i131e

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

42

1991

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

序

東京都立衛生研究所は昭和24年の開設以来，東京都における衛生行政の学術的中核機関として，都民の健康水準の維持向上の一翼をつとめていまに至っております．この間，東京の都市環境は，戦後の窮乏と混乱から昭和30年代の高度成長を経て豊饒と長寿の今日に至るまで，まことにめまぐるしい変貌を重ねてまいりました．当所の基本的な目標はそれによっていささかも変わることはありませんが，業務の内容には行政需要の動向に即応できる変化がつねに求められてきたこともまた事実であります．この研究年報はそうした業務の変遷を研究の面から映す鏡であり，記録にとどめる碑銘であると申せましょう．

地方衛生研究所は，試験検査，調査研究，研修教育，公衆衛生情報の解析提供をもって業務の骨格となすといわれて久しくなります．しかしそれを業務の日常において実践し，学術的，行政的な実績に結び付けてゆくのはたやすい仕事ではありません．最終的には職員各自の資質と意欲に帰せられるとはいえ，自発的な努力にはおのずから限界があります．運営または体制の面からの適切な支援が必要とされるゆえんです．平成２年度に発足した研究調整会議は，こうした現状認識に立つ大橋前所長積年の構想が具体化されたものであり，その狙いは上記の業務骨格を峻別することなく，むしろそれらの自然な融合によって当所の事業の発展と行政目標の達成をもたらそうとするところにあります．

ここにお届けする研究年報第42号は，そうした努力の最初の結実であります．記すところは平成２年度までの調査研究の成果であり，職員個々の意欲と制度面の整備が相俟って調査研究の充実と発展が達成されて行く気運を，本書の行間と紙背に看取して載ければ幸いです．忌憚ないご批判と変わらざるご支援を賜りますようお願い申し上げます．

平成３年12月

東京都立衛生研究所長　倉科　周介

目　　次

報文Ⅰ　感染症等に関する調査研究

東京都内のインフルエンザ検索成績（1990年11月～1991年２月）
……山崎　清，伊藤　忠彦，関根　整治，太田　建爾…… 1

1990年度東京都におけるＨＩＶ－１抗体検査成績
……大貫奈穂美，貞升　健志，関根　大正，吉田　靖子，矢野　一好
新開　敬行，太田　建爾，三木　隆，堀　幹郎，前田　秀夫
貝田　晋，中村　清純，高橋　邦夫…… 5

血餅抽出ＤＮＡ標品からのＰＣＲ法によるヒト免疫不全ウイルス１型（ＨＩＶ－１）ゲノムの検出
……貞升　健志，大貫奈穂美，関根　大正，太田　建爾，三木　隆…… 8

報文Ⅱ　医薬品等に関する調査研究

軟膏中アラントインのジフェンヒドラミンによる配合変化
……萩原　輝彦，秋山　和幸…… 15

修治による生薬成分への影響（第１報）
各種修治地黄中のフェネチルアルコール配糖体成分の分析
……瀬戸　隆子，安田　一郎，浜野　朋子，高野伊知郎，高橋奈穂子
渡辺四男也，秋山　和幸…… 21

漢方製剤六味丸散剤の調製とその理化学的品質評価
……安田　一郎，浜野　朋子，高野伊知郎，高橋奈穂子，瀬戸　隆子
渡辺四男也，秋山　和幸，鈴木　達夫，清水　虎雄，山川　洋平…… 27

高速液体クロマトグラフィーによる漢方製剤防己黄耆湯の試験法について
……高橋奈穂子，安田　一郎，瀬戸　隆子，浜野　朋子，高野伊知郎
渡辺四男也…… 33

めっき廃水中のシアンの測定
――微量拡散―ピリジン・ピラゾロン法と微量拡散―イオン電極法の不一致例の解析とその対応――
……奥本千代美，高橋利恵子，岩崎由美子，渡辺四男也…… 38

イオン対高速液体クロマトグラフィーによる化粧品用水溶性ケイ光タール色素の分析
……伊藤　弘一，佐藤　憲一，鈴木　助治，中村　弘…… 44

高速液体クロマトグラフィーによるトウガラシチンキ配合育毛剤中のカプサイシン，ノナン酸バニリルアミドおよびジヒドロカプサイシンの定量
……岸本　清子，池田　一夫，鈴木　助治，中村　弘…… 49

ヘッドスペース・キャピラリーガスクロマトグラフィーによるシャンプー中の１，４―ジオキサンの含有量調査
……雨宮　敬，鈴木　助治，中村　弘…… 54

1982～1990年東京都衛生検査所精度管理調査における血液学的検査結果
……蓑輪　佳子，大石　向江，小林　千種，一言　広，五味　邦英
渡辺　清明，河野　均也…… 58

報文Ⅲ　食品等に関する調査研究

セレウス菌芽胞の熱抵抗性に関する検討
……新井　輝義，池島　伸至，平田　一郎，神　真知子，楠　くみ子
入倉　善久，伊藤　　武，寺山　　武…… 65

1985～1990年間に東京中央卸売市場に入荷した魚介類のアニサキス *Anisakis*，宮崎肺吸虫 *Paragonimus miyazakii*，
剛棘顎口虫 *Gnatostoma hispidum* の水揚げ地および産地別寄生状況
……村田以和夫，白鳥　憲行，小山　利夫，小田　　稔，渋谷　智晃…… 70

有機スズ化合物の衛生化学的研究（第Ⅶ報）
魚介類中のトリブチルスズおよびトリフェニルスズ化合物含有量（1988～1990年度）
……竹内　正博，水石　和子，山野辺秀夫，中村　　弘…… 77

有機スズ化合物の衛生化学的研究（第Ⅷ報）
魚類における有機スズ化合物の体内分布
……水石　和子，竹内　正博，山野辺秀夫，中村　　弘…… 86

玄米中の微量元素濃度
……山野辺秀夫，竹内　正博，水石　和子，江波戸擧秀，中村　　弘…… 90

キャピラリーGC／MS－SIM 法による魚介類中の non–ortho–Chlorine Substituted PCB 定量
……植田　忠彦，中村　　弘…… 95

輸入チーズの衛生学的品質評価
……竹葉　和江，梅木富士朗，村上　文子，仲真　晶子，井草　京子
丸山　　務，松本　昌雄…… 102

バイオアッセイによる食肉中のアミノグリコシド系抗生物質検査法の検討
……門間　千枝，神保　勝彦，丸山　　務，松本　昌雄…… 112

輸入食肉中の残留農薬の実態調査
……橋本　常生，宮崎　奉之，丸山　　務…… 118

畜水産食品中の抗菌剤の残留実態調査
……堀井　昭三，宮川　弘之，井草　京子，丸山　　務…… 124

野菜・果実類中の残留農薬実態調査
—平成２年度—
……永山　敏廣，小林　麻紀，塩田　寛子，真木　俊夫，観　　公子
橋本　秀樹，川合　由華，二島太一郎…… 129

輸入農産物中の残留農薬実態調査
—平成２年度—
……永山　敏廣，小林　麻紀，塩田　寛子，真木　俊夫，観　　公子
橋本　秀樹，川合　由華，二島太一郎…… 134

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分析
—市販食品から検出されたタール色素の確認例について—
……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…… 141

化学物質及び自然毒による食中毒等事件例（第８報）
—平成２年度—
……真木　俊夫，観　　公子，橋本　秀樹，川合　由華，永山　敏廣
小林　麻紀，塩田　寛子，二島太一郎…… 147

輸入食品中の放射能濃度（第２報）
—平成２年度—
……観　　公子，真木　俊夫，橋本　秀樹，川合　由華，永山　敏廣
小林　麻紀，塩田　寛子，二島太一郎…… 152

食品製造用酵素製剤の品質実態調査（第１報）
酵素活性の測定及び有機副剤の分析
……広門　雅子，平田　恵子，中島　和雄，植松　洋子，松井　敬子
風間　成孔…… 163

食品製造用酵素製剤の品質実態調査（第２報）
製剤中の無機塩類及び不純物の分析
……安野　哲子，荻野　周三，小関　正道，栗原　裕子，風間　成孔…… 170

陰膳方式による栄養成分摂取量調査
……牛尾　房雄，故　川島満春美，船山　恵市，坂牧　成恵
笠原　利英，友松　俊夫…… 176

養殖および天然シマアジにおける一般成分，ミネラル，ビタミンおよび脂肪酸組成の比較
……船山　恵市，牛尾　房雄，友松　俊夫…… 185

報文Ⅳ　生活環境に関する調査研究

皇居外苑濠の植物プランクトン（Ⅳ）
植物プランクトン量と栄養塩
……渡辺真利代，高橋　　巌，土屋　悦輝…… 191

水中の大腸菌群及び大腸菌の酵素反応による迅速試験法に関する検討
……古畑　勝則，　松本　淳彦…… 194

東京都における1972～1987年の呼吸器疾患死亡率月変動の特徴
……牧野　国義…… 203

東京湾の環境汚染モニタリング（第９報）
平成元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…… 210

都内幹線道路沿道周辺の大気浮遊粉塵中の多環芳香族炭化水素濃度について
……多田　宇宏，斉藤　育江，狩野　文雄，加納　堯子…… 214

大気浮遊粉塵中の重金属について
幹線道路沿道よりの距離による濃度特性
……佐藤　泰仁，加納　堯子…… 221

^{32}Ｐ－ポストラベル法によるディーゼルエンジン排気ガス暴露ラットの肺におけるＤＮＡ付加体の検出
……鈴木　孝人，加納　堯子…… 229

報文Ⅴ　毒性に関する調査研究

六味丸の13週間経口投与試験
……藤井　孝，三栗谷久敏，矢野　範男，湯澤　勝廣，長澤　明道
多田　幸恵，福森　信隆，角　千代，佐々木美枝子…… 235

六味丸とオルトフェニルフェノールとの併用による13週間経口投与試験
……藤井　孝，三栗谷久敏，矢野　範男，湯澤　勝廣，長澤　明道
多田　幸恵，福森　信隆，角　千代，佐々木美枝子…… 243

八味地黄丸の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，安田　一郎，角　千代
佐々木美枝子…… 252

走査型電子顕微鏡のための試料作製法の検討
―乾燥法について―
……三栗谷久敏，福森　信隆，角　千代…… 261

Salmonella typhimurium TA 97，TA102 を用いた食品添加物の変異原性試験（第６報）
……藤田　博，角　千代，佐々木美枝子…… 267

都衛研―毒性部動物施設における実験動物管理プログラムの開発
……小嶋　昭江，神谷　信行，林田　志信，池田　虎雄，高橋　博
角　千代，佐々木美枝子…… 276

安息香酸ナトリウムならびにピペロニルブトキサイドのＦ３４４ラットにおける亜急性毒性試験
……藤谷　知子，安藤　弘，池田　虎雄，大石　真之，小懸　昭夫
樺島順一郎，神谷　信行，久保　喜一，小嶋　昭江，高橋　省
高橋　博，多田　幸恵，藤谷　和正，米山　允子，市川　久次…… 285

トリチウム水中に生成される過酸化水素の定量
……金西　信次，金城　康人，渡部　真…… 296

RRR-α-Tocopherolのラット肝への分布
……市川　久次，植田　忠彦…… 304

著書及び他誌発表…… 309
学　会　発　表…… 317

CONTENTS

REPORTS PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

Prevalence of Influenza Occurred in Tokyo. (Nov. 1990-Feb. 1991)
.....K. Yamazaki, T. Itoh, S. Sekine and K. Ohta..... 1

Serological Survey for Antibodies against HIV-1 in Tokyo 1990
..... N. Ohnuki, K. Sadamasu, H. Sekine, Y. Yoshida, K. Yano, T. Shinkai, K. Ohta, T. Miki, M. Hori, H. Maeda, S. Kaida, K. Nakamura and K. Takahashi 5

Detection of HIV-1 Proviral Genome in DNA Specimens Extracted from Blood Clots by Polymerase Chain Reaction
.....K. Sadamasu, N. Ohnuki, H. Sekine, K. Ohta and T. Miki..... 8

REPORTS II PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTCAL HYGIENE

Imcompatibility of Allantoin Caused by Diphenhydramine in Ointment
.....T.Hagiwara and K.Akiyama..... 15

Influence of Processings on the Constituents of Crude Drugs.(I).Analysis on the Phenethyl Alcohol Glycosides in Various Processed Roots of *Rehmannia glutinosa*
..... T. Seto, I. Yasuda, T. Hamano, I. Takano, N. Takahashi, Y. Watanabe and K. Akiyama 21

Preparation of Chinese Medicine "Rokumigan Powder" and its Physical and Chemical Evaluation
.....I. Yasuda, T. Hamano, I. Takano, N. Takahashi, T. Seto, Y. Watanabe, K. Akiyama, T. Suzuki, T. Simizu and Y. Yamakawa..... 27

Analysis of Chinese Medical Preparations "Boi-ogi-to" by High Performance Liquid Chromatography
..... N. Takahashi, I. Yasuda, T. Seto, T. Hamano, I. Takano and Y. Watanabe 33

Determination of Cyanide in Waste Water from Metal Plating Process --- Analysis and Counterplan of Inconsistency between Results with Microdiffusion-Pyridine-Pyrazolone Method and Microdiffusion-Ion-Selective Electorode Method
.....C. Okumoto, R. Takahashi, Y. Iwasaki and Y. Watanabe..... 38

Determination of Water Soluble Fluorescence Coal-Tar Dyes in Cosmetics and Toiletries by Ion-pair HPLC
.....K. Itoh, K. Sato, S. Suzuki and H. Nakamura..... 44

Determination of Capsaicin, Nonanoic Acid Vanillylamide and Dihydrocapsaicin in Hair Tonics Containing Capsicum Tincture by High Performance Liquid Chromatography
.....K. Kishimoto, K. Ikeda, S. Suzuki and H.Nakamura..... 49

Determination of 1,4-Dioxane in Shampoos by Headspace Capillarry Gas Chromatography
..... T. Amemiya, S. Suzuki and H. Nakamura..... 54

The External Quality Assessment at the Registered Clinical Laboratories in Tokyo for Hematology from 1982 to 1990
K. Minowa, H. Oishi, C. Kobayashi, H. Hitokoto, K. Gomi, K. Watanabe and K. Kawano 58

REPORTS III PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

Heat Resistance of the Spore of *Bacillus cereus* Isolates from Foods and "Vomitting-type" Food Poisoning
T. Arai, N. Ikejima, I. Hirata, M. Jin, K. Kusunoki, Y. Irikura, T. Itoh and T. Terayama 65

Distribution Survey of *Anisakis* larvae, *Paragonims miyazakii* and *Gnathostoma hispidum* in Fish and Shellfishes Landed at Tokyo Metropolitan Central Wholesale Market during the Period of 1985–1990
I. Murata, N. Shiratori, T. Koyama, M. Oda and T.Shibuya..... 70

Hygienic Chemical Studies on Organotin Compounds.(Ⅶ). Content of Tributyltin and Triphenyltin Compounds in Fish and Shellfish(1988-1990)
M. Takeuchi, K. Mizuishi, H. Yamanobe and H. Nakamura..... 77

Hygienic Chemical Studies on Organotin Compounds(Ⅷ). Distribution of Tributyltin and Triphenyltin Compounds in Fish
K. Mizuishi, M. Takeuchi, H. Yamanobe and H. Nakamura..... 86

Content of Fifteen Trace Elements in Brown Rice
H. Yamanobe, M. Takeuchi, K. Mizuishi, K. Ebato and H. Nakamura..... 90

Determination of Three non-ortho-Chlorine Substituted PCBs in Fishes and Shellfishes by GC/MS Selected Ion Monitoring
T. Ueda and H. Nakamura..... 95

Estimation of Chemical and Microbiological Quality of Imported Cheese
K. Takeba, F. Umeki, F. Murakami, A. Nakama, K. Igusa, T. Maruyama and M. Matsumoto 102

Microbiological Assay for the Detection of Aminoglycoside Antibiotics in Meats
C. Monma, K. Jinbo, T. Maruyama and M. Matsumoto..... 112

Survey of Pesticide Residues in Imported Meats
T. Hashimoto, T. Miyazaki and T. Maruyama..... 118

Survey of Antibiotic Residues in Livestock and Fishery Products
S. Horii, H. Miyakawa, K. Igusa and T. Maruyama..... 124

Survey of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits.-Apr.1990-Mar.1991-
T. Nagayama, M. Kobayashi, H. Shioda, T. Maki, K. Kan, H. Hashimoto, Y. Kawai and T. Nishima..... 129

Survey of Pesticide Residues in Imported Crops.-Apr.1990-Mar.1991-
T. Nagayama, T. Maki, Y. Kawai, M. Kobayashi, H. Shioda, K.Kan, H. Hashimoto and T. Nishima..... 134

Determination of Food Colors by High Performance Liquid Chromatography. Identitication of Food Colors Detected from Commercial Food
F. Ishikawa, K. Saito, M. Nakazato, K. Fujinuma, T. Moriyasu and T. Nishima..... 141

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toxicants in Tokyo. (Ⅷ) . -1990-
..... T. Maki, K. Kan, H. Hashimoto, Y. Kawai, T. Nagayama, M. Kobayashi, H. Shioda and T. Nishima 147

Radioactive Contamination in Imported Foods. (Ⅱ).-Apr.1990-Mar.1991-
..... K. Kan, T. Maki, H. Hashimoto, Y. Kawai, T. Nagayama, M. Kobayashi, H. Shioda and T.Nishima 152

Survey on Quality of Enzyme Preparations Used in Food Processing.(Ⅰ).Measurement of Enzyme Activities and Analysis of Organic Subsidiaries in Enzyme Preparations
..... M. Hirokado, K. Hirata, K. Nakajima, Y. Uematsu, K. Matsui and M. Kazama 163

Survey on Quality of Enzyme Preparations Used in Food Processing.(Ⅱ). Determination of Inorganic Salts, Heavy Metals, Arsenic and Boron in Enzyme Preparations
..... T. Yasuno, S. Ogino, M. Koseki, Y. Kurihara and M. Kazama..... 170

Duplicate Portion Studies on the Dietary Intakes of Nutrients
..... F. Ushio, the last M. Kawashima, K. Funayama, N. Sakamaki, T. Kasahara and T. Tomomatsu 176

Comparison of Nutritive Components between Cultured and Wild Striped Jack
..... K. Funayama, F. Ushio and T. Tomomatsu..... 185

REPORTS IV PAPERS CONCERNING ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

Phytoplankton in Outer Moats around the Imperial Palace.(Ⅳ). Relations between the Standing Crop of Phytoplankton and Nutrients
..... M. F. Watanabe, I. Takahashi and Y. Tsuchiya..... 191

Rapid Method for the Detection of Coliforms and *Escherichia coli* in Water by Enzymatic Assay
..... K. Furuhata and A. Matsumoto..... 194

Features of Monthly Transition of Death Rates for Respiratory Diseases in Tokyo, 1972-87
..... K. Makino..... 203

Survey of Chemical Pollutants in Biota from Tokyo Bay.(IX). Residue Levels in Japanese Sea Bass and Gull in 1989
..... T. Ohkubo, H. Seto and T. Kanoh..... 210

The Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Contents of Ambient Particulate Matters Collected near an Arterial Road in Tokyo
..... T. Tada, I. Saitoh, F. Kanoh and T. Kanoh..... 214

Heavy Metal Contents in Suspended Particulate Matters of Atmosphere. Density Profile versus Distance from Road Site
..... Y. Sato and T. Kanoh..... 221

Detection of DNA Adducts in the Lungs of Rats Exposed to Diesel Engine Exhaust Using ^{32}P-Postlabeling Analysis
..... T. Suzuki and T. Kanoh..... 229

REPORTS V PAPERS CONCERNING ON TOXICOLOGY

Oral Toxicity Test of Rokumi-gan by Gavage to Rats for 13 Weeks
T. Fujii, H. Mikuriya, N. Yano, K. Yuzawa, A. Nagasawa, Y. Tada, N. Fukumori, C. Sumi and M. Sasaki 235

Inhibitory Effects of Rokumi-gan on the Lesions in Urinary System Induced by 13-Weeks Exposure to *o*-Phenylphenol
T. Fujii, H. Mikuriya, N. Yano, K. Yuzawa, A. Nagasawa, Y. Tada, N. Fukumori, C. Sumi and M. Sasaki 243

Effect of Pretreatment with Hachimi-jio-gan on Thiabendazole-Induced Teratogenicity in Mice
A. Ogata, H. Ando, Y. Kubo, I. Yasuda, C. Sumi and M. Sasaki 252

Examination of Drying Methods in Preparing Specimens for Scanning Electron Microscopy
H. Mikuriya, N. Fukumori and M. Sasaki 261

Mutagenicity Test of Food Additives with *Salmonella typhimurium* TA97 and TA102 (VI)
H. Fujita, C. Sumi and M. Sasaki 267

Personal Computer System for Management of Laboratory Animals at Department of Toxicology, the Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
A. Kojima, N. Kamiya, S. Hayashida, T. Ikeda, H. Takahashi, C. Sumi and M. Sasaki 276

Sub-acute Toxicity of Sodium Benzoate and Piperonyl butoxiide in F344 Rat
T. Fujitani, H. Ando, T. Ikeda, S. Oishi, A. Ogata, J. Kabashima, N. Kamiya, K. Kubo, A. Kojima, O. Takahashi, H. Takahashi, Y. Tada, K. Fujitani, M. Yoneyama and H.Ichikawa 285

Assay of Hydrogen Peroxide Produced in Tritiated Water
N. Kananishi, Y. Kinjo and M. Watanabe 296

Disribution of RRR-α-Tocopherol in the Rat liver
H. Ichikawa and T. Ueda 304

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS 309
THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS 317

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.*,**42**, 1-4, 1991

東京都内のインフルエンザ検索成績 (1990年11月～1991年2月)

山崎　清*, 伊藤忠彦*
関根整治*, 太田建爾*

Prevalence of Influenza Occurred in Tokyo (Nov. 1990～Feb. 1991)

KIYOSHI YAMAZAKI*, TADAHIKO ITO*, SEIJI SEKINE* and KENJI OHTA*

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

緒　言

近年のインフルエンザの流行は，インフルエンザAH1型，AH3型，B型のそれぞれのウイルスによる単独流行[1-2]あるいはAH1型，AH3型，B型ウイルス三型の組み合わせによる混合流行[3-6,10]が認められている．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．

本報では，1990年11月から1991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，1990年11月下旬から1991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36集団151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6医療機関を受診したインフルエンザ様疾患々者13名(9歳～78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151例について，既報[2]に準じ発育鶏卵及びRD，Hep 2，HeLa，Vero355，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／32／89
AH3型：A／貴州／54／89，A／東京／82／91
B　型：B／香港／22／89，B／愛知／5／88

これらのうちA／東京／82／91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．また，インフルエンザ様疾患の症状を呈し，かつ下痢及び嘔吐などの症状を伴なった患者についてはウイルス性下痢症をも疑い，患者糞便より著者らの方法[7]を用いて小型球形ウイルス(以下SRSVと略す)の検索も併せて行った．

成績と考察

患者の病因検索　1990年11月1集団，12月3集団，1991年1月27集団，2月5集団の合計36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，24集団例(患者97名中50名)よりインフルエンザAH3型ウイルスを分離した．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5例(1991年1月下旬4集団，2月上旬1集団)認められた．AH3型による集団例は合

*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(1990～1991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		アデノ	コクサッキ	アデノ	単純ヘル	SRSV*	不明
	例数	件数	AH3型	AH1型	[CF]	-B群 2型	4型	ペス1型		
1990. 11下	1	5			1**					
. 12上	2	10			1***	(1)			(1)	1
中	1	4				1(3)	(1)			
1991. 1中	8	30	8(19)						(1)	
下	19	87	16(24)	2(5)				(1)		1
. 2上	5	15	5(7)					(1)		
計	36	151	29(50)	2(5)	2	1(4)	(1)	(2)	(2)	2

( )内はウイルス分離株数
＊：電子顕微鏡法(EM)による検出
＊＊：例数
＊＊＊：ペア血清高力価(32～64倍)保有につき推定

計29集団であったことが確認された．AH1型ウイルスによる事例は，1991年1月下旬に搬入された2集団で，患者9名中5名からはウイルスを分離した．残り4名は血清学的にAH1型に対する抗体価の有意上昇が認められ同ウイルスによる感染と判定された．

インフルエンザウイルス以外のウイルスによる事例は，血清学的試験の結果アデノウイルス感染によると推定されたものが1集団，さらに同ウイルスに対して急性期血清がすでに高い抗体価を保有(32～64倍)する1集団例が認められ，本例も同ウイルスによるものであることが推定された．この他，1990年12月上旬に搬入された1集団5名中1名からはコクサッキーB群2型ウイルスを分離した．12月中旬に遭遇した1集団例(4名)では3名よりコクサッキーB群2型及び1名からはアデノ4型ウイルスが検出され，本例はこの2種のウイルスによる感染であることが認められた．さらに，インフルエンザウイルスは検出されなかったものの，血清学的にAH3型に感染していたと診断された2名の患者より単純ヘルペス1型ウイルスが検出された．

1991年1月下旬に発症した病因不明の症例及びインフルエンザ様疾患の症状を呈し，かつ下痢及び嘔吐などの症状を伴なった患者についてはSRSVの感染を疑い，電子顕微鏡法(EM)で糞便を検索した．その結果，2名の患者から同ウイルスを確認した．これまで，著者ら[8-10]はインフルエンザ様疾患の症状を呈し，かつ下痢及び嘔吐などの症状を伴った症例の中に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13例のウイルス分離試験の結果，4例よりインフルエンザAH3型ウイルスを，1例よりアデノ3型ウイルスを分離した．残り8例はウイルス分離試験は陰性であった．また，ペア血清が得られた8例について，血清学的試験を行った．その結果，ウイルスが検出された4例を含む5例に，AH3型ウイルス抗原に対する抗体の有意上昇が認められた．残り3例は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も認められず，病因を明らかにすることはできなかった．

インフルエンザウイルス検出患者血清のHI試験成績

インフルエンザAH1型及びAH3型ウイルスが分離された患者のうち，急性期及び回復期に得られたペア血清(AH3型45例，AH1型5例計50例)についてHI抗体価の変動を検討した．表2に示すごとく，それぞれのペア血清は検出したウイルスと同型の抗原株に対してのみ抗体価の上昇が認められた．ペア血清における抗体の有意上昇の目途を4倍以上として見ると，AH3型抗原株に対する有意な抗体の上昇率はA／貴州／54／89株に対して77.8%(30／45)，A／東京／82／91株では97.8%(44／45)であった．また，AH1型ウイルスを検出した5例はAH1型抗原株に対して100%抗体の上昇が認められた．

HI試験に用いたA型，B型それぞれの抗原株に対して，急性期血清における128倍(n＝4)以上の抗体の保有は，AH1型山形株で97.8%，AH3型貴州株93.3%，

表2．インフルエンザウイルス分離陽性患者のHI試験成績(1990年11月～1991年2月)

回復期

A/山形/32/89 (H1)

急性期	<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9>10	計
<1											
1											
2											
3				1**						1	2
4										1	1
5					3						3
6					1	10	1		1		13
7						1	16		1	1	19
8								10			10
9									2		2
計				1		4	11	17	10	5	2 50

A/貴州/54/89 (H3)

急性期	<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9>10	計
<1									1		1
1											
2											
3									1	1	2
4								1	1	1	3
5								1	3	4	4 12
6									6	5	1 12
7								4	5	2	3 14
8									2	2	4
9										2	2
計								6	19	17	8 50

A/東京/82/89 (H3)

急性期	<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9>10	計
<1									5	5	10
1											
2										2	2
3							2	3	2	3 1	11
4					1		2	7	1	1	12
5						2	1	5	1	1	10
6							2		3		5
7											
8											
9											
計				1	2	7	20	14	5	1	50

B/香港/22/89

急性期	<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	計
<1	7										7
1											
2			1								1
3				5	3						8
4					4	2					6
5						12					12
6						1	5	1			7
7								7			7
8									2		2
9											
計	7		1	5	7	15	5	8	2		50

B/愛知/5/88

急性期	<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	計
<1	3										3
1											
2											
3				1	1						2
4					5	2					7
5						3	3				6
6							9	2			11
7							1	10	4		15
8								1	2	2	5
9										1	1
計	3			1	6	5	13	13	6	3	50

＊：8×2^n 値　　＊＊：例　数

＿：AH 1 型ウイルス検出患者及びそれを含む

東京株73.3%，B型香港株68.0%，愛知株90.0%と各株共に高い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ろうが，患者の急性期における高い抗体価の保有は，毎年のごとく繰り返し流行する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．なお，患者ペア血清においてインフルエンザB型のB／香港／22／89，B／愛知／5／88株に対するHI抗体価の有意上昇例は1例も認められず，今冬期は東京都におけるB型による流行はなかったものと推察された．

以上のごとく今冬期の東京都におけるインフルエンザウイルスによる集団かぜの主流行は，AH 3 型ウイルスによるものであったが，一部AH 1 型ウイルスによる集団例もあったことが確認された．なお，全国的には1990年10月北海道においてインフルエンザ様疾患の初発以来，11月までに各地から同疾患発生の報告[11]がなされたが，病因はアデノ，エコー，コクサッキー，パラインフルエンザウイルスなどによるものであった．インフルエンザウイルス確認の初発は，1990年12月に横浜市においてAH 3 型ウイルス検出の報告[11]をかわきりに，以後全国的に同型，AH 1 型及びB型ウイルス検出の報告がなされ，流行の主体は東京都の場合と同様AH 3 型で，これにAH 1 型あるいはB型ウイルスが加わった流行であったことが報告されている[12]．

ま と め

1．東京都内における1990年11月中旬から1991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AH 3 型ウイルスによるものが主体で，この他に少数例ではあるがAH 1 型ウイルスによるものも認められた．

2．インフルエンザの流行初期に同一集団においてインフルエンザウイルスは検出されず，コクサッキーB群及びアデノ4型による2種のウイルスが同時に分離された事例が1例認められた．

3．血清学的試験の結果AH 3 型による感染と診断された患者2名から単純ヘルペス1型ウイルスを検出し，複合感染であったことを確認した．

4．インフルエンザ様疾患の症状を呈し，かつ下痢及び嘔吐などの症状を伴なった患者については，SRSV感染症を疑い，患者糞便を電子顕微鏡法(EM)で検索した結果，SRSVを確認し，SRSVによる感染例であったことを明らかにした．

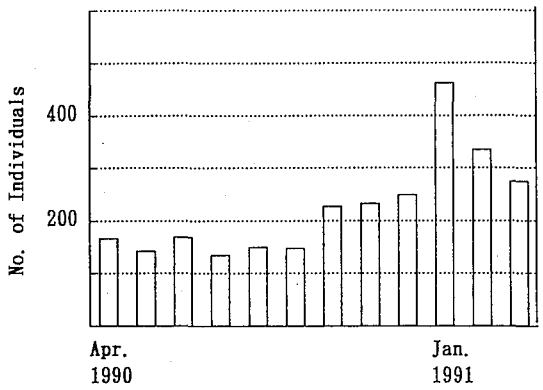


Fig. 1. Monthly Shift of Individuals Who Visited Health Centers in Tokyo for the Test of HIV-1 Antibody.

受診者は222名であった．10月以降の受診者はそれ以前に比べて増加し，1月にピークとなった．これは某宗教団体の集団検診によるものである．(Fig. 1)

一次スクリーニング検査で陽性となったのは8件であった．そのうちの40才代の男性1名のみを確認検査で陽性と判定した．なお，残りの7件中5件はWB法でバンドが検出されたが，陽性の判定基準をみたしていないため判定保留とし3か月後の再検査を求めた．2件はバンドが検出されず，陰性と判定した．また，EIAのカットオフ値の1／3以上，すなわちOD値が0.100から0.299の値を示した35件も同様にWB法により検査した．その結果p24を含むバンドが認められた7件については3か月後再検査するよう指導した．なお，再検査を求めた検体については血餅からDNAを抽出し，PCR法によるHIV-1ゲノムの検出を試みた．その詳細については東京衛研年報42号(1991年)の貞升らの記載[6]を参照されたい．

2．無料街頭検診

1990年12月2日，世界エイズデーの記念行事の一環として，都内の某広場で一般健康診断と合わせてHIV-1抗体検査を含むSTDの無料街頭検診を行った．その結果をTable 1に示した．検査の受診者は男性115名，女性22名の計137名であった．平均年齢は男性29.0才，女性34.3才であった．

HIV-1抗体検査により陽性と判定されたのは137名中1名(0.7%)であった．この1名は20才代の男性で，後述するHBs抗体及びガラス板法，TPHAによる梅毒血清反応も陽性であった．また，一次スクリーニングでカットオフ値の1／3以上のOD値を示した検体8件をWB法で検査したところ，その内2件が，p24の位置にバンドを示した．

HBs抗原は全例で陰性であったが，HBs抗体は男性20名(14.6%)，女性3名(2.2%)の計23名(16.8%)で陽性であった．陽性率は一般人で報告されている26.5%[7]よりは低かった．HC抗体はEIA法による一次スクリー

Table 1. Serological Tests for Sexual Transmitted Diseases on the Street in Tokyo

Age group	No. of serum specimens tested	No. of reactive serum specimens tested							
		HIV		HBsAb	HBsAg	HCV		Syphilis	
		EIA	WB			EIA*	RIBA	VDRL	TPHA
～20	13(2)	0	0	0	0	0	0	3	1
21～25	38(3)	0	0	4(1)	0	0	0	1	2
26～30	41(4)	1	1	9	0	2	0	2	3
31～35	13(3)	0	0	1	0	1(1)	0	0	1
36～40	12(4)	0	0	3	0	1	0	0	0
41～45	9(2)	0	0	3(1)	0	0	0	0	1
46～50	3(0)	0	0	1	0	0	0	0	0
51～55	2(1)	0	0	2(1)	0	0	0	0	1
55～60	6(3)	0	0	0	0	1	1	0	0
Total	137(22)	1	1	23(3)	0	5(1)	1	6	9

No. of women in parenthesis

*Reactive by Abbott and／or Ortho kit

ニングで計5名が陽性となったが，イムノブロット法による確認検査によりその内の1名のみを陽性と判定した(陽性率0.7%)．なお，一般献血者のHC抗体陽性率は1.15%との報告がある[8]．

梅毒血清検査ではガラス板法，TPHA共に陽性を示したのは4例(2.9%)，ガラス板法のみ陽性を示したのは2例(1.5%)，TPHAのみが陽性であったのは5例(3.6%)であり，全例男性であった．この11例中6例はHBs抗体陽性であった．

同時に行ったアンケートによれば男性受診者のうち49名が同性愛の経験をもつと回答している．また，同性愛経験者ではHBs，HC抗体及び梅毒血清反応の陽性率は男性全体より高率であった[9]．

本実験で実施したいずれかの検査で陽性と判定されたのは男性24名，女性3名で，各々性別の比率は20.9%，12.5%であり男性の陽性率が高かった．

考　察

わが国のHIV-1感染者は着実に増加しており，新たに報告される患者感染者の多くが首都圏在住である．東京都のHIV-1抗体検査は都立病院と，各保健所を窓口として当研究所で行われているが，都内保健所での抗体検査受診者数および，抗体陽性者検出率には過去4年間で目立った変化は認められない．検出率が低い原因は保健所での抗体検査受診者が主に健康診断等を目的とする低リスク群であるためと思われる．一方，STD高リスク群での抗体陽性率は，保健所でのそれよりも高いと予想される．今回の無料街頭検診ではあらかじめ広報を行った上でHIV-1を含むSTDの検査を行い，高リスク群を含む一般都民の受診を促した．

街頭検診の結果，HIV-1抗体検査では137名中1名(0.7%)の陽性者を検出した．この1名は，HBs抗体及びガラス板法，TPHAによる梅毒血清反応も陽性であり，STD感染の何らかの高リスクグループに属している可能性が示唆される．この1名以外にWB法による検討でP24の位置にバンドが認められた検体が2件あった．高リスクグループに属し，WB法による確認検査でP24が認められた場合，3か月後以降に再検査をすることが望ましいが，今回の検査では再検査は行っていない．

HIV-1以外に梅毒血清陽性率も一般健康診断での陽性率(TPHAで2.1%[9])より高かった．その陽性者の全例が男性であったことより，この検診ではSTDの高リスク群に属する男性の受診が多かったと思われる．

これらの抗体検査結果及びアンケート結果より，今回行ったような無料街頭検診でSTD高リスク群の受診を促す事ができると考えられる．また，HIV-1抗体陽性者を検出し得た事でその有効性も明らかである．今後，保健所での検査と平行して，このような積極的な抗体検査も必要であると思われる．

ま と め

1990年度の都内保健所(目黒区を除く)での抗体検査受診者は計2,666名，うち陽性は1名であった．この低検出率の原因は，保健所での抗体検査受診者が主に健康診断等を目的とする低リスク群であるためと思われる．一方，HIV-1を含むSTDの無料街頭検診により，137名中HIV-1抗体陽性者1名を検出した．この1名はHBs抗体及び梅毒血清反応も陽性であり，STD感染の高リスク群に属している可能性が示唆された．この検診では，STDの高リスク群を効率良く検査し得たと推察される．今後，保健所での抗体検査と平行して，このような積極的な抗体検査を行うことが必要であると思われる．

文　献

1) M. H. Merson; The 3rd Workshop on Epidemiology and Control of AIDS, 1990
2) 厚生省エイズサーベイランス委員会，1991
3) Nakamura, K. et al.: Japan. J. Med. Sci. Biol., **40**, 159-164, 1987
4) 大貫奈穂美他：東京衛研年報，**39**，43-48，1988
5) Ortho HIV Western blot kit insert, 1990
6) 貞升健志他：東京衛研年報，**42**，8-13，1991
7) 門奈丈之他：医学のあゆみ，**151**，745，1989
8) 西岡久壽彌；Hepatitis B and Non-A Non-B Hepatitis, Japanese Red Cross Central Blood Center, 1990
9) 高橋邦夫他：厚生省HIV疫学研究班合同報告会・総会討議資料，37-41，1991
10) 鈴木敬子他：東京衛研年報，**40**，22-25，1989

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 8-13, 1991

血餅抽出DNA標品からのPCR法によるヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)ゲノムの検出

貞升健志, 大貫奈穂美, 関根大正
太田建爾, 三木　隆

Detection of HIV-1 Proviral Genome in DNA Specimens Extracted from Blood Clots by the Polymerase Chain Reaction

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

We tried to detect HIV-1 proviral genome from blood clots of sero-negative, positive and indeterminate samples in Western blot assays (IWBs) of HIV-1 antibody by the polymerase chain reaction (PCR). DNA was extracted from blood clots by being treated with proteinase K, phenol and chloroform, and used for PCR. Three pairs of HIV-1 specific oligonucleotide primers (SK29/30 for LTR, SK68/69 for the env gene, and pol 1/2 for the pol gene) were used for amplification of the respective gene segment, and the amplified product was detected by the digoxigenin-labeled probe for each segment. Our experiments using PCR showed the presence of an env gene or LTR segment in sero-positive samples, and an env gene segment in some IWBs examined. These results indicate that DNA samples from blood clots can be used for PCR analysis of HIV-1 genome in sero-positive samples and IWBs.

Keywords：ヒト免疫不全ウイルス1型 HIV-1, 血餅 blood clot, ポリメラーゼ連鎖反応 polymerase chain reaction (PCR)

緒　言

衛生研究所では1987年にHIV-1(ヒト免疫不全ウイルス1型)抗体検査事業を開始して以来，1991年3月末までに取り扱った検体数は15,000件を数えている．

一般にHIV-1抗体検査では，一次スクリーニングとして酵素免疫測定(EIA)法または粒子凝集(PA)法が用いられている．陽性を示した検体は，確認試験としてウエスタンブロット(WB)法または間接蛍光抗体(IFA)法を実施している．WB法においてHIV-1のP24コア蛋白とのみ反応する検体(p24 Indeterminate Western blot；以下 P24IWB と略す)があり，その中にはHIV-1感染後の経過日数が少ないためのものもある．この様な例では3カ月～2年の内に陽性化することが知られている[1-3]．したがって，当研究所では原則としてかかる判定保留例を3カ月後に同様の方法で再検査に付すことにしている．これまで著者らは検査結果の判定保留例をなくす目的で二次元電気泳動法を用いる解析法の検討を試みたが，P24IWBとHIV-1陽性血清を区別するに至らなかった[4]．さらにHIV-1に感染しても抗体が陽性化しないサイレントエイズ[5]への行政上の対応問題もあり，抗体検出に依存しない実験室内診断法の開発が強く望まれている．この様な要請に応えるための一つの手技として遺伝子診断法であるpolymerase chain reaction(PCR)法がある[6-8]．

HIV-1は，約9,000塩基からなる一本鎖のRNAを持つウイルスであるが，このウイルス自身の持つ逆転写酵素により二本鎖のDNAへと複製し，プロウイルスとして宿主細胞のDNA内へと組み込まれる．一度，DNA内に組み込まれると極めて安定でその細胞が死滅しないかぎり，永続的なウイルス粒子の放出が可能となる．PCR法によりHIV-1の検索をする場合，ウイルスのRNAではなく感染細胞内のプロウイルスDNAを標的として，

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

フィコールで分離したリンパ球からDNAを検出して行うことが多い[7]．当研究所が取り扱っている保健所経由の検体は抗体検査用のため抗凝固剤が含まれていない．したがって，これらの検体でPCR法によるHIV-1の検索を行う場合血餅からのDNA抽出が必要となる．そこで，著者らは血餅からのDNA抽出およびそのDNAを材料としたPCR法を確立し，本法によりHIV-1抗体陽性例および判定保留例の血餅からのHIV-1プロウイルスゲノムの検出を試みた．

材料および方法

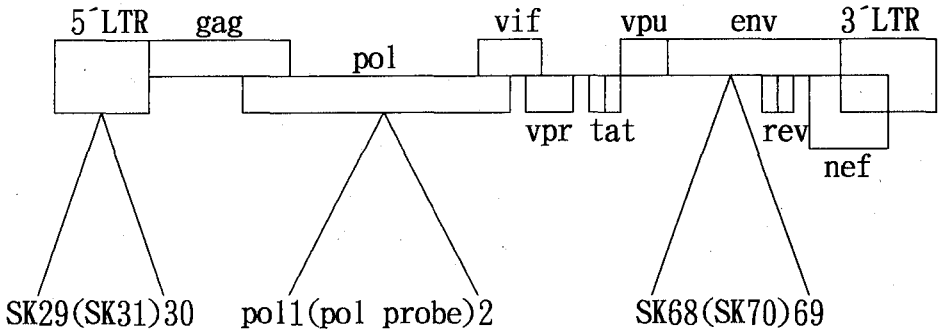
1．血餅および細胞

HIV-1抗体陽性または陰性であった検体の血餅およびP24IWBあるいはWB法によりHIV-1 P17コア蛋白とのみ反応した検体(以下P17IWBと略す)の血餅からPCR用のDNAを抽出した．同時に陽性対照としてHIV-1感染Molt-4細胞からDNAを抽出した．

2．血餅からのDNA抽出

下記の方法で血餅からDNAの抽出を行なった．

血餅約3gを箸で潰し，これを4mlのproteinase K (200μg／ml)加1％SDS含有TEN緩衝液(10mMTris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA, 100mM NaCl)に入れ，37℃，12時間振とう処理した．その後，これに同量のフェノールを加え，3時間振とう後，遠心(9,000G，10分)しその上清を得た．この操作を3回繰り返した後，同量のクロロホルムを加え3時間振とう後遠心し，その上清を−20℃にてエタノール沈殿(一晩)を行ない，遠心後その沈殿物を70％エタノールで3回洗浄した．次に沈殿物を500μlのTE緩衝液(10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA)に再溶解後，37℃，1時間RNase A処理し，再びフェノールおよびクロロホルムでそれぞれ1回処理後，エタノール沈殿した．沈殿物を70％エタノールで洗浄後，適量(約500μl)の蒸留水に溶解し，分光光度計



		primer or probe	strand		sequence(5´−3´)	Size of amplified DNA(bp)
H I V	LTR	SK29	primer	+	ACTAGGAACCCACTGCT	105
		SK30	primer	−	GGTCTGAGGGATCTCTA	
		SK31	probe	−	ACCAGAGTCACACAACAGACGGGCACACACTACT	
	pol	pol1	primer	+	ATTAGCAGGAAGATGGCC	142
		pol2	primer	−	TACTCCTTGACTTTGGGG	
		pol probe	probe	−	CCACCAACAGGCGGCCTTAACCGTAGTACTGGTGAAATT	
	env	SK68	primer	+	AGCAGCAGGAAGCACTATGG	142
		SK69	primer	−	CCAGACTGTGAGTTGCAACAG	
		SK70	probe	+	ACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGT	
β-globin		PC03	primer	+	ACACAACTGTGTTCACTAGC	110
		PC04	primer	−	CAACTTCATCCACGTTCACC	
		19A	probe	+	CTCCTGAGGAGAAGTCTGC	

Fig. 1. Nucleotide sequence of oligonucleotide primers (probes) and their locations in the HIV-1 genome, primers and the probe of β-globin.
"+" primers (probes) are complementary to the minus strand, and "−" primers (probes) to the plus strand.

DU-7500(Beckman)を用いDNA量を測定し，DNA試料とした．なおPCRを実施するまで−50℃にて保存した．

3．PCRおよび特異的遺伝子の検出

PCRは，各抽出DNA 1 μgをとり，Perkin Elmer Cetus社のGeneAmpキットを用い，ASTEC PC-600にて95℃ 1分，53℃ 1分，72℃ 1分を1サイクルとして計50サイクル，最後のサイクル終了後さらに72℃ 5分反応させた．反応条件の設定は，陽性対照としたHIV-1感染Molt-4細胞由来のDNAを用いて行った．HIV-1ゲノムのLTR，env，pol領域をそれぞれ標的としたSK29／30，SK68／69[7]，pol 1／2[8]をプライマーとして使用した(Fig. 1)．反応終了後，反応液の一部を1.5%アガロースゲルで電気泳動した．アルカリ変性・中和後，バキュジーン(Pharmacia LKB)を用いてナイロン膜(Hybond-N，Amersham)に転写し，紫外線(320nm，UVランプ)を5分間照射し固定した．転写したナイロン膜は，ジゴキシゲニン-dUTPでラベルしたプローブとハイブリダイズさせた後，Nucleic Acid Detection Kit (Boehringer Mannheim)を用いて検出した．プローブは，LTR用にSK31，env用にSK70[7]，pol用にpol probe[8]を使用した(Fig. 1)．

ハイブリダイゼイションの条件については，Tm(℃)＝69.3＋0.41(G＋C)%−650／L式から各プローブのTm値を算定し，Tm−(10〜20)(℃)の温度でハイブリダイズさせた．

標識プローブは，DNAテイリングキット(Boehringer Mannheim)を用いて，各プローブの3'末端側をジゴキシゲニンでラベルして調製した．β−グロビン用のプライマー，プローブ[6]は，PCRの内部コントロール用として用いた(Fig. 1)．なお，使用したすべてのプライマーおよびプローブはメーカー(TaKaRa，東洋紡エンジニアリング)に注文し合成させた．

結　果

1．血餅からのDNA抽出

検体各々の総白血球数などは不明であるが，約3 gの血餅より平均45 μgのDNAが抽出できた．血餅から抽出したDNAが，PCR法に使用できるか否か，β−グロビン遺伝子をPCRで増幅させて検討した．サザンブロット後ジゴキシゲニン系を用いて発色させた結果，個々のシグナルに若干の差は認められるものの，すべての検体で特異的バンドが検出できた(Fig. 2)．血餅から抽出したDNAがこのPCRの使用条件下で働き，ジゴキシゲニンを標識したプローブで検出できることを示すものである．

2．血餅DNA標品からのHIVゲノムの検出

PCR法によりHIV-1のLTR，pol，env領域の増幅を行い，それぞれジゴキシゲニンを標識したプローブによるHybridizationで検出した．その結果，HIV-1感染Molt-4細胞では使用した3領域すべてで陽性であった．HIV-1抗体陽性者では，env領域で2例中1例，LTR領域で2例中1例が陽性であったが，pol領域ではいずれの検体においても特異的バンドは検出できなかった．P24IWBではenv領域において4例中2例が陽性であった(Fig. 3)．しかしP17IWB 6例および健康人7例はいずれの領域においても陰性であった．

考　察

P24IWBの約3%が3カ月〜2年後に陽転化することが知られている[1−3]．Jacksonら[9]は供血者の中でHIV感染のリスクファクターがないが，EIA法陽性例にP24IWBを多く認めている．これらの例についてPCR法で検討した結果，全てが陰性であったと報告している．一方，リスクファクターがありEIA法で陰性と判定されたP24IWBの中にはPCR法陽性例も報告されている[10]．このようなP24IWB例のフォローアップを行なうか否かを決定する場合，諸外国ではHIV-1感染に対するリスクファクターの有無が参考とされている．しかしながら，東京都では1989年より問診表を廃止したため，HIV-1感染に対するリスクファクターの有無を知ることができない．そこで，P24IWBの場合は3カ月後再検査という成績を出し，抗体の推移を追跡している．しかし，一般には再検査のため再度保健所へ来所する人は極めて少なく，その後の経緯は不明なことが多い．

今回，著者らは遺伝子診断法のPCR法を用いて，リスクファクターの不明なP24IWBの血餅からDNAを抽出しHIV-1ゲノムの検出を試みた．その結果，P24IWB例の一部にenv領域で陽性が認められた．この結果がそのままHIV-1による感染を意味するとは現在のところ言及できない．PCR法陽性のP24IWBについては今後も引き続き判定保留例として慎重な対応をした上で，しかるべき判断を下すべきものと考えられる．P24IWBのPCR法陰性例についてはHIV-1陰性として取り扱っても良いことが示唆される．なお，P17IWBについては，最近，WHOの報告においてもフォローアップは不必要とされている[2]．この点については著者らの実験結果とも一致している．

一方，PCR法によるHIV-1の診断ではHIV-1ゲノ

ムの2領域に陽性結果が認められた場合は陽性とし，1領域のみ陽性の場合は判定保留としている(D. Imagawa私信)．もしこの定義に従えば，本実験に供試した抗体陽性2例およびP24IWBにおいてもPCR法で判定保留という結果となった．その理由として，実験に供試した血餅抽出DNA 1 μg中に占めるリンパ球由来のDNA含量，およびジゴキシゲニンを用いた検出系の感度が考えられる．血餅の場合，HIV-1の標的でない数多くの分核球や赤芽球なども共存するため，抽出DNA 1 μgあたりのリンパ球由来のDNA含量が低いことが挙げられる．

今後，検査レベルで血餅からPCR法によりHIV-1を検査する場合は，1コピー程度のウイルスゲノムを検出できるプライマーの選択およびPCR法の改良が必要である．

現在，著者らはこれまでに用いられて来たPCR法を改良し，二段階PCR法によるHIV-1ゲノムの検出法を検討中である．この方法を用いることにより，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．血餅から抽出したDNAを材料にPCR法を用いてβ-グロビン遺伝子領域の増幅を行い，サザンブロット後，非放射性のジゴキシゲニン標識プローブによるHybridizationで検出した．その結果，血餅から抽出したDNAでもβ-グロビン遺伝子の検出が可能であった．

2．HIV-1抗体陽性例，WB法判定保留例の血餅抽出DNAを用いてHIV-1のLTR，pol，env領域のPCRを行った後，非放射性のジゴキシゲニン標識プローブによるHybridizationで検出した．その結果，HIV-1抗体陽性例ではenv領域で2例中1例陽性，LTR領域で2例中1例陽性であった．WB法判定保留例ではenv領域で4例中2例にHIV-1様ゲノムの存在を示唆する結果を得た．

(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，本研究の概要はエイズ研究会第4回学術集会，ウイルス学会第38回総会で発表した．)

文献

1) *MMWR*, 38, Suppl S-7, 1-7, 1989
2) *Weekly Epidemiological Record, WHO*: **65**, 281-288, 1990
3) Kleinman, S., Fitzpatrick, L., Secord, K. et al.: *Transfusion*, **28**, 280-282, 1988
4) 大貫奈穂美，貞升健志，関根大正，太田建爾，藪内 清，三木 隆：東京衛研年報，**41**，16-21，1990
5) Imagawa, D. T., Lee, M. H., Wolinsky, S. M. et al.: *N Engl J Med*, **320**, 1458-1462, 1989
6) Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T. et al.: *Nature*, **324**, 163-166, 1986
7) Ou, C-Y., Kwok, S., Mitchell, S. W., Mack, D. H. et al: *Science*, **239**, 295-297, 1988
8) 中永和枝，吉原なみ子：免疫と血液，**11**，113-119，1989
9) Jackson, J. B., MacDonald, K. L., Cadwell, J. et al: *N Engl J Med*, **322**, 217-222, 1990
10) Wolinsky, S. M., Rinaldo, C. R., Kwok, S. et al: *Ann Intern Med*, **111**, 961-972, 1989

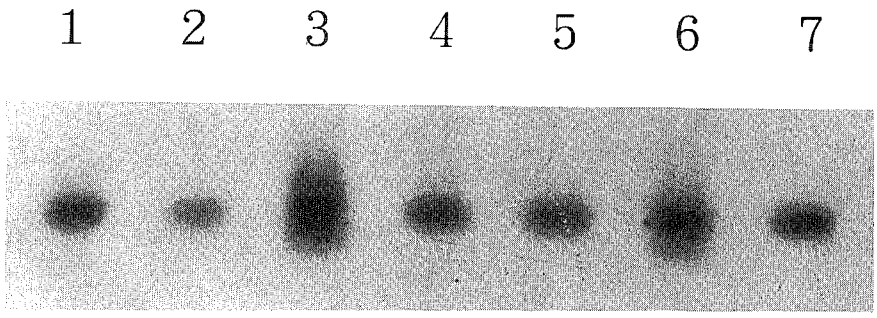


Fig. 2. Detection of β-globin gene in blood clots from seven healthy individuals using the labeled probe (19A) with digoxigenin-dUTP after amplification with PC03/PC04 primer pair.

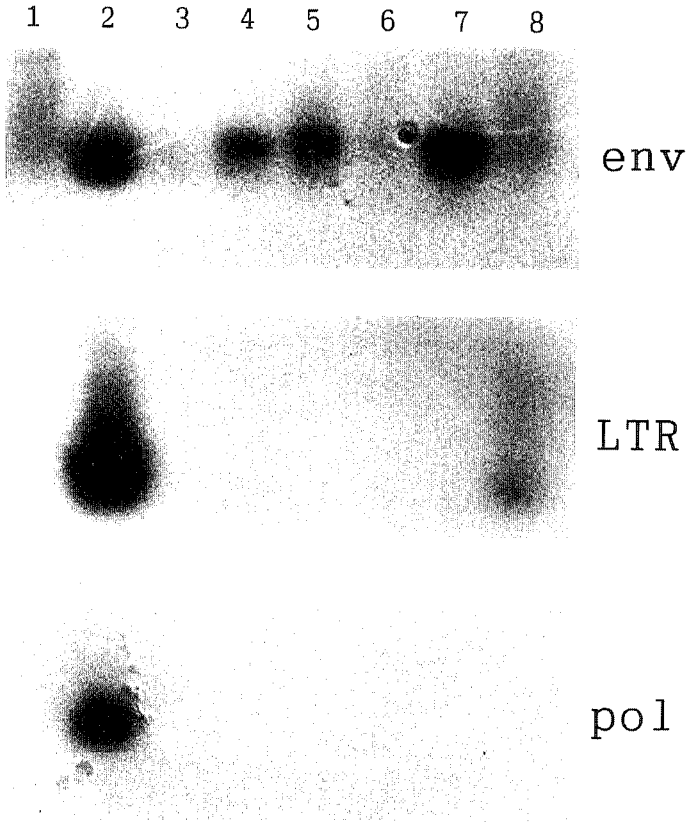


Fig. 3. Detection of HIV-1 proviral DNA in blood clots using labeled probes with digoxigenin-dUTP after amplification with three different primer pairs.
1 ; sero-negative, 2 ; Molt4/HIV, 3-6 ; p24 indeterminate,
7 & 8 ; sero-positive.

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.*,**42**, 15-20, 1991

軟膏中アラントインのジフェンヒドラミンによる配合変化

萩原輝彦，秋山和幸

Imcompatibility of Allantoin caused by Diphenhydramine in Ointment

TERUHIKO HAGIWARA and KAZUYUKI AKIKAWA

The stability of allantoin in the ointment added together with diphenhydramine was studied by an accelerated test (40°C, 80% RH). After 6 months, the concentration of allantoin decreased to ca. 34% of its initial amount. However, if added together with diphenhydramine hydrochloride, allantoin in the ointment was stable for the accelerated test period. The time course of the remaining allantoin followed the second-order reaction equations. It was observed that this incompatibility between allantoin and diphenhydramine occurred only in the hydrophilic ointment.

Keywords：アラントイン allantoin，ジフェンヒドラミン diphenhydramine，親水軟膏 hydrophilic oiniment

緒　言

アラントイン(5-Ureidohydantoin)(Fig. 1)は抗炎症作用，肉芽形成促進作用を有するとされ，市販軟膏や点眼薬の処方に加えられている．製剤処方の内容により，アラントイン含量は低下する可能性があるとされているが，詳細は明らかにされていない[1]．軟膏中のアラントイン定量法には，比色法[2]，螢光法[3]及び高速液体クロマトグラフ(HPLC)法[1,4,6]などが知られている．測定原理として，アラントインの加水解分解物であるグリオキシル酸を基質とする比色法[5]を用いる場合は含量規格に適合するが，著者らが開発したHPLC法には，不適合となる軟膏がみられた．このため，親水軟膏を基剤とする軟膏を試作し，配合薬であるジフェンヒドラミンとの関連において，軟膏中アラントインの安定性を加速試験により検討した．同様に，市販軟膏及び点眼薬についても加速試験や水分定量を行ったところ，アラントインの含量低下原因が明らかになった．この時検討し，新たに開発した定量法も併せて報告する．

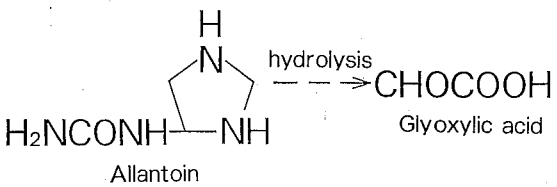


Fig. 1.

実験の部

1)試薬及び装置

親水軟膏：山田製薬，日本薬局方品．ジフェンヒドラミン：塩酸ジフェンヒドラミン(東京化成)30gを100mlの水に溶解し，8規定水酸化ナトリウム試液5mlを加える．析出した塩基を，ジエチルエーテル50mlずつで3回抽出する．エーテル層を分取し，水30mlずつでフェノールフタレイン試薬が赤色を呈さなくなるまで洗う．このエーテル層を5gの無水硫酸ナトリウムで乾燥後，エバポレターでエーテルを留去してジフェンヒドラミンを得る(用時調整)．

内標準溶液：150mgのパントテン酸カルシウムに水を加えて溶解し500mlとしたもの．その他，ことわりのない試薬は，関東化学㈱製の試薬特級を用いた．

2)試作軟膏Ⅰ，Ⅱ及びⅢ

Table 1に示した処方に従い，100gの親水軟膏にアラ

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

ントイン，ジフェンヒドラミン及び塩酸ジフェンヒドラミンを加え，よく混和して試作軟膏Ⅰ，Ⅱ及びⅢを調整しプラスチック製の軟膏つぼに小分けした．

Table 1. The prescriptions of ointment for the experiments.

Ointment		
Ⅰ	Allantoin	0.5g
	Diphenhydramine	0.9g
	Hydrophilic Ointment	100g
Ⅱ	Allantoin	0.5g
	Diphenhydramine Hydrochloride	0.9g
	Hydrophilic Ointment	100g
Ⅲ	Allantoin	0.5g
	Hydrophilic Ointment	100g

3)加速試験

試作軟膏Ⅰ～Ⅲを加速試験器(ヤマト科学製，IG-41型)に，温度40°C，相対湿度(RH)80%で6箇月間保存した．また，アラントインとジフェンヒドラミンを含有する市販軟膏A～J及び，ジフェンヒドラミンを含まない製剤K～Oも加速試験器中に同じ条件で保存した．対照として，試作軟膏Ⅰ～Ⅲ及び市販軟膏A～Jを実験室内の成行き温度で保存したものを用いた．

4)試作軟膏の定量

0.05gの試作軟膏(アラントインとして，0.25mg対応量)を50ml遠心管に精密に量り，20mlのクロロホルムを加え，振とうして軟膏を分散させる．この液に，正確に内標準溶液2ml及び水3mlを加え5分間振とうし，遠心(3000rpm，5分間)して上澄液を試験溶液とする．別に，105℃で2時間乾燥し，シリカゲルデシケータ中で放冷したアラントイン約25mgを精密に量り，水にとかして正確に200mlとする．この液2mlを正確に量り，内標準溶液2mlを正確に加え，水で5mlとした液を標準溶液とする．試験溶液及び標準溶液10μlずつをHPLCに注入して，内標準溶液に対するアラントインのピーク面積比AT及びASを求める．

軟膏中のアラントイン量(mg／g)＝標準品の量(mg)×(AT／AS)×(1／w)

w：試料採取量(g)

5)市販軟膏の定量

アラントインの処方量が多く希釈が必要な場合は，一定量の試料を精密に量り，クロロホルム20mlで分散させ，水5mlを正確に加え5分間振とうし遠心する，この上澄液を必要により正確に希釈して，この液2mlを正確に量り内標準溶液2mlを正確に加え，水で5mlとした液をHPLCに注入して，試作軟膏と同様にアラントイン含量を算出する．

6)軟膏中の水分定量

約50mgの軟膏を精密に量り，20mlの脱水溶媒(油類用CM，三菱化成)を加え，スターラーで分散させた後，カールフィシャー法により軟膏中の水分含量を求めた．

7)HPLCの測定条件

カラム：TSK-gel SCX 6mm i. d. ×15cm(東ソー)．移動

Chart 1. The procedure for determination of allantoin in ointment.

Take a portion of ointment equivalent to 0.25mg of allantoin.

|

Add 20ml of chloroform and shake vigorously till the ointment disperses.

|

Add 2ml of the internal standard solution* and 3ml of water.

|

Shake vigorously for 5min and centrifuge for 5min (3000rpm).

|

Inject 10μl of the supernatant on to HPLC apparatus.

*Internal standard solution: Calcium pantothenate in water (750mg→1000ml)

(HPLC conditions)

Column; TSK-gel SCX, 6mm i. d. x 150mm (TOSOH) Mobile phase; 1/15M Potassium Dihydrogenphosphate. Flow rate; 0.5ml/min. Column tem.; 40°C. Detection; UV 210nm. Sens.; 0.16 AUFS. Rec. out; ATTx3. Inj. vol.; 10μl.

相：1／15Mリン酸－カリウム．流速：0.5ml／min．カラム温度：40° C．検出：UV 210nm．感度：0.16AUFS×Rec. out ATT 3．注入量：10 μl

結果及び考察

1)アラントインの定量について

検量線 0.05-0.5mg(n＝6)のアラントインに内標準溶液2 mlを正確に加え，水で5 mlとした液10 μlずつをHPLCに注入し，内標準物質にたいするアラントインのピーク面積比を測定して検量線を作製した．最小二乗法による検量線はY＝0.271X-0.001(r＞0.99) X：ピーク面積比 Y：アラントインの量(mg／5 ml)ほぼ，原点を通過する検量線が得られた．

回収率 約500mgのアラントインを精密に量り，親水軟膏を加えて500gとし，よく混和して添加回収試験用軟膏を作製した．これを本定量法によりアラントインの定量を行った(n＝6)．平均：101.5%，偏差(σ_{n-1})：1.11%，相対標準偏差：1.1%と良好な結果をえた．

軟膏中のアラントイン定量法としてSawickii試薬[5]による比色法及び塩酸フェニレフリンによる発蛍光法[3]などが，知られている．いずれもアラントインを加水分解して生成するグリオキシル酸(Fig. 1)を測定するものであり，アラントイン分解物を量り込む可能性がある．Kawaseら[1]はHPLC分離後，ポストカラム反応によりアラントインのUV測定をしているが，その操作は煩雑である．石原ら[4]は相楽ら[6]の生薬中アラントインのHPLC条件を軟膏中アラントインの測定に応用したが，試料採取量が5 g(アラントインとして2.5mg)と多量を要し，また，特殊な高速遠心機が必要である．しかし，今回新たに開発したHPLC法は，軟膏からアラントインを内標準法により簡単な液－液分配で定量的に抽出する方法で，精度よく測定することができる．

2)試作軟膏の加速試験

塩酸ジフェンヒドラミンとアラントインが配合されている軟膏Ⅱでは40° C，80%RHの加速試験条件(AC条件)及び実験室内の成行き温度条件(RT条件)のいずれにおいても，アラントイン含量は3箇月で軟膏作製時の94%，6箇月で91%であり保存条件による差はみられず，また含量はほとんど低下していない(Table 2)．これは，

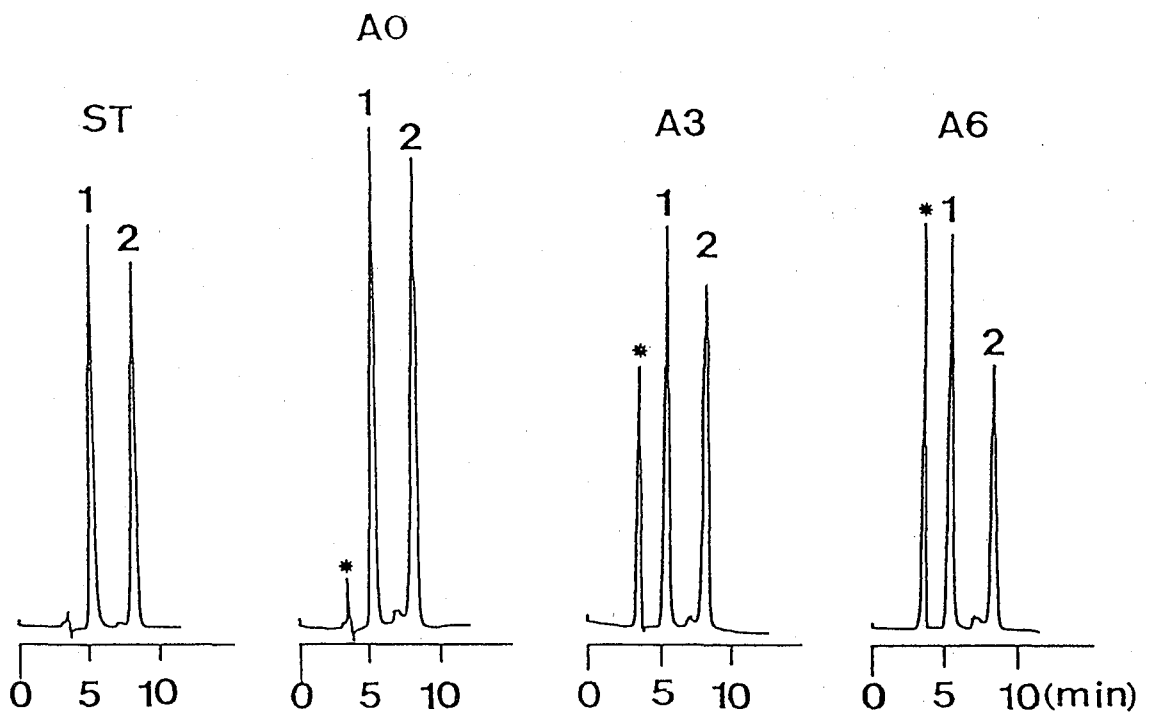


Fig. 2. Chromatogram of allantoin in the ointment. Typical chromatogram of authentic allantoin standard (ST). Chromatogram of ointment A at the beginning of accelerated test (AO), 3 month later (A3) and at the end of the test for 6 month (A6). Peak: 1; IS (Calcium pantothenate). 2; allantoin. *; Degradation product of allantoin.

Table 2. Amount of remaining allantoin in the ointment Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ during accelerated test (AC).

Periods of AC	3 month		6 month	
Condition	AC	RT	AC	RT
Ointment Ⅰ	55	75	34	70(%)
Ointment Ⅱ	93	94	91	93
Ointment Ⅲ	94	94	92	94

AC：40°C, 80% RH　　RT：Room temperature

The amount of allantoin in the ointment at the beginning corresponds to 100 percent.

対照としてアラントインのみを親水軟膏に混和した軟膏Ⅲと比較しても差はみられない．すなわち，塩酸ジフェンヒドラミンはアラントインに対し，配合変化を起こしていないことがわかる．一方，ジフェンヒドラミン(遊離塩基)とアラントインを混和した軟膏Ⅰでは，保存3箇月でAC条件55%及びRT条件75%，保存6箇月で，AC条件34%，RT条件70%程度となり，いずれも含量低下が著しい．すなわち，アラントインは親水軟膏中でジフェンヒドラミンにより配合変化をうけることが明らかとなった．

3)軟膏中配合変化の反応次数と半減期

軟膏中の配合変化に関する報告は少ない．プレドニゾロンのジフェンヒドラミンによる分解は報告[7]されているが，反応次数については検討されていない．試作軟膏Ⅰを用いて経時的にアラントインの濃度［A］を測定し，その分解反応次数の推定を試みた．経過日数に対するアラントイン測定濃度の逆数1／［A］のプロットはよい直線性を示した(Fig. 3)．一般的に，時間に対する実測の濃度［A］の逆数1／［A］プロットが直線であればその反応は二次反応とされる．また，初濃度を変化させて分解試験を行わなくても反応次数が評価できる簡便法として，分解曲線の曲がり具合により反応次数を決定するKazragis法[8]がある．大草[9]の解説に準拠[10]してFig. 3より計算した加速試験の場合の反応次数はn＝2.01であった．以上より，AC条件で，試作軟膏Ⅰのアラントインはジフェンヒドラミンにより，二次反応にしたがって分解されることが推定された．これより計算したAC条件及びRT条件における反応速度定数K_{AC}，K_{RT}，半減期$t_{1/2AC}$，$t_{1/2RT}$及び貯蔵期間(アラントインの濃度が初濃度の90%残存する時間)t_{90AC}，t_{90RT}はそれぞれ以下のとおりであった．

反応速度定数　$K_{AC}=2.52\times10^{-3}(mg/g)^{-1}(日)^{-1}$,

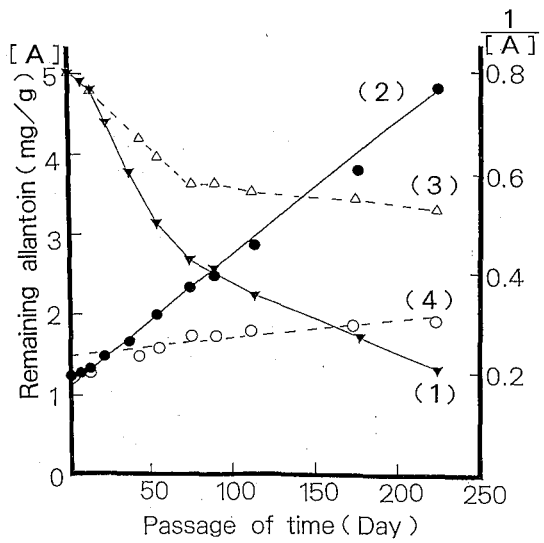


Fig. 3. Time course of the concentration of allantoin in the hydrophilic ointment containing diphenhydramine in the accelerated test (40°C, 80% RH) and in the laboratory at ambient temperature.
(1)▼：Accelerated test, [A] vs. time.
(2)●：Accelerated test,1/ [A] vs. time.
(3)△：Ambient temperature in laboratory, [A] vs. time.
(4)○：Ambient temperature in laboratory, 1/[A] vs. time.

$K_{RT}=3.28\times10^{-14}(mg/g)^{-1}(日)^{-1}$,

半減期　$t_{1/2AC}=79$(日)，$t_{1/2RT}=683$(日)

貯蔵期間　$t_{90AC}=8.8$(日)，$t_{90RT}=76$(日)．

4)市販軟膏について

医薬品として市販されている軟膏15種類，リニメント

2種類に，アラントインとジフェンヒドラミンは共通して処方に加えられている[11]．このうち，10種類について6箇月のAC条件による加速試験を行った．対照として試作軟膏の場合と同様に，同じロットの製剤をRT条件で保存した．製造年月日は不明であるが，軟膏2種類及びリニメント2種類は，製剤入手時に含量規格基準の90%を下回っていた(Table 3)．軟膏G及びHを除き，AC条件の6箇月間で市販軟膏のアラントイン含量は22-59%と低下し，リニメントでは，定量限界の1%以下(対表示量比)となった．RT条件で保存した市販軟膏では，軟膏G及びHのアラントインの含量に変化はないが，その他の製剤では入手当初より減少した．軟膏A及びBもアラントイン含量は90%程度となり，時間の経過にしたがい含量規格基準を割り込む可能性は否定できない(Table 3)．

軟膏G及びHは，100g中にアラントイン(G：0.2g，H：1g)及びジフェンヒドラミン(G：1g，H：0.5g)で，他の軟膏も，両成分が同様に軟膏100g中に0.2g-1.0g配合されている．しかし一方で，軟膏G及びHの水分含量は，2－3%である．これは，アラントイ

Table 3. Determination of allantoin for the marketing preparations, in which both allantoin and diphenhydramine were prescribed, during the accelerated test (AC) and storage test (RT)[1]

Preparation	Allantoin content (%)[2]				Water content(%)[3]
	Beginning	AC 3 month	AC 6 month	RT 6 month	
Ointment A	103	59	39	90	51
Ointment B	98	52	22	90	56
Ointment C	78	53	40	78	51
Ointment D	86	56	40	84	51
Ointment E	96	77	34	67	55
Ointment F	91	74	59	77	46
Ointment G	102	104	104	103	1.7
Ointment H	98	97	98	98	3.0
Liniment I	58	7	ND[4]	5	75
Liniment J	58	8	ND[4]	5	74

1) Stored at ambient temperature in laboratory.
2) The amount of allantoin in the label claim of preparation corresponds to 100%.
3) The water content of the ointment was determined by the Karl Fischer titration.
4) ND： Below one percent of the label claim.

Table 4. Determination of allantoin during the accelerated test (AC) of the preparations on the market, in which diphenhydramine was not prescribed.

Preparation	Period of AC			Water content
	Beginning	3 month	6 month	
Ointment K	95	96	95(%)	1.4(%)
Ointment L	99	97	97	1.5
Ointment M	105	103	105	53
Eye lotion N	95	94	92	UD
Eye lotion O	96	94	94	UD

UD：Determination was not accomplished.

ン含量の低下が認められた軟膏の水分含量45－55％に比べて明らかに低い．また，さらに水分含量の高いリニメントⅠ及びJでは，アラントイン含量の低下が，より著しいことを総合すると，水がアラントインの分解に関与していることが結論される．また，ジフェンヒドラミンを含まない市販軟膏3種類及び点眼薬2種類を6箇月間のAC条件で保存した．その結果，水分含量が少ない軟膏K，Lはもちろん，水分含量が，53％の軟膏Mもアラントイン含量に変化はみられず，さらに，水分含量の多い点眼薬でも変化は認められなかった(Table 4)．これらの結果からジフェンヒドラミンが存在しない場合は水分含量の多少にかかわりなく分解は起こらないことが結論される．Kawaseら[1]は，処方内容により製剤中アラントインの安定性は左右されると報告している．しかし，アラントインの安定化に寄与する処方内容の詳細は明らかにしていない．

以上，要約すると，1)軟膏中のアラントインはジフェンヒドラミン塩基との配合により分解することを認めた．2)その分解反応は二次反応であり，軟膏中の水分含量により影響されることを認めた．3)ジフェンヒドラミン塩基でなく，塩酸塩を配合した場合は分解反応は進行しないことを認めた．

なお，アラントインの分解生成物については検討中である．(本研究の概要は日本薬学会第110年会1990年8月で発表した．)

文　献

1) Kawase J., Ueno H., Nakae A., Tsuji K.: *J. Chromatogr.*, **252**, 209-216, 1982
2) Vogels G. D., Drift C.: *Anal. Biochem.*, **33**, 143-157, 1970
3) 海東常敏，相楽和彦，伊藤裕二，中村香能美，安茂俊夫：薬誌**97**，165-170，1977
4) 石原朗子，小原由子，阿部禎弘：徳島県製薬指導所事業報告，**18**号，17-20，1989
5) 井上哲男，立沢政義：薬剤学**30**，77-80，1970
6) 相楽和彦，須藤桂一，吉田継親：生薬学雑誌，**42**，268-271，1988
7) 内藤俊一，後藤サユリ，岡田忠三，菊森清忠，進藤健治：薬剤学**31**，304-309，1971
8) Kazragis, A: *Z. Fiz. Khim.* **40**, 1220-1223, 1966
9) 大草直也：医薬品速度論，第6章，山名月中編，1979，南江堂
10) 辻　彰，南　秀実：医薬品の開発，後藤　茂編，第16章，P155-212，1990，広川書店(東京)
11) 日本医薬情報センター編，日本医薬品集(一般薬)，第4版，1989，薬業時報社(東京)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 21-26, 1991

修治による生薬成分への影響(第1報)
各種修治地黄中のフェネチルアルコール配糖体成分の分析

瀬戸隆子*, 安田一郎*, 浜野朋子*, 高野伊知郎*,
高橋奈穂子*, 渡辺四男也*, 秋山和幸*

Processing Influence on the Constituents of Crude Drugs (I)
Analysis on the Phenethyl Alcohol Glycosides in Various Processed Roots of Rehmannia glutinosa

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

Rehmannia root is called Jio in Japanese (Di-fuang in Chinese), and in China the processed roots of *Rehmannia glutinosa* are divided into some classes of Jio having their own clinical uses: Sen-jio (Xian-di-fuang, fresh material), Kan-jio (Gan-di-fuang, sun-dried or heat-dried material of Sen-jio) and Juku-jio (Shu-di-fuang, steamed in liquor and sun-dried material of Kan-jio). Some kinds of Jio have been found to contain phenethyl alcohol glycosides including many bioactive compounds, the principals of which are purpureaside C and acteoside. So they were analyzed by HPLC and compared with various Jios. The peaks of the phenethyl alcohol glycosides on HPLC patterns had got lower from "Air-dried" jio prepared from Sen-jio by slicing and air-drying to Kan-jio, further Juku-jio. Contents of purpureaside C and acteoside were determined on three kinds of Jio. "Air-dried" jio (n=2) had the values 1.84 mg/g for purpureaside C and 3.59 mg/g for acteoside. The amounts of purpureaside C in Kan-jio (n=10) and in Juku-jio (n=11) were 1 by 6 times and 1 by 12 times in "Air-dried" jio, respectively. Similarly, the amounts of acteoside in Kan-jio and Juku-jio were 1 by 7 times and 1 by 21 times in "Air-dried" jio.

Keywords：地黄 Di-fuang, カイケイジオウ *Rehmannia glutinosa*, プルプレアサイドC purpureaside C, アクテオサイド acteoside, フェネチルアルコール配糖体 phenethyl alcohol glycoside

緒　論

地黄は神農本草経に乾地黄として記載されて以来繁用される生薬で，中国ではカイケイジオウ *Rehmannia glutinosa* LIBOSCH の根を用い，生のままのものを鮮地黄，鮮地黄を陽干したものを乾地黄(生地黄)，酒を加えて蒸して仕上げたものを熟地黄と称している．これら修治法の異なる3種の地黄は効能も鮮地黄は「清熱凉血」，乾地黄は「凉血滋陰」そして熟地黄は「補血滋陰」と臨床上区別して使用されている[1]．これに対し日本では古来アカヤジオウ *Rehmannia glutinosa* var. *purpurea* MAKINO を用いていたが，現在はほとんど使われておらず，日本薬局方「ジオウ」は乾地黄，熟地黄両者を包含した規定となっており，同一処方にも中国産あるいは韓国産の熟地黄または乾地黄の両者が使用されている．近年地黄の成分と薬理作用が明らかにされてきており，数種のイリドイド配糖体に利尿作用[2]，瀉下作用[3]，血糖降下作用[4]，ストレス負荷マウスの学習行動を改善する作用[5]，膀胱及び尿道平滑筋収縮作用[6]，アルドースリダクターゼ阻

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

害作用[7]が，多糖類に血糖降下作用[8]が，また，フェネチルアルコール配糖体に免疫抑制作用[9]，5－リボキシゲナーゼ阻害作用[10]，アルドースリダクターゼ阻害作用[11]の生理活性が報告され，著者らも循環器系作用成分として乾地黄からadenosineを単離した[12]．これらの成分のうち，イリドイド配糖体については，生理活性を有するcatalpol[2,3,5]，aucubin[5]，rehmannioside B[6]，rehmannioside D[4]を含めてすでに各種地黄中の含量が調べられており[4]，また，著者らもadenosineについて定量を行った[12]．しかし，rehmannioside Dが変化しないことを除きいずれも熟地黄で減少しており，修治の目的をこれらの分析結果から説明し，品質評価に応用していくことは難しい．一方，actoside，purpureaside C[9,11]をはじめ10種以上の多くの生理活性物質を含むフェネチルアルコール配糖体類が熟地黄から分離されており，これらについてはまだ含量報告がされていないので，各種地黄中の含量について，高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分析を行い，成分の差異について検討を加えた．

実験方法

1．実験材料

鮮地黄 鮮地黄A：1988年韓国産カイケイジオウの新鮮根として入手した．径7～15mm，長さ7～17cmの棒状．類白色の切断面は空気に触れると黄変する．鮮地黄B：1988年長野県産カイケイジオウの新鮮根として入手した．径20～30mm，長さ10～17cm．外面は滑らかでやや黄褐色を帯びており紡錘形を呈す．類白色の切断面は空気に触れると黄変する．

乾地黄 乾地黄A～E：1988年中国産として輸入業者から入手した全形品．豊島病院乾地黄：1991年都立豊島病院使用薬剤，刻み品．中国北京市市場品乾地黄A，B：1990年北京市派遣研修時収集した刻み品．北京市中医医院乾地黄：北京市中医医院使用薬剤，1990年北京市派遣研修時収集した刻み品．中国河北省安国薬市市場品乾地黄：1990年北京市派遣研修時収集した全形品．

熟地黄 熟地黄A：1988年香港市場品．中国産として入手した刻み品．熟地黄B：中国産1988年輸入業者から入手した．熟地黄C：中国河南省産1988年輸入業者から入手した全形品．熟地黄D，E：韓国産1988年輸入業者から入手した全形品．衛生局東洋医学研究事業共通試料六味丸(散剤)(ロットNo.900830及びNo.901130)原料用熟地黄：ロットNo. FC032113(ウチダ)．1990年入荷品，中国河南省産．豊島病院熟地黄：1991年都立豊島病院使用薬剤，刻み品．北京市中医医院熟地黄：北京市中医医院使用薬剤，1990年北京市派遣研修時収集した刻み品．中国北京市市場品熟地黄A，B：1990年北京市派遣研修時収集した刻み品．中国河北省安国薬市市場品熟地黄：1990年北京市派遣研修時収集した全形品．

炭地黄 北京市中医医院炭地黄：北京市中医医院使用薬剤，軽質，熟地黄を炒め処理したもので炭様，1990年北京市派遣研修時収集した全形品．

2．装置及び試薬

HPLC装置 分析用：880-PUシステム(日本分光製)，三次元用：MULTI-340システム(日本分光製)

核磁気共鳴(NMR)装置 JEOL FX-270(日本電子製)

粉砕器 振動式粉砕器TI-100(平工製作所製)

TLC用プレート Kieselgel 60 F_{254}(メルク製)

カラム用充塡剤 シリカゲル：Kieselgel 60，230-400mesh ATMS(メルク製)，逆相用シリカゲル：Cosmosil 75C_{18}-OPN(ナカライテスク製)，Cosmosil 140 C_{18}-OPN(ナカライテスク製)，ポリスチレン樹脂：DIAION HP20(三菱化成製)，三菱ゲルCHP20P(三菱化成製)，分子ふるいゲル：Sephadex LH-20(ファルマシア製)

HPLCカラム TSKgel ODS-80TM，5 μm，4.6 i. d. mm×150mm(東ソー製)

NMR用試薬 重メタノール，テトラメチルシラン(メルク製)

3．フェネチルアルコール配糖体の分析

標準品の単離 熟地黄A 1 kgを刻み，50%メタノールで冷浸後ろ過．次にその残渣を70%メタノールで加温抽出し，その抽出液を前記のろ液と合する．減圧下メタノールを留去した後水を加えて1 lとし，DIAION HP20カラムに通導し，水洗後50%メタノール2.5 lで溶出させ，減圧留去する．残留物に水を加え，Cosmosil 140C_{18}-OPNカラムに付し，水溶出部を除いた後メタノールで溶出し，メタノールを留去する．このメタノール溶出部を水に溶解し，Sephadex LH-20カラムにより，水から順次メタノールを増加させた溶媒で溶出し分画した．この10%メタノール画分(A)及び20%メタノール画分(B)にTLC(プレート：Kieselgel 60 F_{254}，展開溶媒：酢酸エチル・エタノール・水＝8：2：1)で各々R_f値0.20，0.48に1%塩化第二鉄メタノール試液により緑色に呈色する物質が認められた．これらを画分Aから順次Cosmosil 75C_{18}-OPN(水－メタノール系，30%メタノール)，三菱ゲルCHP20P(水－メタノール系，40%メタノール)及びシリカゲル(クロロホルム・メタノール・水＝40：10：1)を用いたカラムにより，また，同様に画

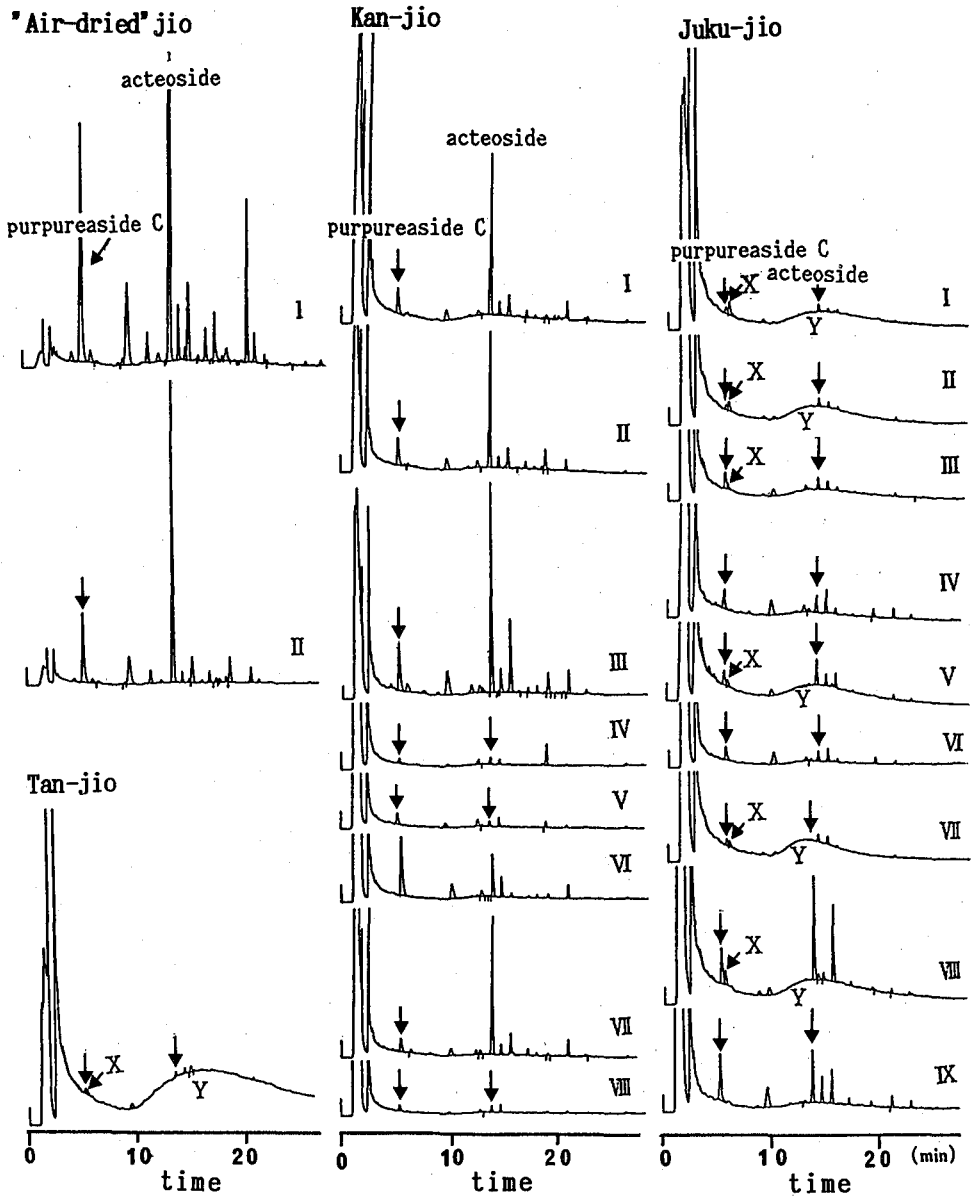


Fig. 1. HPLC Chromatograms of Phenethyl Alcohol Glycosides of Various Processed Jio

"Air-dried" jio(「風乾」地黄) : Ⅰ Prepared from Sen-jio (鮮地黄) A, Ⅱ Prepared from Sen-jio B.

Kan-jio (乾地黄) : Ⅰ Sample of Tokyo Metropolitan Toshima General Hospital, Ⅱ Sample from Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ⅲ Commercial Sample in Beijing City A, Ⅳ Commercial Sample in Beijing City B, Ⅴ Commercial Sample in Anguo (安国) Drugs Market, Ⅵ Kan-jio A, Ⅶ Kan-jio B, Ⅷ Kan-jio C.

Juku-jio (熟地黄) : Ⅰ Raw Material of Rokumigan (六味丸), Ⅱ Sample of Tokyo Metropolitan Toshima General Hospital, Ⅲ Sample from Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ⅳ Commercial Sample in Beijing City A, Ⅴ Commercial Sample in Beijing City B, Ⅵ Commercial Sample in Anguo (安国) Drugs Market, Ⅶ Juku-jio B, Ⅷ Juku-jio C, Ⅸ Juku-jio D.

Tan-jio (炭地黄) : Sample from Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine.

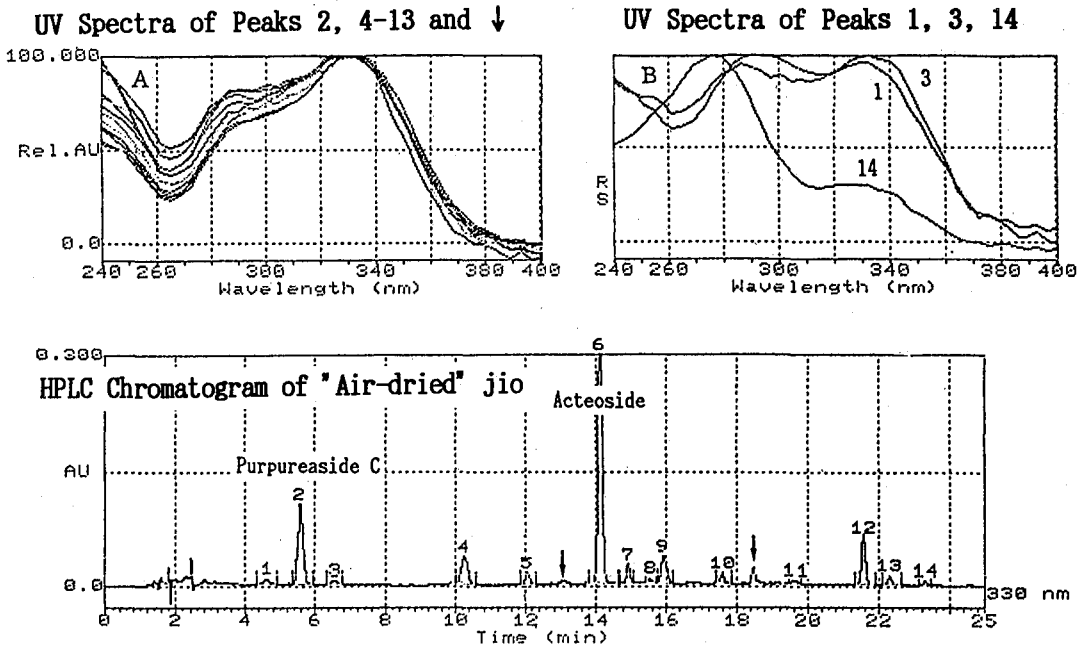


Fig. 2. HPLC Chromatogram of "Air-dried" jio Prepared from Sen-jio A and UV Spectra of the Each Peak

分Bから三菱ゲル CHP20P(水－メタノール系，40%メタノール)シリカゲル，(酢酸エチル・エタノール・水＝20：3：2及びクロロホルム・メタノール・水＝40：10：1)を用いたカラムにより単離精製し，それぞれ ^{13}C-NMR データが文献値[9]と一致したことから，purpureaside C 及び acteoside と同定した．

HPLC 用試料の調製　鮮地黄は薄切りにして風乾したもの(「風乾」地黄)，乾地黄及び熟地黄は刻んだものそれぞれ2gを50%メタノール20ml と共に振動式粉砕機の試料カップにいれ粉砕し，50%メタノールでメスフラスコに洗い込み，100ml にメスアップ，30分間超音波処理後，0.45μm のフィルターでろ過し HPLC 試料液とする．

HPLC 条件　カラム：TSKgel ODS-80T$_M$，15cm，移動相(グラジェントモード)：0.05%リン酸を含む水・アセトニトリル混液のアセトニトリル濃度を，初期の5分間は15%，その後25分までの間に15%から35%へ直線的に上昇させ，以後30分まで同濃度で溶出させた．流速1ml/min，検出波長：UV330nm，試料注入量：20μl．定量はピーク高さから絶対検量線法により行った．

3次元 HPLC 条件　検出波長：UV210～450nm．その他は上記に同じ．

結果及び考察

Fig. 1 に各種地黄の HPLC クロマトグラムを掲げたが，「風乾」地黄，乾地黄，熟地黄のほか1検体ではあるが炭地黄が入手できたのであわせて分析した．t_R 5.4分のピークは purpureaside C，14.1分のピークは acteoside で，アルドースリダクターゼ阻害作用，免疫抑制作用の強い成分である．Fig. 2 は鮮地黄Aから調製した「風乾」地黄について3次元 HPLC を行い各ピークの UV スペクトルを調べたもので，330nm におけるクロマトグラムに現れた各ピークの有する UV スペクトルを図中A，Bに示した．これらのピークの内，1，3，14以外の2～13と↓で示したピークはいずれも purpureaside C，acteoside とよく似た UV スペクトルを有し，同族のフェネチルアルコール配糖体であることを示している．

これらフェネチルアルコール配糖体は「風乾」地黄では多く含まれ，個々にみれば個体差はあるものの乾地黄，そして熟地黄へと修治が行われるにしたがい全般に減少する傾向が見られた．主要成分である purpureaside C 及び acteoside について定量結果を Table 1 に示したが，平均含量は各々「風乾」地黄で1.84mg/g 及び3.59mg/g，乾地黄で0.27mg/g 及び0.47mg/g，熟地黄では0.16mg/g 及び0.17mg/g であった．各種地黄間で両成分の含量を相対的に比較するため，含量の最も低い熟地黄の平均値

Table 1. Comparison of purpureaside C and Acteoside Contents in Processed Rehmannia Roots

Processed Rehmannia Root	Purpureaside C			Acteoside		
	Minimum～Maximum	Average	[Ratio*]	Minimum～Maximum	Average	[Ratio*]
"Air-dried" jio(「風乾」地黄)** (n＝2)	0.82～2.87,	1.84mg/g	[12]	1.58～5.58,	3.59mg/g	[21]
Kan-jio(乾地黄) (n＝11)	0.14～0.70,	0.27	[2]	0.16～1.73,	0.47	[3]
Juku-jio(熟地黄) (n＝10)	0.02～0.52,	0.16	[1]	0.04～0.56,	0.17	[1]

*showed the ratios, the each average value of Juku-jio as "1"
**sliced and air-dried Sen-jio(鮮地黄)

を1として［ ］内に示したが，「風乾」地黄に比べ乾地黄，熟地黄では大変低く，乾地黄及び熟地黄中のpurpureaside C含量はそれぞれ「風乾」地黄中の1/6及び1/12，同様にacteoside含量は1/7，1/21であった．特にacteosideはpurpureaside Cに比べ減少率が高い傾向にあり，「風乾」地黄でHPLCクロマトグラムの主ピークであるのに対し他の成分より低いピークとなっている現象を反映していた．

一方，Fig. 1で熟地黄の特徴として，purpureaside Cのすぐ後に出現してくるピークXと，幅広くベースラインの高まりとして現れている部分Yがあり，この両者は同時に出現している傾向にある．Yは面積的にみればかなりの量である．このYは更に熟地黄を表面が焦げるほど炒めて仕上げる加熱処理の強まった炭地黄で特に顕著に現れた．

ここで用いた「風乾」地黄は鮮地黄を風乾したものであるが，厳密には鮮地黄と言うより乾地黄に近いと考えられ，乾地黄も実際には調製時に加熱もおこなわれ[13]，加熱の強いものはFig. 1の乾地黄Ⅳ，Ⅴ，Ⅷのようにフェネチルアルコール配糖体成分の減少を来し，また，熟地黄として十分に調製されたものはXやYが出現するともいえる．

結合糖の多いrehmannioside D(結合糖3個)は熟地黄でも殆ど分解せずに残るが，catalpol，aucubin，rehmannioside Bは鮮地黄から乾地黄，熟地黄へ調製するに従い減少することが報告[4]されている．すでに定量したadenosineも熟地黄では減少しており[12]，今回調査したフェネチルアルコール配糖体も含め，地黄の成分として報告されている多くの生理活性成分が熟地黄では減少していることが明らかとなった．しかしまた，今回の分析から，生理活性の有無は不明であるが熟地黄に新たに生成してくる成分の存在することも見いだされた．いずれにしても，修治により生理活性成分も含め，成分変化の生じていることは明らかである．しかし現在のところ，これらの成分の変動により，鮮地黄，乾地黄，熟地黄を臨床上区別して使用することを薬能に結び付けて十分に説明できるに至っておらず，修治の意義を反映する理化学的品質評価を目指す立場からはX，Yも含め，更に指標成分の解析を行うことが必要であると考えられるので，今後も引続き検討して行きたい．

結　語

今回，purpureaside C，acteosideを始めとするフェネチルアルコール配糖体類のHPLCパターン分析法を設定して，「風乾」地黄，乾地黄，熟地黄及び炭地黄中の含量を調査した．その結果，Fig. 1及びTable 1に示したようにpurpureaside C並びにacteoside等フェネチルアルコール配糖体は修治によって大幅に減少した．その「風乾」地黄の含量は各々1.84mg/g及び3.59mg/gで，乾地黄及び熟地黄中のpurpureaside C含量はそれぞれ「風乾」地黄中の1/6及び1/12，同様にacteoside含量は1/7，1/21であった．従って，地黄から報告されている生理活性成分のうちrehmannioside Dが変化しないことを除き，catalpol，aucubin，rehmannioside B，adenosineはいずれも熟地黄で減少すると報告されているので，熟地黄で高含量となる生理活性成分は見いだされていない．一方で，今回の分析に当たり，HPLCクロマトグラム上，熟地黄に新たに生成してくる成分も認められ，修治の化学的裏付けにこれらの物質の関与も可能性があり，熟地黄の品質評価の指標成分については更に検討が必要と思われた．

謝辞　本研究に当たり，各種地黄を御分与下さいました北京市中医医院，また，入手にご尽力下さいました㈱ウ

チダ和漢薬に感謝致します.
(本研究は，平成2年度衛生局東洋医学事業「六味丸(散剤)及び老人性疾患に繁用される生薬に関する研究」の一部として実施したものである.)

