューサイエンス社，東京.
12）高井勝美：食中毒事件例，食品衛生学雑誌，24，510-511，1983.
13）我妻正迪，大島栄司：北海道農業試験場研究報告，130，145～151，1981.
14）堀井昭三ほか：食品衛生学会第44回学術講演要旨，21，1982，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 113-118, 1990

輸入食品中の放射能濃度
― 昭和63年度及び平成元年度 ―

観　公子*, 真木俊夫*, 永山敏廣*, 橋本秀樹*,
川合由華*, 小林麻紀*, 塩田寛子*, 二島太一郎*

Radioactive Contamination in Imported Foods
— Apr. 1988 ~ Mar. 1990 —

KIMIKO KAN*, TOSHIO MAKI*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*,
HIDEKI HASHIMOTO*, YUKA KAWAI*, MAKI KOBAYASHI*,
HIROKO SHIODA* and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords：チェルノブイリ事故 Chernobyl accident, 放射能汚染 radioactive contamination, 輸入食品 imported foods, 調査 survey, セシウム cesium, トナカイ肉 reindeer meat, 香辛料 spice, 原産国 country of origin, NaI シンチレーションディテクタ NaI scintillation detector

諸　言

1986年4月26日未明，ソ連ウクライナ共和国チェルノブイリで原子力発電所が大爆発を起こしたため，放射性物質が大気中に拡散し，それが気流に乗って近隣のヨーロッパ諸国をはじめ世界のほとんどの国に放射能汚染をもたらした．ヨーロッパ諸国では作物が直接放射能降下物で高濃度に汚染され，一週間後には我が国でも環境中から通常より高濃度の放射能が検出された．野菜，牛乳，茶葉等から次々と事故の影響と思われる放射能が高く検出され[1-3]，分析関係者に驚異を与えた．

その後，ヨーロッパ汚染諸国からの放射能で汚染された食品の輸入に対応するため，我が国では諸々の根拠，すなわち放射能降下物核種分析結果，放射能核種の物理的及び生物学的諸性質，食品摂取量，輸入食品の割合及び放射能推定被曝量等[4]から勘案した結果，輸入食品中のセシウム134(^{134}Cs)及びセシウム137(^{137}Cs)の放射能濃度を指標核種とし，放射能濃度を1 Kgあたり370Bq以下と暫定限度を定めて，検査監視体制を強化した．しかし，なかには検査もれのため流通してしまうものもあり，京都では市販の月桂樹の葉から暫定限度以上の774Bq／Kgの放射能が検出されている[5]．また，昭和62年1月9日厚生省の第1回発表(トルコ産のヘーゼルナッツから放射能520～980Bq／Kg検出)以後，香辛料，野草加工品，肉類，きのこ等から次々と暫定限度を超えたという報道に消費者の輸入食品への不安は高まるばかりであった．また，消費者からの「放射能汚染は少なければ少ない程よい」「暫定限度以下のものについても公開して欲しい」との要望もある．そこで，著者らは放射能汚染による有害食品の排除及び消費者の不安等に応えるため，都内に流通している食品中の放射能濃度を測定し，その汚染実態を調査したので報告する．

実験方法

1．試料

1988年4月から1990年3月までに東京都内で市販されていた輸入食品等920件を試料とした．

2．器具及び装置

γ線用NaI(Tl)シンチレーションディテクタ：アロカ㈱製　Aloka MODEL ND-451F

ユニバーサルスケーラー：アロカ㈱製 MODEL JDC-819

粉砕機：(有)広沢鉄工所製　ダンシングアジテイター

測定用容器：V-11型13cm φ×7.7cm高(容積　約1 l, 標準線源と同サイズのもの)

γ線標準線源：^{137}Cs 7.71Bq(×10^3)(日本アイソープ協会検定済みのもの)，^{40}K 塩化カリウム(試薬特級) 955 g

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

3．試料の調整

乾燥試料で固形，粒状及び葉状のものは粉砕機で粉砕した．食肉，野菜，チーズ等固形のものは細切した．また，粉状あるいは液状のものはそのまま用いた．

4．分析方法

調製した試料の一定量500ｇ～1000ｇを容器に詰め，試料中の総セシウムの放射能量をγ線用NaI(Tl)シンチレーションディテクタで30分間測定した．測定値が50Bq／Kgを超えた試料については再度測定し，セシウムのガンマ線測定の妨害となるカリウム40(^{40}K)の放射能濃度を差し引き検出値とした．なお，本法で500gを秤取した場合の定量限界値は約35Bq／Kgであったが，著者らは厚生省昭和62年10月３日衛検第257号検査成績書記載事項の「51Bq／Kg以上を実測値として明記する」に従って50Bq／Kgを超えるものについて検出値とした．シンチレーションディテクタで100Bq／Kgを超えた試料については，都立アイソトープ総合研究所にてゲルマニウム半導体検出器で測定を行った．

結果及び考察

1．放射能汚染状況

都内に流通している輸入食品等920試料(1988年度492試料，1989年度428試料)について，放射能測定を行った．その結果，50Bq／Kgを超えたものは25試料で，そのうち１試料(トナカイの肉)が暫定限度値370Bq／Kgを超えていた．この試料については「食品衛生法第４条第２号違反として取り扱う」とし，都は輸入業者及び食肉処理業者に違反品の回収を指示した．

2．検出状況

１）放射能濃度別

放射能濃度別による検出試料数を表１に示した．放射能濃度が51～100Bq／Kgのものが14件(1.5％)，101～200Bq／Kgのものが９件(1.0％)，201～300Bq／Kgと301Bq／Kg以上のものが各々１件(0.1％)であった．また50Bq／Kg以下のものは895件で全体の97.3％を占めていた．

表１．放射能濃度別による検出試料数

放射能濃度(Bq/Kg)	検出試料数		
	1988年度	1989年度	計
0～ 50	476	419	895
51～100	10	4	14
101～200	5	4	9
201～300	1	0	1
301～	0	1	1
計	492	428	920

50Bq／Kgを超えた試料件数を年度別に比較すると，1988年度が16件で1989年度は９件とチェルノブイリ事故から経過するに伴い50Bq／Kgを超えた試料の検出件数及びその割合が減少する傾向にあった．これは^{134}Csの放射性崩壊による自然減少に伴い，作物中に取り込まれる放射性物質も少なくなり，食品中の放射能濃度も減少したものと考えられる．

２）食品群別

調査した食品を食品群別に検出状況を表２に示した．食品を14群に分類してその特徴を見ると50Bq／Kgを超えて検出されたものは香辛料・ハーブ類の14試料で香辛料全体の約14％を占めていた．次いで蜂蜜，ナッツ類，ジャム・マーマレード，食肉製品，野菜・果実・加工品の順であった．

穀類187試料及び乳製品108試料はいずれも50Bq／Kg以下であった．乳製品に関してはアメリカで通関前のチーズから相当量の放射能が検出されたとの報告[6]があり，また，我が国で乳児の飲む粉乳の原料の大半はヨーロッパから輸入されているため，その汚染が懸念されるところであった．また，乳幼児が多く摂取するために注意を要するベビーフード等も全て50Bq／Kg以下であったが，これらについては今後とも充分留意して調査を継続していく必要があると考える．

年度別にみると香辛料・ハーブ類，蜂蜜，ジャム・マーマレード類，食肉類及び野菜・果実類は1989年度より1988年度の方が検出率が高かった．

図１に50Bq／Kgを超えて検出された試料の品目別割合を示した．

50Bq／Kgを超えて検出された試料のうち香辛料・ハーブ類が56％を占めていた．事故以前に採取された月桂樹葉ではセシウムの放射能は検出されていないという報告[7]もあることから，これは香辛料・ハーブ類の原料である葉や花草木類が野外で栽培されていたため，放射性降下物により表面汚染されていたためと考えられる．さらにこれらの試料は乾燥された状態にあるため単位当りの放射能濃度が高くなったものと考えられる．特に複雑な構造の花や，表面に細毛のある植物体では付着した降下物を落とすのが困難である．この様な香辛料等からの検出は懸念されるところであるが，香辛料等の採取量から考えて特に健康に害があるとは考えられない．

ジャム類，蜂蜜も同様に放射性降下物による汚染と考

表2．食品群別の測定試料数と検出件数*及びその検出率

食品群	1988年度			1989年度			計		
	試料数	検出数*	検出率(%)	試料数	検出数*	検出率(%)	試料数	検出数*	検出率(%)
1 香辛料・ハーブ類	43	8	18.6	58	6	10.3	101	14	13.9
2 蜂蜜	11	2	18.2	13	0	0	24	2	8.3
3 ナッツ類	11	0	0	25	2	8.0	36	2	5.6
4 ジャム・マーマレード類	31	2	6.5	14	0	0	45	2	4.4
5 食肉・製品	35	2	5.7	48	1	2.1	83	3	3.6
6 野菜・果実・加工品	71	2	2.8	45	0	0	116	2	1.7
7 穀類	103	0	0	84	0	0	187	0	0
8 乳・製品	53	0	0	51	0	0	104	0	0
9 酒類	36	0	0	28	0	0	64	0	0
10 魚介・加工品	25	0	0	20	0	0	45	0	0
11 菓子類	29	0	0	12	0	0	41	0	0
12 油脂類	11	0	0	15	0	0	26	0	0
13 調味料	9	0	0	8	0	0	17	0	0
14 その他(ベビーフード等)	24	0	0	7	0	0	31	0	0
計	492	16	3.3	428	9	2.1	920	25	2.7

*：^{134}Cs及び^{137}Csの放射能濃度の合計が50Bq／Kgを超えた試料数

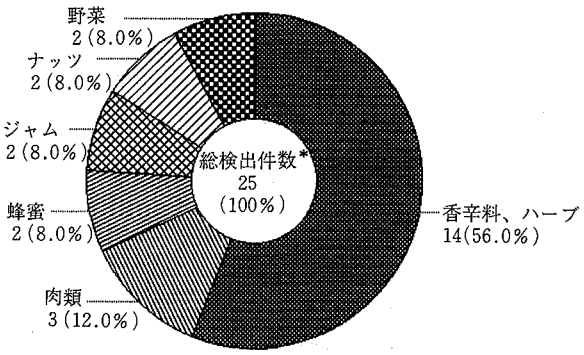


図1．検出試料の品目別割合
*：^{134}Cs及び^{137}Csの放射能濃度の合計が50Bq/Kgを超えた試料数

えられる．

検出された野菜類2件は“干しきのこ”である．きのこやナッツ類はカリウムをその成分として多く含んでいる．セシウムはこのカリウムと化学的同属体であり[8]，生体の中でセシウムがカリウムに置き代わり生物濃縮するものと考えられる．

肉類については濃縮汚染された食餌の採取により体内蓄積されたものと考えられる．特に動物ではセシウムは筋肉と生殖器に蓄積される[5]．今回測定したもののうち検出されたものは筋肉部であり，肝臓等の試料については検出されなかった．

3）原産国別

原産国別による検出状況を表3に，50Bq／Kgを超えて検出された試料の国別割合を図2に示した．

原産国ではギリシャが一番多く4件，トルコ，イタリア，西ドイツ各3件，次いでアメリカ，スウェーデン各2件，ルーマニア，ソビエト，日本各1件の順であった．

事件の当事国であるソビエトが少ないのは，事故当時の風向きや降雨に影響されると言われている[1]ことの他に，ソビエトからの輸入制限，さらに検疫所での検査強化があったことも一因と考えられる．

遠く離れたアメリカと日本の試料からも検出されているが，これはチェルノブイリ事故の他に何らかの放射能物質の環境汚染が原因と考えられる．

4）検出試料の内容

50Bq／Kgを超えて検出された試料の内訳を表4に示

表3．国別による測定試料数と検出件数*

原産国名	1988年度		1989年度		計	
	試料数	検出件数*	試料数	検出件数*	試料数	検出件数*
フランス	61	0	58	0	119	0
イタリア	51	3	32	0	83	3
西ドイツ	58	3	21	0	79	3
アメリカ	20	0	43	2	63	2
スイス	25	0	23	0	48	0
ソビエト	20	1	22	0	42	1
中国	22	0	20	0	42	0
オランダ	18	0	15	0	33	0
デンマーク	25	0	8	0	33	0
スペイン	13	0	11	0	24	0
イギリス	14	0	6	0	20	0
カナダ	7	0	11	0	18	0
日本	3	1	14	0	17	1
ハンガリー	8	0	7	0	15	0
トルコ	3	2	9	1	12	3
ギリシャ	6	1	5	3	11	4
ノルウェー	6	0	5	0	11	0
その他	132	5	118	3	250	8

その他の原産国の内訳：

ポーランド9，スウェーデン9(2)*，インド8，インドネシア8，オーストラリア8，チェコスロバキア7，ベルギー7，アイスランド7，アイルランド6，オーストリア6，ニュージーランド6，フィンランド6，ルーマニア6(1)*，ブルガリア5，マレーシア5，ユーゴスラビア5，サラワク4，ポルトガル4，イスラエル3，イラン3，タイ3，モロッコ3，アルゼンチン2，ビルマ2，ブラジル2，東ドイツ2，シンガポール1，フィリピン1，ペルー1，南アフリカ1，不明等111(5)*

*：^{134}Cs 及び ^{137}Cs の放射能濃度の合計が50Bq／Kgを超えた試料数

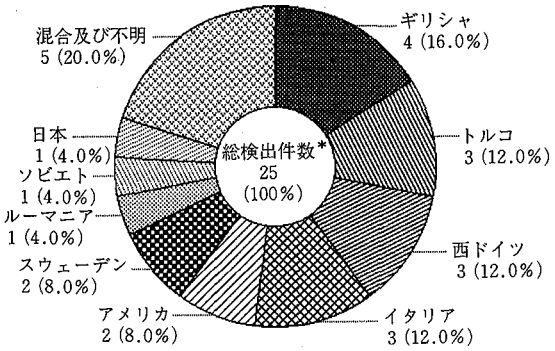


図2．検出試料の国別割合

*：^{134}Cs 及び ^{137}Cs の放射能濃度の合計が50Bq／Kgを超えた試料数

した．核種別の検出値は当研究室で100Bq／Kgを超えて検出されたもので，試料の精密検査のため都立アイソトープ総合研究所で測定した値である．

100Bq／Kgを超えて検出された試料はほとんどがローレルとセージであり，トナカイの肉2件，蜂蜜，干しきのこが1件ずつであった．

トナカイの肉のうち，1989年の1試料から暫定限度値の370Bq／Kgを超える380Bq／Kgが検出された．前年度のトナカイの肉の試料は190Bq／Kgで暫定限度値内であった．厚生省の発表の中にもトナカイの肉から暫定限度値以上の放射能が検出されたものがあったが，部位によってバラツキがあった[3]．トナカイは苔を主食として

表4．検出試料の内訳と検出値

	No	品名	検出値(Bq/Kg) $^{134}Cs+^{137}Cs$	^{134}Cs	^{137}Cs	原産国名	製造または輸入年月日
	1	ローレル(月桂樹葉)	213	43	170	ギリシャ,フランス,トルコ	88.5.9
	2	ローレル(〃)	145	25	120	トルコ	不明
	3	ローレル(〃)	120	27	93	ソビエト	不明
	4	ローレル(〃)	91	—	—	不明	不明
1	5	セージ	72	14	58	ギリシャ,フランス,トルコ	88.6.15
9	6	セージ	69	13	56	ギリシャ	88.3.23
8	7	セージ	64	—	—	トルコ	不明
8	8	ラベンダー	79	14	65	西ドイツ	不明
年	9	蜂蜜(栗の花)	182	32	150	イタリア	88.5.20
度	10	蜂蜜(ライムの花)	67	11	56	イタリア	不明
	11	ブルーベリージャム	59	11	48	西ドイツ	87.4.10
	12	ブルーベリージャム	54	7	47	西ドイツ	87.4.10
	13	コンビーフ	55	—	—	ルーマニア	87.10.21
	14	トナカイの肉	190	0	190	スウェーデン	不明
	15	干しきのこ	185	25	160	イタリア	不明
	16	椎茸	61	—	—	日本	不明
	1	セージ	184	24	160	ギリシャ	不明
1	2	セージ	173	23	150	ギリシャ	不明
9	3	セージ	116	18	98	ギリシャ	89.8.1
8	4	セージ	106	16	90	不明	89.1.21
9	5	ローレル(月桂樹葉)	54	—	—	不明	不明
年	6	カルワイ	56	—	—	トルコ	不明
度	7	ヘーゼルナッツ	83	—	—	アメリカ	89.8.16
	8	ヘーゼルナッツ(殻付き)	52	—	—	アメリカ	89.8.16
	9	トナカイの肉	380	0	380	スウェーデン	87.2.

おり，降下物による汚染あるいは環境汚染により蓄積した苔からの食物連鎖による生体濃縮が行われていたと考えられる．

今回の調査で380Bq／Kgを検出したトナカイの肉は，輸入年月が1987年2月で事故より10ヶ月後のものであるから，事故の影響も考えられたが，事故の影響の目安である^{134}Csは検出されず，^{137}Csが検出されたことからチェルノブイリ事故によるものではないと推察される．これはおそらく事故以前に食肉用に調製されたもので，このセシウム放射能濃度は1950年代にさかんに行われた大気圏での核実験等による環境汚染に起因するものと考えられる．

きのこについては今回の事故の生物濃縮汚染の指標として調査されている報告[9]もあるがここで185Bq／Kg検出されたイタリア産の干しきのこも生物濃縮されており，さらには乾燥体のため単位当りの濃度が高くなっていると考えられる．日本産のきのこについては核種の分離測定がなされていないので，今回の事故との関係は定かではないが，セシウムが50Bq／Kgを超えて検出された．

ローレルは1988年度より1989年度の方が検出試料数，検出量共に少なく，同じ香辛料でもセージは両年度の検出試料数はほとんど変わらず検出された放射能量はやや多くなっていた．これはセージには前述したように表面に細毛があるため，付着した降下物が多く残留しやすいことも考えられる．また処分できなかった高濃度汚染の品物が混合されていたためではないかと考えられる．

事故当時，何種類もの放射性核種が放出されたが放射性降下物中の被曝影響度66％を占める^{134}Csと^{137}Csの割合は(1：2)と調査されている[4]．各品目のこの割合をみると事故から約2年後の1988年では(1：3)～(1：7)で平均(1：5)，約3年後の1989年では(1：5)～(1：7)で平均(1：6)である．半減期の短い^{134}Cs(半減期2年)の割合が年を経るごとに少なくなっていることがわかった．

しかし，本事故の降下物中に検出された核種で半減期の長い^{137}Cs（半減期30年）や，β崩壊をしセシウムより危険率が高く降下物中の被曝影響度33％の^{90}Sr（半減期29年）[4]が環境中に残留していくことは確実である．

ま と め

1988年4月から1990年3月までに都内で市販されていた輸入食品等920試料について放射能濃度を調査したところ，放射能濃度が50Bq／Kgを超えて検出された試料は25件（2.7％）あった．そのうちの1試料はトナカイの肉で厚生省の定めた暫定限度値を超える380Bq／Kgの濃度であった．

食品群別で検出頻度の高いのは香辛料であり，国別ではギリシャ，トルコ，ドイツ，イタリアの順に検出率が高かった．

年度で比較すると1988年度より1989年度の方が検出試料数及び検出濃度共に低い傾向にあった．また，検出された核種濃度割合を両年度で比較したところ^{134}Cs：^{137}Cs比の平均は1：5（1988年度），1：6（1989年度）と^{134}Csの割合が小さくなる傾向であった．

しかし，汚染国の放射能制限値には我が国より高い基準を設定している国もあり，高濃度汚染食品が直接又は間接に輸入される可能性もある．さらに検疫所における放射能検査の緩和等から汚染食品が市場に流通する可能性も考えられる．また，制限値のない高濃度の非食品，例えば土壌[10]あるいは飼料等の輸入により栽培作物や家畜に生体濃縮され，それが食品の放射能汚染につながることも考えていかなければならない．

食品中の放射能濃度を測定し，その汚染実態を明らかにしたが，以上のことを考えると今後しばらくは食品全般の放射能測定を続けていく必要があると考える．

文 献

1）阿部史朗：食品衛生研究，37(10)，7-24，1987.
2）小若順一：気をつけよう輸入食品，1-60，1988，学陽書房，東京.
3）放射能と食品，1-68，1988，生活クラブ生活共同組合連合事業部，東京.
4）高谷幸：食品衛生研究，39(10)，15-25，1989.
5）食卓にあがった死の灰，1-36，1987，原子力資料情報室，東京
6）William C. Cunningham, William B. Stroube, Edmond J. Baratta：*J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72, 15-18, 1989.
7）大久保隆，岩島 清：公衆衛生院研究報告，37，169-175，1988.
8）川端俊治：New Food Industry, 30, 1-9，1988.
9）John K. Korky, Ludowik Kowaiski：*J. Agric. Fd. Chem.* 37, 568-569, 1989.
10）消費者リポート，第702号，1988.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 119-124, 1990

野菜・果実類中の残留農薬実態調査
—平成元年度—

永山敏廣*, 真木俊夫*, 橋本秀樹*, 川合由華*,
観公子*, 飯田真美*, 小林麻紀*, 塩田寛子*,
二島太一郎*

Survey of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits
—Apr. 1989～Mar. 1990—

TOSHIHIRO NAGAYAMA*, TOSHIO MAKI*, HIDEKI HASHIMOTO*
YUKA KAWAI*, KIMIKO KAN*, MAMI IIDA*, MAKI KOBAYASHI*,
HIROKO SHIODA*, and TAICHIRO NISHIMA*

Summary

Thirty-five organophosphorus, 24 organochlorine, and two carbamate pesticides were investigated in 28 kinds of crops and 11 kinds of organically cultivated crops or the like.

The residues of seven kinds of insecticides and three kinds of fungicides were detected in several kinds of crops. Concentrations of organophosphorus insecticides(EPN, chlorpyrifos, fenitrothion(MEP), phenthoate (PAP), methidathion (DMTP), prothiofos and cyanophos (CYAP)) and organochlorine fungicides (chlorothalonil(TPN), iprodione and quintozene(PCNB)) were trace～0.74 and trace～15 ppm, respectively. The identification ratio was as high as 20% for TPN, and the content of TPN or iprodione in residue was more than 1 ppm in three samples. The level of TPN, in particular, was higher than the standard for withholding registration.

In Japanese honeywort, cucumber, radish green and peach skin, which were types of organically cultivated crops, residues of EPN, TPN, iprodione and PCNB were detected at concentrations of trace ～0.06 ppm.

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, 無農薬栽培 organic cultivation

諸　言

著者らは生鮮野菜・果実類について，農薬の残留実態調査を行ってきた[1-9]．今回は平成元年度における残留農薬の調査結果を報告する．

また，近年いわゆる有機農産物といわれる無・減農薬栽培野菜・果実類が市販されている[10]．これら野菜・果実類中の農薬残留実態はほとんど明らかにされていない[11]．そこで，著者らが過去に調査した一般流通作物のうち農薬の検出頻度の高い野菜・果実類を中心に，無・減農薬栽培作物について残留農薬を調査したので，併せて報告する．

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169　東京都新宿区百人町３－24－１
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－１, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

実験の部

1．試料

(1) 一般流通（慣行栽培）野菜・果実類

1989年4月から1990年3月にかけて東京都内に入荷した野菜・果実類等35検体について調査した.

(2) 無・減農薬栽培野菜・果実類

1988年4月から1990年3月にかけて東京都内で販売，あるいは販売予定の野菜・果実類等39検体について調査した.

2．調査農薬名

(1) 有機リン系農薬：EPN，クロルピリホス，クロルフェンビンホス(CVP-E, -Z)，ジクロルボス(DDVP)，ジメトエート，ダイアジノン，パラチオン，フェニトロチオン(MEP)，フェンチオン，(MPP)，フェントエート(PAP)，ホサロン，マラチオン，トリクロルホン(DEP)，サリチオン，エチルチオメトン(ジスルホトン)，ジクロフェンチオン(ECP)，シアノホス(CYAP)，クロルピリホスメチル，ホルモチオン，プロチオホス，メチダチオン(DMTP)，テトラクロルビンホス(CVMP)，プロパホス，EPBP，エチオン，イソキサチオン，チオメトン，シアノフェンホス(CYP)，ホスメット(PMP)，ピリダフェンチオン，ピリミホスメチル，ジアリホール，エディフェンホス(EDDP)，IBP　計35種

(2) 有機塩素系農薬：総BHC(α－，β－，γ－，δ－BHCの総和)，総 DDT(pp'－DDT, pp'－DDE, pp'－DDD の総和)，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，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：㈱島津製作所製 LC-5A (検出器 UV)，LC-6AD(検出器　UV)

4．分析方法

前報[6]に従った.

Table 1. Residues of Organophosphorus Insecticides in Crops

Sample	EPN (ppm)	PAP (ppm)	Others[1] (ppm)
Celery [SERURI]			
(petiole)	0.05	—[2]	—
(leaf)	0.35	—	—
Parsley [PASERI]	—	0.32	—
Race ginger [NESHOGA]	0.12	—	0.09 (prothiofos)
Strawberry [ICHIGO]	—	—	0.08 (DMTP)
Peach			
(skin)	—	—	0.32(chlorpyrifos), Tr[3] (MEP), 0.07(CYAP)
Melon			
(rind)	—	—	Tr (MEP)
Mandarin orange [UNSHUMIKAN]			
(peel)	—	0.74	—

1) Chlorpyrifos, CVP, DDVP, dimethoate, diazinon, parathion, MEP, MPP, phosalone, malathion, DEP, salithion, disulfoton, ECP, CYAP, chlorpyrifos-methyl, formothion, prothiofos, DMTP, CVMP, propaphos, EPBP, ethion, isoxathion, thiometon, CYP, PMP, pyridaphenthion, pirimiphos-methyl and dialifol are investigated.

2) —：not detected

3) Tr：below 0.01ppm

結果及び考察

1．一般流通野菜・果実類

(1) 有機リン系農薬

野菜類4検体(検出率：17%，以下同様)から3種，また果実類4検体(36%)から5種の有機リン系農薬を検出した(Table 1).

残留基準のある農薬は検出されなかった.

環境庁の定めた登録保留基準のある農薬では，PAP(検出作物名：パセリ)，DMTP(イチゴ)及びプロチオホス(根ショウガ)の3種が3検体(9%)から検出された.これらのうち，パセリから検出されたPAPは，基準値0.1ppmを超えていた．PAPは1日摂取許容量(ADI) 0.003mg／kg／day，LD_{50}300～400mg／kgの劇物(3%以下の製剤は普通物)である．今回の残留量では喫食上問題はないものの他の数種の野菜・果実類に0.1ppmの残留基準値も設定されていることから，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，EPN(セルリーの葉柄及び葉，根ショウガ)，MEP(モモの果皮及びメロンの果皮)，PAP(温州みかんの果皮)及びCYAP(モモの果皮)の4種が6検体から検出された．これらのうち，セルリー及び根ショウガから検出されたEPNは，他の種々野菜・果実類に設定されている残留基準値0.1ppmを超えていた．EPNはLD_{50}35～45mg／kg(ラット，♂，経口)の毒物(1.5%以下の製剤は劇物)であり，比較的残留しやすい農薬のひとつである[6-8]．加熱調理後も70%以上が残存することから[12]，その残留には十分留意する必要がある.

(2) 有機塩素系農薬

野菜類5検体(21%)及び果実類の果皮3検体から3種の有機塩素系殺菌剤を検出した(Table 2).

残留基準値を超えたものはなかった.

セルリーの葉及びパセリから検出されたTPNは，その登録保留基準値1.0ppmを大きく超えていた．特にパセリからの検出量は基準の15倍量と非常に多かった．TPNは水洗されやすいものの[13]，パセリは軽く水洗したものをそのまま用いることが多く，接触した他の食品への移行も考えられる．また，このように農薬を10ppm以上検出する例が毎年見られることから[7-9]，農薬の正しい使用方法の遵守や使用方法そのものを改善する等，速やかな対応が望まれる.

(3) 農薬複数残留実態

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 3に示した.

Table 2. Residues of Organochlorine Fungicides[1] in Crops

Sample	TPN(ppm)	Iprodione (ppm)	PCNB (ppm)
Japanese honeywort [MITSUBA]	0.87	—[2]	—
Chinese cabbage [HAKUSAI]	Tr[3]	—	—
Celery			
(petiole)	0.017	—	—
(leaf)	3.8	—	—
Parsley	15	—	0.010
Pimiento [PIMAN]	—	0.02	—
Peach			
(flesh)	—	Tr[4]	—
(skin)	0.90	2.5	—
Water melon [SUIKA]			
(rind)	0.015	—	—
Melon			
(rind)	0.13	—	—

1) Captan, captafol, TPN, PCNB, procymidone, vinclozolin and iprodione are investigated.
2) —：not detected
3) Tr：below 0.005ppm
4) Tr：below 0.01ppm

28種作物35検体について48種の農薬を調査した．複数残留はセルリーの葉柄及び葉，根ショウガ，モモの果皮及びメロンの果皮等4種作物5検体(14%)に認められた．根ショウガは複数の有機リン系殺虫剤による，また，セルリー，モモの果皮及びメロンの果皮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認められた．特にモモの果皮からは有機リン系殺虫剤3種，有機塩素系殺菌剤2種と多くの農薬の同時残留が認められ，多種多様な農薬が使用されていることが明らかとなった.

2．無・減農薬栽培野菜・果実類

無・減農薬栽培と表示された野菜・果実類39検体について調査したところ，5検体から有機塩素系殺虫剤及び殺菌剤が検出された.

有機リン系，有機塩素系及びカーバメイト系殺虫剤51種について調査した結果を，Table 4に示した．その結果，ミツバの葉からEPNが0.008ppm検出されたのみで，

Table 3. Details in the Samples Contained Several Pesticides

Sample	Pesticide residues (ppm)
Celery	
(petiole)	EPN (0.05)[1], TPN (0.017)
(leaf)	EPN (0.35), TPN (3.8)
Race ginger	EPN (0.12), prothiofos (0.09)
Peach	
(skin)	chlorpyrifos (0.32), MEP (Tr[2]), CYAP (0.07), TPN (0.90), iprodione (2.5)
Melon	
(rind)	MEP (Tr), TPN (0.13)

1) The value in parentheses shows detected levels of the pesticide.
2) Tr : below 0.01ppm

Table 4. Residues of Insecticides[1] in Organic Cultivation Crops

Sample	No. of sample	No. of positive	EPN (ppm)	T−BHC[2] (ppm)	α-Benzoepin (ppm)	β-Benzoepin (ppm)
Spinach [HORENSO]	5	0				
Lettuce [RETASU]	2	0				
Japanese honeywort						
(leaf)	1	1	0.008	—[3]	—	—
Perilla [AOZISO]	2	0				
Celery						
(petiole)	1	0				
(leaf)	1	0				
Cucumber [KYURI]	2	0				
SAYAENDO	3	0				
Radish [DAIKON]						
(root)	7	0				
(green)	7	0				
Turnip [KABU]						
(root)	2	0				
(green)	2	0				
Tomato	2	0				
Peach						
(flesh)	1	0				
(skin)	1	0				
Japanese honeywort[4]						
(root)	2	2	—	0.003	0.03	0.03
(leaf)	2	1	—	0.002	—	—
Total	43	4	0.008	0.002～0.003	0.03	0.03

1) 33 Kinds of organophosphorus, 16 Kinds of organochlorine and 2 Kinds of carbamate insecticides are investigated.
2) T-BHC:the amount of α-BHC, β-BHC, γ-BHC and δ-BHC residues
3) — : not detected
4) These were cultured for harvest the Japanese honeyworts which was used the method of organic cultivation reduce artificial substances.

他からは全く検出されなかった．このミツバは無農薬栽培のものであり，検出されたEPNは土壌あるいは水由来とも考えられるが，混入原因は特定できなかった．一方，減農薬栽培品を収穫するために栽培されていた定植前のミツバの根及び葉各2検体について調べたところ，総BHC及びベンゾエピンが0.002～0.03ppmの範囲で検出された(Table 4)．これらのうち，総BHCは土壌由来と考えられるものの，栽培農家においてベンゾエピンは使用されていないとのことから，EPNと同様，その原因は特定できなかった．

有機リン系及び有機塩素系殺菌剤9種について調査した結果をTable 5に示した．その結果，キュウリ，大根の葉及びモモの果皮からTPN，イプロジオン及びPCNBが0.001ppm未満～0.06ppmの範囲で検出された．これらのうちTPNを検出したキュウリ及びPCNBを検出した大根は，無農薬表示のものであった．大根の葉から検出されたPCNBは，近くの畑で使用されたPCNBが，飛散した土壌と共に混入した可能性が非常に高く，無農薬栽培であっても，近隣で農薬を使用している場合，その農薬が混入し，微量検出されることが示唆された．一方，減農薬栽培品を収穫するために栽培していたミツバからTPN及びプロシミドンが比較的高濃度で検出さ

Table 5. Residues of Fungicides[1] in Organic Cultivation Crops

Sample	NO. of sample	No. of positive	TPN(ppm)	Iprodione (ppm)	PCNB(ppm)	Procymidone (ppm)
Spinach	5	0				
Lettuce	2	0				
Japanese honeywort (leaf)	1	0				
Perilla	2	0				
Celery (petiole)	1	0				
(leaf)	1	0				
Cucumber	2	1	0.008	—[2]	—	—
SAYAENDO	3	0				
Radish (root)	7	0				
(green)	7	2	—	—	Tr[3], 0.007	—
Turnip (root)	2	0				
(green)	2	0				
Tomato	2	0				
Peach (flesh)	1	0				
(skin)	1	1	—	0.06	—	—
Japanese honeywort[4] (root)	2	2	0.017, 0.040	—	—	1.3, 12
(leaf)	2	2	0.99	—	—	1.4, 13
Total	43	8	0.008～0.99	0.06	Tr～0.007	1.3～13

1) 2 Kinds of organophosphorus and 7 Kinds of organochlorine fungicides are investigated.
2) —：not detected
3) Tr:below 0.001ppm
4) These were cultured for harvest the Japanese honeyworts which was used the method of organic cultivation reduce artificial substances.

れた．特にプロシミドンは登録保留基準値2 ppm の6倍以上検出されており，一般流通作物の最大値にほぼ匹敵していた．したがって，減農薬栽培ミツバは，初めに農薬を通常通り使用して栽培した根を用いて葉を育成し，減農薬栽培品として販売されている実態が示唆された．

なお，除草剤は CNP について調査したが，いずれからも検出されなかった．

ま と め

1989年4月から1990年3月までに都内に入荷した野菜・果実類35検体及び1988年4月から1990年3月までに都内で無・減農薬栽培と表示して販売するために入荷した野菜・果実類39検体について，残留農薬の実態調査を行った．

1．一般流通野菜・果実類

有機リン系農薬は，EPN，PAP，DMTP，プロチオホス及び MEP の殺虫剤5種類が，8検体から痕跡～0.74ppmの範囲で検出された，パセリから PAP が登録保留基準値を超えて検出された．

有機塩素系農薬では，TPN，イプロジオン及び PCNB の殺菌剤3種類が10検体から痕跡～15ppm の範囲で検出された．セルリーの葉及びパセリからTPN が登録保留基準値を超えて検出された．

カーバメイト系農薬は検出されなかった．

農薬の複数残留は5検体に認められた．

2．無・減農薬栽培野菜・果実類

有機リン系農薬は，EPN がミツバの葉から0.008ppm 検出された．

有機塩素系農薬では，TPN，イプロジオン及び PCNB の殺菌剤3種がキュウリ，大根の葉及びモモの果皮4検体から痕跡～0.06ppm の範囲で検出された．

カーバメイト系農薬は検出されなかった．

本調査は東京都衛生局食品環境指導センターと共同で行ったものである．

文　献

1）小関正道，嶋村保洋，真木俊夫他：東京衛研年報，31-1，170-173,1980.
2）小関正道，田村行弘，真木俊夫他：東京衛研年報，32-1，172-176，1981.
3）永山敏廣，田村行弘，真木俊夫他：東京衛研年報，34，165-170，1983.
4）永山敏廣，観　公子，田村行弘他：東京衛研年報，35，210-218，1984.
5）田村行弘，観　公子，永山敏廣他：東京衛研年報，36，199-205，1985.
6）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：東京衛研年報，37，173-183，1986.
7）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：東京衛研年報，38，222-228，1987.
8）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：東京衛研年報，39，130-138，1988.
9）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：東京衛研年報，40，155-162，1989.
10）神谷一博：食の科学，143，54-59，1990.
11）栃木衛研食品部：栃木衛研所報，19，92-93，1989.
12）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.
13）戸張真臣，笠井　裕，西田　敦：食品衛生研究，40，67-84，1990.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 125-132, 1990

輸入農産物の残留農薬実態調査
—昭和63年度及び平成元年度—

永山敏廣*, 真木俊夫*, 川合由華*, 小林麻紀*,
塩田寛子*, 観　公子*, 橋本秀樹*, 二島太一郎*

Survey of Pesticide Residues in Imported Crops
— Apr. 1988 ~ Mar. 1990 —

TOSHIHIRO NAGAYAMA, TOSHIO MAKI, YUKA KAWAI,
MAKI KOBAYASHI, HIROKO SHIODA, KIMIKO KAN,
HIDEKI HASHIMOTO and TAICHIRO NISHIMA

Summary

Twenty-five organophosphorus, 21 organochlorine, and four carbamate pesticides were investigated in 56 imported crops. We detected residues of 20 kinds of insecticides, three kinds of fungicides and one kind of herbicide in 29 kinds of crops. The ranges of organophosphorus insecticides, organochlorine pesticides and carbamate pesticides were trace ~2. 0, trace ~3. 7 and 0. 01~17 ppm, respectively. Residues of these pesticides were at levels lower than the FAO/WHO tolerances for these agents.

The pesticides detected were characteristic of the original area. Various pesticides were in or on several imported crops from the Americas, organophosphorus or organochlorine insecticides were from Asia, and organochlorine fungicides were from Oceania.

Dicloran and methoxychlor in American crops were also investigated. Concentrations of trace~8. 9 and 0.007~0.008 ppm, respectively, were detected. The levels of these residues were lower than the U.S.tolerances for such residues.

Keywards：残留農薬 pesticide residues, 輸入農産物 imported crops, 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, ポストハーベトアプリケーション postharvest application, ジクロラン dicloran (2,6-dichloro-4-nitroaniline ; CNA), メトキシクロル methoxychlor

緒　言

近年，国内で消費される食品のうち5割以上が輸入食品で占められており(カロリー換算として)，その種類も多種多様化している[1]．特に，野菜・果実類等の生鮮青果物の輸入が急増しており，その安全性確保は衛生行政の最重要施策のひとつとなっている．しかし，諸外国における農薬の法規則[2]及び使用実態に関する情報は極めて少なく，残留農薬に関する報告[3-11]も数種の農産物あるいは農薬についてのみで，その実態はほとんど明らかにされていない．そこで今回，種々の輸入農産物について，農薬の残留実態を調査し，検討を加えた．

実験の部

1．試料

1988年4月から1990年3月にかけて東京都内に入荷した輸入野菜・果実類等56種226作物について調査した．これら作物の内訳をTable 1に示した．柑橘類は果肉と果皮に分けて，その他の作物は剝皮等を行い可食部について分析した．

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

Table 1. The List of Investigated Crops

	Commodities
Vegetables	Trevise (7)[1], Chicory (8), Celery[2], Broccoli (5), Asparagus (9), Garlic (stem) [NINNIKUNOKUKI] (6), Okra (3), Pumpkin [KABOCHA] (8), Tamarillo[3] [KODACHITOMATO](2), Broad bean[4] [SORAMAME](4), Chinese pea[4] [SAYAENDOU](10), String pea[4] [SAYAINGEN](7), Baby corn[4] (3), Sweet corn[4] (6), Green pea[4] (5), Green soybean[4] [EDAMAME](6), Potato[5] (9), Taro[4] [SATOIMO], Carrot[4] [NINJIN](2), Leek [RIKI], Onion [TAMANEGI], Shallot [ESHAROTTO](3)
	22 species 107 crops
Mushrooms	MATSUTAKE(3), Champignon[4] [MASSHURUMU], SHIITAKE(2), Mixed mushroom[4]
	4 species 7 crops
Fruits	
Citrus[6]	Lemon(5), Grapefruit(5), Orange(5), Lime(2), Tangelo, Pomelo 6 species 19 crops
Others	Cherry [SAKURANBO](10), Strawberry [ICHIGO](6), Grape [BUDOU](8), Melon[3] (3), Papaya[3](3), Nectarine[3], Mango[3](3), Avocado[3](2), Kiwifruit[3](6), Mangosteen[3], Banana[3] (6), Pineapple[3](2), Litchi[3](5), HAMIGUA[3], Cactus pear[3], Babaco[3], Kiwano[3]
	17 species 60 crops
Cereals (grains)	Wheat [KOMUGI (GENBAKU)](5), Corn [TOUMOROKOSHI](3), Corngrits(5), Buckwheat [GENSOBA](4) 4 species 17 crops
Beans	Soybean [DAIZU](9), Small red bean [AZUKI](5), Garden pea [ENDOUMAME](2)
	3 species 16 crops
	Total 56 species 226 crops

1) Values in parentheses indicate number of individual samples.
2) This sample is analyzed separately petiole and leaf.
3) These skins, rinds or peels are removed and discarded prior to analyze samples.
4) include the cut or frozen commodity
5) precooked frozen potato
6) This sample is analyzed separately flesh and peel.

2. 調査農薬名

アメリカ，アジア，アフリカ，オセアニア及びヨーロッパの各地域における残留許容量などから以下の調査対象農薬を設定した．

(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，エチオン，オメトエート，ジスルホトン(エチルチオメトン)，ジメトン(-o, -s)，テトラクロルビンホス(CVMP)，トリクロルホン(DEP)，ホスメット(PMP)，メカルバム，メチダチオン(DMTP)，クロルピリホスメチル，ピリミホスメチル

計25種

(2) 有機塩素系農薬：総BHC(α-，β-，γ-及びδ-BHCの総和)，総DDT (pp'-DDT，pp'-DDE及びpp'-DDDの総和)，ディルドリン，アルドリン，エンドリン，キャプタン，カプタホール(ダイホルタン)，クロルベンジレート，ジコホール(ケルセン)，イプロジオン，エンドスルファン(-Ⅰ，-Ⅱ；α-，β-ベンゾエピン)，クロロタロニル(TPN)，ヘプタクロル，ヘプタクロルエポキサイド，ビンクロゾリン

計21種

(3) カーバメイト系農薬：カルバリル(NAC)，カルボフラン，ピリミカーブ，クロロプロファム(CIPC)

計4種

総計50種

3. 機器

(1) ガスクロマトグラフ：(株)島津製作所製GC-9A(検出器ECD，FPD，FTD)

(2) 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), LC-6AD(検出器 UV)

(4) 粉砕器：(有)廣澤鉄工所製 ダンシング アジテーター

4．分析方法

昭和50年厚生省告示第50号，残留農薬分析法[12]，増補残留農薬分析法[13]及び残留農薬分析法 Draft[14]等に準じた．

また，これらに分析法が掲載されていない農薬については，新しく開発した方法によった[15]．

結果及び考察

1．農薬残留実態

56種226作物中29種88作物(検出率39%，以下同様)から24種の農薬が検出された．農薬を検出した作物について，作物群別にTable2～4に示した．

(1) 野菜類及びきのこ類

野菜類では，22種107作物中10種30作物(28%)から13種の農薬が検出された(Table 2)．

食品衛生法による残留基準のある農薬は，総DDTがメキシコ産のカボチャ1検体から痕跡(0.01ppm未満)検出されたのみで，他からは検出されなかった．

環境庁の定めた登録保留基準のある農薬では，ジメトエート(検出作物名：チコリ，オクラ，サヤエンドウ)，ホサロン(サヤエンドウ)，エチオン(カボチャ，サヤインゲン)，キャプタン(オクラ)，エンドスルファン(ブロッコリー，エダマメ)及びCIPC(グリンピース，冷凍ポテト)の6種が22検体(21%)から検出された．これらのうち，フランス産のチコリから検出されたジメトエート及びアメリカ，オランダ及びベルギー産の冷凍ポテトから検出されたCIPCは，それぞれの基準値1 ppm及び0.05ppmを超えていた．ジメトエートは1日摂取許容量(ADI)0.01mg/kg/dayの劇物であるが，今回の残留量は国際食品規格残留農薬許容量2 ppm以内であり，喫食上問題はない．一方，CIPCはアメリカにおける生鮮ポテトに対する許容量が50ppmであり，ポストハーベストアプリケーションとして収穫後の馬鈴薯の発芽抑制目的に直接使用されている．今回，多量に検出されたCIPCはこの使用方法に由来すると考える．CIPCは，LD_{50}5000～7500mg/kg(ラット，経口)の普通物であるが，冷凍ポテト中のCIPCは加熱調理後も45～80%が残存することから[4,16,17]，さらに注意深く調査していく必要がある．

オメトエートは日本で基準値が設定されていないが，チコリ，オクラ及びサヤエンドウ各1検体から痕跡(0.01ppm未満)～0.04ppmの範囲で検出された．これら作物からはジメトエートも併せて検出されたことから，検出されたオメトエートはジメトエートの代謝産物であり[18]，農薬として直接使用されてはいなかったと推察する．

きのこ類では，中国産のシイタケ1検体(14%)から総BHCが0.005ppm検出されたのみであった．

(2) 果実類

23種79作物中12種34作物(43%)から14種の農薬が検出された(Table 3)．

柑橘類の果皮からの検出率が63%と高く，6種作物総てから8種の農薬が検出された．これら作物には残留基準は設定されていない．果実に対する登録保留基準が設定されている農薬では，クロルピリホス(レモン，オレンジ，ポメロの各果皮)，ダイアジノン(タンジェロの果皮)，エチオン(グレープフルーツ，ライムの果皮)，ジコホール(グレープフルーツの果皮)及びビンクロゾリン(レモン，タンジェロの各果皮)の6種が検出された．一方，クロルベンジレート及びNACがレモンの果皮から1 ppmを超えて検出された．これら農薬のFAO／WHO勧告による国際食品規格残留農薬許容量は1及び7ppmであるが，この許容量は剝皮せずに分析したときのものであり，今回の検出量との比較はできない．しかし，柑橘類の果皮は比較的農薬を残留し易いことから，十分な監視が必要である．

その他の果実類では，チェリー，キウィフルーツ及びライチにおける検出率が，それぞれ60，83及び100%と高かった．検出された農薬はいずれも低レベルであり，喫食上特に問題はないが，国内産の果実からは全く検出されないパラチオンがチェリー及びライチから0.01～0.12ppmの範囲で検出された．一方，ポストハーベストアプリケーションとして使用が認められているキャプタンがブドウから0.027～0.033ppm検出された．

(3) 穀類及び豆類

7種33作物中6種23作物(70%)から有機リン系及び有機塩素系殺虫剤が検出された(Table 4)．特に，アメリカ及びカナダ産小麦からはマラチオン及びクロルピリホスメチルが，コーンからはマラチオン及びピリミホスメチルが検出された．これら農薬はポストハーベストアプリケーションとして使用された可能性が高く，比較的高頻度で検出される[5,9]．しかし，小麦粉及びコーンスターチ等の加工品への移行率は0.9～4.5%と低く[8]，また，加熱調理による減少も認められる．一方，中国産玄ソバ，大豆及び小豆からは，総BHCが痕跡(0.001ppm未

Table 2. Pesticide Residues in Imported Vegetables and Mushrooms

Crops	Country	No. of sample	No. of positive	Pesticide	Residue (ppm)	Tolerance (ppm)
Chicory	France	1	1	Dimethoate	2.0	1[1], 2[2]
				Omethoate	0.04	
Broccoli	Taiwan	2	1	Endosulfan[3]	0.016	0.5[1], 2[2]
Okra	Thailand	2	2	Dimethoate	0.07	1[1], 2[2]
				Omethoate	Tr[4]	
				Captan	0.01	5.0[1]
Pumpkin	USA	2	1	Dieldrin	Tr[5]	
	Mexico	4	3	Chlorpyrifos	Tr[4]	
				Ethion	0.02	0.3[1], 0.5[2]
				T-DDT[6]	Tr[4]	0.2[7]
				Dieldrin	0.008	
				Endrin	0.023	
	Newzealand	1	1	Dieldrin	0.032	
Broad bean	Taiwan	1	1	EPN	Tr[4]	
Chinese pea	Taiwan	10	4	Chlorpyrifos	0.02	
				Dimethoate	0.03, 0.05, 0.07	1[1], 2[2]
				Phosalone	0.25	0.5[1], 1[2]
				Omethoate	0.03	
String pea	Taiwan	6	2	Ethion	0.04, 0.04	0.3[1], 2[2]
Green pea	USA	3	1	CIPC	0.01	0.05[1]
Green soybean	Taiwan	6	5	EPN	Tr, Tr, 0.03	
				Chlorpyrifos	Tr, 0.02, 0.03	
				Parathion	0.01	0.7[2]
				Endosulfan	0.01, 0.02	0.5[1], 2[2]
Potato[8]	USA	5	4	CIPC	0.02, 0.28, 1.1, 4.6[9]	0.05[1]
	Canada	2	2	CIPC	0.01, 0.03	0.05[1]
	Holland	1	1	CIPC	0.26	0.05[1]
	Belgium	1	1	CIPC	0.88	0.05[1]
SHIITAKE	China	1	1	T-BHC[10]	0.005	

1) standard for withholding registration
2) FAO/WHO tolerance for residues
3) the amount of endosulfan- I and II
4) Tr: below 0.01ppm
5) Tr: below 0.005ppm
6) the amount of pp'-DDT, pp'-DDE and pp'-DDD
7) tolerance for pesticide residues
8) precooked frozen potato
9) unpeeled
10) the amount of α-, β-, γ- and δ-BHC

Table 3. Pesticide Residues in Imported Fruits

Crops	Country	No. of sample	No. of positive	Pesticide	Residue(ppm)	Tolerance (ppm)
Lemon						
(flesh)	USA	5	1	Chlorobenzilate	0.03	1[1]
(peel)	USA	5	3	Chlorpyrifos	0.03	0.5[2]
				Chlorobenzilate	3.7	1[1]
				Vinclozolin	0.007	20[2]
				NAC	0.34,17	7[1]
				CIPC	0.02	0.05[2]
Grapefruit						
(flesh)	USA	5	1	Ehion	Tr[3]	0.3[2],2[1]
(peel)	USA	5	5	Ehion	0.07,0.14,0.15,0.23,2.0	0.3[2],2[1]
				Dicofol	Tr[3],0.78,0.95	3[2],5[1]
Orange(peel)	USA	5	1	Chlorpyrifos	0.03	0.5[2]
Lime(peel)	Mexico	2	1	Ethion	0.31	0.3[2],2[1]
Tangero(peel)	Newzealand	1	1	Daiazinon	Tr[3]	0.1[2],0.7[1]
				Vinclozolin	0.008	20[2]
Pomelo(peel)	USA	1	1	Chlorpyrifos	0.07	0.5[2]
Cherry	USA	9	5	Parathion	0.02,0.02,0.03	0.3[4],0.5[1]
				Endosulfan	Tr[3]	0.5[2],2[1]
				Iporodion	Tr[3],0.23	10[2]
	Newzealand	1	1	Iprodion	0.19	10[2]
Strawberry	USA	6	3	Malathion	Tr[3],0.01	0.5[2],[4],1[1]
				Vinclozolin	0.089	20[2]
Grape	USA	6	1	Captan	0.027	5[2]
	Chili	1	1	Captan	0.033	5[2]
Kiwifruit	Newzealand	6	5	Pirimiphos-methyl	0.03	
				Chlorpyrifos	0.02	0.5[2]
				Vinclozolin	Tr[5], Tr,0.021,0.026	20[2]
Litchi	Taiwan	5	5	Parathion	0.01,0.02,0.02,0.04,0.12	0.5[1]
Babaco	Newzealand	1	1	Dicofol	0.02	3[2],5[1]
				Vinclozolin	0.013	20[2]

1) FAO/WHO tolerance for residues in or on fruits
2) standard for withholding registration in or on fruits
3) Tr: below 0.01ppm 4) tolerance for pesticide residues 5) Tr: below 0.005ppm

Table 4. Pesticide Residues in Imported Cereals and Beans

Crops	Country	No. of sample	No. of positive	Pesticide	Residue (ppm)	Tolerance (ppm)
Wheat	USA	3	3	Malathion	0.08,0.09,0.61	0.5[1],8[2]
				Chlorpyrifos-methyl	0.02,0.04,0.49	
	Canada	1	1	Malathion	0.02	0.5[1],8[2]
	Australia	1	1	MEP	0.04	
Corn (grain)	USA	3	2	Pirimiphos-methyl	0.10,0.10	
Corngrits	USA	5	3	Malathion	Tr[3],0.02,0.02	0.5[1],8[2]
				Pirimiphos-methyl	0.02	
Buckwheat	China	3	3	T-BHC	0.002,0.003,0.018	0.5[4]
Soybean	USA	3	2	Dieldrin	Tr[5],0.007	
	China	6	6	T-BHC	0.002,0.003,0.004, 0.007,0.008,0.010	
Small red bean	China	4	2	T-BHC	Tr,0.004	

1) standard for withholding registration
2) FAO/WHO tolerance for residues
3) Tr: below 0.01ppm
4) FAO/WHO tolerance is established for residues of the lindane.
5) Tr: below 0.001ppm

Table 5. The Influence of Original Country in the Pesticide Residues in Crops

Area	No.of samples	No. of positive samples: Organophosphorus insecticides	Organochlorine insecticides	Organochlorine fungicides	Carbamate insecticides	Carbamate herbicides	Total	Detected rate(%)
America	99	25(7)[1]	9(6)	7(3)	2(1)	8(1)	43(18)	43
Asia	75	18(7)	15(2)	1(1)	0	0	32(10)	43
Oceania	27	3(4)	2(2)	7(2)	0	0	10(8)	37
Europe	25	1(2)	0	0	0	2(1)	3(3)	12
Total	226	47(12)	26(7)	15(3)	2(1)	10(1)	88(24)	39

1) Values in parentheses indicate number of detected pesticides.

満)～0.018ppmの範囲で検出された．BHC は使用禁止後約20年間は作物から検出される傾向が認められる[19]．中国におけるBHCの禁止措置は1980年代と推察されることから，今後さらに継続的に検出されると考える．

2．地域別による比較

輸入農薬の原産国を５地域に分類し，地域別に農薬の検出状況をまとめ，Table5に示した．

農薬の検出率はアメリカ，アジア産が高く，次いでオセアニア，ヨーロッパ産の順であった．また，検出された農薬に地域特異性が認められる．これは，輸入対象作物が地域により異なるためとも考えられるが，さらに，国により使用農薬に違いのあることが推察される．アメリカ地域では多種多様な農薬が使用されており，検出された農薬は18種と最も多かった．アジア地域では有機リン系及び有機塩素系殺虫剤が，また，オセアニア地域では有機塩素系殺菌剤が検出される傾向が見られた．

3．ポストハーベストアプリケーション農薬

平成元年度に，アメリカにおけるポストハーベストア

プリケーション農薬であるジクロラン(ジクロロニトロアニリン；CNA)及びメトキシクロルの試験法を開発した[15]．そこで，冷凍保存しておいたアメリカ産作物のうち，アメリカにおいて残留許容量の設定されている作物を選び，各農薬の残留実態を調査した．

(1) ジクロラン

セルリー，ネクタリン，チェリー及びブドウの4種18検体について調査し，結果をTable6に示した．

セルリーの葉柄から2.9ppm，葉から8.9ppmと非常に高濃度で検出された．葉柄中の濃度で設定されている登録保留基準値0.6ppmの約5倍量検出されたが，アメリカにおける葉を含めたプレハーベストアプリケーションとしての許容量15ppmは超えていない．ジクロランは殺菌剤であり，ADI 0.03mg／kg／dayの普通物である．喫食上問題はないと思うが，多量の残留には留意する必要がある．ポストハーベストアプリケーションとしての許容量の設定されているネクタリン及びチェリーでは，チェリー9検体中5検体から0.01ppm未満～0.44ppmの範囲で検出された．

(2) メトキシクロル

9種39作物について調査した結果をTable 7 に示した．

貯蔵庫処理に伴う許容量の設定されているコーン2検体から0.007～0.008ppmの範囲で検出された．メトキシクロルは殺虫剤であり，ADI 0.1mg／kg／dayの普通物

Table 6. Residues of Dicloran in American Crops

Crops	No. of sample	No. of positive	Residue(ppm)	Tolerance (ppm)
Celery				
(petiole)	1	1	2.9	0.6[1],15[2]
(leaf)	1	1	8.9	
Nectarine	1	0		20[3]
Cherry	9	5	Tr[4],0.04,0.04,	20[3]
			0.15,0.44	
Grape	6	1	0.03	10[2]

1) standard for withholding registration
2) tolerance for pesticide residues in USA(EPA)
3) tolerance for residues from pre- and post-harvest application in USA(EPA)
4) Tr: below 0.01ppm

Table 7. Residues of Methoxychlor in American Crops

Crops	No. of sample	No. of positive	Residue (ppm)	Tolerance[1] (ppm)
Broccoli	3	0		14
Pumpkin	2	0		14
Sweet corn	6	0		14
Nectarine	1	0		14
Cherry	9	0		14
Strawberry	6	0		14
Grape	6	0		14
Melon	3	0		14
Corn	3	2	0.007,0.008	2[2]

1) tolerance for residues in USA(EPA)
2) tolerance for residues from storage-bin treatment in USA(EPA)

である．今回の検出量ではまったく問題はないと考える．

ま と め

1988年4月から1990年3月までに都内に入荷した輸入生鮮農産物等56種226作物について，残留農薬の実態調査を行った．

1．農薬残留実態

12種の有機リン系殺虫剤が47作物から痕跡～2.0ppmの範囲で検出された．

有機塩素系農薬では7種の殺虫剤が26作物から痕跡～3.7 ppm の範囲で，3種の殺菌剤が15作物から痕跡～0.23ppmの範囲で検出された．

カーバメイト系農薬では，各1種の殺虫剤及び除草剤が0.01～17ppmの範囲で検出された．

残留基準値を超えた作物はなく，登録保留基準値を超えたものが一部見られたが，国際食品規格残留農薬許容量を超えたものはなかった．

2．地域別による比較

検出された農薬に地域特異性が認められ，アメリカ地域では多種多様な農薬が，また，アジア地域では有機リン系及び有機塩素系殺虫剤が，オセアニア地域では有機塩素系殺菌剤が検出される傾向が認められた．

3．ポストハーベストアプリケーション農薬

ジクロラン及びメトキシクロルについて調査したところ，ジクロランはセルリー，チェリー及びブドウから痕跡～8.9ppmの範囲で，メトキシクロルはコーンから0.007～0.008ppmの範囲で検出された．

セルリーから検出されたジクロランは登録保留基準値を超えていたが，アメリカにおける残留許容量を超えていた作物はなかった．

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）厚生省生活衛生局検疫所業務管理室輸入食品監視情報検討会，厚生省輸入食品衛生監視員協議会編：輸入食品1988年―統計に見る食品輸入の実態―，1989，（社）日本食品衛生協会

2）The Office of the Federal Register National Archives and Records Administration: *Code of federal regulations* 40 Parts 150 to 189, 1988.

3）広島紀以子，高畑寿太郎，菊池正行他：仙台市衛生試験所報，18，264-268，1988．

4）関田寛，佐々木久美子，河村葉子他，衛生試験所報告，103，127-129，1985．

5）斎藤勲，岡尚男，高橋弘明他：愛知衛研所報，32，55-61，1982．

6）河村葉子，武田明治，内山充他：食衛誌，21，70-74，1980．

7）小西良昌，吉田精作：栄食誌，40，375-380，1987．

8）永山敏廣，田村行弘，真木俊夫他：東京衛研年報，34，165-170，1983．

9）永山敏廣，真木俊夫，観公子他：食衛誌，30，438-443，1989．

10）花井義道，井口由紀：横浜国大環境研紀要，16，29-35，1989．

11）根本了，鈴木隆，斎藤行生：食衛誌，31，182-186，1990．

12）後藤真康，加藤誠哉編著：残留農薬分析法，1980，ソフトサイエンス社．

13）後藤真康，加藤誠哉：増補残留農薬分析法，1987，ソフトサイエンス社．

14）厚生省生活衛生局食品化学課：残留農薬分析法 Draft，厚生省食品化学レポートシリーズ No.40，1985．

15）未発表

16）永山敏廣，真木俊夫，川合由華他：日本食品衛生学会第58回学術講演会 講演要旨集，24，1989．

17）国民生活センター：フライドポテトの比較テスト結果，11，1989．

18）William A. Steller, William W. Brand: J. Agr. Food Chem., 22, 445-449, 1974.

19）田村行弘，観公子，永山敏廣他：東京衛研年報，36，199-205，1985．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 133-139, 1990

食品中のカンタキサンチン分析法

天川映子*, 荻原　勉*, 大西和夫*, 寺山　武**

Determination of Canthaxathin in Foods

EIKO AMAKAWA*, TSUTOMU OGIWARA*, KAZUO OHNISHI*, and TAKESHI TERAYAMA**

An analytical method to measure canthaxanthin(CT) in foods using high performance thin layer chromatography(HPTLC) and HPLC was studied.

CT was extracted in diethyl ether from a mixture of sample and ethanol・water(1 : 1). The extracted solution was evaporated under reduced pressure at 45°. The pigment extract was analysed by TLC using a HPTLC silica gel plate(Merck, Kieselgel 60, 10x10cm) with dichloromethane・diethyl ether(9 : 0.5) as a developing solvent. Samples rich in fat were injected into a SEP-PAC alumina A column to remove fat, thus ensuring efficient analysis. The following procedure was carried out. The pigment extract was dissolved in hexane. After the solution was dehydrated with anhydrous sodium sulfate, it was applied onto the column. The column was washed with hexane , and the pigment was then eluted with acetone and methanol in a stepwise manner. The sample was also analysed on HPLC, if it was found to contain CT. The conditions of HPLC analysis were as follows : Column, Unisil QC18 column ; mobile phase, acetonitrile・methauol・dichloromethane(5 : 4 : 2) ; detection, 478nm and a photodiode array detector.

cis-CT was formed from *trans*-CT by heating and standing at room temperature. Recovery of exogenously added CT from commercial foods was 95.1－101.4%. The lowest detection limit was 10 μg/g.

This method was considered useful for the rapid and sensitive analysis of CT in foods.

Key words：カンタキサンチンcanthaxanthin, 食品foods, 高性能薄層クロマトグラフィーHPTLC, 高速液体クロマトグラフィーHPLC,

緒　言

カンタキサンチン(CT と略す)は米国, EC 諸国, 台湾, オーストラリアなどで赤橙色の着色料としてトマトピューレなどのトマトを原料とする加工食品, ソーセージなどの食肉製品やドレッシングなどに使われている. また, 家禽類の体色や卵黄の色を良くするための飼料用添加剤に用いられている. さらに, カナダや EC 諸国では, 医薬品の分野で, 光線性ヒフ症や白斑症の治療などでヒトのヒフを日焼け様の色にするための服用薬としても, 使用されている[1-6].

CT は天然界に, キノコ(*Cantharellus cinnabarinus*), フラミンゴの赤毛, マスなどに存在する[1]が, 現在は化学的合成により工業生産されている. また, その構造は, β－カロチンのヨノン環にケト基をもつ4, 4'－ジケト－βカロチンである.

わが国では, 合成された CT は指定外食品添加物であるが, 鶏卵の色及び養殖のニジマスやクルマエビなどの体色を改善するために, 生体内移行の着色料として飼料用に用いられている[1-2),7)]

CT の健康への影響について, FAO／WHO 食品添加物専門家委員会では, その安全性を A(1)クラスに評価している. しかし, ヒフを日焼け色にするため長期にCT製剤を内服したヒトの一部に, 網膜の内層に沈着物を生じて視野狭窄を示す症例がみられる[8]ことや, CT添加

*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, Shibazaki-cho 3 chome, Tachikawa, Tokyo 190, Japan
**東京都立衛生研究所

飼料で飼育のニワトリでは，肝臓中のレチノール量が減少する[9]などCTの使用について問題点を指摘した報告もある．CTはビタミンA活性がないといわれているが，その生体内代謝については未解明な部分が多い．

CTの分析法に関する報告例は少なく[4-5), 10)]，食品を対象としたものにOsadcaらの報告[4)]があるが，この方法は前処理に要す時間が長く，かならずしも満足されるものではない．すなわち，CTはカロチノイド系色素であるため，抽出後は光により分解，退色するため，迅速に分析する必要がある．著者らは，食品に使用される天然着色料に関して，その分析法[11-13)]及び使用実態[14)]を報告してきたが，今回はCTの分析法について検討した．その結果，高性能薄層クロマトグラフィー(HPTLCと略す)により定性分析した後，高速液体クロマトグラフィー(HPLCと略す)を用いて確認，定量することにより，短時間に高感度での測定が可能な分析法を確立することが出来た．また，本法を市販食品中のCTの分析に応用したので，その結果も併せて報告する．

実験方法

1．検体

平成元年4月から平成2年3月の間に都内の小売店より購入した，CTの使用が予想される魚介類及びその製品，調味料，菓子類及び卵製品など計7検体を用いた．

2．装置

高速液体クロマトグラフは日本分光工業(株)製TWINCLE型，検出器は同社製紫外可視分光検出器870－UV型及び紫外可視多波長検出器MULTI－340型，データ処理には同社製データ処理システムDP－L340／98(Ver. 4.0)を用いた．

3．試薬

(1) 標準色素及び色素標準溶液

CT：Fluka社製カンタキサンチン(トランス)，98%以上含有．

β－アポ－8'－カロテナール：Fluka社製β－アポ－8'－カロテナール(トランス)，99%以上含有．

β－アポ－8'－カロチン酸エチルエステル：日本ロシュ社製Carophyll Yellow(β－アポ－8'－カロチン酸エチルエステル10%含有)を水に懸濁後，クロロホルムで抽出して得られた色素を用いた．

クルクミン及びβ－カロチン：和光純薬工業(株)製特級品．

パプリカ抽出色素及びビキシン：東京化成工業(株)製カプサンチン及びビキシン．

ノルビキシン：アイゼン(株)製アナトーEX．

CT標準溶液：Fluka社製カンタキサンチン(トランス)を少量のジクロロメタンに溶解後，メタノール・ジクロロメタン(1：1)で適宜希釈して調製した．

他の色素の標準溶液も同様にして調製した．

(2) HPTLC用シリカゲルプレート　メルク社製HPTLCプレート，キーゼルゲル60，10x10cm．

(3) HPTLC用展開液　ジクロロメタン・ジエチルエーテル(9：0.5)．

(4) アルミナAカートリッジカラム　日本ウォーターズ社製SEP－PAKアルミナAカートリッジ．

(5) HPLC用移動相　アセトニトリル・メタノール・ジクロロメタン(5：4：2)．

その他の試薬はいずれも特級品を用いた．

4．試験溶液の調製

試料からの色素の抽出については，既報[13)]に準じて行った．すなわち，よく細切した検体2.0－5.0gを秤取後，分液ロートに移しエタノール・水(1：1)を10mlとジエチルエーテル20mlを加え10分間振とう抽出した後，有機層を褐色のナス型フラスコに移した．水層にはさらにジエチルエーテル10mlを加え，有機層が着色しなくなるまで抽出操作を繰り返した．次いでこれらの有機層を合わせて，減圧下(45°以下)で溶媒を留去し，色素抽出物を得た．

トマトピューレ，ケチャップなど油脂分が少ない検体からの色素抽出物は，少量のジクロロメタンで溶解後10mlとした後，ミクロフィルター(0.4μm)でろ過し，得られたろ液をHPTLC及びHPLC用試験溶液とした．

ソーセージやドレッシングなど油脂分の多い食品からの色素抽出物の場合は，アルミナAカートリッジカラムを用いて油脂を除去したものを試験溶液とした．すなわち，色素抽出物を約10mlのヘキサンに溶解後，無水硫酸ナトリウムを少量加え，約15分間放置して脱水した後，あらかじめ，ヘキサン10mlを通して洗浄したアルミナカラムに注入した．流速約2.0ml／minで色素液を流して，色素をカラムに吸着させた後，ヘキサンを10ml,5mlと2回注入してカラムを洗浄後，アセトン2ml次いでメタノール5mlを順次注入して色素を溶出した．初めの約1mlは捨て，次いで溶出する色素液を集め，これにジクロロメタンを加え10mlとしたものをHPTLC及びHPLC用試験溶液としてた．得られた試験溶液の色素濃度が低い場合は，45°以下で減圧濃縮した．

5．HPTLCによる分析

シリカゲルプレートの下端より1.5cmのところに，マイクロシリンジを用いて試験溶液及び標準色素溶液をス

ポットした後，暗所で約6cmの高さまで展開した．展開終了後，直ちにドライヤーを用いて溶媒を除去した後，Rf値と色調を自然光及び紫外線(365nm)照射下で観察した．

6．HPLCによる分析

HPTLCによりCTが確認された試験溶液について，HPLCにより，以下の条件で分析を行った．

カラム　ガスクロ工業(株)製 Unisil QC18，5μm，250mm×4.6mm．I. D.

移動相　アセトニトリル・メタノール・ジクロロメタン(5：4：2)．

流速　1.0ml／min.

検出波長　478nm.

注入量　10μl.

得られたクロマトグラムについて，ピークの保持時間と多波長検出器を用いて測定した吸収スペクトル(250−550nm)により定性的に確認を行うとともに，ピーク面積法により定量した．

結果と考察

1．アルミナAカートリッジカラムによる油脂分の除去

ドレッシングなど油脂含有量の高い食品からの色素抽出物は，当然のことながら油脂分を多く含むためHPTLC展開時にスポットが拡散し，Rf値に悪影響を及ぼすばかりでなく，HPLCにおいても移動相への油脂の溶解度が低いため，測定中カラムに目ずまりを起こし易くなる．そこでアルミナカラムによる油脂の除去を試みた．

CTなど，カロチノイド系色素はアルミナによく吸着するが，油脂の共存下では吸着率が減少する．そこで，油脂共存下におけるアルミナへのCTの吸着する様子を調べた．

市販のラードを0.3g／mlになるように溶解したクロロホルム溶液を2−18ml(ラードとして0.6−5.4gを含有)とり，それぞれに100μg／ml CT標準溶液1mlを添加して，減圧下で溶媒を除去後，残留物を約10mlのヘキサンに溶解した．これに無水硫酸ナトリウム少量を加えて脱水した後，得られた溶液をカラムに注入して，色素が吸着する様子を観察した．ラード溶液6ml(ラード1.8g)添加までCTはほぼ完全にカラムに吸着されるが，これ以上油脂が増加すると吸着率は徐々に減少した．そこで同カラムをさら一本連結したところ，ラード溶液18ml(ラード5.4g)を添加したものを注入してもCTは完全に，カラムに吸着保持された．この時の回収率は95.6%と満足のゆくものであった．

以上の結果から，色素抽出物中の油脂量が1.5g以下の場合は1本のカラムを，それ以上の場合は2本のカラムを連結し用いることにした．

2．HPTLC

HPTLCは従来のTLCに比べて展開時間が短く，また少量の試料で良好な分離が得られることが報告されている[15]．CTのようなカロチノイド系色素は特に光により退色しやすいため短時間で展開できるHPTLCの使用を試みた．

展開溶媒[4]について種々検討したところジクロロメタン・ジエチルエーテル(9：0.5)により，Fig.1.に示したようにRf＝0.45に赤橙色の単一スポットが得られた．食品に使用される可能性のある他の7種類の油溶性色素，β−アポ−8'−カロテナール，β−アポ−8'−カロチン酸エチルエステル，クルクミン，β−カロチン，パプリカ抽出色素，ビキシン及びノルビキシンとも良く分離するクロマトグラムが得られた．また展開時間はほぼ15分(20°)と短時間であった．

なお，検出限界は試料の1gについて10μg(スポット

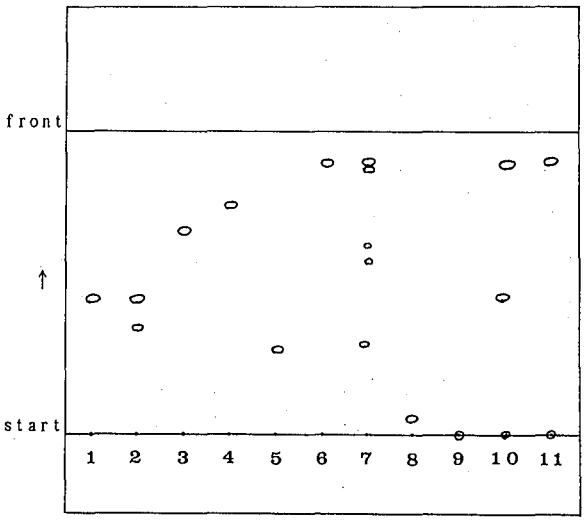


Fig 1．HPTLC Chromatogram
HPTLC plate；silica gel 60. Developing solvent；dichloromethan·diethyl ether(9：0.5).
1；*trans* − canthaxanthin，2；product resulted from *trans* − canthaxanthin by heating for 100min at 60℃，3；β−apo−8'−carotenal，4；β−apo−8'−carotenoic acid ethyl ester，5；curcumin，6；β−carotene，7；paprika extract，8；bixin，9；norbixin，10；tomato puree extract added *trans* − canthaxanthin，11；tomato puree extract

量10 μl)であった.

以上の結果から HPTLC は TLC に比べて短時間で,しかも高感度で CT の検出が可能であるため, CT の検出に極めて有効な手段と考える.

3. HPLC

(1) 分析条件:分析カラム及び移動相[9-10), 13)]について種々検討した結果, Unicli QC18 カラムを用い,移動相にアセトニトリル・メタノール・ジクロロメタン(5:4:2)を使用したところ, Fig.2. A に示した単一でシャープなクロマトグラムが得られた. β-アポ-8'-

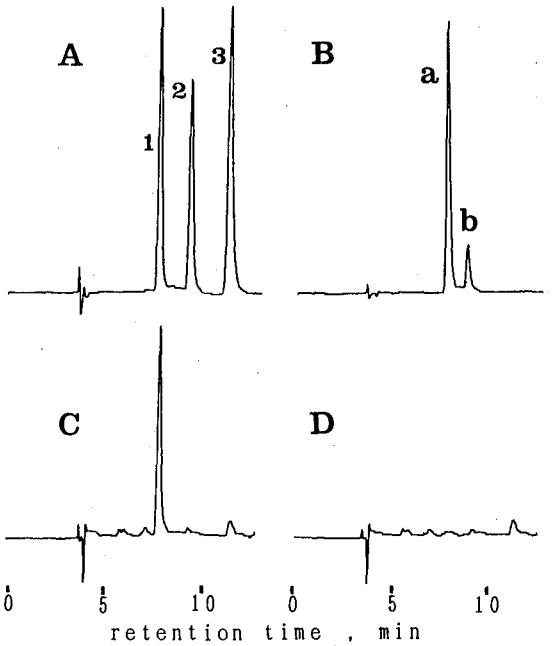


Fig 2. HPLC Chromatograms

HPLC condition Column ; Unisil QC18,5 μm, 4.6x250mm. Mobile phase ; acetonitrile・methanol・dichloromethane (5 : 4 : 2). Detection ; 478nm. Flow rate ; 1.0ml/min. Injection volume ; 10 μl.

A : standard carotenoids
1 ; *trans*-canthaxanthin, 2 ; β-apo-8'-carotenal, 3 ; β-apo-8'-carotenoic acid ethyl ester

B : products from *trans*-canthaxanthin by heating for 100min at 60℃
a ; *trans*-canthaxanthin, b ; *cis*-canthaxanthin

C : tomato puree extract added *trans*-canthaxanthin

D : tomato puree extract

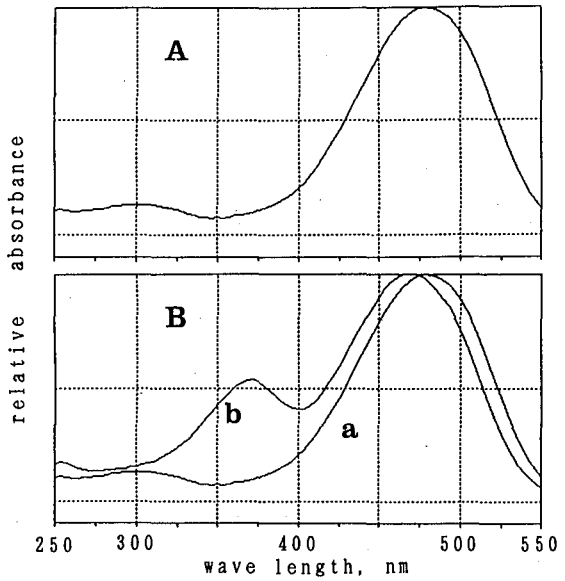


Fig 3. Absorption spectra of canthaxanthin

A : *trans* - canthaxanthin (λ max 478nm)

B : products resulted from *trans* - canthaxanthin by heating for 100min at 60℃

a ; *trans* - canthaxanthin(λ max 478nm),b ; *cis* - canthaxanthin(λ max 468nm, 368nm)

カロテナールなど他の7種の色素のうち, β-アポ-8'-カロテナールとβ-アポ-8'-カロチン酸エチルエステルは保持時間15分以内に, β-カロチンが20分にピークを示した. その他の色素はこの条件下ではピークが見られなかった.

また, Fig.3. A に示した紫外可視多波長検出器で測定した吸収スペクトルによれば, CT の極大吸収波長(λ max と略す)は478nm であった.

(2) 検量線及び検出限界:検量線は, 0.004-0.150 μgの範囲で直線性を示した. 定量限界は試料1gあたり5 μgであった. また, 紫外可視多波長検出器による吸収スペクトルの検出限界は試料1 g あたり10 μgであった.

4. シス型CTの生成

CTにはトランス型(t型と略す)とシス型(c型と略す)が存在することが知られている. 自然界の CT は, ほとんどt型であるが, これは保存あるいは加熱により容易に異性化しc型に変わるといわれている[1)]. また, 工業生産されているCT製剤ではt型とc型の比がほぼ3:1であり, CT 入り飼料で飼育されたニワトリの肝臓中にはt型よりc型の方が多く検出された[5)]など興味深い報告もある. このようなことから, 食品添加物として

CTが使用された場合，製剤由来のt型CTとc型CTの他に，食品の製造工程や保管中あるいは分析操作中に，c型が生成されることが予想される．

そこで，CT標準溶液を褐色試験管にとり15 μg／mlになるようにメタノールで希釈した後，25°，45°及び60°で0－100分間加熱したものについて分析を試みた．

45°で30分，60°では15分以上経過するとHPLCではFig.2.Bのようにt型による主ピークaのほかに小ピークbがみとめられた．これらについて紫外可視多波長検出器で吸収スペクトルを測定したところ，Fig.3.Bようにピークaは478nm，bは468nmと368nmにそれぞれλmaxを示した．Mayneら[5]は，t型CTは474nmに，c型はこれより短波長側の466nmと364nmにλmaxを有すと報告している．このことからピークaはt型CTであるが，bはc型によるものと考えられる．c型については15－シス，13－シス及び9－シスが主な異性体として考えられている[10]ことから，ピークbは，これらc型CTの混合物によるものと推察される．

次いで，Fig.4.にc型の生成に及ぼす温度の影響を示した．実験開始直後(0分時)の478nmにおけるt型CTのHPLCでの相対吸光度を100％とした時，t型は25°では100分後でも変化はみられなかったが，24時間後には95％に減少した．また，0分時のt型CTを100％として比較すると，c型の相対吸光度は100分後では0％であったが，24時間後に2％を示した．48時間経過すると，さらにt型が91％，c型が3％となり緩慢な速度ではあるがt型の減少とc型の増加がみられ，室温での放置によっても異性化がゆるやかに進行することが確認された．一方，45°では30分以上経過するとc型の生成をわずかにみるが，100分後においても，t型とc型を合計した相対吸光度は0分時のt型のものにほぼ等しかった．このことから45°では100分間経過でc型の生成が認められるにもかかわらず，色素総量の減少はほとんどないと考えられる．しかし，60°ではt型の減少率およびc型の増加率は，45°の場合に比べて明らかに大きく，100分後にはt型は約80％に減少しc型は12％と増加した．また，色素総量としても90％に減少した．従って，60°ではc型の生成と同時に色素の分解が起こり．色素総量としての損失を招いたと考えられる．

HPTLCの結果はc型CTの生成にともないFig.1.に示したようにt型CTによる主スポットの他にRf＝0.35に赤橙色の副スポットがみとめられた．この展開パターンはOsadcaら[4]が行ったt型とc型CTを分離した時のものに類似しており，このことからもRf＝0.35のスポットはc型CTによるものと考えられる．

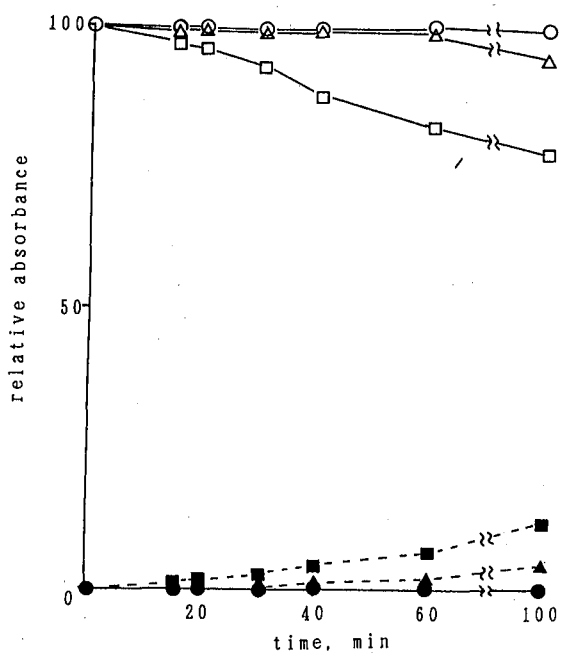


Fig 4. Influence of temperature on formation of *cis* – canthaxanthin from *trans* – canthaxanthin
Detection : *trans* – canthaxanthin (478nm).
cis – canthaxanthin (468nm)
—○— : *trans* – canthaxanthin at 25℃
…●… : cis–canthaxanthin at 25℃
—△— : *trans* – canthaxanthin at 45℃
…▲… : *cis* – canthaxanthin at 45℃
—□— : *trans*–canthaxanthin at 60℃
…■… : *cis* – canthaxanthin at 60℃

以上の結果から，本法での操作中におけるCTの異性化及び分解が起こる割合は，本法では分析操作が約1時間で終了するため，遮光下で行った場合，極めて小さいと考えられる．

また，CT使用食品では，t型とc型が共存して含有されていることが予想される．これらは，製剤由来の他に食品の製造あるいは流通の過程で，t型より生成されたc型を含むものであると考えられる．そこで，食品中にCTを検出した場合，t型とc型を合計したものをCT量とする必要がある．

5．回収率

CTの使用が予想される食品に試料1gあたりCT100 μgを添加して回収率を検討したところ，Table 1.にしめしたように95.1－101.4％と良好な結果が得られた．

Table 1. Recovery of canthaxanthin in commercial foods

Sample	Canthaxanthin		
	Added (μg/g)	Found (μg/g)	Recovery (%)
Tomato puree	100	99.1	99.1
Cookie	100	95.1	95.1
Salad dressing	100	101.4	101.4
Chicken sausage	100	98.0	98.0
Omelet	100	97.9	97.9

Background value of canthaxanthin in all samples <10 μg/g n = 3

なお，トマトピューレに添加した場合の HPTLC クロマトグラムをFig.1.に，HPLC クロマトグラムをFig.2. C及びDに示した．紫外可視多波長検出器により得られた吸収スペクトルは添加した CT 標準溶液由来の t 型 CTによく一致した．また，c 型は検出されなかった．

6．市販食品への適用

本法を用いて市販食品を分析した結果を Table 2 に示した．7試料いずれからも CT は検出されなかった．また，HPTLC 及び HPLC において，いずれの場合も妨害はみられなかった．

しかし，現在のところ CTはFAO／WHO 食品添加物専門家委員会での毒性評価がA(1)クラスであり，また，食品に使用できる油溶性赤色系色素の種類が少ないことなどを考え合わせると，実際には食品にかなり使われている可能性がある．

今後は，さらに広範囲の食品について調査を行うとともに，CT 添加飼料で飼育されたニワトリやマス，エビなどの動物に由来する食品中の CT を分析し，CT が動物体内でどのような変化を経て，最終食品に移行するかについても検討する予定である．

Table 2. Analytical result on commercial foods

Sample	Country of origin	Color of sample	Detected pigment
Canned crawfish soup	France	orange	
Raw shrimp	Japan	orange	
Dried sakura shrimp	Japan	red	R-102
Salad dressing	Japan	red-brown	paprika extract
Tomato puree	Japan	red	lycopene
Cookie	Japan	brown-orange	
Omelet	Japan	yellow	β-carotene

Canthaxanthin was not detected in any samples.
Detection limit>10 μg/g n = 1

ま と め

食品中の CT 分析法について検討した結果，下記のことが明らかになった．

1） 油脂を多く含む試料の場合，色素抽出物のクリーンアップに，アルミナAカートリッジカラムを用いたところ，油脂分を簡便に除くことが出来た．

2） HPTLC 及び HPLC を用いることにより，食品に使用される可能性のある他の7種の油溶性着色料と良く分離出来た．また，紫外可視多波長検出器により吸収スペクトルを確認できた．HPTLC では15分と短い展開時間で，高感度な CT の検出が可能であった．

3） 加熱あるいは室温に放置することにより，c 型 CTが容易に生成されることを確認した．このことから，食品中に CT を検出した場合，t 型と c 型の合計をもって CT 量とする必要がある．

4） 市販食品を用いての HPLC での回収率は95.1－101.4%と良好であった．また，本法での検出限界は試料1 g あたり10 μg であった．

なお，市販食品7検体について本法により分析を行ったが，そのいずれからも CT は検出されなかった．また，HPTLC 及び HPLC での妨害は見られなかった．

以上の結果から，本法は食品中の CT の迅速で高感度な分析法として有効に使用出来るものと考える．

謝辞：標準色素を提供していただいた日本ロシュ社及びアイゼン(株)に深謝致します．

文 献

1） 谷村顕雄，片山 脩，遠藤英美，黒川和男，吉積智司編：天然着色料ハンドブック，241－245，1979，光淋，東京．
2） 伊藤良仁：New Food Industry，29，24－31，1987.
3） J. C. Bauernfeind：Food Technolgy，May，48－49，1975.
4） M. Osadca，E. Deritter，R. H. Bunnell：J. Assoc. Off. Anal. Chem，49，1078－1083，1966.
5） S. T. Mayne，R. S. Parker：J. Agric. Food Chem.，36，478－482，1988.
6） A. K. Gupta，H. F. Haberman，D. Pawlowski，G. Shulman，I. A. Menon：Int. J. Dermatology，4，528－532，1985.
7） 伊藤良仁：New Food Industry，30，30－35，1988.
8） A. M. Ros，H. Leyon，G. Wennersten：Photod-

ermatology, 2, 183－185, 1985.
9) S. T. Mayne, R. S. Parker：J. Agric. Food Chem., 36, 483－485, 1988.
10) H. J. C. F. Nelis, M. M. Z. Van Steenberg, M. F. Lefevere, A. P. De Leenheer：J. Chromatog., 353, 295－302, 1986.
11) 荻原 勉, 野沢竹志, 平田恵子, 天川映子, 大石充男, 関 博麿：食衛誌, 21, 207－213, 1980.
12) 平田恵子, 荻原 勉, 天川映子, 大西和夫：同上, 24, 1－6, 1983.
13) 天川映子, 平田恵子, 荻原 勉, 大西和夫：分化, 33, 586－590, 1984.
14) 荻原 勉, 天川映子, 平田恵子, 野沢竹志, 大西和夫, 坂井千三：東京衛研年報, 36, 245－250, 1985.
15) 大森竹塩：分化, 29, 189－193, 1980.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 140-142, 1990

天然調味料の品質評価（第2報）*

中島和雄**, 松井敬子**, 広門雅子**,
平田恵子**, 植松洋子**, 風間成孔**

Survey on Quality of Natural Flavor Enhancers (II)

KAZUO NAKAJIMA** KEIKO MATSUI**, MASAKO HIROKADO**,
KEIKO HIRATA**, YOKO UEMATSU**, and MASAYOSHI KAZAMA**

Keywards：天然調味料 natural flavor enhancers, アミノ酸 amino acid, グルタミン酸 glutamic acid, 核酸 nucleic acid

緒　言

これまでに天然添加物の調査の一環として天然調味料の分析を行ってきた．前回昭和57年の調査結果[1]では，市販の天然調味料は，食品添加物として指定されているグルタミン酸が添加され，これを用いて味を調整した調味料がほとんどであった。この時収去した検体は，ポーク，チキン，ビーフなど畜産系の調味料が主体であったので，畜産系以外の天然調味料の傾向がわからなかった。その後7年を経過した今日，新技術の進歩により，市場には各種成分を含む多様な調味料が使われてきている。そこで今回，畜産系の他に，原料別にみた水産系，野菜系，加水分解系および酵母系などの調味料を収去し，その品質評価を目的に，アミノ酸および核酸について分析を行いその傾向を検討したので報告する．

実験方法

試料　東京都衛生局食品監視課より，平成元年4月から2年3月にかけて当所に送付された天然調味料製剤147検体を用いた．

試薬　すべて試薬特級品を用いた．

装置　アミノ酸分析計：日立アミノ酸分析計835型，高速液体クロマトグラフ：日本分光工業製880シリーズ，検出器：日本分光工業製紫外可視検出器870型

アミノ酸の分析　試料100mgを塩酸溶液(PH 2)に溶かし100mlとし，ミリポアフィルター（0.22 μm)でろ過し試料溶液とした．試料溶液50 μlを用いアミノ酸分析計により，アミノ酸の分析を行った。

核酸の分析　試料100mgを水に溶かし50mlとし試料溶液とした．5′ーイノシン酸ナトリウム，5′ーグアノシン酸ナトリウム，5′ーウリジン酸，5′ーシトシン酸および5′ーアデノシン酸を，最終濃度として約10 μg／ml になるように希釈し標準溶液とした．この液を用い高速液体クロマトグラフィー(以下HPLCと略す)を行った．

HPLCの条件：カラム Asahipak GS 320 (7.6 ϕ × 500mm)，溶離液　10mMリン酸ナトリウム溶液，流速 1 ml／min，検出波長 UV254nm

結果および考察

アミノ酸の分析　天然調味料中のアミノ酸17種の定量分析を行った．天然調味料147検体のすべてからアミノ酸が検出された．総アミノ酸含有量としては，0.3～62.8%で検体によりかなり差があった．天然調味料の分類例[2]を図1に，原料別の総アミノ酸含有量の平均値を表1に示した．加水分解系としては，動物蛋白ではボーンエキスの加水分解物が，植物蛋白では小麦グルテンやコーングルテンの加水分解物が使われており，そのペースト状の検体のアミノ酸含有量の平均値が41.4%で最も多かった．また酵母エキスの抽出物が使われている酵母系および酵母配合系で比較的アミノ酸含有量が多かった．一方，野菜系としては，椎茸，オニオンなどが使われ，その粉末状の検体のアミノ酸含有量の平均値は，3.7%であり，そばつゆ，ガラスープおよび焼肉のたれなどを含むその他の液体状の検体では3.5%で少なかった．

前回昭和57年の調査結果[1]では，グルタン酸の多い検

---

*第1報，東京衛研年報，34，191-196，1983.

**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, Hyakunin–cho 3 chome, Sinjuku–Ku, Tokyo 169, Japan

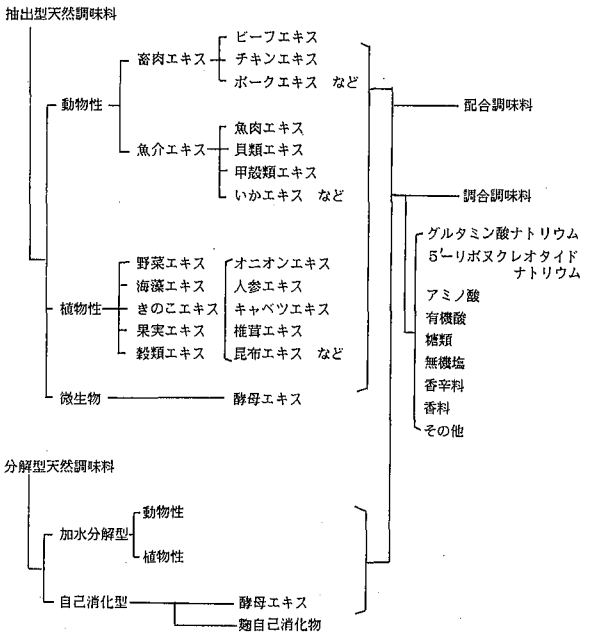


図1　天然調味料の分類例

体がほとんどであったので，さらに，総アミノ酸に対し各種アミノ酸の量が多い検体の数を調べた．総アミノ酸中に占める各種アミノ酸の割合が，天然物の場合20％を超えるものがないことから，この値を超えたものを特定のアミノ酸が添加されたものと考えた．酵母系9検体では，各種アミノ酸を20％以上含む検体がなく，すべて抽出物をそのまま利用していることが考えられた．原料にポーク，チキン，およびビーフエキスなどが使われている畜産系では，25検体中，21検体がグルタミン酸を20％以上含んでいた．残りの4検体は，総アミノ酸が0.3％以下の検体であり，総アミノ酸含有量の多いものは，すべてグルタミン酸が多いことがわかった．原料にカツオ，貝，エビおよびホタテなどのエキスが使われている水産系では，35検体中，31検体がグルタミン酸を20％以上含んでいた．また，水産系では，グルタミン酸とともにグリシンを20％以上含んでいる検体が4検体あり，これらはエビおよびカニの成分を増強したものであることが考えられた．

天然調味料は，アミノ酸分析の結果から，グルタミン

表1．天然調味料の原料別アミノ酸含有量

原料名	検体数	性状	検体数	アミノ酸含有量の平均値（％）	総アミノ酸に対しグルタミン酸を20％以上含む検体数
畜産系	25	粉末	17	14.9	15
		ペースト	8	10.0	6
		液体	0		
水産系	35	粉末	22	11.9	21
		ペースト	5	10.8	2
		液体	8	10.9	8
野菜系	13	粉末	11	3.7	5
		ペースト	1	0.5	0
		液体	1	3.5	1
加水分解系	26	粉末	19	31.2	12
		ペースト	4	41.4	2
		液体	3	11.9	3
酵母系	9	粉末	5	21.3	0
		ペースト	4	18.8	0
		液体	0		
酵母配合系	12	粉末	7	19.0	5
		ペースト	5	18.8	4
		液体	0		
その他	27	粉末	4	11.1	4
		ペースト	0		
		液体	23	3.5	21
合　計	147		147		109

酸，グリシン，アラニンおよびアスパラギン酸などの特定のアミノ酸を20％以上含む検体が，147検体中121検体(82％)あった．この中でグルタミン酸を20％以上含む検体が，109検体(全体の74％)あった．一方，天然由来のアミノ酸のみを含む検体は26検体(18％)であった．特定のアミノ酸が多い検体は，そのほとんどがアミノ酸添加により調整された調合調味料であることが推測された．

核酸の分析　天然調味料中の核酸５種の定量分析を行った．総核酸含有量としては，0.0～4.8％で，アミノ酸と比較し，その含有量は全体的に少なかった．原料別の総核酸含有量の平均値を表２に示した．酵母系は2.2％，酵母配合は1.4％で多く，野菜系は0.1％で少なく，この傾向はアミノ酸の傾向と同様であった．次に，総核酸中の５′－イノシン酸および５′－グアノシン酸が明らかに多い検体として，総核酸に対し，この合計が90％以上の検体の数を調べた．その検体は15検体(10％)で，これらは合成添加物を添加したものであることが示唆された．残りの132検体(90％)からは５′－イノシン酸，５′－グアノシン酸，５′－ウリジン酸，５′－シントシン酸および５′－アデノシン酸などが検出されものがあり，天然由来の核酸が多く含まれていることが示唆された．

表２．天然調味料の原料別核酸含有量

原料名	検体数	核酸含有量の平均値(％)
畜産系	25	0.6
水産系	35	0.5
野菜系	13	0.1
加水分解系	26	0.8
酵母系	9	2.2
酵母配合系	12	1.4
その他	27	0.2
合　計	147	

ま と め

天然調味料147検体のアミノ酸および核酸の定量分析を行った．アミノ酸分析の結果では，天然物のほかにグルタミン酸，アスパラキン酸，グリシン，およびアラニンが添加されたと考えらる検体があり，グルタミン酸が総アミノ酸に対し20％以上含まれる検体が総検体数の74％あった．原料別にみると，酵母系の調味料は，すべて天然由来のアミノ酸のみからできていることが考えられた．しかし，酵母系以外の調味料では，アミノ酸が添加されたと考えられる検体がほとんどであった．核酸分析の結果では，総核酸に対し，合成添加物の核酸を90％以上含む検体が総検体数の10％あった。これらのことから，今回調査した天然調味料は，調合調味料が主体であることが示唆された．

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）広門雅子，中島和雄，高橋巌，遠藤英美，講入茂：東京衛研年報，34，191-196，1983
2）高橋　紀：食品と開発，23(７)，59-61，1988

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 143-147, 1990

イオンクロマトグラフィーによる食品添加物製剤中の炭酸塩及び炭酸水素塩の定量

栗原裕子*, 安野哲子*, 荻野周三*,
小関正道*, 風間成孔*

Determination of Carbonate and Hydrogencarbonate in Food Additive Preparations by Ion Chromatography

YUKO KURIHARA*, TETSUKO YASUNO*, SHUZO OGINO*, MASAMICHI KOSEKI* and MASAYOSHI KAZAMA*

A simple and useful method is described for determination of carbonate and hydrogencarbonate in food additive preparations, using ion-exclusion chromatography. The analysis was performed using an ICE-AS 1 column (Dionex®), a 1mM octane sulfonic acid solution for the eluant, and a 3mM tetrabutylammonium hydroxide solution for the regenerant. The calibration curve for carbonate in the range of 10－300 μg/ml was linear. Using a 50 μl injection loop, the detection limit for carbonate was 1.25mg/g in food additive preparations. The samples had to be dissolved in 0.002N sodium hydroxide solution or 0.1N formaldehyde solution for stabilization of carbonate and hydrogencarbonate. The recovery of carbonate added to various food additive preparations at levels of 5.7－357.2mg/g were in the range of 99.1－103.7%.

Keywords：イオンクロマトグラフィー ion chromatography, 炭酸塩 carbonate, 炭酸水素塩 hydrogencarbonate, 食品添加物製剤 food additive preparation

はじめに

炭酸ナトリウムは炭酸カリウムとともにアルカリ剤としてかんすいほか多くの食品添加物製剤に使用されている[1,2]. また, 炭酸水素ナトリウムはやはり食品添加物製剤である合成膨脹剤の主要成分として多用されている[1,2].

前報で, 著者らは食品添加物製剤中の炭酸塩及び炭酸水素塩を簡便に精度良く定量できる方法として, 酵素反応を利用した分析法を検討し, 報告した[3]. しかし, 食品添加物製剤の配合成分によっては酵素に影響を与えるものもあり, 汎用性の点に問題が残った.

イオンクロマトグラフィー(以下ICと略す)はイオン種の分離分析法として簡便で応用範囲の広い方法である[4,5]. ICを利用した炭酸塩類の分析法についてはいくつか報告がある[6-8]が, 多くは生体系の炭酸水素塩の測定についてである.

著者らは今回このICにより, 酵素法ではできなかった次亜硫酸ナトリウム製剤をはじめ, 食品添加物製剤中の炭酸塩及び炭酸水素塩を, 簡便にかつ精度良く定量する方法を検討し, 良好な結果を得たので報告する.