文　献

1) 中山医学院，神戸中医学研究会次編：漢薬の臨床応用，87，344，357，1979，医歯薬出版，東京.
神戸中医学研究会編：中医臨床のための常用漢薬ハンドブック，142-147，1987，医歯薬出版，東京.
2) 鈴木良雄：日薬理誌，**60**，550-555，1964.
3) 北川勲，西村正，古林安見子，吉岡一郎：薬誌，**91**，593-596，1971.
4) 大塩春治，成瀬義和，井上博之：生薬学雑誌，**35**，291-294，1981.
5) 今井孝司，貴志豊和，井上博之，西山信好，斉藤洋：薬誌，**108**，572-585，1988.
6) Yoshikawa, M., Fukuda, Y. and Taniyama, T.: *J. Pharm. Dyn.*, **10**, s53, 1987.
7) 西村浩昭，諸田隆，山口琢児，陳政雄：日本国特許庁公開特許広報，平2－96587，1990.
8) 遠藤勝也，松浦昭宏，金沢和夫，小野里敦雄，今野長八，ヒキノヒロシ：日本薬学会104年会講演要旨集，165，1984.
9) Sasaki, H., Nishimura, H., Morota, T., Chin, M. (Chen Zheng-xiong), Mitsuhashi, H., Komatu, Y., Maruyama, H., Tu Guo-rui and Xiong Yu-lang: *Planta Medica*, **55**, 458-462, 1989. 屠国端，何偉，佐々木博：日本国特許庁公開特許広報，平2－85211，1990.
10) 西村浩昭，諸田隆，柳沢利彦，陳政雄：日本国特許庁公開特許広報，平2－40394，1990.
11) 西村浩昭，諸田隆，山口琢児，陳政雄：日本国特許庁公開特許広報，平2－36189，1990.
12) 瀬戸隆子，秋山和幸，砂金信義，久保田和彦：和漢医薬学会誌，**8**(2)印刷中.
13) 上海科学技術出版社，小学館編：中薬大辞典，第一巻，349-352，1985，小学館，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 27-32, 1991

漢方製剤六味丸散剤の調製とその理化学的品質評価

安田一郎*, 浜野朋子*, 高野伊知郎*, 高橋奈穂子*
瀬戸隆子*, 渡辺四男也*, 秋山和幸*,
鈴木達夫**, 清水虎雄**, 山川洋平**

Preparation of Chinese Medicine "Rokumigan Powder" and its Physical and Chemical Evaluation

ICHIRO YASUDA*, TOMOKO HAMANO*, ICHIRO TAKANO*, NAHOKO TAKAHASHI*,
TAKAKO SETO*, YOHYA WATANABE*, KAZUYUKI AKIYAMA*,
TATUO SUZUKI**, TORAO SIMIZU** and YOUHEI YAMAKAWA**

Keywords：漢方薬 chinese medicine, 六味丸散剤 rokumigan powder, モロニサイド morroniside, ロガニン loganin, ペオニフロリン paeoniflorin, ペオノール paeonol, γ-アミノ酪酸 γ-aminobutyric acid, 定量分析 quantitative analysis, 品質評価 evaluation

緒　言

東京都衛生局では東洋医学事業の1つとして「老人性疾患に対する漢方薬の有効性」を共通テーマに，臨床，薬理，品質評価及び薬用植物の栽培研究を実施している．平成2年度は腎臓疾患に多用される基本処方，六味丸(散剤)が共通薬剤に選ばれ，著者らは本散剤の製造を担当することになった．そこで生薬鑑別試験による原料生薬の選品を行い，製剤化後，本散剤の医薬品としての均質性，安全性についての検討を行った．

臨床研究において，化学物質の生体機能に及ぼす影響を検定する実験系では，被検物質(医薬品)が一定の品質に管理されていることが実験の再現性を得る上で必須条件である．日本薬局方(以下日局と略す)では，化学薬品製剤の場合，含量規格として表示量±5％～±10％に規定されている．しかし，成分変動の激しい天産物である生薬を，簡単に配合しただけの漢方方剤は一定の品質の確保が難しく，そのため，医療用漢方エキス製剤で，指標成分含量の下限値が標準湯剤中の70％以上，含量規格幅は原則として中心値±50％とされている(昭和60年5月31日　厚生省薬務局薬審二第120号)にすぎない．そこで，原料を優良生薬各1ロットに定め，均質性確保を念頭に置きながら六味丸散剤の製造を行った．

製造された本散剤は，有効成分と言われているモロニサイド(MO)，ロガニン(LO)，ペオニフロリン(PN)，ペオノール(PL)，及びγ-アミノ酪酸(GABA)(図1)を

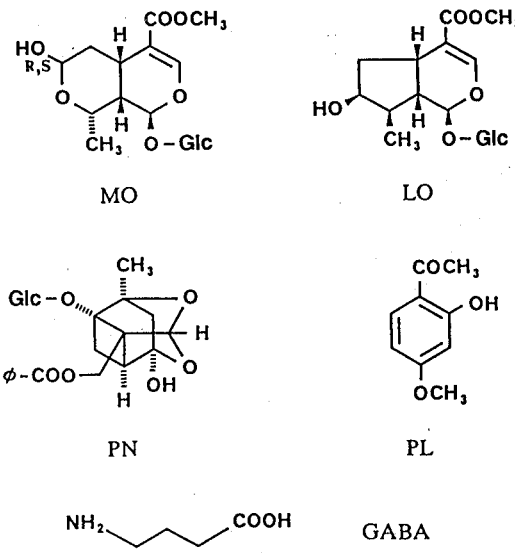


図1．モロニサイド(MO)，ロガニン(LO)，ペオニフロリン(PN)，ペオノール(PL)及びγ-アミノ酪酸(GABA)の化学構造

＊東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科　169 東京都新宿区百人町3－24－1
＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan
＊＊東京都衛生局薬務部薬事衛生課

指標成分とし分析するとともに，成分含量を総合的に判断できる希エタノール(50%エタノール)エキス含量を測定した．そして，これらの結果から本散剤が東洋医学研究用試料として品質的に充分か否かを判断した．

また，天産物である生薬から製造された本散剤に，有害物質が含まれている懸念があるため，有害物質の検索も同時に進めた．そのうち，農薬，かび毒及び放射能は当所食品研究科が担当し，既に報告している[1]ので，今回，有害金属について分析し，その安全性を考察した．

実験の部

(1)原料生薬

地黄　地黄には新鮮な生の根である「鮮地黄」(中国では「鮮生地」の名称で扱われる)，乾燥品である「乾地黄」(中国では「生地黄」の名称で扱われる)，酒を加えて蒸した「熟地黄」(中国でも「熟地黄」と呼ばれる)の3種類がある[2,3]．東洋医学では，補血の効に熟地黄が最も優れる[4]といわれていることから，六味丸(散剤)の原料として，熟地黄を用いた．

灰分 6.0%以下，酸不溶性灰分 2.5%以下の日局規格に適合する中国河南省産2ロット，内蒙古省産1ロット及び山西省産1ロット計4ロットの熟地黄のうち，外面が漆黒色で肥大し，大きさ，形の最もよく揃っている河南省産，ロット番号FC032113(ウチダ)を原料生薬とした．

山薬　乾燥減量 14.0%以下，灰分 6.0%以下，酸不溶性灰分 0.5%以下の日局規格に適合する中国河南省産2ロット，江蘇省産1ロット及び広西省産1ロット計4ロットの山薬のうち，重質で，外面に光沢があり，周皮の多くが除かれ，形状の最もよく整っている河南省産，ロット番号FC222616(ウチダ)を原料生薬とした．

山茱萸　灰分 5.0%以下，希エタノールエキス含量35.0%以上の日局規格に適合する韓国産山茱萸3ロットのうち，表面につやがあり，黒色を帯びることがなく，酸味も強く，また，果柄，種子等の異物をほとんど含まない，ロット番号FC032216(ウチダ)を原料生薬とした．

沢瀉　灰分 5.0%以下，酸不溶性灰分 0.5%以下の日局規格に適合する中国四川省産2ロット及び貴州省産1ロット計3ロットの沢瀉のうち，内部が充実して重質で，虫害を受けず，断面が淡黄色を呈し，香りの最も強い四川省産，ロット番号JA222210(ウチダ)を原料生薬とした．

茯苓　灰分 1.0%以下の日局規格に適合する中国雲南省産1ロット，四川省産1ロット及び北朝鮮産1ロット計3ロットの茯苓のうち，質が重く充実し，帯赤白色で粘り気と潤いのある雲南省産，ロット番号JA222623(ウチダ)を原料生薬とした．

牡丹皮　木部を5.0%以上，木部以外の異物を1.0%以上含まず，灰分 6.0%以下，酸不溶性灰分 1.0%以下の日局規格に適合する中国安徽省産3ロット及び韓国産1ロット計4ロットの牡丹皮のうち，香気が強く，太くて長く，形状が最もよく整った安徽省産，ロット番号FC223130(ウチダ)を原料生薬とした．

(2)六味丸(散剤)の製造及び保存

散剤の製造　それぞれの原料生薬は，都立豊島病院東洋医学外来で用いる六味丸(散剤)の割合(地黄8，山薬4，山茱萸4，沢瀉3，茯苓3，牡丹皮3)[5]に従って配合した．

製造量は，本東洋医学研究事業の薬理及び品質評価研究に充当する量 282.5kgとした．

作業は㈱ウチダ和漢薬大潟工場(新潟県中頸城郡)で2

表1．六味丸(散剤)No.900830及びNo.901130の原生薬と仕込量

生薬	産地	ロット番号	1回目仕込量(kg)*1	2回目仕込量(kg)*2
地黄(熟)	中国河南省	FC032113	76.0	28.0
山薬	中国河南省	FC222616	38.0	14.0
山茱萸	韓国	FC032216	38.0	14.0
沢瀉	中国四川省	JA222210	28.5	10.5
茯苓	中国雲南省	JA222623	28.5	10.5
牡丹皮	中国安徽省	FC223130	28.5	10.5
	仕込総量		237.5	87.5
	製品上がり量		206.0	76.5
	六味丸(散剤)ロット番号		No.900830	No.901130

＊1　製造期間は平成2年7月15日～30日．

＊2　製造期間は平成2年10月15日～30日．

回に分けて行い，平成2年7月15日から30日にかけ製造した散剤をロット番号900830，平成2年10月15日から30日にかけ製造した散剤をロット番号901130とした．

製造方法は，表1に示す原料生薬をそれぞれ個別に刻んだ後，全生薬を前述の配合比で合わせ，よく混和した．次にマキノ式粉砕器(マキノ産業)を用い，メッシュを替えながら，1回目粉末粒子径3mm以下，2回目1mm以下，3回目0.5mm以下，4回目0.1mm以下と，段階的に微細な粉末とし，散剤とした．これらは均一な試料となるように充分攪拌した．

散剤の保存　製造した散剤は直ちに500gまたは100gの着色プラスチック容器(材質は硬質ポリエチレン，ポリプロレン及びナイロンより成る)に乾燥剤(オゾ^{R}，㈱雪江堂)1個とともに充填し，ボトルインナーシールで気密状態とし，さらにプラスチックのキャップを施した．これらは10°C，暗所に保存し，薬理研究用には500g包装，品質評価研究用には100g包装及び500g包装を試料とした．

(3)分析用試料　六味丸(散剤)ロット番号900830のうち，100g入り容器に充填した試料100本に00から99の容器番号をつけた．次に乱数表を引き，00から99の100個の数列Aを作成した後，数列Aに従い初めから6本ずつ，16群と余り4本にグループ分けした．さらに乱数表を引き，01から16の16群の数列Bを作成し，数列Bの8番目の群の6本を定量分析用試料とした．また，粒度試験用及び金属分析用には，数列Aの97及び98番目の試料を用いた．

(4)粒度分布試験　日局製剤総則　11.散剤，粒度の試験の項[6]に従い，粒度分布を明らかにした．

(5)乾燥減量及びエキス含量　日局一般試験法生薬試験法の項[7]に従った．エキス定量には抽出溶媒として，希エタノールを用いた．

(6)モロニサイド(MO)，ロガニン(LO)，ペオニフロリン(PN)及びペオノール(PL)の定量

試料溶液の調製　試料約1.0gを精密に秤量し，希エタノール40mlを加えて20分間振とう抽出を行った．遠心分離後上澄液を分取し，残留物に希エタノール25mlを加えて同様の操作を2回繰り返した．上澄液を合し，希エタノールで正確に100mlとした後，0.45μmのフィルターを通し試料溶液とした．

標準溶液の調製　MO(栗田工業製)約3.00×10^{-2}，LO(栗田工業製)約2.00×10^{-2}，PN(松浦薬業製)約3.00×10^{-2}，PL(小城製薬製)約3.50×10^{-2}mg/mlとなるよう4成分混合希エタノール溶液を調製し，標準溶液とした．

検量線の作成　標準溶液を希エタノールで希釈して，最低濃度1/25希釈液までの5段階標準系列を調製した．その10μlをHPLC(日本分光製)に注入し，4成分各々について得られたピーク高さから検量線を作成した．

HPLC条件　カラム；TSKgel ODS-12OT，4.6mm I.D.×250mm，5μm，移動相；水・アセトニトリル混液，(90：10)→(74：26)→(40：60)ステップグラジェント(図2)，検出;紫外部230nm(0～18min)，270nm(18～25min)，流速；1.0ml/min，温度；45°C，感度；0.16AUFS，注入量；10μl．

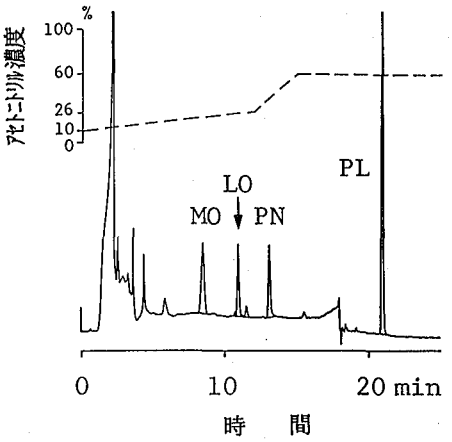


図2．六味丸(散剤)のHPLCクロマトグラム
MO：モロニサイド　LO：ロガニン　PN：ペオニフロリン　PL：ペオノール
HPLC条件：カラム；TSKgel ODS-120T：4.6mm I.D.×250mm，5μm，移動相；水・アセトニトリル混液，(90：10)→(74：26)→(40：60)ステップグラジェント，検出；紫外部230nm(0～18min)，270nm(18～25min)，流速；1.0ml/min，温度；45°C，感度；0.16AUFS，注入量；10μl．

(7)γ-アミノ酪酸(GABA)の定量

試料溶液の調製　試料約2.0gを精密に秤量し，水40mlを加えて30分間振とう抽出を行った．遠心分離後上澄液を分取し，残留物に水25mlを加えて同様の操作を2回繰り返した．上澄液を合わせ，0.2N塩酸10mlを加え，水で正確に100mlとした後，0.45μmのフィルターを通し，試料溶液とした．

標準溶液の調製　GABA約20.0mgを精密に秤量し，水に溶かして正確に50mlとし，標準溶液とした．

検量線の作成　標準溶液を水及び0.1N塩酸溶液で希釈して，0.02N塩酸溶液中GABA 1～50μg/mlの標準系

列を調製した．その50 μl を835形自動アミノ酸分析計（日立製）に注入し，得られたピーク高さから検量線を作成した．

分析方法　試料溶液50 μl を自動アミノ酸分析計に注入し，高分離分析マニュアル[8]により1サイクル140で分析を行った（図3）．

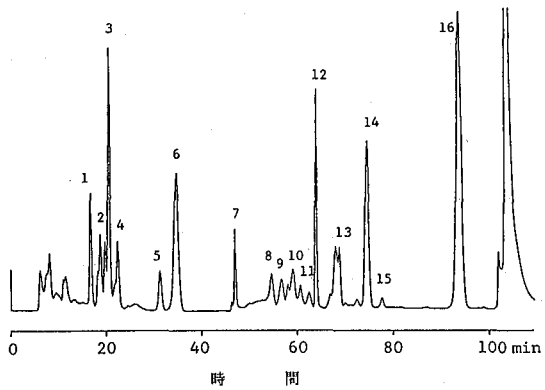


図3．六味丸（散剤）のアミノ酸クロマトグラム
1：アスパラギン酸，2：スレオニン，3：セリン，4：グルタミン酸，5：グリシン，6：アラニン，7：バリン，8：イソロイシン，9：ロイシン，10：チロシン，11：フェニルアラニン，12：γ-アミノ酪酸（GABA），13：リジン，14：アンモニア，15：ヒスチジン，16：アルギニン，その他のピークは未同定
分析条件：本文中に記載した．

分析条件　充塡剤；カスタムイオン交換樹脂#2619（日立製），カラム；4.0mm I.D.×150mm，プレカラム；4.0mm I.D.×120mm，移動相；MCI^{R} 緩衝液835-PHキット（和光純薬製），検出試薬；ニンヒドリン試薬-835セット（和光純薬製），検出；可視部570nm，感度；0.5AUFS.

(8)金属の定性分析　試料約0.5gをそのまま測定用フィルムに入れ，ultra-trace 0600形螢光X線分析装置（Kevex製）で分析した．

分析条件　1次ターゲット；モリブデン，2次ターゲット，X線管電圧及び電流；モリブデン，35kV，35mA，ゲルマニウム，25kV，20mA，測定時間；100秒．

結果及び考察

(1)六味丸（散剤）の製造

今回製造した散剤は，各原料生薬の粉末を一定の割合で配合した散剤ではない．原料の1つである熟地黄が湿潤しているため，そのままでは粉砕～散剤化が難しいことから，全形生薬をいわゆる「刻み品」として大きさを整えた段階で配合し，その後粉末化した．切断，配合，混和，粉砕，混和，充塡の一連の工程は2回に分け実施した．

表1にそれぞれの原料生薬量と仕込量を掲げたが，1回目のロット番号900830では，原料237.5kgから散剤206.0kgを得，86.7%の仕上がり率であった．また，2回目のロット番号901130では，87.5kgから76.5kg，87.4%の仕上がり率であった．いずれも，重量が約13%減少したが，これは生薬を粉砕する際発生する微粉末の飛散に加え，作業ロス，生薬の乾燥などによると考えている．

本製剤についての粒度を調べたところ，表2に示すように，73%が75 μm 未満の微細な粉末で，比較的粒度の細かい散剤であった．

表2．六味丸（散剤）No.900830の粒度分布*

粒子径	分布比（%）
850 μm 以上	0.0
500 μm 以上	0.0
75 μm 以上	26.9
75 μm 未満	73.1
計	100.0

＊日局製剤総則11．散剤粒度試験[11]の項に従い，約10.0gについて2回の平均値を算出した．

(2)六味丸（散剤）の成分分析

散剤が成分的にどの程度均質な試料であるかを確認するため，容器間及び同一容器内の含量分布を調べた．

分析対象成分は，牡丹皮の有効成分であるPN及びPL，山茱萸のMO及びLOである．さらに，漢方製剤の品質を評価するうえで，水溶性成分であるアミノ酸を分析することは有用な手段である[9]といわれることから，遊離アミノ酸のなかで指標となるGABAを定量した．GABAは脳代謝促進剤として健康保険適用を受けている医療用医薬品であり[10]，六味丸原料生薬の沢瀉に多量に含有される成分である[11]．また，成分含量を総合的に評価するものとして希エタノールエキス含量を測定した．

これらの分析結果は，6試料の平均値，標準偏差及び

表3．六味丸(散剤)No.900830の成分分析結果

	容器間分布[1]			同一容器内分布[2]		
	平均値	標準偏差	変動係数	平均値	標準偏差	変動係数
モロニサイド	2.31mg/g	0.04**mg/g	1.80%	2.27mg/g	0.01mg/g	0.60%
ロガニン	1.15mg/g	0.03mg/g	2.38%	1.12mg/g	0.02mg/g	1.62%
ペオニフロリン	1.56mg/g	0.03mg/g	2.12%	1.59mg/g	0.04mg/g	2.51%
ペオノール	2.27mg/g	0.07*mg/g	2.95%	2.27mg/g	0.02mg/g	1.04%
γ-アミノ酪酸	0.267**mg/g	0.004mg/g	1.71%	0.274mg/g	0.002mg/g	0.90%
エキス含量	41.9%	0.7%	1.74%	41.5%	0.3%	0.60%
乾燥減量	5.84%	0.22%	3.83%	5.63%	0.19%	3.40%

1） 乱数表に従い分けられた異なる6ボトル(100g入り)の分析結果から算出した．
2） 同一容器内の試料の6回の分析結果から求めた．
** 同一容器内と有意差($p<0.01$)がある．
* 同一容器内と有意差($p<0.05$)がある．

変動係数に分け，表3にまとめて記載した．各成分の平均値について検討したところ，容器間のGABA含量は，同一容器内の含量と危険率1％で有意差を認めたが，0.267mg/g，0.274mg/gと，その差(95％信頼区間，0.007±0.004mg/g)は相対含量にして3％以下と小さいものであった．その他の平均値は容器間と同一容器内で有意差が認められなかった．

変動について調べたところ，MOの容器間変動は容器内変動と危険率1％で，PLは危険率5％で有意差が認められた．しかし，MOの容器間変動は1.80％，PLは2.95％と小さな値であり，それらのバラツキは少ないと判断された．乾燥減量の容器間変動は3.83％であったが，定量誤差を含む容器内変動も3.40％であり，有意差も認められなかった．また，その他の成分の変動は極めて小さく，容器間と容器内とで有意差も認めなかった．以上の結果を総合的に判断し，今回製造した六味丸(散剤)は，成分含量幅の点では化学薬品製剤と同程度の均質性を持つと結論づけられた．

(3)金属の分析結果

六味丸(散剤)中に含まれる金属の分析は，モリブデン及びゲルマニウムを2次ターゲットとした螢光X線分析法により行った．その結果，図4に示すように，広く天然に存在するカリウム(K)，カルシウム(Ca)，マンガン(Mn)，鉄(Fe)，銅(Cu)，亜鉛(Zn)，ブロム(Br)及びストロンチウム(Sr)が確認された．そして，ヒ素(As)，水銀(Hg)，クロム(Cr)等の有害金属は検出されなかった．即ち，含有金属の面では，臨床及び薬理研究に何ら支障はないものと考えられた．

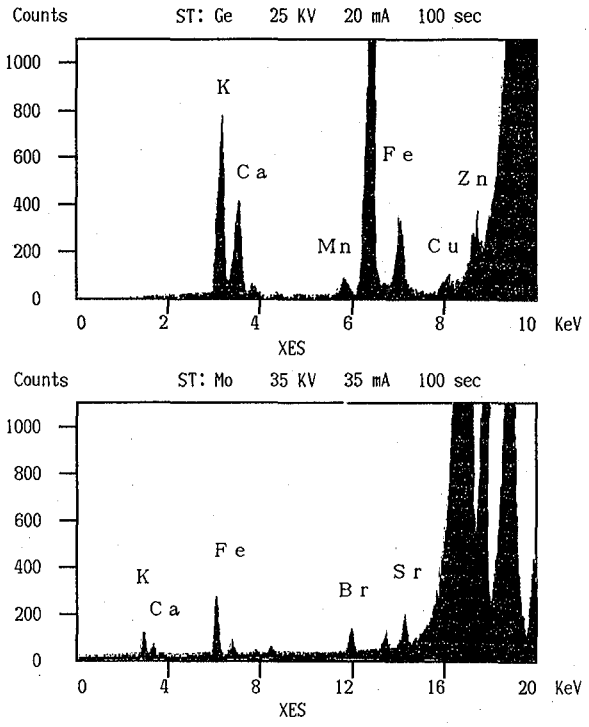


図4．六味丸(散剤)の螢光X線 スペクトル
ST：2次ターゲット．その他の分析条件は本文中に記載した．

(4)考察

今回，薬理研究及び品質評価研究用に，成分的に均質な六味丸(散剤)を作製することができた．

一般に，漢方薬には農薬等の有害物質の許容限度値は

設定されていない．安全性について考察すると，有害金属のほか，かび毒，有機リン系農薬及びBHCを除いた有機塩素系農薬は検出されず，また放射能も検出限界以下の濃度と報告されている[1]．総BHCは0.017ppm検出されたが，食品の残留農薬基準が牛乳，野菜，果実で0.2ppmである[12]ことから，成人服用量1日9gを考慮すると，害作用発現に直結する可能性はないと考えている．

製剤の有効性について成分含量から考察すると，1日服用量9g中のPL量は，50kgの成人の場合20.5mgと換算される．PLの抗炎症作用を調べた動物実験では，ラットのカラゲニン浮腫，デキストラン浮腫，酢酸浮腫には，経口投与で500mg/kgが必要であり[13]，中枢抑制作用発現には125～250mg/kgをマウスに腹腔内注射する必要がある[14]．また，本散剤1日服用量中のGABA含量は2.4mgであるが，本態性高血圧，腎性高血圧等の改善に患者に投与するGABAの量は1日1gである[10]．これらから，指標成分のみで六味丸(散剤)の薬効発現を説明することは難しく，現段階では，薬効を特定成分の含量に直接関連づけて説明することはできないと考えている．しかし，臨床効果を再現性良く実証するには，含有される多くの成分が一定の割合に存在し，薬剤としての恒常性が維持されていることが，漢方薬の有効性を論ずる上で必要と思われる．

まとめ

優良品と思われる原料生薬を選品し六味丸(散剤)を2回に分け，計282.5kg製造した．本散剤の粒度は比較的細かいものであった．成分的には，モロニサイド2.31mg/g，ロガニン1.15mg/g，ペオニフロリン1.56mg/g，ペオノール2.28mg/g，γ-アミノ酪酸0.267mg/gを含有しており，成分的にバラツキが少なく，均質な散剤であった．また有害金属は検出されず，有害物質についての問題も特に認められなかった．

謝辞 本研究にあたり，化学物質の安全性評価について御助言を頂いた当所毒性部 佐々木美枝子部長及び藤井孝博士，食品研究科 田村行弘副参事研究員に，また製剤調製に御協力頂いた㈱ウチダ和漢薬大潟工場 内田知尚工場長ならびに伊藤親氏に深謝致します．

(本研究は，平成2年度衛生局東洋医学事業「六味丸(散剤)及び老人性疾患に繁用される生薬に関する研究」の一部として実施したものである．)

文献

1) 藤井孝，佐々木美枝子，角千代，長井二三子，佐藤かな子，藤田博，小縣昭夫，吉田誠二，安田一郎，浜野朋子，田村行弘，上村尚，真木俊夫，観公子，永山敏廣，諸角聖，和宇慶朝昭，東京都衛生局学会誌，**86**，64-65，(1991)
2) 難波恒雄：原色和漢薬図鑑(上)，64-65，1980，保育社，大阪
3) 中国医学科学院薬物研究所編，中薬志(第二冊)，337-340，1982，人民衛生出版社，北京
4) 神戸中医学研究会：漢薬の臨床応用，344-346，1981，医歯薬出版株式会社，東京
5) 楊蘊祥，劉翠栄編，古今名方，130-131，1988，河南科学技術出版社，中国河南省
6) 日本公定書協会編，第11改正日本薬局方解説書，A-84-A-89，1986，廣川書店，東京
7) 日本公定書協会編，第11改正日本薬局方解説書，B-167-B-179，1986，廣川書店，東京
8) 鴈野重威，科学の領域増刊121号，新・高速液体クロマトグラフィー，1-13，1978，南江堂，東京
9) 早坂正孝，草野源次郎，水柿道直，薬剤学，**49**，33-40，1989
10) 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3版，第2編薬のまとめ，120，1986，アサヒメディカル，東京
11) 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，東京衛研年報，**41**，55-61，1990
12) 日本食品衛生学会，食品・食品添加物等規格基準(抄)，食衛誌，**31**，84-87，1990
13) 原田正敏，山下厚子，油田正樹，薬誌，**92**，750-756，1972
14) 原田正敏，山下厚子，薬誌，**89**，1205-1211，1969

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 33-37, 1991

高速液体クロマトグラフィーによる漢方製剤防已黄耆湯の試験法について

高橋奈穂子*, 安田一郎*, 瀬戸隆子*
浜野朋子*, 高野伊知郎*, 渡辺四男也*

Analysis of Chinese Medical Preparations "Boi-ogi-to" by High Performance Liquid Chromatography

NAHOKO TAKAHASHI*, ICHIRO YASUDA*, TAKAKO SETO*,
TOMOKO HAMANO*, ICHIRO TAKANO* and YOHYA WATANABE*

A system for simultaneous determination with no preparative operation of Glycyrrhizic acid (GL), Sinomenin (SI) and 7, 3'-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavone-7-*O*-β-D-glucoside (DI) in Boi-ogi-to, which is one of the Chinese medical preparations, by high performance liquid chromatography (HPLC) was established. They were precisely analyzed on an ODS silica column using a mixture of water and acetonitrile including 0.4% phosphoric acid as the mobile phase with a column temperature of 60℃ and a UV detection of 260 nm.
When this system was applied to 24 samples of commercial preparations, the contents of GL, SI and DI varied widely between the manufacturers (c. v. : 39.6-76.6%), in contrast they varied slightly among the same manufacturers (c. v. : 1.7-43.0%).

Keywords：高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography (HPLC), 防已黄耆湯 Boi-ogi-to, 漢方製剤 chinese medical preparations, グリチルリチン酸 glycyrrhizic acid, シノメニン sinomenin, 7, 3-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラボン-7-*O*-β-D-グルコサイド 7, 3'-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone-7-*O*-β-D-glucoside

緒　言

漢方製剤とは，漢方医学の治療の目的に応じていくつかの生薬を一定の規則に従って処方し，製剤化されたものであり，その使用量は年々増加している．しかし，配合される各種生薬に含有される成分の種類や含量などは未解明な部分が多いため，漢方製剤の品質確保上必要な試験法の整備が急がれている．このため厚生省では医療用漢方製剤の製造承認申請書に，2種類以上の指標成分の定量の記載を求め[1]，品質の確保に努めている．

今回我々は漢方製剤の一例として防已黄耆湯を選択し，

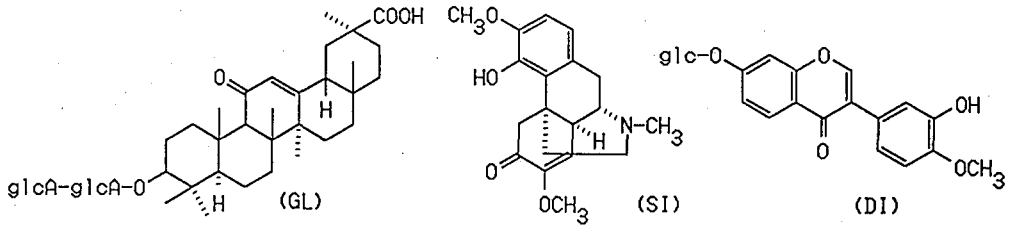


Fig. 1. Chemical Structures of GL, SI and DI
glcA：glucuronic acid　　glc：glucose

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

試験法の開発に着手した．防已黄耆湯は黄耆，防已，甘草，大棗，蒼朮，生姜の6種類の生薬から成り，肥満症，関節痛，浮腫などに適用される製剤[2,3]である．この製剤の配合生薬のうち，配合量の多い防已，黄耆にはSinomenin(SI)と7,3'-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavone-7-*O*-β-D-glucoside(DI)が，また要薬である甘草にはGlycyrrhizic acid(GL)(Fig. 1)が含有されており，それぞれ生薬からの分析例が報告されている[4-6]．そこでこれら3成分を本製剤の指標成分として選択し，逆相系の高速液体クロマトグラフ法(HPLC)による同時定量を試みた．

さらに，開発した試験法を用いて市販漢方製剤を分析したところ，製造メーカー間による含有成分のバラツキが確認されたので併せて報告する．

実験の部

1．実験材料

エキスの調製：黄耆，防已各5.0g，大棗，蒼朮3.0g，甘草1.5g，生姜1.0g(1日分)を，600mlの水で約半量になるまで煎じ，自家煎剤とした．さらに，これを凍結乾燥したものを自家エキスとした．また，自家エキスから甘草，防已，黄耆をそれぞれ1種類ずつ除き同様に製したものを，抜き自家エキスとした．

市販製剤：都内に流通している防已黄耆湯製剤4種24検体を実験材料とした．内訳は，エキス製剤3種(A，B及びC)，-エキスと構成生薬の粉末からなる混合製剤1種(D)，計4種であり，A，B，C，Dともに異なる6ロットを対象とした．

2．定量法

標準品及び標準溶液：標準品GLは半井化学社製，SIは東レテクノ社製は，DIは中国産黄耆より抽出単離したもの[7]を用いた．乾燥した標準品としてGL，SI及びDIそれぞれ約10mgを精密に量り，メタノールに溶解し，正確に100mlとしたものを標準溶液とした．

試料溶液：自家エキス，抜き自家エキス及び市販製剤各約1/2日量を精密に量り，水・アセトニトリル・リン酸(70：30：0.4)混液30mlを加え，振とう後遠心分離し上澄をとった．同様の操作をさらに2回繰り返し，全上澄を集めて抽出溶媒で希釈し，正確に100mlとした後，0.45μmのフィルターを通した液を試料溶液とした．

HPLC条件：カラムはTSKgel ODS-120T(5μm，4.6×250mm)を用いた．移動相は，A液：水・アセトニトリル・リン酸(97：3：0.4)混液，及びB液：水・アセトニトリル・リン酸(70：30：0.4)混液を用い多段階グラジェントによりGL，SI及びDIを同時に分析した．流速は1.0ml/min，温度は60℃，検出波長は260nm，注入量は25μlとした．以上の条件で，自家エキスを分析したクロマトグラム及びアセトニトリルグラジェントモードをFig. 2に示した．t_RはGLが約65分，SI 12分，DI 37分であった．

また，抜き自家エキスを分析した結果，t_Rが約22分のピークは防已由来，52及び58分のピークは甘草由来の物質であることが判明した．

検量線：標準溶液を希釈し，各種濃度の標準系列を作り，これをHPLCに注入し，ピーク高さと濃度から検量線を作成した．

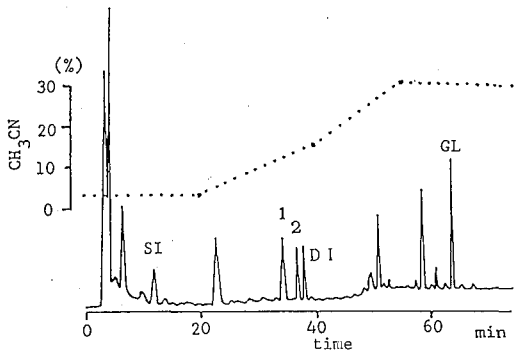


Fig. 2. HPLC Chromatogram of "Boi-ogi-to"(防已黄耆湯)
HPLC conditions were the same as Experimental Section

結果及び考察

1．HPLC条件の検討

移動相：逆相系として通常用いられる水・アセトニトリル系を選択し，対象3成分の大きな極性の違いを考慮し，短時間で分析を終了させるため，グラジェント法を検討した．また，ピークのテーリングをおさえるために，酸(リン酸，シュウ酸，酢酸)とその濃度についても検討を行った．その結果，最適分離条件は0.4%リン酸酸性下，アセトニトリルグラジェントモードであることが判明した．

測定波長：自家エキス及び標準溶液について，三次元HPLC(MULTI-340，日本分光製)により3成分を分析した．その結果，Fig. 3に示す様に，GLは255nm，SIは265nm，DIは255nm付近に極大吸収を示した．そこで，3成分共に吸収が比較的強い260nmを選択した．

カラム温度：通常用いるカラム温度(40℃)では甘草由来の2つのピーク(Fig. 2にピーク**1**及び**2**として示す)とDIとの分離が不十分なため，定量に困難を来した．そこでピーク**1**及び**2**とDIとの温度依存性の相違に着目

し，移動相に0.4%リン酸を含む15%アセトニトリル溶液を用い，溶出時間と温度との関係を検討した．その他のHPLC条件は前述のものと同様にした．その結果，Fig. 4に示す様に，40℃では，DIはピーク1及び2の間にあり，かつピーク2との分離が不十分であった．

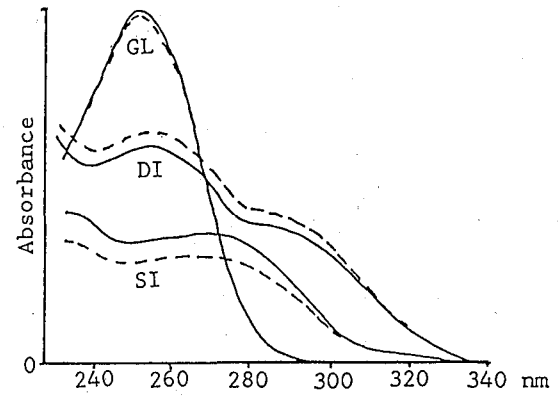


Fig. 3. UV Spectra of the Peaks of GL, DI and GL in "Boi-ogi-to"(防已黄耆湯)
——：Standard Compounds
- - -：The peaks in "Boi-ogi-to"(防已黄耆湯)

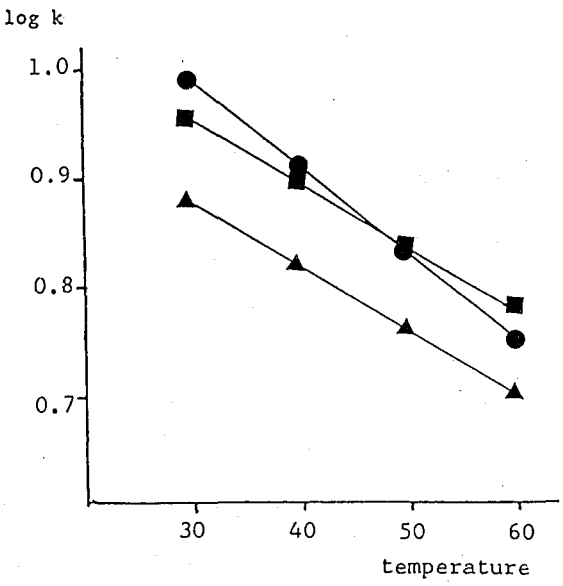


Fig. 4. Effect of Column Temperature on log k Value for DI, 1 and 2
-■-：Peak of DI
-▲-：Peak of 1 (unknown)
-●-：Peak of 2 (unknown)

50℃ではピーク2とDIは一つに重なったが，60℃にカラム温度を上げるとDIの出現がピーク2よりも遅くなり，完全に分離した．一方，カラム温度を下げ，30℃にすると各々のピークの形状が悪くなり，カラム温度としては不適当であった．以上の結果からカラム温度を60℃に設定した．本条件は，GL，SIにおいても精度良い定量が行えた．

2．ピークの同定と純度の確認

GL，SI及びDIに対する妨害ピークの有無を調べるため，ピークの同定と純度の確認を行った．実験の部に示したHPLC条件で標準溶液及び自家エキスを分析したところ，Fig. 3に示すように，実線で示した標準溶液のGL，SI及びDIの各々のピークのUVスペクトルは，点線で示した自家エキス(Boi-ogi-to)のGL，SI及びDI相当ピークのものと一致し，ピーク純度に問題はなかった．更に，甘草，防已，黄耆の各抜き自家エキスでは，それぞれGL，SI及びDIピーク出現位置にピークが認められず，その他の生薬成分の妨害は受けなかった．

3．抽出溶媒の検討

B液で3回振とう抽出した場合のピーク高さを100%としたときの各種溶媒におけるピーク高さの割合をTable 1に示した．その結果，B液が3成分ともに最も抽出効率は良好であった．

Table 1. Effect* of Various Solvents on Extraction (%) of GL, SI and DI

Solvents	GL	SI	DI
Solution B**	100	100	100
Water	100	93	95
50% Methanol	98	51	90
Methanol	62	41	87
50% Ethanol	98	86	99
Ethanol	81	40	89

* ：The maximum value was indicated as 100%
** ：The mixture of water, acetonitrile and phosphoric acid (70 : 30 : 0.4)

4．抽出方法及び回数の検討

Fig. 5は市販のエキス製剤(A-1)及びエキスと粉末の混合製剤(D-1)の，抽出方法と回数の検討結果である．5回振とう抽出した時のGLのピーク高さを100%とすると，まずA-1は，振とう抽出及び超音波抽出と

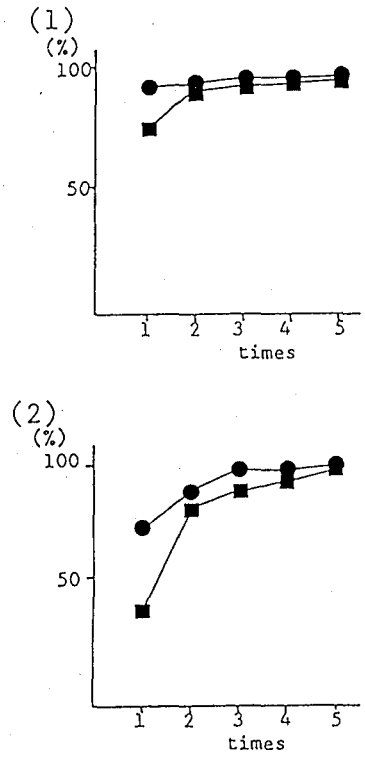


Fig. 5. Effect* of Extraction Methods and Times on Extraction of GL
(1): Shaking Extraction
(2): Ultrasonic Extraction
-●-: A-1
-■-: D-1
*: The maximum value was indicated as 100%

もにほぼ3回で100%に達した．次に，D-1では振とう抽出3回でほぼ100%に達したが，超音波抽出では90%程度であった．以上の結果から，試料溶液の調製は3回振とう抽出で行うことにした．

5．定量性の検討

定量性の検討を，繰り返し精度，添加回収及び検量線について行った．まず，繰り返し精度は，c.v.値がGL 0.90%，SI 2.49%，DI 2.73%(各n＝5)であった．次に，添加回収では，自家製剤1/2日量に対してGLを0.8mg添加したときの回収率は96.2%(c.v.＝0.92%)，SI(添加量1.0mg)96.2%(1.47%)，DI(添加量0.3mg)99.7%(3.06%)，(各n＝5)であった．最後に検量線は，GLが20-400ngの範囲でr＝0.9995，SIが0.525-10.5μgの範囲でr＝0.9999，DIは9.4-188ngの範囲でr＝0.9999を示し良好であった．次にこの試験法を用いて実際に市販製剤を分析し，GL，SI及びDIの一日当りの含量と，平均値及びc.v.値を求めた．

6．市販製剤の分析

Table 2に示すように，製造メーカー内ロット間の3成分のc.v.値は1.7-43.0%(平均15.0%)であり，既に報告されている甘草のグリチルリチンの分析例[8]などに比較すると変動が小さかった．次に，製造メーカー間における3成分の平均値を比較した結果，一例としてGL

Table 2. GL, SI and DI Contents (mg/day) of Commercial Preparations

Sample*	GL content mg/day	GL content mean (c.v.)	SI content mg/day	SI content mean (c.v.)	DI content mg/day	DI content mean (c.v.)
A-1	2.20		1.57		0.85	
2	2.24		1.73		0.86	
3	2.29	2.24	1.80	1.64	0.85	0.85
4	2.20	(3.0%)	1.75	(10.8%)	0.86	(1.7%)
5	2.16		1.69		0.82	
6	2.34		1.32		0.85	
B-1	1.01		1.26		0.36	
2	1.02		1.26		0.36	
3	1.17	1.09	1.13	1.29	0.35	0.36
4	1.18	(7.0%)	1.40	(8.2%)	0.35	(3.2%)
5	1.05		1.42		0.38	
6	1.13		1.29		0.37	
C-1	0.95		1.05		0.15	
2	0.86		0.83		0.14	
3	1.05	0.92	0.94	1.18	0.06	0.11
4	0.94	(10.2%)	1.75	(28.2%)	0.09	(32.4%)
5	0.93		1.16		0.12	
6	0.77		1.36		0.08	
D-1	1.84		3.20		0.26	
2	1.79		2.36		0.28	
3	1.82	1.58	2.40	2.65	0.26	0.31
4	1.45	(19.0%)	2.58	(13.7%)	0.58	(43.0%)
5	1.07		2.37		0.23	
6	1.05		3.01		0.25	
overall		1.46 (40.5%)		1.69 (39.6%)		0.41 (76.6%)

*: Samples A, B, C and D were the preparations of different manufacturers

では，A製剤2.24mg，B製剤1.09mg，C製剤0.92mg，D製剤1.58mg，平均1.46mg，c.v.40.5%に見られるように，同一製造メーカー内のロット間における含量値に較べてバラツキが大きかった．

現行の日本薬局方(日局)では，甘草など主要含有成分の明かな生薬の一部について主要成分の含量の範囲が定められている[9]．そのため今回分析した防已黄耆湯中のGL含量値のバラツキも一定の範囲内にあることが望ましい．しかし，製造メーカー間においては日局で定められた範囲内に納まっていないものもあった．SI及びDIについては現在のところ含量の規格はないが，日局のGL含量規格を基準とすると，メーカー間での測定値のバラツキはその基準を上回るものであった．

今回，防已黄耆湯のHPLCによる試験法を開発し，市場品の成分含量の相違を明らかにしたが，このことは他の市販漢方製剤にも予想されることであり，今後防已黄耆湯以外の漢方製剤の試験法を開発し，一定の品質確保に努めたい．

結　論

漢方製剤の防已黄耆湯をとりあげ，多成分分析の一例としてHPLCによる同時定量法を検討した．対象成分としては甘草，防已，黄耆の指標成分であるGlycyrrhizic acid, Sinomenin, 7, 3'-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavone-7-*O*-β-*D*-glucosideを選択した．まず自家エキスを調製し，移動相，測定波長，カラム温度，抽出溶媒，抽出方法の検討を行い，最も定量性の高い条件を確立した，また，それぞれのピークの重なり，純度の確認は三次元HPLCを用いて行った．

次に開発された方法を用いて，市販漢方製剤の定量を行った．その結果，同一製造メーカー内の場合は，各製剤のGL，SI，DI含量のバラツキは小さい反面，製造メーカー間での測定値を比較するとそのバラツキは大きかった．

文　献

1) 厚生省薬務局審査第一，第二課長通知，薬審二第120号，昭和60年5月31日
2) 矢数道明：漢方処方解説，509，1966，創元社，大阪
3) 原田正敏：漢方薬物治療学，152，1985，広川書店，東京
4) 原田正敏：繁用生薬の成分定量，94-119，1989，広川書店，東京
5) 原田正敏：繁用生薬の成分定量，296-305，1989，広川書店，東京
6) 桂英二，山岸蕎：北海道立衛生研究所報，**37**，48-52，1987
7) 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
8) 原田裕文，安田一郎，瀬戸隆子，浜野朋子，秋山和幸：第19回全国衛生化学技術協議会年会講演集，128-129，1982
9) 厚生省薬務局：第12改正日本薬局方，878，1991

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 38-43, 1991

めっき廃水中のシアンの測定——微量拡散-ピリジン・ピラゾロン法と微量拡散-イオン電極法の不一致例の解析とその対応

奥本 千代美*, 高橋 利恵子*, 岩崎 由美子*, 渡辺 四男也*

Determination of Cyanide in Waste Water from Metal Plating Process —Analysis and Counterplan of Incosistency between Results with Microdiffusion -Pyridine-Pyrazolone Method and Microdiffusion-Ion-Selective Eelectrode Method.

CHIYOMI OKUMOTO*, RIEKO TAKAHASHI*,
YUMIKO IWASAKI* and YOHYA WATANABE*

Keywords：シアン化物イオン cyanide ion, めっき廃水 waste water from metal plating process, イオン電極法 ion-selective electrode method, ピリジン・ピラゾロン法 pyridine-pyrazolone method, めっき助剤 assistant agent for plating, 硫化物イオン sulfide ion

緒　言

毒物および劇物取締法施行令によるめっき廃水中のシアンの定量方法[1](以下，公定法とする)は，試料の pH 調整，通気処理によるシアン化水素の遊離と補集，ピリジン・ピラゾロン試薬による吸光光度分析という複雑な操作を必要とする．著者らは，多数の検体を能率よく試験する目的で，種々の予試験あるいはスクリーニング法を検討してきた[2-6].

この中で開発した酢酸緩衝液を使用した微量拡散—ピリジン・ピラゾロン法[6](以下，MDP 法とする)は公定法とよく近似した測定値を与え，また，微量拡散—イオン電極法[2](以下，MDI 法とする)は操作が非常に簡便であるという利点から，これらの測定法を実際の試料に適用してきた．しかし，試料によって MDI 法により高い測定値を示すが MDP 法ではシアンを検出しない事例がしばしばみられた．そこで，平成元年度のシアン廃水指導取締事業における7,180件のめっき廃水検体中，本事例の154検体について解析し，この原因を検討した．その結果，めっき助剤中の配合薬品に起因する典型的な事例を明らかにすることができ，また，その影響を除くことにより定量性の向上をはかることができたので報告する．

実　験

1　試薬

特に記載のないものは市販の試薬特級品を使用した．シアン化物イオン標準液，ピリジン・ピラゾロン溶液，クロラミンT試薬，酢酸—酢酸ナトリウム緩衝液，リン酸塩緩衝液，0.1M水酸化ナトリウム溶液，混合指示薬等は既報[6]のとおりに調製した．

2　装置

シアン化物イオンメーター:東亜電波工業製 IM-40 S，分光光度計システム：紫外可視分光光度計　UV-160 A，オートサンプルチェンジャー　ASC-5，ポンプ　SW-2　以上島津製作所製，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　ゲルマニウムおよびスズ，ケイ光X線用液体試料ホルダー(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)，イオンクロマトグラフ装置：ポンプ　880-PU，検出器　875-UV 以上日本分光工業製，試料注入器　レオダイン社製7125型，データ処理装置　島津製作所製クロマトパック C-R 3 A

3　試料

平成元年度シアン廃水指導取締事業による都内めっき

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

工場の廃水7,180件を用いた.

めっき助剤希釈水溶液：めっき助剤(ⅰ), (ⅱ)および(ⅲ)を水で希釈し，各々1％(v／v)～10^{-4}％(v／v)の濃度の液を調整した.

めっき助剤含有シアン標準溶液：めっき助剤希釈水溶液にシアンイオン濃度1 μg/mlとなるようにシアン化物イオン標準液を添加して調製した.

4 拡散操作

拡散板[4]を用意し，試料および吸収液各2 mlを各々採取し，試料に濃硫酸1滴を加え，直ちに粘着テープで気密にし，室温で一夜放置する(拡散時のpHは1以下である). 同時に別の拡散板に試料および吸収液を採取したのち，試料液には濃硫酸の代わりに酢酸—酢酸ナトリウム緩衝液0.5mlを加え，同様に操作する(拡散時のpHは5である).

5 シアン化物イオンの定量

上記の操作で得られた両吸収液について，シアン化物イオン電極を用いて，シアン濃度を測定する. また，吸収液の一定量をとり，ピリジン・ピラゾロン法による吸光光度分析法によりシアン濃度を測定する.

6 めっき廃水およびめっき助剤のケイ光X線分析およびイオンクロマトグラフィーによる定性分析

めっき廃水およびめっき助剤中のシアン測定妨害物質の検討のためケイ光X線分析およびイオンクロマトグラフィーを行った.

ケイ光X線分析の測定条件

X線管球：モリブデン対陰極，2次ターゲット：ゲルマニウム(印加電圧30kV，印加電流20mA)またはスズ(印加電圧40kV，印加電流30mA)，測定時間：200秒，測定範囲：0～10keVまたは0～40keV，X線通路：空気，試料量：4 ml(液体試料ホルダー)

イオンクロマトグラフィーの測定条件

カラム：TSKgel IC-Anion-PW(4.6mm×5 cm 東ソー製)，移動相：4 mM リン酸緩衝液(pH 9.1)，流速：1.2ml／min，検出波長：220nm，試料注入量：100 μl

結果と考察

1 めっき廃水中のシアンの試験結果

平成元年度めっき廃水検体7,180件をMDI法およびMDP法により測定した結果を表1に示す. めっき廃水は都内のめっき工場の廃水を毎月1回ずつ採水したもので，1年間に1事業所1～12件の検体数である.

表1. MDI法およびMDP法によるめっき廃水中のシアンの測定値と検体数(1989)

		MDP法				
		0	0＜a≦1	1＜a≦10	10＜a	合計
MDI法	0	6,512*	0	0	0	6,512
	0＜a≦1	101	359	3	0	463
	1＜a≦10	41	64	73	0	178
	10＜a	12	3	9	3	27
	合計	6,666	426	85	3	7,180

＊：検体数

a：測定値(μg/ml)

MDI法：微量拡散—イオン電極法[2]

MDP法：酢酸緩衝液使用微量拡散—ピリジン・ピラゾロン法[6]

表2. 廃水検体のMDI法およびMDP法不一致頻度回数別めっき事業所数(1989)

不一致回数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	合計
めっき事業所数	63	14	5	3	3	0	0	0	0	1*	1**	0	90
													(延検体数 154)

＊：事業所a

＊＊：事業所b

表1に示すようにMDI法による測定結果は(+)であるがMDP法による測定結果が(−)となる検体は154件(全体の2.4%)であり，その事業所数は90所であった．なかでも事業所aは10回，事業所bは11回MDI法で(+)，MDP法で(−)の結果であった(表2)．このうち事業所aはMDI法による測定値が100 μg/ml以上の高い値を示すことが多く，他の事業所と著しく異なっていた．このように，MDI，MDPの2法によって異なる結果を与える検体は，排出する事業所がある程度限定されている．そこで，これらの原因を調査するため，代表的な事業所aおよびbの事例について妨害物質の検討を行った．

2 事業所aおよびbの廃水

平成元年度の事業所aおよびbの各月のMDI法およびMDP法による測定結果を表3に示した．いずれの結果もMDI法では(+)であるが，MDP法ではほとんどが(−)であった．MDI法およびMDP法は，拡散時のpHが各々1以下および5と異なる．そこでこの拡散時のpHの影響を調べるため，事業所aおよびbの廃水について，表4に示すように拡散時のpHを1以下および5に調製して，各々イオン電極法およびピリジン・ピラゾロン法の二つの方法でシアン濃度を測定し，これらの値を比較した．

その結果，表4に示すように，1)事業所aの廃水は，pH値に関係なくピリジン・ピラゾロン法ではシアンを検出しないが，イオン電極には感応すること，2)事業所bの廃水は，pH 5ではイオン電極法およびピリジン・ピラゾロン法のいずれの測定法によってもほとんどシアンを検出しないが，pH 1以下の強酸性では，両測定法ともシアンを検出することがわかった．

また，MDI法による測定値がシアン廃水の基準1 μg/mlをこえ，MDP法による測定値が0を示す53検体(表1)について前記と同様に測定を行った結果，1)に属するものは14件，2)に属するものは39件であった．

このようにMDP法とMDI法の測定結果が一致しない原因は2通りに大別して考えられる．即ち，2)の場合は，シアン化合物あるいはシアン錯化合物の存在が示唆される．これらの化合物は各々異なる解離定数をもち，各pHにおけるシアン化物イオンおよび遊離シアン化水素の濃度が異なることから，拡散時のpH条件により測定値に差が生じるのは当然と考えられる．

次に，1)の場合であるが，ピリジン・ピラゾロン法では呈色しないが，イオン電極には感応する何らかの共通因子が考えられる．そこで，両試験法の結果が一致しない事業所について薬務部毒劇物指導係および薬事衛生事務所の協力を得て，めっきの種類，使用薬剤の種類，調合方法等を調査した．しかし，これらは企業秘密に属するものであり，詳細については正確に把握することはできなかった．ただ，先にあげた14件のイオン電極に感

表3．事業所aおよびbの廃水のMDI法およびMDP法によるシアン測定値の比較(1989)

測定年月*		89/4	5	6	7	8	9	10	11	12	90/1	2	3
事業所a	MDI法	130**	18	600	100	140	24	15	50	230	24	11	6.0
	MDP法	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1
事業所b	MDI法	2.6	1.5	3.9	5.8	9.5	10	5.0	1.3	6.0	−	3.3	3.0
	MDP法	0	0	0	0	0	0	0	0	0	−	0	0

＊：毎月1事業所当り1検体ずつ測定した
＊＊：シアン測定値(μg/ml)

表4．事業所aおよびb廃水の拡散時pHと測定法の違いによるシアン測定値の比較

拡散時のpH	1以下		5	
	I(=MDI)	P	I	P(=MDP)
事業所a	600	0.0	390	0.0
	100	0.0	49	0.0
	140	0.0	53	0.0
	24	0.0	19	0.0
	15	0.0	7.0	0.0
事業所b	3.9	3.3	0.0	0.0
	5.8	5.0	0.3	0.0
	9.5	7.0	0.0	0.0
	10	9.8	0.0	0.0
	5.0	4.7	0.0	0.0

I：イオン電極法による測定値(μg/ml)
p：ピリジン・ピラゾロン法による測定値(μg/ml)

応する物質が含まれると思われる廃水を出す5事業所のうち3事業所では，少なくともめっき助剤(ⅰ)，(ⅱ)および(ⅲ)を使用していることが判明した．

3 めっき助剤のイオン電極法およびピリジン・ピラゾロン法に与える影響

めっき助剤希釈水溶液およびめっき助剤含有シアン標準溶液について，事業所aおよびbの廃水と同様に，pH 1以下およびpH 5で拡散処理を行い，これらについて各々イオン電極法およびピリジン・ピラゾロン法によりシアン濃度を測定した．めっき助剤希釈水溶液の場合はイオン電極法で，めっき助剤(ⅰ)および(ⅱ)が(＋)に妨害し，このうち(ⅰ)は10^{-3}%以上の濃度でシアン廃水の基準値(1 μg/ml)をこえる測定値を与えた．しかし，助剤(ⅲ)は1%濃度でもイオン電極法に影響を与えなかった．一方，ピリジン・ピラゾロン法では(ⅰ)，(ⅱ)および(ⅲ)ともに(＋)に妨害することはなかった．

また，めっき助剤含有シアン標準溶液を用いたシアン回収試験では，めっき助剤(ⅰ)および(ⅱ)はイオン電極法で(＋)，ピリジン・ピラゾロン法では(－)に影響した．助剤(ⅲ)は10^{-1}%以上の濃度で，イオン電極法，ピリジン・ピラゾロン法の両法において，シアンの回収を(－)に妨害した．

これらの現象はpH 1以下およびpH 5のいずれの条件で拡散処理した場合についても同様の結果であった．このうち表5にはpH 1以下で拡散を行った時のシアン測定値を示した．

4 めっき助剤中のシアン測定に及ぼす妨害成分

シアンイオン電極法に影響を与える共存イオンとしては選択係数の大きい順にイオウ(共存不可)，ヨウ素，臭素，チオシアン，硝酸，硫酸，炭酸，塩素などが知られている．これらのうち硫酸，塩素などは(－)の妨害を示し，(＋)の大きな妨害を与えるものはイオウである．めっき助剤(ⅰ)，(ⅱ)および(ⅲ)についてケイ光X線による測定を行ったところ，表6に示すように助剤(ⅰ)からはS，Ca，Cu，Znを，(ⅱ)からはS，Fe，Cu，Znを，(ⅲ)からはCu，Seを検出した．またこれらの助剤

表5．めっき助剤のシアン測定値に及ぼす影響

めっき助剤の濃度(%)		めっき助剤希釈水溶液 0	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	1	めっき助剤含有シアン標準溶液(CN^-：1 μg／ml) 0	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	1
助剤(ⅰ)	I (=MDI)	0	0.3	2.2	51	600	11000	1.0	1.3	2.6	52	650	11000
	P	0	0	0	0	0	0	1.0	1.0	1.0	0.8	0.3	－
助剤(ⅱ)	I (=MDI)	0	0.1	0.4	22	190	1500	1.0	1.0	1.4	23	200	1500
	P	0	0	0	0	0	0	1.0	1.0	1.0	0.9	0.8	－
助剤(ⅲ)	I (=MDI)	0	0	0	0	0	0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9
	P	0	0	0	0	0	0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	－

拡散時pH：1以下
I：イオン電極法による測定値(μg/ml)
P：ピリジン・ピラゾロン法による測定値(μg/ml)
－：試験液が懸濁し，測定不能

表6．めっき助剤およびめっき廃水のケイ光X線分析法による測定結果

含有物質＼試料	めっき助剤(ⅰ)	めっき助剤(ⅱ)	めっき助剤(ⅲ)	事業所a	事業所b	事業所c
S	＋	＋		＋		
Ca	＋			＋		
Fe		＋		＋	＋	＋
Ni				＋	＋	＋
Cu	＋	＋	＋	＋	＋	＋
Zn	＋	＋				
Se			＋			

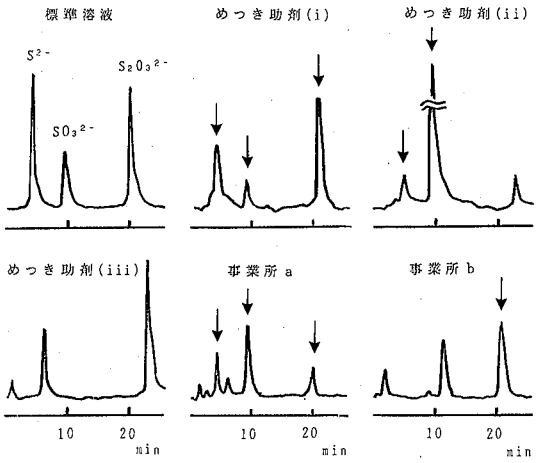


図1．めっき助剤およびめっき廃水のイオンクロマトグラム
標準溶液：$Na_2S\cdot 9H_2O$，$Na_2SO_3\cdot 7H_2O$ および $Na_2S_2O_3\cdot 5H_2O$ を各1mMの濃度に混合した

を水で100倍に希釈した液についてイオンクロマトグラフィーによる測定を行ったところ，図1に示すように助剤(ｉ)からは S^{2-}，SO_3^{2-}，$S_2O_3^{2-}$，(ii)からは S^{2-}，SO_3^{2-} が認められた．以上のことから助剤(ｉ)および(ii)が，シアンイオン電極法を(＋)に妨害する原因は含有成分の S^{2-} に，またピリジン・ピラゾロン法を(－)に妨害する原因は S^{2-} または SO_3^{2-} に帰因する[7]と結論することができる．まためっき助剤(iii)は(ｉ)および(ii)と異なり，イオウを検出しないが，セレンを検出した．この助剤(iii)はイオン電極法およびピリジン・ピラゾロン法において(＋)の妨害を示さないが，10^{-1}％以上の共存では両法に対しシアンの回収を(－)に妨害した．これらのことから(iii)はイオン電極に対して影響するのではなく，共存するセレンがシアン化合物と錯化合物を形成することによりシアン化水素の遊離を妨害するものと考えられる．詳細については，他の金属イオンの影響などを含めて引き続き検討を行いたい．

5　イオンクロマトグラフィーによるめっき廃水の定性分析

5回以上MDI法とMDP法の値が異なる結果を与えた5事業所の廃水についてイオンクロマトグラフィーによる定性分析を行った．10回の異なった結果を与えた事業所ａの廃水中からは，S^{2-}，SO_3^{2-} および $S_2O_3^{2-}$ と同位置にピークを検出した(図1)．次に事業所ｂの廃水には $S_2O_3^{2-}$ と同位置にピークを認めたものの S^{2-} は検出しなかった．また他の廃水はいずれも S^{2-} の位置にピークを認めなかった．以上の事から，事業所ａの廃水がMDI法とMDP法で異なる結果を与えた原因は，使用めっき助剤中の S^{2-} によるものと考えられる．

6　妨害成分の除去

イオウを含有するめっき助剤(ｉ)および(ii)はイオン電極法を大きく(＋)に妨害するだけでなくピリジン・ピラゾロン法を(－)に妨害する．我々は，予試験法としてMDI法を採用しているが，予試験で10μg/ml以上の値を示した廃水についてはMDP法にも影響があると考えられるので，イオウの妨害を除く操作が必要であることがわかった．そこで，硫化ナトリウム9水和物を用いて S^{2-} の濃度が 10^{-1}，10^{-2}，10^{-3} および 10^{-4}％(w／v)となる溶液を調製し，各々の溶液についてイオン電極による測定を行ったところ，濃度計の針はそれぞれ300，40～50，5および0.3μg/mlを示した．事業所ａのシアン化物イオン電極による測定値は高いときには数100μg／mlとなるが，この数字が全て共存する硫化物によるものであるとした場合，拡散操作で採取される試料2ml中に含まれるイオウの含有量は数mg以下と考えられる．

イオウの除去方法としては，既に種々の報告があるが，今回その一つである酢酸亜鉛溶液による除去を検討した．10％(w／v)酢酸亜鉛溶液の1mlは S^{2-} の14mgに相当することから，拡散操作時に試量2mlに対し0.1mlの酢酸亜鉛溶液を添加することにした．めっき助剤(ｉ)および(ii)はピリジン・ピラゾロン法によるシアン化物イオンの回収試験を(－)に妨害してきたが，酢酸亜鉛溶液を添加し，MDP法で測定を行ったところ回収率は98％以上に向上した．事業所ａの10検体について酢酸亜鉛溶液を添加して拡散処理を行い，シアンイオンを測定したところ，MDI法，MDP法のいずれの方法によっても，シアンイオンを検出しなかった．

ま と め

1)シアンイオン電極法とピリジン・ピラゾロン法により相反する結果を与える原因の一つとして，イオウを含有するめっき助剤の使用が判明した．

2)予試験としてシアンイオン電極法による試験を行いその値が10μg/ml以上の大きな値を示す試料については，拡散時に10％(w／v)酢酸亜鉛溶液を添加して試験を行うように，先に報告[6]した酢酸緩衝液使用ピリジン・ピラゾロン法を改良した．

(本研究は平成2年度当研究所調査研究課題として実施したものである．)

謝辞　本研究に当り，試料の採取，情報の収集にご協力いただいた薬事監視員の皆様に深謝いたします．

文　献

1) 厚生省令第46号(昭和46年12月27日)
2) 秋山和幸，長嶋真知子，奥本千代美，寺島潔，萩原輝彦：分析化学，**31**，402-404，1982
3) 奥本千代美，長嶋真知子，風間成孔，秋山和幸：衛生化学，**30**，7-13，1984
4) 高橋利恵子，奥本千代美，岩崎由美子，秋山和幸：東京衛生研年報，**37**，85-89，1986
5) 奥本千代美，高橋利恵子，岩崎由美子，秋山和幸：東京衛研年報，**37**，79-84，1986
6) 奥本千代美，高橋利恵子，岩崎由美子，秋山和幸：東京衛研年報，**40**，90-95，1989
7) 栗谷川福子，奥沢昌子，松本茂：衛生化学，**19**，110-116，1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 44-48, 1991

イオン対高速液体クロマトグラフィーによる化粧品用水溶性ケイ光タール色素の分析

伊藤弘一*, 佐藤憲一*, 鈴木助治*, 中村　弘*

Determination of Water Soluble Fluorescence Coal-Tar Dyes in Cosmetics and Toiletries (by Ion-Pair) HPLC

KOICHI ITOH※, KENICHI SATO※, SUKEJI SUZUKI※
and HIROSHI NAKAMURA※

Keywords：イオン対高速液体クロマトグラフィー ion-pair high performance liquid chromatography, ケイ光検出器 fluorescence detector, タール色素 coal-tar dyes, 化粧品 cosmetics

緒　言

現在，化粧品及び医薬部外品に使用可能なタール色素は「医薬品等に使用されるタール色素を定める省令」(厚生省令第30号)に規定された83の色素(法定色素)に限られている．これら化粧品中のタール色素の分析は従来より主として薄層クロマトグラフ(TLC)法で行われているが，複雑な前処理を必要とすることが多いため，最近比較的前処理の少ない高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による方法が取り入れられるようになった．

著者らは以前にこれら法定色素のうち水溶性色素について可視部検出器を用いたHPLCによる分析法を報告した[1]．また，これまでに報告されたHPLCによるタール色素の分析法の多くが検出器に紫外部又は可視部検出器を使用したものである[2,3]．しかし，これらの方法を用いて色素配合量の少ない市販化粧品を分析するには，なお十分な感度が得られないため，高度な濃縮やカラム処理等の繁雑な前処理が必要となってくる．化粧品中の微量のタール色素を簡便に分析するためには可能な限り高感度な検出器を用いたHPLC法を開発する必要がある．

著者らはケイ光を有する水溶性タール色素のうち化粧品に繁用されている色素8種(赤色3号，赤色104号，赤色105号，赤色106号，赤色213号，赤色230号，黄色202号，緑色204号)についてケイ光検出器を用いたHPLC法を検討した．また本法によって代表的なケイ光タール色素である赤色213号が配合された市販化粧品の分析も行ったので報告する．

実験方法

1．試薬　標準色素として赤色3号(エリスロシン)，同104号(フロキシンB)，同105号の(1)(ローズベンガル)，同106号(アシッドレッド)は国立衛生試験所標準品を，緑色204号(ピラニンコンク)は葵巳化成(株)製の米国FDA認定品を，赤色230号の(2)(エオシンYSK)，同213号(ローダミンB)及び黄色202号の(1)(ウラニン)は同社製の化粧品用の認定市販品を用いた．

カウンターイオン用試薬として臭化テトラヘキシルアンモニウム(以下THAと略す)および臭化テトラヘプチルアンモニウム(THPA)はアルドリッチ社製特級品を，ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(DBS)および塩化セチルトリメチルアンモニウム(CTA)は東京化成工業(株)製特級品を用いた．

その他の試薬はすべて和光純薬工業(株)製特級品およびHPLC用試薬を用いた．

2．装置及び器具　高速液体クロマトグラフ：自動注入装置付島津LC-6AD型，検出器：日本分光820-FP型ケイ光検出器，島津SPD-6AV型可視紫外検出器，データ処理装置：島津クロマトパックC-R6A型，ディスポーザブルフィルター：マイショリディスク(H-13-5)(東ソー)

3．色素標準溶液の調製　上記各色素10mgを精秤し，メタノールに溶解し，100mlとする．

4．試験溶液の調製　**4-1．**固体試料　試料0.5～2gを50mlの遠心分離管にとり，メタノール20mlを加えて

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

混和し，超音波浴を用いて15分間抽出を行った後，3,000rpmで10分間遠心分離を行った．得られた上澄液をHPLC用ディスポーザブルフィルターを用いてろ過した後，そのろ液をHPLC用試験溶液とした．

4-2． 液体試料　試料の原液又は適宜メタノールで希釈した液をHPLC用ディスポーザブルフィルターでろ過し，そのろ液をHPLC用試験溶液とした．

5．HPLCによる定性および定量　各色素の標準溶液および試験溶液のそれぞれについて，下記のHPLC測定条件に従い，測定を行った．得られたピークの保持時間により定性を行い，またピーク面積により作成した検量線を用いて定量を行った．

6．HPLC測定条件　カラム：TSKgel ODS 80_{TM}(5 μm, 4.6mm i.d.×150mm)(東ソー)，CAPCELL PAK C_{18}(5 μm, 4.6mm i.d.×150mm)(資生堂)，移動相および検出波長：表1に示す．流速：1 ml／min，カラム温度：40℃，注入量：10 μl．

実験結果および考察

I．HPLC測定条件の検討

1．カラム　酸性色素である赤色3号，同104号，同105号，同106号，同230号，黄色202号及び緑色204号のカラムは前報[1]で検討したTSKgel ODS 80_{TM}を用いた．また塩基性物質の分析にはポリマーコート型のカラムが適していると報告[4]されているため，塩基性色素である赤色213号の検討にはCAPCELL PAK C_{18}を用いた．

2．移動相　可視部および紫外部検出器による同時測定を目的とするため，前報[1]で検討した移動相(表1)を用いた．

3．検出波長　a)ケイ光波長(E_M)可視部検出器およびケイ光検出器を直列につないだHPLC装置に各色素の標準溶液を注入し，可視部ピークが得られた時点で送液を止め，ケイ光検出器を用いて270～700nmの範囲のケイ光スペクトルを測定した．一例として赤色213号のケイ光スペクトルを図1に示す．図1において500nm付近のピークは，溶媒ブランクにおいても検出され，溶媒等の散乱光によるものと思われる．表1に各色素の最適ケイ光波長を示す．

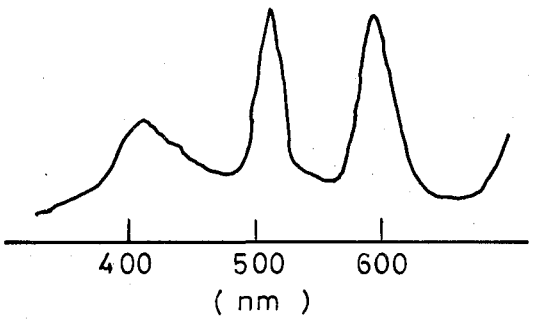


図1．赤色213号のケイ光スペクトル
励起波長：254nm

表1．水溶性ケイ光タール色素のHPLC測定条件

色　素	赤色3号	赤色104号	赤色105号	赤色106号
移動相				
CH_3CN：0.05Mリン酸二水素ナトリウム	3：2	4：1	4：1	3：2
カウンターイオン[2]	THA	THPA	THPA	THA
pH[4]	3			3
励起波長(nm)	550	560	570	570
ケイ光波長(nm)	560	570	580	580

色　素	赤色213号	赤色230号	黄色202号	緑色204号
移動相				
CH_3CN：0.05Mリン酸二水素ナトリウム	3：2	3：2	☆[1]	3：2
カウンターイオン[2]	DBS	THA	CTA[3]	THA
pH[4]	3	3	5	3
励起波長(nm)	570	540	470	300
ケイ光波長(nm)	590	550	510	520

1) CH_3OH-CH_3CN-0.05Mリン酸二水素ナトリウム(35：15：50)　2)0.005M
3) 0.002M　4)リン酸にて調整

b)励起波長(E_x)　ケイ光波長を表1に示した波長とし，種々の励起波長を用いて各色素についてHPLCを行い，得られたクロマトグラムのピーク高により最適励起波長を求めた．赤色213号について励起波長とピーク高の関係を図2に示し，同様にして得られた各色素の最適励起波長を表1に示す．黄色202号においては240nmに最高値を認めたが，この波長ではノイズが大きくSN比が不良であったため，励起波長として470nmを設定した．また図3に表1の検出波長を用いて測定した赤色106号(図3のa)，赤色230号(同b)及び赤色3号(同c)のクロマトグラムを示す．いずれの色素も検出波長による感度差が大きく僅かな波長変更により検出感度が異なるので各色素の最適波長を用いることが重要である．

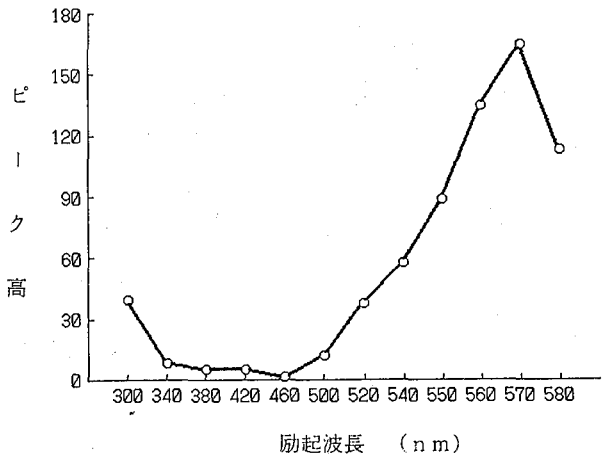


図2．各励起波長におけるピーク高の変動
試料：赤色213号，ケイ光波長：590nm

表2．各検出器における定量限界の比較

色　素	ケイ光	可視	紫外
	μg／ml	μg／ml	μg／ml
赤色　3号	0.1	1	
赤色104号	0.02	0.2	
赤色105号	0.1	0.2	
赤色106号	0.01	0.1	
赤色213号	0.002	0.2	
赤色230号	0.02	0.1	
黄色202号	0.1		10
緑色204号	0.002	0.2	

試料液注入量：10μl

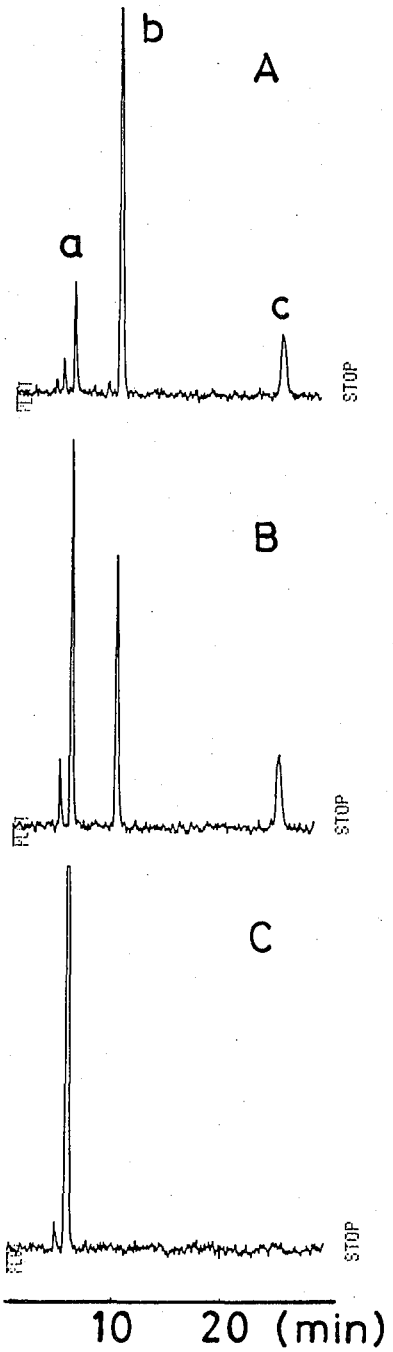


図3．各測定波長によるクロマトグラム
測定波長；A：E_x540nm, E_M550nm, B：E_x550nm, E_M560nm, C：E_x570nm, E_M580nm, ピーク；a：赤色106号, b：赤色230号
c：赤色3号，その他のHPLC測定条件は表1による．

4．各色素の定量限界 各色素についてケイ光検出器，可視部検出器および紫外部検出器における定量限界を比較した．表2にその結果を示す．ケイ光検出器を用いることにより，赤色213号，黄色202号及び緑色204号は可視部検出器の約100倍の感度上昇が認められた．しかし赤色105号ではそれほどの感度の上昇は認められなかった．黄色202号は可視部において適当な検出波長がなく，紫外部検出器では感度が非常に悪いため，ケイ光検出器を用いて測定することは最良な手段となると思われる．

Ⅱ．市販化粧品中の赤色213号の定量

1．赤色213の検量線作成 表1に示した励起波長570nm，ケイ光波長590nmを用いて，HPLCの測定条件に従って操作した．検量線は赤色213号の標準溶液をメタノールで希釈し，0～20ng／mlの標準系列を調製して作成した．

2．添加回収率および市販化粧品の分析結果 界面活性剤等の影響によりTLCによる分析が困難なシャンプーに赤色213号を20ng／g添加し，回収実験を行い表3にその結果を示した．5回の実験の平均回収率は98.3%で，変動係数は2.6%であった．そこで，本法により市販化粧品中の赤色213号の分析を行った．表4に分析結果を，図4に市販シャンプーのクロマトグラムを示す．本法を用いることにより，化粧水のように極めて微量含まれる製品からシャンプーのように高濃度の製品まで赤色213号を高感度で精度良く分析することができた．

表3．シャンプーに対する赤色213号の添加回収率

赤色213号添加量	赤色213号検出量	回収率
ng／g	ng／g	%
0	20.95	
20	40.83	99.40
20	41.70	103.75
20	40.96	100.05
20	38.87	89.60
20	40.69	98.70
平均値	40.61	98.30
標準偏差	1.05	
変動係数	2.58%	

表4．市販化粧品中の赤色213号の分析値

試料		赤色213号 μg／g
シャンプー	1	0.79
	2	2.55
	3	2.03
リンス	1	1.54
	2	0.21
	3	1.76
化粧水	1	0.050
	2	0.092
	3	0.0059
クリーム	1	0.14
コールドパーマ液	1	0.93

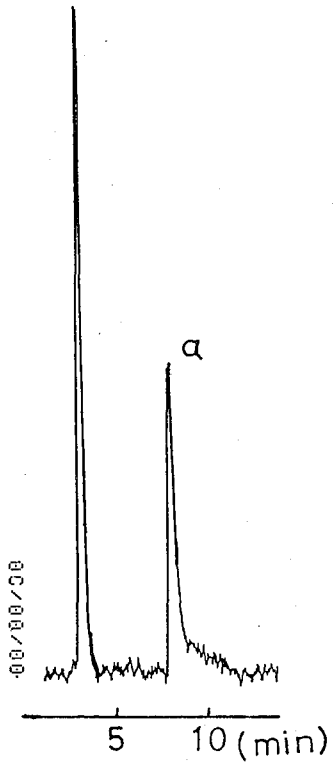


図4．市販シャンプーのクロマトグラム
ピークa：赤色213号
測定条件：表1による

ま と め

ケイ光検出器付HPLCを用いて，8種のケイ光タール色素の分析法を検討した．ケイ光検出器を用いることにより，概ね可視部または紫外部検出器より約10～100倍

の検出感度が得られた．また，TLC 分析等において複雑な前処理を必要とするシャンプーに赤色213号を添加して本法により回収実験を行ったところ，精度良く分析することができた．本法で赤色213号配合の市販化粧品を分析したところ，0.005～2.6 μg／g を検出した．

（本研究の概要は日本薬学会第111年会，1991年３月で発表した．）

文　献

1) 日本薬学会110年会講演要旨集Ⅳ，P. 176 (1990)
2) 桑野和民，三田村敏男：食衛誌，**27**，278-282，1986
3) Gagliardi, L., Cavazzutti, G., Amato, A., Basili, A. and Tonelli, D.: *J. Chromatogr.* **394**, 345-352, 1987
4) Ohtsu, Y., Shimojima, Y., Okumura, T., Koyama, J., Nakamura, K. and Nakata, O.: *J. Chromatogr.*, **481**, 147-157, 1989

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 49-53, 1991

高速液体クロマトグラフィーによるトウガラシチンキ配合育毛剤中のカプサイシン，ノナン酸バニリルアミドおよびジヒドロカプサイシンの定量

岸本清子*，池田一夫*，鈴木助治*，中村　弘*

Determination of Capsaicin, Nonanoic Acid Vanillylamide and Dihydrocapsaicin in Hair Tonics Containing Capsicum Tincture by High Performance Liquid Chromatography

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

Keywords：高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography，トウガラシチンキ capsicum tincture，カプサイシン capsaicin，ノナン酸バニリルアミド nonanoic acid vanillylamide，ジヒドロカプサイシン dihydrocapsaicin，育毛剤 hair tonic，化粧品 cosmetics

緒　言

動植物を含む天然物は古くから美容や民間療法に使用されている．現在でもその伝統は続いており，消費者の自然指向ブームと相まって，多くの天然物が化粧品および医薬部外品に配合されている．しかし，化粧品および医薬部外品(以下化粧品等と略す)に使用される植物エキス等の天然物は，それらの有効成分や配合量に関する規制基準が十分整備されていないのが現状である．天然物という性格上，成分含量に関する基準の設定は困難であるが，最近，植物エキス配合化粧品等が増加の傾向にあるため，著者らは薬事衛生上意義あることと考え，すでにそれらの品質評価の手段として有効成分の分析法について検討してきた．[1,2]

トウガラシチンキは，医薬品では局所刺激薬として神経痛，筋肉痛などの外用薬に，また化粧品等では毛根刺激剤，頭皮刺激剤，止痒剤として養毛，育毛剤に使用されている．トウガラシチンキは皮膚刺激性が強いために，厚生省告示の化粧品品質基準[3]により化粧品への配合量は1.0%以下に規制されている．しかし，化粧品原料基準[4]では「トウガラシまたはその変種の果実をエタノールで浸出して製したチンキ剤」とされており，有効成分に関する規定はない．また，医薬部外品に関しては，特に規制基準はない．

トウガラシの辛味成分としてはカプサイシン，ジヒドロカプサイシン，ノルジヒドロカプサイシンなどのカプサイシノイドがある．これらの主成分に関する分析法としては，食品，生薬および医薬品を対象とした高速液体クロマトグラフィー(HPLC)[5-9]およびガスクロマトグラフィー[10-12]などが報告されている．しかしトウガラシチンキ配合量の少ない化粧品等を対象にした分析法はほとんど報告がみられない．大西ら[13]はHPLCによるカプサイシノイドの相互分離を検討しているが化粧品分析への詳細な応用は行っていない．従って，実際試料における簡易かつ実用的な分析法の開発が必要である．

そこで今回，著者らは化粧品等の品質評価の基礎的研究の一環として，トウガラシチンキ配合育毛剤中のカプサイシンとジヒドロカプサイシンおよび合成カプサイシンとして配合されるノナン酸バニリルアミドの3種類のカプサイシノイドに着目してHPLCによる定量法を検討し，市販育毛剤に適用できたので報告する．

実験方法

1．試薬及び試料　1)カプサイシン(CAP)—和光純

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

薬工業製(生薬試験用)，ノナン酸バニリルアミド(NVA)—東工化学製，ジヒドロカプサイシン(DHC)—シグマ社製カプサイシンから合成したものを用いた[10]．その他の試薬は試薬特級を用いた．

2)標準溶液—CAP，NVA およびDHC を各々5 mg 精秤し，メタノールに溶かして50ml とした．これを必要に応じてメタノールで希釈し，それぞれ1，2，3，4，5 μg／ml の標準溶液を調製した．

3)試料—市販の養毛・育毛剤10製品を昭和62年～平成2年の間に東京都内の小売店より入手した．

4)カートリッジ式カラム—Sep-Pak C_{18}，Sep-Pak Si カートリッジ(ウォーターズ社製)，Bond Elut SI(バリアン社製)．

2．装置 高速液体クロマトグラフ—ポンプ：日立655A-12型，試料注入装置：レオダイン社製7125型，ケイ光検出器：日本分光820-FP 型，データ処理装置：島津C-R 5 A型．

ガスクロマトグラフ質量分析計—質量分析計：VG Analytical 社製 VG70- S 型，ガスクロマトグラフ：Hewlett Packard 5890 A 型，データ処理装置：VG Analytical社製11-250 J 型．

3．試験溶液の調製 50ml のナシ型フラスコに試料約1 g を精密に秤取し，エタノール5 ml を加え，ロータリーエバポレーターを用いて40℃で減圧濃縮する．さらにエタノール5 ml を加えて再び濃縮する．残留物にジクロルメタン5 ml を加えて溶解し，Sep-Pak Si カートリッジに10ml のガラス製注射器を用いて徐々に吸着後，さらにジクロルメタン15ml を流して洗浄する．ついでメタノール—ジクロルメタン(2：8)の混液を流して溶出液3 ml を採取し，HPLC 用試験溶液とする．

4．HPLC による定量 試験溶液5 μl を HPLC に付し，あらかじめ CAP，NVA および DHC の1.0～5.0 μg／ml の標準系列より作成した検量線により定量を行う．

HPLC 測定条件－カラム：TSKgel-ODS 80T_M，5 μm，4.6mm i.d.×15cm(東ソー製)，カラム温度：40℃，移動相：メタノール－0.05M硝酸銀溶液(17：10)，流速：0.8ml／min，ケイ光検出器：Ex.270nm，Em.330nm．

5．カプサイシノイドの確認 CAP，NVA および DHC をガスクロマトグラフー質量分析計(GC／MS)に付してマスクロマトグラムをとり，ピークの保持時間およびそれらのマススペクトルを測定して確認した．また，微量のカプサイシノイドが検出された場合には，m／z 137における Selective Ion Monitoring(SIM 法)により同定を行った．

GC／MS 測定条件—カラム：DB1701，0.25mm i.d.×30m(J&W Scientific)，カラム温度：60℃(0分)→昇温(30℃／分)→270℃(0分)→昇温(2.5℃／分)→280℃(10分)，キャリアーガス：ヘリウム，1 ml／分(15psi)，注入モード：スプリットレス，イオン化方法：電子衝撃型(EI)，イオン化電圧：70eV，分解能：1000，質量範囲：m／z 50-500

実験結果および考察

1．前処理法の検討 育毛剤には高級アルコール類や油脂等の基剤，界面活性剤，香料，殺菌剤などが配合されている．そのため試料の希釈液を直接 HPLC に注入した場合，カプサイシノイドのピーク付近に妨害ピークが出現したり，保持時間の大きいピークの出現によって分析時間が延長し，カラムの劣化が生ずるなど問題が多い．そこで，これらの妨害物質の除去を目的としてカートリッジ式の前処理カラムを用いたクリーンアップ法を検討した．

まず，カプサイシノイドを逆相系の Sep-Pak C_{18} と順相系の Sep-Pak Si および Bond Elut SI の各カートリッジに吸着させ，それぞれメタノールによる溶出を試みたが，Bond Elut SI については強く吸着し，溶出できなかった．

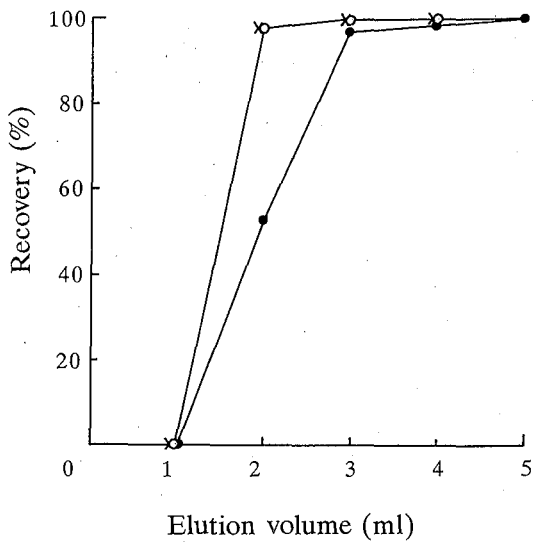


Fig. 1. Elution of CAP from Sep-Pak Si Cartridges by Various Solvents

×—×：CH_3OH

○—○：CH_3OH-CH_2Cl_2(2：8)

●—●：CH_3OH-CH_2Cl_2(1：9)

これに対して Sep-Pak C_{18} カートリッジを使用した場合，育毛剤をカートリッジに吸着させ，水洗後，メタノールで CAP および DHC を溶出させることができたが，HPLC 用カラムと同じ逆相モードのため，試料によっては近接する妨害ピークを完全に除去することができなかった．

そこで，次に順相系の Sep-Pak Si について検討した．育毛剤をカートリッジに吸着後，カラムをジクロルメタンで洗浄したところ，ジクロルメタン10ml で近接する妨害ピークがほとんど除去され，更に20ml までカラムを洗浄してもカプサイシノイドの溶出は見られなかった．なお，ヘキサンを用いた場合は若干のカプサイシノイドの溶出が認められた．次にカートリッジからの溶出条件については，CAP を用いアセトニトリル，メタノールージクロルメタン系について検討したが，Fig. 1 に示すようにメタノールあるいはメタノールージクロルメタン（2：8）の混液を流すと，カプサイシノイドが 3 ml 以内で完全に溶出することがわかった．メタノールに比べてメタノールージクロルメタン（2：8）による溶出の方

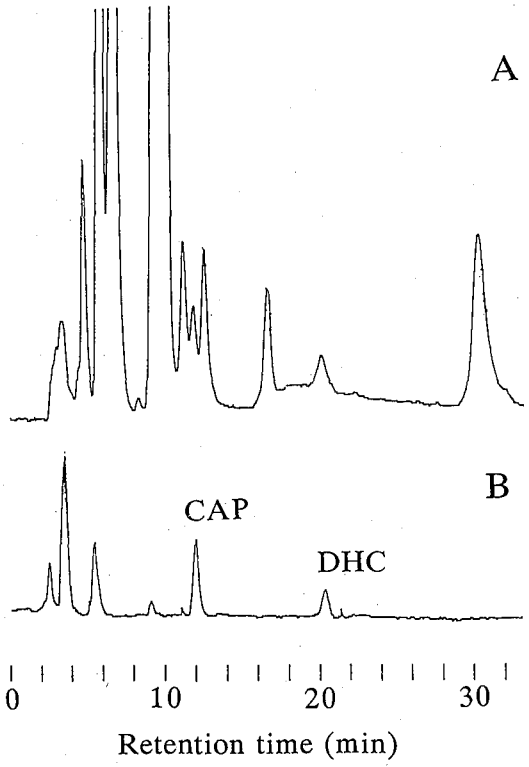


Fig. 2. High Performance Liquid Chromatograms of Hair Tonic before (A) and after (B) Clean-up with Sep-Pak Si Cartridge

Sample 1.0g
↓ EtOH 5ml X 2
evaporate twice under reduced pressure at 40℃
↓ CH_2Cl_2 5ml
adsorb to Sep-pak Si cartridge
↓ wash with CH_2Cl_2 15ml
elute with CH_3OH-CH_2Cl_2 (2:8) 3ml
↓
HPLC (5μl)
column : TSKgel-ODS 80Tᴍ (4.6mm i.d. X 150mm),
column temp. : 40℃, moble phase : CH_3OH - 0.05M $AgNO_3$ (17:10), flow rate : 0.8ml/min,
detection : Ex:270nm, Em:330nm

Fig. 3. Analytical Procedure for CAP, NVA and DHC

がカラムに吸着した妨害物質の溶出を防ぐことができ，Fig. 2 に示すように実試料においても良好なクリーンアップを示した．

以上の検討結果より試料の前処理は，Fig. 3 に示すように試料にエタノールを加え，減圧下濃縮操作を繰り返して香料等の揮発性物質を留去後，Sep-Pak Si カートリッジに吸着，ジクロルメタンで洗浄し，メタノールージクロルメタン（2：8）の混液で CAP，NVA および DHC を溶出させて試験溶液を調製することとした．

2．HPLC 条件の検討　ODS 系カラムを用い，移動相としてアセトニトリル－水－酢酸系およびメタノール－0.05M 硝酸銀溶液系を検討した．アセトニトリル－水－酢酸系では CAP と NVA の分離を達成することはできなかった．これに対してメタノール－0.05M 硝酸銀溶液系では，Fig. 4 に示すように 3 成分の分離は良好であ

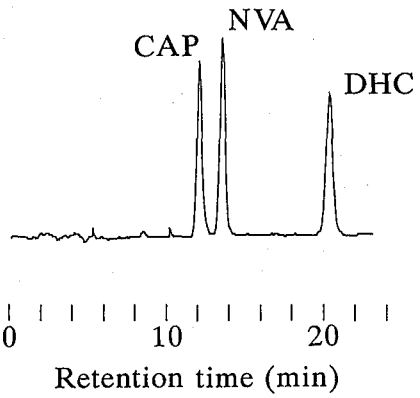


Fig. 4. High Performance Liquid Chromatogram of CAP, NVA and DHC

Table 1. Recovery of CAP, NVA and DHC added to Hair Tonics

Sample	Capsaicinoid	Found (μg)	Added (μg)	Recovery(%), n = 5		
				Range	Average	C.V.[2)]
Hair Tonic A[1)]	CAP	-	5	84.6-101.2	91.6	7.0
	NVA	-	5	83.9- 95.3	90.3	5.5
	DHC	-	5	86.8- 97.5	92.1	5.0
Hair Tonic B[1)]	CAP	5.9	10	81.2- 96.0	85.2	7.2
	NVA	-	10	85.4- 96.0	89.5	4.3
	DHC	2.4	10	80.2- 95.0	89.3	5.4

1) Amount of sample taken : 1.0g

2) Coefficient of variation(%)

り，その保持時間はCAP 12.7，NVA 14.0，DHC 20.3分であった．また，UV検出器(280nm)に比べ，ケイ光検出器(Ex. 270nm，Em. 330nm)の方が約10倍の感度を示したため，カプサイシノイドの検出にはケイ光検出器を用いた．

3．検量線 CAP，NVAおよびDHCは，1.0−5.0μg／mlの範囲で濃度とピーク面積の間に原点を通る直線関係が得られた．なお，本法における検出限界はいずれも約0.5μg／gであった．

4．添加回収実験 本法の定量性と再現性について検討するため，市販育毛剤を用いて添加回収実験を行った．その結果をTable 1に示す．トウガラシチンキ未配合の育毛剤AにCAP，NVA，DHCの各5μgを添加したところ，5回の平均回収率はいずれも90%以上，変動係数は7%以下であった．トウガラシチンキ配合の育毛剤BはCAPの含有量が5回の平均測定値で5.9μg／g，DHCが2.4μg／gであった．これに各カプサイシノイドの10μgを添加したところ，平均回収率は83%以上，変動係数は7%以下であり，定量性，再現性共にほぼ満足できる結果が得られた．

5．GC／MSによるCAP，NVAおよびDHCの確認 育毛剤中のトウガラシチンキは配合量が少ないため，試料中に含有されるCAP，NVAおよびDHCは極めて微量である．そのため，HPLCでカプサイシノイドを検出したときは，GC／MSでSIM法によってそれらの確認を行った．

カラムとしてはDB-1，DB-17，DB-1701，FFAPを検討したが，Total Ion Chromatogram(TIC)においてCAP，NVA及びDHCの相互分離が最も良好なDB-1701を使用した．マスクロマトグラムより各ピークにおけるマススペクトルを測定したところ，Fig. 5に示すように

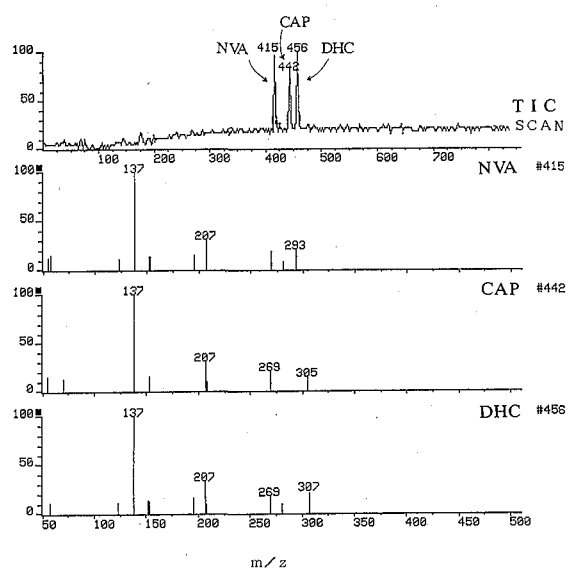


Fig. 5. Total Ion Chromatogram and Mass Spectra of NVA, CAP and DHC

分子イオンピークはNVAがm／z 293，CAPがm／z 305，DHCがm／z 307であり，ベースピークはいずれもベンジル位で開裂したm／z 137($C_8H_9O_2$)[6)]が観察された．そこで，試料中のCAP，NVAおよびDHCの検出にはm／z 137をモニターするSIM法を用いた．Fig. 6に示すように，トウガラシチンキ配合の市販育毛剤(Table 2，検体No.3)の微量CAPとDHAを確認することができた．SIM法によってCAP，NVAおよびDHCは0.05〜0.5μg／mlの濃度レベルで十分確認することができるが，それらの濃度とピーク面積の間には直線関係が見られず定量性は得られなかった．

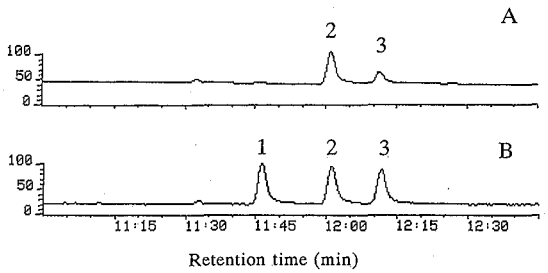


Fig. 6. Chromatograms of Hair Tonic (A) and Capsaicinoid Standards (B) by SIM (m/z 137)
1：NVA, 2：CAP, 3：DHC

Table 2. Analytical Results of Hair Tonics Containing Capsicum Tincture

Sample No.	Content(μg/g) CAP	NVA	DHC
1	1.5	—	1.0
2	—	—	—
3	5.9	—	2.4
4	4.8	—	2.1
5	1.4	—	0.6
6	—	—	—
7	1.5	—	1.0
8	6.1	—	2.0
9	—	—	—
10[1)]	—	29.0	—

1) The sample contains NVA.

6．市販育毛剤の分析結果 本法をトウガラシチンキ配合の表示がある市販育毛剤10検体に適用した．Table 2に分析結果を示す．いずれの試料においても直接の妨害ピークは認められず，CAP，NVA およびDHC を定量することができた．

以上の結果，カプサイシノイドを定量することにより育毛剤中のトウガラシチンキを確認することが可能になった．従って，トウガラシチンキ配合育毛剤の品質評価のための手段として有効と考えられる．しかし，トウガラシチンキの配合量が少ない化粧品に関しては未だ十分とは言えない．植物成分配合化粧品の増加は，消費者が天然物の持つ緩和な薬効や安全性に関心が高く，その要望の現れであると考えられるが，実際には化粧品に配合される微量天然成分の分析が困難であるため定量的評価はほとんど行われておらず，トウガラシチンキ配合化粧品においても安全性や品質評価の面から，更に高感度，高精度の定量法を検討する必要があると考える．

ま と め

トウガラシチンキ配合の育毛剤について，HPLC によるCAP，NVA およびDHC の定量法を検討した．

1)HPLC 用カラムとしてTSKgel-ODS 80T_M，移動相にメタノール－0.05M硝酸銀溶液(17：10)を用いて分離定量することができた．

2)クリーンアップ操作は，Sep-Pak Si カートリッジを用いて行い，ジクロルメタンで処理することにより夾雑物を除去することができた．

3)市販育毛剤に対してCAP，NVA，DHC を各々5μg および10μg 添加したときの回収率は84％以上であった．

本法はカプサイシノイドの簡易かつ迅速な定量法としてトウガラシチンキ配合の市販育毛剤に適用できる．

引 用 文 献

1) Nakamura, H. and Okuyama, T.: *J. Chromatogr.*, **509**, 377-382 (1990).
2) 岸本清子，鈴木助治，中村弘，渡辺四男也：衛生化学，**35(5)**，377-381 (1989).
3) 化粧品品質基準，昭和42年8月8日厚生省告示第321号
4) “化粧品原料基準第2版注解”，p718，p1715，日本協定書協会編，薬事日報社，東京，1984.
5) 厚生省生活衛生局食品化学課：厚生省食品化学レポートシリーズ，**39**，209-212(1985).
6) Games, E. D. and Alcock, J.N.: *J. Chromatogr.*, **294**, 269-279 (1984).
7) Iwai, K., Suzuki, T. and Fujiwake, H.: *J. Chromatogr.*, **172**, 303-311 (1979).
8) Jurenitsch, J. and Kampelmuhler, I.: *J. Chromatogr.*, **193**, 101-110 (1980).
9) Kawada, T., Watanabe, T., Katsura, K., Takami, H. and Iwai, K.: *J. Chromatogr.*, **329**, 99-105 (1985).
10) 風間成孔，寺島潔，高橋利恵子，安田一郎，秋山和幸，原田裕文:医薬品研究，**16(1)**，155-164 (1985).
11) Jurenitsch, J. and Leinmuller, R.: *J. Chromatogr.*, **189**, 389-397 (1980).
12) Krajewska, M. A. and Powers, J. J.: *J. Chromatogr.*, **409**, 223-233 (1987).
13) 大西重樹，米谷融，原昭二：薬学雑誌，**103(2)**，236-239 (1983)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 54-57, 1991

ヘッドスペース・キャピラリーガスクロマトグラフィーによるシャンプー中の1，4－ジオキサンの含有量調査

雨宮　敬*，鈴木助治*，中村　弘*

Determination of 1, 4-Dioxane in Shampoos by Headspace Capillary Gas Chromatography

TAKASHI AMEMIYA*, SUKEJI SUZUKI* and HIROSHI NAKAMURA*

Keywords：化粧品　cosmetics, シャンプー　shampoo, 1, 4-ジオキサン　1, 4-dioxane, ヘッドスペース・キャピラリーガスクロマトグラフィー　headspace capillary gas chromatography

緒　言

ポリオキシエチレン系非イオン界面活性剤は，各種化粧品の乳化剤や洗浄剤等として頭髪化粧品，クリーム，ローション等に汎用されている．特にシャンプー等では洗浄力を高めるためポリオキシエチレンアルキル硫酸エステル，ポリオキシエチレンアルキルエーテル及びポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル等が1－10%程度の高濃度に配合されている．これらの界面活性剤は原料の高級アルコールに2－20モルのエチレンオキサイドを付加重合させて製造するため，その過程で1，4－ジオキサンを副成する[1,2]ことが指摘されている．

1，4－ジオキサンは動物実験において発ガン性が認められるという[3-5]ことから，わが国では「化審法」[6]により人の健康を損なう恐れの疑いのある化学物質として，その製造量及び輸入量の届出を必要とする「指定化学物質」に指定されている．1，4－ジオキサンの分析法には，Birkel法[7]，溶媒抽出－GC法[8]等が報告されているが，微量分析には複雑な前処理を必要とするなど，迅速性，感度等において満足すべきものではない．Beenaertら[9]はオートサンプラー付ヘッドスペース・キャピラリーガスクロマトグラフィーを用いて，簡便かつ良好な精度で化粧品中の1，4－ジオキサンの定量を行っている．その結果によるとベルギー及び当時の西ドイツ等の市販化粧品特にシャンプー中に1，4－ジオキサンを最高612 μg／g 検出している．

しかし，わが国においては化粧品中の1，4－ジオキサン含有量に関する報告は殆どみられない．そこで，著者らは，Beenaert[9]らの方法に準拠して都内に流通する市販シャンプー中の1，4－ジオキサンの含有量を調査したので報告する．

実験方法

1．試料　平成2年10月から11月において東京都内で購入した市販シャンプーであり，総検体数は70検体を試験に供した．

2．試薬　1，4－ジオキサン標準溶液：1，4－ジオキサン(和光純薬) 1 g を精秤し，水に溶かして正確に50ml とする．

3．装置　ヘッドスペースサンプラー：ヒューレット・パッカード19395A型(概略図を，Fig.1に示す)，ガ

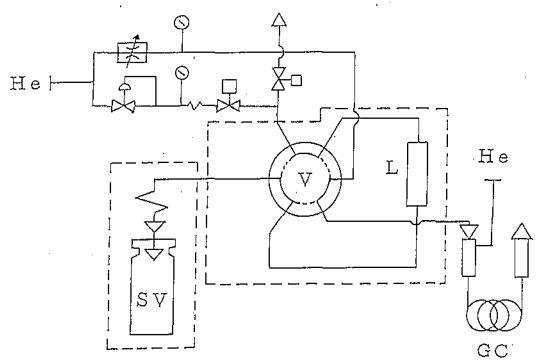


Fig. 1. Diagram of Headspace Sampler
SV：Sample Vial (20ml), V：Gas Sampling Valve, L：Sample Loop, GC：Capillary Gas Chromatograph, He：Carrier Gas

*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

スクロマトグラフ：ヒューレット・パッカード5890型，インテグレーター：ヒューレット・パッカード3950型，ガスクロマトグラフ／質量分析計：VG-70s 型 VG アナリティカル社製，ミキサー：オートマティックラボミキサー NS-8(井内製)

4．ヘッドスペースサンプラー操作条件 恒温槽温度：70℃，バイアル浸漬時間：30分，サンプルループ温度：75℃，ヘッドスペースガス採取量：1 ml，プレシャリゼーション：10秒，ベント：10秒，インジェクション：30秒

5．ガスクロマトグラフ測定条件 カラム：Halomatics 624化学結合型フューズドシリカキャピラリー，長さ30m，内径0.53mm，膜厚3 μm(シアノプロピル・メチル・フェニルシリコン，カドレックス社製)，カラム温度：50℃→220℃(4 ℃／min昇温)，注入口温度：250℃，検出器温度：250℃，キャリヤーガス流量：He 30ml／min，検出器：FID

6．検量線 1，4－ジオキサンを検出しない試料(シャンプー)を予め用意し，その1.0g ずつを6ケの20ml のバイアルにそれぞれ正確にはかりとる．次にマイクロシリンジを用いて1，4－ジオキサンをそれぞれ0，10，20，50，100，200 μg となるように，1，4－ジオキサン標準溶液を加えてマグミキサーでよく混和する．このバイアルを内側をテフロンでコーティングしたブチルゴム製セプタムとアルミキャップで密栓した後，ヘッドスペースサンプラーの恒温槽に装填する．次にヘッドスペースサンプラー及びガスクロマトグラフの操作条件に従って操作し，得られた1，4－ジオキサンのピーク面積から検量線を作成する．

7．分析方法 試料1.0g を20ml バイアルに精秤し，前記検量線の作成と同様に操作して，得られたクロマトグラムの保持時間から定性を行い，ピーク面積と検量線から定量を行った．

結果及び考察

1．恒温槽の設定温度 ヘッドスペースサンプラーの恒温槽設定温度と試料からの1，4－ジオキサン発生量の関係について検討した．1，4－ジオキサンを検出しない試料1.0g に1，4－ジオキサンが100 μg となるように1，4－ジオキサン標準溶液を加えてよく混和したのち，40℃から80℃まで10℃毎に設定温度を変えて1，4－ジオキサン発生量を測定した．Fig.2に示すように50℃では最高ピーク面積の50％強であったが，60℃以上でほぼ一定面積に達したので，ヘッドスペースサンプラーの恒温槽の設定温度を70℃とした．

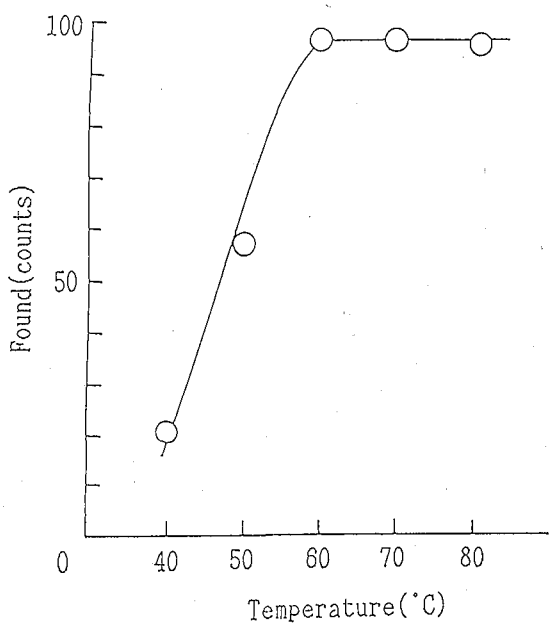


Fig. 2. Effect of Temperature on Amount of 1, 4-Dioxane in Headspace Gas

2．バイアルの浸漬時間 ヘッドスペースサンプラー恒温槽の設定温度を70℃とした時のバイアルの浸漬時間の影響を検討した．前記同様の試料を作成し，70℃とした恒温槽に入れ，5分及び10から90分まで10分間隔に検

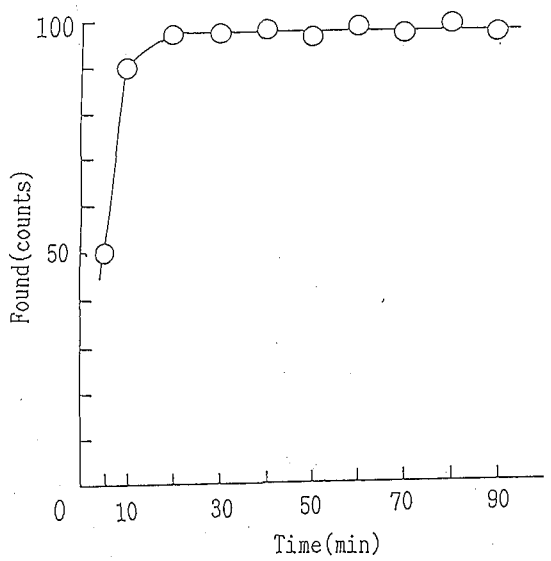


Fig. 3. Effect of Time on Amount of 1, 4-Dioxane in Headspace Gas

討した．Fig.3に示したように浸漬時間20分以上でほぼ一定のピーク面積が得られたので，恒温槽の浸漬時間を30分に設定した．

3．検量線 実験方法6の検量線の作成に従って作成した検量線は10－200 μg／g の範囲で良好な直線性が得られた．

4．添加回収率 1，4－ジオキサンを含有しない試料1.0g を精秤し，これに1，4－ジオキサン20，50及び100 μg となるように1，4－ジオキサン標準溶液を添加してそれぞれの回収率を求めた．測定はそれぞれ10回繰り返して行ったところ，Table 1に示すように回収率はいずれの濃度段階においても100.1-100.9％であり，

Table 1. Recoveries of 1, 4-Dioxane from Shampoos (N＝10)

Sample	Sample weight(g)	Added (μg)	Recovery (％)	C.V. (％)
Shampoo	1.0	20	100.1	5.7
	1.0	50	101.4	6.1
	1.0	100	100.9	6.0

変動係数も約6％とほぼ良好な値を示した．なお，本法の検出限界は2 μg／g であった．

5．実際試料の測定結果 市販シャンプー70検体の測定結果をTable 2に示す．また，Fig.4に市販シャンプー

Table 2. Analytical Results of 1, 4-Dioxane in Commercial Shampoos

Sample No.	Content of 1, 4-Dioxane (μg／g)	Sample No.	Content of 1, 4-Dioxane (μg／g)	Sample No.	Content of 1,4-Dioxane (μg／g)
1＊	7.0	26＊	2.9	51＊	6.8
2＊	7.3	27	ND	52＊	11.7
3＊	53.2	28＊	27.2	53＊	ND
4＊	3.5	29＊	8.0	54＊	ND
5＊	14.3	30＊	ND	55	ND
6＊	17.5	31＊	13.5	56	ND
7＊	14.4	32＊	ND	57	ND
8＊	7.2	33＊	ND	58＊	18.5
9＊	ND	34＊	ND	59＊	6.6
10	ND	35＊	3.9	60＊	5.1
11	ND	36＊	27.1	61＊	16.7
12	ND	37	ND	62＊	ND
13	ND	38	6.0	63＊	ND
14	ND	39＊	ND	64	ND
15	ND	40	28.5	65＊	11.3
16＊	9.4	41	ND	66＊	ND
17＊	22.2	42	11.3	67＊	ND
18＊	30.0	43＊	67.7	68＊	18.8
19＊	45.6	44	ND	69＊	17.8
20＊	21.9	45	ND	70	9.6
21	ND	46＊	15.5		
22	ND	47	ND		
23	27.2	48	ND		
24＊	8.3	49	ND		
25	3.2	50	ND		

ND：not detected

＊：Polyoxyethylene nonionic surfactant indicated on the container of commercial shampoos was contained

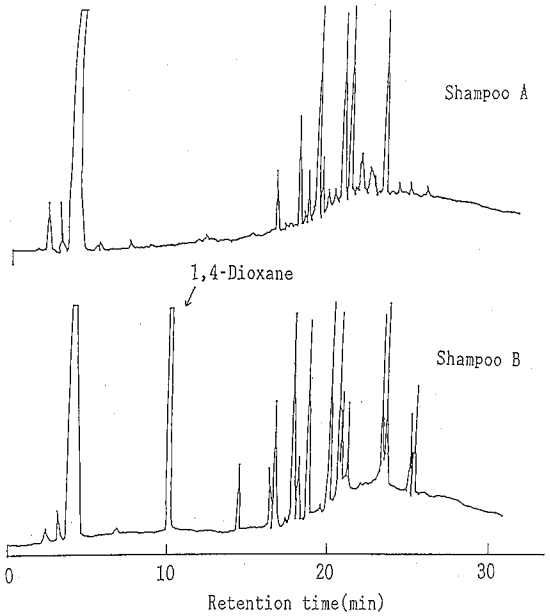


Fig. 4. Gas Chromatograms of 1, 4-Dioxane in Shampoos

の代表的なクロマトグラムを示す．図のAは1，4－ジオキサンを検出しない例であり，Bは検出したものである．1，4－ジオキサンの保持時間は約10分であった．1，4－ジオキサンの確認はガスクロマトグラフ／質量分析計(GC／MS)で行った．m/z 88の分子イオンピーク及びm/z 58，43，28の各フラグメントピークより確認した．

市販シャンプー70検体の測定結果をみると，検出限界の2 μg／g以下のもの(Table 2ではNDと表示)は33検体(47％)認められたが，全体の53％に相当する37検体より2 μg／g以上の1，4－ジオキサンが検出された．その内訳は2－10 μg／gのもの15検体(21％)，11－20 μg／gのもの12検体(17％)，21－30 μg／gのもの7検体(10％)及び31 μg／g以上のもの3検体(4％)であった．最高値は67.5 μg／gであり，全体の平均値は9.0 μg／gであった．これらの結果をBeenaert[9]らが報告している測定値612，490，290 μg／g等と比較するとかなり低い値であった．Leungら[10]は1，4－ジオキサンのヒトに対する実質安全量(Virtually safe dose, VSD)を0.8mg／kg／日としていることやシャンプーは使用後直ちに洗い流すものであること等からこの程度の含有量ではヒトの健康に直接影響を及ぼすことはないと考えられる．しかし，わが国の化粧品輸入量の増加をかんがみると，今後とも製品の監視を適時行っていく必要があるものと考える．

ま と め

ヘッドスペースサンプラー付キャピラリーガスクロマトグラフィーを用いて市販シャンプー70検体について1，4－ジオキサンの含有量調査を行った．その結果，全体の53％の検体より2 μg／g以上の1，4－ジオキサンが検出され，その最高値は67.5 μg／gであった．また，全体の平均濃度は9.0 μg／gであった．

(本研究の概要は日本薬学会第111年会1991年3月で発表した．)

文 献

1) Worsfold, D. J. and Eastham, A. M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 897-899, (1957)
2) Worsfold, D. J. and Eastham, A. M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 900-902, (1957)
2) Argus, M. F., Arcos, J. C. and Hogh-Ligeti, C.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **35**, 949-958 (1965)
4) Kociba, R. J., McCollister, S. B., Park, C., Torkelson, T. R. and Gehring, P. J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **30**, 275-286 (1974)
5) Hogh-legeti, C., Argus, M. F. and Arcos, J. C.: *Br. J. Cancer*, **24**, 164-167 (1970)
6) 「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(昭和48年，法律第117号)
7) Birkel, T. J., C. R., Warner, T. and Fazio, T.: *J. Assoc, Off. Anal. Chem.*, **62**, 931-936, (1979)
8) Black Donald, B., Lawrence Roberrt, C., Lovering Edward, G. and Watson James, R.: *J. Assoc, Off. Anal. Chem.*, **66**, 180-183 (1983)
9) Beernaert, H., Herpol-Borrremans, M. and De Cock, F: *Belg. J. Food, Chem. Biotech.*, **42**, 131-135 (1987)
10) H. Leung: *Toxicol. Lett.*, **51**, 147, 1990

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 58-64, 1991

1982年～1990年東京都衛生検査所精度管理調査における血液学的検査結果

蓑輪佳子*, 大石向江*, 小林千種*, 一言　広*,
五味邦英**, 渡辺清明***, 河野均也****

The External Quality Assessment at the Registered Clinical Laboratories in Tokyo for Hematology from 1982 to 1990

KEIKO MINOWA*, HISAE OISHI*, CHIGUSA KOBAYASHI*,
HIROSHI HITOKOTO*, KUNIHIDE GOMI**,
KIYOAKI WATANABE*** and KINYA KAWANO****

Keywords：登録衛生検査所 registered clinical laboratory，外部精度管理調査 external quality assessment，血液学 hematology，変動係数 coefficient of variation，自動血球計数器 automated blood cell counter

緒　言

東京都では東京都医師会の協力を得て，1982年から都内の登録衛生検査所を対象に検査精度の向上をめざして，生化学，血液学，血清学，微生物学検査の外部精度管理調査を年1回実施してきた．その調査結果は「東京都衛生検査所精度管理調査結果報告書[1)]」として毎年報告されている．

その中の血液学検査は，赤血球数，白血球数，ヘモグロビン，ヘマトクリット，血小板数の5項目を対象として実施している．調査試料としては新鮮血液とコントロール血液の両方を使用している．このような新鮮血液を使用した調査は，試料の準備が困難なため全国でも稀で，本調査のように比較的規模が小さい場合に，実施可能なものである．そこで，新鮮血液について1982年から1990年までのデータをまとめ，検査所間の検査精度のバラツキの推移を見たので，報告する．また，測定機器による差が検査精度に及ぼす影響についても合わせて報告する．

方　法

1．精度管理調査について

1)実施年：1982年(第1回)～1990年(第9回)

2)対象検査所及び数：東京都内の登録衛生検査所，検査所数は表1を参照

3)調査方法：オープン調査とブラインド調査の二方式で実施した．オープン調査は，調査試料を直接検査所に配付する方式であり，ブラインド調査は，東京都医師会により選定された協力医療機関（モニター医）を介して患者検体と同様に調査試料を検査所に提出する方式である．その結果の回収方法は，オープン調査では調査票[1)]に記入したものを回収した．また，ブラインド調査ではモニター医に届けられた検査結果報告伝票を回収した．さらに測定結果以外に測定法，外部委託検査の有無，試薬，使用機器などを併せて調査した．

4)調査回数：オープン調査は1回/年，ブラインド調査は開始当初1回/年だったが、1986年（第5回）からはある一定の間隔をおいて2回/年実施した．

5)対象項目：赤血球数，白血球数，ヘモグロビン，ヘマトクリット，血小板数の5項目．そのうち血小板数は，1983年から調査対象項目に加えた．

6)調査試料：ボランティアから新鮮血液を血液バッグに200～400ml採血し，容器（オープン調査：ガラス製シリンジVT-050P〈テルモ〉，ブラインド調査：モニター医を通じて収集した各検査所が使用し

＊東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科　169東京都新宿区百人町3－24－1
＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169, Japan
＊＊昭和大学医学部臨床病理学教室
＊＊＊慶応義塾大学医学部中央臨床検査部
＊＊＊＊日本大学医学部臨床病理学教室

表1．参加検査所数

実施年度	項目									
	赤血球数		白血球数		ヘモグロビン		ヘマトクリット		血小板数	
	オープン	ブラインド	オープン	ブラインド	オープン	ブラインド	オープン	ブラインド	オープン	ブラインド
1982年(第1回)	48	29	48	29	48	29	47	29	—	—
1983年(第2回)	48	37	48	37	48	37	47	37	46	34
1984年(第3回)	52	38(47)	52	38(47)	52	38(47)	51	38(47)	49	38(47)
1985年(第4回)	51	36(45)	51	36(45)	51	36(45)	51	36(45)	49	36(45)
1986年(第5回)	49	37(47)	48	37(47)	49	37(47)	49	37(47)	46	37(47)
1987年(第6回)	46	36(46)	46	36(46)	45	36(46)	46	36(46)	42	36(46)
1988年(第7回)	45	35(45)	45	35(45)	44	34(44)	45	34(44)	42	34(44)
1989年(第8回)	42	31(39)	41	31(39)	42	31(39)	42	31(39)	40	31(39)
1990年(第9回)	42	29(36)	42	29(36)	42	29(36)	42	29(36)	40	29(36)

( )内の数字は，ブラインド調査時のモニター医数を示す

表2．調査試料

	抗凝固剤	試料(新鮮血液)の種類および配付数		
		オープン調査	ブラインド調査 (1回目)	(2回目)
1982年(第1回)	EDTA・2K	1種類各1本	1種類各1本	—
1983年(第2回)	Anglot/ET	2種類各1本	2種類各1本	—
1984年(第3回)	CPD	2種類各1本	2種類各1本	—
1985年(第4回)	CPD	2種類各1本	2種類各1本	—
1986年(第5回)	CPD	2種類各1本	2種類各1本	2種類各1本
1987年(第6回)	CPD	2種類各1本	2種類各1本	2種類各1本
1988年(第7回)	CPD	2種類各1本	2種類各1本	2種類各1本
1989年(第8回)	CPD	—	2種類各2本	—
1990年(第9回)	CPD	2種類各2本	2種類各2本	2種類各2本

表3．配付試料濃度

	低濃度領域試料(A1)	高濃度領域試料(A2)
赤血球数	$240\sim399\times10^4/\mu l$	$400\sim520\times10^4/\mu l$
白血球数	$2.0\sim7.0\times10^3/\mu l$	$8.0\sim14.0\times10^3/\mu l$
ヘモグロビン	7.0～12.9g/dl	13.0～16.0g/dl
ヘマトクリット	20.0～39.9%	40.0～48.0%
血小板数	$8.0\sim18.9\times10^4/\mu l$	$19.0\sim28.0\times10^4/\mu l$

ている試験管）に2mlづつ分注して調査試料とした．つまりオープン調査とブラインド調査には，同一の新鮮血液を使用したことになる．但し，ブラインド調査が2回/年になった1986年以降は，ブラインド調査1回目には，オープン調査と異なる新鮮血液が用いられた．

配付試料である新鮮血液の種類と配付数及び採血時に使用した抗凝固剤を表2に示した．なお，1989年には新鮮血液を使用するオープン調査は実施しなかった．

2．集計方法

オープン，ブラインド調査別に，各年度の個別データ[1)]から全検査所の平均値と標準偏差を算出した．次にその $\bar{X}\pm3SD$ を外れた測定値を除外した残りの各デー

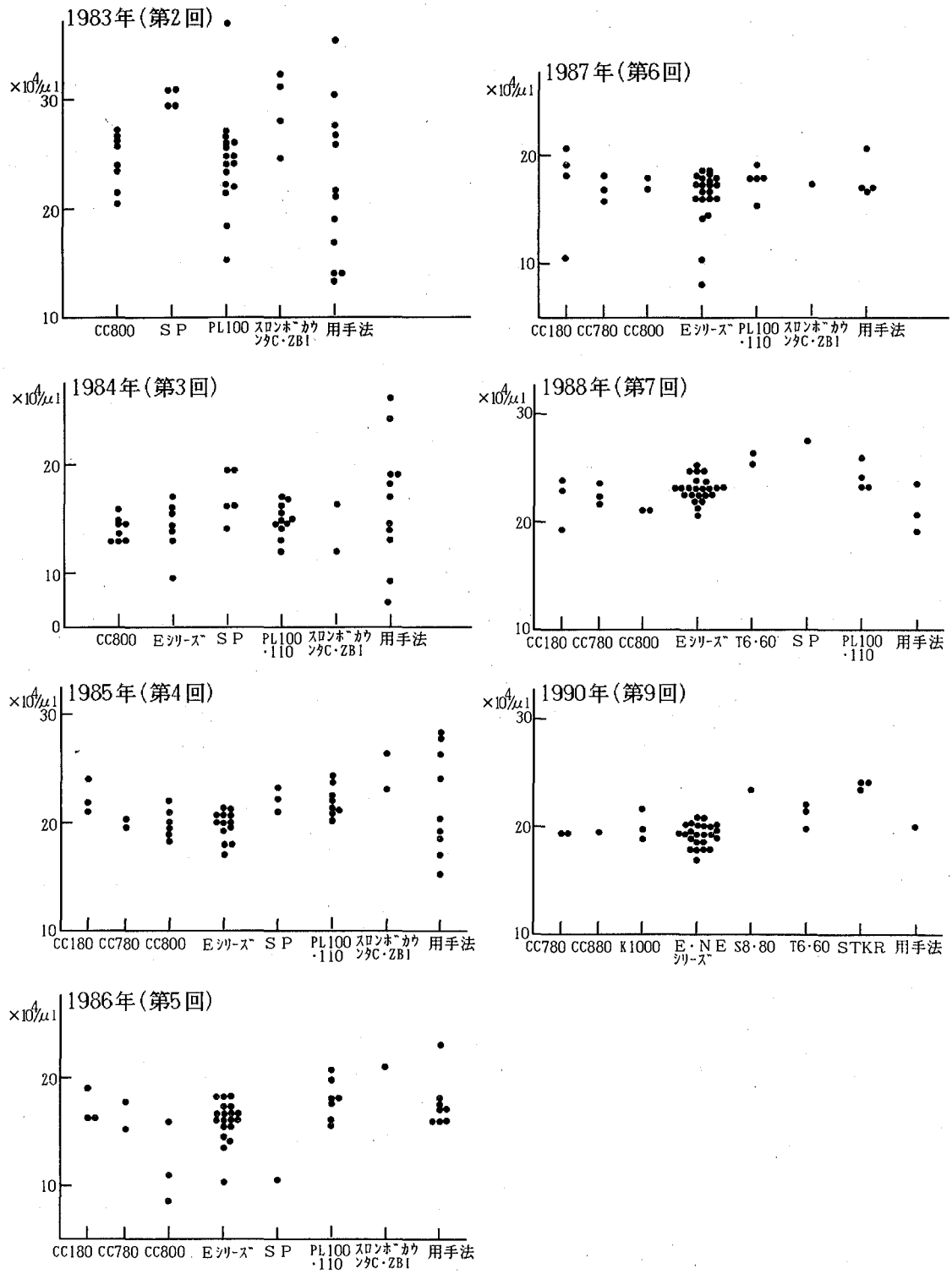


図1．機器別の血小板数(1983～1990年)

タから，再び平均値，標準偏差さらに変動係数（%）を求めた．この補正は，検体の取り違い，データの記入ミスなど明らかなミスと思われる極端に外れた測定値によって計算値が偏ることを避けるために行った．また2種類の試料濃度が大きく異なった場合は，表3のように低濃度，高濃度領域と2つに分けて変動係数を求めた．さらにブラインド調査を2回実施した年度は，二つの変動係数の平均値を示した．

血小板数については使用機器別に分類し，主な機器についてその測定値を図1に示した．

結果及び考察

表1に参加検査所数を示した．ブラインド調査への参加数がオープン調査に比べ少ないのは，集団検診のみを業務としている，あるいは医院からの検体を受け付けていないなどの理由でモニター医が選定できなかったためである．また，調査開始当初に比べ参加検査所数が減少傾向にあるのは，大手検査所による小規模検査所の統廃合などの結果である．

表4にオープン調査の赤血球数測定に使用された機器の数を示した．血小板数については，図1から測定値と共に主要機器の使用台数を読みとることができる．赤血球数測定のために1982年～1990年に使用された機種は約25種になり，半自動血球計数器から全自動血球計数器への転換が見られた．1982年には，半自動血球計数器（東

表4．赤血球数測定時の血球計数器数　　（　）百分率

機器名	1982年（第1回）	1983年（第2回）	1984年（第3回）	1985年（第4回）	1986年（第5回）	1987年（第6回）	1988年（第7回）	1989年（第8回）	1990年（第9回）
東亜CC107	1(2)	1(2)	1(2)	1(2)					
〃 CC108	6(13)	4(8)	4(8)						
〃 CC110		2(4)	1(2)	1(2)	2(4)	2(4)	1(2)	1(2)	
〃 CC120	7(15)	6(13)	4(8)	2(4)	2(4)		1(2)		
〃 CC130	1(2)	1(2)	1(2)	1(2)	1(2)	1(2)	1(2)		
〃 CC150					2(4)	3(7)	3(7)	2(5)	2(5)
〃 CC170	1(2)	1(2)	1(2)	1(2)	1(2)	1(2)			
〃 CC180				3(6)	3(6)	4(9)	3(7)	2(5)	
〃 CC700			1(2)	1(2)	1(2)	1(2)	1(2)	1(2)	1(2)
〃 CC720	10(21)	6(13)	4(8)	3(6)	2(4)	1(2)	1(2)		
〃 CC780				2(4)	2(4)	3(7)	3(7)	3(7)	2(5)
〃 CC800	4(8)	7(15)	8(15)	7(14)	3(6)	2(4)	2(4)	2(5)	1(2)
〃 K1000								1(2)	3(7)
〃 Eシリーズ			8(15)	13(25)	19(39)	21(46)	23(51)	22(52)	24(57)
コールターD	1(2)	1(2)	1(2)						
〃 S/SR	14*(29)	9(19)	7(13)	7(14)	6(12)	6(13)	2(4)	1(2)	
〃 S8･80									1(2)
〃 T6･60							2(4)	3(7)	3(7)
〃 SP		4(8)	5(10)	3(6)	1(2)		1(2)	2(5)	
〃 STKR									3(7)
日本光電 MEK2100		1(2)							
〃 MEK3100							1(2)	2(5)	1(2)
エルマ ACM30･503	1(2)	2(4)	2(4)	2(4)	1(2)				
OCD 9			1(2)	1(2)	1(2)				
その他	1(2)			1(2)	2(4)	1(2)			1(2)
用手法	1(2)	3(6)	3(6)	2(4)					
合　計	48(100)	48(100)	52(100)	51(100)	49(100)	46(100)	45(100)	42(100)	42(100)

*コールターSPを含む

亜CC107, CC108, CC120, CC130, CC170, コールターD, エルマACM30・503）を使用する検査所が18所（38％），全自動あるいはそれに相当する血球計数器を使用する検査所が28所（57％）見られたが，1990年では赤血球から血小板まで5項目を同時測定できる全自動型が37所（87％）を占め，半自動型は見られなくなった．血小板については，図1で主な機器の使用状況が判別できるが，赤血球数測定と同様，全自動血球計数器の使用率の増加が認められた．また，1990年に使用されていた機種は約10種類であるが，特定機種へ使用が集中する傾向がみられた．

次に，用手法（目算法）による測定を行っていた検査所数を見ると，赤血球数の場合，1982～1985年に1～3か所あったが，その後すべて機器による測定に変わった．血小板数は，1983年に用手法で測定した検査所は，全体の約1／4（12か所）を占めていたが，1990年には1所のみになり，この10年間で自動血球計数器の利用が定着したことが認められた．

図2に，1982年（第1回）から1990年（第9回）までの検査所間の変動係数の推移を示した．赤血球数，ヘモ

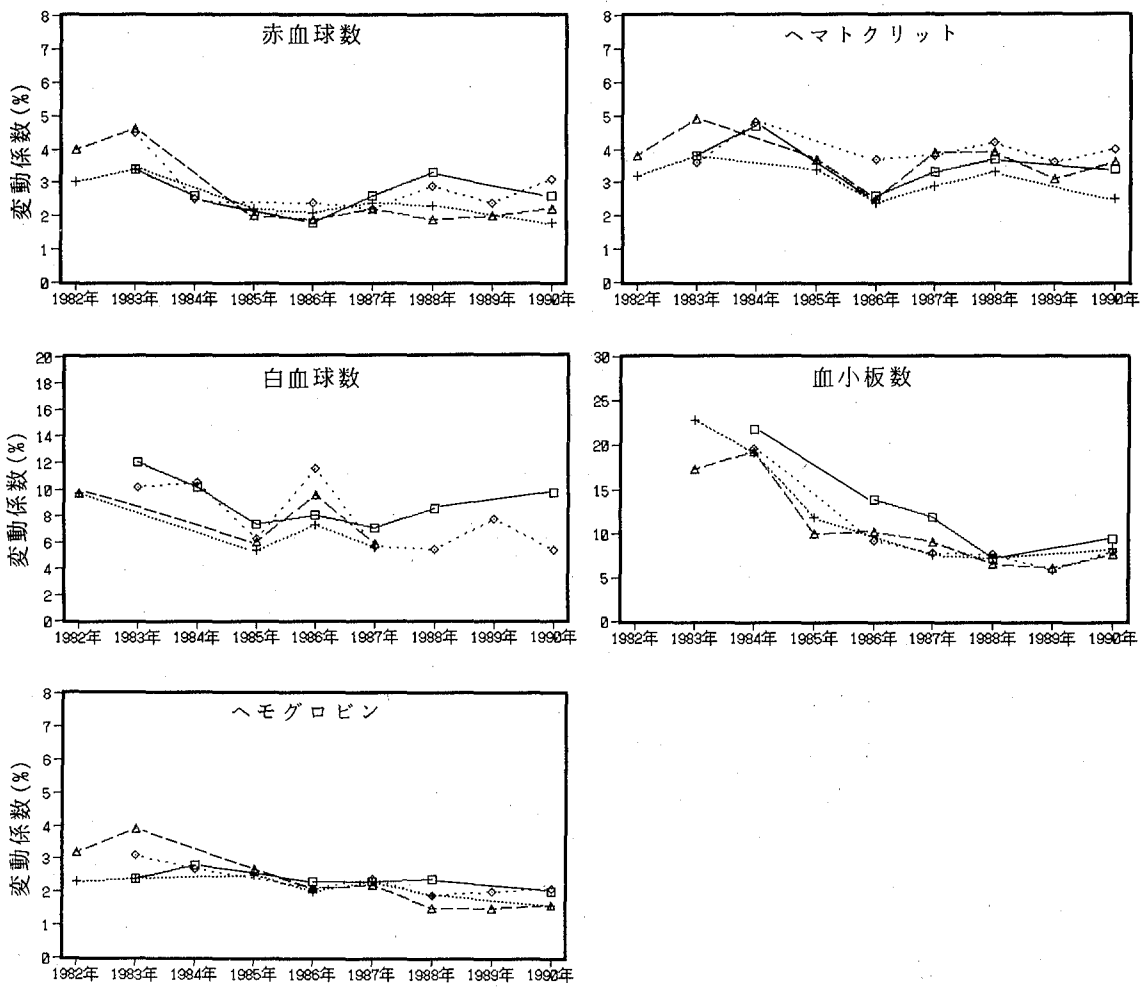


図2．検査所間の変動係数(％)

□：オープン調査　低濃度領域試料(A1)
＋：　〃　　高濃度　〃　(A2)
◇：ブラインド調査　低濃度領域試料(A1)
△：　〃　　高濃度　〃　(A2)

グロビン及び血小板数の変動係数は経年的に小さくなり，その中で赤血球数とヘモグロビンは1985年以降一定の水準を保ち，その値は赤血球数，ヘモグロビン共に，２％前後であった．また，血小板数はその改善が顕著で，調査当初は17.3%，22.8%であったが，第９回では7.6%，8.0%，8.3%，9.4%にまで低下した．一方，白血球数とヘマトクリットは，調査年度による変動係数の変化が大きく（白血球数５～10%，ヘマトクリット２～５％），調査開始当初と比較しても変動係数の改善が認められず，検査所間のバラツキは先の３項目ほど改善されていないことが推察された．

次に，低濃度試料と高濃度試料を比較すると，両者の変動係数に顕著な差は認められなかった．さらに，オープン方式とブラインド方式の違いによる影響を見ると，５項目ともに１，２回目（1982，1983年）の検査所間のバラツキは，ブラインド方式の方が大きかったが，その後の調査では両方式の差は認められなくなってきた．

血小板数における著しい検査所間差の改善は，図１に示したように用手法に代って自動化が進み，自動血球計数器を導入した検査所が急増したこと，そしてより測定精度の高い血球計数器への転換が進められたことなどが原因と考えられる．しかし，用手法が減少しそして機器の精度が向上するにつれて，機種間差による系統誤差が検査所間のバラツキの原因として浮かび上がり，この問題は他の４項目についても同様の傾向として認められた．また，コントロール血球を使用した場合の機種間差[2-4]は従来より指摘されていたが，新鮮血液を使用した本調査でもその傾向が現れていた．

ここで，他の外部精度管理調査の実施状況[5]をみると，県レベルでは1989年度に東京都以外の17府県でも血液学検査の調査を実施している．これらはいずれも参加数が10～100か所の小ないし中程度の調査規模である．一方，参加数が1000～2000か所の大規模な調査としては日本医師会，日本臨床衛生検査技師会の実施例がある．これらの中で，新鮮血を使用した調査としては，県レベルで９調査例があるが，大規模な調査では実施されていないのが現状である．この９県の調査例における施設間（衛生検査所，病院などが対象）の変動係数[6-14]は，赤血球数で１～４％，白血球数で５～10%，ヘモグロビンで１～４％，ヘマトクリットで１～６％そして血小板数で８～15％を示し，東京都の衛生検査所間の変動係数とほぼ等しい結果であった．

外部精度管理調査は，検査所間差や検査精度の状況を捉え，検査データの互換性を妨げる要因，例えば機種間の系統誤差などの問題点を明らかにして，検査所間のバラツキをなくす一助にはなるが，現在の調査方法では正確度の評価を的確に行うことはできない．東京都では1989年から機器メーカーの測定による参考値を得て，それを仮の真値として正確度の評価を行っている．しかし，メーカーによっては参考値の得られない場合があり，評価できない検査所が生じ，引き続き今後の検討課題となっている．一方，検査所間のバラツキを減少させた一因としてあげた自動血球計数器についても，機種間差など未解決の問題点が残っている．

さらに，白血球数，血小板数の変動係数が他項目に比べ大きいことの原因の一つに，これらの成分が赤血球やヘモグロビンに比べ，経時的に変化を受けやすい成分であり，しかも試料配付から測定までの所要時間に検査所間の差があり、その影響も考えられる．また血小板では，機器によっては抗凝固剤（CPD）と希釈液との間に不適合が生じ，その結果測定値に影響すること[15]が知られている．

今後，現在の血液学的検査の水準をより向上させるために，正確度の評価方法，調査試料に関わる種々の問題（安定した試料の作成，配付所要時間の短縮など）のより詳細な検討を行い，機器校正に関してはメーカー側の協力を得て標準となるキャリブレーターの提供が必要と思われる．さらにこれらを実施するにあたっては，精度管理調査の主体である検査所の一層の理解と協力を得て基礎的な検討を重ねた後に，調査にフィードバックさせその効果を確認することが必要である．

要　約

1982年～1990年までの東京都衛生検査所精度管理調査結果より，血液学的検査における検査所間のバラツキの推移をみた．

赤血球数，ヘモグロビン及び血小板数の変動係数は経年的に小さくなり，赤血球数とヘモグロビンは1985年以降一定の水準を保ち，その変動係数は赤血球数，ヘモグロビン共に，２％前後であった．また，血小板数はその改善が顕著で，その変動係数は調査当初20％前後であったが，1990年には10％以下にまで改善した．一方，白血球数とヘマトクリットは，調査開始当初と比較しても変動係数の改善が認められず，検査所間のバラツキは先の３項目ほど改善されていないことが推察された．

血小板数における著しい検査所間差の減少は，用手法に変わって，自動血球計数器を導入した検査所が急増したことなどが原因と考えられた．しかし，用手法が減少しそして機器の精度が向上するにつれて，機種間差によ

る系統誤差が検査所間のバラツキの原因として浮かび上がり，この問題は他の4項目についても同様の傾向として認められた.

（付記：本精度管理調査は，「東京都衛生検査所精度管理事業」主管：東京都衛生局医療計画部医務指導課として実施したものである.）

文　献

1) 東京都：昭和57年（第1回）～平成2年度（第9回）東京都衛生検査所精度管理調査結果報告書，1983～1991
2) 佐々木正照，木村寿之，小川祥子等：臨床検査，**24**（12），1559-1564，1980
3) 新谷和夫他：機器・試薬，**6**，307-317，1983
4) 新谷和夫：機器・試薬，**8**，23-39，1985
5) 地方衛生研究所全国協議会強化対策委員会：地方衛生研究所の業務と検査の精度管理，78，1990
6) 神奈川県衛生部：平成元年精度管理調査研修会，1990
7) 山梨県医師会：平成元年度（第7回）臨床検査精度管理調査結果報告，1990
8) 栃木県臨床検査精度管理委員会：昭和63年度コントロールサーベイ結果報告，1989
9) 群馬県医師会臨床検査委員会：平成元年度（第7回）群馬県医師会臨床検査精度管理報告書，1990
10) 長野県医師会等：平成元年度長野県臨床検査精度管理調査結果報告書，1990
11) 静岡県医師会等：平成元年度（第6回）静岡県精度管理調査報告書，1990
12) 大阪府医師会：昭和63年度（第16回）精度管理調査結果報告，1989
13) 京都府医師会：第7回臨床検査精度管理調査結果報告書，1989
14) 広島県医師会精度管理調査委員会：平成元年度（第17回）臨床検査精度管理調査報告，1990
15) 私信

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.*,**42**, 65-69, 1991

セレウス菌芽胞の熱抵抗性に関する検討

新井輝義*, 池島伸至*, 平田一郎*, 神　真知子*, 楠　くみ子*, 入倉善久*, 伊藤　武*, 寺山　武**

Heat Resistance of the Spore of *Bacillus cereus* Isolates from Foods and "Vomitting-type" Food Poisoning

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

Keywords：セレウス菌 *Bacillus cereus*, 芽胞 Spore, 熱抵抗性 Heat resistance

緒　言

セレウス菌による食中毒は，1950年のHaugeによる集団下痢症例の報告以来，東欧や北欧各国で下痢や腹痛を主症状とする食中毒として，しばしば報告されてきた．しかし，1970年代に入ってからは，嘔気や嘔吐を主症状とする嘔吐型食中毒事例が，イギリスをはじめ各国で次々と報告されるようになった．本邦においても，本食中毒に関心が示されるようになり，下痢型症例と嘔吐型症例が食中毒事例として報告されている．ただし，東京都で発生したセレウス菌食中毒はいずれも，嘔吐型によるものであり，下痢型はまったく認められていない．

嘔吐型セレウス菌食中毒は，セレウス菌芽胞が加熱調理後も食品中に生残し，放冷過程で発芽増殖する際にある種の嘔吐毒が食品内に産生され，これを喫食することによって発病するものと考えられる．そこで今回は，嘔吐型セレウス菌食中毒由来のセレウス菌株および，鞭毛抗原型が嘔吐型セレウス菌食中毒由来株と同型の，食品や生米由来のセレウス菌について，これらの菌株の澱粉分解性および芽胞の熱抵抗性を検討したので，その成績を報告する．

材料と方法

1）供試菌株：実験に供試した菌株は，1975年から1987年までに東京都で発生したセレウス菌による嘔吐型食中毒由来の47株，1987年8月から翌年8月までに当所に搬入された市販の各種食品および飲食店等の調理環境の拭取り試料1,497件から分離した164株，1989年8月から10月までに一般家庭から入手した生米46試料から分離した84株，合計295株である．

2）鞭毛抗原型別：Taylor と Gilbert[1]の18型(以下TG1～TG18型と略記)および寺山ら[2]が追加した18型(以下T1～T18型と略記)，合計36種の型別血清を用いて寺山ら[2]に従って型別を行った．

3）澱粉分解性試験：鞭毛抗原型別された供試菌株を，1％可溶性澱粉加普通寒天平板に30℃ 2日培養後，平板全体にルゴール液を添加して澱粉分解性を判定した．

4）芽胞液の調製：芽胞寒天平板[3](Nutrient broth No.2 (Oxoid) 6.0g, KH_2PO_4 0.25g, $MnSO_4$ 0.03g, Bacto Agar (Difco 社製) 15g, 精製水1l, pH7.0)で35℃, 2～3日間培養後，位相差顕微鏡により芽胞が90％以上形成されていることを確認し，菌苔をかきとり，滅菌生理食塩液に懸濁した．懸濁芽胞液を一部試験管にとり，オイルバスで75℃, 20分加熱後，氷水で急冷し，その10倍段階希釈液を普通寒天平板に塗抹培養して発育集落数を算定した．この値を芽胞数とした．

5）芽胞の耐熱性試験：芽胞寒天平板上で形成された芽胞を約10^6個／mlになるように，滅菌生理食塩液で調整

＊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　169 東京都新宿区百人町3－24－1

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

し，2.5mlずつ中試験管に分注した．これを100℃および105℃のオイルバス中で，5，10，15，20，30分間加熱後，直ちに氷水で急冷し，その10倍段階希釈液を普通寒天平板に塗抹培養し，発育集落数を算定し，それぞれの生残芽胞数とした．また，対照には75℃で20分間加熱した試料の生残芽胞数を用いた．熱抵抗性はこれらの成績から求めたD値(菌数が1／10に減少するのに要する時間)で表した[4]．

表1．一般食品・調理場拭取り由来株，生米由来株の鞭毛抗原型および澱粉分解性

鞭毛抗原型※	一般食品・調理場拭取り 株数	澱粉分解性 ＋	澱粉分解性 －	生米 株数	澱粉分解性 ＋	澱粉分解性 －	株数合計
*TGI	15(9%)	0	15	11(13%)	0	11	26
3	1	1	0	0	0	0	1
4	1	1	0	1	1	0	2
6	3	1	2	0	0	0	3
11	6	6	0	1	1	0	7
12	1	1	0	1	1	0	2
13	0	0	0	2	2	0	2
14	2	2	0	2	2	0	4
15	1	1	0	2	2	0	3
16	0	0	0	1	1	0	1
18	1	1	0	4(5%)	4	0	5
**T2	6	6	0	4(5%)	4	0	10
3	2	1	1	0	0	0	2
4	10(6%)	10	0	1	1	0	11
5	1	1	0	2	2	0	3
7	4	4	0	4(5%)	4	0	8
10	1	0	1	0	0	0	1
11	1	0	1	0	0	0	1
12	3	3	0	4(5%)	4	0	7
13	2	0	2	0	0	0	2
14	1	0	1	0	0	0	1
16	2	1	1	0	0	0	2
17	5	5	0	1	0	1	6
型別株	69(42%)	45	24	41(49%)	29	12	110
型別不能株	95(58%)	☆	☆	43(51%)	☆	☆	138
合計	164	・	・	84	・	・	248

*TG：Taylor と Gilbert の鞭毛抗原型，**T：寺山の鞭毛抗原型

☆：型別不能株については澱粉分解性試験を行わなかった．

結　果

1．食品および拭取り由来株の鞭毛抗原型：本実験に供試した嘔吐型食中毒由来株の45株はTG1型であった．一般食品・調理場拭取り由来株では，164株のうち69株(42%)が21種の血清型に，生米由来株では，84株中41株(49%)が15種の血清型に型別された(表1)．そのうち食中毒由来株と同一血清型のTG1型は，食品由来株では15株(9%)，生米由来株では11株(13%)といずれの場合でも最も多く認められた．その他，比較的多い血清型は，食品由来株では，T4型が10株(6%)，TG11型，T2型がそれぞれ6株，T17型が5株，T7型が4株であった．また生米由来株では，TG18型，T2型，T7型，T12型がそれぞれ4株(5%)であった．

2．食品および拭取り由来株の澱粉分解性：食中毒由来株のTG1型45株は澱粉分解性がすべて陰性であった．食品・調理場拭取り由来164株のうち鞭毛抗原型が型別された69株を対象に，澱粉分解性の試験を行った．69株のうち，45株(65%)が澱粉分解陽性で，28株(35%)が陰性であった．生米由来株では，41株のうち，29株(71%)が澱粉分解陽性，残りの12株(29%)は陰性であった．食中毒由来株と同一血清型であるTG1に該当する26菌株

表2．嘔吐型食中毒由来セレウス菌[a)]の芽胞の熱抵抗性

菌株NO.	原因食品	D値(分) D_{100}	D値(分) D_{105}
39	チャーハン	4.5	2.5
44	チャーハン	5.5	2.5
101	チャーハン	4.0	1.0
121	チャーハン	19.5	4.0
143	チャーハン	9.0	2.5
32	ピラフ	4.0	3.0
66	ピラフ	10.5	1.0
189	ピラフ	5.5	2.5
134	オムライス	16.5	4.0
157	おにぎり	8.0	2.5
3	スパゲッティ	6.5	1.5
86	スパゲッティ	5.0	4.0
114	焼きそば	6.0	2.5

a)供試菌株は，ふん便由来であり，すべて鞭毛抗原型はTaylor と Gilbert の血清型1型(TG1)で，澱粉非分解である．

はすべて澱粉分解陰性であった．なお澱粉分解陰性株は鞭毛抗原型TG 6，T 3，T 10，T 11，T 13，T 14，T 16，T 17該当株に認められた(表 1).

表 3．一般食品由来セレウス菌[a)]の芽胞の熱抵抗性

菌株NO.	食　品	D値(分) D_{100}	D値(分) D_{105}
7	みる貝	14.0	2.5
45	赤貝刺身	3.5	2.0
287	小　柱	5.5	5.0
288	ほたて貝	5.5	4.5
H83	ハチミツ	6.0	4.0
H120	ハチミツ	7.0	1.5
174	木綿豆腐	10.5	3.0
181	絹ごし豆腐	5.0	3.5
24	マカロニサラダ	4.5	3.0
85	チャーハン	13.5	4.5
131	しじみエキス	8.0	3.5
144	シュークリーム	3.5	3.0
207	スパゲッティ	5.5	4.0
83	ギョウザ巻	4.0	3.5
76	冷蔵庫内拭き取	4.5	4.5

a)供試菌株はすべて，鞭毛抗原型TG 1 型，澱粉非分解である．

表 4．生米由来セレウス菌[a)]の芽胞の熱抵抗性

菌株NO.	D値(分) D_{100}	D値(分) D_{105}
502	6.0	2.5
504	6.0	5.0
585	16.0	5.5
630	7.0	2.0
654	11.5	2.5
670	8.0	5.5
675	11.5	4.5
683	13.5	5.0
698	13.0	5.0
703	13.0	5.0
720	10.0	4.0

a)供試菌株はすべて，鞭毛抗原型TG 1 型で，澱粉非分解である．

3．芽胞の熱抵抗性：食中毒由来株が澱粉非分解の TG 1 型株であることから，一般食品や生米由来株も澱粉非分解の TG 1 型株を選んだ．TG 1 型澱粉非分解の食中毒由来13株，食品由来15株，生米由来11株のセレウス菌について芽胞の熱抵抗性を検討し，それらのD値を表 2，表 3，表 4 に示した．また，図 1 には各菌株の芽胞死滅曲線を示した．食中毒由来13株の100℃加熱におけるD値は，4.0～6.5分が 8 株で，8.0～10.5分が 3 株，16.0～19.5分が 2 株であった．105℃加熱では，1.0～1.5分が 3 株，2.0～2.5分が 6 株，3 分台が 1 株，4 分台が 3 株であった．

食品由来15株の100℃加熱におけるD値は，3 分台が 2 株，4 分台が 3 株，5 分台が 4 株，6～8 分台が 3 株であった．105℃加熱では，1 分台が 1 株，2 分台が 2

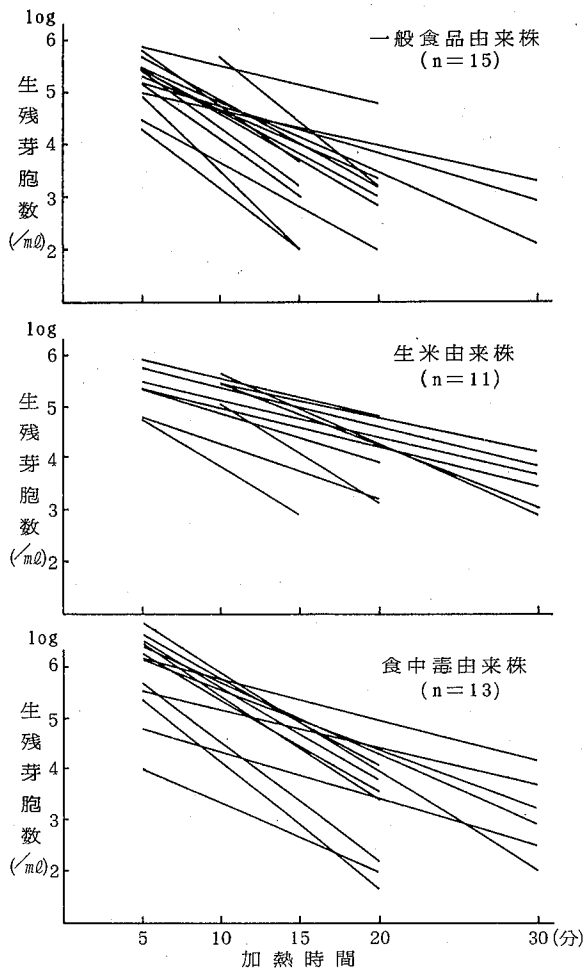


図 1．100℃加熱におけるセレウス菌芽胞の死滅曲線

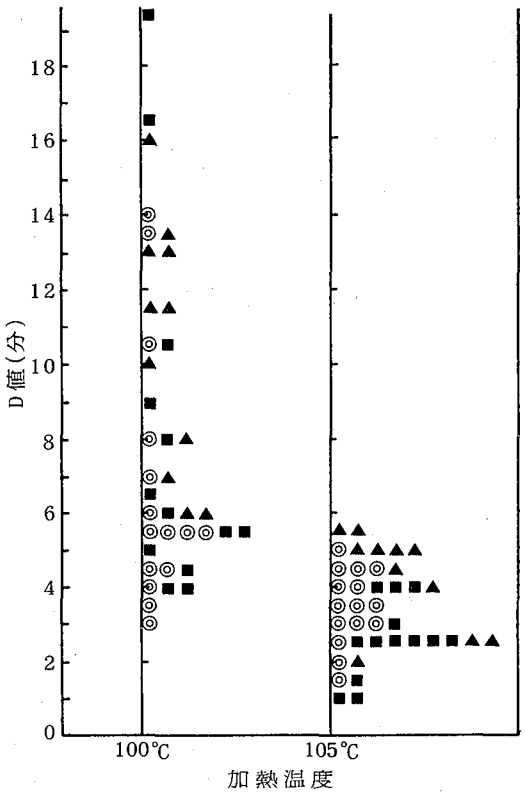


図2．一般食品，生米，食中毒由来TG1型セレウス菌芽胞の熱抵抗性の比較
◎一般食品由来(n=15)，▲生米由来(n=11)，■食中毒由来(n=13)

株，3分台は6株，4分台が5株，5分台が1株であった．

生米由来株の11株のD値は，100℃加熱では，6～8分台が4株，10～13分台が6株，16分台が1株であった．105℃加熱では，2分台が3株，4分台が2株，5分台が6株であった．

各由来菌株ごとに芽胞の熱抵抗性を比較した結果，図2に示すごとく，100℃加熱では，食中毒由来株と生米由来株が一般食品由来株よりもやや熱抵抗性が高かった．105℃の温度では由来によるきわだった熱抵抗性の差異は認められなかった．

考　察

セレウス菌は自然界に広く分布する土壌細菌であるが，人に対する病原性は嘔吐・下痢を主症状とする嘔吐型食中毒と下痢・腹痛を主症状とする下痢型食中毒が知られている．近年，本菌の生物学的性状の検討が進むと共に，Gilbert や Taylor[1,5]，寺山[2,6]らにより鞭毛抗原の血清型による分類が確立され，食中毒事例や食品等に分布する本菌の疫学的な解析が可能となった．すなわち嘔吐型食中毒の原因食品は，米飯やチャーハン，スパゲッティ等の特定の食品であり，本食中毒事例から分離されるセレウス菌はその多くが澱粉非分解の，血清型TG1，TG3，TG5型であること，これに対して，下痢型食中毒の原因食品は，肉および肉加工品，スープなどが多く，分離される本菌は，そのほとんどが澱粉分解の血清型TG2，TG6，TG8，TG9，TG10型であることが，伊藤ら[7]，Gilbert や Taylor[5]，品川ら[8~10]によって明らかにされている．また，寺山らや潮田ら[2,11]，品川ら[8~10]は，一般の食品，生米等の穀類および野菜等からもTG1型のセレウス菌が最も多く分離されることを報告している．我々の調査でも，食品，生米いずれからもTG1型が最も多く検出され，これらの成績と一致する成績であった．

著者らはセレウス菌による嘔吐型食中毒の予防を目的として，食中毒事例，食品および生米から分離した，本食中毒の主な起因菌型である澱粉非分解のTG1型株を対象として，これらの芽胞の熱抵抗性を検討した．これまで本菌の芽胞の熱抵抗性については，楠ら[12]，品川ら[8]や神保ら[13]によって検討されており，いずれの報告も，100℃30分，105℃5分の加熱に対し，食中毒由来株が特異的に強いと報告している．また Parry と Gilbert[14]は，食中毒および生米由来株の芽胞懸濁液を95℃で加熱してD値を検討し，食中毒由来のTG1型株が，ついで生米由来のTG1型株が強い抵抗性を持つことを示した．

今回実施した著者らの成績は，100℃に加熱した場合，食品由来株のD値は，最高が14.0分であり，ほとんどの菌株(66.7%)は6分以下であったのに対し，生米由来株のD値は供試した菌株すべてが6分以上，また，食中毒由来株は6分以上の株が多く，最高19.5分であり，これまでの報告と同様に，食中毒由来および生米由来株の熱抵抗性が高い傾向がみられた．105℃に加熱した場合は，食中毒，生米および食品由来株いずれもD値が3分前後に集中し，供試したすべての菌株が5.5分以下であった．

嘔吐型食中毒の原因食品として米飯を原料としたチャーハンやピラフが多いことと，生米由来のTG1型セレウス菌芽胞の熱抵抗性が高いこととは関連があるものと考えられる．すなわち，米飯を炊いた場合，食中毒原性のセレウス菌芽胞は加熱調理に抵抗して生残し，米飯を室温に数時間放置すると容易に発芽し，セレウス菌

が増殖して嘔吐毒を産生するものと推察される.

セレウス菌による嘔吐型食中毒を予防するには加熱の温度はもとより，調理後の温度管理もまた重要な要因になると考えられるので，食品の保存条件とセレウス菌の増殖性についても検討が必要であろう.

今回は澱粉非分解 TG 1 型に限定して芽胞の熱抵抗性を検討したが，TG 1 型以外のセレウス菌または澱粉分解性のセレウス菌についても同様に検討を要するものと思われる.

要　約

セレウス菌による嘔吐型食中毒の予防を目的として，本食中毒の主要な菌型である澱粉非分解，TG 1 型の食品および生米由来株と食中毒事件由来株の芽胞の熱抵抗性を検討した．その結果，100℃に加熱した場合，食品由来株のD値は，最高が14.0分であり，ほとんどの菌株(66.7%)は 6 分以下であったのに対し，生米由来株のD値は供試した菌株すべてが 6 分以上，また，食中毒由来株は 6 分以上の株が多く，最高19.5分であり，これまでの報告と同様に，食中毒由来株および生米由来株の熱抵抗性が高い傾向がみられた．また，105℃の加熱におけるD値はいずれの株も 3 分前後に集中しており，由来による熱抵抗性はみられなかった.

文　献

1) Taylor, A. J., and Gilbert, R. J.: *J. Med. Microbiol.*, **8**, 543-550, 1975.
2) 寺山　武，新垣正夫，山田澄夫，潮田　弘，五十嵐英夫，坂井千三，善養寺　浩：食衛誌，**19**, 98-104, 1978.
3) Parry, J. M., Turnbull, P. C. B. and Gibson, J. R.: *A Color Atlas of Bacillus Species*, 259, Wolfe Medical Publications Ltd., England.
4) Ingram, M.; Sporeformers as Food Spoilage Organisms *in* Gould, G. W. & Hurst, A. (eds.), *The Bacterial Spore*, 547-610, 1969, Academic Press, London and Newyork.
5) Gilbert, R. J. and Parry, J. M.: *J. Hyg., Camb.*, **78**, 69-74, 1977.
6) 寺山　武：検査と技術，**8**, 1007-1012, 1980.
7) 伊藤　武，甲斐明美，斎藤香彦，柳川義勢，稲葉美佐子，高橋正樹，高野伊知郎，新垣正夫，坂井千三，篠原　楷，加藤喜市，田村延一，土屋伸久，駒井嘉明：東京衛研年報，**33**, 9-18, 1982.
8) 品川邦汎，国田信治，佐々木　寧，岡本　晃：食衛誌，**20**, 431-436, 1979.
9) 品川邦汎，国田信治，大中隆史，武政二郎：食衛誌，**21**, 266-272, 1980.
10) Shinagawa, K., Matsusaka, K., Konoma, H. and Kurata, H.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, **47**, 557-565, 1985.
11) 潮田　弘，五十嵐　英夫，高橋正樹，新垣正夫，寺山　武，坂井千三：東京衛研年報，**31**-1, 109-114, 1980.
12) 楠　淳，池島伸至，新井輝義，神　真知子，入倉善久，友成正臣，伊藤　武，坂井千三：東京衛研年報，**28**-1, 11-14, 1977.
13) 神保勝彦，小久保　弥太郎：東京衛研年報，**33**, 161-165, 1982.
14) Parry, J. M. and Gilbert, R. J.: *J. Hyg., Camb.*, **84**, 77-82, 1980.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 70-76, 1991

1985～1990年間に東京中央卸売市場に入荷した魚介類のアニサキス *Anisakis*，宮崎肺吸虫 *Paragonims miyazakii*，剛棘顎口虫 *Gnathostoma hispidum* の水揚げ地および産地別寄生状況

村田以和夫*，白鳥憲行**，小山利夫**，
小田稔**，渋谷智晃**

Distribution Survey of *Anisakis* larvae, *Paragonims miyazakii* and *Gnathostoma hispidum* in Fish and Shellfishes Landed at Tokyo Metropolitan Central Wholesale Market during the Period of 1985-1990

IWAO MURATA*, NORIYUKI SHIRATORI**, TOSIO KOYAMA**,
MINORU ODA** and TOMOAKI SHIBUYA**

Keywords：アニサキス *Anisakis* larvae，宮崎肺吸虫 *Paragonims miyazakii*，剛棘顎口虫 *Gnathostoma hispidum*，魚介類 fish and shellfishes，東京中央卸売市場 Tokyo Metropolitan Central Wholesale Matket

はじめに

著者ら[1-3]は，1978，1984及び1985年に各種魚介類を介して人体に感染する寄生虫の検索成績を報告し，アニサキス症をはじめ各種の寄生虫症例が増加傾向にあることを指摘[4]し，感染予防のための正しい知識の普及に努めて来た．1960～1981年間のアニサキス症例数は，小山[5]のアンケート調査によると全国で，1,424例にのぼり，その後も増えつづけ，1989年の影井[6]らの集計によると，日本内視鏡学会で報告された症例数だけでも6,099例，累計で13,506例に達している．特に，北海道の1,564例と九州の9,704症例は全国の71.8％を占め，際立った症例の偏在性が認められる．この地方偏在性はどのような原因によるものかについて検討するためには，本虫の魚種別・水揚げ地別の寄生率を先ず調査し，あわせてこれら地域の食習慣，漁場の魚と海産哺乳動物との遭遇頻度についても海域および海流ごとに解析する必要がある．

そこで，今回は *Anisakis* 亜科幼線虫を中心に魚種別，水揚げ地別の寄生率を調査し，加えて人体寄生例が漸増しているサワガニを中間宿主とする宮崎肺吸虫 *paragonims miyazakii* 及び輸入ドジョウを中間宿主とする，顎口虫 *Gnathostoma hispidum* の産地別寄生率について調査したので，その成績を報告する．

材料及び方法

1　検査材料：1985年から1990年の間に東京中央卸売市場に全国各水揚げ地より入荷したスケトウダラ　762尾，マダラ　3尾，マサバ　701尾，スルメイカ　646尾，サワガニ　1,333匹　計3,445検体及びトリブチルスズ(TBTO)等他の検査目的で搬入された被検体，ならびに小売店からの任意購入魚介類，内訳，海水魚　17種，汽水魚　6種，淡水魚　6種，イカ　2種計　530検体，スモークサーモン・ニシン，タラコ等の製品，原料　3種を被検体とした．

2　*Anisakis* の検査法：魚は全て内蔵をホーローバットに移し，寄生虫数を調べ，魚体は三枚におろし筋肉内寄生の有無を確認した．得られた寄生虫は小山[7]らの分類に従い，形態学的に同定した．

3　サワガニからの宮崎肺吸虫 Metacercariae の検査法：7×10cm の圧平用ガラス板にピンセットで軟部組織をとり，もう1枚のガラス板を重ねて圧平し，実体顕微鏡下で Metacercariae を検出した．

4　ドジョウからの顎口虫検査法：産地ごと1群の全内蔵をビーカーに取り出し，解剖ハサミで細切後10倍量の人工胃液で　37℃ 1夜消化，次いで，水流ポンプで消化液を吸引除去，沈渣に生理食塩水を加え，上清が透明になるまで洗浄－静置－吸引除去の操作を繰り返し，洗浄の沈渣をシャーレに取り，実体顕微鏡下で虫体を検出し

＊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, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
＊＊東京都食品環境指導センター

た.

成　績

1　*Anisakis* 亜科幼線虫の水揚げ地別寄生状況(1987～1990)：表1に示すように，スケトウダラの *Anisakis* 寄生率は，北海道全水揚げ地平均で99.7%(678／680)と極めて高く，次いで新潟　59.6%(28／47)，宮城　45.7%(16／35)の順であった．また，1尾当たりの本虫寄生数が50隻を超える水揚げ地は，網走；72.0%，羅臼；平均18.4%，根室；16.3%であり，一方，比較的寄生率の低い宮城及び新潟産のほとんどのものが，1尾当たり1～10隻の少数寄生であった．根室産のマダラ3尾の本虫寄生状況は，いずれも1尾当たり11～50隻の虫体が検出され，一部肝臓および筋肉内から *Anisakis* I型，及び淡赤褐色で太く大形(1.1～1.5mmx28～32mm)の線虫

表1．*Anisakis* 亜科幼線虫の水揚げ地別寄生状況(1987～1990)

検査材料	水揚げ地	陽性数/検査数 (%)	平均陽性率	寄生数/1尾(%) 1～10	11～50	>50	備考 年,検査回数
スケトウダラ	北海道・羅　臼	44 / 44 (100.0)		(54.5)	(36.4)	(9.1)	1987
	〃　・　〃	186/187 (99.5)	*	(27.3)	(54.0)	(18.2)	1988～89　5回
	〃　・　〃	213/214 (99.5)	722/762	(29.0)	(42.5)	(28.0)	1989～90　5回
	〃　・網　走	25 / 25 (100.0)	(94.8)	(0.0)	(28.0)	(72.0)	1989
	〃　・根　室	55 / 55 (100.0)		(7.3)	(76.4)	(16.3)	1988
	〃　・中標津	155/155 (100.0)		(49.1)	(36.1)	(14.8)	1988　4回
	宮　城・志津川	16 / 35 (45.7)		(42.8)	(2.9)	(0.0)	1988
	新　潟・佐　渡	28 / 47 (59.5)		(57.4)	(2.1)	(0.0)	1990
マダラ	北海道・根　室	3 / 3 (100.0)		(0.0)	(100.0)	(0.0)	1987
マサバ	千　葉・館　山	55 / 67 (82.1)	*	1～19 平均 4.6隻/1尾			1987
	〃　・銚　子	24 / 25 (96.0)	266/283	(68.0)	(28.0)	(0.0)	1988
	茨　城・波　崎	63 / 63 (100.0)	(94.0)	(100.0)	(0.0)	(0.0)	1990
	青　森・八　戸	124/128 (96.9)		(89.1)	(7.8)	(0.0)	1988　2回
	長　崎・松　浦	74 / 77 (96.1)		(79.2)	(16.9)	(0.0)	1990
	佐　賀・伊万里	50 / 50 (100.0)	*	(28.0)	(72.0)	(0.0)	1990
	福　岡・福　岡	38 / 40 (95.0)	290/332	(80.0)	(15.0)	(0.0)	1989
	鳥　取・境　港	87 /100 (87.0)	(87.3)	(79.0)	(8.0)	(0.0)	1989～90　2回
	京　都・舞　鶴	13 / 16 (81.3)		(75.0)	(6.3)	(0.0)	1990
	石　川・七　尾	28 / 49 (57.1)		(46.9)	(10.2)	(0.0)	1988
	兵　庫・西淡町	7 / 86 (8.1)		(8.1)	(0.0)	(0.0)	1988
スルメイカ	長　崎・佐世保	16 / 60 (26.7)		(26.7)	(0.0)	(0.0)	1989
	福　岡・福　岡	4 / 40 (10.0)		(10.0)	(0.0)	(0.0)	1988
	山　口・下　関	15 / 40 (37.5)	**	(37.5)	(0.0)	(0.0)	1988
	鳥　取・境　港	13 /124 (10.5)	106/641	(10.5)	(0.0)	(0.0)	1988～90　3回
	石　川・七　尾	6 / 50 (2.0)	(16.5)	(16.0)	(0.0)	(0.0)	1989
	富　山・新　湊	8 / 40 (20.0)		(20.0)	(0.0)	(0.0)	1989
	〃　・氷　見	0 / 50 (0.0)		(0.0)	(0.0)	(0.0)	1987
	新　潟・佐　渡	12 / 45 (26.7)		(26.7)	(0.0)	(0.0)	1989
	岩　手・大船渡	29 /120 (24.2)		(24.2)	(0.0)	(0.0)	1988　2回
	北海道・瀬棚町	3 / 77 (3.9)		(3.9)	(0.0)	(0.0)	1989

注)＊：*Anisakis* I型幼虫のみ，*Terranova* A & B及び *Contracaecum* を除く．

＊＊：*Anisakis* I & II型及び *Contracaecum* を含む．

Pseudoterranova sp. が数例見いだされた．マサバの *Anisakis* 寄生状況は，千葉・館山から青森・八戸に至る太平洋側の寄生率と長崎・松浦から石川・七尾に至る日本海側の寄生率を比較した結果，平均陽性率では，太平洋側94.0%(266／283)，日本海側87.3%(290／332)と顕著な差が認められなかった．マサバ1尾当たりの本虫寄生数は，ほとんどの水揚げ地のものが，1～10隻であったのに対して，玄海灘に直面する佐賀県伊万里産のものは寄生率100%でしかも，50尾の内36尾(72%)の検出虫数が11～50隻を示した．この成績は根室産のスケトウダラに匹敵する寄生数であった．一方，兵庫県淡路島の瀬戸内海産のマサバは，8.4%(7／86)と寄生率，寄生数ともに極めて低い成績を示した．

スルメイカの *Anisakis* 寄生率は，下関産が37.5%と高率で，次いで佐世保，佐渡産26.7%，唯一太平洋側の大船渡産のものは24.2%，新湊産20.0%，境港と福岡産のものは，それぞれ10.5と10.0%を示した．しかし，北海道瀬棚産及び富士県氷見産のスルメイカは，それぞれ3.9%及び0.0%と，全平均寄生率16.5%(106／640)と比較して極めて低率であった．今回の調査ではイカの筋肉，内蔵寄生の *Anisakis* 亜科幼線虫すべてを検出陽性とし，一部について分類型別を試みた結果，産地と検査時期により若干の差が認められたが，人体症例の少ない *Anisakis* II型が70%台，人体症例の多い *Anisakis* I型が20%台，人体影響のない *Contracaecum* は10%未満であった．

表2に1985～1990年間の *Anisakis* 亜科幼線虫検出魚種一覧を示す．これら検査材料は，他の検査目的及び研修目的で任意に購入したもので，魚種別水揚げ地別の寄

表2．*Anisakis* 亜科幼線虫　検出魚種一覧(1985～1989)

魚　種	水揚げ地	検査数	寄生数(生・死)	分類(他種)	検査年
マサバ	静岡	1	9	I型	1985
〃	鳥取	1	153	〃	〃
〃	千葉	4	12& 6 & 7	〃	1986
〃	不明	13	13	〃	1989
ニシン	ノルウエイ	1	21(死)	不明	1985
〃	不明	5	4	〃	1989
スモークニシン	不明	3	1(死)	〃	1987
マアジ	佐賀	1	2	I型	1985
〃	鹿児島	2	3	〃	1986
トビウオ	静岡	1	3	*contracaecum*	1985
〃	千葉	1	1	〃	1986
〃	鹿児島	3	1	I型	1987
サンマ	福島	1	1	*Terranova* B	1985
〃	宮城・岩手	3	0	(ペンネラ・鉤頭虫)	1987
メバル	新潟	1	2	不明	1985
サケ	不明	2	9 & 6 (死)	不明	〃
〃	岩手	1	0	(条虫 Plerocercoid)	1987
スモークサーモン	不明	1	1(死)	不明	1985
キス	宮城・千葉	17	0	(条虫 Plerocercoid)	1987
〃	不明	10	1	不明	1989
クロムツ	不明	1	1	I型	1987
ウナギ	静岡・台湾	14	0	(鰾線虫)	〃
サクラマス	秋田	5	1	I型	1989
スルメイカ	不明	11	9	II型	〃
アナゴ	不明	14	11	未同定	〃
タラコ	不明	13	2(死)	不明	〃

注)　アンダーライン：魚介加工製品

生率を調査するためのものではないが，イシダイ，マダイ，キチジ，マコガレイ等海水魚17種類，ボラ，ハゼ，スズキ等汽水魚6種類及びニジマス，ヤマメ，イワナ，アユ等養殖淡水魚6種類，計29種，全検査数530検体のうち13種，130検体及び3製品から虫体を検出した．検体材料の中には，ノルウェイ産のニシンやスモーク用のサケのように，冷凍品も含まれていたために，虫体が死滅しており，分類型別不可能なものもあった．

2 サワガニにおける宮崎肺吸虫 Metacercariae の産地別寄生状況(1987～1989)：表3に示すとおり，今回の調査では，平均寄生率の高い河川は天竜川と都田川で，それぞれ6回及び2回の検査の結果，天竜川産の平均寄生率は，6.4%(29／447)と後者，都田川産の平均寄生率6.4%(13／173)と同率であった．そのうち，静岡県金谷の出荷業者の取り扱った天竜川産のサワガニは，16.3%と最も高寄生率を示し，次いで天竜産のものは，13.3%を示した．一方，高知県土佐市の四万十川産のサワガニは，15.9%，4.0%，1.5%，平均4.6%と低率で，宮崎県宮崎市(河川不明)産のものからは本虫の Metacercariae は見いだされなかった．

3 ドジョウにおける剛棘顎口虫の産地別幼虫寄生状況(1987～1989)：表4に示すように，中国産輸入ドジョウと国産ドジョウからの本虫検出数を比較すると，1群当たり10～17虫を検出し得たのは，中国産・揚子江下流域の浙江省，江蘇省及び南京産の北緯35度以南のドジョウで，大連(旅大・北緯38度)産のもの，及び日本・千葉県佐原市，横芝町産のドジョウからは全く本虫は検出されなかった．

考　察

近年，急激な増加傾向にある，アニサキス症の実態については，第35回日本消化器内視鏡学会総会(1988)のワークショップ，パネルディスカッション及び一般演題などで，アンケート調査結果を含む多くの症例報告がなされている．影井[6](1989)は，これらの症例報告及び独自調査による学会等での報告症例の累計をまとめ，本症の疫学的考察と予防対策について述べている．*Anisakis* に関する総合的な研究は，1970年代に精力的に行われた．これら研究成果については，日本水産学会編「魚類とアニサキス」(1974)に要約されており，*Anisakis* 亜科幼線虫感染魚類一覧(影井)よると，*Anisakis* I型幼虫は，132種類の魚類と1種類のイカ類，*Anisakis* II型幼虫は25種類の魚類と2種類のイカ類，*Terranova* A型は，9種類，B型は15種類の魚類からリストアップされている．我が国に於ける魚種別・水揚げ地別の本虫寄生率に関しては，梅本ら[7](1989)が大阪中央卸売市場に入荷したマサバ，スルメイカのアニサキス及びニベリニア条虫の寄生実態について報告している．

マサバ334尾，スルメイカ342尾について調査した結果，九州，山陰，北陸地方の日本海側と瀬戸内，近畿，東海，東北地方の太平洋側とに分けて本虫寄生率を比較すると，マサバは日本海側が87.6%，太平洋側が43.7%と顕著な差が認められた．また，九州(日本海側)産のマサバは，寄生率が92.6%，1尾当たりの平均寄生数が41.9隻と極めて多く，次いで山陰産86.1%，北陸産70.0%の順であったのに対し，瀬戸内と近畿産のものは30%前後と低率であり，また，スルメイカの寄生率も日本海側のものは，25.6%と太平洋側12.0%の寄生率を約2倍上回ったと述べている．今回，著者らが行った調査でも，対馬暖流の北上する玄海灘に面した，長崎・松浦，佐賀・伊万里及び福岡産のマサバの寄生率は，それぞれ，96.1%，100%，95.0%を示し，1尾当たりの寄生数も伊万里産のものは，梅本らの成績と同様に，1尾当たり11～50隻のものが72.0%も占めていた．次いで，鳥取産87.0%，京都・舞鶴産81.3%，石川・七尾産57.1%の順で，日本海側の平均寄生率は94.0%を示した．

しかしながら，千葉・館山から青森・八戸に至る太平洋側4水揚げ地のマサバの本虫平均寄生率は，94.0%と日本海側の平均寄生率を僅かに上回る成績であった．

一方，瀬戸内海産のマサバは，本虫寄生率が8.1%と明らかに低率で，対馬暖流の及ぶ海域と，季節により黒潮と親潮が交叉する海域の寄生状況とは，全く相違するものであった．玄海灘はイルカやクジラの出産，育児の海域として知られ，また，宮城県女川の捕鯨基地や金華山沖のマッコウクジラの捕鯨海域は近年まで地場産業を支えて来たところである．これら海域で水揚げされる魚介類は，クジラの糞(卵)－オキアミ(第1中間宿主)－小魚－中魚(第2中間宿主)と食物連鎖を通じて，本幼虫の蓄積が進み，高寄生率と寄生数を維持しているものと推定されている．一方，瀬戸内海では海運および海流の関係で，海産哺乳動物との遭遇機会が比較的少ないために，低寄生率を示すものと思われる．梅本らの報告では，日本海側のスルメイカの寄生率は25.6%で，太平洋側12.0%と比べて，約2倍高いと述べている．しかし，今回の調査では，太平洋側のスルメイカ水揚げ地としては，岩手・大船渡だけであるが，本虫の寄生率は24.2%と長崎・佐世保から新潟・佐渡に至る日本海側の7箇所の水揚げ地の平均寄生率16.5%と比較して，むしろ太平洋側の方が高率を示した．また，富山県の氷見産および北海

表3．サワガニにおける宮崎肺吸虫 *Paragonimus miyazakii*,Metasercariae の産地別寄生状況（1987～1989）

産地		河川	陽性/検査数(%)	平均寄生率	検査年・月
宮崎	宮崎	不明	0/100(0.0)		1988・8
高知	土佐	四万十川	5/328(1.5)		1987・1
			4/100(4.0)	24/522	1988・8
			15/ 94(15.9)	(4.6)	1988・9
愛知	南設樂	不明	5/ 91(5.5)		1987・10
静岡	金谷		17/104(16.3)		1987・9
	天竜	天竜川	0/ 37(0.0)		1987・9
			8/ 60(13.3)	29/447	1989・4
			0/ 40(0.0)	(6.4)	〃・6
			2/ 95(2.1)		〃・8
			2/111(1.8)		〃・9
	引佐	都田川	8/100(8.0)	13/173	1987・9
			3/ 73(4.1)	(6.4)	1988・9

注） 1匹当たりの *Paragonimus miyazakii metacercariae* 寄生数：1～12隻，平均2.8隻

表4．ドジョウにおける剛棘顎口虫 *Gnatostoma hispidum* の産地別寄生状況(1987～1989)

産地		検査数	検出虫数	寄生数/1尾	年・月
中国	浙江省	59	17	0.29	1987・9
		41	12	0.29	1989・8
	江蘇省	62	10	0.16	1987・9
	南京	60	0	0.0	1988・8
		48	13	0.27	1988・8
	大連	200	0	0.0	1989・9
日本	佐原	100	0	0.0	1988・9
	千葉	95	0	0.0	1988・9
	横芝	259	0	0.0	1987・9

道・瀬棚産のスルメイカは，それぞれ3.9%，0%と低率で，福岡産，鳥取・境港産，石川・七尾産の日本海側のものが，いずれも10%台で，梅本らの太平洋側の寄生率(12.0%)と比べ，寄生率の差は認められなかった．マサバは対馬暖流系(日本海)と黒潮系(太平洋)の二つの魚群に大別され，またスルメイカは冬生まれ群(東シナ海・九州沿岸で発生，対馬暖流に乗って北海道沿岸まで北上分布，一部は黒潮流路沿いに三陸，道東に分布)と夏生まれ群(紀伊から常磐；太平洋側および隠岐から能登；日本海側の限定ローカル分布)ならびに秋生まれ群(九州西方で発生，対馬暖流沿いに北上，大和堆を中心日本海沖合分布)の3群に大別されており季節と共に各海域を回遊するため，今回の調査成績と梅本らの報告に見られる成績の相違については，水揚げ海域の特定およ

び季節変動も含めてさらに検討する必要があろう．スケトウダラ，オホーツク海カムチャッカ沖から北海道・網走～根室の国後島と知床半島の根室海峡で産卵期(11～3月)に漁獲され，一部は10月から4月頃まで三陸沖と新潟・佐渡に至る海域でも漁獲される．本虫の寄生率は，鈴木・大石(1974)[8]によると，東カムチャッカ沖50%，岩内沖70%，噴火湾92～95%，東西カムチャッカ沖，タライカ湾及び羅臼沖でそれぞれ100%，平均92%を示したと記載されている．今回，羅臼沖，網走及び西標津産のスケトウダラの本虫寄生率は平均で94.8%を示し，1971～1974年間の鈴木・大石の成績と一致した．一方，過去に比較する成績は見いだされなかったが，今回の宮城県・志津川及び新潟県・佐渡の本虫寄生率は，北海道産の寄生率と比べて，それぞれ45.7%，59.5と著しく低率であった．スケトウダラの本虫筋肉内寄生率は，羅臼沖が12.5%，東カムチャッカ産が13.3%，タライカ湾産が41.2%と高率であったと鈴木・大石らは報告している．著者らの調査では，スケトウダラの筋肉内を精査していないが，マダラとは異なり，まれに侵入，付着している程度と思われる．我が国の食習慣は北海道のサケのルイベ，刺し身が一般に知られているが，マダラの刺し身や肝臓の生食も一般に行われている．また，関西以西九州に至る地域では「しめサバ」をはじめ一般に「光り物」と呼ばれる魚の生食が行われており，これら関東地方では郷土料理店でしか味わえない独特の調理法が家庭内で行われていることにより，多くのアニサキス症例が発生したものと推定される．今回，スモークニシン，スモークサーモン及びタラコ等の加工品・原料から，死滅した虫体が検出されたことから，冷凍処理を行えば，－20℃48時間で本虫は死滅するという，これまでの実験成績が証明されたものと思われる．今後，胃内視鏡検査の普及によりさらに多くの本症例が明らかになるものと思われるが，本症に有効とされる薬物療法は未だに確立されていないので，魚介類の生食には新鮮なうちに内蔵を除去するなど，細心の注意を払うばかりでなく，感染予防のためには冷凍と加熱調理の励行が必要であろう．

サワガニにおける宮崎肺吸虫 Matacercariae の陽性率の成績は，前回の成績(1984)に追加して，新たに宮崎産0%，高知・四万十川産平均4.6%，愛知・南設楽5.5%を記載した．静岡・天竜川産の平均寄生率は，6.4%(前回10.7%)，同県引佐郡都田川産ものは，6.4%(前回0.1%)と天竜川産が4.3%減少，逆に都田川産が6.3%増加の成績を示した．今回，大井川産のものは入手できなかったが，静岡県島田保健所の後藤[9](1988)の大井川流域に生息するサワガニの肺吸虫寄生状況によると，川根町で30.8～75.0%，中川根町で56.0～60.7%と極めて高率であったと報告されている．これらの成績は，影井[10]の総説に記述される成績(25～44%)と殆ど差がなく，大井川上流の野性動物(終宿主)と，サワガニ(中間宿主)との遭遇頻度が現在も変らないことが示唆され興味深い．1980～1982年ごろ多発した本症は，その後散発的に報告されてはいるが，一時の増加傾向は見られなくなった．流通業者と飲食業者への本症に関する知識の啓蒙が実ったものと思われる．

次に，輸入ドジョウからの顎口虫の検出状況については，中国　浙江省，江蘇省および南京産から1検査群当たり10～17虫体を消化法で検出したが，いずれも北緯35度以南の産地で，北緯38度に位置する大連産のものおよび日本産のドジョウからは，全く本虫を検出し得なかった．この成績は，前回(1981～1983)の成績　すなわち，中国・蘇州産のドジョウ600尾1群中130隻(1尾当たり0.22隻)の顎口虫の幼虫が検出されたと同様に，今回も，ドジョウ1尾当たり，浙江省産が，0.29隻，南京産0.27隻，江蘇省0.16隻と寄生状況に変化が見られなかった．我が国のドジョウ消費量の約60%が輸入ものであることを考慮すれば，いずれにしてもドジョウの「踊り喰い」など民間伝承による「イカモノ喰い」や「ゲテモノ喰い」を自粛する以外に本虫感染を予防することは困難であり，やはり加熱調理を励行すべきであろう．

ま と め

1985～1990年間に東京中央卸売市場に入荷した，魚介類の *Anisakis*，宮崎肺吸虫及び剛棘顎口虫の産地別，魚種別寄生状況を調査した．*Anisakis* の寄生率調査では，スケトウダラは北海道産が平均94.8%，宮城産が45.7%，新潟産が59.5%を示し，マサバは千葉から青森県に至る太平洋産の平均寄生率が94.0%，長崎から石川県に至る日本海産が87.3%と高寄生率を示した．特に，玄海灘に面する九州産のマサバは95～100%の高寄生率を示すとともに，1尾当たりの *Anisakis* 寄生数が北海道産のスケトウダラに匹敵するものであった．一方，瀬戸内海産のものは8.1%と低率であった．

長崎から北海道に至るスルメイカの *Anisakis* 亜科幼線虫の平均寄生率は16.5%を示した．太平洋側の岩手・大船渡産の本虫寄生率は24.2%と山口(37.5%)，長崎，新潟産(26.7%)の寄生率に次ぐ高寄生率であった．このほか，海水魚17種類，汽水魚6種類，淡水魚6種類，合計29魚種の内，13種類の魚及び加工製品・原料3種から *Anisakis* 亜科幼線虫が検出された．

サワガニにおける宮崎肺吸虫 *metacercariae* の寄生状況は，静岡県・天竜川産の平均寄生率が同県・都田川と同様6.4％を示し，次いで愛知県・南説楽産5.5％，高知県・四万十川産4.6％を示したが，宮崎県・宮崎産のものからは全く検出されなかった．

輸入ドジョウにおける剛棘顎口虫の寄生状況は，１尾当たり，北緯35度線より南の中国・浙江省産が平均0.29隻，南京産が平均0.14隻，江蘇省産が0.16隻を示し，既報(1984)の成績，すなわち蘇州産１尾当たり0.22隻と状況変化は認められなかった．また，北緯35度線より北の大連産及び日本産のドジョウからは，前回(1984)報告した，台湾産，韓国及び日本産の調査成績と同様に，全く本虫を見いだすことができなかった．

これら寄生虫感染予防のためには，加熱調理と冷凍処理の必要性が強く示唆される成績であった．

(本研究は，東京都環境衛生部食品監視課の昭和60年度から平成元年度の先行調査として実施したものであり，本報の概要は，第51回日本寄生虫学会東日本大会1991年10月で発表した．)

文　　献

1) 村田以和夫，大久保暢夫，山田　満，金井日出夫，林　滋生：東京衛研年報，**29**-１，95-100，1978
2) 村田以和夫，宮沢貞雄，伊藤勝雄，松崎　修，名雪雅義：東京衛研年報，**35**，163-171，1984
3) 村田以和夫，近藤　聡，浦野元幸：東京衛研年報，**36**，23－32，1985
4) 村田以和夫：*New Food Industry*, **31**，12，53-63，1989
5) 小山　力，荒木　潤，町田昌昭，唐沢洋一：モダンメディア，**28**，９，12，1982
6) 影井　昇：最新医学，**44**，４，781-791，1989
7) 梅本　功，森下　廣，山中　平，辰巳年幸，上田誠己，前田卓三，田中　護：全国食品衛生監視員研修会研究発表抄録：平成元年11月16日，千代田区公会堂，厚生省
8) 鈴木松朗，大石圭一：魚類とアニサキス：日本水産学会編，水産学シリーズ，７，第２刷，７，113-125，恒星社厚生閣，(昭和56年)，東京
9) 後藤忠雄，石川正夫，藤倉　幸，作山　昂，向後勝成，梅原靖壽，林　道明：第29回　全国食品衛生監視員協議会関東ブロック大会研修会抄録；平成元年９月６～７日，横浜
10) 影井　昇：Medical Tribune，特集　最近の寄生虫疾患「宮崎肺吸虫症」1983年８月11日号，27-30

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 77-85, 1991

有機スズ化合物の衛生化学的研究(第7報*)
魚介類中のトリブチルスズおよびトリフェニルスズ化合物含有量(1988－1990年度)

竹内正博**, 水石和子**, 山野辺秀夫**, 中村　弘**

Hygienic Chemical Studies on Organotin Compounds (VII)
Content of Tributyltin and Triphenyltin Compounds in Fish and Shellfish (1988—1990)

MASAHIRO TAKEUCHI**, KAZUKO MIZUISHI**, HIDEO YAMANOBE** and HIROSHI NAKAMURA**

Tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT) compounds in fish and shellfish have been determined by electron capture detection gas chromatography to investigate organotin pollution which is derived from antifouling paints for ship bottoms and fishery firm nets. The 88 kinds and 500 species in the total of fish and shellfish samples were obtained in the Tokyo central market during three periods from April, 1988 to March, 1989 (fiscal 1988), from April, 1989 to March, 1990 (fiscal 1989), and from April, 1990 to March, 1991 (fiscal 1990). Those samples consisted of 5 groups: A) cultured fish, B) bay or inshore fish, C) offshore fish, D) shellfish and E) others. The averages and their standard deviations of TBT in the samples were 0.072ppm and 0.126ppm in fiscal 1988, 0.142ppm and 0.205ppm in fiscal 1989 and 0.161ppm and 0.231ppm in fiscal 1990, respectively. The averages and their standard deviations of TPT in the samples were 0.207ppm and 0.314ppm in fiscal 1988, 0.221ppm and 0.296ppm in fiscal 1989, and 0.168ppm and 0.225ppm in fiscal 1990, respectievly. From the statistical results, it was concluded that the TBT level was increasing and the TPT level was decreasing from year to year. These tendencies were consistant with that of the TBT and TPT amounts used as antifouling paints in Japan, and in addition, were in accordance with that of the monitoring results on TBT and TPT of Tokyo Bay. As the results of the safety evaluation of fish and shellfish as food, it was revealed that the TBT and TPT levels were not so high as effect to human health, although they were relatively high in the case of cultured and inshore fish.