実験方法

1．**試料**　東京都衛生局食品監視課より平成元年4月から平成2年3月にかけて送付された次亜硫酸ナトリウム製剤2種類, かんすい1種類, 合成膨脹剤7種類, 及びその他の食品添加物製剤3種類の計13種類を試料とした. また, その表示成分をTable 1に示した.

2．**試薬及び標準液**　1）炭酸ナトリウム：無水, 試薬特級品を105℃で4時間乾燥して用いた.

2）炭酸イオン標準液：炭酸ナトリウム441.6mgを水に溶かして100mlとした.

3）オクタンスルホン酸(以下OSAと略す)：Dionex社製, 0.10M溶液.

4）水酸化四ブチルアンモニウム(以下TBAOHと略す)：Aldrich Chemical Company製, 40%水溶液を室温で結晶が折出しないように20%に希釈して保存した.

5）ホルムアルデヒド液：試薬特級, 35%ホルムアル

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

Table 1. Indicated Ingredients of Food Additive Preparations

Samples		Ingredients	Content(%)
Sodium Hydrosulfite Preparation	1	Sodium Hydrosulfite	99
		Sodium Carbonate	1
	2	Sodium Hydrosulfite	95
		Sodium Carbonate	5
Kansui	1	Potassium Carbonate	81
		Sodium Carbonate	10
		Disodium Hydrogenphosphate	6
		Sodium Polyphosphate	2
		Sodium Pyrophosphate	1
Baking Powder	1	Sodium Hydrogencarbonate	30
		Aluminium Potassium Sulfate	40
		Potassium Hydrogen Tartrate	15
		Starch	15
	2	Sodium Hydrogencarbonate	33
		Calcium Dihydrogenphosphate	21
		Aluminium Potassium Sulfate	13
		Potassium Hydrogen Tartrate	9
		Disodium Dihydrogenpyrophosphate	4
		Starch	20
	3	Sodium Hydrogencarbonate	30
		Ammonium Chloride	23
		Potassium Hydrogen Tartrate	20
		Aluminium Potassium Sulfate	10
		Others	17
	4	Sodium Hydrogencarbonate	40
		Ammonium Chloride	30
		Potassium Hydrogen Tartrate	15
		Aluminium Potassium Sulfate	5
		Starch	10
	5	Sodium Hydrogencarbonate	40
		Potassium Hydrogen Tartrate	35
		Ammonium Chloride	13
		Aluminium Potassium Sulfate	7
		Starch	5
	6	Sodium Hydrogencarbonate	29
		Calcium Dihydrogenphosphate	17
		Aluminium Potassium Sulfate	14
		Potassium Hydrogen Tartrate	7
		Fumaric Acid	2
		Starch	31
	7	Sodium Hydrogencarbonate	50
		Aluminium Potassium Sulfate	30
		Potassium Hydrogen Tartrate	10
		Others	10
Preparation	1	Sodium Carbonate	1
		Sodium Pyrophosphate	5.33
		Potassium Metaphosphate	3
		Ascorbic Acid	1
		Sodium Nitrite	0.63
		Potassium Nitrate	0.40
		Others	88.64
	2	Sodium Carbonate	50
		Sodium Metaphosphate	15
		Sodium Polyphosphate	15
		Sodium Pyrophosphate	10
		Others	10
	3	Sodium Carbonate	3
		Sodium Pyrophosphate	50
		Fumaric Acid	1.3
		Calcium Dihydrogenphosphate	1.2
		Aluminium Potassium Sulfate	0.7
		Others	43.8

デヒド(以下ホルマリンと略す)

6) 水：すべて蒸留水を Milli-Q Labo(日本 Millipore Limited)で処理した超純水を使用した.

他の試薬はいずれも市販特級品を用いた. また, 溶液類はすべて用時調製した.

3. **装置** イオンクロマトグラフ：Dionex社製, 4000i 型

4. **試験溶液の調製** 1) 次亜硫酸ナトリウム製剤：あらかじめホルマリン5mlに水5mlを加え, 1N 水酸化ナトリウム溶液で中和した液(以下この溶液をホルマリン調製液と称す)2mlに, 試料約800mgを精秤して加え, 流水で冷却しながら完全に溶解させ, 水を加えて正確に100ml としたものを試験溶液とした.

2) かんすい：試料約800mgを精秤し, 水を加えて溶かし, 正確に100mlとした. 必要があればこれを水で希釈して, 炭酸イオンの濃度が30～170 μg/ml になるように調製したものを試験溶液とした.

3) 合成膨脹剤及び他の製剤：0.002N 水酸化ナトリウム溶液に, 試料約800mg を精秤して加えて溶かし, 全量を100mlとした. もし不溶物があれば0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し, 必要があればこれを0.002 N 水酸化ナトリウム溶液で希釈して, 炭酸イオンの濃度として30-170 μg/mlになるように調製したものを試験溶液とした.

5. **IC の分析条件** 分析カラム：Dionex社製 ICE-AS 1 (9×250mm), 溶離液：1mM OSA 溶液, 流量：1.0 ml/min, 注入量：50 μl, 検出感度：30 μS/cm, サプレッサー：Dionex社製 AMMS-ICE 型, 再生液：3mM TBAOH 溶液.

6. **定量** 検量線から, ピーク面積法で定量を行った.

結果及び考察

1. **分析条件** 炭酸イオン標準液を50倍に希釈した液(炭酸イオンとして50 μg/ml)を標準溶液として, 溶離液と再生液の濃度を検討した. 流量1.0ml/min において, OSA の濃度を0.2～1.2mM まで0.2mM 毎に 6 段階に変化させ, 各濃度に対して TBAOH の濃度を1～5 mM まで 1 mM 毎に 5 段階に変化させて標準溶液を測定した. OSA の濃度を変化させても保持時間には影響がなかったが, 低濃度になるほどベースラインは多少不安定になった. また, TBAOH の濃度が高くなると, 炭酸イオン(炭酸塩も炭酸水素塩も検出時には炭酸水素イオンの形になっていると思われるが, ここでは便宜上炭酸イオンと表現する. 以下同様)のピークの後に落ち込みがみられるようになり(Fig. 1), ピーク面積に影響を与えた.

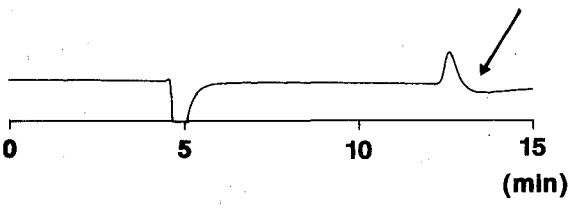


Fig. 1. An Example of Ion Chromatogram of Carbonate
Note the Dropping Conductivity Soon after the Carbonate Peak

検討の結果, 他のピークとの分離性, ベースラインの安定性, ピーク面積の再現性等を考慮して, OSA 濃度は1mM, TBAOH 濃度は3mM とした. この条件において炭酸イオンの保持時間は12.5min であった. また, 標準溶液を用いて10回繰り返し測定を試みたところ, 平均ピーク面積の変動係数は4.4%であり, 再現性は良好と思われた.

なお, この条件でも測定回数が300回を越える頃にやがて落ち込みが出現したが, これは0.1N 塩酸でサプレッサーを洗浄することにより解消することができた.

2. **検量線** 炭酸イオン標準液を段階的に希釈して標準溶液とし, 検量線を作成した. 炭酸イオンとして10～300 μg/mlの範囲で直線性を示した(r=0.999). 検出限界は試料中の炭酸イオン濃度として1.25mg/gであった.

3. **試験溶液の調製方法** 1) 次亜硫酸ナトリウム製剤：次亜硫酸ナトリウムの水溶液は空気により酸化されてしだいに混濁するので, 中性のホルマリンに溶かして安定化させる必要があった. 次亜硫酸ナトリウムとホルムアルデヒドは下式のように反応する[2].

$$Na_2S_2O_4 + 2HCHO + 4H_2O \longrightarrow NaHSO_2 \cdot HCHO \cdot 2H_2O + NaHSO_3 \cdot HCHO \cdot H_2O$$

したがって, ホルムアルデヒドの必要理論量は, 次亜硫酸ナトリウム1gに対しホルマリンとして1ml であるが, ホルマリンがカラムに与える影響も考慮して, 試験溶液の1%に抑えることにした.

また, ホルマリンの希釈倍率を変えて試料を溶解し測定してみたが, 希釈する水の量が 1 : 1 の割合以上になると, 測定値が減少した.

以上のことより, 試料800mgはホルマリン調製液2ml に完全に溶解させた後, さらに水を加えて正確に100ml にした. また, 溶解は発熱を伴うので流水で冷却しながら行った.

2) 合成膨脹剤及び他の製剤：合成膨脹剤及び他の製

剤を水に溶解したとき，配合されている酸性物質の影響で二酸化炭素が発生する試料に対し，水酸化ナトリウム溶液を溶媒として使用することにした．

まず，その必要量を検討した．炭酸水素ナトリウムに対し2倍量の酒石酸水素カリウムを加え，溶媒としての水酸化ナトリウム濃度を変えた溶液を調製した．これらを測定し，同量の炭酸イオンを含む標準溶液とピーク面積を比較した．この結果，水酸化ナトリウム溶液の濃度が0.002N 以上の時にピーク面積の減少はみられなくなった．実際の試料には炭酸水素ナトリウムの2倍量もの酸性物質が配合されることはないので，試験溶液は0.002N 水酸化ナトリウム溶液を用いることにした．

4．配合成分の影響　次亜硫酸ナトリウム製剤は次亜硫酸ナトリウムと炭酸ナトリウムの2成分からなる製剤であるが，かんすいにはリン酸塩類，合成膨脹剤及びその他の製剤には有機酸，リン酸塩類，食塩等，様々な食品添加物や食品素材が配合されていることが多い．そこでこれらの配合成分が本測定法に与える影響を検討した．

炭酸イオンに対し9種類の物質(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，フマル酸，アスコルビン酸，リン酸水素二ナトリウム，メタリン酸ナトリウム，ポリリン酸ナトリウム，ピロリン酸四ナトリウム)を2～20倍量加えた溶液を調製し，これを測定して同量の炭酸イオンを含む標準溶液と比較した．ただし，酸性物質を加える場合には，0.002N 水酸化ナトリウム溶液に溶解した．

Fig. 2 に代表的な物質を配合した試験溶液のイオンクロマトグラムを示した．どの化合物とも良好な分離を示す炭酸イオンピークが観察された．また，Table 2 に示したように炭酸イオンの測定値は標準溶液と比較していずれもほぼ100％となり，これらの物質が本条件下でICによる分離定量に影響を与えないと考えられた．

Table 2．Influence of Various Compounds on the Determination of Carbonate

Compounds	Added	Relative Ratio[b)]
	mg	%
Standard[a)]	0	(100)
Potassium Hydrogen Tartrate	10	102
Aluminium Potassium Sulfate	10	93
Ammonium Chloride	10	97
Fumaric Acid	10	100
Ascorbic Acid	20	101
Disodium Hydrogenphosphate	100	104
Sodium Metaphosphate	100	103
Sodium Polyphosphate	100	102
Sodium Pyrophosphate	100	98

a)Standard：5mg CO_3^{2-}

b)Each Value is Calculated from Relative Peak Area to the Standard

5．添加回収実験　配合成分が様々に異なる13種類の試料に対し，表示量とほぼ同量の炭酸イオン濃度となるよう炭酸ナトリウムを添加して回収実験を行った．結果は Table 3 に示した．

次亜硫酸ナトリウム製剤では，101.1～102.2％の回収率が得られた．かんすいは100.6％，合成膨脹剤では，99.1～103.7％の結果が得られた．その他の製剤でも，99.6～102.7％と良好な結果が得られた．

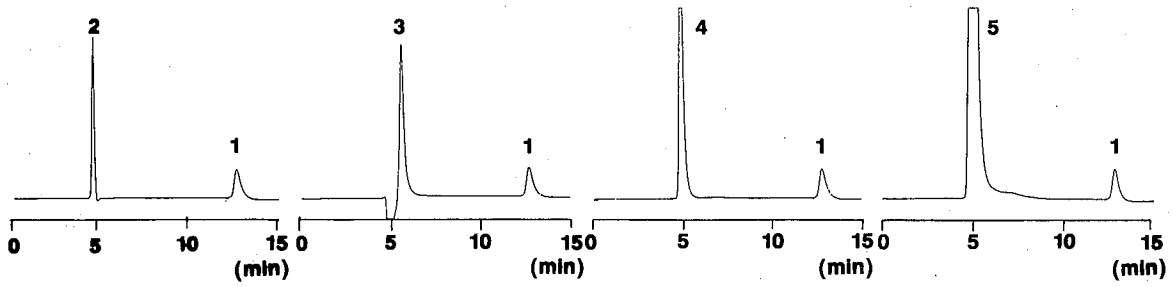


Fig. 2．Ion Chromatograms of Carbonate and Ingredients of Food Additive Preparations

1：Carbonate
2：Hydrogen Tartrate
3：Sulfate
4：Chloride
5：Pyrophosphate

Table 3. Recovery of Carbonate Ion Intentionally Added to Food Additive Preparations

Food Additive Preparations		Content (CO_3^{2-}mg/g)[a)]	Added (CO_3^{2-}mg/g)[a)]	Recovery (%)[a)]	C. V. (%)
Sodium Hydrosulfite Preparation	1	6.0	5.7	102.2	3.1
	2	37.9	28.3	101.1	0.5
Kansui	1	429.0	328.4	100.6	1.0
Baking Powder	1	234.6	214.3	102.5	0.5
	2	233.0	235.7	99.8	0.2
	3	220.7	214.3	103.7	0.5
	4	293.4	285.7	101.6	0.5
	5	285.0	285.7	102.5	2.0
	6	228.6	207.2	99.9	2.3
	7	342.9	357.2	99.1	0.5
Preparation	1	22.0	17.0	102.7	1.2
	2	6.3	5.7	100.3	1.4
	3	350.4	283.1	99.6	0.9

a)Average of 3 Runs

おわりに

食品添加物製剤中の炭酸塩及び炭酸水素塩をICを用いて定量する方法を検討した．本法は，安定剤を使って試験溶液を調製するだけの簡単な操作のみで短時間に定量が可能である．回収率は99.1～103.7%，検出限界は試料中の炭酸イオンとして1.25mg/gであった．これらのことから本法は次亜硫酸ナトリウム製剤，かんすい，合成膨脹剤，その他多くの食品添加物製剤中の炭酸塩及び炭酸水素塩定量法として十分に実用可能な方法と考えられる．

文　献

1）岸真之輔編集発行：食品添加物便覧，1987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，1987，広川書店

3）津田裕子，安野哲子，荻野周三，小関正道，風間成孔：東京衛研年報，40，192-196，1989

4）Small, H., Stevens, T. S. and Bauman, W. C.：*Anal. Chem.*, 47, 1801-1809, 1975

5）Barth, H. G., Barber, W. E., Lochmuller, C. H. Majors, R. E. and Regnir, F. E.：*Anal. Chem.*, 60, 387R-435R, 1988

6）Smith, F. C., Jr. and Chang, R. C.：*Practice of Ion Chromatography*, 1983, Wiley, New York

7）Vlacil, F., Vins, I. and Coupek J.：*J. Chromatogr.*, 391, 119-132, 1987

8）Golombek R. and Schwedt G.：*J. Chromatogr*, 452, 283-294, 1988

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 148-151, 1990

食用タール色素中重金属試験法の改良

平田恵子*, 広門雅子*, 中島和雄*,
植松洋子*, 松井敬子*, 風間成孔*

A Modified Method for the Determination of Heavy Metal Contaminants in Food Colors

KEIKO HIRATA*, MASAKO HIROKADO*, KAZUO NAKAJIMA*, YOKO UEMATSU*,
KEIKO MATSUI*, and MASAYOSHI KAZAMA*

Keywords：食用色素 food colors, クロム chromium, マンガン manganese, 鉄 iron, 亜鉛 zinc, 溶媒抽出法 solvent extraction method, 原子吸光分析法 atomic absorption spectrophotometry

緒　言

食品衛生法で定められたタール色素試験法中重金属試験法[1]は，乾式灰化法を用いているためハロゲン物質を有する．色素では重金属が揮散し回収率が低下するなど難点を有する．また，湿式灰化法[2]では操作が繁雑であったり，試薬からの重金属混入も問題となる．

そこで，我々は外海らの溶媒抽出法[3](以下既報と略す)による重金属試験法がタール色素規格試験へ適用できるかどうかの検討をした．限度規定のある金属[1]は食用赤色３号，赤色104号，赤色105号中の亜鉛，青色１号，赤色106号，緑色３号中のクロム及びマンガン，青色２号中の鉄があり，これらについて試験法の検討をした．既報[3]を用いて亜鉛，クロム及びマンガン，鉄について検討した中で，青色１号中のクロム及びマンガンの回収率は著しく低かった．そこで金属キレートの抽出率が良い溶媒の選択などを検討し，既報[3]に改良を加えた．また，その方法を他の金属にも応用したところ，規格試験に適した簡易な方法を見いだすことができたので報告する．

実験の部

１．色素　食用青色１号，赤色３号，赤色104号は国立衛生試験所より配布されたものを用いた。食用赤色106号，青色２号，赤色105号はアイゼン(株)製を緑色３号は東京化成工業(株)製を用いた．

２．装置　原子吸光分析装置：パーキンエルマー2380型，光源：浜松電気製の単元素ホローカソードランプ，バーナー：10cmのスリットバーナー(空気ーアセチレン)．

３．試薬及び試液　１）金属標準溶液：クロム，マンガン，鉄及び亜鉛の各原子吸光分析用試薬(1,000 ppm)を0.1 N 硝酸で適宜希釈して用いた．２)酢酸緩衝液(pH 6.0)：1 N 酢酸及び1 N 酢酸ナトリウムを用いて調製した．

３）キレート剤：和光純薬工業(株)製ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム(以下 DDTC と略す)．

その他の試薬はすべて試薬特級品を用いた．

４．定量操作　各食用色素0.5gを正確に秤取し水で100mlとした．その20mlを色素試料液とし，50ml容遠心沈でん管に分取した．その溶液に酢酸緩衝液10ml及び10% DDTC 溶液5mlを加え混和後しばらく放置した．ついでクロム，マンガン及び鉄を測定する場合は水飽和メチルイソブチルケトン(以下 MIBK と略す)を，亜鉛の場合は酢酸ブチルを10ml加え５分間振り混ぜて抽出した後，密せんして遠心分離(3,000 rpm, 5 min)した．その上層を小試験管に採取し原子吸光測定用検液とした．

測定条件は表１に従い，金属標準溶液20ml(クロム，マンガン，鉄では2～20 μgを，亜鉛は0.5～5 μgを含有する)を用いて試料と同様に操作して作成した検量線より色素中の金属濃度を求めた．

５．添加回収実験　各色素を0.1または0.25g含有する色素試料液20mlを用い，４の定量操作に従って回収実験をした．青色１号，赤色106号，緑色３号にはクロム及びマンガンを20～100 μg/gとなるように添加し，青色

*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 Metoropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

表1．原子吸光測定条件

金属	波長 (Å)	ランプ電流 (mA)	スリット幅 (nm)	アセチレン流量 (l/min)	空気流量 (l/min)
亜鉛	2139	10	0.7	12	45
クロム	3579	6	0.7	12	45
マンガン	2795	6	0.2	12	45
鉄	2488	30	0.2	14	45

2号には鉄を40～250 μg/gとなるように添加した．赤色3号，104号，105号には亜鉛を20 μg/gとなるように添加した．

結果及び考察

1．クロム及びマンガン測定の検討

既報[3]を用いて回収率が低かった青色1号中のクロム及びマンガンについて種々検討した．

(1) **色素量の影響**　既報[3]では抽出溶媒に酢酸ブチルを用い色素量は0.5gに設定している．その時の回収率はクロムで34%，マンガンは37%であった．そこで，色素の影響が考えられたので，回収率に及ぼす色素量の影響を調べた．色素量を0.25gにするとクロムの回収率は76%，マンガンは60%であった．0.1gの場合はマンガンでは60%で変わらないが，クロムの回収率は93%と0.5gの時と比べて明らかな向上がみられ，色素試料液中の色素量はできるだけ少量が望ましいことがわかった．

(2) **抽出溶媒の検討**　(1)の結果から測定に用いる色素試料液中の色素量を減じる必要があったため，色素の存在下で金属錯体の抽出率が良く，測定感度の上がる溶媒の選択を試みた．

抽出溶媒に酢酸ブチル，MIBK[4]，ジイソブチルケトン(以下 DIBK と略す)[5]を用い，0.25gの青色1号にクロム及びマンガンを40 μg添加して4の定量操作に従って測定し，その時の吸光度を比較した結果を表2に示した．なお，測定はそれぞれの溶媒でベースラインが安定し，感度の良い条件で行った．

クロム，マンガンとも MIBK を用いた時，他の溶媒に比べ吸光度が高いことから，金属錯体の抽出率が良く，測定感度が上がることがわかった．そのため以後，クロム及びマンガンの抽出溶媒は MIBK を用いることにした．

なお，既報[3]では抽出率の低い青色1号には塩析剤として硫酸アンモニウムを用いるようにしているが，用いない時でも高い抽出率が得られた．

また，いずれの溶媒でも水層と有機層の分離が悪く遠心分離操作を必要としたため，この時点で分液ロートを用いずに遠心分離管を用いることにした．

表2．抽出溶媒の比較

溶媒	吸光度[1] クロム	吸光度[1] マンガン
酢酸ブチル	0.012	0.240
MIBK	0.076	0.315
DIBK	0.006	0.205

1）：二回測定の平均値
色素量：0.25 g
クロム及びマンガン添加量：40 μg/g

表3．DDTC 量の影響

DDTC量（%）	回収率（%）[1] クロム	回収率（%）[1] マンガン
2	94.6	60.4
5	99.5	94.4
10	98.5	94.7

1）：二回測定の平均値
色素量：0.25g
クロム及びマンガン添加量：40 μg/g

(3) **DDTC の量の検討**　MIBK を抽出溶媒とすることにより，クロムの回収率は色素が0.25gの時でも90%以上と向上したが，マンガンは60%であった．この理由として DDTC 量の不足が推測され，その検討を行った．既報[3]では2% DDTC 溶液を用いている．そこで，0.25gの青色1号にクロム及びマンガンを10 μg添加し，DDTC の量を2,5,10%とした時の回収率を比べその結果を表3に示した．

DDTC 量が5%以上でクロム及びマンガンとも回収率は90%以上となった．このことから2%の DDTC 量は

表4．クロム及びマンガンの添加回収率

色素名(試料量g)	クロム			マンガン		
	添加量(μg/g)	検出量(μg/g)[1)]	回収率(%)	添加量(μg/g)	検出量(μg/g)[1)]	回収率(%)
青色1号(0.25)	0	ND	-	0	ND	-
	40	36.9	92.3	40	39.9	99.6
	80	78.0	97.5	80	75.9	94.8
赤色106号(0.25)	0	ND	-	0	ND	-
	20	20.4	101.9	20	21.5	107.4
	40	40.7	101.7	40	41.1	102.8
緑色3号(0.25)	0	ND	-	0	ND	-
	20	11.2	56.0	20	18.2	91.1
	40	23.1	57.8	40	37.5	93.6
(0.1)	50	41.1	82.8			
	100	93.3	93.3			

1)：二回測定の平均値，ND<10 μg/g

マンガンのキレート剤としては十分でなかったことがわかり，以後の試験は10% DDTC 溶液 5 ml を用いることにした．

(4) **青色1号，赤色106号及び緑色3号へのクロム及びマンガンの添加回収実験**　青色1号で検討した条件を赤色106号及び緑色3号へも適用し，回収実験を行った結果を表4に示した．

青色1号ではクロム及びマンガンとも90-100%の回収率を示し良好な結果が得られた．赤色106号では100%を若干越える値であるがほぼ良好であった．これはわずかであるが赤色が溶媒に移行するため，原子吸光測定時に付加誤差を与えたのではないかと考えられる．

緑色3号のマンガンは90%以上の回収率が得られ良好であった．しかし，クロムでは色素量0.25gの時の回収率が60%以下と低く，0.1gの時80%以上の回収率が得られ，色素の影響がみられた．そこで DDTC 量をさらに増加させることが考えられたが，DDTC 量は DDTC の水への溶解度及び抽出液の pH への影響などから10%が限度と考えられた．そのため緑色3号の色素量は0.1gが適当と判断した．

クロム及びマンガンの限度値[1)]は各色素25 μg/gまたは50 μg/gであるので，色素量を0.1gと設定しても測定は可能であり緑色3号についても問題はないと考える．

なお，クロム及びマンガンの検量線の範囲は0.2-2 μg/mlであり検出下限は10 μg/gであった．

表5．鉄の添加回収率

色素名(試料量g)	添加量(μg/g)	検出量(μg/g)[1)]	回収率(%)
青色2号 (0.25)	0	7.5	-
	40	46.8	98.3
	100	95.2	87.7
(0.1)	250	246	95.4

1)：二回測定の平均値

2．鉄測定の検討

クロム及びマンガンの方法を青色2号中の鉄測定に応用した．

(1) **抽出溶媒の選択**　抽出溶媒の検討をしたところ，色素量0.25gに鉄を40 μg添加した時酢酸ブチルでの吸光度は0.088で，MIBK では0.138であった．そのためクロムなどと同様に鉄も MIBK を用いることにした．

(2) **青色2号への鉄の添加回収実験**　青色2号への鉄の添加回収実験の結果を表5に示した．

鉄の回収率は色素量が0.25g，0.1gの時のいずれも87%以上の良好な結果が得られ，色素の影響はみられなかった．

なお，鉄の検量線の範囲は0.1-2 μg/mlであり，検出下限は5 μg/gであった．

3．亜鉛測定の検討

上記で改良した方法を赤色3号，104号，105号中の亜鉛にも応用した．

(1) **抽出溶媒の選択** 抽出溶媒に酢酸ブチル，MIBK，DIBK を用いて検討したところ，酢酸ブチルがいくぶん抽出率は良いが明確な差はみられなかった．しかし，キサンテン系色素である赤色３号，104号，105号では色素酸と考えられる[3]溶媒への着色があり，それが原子吸光測定時に付加誤差をあたえる恐れがあった．そこで，溶媒への着色の程度を比べてみると酢酸ブチルが他に比べ低かった．また原子吸光測定時の安定性も良かったので亜鉛の抽出溶媒は酢酸ブチルを用いることにした．

(2) **赤色３号，104号，105号への亜鉛の添加回収実験** 亜鉛を赤色３号，104号，105号に添加した時の回収実験の結果を表６に示した．

いずれの色素も89-100％の良好な回収率が得られた．

この結果は色素量0.1gの時のものであるが，食用104号を用いて色素量が0.25gの時の回収率は110％に近く，さらに0.5gにすると110％以上となった．このことから，色素量を多くした場合は色素酸の影響を考慮する必要がある．しかし，亜鉛の限度値[1]は200 μg/gであるので限度値付近を測定するには色素試料液中の色素量は0.02gで良いので，その場合溶媒に移行してくる色素酸の影響はほとんどなくなるものと考える．

なお，亜鉛の検量線の範囲は0.05-0.5 μg/mlであり，検出下限は２ μg/gであった．

表６．亜鉛の添加回収率

色素名(試料量g)	添加量(μg/g)	検出量(μg/g)[1)]	回収率(％)
赤色３号 (0.1)	0	4.1	-
	20	23.7	98.0
赤色104号 (0.1)	0	13.0	-
	20	33.0	100.0
赤色105号 (0.1)	0	22.7	-
	20	40.5	89.0

1）：二回測定の平均値

ま と め

１．公定法の乾式灰化法[1]に代わる方法として，食用色素中の重金属試験法に溶媒抽出法が適用できるかどうかの検討をした．

限度規定のある亜鉛，クロム，マンガン及び鉄をそれぞれ対象となる色素に添加し試験法の検討をした．

２．抽出溶媒の検討をしたところ，青色１号，赤色106号，緑色３号中のクロム及びマンガンと青色２号中の鉄には MIBK が，赤色3，104，105号中の亜鉛には酢酸ブチルが良好であった．

３．青色１号において回収率に対する DDTC 量の影響を調べたところ，２％ DDTC 溶液を用いた時のマンガンの回収率は60％であったのが５％以上の DDTC 溶液では90％以上の良好な回収率が得られたので，10％の DDTC 溶液を用いることにした．また，この条件を他の金属にも適用した．

４．青色１号，赤色106号及び緑色３号へのクロム及びマンガン，青色２号への鉄及び赤色３号，104 号，105 号への亜鉛の添加回収率は色素量が0.1gの時，すべての色素で80％以上の良好な回収率が得られた．

以上のことから，既報[3]を改良した本法はタール色素規格試験に十分適用できると考える．また，短時間にできる方法なので迅速性を要求される規格試験に適した方法と考える．

文 献

1）食品添加物公定書：第５版，厚生省，p27-28，p286-303，1986.

2）日本薬学会編：衛生試験法注解，p398-400，1980.

3）外海泰秀，野村幸雄：衛生化学，18，363-367，1972.

4）深町和美，森本昌宏，柳川正男：分析化学，21，26-31，1972.

5）永淵義考，深町和美，分析化学，29，T98-T103，1980.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 152-157, 1990

食物繊維の一日摂取量
(給食施設の食事と国民栄養調査を基にして)

川島満春美*, 牛尾房雄*, 友松俊夫*,
山岸達典**, 道口正雄***

Daily Intakes of Dietary Fiber in Duplicate Portion and Market Basket Studies

MASUMI KAWASHIMA*, FUSAO USHIO*, TOSHIO TOMOMATU*,
TATUNORI YAMAGISHI** and MASAO DOGUCHI***

Keyword：食物繊維 Dietary Fiber, 一日摂取量 Daily Intake, 水溶性食物繊維 Soluble Dietary Fiber, 不溶性食物繊維 Insoluble Dietary Fiber

緒　言

現在まで多くの報告により，食物繊維(Dietary fiber 以下 DF)は，血中コレステロールの低下作用，血糖上昇抑制作用，消化管内の食物滞留時間短縮作用等の生理活性のあることが認められており，また虚血性心疾患，糖尿病及び大腸がん，大腸憩室症などの非感染性疾患との関わりがあることが示唆されている[1]．しかし，どの様なDFをどのくらい摂取すれば妥当なのか，未だ不明な点が多い．これは，恐らく今までに満足すべき，精度の高い簡便な分析方法が無かったために，DF摂取量に関する実態調査の報告が少なかったことも一因と考えられる．

1983年にAspらは，DF分析法として酵素分解による重量分析法を提唱[2]しており，現在，この方法はDFの定義に最も合致した方法として評価されている．

1985年より，地方衛生研究所全国協議会(以下地研協議会)では，Asp法及びProsky-AOAC法[3]を用いて，食品中のDF含有量とDF摂取量について実態調査を実施している[4]．著者らはこの調査・研究に参加するとともに，平行して独自にDFの一人一日当りの摂取量(以下DF一日摂取量)を調べることを目的にして，マーケットバスケット方式(以下マーケットバスケット法)と陰膳方式(以下陰膳法)の2つの方式を用いて，DF一日摂取量の実態調査を継続的に行ってきた．そこで現在まで得られた結果を，ここではまとめて報告する．

実験の部

1．試料

1）マーケットバスケット法：試料の食品は，国民栄養調査(1985年)[5]による食品群別摂取量に基づいて，1986年4～5月の期間に都内のスーパーで購入した．これらの食品は，1群(米・もち)，2群(穀類・種実・いも類)，3群(砂糖・菓子類)，4群(豆類)，5群(果実類)，6群(緑黄色野菜類)，7群(その他の野菜・きのこ類・海草類)，8群(加工食品・調味料・嗜好飲料)，9群(魚介類・肉・卵・乳類)の計9群の食品群に分別した．試料は，まず国民栄養調査による食品群別摂取量に基づき，前述の各食品群ごとに混合して凍結乾燥を行った．その後，乾燥した試料は，0.5mm以下の粉末粒子としたものを分析用の試料とした．

なお，3，4，6，8，9群の5つの食品グループについては，乾燥したものを石油エーテルにより脱脂処理を行った．

2）陰膳法：陰膳法の試料は，1985～1989年までに都内集団給食施設46ヵ所から一日の各食事を収集した．こ

*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
***東京都立衛生研究所理化学部 169 東京都新宿区百人町3－24－1
*, ***The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan
**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, Shibazaki-cho 3 chome, Tachikawa, Tokyo 190, Japan

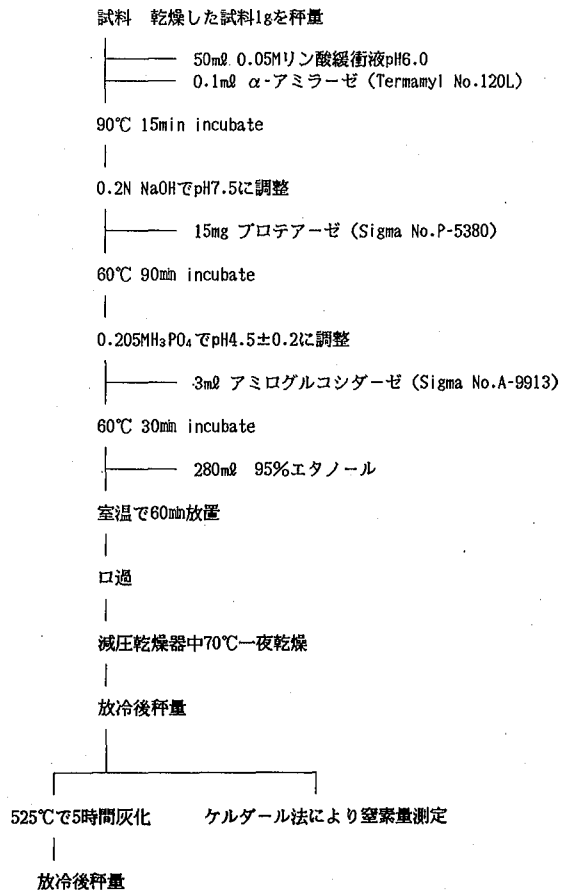


図1．Prosky-AOAC法

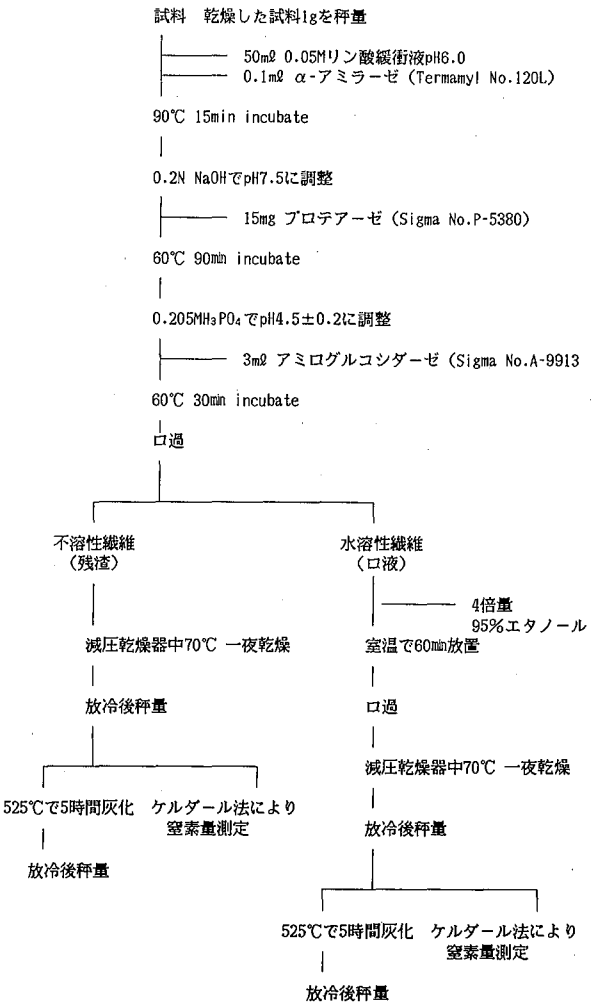


図2．水溶性，不溶性食物繊維分析法

れらの食事は，主食，副食に分別，各々を混合粉砕し，凍結乾燥を行った後，粉末化し0.5mm以下の粒子としたものを分析用の試料とした．なお，副食については凍結乾燥した試料を石油エーテルで脱脂処理を行った．

2．酵素

分析に用いた酵素は下記の通りである．

α－アミラーゼ; Novo製 Termamyl 120L, プロテアーゼ; Sigma製 No.P-5380, アミログルコシダーゼ; Sigma製 No.A-9913

3．分析方法

分析法は，「図－1」に示したようにProsky-AOAC法に準拠し行った．しかし一部試料については「図－2」に示す如く，酵素処理後水溶性DFと不溶性DFとに分別して測定した．

結果及び考察

1．マーケットバスケット法によるDF一日摂取量

マーケットバスケット法によるDF一日摂取量は，「表－1」に示すとおり17.9g/dayであった．このDF摂取量の寄与率は，7群の野菜・きのこ類・海草類と2群の穀類・種実類・いも類が高く，それぞれ33%と29%であった．次に，米・もちの寄与率は，果実類の場合と同様に第3位を占め，8.9%であった．これは，食品中のDF含量からみれば，野菜や豆類よりも低いが，食品の一日摂取量は，他の食品と比べると米・もちの方が多くなっているためと考える．1986年の地研協議会が実施した国民栄養調査に基づく，マーケットバスケット法によるDF一日摂取量では，全国平均18.6g/dayと報告されており[4]，本調査の結果は，全国平均とほぼ同じ値を示していた．

DF一日摂取量の経年変化について，著者ら(1986年)は，国民栄養調査食品群別摂取量を用いて，主に植物性

表1．1985年国民栄養調査に基ずくマーケットバスケット法による食物繊維摂取量

郡別番号	食品群名	食品摂取量（g）	食物繊維量（g）	寄与率（%）
1	米・もち	691.3	1.6	8.9
2	穀類・種実・いも類	345.4	5.1	28.5
3	砂糖・菓子類	47.7	0.4	2.2
4	豆類	68.3	1.3	7.3
5	果実類	150.0	1.6	8.9
6	緑黄色野菜類	63.3	1.3	7.3
7	その他野菜 きのこ類・海草類	200.9	5.9	33.0
8	加工食品・調味料 嗜好飲料	152.6	0.3	1.7
9	魚介類・肉卵・乳類	399.3	0.4	2.2
	合計	2118.8	17.9	100.0

表2．1973年，1978年および1983年の国民栄養調査に基ずくマーケットバスケット法による食物繊維摂取量

郡別番号	食品群名	食物繊維摂取量（g）		
		1973年	1978年	1983年
1	穀類	2.3 (359.9)	2.1 (328.7)	2.2 (314.9)
2	種実・いも類	1.7 (52.2)	2.4 (62.3)	2.3 (64.7)
3	砂糖・菓子類	0.6 (31.5)	0.5 (26.9)	0.4 (26.0)
4	豆類	2.3 (63.6)	2.2 (67.7)	2.3 (69.9)
5	果実類	2.2 (184.0)	2.1 (181.3)	2.0 (166.4)
6	緑黄色野菜類	2.1 (81.3)	1.5 (59.5)	1.5 (61.1)
7	その他野菜・きのこ類	4.1 (210.2)	3.6 (200.4)	3.6 (198.0)
8	海草類	2.2 (4.5)	2.7 (5.6)	2.7 (5.7)
9	加工食品	0.2 (5.4)	0.2 (6.4)	0.2 (6.3)
	合計	17.7 (992.6)	17.3 (938.8)	17.2 (913.0)

（　）：食品の摂取量

食品によるDF一日摂取量の測定を実施している[6]．その結果は，「表－２」に示すとおり，DF一日摂取量は，1973年が17.7g，1978年が17.3g，1983年が17.2gと若干減少する傾向を示していた．この傾向は，穀類，緑黄色野菜，その他の野菜・きのこ類の食品摂取量が減少しているため，DF摂取量は低下を招いたものと判断された．

薬師寺ら[7]は，前述の地研協議会報告における各種食品DF含有量表を用いて，1951年から1985年までのDF一日摂取量を算出している．その結果によると，DF一日摂取量は1951年22.42g/day，1960年19.95g/day，1972年18.92g/day，1980年17.46g/day，1985年17.34g/dayであり，DF一日摂取量は経年的に減少している．

2．陰膳法によるDF一日摂取量

「表－３，図－３」に結果を示す．今回の調査ではエネルギー摂取量2299Kcal±570，主食からのDF摂取量4.7ｇ±1.63，副食からのDF摂取量18.0g±4.54，一日

表３．陰膳方式による食物繊維摂取量調査結果

	食事量 (ｇ/day)	エネルギー量 (Kcal/day)	食物繊維摂取量（ｇ/day） 主食からの摂取量	副食からの摂取量	総摂取量
n=46					
範囲	1348～2984	1251～3626	1.4～8.8	9.7～29.9	14.6～34.9
平均値±標準偏差	1851± 309	2299± 570	4.7±1.63	180±4.54	22.7±4.71

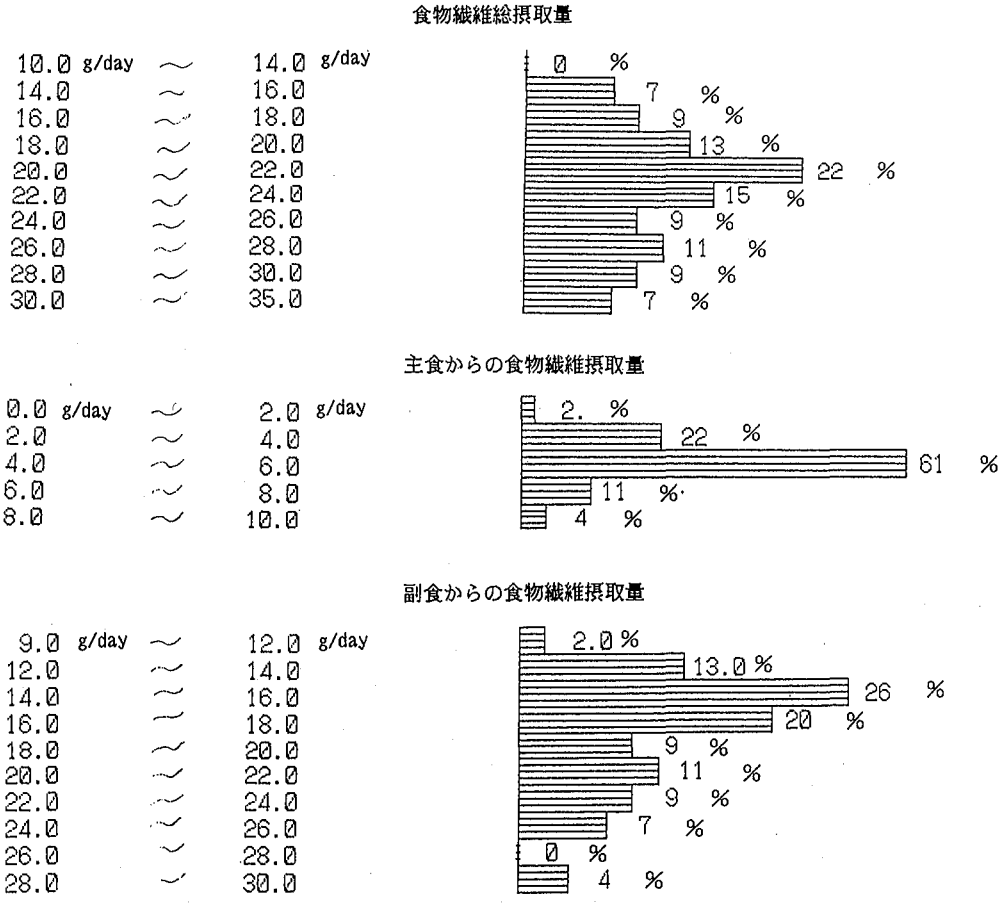


図３．食物繊維一日摂取量のヒストグラム（n=46）

DF摂取量22.7g±4.71であった．DFの総摂取量は46試料中33試料が20g/day 以上であった．しかし最大値と最小値の差は約2倍を示していた．1987年，山東ら[8]は和歌山県下の住民の食事調査を行なっており，そのDF一日摂取量が22.8gで，その平均値では著者と同程度のレベルであることを報告している．さらに地研協議会の報告書によると，総一日摂取量が19.6g±4.16，主食からの摂取量が4.5g±2.03，副食からの摂取量が15.1g±5.10，と報告されている．

以上述べたごとく，陰膳方式ではいずれの調査結果においても，DF一日摂取量は20g前後の数値を示していた．この陰膳法による結果は，マーケットバスケット法と比べると若干高い数値を示す傾向が見られた．これは国民栄養調査と給食施設における各食品群を構成している食品の選択あるいは食品の構成比率が，若干異なることも一因であると考えられる．

3．水溶性DFと不溶性DF一日摂取量

DFの組成によりその生理的メカニズムが異なることが知られている．ペクチン，グルコマンナンやグアーガムなどの水溶性DFは，血中コレステロールの低下作用や血糖上昇抑制作用が認められている．一方セルロースやリグニンなどの不溶性DFは，食物の消化管内の通過時間を短縮し，便秘の予防，その治療に良好な結果を示し，腸憩室症，痔疾，大腸がんの予防に効果があるといわれている．そこで，1987年～1989年に収集した30カ所の給食施設の食事については，水溶性と不溶性に分けてDF摂取量を求めた．その結果を「表－4，図－3」に示した．水溶性DF一日摂取量は，総水溶性DF摂取量が2.8g±1.3，主食からの摂取量が0.3g±0.39，副食からの摂取量が2.5g±1.24，であった．一方，不溶性DF一日摂取量は，総不溶性DF摂取量が19.7g±3.89，主食からの摂取量が4.5g±1.75，副食からの摂取量が15.2g±3.74であった．

以上，本調査の結果から，すなわち，マーケットバスケット法および陰膳法によるDF一日摂取量について調査した結果，マーケットバスケット法では17.9g/day，陰膳法では平均22.7g/dayであった．したがってDF一日摂取量は現時点では20g/dayの付近にあるものと推定さ

表4．水溶性，不溶性別食物繊維一日摂取量

	食事量 (g/day)	エネルギー量 (Kcal/day)	水溶性食物繊維摂取量 (g/day) 主食からの摂取量	副主食からの摂取量	総摂取量	不水溶性食物繊維摂取量 (g/day) 主食からの摂取量	副食からの摂取量	総摂取量
n=30								
範囲	1348～2984	1251～3626	0～1.3	0.4～6.2	0.4～6.5	1.4～8.8	9.7～23.4	12.6～28.2
平均値±標準偏差	1846± 309	2189± 534	0.3±0.38	2.5±1.26	2.8±1.28	4.5±1.75	15.2±3.74	19.7±3.80

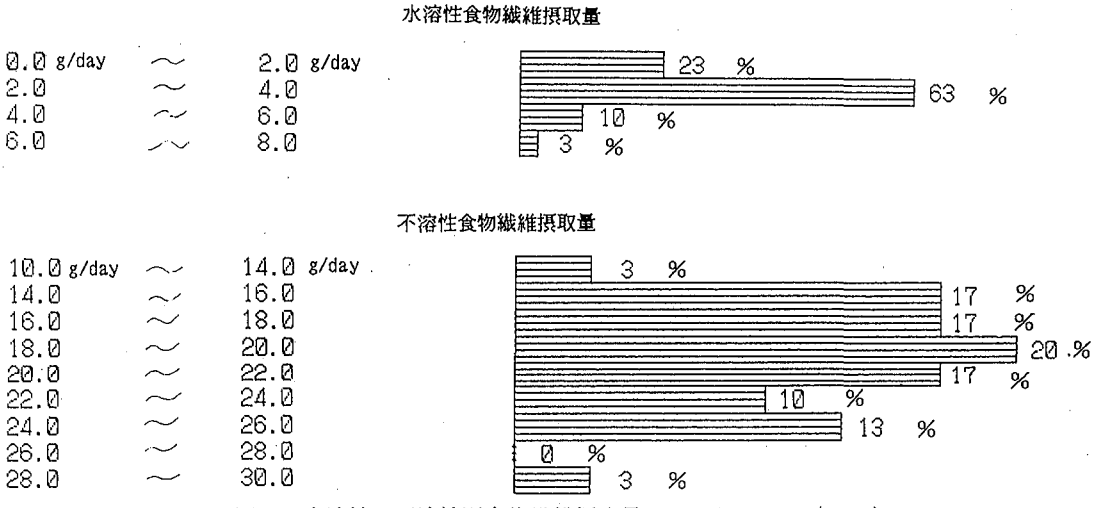


図4．水溶性，不溶性別食物繊維摂取量のヒストグラム（n=30）

れる．また摂取量されたDFは約70～80％が不溶性，約20～30％が不溶性であると推定された．

本分析法では70％エタノールを加えてDFを析出させている．しかし最近，大隈ら[9]はこの70％エタノールによっても沈澱しない水溶性DFの存在を示唆している．この報告によると押し麦3.5％，きな粉3.5％のエタノール可溶性DFの存在を示している．本調査においては，エタノール可溶性DFを測定していないため，この点を考慮すれば，DF一日摂取量は更に増加する可能性があるものと考えられる．現在，DFの有効的な摂取量は未だ不明である．しかも一方では，DF補給を目的としたポリデキストロース等のDFを添加した食品が出回っている．したがって，今後DF摂取量のガイドラインの早急なる設定が望まれるところである．

要　約

食物繊維の一人一日当りの摂取量を目的にマーケットバスケット法と陰膳法を用いてその実態調査を行った．その結果は下記の通りであった．

1．マーケットバスケット法による国民栄養調査に基づく，食物繊維摂取量は17.9g/dayであった．

2．陰膳法による都内集団給食施設46カ所の食事からの食物繊維摂取量は平均22.7g±4.71であった．主食からの摂取量は4.7g±1.63，副食からの摂取量は18.0g±4.54であった．

3．水溶性食物繊維摂取量は2.8g±1.3，不溶性食物繊維摂取量は19.7g±3.89であった．

文　献

1）印南　敏，桐山修八編：食物繊維，1985，第一出版，東京

2）Asp, N, G., Johansson, C. G, Hallmer, H.and Siljeström, M.: *J. Agric.Food Chem.*, 31, 476(1983)

3）Prosky, L., Asp, N. G., Furda, I., Devries, J. W., Schweizer, T.S. and Harland, B. F.: Determination of total dietary fiber in food products *J. Assoc. off・Anal. Chem.*, 68, 677-679(1985)

4）地方衛生研究所協議会編：表示栄養成分の分析法と摂取量に関する研究(1987)

5）厚生省保健医療局健康増進栄養課編：国民栄養の現状(昭和60年度)昭和62年度版国民栄養の現状，(1987)，第一出版

6）川島満春美，道口正雄，牛尾房雄：食事からの食物繊維摂取量について，第41回日本・栄養食糧学会総会講演要旨集，p.197(1987)

7）薬師寺　積，住本建夫，田口修三，西宗高広，et al：食品含量積算法による日本人の食物繊維摂取量，大阪府立公衛研所報，19，93-110(1988)

8）山東英幸，辻澤　廣，上田幸右，橋爪　崇.，et al: 和歌山県における食物繊維の一日摂取量について，日本食品衛生学会第54回学術講演要旨集，p. 67(1987)

9）大隈一裕，松田　功，勝田康夫，辻　啓介：高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた食物繊維の新定量法，日本農芸科学会誌1990年度大会講演要旨集，P. 231(1990)，福岡

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 158-161, 1990

伊豆諸島産アシタバ（*Angelica keiskei*）の一般成分およびミネラル含量

門間公夫*, 菊谷典久*, 笠原利英*, 井口正雄*,
友松俊夫*, 村上泰城**, 浦野元幸***

Proximate and Mineral Compositiom of Ashitaba (*Angelica keiskei*) Harvested in the Izu Islands

KIMIO MONMA*, NORIHISA KIKUTANI*, TOSHIHIDE KASAHARA*,
MASAO IGUCHI*, TOSHIO TOMOMATU*, YASUKUNI MURAKAMI**
and MOTOYUKI URANO***

Ashitaba(*Angelica keiskei*) is a wild plant growing in abundance mainly in the Izu Islands . This plant, whose leaves are cooked and eaten like spinach, is now cultivated exclusively in this area for the market place.

This paper describes proximate and mineral compositions of Ashitaba leaves. Leaf samples, both cultivated and wild, were collected from the Izu Islands of Oshima, Miyakejima and Hachijojima in spring and autumn.

The ranges of nutrient values obtained from all the samples were found to be 70.0-87.8 g water, 2.9-4.3 g protein, 0-0.1g lipid, 1.2-2.6g crude fider and 1.3-1.9 ash per 100g of wet tissue respectively. Analyses of nine minerals gave the following results : 23-340mg calcium, 36-100mg phosphorus, 0.8-2.8mg iron, 18-130mg sodium, 380-640mg potassium, 22-40mg magnesium, 0-0.2mg copper, 0.2-1.0mg zinc and 0.4-1.8mg manganese per 100g of wet tissue respectively.

Ashitaba leaves were relatively rich in crude fider, protein, sodium and manganese compared with other common leafy vegetables in Japan. In the seasonal variation of nutrients, crude fiber, phosphorus and zinc contents of the samples harvested in spring were much higher than those in autumn. Significant differences in nutritional content were not found between cultivated and wild plants, except for sodium levels, where the cultivated plants tended to have a higher content.

Keywords：アシタバ *Angelica keiskei*, 一般成分 Proximate composition, ミネラル成分 Mineral composition, 葉菜 Leafy vegetadle

緒　　言

アシタバ(*Angelica keiskei*)はセリ科に属する強壮な多年草で房総半島から紀伊半島にかけての海岸地域や伊豆諸島に分布している．その葉は，催乳，強精作用[1)]や高血圧の予防[2)]などに効果があるとされ，昔から民間薬としても使われてきた．

東京都の島しょ地区の大島，三宅島や八丈島などでは，自生のアシタバの葉が，一般の野菜が不足する季節には，島民の貴重な生鮮野菜として古くから利用されてきた．一方，食生活の多様化や自然食ブームの中で，アシタバ

*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 Reseach Laboratory of Public Health
24－１, Hyakunin-cho 3 chome, shinjuku-Ku, Tokyo 169, Japan
**東京都衛生局島しょ保健所
***元東京都衛生局島しょ保健所

は，内地の東京市場にも出荷されるようになり，需要の急増とともに，近年これらの島において，栽培が盛んに行われるようになった．さらに，乾燥品や粉末にした加工品の製造も行われ，その用途も拡大しつつある．

著者らは，東京都の島しょ地区で独自に生産されている農産物の栄養評価を行う目的で，小笠原諸島産のシカクマメ[3),4)]，パッションフルーツ[5)]の栄養成分の分析を行ってきた．今回これらに引き続いて，伊豆諸島の大島，三宅島，八丈島産のアシタバについて，産地，収穫時期や自生種，栽培種による，栄養成分の差異を明らかにすることを目的として，一般成分および9種類のミネラル成分の分析をおこなったので，以下報告する．

試料および実験方法

1．試料

アシタバ：1988年の春(5月)および秋(11月)に東京都の島しょ地区の大島(大島町)，三宅島(三宅村)および八丈島(八丈町)で採取した自生および栽培のアシタバの葉を用いた．

2．実験方法

試薬：カルシウム，鉄，ナトリウム，カリウム，マグネシウム，銅および亜鉛の標準液は和光純薬工業製の原子吸光分析用，リン標準液は和光純薬工業製の光電用，塩化ランタン溶液は原子吸光分析用，塩酸は和光純薬工業製の有害金属測定用，その他の試薬はいずれも和光純薬工業製の試薬特級を用いた．水は再蒸留水を使用した．

装置：原子吸光分析装置は日本ジャーレル・アッシュ製の AA-845型，電気炉はトリオサイエンス製の電気マッフル炉，分光光度計は島津製作所の UV-265FS 型を使用した．

一般成分の分析：水分，タンパク質，脂質および灰分の測定は前報[3)]によった．繊維は，ヘンネベルグストーマン改良法[4)]で定量した．糖質は，水分，タンパク質，脂質，繊維および灰分の合計量を100gから差し引いた計算値によった．エネルギー値は100gあたりのタンパク質，脂質，繊維，糖質の含有量をもとに，四訂日本食品標準成分表[6)]に準じ，算出した．

無機質の分析：ナトリウム，カリウムおよびリンの分析は前報[3)]によった．カルシウム，鉄，マグネシウム，マンガン，亜鉛および銅の定量は，500℃で16時間，試料を灰化し，1％塩酸で定容後，原子吸光法[7)]により行った．なお，カルシウム，鉄，マグネシウムの測定には，干渉除去剤として塩化ランタンを使用した[8)]．

結果および考察

伊豆諸島産アシタバの一般成分分析結果およびエネルギー値を Table 1 に示した．水分含量は79.0～87.8%であった．タンパク質の含量は2.9～4.3%の範囲であり，秋に高くなる傾向がみられたが，自生と栽培での差はなかった．脂質は0～0.1%の範囲で，季節による差や自生と栽培での差は見られなかった．繊維含量は1.2～2.6%で，春に高い傾向であったが，自生と栽培での差はなかった．灰分は1.3～1.9%の範囲であった．エネルギー値は34～65Kcal/100gであった．三宅島のアシタバでは，自生および栽培種とも秋にエネルギー値が高かったが，大島および八丈島産のアシタバでは，季節による差はほとんどなかった．以下，分析結果をもとに他の葉菜類との比較検討を行った．

水分含量は，葉菜では90%以下のものはまれであるが，今回の分析値は，79.0～87.8%で，シソの値(87.5%；

Table 1. Proximate Composition of Ashitaba Leaves Harvested in the Izu Islands

	Oshima				Miyakejima				Hachijojima			
	May		Nov.		May		Nov.		May		Nov.	
	wild	cultivated	wild	cultivated	wild	cultivated	wild	cultivated	wild	cultivated	wild	cultivated
Water	87.6	87.8	86.7	87.6	85.8	84.8	79.0	80.9	85.4	84.9	85.8	85.1
Protein	3.6	4.3	3.5	4.2	3.1	2.9	4.3	4.0	3.5	3.3	4.2	3.5
Lipid	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Carbohydrate												
Non-Fibrous	5.4	4.8	6.5	5.5	7.2	8.6	13.6	11.2	6.6	7.5	6.4	8.6
Crude Fiber	1.9	1.6	1.8	1.2	2.0	1.9	1.6	2. 0	2.6	2.3	1.6	.1.4
Ash	1.4	1.4	1.4	1.4	1.8	1.7	1.5	1.8	1.8	1.9	1.9	1.3
Energy(kcal)	36	34	39	35	41	45	65	58	42	44	40	45

Values were expressed as g per 100 g fresh weight

Table 2. Mineral Composition of Ashitaba Leaves Harvested in the Izu Islands

	Oshima				Miyakejima				Hachijojima			
	May		Nov.		May		Nov.		May		Nov.	
	wild	cultivated	wild	cultivated	wild	cultivated	wild	cultivated	wild	cultivated	wild	cultivated
Calcium	79	84	150	75	340	330	100	87	80	200	23	71
Phosphorus	57	73	49	49	80	62	36	48	100	54	41	49
Iron	1.1	1.1	1.5	1.5	2.8	1.5	1.2	1. 1	1.0	0.8	1.2	1.0
Sodium	41	80	18	130	73	110	79	43	26	29	23	40
Potassium	460	430	640	390	460	480	380	610	420	530	540	460
Magnesium	35	35	40	33	24	27	39	22	36	37	32	33
Coper	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0. 1	0.1	0	0.2	0.1
Zinc	1.0	1.0	0.7	0.8	0.9	0.8	0.5	0. 6	0.9	0.2	0.6	0.5
Manganese	0.5	0.4	1.0	0.4	0.5	0.5	0.7	0.7	0.5	1.8	0.7	1.2

Values were expressed as mg per 100 g fresh weight

四訂日本食品標準成分表による，以下同様)に近い．タンパク質の分析値は，2.9～4.3%で他の葉菜に比較して高く，シソ(3.8%)とほぼ同じ含量であった．脂質含量は，他の葉菜類と差がなかった．食品中の不消化成分である食物繊維は，血中コレステールの低下作用，整腸作用や大腸癌の予防に効果があるとされ注目されているが[9]，今回分析したアシタバの粗繊維は1.2～2.6%で，他の葉菜類と比較すると高い値であった．灰分は，他の葉菜類とほぼ同じ値であった．葉菜のエネルギー値は，コマツナ(21kcal)，シュンギク(21kcal)，セリ(17kcal)，ホウレンソウ(25kcal)など，多くは30kcal以下であるが，今回分析を行ったアシタバでは，他の葉菜類に比べタンパク含量が多いため，その値は高かった．

ミネラル成分の分析結果をTable 2に示した．カルシウムは23～340mg/100 g，ナトリウムは18～130mg/100 gで両元素ともばらつきが大きかった．その理由としては，アシタバの成育する土壌によって，それら元素の量が異なることが考えられた．リンは36～100mg/100 gであり，秋に含有量が少なくなる傾向であった．鉄は0.8～2.8mg/100 g，カリウムは，380～640mg/100 gであった．マグネシウムは，22～40mg/100 gの範囲であった．銅の含量は，0～0.2mg/100 gであった．亜鉛は0.2～1.0mg/100 gであった．また，八丈島産の栽培アシタバを除いて，その含量は春に多かった．マンガンは，0.4～1.8mg/100 gであった．自生のアシタバでは，秋に含量が多くなる傾向であった．

ミネラル含量を他の葉菜と比較すると，カルシウム，リン，鉄およびカリウムは，他の葉菜とほぼ同じ含有量であった．ナトリウム含量は，他の葉菜と比べ高い値であった．海辺などの塩分の高い地域に自生する植物は耐塩性が強く，ナトリウム含量がきわめて高いことが知られている[10]．アシタバも海岸に自生する植物であるので，ナトリウム含量が高かったものと思われた．なお，海辺の砂地に成育し，近年市場に流通してきた野菜であるオカヒジキ(60mg/100 g)もナトリウム含量が高い．

マグネシウムは，虚血性心疾患などとの関連で注目されている元素であり，その摂取量が大きいほど，それらの疾患の発生が少ないとされているが[11]，その含量はコマツナ，キョウナ，シュンギクなどの葉菜とほぼ同じ含量であった[11]．必須微量金属であり，生体内酵素等の構成成分である，銅および亜鉛[12),15)]の含量も，マグネシウムの場合と同じく他の葉菜とほぼ同じ含有量であった．マンガンは，生体内の多くの酵素を活性化するために必要不可欠な元素で，豆類，穀類についで緑色葉菜類に多く含まれている[12,15]．今回分析を行ったアシタバのマンガン含有量は，コマツナ，キョウナ，シュンギクなどの野菜の含量[12)]に比べやや高い値であった．

以上，伊豆諸島産の自生および栽培のアシタバ栄養成分の分析を春と秋に行った．その結果，ナトリウム含量が自生種より栽培種で高かったことを除いて，他の栄養成分には，自生と栽培での大きな差はなかった．粗繊維，リンおよび亜鉛の含量は，秋より春のアシタバで高かった．今回分析を行ったアシタバは，他の葉菜類に比べ，タンパク質，粗繊維およびマンガンの多い，葉菜といえる．

文　献

1）奥田拓男：天然薬物辞典，1986，廣川書店，東京
2）伊沢一郎：薬草カラー図鑑①，1990　主婦の友社，東京
3）菊谷典久，佐藤直子，笠原利英，井口正雄，友松俊夫，道口正雄，浦野元幸，山下三雄，小沢　聖：東京衛研年報，37，237-240，1989
4）井口正雄，菊谷典久，友松俊夫，道口正雄，浦野元幸，山下三雄，小沢　聖：東京衛研年報，38，253-256，1987
5）菊谷典久，門間公夫，井口正雄，友松俊夫，小沢聖，和田　実，青木睦夫，登坂三紀夫，浦野元幸：東京衛研年報，39，164-167，1988
6）科学技術庁・資源調査会編：四訂　日本食品標準成分表，1982，大蔵省印刷局，東京
7）日本薬学会編：衛生試験法・注解，4-14，1980，金原出版，東京
8）小原哲二郎他編：食品分析ハンドブック，259-284，1982，建帛社，東京
9）日本栄養士学会編：食物繊維，1982，第一出版，東京
10）高橋英一：日本農芸化学会誌，63，1379-1381，1989
11）Marier, J. R.：最新医学，38，646-648，1983
12）食品成分研究会編：食品の食物繊維・無機質・コレステロール・脂肪酸含量表，1985，医歯薬出版，東京
13）和田　攻，荒井泰昭，阿部哲昭：ファルマシア，21，407-413，1985
14）和田　攻，真鍋重夫，北川泰久，方　金福：医学のあゆみ，137，1063-1066，1986
15）日本化学会訳編：微量元素ー栄養と毒性ー，1975，丸善，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.*, **41**, 163-168, 1990

浄水処理過程における非低沸点疎水性有機物群の動向

高橋保雄*, 笹野英雄*

Fate of Nonvolatile Hydrophobic Organic Materials through Water Purification

YASUO TAKAHASHI* and HIDEO SASANO*

Keyword：疎水性有機物群 Hydrophobic Organic Materials, 浄水処理 Water Purification, 紫外吸収スペクトル Ultraviolet Absorption Spectrum, 蛍光スペクトル Fluorescence Spectrum, 分子量分布 Molecular Mass Distribution.

緒　言

1974年，ハリスらは水道水からトリハロメタンを検出した．それを契機として，水道水中の微量有機物に関心が向けられ，多数の微量有機物が同定確認されるようになった．

これら微量有機物の多くは疎水性有機物である．そして，これら疎水性有機物は人為汚染に由来することが多いと現在考えられている．

そこで，著者等は疎水性有機物群の内，非低沸点疎水性有機物群が通常の浄水処理過程でどの様に処理されるかを究明するために，その動向を調査した．同時に，著者等が水道水・水道原水において同定確認した有機リン酸トリエステル・有機塩素系農薬・有機リン系農薬[1]の非低沸点疎水性有機物群に対する寄与度合についても調査し，知見を得たので併せて報告する．

実験方法

1．試薬

ヘキサン・クロロホルム・エーテル・無水硫酸ナトリウム：和光純薬残留農薬試験用，フロリジル：和光純薬100～200 mesh を650℃で6.5時間焼成し活性化して使用，有機塩素系農薬(α-1，2，3，4，5，6ヘキサクロロシクロヘキサン(α-BHC)・ジメチルテトラクロロフタレート(TCTP)・5-タート-ブチル-3-(2，4-ジクロロ-5-イソプロポキシフェニル)-1，3，4-オキサジアソリン-2-オン(オキサジアゾン)・p-ニトロフェニル2，4，6-トリクロロフェニルエーテル(CNP)・2，4-ジクロロフェニル3-メトキシ-4-ニトロフェニルエーテル(クロメトキシニル)・s-p-クロロベンジル-N，N-ジエチルチオカルバメート(ベンチオカーブ))・有機リン系農薬(ジエチル2-イソプロピル-4-メチル-6-ピリミジニルホスホロチオネート(ダイアジノン)・ジメチル4-ニトロ-m-トールホスホロチオネート(MEP))：和光純薬農薬標準品，有機リン酸トリエステル(トリブチルホスフェート(TBP)：和光純薬特級，トリ(2-ブトキシエチル)ホスフェート(TBXP)：和光純薬化学用，トリフェニルホスフェート(TPP)：東京化成一級，トリス(1，3-ジクロロ-2-プロピル)ホスフェート(CRP)：横浜市衛生研究所より供与)，標準品ポリスチレンPSS-7・8・9・10・11・12(分子量はそれぞれ19000・9000・4000・2100・800・500である．)：ガスクロ工業標準品

2．機器

2．1分光光度計

日立自記分光光度計320，日立蛍光分光光度計650-40

2．2高速液体クロマトグラフ(HPLC)

ポンプ：島津LC－5A，紫外吸収検出器：島津SPD－6A，蛍光検出器：津島RF－530，カラム：昭和電工のGPC A-802で8mmid×500mm，移動相：クロロホルム，流速：0.8ml/min，記録計：津島R－111M

2．3ガスクロマトグラフ

(1)ECD検出器付GC(ECD－GC)

津島GC 6Aを使用し，α-BHC・TCTP・オキサジアゾン・CNP・クロメトキシニルを次の条件で定量した．カラム：1.95%QF-1+1.5% 0 V-17 on Gas ChromQ 3mmid

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

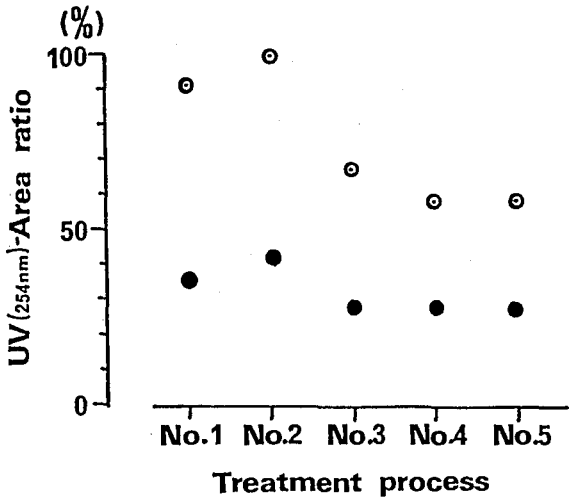


Fig. 3. Area ratio of the chromatograms of the hydrophobic organic materials in the extracts from treatment process water, monitored at 254nm. These were calculated from the date in Fig. 2.
⊙ : Chloroform extract ● : Hexane extract
No. 1 : Raw water No. 2 : Flocculated water
No. 3 : Precipitated water No. 4 : Filtrated water No. 5 : Finished water
No. 6 : Blank (Solvent)

ンチオカーブは第3分画に，TBP・CRP・TBXP・TPPは第5分画に溶離されている．上記の有機塩素系農薬，有機リン系農薬，有機リン酸トリエステルの分画位置と割合をFig. 4 中の黒印で示した．

第一分画のピークは無機物の環状イオウ分子(S_8)であることが確認されている[3]．無機物は溶媒抽出により除去されると言われているが，S_8は溶媒層に移行している．大部分の非低沸点疎水性有機物は第3，4，5分画に存在していた．水道原水と水道水の比較より，分子量約500以上で極性のある非低沸点疎水性有機物は浄水処理で除去されていた．有機塩素系農薬，有機リン系農薬，有機リン酸トリエステルは第3，4，5分画に存在し，全ピーク面積に対する占める割合は極一部であった．多環芳香族，蛍光染料らの環境汚染物質も第3，4，5分画に存在するが，全ピーク面積に対する占める割合は存在量から予測して極一部であると推定される．このことから，現在ガスクロマトグラフ等で測定されている有機物は非低沸点疎水性有機物群の極一部であると認識する必要性がある．

Fig. 5 は水道原水及び水道水の各分画液における非低沸点疎水性有機物群の蛍光スペクトラム(但し，励起波長254nm)である．水道原水の第3，4，5分画の有機物群は300nm，375nm，425nm，580nm に蛍光を発し，また水道水の第5分画の有機物群は375nm，425nm に蛍光を発していた．すなわち水道原水の第4，5分画に認

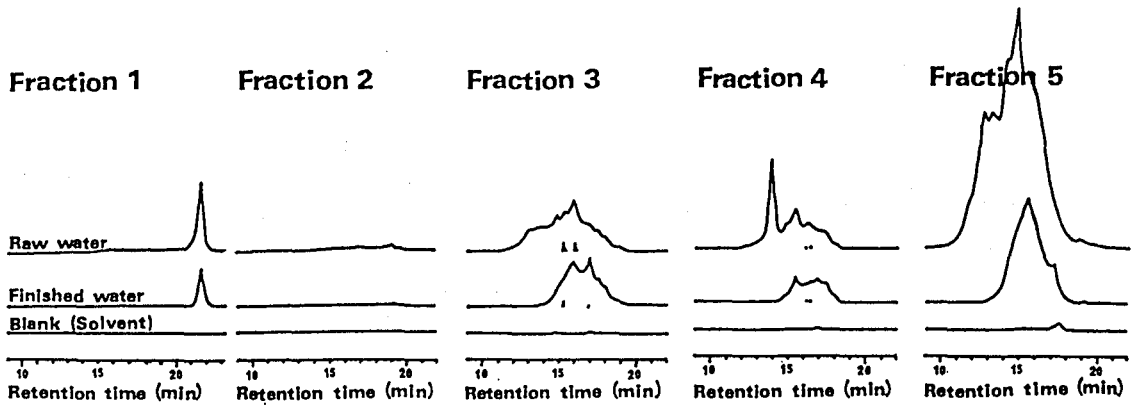


Fig. 4. HPLC patterns of the fractions eluted by florisil column chromatography.
Hexane extracts from raw and finished water were subjected to florisil column chromatography.
Fraction 1 : Hexane 50ml Fraction 2 : Hexane 50ml
Fraction 3 : 35% Ether–hexane 35ml Fraction 4 : 35% Ether–hexane 35ml
Fraction 5 : Acetone 50ml
Black marks corresponded to the total area of TCTP, oxadiazon, CNP, chromethoxynil, diazinon. MEP and benthiocarb of fraction 3 and 4, monitored at 254nm.

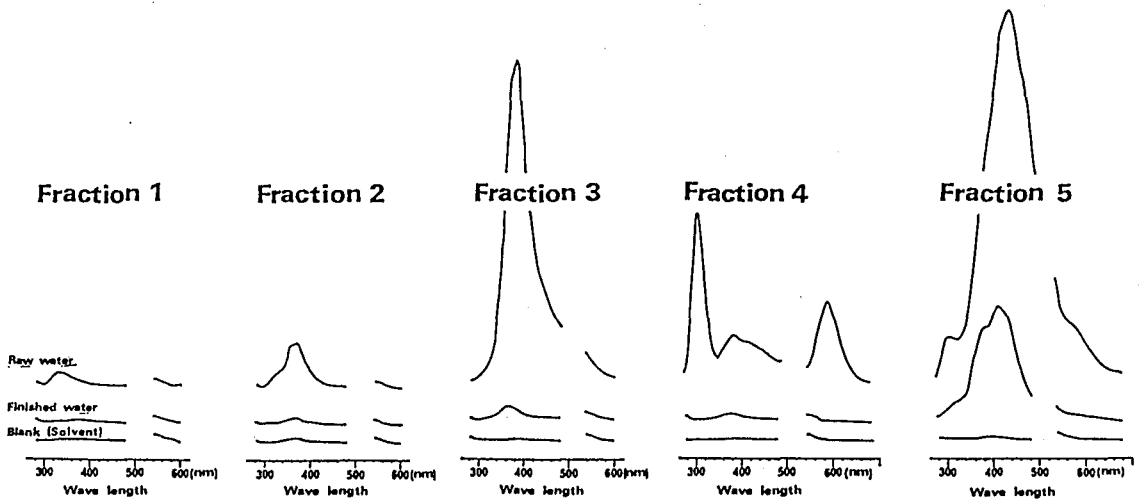


Fig. 5. Fluorescence specta of the fractions from florisil column chromatography with excitation at 254nm. Hexane extracts from raw and finished water were subjected to florisil column chromatography. Fraction 1, 2, 3, 4 and 5 are described in Fig. 4.

められた300nm，580nm に蛍光を発していた極性のある有機物群は浄水処理でほぼ完全に除去されていた．

Fig. 6 及びFig. 7 は水道原水・水道水の第3，4，5分画液における蛍光(励起254nm，蛍光375nm 及び励起254nm，蛍光425nm)モニターの分子量分布のクロマトグラムである．375nm，425nm に蛍光を発した非低沸点疎水性有機物群は分子量約500未満であった．

Fig. 8 及びFig. 9 は水道原水・水道水の第3，4，5分画液における蛍光(励起254nm，蛍光300nm 及び励起254nm，蛍光580nm)モニターの分子量分布のクロマトグラムである．300nm，580nm に蛍光を発した非低沸点疎水性有機物群の大部分は分子量約800であったが，しかし，一部分は分子量約500未満であった．

ま と め

水道原水・凝集水・沈殿水・ろ過水・水道水中の非低沸点疎水性有機物群の紫外吸収スペクトルは250nm 弱付近にピークを持っていた．そこで，非低沸点疎水性有機物群を便宜上，254nm でモニターすることにした．

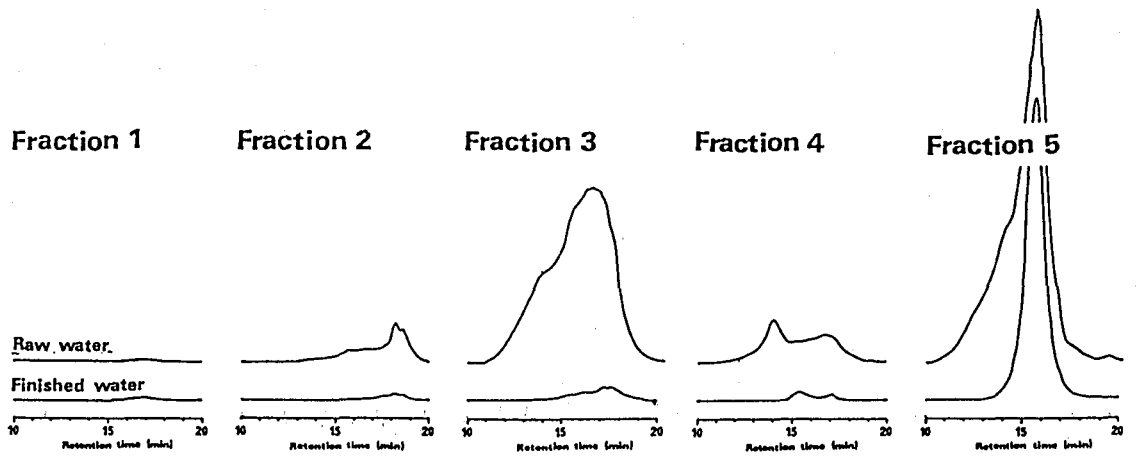


Fig. 6. HPLC patterns of fractions monitored by fluorescence at 254nm excitation and 375nm emission. Hexane extracts from raw and finished water were subjected to florisil column chromatography. Fraction 1, 2, 3, 4 and 5 are described in Fig. 4.

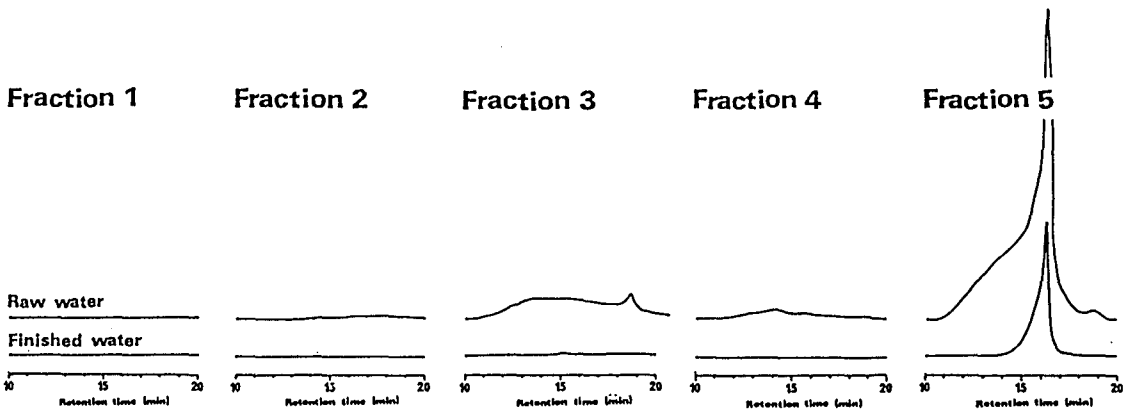


Fig. 7. HPLC patterns of fractions monitored by fluorescence at 254nm excitation and 425nm emission. Hexane extracts from raw and finished water were subjected to florisil column chromatography. Fraction 1, 2, 3, 4 and 5 are described in Fig. 4.

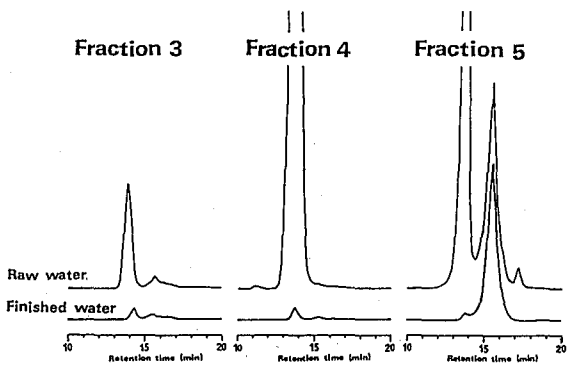


Fig. 8. HPLC patterns of fractions monitored by fluorescence at 254nm excitation and 300nm emission. Hexane extracts from raw and finished water were subjected to florisil column chromatography.
Fraction 3, 4 and 5 are described in Fig. 4.

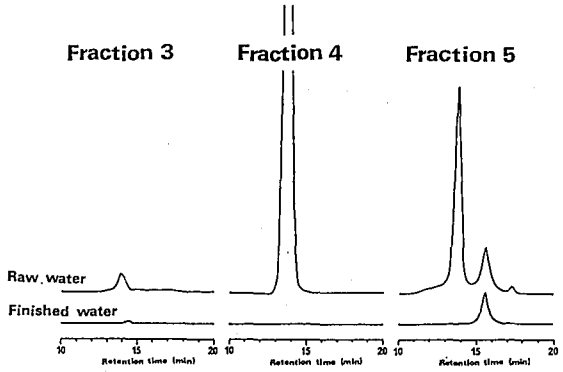


Fig. 9. HPLC patterns of fractions monitored by fluorescence at 254nm excitation and 580nm emission. Hexane extracts from raw and finished water were subjected to florisil column chromatography.
Fraction 3, 4 and 5 are described in Fig. 4.

UV(254nm)モニターで浄水処理を観察すると，水道原水中の分子量約2,100以上の非低沸点疎水性有機物群はほぼ完全に，分子量約2,100以下も一部，凝集沈殿で除去されていた．

水道原水中の大部分の非低沸点疎水性有機物群は比較的極性のある物質群であり，また300nm，375nm，425nm，580nm に蛍光を発していた．その内，300nmと580nm に蛍光を発する物質群は分子量約800であり，浄水処理でほぼ完全に除去されていた．一方，375nm と425nm に蛍光を発する物質群は分子量約500未満で一部除去されていた．現在，ガスクロマトグラフ等で測定されている環境汚染物質は水中の非低沸点疎水性有機物群の極一部であると認識する必要性がある．

参考文献

1）高橋保雄，森田昌敏：水質汚濁，11，161-168，1988
2）浦野紘平，川本克也，林幸司：水質汚濁，4，43-50，1981
3）高橋保雄，森田昌敏：水質汚濁，11，710-714，1988

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 169-174, 1990

ドライクリーニング所におけるテトラクロロエチレンの使用実態と溶剤蒸気回収装置の効果

有賀孝成*, 押田裕子*, 栃本博*,
西島基弘**, 寺山武***

Survey of usage of Tetrachloroethylene and Effect of Vaporous Solvent Collector in Laundries

TAKANARI ARIGA*, HIROKO OSHIDA*, HIROSHI TOCHIMOTO*,
MOTOHIRO NISHIJIMA** and TAKESHI TERAYAMA***

Keywords：塩素系有機溶剤 chlorinated organic solvent, テトラクロロエチレン tetrachloroethylene, 溶剤蒸気回収装置 vaporous solvent collector, 排水処理 wastewater treatment, ドライクリーニング dry cleaning

緒　言

わが国では年間150億m³の水が上水用に使用されており，このうち，22%に当たる33億m³を地下水に依存している[1]．また，上水道の整備されていない地域では約200万世帯，800万人の人々が地下水をそのまま飲料水として使用していると推定されている．

近年，この地下水がテトラクロロエチレン(PCE)やトリクロロエチレン(TCE)等の塩素系有機溶剤に広範に汚染されている事実が明かとなってきた[2]．これらの有機溶剤は動物に対する蓄積性はないものの，環境中での分解が遅く，発ガン性の疑いが指摘されており[3]，社会問題としてクローズアップされている．

わが国におけるPCE及びTCEの出荷量(昭和63年)はそれぞれ，71,400及び68,700 tに達している[4]．これらの主な用途は，TCEはその約80%が金属の脱脂洗浄用に，残る20%は溶剤等に使用されている．これに対して，PCEは金属の脱脂洗浄や溶剤用にも28%程度使用されているが，約32%はドライクリーニング用の洗浄剤として使用されている．

厚生省は昭和58年，PCEとTCE及び1,1,1-トリクロロエタン(MC)の3物質について，水道水の暫定的な水質基準を定めた[5]．それと同時に，地下水汚染を未然に防止するため，PCEを使用しているドライクリーニング所に対する溶剤蒸気回収装置(ガス回収装置)及び排水処理装置の設置並びにその維持管理の徹底等を指示してきた[6]．また，平成元年にはPCEが化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律に定める第2種特定化学物質に指定されたことに伴い，PCEを使用するドライクリーニング所の排水は水質汚濁防止法及び下水道法（排水基準0.1mg／l以下)で規制されることとなった．

しかし，ドライクリーニング所におけるPCEの使用実態及びガス回収装置あるいは排水処理装置の実際の性能や維持管理方法等については不明な点が多く，詳細な調査報告も見られない．

そこで我々は，ドライクリーニング所に対する適切な助言，指導を行うための基礎資料を得るため，PCEを使用しているドライクリーニング所を対象としてPCEの使用量，排水量等の詳細な調査を実施し，ドライクリーニング所におけるPCEの環境汚染防止対策を検討してきた．本報では，ドライクリーニング所の設備とPCEの使用実態及びガス回収装置の効果等について報告する．

調査方法

1．ドライクリーニング設備の実態

東京都小平及び東村山市内のドライクリーニング所で，PCEを使用している54施設を対象にして，昭和63年2

*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, Shibazaki-cho 3 chome, Tachikawa, Tokyo 190, Japan
**東京都立衛生研究所生活科学部
***東京都立衛生研究所

月に，各施設で稼働しているドライクリーニング機械(ドライ機)のメーカー，型式及び容量，ガス回収装置及び排水処理装置の設置状況とその処理方法を調査した．

2．ドライ機の運転状況及びガス回収装置の効果

ガス回収装置の稼働している7施設とまだ設置していない10施設を対象にして，昭和62年8月から昭和63年7月までの間にそれぞれ，4ヵ月～1年間調査した．

ドライ機の運転回数及びPCEの補充量は施設管理者に毎日の記録を依頼した．なお，洗濯物量はドライ機の容量と運転回数の積とした．

排水量は排水処理装置の排水口に20*l*容のポリエチレン製の受器を置き，排水の全量を回収して計量した．

3．排水中のPCE濃度

排水処理装置を設置している31施設を対象にして，昭和63年2月から3月の間に，排水処理装置の前後で排水中のPCE濃度を調査した．

なお，活性炭吸着式(活性炭式)及び高分子吸着式(高分子式)排水処理装置では水分離器の上澄液を処理前の試料とした．また，処理後の試料は排水を計量する受器の口元に，あらかじめ容量が約300m*l*となるように加工した500m*l*容のポリエチレン製の瓶を固定し，ここから採取した．

PCEの分析は溶媒抽出ーガスクロマトグラフ法[7]に準じた．ガスクロマトグラフは島津製作所製GC7A型(ECD検出器付き)を使用し，標準物質は水質試験用有機ハロゲン化物標準液B－2(和光純薬，PCE 4 mg／m*l*)を残農用ヘキサン(和光純薬)で適宜，一定量に希釈して使用した．

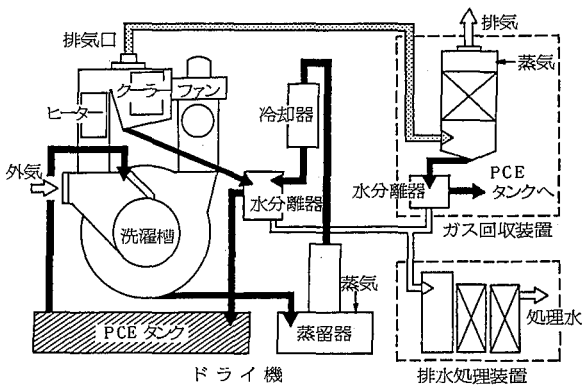


図1．ドライクリーニング所のPCE汚染防止システム例

結果及び考察

1．ドライクリーニング設備の実態

1）ドライ機

ドライクリーニング所のシステム例の概略を図1に，54施設で稼働していたドライ機の容量を表1に示した．

ドライ機の容量は3.7kgから最大54kgのものまであったが，10kg未満の施設が半数の27施設あり，10～20kgの20施設を加えると87％の施設が20kg未満のドライ機を使用していた．20kg以上の施設は7施設と少なく，30kg以上の施設は5施設で全体の1割以下であった．

メーカー及び型式の判明したドライ機は51台あったが，このうち17台は輸入品であった．また，型式は42機種に及び同一の機種は多いものでも4台だけであった．

ドライ機は洗濯物の洗浄から乾燥，脱臭までの工程を一貫して行い，洗浄に使用した後のPCEはドライ機に装備されている蒸留器で再生して，繰り返し使用している．また，脱液後の衣類に付着したPCEも乾燥工程で回収される．しかし，この乾燥工程ではPCEの除去が不十分なため，次の脱臭工程でドライ機内に外気を導入してPCEを除去する．ガス回収装置はこの時発生する排気中のPCEを回収する装置である．

2）ガス回収装置

ガス回収装置の処理方式別の設置施設数を表2に示した．

ガス回収装置を設置している施設は54施設のうち15施設であった．その処理方式は粒状活性炭式が7施設で最も多く，次に冷凍式が5施設あった．その他には流動活性炭式が2施設あり，冷凍式と粒状活性炭式を併用している施設が1施設あった．厚生省はドライ機の容量の合計が30kg以上の施設に対してガス回収装置の設置を義務づけているが[8]，30kg以上のドライ機が稼働している5施設のうち2施設はまだ設置していなかった．

3）排水の処理方法

洗濯物の洗浄に使用した後のPCEには洗濯物や洗剤に由来する水分が含まれている．また，蒸留時にはその

表1．ドライ機の容量

容量(kg)	施設数
10 未 満	27
10 ～ 20	20
20 ～ 30	2
30 以 上	5
計	54

効率を高めるために蒸気あるいは水を加える．このため，これらに由来する水分は水分離器でPCEと分離してドライ機から排出される．また，ガス回収装置でも脱着後のPCEには水分が混入しているため，ドライ機と同様にこの水分は水分離器から排出される．従って，ドライクリーニング所ではドライ機とガス回収装置の双方から発生する排水を処理する必要がある．

ドライクリーニング所で現在行っている排水処理の方法を表3に示した．

54施設のうち34施設が自家処理を行っていた．また，排水処理を業者に依託している施設が10施設あり，これを合わせると全体の約80％が何等かの方法で排水処理を行っていた．自家処理を行っている施設について，排水処理装置の処理方式を見ると，その80％が活性炭式であり，その他には曝気式が4施設，高分子式が2施設であった．

活性炭式の排水処理装置は活性炭を半年に一回程度の頻度で交換する必要があるが[6]，装置をドライ機やガス回収装置と直結して設置し，排水を連続的に処理することができる．

曝気式排水処理装置は自動式と手動式の装置が市販されている．自動式は活性炭式排水処理装置と同様に排水の連続処理が可能であるが，装置が大きく高価である．また，手動式は比較的低廉であり操作も簡単であるが，その都度排水の入れ替えの作業が必要である．これらのことから，活性炭式排水処理装置は日常の維持管理が比較的簡便であり，価格も低廉であることからよく普及したと考えられる．

表2．ガス回収装置の設置状況

処理方式	施設数
粒状活性炭式	7
流動活性炭式	2
冷凍式(内臓式)	5(2)
冷凍式＋粒状式	1
未設置	39
計	54

表3．排水の処理方法

処理方式	施設数
処理装置設置	34
活性炭式	28
高分子式	2
曝気式	4
業者依託	10
未処理	10
計	54

2．PCEの使用実態と排水量

PCEを使用している17施設のドライクリーニング所を対象にして，洗濯物量，PCEの補充量及び排水量を調査した．各施設における設備の概要及び調査結果の月平均値を表4に示し，表5には洗濯物100kg当りのPCE補充量と排水量をガス回収装置の処理方式別に示した．

1）洗濯物量

調査対象とした17施設のドライクリーニング所で処理した洗濯物量は1月当り282～9,880kg(平均3,070kg)と施設によって大きく異なったが，半数以上の9施設は2,000kg以下であった．また，これらの施設では6.8～12kgと比較的小型のドライ機を使用しており，その運転回数は1月当り41～163回(平均109回)であった．これに対して，1月当りの洗濯物量が3,000kgを越える6施設はいずれも18kg以上のドライ機を使用しており，運転回数も173～284回(平均236回)と多かった．

2）PCE補充量

ドライ機では前述のようにPCEを回収，再生して繰り返し使用している．しかし，PCEは脱臭時の排気や蒸留残渣物あるいは排水中への移行等により徐々に減少する．そのため，ドライ機には随時PCEが補充されている．また，洗浄時には1回に50～150ml程度の液状洗剤が使用されているが，この中にもPCEが50％程度含まれている．

各施設で新たに補充したPCEの量は概ね洗濯物量に比例し，1月当り16～583kg(平均144kg)の範囲であった．そこで，PCE補充量を洗濯物100kg当りに換算してみると，ガス回収装置の有無で大きく異なることが分かった．すなわち，ガス回収装置の稼働している7施設では洗濯物100kg当り0.86～6.76kg(平均3.81kg)であったのに対して，これの設置していない施設では1.26～9.64kg(平均6.77kg)と平均値で約2倍の差がみられた．このことから，ガス回収装置はドライ機の排気中に移行するPCEを回収することでPCE補充量の43.7％を削減できることが分かった．

また，各施設の洗濯物100kg当りのPCE補充量を詳細にみると，ガス回収装置を設置していないM及びHの2

表4．調査対象設備の概要及びドライ機の運転状況

（月平均値）

施　設	ドライ機容量 (kg)	ガス回収装置の処理方式	ドライ機の運転回数	洗濯物量 (kg)	PCE補充量 (kg)	排水量 (l)
A	54.4	粒状活性炭式	181	9,880	583	1,240
B	22	粒状活性炭式	284	6,240	162	872
C	18.1	流動活性炭式	236	4,280	147	118
D	18.1	粒状活性炭式	173	3,140	100	417
E	14.5	冷凍式[1)]	159	2,300	19	67
F	12	粒状活性炭式	131	1,580	106	121
G	11.3	冷凍式	117	1,320	52	40
H	30	—[2)]	282	8,470	239	158
I	18.1	—	260	4,720	338	40
J	10	—	296	2,960	187	35
K	11.3	—	162	1,940	187	177
L	11.3	—	117	1,320	81	40
M	8	—	163	1,300	16	18
N	9.1	—	135	1,220	115	37
O	10	—	72	725	52	15
P	10	—	51	514	41	15
Q	6.8	—	41	282	27	14

1）ドライ機に内臓
2）未設置

施設ではPCE補充量がそれぞれ，1.26及び2.82kgであり，ガス回収装置を設置している施設の平均値3.81kgをかなり下回っていた．このことは，PCE補充量がガス回収装置の有無の他に，ドライ機の運転方法によっても大きく異なることを示すものと考える．

PCE補充量を削減し大気への負荷量を削減するためにはガス回収装置の設置を進めると同時に，乾燥時間を充分にとる，あるいは蒸留残渣物の処理を確実に行う等，ドライ機の維持管理を適切に行うことが重要であると考える．

3）排水量

各施設の1月当りの排水量は14lから1,240lまで施設によって大きく異なった．しかし，20l以下の施設が全体の23%あり，半数以上の9施設が50l以下であった．また，200lを越える施設が3施設あったが，これらの施設はいずれも洗濯物量が多く，粒状活性炭式のガス回収装置が稼働していた．そこで，PCE補充量と同様に，洗濯物100kg当りの排水量をみると，ガス回収装置の処

表5．ガス回収装置の処理方式別効果と排水量

（洗濯物100kg当り）

処理方式	施設数	PCE補充量（kg）		排水量（l）	
		範　囲	平均値	範　囲	平均値
粒状活性炭式	4	2.59～6.76	4.61	7.65～13.9	11.8
流動活性炭式	1	3.45	3.45	2.77	2.77
冷　凍　式	2	0.86～3.93	2.39	2.92～3.01	2.96
未　設　置	10	1.26～9.64	6.77	0.85～9.13	3.08

理方式が流動活性炭式及び冷凍式の3施設では2.77～3.01l（平均2.90l）であった．これはガス回収装置を設置していない10施設の0.85～9.13l（平均3.08l）と平均値ではほとんど変わりはみられない．これに対して，粒状活性炭式の4施設では7.65～13.9l（平均11.8l）であり，他に比較して約4倍も多かった．

そこで，B，C及びGの3施設を対象にして，ガス回収装置からの排水量をその処理方式別に調査した．その結果，洗濯物100kg当りの排水量は流動活性炭式及び冷凍式ではそれぞれ，0.81及び0.73lであったが，粒状活性炭式では8.55lと約10倍の差があった．また，粒状活性炭式のB施設ではドライ機を5～8回運転する毎にPCEの脱着を行っていたが，この時，一回当り7.6～9.4l（平均8.5l）と多量の排水が認められた．

流動活性炭式では活性炭を移動させてPCEの吸着と脱着を連続的に行い，PCEの脱着は間接加熱で行っている．また，冷凍式では排気を冷却し，凝縮したPCEを回収する．このため，流動活性炭式及び冷凍式では排水量が少ない．これに対して，粒状活性炭式ではPCEの脱着時に蒸気を使用するため，これに由来する多量の排水が，一時的に発生することが分かった．このため，排水処理には特に留意する必要があると考える．

また，ガス回収装置を設置していない施設の洗濯物100kg当りの排水量は0.85～9.13lと相当のバラツキがみられる．これは，洗剤や洗濯物に由来する排水量の差は比較的少ないと思われることから，排水量の相違は蒸留の頻度及び蒸留時に加える蒸気あるいは水の量に大きく依存していると考えられる．

3．排水中のPCE濃度

排水処理装置の稼働している31施設を対象にして，排水処理装置の前後で排水中のPCE濃度を調査した．結果を表6に示した．

排水処理装置の処理方式は活性炭式が25施設，曝気式が4施設，高分子式が2施設であった．

処理前の排水中のPCE濃度は1.3～270mg／lの範囲であった．54施設のうち，50mg／l以下と50～100mg／lの施設がそれぞれ10施設あり，全体の64％が100mg／l以下であった．PCEの水に対する溶解度(25℃)は約150mg／lであるが，これを越える施設が7施設あり，このうち3施設では200mg／l以上であった．これらの施設ではドライ機から微粒子状のPCEが排出していると考えられる．

処理後のPCE濃度は，排水基準値である0.1mg／l以下の施設は9施設で全体の29％であった．排水基準値を越えた22施設のうち14施設は基準値の10倍の1.0mg／l以下であった．しかし，その他の8施設は1.0mg／l以上であり，そのうち10mg／l以上が5施設あり，その最高は94mg／lであった．

処理後のPCE濃度を処理方式別にみると，曝気式は対象数が4施設と少ないものの，そのいずれもが1.0mg／l以下であり，処理効果が比較的安定していると考えられる．

処理前後のPCE濃度の関係を施設別にみると，処理後の濃度が0.1mg／l以下の9施設のうち，8施設では処理前の濃度が100mg／l以下であった．しかし，その他の施設については明確な関係はみられなかった．

これらのことから，排水処理装置を設置している施設では一定の処理効果は認められるものの，全体的にみれば極めて不十分な状況にあることが分かった．更に詳細な調査を実施し，その原因の解明と対応策を確立する必要がある．

有機溶剤による環境汚染を防止するためには発生源における使用量を削減し，環境に対する負荷量を削減することが重要である．今回の調査で，ガス回収装置はPCEの大気中への拡散を防止すると共にPCE使用量の削減に有効であることがわかった．しかし，その設置率は28％であった．厚生省は30kg以上のドライ機の稼働している施設についてガス回収装置の設置を義務づけてい