Keywords：トリブチルスズ化合物 tributyltin compounds, トリフェニルスズ化合物 triphenyltin compounds, 防汚塗料 antifouling paints, 魚介類 fish and shellfish, 含有量 content, モニタリング monitoring, 環境汚染 environmental pollution

緒　言

船底塗料及び漁網防汚剤として広く使用されてきた有機スズ化合物による閉鎖性海域の汚染が世界的に問題となっている．わが国においては，養殖イケスに使用したトリブチルスズ(TBT)系漁網防汚剤によるハマチの汚染問題に端を発したが，その後の調査でTBT汚染は船底塗料を経由して天然魚まで広がっていることが確認され，また最近は，TBT系防汚塗料と同様に使用されてきたトリフェニルスズ(TPT)系防汚塗料による魚介類の汚染が指摘されている[1-3]．

＊第6報，東京衛研年報，**40**，127－132，1989

＊＊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, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169, Japan

これらの有機スズ汚染対策として，1990年1月及び9月に「化学物質の審査及び製造に関する法律(化審法)」において，ビストリブチルスズオキシド(TBTO)が第1種特定化学物質，その他のTBT系化合物13種及びTPT系化合物7種が第2種特定化学物質に指定され，製造及び輸入量が規制されるに至った．また，同時に関係省庁も行政指導を開始し，通産省は製造メーカーに対して，TPT系塗料については製造中止，TBT系塗料については含有量の低減化を，運輸省は小型船舶への使用自粛及び大型船舶への使用制限を勧告した．更に，農水省もTBT及びTPT系塗料の漁網及び船底への使用自粛を通達した．その結果，全国漁業共同組合連合会および日本定置漁業協会は既に1985年より行っている養殖イケスに対する使用を一段と厳しく自主規制すると共に，今後に定置網への使用も制限していく方針を打ち出している．

これらの汚染防止対策が徹底すれば，海洋中のTBT及びTPT濃度は速やかに減少し，魚介類汚染も比較的短期間で低減化することが期待できる．しかし，不十分であれば，低減化に長時間を要することになり，付加的な対策が必要となる．従って，現時点で汚染対策の実効性を確認することはきわめて重要かつ緊急的業務と言える．

そこで，著者らはこれらの汚染防止対策の有効性の確認と現状のレベルにおける魚介類の食品安全性を評価することを目的として，1988－1990年度に渡って入手した魚介類試料について，TBT及びTPT含有量を測定した．

調査法

1．試料

1988年4月から1991年3月までの期間に東京中央卸売市場内において購入した魚介類87種520検体を調査した．試料は，A)養殖魚類，B)内湾及び沿岸性魚類，C)沖合い及び深海性魚類，D)エビ及び貝類，E)その他に分類し，購入後は仲買人を通して出荷地を確認した．分類は原色日本海水魚類図鑑[6]に基づいたが，魚類の生態については不明な点が多いので，その場合は出荷地を参考にした．

2．試料調製

体長50cm以上の大型魚(ハマチ，マダイ，スズキ等)は各1検体，体長30－50cmの中型魚(カレイ，サバ，カマス等)は3匹で1検体，体長30cm未満の小型魚(イワシ，アジ，コノシロ等)は5－10匹で1検体とした．それぞれを三枚に下ろし，筋肉部について，細切混和後ホモジナイザーで摩砕した．貝類は約1kgから，エビ類は約500gから可食部を取り出し，細切混和後ホモジナイザーで摩砕した．これらの試料は－40℃のフリーザー中で保存した．

3．分析法

既報[7]に従ってTBT及びTPTを測定し，結果はTBTについてはビストリブチルスズオキシド(TBTO)換算，TPTについては塩化トリフェニルスズ(TPTC)換算で表示した．

4．統計解析

統計解析にはNEC PC-9801パーソナルコンピュータ及び(株)ビューフレックスの統計ソフトStat Flexを使用した[8]．

調査結果

1988年度，1989年度及び1990年度の試料の測定結果を表1，2及び3に示す．先ず，TBT含有量について述べると，1988年度は検出範囲が0.00-0.92ppm，平均値及び標準偏差がそれぞれ0.072ppm，0.126ppm，1989年度は検出範囲が0.00-1.05ppm，平均値及び標準偏差が0.142ppm，0.205ppm，1990年度は検出範囲0.00-1.31ppm，平均値及び標準偏差がそれぞれ0.161ppm，0.231ppmであった．3年間全体では検出範囲が0.00-1.31ppm，平均値及び標準偏差は0.130ppm，0.201ppmであった．また，0.01ppm以上検出したものの割合(検出率)は1988年度が106／141(75.2%)，1989年度が156／180(86.7%)，1990年度が179／199(89.9%)であった．更に，厚生省が勧告した1日許容摂取量(1.6μg／kg／日)と国民栄養調査による魚介類摂取量(地域ブロック別最大値：109.9g／日)[9]から算出した許容濃度(0.73ppm)を超えたものの割合は1988年度1／141(0.7%)，1989年度3／180(1.7%)，1990年度5／199(2.5%)であった．

また，全結果を群別にまとめると，A)養殖魚類については検出範囲が0.00-1.31ppm，平均値及び標準偏差が0.314ppm，0.305ppm，B)内湾及び沿岸性魚類については検出範囲が0.00-0.750ppm，平均値及び標準偏差が0.0825ppm，0.110ppm，沖合い及び深海性魚類については検出範囲が0.00-0.230ppm，平均及び標準偏差が0.0285ppm，0.040ppm，D)エビ及び貝類については検出範囲が0.00-0.930ppm，平均及び標準偏差が0.172ppm，0.215ppm，E)その他については検出範囲が0.00-0.040ppm，平均及び標準偏差が0.012ppm，0.014ppmであった．

次に，TPT含有量について述べると，1988年度は検出範囲が0.00-1.63ppmで平均値及び標準偏差がそれぞれ0.207ppm，0.314ppm，1989年度は検出範囲が

Table 1. Results of fiscal 1988 (1988. 4 -1989. 3)

Samples	N	Range(ppm) (TBT/TPT)	Average(ppm) (TBT/TPT)	No. of overtolarence (TBT/TPT)
A)カンパチ(*Seriola dumerili*)	1		0.34/0.37	0/1
シマアジ(*Pseudcaranx dsntex*)	2	0.14-0.64/0.32-0.72	0.39/0.53	0/2
ハマチ(yellow tail, *Siriois quinqueradiata*)	5	0.02-1.01/0.22-0.39	0.31/0.27	1/4
マダイ(sea bream, *Pagrus major*)	5	0.10-0.20/0.05-0.53	0.15/0.27	0/2
B)アイナメ(greenling, *Hexagrammons Otakill*)	2	0.00-0.01/0.00-0.06	0.00/0.03	0/0
アナゴ(coger eel, *Astroconger myriaster*)	3	0.00-0.03/0.13-0.17	0.02/0.15	0/0
イサキ(grunt, *Parapristipoma trilineatum*)	4	0.01-0.05/0.33-0.64	0.03/0.48	0/4
カマス(barracuda, *Sphyraena Japonica*)	2	0.07-0.25/0.36-0.43	0.16/0.40	0/2
キス(sillaginoid, *Sillago japonica*)	2	0.00-0.01/0.07-0.34	0.01/0.21	0/1
コノシロ(gizzard shad, *Clupanodon punctatus*)	3	0.00-0.01/0.07-0.25	0.00/0.15	0/1
サワラ(Spanish mackerel, *Scomberomorus niphonius*)	3	0.16-0.33/0.54-1.36	0.26/0.84	0/3
スズキ(seabass, *Lataolabrax japonicus*)	4	0.06-0.34/0.18-1.63	0.24/1.14	0/3
タカベ(*Labracogllosa argentiventris*)	1		0.01/0.01	0/0
タチウオ(hairtail, *Trichiurus lepturus*)	4	0.06-0.51/0.79-1.17	0.33/0.97	0/4
ヒラメ(flounder, *Paralichthys olivaceus*)	2	0.00-0.01/0.01-0.12	0.01/0.07	0/0
ボラ(grey mullet, *Mugil csphalus*)	3	0.00-0.02/0.00-0.08	0.01/0.04	0/0
マアジ(horsemackerel, *Trachurus japonicus*)	5	0.00-0.02/0.02-0.16	0.01/0.11	0/0
マイワシ(sardine, *Sardinos melanosticta*)	5	0.03-0.16/0.05-0.80	0.09/0.29	0/2
マコガレイ(marbled sole, *Limanda yokohamae*)	2	0.00-0.00/0.01-0.02	0.00/0.02	0/0
マナガツオ(harvest fish, *Pampus argenteus*)	2	0.06-0.14/0.43-0.54	0.10/0.49	0/2
C)アオダイ(*Paracaesio xanthurus*)	3	0.00-0.01/0.01-0.03	0.01/0.02	0/0
ウメイロ(*Paracaesio xanthurus*)	2	0.00-0.00/0.01-0.01	0.00/0.01	0/0
カツオ(bonito, *Katsewonus pelamis*)	2	0.00-0.02/0.00-0.01	0.01/0.01	0/0
キチジ(bighand thornyhead, *Sebastolos macrochir*)	3	0.00-0.00/0.00-0.03	0.00/0.02	0/0
キメジマグロ(*Thunnus albacares*)	2	0.03-0.03/0.00-0.07	0.03/0.04	0/0
キンメダイ(*Baryx splendens*)	2	0.00-0.01/0.10-0.10	0.01/0.10	0/0
サンマ(mackerel pike, *Colorabis saira*)	4	0.00-0.01/0.00-0.01	0.00/0.01	0/0
スケトウダラ(walleye pollack, *Theragra chalcogramma*)	2	0.02-0.03/0.00-0.00	0.03/0.00	0/0
スルメイカ(sagittated calamary, *Todarandes pacificus*)	2	0.00-0.05/0.01-0.02	0.03/0.02	0/0
トビウオ(flying fish, *Prognichthys agoo agoo*)	4	0.00-0.03/0.00-0.02	0.01/0.01	0/0
マサバ(mackerel, *Pneumophrus Japonicus*)	5	0.00-0.08/0.00-0.43	0.04/0.16	0/2
マダラ(cod fish, *Gadus macrocephalus*)	1		0.01/0.01	0/0
メイタガレイ(frog flounder, *Pleuronichthys cornutus*)	1		0.00/0.00	0/0
メジマグロ(tuna, *Thunnus thynnus*)	1		0.00/0.00	0/0
ヤリイカ(calamary, *Doryteuthis bleekerisquid*)	3	0.02-0.04/0.00-0.04	0.03/0.02	0/0
D)アカガイ(ark shell, *Andara (Scapharca) broughtonii*)	3	0.02-0.16/0.00-0.09	0.08/0.04	0/0
アサリ(short-necked clam, *Tapes (Amygdala) japonica*)	4	0.01-0.09/0.01-0.42	0.05/0.18	0/2
カキ(oyster, *Crassotrea gigas*)	6	0.16-0.32/0.14-0.41	0.28/0.30	0/5
クルマエビ(prawn, *Sebastes itinus*)	4	0.00-0.05/0.00-0.02	0.02/0.01	0/0
シバエビ(prawn, *Metapenaeus joyneri*)	2	0.01-0.03/0.18-0.19	0.02/0.19	0/0
シロツブガイ(*Neptunes (Barbitonia) arthritica*)	1		0.01/0.00	0/0
シロバイガイ(ivory shell, *Buccinidae*)	2	0.00-0.01/0.00-0.01	0.01/0.01	0/0
タイラガイ(razor shell, *Atrina (Servatrina) penna*)	1		0.08/0.18	0/0
バカガイ(trough shell, *Mactra chinensis*)	3	0.06-0.11/0.02-0.28	0.08/0.11	0/1
ハマグリ(clam, *Meretrix lusoria*)	4	0.00-0.04/0.00-0.09	0.02/0.02	0/0
ホタテガイ(scallap, *Patinopecten yessoensis*)	3	0.09-0.20/0.08-0.43	0.15/0.22	0/1
ホッキガイ(*Spisula (Pseudocardium) sachalfnensis*)	1		0.03/0.02	0/0
マテガイ(razor clam, *Solen strictus*)	3	0.01-0.13/0.01-0.06	0.07/0.03	0/0
ミルガイ(trough shell, *Tresus keenae*)	3	0.00-0.00/0.02-0.02	0.00/0.02	0/0
E)シジミ(corbicula, *Corbicula(Corbiculina) leana*)	4	0.00-0.04/0.00-0.14	0.02/0.04	0/0
Total	141	0.00-0.92/0.00-1.63	0.07/0.21	1/43

A)Cultured fish, B)Bay or inshore fish, C)Offshore fish, D)Shellfish, E)Others
Values of 0.00 mean lower than 0.005 ppm.

Table 2. Results of fiscal 1989 (1989.4-1990.3)

Samples	N	Range(ppm) (TBT/TPT)	Average(ppm) (TBT/TPT)	No. of overtolarence (TBT/TPT)
A)カンパチ(*Seriola dumerili*)	1		0.07/0.36	0/1
シマアジ(*Pseudcaranx dsntex*)	9	0.03-1.05/0.29-1.46	0.36/0.65	1/9
ハマチ(yellow tail, *Siriois quinqueradiata*)	9	0.01-0.61/0.04-0.94	0.23/0.40	0/8
マダイ(sea bream, *Pagrus major*)	11	0.0.-0.38/0.04-0.37	0.20/0.17	0/4
B)アイナメ(greenling, *Hexagrammons Otakii*)	3	0.01-0.05/0.06-0.18	0.03/0.11	0/0
イサキ(grunt, *Parapristipoma trillineatum*)	5	0.00-0.07/0.00-0.30	0.02/0.11	0/1
イシモチ(croaker, *Argyrosomus argentatus*)	3	0.06-0.16/0.44-1.55	0.10/0.82	0/3
オニカサゴ(*Scorpaenopsis diabolus*)	1		0.00/0.27	0/1
カマス(barracuda, *Sphyraena Japonica*)	1		0.22/0.17	0/0
シイラ(dorado, *Coryphaena hippurus*)	1		0.06/0.11	0/0
スズキ(sea-bass, *Lataolabrax japonicus*)	6	0.06-0.35/0.25-1.28	0.19/0.99	0/6
タカベ(*Labracogllosa argentiventris*)	4	0.02-0.04/0.02-0.20	0.03/0.08	0/0
タチウオ(hairtail, *Trichiurus lepturus*)	2	0.11-0.16/0.26-0.26	0.19/0.26	0/2
ニベ(nibe croaker, *Nibea mitsukurii*)	1		0.38/0.29	0/1
ヒラマサ(*Seriola dumerili*)	1		0.10/0.11	0/0
ヒラメ(flounder, *Paralichthys olivaceus*)	2	0.00-0.01/0.00-0.02	0.01/0.01	0/0
ホタルイカ(firefly squid)	1		0.00/0.03	0/0
ボラ(grey mullet, *Mugil csphalus*)	1		0.03/0.12	0/0
マアジ(horse-mackerel, *Trachurus japonicus*)	6	0.02-0.08/0.03-0.81	0.04/0.39	0/5
マイワシ(sardine, *Sardinos melanosticta*)	6	0.01-0.18/0.09-0.32	0.08/0.12	0/1
マガレイ(right-eyed flounder, *Limanda herzensteini*)	1	0.00-0.02/0.02-0.05	0.01/0.03	0/0
マコガレイ(marbled sole, *Limanda yokohamae*)	2	0.04-0.06/0.36-0.50	0.05/0.43	0/2
メバル(gopher, *Sebastes inermis*)	2	0.02-0.04/0.03-0.05	0.03/0.04	0/0
ムツ(Jananese bluefish, *Scombrops boops*)	1		0.00/0.19	0/0
C)イイダコ(*Octopus fangsiao*)	1		0.00/0.00	0/0
カツオ(bonito, *Katsewonus pelamis*)	4	0.01-0.16/0.02-0.04	0.06/0.03	0/0
キチジ(bighand thornyhead, *Sebastolos*)	2	0.01-0.01/0.02-0.02	0.01/0.02	0/0
キンメダイ(*Baryx splendens*)	4	0.00-0.01/0.10-0.32	0.01/0.18	0/1
サケ(*salmon, Oncorhynchus keta*)	10	0.00-0.10/0.00-0.04	0.02/0.00	0/0
サンマ(mackerel pike, *Colorabis saira*)	1		0.01/0.02	0/0
スルメイカ(sagittated calamary, *Todarandes pacificus*)	5	0.03-0.06/0.00-0.02	0.04/0.01	0/0
スケトウダラ(Walleye pollack, *Theragra chalcogramma*)	3	0.02-0.04/0.00-0.03	0.03/0.01	0/0
トビウオ(flying fish, *Prognichthys agoo agoo*)	4	0.01-0.17/0.01-0.31	0.06/0.11	0/1
ホッケ(Atka mackerel, *Pleurogrammus azonus*)	2	0.01-0.04/0.03-0.03	0.03/0.03	0/0
マサバ(mackerel, *Pneumophrus Japonicus*)	6	0.02-0.10/0.04-0.57	0.04/0.16	0/1
マダラ(cod fish, *Gadus macrocephalus*)	3	0.01-0.01/0.01-0.01	0.01/0.01	0/0
ヤリイカ(calamary, *Doryteuteis bleekerisquid*)	2	0.02-0.03/0.01-0.01	0.03/0.01	0/0
D)アカガイ(ark shell, *Andara (Scapharca) broughtonii*)	2	0.00-0.04/0.00-0.01	0.02/0.01	0/0
アゲマキ(*Sinonovacula constricta*)	2	0.02-0.03/0.06-0.08	0.04/0.07	0/0
カキ(oyster, *Crassotrea gigas*)	16	0.00-0.73/0.02-0.35	0.34/0.14	0/5
シャコ(squilla)	3	0.01-0.11/0.13-0.83	0.05/0.44	0/2
バカガイ(trough shell, *Mactra chinensis*)	2	0.03-0.12/0.00-0.09	0.08/0.05	0/0
ハマグリ(clam, *Meretrix lusoria*)	6	0.00-0.01/0.00-0.01	0.00/0.00	0/0
ホタテガイ(scallap, *Patinopecten yessoensis*)	14	0.07-0.93/0.03-0.41	0.43/0.20	2/6
ミルガイ(trough shell, *Tresus keenae*)	1		0.03/0.13	0/0
E)アユ(sweetfish)	2	0.00-0.03/0.00-0.01	0.02/0.01	3/0
イワナ(char, *Salvelinus pluvius*)	2	0.01-0.01/0.02-0.02	0.01/0.02	0/0
シジミ(corbicula, *Corbicula (Corbiculina)* leana)	1		0.00/0.00	0/0
ヤマメ(Oncorhynchus)	2	0.01-0.02/0.02-0.02	0.02/0.02	0/0
Total	180	0.00-1.05/0.00-1.55	0.14/0.22	3/60

A)Cultured fish, B)Bay or inshore fish, C)Offshore fish, D)Shellfish, E)Others

Table 3. Results of fiscal 1990 (1990.4-1991.3)

Samples	N	Range(ppm) (TBT/TPT)	Average(ppm) (TBT/TPT)	No. of overtolarence (TBT/TPT)
A)シマアジ(*Pseudcaranx dsntex*)	13	0.04-1.14/0.10-0.67	0.33/0.29	1/7
ハマチ(yellow tail, *Siriols quinqueradiata*)	13	0.07-1.31/0.12-0.41	0.45/0.22	4/4
マダイ(sea bream, *Pagrus major*)	13	0.07-0.73/0.08-0.85	0.42/0.28	0/6
B)アイナメ(greenling, *Hexagrammons Otakii*)	7	0.01-0.03/0.04-1.23	0.02/0.36	0/2
アナゴ(coger eel, *Astroconger myriaster*)	1		0.09/0.20	0/0
イサキ(grunt, *Parapristipoma trilineatum*)	2	0.01-0.09/0.10-0.27	0.05/0.19	0/1
イシモチ(croaker, *Argyrosomus argentatus*)	2	0.10-0.12/0.34-0.65	0.11/0.50	0/2
イナダ(*Seriola quinqueradiata*)	2	0.03-0.04/0.15-0.17	0.04/0.16	0/0
カジカ(*Cottus pollux*)	1		0.02/0.09	0/0
カマス(barracuda, *Sphyraena Japonica*)	1		0.23/0.25	0/1
カンパチ(*Seriola dumerili*)	1		0.05/0.14	0/0
クロガレイ(*Liolsetta obscura*)	1		0.02/0.04	0/0
クロダイ(black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*)	1		0.08/1.02	0/1
クロムツ	1		0.02/0.02	0/0
クロメバル(*Sebastes itinus*)	2	0.00-0.07/0.00-0.01	0.04/0.01	0/0
コノシロ(gizzard shad, *Clupanodon punctatus*)	2	0.04-0.06/0.03-0.24	0.05/0.14	0/1
サワラ(Spanish mackerel, *Scomberomorus niphonius*)	2	0.00-0.75/0.08-0.78	0.38/0.42	0/1
シイラ(dorado, *Coryphaena hippurus*)	1		0.04/0.05	0/0
スズキ(sea-bass, *Lataolabrax japonicus*)	7	0.07-0.29/0.35-1.21	0.18/0.78	0/7
ソイ(*Sebastes volpes*)	1		0.10/0.08	0/0
ニベ(nibe croaker, *Nibea mitsukurii*)	2	0.20-0.33/0.25-0.30	0.27/0.28	0/2
ヒラマサ(*Seriola dumerili*)	3	0.05-0.14/0.02-0.22	0.09/0.14	0/0
ヒラメ(flounder, *Paralichthys olivaceus*)	10	0.00-0.23/0.00-0.43	0.06/0.11	0/1
マアジ(horse-mackerel, *Trachurus trachurus*)	2	0.01-0.06/0.05-0.07	0.03/0.06	0/0
マイワシ(sardine, *Sardinos melanosticta*)	4	0.11-0.16/0.06-0.16	0.14/0.10	0/0
マコガレイ(marbled sole, *Limanda yokohamae*)	1		0.01/0.02	0/0
マゴチ(common flathead, *Platycephalus indicus*)	1		0.02/0.72	0/1
マダコ(octopus, *Octpus vuigaris*)	7	0.02-0.16/0.03-0.17	0.08/0.07	0/0
ムツ(Jananese bluefish, *Scombrops boops*)	1		0.00/0.19	0/0
メバル(gopher, *Sebastes inermis*)	2	0.00-0.03/0.05-0.08	0.02/0.07	0/0
ワラサ(yellow tail, *Sirioia quinqueradiata*)	2	0.02-0.08/0.13-0.32	0.05/0.23	0/1
C)アオリイカ	1		0.15/0.07	0/0
ウマズラハギ(*Thanaconus modestus*)	1		0.16/0.05	0/0
ウメイロ(*Paracaesio xanthurus*)	1		0.00/0.01	0/0
オナガダイ	1		0.00/0.02	0/0
カツオ(bonito, *Katsewonus pelamis*)	5	0.01-0.06/0.01-0.04	0.02/0.02	0/0
キチジ(bighand thornyhead, *Sebastolobus*)	1		0.02/0.00	0/0
キハダ(yellowfin tuna, *Neothunnus macropterus*)	2	0.01-0.02/0.02-0.04	0.02/0.03	0/0
キンメダイ(*Baryx splendens*)	3	0.00-0.01/0.15-0.30	0.00/0.20	0/1
サケ(*Oncorhynchus keta*)	9	0.01-0.23/0.01-0.08	0.07/0.03	0/0
サンマ(mackerel pike, *Colorabis saira*)	2	0.01-0.02/0.01-0.04	0.02/0.03	0/0
スルメイカ(sagittated calamary, *Todarandes pacificus*)	3	0.01-0.03/0.01-0.01	0.02/0.01	0/0
スケソウダラ(Walleye pollack, *Theragra chalcogramma*)	1		0.01/0.00	0/0
トビウオ(flying fish, *Prognichthys agoo agoo*)	3	0.01-0.10/0.03-0.07	0.05/0.05	0/0
マサバ(mackerel, *Pneumophrus Japonicus*)	3	0.01-0.52/0.05-0.11	0.19/0.08	0/0
D)アカガイ(ark shell, *Andara* (*Scapharca*) *broughtonii*)	1		0.01/0.00	0/0
アゲマキ(*Sinonovacula constricta*)	4	0.01-0.28/0.00-0.06	0.14/0.03	0/0
アワビ(ear shell)	1		0.05/0.05	0/0
カキ(oyster, *Crassotrea gigas*)	8	0.01-0.65/0.02-0.14	0.25/0.07	0/0
クルマエビ(prawn, *Peraeus japonicus*)	3	0.00-0.01/0.00-0.01	0.00/0.00	0/0
シャコ(squilla)	2	0.02-0.24/0.35-0.54	0.13/0.45	0/2
ナミガイ(*Panope japonica*)	2	0.01-0.01/0.02-0.03	0.01/0.03	0/0
ハマグリ(clam, *Meretrix lusoria*)	7	0.00-0.01/0.00-0.01	0.00/0.00	0/0
ホタテガイ(scallap, *Patinopecten yessoensis*)	12	0.22-0.90/0.02-0.34	0.38/0.13	1/2
ホッキガイ(*Spisula* (*Pseudocardium*) *sachalinensis*)	3	0.04-0.13/0.03-0.09	0.09/0.07	0/0
ミルガイ(trough shell, *Tresus keenae*)	1		0.01/0.02	0/0
ムラサキイガイ(Mytilus edulis)	3	0.12-0.15/0.00-0.17	0.13/0.07	0/0
ムールガイ(blue mussle, *Mytilus coruscum*)	3	0.03-0.28/0.02-0.18	0.14/0.08	0/0
E)ウナギ(eel)	5	0.00-0.01/0.01-0.16	0.01/0.01	0/0
Total	199	0.00-1.31/0.00-1.23	0.16/0.17	5/42

A)Cultured fish, B)Bay or inshore fish, C)Offshore fish, D)Shellfish, E)Others

0.00-1.55ppm，平均値及び標準偏差がそれぞれ0.221ppm，0.296ppm，1990年度は検出範囲0.00-1.23ppm，平均値及び標準偏差がそれぞれ0.168ppm，0.225ppmであった．3年間全体では検出範囲が0.00-1.63ppm，平均値及び標準偏差は0.196ppm，0.277ppmであった．また，0.01ppm以上検出したものの割合(検出率)は1988年度が121／141(85.7%)，1989年度が156／180(86.7%)，1990年度が185／199(93.0%)であった．更に，FAO／WHOが勧告したTPTの1日許容摂取量(0.5μg／kg／日)と魚介類摂取量(109.9g／日)から算出した許容濃度(0.24ppm)を超えたものの割合は1988年度43／141(30.5%)，1989年度60／180(33.3%)，1990年度42／199(21.1%)であった．

また，全結果を群別にまとめると，A)養殖魚類については検出範囲が0.040-1.46ppm，平均値及び標準偏差が0.317ppm，0.244ppm，B)内湾及び沿岸性魚類については検出範囲が0.00-1.63ppm，平均値及び標準偏差が0.306ppm，0.370ppm，C)沖合い及び深海性魚類については検出範囲が0.00-0.570ppm，平均及び標準偏差が0.048ppm，0.088ppm，D)エビ及び貝類については検出範囲が0.00-0.830ppm，平均及び標準偏差が0.113ppm，0.139ppm，E)その他については検出範囲が0.00-0.160ppm，平均及び標準偏差が0.026ppm，0.049ppmであった．

考　察

1．魚介類中のTBTおよびTPT含有量の推移予測

ある物質による環境汚染を考えるとき，その物質の汚染レベルは通常一定のタイムラグをもって生産量あるいは使用量と相関して推移する．従って，汚染レベルは生産量あるいは使用量の増加と共に増加し，生産量あるいは使用量の減少と共に減少する．このことはPCB汚染あるいは有機塩素系農薬の例を引くまでもなく良く知られた事実であり，TBT及びTPTの場合も使用量の変化から，汚染レベルの推移を予測することができる．特に，TBT及びTPTは環境中あるいは生体中での分解がPCBに比べればはるかに速く[10~12]，また生産量のほぼ全量が汚染塗料として使用され，海水中に放出されているので，用途が多岐に渡るPCBの場合より予測が簡単である．以上を前提として，TBT及びTPTの使用量から魚介類中濃度の推移予測を行うことにした．

わが国において使用されてきたTBTおよびTPT系防汚塗料の正確な数量は明らかにされていないが，杉田[13]は図1に示すような製剤ベースの概算使用量を報告している．そこで，この図から使用量の推移を辿ると，TPT

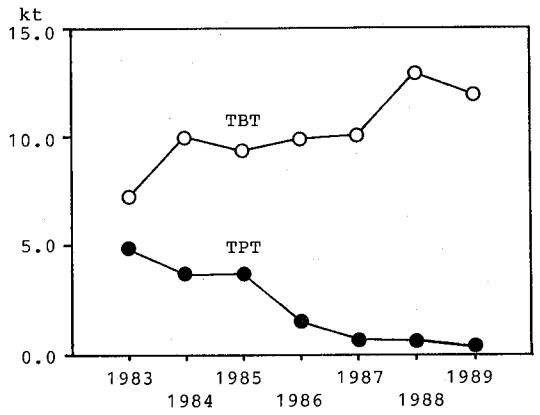


Fig. 1. Annual change of TBT and TPT amounts as antifouling paints on formula base

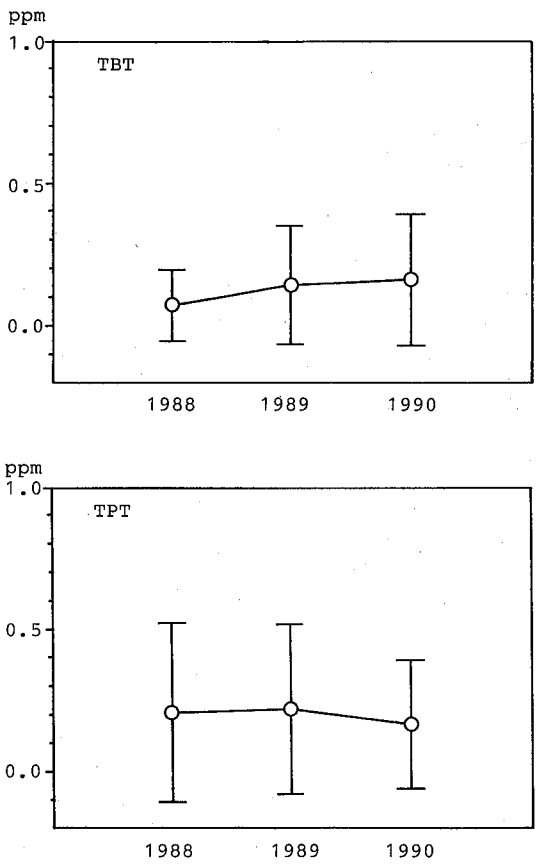


Fig. 2. Annual change of TBT and TPT content in fish and shellfish
Vertical lines represent satndard deviations.

塗料は1983年来ほぼ毎年増加を続け，1988年には13,000t程度まで達し，1989年になってようやく横這いあるいは若干の減少傾向が認められるに至っている．一方，TPT 系塗料は1983年来減少を続け，特に最近は1983年の10分の1以下まで減少している．このようにTBT 使用量に頭打ちの兆候が認められること，またTPT 使用量に一貫した減少傾向が認められることは，化審法による製造・輸入規制とそれに先立つ関連業界の自主規制及び各省庁の行政指導に基づく使用規制等の結果と考えることができる．このような使用実態により，魚介類中の TBT 濃度については微増あるいは横這い傾向，TPT 濃度については低下傾向が予測される．

そこで，使用量に基づく推移予測と今回の3年度にわたる調査結果を比較した．その結果，図2に示すようにTBT の平均値には増加傾向，TPT の平均値には減少傾向が認められ，TBT 及び TPT 系船底塗料の使用量の推移傾向と完全に一致した．TBT と TPT の両方の傾向が一致したことは単なる偶然である可能性は極めて低く，実態を反映しているものと考えられる．そこで，各年度間で平均値の差について Student の t 検定を行い，増減に統計的有意差が認められるか否かを確認した．表4に示したようにTBT については1989年度が1988年度より，また1990年度が1988年度より有意に高いことから横這いまたは微増傾向が統計的に推定できた．一方，TPT については1988年度と1989年度は有意な差は認められないものの，1990年は1988年及び1989年より有意に低く，1989年度を境として低減化傾向を示すことが統計的に推定できた．

ところで，TBT 及び TPT に関するこれらの傾向が著者らが行っている東京湾の定点観測結果[14~15]とも一致していることは強調に値する．それらの調査の1例として図3に，湾内の5定点(金沢八景，羽田，三枚洲，船橋，富津)で採取したアサリの TBT 及び TPT 含有量の経年推移を示す．アサリ中の TBT 含有量は調査を開始した1987年以来横這いあるいは微増傾向を示しており，これに対し TPT 含有量は1989年より減少傾向に転じている．これらの傾向は今回の魚介類中の TBT 及び TPT 濃度の推移傾向と良好な一致を示している．東京湾はわが国における船底塗料由来の TBT 及び TPT 汚染を集約していると考えることができるので，東京湾の TBT 及び TPT 汚染にも同一の傾向が認められることは予測の妥当性を裏付けるものである．

Table 4. Results of Student's t-test

(TBT)	1989	1990
1988	-3.220***	-3.773***
1989		-0.761

***p<0.001

(TPT)	1989	1990
1988	0.040	1.976*
1989		2.126*

*p<0.05

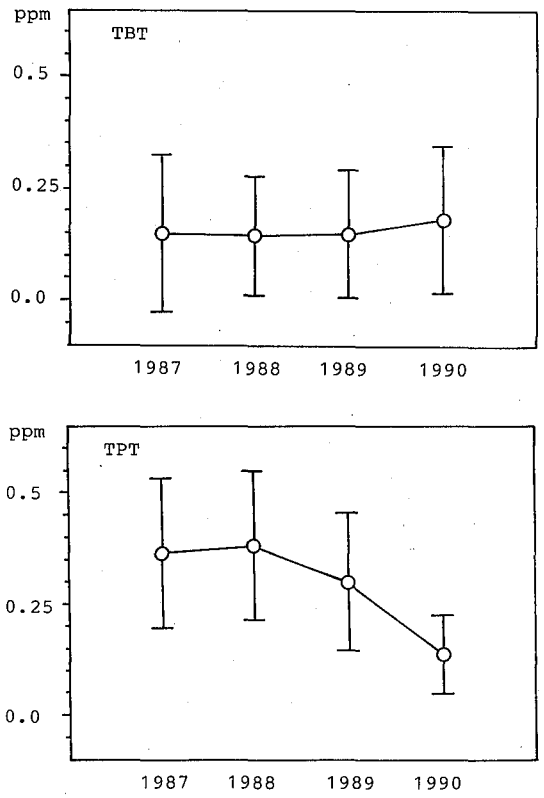


Fig. 3. Annual change of TBT and TPT content in short-necked clam collected from Tokyo bay
Vertical lines represent satndard deviations.

2．魚介類の食品安全性評価

3年間の測定結果を用いて魚介類の安全性評価を検討した．TBT については，ハマチ，マダイ，シマアジ等の養殖魚類，サワラ，スズキ，タチウオ等の一部の内湾・沿岸性魚類及び養殖漁業が盛んな内湾で養殖されているカキやホタテガイ等の貝類が比較的高い値を示している．しかし，いずれもその平均値は最大許容濃度より

はかなり低い値である．個別の測定値を見ても最大許容濃度を超過した検体の割合は，3年間を通して9／512(1.8%)であり，従ってTBTについては，現在の汚染レベルが食品安全性の面で，問題になるとは考えられない．しかし，前述したように魚介類中のTBT濃度は微増傾向を示していることが予測されるので，養殖漁網への使用自主規制を更に徹底化すると共に，代替品の開発により船底塗料への使用量の一層の低減化を図る必要がある．

TPTについては，先に述べたように低減化傾向を示しているとはいえ，依然として蓄積レベルがTBTより高く，しかも最大許容濃度はTBTの約1／3であるので，魚介類の食品安全性評価についてはTBTの場合ほど簡単に結論することはできない．

TPT濃度の高い魚介類をリストアップすると，1988年度においてはカンパチ，シマアジ，ハマチ，マダイ等の養殖魚とイサキ，カマス，サワラ，スズキ，タチウオ，マイワシ，マナガツオ，カキ等の内湾・沿岸性魚介類，1989年度においてはカンパチ，シマアジ，ハマチ等の養殖魚とイシモチ，スズキ，タチウオ，マアジ，マコガレイ，シャコ等の内湾・沿岸性魚類，更に1990年度においてはマダイおよびシマアジの養殖魚とアイナメ，スズキ，シャコ等の内湾・沿岸性魚類である．従って，この場合もTBTと同様に養殖魚類と一部の内湾・沿岸性魚類及び養殖漁業が盛んな内湾で養殖されている貝類が高い傾向を示している．

これらの高濃度蓄積魚種は，二三の例外魚種を除くと養殖魚も含めて，ほとんどが船底塗料及び漁網防汚剤による汚染の影響を強く受ける閉鎖性海域に主として棲息する，いわゆる内湾回遊性あるいは内湾定着性の魚介類と言える．従って，船底塗料による汚染の影響少ない開放性の海域に棲息する魚介類に比べて，高蓄積性となると考えられるが，これらの内湾内海性魚介類は漁獲量が比較的少なく，通常の食生活においては摂取量の少ない魚介類に属する．水産庁の調査によれば[16~17]，日本人の魚介摂取量の内訳は遠洋沖合い産(海草類も含む)が65.6g，内海内湾産(貝類を含む)が20.1gである．また，今回の調査によれば遠洋沖合い魚類のTPT濃度は平均0.048ppmであるので，遠洋沖合い産魚類から65.6×0.048＝3.15μg摂取することになる．一方，TPTの許容摂取量が0.5μg／kg／日であることから体重50kgの成人の場合は1日当たり0.5×50＝25μgが許容できるので，残り25.0－3.15＝21.85μgを内海内湾産から摂ることができ．この場合の最大濃度は21.85/20.1＝1.09ppmまで許容できることになる．このような試算から，内海内湾魚介類の基準値として，1ppm程度が妥当であると考えられる．そこで，実際に1ppmを超えるものを3年間の調査結果からピックアップすると，スズキが1ppm前後で若干問題となる程度であり，その他の魚介類については通常の摂取においてはほとんど問題が無いといえる．

おわりに

1988年度から1990年度の3年度にわたる調査に基づいて，魚介類中のTBT及びTPT濃度の推移を検討した．その結果，TBTには横這いあるいは微増傾向が認められ，TPTには減少傾向が認められた．この傾向は防汚塗料の使用量の推移と相関性があり，また東京湾の汚染モニタリング結果とも一致することから，妥当性のあるものと考えられた．

魚介類の食品安全性については，養殖魚を含む一部の内海内湾性魚介類が問題となるが，それらの摂取量が少ないことから，現状のレベルで直ちに問題となるとは考えられなかった．ただし，魚介類類中のTPT濃度はTBT濃度に比べて高く，またTBTについては低レベルとはいえ，微増傾向が認められたので，養殖漁網への使用自主規制を更に徹底化すると共に，代替品の開発により船底塗料への使用量の一層の低減化を図る必要がある．いずれにしても，今後のモニタリングが重要であることが再確認された．

謝辞：本調査を実施するに当たり，御協力頂いた衛生局生活環境部獣医衛生課，食品環境指導センター並びに市場衛生検査所の各位に深謝致します．

文　献

1) 環境庁保健調査室：化学物質と環境，平成2年度．
2) 竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：東京衛研年報，**40**，127-132，1989．
3) 水石和子，竹内正博，山野辺秀夫，渡辺四男也：東京衛研年報，**40**，121-126，1989．
4) 食品中のビストリブチルスズオキシド(TBTO)の安全性評価検討委員会報告，昭和60年4月26日．
5) FAO/WHO Monograph, 1970 Evaluations of some pesticide residues in food, 1971.
6) 蒲原稔治，岡村収：原色日本海水魚類図鑑I，II，1985，保育社．
7) 竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也，道口正雄：分析化学，**38**，522-528，1989．
8) 市原清志：バイオサイエンスの統計学，1990，南江堂．
9) 厚生省：国民栄養の現状，平成元年3月．

10) FHO：Environmental Health Criteria 15, Tin and Organotin Compounds, 1980.
11) 高橋一暢，吉野登統，大八木義彦：日化，**1987**，181-186.
12) 和田攻，真鍋重夫，岩井秀明，荒川泰昭，産業医学，**24**，24-54，1982.
13) 杉田昭夫：日本水産学会シンポジウム講演資料，有機スズ化合物による海洋汚染と水生生物に対する影響，1991.
14) 竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：日本分析化学会第39年会講演要旨集，189，1990.
15) 竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，中村弘：環境科学会第1990年会講演要旨集，82，1990.
16) 厚生省通達環食442：食品中に残留するPCBの規制について，昭和47.8.24.
17) 山県登，大喜多敬一編：環境汚染分析法9，p25，1973，大日本図書.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 86-89, 1991

有機スズ化合物の衛生化学的研究（第VIII報）
魚類における有機スズ化合物の体内分布

水石和子*, 竹内正博*, 山野辺秀夫*, 中村　弘*

Hygienic Chemical Studies on Organotin Compounds (VIII)
Distribution of Tributyltin and Triphenyltin Compounds in Fish

KAZUKO MIZUISHI*, MASAHIRO TAKEUCHI*, HIDEO YAMANOBE* and HIROHI NAKAMURA*

Organotin (TBT: tributyltin compound; TPT: triphenyltin compound) concentrations in muscular tissue, liver, kidneys and gills of fish were observed. The fish samples purchased from the Tokyo Central Market from May to October in 1990 were sea bream; *Pagrus major* (cultured fish, 10 samples) and sea bass; *Lataolabrax japonicus* (bay or shore fish, 4 samples). These organotin compounds, TBT and TPT, in the samples were determined as tributyltin chloride and triphenyltin chloride by elcetron capture detcetion gas chromatography.

In all muscular tissue, kidneys and gills, TBT was detected. Unlike in the latter two organs, the concentrations of TBT in the liver were very low compared with those in the muscles (under 1/10). It was indicated that TBT was metabolized in liver immediately, while TPT was detected in all tissue and organs. Accodingly, TPT showed a tendency to accumulate in the tissue and organs since its metabolism or decomposition is carried out slowly. The concentrations of TBT and TPT were relatively high in the gills so that there might be two ways to receive TBT and TPT. One might be feed and the other might be branchial respiration.

Keywords：トリブチルスズ化合物 tributyltin compound, トリフェニルスズ化合物 triphenyltin compound, マダイ sea bream, スズキ sea bass, 分布 distribution, 筋肉 muscle, 肝臓 liver, 腎臓 kideny, エラ gill

緒　言

漁網防汚剤や船底塗料に用いられているトリブチルスズ化合物（TBT）及びトリフェニルスズ化合物（TPT）等の有機スズ化合物による環境汚染が明らかにされ，魚介類への移行及び蓄積が問題となってきている．著者等はこれまでに各種魚介類を中心としたTBT汚染に関する報告を行ってきたが[1-5]今回は，養殖魚としてマダイ及び内海魚としてスズキの組織及び器官中の有機スズ測定を行い，TBT及びTPTについての汚染調査と各組織・器官における分布状態を観察した．

実　験

1．試料

1990年（平成2年）6月から同年10月までの期間に，東京都中央卸売市場で入手した養殖魚のマダイ10及び内海魚のスズキ4，計14検体を調査対象とした．検体試料は解体し三枚におろして，組織試料の可食部（筋肉組織）はホモジナイザーで均一化して，器官試料の肝臓，腎臓及びエラはそのままポリエチレン容器に採取した．保存は−50℃で行った．

2．測定法

既報に従って[6]測定した．均一化した試料（エラは細片）5gを遠沈管に採り塩酸酸性にしてTBT化合物はトリブチルスズクロリド（TBTC）またはTPT化合物はトリフェニルスズクロリド（TPTC）とし，メタノール・

*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, Shnjuku-ku, Tokyo 169, Japan

酢酸エチル存在下，ヘキサンージエチルエーテル（3：1，v/v）混液で抽出した．抽出液は濃縮後フロリジールカラムクロマトグラフィーでクリーンアップした．フロリジールカラムに吸着したTBTC及びTPTCをヘキサンージエチルエーテル酢酸（75：25：1，v/v/v）溶出液で溶出し，この液を濃縮して（5 ml）試験溶液を調製した．試験溶液についてピーク高絶対検量線法による電子捕獲検出ガスクロマトグラフィーで定量し，TBTC及びTPTC値を求めてTBT及びTPT濃度とした．

結果及び考察

マダイ及びスズキの可食部（筋肉組織），肝臓，腎臓及びエラ中のTBT及びTPT濃度，範囲及び平均値を表1，2に示した．

1．TBT TBTはマダイ，スズキの総ての筋肉組織から検出された．また養殖魚のマダイの筋肉組織，肝臓，腎臓及びエラ中TBT濃度の平均値は，内海魚のスズキに比較して高い値を示しており，養殖魚網に防汚剤として使用されているTBT化合物の影響が見られている．

筋肉組織での濃度範囲は，マダイでは0.26-0.80 μg/g（平均0.50 μg/g）であり，スズキでは0.08-0.32 μg/g（平均0.20 μg/g）であった．肝臓中TBT濃度は，マダイではND（検出限界，0.01 μg/g未満）-0.17 μg/g

Table 1. TBT and TPT content in Madai (Sea bream, *pagrus major*)

	TBT				TPT			
No.	Muscle	Liver	Kidney	Gill	Muscle	Liver	Kidney	Gill
1	0.16	0.14	—	0.44	0.23	0.38	—	0.13
2	0.48	0.11	0.57	0.40	0.26	0.26	0.30	0.14
3	0.61	0.01	2.42	0.39	0.31	0.56	0.56	0.25
4	0.31	0.01	1.06	0.49	0.30	0.25	0.09	0.13
5	0.43	0.04	1.02	0.63	0.39	0.49	0.56	0.16
6	0.75	0.17	1.16	0.34	0.41	0.39	0.59	0.20
7	0.80	0.01	2.36	0.47	0.85	0.70	2.08	0.51
8	0.26	0.01	0.55	0.10	0.17	0.16	0.33	0.11
9	0.32	ND	0.62	0.22	0.18	0.11	0.24	0.09
10	0.47	0.02	1.15	0.30	0.19	0.08	0.18	0.10
Range	0,26-0.80	ND-0.17	0.55-2.42	0.10-0.63	0.17-0.85	0.08-0.70	0.09-2.08	0.09-0.51
Mean	0.50	0.05	1.21	0.38	0.33	0.34	0.55	0.18

μg/g

ND=less than 0.01 μg/g

Table 2. TBT and TPT content in Suzuki (Sea bass, *Lataolabrax japonicus*)

	TBT				TPT			
No.	Muscle	Liver	Kidney	Gill	Muscle	Liver	Kidney	Gill
1	0.13	ND	0.20	0.21	1.03	1.79	1.02	0.68
2	0.32	ND	0.40	0.25	1.21	2.07	1.63	1.10
3	0.26	0.01	0.74	0.33	0.54	0.71	0.88	0.44
4	0.08	ND	0.12	0.06	0.36	0.41	0.49	0.24
Range	0.08-0.32	ND-0.01	0.12-0.74	0.06-0.33	0.36-1.21	0.41-2.07	0.49-1.63	0.24-1.10
Mean	0.20	0.002	0.37	0.21	0.79	1.25	1.01	0.62

μg/g

Table 3. Ratio of TBT and TPT concentration of liver, kidney and gill to muscle

(TBT)	Liver/Muscle	Kidney/Muscle	Gill/Muscle	Liver/Kidney
sea bream	0.10	2.42	0.76	0.04
sea bass	0.01	1.82	1.05	0.005
(TPT)				
sea bream	1.03	1.67	0.55	0.62
sea bass	1.58	1.28	0.78	1.24

(平均0.05 μg/g) 及びスズキでは，ND-0.01 μg/g (平均0.002 μg/g) であった．

筋肉組織と肝臓のTBT濃度の平均値の比（肝臓／筋肉組織）を求めたところ，表3に示すように，マダイは0.10及びスズキは0.01と，いずれも0.1以下であり，肝臓でのTBT濃度は筋肉組織に比較して低い傾向が見られた．この傾向は肝臓に移行したTBT化合物は比較的速やかに代謝分解され蓄積されないためと考えられる．一方腎臓中のTBT濃度はマダイが0.55-2.42 μg/g (平均1.21 μg/g) 及びスズキが，0.12-0.74 μg/g (平均0.37 μg/g) であり，いずれも肝臓よりも高い値を示した．腎臓と筋肉組織のTBT濃度の平均値の比（腎臓／筋肉組織）では，マダイが2.42及びスズキが1.82であった．いずれも，筋肉組織より濃度が高く，また，肝臓と腎臓の平均値の比ではマダイでは0.04及びスズキで0.005を示し，肝臓に比べTBT化合物は腎臓に濃縮されることが顕著であった．エラ中 TBT 濃度は，マダイが0.10-0.63 μg/g (平均0.38 μg/g) 及びスズキが0.06-0.33 μg/g (0.21 μg/g) の範囲であった．平均値を見ると，顕著な差はなかった．総ての魚のエラからTBT化合物が検出されていることから，海水中に溶解しているTBT化合物がエラ呼吸により海水からエラ組織に吸収あるいは吸着されるものと考えられる．

2．TPT TPTはマダイ及びスズキ総ての組織・器官から検出された．TBTの場合と異なり，TPT濃度は，養殖魚のマダイより内海魚のスズキの方が高い傾向が見られた．この傾向は船舶塗料由来のTPT化合物による海水汚染が広域に渡っていることを示している．

筋肉組織のTPT濃度はマダイ0.17-0.85 μg/g (平均0.33 μg/g) 及びスズキ0.36-1.21 μg/g (平均0.79 μg/g) であり，肝臓ではそれぞれ，0.08-0.70 μg/g (平均0.34 μg/g) 及び0.41-2.07 μg/g (平均1.25 μg/g) で，また腎臓では0.09-2.08 μg/g (平均0.55 μg/g) 及び0.49-1.63 μg/g (平均1.01 μg/g) であった．筋肉組織と肝臓の平均濃度の比（肝臓／筋肉組織）を検討したところ，表3に示すように，マダイが1.03，スズキが1.58であり，いずれも1.0以上で肝臓に蓄積する傾向があった．特に内海魚の肝臓中濃度が高い傾向を示している．スズキの肝臓から1.79 μg/g (筋肉組織では1.03 μg/g) 及び2.07 μg/g (同，1.21 μg/g) を検出したものがあった．以上のことから肝臓中濃度の低いTBT（筋肉組織の濃度の1／10以下）に比較して，TPTは肝臓での代謝・分解が遅く蓄積されやすいことがわかった．また，筋肉組織と腎臓における平均濃度の比（腎臓／筋肉組織）はマダイが，1.67及びスズキが1.28であり，1.0以上を示し，TBTと同様にTPTは筋肉組織より腎臓にも高濃度に蓄積されやすい傾向がみられた．肝臓と腎臓のTPT平均濃度の比は0.62-1.24の範囲で，肝臓と腎臓における濃度の差は小さくなっている．TBTの場合の0.02-0.005に比較した結果からもTBTよりTPTが肝臓に蓄積・濃縮されていることがわかる．

エラ中TPT濃度はマダイが0.09-0.51 μg/g (平均0.18 μg/g) 及びスズキが0.24-1.10 μg/g (平均0.62 μg/g) であった．エラ中濃度は特に内海魚に高い傾向がみられた．これは船底塗料の海水への溶出との相関をあらわしているものと考えられる．

3．体内分布の相関性

マダイについての筋肉組織，肝臓，腎臓及びエラ中TBT及びTPT濃度についての相関係数を表4に示した．

Table 4. Correlation coefficients of TBT and TPT concentrations of muscle, liver, kidney and gill of madai

	Liver	Kidney	Gill
Muscle	0.71/0.94	0.92/0.94	0.90/0.98
Liver		0.42/0.85	0.61/0.95
Kidney			0.85/0.96

TBT/TPT

TBT では筋肉組織－エラ間が0.90，筋肉－腎臓が0.92であり，筋肉組織とエラ及び腎臓間に高い相関性が見られた．TPT では筋肉組織，肝臓，腎臓及びエラ相互間の相関係数が0.85-0.98の範囲にあり総て有意であった．TBT 及び TPT 濃度共に筋肉組織－エラ間に高い相関関係が見られることから魚への TBT 及び TPT の取り込みは餌（食物連鎖）のみならず海水（エラ呼吸）からも行われ，２種の取り込み経路があることが明らかであった．エラ呼吸による直接吸収も主要な摂取経路であることが指摘できた．

4．生体内代謝と濃縮

食餌により摂取あるいはエラ呼吸により海水から直接魚に摂取された TBT 及び TPT は各組織・器官に移行し蓄積・濃縮されるが，それぞれの体内分布に差があった．

TBTは筋肉組織－エラ，筋肉組織－腎臓間で相関性が高くなっているが肝臓との相関性が低いことから摂取された TBT の各組織・器官への移行及び代謝速度が異なっていることが考えられる．肝臓では移行後速やかに代謝・分解されるため（生物学的半減期が短い）肝臓中濃度が筋肉組織より１／10以下と低くなっている．

TPT濃度は全組織・器官間で高い正の相関関係を示していることから，各組織・器官のTPTの代謝速度は差が無いかあるいは比較的遅く，摂取された TPT がそのまま移行・蓄積する傾向があると考えられる．

ま と め

1990年６月から同年10月の間に東京卸売市場で入手した養殖魚（マダイ，10検体）と内海魚（スズキ，４検体）の可食部（筋肉組織），肝臓，腎臓及びエラ中の TBT 及び TPT 濃度を測定し，それらの体内分布を観察した．

TBTはマダイ，スズキ共に全ての筋肉組織，腎臓及びエラから検出されており，筋肉組織中濃度と腎臓及びエラの濃度との間には相関性が見られた．一方肝臓での濃度は筋肉組織に比べ低く，特にスズキではほとんど検出限界以下であった．肝臓中濃度が低いことから肝臓での TBT 代謝速度が速いことが推測できた．また筋肉組織，肝臓，腎臓及びエラ中TBT濃度の平均値はいずれも養殖魚のマダイの方が内海魚のスズキより高く，養殖漁網に用いられているTBT化合物の影響が見られた．

TPT は総ての筋肉組織・肝臓・腎臓及びエラから検出された．各組織・器官濃度は相互間で正の相関関係がみられていることから，摂取された TPT の代謝・分解速度は遅くそのまま各組織・器官に移行・蓄積しているものと考えられる．TPT濃度はマダイよりスズキの方が高い傾向があり，船舶塗料由来の TPT 化合物による汚染が広域に渡っていることが明らかであった．

TBT，TPT ともに筋肉組織とエラ中濃度の間で相関性があり，TBT 及び TPT の主要な取り込み経路は食餌のみならずエラ呼吸（海水からの吸収・吸着）であることが指摘できた．

文　献

1) 竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男他：東京衛研年法，**37**，154-157，1986．
2) 竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男他：東京衛研年法，**38**，155-159，1987．
3) 竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男他：東京衛研年法，**38**，160-166，1987．
4) 水石和子，竹内正博，山野辺秀夫，渡辺四男他：東京衛研年法，**40**，121-126，1989．
5) 竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男他：東京衛研年法，**40**，127-132，1989．
6) 竹内正博，水石和子，山野辺秀夫，渡辺四男他：分析化学，**36**，138-142，1987．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 90-94, 1991

玄米中の微量元素濃度

山野辺 秀 夫*, 竹 内 正 博*, 水 石 和 子*
江波戸 擧 秀*, 中 村 弘*

Content of Fifteen Trace Elements in Brown Rice

HIDEO YAMANOBE*, MASAHIRO TAKEUCHI*, KAZUKO MIZUISHI*
KIYOHIDE EBATO* and HIROSHI NAKAMURA*

Keywords：定量 determination, 微量元素 trace element, 相関 correlation, 玄米 brown rice, 原子吸光分析 atomaic absorption spectrophotometry, 高周波誘導結合プラズマ(ICP)inductively coupled plasma(ICP)

緒　　言

1970年に食品衛生法において，玄米の規格基準(Cdとして1.0ppm未満)が制定されて以来これまで元素含有量については種々報告されている[1-3]．玄米中に含有する元素濃度を把握することは，各種元素の相関性や食品の安全性の評価の一助になることが期待されるが，元素濃度は，天候，生産地の土壌および銘柄等によって異なると考えられるので，長期にわたって多数の試料を測定する必要がある．しかし，これまでの調査は単年度におけるものが多く，しかも多元素を同時に調査した報告例はほとんどない．そこで，我々は1972年以来行政検査として実施している都内搬入玄米の重金属汚染調査の一環として原子吸光分析法及び高周波誘導結合プラズマ(ICP)発光分光分析法で測定可能な15元素(Cd, As, Cu, Cr, Pb, Sn, P, Sb, Mn, Fe, Mg, Sr, Ca, Zn, Ba)を調査した．

実　　験

1．試料　1984年から1987年の4年間に東京都内に搬入された玄米約600検体(各年150検体)のうち，その過半数を占めるアキヒカリ，ササニシキ，コシヒカリおよびキヨニシキの4銘柄を選び，各年毎に無作為に抽出した100検体(各年25検体)を試料とした．表1に試料の内訳を示す．

2．試薬　カドミウム(Cd)，ヒ素(As)，銅(Cu)，クロ

表1．試料に供した銘柄，検体数および産地名

銘柄	'84	'85	'86	'87	計	産地名
アキヒカリ	2	4	2	10	18	青森県，岩手県，秋田県 福島県，新潟県，千葉県
ササニシキ	9	7	9	6	31	岩手県，秋田県，山形県 宮城県，福島県
コシヒカリ	11	9	8	4	32	宮城県，福島県，新潟県 栃木県，茨城県，千葉県 長野県，富山県，石川県
キヨニシキ	3	5	6	5	19	岩手県，秋田県，山形県 福島県
計	25	25	25	25	100	

*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 chyome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

表2．ICP装置の測定波長および添加回収実験結果

	測定波長(nm)	添加量(μg/g)	回収量(μg/g)	回収率(%)
Sn	189.9	25.0	23.8	95.4
P	213.6	250.0	267.0	106.8
Sb	217.5	5.0	4.92	98.4
Mn	257.6	10.0	10.34	103.4
Fe	259.9	12.5	12.42	99.4
Mg	279.6	250.0	172.8	69.1
Sr	407.7	5.0	5.01	100.1
Ca	422.6	50.0	49.8	99.6
Zn	213.8	25.0	25.9	103.6
Ba	455.4	5.0	5.04	100.7

ム(Cr)，鉛(Pb)，スズ(Sn)，リン(P)，アンチモン(Sb)，マンガン(Mn)，鉄(Fe)，マグネシウム(Mg)，ストロンチウム(Sr)，カルシウム(Ca)，亜鉛(Zn)，およびバリウム(Ba)の標準液：和光純薬工業(株)製の原子吸光分析用1000ppm標準溶液を適宜希釈して使用した．その他の試薬は和光純薬工業(株)製の有害金属測定用試薬を用いた．

3．装置 原子吸光分析装置はバリアン インスツルメンツ リミテッド製 Spectr AA-400型を使用した．水素化物の測定は同社製の水素化物発生装置VGA-76型を，またフレームレス原子吸光測定は同社製のGTA-96型を接続して行った．高周波誘導結合プラズマ(ICP)発光分析にはJobin Yvon社製JY48P型を使用した．

4．試験溶液の調製および測定 1) CdおよびCu：試料5.0gを採り日本薬学会協定の衛生試験法(飲食物試験法)[4,5]に従って測定溶液を作製し，フレーム原子吸光法で測定した．本試験法の回収率は95.0%以上，変動係数3.0%以下であった．2) As：試料1.0gを衛生試験法(飲食物試験法)[4]に従って湿式分解し，中和後20%ヨウ化カリウム溶液2.5mlおよび濃塩酸4.5mlを加えて水で50mlとした．本法の回収率は93%以上，変動係数3.5%以下であった．3) Cr及びPb：試料2.0gを湿式分解後，0.1%硝酸溶液で10mlに調製し，これを測定液としてフレームレス原子吸光法で定量した．NBS No.1575 PINE NEEDLEを用いた回収率はCrが101.2%，Pbが107.4%，変動係数はCrが4.6%，Pbが3.0%であった．4) その他の元素：試料1.0gを採り，硝酸－過塩素酸を用いホットプレート上で湿式分解後，過塩素酸がほぼ乾固するまで過熱した．分解液に0.5N塩酸を加え10mlにして測定液とした．測定はICP発光分析法[7]で行った．

本法の回収率および測定精度は次のように確認した．すなわち，玄米5.0gを試験法に従って処理した後，表2に示した濃度になるように各元素を添加した．Mg以外ほぼ定量的な回収率が得られたが，Mgは回収率が69.1%であったのでこの値から測定値を補正した．

結果および考察

各元素の濃度範囲，平均および標準偏差を表3に示した．既に報告されている結果と比較すると，池辺ら[1]はCd 0.11±0.048ppm，Cu 2.82±0.520ppm，Zn 20.5±2.333ppm，Mn 26.0±6.474ppm，松下ら[2]はCd 0.094±0.098ppm，Cu 2.81±0.78ppm，Zn 1.91±

表3．玄米中の元素含有量

元素	範囲(ppm)	平均±SD(ppm)
Cd	0.00 - 0.25	0.06 ± 0.06
As	0.00 - 2.20	0.21 ± 0.23
Cu	0.62 - 4.26	2.40 ± 0.60
Sn	1.44 - 9.53	3.33 ± 2.10
P	590 - 3520	2780 ± 420
Sb	0.00 - 2.77	1.59 ± 0.64
Mn	11.5 - 72.3	27.8 ± 7.9
Fe	6.9 - 33.3	11.7 ± 3.4
Mg	813 - 1320	1020 ± 107
Sr	0.12 - 0.60	0.26 ± 0.09
Ca	55.9 - 130.0	80.3 ± 13.4
Zn	12.3 - 42.0	19.2 ± 5.2
Ba	0.07 - 1.46	0.39 ± 0.26
Cr*	0.004 - 0.024	0.011 ± 0.004
Pb*	0.006 - 0.096	0.033 ± 0.019

N：100 *N：49

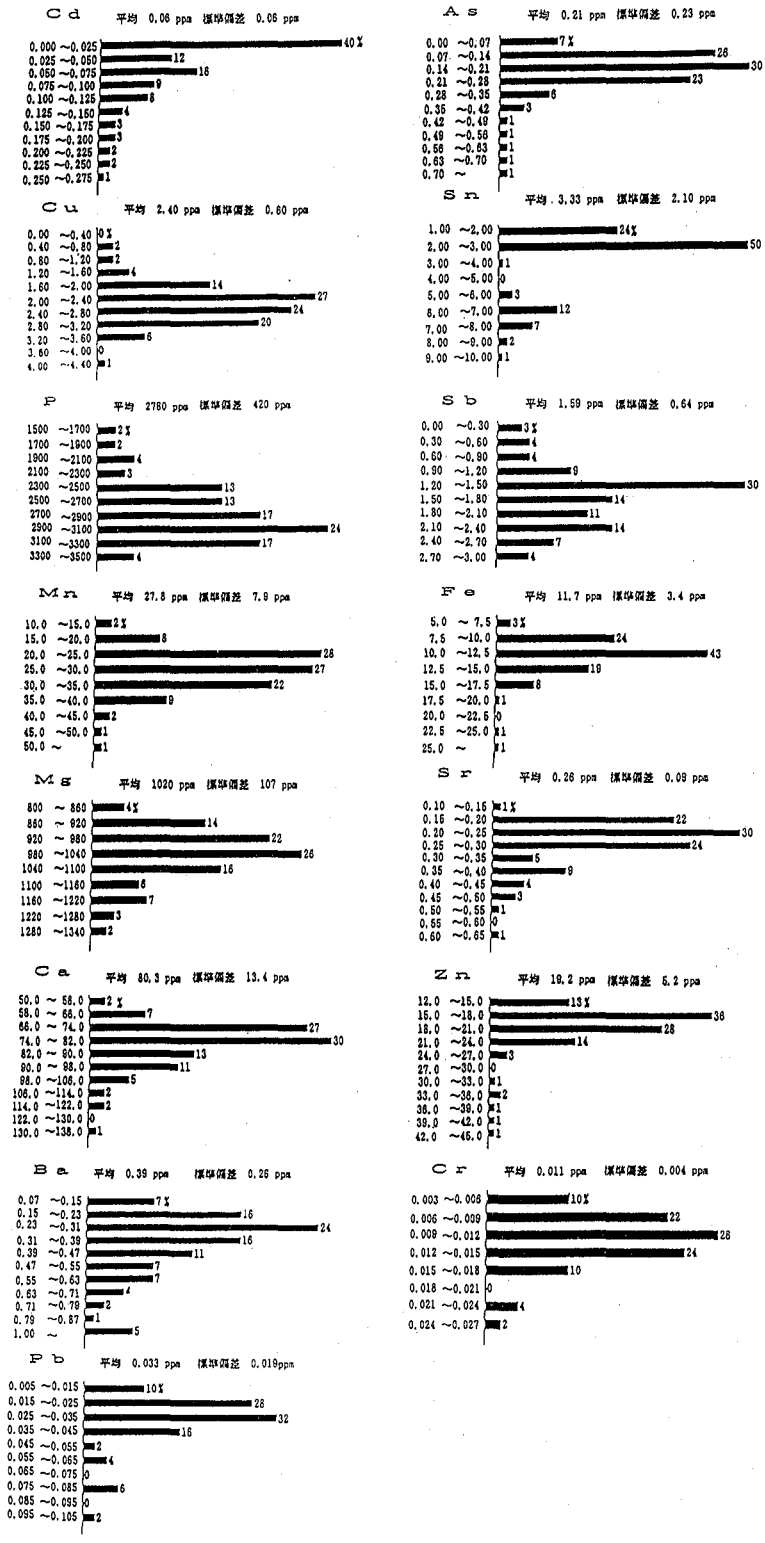


図1．測定元素のヒストグラム

2.4ppm, Mn 26.5 ± 7.2ppm と報告しており，また，ICP 発光分光分析法により多元素を同時定量した池辺ら[3]のうち12元素(＝5, Cd 0.09 ± 0.053ppm, Cu 2.530 ± 0.609ppm, P 2750 ± 155ppm, Mn 23.77 ± 1.83ppm, Fe 8.367 ± 1.807ppm, Mg 1317 ± 66ppm, Sr 0.174 ± 0.031ppm, Ca 69.16 ± 5.56ppm, Zn 16.80 ± 2.76ppm, Ba 0.329 ± 0.176ppm, Cr 0.017 ± 0.007ppm, Pb ND) を比較してもほぼ同じ値であった.

表3で得られた値を図1のヒストグラムで示した．これらのヒストグラムは玄米中に含まれる各元素含有量が対数正規分布をとることを示している.

つぎに各元素の相関関係をみるため，有意差マトリクスを両側測定した結果を表4に示した．この表から1％の危険率で有意差が認められた元素の組合せは，Cd－Cu, Sn－P, Sn－Sb, Sn－Fe, Sn－Mg, Sn－Ca, Sn－Zn, P－Sb, Mn－Fe, Mn－Ca, Mn－Zn, Mn－Ba, Fe－Mg, Fe－Ca, Fe－Zn, Fe－Ba, Mg－Ca, Mg－Zn, Sr－Ba, Ca－Zn, Ca－Ba, Zn－Baの22組である．これらの組み合せの中で相関係数の特に高いものについて散布図と回帰直線を図2に示した．これら相関性の高い元素の多くはヒトの必須微量元素と関連しており，栄養学的に興味ある結果となった.

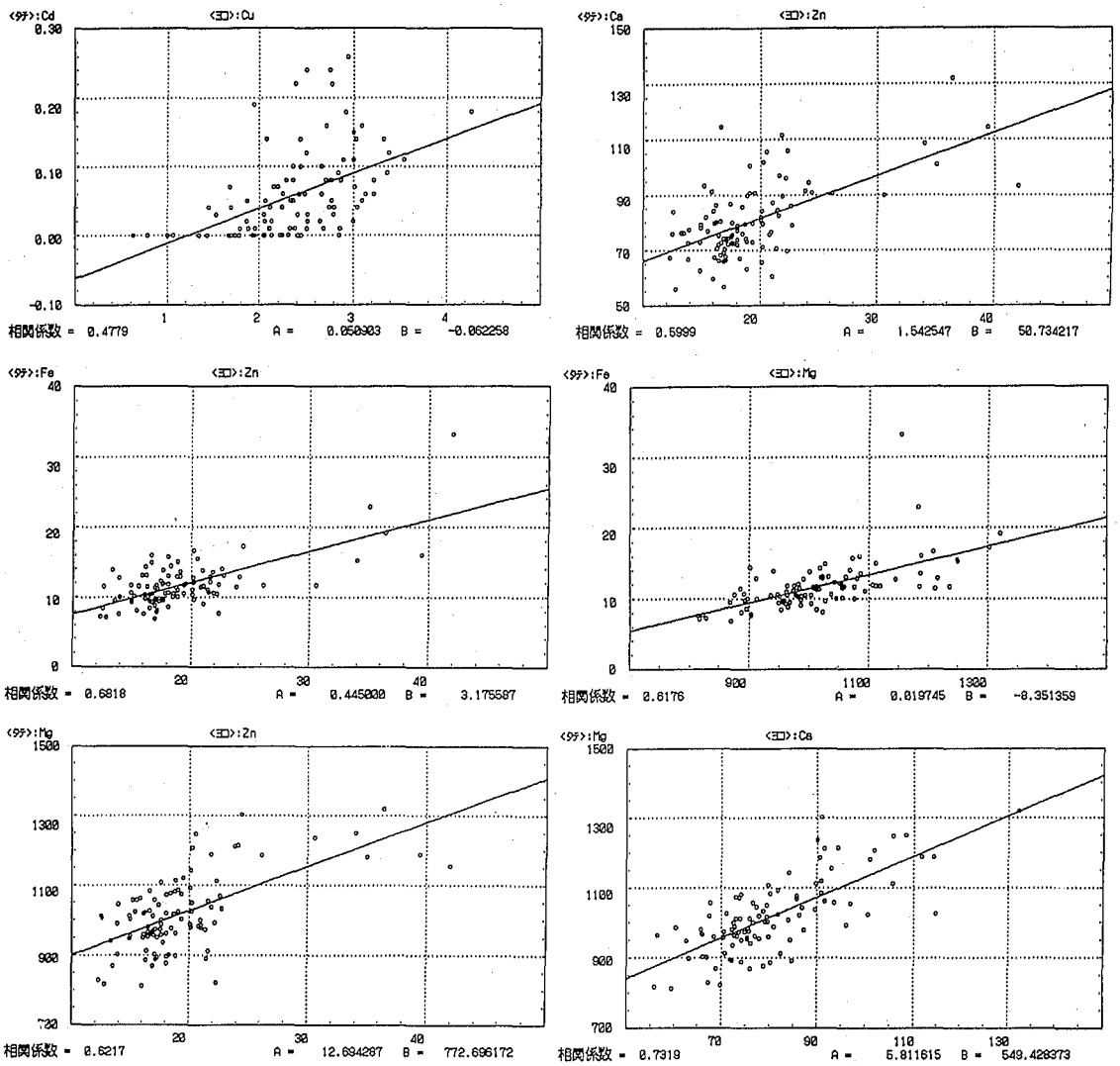


図2．散布図および回帰直線

表4．有意差判定マトリックス

元素	Cd	As	Cu	Sn	P	Sb	Mn	Fe	Mg	Sr	Ca	Zn	Ba
Cd			***		*				*				
As												*	
Cu												*	*
Sn					***	***	**	***	***		***	***	*
P						***						**	
Sb													
Mn								***	*		***	***	***
Fe									***		***	***	***
Mg											***	***	
Sr												*	***
Ca												***	***
Zn													***
Ba													

両側測定…有意水準　***1%　**　2%　*　5%

結　語

食品および環境中の微量元素のバックグランド濃度の把握は，食品衛生や環境保全の立場から重要である．玄米中に含まれる微量元素については，今までまとまったものがなく，また主食として毎日摂取するところからその元素含有量を把握することが求められていた．今回測定した15元素の測定値は，食品衛生学的な評価基準の資料として有効に活用できるものと考える．

(本研究の概要は日本食品衛生学会第60会学術講演会，平成2年9月，札幌で発表した.)

文　献

1) 池辺克彦，田中之雄，田中涼一，国田信治：食衛誌，**13**，195-204，1972
2) 松下純雄，市橋啓子：兵庫県衛生研究所研究報告，**17**，76-78，1982
3) 池辺克彦，田中涼一：食衛誌，**24**，282-288，1983
4) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，556-557，1990，金原出版株式会社
5) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，567-573，1990，金原出版株式会社
6) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，62-65，1990，金原出版株式会社
7) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，17-32，1990，金原出版株式会社

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **42**, 95-101, 1991

キャピラリーGC/MS-Selected Ion Monitoring 法による魚介類中の Non-*ortho*-Chlorine Substituted PCB の定量

植田忠彦*, 中村　弘*, 秋山和幸**

Determination of Three Non-*ortho*-Chlorine Substitued PCBs in Fishes and Shellfishes by GC / MS Selected Ion Monitoring Method

TADAHIKO UETA*, HIROSHI NAKAMURA* and KAZUYUKI AKIYAMA**

Keywords：コプラナー PCB, Coplanar PCB, non-*ortho*-chlorine substituted PCB, 高分解能ガスクロマトグラフ／質量分析, high resolution gas chromatograph mass spectrometry, 魚介類 fish and shellfish

緒　言

我が国においては昭和47年(1972)に Polychlorinated biphenyls(PCB)の製造ならびに使用が禁止された[1]. しかし, 著者らがこれまで行ってきた魚介類を中心とする食品ならびに環境中の PCB 汚染の実態調査[2]によれば, 20年を経た今日においても, 漸減傾向を示しながらも魚介類ならびに海洋性哺乳類のPCB汚染は続いている. 一方, ポリ塩化ジベンゾーパラジオキシン(PCDD)やポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)の生物に対する影響の研究[3]や環境ならびに生物汚染調査[4,5]の進展と相挨って, PCB のなかにもこれらに類似の毒性を発現するタイプのPCB異性体が存在することが明らかにされてきた[6-10]. これらの異性体はオルト位に塩素原子を持たない塩素数が4～6のものであり, non-*ortho*-chlorine substituted PCB または Coplanar PCB(CPCB)と呼ばれる. これらの CPCB は極性が高く従来の PCB 分析法では検出することができない.

また, 魚介類への蓄積量も低く, これらを定量するためには高感度かつ精度の高い分解法が必要である. これまでに GC-ECD 法[11]あるいは高分解能 GC/MS Selected Ion Monitoring(SIM)法[12]による定量法が報告されているが, いずれも PCDD や PCDF との系統的な分析を目的とするものであり, 試料の前処理が非常に煩雑なために多数の試料を処理するには不向きである.

著者らは PCB および CPCB の分離定量法として簡易な前処理と高分解能 GC/MS-SIM 法による定量法を開発し, 魚介類中の PCB および CPCB の含有量を調査したので報告する.

実験方法

1. 調査試料　平成2年(1990)4月より平成3年(1991)3月までに東京都中央卸売市場に入荷した魚介類および東京湾で捕獲されたスズキ, アイナメの合計32種類118検体である.

2. 標準品および試薬　標準品の3, 3', 4, 4'-Tetrachloro-biphenyl(C4PCB), 3, 3', 4, 4', 5, -Pentachloro biphenyl(C5PCB) および 3, 3', 4, 4', 5, 5'-Hexachloro-biphenyl(C6PCB)は愛媛大学より分与されたものを用いた. 試薬は特級品および残農用ジエチルエーテルとヘキサンを用いた. また, フロリジールは130℃で15時間活性化したものを用いた.

3. 試料の前処理法　試料は魚介類の可食部をホモジナイズして用いた. Fig.1に示すスキームに従って PCB 画分および CPCB 画分を得て, この CPCB 画分を試験溶液とした.

4. 装置および測定条件　測定装置は VG Analytical 社製 VG-70s 型質量分析計に Hewlett Packard 社製　オートサンプラー(7673A型)付　5890A型ガスクロマトグラフを接続して用いた. MS 測定条件はイオン化電圧70eV,

＊東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科
＊＊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

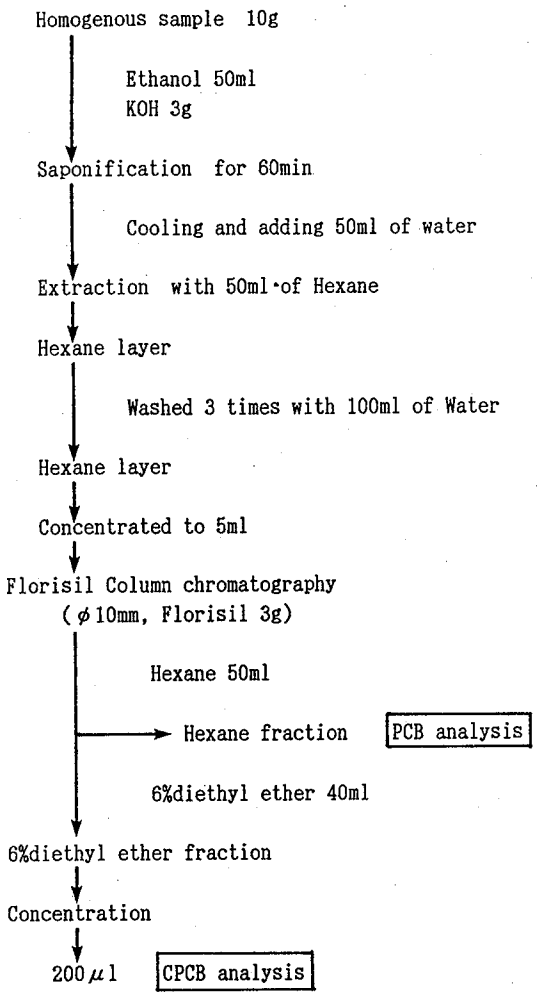


Fig. 1. Scheme for determination of non-*ortho*-chlorine substituted PCB

トラップ電流100～200 μA，加速電圧 8 kV，分解能 5,000，SIM モニターイオン C4PCB(m/z 289.9224)，C5PCB(m/z 323.8834)，C6PCB(m/z 357.8444)とした．

GC 測定条件はカラムが J & W Scientific 社製 BD-17 φ 0.25mm × 30m，キャリアーガス(He 1 ml/min, 12psi)，カラム温度55℃(2 min hold)，180℃まで昇温(20°C/min)，次いで280℃まで昇温(5 ℃/min, 5 min hold)，注入口温度250℃，スプリットレス法，注入量は 2 μl とした．

5．検量線および定量法 C4PCB，C5PCB，C6PCB 各々0.002，0.005，0.01，0.02 μg/ml の濃度のヘキサン溶液を調製し，この溶液の SIM 測定クロマトグラムピーク面積と濃度により検量線を作成した．

定量は CPCB 試験溶液の SIM 測定クロマトグラムと同時に作成した検量線を用いて行った．

結果および考察

1．前処理法 CPCB は PCB 製品の中に含まれている成分の一グループである．Tanabe ら[13]は PCB 製品の一種，カネクロール中に含まれている C4PCB，C5PCB および C6PCB の三つの CPCB 組成の分析結果を報告している．その報告によれば，CPCB の含有量は PCB の 1％以下の微量であり，これらを分析するためには共存する他の PCB 異性体から目的とする CPCB を分離する必要がある．環境試料や生体試料中の CPCB 濃度は環境中での分解や生体内での代謝あるいは濃縮等によって製品中の組成比とはかなり異なった組成となっていることも予想され，更に，試料中にはこれらの定量を妨害する成分も存在することから，微量の CPCB を精度良く定量するためにはこれらの妨害物質を出来る限り除去することのできる前処理操作が必要である．これまでに CPCB の定量法として，Tanabe[11]や高山ら[12]が報告した PCDD 及び PCDF との系統的な分離定量法は，分離操作に活性炭カラムや積層カラムを用いるものであり，溶出に用いる溶媒量も多く，前処理に長時間を要する．

今回，著者らが設定した Fig. 1 に示す前処理法によれば PCB はフロリジルカラム(φ 1 ×15cm，フロリ

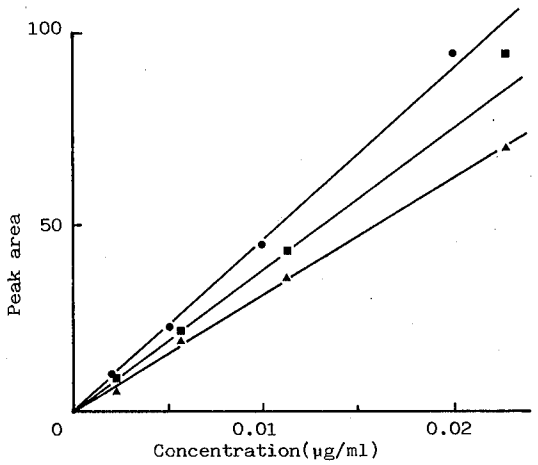


Fig. 2. Calibration curves of non-*ortho*-chlorine substituted PCB

—●—: 3,3′,4,4′-CPCB
—■—: 3,3′,4,4′,5-CPCB
—▲—: 3,3′,4,4′,5,5′-CPCB

ジール3g)よりヘキサン50mlのフラクションに100%溶出するがCPCBはカラム内に保持されている．次いで6%ジエチルエーテル・ヘキサン40mlを流すことによりCPCBはこのフラクションに溶出する．本法におけるC4PCB，C5PCBおよびC6PCB各々100ngを用いた回収率は82.3，86.2および80.3%であった．本法はPCBとCPCBを分離定量することを目的とする方法であり，先の方法に比べて使用する溶媒量は約1/5程度の少量で，かつ，所要時間も短くて済む利点がある．

2．定量性と定量下限 Fig. 2はC4PCB，C5PCBおよびC6PCBの検量線であるが，いずれも0.002～0.02 μg/mlの濃度範囲で良好な直線性を示している．

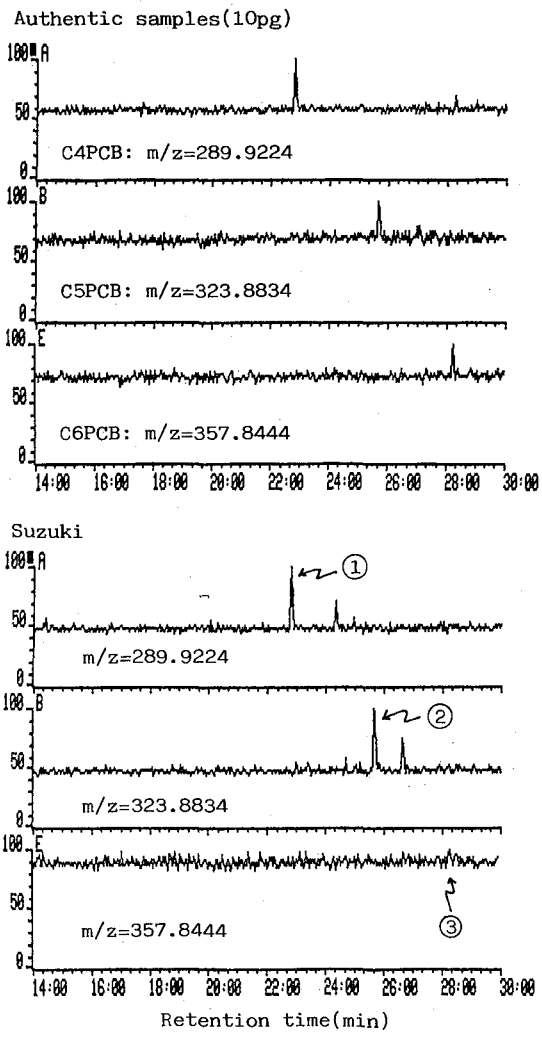


Fig. 3. GC/MS SIM chromatograms of authentic samples and non-*ortho*-chlorine substitued PCB in fish
①：C4PCB ②：C5PCB ③：C6PCB

Fig. 3はCPCB標準物質各々10pgおよび本法により処理したスズキのSIMクロマトグラムを示したものである．

定量下限は20pg/gであるが，魚介類中のCPCB汚染のモニタリング法としてはほぼ目的を達成できる感度であり，更に試料の処理量ならびに最終試験溶液量を考慮することにより定量下限の向上を図ることが可能と考える．

3．魚介類中のPCBおよびCPCB Table 1に今回測定した魚介類中のPCBおよびCPCB含有量を示す．定量値は回収率で補正した値である．

PCB異性体の中でC4PCB，C5CPBおよびC6PCBの三つのCPCBは生体に対する毒性が強いために注目されているが，その毒性強度はC5PCB＞C6PCB＞C4PCBであると報告されている[9]．従って，これらの異性体の各々の濃度を把握することが生体に対する影響を評価する上で重要となる．

これまでに生体試料中のCPCB含有量に関する報告は幾つか認められるが，樫本ら[4]の報告によれば，CPCBの人体脂中の濃度はC5PCB＞C6PCB＞C4PCBであり，一方，Tanabeら[10]の報告によればC4PCB＞C5PCB＞C6PCBである．しかし，いずれの報告も魚類あるいは海洋性哺乳類中のこれらの濃度は人体脂の濃度と異なり，C4PCBがC5PCBやC6PCBに比べて極めて高いと報告している[10,12]．

今回の著者らの調査によればPCB含有量の高いものは概してCPCB含有量も高く，CPCB汚染がPCB製品由来であることを示している．しかし，なかには必ずしもCPCB濃度がPCBと対応しない例も認められ，この原因が魚種間の代謝の違いによるものか，摂取する餌中のCPCB濃度の違いによるものか不明であり，今後検討する必要がある．また，C4PCBおよびC5PCBは多くの魚種より検出されたがC6PCBを検出する魚介類はわずかであった．CPCB異性体濃度はほとんどの場合C4PCB＞C5PCBであったが，一部にはC5PCB＞C4PCBの魚種も認められた．しかも，同一魚種であってもこれらの蓄積濃度にはかなりの個体差も認められた．著者らの調査によれば，冬季に捕獲される体長50cm以上の大型スズキに比べて，7月頃に捕獲される体長40cm程度の小型のスズキのPCB濃度は2～3倍高い値を示すことがあり，この差異は成長期における食餌量と食性等によるものと考えられる．CPCB異性体の濃度の違いもこのような魚種の習性や生育環境のPCB汚染の状況の違いなど

Table 1. Concentrations (wet weight basis) of non-*ortho*-chlorine substituted PCB in fishes and shellfishes

Sample	N	PCB(μg/g)		C4PCB(pg/g)		C5PCB(pg/g)		C6PCB(pg/g)	
		Range	Mean	Range	Mean	Range	Mean	Range	Mean
Ainame(greenling)	4	0.011-0.447	0.169	ND-145	61	ND-139	87	ND-27	11
Aji(horse-mackerel)	4	0.002-0.027	0.013	ND-439	161	ND-75	19	ND	ND
Akagai(ark shell)	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Anago(conger eel)	1	0.023	0.023	44	44	46	46	ND	ND
Bora(gray mullet)	1	0.066	0.066	112	112	ND	ND	ND	ND
Hamachi(yellow tail)*	8	0.010-0.090	0.050	ND-271	134	ND-277	115	ND	ND
Higedara(gray hakeling)	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hiramasa(amberjacks)*	1	0.102	0.102	574	574	ND	ND	ND	ND
Hirame(bastard halibut)*	3	0.008-0.022	0.013	ND-395	192	ND	ND	ND	ND
Hotategai(scallop)*	3	ND-0.017	0.006	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ishimochi(croaker)	1	0.017	0.017	169	169	ND	ND	ND	ND
Iwashi(sardine)	5	0.012-0.041	0.025	ND-304	102	ND-73	36	ND-92	18
Kajika(japanesre sculpin)	1	0.005	0.005	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Kaki(oyster)*	2	ND-0.015	0.008	ND-164	82	ND-70	35	ND	ND
Kamasu(barracuda)	1	0.038	0.038	33	33	19	19	ND	ND
Katsuo(bonito)	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Kihadamaguro(yellowfin tuna)	2	0.002-0.012	0.007	ND-281	140	ND-44	13	ND	ND
Kinmedai(alfoncino)	3	0.030-0.049	0.028	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Konoshiro(gizzard shad)	2	0.009-0.161	0.085	ND-521	261	ND-103	52	ND-10**	5.0
Kurumaebi(prawn)*	1	0.053	0.053	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Madai(sea bream)*	6	0.012-0.065	0.031	ND-211	95	ND-124	46	ND	ND
Mutsu(japanese bluefish)	1	0.002	0.002	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Muurugai(mussel)	3	ND-0.002	0.001	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Saba(macherel)	3	0.015-0.045	0.028	ND-238	79	ND-84	28	ND	ND
Sake(salmon)	2	0.021-0.026	0.024	33-35	34	34-49	41	ND-14**	6.8
Sanma(macherel pike)	2	0.005-0.009	0.007	52-186	119	16-46	31	ND	ND
Sawara(spanish mackerel)	2	0.026-0.039	0.033	139-146	142	ND	ND	ND	ND
Shiira(dorado)	1	0.019	0.019	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Shimaaji(striped jack)*	6	0.024-0.075	0.047	ND-214	80	ND-232	78	ND	ND
Suzuki(perch)	40	0.015-0.819	0.197	ND-899	86	ND-254	66	ND-44	13
Tachiuo(hairtail)	2	0.028-0.197	0.113	ND-124	62	ND-44	22	ND	ND
Unagi(eel)*	4	0.016-0.033	0.023	ND-165	73	ND-138	36	ND	ND

* : cultured ** : near the detection limit

N : number of samples

ND : not detected

Table 2. Concentrations of TEQ from non-*ortho*-Chlorine Substituted PCB in Fishes and Shellfishes

Sample	N	PCB (μg/g)	CPCB (pg/g)	C4PCB/PCB (%)	C5PCB/PCB (%)	C6PCB/PCB (%)	CPCB/PCB (%)	TEQ (pg/g)
Ainame	4	0.169	159	0.036	0.051	0.007	0.094	13.2
Aji	4	0.013	180	1.24	0.15	-	1.38	3.01
Akagai	1	ND	ND	-	-	-	-	-
Anago	1	0.023	90	0.19	0.20	-	0.39	6.94
Bora	1	0.066	112	0.17	-	-	0.17	0.11
Higedara	1	ND	ND	-	-	-	-	-
Ishimochi	1	0.017	169	0.99	-	-	0.99	0.17
Iwashi	5	0.025	156	0.41	0.41	0.072	0.62	5.61
Kajika	1	0.005	ND	-	-	-	-	-
Kamasu	1	0.038	52	0.087	0.005	-	0.14	2.88
Katsuo	1	ND	ND	-	-	-	-	-
Kihadamaguro	2	0.007	153	2.00	0.19	-	2.19	2.09
Kinmedai	3	0.028	ND	-	-	-	-	-
Konoshiro	2	0.085	318	0.31	0.061	0.006	0.37	8.09
Mutsu	1	0.002	ND	-	-	-	-	-
Muurugai	3	0.001	ND	-	-	-	-	-
Saba	3	0.028	107	0.38	0.10	-	0.38	4.28
Sake	2	0.024	82	0.14	0.17	0.028	0.34	6.23
Sanma	2	0.007	150	1.70	0.44	-	2.14	4.77
Sawara	2	0.033	142	0.43	-	-	0.43	0.14
Shiira	1	0.019	ND	-	-	-	-	-
Suzuki	40	0.197	165	0.044	0.034	0.007	0.084	10.0
Tachiuo	2	0.113	84	0.055	0.019	-	0.074	3.36
Hamachi*	8	0.050	249	0.27	0.23	-	0.50	17.4
Hiramasa*	1	0.102	574	0.56	-	-	0.56	0.57
Hirame*	3	0.013	192	1.48	-	-	1.48	0.19
Hotategai*	3	0.006	ND	-	-	-	-	-
Kaki*	2	0.008	117	1.03	0.44	-	1.50	5.33
Kurumaebe*	1	0.053	ND	-	-	-	-	-
madai*	6	0.031	141	0.31	0.087	-	0.45	7.00
Shimaaji*	6	0.047	158	0.17	0.17	-	0.34	11.8
Unagi	4	0.023	109	0.32	0.16	-	0.47	5.47
average	118	0.039	114	0.42%	0.091%	0.004%	0.52%	4.09

＊：cultured

N：number of samples ND：not detected

TEQ：2,3,7,8-TCDD Equivalency Quantity

Calculating formula of TEQ[9)]

TEQ＝C4PCB×0.001＋C5PCB×0.15＋C6PCB×0.006

が原因となり，生じたものと推察される．

Table 2 に示したように，CPCB 濃度の高い魚種はヒラマサ，コノシロ，ハマチ等であるが，PCB に対する CPCB の割合は 0 ～2.19% の範囲であり，平均 $\bar{x}$ = 0.52% であた．Tanabe ら[13]の報告によれば PCB 製品の KC-300 から 600 までのこれらの含有率の平均値は約 0.38% であることから CPCB の魚介類への蓄積率がやや高いことを示している．また，PCB を検出しない 3 魚種を除く魚介類中の PCB に対する C4PCB および C5PCB の割合は，各々 0 ～2.00%，$\bar{x}$=0.42% および 0 ～0.44%，$\bar{x}$=0.091% であり，PCB 製品中の PCB に対するこれらの異性体の割合，0.38% および 0.003% と各々比較すると，C4PCB が約20% 高い値であるのに対し，C5PCB は約30倍高い値を示している．このことは C4PCB に比べて C5PCB が環境中あるいは生体中で分解または代謝されにくいことを示していると考えられ，生体に与える影響を評価する上でも重要である．今回の CPCB 異性体間の濃度に関する著者らの調査結果は高山ら[12]のこれまでの報告(C4PCB≫C5PCB)とは異なる場合のあることを示しており，この違いの原因は現時点では明らかではないが，魚介類への CPCB の蓄積に関する因子の複雑さを示すものであり，更に検討する必要がある．

4．CPCB の毒性 CPCB は二つのベンゼン環が平面構造を取り易く，TCDD や PCDF に似た構造を有しており，しかも胸腺萎縮，肝障害，生殖障害など生体に与える影響がこれらに似ていることから，その毒性についても TCDD や PCDF と比較検討されてきた[7,9]．TCDD や PCDF は多くの異性体の混合物からなり，その異性体間の毒性が大きく異なるために，これらの化合物の毒性は個々に評価するのではなく最も強い毒性を有する 2，3，7，8-TCDD の毒性を 1 とした各々の毒性強度係数を用いて換算し，評価されている．近年，CPCB の毒性もこの換算係数 ITEF(International Toxicity Equivalency Factor)[14,15]を用いて 2，3，7，8-TCDD の毒性強度に換算した TEQ(2, 3, 7, 8-TCDD Equivalency Quantity)により総 CPCB として評価する方法が用いられている[9]．

TEQ により CPCB の毒性評価を行う場合，C4PCB，C5PCB および C6PCB の TEQ 値に対する寄与率が各々 0.6，95.5および3.8%(換算係数は各々0.001，0.15，0.006)であることから，C5PCB の残留濃度が最も大きな影響を与えることになる．

今回の著者らの調査結果(Table 2)によれば，C5PCB 濃度の高いものが養殖魚のハマチ，シマアジおよび沿岸魚のスズキの一部に認められた．

以上，市販魚の中にも CPCB を含有する魚種が認められたことは，ダイオキシン関連化合物が生体系に与える影響を評価する上でこれらの関与を考慮する必要があることを示している．

従って，魚介類中の PCB 汚染調査とあわせて，更に詳細な CPCB の含有量調査を引き続き行い，汚染の現状と今後の推移を把握する必要がある．

結　語

魚介類中の CPCPB の定量法について検討すると共に，市販魚介類ならびに東京湾内捕獲魚中の CPCB 含有量調査を行い，以下の結果を得た．

1．高分解能 GC/MS Selected Ion Monitoring 法による CPCB 定量法を確立した．
2．本法の定量下限は20pg/g であった．
3．市販の魚介類中の CPCB 含有量は 3 , 3', 4, 4'-CPCB が ND-574pg/g，3, 3', 4, 4', 5 -CPCB が ND-277pg/g，3 , 3', 4, 4', 5, 5'-CPCB が ND-92pg/g であった．

謝　辞

本研究を行うに当たり貴重な標準物質を御恵与下さった愛媛大学農学部　立川　涼教授ならびに田辺信介助教授に深謝致します．

文　献

1) 昭和47年 8 月24日付け環食第442号厚生省環境衛生局長通知「食品中に残留するPCBの規制について」
2) 植田忠彦，渡辺四男他：東京衛研年報，**40**, 115-120, 1989.
3) Travis, C. C. and Hattemer-Frey, H. A., *Chemoshere*, **20**, 729-742, 1990.
4) Kashimoto, T., Takayama, K., Mimura, M., Miyata, H., Murakami, Y. & Matsumoto, H., *Chemosphere*, **19**, 921-926, 1989.
5) Rappe, C., Andersson, R., Bergqvist, P. A., Brohede, C., Harklund, M., Nygren, M., Swanson, S. E., Tysklind, M. & Wilberg, K., *Chemosphere*, **16**, 1603-1618, 1987.
6) Safe, S., Bandiera, S., Sawyer, T., Zmuddzka, B., Mason, G., Romkers, M., Denomme, M. A., Sparling, J., Okey, B. & Fujita, T., *Environ. Health Perspect.*, **61**, 21-33, 1985.
7) Sawyer, T. & Safe, S., *Toxicol. Lett.*, **13**, 87-94, 1982.
8) Harris, C. & Bradshaw, W. S., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **13**, 715-721, 1984.

9) Hanberg, A., Waern, F., Asplund, L., Haglund, E. & Safe, S., *Chemosphere*, **20**, 1161-1164, 1990.

10) Tanabe, S., Kannan, N., Subramanian, An., Watanabe, S. & Tatsukawa, R., *Environ. Pollut.*, **47**, 147-163, 1987.

11) Tanabe, S., Kannan, N., Wakimoto, T. & Tatsukawa, R., *Intern. Environ. Anal. Chem.* **29**, 199-213, 1987.

12) 高山幸司, 宮田秀明, 味村真弓, 樫本 隆, 衛生化学, **37**, 125-131, 1991.

13) Kannan, N., Tanabe, S., Wakimoto, T. & Tatsukawa, R., *J. Assoc. Off. Chem.*, **70**, 451-454, 1987.

14) Kutz, F. W., Barnes, D. G., Bretthauer, E. W., Bottiore, D. P. & Greim, H., *Toxicol. Environ. Chem.*, **26**, 99-109, 1990.

15) Kutz, F. W., Barnes, D. G., Bottiore, D. P., Greim, H. & Bretthauer, E. W., *Chemosphere*, **20**, 751-757, 1990.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 102-111, 1991

輸入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 Microbiologocal Quality of Imported Cheese

KAZUE TAKEBA*, FUJIO UMEKI*, FUMIKO MURAKAMI*
AKIKO NAKAMA*, KYOKO IGUSA*, TSUTOMU MARUYAMA**,
and MASAO MATSUMOTO*

Keywords：輸入チーズ imported cheese, 水素イオン濃度 pH, 水分 moisture, 塩分 sodium chloride content, 揮発性塩基窒素 volatile basic nitrogen(VBN), チラミン tyramine, 保存料 preservatives, 成分規格 compositional standards, 品質評価 quality assurance, 細菌汚染 bacterial contamination

緒　論

過去30年間の「国民栄養調査」[1]によると，近年日本人の食生活は，でんぷん質を中心とする食事内容から，次第に動物性蛋白質を多く摂取する欧米型になっており，米からパンへ，魚介類から肉類，乳・乳製品類へ移行していることがうかがえる．動物性蛋白質食品の中でも乳・乳製品の摂取量の増加が著しく，特にチーズの消費量の拡大が顕著である．このチーズ消費量の推移を「チーズの需給動向」[2]で見ると，この10年間で2倍も伸び，現在(1990)総消費量は約15万トンとなっている．

このようにチーズの消費が増えている理由としては，乳成分が高血圧，脳卒中，心臓病，骨粗しょう症等の成人病予防に有効であるという健康志向的なものや，チーズ入り洋菓子や和菓子の登場に見られるような食の多様化現象的なもの等いろいろ考えられる．今後これらに加え，畜産物の市場開放も伴い，更に消費は拡大して行く傾向にあると思われる．

現在，わが国は15ヶ国から約800品目のチーズを輸入しているが[3]，これら輸入チーズに関する衛生学的評価のための調査資料は少ない．

わが国における乳・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，プロセスチーズには乳固形分及び大腸菌群の規定があるが，ナチュラルチーズには何の規格もないのが現状である．

そこで今回，輸入ナチュラルチーズの衛生学的品質把握を主目的として，理化学的および細菌学的試験を行った．

実験方法

1．試料

1985～1988年間に東京都内で求めた輸入ナチュラルチーズ644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，サルモネラ，黄色ブドウ球菌，セレウス菌及びリステリア属菌である．

3．試験方法

3－1．理化学的試験方法

pH，水分，VBN及び保存料の試験は衛生試験法注解[4]または乳製品試験法注解[5]に準拠しておこなった．塩

＊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
＊＊国立公衆衛生院衛生獣医学部　108　東京都港区白金台4-6-1
＊＊The National Institute of Public Health 6-1, Shirogabedai 4 chome, Minato-ku, Tokyo 108, Japan

Table 1. pH of Imported Cheese

Type	Cheese	No. of sample	pH	
			Range	Average±SD
Fresh	Cream	9	4.3～5.7	4.9±0.4
	Mozzarella	11	5.4～6.2	5.7±0.2
	Ricotta	1		5.5
Washed	Maroilles	1		7.6
Chèvre		1		5.6
White mould ripened	Camembert	8	5.7～7.4	6.8±0.5
	Brie	9	6.4～7.6	7.1±0.4
Blue mould ripened	Roquefort	1		5.7
	Gorgonzola	1		7.1
	Blue	7	5.2～7.3	6.2±0.8
Semi-hard/Hard	Maribo	6	5.5～5.7	5.6±0.1
	Samsoe	9	5.5～5.7	5.6±0.1
	Egmont	5	5.2～5.5	5.2±0.1
	Gouda	21	5.3～5.7	5.5±0.1
	Royalp	1		6.4
	Edam	6	5.3～5.5	5.4±0.1
	Cheddar	9	5.2～5.6	5.3±0.1
	Mixed	7	5.4～5.6	5.5±0.1
	Gruyère	3	5.6～5.7	5.7±0.1
	Emmental	3	5.7～5.8	5.7±0.1
	Maasdam	1		5.8
Others		11	5.4～6.2	5.7±0.3

(n=131)

分はIDFの方法[6]に，チラミンは著者らが開発した方法[7]に準拠して行った．

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)[8]に，セレウス菌の試験はNGKG培地を用いる方法[9]に，リステリア属菌の試験は厚生省が通知した方法[10]に準拠して行った．

結　果

1．pH

チーズ131検体のpH測定結果をTable 1に示した．供試輸入チーズのpHは4.3～7.6の範囲であった．クリーム，モツァレラのようなフレッシュタイプのチーズ及びマリボー，サムソー，ゴーダ等の半硬質及び硬質タイプのpHは4.3～6.2と弱酸性領域にあった．これに対しカマンベール，ブリーに代表されるような白カビ熟成タイプ及びロックフォール，ゴルゴンゾーラに代表されるような青カビ熟成タイプのチーズのpHは5.2～7.6と弱酸性から弱アルカリ性の領域で，熟成が進んでいるもの程アルカリ性を示した．

2．塩分

チーズ129検体の塩分測定結果をTable 2に示した．供試輸入チーズの塩分は0.6～4.3%の範囲で，最低値はクリームチーズの0.6%で，最高値はマルワールチーズの4.4%であった．ブルー，ゴーダー及びエダムチーズの中には，やや高い塩分濃度を示すものがあった．

3．水分

チーズ130検体の水分測定結果をTable 3に示した．供試輸入チーズの水分は29～54%であった．タイプ別に見ると，フレッシュタイプチーズの水分は38～54%，白カビタイプチーズは43～54%，青カビタイプチーズは37～53%，乳酸菌熟成タイプチーズは29～48%の範囲であった．

4．揮発性塩基窒素(VBN)

チーズ336検体のVBN値測定結果をTable 4に示した．

Table 2. Sodium Chloride Content of Imported Cheese

Type	Cheese	No. of sample	Sodium chloride (%)	
			Range	Average±SD
Fresh	Cream	9	0.6~1.1	0.8±0.2
	Mozzarella	11	1.3~2.9	2.0±0.5
	Ricotta	1		2.5
Washed	Maroilles	1		4.4
Chèvre		1		1.9
White mould ripened	Camembert	8	1.5~2.5	1.8±0.4
	Brie	9	1.2~2.5	1.8±0.4
Blue mould ripened	Roquefort	1		4.3
	Gorgonzola	1		1.4
	Blue	7	1.4~4.3	2.8±1.0
Semi-hard/Hard	Maribo	6	1.3~2.1	1.8±0.2
	Samsoe	9	0.7~1.9	1.5±0.3
	Egmont	5	1.7~2.5	1.9±0.3
	Gouda	21	1.4~2.8	2.3±0.5
	Edam	6	2.5~3.9	3.3±0.5
	Cheddar	9	1.2~1.9	1.6±0.2
	Mixed	7	1.3~2.5	2.1±0.4
	Gruyère	3	1.1~1.8	1.4±0.3
	Emmental	3	0.3~0.9	0.6±0.2
Others		11	1.5~3.6	1.9±0.7

(n=129)

Table 3. Moisture of Imported Cheese

Type	Cheese	No. of sample	Moisture(%)	
			Range	Average±SD
Fresh	Cream	9	51.1~54.2	52.0±1.1
	Mozzarella	11	38.4~49.4	44.6±2.8
Washed	Maroilles	1		50.6
Chèvre		1		53.1
White mould ripened	Camembert	8	42.6~53.9	49.1±3.8
	Brie	9	46.9~52.4	49.2±2.0
Blue mould ripened	Roquefort	1		41.7
	Gorgonzola	1		52.5
	Blue	7	37.3~52.5	44.1±5.6
Semi-hard/Hard	Maribo	6	38.2~41.6	39.7±1.3
	Samsoe	9	39.1~43.4	41.7±1.2
	Egmont	5	36.6~43.7	38.2±2.8
	Gouda	21	36.0~41.6	37.2±7.8
	Edam	6	29.2~47.8	39.4±5.5
	Cheddar	9	30.3~36.8	34.4±1.9
	Mixed	9	38.0~43.4	40.4±2.2
	Gruyère	3	33.0~36.2	34.9±1.4
	Emmental	3	33.9~36.5	35.6±1.2
Others		11	38.6~49.9	43.3±3.5

(n=130)

Table 4. Volatile Basic Nitrogen(VBN) of Imported Cheese

Type	Cheese	No. of sample	VBN(mg/100g)	
			Range	Average±SD
Fresh	Cream	4	1～ 14	9± 5
	Mozzarella	20	6～ 25	13± 6
	Ricotta	1		15
Washed	Maroilles	6	382～462	422± 56
	Pont-l'Evêque	4	206～248	231± 16
	Livarot	3	168～206	188± 16
	Munster	2	206～290	248± 42
Chèvre		20	11～679	208±194
White mould ripened	Camembert	21	28～693	189±158
	Brie	20	55～273	151± 71
Blue mould ripened	Roquefort	20	98～336	206± 48
	Gorgonzola	1		160
	Blue	23	49～560	298±139
Semi-hard/Hard	Maribo	22	15～ 85	32± 15
	Samsoe	18	14～ 56	33± 10
	Egmont	20	7～ 29	13± 6
	Gouda	20	8～107	28± 22
	Royalp	1		245
	Smoked	4	11～ 19	16
	Edam	20	14～ 69	39± 13
	Cheddar	22	7～ 60	23± 14
	Mixed	13	1～ 46	19± 12
	Gruyère	20	53～151	103± 32
	Emmental	20	82～235	114± 36
	Maasdam	1		83
Others		10	8～112	32± 28

(n=336)

輸入チーズのVBN値は1～693mg/100gの範囲であった．フレッシュタイプチーズのVBN値は1～25mg/100gの範囲で，また，ロイアルプ，グリュイエール及びエメンタールを除く乳酸菌熟成タイプのチーズのVBN値も比較的低く1～107mg/100gの範囲であった．これに対しマルワール，ポン・レヴェック，リヴァロ及びムンステルのようなウオッシュタイプチーズのVBN値は全般的に高く168～462mg/100gの範囲であった．また，シェーヴルタイプ，白カビタイプ，青カビタイプチーズのVBN値も非常に高く，中には約700mg/100gのものもあった．

5．チラミン

チーズ336検体のチラミン測定結果をTable 5に示した．輸入チーズのチラミン含量はND～3210 μg/gの範囲であった．フレッシュタイプのチーズのチラミン含量は低く，ND～88 μg/gの範囲であった．ウオッシュタイプでは全てのチーズからチラミンが検出され，5～751 μg/gの範囲であった．シェーヴル，白カビ，青カビ及び乳酸菌熟成タイプのチーズのチラミン含量は，それぞれND～698，ND～1538，ND～2074及びND～3210 μg/gの範囲であった．ブリー，ブルー，チェダー及びエメンタールの中には1 mg/g以上のものも見られた．

6．保存料

チーズの安息香酸(59検体)及びプロピオン酸(43検体)測定結果をTable 6に示した．安息香酸は検査した全てのチーズから検出され，検出範囲は0.001～0.020g/kg

Table 5. Tyramine Content of Imported Cheese

Type	Cheese	No. of sample	Tyramine content(μg/g)	
			Range	Average±SD
Fresh	Cream	4	ND～ 14.1	4.9± 5.6
	Mozzarella	20	ND～ 87.8	20.2± 27.6
	Ricotta	1		55.8
Washed	Maroilles	6	65.6～ 511.5	276.2±170.6
	Pont-l'Evêque	4	5.4～ 87.1	34.1± 31.5
	Livarot	3	41.4～ 87.8	60.2± 19.9
	Munster	2	527.4～ 751.2	639.3±111.9
Chèvre		20	ND～ 697.8	272.2±279.4
White mould ripened	Camembert	21	ND～ 939.2	179.4±289.2
	Brie	20	ND～1537.6	182.1±395.4
Blue mould ripened	Roquefort	20	26.2～ 321.4	156.8± 84.6
	Gorgonzola	1		1730.1
	Blue	23	ND～2073.6	338.9±640.1
Semi-hard/Hard	Maribo	22	ND～ 547.9	110.2±165.8
	Samsoe	18	ND～ 626.0	226.6±201.7
	Egmont	20	ND～ 408.4	71.1±118.1
	Gouda	20	ND～ 162.8	19.6± 35.7
	Royalp	1		688.7
	Smoked	4	58.3～ 201.9	96.3
	Edam	20	ND～ 419.1	65.7±106.1
	Cheddar	22	ND～1149.7	272.6±316.1
	Mixed	13	1.8～ 257.8	36.2± 65.9
	Gruyère	20	0.6～ 819.9	118.5±203.5
	Emmental	20	33.0～3210.4	790.1±771.7
	Maasdam	1		18.1
Others		10	ND～ 588.7	110.7±171.1

(n=336)

で，平均値は0.005g/kg であった．安息香酸検出値とチーズの種類との間に特に関連性は見られなかった．

プロピオン酸は主にガス孔(チーズアイ)を有するチーズを対象に検査した．検出範囲は ND～7.7g/kg で，平均値は3.1g/kg であった．ソルビン酸及びデヒドロ酢酸は，いずれの輸入チーズからも検出されなかった．

7．細菌学的検査成績

細菌学的検査は632検体について行い，その結果をTable 7 に示した．大腸菌群は調査した全種類のチーズ223例(35％)から検出された．検出率の高いものはカマンベールが29例，ブリーが23例，その他のブルータイプが23例，ムンステルが14例，その他の白カビタイプが12例，ロックフォールが12例，マリボーが11例及びシェーヴルタイプが10例であった．大腸菌群陰性のチーズはスチィルトン，エグモント，その他の硬質タイプ及びパルメザンであった．

大腸菌は83例(13％)から検出された．検出率の高いものはカマンベールが16例，マリボーが10例，その他の白カビタイプが９例，ブリーが８例，その他の青カビタイプが６例，ルブロションが５例，その他のウオッシュタイプが５例及びシェーヴルが５例であった．

セレウス菌は21例(３％)から検出され，検出率の高いものはシェーヴルが８例，ブリーが３例，エグモントが２例でポンレヴェック，エポワース，カマンベール，その他の青カビタイプ，マリボー，その他の半硬質タイプ，グリュイエール及びその他の硬質タイプがそれぞれ１例

Table 6. Benzoic Acid and Propionic Acid Content of Imported Cheese

Type	Cheese	Benzoic acid(g/kg)			Propionic acid(g/kg)		
		No. of sample	Range	Average±SD	No. of sample	Range	Average±SD
Fresh	Cream	3	0.006~0.018	0.011±0.005			
	Mozzarella	2	0.002~0.006	0.004			
Chèvre		2	0.001~0.018	0.010			
White mould ripened	Camembert	5	0.001~0.003	0.002±0.001			
	Brie	9	0.001~0.006	0.004±0.002			
Blue mould ripened	Blue	2	0.001~0.010	0.006			
Semi-hard/Hard	Maribo	1		0.004			
	Samsoe	5	0.002~0.008	0.004±0.002			
	Egmont	3	0.004~0.008	0.007±0.002	3	2.8~3.5	3.1~0.3
	Gouda	5	0.004~0.008	0.006±0.002	1		0.3
	Royalp				1		2.8
	Edam	3	0.003~0.008	0.005±0.002			
	Cheddar	4	0.003~0.020	0.010±0.006			
	Mixed	2	0.002~0.009	0.006			
	Gruyère	3	0.002~0.019	0.009±0.005	14	ND~1.2	0.9~0.5
	Emmental	8	0.002~0.007	0.004±0.002	22	ND~7.7	4.5~2.3
	Maasdam				2	5.5~5.8	5.7
Others		2	0.003~0.010	0.007			

(n=59)

Table 7. Detection of Coliform, *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *B. cereus and L. monocytogenes* from Imported Cheese

Type	Cheese	No. of sample	No.of positive					
			Coliform	*E. coli*	*Salmonella*	*S. aureus*	*B. cereus*	*L. monocytogenes*
Fresh	Cream	14	2	0	0	0	0	0
	Mozzarella	30	8	0	0	0	0	0
	Ricotta	2	1	0	0	0	0	0
Washed	Maroilles	6	3	1	0	0	0	0
	Pont-l'Evêque	7	6	3	0	0	1	0
	Livarot	4	4	4	0	0	0	0
	Munster	15	14	1	0	0	0	3
	Epoisses	4	3	1	0	0	1	1
	Reblochon	8	5	5	0	0	0	1
	Other	14	8	5	0	0	0	5
Chèvre		41	10	5	0	0	8	1
White mould ripened	Camembert	59	29	16	0	0	1	1
	Brie	42	23	8	0	0	3	0
	Other	23	12	9	0	0	0	0
Blue mould ripened	Roquefort	24	12	0	0	0	0	0
	Gorgonzola	4	2	0	0	0	0	0
	Stilton	2	0	0	0	0	0	0
	Other	48	23	6	0	0	1	1
Semi-hard/Hard	Maribo	23	11	10	0	0	1	0
	Samsoe	22	1	0	0	0	0	0
	Egmont	15	0	0	0	0	2	0
	Gouda	33	7	1	0	0	0	0
	Smoked	7	1	0	0	0	0	0
	Edam	26	6	0	0	0	0	0
	Other semi hard	20	8	3	0	0	1	0
	Cheddar	27	4	1	0	0	0	0
	Mixed	18	7	3	0	0	0	0
	Gruyère	21	1	0	0	0	1	0
	Emmental	25	1	0	0	0	0	0
	Other hard	8	0	0	0	0	1	0
	Parmesan	1	0	0	0	0	0	0
Others		39	9	0	0	0	0	0

(n=632)

ずつであった.

リステリア・モノサイトゲネスは13例(2%)から検出された. その他のウオッシュタイプが5例, ムンステルが3例, エポワース, ルブロション, シェーヴル, カマンベール及びその他のブルータイプがそれぞれ1例ずつであった. これらの血清型は1/2aが7株, 1/2bが1株, 1/2cが1株, 4bが4株であった.

今回の調査ではサルモネラ, 黄色ブドウ球菌はいずれのチーズからも検出されなかった.

考　察

1. 理化学的試験

チーズのpHは, 製造開始当初は乳酸菌の影響で, 5以下に低下するが, 熟成が進むに従って上昇し, 最終的にはそれぞれチーズの種類により一定のpH領域を示すようになる. また, チーズのpHが上昇するとスターター及び熟成に使用した以外の微生物が発育し易い条件となると言われている[11]. 今回の調査結果でも, 大腸菌群, 大腸菌, セレウス菌及びリステリア・モノサイトゲネスが検出されたチーズは, 過半数が弱酸性～弱アルカリ性のウオッシュ, 白カビ及び青カビタイプであり, 前報で著者らが報告した国産チーズのpHの調査でも同様の結果[12]であった. これらのタイプのチーズの製造, 取扱, 保存には特に衛生的な注意が必要であることを示唆している.

チーズの加塩は, 風味上の問題だけでなく異常発酵の抑制, 有害菌の発育阻止, カードの収縮硬化を促進し熟成の調節, 最終製品の水分調節等の目的のために行われる. しかし, 最近食品中の塩分に関しては, 健康上の理由から低塩化が求められている. 国産チーズの調査結果[12]では低塩化の傾向が見られたが, 今回の輸入チーズの塩分は, 国産チーズと比較して全般に高い傾向を示している. 特にブルーの塩分は相対的に高く, 中でもロックフォールの塩分は4.4%と平均塩分濃度の約2倍であった. これはこの種のチーズの熟成菌の塩分要求濃度が高いためであると考えられる.

チーズのVBN値に関しては, これまで報告されたものは殆どないが, 各種チーズのVBN値はチーズの熟成度の指標となるものではないかと考えられる. 最近国際酪農連盟においてもチーズの熟成度を判定する方法については, 検討課題として取り上げられている. VBN値については今後データの蓄積も必要であるが, 極度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チーズなどの判定に参考となるのではないかと考えられる.

チラミンはチロシンから, チーズ熟成中に生成されるアミンで, 一度に多量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. 健常者では通常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. しかし, 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とから, 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ことがあり, ヨーロッパ諸国ではその事故例も報告されている[13-14]. 今回分析した輸入チーズのチラミン含量は, 外国での報告値[15-20]と比較して全般的に高く, 特にブリー, ブルー, チェダー及びエメンタールの中にはチラミン含量が1 mg/g以上のものもあった. わが国における一人当りのチーズ消費量は, 欧米人の1/10～1/20と少ないが, MAO阻害作用を有する薬剤を服用中の人は, チラミンを含む食品を摂取する際には, 注意することが必要と思われる.

わが国で安息香酸は, キャビアのほか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植物界に分布しており, また乳及び乳製品にも原料乳由来の安息香酸が微量存在していることが知られている[21-22]. 今回の調査結果から, 輸入チーズ中の安息香酸含量は0.001～0.019g/kgの範囲で, 外国における報告値のように0.1～0.4g/kg[23-24]と高いものはなく, 食品衛生上問題となるようなものはなかった.

プロピオン酸は, チーズに保存料として3 g/kg使用が認められているが, またチーズ中に天然物として存在することがある. エメンタール, グリュイエール, エグモント及びマースダム等のプロピオン酸菌で熟成させるタイプのチーズには, 発酵生成物としてプロピオン酸を含有している. この種のチーズはチーズ孔(チーズアイ)を有するのを特徴としている. 今回の調査でエメンタールの中には, 保存料としての基準値の約2.5倍もの7.7g/kgを含有しているのが最高値であった. しかし, いずれのチーズにも保存料の表示はなく, 天然物のプロピオン酸と考えられる. チーズによりプロピオン酸含量が異なるのは, 製造時における発酵条件が, それぞれのチーズの種類により微妙に異なるためと考えられる[25]. ゴーダのようにプロピオン酸発酵を行わないチーズからも微量プロピオン酸が検出されることがあるが[26], これらは製造行程におけるプロピオン酸菌による汚染ではないかと考えられる.

2. 細菌学的検査

細菌学的検査では, 大腸菌群はチーズのタイプに関係なく検出され, 陽性率は35%であった. 大腸菌の陽性率

は13%で，ウオッシュ，シェーヴル，白カビ及び乳酸菌熟成タイプが高い陽性率を示した．ウオッシュ，シェーヴル，白カビタイプのチーズには，未殺菌乳を原料とするのを特徴とする伝統的なチーズが多い．そのため大腸菌群及び大腸菌は，原料由来のものが多いと考えられる．この種のチーズの製造，取扱い，保存には衛生的な配慮が必要である．

食中毒起因菌である黄色ブドウ球菌及びサルモネラはすべて陰性であったが，セレウス菌の陽性率は21%であった．これはセレウス菌が芽胞形成菌で熱抵抗性があり，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と考えられる．ただし，チーズを原因食品とするセレウス菌食中毒の確かな発生例が，わが国や諸外国でも報告されていないことから，高率に検出されているセレウス菌をチーズから完全に除菌する必要はないと考えている．

最近，欧米で乳・乳製品による集団感染症例[27-28]の原因菌として報告されたリステリア・モノサイトゲネスは，今回の調査で13例(２%)検出された．欧米でも主として，軟質タイプのチーズからの検出例が報告[29-31]されており，今後も輸入チーズについては本菌の監視が必要である．

ま と め

輸入チーズを対象にpH，塩分，水分，揮発性塩基窒素，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属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ようなものはなかった．細菌学的項目では，大腸菌群が644検体中233例(35%)，大腸菌は83例(13%)に検出された．セレウス菌は21例(３%)，リステリア・モノサイトゲネスは13例(２%)に検出された．サルモネラ及び黄色ブドウ球菌は，いずれのチーズからも検出されなかった．

謝辞　試料収集にあたり協力いただきました食品機動監視班に深謝致します．

文　献

1) 厚生省保健医療局保健増進栄養課編：国民栄養の現状，1988.
2) 農林水産省畜産局牛乳乳製品課：チーズの需給動向，1990.
3) 岩野貞雄監修：世界のワイン＆チーズ辞典，'89/'90年度版，飛鳥出版，東京.
4) 日本薬学会編：衛生試験法注解，1980，金原出版，東京.
5) 日本薬学会編：乳製品試験法注解，1984，金原出版，東京.
6) 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，1980.
7) 竹葉和江，村上文子，松本昌雄，中沢裕之：食衛誌，**31**，137-143，1990.
8) 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.
9) 神保勝彦，松本昌雄，村上　一：東京衛研年報，**29-1**，158-162，1978.
10) 厚生省乳肉衛生課：食品衛生研究，**38**，115-122，1988.
11) 米田義樹：*New Food Industry*，**30**，33-44，1988.
12) 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：東京衛研年報，**41**，95-100，1990.
13) Asatoor, A. M., Levi, A. J. and Miline, M. D.: *Lancet*, ii, 733-734, 1963.
14) Blackwell, B.: *Lancet*, ii, 849-851, 1963.
15) Yamamoto, S., Wakabayashi, S. and Makita, M.: *J. Agric Food Chem.*, **28**, 790-793, 1980.
16) Lehtanen, P.: *Lebendsm. Unters. Forsch.*, **183**, 177-181, 1986.
17) Sen, N. P.: *J. Food Sci.*, **34**, 22-26, 1969.
18) Marley, E. and Blackwell, B.: *Adv. Pharmacol. Chemother.*, **8**, 185-239, 1970.
19) Spettoli, P.: *Industrie Agravie*, **9**, 1-5, 1971.
20) Yen, G. C. and Chandra, T.: *J. Sci. Food Agric.*, **44**, 273-280, 1988.
21) 西本孝男，上田雅彦，植田栄：食衛誌，**10**，410-413，1963.
22) 栗崎純一，笹子謙治，津郷友吉，山内邦夫：食衛誌，**14**，25-30，1973.
23) 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.
24) 慶田雅洋：食品衛生研究，**31**，291-300，1981.
25) 米田義樹：*New Food Industry*，**30**，80-87，1988.
26) 高橋まゆみ，蕨　由美，野沢恒平，増井　武，小沢知之，松橋典子，兵頭直子：食衛誌，**27**，87-90，1986.
27) Fleming, D. W., Cochi, S. L., MacDonard, K. L., Brondum., J., Hayes, P. S., Plikaytis, B. D., Homes, M. B., Audurier, A., Brroome, C. V. and Reingold, A. L.: *New Engl. J. Med.*, **312**, 404-407, 1985.

28) Linnam, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, G., May, S., Salminen, C., Hird, D. W. Yonekura, M. L., Hayes, P. Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B. D., Fannin, S. L., Kleks, A. and Broome, C. V.: *New Engl. J. Med.* **319**, 823-828, 1988.

29) Beckers, H. J., Soentoto, P. S. S., Delfgou-van Asch, E. H. M.: *Int. J. Food Microbiol.*, **4**, 249-256, 1987.

30) Pini, P. N., Gilbert, R. J.: *Int. J. Food Microbiol.*, **6**, 317-326, 1988.

31) Mass, S., Cesaroni, D., Poda, G., Trovatelli, L. D.: *J. appl. Bact.*, **68**, 153-156, 1990.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 112-117, 1991

バイオアッセイによる食肉中のアミノグリコシド系抗生物質検査法の検討

門間千枝*, 神保勝彦*, 丸山　務**, 松本昌雄*

Microbiological Assay for the Detection of Aminoglycoside Antibiotics in Meats

CHIE MONMA*, KATSUHIKO JINBO*, TSUTOMU MARUYAMA**
and MASAO MATSUMOTO*

Keywords：アミノグリコシド系抗生物質 aminoglycoside antibiotics, バイオアッセイ microbiological assay, 残留抗生物質 antibiotic residues, 食肉 meat

はじめに

食肉中のアミノグリコシド系抗生物質(以下, AGsと略す)を同定する方法には, 厚生省が通知したバイオアッセイによる方法[1](以下, 厚生省法と略す)がある. この方法はAGsの他, マクロライド系抗生物質, テトラサイクリン系抗生物質を分別同定できるが, 試験操作が極めて煩雑であり, 実用性に難点がある.

また, 高速液体クロマトグラフィーによる方法が報告されているが, AGsが紫外部吸収をもたないことから蛍光誘導体化法で検出しなければならないため, 操作が煩雑でかつ不安定である[2,3]. さらに, 免疫学的方法[4,5]や薬剤不活化酵素を用いた方法[6]なども報告されているが, AGsの一部の薬剤しか対象としていないため, 実用性は低いと考えられる.

一方, 残留抗菌性物質検査法として, 著者ら[7]は厚生省法を改良した簡易系統別検査法を開発し報告した. 本法は, 厚生省法で対象としている以外の抗菌性物質, すなわち, ペニシリン系抗生物質, サルファ剤をも同時に簡易, 迅速に検出できる利点がある. しかし, AGsに対しては他の抗菌性物質に比べて低濃度の残留が検出しにくく, AGsが明かに残留していると思われる食肉からAGsが認められなかったことを著者らは経験してきた.

そこで, 著者らは, 簡易系統別検査法の手順を基礎にして, AGs検査法の検討を行った.

実験材料及び方法

1．抗菌性物質標準品

実験に供試したAGsは硫酸カナマイシン(KM), 硫酸ジヒドロストレプトマイシン(DSM), 硫酸ストレプトマイシン(SM), 硫酸フラジオマイシン(FM), 硫酸ゲンタマイシン(GM)の5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. 各抗菌性物質の標準液はMIC法[8]に従って調製した.

2．試験菌株

抗生物質検定用に用いられている *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. mycoides* ATCC 11778, *B. cereus* ATCC 19637, *B. brevis* ATCC 8185, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *M. flaius* ATCC 10240, *Corynebacterium xerosis* NCTC 9755, *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *S. aureus* 209P, *Escherichia coli* NIHJ の11種類を実験に供試した.

3．器具

a) ペトリ皿

日水製薬(株)製の内径86 mmの滅菌済みプラスチックシャーレを用いた.

b) パルプディスク

東洋ろ紙(株)の直径10 mm, 厚さ1.2 mm(吸水量0.08 ml ± 0.01 ml)のパルプディスクを121℃, 15分間高圧滅

＊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, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku Tokyo, 169 Japan
＊＊現国立公衆衛生院衛生獣医学部

菌後，十分乾燥させてから用いた．

4．緩衝液の調製

緩衝液は，pH 3.0 及び pH 4.0 マッキルベン緩衝液，pH 5.0，pH 6.0，pH 7.0 及び pH 8.0 リン酸緩衝液，pH 11.0 リン酸・水酸化ナトリウム緩衝液の 7 種類を用いた．

pH 3.0 及び pH 4.0 マッキルベン緩衝液，pH 6.0 及び pH 8.0 リン酸緩衝液は，厚生省が通知した畜産物中の残留物質検査法第 1 集[9]（以下，個別検査法と略す）あるいは簡易系統別検査法[7]に従って調製した．

pH 5.0 リン酸緩衝液は，0.1M リン酸一カリウム 9.9 ml に 0.1M リン酸二カリウム 0.1 ml を加え混合し，pH 7.0 リン酸緩衝液は，0.1M リン酸一カリウム 3.5 ml に 0.1M リン酸二カリウム 6.5 ml を加え混合して用いた．

pH 11.0 リン酸・水酸化ナトリウム緩衝液は，0.1M 水酸化ナトリウム 8.26 ml と 0.1M リン酸二ナトリウム 50 ml を加え混合して用いた．

5．ベーカー10 SPE カラム COOH 型（以下，COOH 型カラムと略す）

COOH 型カラムにヘキサン 5 ml を通し，空気を引いて 1 分間乾燥した後，メタノール 5 ml，蒸留水 5 ml で処理した．次に，本カラムを pH 4.0 マッキンベン緩衝液，pH 5.0，pH 6.0，pH 7.0，pH 8.0 のリン酸緩衝液で，それぞれ処理し，使用前までそれらの緩衝液で保持した．

6．試験菌液及び芽胞浮遊液の調製

B. subtilis ATCC 6633 の芽胞浮遊液及び *M. luteus* ATCC 9341 の試験菌液は厚生省が通知した畜水産食品中の残留物質検査法の第 1 集の 5[10]，それ以外の菌株の菌液及び芽胞浮遊液は個別検査法[9]に従って調製した．

7．抗生物質検査用培地の調製

検査用培地として，抗生物質検査に通常利用されている Antibiotic Medium 1，2，5，8，11（Difco 社）と感性ディスク用培地－N（日水製薬（株））の 6 種類（以下，AM 1 培地，AM 2 培地，AM 5 培地，AM 8 培地，AM11 培地，SD 培地と略す）を用いた．

これらの検査用培地 6 種類をそれぞれ 121℃，15分間高圧滅菌後，55 ± 1℃に保持した．これにあらかじめ調製した試験菌液及び芽胞浮遊液をそれぞれ加え，十分混合した後，その 8 ml をペトリ皿に注入し，水平に静置して凝固させ検査用培地とした[10]．

8．バイオアッセイ用試験溶液の調製

簡易系統別検査法[7]に準拠して調製した．すなわち，試料（食肉）10 g に緩衝液を 30 ml を加え乳剤とした後，遠心分離により上清を得た．上清にヘキサン 10 ml を加え脱脂後，クロロホルム 30 ml を加え振盪後遠心分離した．水層に抽出された AGs を COOH 型カラムに保持させ，緩衝液を用いて AGs を溶出させ，これを pH 8.0 に調製しバイオアッセイ用試験溶液とした．

9．バイオアッセイ及び判定法

抗菌性物質標準液及び試験溶液に浸漬したパルプディスクを検査用培地平板上にのせ，本培地を氷室に30分間放置した後，30℃，18時間培養した．パルプディスク周辺に出現した阻止円直径をノギスで測定して，直径 12 mm 以上のものを陽性とした[9]．阻止円の直径からあらかじめ作成した検量線により抗生物質の濃度を算出した．

実験結果及び考察

1．AGs に対する試験菌の感受性及び検査用培地の選択

表 1 に，5 種類の AGs に対する各試験菌の感受性を示す．供試したいずれの薬剤に対しても，*B. subtilis* ATCC 6633 が最も高い感受性を示した．

検査用培地の種類により形成される発育阻止円の大きさが異なることから，表 2 に示す 6 種の培地を対象に *B. subtilis* ATCC 6633 を用いて検出限界を検討した．AM 2 培地と AM 5 培地が他の培地に比して高い感受性を示した．AM 2 培地と AM 5 培地では同程度の阻止円が形成されたが，AM 5 培地は形成される阻止円が AM 2 培地に比して明瞭であり判定し易かった．

Korsrud ら[11]は，AGs に対する検出限界には *B. subtilis* ATCC 6633 混合 AM 5 培地を推奨しているし，簡易系統別検査法でも AGs 検出に本培地が用いられていることから，残留 AGs 検査には，*B. subtilis* ATCC 6633 混合 AM 5 培地が適していると考えられた．

2．食肉からの AGs の抽出に及ぼす pH の影響

表 3 に，KM 0.5 μg/g 及び GM 0.5 μg/g を添加した豚肉を用いて，pH 4.0 マッキルベン緩衝液及び pH 5.0，pH 6.0，pH 7.0，pH 8.0 のリン酸緩衝液でそれぞれ抽出した際の KM 及び GM の抽出率を示す．pH 4.0 マッキルベン緩衝液，pH 7.0 及び pH 8.0 のリン酸緩衝液の抽出率はいずれも約80％と高かった．これに対して，pH 5.0 リン酸緩衝液では抽出率は約50％，pH 6.0 リン酸緩衝液では約30％であった．

3．AGs の COOH 型カラムへの保持

COOH 型カラムは弱陽イオン交換を主な作用とし，分離目的物質を保持するときは，カラムを分離目的物質の両方の官能基が分離していることが必要である[12]．COOH 型カラムと分離目的物質である AGs の酸解離定

表1．アミノグリコシド系抗生物質に対する各種試験菌の感受性

試験菌	細菌発育防止濃度(μg/ml)				
	KM	DSM	SM	FM	GM
B. subtilis ATCC 6633	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8
B. mycoides ATCC 11778	>1.6	>1.6	>1.6	>1.6	>1.6
B. cereus ATCC 19637	>1.6	>1.6	>1.6	>1.6	>1.6
B. brevis ATCC 8185	>1.6	>1.6	>1.6	>1.6	>1.6
M. luteus ATCC 9341	>1.6	>1.6	>1.6	>1.6	>1.6
M. flavus ATCC 10240	>1.6	>1.6	>1.6	>1.6	>1.6
C. xerosis NCTC 9755	>1.6	>1.6	>1.6	>1.6	1.6
B. bronchisepticea ATCC 4617	>1.6	>1.6	>1.6	>1.6	>1.6
S. epideridis ATCC 12228	>1.6	>1.6	>1.6	>1.6	1.6
S. aureus 209P	>1.6	>1.6	>1.6	>1.6	1.6
E. coli NIHJ	>1.6	>1.6	>1.6	>1.6	>1.6

使用培地：感性ディスク用培地-N
KM：硫酸カナマイシン，DSM：硫酸ジヒドロストレプトマイシン
SM：硫酸ストレプトマイシン，FM：硫酸フラジオマイシン，GM：硫酸ゲンタマイシン

表2．検査用培地とアミノグリコシド系抗生物質の検出限界

検査用培地	検出限界(μg/ml)				
	KM	DSM	SM	FM	GM
AM1	0.2	1.6	0.8	1.6	0.2
AM2	0.2	0.4	0.4	0.8	0.2
AM5	0.2	0.4	0.4	0.8	0.2
AM8	0.4	0.8	0.8	>1.6	0.2
AM11	0.4	0.8	0.8	1.6	0.2
SD	1.6	1.6	1.6	1.6	0.8

供試菌：*B. subtilis* ATCC 6633
AM 1：Antibiotic Medium 1，AM2：Antibiotic Medium 2，AM5：Antibiotic Medium 5，AM 8：Antibiotic Medium 8，AM11：Antibiotic Medium 11，SD：感性ディスク用培地-N

数 pKa[12,13]から，保持に用いる緩衝液が pH 6.0～7.0 のとき，両方の官能基がほとんど解離し AGs の COOH 型カラムへの保持が良好であると考えるので，保持液の pH の影響を調べた．

表4に，KM 0.5 μg/ml を溶解させた pH 4.0 マッキルベン緩衝液及び pH 5.0，pH 6.0，pH 7.0，pH 8.0 のリン酸緩衝液をそれぞれ 10 ml 用いて，KM を COOH 型カ

表3．食肉からのアミノグリコシド系抗生物質抽出に及ぼす抽出液の pH の影響

抗生物質	抽出率(%)				
	抽出液のpH				
	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
KM	82.4	50.2	30.7	80.6	80.2
GM	76.5	48.5	30.7	76.2	78.5

表4．ベーカ10 SPE カラム COOH 型へのカナマイシン保持に対する緩衝液の pH の影響

緩衝液の pH	保持率(%)	
	KM添加緩衝液	KM添加豚肉
4.0	10.4	24.4
5.0	46.3	28.2
6.0	70.6	40.5
7.0	86.0	78.7
8.0	60.0	72.6

ラムから保持させた結果を示す．KMの保持率はpH 7.0リン酸緩衝液が最もよく，約85%であった．

次に，KM 5.0 μg/gを添加した豚肉を用い，pH 4.0, pH 5.0, pH 6.0, pH 7.0, pH 8.0の緩衝液で抽出し，その抽出液を用いてKMのCOOH型カラムへの保持について検討した成績でも，保持率はpH 7.0リン酸緩衝液で最も高かった．KM以外のAGsでも同様の傾向が得られた．

このことから，食肉からのAGs抽出条件はpH 7.0リン酸緩衝液を用いて抽出し，その抽出液をCOOH型カラムへ保持させる方法が最適であると考えられた．

4．AGsのCOOH型カラムからの溶出

COOH型カラムからの分離目的物質の溶出は，カラムの官能基あるいは分離目的物質の官能基の解離を抑制することにより行われる[12]．

pH 3.0マッキルベン緩衝液，pH 8.0リン酸緩衝液及びpH 11.0リン酸・水酸化ナトリウム緩衝液を用いてKMの溶出率を比較した結果，KM溶出率はCOOH型カラムの官能基の解離を抑制するpH 3.0マッキルベン緩衝液が最もよく約85%，AGsの解離を抑制するpH 11.0リン酸・水酸化ナトリウム緩衝液が約75%であった．pH 8.0リン酸緩衝液はKMを全く溶出しなかった．

図1に，pH 3.0とpH 11.0の緩衝液におけるKM溶出パターンを示す．pH 3.0マッキルベン緩衝液では，最初の1 mlではKMは検出されず，2～3 mlの間に溶出された．これに対して，pH 11.0リン酸・水酸化ナトリウム緩衝液では，KMは最初の3 mlでは溶出されず，4～7 mlの間に溶出された．このパターンはKM以外のAGsでも同様であった．

食肉にKMを添加した場合でも，pH 3.0マッキルベン緩衝液による溶出でKMは最初の1 mlでは溶出しなかったが，上記の成績と同様に2～3 mlの間に溶出され，その溶出率は約75%であった．このパターンは，KM以外のAGsでも同様であった．なお，食肉の場合ではpH 11.0リン酸・水酸化ナトリウム緩衝液による溶出は極めて低く約45%にすぎず，集中的に溶出されなかった．このことから，COOH型カラムからのAGs溶出は，pH 3.0マッキルベン緩衝液が最適であると考えられた．

5．食肉中の残留AGs検査法

以上の基礎的検討から，食肉中の残留AGs検査法として，図2に示す方法を考察した．すなわち，試料(食肉)10gにpH 7.0リン酸緩衝液30 mlを加え乳剤とした後，遠心分離により上清を得る．上清液にヘキサン10 mlを加え脱脂後，クロロホルム30 mlを加え振盪後遠心分離する．水層に抽出されたAGsをCOOH型カラム

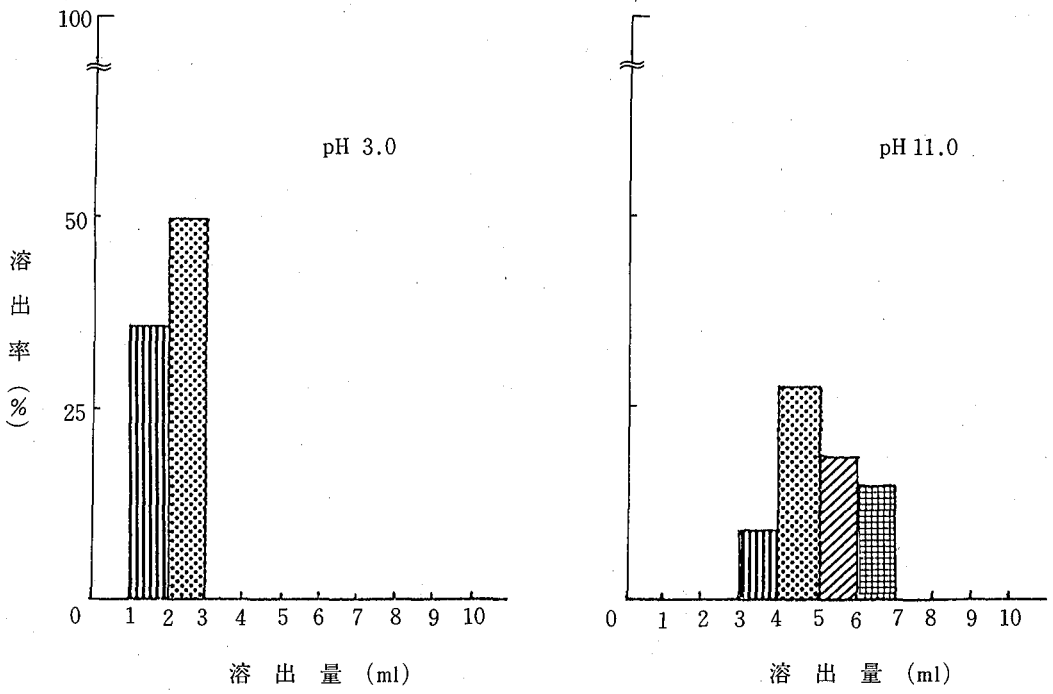


図1．pH 3.0及びpH 11.0におけるベーカー10 SPEカラムCOOH型からのカナマイシン溶出パターン

食肉 10 g
| pH 7.0 リン酸緩衝液 30 ml
| ホモジナイズ，遠心分離(3,000 rpm，15分間)
上清液
| ヘキサン 10 ml
| ホモジナイズ，遠心分離(3,000 rpm，15分間)
水層
| クロロホルム　30 ml
| ホモジナイズ，遠心分離(3,000 rpm，15分間)
水層
|
ベーカー 10 SPE カラム COOH 型
| pH 3.0 マッキルベン緩衝液 2.0 ml で溶出
溶出液
| 1N NaOH で pH 8.0 に調整
試験溶液
|
バイオアッセイ
(*B. subtilis* ATCC 6633 混合 AM 5 培地)

図 2．食肉中の残留アミノグリコシド系抗生物質検査法

に保持させ，溶出液として，pH 3.0 マッキルベン緩衝液を用い，最初の 1 ml を捨て，次の 2 ml で溶出させる．これを pH 8.0 に調製しバイオアッセイ用試験溶液とし，検査用寒天平板には *B. subtilis* ATCC 6633 混合 AM 5 培地を用いる．

本法では，AGs 以外のサルファ剤(スルファモノメトキシン，スルファジメトキシン)，マクロライド系抗生物質(リン酸タイロシン，エリスロマイシン)，テトラサイクリン系抗生物質(塩酸オキシテトラサイクリン，塩酸クロルテトラサイクリン)，ペニシリン系抗生物質(ペニシリン G カリウム，アンピシリン)は検出されなかった．

表 5 は，今回開発した方法における AGs の検出限界を厚生省法や簡易系統別検査法と比較した成績であるが，

表 5．各検査法におけるアミノグリコシド系抗生物質検出限界

検査法	検出限界(μg/g)				
	KM	DSM	SM	FM	GM
今回開発した方法	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
厚生省法	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
簡易系統別検査法	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

本法の AGs 検出限界は，KM，DSM，SM，FM，GM のいずれも 0.1 μg/g であり，厚生省法及び簡易系統別検査法に比べ10倍低い値であった．

6．AGs 検査法の応用

表 6 に，と畜場の検査において出荷前に SM 投与が疑われた一頭の牛の筋肉及び腎臓について，今回開発した方法，厚生省法，簡易系統別検査法を用いて SM の検出を行った．この結果，開発した方法により検査した 3 例の筋肉と腎臓から SM が検出されたが，厚生省法では 4 例とも検出されず，簡易系統別検査法では筋肉の 1 例及び腎臓の 1 例から検出された．

表 6．各検査法によるストレプトマイシン投与が疑われた牛の検査成績

検査法	筋肉 1	筋肉 2	筋肉 3	腎　臓
今回開発した方法	＋	＋	＋	＋
厚生省法	－	－	－	－
簡易系統別検査法	－	＋	－	＋

＋：検出，－：検出せず
SMの同定はバイオオートグラフィーによった．

結　　論

食肉中に残留する微量の AGs を簡易に確実に検出できる検査法を確立する目的で著者らが開発した簡易系統別検査法の手順を基礎に検討し，次の結果を得た．

1．AGs 検査用寒天平板には *B. subtilis* ATCC 6633 混合 AM 5 培地が最適であった．
2．食肉からの AGs 抽出は，pH 4.0 マッキルベン緩衝液，pH 7.0，pH 8.0 リン酸緩衝液が優れていた．
3．AGs の COOH 型カラムへの保持は pH 7.0 リン酸緩衝液が最もよく，保持率は約85％であった．
4．COOH 型カラムからの AGs の溶出は pH 3.0 マッキルベン緩衝液が最も良く，2～3 ml の間に溶出され，その溶出率は約75％であった．
5．食肉中の残留 AGs 検査法として，pH 7.0 リン酸緩衝液で抽出し，脱脂と除タンパク後，水層に抽出された AGs を COOH 型カラムに保持させ，pH 3.0 マッキルベン緩衝液で溶出させ，pH 8.0 に調整し，これを試験溶液として，*B. subtilis* ATCC 6633 混合 AM 5 培地を用いて AGs を検出する方法を開発した．
6．新たに開発した方法による AGs の検出限界は，KM，DSM，SM，FM，GM はいずれも 0.1 μg/g であり，厚生省法及び簡易系統別検査法に比べて10倍低い値で

あった.

7．と畜場の検査でSM投与が疑われた牛を対象に筋肉3件，腎臓1件についてAGsの検出を行ったところ，開発した方法では検査した全ての材料からAGsが検出されたが，厚生省法ではどの材料からも検出されず，簡易系統別検査法では筋肉及び腎臓の各1件から検出された．これらのことから，本法により，従来法では検出されなかった微量のAGsを簡易に確実に検出することができるものと考えられる．

（本研究の概要は，第60回　日本食品衛生学会　1990年9月で発表した.）

文　献

1) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜水産食品中の残留物質検査法　第1集の3，1981.
2) Shaikh, B. and Allen. E. H.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 1007-1013, 1985.
3) Jehl, F., Gallion, C. and Monteil, H.: *J. Chromatogr.*, **531**, 509-548, 1990.
4) White, O. L.: *Trends in Analytical Chemistry*, **5**, 29-31, 1986.
5) 門間千枝，神保勝彦，丸山務：東京衛研年報，**41**, 91-94, 1990.
6) 花岡正季，長谷篤：食衛誌，**29**，175-179, 1988.
7) 神保勝彦，門間千枝，丸山務，松本昌雄：食衛誌，**32**，86-92, 1991.
8) 三橋進ら；*CHEMOTHERAPY*, **29**，76-79, 1981.
9) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜産物中の残留物質検査法　第1集．1977.
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1集の5，1983.
11) Korsrud, G. O. and Macneil, J. D.: *J. Food Prot.*, **51**, 43-46, 1988.
12) Horne, K. C. V.: *Sorbent Extraction Technology*, 94-104, 1985, Analytichem International, Inc., California.
13) Routan, M. C.: *J. Chromatogr.*, **340**, 361-400, 1981.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **42**, 118-123, 1991

輸入食肉中の残留農薬の実態調査

橋本常生*, 宮崎奉之*
丸山　務**

Survey of Pesticide Residues in Imported Meats

TSUNEO HASHIMOTO*, TOMOYUKI MIYAZAKI*
and TSUTOMU MARUYAMA**

Keywords：残留農薬 pesticide residues, 輸入食肉 imported meats, 有機塩素系農薬 organochlorine pesticides, 有機リン系農薬 organophosphorus pesticides

緒　言

1987年，厚生省は米国においてオーストラリア産牛肉から，DDT，ディルドリン等の有機塩素系農薬が基準値以上に残留していたとの情報を入手し，輸入時におけるオーストラリア産牛肉の検査を実施したところFAO／WHOの最大残留基準値(0.2ppm)を超えるディルドリンを検出(1.24ppm)した．このため，同年8月26日に暫定基準値を設け，その基準値を超える食肉が流通しないように措置を講じた．

東京都においても，8月27日よりオーストラリアから輸入された牛肉について，スーパー等の輸入牛肉を取り扱う流通業への緊急監視を行い，収去品について残留農薬の分析を実施した．その後も継続し，牛肉の他に鶏肉や豚肉等を対象とし，また他の輸出国からの検体についても残留農薬の分析を実施してきた．

そこで今回，1987年から1990年まで，東京都内で流通した輸入食肉について残留農薬の分析結果をまとめたので報告する．

実験の部

1．試　料

1987年8月から1990年10月にかけて東京都内で収去した食肉(牛肉151検体，鶏肉62検体，豚肉46検体，羊肉6検体，馬肉1検体)総計266検体について調査した．

2．調査農薬

有機塩素系農薬は総BHC(α-, β-, γ-, δ-BHCの総和)，ヘキサクロルベンゼン，ヘプタクロル(ヘプタクロルエポキサイドを含む)，ディルドリン(アルドリンを含む)，総DDT(*p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDTの総和)の12化合物を，有機リン系農薬はクロルピリホス1化合物で総計13化合物を調査した．

3．使用機器

キャピラリーガスクロマトグラフ：ヒューレットパッカード社製HP5890(検出器：ECD)

4．分析方法

昭和62年8月27日付厚生省通達(衛乳第42号)[1]に示された牛肉中の有機塩素化合物の分析法に準じた．

結果と考察

残留農薬の基準として厚生省の暫定的基準[1]およびFAO／WHO食品規格委員会の残留農薬基準[2,3]の一部を表1，2に示した．測定値は脂肪中の濃度で表わし，本分析方法での検出限界は総DDTで0.05ppm，ディルドリン(アルドリン含む)，ヘプタクロル(エポキサイド含む)は0.02ppmである．基準のない総BHCは総DDTと同じように異性体が多く存在するので0.05ppmを，ヘキサクロルベンゼンは0.02ppmを検出限界とした．

5種類の食肉266検体の残留分析の結果からは暫定的基準値やFAO／WHOの基準を越える検体はなかった．しかし有機塩素系農薬が51検体(19.1%)から検出され，その内訳は総DDTが45検体(16.9%)，総BHCが10検体(3.7%)，ディルドリンが9検体(3.3%)であった．

1．牛　肉

牛肉の151検体中，基準を越える検体はなかったが9

＊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
＊＊現　国立公衆衛生院衛生獣医学部

表1．輸入食肉中残留農薬の暫定的基準値[1)]

(昭和62年8月,厚生省)

農　薬　名	基準値(ppm：脂肪中)
総DDT	5
ディルドリン(アルドリンを含む)	0.2
ヘプタクロル(エポキサイドを含む)	0.2

表2．FAO／WHO残留農薬基準[2,3)]

農　薬　名	対　象	最大残留基準(ppm：脂肪中)
BHC(リンデンとして)	畜肉	2
	食鳥肉	0.7
総DDT	畜肉,食鳥肉	7
ディルドリン(アルドリンを含む)	畜肉	0.2
ヘプタクロル(エポキサイドを含む)	畜肉,食鳥肉	0.2
ヘキサクロルベンゼン	畜肉,食鳥肉	1

検体(5.9%)から農薬が検出され，その内訳は，総DDTが8検体(0.056－0.57ppm)，総BHCが3検体(0.41－1.08ppm)で両方の農薬が残留するものも見られた(表3)．現在，日本への牛肉輸出の主要国はオーストラリアと米国であり，事件の発端となったオーストラリア産牛肉は試料108検体中5検体(4.6%)から，総DDTが4検体(0.056－0.083ppm)と総BHCが1検体(0.41ppm)検出され，米国産は試料33検体中1検体より総DDT(0.090ppm)が検出されただけであった．中国産牛肉2検体からは総DDT(0.20，0.25ppm)と総BHC(1.05，1.08ppm)が検出され，オーストラリア産牛肉の残留量に比べるといずれの農薬も2～3倍高い値を示した．

2．鶏　肉

鶏肉の62検体中35検体(56.4%)から農薬が検出され，輸入牛肉や豚肉の結果に比べて高い検出率を示した(表4)．検出された農薬の内訳は総DDTが32検体(0.06－0.77ppm)，総BHCが5検体(0.11－0.63ppm)，ディルドリンが9検体(0.020－0.13ppm)であった．特にタイ産の鶏肉は29検体中28検体(96.5%)から総DDT(28／28)，ディルドリン(7／28)，総BHC(1／28)が検出された．また，中国産の鶏肉3検体全てから総BHCが，1検体からは総DDTが検出された，タイ産の鶏肉はDDT，ディルドリンの残留，中国産はBHCの残留が顕著にみられ，輸出国により農薬の残留パターンの違いが認められた．また，中国産の牛肉にBHCの残留がみられたことや，中国から輸入された穀類(大豆，小豆等)にBHCが低濃度に残留していることから[4)]，食物連鎖による生体残留濃縮に由来するものと推察できる．そのため，今後も食肉中へのBHCの残留が続くものと考えられる．

3．豚　肉

豚肉の46検体中3検体(6.5%)から総DDT(0.51ppm)，総BHC(2.2，2.7ppm)が検出された(表5)．総BHCが検出された検体はデンマークと台湾産で，FAO／WHOの残留基準のリンデン(γ-BHC)2ppmを越えないが，今回調査した中では最も高い値を示した．

4．羊肉

羊肉はニュージーランド及び，オーストラリアから輸入された6検体中4検体から総DDT(0.07－0.16ppm)が検出された(表6)．検体数が少ないが，牛肉や豚肉と比べると検出率は高く，今後も実態調査の必要性が認められる．

鈴木ら[5)]のオーストラリア産輸入食肉中の残留農薬の実態調査の結果では，牛肉55検体中1検体から暫定的基準値を越えるディルドリンを検出した．また，牛肉ではDDTに比べディルドリンや，ヘプタクロルエポキサイドの残留量は少なく，羊肉についても類似した残留パターンを示した．今回，著者らが分析したオーストラリア産牛肉や，ニュージーランド産羊肉の結果も，ほぼ同

表3．牛肉の残留農薬検出状況

年度	国名	検体数	検出件数	検出農薬	残留量（ppm：脂肪中）
1987	オーストラリア	71	3	総DDT	0.056,0.068,0.057
	米国	7	1	総DDT	0.090
	日本	2	0		
	メキシコ	1	0		
	計	81	4		
1988	オーストラリア	11	1	総DDT	0.083
	米国	9	0		
	中国	2	2	総DDT	0.21,0.25
				総BHC	1.05,1.08
	ニュージーランド	1	0		
	カナダ	1	0		
	計	24	3		
1989	オーストラリア	12	1	総BHC	0.41
	米国	10	0		
	ニュージーランド	1	1	総DDT	0.11
	日本	1	0		
	計	24	2		
1990	オーストラリア	14	0		
	米国	7	0		
	不明	1	0		
	計	22	0		
総計		151	9(5.9%)	総DDT(8／9)	0.056−0.57
				総BHC(3／9)	0.41−1.08

(%)：農薬の検出率

(／)：各農薬の検出件数／農薬の検出件数

表4．鶏肉の残留農薬検出状況

年度	国　名	検体数	検出件数	検出農薬	残留量 (ppm：脂肪中)
1987	タ　イ	4	4	総 DDT	0.092−0.053
	中　国	2	2	総 BHC	0.26,0.35
	米　国	1	0		
	チ　リ	1	0		
	日　本	1	0		
	計	9	6		
1988	タ　イ	12	12	総 DDT(12／12)	0.085−0.77
				ディルドリン(7／12)	0.020−0.052
				総 BHC(1／12)	0.11
	米　国	9	1	総 DDT	0.25
	中　国	1	1	総 DDT	0.085
				総 BHC	0.13
	ブラジル	2	1	総 DDT	0.16
				ディルドリン	0.13
	不　明	1	1	総 DDT	0.60
				ディルドリン	0.027
	計	25	16		
1989	タ　イ	3	3	総 DDT	0.085−0.17
	米　国	6	0		
	ブラジル	3	1	総 BHC	0.63
	計	12	4		
1990	タ　イ	10	9	総 DDT	0.060−0.24
	米　国	4	0		
	ブラジル	1	0		
	メキシコ	1	0		
	計	16	9		
総　計		62	35(56.4％)	総 DDT(32／35)	0.060−0.77
				総 BHC(5／35)	0.11−0.63
				ディルドリン(9／35)	0.020−0.13

(％)：農薬の検出率

(／)：各農薬の検出件数／農薬の検出件数

表5．豚肉の残留農薬検出状況

年度	国　名	検体数	検出件数	検出農薬	残留量（ppm：脂肪中）
1987	台　湾	1	0		
1988	デンマーク	7	1	総 DDT	0.051
	台　湾	3	0		
	カナダ	2	0		
	韓　国	1	0		
	計	13	1		
1989	デンマーク	4	1	総 BHC	2.2
	台　湾	3	1	総 BHC	2.7
	米　国	3	0		
	カナダ	2	0		
	韓　国	1	0		
	日　本	1	0		
	計	14	2		
1990	デンマーク	3	0		
	台　湾	10	0		
	カナダ	2	0		
	米　国	2	0		
	不　明	1	0		
	計	18	0		
総	計	46	3(6.5%)	総 DDT	0.051
				総 BHC	2.2,2.7

表6．羊肉,馬肉の残留農薬検出状況

年度	国　名	検体数	検出件数	検出農薬	残留量（ppm：脂肪中）
1987	ニュージーランド	2	1	総 DDT	0.16
1988	ニュージーランド	3	2	総 DDT	0.11,0.55
	アルゼンチン	1*	0*		
1990	オーストラリア	1	1	総 DDT	0.070
総	計	6(1*)	4(0*)	総 DDT	0.070−0.16

*：馬肉

レベルの残留量を示し，残留パターンも同じ傾向であった．

このことは，結果と考察の2．で述べた鶏肉の結果同様，食肉中の残留パターンの変化は輸出国の農薬の使用実態や飼育方法の違いに由来するものと考えられる．

ま と め

1987年8月から1990年10月まで，東京都内に流通した輸入食肉(牛肉，鶏肉，豚肉，羊肉，馬肉)266検体について残留農薬(13化合物)の実態調査を行った．その結果51検体(19.1%)から農薬を検出し，その内訳は総DDTが45検体(16.9%)，総BHCが10検体(3.7%)，ディルドリンが9検体(3.3%)であった．これらはいずれも暫定的基準値やFAO／WHOの残留許容量を越えるものはなかった．

牛肉は151検体中9検体(5.9%)から農薬(総DDT，総BHC)が検出された．オーストラリア産は108検体中5検体より総DDT(0.053－0.083ppm)，総BHC(0.41ppm)が，米国産は33検体中1検体から総DDT(0.09ppm)が検出され，中国産の総DDT(0.21，0.25ppm)と総BHC(1.05，1.08ppm)の検出に比べると低濃度での残留であった．

鶏肉は62検体中35検体(56.4%)から農薬が検出され，高い検出率を示した．特にタイ産で29検体中28検体より総DDTが，中国産では3検体すべてから総BHCが検出され，輸出国によって農薬の残留パターンの違いがみられた．

豚肉は46検体中，デンマークと台湾の3検体(6.5%)から総DDT(0.051ppm)，総BHC(2.2，2.7ppm)が検出された．

羊肉はニュージーランド及びオーストラリア産6検体中4検体から総DDT(0.07－0.55ppm)が検出された．

食肉の種類や輸出国によって，食肉中の農薬の残留パターンの変化が見られた．これは輸出国の農薬の使用実態や飼育方法などの違いに由来するものと考えられる．

文 献

1) 厚生省通達：昭和62年8月27日付衛乳第42号，DDT等の残留する輸入食肉の流通防止について
2) 厚生省環境衛生局食品化学課：厚生省食品化学レポートシリーズNO. 18，1982
3) FAO/WHO Codex Alimentarius Commission: *Codex Alimentarius Vol. X III Ed. 2 Codex Maximum Limits for Pesticide Residues*, 1986
4) 永山敏廣，真木俊夫，川合由華他：東京衛研年報，**41**，125-132，1990
5) 鈴木 隆，石坂 孝，佐々木久美子，斉藤行生，福田 裕：食衛誌，**30**，48-53，1989

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 124-128, 1991

畜水産食品中の抗菌剤の残留実態調査

堀井昭三*, 宮川弘之*
井草京子*, 丸山務**

Survey of Antibiotic Residues in Livestock and Fishery Products

SHOZO HORII*, HIROYUKI MIYAKAWA*, KYOKO IGUSA*
and TSUTOMU MARUYAMA**

Residual quinolones such as oxolinic acid (OA), nalidixic acid (NA) and piromidic acid (PA) in the total of 167 samples of 6 kinds of cultured fish and two kinds of cultured prawn, and the residual coccidiostats of nicarbazine (NC), pyrimethamine (PM), salinomycin, monensin and lasalocid sodium (LS) in the total of 278 samples of chicken tissues and eggs were investigated. These samples had been purchased at retail shops in Tokyo during the period from 1988 to 1990. We detected OA in one eel sample out of 28 at level of 0.07 ppm, NC in one chicken sample out of 46 at level of 0.56 ppm, LS in 5 chicken liver samples out of 51 in the range from 0.02 to 0.10 ppm and PM in one sample out of 46 eggs at level of 0.04 ppm. Clopidol were detected in the range from 0.05 to 0.89 ppm in 6 imported chicken muscle samples out of 38. All samples in which clopidol was detected were imported from China.

Keywords：残留抗菌剤 antibiotic residues, 畜水産食品 livestock and fishery products, 高速液体クロマトグラフィー high-performance liquid chromatography

畜産界における抗生物質や合成菌剤の使用は家畜や家禽の疾病の治療や予防，あるいは発育促進のうえからも極めて有効な手段である．また，オキソリン酸，サルファ剤及びテトラサイクリン等は家畜のみならず，養殖魚の疾病治療や予防にも用いられている．これらの抗生物質や合成抗菌剤の使用は暫時増加し[1]，畜水産物中における残留の懸念もあり，「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律」，いわゆる飼料安全法が1976年に制定され，使用の制限が行われるようになった．

著者らは，1980年以降畜水産食品中における各種抗菌剤の残留実態調査や分析法の検討等，その安全性評価を行ってきた．1983年までの調査では，鶏肉からクロピドールが検出され[2]，1988年には鶏肉中のラサロシドナトリウムを同定した[3]．また，台湾から輸入した豚肉よりスルファメサジンを検出する[4]など抗菌剤の残留問題を指摘してきた．

今回は1988-1990年の三年間における養殖魚介類と家禽を対象に残留抗菌剤の調査を行った成績について報告する．

実験方法

1．試　料　1988－1990年の間に，都内の卸売業者や小売店(スーパーを含む)より購入または，収去したハマチ(31件)，ウナギ(28件)，アユ(28件)，アジ(12件)，ヒラメ(９件)，タイ(15件)，クルマエビ(16件)．及びブラックタイガー(28件)の計167検体の養殖魚介類，家禽類として鶏肉(117件)，鶏肝臓(51件)及び鶏卵(110件)の計278検体を検査対象とした．さらに，1990年には輸入鶏肉38検体についてクロピドールの検査も行った．

＊東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科　169　東京都新宿区百人町３－24－１
＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan
＊＊国立公衆衛生院衛生獣医学部　108東京都港区白金台４－６－１
＊＊National Institute of Public Health 6-1, Shiroganedai 4 chome, Minato-ku, Tokyo 108, Japan

Table 1. HPLC Conditions

Column	: Nucleosil 100 C18, 5 μ, 4.6×250mm
Flow Rate	: 0.7ml／min
Column Temp.	: 40°C
Mobile Phase	: acetonitrile／methanol／10mM tetrabuthyl ammonium bromide containing 50mM citric acid＝20／35／45
Wave Length	: Fig. 1. UV 262nm, Fig. 2. ex. 330nm, em. 400nm

2．試　薬　各抗菌剤標準品は食品指定検査機関協議会より購入したもの，その他の試薬は市販特級品を使用した．

3．装　置　ホモジナイザー：IKA WERK 製 ULTRA TURRAX，高速液体クロマトグラフ(HPLC)：ポンプ：6 AD，検出器：UV；SPD-6 AV，オートサンプラー：SIL-6B，データー処理装置：C-R4AX，システムコントローラー：SCL-6B，カラムオーブン：CTO-6A(島津製作所製)ポンプ：880-PU，検出器：UV；870-UV，蛍光；820-EP(日本分光工業製)，デガッサー：SHODEX DEGAS KT(昭和電工製)

4．分析方法　オキソリン酸(OA)，ナリジクス酸及びピロミド酸はUV-HPLCにより[5,6]，ラサロシド[7]及びピリメタミン(PM)は蛍光検出HPLCによる著者等[8]の方法で分析した．クロピドールはECD-GCを，ナイカルバジンはUV-HPLCを使用する厚生省通知[9~11]に準拠し，サリノマイシン，モネンシンは竹葉ら[12]のオートバイオグラフィーによる方法で分析した．

OAのメチル化は試料を乾固後80％メタノール0.5mlを加え，さらにジアゾメタンエーテル溶液2-3mlを加え室温に30分放置する事により行った．

なお，記載したHPLCクロマトグラムについては，その測定条件をTable 1に示した．

結果及び考察

1．養殖魚介類における残留抗菌剤

養殖魚介類については，代表的合成抗菌剤であるキノロン(ピリドンカルボン酸)系のOA，ナリジクス酸及びピロミド酸の各抗菌剤について検討し，その成績をTable 2に示した．1988－1990年間に167検体の養殖魚介類について調査したが，ナリジクス酸とピロミド酸は検出されず，OAは1988年のウナギ1検体からのみ検出され，その濃度は0.07ppmとそれほど高いものでなかった．ウナギから検出されたOAは，メチル化により再確認を行った．すなわち，OAは容易にメチル化し，メチルOA(MeOA)となるが，OAとMeOAは共に紫外部(UV)に吸収を持ち且つ蛍光を有し，UVと蛍光検出器を直列に繋ぎモニター出来ることから，それぞれのHPLCクロマトグラムを比較した．Fig. 1はUVのFig. 2は蛍光のHPLCクロマトグラムである．両図共ピークAはMeOA，BはOAを示している．又，クロマトグラム1は標準品，2はOA不検出のウナギの試料，3はOAを検出したウナギの試料，4は試料3をさらにメチル化したものであり，いずれも標準品とOA陽性検体のピークの保持時間は良く一致し，OAであることが確認できた．Fig. 1とFig. 2でAとBのピーク高が異なるのは，各々の相対的感度に相違があることによるものと推察される．OAの分析にはHPLCのほか高槻[13]のGC

Table 2. Contents of Residual Quinolones (OA, PA, NA) in Cultured Fish and Prawn (1988-1990)

Years	Foods	No. of Sample	No. of Positive	Residues (ppm)
1988	Yellow tail	31	0	—
	Eel	11	1	0.07(OA)
	"Ayu"	10	0	—
	Horse mackerel	3	0	—
1989	Eel	10	0	—
	"Ayu"	10	0	—
	Prawn	7	0	—
	Black tiger	19	0	—
1990	Eel	7	0	—
	"Ayu"	8	0	—
	Sea bream	15	0	—
	"Hirame"	9	0	—
	Horse mackerel	9	0	—
	Prawn	9	0	—
	Black tiger	9	0	—

OA: Oxolinic acid, PA: Piromidic acid, NA: Nalidixic acid

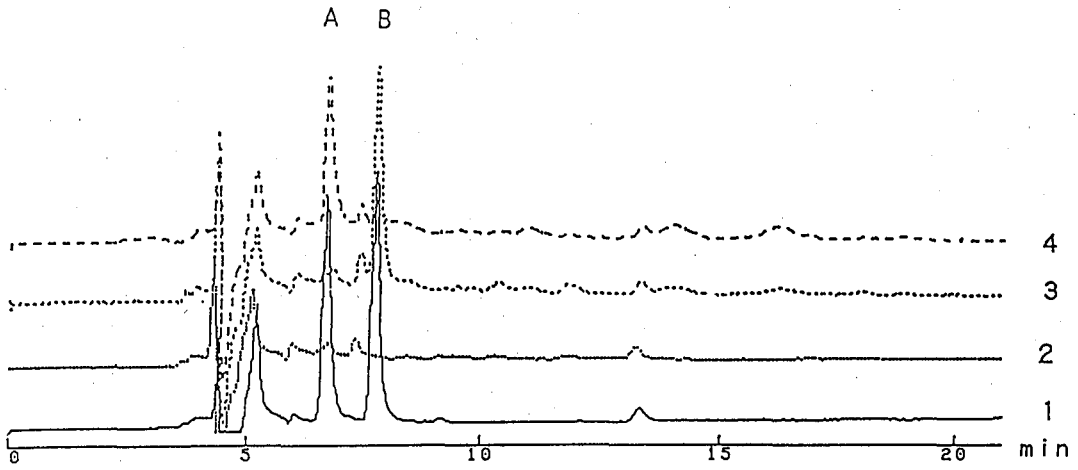


Fig. 1. Liquid chromatograms of oxolinic acid(OA), methylated OA(MeOA) and eel extract samples with UV detection.
Peaks; A: MeOA, B: OA,
Chromatograms; 1: MeOA & OA, 2: blank eel sample, 3: OA
detected eel sample, 4: methylated sample 3

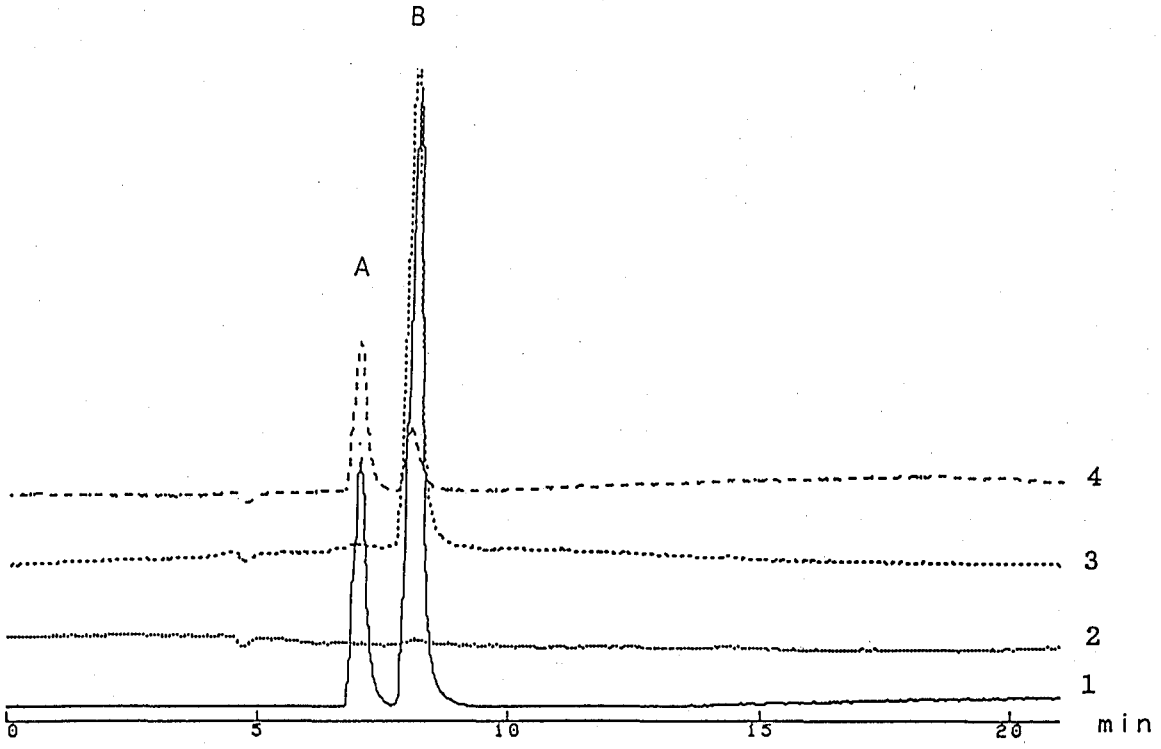


Fig. 2. Liquid chromatograms of OA, MeOA and eel extracts with fluorescent detection.
Peaks(A, B) and chromatograms(1-4) as in Fig. 1.

／MS(SIM)による方法等多数の報告があるが，OA の確認はメチル化及びUV と蛍光検出器を併用することにより，HPLC のみで容易に出来た．

OA はウナギのひれ赤病，赤点病，アユのビブリオ菌症，ハマチの類結節症等の治療や予防の目的で広範囲に使用されており，今後においても残留の可能性が憂慮される．

2．鶏肉及び鶏卵における残留抗菌剤

調査した抗菌剤のうちナイカルバジン(NC)とピリメタミン(PM)は合成抗菌剤であり，サリノマイシン，モネンシン及びラサロシド(LS)はイオノフォアー作用を有するポリエーテル系の抗生物質であるが，いずれも抗コクシジウム剤として，鶏のコクシジウム症の治療や予防に用いられている．

ポリエーテル系の抗生物質は1988－1990年間の鶏肉，鶏肝臓全検体について，NC は1988年と1989年，PM は1990年の鶏肉，鶏肝臓と鶏卵について調査した．Table 3 に示すごとく，鶏肉，鶏肝臓計168検体からはサリノマイシン，モネシン及び PM は検出されなかったが，NC は鶏肉 1 検体から，LS は鶏肝臓 5 検体からそれぞれ検出された．PM は鶏卵 1 検体からのみ検出された．

a．NC, 今回の調査では，1988年の鶏筋肉22検体中 1 検体からのみ NC が検出され，その濃度は0.56ppm であった．NC は1987年に九州でキャリーオーバーに依る飼料汚染事故が発生し[14,15]，調査鶏卵の約半数から0.01－0.10ppm 検出され問題視された．本抗菌剤の分析は HPLC で行ったが，検出された NC の濃度が0.56ppm あったため，鶏肉から容易に精製可能となり，混在する成分の影響を受けることなく分光光度計(可視)を使用する厚生省通知[9]の方法でも再確認出来た．

b．PM, 飼料汚染に伴う鶏卵中への NC の残留事故により，NC 使用自粛の行政指導がなされ，NC の代わりに PM が使用されるようになってきた為，1990年からは NC に代わり PM を検査対象薬剤にした．鶏肉と鶏肝臓では陰性であったが，鶏卵46検体中 1 検体からのみ PM が0.04ppm 検出された．PM 陽性試料は堀[16]の報告に基づいて抽出液を濃縮，精製し，UV-HPLC により確認することが出来た．

c．LS, LS はサリノマイシン，モネシン同様イオノフォアーであり，日本では主に抗コクシジウム剤としてナトリウム塩の形で，ブロイラーに使用されているが，国によっては，牛の増体率向上の目的にも使用されている．3 年間の調査では鶏肉からは全く検出されなかったが，鶏肝臓からは毎年 1 － 2 例，0.02－0.10ppm の範囲で検出された．これは，他の薬剤と同様に，残留量は，肝臓が筋肉より，より高い為と思われる．LS の再確認は著者等[4]が先に報告した LC／MS による方法で行った．

3．輸入鶏肉におけるクロピドール(CL)の残留

CL は現在国内での使用が禁止されているので鶏肉中の残留抗菌剤の対象薬剤とはしていない．ところが1990年に神奈川県で輸入鶏肉から CL が検出されたことから，東京都においてもさっそく，輸入鶏肉について CL の検査を実施した．Table 4 に示すごとく，タイ，ブラジル，ペルー，アメリカ及び中国の 5 ケ国の鶏肉計38検体について検査した結果，中国産のもののみ16検体より0.05－0.89ppm の範囲で CL が検出されたが，その他の国のものからは検出されなかった．市場に流通している鶏肝臓の大部分が国産品で，輸入品の入手が不可能なために今回は，鶏の筋肉部についてのみ検査したが，著者ら[2]の

Table 3. Contents of Residual Antibiotics in Chicken and Egg (1988－1990).

Years	Foods	No. of Sample	Coccidiostats	No. of Positive	Residues (ppm)
1988	Chicken Muscle	22	NC,SM,MN,LS	1	0.56(NC)
	Chicken Liver	9	NC,SM,MN,LS	1	0.06(LS)
	Egg	32	NC	0	－
1989	Chicken Muscle	47	NC,SM,MN,LS	0	－
	Chicken Liver	20	NC,SM,MN,LS	2	0.02(LS),0.02(LS)
	Egg	32	NC	0	－
1990	Chicken Muscle	48	PM,SM,MN,LS	0	－
	Chicken Liver	22	PM,SM,MN,LS	2	0.02(LS),0.10(LS)
	Egg	46	PM	1	0.04(PM)

NC: Nicarbazin, SM: Salinomycin, MN: Monensin, LS: Lasalocid sodium, PM: Pyrimethamine

Table 4. Incidence of Residual Clopidol in Imported Chicken (1990).

Countries	No. of Sample	No. of Positive	Concentrations(ppm)
Thailand	13	0	−
Brazil	2	0	−
Peru	1	0	−
U. S. A.	6	0	−
China	16	6	0.05,0.05,0.25,0.29,0.58,0.89

以前の報告にも見られるように，CL 陽性の肝臓ではより高い残留があるものと推察される．

CL 分析は，GC-ECD 法[10] によったが，CL を検出した鶏肉については，以前報告した GC／MS(SIM m／z 205)による方法[2] で CL の残留を再確認した．

以上のごとく，ウナギから OA，国内産鶏から NC と LS，輸入鶏から CL，鶏卵から PM の残留が確認されたが，含有量が0.02－0.89ppm と比較的微量であることからこれらの食品を摂取しても直ちに健康障害を起こすとは考えられない．しかし，食品に対する安全性の確保の面から好ましいことではない上に，食品衛生法違反でもあり，抗菌剤の残留が確認された食品は市場から排除されるべきであり，産地での適切な指導が望まれる．また，国により許可されている薬剤が異なっており，各国の抗菌剤使用状況の情報収集にも留意し，今後も同様な調査を継続する必要があろう．

要　約

1988－1990年の３年間に東京都内の流通養殖魚介類及び鶏肉，鶏卵中における残留抗菌剤の調査を行った結果以下の成績を得た．

１)ハマチ，ウナギ，アユなどの養殖魚介類167検体についてオキソリン酸，ナリジクス酸，ピロミド酸の各抗菌剤を分析したところ，ウナギ１検体よりオキソリン酸が0.07ppm 検出された．

２)鶏肉と鶏肝臓計168検体についてナイカルバジン，ピリメタミン，サリノマイシン，モネンシン及びラサロシドの各抗菌剤を調査した結果，鶏肉１検体からナイカルバジンが0.56ppm，鶏肝臓５検体からラサロシドが0.02－0.10ppm 検出された．

３)鶏卵46検体中１検体からピリメタミンが0.04ppm 検出された．

４)タイ，ブラジル，ペルー，米国及び中国から輸入された鶏肉38検体中６検体からクロピドールが0.05－0.89ppm 検出された．クロピドールが検出された鶏肉は，いずれも中国産であった．

謝　辞　試料の収去や情報提供を受けました東京都食品環境指導センターの諸氏に深謝致します．

文　献

1) 家畜衛生統計　1989年版，農林水産省畜産局衛生課．
2) 堀井昭三，山岸達典，松本昌雄：東京衛研年報，**35**，207-209，1984.
3) 堀井昭三，神保勝彦，橋本常生他：東京衛研年報，**40**，137-140，1989.
4) 堀井昭三，宮原加代子，丸山務：食衛誌，**32**，30－37，1991.
5) Horii, S., Yasuoka, C. and Matsumoto, M.: *J. Chromatogr.*, **388**, 459－461, 1987.
6) 堀井昭三，門間千枝，松本昌雄：東京衛研年報，**38**，182－184，1987.
7) Horii, S., Miyahara, K. and Momma, C.: *J. Liquid Chromatogr.*, **13**, 1411－1417, 1990.
8) 宮川弘之，堀井昭三，井草京子他：第61回日本食品衛生学会講演要旨集，P 44，1991.
9) 厚生省通知環乳第20号，1981.
10) 同上　第42号，1978.
11) 同上　第９号，1983.
12) 竹葉和江，村上文子，神保勝彦他：東京衛研年報，**38**，141-144，1986.
13) Takatsuki, K.: *J. Chromatogr.*, **538**（２），259-267, 1991.
14) 森部昌江，藤本喬：福岡市衛試報，**10**，30-36，1985.
15) 大石義也，小田隆弘：食衛誌，**30**，542-547，1989.
16) 堀義宏：食衛誌，**24**，33-37，1983.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 129-133, 1991

野菜・果実類中の残留農薬実態調査
—平成2年度—

永山敏廣*, 小林麻紀*, 塩田寛子*, 真木俊夫*
観公子*, 橋本秀樹*, 川合由華*, 二島太一郎*

Survey of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits
—Apr. 1990.~Mar. 1991.—

TOSHIHIRO NAGAYAMA*, MAKI KOBAYASHI*, HIROKO SHIODA*, TOSHIO MAKI*, KMIKO KAN*, HIDEKI HASHIMOTO*, YUKA KAWAI* and TAICHIRO NISHIMA*

Pesticide residues in 32 kinds of crops and 21 kinds of organic cultivation crops or the like were investigated. In several kinds of crops, residues of three kinds of organophosphorus insecticides and three kinds of organochlorine fungicides were detected. Concentrations of insecticides (diazinon, malathion and phosalone) and fungicides (chlorothalonil (TPN), procymidone and quintozene (PCNB)) were trace~1.9 ppm in five kinds of crops and 0.044~3.5 ppm in 11 kinds of crops, respectively. The level of diazinon in parsley was higher than that of the tolerance for pesticide residues.

Residues of organophosphorus insecticides (EPN, prothiofos and phosalone) and organochlorine fungicides (TPN, procymidone and vinclozolin) in three and six kinds of the like of organic cultivation crops were respectively detected. Their concentration were 0.01~0.52 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

緒　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[1-10]．今回は平成2年度における残留農薬の調査結果を報告する．

また，近年，無・減農薬栽培と表示された野菜・果実類が市販されている．しかし，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[10]．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．

実験の部

1．試　料

(1) 一般流通(慣行栽培)野菜類

1990年4月から1991年3月にかけて東京都内に入荷した野菜類32検体について調査した．

(2) 無・減農薬栽培野菜・果実類

1990年4月から1991年3月にかけて東京都内に入荷した野菜・果実類等21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

＊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

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), クロルベンジレート, 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25種

(3) カーバメイト系農薬：カルバリル(NAC), BPMC 計2種

総計62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), GC-14A(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FPD, TSD)

(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)

日本ミリポア・リミテッド ウォーターズ製 カルバメート分析システム

4．分析方法

前報[6]に従った.

結果及び考察

1．一般流通野菜類

(1) 有機リン系農薬

野菜類32検体中8検体(検出率：25%, 以下同様)からダイアジノン, マラチオン, ホサロン及びエチルチオメトンの酸化代謝物であるジスルホトンスルホンを検出した(Table 1).

残留基準のある農薬は, ダイアジノン(検出作物名：パセリ)の1種が2検体(6%)から検出された. このう

Table 1. Residues of Organophosphorus Insecticides in Crops

Sample	No. of sample	No. of positive	Diazinon (ppm)	Malathin (ppm)	Others[1] (ppm)
CHINGENSAI	4	0			
Perilla[AOZISO]	3	0			
Japanese hneywort [MITSUBA]	3	0			
Celery[SERURI]					
(petiole)	2	0			
(leaf)	2	1	0.02	0.47	—[2]
Parsley[PASERI]	7	4	Tr[3],0.13	0.07,1.9	Tr(disulfoton sulfone)
Race ginger[NESHŌGA]	7	2	—	—	Tr,0.07(disulfoton sulfone)
Mini tomato	4	1	—	—	0.15(phosalone)

1) EPN, PAP, chlorpyrifos, CVP, DDVP, dimethoate, parathion, MEP, MPP, phosalone, 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

ち1検体は，基準値0.1ppmを超えていた．ダイアジノンは1日摂取許容量(ADI)が0.002mg／kgの劇物(1％以下の製剤は普通物)であるが，パセリは1回に多量に摂取することは少ないことから，健康上特に問題はないと考える．しかし，残留基準を超えたことは，農薬の安全使用基準(乳・粉剤を収獲21日まで2回以内散布)を遵守しなかったとも推察される．農薬使用者の充分な配慮が望まれる．

環境庁の定めた登録保留基準のある農薬ではダイアジノン(セルリーの葉)，マラチオン(セルリーの葉，パセリ)及びホサロン(ミニトマト)の3種が4検体(13％)から検出されたが，いずれも基準値以内であった．

(2) 有機塩素系農薬

11検体(34％)から3種の有機塩素系殺菌剤を検出した(Table 2)．

TPN(ミツバ，セルリーの葉及びパセリ)及びPCNB(パセリ)は，それぞれの登録保留基準値1.0及び0.08ppmを超えていた．特に，パセリから検出されたPCNBは，基準値の約18倍であった．PCNBは，ADI 0.007mg／kg／dayの普通物であり，喫食上特に問題はない．しかし，PCNBは土壌処理剤であり[11]，作物に直接散布されないことから，通常検出量は低レベルである．従って，今回の結果は粉剤の飛散混入等があったとも考えられ，その使用に当ってはなお一層の注意が望まれる．

(3) カーバメイト系農薬

セルリーの葉1検体からNACが0.05ppm検出されたのみであった．

(4) 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)を検出した野菜類についてまとめ，Table

Table 2. Residues of Organochlorine Fungicides[1] in Crops

Sample	No. of sample	No. of positive	TPN(ppm)	Procymidone (ppm)	PCNB (ppm)
CHINGENSAI	4	0			
Perilla[AOZISO]	3	0			
Japanese honeywort [MITSUBA]	3	3	0.95,3.5	1.0	—[2]
Celery[SERURI]					
(petiole)	2	0			
(leaf)	2	2	0.044,1.4	—	—
Parsley[PASERI]	7	3	0.89,3.0	—	1.4
Race ginger[NESHŌGA]	7	0			
Mini tomato	4	3	0.089,0.14	0.10	—

1) Captan, captafol, TPN, PCNB, procymidone, vinclozolin and iprodione are investigated.
2) —：not detected

Table 3. Details in the Samples Contained Several Pesticides

Sample	No.	Pesticide residues (ppm)
Celery		
(leaf)	1	Diazinon(0.02)[1],Malathion(0.47),TPN(0.044)
Parsley	1	Diazinon(0.13),Malathion(0.07)
	2	Malathion(1.9),TPN(3.0)
Mini tomato	1	Phosalone(0.15),TPN(0.089)

1) The value in parentheses shows detected levels of the pesticide.