表6．排水中のPCE濃度

処理方式	施設数	濃度別施設数								
		処理前のPCE濃度（mg／l）					処理後のPCE濃度（mg／l）			
		<=50	50～100	100～150	150～200	200<	<=0.1	0.1～1.0	1.0～10	10<
活性炭式	25	9	9	3	2	2	8	10	2	5
曝気式	4	1	1	0	1	1	1	3	0	0
高分子式	2	0	0	1	1	0	0	1	1	0
計	31	10	10	4	4	3	9	14	3	5

るが，30kg以下の施設でも洗濯物の多い施設ではPCE使用量は相当量に達しており，今後こうした施設についても何等かの対応策が必要であると考える．

一方，排水処理装置の設置率は60％程度であった．また，排水処理装置を設置している施設でも処理後のPCE濃度が排水基準を満足する施設は29％であった．環境庁は昭和62年度に実施した業種別の排水中のPCE濃度の調査結果を公表しているが，この中で洗濯業の超過率が27％と他の業種に比較して特に高いことを指摘している[9]．今回の調査では70％以上が排水基準を越えており，基準値の10倍を越えている施設が26％も認められた．

今後，ガス回収装置及び排水処理装置の設置指導を徹底していくことと併せて，環境汚染を防止する観点からの適正なドライ機の維持管理方法について指導していく必要がある．また，排水中へのPCEの排出状況，排水処理装置の性能，管理上の問題点等を解明し，排水処理対策を確立する必要があると考える．

要　約

PCEを使用しているドライクリーニング所を対象として，各施設で稼働している設備の実態とその運転状況及び排水中のPCE濃度を調査した．

1）各施設で稼働していたドライ機の容量は20kg以下が全体の87％を占めており，30kgを越える施設は9％程度であった．

2）1月当りの洗濯物量は282～9,880kg（平均3,070kg）と施設によって大きく異なり，洗濯物量が3,000kg以上の施設では18kg以上の大型のドライ機を設置しており，稼働率も高かった．

3）ガス回収装置はPCE補充量を約40％以上削減でき，PCEの大気汚染防止に極めて有効であることが分かった．しかし，その設置率は28％であった．

4）1月当りの排水量は約半数が50l以下であった．また，粒状活性炭式のガス回収装置が稼働している施設ではPCEの脱着時に平均8.5lと多量の排水が排出した．

5）排水処理装置を設置している施設は60％程度であり，その処理方式は活性炭吸着式が80％を占めた．しかし，処理後のPCE濃度が排水基準の0.1mg／l以下の施設は29％程度であり，基準値の10倍を越える施設が26％あった．

本研究は東京都小平保健所及び同東村山保健所と共同で実施したものである．

文　献

1）環境庁企画調整局企画調整課編：環境白書，平成元年版，293，1989.
2）環境庁水質保全局：昭和57年度地下水汚染実態調査結果，昭和58年8月.
3）日本水道協会：飲料水中の各種化学物質の健康影響評価，昭和63年3月，東京.
4）化学工業日報社：化学工業年鑑，1989年版，220-221，1988.
5）厚生省通知：昭和59年2月18日付，環水第15号.
6）厚生省通知：昭和59年8月23日付，衛指第20号.
7）日本工業標準調査会：JIS K0125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）厚生省通知：平成元年7月10日付，衛指第114号.
9）環境庁水質保全局：トリクロロエチレン等の排出状況及び地下水等の汚染状況について，昭和62年12月.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 175-180, 1990

活性炭吸着式排水処理装置による ドライクリーニング排水中のテトラクロロエチレンの処理効果

有賀孝成*, 押田裕子*, 栃本博*,
西島基弘**, 寺山武***

The Removal of Tetrachloroethylene from Wastewater by Activated Carbon Method in Laundries

TAKANARI ARIGA*, HIROKO OSHIDA*, HIROSHI TOCHIMOTO*,
MOTOHIRO NISHIJIMA** and TAKESHI TERAYAMA***

Keywords：塩素系有機溶剤 chlorinated organic solvent, テトラクロロエチレン tetrachloroethylene, 排水処理 wastewater treatment, 活性炭式 activated carbon method, ドライクリーニング dry cleaning

緒　言

テトラクロロエチレン(PCE)等，塩素系有機溶剤による環境汚染を防止するためには発生源における使用量及び環境への負荷量を削減することが重要である．

わが国における PCE の出荷量(昭和63年)は年間71,400 t に達しているが，このうちの32％はドライクリーニングの洗浄剤として使用されている[1]．このため，ドライクリーニング所の排水は地下水に対する PCE の汚染源の一つとして懸念されており，ドライクリーニング所における環境汚染防止対策は緊急な課題となっている．

厚生省，通産省は平成元年７月，「ドライクリーニング所営業者に係る PCE の環境汚染防止に関する技術上の指針」を定め，それまでの暫定的な指導から溶剤蒸気回収装置(ガス回収装置)及び排水処理装置の設置義務等を明確にした．また，厚生省は排水処理装置から排出する PCE の管理基準濃度を0.1mg／l以下と定めた[2]．

前報では[3]，ドライクリーニング所で稼働している設備及び PCE の使用実態等の調査結果から，ガス回収装置は PCE 使用量の削減及び大気に対する PCE の汚染防止に極めて有効であることを明らかにした．しかし，排水処理装置については，その設置率が現在のところ60％程度に留まっており，しかも，処理後の PCE 濃度は管理基準濃度に照らして満足できる状況ではなかった．

本報では，現在最も普及している活性炭吸着式(活性炭式)排水処理装置の稼働している施設を対象にして，排水中の PCE 負荷量及び排水処理装置の処理効果を詳細に調査し，その問題点と対応策を検討したのでこれらの結果を報告する．

調査方法

1．対象及び期間

東京都東村山及び小平市内の PCE を使用しているドライクリーニング所で活性炭式排水処理装置が稼働している８施設を対象にして，昭和62年８月から昭和63年７月まで，１年間調査した．

各施設で稼働していた設備の概要を表１に示し，ドライクリーニング機械(ドライ機)の水分離器及び活性炭式排水処理装置の構造例を図１に示した．

ドライ機の水分離器には蒸留器と乾燥クーラーからそれぞれ，水を含む PCE が流入する．PCE と水の分離は比重分離によっており，分離した排水は直接排水処理装置に導入される．また，ドライ機の排気中に含まれる PCE を回収するガス回収装置の稼働している施設ではこの水分離器からも PCE を含む排水が発生するため，これらを併せて処理する必要がある．

排水処理装置はメーカーによって大きさや内部構造に多少の相違がみられたが，いずれも水分離器と２槽の活

*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, Shibazaki-cho 3 chome, Tachikawa, Tokyo 190, Japan
**東京都立衛生研究所生活科学部
***東京都立衛生研究所

表1．調査対象設備の概要

施設	ドライ機		ガス回収装置の処理方式	排水処理装置のメーカー
	メーカー	容量(kg)		
A	M社	30	—[1)]	N社
B	T社	10	—	N社
C	I社	14.5	冷凍式[2)]	N社
D	M社	12	粒状活性炭式	S社
E	T社	11.3	—	N社
F	L社	10	—	Z社
G	L社	10	—	Z社
H	M社	6.8	—	A社

1）未設置
2）ドライ機に内臓

性炭槽から成る3槽構造であった．表1に示したB，C，D及びHの4施設は調査開始前2ヶ月以内に新設したものであった．その他の4施設はいずれも設置後半年程度を経過していたため，調査開始前にメーカーの技術者による活性炭の交換を行った．

2．調査項目

1）洗濯物量，PCEの補充量，排水量及びPCEの分析：前報と同様に行った．

2）PCE原液量：毎月1回，排水処理装置の水分離器を点検し，貯留したPCE原液を回収して計量した．

3）排水中のPCE濃度：毎月1回，排水処理装置の前後で排水中のPCE濃度を測定した．処理前の試料は排水処理装置の水分離器の上澄液とした．

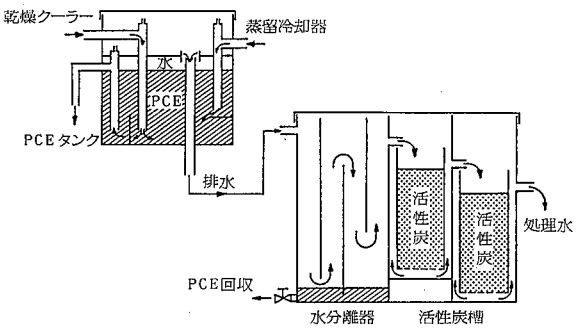


図1．ドライ機の水分離器と活性炭式排水処理装置の構造例

結果及び考察

1．排水中に流出したPCE量

ドライ機の運転状況及び排水中のPCE負荷量を表2に示した．

1）排水処理装置の水分離器で回収したPCE原液量

8施設ではいずれも排水処理装置の水分離器からそれぞれ，年間57～20,400kgのPCE原液が回収された．回収量の多いA，C，D及びHの4施設はいずれも12回の調査で毎回PCE原液が回収された．また，E施設は12回中8回回収され，その量も年間2,420kgと比較的多かったが，8回のうち2回で2,100kgが回収された．その他の施設ではF及びG施設ではそれぞれ6回及び3回回収されたが量的には年間57及び69kgと他に比較して少なかった．またB施設では583kgが一回で回収されたものであり，その他は回収されなかった．

これらのことから，ドライ機及びガス回収装置の水分離器からは量の多少はあるものの，多くの施設で日常的にPCE原液の流出していることが分かった．

2）PCE原液の流出原因

PCEの原液がドライ機の水分離器で比重分離されずに流出する原因としては，蒸留操作の不手際等による突沸が最大のものであり，大規模なものでは一度に数十kgの流出もある．今回の調査ではこうした事例はなかったが，B及びE施設で見られたような一時的に多量のPCE原液の流出は小規模な突沸による水分離器内のエアーバランスの乱れに起因していることが考えられる．

また，この他の原因として，排水中の夾雑物と結合したPCE，水と激しく混和した時に生じる粒状化した

表2．ドライ機の運転状況と排水中のPCE 負荷量

施　設	運転回数（月）	洗濯物量（kg／月）	PCE 補充量（kg／月）	排 水 量（l／月）	排水中の PCE 負荷量（g／年）	
					原液量[1)]	溶存量[2)]
A	282	8,470	239	158	17,800	341
B	296	2,960	187	35	583	17.1
C	159	2,300	19	67	20,400	154
D	131	1,580	106	121	3,770	122
E	117	1,320	81	40	2,420	22.7
F	72	725	52	15	57	24.7
G	51	514	41	15	69	8.3
H	41	282	27	14	4,990	35.6

1）排水処理装置の水分離器で回収した PCE 原液量
2）活性炭処理前の PCE 濃度×排水量

PCE や油膜状の PCE が排水と共に流出する．あるいは PCE 過飽和の排水が排水処理装置の水分離器で冷却して PCE が析出する等が考えられる．

3）PCE 原液の流出量と排水量の関係

洗浄工程当り，すなわちドライ機を一回運転する毎の PCE 流出量と排水量の関係を検討した．

毎回の調査で PCE 原液の流出を認めた4施設のうち，粒状活性炭式のガス回収装置が稼働していたD施設を除くA，C及びHの3施設では洗浄工程当り5～11gの PCE が流出しており，洗浄工程当りの排水量は0.34～0.56l（平均0.44l）であった．これに対して，PCE 原液の流出量が少ないB，F及びGの3施設では洗浄工程当りの流出量が0.066～0.16gと少なく，排水量も0.12～0.30l（平均0.21l）と少なかった．特に，PCE 原液の回収が一回だけであったB施設ではドライ機の運転回数が月平均296回と多く，洗濯物量も2,960kgと多かったが，洗浄工程当りの排水量は0.12l と8施設中最も少なかった．

これらのことから，PCE 原液の流出する原因は水分離器の基本的な性能やその維持管理の良否等によって異なるが，洗浄工程当りの排水量の多い施設では PCE 原液が流出しやすくなると考えられる．

PCE 原液の流出はドライ機の運転及び維持管理を適正に行うことで相当改善できると思われるが，水分離機能を強化する等，ドライ機の性能向上を図ることが必要であると考える．

4）活性炭処理前の排水中の PCE 濃度

活性炭処理前の排水中 PCE 濃度の年間の推移を図2に示した．

活性炭処理前すなわち，排水処理装置の水分離器の上澄液の PCE 濃度は年間を通して概ね各施設でそれぞれ一定しており，そのレベルは PCE 原液の回収量と一致している傾向が見られた．PCE 原液が毎回回収されたA，C及びHの3施設はいずれも年間を通して概ね150mg／l 以上で推移し，平均値はそれぞれ，185，189及び208mg／l であった．これに対して，PCE 原液の回収量が少ないB，E及びGの3施設では共に10～100mg／l の範囲で推移し，平均値はいずれも37～45mg／l と低かった．

次に，活性炭処理前の PCE 濃度と排水量の積から排

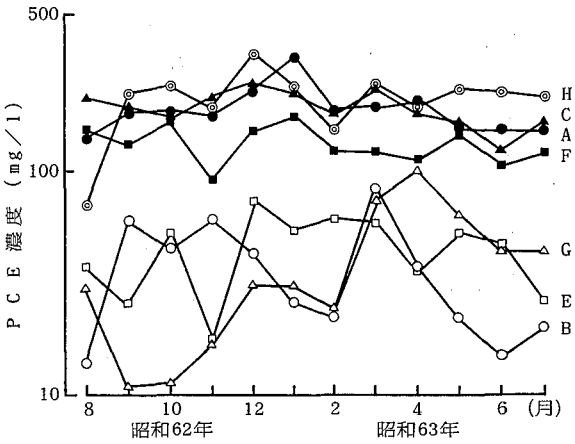


図2．活性炭処理前の排水中PCE 濃度の推移
A－H：調査対象施設

水中に溶存して排出したPCEの総量(溶存量)を求た．各施設の溶存量は原液量に比較して非常に少なく，排水中のPCE全体に占める割合は原液量の特に少なかったF及びG施設でそれぞれ，30及び11％であった他はいずれも3％程度以下であった．

このことから，ドライクリーニング所における排水処理は排水中のPCE濃度の低減化と同時に，排水と共に流出するPCE原液を確実に回収することが極めて重要であることが分かった．そのためには，排水処理装置の水分離器は貯留したPCEの確認及び回収が容易に行える構造である必要があり，既存の装置は更に改善の余地があると考える．

2．活性炭式排水処理装置の処理効果

1）活性炭処理後の排水中PCE濃度

活性炭処理後の排水中のPCE濃度の推移を図3に示した．

処理後のPCE濃度を管理基準値に照らしてみると，3群に大別できた．B及びHの2施設はそれぞれ1回ずつ管理基準値の0.1mg／lを上回った他は年間を通して常に管理基準値以下であった．また，E施設は1月から5月にかけて0.1mg／lを越えたが，その他は管理基準値以下で推移し，G施設は最初3.7mg／lと高かったがその後一貫して低下し6回目以降は0.1mg／l以下になった．これに対して，A及びCの2施設はそれぞれ2.1～25mg／l(平均12.1mg／l)及び0.99～23mg／l(平均7.94mg／l)と毎回管理基準値を大幅に上回った．また，F施設は管理基準値以下になることはなかったが，1.0mg／lを越えることもなく，0.11～0.79mg／l(平均0.425mg／l)の範囲で推移した．

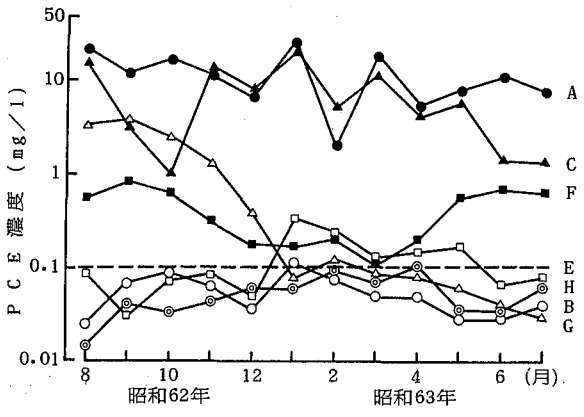


図3．活性炭処理後の排水中PCE濃度の推移
A－H：調査対象施設
－－－：管理基準濃度

2）処理後のPCE濃度と他の調査項目との関係

毎回の調査で管理基準値を大幅に上回ったA及びCの2施設は共に多量のPCE原液が流出していた．また，活性炭処理前のPCE濃度もそれぞれ140～310mg／l(平均186mg／l)及び120～240mg／l(平均189mg／l)と常に高く，月平均排水量もそれぞれ158及び67lと他に比較して多かった．これに対して，年間を通して管理基準値を満足したB及び比較的低濃度で推移したEとGの3施設はPCE原液の流出量が少なく，処理前のPCE濃度の平均値は37～45mg／lと低かった．

このことから，処理後の成績が悪かったA及びCの2施設ではPCE原液が日常的に流出しているため，排水処理装置の水分離器でもPCEの分離が不十分な状態にあり，PCE過飽和の排水が活性炭層に流入している．そして，排水量が多いため活性炭層での流速が速く，十分な吸着処理ができていないと考えられる．

また，H施設ではPCE原液が日常的に流出しているため，活性炭処理前では依然として過飽和の状態であった．しかし，排水量が少ないため活性炭槽での吸着が十分行われており成績が良かったと考えられる．

FとGの2施設はドライ機及び排水処理装置に同一機種が稼動しており，排水量も共に15l程度と少なかった．しかし，F施設では処理後のPCE濃度が0.1mg／l以下にならなかった．このことはZ社の排水処理装置では排水量が少ない施設でも処理前のPCE濃度が11～99mg／l(平均39mg／l)と低い場合には対応できるが，F施設のように89～170mg／l(平均132mg／l)と高濃度の場合には対応できないと考えられる．

これらのことから，活性炭式排水処理装置はPCEの原液は水分離器で回収できるが，PCE原液が恒常的に流出している施設あるいは排水量の多い施設では活性炭処理が困難であることが分かった．また，このように活性炭の処理能力が大きく制限される要因として，ドライ機からの排水の多くが蒸留時に使用する蒸気に由来しているため，排水量が比較的少ない施設でも流量の変動幅の大きいことが，大きく関与していると考える．

3．排水処理システムの改善

D施設は洗濯物量が月平均1,580kgと比較的多く，PCE原液も毎回回収された．また，粒状活性炭式ガス回収装置が稼動しているためPCEの脱着時に多量の排水が発生し[3]，月平均の排水量も121lと多い．このため，排水処理装置がこの流量の変動に対応できないことが考えられた．そこで，実験的に処理システムを次のように

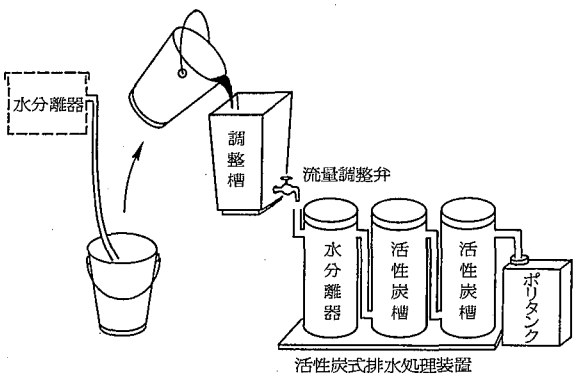


図4．改善した排水処理システムの概要

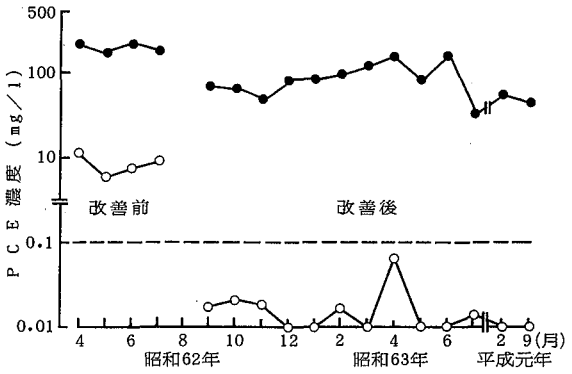


図5．排水処理システムの改善効果
—●—：処理前，—○—：処理後
－－－：管理基準濃度

変更して調査した．

ドライ機及びガス回収装置からの排水は一旦ポリエチレン製のバケツに受けて静置した．次に，底部に沈澱したPCE原液を除く上澄液だけを開口部を布で覆った流量調整弁付きのポリバケツ(調整槽)に入れ，毎時1～2l程度の流速となるように既存の排水処理装置に導入した．

改善した処理システムの概要及び排水中のPCE濃度の推移を図4及び図5に示した．

処理後のPCE濃度をみると，改善前には10mg／l付近であったが，改善後は常に管理基準値の0.1mg／l以下で推移した．また，処理前の濃度も改善前には170～230mg／lと常に過飽和の状態であったが，改善後には80～160mg／l(平均83mg／l)とかなり低下した．

このことから，排水量及びPCE原液の流出量が多い施設では排水処理装置をドライ機から分離し，PCEを十分分離してPCE濃度を低下させた後，流量を調整して活性炭層の通過速度を低くすることで良好な成績の得られることが分かった．

この方法は水分離の作業が必要となるが，既存の排水処理装置をそのまま活用できる．また，排水量，PCE原液の流出量等を常時確認することで，ドライ機の運転及び管理状況を把握することができる他，突沸等の異常時にも活性炭槽が高濃度のPCEに汚染されないため容易に対処できる等，波及効果も大きいと考える．

また，活性炭は定期的に交換する必要があり，その期間は半年から一年程度といわれている[4]．しかし，この施設では2年間を経過しても良好な成績が得られている．このことから，活性炭は維持管理を適正に行えば相当長期間使用できることが分かった．

4．PCEの補充量と排水中での推移

ドライ機ではPCEを再生して繰り返して使用するが，徐々に漏出するためPCEを随時補充している．洗濯物100kg当りのPCE補充量とその推移を図6に示した．

前報で，洗濯物100kg当りのPCE補充量はガス回収装置を設置していない施設では6.77kgであったが，このうち43．7％はガス回収装置を導入することで回収できることを報告した．今回の調査で，8施設の排水中に移行したPCE量は洗濯物100kg当り0.94～148g(平均35.0g)の範囲であった．これらのことから，PCE補充量のうち排水に移行する量は0.52％程度と少なく，補充量の多くは洗濯物や脱臭時の排気中に移行して大気中に揮散し，その他は蒸留残渣物等に残留し廃棄されたものと考えられる．

ドライ機からは多くの施設でPCEの原液が流出しており，これが排水中に移行したPCEの70～99％以上(平

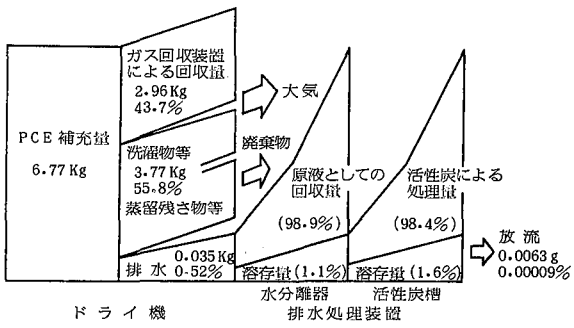


図6．洗濯物100kg当たりのPCE補充量とその推移

均98.9%)を占めた．このPCE原液は排水処理装置の水分離器で回収された．また，排水に溶存したPCEは次の活性炭槽でその93～99%(平均98.4%)が処理された．その結果，排水処理装置では排水中に移行したPCEの99.9%以上が処理され，処理水と共に排出したPCE量は洗濯物100kg当り平均0.00632gであった．

以上のことから，活性炭式排水処理装置は排水の地下浸透に起因する地下水へのPCE負荷量の削減，特に，PCE原液を回収することによる効果は極めて大きいことが分かった．しかし，処理後の排水中のPCE濃度は管理基準値に照らして必ずしも満足できる状況ではなかった．

活性炭式排水処理装置の処理効果を高めるためには活性炭処理前のPCE濃度及び活性炭槽での流速を低くする必要がある．そのため，PCE原液の流出量あるいは排水量の多い施設では，排水処理装置をドライ機から分離し，ドライ機からの排水は一旦別の容器に受け，PCEを充分に分離した後に流量調整して排水処理装置に導入することで処理能力を大幅に向上することができた．これにより活性炭式排水処理装置が長期間，安定した性能で使用できることが分かった．また，排水量の少ない施設でも，排水処理装置を単に設置しただけではその効果は期待できない．PCE原液の回収及び簡易測定法[4]等によりPCE濃度を常に監視する等，日常の維持管理を適切に行うことが必要である．

ドライクリーニング所におけるPCEの環境汚染を防止するためには，ガス回収装置及び排水処理装置の設置指導を更に徹底することと併せて，今後は蒸留残渣物などのPCEを含む廃棄物の適正な管理方法等，環境に対するPCE負荷量を更に削減するためのドライクリーニングシルテム全体の適正な維持管理方法を指導していくことが必要であると考える．

要　約

PCEを使用しているドライクリーニング所で活性炭式排水処理装置の稼動している8施設を対象にして，排水中のPCE負荷量及び排水処理装置の処理効果を調査し，次の結果を得た．

1）ドライ機に補充したPCEのうち，排水中に移行したPCE量は0.52%程度であり，補充したPCEの大部分は洗濯物や排気中に移行し大気中へ揮散した他，蒸留残渣物と共に廃棄されたと考える．

2）ドライ機からは多くの施設でPCEの原液が恒常的に流出しており，その量が排水中に移行したPCE量の70～99%を占めた．

3）活性炭式排水処理装置は水分離器でPCE原液を回収できた．しかし，PCE原液の流出量及び排水量の多い施設では活性炭処理が不十分となり，処理後のPCE濃度が管理基準値を大幅に上回った．

4）活性炭槽での溶存するPCEの処理能力は処理前のPCE濃度が100mg／l程度以下では月平均排水量が40l程度までは対応できたが，PCEが過飽和の場合には対応できないことが分かった．

5）ドライ機からの排水は一旦別の容器に受けて，PCE原液を除いた後に流量調整して排水処理装置に導入することで，効率よく処理できることが分かった．

本研究は東京都東村山保健所及び同小平保健所と共同で実施したものである．

文　献

1）化学工業日報社：化学工業年鑑，1989年版，220-221，1989.
2）厚生省通知：平成元年7月10日付，衛指第114号.
3）有賀孝成，押田裕子，栃本　博，西島基弘，寺山武：東京衛研年報，41，-，1990.
4）有賀孝成，押田裕子，栃本　博，西島基弘，寺山武：東京衛研年報，40，243-250，1989.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 181-185, 1990

簡易曝気法によるドライクリーニング排水中のテトラクロロエチレン処理

有賀孝成*, 押田裕子*, 栃本博*,
西島基弘**, 寺山武***

Simple Aeration Method for Removal of Dissolved Tetrachloroethylene from Wastewater in Laundries

TAKANARI ARIGA*, HIROKO OSHIDA*, HIROSHI TOCHIMOTO*,
MOTOHIRO NISHIJIMA** and TAKESHI TERAYAMA***

Keywords：塩素系有機溶剤 chlorinated organic solvent, テトラクロロエチレン tetrachloroethylene, 1,1,1-トリクロロエタン 1,1,1-trichloroethane, 排水処理 wastewater treatment, 簡易曝気法 simple aeration method, ドライクリーニング dry cleaning

緒　言

テトラクロロエチレン(PCE)を使用するドライクリーニング所では排水処理装置の設置が義務づけられており，その処理方式は活性炭吸着式(活性炭式)，曝気式またはこれらの併用式のいずれかとされている[1]．また，厚生省通知では排水処理装置から排出するPCEの管理基準濃度を0.1mg／l以下と規定している[2]．

著者らは[3]，PCEを使用しているドライクリーニング所における排水中のPCE濃度を調査した結果，処理後のPCE濃度が管理基準値を満足する施設は30％程度であり，26％の施設では基準値の10倍を越えていたことを報告した．また，前報[4]では，ドライクリーニング機械(ドライ機)からは多くの施設で排水と共にPCEの原液が恒常的に流出していること，活性炭式排水処理装置では，このPCE原液の流出量あるいは排水量が多い場合には活性炭処理が不十分となることを明らかにした．また，その対策として，排水処理装置をドライ機から分離し，排水は一旦別の容器に受け，PCE原液を十分に分離した後に流量調整して排水処理装置に導入することで，PCE濃度を管理基準値以下に維持することができることを報告した．

本報では，曝気式排水処理装置のうち手動式の装置による排水中に溶存するPCEの処理効果及び小規模な施設を対象とする処理方法として簡易曝気法を検討したのでこれらの結果を報告する．

調査方法

1．手動式曝気装置の処理効果

八王子市内のドライクリーニング所で実際に稼働している装置について昭和63年1月に調査した．

調査した処理装置はA社製SA-60型，処理水量は60l／回，曝気風量は25l／分であった．なお，処理操作はすべて現地で施設管理者が行った．

2．簡易曝気法の検討

1）対象及び期間

八王子市内のドライクリーニング所でPCE及び1,1,1-トリクロロエタン(MC)を使用しているそれぞれ3施設を対象にして，昭和62年10月から昭和63年3月までの間に行った．

2）試料及び処理方法

ドライ機からの排水は20l容ポリエチレン製の容器に回収して一夜静置した後，沈殿した溶剤を除く上澄液を試料とした．

試料10lを曝気容器(10l容ポリエチレン製広口丸型瓶)に入れ，あらかじめシリコンチューブでエアーポン

*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, Shibazaki-cho 3 chome, Tachikawa, Tokyo 190, Japan
**東京都立衛生研究所生活科学部
***東京都立衛生研究所

プ(風量5～7l／分)に接続したバブラー(ガラス製15×20mm，円柱型)を底部に沈めて曝気した．なお，MCでは処理水量は5lとし，曝気容器も5l容のものを使用した．

3）**PCE の分析法**

前報と同様に行った．

結果及び考察

1．手動式曝気装置の処理効果

曝気式排水処理装置には自動式と手動式の装置が市販されている．自動式はドライ機からの排水を直接装置に導入し，連続的に処理することができる．しかし，自動式は装置が大きく，高価なため一部の大規模な施設で導入されている程度である．ここでは手動式の装置についてPCEの処理効果を調査した．

手動式はドライ機からの排水を一旦別の容器に受け，PCEの原液を除く上澄液だけを曝気装置に移して曝気し，溶存しているPCEを除去する方法である．

調査した装置は屋外に設置されており，処理水量60lと比較的大型の装置で，曝気風量は毎分25l程度であった．水温15℃付近で約60lの排水を処理したときのPCE濃度の経時変化を図1に示した．

処理前のPCE濃度は280mg／lと相当高かったが，曝気開始1時間後には1.5mg／l以下となり，3時間後には管理基準値の0.1mg／l以下となった．

また，気温2～10℃の冬季に5時間曝気した時の調査結果を表1に示した．

処理後の排水中PCE濃度は5回のうち1回だけ0.29mg／lと管理基準値を越えたが，その他の4回は0.046～0.092mg／lといずれも良好な成績であった．

管理基準値を満足した4回はいずれも水温が6～10℃の範囲であったが，管理基準値を越えた1回は水温が2～3℃と他に比較してかなり低くかった．このために，処理効率が低下しPCE処理が不十分となったものと考えられる．

手動式はその都度水分離の作業が必要であるが，PCE原液を確実に回収することができ，構造が単純で操作が簡単なため失敗も少なく，安定した成績の得られることが分かった．また，排水の水温はPCEの処理効率に大きく影響することが分かった．

2．簡易曝気装置の処理効果

市販の曝気装置は比較的高価であり，ドライクリーニング所は小規模な施設が多く，排水量も月平均20l程度以下の施設が20％以上あり，半数以上は50l以下である[3]．こうした施設では排水処理装置の設置場所に苦慮

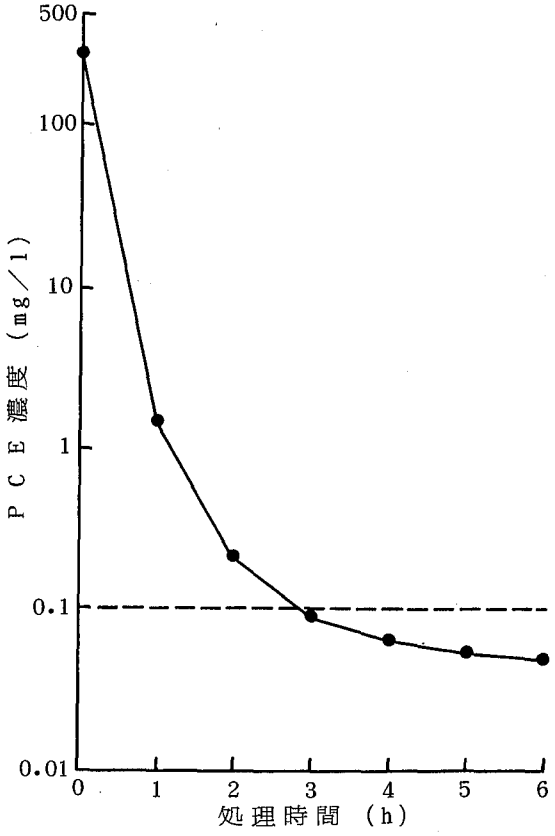


図1．手動式曝気装置の処理時間とPCE濃度
A社製PC-60M型
処理水量：60l，曝気風量：25l／分，
水温：15℃付近
－－－－：管理基準濃度

表1．手動式曝気装置によるPCEの処理効果

水温(℃)		気温(℃)		PCE濃度(mg／l)	
処理前	処理後	処理前	処理後	処理前	処理後
6	10	6	10	180	0.061
6	5	4	5	150	0.046
6	6	6	6	170	0.092
2	3	2	3	190	0.29
6	8	7	9	150	0.051

A社製PC-60M型
処理時間：5時間

している例も多い.

また，一部の施設では洗浄剤としてMCを使用するドライ機が稼働している．厚生省はMCについても管理基準濃度を3 mg／l以下と定め，PCEと同様な取扱いを指示している[2]．MC用のドライ機では蒸留時に蒸気や水を加えるとMCが劣化するため，圧搾空気を使用して蒸留効率を高めている[5]．このため，排水量はPCE用のドライ機に比較して非常に少ない.

そこで，こうした排水量の少ない小規模な施設を対象とするPCE及びMCの処理方法として，簡単な操作で確実に溶剤が除去でき，かつ低廉で特別な設置場所を要しない簡易曝気法を検討した.

1）処理水量

曝気法による溶剤濃度の減少速度は処理水量及び水温，曝気風量及び空気中のPCEあるいはMC濃度等によって異なる.

処理水量は小規模施設での排水量を勘案してPCEでは10l，MCでは5lとした．また，曝気用のエアーポンプは曝気風量が毎分5～7l程度の安価な市販品を使用した.

2）温度の影響

水温5℃付近の冬季と15℃付近の春先にそれぞれ屋外で曝気し，温度の影響を検討した.

排水中のPCE及びMC濃度の経時変化をそれぞれ，図2及び図3に示した.

PCEは水温15℃付近では，初期濃度が166，133及び92mg／lであったものが，1時間後にはそれぞれ，0.70，0.45及び0.25mg／lと急激に低下した．そして，4時間後にはそれぞれ，0.10，0.039及び0.019mg／lとなり，いずれも管理基準値の0.1mg／l以下となった．これに対して，水温5℃付近では初期濃度が143，94及び42mg／lであったものが，1時間後にはそれぞれ，1.2，0.94及び0.82mg／lにまで低下した．しかし，それ以後は徐々に減少し，4時間後ではそれぞれ，0.30，0.27及

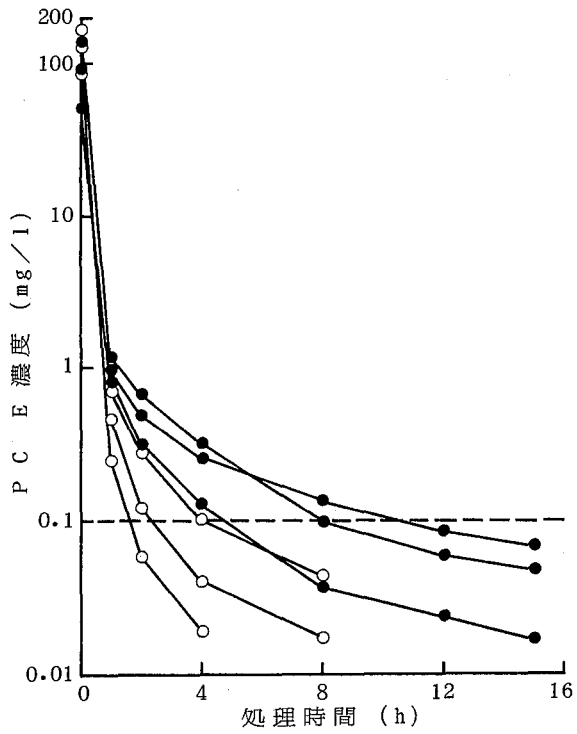


図2．簡易曝気装置による水温及び処理時間とPCE濃度
処理水量：10l，曝気風量：5～7l／分
—●—：水温5℃付近，—○—：水温15℃付近
－－－：管理基準濃度

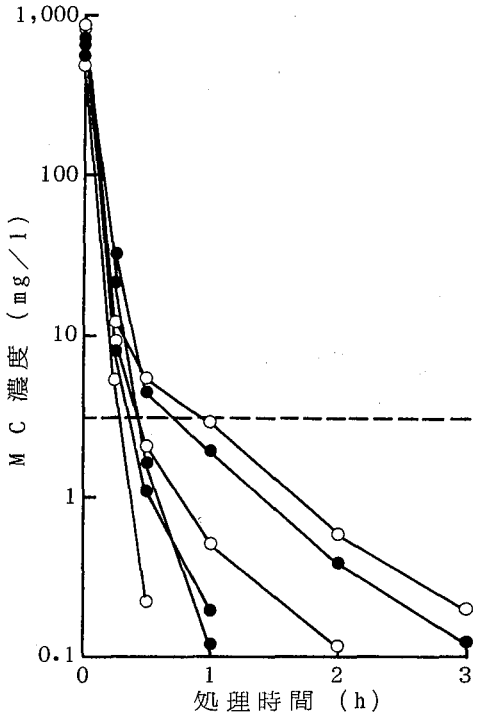


図3．簡易曝気装置による水温及び処理時間とMC濃度
処理水量：5l，曝気風量：5～7l／分
—●—：水温5℃付近，—○—：水温15℃付近
－－－：管理基準濃度

び0.12mg／l といずれも管理基準値を越えており，すべての試料が0.1mg／l 以下となったのは曝気開始10時間後であった．

これらのことから，PCE は1.0mg／l 程度までは１～２時間程度と比較的短時間に低下するが，それ以下の低濃度域では水温に大きく左右される他，同一条件下でも排水の種類によって大きく異なることが分かった．

簡易曝気装置と手動式曝気装置の曝気風量は排水1l 当りそれぞれ，0.5～0.7l／分及び約0.4l／分であり，簡易曝気装置の方が多い．しかし，水温5℃付近での処理効果を比較してみると，手動式曝気装置では５時間の曝気で十分処理できたが，簡易曝気法では10時間程度の曝気が必要であった．このことは，曝気法の処理効率が排水の種類や水温等の他に装置の構造等他の条件によっても大きく異なることを示すものと考える．その要因として，バブラーから発生する気泡の大きさ等，排水と空気の境界面の面積の相違が大きく関与しているものと考える．

MC の減少速度は，PCE と比較して非常に速く，水温15℃付近では，初期濃度917，854及び503mg／l であったものが，曝気開始30分後にはそれぞれ，5.4，2.1及び0.22mg／l となり，１時間後には2.9，0.51及び0.11mg／l とすべて管理基準値の３mg／l 以下となった．また，水温５℃付近でも初期濃度714，704及び570mg／l が30分後にはそれぞれ，1.1，1.6及び4.7mg／l，１時間後にはそれぞれ，0.19，0.11及び1.9mg／l といずれも基準値以下となった．

MC の減少速度は排水の種類によってかなり異なったが，水温の影響は比較的少なく，短時間で管理基準値以下になることが分かった．これは，MC の処理水量を PCE の半分に設定したことの他に，MC の管理基準濃度が PCE に比較して高く設定されていること及び MC は蒸気圧が高く空気中に揮散しやすいためと考える．

これらのことから，MC は２～３時間程度の曝気で十分処理できるが，PCE の曝気時間は水温の低い冬季には長時間の曝気を行う等，十分な余裕をもって設定する必要のあることが分かった．

3）現場での実用性

PCE 及び MC を使用しているドライクリーニング所それぞれ３施設に本法による排水処理を依頼し，現場での実用性を調査した．曝気時間は冬季であることを考慮し，PCE では12時間，MC では３時間とした．

PCE 及び MC の処理効果をそれぞれ，表２及び表３に示した．

表２．簡易曝気装置による PCE の処理効果

施設	水温(℃)		気温(℃)		PCE 濃度(mg／l)	
	処理前	処理後	処理前	処理後	処理前	処理後
A	0	0	0	0	130	0.13
	1	2	1	1	98	0.056
	3	4	1	1	110	0.031
	2	2	0	0	110	0.064
	4	8	5	9	150	0.077
B	2	4	8	11	65	0.048
	9	5	6	6	58	0.061
	5	7	6	9	89	0.078
	6	7	8	10	73	0.15
	4	6	8	14	67	0.10
C	10	7	10	9	52	0.063
	12	4	10	8	75	0.066
	11	5	11	9	96	0.035
	16	10	16	11	130	0.096
	16	8	13	13	110	0.060

処理水量：10l
曝気風量：５～7l／分
処理時間：５時間

表３．簡易曝気装置による MC の処理効果

施設	水温(℃)		気温(℃)		MC 濃度(mg／l)	
	処理前	処理後	処理前	処理後	処理前	処理後
D	4	4	1	1	1,100	1.4
	8	5	9	8	1,200	0.22
E	2	4	4	5	360	0.1以下
	13	16	10	12	250	0.1以下
F	12	14	10	12	280	0.1以下

処理水量：５l
曝気風量：５～7l／分
処理時間：３時間

PCE は延べ15回調査した結果，A 及び B 施設でそれぞれ１回0.1mg／l を越えたが，その他の13回はいずれもそれ以下であった．また，MC では３施設延べ５回の結果はいずれも管理基準値の３mg／l 以下であった．

今回の調査は冬季に行ったが，PCE 及び MC 共に良好な成績であった．このことから，これ以外の季節で水温が高い場合には今回と同等以上の効果が十分期待できる．

4）排気中の PCE 濃度

簡易曝気装置について，曝気処理時の排気中の PCE 濃度を測定した[6]．その結果，事前の水分離が不十分なために排水に過飽和の PCE が含まれている，あるいは曝気槽に排水を移すときの不手際などにより排水に PCE 原液が混入している等の場合には排気中の PCE 濃度は300ppm を越え，それが10分間程度継続することがあった．しかし，十分に静置した排水の PCE 濃度は100mg／1 程度以下であり，この場合には排気中の PCE 濃度は曝気初期でも50～100ppm 程度以下であった．

市販の排水処理装置には排気中の PCE を処理するための活性炭フィルターが装備されている．排水量が多く，処理頻度の高い施設では活性炭フィルターの装着あるいは排気をガス回収装置に導入する等，排気中の PCE 処理について十分な対策が必要である．しかし，本法で対象としている排水量が少なく処理頻度も週一回程度の施設では，水分離の作業を確実に行い，通風のよい屋外で処理すれば，排気中の PCE 処理は特に必要ないものと考える．

また，曝気法の処理効率は曝気空気中の PCE 濃度に影響される．操業中のドライ機付近では PCE 濃度が50ppm を越えている[7]．そのため，やむなく屋内で処理する場合には排気中の PCE 処理を確実に行うと共に新鮮な外気を導入して曝気する必要がある．

以上のことから，簡易曝気装置の処理効率は排水の種類や水温等，各種の条件に大きく影響されるため，あらかじめ実際の排水を用いてその処理能力を確認し，曝気時間は十分な余裕を持って設定すること．事前の水分離を十分に行い排水の PCE 濃度をできるだけ低くし，曝気処理は屋外で行うこと等に配慮すれば年間を通じて実用できることが分かった．また，本法は活性炭式排水処理装置の補助装置としても十分活用できると考える．

ドライクリーニング所における排水処理は、各施設の排水量，ガス回収装置の処理方式，PCE 原液の流出量あるいは処理装置の設置場所等，施設の実状に応じた処理方法を選択することが大切である．排水処理装置はそれぞれの特性を踏まえて，適正に管理すればその機能を十分維持できると考える．

ドライクリーニング所は小規模な施設が多く，その設備や運転状況も一様ではない．PCE 管理の適正化を図り環境汚染を防止するためには，各施設の実状に即した適切な助言，指導が重要であると考える．

要　約

排水処理装置として市販の手動式曝気装置の稼働しているドライクリーニング所において，その処理効果を調査した．また，排水量の少ない小規模な施設を対象とする処理方法として簡易曝気法を検討した．

1）手動式曝気装置はその都度水分離の作業が必要であるが，これにより PCE 原液は確実に回収できる．また，排水中に溶存する PCE の処理は構造が単純で操作も簡単なため，失敗が少なく安定した成績の得られることが分かった．

2）曝気式排水処理装置の処理効率は水温及び排水の種類等，各種の条件に大きく影響されるため，装置毎に実際の排水を用いてその処理能力を確認し，曝気時間は十分な余裕をもって設定する必要がある．

3）簡易曝気装置は事前の水分離を確実に行い排水の PCE 濃度をできるだけ低くすること及び曝気処理は通風のよい屋外で行うこと等に配慮すれば，年間を通して十分実用できることが分かった．

本研究は東京都八王子保健所と共同で実施したものである．

文　献

1）厚生省・通産省：クリーニング営業者に係るテトラクロロエチレンの環境汚染防止措置に関する技術上の指針，平成元年７月７日付，告示第６号．
2）厚生省通知：平成元年７月10日付，衛指第114号．
3）有賀孝成，押田裕子，栃本　博，西島基弘，寺山武：東京衛研年報，41，-，1990．
4）有賀孝成，押田裕子，栃本　博，西島基弘，寺山武：東京衛研年報，41，-，1990．
5）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，12，1987，日本クリーニング公害予防センター，東京．
6）日本工業標準調査会：JIS K0804検知管式ガス測定器，1985，日本規格協会，東京．
7）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．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 186-195, 1990

空調用冷却塔水におけるレジオネラ属菌の生息状況

古畑勝則*, 大橋則雄*, 松本淳彦*

Distribution of *Legionella* Species in Cooling Tower Water

KATSUNORI FURUHATA*, NORIO OHASHI*,
and ATSUHIKO MATSUMOTO*

Keywords：レジオネラ *Legionella pneumophila*, 冷却塔水 cooling tower water, 分布 distribution

緒　言

1976年の夏，米国フィラデルフィアにおいてレジオネラ症が集団発生して以来，世界各地から本症の事例が報告されるようになり，同時に環境中からもレジオネラが分離されるようになった[1]．

我国では，1980年に初めて斎藤ら[2]が本菌による症例報告を行っており，現在までにレジオネラ症と診断が確定した患者は20名を数えている[3]．しかし，これらはいずれも散発例であり，フィラデルフィアやロンドン[3]でみられたような集団発生ではない。本菌は発見当初，病原性の強いものと考えられていたが，最近では健康なヒトが発症することはまれで，幼児や高齢者あるいは入院患者等の免疫力が低下しているヒトが罹患しやすい日和見感染菌の一つとして認識されている．

本菌の感染経路は十分に解明されているわけではないが，米国における集団発生時の疫学的調査から感染源としてレジオネラが偏在的に多数生息していた空調用冷却塔が強く疑われ，ここから飛散したエアロゾルによって感染したものと考えられた[4]．その後の調査結果でも多数の冷却塔にレジオネラが生息していることが明らかになり，本症の感染源として冷却塔の重要性が示唆されている[5,6]．

本菌が冷却塔をはじめ，温水器や給湯施設等の水中に多く存在するのは，長期間にわたって温度が比較的高く，しかもその変動の小さいことがまず指摘される．とりわけ冷却塔では，夏期の運転期間中25～30℃とほぼ一定であり，さらに補給水量が少ないために冷却水が空気中の塵埃を取り込みながら濃縮され，栄養的に微生物群の増殖にとって好条件になっていることが第二に指摘できることである．実際に観察された少数例によると，レジオネラが検出された冷却塔には藻類や原生動物などさまざまな微生物が生息しており，これらの代謝産物や寄生することによるエネルギー摂取，いわゆる共生関係をとることがレジオネラ以外の細菌とは自然界における性格を異にする点であると言われる．このように微生物群の存在する環境水は身辺に普通にみられるが，分布菌数が大きく異なる最大原因は既述した富栄養状態の他に水温状況があると考えられる．

著者らはこれらの点を明確にする目的から，1987年から3年間，夏期を中心に冷却塔水における本菌の分布状況を調べ，同時に冷却水の水質との関係を検討するため理化学試験や細菌試験及び生物試験を並行して実施した．

材料及び方法

1．材料　**1）冷却塔水**　1987年，1988年及び1989年の3年間にわたり，6月から9月の夏期の間に，都内のビルに設置されている空調用冷却塔174箇所を対象に調査を実施した．各冷却塔の冷却水は柄杓でよくかき混ぜた後，付着物，浮遊物とともにその2～4 l を滅菌ポリエチレン容器に採取し，その日のうちに以下の方法でそれぞれの試験に供した．対象にした冷却塔では，水温，形式，清掃状況，薬品の有無等について調査した．

2．方法　**1）レジオネラ属菌の検出**　採取した冷却水は浮遊物を沈殿させ，その上澄水500ml，1,000ml を0.22 μm のメンブランフィルター数枚で吸引ろ過した．このフィルターを5 ml の滅菌蒸留水が入った三角コルベン(100ml 容)に入れて約1分間ボルテックスミキサーで激しく振とうした．これに0.2 M HCl-KCl 溶液(pH 2.2)を5 ml 添加してさらに約1分間振とうした．その

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

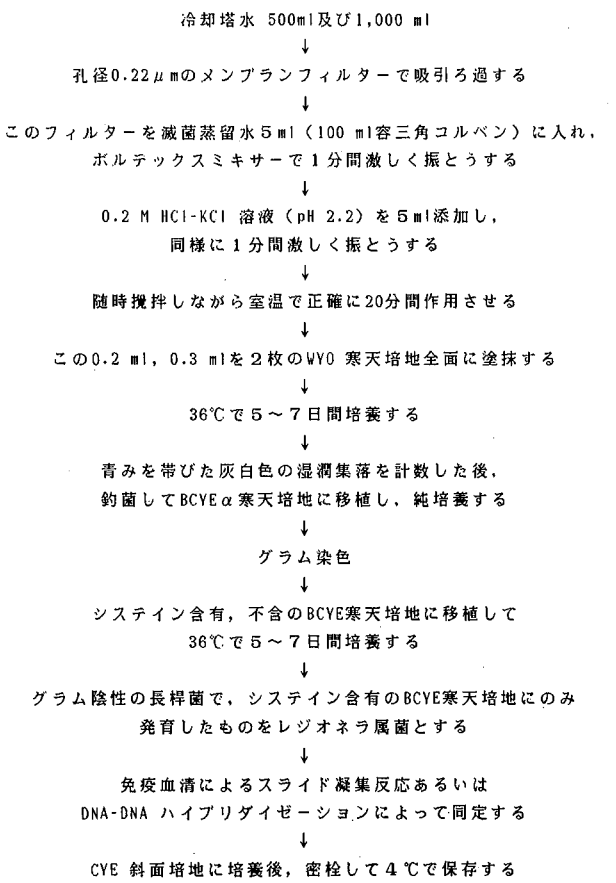


図1．レジオネラ属菌の検査手順

まま随時撹拌しながら室温で正確に20分間作用させた．この0.2ml，0.3mlを2枚のWYO寒天培地(栄研化学)の全面に乾燥するまで塗抹し，これを36℃で培養した．毎日観察して3日目から出現してくる青みを帯びた灰白色の湿潤集落を計数した後，これらの一部を釣菌してBCYEα寒天培地(Oxoid)に再分離した．これらの純培養株はグラム染色を行うとともに，L－システイン含有BCYEα寒天培地と不含CYE寒天基礎培地(Oxoid)に塗布して36℃で5～7日間培養した．菌体が2～20μmあるいはそれ以上の細長いグラム陰性桿菌で，L－システイン含有BCYEα寒天培地にのみ発育した菌株をレジオネラ属菌とした．これらについて免疫血清(デンカ生研)によるスライド凝集反応あるいはDNA-DNAハイブリダイゼーション(小林製薬)を行って菌種を同定した．また再確認のため，藪内の方法[7]によって菌体脂肪酸組成を調べ，主要脂肪酸がイソ型メチル側鎖をもつC16飽和分枝脂肪酸(i-16:0)やアンテイソ型メチル側鎖を有するC15飽和分枝脂肪酸(a-15:0)及びi-14:0，a-17:0であることを確認した．これら一連の手順を図1に示した．

2）**共存細菌の試験**　上水試験方法(1985)[8]に準拠して一般細菌と大腸菌群について定量試験を行った．また冷却塔水の菌叢を調べるために，一般細菌として検出された細菌を純培養し，これらについてグラム染色，ブドウ糖OF試験，オキシダーゼ試験を行った後，グラム陰性桿菌にはブドウ糖発酵性桿菌同定用キットEB－20(日水)及びブドウ糖非発酵性桿菌同定キットNF-18(日水)を用いて同定した．グラム陽性菌については医学細菌同定の手引き[9]に準じて属レベルで同定を行った．

3）**生物試験**　試料は一夜静置して浮遊物，付着物を沈澱させたものを集め，これについて光学顕微鏡で観察し，藻類を主体に原生動物等について定性的に調べた．

4）**理化学試験**　pH，過マンガン酸カリウム消費量，総窒素，硬度，塩素イオン，アルミニウム，鉄，銅，亜鉛について，上水試験方法(1985)[8]に準拠して試験を行った．有機体炭素はTOC-500(島津)によって測定した．

結　果

1．レジオネラ属菌の検出状況

1987年から3年間にわたる検出状況を表1に示した．

1987年は6月から9月にかけて90箇所114試料について調査を実施した．このうち68試料(59.6%)からレジオネラを検出した．検出状況を月別にみると，6月は14試料中10試料から1.0×10^2～3.0×10^4個／lのレジオネラを検出し，検出率は71.4%であった．7月は14試料中9試料，64.3%の検出率で，菌数は8.0×10^1～6.0×10^4個／lであった．8月は53試料中30試料(56.6%)から，9月は33試料中19試料(57.6%)からレジオネラを検出し，その菌数はそれぞれ2.0×10^2～5.0×10^4個／l，4.0×10^1～5.0×10^5個／lであった．

この年はレジオネラの時間的消長を検討するために8箇所の冷却塔(aからh)を定点にして6月から4カ月間毎月調査を行った．その結果，5箇所からは毎月レジオネラを検出し，その菌数は図2のように10^2～10^4個／lの範囲で変動していたが，とくに8月に菌数が増加して10^3～10^4個／lとなっていた．また6月，7月には検出されなかったが8月に急増した冷却塔(e)が1箇所あった(図2)．なお，この調査期間中まったくレジオネラが検出されない小型冷却塔(h)が1箇所あったが，殺菌剤を使用している施設であった．

1988年は7月，8月に24箇所を対象に72試料について検査を行った．このうち10箇所について冷却塔の清掃後

表1．冷却塔水からのレジオネラ属菌の検出状況

調査年・月	検査試料数	検出試料数	検出率(%)	菌数(個／l)
1987年				
6月	14	10	71.4	1.0×10^2～3.0×10^4
7月	14	9	64.3	8.0×10^1～6.0×10^4
8月	53	30	56.6	2.0×10^2～5.0×10^4
9月	33	19	57.6	4.0×10^1～5.0×10^5
小　計	114(90箇所)	68	59.6	
1988年				
7，8月	72(24箇所)	21	29.2	4.0×10^1～8.4×10^4
1989年				
8，9月	開放型　29	24	82.8	4.0×10^1～2.0×10^4
	密閉型　31	12	38.7	4.0×10^1～8.0×10^4
小　計	60(60箇所)	36	60.0	
合　計	246(174箇所)	125	50.8	4.0×10^1～5.0×10^5

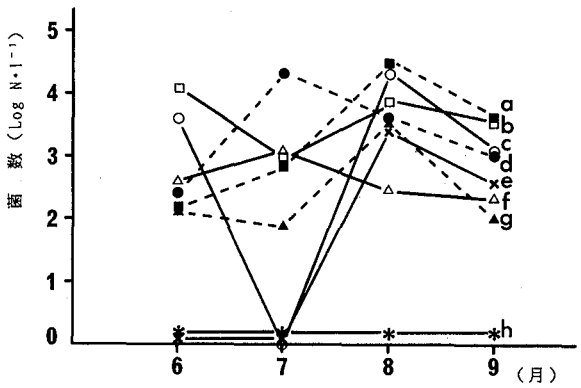


図2．8箇所の冷却塔におけるレジオネラ菌数の変動
h：殺菌剤使用

の影響をみるため3日から7日間隔で数回検査を行った．これは冷却塔に殺菌剤，殺藻剤等の薬品を使用している5箇所と使用していない5箇所を対象としたが，薬品を使用していた冷却塔の4箇所からはまったくレジオネラは検出されなかった．しかし，1箇所のみは清掃9日後から10^2～10^3個／lが検出されはじめた．一方，薬品を使用していない施設では清掃の効果に差がみられた．すなわち，3箇所では調査日によって検出，不検出の時があり，菌数は10^3個／l以下であった．2箇所の施設では清掃効果がまったく認められず，10^3～10^4個／lの菌数が常時検出された．図3にレジオネラが検出された6箇所の冷却塔における菌数変動を示した．AからEの5箇所はいずれも薬品未使用である．A，B冷却塔では清掃

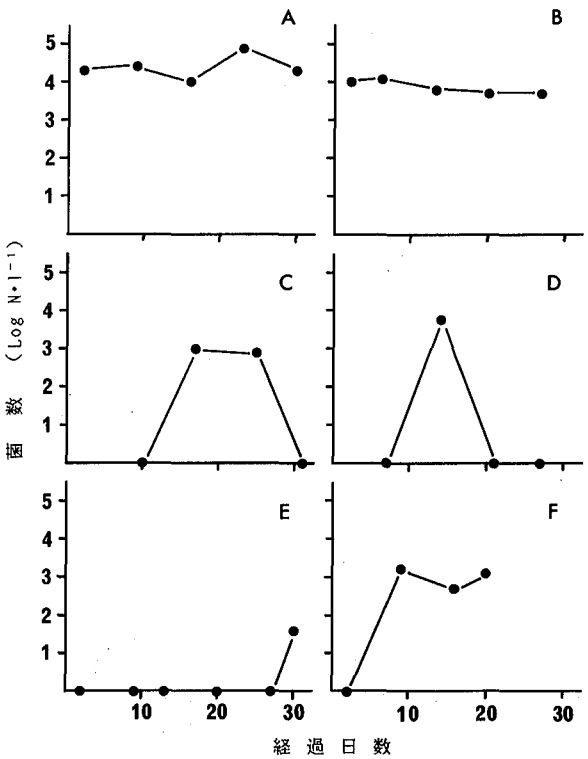


図3．冷却塔清掃後のレジオネラ菌数の経日変化
AからEは薬品未使用の冷却塔，Fは薬品使用

直後から10^4個／lのレジオネラが検出され，5回の検査では菌数の変化はほとんどみられなかった．C，D，E冷却塔は調査の途中で1～2回検出されたものであり，

菌数は10^2～10^4個／1であった.

この2年間の調査を行ってきたなかで，冷却塔使用の年数や時期等によるレジオネラの検出状況に大きな差はなかったが，冷却塔の構造の違いによって若干の相違がみられたので，1989年はこの点について追試を行った．すなわち，冷却水を直接空気と接触させる開放型29箇所と，冷却塔内に熱交換器を設けて冷却水を間接冷却する密閉型31箇所をそれぞれ対象に比較調査を行った．その結果，密閉型では38.7%(12試料)と低い検出率であったのに対して，開放型では82.8%(24試料)と検出率が非常に高く，危険率1%で有意差が認められた．しかし菌数については，開放型で4.0×10^1～2.0×10^4個／1，密閉型では4.0×10^1～8.0×10^4個／1とほとんど同レベルであり，冷却塔の構造とは特に有意な差はみられなかった.

2．検出されたレジオネラ属菌の菌種

表2に検出されたレジオネラ属菌の同定結果を示した．現在，レジオネラ科には *Legionella* 属の他に *Tatrockia* 属と *Fluoribacter* 属の3属が提案されているが，本論文では *Legionella* 属として記載した．検出率が最も高かった菌種は *L.pneumophila* であり，なかでも血清群1が64試料中52試料(81.3%)と高率で検出された．このほか血清群3(3.1%)，血清群4(1.6%)，血清群5(1.6%)，血清群6(1.6%)がわずかながら検出された．また血清群1から6以外で *L.pneumophila* と同定された菌株が34.4%の試料から分離された．*L.pneumophila* 以外の菌種では *L.dumoffii* (4.7%)，*L. anisa* (1.6%)，*L.birminghamensis* (1.6%)が低率ながら *L.pneumophila* とともに異なった冷却塔から検出された.

図4及び図5はBCYE α寒天培地上に発育した *L.pneumophila* (血清群1)の集落とグラム染色所見を示したものである．本菌の集落は凸状，辺縁明瞭なS型で，色調は青みを帯びた灰白色であった．グラム染色では通常の陰性菌と比べて染まりにくいが，グラム陰性の長桿菌が観察された．また，本菌が増殖した平板には淡い酸臭または卵の腐敗臭に類似した臭気があるのが特徴的であった.

3．冷却水から検出された細菌

一般細菌と大腸菌群の試験結果を表3に示した．これら2項目についてレジオネラとの相関関係を調べたが有意な傾向はみられなかった．しかし，レジオネラが検出された試料では一般細菌の菌数が少ない傾向がみられた.

表4はレジオネラが検出された30試料及び不検出の30試料からそれぞれ検出された主な細菌を示したものである．レジオネラ陽性試料からは29種類の細菌が検出された．なかでも *Bacillus* が最も高率に検出され，76.7%(23／30)の検出率であった．次いで *Corynebacterium* が63.3%(19／30)，*Pseudomonas vesicularis* が60%(18／30)であった.

一方，レジオネラ陰性試料からは21種類の細菌が検出され，やはり *Bacillus* が86.7%(26／30)と最も高い検出率であった．*Corynebacterium* が53.3%(16／30)で，その他 *Serratia marcescens* が43.3%(13／30)，*Enterobacter cloacae* と *Micrococcus* が40%(12／30)であった．しかし，レジオネラが検出された冷却水で高い検出率(60%)であった *P.vesicularis* は26.7%(8／30)と低い検出率であった．そこで両群における本菌の検出率を検定したところ，危険率1%で有意差が認められ，レジオネラが検出された冷却塔には *P. vesicularis* が多く生息している傾向が認められた.

表2．冷却塔水から検出されたレジオネラ属菌

菌種名	検出試料数	検出率(%)
Legionella pneumophila 1群	52	81.3
L. pneumophila 3群	2	3.1
L. pneumophila 4群	1	1.6
L. pneumophila 5群	1	1.6
L. pneumophila 6群	1	1.6
L. pneumophila 1群から6群以外	22	34.4
L. dumoffii	3	4.7
L. anisa	1	1.6
L. birminghamensis	1	1.6

レジオネラ属菌検出試料；64試料

表3．一般細菌，大腸菌群及び理化学試験の結果

項　目	検査試料数*	最小値	最大値	平　均	標準偏差
一般細菌	239	2	6.3×10^6	65492.3	435308
(1 ml 中)	123	7	4.1×10^5	11988.8	51514
大腸菌群	183	0	5.4×10^3	210.4	699.1
(100ml 中)	84	0	1.3×10^3	58.7	194.9
水温	239	16.4	36.5	26.4	3.3
(℃)	123	16.4	36.5	27.0	3.3
pH	239	7.4	9.0	8.3	0.25
	123	7.5	8.9	8.4	0.22
総窒素	239	0.2	239	33.1	37.9
(mg／l)	123	0.9	239	32.7	40.7
Cl^-	239	7.7	5040	280.5	432.2
(mg／l)	123	8.7	1783	268.2	326.5
$KMnO_4$	179	2	170	20.8	19.5
(mg／l)	87	2	74	16.6	12.8
TOC	60	0.9	43.9	8.81	8.9
(mg／l)	36	1.0	43.9	8.39	9.1
硬　度	100	46	3600	680.6	740.6
(mg／l)	63	74	3600	743.7	830.3
鉄	239	0	52	0.64	3.8
(mg／l)	123	0	4.0	0.17	0.5
銅	100	0	0.63	0.044	0.076
(mg／l)	63	0	0.26	0.037	0.047
亜鉛	100	0	0.55	0.082	0.13
(mg／l)	63	0	0.5	0.054	0.095
アルミニウム	60	0	0.2	0.021	0.03
(mg／l)	36	0	0.06	0.014	0.015

*各項目の上段は全調査結果，下段はレジオネラ検出試料についての結果

4．冷却水中に認められた藻類と原生動物

レジオネラが検出された74試料及び不検出の89試料で認められた主な藻類と原生動物を表5に示した．レジオネラ陽性試料からは藻類では藍藻類の *Oscillatoria* と珪藻類の *Achnanthes* がともに28.4%(21／74)と最も多く認められた．次いで珪藻類の *Nitzschia* が25.7%(19/74)であった．原生動物では繊毛虫類の *Vorticella* が31.1%(23／74)，線虫類が25.7%(19／74)，根足虫類の *Amoeba* が23%(17／74)に認められた．

一方，レジオネラ陰性試料には珪藻類の *Achnanthes* が27%(24／89)と最も高頻度に認められたが，さきの *Oscillatoria* と *Nitzschia* は，それぞれ13.5%(12／89)，10.1%(9／89)の試料にみられたにすぎなかった．このようにレジオネラが検出された冷却塔には *Oscillatoria* と

表4．冷却塔水から検出された主な細菌

属 名 (菌 種)	レジオネラ陽性(n=30)		レジオネラ陰性(n=30)	
	検出試料数	検出率(%)	検出試料数	検出率(%)
Citrobacter freundii	12	40.0	11	36.7
Enterobacter cloacae	10	33.3	12	40.0
Enterobacter spp.	7	23.3	0	—
Escherichia coli	11	36.7	9	30.0
Klebsiella spp.	7	23.3	3	10.0
Serratia marcescens	11	36.7	13	43.3
Acinetobacter calcoaceticus	4	13.3	3	10.0
Pseudomonas acidovorans	6	20.0	0	—
P. aeruginosa	14	46.7	10	33.3
P. fluorescens	9	30.0	7	23.3
P. paucimobilis	8	26.7	5	16.7
P. putida	0	—	6	20.0
*P. vesicularis**	18	60.0	8	26.7
Bacillus spp.	23	76.7	26	86.7
Corynebacterium spp.	19	63.3	16	53.3
Micrococcus spp.	9	30.0	12	40.0
Staphylococcus spp.	5	16.7	7	23.3

*：$p<0.01$で有意差有り

Nitzschia が多く生息している傾向がみられ，ともに危険率1%で有意差が認められた．

5．理化学試験の結果

理化学試験の結果を表3に示した．各項目の上段には全体の調査結果を，下段にはレジオネラ陽性試料についての結果をまとめた．レジオネラ陽性試料についてみると，水温は16.4～36.5℃で平均27.0℃であり，標準偏差は3.3とばらつきは小さかった．またpHは7.5～8.9で平均8.4とややアルカリ側であり，標準偏差は0.22と小さく，冷却塔による差はほとんどみられなかった．ところが，総窒素は0.9～239mg／l（平均32.7mg／l），塩素イオンは8.7～1,783mg／l（平均268.2mg／l），過マンガン酸カリウム消費量は2～74mg／l（平均16.6mg／l），TOCは1.0～43.9mg／l（平均8.39mg／l），硬度は74～3,600mg／l（平均743.7mg／l）であり，これらの項目ではいずれも濃度範囲が広く，かつ標準偏差の値も大きくなっており，冷却塔によってかなり異なっていた．また金属はいずれも低濃度で，鉄が0～4.0mg／l（平均0.17mg／l），銅は0～0.26mg／l（平均0.037mg／l），亜鉛0～0.5mg／l（平均0.054mg／l），アルミニウム0～0.06mg／l，（平均0.014mg／l）であった．これらの理化学項目とレジオネラの検出との相関を検討したが，両者間には特に有意な傾向はみられなかった．

考　察

1987年から1989年の夏期に，都内の中高層建築物に設置されている空調用冷却塔174箇所を対象にレジオネラ属菌の生息実態調査を行い，これらの過半数(50.8%)でレジオネラの存在を確認した．これと同様な報告は数多くみられており，東京都の他に富山県(13.0%)[10]，宮城県(20.0%)[11]，静岡県(52.1%)[12]，大阪市(61.0%)[13]，広島県(78.1%)[14]，三重県(78.6%)[15]，千葉県(91.2%)[16]など，13.0%から91.2%と検出率にかなりの差異はあるものの，広い地域でレシオネラが検出されている．また伊藤の報告[6]では，全国規模で行った調査の結果，全体で36.7%の検出率であった．これらの報告はいずれも濃縮倍率や検出限界が異なっているた

表5．冷却塔水で認められた主な藻類と原生動物

生物名		レジオネラ陽性(n=74)		レジオネラ陰性(n=89)	
		検出試料数	検出率(%)	検出試料数	検出率(%)
藍藻類	*Oscillatoria**	21	28.4	12	13.5
	Phormidium	11	14.9	9	10.1
	Chroococcus	7	9.5	2	2.2
珪藻類	*Achnanthes*	21	28.4	24	27.0
	*Nitzschia**	19	25.7	9	10.1
	Navicula	9	12.2	6	6.7
緑藻類	*Urothrix*	4	5.4	6	6.7
	Coccomyxa	4	5.4	2	2.2
繊毛虫類	*Vorticella*	23	31.1	33	37.1
	Aspidisca	10	13.5	10	11.2
根足虫類	*Amoeba*	17	23.0	13	14.6
	Euglypha	7	9.5	11	12.4
	Arcella	4	5.4	7	7.9
輪虫類	*Rotaria*	13	17.6	14	15.7
	Philodina	3	4.1	7	7.9
	Lecane	8	10.8	8	9.0
	Monostyla	4	5.4	8	9.0
線虫類		19	25.7	29	32.6
鞭毛虫類		4	5.4	0	−

*：$p<0.01$で有意差有り

め，一概に比較することはできない．

現在，レジオネラ属菌には25の菌種が報告されているが[17]，なかでも特に *L.pneumophila*（血清群1）が冷却塔から最も多く検出される共通性が認められている[6,12-14]．菌種を決定するには抗血清によるスライド凝集反応が一般的に行われているが，現在市販されている抗血清で同定できるのは5菌種のみであり，その他の種は同定することができない．最近，DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる同定法がレジオネラの分野にも開発され，この方法によって現在までに知られている25菌種すべてが同定可能となった．しかし *L.pneumophila* には血清群が13存在しており[17]，本法ではこれを決定することができず，凝集反応による方法でも血清群6まで確認できるのが限度である．

冷却塔など環境水から分離されるレジオネラ属菌を同定するには，この両方法の併用で問題はないと考える．1988年，1989年に分離した120株のレジオネラについては，75%の菌株が凝集反応によって同定された．その内訳は，*L.pneumophila* 血清群1の他に同血清群3，4，5，6と *L.dumoffii* であった．残りの25%はいずれの抗血清にも凝集反応を示さなかったため，DNA-DNA ハイブリダイゼーション法によって同定した．その結果，主要な *L.pneumophila* とともに2箇所の冷却塔から *L.anisa* 及び *L.birminghamensis* の2菌種が分離同定され，我国における最初の分離例であった．さきの凝集反応を示さず，後者の方法で同定された *L.pneumophila* は血清群1から6以外に相当するものであろうと考えられる．

以上のように，WYO 寒天培地を用いて36℃で培養したとき3日経過後から出現してくる特徴的な集落のうち，グラム染色により陰性で幅0.5～0.7 μm の長桿菌であることを確かめ，かつシステイン含有，不含の BCYE α 寒天培地で培養してシステインの要求性を確認することによって確実にレジオネラ属菌と同定することができた．

レジオネラは身近な土壌や環境水中に普通に存在して

いながら，その菌数は非常に少ないといわれている．しかし，冷却水中には10^4～10^5個／lもの多くの菌数が偏在している事実が確認された．この理由として水質分析，特に塩素イオン濃度の測定結果からも明らかなように，補給水(多くは水道水を使用している)が少ないために冷却水が10倍から1,000倍も濃縮されて富栄養状態になっていることや，水温が冷却塔の稼働中30℃付近で長期間変動の少ないこと，そして多くの藻類や原生動物が認められたことから清掃が不十分であること等が考えられる．これらの状況が特にレジオネラの増殖に好条件となっているものと推察された．

これまで我国ではレジオネラ症の集団発生例は報告されていないが，臨床材料からは本菌が分離されており，20例余りのレジオネラ症患者が報告されている[3]．今回の調査結果からも明らかなように，レジオネラ症の感染源として重要視されている冷却塔には多くのレジオネラ属菌が生息しており，我国においても冷却塔の管理状況如何によっては本症が集団発生する可能性は否定できず，冷却塔の適正な維持管理が必要であろうと考えられた．

結　語

都内174箇所の空調用冷却塔について，レジオネラ属菌の生息状況を主目的に調査を行い，併せて水質，微生物の分析をも実施して両者の関連性を追求した．

Legionella pneumophila を優占種としたレジオネラが50.8%の冷却塔水から検出され，10^1～10^5個／lのオーダーで生息していることがわかった．この *L.pneumophila* とともに5箇所の冷却塔から *L.dumoffii*，*L.anisa*, *L.birminghamensis* が低率ながら分離され，後二者は我国では初めての検出例であった．

特にレジオネラを多く検出した冷却塔には *Oscillatoria* や *Nitzschia* 等の藻類や細菌では *Pseudomonas vesicularis* が多く増殖している共通した傾向が認められた．

謝　辞：今回行った一連の調査は，衛生局生活環境部環境指導課，食品環境指導センター及び板橋区板橋，赤塚，志村保健所衛生課との共同で実施したものである．試料採取や冷却塔の形式調査等には多大な御協力を賜りました．ここに末尾ながら記して感謝の意を表します．

文　献

1）藪内英子：*Legionella*，三輪谷俊夫監修，医学細菌学2巻，365-442，1987，菜根出版，東京．
2）斎藤　厚，下田照文，長沢正夫，他：感染症学雑誌，55(2)，124-128，1981．
3）藪内英子，荒川迪生：レジオネラの現状と診断の進歩ー疫学的見地からー，副島林造，松本　明編，細胞内増殖性菌による最近話題の感染症，297-316，1989，医薬ジャーナル社，大阪．
4）Dondero Jr., T. J., Rendtorff, R. C., Mallison, G. F., *et al.*：*N. Engl. J. Med.*, 302, 365-370, 1980.
5）中浜　力：感染症学雑誌，57(8)，643-654，1983．
6）伊藤直美：感染症学雑誌，57(8)，682-693，1983．
7）藪内英子：検査と技術，8(9)，779-785，1980．
8）日本水道協会，厚生省監修：上水試験方法，1985．
9）Cowan S. T., 坂崎利一訳：医学細菌同定の手引き，1981，近代出版，東京．
10）刑部陽宅，林美千代，児玉博英：富山衛研年報，第10号，233-236，1988．
11）相原京子，今野純夫，中野三俊，角田　行：仙台市衛生試験所報，第16号，88-89，1986．
12）三輪憲永，赤羽荘資，斎藤祥博，中津川修二：静岡県衛生環境センター報告，No. 30，1-9，1987．
13）石井営次，来住輝彦，朝倉徳恵，他：生活衛生，33，247-257，1989．
14）榊美代子：広島県衛生研究所研究報告，No. 35，7-11，1988．
15）高橋裕明，佐藤和彦，片岡輝美，他：三重衛研年報，No. 32，51-56，1986．
16）小岩井健司，高木謙二，岸田一則，三瓶憲一，矢崎廣久：千葉衛研報告，第12号，33-36，1988．
17）藪内英子：臨床と微生物，15(5)，583-588，1988．

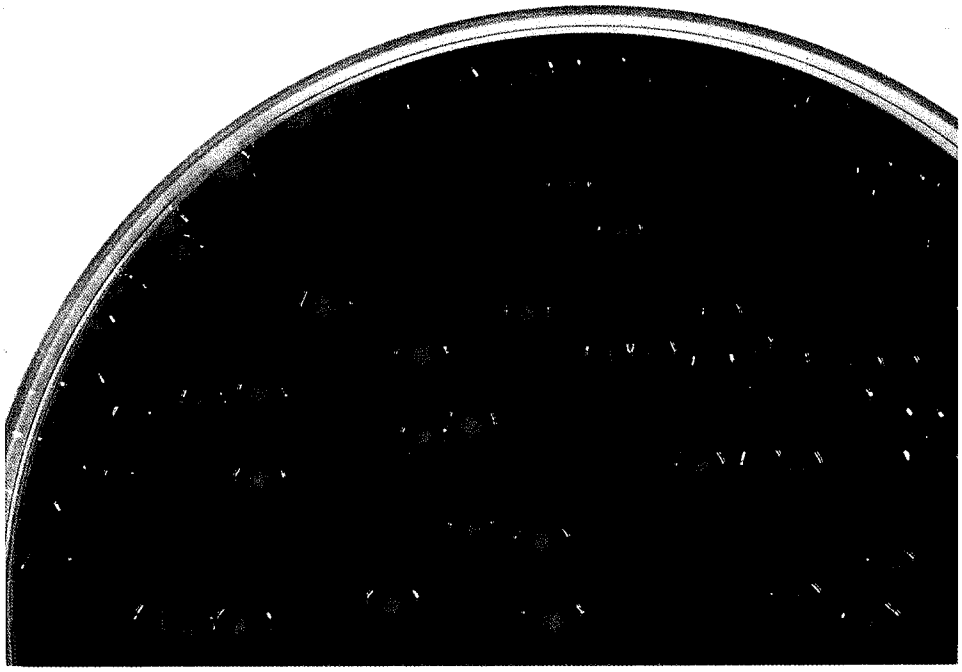


図4．*Legionella pneumophila* serogroup 1の集落 （BCYE α培地，36℃，5日間培養）

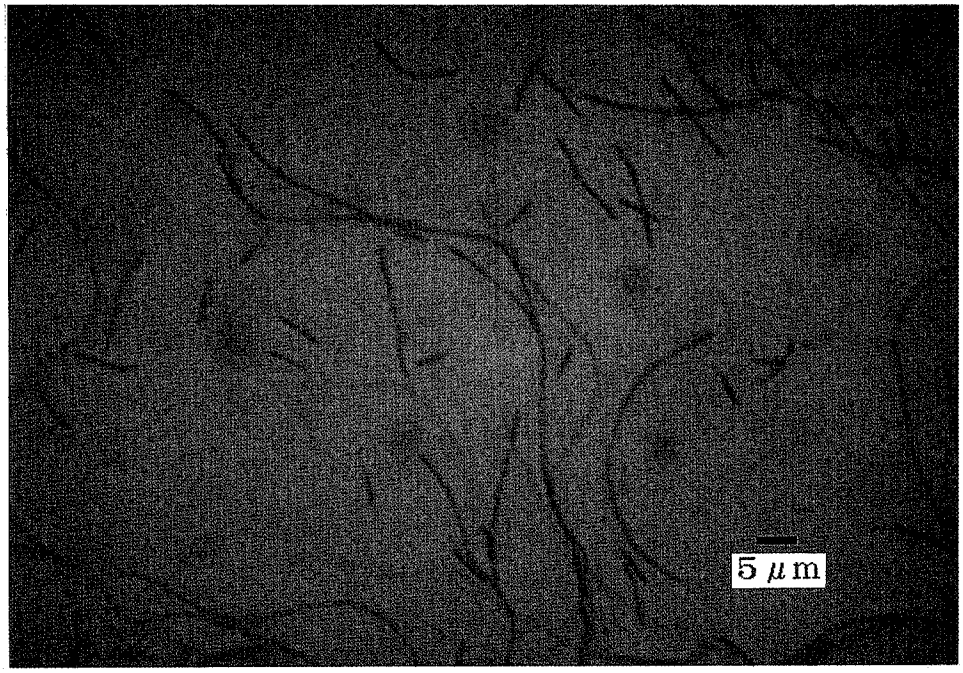


図5．*Legionella pneumophila* serogroup 1のグラム染色所見 （BCYE α培地，36℃，5日間培養）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 197-202, 1990

室内環境におけるアスベスト粉塵の実態について（Ⅱ）
電子顕微鏡による検索

関　比呂伸*，佐藤泰仁*，加納堯子*，福森信隆**，斎藤　勝***

Survey on the Concentration of Asbestos Fibers in Environment (II)
the Examination by Electron Microscopy

Hironobu Seki*, Yasuhito Sato*, Takako Kanoh*,
Nobutaka Fukumori** and Masaru Saito***

Keywords：アスベスト asbestos，電子顕微鏡 electron microscopy，室内汚染 indoor pollution，繊維長さ fiber length

はじめに

東京都衛生局生活環境部の事業の一環として，アスベスト等が吹き付けられている20施設を対象にアスベスト繊維による汚染の実態を調査し，前報(東京衛研年報39号[1])では主に光学顕微鏡観察による結果を報告した．今回は電子顕微鏡観察による結果を報告すると共に光学顕微鏡と電子顕微鏡測定値について本調査結果から考察を試みたので報告する．

方法・材料

調査期間は昭和62年9月18日～11月24日，観察に使用した電子顕微鏡は透過型電子顕微鏡(H－7000型：日立製作所)，採塵方法及び分析方法は環境庁『アスベスト排出抑制マニュアル』に準じて行った．なお詳細については前報に記載のため省略した．

電子顕微鏡計測方法：観察は，加速電圧75kvでエネルギー分散型X線分析装置(Kevex-7500型)の付属した透過型顕微鏡を用いて行なった．

最初に，2千倍の倍率でグリッド全網目内の長さ5 μm以上の繊維状形態物を探索し，計数後，元素分析を行なった．次に，グリッドの全網目の中からランダムに25カ所を選んで1万倍で精査し元素分析を行なうと共に，型状，特に繊維の基質構造，繊維末端の破断面を観察してアスベスト繊維の同定を行なった．

試料中のアスベスト繊維数(本／1)は次式で求めた．

$$F(\text{本}/1)=(A1\times f)\div(A2\times n\times V)$$

F：吸引空気1l中に含まれるアスベスト繊維数
A1：ニュークリポアフィルターの有効口過面積 (mm^2)＝226.865
A2：グリッドの網目の面積(mm^2)＝0.01
f　：計数アスベスト繊維数
n　：観察網目数＝25
V　：吸引空気量(1)

結果及び考察

Ⅰ　各施設のアスベスト繊維濃度

各施設の各測定場所におけるアスベスト繊維濃度は表1に示し，表2に測定場別アスベスト繊維濃度の幾何平均及び幾何標準偏差値をまとめて示した．

全アスベスト繊維数の幾何平均値は，事務所6.2本／1，機械室7.6本／1，外気5.3／1を示し，長さ5 μm以上のアスベスト繊維は各々0.2，0.4及び0.4本／1であった．

全アスベスト繊維及び長さ5 μm以上のアスベスト繊維濃度の平均値は，各測定場所間に有意な差は認められなかった．また，空調機械室における測定値の中には，事務室や外気と比較し非常に高い値を示したのもあり，その値は4倍から10倍も高かった．

電子顕微鏡観察による大気中アスベスト繊維の濃度について塩田等[2]は，札幌市の平均値は9.9本／1，最大値

*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, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjukuku, Tokyo 169, Japan
**東京都立衛生研究所毒性部病理研究科
***東京都衛生局食品環境指導センター建築物衛生課

表1．各施設，各測定場所におけるアスベスト繊維濃度(本／1)

	用途	全アスベスト繊維 事務室等	空調機械室	外気	長さ5 μm以上のアスベスト繊維 事務室	空調機械室	外気
1	事務所	7.5	2.3	16.2	0.07	0.18	1.65
2	事務所	9.0	3.3	8.4	N.D.	0.44	0.30
3	事務所	5.7	8.1	8.1	0.11	1.60	1.25
4	事務所	6.7	7.8	7.8	0.12	0.24	0.15
5	事務所	17.3	16.1	5.3	0.13	1.55	0.75
6	事務所	25.1	278.3	7.6	0.73	0.12	1.08
7	事務所	0.6	0.6	0.6	…*	…*	…*
8	事務所	22.6	9.2	2.0	2.04	0.37	0.48
9	事務所	27.0	16.4	3.7	1.12	1.33	0.77
10	事務所	4.9	0.7	5.6	0.35	0.25	N.D.
11	興行場	7.5	4.1	…**	0.10	0.29	…**
12	集会場	43.9	2.8	3.6	0.20	0.09	0.19
13	興行場	9.5	3.1	5.1	1.93	0.21	0.32
14	店舗	4.4	9.1	1.1	0.17	2.10	N.D.
15	店舗	0.5	76.8	3.3	0.09	8.75	0.42
16	学校	5.2	6.0	27.8	0.26	0.12	1.05
17	学校	9.4	27.2	11.1	0.59	0.35	0.76
18	学校	3.6		20.3	N.D.		1.40
		1.1			0.18		
19	旅館	1.8	23.1	7.1	0.13	0.09	0.28
20	遊技場	9.8	3.8	2.3	N.D.	0.24	0.74

N.D.：検出値以下
＊：測定せず，＊＊：測定不能

表2．測定場所別のアスベスト繊維濃度(本／1)

測定場所	全アスベスト繊維 例数	幾何平均±幾何標準偏差	長さ5 μm以上のアスベスト繊維 例数	幾何平均±幾何標準偏差
事務室等	21	6.2±3.3 (0.6～43.9)	20	0.2±4.7 (N.D.～2.04)
空調機室	19	7.6±4.4 (0.6～278.3)	18	0.4±3.5 (0.12～8.75)
外気	19	5.3±2.6 (0.6～27.8)	18	0.4±5.6 (N.D.～1.65)

( )内の数字は範囲

24.9本／1と報告し，高尾等[3]は，久留米市の平均値は5.15本／1，最大値22.89本／1，また，酒井等[4]は，名古屋市の平均値は14本／1，最大値31本／1と報告している．今回の計測値は，平均値では低めに，最大値では高めの値であった．

用途別に区分したビル室内及び外気のアスベスト濃度を表3に示した．サンプル数が少なく単純に比較する事は難しいが，全アスベスト繊維及び長さ5 μm以上のアスベスト繊維濃度は，店舗，学校の空調機械室及び学校付近の外気が非常に高い値を示した．

表3．用途別ビルのアスベスト繊維濃度(本／1)

	例数	全アスベスト繊維 事務室等	空調機械室	外 気	長さ5 μm以上のアスベスト繊維 事務室等	空調機械室	外 気
事務所	10	8.5	6.5	4.9	0.21	0.45	0.40
興行場等	3	8.9	3.6	3.4	0.12	0.24	0.49
店 舗	2	1.5	26.4	1.9	0.12	4.29	0.06
学 校	3	3.7	12.8	18.4	0.13	0.20	1.04
旅館等	2	8.9	8.0	5.1	0.16	0.09	0.23

数字は幾何平均値

表4．空調機械室の吹き付けアスベスト材劣化の程度とアスベスト繊維濃度（本／1）

劣化度	状 態	例数	濃度
A	全体的に表面が荒れ剥離形跡有り	3	1.9
B	部分的に表面が荒れ剥離形跡有り	8	6.8
C	表面が安定し劣化も進んでいない	9	13.4

濃度は幾何平均値

空調機械室の吹き付けアスベスト材の劣化(損傷)の程度とアスベスト繊維濃度との関係を表4に示した．例数は少ないが，平均値だけでみるならば，劣化の進行程度と室内から検出されたアスベスト繊維濃度とは逆の関係にあり，劣化の少ないほどアスベスト繊維が多く検出された．この結果は前報[1]の光学顕微鏡による観察結果とは異なった．酒井等[4]，やはり例数は少ないが損傷度と室内石綿濃度との間に一定の傾向はみられないと報告している．

更に，酒井等[4]によれば，アスベスト吹き付け室内におけるアスベスト繊維の検出率は100%，検査対照の室内では，92%，外気が92%であり．これら3者のアスベスト繊維濃度間に有意な差はみられなかったとしている．今回の調査では，全測定場所からアスベスト繊維が検出された，しかし，測定場所間のアスベスト濃度に大きな違いは認められなかったことからアスベスト吹き付けによる影響は少ないものと思われた．

測定場所別にアスベスト(クリソタイル)繊維サイズ(長さ)及び各繊維サイズの出現頻度を表5に示した．検出されたアスベスト繊維は2 μm以下が多く，事務室等試料の86.1%，空調機械室試料の80%，外気試料の67.3%が2 μm以下のアスベスト繊維で占められていた．5 μm未満の繊維では，各施設の95.8%(事務室等)，96.7%(空調機械室)及び93.6%(外気)は全繊維数の大部分を5 μm未満の繊維で占められていた．

一般大気中アスベスト繊維の数とサイズについては，塩田等[2]，高尾等[3]，酒井等[4]，環境庁[5]が，アスベスト吹き付け室内では，酒井等[4]，森等[6]が，また，Burdett等[7]，Chadwick等[8]が同様の結果を示している．

検出されたアスベスト繊維の種類及び数を測定場所別に表6に示した．現在，我国で最も多く使用されているアスベスト繊維はクリソタイルであるので，空気中から検出されたアスベスト繊維はクリソタイルが大部分(90%以上)を占めていた．クリソタイル以外のアスベスト繊維は，多くはクロシドライトとアモサイトであった．測定場所別では，事務室等よりも空調機械室や外気のほうに多く存在していた．

表7には，総繊維数に占めるアスベスト繊維の含有率を測定場所別に区分して示した．また，その出現頻度を表8に示した．アスベスト繊維の含有率は，平均値で27.4%と低く，約7割は非アスベスト繊維であることが判明した．測定場所別では，空調機械室のアスベスト含有率が高いが，それでもアスベスト繊維数は総繊維数のわずか4割であった．更に表8から，アスベスト繊維含有率が4割未満の試料は全体の8割を占めていたことから，総繊維中のアスベスト繊維の含有率は低いものと考えられた．

木村[9]は一般大気環境の繊維状物質を光顕で観察する場合，繊維物質の50～90%がアスベスト繊維と判定されてしまう．これは，アスベスト繊維と非アスベスト繊維

表5．各測定場所におけるアスベスト繊維サイズとその濃度(本／1)及び出現頻度(%)

繊維サイズ	事務室等	空調機械室	外気
0.2～0.5	1.44±1.12 (16) 14.2	2.09± 4.30 ((6) 8.4	0.74±2.08 (5) 11.9
0.5 ～1.0	4.57±6.21 (16) 45.0	7.70±20.40 (15) 31.1	1.84±2.51 (10) 29.5
1 ～2	2.73±3.26 (15) 26.9	1040±31.79 (16) 40.5	1.61±1.79 (21) 25.9
2 ～5	0.98±1.44 (8) 9.7	4.14±8.81 (14) 16.7	1.64±2.36 (13) 26.3
5 ～10	0.32±0.59 (7) 3.1	0.55±1.14 (6) 2.2	0.33±0.66 (5) 5.3
10 ～	0.11±0.27 (3) 1.1	0.28±0.53 (5) 1.1	0.07±0.19 (2) 1.1

繊維サイズは μm で示す
繊維濃度は平均値±標準偏差で示す
( )内の数字は例数

表6．測定場所別におけるアスベストの種類と繊維数(本／1)

種類	事務室等 (20カ所)	空調機械室(18カ所)	外気(18カ所)
総アスベスト	(20,100)6.22±3.28	(18,100)7.55±4.39	(18,100)5.30±2.59
クリソタイル	(18, 90)7.04±3.11	(18,100)5.99±4.51	(17, 94)3.74±3.23
クロシドライト	(5, 25)1.91±2.40	(8, 44)2.30±2.95	(11, 61)1.66±1.85
アモサイト	(4, 20)1.12±2.89	(5, 28)1.01±1.95	(2, 11)1.06, 0.59
その他	(4, 20)0.92±2.42	(5, 28)1.34±2.48	(7, 39)1.15±2.10

( )内数字は検出カ所と検出率%
数字は幾何平均±幾何標準偏差

表7．長さ5 μm 以上の総繊維に占めるアスベスト繊維の含有率(%)

測定場所	例数	平均 ± 標準偏差
事務室等	4	14.2± 5.7* (9.1～20.2)
空調機室	6	38.5±33.0* (13.3～94.0)
外気	10	26.1±20.4 (0～68.4)
全体	20	27.4±23.8 (0～94.0)

( )内の数字は範囲
*：$p<0.05$

表8．長さ5 μm 以上のアスベスト繊維と総繊維との比(%)の出現頻度

比の範囲	頻度	%
0	2	10
1～ 20	8	40
21～ 40	6	30
41～ 60	1	5
60～ 80	2	10
81～100	1	5
	20	100

の識別に用いられる光の屈折率1.5付近の物質という判断基準ではアスベスト繊維を識別することは難しいからであると述べている．みなみに，アスベスト繊維の屈折率は，1.53～1.70であり，それに対してグラスファイバーでは1.47～1.55，ロックウールは1.62，ミネラルウールは1.53で，アスベスト以外の繊維状物質も非常に近似的な屈折率である．

Ⅱ 光学顕微鏡と電子顕微鏡観察による測定値の比較

1．長さ5 μm 以上のアスベスト繊維を対象にした場合

表9及び10には，電子顕微鏡(電顕)と光学顕微鏡(光顕)による測定値間の関係を検討するため，長さ5 μm 以上のアスベスト繊維のみを対象にして測定した両測定値の比(濃度比)，更に，その出現頻度を測定場所別に区分して示した．両測定値に差がなければ1を示す．

全試料の平均濃度比では，一見，両者の測定値の差は少なく(0.98)一致率は良好のように見えるが，バラツキ

は大きく，測定値比は0.03から4.57の範囲にあった．測定場所毎に測定比をみると，外気試料の場合は，事務室及び空調機械室の試料に比べバラツキが大きく，電顕の測定値は光顕のそれよりも高い値を示し，両測定値間の一致率は低かった．

表10から光顕測定値のほうが電顕のそれよりも高い値を示し，両測定比が１～100％に分布していた試料は，事務所試料には76.5％，空調機械室試料には88.2％及び外気試料に37.5％に含まれていた．すなわち，事務室及び空調機械室の測定値比もバラツキは大きかった．この結果から，長さ５μm以上のアスベスト繊維のみを対象にした場合の光顕と電顕測定値間には，一貫した関係は認められないと考察した．

ちなみに，光顕と電顕の両測定方法による測定濃度間の相関係数を表１１に示した．検出された大小アスベスト繊維を計測した全アスベスト繊維数間では，両方法間に相関は認められたが($r=0.417$, $p<0.01$)，長さ５μm以上のアスベスト繊維を対象にした場合には相関は認められなかった．

そこで，両方法の測定値の関係を更に検討するために次の方法を試みた．

２．長さ５μm以上の繊維(非アスベスト繊維を含める)を対象とした場合

全試料の中から無作為に20試料を選び，長さ５μm以上のアスベスト繊維及び同長の非アスベスト繊維を含めた総繊維について両方法で測定し測定値間の相関をみた．その結果，長さ５μm以上のアスベスト繊維についてのみ，両測定値間に相関が認められ($r=0.575$, $p<0.01$)１．の結果とは反対の結果が得られた．

この方法を用いて，両方法の測定値の関係について検討を試みた報告が３つある．高尾等[3]は，長さ５μm以上のアスベスト繊維のみを対象にした場合は両測定値間に相関は認められず($r=0.165$)，総繊維数の間には有意な相関($r=0.576$, $P<0.01$)が認められた報告している．同じく塩田等[2]及び酒井等[4]も，長さ５μm以上のアスベスト繊維を対象とした場合には有意な相関関係は認められなかったと報告している($r=0.181$及び0.201)．更に，酒井等[4]は両方法の測定値間に相関が認められない理由として，①光顕法によるアスベスト繊維の同定には限界があること，②空気中に浮遊するアスベスト繊維の分布は不均一であること，③観察面積が少ないため試料

表９．電顕及び光顕で測定した両測定値比
（長さ５μm以上のアスベスト繊維）

測定場所	例数	平均 ± 標準偏差
事務室等	17	0.66±0.80 (0.08～2.52)
空調機室	17	0.59±0.79 (0.03～3.37)
外　気	16	1.73±1.50 (0.07～4.57)
全　体	50	0.98±1.17 (0.03～4.57)

(　)内の数字は範囲
測定値比は，”電顕で求めた数／光顕で求めた数”より計算した．

表11．光顕法と電顕法測定値間の相関係数

	全アスベスト繊維	長さ５μm以上のアスベスト繊維
事務室等	−0.006	−0.050
空調機室	0.433	0.235
外　気	−0.195	−0.236
全　体	0.417**	0.219

**：$p<0.01$

表10．電顕及び光顕測定値比の分布(長さ５μm以上のアスベスト繊維)

比の範囲	頻度	%	事務室等	空調機室	外　気
0.01～0.5	24	46	(11) 64.7	(9) 52.9	(4) 25.0
0.51～1.0	10	20	(2) 11.8	(6) 35.3	(2) 12.5
1.01～2.0	9	18	(3) 17.6	(1) 5.9	(5) 31.2
2.01～3.0	2	6	(1) 5.9		(1) 6.3
3.01～4.0	3	6		(1) 5.9	(2) 12.5
4.01～	2	4			(2) 12.5
	50	100	(17) 100	(17) 100	(16) 100

測定値はその代表性を有していないこと(ただしフィルターでの繊維分布が不均一な場合)を取り上げている．いずれの理由の可能性もあるが，今回の調査結果のように，長さ5 μm以上のアスベスト繊維を対象にして観察例数を50から20に減少した場合に相関関係が認められた等，両測定値への偶然誤差の影響は大きいものと思われた．

一方，Hwang 等[10]，測定方法を光顕法と電顕法に区分し，更に電顕観察を直接法と間接法にわけて3者による測定値の比較している．すなわち，クリソタイル鉱山，精練所，紡績工場及び造船所の粉塵を試料にして長さ5 μm以上のアスベスト繊維を対象にして検討した結果，電顕の間接法と光顕との測定値間では相関は認められないが，電顕の直接法との間には高い相関が認められたと報告している．間接法は，観測試料の作成工程で超音波を使用し，光顕では一本に見えるアスベスト繊維の束を単線維に解離して数を増すことから，光顕による測定値とは一致しない．従って，両測定値間の一貫した関係は求めにくいものと考える．

光顕と電顕観察による測定値を比較する場合には，対象物，資料作成工程等，可能な限り同じ条件下において検討することが望ましい．光顕によるアスベスト繊維の計測は，Aspect比(繊維長と径の割合)3：1以上で長さ5 μm以上の繊維を対象としている．

そこで，対象物を長さ5 μm以上の繊維として両方法による測定値間の関係を検討したが，観察試料の作成工程も異なり，飛散アスベスト繊維が少ない一般環境での測定には当然，数のバラツキが付随するから，両測定値間の関係を求めるのは難しかった．

しかし，光顕法は操作法も簡便で短時間で処理が出来，繊維の数，及びその種類等，試料繊維の概略やその状況を得る手段としては優れた方法であると考える．共存物質の影響を受けずに，精度よく，アスベスト繊維を識別する測定法の開発が必要と考えた．

ま と め

今回，都内の20ビルを対象に空気中アスベスト繊維を電子顕微鏡を用いて計測した．

1）測定場所に区分するとアスベスト繊維濃度は，幾何平均値で事務室6.2本／1，空調機械室7.6本／1，外気5.3本／1であり，測定場所間に有意な差は認められなかった．

2）空調機械室の吹き付けアスベスト材の劣化の程度とアスベスト繊維濃度との間に正の関係は認められなかった．

3）検出されたクリソタイル繊維サイズ(長さ)は，大部分が5 μm未満の短い繊維であった．

4）検出されたアスベスト繊維の種類は，90％以上がクリソタイルでクリソタイル以外のアスベストはクロシドライト，アモサイト等が観察された．

5）長さ5 μm以上のアスベスト繊維と非アスベスト繊維を含めた総繊維数の計測結果では，検出された約7割位が非アスベスト繊維でアスベスト繊維の含有率は低かった．

6）電顕法と光顕法による測定値を比較した．①測定場所による両測定値間に相関は無いが，全試料のアスベスト繊維総数の間には有意な相関(r＝0.417)が得られた．②長さが5 μm以上のアスベスト繊維を対象にした両測定値間には有意な相関は認められなかった．③今回の調査においても光顕法と電顕法による測定間に一貫した関係は認められなかった．

謝辞：今回の調査で電子顕微鏡の測定について御指導，御助言をいただいた当所生活科学部，荻野周三氏に感謝の意を表します．

(本調査は昭和62年度東京都アスベスト問題プロジェクトの一部として実施し，概要の一部は日本公衆衛生学会第47回大会1988年9月で発表した．)

文 献

1）佐藤泰仁，関比呂伸，福森信隆　ほか：東京衛研年報，39，212-224，1988.