3に示した.

複数残留はセルリーの葉，パセリ及びミニトマトに認められた.

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21検体について調査したところ，8検体(38%)から有機リン系殺虫剤3種及び有機塩素系殺虫・殺菌剤4種が検出された(Table 4).

残留基準値及び登録保留基準値を超えたものはなかったが，ミツバ及びピーマンでは，農薬の複数残留が見られた.

今回農薬を検出した試料のほとんどは低農薬栽培であるが，その残留量は一般流通(慣行栽培)作物とほぼ同レベルであった．従って，農作物中の農薬残留量は，農薬の使用回数あるいは使用濃度等より，使用時期によるとも推察され，さらに調査検討を加えていく必要があると考える.

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

1990年4月から1991年3月までに都内に入荷した野菜・果実類63検体について，一般流通品(慣行栽培品)及び無・減農薬栽培品に分けて，残留農薬の実態調査を行った.

1．一般流通野菜類

有機リン系農薬は，ダイアジノン，マラチオン及びホサロンの殺虫剤3種類が，5検体から痕跡～1.9ppmの範囲で検出された．パセリからダイアジノンが残留基準値を超えて検出された.

有機塩素系農薬では，TPN，プロシミドン及びPCNBの殺菌剤3種類が11検体から0.044～3.5ppmの範囲で検出された．ミツバ，セルリーの葉及びパセリからTPN，パセリからPCNBが登録保留基準値を超えて検出された.

Table 4. Residues of Pesticides[1] in Organic Cultivation Crops

Sample	No. of sample	No. of positive	Pesticide residues (ppm)
Spinach [HŌRENSŌ]	1	1	TPN(0.28)[2]
Perilla	1	0	
Lettuce [RETASU]	4	1	TPN(0.028)
Japanese honeywort			
(leaf)	1	1	EPN(0.06),Prothiofos(0.01),Procymidone(0.22)
(root)	1	1	EPN(0.12),Prothiofos(0.03),Procymidone(0.52)
Celery			
(petiole)	1	0	
(leaf)	1	0	
Cucumber [KYŪRI]	3	1	Procymidone(0.03)
Pimiento [PĪMAN]	2	1	Phosalone(0.25),Procymidone(0.14),Vinclozolin(0.02)
Radish [DAIKON]			
(root)	1	0	
(leaf)	1	0	
Race ginger	1	0	
String pea[SAYAINGEN]	1	1	TPN(0.28)
Mandarin orange [UNSHŪMIKAN]			
(flesh)	1	0	
(peel)	1	1	Chlorobenzilate(0.01)

1) 52 kinds of insecticides (organophosphorus: 33,organochlorine: 17,carbamate: 2) and 9 kinds of fungicides (organophosphorus: 2,organochlorine: 7) are investigated.

2) The value in parentheses shows detected levels of the pesticide.

カーバメイト系農薬はセルリーの葉からNACが0.05ppm検出された.

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，ミツバの葉及び根からEPNが0.06～0.12ppm，プロチオホスが0.01～0.03ppm検出された．また，ピーマンからホサロンが0.25ppm検出された.

有機塩素系農薬では，TPN，プロシミドン及びビンクロゾリンの殺菌剤3種が6種類の野菜類から検出された.

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，真水俊夫他：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) 永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：東京衛研年報，**41**，119-124，1990.

11) 香月繁孝，飯塚慶久，後藤宗玄他：農薬便覧　第7版，1989，農山漁村文化協会，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **42**, 134-140, 1991

輸入農産物中の残留農薬実態調査
—平成2年度—

永山敏廣*, 小林麻紀*, 塩田寛子*, 真木俊夫*,
観公子*, 橋本秀樹*, 川合由華*, 二島太一郎*

Survey of Pesticide Residues in Imported Crops
—Apr. 1990.~Mar. 1991.—

TOSHIHIRO NAGAYAMA*, MAKI KOBAYASHI*, HIROKO SHIODA*, TOSHIO MAKI*, KIMIKO KAN*, HIDEKI HASHIMOTO*, YUKA KAWAI* and TAICHIRO NISHIMA*

Pesticide residues in 209 foreign crops were investigated. Residues of 11 kinds of organophosphorus insecticides in 48 crops were detected. In the case of the organochlorine pesticides, four kinds of insecticides, three kinds of fungicides and one kind of herbicide were detected in 11, 19 and 8 crops, and the case of carbamate pesticides, one kind of insecticide and one kind of herbicide were detected in 8 and 4 crops, respectively. The range of each pesticide was trace~0.33, trace~0.35, trace~7.3, 0.01~0.41, 0.03~0.75 and 0.09~0.96 ppm. Residues of these pesticides were at levels lower than the tolerance for pesticide residues in Japan and the FAO/WHO tolerances for these agents.

The characteristic pesticides were detected in imported crops by the country of origin. Various pesticides were in or on several imported crops from the North and South America.

Keywords：残留農薬 pesticide residues, 輸入農産物：imported crops, 有機リン系農薬：organophosphorus pesiticides, 有機塩素系農薬：organochlorine pesticides, カーバメイト系農薬：carbamate pesticides, ポストハーベストアプリケーション：postharvest application

緒　言

近年，生鮮青果物の輸入が急増しており[1-3]，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．そこで，著者らは昭和57年度より，種々の輸入農産物について農薬の残留実態を調査している[4-7]．今回は平成2年度における調査結果を報告する．

実験の部

1．試　料

1990年4月から1991年3月にかけて東京都内に入荷した輸入野菜・果実類等39種162作物，及びそれらの加工品7種47品目について調査した．これら作物及び品目の内訳を Table 1 に示した．甘橘類は果肉と果皮に分けて，その他の試料は剝皮等を行い可食部について分析した．

また，別に柑橘類3種16作物について，ポストハーベスト農薬等の調査を加えた．

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，

*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 Raw Agricultural and food commodity

Commodities			
Raw agricultural commodity			
Vegitables	Trevise(5)[1],Chicory(6),SABABEJI(1),Asparagus[2](8),Garlic(stem)[NINNIKUNOKUKI](6),Okra(5),Pumpkin[KABOCHA](4),Tamarillo[KODACHITOMATO][3](1),Chinese pea[2][SAYAENDOU](5),String pea[SAYAINGEN](6),Baby corn[2](4),Sweet corn[2](5),Green pea[2](5),Green soybean[2][EDAMAME](11),Potato[4](6),Carrot[NINJIN](1)	16 species	79 crops
Mushrooms	MATSUTAKE(4),SHIITAKE(4)	2 species	8 crops
Fruits			
Citrus[5]	Lemon(2),Orange(1),Grapefruit(1)	3 species	4 crops
Others	Cherry[SAKURANBO](4),Strawberry[ICHIGO](7),Grape[BUDOU](4),Melon[3](3),Papaya[3](3),Mango[3](4),Kiwifruit[3](2),Banana[3](3),Pineapple[3](3),Litchi[3](3),Japanese persimon[KAKI][3](1)	11 species	37 crops
Cereals	Wheat[KOMUGI](5),Corn[TOUMOROKOSHI](5),Buckwheat[GENSOBA](5)	3 species	15 crops
Beans	Soybean[DAIZU](5),Small red bean[AZUKI](5)	2 species	10 crops
Nuts	Almond(5),Cashew nut(4)	2 species	9 crops
Food commodity			
Dried fruits	Raisin[REZUN](4),Prune[PURUN](6),Apricot[ANZU](5),Pineapple(5),Banana(5)	5 species	25 crops
Processed wheat	Flour[KOMUGIKO](12),Bread[PAN](10)	2 species	22 crops
		Total 46 species	209 crops

1) Values in parentheses indicate number of individual samples.
2) include the cut or frozen commodity
3) These skins, rinds or peels are removed and discarded prior to analyze samples.
4) precooked frozen potato
5) This sample is analyzed separately flesh and peel.

-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, メチルパラチオン, アジンホスメチル 計27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, ジクロラン, メトキシクロル 計23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

(4) その他の農薬：塩化メチレン, トリクロロエタン 計2種

総計56種

これらのうち, アジンホスメチル, ジクロラン, メトキシクロル, 塩化メチレン及びトリクロロエタンは, アメリカにおけるポストハーベスト農薬であることから, アメリカ地域の農産物についてのみ調査した.

3. 機 器

(1) ガスクロマトグラフ：㈱島津製作所製GC-9A, GC-14A(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, FPD)

(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), 日本ミリポア・リミテッド ウォーターズ製 カルバメート分析システム

(4) ガスクロマトグラフー質量分析計：Finigan Mat 社製 Incos-50

(5) 原子発光検出器：Hewlett Packard 社製 AED HP5921A

(6) 粉砕器：㈲廣沢鉄工所製 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309号，残留農薬分析法[8]，増補残留農薬分析法[9]及び残留農薬分析法 Draft[10] 等に準じた.

また，これらに分析法が収載されていない農薬につい

Table 2. Pesticide Residues in Imported Raw and Frozen Agricultural Commodities

Crops	Country	No. of sample	No. of positive	Pesticide	Residue(ppm)	Tolerance (ppm)
Chicory	Belgium	6	1	Dimethoate	0.03	1[1],2[2]
Chinese pea	Taiwan	4	1	Dimethoate	0.08	1[1],2[2]
Green soybean	Taiwan	10	5	EPN	0.03,0.03	
				Chlorpyrifos	0.01,0.02,0.09	
				Parathion	Tr[3]	0.7[2]
				Ethion	0.02	0.3[1]
				Endosulfan[4]	Tr	0.5[1],2[2]
				NAC	0.11	
Potato[8]	USA	5	3	CIPC	0.09,0.33,0.96	0.05[1]
	Canada	1	1	CIPC	0.33	0.05[1]
Lemon (peel)	USA	2	2	Chlorpyrifos	0.02,0.17	0.5[1],0.3[2]
Orange (peel)	USA	1	1	Chlorpyrifos	0.02	0.5[1],0.3[2]
Grapefruit (peel)	USA	1	1	Chlorpyrifos	0.01	0.5[1],0.3[2]
				DMTP	0.03	0.2[1],2[2]
				NAC	0.03	7[2]
Cherry	USA	3	2	Parathion	0.02	0.3[5],0.5[2]
				Dimethoate	0.11	0.5[1],2[2]
				Iprodion	0.08	10[1]
	Newzealand	1	1	Iprodion	0.75	10[1]
Strawberry	USA	7	3	Malathion	Tr,0.01	0.5[1,5],1[2]
				Iprodion	0.37	20[1]
Mango	Philippines	3	1	Parathion-methyl	0.01	0.2[2]
Litchi	Taiwan	3	3	Parathion	Tr,0.02,0.04	0.5[2]
Wheat[1]	USA	3	3	Malthion	0.10,0.12,0.23	0.5[1],8[2]
				Chlorpyrifos-methyl	0.04,0.8,0.33	10[2]
	Canada	1	1	Malathion	Tr	0.5[1],8[2]
	Australia	1	1	MEP	0.07	10[2]
Corn(grain)	USA	5	1	Malathion	Tr	0.5[1],8[2]

1) standard for withholding registration
2) FAO/WHO tolerance for residues
3) Tr: below 0.01ppm
4) amount of endosulfan-I and II
5) tolerance for pesticide residues

ては，新しく開発した方法によった[11]．

結果及び考察

1．農薬残留実態

1-1． 生鮮農作物

39種162作物中13種31作物(検出率19%，以下同様)から13種の農薬が検出された．農薬を検出した作物について，Table 2 に示した．

野菜類では，16種79作物中4種11作物(14%)から18種の農薬が検出された．

食品衛生法による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，ジメトエート(検出作物名：チコリー，サヤエンドウ，エダマメ)，エチオン(エダマメ)，エンドスルファン(エダマメ)及びCIPC(冷凍ポテト)の5種が8検体(10%)から検出された．これらのうち，アメリカ及びカナダ産の冷凍ポテトから検出されたCIPCは，基準値0.05ppmを超えていたが，CIPCのアメリカ及びカナダにおける生鮮ポテトに対する許容量は50及び15ppmであり，今回の検出値はこれらの1/45以下であった．CIPCは諸外国においてポストハーベスト農薬として収獲後の馬鈴薯の発芽抑制目的に直接使用されている[12,13]．今回検出されたCIPCはこの使用方法に由来すると考える．

(2) 果実類

11種37作物中7種14作物(38%)から8種の農薬が検出された(Table 2)．

甘橘類の果皮からの検出率が高く，3種作物総てから3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，グレープフルーツの各果皮)及びDMTP(グレープフルーツの果皮)の2種が検出された．DMTPはレモン及びオレンジからも検出されたとの報告もあり[14]，国内産の甘橘類からも高頻度で検出される農薬のひとつである[15]．

その他の果実類では，チェリー及びライチにおける検出率が，それぞれ75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，昨年度と同様，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痕跡～0.04ppmの範囲で検出された．また，0.01ppmと非常に低レベルであるが，メチルパラチオンがマンゴから検出された．パラチオンやメチルパラチオンは，日本では特定毒物に指定されており，取扱いが厳しく規制されている．これら農薬のADIはそれぞれ0.005及び0.02mg/kg/dayであり，喫食上特に問題はない．しかし，このような国内では使用できない農薬が輸入品から検出されることもあることから，農薬の残留実態把握には十分な留意が必要である．

(3) 穀類，豆類及び種実類

穀類3種15作物中2種6作物(40%)からマラチオン，MEP及びクロルピリ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．

1-2． 加工食品

7種47品目中5種21品目(45%)から6種の農薬が検出された．農薬を検出した作物について，Table 3 に示した．

(1) 乾燥果実類

5種25品目中3種7品目(28%)から4種の農薬が検出された．特に，干しアンズからNACが高頻度で検出され，また，アジンホスメチルも検出されたが，アメリカにおける生鮮果実類に対する許容量の1/10以下であり，ADI 0.01及び0.0025mg/kg/day等を考慮しても喫食上特に問題はない．しかし，これら加工食品はそのまま喫食することから，残留した農薬はそのまま摂取される．継続して残留量を監視していく必要がある．

(2) 小麦加工品

小麦粉12品目及びパン10品目について調査したところ，マラチオン及びクロルピリホスメチルが0.02ppm以下と非常に低レベルであるが，それぞれ9(75%)及び5品目(50%)から検出された．これら農薬は，玄麦中に残留した農薬の0.9～4.5%程度が移行したことによる[6]．近年，マラチオンやMEPに比較し，残留性の高いクロルピリホスメチル等が使用されており[6]，低レベルではあるが，今後も農薬が高頻度で検出されるものと思う．

2．地域別による比較

輸入農産物の原産国を前報[7]と同様5地域に分類し，地域別に農薬の検出状況をまとめてTable 4 に示した．

農薬の検出率はアメリカ大陸産が高く，次いでオセアニア，アジア，ヨーロッパ産の順であった．また，有機リン系殺虫剤の検出される割合が最も高く，特にアメリカ及びアジア地域産で多く認められた．昨年度の結果に比較して有機塩素系殺虫剤の検出率が低かったが，これは，今年度の有機塩素系農薬の確認限度が高く(昨年度：0.001～0.01ppm，今年度：0.01～0.05ppm)，ごく微量の有機塩素系農薬を検出できなかったことによると考える．

Table 3. Pesticide Residues in Food Commodities

Crops	Country	No. of sample	No. of positive	Pesticide	Residue(ppm)	Tolerance (ppm)
Raisin	USA	3	1	Dicofol	0.35	
	Australia	1	1	CNA	0.01	10[1]
Prune	USA	6	1	CNA	0.02	15[1]
Apricot	USA	5	4	Azinphos-methyl	0.10,0.11	2[1]
				NAC	0.10,0.21,0.73,0.75	
Wheat flour		12	9	Malathion	Tr,Tr[2],0.005,0.006, 0.006,0.01,0.01,0.02	
				Chlorpyrifos-methyl	Tr,Tr,Tr,Tr,0.005, 0.006	2[3]
Bread		10	5	Malathion	Tr,0.006,0.008,0.009, 0.009	
				Chlorpyrifos-methyl	Tr,Tr	

1) tolerance for residues in or on raw agricultural commodities in USA (EPA)
2) Tr: below 0.005ppm
3) FAO/WHO tolerance for residues

Table 4. The Influence of Original Country in the Pesticide Residues in Raw Agricultural Commodities

Area	No. of samples	No. of positive samples						Detected rate(%)
		Organophosphorus insecticides	Organochlorine insecticides	Organochlorine fungicides	Carbamate insecticides	Carbamate herbicides	Total	
America	64	12(6)[1]	0	2(1)	1(1)	4(1)	18(9)	28
Asia	72	10(6)	1(1)	0	1(1)	0	10(7)	14
Oceania	14	1(1)	0	1(1)	0	0	2(2)	14
Europe	11	1(1)	0	0	0	0	1(1)	9
Africa	1	0	0	0	0	0	0	0
Total	162	24(10)	1(1)	3(1)	2(1)	4(1)	31(14)	19

1) Values in parentheses indicate number of detected pesticides.

3．柑橘類から検出される農薬について

柑橘類3種16作物について，2,4-D，イマザリルを加えたポストハーベスト農薬6種(メトキシクロルを除く)及びその他の農薬50種(オメトエートを除く)を調査した結果をTable 5に示した．

クロルピリホス，DMTP，クロルベンジレート，NAC，CNA，2,4-D，トリクロロエタン及びイマザリルの各農薬が痕跡～0.27，0.87，0.03～0.14，0.06～0.28，0.02～0.05，0.01～1.0，痕跡～0.23及び0.01～7.3ppmの範囲で検出されたが，特に，ポストハーベスト農薬としての使用が認められている2,4-D及びイマザイルの検出率が50及び81％と高かった．2,4-Dはヘタ部分からの腐敗を防ぐために[12]，また，イマザイルはTBZ等のベンズイミダゾール系薬剤抵抗性種に対する殺菌剤として使用されている．今回の結果は，アメリカ及びFAO/WHOの許容量以下であり，また，それぞれのADI 0.3及び0.01mg/kg/day等を考慮して特に問題はない．しかし，柑橘類に農薬が使用された場合果皮に残留し易く，果皮中の濃度の1/75～1/7の濃度が果肉から検出されている．また，比較的検出され易い農薬であることから[16,17]，今後さらに監視を続けていく必要がある．

Table 5. Pesticide Residues in citrus Fruits

crops	Country	No. of sample	No. of positive	Pesticide	Residue(ppm)	Tolerance (ppm)
Lemon						
(flesh)	USA	10	9	2,4-D	0.01,0.02,0.03,0.04,0.06	5[1],2[2]
				Imazalil	0.01,0.02,0.07,0.12,0.19, 0.25,0.42,0.45,0.52	10.0[1],5[2]
(peel)	USA	10	10	Chlorpyrifos	0.03,0.05,0.10,0.10,0.13	1.0[1],0.3[2]
				Chlorobenzilate	0.03,0.03,0.04,0.06,0.06, 0.14	5.0[1],1[2]
				CNA	0.02,0.03,0.04,0.05	
				2,4-D	0.04,0.05,0.27,0.29,0.39, 0.41	5[1],2[2]
				Trichloroethane	Tr[3],0.13,0.23	
				Imazalil	0.08,0.24,0.34,0.71,3.8, 4.2,5.6,5.9,6.3,7.3	10.0[1],5[2]
Orange						
(fresh)	USA	2	0			
	Australia	1	0			
(peel)	USA	2	2	Chlorpyrifos	0.11,0.27	1.0[1],0.3[2]
				DMTP	0.87	2.0[1],2[2]
				CNA	0.04	
				Trichloroethane	0.05	
				Imazalil	0.29	10.0[1],5[1]
	Australia	1	1	Chlorpyrifos	0.11	0.5[4],0.3[2]
Grapefruit						
(fresh)	USA	3	2	Imazalil	0.02,0.10	10.0[1],5[2]
(peel)	USA	3	3	Chlorpyrifos	Tr[5]	
				NAC	0.06,0.28	10[1],7[2]
				2,4-D	0.01	5[1],2[2]
				Imazalil	1.5,2.8	10.0[1],5[2]

1) tolerance for residues of the whole citrus fruits in USA (EPA)
2) FAO/WHO tolerance for residues of the whole citrus fruits
3) Tr: below 0.05ppm
4) maximum residue limit of the whole citrus fruits in Australia
5) Tr: below 0.01ppm

ま と め

1990年4月から1991年3月までに都内に入荷した輸入生鮮農産物等46種209作物について，残留農薬の実態調査を行った．

1．生鮮農作物中の農薬残留実態

10種の有機リン系殺虫剤が痕跡～0.33ppm の範囲で検出された．

有機塩素系農薬では2種の殺虫剤が痕跡～0.14ppm，2種の殺菌剤が0.02～0.75ppm の範囲で検出された．

カーバメイト系農薬では，1種の殺虫剤が0.03～0.28ppm，1種の除草剤が0.09～0.96ppm 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，各輸出国及び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．加工食品中の農薬残留実態

有機リン系殺虫剤3種，有機塩素系殺虫・殺菌剤各1種及びカーバメイト系殺虫剤1種が，痕跡～0.75ppmの範囲で検出された．

3．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，アメリカ地域産から多種多様な農薬が検出される傾向が認められた．

4．柑橘類中のポストハーベスト農薬

6種農薬について調査したところ，2,4-D，イマザリル及びトリクロロエタンが0.01～7.3ppmの範囲で検出された．

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) 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1989－統計に見る食品輸入の実態－，1990，㈳日本食品衛生協会，東京．

2) 1990年度(平成2年)輸入青果物統計資料(バナナ・シトラス・パインその他)，1991，㈳日本青果物輸入安全推進協会，東京

3) 東京都中央区卸売市場業務部普及課編：平成元年東京都中央卸売市場年報 農産物編，1990，東京都，東京．

4) 永山敏廣，田村行弘，真木俊夫他：東京衛研年報，**34**，165-170，1983.

5) 永山敏廣，観　公子，田村行弘他：東京衛研年報，**35**，210-218，1984.

6) 永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：食衛誌，**30**，438-443，1989.

7) 永山敏廣，真木俊夫，川合由華他：東京衛研年報，**41**，125-132，1990.

8) 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，東京．

9) 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，東京．

10) 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.

11) 未発表

12) 平成元年度委託調査報告書 収獲後使用の農薬に関する調査，東京都生活文化局消費者部，1990.

13) John Wiley and sons: *1989 Crop Protection Chemicals Reference 5th edition*, 1990, Chemical and Pharmaceutical Press, New York.

14) 食品環境部：広島市衛研年報，**9**，82-85，1990.

15) 永山敏廣，真木俊夫，飯田真美他：東京衛研年報，**40**，155-162，1989.

16) Luke M. A., Masumoto H. T., Cairns T., Hundley H. K.: J. A. O. A. C. **71**, 415-433, 1988.

17) JOF 1000年 Love 日本子孫基金　通信No. 32，1991，日本子孫基金．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **42**, 141-146, 1991

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分析
―市販食品から検出されたタール色素の確認例について―

石川ふさ子*, 斉藤和夫*, 中里光男*, 藤沼賢司*
守安貴子*, 二島太一郎*

Determination of Food Colors by High Performance Liquid Chromatography
Identification of Food Colors Detected from Commercial Food

Fusako Ishikawa*, Kazuo Saito*, Mitsuo Nakazato*, Kenji Fujinuma*, Takako Moriyasu*
and Taichiro Nishima*

Keywords：食用色素 food colors, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography, アルラレッドAC allura red AC, パテントブルーV patent blue V, キノリンエロー quinoline yellow

緒　言

輸入食品の増加に伴って，我が国で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．

先に我々は我が国での許可色素に加え米国やEC諸国での許可色素を含めた17種の酸性タール色素について，セップパック NH_2 カートリッジカラムを用いた前処理法およびイオンペアモードを用いた濃度グラジェントによる高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を検討し，その結果を報告した[1]．

今回，食品機動監視班及び保健所から搬入された食品についてペーパークロマトグラフィー(PC)により色素の分析を行なったところ，輸入食品より数種の許可外色素と思われる色素及び国内品数検体より確認の困難な色素を検出したものについて，前報で報告したHPLCを応用してそれらの色素を分析し確認したので，その事例について報告する．

実験方法

1．試　料

都内で市販されていた食品を用いた．

2．試　薬

色素標準液：キノリンエロー(QY)はクロマ社製，パテントブルーV(PBV)はシグマ社製の(C．I．42051)と(C．I．42045)の2種を使用し，各々50mgを水50mlに溶解した．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は国立衛生試験所から分与されたものを用い，同様に溶解した．

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，同様に溶解した．

展開用ろ紙：東洋濾紙製9本溝入りペーパークロマトグラフィー用ろ紙

展開溶媒：i)アセトン・イソアミルアルコール・水(6：5：5)混液

ii)n-ブタノール・無水エタノール・1％アンモニア水(6：2：3)混液

iii)25％エタノール溶液・5％アンモニア水(1：1)混液

その他の試薬は前報[1]と同様のものを用いた．

3．装　置

前報のとおりである．

4．HPLCの測定条件

カラム，移動相，移動相のグラジェント条件，検出波長，その他の条件は前報に準じた．

5．試験溶液の調製

キャンディー：前報に準じて行った．

ガム：試料は細切し，色調の濃淡により5－10gを秤り5倍量の水を加え水浴上で時々攪拌しながら加温し，

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

水層が着色したならば上澄液を分取した．残渣が着色している場合は更に5倍量のアンモニア性70%エタノールを加え加温して色素を抽出し，上澄液を分取した．分取した上澄液を10%酢酸で中和し，エタノールを水浴上で蒸発させた．これを先の上澄液と合わせ10%酢酸でpH 3－4に調整し，色素抽出液とした．さらに前報に準じてセップパックNH_2カートリッジカラムに負荷し，1%アンモニア含有50%エタノールで溶出した液を酢酸で中和し，これをHPLC用試験溶液とした．

即席中華麺：試料は砕いて，その20gに5倍量の70%エタノールを加え水浴上で時々攪拌しながら加温して色素を抽出し，綿栓ろ過して上澄液を分取した．水浴上でエタノールを蒸発させた後，10%酢酸でpH 3－4に調整した．必要があればろ紙ろ過し，これを色素抽出液とした．以下キャンデーと同様に操作した．

市販食品からの分析事例について

1．イギリス産キャンデーからのキノリンエローの検出

平成元年7月食品機動監視班から搬入されたイギリス産レモンキャンデーを毛糸染色法により色素を精製し[2]，PCを行ったところ，クロマ社製のキノリンエローと類似したRfのスポット及びY 4，Y 5と思われる不明瞭なスポットが認められた．そこでこれらの点を確認するためにキノリンエローの標準品及び試料について前報で報告したHPLCを用いて分析した．

キノリンエローはEC諸国等で許可されており，2-(2'-キノリル)1,3-インダンジオンのスルホン化物のナトリウム塩の混合物であり[3,4]，製造メーカーによりその種類や混合比が異なっている．そのためにPCでは判定の極めて困難な色素の一つである．東京化成㈱製，シグマ社及びクロマ社の標準品についてHPLCで分析したところ，東京化成㈱製，シグマ社製の標準品からは検出波長450nmにおいて保持時間17.2，18.6分の2つのピークが検出され，一方クロマ社製のものからは保持時間12.5，17.9，22.0，26.1分の4つのピークが検出され，両者に共通するピークは認められなかった．

標準品としてクロマ社製のキノリンエローを用いY 4，Y 5と同時に分析した場合，Fig. 1に示したようにそれらの分離は良好であった．

また，前報に報告した17種の酸性タール色素にクロマ社製のキノリンエローを加え，同時に分析したときのクロマトグラムをFig. 2に示した．キノリンエローの2番目のピーク(保持時間17.9分)が検出波長450nmでG 3と重なるが550nmではキノリンエローのピークは認められないので，550nmのクロマトグラムとの比較によりG 3との判別が可能であった．

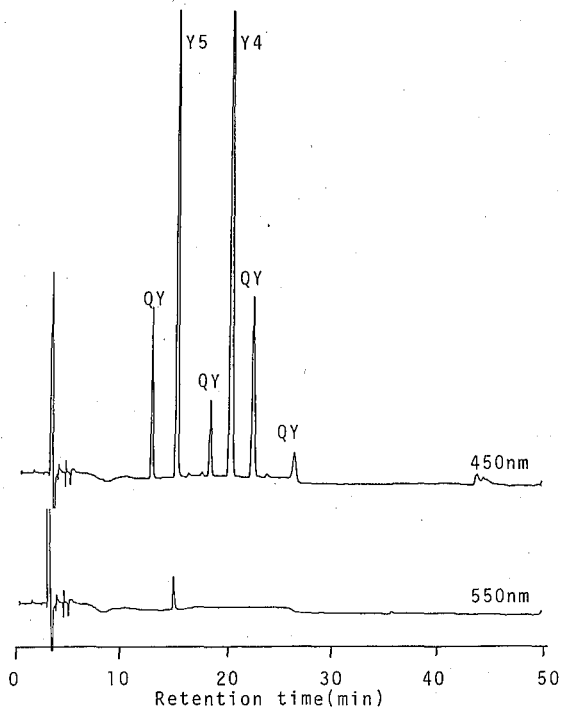


Fig. 1. Chromatograms of Y4, Y5 and QY on HPLC
Operating conditions: column, Cosmosil 5C18-AR (4.6mm i. d. x250mm); moble phase, (A) 0.015M TBA solution (pH6.8)-acetonitrile (7 : 3) (B) acetonitrile; gradient profile, 0-10% B 1%／min, 10% B 10min, 10-40% B 2%／min, 40% B 10min; flow rate, 1ml／min; detection wavelength, (1) 450nm (2) 550nm; injection volumn, 10 μl; concentration of each food colors, 10 μg／ml.

イギリス産レモンキャンデーについてセップパックNH_2カートリッジカラムを用いて精製し，HPLCにより分析したところ，クロマ社製のキノリンエローの4つのピークのうち保持時間12.5，17.9，26.1分の3つのピークと一致したのでこれをキノリンエローと判定し，他にY 4，Y 5が確認出来た．

なお，本キャンデーは同一袋中にレモンとして黄色の濃さが微妙に異なる3種が混在していたため，それぞれの色の濃淡により分類し各々について分析すると，濃い黄色のキャンデーからはY 5とキノリンエローが検出され(Fig. 3)，中間色のものからはY 4，淡黄色のものか

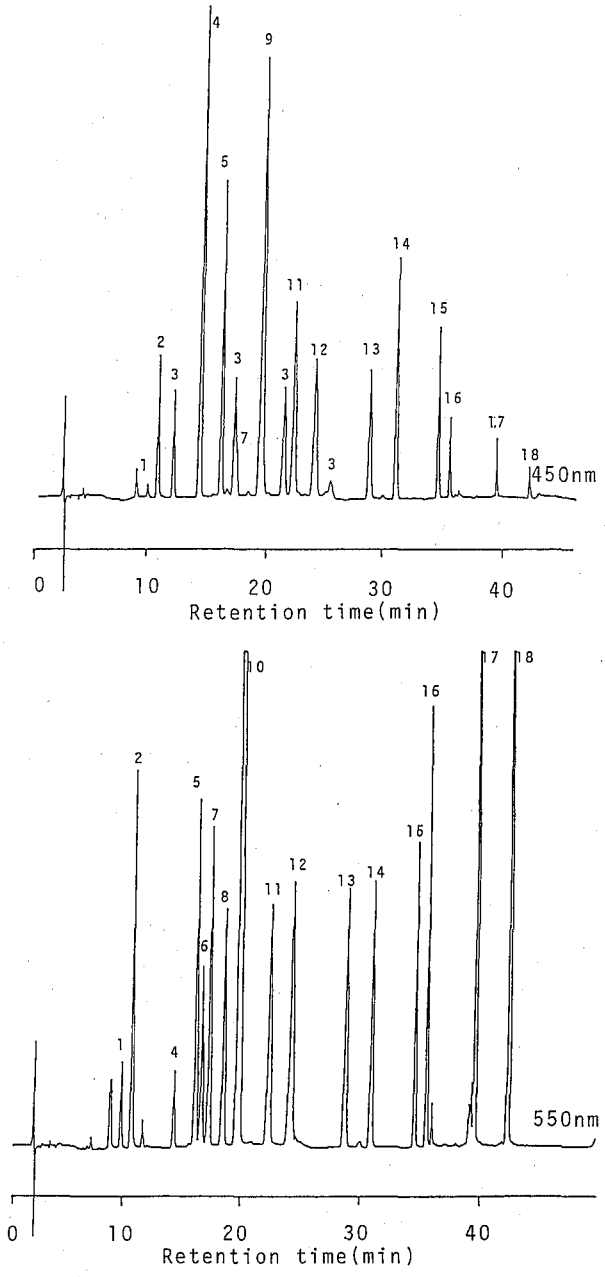


Fig. 2. Chromatograms of 18 Food Color Standards on HPLC

Operating conditions were same as described in Fig. 1.

Food colors: 1, B2; 2, GS; 3, QY; 4, Y5; 5, ALR; 6, PBV; 7, G3; 8, B1; 9, Y4; 10, R106; 11, FRE; 12, R2; 13, AZO; 14, R102; 15, P6R; 16, R3; 17, R104; 18, R105.

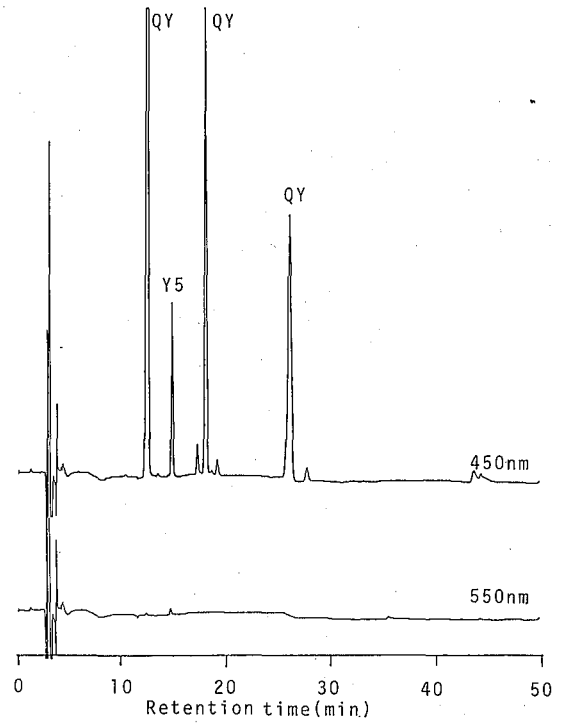


Fig. 3. Chromatograms of Food Colors Extracted from Commercial Candy (Deep Yellow) on HPLC

Operating conditions were same as described in Fig. 1.

らはキノリンエローが検出された．中間色のキャンデーのみを分析すればキノリンエローは検出されなかったことになり，サンプリング時に検体の色調をよく観察しながら分析しなければならないことを痛感した．

また，前述のようにキノリンエローは数種の混合物であり，検体から検出されるものの種類や混合比が一定でないため同定の際注意を要する．

2．アメリカ産ガムからのアルラレッドACの検出

1)平成2年2月都内保健所からアルラレッドAC使用の疑いがあるとしてアメリカ産ガムが搬入された．その後4月に食品機動監視班による緊急監視が行われ卸売業者から収去された同ガムが搬入された．

ガムからの色素の抽出は水で煮沸して溶出する方法[2]，水とクロロホルムで振とうし水層に色素を抽出する方法[5]があるが水とクロロホルムによる方法ではクロロホルム層に色素が移行し，水層への抽出は完全には出来なかった．そこで細切したガム5gを秤りとり5倍量を水を加えて攪拌しながら水浴上で加温し，水層に色素が移

行してから上澄液を分取した．残渣がまだ着色していたので更に5倍量のアンモニア性70%エタノールを加えて同様に水浴上で色素の抽出を行ったところ，残渣にR 3と思われる色素が一部残ったがそれ以外の色素はよく抽出できた．分取した上澄液を10%酢酸で中和した後，エタノールを水浴上で蒸発させ，先の上澄液と合し10%酢酸でPH3-4に調整した．これをセップパック NH_2 カートリッジカラム処理を行いHPLC用試験溶液とし，一部を水溶上で乾固してPC用試験溶液とした．

このガムは「オリジナル」,「ストロベリー」,「グレープ」の3種があり，これをPCで分析したところ「オリジナル」からはR 3あるいはアルラレッドACが検出され,「ストロベリー」からはR 3のみが検出された．また「グレープ」はR 3，B 1が検出されるものあるいはアルラレッドAC，R 3，B 1およびB 2の4種が検出されるものがあった．同種のものでも検出される色素が異なっていたが，これはロット番号の相違によるものであった．PCで検出されたアルラレッドACの確認をHPLCにより行ったところ，色素は完全に分離・確認することが出来た．Fig. 4には「グレープ」から4種の色素を確認したときのクロマトグラムを示した．

なおロット番号により使用されている色素が異なっていたことはアメリカからの出荷時に何等かの混乱があったものと推定される．

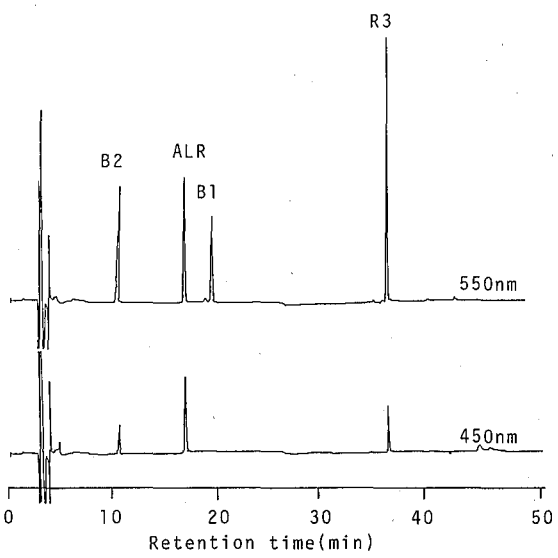


Fig. 4. Chromatograms of Food Colors Extracted from Commercial Chewing Gum (Grape) on HPLC
Operating conditions were same as described in Fig. 1.

2)平成2年7月都内保健所からアルラレッドACが検出されるとしてアメリカ産ガムが搬入された．このガムは「オレンジ」,「ウォーターメロン」と「ストロベリー」の3種があり，PCにより分析したところ「ウォーターメロン」と「ストロベリー」からアルラレッドACが検出され,「オレンジ」からはY 5が検出された．本品からのアルラレッドACの確認についてもHPLCを用いて行った．

なお，アルラレッドACは検出時において米国では許可されていたがわが国では許可外色素であった．しかし平成3年1月17日付厚生省令第1号及び厚生省告示第1号により食用赤色40号としてわが国でもその使用が認可された．

3．スイス産キャンデーからのパテントブルーVの検出

昭和58年6月都内保健所からパテントブルーVが検出される疑いがあるとして，スイス産キャンデーが搬入された．

パテントブルーVはEC諸国やスウェーデンなどで許可されている．カラーインデックスの第3版にはC.I. 42045とC.I. 42051が記載されており，それぞれパテントブルーVとして市販されている．そこで試料を分析するに先立ちパテントブルーVの標準品についてHPLCによる分析を検討した．前報では東京化成㈱製のパテントブルーV(C.I. 42045)を標準品として用いたが，今回シグマ社製の(C.I. 42045)と(C.I. 42051)の2種のパテントブルーVの標準品を用いHPLCで分析を行った．

前報に報告した17種の酸性タール色素から東京化成㈱製のパテントブルーV(C.I. 42045)を除き，シグマ社製のパテントブルーV(C.I. 42051)と(C.I. 42045)を加え，同時に分析したときのクロマトグラムをFig. 5に示した．東京化成(株)製のパテントブルーV(C.I. 42045)と，シグマ社製のパテントブルーV(C.I. 42045)の保持時間は一致し，またシグマ社製の(C.I. 42051)と他の色素との分離は良好であった．

搬入された検体を毛糸染色法により色素を精製し，PCで分析したがパテントブルーV(C.I. 42051)を,ii)iii)の展開溶媒で展開したときのRfはB 1と近似しており両者の判別が難しいため，HPLCで分析した．その結果，試料から検出された色素はパテントブルーV(C.I. 42051)と判定でき同時にY 4も同定出来た．この時のクロマトグラムをFig. 6に示した．

4．Y 4使用の疑義がもたれた清涼菓子

平成元年10月都内保健所より着色料としてR 102，Y

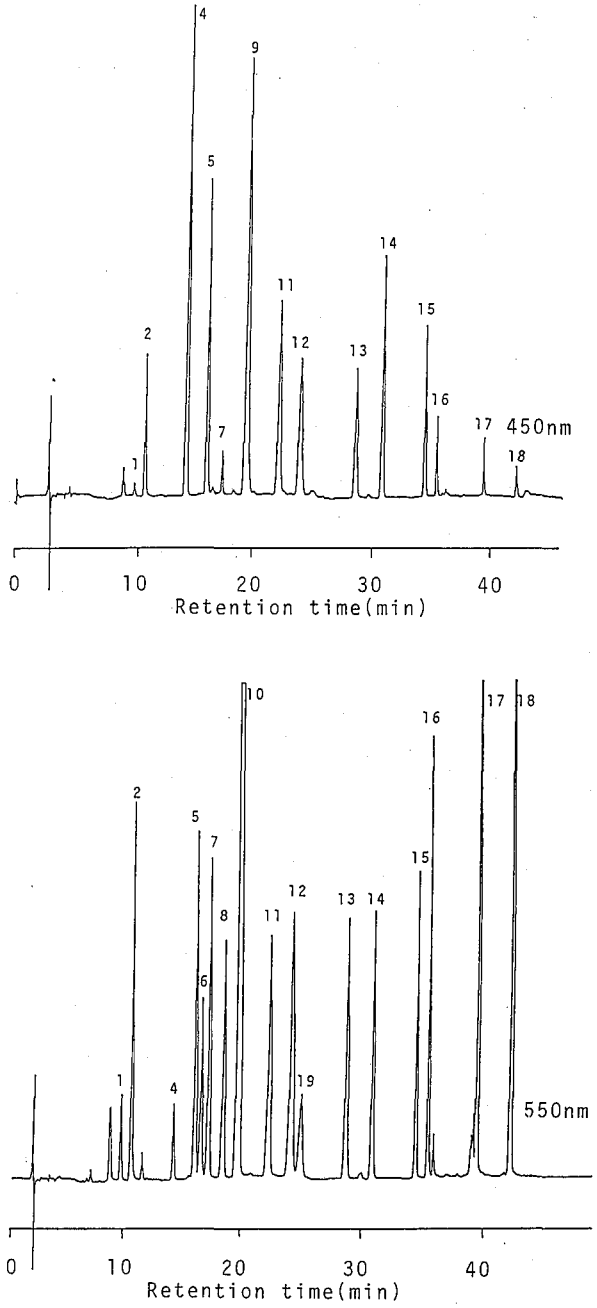


Fig. 5. Chromatograms of 18 Food Color Standards on HPLC

Operating conditions were same as described in Fig. 1.

Food colors: 19, patent blue V (C. I. 42051). Other food colors were same as described in Fig. 2.

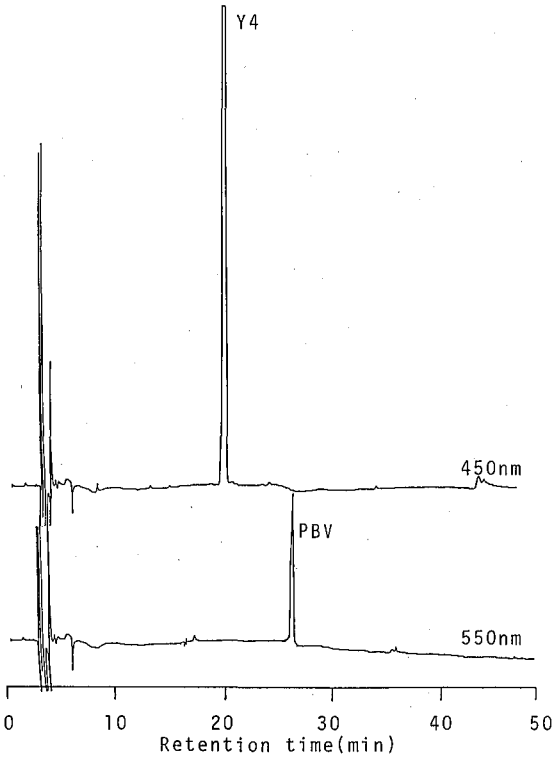


Fig. 6. Chromatograms of Food Colors Extracted from Commercial Candy on HPLC

Operating conditions were same as described in Fig. 1.

5使用の表示があるが他にY 4使用の疑いがあるとして清涼菓子が搬入された．毛糸染色法により色素を精製し，PCで分析したところ，クロマトグラム上にY 4のRfと近似するRfをもつ黄色のスポットが認められた．しかしながらiii)の展開溶媒で展開したときのスポットが不明確なこと，このスポットがアンモニア蒸気で変色し赤色を帯びることの2点について考慮するとY 4以外の色素の可能性が示唆された．確認のため毛糸染色法により調製した試験溶液をHPLCで分析したところクロマトグラム上に未知のピークが認められたが，Y 4と一致するピークは認められなかった．また前処理法としてポリアミド法[6]や前報で報告セップパック NH_2法[1]を用いた場合PCのクロマトグラム上のこのスポットが出現しないことから，この検体に使用されているY 5あるいはR 102が毛糸染色法の操作の途中で何等かの反応を起こしY 4類似のスポットが出現したものと考えられる．加藤ら[7]は還元漂白剤が使用されている毛糸を用いた場合，

R102またはY 5は弱い還元をうけるか，重亜硫酸塩が付加することにより黄色の未知色素を出現することを報告しており，本件はその1例であると考えられる．

5．毛ガニラーメン(即席中華麺)からのR102の検出

平成元年6月食品機動監視班が収去した検体の毛ガニラーメンを毛糸染色法により分析したところ，ペーパークロマトグラム上にR102と類似する赤色スポットが認められたが，他の天然成分の影響を受け判定が困難であった．HPLCで分析したところ，これらの天然色素とも分離できこの色素はR102であることが確認された．これは毛ガニを着色するため，または色調を増すために使用されたものとみられ表示違反として処分された．

ま と め

食品機動監視班あるいは保健所から色素の検査のため搬入された検体のうち，許可外色素と思われる色素及びPCで判定の困難な色素について，前報で報告したHPLCを応用して確認した事例について報告した．その結果，HPLCは食品に使用されている色素の有用な確認の手段として応用できることが判った．

前回HPLCで未検討であったキノリンエローとパテントブルーV(C．I．42051)についても同一条件で分析したところ，他の17種の酸性タール色素との分離は良好であり，キノリンエローのような混合物の色素の判定にも極めて有効であった．

文 献

1) 石川ふさ子，斉藤和夫，中里光男他：東京衛研年報**41**，101-107，1990.
2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，351-368，1980，金原出版株式会社，東京.
3) Compagnon, P. A., Becart, A., Deleuze, C., Lo Gatto, V.: *Analusis*, **16**, 428-433, 1988.
4) Masiala-Tsolo, C., Gelbcke, M., Dumont, L., Parmentier, F., Grimee, R.: *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **91**, 227-235, 1982.
5) Perdih, Anton and Ekar, Igor: *Z. Lebensm. Unters.-Farsch.*, **163**, 100-103, 1977.
6) 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.
7) 加藤クニ，中岡正吉，福井昭三：神奈川県衛研報告，**7**，63-65，1977.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 147-151, 1991

化学物質及び自然毒による食中毒等事件例(第8報)*
—平成2年度—

真木俊夫**, 観公子**, 橋本秀樹**, 川合由華**, 永山敏廣**,
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 (VIII)
—1990—

TOSHIO MAKI**, KIMIKO KAN**, HIDEKI HASHIMOTO**, YUKA KAWAI**, TOSHIHIRO NAGAYAMA**,
MAKI KOBAYASHI**, HIROKO SHIODA** and TAICHIRO NISHIMA**

Keywords：化学性食中毒 chemical food poisoning, グルタミン酸モノナトリウム monosodium glutamate, 里芋 taro, ゴルゴンゾラチーズ gorgonzola cheese, フグ pufferfish, スモークサーモン smoked salmon, 異臭 offensive smell

著者らは前報[1~5]において都内で発生した化学性食中毒事件を報告してきた.

今回は平成2年度に起きた化学物質による食中毒等事例8件, 自然毒による事例1件について報告し, 今後の食中毒発生防止の為の参考に供する. 表1.に事例の概要をまとめて示した.

1. ワンタンによる有症苦情事例

事件の概要 平成2年6月 某中華料理店からワンタン等を出前注文し, 喫食した9名のうち6名が15~25分後から顔, 手足, 全身の痺れを訴え管轄の保健所に届出た.

①試 料 喫食したワンタン及びその汁の残品.

②原因物質の検索 出前注文したメニューは, ワンタン, ソース焼きソバ, 五目焼ソバ, 焼飯であった. 6名の食中毒様症状は中国飯店症候群(CRS)に酷似していた. 直ちに残品のワンタン及びその汁についてグルタミン酸モノナトリウム(MSG)の分析を試み, ワンタンから5.5%, 汁から6.6%を得た.

③考 察 9名は某貸スタジオにいた若者達で, 昼食に中華料理を喫食し今回の事件に遭遇した. 調理人は中

表1. 平成2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2年6月	6/9	ワンタン	グルタミン酸モノナトリウム
2.	6月	1/1	芋がら(ずいき)	シュウ酸カルシウム
3.	6月	1/2	ゴルゴンゾラチーズ	不明
4.	12月	3/5	フグ	フグ毒
5.	同3年1月	4/4	スモークサーモン	硝酸イオン
6.	同2年8月	14/19	飲料水	残留塩素他
	8月	1/2	焼きガレイ	鮮度低下
	12月	2/2	ムキガレイ	鮮度低下
	12月	1/1	ゆでガニ	鮮度低下

*第7報, 東京衛研年報**41**, 108-112, 1990.

**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

華料理にMGSを小さじ山盛り一杯を加えたと言っているが，分析結果や症状から判断しても，かなりのMSGが使われたと推定される．しかし9名全員が発症しなかったのには，出前料理の喫食量からMSGの摂取量が異なったことと，ヒトに対する感受性の違いがあったからと思われる．

昭和46年に都内で味付昆布によるCRS事件が多発[6,7]した．この時の調査でCRSが発症する一般量は3－5gと推定された．しかしMSGの摂取量と発症量に関係が見られたものの，発症にはかなりの個体差が観察された．全く症状を発現しないヒトもいたが，特にアルコールに強いヒトはCRSにかかりにくいことが分かった[7]．またkenneyら[8]は人種間でも差がみられ，特に黒人は白人に比べ発症しにくいと述べている．日本人の食事パターンは年々変化し，外食嗜好が増加している．料理によっては知らぬまにMSGの過剰摂取もあり得ることから，その安全性が懸念される事件であった．

2．芋がらによる有症苦情事例

事件の概要　平成2年6月　都下の某土産店で芋がらを購入し，翌朝から調理した本人が味見をしたところ，口の中に強い刺激が認められた．あわてて吐き出したが夕方になっても上顎，喉の奥に痛みが残った．芋がらに薬品が使われたのではないかと保健所に届けられた．

①試　料　里芋のずいき

②原因物質の検索　搬入された残品はビニール袋に入ったずいきであった．柄の色は青緑を帯びていたが，外観的にはかび等が生えている様子はなく，また有毒植物に類似する茎でもなかった．今回訴えた症状は，一般に里芋を喫食した時によく聞かれ，これはシュウ酸カルシウム結晶が関与していると言われている．そこでこのずいきの細胞を検鏡したところ，多数のシュウ酸カルシウム針状結晶を認めた．さらにHPLCによるずいきの浸出液の分析を行い，シュウ酸カルシウムを検出した．

③考　察　サトイモ科植物は強いえぐ味を呈することが知られている．このえぐ味は舌や食道粘膜に刺激を与えるためで，この原因はシュウ酸カルシウム結晶によると言われている．しかし欧米では里芋は食用にされず，観賞用に栽培されているにすぎないのでこの種の事件はあまり見られない．

里芋のずいきは赤色と青色の二種類が存在するが，特においしく食べられるのは赤みを帯びた方で，青色は野生種に近くえぐ味が多く食用に向かない[9]．このえぐ味を取り除くには長時間水にさらすか，湯でこぼしがよいとされている．苦情者も10分程度湯でこぼしを行ったが，えぐ味は完全に取りきれなかった．そこで我々も苦情者と同様な湯でこぼしを行い，検鏡とHPLCでシュウ酸カルシウム結晶を確認してみた．細胞内には相当量の結晶が認められ，浸出液中のシュウ酸カルシウム量にもバラツキが見られた．従来から言われているように容易に結晶が取り除けないことが分かった．今回食用に不向きな青いずいきが土産店で販売されていたことは，注意するべきことであり，また短時間の湯でこぼしでは，えぐ味を充分に取り除くことができず，この種の苦情が再発する可能性を示唆した．

3．ゴルゴンゾラチーズによる有症苦情事例

事件の概要　平成2年6月　某デパート食品売り場で購入したチーズを19時頃，2名が喫食し，1名が1時間後に臀部のかゆみ，下痢を呈し，さらに1時間後に全身の発疹がみられた．明朝，医師の診察を受けたが38度程の発熱があった．湿疹は昼までに消失したが，このチーズが原因ではないかと保健所に届出があった．

①試　料　喫食したゴルゴンゾラチーズ残品及び同ロット参考品．

②原因物質の検索　チーズ以外に喫食したものは，冷や奴，ホールウィート乾パン及びワインである．全身の発疹がみられたので，不揮発性腐敗アミンの分析を行った．その結果，残品及び参考品からヒスタミンそれぞれ7.4mg%; 61mg%，カダベリン210mg%; 15mg%，スペルミジン5 mg%未満；5.9mg%，チラミン290mg%；440mg%，プトレシン110mg%; 7.8mg%及び揮発性塩基窒素(VBN)110mg%; 150mg%が得られた．

①考　察　チーズによる食中毒は，チーズの発酵工程中に生成するチラミンが原因の一つになっている．我が国では極めてまれであるが，欧米では要注意とされている．これは食習慣の違いからチーズの摂取量に起因するものと思われる．通常，このチラミンは体内でモノアミン酸化酵素(MAO)により分解され，パラヒドロキシ酢酸となって尿中へ排泄されるので，チラミンの影響はさほど問題にならない．だがMAO作用阻害剤の薬物を服用中の患者が，時にチーズを喫食すると含有していたチラミンの作用で血圧上昇をもたらし食中毒様症状を呈する．健常者は100～400mg，NAO服用患者では6 mg以上のチラミンで血圧上昇が見られると報告されている[10]．得られた値は，市販のゴルゴンゾラチーズの173mg%[10]程度と比較しても正常範囲内と思われ，直ちに血圧上昇等に関与しているとは考えにくかった．しかし，その他のアミン類も検出されていることなので，チラミンがどの様に作用するのか，今後の調査に待たな

ければならない．今回訴えた症状は血圧上昇に直接関係するものではなかったが，苦情者がMAO阻害薬物の服用者でないこと，またこれに似た先天的な体質でもないこと等総合的に判断してチラミンが原因であるとは立証しにくい事例であった．

4．フグによる食中毒事例

事件の概要 平成2年12月 患者ら2名は千葉県沖でショウサイフグを35匹釣り，帰宅後，患者本人が調理をし，同日夕方から5名でフグちりを食べた．肝を喫食した3名は口，手指の痺れを訴え，夜9時頃から容体が悪化し救急車で病院に収容された．2名の症状は軽く翌日退院したが，1名は重症で危篤状態におちいった．事件に関与した警察から管轄の保健所へ通報があった．

①試 料 加熱済フグ残品，身と内臓の混ぜ合わせ．

②原因物質の検索 患者の中毒症状はフグ様食中毒であった．残品はいかにも素人が調理したという雑な扱いであった．直ちにフグ毒検査を開始し，加熱済フグ残品から4.0MU/g，身と内臓の混ぜ合わせから233MU/gのフグ毒を検出した．

③考 察 患者は肝を喫食した父親と息子及び同僚の3名であった．残りの2名は肝を食べていなかったため，特に典型的なフグ中毒症状は発現しなかった．入院した2名は肝の喫食量が少なかったらしく，翌日退院した．父親は心肺機能が一時停止し，脳死に近い状態におちいったが，病院側の懸命な治療の結果一命は取り止めた．ほとんどのフグの肝には高濃度のテトロドトキシンが含有されている．このことは一般の人にも精通していることと思われるが，肝は珍味と言って口にする人が多い．また素人が調理するケースもたびたび見られ，毎年全国的に事件が多発し死亡者まで出ている[11]．肝を喫食する等無謀な事件であった．

5．スモークサーモンによる有症苦情事例

事件の概要 平成3年1月 某レストランにて会食した4名が食事最中から気分が悪くなり，嘔吐，下痢，腹痛，舌と喉の奥がしびれたり，目がちかちかしたりする症状を呈し，4名とも救急車で二病院に分かれ入院した．

①試 料 スモークサーモン残品，ドレッシング，マヨネーズ参考品が搬入された．

②原因物質の検索 会食のメニューはスモークサーモン，ポタージュスープ，牛肉の赤ワイン煮込み，里芋，ニンジン，ホウレンソウ，アンコウのソテー，アイスクリーム，コーヒー及びパンであった．4名全員が喫食したのはスモークサーモンとポタージュスープだけであった．次のメニューが運ばれないうちに食中毒症状を呈した．そこで原因はスモークサーモンかポタージュスープのいずれかと思われた．スープはカボチャを材料にしたもので，特に，これ以外の材料は使われていなかったので，第一段階でスモークサーモンを検査することにした．舌や喉の奥に刺激やしびれを認めていることから，サーモンを燻煙した時に発生するフェノール類の刺激性物質の可能性が考えられた．しかし，これらの化合物はGC-MSによる検索からでも認められなかった．さらに原因追求のためにレストラン内の調査が行われた．その結果，このレストランでサーモンに硝酸カリウムを使用していることが判明した．直ちに残品中の硝酸イオンの分析を試みた．硝酸イオンは銅カドミウム還元カラムを装着したフローインジェクション分析機を用いて定量した．硝酸イオン1,270 μg/g，亜硝酸イオン2 μg/g未満であった．なお，搬入されたドレッシング及びマヨネーズ中の酸価は0.2，過酸化物価は1未満であった．

③考 察 事件に関与したスモークサーモンは自家製の燻煙を行っていた．この魚は1匹3.4kgのアキサケを3枚におろし，砂糖，塩等と共に硝酸カリウム水溶液に漬け，その後，約10時間かけて燻煙を行い発色効果をねらったものと思われる．搬入されたスモークサーモンにはその効果があったとは言いがたい色合いであった．しかし魚への硝酸カリウム使用は許可されていない．幸い硝酸カリウムの毒性は比較的低い．ヒトの急性中毒は1回に1g以上で，時には悪心，嘔吐，腹痛等の症状が見られると報告されている[12]．分析結果から推定すると急性中毒量に達するには，魚を1人1kg喫食しなければならない．患者らの喫食量が不明であったので直接の原因が硝酸イオンであったかどうか判断し難い事件であった．なお，この事件は硝酸カリウムの不正使用ということで取り締まられた．

6．その他の有症苦情事例

事件の概要 事例－1：平成2年8月 某飲食店で昼食を取った社員19名のうち14名が，下痢，腹痛及び発熱等の食中毒様症状を呈した．調査を進めていくうちに，患者らが勤務するビルで使用している高架水槽中の残留塩素が検出されないことが現場での検査で判明した．この飲料水が原因ではないかと検体の搬入があった．

事例－2：同年8月 食品小売店から2枚入り「焼きガレイ」パック詰めを購入し，同日の夕食時に母親が子供に食べさせるため少量喫食したところ，味がおかしく舌を刺すようであった．帰宅した主人も少量食べたが同様に異常を認めた．母親は食後1時間から胃痛，下痢，吐気の症状を呈した．その後，手足のかゆみを伴った．

事例－３：同年12月　近所のスーパーでムキガレイ切り身(２切れ)を購入し，帰宅後，切り身を水洗いし醤油で10分間煮付けてから，17時頃母親と子供で喫食したところ，２人とも喉がえぐられる様な苦味を呈した．販売した店員にも喫食してもらったところ，同様に苦味を認めた．その後，苦情者らは大学病院で受診した．帰宅後21時頃に嘔吐があった．翌朝，唇が膨らみ，さらには翌々朝に水様性下痢があった．半切れを喫食した子供は翌朝，顔がむくみ，唇が膨れ，下唇の中央が裂け出血していた．このムキガレイがおかしいのではないかと保健所に届出た．

事件－４：同年12月　某スーパーでゆでガニ(ズワイ)を購入し，そのまま11日間冷凍保存して置いたものを，喫食前日に解凍し，大根サラダ，玉子焼き，吸い物，おしんこ等と喫食したところ，５時間後から嘔吐，腹痛及び下痢症状を呈した．

①試　料　事例－１は高架水槽，２階給湯室からの飲料水，事例－２は焼きガレイ残品と販売店から収去した参考品，事例－３はムキガレイ切り身残品，魚屋でパックされた切り身参考品，魚屋でフィレーの状態で保管されていた参考品，事例－４は前日より解凍したゆでガニ

②原因物質の検索　事例－１は現場での検査で残留塩素が検出されないことが分かった．高架水槽の管理が悪いことも考えられたので，高架水槽から採取した水と２階給湯室の水について飲料水の理化学試験の項について検査を行った．臭，味とも異常はなかった．色度はそれぞれ７；７，濁度は１；１，pH は7.4; 7.4であった．塩素イオン24.3; 24.2ppm，過マンガン酸カリウム消費量は1.5mg/１; 1.4mg/1，亜硝酸性及び硝酸性窒素の総計は1.0ppm; 残留塩素は0.1ppm 以下であった．事例－２の焼きガレイ残品はすでに腐敗臭を認めた．VBN は残品64mg%，参考品14mg%と参考品に比較してかなり高い値を示した．しかし，プトレシン，カダベリン，スペルミジン，チラミン及びヒスタミンは検出されなかった．事例－３はムキガレイの切り身残品は微に腐敗臭を認めた．他の搬入品は異常がなかった．VBN は82mg%，参考品は43mg%; 43mg%，pH は７；７，塩分は0.3; 0.3; 0.3%，油脂分は23; 15; 15%，ワックスは検出限界以下，酸価は42.7; 48.1; 63.3，過酸化物価は41; 23; 11であった．ヒスタミン及び不揮発性腐敗アミンはいずれからも検出されなかった．事例－４の外観は異常がなかったものの臭にやや鮮度低下臭を認めた．VBN は19.9mg%であった．

③考　察　事例－１の高架水槽及び２階と給湯室から採取した水は，いずれも色度が基準を超えて７を示した．さらに残留塩素は0.1ppm 以下でその管理に問題があったが，この事件は同時に喫食した食品から細菌が検出され，飲料水，食品ともずさんな管理体制による事例であった．なお，この事件は細菌による食中毒事件として取り扱われた．事例－２の焼きガレイは販売店で焼いたもので，苦情者は購入して直ちに喫食し味の異常を訴えた．販売される前から腐敗が始まっていたと思われ，販売店での保存状態に問題があったと推察される．事例－３のムキガレイは販売した魚屋が冬期に約６kg のメロを仕入れた一部である．このメロはマゼランアイナメ，フォークランドアイナメ，メロハタを指す場合があり，この魚種を特定するのは難しい．しかし，これらは刺身，煮付け，塩焼にして喫食すると美味であるという．その後の調査からこの魚はブルーコットである旨，販売元の某漁業会社から回答があった．小売店が販売していたムキガレイはブルーコットと推定された．しかし，この魚の油脂分，ワックス分とも正常範囲内でワックスの多い有毒魚には相当しなかった．販売時における保存に原因があったと推定される．事例－４は冷蔵庫が普及した時代とはいっても，購入した生ものを11日間も冷凍保存しておくというのは，理由はともあれ衛生学的見地からみても余りにも冷蔵庫を過信する苦情事件であった．

本報告は，平成２年に起きた化学性食中毒等のうち１．ワンタン及びその汁による有症苦情　２．芋がらによる有症苦情　３．ゴルゴンゾラチーズによる有症苦情　４．フグによる食中毒　５．スモークサーモンによる有症苦情　６．その他の有症苦情の９事例を取り上げた．これらの調査は衛生局生活衛生部食品保健課，各関連の保健所と協力して実施したものである．

文　献

1) 真木俊夫，観　公子，永山敏廣，飯田真美，二島太一郎・東京衛研年報，**37**，163-165，1986.
2) 真木俊夫，観　公子，永山敏廣，飯田真美，二島太一郎・東京衛研年報　**38**，229-232，1987.
3) 真木俊夫，観　公子，永山敏廣，飯田真美，川合由華，二島太一郎：東京衛研年報　**39**，126-129，1988.
4) 真木俊夫，観　公子，永山敏廣，飯田真美，川合由華，二島太一郎：東京衛研年報　**40**，163-168，1989.
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：東京衛研年報　**41**，108-112，1990.

6) 西垣　進，田村行弘，山田　洋ら：東京衛研年報，**23**，205-210，1971.
7) 西垣　進，田村行弘，真木俊夫ら：東京衛研年報，**23**，211-216，1971.
8) Kenney, R. A., Tidball, C. S.: *Am. J. Clinical Nutr.* **25**, 140-146, 1972.
9) 高嶋四郎：原色日本野菜図鑑，119，1982，保育社，東京.
10) 竹葉和江，村上文子，松本昌雄，中澤裕之：食品衛生学雑誌　**31**，137-143，1990.
11) 全国食中毒事件録：厚生省生活衛生局食品保健課編
12) 新村壽夫：食品添加物の生化学と安全性，271，1979，地人書館，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 152-161, 1991

輸入食品中の放射能濃度(第2報*)
―平成2年度―

観　公子**, 真木俊夫**, 橋本秀樹**, 川合由華**,
永山敏廣**, 小林麻紀**, 塩田寛子**, 二島太一郎**

Radioactive Contamination in Imported Foods (II)
—Apr. 1990～Mar. 1991—

KIMIKO KAN**, TOSHIO MAKI**, HIDEKI HASHIMOTO**,
YUKA KAWAI**, TOSHIHIRO NAGAYAMA**, 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, 核種比 nuclide ratio, 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

緒　言

チェルノブイリ事故から5年が経過したが，放射能汚染の食品への影響は続いている．我が国においても，放射能汚染のため厚生省から積み戻しを命ぜられた輸入食品は後を断たない．平成2年度には3件(アルバニア産ハーブ茶，ユーゴスラビア産乾燥きのこ，フランス産ミックススパイス)あった[1]．事故後の4年間を比較すると放射能で汚染された食品の積み戻しは徐々に減少しているが，世界の汚染状況をみると，まだ汚染食品が完全に無くなったわけではない．検疫所のチェックの網にかからなければ国内に流通してしまう恐れもある．

また，今までに厚生省の積み戻し命令を受けたものの中には，原産国がチェルノブイリ事故の影響の少ないブラジル，香港からのものがあった．これは原料を輸入し加工するとそこが原産国となることから，輸出入を通じて放射能汚染食品は世界中に分布する結果になっている．今後，この様な放射能汚染のほとんどない国から輸入される放射能汚染食品についても注意しなければならない．また，規制の無い放射能汚染飼料，土壌，肥料の輸入により，栽培される国内の食品汚染も懸念されるところである．

著者らは前報[2]において都内に流通していた輸入食品の放射能汚染実態調査を行い，放射能汚染食品を排除し，食の安全性を確保してきた．前報[2]では昭和63年度及び平成元年度における放射能濃度について報告したが，本報では平成2年度における輸入食品の放射能濃度について報告する．

実験方法

1．試　料

1990年4月から1991年3月までに東京都内に流通していた輸入食品等339試料を検査した．

2．器具及び装置

前報[2]に従った．

3．試料の調整

前報[2]に従った．

4．分析方法

前報[2]に従った．

ただし測定時間については，放射能の検出限界値として最低50Bq/Kgを確保するため300gに満たない試料は1時間測定した．また放射能濃度の値については，各試料の重量及び測定時間から算出し，シンチレーションディテクタの定量限界値以上を数値化した．

結果及び考察

1．放射能汚染状況

＊東京衛研年報，**41**，113-118，1990.

＊＊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

都内に流通していた輸入食品等339試料について，放射能濃度を測定した結果，50Bq/Kgを超えたものは7試料であり，厚生省の暫定基準値370Bq/Kg以上を超えるものはなかった．

2．放射能検出状況

1)放射能濃度別

放射能濃度別による試料数及び検出率を表1に示した．

表1．放射能濃度別による検出試料数及び検出率

放射能濃度(Bq/Kg)	検出試料数	検出率(%)
0～ 50	332	97.9
51～100	4	1.2
101～200	3	0.9
計	339	100

放射能濃度が51～100Bq/Kgのものが4試料(1.2%)，101～200Bq/Kgのものが3試料(0.9%)であった．また，201Bq/Kg以上のものはなく，50Bq/Kg以下のものは332試料で総試料の97.9%を占めていた．

50Bq/Kgを超えた試料数は昭和63年度の16試料(3.2%)，平成元年度の9試料(2.1%)と比較すると平成2年度は7試料(2.1%)と事故からの経過に伴い，試料数は減少していたが，検出率においての減少はなかった．

このことは，今後も，50Bq/Kgを超えて検出される試料の割合はあまり変化がなく，統計的に横ばい傾向がつづくものと予想される．

2)食品群別

食品群別による検出状況を表2に，検査総試料の食品群別割合を図1に示した．

食品を14群に分類して見ると，50Bq/Kgを超えて検出されたものは香辛料・ハーブ類群の6試料でこれは，香辛料・ハーブ類群の7.9%，総試料の1.8%を占めていた．また，50Bq/Kgを超えた試料数は平成元年度と同様6試料であったが，検出率は平成元年度の10.3%から7.9%に減少していた．

検査数では香辛料・ハーブ類群は前報[2]でも検出率が高く，監視の強化を行ったため総試料の22.4%と一番多く検査を行った．

香辛料・ハーブ類群以外で検出されたものは野菜・果実加工品群の1試料(野菜類群の2.0%，総試料の0.3%)であった．

放射能を測定したセシウムは化学的にアルカリ金属に属し，カリウムと同属体で植物にとって必須元素である．

表2．食品群別の試料数と検出数*及びその検出率

	食品群	試料数	検出数*	検出率(%)
1	香辛料・ハーブ類	76	6	7.9
2	野菜・果実・加工品	50	1	2.0
3	食肉・食肉製品	34	0	0
4	菓子類	33	0	0
5	乳・乳製品	26	0	0
6	蜂蜜	24	0	0
7	穀類	20	0	0
8	ナッツ類	18	0	0
9	酒類	10	0	0
10	魚介・加工品	10	0	0
11	ジャム・マーマレード類	10	0	0
12	油脂類	2	0	0
13	調味料	3	0	0
14	その他	23	0	0
計		339	7	2.1

*：^{134}Csおよび^{137}Csの放射能濃度の合計が50Bq/Kgを超えた試料数

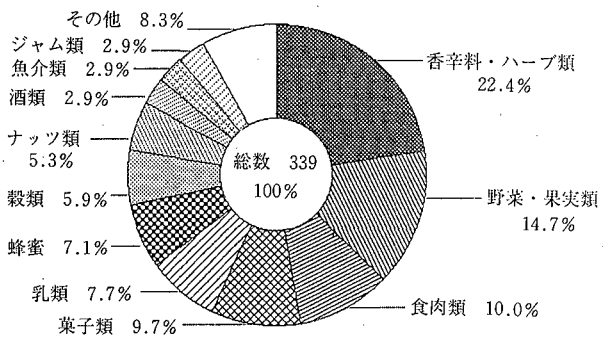


図1．放射能検査試料の食品群別割合

カリウムは植物にとって重要な元素でありながら，土壌中に欠乏しやすいためセシウム汚染された場合はセシウムがカリウムと同じ様な挙動を示しセシウムの植物への蓄積に関与するのではないかと考えられている[3]．

ここに検出された試料は，香辛料・ハーブ類，野菜類といずれも植物体であるため，放射能の環境汚染によりカリウムと共に吸収されたセシウムに起因するものと考える．また，これらは乾燥品のため重量当りの濃度が高くなって検出されたものと考える．

また，香辛料は高度な殺菌技術[4]で殺菌を行い，乾燥

状態で保存されるものが多く，長期保存が可能なことから，高濃度放射能汚染された香辛料は，現在も汚染地域の倉庫に貯蔵されている可能性がある．それらが少しずつ汚染の少ないものと混ぜられて暫定基準値以下に薄められていることも考えられる．

前報[2]で暫定基準値370Bq/Kgを超えて検出された食肉製品や51Bq/Kg以上の検出があった蜂蜜，ジャム類，ナッツは，今回の調査ではいずれも50Bq/Kg以下であった．

しかし，人間の食料として不適格と判定された食品が家蓄の飼料となることや，汚染草木，実，苔，汚染動物等を食料としている野生動物の筋肉にはセシウムの蓄積が十分考えられることから，食肉類においても今後，監視する必要があるものと考える．

3)原産国別

原産国別による検査状況を表3に示した．

50Bq/Kgを超えて検出されたものの原産国はギリシャとドイツが各2試料，フランスが1試料であった．

ギリシャとドイツは前報[2]においても検出率は高く，フランスも共に放射能汚染地域とされている．原産国不明の試料が2試料あるが，これは香辛料のセイジであることからセイジの分布[5]しているヨーロッパ南部，特に原産の地中海地域からのものと考えられる．

図2に検査試料の国別割合を，図3に50Bq/Kgを超えた試料の国別割合を示した．

総試料の15.9%を検査したフランスからのものは，50Bq/Kgを超えた試料の14.3%を占めて検出されており，総試料の6.8%を検査したドイツ産及びギリシャ産のものは各々検出試料の28.6%を占めていた．

前述したように，ブラジルや香港からの放射能汚染食品が積み戻しされていることから放射能汚染分布の広がりも予想されたため，放射能汚染のほとんどないアメリカや中国のものも各々総数の14.2%，7.1%と比較的多く検査を行ったが，いずれの国からも50Bq/Kgを超え

表3．国別による測定試料数と検出数*

原産国名	試料数	検出数*	原産国名	試料数	検出数*
フランス	54	1	アルゼンチン	3	0
アメリカ	48	0	イギリス	3	0
ドイツ	23	2	フィリピン	3	0
中　国	24	0	モロッコ	3	0
スイス	14	0	イスラエル	2	0
スペイン	14	0	インドネシア	2	0
オランダ	13	0	エジプト	2	0
デンマーク	11	0	ノルウェー	2	0
ニュージーランド	9	0	パキスタン	2	0
カナダ	8	0	ブルガリア	2	0
トルコ	7	0	アルバニア	1	0
イタリア	6	0	イラン	1	0
オーストラリア	5	0	キプロス	1	0
ギリシャ	5	2	スウェーデン	1	0
タイ	5	0	スリランカ	1	0
インド	4	0	スーダン	1	0
オーストリア	4	0	チリ	1	0
チェコスロバキア	4	0	ポルトガル	1	0
ハンガリー	4	0	ミャンマー	1	0
フィンランド	4	0	メキシコ	1	0
ベルギー	4	0	ユーゴスラビア	1	0
マレーシア	4	0	台　湾	1	0
日　本	4	0	不明	25	2

*：^{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

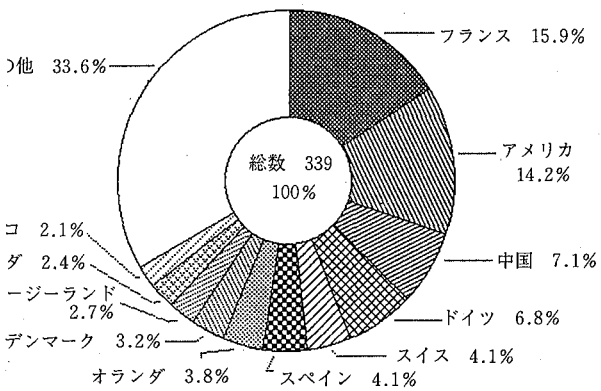


図2．放射能検査試料の国別割合

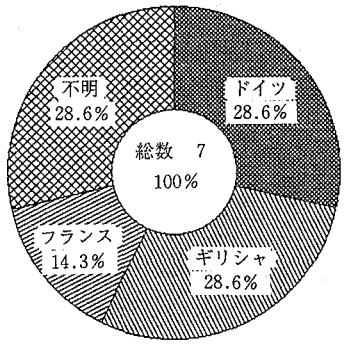


図3．放射能濃度が50Bq/Kgを超えた試料の国別割合

て検出されたものはなかった．

4)放射能濃度が50 Bq/Kgを超えて検出された試料

放射能濃度が50Bq/Kgを超えて検出された試料の内訳を表4に示した．核種の検出値は当研究室でスクリーニング検査を行い，100Bq/Kgを超えたものについて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．

50Bq/Kgを超えた試料はリンデン，セイジ，レモンバーム，オレガノ，モリーユ(アミガサダケ)の5種7試料であった．きのこの1試料以外は6試料全てが香辛料，ハーブであった．

セシウムの放射能濃度が最も高く検出されたのはリンデンの178Bq/Kgで，次にセイジの156Bq/Kgであった．これらハーブや香辛料は食事からの摂取量を考えると直ちに健康に影響するとは考えられにくい．

ポーランドではチェルノブイリ事故後，きのこのセシウム蓄積性を生物濃縮汚染の指標として調査したこともある[6]．我が国においても，野生のきのこについて調査した報告[7]があるが，それによるとチェルノブイリ事故から4年後の野生きのこから高濃度のセシウムが検出されている．このようにきのこには放射能の環境汚染でその僅かな成長期間内にセシウムを大量に吸収することが判明している．従ってここに検出されたきのこは放射能の汚染地域から採集されたものであったと考える．また，今回測定したきのこは乾燥物のため重量当りの濃度が高まったものと考える．

香辛料，ハーブについては本報の2)食品群別で述べたようなことが考えられた．

5)放射能核種セシウム-134(^{134}Cs)とセシウム-137(^{137}Cs)の比

表4からセシウム(Cs)の放射能核種をみると，事故直後の^{134}Csと^{137}Csの割合は1：2であったところが，4年後の1990年では1：9となっていた．半減期から考えると当然であるが年々^{134}Csの割合は小さくなってくるものと思われる．しかし，放射能半減期の計算式[8]から計算すると4年後では^{134}Csと^{137}Csの割合はおよそ1：8となるはずであるが，ここに1：9となったのは

表4．放射能濃度が50Bq/Kgを超えた試料の内訳と検出値

No	品名	検出値(Bq/Kg)			原産国	製造または輸入年月日
		^{134}Cs+^{137}Cs	^{134}Cs	^{137}Cs		
1	リンデン	178	18	160	ドイツ	90.04.20
2	セイジ	156	16	140	不明	89.04.19
3	セイジ	101	10	91	不明	89.11.24
4	レモンバーム	91	9	82	ドイツ	90.08.06
5	オレガノ	89			ギリシャ	90.04.23
6	モリーユ(アミガサタケ)	73			フランス	90.12.11
7	セイジ	53			ギリシャ	90.03.20

表5．放射能濃度が30Bq/Kg以上50Bq/Kg以下の試料

No	品名	検出値(Bq/Kg) $^{134}Cs+^{137}Cs$	原産国	製造または輸入年月日
1	ローレル	39	不明	90.03.19
2	セボリー	36	アルバニア	89.08.24
3	チョコレート	34	スイス	不明
4	セイジ	30	ギリシャ	不明
5	シナモン	30	中国	不明
6	ペパーミント	30	ブルガリア	90.05.11
7	ハイビスカス	30	ドイツ	89.11.24

チェルノブイリ事故以前の核実験等により環境が汚染され残留していた半減期約30年の ^{137}Cs が加算された結果によるものと考える．この様に ^{137}Cs の半減期は長いので今後も食品への影響は続くものと考える．

50Bq/Kgを超えて検出された原試料及び同種試料を写真1から5に示した．

6)放射能濃度が30Bq/Kg以上50Bq/Kg以下の試料

放射能濃度が30Bq/Kg以上50Bq/Kg以下の試料の内訳を表5に示した．

消費者らは放射能の人体への影響を懸念し，できるだけ放射能汚染のない食品を望んでいるところから，著者らは50Bq/Kg以下についても測定を行い検出限界値までの値を示した．

放射能濃度が30Bq/Kgから50Bq/Kgの試料は高濃度順にローレル，セボリー，チョコレート，セイジ，シナモン，ペパーミント，ハイビスカスの7試料であった．ここにおいても，香辛料，ハーブがほとんどでチョコレート1試料を除いた6試料全てがそれであった．

チョコレートは原料として使われた脱脂粉乳が放射能汚染されていたものと考える．

ま と め

1990年4月から1991年3月までに都内で流通していた輸入食品等339試料について放射能濃度を調査した．放射能濃度が50Bq/Kgを超えて検出された試料は7試料(2.1%)であったが，暫定限度値370Bq/Kgを超えて検出されたものはなかった．

検出頻度の高い食品群は香辛料・ハーブ類であり，原産国はギリシャ，ドイツ，フランスであった．50Bq/Kgを超えて検出された試料は，香辛料，ハーブが6試料，きのこが1試料であった．検出されたセシウムの核種割合は ^{134}Cs：^{137}Cs の比が1：9であった．

放射能濃度が30Bq/Kgから50Bq/Kgの試料は香辛料，ハーブが6試料，チョコレートが1試料であった．

平成2年度における食品中の放射能濃度を測定し，その実態を明らかにしたが，放射能汚染食品の検出頻度の減少に伴い，検疫所の監視が緩和されると汚染食品が国内に流通する可能性も考えられることから，今後も都内での監視は続けるべきと考える．

また，日本に輸入されている放射能汚染土壌(ピートモス)でカイワレダイコンを栽培し，セシウムの高濃度移行が確かめられている[9]ことや，蓄産に必要な飼料はほとんどが輸入である[10]ことを考えると，汚染土壌や飼料で生産される国内産の農蓄産物についても放射能濃度測定を行っていく必要があると考える．

写真の説明

1．リンデン	LINDEN
2．セイジ	SAGE
3．レモンバーム	LEMONBALM
4．オレガノ	OREGANO
5．モリーユ（アミガサダケ）	MORILLES

文 献

1) 放射能暫定限度を超える輸入食品の発見について(第31報)，厚生省生活衛生局食品保健課事務連絡，平成3年3月13日．

2) 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：東京衛研年報，**41**，113-118，1990.

3) 小出裕章：たべはかニュース，NO 2，4-6，1989，たべものの放射能をはかる会，京都．

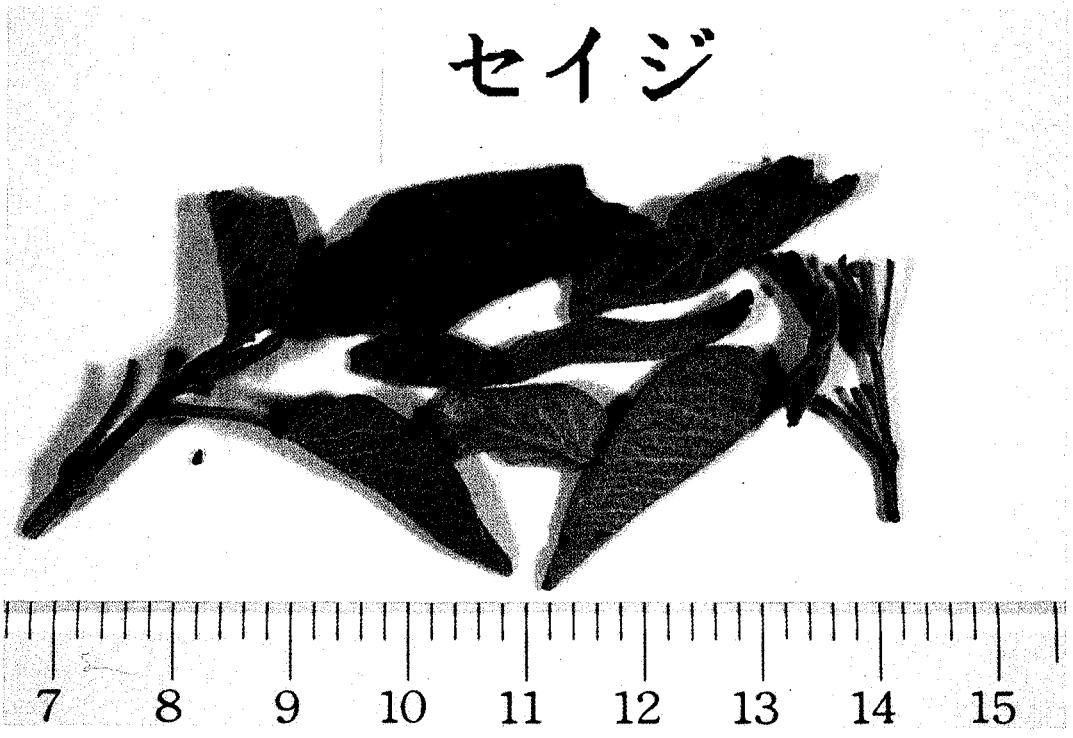
4) 食品と開発，**25**(4)，23-29，1990，㈱健康産業新聞社．

5) 住江金之，小原哲二郎：原色食品図鑑，260，1975，建帛社，東京．

6) John K. Korky, Ludowik Kowaiki：*J. Agric. Fd.*

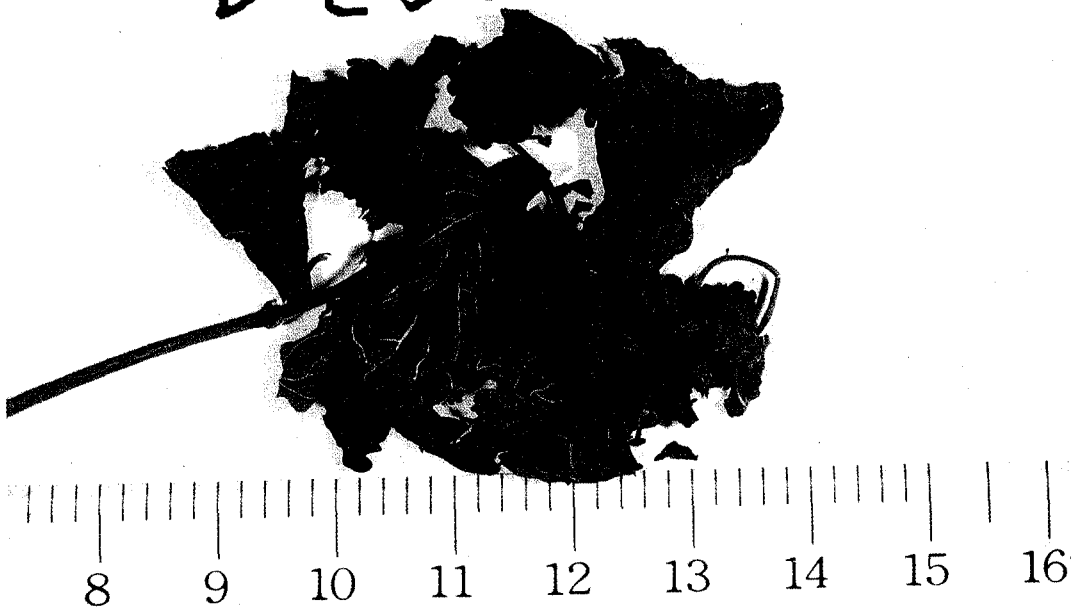
Chem., **37**, 568-569, 1989.
7) 食品放射能測定データー報告，弘前大学環境医学研究会，1990.
8) 伊藤和夫，河村文夫，北原一太他：放射性同位元素の科学－基礎と応用－，27-29，1985，廣川書店，東京.
9) 食卓にあがった死の灰 パート3，38-40，1988，原子力資料情報室，東京.
10) 宮本伸昭：蓄産の研究，**37**(1)，161-168，1983.