2）塩田恒雄，横田秀幸，鈴木寿一　ほか：札幌市衛研年報，14号，101-113，1988.

3）高尾真一，田上四郎，桜井利彦：大気汚染学会誌，24，212-226，1989

4）酒井潔，久永直見，三谷一憲　ほか：日本公衛誌，37，109-117，1990.

5）環境庁大気保全局大気規制課：アスベスト排出抑制マニュアル，137-145，昭和60年，ぎょうせい，東京.

6）森義明，宮崎竹二，薬科宗博ほか：第29回大気汚染学会講演要旨集，271，1988.

7）Burdett, G. J. and Jaffrey. S. A. M. T.：*Ann. Occup. Hyg.*, 30, 185-199, 1986.

8）Chadwick, D. A., Buchan, R. M. and Beaulieu, H. J.：*Environ. Res.*, 36, 1-13, 1985.

9）木村菊二：空気清浄，24，14-21，1987

10）Hwang. C.–Y. and wang, Z. M.：*Arch. Environ. Health*, 38, 5-10, 1983.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 203-208, 1990

高層住宅床面のダニ相およびヒョウヒダニ数とヒョウヒダニアレルゲン量の相関

吉川　翠*

Invenstigation of Mite Fauna and Correlation of Mite Numbers and Amounts of Mite Allergens in Floor Dust of Houses

MIDORI YOSHIKAWA*

Keywords：チリダニ科 Pyroglyphidae, ヒョウヒダニ属 *Dermatophagoides*, ヒヨウヒダニアレルゲン mite allergens

諸　言

住宅内のダニ相やダニ数は，住宅の種類，建築年数，住宅周辺の環境，部屋の使用目的，床材，調査時期などによって異なるし，また，生活の仕方によっても異なる[1)-7)]．同一住宅内で異なった床材におけるダニ調査報告はいくつかあるが，ヒョウヒダニアレルゲン量に関する報告は少ない[8)-10)]．

チリダニ科ヒョウヒダニ属は，1964年にアレルギー性喘息の原因虫になると報告されて以来，アレルギー疾患を起因するものの重要原因とされている[11)-15)]．住宅内におけるヒョウヒダニ属の分布を1㎡当りのダニ数で，畳，絨毯，板(間)で比べると，絨毯＞畳＞板間の順で多いとの報告がある[4),8-10)]．ヒョウヒダニアレルゲンが同様な結果になりうるのかは報告が少なく結論が出しにくい．さらに，同一場所でヒョウヒダニ数とヒョウヒダニアレルゲン量を調査し，その相関を調べた報告はない．そこで，我々は25階建超高層住宅内の，同じような間取りの住宅19世帯で畳と板間のダニ類を調べダニアレルゲン量を定量し，その相関を検討した．

この研究は，①畳や板間(一部絨毯敷きを含む)におけるダニ相とダニ数はどのぐらい異なるのか，既報告と一致するかについて調べ，②畳と板間でのチリダニ科ヒョウヒダニ数とヒョウヒダニアレルゲン量を定量し相関を調べ，床材とヒョウヒダニアレルゲンとの定量を明らかにすることを目的とした．

実験方法

1　ダニ相とダニ数調査

調査は1989年1月中旬～下旬に，板橋区内のH団地19世帯で行った．H団地は，築後，1年9ケ月目の25階建の超高層住宅である．1～25階までのうちでダニ調査を希望した世帯の中から，各階1～3世帯ずつを無作為に選び，19世帯とした．

各世帯とも間取りはほとんど同じで，床面積が64～68㎡あり，畳部屋(6畳)，板敷き洋室2室と，板敷きダイニングルーム(板間)である．戸外に面した部屋の方角は，東西東北のいずれも含まれている．

調査対象の部屋は畳部屋と板間である．畳部屋で畳の上に絨毯を敷いている場合は，絨毯の下の畳面を調査対象とし，また，板間の上に絨毯を敷いている場合には，絨毯をテープで固定している場合を考慮にいれて，絨毯面を調査対象とした．従って，ダニ調査の対象となった床材は，畳，板間，絨毯の3種類である．

畳の調査には，部屋の，使用頻度の高い部分1㎡をビニールテープで囲み，掃除機の吸引口に小さな和紙袋を付けて，3分間かけて畳表面の塵を集めた．塵からダニを分離した．板間でも畳部屋と同様に，使用頻度の高い部分1㎡をテープで囲み，3分間かけて掃除機で塵を集めた．塵からのダニ分離法も同様である．

掃除機で集めた塵は，16メッシュと200メッシュの2連の篩で振盪後，200メッシュ上の細塵を取り，1ℓビーカーに入れ，飽和食塩水と中性洗剤一滴加えてよく撹拌した．この懸濁液を遠心分離し，上澄液をろ紙上にろ過した．ろ紙上のダニは顕微鏡下で同定し計数した．チリダニ科のみ属まで同定し，他は科までとした．

2　ヒョウヒダニアレルゲン量の定量法

塵中のダニアレルゲン量を調べた．ダニ相調査のため

*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 Reseach Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

の1㎡と隣り合わせの1㎡をビニールテープで囲み，3分間かけて塵を集めた．100mgを越えた重量の塵は100mgを無作為に取り，100mg以下の塵は全量に，リン酸緩衝生理食塩水を，20mgの塵に対して2mlの割合で加え(塵量が極めて少ない場合には塵量2mgに対し2mlを加えて後で換算した)，遠心分離をした．上澄液を約10000倍に希釈し(後述の標準曲線にあうように希釈した)，希釈液から200 μlををを取り，ウサギの特異抗体を結合させたガラスロッドを一個入れてよく撹拌した．撹拌後はよく洗滌し，ロッドに付着したもの以外をすべて洗い流した．ウサギの特異抗体液を加え，ロッドに付着したもの以外は洗い落すために，よく洗滌した．すなわち，この工程で，抗原を抗体でサンドウィッチにしたことになる．さらに，プロテインA(^{125}I)を100 μl加えてよく撹拌した後，余分なものを洗い出した．そして，ロッド上のプロテインAの放射能をガンマーカウンターで計数した．

標準曲線を作成するために，ヒョウヒダニ抗原10pg～2 μgを1mlのリン酸緩衝生理食塩水と撹拌し，上述の方法でロッドに付着させて，プロテインAの放射能数を計数した．この数値から，上記の塵中ヒョウヒダニ抗原量を換算した．

ヒョウヒダニアレルゲン定量は，ダニの糞由来のもの(Der Ⅰ)と虫体由来のもの(Der Ⅱ)に分けて調べた．

結　　果

1　ダニ相とダニ数調査

19世帯から採取されたダニは13科に属し，合計2303匹であった．

畳部屋では1㎡当りのダニ数は1～183匹で，100匹を越えたのは3世帯のみであった．この3世帯は，勤務のためほぼ毎日部屋を閉め切っていた家(南向き，11A)，モデルルームとして使用されているため部屋を締め切ることが多かった家(東南向き，25A)，小さな子供がいるため閉めきり暖房をし続けていた家(西向き，23B)である．

25階を階数別に3グループに分けて(1～5階，11～15階，21～25階)ダニ数を比較すると，幾何平均値で9.9匹，22.8匹，40.2匹となった．ダニ数を対数値にして平均値の差の検定をすると，1～5階と21～25階のダニ数に差がみられ，21～25階のダニ数が1～5階に較べて有意に多かった．

畳から採取されたダニ類は少なくとも10科であり，構成比率が高いのは，イエササラダニ科30.8%，チリダニ科30.3%，ホコリダニ科28.4%，ツメダニ科6.2%の順であった(表1)．チリダニ科のダニはすべてヒョウヒダニであった．

板間で絨毯の上から塵を取ったのは11A，14A，23Aで，23Bではホットカーペット隣接の板間を調べ，25Bでは絨毯の下の塵を集めた(表2)．板間と絨毯から採取されたダニ数は合計1478匹で，板間1㎡当り1～7匹，絨毯の上，下，隣接面では84～568匹であり，板間のみと絨毯が使用されている場合とではダニ数に差が見られた．板間と絨毯のダニ数を畳同様に階数別に3つのグループに分けて(1～5，11～25，21～25階)，幾何平均値で比べると，それぞれ2.0，3.3，2.6匹となり差はみられなかった．

ダニ相ではチリダニ科が多く93.8%を，次にホコリダニ科4.0%であり，それ以外のダニ類は1%以下の構成比率であった．

ダニ数が多かった絨毯敷きの3世帯と，絨毯の下1世帯，絨毯隣接板面1世帯の家の方角は南向き(11A)，北向き(14A)，西(23A)，北(23B)，西(25B)であり，一定の方角に位置した家に数が多いとはいえなかった．

2　ヒョウヒダニ数とヒョウヒダニアレルゲン量の相関

ヒョウヒダニアレルゲン量は，糞由来のDer Ⅰを用いて相関を調べた．その理由は，Der Ⅰは，Der Ⅱに比べて，①アレルゲン活性が高く，②飼育中のヒョウヒダニではDer Ⅰの構成比率が高いと報告されていること，③糞は虫体よりも微少なので人の気管に入りやすいこと，などである．

畳1㎡から採取した塵中のヒョウヒダニアレルゲン量は1.61～624ngの範囲で，幾何平均値では23.50ngとなった．(表3)．板間1㎡では0.05～20.1ngの範囲で，幾何平均値にして2.05ngとなった．一方，絨毯の上，下，隣接の板面では，229～15,800ngの範囲で，幾何平均値では2,775.88ngである(表3)．

畳部屋のヒョウヒダニ数とヒョウヒダニアレルゲン量を対数値にして相関をみると，相関係数は0.62となり，板間での相関係数は0.38であった．絨毯を使用していた5世帯でのヒョウヒダニ数とヒョウヒダニアレルゲン量では0.76と高くなった．

考　　察

住宅内に生息するダニの繁殖条件は，①高温多湿であること，②餌があること，③潜れる場所があること，の3つが揃うことである[5-6),10)]．これら繁殖条件のうち，湿度が一番大きな影響を与えると考えられる[2-3),6-7),10),17)]．従って，各家の生活の仕方を同一にして調査をすると，階数別では湿度が高くなる1，2階では数が多く，3階以上はダニ数が少なくなる傾向を示し，南北部屋で

表1．畳部屋1㎡当りのダニ相，ダニ数

調査家屋No / ダニ(科名)		2A	2B	4A	5A	5B	6A	11A	12A	14A	14B	14C	21A	21B	22A	23A	23B	24A	25A	25B	合計	構成比(%)
トゲタニ																	3				3	0.4
ホコリダニ		2	1	1	1	6	1	4		7	1	1	1	13	3	42	55	20	54	21	234	28.4
ツメダニ			8			1		13		3		3		1	1		18	1	1	1	51	6.2
ヒメハダニ															1						1	0.1
コナダニ		1	2									1	1	1		9	11		2		28	3.4
マルニクダニ																	1				1	0.1
チリダニ		3	3		6	28	4	18	1	19	7	8	5	12	31	2	27	14	47	15	250	30.3
イエザサラダニ			17	1				148			64	3					2		19		254	30.8
カザリヒワダニ																			2		2	0.2
ササラダニ			1																		1	0.1
ダニ合計		6	32	2	7	35	5	183	1	29	72	16	7	27	36	53	117	35	125	37	825	100
備考	塵量(mg)	14.9	25.4	12.9	30.8	85.5	11.7	75.2	13.6	48.5	26.5	144.8	14.6	131.0	158.6	146.1	107.1	67.1	143.2	24.7		
	畳部屋の方角	南	西	南西	東南	西	東南	南	西	東	東南	南	東	南西	南西	南西	西	西	東南	南西		
	その他	共働き						日中不在								畳の上に絨毯	畳の上に絨毯子供小さい		モデルルーム			

注)　1）調査家屋Noの数字は家屋がある階数を示す

表2．板間（絨毯を含む）1㎡当りのダニ相とダニ数

調査家屋No / ダニ(科名)		2A	2B	4A	5A	5B	6A	11A	12A	14A	14B	14C	21A	21B	22A	23A	23B	24A	25A	25B	合計	構成比(%)
ホコリダニ								2	1	15					1	2				38	59	4.0
ツメダニ								2		1		1					3			3	10	0.7
ハリクチダニ													1								1	0.1
ハダニ				1																	1	0.1
コナダニ				1				4		3										6	14	0.9
チリダニ		1	1		2	8	4	186	2	549	3	2	3	1	3	205	81	7	1	328	1387	93.8
イエザサラダニ								3			1					1				1	6	0.4
ダニ合計		1	1	2	2	8	4	197	3	568	4	3	4	1	4	208	84	7	1	376	1478	100
備考	塵量(mg)	2.5	3.1	12.6	16.7	54.2	19.6	143.8	80.5	403.5	13.2	40.6	11.7	32.9	37.6	612.2	816.8	20.7	6.3	624.6		
	板間の方角	南	北	西	南	北	南	南	北	北	南	南	北	西	西	西	北	西	南	西		
	その他	共働き						絨毯 日中不在		絨毯						絨毯	絨毯 子供小さい		モデルルーム	絨毯		

注)　1）調査家屋Noの数字は家屋がある階数を示す

表3．畳，板間（絨毯含む）1㎡中のヒョウヒダニアレルゲン量

ダニアレルゲン量と塵量 / 調査家屋No	畳			板間(絨毯*)		
	塵量(mg)	Der Ⅰ(ng/㎡塵)	Der Ⅱ(ng/㎡塵)	塵量(mg)	Der Ⅰ(ng/㎡塵)	Der Ⅱ(ng/㎡塵)
2 A	4.5	4.42	9.30	8.6	1.91	1.92
2 B	12.9	1.61	5.39	1.7	0.440	0.119
4 A	10.9	3.05	1.55	4.0	0.050	0.043
5 A	24.7	14.9	12.9	18.9	1.44	0.762
5 B	28.7	45.9	31.4	37.8	5.81	5.17
6 A	41.1	76.9	61.8	18.3	2.60	3.86
11 A	38.6	24.3	11.2	(177.2*)	(3.630)	(885)
12 A	8.3	1.96	0.636	112.2	1.59	0.730
14 A	61.7	81.5	122	(357.9*)	(3,410)	(3,630)
14 B	28.5	19.0	9.43	4.2	0.213	0.112
14 C	92.2	19.5	25.7	36.2	14.2	13.5
21 A	18.9	4.65	10.9	41.4	2.98	2.95
21 B	98.8	94.5	35.5	51.2	5.29	2.78
22 A	140.2	238	90.8	67.0	20.1	12.9
23 A	119.4	52.6	18.9	(527.7*)	(3,680)	(2,330)
23 B	89.1	624	285	(436.8*)	(229)	(148)
24 A	44.5	25.5	27.0	18.8	18.6	1.36
25 A	60.3	100	29.4	13.3	0.876	0.452
25 B	11.9	7.83	16.7	(1,249*)	(15,800)	(4,660)

注) 1）*は板間で絨毯を使用していた世帯
2）Der Ⅰ，Der Ⅱとはヒョウヒダニアレルゲンで糞由来のものと，虫体由来のもの
3）調査家屋Noの数字は，家屋のある階数を示す

は，北側部屋の室内温度は南部屋よりも高く，畳の含水量は北側部屋で高く，ダニ数も多くなる傾向を示す[10),16)].

しかし，生活様式も含めた今回の調査結果では，ダニ数を階数別に3つのグループに分けて比べると，板間では差がみられなかったが，畳部屋では1～5階よりも21～25階の方でダニ数が有意に多く，上述のこれまでの報告とは逆の結果となった．さらに，北側に位置した家のダニ数が，南に面した家に比べて特に多いともいえなかった(表1，2)．この理由として，生活の仕方による影響があったと思われた．生活様式のどのような事項がダニ相，ダニ数に影響をするのかに関して，畳，板間，絨毯使用別に検討し，その後でヒョウヒダニアレルゲン量の多少ならびにヒョウヒダニ数との相関に関して考察する．

生活の仕方の中でダニ相，ダニ数に影響を与えたと思われたのは，室内温湿度(繁殖条件①)と，掃除頻度(同②)であろう．潜れる場所(同③)は，同一床材を調査しているので，今回の比較からは除外できる．

畳表面1 m²当りのダニ数は，一般に，50～300匹の範囲が多い[9-10),16-17)]．冬期は畳表面の湿度が低いためにダニは畳内部に潜りこみ，表面のダニ数が50匹前後になることもある．19世帯の畳部屋での平均ダニ数は43.4匹であり，ダニ数は冬期としては一般的な数値と考えられた．ダニ数が多かった，11A，23B，25Aの家では部屋の閉めきり時間が長く，その結果として室内湿度が高くなったと思われた．室内を締め切ると，戸外より湿度が5－20％R. H高くなるからだ[18)]．さらに，一見して清掃状態があまり良好とは思われなった4世帯の中に11A，と23Bの2世帯とモデルルームの25Aの1世帯が含まれており，畳部屋のダニ数が多かった3世帯は，清掃頻度が少ないことにも影響されたと考えられた．また1～5階に比べて21～25階り畳部屋のダニ数が多かったのも，超高層住宅ゆえに室内の閉め切り時間が低層よりも長かったのではないかと思われた．

室内がある程度高湿度に保たれ，その影響を畳が受けたであろうことは，ダニ相からもいえる．ダニ相では，イエササラダニが30.8％でチリダニ30.3％よりも高く，この傾向はコンクリート水分量の多い築後3年未満(一部では5年未満)の家のダニ相にみられるものである[5),10)]．イエササラダニやホコリダニはカビを摂食するので，これらのダニが50％以上の構成比率を占めた家では，畳にカビがはえていた可能性がある．

板間1 m²のダニ数は，一般では10～50匹の範囲である[8-10)]．板間でも，今回の調査対象のH団地のように溝のない板間でのダニ数は少ない．この理由として，繁殖条件③の潜れる場所がないからである．ダニが床材表面にいると，清掃などの際に人に除去されてしまうからだ．一方，板間で絨毯を使用していた5世帯では，いずれもダニが多かった(表2)．絨毯表面のダニを調べた3世帯では繁殖条件が揃っているのでダニ数が多くなったと考えられるが，ホットカーペット隣接の板面を調査した23Bや絨毯下の板間を調査した25Bでも板間よりダニ数が多くなったのは，絨毯からダニが這い出したり，くつ下やスリッパに付着して絨毯から板面に移動したのが検出されたからであろう．絨毯使用の5世帯のダニ数が，絨毯同様の繁殖条件①～③のある畳よりも多い傾向を示したのは，ダニ採取が掃除機を用いて行われたため，掃除機の吸引力のとどきやすい床材との異なりによるものと考えられる．床材のダニ数が絨毯＞畳＞板となりこの点では既報告と同じであった．

ヒョウヒダニアレルゲン量はチリダニ科ヒョウヒダニ属の生体・死骸・糞を含めたもので，ヒョウヒダニの繁殖状況と清掃状況がわかる．特に糞由来のアレルゲンであるDer Ⅰは分子量が24000とされ．虫体由来のDer Ⅱ(分子量15000)よりもアレルゲン活性が高く，ヒョウヒダニアレルゲン量としてはDer Ⅰを用いるのが望ましいとも考えられている[19)]．畳，板間，絨毯で床面のヒョウヒダニアレルゲン量Der Ⅰを比べると，繁殖条件が揃わず，清掃しやすい板間でのアレルゲン量は極めて低いが，繁殖条件が揃った畳や絨毯では高い．さらに畳と絨毯を比べると，上述のように塵採取に掃除機を用いているため掃除機の吸引力のおよぶ範囲が畳ではい草表面しかとどかず，い草の下に砂を敷いて吸引力を調べても吸引力は砂を取るまでにはいたらないとの報告もあり，また，ヒョウヒダニの糞の大きさは10－40 μmで，い草の隙間から落ち，吸引されないこともあるが，絨毯ではパイルを糊付した上部の基布にダニの死骸も糞も蓄積され，掃除機の吸引力はパイル間の空間を通して基布面まで届くこともあるから，ヒョウヒダニアレルゲン量が畳より高くなったのであろう[10),20)]．絨毯でのヒョウヒダニダニアレルゲンは布団表面と同じように高かった[10),14)]．

ヒョウヒダニ数とヒョウヒダニアレルゲン量の相関係数は，絨毯，畳，板間の順であった．絨毯と畳，板間には繁殖条件が揃っているのでダニ数もアレルゲン量も多くなるが，板間は条件が揃わず少ないのは上述のとおりである．畳と絨毯では絨毯の方がやや高い．この理由は

ヒョウヒダニアレルゲン量が絨毯の方で畳より高くなったことと同じであろう.

要　約

築後1年9ケ月目の，25階建超高層住宅で，1月中旬に19世帯の畳部屋と板間(一部絨毯使用)で，畳，板間，絨毯の床材別に調査を行った．床材別にダニ数，ダニ相を比較し，さらに，チリダニ科ヒョウヒダニ属のダニ数とヒョウヒダニアレルゲン量の相関を検討した．

その結果，畳部屋では1㎡中のダニ数が1～183匹となり，このダニ数を対数値にして，1～5階，11～15階，21～25階と3つのグループに分けて平均値の差の検定をすると，1～5階よりも21～25階でダニ数は多くなった．この理由として，冬期ゆえに部屋の閉め切り時間が超高層階(21～25階)では低層階よりも多く，その結果室内湿度が高くなったからと考えられた．

畳部屋のダニ類は，イエササラダニ30.8%，チリダニ30.3%，ホコリダニ28.4%，ツメダニ6.2%で，新築住宅のダニ層を示した．板間はダニの繁殖条件が揃っていないためにダニ数は少なく，1㎡中1～7匹であった．絨毯は1㎡中84～568匹であった．板間のダニ数を階数別に3つのグループに分けて比べたが，差はみられなかった．板間のダニ層はチリダニ93.8%，ホコリダニ科4.0%で，その他の構成比率は低かった．

ヒョウヒダニ数を床材別に比べると絨毯＞畳＞板間の順で高く，また，ヒョウヒダニアレルゲン量も絨毯＞畳＞板間の順で高かった．対数値を用いてダニ数とアレルゲン量の相関係数を調べると，絨毯0.76，畳0.64，板間0.38となった．

謝辞　ヒョウヒダニアレルゲンの定量をして下さった国立相模原病院の安技浩先生の深謝します．
(この実験の一部は厚生科学研究費によった.)

文　献

1) Vyszenki–Moher, D. L., Arlian, L, G., Bernstein, I. L. and Gallagher, J. S.：*J. Allergy clin. Immunol.* 77, 745-748, 1986
2) Lang, L. D. and Mulla, M. S.：*Environ. Entomol.*, 7, 781-783, 1978
3) Lang, L. D. and Mulla, M. S.：*Environ. Entomol.*, 6, 213-216, 1977
4) 大海久徳：ビルの環境衛生管理，10，69－76，1980
5) Yoshikawa, M., Hnaoka, K. and Yamada, Y.：Eiken nenpo, 33, 299-306, 1982
6) 吉川翠：都衛研年報，40，259-263，1989
7) 大島司郎：小児外科・内科，7，55-62，1975
8) 生協・科学センター：Sic Report, 9, 2-21, 1987
9) 一瀬直美，松田良夫：空気清浄，23(4)，9-27，1986
10) 吉川翠，芦沢達，山田雅士：ダニ・カビ・結露，28-88，1989，井上書院，東京
11) Voorhorst, H., Spieksma–Boezman, M. I. A. and Spieksma, F. Th. M.：*Allerg. Asthma*, 10(6), 329-334, 1964
12) Tovey, E. R., Chapman, M. D., Wells, C. W. and Platts–Mills, T. A. E.：*Am. Rev. Respir. Dis.*, 124, 630-635, 1981
13) Korsgaad, J.：*Am. Rev. Respir. Dis.*, 125, 80-84, 1982
14) Sakaguchi, M., Inouye, S., Yasueda, H., Irie, T., Yoshizawa, s. and Shida, T.：*Int. Arch. Allergy Appl. Immunol*, 90, 190-193, 1989
15) Yasueda, H., Hita, H., Yui, Y. and Shida, T.：*Int. Arch Allergy Appl Immunol*, 90, 182-189, 1989
16) 高岡正敏：御茶ノ水医学雑誌，34(4)，277-288，1986
17) 吉川翠，大野正彦，山口正彦，緒方一喜：日公衛誌，31，135-140，1984
18) 室内環境計画編集：室内環境計画，586-598，1974，彰国社，東京31(3)，135-140，1974
19) Tovey, E. R., Chapman, M., D. and Platts–Mills, T. A. E.：*Nature*, 289, 592-593, 1981
20) 日本消費者協会：月刊消費者，343，5-19，1989

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 209-215, 1990

死亡率の時系列データから得られるいくつかの構成要素について

牧 野 国 義*

A Study of Some Elements Deduced from Time-Serial Data on Death Rates

KUNIYOSHI MAKINO*

SUMMARY

In time–serial death rate data, it is assumed that a crude death rate is composed of some elements, such as expected death rate, excess death rate and trends, because there is a close assocfation between the death rate for a certain year and the death for the previous year. However, such elements have not been taken into account in the studies of deaths. This paper describes a method to estimate these elements from data on death rates for four causes (total deaths, malignant neoplasms, heart diseases and pneumonia–bronchitis) from 1952 to 1987 in Tokyo, and describes the statistical features of the elements.

A coefficient of death by month, one of the elements, indicated the seasonal variations in the causes of death more clearly than the original death rate. The seasonal variations were apparent for death rates from respiratory or circulatory diseases. The trends should not be calculated by using the actual death rate, but by using the expected one in order to exclude the effect of transient and abrupt increases in the death rate in certain years. One would assume that the trend of death rates for heart diseases in Japan would increase year by year in consideration of the population or nutrition ploblem during the 36–year period. THe results in this study agreed with this assumption. However, when the trend was calculated using the actual death rates, results indicated that it must have decreased in the early period. Excess death rates for the three causes (total deaths, heart diseases and pneumonia–bronchitis) occurred frequently during the early period but not in the recent period. The consistency of this method was confirmed because there was little difference among the values of the elements during the same period when the length of the study period was divided into three stages.

Keywords：期待死亡率 Expected death rate, トレンド Trend, 超過死亡率 Excess death rate, 月死亡係数 Coefficient of death by month

緒　　言

人は生まれ，やがて死ぬ．このできごとは，人類創世以来繰り返され，そして，人類が存在する限り今後も変わることがない．しかし，出生や死亡の人口割合は，時代，国，人種，死因などにより大きく異なっている．これらにより得られたデータのうち，死亡の人口割合を時間とともに蓄積した死亡率の時系列データは，死亡原因の解明や対策などへの重要な手がかりとなる統計量の一つである．この統計量は，ある時期の独立した値ではなく，過去からのトレンドや期待値，超過死亡など，死亡率の時間依存性のある構成要素が複合した結果その時期に現れた値である．しかしながら，従来の時系列解析では，死亡率は時間の関数として扱われ，[1−3]トレンド以外は，一般に死亡率の構成要素に分類して検討されることがなかった．また，トレンドについても，死亡率自体から算出されるため，不定期の要因による死亡増加があ

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

ると，直接その影響を受け，あたかもトレンドによる増加であるが如き印象を与えた．これは上記の死亡率の性格を考慮すると不正確である．そこで，本稿では死亡率をいくつかの構成要素に分類し，死亡率が時間的に変化する際の特徴をより明確に表現する方法について検討した．

研究方法

1．死亡率の構成要素

死亡率の構成要素は，厳密には，性，年齢，人種などの属性的要素と，期待死亡率，超過死亡率，トレンドなどの量的要素に分けることができるが，前者は時系列データとは関係がないので，ここでは後者に限定する．その時間単位は年，月，日などが利用可能であるが，季節性，死亡数などを考慮して，時間単位を月とした．

2．死亡率資料

東京都衛生年報に掲載された1952～87年，36年間の総死亡と代表的死因である悪性新生物，心疾患，肺炎・気管支炎による月別死亡率を資料として利用した．

3．構成要素の導出

i年，j月の月別の観測死亡率をd(i,j)，期待死亡率を$d_1(i,j)$とすると，

$$d(i,j)=d_1(i,j)+\varepsilon \quad (1)$$

通常の統計モデルでは，εは正規分布型の誤差とみなされるが，ここでは短期間の環境要因による超過死亡率$e_1(i,j)$を考慮するので，

$$\varepsilon=e_1(i,j)+\varepsilon_1 \quad (2)$$

のように分解する．このε_1は偶然変動，つまり誤差を示す．期待死亡率と偶然変動の和(以下仮の期待死亡率と呼ぶ)を$d_2(i,j)$とおくと，(1)式は，

$$d(i,j)=d_2(i,j)+e_1(i,j) \quad (3)$$

(1)式と(3)式の相違からみられるように，後式は非負の不連続量を考慮するため，通常利用される連続性のある回帰モデルは不適当になる．そのために，以下のようにモデルの導出はやや煩雑となる．

まず，この$d_2(i,j)$を推定するために，各月の期待死亡率の年次的変化率は小さいことに着目する．このことは，階差$2(2d_1(i,j)-d_1(i-1,j)-d_1(i+1,j)$が小さいことを意味する．d(i,j)の階差2を$c_j(i)$としたとき，j月のd(i,j)の年次推移が直線的の場合に$c_j(i)=0$となり，山型の場合に$c_j(i)>0$となるのだから，上記を言い換えれば，$c_j(i)$が大きい場合に，d(i,j)は正の$e_1(i,j)$を含む可能性が高いことになる．そこで，正の$c_j(i)$の中から$e_1(i,j)$による外れ値を検索する．この検索法にはSmirnov–Grubbs法を利用する．ただし，本来$c_j(i)\fallingdotseq 0$であることを考慮して，外れ値の判定基準の危険率を通常の5％よりも厳しく10％とする．外れ値については欠測値処理の方法を利用し，残りの正データの平均値Xを推定値とする．このとき，

$$d(i,j)=(X+d(i-1,j)+d(i+1,j))/2 \quad (4)$$

この操作を繰り返して得られたj月のd(i,j)のデータ列が$d_2(i,j)$で，(3)式から$e_1(i,j)$が求められる．

次にトレンドa(i,j)を移動平均法により以下のように算出する．同法は，奇数点のデータの平均値をその中点の値と推定する方法であるが，1年は12カ月であるから，11カ月と13カ月の$d_2(i,j)$の移動平均値の中点をとる．すなわち，i年j月を通算し，$m=12(i-1)+j$とし，$d_2(m)=d_2(i,j)$と置き換えたとき，

$$a_0(i,j)=a_0(m)=\left(\sum_{k=m-5}^{m+5} d_2(k)/11+\sum_{k=m-6}^{m+6} d_2(k)/13\right)/2 \quad (5)$$

ここで，m－6とm＋6が調査期間内にあるためには，初期と終期各6ヵ月の値が欠損する．そこで，欠損したj月の値を翌年または前年のj月の既知の年平均値との比から推定する．例えば，m＝7～18の$a_0(m)$の和をa_1，m＝19～30の和をa_2とすると，a_0(1)の推定値は，a_0(13)・a_1/a_2となる．期間最初の月(m＝1)の推定値をhとし，このときのトレンドを0とすると，i年j月のトレンドa(i,j)は，$a(i,j)=a_0(i,j)-h$で与えられる．

次に，

$$A(i)=\sum_{j=1}^{12} a(i,j),\quad D_k(i)=\sum_{j=1}^{12} d_k(i,j),\quad (k=1,2)$$

月死亡係数をB(j)とおくと，$d_1(i,j)$は，

$$d_1(i,j)=a(i,j)+B(j)\cdot(D_1(i)-A(i)) \quad (6)$$

と定式化でき，$\Sigma B(j)=1$である．左辺は得られていないが，偶然変動の和は死亡率の和よりも非常に小さいとみなせるので，

$$\sum_{i=1}^{n} d_1(i,j)=\sum_{i=1}^{n}(d_2(i,j)-e_1(i,j))\fallingdotseq\sum_{i=1}^{n} d_2(i,j) \quad (7)$$

同様に，$D_1(i)\fallingdotseq D_2(i)$とみなすことができ，よって

$$B(j)=\sum_{i=1}^{n}(d_2(i,j)-a(i,j))/\sum_{i=1}^{n}(D_2(i)-A(i)) \quad (8)$$

以上から(6)式により，$d_1(i,j)$も算出できる．

4．死亡率構成要素の精度の検証(調査期間による変動)

各構成要素の値は調査期間のデータより定められるので，調査期間が異なると構成要素の値も変動する可能性がある．そこで，手法の一貫性を検証するために，異なった調査期間で各構成要素を算出し，同一期間における計算値の一致性を検討した．原データの調査期間は1952～87年であるから，比較対照期間を1962～87年，1972～87年とした．3期間で共通する期間は1972～87年である．ただし，トレンドについては1972年1月を初期値0とした．また，死亡の季節変動については，従来調査期間の死亡率月平均値の変動を観察する方法が利用されている．[1,2]この方法と月死亡係数との調査期間による変動性を比較するため，調査期間を3期間(1952～63, 64～75, 76～87年)に等分し，各期間での月死亡係数と月平均死亡率の年死亡率への割合(以下，月死亡率比と記す)とを比較した．

結　　果

まず，総死亡，悪生新生物，心疾患，肺炎・気管支炎の月死亡係数をFig. 1に示した．心疾患と肺炎・気管支炎の月死亡係数は月変動が非常に大きく，対照的に悪性新生物は小さかった．3死因は，冬高夏低の類似した年周期性を示した．一方，悪性新生物も，変動差が小さいとはいえ，2月から12月に向かって増加する形で年周期性を示したことは興味深い．

次に，4死因の1952年1月から1987年12月までの，A.

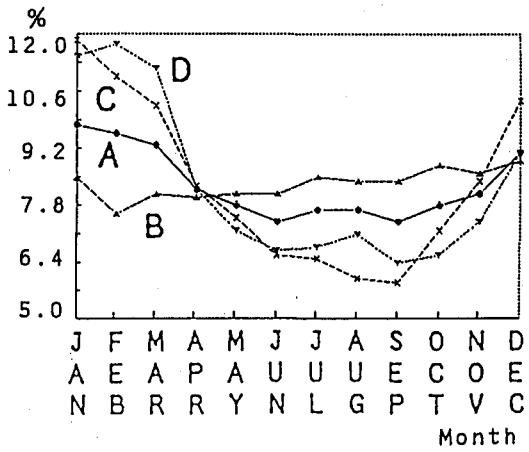


Fig. 1．Coefficient of Death by Month
A：Total Death, B：Malignant Neoplasms,
C：Heart Diseases, D：Pneumonia–Bronchitis

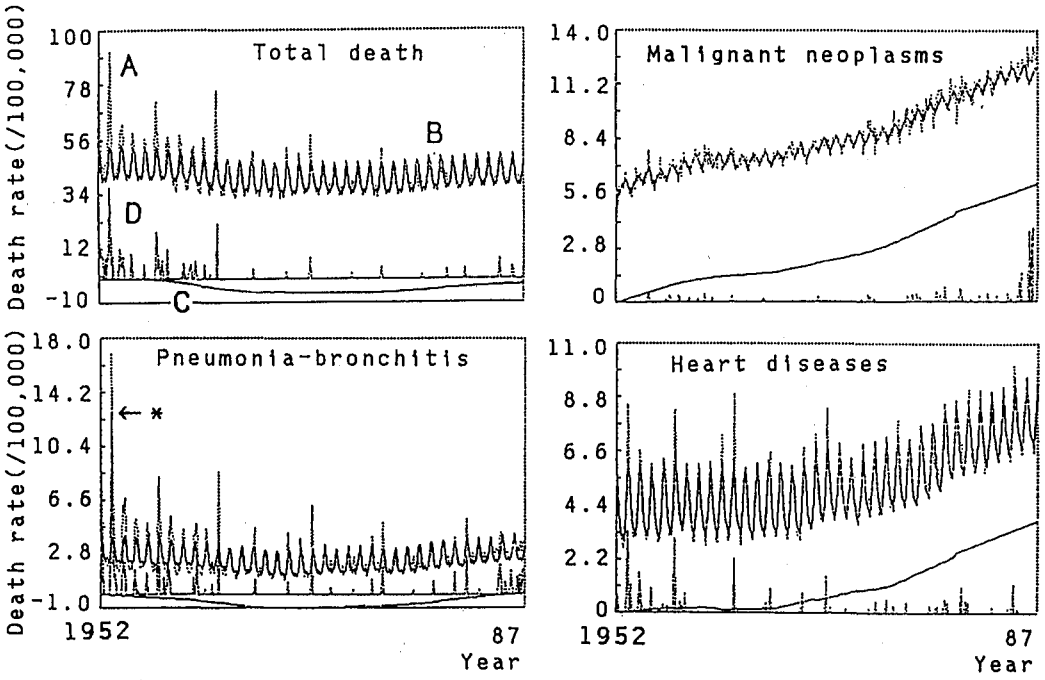


Fig. 2．Crude Death Rates and Those Elements by Month between 1952 and 1987
A：Crude, B：Expected, C：Trend and D：Excess Death Rates
＊：Position of Arrow Head shows The Excess Death Rate

粗死亡率，B．期待死亡率，C．トレンド，D．超過死亡率をFig. 2に示した．粗死亡率と期待死亡率はその多くが重なるために，図の大部分は見分けにくい．一部の見分けられる部分については超過死亡があることを示している．総死亡と肺炎・気管支炎のトレンドは，36年間では減少後増加する傾向を示し，悪性新生物と心疾患のトレンドは，全期間で増加傾向があり，近年程その傾向が顕著である．また，総死亡，心疾患，肺炎・気管支炎の大きなピークは時期が共通し，死因間に密接な関りのあることを示唆した．超過死亡率は，3死因間では肺炎・気管支炎が大きく，特に，1953年1月には期待死亡率の3倍を越え，肺炎・気管支炎が突発的な要因の影響を受け易い死因であることが推察された．

さらに，調査期間を，36，26，16年間に変えて構成要素を算出したときの共通期間(1972～87年)の値からこの手法の安定性をみた．Table 1は4死因それぞれの期待死亡率で，各期間の値の一致性が高く，手法の安定性が確認された．また，他の構成要素についてもほぼ同様であった．

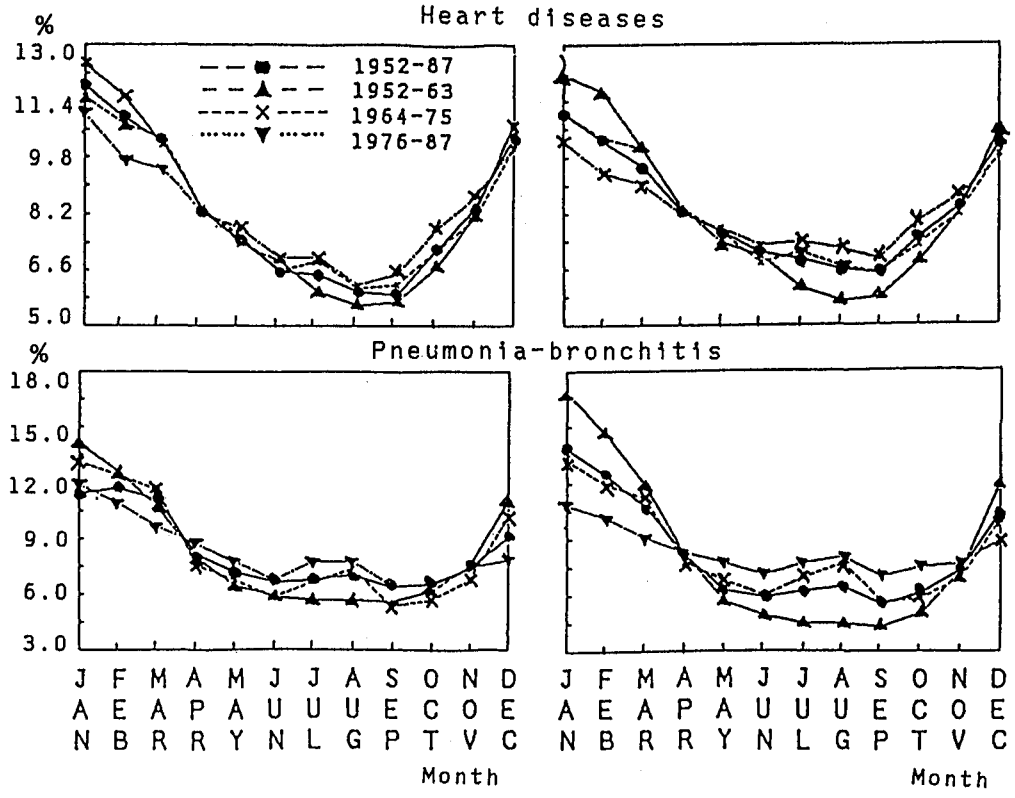
最後に，調査期間を12年間毎に区切ったとき，調査期間の変化で月死亡係数と月死亡率比とがどのように異なるかを死亡率の季節変動が著しい心疾患と肺炎・気管支炎について比較し，Fig. 3に示した．また，全期間で得られた値と各期間で得られた値との比をTable 2に示した．月死亡係数と月死亡率比の3調査期間による全期間との比を各月でとると，計36個の値の平均値はいずれもほぼ1であったが，標準偏差，最大，最小は以下のようであった．心疾患では，月死亡係数がそれぞれ，0.049，1.10，0.89であったのに対し，月死亡率比はそれぞれ，0.066，1.14，0.86であった．また，肺炎・気管支炎では，月死亡係数がそれぞれ，0.109，1.23，0.80であったのに対し，月死亡率比はそれぞれ，0.153，1.27，0.70で，明らかに月死亡係数の方が変動が小さいことを示した．

考　察

死亡率の時系列データを利用した従来の解析では，その解析目的により設定される統計モデルに相違はあるが，共通する点は，死亡率の時系列が連続変数として説明できると考えていることである．確かに，死亡率の年代による変化の検討[4-7]，性や年齢による年次的差の検討[8,9]では有効である．しかし，死亡要因の探究を目的とする場合には必ずしも妥当であるとは言い難い．もし，

Table 1. Expected Death Rates for Four Causes in 1972-87 during Three Periods of A：1952-87, B：1962-87 and C：1972-87 (/100,000)

Cause	Total death			Malignant neoplasms			Heart diseases			Pneumonia–bronchitis		
Year Period	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1972	468	468	468	102	102	102	57.2	57.2	57.2	23.2	23.2	23.2
1973	473	474	478	103	103	103	62.4	62.0	62.5	25.4	25.1	25.7
1974	469	469	471	104	104	104	63.8	63.4	63.8	26.2	25.9	26.2
1975	465	465	467	106	106	106	66.1	66.5	66.3	27.3	27.7	28.2
1976	465	461	461	110	110	110	66.9	66.9	67.1	25.2	23.4	23.5
1977	468	469	468	115	115	116	67.1	67.1	67.1	23.1	23.4	23.1
1978	482	482	482	119	119	119	71.4	71.5	71.5	25.4	26.1	25.8
1979	476	476	477	123	123	125	74.4	74.6	75.4	24.4	24.5	24.5
1980	495	495	497	126	126	127	81.8	82.8	83.2	29.6	29.5	29.9
1981	501	501	505	129	129	131	82.9	82.9	83.5	31.0	31.1	31.2
1982	493	493	493	131	131	131	84.4	84.9	84.9	32.0	32.0	32.0
1983	509	510	510	135	135	136	86.4	86.4	86.4	35.5	36.4	36.4
1984	510	510	510	139	139	139	88.9	89.2	89.2	34.3	34.7	34.3
1985	510	517	518	141	141	141	91.1	91.2	91.4	37.7	37.5	37.7
1986	522	522	521	143	140	140	94.8	95.0	95.0	40.1	39.5	39.6
1987	528	528	530	141	140	140	96.0	96.0	96.0	43.5	41.7	41.9



(1) Coefficient of Death by Month

(2) Ratio of The Monthly and Annual Death Rates

Fig. 3. Comparison of Coefficient of Death by Month with Ratio of The Monthly and Annual Death Rates in Three Study Periods of 1952-63, 1964-75 and 1976-87

不定期の無視できない量の死亡増加をもたらす要因がある場合には，死亡率に不連続な要素が含まれ，この要因を連続変数から検出することは困難であるからである．さらに，他の要因の検出にも影響を及ぼすことにもなる．一方，死亡数と人口との比のみで得られた死亡率を厳密に各構成要素に分類することも困難で，各構成要素は全て推定量であって，時間的に変化する相対量として意義を有する．年周期性のある月死亡率のより一般的な形は，スペクトル解析でみられるような，$y = A(t)\cos\omega t + B(t)$であろう(ただし，$\omega = 2\pi/12 = \pi/6$ となる)．しかし，超過死亡があるような場合には，A(t)，B(t)を容易には設定できず，一応のモデルを設定したとしても，モデルによる偏りと偶然変動とを区別することは困難と思われる．この設定は今後の検討課題であろう．

月死亡係数は，死亡率の季節変動性を示す指標であるから，その変動要因は主に気候であると考えられる．気候は年次により多少変化するので，月死亡係数も同様に年次によって多少の変化はあろう．しかし，感染症の流行など年次により全く異なる要因は死亡率の季節変動性を歪めて表わす惧れがあり，超過死亡として考慮すべきと思われる．このことは，Fig. 3が明示している．月の死亡への影響が年代で大きく変化しないとすれば，期待死亡率の周期の振幅も年代により大きくは変化しない．Fig. 2のように，4死因の振幅は全期間でほぼ一定である．期待死亡率の振幅の位置する高さの年次的変化が概ねトレンドである．

心疾患のトレンドは，悪性新生物同様全期間で増加しているが，初期に超過死亡が多発していることから，粗死亡率から算出したトレンドでは超過死亡が加えられ，総死亡のトレンドのように，初期に減少し，その後増加

Table 2. Comparison of Coefficient of Death by Month (Item A) with Ratio of The Monthly and Annual Death Rates (Item B) in Three Study Periods of 1952-63, 1964-75 and 1976-87 Ratio of Values in Each of The Periods and in The Total Period of 1952-87

Cause & Period		Total death			Malignant neoplasms			Heart diseases			Pneumonia–bronchitis		
Item	Month	1952-63	1964-75	1976-87	1952-63	1964-75	1976-87	1952-63	1964-75	1976-87	1952-63	1964-75	1976-87
A	1	1.09	1.02	1.00	1.00	0.98	0.99	1.05	0.97	0.93	1.23	1.15	1.04
	2	1.04	1.00	0.94	1.08	1.07	1.04	1.05	0.98	0.89	1.08	1.06	0.93
	3	1.00	1.01	0.92	1.00	1.02	1.01	0.99	1.01	0.92	0.96	1.04	0.87
	4	1.00	1.00	1.02	0.98	0.98	1.03	1.01	1.01	1.00	0.98	0.93	1.07
	5	0.96	1.00	1.04	0.98	1.00	1.04	0.99	1.01	1.04	0.90	0.94	1.08
	6	0.97	0.99	1.03	1.00	1.01	1.01	1.05	1.00	1.06	0.88	0.88	1.01
	7	0.94	1.00	1.03	0.92	1.00	1.00	0.92	1.06	1.08	0.84	0.99	1.15
	8	0.94	1.01	1.03	1.01	0.99	0.93	0.93	1.02	1.03	0.80	1.04	1.10
	9	0.97	0.97	1.01	1.00	1.01	1.02	0.97	1.05	1.10	0.88	0.84	1.02
	10	0.99	1.00	1.04	1.03	0.99	0.99	0.93	1.00	1.08	0.94	0.86	0.98
	11	1.02	1.01	1.05	1.01	0.99	0.98	0.98	0.96	1.04	1.01	0.92	1.00
	12	1.03	0.99	0.99	0.99	0.97	0.97	1.04	0.97	0.97	1.22	1.12	0.87
B	1	1.08	0.98	0.93	1.01	1.00	0.99	1.10	1.00	0.93	1.22	0.96	0.78
	2	1.09	0.99	0.92	1.03	1.01	0.99	1.14	1.01	0.91	1.18	0.96	0.82
	3	1.03	1.02	0.95	0.99	1.01	0.99	1.05	1.05	0.95	1.11	1.05	0.84
	4	1.00	1.00	1.01	0.99	0.98	1.03	1.01	1.01	0.99	1.00	0.95	1.01
	5	0.96	1.01	1.05	0.96	0.99	1.01	0.96	1.00	1.01	0.90	1.08	1.24
	6	0.96	1.00	1.04	1.00	1.01	1.00	0.99	0.96	1.03	0.83	1.02	1.20
	7	0.93	1.04	1.04	0.99	1.00	1.00	0.88	1.03	1.07	0.73	1.11	1.24
	8	0.93	1.03	1.04	1.00	0.99	1.01	0.86	1.02	1.09	0.70	1.20	1.25
	9	0.97	1.00	1.06	0.99	1.00	1.00	0.89	1.00	1.06	0.78	1.02	1.27
	10	0.96	1.00	1.04	1.02	1.00	1.00	0.91	0.97	1.07	0.82	0.95	1.23
	11	0.99	0.98	1.01	1.02	1.00	0.99	0.98	0.98	1.04	0.99	0.95	1.05
	12	1.03	0.98	0.97	1.01	1.00	1.00	1.04	0.97	0.96	1.15	0.96	0.86

したと思われる．心疾患死亡の増加は，高齢化による人口構造の変化にも起因しているが，食生活の変化などによる成人病患者の増加に依るところが大きいと考えられ，死亡率直接からのトレンドより，Fig. 2のトレンドの方が，より論理的であると思われる．トレンドは，特定要因の影響が徐々に現れた結果生じるが，急激に現れた結果生じるのが，超過死亡で，その最大要因はインフルエンザなどの感染症の流行と推察される．他の要因についてもさらに検討が必要である．

ま と め

死亡率の時系列データから，その死因の時間的変化の特徴をより明確に表現するため，死亡率をその構成要素である期待死亡率，トレンド，超過死亡率などで表わす方法を導出した．また，その過程で得られる月死亡係数を含め，これらの各構成要素の上記特徴を，東京の総死亡，悪性新生物，心疾患，肺炎・気管支炎による1952年1月から1987年12月までの期間における死亡率を用いて検討した．

月死亡係数は，その死因の季節変動性を示す良好な指標となる．死亡率自体からもその特徴を推察することはできるが，年次毎の影響を受け易く，年代によりかなり変化する欠点があり，特に，呼吸器，循環器系の死因で著しい．月死亡係数の年代による変化の小さいことは期待死亡率にも反映し，期待死亡率の月変化は，全期間を通してほぼ一定した振幅の年周期性を有し，振幅の高さは徐々に変動する．この徐々なる変動がトレンドを示す．死亡率自体を用いてトレンドを算出する場合には，その算出法により差異はあるが，やはり年次毎の影響を過大

に受ける可能性がある．心疾患のトレンドは全期間を通して増加傾向であったが，期間初期に超過死亡が多発しているので，従来のトレンド算出法では減少後増加したと思われる．しかし，その要因を考慮すると，全期間増加傾向の方が妥当である．悪性新生物以外の3死因では，主たる超過死亡は期間初期に集中して発生し，近年の発生は僅かであった．しかし，将来ともこの傾向が持続する保証はない．都民の健康を保持せんとする健康サーベイランスを実施する場合には，トレンドや超過死亡率を確認しておくことも必要な手だての一つと考えられる．

文　献

1）片山功仁慧，籾山政子：日本公衛誌，17，409-418，1970

2）Bowie, C. and Prothero, D.：*Int. J. Epidemiol.*, 10, 87-92, 1981

3）牧野国義，溝口　勲：東京衛研年報，36，283-289，1985

4）永田久紀，石榑清司，浅野弘明：日衛誌，37，613-617，1981

5）Rosenberg, M. J. and Rosenthal, S. M., *AJPH*, 77, 833-836, 1987

6）冨井　章：日本公衛誌，24，703-712，1977

7）牧野国義：日生気誌，25，69-78，1988

8）Davis, D. L. and Schwartz, J.：*Lancet*, 1，633-636，1988

9）Devesa, S. S., Pollack, E. S. and Young, J. L. Jr.：*Am. J. Epidemiol.*, 119, 274-291, 1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 216-219, 1990

環境における化学物質の安全性に関する調査研究（第3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N-ニトロソジフェニルアミンの分析法

高橋　巖**, 岡本　寛**, 大橋則雄**, 笹野英雄**

Studies on Environmental Safety of Chemicals (III)* Determination of *N*-Nitrosodiphenylamine in Environment by Capillary Gas Chromatography / Mass Spectrometry

IWAO TAKAHASHI**, YUTAKA OKAMOTO**, NORIO OHASHI** and HIDEO SASANO**

Keywords：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capillary gas chromatography / mass spectrometry, N-ニトロソジフェニルアミン N-nitrosodiphenylamine, スコーチ防止剤 antiscorching agent, 海水 seawater, 底質 sediment, 魚 fish

緒　言

環境庁では，昭和49年以来，環境中における化学物質による汚染の実態調査を実施している．この間，昭和53年度に作成したプライオリティリスト[1](有害性のほか，生産量，用途など環境への放出という観点も考慮に入れて約2,000の化学物質を選択)に基づき，昭和51年度から10ヶ年計画で第1次化学物質環境安全性総点検調査を実施した．さらに，平成元年度からは，昭和62年度に作成した新プライオリティリスト[2](約1,100の化学物質を選択)に基づき，第2次化学物質環境安全性総点検調査を実施することになった[3].

今回，ゴム用スコーチ防止剤として使用され，環境中に大量に放出されると考えられるN-ニトロソジフェニルアミン(以下NDPAと略す)をプライオリティリストより選び，環境中の残留レベルを測定するための分析法を確立した．また，この方法を用いて，東京湾の海水，底質及び魚(スズキ)中のNDPAを調査したのであわせて報告する．

実験の部

1．試薬及び標準品

1）**試　薬** N-ニトロソジフェニルアミン：東京化成特級，ジフェニルアミン：和光純薬特級，ヘキサン，アセトン，酢酸エチル，アセトニトリル：残留農薬試験用，無水硫酸ナトリウム：PCB・フタル酸エステル用，アントラセン-d_{10}：Aldrich社製，アルミナ：ICN Biomedicals社製 ICN Alumina B, Akt. Ⅰ(400℃，3時間活性化)その他の試薬は特級品を用いた．

2）**標準液**　NDPA約50mgを正確にはかり，ヘキサンを加えて100mlとし標準原液とする．これを希釈して0.05～1.0 μg／mlとし，各溶液1 mlに内部標準液100 μlを添加し標準液とする．

3）**内部標準液**　アントラセン-d_{10}約10mgを正確にはかり，ヘキサンを加えて100mlとし内部標準原液とする．これを希釈して2 μg／mlの内部標準液とする。

2．器　具

ガラス器具は，褐色ガラス器具またはアルミ箔等で遮光したものを使用する．

3．装　置

ヒューレット・パッカード社製 GC／MS5970B

4．試料液の調製

1）**水質試料**　試料1 ℓをpH 7～9に調製後，分液ロートに移し，ヘキサン100mlずつで2回，10分間振とう抽出する．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(40℃以下)を用いて約2 mlに濃縮する．濃縮液をアルミナカラム(1.0 φ

---

*第2報，東京衛研年報，40，223-229，1989.

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

×30cm のカラムにアルミナ5 g を乾式充塡し無水硫酸ナトリウム2 g を積層した後，ヘキサン・酢酸エチル(95：5)10ml を流したもの)にのせ，容器は少量のヘキサンで洗い，洗液はカラムに加える．続いて，ヘキサン・酢酸エチル(95：5)60ml を流し，初めの10ml は捨て，残りの50ml を分取する．この液をロータリーエバポレーターを用いて約2 ml に濃縮し，窒素ガスを吹き付けて1 ml に濃縮した後，内部標準液100 μl を添加し試料液とする。

2）**底質試料**　試料20 g を100ml 共栓付遠沈管にとり，アセトン50ml を加えて10分間振とう抽出後，2,500rpm で遠心分離を行いアセトン層を分取する．残渣にアセトン50ml を加えて同様な抽出操作を行う．アセトン層を合わせ5％塩化ナトリウム溶液500ml の入った分液ロートに取り，ヘキサン100ml ずつで2回，10分間振とう抽出する．ヘキサン層を5％塩化ナトリウム50ml で洗浄後，無水硫酸ナトリウムで脱水し，ロータリーエバポレーターを用いて約2 ml に濃縮する．濃縮液は水質試料と同様に，カラムクロマトグラフィー，濃縮を行い試料液とする。

3）**魚試料**　試料20 g を100ml 共栓付遠沈管にとり，アセトン50ml を加えて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．残渣にアセトン50ml を加えて同様な抽出操作を行う．アセトン層を合わせ，底質試料と同様にヘキサンに転溶後，脱水し，ロータリーエバポレーターを用いて10ml に濃縮する．濃縮液を分液ロートに取り，ヘキサン飽和アセトニトリル30ml ずつで2回，10分間振とう抽出する．アセトニトリル層を5％塩化ナトリウム溶液200ml の入った分液ロートに取り，ヘキサン50ml ずつで2回，10分間振とう抽出する．ヘキサン層を5％塩化ナトリウム50ml で洗浄後，無水硫酸ナトリウムで脱水し，ロータリーエバポレーターを用いて約2 ml に濃縮する．濃縮液は水質試料と同様に，カラムクロマトグラフィー，濃縮を行い試料液とする．

なお，NDPA は光分解を受けやすいので，上記操作はできる限り遮光して行う．

5．**測　定**　試料液1 μl をGC／MS(SIM)に注入し，NDPA と内部標準のピーク面積比を求め，予め作成した検量線より定量する．

〔GC／MS(SIM)条件〕

カラム：CP-WAX51　0.25mm φ×25 m 膜厚0.2 μm　キャリアーガス：ヘリウム　カラム入口圧：15psi　カラム温度：初期温度60℃，初期温度保持時間1分，昇温速度15℃／min，最終温度220℃，最終温度保持時間5分　注入口温度：230℃　セパレーター温度：260℃　イオン化電圧：70eV　注入法：スプリットレス　モニターイオン：m／z 169，188(内部標準)

結果及び考察

1．NDPA のマススペクトル

GC／MS により得られた NDPA のマススペクトルを図1に示す．NDPA は GC 注入口で熱分解し，ジフェニルアミン(以下 DPA と略す)になる[4]．したがって，ベースピークのm／z 169は，DPA の分子イオンである．本スペクトルは DPA のスペクトルと一致した．

2．検量線

0.05～1 μg／ml の NDPA 標準液1 μl を GC／MS に注入し，内部標準とのピーク面積比より検量線を作成した．検量線は図2に示すとおり良好な直線性を示した．

3．NDPA の光分解性

NDPA の低濃度(0.1 μg／200ml)における光分解性を調べた．残存率は，1日放置では64％，2日放置では10％であった．したがって，分析操作は褐色ガラス器具，アルミ箔等を用いて遮光して行う必要があり，また，試料液及び標準液も遮光して保存することとした．

4．NDPA と DPA の分離

NDPA は，GC／MS では熱分解物である DPA として測定する．したがって，GC／MS 測定前に NDPA と

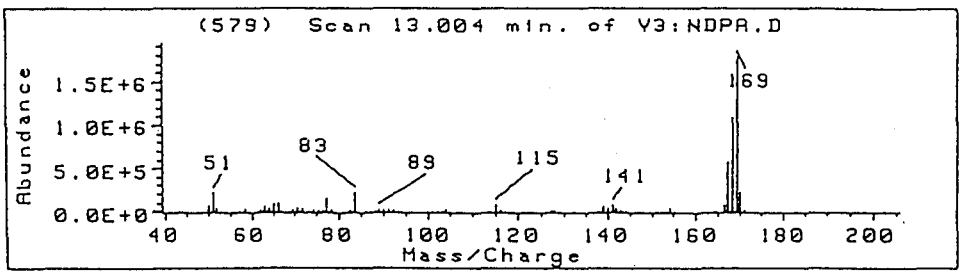


図1．NDPA のマススペクトル

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 220-222, 1990

東京湾の環境汚染モニタリング（第8報）*
昭和63年度スズキ及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 (VIII)*
Residue Levels in Japanese Sea Bass and Gull in 1988

TOMOKO OHKUBO**, HIROSHI SETO** and TAKAKO KANOH**

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が実施され，スズキ(*Lateolabrax japonicus*)及びウミネコ(*Larus crassirostris* Vieillot)中の化学物質濃度の変化及び特徴を報告してきた[1]．

第一種特定化学物質(化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律)に指定されている PCB，HCB，ドリン類，DDT 類など有機塩素系化合物による汚染は，減少傾向が見られるが，TBT のように，最近新たにその汚染が問題となっている物質もある．

最近の化学物質による環境汚染の特徴は，多様化，広域化，深刻化であり，地球環境そのものの保全すら危いと熱心に叫ばれるようになってきた．社会は，常に新しいもの，便利なものを要求している．しかし，フロンのように時にはそれが環境汚染を生み出す危険性を持っている．そこで，自然の自浄作用，また人間を含めた動植物の生体防御機能を損なわないよう，環境の汚染をできるだけ抑制し改善するためには，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63年度に実施した東京湾のスズキ及びウミネコにおける環境汚染モニタリング結果である．

試料及び分析方法

試　料　スズキは，昭和63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63年5月から9月にかけて羽田空港付近で捕獲された若鳥を採取日の順に8羽ずつまとめ5検体とした．鑑定及び試料の調製は前報[1]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[2]により行った．詳細な操作法，分析条件は報告書[3]に記載した．

分析した化学物質は37種類である．使用した略号は前報[1]と同様である．

試薬，分析装置は前報[1]と同様のものを使用した．

結果及び考察

スズキについて　スズキ可食部の化学物質濃度を Table 3 に示す．PCB 濃度は，昭和61年度に最低の0.06 μg／g を示したが，その後増加し，今年度は0.2 μg／g となった．PCB は昭和49年6月に第一種特定化学物質に指定され，その使用が全面的に中止になっていることから，そのまま分解されずに環境中に残留していることがわかる．DDT 類濃度はほぼ平年並みであった．塩素化ベンゼン類は，昭和59年度を境に減少傾向であり，昨年度は測定濃度も検出率も増加したが，今年度は，全く検出されなかった．クロルデン類の濃度は，昨年度はかなり上昇したが，今年度は，一昨年度と同レベルになった．クロルデン類は，昭和61年9月に第一種特定化学物質に指定され使用禁止となったが，難分解性であり，更にこれまでに多量に使用されてきたことから，今後とも環境中における残留状況を注意深く監視する必要がある．TBT は，昨年度の2倍の濃度であった．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るが，TBTO を除く TBT(13物質)は昭和63年4月及び平成元年3月に指定化学物質に指定され，TBTO は平成2年1月に第一種特定化学物質に指定され，製造，輸入が全面禁止となった．TBTO 以外の

---

*第7報，東京衛研年報，40，251–255，1989.

**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，Hyakunin–cho 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	566±25	31.5±0.5	75.1	2.93
2	521±6	30.8±0.6	76.3	2.86
3	497±10	30.0±1.1	75.0	2.68
4	469±8	30.6±0.9	74.4	2.55
5	378±68	27.7±2.2	74.0	2.84
mean	486	30.1	75.0	2.77

*：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=8)

group No.	sex	body weight (g) mean±SD	wing length (cm) mean±SD	water (%)	fat(%)
1	mix	547±49	34.7±1.1	65.7	6.13
2	mix	540±66	34.2±1.2	66.6	5.89
3	mix	614±65	36.0±1.6	65.1	5.39
4	mix	575±61	35.4±1.7	68.3	4.88
5	mix	569±68	35.3±0.8	65.7	5.93
mean		569	35.1	66.3	5.64

TBT の蓄積性は高くないが，難分解性であることから，環境汚染の進行を防止するため，今後とも環境汚染対策を推進する必要があろう．

ウミネコについて ウミネコ胸筋の化学物質濃度を Table 3 に示す．PCB とディルドリンの濃度が，昨年度と同様，上昇した．β-HCH は今年度も検出された．HCH 類は，農薬として使用されていたが，昭和46年以降使用が中止されている．γ体以外の HCH 異性体は残留性の高い物質として知られているが，当所の調査結果においても経年的な変動は少なく，調査開始以来，常に検出されている．DDT 類はほぼ平年並みの濃度であった．塩素化ベンゼン類は今年度は*p*-DCB，1，2，4-TrCB，PeCB がそれぞれ1検体ずつ検出されたが，昭和60年度を境に漸減している．クロルデン類は，昨年度の半分以下の濃度レベルとなった．TBT は今年度も検出されなかった．

なお，本調査は衛生局医療福祉部環境公害保健課と協力して実施したものである。

文 献

1) 大久保智子，瀬戸 博，加納堯子：東京衛研年報，40，251-255，1989
2) 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
3) 東京都立衛生研究所：昭和63年度生物指標環境汚染調査報告書，1989
4) 環境庁編：化学物質と環境，No. 15，1989

結果及び考察

Table 1に今回捕獲された鳩の体重と肺重量の平均値及び標準偏差を示した．肺重量のばらつきが大きいがこれは心臓からの採血(脱血)が不完全な試料があったためである．鳩の性別，年齢は不明であった．

各地区別の鳩の肺を5羽分まとめてアルカリ分解し，精製して得た検液を高速液体クロマトグラフ(HPLC)により分析した．そのクロマトグラムの一例をFig 1に示した．両地区の鳩試料のクロマトグラムは，よく似たパターンを示し，BkF, BaP, BghiPが検出された．また，炭粉も検出された．鳩1羽分の肺あたりのPAH重量及び炭粉重量をTable 2に示した．

これらのデータをディーゼルエンジン排ガスを暴露したラットの肺に蓄積したPAH及び炭粉濃度についてのデータ[5]と比較検討した．まずPAH相互の比率(BkF：BaP：BghiP)に着目した．鳩では平均0.8：1：2.3であった．一方，暴露停止後(半年間)のラットでは0.9：1：3.2とBghiPが相対的にやや高いもののほぼ同じ比率であった．次に，PAHの炭粉量に対する割合(BkF/C, BaP/C, BghiP/C，各ng/mg)についてみると，鳩では各々1.2, 1.6, 3.6だが暴露したラットでは0.6, 0.8, 2.5であった．PAHの量は炭粉の約百万分の一と微量であることを考慮すると，野生の鳩とディーゼルエンジン排ガスを暴露したラットの肺中のPAH相互の量比及びPAHと炭粉との量比のそれぞれの値がかなり近いものと判断できる．このことは，両者に暴露された汚染物質の性状あるいは起源が似ていることを示唆している．

野生の鳩の肺に見出された炭粉は明らかに大気汚染に由来するものであり，鳩が大気汚染の指標生物として利用可能なことを示している．しかし，PAHについては大気汚染の他，食餌に由来するものがあることを常に念頭にいれておく必要がある．大気汚染によるPAH暴露量を推定するには肺中のPAHだけでなく炭粉を測定することが有効である．

なお，暴露量を推定するうえで年齢は重要な因子である．鳩の寿命は20年[9]と言われており，高齢の個体は若

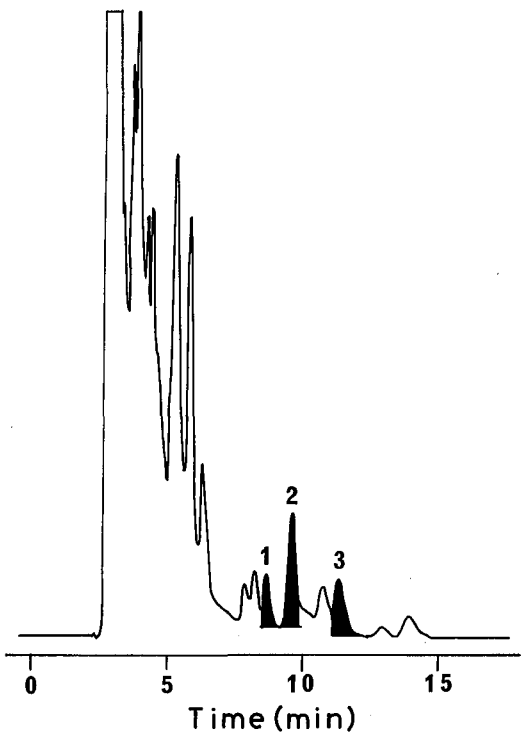


Fig. 1. Typical HPLC Chromatogram of PAHs from Pigeon Lungs.
Peaks：1,BkF; 2,BaP; 3,BghiP
HPLC conditions：column, TSK gel ODS-120T, 4.6mm i. d. x 25 cm; mobile phase, hexane, acetonitrile, water 3, 75, 22% (V/V)；flow rate, 1.3ml/min；column oven temp., 40℃；detector, fluorescence Ex 365 nm, Em 430 nm.

Table 1.

Mean±S. D.

Locations	Body weight(g)	Lung weight(g)
Shibuya St., bus terminal	288±14	3.93±1.18
Suitengu shrine	274±23	3.35±0.68

Table 2. Lung Burdens of PAHs and Carbon in Pigeons.

Locations	PAH (ng)			Carbon (mg)
	BkF	BaP	BghiP	
Shibuya St., bus terminal	0.15	0.18	0.43	0.11
Suitengu shrine	0.12	0.18	0.39	0.12

The data are expressed as a fifth part of the contents in the lungs of five pigeons.

齢の個体にくらべて肺中のPAH蓄積量が多いと推察される．したがって，実際のモニタリングに際しては年齢を確定しておくことが望ましい．鳩肺中の汚染物質のモニタリングによる大気汚染の生体影響の解明は今後の課題である．

文　献

1）厚生省編：国民衛生の動向，57-60，1989

2）Carnow, B. W.：*Arch. Environ. Health*, 27, 207-218, 1973

3）Menck, H. R., Casacrande, J. T. and Henderson, B. E.：*Science*, 183, 210-212, 1974

4）大井　玄，福田雅夫，関比呂伸，前田ヒロ子，湯目邦雄，秋山和幸，野牛　弘：東京衛研年報，23, 295-298，1971

5）瀬戸　博，大久保智子，鈴木孝人，大沢誠喜，池田真悟，渡辺伸枝，加納堯子：東京衛研年報，41, 226-228，1990

6）尾花裕孝，堀伸二郎，田中涼一，樫本　隆：食衛誌，25，35-40，1984

7）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

8）瀬戸　博，大久保智子，加納堯子：東京衛研年報，40，271-273，1989

9）日本実験動物協会編：実験動物テキスト　鳥類，9-13，1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 226-228, 1990

ディーゼルエンジン排ガス暴露後のラット肺中の多環芳香族炭化水素及び炭粉量の変化

瀬戸　博*, 大久保智子*, 鈴木孝人*, 大沢誠喜*, 池田真悟*, 渡辺伸枝*, 加納堯子*

Clearance of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Elemental Carbon from Rat Lungs after Exposure to Diesel Engine Exhaust

HIROSHI SETO*, TOMOKO OHKUBO*, TAKAHITO SUZUKI*, MASANOBU OHSAWA*, SHINGO IKEDA*, NOBUE WATANABE* and TAKAKO KANOH*

Keywords：多環芳香族炭化水素 polycyclic aromatic hydrocarbon, 元素状炭素 elemental carbon, 肺 lung, ディーゼルエンジン排ガス diesel engine exhaust, クリアランス clearance, ラット rat

緒　言

大気汚染による健康影響調査の一環として，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への発癌性多環芳香族炭化水素(PAH)の蓄積について報告した[1]．

エンジン排ガス中のPAHは粒子状炭素(炭粉)の表面に吸着した形で存在している[2]．PAHは単独で肺に投与された場合には，代謝が早く肺内にほとんど蓄積しない．ディーゼルエンジン排ガスに暴露された場合にPAHが肺に蓄積する要因として，PAHの保持母体である炭粉が肺から排出されにくいため[3]と考えられている．そこでPAHの肺から除去(クリアランス)と炭粉のクリアランスとは密接に関係しているものと考え，ディーゼルエンジン排ガス暴露後のラット肺中のPAH及び炭粉量の変化について検討した．その結果，PAHと炭粉量は極めて良く相関すること，またPAHのクリアランスは炭粉のクリアランスよりも早いことから，肺内においても炭粉がPAHの保持母体となっていることが確認された．しかも，炭粉の半減期は70～260日と非常に長いという結果が得られた．このことは，肺に吸入された炭粉及び炭粉に吸着したPAHの「生物学的モニタリング」により暴露量の推定が可能であることを示すものである．

実　験

1．動物への暴露及び試料の採取

動物は，5週齢の雄のF 344／DuCrj(日本チャールスリバー社)，排ガス発生源はヤンマーディーゼルエンジン(NFAD50型，排気量309ml，直噴型)，燃料は軽油(JIS 2号相当品，日本石油)を使用した．暴露チャンバーは前報[1]と同型を用い，温度，湿度，換気，飼料及び飲料水等の飼育条件も前報[1]と同条件で行なった．暴露排ガスの平均粒子濃度は6.8mg/m^3，NO_2の平均濃度は4.0ppmで3ケ月間(7時間／日，5日／週)暴露を続けた．暴露停止後は清浄空気室にて飼育し，経時的に前報[1]と同様の方法でラットの肺を採取し，1測定日について5匹分をまとめ1試料とし，計2試料を調製し，PAH及び炭粉量の測定を行なった．暴露排ガス及び飼料中のPAHについても分析を行なった．

2．PAH及び炭粉の分析

PAHの分析方法は前報[1]と同じく尾花らの方法[4]，すなわちアルカリ分解，シリカゲルアルミナ2層クロマト，蛍光検出器付高速液体クロマトグラフ(HPLC)による方法に準じて行なった．炭粉測定は既報の方法[5]，すなわちアルカリ分解，ヘキサンによる有機物抽出，ガラス繊維ろ紙によるろ過，元素分析による方法を用いた．

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1，Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

結果及び考察

暴露粉塵及び飼料中のPAH分析結果をTable 1に示した．ディーゼルエンジン排ガスを暴露したラットの肺からは，これらのPAHのうちピレン，ベンゾ［k］フルオランテン(BkF)，ベンゾ［a］ピレン(BaP)，ベンゾ［e］ピレン(BeP)，ベンゾ［g, h, i］ペリレン(BghiP)が検出されているが，今回の実験ではBkF，BaP及びBghiP量の変化について検討した．

Fig. 1に一例として暴露停止12週後にラット肺から抽出された検液のHPLCクロマトグラムを示した．BkF，BaP，BghiPはいずれも検出されている．一方，非暴露群の9週齢のラット肺中のBkF, BaP, BghiPの濃度は低レベルで各々0.033，0.017，0.042(ng／ラット肺)であり，炭粉は検出されなかった．

Fig. 2に暴露停止直後から1年後まで，PAH及び炭粉量の変化を観察した結果を示した．各物質の減少速度は観察時期によって異なり，3期間に分ける事ができる．第1の期間は暴露停止直後から4週目までの比較的早く減衰する期間である．この期間の半減期はBkF112日，BaP56日，BghiP46日，炭粉70日であった．第2の期間は4週から26週までで，比較的長い半減期を示す期間である．この期間の半減期はBkF112日で変わらず，BaP112日，BghiP133日，炭粉260日であった．第3の期間は26週以後でPAH量がほとんど変化しない期間である．しかし，炭粉は第2の期間と同様に減少している．このように，ディーゼルエンジン排ガス暴露によるPAH及び炭粉の半減期は長いことから，これらの物質の肺中の蓄積量を測定することにより暴露量の推定に役立てること，すなわち「生物学的モニタリング」が可能

Table 1. Concentrations of PAHs in Diesel Engine Soot and Diet.

PAH	Soot (ng/mg)	Diet (ng/g)
benzo［k］fluoranthene	0.6	0.5
benzo［a］pyrene	0.5	1.3
benzo［g, h, i］perylene	0.5	2.7
anthracene	3.1	1.7
pyrene	36	9.0
benz［a］anthracene	8.0	1.3
benzo［e］pyrene	0.9	2.5
dibenz［a, h］anthracene	nd	nd

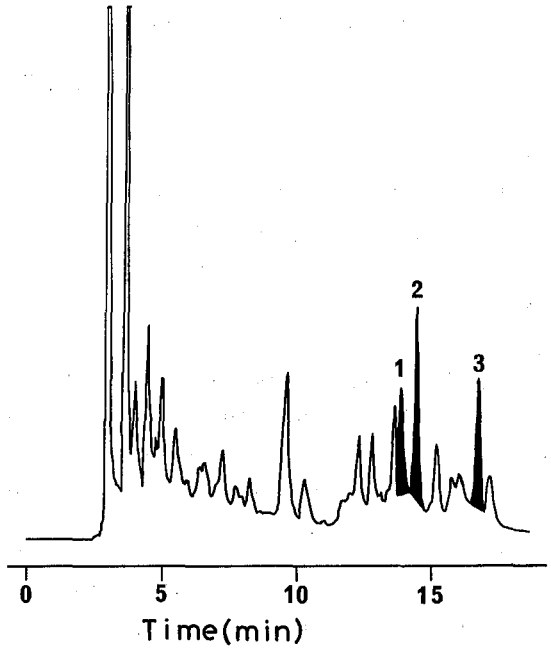


Fig. 1. Typical HPLC Chromatogram of PAHs from Rat Lungs.
Twelve weeks after the end of exposure to diesel engine exhaust.
Peaks：1, BkF ; 2,BaP ; 3,BghiP
HPLC conditions ： column, Inertsil ODS-2, 4.6mm i. d. × 25cm; mobile phase, acetonitrile, water 75,25%(V/V); flow rate, 1.3ml/min ; column oven temp., 40℃; detector, fluorescence Ex 365nm, Em 430 nm.

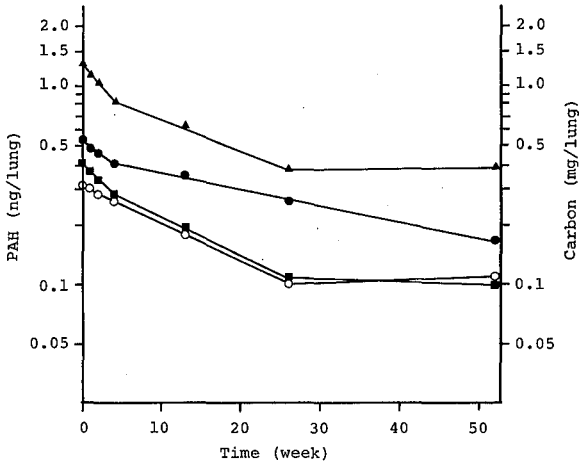


Fig. 2. Clearance of PAHs and Carbon from Rat Lungs.
○,BkF; ■,Bap; ▲,BghiP; ●,Carbon

Table 2. Correlation Matrix

	BkF	BaP	BghiP	carbon
BkF	—			
BaP	0.984	—		
BghiP	0.976	0.998	—	
carbon	0.948	0.965	0.955	—

である.

Table 2に示すように，全期間を通してPAH間の相関は極めて高かった．PAH量の相互の比率はほぼ一定しており，BkF：BaP：BghiP＝0.9：1：3.2(暴露停止後半年間の平均)であった．ディーゼルエンジン排ガス中のススの組成表(Table 1)と比較するとBghiPが相対的に多くなっていることがわかる．また，炭粉とPAHとの相関も比較的高かった(r＝0.94以上)．減少量の多い第2期までの減衰期間でみると炭粉の減少速度はいずれのPAHよりも遅く，肺内においても炭粉がPAHの保持母体となっていることを支持する結果が得られた．しかし，第3期では炭粉のみが減少しPAHはほとんど変化していない．炭粉減少に起因するPAHの減少分に相当する他の要因による増加分があることを示唆している．ラットは飼料中に含まれるPAHを摂り込み，血流を通じてわずかではあるが肺に蓄積することが考えられる．暴露停止後，時間が経過し残存するPAH量が少なくなった時には，飼料由来のPAHの量が無視できなくなった可能性がある．非暴露の老齢ラットの肺中PAH量の測定により確認することが必要と考えている．

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実施したものである．本研究の一部は第30回大気汚染学会(川崎市，1989年11月9日)で発表した．

文　献

1) 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.
2) Tong, H. Y., Sweetman, J. A., Karasek, F. W., Jellum, E. and Thorsrud, A. K., : *J. Chromatogr.*, 12, 183-202, 1984.
3) Sun, J. D., Wolff, R. K., Kanapilly, G. M. and McClellan, R. O., : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 73, 48-59, 1984.
4) 尾花裕孝，堀伸二郎，田中涼一，樫本　隆：食衛誌，25，35-40，1984.
5) 瀬戸　博，大久保智子，加納堯子：東京衛研年報，40，271-273，1989.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 229-232, 1990

マロンアルデヒドによるDNAの加橋反応の検討

大久保 智 子*, 瀬 戸 博*, 長 井 二三子**, 加 納 い つ***,
加 納 堯 子*

Examination of DNA Cross-Link Induced by Malonaldehyde

TOMOKO OHKUBO*, HIROSHI SETO*, FUMIKO NAGAI**, ITSU KANO***
and TAKAKO KANOH*

Keywords：マロンアルデヒド malonaldehyde, DNA, 架橋 cross-link

マロンアルデヒド(MA)は，過酸化脂質が分解する際に副生する2つのアルデヒド基を有する極めて化学的反応性の高い物質である．ラット及びヒトの尿中に代謝物として，MA-アミノ酸結合体[1]やMA-グアニン結合体[2]が見いだされることから，生体内においても酵素や核酸など種々の生体成分と反応し，その本来の機能を損なわせる恐れがある．MAはサルモネラ菌によるAmes試験で変異原性が認められ[3]，マウスの皮膚への塗布による発ガン性も認められている[4]．核酸に対する反応性については，当初DNAの架橋が指摘されていた[5]が，その後，グアニン塩基[6]，アデニン塩基[7]，シントン塩基[7]への共有結合性の化学的修飾が解明された．一方，架橋についてはReissらが[5]，DNA塩基のアミノ基に架橋してできる－N＝C－C＝C－N＝の構造を提出したが，その分光学的証明はいまだなされておらず，未解決の問題である．著者らの研究では，上記のアミノイミノプロペン構造はグアニン塩基とMAとの反応において1位Nと2位exoアミノ基との間で形成されるのみで，本構造による2分子塩基の結合体の形成を確認することはできなかった[8]．

最近，Basuらがプラスミド DNAを用いて，MAによる架橋の程度をMAの変異原性と関係づけて調べている[9]．そこで，彼らの方法を用い，MAによるDNAの架橋の検出実験を行った．しかし，結果的にはDNAの架橋を確認することはできなかった．以下，その詳細について報告する．

実験の部

試薬　マロンアルデヒド・ナトリウム塩(MA・Na)はMarnettとTuttleの方法[10]で，メチルマロンアルデヒド・ナトリウム塩(MeMA・Na)及びエチルマロンアルデヒド・ナトリウム塩(EtMA・Na)はKlimkoとSkoldnovの方法[11]に従って作製した．4,5',8-trimethylpsoralenはAldrich製，pBR322DNA，制限酵素EcoR I，アルカリホスファターゼ及びT4ポリヌクレオチドキナーゼは宝酒造㈱製，γ-^{32}P-ATP(111TBq／mM)はNew England Nuclear製を使用した．分子量マーカーは，㈱ニッポンジーン製のλ／Hind Ⅲ digestを使用した．

方法　環状pBR322DNAをEcoR Ⅰで切断し，直鎖状二本鎖DNA(dsDNA)を得，クロロホルム処理を行い，dsDNAを回収し，TE(10mM Tris-HCl，1 mM EDTA，pH7.4)に溶解した．

DNAの架橋の検出

MA・Na，MeMA・Na及びEtMA・Naは蒸留水に溶解し，塩酸でpH 4に調整した．4,5',8-trimethylpsoralenは蒸留水に溶解した．

反応①

EcoR Ⅰ処理直鎖状pBR322DNA 500ng，25mM Tris-HCl(pH4.25)，250nM 4,5',8-trimethylpsoralenを含む全量10μlの反応液で37℃，3時間，暗所で反応を行った．反応後，一部は365nmの光を5分間照射した．エタノール沈殿により薬物を除き，DNAを回収，乾燥し，TEに溶解した．一部は100℃で5分間加熱した後，た

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1，Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan
**東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科
***東京都立衛生研究所多摩支所

だちに氷冷し，加熱しないもの及び分子量マーカーと共に，0.7%アガロースゲルを用いて，40mM Tris，20mM 酢酸，2 mM EDTA を含む Buffer(pH8.1)で，100 V，30分間電気泳動を行った．臭化エチジウム染色(EB 染色)を行い，紫外線照射装置(312nm)上で泳動位置を確認した．

反応②

EcoR Ⅰ処理直鎖状 pBR322DNA 500ng，25mM Tris–HCl(pH4.25)，125mM MA・Na または EtMA・Na を含む全量10 μl の反応液で37℃，3，24，168時間反応を行った．エタノール沈殿以下，反応①と同様の操作を行った．

反応③

5'-末端^{32}P 標識 DNA(^{32}P-DNA)の調製

EcoR Ⅰ処理直鎖状 pBR322DNA の 5'-末端リン酸基を，アルカリホスファターゼ処理により除去し，フェノール処理後，エタノール沈殿により DNA を回収し，T 4 ポリヌクレオチドキナーゼと γ-^{32}P-ATP を用いて 5'-突出末端を^{32}P で標識した．エタノール沈殿により^{32}P-DNA を回収，乾燥し，TE に溶解した．

MA 及び MeMA と^{32}P-DNA との反応

^{32}P-DNA 6,000cpm(1 ng)，30mM Tris–HCl(pH4.25)，200mM MA・Na(蒸留水に溶かした直後のもの，または室温に 2 週間放置したもの)または500mM MeMA・Na を含む全量10 μl の反応液で37℃，1時間反応を行った．キャリアーとして dsDNA を200ng 加え，エタノール沈殿以下，反応①と同様の操作を行った．電気泳動したゲルをろ紙上に固定，乾燥し，−80℃で一晩，増感紙(コダック Lanex Regular)を用いてオートラジオグラフィーを行った．

結果及び考察

DNA の架橋の検出法の原理は，アガロース電気泳動上の移動度の差を利用して，架橋二量体 DNA と一本鎖 DNA を，EB 染色またはオートラジオグラフィーにより検出することである．まず，われわれの実験方法で DNA の架橋を起こさせ，それを検出できるかどうかを調べるため，架橋を起こすことが知られている 4,5',8-trimethylpsoralen[12]を用いて反応①を行った．図 1 に示すように，dsDNA は100℃で加熱されると，水素結合がはずれ直鎖状一本鎖 DNA(ssDNA)に変性し，加熱されなかった dsDNA(図 1．レーン 5)より泳動距離の長い ssDNA の位置に泳動される(図 1　レーン 6)．また，DNA と4,5',8-trimethylpsoralen を反応させても，反応後365nm の光を照射されなければ，架橋反応は起こらず，加熱されることにより，ssDNA の位置に泳動される(図 1　レーン 3，4)．つまり，DNA が架橋しなければ，100℃で加熱されると ssDNA の位置に泳動されるのである．しかし，DNA は 4,5',8-trimethylpsoralen と反応後，365nm の光を照射されることにより，架橋反応が起こり，100℃で加熱されても dsDNA の位置に泳動される(図 1　レーン 2)．よって，この実験方法で架橋の有無が検出できることが確認された．

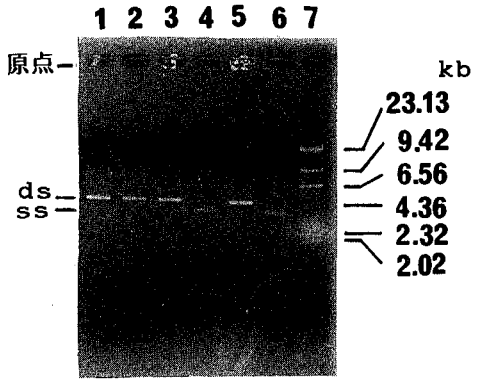


図 1．4,5',8-trimethylpsoralen と反応させた DNA のアガロースゲル電気泳動

1～6，EcoR Ⅰ処理直鎖状 pBR322DNA; 1,250nM 4,5',8-trimethylpsoralen と37℃，3 時間，暗所で反応させ，次に365nm の光を 5 分間照射し非加熱；2,1 と同様の反応，操作を行い100℃，5 分間加熱；3,1 と同様の反応を行い，光を照射せず非加熱；4,1 と同様の反応を行い，光を照射せず100℃，5 分間加熱；5,何も反応させず非加熱；6,何も反応させず100℃，5 分間加熱；7,Hind Ⅲ処理 λ DNA，分子量サイズマーカー．

ds, 一本鎖 DNA；ss, 一本鎖 DNA；kb, kilo base pair (塩基対)．

そこで，MA が DNA の架橋を起こしやすい薬物であるならば EB 染色でも十分に検出できると考え，反応②のような反応組成で DNA の架橋の有無を調べた．図 2 では反応②の24時間反応の結果を示したが，EtMA・Na または MA・Na と反応させた DNA は，加熱されることにより ssDNA と同じ位置に泳動され(図 2　レーン 3，5)，架橋を確認することはできなかった．また，反応時間を24時間以外に，3 時間，あるいは168時間にして行っても同様の結果が得られた(図は示していない)．このことから，MA による DNA の架橋は，EB 染色では確認することができないほど少量しか架橋しないか，ある

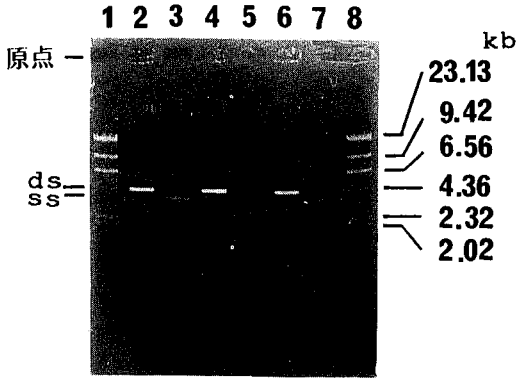


図2．MA及びEtMAと反応させたDNAのアガロースゲル電気泳動

1，8，Hind Ⅲ処理λ DNA，分子量サイズマーカー；2～7，EcoR Ⅰ処理直鎖状pBR322DNA；2,125mM EtMAと37℃，24時間反応させ非加熱；3,2と同様の反応を行い100℃，5分間加熱；4,125mM MAと37℃，24時間反応させ非加熱；5,4と同様の反応を行い100℃，5分間加熱；6,何も反応させず非加熱；7,何も反応させず100℃，5分間加熱．

ds, 二本鎖DNA；ss, 一本鎖DNA；kb kilo base pair（塩基対）．

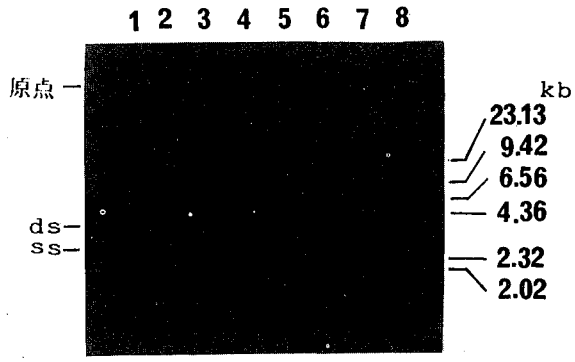


図3．MA及びMeMAと反応させた^{32}P-DNAの電気泳動のオートラジオグラム

1～8，EcoR Ⅰ処理直鎖状pBR322DNA；1,2週間室温放置した200mM MAと37℃，1時間反応させ100℃，5分間加熱；2,1と同様の反応を行い非加熱；3,溶解直後の200mM MAと37℃，1時間反応させ100℃，5分間加熱；4,3と同様の反応を行い非加熱；5,500mM MeMAと37℃，1時間反応させ100℃，5分間加熱；6,5と同様の反応を行い非加熱；7,何も反応させず100℃，5分間加熱；8,何も反応させず非加熱．

ds, 二本鎖DNA；ss, 一本鎖DNA；kb, kilo base pair（塩基対）

右横の数字は分子量サイズマーカーの位置を示す．

いは全く架橋しないかのいずれかだと考え，放射能標識DNAを用いた反応③を行うことにした．まず，dsDNAのEcoR Ⅰ切断による5'-突出末端を^{32}Pで標識してから，反応②のようにMAと反応させ，そのDNAを電気泳動し，泳動位置をオートラジオグラフィーで検出した．また，MeMAは室温に放置しても比較的安定なものだが，それに対してMAは，室温では不安定で，特に酸性下では変質しやすいので，変質したMAの方がDNAの架橋を起こし易いか否かの可能性も調べるため，蒸留水に溶かした直後のMA・Na，蒸留水に溶かしpHを4にしてから2週間室温に放置しておいたMA・Na，及びMeMA・Naを用いてDNAと反応させた．その結果は，やはり反応②と同様，3つの薬物とも100℃で加熱されることによりssDNAの位置に泳動され，架橋を確認することはできなかった(図3)．また，レーン4ではDNAが泳動されずに，原点に残ったままの状態になっているのがわかる．しかし，100℃で加熱されるとssDNAの位置に泳動される(図3　レーン3)．MAが存在することにより微量のDNAはMAの大きい凝集塊に含まれ，原点に残った可能性がある．

Basuらは，MAによるDNAの架橋は37℃の時，pH7.4では起こらないが，pHを4.2にすると薬物濃度が200mMの場合，MeMaで100%，MAで50%起こると報告している[9]．しかし，われわれはpHを4にし，37℃で1時間反応させたが，MeMA，MA共にDNAの架橋を確認することはできなかった．この相違の原因は次のように考えられる．Basuらの熱処理の条件は100℃で3分間だが，われわれは100℃で5分間行った(図3)．3分間加熱した後，泳動すると，一部はdsDNAのままの位置に泳動され，一部のみssDNAの位置に移動した(図は示していない)．100℃で加熱する場合，熱がtubeを伝わり，中の溶液を加熱するまでには，多少時間がかかるため，3分間では加熱時間が足りず，ssDNAにならずにdsDNAのまま存在し，実際には架橋していないにもかかわらず，これを架橋したDNAと見誤った可能性がある．

また，MA自身ポリマー化[8]しやすい性質があり，DNA鎖が化学結合とは関係なく絡み合う可能性もある．

あるいは，MA は前にも述べたが，非常に不安定で，保存状態が悪いとポリマー化や分解など様々な変化が起こり変質してしまうことから，何らかの原因により変質した MA を用いたため架橋反応が起きたのではないかと考えられる．

結論として，今回 *in vitro* で行った種々の反応条件下では，MA，MeMA，EtMA による DNA の架橋が起きないことが確認された．従って，これらの物質による変異原活性などが架橋に起因すると考えられてきたことについては，別の角度からの検討が必要である．

文　献

1）Hadley, M. and Draper, H. H.：*FASEB J.*, 2, 138-140, 1988

2）Hadley, M. and Draper, H. H.：*LIPIDS*, 25, 82-85, 1990

3）Mukai, F. H. and Goldstein, B. D.：*Science*, 191, 868-869, 1976

4）Shamberger, R. J., Andreone, T. L. and Willis, C. E.：*J. Natl. Cancer Inst.*, 53, 1771-1773, 1974

5）Reiss, U., Tappel, A. L. and Chio, K. S.：*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48, 921-926, 1972

6）Seto, H., Okuda, T., Takesue, T. and Ikemura, T.：*Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 56, 1799-1802, 1983

7）Nair, V., Turner, G. A. and Offerman, R. J.：*J. Am. Chem. Soc.*, 106, 3370-3371, 1984

8）Seto, H., Seto, T., Takesue, T. and Ikemura, T：*Chem. Pharm. Bull.*, 34, 5079-5085, 1986

9）Basu, A. K., Marnett, L. J. and Romano, L. J.：*Mutation Res.*, 129, 39-46, 1984

10）Marnett, L. J. and Tuttle, M. A.：*Cancer Res.*, 40, 276-282, 1980

11）Klimko, V. T. and Skoldinov, A. P.：*Zh. Obshch. Khim.*, 29, 4027-4029, 1959

12）Cech, T. R. and Pardue, M. L.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 2644-2648, 1976

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.*, 41, 233-244, 1990

セラミックスのラットによる亜急性毒性試験およびオルトフェニルフェノールの膀胱発癌に対する影響

藤井　孝*, 三栗谷久敏*, 矢野範男*, 湯澤勝廣*,
長澤明道*, 福森信隆*, 多田幸恵*, 佐々木美枝子*

Subacute Toxicity Test of Ceramics by Gavage to Rats and Influence of Ceramics on Urinary Bladder Carcinogenesis Induced by *o*-Phenylphenol

TAKASHI FUJII*, HISATOSHI MIKURIYA*, NORIO YANO*,
KATSUHIRO YUZAWA*, AKEMICHI NAGASAWA*, NOBUTAKA
FUKUMORI*, YUKIE TADA* and MIEKO SASAKI*

Summary

Powdered ceramics, mixtures of magnesium oxide, aluminium oxide and silicon oxide, were suspended in water and administered by stomach tube to rats for 13 weeks. Groups of 8 rats of each sex were given 10%, 20% or 40% suspension of test chemicals and fed a basal diet (L. M or H group). Croups of 5 male rats were given 10% or 20% suspensions of test chemicals and fed diet containing 1.3% o-phenylphenol (OPP), a urinary bladeer carcinogen in rats (L-O or M-O group). A group of 6 male rats was fed a diet containing 1.3% OPP (OPP group). The deaths of 2／8 males and 3／8 females in the H groups were considered to be chemically related. The final mean body weights were lower in L, M or H group by 8-18% in males and 1-5% in females, by 5% in the OPP group, by 12-21% in the L-O or M-O groups compared to vehicle controls. No chemical-related histopathologic changes were observed in L, M and H groups of each sex. Hyperplasia of the urinary bladder epithelium in L-O and M-O groups was oeserved at increased incidences compared to that in both vehicle control and OPP groups.