1



2

レモンバーム

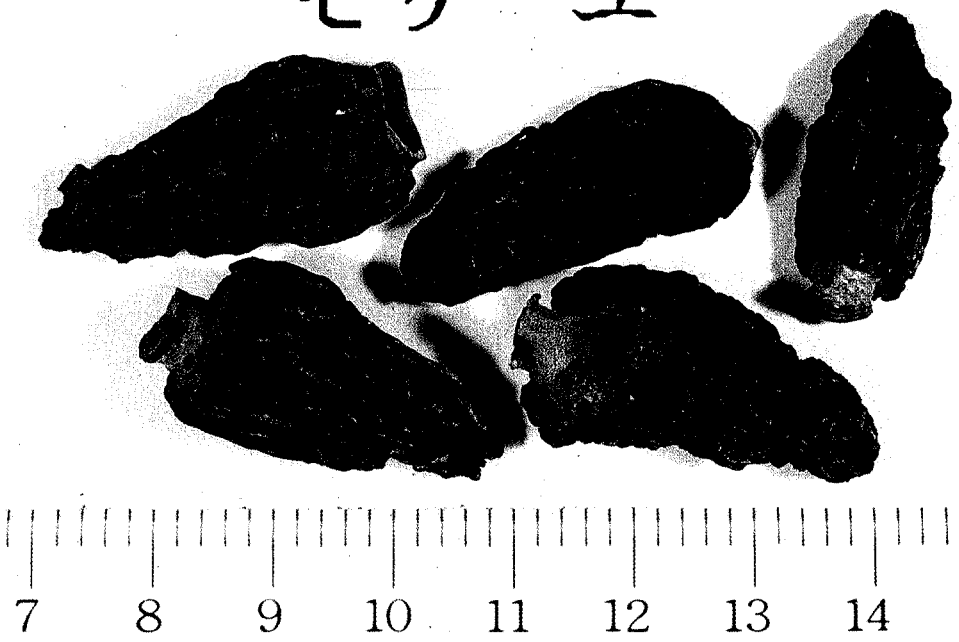


3

オレガノ

4

モリーユ



東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 163-169, 1991

食品製造用酵素製剤の品質実態調査(第1報)
酵素活性の測定及び有機副剤の分析

広門雅子*, 平田恵子*, 中島和雄*
植松洋子*, 松井敬子*, 風間成孔*

Survey on Quality of Enzyme Preparations Used in Food Processing (I)
Measurement of Enzyme Activities and Analysis of Organic Subsidiaries in Enzyme Preparations

MASAKO HIROKADO*, KEIKO HIRATA*, KAZUO NAKAJIMA*, YOKO UEMATSU*, KEIKO MATSUI* and MASAYOSHI KAZAMA*

Keywords：酵素製剤 enzyme preparations, アミラーゼ amylase, プロテアーゼ protease, リパーゼ lypase, 酵素活性 enzyme activity, 溶剤 solvent, 単糖類 monosaccharide, 二糖類 disaccharide

緒　言

酵素は古くから清酒や味噌などの製造に利用されている天然添加物である．近年，科学技術の進歩により種々の改良が加えられた酵素，ニューバイオテクノロジーを応用した固定化酵素及び遺伝子組替え酵素などの多くの酵素が食品製造用に開発されてきている．厚生省によって，一昨年表示のための天然添加物リストが作成され，65品目の酵素が収載されたが，公的な品質規格は全く設定されていない．

我々は成分規格を作成するための基礎資料とするため市販品について酵素活性力の試験及び副剤(酵素活性力の均一化及び製剤の形態を形成させるために添加されるもの)の分析を行ったのでその結果を報告する．

実験の部

Ⅰ．試料：都食品機動監視班が平成2年度に酵素製剤製造メーカーから買い上げたもの及び任意に提出されたもので，その内訳はアミラーゼ15種，プロテアーゼ18種，リパーゼ5種，セルラーゼ5種及びシクロデキストリングルコシルトランスフェラーゼ1種の計44検体である．

Ⅱ．試薬及び試液

1．可溶性デンプン：メルク社製　**2．**バレイショデンプン：日本薬局方品　**3．**乳製カゼイン：Hammarsten(メルク社製)　**4．**オリーブ油：日本薬局方品　**5．**ソモギ試液：衛生試験法注解に記載された方法[1]で作成した．**6．**ブドウ糖標準原液：ブドウ糖約1gを正確に量り，105℃で6時間乾燥し，その減量を測定した．その無水物5gに対応するブドウ糖を正確に量り，水を加えて溶かし正確に1,000mlとし，ブドウ糖標準原液とした．**7．**0.5%可溶性デンプン溶液：あらかじめ可溶性デンプン約2gを精密に量り，105℃で4時間乾燥し，その減量を測定した．その乾燥物1gに対応する可溶性デンプンを正確に量り，少量の水に懸濁し，約100mlの沸騰水中に徐々に加えた後，5分間煮沸し冷却した．冷後，表1に示した各試料の試験条件に従って最適pHに調整し，水を加えて200mlとした．**8．**1%バレイショデンプン溶液：改訂かぜ薬・解熱鎮痛薬試験法[2](以後薬審法と呼ぶ)に従って調製した．**9．**フォリン試薬(フェノール試薬)：タンパク質測定用(関東化学製)　**10．**チロジン標準溶液：チロジン標準品(和光純薬製)を105℃で3時間乾燥し，その0.5gを正確に量り，0.2N塩酸溶液を加えて溶かし500mlとした．その液1～4mlを正確に量り，それぞれ0.2N塩酸溶液を加えて正確に100mlとした．(この液1ml中に，チロジン10～40μgを含む)　**11．**ポリビニルアルコール：ポバールNo. 117(クラレ製)　**12．**他の試液は全て日本薬局方及び社内規格に従って調製し，試薬はJIS特級品を用いた．

Ⅲ．装置及び条件

1．ガスクロマトグラフ：島津GC-15A(検出器FID)　**2．**液体クロマトグラフ：ポンプ;日本分光880-PU，システムコントローラー;日本分光802-SC，オートサンプ

＊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, Hyakuninchо 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

表1．アミラーゼのデンプン糖化力及び糊精化力試験条件

検体番号	メーカー名	酵素名	実施試験条件 デンプン糖化力 pH	温度	時間(min)	方法*1	実施試験条件 デンプン糊精化力 pH	温度	時間(min)	方法	社内規格の試験条件 デンプン糖化力 pH	温度	時間(min)	方法*1	社内規格の試験条件 デンプン糊精化力 pH	温度	時間(min)	方法
1	N	α-アミラーゼ	5.0	37	60	a	6.0	40	10	b								
2	N	α-アミラーゼ	5.0	37	60	a	6.0	40	10	b					6.0	40	10	b
3	N	α-アミラーゼ	5.0	37	60	a	6.0	40	10	b					6.0	40	10	b
4	A	α-アミラーゼ	5.0	37	60	a	6.0	40	10	b					6.0	40	10	b
5	Y	α-アミラーゼ	5.0	37	60	a	6.0	40	10	b					6.0			Y社*2
6	V	α-アミラーゼ	5.0	37	60	a	5.6	40	10	b					5.6	37	60	V社
7	V	α-アミラーゼ	5.0	37	60	a	5.6	40	10	b					5.6	37	60	V社
8	S	α-アミラーゼ	5.0	37	60	a	6.0	40	10	b	5.0	37	10	S社				
9	Y	β-アミラーゼ	4.5	37	60	a	6.0	40	10	b	4.5	40	60	Y社				
10	A	グルコアミラーゼ	5.0	40	60	a	5.0	40	10	b	5.0	40	30	A社	5.0	40	10	b
11	A	グルコアミラーゼ	4.5	40	60	a	6.0	40	10	b	4.5	40	30	A社				
12	S	アミラーゼ(各種混合)	5.0	37	60	a	5.0	40	経時	c	5.0	40	20	S社	5.0	40	経時	c
13	S	アミラーゼ(各種混合)	5.0	37	60	a	5.0	40	経時	c	5.0	40	20	S社	5.0	40	経時	c
14	V	アミラーゼ，プロテアーゼ	5.0	37	60	a	6.0	40	10	b								
15	V	グルコアミラーゼ，プルラナーゼ	5.0	37	60	a	6.0	40	10	b								

*1：酵素反応終了後の還元糖の測定方法には，ソモギ法とフェーリング法の2法があるが，a法及びY社の方法はソモギ法を，S社及びA社の方法はフェーリング法を採用している．

*2：低分子化に伴って低下するデンプンの粘度を測定する液化力試験法

ラー；日本分光851-AS，検出器；示差屈折計 SE-51(昭和電工) **3．** 紫外可視分光光度計：島津 UV-240 **4．** ウオーターバスインキュベーター：ヤマト BT-23 **5．** 窒素自動測定装置：ケルテック1030 **6．** カールフィッシャー水分測定装置：三菱化成 KF-01

Ⅳ．実験操作法

1．活性試験法

(1) アミラーゼのデンプン糖化力試験(a法)(デンプンにアミラーゼが作用するときグルコシド結合の切断に伴って増加する還元力を測定する．)

試料溶液の調製：試料に適量の水を加えて，濃度が0.1～0.5単位/mlになるように溶かし試料溶液とした．必要に応じ超音波抽出し濾過した．

操作法：試験管に可溶性デンプン溶液8mlをとり，40℃で10分間放置した後，試料溶液1mlを加え直ちに振り混ぜた．この液を40℃で正確に60分間放置したのち，これに水酸化ナトリウム試液1mlを加え，直ちに振り混ぜ検液とした．別の試験管(直径30mm)にソモギ試液5mlをとり，検液1mlを加え静かに混合し試験管の口にロートをのせ，沸騰水浴中で15分間加熱した後，直ちに水冷した．冷後2.5%ヨウ化カリウム溶液2mlを徐々に加え，2N硫酸2.5mlを素早く加え，よく攪拌し沈澱を完全に溶解した．5分後，0.005Nチオ硫酸ナトリウム溶液で0.5%デンプン試液1mlを指示薬として滴定し，測定値 V_T(ml)を求めた．別に空試験として試料溶液1mlを試験管に取り，水酸化ナトリウム試液1mlを加え，よく振り混ぜた後，可溶性でんぷん溶液8mlを加えてよく振り混ぜ，以下同様に操作して測定値 V_B

表2．市販アミラーゼのデンプン糖化力及び糊精化力試験結果及び有機態窒素の定量結果

検体番号	メーカー名	酵素名	基原	社内規格算定方式				統一算定方式		有機態窒素定量結果
				糖化力試験		糖精化力試験		糖化力試験結果 (U/g/min)*1	糊精化力試験結果 (U/g/min)*2	
				実験結果 (U/g)	社内規格値 (U/g)	実験結果 (U/g)	社内規格値			N(%)
1	N	α-アミラーゼ	細菌					300	6,700	0.3
2	N	α-アミラーゼ	細菌			26,000	30,000DUN/g	700	26,000	0.3
3	N	α-アミラーゼ	細菌			8,300	7,000DUN/g	400	8,300	0.1
4	A	α-アミラーゼ	細菌			7,000	10,000 U/g	300	7,000	0.1
5	Y	α-アミラーゼ	細菌				80,000 U/g	4,800	60,000	0.8
6	V	α-アミラーゼ	細菌				240,000 NU/g	700	34,000	0.9
7	V	α-アミラーゼ	細菌				60,000 NU/g	300	4,600	0.7
8	S	α-アミラーゼ	真菌	9,600	8,700-11,000			9,600	150,000	3.4
9	Y	β-アミラーゼ	細菌	670,000	700,000			11,000	180,000	4.3
10	A	グルコアミラーゼ	真菌	15,000	13,000	100,000	90,000 U/g	5,000	100,000	1.8
11	A	グルコアミラーゼ	真菌	3,000	4,200			1,000	3,800	1.3
12	S	アミラーゼ(各種混合)		150,000	40,000	98,000	40,000 U/g	2,500		1.8
13	S	アミラーゼ(各種混合)		150,000	40,000	94,000	40,000 U/g	2,500		1.8
14	V	アミラーゼ，プロテアーゼ	真菌					1,000	16,000	1.9
15	V	グルコ,プルラ	真菌					700	2,100	1.9

グルコ,プルラ：グルコアミラーゼ,プルラナーゼ

*1：1分間に1mgのブドウ糖に相当する還元力をもたらす酵素力をデンプン糖化力の1単位とする．

*2：1分間にバレイショデンプンのヨウ素呈色の青色1％を減少させる酵素力をデンプン糊精化力の1単位とする．

(ml)を求めた．

ブドウ糖検量線の作成：ブドウ糖標準原液2～10mlを正確に量り，水を加えてそれぞれ100mlとした．別の試験管にソモギ試液5mlをとり，各標準液1mlを加え静かに混合した．以下試料溶液と同様に操作し，測定値V_r(ml)を求めた．別に標準液1mlの代わりに水1mlを用いて同様に操作し，滴定値V_0(ml)を求めた．各標準液1ml中のブドウ糖量を横軸にとり，それぞれに対応する測定値差V_0-V_rを縦軸にとって検量線を作成し，測定値差1.00mlに対応するブドウ糖量(Fmg)を求めた．

本品1g中のデンプン糖化力は次式により求めた．

デンプン糖化力$=(V_B-V_T)\times F/6/W$(単位/g)

F：ブドウ糖検量線より求めた測定値差が1mlの時のブドウ糖量(mg)

W：試料採取量(g)/希釈倍数

(2) アミラーゼのデンプン糊精化力試験(デンプン中の直鎖成分のアミロースの低分子化に伴って減少するデンプンのヨウ素呈色の青色を測定する)

b法：薬審法[2]に従った．1分間にバレイショデンプンのヨウ素呈色の青色を1％減少させる酵素力を糊精化力の1単位とした．

c法：デンプン溶液10mlを試験管にとり，40℃の恒温槽に入れ予熱した後，あらかじめ40℃にあたためた試料溶液0.5mlを作用させ，その0.1mlずつを1分おきにピペットでとり，あらかじめヨウ素溶液10mlを入れた試験管に入れ，よく振り混ぜた後，波長670nmにおける透過率(T％)の中から66％に相当する反応時間(t)を比例計算により算出し，次式によりデンプン糊精化力を計算した．

デンプン糊精化力(U/g)$=600\times$希釈倍数/t

表3．市販プロテアーゼ中の有機態窒素の定量結果及び蛋白消化力試験の結果及び条件

検体番号	メーカー名	酵素名	基原	有機態窒素定量結果 N(%)	蛋白消化力試験結果 統一算定方式 (U/g/min)*1	蛋白消化力試験結果 社内算定方式 (U/g)*2	蛋白消化力 (社内規格値)	蛋白消化力試験条件 pH	温度	時間
1	V	アルカリ性プロテアーゼ	細菌	1.2	130,000	−	2.4AU/g	7.0	37	10
2	V	中性プロテアーゼ	細菌	0.7	28,000	−	0.5AU/g	7.0	37	10
3	Y	酸性プロテアーゼ	真菌	1.5	96,000	96,000	100,000 U/g	2.6	40	20
4	Y	アルカリ性プロテアーゼ	細菌	0.8	98,000	98,000	100,000 U/g	7.0	40	20
5	Y	中性プロテアーゼ	真菌	1.4	40,000	40,000	40,000 U/g	6.0	40	20
6	S	中性プロテアーゼ	真菌	2.1	51,000	51,000	48.000-62,000 U/g	6.0	37	10
7	N	アルカリ性プロテアーゼ	細菌	0.4	23,000	23,000	20,000 U/g	7.5	30	10
8	N	アルカリ性プロテアーゼ	真菌	3.4	51,000	51,000	50,000 U/g	7.5	30	10
9	N	酸性プロテアーゼ	真菌	0.5	30,000	30,000	20,000 U/g	3.0	30	10
10	N	アルカリ性プロテアーゼ	細菌	0.3	26,000	26,000	20,000 U/g	7.5	30	10
11	N	アルカリ性プロテアーゼ	細菌	0.1	11,000	11,000	10,000 U/g	7.5	30	10
12	A	酸性プロテアーゼ	真菌	3.5	50,000	8,000	7,000 U/g	3.0	37	60
13	A	アルカリ性プロテアーゼ	細菌	0.5	60,000	9,000	10,000 U/g	7.0	37	60
14	A	酸性プロテアーゼ	真菌	5.3	39,000	6,000	5,500 U/g	3.0	37	60
15	A	アルカリ性プロテアーゼ	細菌	0.7	63,000	10,000	10,000 U/g	10.0	37	60
16	A	アルカリ性プロテアーゼ	真菌	3.1	72,000	11,000	10,000 U/g	7.0	37	60
17	A	中性プロテアーゼ	細菌	4.5	1,100,000	170,000	150,000 U/g	7.0	37	60
18	A	パパイン	植物	2.3	490,000	490,000	400,000 U/g	8.0	37	10

*1：検体1−17はa方式，18はc方式

*2：検体3−11はa方式，12−17はb方式，18はc方式

a方式：乳製カゼインを分解して1分間に1 μgのチロジンに相当する非タンパク性のフォリン呈色物質を生成する蛋白消化力を1単位とする

b方式：乳製カゼインを分解して60分間に反応ろ液1 ml中にチロジン100 μgに相当する非タンパク性のフォリン呈色物質を生成する蛋白消化力を1単位とする

c方式：乳製カゼインを分解して1分間に1 μgのチロジンに相当するアミノ酸を生成する蛋白消化力を1単位とする

(3) プロテアーゼの蛋白消化力試験

pH，温度，反応時間は表3の条件を用い，実験操作は薬審法[2]に準じて行った．

(4) リパーゼの脂肪消化力試験

pH，温度，反応時間は表4の条件を用い，実験操作は薬審法[2]に準じて行った．

2．有機態窒素定量法：総窒素量からアンモニウム態窒素量を差し引いて求めた．

総窒素定量法：試料1 gをとり，食品添加物公定書中のケールダール法[3]に従って分解し試料液を調製した．窒素約10mg以下に対応する量の試料液をとり，自動窒素測定装置を用いて定量した．

アンモニウム態窒素定量法：蒸留法[4]を用いた．

3．溶剤の分析法：ガスクロマトグラフ法[5]を用いた．

4．糖の定量法：液体クロマトグラフ法[6]を用いた．

結果及び考察

Ⅰ．酵素活性試験 デンプン，蛋白質，脂肪の三大栄養素の分解にかかわる酵素であるアミラーゼ，プロテアーゼ及びリパーゼについて検討した．

1．アミラーゼ活性試験 アミラーゼの活性試験法には還元力の増加を測定する糖化力法(a法)，デンプンのヨウ素呈色の減少を測定する糊精化力法(b，c法)，粘度の減少を測定する液化法がある[7]．表1に示したように，α-アミラーゼにはほとんどのメーカーが糊精化力法を採用していた．これはα-アミラーゼがデンプンをランダムに切断し，グルコース重合度が2ケ～6ケのオリゴ糖を生成するためと考えられる．一方β-アミラーゼはマルトース単位に，グルコアミラーゼはグルコース単位に分解することから，主として糖化力が用いられていた．液化力法はY社のα-アミラーゼ1検体のみに用いられていた．混合製品には糖化力及び糊精化力の両方が用いられていた．

(1) 糖化力試験法の検討及び結果

①試験法の検討 社内規格の試験法を分析し，統一試験法を検討した．基質には1％バレイショデンプンと可溶性デンプンの2種類が用いられていた．試料液の場合は両者の間に差はみられなかったが，空試験液では差がみられ，可溶性デンプンの0.5％の濃度のものが最もバ

表4．市販リパーゼ中の有機態窒素の定量結果及び脂肪消化力試験の結果及び条件

検体番号	メーカー名	酵素名	基原	有機態窒素定量結果 N(%)	脂肪消化力試験結果 統一算定方式 (U/g/min)*1	脂肪消化力試験結果 社内算定方式 (U/g)*2	脂肪消化力 (社内規格値)	脂肪消化力試験条件 pH	温度	時間
1	N	リパーゼ	真菌	0.8	9,300	550,000	500,000 U/g	7.0	37	60
2	A	リパーゼ	真菌	7.4	38,000		150,000FIPU/g	7.0	37	30
3	A	リパーゼ	真菌	1.3	3,900	39,000	40,000 U/g	6.0	37	30

*1：全てa方式　　*2：検体1はb方式，検体3はc方式

a方式：オリーブ油を分解して1分間に1 μMの脂肪酸を遊離する脂肪消化力を1単位とする．

b方式：オリーブ油を分解して60分間に1 μMの脂肪酸（オレイン酸として）を遊離する脂肪消化力を1単位とする．

c方式：オリーブ油を分解して1分間に1 μMの脂肪酸を遊離する脂肪消化力を10単位とする．

ラツキが少なく，基質には0.5%可溶性デンプン溶液が良好であることが判った．

反応時間はメーカー毎に異なっていた(表1)．反応時間について検討したところ，10～60分の範囲で定量性を示すことが判ったので，操作誤差を少なくするため及び試料中に賦形剤として添加される還元糖の影響をできるだけ少なくするために，反応時間を60分と長く設定するのが良いと考えた．

酵素反応により還元糖が生成するが，この還元糖の測定法としてはフェーリング法及びソモギ法が用いられていた．フェーリング法を採用しているメーカーが多かったが，チオ硫酸ナトリウム溶液滴定の終末点の判定し易さを比較するとソモギ法が良好であった．衛生試験法中の還元糖の定量法にもソモギ法が採用されていることから，この方法が良好と考えた．

活性力単位の表現方法は各社まちまちであった．「1分間に1 mgのブドウ糖に相当する還元力をもたらす酵素力」をデンプンの糖化力の1単位とする考え方はわかりやすく，これを統一単位として採用した．

②結果　表2に糖化力試験の結果を統一算定方式で算出し，統一単位で示した．また社内規格があるものは，社内規格算定方式で算出し併記した．検体12及び13番以外は社内規格値にほぼ近い値を示した．検体12及び13番の測定値は15万単位で，社内規格値の4万単位よりはるかに高い値を示した．メーカーに確認したところ，この4万単位は最低値を示したものであることが判った．α-アミラーゼのうち，糖化力が4,800単位(検体5)，9,600単位(検体8)と高い値のものがあったが，これらにはβ-アミラーゼやグルコアミラーゼが混在していると考えられる．

(2) 糊精化力試験の検討及び結果

①試験法の検討　pH，温度，時間，方法は糖化力試験法以上に各社まちまちであった(表1)．薬審法(b法)[2]と同様の方法を用いているメーカーがあった．この方法は簡便であるため，統一試験法として用い，pHの変化は反応に影響があると考えられるので社内規格条件を用い，試料の希釈溶液も同様に社内規格条件に従うのがよいと考えた．しかし，このb法は空試験値のバラツキが大きかったことから，さらに検討が必要である．S社の方法(c法)はb法の反応10分後の溶液の吸光度を測定する方法とは全く異なり，1分おきに得られた透過率の中から66%に相当する反応時間を算出する方法であるが，b法よりやや簡便であるので，この方法も含めFAO/WHO規格[8]及びFCC規格[10]の試験法とともに検討したい．

②結果　測定値を統一算定方式で算出し，表2に統一単位で示した．一方，社内規格のあるものは社内規格算定方式の値を表2に併記した．ほとんどの検体は社内規格値にほぼ近い値を示した．S社の検体12及び13の結果は社内規格値4万単位に比べはるかに高い値(98,000単位，94,000単位)を示したが，この4万単位は活性力の最低値であることが判った．統一算定方式で結果を比較すると糖化力の高い検体(5，8，9，10)は糊精化力も高かった．従って，これらの検体は酵素含量が高いと考えられる．

2．プロテアーゼの蛋白消化力試験の条件及び結果

統一試験法を作るに先立って，各社の社内規格を検討した．一社を除き，ほとんどのメーカーは薬審法[2]に記載されたカゼイン-フォリン比色法を採用していた．しかし，表3に示したように，pH，温度，反応時間などの測定条件及び活性力単位の表現方法は各社により異なっていた．そこで試験方法は社内規格に従い，力価算定には統一方式として薬審法[2]を用い，また各社算定方式でも算出した．統一方式で1,100～1,100,000単位と幅広い値が得られた．また大部分が社内規格値にほぼ近い値を示した(表3)．

表5．市販酵素製剤中の副剤の分析結果

酵素の種類	形状	検体数	水分	溶剤*1	単糖及び二糖*2
アミラーゼ	液体	6	41.9～73.9%(6)	Gly 1%(1)	ショ糖8.8～17.3%(3) 果糖10.4%(1) ソルビット31.8%(1)
	粉末	9			乳糖65.8～66.3%(2) ブドウ糖18.5～31.3%(3) 麦芽糖6.4%(1)
プロテアーゼ	液体	2	41.3～46.7%(2)	Gly 45.9%(1)	ソルビット35%
	粉末	16			乳糖49.3～69.7%(3) ブドウ糖10.9～47.9%(4) 麦芽糖6.4%～10.0%(2)
リパーゼ	液体	2	53.1～62.5%(2)	Gly 40.3%(1)	
	粉末	3		PG 13.6%(1)	ブドウ糖17.2～51.5%(3) ソルビット20.9%(1)
セルラーゼ	粉末	5			乳糖85.8～91.2%(2) ブドウ糖31.3～39.8%(2) 麦芽糖7.7%(1)
シクロデキストリングルコシルトランスフェラーゼ	液体	1	81.7%(1)	EtOH 6.7%(1)	

( ) 内の数字は検体数　Gly：グリセリン　PG：プロピレングリコール
*1：PG>0.1%　Gly>1%　*2：5%以上

今後は統一試験法の設定に向けて，薬審法[2]，FAO/WHO規格[9]及びFCC規格[10]を参考にして検討したい．

3．リパーゼの脂肪消化力試験の条件及び結果

統一試験法を作るに先立って，各社の社内規格を検討した．ほとんどのメーカーは薬審法[2]に準じた方法を採用していた．測定条件及び活性力単位の表現方法は各社毎に異なっていた(表4)ので，蛋白消化力試験と同様の方式で測定したところ，統一方式で3,900～38,000単位を示し，大部分が社内規格値に近似していた(表4)．

Ⅱ．有機態窒素　酵素は蛋白質から成るため，窒素含量から酵素含量を概略知ることが出来るのではないかと考え，有機態窒素の含量(総窒素量からアンモニウム態窒素量を差し引く)を測定した．その結果は活性試験の結果と共に表2，3，4に示した．含量の最高はα-アミラーゼで4.3%(検体9)，プロテアーゼでは5.3%(検体14)，リパーゼでは7.4%(検体2)で，蛋白質に換算すると各々約26%，32%，44%であった．有機態窒素含量と酵素活性力の値を比較したところ，アミラーゼ及びリパーゼでは窒素含量が最も高いものが，酵素活性力が最も高かった．しかしプロテアーゼでは，窒素含量の最も高いものの活性力は低く，窒素量と活性力の間に全く相関は見られなかった．アミラーゼ及びリパーゼでも全体的には高い相関はなかった．通常は，酵素の含量と活性力の間には相関があると考えられるので，相関のない理由として，窒素含有有機物(微生物培養の栄養源として使われる大豆蛋白や脱脂大豆糟など)の残留の可能性が考えられる．

Ⅲ．副剤　天然添加物には主剤の機能を安定化させたり，効力を均一にするために，種々の副剤(食品添加物及び食品原材料)が添加されると言われているので有機副剤について分析を行った．その結果を表5に示した．なお無機副剤については第2報[4]で報告する．

1．水及び溶剤　液体製品11検体中，全てに水が41.3～81.7%，3検体にグリセリンが1～45.9%，1検体にプロピレングリコールが13.6%，1検体にエタノールが6.7%含まれ，水の含量が最も多かった．食品添加物であるグリセリン及びプロピレングリコールは，製剤の保存性を高める作用もある．これらは製剤への表示が必要であるが，検査した製品にはこれらの表示が全くなかった．

2．糖類　液体製品の場合，11検体中，3検体にショ糖が8.8～17.3%，1検体に単糖が10.4%，2検体にソルビットが31.8～35%含まれていた．この場合のソルビットは溶剤の目的で使用されていると考えられる．粉末製品については，33検体中，7検体に乳糖が49.3～91.2%，12検体にブドウ糖が10.9～47.9%，4検体に麦芽糖が6.4～10.2%，1検体にソルビットが20.9%含まれ，乳糖の含量が最も多かった．ソルビット以外の糖類は，酵素の効力を均一化するために添加された希釈剤であるが，食品原材料に分類されているため製剤への表示は必要ないとされている．しかし，ソルビットには表示が義務付けられているが，検査した製品には表示がなかった．

まとめ

市販の酵素製剤の品質の実態を把握する目的で市販アミラーゼ，プロテアーゼ，リパーゼの酵素活性力の試験及び有機副剤の分析を行った．

1．活性試験の統一試験法を作るに先だって社内規格を検討したところ，α-アミラーゼには主として糊精化力法が，β-アミラーゼ及びグルコアミラーゼには糖化力法が採用されていた．またプロテアーゼには主としてカゼイン-フォリン比色法が用いられていた．市販品について活性試験を行ったところ，大部分が社内規格値にほぼ近い値を示した．一部社内規格値が製品の活性力よりかなり低く設定されていたが，やはり規格値は製品の効力に近い値を設定すべきだと考える．

2．アミラーゼの場合には試験条件及び試験法とも統一出来る可能性があることが判った．プロテアーゼの場合には酸性，中性，アルカリ性に分けた試験法の作成が可能であると考えられる．従って今後薬審法[2]，FAO/WHO規格[8,9]，FCC規格[10]などを参考に統一試験法を検討したい．

3．有機副剤を分析した結果，粉末製品には乳糖が最も多く使用されていた．液体製品に溶剤として食品添加物のグリセリン，プロピレングリコール，ソルビットが使用されていたが，製品にはこれらの副剤の表示が全くなかった．今後製剤への表示を徹底させるべきだと考える．

謝辞：本調査を実施するに当り試料収集にご協力いただいた食品機動監視班の皆様に深謝致します．

文献

1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，311～313，1990，金原出版㈱，東京
2) 日本公定書協会編：改訂かぜ薬・解熱鎮痛薬試験法［付録］坐薬中の解熱鎮痛薬の定量，221～247，1986 薬業時報社，東京
3) 日本食品添加物協会編：第5版食品添加物公定書，1986，日本食品添加物協会，東京
4) 安野哲子，荻野周三，小関正道，栗原裕子：東京衛研年報，**42**，170-175，1991
5) 植松洋子，広門雅子，平田恵子，中島和雄，松井敬子，風間成孔：東京衛研年報，**40**，183-186，1989
6) 中島和雄，広門雅子，平田恵子，植松洋子，松井敬子，風間成孔：東京衛研年報，**40**，175-177，1989
7) 赤堀四郎：酵素研究法2，108-135，1956，朝倉書房
8) Joint FAO/WHO expert committee of food additives; Specifications for identity and purity: *FAO Food and Nutrition Paper*, **19**, 229-252, 1981
9) Joint FAO/WHO expert committee of food additives; Specifications for identity and purity of certain food additives: *FAO Food and Nutrition Paper*, **38**, 291-295, 1988
10) Committee on codex specifications: *Food Chemicals Codex*, Third Edition, 479-499, 1981, National Academy Press.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **42**, 170-175, 1991

食品製造用酵素製剤の品質実態調査(第2報*)
製剤中の無機塩類及び不純物の分析

安野哲子**, 荻野周三**, 小関正道**
栗原裕子**, 風間成孔**

Survey on Quality of Enzyme Preparations Used in Food Processing (II) Determination of Inorganic Salts, Heavy Metals, Arsenic and Boron in Enzyme Preparations

TETSUKO YASUNO**, SHUZO OGINO**, MASAMICHI KOSEKI**, YUKO KURIHARA**
and MASAYOSHI KAZAMA**

Keywords：酵素製剤 enzyme preparations, 食品添加物 food additives, 無機塩類 inorganic salts, 重金属 heavy metals, 鉛 lead, ヒ素 arsenic, ホウ素 boron

緒　言

食品製造用酵素製剤は，添加物として食品の製造や加工に多用されているにもかかわらず，わが国ではまだ規格が制定されていないこともあって，品質の実態が明らかでない．そこで食品製造用酵素製剤を分析して，食品添加物としての品質の実態を調査した．本報では，製剤中の無機塩類と有害性不純物について結果を報告する．

無機塩類は，微生物を基原として酵素を製造するときの培地成分や，酵素の分離精製時の塩析剤，沈澱剤に使用される[1-6]．また，酵素の安定剤，賦活剤，賦形剤などの目的で，製剤に配合されることも多い[7,8]．この無機塩類については，強熱残留物[9]を測定して全体量の目安としたほか，カルシウム塩，マグネシウム塩，リン酸塩，アンモニウム塩，塩化物を分析して，酵素製造用剤の残留と，配合添加物の表示の適否について検討した．一方，有害性不純物については，原材料や製造装置などに由来するものとして，重金属，鉛，ヒ素，ホウ素[10]を分析して，製剤の純度を把握した．

実験の部

1．試料　平成2年度に東京都衛生局食品環境指導センターより送付された44検体を試料とした(表1)．

2．試薬　和光純薬工業㈱製の試薬特級品を用いた．

3．標準液　カルシウム，マグネシウム，リン標準混液：関東化学㈱製原子吸光分析用カルシウム，マグネシウム，リン各標準原液(各1,000ppm)1.00mlに塩酸溶液(1→4)10mlを加え，水で正確に100mlとした(カルシウム，マグネシウム，リンの各10 μg/ml混液)．

塩素イオン標準液：塩化ナトリウムを用い，塩化ナトリウム濃度2，4，6，8 μg/mlの水溶液列を調製して，これを塩素イオン標準液とした．

鉛標準液：関東化学㈱製の原子吸光分析用鉛標準液(1,000ppm)1.00mlに塩酸溶液(1→4)10mlを加え，水で正確に100mlとした(鉛10 μg/ml)．

ホウ素標準液：関東化学㈱製原子吸光分析用ホウ素標準原液(1,000ppm)1.00mlに塩酸溶液(1→4)10mlを加え，水で正確に100mlとした(ホウ素10 μg/ml)．

4．装置及び条件　誘導結合プラズマ(以下ICPと略す)発光分析装置：Thermo Jarrell Ash社製 PolyScan 61ESS，高周波出力; 1,150W，検液導入速度; 100RPM，ネブライザー圧; 30PSI，プラズマ観測高さ; 15mm，分析線; カルシウム317.933nm マグネシウム279.078nm リン214.914nm 鉛220.353nm ホウ素249.773nm，イオンクロマトグラフ：Dionex社製4000i，カラム; AG4A(4×50mm)＋AS4A(4×250mm)，サプレッサー; AMMS，溶

＊第1報，東京衛研年報，**42**，163-169，1991.

＊＊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

表1．酵素製剤試料

試料 No.	酵素及び他の配合添加物	メーカー	基 原	性 状
1	α-アミラーゼ	A社	*A. oryzae*	淡褐色粉末
2	α-アミラーゼ	B社	*B. subtilis*	白色粉末
3	α-アミラーゼ	C社	*B. licheniformis*	黒褐色液体
4	α-アミラーゼ	C社	*B. subtilis*	黒褐色液体
5	α-アミラーゼ，炭酸カルシウム5.0%	D社	*Bacillus*	白色粉末
6	α-アミラーゼ，硫酸カルシウム35%	E社	細菌	類白色粉末
7	α-アミラーゼ，炭酸カルシウム20%	E社	細菌	類白色粉末
8	α-アミラーゼ	E社	細菌	褐色液体
9	β-アミラーゼ	B社	*B. subtilis*	淡褐色粉末
10	各種アミラーゼ	A社		淡黄色粉末
11	各種アミラーゼ	A社		淡黄色粉末
12	グルコアミラーゼ	D社	*Aspergillus*	淡褐色粉末
13	グルコアミラーゼ	D社	*Aspergillus*	褐色液体
14	アミラーゼ，プロテアーゼ	C社	糸状菌	黒褐色液体
15	グルコアミラーゼ，プルラナーゼ	C社	*A. niger*	黄褐色液体
16	プロテアーゼ	A社	*A. oryzae*	淡褐色粉末
17	プロテアーゼ	B社	*A. niger*	淡褐色粉末
18	プロテアーゼ	B社	*B. subtilis*	淡褐色粉末
19	プロテアーゼ	B社	*A. oryzae*	淡褐色粉末
20	プロテアーゼ	C社	*B. subtilis*	黒褐色液体
21	プロテアーゼ	C社	*B. licheniformis*	黒褐色液体
22	プロテアーゼ	D社	*Rhizopus*	淡褐色粉末
23	プロテアーゼ	D社	*Aspergillus*	淡黄色粉末
24	プロテアーゼ	D社	*Aspergillus*	淡褐色粉末
25	プロテアーゼ	D社	*Bacillus*	淡黄色粉末
26	プロテアーゼ，硫酸カルシウム17%	D社	*Bacillus*	類白色粉末
27	プロテアーゼ	D社	*Bacillus*	淡褐色粉末
28	プロテアーゼ	E社	糸状菌	淡褐色粉末
29	プロテアーゼ	E社	糸状菌	淡褐色粉末
30	プロテアーゼ，炭酸カルシウム20%	E社	細菌	類白色粉末
31	プロテアーゼ	E社	細菌	淡褐色粉末
32	プロテアーゼ	E社	細菌	類白色粉末
33	パパイン	D社		類白色粉末
34	リパーゼ	C社	*A. niger*	黒褐色液体
35	リパーゼ	C社	*M. miehei*	褐色液体
36	リパーゼ	D社	*Aspergillus*	淡褐色粉末
37	リパーゼ	D社	*Rhizopus*	淡褐色粉末
38	リパーゼ	E社		淡褐色粉末
39	セルラーゼ	B社		淡褐色粉末
40	セルラーゼ	B社		類白色粉末
41	セルラーゼ	B社	*A. niger*	淡黄色粉末
42	セルラーゼ	D社	*Aspergillus*	淡褐色粉末
43	セルラーゼ	E社	糸状菌	類白色粉末
44	シクロデキストリングルコシルトランスフェラーゼ	D社		褐色液体

離液; 1.7mM 炭酸ナトリウム 1.8mM 炭酸水素ナトリウム溶液, 流速; 1.5ml/min, 再生液; 0.025N 硫酸, 注入量; 50 μl, 検出器; 電気伝導度検出器, 感度; 30 μS

5．分析方法 (1)強熱残留物　食品添加公定書[9]中, 強熱残留物試験法の方法に従った.

(2)カルシウム塩, マグネシウム塩, リン酸塩　試料約1gを磁製るつぼに正確に量り, 粉末試料はそのまま, 液体試料はホットプレート上で蒸発乾固した後電気炉に入れ, 500℃まで徐々に温度を上げてから約15時間加熱して灰化した. これに塩酸溶液(1→4)10mlと適量の水を加え, 水浴上で加温溶解し, 冷後, 必要があれば5種Cのろ紙でろ過し, 水で正確に100mlとした. これを検液とし, ICP発光分析法により, カルシウム, マグネシウム, リンを定量した. 検量線はブランクと各10 μg/mlの2点検量線とした. なお, 検液に希釈の必要があれば水で希釈し, その場合には, 標準液と同条件となるように塩酸濃度も調整した.

(3)アンモニウム塩　試料約1gをビーカーに正確に量り, 適量の水で容量500mlの丸底フラスコに移し, 沸石と消泡用のシリコーン樹脂を入れ, 10%水酸化ナトリウム溶液30mlを加えて, 留出液約120mlを得るまで蒸留した. 受器には0.1N硫酸20mlと水約30mlを入れておき, 蒸留後, メチルレッドを指示薬として0.1N水酸化ナトリウム溶液で滴定し, 窒素量を算出した[11].

(4)塩化物　試料約1gを磁製るつぼに正確に量り, 粉末試料はそのまま, 液体試料はホットプレート上で蒸発乾固した後電気炉に入れ, 500℃まで徐々に温度を上げてから約15時間加熱して灰化した. これに水を加えて溶解し, 5種Cのろ紙でろ過してから, 水で正確に100mlとした. これを検液とし, 必要があれば水で希釈して, イオンクロマトグラフィーにより塩素イオンを定量した. 検量線は塩化ナトリウム0, 2, 4, 6, 8 μg/mlの5点検量線とした.

(5)重金属　食品添加物公定書[9]中, 重金属試験法の方法に従った.

(6)鉛　試料の強熱残留物に塩酸溶液(1→4)10mlと適量の水を加え, 水浴上で加温溶解し, 冷後, 必要があれば5種Cのろ紙でろ過して, 水で正確に100mlとした. これを検液とし, ICP発光分析法により鉛を定量した. 検量線はブランクと鉛10 μg/mlの2点検量線とした.

(7)ヒ素　食品添加物公定書[9]中, ヒ素試験法の方法に従った.

(8)ホウ素　試料約1gを磁製るつぼに正確に量り, 1%炭酸ナトリウム溶液5mlを加え, ホットプレート上で蒸発乾固した後電気炉に入れ, 500℃まで徐々に温度を上げてから約15時間加熱して灰化した[12]. これに塩酸溶液(1→4)10mlと適量の水を加えて溶解し, 5種Cのろ紙でろ過してから, 水で正確に100mlとした. これを検液とし, ICP発光分析法によりホウ素を定量した. 検量線はブランクとホウ素10 μg/mlの2点検量線とした.

結果及び考察

1．製剤中の無機塩類　強熱残留物, カルシウム塩, マグネシウム塩, リン酸塩, アンモニウム塩, 塩化物の分析結果を表2に示した.

(1)強熱残留物　強熱残留物は試料に硫酸を加えて強熱するとき残留する物質の量で, 試料中の無機物量の目安となるものである. 0.4-124.7%の範囲で検出され, 全体に高い値で, 表示された添加物(表1)以外にも無機塩類が配合されていることが予想された.

(2)カルシウム塩　培地成分, 塩析剤, 沈澱剤などの酵素の製造用剤として用いられるほか, 安定剤, 賦活剤として, α-アミラーゼやプロテアーゼに配合されることが多い. カルシウム(Ca)として0.004-13.4%検出された. カルシウム塩についてはNo.5, 6, 7, 26, 30の5試料に配合表示があったが, これと同等もしくはそれ以上の量を他の2試料(No.18と31)からも検出しており, 配合表示に疑念がもたれた.

(3)マグネシウム塩　培地成分として硫酸マグネシウムが用いられることがある. マグネシウム(Mg)として0.002-1.6%検出された.

(4)リン酸塩　リン酸二水素カリウムが培地成分に用いられるほか, 固結防止剤としてリン酸一水素カルシウムが, また, 金属イオンによる酵素の活性低下を防止する金属封鎖剤として, 縮合リン酸塩が製剤に配合されることがある. リン(P)として0-4.4%検出された.

(5)アンモニウム塩　培地成分のほか, 塩析剤として硫酸アンモニウムがよく使用される. また, 安定剤として塩化アンモニウムが製剤に配合されることがある. 前報[13]に示す総窒素量が1.0%以上の試料について分析したが, 最高で1.6%の窒素(N)が検出された. なお, アンモニウム塩の多くは強熱により分解して揮散するため強熱残留物には含まれない.

(6)塩化物　酵素の腐敗防止や安定化の目的で, 塩化ナトリウムが配合されることが多い. 添加物の中には, 原料由来の塩化物について成分規格で3.55%まで残留が認められているものもあることから, 今回は1.0%を下限として定量した. 最高は塩素(Cl)として47.9%であった.

表2．酵素製剤中の無機塩類

試料 No.	強熱残留物 (%)	カルシウム塩 (Ca%)	マグネシウム塩 (Mg%)	リン酸塩 (P%)	アンモニウム塩 (N%)	塩化物 (Cl%)
1	2.7	0.06	0.1	0.4	0.5	<1.0
2	0.6	0.03	0.005	0.07		<1.0
3	18.0	0.2	0.02	0.1		8.0
4	16.4	0.4	0.03	0.02		7.4
5	8.8	2.0	0.02	0.07		<1.0
6	99.9	8.3	0.002	0.05		34.8
7	124.7	13.4	0.05	0.01		38.7
8	27.2	0.1	0.02	0.03		12.1
9	7.2	0.03	0.2	1.0	0.6	<1.0
10	3.9	0.02	0.3	0.8	0.3	<1.0
11	4.4	0.02	0.3	0.8	0.3	<1.0
12	2.5	0.04	0.2	0.4	0.2	<1.0
13	9.0	0.09	0.1	0.2	0.3	3.0
14	7.4	0.06	0.02	0.1	0.3	2.5
15	2.2	0.005	0.03	0.2	0.4	<1.0
16	2.0	0.03	0.1	0.3	0.2	<1.0
17	5.4	0.005	0.1	1.3	0.3	<1.0
18	100.9	5.8	0.04	0.1		39.0
19	5.2	0.02	0.3	1.0	0.2	<1.0
20	11.5	0.07	0.02	0.06		4.6
21	1.1	0.1	0.01	0.05	0.1	<1.0
22	15.7	0.07	1.2	2.2	0.5	<1.0
23	21.8	0.1	1.6	4.4	0.7	<1.0
24	8.5	0.04	0.4	1.3	0.3	<1.0
25	6.0	0.7	0.07	0.9	0.8	<1.0
26	110.2	4.2	0.02	0.05		47.9
27	2.8	0.2	0.007	0.07		<1.0
28	9.8	0.04	0.5	1.6	0.4	<1.0
29	1.9	0.004	0.03	0.4		<1.0
30	27.8	7.9	0.05	0.02		<1.0
31	90.2	4.7	0.005	0.02		<1.0
32	11.6	0.02	0.007	0.06		5.8
33	2.7	0.2	0.1	0.02	0.3	<1.0
34	0.6	0.004	0.01	0.03		<1.0
35	0.4	0.01	0.003	0.000		<1.0
36	3.5	0.07	0.02	0.3	0.2	<1.0
37	5.4	0.1	0.2	0.7	1.0	<1.0
38	0.9	0.02	0.006	0.2	1.6	<1.0
39	2.2	0.02	0.2	0.4	0.1	<1.0
40	1.0	0.005	0.06	0.1		<1.0
41	9.1	0.02	0.3	2.2	0.4	<1.0
42	3.3	0.03	0.3	0.6		<1.0
43	0.4	0.004	0.009	0.02		<1.0
44	3.0	0.1	0.002	0.01		2.4

2．配合添加物の表示 食品添加物製剤の場合，配合添加物について，原則としてその品名及び配合量％を表示することが，食品衛生法で義務づけられている．表示のあった試料について，適否を判定するために分析した結果が表3である．No. 5，6，26，30では問題はなかったが，No. 7の試料で表示の1.7倍量を検出した．これについてメーカーに対し調査したところ，表示の誤りが判明した．また，1．(2)の項でも触れたが，カルシウム塩について表示がない試料から，表示のある試料と同等量もしくはそれ以上のカルシウムが検出されたため，カルシウム塩配合の有無についてメーカーに確認したところ，配合有りとの回答を得た．マグネシウム塩，リン酸塩，アンモニウム塩に関する調査では，メーカーから，全試料とも添加物の配合は無いとの回答を得た．塩化物の場合，No. 5と13の2試料に塩化ナトリウム配合の表示があった．検出量からみて他の試料にも配合されていることが推測されたが，塩化ナトリウムは食品素材として分類され，添加物のような表示の適用は受けないことから，ここでの考察は割愛する．平成元年11月に食品添加物について表示基準が改正され(厚生省令第48号)，現在は経過措置期間でもあり，表示の混乱は予想されたが，やはり一部の試料に不備不徹底が見られた．経過措置期間のあける平成3年7月1日以降，新基準が確実に浸透するよう，指導ならびに監視の強化が望まれる．

表3．酵素製剤中の配合添加物

試料 No.	品　名	表示量 (％)	定量値 (％)
5	炭酸カルシウム	5.0	4.9
6	硫酸カルシウム	35	35.6
7	炭酸カルシウム	20	33.5
26	硫酸カルシウム	17	17.8
30	炭酸カルシウム	20	19.8

3．酵素製造用剤の残留 マグネシウム塩，リン酸塩及びアンモニウム塩について，メーカーから添加物の配合は無いとの回答を得たため，それぞれの検出量は，天然物あるいは酵素の製造に用いた培地成分や塩析剤などの残留量であると考えられた．検出されたマグネシウムとリンの最高値を，培地成分としてよく用いられる硫酸マグネシウム($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)及びリン酸二水素カリウム(KH_2PO_4)に換算すると，16.2％と19.3％になる．また窒素の最高値を，塩析剤に使用される硫酸アンモニウム($(NH_4)_2SO_4$)に換算すると7.5％となり，いずれもかなりの量が残留していることになる．一方，マグネシウム塩やリン酸塩，アンモニウム塩は，固結防止剤，金属封鎖剤，安定剤などとして製剤に配合されることもある．配合された添加物の表示だけを義務づけ，同じ塩類の残留量に対し何も規制が無いのは片手落ちである．酵素製剤の規格の制定にあたっては，天然物及びこれら製造用剤の残留に対しても，何らかの規制を設けるべきであると考える．

4．有害性不純物 重金属，鉛，ヒ素，ホウ素について測定した．特別な場合を除き添加物製剤では，重金属は鉛として20 μg/g，鉛は10 μg/g，ヒ素は三酸化ヒ素(As_2O_3)として2 μg/gを下限に試験をしており，酵素製剤についてもこの限度を適用して試験した．重金属試験では1試料(No. 9)が限度を超えたため，ICP発光分析法により原因を検討したところ，銅が23 μg/g検出された．鉛は全試料10 μg/g以下，ヒ素も全試料2 μg/g以下であった．FAO/WHO及びFCCの酵素製剤の一般規格[14,15]には，重金属，鉛及びヒ素に関する規定があり，重金属は鉛として40 μg/g以下，鉛は10 μg/g以下，ヒ素はAsとして3 μg/g以下とそれぞれ限度が定められている．44試料はすべてこの限度をクリアしていた．ホウ素についてはFAO/WHO規格[14]及びFCC規格[15]には規定がないが，わが国の食品の寒天の規格[16]にホウ酸として0.1％以下という限度が定められている．試料中のホウ素の最高値はホウ酸として0.04％で，しかも酵素製剤の添加物としての使用量を考えると，衛生上の問題はないと考える．

結　語

酵素は従来天然物ということで，わが国では食品衛生上，食品衛生法第4条(不衛生食品等の販売等の禁止)の適用を受けるだけで，規格も無く，その内容は一般にはほとんど明らかにされていなかった．平成元年11月，食品添加物の全面表示のため，「化学的合成品以外の食品添加物リスト」(厚生省告示第207号)が発表され，市場に流通している酵素の種類が明らかとなったが，規格を制定するまでにはいたらず，その品質の実態は依然不明であった．今度の調査では無機塩類を対象に，製剤中の酵素製造用剤の残留と配合添加物の表示の現状を明らかにした．また，重金属，鉛，ヒ素，ホウ素を分析して，その汚染状況を把握した．表示に関しては，一部の試料で不備不徹底がみられた．酵素製剤の表示については，食品添加物表示懇談会で指針が作成されている[8]ことでもあり，新基準への移行が円滑にそして速やかに進行す

るよう，指導，監視の強化が必要であると考える．有害性不純物に関しては，全試料ともFAO/WHOやFCCなどの規格値[14-16]以下であったが，酵素によっては，機能活性に金属イオンを必要とするものもあり，製剤に配合されることが予想されることから，今後も監視の継続が必要である．

謝辞　試料の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）特許公報，昭47-1831，1972，特許庁
2）特許公報，昭47-27956，1972，特許庁
3）特許公報，昭48-1192，1973，特許庁
4）特許公報，昭49-1871，1974，特許庁
5）特許公報，昭49-24670，1974，特許庁
6）特許公報，昭49-37276，1974，特許庁
7）辻阪好夫，山田秀明，鶴　大典，別府輝彦編：応用酵素学，1980，講談社，東京
8）食品添加物表示懇談会編集委員会編：食品添加物表示の実務，新訂版，1990，食品添加物表示懇談会，東京
9）石館守三，谷村顕雄監修：食品添加物公定書解説書，第五版，1987，廣川書店，東京
10）特許公報，昭53-28515，1978，特許庁
11）高木誠司：定量分析の実験と計算・第2巻容量分析法，改訂版，252-253，1971，共立出版，東京
12）日本薬学会編：衛生試験法・注解，590，1990，金原出版，東京
13）広門雅子，平田恵子，中島和雄，植村洋子，松井敬子，風間成孔：東京衛研年報，**42**，163-169，1991
14）*FAO Food and Nutrition Paper*, **19**, 214-216, 1981
15）*Food Chemicals Codex*, 3rd ed., 107-110, 1981, National Academy Press, Washington, D. C.
16）厚生省生活衛生局監修：食品衛生小六法，平成2年版，214-215，1990，新日本法規出版，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 176-184, 1991

陰膳方式による栄養成分摂取量調査

牛尾房雄*, 故川島満春美, 船山恵市*
坂牧成恵*, 笠原利英**, 友松俊夫*

Duplicate Portion Studies on the Dietary Intakes of Nutrients

FUSAO USHIO*, the last MASUMI KAWASHIMA, KEIICHI FUNAYAMA*,
NARUE SAKAMAKI*, TOSHIHIDE KASAHARA** and TOSHIO TOMOMATSU*

Duplicate portion studies were made on the dietary intake of fat, protein, energy, 7 kinds of vitamins, 9 kinds of minerals and 13 kinds of fatty acids in meals provided by companies or hospitals in Tokyo area.

1) The average daily intake of each nutrient per day was as follows: 58.6g of fat, 75.9g of protein 2,130kcal of energy, 4,260mg of Na, 2,100mg of K, 500mg of Ca, 1,050mg of P, 216mg of Mg, 12.9mg of Fe, 9.0mg of Zn, 1.2mg of Cu, 3.4mg of Mn, 270 μg of retinol, 2,500 μg of β-carotene, 0.96mg of thiamin, 1.0mg of reboflavin, 51mg of ascorbic acid, 15mg of niacine, 7.5mg of α-tocopherol equivalent. Compared with the desirable dietary allowances for an adult per day in Japan, the daily intake investigated in this experiment was low for riboflavin and calcium.

2) The average daily intake of saturated fatty acids, monoenoic fatty acids and polyenoic fatty aaids were 10.8g, 15.7g and 13.8g, respectively.

The composition ratio of saturated fatty acids, monoenoic fatty acids and polyenoic fatty acids was 1: 1.5: 1.3.

Keywords：摂取量 Daily Intake, 栄養成分 Nutrient, レチノール Retinol, β-カロチン β-Carotene, チアミン Thiamin, リボフラビン Riboflavin, カルシウム Calcum, マグネシウム Magnesium, トコフェロール Tocopherol, 脂肪酸 Fatty acid

緒　言

戦後，日本人の食生活の欧米化は，体位の向上と平均寿命の伸びを達成させた．しかし一方でこの変革は，脳血管疾患，心臓病，糖尿病等の成人病の増加を来しており，近年食生活の再検討の必要性が言われて来ている．

現在の栄養摂取状況を知るのに通常，国民栄養調査成績が用いられるが，この成績は3日間の食事の各食品荷重平均より計算したものであり，栄養成分の調理による減少等はほとんど考慮されていない．実際には，国民栄養調査で示されているほどビタミン，ミネラルが摂取されていないことが推測される．

そこで現在の各種栄養成分摂取量の実態を把握すべく，いわゆる陰膳方式を用い，1987年より東京都内管理給食施設より集めた食事について栄養摂取量調査を行ったので，得られた結果について報告する．またトコフェロール，脂肪酸については，マーケットバスケット方式による調査も行ったもので，併せて報告する．

実験方法

1．試料および調整

1987年から1990年にかけて，都内の会社，病院等の管理給食施設14カ所より収集した40日分の食事を試料として用いた．

＊東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan
＊＊桜美林短期大学　194-02　東京都町田市常盤町3758
＊＊Ohbirin Junior College 3788, Tokiwa-cho, Machida, Tokyo 194-02, Japan

試料は，主食，副食に分け，各々を混合均一化した．ビタミンA，E，脂肪酸はこの混合均一試料を直接分析に供したが，その他の物質は凍結乾燥した後，各々の分析に供した．ビタミンE，脂肪酸について行ったマーケットバスケット方式では，昭和61年度国民栄養調査の食品群別摂取量関東Ⅰ地区表[1]に基づき行った．すなわち食品100種を購入し，15群に分別した．上記食品群別摂取量の数値に従って食品を採取し，適宜調理を行い，各食品群ごとに混合均一化し，分析試料に供した．

2．分析方法

各々の分析方法は下記のごとくである．

1） タンパク質：セミミクロケルダール法[2]，2） 脂質：ソックスレー抽出法[3]，3） 水分：凍結乾燥法，4） 粗繊維：ヘンネベルグ・ストーマン法[4]，5） 灰分：衛生試験法[5]により行った．またエネルギー換算はAtwaterの係数[6]を用いた．6） ミネラル：衛生試験法[5]に従い灰化した後，リン以外はフレーム原子吸光法により測定した．リンはモリブデンブルー比色法[7]により行った．7） カロチン，レチノールおよびトコフェロール：衛生試験法[8]に従い加水分解した後，HPLCにより測定した．8） チアミン，リボフラミン：チアミンはチオクローム蛍光法[9]，リボフラビンはルミフラビン蛍光法[9]により行った．9） アスコルビン酸：小高らの2,4-ジニトロフェニールヒドラジン・HPLC法[10]に従い行った．10） 脂肪酸組成：クロロホルム・メタノール(2：1)混液を用いた金田らの方法[11]で脂肪を抽出した後，ナトリウムメトキシド法によりメチルエステルとし，GLCで測定した．

HPLC，GLCの測定条件を各々Tabl 1，2に示す．

実験結果および考察

Table 3にタンパク質，脂質，エネルギーの摂取量，Table 4，5には各々ミネラル，ビタミン(レチノール，カロチン，チアミン，リボフラビン，アスコルビン酸，ナイアシン)の摂取量を示す．また栄養所要量が設定されているものは，第4次改定日本人栄養所要量[12]における成人男子の所要量を示した．

(1) タンパク質，脂質，エネルギー

平均摂取量は，エネルギー2,130±504kcal，タンパク質75.9±14.0g(エネルギー比14.6±2.3)，脂質58.6±20.2g(エネルギー比24.6±6.2)であった．この摂取量は栄養所要量に比較し，エネルギーでは若干低いものの，脂肪エネルギー比，タンパク質量では所要量を満たしていた．

(2) ミネラル

ナトリウム，カリウム，カルシウム，リン，マグネシウム，鉄，亜鉛，銅，マンガンの一日摂取量(平均値±標準偏差)は各々4,260±1,420mg，2,100±461mg，500±182mg，1,050±230mg，216±57mg，12.9±7.5mg，9.0±2.7mg，1.2±0.34mg，3.4±0.91mgであり，鉄はその所要量を満足していた．

ナトリウム(以下Naと略す)の平均摂取量は，食塩に換算すると約11gに相当し，目標摂取量(10g)を多少上回るほどの数値であった．また現在，カリウム(以下Kと略す)の目標摂取量は対Na比を考慮して2～4gとさ

Table 1. Analytical conditions of HPLC for determination of carotene, retinol, tocopherol and ascorbic acid

1) Carotene: TSK Gel ODS 80TM 150mm×4.6mmI. D.; mobile phase, CH_3CN·MeOH·CH_2Cl_2(8：1：1)
column temp, 38°C; flow rate, 0.5ml/min; UV/VIS detector 430nm
2) Retinol: Nucleosil ODS 250mm×4.6mmI. D.; mobile phase, MeOH·H_2O(95：5)
column temp., room temp.; flow rate, 0.5ml/min; Fluorescence detector EX 340nm EM 460nm
3) Tocopherol: Nucleosil NH_2 250mm×4.6mmI. D.; mobile phase, n-Hexane·Isopropanol(98：2)
column temp., room temp.; flow rate, 1.0ml/min; Fluorescence detector EX 298nm EM 325nm
4) Ascorbic acid: Nucleosil 100 250mm×4.6mmI. D.; mobil phase, n-Hexane·Ethylacetate·Acetic A. (4：5：1)
column temp., room temp.; flow rate, 1.0ml/min; UV/VIS detector 495nm

Table 2. Analytical condition of GLC for determination of fatty acids

column：Carbon wax 20M capilally column 30m×0.25mmI. D.
column temp: 140°C(for 5min)～1.5°C/mic～210°C(for 10min)
detector temp: 230°C　　injection temp：230°C
splitting ratio: 1：50　　carrier gas: Helium
carrier gas flow rate: 0.4ml/min　inlet pressure: 1.5kg/cm^2

Table 3. Avarage daily intakes of protein, fat, carbonhydrate and energy (N=40)

	Protein g/day	%energy from protein	Fat g/day	%energy from fat	Carbonhydrate g/day	Energy kcal/day
Main dish						
Mean±SD	20.0±4.8		4.6±1.6		215±59.2	1020±268
Range	12.4~40.1		2.0~8.3		132~436	645~2040
Sub dish						
Mean±SD	55.8±13.5		53.5±20.3		99.1±49.9	1110±351
Range	30.4~81.1		19.5~90.2		45.2~281	550~2260
Total						
Mean±SD	75.9±14.0	14.6±2.3	58.6±20.2	24.6±6.2	314±88.4	2130±504
Range	48.3~102	9.7~18.6	23.2~95.1	12.4~37.6	193~557	1250~3630
Desirable dietary allowances*	70g/day			20~25%		2200~2500kcal

* : Desirable dietary allwances for a japanese adult man per day

Table 4. Average daily intake of 9 kinds of minerals(mg/day)

	Na	K	Mg	Ca	P	Fe	Zn	Cu	Mn
N=40									
Main dish									
Mean±SD	214±225	178±81	37±18	34±12	210±54	1.4±0.8	3.4±1.2	0.57±0.18	1.9±0.68
Range	16~1050	69~430	13~110	16~69	126~364	0.4~3.3	1.6~8.8	0.30~1.1	1.1~4.2
Sub dish									
Mean±SD	4050±1460	1920±439	179±49	470±181	840±213	11.5±7.4	5.5±2.1	0.60±0.25	1.5±0.48
Range	1800~8290	950~2850	98~300	150~880	390~1250	4.0~35.5	2.7~11.2	0.25~1.2	0.7~3.1
Total									
Mean±SD	4260±1420	2100±461	216±57	500±182	1050±230	12.9±7.5	9.0±2.7	1.2±0.34	3.4±0.91
Range	1920~8370	1140~3100	121~360	187~899	610~1520	4.8~37.9	5.0~17.5	0.60~2.0	2.1~6.2
mg/100kcal									
Mean±SD	2030±582	1020±233	104±23	243±97	502±89	6.1±3.1	4.2±0.7	0.55±0.11	1.6±0.91
Desirable dietary allowance*				600mg		10mg			

* : Desirable dietary allwances for a japanese adult man per day

Table 5. Average daily intake of 5 kinds of vitamins (N=40)

	Retinol μg/day	α-Carotene μg/day	β-Carotene μg/day	Vitamin A IU/day	Thiamin mg/day	Riboflavin mg/day	Ascorbic Acid mg/day	Niacin mg/day
Main dish								
Mean±SD	N. D	N. D	N. D	N. D	0.24±0.38	0.09±0.04	0.23±1.1	2.4±3.8
Range					0.05~1.6	0.03~0.18	N. D~6	0.6~19
Sub dish								
Mean±SD	490±1400	700±510	2500±1400	3000±4700	0.72±0.34	0.93±0.31	51±18	12±5.6
Range	18~8700	79~2000	320~5700	280~29000	0.09~1.6	0.48~1.7	19~85	5~30
Total								
Mean±SD	490±1400	700±510	2500±1400	3000±4700	0.96±0.55	1.0±0.32	51±18	15±6.5
Range	18~8700	79~2000	320~5700	280~29000	0.18~2.6	0.52~1.8	19~86	6.5~31
μg,IU or mg/1000kcal								
Mean±SD	250±740	340±250	1200±690	1500±2400	0.43±0.22	0.49±0.18	25±10	6.9±3.0
Desirable dietary allowances*				2000IU	1.0mg	1.4mg	50mg	17mg

*: Desirable dietary allowances for a japanese adult per day

れているが[12]，本調査のK摂取量はこの目標摂取量の範囲内であった．

カルシウム(以下Caと略す)の摂取量は所要量(600mg/day)の約80%であり，国民栄養調査成績[13]と同じように所要量を下回っていた．しかし40試料中5試料については600mg以上を示し，これら食事はいずれも牛乳等の乳製品が含まれていたことより，Ca供給源としての乳製品の重要性を裏付ける結果となった．リン(以下Pと略す)はCa代謝と関連を有することより，その目標摂取量は，Caとほぼ当量とされている[12]．しかし，本調査では，P/Ca比率は約2.1倍と高く，食品添加物としてのリン酸塩使用による結果と考えられ，Pの過剰摂取が憂慮される．

マグネシウム(以下Mgと略す)もCaと関連がある．Karppanenらは[14]その摂取量比が骨代謝のみならず，循環器系疾患発症と関連し，Ca/Mgの増加がこれら疾患のリスクファクターとなるという仮説を提唱している．また，Mg代謝はCaのみならずK，Naの生体内での動態にも関与しているとも言われている[15]．1989年，厚生省公衆衛生審議会では，成人のMg目標摂取量としてCa所要量(600mg/day)の1/2，300mg/dayが設定された[12]．本調査のMg摂取量は量的には目標摂取量の約2/3であるものの，Ca/Mg比は約2.3と適正数値に近似している．骨粗鬆症に対する懸念によりCa摂取の増加は必要であろうが，その際，CaとMgのバランスを考慮し，穀類，野菜，魚類等によりMg摂取量を多くすることも重要と思われた．

銅，亜鉛，マンガンの所要量は，現在我国では設定されていないが，本調査の平均摂取量はこれまで報告された数値と近似している[16]．またこれらのミネラルはCa，Feなどのミネラルと異なり，主食からの摂取量が重要性を示し，総摂取量の約50%を占めた．穀類の摂取が減少傾向である[13]ことを考えると，これらミネラルの摂取量も減少することが推測される．所要量は設定されていないが，いずれのミネラルも生体内の酵素反応に関与していることにより，現在の摂取量がさらに減少することは人体にマイナス影響を及ぼすことが懸念される．

(3) ビタミンおよび脂肪酸

レチノール，α-カロチン，β-カロチンの一日摂取量は各々490±1,400μg(平均値±標準偏差)，700±510μg，2,500±1,400μgであり，ビタミンA効力としては，3,000±4,700IUであった．またチアミン，リボフラビン，アスコルビン酸，ナイアシンの一日摂取量は，各々0.96±0.55mg，1.0±0.32mg，51±18mg，15±6.5mgを示した．この平均摂取量は，ビタミンA，チアミン，アスコルビン酸では所要量を満足させているものの，リボフラビン，ナイアシンは所要量より若干低い．しかしナイアシンについては，体内においてトリプトファンから生成され，トリプトファン60mgがナイアシン1mgに相当するとされている．アミノ酸分析の結果では，トリプトファンの平均摂取量は810±190mg(未公開資料)を示しており，このことを考慮すればナイアシンの所要量は満たされているものと判断された．またビタミンAの摂取量は，所要量の1.5倍を示したものの今回の試料の中に鶏肝臓を含む食事があり，これがレチノール摂取量8,700μgを示したことによる．この食事を除外すれば，ビタミンA効力は2,300±1,900IUとなり，平均摂取量は所要量に近似した数値となる．ビタミンAは，食事間の変動が大きい栄養成分の一つであり，レチノールの摂取量は490±1,400μg(平均値±標準偏差)を示し，上記8,700μg/dayを除外した場合でもその摂取量は270±500μgと大きい変動を示している．またα-カロチン，β-カロチンにおいても，摂取量の変動係数は各々73%，56%と小さくない．ビタミンA摂取量については，小嶋ら[17]，四方田ら[18,19]はマーケット方式を用いて調査を行っている．小嶋らはレチノール321μg，β-カロチン2,137μg，ビタミンA効力2,264IUと本調査のビタミンA摂取量と近似した値を示したが，四方田らは，レチノール206μg，β-カロチン1,007μg，ビタミンA効力は1,309IUとし，異なる結果を報告している．この事もレチノール，β-カロチンの摂取量が食事内容，食品構成によりかなり変動することを示し，さらに同種の食品でもレチノール，β-カロチン含量の食品間の変動が大きいことが推測される．

Table 6，7に脂肪酸，トコフェロールの摂取量を示す．またTable 8には，脂肪酸，トコフェロールのマーケットバスケット方式(以下MB法と略す)による結果を示す．

摂取される脂肪の脂肪酸組成について，米国では飽和脂肪酸：モノ不飽和脂肪酸：ポリ不飽和脂肪酸(以下S：M：Pと略す)の比率を1：1：1にすることを目標としている．我国では，従来より飽和脂肪酸：不飽和脂肪酸(以下S：Pと略す)の比率が1：2であることが望ましいとしている．

今回，陰膳方式(以下DP法と略す)では，S：M：Pでみると1：1.5±0.32：1.3±0.44，MB法は，1：1.1：0.7を示し，DP法のほうがMB法の場合より，ポリ不飽和脂肪酸の比率が高い．DP法，MB法いずれも

Table 6. Average daily intake of main fatty acids (N=40)

Fatty acid	Mean±SD g/day	Range g/day
C14	0.89±0.57	0.13～2.8
C16	7.1±2.6	1.9～12
C18	2.8±1.1	0.51～5.3
C18：1(N-9)	13.9±5.2	4.4～24
C18：2(N-6)	10.9±5.4	2.4～25
C18：3(N-3)	1.7±0.77	0.39～3.1
C20：1(N-9)	0.48±0.43	0.12～2.5
C20：4(N-6)	0.15±0.08	0.05～0.33
C20：5(N-3)	0.37±0.50	N. D～2.3
C22：1(N-11)	0.37±0.77	N. D～3.6
C22：5(N-6)	0.10±0.10	N. D～0.38
C22：6(N-3)	0.66±0.63	0.06～2.8
Saturated fatty acid(SFA)	10.8±4.08	2.71～19.1
Monoenoic fatty acid(MEFA)	15.7±6.07	5.25～28.2
Polyenoic fatty acid(PEFA)	13.9±6.71	3.73～32.3
SFA：MEFA：PEFA	1：1.49±0.32：1.31±0.44	
N-3 Fatty acid(N-3 F. A)	2.81±1.66	0.48～7.27
N-6 Fatty acid(N-6 F. A)	11.0±5.42	2.42～25.3
N-3 F. A/N-6 F. A	0.27±0.12	

C14 Tetradecanoic A.(Myristic A.), C16 Hexadecanoic A.(Palmitic A.)
C18 Octadecanoic A.(Stearic A.), C18：1(N-9) 9-Octadecanoic A.(Oleic A.)
C18：2(N-6) 9,12-Octadedienoic A.(Linoleic A.)
C18：3(N-3) 9,12,15-Octadedienoic A.(α-Linolenic A.)
C20：1(N-9) 11-Eicosanoic A., C20：4(N-6) 5,8,11,14-Eicosatetraenoic A.(Arachidonic A.)
C20：5(N-3) 5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic A., C22：1(N-11) 13-Docosenoic A.(Erucic A.)
C22：5(N-3) 7,10,13,16,19-Docosapentaenoic A., C22：6(N-3) 4,7,10,13,16,19-Docosahexanoic A.

Table 7. Average daily intake of tocopherols (N=40)

	α-Toc mg/day	β-Toc mg/day	γ-Toc mg/day	δ-Toc mg/day	* α-Toc 当量 mg/day
Main dish					
Mean±SD	0.40±0.36	0.02±0.03	0.23±0.27	0.06±0.10	0.43±0.39
Range	0.09～2.1	N. D～0.12	N. D～0.77	N. D～0.35	0.12～2.1
Sub dish					
Mean±SD	5.5±2.1	0.23±0.19	13±6.5	3.4±2.3	7.0±2.6
Range	1.3～9.7	N. D～0.75	3.9～27	0.16～10	1.7～12
Total					
Mean±SD	5.9±2.2	0.25±0.20	13±6.6	3.4±2.3	7.5±2.8
Range	1.6～11	N. D～0.8	4.1～27	0.16～10	2.0～13
mg/1000kcal					
Mean±SD	2.8±1.0	0.01±0.01	6.5±3.0	1.6±1.1	3.6±1.3

* α-Toc Equivalent：α-Toc+0.5×β-Toc+0.1×γ-Toc+0.03×δ-Toc
**Recommeded diely allowance of α-Toc Equivalent for adult man per day：8mg/day

Table 8. Estimated of daily intake of tocopherols and fatty acids by market studies

Category	Tocopherols(mg/day)					Fatty acids(g/day)											
	α-Toc	β-Toc	γ-Toc	δ-Toc	α-TocEq*	C14	C16	C18	C18:1	C18:2	C18:3	C20:1	C20:4	C20:5	C22:1	C22:5	C22:6
1. Rice & Cereals	0.25	0.06	0.44	0.06	0.32	0.07	0.50	0.09	0.54	0.45	0.04	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
2. Nuts, Seed & Potatos	0.14	0.02	0.31	0.02	0.18	N.D	0.06	0.03	0.21	0.27	0.01	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
3. Sugar & confectioneies	0.04	0.01	0.38	0.17	0.10	0.04	0.47	0.48	0.51	0.08	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
4. Fats & Oil	1.9	0.67	5.8	0.67	2.9	0.21	1.4	0.51	6.9	3.3	1.0	0.15	N.D	N.D	0.08	N.D	N.D
5. Beans & Bean products	0.28	0.13	3.3	1.8	0.73	N.D	0.50	0.17	0.94	2.1	0.4	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
6. Fruits	0.40	0.03	0.01	N.D	0.42	N.D	0.01	Tr	0.01	0.01	0.01	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
7. Green vegetables	0.21	0.04	0.08	0.01	0.24	N.D	0.01	Tr	Tr	0.02	0.03	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
8. Vegetables & Fungi	0.09	0.02	0.06	N.D	0.11	N.D	0.02	Tr	0.01	0.04	0.02	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
9. Sea weed	0.14	0.01	N.D	N.D	0.15	Tr	0.03	N.D	0.01	Tr	N.D	Tr	0.01	0.04	N.D	N.D	N.D
10. Beverages & Seasons	0.01	N.D	N.D	N.D	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	Tr	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
11. Fishs, Molluscs & Crustaceans	0.27	N.D	0.01	0.02	0.27	0.24	0.69	0.14	0.46	0.13	0.04	0.08	N.D	0.25	0.16	0.05	0.35
12. Meats	0.14	N.D	0.03	N.D	0.14	0.18	2.5	1.2	3.3	0.83	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
13. Eggs	0.23	N.D	0.20	0.01	0.25	N.D	0.88	0.25	1.3	0.38	N.D	N.D	0.04	N.D	N.D	N.D	0.05
14. Milk & Daily proaucts	0.08	N.D	N.D	N.D	0.08	0.56	1.2	0.42	0.76	0.07	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
15. Prepared foods	0.52	0.04	0.44	0.15	0.58	0.09	0.77	0.50	0.91	0.49	0.05	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Total	4.7	1.0	11.1	2.9	6.5	1.4	9.1	3.8	15.8	8.2	1.6	0.23	0.05	0.29	0.24	0.05	0.40

Saturated fatty acid: Monoenoic fatty acid: Polynoic acid=1 : 1.1 : 0.7

N-3 Fatty acid/N-6 Fatty acid=0.28

* α-Toc Equivalent : α-Toc+0.5× β-Toc+0.1× γ-Toc+0.03× δ-Toc

** Recommeded diely allowance of α-Toc Equivalent for adult man per day: 8mg/day

C18：1(オレイン酸), C18：2(リノール酸), C16(パルミチン酸)の脂肪酸摂取量が多いことは同じであるが, DP法ではC18：1 13.9±5.2mg, C18：2 10.9±5.4mg, C16 7.1±2.6mg, MB法ではC18：1 15.8, C18：2 8.2mg, C16 9.1mgと, DP法においてC18：2が多いことにより不飽和脂肪酸の摂取が多くなっている. 今回のDP法に用いた試料に, リノール酸高含有の植物油脂を使用した食事が多いことが推測された. 一方最近, 奥山らはリノール酸等N-6系脂肪酸が慢性疾患の発症に関与することを示し, リノール酸の過剰摂取に警鐘を鳴らし, α-リノレン酸, C20：5(エイコサペンタエン酸), C20：6(ドコサセキサエン酸)等, N-3系脂肪酸摂取を推奨している. また現在の我国のN-3系脂肪酸/N-6系脂肪酸の比率を0.2前後と推測し, この比率を上げることが必要であると提唱している[20]. 本調査におけるこのN-3系脂肪酸/N-6系脂肪酸比率はDP法では0.27, MB法では0.28とほぼ同数値を示した. MB法を用いた日高らはの報告でも, N-3系脂肪酸/N-6系脂肪酸比率は0.3であり[21], N-3系脂肪酸/N-6系脂肪酸比率の現状は推定値0.2より高いものと思われる.

総トコフェロール(以下Tocと略す)の本調査における一日摂取量は19.2±10.6mgであった. 総Tocのうち, α-Tocは2%～30%, γ-Tocは50～60%を示し, ビタミンEの生理活性値であるα-Toc当量の摂取量は7.5±2.7mgとなった. 一方, 1987年国民栄養調査によるMB法では, 主に油脂類, 豆類, 加工食品, 果実類等から摂取し, α-Toc 4.7mg, β-Toc 1.0mg, γ-Toc 11.1mg, δ-Toc 2.9mg, α-Toc当量は6.5mgを示した. 現在までMB法を用いたToc摂取量についていくつか報告がなされている. 井崎らはα-Toc当量を6.52mgとし[22], 小西らは7.18mg[23], 小嶋らは6.267mg[17]と報告している. また市川らは各種食品のToc含有量を調べ, その数値を用い, 国民栄養調査の食品摂取量からα-Toc等量を5.07mgと推定している[23]. 本調査結果もこれら報告値と近似した数値である. ビタミンEの所要量については, ポリ不飽和脂肪酸摂取量を勘案し, 米国では15IU(10mg), 我国では1989年目標摂取量として成人男子8mg, 女子7mgが提唱されている[12]. 本調査結果は, この目標摂取量を若干下回っている. しかしポリ不飽和脂肪酸に対するピタミンEeq比率(ビタミンEeq摂取量/ポリ不飽和脂肪酸摂取量)は, DP法0.54, MP法0.61と所要量設定の基準とされた0.4を上回っており, 本調査ではビタミンE目標摂取量をほぼ満足していると判断された.

以上, 40の食事についての栄養成分分析を行い, その平均値を用いて, 現在の栄養素摂取状況を推測した. しかし陰膳方式の場合には, 実際人が口にする状態の食品, 食事を分析するという利点があるものの, 当然食事間の変動が大きいことが予想され, 40試料では栄養摂取量の実態を十分把握できているとは言えない. 正確な栄養摂取状況の把握のためには今後さらに試料数を増し, またマーケットバスケット方式調査を組み入れることが必要であろう. そうなれば, 行政における栄養指導, 啓蒙運動上有益な資料になりうると思われる.

謝辞 本調査の執行について, 試料収集に御協力戴いた梅ケ丘病院 臼井史生氏, 松沢病院 服部富子氏, 健康づくり推進部 黒川順子氏, 島しょ保健所 椎野功氏, 衛生研究所 横山知子氏に深謝します.

文 献

1) 厚生省：国民栄養の現状(昭和63年国民栄養調査成績), 72, 1990.
2) 日本薬学会編：衛生試験法注解, 272, 1990, 金原出版, 東京.
3) 日本薬学会編：衛生試験法注解, 322, 1990, 金原出版, 東京.
4) 日本薬学会編：衛生試験法注解, 293, 1990, 金原出版, 東京.
5) 日本薬学会編：衛生試験法注解, 261-262, 1990, 金原出版, 東京.
6) 科学技術庁資源調査会編：四訂日本食品標準成分表, 19, 1982, 大蔵省, 東京.
7) 日本薬学会編：衛生試験法注解, 271, 1990, 金原出版, 東京.
8) 日本薬学会編：衛生試験法注解, 345-353, 1990, 金原出版, 東京.
9) 日本薬学会編：衛生試験法注解, 356-362, 1990, 金原出版, 東京.
10) 小高 要, 稲垣節子, 氏家 隆, 上野順士, 須田浩行：ビタミン, **59**, 451-455, 1985.
11) 金田尚志, 中島敦子, 藤本健四郎, 小林 正, 桐山修八, 海老原清, 印南 敏, 辻 啓介, 辻 悦子, 衣巻豊輔, 新間脩子, 米山 智：*J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **26**, 497-505, 1980.
12) 厚生省：第四次改正日本人の栄養所要量, 59-109, 第一出版, 東京.
13) 厚生省：国民栄養の現状(昭和63年国民栄養調査成績), 40-41, 1990.

14) Karppanen, H: *Arterry*, **9**, 190-199, 1981.
15) Marier, J. R：最新医学，**38**，646-648，1983.
16) 鈴木継美：栄養学雑誌，**44**，231-237，1986.
17) 小嶋美穂子，青木　茂，津田泰三，原田浩之：栄養誌，**43**，362-366，1987.
18) 四方田千住子，豊田正武，一色賢司，加藤丈夫，神蔵美枝子，白石由美子，西島基弘，林　弘道，深沢喜延，横山　剛，米田孟弘，平山佳伸，山本芳子，市川和孝，吉野秀一郎，伊藤誉志男：栄養誌，**39**，273-279，1987.
19) 四方田千住子，一色賢司，加藤丈夫，神蔵美枝子，白石由美子，西島基弘，林　弘道，深沢喜延，横山　剛，米田孟弘，森口　裕，内山寿紀，城　照雄，伊藤誉志男：栄養誌，**40**，451-455，1987.
20) 奥山治美：油化学，**37**，774-786，1988.
21) 日高公雄，吉田宏三，井崎やゑ子，戸田和子：栄養誌，**39**，308-320，1986.
22) 井崎やゑ子，日高公雄，吉田宏三，戸田和子：栄養誌，**38**，351-355，1987.
23) 小西良昌，住本建夫，田中涼一：大阪府立公衛研所報　食品衛生編，**18**，17-20，1987.
24) 市川富夫，富岡和久：栄養誌，**37**，291-299，1984.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 185-190, 1991

養殖および天然シマアジにおける一般成分，ミネラル，ビタミンおよび脂肪酸組成の比較

船山恵市* 牛尾房雄* 友松俊夫*

Comparison of Nutritive Components between Cultured and Wild Striped Jack

KEIICHI FUNAYAMA* FUSAO USHIO*
and TOSHIO TOMOMATSU*

The contents of nutritive components such as moisture, protein, lipid, ash, 5 minerals, 4 vitamins and 15 fatty acids were examined for the muscles, which were divided into 4 parts : dorsal, ventral, caudal and dark muscles of striped jack, *Caranx delicatissimus*. The results obtained were as follows :

1. The lipid content in the dark muscle of the cultured fish was higher than that of the wild fish, which was approximately 40g/100g flesh.

2. The content of iron in the dark muscle of the cultured and wild fish was about 9～14 times higher than that in the ordinary muscles. The content of potassium was lower in the dark muscle of the cultured fish than that in the ordinary muscles. On the other hand, the content of potassium in the dark muscle of the wild fish tended to be reversed.

3. The wild fish contained thiamin which was about 7 times higher than the cultured fish. The content of α-tocopherol in the cultured fish was about 1.5 times higher than that in the wild fish.

4. In the fatty acid composition, percentages of $C_{16:1(n-7)}$, $C_{18:4(n-3)}$, $C_{20:1(n-11)}$ and $C_{22:1(n-11)}$ acids in the cultured fish were higher than those in the wild fish, while percentages of C_{16}, C_{18}, $C_{18:1(n-9)}$, $C_{18:1(n-7)}$ and $C_{20:4(n-6)}$ acids lower. Percentages of $C_{16:1(n-7)}$ and $C_{20:5(n-3)}$ acids in the dark muscle were slightly lower than those in the ordinary muscles, while the percentage of $C_{22:6(n-3)}$ acid was higher.

Keywords : シマアジ *Caranx delicatissimus*, 水分 moisture, たんぱく質 protein, 脂質 lipid, ミネラル mineral, ビタミン vitamin, 脂肪酸 fatty acid

緒　言

成人病に対する予防の見地から，近年日本型食事が見なおされつつある．なかでも，飽和脂肪酸含量の高い脂質の取り過ぎによって引き起こされる疾患の予防に，高度不飽和脂肪酸含量の高い魚油が，有効であることが認められてきており[1]，魚食への関心が高まっている．

現在市場に出回っている多くの魚は天然魚であるが，一部の魚種で天然魚の漁獲高は年々減少してきている．一方，養殖技術の向上により，その対象魚種の広まりと生産増加はめざましく，我々の食生活における養殖魚の占める位置は，ますます高まってきている．

シマアジ(*Caranx delicatissimus*)は，その味と希少性から，高級魚として，一般家庭の食卓にのぼることは希であった．しかし，東京都小笠原水産センターにより，自然産卵による種苗の生産が可能になったこと[2]などによって，養殖がさらに盛んになり，今後，食する機会が増加するものと推測される．しかし，その栄養価は四訂日本食品標準成分表(以下成分表と略す)[3]には収載されておらず，不明である．

そこで，シマアジの栄養成分の基礎データを得る目的

＊東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科　169 東京都新宿区百人町 3-24-1
＊ The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24-1, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku Tokyo, 169 Japan

Table 1. Caught place, number of samples, date and physique condition on striped jack., *Caranx delicatissimus*, for analyses

Sample	Place	n	Date	Fork length(cm)	Body weight(g)	Condition* factor
Cultured	Mie pref.	3	Nov.14,1988	35.0±0.7**	1031± 51	24.0±1.9
Wild	Fukuoka pref.	3	Nov.13,1989	42.7±0.8	1655±120	21.2±0.6

* ：〔Body weight／(Fork length)^3〕×1000

**：Mean±S. D.

で，養殖および天然シマアジについて，一般成分，ミネラル，ビタミンおよび脂肪酸の各成分を分析し，比較検討を行った．

実験の部

1．供試魚 本実験に使用した養殖シマアジは，築地市場に活魚で入荷した三重県産のものである．また天然シマアジは，福岡県近海で活けじめされたものである．産地，試料数，漁獲日，尾叉長，体重および肥満度を，Table 1 に示す．

試料の調製は，魚体を三枚におろして皮，骨およびひれを除き，可食部重量を測定した．その可食部を Fig. 1 に示すように背肉，腹肉，尾肉および血合肉の 4 部位に分け，それぞれの重量を測定した．各分析用に採取した後，分析まで−18℃ で凍結保存した．

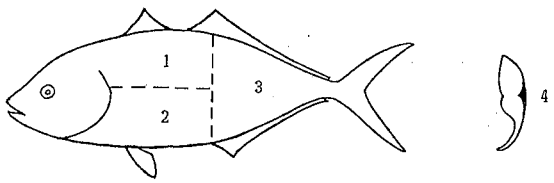


Fig. 1. Sampled position of striped jack.
1. Dorsal muscle 2. Ventral muscle
3. Caudal muscle 4. Dark muscle

2．操作

1） 一般成分の分析法 四訂成分表の方法に準拠して行った．すなわち，水分は常圧105℃ 恒量乾燥法，たんぱく質はケルダール法，脂質はソックスレー抽出法，炭水化物は差引により，灰分は550℃ 乾式灰化法で求めた．エネルギーはたんぱく質・脂質・炭水化物の換算係数として4.22・9.41・4.11を用いて算出した．

2） ミネラルの分析法 450℃ で乾式灰化後，塩酸溶液とし，ナトリウム(以下 Na と略す)，カリウム(以下 K と略す)，カルシウム(以下 Ca と略す)および鉄(以下 Fe と略す)は原子吸光法[4]により，またリン(以下 P と略す)はモリブデンブルー比色法[5]により定量した．

3） ビタミンの分析法 レチノールおよびトコフェロールはけん化後溶媒抽出し，それぞれ高速液体クロマトグラフィー法(以下 HPLC 法と略す)[6,7]，サイアミンはチオクローム蛍光法[8]，リボフラビンはルミフラビン蛍光法[9]を用いて分析を行った．

4） 脂肪酸の分析法 前報[10]に準拠して行った．

3．試薬および装置 1)試薬 JIS特級，原子吸光分析用，電子工業用および HPLC 用を用いた．2)装置 原子吸光分析装置；Nippon-Jarrel Ash 製 AA-845型，HPLC 装置；日本分光製880-UP，蛍光検出器；島津製 RF-530，インテグレータ；島津製 C・R 3 A，蛍光分光装置；島津製 RF-540，ガスクロマトグラフ；HP 製 5890，インテグレータ；Varian 製 CDS 401

結果および考察

1．一般成分 エネルギー，水分，たんぱく質，脂質，炭水化物および灰分の結果を Table 2 に示す．

一般に，養殖魚は天然魚に比べて脂質に富んでいるといわれている[11]．今回分析したシマアジでも平均値で比較すると同様の傾向がみられ，可食部(筋肉各部位を合わせたものを可食部とする)当りで，養殖魚16.9g／100g，天然魚10.5g／100g の値を示している．特に，養殖魚の血合肉中脂質は，すべての個体で天然魚の値を上回り，約40g／100g の値を示した．

伊達ら[12]は，脂質分の多いことで知られている養殖ハマチ各部位について調べ，背肉11.5g／100g，腹肉17.0g／100g，尾肉5.2g／100g および血合肉21.8g／100g の脂質含量を報告しているが，今回用いた養殖シマアジの血合肉中脂質含量は，ハマチの値を約 2 倍ほど上回っていた．

2．ミネラル Table 3 に各ミネラルの分析値を示す．可食部当りにおける Ca，P および Fe 含量は，養殖魚，

Table 2. Mean values of energy, moisture, protein, lipid, carbohydrate and ash contents in muscles of striped jack.

Muscle	Energy (kcal)	Moisture	Protein	Lipid	Carbohydrate	Ash
			(g/100g)			
Cultured fish						
Dorsal	230±26*	62.5±2.1	21.4±1.8	14.8±3.4	0.2±0.1	1.2±0.1
Ventral	248± 8	61.0±0.7	20.7±1.5	17.0±1.5	0.3±0.2	1.1±0.1
Caudal	207± 5	64.9±0.6	21.4±1.0	12.4±0.8	0.1±0.1	1.2±0.1
Dark	439± 6	45.2±0.8	13.1±0.2	40.7±0.6	0.2±0.2	0.8±0.1
Whole	243±14	61.6±1.1	20.6±1.4	16.6±2.0	0.2±0.1	1.2±0.1
Wild fish						
Dorsal	194±43	65.4±4.1	23.0±0.8	10.3±4.9	0.1±0.1	1.2±0.1
Ventral	200±41	64.9±3.9	22.8±0.8	11.0±4.7	0.1±0.0	1.2±0.1
Caudal	174±32	67.2±3.0	23.6±0.7	7.9±3.7	0.1±0.0	1.2±0.0
Dark	288±43	58.0±3.9	17.4±1.3	22.2±5.0	1.4±0.5	1.0±0.1
Whole	196±39	65.3±3.7	22.7±0.7	10.5±4.5	0.3±0.1	1.2±0.1

*：Mean±S. D. (n=3)

Table 3. Mean values of minerals and vitamins in the muscles of striped jack.

Muscle	Ca	P	Fe	Na	K	Retinol	Thiamin	Riboflavin	α-Tocopherol
	(mg/100g)					(μg/100g)	(mg/100g)		
Cultured fish									
Dorsal	7±2*	230±20	0.3±0.1	76± 8	490±40	16± 5	0.04±0.01	0.09±0.01	2.42±0.03
Ventral	11±1	230±20	0.4±0.1	89± 6	450±30	19± 8	0.04±0.01	0.09±0.01	2.70±0.41
Caudal	6±2	230±20	0.3±0.1	82± 5	490±30	13± 5	0.05±0.01	0.11±0.02	1.98±0.15
Dark	8±5	150±10	3.6±0.5	100±20	250±30	44± 5	0.17±0.02	0.55±0.10	6.30±0.58
Whole	8±2	220±20	0.6±0.0	83± 3	460±20	18± 5	0.05±0.01	0.13±0.02	2.65±0.15
Wild fish									
Dorsal	6±1	250±10	0.3±0.0	59± 7	560±10	12± 2	0.37±0.20	0.07±0.01	1.74±0.28
Ventral	8±2	230±10	0.3±0.1	73± 6	520±10	14± 4	0.34±0.17	0.08±0.01	1.71±0.18
Caudal	6±2	230±20	0.3±0.1	64± 7	530±20	11± 3	0.35±0.19	0.08±0.03	1.38±0.17
Dark	8±3	200±20	4.3±0.4	82± 3	720±90	40±12	0.45±0.13	0.90±0.11	3.50±0.26
Whole	7±1	230±10	0.7±0.1	67± 5	550±20	15± 4	0.36±0.19	0.16±0.01	1.74±0.19

*：Mean±S. D. (n=3)

天然魚共ほぼ同程度であった．しかし，NaおよびKでは相違を示し，Na含量は養殖魚83mg／100g，天然魚67mg／100gと約1.2倍養殖魚が高く，K含量では養殖魚460mg／100g，天然魚550mg／100gと逆に天然魚の方が高い値を示した．

また部位別で見ると，天然魚におけるK含量は，血合肉720mg／100g，その他の部位520～560mg／100gであったのに比べ，養殖魚の値は，血合肉250mg／100g，その他の部位450～490mg／100gと，血合肉のK含量はその他の部位の約1／2と低い値を示している．前記の伊達らの報告[12]によると，養殖ハマチにおいても，血合肉のK含量はその他の部位に比べ低い値を示している．このことより，血合肉においてK含量が少ないのは，養殖魚における傾向であることも考えられる．

NaおよびK含量のこのような傾向は，ミラネルの吸収経路が飼料および環境水からであること[13]から判断

Table 4. Fatty acid compositions of the lipids in the muscles of striped jack.

Fatty acid	Cultured fish					Wild fish				
	Dorsal	Ventral	Caudal	Dark	Whole	Dorsal	Ventral	Caudal	Dark	Whole
	(%)					(%)				
C 14	4.8±0.3*	5.0±0.1	4.9±0.2	4.8±0.0	4.9±0.1	4.9±0.4	4.7±0.4	4.7±0.4	4.1±0.6	4.6±0.4
C 16	19.1±0.6	18.9±0.6	18.7±0.6	18.6±0.8	18.8±0.4	20.0±0.4	20.1±0.4	19.7±0.2	19.3±0.7	19.7±0.3
C 16 : 1(*n*-7)	6.7±0.2	6.7±0.1	6.4±0.2	5.9±0.1	6.4±0.2	5.8±0.2	5.8±0.2	5.7±0.2	5.3±0.5	5.6±0.2
C 18	3.7±0.2	3.6±0.2	3.6±0.2	4.0±0.2	3.7±0.2	4.6±0.1	4.4±0.1	4.6±0.1	4.9±0.2	4.6±0.1
C 18 : 1(*n*-9)	13.3±1.1	13.0±0.8	13.0±0.8	12.7±0.3	13.0±0.7	15.9±1.0	15.5±0.8	16.1±0.9	15.8±1.0	15.8±0.8
C 18 : 1(*n*-7)	3.1±0.1	3.1±0.1	3.0±0.1	3.0±0.1	3.0±0.1	3.5±0.1	3.4±0.3	3.5±0.1	3.6±0.0	3.5±0.1
C 18 : 2(*n*-6)	1.1±0.1	1.1±0.1	1.1±0.1	1.1±0.1	1.1±0.1	1.1±0.1	1.2±0.1	1.1±0.0	1.2±0.1	1.1±0.1
C 18 : 4(*n*-3)	1.8±0.1	1.9±0.1	1.8±0.1	1.7±0.1	1.8±0.0	1.3±0.3	1.3±0.3	1.3±0.3	1.1±0.3	1.2±0.3
C 20 : 1(*n*-11)	2.2±0.2	2.2±0.2	2.4±0.1	2.7±0.2	2.3±0.1	1.6±0.2	1.4±0.1	1.5±0.1	1.5±0.2	1.5±0.1
C 20 : 1(*n*-9)	1.2±0.1	1.2±0.1	1.2±0.1	1.2±0.1	1.2±0.1	1.4±0.1	1.3±0.2	1.4±0.1	1.3±0.2	1.3±0.2
C 20 : 4(*n*-6)	1.0±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1	0.9±0.0	1.4±0.2	1.4±0.2	1.4±0.2	1.3±0.1	1.4±0.2
C 20 : 5(*n*-3)	10.1±0.1	10.1±0.1	9.9±0.1	9.0±0.1	9.8±0.1	9.1±0.9	9.2±0.9	8.7±1.0	8.2±0.8	8.8±1.0
C 22 : 1(*n*-11)	2.1±0.1	2.2±0.2	2.3±0.2	2.7±0.3	2.3±0.2	1.3±0.1	1.2±0.2	1.3±0.1	1.2±0.2	1.3±0.2
C 22 : 5(*n*-3)	2.7±0.3	2.8±0.3	2.8±0.3	3.0±0.2	2.8±0.3	3.3±0.2	3.3±0.1	3.3±0.2	3.6±0.2	3.3±0.2
C 22 : 6(*n*-3)	18.2±0.5	18.2±0.2	18.5±0.3	19.0±0.5	18.4±0.2	17.4±2.1	17.9±2.2	17.7±2.1	19.4±2.7	18.0±2.3

* : Mean±S. D. (n=3)

すると，その要因が大きいものと推察される．

なお血合肉では，Feを構成成分とするミオグロビンやヘモグロビンを多く含有するため，Fe含量が天然魚，養殖魚共に他部位より9～14倍高い値を示していた．

3．ビタミン Table 3に各ビタミンの分析値を示す．

サイアミン含量では，天然魚は全部位で養殖魚より高く，可食部当りで表すと，約7倍の値を示している．これは個体差を考慮にいれても，明らかに高い値であった．この傾向は，成分表[3]の天然ブリと養殖ハマチにおいても見られている．

また，天然シマアジに見られたサイアミン含量は，成分表[3]に載っている他の魚種と比較しても高い値であり，これは天然シマアジの特徴であることも推測される．

一方α-トコフェロール含量では，養殖魚は天然魚より約1.5倍高い値を示した．これは，餌料による影響と思われる．すなわち，養殖マダイ筋肉中のα-トコフェロール含量は，餌料中のα-トコフェロール含量と正の相関関係にあるという村田らの報告[14]からも推察される．

部位別では，天然・養殖シマアジ共に，分析したすべてのビタミンにおいて，血合肉中の含量は普通肉より高い値を示した．

4．脂肪酸組成 Table 4に各脂肪酸の組成値を示す．

養殖魚，天然魚とも，主要脂肪酸はパルミチン酸(C_{16})，ドコサヘキサエン酸($C_{22:6(n-3)}$)，オレイン酸($C_{18:1(n-9)}$)およびエイコサペンタエン酸($C_{20:5(n-3)}$)であった．しかし，その組成比は天然魚・養殖魚間で若干の相違を示し，養殖魚ではパルミチン酸，ステアリン酸(C_{18})，オレイン酸，バクセン酸($C_{18:1(n-7)}$)およびアラキドン酸($C_{20:4(n-6)}$)が天然魚より低い比率を示し，一方，パルミトレイン酸($C_{16:1(n-7)}$)，オクタデカテトラエン酸($C_{18:4(n-3)}$)，エイコセン酸($C_{20:1(n-11)}$)，エイコサペンタエン酸およびセトレイン酸($C_{22:1(n-11)}$)が高い比率となっていた．

また各部位の脂肪酸組成比は，背肉，腹肉および尾肉では，養殖魚，天然魚いずれにおいても，ほとんど類似しているものの，血合肉は他部位と若干の相違を示し，ドコサヘキサエン酸が高く，一方パルミトレイン酸およびエイコサペンタエン酸は低い傾向が見られた．田代ら[15]はブリの脂肪酸について，血合肉におけるドコサヘキサエン酸が，普通肉に比較し高いことを報告しており，今回の結果と符合している．

以上，シマアジの天然魚と養殖魚についてその栄養成分を比較検討したところ，養殖魚では脂質およびトコフェロールにおいて，天然魚より高い傾向を示し，一方，サイアミンにおいて低い傾向を示した．しかし，調査例数が少ないため，これらの傾向について明確に断定することはできないが，飼料，環境水，運動量等に起因するのではないかと推察される．

シマアジはその味の良さにより，養殖技術の進歩とともに，家庭において食する機会も多くなるものと予想される．そこで，シマアジの栄養成分を明確にするためには，今後さらに例数を増やすことが必要と思われる．

要　約

養殖および天然シマアジの可食部を背肉，腹肉，尾肉および血合肉の4部位に分け，水分，たんぱく質，脂質，灰分，ミネラル5種類，ビタミン4種類および脂肪酸15種類の分析を行い，比較検討した．

1．養殖シマアジの血合肉では，天然シマアジに比べ約2倍高い脂質含量を示し，その平均値は約40g／100gであった．

2．Feは養殖・天然魚共に血合肉に多く含まれ，普通肉に比べ9～14倍高い値を示した．

Kは，養殖魚の血合肉では普通肉に比べ低い値を示したが，天然魚では逆の傾向を示した．

3．サイアミン含量において，天然魚は養殖魚より，約7倍の高値を示した．

α-トコフェロール含量においては，養殖魚は天然魚より約1.5倍高い値を示した．

4．脂肪酸組成において，養殖魚ではパルミトレイン酸，オクタデカテトラエン酸，エイコセン酸およびセトレイン酸に高い傾向が見られ，一方パルミチン酸，ステアリン酸，オレイン酸，バクセン酸およびアラキドン酸に低い傾向が見られた．

血合肉では，普通肉に比べパルミトレイン酸およびエイコサペンタエン酸がやや低い傾向を示し，ドコサヘキサエン酸がやや高い傾向を示した．

今回の分析結果より，養殖魚は天然魚より脂質およびトコフェロール含量で高値を示し，一方天然魚はサイアミン含量で高値を示した．

文　献

1) 鹿取　信：油化学，**34**，911-920，1985
2) 昭和60年度東京都水産試験場事業報告，264-265
3) 科学技術庁資源調査会編：四訂日本食品標準成分表，大蔵省印刷局，東京，1982
4) 小原哲二郎他編：改訂食品分析ハンドブック，281-289，建帛社，東京
5) 小原哲二郎他編：改訂食品分析ハンドブック，

275-277, 建帛社, 東京
6) 日本薬学会編：衛生試験法・注解(追補), 1288-1289, 1983, 金原出版, 東京
7) 日本薬学会編：衛生試験法・注解(追補), 1293-1296, 1983, 金原出版, 東京
8) 日本薬学会編：衛生試験法・注解, 209-213, 1980, 金原出版, 東京
9) 日本薬学会編：衛生試験法・注解, 213-215, 1980, 金原出版, 東京
10) 船山恵市, 牛尾房雄, 友松俊夫, 道口正雄：東京衛研年報, **38**, 257-261, 1987
11) 佐伯清子, 熊谷 洋：日水誌, **50**, 1551-1554, 1984
12) 伊達かおる, 山本義和：日水誌, **54**, 1041-1047, 1988
13) 山本義和：無機質, 池田靜徳編, 魚介類の微量成分, 215-216, 1981, 恒星社厚生閣, 東京
14) 村田 寿, 山内 清：日水誌, **55**, 1435-1439, 1989
15) 田代勇生, 露木英男：日食工誌, **29**, 160-167, 1982

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.*,**42**, 191-193, 1991

皇居外苑濠の植物プランクトン（IV*）
—植物プランクトン量と栄養塩—

渡 辺 真利代**, 高 橋 巌**, 土 屋 悦 輝**

Phytoplankton in Outer Moats around the Imperial Palace (IV)
Relations between the Standing Crop of Phytoplankton and Nutrients

MARIYO F. WATANABE**, IWAO TAKAHASHI** and YOSHITERU TSUCHIYA**

Keywords：植物プランクトン phytoplankton, クロロフィル *a* chlorophyll *a*, 窒素 nitrogen, 燐 phosphorus, 炭素 carbon

緒　言

皇居外濠群は貯水量480,000トンを有し広大な緑地を背景としてはいるものの都心に存在するという立地条件のために，自然湖沼と比較してより強い富栄養化への影響を受けている．また，流入河川がないため地下水の汲み上げなどにより人工的に水量を確保することが必要とされる．そのため1987年6月から1989年7月にかけては日量8,000トンの水が東京駅地下より導水された．しかし，これによる水質改善は一時的であり依然として藍藻の水の華，アオコが出現している[1,2]．ここでは，最近の調査結果をもとに皇居濠群の富栄養化の状況，特に植物プランクトン量と栄養塩との関係について考察したい．

調査処法

採水は皇居を左回りに一周するように，日比谷濠（station 1及び2），蛤濠（st. 3），桔梗濠（st. 4）清水濠（st. 5），牛が淵（st. 6），千鳥が淵（st. 7），半蔵濠（st. 8），桜田濠（st. 9，10，11）の11地点で実施し，表面水を採取した．採取時期は以下の通りである：1988年5月26日，8月10日，11月9日，1989年2月15日，5月26日，8月10日，11月9日，1990年2月15日，5月23日，8月8日，11月9日，1991年2月7日．

採取した表面水はグラスファイバーろ紙（Whatmann GF／C）を用いて粒状態と溶存態に分離し，粒状態についてはクロロフィルa（chl. a），有機態窒素（PON），有機態燐（POP），有機態炭素（POC）を，溶存態については有機態窒素（DON），有機態燐（DOP），有機態炭素（DOC），窒素無機成分（NH_3-N，NO_2-N，NO_3-N），燐酸態燐（PO_4-P）を定量した．各成分の分析は以下の方法及び機器によった．

chl.a, POP, PO4-P：Strickland and Parsons（1968）[3]

PON及びPOC：元素分析計（柳本商事製）

DOC：TOC500（島津製作所製）

NH_3-N，NO_2-N，NO_3-N：上水試験方法[4]

結果及び考察

図1には3ヵ所の濠における過去3年間のchl. a量とpheo. a量の季節変化を示した．全体としてはst. 7のchl. a値は他の2地点より高く，8月の値で比較してみると，st. 7としては低い1989年の値でもst. 1及びst.10の最高値よりも高い値であった．植物プランクトンの現存量として用いられるchl. a量は多くの場合8月，5月に高く，2月に低くなっているが，これは春から夏にかけて藍藻の水の華が出現するためであり，主に *Microcystis* 類によるものである．*Microcystis* 属中では *M. aerugi-nosa, M. viridis, M. wesenbergii* が主要な構成種であり，例年これらの種は合わせて10^4／mlから10^5／ml出現していた．しかし，東京駅地下水の濠への導水に伴い塩素イオン濃度が1987年8月から増加し，1988年8月から1989年2月にかけて高い値が測定された．この結果，植物プランクトン量や種類組成に変化がみられ，汽水域に特徴的な種類の出現や *Microcystis* 類の細胞数の減少がみられた．この塩素イオン濃度の変化による植物プランクトンへの影響は時間的には後ろにずれ，st. 1やst.10の

第3報，東京衛研年報，**40**, 236-242, 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

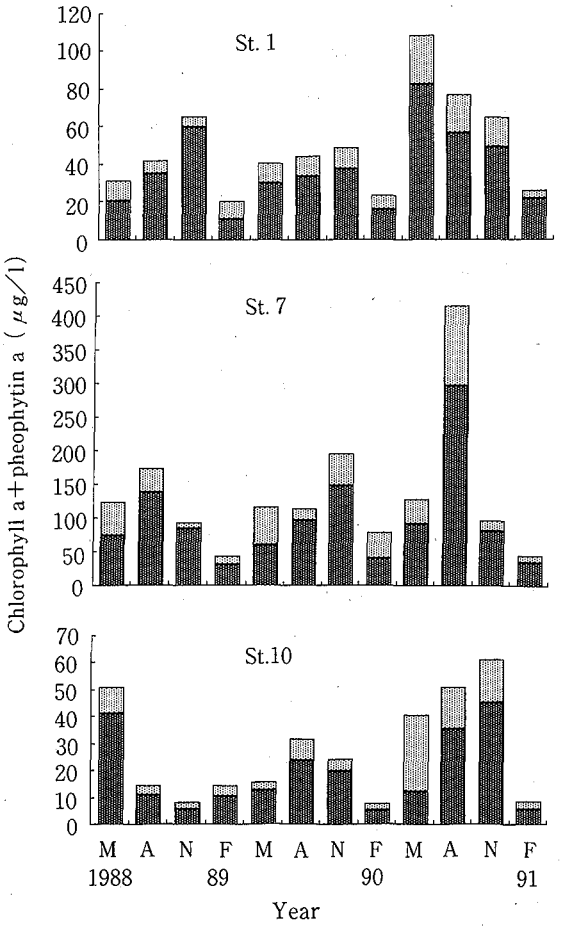


図1．日比谷濠（st. 1）、千鳥が淵（st. 7）、桜田濠（st.10）における植物プランクトン量の季節変化
▨：chl. a（mg／l）
■：pheo. a（mg／l）

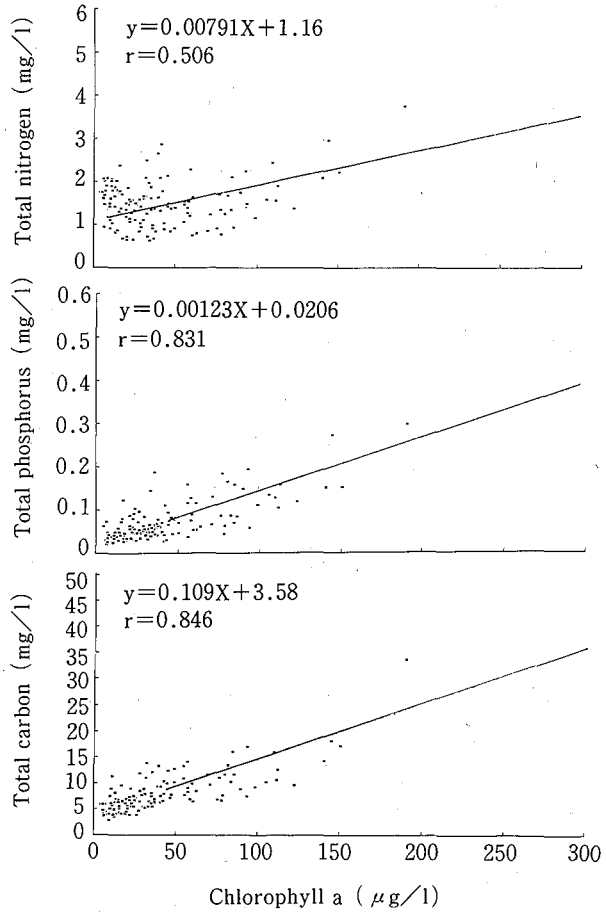


図2．植物プランクトン量と全窒素、全燐、全炭素との関係

ように1989年の植物プランクトン量が減少している濠が多かった．また，*Microcystis* 類は全ての濠で減少し，ほとんどの濠で10^2／ml から10^3／ml 程度となっていた．

図2には過去3年間の全濠のデータをともに植物プランクトン量と全窒素，全燐，全炭素との関係を示した．全窒素は3種の無機態の窒素（NH_4-N，NO_3-N，NO_2-N），DON，PON の合計であり，全燐は PO_4-P，DOP，POP を加算し，全炭素は DOC，POC を加算して求めた．植物プランクトン量と全炭素，全燐との相関が良く，それぞれ相関係数0.846，0.831という値が得られたのに対し，植物プランクトンと全窒素の間では0.506であった．これは無機態の窒素や DON に比較し，水中の PO_4-P や DOP が極めて少ないことからも予想できることではあるが，濠水中の燐のほとんどが植物プランクトン体中に存在するものと考えられる．一般に，富栄養化の指標として全窒素量と全燐量が問題となるが，濠水で測定されている値は諏訪湖や霞ヶ浦と同程度のものであった[5]．また，*Microcystis* のような水の華が出現している水界においては燐よりは窒素不足であるという報告がある[6,7]．濠水の場合 *Microcystis* の水の華が出現している夏期には窒素不足になっている可能性はあるが，年間を通した場合燐量が植物プランクトンの成長の制限要因となっているものと思われる．

結　論

皇居外濠群の植物プランクトン量と全窒素量，全燐量と全炭素量との関係を比較したところ，chl. a＋pheo.a 量と全燐量または全炭素量との間の相関が良く，年間を通した場合燐量が外濠群の植物プランクトンの成長制限

要因になっている可能性が強い.