緒　言

セラミックスは従来セメント，ガラス，陶磁器などの窯業製品を指す言葉であるが，最近では，ファイン・セラミックスと呼ばれるものを一般的と思う人が多いことであろう．ファイン・セラミックスは，その特性と用途によって，IC基板，磁性体などのエレクトロセラミックス，熱機関材料などのエンジニアセラミックス，人工骨などのバイオセラミックスなど，実に多くの分野で利用されている[1]．私達のごく身近でも，遠赤外線放射や抗菌作用などを利用した衣料[2]，皮革製品がみられることから，接する機会の多い物質と思われる．また，前述したバイオセラミックスに関連した領域として，医薬品，食品などへの利用も十分に考えられる．従って，今後セラミックスが，意図的あるいは偶然にヒトと接触，または体内に摂取される機会は増加すると予想される．そこで，セラミックスの安全性を検討，評価する第一歩として，セラミックスの原材料である微粉末セラミックスの生体に及ぼす影響を，観察する実験を企画，実施した．

本実験では，セラミックスが経消化管的にヒトに摂取されることを想定し，ラットに13週間経口投与し，毒性学的に検索することとした．また，ラット尿路系に対し発癌および毒作用を現出するオルトフェニルフェノール

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

OPP[2-4]との併用投与実験を併せて行い，セラミックスがOPPの作用をどのように修飾するかを観察した．

実験材料および方法

被検物質 セラミックス(KAM-1：酸化マグネシウム MgO，酸化珪素 SiO_2と酸化アルミニウム Al_2O_3の混合物)は大阪セメント株式会社(大阪)より供給された．OPP は Dow Chemical co., NJ, USA の Dowicide 1 (Lot No. MM01040)を購入し，用いた．

実験動物および飼育環境 F 344／DuCrj ラット 雌雄を4週齢で日本チャールスリバー(神奈川)より購入した．ラットはバリアー飼育区域内の，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，ステンレス製懸垂式ケージに1ケージに3−4匹収容し，自動給水装置付きベルト式飼育棚にて飼育した．ラットの個体識別は耳パンチで行った．環境への馴化と疾病の有無を観察するためにラットは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．

投与方法および期間 セラミックスは水道水に懸濁し，体重100 g 当たり 1 ml の容量で胃ゾンデを用い，強制経口投与した．セラミックスの水懸濁液の濃度は，胃ゾンデによる投与可能な最高粘度とし，40%に設定，以下公比1／2で20および10%の3濃度とした．懸濁液の pH は濃度10%で11であった．OPP は，これまでの実験と同様に[3-5]，飼料に1.3%の重量濃度に添加し，これを摂取させた．セラミックスは日曜，祝日を除く毎日(1週間に6日)投与し，OPP は実験期間を通して自由に摂取させた．投与期間は13週とし，ラットが5週齢になった時点より，セラミックスおよびOPPの投与を開始した．投与物質，濃度および群の構成動物数は Table 1 に示した．

一般状態観察 瀕死，死亡および異常行動の有無，被毛および可視粘膜の観察さらに体重測定は，1日1回，1週間に6日行った．摂餌量(重量)は1週間に1回の測定とし，(給餌量−残餌量)／3(日)を，各ケージのラット数で除して1匹当たりの摂餌量を算定した．

血液学的検査 投与終了後の解剖時に大腿静脈より採血し，Coulter Counter Model S(Coulter Electric 社)により，赤血球数(RBC)，白血球数(WBC)，ヘモグロビン量(Hb)およびヘマトクリット値(Ht)の測定を行った．

血清生化学的検査 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)，アルカリフォスファターゼ活性(ALP)，コレステロール(CHO)，尿素窒素(UN)，総蛋白量(TP)およびアルブミン量(Alb)を測定した．

Table 1. Experimental Design

Group	NO. of rats		Chemicals	
	Male	Female	Ceramics[1)]	OPP[2)]
Control	8	8	0%	0%
L	8	8	10%	0%
M	8	8	20%	0%
H	8	8	40%	0%
OPP	6	0	0%	1.3%
L-O	5	0	10%	1.3%
M-O	5	0	20%	1.3%

1) Rats were administered each concentration of ceramics in water by gavage.
2) Rats were fed diet containing each concentration of o−phenylphenol (OPP)

病理学的検査 投与期間終了後，生存例は放血屠殺し，肉眼的検索を行った．脳，心臓，肺，胸腺，脾臓，肝臓，腎臓，副腎，精巣，前立腺，膀胱(固定後秤量)，子宮，卵巣は摘出し器官重量を測定した．この他，顎下腺，舌下腺，耳下腺，食道，胃，大小腸，膵臓を摘出した．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0.5−0.8ml 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，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．摘出した器官は10%中性緩衝ホルマリン液で固定後，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．途中死亡，瀕死屠殺例もこれに準拠して処置した．

推計学的分析 体重，摂餌量，血液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 型の順位和検定を行った．組織学的検索の結果は変化の

出現率，Fisher's exact test を用いて検定した．危険率は全て5％においた．

実験結果

途中死亡 投与期間中の死亡あるいは瀕死解剖例(以下，死亡例とする)は，H群雄が2例(4および5週：投与開始後4および5週目の意，以下同様)，雌が3例(3，6，11週)，M-O群が1例(1週)であった．H群の死亡例は，腹部が膨満し，自発運動の低下，意識呼吸の増加がみられ死に至った．剖検では，胃から盲腸にかけての消化管の拡張および管壁の菲薄化が顕著に認められた．管内には比較的無臭の気体が充塡され，これが管腔を拡張させており，内壁には白色の砂粒から小塊状になったセラミックスが付着していた．胃噴門，幽門および回盲腸移行部付近では1－8 mm の小塊状を呈する多数の被検物質の凝固塊が，これらの部位の管腔を狭窄あるいは閉塞しているのが観察された．消化管のうち前胃粘膜に少数の微小黒点が散在性にみられたが，他の部位では明らかな異常は認められなかった．組織学的には，H群では11週死亡の雌の1例を除き，前胃の粘膜上皮細胞の限局性壊死ないし糜爛と粘膜下層の浮腫および細胞浸潤とが観察された．M-O群の1例は，投与直後の死亡であり，肺にセラミックスの貯留が認められたことから，群の母数から除外した．

投与量 投与終了まで生存したラット1匹当りのセラミックス総投与量を平均体重値から算出すると，雄ではL群15.77 g，M群29.70 g，雌ではL群9.78 g，M群21.06 g，H群40.02 g，L-O群15.13 g，M-O群26.13 gであった．同じく，OPP 総投与量を，摂餌量から算出すると，OPP 群19.7 g，L-O群16.9 g，M-O群16.0 gであった．

体重変動 体重増力の推移を Fig. 1－3 に示した．実験期間を通して対照群は雌雄とも順調な増加であったが，投与群は，単独および併用群とも用量(濃度)に比例した増加抑制がみられ，この傾向は雌より雄で明らかに認められた．OPP を投与した群では，単独群の抑制が最も軽度であり，以下，L-O群，M-O群の順であった．投与開始および終了時の平均値を Table 2 に示した．投与終了時における投与群の平均体重は対照群に比べ，雌雄とも低下しており，雄のM，H群およびL-O群は有意に低かった．対照群の終了時平均値を100とすると，雄では，L群92，M群90，H群82，OPP 群95，L-O群88，M-O群79，雌では，L群99，M群98，H群95であった．このように，H群雄，L-OおよびM-O群は終了時に，対照群に比べて10％以上の体重増加抑制を示した．

摂餌量 摂餌量の平均値を奇数週のみ Table 3 に示し

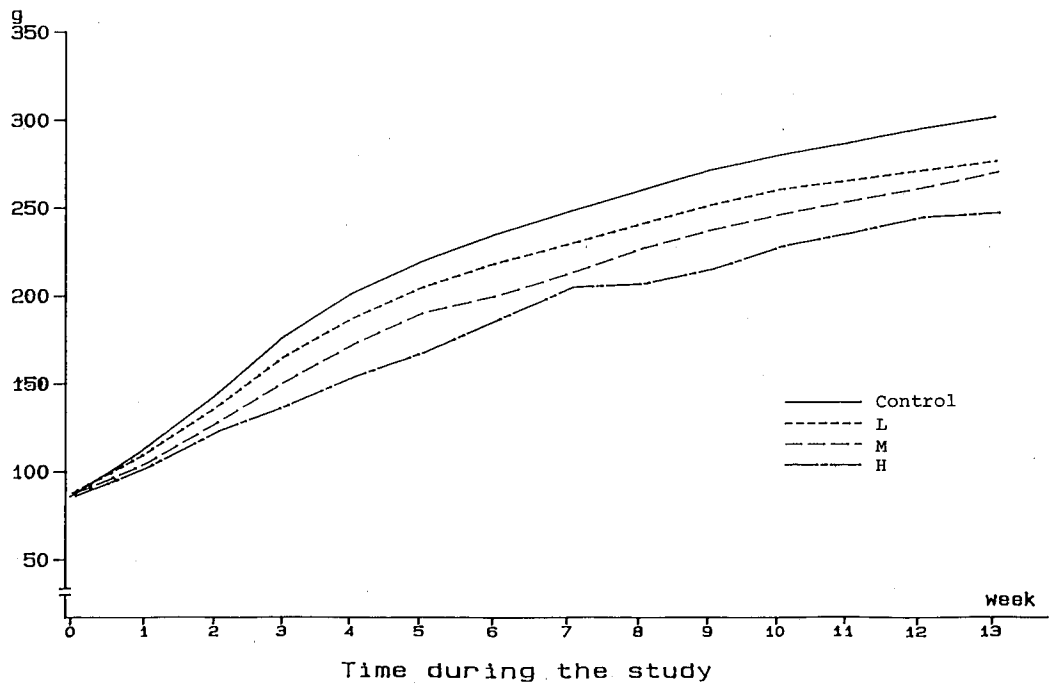


Fig 1. Body Weight Change of Male Rats Treated with Ceramics

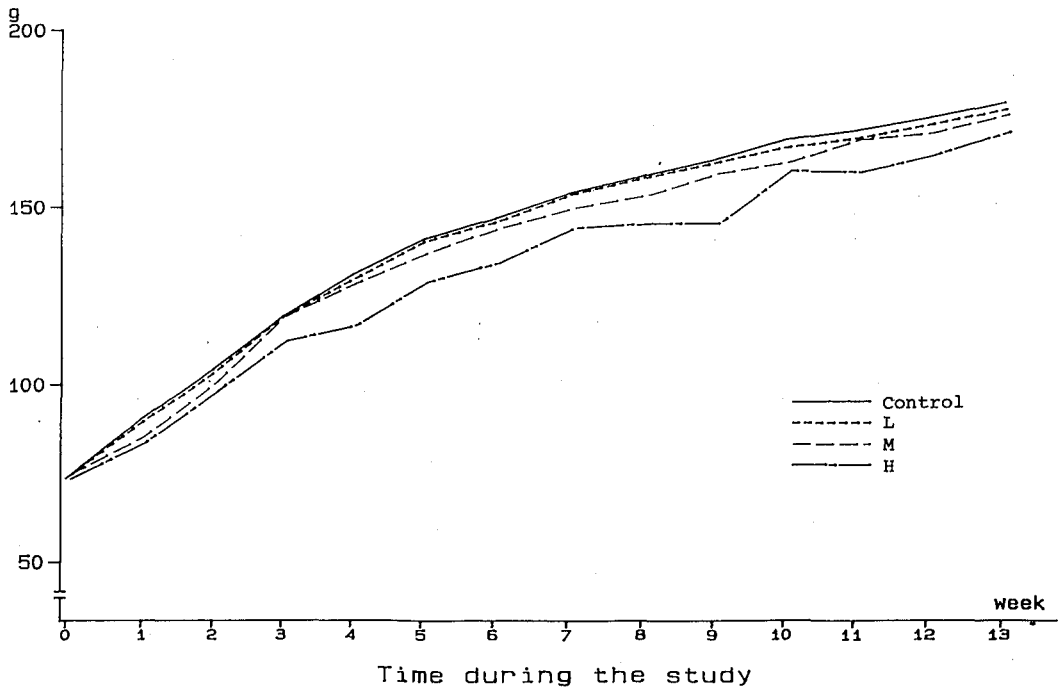


Fig 2. Body Weight Change of Female Rats Treated with Ceramics

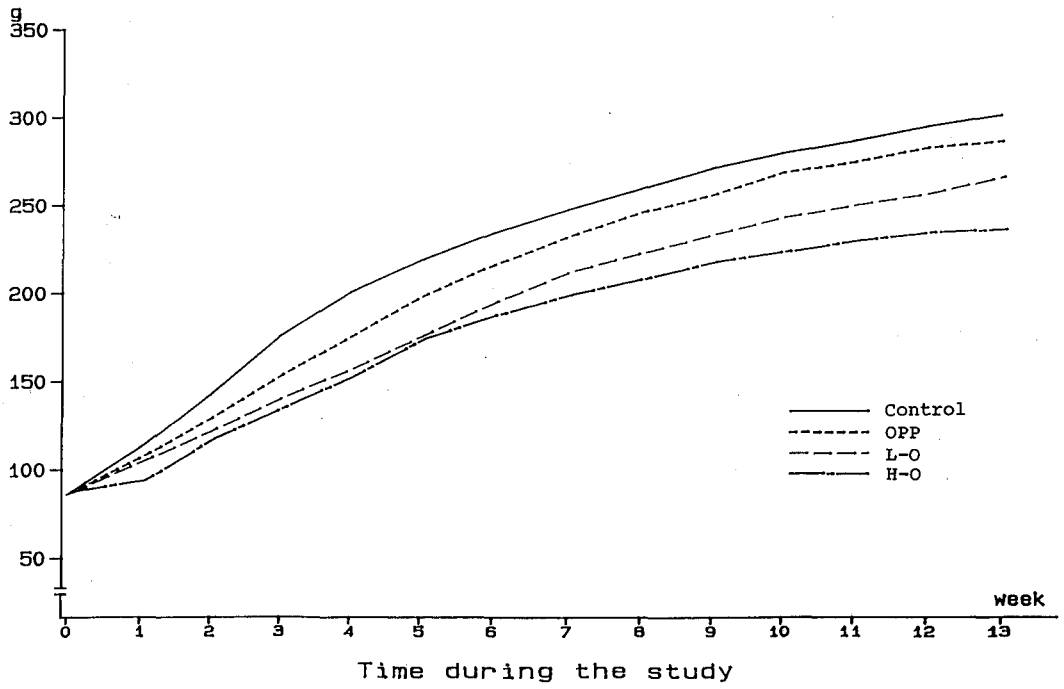


Fig 3. Body Weight Change of Male Rats Treated with Ceramics and OPP

Table 2. Body Weight Change

Group	Male		Female	
	Initial[1]	Final[2]	Initial	Final
Control	85.8±4.5(8)[3]	301.9±16.3(8)	73.5±2.1(8)	179.9±5.6(8)
L	88.0±4.1(8)	277.3±24.3(8)	73.9±2.5(8)	179.9±6.6(8)
M	87.4±2.7(8)	270.8±16.4(8)※	74.4±2.4(8)	176.5±8.1(8)
H	86.0±3.3(8)	247.5±20.3(6)※	73.3±2.5(8)	171.5±5.5(8)
OPP	86.2±3.2(6)	287.2± 8.8(6)		
L-O	86.6±2.9(6)	267.0±17.5(5)※		
M-O	87.4±3.4(6)	237.0±10.4(4)※§		

1) Mean body weight at the begining of the administration.
2) Mean body weight at the end of the administration.
3) Mean ± SD, parentheses shows the number of rats weighed.
※Significant difference from the control ($P<0.05$).
§ Significant difference from OPP group ($P<0.05$).

Table 3. Feed Intakes

Group	wk 1	wk 3	wk 5	wk 7	wk 9	wk 11	wk 13
Male							
Control	8.7 [1]	14.6	15.9	15.5	15.5	14.9	14.4
	(102.8)[2]	(102.0)	(79.0)	(65.9)	(59.3)	(53.1)	(48.6)
L	10.9	13.2	14.8	14.3	14.9	14.1	14.0
	(122.7)	(96.8)	(78.7)	(65.4)	(61.6)	(53.9)	(54.3)
M	10.2	11.9	13.9	14.5	14.7	13.7	15.4
	(116.8)	(92.3)	(80.3)	(72.0)	(64.6)	(55.4)	(58.8)
H	9.4	10.3	11.0	15.4	13.5	13.9	15.0
	(109.6)	(83.2)	(72.1)	(82.5)	(65.0)	(60.9)	(61.1)
OPP	12.1	13.7	15.2	16.5	16.9	15.4	16.9
	(140.7)	(105.4)	(86.5)	(75.9)	(68.7)	(57.0)	(59.7)
L-O	12.0	12.6	12.9	15.2	15.3	15.3	16.8
	(137.2)	(101.3)	(81.4)	(77.1)	(67.9)	(62.6)	(64.8)
M-O	8.3	11.4	13.2	15.6	14.6	15.7	15.5
	(93.4)	(96.1)	(85.6)	(82.6)	(69.8)	(69.9)	(66.0)
Female							
Control	10.1	10.7	10.5	10.4	10.6	9.8	10.2
	(135.9)	(103.0)	(79.7)	(69.9)	(66.6)	(57.9)	(57.9)
L	10.1	10.2	10.6	10.0	9.9	9.6	10.5
	(135.6)	(98.6)	(81.2)	(68.3)	(62.2)	(56.8)	(60.2)
M	8.6	9.8	9.5	10.5	9.9	10.5	11.3
	(114.8)	(97.3)	(74.2)	(73.0)	(64.7)	(64.5)	(65.7)
H	8.4	8.6	9.8	10.3	8.9	10.4	10.7
	(114.3)	(87.3)	(84.7)	(77.1)	(69.9)	(65.2)	(64.8)

1) g/rat/day, 2) g/kg body weight/day.

た．普通飼料摂取群(単独群)は，対照群に比べ，絶対重量では，投与各群の雄は1－11週目，雌は1－4週目に低い値を示し，以後はほぼ同様か高い値を維持したが，投与量に比例した増減傾向はみられなかった．体重比重量では，投与群雄が1－5週目，雌が1－3週目に低い値を示し，以後は体重増加の抑制に伴ない，投与終了時まで高い値を呈し続けた．雄では投与量に比例して増加したが，雌では明らかではなかった．OPP添加飼料摂取群(OPP群および併用群)では，OPP群が高い値を示したが，セラミックス投与量に伴う増減傾向はみられなかった．

血液学的検査 検査結果をTable 4に示した．セラミックス単独群では，雌雄とも対照群に比べ投与群の赤血球数は少なく，M群雄では有意な減少であった．また，ヘマトクリット値も投与群で低く，M群雌雄は有意な低下であった．さらに，ヘモグロビン量はH群雄を除く投与各群で少なく，MおよびH群雌は有意に減少していた．このうち，投与量に関連した変動は雌のヘモグロビン量およびヘマトクリット値の低下であった．雄ではH群を除外すると，赤血球数，ヘモグロビン量およびヘマトクリット値で同様の傾向がみられた．OPP単独および併用群は，いずれも対照群と近似した値であった．

血清生化学検査 検査結果はTable 5に示した．セラミックス単独群では投与量に比例して，雌雄のTPおよびAlb,，雌のCHOが低下し，雌雄のALPおよびUN，雌のGOTが上昇した．OPP群では対照群に比べ，GOTおよびALPが低下，CHO，TPおよびAlbが上昇し，GOTを除き有意であった．これに対し，併用群では，セラミックスの投与量に比例して，OPP群に比べGOTはさらに低下し，L-OおよびM-O群とも対照群との間に有意差を生じた．一方，CHO，TPおよびAlbは，低下して対照群の値に近づく傾向を示した．

臓器重量 重量測定の結果をTable 6および7に示した．

セラミックス単独群では投与量に比例して，雌雄の膀胱は，絶対および体重比重量ともに増加し，雄の脳，肺，肝臓，腎臓および精巣は絶対重量は減少し，体重比では増加していた．さらに，雌の胸腺および左卵巣，雄の前立腺は，絶対重量は増加，体重比では同じかあるいは減少していた．これらのうち，絶対および体重比重量ともに，対照群との間に有意差を示したのは，H群雄の腎臓と各群雌の膀胱であった．OPP群では対照群に比べ，肝臓，腎臓，精巣，前立腺および膀胱は，絶対重量および体重比重量ともに増加し，肺，心臓および脾臓は，絶対重量は増加，体重比では同じかやや増加していた．これらのうち，腎臓と膀胱は，絶対および体重比重量ともに対照群に比べ有意であった．併用群では，セラミックス投与量に比例して，OPP群よりも膀胱の絶対および

Table 4. Hematological Examination

Group	No.of rats[1)]	RBC (10^6/mm^3)	WBC (10^3/mm^3)	HGB (gm/dl)	HCT (%)
Male					
Control	8	8.83±0.4[2)]	7.2±0.7	17.5±0.3	46.3±1.5
L	8	8.69±0.2	8.2±0.7	17.3±0.5	45.7±1.1
M	8	7.96±0.3*	7.5±0.8	17.1±0.4	43.0±1.5*
H	6	8.24±0.2	8.5±0.5	17.7±1.2	44.8±0.8
OPP	6	8.86±0.2	7.9±0.5	17.5±0.3	46.5±1.0
L-O	5	8.83±0.4	8.2±0.4	17.6±0.1	46.8±2.1
M-O	4	8.68±0.2	7.9±0.9	17.1±0.1	45.3±1.0
Female					
Control	8	8.14±0.3	8.1±0.3	17.5±0.4	44.9±1.8
L	7	7.90±0.2	7.9±0.6	17.2±0.1	42.9±1.0
M	8	7.72±0.3	8.2±1.0	16.6±0.3*	42.0±1.4*
H	4	7.88±0.3	9.0±1.0	16.6±0.4*	43.1±1.5

1) No. of rats examined. 2) Mean ± SD.

* Significant difference from the control ($P<0.05$).

Table 5. Serum Biochemical Examination

Group	No. of rats[1)]	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	ALP (IU/l)	CHO (mg/dl)	UN (mg/dl)	TP (g/dl)	Alb (g/dl)
Male								
Control	8	118.6±14.5[2)]	27.6±5.7	753.0±50.4	54.0±4.2	22.0±1.0	7.09±0.15	3.33±0.05
L	8	132.5±21.7	30.0±5.5	781.5±76.7	53.5±2.4	23.4±1.9	7.04±0.14	3.25±0.09*
M	8	127.3±11.9	25.8±3.6	840.0±71.4*	51.3±3.3	24.8±0.7*	6.85±0.16*	3.23±0.07*
H	8	126.3±17.9	29.2±5.6	964.7±58.9*	53.3±2.4	25.1±1.0*	6.75±0.29*	3.22±0.12
OPP	6	102.6± 7.7	24.3±3.9	555.0±32.7*	65.3±3.2*	21.1±1.4	7.53±0.10*	3.73±0.12
L-O	5	95.2±14.3*	23.6±3.2	622.8±52.8*	58.2±2.5	22.8±2.1	7.30±0.19*	3.62±0.1[1]*
M-O	4	93.0±14.4*	24.0±2.4	580.5±55.6*	52.3±4.3	18.9±2.4*	6.95±0.13	3.50±0.08*
Female								
Control	8	115.6±14.4	21.6±6.2	617.6±39.4	84.6±2.8	23.8±1.2	7.14±0.25	3.45±0.13
L	7	123.4±18.4	24.9±5.9	653.1±70.8	75.9±4.6*	23.6±1.6	7.04±0.34	3.40±0.14
M	8	137.5± 8.6*	29.6±3.3*	766.8±64.4*	69.1±3.1*	25.9±0.9*	6.64±0.19*	3.20±0.09*
H	4	150.5±45.1	28.0±7.7	826.0±65.6*	65.5±3.7*	27.4±0.8*	6.45±0.13*	3.03±0.05*

1) No. of rats examined. 2) Mean ± SD.

* Significant difference from the control ($P<0.05$)

体重比重量は，さらに増加し，脳，肺および腎臓では絶対重量は減少し，体重比重量が高くなる傾向を強めた．また，胸腺，脾臓および前立腺は，絶対重量は減少し，体重比では同じかあるいは減少していた．これに対し，肝臓は絶対重量が減少して対照群の値に近づき，体重比重量ではほぼ同じ値を示した．

病理学的検査 投与終了時における生存例の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 8 に示す如く，雌雄の対照群および投与群の腎臓，肝臓，肺および胃に，いずれも軽度な変化が，OPP，L-OおよびM-O群の膀胱に変化が観察された．

腎臓では，皮髄境界部の尿細管に層状の石灰沈着がみられ，セラミックス単独群雌では対照群の全例に発生し，用量に比例して発生率は低下した．一方，雄では対照群で非常に軽度な変化が2例みられたのみであった．OPP群および併用群では，対照群に比べ頻発し，セラミックス投与に伴い軽度に減少した．

肝臓では，内皮細胞，線維芽細胞，類上皮細胞にリンパ球あるいは肝細胞の単細胞壊死などを包含した小巣状を呈する微小肉芽が散在している観察された．セラミックス単独群では，変化は雄に頻発し，発生率は対照群が最高で，投与群では用量に比例して低下していた．雌では対照群と投与群との間に差異はなかった．OPP群では全例に変化がみられたが，併用群では出現率が減少していた．

肺では，主として管径の大きな動脈の分岐部の壁に限局性の石灰沈着が認められ，軽度な変化としては，中膜に限局された微小な石灰沈着として観察された．投与に関連した変化の発生率および変化程度の発現態度は前述の肝臓の微小肉芽と同様であった．

この他，胃では胃底腺の軽度な腺細胞萎縮および腺腔の拡張がみられ，雄では変化の発生率，変化程度とも投与群に高く強かったが，用量－反応関係は認められなかった．OPP群は対照群とほぼ同じ頻度であり，併用群ではやや高頻度になっていた．

膀胱では移行上皮細胞の過形成がOPP群で50％(3／6)に，L-OおよびM-O群で全例に認められたが，セラミックス投与に比例した出現率の上昇は認められなかった．変化の顕著な例はL-O群で最も多く，OPP群では少なかった．

考　察

投与期間終了までに死亡したH群雌雄(濃度40％)は，セラミックス凝固塊による機械性・単純性の消化管閉塞

Table 6. Organ Weight (Male)

Group	No. of organs[1)]	Brain mg	Thymus mg	Lung mg	Heart mg	Spleen mg	Liver g
Control	8	1946±40[2)]	162±18	888±49	843±34	587±48	9.63±0.56
		(638±25)[3)]	(54±4)	(295±19)	(280±12)	(194±13)	(3.18±0.07)
L	8	1918±36	134±17*	818±63	754±63*	535±38	9.09±0.82
		(697±59)	(48±4)	(296±14)	(272± 8)	(194±10)	(3.28±0.16)
M	8	1905±39	138±25	839±35	754±35*	537±42	9.07±0.71
		(705±36)	(51±8)	(310±19)	(279±12)	(199±14)	(3.35±0.08)
H	8	1880±55	107±10*	789±58*	688±51*	450±32*	7.87±0.76*
		(763±52)*	(43±4)*	(319±12)	(278±11)	(182± 5)	(3.19±0.15)
OPP	6	1945±14	162±23	862±34	793±48*	570±27	11.33±0.48*
		(678±21)*	(56±7)	(300± 5)	(276±17)	(198± 7)	(3.95±0.15)*
L-O	5	1909±56	136± 8§	785±52*§	732±76*	512±33*§	10.27±0.90§
		(716±32)*§	(51±4)	(294±10)	(274±25)	(192±14)	(3.85±0.23)*
M-O	4	1845±48*§	121± 8*§	764±46*§	568±216	451±52*§	9.48±0.47§
		(779±22)*§	(52±5)	(323±24)	(240±91)	(191±22)	(4.00±0.11)*

Kidney (R) mg	Kidney (L) mg	Adrenal (R) mg	Adrenal (L) mg	Testis (R) mg	Testis (L) mg	Prostate mg	Bladder mg
840±54	860±42	18.4±1.5	19.5±1.8	1361±71	1400±80	235±31	82±10
(278±11)	(285± 8)	(6.2±0.7)	(9.5±0.6)	(451±19)	(464±21)	(79± 9)	(27±3)
794±77	799±63	18.5±2.6	21.3±2.4	1342±89	1388±61	20, ±47	81± 7
(286±10)	(289± 9)	(6.6±0.8)	(7.7±0.6)*	(485±21)	(503±30)	(78±12)	(29±4)
791±47	797±42	18.7±1.6	20.8±2.0	1341±59	1381±68	210±37	89±12
(292± 9)	(294± 5)	(6.9±0.8)	(7.7±1.0)*	(496±20)*	(511±27)*	(78±14)	(33±4)*
740±65*	743±59*	19.2±2.0	19.9±2.0	1279±59	1329±56	172±40*	88±10
(299±13)*	(301±10)*	(7.8±0.7)*	(8.1±1.0)*	(519±45)	(540±42)*	(69±14)	(36±3)*
950±50*	948±36*	17.7±1.2	20.1±2.1	1429±55	1445±45	240±20	105±5*
(331± 9)*	(330±12)*	(6.2±0.4)	(7.0±0.6)	(498±23)*	(503±19)*	(84± 7)	(36±2)*
838±59§	853±54§	17.6±2.2	20.9±1.9	1320±76§	1355±76§	216±26	111±17*
(314±9)*§	(320±23)*	(6.7±1.1)	(7.9±1.0)*	(495±28)*	(508±29)*	(81± 5)	(41±6)*
808±59§	827±40§	16.8±2.4	21.3±2.1	1288±89§	1357±116	163±28*§	114±38
(341±22)*	(349±9)*§	(7.1±1.0)	(9.0±1.0)*§	(543±17)*§	(572±25)*§	(69±14)	(48±14)

1) No. of organs weighed. 2) Mean ± SD (Absolute weight). 3) Mean ± SD (Relative weight : weight/100 g body weihgt). Significcant difference from the control (*), and OPP group (§) ($P<0.05$).

Table 7. Organ Weight (Female)

Group	No. of organs[1]	Brain mg	Thymus mg	Lung mg	Heart mg	Spleen mg	Liver g
Control	8	1821±53[2] (1013±25)[3]	156±11 (87±5)	658±35 (366±14)	539±23 (300± 6)	381±20 (212±12)	5.56±0.24 (3.09±0.08)
L	7	1825±32 (1027±52)	155±13 (87±8)	648±16 (365±12)	546±30 (304±21)	374±12 (210±12)	5.42±0.30 (3.04±0.11)
M	8	1807±42 (1025±47)	146± 8 (83±6)	657±29 (372±10)	530±30 (300± 9)	386±17 (219±10)	5.66±0.31 (3.21±0.04)*
H	6	1781±22 (1039±29)	142± 7 (83±5)	655±22 (382±16)	502±40 (293±19)	379±24 (221±13)	5.56±0.14 (3.24±0.04)*

Kidney (R) mg	Kidney (L) mg	Adrenal (R) mg	Adrenal (L) mg	Ovary (R) mg	Ovary (L) mg	Uterus mg	Bladder mg
548±20 (304± 8)	546±20 (303± 7)	20.8±1.7 (11.6±1.0)	23.3±2.7 (13.0±1.6)	2714±4.8 (15.2±2.6)	28.8±5.5 (16.0±2.8)	384±68 (214±42)	58±6 (32±4)
550±26 (309±15)	559±23 (314±13)	20.9±3.2 (11.7±1.7)	23.0±2.3 (12.9±1.4)	26.1±3.9 (14.7±2.2)	27.7±4.6 (15.6±2.5)	385±78 (216±42)	69±5* (39±3)*
561±35 (318±13)	577±34 (327±12)*	22.0±2.6 (12.5±1.2)	23.8±1.7 (13.5±0.8)	26.8±3.7 (15.2±2.0)	26.7±3.8 (15.1±1.8)	399±99 (226±56)	77±9* (43±4)*
563±16 (329±12)*	561±21 (328±11)*	21.8±2.4 (12.7±1.6)	24.3±2.9 (14.2±1.8)	27.6±2.8 (16.1±1.2)	23.3±7.0 (13.6±4.2)	376±22 (220±19)	77±6* (45±3)*

1) No. of organs weighed. 2) Mean ± SD (Absolute wehght). 3) Mean ± SD (Relative weight : weight/100 g body weight). * Significant difference from the control ($P < 0.05$)

Table 8. Summary of Histopathological Findings

	Male							Female			
	Control	L	M	H	OPP	L-P	M-O	Control	L	M	H
No. of rats[1]	8	8	8	6	6	5	4	8	8	8	5
Kidney											
Calcification[2]	(25%)[3]	(0%)	(0%)	(0%)	(67%)	(80%)	(50%)	(100%)	(50%)	(25%)*	(20%)*
in urinary tubules ±	2[4]	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
+	0	0	0	0	4	4	2	7	2	2	1
Liver											
Microgranuloma	(88%)	(63%)	(38%)	(33%)	(100%)	(40%)	(50%)	(38%)	(25%)	(38%)	(20%)
±	1	0	0	0	3	0	1	1	0	2	0
+	6	5	3	2	3	2	1	2	2	1	1
Lung											
Calcification	(63%)	(50%)	(38%)	(33%)	(83%)	(60%)	(40%)	(38%)	(38%)	(38%)	(0%)
in bascular wall ±	1	1	0	1	0	1	0	1	1	2	0
+	4	3	3	1	5	2	2	2	2	1	0
Stomach											
Dilatation of	(13%)	(50%)	(75%)	(33%)	(17%)	(40%)	(50%)	(13%)	(13%)	(14%)	(0%)
lumen in gastric ±	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
glands +	0	4	6	2	1	2	1	0	0	0	0
Urinary biadder											
Hyperplasia of	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(50%)	(100%)*	(100%)*	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
transitional cells ±	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
+	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
++	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0
+++	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0

1) No. of rats examined histologically 2) Severity : ± very slight change, + slight change, ++ moderate change, +++ sever change. 3) Perentheses shwos the percentage of rats with the change (no. of rnts with the change/no. of rats examined. 4) No. of rats with the severity of this change.

* Significant difference from the control ($P<0.05$)

を起こしており[6]，直接の死因は閉塞，著明なガス貯留，胸腔の圧迫により，呼吸不全を招来したことであろう．すなわち，被検物質に凝固性があったこと，懸濁液の濃度，粘度が高く，投与量も多かったことが死因になったと考えられる．また，死亡はH群雌雄の5例のみで，1例を除いて3－6週と比較的早期にみられ，その後発生していない．このことから，被検物質に蓄積性あるいは遷延性の致死効果はないと考えられる．M-O群の死亡1例は，単純な投与失敗と思われる．OPP群，併用群とも投与に関連した死亡はみられず，セラミックスとOPPとの併用によって致死効果は増強されなかった．

体重増加抑制はセラミックス単独群雌雄，とくに雄では顕著に用量－反応関係をもって現れており，セラミックス投与による影響と考えられる．OPP群でも抑制は起こったが，併用群では，用量－反応関係をもってOPP群より強く現れており，セラミックス投与が抑制効果を増強したことを示している．今回の投与はラットの成長期に当たる5－18週齢にかけて行われており，この時期の体重増加は成長の指標であることから，セラミックス投与は成長を抑制し，遅延させたと表現できよう．本施設で同一系統のラットを用いた13週間投与実験でみられた体重増加の抑制割合(対照群を100とした値)は，解熱・鎮痛薬のアセトアミノフェンでは1.25%群雄84，同雌97，2.5%群雄38，同雌47であり[7]，防かび剤のチアベンダゾールでは0.8%群雄43，同雌37，0.4%群雄80，同雌78，0.2%雄94，同雌90であった[8]．すなわち，これらの薬物と比べ，セラミックスは投与濃度が高いにも拘らず，雌雄とも体重増加抑制は軽度であり，抑制作用は弱いことが分かる．

増加抑制は摂餌量の多少と関連するが，対照群と投与各群との摂餌量に大きな差は認められず，食思不振，食物摂取量の減少に抑制の原因を求めることはできない．セラミックスの水懸濁液は，濃度10%でpHが11であったこと，凝固性があったことなどから，胃液のpHを変化させる，消化管粘膜を機械的に刺激し，粘膜表層に付着，上皮細胞と餌料とを遮断するなどの影響を与えたと推定される．これらから，セラミックスは消化・吸収の不良を惹起し，栄養状態を悪化させることによって体重増加を抑制し，成長の抑制・遅延を招来したものと推察できる．また，腸内細菌叢の代謝活性は宿主の栄養や生理状態に関係しているとの知見がある[9]．このことから，セラミックスの機械的刺激作用に加えて，抗菌作用があることを前提とすれば，投与によってラットの腸内細菌叢のインバランスが起こり，恒常性の乱れ，栄養障害などを現出させたものと考えられる．

血液検査の結果は，セラミックス単独投与群の軽度な貧血傾向を示唆しているが，用量に比例した増強傾向は明らかではなかった．また，貧血傾向のみられなかったOPP群にセラミックスを併用しても変化は顕現化されなかったこと，組織所見で，造血臓器・組織に異常はなく，血球破壊亢進像も見られなかったことから，体重増加抑制，栄養状態の悪化などが関与した二次的なものであり，非特異的な変化であると考えられる．

血清生化学検査の結果から，セラミックス単独投与群では，雌雄とも用量に伴いGOT，UN，ALPの上昇がみられたことから，肝臓および腎臓の疾患が疑われたが，組織所見で明らかな障害像はなく，基質的変化には至っていない．また，投与に関連してTP，Alb，CHOの低下が起こっており，消化吸収の不良，蛋白質の不足が推定される．すなわち，投与による栄養状態の不全が各検査値の変動要因になったと考えられる．併用群では，セラミックス単独群と異なりALPおよびGOTは低下傾向を示した．これは，OPP単独投与では，セラミックス投与とは逆に，ALPおよびGOTが低下していたことの反映と考えられる．

投与群では，雌の脳および雄の脾臓を除く各臓器重量の変化は用量の増加に比例して顕著になっていた．すなわち，これらの臓器は絶対重量では対照群に比べ低下しているが，体重比重量では上回っており，体重増加抑制の程度を越える重量低下ではない．従って，変化は体重増加抑制と同じく成長抑制または遅延に関連していると推定される．雌の胸腺および左卵巣，雄の前立腺は用量に関連した変動を示した．これらは上述の各臓器と異なり，体重増加抑制の程度を越えて低下している．しかし，この低下は軽度であること，これらの臓器重量は個体の成長に深く関連していることから，セラミックスが特異的にこれらの臓器に作用したのではなく，脳，肝などの変化と同様の要因が，やや強く働いた結果であると思われる．

膀胱重量の増加は，軽度ながらセラミックス単独投与で雌にみられており，投与に関連した変化であろう．ラット膀胱に対し腫瘍誘発作用を現すOPPは，今回も単独投与で，膀胱重量を増加させ，セラミックス併用によって，用量に比例した増加をさらに明瞭にした．このことから，セラミックスはOPPの作用を増強したと考えられる．投与終了時における生存例の病理組織学的検索では，膀胱移行上皮の過形成がセラミックス単独投与では観察されなかったが，併用群では変化程度とその発

現率は明らかにOPP単独投与を上回っていた．すなわち，セラミックスは単独では膀胱移行上皮に明らかな増殖作用を示さないが，OPPの増殖あるいは腫瘍発生作用に対して促進効果を発揮することが示唆されたと考えられる．この作用機序は不明であるが，懸濁液のpHが高いことの影響は無視できないと思われる．

この他，組織学的検索では腎臓，肝臓，肝および胃の軽度な変化が雌雄の対照群および投与群に観察された．胃を除き，変化の発生率および程度は対照群で顕著であり，投与に伴って軽減されたことから，投与に関連して発生したと考えられる．これらの変化は，いわゆるラットの「自然発生疾病あるいは障害」として，加齢に伴い高率に発生することが報告されている[10-15]．このうち，腎臓の変化はF344系の雌では9週齢で100％の発生と報告されており[14]，本実験の対照群が18週齢を越えていたことから全例に発生したと考えられる．一方，投与群での低率の発生は，体重および臓器重量変動と同様に，成長の抑制，遅延を反映したもので，投与群のラットは自然発生疾病の好発週齢に該当する成長段階，または好発要因を獲得する生理段階に達していなかったと思われる．すなわち，投与群の間には，用量に相関した成長段階のズレがあり，用量に伴う組織変化の発生率の低下も，これに起因していると推察される．雌の体重および臓器重量の増加抑制は雄に比べ軽度で，投与に関連した変動を顕著に現わさなかったが，この腎臓での変化は明瞭に投与に伴う成長段階のズレを表現していた．この他，肺および肝臓における変化も腎臓での変化と同様に成長遅延が関与したものと思われる．

本実験で用いた微粉末セラミックスが多孔質体としての特性を有することからも[16]，一種の担体，キャリアーとしての作用があるのではないかと推定される．そこで，セラミックスの安全性の検討については，今後も様々のアプローチが考えられるが，そのなかでも，他の化学物質と併用して与える実験は，キャリアーとしてのセラミックスの作用効果の有無あるいは態度を観察するうえで，興味深いものがある．

文　献

1）柳田博明：ファイン・セラミックス，講談社，14-101，1985.

2）清水　賢ほか：セラミックスの繊維工業への応用（講演会テキスト），日本繊維機械学会編，1－26，1989.

3）Hiraga, K. and Fujii, T.：*Fd Chem. Toxic.*, 22, 865-870, 1984.

4）Hiraga, K. and Fujii, T.：*Fd Cosmet. Toxicol.*, 19, 303－310, 1981.

5）Fujii, T., Nakamura, K. and Hiraga, K.：*Fd Chem. Toxic.*, 25, 359-362, 1987.

6）増田正典，細田四郎，川井啓市：腸の限局性病変をきたす疾患．胃腸病；病態栄養学双書第2巻．第一出版．293-295．1977.

7）林田志信，高橋　博，平賀興吾：東京衛研年報，29(2)，116-124．1978.

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(2)，5-15，1981.

9）光岡知足：トキシコロジーフォーラム，9(2)，3-6，1986.

10）榎本　真，赤崎兼義編：毒性病理学．ソフトサイエンス，116-117，1987.

11）Maekawa, A et al：*J. Toxic. Sci.*, 8，279-290，1983.

12）Coleman G. L. et al：*J. Gerontology*, 32(3)，258-278，1977.

13）Imai S. et al：*Exp. Anim.*, 35(4)，521-525，1986.

14）Iwata H. et al：*Exp. Anim.*, 35(3)，299-305，1986.

15）西部忠幸：奈良医誌，27，(1)，1-26，1976.

16）柳田博明：ファイン・セラミックス，講談社，106-124，1985.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 245-254, 1990

チアベンダゾールおよびオルトフェニルフェノールのラットを用いた6週間の併用毒性試験

三栗谷 久 敏*, 藤 井 孝*, 米 山 允 子*,
嶋 田 照 江**, 佐々木 美枝子*

Toxicity of Thiabendazole and *o*-Phenylphenol by Simultaneous Administration to Rats for Six Weeks

HISATOSHI MIKURIYA*, TAKASHI FUJII*,
MASAKO YONEYAMA*, TERUE SHIMADA**
and MIEKO SASAKI*

Summary

Thiabendazole (TBZ) has an 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 administration of *o*-phenylphenol (OPP), a urinary bladder carcinogen, and TBZ in rats.

Male F344/DuCrj rats were given 0 (control group), 533mg OPP (O-1 group), 800mg OPP (O-2 group), 1200mg OPP (O-3 group), 355mg TBZ (T group), 533mg OPP plus 355mg TBZ (OT-1 group), 800mg OPP plus 355mg TBZ (OT-2 group) or 1200mg OPP plus 355mg TBZ (OT-3 group) per kg body weight/day by gavage (using olive oil as vehicle) once a day, six days a week, for six weeks.

The T and OT groups suffered growth retardation throughout the study.

Levels of cholesterol, phospholipid and glutamate pyruvate transaminase in serum were significantly increased in the T and OT groups.

Degeneration and necrosis of tubular epithelium in the kidney were observed in groups OT-1, OT-2 and OT-3, and the incidence and severity of these changes both increased in a dose-dependent manner. There were increased incidences of shrinkage of lymph nodes with and/or without hemosiderosis of the spleen in the T and OT groups.

The six-week treatment of rats in any group caused no discernible changes in the urinary bladder epithelium upon examination by scanning electron microscope.

Keywords: thiabendazole, *o*-phenylphenol, gavage, F344/DuCrj rat, simultaneous administration.

緒　　言

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癌原性を有することも明らかにしてきた[1,2]. この中でOPPによる膀胱腫瘍は，発生率や病理組織学的所見はOPP-Naによるものと一致しているが，腫瘍の発生，増殖はOPP-Naより遅れる傾向があることを観察した．さらにOPP-Naによるラット膀胱発癌が，同じ防かび剤であるチアベンダゾール(TBZ)との併用によって増強されることを確認した[3-5]. 前回までの実験は，OPPまたはOPP-Naを飼料に添加して与える方法を用いたが，これは持続的な投与であり，必ずしも

*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, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan
**東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科

投与量を正確に把握できないことから，今回は強制経口で1日1回投与することによって，用量と反応の関連を観察しようと考えた．

このようなことから，本実験ではTBZとOPPをラットに短期間強制的に同時投与し，膀胱粘膜に対する影響を走査電子顕微鏡(SEM)的に，その他の影響について，血液，血清生化学的および病理組織学的に検討することとし，6週間の強制経口投与試験を行った．

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，日本薬局方オリーブ油(宮沢薬品)に懸濁し，OPPは宮沢薬品のo-hydoroxydiphenyl(Lot No. AWL8283)を同オリーブ油に溶解して用いた．投与容量は10ml／kg B. W. とした．

実験動物・飼育管理：日本チャールスリバー㈱社生育のF 344／DuCrjラット雄を4週令で購入した．ラットは室温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，前面および床面が網のステンレス製ケージに3匹ずつ収容，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：投与期間は6週間とした．ラットは1群6匹とし，Table 1．に示すように対照群(Control群，オリーブ油投与)，533mg／kg B. W. OPP投与群(O-1群)，800mg／kg B. W. OPP投与群(O-2群)，1200mg／kg B. W. OPP投与群(O-3群)，355mg／kg B. W. TBZ投与群(T群)および533，800，1200mg／kg B. W. OPPの各用量(濃度)と355mg／kg B. W. TBZの併用投与群(OT-1，OT-2およびOT-3群)の8群を設定し，合計48匹用いた．ラットが5週令になった時点から投与を開始した．投与期間中は基礎飼料(CE-2)と水道水を自由に摂取させた．なお，被検物質の用量の設定に当たっては，予備実験を行いその結果を参考にした[6]．今回設定したOPP用量のうち，800mg／kg B. W.は前報の発癌試験で，膀胱発癌が著明であった1.25% OPP添加飼料を与えたラットの平均一日摂取量に相当する[1]．

Table 1. Experimental Design

Group	No. of rats	Dose(mg/kg body weight)*	
		OPP	TBZ
Control	6	0	0
O-1	6	533	0
O-2	6	800	0
O-3	6	1200	0
T	6	0	355
OT-1	6	533	355
OT-2	6	800	355
OT-3	6	1200	355

*Rats were administered each concentration of test chemicals in olive oil by gavage.

投与は午前9：30から10：30までの間に胃ゾンデを用いて行い，動物の一般状態は投与前および午後の2回観察した．体重は毎日，摂餌量および摂水量は毎週測定した．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，3000rpmで10分間遠心，上清を分離し，Automatic Analyzer 705(日立)を用いて，アルカリフォスファターゼ活性(ALP)，総コレステロール(CHO)，グルコース(GLU)，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(GGT)，乳酸デヒドロゲナーゼ活性(LDH)，リン脂質(PL)，中性脂肪(TG)，総タンパク(TP)および尿素窒素(UN)を測定した．血液学的検査は血清生化学検査用血液と同時に約0.5mlの血液をEDTA-2K処理試験管に採取し，Coulter Counter Model S(Coulter Electric Co.)を用いて，白血球数(WBC)，赤血球数(RBC)，ヘモグロビン量(Hgb)，ヘマトクリット(Hct)，平均赤血球容積(MCV)，平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)，平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)の各項目について測定した．

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，脳，心臓，肺，胸線，肝臓，腎臓，副腎，脾臓，精巣および前立線を摘出，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．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．膀胱は注射筒を用い残留尿を除去した後，2%グルタールアルデヒド固定液(0.1Mリン酸緩衝液，pH7.4)0.3－0.5mlを注入し膨張させ内尿道口付近を結紮，摘出した．膀胱は約30分後正中線で2分し，さらに1時間同固定液で前固定した．一晩0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で洗浄後，1%オスミウム酸(0.1Mリン酸緩衝液，pH7.4)で後固定した．その後定法に従い，エタノール系列で脱水し，

酢酸イソアミル置換を経て日立 HCP-2型臨界点乾燥器で乾燥した．乾燥した試料はアルミニウム製試料台に接着し，日立E-102型イオンスパッターで白金，パラジウム蒸着を施した．観察は日立S-800型走査電子顕微鏡(SEM)を用い，加速電圧10KV にて行った．

推計学的分析：体重，摂餌量，摂水量，血清生化学的検査，血液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．組織学的検索の結果は，障害の発生率について Fisher の直接確率検定を行った．危険率は5％に置いた．

結　　果

投与期間中，OT-1群に1例(投与29日目)およびOT-3群に1例(投与2日目)死亡がみられた．投与終了まで生存したラットは対照群，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．全投与期間を通してT群およびOT群は明らかな増加抑制がみられ，T群は投与17日目，OT-1群は投与15日目，OT-2群は投与11日目，OT-3群は投与9日目以後それぞれ実験終了時まで対照群に比べ有意に小さかった．さらに，OT-1群はO-1群に比べ投与24日目，OT-2群はO-2群に比べ投与22日目，OT-3群はO-3群に比べ投与17日目から実験終了時まで有意に小さかった．O群は投与12日目前後からわずかな増加抑制がみられ，実験終了時まで続いた．実験終了時の対照群の平均体重を100とすると，O-1群 96，O-2群 92，O-3群 92，T群 75，OT-1群 75，OT-2群 72，OT-3群 71であった．

摂餌量は Table 2 に示す如く，対照群に比べ実験0週でT群およびOT群が有意に少なく，実験5週でO-3，OT-1およびOT-3群が有意に多かったほか，各群とも大差なかった．投与期間中を通しての1日平均摂餌量は，絶対値でO-3群がやや多いほか各群とも大差なく，体重比では投与群とくにO-3およびOT-3群が多かった．

摂水量は実験0週のT群を除いて投与群が対照群に比べ多く，O-2およびO-3群は実験2週以降，T群およびOT群は実験1週以降有意に多かった．さらにOT-1群はO-1群に比べ実験2週以降，OT-3群はO-3群に比べ実験1週以降，実験2，3週を除き有意に多かった．投与期間中を通しての1日平均摂水量は，絶対値，体重比とも投与群が多く，特にOT-3群で著明であった．また，O群およびOT群では OPP の用量(濃度)に伴う増加がみられた(Table 2)．

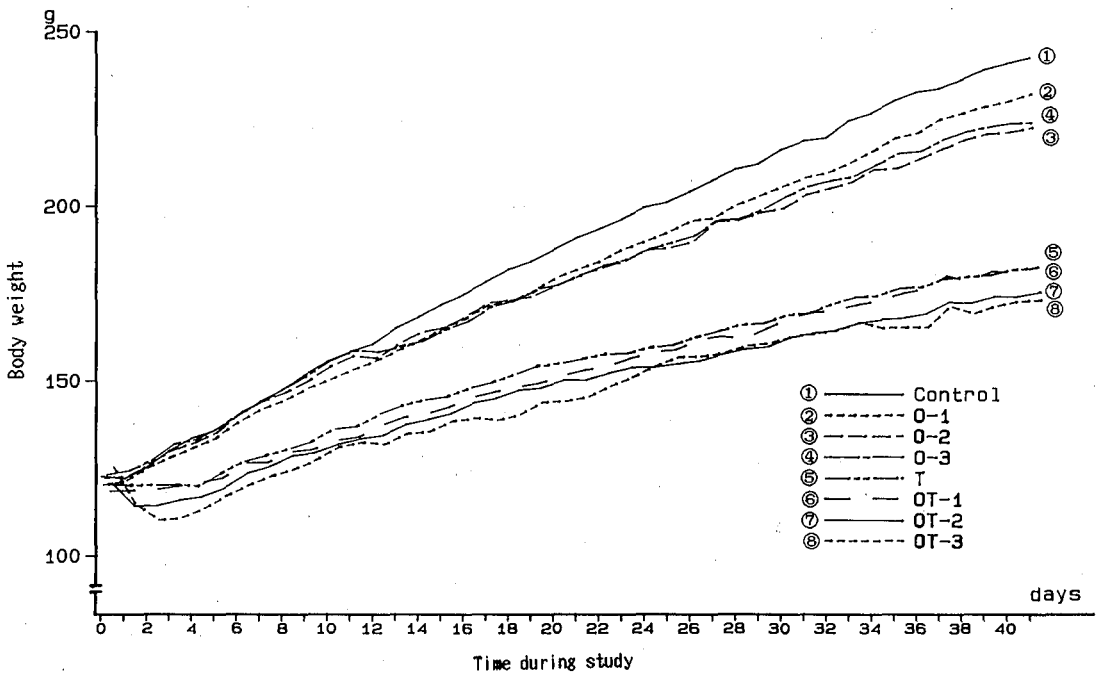


Fig. 1. Changes of Mean Body Weights

Table 2. Food and Water Consumption

Wk on study	Gr.up	Control	O-1	O-2	O-3	T	OT-1	OT-2	OT-3
0	Food	11.0±0.5(6)[1)]	10.7±0.1(6)	10.6±1.3(6)	11.8±0.7(6)	7.7±0.8(6)*	8.2±0.7(5)*	6.3±1.2(6)*	4.0±0.4(6)*
1		10.5±0.6(6)	10.0±0.1(6)	10.6±0.3(6)	11.4±0.1(6)	9.8±0.1(6)	9.3±0.5(5)	9.6±0.7(6)	10.6±0.7(5)
2		10.8±0.2(6)	11.3±0.4(6)	11.6±0.8(6)	11.9±0.1(6)	10.5±0.1(6)	10.8±0.1(5)	10.6±0.4(6)	11.1±1.2(5)
3		11.1±0.4(6)	11.0±0.9(6)	11.6±0.6(6)	12.7±0.7(6)	10.5±0.2(6)	11.3±0.3(5)	10.8±0.1(6)	11.8±0.9(5)
4		10.4±0.6(6)	11.3±1.1(6)	10.7±0.9(6)	11.7±1.3(6)	11.0±0.4(6)	12.0±0.6(4)	10.7±0.4(6)	12.1±1.4(5)
5		10.1±0.1(6)	11.9±0.8(6)	11.5±0.7(6)	13.0±0.1(6)*	11.9±0.1(6)	13.5±1.0(4)*	11.9±0.3(6)	12.4±0.6(5)*
Daliy mean consumption(g)		10.7	11.0	11.1	12.0	10.2	10.9	10.0	10.3
(g/kg B.W.)		83.1	86.9	86.9	92.9	84.4	86.1	85.2	90.6
0	Water	16.6±0.3(6)	18.1±0.2(6)	20.0±1.6(6)	19.8±0.1(6)	14.4±0.6(6)	18.0±0.1(5)	16.6±4.2(6)	19.4±4.4(6)
1		14.8±1.1(6)	17.3±0.1(6)	18.8±1.7(6)	20.0±1.1(6)	21.5±1.6(6)*	24.3±4.0(5)*#	22.9±2.4(6)*	28.4±1.6(5)*&
2		15.4±1.2(6)	18.6±1.3(6)	22.7±0.1(6)*	26.7±2.5(6)*	23.0±2.5(6)*	27.5±0.6(5)*#	27.5±2.2(6)*	29.4±1.1(5)*
3		15.3±0.6(6)	18.9±2.2(6)	24.6±0.1(6)*	27.8±2.1(6)*	26.0±0.5(6)*	27.6±5.0(5)*#	27.0±0.1(6)*	33.4±0.6(5)*
4		15.1±0.6(6)	21.1±0.1(6)*	23.6±0.5(6)*	28.0±3.8(6)*	28.0±1.0(6)*	27.4±1.2(4)*#	28.6±0.1(6)*	37.4±1.8(5)*&
5		15.4±0.8(6)	21.5±0.6(6)	25.4±0.6(6)*	29.7±2.1(6)*	28.5±1.8(6)*	ND	30.0±2.6(6)*	35.2±3.5(5)*&
Daily mean consumption(g)		15.4	19.3	22.5	25.3	23.6	25.0	25.4	30.5
(g/kg B.W.)		120.3	151.5	175.1	194.7	194.5	208.6	217.6	266.6

1) Mean ± SD (g/rat/day), and no. of rats examined in the group showed in parenthesis.

ND Not determined.

* Significantly different from control group at $p<0.05$.

\# Significantly different from O-1 group at $p<0.05$.

& Significantly different from O-3 group at $p<0.05$.

血液学的検査の結果をTable 3に示した．RBCはO-1群を除く投与群で対照群より低く，OT群でOPP用量に伴う減少が見られた．MCVは対照群に比べT群，OT-3群で有意に大きく，OT-3群はO-3群に比べても有意に大きかった．T群，OT群は軽度な貧血傾向が認められた．

血清生化学検査の結果をTable 4に示した．ALPはT群およびOT-1群を除き対照群より低く，またOT群はO群より高い傾向がみられた．CHO，PLはいずれも投与群が対照群より高く，T群およびOT群では有意に高かった．さらにOT各群はそれぞれ対応するO群(例：OT-1とO-1)より有意に高かった．GOTはO-1群を除く投与群で高かった．GPTはT群およびOT群で対照群に比べ有意に高かった．またOT-1群はO-1群に比べ，OT-2群はO-2群に比べ有意に高かった．TGはO-1群を除く投与群で対照群より低い傾向を示し，統計学的に有意差はなかったがT群およびOT群は著明に低かった．各測定項目のうち，用量に比例した変動は，いずれも軽度ながら，O群のALPの低下，GOTおよびGPTの上昇であった．これに対し，OT群ではALPが極く軽度に低下していたのみであった．さらにT群では対照群に比べ，GOT，GPTはO群と同じく上昇したが，ALPは低下せず，逆に上昇した．

臓器重量をTabile 5に示した．脳は対照群に比べ体重比重量が投与群で大きく，T群およびOT群は有意に大きかった．さらに，OT各群ではそれぞれ対応するO群より有意に大きかった．肝臓の絶対重量は対照群に比べO群で大きく，T群およびOT群は同様かやや小さかった．体重比重量は対照群に比べ各投与群いずれも有意に大きく，またOT-2群はO-2群より，OT-3群はO-3群より有意に大きかった．心臓では絶対重量は対照群に比べ投与群で小さい傾向を示し，OT-2，OT-3群は有意に小さかった．体重比重は対照群に比べT群およびOT群が有意に大きく，OT各群ではそれぞれ対応するO群に比べても有意に大きかった．腎臓は左右とも対照群に比べ，絶対重量はO群でやや大きく，T群およびOT群では逆に小さかった．体重比重量は投与群が有意に大きかった．また，OT各群では右腎臓の体重比重量がそれぞれ対応するO群に比べて有意に大きかった．脾臓は絶対重量が対照群に比べ投与群で小さく，T群およびOT群では有意に小さかった．さらにOT群ではそれぞれ対応するO群に比べて有意に小さく，OPP用量に伴う重量の減少がみられた．体重比重量は各群大差なかった．精巣では絶対重量が左右とも対照群と大差なかった．体重比重量は対照群に比べ右のT群およびOT群，左のOT-2群およびOT-3群が有意に大きく，右のOT各群はそれぞれ対応するO群に比べても有意に大きかった．前立線の絶対重量は投与群が小さい傾向を示し，T群およびOT群で著明であった．OT群ではOPP用量に伴う重量の減少が認められた．体重比重量はO群で対照群と大差なく，T群，OT群で著明に小さかった．しかし絶対重量，体重比重量とも統計学的な有意差はなかった．副腎では左右とも投与群の絶対重量は対照群と同様かやや大きく，体重比重量は対照群に比べT群およびOT群で有意に大きかった．さらにOT各群ではそれぞれ対応するO群に比べて有意に大きかった．胸線は絶対重量が対照群に比べ投与群が小さく，T群およびOT群で著明であった．O群，OT群ともOPP用量に伴う重量の減少が認められた．体重比重量はO群で対照群と大差なく，T群，OT群で著明に小さかった．しかし，絶対重量，体重比重量とも統計学的な有意差はなかった．

投与終了後の**解剖検索**では対照群，投与群とも著明な変化は認められなかった．**組織学的検索**では，Table 6に示すごとく投与に関連して腎臓および脾臓に変化が観察された．尿細管上皮の変性は，近位および遠位の細胞核の淡明化および膨化，細胞質の淡明化および小空胞形成，基底膜の肥厚・皺襞形成がみられたもので，ネフロン単位で散在性に認められた．この変化は，投与群では全例にみられ，対照群に比べ各群の発生率は有意に高かった．変化部位はO群では近位に，OT群では遠位にやや多くみられた．変化程度は用量に伴ってやや強くなり，O群に比べOT群で増強されていた．尿細管上皮細胞の壊死は，変性と同じくネフロン単位で，主に近位尿細管で限局性に起っていた．変化はO群ではみられず，T群よりもOT群で多く発生し，OPP用量の増加に伴い変化程度が増強される傾向を示した．乳頭部の間質細胞の変性あるいは壊死は，O群とOT群にみられ，いずれもOPP投与量に比例した明らかな増強傾向を示さなかった．また，O群とOT群の発生率および変化程度は，ほぼ同じであり，著明な差異は認められなかった．尿円柱は，エオジン好染，PAS陰性の小顆粒の集合体あるいはエオジン好染，PAS陽性の均質または濃淡のあるものなどが観察された．変化はO群ではO-3群の1例に発生したのみであったが，TおよびOT群は全例に出現し，対照群に比べ有意に高率の発生であった．OT群ではOPP用量に比例した増強は認められなかった．脾臓では，脾リンパ小節の縮小，ヘモジデリン沈着がTおよびOT群で観察された．OT群では，変化の発生率は

Table 3. Hematological Examination

Group	No. of rats	WBC $\times 10^3$	RBC $\times 10^6$	Hgb gm	Hct %	MCV μ^3	MCH $\mu\mu$g	MCHC %
Control	6[1)]	7.9±2.0[2)]	8.18±0.19	15.8±0.3	42.8±1.1	52±1	19.4±0.3	37.0±0.5
O-1	6	6.5±0.9	8.21±0.35	15.9±0.3	43.0±1.7	52±1	19.4±0.8	37.0±1.3
O-2	6	5.8±1.5	7.76±0.32	15.3±0.4	40.6±1.8	52±1	19.7±0.6	37.6±1.0
O-3	6	6.2±0.4	7.85±0.51	15.4±0.6	41.5±2.8	53±0	19.7±0.7	37.2±1.4
T	6	5.6±1.2	7.68±0.40	15.3±0.4	42.3±2.2	55±1*	20.0±0.6	36.3±0.9
OT-1	4	5.9±0.6	7.97±0.17	15.3±0.3	42.8±1.0	54±2	19.3±0.5	35.8±0.5
OT-2	6	4.9±0.5	7.69±0.42	15.1±0.4	41.5±1.9	54±1	19.6±0.8	36.3±1.2
OT-3	5	5.2±0.8	7.30±0.44	15.0±0.7	40.0±2.2	55±0*#	20.6±0.4	37.5±0.8

1) Number of rats examined.
2) Mean ± SD.
* Significantly different from control group at $p<0.05$.
\# Significantly different from O-3 group at $p<0.05$.

Table 4. Biochemical Examination of Serum

Group	No. of rats	ALP IU/l	CHO mg/dl	GGT IU/l	GLU mg/dl	GOT IU/l	GPT IU/l	LDH IU/l	PL mg/dl	TG mg/dl	TP g/dl	UN mg/dl	O/P
Control	6[1)]	939±191[2)]	54±11	4±0	131±23	163±41	29±6	3123±724	123±22	100±27	5.8±1.0	17.4±1.2	5.65±0.52
O-1	6	806±125	63± 8	4±1	127±15	163±27	29±4	3123±287	142±17	100±17	6.1±0.5	18.6±0.9	5.63±0.99
O-2	6	706± 45	63± 9	3±0	123± 9	171±14	32±2	3279±296	138±26	78±41	6.1±0.7	18.3±1.0	5.35±0.60
O-3	6	687±115	66±10	4±0	128±12	181±29	39±4	3028±321	145±26	73±28	6.2±0.6	18.9±1.7	4.68±0.37
T	6	1005± 81	90± 7*	4±0	125± 8	191±22	43±2*	2921±579	185±13*	30± 8	6.7±0.4	17.7±1.3	4.42±0.49
OT-1	4	969± 95	101± 8*#	5±1	120± 4	182±31	46±6*#	3110±371	202±17*#	28± 7	7.2±0.1	17.0±1.8	3.97±0.49
OT-2	6	858± 95	100± 7*$	4±1	117± 4	211±41	45±5*$	3567±683	199±14*$	30± 4	6.8±0.4	17.0±1.9	4.77±1.03
OT-3	5	876±135	112± 4*&	5±1*&	129±11	190±40	46±5*	3319±589	220±11*&	28± 7	6.9±0.9	15.9±0.9	4.12±0.69

1) Number of rats examined.
2) Mean ± SD.
* Significantly different from control group at $p<0.05$.
\# Significantly different from O-1 group at $p<0.05$.
$ Significantly different from O-2 group at $p<0.05$.
& Significantly different from O-3 guoup at $p<0.05$.

Table 5. Organ Weight

Group	No. of rats	Body weight(g)	Brain (mg)	Liver (g)	Heart (mg)	Kidney(R) (mg)	Kidney(L) (mg)	Spleen (mg)	Lung (mg)	Testis(R) (mg)	Testis(L) (mg)	Prostate (mg)	Adrenal(R) (mg)	Adrenal(L) (mg)	Thymus (mg)
Control	6[1]	243±21[2]	1899±63	9.14±1.07	769±59	825±80	841±93	505±27	904±135	1313±109	1336±111	193±52	19.2±3.0	21.1±3.2	223±20
			(793±64)[3]	(3.76±0.16)	(317±15)	(340±15)	(346±13)	(209±14)	(372±42)	(542±16)	(551±18)	(79±16)	(7.9±0.6)	(8.7±1.0)	(92± 9)
O-1	6	232±10	1886±28	10.73±0.75	745±24	898±81	917±76	489±20	912±204	1307±85	1361±76	184±23	19.0±3.6	20.3±3.3	199±32
			(821±31)	(4.63±0.14)*	(322± 6)	(388±21)*	(396±18)*	(212±13)	(393±80)	(567±15)	(588±17)	(79± 8)	(8.2±1.3)	(8.7±1.2)	(87±17)
O-2	6	221±13	1873±52	10.55±1.07	727±53	880±80	899±91	476±41	800±42	1319±78	1361±50	182±49	18.7±3.8	20.8±3.0	189±12
			(853±40)	(4.77±0.25)*	(329±18)	(398±20)*	(407±19)*	(216±11)	(363±26)	(598±26)	(618±34)	(82±18)	(8.4±1.5)	(9.5±1.4)	(86± 4)
O-3	6	224± 9	1884±48	11.36±0.68*	720±42	926±59	936±63	474±25	837±79	1312±43	1360±39	173±41	21.4±3.0	21.9±1.7	176±18
			(844±39)	(5.08±0.21)*	(322±14)	(414±12)*	(419±20)*	(212±12)	(375±31)	(587±14)	(609±16)	(77±16)	(9.6±1.2)	(9.8±0.7)	(79± 8)
T	6	177±10*	1845±29	8.57±0.49	709±42	747±43	781±49	377±26*	815±33	1300±32	1351±59	99±10	20.6±2.7	24.1±1.8	77±11*
			(1042±48)*	(4.83±0.08)*	(401±24)*	(421±15)*	(441±18)*	(213±16)	(460±13)	(735±33)*	(762±16)	(56± 6)	(11.6±1.5)*	(13.7±1.6)*	(44± 6)
OT-1	4	178± 8*#	1887±25	9.59±0.59	706±20	797±29	783±22	380±27*#	847±37	1340±44	1363±40	110±23	20.6±2.3	23.9±2.5	82± 6
			(1063±42)*#	(5.39±0.11)*	(398±17)*#	(449±11)*#	(441±14)*	(213±11)	(478±39)	(755±32)*#	(767±23)	(62±11)	(11.6±1.6)*#	(13.5±2.0)*#	(46± 4)
OT-2	6	171± 6*$	1826±21	9.12±0.37	649±26*	754±34	790±44	370±40*$	807±30	1281± 7	1315±43	99±19	20.4±1.7	22.6±0.9	70± 8*
			(1072±26)*$	(5.35±0.13)*$	(381±13)*$	(442±12)*$	(463±22)*$	(217±20)	(473±12)	(752±28)*$	(772±35)*	(58±11)	(12.0±0.9)*$	(13.3±0.6)*$	(41± 3)
OT-3	5	166± 9*&	1822±33	9.09±0.46&	652±49*	780±32	768±51&	334±30*&	834±72	1290±94	1340±73	86± 8	23.0±2.8	25.2±3.0	65± 7*
			(1097±53)*&	(5.47±0.08)*&	(391±17)*&	(470±17)*&	(462±25)*	(201± 8)	(502±41)	(775±38)*&	(807±57)*	(52± 3)	(13.8±1.3)*&	(15.1±1.4)*&	(39± 4)

1) Number of rats weighed.

2) Absolute mean weight ± SD.

3) Relative mean weight ± SD (g or mg/100g body weight).

* Significantly different from control group at $p<0.05$.

\# Significantly different from O-1 group at $p<0.05$.

$ Significantly different from O-2 group at $p<0.05$.

& Significantly different from O-3 group at $p<0.05$.

Taale 6. Summary of Histopathological Findings of Kidney and Spleen

Group		Control	O-1	O-2	O-3	T	OT-1	OT-2	OT-3
No. of rats[1)]		6	6	6	6	6	5	6	5
Degeneration of	2)	(17%)[3)]	(100%)*	(100%)*	(100%)*	(100%)*	(100%)*	(100%)*	(100%)*
tubular epithelium	±	1	2	0	0	1	1	0	0
	+	0	4	5	5	4	2	3	0
	++	0	0	1	1	1	2	3	5
Necrosis of tubular		(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(17%)	(60%)	(67%)	(100%)*
epithelium	±	0	0	0	0	1	1	0	1
	+	0	0	0	0	0	2	4	4
Degeneration and/or		(0%)	(33%)	(50%)	(50%)	(0%)	(20%)	(50%)	(40%)
necrosis of inter	±	0	2	0	1	0	0	2	1
stitial cells in	+	0	0	3	2	0	1	1	1
papilla									
Urinary casts		(0%)	(0%)	(0%)	(17%)	(100%)*	(100%)*	(100%)*	(100%)*
	±	0	0	0	0	1	1	1	0
	+	0	0	0	1	5	4	5	5
Spleen									
shrinkage of lymph		(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(67%)	(80%)	(67%)	(100%)*
nodes with/without	±	0	0	0	0	1	1	0	1
hemosiderosis	+	0	0	0	0	3	3	4	4

1) No. of rats examined histopathologically. 2) Severity : ± verx slight change, + slight change, ++ : moderate change. 3) Values in parentheses show the percentages of the sum of rats with the change (no. of rats with the change/no. of rats examined)

* Statistically different from the control ($p<0.05$).

対照群に比べOT－3群で有意に高いが，OPP用量に伴う増強は明らかではなかった．この他，肝臓の微小肉芽，肺の血管壁の石灰沈着が対照群，投与群に散見された．SEMによる膀胱粘膜の観察では，対照群の内腔面は全体的に平滑で，5－6角形の辺縁の明瞭な細胞が敷石状に配列しており，これをさらに拡大すると，細胞表面は小堤防状に突出した部分と陥没した部分が網目状に連なって小堤防状突起(microridge)を構成している像が認められた．投与群の膀胱粘膜もこれと同様の形態であり，差異はみられなかった．

考　察

TBZとOPPの同時強制投与によるラットへの影響について検討した．

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いる[7,8]．今回の実験では，OPP単独群に比べTBZ単独群は著明に増加が抑制され，さらに両者を併用すると，それぞれの単独投与よりも抑制が強められた．しかも，併用群の摂餌量は対照群，OPP単独群と大差ないことから，OPP，TBZ併用は消化・吸収の不全状態を招き，顕著な体重抑制を惹起すると考えられる．

今回，OPP単独および併用群では，OPP用量に伴う摂水量の増加がみられた．前報で述べたごとく，TBZ投与は摂水量を増加させるが[7,8]，今回の摂水量の増加はそれを上回ることから，OPPはTBZ投与による摂水量の増加をさらに亢進させ，原因としてOPP排出のためあるいは腎臓障害によるものなどが考えられる．今後は摂水量に加えて，尿量の測定をするなど，さらに検討が必要と思われる．

血液学的検査では，TBZ単独および併用群に軽度の貧血傾向がみられた．ラットへのTBZ投与は貧血傾向を生じさせることから[7,8]，併用群の貧血は主にTBZに起因するものと考えられる．また，併用群ではOPP用量に比例して，貧血傾向が強くなっており，OPPの関与も考慮すべきと思われる．さらに，組織学的にTBZ単独および併用群で脾臓にヘモジデリン沈着が認められており，血球破壊亢進などによる貧血との関連が考えられる．

血清生化学的検査において，投与群ではGOT，GPT，CHOおよびPLが上昇していた．GOT，GPTの上昇は肝障害，CHO，PLの上昇は肝機能の亢進あるいは腎障害による排泄能の低下などが示唆される[9]．また，併用群ではOPP単独群で用量に伴って変動したALP，GOT，GPTは一定傾向がみられず，TBZ単独群と近似した値を示したこと，TBZ単独群は対照群より高い値を示していることから，併用群におけるこれらの測定値の上昇または低下は，主にTBZの投与に起因するものと思われる．

臓器重量をみると，肝臓は投与群で絶対重量は対照群と大差ないかあるいは大きく，体重比重量は顕著に大きいことから，投与に関連した変動と思われる．また，これらのことは血清生化学検査でCHO，PLが上昇したことから，肝機能の亢進状態[9]を反映していると考えられる．腎臓重量は肝臓とほぼ同様の傾向を示し，腎障害との関連が疑われる．脾臓は投与群の体重比重量が対照群と大差なく，絶対重量の減少が体重の減少と連動して見られることから，主に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．しかし，TBZ単独および併用群では組織学的に萎縮を示唆する変化が見られており，TBZ，OPP併用特にTBZの直接的な作用も考慮する必要があろう．精巣および副腎では，左右とも絶対重量は各群大差なく，体重比重量は対照群と比べOPP単独群で大差なく，TBZ単独および併用群で有意に大きかった．また，右精巣と左右副腎の併用群はOPP濃度が同レベルのOPP単独群より有意に大きかった．したがって，併用群の変化はTBZによるものと思われる．前立腺および胸腺は，投与群で絶対重量が小さく，TBZ単独および併用群では著明であった．体重比重量はOPP単独群で対照群と大差なく，TBZ単独および併用群は絶対重量と同様著明に小さかった．また，絶対重量，体重比重量ともTBZ単独，併用群間で大差なかった．これらのことから，併用群の重量の減少は主にTBZの作用によるものと考えられる．

病理学的検索では投与に関連して，腎臓および脾臓に変化が認められた．腎臓の尿細管上皮の変性は，併用群でOPP単独群より顕著にみられた．さらに，変性が進行した壊死はOPP単独ではみられず，TBZ単独より併用群で著明であり，OPP用量に伴って増強された．すなわち，OPPとTBZとは尿細管上皮に対して障害作用を有し，両者を併用すると，その作用は用量に関連して増強されることが明らかにされた．乳頭部の間質細胞の壊死は，TBZ単独群ではみられず，OPP単独群とTBZ併用群との間に発生率において大差は認められない．従って，変化はOPPによるものであり，TBZ併用によって増悪されないと考えられる．腎臓の尿円柱は，OPP単独群では1例，TBZ単独群では全例に認められ，併用群ではOPP用量に伴う増強がみられないことから，変化は主にTBZによって惹起されたとすべきであろう．

脾臓の変化は，萎縮を示唆しており，OPP 単独群にみられないものの，併用群で OPP 用量に比例してやや顕著になっている．このことから，変化は主として TBZ に起因するが，OPP 併用によって増強されたことを示唆していると思われる．SEM による観察で，膀胱の粘膜上皮は，対照群，投与群とも同様の形態を示しており，これまでの膀胱の粘膜上皮の SEM による観察報告[10-12]から，今回の対照群はいわゆる正常像を呈しておたと考えられる．したがって，投与群の膀胱は SEM レベルでの観察においても，投与による影響がなかったと考えられる．

以上の如く，今回のラットを用いた実験で，OPP および TBZ 併用投与に関連した種々の変化が観察され，とくに腎障害が著明に増強されていた．しかし，膀胱は本実験条件下では変化がみられなかった．奥田[13]は OPP-Na の混餌によるラットへの投与で，膀胱粘膜の SEM による観察を行い，投与 4 週の時点で上皮細胞が大小不同になり，その表面に小絨毛状突起(short uniform microvilli)やロープ状あるいは葉状の小堤防様隆起(ropy or leafy microridges)，さらに不可逆的変化であり，腫瘍発生に至ると考えられている大小長短不整の小絨毛状突起(pleomorphic microvilli)[14]を認めている．しかし，OPP 投与の同様な観察では，軽微な変化しか見られなかったと報告している．今回，OPP と OPP-Na の膀胱発癌を増強する TBZ を併用することによって OPP による膀胱腫瘍の発生や増殖が促進されることを期待したが，6 週間投与でも上記の様な変化はみられず，TBZ 併用による影響はなかった．しかしながら，本実験では 1 日 1 回の強制投与であるため，混餌による投与との差，とりわけ代謝産物などの血中濃度あるいは尿中濃度の変動による影響が考えられ，投与方法，投与量の増加，投与期間の延長など，さらに検討する必要があると思われる．また，今後 TBZ による OPP-Na 膀胱発癌増強作用のメカニズムの解明とともに，OPP と TBZ または OPP-Na と TBZ この両者の相互作用の相違などについて検討を続けたいと考える．

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) 米山允子：未発表
7) 三栗谷久敏，林田志信，高橋　博，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，32-2，5-15，1981
8) 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
9) 谷本義文：実験動物の血液・尿生化学，48-57，1988，ソフトサオエンス社，東京
10) Arai, M., Kani, T., Sugihara, S., Matsumura, K., Miyata, Y., Shinohara, Y. and Ito, N.：*Gann*, 65, 529-540, 1974
11) Jacobs, J. B., Arai, M., Choen, S. M. and Friedell, G. H.：*Cancer Res.*, 36, 2512-2517, 1976
12) Shirai, T., Murasaki, G., Tatematsu, M., Tsuda, H., Fukushima, S. and Ito, N.：*Gann*, 68, 203-212, 1977
13) 奥田宗久：名市大医誌，37，157-186，1986
14) Jacobs, J. B., Arai, M., Choen, S. M. and Friedell, G. H.：*Cancer Res.*, 37, 2817-2821, 1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 255-264, 1990

チアベンダゾール（TBZ）のマウスおよびラットの腎臓に及ぼす影響

多田幸恵*, 米山允子*, 藤谷知子*, 佐々木美枝子*

Effects of Thiabendazole on the Kidneys of ICR Mice and F344 Rats

YUKIE TADA*, MASAKO YONEYAMA*, TOMOKO FUJITANI*
and MIEKO SASAKI*

Summary

The effects of thiabendazole (TBZ) on the Kidneys of Crj : CD-1 (ICR) mice and F344/DuCrj rats were investigated. A single dose of TBZ (800 or 1200mg/kg) in mice produced white maculae in Kidneys 1 h after administration (at either dose). Microscopic examination revealed dilation of the proximal, distal and collecting tubules with flattening and degeneration of the tubular epithelium. Further, prior administration of phenobarbital (75mg/kg, i. p., daily for three days) in the TBZ-treated mice resulted in a lower incidence of white maculae and tubular damage than in those treated with TBZ alone. On the other hand, prior administration of SKF-525A (40mg/kg, i. p.) in the TBZ-treated mice resulted in a higher incidence of white maculae and tubular damage.

These findings suggest that the TBZ-induced renal damage may be attributed to the parent compound rather than its metabolites. The concentration of TBZ in the blood was lowest in the mice pretreated with PB, and was higher in mice pretreated with SKF-525A than in those given TBZ alone. The renal damage was related to concentration of TBZ in blood. White maculae and tubular damage were not observed in the kidneys of rats treated with TBZ (500 or 1000mg/kg/day for three days), suggesting that the effects of TBZ in rats differed from those in mice.

Keywords：チアベンダゾール thiabendazole, 腎臓 kidney, Crj：CD 1 (ICR) マウス Crj：CD 1 (ICR) mouse, 酵素誘導 induction, 阻害 inhibition, F344/DuCrj ラット F344/DuCrj rat

緒　言

チアベンダゾール(TBZ)は，1961年に駆虫剤として開発された．わが国では1978年に食品添加物として認可され[1]，柑きつ類，バナナなどに防ばい剤として使用されている．

TBZ の毒性に関してはいくつかの報告があり，Robinson らは，ラットの亜急性試験で体重の増加抑制がみられ，犬の慢性試験で中程度の貧血がみられたと報告[2]，ラットの慢性試験で軽い貧血とヘモジデリン沈着症が見られたと報告している[3]．

当部では，これまで TBZ の毒性を検討し，三栗谷らはラットの13週間試験で[4]，林田らはラットの104週間試験で[5]，体重の増加抑制及び軽い貧血がみられたと報告している．藤井らはラットの OPP-Na による膀胱発ガンが TBZ により増強されたと報告[6]，小縣らはマウスで催奇形作用が認められたと報告している[7]．当部で催奇形試験を行った際，母体の腎臓に肉眼的観察で帯白色を呈する部分(白斑)を認めた．しかし腎臓に対する TBZ の影響を報告した文献は見あたらなかった．そこで我々はマウスを用いて1，3，5および7日間の投与試験を行い，腎臓の機能および組織の経時的な変化を報告した[8]．TBZ の250および500mg/kg/day の投与によ

*東京都立衛生研究所毒性部　169　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of public Health
24－1，Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

り，尿量の増加，尿中への高分子蛋白の出現，体重100gあたりの腎臓重量の増加傾向が認められた[8]．病理学的には，肉眼的観察で腎臓に白斑がみられ，光学顕微鏡による観察で尿細管上皮細胞の変性，尿細管の拡張，尿細管上皮細胞の好酸性低下，間質への細胞浸潤，間質の線維増生が経時的にみられ，電子顕微鏡による観察で糸球体上皮細胞足突起の融合，遠位尿細管管腔への多数のミエリン体出現が認められた[8]．

今回は，マウスにTBZを高用量投与し腎臓の初期変化を病理学的に検索，前処置として薬物代謝酵素を誘導あるいは阻害した後，TBZを投与し腎臓の病理学的変化を検索，ラットにTBZを3日間投与し腎臓の病理学的変化を検索した．

実験方法

実験動物および飼育環境：日本チャールスリバー㈱生育のCrj：CD 1 (ICR)マウスの雄およびF 344／DuCrjラットの雌雄を4週齢で購入，1週間馴化飼育後，実験に用いた．馴化飼育および実験期間中，マウスはチップを敷いたプラスチックケージに3ないし5匹ずつ収容，ラットは前・底面が金網のステンレスケージに5匹ずつ収容し，室温25±1℃，湿度50−60%，照明12時間，換気回数毎時10回の飼育室にて，固形飼料CE-2(日本クレア)と細菌ろ過器を経由した水道水を自由に摂取させ飼育した．

投与および病理学的検索：

1．高用量のTBZを投与したマウスの腎臓における病理学的検索

Merck Sharp and Dohme International社製Thiabendazole microfine(lot no. BZA-539，純度98.5%)をオリーブ油(日本薬局法)に懸濁させ，10ml／kgの液量で800(L群)および1200mg／kg(H群)を胃ゾンデを用いマウスに経口投与した．対照群にはオリーブ油を与えた．投与後1，6および24時間後に断頭屠殺し，肉眼的観察後腎臓を摘出し，器官重量を測定した後，10%中性緩衝ホルマリンに固定した．定法に従いパラフィン包理し，薄切後，ヘマトキシリン・エオジン染色(H＆E染色)した．必要に応じPAS染色，Azan−Mallory染色および凍結切片によるオイル赤O染色を行った．

2．薬物代謝酵素を誘導あるいは阻害したマウスの腎臓における病理学的検索およびTBZの血中濃度の測定

薬物代謝酵素誘導剤であるフェノバルビタールナトリウム(PB：和光純薬工業，lot no. KWL7006)を滅菌済生理食塩水に溶解し，75mg／kgを1日1回，3日間，マウスに腹腔内投与した．PBの最終投与後24時間後に，オリーブ油に懸濁させたTBZを10ml／kgの液量で，0(PB-対照群)，500(PB-L群)および1200mg／kg(PB-H群)，経口投与した．薬物代謝酵素阻害剤である2-diethylaminoethyl-2，2-diphenylvalerate hydrochloride(SKF-525 A：Smith Kline & French(Philadelphia, PA, USA)より贈与)を滅菌済生理食塩水に溶解し，40mg／kgをマウスに腹腔内投与した．SKF-525 Aの投与後1時間後にTBZを10ml／kgの液量で，0(SKF-対照群)，500(SKF-L群)および1200mg／kg(SKF-H群)，経口投与した．陽性対照として，PBあるいはSKF-525 Aによる前処置をせずに，TBZを0(対照群)，500(L群)および1200mg／kg(H群)経口投与した．TBZあるいはオリーブ油投与後24時間後に，実験1と同様腎臓を摘出し病理学的に検索した．

組織学的検索と併せて，TBZの血中濃度の測定を行った．TBZ投与後1，3，5および24時間後に動物を断頭屠殺し，ヘパリン処理した試験管に血液を採取した．血液をメタノール(関東化学：高速液体クロマト用)と1：1で混和した後3000r. p. m., 15分間遠心分離し，上清を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析した．HPLCは，逆相カラム，ケムコソルブ5-ODS-H，内径4 mm×長さ300mm(ケムコ㈱，大阪)に，移動相，25mM酢酸ナトリウム緩衝液pH5.5・メタノール7：4を0.6ml／minで流し，UV310nmで測定した．血中濃度は，標準物質と血液サンプルのクロマトグラムの面積比から算出した．標準物質には，2-(4-thiazolyl)-1H-benzimidazole(和光純薬：食品添加物試験用)を用いた．

3．ラットの腎臓における病理学的検索

オリーブ油に懸濁させたTBZを，雌雄のラットに10ml／kgの液量で，0(対照群)，500(L群)および1000mg／kg(H群)を1日1回，3日間，経口投与した．最終投与後24時間後に実験1と同様腎臓を摘出し病理学的に検索した．

4．実験1，2，3の統計解析はScheffeの多重比較検定[9]を行った．

結　果

1．TBZの高用量投与によるマウスの腎臓における初期変化

腎臓の絶対重量および体重100gあたりの相対重量をTable 1に示した．L群およびH群に，投与後1，6および24時間後(以下投与後を略す)に相対重量の減少傾向がみられたが，有意差は認められなかった．

主な肉眼的および組織学的検索結果をTable 2に示した．肉眼的検索では，L群に1時間後に1例，H群に

Table 1. Effects of TBZ on the Kidney Weights in ICR Mice

Dose of TBZ (mg/kg body weight)	Hours after TBZ 1	6	24
	Absolute weight(g)		
0	0.58±0.07	0.50±0.03	0.51±0.05
800	0.56±0.03	0.49±0.03	ND
1200	0.52±0.03	0.48±0.03	0.50±0.04
	Relative weight(g /100 g body weight)		
0	1.87±0.22	1.65±0.09	1.78±0.18
800	1.81±0.10	1.63±0.15	ND
1200	1.65±0.06	1.53±0.08	1.68±0.17

Values are means ± SD for groups of five mice. ND : not determined

Table 2. Effects of TBZ on Gross and Histological Findings in the Kidneys of ICR Mice

Hours after TBZ	1			6			24	
Dose(mg/kg body weight)	0	800	1200	0	800	1200	0	1200
No. of mice	5	5	5	5	5	5	5	5
Observation								
Gross findings								
White maculae	0[1)]	1	1	0	0	1	0	2
Histological findings								
Dilation of lumen :								
of proximal tubules	0	3	3	0	1	2	1	3
of distal tubules	0	5	3	0	1	2	0	2
Dilation :								
of proximal tubules	0	1	0	0	0	0	0	1
of distal tubules	0	2	0	0	0	1	0	2
of collecting tubules	0	5	4	0	1	2	0	2
Degenerative desquamation :								
in proximal tubule	0	4	4	0	2	4	1	5
in distal tubule	0	1	3	1	0	2	0	3
in collecting tubule	0	1	5	0	0	2	0	3

1) Number of mice affected after treatment

1時間後に1例，6時間後に1例，24時間後に2例，けし粒大ないし腎臓の1／4を占める大きさの帯白色を呈する部分(白斑)が見られた．対照群には白斑はみられなかった．組織学的検索では，肉眼的検索で白斑の見られた腎臓の近位尿細管および遠位尿細管に，尿細管上皮細胞の偏平化により内腔の拡張がみられ，近位尿細管，遠位尿細管および集合管に拡張がみられた．拡張した尿細管および集合管は，腎臓の被膜側を底辺とするクサビ型にみられ，周囲の変化のみられない組織との境界は明瞭であった(Fig. 2-A)．尿細管の拡張がクサビ型にみられた部位では，糸球体の毛細血管中の赤血球の数が少なく，皮髄境界部にうっ血が認められる事が多かった．上記の尿細管の拡張に加え，L群およびH群に投与後1時間後よりボウマン嚢の立方上皮細胞，近位および遠位尿細管の上皮細胞の変性剝離がみられた(Fig. 2-B)．剝離した細胞残渣はエオジン淡染の円形を呈していた．へ

Table 3. Effects of Pretreatment with Phenobarbital (PB) or SKF-525A on the Kidney Weights of ICR Mice treated with TBZ

Dose of TBZ (mg/kg body weight)	Treatment		
	TBZ	PB + TBZ	SKF-525A + TBZ
		Absolute weight(g)	
0	0.51±0.05	0.47±0.03(4)	0.48±0.03
500	0.50±0.03	0.47±0.02	0.46±0.04(6)
1200	0.51±0.07	0.49±0.04(4)	0.64±0.11(6)
		Relative weight(g/100g body weight)	
0	1.78±0.18	1.60±0.09(4)	1.61±0.07
500	1.70±0.07	1.66±0.06	1.61±0.11(6)
1200	1.82±0.21	1.69±0.07(4)	2.27±0.48(6)

Values are means ± SD for groups of five mice, except where other numbers are indicated in brackets.

ンレおよび遠位尿細管など下部の尿細管の内腔にも同様の残渣が認められた(Fig. 2-C). 尿細管上皮細胞の変性剝離は, L群よりもH群に顕著で, 6時間後および24時間後も同程度にみられた. 尿細管の拡張がみられない腎臓においても, ボウマン嚢および尿細管の上皮細胞の変性剝離は認められた. 尿細管上皮細胞の壊死および糸球体の顕著な変化はみられなかった.

L群に1時間後に1例, H群に1時間後に2例, 6時間後に1例, 24時間後に2例, 近位尿細管の上皮細胞の腫大および細胞数の軽度な増加が広汎に認められた. これらの尿細管は, 細胞の腫大のため管腔がみられず, PAS染色では刷子縁が基底部に向かって不規則に深く陥凹した像が観察された(Fig. 3.). これらの変化は対照群にはみられなかった.

2. 薬物代謝酵素を誘導あるいは阻害したマウスの腎臓における病理学的変化およびTBZの血中濃度

腎臓の絶対重量および体重100gあたりの相対重量をTable 3に示した. 絶対重量, 相対重量とも, 対照群, PB対照群, SKF対照群との比較において, TBZ投与による有意差はみられなかった. また陽性対照群との比較において, SKF-H群に絶対重量および相対重量の増加がみられたが有意差はなく, PBあるいはSKF前処置による有意差は認められなかった.

主な肉眼的および組織学的検索結果をTable 4に示した. 肉眼的検索で, H群に5例中2例, SKF-L群に6例中2例, SKF-H群に6例中1例, 白斑が認められた. 対照群, L群, PB対照群, PB-L群, PB-H群, SKF対照群には白斑はみられなかった. またSKF-H群に6例中4例, 腎臓がやや腫大し表面は平滑で帯白色を呈し, 割面の皮質は帯白色, 髄質が暗赤色を呈する変化が認められた.

組織学的検索で, SKF-H群に6例中4例, 皮髄境界部の毛細管網に強いうっ血が認められた. H群に5例中3例, PB-L群に5例中1例, SKF-L群に6例中3例, SKF-H群に6例中4例, 尿細管および集合管の拡張がみられた. 対照群, L群, PB対照群, PB-H群, SKF対照群にはみられなかった. 肉眼的検索で白斑のみられた腎臓には, これらの尿細管の拡張が実験1と同様, 被膜面を底辺とするクサビ状に認められた. SKF-H群6例中4例の皮質が帯白色, 髄質が暗赤色を呈した腎臓には, 近位および遠位尿細管の内腔拡張および上皮細胞の偏平化が広汎に認められた. 尿細管の拡張は軽度であった.

L群に5例中1例, H群に5例中2例, SKF対照群に5例中1例, SKF-L群に6例中5例, SKF-H群に6例中5例, 近位尿細管上皮細胞の変性剝離がみられた. SKF-H群に6例中4例, 遠位尿細管上皮細胞の変性剝離が顕著に認められた(Fig. 4-A). この変化は対照群, PB対照群, PB-L群, PB-H群にはみられなかった. SKF-H群に6例中4例近位尿細管の壊死が散見された(Fig. 4-B).

TBZの血中濃度：TBZ投与後1, 3, 5および24時間後のTBZの血中濃度をFig. 1に示した. 500mg/kg投与群では, L群と比較し, 1, 3および5時間後に, PB-L群でTBZの血中濃度が低く, SKF-L群でTBZの血中濃度が高かった. 特に1時間後のPB-L群は有意に低かった.

1200mg/kg投与群では, H群と比較し, 1および3

Table 4. Effects of Pretreatment with Phenobarbital (PB) or SKF-525A on Gross and Histological Findings in the Kidneys of ICR Mice treated with TBZ

Treatment	TBZ			PB + TBZ			SKF-525A + TBZ		
Dose(mg/kg body weight)	0	500	1200	0	500	1200	0	500	1200
No. of mice	5	5	5	4	5	4	5	6	6
Observation									
Gross findings									
White maculae	0[1)]	0	2	0	0	0	0	2	1
Dark red lesion in medulla	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Histological findings									
Congestion in medulla	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Dilation of lumen :									
of proximal tubules	0	0	3	0	2	0	0	4	4
of distal tubules	0	0	3	0	0	0	0	3	4
Dilation :									
of proximal tubules	0	0	3	0	1	0	0	2	4
of distal tubules	0	0	3	0	0	0	0	3	4
of collecting tubules	0	0	3	0	0	0	0	2	4
Degenerative desquamation :									
in proximal tubule	0	1	2	0	0	0	1	5	5
in distal tubule	0	0	2	0	0	0	0	1	4
in collecting tubule	0	1	1	0	0	0	0	0	4
Necrosis of proximal tubules	0	0	0	0	0	0	0	0	4

1) Number of mice affected after treatment

時間後に，PB-H群およびSKF-H群でTBZの血中濃度が低く，5時間後にPB-H群の血中濃度が低く，SKF-H群の血中濃度が高かった．24時間後には，SKF-L群およびSKF-H群で少量のTBZが検出されたが，L群およびH群，PB-L群およびPB-H群ではTBZが検出されなかった．

3．TBZを3日間投与したラットの腎臓における病理学的変化

試験期間中にH群雄に11例中7例の死亡が見られた．対照群およびL群の雌雄には死亡がみられなかった．

腎臓の絶対重量および体重100gあたりの相対重量をTable 5に示した．L群の雄および雌，H群の雄に相対重量の有意な増加がみられた．

肉眼的検索では，対照群と比較し変化がみられなかった．マウスの投与群にみられた白斑が，ラットには観察されなかった．

組織学的検索で，L群の雄に11例中3例，L群の雌に10例中5例，H群の雄の生存例4例全例に，近位尿細管上皮細胞の空胞化が見られた．H＆E標本でみられた空胞は大小種々の大きさで，PAS染色，アザン染色，凍結切片によるオイル赤O染色で染色されなかった．対照群にはこれらの空胞がみられなかった．TBZでマウスにみられた尿細管上皮細胞の変性剝離，尿細管および集合管の拡張および近位尿細管の上皮細胞の腫大は，ラットにはみられなかった．

考　察

TBZの投与により腎臓に認められた白斑は，近位および遠位尿細管の内腔の拡張，近位および遠位尿細管と集合管の拡張，尿細管上皮細胞の変性を主な変化とする境界明瞭なクサビ形の変性巣であった．尿細管の拡張と尿細管上皮細胞の変性剝離は同時に認められた例が多かったが，尿細管の拡張がみられない個体において，尿細管上皮細胞の変性剝離がみられた例もあり，尿細管上皮細胞の変性剝離は，尿細管の拡張に先駆けて発現したものと考えられた．遠位尿細管の拡張は，近位尿細管上皮細胞の剝離した細胞残渣が，末梢の尿細管で閉塞を起こしたことによるものと考えられる．またTBZの500mg/kgの1日間投与で尿量の増加した[8)]ことを考慮す

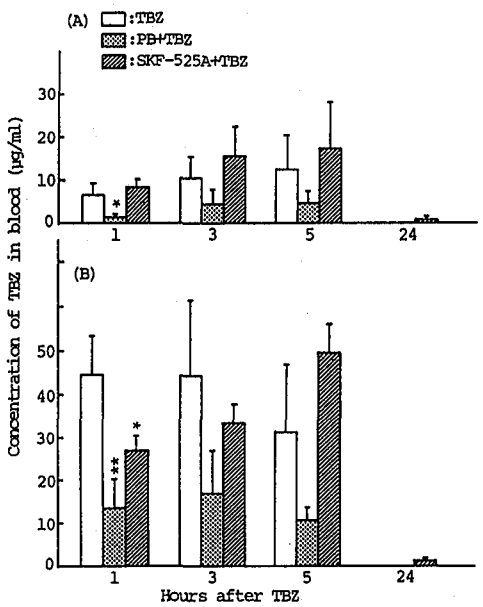


Fig. 1. Effects of TBZ and/or Phenobarbital (PB) or SKF-525A treatment on concentration of TBZ in blood. (A): Mice were given 500mg TBZ/kg body weight, (B): Mice were given 1200mg TBZ/kg body weight, Values are means ± SD and those marked with asterisks differ significantly (Scheffe's test) from the corresponding TBZ-treated group value (*p<0.05, **p<0.01). TBZ was not detected in blood of TBZ-treated mice and PB + TBZ-treated mice at 24h after dose.

ると，近位尿細管上皮細胞の変性により再吸収能が低下し，遠位尿細管に多量の原尿が流入したことも拡張の一因と考えられる．

小縣らは，TBZ の催奇形性に及ぼす PB あるいは SKF-525A の影響を検索し，SKF-525A 前処置が吸収胎児の発現率を上昇させ，骨格癒合奇形の胎児数および四肢減形成奇形児を増加させる傾向があると報告している[10]．今回の実験においても，薬物代謝酵素活性を誘導した PB-L 群および PB-H 群に，腎臓の白斑および尿細管の障害の発現が少なく，薬物代謝酵素活性を阻害した SKF-L 群および SKF-H 群に，腎臓の白斑および尿細管の障害の発現が多かった．特に SKF-H 群 6 例中 4 例に，皮髄境界部の毛細管網で強いうっ血がみられ，近位および遠位尿細管の内腔の拡張，近位および遠位尿細管上皮細胞の変性剝離が，広汎に顕著に認められた．TBZ による腎臓の障害は，PB 前処置により抑制され，SKF-525A 前処置により増強されたと考えられる．この結果は，TBZ による腎臓の障害が，TBZ の代謝物によるよりも TBZ 自体により引き起こされたことを示唆していると思われる．

米山らは，催奇形性発現が TBZ の生体への吸収量および胎盤通過量に関係すると報告している[11]．今回の実験においても，TBZ の血中濃度は，TBZ 単独投与群と比較し PB 前処置群が低く，SKF 前処置群が高い傾向を示した．1200mg/kg 投与群では，1 および 3 時間後に，TBZ の血中濃度が，TBZ 単独投与群で SKF 前処置群より高い値を示したが，TBZ 単独投与群では投与後

Table 5. Effects of TBZ on the Kidney Weights in F344 Rats given Daily Doses by Gavage for Three Days

Dose of TBZ (mg/kg body weight)	Male	Female
	Absolute weight(g)	
0	0.88±0.04	0.73±0.03(4)
500	0.86±0.04	0.71±0.04
1000	0.85±0.02(4)	ND
	Relative weight(g/100 g body weight)	
0	0.89±0.03	0.93±0.01(4)
500	0.99±0.07*	1.03±0.05**
1000	1.13±0.04(4)**	ND

Values are means ± SD for groups of five mice, except where other numbers are indicated in brackets. Those marked with asterisks differ significantly (Scheffe's test) from the corresponding control value (*p<0.05; **p<0.01). ND: not determined

1時間後をピークとして，その後血中濃度が低下しているのに対し，SKF 前処置群では，TBZ 投与後5時間後まで血中濃度が増加しており，5時間後以降の血中でのTBZ の滞留時間が TBZ 単独投与群と比較し長いものと予想される．組織学的検索では，PB 前処置群で腎臓の障害の発現率が低く，SKF 前処置群で腎臓の障害の発現率が高かった．投与後5時間後以降の TBZ の血中濃度の動向と，腎臓中の TBZ 濃度の動向を今後検討する必要があるが，TBZ による腎臓の障害は，血中および腎臓中の TBZ 濃度と関連があるものと考えられる．

ラットでは1000mg／kg 投与群に11例中7例の死亡が認められ，マウスの腎臓にみられた白斑および尿細管の変性はみられなかった．ラットの腎臓における TBZ の作用とマウスの腎臓における TBZ の作用の相違については，今後の検討を要すると思われる．

文　献

1）石館守三：食品添加物公定解説書，第4版，B-625-628，1979，広川書店，東京

2）Robinson, H. J., Stoerk, H. C. and Graessle, O. E.：*Toxic. Appl. Pharmac.*, 7, 53-63, 1965

3）Robinson, H. J., Phares, H. F. and Graessle, O. E.：*Ecotoxic. Envir. Saf.*, 1, 471-476, 1978

4）三栗谷久敏，林田志信，高橋　博，井口重孝，平賀興吾：東京衛研年報，32-(2)，5-15，1981

5）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

6）Fujii, T., Mikuriya, H., Kamiya, N. and Hiraga, K.：*Fd. Chem. Toxic.* 24, 207-211, 1986

7）Ogata, A., Ando, H., Kubo, Y. and Hiraga, K.：*Fd. Chem. Toxic.* 22, 509-519, 1984

8）Tada, Y., Yoneyama, M., Kabashima, J., Fujitani, T. and Nakano, M.：*Fd. Chem. Toxic.* 27, 307-315, 1989

9）Shayne, C. G. and Carrol, S. W.：*Principles and Methods of Toxicology*, 273-320, 1982, Raven Press, New York

10）Ogata, A., Yoneyama, M. and Sasaki, M.：*Fd. Chem. Toxic.* 25, 119-124, 1987

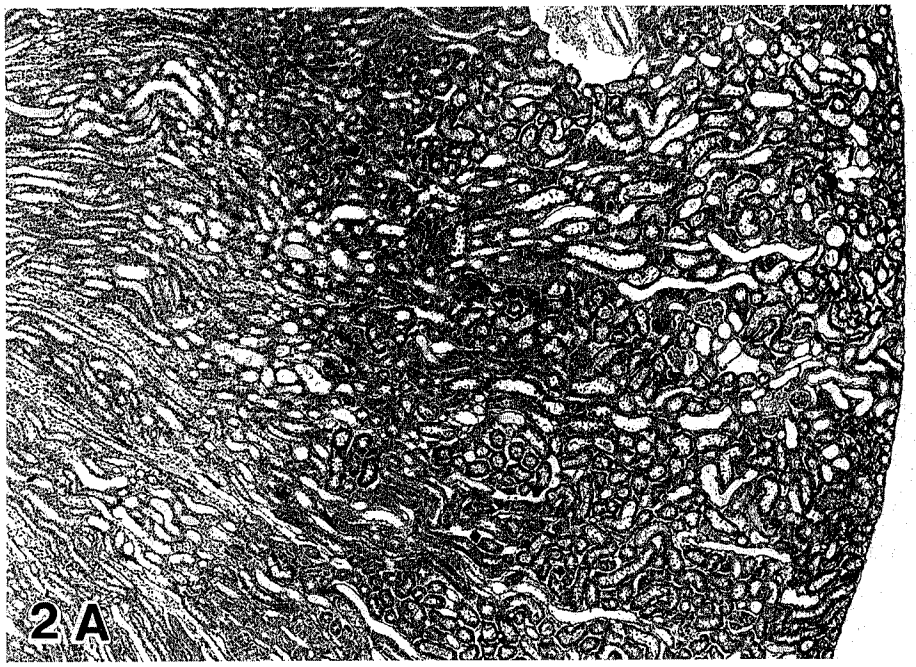
11）米山允子，小縣昭夫，藤井　孝ら：東京衛研年報，34，337-342，1983

Explanation of Photographs

Fig. 2. The kidney from a mouse sacrificed 24h after the administration of 1200mg TBZ／kg body weight. A：There are dilation of proximal, distal and collecting tubules. The dilation was located in a wedge-shaped area (H & E, ×50). B：High power view of tubules seen in Figure A. There are flattening and degenerative desquamation of the tubular epithelium (H & E, ×94). C：There are cell debris in the lumen of loop of Henle (H & E, ×375)

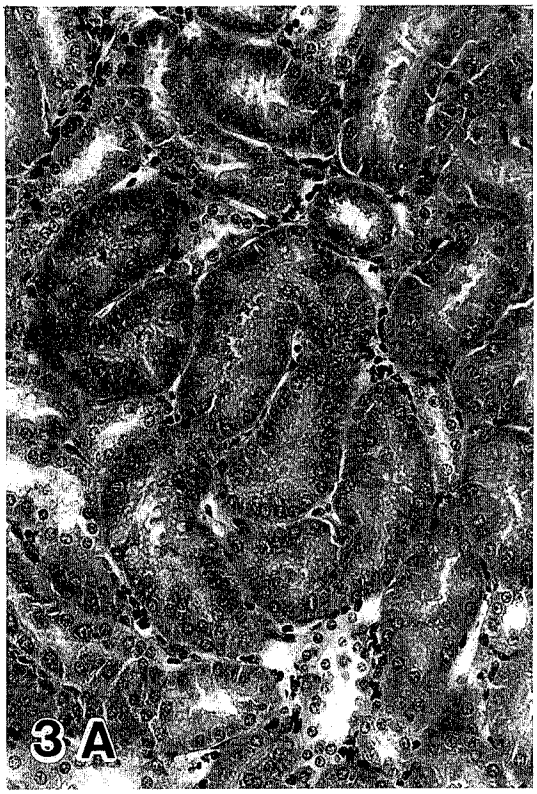
Fig. 3. The kidney from a mouse sacrificed 24h after the administration of 1200mg TBZ／kg body weight. There are enlargement and hyperplasia of proximal tubuler cells. A：(H & E, ×248), B：(PAS, ×300).

Fig. 4. The kidney from a mouse sacrificed 24h after the administration of 1200mg TBZ／kg body weight pretreated with SKF-525A. A：There are congestion at the cortico-medullary junction and marked degenerative desquamation of the distal tubular epithelium (H & E, ×124). B：There are proximal tubular necrosis (H & E, ×188).


2 A

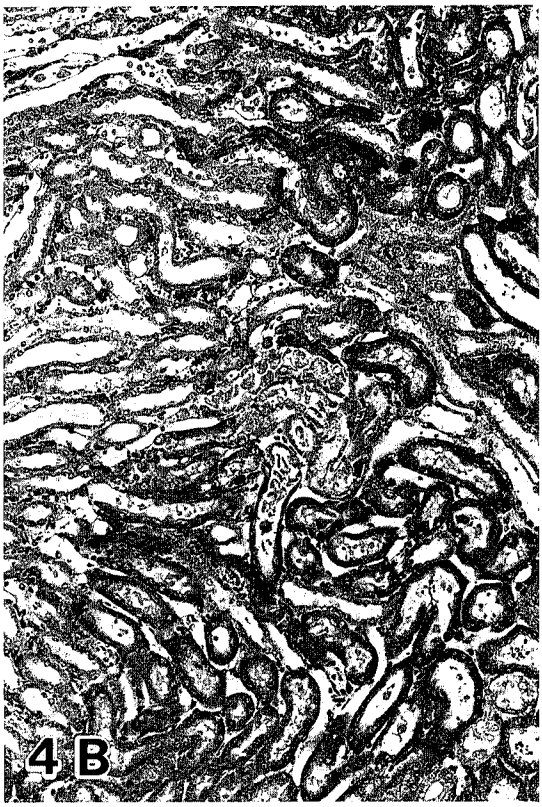
2 B

2 C


3 A

3 B

4 A


4 B

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 265-266, 1990

ペリルアルデヒドのヒト由来株化細胞における突然変異原性について

鈴木英子*，市川久次*，佐々木美枝子*

Mutagenicity of Perillaldehyde in a Human Cell Strain

HIDEKO SUZUKI*, HISATSUGU ICHIKAWA*, MIEKO SASAKI*

Keywords：ペリルアルデヒド Perillaldehyde, 突然変異原性 mutagenicity, ウアバイン ouabain

緒　　言

蘇葉は，カゼ，アレルギーによる諸症状の改善薬に配合されている．

今回，東洋医学事業研究の一環として，蘇葉の精油成分の一つであるペリルアルデヒドをとりあげ，ヒト胎児由来株化細胞，RSa，を用いて突然変異原性試験を行い，陽性の結果を得たので報告する．

実験材料および方法

細胞および培養　ヒト胎児由来株化細胞，RSa[1]，を用いた．細胞は，牛胎児血清(GIBCO)10％および抗性物質としてペニシリン(100u／ml)とストレプトマイシン(100 μg／ml)を含む，Eagles' minimum essential medium(MEM)(GIBCO)を用い，37℃，5％CO_2条件下で培養した．細胞毒性(生存率)および突然変異原性の測定の場合は，培養液中の牛胎児血清濃度を15％にした．

試料　(S)-(−)-ペリルアルデヒド(PA)(Aldrich)，ouabain(Oua)(Sigma)を用いた．PA は，使用直前に，氷冷した99.5％エタノールに溶解した後，MEM で希釈し，0.5％以下のエタノール溶液とした．Oua は，PBS に溶解した後，ミリポアフィルターでろ過滅菌し，血清の入った培養液にて調整した．

突然変異原性試験　8×10^5個の細胞を10mlの正常培地の入った10cm径のシャーレに播種した．24時間培養後，培地を除いて，PA を所定の濃度に添加し，37℃の炭酸ガス培養器中で24時間処理した．変異原処理後，正常培養液中で48時間培養した後，0.25％トリプシンを用いて培養面より剝離して，生存率と突然変異率の測定のため，再播種した．生存細胞検出のためには，5×10^2個の細胞を10mlの正常培地の入った10cm径シャーレに播種した．14日間培養した後，0.2％(W／V)メチレンブルーを含んだ30％メタノール溶液で固定，染色し，コロニーを数えた．この場合，1群3枚のシャーレを用いた．突然変異細胞検出のためには，5×10^4個の細胞を10mlの5×10^{-8}M Oua 含有培地の入った10cm径シャーレに再播種し，選択培養を行った．7日後に培養液を交換し，14日後に，コロニーを固定，染色し，Oua 耐性(Oua^r)細胞のコロニー数を数えた．この場合，1群6枚のシャーレを用いた．生存率および突然変異率は次式により求めた．

$$\text{生　存　率}=\frac{\text{正常培養液でのコロニー数}}{\text{播種した細胞数}}$$

$$\text{突然変異率}=\frac{\text{選択培養液でのコロニー数}}{\text{播種した細胞数}}\div\text{生存率}$$

結果および考察

Table 1 に示すように，PA を処理した RSa 細胞の生存率は，PA の量の増加にともなって低下した．0.025 μg／mlの低濃度処理でも，RSa 細胞の生存率は，約23％に低下し，強い細胞毒性が認められた．突然変異率は，無処理群に比べ有意に増加し，0.02 μg／mlまでは，PA の量の増加にともなって増加したが，0.02 μg／mlをこえると減少した．PA 0.02 μg／mlの処理では，突然変異頻度は，無処理群の約15倍に増加した．以上の結果は，PA は突然変異原物質であることを示唆する．

今回，検討したペリルアルデヒドは，漢方薬以外にも，食品添加物の着香料としても使用されているが，石館らは，チャイニーズハムスター線維芽細胞株(CHL)を用いた染色体異常試験において陽性の結果を報告した[2]．

一方，森本らは，蘇葉のメタノールエキスの枯草菌で

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

Table 1. Mutagenicity of Perillaldehyde in RSa cells

Treatment		Survivors[a]	Resistants[b]	Mutation freq[c].
	0	169±2	0.2±0.2	0.0986
Perill-	0.010	160±10	0.2±0.2	0.1041
aldehyde	0.015	152±9	1.3±0.2	0.8771
μg／mℓ	0.020	107±2	1.7±0.2	1.5576
	0.025	39±5	0.2±0.2	0.4273

a Number of surviving colonies per dish (5×10^2 cells) ,mean ± S.E.

b Number of ouabain resistant colonies per dish (5×10^4 cells), mean ± S.E.

c Mutation frequencies per 10^4 surviving cells.

のDNA修復試験(rec-assay)を行った結果，陽性であることを報告した[3]．これはDNA障害を受けたことを示すものである．

従ってさらに，ペリルアルデヒドのDNAへの作用を検討する必要がある．

文　献

1) Suzuki, H., Suzuki, N., Sasaki, M. and Hiraga, K.: *Mutation Res.*, 156, 123-127, 1985

2) 石館　基，祖父尼俊雄，吉川邦衛：変異原と毒性，5(6), 579-587, 1982

3) Morimoto, I., Watanabe, F., Osawa, T., Okitsu, T. and kada, T.: *Mutation Res.*, 97, 81-102, 1982

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 267-269, 1990

ペリラアルデヒドの培養細胞染色体への作用

田　山　寿美子*, 市　川　久　次*, 佐々木　美枝子*

Effects of Perillaldehyde on Induction of Chromosomal Aberrations and Sister-Chromatid Exchanges (SCEs) in CHO-KI Cells

SUMIKO TAYAMA*, HISATUGU ICHIKAWA* and MIEKO SASAKI*

Keywords：ペリラアルデヒド perillaldehyde, CHO-K 1 細胞 CHO-K 1 cells, 染色体異常 chromosomal aberrations, 姉妹染色分体交換 sister-chromatid exchanges (SCEs)

緒　　言

東洋医学検討の一環として，当所では今回蘇葉を取り上げることとなった．蘇葉はわが国では風邪，アレルギーによる諸症状の改善薬に配合されている．蘇葉の薬理作用は未詳であり，またその変異原性についても，森本[1]らによるバクテリアを用いた一連の生薬のスクリーニングの中で取り上げられているのみで，そこではメタノール抽出物に rec-assay 陽性の結果が示されている．蘇葉の主成分としてはペリラアルデヒド(PA)とペリラケトンが知られており，PA についてはその変異原性が石館ら[2]により調べられている．それによるとサルモネラ菌での突然変異誘発試験，およびマウスでの小核試験では陰性であるが，培養細胞(CHL 細胞)における染色体異常試験では陽性である．

今回われわれは CHO-K 1 細胞を用いて，PA に関し，薬物代謝系であるラット肝ミクロゾーム系(S-9 mix)の有無における染色体異常および姉妹染色分体交換(sister-chromatid exchange, SCE)誘発能を調べた．

材料および方法

試薬　ペリラアルデヒド(PA)：Aldrich 社，シクロホスファミド(CP)：ICN Pharmaceuticals 社，5-ブロモ-2'-デオキシウリジン(BUdR)：Sigma 社，コルセミド：Gibco 社，ジメチルスルホキシド(DMSO)：和光純薬工業

細胞及び培養　チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO-K 1 株を，10%仔牛血清添加の Ham の F-12培養液で角形培養瓶を用い37℃にて密栓培養した．

S-9 mix の調整　S-9 は Ames ら[3]の方法に基き作成した Aroclor 1254で酵素誘導した SD 系雄ラットの肝ホモジネートの S-9 フラクションを，−80℃で凍結保存したものを用いた．S-9 mix は Natarajan ら[4]の方法に従い調整した．S-9 mix 中の S-9 の濃度は30%であり，S-9 における蛋白濃度は Lowry 法で25.3mg/ml である．

薬物調整及び処理　約 5×10^5個の細胞を処理 2 日前に播種した．その細胞に薬物を溶かした DMSO 溶液50 μl を含む培養液4.25ml，及び S-9 mix または培養液0.75ml(15% S-9 mix 濃度)を加え，37℃で 3 時間処理した．新しい培養液で 1 回洗った後，培養瓶をアルミホイルで被って遮光し，0.5 μg/ml の BUdR の入った培養液10ml を加えて27時間密栓培養した．

標本作成及び染色　培養終了 2 時間前にコルセミド0.1 μg/ml を加え，分裂中期細胞を集めた．標本作成及び染色は，われわれが先に行った方法[5]に準じた．

観察及び検定　各々の標本について，染色分体が染め分けられた細胞の割合(D. S. C.)，細胞当りの SCE の数，染色体異常の種類と数及び核内倍加染色体(endoreduplication, ERD)を各々100，25，100及び200の細胞について観察記録し，SCE については Kruskal-Wallis test 及び Distribution free multiple comparison test，染色体異常については χ^2test により有意差検定を行った．

結果及び考察

結果を Table 1．に示す．ペリラアルデヒド(PA)は SCE 及び染色体異常誘発作用を S-9 mix の有無に関わ

*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
*Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24− 1, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

Table 1. Frequencies of Sister-Chromatid Exchanges (SCEs) and Chromosomal Aberrations in CHO-K 1 cells after an Expression Time of 27 h Following a 3-h Treatment of Perillaldehyde (PA) with or without S-9 Mix

PA (μg/ml)	S-9 mix	Cells with chromosomal aberrations(%)		Types of chromosomal aberrations/100 metaphases						ERDs (%)	SCEs/cell (Mean ± S. E.)	D.S.C. (%)
				Gaps		Breaks and fragments		Ex.	Ot.			
		Including gaps	Excluding gaps	C 1	C 2	C 1	C 2					
0	−	1	1	0	0	1	0	0	0	0	6.2±0.35	99
50	−	2	2	0	0	0	0	0	2	0.5	8.7±0.41**	99
100	−	5	5	0	0	2	0	1	3	1.0	12.8±0.85**	92
150	−	13**	12**	1	0	3	1	6	2	23.0	N. D. S.	0
200	−	N. M.	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
0	+	3	2	1	0	1	1	0	0	0	6.9±0.53	98
50	+	2	1	1	0	0	0	1	0	0	12.8±0.75**	98
100	+	3	2	0	1	1	0	0	1	0	14.0±0.76**	100
150	+	2	2	0	0	0	1	1	0	0	13.5±0.64**	96
200	+	1	1	0	0	1	0	0	0	0	14.4±0.67**	98
300	+	20***	19***	1	0	1	3	12	5	4.5	18.4±0.97**	62
CP[a]2.5	+	8	6	2	0	0	2	2	2	0.5	38.6±1.68	94

**$p<0.01$, ***$p<0.001$

C 1, chromatid type; C 2, chromosome type; Ex, chromatid exchanges; Ot, other aberrations (ring, dicentric); ERDs, endreduplications; D. S. C., differential staining sister chromatids; N. M., no metaphases; N. D. S.., no cells with D. S. C.

a. Cyclophosphamide (positive control).

らず示した．SCE誘発はS－9 mix添加，無添加の両場合ともPA 50 μg／ml濃度から起こったが，S－9 mix無添加では150 μg／ml濃度で処理以後2回の分裂を経た細胞の割合(D. S. C. %)が0となり，細胞分裂遅延を示した．同時にこの濃度で13%の染色体異常が生じた．その異常の主なものは染色分体及び染色体の交換(exchange, dicentric)及び切断(break)であった．この通常の異常の他に，23%の高率で染色体の核内倍加(ERD)を示す細胞が出現した．

一方S－9 mixを添加した場合は，その細胞毒性(細胞分裂阻害)は弱まり，細胞分裂可能な最高濃度はS－9 mix無添加時のそれの2倍(300 μg／ml)にまで高まった．この最高濃度はS－9 mix無添加の場合と同様，細胞分裂遅延を起こす(D. S. C. 38%)と同時に染色体異常を誘発した(27%)．その異常の約8割は交換型の異常であった．ERDの出現は低かった(4.5%)．SCEの誘発はPAの全濃度(50－300 μg／ml)で起こったが，その増加に濃度依存性はなかった．

S－9 mix添加，無添加対照群の染色体異常(1及び3%)及びSCE頻度(6.2及び6.9／cell)は，われわれがこの実験系で通常得ている範囲であった．また代謝活性化の指標として用いた陽性対照のシクロホスファミド(CP)は，われわれの先の成績[6]と一致してこの実験条件で高率にSCEを誘発し(38.6／cell)，S－9 mixが代謝活性化系として有効に機能していることを示唆した．

今回の結果は，染色体異常に関し石館ら[2]の報告と矛盾しない．彼らはPA 50 μg／ml，24時間暴露で39%の染色体異常及び31%の倍数体出現を観察しており，交換型の異常も高率で認めている．3時間の暴露でのわれわれの結果でも，PA 150 μg／mlで交換型異常は全異常(13%)の6割を占めており，また染色体の核内倍加を示す細胞も高率で出現した(23%)．

S－9 mixを加えた実験の結果は，SCE誘発能を有する新たな物質(代謝物)が生成されたことを示す．即ち，PA 50 μg／ml濃度でのSCE頻度は，S－9 mix添加によって明らかに高まっている(8.7／cell→12.8／cell)．またSCEの誘発頻度がPAの濃度に依存して増加しなかったことは，この代謝物の生成もPAの濃度に依存して増加していない事を示すものと考えられる．PA投与量 50 μg／ml はこの条件での*in vitro* 代謝の限界であるかもしれない．従って300 μg／ml濃度での細胞毒性及び染色体異常誘発には，代謝されなかったPA自身も大きく関わっているものと推測される．またS－9 mix添加によって分裂細胞が得られるPAの最高濃度が高まったことは，代謝物の細胞毒性作用がPAのそれと相加的ではないことを示し，その作用機序がPAとは異なっていることを窺わせる．

PAは細胞分裂遅延を引き起こす150 μg／ml濃度で，染色体数の倍化(ERD)を誘発した．ERDの誘発機構は明らかではないが，染色体傷害とそれに続いて起こる分裂阻止が倍加染色体(diplochromosomes)形成に深く関与しているとの考え[7]がある．この濃度のPAは染色体異常も誘発しており(13%)，この結果はこの考えられているERD誘発の条件とよく一致した．

以上述べたことから次の事が結論される．

1．蘇葉の主要成分であるPAは比較的強い細胞毒性(細胞分裂可能な最高濃度，150 μg／ml)を有し，またSCE誘発に導くDNA傷害作用，及び細胞分裂遅延を引き起こす濃度での染色体異常及び染色体の核内倍加(ERD)誘発作用を示す．

2．肝ミクロソーム系(S－9 mix)の存在により生成してくる代謝産物にもSCE誘発能がある．

PAの代謝に関する報告はまだなく，代謝物については今後調べられる必要がある．

文　献

1) Morimoto, I., Watanabe, F., Osawa, T. and Okitsu, T.：*Mutation Res.*, 97, 81-102, 1982

2) 石館　基，祖父尼俊雄，吉川邦衛：変異原と毒性，5(6), 579-587, 1982

3) Ames, B. N., McCann, J. nnd Yamasaki, E.：*Mutation Res.*, 31, 347-364, 1975

4) Natarajan, A. T., Tates, A. D., Van Buul, P. P., Meijhrs, M. and Vogel, N. D.：*Mutation Res.*, 37, 83-90, 1976

5) Tayama–Nawai, S., Yoshida, S., Nakao, T. and Hiraga, K.：*Mutation Res.*, 141, 95-99, 1984

6) Tayama, S., Kamiya, N. and Nakagawa, Y.：*Mutation Res.*, 223, 23-33, 1989

7) Lücke–Huhle, C.：*Mutation Res.*, 119, 407-413, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 270-274, 1990

蘇葉抽出物の変異原性試験

藤田　博*, 高野伊知郎**, 安田一郎**
秋山和幸**, 市川久次***, 佐々木美枝子***

Mutagenicity Test of Extracts of Perilla Herb

HIROSHI FUJITA*, ICHIRO TAKANO**, ICHIRO YASUDA**
KAZUYUKI AKIYAMA**, HISATUGU ICHIKAWA***
and MIEKO SASAKI***

Keywords：変異原性 mutagenicity, 蘇葉 perilla herb, soyo, 漢方薬 crude drugs, *Salmonella typhimurium*

近年，漢方薬の効能が見直され，病院の治療薬として用いられるようになってきている．本来医薬品については薬品としての有効性の研究に加えて安全性の研究が義務づけられていることから，漢方薬についても，その効果や安全性についての研究を行わなければならないと考えられるようになってきた．安全性を評価するために調べられている変異原性については，森本らが多くの生薬についての試験を実施し，予想以上に多い45種の生薬抽出物に変異原性を見いだしている[1]．また発ガン物質の変異原性を抑制する効果があることがいくつかの生薬抽出物に見いだされている[2,3]．

この変異原性試験にはAmesらにより開発された *Salmomella typhimurium* TA株[4-6]が広く利用され，多くの変異原の検出に貢献してきた．Amesらは，開発した多くの菌株の中からTA97，TA 98，TA 100およびTA 102の4株を試験に用いることを提案している[6]．TA 97およびTA 98はフレームシフト型の変異原に，TA 100およびTA 102は塩基置換型の変異原に良く反応する．さらに後から開発されたTA 97およびTA 102は，TA 98およびTA 100と比較した場合，TA 97はTA 98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[7]，TA 102は過酸化物に良く反応する[8,9]特徴がある．

一生薬である蘇葉は，半夏厚朴湯などの処方[10]に用いられ，解熱，鎮咳効果があるとされている．また食用として生食，漬物にも利用されている．蘇葉の変異原性については，森本らによるRec-assayで陽性であるが，サルモネラのTA 98およびTA 100を用いた試験では陰性の報告がある[1]．今回，新しい試験株も加えて蘇葉抽出物の詳細な変異原性試験を実施したので報告する．

実験材料および方法

試料の調整　京都市左京区大原町において栽培されているシソ *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudoを採取し，水洗した葉部を10日間風乾した後，抽出に用いた．抽出は試料各100 gにエーテル，エタノールおよび水を2,500ml加え，室温で7日間冷浸し，ろ過したものを抽出液とした．

エーテル抽出物はロータリーエバポレータを用い，26℃以下でエーテルを減圧留去し，抽出物4.9 gを得た．エタノール抽出物はロータリーエバポレータを用い，35℃以下でエタノールを減圧留去し，抽出物37.1 gを得た．水抽出物は凍結乾燥機を用い，減圧下で水を除去し，抽出物14.1 gを得た．

エーテルおよびエタノール抽出物は，ジメチルスルホキシド(同仁化学，吸収スペクトル用)に，水抽出物は，蒸留水に溶解し，試験に用いた．

陽性対照物質は，2－アミノアントラセン(和光純薬)，9－アミノアクリジン(和光純薬)，2－ニトロフルオレン(アルドリッチ)，マイトマイシンC(協和発酵)を用いた．

*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 Metoroporitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunin-cho 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
***東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科

表1．蘇葉エーテル抽出物の変異原性試験

Dose μg/plate	No. of Revertants/plate							
	TA 97		TA 98		TA 100		TA 102	
	−S 9	+S 9	−S 9	+S 9	−S 9	+S 9	−S 9	+S 9
1000	79#	162	15#	30	102#	155	2#	210
100	141	218	17	31	125	149	243	418
10	151	231	17	36	123	123	271	365
1	156	201	15	42	120	150	273	400
0	165	218	16	34	115	139	267	395
Positive	350[a]	3107[b]	807[c]	1568[b]	949[c]	2605[b]	2494[d]	1833[b]

a) ：9-Aminoacridine 50 μg/plate　b) ：2-Aminoanthracene 5 μg/plate
c) ：2-Nitorofluorene 5 μg/plate　d) ：Mitomicin C 0.5 μg/plate
#：Killing

表2．蘇葉エタノール抽出物の変異原性試験

Dose μg/plate	No. of Revertants/plate							
	TA 97		TA 98		TA 100		TA 102	
	−S 9	+S 9	−S 9	+S 9	−S 9	+S 9	−S 9	+S 9
1000	172	193	18	38	148	158	157	362
100	136	177	15	32	142	144	254	370
10	136	173	15	33	134	138	237	337
1	140	189	17	33	137	157	298	364
0	148	189	20	34	131	148	279	369
Positive	377[a]	2712[b]	1032[c]	1568[b]	619[c]	3304[b]	2161[d]	1433[b]

a) ：9-Aminoacridine 50 μg/plate　b) ：2-Aminoanthracene 5 μg/plate
c) ：2-Nitorofluorene 5 μg/plate　d) ：Mitomicin C 0.5 μg/plate

菌株 *Salmonella typhimurium* TA 97[7], TA 98[4], TA 100[4] および TA 102[8,9] を普通ブイヨン(Nutrient broth No.2, オキソイド)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[6,11]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 S 9[6] を用いた．S 9 mix[6,11] 中の S 9 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 S 9 mix 0.5ml，代謝活性化しない場合にはリン酸緩衝液(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分間の前培養を行った．これに45℃に保温した軟寒天[6] 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自動コロニーカウンターで計数した．

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．両検定で有意である場合に陽性とした．

結果および考察

予備試験を行い試料の試験菌株に対する増殖阻害性および培地中における溶解性について調べた．その結果，エーテル抽出物，エタノール抽出物は10mg/プレートでともに増殖阻害が見られ，さらに培地中に試料が析出した．1 mg/プレートでもわずかではあるが増殖阻害および試料の析出が見られたが，この濃度を最高濃度として10倍希釈し，4 濃度で本試験を行った．水抽出物につい

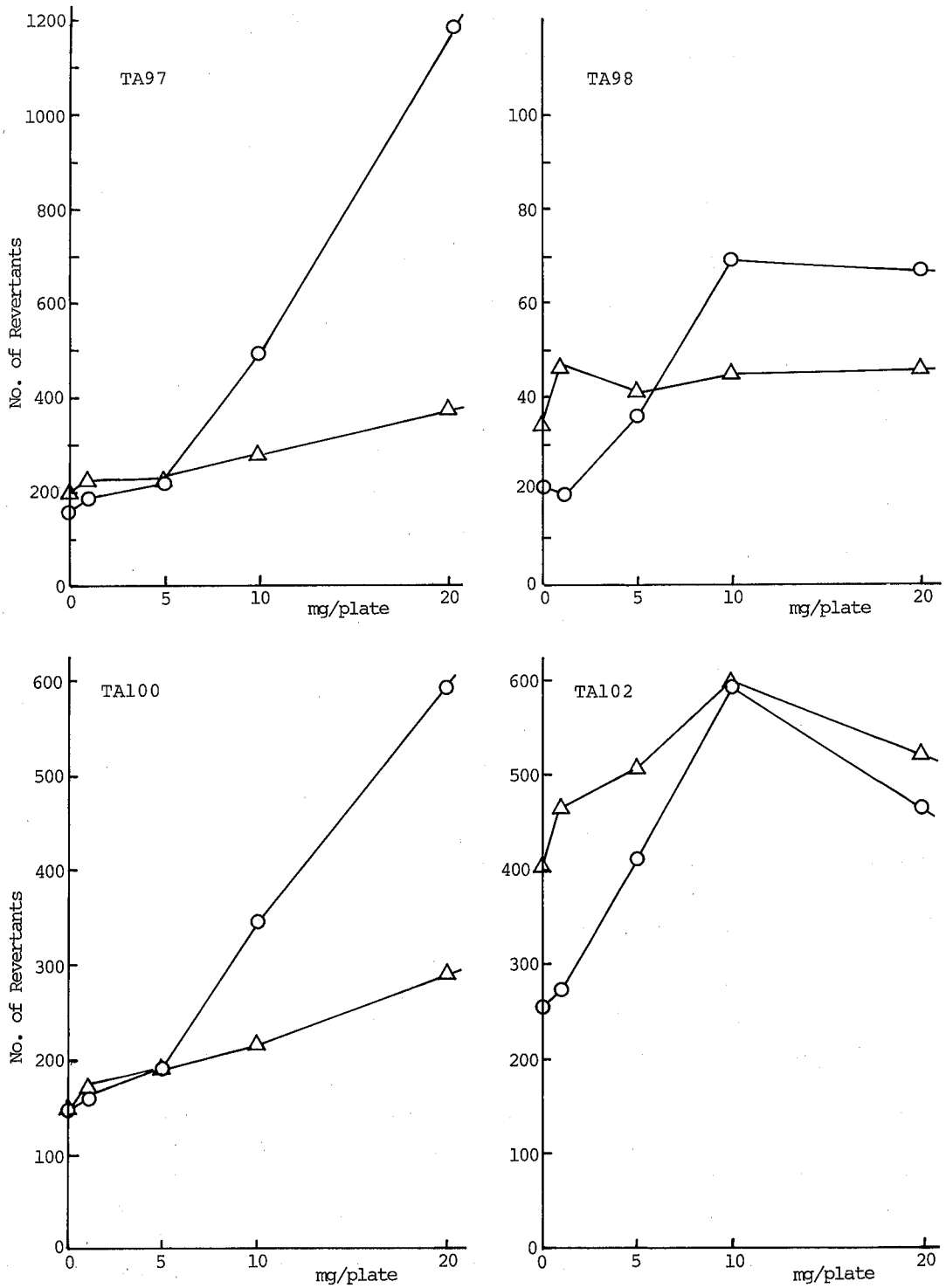


図1．蘇葉水抽出物の変異原性試験
○：S9無添加，△：S9添加

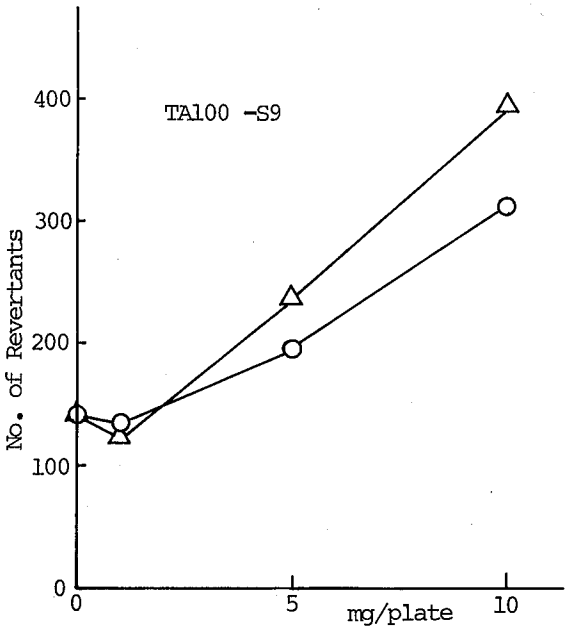


図2．蘇葉水抽出物の変異原性に対する加熱処理の影響
○：非加熱，△：100℃，20分加熱

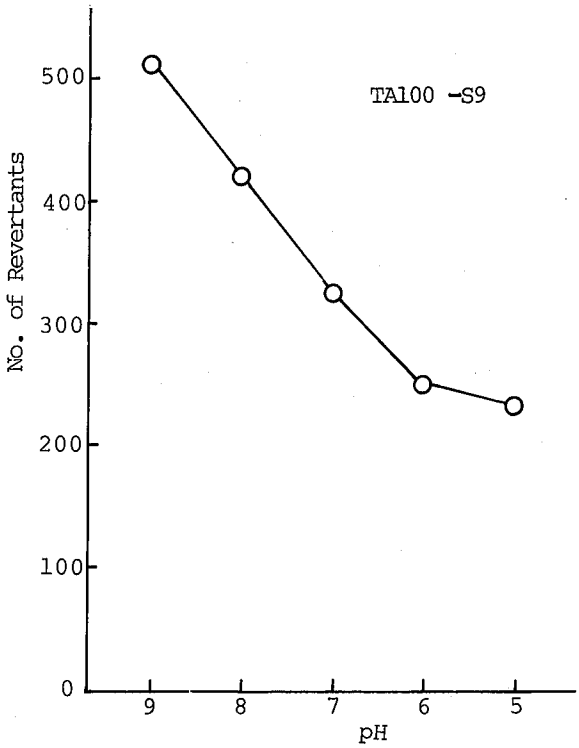


図3．蘇葉水抽出物の変異原性に対するリン酸緩衝液のpHの影響
抽出物量は10mg／プレート

ては20mg／プレートでわずかに増殖阻害が見られたことから，この濃度を最高濃度として20mg，10mg，5mgおよび1mg／プレートの4濃度で本試験を行った．

エーテル抽出物についての結果を表1に示した．1mg／プレートで増殖阻害が見られ，S9 mix無添加において著しく復帰コロニー数が減少した．いずれの菌株においても変異原性を示す復帰コロニー数の有意な増加は見られず，変異原性は陰性であった．

エタノール抽出物についての結果を表2に示した．いずれの菌株においても復帰コロニー数の有意な増加は見られず，変異原性は陰性であった．

次に水抽出物については，4菌株において復帰コロニー数が有意に増加し，変異原性が見られた(図1)．この変異原性はS9 mix無添加において高く，S9 mixを添加することにより減少した．特にTA 98においては変異原性が失われるが，他の菌株においては減少はするものの復帰コロニー数は用量に伴い増加し，弱い変異原性が残った．S9 mix無添加のときの変異原性は，TA 97において最も強く発現し，抽出物20mgの復帰コロニー数はコントロールの6倍に増加した．これは復帰コロニー50個／mg抽出物であり，抽出物量から求めると蘇葉1gあたり7,050個の復帰コロニーに相当するものである．ただし，この変異原性は陽性対照に用いた変異原の9－アミノアクリジンなどと比べると弱いものである．

ここに用いた試験法では試料中にヒスチジンが多量に含まれていると陽性の結果を呈することがわかっている．そこで試料中のヒスチジン量を測定した．エーテル，エタノール抽出物ではヒスチジンは全く検出されなかったが，水抽出物には0.1 μg／mg抽出物のヒスチジンが含まれていた．ヒスチジンが試料中に存在したときの自然復帰コロニー数の増加は，試験に用いた4菌株において1－4個／μgヒスチジンの範囲である．試料最高濃度の20mg／プレートでは，ヒスチジンは2 μgとなり，復帰コロニーは2－8個／プレートの増加であると考えられる．従ってこの程度の増加であるならば水抽出物中のヒスチジン量が測定結果に与える影響はほとんどなく，水抽出物の変異原性は，これに含まれる変異原性物質によるものと考えたい．

この変異原はS9中の代謝酵素によって代謝され変異原活性が失われるが，さらにこの変異原の性質について調べてみた．先ず，100℃，20分間の熱処理をし，TA 100，S9 mix無添加の条件下で変異原性を調べたところ，

変異原性に変化は認められなかった(図2). さらにpHの影響を知るために, 試験に用いるリン酸緩衝液のpHを変化させたときの変異原性をTA 100, S9 mix無添加において調べた(図3). その結果, pHが高いときは変異原性は高いが, pHを下げると変異原性が下がることが分かった. 以上のことから水抽出物に含まれる変異原は, アルカリ性および熱には安定であるが, 酸性条件下やS9中の代謝酵素によって変異原活性が失われることがわかった.

水抽出物にはいろいろな化合物が含まれており, 組成については明らかではなく, 複数の可能性もある変異原性を示す化合物の同定はできていない. 種々の植物からの抽出物には変異原性を示すケルセチンなどのフラボン類が存在することが知られている[14]. しかし, フラボン類はメタノールなどの有機溶媒による抽出分画に存在し, その変異原性はS9 mixを添加することにより増加する[14,15]ことから, 水抽出物に見られた変異原性とは異なっている. 従って, 水抽出物に含まれている変異原性物質はフラボン類ではないであろう.

蘇葉の変異原性についての報告には, 山本らが水の加熱還流によって得た試料についてTA 98およびTA 100を用いた試験を試み, 陰性の結果を得ている[16]. また森本らは水およびメタノールを40℃加温処理して得た試料について試験したところ, メタノール抽出物はRec-assayで陽性であったが, TA 98およびTA 100においては陰性と報告している[1]. 今回の試験では, 水抽出物に変異原性が見られ, これまでの報告とは少し異なる結果であった. 抽出方法や抽出時間の違いによる抽出物組成の違いが原因であろうが, 10mg以上で変異原性が出現してくることから, 非常に微量な成分か余り強くない変異原であろう. さらにメタノール抽出物がRec-assay陽性である[1]ことからエタノール抽出物などについてもさらに検討が必要かもしれない. 最後に, 蘇葉の農薬などによる汚染の可能性が否定できないことから, 今後, その検討も含む変異原性物質の同定を試みたい.

要　旨

蘇葉のエーテル, エタノールおよび水抽出物についてサルモネラを用いた変異原性試験を行った. 試験にはAmesらが開発したTA 97, TA 98, TA 100およびTA 102の4試験菌株を用いた. その結果, エーテル, エタノール抽出物については4試験菌株において, S9 mixの添加に関わらず変異原性は陰性であった. 水抽出物の場合は4試験菌株のS9 mix無添加において, 変異原性が見いだされた. しかしS9 mixを添加することにより変異原性は減少し, TA 98では見られなくなったが, 残る3試験菌株では弱い変異原性が残った. この水抽出物に見られた変異原性は, アルカリ性条件下および加熱処理では安定であるが, 酸性条件下では減少した.

(本研究は平成元年度衛生局東洋医学事業研究「老人性疾患に対する漢方薬の有効性について」の一課題として実施したものである.)

文　献

1) Morimoto, I., Watanabe, F., Osawa, T. and Okitu, T.: *Mutation Res.*, 97, 81-102, 1982.
2) Sakai, Y., Nagase, H., Ose, Y. and Yamada, F.: *Mutation Res.*, 174, 1-4, 1986.
3) 渡辺富士雄, 森本　功, 興津知明: 生薬学雑誌, 41, 248−252, 1987.
4) McCann, J., Spingarn, N. E., Kobori, J. and Ames, B. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 979-983, 1975.
5) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E.: *Mutation Res.*, 31, 347-364, 1975.
6) Maron, D. M. and Ames, B. N.: *Mutation Res.*, 113, 173-215, 1983.
7) Levin, D. E., Yamasaki, E. and Ames, B. N.: *Mutation Res.*, 94, 315-330, 1982.
8) Levin, D. E., Hollstein, M. and Ames, B. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7445-7449, 1982.
9) Levin, D. E., Marnett, L. J. and Ames, B. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 4457-4461, 1984.
10) 難波恒雄: 原色和漢薬図鑑, 284-285, 1980, 保育社
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) Seino, Y., Nagao, M., Yahagi, T. and Sugimura, T.: *Mutation Res.*, 58, 225-229, 1978.
15) Bjeldanes, L. F. and Chang, G. W.: *Science*, 197, 577-578, 1977.
16) 山本久子, 水谷民雄, 野村治子: 薬学雑誌, 102, 596-601, 1982.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 275-281, 1990

蘇葉抽出物の細胞活性について

佐々木美枝子*, 吉 田 誠 二*, 市 川 久 次*,
高 野 伊知郎**, 安 田 一 郎**, 秋 山 和 幸**

Cytological Activities of Perilla Extracts

MIEKO SASAKI*, SEIJI YOSHIDA*, HISATSUGU ICHIKAWA*,
ICHIRO TAKANO**, ICHIRO YASUDA** and KAZUYUKI AKIYAMA**

Summary

Naturally occurring substances have heen widely used as drugs and food additives. Toxicology of these substances, however, has not been sufficiently studied because almost all of them are complex chemicals and their activities are difficult to examine. On the other hand, anti-carcinogenicity or anti—mutaganicity has been found in some of these materials. Recently, Chinese medicine(naturally occrrring drugs)has gained a renewed interest in Japan as a therapeutic agent for cancer or chronic diseases. The effects of these drugs have not been established yet, and qualitative and quantitative studies have become necessary.

Perillae(leaf of *Perilla frutescens* var. acuta)is a popular herb in Japan, and has been looked to provide a good aroma and spoil—preventing effects, and also it is mixed into Chinese medicine to cure common cold by on the basis of its anti—allergic effect.

The main active component of Perillae is Known as perillaldehyde, and another toxic derivaive, perilla ketone, is a potent pulmonary edematogenic agent in farm animals. Biological activity of the ether—, ethanol—, and water—extract from leaves of perilla and purified perillaldehyde was investigated in cultured CHO—K 1 cells and in *in vitro* antibody producing system using primary cultures of spleen cells of mice. Weak mutagenicity and anti—mutagenicity were observed in a dose—dependent manner in the water—extract on CHO—K 1 cells, and perillaidehyde may enhance MNNG—induced ouabain—resistant mutation in low dose levels. Concerning the effect on antibody production in vitro, the ether—extract enhanced immunological response in the early stage, and the ethanol—extract and perillaldehyde were immunosuppressive.

The correlation of cytological activities to the chemical structure, and details of these effects are the subject of future.

Keywords：Extracts of *Perilla frutescens*, Perillaldehyde, Cytotoxicity, Mutagenicity, Clastogenicity, Immunological activity

緒　　言

紫蘇はその香りと食品の腐敗を防ぐ効果のためにわが国でよく使われる植物である．また漢方薬にはカゼなどの処方として抗アレルギー効果を期待して処方される．

蘇葉の精油成分はペリルアルデヒドとして知られ，また家畜に肺水腫を起こすペリトラケトンがその関連物質として知られている[1)]．

東洋医学事業の一環として蘇葉のエーテル，エタノール，水抽出物および精製ペリルアルデヒドをとりあげ，その生物学的活性について，ほ乳類培養細胞系(CHO-K

*東京都立衛生研究所毒性部　169　東京都新宿区百人町３－24－１
*The Tokyo Metropolitan Research Iaboratory of Public Health
24－１, Hyakunin—cho 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

1細胞)による変異原性，抗変異原性，染色体異常誘発性，チャイニーズハムスターを用いた動物骨髄細胞に対する染色体異常誘発性，およびマウス脾臓細胞を用いた試験管内抗体産生系による免疫活性について調べた．

蘇葉水抽出物に弱い変異原性，抗変異原性が認められ，また各抽出物およびペリルアルデヒドに免疫促進あるいは抑制効果がみられた．染色体に対する作用は，培養細胞系では染色体異常誘発が時にみられたが，動物に投与した場合には骨髄細胞の染色体異常誘発は認められなかった．

これらの活性をさらに追求するためには，各々の作用のより詳細な検討や，抽出物中の活性物質の検索等が必要ぜあろうが，ほ乳類細胞にたいする蘇葉成分の細胞活性について一応の結果がえられたのでここに報告する．

実験方法

1．実験試料

蘇葉の各抽出物はシソ(*Rerilla frutescens* Britton var. *acuta*–kodo)より調整した．日本の代表的シソ生産地である京都市大原町において栽培されている“大原ジソ”を採集し，葉部(葉および枝先)を日陰で10日間風乾して得た乾燥葉を抽出物の原試料とした．

この試料100ｇに対し，エーテル，エタノールまたは水を2500ml づつ加え，室温で７日間冷浸し，綿栓濾過後，濾液を集めめて各抽出液とした．各抽出液はさらに，エーテルおよびエタノール抽出液の場合は，ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を低温で減圧蒸留し，水抽出液の場合は凍結乾燥器による乾燥状態で減圧下で水を除去し，エーテル，エタノール，水各抽出物とした．

精製ペリルアルデヒドは，アルドリッチ社から購入した(ｓ)-(-)-perillaldehyde, Lot. 21, 829-４[18031-40-８]をシリカゲルカラムに付しｎ-ヘキサン・エーテル(９：１)で溶出して分画し，活性画分の溶媒を減圧留去して純度99.7％の精製品を得た．

これら各試料の分析はキャピラリーGC により行った．キャピラリーガスクロマトグラフによるパターン分析により得られた各試料のペリルアルデヒド含有量は，エーテル抽出物で6.9％，エタノール抽出物で3.3％，水抽出物では0.0％であった．

2．CHO-Ｋ１細胞による試験

細胞は衛生研究所毒性部において継代維持されているCHO-Ｋ１細胞を用いた．細胞は牛胎仔血清を添加したＦ-12培養液に培養し，ペリルアルデヒド，蘇葉エーテル抽出物，エタノール抽出物はDMSO に溶解し，蘇葉水抽出物は精製エタノールに溶解して培養液中に添加した．

各試料のCHO-Ｋ１細胞に対する細胞毒性をコロニー形成により先ず検出し，強い毒性を示さない添加量を以下の試験で用いた．

コロニー形成率(細胞生存率)の検出は，100細胞を直径60cm の培養プラスチックシャーレに播き，１夜培養後，各試料を培養液に添加してさらに１週間培養を継続し，１週間後に細胞を固定染色してコロニー数を数えた．

変異原性の検出は，試料を添加した細胞でのウワバイン耐性突然変異の出現頻度を引標とした．陽性対照として変異原性物質であるMNNG(N–methyl–N'–nitro–N–nitrosoguanidine)を用いた．

抗変異原性については，MNNG で誘導されるウワバイン耐性突然変異の出現率にたいする各試料の影響を調べた．

CHO-Ｋ１細胞による変異原性の検出法は，１夜培養した１×10^6の細胞を各試料で２時間処理し，細胞を新鮮培養液で２回洗浄した後，新たに試料無添加の新鮮正常培養液で２日間培養し，さらに１mM のウワバインを添加した培養液に置き換え，さらに２週間培養した．ウワバイン添加培養液は１週間目に１度交換した．２週間の培養後細胞を固定，染色してウワバイン耐性突然変異細胞のコロニーを数え，同時に行った処理細胞の生存率を参考に，10^6の生存細胞あたりの突然変異細胞の数を計算した．誘発突然変異率は，無処理対照群の突然変異率をこれから差し引いたものである．なおこの実験で使用しているCHO-Ｋ１細胞のウワバイン耐性突然変異の自然出現率は，別に行ったFLUCTUATION TEST[2]の結果から10^8あたり数個であることが確かめられている[3]．

MNNG の変異原性に対する影響については，MNNG(1.0μｇ/ml)で２時間処理したCHO-Ｋ１細胞を２日間正常培養液で培養した後，ウワバイン添加と同時に各試料を各々添加し，ウワバイン耐性突然変異数を上述したように計数した．

染色体試験のためには，培養終了の２時間前にコルセミドを培養中に添加して細胞分裂を抑え，その後定法により細胞の低張処理およびカルノア液による固定を行い，乾燥後，ギムザ染色を行って顕微鏡用標本とした．

3．チャイニーズハムスターによる試験

衛生研究所毒性部において系統維持されているチャイニーズハムスターを用い，ペリルアルデヒド，蘇葉エーテル抽出物，エタノール抽出物を経口あるいは腹腔内投与し，原則的には６，24，48時間後に大腿骨骨髄細胞を試験管内に取り出して低張処理，カルノア固定を行い，

ギムザ染色を施して顕微鏡用標本とした．試料を3日間連続経口投与した動物，および単回経口投与後72時間，96時間，120時間経過した動物も，経時的な変化を観察するために試験した．

4．試験管内抗体産生系を用いた試験

CDF_1マウス脾臓リンパ球細胞を無菌的にとりだし，マールブルック法の変法により試験管内抗体産生を行った．マールブルック法と異なる点は，マールブルック培養瓶を使用せず，底にメンブランフィルターを貼った培養用のウェル(ミリセル-HA，日本ミリポア・リミテッド，PIHA 030 50)にリンパ球細胞と抗原を入れ，このウェルをさらに培養液を満たしたガラススャーレに入れ，メンブランフィルターを通してウェル内外の培養液が交換されるようにした．抗原としてはヒツジ赤血球(SRBC：Sheep Red Blood Cells)を用いた．培養ウェルに培養した細胞数は2×10^7リンパ球細胞／ウェルであり，抗原としてこれに10%SRBC を1／100*vol.* 加えて共に培養した．各試料は培養開始と同時に各々の添加量が30 μl となるように濃度を調整して加えた．培養開始後3および4日目に細胞をウェルから取り出し生存細胞数と抗体を産生している細胞数を測定した．生存細胞数はトリパンブルーによる染色により，抗体産生細胞数はカニンガム法により計数した．すなわち，培養ウェルより回収したリンパ球浮遊液0.4m*l* に10%SRBC0.05m*l* およびモルモット補体0.05m*l* を加えて混和し，この細胞混合液をカニンガムチェンバー(高橋技研製品)に0.1m*l* ずつ入れ，チェンバーの周囲をパラフィンで封じた後37℃または室温に静置した．SRBC に対する抗体を産生している脾臓リンパ球の周りに溶血斑の生ずるのを待って，溶血斑の数を数えた．抗体産生細胞数は，各培養ウェルあたりの抗体産生細胞数として表現した．

結果および考察

1．CHO-K 1細胞にたいする細胞毒性

蘇葉エーテル，エタノールおよび水抽出物と精製ペリルアルデヒドのCHO-K 1細胞にたいする細胞毒性の試験結果を表1．および図1．に示す．ペリルアルデヒドが最も強い細胞毒性を示し，次いでエーテル抽出物，エタノール抽出物の順であった．水抽出物はこの実験で用いた量ではほとんど細胞毒性を示さなかった．エーテル，およびエタノール抽出物にはペリルアルデヒドが含まれている．分析結果を基にこれら抽出物中のペリルアルデヒド含有量を計算し表1．に記した．この結果から考えて，エーテルおよびエタノール抽出物の示した細胞毒性は単純にペリルアルデヒドによるものではなく，抽出物

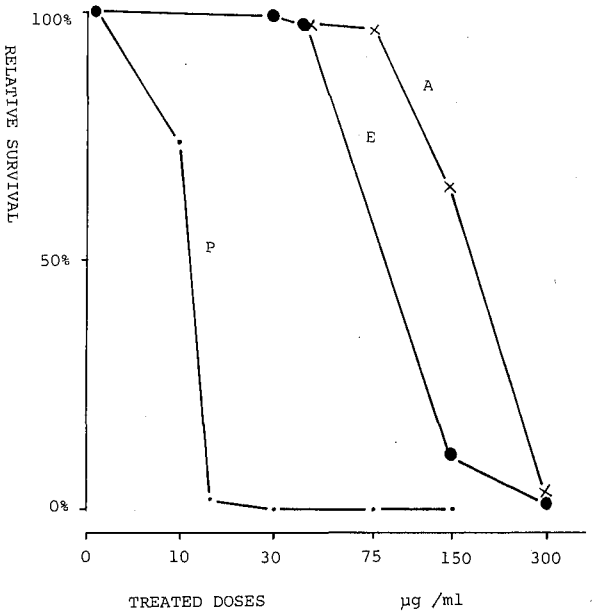


Fig. 1．Cytotoxicity of Perilla Extracts in CHO-K 1 cells

RELATIVE SURVIVAL：
Survival of treated cells was shown as the percentage to the survival of untreated control.
A：Ethanol extract
E：Ether extract
P：Perillaldehyde

中の含まれる種々の化合物の作用の総和であると思われる．

これらの結果を参考にして，以下の実験では著しい細胞毒性を示さない量を試料の添加量として用いた．

2．CHO-K 1細胞にたいする変異原性

各試料の変異原性試験結果を表2．に示す．変異原性試験は，細胞を各濃度の試料で2時間処理した後，正常培養液中で2日間培養し，次いでウワバインを含む選択培養液に移してさらに2週間培養を継続し，生じるウワバイン耐性細胞のコロニーを突然変異細胞として計数した．陽性対照としてはMNNG を用いた．突然変異率は10^6生存細胞あたりの突然変異細胞数として示した．

試験した各試料はいずれもわずかに変異原発生を増加させていた．実験で使用したCHO-K 1細胞にウワバイン耐性突然変異が自然に起こる確率は10^8細胞あたりわずか2細胞であり[3]，これを考慮すれば蘇葉成分には変異原活性のあることは否定できない．特に水抽出物には

Table 1. Cytotoxicity of Perilla Extracts in CHO-K 1 cells

TREATMENT*1	Dose*2	PA Content*3	SURVIVAL*4
Ether Extract	300 ug/ml	17.4ug/ml	2.5%
	150	8.5	54.3
	75	4.3	77.8
	37.5	2.1	76.2
	30	1.7	99.3
	0	0	99.9
Ethanol Extract	300	2.7	43.9%
	150	1.4	65.4
	75	0.68	70.8
	37.5	0.37	72.3
	30	0.27	76.4
	0	0	99.9
Perillaldehyde	100	100	0.1%
	50	50	1.9
	25	25	17.4
	12.5	12.5	37.3
	10	10	63.5
	0	0	99.9
Water Extract	1000	0	73.4%
	100	0	71.8
	10	0	72.0
	1	0	76.3
	0	0	79.5

*1 : Each substance was added in the culture after an over-night incubation of cells.
*2 : Treated doses were shown as the weight of chemicals per 1 ml of culture medium.
*3 : Contents of perillaldehyde(PA)in each extract were calculated from the results of analysis by capillay GC.
*4 : Survival was shown as the percent of surviving cells(colony numbers)per inoculated cells after one-week incubation.

用量と反応の結果に相関があるように思われる．水以外の抽出物については出現する突然変異細胞が非常に少なく，変異原性を確実にとらえるためには試験細胞数を増やすなど，別の実験方法をとらねばからない．なお表2．と表1．で細胞生存率が異なるのは，試料を添加して培養した時間の長短があるためである．

3．CHO-K 1細胞での抗変異原性

CHO-K 1細胞にアルキル化剤であり強い変異原活性をもつMNNGを作用させるとウワバイン耐性突然変異細胞はMNNGの処理量に相関して増加する．（表2．参照）

MNNGによって誘発される突然変異が蘇葉成分によってどのように修飾されるかをみるためにこの実験を行った．MNNGで細胞を処理し，48時間後に各試料を添加して行った試験の結果を表3．に示す．いずれも突然変異率は数百となっているが，水抽出物では添加量に相関して突然変異率が減少している．エーテル抽出物の場合は高濃度で突然変異率の減少がみられ，またペリルアルデヒドでは，高濃度で減少，低濃度で逆に増加している．これだけの結果から各試料の変異原性抑制あるいは促進効果を云々することはできないが，水抽出物は抗変異原活性をもつ可能性がある．

渡辺らは「生薬熱水抽出物の変異原活性抑制効果」[4]と題する論文の中で，調査した104種の生薬の内，19の

Table 2. Mutagenicity of Perilla Extracts in CHO-K 1 cells

TREATMENT*1	Dose*2	SURVIVAL*3	MUTATION FREQUENCY*4
Ether Extract	150 μg/ml	75.7%	$1.3/10^6$
	150	86.5	3.8
Ethanol Extract	150	86.3	$2.4/10^6$
	150	96.0	1.6
Perillaldehyde	10	83.0	$0.7/10^6$
Water Extract	1000	73.4	$11.0/10^6$
	100	71.8	1.3
	10	72.0	0
	0	79.5	0
MNNG	0.25	58.2	$8.8/10^6$
	1.0	30.0	153.3

*1 : CHO-K 1 cells were treated with each substance for 2 hrs, and incubated in fresh growth medium for following 2 days. Then cells were re-plated into the ouabain-containing dishes, and incubated for 2 weeks when the ouabain-resistant mutated cells were selected.
MNNG : N-Methy-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(positive control)

*2 : Treated doses were shown as the weight of chemicals per 1 ml of culture medium.

*3 : Survival was shown as colony numbers(%) of treated cells after 1 week incubation in the fresh growth medium.

*4 : Mutation frequency was shown as induced mutated cells(numbers of ouabain-resistant colony) per 10^6 surviving cells.

Table 3. Effect of Perilla Extracts on Mutation induced by MNNG in CHO-K 1 cells

TREATMENT*1	Dose*2	SURVIVAL*3	MUTATION FREQUENCY*4
Ether Extract	150 μg/ml	10.5%	$300/10^6$
	30	12.5	480
	0	9.5	420
Perillaldehyde	15	10.5	333
	5	8.5	788
	0	12.0	625
Water Extract	100	11.5	420
	30	14.5	540
	0	12.0	666

*1 : CHO-K 1 cells were treated with MNNG(1 μg/ml)for 2 hrs, and the treated cells were incubated in fresh growth medium for following 48 hrs. Then cells were re-plated into new dishes and incubated with each test substance and ouahain for 2 weeks.

*2 : Treated doses were shown as the weight of chemicals per 1 ml of culture medium. Dose 0 means that the cells were treated with MNNG alone.

*3 : Survival was shown as surviving cells(numbers of colony), which had been treated with MNNG, after the incubation in growth medium containing each dose of Perilla extracts for 1 week.

*4 : Mutation frequency was shown as induced mutated cells(numbers of ouabain-resistant colony) per 10^6 surviving cell.

抽出物に変異原性抑制効果のあることを報告している．天然由来物質の様々な活性を検出してゆく上で，変異原性試験のような短時間で行える試験を有効に利用する必要があると思われる．

4．蘇葉成分の染色体にたいする作用

ペリルアルデヒド2000mg／kg-250mg／kg を強制経口投与により，500-31mg／kg を腹腔内注射によりチャイニーズハムスターに投与したところ，腹腔内注射では500mg／kg で3／4，250mg／kg で4／4，125mg／kg では1／4，62.5および31mg／kg では0／4の動物が死亡した．経口投与では死亡はみられなかった．そこで染色体試験のための投与量を，経口投与では2000，1000，500，250mg／kg，腹腔投与では100，50，25mg／kg とした．上記の投与量で単回経口投与または腹腔内投与を行い，6，24，48時間の骨髄細胞の分裂中期染色体を1群400観察したが，染色体異常の誘発は全く認められなかった．

また，経口投与を行った動物については，投与後72，96，120時間目の観察，および3日間連続投与による観察も行ったが結果は陰性であった．

蘇葉エーテルおよびエタノール抽出物についても同様に経口投与と腹腔内投与動物の6，24，48時間目の観察と，3日間連続投与試験を行ったが，結果はいずれも陰性であった．これらの試験結果から試験した蘇葉成分にはチャイニーズハムスターにたいする染色体異常誘発性はないものと結論した．

食品添加物としてのペリルアルデヒドについては，微生物による変異原性試験，培養細胞による染色体異常誘発性，およびマウス小核試験の結果が石館らにより報告されているが[5,6]，これによればペリルアルデヒドは，変異原性(－)，培養細胞(CHL 細胞)に染色体異常を誘発するが，動物実験で染色体にたいする作用をみる試験であるマウス小核試験の結果は陰性である．

我々の行った試験でも，培養細胞(CHO 細胞)ではペリルアルデヒド，蘇葉エタノールおよびエーテル抽出物に染色体異常誘発活性が一部陽性となっている．(用量と反応の相関が得られないため再試験を予定しておりデータはここには示していない．)これらの結果から考察すると，ペリルアルデヒドは試験管内試験でのみ染色体に作用し，動物体内では代謝その他の作用により不活性になる物質なのかも知れない．

5．蘇葉成分の免疫活性

ヒツジ赤血球(SRBC)を抗原として，マウス脾臓リンパ球を抗体産生細胞として用いて試験管内で抗体産生を検出する実験系は免疫学の分野で一般的に利用されている．この試験系を用いて，蘇葉の各成分の免疫活性を調べた．結果を表4．に示す．試料無添加の対照群では，抗体産生細胞数は培養3日目に48／培養ウェル，4日目に1824／ウェルであった．これに対し，蘇葉エーテル抽出物を添加した場合には培養3日目の抗体産生細胞数が138と対照の2.9倍に増加した．エタノール抽出物，精製ペリルアルデヒドはともに抗体産生を抑制した．また水

Table 4．Effect of Perilla Extracts on Antiboby Production in vitro

TREATMENT*1	Dose*2 (μg/ml)	PEC/CULTURE*3 on day 3	PEC/CULTURE*3 on day 4	VIABILITY*4 on day 4
None	0	48(1.0)	1824(1.0)	30%
Ether Extract	150	138(2.9)	1612(0.9)	31%
Ethanol Extract	150	28(0.6)	790(0.4)	25%
Perillaldehyde	50	12(0.3)	560(0.3)	30%
Water Extract	300	90(1.9)	262(0.14)	25%

*1：Mouse spleen cells (2×10^7) were incubated in Millcell-HA with SRBC(Ag) and each test substance for 3, and 4 days.

*2：Treated doses were shown as the weight of each substance per 1 ml of culture, and the volume of chemicals added was adijusted to 30 μl.

*3：PEC/culture means the number of Plaque Forming Cells per a culture well. Cultured spleen cells were harvested on day 3 and 4 cultivation, and antibody producing cells, which produced haemolysin against SRBC, were counted on Cunningham's plates in which haemolytic plaque appeared surrounding such antibody producing cells. A number in parentheses is the ratio of PFC to control PEC.

*4：Viability of harvested cells on day 4 was assayed by the trypan blue exclusion test.

抽出物は培養3日目には促進的に，4日目には抑制的に働いている．培養4日目の細胞生存率はいずれもこの実験系での標準値であり，抑制効果は細胞毒性によるものでないことは明らかである．

この試験は蘇葉成分の免疫学的活性を検索するために予備的に行ったものであり，各試料について，他の試験結果から活性が予想された1用量きり試験していない．免疫活性を明らかにするためには，用量と活性の相関や試料添加の時間，産生される抗体の種類などをさらに検討しなければならない．

漢方薬剤の免疫活性についてはいくつかの報告がみられる．久保，長尾らは桔梗の免疫薬理学的研究についての報告[7,8]のなかでキキョウイヌリンの抗腫瘍作用と貪食細胞にたいする効果について述べ，また木島ら[9]は4種の生薬成分の抗ウイルス作用と抗発癌プロモーター作用について報告している．十全大補湯[10]，桂皮[10]，金銭草[11]，温清飲[12]などについても抗腫瘍活性，免疫活性についての報告がある．また小柴胡湯のように免疫促進効果を期待してすでに臨床で用いられている薬剤もある．

免疫活性は有効性，有害性の両側面をもつ作用であるが，免疫活性を検索することは，天然由来物質の抗腫瘍性などの有効作用を発見して行くうえで重要な研究方向の一つとなるものと思われる．

総　括

蘇葉エーテル，エタノール，水抽出物，および精油成分である精製ペリルアルデヒドの細胞活性を調べ，水抽出物に弱い変異原性と抗変異原性，エーテル，エタノール抽出物およびペリルアルデヒドに免疫促進あるいは抑制効果がみられた．

チャイニーズハムスターによる試験では，蘇葉のエーテル，エタノール抽出物およびペリルアルデヒドに染色体異常誘発は認められなかった．

（この研究は東京都衛生局東洋医学事業の一環として行ったものである．）

文　献

1）Benjamin J. Willson, John E. Garst, *et al*：*SCIENCE*, 197(13), 573-574, 1977.
2）J. Cole, C. F. Arlett and M. H. L. Green：*Mutation Research*, 41, 377-386, 1976.
3）Mieko Sasaki, Seiji Yoshida and Kogo Hiraga：*Mutation Research*, 122, 367-372, 1983.
4）渡辺富士雄，森本　功，興津知明：生薬学雑誌，41(3), 248-252, 1987.
5）石館　基，祖父尼俊雄，吉川邦衛：変異現と毒性，5(6), 579-587, 1982.
6）石館　基，吉川邦衛，祖父尼俊雄：トキシコロジーフォーラム，6(6), 661-678, 1983.
7）久保道徳，長尾孝治，松田秀秋，難波健輔：生薬学雑誌，40(4), 367-374, 1986.
8）長尾孝治，松田秀秋，中田勝久，難波健輔，久保道徳：生薬学雑誌，40, (4), 375-380, 1986.
9）木島孝夫，徳田春邦，小塚睦夫，岡本えみ子，田部昌弘：生薬学雑誌，41(4), 344-348, 1987.
10）原中瑠璃子，小曽戸洋，平馬直樹，等：和漢医薬学雑誌，4(1), 49-58, 1987.
11）氾　紀芳，真弓久則，姫野国祐，徳田倫章：和漢医薬学雑誌，4，88-93, 1987.
12）Yutaka ONO, Takashi NISHIYORI, Akito MASE, *et al*：和漢医薬学会誌，5，68-73, 1988.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 282-288, 1990

人参エキス前処置がチアベンダゾール（TBZ）のマウス催奇形性に及ぼす影響

小縣昭夫*, 安藤　弘*, 久保喜一*, 神谷信行*
尾畑浩魅**, 安田一郎***, 佐々木美枝子*

Effects of Pretreatment with Ginseng on Thiabendazole-Induced Teratogenicity in Mice

AKIO OGATA*, HIROSHI ANDO*, YOSHIKAZU KUBO*
NOBUYUKI KAMIYA*, HIROMI OBATA**, ICHIROU YASUDA*** and MIEKO SASAKI

Summary

To study the effects of ginseng (GS), a plant used in Chinese medicine, on the teratogenicity of thiabendazole (TBZ), pregnant mice were given a dose of 150mg or 300mg GS／kg p. o. for three or nine consecutive days before oral administration of a dose of 1000mg TBZ／kg. The TBZ dose was given on day 9 of gestation. All foetuses were removed from the uterus on day 18 of gestation, and were examined for external and skeletal anomalies.

The malformations seen in the groups of mice pretreated with GS were similar to those in mice treated only with TBZ. In the groups pretreated with GS, however, the incidence of early resorbed foetuses tended to be lower and the numbers and body weight of live foetuses tended to be highter than those in the group treated with TBZ only. The numbers of foetuses having external and／or skeletal malformations in the groups pretreated with GS were lower as compared with those in the group treated with TBZ alone. The incidence of skelenal variation in the groups pretreated with GS tended to be counteractive in comparison with that of group treated with TBZ only.

These results suggested that the counteractive effect of GS pretreatment may be caused by a difference of the TBZ difference of the TBZ concentration in blood.

Keywords：拮抗作用 counteraction, 催奇形性 teratogenicity, チアベンダゾール thiabendazole, 人参 ginseng, マウス mouse

はじめに

薬用人参は古くから生薬として珍重され，漢方では補剤として多くの方剤に用いられており，民間薬としても広く使用されている．近年，薬用人参の薬効を科学的に解明する試みが多くの研究者により行われており[1]，生薬の中では化学的・薬理学的情報を比較的多く持っているもののひとつである．

本実験は既知催奇形物質であるチアベンダゾール(TBZ)の催奇形作用に対し人参エキス前処置が如何なる影響を及ぼすかについて検討した．

TBZ は当部においてその催奇形性が確認され，薬物動態，催奇形作用機序についても検討がなされており[2-6]，他の物質と併用した場合，得られた結果から併用した薬物の効果を考察する上で有用な物質であると考

*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 Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan
**現同微生物部細菌第一研究科
***同理化学部医薬品研究科

えられる.

実験材料ならびに方法

1．試料：チアベンダゾール(TBZ：純度98.5%)はMerck Sharp and Dohme International 社製(Lot no. BZA−540)のものを購入，使用した．水抽出人参エキスは信州薬品研究所㈱より購入，使用した．

TBZ はオリーブ油(局方)に，人参エキスは蒸留水に各々懸濁し，いずれも投与容量が10ml／kgとなるように調整した．

2．動物および飼育条件：Crj：CD-1(ICR)マウス(日本チャールス・リバー社)を4週齢で購入，1ヶ月間の予備飼育の後，8−12週齢の健康な動物を実験に供した．動物は換気毎時10回(HEPA フィルター経由)，温度24−26℃，湿度50−60%に制御された飼育室にて，固型飼料(CE−2：日本クレア製)と水(滅菌フィルター経由水道水)を自由に摂取させた．

雌雄マウスはチップ敷アルミニウムケージ(225×325×110mm^3)に各々10匹飼育した．但し雄マウスは交配開始1週間前よりチップ敷プラスチックケージ(180×325×110mm^3)に1匹飼育した．

交配は雌雄1：1の終夜同居により，翌朝膣栓の確認されたものを妊娠動物とみなし，その日を妊娠0日とした．膣栓の確認されたマウスはプラスチックケージに1匹飼育した．

3．処置：人参エキスは投与用量が150mg，300mg／kgとなるように調整，各々妊娠6〜8日に1日1回連続経口投与した．この二群以外に300mg／kgについては別に妊娠0〜8日に9回連続投与した群を設けた．これらの人参エキス投与群は妊娠9日にTBZ 1000mg／kgを経口投与した．さらに人参エキス300mg／kgを妊娠6−9日に4回経口投与した群，TBZ 1000mg／kgのみを妊娠9日1回経口投与した群を設けた．

4．観察方法：体重測定および一般状態の観察を毎日行い，妊娠18日にエーテルにより麻酔屠殺し，次の検索を行った．

屠殺後直ちに開腹，子宮を開き着床痕，早・後期死亡胎児，生児数を数え，生児は体重測定，性の判別を行った後，外表異常の有無を点検した．次いで母体卵巣の黄体数を数え，主要臓器の重量測定と肉眼的異常の有無を検索した．外表異常点検後，生児は95%エチルアルコールで固定し，アリザリンレッドSで骨格染色[7]を行い骨格異常の有無を調べた．

5．母体血液中 TBZ 濃度：人参エキス前処置150mgと300mg／kg投与(妊娠6−8日)群および TBZ 単独投与群の TBZ 投与後1週間と3時間目の母体血液中の TBZ 濃度(各群3匹)を HPLC を用いて測定した．

6．統計処理：毒性部データ処理システムに組み込まれた統計分析[8]の他に，異常の頻度については二項確立分布に基ずいた鈴木ら[9]の方法を用いた検定も行った．

実験結果

母体に係わる所見

妊娠0日の体重を100とした体重増加率の推移は図1に示す通りで人参エキス前処置群と TBZ 単独投与群との間に有意差は見られなかった．それに比べ人参エキスのみ(妊娠6−9日300mg／kg，4回)投与の群では体重増加抑制傾向は見られず当部において蓄積された陰性対照となる正常妊娠マウスでのそれとほぼ同様の推移を示した．妊娠18日の解剖日までに死亡した動物は人参エキス150mg，300mg／kg(妊娠6−8日3回)前処置群で各々2匹，300mg／kg妊娠0−8日前処置群で3匹，TBZ 単独投与群で2匹であったが，何れも妊娠9日 TBZ 1000mg／kg投与後2−3日目での死亡であった．

解剖時の肉眼的所見ではいずれの群にも特記する変化

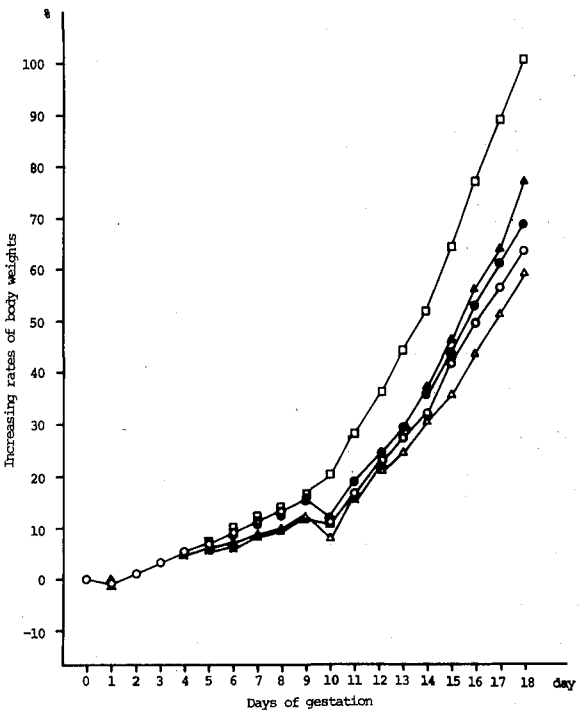


Fig. 1. Increasing rates of body weights
(○); TBZ alone, (●); 300mg GS(6-8) and TBZ,
(△); 150mg GS(6-8) and TBZ,
(▲); 300mg GS(0-8) and TBZ, (□); 300mg GS

を認めなかった.

母体臓器重量(表1)では何れの人参エキス前処置群ともTBZ単独投与群に比べ有意な,また用量に関連した変動は見られなかった.人参エキスのみ投与群での各々の臓器重量は当部でこれまでに蓄積した陰性対照となる母体臓器重量の変動範囲内であった.

生殖の指標

結果を表2に示した.

1母体当りの黄体数,着床数では各群間に意味のある変化は見られなかった.死亡児発現頻度では早期死亡が人参エキス前処置の何れの群においてもTBZ単独群に比べ,推計学的に有意ではないが,低下の傾向が見られた.生児数は人参エキス150mg前処置群がTBZ単独群に比べやや少ない値を示したが,その他の人参エキス前処置群は何れもTBZ単独群に比べ多い値を示した.生児体重では人参エキス前処置群がTBZ単独投与群に比べ雌雄ともやや重い傾向にあった.人参エキスのみ投与群は上述した何れの指標も当部での蓄積された陰性対照での値の範囲内であった.

外表および骨格奇形

結果を表3に示した.

人参エキス前処置はTBZが誘発する奇形の型に変化を与えなかった.しかしながら,奇形児数では骨格奇形での人参エキス300mg/kg前処置(9回投与)群を除く何れの前処置群ともTBZ単独投与群と比べ推計学的に有意な減少を示し,特に人参エキス150mg/kg前処置群では奇形児を有する母体の数においても有意な減少であった.また,奇形児発現頻度でも,推計学的に有意ではないが,外表・骨格奇形の何れにおいてもTBZ単独投与で誘発される発現頻度よりも低下の傾向にあった.人参エキスのみ投与群は奇形の型,数,発現頻度とも当部において蓄積されている自然発生奇形の範囲内であった.

Table 1. Effects of pretreatment with ginseng on organ weights of 18-day-pregnant mice treated with thiabendazole (TBZ) on day 9 of gestation

Dose	No. of dam	Liver g g/100 g	Heart mg mg/100 g	Spleen mg mg/100 g	Kidney (L) mg mg/100 g	Kidnoy (R) mg mg/100 g
TBZ alone 1000mg/kg	19	2.8±0.5[1)] 9.5±1.3[2)]	141.7±11.7 481.5±38.4	139.3± 27.7 471.6± 82.0	236.4±27.5 803.0±90.7	244.1±28.7 829.7±99.5
G 300mg (6-8) +TBZ	18	2.9±0.4 9.8±0.7	143.4± 9.6 486.9±35.2	148.0± 36.9 500.8±116.7	246.7±20.3 836.9±62.6	248.4±22.2 843.3±77.2
G 150mg (6-8) +TBZ	11	2.6±0.4 8.9±1.3	134.9±11.3 464.8±38.4	126.1± 34.4 436.9±131.9	228.0±19.3 787.7±95.0	236.5±17.9 817.4±96.2
G 300mg (0-8) +TBZ	15	2.9±0.3 10.0±1.0	137.1±11.5 470.2±24.4	127.7± 33.4 434.7± 94.4	227.5±21.1 781.7±69.1	232.2±18.9 798.1±65.4
G 300mg (6-9)	20	3.1±0.3 10.4±1.0	141.3±12.6 486.2±37.9	133.1± 22.3 458.5± 77.0	242.8±26.0 834.2±66.2	249.7±26.0 858.1±67.0

Dose	No. of dam	Lung mg mg/100 g	Adrenal (L) mg mg/100 g	Adrenal (R) mg mg/100 g	Ovary (L) mg mg/100 g	Ovary (R) mg mg/100 g
TBZ alone 1000mg/kg	19	184.8±14.6 626.8±36.3	3.9±0.4 13.4±2.0	3.6±0.5 12.4±2.2	9.3±2.1 31.2±5.6	10.1±2.4 34.1±7.8
G 300mg (6-8) +TBZ	18	182.2±11.2 619.1±48.3	3.8±0.6 12.9±2.6	3.4±0.5 11.6±2.1	9.9±2.2 33.2±6.0	9.9±2.1 33.5±7.1
G 150mg (6-8) +TBZ	11	175.5±13.4 604.7±47.7	3.3±0.5 11.5±2.2	3.2±0.4 10.9±1.2	8.5±1.3 29.3±4.0	9.1±2.2 31.4±8.2
G 300mg (0-8) +TBZ	15	179.0±19.5 615.2±65.9	3.7±0.6 12.6±2.2	3.3±0.5 11.4±1.8	9.1±2.0 31.2±6.1	10.5±2.3 36.0±7.6
G 300mg (6-9)	20	180.7±17.9 621.6±53.0	3.7±0.7 12.8±2.7	3.3±0.6 11.5±1.9	10.5±2.6 36.2±9.2	9.9±2.2 33.7±6.8

1) Mean (absolute) ±SD 2) Mean (relative) ±SD

Table 2. Effects of pretreatment with ginseng on the reproductive effects induced by treatment with thiabendazole (TBZ) on day 9 of gestation

Reproductive parameter	TBZ alone 1000mg／kg	G 300mg(6−8) +TBZ	G 150mg(6−8) +TBZ	G 300mg(0−8) +TBZ	G 300mg (6−9)
Females mated!	25	25	25	25	20
Females died″	2	2	2	3	0
Females gestated$	23	23	23	22	20
Females with＞one live foetus	19	18	11	15	20
Corpora lutea／litter#	17.2 ± 2.1	15.7 ± 1.9	15.5 ± 2.2	16.1 ± 2.0	16.6 ± 2.4
Implantation／litter#	14.1 ± 3.5	13.6 ± 2.7	10.9 ± 4.6	13.8 ± 1.9	13.3 ± 3.8
Resorption of foetuses(%)'&					
Early	44.0 ±34.5	33.1 ±32.5	32.6 ±30.4	21.3 ±20.7	4.2 ± 5.4 **
Late	0.3 ± 1.3	1.6 ± 3.1	1.4 ± 3.1	1.4 ± 2.9	1.2 ± 2.9
Live foetuses／litter#	7.6 ± 5.3	8.9 ± 4.8	7.0 ± 5.1	10.8 ± 3.3	12.6 ± 3.6 *
Body wt of live foetuses(g)#					
Male	1.18± 0.13	1.20± 0.12	1.27± 0.12	1.20± 0.12	1.41± 0.12**
Female	1.13± 0.14	1.20± 0.07	1.15± 0.12	1.14± 0.10	1.35± 0.10**

! No. with vaginal plug.

″ No. that died before scheduled kill on day 18.

$ No. with implantation sites.

Values given as mean±SD for litters having one or more live foetuses.

'& "Early" defined as cases showing implanted sites and amorphous germinal mass, "late" defined as cases showing the head and limbs.

Values for per cent resorption and foetal body weight were obtained by averaging the value for each litter.

Values marked with asterisks are significantly different from the corresponding control value (*$p<0.05$; **$p<0.01$)

as determind by the following statistical test : chi - square test (females mated, died, gestated or having＞one live foetus);

t−test (corpora lutea, implantation, live foetuses and foetal body weight); rank sum test (resorption).

骨格変異および化骨進行度

結果を表4に示した.

骨格変異の発現頻度では胸骨核不対称がTBZ単独投与群に比べ，人参エキス前処置300mg／kg投与(妊娠0－8日)群で有意な低下，頸肋が人参エキス前処置150mg／kg群で有意な増加を示した．上記の変異も含めた何れの骨格変異においても人参エキス前処置群はTBZ単独投与群に比べ，その発現頻度において拮抗した値を示す傾向にあった.

化骨進行度では右前指骨数がTBZ単独投与群に比べ，人参エキス前処置300mg／kg投与(妊娠6－8日)群で有意な増加を示した．その他の何れの指標もTBZ単独投与群は人参エキス前処置群に比べ遅延傾向にあった.

人参エキスのみ投与群は骨格変異，化骨進行度の何れの指標も当部において蓄積された陰性対照となる値の範囲内での変動であった.

母体血液中TBZ濃度の経時的変化

結果を表5に示した.

TBZ投与1時間では各群間に変化はみられなかった．投与3時間では推計学的有意差は認められなかったものの，人参エキス前処置群での値はTBZ単独投与群に比べ低い傾向にあった.

考　察

本実験の目的は人参エキス前処置がTBZの催奇形作用にどのような影響を及ぼすかを検討することにあった.

人参エキス前処置はTBZが誘発する奇形の型に変化を与えなかったが，外表および骨格奇形発現頻度を低下させる傾向が認められた．また胎児発育に関しても生児

Table 3. Effects of pretreatment with ginseng on foetal malformation induced by treatment with thiabendazole(TBZ)on day 9 of gestation

Observation	TBZ alone 1000mg／kg	G 300mg(6−8) +TBZ	G 150mg(6−8) +TBZ	G 300mg(0−8) +TBZ	G 300mg (6−9)
			(External malformations)		
No. of litters with malformed foetuses／no. examined	12／19	8／18	2／11*	8／15	2／19
……(%)	(89.5)	(44.4)	(18.2)	(53.3)	(10.5)
Malformations(%)@	38.8±43.4	18.4±30.8	7.6±17.3	10.6±15.8	1.5± 5.4
No. malformed foetuses／no. examined	28／144	13／160*	3／ 77*	12／162*	4／248*
No. of foetuses with：					
Cleft palate	1	0	0	0	1
Open eyelids	0	2	0	1	0
Exencephaly	0	1	0	0	0
Malposition of dactyl	0	1	1	0	0
Amelia	2	3	1	3	0
Short limb	6	0	0	0	0
Oligodactyly	11	6	0	1	0
Syndactyly	1	0	0	0	0
Polydactyly	0	1	0	1	3
Short or non tail	15	2	1	7	0
Hematocyst of eye vesicle	0	1	0	0	0
Anal atresia	3	0	0	0	0
			(skeletal malformations)		
No. litters with malformed foetuses／no. examined	14／19	14／18	8／11	13／15	3／20
……(%)	(73.7)	(77.8)	(72.7)	(86.7)	(15.0)
Malformations(%)@	50.6±41.8	40.2±40.1	42.5±43.7	35.9±25.8	1.5± 3.9**
No. malformed foetuses／no. examined	56／144	41／159*	18／ 77*	52／162	3／248*
No. of foetuses with					
Fusion of vertebral arches	47	37	16	45	2
Fusion of vertebral bodies	23	19	9	14	1
Fusion of vertebral libs	16	5	3	12	1

@Calculated by averaging the percentage in each litter(i. e. no. of malformations／no. of foetuses), and shown as mean± 1 SD.
Values marked with asterisks are significantly different(rank sum test or X^2−test)from the corresponding control value(*$p<0.05$;**$p<0.01$)

体重，化骨進行度などから，人参エキス前処置は TBZ 単独投与に比べると，TBZ による胎児発育抑制を軽減させる傾向を示している．一方，TBZ は骨格変異の中で頸肋の発現頻度を有意に低下させることが鈴木ら[9]の二項確立分布を用いた推計学的方法により明かとなっている．今回，人参エキス前処置はこの指標において TBZ の作用に拮抗した値を示したばかりでなく，その他の骨格変異においても TBZ 単独投与で得られる値と拮抗した数値を示す傾向にあった．

TBZ は当部での実験から，胎児に移行することがわかっている他，特定臓器への局在性はなく，母体血液と胎児内 TBZ 濃度の経時的変化は同様のパターンを示し，奇形の発現にはある一定以上の胎児内濃度が必要であると推測されている．また，TBZ の奇形発現には TBZ の代謝物よりはむしろ親化合物が深く係わっていることが，SKF−525 A(薬物代謝阻害剤)およびフェノバルビタール(薬物代謝酵素誘導剤)前処置による実験結果から示唆されている[4]．さらに TBZ はチトクローム P−450を介

Table 4. Effects of pretreatment with ginseng on the skeletal variations or the ossification induced by treatment with thiabendazole (TBZ) on day 9 of gestation

Observation	TBZ alone 1000mg/kg	G 300mg(6−8) +TBZ	G 150mg(6−8) +TBZ	G 300mg(0−8) +TBZ	G 300mg (6−9)
No. examined	19	18	11	15	20
No. of fetuses examined	144	159	77	162	284
Variation					
Type & percent variation±S. D #					
Asymmetry of sternebrae″	44.5 ±34.0	34.0 ±25.9	43.0 ±32.7	17.4 ±18.5 *	14.4 ±11.3 **
Accessory of sternebrae	0.6 ± 2.6	3.6 ±12.1	0	0.6 ± 2.4	5.3 ±17.1
Cervical rib	7.8 ±13.3	17.6 ±17.5	27.7 ±22.9 *	16.1 ±23.0	29.3 ±21.4 **
14 th rib[2]	9.0 ±11.4	15.2 ±15.2	9.6 ±20.6	15.4 ±22.8	24.2 ±29.9
Splitting & branching of atlas & axis	10.3 ±23.5	11.6 ±19.9	2.0 ± 6.7	7.5 ± 9.2	7.0 ± 8.1
Abnomalities in number @ of pre−sacral vertebrae	23.0 ±36.1	9.6 ±18.2	12.9 ±24.0	2.3 ± 5.3	0.5 ± 2.0 *
Separation or defective development of sternebrae	34.0 ±33.1	13.9 ±15.2	29.1 ±32.9	23.7 ±19.8	6.4 ±10.9 *
Ossification #					
Mean number of ossified fore limb phalanx±SD [(Pro.+Mid.)/2]					
L	2.4 ± 0.7	2.8 ± 0.5	2.7 ± 0.6	2.6 ± 0.6	3.0 ± 0.3 **
R	2.6 ± 0.6	3.0 ± 0.4 *	2.9 ± 0.6	2.7 ± 0.7	3.0 ± 0.4 **
Mean number of ossified hind limb phalanx±SD [(Pro.+Mid.)/2]					
L	2.1 ± 0.8	2.4 ± 0.5	2.6 ± 0.8	2.3 ± 0.6	3.1 ± 0.5 ***
R	2.3 ± 0.8	2.6 ± 0.5	2.7 ± 0.7	2.4 ± 0.6	3.1 ± 0.5 **
Mean number of ossified $ post lumber vertebrae±SD	10.9 ± 1.8	11.6 ± 1.4	11.7 ± 1.9	11.2 ± 1.4	12.5 ± 1.3

″ Cases showing deviation over 1/2 of length of maximum sternal nucleous between left and right nuclei.

[2] Definition of lumber rib was based on Kimmel and Wilson (Teratology, 8, 309−316, 1973).

@ Cases showing abnormality in sum of numbers of cervical, thoracic and lumber vertebrae.

$ Sum of numbers of ossificated sacral vertebrae.

Value of group was obtained by averaging the value of each litter

[Statistical analysis]

ranked sum test (variation) ; t−test (ossification) : *$p<0.05$ **$p<0.01$ ***$p<0.001$

Table 5. The concentration of TBZ in blood from mice pretreated with ginseng

ginseng & TBZ (mg/kg)	after administration of TBZ	
	1 hr	3 hr
0 & 1000	72.3±16.6	59.5± 7.4
150 & 1000	74.5±11.1	39.0±10.7
300 & 1000	68.8± 9.8	46.1±25.4

n= 3

して酸化的代謝を受け[5]，硫酸およびグルクロン酸抱合体をつくり，排泄されることがわかっている[6]．

一方，大浦らの総説[1]によれば，薬用人参抽出物がアセトアミノフェンの肝での代謝を促進することが知られている．アセトアミノフェンはチトクロームP−450を介して酸化的代謝を受けることが知られており[10]，薬用人参には薬物代謝酵素を誘導させる作用のあることが示唆される．以上のことを考慮すれば，本実験において見られた人参エキス前処置によるTBZの催奇形作用に

対する拮抗的効果は，人参エキス前処置により薬物代謝酵素が誘導され，TBZ の代謝を促進させた結果，TBZ 自身が胎児内である一定以上の濃度を保ち得ずその作用が軽減された結果ではないかということが示唆された．

文　献

1）大浦彦吉，柴田承二，熊谷　朗，高木敬二郎，編集，薬用人参—その研究と進歩—，共立出版，1981.

2）Ogata A., Ando H., Kubo Y. & Hiraga K. Teratological studies of thiabendazole in ICR mice. *Fd. Chem. Toxic.*22(7), 509－520, 1984.

3）Yoneyama M., Ogata A., Fujii T. & Hiraga K. The maternal - foetal distribution of thiabendazole in two different vehicles to pregnant mice. *Fd. Chem. Toxic.*22(9), 731－735, 1984.

4）Ogata A., Yoneyama M., Sasaki M., Suzuki K. & Imamichi T. Effects of pretreatment with SKF－525 A or sodium phenobarbital on thiabendazole - induced teratogenicity in ICR mice. *Fd. Chem. Toxic.*25(2), 119－124, 1987.

5）Yoneyama M. & Ichikawa H. Irreversible in vivo and in vitro binding of thiabendazole to tissue protein of pregnant mice. *Fd. Chem. Toxic.*24, 1283－1286, 1986.

6）藤谷知子，米山允子，小縣昭夫，安藤　弘，久保喜一，市川久次．妊娠マウス尿中のチアベンダゾール（TBZ）およびその代謝物の分析　東京都立衛生研究所研究年報，36, 373－376, 1985.

7）Dawson A. B. A note on the staining of skeleton of cleared specimens with Alizarin Red S. *Stain Technol.*1, 123, 1927.

8）Shayne C. G. & Carrol S. W. Statistics for Toxicologists, Principles and Metheds of Toxicology. edited by Wallace Hayes, P-276, 1982.

9）鈴木勝士，亀井孝幸，小縣昭夫，催奇形性試験での自然発生奇形を見分けるための統計検定法．獣医畜産新報，817, 49－54, 1989.

10）加藤隆一，鎌滝哲也　編著．薬物代謝の比較生化学．清至書院．1983.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 289-296, 1990

アスベスト繊維貪食時におけるマウスマクロファージの膜構造の電子顕微鏡的観察

福森信隆*, 荻野周三**, 佐々木美枝子*

Electron Microscopy of Mouse Macrophage Cell Membrane on Phagocytosis of Asbestos Fibers

NOBUTAKA FUKUMORI*, SHUZO OGINO**
and MIEKO SASAKI*

Morphological changes of membranes were examined with the electron microscope in mouse peritoneal macrophages which incorporated chrysotile asbestos fibers. The long fibers became intertwined in the cell membrane of macrophages, and they penetrated through the cells. Membrane structures were absent at sites where fibers broke the cell membrane. Intussusceptum of membrane into the cytoplasm was not observed at these sites. Chrysotile fibers surrounded the nuclei of macrophages, but no evidence of fibrous penetration into the nuclei was observed. The short fibers appeared to be incorporated into the phagocytotic vacuoles near the cell surface. These results suggest that asbestos fibers may cause injury to cell membranes and intracellular organella in macrophages.

Keywords：クリソタイル石綿 chrysotile asbestos, 腹腔マクロファージ peritoneal macrophage, マウス mouse, 貪食 phagocytosis, 電子顕微鏡的観察 electron microscopical observation

緒　言

疫学的には作業環境でのアスベストの発癌性が知られているが，その作用機序に関しての証明はなされていない．化学物質と異なり，生体に侵入したアスベスト繊維は不溶解性鉱物であるため体内挙動，排泄の動態も明らかでない．毒性発現に関しては，化学組成，表面荷電，繊維の形状，免疫系の異常など多くの要因が議論されているが，細胞毒性と疫学，動物実験との比較でアスベストの種類別強度の違いや，吸入あるいは経口摂取動物で容易に実験的発癌に至らないという事実からも毒性機序の一致した見解は得られていない[1,2]．しかし一般に，この様な異物が生体内へ侵入する際には，生体防禦機構を持つ貪食細胞の作用を受けることからマクロファージ等が着目されてきた．マクロファージは，肺胞，腹腔，腸管などに広範囲に分布し，異物の侵入に対して速やかに反応する．近年，活性化されたマクロファージで酸素消費量の増加や活性酸素，過酸化水素の発生が明らかとなり，発癌との関連が考慮されている[3]．

これまでアスベストの毒性に関しては，ラットの胸腔内投与で径が細く繊維の長い形状が短い繊維に比較して発癌性を増強させるというStantonらの仮説が提唱されてきた[4]．このことは，繊維の形状が発癌を誘発する引き金となる可能性を示唆している．またGaryらは，1980年，アスベスト処理で肺胞マクロファージの活性酸素が産生することを報告し[5]，アスベストの種類における産生量は，疫学によるアスベストの毒性の強さと良く一致していた．さらに，活性酸素によるDNA損傷が最近明らかとなったことから[6,7]，アスベストの毒性に影響を与えるマクロファージの関与が重要と推察される．

今回，これらのことを加味して，異物であるアスベストを取り込み時のマクロファージの形態変化について，微細構造の変化，特にマクロファージの膜構築を主に走査型(走査電顕と略す)及び透過型電子顕微鏡(透過電顕と略す)で比較観察した。

*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, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan
**同生活科学部食品添加物研究科

実験方法

実験は，体重約30 g の Crj:CD-1系雄性マウスを使用し，3日前にマクロファージの刺激誘発剤として10%ペプトンを腹腔内に前投与した．アスベストの投与は，UICC (Union Internationale Contre le Cancer)の標準品 Chrysotile 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，30mg／kg体重の割り合いで腹腔内投与を行った．投与1日後に，生理食塩水3 mlを腹腔に注射し，腹部をマッサージしたのち開腹して腹腔浸出液を遠心管に採取した．採取に際して，出血等により赤血球が混在しないように注意した．浸出液は，速やかに生理食塩水で3回遠心洗浄(1,000rpm，10分)を行い，腹腔内細胞を集めた．洗浄後の一定量の浸出液に等量の4%パラホルムアルデヒド(0.1M 燐酸緩衝液，pH7.3)を加えて前固定し，電顕用試料とした．

走査電顕と透過電顕の超薄切片用試料は，その後1%オスミウム酸(0.1M 燐酸緩衝液，pH7.3)で後固定した．走査電顕用試料は，エタノール脱水，酢酸イソアミル浸漬を行い，二酸化炭素による臨界点乾燥後，白金，パラジウムで金属蒸着を施した．走査電顕は，加速電圧10kV の電界放射型S-800(日立)を用いて観察した．透過電顕の超薄切片用試料は，二重固定した後エタノール脱水し，プロピレンオキサイド処理後，エポン樹脂に包埋した．超薄切は，やや厚めの約100 nm で切片を作製して，酢酸ウラニウム・クエン酸鉛の二重電子染色を施した．観察は，加速電圧100 kV の透過型電顕 H-7000,HU-12 A(日立)を用いて行い，アスベスト繊維の同定にはエネルギー分散型 X 線分析装置 Kevex-7500により組成元素及び形状から確認した．また，マクロファージの識別は，細胞形態とアスベスト繊維の貪食により他の細胞と区別した．

透過電顕用の一部の試料は，膜構造の検索のためフリーズフラクチャー法を実施した．パラホルムアルデヒド前固定した後，0.1M 燐酸緩衝液で良く固定液を洗浄し，冷20%グリセリン溶液に浸漬した．急速凍結は，液体窒素で冷却したフレオン22中で行い，試料は凍結後，余分な凍結液を除去して液体窒素の中に保存した．固定台に取り付けた試料をフリーズフラクチャー装置 FD-5 A 型(エイコーエンジニアリング)の－180℃の高真空(2-8x10^{-7}Torr)中に入れて，－130℃まで昇温してフレオン22を飛ばし，低速度回転でフラクチャーを装置内で行った．エッチングは，約－95℃の条件で5分間行い，白金と炭素の回転蒸着を施してレプリカ膜を作製した．付着している組織を塩素系漂白剤で溶解させ，加速電圧の100kV 透過電顕を用いて観察した．

実験結果

図1と図2は，正常なマクロファージを走査電顕と透過電顕を用いて表面構造と切片の断面構造を観察した像である．細胞表面では，無数の方向性の一定でない趨壁が突出して全体を覆い，断面像では微絨毛の形状を呈した．趨壁の直下の細胞質側では，貪食空胞がみられ空胞を囲む膜構造も明瞭であった．核は，不整形を呈し，細胞質内の滑面小胞体や分泌顆粒，ライソゾームが認められた．

アスベスト繊維を取り込んだ図3と図4は，繊維が特にマクロファージの中央部を貫通した像で，貪食された繊維数の少ない例である．マクロファージの表面趨壁の突出が減少して，膜が繊維方向に若干細長くなる形状変化を認めた(図3)．断面像では，繊維の位置する中心部を囲繞するように変形した核が取り巻き，また細胞質成分の減少がみられた．中央部の繊維は，繊維束の状態で分散がみられず，一部は核膜に接していた(図4)．

図5と図6は，多数の細繊維を取り込んだ像で，細胞表面に繊維の突き出しがみられ，形状もさらに長く伸展していた(図5)．断面像(図6)では，細胞質小器官の膜構造は不鮮明となり消失部も多くみられ，ライソゾームの増大が観察された．中心部の繊維束は直接細胞質と接して，繊維の周囲では膜構造の新生がみられなかった．微絨毛側の短い繊維は，貪食空胞に取り込まれる傾向がみられたが，空胞の膜構造が不明瞭であった．繊維を多量に取り込んだ細胞は，全体に小型で痩せた形状を示した．

貪食により繊維の突き出た細胞表面の膜構造は，マクロファージの細胞膜が引っ張られて繊維に絡み付くような像を呈した(図7)．このような状態の透過切片像は繊維部の表面膜が伸張して繊維を包む構造であり，部分的には膜の消失を伴っていた．突き出た繊維の細胞質側では，アスベスト繊維がマクロファージの膜で囲繞された像やあるいは細胞膜の陥入した像は認められなかった(図8)．

図9と図10は，アスベスト繊維とマクロファージ細胞膜の接触部の強拡大像であり，表面構造では繊維に膜が付着しているのが確認された(図9)．断面像では，付着先端部の膜が消失傾向にあり，繊維束周囲では，空胞形成がみられた．強拡大像でも，膜による細胞質側での繊維の包み込みは，みられなかった．

さらに，マクロファージ表面のレプリカ膜を取って観察すると P(Protoplasmic)面でのアスベスト繊維の周囲

では，新しい膜構築がみられず，繊維が直接細胞質に接していることが分かった(図11)．また細胞の表面境界では，繊維部周囲の細胞膜が不明瞭であった(図12)．

アスベスト繊維とそれを貪食するマクロファージの膜構造との関係は，長い繊維束では核を貫通しないで中心部に取り込まれ，繊維方向へ細胞が伸張して表面膜が引っ張られた像を示した．その部分の細胞膜は，消失傾向を示した．細胞質側に侵入した繊維は，膜で包まれることなく直接細胞質に接していた．繊維の取り込みが多いほど，細胞小器官の膜変化が多くみられた．短い繊維は，貪食空胞などに包括されてマクロファージの表面細胞膜への突出は少なかったが，一部では空胞周囲の膜構造の消失がみられた．

考　察

アスベスト繊維の発癌機構に関して解明されていない点が多々あるが，最近，活性酸素の存在が注目されてきた．葛西らは，活性酸素によりDNAの8-ハイドロオキシデオキシグアノシンの生成を認め，DNAの損傷が癌化を促進することを明らかにした．アスベストについても，胸腺のDNAでアスベストとの反応によりその物質の生成が増加したことから，発癌機構を説明している[6]．また肺胞マクロファージでアスベストによる活性酸素の産生が報告されてから[5]，アスベストはマクロファージで活性酸素を生成した後，その活性酸素により核のDNAを損傷させ，発癌を惹起させることが考察される．

マクロファージは，生成異物を貪食して排除する機能を具有している．しかしその有意義な作用を持つ反面，マクロファージ内で異物が消化されない時や細胞よりも長く突出する時，逆に刺激されて他の機能を持つことが判明してきた．活性化されたマクロファージ由来の活性酸素の放出増加は，発癌機構への関与が大きく，今後の重要な問題と示唆される．

これまで長さが8 μm 以上の長い繊維がアスベスト毒性を強めることが知られていることから[8]，マクロファージ細胞の約10 μm の直径と繊維の長さとの相関が考えられる．このことは，短い繊維ではマクロファージの細胞膜内に取り込まれるため膜損傷を起こさず，活性酸素の生成増加を抑制していることに理由づけされる．

これらの知見に基づき，アスベスト繊維とマクロファージの形態との関係を電子顕微鏡で観察したところ，顕著な貪食作用が確認された．マクロファージの中心部を貫く繊維は，核が周囲を取り囲む様相を呈し，そのため核質を貫通することなく，繊維が直接物理的に核小体などにも損傷を及ぼすことがないと考えられる．

正常なマクロファージの表面構造は，不整形な突出した趨壁が外周を覆い球形であるのに比較して，繊維を取り込むと絨毛の連続性が不明瞭を呈し，細胞膜面が滑らかとなり繊維方向に伸張することから，貪食による細胞の変化が推察される．特に，長い繊維を貪食して細胞膜が伸張した末端の付着部では，膜構造の消失，細胞質の空胞化がみられ，明らかに細胞膜の連続性が消失していた．このことは，膜構成成分にも影響を与えていると考えられる．肺胞マクロファージで活性酸素の生成がリン脂質やカルシウムの変動に起因するという報告[9]からも膜との関与が示唆される．

一方，細胞質内の長い繊維は，繊維を膜で囲繞することなく細胞質と直接接していた．このことは，マクロファージ細胞の形状が変動することにより細胞小器官が圧迫などの物理的あるいは繊維成分からの化学的な影響を受けていることも十分に推察される．貪食したマクロファージの細胞小器官の減少や核膜の消失傾向が認められ，ライソゾームの増大などが確認された．これに対して短い繊維は，始めからファゴサイトージスにより貪食空胞の膜に取り囲まれて細胞内に侵入するため，細胞膜の欠損や細胞質に直接影響を与えることが少ないと考えられる．今回の観察は，投与後1日と短時間であったが，さらに長期間マクロファージの細胞内に繊維が残留すると膜を持つファゴゾームに取り込まれる可能性が考察される[10]．しかし，細胞運動や経時変化によっても離断，短小化されない10 μm 以上の長いアスベスト繊維は，細胞膜を持続的に刺激すると思われる．

発癌に限らず，アスベストによる組織の線維化についても活性酸素が原因しているといわれ[11]，また気管支上皮細胞とマクロファージとの関連については，マクロファージからの活性酸素放出と同時に標的細胞である上皮細胞のオキシダーゼ酵素系の関与が重要であるという報告があり[12]，毒性発現にマクロファージの存在が大きな意義を持つと考えられる．これらを証明した形態学的報告はみられず，今後，酵素組織的あるいは免疫的方法を用いてマクロファージの膜機能を微細形態から検討することが必要であると思われる．

結　語

アスベスト繊維を貪食したマクロファージ細胞で繊維と細胞膜との関連について，電子顕微鏡を用いて観察した．長い繊維では，マクロファージの膜は繊維に絡み付いて細胞質への膜の陥入が認められず，繊維付着部では細胞膜の消失が認められた．また，細胞核への繊維の貫

通は，みられなかった．短い繊維は，ファゴサイトージスにより貪食空胞に取り込まれる傾向がみられた．これらのことから長い繊維は，細胞膜によって囲繞されず，細胞膜の欠損や細胞質への影響が示唆された．

文　献

1）*Environmental Health Criteria for Asbestos and Other Natural Mineral Fibres*, 1986, World Health Organization, Geneva

2）大気汚染物質のレビュー，石綿・ゼオライト，1986，日本科学技術情報センター

3）Papadimitriou, J. M. and Ashman, R. B.：*Ultrastruc. Path.*, 13, 343-372, 1989

4）Stanton. M. F., Layard, M. and Tegeris, A.：*JNCI*, 67, 965-975, 1981

5）Gary, E. H., Donald, E. G. and Daniel, B. M.：*Environ. Res.*, 23, 121-136, 1980

6）Kasai, H. and Nishimura, S.：*Gann*, 75, 841-844, 1984

7）Leanderson, P., Soderkvist, P., Tagesson, C. and Axelson, O.：*Br. J. Ind. Med.*, 45, 309-311, 1988

8）Pott, F.：*Reinhalt. Luft*, 38, 486-490, 1978

9）Roney, P. L. and Holian, A.：*Toxicol. Appl. Pharmcol.*, 100, 132-144, 1989

10）Davis, J. M. G., Bolton, R. E. and Garrett, J.：*Environ. Health Perspect.*, 9, 255-260, 1974

11）Case, B. W., et al.：*Environ. Res.*, 39, 299-306, 1986

12）Mossman, B. T. and Marsh, J. P.：*NATO ASI Series*, G 3, 66-74, 1985

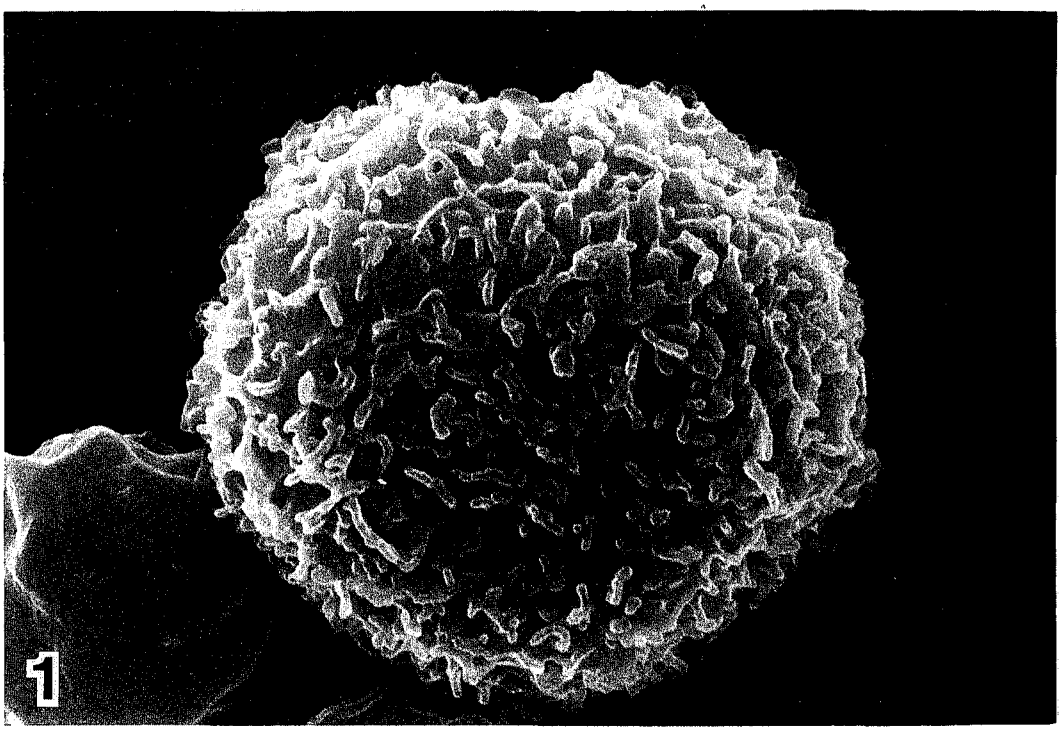


Fig. 1. Scanning electron micrograph of normal peritoneal macrophage from a mouse without phagocytosis.A random and protrudent ridges are seen on the surface of spherical cell. (X7,800)

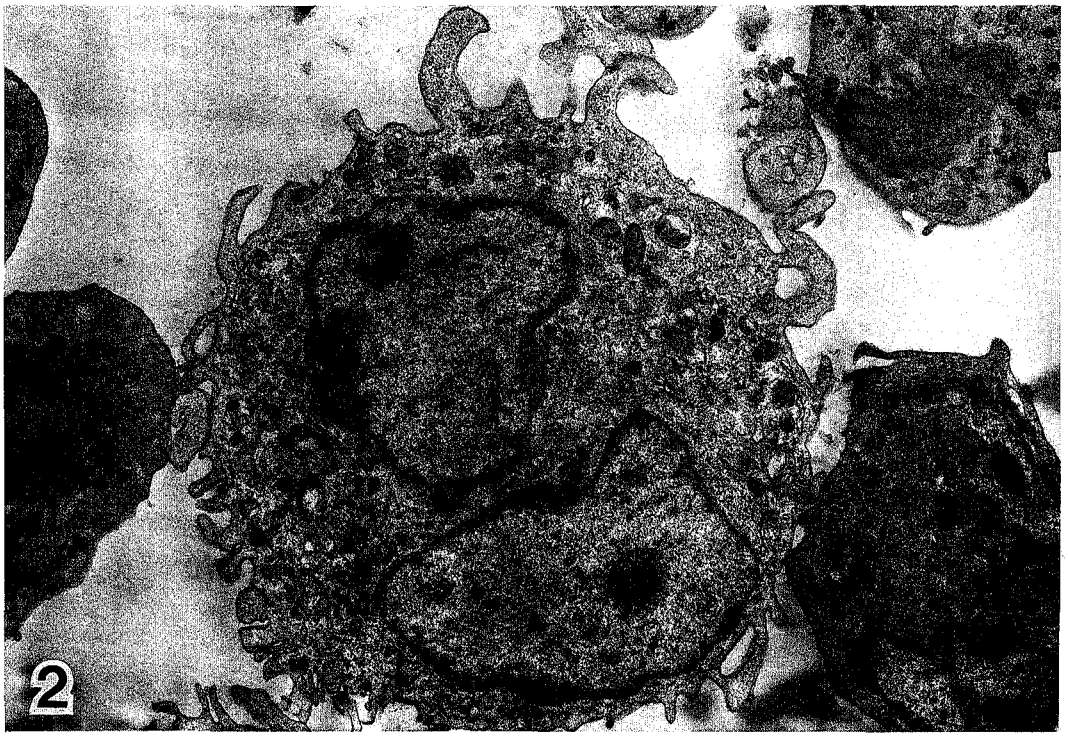
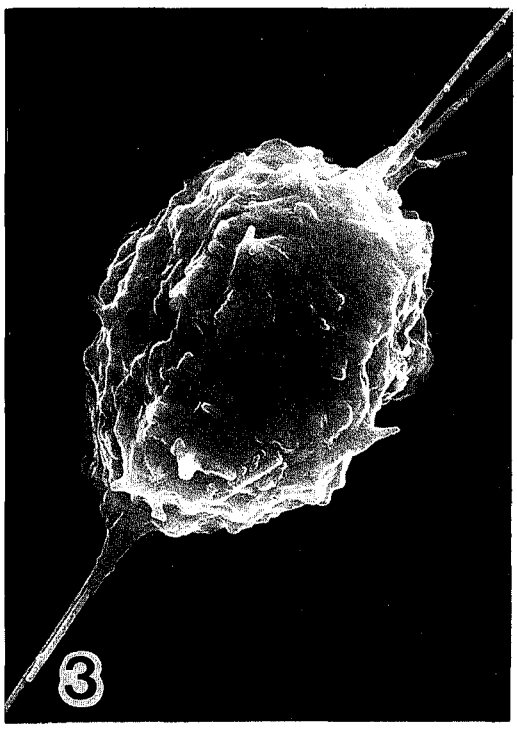


Fig. 2. Section of normal macrophage from a mouse.There are irregular-shaped nuclei some phagocytotic vacuoles in the vicinity of the surface and secretory granules. (X7,600)



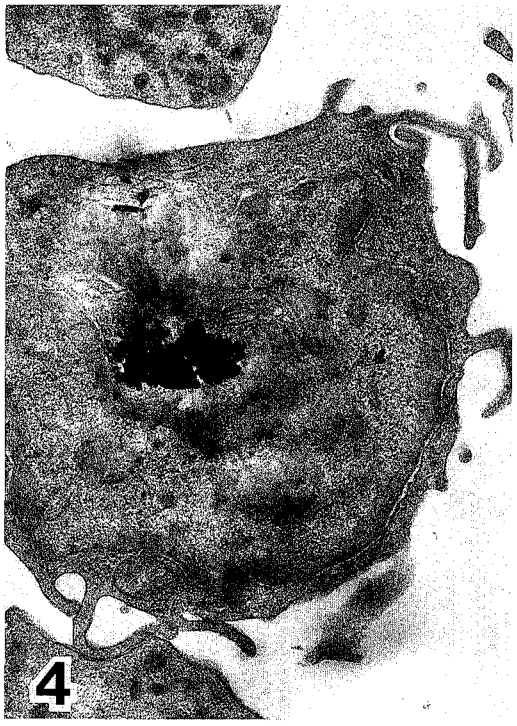
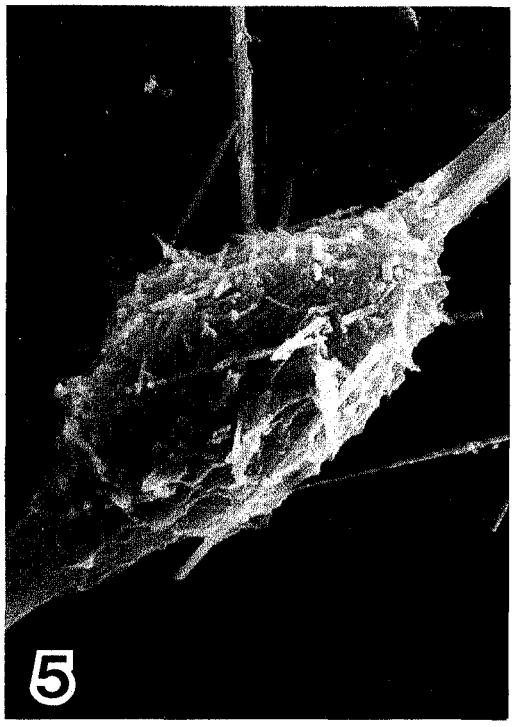


Fig. 3. A macrophage with long fibers of asbestos incorporated in the middle of cell.Note some smooth surface of macrophage and the stretched plasma membrane at the site of penetration. (X4,800)

Fig. 4. Section of a bundle of asbestos fibers in the center of macrophage cell.The distorted nuclei avoiding asbestos fibers without penetration are seen. (X13,200)



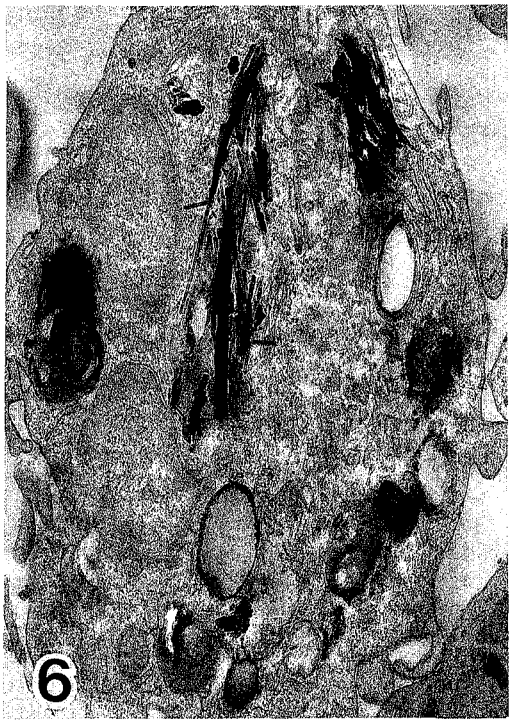


Fig. 5. A macrophage exposed to various sizes of asbestos fibers. Projection of many fibers on the surface of cell is observed. (X4,800)

Fig. 6. Section of macrophage which incorporated a lot of chrysotile fibers. A bundle of fibers exists without membrane enclosure in the middle of cell. (X12,500)

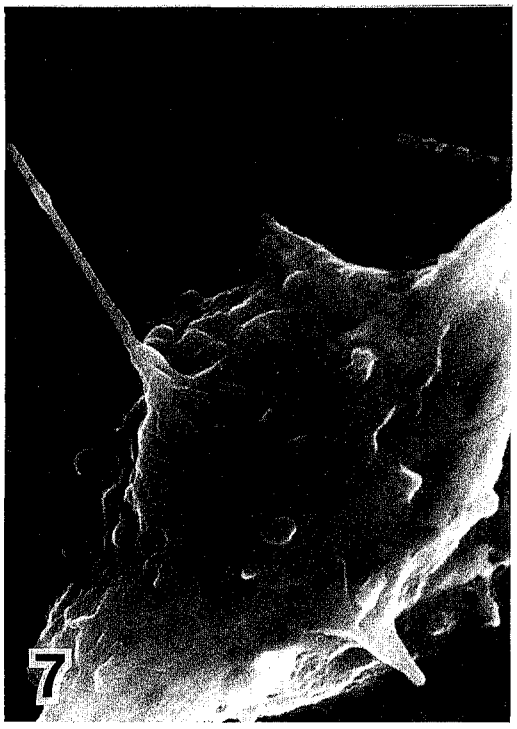


Fig. 7. Scanning electron micrograph of macrophage with phagocytized fiber projecting on the surface.Note the tensile strength of surface membrane toward chrysotile fiber. (X6,200)

Fig. 8. A macrophage with fibers situated intracellularly without association of membrane,accompanying a disappearance of membrane partially. (X22,500)

Fig. 9. High magnification of the protrusion site observed by scanning electron microscopy.Note the adhesion having a connection with membrane and fibers. (X57,500)

Fig.10. High magnification of a section of a mouse intraperitoneal macrophage with a chrysotile fiber.There are a deficiency of plasm membrane at the adhesion portion and no association of membrane in the cytoplasm. (X32,300)

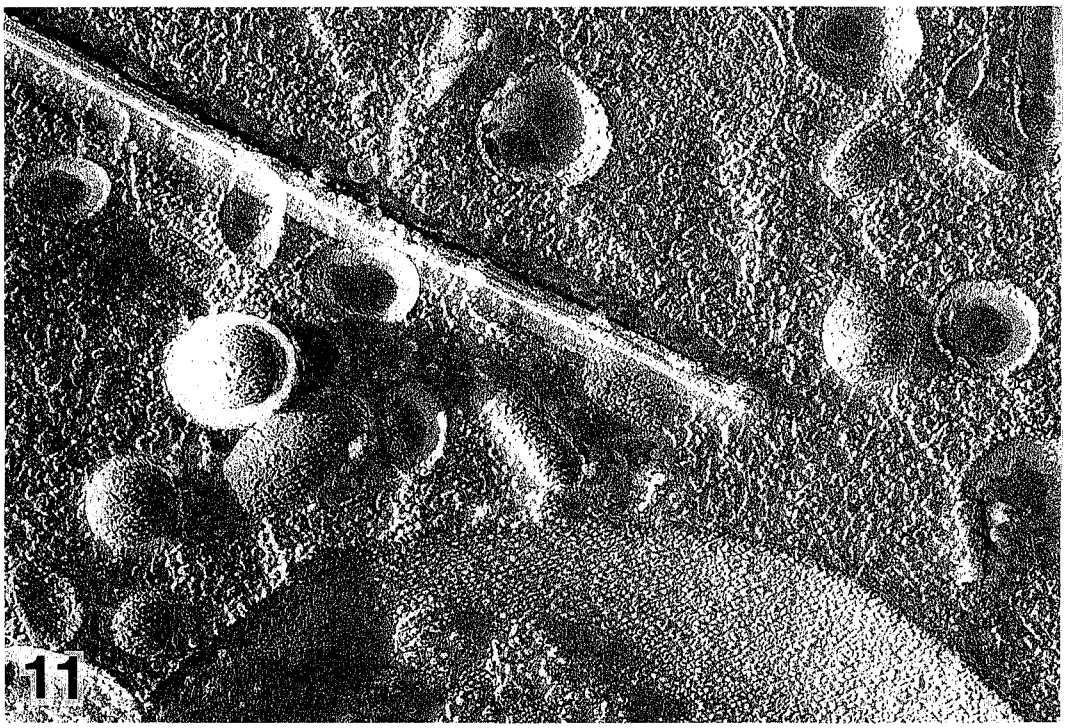


Fig.11. Electron micrograph of macrophage showing P-face of the cytoplasm and nucleus by the freeze-fracture method.There is no formation of membrane structure surrounding asbestos fiber. (X71,500)

Fig.12. Electron micrograph of plasm membrane of macrophage by the freeze-fracture method.Note the obscure membrane structure at the invasive site and no infolding of membrane. (X73,500)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 297-299, 1990

アスベストのサルモネラを用いた変異原性試験

藤田　博*，佐々木　美枝子*

Mutagenicity Test of Asbestos with *Salmonella*

HIROSHI FUJITA* and MIEKO SASAKI*

Keywords：変異原性 mutagenicity，アスベスト asbestos，クリソタイルA chrysotile A，クロシドライト crocidolite，アモサイト amosite，ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium*

アスベストは人において発ガン性があることが示されており[1,2]，実験動物においても発ガン性が確かめられている[2,3]．この発ガン性の機構を解明するために，培養細胞や微生物を利用した変異原性についての研究が数多く行われている[4-8]．それらには培養細胞に対する染色体異常誘発性については陽性の報告[4]があるが，SCEについては陰性[5]である．さらに培養細胞に対する遺伝子突然変異性については陽性[6]の場合と陰性[4]の場合が見られる．サルモネラTA株および大腸菌WP2株を用いた試験においては陰性の報告[7]があるが，別の大腸菌CSH 50株を用いた系では陽性の報告[8]もある．このようにアスベストの変異原性についての報告には異なる結果が多く，機構を解明するにはなお検討が必要であろう．今回我々は，Amesらの開発した試験株のうち，後から開発されたTA 97およびTA 102も加えた4試験菌株で変異原性試験を行ったが，変異原性は見られなかったことを報告する．

実験材料および方法

試料　アスベストは，UICC (Union Internationale Contre le Cancer)の標準品であるクリソタイルA，クロシドライトおよびアモサイトを蒸留水に懸濁し用いた．

陽性対照物質：2－アミノアントラセン(和光純薬)，9－アミノアクリジン(和光純薬)，4－ニトロキノリン－N－オキシド(中井化学)，2－ニトロフルオレン(アルドリッチ)およびマイトマイシンC(協和発酵)をジメチルスルホキシドに溶解し用いた．

菌株　*Salmonella typhimurium* TA 97[9]，TA 98[10,11]，TA 100[10,11]およびTA 102[12,13]を普通ブイヨン(Nutrient broth No. 2，オキソイド製)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[14,15]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[14]を用いた．S9mix[14,15]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S9mix 0.5ml，代謝活性化しない場合にはリン酸緩衝液(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分間の前培養を行った．これに45℃に保温した軟寒天[14] 2 mlを加え混合後，最少グルコース寒天培地[14]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自動コロニーカウンターで計数した．

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[16]を行い，さらにMooreら[17]のプログラムにより回帰分析を行った．

結果および考察

クリソタイルA，クロシドライトおよびアモサイトの3種のアスベストの変異原性試験の結果をそれぞれ表1，2，3に示した．いずれのアスベストにおいても対照プレートの復帰コロニー数に比べて有意な増加を示したものはなく，1 mg／プレートを最高濃度とした結果では変異原性は見いだされなかった．これ以上の濃度では培地中にアスベストが析出して実験として意味がないと判断した．

Chamberlainら[7]は，S. *typhimurium* TA 1535，TA

*東京都立衛生研究所毒性部　169　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1，Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

表1．クリソタイルAの変異原性試験

Dose μg／plate	No. of Revertants／plate							
	TA 97		TA 98		TA 100		TA 102	
	−S 9	+S 9	−S 9	+S 9	−S 9	+S 9	−S 9	+S 9
1000	144	182	16	30	103	135	281	422
500	138	198	14	34	106	129	323	429
100	136	190	10	30	126	139	245	376
50	147	200	15	30	117	133	287	448
10	144	211	17	33	115	129	317	417
0	138	216	16	35	122	116	293	433
Positive	261[a)]	3707[b)]	55[c)]	1045[b)]	304[c)]	1770[b)]	3698[d)]	2102[b)]

a) ：9-Aminoacridene 50 μg／plate　b) ：2-Aminoanthracene 5 μg／plate
c) ：4-Nitroquinoline-N-oxide 5 μg／plate　d) ：Mitomicin C 0.5 μg／plate

表2．クロシドライトの変異原性試験

Dose μg／plate	No. of Revertants／plate							
	TA 97		TA 98		TA 100		TA 102	
	−S 9	+S 9	−S 9	+S 9	−S 9	+S 9	−S 9	+S 9
1000	150	207	27	35	140	157	354	519
500	157	199	21	32	149	158	371	516
100	161	215	21	25	106	149	405	554
50	131	205	27	36	121	170	366	505
10	156	193	26	32	129	168	375	527
0	148	202	24	34	128	161	390	494
Positive	498[a)]	2223[b)]	1079[c)]	649[b)]	1125[c)]	2591[b)]	2414[d)]	804[b)]

a) ：9-Aminoacridine 50 μg／plate　b) ：2-Aminoanthracene 5 μg／plate
c) ：4-Nitorofluorene 5 μg／plate　d) ：Mitomicin C 0.5 μg／plate

表3．アモサイトの変異原性試験

Dose μg／plate	No. of Revertants／plate							
	TA 97		TA 98		TA 100		TA 102	
	−S 9	+S 9	−S 9	+S 9	−S 9	+S 9	−S 9	+S 9
1000	123	166	18	33	144	155	355	501
500	155	208	26	39	143	153	397	535
100	135	208	23	36	138	163	353	500
50	128	215	24	28	146	148	346	452
10	136	206	23	37	131	165	373	489
0	148	202	24	34	128	161	390	494
Positive	498[a)]	2223[b)]	1079[c)]	649[b)]	1125[c)]	2591[b)]	2414[d)]	804[b)]

a) ：9-Aminoacridine 50 μg／plate　b) ：2-Aminoanthracene 5 μg／plate
c) ：4-Nitorofluorene 5 μg／plate　d) ：Mitomicin C 0.5 μg／plate

1538および*E. coli* WP 2 *uvrB*, WP 2 *uvrB polA* を用いて試験を行い，クリソタイル，クロシドライトおよびアモサイトの3種類のアスベストには変異原性がないことを報告している．我々はAmesらによって新しく開発された試験株を含めた4試験株で試験を行ったが，結果は陰性であり，Chamberlainらの報告と同様の結果であった．一方，Cleveland[8]は，*E. coli* CSH 50を用いてアスベストのリヒターライトに変異原性を見いだしている．代謝活性化することにより変異原性が強まることから，アスベストそのものの作用ではなくアスベストから溶出してくる化合物の存在を予想している．このように試験菌株の違いによって両者の結果が異なったのかもしれないが，むしろこれは試料の違いによる可能性を検討する必要があると思われる．今回我々が用いた試料は，UICC標準品として発ガン性実験などの多くの研究に用いられているものであり，試験結果の比較が可能である．試験には標準品を用いるべきであろう．

アスベストには培養細胞に対する染色体異常誘発性があり[4]，アスベスト投与により発生した中皮腫の細胞には，特定の染色体異常が見られる[3]，染色体異常がアスベストによる発ガンの原因のひとつとして考えられている[2]が，培養細胞を用いた変異原性試験の結果には不一致も見られることから，アスベストの発ガンにおけるイニシエータとしての遺伝的傷害の実態については，なお，検討が必要であると考えられる．

要　旨

クリソタイルA，クロシドライトおよびアモサイトの3種類のアスベストについてAmesの試験株TA 97, TA 98, TA 100およびTA 102を用いて変異原性試験を行った．その結果いずれのアスベストも変異原性は見られなかった

文　献

1）Maugh, T. H.：*Science*, 197, 1268-1269, 1977
2）小林　進，細野繁雄，門井英雄：埼玉県公害センター研究報告，14，1-24，1987
3）Libbus, B. L. and Craighead, J. E.：*Cancer Res.*, 48, 6455-6461, 1988
4）Oshimura, M., Hesterberg, T. W. and Barrett, J. C.：*Cancer Res.*, 44, 5017-5022, 1984
5）Casey, G.：*Mutation Res.*, 116, 369-377, 1983
6）Huang, S. L., Saggioro, D. and Malling, H. V.：*Mutation Res.*, 57, 225-232, 1978
7）Chamberlain, M. and Tarmy, E. M.：*Mutation Res.*, 43, 159-164, 1977
8）Cleveland, M. G.：*Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 177, 343-346, 1984
9）Levin, D. E., Yamasaki, E. and Ames, B. N.：*Mutation Res.*, 94, 315-330, 1982
10）McCann, J., Spingarn, N. E., Kobori, J. and Ames, B. N.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 979-983, 1975
11）Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E.：*Mutation Res.*, 31, 347-364, 1975
12）Levin, D. E., Hollstein, M. and Ames, B. N.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7445-7449, 1982
13）Levin, D. E., Marnett, L. J. and Ames, B. N.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 4457-4461, 1984
14）Maron, D. M. and Ames, B. N.：*Mutation Res.*, 113, 173-215, 1983
15）矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，20，1178－1189，1975
16）石居　進：生物統計学入門，133-137，1975，培風館
17）Moore, D. and Felton, J. S.：*Mutation Res.*, 119, 95-102, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 300-314, 1990

d-α-トコフェリルアセテート（ビタミンE）のラットによる13週間経口投与試験

坂本義光*, 安藤弘*, 池田虎雄*, 小縣昭夫*, 神谷信行*
久保喜一*, 小嶋昭江*, 高橋博*, 多田幸恵*, 田山邦昭*
長澤明道*, 林田志信*, 福森信隆*, 藤井孝*, 藤田博*
三栗谷久敏*, 矢野範男*, 湯澤勝廣*, 吉田誠二*, 市川久次**
佐々木美枝子**

Thirteen-week Toxicity Study of d-α-Tocopheryl Acetate(Vitamin E) in F344 Rats

YOSHIMITSU SAKAMOTO*, HIROSHI ANDO*, TORAO IKEDA*
AKIO OGATA*, NOBUYUKI KAMIYA*, YOSHIKAZU KUBO*,
AKIE KOJIMA*, HIROSHI TAKAHASHI*, YUKIE TADA*,
KUNIAKI TAYAMA*, AKEMICHI NAGASAWA*, SHINOBU HAYASHIDA*,
NOBUTAKA FUKUMORI*, TAKASHI FUJII*, HIROSHI FUJITA*,
HISATOSHI MIKURIYA*, NORIO YANO*, KATSUHIRO YUZAWA*,
SEIJI YOSHIDA*, HISATSUGU ICHIKAWA**, MIEKO SASAKI**

Summary

To study the effect of d-α-tocopheryl acetate (Vitamin E) on rats, groups of ten male and ten female F344 rats were fed on pelleted diet containing 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, or 5.0% Vitamin E for 13 weeks. Hemorrhagic death and hemorrhage in various organs occurred only in males at all doses tested. Liver absolute and relative weights were increased in females at doses of 1.0-5.0%. Histologically,peripotal fatty change and cell infiltration were observed in dosed male and female groups accompanied by an increase of serum liver enzymes. These hepatic lesions were more severe in females than in males. The findings of this study were compared with the results of other toxicity studies and the implications concering the effect of excessive vitamin E intake were discussed.

Keywords: Vitamin E, F344 rats, 13-wk feeding test

緒　言

ビタミンE(VE)は抗不妊因子として生体内において生殖機能の回復等の作用を示す脂溶性ビタミンである．またビタミンEは脂質の過酸化を防止する作用，いわゆる抗酸化作用を有し，従来使用されていたButylated hydroxy toluene(BHT)やButylated hydroxy anisole(BHA)に代わって油脂等の抗酸化剤として使用されている[1,2]．一方脂質の過剰摂取などによって生じる過酸化脂質は虚血性疾患，癌や老化の一要因として考えられ，VEはこれらの疾病の予防に望ましいとされており，健康食品として医師の指示なく大量に摂取される機会が多くなっている[3-5]．VEは一般的に毒性が低いとされているが，過剰投与によってヒトでは臨床的に筋力の低下，クレアチン尿，血清クレアチン，トリグリセリド，コレステ

*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　Hyakunin−cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan
**同毒性部薬理研究科

ロールの増加などが知られている[6]．また実験的にヒヨコ，ラットで体重の減少，肝の重量増加及び脂質含量の増加，血液凝固系を含む血液性状への影響などが報告されている[7-11]．しかし実験に用いられた動物や投与量の違いにより，一定の傾向がなく，また性差に関する知見が少ないなど，過剰症については不明な点が多い．当部では以前より食品添加物等の化学物質の安全性に関する研究の一環として抗酸化剤であるBHT,BHAの安全性について毒性試験を行い検討を加えてきた[12,13]．そこで今回これらの抗酸化剤に代わり今後使用量が増加することが予想されるビタミンEを取り上げ，過剰量VEの生体に対する影響を観察する目的でラットによる13週間摂取実験を行った．

実験材料および方法

被験物質：ビタミンEはエーザイ(株)のd-α-Tocopheryl acetate(純度99.0%，Lot No.621013)を使用した．

動物：F344／DuCrj(日本チャールスリバー社)，雌雄，4週令を購入し1週間予備飼育後実験に用いた．動物はバリヤー飼育施設内で飼育し，ベルト式飼育架台の懸下式ステンレス製ケージに個別に収容した．水(ろ過滅菌器経由水道水)および固形飼料を自由に摂取させた．本実験ではAIN-76飼料[14]の成分を一部改良したものを基礎飼料として用いた．組成はカゼイン20%，DL-メチオニン0.3%，コーンスターチ25%，シュクロース20%，グリコース20%，粉末口紙5.0%，塩混合3.5%，ビタミン混合1.0%，コリン重酒石酸塩0.2%，分子蒸留トウモロコシ油5.0%である．

試験方法：粉末飼料(改良AIN-76)に被験物質を添加し固型化したものを試験飼料とした．ラットは1群10匹とし，0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0% VE添加飼料摂取群と基礎飼料(改良AIN-76)摂取群(対照群)の7群を設定した．なお対照群のVE濃度は0.01%とした．試験飼料はラットの5週令時より13週間摂取させた．個々の動物について体重，摂餌・摂水量は1週間に1回測定し，状態観察，瀕死および死亡動物のチェックは毎日おこなった．

血液・血清生化学的検査：　実験終了時に生存したすべてのラットから得られた血液，血清についてつぎの検査を行った．赤血球数(RBC)，白血球数(WBC)，ヘモグロビン量(Hgb)ヘマトクリット値(Hct)，平均血色素量(MCH)平均赤血球容積(MCV)をCoulter Counter Mode lSで，血小板数をCoulter Counter Model S-Plus IVを用いて測定した．屠殺時採取した血液から調製した血清についてAutomatic Analyzer 705を用い　アルブミン(ALB)，ビリルビン(BIL)，カルシウム(CA)，コレステロール(CHO)，クレアチン(CRE)，グリコース(GLU)，リン脂質(PL)，総グリセリド(TG)，総タンパク(TP)，尿素(ALP)，コリンエステラーゼ(CHE)，クレアチンフォスフォキナーゼ(CPK)，γ-グルタミルトランスペプチターゼ(GGT)，グルタミン酸-オキザロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)，グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)，ロイシンアミノペプチダーゼ(LAP)，乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)を測定した．

解剖，病理学的検査：解剖は途中死亡および終了時屠殺例のすべてについて行ない，脳，心，肝，腎，肺，脾，副腎，精巣，前立腺，子宮，卵巣について重量および体重比重量を測定した．秤量臓器に加えて下垂体，耳垢腺，眼球，ハーダー腺，唾液腺，甲・副甲状腺，気管，縦隔，食道，胃，小・大腸，膵臓，精巣上体，精嚢，膀胱，大腿骨，骨格筋について10%緩衝ホルマリン固定後，パラフィン包埋切片を作製しHE染色を行った．また必要に応じて凍結切片を作製しズダン黒，オイルレッドOなどの脂肪染色を行ない組織学的検索を行った．

結　果

本実験では，投与期間中に雄の各投与群で内，外部出血による死亡例がみられた．また雌雄の試験終了時生存例では，VE投与群で臓器重量，血液・血清成分，組織学的変化に投与に関連した変化が見られたが，いずれもVE濃度との有意な相関は認められなかった．

生存率：　途中死亡は雄の投与群のみに見られた．実験終了時の生存率をTable.1に示した．生存数が最も多かった群は5.0%群の7例で最も少なかったものは4.0%群の全例が死亡した．生存曲線をFig.1に示した．最も早い時間に死亡が見られたのは，0.5%群の投与開始後2週目で，その他の群では4週目より死亡する動物が見られた．死亡例は2%群で一時期(8週)に集中して見られたほかは投与期間に伴い順次発生する傾向を示した．死亡した動物はいずれも生存時四肢の爪部分から出血や，解剖時に種々の臓器からの出血が見られた．

体重：実験開始時及び終了時の体重をTable.1に，また投与期間中の体重増加推移をFig.1に示した．雄VE投与群では出血により貧血及び瀕死状態に陥る動物が多く実験期間後半の増加曲線の変動が大きいが，ほぼ4週目より対照群に比べ増加が抑制される傾向を示した．また終了時の値も対照群に比べて低い値を示した．雌の各投与群の増加推移および終了時体重は実験期間を通して対照群と同様であった．

摂餌・摂水量：実験期間中の摂餌・摂水量をFig.4-7に

Table 1. Survival and Mean Body Weights

Group	Male			Female		
	Survival	Mean body weights(g)		Survival	Mean body weights(g)	
		initial	final		initial	final
0.01%(Control)	10/10[1)]	91.0±2.8[2)]	298±11	10/10	78.8±4.4	166± 9
0.5 %	3/10	92.7±2.6	272±37	10/10	77.5±3.6	164± 7
1.0 %	2/10	90.7±5.1	276±36	10/10	78.3±3.9	163± 6
2.0 %	5/10	92.7±4.4	277±30	10/10	78.7±3.9	161± 9
3.0 %	1/10	91.5±5.6	—	10/10	78.6±4.2	162± 9
4.0 %	0/10	—	—	10/10	78.4±4.2	160±10
5.0 %	7/10	92.7±3.4	292±12	10/10	77.7±4.1	161±10

1) Number surviving/number per group
2) Mean ± SD

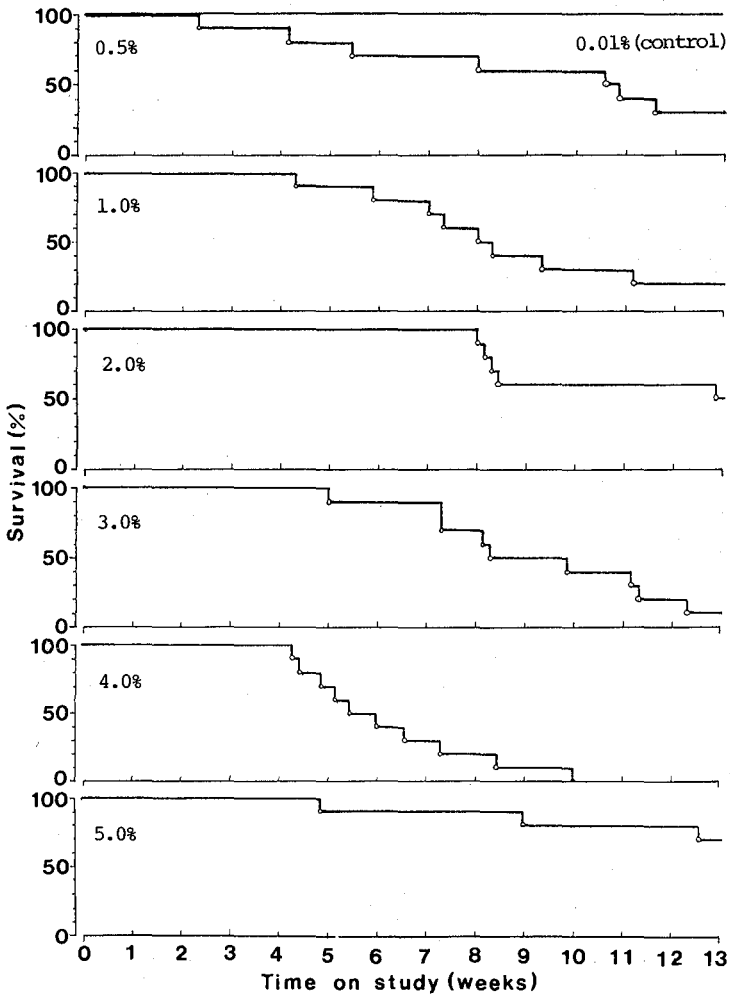


Fig. 1 Survival curves of Male Rats

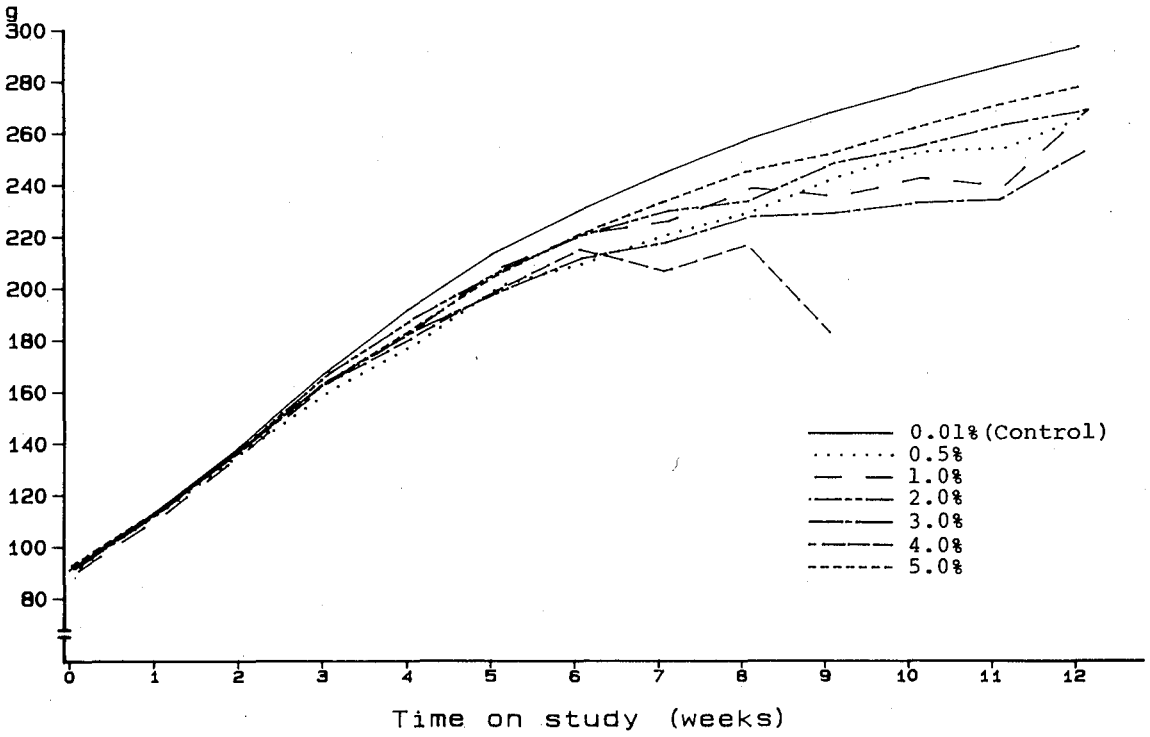


Fig. 2 Changes of Mean Body Weight of Male Rats.

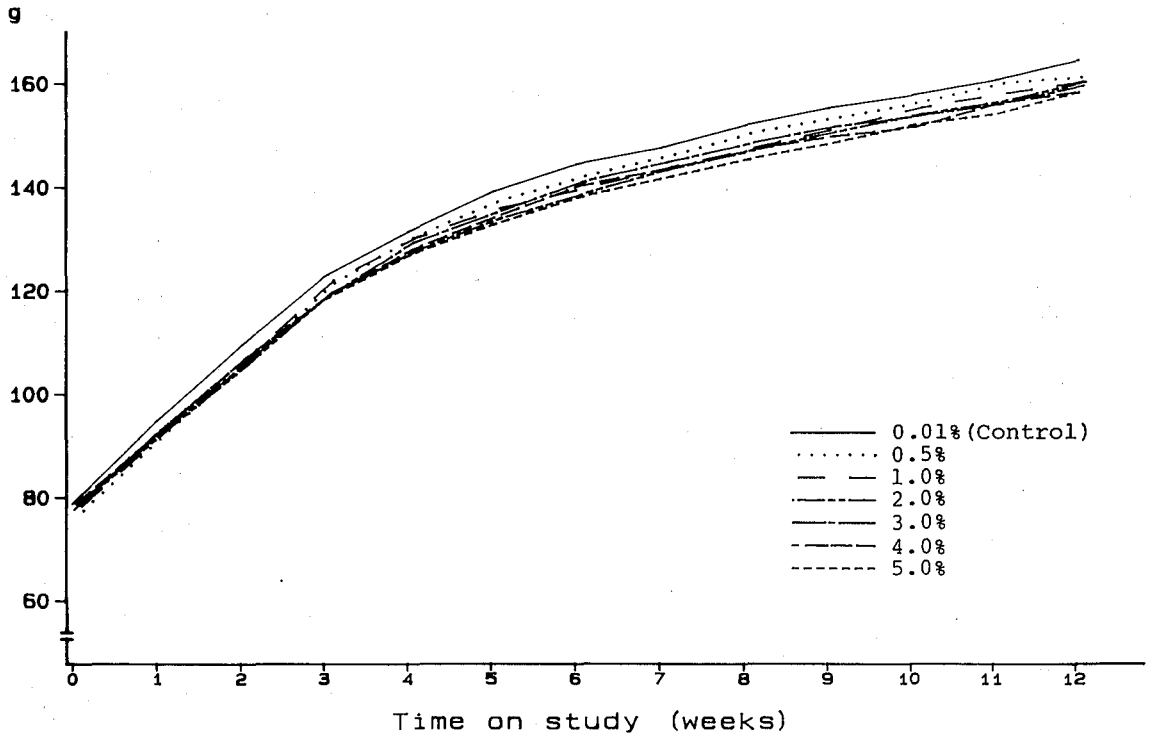


Fig. 3 Changes of Mean Body Weight of Female Rats.

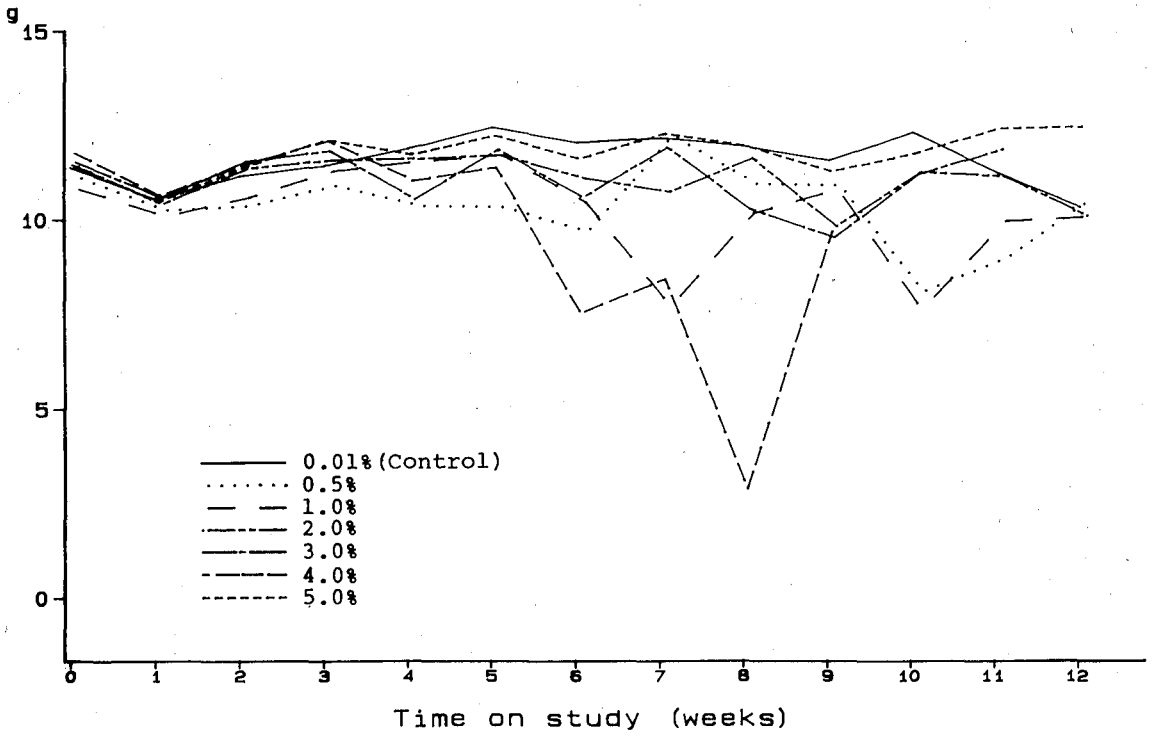


Fig. 4 Changes of Mean Food Consumption of Male Rats.

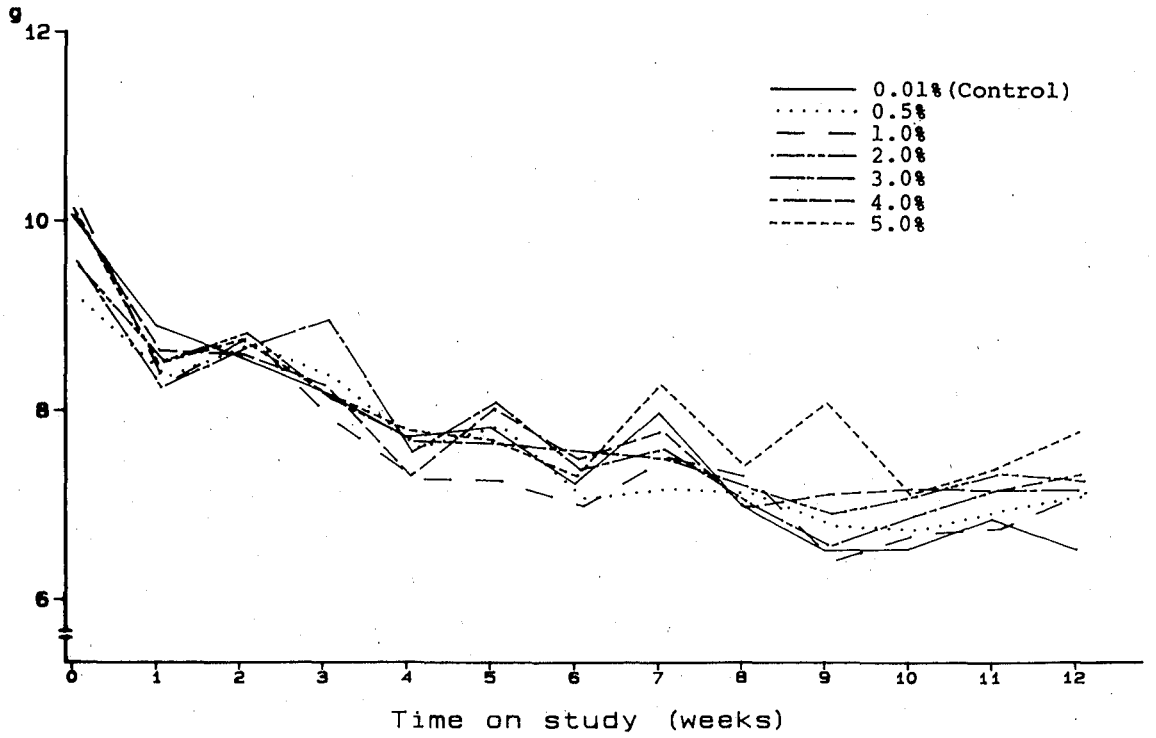


Fig. 5 Changes of Mean Food Consumption of Female Rats.

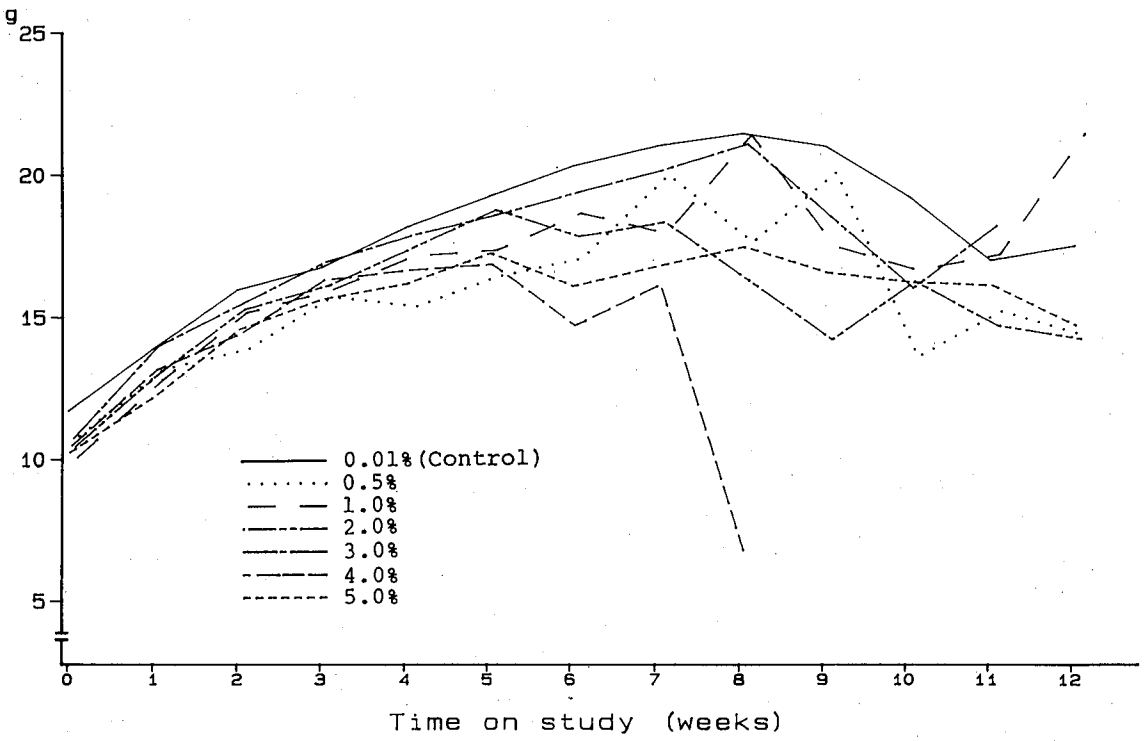


Fig. 6 Changes of Water Consumption of Male Rats.

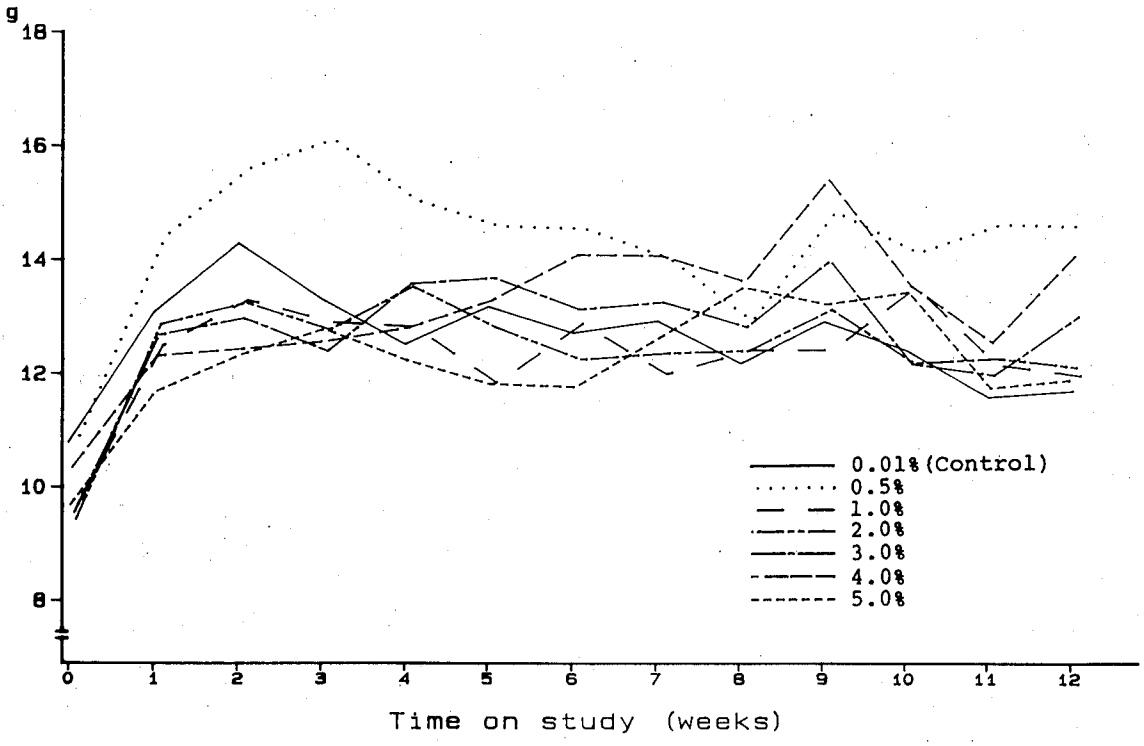


Fig. 7 Changes of Water Consumption of Female Rats.

示した．雄では，実験開始後4週目までは各投与群とも対照群と同様であった．実験後半体重と同様各投与群の変動が大きく比較することができないが，生存例数の多かった2及び5％群では対照群と差はなかった．雌では実験期間を通して対照群とは差はなかった．

一般症状：VE投与に関連した主な症状は出血であった．出血は眼球内，前後肢の爪部分の傷及び鼻腔からのものであった．眼球出血は雄では投与開始3～7週目にかけて0.5％群を除いた各投与群に見られ，発現例数は途中死亡例の1.0％群では1/8(8例中1例の意味)，2.0％群1/5，3.0％群3/9，4.0％群5/10，5.0％群1/7であり，生存例では1.0％群1/2，5.0％群1/7であった．また雌では投与3週目に3.0％群及び5.0％群に各1例見られた．眼球内出血はいずれも発現後1-2週間で消失した．爪からの出血は動物の取扱中に物理的に生じた傷からのもので雄のみに投与後4週目から9週目にかけて2.0％群を除いた各群で見られた．発現例数は死亡例では1.0％群1/8，3.0％群3/9，4.0％群5/10，5.0％群2/3，生存例では0.5％群1/3であった．この部位からの出血を見た動物は0.5％群の1例を除いてすべて1～3日後に死亡し，出血は死亡時まで止まらなかった．鼻腔からの出血は雄死亡例の0.5，1.0％群に各1例，各々8週目と7週目に見られた．そのほか下痢が4週目に0.5％と3.0％群に各1例，7及び10週目に1.0％群に各1例ずつ計2例がみられ，0.5％及び1.0％群の1例が死亡例であった．また雌雄のラットで生死に関係なく1週目より肛門周囲の被毛に黄色の油性の液状物質の付着が見られた．これは5.0％群で雌雄共に最も多くのラットで見られまた期間も実験期間を通して見られたが，濃度の低下に伴いこの所見を示す動物数は減少し，また観察される期間も短かくなった．今回この油性物質の性状については分析を行っていない．

臓器重量：臓器重量は終了時屠殺例についてのみ測定し結果をTable.2,3に示した．雄では前立腺が2.0％群で絶対重量，体重比とも有意に小さく，また0.5，1.0％群でも対照群に比べ低い値を示した．雌では肝臓がほぼ全例で絶対重量，体重比ともに大きく，また腎臓(全群)，脾臓(2.0，4.0，5.0群)，肺(0.5，3.0群)，卵巣(2.0，3.0，4.0，5.0％群)，副腎(2.0，4.0％群)では体重比が対照群に比べ有意に大きかった．

血清生化学的検査：雌雄の結果をTable.4,5に示した．雄投与群ではALB(3.0％群)，GGT(0.5，2.0，5.0％群)，TP(2.0％群)が各々有意に減少した．またALP(2.0％群)，GOP(1.0，2.0，5.0％群)，GPT(5.0％群)が有意に増加した．雌ではALB(2.0，3.0，5.0％群)で，CHO(5.0％群)，F-CHO(0.5，3.0，5.0％群)，PL(2.0，4.0，5.0％群)，UA(1.0％群)が有意に減少し，GOT(5.0％群)，GPT(1.0，2.0，3.0，4.0，5.0％群)が有意な増加を示した．有意差の見られなかった群でもこれらの検査値はいずれも同様な傾向を示した．投与群全体のGOT，GPTの増加率を平均してみると雄ではGOT 143％，GPT 190％で，雌ではGOT 125％，GPT 256％であり雌ではGPTの増加が顕著であった．

血液学的検査：Table,6に示すように，雄2.0％群でRBC，Hgb，Hct，MCHCが有意に減少し，また0.5，1.0％群の各値も対照群に比べ低い値を示した．雌ではRBC(3.0，4.0％群)，Hgb(1.0，2.0，3.0，4.0，5.0％群)が有意に減少した．また雌ではWBC(1.0，5.0％)で有意な増加がみられた．各々有意差の見られない群の値も同様な傾向を示した．

解剖所見：投与群の主な変化は種々の臓器の出血で，比較的多く見られた臓器は，途中死亡例では，多い順に眼，精巣上体及び周囲脂肪組織，骨格筋，精巣，脳，胸腺，肺，前立腺等であった．眼では強膜部または眼球内に，他の臓器では表面及び割面に点状または斑点状に出血が見られた．胸腺では程度の強い例では血腫を形成していた．主な出血臓器の発現数は眼では0.5％群3/7(7例中3例の意味)，1.0％群3/8，2.0％群2/5，3.0％群6/9，4.0％群7/10，5.0％群2/3，脳では0.5％群6/7，1.0％群4/8，2.0％群2/5，3.0％群2/9，4.0％群3/10であり，5.0％群では肉眼的に見られる脳出血はなかった．また実験期間中に出血を見た例のうち眼球及び鼻腔の出血例では剖検時に他の諸臓器により強い出血がみられたが，爪の傷からの出血例では他の臓器の出血はほとんど見られず，この部位からの出血が直接の死亡の要因となった．

終了時屠殺例では死亡例に比べ出血を見る臓器ははるかに少なく，膵臓，胸腺，前立腺に点状出血を見る例が投与群全体で散見される程度であった．全く出血の見られない例は0.5％群1/3，1％群1/2，3.0％群1/1，5.0％群3/7であった．

組織学的所見：雄投与群の途中死亡例及び終了時屠殺例の各臓器に剖検所見に対応した程度の組織内出血が見られた．また脳，眼球，心臓，副腎，膵臓などでは肉眼的に見られる出血に加えて鏡検的に微小出血巣が散見された．このような微小出血の発現例数も途中死亡例で多かった．雌の投与群では組織学的にも出血は認められなかった．出血以外の組織変化はTable.7に示すように肝の小葉中心性壊死及び周辺性脂肪沈着，腎皮髄境界部の石灰沈着，脾臓髄外造血，精巣上体間質の線維化であっ

Table 2. Organ Weight of Male Rats

Group	No.of rats	Body weight(g)	Brain (mg)	Liver (g)	Heart (mg)	kidney(R) (mg)	kidney(L) (mg)	Spleen (mg)	Lung (mg)	Testis(R) (mg)	Testis(L) (mg)	Prostate (mg)	Adrenal(R) (mg)	Adrenal(L) (mg)	Thymus (mg)
0.01%V.E (Control)	10[1]	298±11[2]	1966±30 (672±20)[3]	9.39±0.54 (3.16±0.12)	792±55 (266±14)	793±43 (267±12)	808±27 (272±9)	570±33 (192±8)	888±64 (299±16)	1451±58 (488±20)	1480±68 (498±31)	308±35 (104±12)	16.3±1.3 (5.7±0.5)	20.0±2.1 (6.7±0.7)	194±20 (65.4±5.3)
0.5%V.E	3	272±37	1953±31 (727±110)	8.06±1.25 (2.96±0.11)	765±89 (281±8)	731±77 (269±14)	744±70 (274±12)	616±38 (229±25)	835±36 (309±32)	1032±383 (381±130)	1125±246 (411±48)	219±74 (79±18)	18.6±2.1 (6.9±1.1)	19.3±1.3 (7.2±1.1)	187±38 (68.7±8.7)
1.0%V.E	2	276±36	1998±53 (730±76)	8.33±0.16 (3.04±0.34)	739±59 (269±14)	761±47 (278±19)	771±41 (282±22)	572±15 (209±22)	835±59 (304±18)	1374±37 (502±52)	1741±466 (626±88)	241±8 (88±82)	16.8±1.3 (6.2±0.4)	17.5±0.4 (6.4±1.0)	172±20 (62.6±0.6)
2.0%V.E	5	277±30	1964±28 (715±76)	8.23±1.24 (2.95±0.13)	766±9 (277±9)	762±75 (275±15)	774±65 (280±18)	550±54 (199±16)	839±44 (304±19)	1432±73 (519±32)	122±358 (445±124)	218±46* (78±9)*	16.3±1.2 (5.9±0.8)	19.1±2.2 (6.9±0.9)	175±21 (63.4±4.7)
3.0%V.E	1	247	1957 (792)	7.62 (3.08)	767 (311)	759 (307)	738 (299)	649 (263)	874 (354)	608 (246)	1153 (467)	232 (94)	18.8 (7.6)	19.1 (7.7)	157 (63.8)
4.0%V.E	0	—	— (—)	— (—)	— (—)	— (—)	— (—)	— (—)	— (—)	— (—)	— (—)	— (—)	— (—)	— (—)	— (—)
5.0%V.E	7	292±12	1970±32 (675±31)	8.99±0.45 (3.08±0.09)	780±30 (267±12)	806±51 (275±7)	807±43 (276±7)	572±33 (196±14)	880±32 (301±11)	1416±63 (485±27)	1474±35 (505±19)	291±41 (99±11)	17.6±2.1 (6.0±0.8)	18.7±1.8 (6.4±0.6)	202±22 (69.3±7.9)

1) Number of rats examined 2) Absolute mean weight ± SD 3) Relative mean weight ± SD
*Significantly different from control($p<0.05$) in sheffe's multiple comparison test

Table 3. Organ Weight of Female Rats

Group	No.of rats	Body weight(g)	Brain (mg)	Liver (g)	Heart (mg)	kidney(R) (mg)	kidney(L) (mg)	Spleen (mg)	Lung (mg)	Ovary(R) (mg)	Ovary(L) (mg)	Uterus (mg)	Adrenal(R) (mg)	Aduenal(L) (mg)	Thymus (mg)
0.01%V.E (control)	10[1]	166±9[2]	1825±47 (1100±61)[3]	4.56±0.46 (2.74±0.20)	503±36 (302±13)	492±25 (296±10)	493±29 (297±14)	367±53 (221±16)	635±23 (383±22)	21.3±2.6 (12.8±1.2)	23.6±2.5 (14.2±1.3)	392±78 (235±45)	18.3±1.5 (11.0±0.6)	19.9±1.8 (12.0±1.1)	158±14 (95.2±7.9)
0.5%V.E	10	164±7	1830±23 (1119±38)	5.07±0.44 (3.09±0.18)*	526±29 (321±17)	513±18 (314±8)*	521±20 (319±8)*	372±11 (228±10)	664±26 (406±19)*	24.4±3.3 (14.9±1.9)*	22.8±3.7 (13.9±2.3)	394±94 (241±57)	19.6±2.1 (12.0±1.2)	23.5±5.7 (14.4±3.8)	154±6 (94.5±1.8)
1.0%V.E	10	163±6	1791±45 (1101±42)	5.29±0.45* (3.24±0.20)*	518±25 (318±15)	521±34 (320±14)*	526±30 (323±13)*	381±20 (234±9)	660±22 (405±10)	23.5±3.2 (14.4±1.7)*	25.1±1.3 (15.4±0.7)	369±55 (226±31)	19.1±1.8 (11.7±0.9)	21.8±3.0 (13.4±1.7	154±14 (95.1±7.2)
2.0%V.E	10	161±9	1809±34 (1125±53)	5.05±0.49* (3.13±0.24)*	507±18 (315±15)	512±24 (318±15)*	514±31 (319±13)*	391±18 (243±15)*	651±63 (404±23)	25.3±5.1 (15.8±3.3)*	25.7±3.1 (16.0±1.6)	441±69 (274±43)	20.9±2.0 (12.8±1.3)*	21.4±2.6 (13.3±1.7)	153±10 (95.1±7.2)
3.0%V.E	10	162±9	1821±40 (1128±52)	5.19±0.59* (3.20±0.23)*	494±30 (306±7)	5.3±33 (311±5)*	496±37 (307±9)	380±32 (235±17)	645±37 (399±19)	25.2±5.8 (15.6±3.1)*	26.2±3.4 (16.2±1.7)	453±151 (279±89)	18.9±2.0 (11.7±1.2)	20.6±1.9 (12.7±0.8)	152±14 (94.2±7.6)
4.0%V.E	10	160±10	1832±29 (1146±64)	5.24±0.49* (3.26±0.21)*	509±31 (318±12)	513±34 (320±11)*	516±35 (322±4)*	388±29 (242±13)*	675±41 (422±21)*	25.2±3.2 (15.7±2.2)*	25.7±5.3 (16.1±3.6)	407±72 (255±49)	20.6±3.3 (12.9±2.3)*	22.1±2.3 (13.8±1.8)	156±13 (97.4±46)
5.0%V.E	10	161±10	1840±30 (1148±70)	5.42±0.74* (3.36±0.36)*	499±39 (310±11)	507±47 (315±18)*	510±38 (317±14)*	396±32 (246±6)*	651±31 (405±18)	25.1±2.9 (15.7±1.5)*	25.0±4.2 (15.5±2.1)	380±102 (235±57)	18.3±1.9 (11.4±0.8)	20.7±2.4 (12.9±1.0)	156±14 (97.8±9.3)

1) Number of rats examined 2) Absolute mean weight ± SD 3) Relative mean weight ± SD
Significantly different from control($p<0.05$) in sheffe's multiple comparison test

Table 4. Blood Biochemical Examination in Male Rats

Group	No.of rats	ALB g/dl	ALP IU/l	BIL mg/dl	D-BIL mg/dl	Ca mg/dl	CHE △pH	CHO mg/dl	F-CHO mg/dl	CPK IU/l	CRE mg/dl	GGT IU/l
0.01%(Control)	10[1)]	3.6±0.1[2)]	480±66	0.5±0.1	0.2±0.1	13.1±0.3	0.06±0.02	99± 7	19±7	2303±1116	0.6±0.1	4±1
0.5%	3	3.1±0.4	484±47	0.4±0.0	0.1±0.1	13.0±0.6	0.08±0.02	96±17	20±4	2161± 814	0.5±0.1	2±1*
1.0%	2	3.1±0.2	468±76	0.5±0.1	0.2±0.1	13.2±0.1	0.07±0.00	94±13	19±1	3831± 581	0.6±0.1	2±2
2.0.%	5	3.1±0.3*	499±44	0.4±0.0	0.1±0.0	13.0±0.4	0.06±0.02	91±17	19±5	3611±1743	0.5±0.0	1±0*
3.0%	1	3.2	582	0.4	0.1	13.2	0.04	77	14	7919	0.5	2
4.0%	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5.0%	7	3.3±0.1	601±42*	0.4±0.1	0.1±0.1	13.3±0.2	0.09±0.02	94±11	18±3	3168±1505	0.5±0.1	2±1*

Group	No.of rats	Glu mg/dl	GOT IU/l	GPT IU/l	IP mg/dl	LAP GR-U	LDH IU/l	PL mg/dl	TG mg/dl	TP g/dl	UA mg/dl	UN mg/dl	A/G
0.01%(control)	10	145±13	73± 8	22± 2	7.9±0.7	229±10	904±133	189±131	97±42	7.5±0.2	1.2±0.2	16.1±1.2	0.93±0.02
0.5%	3	141± 9	95±17	38±14	7.8±0.9	215±22	556±126	180± 23	66±28	6.9±0.7	1.3±0.5	15.5±1.0	0.81±0.11
1.0%	2	142±42	122±43*	40±14	7.5±0.1	214±25	815± 52	176± 5	70±33	6.9±0.0	1.7±0.4	18.4±0.6	0.79±0.10
2.0%	5	133± 9	99±10*	36± 3	8.4±1.3	203±27	737±300	178± 24	82±24	6.5±0.6*	1.5±0.5	16.7±0.7	0.90±0.03
3.0%	1	139	138	43	8.6	218	1496	166	61	6.6	2.7	15.3	0.94
4.0%	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5.0%	7	138±15	111± 9*	54±17*	7.7±0.8	232±10	681±168	182± 15	86±35	6.9±0.2	1.1±0.3	16.0±0.9	0.92±0.04

1) Number of rats examined

2) Mean ± SD

*Significantly difference from control($p<0.05$) in sheffe's multiple comparison test

Table 5. Blood Biochemical Examination in Female Rats

Group	No.of rats	ALB g/dl	ALP IU/l	BIL mg/dl	D-BIL mg/dl	Ca mg/dl	CHE △pH	CHO mg/dl	F-CHO mg/dl	CPK IU/l	CRE mg/dl	GGT IU/l
0.01%(Control)	9[1)]	3.6±0.1[2)]	575±119	0.5±0.0	0.1±0.0	10.9±0.3	0.68±0.11	89± 6	19±2	3827±1584	0.5±0.1	3±0
0.5%	10	3.6±0.1	549± 43	0.5±0.1	0.1±0.1	11.1±0.3	0.77±0.09	75± 5	12±3*	3888±2569	0.6±0.1	1±0
1.0%	10	3.5±0.1	520± 62	0.5±0.1	0.2±0.1	11.0±0.2	0.74±0.10	80± 4	13±3	4319±2006	0.5±0.1	1±0
2.0%	10	3.3±0.1*	508± 60	0.5±0.0	0.1±0.1	11.0±0.2	0.63±0.10	76± 8	13±4	3044± 791	0.5±0.1	1±0
3.0%	10	3.3±0.2*	513± 81	0.5±0.0	0.1±0.1	11.0±0.2	0.63±0.06	75±11	12±4*	3341±1423	0.6±0.1	1±0
4.0%	10	3.4±0.2	512± 91	0.5±0.0	0.2±0.1	11.0±0.4	0.66±0.16	76±13	13±5	3871±1924	0.5±0.1	1±1
5.0%	10	3.3±0.1*	530± 52	0.5±0.1	0.2±0.1	11.1±0.4	0.59±0.16	72± 6*	11±3*	4235±2483	0.5±0.1	1±1

	No.of rats	Glu mg/dl	GOT IU/l	GPT IU/l	IP mg/dl	LAP GR-U	LDH IU/l	PL mg/dl	TG mg/dl	TP g/dl	UA mg/dl	UN mg/dl	A/G
0.01%(control)	9	131±14	83± 7	20±2	6.6±0.9	221± 6	1103±237	180±10	44± 9	7.0±0.2	1.3±0.2	16.4±1.7	1.06±0.04
0.5%	10	129±15	95±18	38±11	6.4±0.6	232±11	1026±347	152±15	49±16	7.1±0.1	1.1±0.3	16.9±2.0	1.04±0.03
1.0%	10	126± 2	115±29	67±54*	6.2±0.7	230± 5	1066±545	159± 9	59±28	6.9±0.2	1.0±0.1*	17.8±1.7	1.00±0.05
2.0%	10	125±12	95±10	53±16*	6.4±0.7	218±18	839±183	148±18	46±27	6.5±0.2	1.0±0.2	16.4±2.0	1.04±0.03
3.0%	10	125± 9	106±17	52±16*	6.0±0.9	213±20	895±252	148±17	49±17	6.0±0.3	1.1±0.3	16.6±1.4	1.03±0.06
4.0%	10	120± 9	103±18	53±14*	6.4±0.5	215±20	997±348	149±28*	51±27	6.6±0.4	1.0±0.2	17.3±2.8	1.06±0.05
5.0%	10	129± 5	111±20*	52±19*	6.5±0.7	209±26	1166±357	149±19*	63±47	6.5±0.4	1.1±0.2	17.8±1.9	1.04±0.06

1) Number of rats examined

2) Mean ± SD

*Significantly difference from control($p<0.05$) in Sheffe's multiple comparison test.

Table 6. Hematological Examination in Male and Female Rats

Group	No.of rats	WBC $\times10^3$	RBC $\times10^6$	Hgb gm	Hct %	PLT $\times10^3$	MCV μ^3	MCH $\mu\mu g$	MCHC %
Male									
0.01%V.E(Control)	10[1)]	6.9±0.9[2)]	9.57±0.19	16.5±0.2	48.8±1.2	806±29	50±1	17.2±0.2	34.5±0.5
0.5%	3	7.7±1.4	8.00±1.75	13.5±2.8	40.3±7.3	1013±270	51±2	16.9±0.7	33.5±1.0
1.0%V.E	2	8.0±0.0	7.90±0.42	12.9±0.9	39.5±1.0	925±148	50±1	16.4±0.2	32.7±1.3
2.0%V.E	5	8.1±1.5	7.78±1.00*	12.2±2.4*	37.3±6.3*	886±56	48±2	15.6±1.1	32.7±1.2*
3.0%V.E	1	12.8	7.40	9.9	32.6	1460	44	13.4	30.4
4.0%V.E	0	—	—	—	—	—	—	—	—
5.0%V.E	7	7.2±0.8	8.07±0.48	14.7±1.4	43.5±3.3	847±149	49±1	16.5±1.2	33.8±0.8
Female									
0.01%V.E(Control)	10	7.4±1.0	8.88±0.19	16.6±0.2	46.4±1.4	729±68	52±1	18.8±0.2	35.9±0.9
0.5%V.E	10	9.2±2.7	8.77±0.23	16.3±0.2	45.7±1.3	684±87	52±0	18.6±0.4	35.6±0.8
1.0%V.E	10	9.0±1.4*	8.55±0.20	16.1±0.3*	44.5±1.3	684±46	52±1	18.8±0.4	36.2±1.0
2.0%V.E	10	8.3±1.2	8.58±0.34	15.8±0.6*	44.6±1.9	720±41	52±1	18.4±0.3	35.4±0.8
3.0%V.E	10	8.5±1.5	8.47±0.40*	15.9±0.6*	44.2±2.1*	697±121	52±1	18.7±0.3	35.9±0.7
4.0%V.E	10	8.4±0.4	8.47±0.40*	15.8±0.7*	43.9±2.1*	696±75	52±1	18.7±0.2	36.0±0.9
5.0%V.E	10	9.5±1.8*	8.53±0.37	16.1±0.4*	44.3±1.9*	680±102	52±1	18.8±0.4	36.3±1.0

1) Number of rats examined　2) Mean ± SD

*Significantly difference from control group($p<0.05$) in sheffe's multiple comparison test

た．このうち肝細胞の壊死と脾臓の変化の程度は出血の程度に比例する傾向にあった．また精巣上体の線維化は臓器周囲の脂肪または結合組織内にも見られ，ヘモジデリン，白血球及び赤血球も混在し出血の陳旧巣と考えられた．肝の脂肪沈着は軽度な変化で5.0%群を除く各群で見られた．また腎の石灰沈着は皮髄境界部の尿細管間質に散在しているもので投与群の全例に見られ，1.0%群を除いていずれも軽度な変化であった．生存例では，出血以外の変化では，Table.8，9に示すように，VE投与に関連した雌雄に共通の変化は肝小葉周辺部の脂肪沈着と細胞浸潤であった．脂肪変性の程度は，雄ではいずれも軽度で，また途中死亡例に比べ変化の程度や発現例数が増加する傾向は見られなかった．雌では各投与群でほぼ半数以上のラットに見られ，程度も雄に比べ強い例が多く，脂肪滴も大きなものが多かった．肝の細胞浸潤は小単核球の集族巣が小葉周辺に限局性に散在し主に脂肪変性の見られる部位の周辺部に見られ，白血球などの炎症性細胞や変性した肝細胞が混在していた．程度の強い例では集族巣も大きくまた小葉内の存在数も多く見られ，その程度は脂肪変性と比例していた．雄では観察例数が少なく正確な比較は困難であるがいずれも雌で程度が強く見られた．腎の変化は雄途中死亡例に見られた変化と同じ皮髄境界部の石灰沈着で程度の強い例では沈着部位が帯状をなしていた．この変化は対照群でも見られたが発現数や程度の強さは肝の変化と同様に投与群でも見られたが発現数や程度の強さは肝の変化と同様に投与群で強く現れる傾向を示した．また雌で程度の強い例が多かった．雄のみに見られた変化は脾臓の髄外造血と精巣上体の線維化であった．これらはいずれも死亡例に比べ軽度な変化であった．

考　察

ビタミンE(d-α-tocopheryl acetate)を0.5，1.0，2.0，3.0，4.0，5.0%の割合で混合した固形飼料をラットに13週間摂取させた高用量VEの生体に対する影響を観察した．d-α-トコフェロールのビタミンとしてのわが国の一日の栄養所要量は3-10mg(幼児-成人)である[15)]．本

Table 7. Histopathological Changes of Male Rats died before the Termination of study

Group		0.5%	1.0%	2.0%	3.0%	4.0%	5.0%
No.of rats observed		7	8	5	9	10	3
Liver							
Centrilobular necrosis	−[1)]	5	2	3	1	3	0
	±	0	0	0	0	0	0
	+	0	1	1	1	2	1
	++	2	2	0	5	4	0
	+++	0	3	1	2	1	0
Periportal fatty change	−	4	5	1	8	8	3
	±	1	1	3	0	1	0
	+	2	2	1	1	1	0
Kidney							
Mineralization at corticomedullary junction	−	3	0	1	4	5	1
	±	1	0	0	0	0	0
	+	4	6	4	5	5	2
	++	0	2	0	0	0	0
Spleen							
Extramedullary hematopoiesis	−	1	1	1	0	0	0
	±	0	0	0	0	0	0
	+	6	4	2	5	6	2
	++	0	3	2	3	2	1
	+++	0	0	0	1	2	0
Epididymis							
Interstitial fibrosis	−	6	6	4	8	6	3
	±	0	0	0	0	0	0
	+	1	1	0	1	2	0
	++	0	1	1	0	2	0

1) Severity : −No changes, ± Very slight, + Slight, ++ Moderate, +++ Marked

実験での VE 摂取量はラット(体重, 200 g)の一日の飼料摂取量を10 g とすると50-500mgでこれは上記の成人に対して設定された許容量の約1000-10000倍に相当する.

本実験では, 雄投与群での出血性死亡及び臓器出血や雌での明かな肝重要量の増加, 雌雄での GOT, GPT 等の血清成分, 血液性状の変動及び肝の組織変化などが見られたが, それらの発現率や程度には VE 濃度との相関はなかった. しかしこれらの変化は対照群では見られないことから, いずれも VE 投与の影響によるものと考えた. VE 実験の結果から出血傾向が0.5%投与群でほぼ2週目より見られ, VE による出血傾向が比較的早い時期に発現することがわかる. Abudo ら[11)]の行った d-α-トコフェリルアセテートの125, 500, 2000mg／kgB.W.(飼料中濃度に換算して各々0.23, 0.92, 3.7%に相当)の13週間強制経口投与実験では2000mg／kgB.W.を投与したラットでのみ7/10の出血性死亡を報告している. 本実験の結果は Abudo ら[11)]の高用量での結果に一致するが, 0.92%に相当する500mg／kgB.W.投与群では部分トロンボプラスチン時間の延長は見られるが出血による死亡はなく, 低用量での結果には死亡数に違いがあった. 従来 VE を大量投与しても摂取量の増加に伴い吸収率は低下し血中濃度の上昇割合は低いことが知られている.[15,16)]Yang ら[9)]の 0-25000 IU／kg diet を 8 ヵ月投与したラットの血清濃度は2500mg／kg diet(0.25%)までは濃度

Table 8. Histopathological Changes in Male Rats Killed at the Termination

Group		Control	0.5%	1.0%	2.0%	3.0%	4.0%	5.0%
No.of rats observed		10	3	2	5	1	0	7
Liver								
Periportal cell infiltration	−[1)]	5	0	0	0	0	−	0
	±	5	2	2	3	1	−	3
	+	0	1	0	2	0	−	3
	++	0	0	0	0	0	−	1
Periportal fatty change	−	10	2	1	5	1	−	5
	±	0	1	1	0	0	−	2
Kidney								
Mineralization at cortico-	−	3	0	0	0	0	−	0
medullary junction	±	7	1	0	0	1	−	1
	+	0	2	0	4	0	−	4
	++	0	0	2	1	0	−	2
Spleen								
Extramedullary hematopoiesis	−	0	1	1	4	0	−	6
	±	0	0	0	0	0	−	0
	+	0	2	1	1	1	−	1
Epididymis								
Interstitial fibrosis	−	10	3	1	2	0	−	6
	±	0	0	0	0	0	−	0
	+	0	0	1	3	1	−	1

1) Severity : − No changes, ± Very slight, + Slight, ++ Moderate

に比例したがそれ以上の濃度，10000，25000mg／kg diet (1.0,2.5%)での吸収率はむしろ減少している．神谷ら[18)]は本実験に平行して0.5, 1.0, 2.0, 4.0%のVEを1, 2, 4週間摂取させたラットの血中濃度を測定したが，摂取量に比例せず一定の傾向は見られなかった．従ってVE血中濃度は，飼料中のVE濃度レベルで0.5-1.0%を境としてそれ以上の濃度で飽和状態に達するものと考えられ，本実験の濃度範囲でのVEの作用は一定であったと思われる．本実験の投与群における出血性死亡の差やAbudoら[11)]の実験との差はラットの個体差や実験条件及び飼育条件における物理的要因が結果に反映したものと考えられる．5.0%投与群では出血による死亡率がとくに低かった．油性物質の排泄量が多く吸収されずに排泄されるVE量が多かった可能性が考えられ，今後血中濃度からの検討が必要である．

出血の見られた臓器のうち死亡要因となった顕著な出血は四肢の爪の傷のほか，胸腺，精巣上体，前立腺および周辺の脂肪組織，肺，脳などに多く見られた．藤井ら[13)]は抗酸化剤であるButyrated hydroxy toluen(BHT)を投与した雄ラットで同様な臓器で出血が起きることを報告している．BHTによる出血は，プロトロンビン時間の延長などの血液性状の変化を伴い，それがビタミンKの投与により阻止されることから，出血機構としてVKが関与する血液凝固系への作用が考えられている[19)]．VEによる出血においてもBHTと同様の性質の血液性状の変化が報告されている[10,11)]．本実験で見られたVEによる出血は，血液性状の異常によって走こる出血性素因に共通した性質のものと思われる．また特に出血が顕著であった胸腺，精巣上体などの臓器では，その要因として構造上小血管や毛細血管の分布が豊富であること，また外部からの物理的な刺激を受けやすいことなどが考えられる．今後VEによる出血の性状については，さらに病理組織学的に検討を加え，その詳細を次報で述べたい．

Table 9. Histopathological Changes in Female Rats Killed at the Termination

Group		Control	0.5%	1.0%	2.0%	3.0%	4.0%	5.0%
No.of rats observed		10	10	10	10	10	10	10
Liver								
Periportal cell infiltration	−[1)]	1	1	0	0	0	0	1
	±	7	5	1	4	3	2	4
	+	2	2	6	6	4	7	2
	++	0	1	2	0	3	1	2
	+++	0	0	1	0	0	0	1
Periportal fatty change	−	10	6	2	2	5	3	3
	±	0	0	2	2	0	1	3
	+	0	3	4	6	3	5	3
	++	0	1	2	0	2	1	1
Kidney								
Mineralization at cortico-	−	0	0	0	0	0	0	0
medullary junction	±	1	0	0	0	0	0	0
	+	7	1	0	3	3	1	3
	++	2	9	8	7	7	7	6
	+++	0	0	2	0	0	2	1

1) Severity : − No changes, ± Very slight, + Slight, ++ Moderate, +++ Marked

体重へのVEの影響についてはF344ラットを使ったAbudoら[11)]の実験やCDラットによるWeldonら[10)]の実験では認められていない．これに対し2200 IU／kg dietを投与したニワトリや10000-25000IU／kgを8ヵ月投与したWistarラットでは体重の増加抑制が生じられている．このように体重に関しては一定の結果は得られていない．本実験では雄で抑制傾向が見られたが投与2週目から生じる出血傾向による二次的なものであると思われる．

VE関連した主な変化は肝臓の変化で，出血とは逆が雌で顕著であった．肝重量は絶対重量，体重比とも増加し，組織学的に肝小葉周辺性の脂肪変性(蓄積)および同様な部位での細胞浸潤であった．肝重量の増加や生化学的に脂質が蓄積することはすでに報告されているが，組織学的に脂肪の蓄積の報告はない[9,11)]．小葉周辺性の脂肪沈着はEthionine, 4-amino-pyrazolo-pyrimidineなどの蛋白合成阻害剤によるほか，絶食，飢餓によっても起こる[20)]が，体重の増加傾向や摂餌量は対照群と差がなく，栄養状態の影響はなかったものと思われる．細胞浸潤は脂肪変性を見る部位またはその周辺と存在部位が規則的であり，炎症性細胞や変性または壊死した肝細胞も混在することから薬物による中毒性の炎症性病変と思われた．脂肪変性とともに過剰量のVEによる作用が考えられた．VEによる肝の組織変化としてはWeldon[10)]の長期実験で，中心静脈周辺の類洞内の脂肪染色陽性の大食細胞集族が報告されているに過ぎない．本実験の様な過剰量の範囲での実験が少なく組織学的な変化が見過ごされている可能性もある．またVEの肝に対する作用は出血を起こす作用とは各々逆の性差を示しており機序的には異なった性質のものと思われるがVEの代謝などからの検討が必要である．そのほか途中死亡例で肝の小葉中心性壊死及び脾臓の髄外造血が見られたが，これらは出血による変化と思われる．

血清生化学的にGOT，GPTが増加したが特に雌ではGPTの増加率は高く肝臓での障害性の組織変化を反映しているものと考えられる[21)]．またALB，TP，CHO，PLなどの低下も見られ，肝でのタンパク合成などの機能の低下も予想される．雄では生存例が少なく正確な比較は困難であるが，重量増加は見られず組織変化も雌に比べて軽度であり，VEによる肝への作用は雌で強かったものと思われる．

血液学的には雄生存例及び雌でRBC，Hgb，Hct値の

減少，または減少傾向が見られた．これらの値の変動は雌では，ほぼ全ての群で有意であり，雄に比べてより明確に現れた．雄では生存例で種々の臓器で出血が見られたがいずれも軽度で死亡原因となるものではなかった．また雌では組織学的にも出血は認められなかった．Abudo ら[11]の13週間の実験では2000mg／kg B.W.を投与した雌で投与後5,45日目に RBC，Hgb の低下，また実験終了時に10例中２例に臓器の出血を観察し，これらの血液性状の変化を出血性素因による失血に対する反応であるとしている．しかし2200 IU／kg Diet を投与したヒヨコや2000mg／kg Diet を投与した雌ラットでは出血は起こらず RBC，Hgb，Hct の低下が見られている[7,10]．また網状赤血球の増加が見られることから VE による赤血球の成熟の遅れや寿命の短縮が考えられている．本実験において見られた血液学的成分の変動はその全ての要因が失血によるとは考え難く，むしろ肝の障害による機能低下の影響や，過剰量 VE による消化管からの鉄，ビタミン K 及び B_{12}の吸収への影響など造血機能への間接的な影響も考慮する必要があると思われる．そのほか WBC 増加が雌で見られたが動物に感染症は見られず肝の組織変化を反映したものと思われる．

腎臓の石灰沈着は F344ラットの雌で特に多く見られる自然発生病変である．本実験では雌投与群で程度が強く現れた．岩田ら[22]によれば３-４ヶ月令の動物での発生率は雌10%，雄20%であり石灰沈着機序に於ける雌性ホルモンの関与が示唆されている．また VE にはラット，マウスで発情期を延長するなどの性ホルモン様作用があることが知られている[23,24]．本実験において前立腺重量の減少，卵巣重量の増加などが認められたが，組織学的に卵巣の排卵の促進を示唆する変化や子宮内膜の変化などには見られず，VE ホルモン様作用の有無については確認できなかった．

以上示したように過剰量のビタミンＥ投与によって雄にのみ致死性の出血傾向が見られた．また雌では血清成分の変動を伴った肝の障害性の組織変化が見られた．肝の変化は雄にも見られたが程度は明らかに雌で強かった．本実験において過剰投与されたビタミンＥは雌雄のラットに各々明らかな性差を有する作用を及ぼした．

文　献

1）月刊フードケミカル，９，14-24,1985
2）五十嵐　脩：栄養学雑誌，45，189-196,1987
3）荒木万喜，村山ヒサ子：医学のあゆみ，149，920,1989
4）Gey, K.F., Brubacker. G. B. and Stahelin, H. B.：Am. J. Clin. Nutr., 45, 1368-1377,1987
5）平原文子，山田迪夫：栄養学雑誌，42，21-30,1984
6）Federal. Register：42(209),50193,1978
7）March, B. E., Wong, E., Seier, L., Sim, J. and Biely, J.：J. Nutr.,103,371-377,1973
8）Yang, J. N. V. and Desai, I. D.：J. Nutr., 107,1410-1417,1977
9）Yang, J. N. Y. and Desai, I. D.：J. Nutr., 107,1418-1426,1977
10）Wheldon, G. H., Bhatt. A., Keller, P. and Hummler, H.：Internt. Vit. Nutr. Res., 53,287-296,1983
11）Abudo, K. M., Rao,G., Montgomery, C. A., Dinowitz, M., Kanagalingam, K. : Fd. Chem. Toxic., 21,1043-1050,1986
12）平賀興吾，林田志信，市川久次，米山允子，藤井孝，池田虎雄，矢野範男：東京衛研年報，22,231-249,1970
13）藤井　孝，湯澤勝広，平賀興吾：東京衛研年報 26, 36-44,1975
14）Report of the American Institute of Nutrtion Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies：J.Nutr.107,1340-1348,1977
15）第四次改訂：日本人の栄養所要量　厚生省，1989年９月
16）Baker, H., Frank, O., De Angeles, B., et. al.：Nutr. Rep. Intern., 21,531-536,1976
17）Porta, E. A., Joun, N. S. and Nitta, R. T.：Mech. Aging Devel., 13, 1-39,1980
18）神谷信行，他：未発表
19）Takahashi, O. and Hiraga, K.：J. Nutr., 109, 453-457,1979
20）渡辺慶一，佐藤慎吾：日本病理学大系，第２巻 26-33,1989,中山書店
21）柴田　進：臨床生化学診断法，p 104-105，改訂第５版，金芳堂
22）Iwata, H, Hirouchi, Y., Inoue, H. and Enomoto, M：Exp. Anim., 35,299-305,1986
23）北川昭一：日産婦誌，６，228,1954
24）秦　良磨：日産婦誌，18,825-834,1966

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 315-322, 1990

Salmonella typhimurium TA97, TA102 を用いた食品添加物の変異原性試験（第5報*）

藤田　博**，佐々木美枝子**

Mutagenicity Test of Food Additives with *Salmonella typhimurium* TA97 and TA102 (V)

HIROSHI FUJITA** and MIEKO SASAKI**

Mutagenicity of 33 food additives including 11 flavoring agents, 10 dietary supplements, 7 acidulants and so forth were examined in Ames' tester strains, *Salmonella typhimurium* TA97 and TA102. The mutation test was carried out using 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. Weak mutagenic activity was detected with sodium L-asocorbate in TA97 without S9 mix and in TA102 with and without S9 mix. The other 32 chemicals were not mutagenic in TA97 and TA102.

Keywords：変異原性 mutagenicity, L-アスコルビン酸ナトリウム sodium L-ascorbate, 食品添加物 food additives, 着香料 flavoring agents, 強化剤 dietary supplements, 酸味料 acidulants, サルモネラ *Salmonella typhimurium* TA97, *Salmonella typhimurium* TA102

食品添加物の安全性を検討するために変異原性についてもいろいろな研究が行われている．この変異原性試験の中では，*Salmonella typhimurium* TA 株[1-3]を用いる系が広く利用されている．これを開発したAmesらは，様々な変異原を検出するためにはTA97,TA98,TA100およびTA102の4株を試験に用いるように提案している[3]．ところがTA98およびTA100を用いた試験報告は多いが，後から開発されたTA97およびTA102を用いた試験の報告は少ない．TA97が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]特徴がある．従ってTA97およびTA102を用いた試験を行うことにより，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]可能性がある．

そこで我々は食品添加物の変異原性についても，TA97およびTA102を用いた試験を実施する必要があると考えた．試験にあたりTA98およびTA100における試験結果の報告がある食品添加物も含め，全食品添加物について行うことにした．前報[7-11]までに111種の試験が終了し，10種の食品添加物に弱いが，TA97またはTA102に対する変異原性を見いだした．今回は，着香料(11種)，強化剤(10種)，酸味料(7種)および結着剤(5種)の計33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，表示されたもの以外は全て和光純薬製である．

着香料：シクロヘキシルプロピオン酸アリル(Lot No.DCJ5342)，酢酸ベンジル(Lot No.AWM1857)，酢酸ブチル(Lot No.AWE7070)，シネオール(Lot No.AWH4945)，シトラール(Lot No.AWE7528)，シトロネラール(Lot No.AWJ0431)，シトロネロール(Lot No.KPR0138)，酢酸リナリル(Lot No.AWJ4309)，酢酸-*l*-メンチル(東京化成 Lot No.AZ01)，サリチル酸メチル(Lot No.AWF6031)，酢酸フェネチル(Lot No.PDL5414)，強化剤：クエン酸アンモニウム(Lot

---

*第4報，東京衛研年報，40，353－362，1989

**東京都立衛生研究所毒性部　169　東京都新宿区百人町3－24－1

**The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

No.CTK1771), 塩化第二鉄(Lot No.CTH2338), クエン酸鉄(Lot No.CTJ3863), L-イソロイシン(Lot No.AWM2026), L-アスコルビン酸ナトリウム(Lot No.KPQ0534), チアミン硝酸塩(Lot No.KPK5193), DL-スレオニン(Lot No.KPR5426), L-スレオニン(Lot No.KPK4026), DL-トリプトファン(Lot No.KPF0649), L-トリプトファン(Lot No.KPE6666), 酸味料：アジピン酸(Lot No.KPF0722), クエン酸(Lot No.KPE1615), グルコン酸(Lot No.ECR6657), グルコノデルタラクトン(Lot No.CTM1244), コハク酸(Lot No.SAQ1469), DL-酒石酸(Lot No.CTM0042), L-酒石酸(Lot No.CTE3256), 結着剤：メタリン酸カリウム(Lot No.AWK3484), ピロリン酸四カリウム(Lot No.CTH2224), メタリン酸ナトリウム(Lot No.CTG2505), ポリリン酸ナトリウム(Lot No.CTH7580), ピロリン酸四ナトリウム(Lot No.CTH2227).

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[3,12]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[3,12]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 mix0.5ml, 代謝活性化しない場合にはリン酸緩衝液(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分間の前培養を行った. これに45℃に保温した軟寒天[3] 2 mlを加え混合後, 最少グルコース寒天培地[3]に重層した. 37℃で2日間培養後, プレートに生じた復帰コロニーを自動コロニーカウンターで計数した.

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[13]を行い, さらにMooreら[14]のプログラムにより回帰分析を行った. 両検定において有意な場合変異原性陽性とした.

結果および考察

33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.

強化剤のL-アスコルビン酸ナトリウムは, TA97およびTA102において, S9 mix無添加の時に復帰コロニー数が有意に増加し, 用量相関も見られた. さらにTA102についてはS9 mix添加においても復帰コロニーは増加した. TA102 -S9 mixの場合, 5 mg／プレートでコントロールの復帰コロニー数の1.4倍(0.005復帰コロニー／nmol)であった. 増加量は非常にわずかであるが, 増加に再現性があることから, 非常に弱いが変異原性はあると考えられる.

その他の32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ないと考えられる.

L-アスコルビン酸ナトリウムについては培養細胞に対する変異原性試験の報告があり, ヒトリンパ球およびハムスター子宮由来細胞に対してSCEを誘発する[15]. L-アスコルビン酸については, 我々がTA97およびTA102のS9 mix無添加において弱い変異原性を見いだしている[7]が, Yamaguchi[16]はS9 mix添加およびEDTA-Fe添加におけるTA100に対する変異原性を報告している. いずれも酸素ラジカルの関与を考察している. さらにL-アスコルビン酸には抗変異原性の報告[18]もあり, 変異原性に関して興味ある化合物である.

今回, TA97およびTA102に対する変異原性が見られなかった32種類の食品添加物の変異原性については若干の報告が見られる. 酢酸ブチル, シトラール, サリチル酸メチル, クエン酸アンモニウム, クエン酸鉄, L-イソロイシン, DL-スレオニン, L-スレオニン, DL-トリプトファン, L-トリプトファン, クエン酸, グルコン酸, グルコノデルタラクトン, コハク酸, メタリン酸カリウム, メタリン酸ナトリウムおよびポリリン酸ナトリウムの17種については, TA98, TA100および培養細胞に対して陰性であることをIshidateら[19]が報告しており, 我々の結果に一致するものであった. 一方, 酢酸ベンジルは, 培養細胞に対する変異原性が陽性[20]および陰性の報告[21]があり, さらにシネオール[21]は培養細胞に対する変異原性が, 塩化第二鉄[22]は大腸菌に対する

Table 1. Results of Mutation Test on Food Additives

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate[a)]			
			TA97		TA102	
			−S 9	+S 9	−S 9	+S 9
Flavoring agents						
Allyl Cyclohexylpropionate	DMSO	0.1	51	92	36	443
		0.05	75	165	50	467
		0.01	148	177	314	528
		0.005	137	209	358	516
		0.001	150	207	336	550
		0	166	193	361	564
Benzyl Acetate	DMSO	1	111	180	190	483
		0.5	123	176	227	528
		0.1	116	178	246	486
		0.05	142	186	315	504
		0.01	106	202	299	528
		0	124	180	280	490
Butyl Acetate	DMSO	1	126	192	292	493
		0.5	144	189	318	510
		0.1	123	197	285	473
		0.05	142	195	336	516
		0.01	145	212	311	483
		0	141	192	326	506
Cineole	DMSO	0.1	110	177	160	501
		0.05	132	178	278	474
		0.01	119	194	296	445
		0.005	122	199	306	462
		0.001	120	183	312	474
		0	127	171	334	472
Citral	DMSO	0.1	15	191	27	450
		0.05	125	200	196	581
		0.01	125	187	310	574
		0.005	130	204	370	563
		0.001	144	199	353	582
		0	166	193	361	564
Citronellal	DMSO	0.1	0	145	0	406
		0.05	91	166	155	547
		0.01	120	183	319	549
		0.005	127	168	323	517
		0.001	132	198	362	541
		0	122	189	366	522
Citronellol	DMSO	0.1	90	151	93	464
		0.05	124	178	301	517
		0.01	128	183	316	547
		0.005	116	185	333	485
		0.001	137	187	347	510
		0	122	189	366	522

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate[a)]			
			TA97		TA102	
			−S 9	+S 9	−S 9	+S 9
Linalyl Acetate	DMSO	0.1	94	192	0	549
		0.05	115	179	155	553
		0.01	123	206	324	564
		0.005	132	176	343	554
		0.001	122	192	372	538
		0	127	167	333	519
l-Menthyl Acetate	DMSO	1	121	0	71	0
		0.5	143	53	246	30
		0.1	140	191	204	542
		0.05	137	196	243	526
		0.01	158	208	340	552
		0	147	216	334	536
Methyl Salicylate	DMSO	0.1	138	158	330	595
		0.05	129	187	318	610
		0.01	127	181	317	632
		0.005	128	180	332	620
		0.001	131	180	364	633
		0	127	167	333	519
Phenethyl Acetate	DMSO	0.1	148	206	300	573
		0.05	153	176	340	531
		0.01	145	210	344	562
		0.005	147	179	353	521
		0.001	139	195	385	548
		0	155	214	363	561
Dietary supplements						
Ferric Ammonium Citrate	DW	10	127	190	327	531
		5	135	186	377	515
		1	146	190	394	521
		0.5	162	191	401	519
		0.1	158	182	398	539
		0	164	203	400	509
Ferric Chloride	DW	1	151	187	407	501
		0.5	163	186	404	510
		0.1	148	174	426	515
		0.05	175	201	361	527
		0.01	157	195	388	523
		0	164	203	400	509
Ferric Citrate	DW	10	157	201	379	514
		5	156	182	411	631
		1	139	211	398	545
		0.5	152	200	394	565
		0.1	155	207	375	560
		0	152	215	404	537

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate[a]			
			TA97		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
L-Isoleucine	DW	1	133	208	278	429
		0.5	128	208	330	469
		0.1	126	180	353	494
		0.05	167	209	358	526
		0.01	139	205	362	519
		0	123	215	360	537
Sodium L-Ascorbate	DW	10	163[b]	193	479[b]	618[b]
		5	183	227	496	561
		1	143	202	398	565
		0.5	153	225	373	536
		0.1	148	218	369	544
		0	121	215	360	537
Thiamine Mononitrate	DW	1	132	192	392	525
		0.5	152	202	371	539
		0.1	129	195	417	543
		0.05	132	223	393	557
		0.01	151	202	421	532
		0	152	215	404	537
DL-Threonine	DW	10	177	183	345	436
		5	172	171	384	510
		1	184	168	425	545
		0.5	178	176	421	588
		0.1	160	187	430	590
		0	160	190	430	591
L-Threonine	DW	10	167	195	395	545
		5	171	192	408	554
		1	164	151	393	536
		0.5	184	211	444	564
		0.1	184	202	453	545
		0	160	190	430	435
DL-Tryptophan	DMSO	1	129	194	367	565
		0.5	140	216	336	565
		0.1	145	206	346	543
		0.05	157	185	383	571
		0.01	151	196	351	575
		0	155	242	397	592
L-Tryptophan	DMSO	1	160	204	421	608
		0.5	159	232	399	579
		0.1	149	211	373	574
		0.05	144	211	436	580
		0.01	158	223	394	603
		0	155	242	397	592

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate[a)]			
			TA97		TA102	
			−S 9	+S 9	−S 9	+S 9
Acidulants						
Adipic Acid	DMSO	10	120	224	266	579
		5	151	195	286	462
		1	116	190	288	480
		0.5	117	197	277	479
		0.1	123	195	307	487
		0	108	183	297	480
Citric Acid	DW	10	132	242	297	277
		5	172	253	366	463
		1	144	250	365	537
		0.5	165	224	343	511
		0.1	172	239	370	501
		0	150	224	382	566
Gluconic Acid	DW	10	153	195	402	552
		5	135	202	395	572
		1	146	172	380	542
		0.5	156	188	405	542
		0.1	147	199	366	509
		0	156	192	368	562
Glucono-δ-Lactone	DW	10	143	206	347	520
		5	177	216	370	531
		1	139	225	382	538
		0.5	162	224	372	522
		0.1	143	215	386	519
		0	150	224	382	566
Succinic Acid	DMSO	10	107	157	272	268
		5	112	227	312	520
		1	106	181	289	475
		0.5	125	186	280	498
		0.1	111	197	285	484
		0	108	183	297	480
DL-Tartaric Acid	DW	10	152	194	226	209
		5	145	211	344	272
		1	138	192	354	509
		0.5	155	192	383	533
		0.1	156	180	402	534
		0	156	192	368	562
L-Tartaric Acid	DW	10	155	185	274	211
		5	141	164	333	177
		1	175	203	350	508
		0.5	150	219	377	509
		0.1	147	223	387	515
		0	147	216	334	536

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate[a]			
			TA97		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Salts						
Potassium Metaphosphate	DW	10	156	208	368	462
		5	154	218	378	540
		1	147	212	351	533
		0.5	148	203	323	500
		0.1	145	202	351	508
		0	164	213	345	515
Potassium Pyrophosphate	DW	10	133	146	269	244
		5	125	191	299	277
		1	82	170	287	425
		0.5	137	187	271	468
		0.1	131	187	296	485
		0	114	183	292	478
Sodium Metaphosphate	DW	10	130	198	306	332
		5	157	193	318	341
		1	135	192	325	501
		0.5	145	208	328	499
		0.1	151	205	344	541
		0	164	213	345	515
Sodium Polyphosphate	DW	10	122	181	284	328
		5	132	197	307	343
		1	134	204	307	499
		0.5	141	197	338	496
		0.1	141	208	356	507
		0	151	184	340	496
Sodium Pyrophosphate	DW	10	121	187	334	328
		5	125	195	348	333
		1	114	205	334	489
		0.5	130	207	342	476
		0.1	150	202	341	500
		0	151	184	340	496
Positive controls						
9-Aminoacridine	DMSO	50(μg)	627±213[c]			
Mitomycin C	DMSO	0.5(μg)			2,438±236	
2-Aminoanthracene	DMSO	5(μg)		2,104±656		1,144±226

a) Mean of three plates.

b) Statisicaly significant difference by Kruskal-Wallis test ($P<0.05$) and dose-related increase by regression analysis ($P<0.01$).

c) Mean and standard deviation ($n=19$).

変異原性が見られることが報告されている．シトロネラール，アジピン酸など残る12種については，変異原性についての情報を見いだすことはできなかった．これらの化合物および陽性の報告がある化合物については，今後とも多くの試験系での検索が望まれる．

食品添加物のTA97またはTA102を用いた変異原性試験は，前報[7-11]までに報告した111種類の食品添加物を加えると144種類となる．現在342種が許可されており，約半数の試験が終了した．これまでの結果を総合すると，TA97またはTA102において変異原性が見られた化合

物は，アスコルビン酸[7]，L-アスコルビン酸ナトリウム，オルトフェニルフェノール[7]，チアベンダゾール[7]，塩酸ビリドキシン[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[11]およびエリソルビン酸ナトリウム[11]の11種類であった．これらの化合物の変異原性は，いずれもかなり弱いものであった．変異原性が検出できたのは，TA97およびTA102の変異原性出力が高いためであると思われる．これらの化合物の変異原性については，他の変異原性試験結果の報告なども合わせ，今後とも検討して行きたい．

要　旨

33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-アスコ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32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）藤田　博，佐々木美枝子：東京衛研年報，40，355-362，1989
12）矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，20，1178-1189，1975
13）石居　進：生物統計学入門，133-137，1975，培風館
14）Moore, D. and Felton, J. S.：*Mutation Res.*,：119, 95-102, 1983
15）Galloway, S. M. and Painter, R. B.：*Mutation Res.*, 60, 321-327, 1979
16）Yamaguchi, T.：*Agric. Biol. Chem.*, 45, 327-330, 1981
17）Stich, H. F., Karim, J., Koropatnick, J. and Lo, L.：*Nature*, 260, 722-724, 1976
18）Guttenplan, J. B.：*Nature*, 268, 368-370, 1977
19）Ishidate, M. Jr, Sofuni, T. and Yoshikawa, *K*：*Fd Chem. Toxic.*, 22, 623-636, 1984
20）Caspary, W. J., Langenbach R. and Penman, B. W.：*Mutation Res.*, 196, 61-81, 1988
21）Galloway, S. M., Armstrong, M. J. and Zeiger, J.：*Environ. mol. Mutagen.*, 10, 1-175, 1987
22）Olivier, P. and Marzin, D.：*LARK Medical.*, 6, 252-254, 1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 323-329, 1990

紫外線またはγ線照射した細胞性粘菌における カフェイン感受性回復と突然変異誘発

金西信次*, 金城康人**, 渡部　真**

Caffeine Sensitive Repair and Mutation Induction in UV- or γ-ray-Irradieted *Dictyostelium discoideum*

NOBUJI KANISHI*, YASUHITO KINJO**, MAKOTO WATANABE**

Keyword：カフェイン感受性回復 caffeine sensitive repair, 紫外線誘発突然変異 UV－induced mutation, 細胞性粘菌 cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*

目　的

ある種の化学物質は，DNAもしくはタンパク質あるいは酵素系と結合することによって，分子内の歪みを増大させ，核や染色体の高次微細構造に変化を与え，放射線或はアルキル化剤等の遺伝子損傷に対する修復能などの機能に大きな変動を及ぼすものと思われる[1,2]．その様な化合物の一つであるカフェインはプリンの誘導体で，DNAと結合し[3]，染色体異常や突然変異誘発の作用のほか，紫外線の損傷を増感し，回復阻害作用[4]を与えることが広く知られている．

細胞性粘菌*Dictyostelivm discoidevm*は真核生物の中でも最も単純な核構造を有し，また亜致死損傷からの回復等，高度の回復能によって，極めて高い放射線抵抗性(D_{10}＝3～6×10^3Gy)を示す．その特性に注目し，真核生物におけるDNA損傷修復機構や，突然変異の分子機構を研究する目的から，我々は細胞性粘菌を一つのモデル系として高等動物のリンパ球の系と対比させながら研究を進めている[5,6]，以前に報告したように[5,7,8]，*D. discoideum*ではγ線による致死損傷がカフェインによって増感され[9]，その生存率が経時的に変化するとともに，二相性によって区分される二つの回復過程，即ちγ線照射後比較的短時間で働く回復過程(以下Icの回復という)と，或はその後の細胞の再分裂にともなって作用する回復過程(以下IIcの回復という)とがある．更にカフェインによるこのような増感作用は，細胞性粘菌のアメーバをN-methyl-N'-nitro - N - nitrosoguanidine(MNNGと略)で処理した後，カフェインを含む培地に播種した時も同様に検出され，γ線損傷の場合と同じ様にMNNGの場合もカフェイン感受性IcとIIc回復とがある[5,7,8,10]．

今回我々は，この2種のカフェイン感受性回復過程の特性を解析し，更に突然変異誘発との関係について調べた．

方　法

実験材料：細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum* NC－4株，Ax－3株(bacteriaを捕食しなくても栄養培地でも増殖できる突然変異株)

試薬：カフェイン(和光純薬工業)，アクロマイシンD(Sigma)，サイクロヘキシミド(Sigma)，yeast extract (Difco)，proteose peptone (Difco)

培養方法：前報[5]と同様に，NC－4株の培養は22℃で液体培地(蒸留水1000m*l* 中glucose 5 g，yeast extract 0.5 g，proteose peptone 5 g，K_2HPO_4 2.436 g，KH_2PO_4 0.816 g，$MgSO_4$ 0.25 g)にbacteria懸濁液(液体培地に*Aerobacter aerogenes*を一夜培養したもの)と細胞性粘菌の胞子或はアメーバ細胞を加えて振盪培養した．寒天培地は液体培地に寒天末を2％加えたものである．

Ax－3株の培養はbacteriaを加えないaxenic培養液中(蒸留水1000m*l* 中glucose 15.4 g，yeast extract 7.15 g，proteose peptone 14.3 g，Na_2HPO_4・12 H_2O 1.28 g，KH_2PO_4 0.486 g)でL字管を用いて振盪培養した．

*東京都立衛生研究所毒性部　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
**東京都立アイソトープ総合研究所

細胞数の測定：Coulter Counter，あるいは Thoma 血球計算盤により測定した．

生存率の測定：*D. discoidevm* をbacteria とともに寒天培地に播種し，22℃で培養，寒天培地の表面を覆ったbacteria を粘菌アメーバが捕食したプラーク状のコロニーを数えて生存率を測定した．

サイクロヘキシミド抵抗性突然変異の測定：増殖中のAx－3株アメーバ細胞を紫外線照射し，axenic 培養液で培養の後，350 μg／ml のサイクロヘキシミドを含む寒天培地に bacteria とともに播種し，15～20日間培養，プラークを数えた．bacteria はこの濃度のサイクロヘキシミドを含む寒天培地で増殖可能である．

γ線照射：東京都立アイソトープ総合研究所の^{60}Co線源により照射．照射時間は1時間とし，線源からの距離により線量を変えた．

紫外線照射：HEPES buffer で培地を洗浄，再懸濁し，殺菌灯(254 nm)で照射した．

結果と考察

カフェイン感受性回復に対するアクチノマイシンDの影響

図1は，NC－4株を液体培地で bacteria と共に培養した場合で，実線は増殖中の細胞に2.1×10^3 Gy のγ線を照射し，細胞数の変化を調べたものである．9時間の分裂遅延の後，増殖を再開し，その後非照射細胞の増殖速度とほぼ同じ速度で細胞は増殖した．このγ線照射細胞を，寒天培地に bacteria とともに播種した時の生存率は約85％であった．

細胞を照射直後に0.75 mM のカフェイン含有寒天培地に播種した場合の細胞致死は増感され，生存率は約10％であった．照射後そのままカフェインを含まない液体培地で細胞を培養し，経時的に0.75 mM のカフェインを含む寒天培地に播種して，生存率を求めたものを黒丸の曲線で示した．4時間の比較的短時間の間に生存率が上昇した．これから *D. discoideum* にカフェインによって阻害される修復能力があることが分かる．すなわち照射直後にはカフェインによって生存率が減少した．しかし，カフェインを含まない液体培地での一時的培養で，損傷の一部が修復され，更にその後のカフェイン培地への播種で，残存損傷の修復が阻害された結果として生存率が徐々に上昇する曲線が得られた．これがカフェイン感受性回復過程に対応すると考えられる．

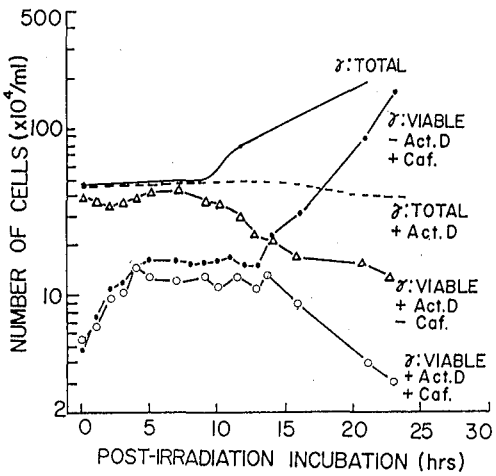


図1　γ線照射したNC－4株のカフェイン感受性回復におけるアクチノマイシンDの効果

この修復の結果においても，カフェインを含まない寒天培地に播種した時と生存率は等しくならず，修復が十分完了したわけではなかった．その後の修復過程は図1に示したように，一時プラトーになった後，細胞数が増加し始めた10時間後より後で更に生存率が上昇し，修復が進行した．そしてカフェインを含む寒天培地に播種した時の生存細胞数は，最終的にカフェインを含まない寒天培地に播種した時の生存細胞数と一致した．

前報[5]でこのカフェイン感受性回復の前半の過程をIcの回復，後半の過程をIIcの回復と名付けたが今回も同じ結果が獲られた．

今回我々はさらにこのカフェイン感受性Icの回復と，IIcの回復とに対するアクチノマイシンDの影響について調べた．γ線照射後液体培地で培養中に10 μg／ml のアクチノマイシンDを添加し，経時的に細胞数を数え，0.75 mM のカフェインを含む寒天培地，あるいは含まない寒天培地に播種した．この濃度のアクチノマイシンDは，非照射細胞の増殖を完全に阻害する最小濃度である．細胞数は23時間後まで殆ど変化しないが幾分減少する傾向があった(図1破線)．この細胞液を希釈し，カフェインを含まない寒天培地に播種した場合，図1に三角印で示したように，照射後10時間後から生存細胞数は徐々に減少した．アクチノマイシンDは希釈により細胞の生存率には影響を与えない．アクチノマイシンDによりRNA合成が行えず，死に至る損傷が徐々に形成され，アクチノマイシンDを除去しても細胞は死ぬものと考えられる．

カフェインを含む培地に播種した場合は，図1に白丸で示したように，アクチノマイシンDが無いときと同様に4時間のIc回復過程及びその後のプラトーを示した．しかしIIcの回復過程は示さず，逆に生存細胞数は急激

に減少した.

アクチノマイシンDはIc回復過程には何ら影響を与えないが, IIc回復過程を阻害する. γ線による損傷を保持する細胞はアクチノマイシンDによってこの時期にカフェインに増感せしめられる様な損傷を形成し, 細胞を致死させるものと考えられる.

Ic回復の温度感受性について

Ic回復の温度感受性について調べるために, 上記の実験と同様にγ線照射後, 液体培地で種々の温度で培養し, 経時的にカフェインを含む寒天培地に播種し, 生存細胞数を求めた. 黒丸は細胞数, 白丸は生存細胞数である. 図2Aは11℃で培養したときで, Icの回復は不明確であり, ほとんどIc回復を示さなかった. 16℃ (図2B)および26℃(図2D)は約10時間のIc回復がみられ, 大幅に回復時間が延長した. そして *D. discoideum* の増殖の至適温度である21℃ (図2C)では, 最も短時間の4時間でIc回復が完了した. この実験からIc回復は温度依存性の酵素的な反応であろうと考えられる.

Ic回復におけるサイクロヘキシミド, アクチノマイシンDの効果

サイクロヘキシミド, アクチノマイシンD等の効果を調べるために, bacteriaを捕食しなくとも増殖しうるAx−3株を用いた. NC−4株ではγ線による損傷がカフェインによって増感されると同様に, Ax−3株は紫外線照射によって生じた損傷が, 同様にカフェインによって増感された.

axenic培地で増殖中の細胞をHEPES buffer中で紫外線照射し, 照射後, 再びaxenic培地で培養し, 経時的に0.75 mMカフェインを含む寒天培地にbacteriaとともに播種した. 165 J／m²の紫外線を照射したAx−3株は, γ線照射したNC−4株と同様にIc回復を示した(図3A). 紫外線照射後, axenic培地の代わりに85.6 mM(15.4mg／ml)のグルコースを含む10 mM HEPES bufferで培養し, 同様に経時的にカフェイン寒天培地に播種した場合は, 少なくとも10時間まではIc回復を示さず, その後幾分生存率は上昇した(図3B). 次ぎに紫外線照射後axenic培地に, 正常の細胞増殖を阻害する濃度, 100 μg／mlのサイクロヘキシミドを添加して培養したときは12時間までIc回復を示さなかった(図3

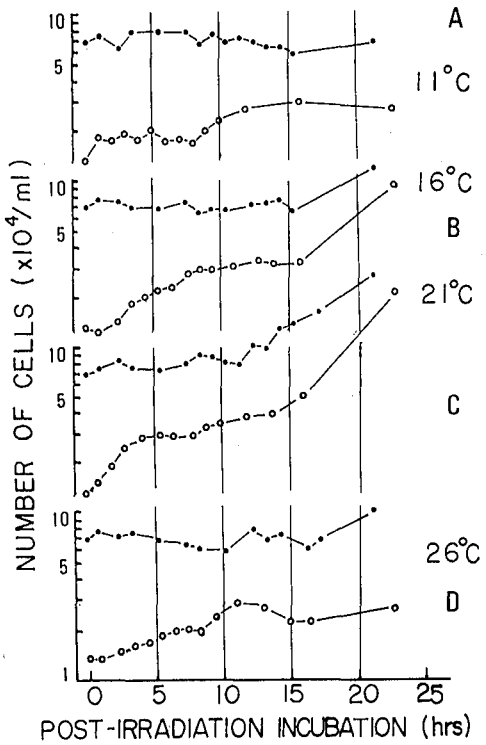


図2 カフェイン感受性Ic回復の温度依存性

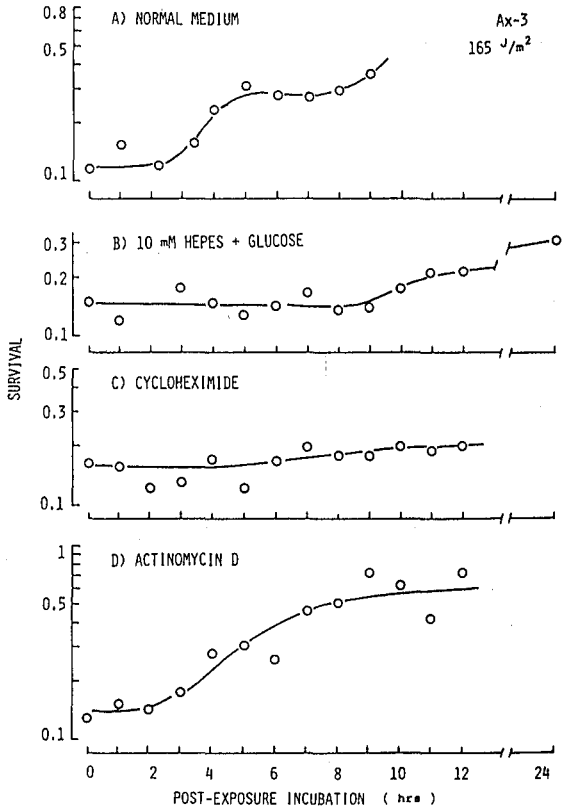


図3 紫外線照射したAx−3株のカフェイン感受性Ic回復における薬剤の効果

C). 同様に10 μg／mlのアクチノマイシンDを添加して培養したときは正常なaxenic培地で培養したときに較べ幾分遅いがIc回復を示した(図3D). アクチノマイシンDの効果はNC－4株をγ線照射した場合(図1)とほぼ同様な結果を示した.

すなわち, 紫外線を照射したAx－3株は, γ線照射したNC－4株と同様にIc回復を示し, この回復過程はエネルギー源としてグルコースを添加した緩衝液だけではIc回復を示さない. 更にタンパク質合成阻害剤であるサイクロヘキシミドはIc回復を阻害し, RNA合成阻害剤であるアクチノマイシンDはIc回復を阻害しない.

このことからIc回復過程は, RNA合成を必要としないが, 新たなタンパク質の合成が必要であると考えられる.

サイクロヘキシミド抵抗性突然変異株について

D. discoideum の突然変異誘発率を測定するための方法は確立されていない. 我々はサイクロヘキシミド抵抗性突然変異に関する方法を確立するために次の実験を行った.

Ax－3株を, 種々の濃度のサイクロヘキシミドを含む寒天培地にbacteriaとともに播種してサイクロヘキシミド抵抗性を調べたところ, 350 μg／mlの濃度のサイクロヘキシミドが, Ax－3株のコロニー形成能を完全に抑制する最低濃度であった. この濃度のサイクロヘキシミドは, bacteriaの増殖にほとんど影響を与えない. それ故この濃度のサイクロヘキシミドを用いてAx－3株からサイクロヘキシミド抵抗性突然変異を分離した.

まず種々の濃度のサイクロヘキシミドを含有するaxenic培地に1～2×10^5個／mlの細胞を播種し, 分離株とAx－3株での増殖を比較した. 図4AはAx－3株の場合で, 50 μg／mlの濃度で増殖は阻害された. 100 μg／mlでは細胞数は全く増加せず, 幾分減少していく傾向にあった. 一方, 分離したサイクロヘキシミド抵抗性株はおおよそ2種類に分類される. 一つはCyc－7で代表されるもので図4Bに示すように50 μg／ml, 100 μg／mlの濃度でAx－3株に較べ明らかに抵抗性であるが, その差はそれほど大きくない, 他の一つはCyc－3で代表されるもので, 図4Cに示すように150 μg／mlの濃度でも増殖し得る.

次に図の中の縦の線によって, controlの細胞が10倍に増殖した時間にサイクロヘキシミドを添加した場合に, 細胞数がどの程度増殖したかを測定し, 分離した9種のサイクロヘキシミド抵抗性株について比較した. 図5はサイクロヘキシミドの濃度を横軸に取ってプロットした

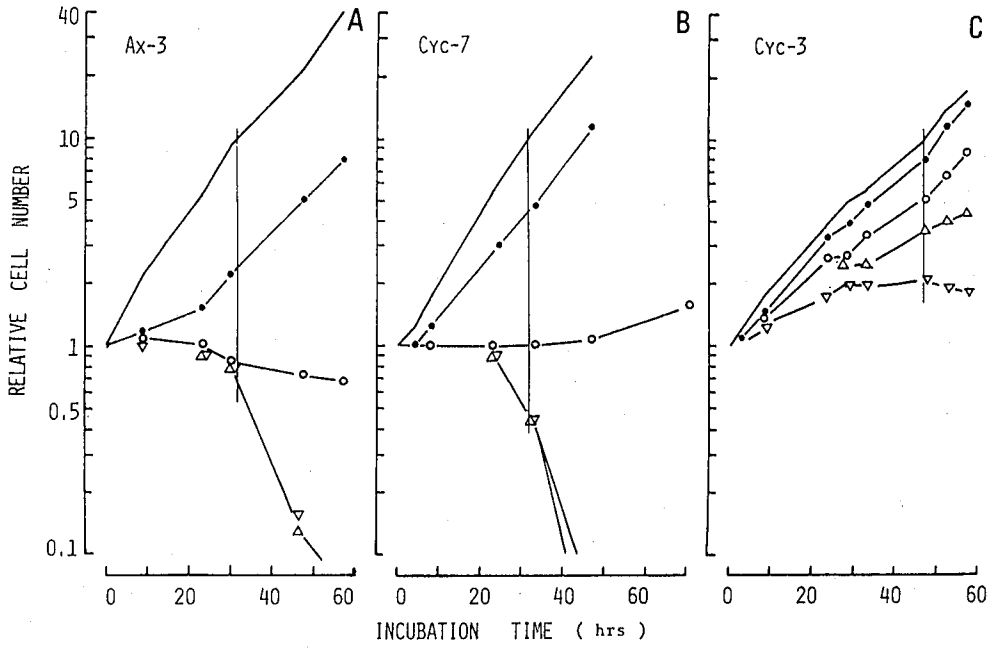


図4 細胞増殖に対するサイクロヘキシミドの効果の比較
サイクロヘシミドの濃度, 実線：0 μg／ml, ●：50 μg／ml, ○：100 μg／ml, △：150 μg／ml, ▽：200 μg／ml

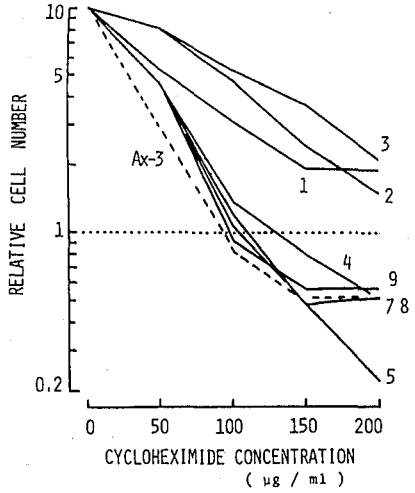


図5　サイクロヘキシミド抵抗性の比較

もので，破線はAx－3株であり，サイクロヘキシミド抵抗性として分離し，テストした9種の株は実線で示したが，全てAx－3株よりも抵抗性であることが判る．

突然変異 expression time の測定

DNAに生じた損傷が突然変異として発現されるまでには，数回の細胞分裂が必要である(expression time)．*D. discoideum* の expression time を測定するために，紫外線照射後 axenic 培地で培養し，経時的に350 μg／ml のサイクロヘキシミドを含む寒天培地に播種して，サイクロヘキシミド抵抗性突然変異の発生頻度を測定した．

図6に示すように紫外線照射直後は突然変異の頻度が少ない．培養時間と共に急激に突然変異頻度は上昇し，細胞数が3倍になったときに突然変異頻度はプラトーになった．このことから細胞数が3倍になる時間を expression time として突然変異率を測定することが良いと結論した．

紫外線誘発突然変異率の測定

紫外線照射後，expression time の間，axenic 培地で培養し，その後サイクロヘキシミドの選択培地に播種した場合の紫外線誘発突然変異率を，照射紫外線線量に対してプロットしたのが図7である．Ax－3株の突然変異誘発率は紫外線照射線量に対して対数的に上昇した．

以上の通りサイクロヘキシミド抵抗性として分離した株は全て親株Ax－3株よりサイクロヘキシミドに抵抗性であった．突然変異の発現に expression time が必要であり，照射した紫外線に対して線量効果関係があった．これらのことからサイクロヘキシミド抵抗性突然変異による *D. discoidevm* の突然変異率の測定が可能であると

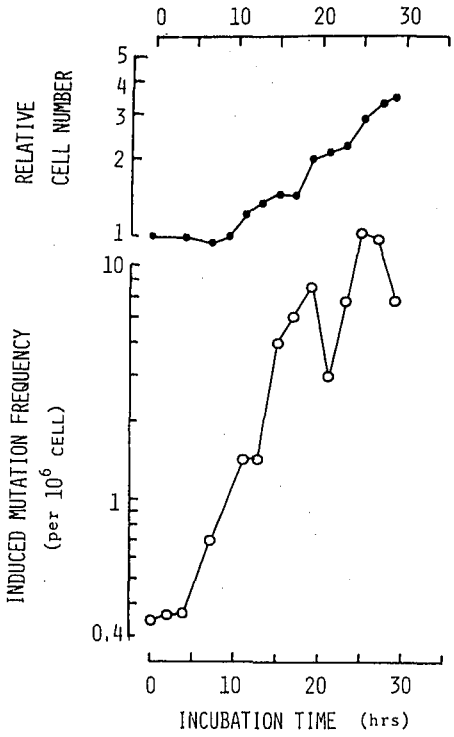


図6　紫外線照射後の突然変異誘発における expression time

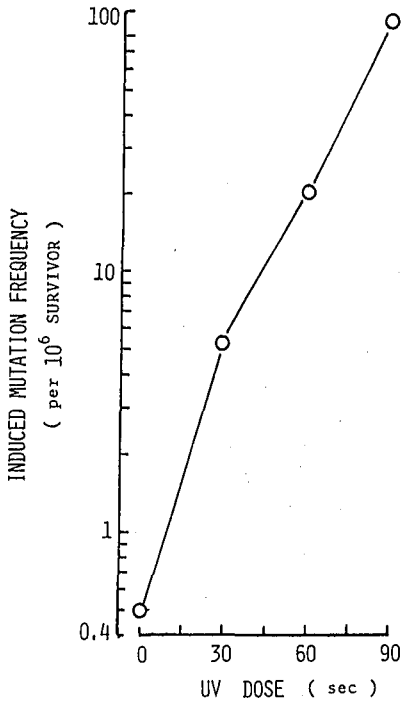


図7　紫外線照射による突然変異誘発

考え，次の実験を行った．

カフェイン感受性回復と突然変異誘発

カフェイン感受性回復過程 Ic と IIc における突然変異誘発について調べた．実験によって細胞の増殖速度が異なるため，expression time は細胞数が3倍になるまでの時間とした．7種類の実験を2度行い，実験の過程と結果を表1に示した．表の中，実験Fは自然突然変異である．実験Gは0.75 mM カフェイン中での培養のみによる突然変異誘発率である．実験Eは紫外線照射直後にサイクロヘキシミドの選択培地に播種した時の突然変異誘発率である．expression time を置かなかったために突然変異誘発率は抵い．実験Fを1としたときE，Gはそれぞれ0.77倍，1.6倍で大きな差はない．

実験Aでは，紫外線照射後 expression time の間を正常液体培地で培養してから選択培地に播種した．誘発突然変異率は自然突然変異(実験F)の28倍であった．実験Bでは紫外線照射後 expression time の間0.75 mM のカフェインを含む液体培地で培養し，その選択培地に播種したもので，自然突然変異の101倍の誘発突然変異率であった．実験Cは紫外線照射後 expression time の始めの6時間正常な液体培地で培養し，その後0.75 mM のカフェインを含む液体培地で培養し，選択培地に播種した場合で，226倍の誘発突然変異率を示した．実験Dは紫外線照射後 expression time の始めの6時間，0.75 mM のカフェインを含む液体培地で培養し，その後正常な液体培地で培養し，選択培地に播種した場合で，48倍の誘発突然変異率を示した．

図8に実験結果を要約した．カフェイン感受性回復過程 Ic ならびに IIc と突然変異誘発との関係について，次のように考察した．

実験Aは図8の実線の経路で示され，カフェインを添加していないため expression time の間に Ic と IIc 回復過程を経過して突然変異を誘起した．実験Cは紫外線照射後 expression time の初めの6時間カフェイン無しで培養し，その後カフェインを添加した．即ち Ic 回復を経た後 IIc 回復を阻害した場合で，突然変異の誘発は激

表1．紫外線照射後の expression time におけるカフェインの添加と突然変異

	method		mutation frequency / 10^6 survival			
	expression time	selection	exp.1	exp.2	av.	rate for exp.F
A	UV, -caf.	cyc.plate	11.6	20.6	16.1	28
B	UV, +caf.	cyc.plate	54.8	61.2	58	101
C	UV, -caf. 6hr, +caf.	cyc.plate	112.2	147.1	130	226
D	UV, +caf. 6hr, -caf	cyc.plate	15.2	39.5	27	48
E	UV,	cyc.plate	0.41	0.48	0.44	0.77
F	-caf	cyc.plate	0.67	0.48	0.57	1
G	+caf	cyc.plate	0.78	1.08	0.93	1.6

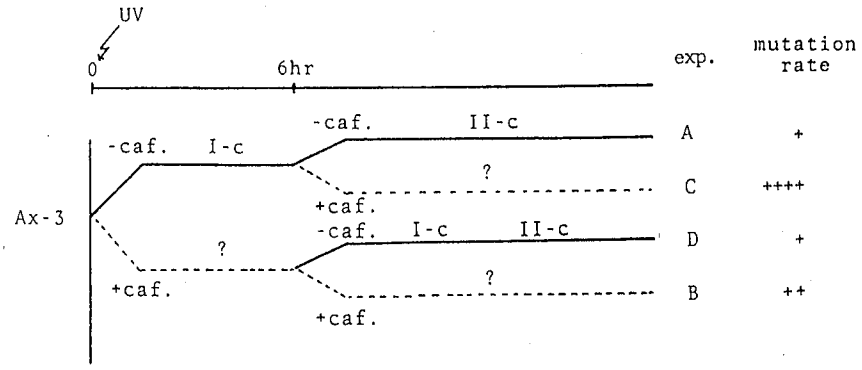


図8　カフェイン感受性 Ic ならびに IIc 回復の突然変異誘発

増した.

この結果からIc回復はerror prone修復であり，DNAの初期損傷から突然変異を誘起させる．そしてIIc回復はerrorが少ないだけではなく，突然変異性の損傷を減少させるようなproofreadingすると仮定することができる.

実験Cでは，Ic回復によってDNAの初期損傷から突然変異性損傷に変換され，IIc回復をカフェインによって阻害した結果，突然変異が激増した．実験Aでは，Ic回復による突然変異性損傷が形成された後，IIc回復のproofreadingによって突然変異性の損傷を正常なDNAに修復したため突然変異誘発が比較的少なかったと説明することが出来る.

実験Dは，6時間カフェイン添加培地で培養した後，カフェインを除いて更に培養した場合で，誘発突然変異はAの場合より幾分多いだけであった．6時間の培養でIc回復は阻害されたが，その間，Ic回復以外のカフェイン非感受性の未知の回復機構が作用していたのかも知れない．6時間以降カフェインを除去することによって，Ic回復が，更にその後IIc回復が作用した可能性がある．上の仮定で突然変異頻度が少なかったことを説明できる.

実験Bでは，紫外線照射直後から全expression timeにカフェインが存在していたので，IcからびにIIc回復は起きなかったと考えられる．その間カフェインに非感受性のerror prone修復が行われた可能性もある.

結　論

カフェインは修復過程を阻害し，紫外線の致死作用を増加させることが知られており，また種々のアルキル化剤の作用も増感する．カフェイン自身の変異原性を初めとして，このような他の変異原とカフェインの競合効果についてはKihlman[11]によってまとめられている．しかしカフェインの生物に対する効果には，その多様な発現性から不明な点が多い.

我々は細胞性粘菌を用いて実験し，γ線，紫外線，MNNGによる致死作用をカフェインが増感し，それらがカフェインによる修復過程の阻害による結果であり，カフェインに感受性を示す回復IcならびにIIcの二つの過程が存在することを明らかにした.

Ic回復過程には新たなタンパク質の合成が必要であり，RNA合成は必要ではないが，IIc回復過程はRNA合成と関連があると考えられる．更にIc回復過程はerror prone repairであり，突然変異を増加させる．一方，IIc回復過程はerror freeであると共にむしろ突然変異を起こす可能性のある損傷を減少させるように作用するものと考えられる.

Changらは[12] Chinese hamsterの細胞を用いて，DNA修復と突然変異の固定の時期にカフェインを作用させたときにのみ紫外線誘発突然変異が増加し，修復後或は選択期には減少すると報告している．これは恒常的に発現されているerror freeな複製後修復過程がカフェインにより阻害され，error prone DNA修復過程に入るためと説明している．我々の結果もこの仮設により説明することが出来る.

文　献

1）渡部　真，放射線障害の機構，304-346，1982，学会出版センター

2）Kunicka, J. E., A. Myc, M. R. Melamed, Z. Darzynkiewicz, *Cell and Tissue Kinetics*, 23, 31-39, 1990

3）Ts' O, P. O. P., P. Lu, *Pro. N. A. S.*, 51, 17, 1964

4）Domon, M., A. M. Rauth, *Radiat. Res.*, 35, 350-368, 1968

5）金西信次，渡部　真，東京衛研年報，25，685-690，1974

6）Kananishi, N. M. Watanabe, *Gamma Fild Symposia*, 9, 19-30, 1970

7）金西信次，渡部　真，遺伝学雑誌，47，352，1972

8）Kananishi, N.. M. Watanabe, *Abst. 6 Int. Cong. Radiat. Res.*, 222, 1979

9）金西信次，渡部　真，遺伝学雑誌，46，422，1971

10）Kananishi, N.. M. Watanabe, *J. Radiat. Res.*, 21, 57, 1980

11）Kihlman, B. A., *Caffeine and Chromosomes*, 1977, Elsvier,

12）Chang, C.-C., C.Philipps, J. E. Trosko, R. W. Hart, *Mutat. Res.*, 45, 125-136, 1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 41, 330-333, 1990

ラット肝初代培養細胞に対する アセトアミノフェンとその異性体の毒性効果

藤谷和正*, 市川久次*, 佐々木美枝子*

Toxic Effects of Acetaminophen and its Isomers on Primary Cultured Rat Hepatocytes

Kazumasa Fujitani*, Hisatsugu Ichikawa*
and Mieko Sasaki*

Abstract

Hepatocytes, prepared from a male F344/DuCrj (Fischer) rat weighing 254 g (71 days old) using a collagenase perfusion technique and cultured 24 hours on type-1-collagen coated dishes, were treated with Acetaminophen, *o*- Acetamidophenol or *m*-Acetamidophenol (*p*-, *o*- or *m*-AAP, 0.668-8.02mg/ml) for 24 hours. The amounts of protein in the cells, ALP, GOT, GPT, GTP and LDH activities in the cells and leakages of the enzymes to the medium were determined. Total GTP in cells and medium increased in parallel with the concentration of *p*-AAP or *o*-AAP. Leakages of GOT increased in parallel with the concentration of *p*-, *o*- or *m*-AAP. GPT in cells increased in pararell with *p*- or *m*- AAP.

Keywords：アセトアミノフェン acetaminophen, アセトアミドフェノール acetamidophenol, ラット rat, 初代培養 primary culture, 肝細胞 hepatocyte, 毒性 toxicity

緒　　言

医薬品・食品添加物等の毒性を検討する場合一般的には動物を用いた投与実験を行うが，最近，少しの動物の生命，わずかな飼育スペースと小量の試薬で目的を達することができる初代培養細胞が，動物愛護と省資源化の観点より広く使用されつつある．また，初代培養細胞は株化細胞に比べて強い組織特異性を残している点で有用である．

アセトアミノフェンは鎮痛解熱剤として現在広く用いられているが，肝毒性が知られており，培養細胞および実験動物に染色体異常を誘発し[1]，アセトアミノフェンとその *o* および *m* 異性体は，N-methyl-N′-nitro-N-nitroso-guanidine の培養細胞に対する変異原性を増強する作用がある[2]．

我々はラットの肝臓より取り出した初代培養肝細胞を用いてアセトアミノフェン(*p*-Acetamidophennol)とその *o* および *m* 異性体の毒性について検討したので報告する．

材料と方法

ラットは日本チャールスリバー(株)の F344/DuCrj(Fischer)の雄4週令を購入飼育し，71日令 254 g で使用した．

試薬は *o*, *m* および *p*-Acetamidophenol(以下 *o*-, *m*- および *p*-AAP と略す．Aldrich Chemical Company, Milwaukee,USA A700-0 ,A720-5,A730-2) Dimethylsulfoxide(以下 DMSO と略す．同仁化学研究所 Luminasol), Insulin (Sigma Chemical Company, I 1882 Bovine Pancreas 由来), Dexamethasone (Sigma D 8893, Cell Culture Grade), Epidermal Growth Factor(以下 EGF と略す Collaborative Research Co., 40001 Culture Grade, Mouse submaxillary glands 由来), Williams' E Medium (Sigma W 4125, Cell Culture Grade), Hepes(Sigma H 9136, Cell Culture Grade), Gentamicin Sulfate(Sigma G 0889, 10mg/ml, Cell Culture Grade), Serva Blue G (Coomassie Brilliant Blue G-250 の高純度品，Serva Feinbiochemica,

*東京都立衛生研究所毒性部　169　東京都新宿区百人町3−24−1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24−1, Hyakunfin−cho 3 chome, Shinjuku−ku, Tokyo 169, Japan

Heldelberg, Research Grade 35050), Trypan Blue Stain 0.4%(Sigma T 9520, Cell Culture Grade), Fetal Bovine Serum(以下 FBS と略す JR Scientific Inc., Woodland, USA),コラゲナーゼ(和光純薬工業 細胞分散用), Trypsin Inhibitor(Sigma T 6522, Type 1-S Soybean, Cell Culture Grade), [Ethylenebis (oxyethylenenitrilo)] tetraacetic acid(以下 EGTA と略す Sigma E4378), Albumin(Sigma A4919, Bovine, Fraction V), 自動分析試薬は第一化学薬品工業(株)より購入, その他は和光純薬工業(株)または関東化学(株)の特級試薬を用いた.

水は Mili-Q(日本ミリポア・ミリテッド)で用時精製した18 MΩのものを用いた. 培地は Williams' E 粉末を水に溶かし Hepes と 1 N-NaOH で pH7.2に調整して保存し, Dexamethasone はエタノール, Insulin は 1 mM HCl, EGF は1mg/ml の Albumin を含む水にそれぞれ10^{-4}M, 10^{-4}M, 10 μg/mlに溶かし, 用時10%(v/v)FBS-10^{-7} M Dexamethsone-10^{-7}M Insulin-20 ng/ml EGF となるように培地に混ぜ, 基準培地とした. 灌流液の Stock Solution すなわち 80 g/l NaCl- 4 g /l KCl-0.78 g /l $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$-1.51 g /l $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$-23.8 g /l Hepes-0.06 g /l Phenol Red の100ml に Glucose 0.9 g, $NaHCO_3$ 0.35 g, EGTA 0.19 g を加え 1 N-NaOH で pH7.5, 全量1 l にしたものを前灌流液, Stock Solution 100ml に $CaCl_2$ 0.555 g, Trypsin Inhibitor 0.05 g, $NaHCO_3$ 0.35 g, Collagenase 0.5 g を加え pH7.5, 全量1l にしたものをコラゲナーゼ灌流液とした. 各 AAP は用時 DMSO に溶かし, *m* と *p*-AAP は40-480mg/ml, *o*-AAP は40-300mg／mlとした. DMSO あるいはエタノール溶液以外は0.22 μm の Sterivex-GV Bell(日本ミリポアリミテッド)で加圧濾過した.

灌流用ポンプは Perista Pump SJ-1220(アトー(株))の2段のチューブを並列につなぎ流量を増して使用した.

ディッシュは Collagen-Type 1 を塗布してある60mm φ のポリスチレン製 Collagen-Coated Dish(岩城硝子(株) CORNING 25010 COL 1)を使用した.

ポンプのチューブ, 肝臓・肝細胞に直接触れる器具などは滅菌したものを用い, 肝臓切取り後の操作は無菌的に行った.

肝細胞の分離と培養は中村ら[3]の Collagenase *in situ* 灌流法に準拠し一部改変して実施した.

ラットをネンブタールで麻酔し開腹, 門脈よりカニューレを入れ, 37℃の前灌流液をペリスタポンプで30ml/min の速さで流し, 右心房下の下大静脈を切開して肝臓の血液を除いた後, コラゲナーゼ液に切り替え, とろけたところで肝臓を切取りシャーレに移した. クリーンベンチに移し, CMF Hanks 液 約10mℓを入れメスで細切して細胞を分散, ガーゼで濾過, 遠心(50 ×*g*, 1 min)の後, 上清を除いた. さらに Hanks 液を加えて遠心して上清を除くことを3回繰り返し, 下層に基準培地を加えて細胞を分散させた. その一部を取り Trypan Blue で染色し細胞数と生存率を調べた後, 基準培地で 5×10^5cells/mlに希釈し, 4 ml づつディッシュにまき, 37℃ 5 % CO_2-30% O_2インキューベーターで培養を開始し, 3時間後培地を交換し死細胞を除いた.

培養開始からおよそ1日後, 基準培地に *o*, *m* または *p*-AAP の DMSO 溶液を加えた培地(*m* または *p* は 0.668-8.02mg/ml medium, *o* は0.668-5.01mg/ml medium)に 2 min/dish の速さで培地交換して投与開始とした. 基準培地あるいは基準培地に DMSO を添加したものに培地交換した群を設け, 後者をコントロール群とした. 基準培地に交換した群の4枚はすぐ, 他は24時間後に各群4枚ずつ培地を回収, 細胞は燐酸緩衝液2 ml を加え掻き取り, −80℃で保存した。各群2枚のディッシュを生存率計数と写真撮影用とした.

掻き取り細胞には1 ml の燐酸緩衝液を加え, 回収培地はそのまま, ポッターエレベージョンホモジナイザーでモジナイズし, 細胞については Bradford 法[2]を改変した Read&Northcote の方法[5]で添加法により蛋白を定量の後, 12000 ×*g*, 30 min で遠心し上清を採った.

上清は日立705型自動分析装置で ALP(ベッセイ・ローリー法), GOT(カルメン法), GPT(カルメン法), GTP(γグルタミル CPA 基質・発色法)LDH 活性(ロブレスキー・ラ・デュー法)について, 管理血清セロノルム添加で回収率をチェックして, 測定した.

結果と考察

分離直後の細胞の生存率は80%以上だった. 3時間後の培地交換後に認められた細胞膜の損傷は1日でほぼ消失した. AAP 投与開始直後の基準培地の群の細胞の様子をFig.1に示す. *o*-AAP の5.01および2.67mg/ml では基準培地に DMSO 溶液を添加した時に結晶が析出した. トリパンブルー染色試験の結果, 5 mg/ml 以上の各 AAP 濃度で24時間後に生きている細胞は無かった(Fig.2-A). CHO-K 1 細胞(チャイニーズハムスター卵巣由来株化細胞)を用いた7日間投与実験の結果[2]と比べて LD_{50}の値は3-30倍である. Farber ら[7]の *p*-AAP の20 mM(3.0mg/ml), 4 hours 処理で 5 %以下の死亡率という結果との比較では, 今回の実験は24 hours という長時間処理であるので矛盾しないと考える. 細胞中の蛋白質

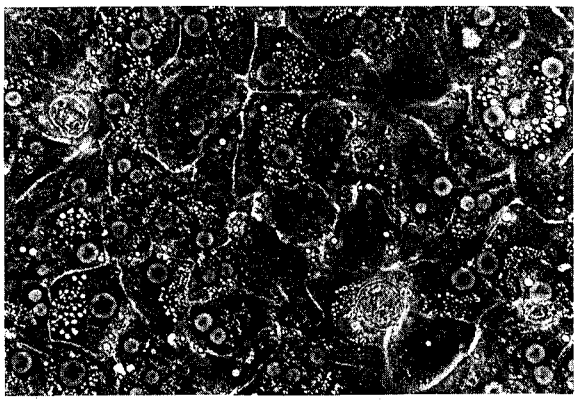


FIG. 1 Hepatocytes in primary cultures ovserved 24 hours after plating under phase contrast microscopy. ×350

量は AAP 濃度が増すと減少したが(Fig.2-B)，これは細胞膜の損傷による漏出を示すと考えられる．ディッシュの collagen は蛋白定量に影響しない．Fig. 2-C 1 から G 2 で言う TOTAL とはディッシュ 1 枚の細胞についての測定値と培地についての値(添加されている血清に起因する投与開始時の値を差し引いた値，すなわち細胞外漏出量)を合計した値であり，LEAK% とは漏出量が TOTAL に占める割合である．100-(LDH のLEAK%)は細胞の生存率と同等に用いることができると言われているが[6,7,8]，本実験ではごく低濃度でのみ生存率と比例する結果となった(Fig.2-G2)．これは処理時間が24時間という長時間であるため高濃度 AAP では LDH が失活することに起因すると考えられる．Chao ら[8]の 6 hours 実験の15 mM (2.27㎎/ml) でLDH LEAK 35%，5 mM で47%という結果と似ている．LDH TOTAL と AAP 濃度は良く負に相関している(危険率0.1%，Fig.2-G 1)．GTP は肝癌の初期に上昇すると言われているが，本実験でも *o* と *p* の全ての AAP 濃度において上昇し，GTP のほとんどは漏出した(Fig.2-F1, -F2)．GOT LEAK と *o*-AAP を除く GPT LEAK がほぼ AAP の投与濃度に比例している (GOT の *p* と *m* が0.1%，*o* が 1 %，GPT の *p* と *m* が0.1% の危険率で有意に相関 Fig.2-D2,-E2)．ALPは投与による変化が少ない (Fig.2 C-1, -C 2)．

以上のことより細胞膜の損傷と酵素の漏出の間には濃度依存関係が見られ，GOT と GPT の漏出を指標として本実験条件下で検討を行えば，細胞膜損傷のスクリーニング法として使用できる可能性が大きいと考える．なおより低濃度の AAP を投与すれば直線的 Dose Responce が得られるかもしれないが，細胞毒性を見るには今回の濃度で適当と考える．

文　献

1) 吉田誠二，縄井寿美子，平賀興吾：東京衛研年報，31-2,102-108,1980

2) 藤谷和正，佐々木美枝子：東京衛研年報，37，376-379,1986

3) 中村敏一：初代培養肝細胞実験法，6 -11,1987,学会出版センター，東京

4) Bradford,M.M：*Anal.Chem.*,72,248-254,1976

5) Read,S.M. and Northcote,D.H.：*Anal. Chem.*,116, 53-64,1981

6) Casini,A., Giorli,M., Hyland,R.J., Serroni,A., Gilfor,D. and Farber,J.L.：*J. Bioi. Chem.*,257,6721-6728,1982

7) Farber,J.L. ; Leonard,T.B. ; Kyle,M.E. ; Dainakae ; Serroni, A. and Rogers, S.A. ： *Archiv. Biochem. Biophys.*,267,640-650,1988

8) Chao,E.S., Dunbar, D. and Kaminsky, L.S. : *Cell Biol-.Toxicol.*,4,1-11,1988

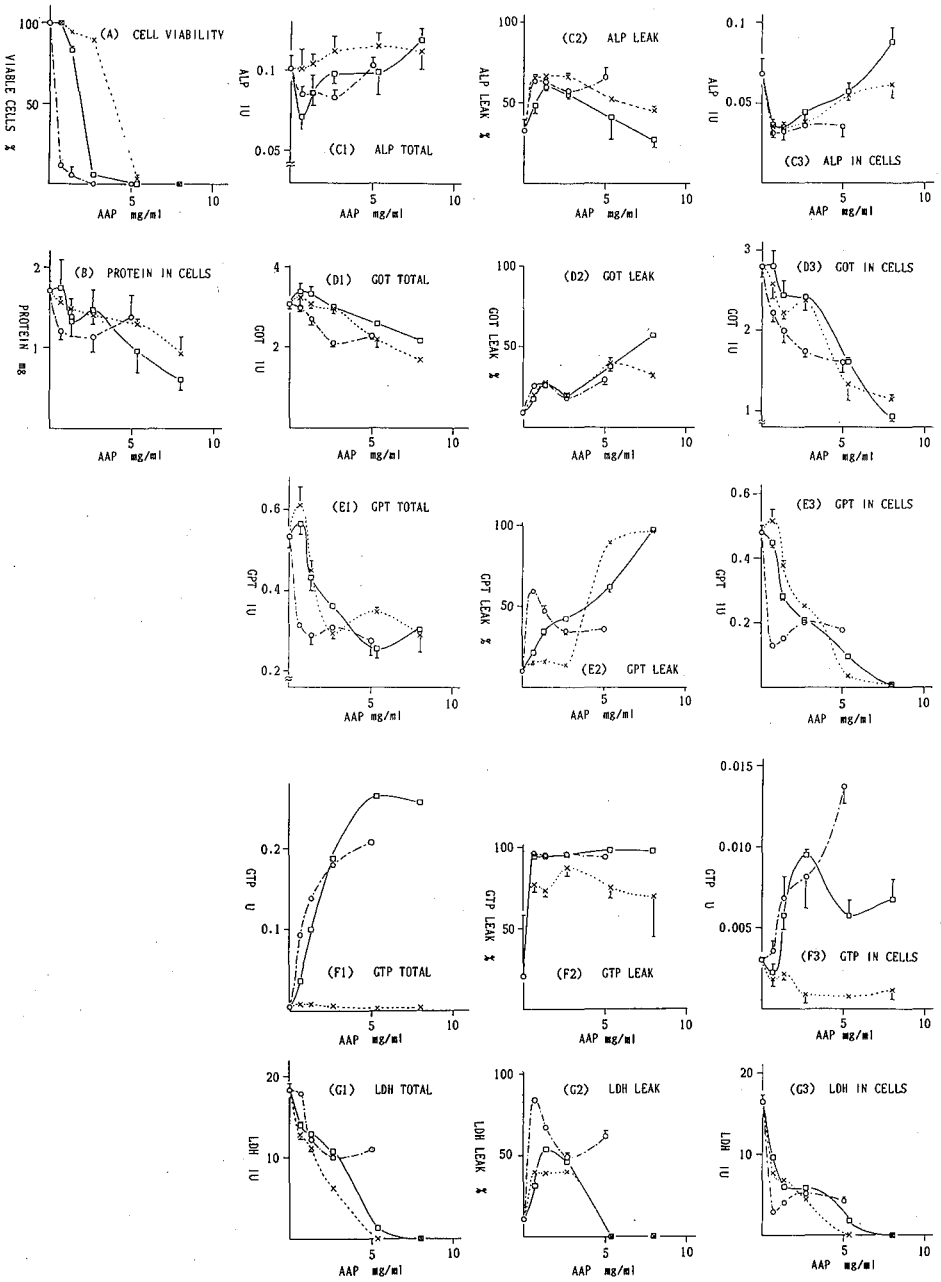


FIG. 2 Effects of Acetaminophen and isomers for rats hepatocytes cultured.

Hepatocytes prepared from a 71–days old 254g F344/DuCrj (Fischer) male rat by collagenase perfusion technique were treated with *p*–AAP(□—), *o*–AAP(○—·)or *m*–AAP(×---) for 24 hours. Cells' viabilites were determined by trypan blue exculusion(A). For another dishes, medium and scraped cells were frozen at −80℃. The medium and the cells were homogenated. After protein determination of the cells, the homogenates were centrifuged at 12000 ×*g* for 30 minutes and ALP, GOT, GPT, GTP and LDH activities of the supernatants were determined by HITACHI 705 Automatic Analyzer. Results, except A, are the mean ± SD on 4 separate cultures. "ENZYME TOTAL" means (ENZYME in medium/dish–ENZYME in medium/dish at 0 hour + ENZYME in cells/dish), "ENZYME LEAK %" means (EMZYME in medium/dish)/" EMZYME TOTAL"×100.

著書及び他誌発表

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1989.7—1990.3)

著　　書

寺山　武：ブドウ球菌の新しい分類と病原性，今村貞夫，小川　秀興，荒田次郎編，17皮膚科 MOOK 細菌性皮膚疾患，29-38，1990，金原出版，東京.

Morozumi, S., Wauke, T., Kudoh, Y., and Hitokoto, H.：**Antifungal Effects of Commercial Foods and Spices, and Their Components**. *In* Natori, S., Hashimoto, K. and Ueno, Y. (eds.), *Mycotoxins and phycotoxins*'88, 16-19, 1989, Elsevier, Amsterdam.

秋山　和幸，瀬戸　隆子，安田　一郎，浜野　朋子，高野伊知郎，高橋奈穂子：八味地黄丸構成薬及び蘇葉に関する成分分析法の開発並びに生理活性物質の構造研究，昭和63年度東洋医学事業研究報告書，37-71，1989．東京都衛生局，東京.

安田　一郎：基原植物を中心とした甘草の品質評価ほか，中国伝統医学とその周辺，1990，東京都情報連絡室，東京.

丸山　務，神崎　政子，飯田　孝，平井　克哉：人畜共通感染症に関するシンポジウム，1989，学窓社，東京.

金子　誠二，丸山　務：エルシニア感染症，副島林造，松本　明編，細胞内増殖性菌による最近話題の感染症，258-270，1989，医薬ジャーナル社，大阪.

宮崎　奉之：ハロゲン化アニゾール，元廣　輝重編，魚貝類の生息環境と着臭，51-59，1989，恒星社厚生閣，東京.

吉川　翠：ダニの生態とその防除，環境管理技術研究会編，衛生害虫防除の実際，35-45，1989，環境管理技術研究会，大阪.

市川　久次，佐々木美枝子，藤田　博，吉田　誠二：蘇葉の精油成分ペリルアルデヒド及び抽出物の生物活性に関する研究，昭和63年度東洋医学事業研究報告書，73-80，1989，東京都衛生局，東京.

Itoh, T., Hirata, I., Terayama, T., Shingaki, M., Takahashi, S., Nakano, M., Ishiyama, N., Akamine, I. and Mutoh, T.：**Isolation of *Campylobacter pylori* from the Stomach of Cynomolgus Monkeys and Experimental Infection of the Cynomolgus Monkeys with the Organisms,** *In* Takemoto, T., Kawai, K. and Shimoyama, T. (eds.), *Campylobacter pylori and Gastroduodenal Diseases*, vol. 2, 41-47, 1990, Organizing Committee of Tokyo International Symposium on *Campylobacter pylori*, Tokyo.

他誌発表論文

Uchiyama, T., Imanishh, K., Saito, S., Araake, M., Yan, X.-J., Fujikawa, H., Igarashi, H., Kato, H., Obata, F., Kashiwagi, N. and Inoko, H.：**Activation of Human T Cells by Toxic Shock Syndrome Toxin—I, The Toxin Binding Structures Expressed on Human Lymphoid Cells Acting as Accessory Cells Are HLA Class II Molecules,** *Eur. J. Immunol.*, 19, 1803-1809, 1989.

Uchiyama, T., Tadakuma, T., Imanishi, K., Araake, M., Saito, S., Yan, X.-J., Fujikawa, H., Igarashi, H. and Yamaura, N.：**Activation of Murine T Cells by Toxic Shock Syndrome Toxin—I. The Toxin binding Structures Expressed on Murine Accessory Cells Are MHC Class II Molecules**, *J. Immunol.*, 143, 3175-3182, 1989.

Kaida, S., Miyata, T., Yoshizawa, Y., Igarashi, H. and Iwanaga, S.：**Nucleotide and Deduced Amino Acid**

Sequences of Staphylocoagulase Gene from *Staphylococcus aureus* Strain 213, *Nucleic Acids Research*, 17, 8871, 1989.

Fujikawa, H. and Matsushita, M.：**Fractal Growth of *Bacillus subtilis* on Agar Plates**, *J. Phys. Soc. Jpn.*, 58, 3875-3878, 1989.

諸角　聖，一言　広，氏家　昌行，長谷川　誓，岡本　明：市販塩素系カビ取り剤，アルコール系殺菌剤およびカビ防止剤の真菌防除効果，防菌防黴，17，473-481，1989.

武士俣邦雄：液体クロマトグラフィー定量分析で尿中ホモゲンチジン酸が異常高値を示した乳児の発見，衛生検査，39，189-191，1990.

Hayashi, Y., Ando, T., Utagawa, E., Sekine, S., Okada, S., Yabuuchi, K., Miki, T. and Ohashi, M.：**Western Blot (Immunoblot) Assay of Small, Round-Structured Virus Associated with an Acute Gastroenteritis Outbreak in Tokyo**, *J. Clin. Microbiol.*, 27, 1728-1733, 1989.

Nakayama, T., Urano, T., Osano, M., Hayashi, Y., Sekine, S., Ando, T. and Makino S.：**Outbreak of Herpangina Associated with Coxsackievirus B3 Infection**, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 8, 495-498, 1989.

Kamata, K. and Motohashi, N.：**Raman Spectra of Methyl-Substituted Benz[*c*]acridines and their Complex with DNA**, *Anticancer Research*, 9, 579-582, 1989.

Kamata, K. and Motohashi, N.：**Interaction of 7, 10-Dimethylbenz [*c*] acridine with Deoxyribonucleic Acid**, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 43, 534-540, 1989.

Kamata, K. and Motohashi, N.：**Separation of Methyl- Substituted Benz [*c*] acridines by Cation-Exchange High Performance Liquid Chromatography**, *J. Chromatogr.*, 498, 129-135, 1990.

Uehara, S., Yasuda, I., Takeya, K., Itokawa, H. and Iitaka, Y.：**New Bisbolane Sesquiterpenoids from the Rhizomes of *Curucuma xanthorrhiza* (Zingiberaceae) II**, *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 261-263, 1990.

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，衛生化学，35，347-353，1989.

岸本　清子，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スウェルチアマリンの定量，衛生化学，35，377-381，1989.

竹内　正博，水石　和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：臭化水素酸処理カラムを用いるガスクロマトグラフィーによる魚介類試料中のトリブチルスズ及びトリフェニルフズ化合物の定量，分析化学，38，522-528，1989.

Ikeda, K., Suzuki, S. and Watanabe, Y.：**Determination of Sunscreen Agents in Cosmetic Products by Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography**, *J. Chromatogr.*, 482, 240-245, 1989.

Nakamura, H. and Okuyama, T.：**Gas Chromatographic and Mass Spectral Analysis of Aloenin in Skin Care Cosmetics**, *J. Chromatogr.*, 509, 377-382, 1990.

Ueda, T. and Igarashi, O：**Determination of Vitamin E in Biological Specimens and Foods by HPLC- Pretreatment of Samples and Extraction of**

Tocopherols, *J. Micronutr. Anal.*, 7, 79-96, 1990.

Fukushima, H., Gomyoda, M., Ishikura, S., Nishino, T., Moriki, S., Endo, J., Kaneko, S and Tsubokura, M.：**Cat Contaminated Environmental Substances Lead to *Yersinia pseudotuberculosis* Infection in Children**, *J. Clin. Microbiol.*, 27, 2706-2709, 1989.

宮崎 奉之，橋本 常生，丸山 務，松本 昌雄，中澤 裕之：高速液体クロマトグラフィーによる牛肉中の蛋白同化ホルモンの定量，食品衛生学雑誌，30，384-389，1989.

渡部健二朗，木川 寛，河村 太郎，宮崎 奉之，松本 昌雄，中澤 裕之，藤田 昌彦：カラムスイッチングを用いた電気化学検出高速液体クロマトグラフィーによる牛肉中のゼラノール，17β-エストラジオール及びジエチルスチルベストロールの同時定量，分析化学，38，712-717，1989.

Kaneuchi, C., Shibata, M., Kawasaki, T., Kariu, T., Kanzaki, M. and Maruyama T.：Occurrence of ***Yersinia* spp. in Migratory Birds, Ducks, Seagulls, and Swallows in Japan**, *Jpn. J. Vet. Sci.* 51, 805-808, 1989.

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チーズ中のチラミンの分析，食品衛生学雑誌，31，137-143，1990.

Takeba, K., Maruyama T., Matsumoto M. and Nakazawa H., **Determination of Tyramine in Cheese by Reversed-Phase High-Perfomance Liquid Chromatography with Amperometric Detection**, *J. Chromatogr.*, 504, 441-444, 1990.

小久保彌太郎，飯田 孝，金子 誠二，丸山 務：食肉を対象とした***Listeria monocytogenes*** の検査法の検討，食品衛生学雑誌，31，51-56，1990.

細貝 益男，青木富美男，金子 誠二：福島県会津地方における***Yersinia enterocolitica*** 感染症，小児科臨床，43，281-287，1990.

Saito, K., Nishijima, M. and Miyazaki, T.：**Structural Analysis of an Acidic Polysaccharide from *Ganoderma lucidum* (Studies on Fungal Polysaccharides. XXXV)**, *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 3134-3136, 1989.

Koseki, M., Takahashi, I., Yasuno, T., Ogino, S., Tsuda, Y. and Kazama, M.：**Determination of Organic Acids in the Presence of Metal Ion**, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72, 775-776, 1989.

Koseki, M., Tsuji, K., Nakagawa, Y., Kawamura, M., Ichikawa, T., Kazama, M., Kitabatake, N. and Doi, E.：**Effect of Gum Arabic and Pectin on the Emulsification, the Lipase Reaction, and the Plasma Cholesterol Level in Rats**, *Agric. Biol. Chem.*, 53, 3127-3132, 1989.

Nakajima, K., Kazama, M., Utsumi, H. and Hamada A.：**α-Tocopherol-Induced Hexagonal H_{II} Phase Formation in Egg Yolk Phosphatidylcholine Membranes**, *Chem. Pharm. Bull*, 38, 1-4, 1990.

吉田 令子，渡辺 悠二，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，分析化学，39，183-187，1990.

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，公衆衛生，54，189-193，1990.

Watanabe, M. F., Harada, K., Matsuura, K., Oishi, S., Watanabe, Y. and Suzuki, M. : **Heptapeptide Toxins Contained in Natural Samples of *Microcystis* Species**, *Toxicity Assessment*, 4, 487-497, 1989.

古畑　勝則，小池　和子，松本　淳彦：**飲料用タンク水から高頻度に分離された *Protomonas extorquens* の消長と塩素抵抗性**，日本微生物生態学会報，4，35-47，1989.

Oishi, S : **Effects of Co-Administration of Di (2-ethylhexyl) phthalate and Testosterone on Several Parameters in the Testis and Pharmacokinetics of Its Mono-De-Esterified Metabolite**, *Arch. Toxicol.*, 63, 289-295, 1989.

Oishi, S. : **Effect of Phthalic Acid Esters on Testicular Mitochondrial Functions in the Rats**, *Arch. Toxicol.*, 64, 143-147, 1990.

大石　充男，大西　和夫，西島　基弘，中込　和哉，中澤　裕之：**ショ糖脂肪酸エステルのラード中抗酸化剤に対する相乗効果**，衛生化学，36，69-73，1990.

大西　和夫，西島　基弘，細貝祐太郎：**ハーブ抽出物の変異原性について**，食品衛生学雑誌，31，74-77，1990.

榎田　隆一，平田　一郎，鈴木　敬子，伊藤　　武，寺山　　武：**ELISA キット「Equate Salmonella」による食肉からのサルモネラ検査法の検討**，食品と微生物，6，107-111，1989.

楠　くみ子，池島　伸至，新井　輝義，神　真知子，入倉　善久，平田　一郎，太田　建爾，坂井　千三：**こんにゃくの軟化剝離現象の起因菌 *Coryneform bacteria* の分離と検出菌の性状**，食品と微生物，6，117-122，1989.

諸岡　達也，竹尾　浩美，小田　禎一，村上　紀之，伊藤　　武：**未熟児室における *Campylobacter jejuni* の院内感染例**，日本新生児学会雑誌，25(3)，576-580，1989.

総説・解説

福見　秀雄，石丸　隆治，木村三生夫，伊藤　雅治，大橋　　誠：**感染症対策の今昔**，臨床と微生物，16，77-91，1989.

大橋　　誠：**微生物学的検査における精度管理とレファレンス・サービス・システム**，モダンメディア，35，493-502，1989.

寺山　　武：**食品からのサルモネラ検査に偉力を発揮する検査試薬：フードテスト・サルモネラ**，ニューフードインダストリー，32，89-92，1990.

五十嵐英夫：**ブドウ球菌の分類**，小児内科，21，963-970，1989.

五十嵐英夫：**細菌毒**，中毒研究，2，385-391，1989.

五十嵐英夫：**トキシックショック症候群（TSS）**，看護 MOOK, 33，100-105，1989.

五十嵐英夫：**細菌毒素の検出法 3，TSST-1**，臨床医，15，増刊号，385-386，1989.

松下　　秀，工藤　泰雄：**組織侵入性大腸菌の検査と疫学**，臨床検査，33，1226-1229，1989.

工藤 泰雄：細菌性腸炎の診断と治療，臨床消化器内科，4，2127-2134，1989.

工藤 泰雄：コレラ菌ー菌の病原性と防疫対策，公衆衛生情報，19(4)，4-8，1989.

諸角 聖：カビ毒ー真菌中毒症ー，中毒研究，2，377-374，1989.

甲斐 明美：**Verocytotoxin** 産生性大腸菌，検査と技術，18，257-258，1990.

村田以和夫：寄生虫病をめぐる最近の話題，ニューフードインダストリー，31(12)，53-63，1989.

丸山 務：食品衛生におけるリステリア菌，食品と微生物，6，3-15，1989.

丸山 務：特殊な細菌感染症の診断法，***Yersinia***，臨床医，15，増刊号，355-357，1989.

丸山 務：低温保蔵食品の安全性，特に最近注目されている低温増殖性の病原菌について，日本食品低温保蔵学会誌，15，194-199，1989.

福島 博，丸山 務，金子 賢一，井上 正直：エルシニア感染症およびエルシニアの生態，日獣会誌，42，829-840，1989.

宮崎 奉之：食肉中の残留化学物質ー有機塩素系農薬およびホルモン剤ー，肉の科学，30，137-143，1989.

丸山 務：最近のリステリア菌に関する話題，特に食品衛生の立場から，感染症，20，36-39，1990.

垣 鍔直，吉川 翠：超高層住宅の住戸内環境に関する研究，住宅設備，10，44-49，1989.

笹野 英雄：水と健康，飲料水の保存について，保健の科学，31，702-709，1989.

伊藤 武，甲斐 明美，平田 一郎，鈴木 敬子，仁科 徳啓，塩沢 寛治，杉枝 正明，林 道明，大久保吉雄，小川 政之，岡田 京子，中戸川由香，浅川 豊：下痢原性大腸菌，食品と微生物，6，67-75，1989.

伊藤 武：病原大腸菌に関する最近の知見，食品衛生研究，39(8)，15-31，1989.

伊藤 武：特殊な細菌感染症の診断法 ***Campylobacter pylori***，臨床医，15，増刊号，1443-1445，1989.

伊藤 武：公衆衛生からみたサルモネラ症，臨床獣医，7(7)，29-35，1989.

伊藤 武：カンピロバクターの生態と病原性，防菌防黴，17，551-560，1989.

学 会 発 表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1989.7—1990.3)

学会発表

大橋　誠：細菌学的検査領域におけるレファレンス・システムと精度管理，第43回日本細菌学会東北支部総会（1989，8）.

大橋　誠：海外旅行者検便の成績から見た細菌性下痢症の動き（シンポジウム：熱帯性下痢症ー社会情勢の変遷にまつわる動向と課題ー），第31回日本熱帯医学会総会，（1989，11）.

黒沢　大介，市瀬　正之，小林　淑子，松江　隆之，小野川　尊，天野　裕次，斉藤　誠，寺山　武：健康者由来 ***Salmonella*** serovar Hadar の接合伝達性 R-plasmind と生物型の検討，日本感染症学会第64回総会（1990，4）.

小林　淑子，天野　裕次，市瀬　正之，黒沢　大介，松江　隆之，小野川　尊，斉藤　誠，寺山　武，松田　清治：***C. trachomatis*** 及び ***N. gonorrhoeae*** 検査用検体の郵送について，日本感染症学会第64回総会（1990，4）.

五十嵐英夫，藤川　浩，宇佐美博幸，川畑俊一郎，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性状について，第36回毒素シンポジウム（1989，7）.

斎藤　慎二，内山　竹彦，荒明美奈子，獅子　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結合構造の解析，第36毒素シンポジウム（1989，7）.

内山　竹彦，今西　健一，荒明美奈子，斎藤　慎二，巌　小傑，藤川　浩，五十嵐英夫：**Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1)** 結合分子の解析，第36回毒素シンポジウム（1989，7）.

巌　小傑，内山　竹彦，今西　健一，荒明美奈子，斎藤　慎二，藤川　浩，五十嵐英夫：ブドウ球菌外毒素 **Toxic shock syndrome toxin-1** によって誘導されたマウスリンパ芽球からの **IL-2** 産生，第36回毒素シンポジウム（1989，7）.

内山　竹彦，今西　健一，荒明美奈子，斎藤　慎二，巌　小傑，藤川　浩，五十嵐英夫，多田隅卓史，加藤　秀人，小幡　文弥，柏木　登，獅子　英俊：ブドウ球菌外毒素 **Toxic shock syndrome toxin-1** のリンパ組織上の結合分子の解析，**TSST-1** は **MHC** クラスⅡ分子に結合してT細胞を活性化する，第34回ブドウ球菌研究会（1989，9）.

五十嵐英夫，杉浦　睦，藤川　浩，大国　寿士，留目　優子，渡部潤之助，奥住　捷子，十字　猛夫：健康者の **Toxic shock syndrome toxin-1** に対する抗体保有調査，第34回ブドウ球菌研究会（1989，9）.

五十嵐英夫，西田　潤子，杉浦　睦，藤川　浩，大国　寿士，留目　優子：**Toxic shock syndrome toxin-1** およびエンテロトキシンC産生黄色ブドウ球菌が原因と考えられる **Toxic shock syndrome** 様患者のこれら毒素に対する抗体の変動，第34回ブドウ球菌研究会（1989，9）.

潮田　弘，藤川　浩，五十嵐英夫，工藤　泰雄：食品衛生における大腸菌に関する研究ー複合調理済食品からの大腸菌検査における **EC** 試験法と **BGLB** 培養法の比較検討ー，食品衛生微生物研究会第10回学術講演会（1989，10）.

横溝　祐一，五十嵐英夫，森　康行，西森　敬，新井　啓五，河津信一郎，稲毛　幹雄，柚木　弘之：ブドウ球菌エンテロトキシンA，B，Cおよび **TSST-1** に対する牛，豚のリンパ球のマイトジェン反応，第108回日本獣医学会総会（1989，10）.

吉田　勲，甲斐　明美，松下　秀，西山　春代，太田　建爾，工藤　泰雄，大橋　誠：集団食中毒および散発下痢症由来腸炎ビブリオの産生溶血毒について，第23回腸炎ビブリオシンポジウム（1989，10）．

山田　澄夫，松下　秀，吉崎　千恵，工藤　泰雄，大橋　誠：*Aeromonas* の病原性について，第23回腸炎ビブリオシンポジウム（1989，10）．

津野　正朗，倉科　周介，大橋　誠：感染症サーベイランス領域における検査室由来情報処理について，研究・技術計画学会第4回年次学術大会（1989，10）．

倉科　周介，津野　正朗，大橋　誠：国勢調査学試論，研究・技術計画学会第4回年次学術大会（1989，10）．

大橋　誠，津野　正朗，倉科　周介：地方衛生研究所における公衆衛生情報システムの意義と将来性，第48回日本公衆衛生学会総会（1989，10）．

倉科　周介，津野　正朗，大橋　誠：公衆衛生情報データベースの構築と利用，第48回日本公衆衛生学会総会（1989，10）．

津野　正朗，倉科　周介，大橋　誠：検査室由来情報処理に関する考察／コンピュータ導入の問題点，第48回日本公衆衛生学会総会（1989，10）．

Kudoh, Y., Yamada, S., Matsushita, S. and Ohashi, M.: **Studies on Enteropathogenicity of *Aeromonas* Isolates Associated with Diarrheal Disease**, The 25th Joint Conference, U. S.–Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel (1989, 11).

藤川　浩，松下　貢：寒天平板上における *Bacillus subtilis* のフラクタル様成長，形の科学会第16回シンポジウム（1989，11）．

巌　小傑，内山　竹彦，今西　健一，荒明美奈子，斎藤　慎二，五十嵐英夫：TSST-1により活性化されたマウスT細胞のハイブリドーマの確立とその性状の解析，第19回日本免疫学会総会・学術集会（1989，11）．

斎藤　慎二，内山　竹彦，荒明美奈子，今西　健一，巌　小傑，獅子　英俊，五十嵐英夫：ヒトリンパ球上に表現される Staphylococcal enterotoxin A 結合構造の解析，第19回日本免疫学会総会・学術集会（1989，11）．

今西　健一，内山　竹彦，荒明美奈子，斎藤　慎二，巌　小傑，藤川　浩，五十嵐英夫：Toxic shock syndrome toxin-1 はアクセサリー細胞上の HLA クラスII分子に結合してT細胞を活性化する，第19回日本免疫学会総会・学術集会（1989，11）．

内山　竹彦，多田隅卓史，今西　健一，荒明美奈子，斎藤　慎二，巌　小傑，藤川　浩，五十嵐英夫，山浦　昇：マウスのアクセサリー細胞に表現される Toxic shock syndrome toxin-1 結合分子は MHC クラスII分子である，第19回日本免疫学会総会・学術集会（1989，11）．

横溝　祐一，森　康行，五十嵐英夫，西森　敬：種々の哺乳類，鳥類，両生類，魚類のリンパ球に対するブドウ球菌エンテロトキシン（SE）及び TSST-1 のマイトジェン活性，第19回日本免疫学会総会・学術集会（1989，11）．

工藤　泰雄：細菌性食中毒・下痢症の診断技術の進歩とその問題点ー大腸菌による腸管感染症を中心にして（サテライトシンポジウム，臨床細菌研究会「感染症の診断技術の進歩とその問題点」），第63回日本細菌学会総会（1990，3）．

斎藤　慎二，荒明美奈子，五十嵐英夫，内山　竹彦：ブドウ球菌エンテロトキシンAによるT細胞活性化機構の解析，第63回日本細菌学会総会（1990，3）．

今西　健一，五十嵐英夫，内山　竹彦：A群レンサ球菌発熱性毒素によるマウスT細胞の活性化機序の解析，第63回日本細菌学会総会（1990，3）．

内山　竹彦，斎藤　慎二，今西　健一，巌　小傑，荒明美奈子，五十嵐英夫：HLA クラスⅡ DR, DQ, DP 分子はすべて Toxic shock syndrome toxin-1 を結合し，T細胞活性化のアクセサリー分子となりうる，第63回日本細菌学会総会（1990，3）．

巌　小傑，今西　健一，斎藤　慎二，五十嵐英夫，内山　竹彦：TSST-1 応答性Tハイブリドーマを用いたT細胞活性化の機構の解明，第63回日本細菌学会総会（1990，3）．

五十嵐英夫，杉浦　睦，藤川　浩，大国　寿一，留目　優子，西田　潤子，渡部潤之助，池田　幹雄，奥住　捷子，十字　猛夫：Toxic shock syndrome toxin-1 に対する抗体の簡易・迅速測定法とその応用，第63回日本細菌学会総会（1990，3）．

横溝　祐一，稲毛　幹雄，五十嵐英夫，森　康行，西森　敬：TSST-1 及びエンテロトキシンC陽性 *Staphylococcus aureus* のウシ乳房炎からの分離，第63回日本細菌学会総会（1990，3）．

甲斐　明美，高橋　正樹，新垣　正夫，柳川　義勢，斎藤　香彦，伊藤　武，太田　建爾，工藤　泰雄，大橋　誠：カタラーゼ陽性 *Campylobacter* 属菌の菌体脂肪酸組成の分析と分類への応用，第63回日本細菌学会総会（1990，3）．

新垣　正夫，高橋　正樹，柳川　義勢，太田　建爾，工藤　泰雄，大橋　誠，伊藤　武，平田　一郎：*Campylobacter mustelae* が産生するウレアーゼの精製およびその免疫学的特異性，第63回日本細菌学会総会（1990，3）．

松下　秀，山田　澄夫，工藤　泰雄，大橋　誠：新型抗原を持つと考えられる *Shigella flexneri* について，第63回日本細菌学会総会（1990，3）．

村田以和夫，安田　一郎：安中散抽出液および Anethole 液3時間処理 *Anisakis* Ⅰ型幼虫のラットに対する感染抑制効果，第49回日本寄生虫学会東日本大会（1989，10）．

関根　大正，大貫奈穂美，三木　隆：HIV-1 抗体検査における判定保留例の二次元電気泳動による検討，平成元年度第1回 HIV 感染者発症予防・治療に関する研究班会議（1989，7）．

関根　整治，安東　民衛，林　志直，村尾美代子，藪内　清，三木　隆，大橋　誠，岡田正次郎：免疫電顕法による Smallround structured viruses の抗原解析，第37回日本ウイルス学会総会（1989，11）．

大貫奈穂美，関根　大正，貞升　健志，藪内　清，三木　隆：HIV-1 抗原標本の二次元電気泳動による解析，第37回日本ウイルス学会総会（1989，11）．

奥本千代美，高橋利恵子，岩崎由美子，秋山　和幸：めっき廃液中のシアン分析における pH 制御・微量拡散法の応用，第26回全国衛生化学技術協議会年会（1989，9）．

浜野　朋子，安田　一郎，瀬戸　隆子，高野伊知郎，高橋奈穂子：無承認無許可医薬品中の生薬カッコンの試験法について，第26回全国衛生化学技術協議会年会（1989，9）．

萩原　輝彦，秋山　和幸，道口　正雄：**固相抽出-HPLC法によるジゴキシン錠の溶出試験**，第26回全国衛生化学技術協議会年会（1989，9）.

浅水　哲也，秋山　和幸，安田　一郎：**オウギ毛状根のγ-aminobutyric acid（GABA）の生産**，日本生薬学会第36回年会（1989，10）.

上原　真一，安田　一郎，竹谷　孝一，糸川　秀治：**インドネシア産生薬Temu Lawakの研究（V）ービサボラン型セスキテルペノイドー**，日本生薬学会第36回年会（1989，10）.

糸川　秀治，代田　　修，森田　博史，竹谷　孝一，安田　一郎：**南米産生薬Cangorosaの細胞毒性画分より得られるトリテルペノイドについて**，日本生薬学会第36回年会（1989，10）.

安田　一郎，村田以和夫：**寄生虫症に有効な和漢薬の研究（第3報）生薬及び香辛料のアニサキスⅠ型幼虫に対する運動抑制効果**，日本生薬学会第36回年会（1989，10）.

上原　真一，安田　一郎，竹谷　孝一，糸川　秀治，陳　毓　享：***Curcuma*属生薬の品質とその生物活性ー市場品生薬について**，日本生薬学会第36回年会（1989，10）.

瀬戸　隆子，安田　一郎，浜野　朋子，高野伊知郎，高橋奈穂子，秋山　和幸，福田　達男：**営実の品質について（その2）ノイバラとテリハノイバラの成分及び寫下活性の比較**，日本生薬学会第36回年会（1989，10）.

植田　忠彦，五十嵐　脩：**HPLCによる生体試料中のビタミンE定量法**，第1回ビタミンE研究会（1989，9）.

植田　忠彦，五十嵐　脩：**d-α-トコフェロール過剰投与時の臓器内分布と臓器の蓄積特異性**，第1回ビタミンE研究会（1989，9）.

観　　照雄，森　謙一郎，金子　正美，中村　義昭，渡辺四男也：**ぬれティッシュ類に使用されている防腐殺菌成分の調査結果**，第26回全国衛生化学技術協議会年会（1989，9）.

雨宮　　敬，鈴木　助治，渡辺四男也：**ケイ光X線分析法による酸化チタン中の鉛及びヒ素の同時定量**，第26回全国衛生化学技術協議会年会（1989，9）.

竹内　正博，水石　和子，山野辺秀夫，渡辺四男也，道口　正雄：**海水中pptレベルのトリブチルスズ及びトリフェニルスズ化合物の定量**，第38年会日本分析化学会（1989，10）.

水石　和子，竹内　正博，山野辺秀夫，渡辺四男也，道口　正雄：**魚介類中のトリブチルスズ及びトリフェニルスズ化合物の定量**，第38年会日本分析化学会（1989，10）.

金子　誠二，小久保彌太郎，丸山　　務，福島　　博：**ヒトおよび各種動物から分離された*Yersinia pseudotuberculosis*血清型4bに保有されるプラスミドの性状**，第108回日本獣医学会（1989，10）.

神保　勝彦，門間　千枝，竹葉　和江，丸山　　務，松本　昌雄：**バイオアッセイによるはちみつ中の残留テトラサイクリン系抗生物質およびサルファ剤の検査法**，日本食品衛生学会第58回学術講演会（1989，10）.

竹葉　和江，村上　文子，丸山　　務，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残留ペニシリン系抗生物質の同時分析法**，日本食品衛生学会第58回学術講演会（1989，10）.

宮崎 奉之, 橋本 常生, 丸山 務, 松本 昌雄, 中澤 裕之：**ECD-HPLCによるホルモン剤の分析法**, 日本食品衛生学会第58回学術講演会（1989, 10).

水谷 浩志, 福田 豊, 金谷 和明, 佐藤 博行, 小川 智徳, 花澤 孝悌, 飯田 孝, 神崎 政子, 丸山 務：**と畜場に搬入された牛・豚におけるリステリア菌の保菌実態調査**, 第83回東京都衛生局学会（1989, 10).

小久保彌太郎,飯田 孝,金子 誠二,丸山 務：**各種食肉におけるリステリア菌の汚染状況**, 食品衛生微生物研究会第10回学術講演会（1989, 11).

Kokubo, Y., Iida, K., Kaneko, S. and Maruyama, T.：**The Occurrence of *Listeria* in Raw Meat in Japan**. UJNR 24th Toxic Microorganisms（1989, 11).

丸山 務：**リステリア菌の自然界における分布と検査法**, 平成元年度日本獣医公衆衛生学会総会（1990, 2).

Kaneko, S., Maruyama, T. and Fukushima, H.：**Comparison of Plasmid DNA among Different Serogroups of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis***, UCLA SYMPOSIA ON MOLECULAR & CELLULAR BIOLOGY, Molecular Biology of Yersiniae：A Model for Gram Negative Pathogenesis（1990, 2).

Fukushima, H. and Kaneko, S.：**Restriction Endonuclease Analysis of Plasmid DNA in Epidemiological Survey of *Yersinia pseudotuberculosis* Infection**, UCLA SYMPOSIA ON MOLECULAR & CELLULAR BIOLOGY, Molecular Biology of Yersiniae：A Model for Gram Negative Pathogenesis（1990, 2).

安田 和男, 牛山 博文, 只野 敬子, 二島太一郎：**健康食品の衛生学的評価**, 第26回全国衛生化学技術協議会年会（1989, 9).

牛山 博文, 若林 敬二, 長尾美奈子, 杉村 隆：**ヒト尿中のヘテロサイクリックアミンの定量**, 第48回癌学会総会（1989, 10).

永山 敏廣, 真木 俊夫, 川合 由華, 観 公子, 飯田 真美, 二島太一郎：**クロルプロファムの輸入冷凍ポテト中残留実態と調理加工時における消長**, 日本食品衛生学会第58回学術講演会（1989, 10).

上村 尚, 田端 節子, 二島太一郎, 中野 雅行：**鶏におけるアフラトキシン投与の生体に及ぼす影響**, 日本食品衛生学会第58回学術講演会（1989, 10).

牛山 博文, 若林 敬二, 長尾美奈子, 杉村 隆：**ヘテロサイクリックアミンのヒトに対する曝露量：ヒト尿中の定量値**, 日本環境変異原学会第18回大会（1989, 11).

永山 敏廣, 真木 俊夫, 川合 由華, 観 公子, 飯田 真美, 二島太一郎：**輸入農産物における農薬の残留実態**, 第83回東京都衛生局学会（1989, 11).

上村 尚：**インドネシアにおけるアフラトキシンの汚染の実態と摂取量**, マイコトキシン研究会第30回学術講演会（1990, 1).

中島 和雄, 風間 成孔, 内海 英雄, 濱田 昭：**トコフェロールによるリポソーム膜の構造変化**, 第1回ビタミンE研究会（1989, 8).

中島 和雄, 風間 成孔, 内海 英雄, 濱田 昭：**トコフェロールによるリポソーム膜のヘキサゴナル相誘**

導能の構造活性相関とコレステロールの効果，第62回日本生化学会大会（1989，11）．

船山　惠市，牛尾　房雄，川島満春美，笠原　利英，坂牧　成恵，友松　俊夫，服部　富子，椎野　　功，登坂三紀夫：日常食の栄養素摂取量について，第83回東京都衛生局学会（1989，11）．

佐々木憲二，木下　真男，大沢　誠喜，鈴木　孝人：ディーゼル排ガス暴露の肺拡散能力値への影響，第26回日本臨床生理学会（1989，10）．

吉川　　翠，垣　　鍔直：超高層住宅の住戸内環境とダニについて，第48回日本公衆衛生学会総会（1989，10）．

鈴木　孝人，加納　堯子：ディーゼル排ガス暴露によるビタミンB_6含量の減少，第30回大気汚染学会（1989，11）．

瀬戸　　博，大久保智子，鈴木　孝人，大沢　誠喜，加納　堯子：ディーゼルエンジン排ガス暴露後のラット肺中多環芳香族炭化水素および炭粉量の変化Ⅰ，第30回大気汚染学会（1989，11）．

大久保智子，瀬戸　　博，加納　堯子：肺に沈着した炭粉の分析法，第30回大気汚染学会（1989，11）．

牧野　国義：東京都のいくつかの死因についての月別超過死亡率，期待死亡率，トレンド，第60回日本衛生学会（1990，3）．

高橋　保雄，笹野　英雄，森田　昌敏：ベンチオカーブの塩素処理による分解，第24回水質汚濁学会（1990，3）．

古畑　勝則，小池　和子：飲料用タンク水から高頻度に検出された***Protomonas extorquens***の塩素抵抗性について，第48回日本公衆衛生学会総会（1989，10）．

古畑　勝則，小池　和子：水環境および空気環境からの***Protomonas extorquens***の検出状況，第5回日本微生物生態学会（1989，10）．

渡辺真利代，原田　健一，松浦　憲司，鈴木　真言：藍藻***Microcystis***属の毒素ーその生産と分解ー，第54回日本陸水学会（1989，10）．

加藤　辰巳，渡辺真利代，渡辺　真之：***Microcystis***属ラン藻の酵素多型，第54回日本陸水学会（1989，10）．

古畑　勝則，小池　和子，野口　佳子，長谷川鎮雄：院内環境から分離された***Protomonas extorquens***の性状と薬剤感受性について，第5回日本環境感染学会（1990，2）．

Ichikawa, H., Ueta, T. : **Effects of Fatty Acid Amides (FAA) on the Hemolysis in Young Rats**, 5 th International Congress of Toxicology (1989, 7).

加納　いつ，長井二三子，牛山　慶子，佐藤かな子，中尾　順子，加納　和孝：ウマ**Na, K-ATPase** α_1サブユニットの遺伝子構造（第2報），第62回日本生化学会大会（1989，11）．

加納　いつ，佐藤かな子，長井二三子，牛山　慶子，中尾　順子，原　　諭吉，加納　和孝：抗ウマ**Na, K-ATPase**モノクローナル抗体結合部位の同定，第62回日本生化学会大会（1989，11）．

神谷　信行，市川　久次，佐々木美枝子，大橋　　誠：東京都立衛生研究所毒性部情報処理システム，第3回公

衆衛生情報研究協議会（1990, 2）.

神谷 信行,市川 久次,佐々木美枝子,大橋 誠：**東京都立衛生研究所における LA 化の試み**，情報処理学会第40回全国大会（1990, 2）.

大石 充男，大西 和夫，西島 基弘，中込 和哉，中澤 裕之，内山 俊一，鈴木 周一：**迅速クーロメトリーによる油脂中 POV の測定**，日本食品衛生学会第58回学術講演会（1989, 10）.

田口 信夫，大西 和夫，西島 基弘，内海 英雄，濱田 昭：**食品添加物の膜作用性ーリボソーム並びに赤血球による検討ー**，日本食品衛生学会第58回学術講演会（1989, 10）.

遠山 一郎，佐藤三枝子，山県 文夫，坂井 千三，伊藤 武，平田 一郎：**新型採便管の赤痢菌及びサルモネラの保存効果**，第38回日本感染症学会東日本地方総会（1989, 10）.

矢口久美子，平田 一郎，渡辺 学，伊藤 武，寺山 武：**テトラクロロエチレン分解嫌気性桿菌の発育条件とその分解経路**，第24回水質汚濁学会（1990, 3）.

伊藤 武：**輸入食品をめぐる衛生問題・輸入食品と食品媒介感染症**，第109回日本獣医学会公衆衛生分科会シンポジウム（1990, 3）.

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

松　本　昌　雄（委員長）
秋　山　和　幸
帆　刈　祥　弘
五十嵐　英　夫
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

1990年12月　発行

規格表　第２類
印刷番号（２）549
刊行物番号（Ｈ）24

東京都立衛生研究所研究年報第41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3－35－9
電　話 03（625）７４８１（代）