文　献

1) 渡辺真利代, 土屋悦輝：東京衛研年報, **38**, 329-332, 1987
2) 渡辺真利代, 土屋悦輝：東京衛研年報, **39**, 265-270, 1988
3) Strickland, J. D. H. and Parsons, T. R.: *A Practical Handbook of Sea Water Analysis,* 1972 Fish. Res. Bd. Can.
4) 日本水道協会編：上水試験方法　1985
5) Lake Biwa Research Institute: *Data Book of World Lakes,* LECS' 84 1984
6) Ohtsuki, A, Aizaki, M and Kawai, T.: *Jpn. J. Limnol.* **48**, SI-SII, 1987
7) Sakamoto, M.: *Jpn. J. Limnol.* **50**, 45-51, 1989

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 194-201, 1991

水中の大腸菌群及び大腸菌の酵素反応による迅速試験法に関する検討

古畑勝則*, 松本淳彦*

Rapid Method for the Detection of Coliforms and *Escherichia coli* in Water by Enzymatic Assay

KATSUNORI FURUHATA* and ATSUHIKO MATSUMOTO*

Keywords：迅速法 rapid detection, 大腸菌群 coliforms, 大腸菌 *Escherichia coli*, 酵素活性 enzyme activity, 水試料 water sample

緒　言

1990年秋に埼玉県で起こった飲料水を介した病原性大腸菌による集団下痢症事件は記憶に新しい．飲料水の微生物学的安全性の評価は，水道法水質基準に基づいた病原性微生物による汚染，または汚染されていることを疑わせる指標としての大腸菌群と一般細菌数で行われている．

大腸菌群については，糞便汚染に対する指標細菌として古来から重要視され，化学的試験項目に比べて鋭敏であることから，その試験法は現在もまったく変わっていない．しかし，その手順は，推定，確定，完全の3段階にわたるステップが必要であり，菌種を同定するための生化学的性状試験など，一連の培養操作が煩雑で，しかも，結果が出るまでに一週間以上もの長時間を要する．このため，緊急時の対応が困難であることから，迅速で簡易に検出できる試験方法を導入するべきとの要望が多方面から出されている．

既に，臨床検査分野では，大腸菌群や *E. coli* が産生する酵素の β-galactosidase, β-glucuronidase に着目し，これを合成発色基質（*o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside：ONPG）あるいは蛍光基質（4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide：MUG）に作用させて，それぞれの加水分解生成物の発色によって短時間で両者を分別，検出できる方法が実用化されている[1-3]．

これと同じ手法（以後，ONPG-MUG 法と記述する）が飲料水の分野でも種々検討されてきたが[4-9]，米国環境保護庁（USEPA）は1989年7月17日付けの Federal Register のなかで ONPG-MUG 法を採用することを通告し[10]，翌年1990年には *E. coli* の試験法として MUG を EC 培地や普通寒天培地に添加したものを使用する方法も公布している[11]．

一方，わが国では，厚生省監修，上水試験方法（日本水道協会，1985）を改訂する時期にあたっており，試験法等調査専門委員会（日本水道協会内）は，この ONPG-MUG 法を大腸菌群の迅速試験法として新たに採用することの是非について検討を進めている．

本論文では，主に ONPG-MUG 法と現在の LB-BGLB 法との整合性及び検出感度の点について，各種の大腸菌群を使用して検討を行い，併せて，種々の水試料を対象に応用試験を試みた．

材料及び方法

1．供試菌　標準菌株として理化学研究所より分与された *Escherichia coli* JCM 1649, *Citrobacter freundii* JCM 1657, *Klebsiella pneumoniae* JCM 1662, *K. oxytoca* JCM 1665, *Enterobacter cloacae* JCM 1232, *E. agglomerans* JCM 1236, *Aeromonas hydrophila* JCM 1027, 及び著者らが環境水から分離した *E. coli* KFRW 9180, *C. freundii* KFRW 9135, *K. pneumoniae* KFRW 9161, *E. cloacae* KFRW 9154, *Serratia marcescens* KFRW 9127 及び *Pseudomonas aeruginosa* KFRW 9102の合計7属9種13株である．

2．供試水　水道水20試料，プール水56試料（シーズンオフ中の学校プール水46，室内プール水10），井戸水20試料，湧水10試料，池水18試料，河川水6試料，浄化

＊東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科
169 東京都新宿区百人町3-24-1
＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

槽放流水4試料の合計134試料である.

3．使用培地 試験管入りONPG-MUG培地(Colilert Test, 荏原インフィルコ), 及びLB培地, BGLB培地, EMB培地, 標準寒天培地(いずれも日水製薬製)を使用した.

4．ONPG-MUG法による培養操作 10mlの水を試験するための粉末培地入り試験管に各試料水を10ml入れ, スクリューキャップを締めてから転倒攪拌して培地を溶解させた. この試験管を36°Cで24時間培養して, 培地の黄変を確認した. 黄色の希薄なものはさらに4時間培養を延長し, 標準比色管(残留塩素のオルトトリジン比色法で0.1mg／l弱に相当する)と同等以上のものを陽性と判定した. さらに, この黄変を示した試験管に紫外線ランプ(波長366nm)を照射して蛍光の有無を確認した. 一部の試料については5本ずつの3段階による最確数試験も行った.

5．LB-BGLB法による培養操作 上水試験方法(1985)[12]に準じた. 2倍濃厚LB培地10ml入り発酵管に試料水10mlを入れ, 36°Cで24時間あるいは48時間培養を行ってガス産生の有無を確認した. ガス産生を認めたものは, その1白金耳量をBGLB培地発酵管に移植し, 36°Cで48時間培養後のガス産生を確認した. 一部の試料についてはONPG-MUG法と同様に最確数試験を行った.

6．供試菌株による検出感度の検討 すべての菌株は, あらかじめ標準寒天培地に画線して36°C, 20時間の前培養を行ってから, その1集落を釣菌して同条件で平板培地全面に塗抹培養した. この平板から菌体を白金耳で集めて希釈水(滅菌生理食塩水)に均一に浮遊させ, およそ10^8CFU／mlの菌液を調製した. これを10^{-3}CFU／mlまで10倍段階希釈し, このうちの10^2～10^{-3}CFU／mlの6段階の菌数系列を使用した. *A. hydrophila* と *P. aeruginosa* の2菌種は10^8～10^3CFU／mlの10倍希釈系列を用いた. これら10倍段階希釈菌液の各10mlをONPG-MUG, LB-BGLBの両培地に接種して36°Cで培養し, 所定の培養時間後判定を行った. ここで, 10ml中の接種菌数は, 10^2CFU／mlオーダーに希釈したものについて標準寒天培地で混釈後36°C, 24時間の培養を行い, 出現した集落を計数して換算した.

7．ONPG-MUG培地からの分離菌株の同定 各種水試料において, ONPG-MUG培地で黄変が認められた試験管から1白金耳量をEMB寒天培地に画線し, 36°C, 24時間培養した. 出現した形態の異なる集落について釣菌して標準寒天培地で再分離した. これらの菌株についてブドウ糖OF試験とオキシダーゼ試験を行ってから簡易同定キットAPI20EまたはAPI20NE(アスカ純薬)を使用して同定を行った.

8．分離菌の性状の再確認 属, 種が決定した菌株は, あらかじめ滅菌蒸留水10mlを入れたONPG-MUG培地とLB-BGLB培地に少量を接種し, 各条件下で培養を行った後, 判定した.

結　果

1．ONPG-MUG法による培地の色調変化及び検出最少菌数

標準菌株6株及び環境水分離菌株4株の計10株について, 同じ10^3オーダーの菌数濃度でONPG-MUG培地に接種し, 36°Cで培養した. 24時間経過後の各菌種の色調変化を標準菌株についてカラー写真(図1)に示した. 明らかに *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *C. freundii* の4菌種は鮮明な黄色を呈し, 菌数の違いによる黄色の濃淡差はみられなかった. ところが, *E. cloacae* は若干黄変濃度が薄く, 接種菌数によって色調に差がみられた. すなわち, 黄変した最少菌数は1.3×10^1CFUであったが, この黄色もやや希薄であり, 1桁ずつ菌数が増加するごとに黄色が濃厚となった. *E. agglomerans* はさらに希薄で, 7.5×10^3CFUの接種菌数でもわずかに黄変する程度であった. この傾向は環境分離株でも同様であった.

これら黄変した全試験管に紫外線ランプを照射したところ, 標準株, 環境分離株ともに *E. coli* のみが青白色の蛍光を発することが確認された. 蛍光の色調度合いで接種菌数の違いによる濃淡差はなかった(図2).

表1にはONPG-MUGとLB-BGLB培地で反応を示したときの最少接種菌数を記しているが, 標準株の *E. coli*, *K. oxytoca*, *C. freundii* の3菌種は1桁の菌数で両培地に反応を起こさせた. この時の菌数(10ml中)は, それぞれ1.8CFU, 1.9CFU, 1.0CFUであった. ところが, *K. pneumoniae* の場合はこれより高濃度の1.2×10^3CFU以上でないとONPG-MUG培地は黄変しなかったが, LB-BGLB培地では *E. coli* などと同様に1.2CFUの菌数レベルでガス産生が認められた. *E. cloacae* と *E. agglomerans* では, それぞれ1.3×10^1CFU, 7.5×10^2CFUの菌数で黄変が認められたが, ガス産生は10^7～10^8CFUの菌数でも示さなかった. また, 蛍光を発したのは *E. coli* のみであり, 黄変反応を示した接種菌数と同じ1.8CFUであった.

環境水分離株では, *E. coli* と *C. freundii* は標準株と同じく, それぞれ3.3CFU, 3.4CFUの1桁の菌数レベル

表1．大腸菌群（標準株及び環境分離株）の反応と陽性時の最少接種菌数

菌種		ONPG-MUG		LB-BGLB
		黄変	蛍光	ガス産生
Escherichia coli	JCM 1649	1.8×10^{0}	1.8×10^{0}	1.8×10^{0}
Citrobacter freundii	JCM 1657	1.0×10^{0}	−	1.0×10^{0}
Klebsiella pneumoniae	JCM 1662	1.2×10^{3}	−	1.2×10^{0}
K. oxytoca	JCM 1665	1.9×10^{0}	—	1.9×10^{0}
Enterobacter cloacae	JCM 1232	1.3×10^{1}	−	—
E. agglomerans	JCM 1236	7.5×10^{2}	−	−
Escherichia coli	KFRW 9180	3.3×10^{0}	3.3×10^{0}	3.3×10^{0}
Citrobacter freundii	KFRW 9135	3.4×10^{0}	−	3.4×10^{0}
Klebsiella pneumoniae	KFRW 9161	6.0×10^{0}	−	6.0×10^{0}
Enterobacter cloacae	KFRW 9154	7.4×10^{3}	−	7.4×10^{-1}

上段は標準株，下段は環境分離株について示す．
10ml 中の菌数(CFU)，−：最大接種菌数10^{8}～10^{9}CFU でも反応を示さないもの．

でONPG-MUG 培地の黄変とLB-BGLB 培地でのガス産生がみられた．しかし，*K. pneumoniae* は標準株の場合よりおよそ2桁少ない6.0×10^{0}CFU の菌数でONPG-MUG 培地を黄変させ，同時にLB-BGLB 培地でガスを産生した．*E. cloacae* のみは他の菌種とは異なり，黄変を示したのは7.4×10^{3}CFU が最少菌数であった．標準株との感度で約100倍の違いがあった．また同菌種の標準株ではLB-BGLB 培地からのガス産生はみられなかったが，分離株では7.4×10^{-1}CFU の接種菌数でガス産生を示した．このように同一菌種であっても菌株によって明らかに検出感度の面で相違が認められた．これらの菌株においても，ONPG-MUG 培地で蛍光が認められたのは *E. coli* のみであり，その最少反応菌数は標準株の場合と同様に3.3CFU の1桁レベルであった．

なお，大腸菌群に属さない細菌でONPG-MUG 培地を黄変させる，いわゆる疑似陽性(false-positive)を示すと言われる菌種についても検討を行った．まず，環境水からしばしば検出される *S. marcescens* が黄色を呈することが判明した．この反応は実験した最少接種菌数の8.4×10^{0}CFU レベルで起った．しかし，その黄変濃度はかなり希薄であり，*E. agglomerans* の10^{2}オーダー時の色調に相当するものであった．接種菌数を10倍ずつ増加して10^{8}段階まで試みたが，いずれの系列でも黄色度合いに濃淡差がみられなかった．次に *A. hydrophila* は，実験した最高菌数の1.3×10^{8}～10^{9}CFU レベルでONPG-MUG 培地を黄変することが確認でき，その濃淡差も明瞭に表れた．なお，*P. aeruginosa* は，10^{9}CFU の接種菌数でも黄変現象を起こすことはなかった．

2．各種水試料を対象としたONPG-MUG 法とLB-BGLB 法の比較

まず，シーズンオフ中の学校プール水46試料を用いて，最確数試験方法によって両培地で並行して培養を行った．プール水中の大腸菌群数は概して少なく，100倍希釈水では双方ともすべて陰性を示した．ONPG-MUG 法でONPG 反応陽性を呈したのは34試料(73.9%)であり，これに対してLB-BGLB 法のそれは17試料(37.0%)と少なく，明らかにONPG-MUG 法の陽性率が高かった．全試料のなかでONPG-MUG 法とLB-BGLB 法とが共通して陽性を呈した16試料(34.8%)について，陽性管数を原水，10倍希釈水の2段階について培養時間ごとに表2に示した．同時に蛍光が認められた試料1，2，5，10は，下段にその陽性管数を併記した．この4試料は両培養法の陽性管数が近似していた．すなわち，試料1，10では陽性管数が同一であり，それぞれ5－5－0(MPN：240)と5－0－0(MPN：23)であった．また試料2，5では10倍希釈系列の陽性管数に1本の差がみられたが，黄変試験管数はそれぞれ5－5－0(MPN：240)，5－3－0(MPN：79)であった．これら4試料の蛍光反応陽性管数はそれぞれ2－0－0(MPN：4.5)，4－0－0(MPN：13)，1－0－0(MPN：2)，5－3－0(MPN：79)であった．なお，ONPG-MUG 法でのみ陽性を示した18試料は，5－5－0(MPN：240)から1－0－0

表2．学校プール水をONPG-MUG及びLB-BGLB培地により最確数法（5本の3段階）で培養したときの陽性管数の比較

試料No.	ONPG-MUG			LB-BGLB				
	24h	28h	最確数	24h	48h	24h	48h	最確数
1	5-5	5-5	240	5-4	5-5	5-5	-	240
	2-0	2-0	4.5					
2	5-5	5-5	240	5-1	5-4	5-4	-	130
	1-0	1-0	2					
3	5-4	5-4	130	5-0	5-3	5-3	-	79
4	5-3	5-4	130	4-1	5-4	5-4	-	130
5	5-3	5-3	79	5-3	5-3	5-2	5-2	49
	5-3	5-3	79					
6	5-2	5-3	79	3-1	4-1	4-1	-	17
7	5-2	5-2	49	1-0	3-1	3-0	3-0	7.8
8	5-2	5-2	49	0-0	1-0	0-0	1-0	2
9	5-1	5-1	33	0-0	1-0	0-0	1-0	2
10	5-0	5-0	23	2-0	5-0	3-0	5-0	23
	4-0	4-0	13					
11	5-0	5-0	23	2-0	3-0	0-0	3-0	7.8
12	4-0	4-0	13	0-0	5-0	1-0	4-0	13
13	2-0	2-0	4.5	0-0	4-0	0-0	4-0	13
14	1-0	2-0	4.5	0-0	2-0	2-0	-	4.5
15	1-0	1-1	4	0-0	2-0	0-0	2-0	4.5
16	1-0	1-0	2	2-0	2-0	2-0	-	4.5

両培地で陽性となった16試料について，100倍希釈ではすべて陰性であったので10倍希釈までの2段階の陽性管数を示した．試料1，2，5，10は，ONPG-MUG法で蛍光を発したものであり，その試験管数を下段に示した．

(MPN：2)の範囲で陽性を示した．

ONPG-MUG培地を培養後24時間とさらに4時間の延長培養後に判定して陽性試験管数を比較したところ，まったく同数であったものが21試料(61.8%)あった．また，培養延長後に陽性管が増加した試料が13試料(38.2%)あり，9試料は10倍希釈水で，4試料は原水でみられた．これらの試験管はいずれも黄色が希薄で，陽性限界と同程度であった．

次に，学校プール水以外の大腸菌群の菌数オーダーが異なると思われた7種類(88試料)の試料水を選び，これらの10mlをONPG-MUGとLB-BGLBの1本ずつに接種して培養を行った．表3には陽性を呈したそれぞれの試料数と陽性率を示した．残留塩素(0.2～0.7mg／l)の含有水道タンク水20試料と営業用室内プール水10試料では，陽性反応を示したものはなかった．しかし，これら以外

表3．各種水試料をONPG-MUG法とLB-BGLB法で培養したときの陽性試料数

供試試料 （試料数）	ONPG-MUG		LB-BGLB
	黄変(%)	蛍光(%)	ガス産生(%)
水道水 (20)	0(0)	0(0)	0(0)
室内プール水 (10)	0(0)	0(0)	0(0)
井戸水 (20)	3(15)	0(0)	5(25)
湧水 (10)	4(40)	2(20)	4(40)
池水 (18)	12(67)	8(44)	13(72)
河川水 (6)	6(100)	6(100)	6(100)
浄化槽放流水 (4)	4(100)	4(100)	4(100)

の水試料では両培地で陽性反応が認められ，井戸水，湧水，池水ではONPG-MUG培地でそれぞれ15，40，67%がONPG陽性であった．河川水，浄化槽放流水はそれぞれ6試料，4試料とも両培地で100%の陽性率を示し，いずれの試料でも黄変と同時に蛍光反応が認められた．

3．ONPG-MUG反応陽性水試料から分離された菌株の性状

ONPG-MUG培地で陽性反応を示した各種水試料からの分離菌株の構成菌種の内訳を表4に示した．

プール水では，分離した菌株はすべて*Enterobacter*に属し，なかでも*E. cloacae*が45%と最も多かった．次いで，*E. sakazakii*，*E. agglomerans*，*E. amnigenus*であった．その他，*Serratia marcescens*もわずかに分離された．井戸水から分離された菌種は，*E. cloacae*，*S. marcescens*，*Pseudomonas*の3菌種で他の試料より少なかった．湧水では，*E. sakazakii*と*C. freundii*が最も多く，他に*E.coli*，*S. marcescens*などが分離された．池水からは，*E. coli*が39%，*E. cloacae*が31%と多く分離され，その他，*K. pneumoniae*や*Pseudomonas*などであった．河川水では，*E. cloacae*，*C. freundii*，*E. coli*がそれぞれおよそ25%から分離され，他に*K. pneumoniae*や*E. agglomerans*が分離された．浄化槽放流水からは*E. coli*が最も多く分離され，64%の分離率であった．その他，*E. cloacae*などもわずかながら分離された．

最後に，これら139株について，ONPG-MUG，LB-BGLB培養を並行して行い，それぞれが黄変，蛍光，

表4．ONPG-MUG陽性反応を示した各種水試料から分離された構成菌種の内訳

菌　種（属）	学校プール水 (n=12)	井戸水 (n=3)	湧水 (n=4)	池水 (n=12)	河川水 (n=6)	浄化槽放流水 (n=4)	合　計
分離菌株数	40	7	14	36	31	11	139
同定菌種数	5	3	6	6	6	4	9
Escherichia coli	−	−	2	14	7	7	30
Citrobacter freundii	−	−	4	−	8	−	12
Klebsiella pneumoniae	−	−	−	4	4	1	9
Enterobacter cloacae	18	4	1	11	8	2	44
E. sakazakii	9	−	4	2	1	−	16
E. agglomerans	7	−	−	1	3	−	11
E. amnigenus	4	−	−	−	−	−	4
Serratia marcescens	2	2	2	−	−	1	7
Pseudomonas spp.	−	1	1	4	−	−	6

表5．ONPG-MUG陽性反応を示した各種水試料から分離された菌種の性状

菌　種(属)　(株数)	ONPG-MUG		LB-BGLB
	黄変(%)	蛍光(%)	ガス産生(%)
Escherichia coli (30)	30(100)	30(100)	30(100)
Citrobacter freundii (12)	12(100)	0(0)	12(100)
Klebsiella pneumoniae (9)	9(100)	0(0)	9(100)
Enterobacter cloacae (44)	44(100)	0(0)	32(73)
E. sakazakii (16)	16(100)	0(0)	12(75)
E. agglomerans (11)	11(100)	0(0)	6(55)
E. amnigenus (4)	4(100)	0(0)	2(50)
Serratia marcescens (7)	7(100)	0(0)	0(0)
Pseudomonas spp. (6)	0(0)	0(0)	0(0)

及びガス産生を呈するか否かについて再確認を行った．表5に示したように，大腸菌群の3菌種 *E. coli*, *C. freundii*, *K. pneumoniae* は100％が黄変と同時にガス産生を示した．しかし，*Enterobacter* 属の4菌種はすべて黄変したが，25～50％の株にガス産生しないものがあった．ガス産生を示さなかった *S. marcescens* は7株とも黄変した．このように，*Enterobacter* 属と *Serratia* 属の一部がONPG-MUG培地で黄変を呈しながら，一方のLB-BGLBではガス産生しない，いわゆる疑似陽性反応を呈する主要菌種であることが判明した．なお，*E. coli* の30株はすべて黄変反応を呈すると同時に蛍光を発した．

考　察

乳糖(Lactose)の分解によるガスの産生で大腸菌群の存否を判定している現行の試験法は，本菌群が産生するβ-galactosidase(Lactase)等による酵素反応に基づくものであり，最終的にガス(CO_2+H_2)まで分解(発酵)されることを確認していることに他ならない．一般的に，細菌類を同定する際の一連の生化学的性状試験においても多くの糖類分解酵素の活性を調べ，それぞれの陽性，陰性反応から菌種の鑑別を行っている．この中の1項目にONPG試験があるが，これはβ-galactosidase活性による黄色の安定物質 *o*-nitrophenol を検出するものである(ONPG陽性反応)．他方のMUG試験は，もう一つの酵素であるβ-glucuronidase活性で起こる蛍光物質4-methylumbelliferon の遊離(MUG陽性反応)を確認する方法である．糖類分解酵素はこの他にもあるが，腸内細菌の多くはβ-galactosidase活性を示し，特に *E.coli* はじめ，*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* など大腸菌群の共通的な酵素反応である．一方のβ-glucuronidase は一部の *Shigella* や *Salmonella*[13] を除くと *E. coli* 特有の酵素であるといわれている[14]．これら2つの酵素反応を同時に起こさせて大腸菌群と *E. coli* を確認する方法が今回検討を行ったONPG-MUG培養法である．

本法の開発はKilianとBülow(1976)が多種類の腸内細菌等についてβ-galactosidaseをはじめとする種々の酵素活性を調べた報告に端を発しており，*E. coli*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* の他，*Shigella sonnei* や *S. marcescens* などで94％以上の株がβ-galactosidase(ONPG)陽性反応を示したとしている[14]．一方，Lapageら[15]は，*Aeromonas*, *Actinobacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium lividum*, *Erwinia herbicola* などの菌種でもONPG-MUG陽性を示すことがあると記述している．

さて，飲料水の大腸菌群試験に本法を用いた多くの調査報告があり[4-9]，これらの成績をもとにUSEPAでは導入を具体化したものと考えられる．しかし，1991年1月に至って，USEPA自身が *E. coli* の試験法としては問題があるとのコメントを発表し[16]，最終的な採否は保留の形となっている．この具体的内容は不明である．しかしながら，今回著者らが行った32株の *E. coli* についての検討結果からは，ONPG反応，MUG反応において問題点は見いだされなかった．

本論文の主目的は，現行試験法のLB-BGLB培養法との整合性にあった．いろいろな水試料を培養して比較すると，ONPG-MUG法の陽性率がかなり高く出ることがあった．この理由として二つのことが考えられる．第一に，ONPG-MUG法で陽性を示す大腸菌群のなかで水中からしばしば検出される *Enterobacter* 属には，LB-BGLB培養でのガス非産生株が25～50％ほど存在していたため，この差が現れたものと考えられた．このことは，本菌属が実際の水試料を培養したONPG-MUG陽性管から最も多く検出されたこと，及び再確認試験でも立証された．第二は，大腸菌群以外の菌種(乳糖非分解菌)がONPG反応を呈する，いわゆる疑似陽性の問題である．今回検討した *S. marcescens* 及び *A. hydrophila* がこれに該当する菌種である．しかし，前者では8.4CFU以上の接種菌数で黄変はしたものの，その色調は非常に希薄であった．また後者では，その反応菌数は10^8CFU以上のレベルであり，水道水はじめ一般環境水中にはそれほど高濃度に存在しているとは考えにくいので，実際上の疑似陽性問題は少ないと思われる．その他の *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, *Erwinia* などの菌種でも同様と考えられ，*Flavobacterium* については報告もある[17]．むしろ，ONPG疑似陽性問題を議論するよりも *Enterobacter* 属の大陽菌群としての位置づけが重要ではないかと考えられた．

最後に，ONPG-MUG法の培養時間，すなわち酵素反応時間については，延長時間をとらずに24時間を厳守した方が疑似陽性問題を回避することになろうと考えられた．このときの培養にはフラン器は不適であり，循環式恒温水槽を使用すれば温度も5分ほどで36℃まで上昇するので，24時間後に明瞭な黄色を呈したものを陽性と判定すべきであると考えられた．

結　語

水中の大腸菌群及び大腸菌の簡易迅速試験法として，酵素反応に基づくONPG-MUG法が従来のLB-BGLB法の代替試験法になり得るか否かを検討し，次の結果を得た．

1．大腸菌群の標準菌株(4属6種)と環境水分離菌株(4属4種)は，すべてONPG陽性(黄変)反応を呈し，なかでも *E. coli* は例外なくONPG，MUGとも陽性(黄変，蛍光)反応を呈することが確認された．

2．ONPG-MUG反応を呈する最少菌数は，*E. coli* が1.8～3.3CFU，*K. oxytoca* が1.9CFU，*C. freundii* が1.0～3.4CFUであり，良好な検出感度を示した．*K. pneumoniae*，*E. cloacae*，*E. agglomerans* ではそれぞれ6.0×10^{0}～1.2×10^{3}CFU，1.3×10^{1}～7.4×10^{3}CFU，7.5×10^{2}CFUであり，検出感度がやや低かった．

3．多くの水試料の培養比較から，ONPG-MUG法はLB-BGLB法よりも陽性率がかなり高かったが，この傾向は水中の大腸菌群数が相対的に少ない試料に顕著に表れた．

4．ONPG陽性を示す *Enterobacter* 属にガス非産生株の多いことが判明した．

5．ONPG反応は，培養24時間で明瞭に黄変したものを陽性と判定すれば，大腸菌群試験法として有用であった．

文　献

1) 森　伴雄：臨床と微生物，**18**(1)，51-56，1991
2) Hansen, W. and Yourassowsky, E.: *J. Clin. Microbiol.*, **20**(6), 1177-1179, 1984
3) Delisle, G. L. and Ley, A.: *J. Clin. Microbiol.*, **27**(4), 778-779, 1989
4) Edberg, S. C., Allen, M. J., Smith, D. B. and The National Collaborative Study: *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**(6), 1595-1601, 1988
5) Berg, J. D. and Fiksdal, L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**(8), 2118-2122, 1988
6) Edberg, S. C., Allen, M. J. and Simth, D. B.: *Wat. Sci. Tech.*, **21**(3), 173-177, 1989
7) Edberg, S. C., Allen, M. J., Smith, D. B. and The National Collaborative Study: *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**(4), 1003-1008, 1989
8) Lewis, C. M. and Mak, J. L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**(12), 3091-3094, 1989
9) Katamay, M. M.: *J. AWWA*, **82**(9), 83-87, 1990
10) Environmental Protection Agency: *Federal Register*, **54**(135), 29998-30002, 1989
11) Environmental Protection Agency: *Federal Register*, **55**(106), 22752-22756, 1990
12) 日本水道協会，厚生省監修：上水試験方法，1985
13) Trepeta, R. W. and Edberg, S. C.: *J. Clin. Microbiol.*, **19**(2), 172-174, 1984
14) Kilian, M. and Bülow, P.: *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B*, **84**, 245-251, 1976
15) Lapage, S. P., Efstratiou, A. and Hill, L. R.: *J. Clin. Path.*, **26**, 821-825, 1973
16) AWWA: *J. AWWA*, **83**(1), 17-18, 1991
17) Covert, T. C, Shadix, L. C., Rice, E. W., Haines, J. R. and Freyberg, R. W.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**(10), 2443-2447, 1989

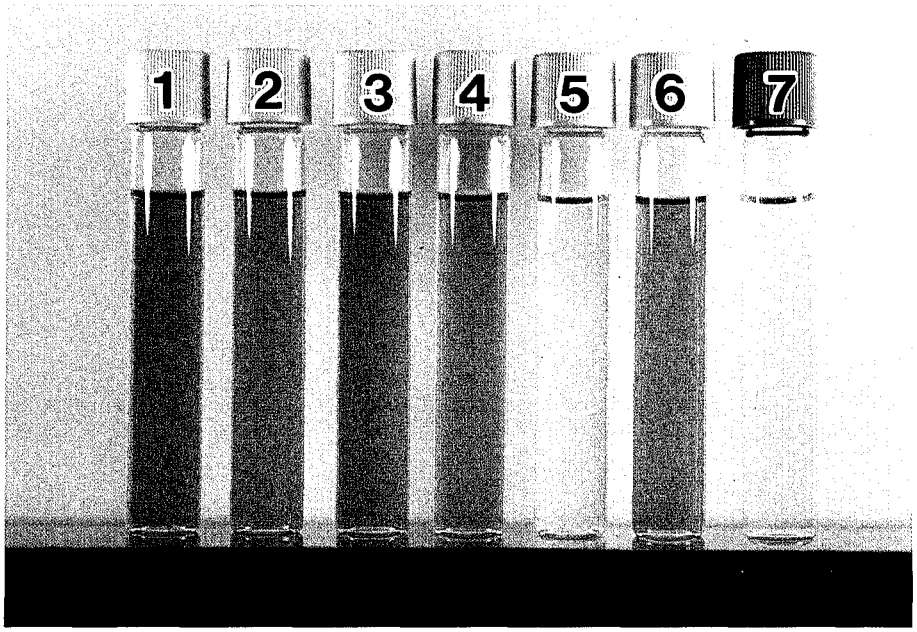


図1．*E. coli* JCM 1649(1), *K. pneumoniae* JCM 1662(2), *K. oxytoca* JCM 1665(3), *E. cloacae* JCM 1232(4), *E. agglomerans* JCM 1236(5), *C. freundii* JCM 1657(6)のONPG反応
(同じ接種菌数10^3 CFUオーダーで，菌種によって黄色の濃淡がみられた．No. 7は陽性反応の最低濃度を判定する比色管.)

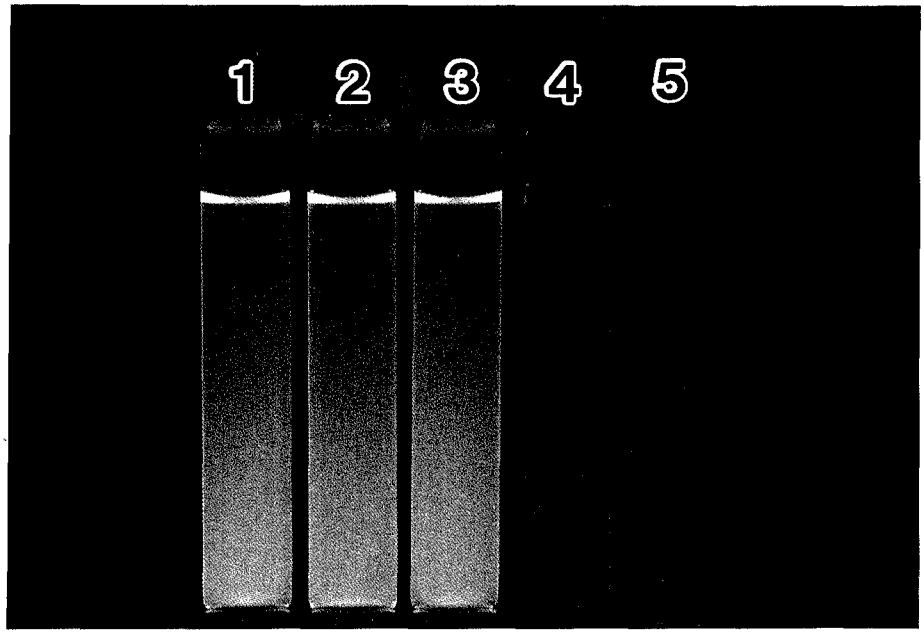


図2．*E. coli* 特有のMUG反応
(標準菌株，環境水分離株ともに青白色蛍光を発し，接種菌数1.8×10^2 CFU (No.1)～1.8×10^0 CFU(No. 3)による蛍光色の濃淡差はない.)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 203-209, 1991

東京都における1972～1987年の呼吸器疾患死亡率月変動の特徴

牧野国義**

Features of Monthly Transition of Death Rates for Respiratory Diseases in Tokyo, 1972-87

KUNIYOSHI MAKINO**

Features of monthly transition in death rates due to respiratory diseases (lung cancer, pneumonia-bronchitis and asthma) in Tokyo were examined by sex and area (ward-area and city-area of Tokyo) during the period from 1972-87 by using the methods for elements of death rates.

Expected death rates for pneumonia-bronchitis and asthma showed a clear trend in each year for both sexes and also in both areas. It was confirmed that the death rates for lung cancer and pneumonia-bronchitis were higher in males than in females, and similarly, in the ward-area than in the city-area. In contrast, the differences in death rates showed a tendency to increase between sexes and decrease between areas. Time trends of the death rates since January in 1972 increased monotonically for lung cancer and decreased monotonically for asthma. On the other hand, the trend for pneumonia-bronchitis varied in a complex way. Excess death rates for pneumonia-bronchitis were the highest of the three causes of death with many of them occurring in January.

Keywords：死亡率構成要素 Element of death rate, 呼吸器疾患 Respiratory disease

緒　言

東京都の昭和60年の訂正死亡率は，男女それぞれ388, 295，全国比はそれぞれ0.94，0.97で，都道府県の中では低い方になる．しかし，昭和40年の訂正死亡率の全国比はそれぞれ0.87，0.89で，年次的には全国平均に近づきつつある．このように，死亡率の地域比較は時間変化にも留意する必要がある．前年度にはこの時間変化のより明確な表現方法に焦点を当て，長期間の月別観測死亡率からの構成要素導出方法や東京都における主要死因の粗死亡率を用いた構成要素の推移について述べた[1]．本報では，大気汚染など環境要因の影響が懸念される呼吸器疾患死亡率についてこの方法を利用し，年齢構成の年次的変動による影響のある粗死亡率ではなく，この影響を削除した月別の訂正死亡率を用いて性別，地域別(区部，市部別)に構成要素を求め，その特徴と地域差，性差を検討した．

研究方法

1．死亡率資料

調査期間を1972～87年の16年間とし，東京都における気管，気管支及び肺の悪性新生物(以下肺がんと記す)，肺炎・気管支炎，喘息の3呼吸器疾患による性別，地域(区部，市部)別の訂正月死亡率(30日で換算)を用いて，前年度報告した方法[1]により，その構成要素である月死亡係数，トレンド，期待死亡率，超過死亡率を算出した．

2．解析方法

まず，観測死亡率と期待死亡率の12ヵ月までのコレログラムを求め，3死因の年周期性を検討し，性別，地域別に比較した．同様に，各構成要素について調査期間における特徴と性別，地域別の差を比較し，検討した．さらに，地域差，性差の時間的傾向を確認するために，観測死亡率と期待死亡率について月との相関，回帰分析を行った．

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

結　果

まず，3死因の観測死亡率と期待死亡率の調査期間における年次死亡率をTable 1に示した．年次死亡率の変動はそれほど激しくないが，月別の観測死亡率は非常に変動が激しい．3死因の中では月変動の小さい肺がんについて，性別，地域別の月別観測死亡率の推移をFig. 1に示した．肺がんの場合には増加傾向と性差が図から認められたが，月変動がさらに激しい他の2死因については月変動傾向は不明であった．

期待死亡率のコレログラムにより，Fig. 2のように年周期性をみると，3死因のうちでは肺炎・気管支炎や喘息が顕著で，期待死亡率の周期性が観測死亡率(図省略)よりも明確であった．また，性別，地域別にみると，肺がんや肺炎・気管支炎では区部・男が他とやや異なった

Table 1. Annual Observed and Expected Death Rates for Three Respiratory Diseases by Sex and Area (Ward-area and City-area) for 16 Years of 1972-87

Death Rate	Year	Lung Cancer Male Ward	Lung Cancer Male City	Lung Cancer Female Ward	Lung Cancer Female City	Pneumonia-Bronchitis Male Ward	Pneumonia-Bronchitis Male City	Pneumonia-Bronchitis Female Ward	Pneumonia-Bronchitis Female City	Asthma Male Ward	Asthma Male City	Asthma Female Ward	Asthma Female City
Observed	1972	207	160	80	74	281	249	247	226	64	49	53	52
	73	187	157	94	84	331	250	281	231	62	58	35	45
	74	199	146	93	70	313	290	265	242	60	49	51	49
	75	207	150	90	75	338	297	291	230	58	49	41	29
	76	222	183	87	78	281	304	248	202	48	40	35	40
	77	245	200	97	65	260	241	211	183	47	40	36	26
	78	238	208	106	74	285	261	215	188	38	52	31	27
	79	242	204	104	74	264	240	182	203	41	33	28	24
	80	247	202	108	70	303	313	238	216	40	44	39	26
	81	267	207	101	90	308	296	236	227	44	35	34	31
	82	262	196	119	90	307	282	229	216	48	29	33	23
	83	270	219	106	100	338	344	233	221	48	33	33	32
	84	284	232	111	96	311	278	218	193	39	25	32	21
	85	262	242	114	92	339	319	230	248	41	36	35	21
	86	269	220	103	119	324	329	238	231	45	32	32	35
	87	278	254	116	101	355	361	234	239	39	32	34	27
Expected	1972	196	157	77	69	278	234	245	215	58	43	46	40
	73	186	155	91	70	307	250	263	222	57	54	35	41
	74	190	141	88	67	307	275	263	226	57	43	43	45
	75	204	150	90	70	310	278	264	215	52	43	38	26
	76	222	177	87	69	258	264	220	178	44	37	34	33
	77	241	192	93	62	258	236	206	179	41	38	34	25
	78	235	192	104	71	281	244	199	179	38	39	30	27
	79	236	196	102	63	261	240	179	201	40	30	27	24
	80	243	194	105	68	291	288	221	212	39	41	35	25
	81	263	203	101	78	303	290	232	222	44	32	32	27
	82	260	196	115	88	305	280	227	216	45	29	33	23
	83	265	212	106	90	327	321	227	214	46	30	33	28
	84	274	223	110	89	310	278	218	193	39	25	32	21
	85	260	238	110	92	329	308	224	216	38	35	33	21
	86	266	220	102	107	323	326	232	229	43	31	31	30
	87	272	248	113	98	346	336	229	227	38	29	32	27

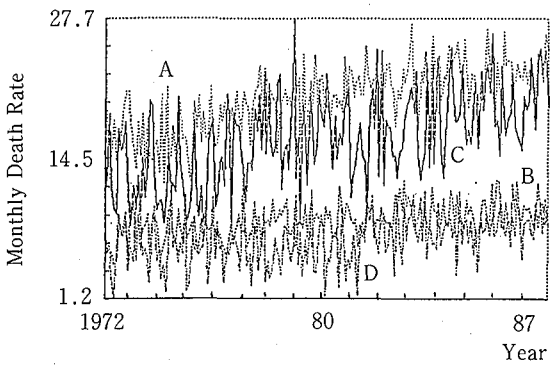


Fig. 1. Observed Monthly Death Rate for Lung Cancer by Sex and Area in the Study Period
A : Male & Ward, B : Female & Ward
C : Male & City, D : Female & City

曲線を描いた.

期待死亡率の推移を Fig. 3 に示した. 死亡率の高さは3死因とも Fig. 1 の肺がん同様に, 区部・男, 市部・男, 区部・女, 市部・女の順であった. さらに, Fig. 4 に, 期待死亡率の地域差(区部—市部), 性差(男—女)を示した. 図中の記号は各年の1月を表している. 喘息の場合は地域差, 性差ともに小さい. 一方, 肺がんや肺炎・気管支炎はともに男>女, 区部>市部が明らかで, 両死因とも年周期がみられた. この傾向は観測死亡率でも同様であったが, 予想されるように, 期待死亡率の方が明確であった. また, 観測死亡率と期待死亡率の地域差, 性差と月との相関, 回帰分析の結果を Table 2 に示した. 肺がんの場合, 地域差と月との相関は男女とも有意でなかったが, 負相関(男女それぞれ-0.130, -0.144)で減少傾向, 性差の場合は有意の正相関(それぞれ0.887, 0.800)で拡大傾向, 肺炎・気管支炎では, 地域差, 性差とも有意の相関(男女, 区部, 市部それぞれ-0.600, -0.672, 0.934, 0.866)で, 肺がんと同様の傾向であった. 一方, 喘息は地域差, 性差が他の2死因と男女, 区部, 市部とも逆の傾向(同様に, それぞれ0.193, 0.448, -0.558, -0.291)を示した.

月死亡係数(期待値 : 8.3)では, 肺がんは概ね期待値±1の範囲にあり, あまり季節変動を示さなかったが, 肺炎・気管支炎や喘息は冬高夏低の変化パターンで, 明らかな季節変動を示した(Fig. 5). 3死因の中では肺炎・気管支炎の変化が滑らかであった. これは肺炎・気管支炎の死亡数が多かったことにより, 偶然変動が小さかったためと考えられる. また, 8月に小さなピークがあり, 区部・男は他の地域, 性よりピークが低い. この差は, Fig. 2 の期待死亡率のコレログラムの区部・男と

Table 2. Correlation and Regression Analyses of Month in the Study Period with Difference Item between Areas or Sexes for Observed and Expected Death Rates in Each Factor of Sex or Area (Ward-area or City-area)

Cause of Death	Factor	Difference Item	Observed Death Rate Correlation Coefficient	Observed Death Rate Regression[a)] Slope	Observed Death Rate Regression[a)] Intercept	Expected Death Rate Correlation Coefficient	Expected Death Rate Regression[a)] Slope	Expected Death Rate Regression[a)] Intercept
Lung	Male	Area	−0.038	−0.003	3.93	−0.092	−0.002	3.97
Cancer	Female		−0.055	−0.003	1.69	−0.162*	−0.003	2.12
	Ward	Sex	0.520***	0.028	9.08	0.813***	0.026	8.84
	City		0.330***	0.028	6.84	0.621***	0.027	6.99
Pneumonia −	Male	Area	−0.191**	−0.019	3.30	−0.393***	−0.015	3.29
Bronchitis	Female		−0.274***	−0.021	3.60	−0.522***	−0.017	3.26
	Ward	Sex	0.484***	0.035	2.57	0.645***	0.035	2.61
	City		0.300***	0.033	2.87	0.656***	0.033	2.57
Asthma	Male	Area	0.041	0.001	0.53	0.104	0.001	0.62
	Female		0.115	0.004	0.02	0.230**	0.003	0.19
	Ward	Sex	−0.153*	−0.004	1.30	−0.337***	−0.003	1.23
	City		−0.036	−0.001	0.79	−0.162*	−0.002	0.80

＊ : $p<0.05$、＊＊ : $p<0.01$、＊＊＊ : $p<0.001$

a) Month Variable : January in 1972 = 1 、December in 1987 = 192(16Yr×12)

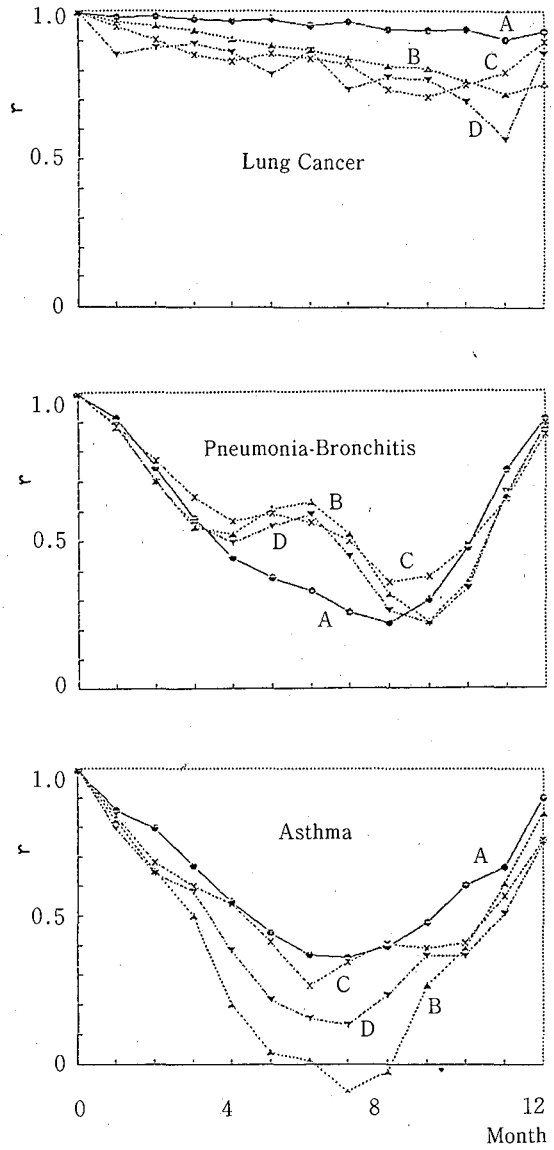


Fig. 2. Correlogram of Expected Monnthly Death Rates for Respiratory Diseases by Sex and Area
A(●——●) : Male & Ward,
B(▲·····▲) : Female & Ward
C(×·····×) : Male & City,
D(▼·····▼) : Female & City
r : Correlation Coefficient

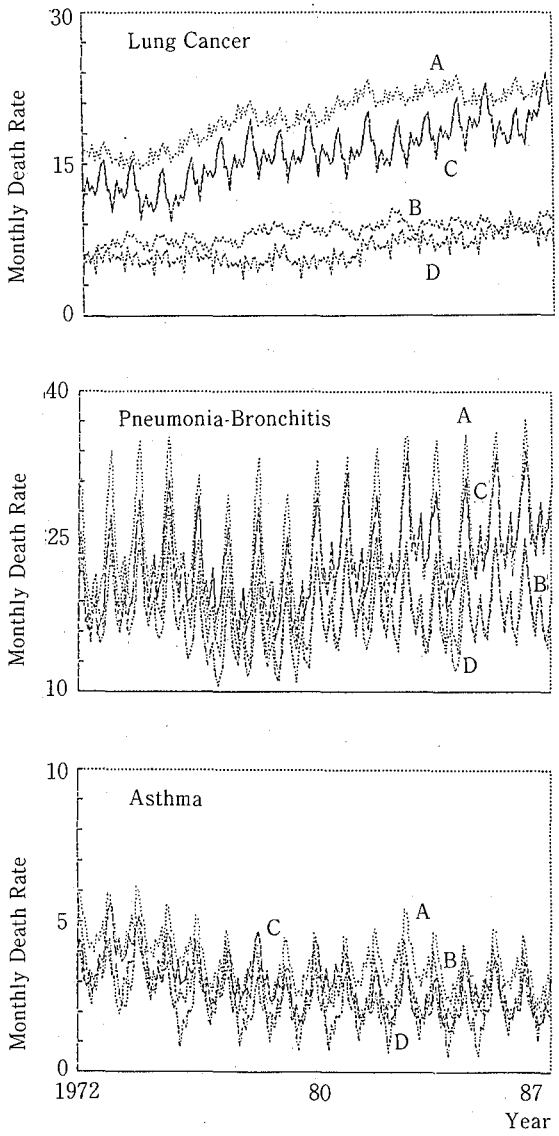


Fig. 3. Expected Monthly Death Rates for Respiratory Diseases by Sex and Area in the Study Period
A : Male & Ward, B : Female & Ward
C : Male & City, D : Female & City

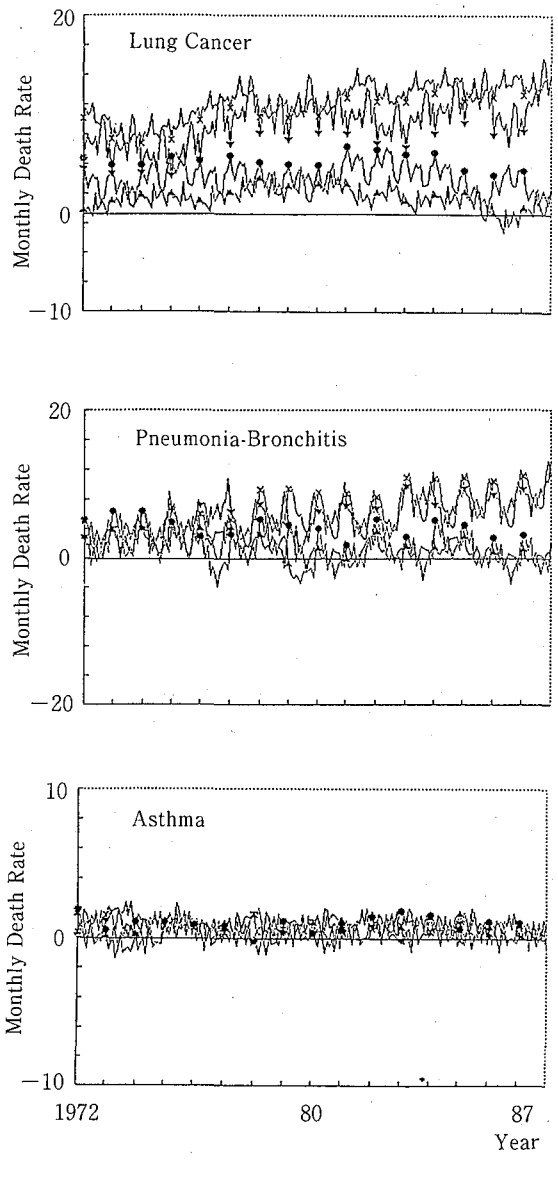


Fig. 4. Differences of Death Rate between the Areas or the Sexes
● : Ward–City for Male,
▲ : Ward–City for Female
× : Male–Female in Ward-area,
▼ : Male– Female in City-area

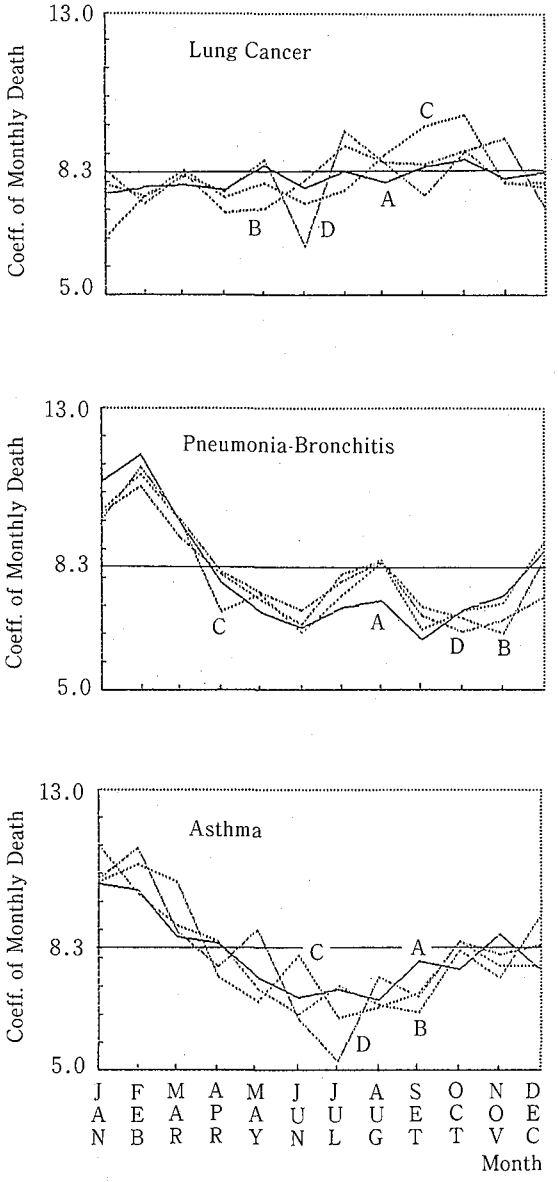


Fig. 5. Coefficient of Monthly Death by Sex and Area
A : Male & Ward, B : Female & Ward
C : Male & City, D : Female & City

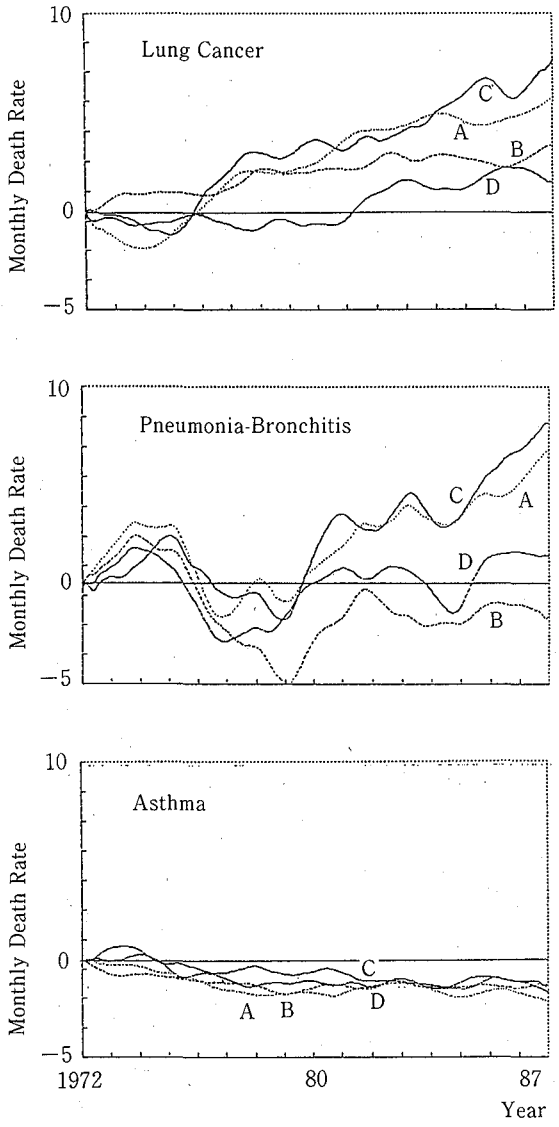


Fig. 6. Time Trends of Death Rates for Respiratory Diseases by Sex and Area
A : Male & Ward, B : Female & Ward
C : Male & City, D : Female & City

他の地域，性との差と関連すると考えられる．

次に，1972年1月の時点を0とするトレンドはFig. 6のようになった．肺がんや肺炎・気管支炎の場合，市部・男の増加が著しく，逆に，区部・女には鈍化傾向がみられた．全体に，肺がんは増加傾向で，肺炎・気管支炎は増減増のやや複雑な変化であった．一方，喘息の場合は地域，性でほとんど変わらず，漸減傾向であった．

なお，超過死亡率については，肺炎・気管支炎が3死因の中で高く，月別には，冬季，特に1月に集中した．他の2死因の場合は特定月に集中することはなかった．また，3死因とも期間前期に高い傾向がみられた．地域，性別には，肺がんと肺炎・気管支炎の場合，区部よりも市部で，喘息の場合，女よりも男に高い傾向がみられた．

考　察

呼吸器疾患の死亡率時系列の特徴に関して，死亡率の年次傾向，調査期間による季節変動による季節変動の相違，気象要素の死亡率への影響については既に検討し，報告した[2]．ここでは，呼吸器疾患死亡率の地域差，性差の時間的変化に焦点を当て，月変動の特徴や差の動向をより明確に見きわめるために，構成要素別に検討した．このような死亡率の差の時間的変化の研究は，死亡率に寄与する要因(以下死亡要因と記す)の重要な手がかりを示すにもかかわらず，報告例は比較的少ない．なお，この報告は，年齢構成の年次的変動により偏りが生じる粗死亡率ではなく，訂正死亡率を用いた．永田ら[3]やSametら[4]は，年齢階級別に分けて死亡率の推移を解析している．年齢層によりこの死亡要因が異なる場合などにはその必要があるが，個々の死亡数は少なくなり，偶然変動の影響が大きくなるので，通常の場合は訂正死亡率を利用した方が良いと思われる．

Fig. 2やFig. 5の肺炎・気管支炎で，区部・男と他の地域，性とに差がみられた原因について，現在のところ，これを説明できる情報を得ていない．職業的な要因の可能性はあるが，これについては詳細な検討が別に必要である．

肺がんや肺炎・気管支炎による死亡率の区部市部間の地域差が減少傾向にあることは，両疾患の死亡要因が異なるので，減少傾向の要因も必ずしも一致するとは考えられないが，人口移動や市部の都市化が背景要因にあると推察される．

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．

呼吸器疾患死亡率のトレンドについてはいくつか報告されているが[5-7]，いずれも年次変動で，月変動のトレンドをみていない．その必要性は解析目的により異なるが，Fig. 6のように，トレンドの特徴を把握するには月単位とした方がより緻密である．

特に肺炎・気管支炎の場合，超過死亡率が1月に多発した原因が低温や風邪・インフルエンザの流行にあることは容易に推察できる．しかし，市部が区部よりも高い原因については，区部と市部の気温差が考えられるが，

偶然変動の差である可能性もあり，明らかでない．両地域の冬季の有病率や呼吸器疾患有症率など関連要因の情報が得られると，この点が明らかになると思われる．

まとめ

1972年から1987年までの16年間の東京都における性別，地域(区部，市部)別の3呼吸器疾患(肺がん，肺炎・気管支炎，喘息)の月別訂正死亡率について構成要素(月死亡係数，トレンド，期待死亡率，超過死亡率)を算出し，月変動の特徴や地域差，性差を検討した．

3死因の中で，肺炎・気管支炎や喘息の期待死亡率は年周期性が著明であった．性別，地域別には，全体として大きな差はなかったが，区部・男の場合に，一部他の地域，性と異なった傾向がみられた．月死亡係数の傾向も年周期性と類似し，肺炎・気管支炎や喘息は冬高夏低傾向であった．また，期待死亡率の地域差，性差についてみると，肺がんや肺炎・気管支炎は明らかに男＞女，区部＞市部であったが，時間的には地域差が減少し，性差が拡大する傾向がみられた．一方，喘息の場合は地域，性で差がみられなかった．次に，1972年1月からのトレンドによると，肺がんは単調増加，喘息は単調減少，肺炎・気管支炎は増減増傾向を示した．性別，地域別には，肺がんや肺炎・気管支炎は市部・男の増加が他より顕著であった．また，超過死亡率は，3死因の中では肺炎・気管支炎が高く，1月に集中した．性別，地域別には，肺がんや肺炎・気管支炎が市部＞区部，喘息が男＞女であった．なお，これらの差を生じた原因については関連要因の情報を収集して別に解析する必要がある．

付記(本研究の概要は第61回日本衛生学会，1991年4月，で発表した．)

文献

1) 牧野国義：東京衛研年報，**41**，209-215，1990
2) 牧野国義，溝口　勲：東京衛研年報，**36**，283-289，1985
3) 永田久紀，石榑清司，浅野弘明：日衛誌，**37**，613-617，1981
4) Samet, J. M., Wiggins, C. L., Key, C. R. and Becker, T. M.: *AJPH,* **78**, 1182-1186, 1988
5) Halfon, N. and Newacheck, P. W.: *AJPH,* **76**, 1308-1311, 1986
6) Trichopoulos, D, Hatzakis, A. Wynder, E. Kalandidi, A. and Katsouyanni, K: *Environ. Res.,* **44**, 169-178, 1987
7) Williams, F. L. R., Llord, O. L. and Berry, W. G.: *AMBIO,* **16**, 206-210, 1987

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 210-213, 1991

東京湾の環境汚染モニタリング(第9報)*
平成元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 (IX)*
Residue Levels in Japanese Sea Bass and Gull in 1989

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

緒 言

1978年以来，環境庁の委託による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)の中の化学物質濃度の変化及び特徴を報告してきた[1].

PCB，ドリン類，DDT類など有機塩素系化合物による汚染は，減少傾向はみられるものの，依然として続いている．この環境汚染モニタリングの調査対象物質も最近では，昭和58年度にクロルデン類，60年度にTBT，そして今年度にはトリフェニルスズ化合物(TPT)が新たに加えられた．これは，これら化学物質の汚染が明らかになった結果の，行政側の対応である．TPTは，難分解性でかつ長期毒性があり，また昭和63年の環境庁の調査[2]によると国内の広い地域でその汚染が確認され，平成2年1月6日第2種特定化学物質に指定された．環境への汚染をできるだけ抑制し，人間への健康影響を未然に防ぐために，本調査の内容を充実し，継続的に監視していく必要がある．

本報告は，平成元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，平成元年10月千葉県船橋沖で捕獲された7尾を重量の順に1または2尾ずつまとめ5検体とした．ウミネコは，平成元年5月から7月にかけて羽田空港付近で捕獲された若鳥を採取日の順に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[3]により行った．詳

Table 1. Constitutions of Sea Bass Samples and Water and Fat Contents of the Muscle.(n＝1 or 2)

group No.	body weight(g) mean±SD	length*(cm) mean±SD	water(%)	fat(%)
1	2998	72.5	75.0	5.50
2	2515	67.0	73.7	6.02
3	2508	67.0	73.2	6.65
4	2462±28	65.8±1.8	74.1	5.73
5	2317±28	65.3±0.4	76.1	4.27
mean	2560	67.5	74.4	5.63

*：not included the part of tail fin

*第8報，東京衛研年報，41，220-222，1990.

**東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 169 東京都新宿区百人町3-24-1

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

Table 2. Constitutions of Black-Tailed Gull Samples 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	560±47	36.3±1.1	71.5	6.18
2	mix	589±72	35.0±1.5	69.8	7.28
3	mix	540±39	36.1±0.6	70.5	7.11
4	mix	608±57	36.9±1.4	71.9	6.05
5	mix	585±72	36.5±1.0	71.3	6.72
mean		576	36.2	71.0	6.67

細な操作法，分析条件は報告書[4]に記載した．

分析した化学物質は38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．化学物質濃度を比較する場合，年齢，体重，体長などを揃えて調査を行う必要があるが，今年度の検体は平均，体重2560g，体長67.5cmで，例年のスズキ(体重300～500g，体長30cm程度)に比べて大型であった．このことから，各測定値を昨年度の結果と単純に比較することは難しく，体長による濃度補正などが必要と考える．

PCB濃度は，昨年度の2倍の0.39 μg／gを示した．今年度のスズキは大型で年齢も高い(10年程度)ことから，PCBは，年月を経て，徐々にスズキの体内に蓄積していくことがわかる．ディルドリン濃度は，検体が大型であったにも関わらず例年とほぼ同程度であった．低濃度ではあるが，毎年検出される化学物質の1つである．DDT類濃度は昨年度の3倍であった．これも検体が大型であったためと考えられる．クロルデン類の濃度も，昨年度の3.5倍であった．β-HCHは，例年，検出限界値の0.001 μg／gか不検出であったのに対し，今年度は平均0.003 μg／gで全ての検体から検出された．しかし，他のα，γ，δ-HCHは検出されなかった．塩素化ベンゼン類は，昨年度は全く検出されなかったが，今年度はp-DCBが5検体全てから平均0.11 μg／gも検出され，また，1,2,4-TrCBとPeCBが5検体中2検体から検出された．TBT濃度は，平均0.24 μg／gで検体が大型であったにも関わらず，昨年度に比べ少し減少した．今年度より調査が始まったTPTの濃度は平均1.8 μg／gで，TBTに比べはるかに高濃度の汚染が確認された．

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．一昨年度，昨年度と上昇傾向にあったPCBとディルドリンの濃度は，今年度は減少した．DDT類では，*p, p'*-DDEのみ検出されたが，最近はあまり濃度変化はなく，例年と同程度の汚染であった．クロルデン類は，昨年度の半分以下の濃度レベルとなり，調査開始以来最低の値を示した．昭和61年9月に第1種特定化学物質に指定されて，使用が禁止されたためと考えられるが，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．β-HCHは今年度も検出された．塩素化ベンゼン類はp-DCB，1,2,4-TrCBが5検体中3検体から，1,2,3,4-TeCBとPeCBは1検体からのみ検出された．TBTは今年度も検出されなかったが，TPT濃度は平均0.04 μg／gでスズキに比べると低濃度ではあるが全検体から検出された．有機スズ化合物についてはこれまでTBTを調査してきたが，東京湾のウミネコからはTBTは検出されなかった．しかし，今回，TPTについて調査したところ，有機スズ化合物が初めて鳥類から検出された．高等動物においてもTBT以上にTPTの汚染が進んでいると考えられる．

TPTは，貝類，藻類の付着を防止するための船底塗料，漁網防汚剤や農薬の一成分として用いられた．平成元年度の環境庁の調査[5]によると，TPTによる汚染は東京湾のスズキやウミネコだけでなく，山田湾，日本海東北沖，三浦半島，伊勢湾，琵琶湖，大阪湾，鳴門，瀬戸内海，山陰沖，薩摩半島西岸と日本各地の魚貝類でも確認された．特に瀬戸内海・安芸灘のスズキは採取した5検体の全てが1.6 μg／g以上の濃度であり，WHO(世界保健機関)とFAO(国連食糧農業機関)が定めた1日許容摂取量(毎日，一生涯摂取した場合の安全許容量)である0.5 μg／kg体重／日(体重50kgの人が毎日96g食べるとして0.26 μg／g)をはるかに越える汚染であった．東京

Table 3. Concentrations of Pollutants in Muscle Tissues of Sea Bass and Black-Tailed Gull.

compound	Sea Bass		Black-Tailed Gull	
	range[a]	mean[a]	range[a]	mean[a]
PCB*1	0.29−0.56	0.39	1.1−1.9	1.4
PCN*2	nd	nd	nd	nd
HCB	0.002−0.009	0.004	0.010−0.012	0.011
aldrin	nd	nd	nd	nd
dieldrin	0.002−0.003	0.003	0.005−0.010	0.007
endrin	nd	nd	nd	nd
o, p'-DDT	nd	nd	nd	nd
p, p'-DDT	0.004−0.012	0.007	nd	nd
o, p'-DDE	nd−0.003	−	nd	nd
p, p'-DDE	0.017−0.042	0.027	0.19−0.31	0.23
o, p'-DDD	0.003−0.004	0.004	nd	nd
p, p'-DDD	0.008−0.015	0.011	nd	nd
trans-chlordane	0.005−0.009	0.007	nd	nd
cis-chlordane	0.017−0.035	0.025	0.002−0.004	0.003
trans-nonachlor	0.024−0.060	0.042	0.027−0.078	0.051
cis-nonachlor	0.010−0.026	0.017	0.006−0.028	0.012
oxychlordane	0.001−0.003	0.001	0.013−0.023	0.018
heptachlor	nd	nd	nd	nd
HCE	nd	nd	0.001−0.002	0.002
α-HCH	nd	nd	nd	nd
β-HCH	0.001−0.006	0.003	0.012−0.018	0.014
γ-HCH	nd	nd	nd	nd
δ-HCH	nd	nd	nd	nd
o-DCB*1	nd	nd	nd	nd
m-DCB*1	nd	nd	nd	nd
p-DCB*1	0.09−0.15	0.11	nd-0.02	−
1,2,3-TrCB	nd	nd	nd	nd
1,2,4-TrCB	nd−0.003	−	nd−0.003	−
1,3,5-TrCB	nd	nd	nd−0.001	−
1,2,3,4-TeCB	nd	nd	nd	nd
1,2,3,5-TeCB	nd	nd	nd	nd
1,2,4,5-TeCB	nd	nd	nd	nd
PeCB	nd−0.005	−	nd−0.001	−
DnBP*3	nd	nd	nd	nd
DEHP*3	nd	nd	nd	nd
TBP*1	nd	nd	nd	nd
TBT*4	0.20−0.33	0.24	nd	nd
TPT*2	1.3−2.3	1.8	0.03−0.05	0.04

a : μg/g on wet weight basis

＊1 : nd<0.01, ＊2 : nd<0.02, ＊3 : nd<0.1, ＊4 : nd<0.05

others : nd<0.001

湾のウミネコからもTPTが検出されたことから，魚を常食とするわれわれ人間にも何らかの健康影響が懸念される．塗料業界は現在TPTの生産・販売を自主的に停止しているが，第1種特定化学物質に指定され，使用禁止となったトリブチルスズオキシド(TBTO)を除くTBT類13種は，平成2年9月12日に第2種特定化学物質に指定されたものの，未だ使用禁止にはなっていないことから，TPTもTBTも共に今後とも注意深く監視していく必要がある．また，TBT，TPTの分解生成物であるジフェニル体，ジブチル体の生体内蓄積についても調査の必要があると考えられる．

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，**41**，220-222，1990
2) 環境庁編：化学物質と環境，**No.**15，1989
3) 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
4) 東京都立衛生研究所：平成元年度生物モニタリング結果報告書，1990
5) 環境庁編：化学物質と環境，**No.**16，1990

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 214-220, 1991

都内幹線道路沿道周辺の大気浮遊粉塵中の多環芳香族炭化水素濃度について

多田宇宏*, 斎藤育江*, 狩野文雄*, 加納尭子*

The Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Contents of Ambient Particulate Matters Collected near an Arterial Road in Tokyo

TAKAHIRO TADA, IKUE SAITO, FUMIO KANOH and TAKAKO KANOH

Keywords：大気浮遊粉塵 ambient particulate matters, 多環芳香族炭化水素 polycyclic aromatic hydrocarbons, 季節変動 seasonal variation

緒　言

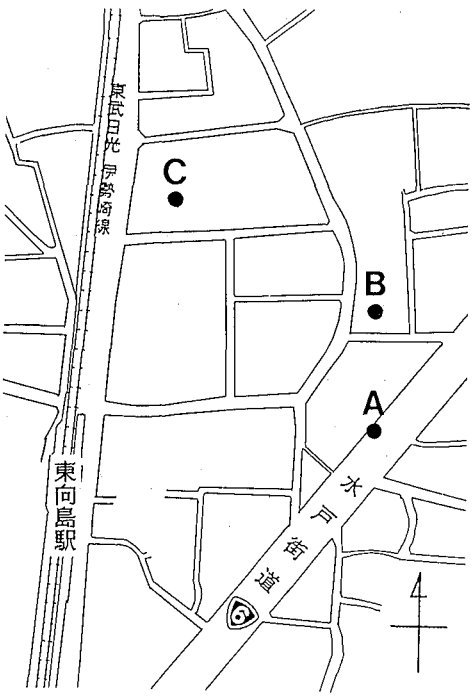
疫学調査によれば，都市の大気汚染濃度の高い地区に居住する住民には，呼吸器症状の有症率が高いことが報告されている[1,2]．交通量の増加とともに幹線道路の沿道周辺では，大気浮遊粉塵が増加している．大気浮遊粉塵中には，化石燃料の燃焼過程から生ずる多種の多環芳香族炭化水素(以下PAHと略す)を含有している[3,4]．

これらPAHの中には，ベンゾ(a)ピレンのような発ガン性物質も数多く存在し，環境汚染や住民への健康影響が問題となっている．そこで我々は，都内幹線道路周辺に居住する住民の大気汚染物質による健康影響を調査する疫学調査の一環として，幹線道路沿道周辺のPAH濃度〔ベンゾ(K)フルオランテン，ベンゾ(a)ピレンおよびベンゾ(ghi)ペリレン〕を沿道距離別(沿道0m，沿道20m，沿道150mおよび対照地)，季節別(2月，5月，8月および11月)および粉塵粒径別(7.0μm以上，7.0～3.3μm，3.3～2.0μm，2.0～1.1μmおよび1.1μm以下)に測定し，PAH濃度による大気汚染の汚染状況を検討した．

実験方法

1．試料採取

1987年8月より1990年2月までの間(2月，5月，8月および11月)の計11回浮遊粉塵試料採取を実施した．採取地点は，都内水戸街道沿道周辺地域の道路端から北西側に距離0m地点(互福堂薬局前)，距離20m地点(向島保健所)，距離150m地点(東京都向島歯科医師会)(図1)および対照地点の東大和市水道管理事務所で，地上1.2mの位置にアンダーセン・ハイボリュームエアサンプラー(日本科学工業製，紀本電子製および柴田科学器



A：沿道0m　B：沿道20m　C：沿道150m

図1．採取地点

＊東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究料　〒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

機製，分粒特性：7.0 μm 以上，7.0～3.3 μm，3.3～2.0 μm，2.0～1.1 μm および1.1 μm 以下)を設置した．試料採取は6日間，(1987年8月および1987年11月は7日間)流量約570 l／min で石英繊維ろ紙(Pallflex AHQ-630 350 mm φ，2500 QAST 253×203 mm)に捕集した．

2．試料調整

1)粉塵量：粉塵採取フィルターは，室温で湿度50%に保ったデシケーター内に2日間放置して恒湿化した後，直ちに0.1mg の位まで秤量し，採取前の秤量値を差し引いて粉塵量を求めた．

2)PAH 分析試料：ステージフィルターの1／4部分およびバックアップフィルターを50mm φ のベルトポンチでくり抜いた部分に，ベンゼン・エタノール(3：1体積比)8 ml を加えて20分間超音波抽出した．その後抽出液を3,000r.p.m. で15分間遠沈処理した．その上澄液4 ml を共栓付遠沈管に移し，5％水酸化ナトリウム5 ml を加え試験管ミキサーで激しく攪拌した後，遠沈処理した．その上澄液(ベンゼン層)2 ml を共栓付試験管にとり，ロータリーエバポレーターで減圧乾固し，残渣をジメチルスルホオキシド(DMSO)に溶解して，PAH〔ベンゾ(k)フルオランテン，ベンゾ(a)ピレンおよびベンゾ(ghi)ペリレン〕分析の試料とした[5-7]．

3．試　薬

ベンゼン，エタノール(残留農薬試験用，和光純薬)，アセトニトリル(液体クロマトグラフ用，和光純薬)，ジメチルスルホオキシド(ルミナゾール，同人化学)，水酸化ナトリウム(特級，和光純薬)，ベンゾ(k)フルオランテン(R. K chemical)，ベンゾ(a)ピレン(和光純薬)，ベンゾ(ghi)ペリレン(アルドリッチ)

4．分析装置

高速液体クロマトグラフィー(日本分光800シリーズ)

5．分析条件

カ　ラ　ム：Finepac SIL-C_{18}p (50 mm×4.6 mmI.D.)
　　Finepac SIL-C_{18}(250 mm×4.6 mmI.D.)
カラム温度：35°C
移　動　相：アセトニトリル：水(80：20 体積比)
流　　量：1.5 ml／min
検　出　器：分光蛍光光度計(日本分光820-FP)
　　励起波長370 nm，蛍光波長410 nm

結果および考察

PAH 濃度の測定結果は，表1から表11に示した．3種類の PAH，ベンゾ(k)フルオランテン(以下 B(k)F と略す)，ベンゾ(a)ピレン(以下 B(a)P と略す)およびベ

表1．1987年8月の粒径別の粉塵量および PAH 濃度

場所	粒径 μm	粉塵量 μg/m³	B(k)F ng/m³	B(a)P ng/m³	B(ghi)P ng/m³
0m	>7.0	79.1	0.057	0.094	0.116
	7.0～3.3	19.7	0.031	0.038	0.041
	3.3～2.0	11.1	0.049	0.077	0.083
	2.0～1.1	10.6	0.080	0.125	0.134
	1.1>	57.2	1.129	1.476	1.969
	total	177.7	1.347	1.809	2.343
20m	>7.0	34.3	0.024	0.043	0.031
	7.0～3.3	11.9	0.019	0.025	0.026
	3.3～2.0	5.7	0.034	0.062	0.068
	2.0～1.1	7.8	0.093	0.170	0.222
	1.1>	30.5	0.809	1.086	1.404
	total	90.2	0.979	1.386	1.752
150m	>7.0	32.0	0.018	0.031	0.020
	7.0～3.3	15.0	0.015	0.022	0.018
	3.3～2.0	5.9	0.029	0.052	0.048
	2.0～1.1	8.2	0.067	0.122	0.122
	1.1>	27.5	0.509	0.726	0.905
	total	88.6	0.637	0.953	1.111
東大和	>7.0	28.3	0.006	0.009	0.014
	7.0～3.3	13.4	0.013	0.016	0.020
	3.3～2.0	6.4	0.016	0.025	0.026
	2.0～1.1	10.0	0.041	0.060	0.091
	1.1>	42.8	0.238	0.340	0.624
	total	100.9	0.313	0.451	0.775

表2．1987年11月の粒径別の粉塵量および PAH 濃度

場所	粒径 μm	粉塵量 μg/m³	B(k)F ng/m³	B(a)P ng/m³	B(ghi)P ng/m³
0m	>7.0	106.4	0.048	0.098	0.198
	7.0～3.3	23.9	0.060	0.092	0.120
	3.3～2.0	14.5	0.084	0.145	0.151
	2.0～1.1	15.2	0.214	0.386	0.392
	1.1>	98.9	2.540	4.479	5.710
	total	259.0	2.947	5.470	6.571
20m	>7.0	34.3	0.028	0.047	0.046
	7.0～3.3	13.5	0.061	0.084	0.086
	3.3～2.0	7.8	0.087	0.148	0.134
	2.0～1.1	11.9	0.276	0.482	0.410
	1.1>	56.0	1.761	3.251	2.944
	total	123.5	2.214	4.012	3.620
150m	>7.0	33.2	0.032	0.048	0.062
	7.0～3.3	12.7	0.052	0.069	0.070
	3.3～2.0	8.4	0.112	0.190	0.195
	2.0～1.1	11.8	0.258	0.536	0.471
	1.1>	56.6	1.885	3.494	3.236
	total	122.7	2.340	4.337	4.033
東大和	>7.0	26.5	0.007	0.014	0.012
	7.0～3.3	11.0	0.019	0.027	0.017
	3.3～2.0	5.8	0.034	0.052	0.033
	2.0～1.1	8.5	0.120	0.178	0.155
	1.1>	38.5	0.899	1.509	1.741
	total	90.2	1.080	1.780	1.959

表3．1988年2月の粒径別の粉塵量およびPAH濃度

場所	粒径 μm	粉塵量 μg/m³	B(k)F ng/m³	B(a)P ng/m³	B(ghi)P ng/m³
0m	>7.0	113.7	0.051	0.097	0.172
	7.0~3.3	32.0	0.053	0.091	0.086
	3.3~2.0	18.1	0.074	0.146	0.115
	2.0~1.1	14.3	0.195	0.324	0.291
	1.1>	93.2	2.225	4.288	3.975
	total	271.3	2.597	4.947	4.641
20m	>7.0	42.8	0.035	0.046	0.052
	7.0~3.3	17.0	0.051	0.092	0.073
	3.3~2.0	10.3	0.094	0.148	0.125
	2.0~1.1	10.1	0.198	0.421	0.328
	1.1>	57.9	2.041	3.028	2.737
	total	138.0	2.419	3.735	3.315
150m	>7.0	42.1	0.023	0.046	0.046
	7.0~3.3	15.7	0.051	0.078	0.075
	3.3~2.0	10.6	0.111	0.156	0.144
	2.0~1.1	10.5	0.231	0.440	0.416
	1.1>	57.7	1.838	3.112	2.887
	total	136.6	2.255	3.832	3.568
東大和	>7.0	44.8	0.011	0.018	0.019
	7.0~3.3	20.0	0.029	0.036	0.034
	3.3~2.0	12.3	0.040	0.061	0.042
	2.0~1.1	11.1	0.143	0.212	0.200
	1.1>	65.3	1.263	1.631	1.737
	total	153.5	1.486	1.958	2.033

表4．1988年5月の粒径別の粉塵量およびPAH濃度

場所	粒径 μm	粉塵量 μg/m³	B(k)F ng/m³	B(a)P ng/m³	B(ghi)P ng/m³
0m	>7.0	58.9	0.096	0.105	0.295
	7.0~3.3	13.6	0.057	0.061	0.126
	3.3~2.0	7.2	0.109	0.131	0.248
	2.0~1.1	10.4	0.258	0.368	0.645
	1.1>	51.1	1.459	1.787	3.046
	total	141.1	1.979	2.453	4.361
20m	>7.0	22.5	0.027	0.028	0.039
	7.0~3.3	7.5	0.035	0.038	0.079
	3.3~2.0	2.9	0.079	0.093	0.172
	2.0~1.1	6.4	0.159	0.206	0.396
	1.1>	29.8	0.926	0.895	1.660
	total	69.1	1.225	1.261	2.347
150m	>7.0				
	7.0~3.3				
	3.3~2.0		欠測		
	2.0~1.1				
	1.1>				
	total				
東大和	>7.0	13.5	0.010	0.011	0.019
	7.0~3.3	7.4	0.014	0.013	0.022
	3.3~2.0	4.1	0.029	0.025	0.056
	2.0~1.1	6.1	0.067	0.073	0.130
	1.1>	21.4	0.373	0.292	0.725
	total	52.5	0.493	0.412	0.952

表5．1988年8月の粒径別の粉塵量およびPAH濃度

場所	粒径 μm	粉塵量 μg/m³	B(k)F ng/m³	B(a)P ng/m³	B(ghi)P ng/m³
0m	>7.0	76.0	0.103	0.115	0.289
	7.0~3.3	15.2	0.042	0.047	0.093
	3.3~2.0	8.2	0.060	0.071	0.127
	2.0~1.1	8.4	0.113	0.149	0.265
	1.1>	49.4	1.134	1.681	2.813
	total	157.2	1.452	2.063	3.587
20m	>7.0	14.6	0.017	0.019	0.038
	7.0~3.3	6.1	0.010	0.013	0.021
	3.3~2.0	2.8	0.022	0.028	0.052
	2.0~1.1	4.1	0.057	0.076	0.197
	1.1>	20.3	0.466	0.562	1.310
	total	48.0	0.572	0.697	1.618
150m	>7.0	13.3	0.014	0.013	0.022
	7.0~3.3	7.1	0.012	0.013	0.021
	3.3~2.0	3.1	0.017	0.021	0.040
	2.0~1.1	4.5	0.060	0.075	0.169
	1.1>	22.1	0.585	0.665	1.513
	total	50.1	0.688	0.788	1.764
東大和	>7.0	8.1	0.007	0.005	0.009
	7.0~3.3	5.0	0.007	0.007	0.011
	3.3~2.0	2.2	0.011	0.012	0.019
	2.0~1.1	2.7	0.033	0.037	0.095
	1.1>	15.9	0.251	0.292	0.753
	total	33.9	0.309	0.353	0.888

表6．1988年11月の粒径別の粉塵量およびPAH濃度

場所	粒径 μm	粉塵量 μg/m³	B(k)F ng/m³	B(a)P ng/m³	B(ghi)P ng/m³
0m	>7.0	115.0	0.152	0.212	0.380
	7.0~3.3	24.1	0.106	0.129	0.238
	3.3~2.0	12.7	0.132	0.177	0.238
	2.0~1.1	13.4	0.319	0.458	0.577
	1.1>	78.9	3.450	5.912	8.093
	total	244.1	4.158	6.888	9.525
20m	>7.0	28.7	0.056	0.060	0.104
	7.0~3.3	9.6	0.055	0.058	0.087
	3.3~2.0	3.4	0.105	0.126	0.166
	2.0~1.1	8.7	0.374	0.533	0.633
	1.1>	41.0	2.342	3.609	4.258
	total	91.4	2.932	4.386	5.247
150m	>7.0	31.1	0.045	0.048	0.064
	7.0~3.3	11.6	0.069	0.075	0.104
	3.3~2.0	4.8	0.136	0.164	0.241
	2.0~1.1	10.1	0.284	0.430	0.484
	1.1>	44.8	2.116	2.958	3.368
	total	102.4	2.651	3.676	4.262
東大和	>7.0	12.3	0.013	0.016	0.023
	7.0~3.3	6.4	0.043	0.046	0.069
	3.3~2.0	3.7	0.064	0.071	0.093
	2.0~1.1	6.7	0.206	0.254	0.320
	1.1>	35.1	1.418	1.766	2.749
	total	64.2	1.744	2.153	3.254

表7．1989年2月の粒径別の粉塵量およびPAH濃度

場所	粒径 μm	粉塵量 μg/m³	B(k)F ng/m³	B(a)P ng/m³	B(ghi)P ng/m³
0m	>7.0	63.6	0.027	0.049	0.091
	7.0~3.3	15.7	0.031	0.054	0.050
	3.3~2.0	8.8	0.068	0.099	0.084
	2.0~1.1	8.9	0.148	0.232	0.177
	1.1>	56.3	1.466	2.334	2.660
	total	153.4	1.741	2.770	3.063
20m	>7.0	17.5	0.015	0.018	0.030
	7.0~3.3	7.5	0.029	0.037	0.031
	3.3~2.0	4.4	0.051	0.068	0.052
	2.0~1.1	7.3	0.187	0.270	0.191
	1.1>	31.4	1.084	1.184	1.445
	total	68.1	1.366	1.577	1.747
150m	>7.0	18.2	0.013	0.021	0.026
	7.0~3.3	8.1	0.022	0.029	0.026
	3.3~2.0	4.0	0.053	0.065	0.055
	2.0~1.1	6.7	0.121	0.176	0.127
	1.1>	30.4	0.898	0.944	1.276
	total	67.2	1.107	1.236	1.509
東大和	>7.0	12.4	0.006	0.006	0.012
	7.0~3.3	5.5	0.013	0.013	0.019
	3.3~2.0	3.5	0.023	0.032	0.020
	2.0~1.1	4.6	0.062	0.084	0.073
	1.1>	23.6	0.680	0.595	0.876
	total	49.6	0.783	0.730	1.000

表8．1989年5月の粒径別の粉塵量およびPAH濃度

場所	粒径 μm	粉塵量 μg/m³	B(k)F ng/m³	B(a)P ng/m³	B(ghi)P ng/m³
0m	>7.0	98.8	0.053	0.086	0.165
	7.0~3.3	20.5	0.062	0.053	0.091
	3.3~2.0	16.1	0.133	0.123	0.197
	2.0~1.1	19.1	0.237	0.252	0.391
	1.1>	83.8	1.891	2.744	3.758
	total	238.3	2.376	3.258	4.603
20m	>7.0	25.8	0.017	0.020	0.041
	7.0~3.3	9.2	0.031	0.025	0.043
	3.3~2.0	5.1	0.036	0.033	0.058
	2.0~1.1	8.6	0.132	0.134	0.236
	1.1>	43.8	0.987	0.912	1.575
	total	92.5	1.203	1.124	1.954
150m	>7.0	23.5	0.039	0.047	0.053
	7.0~3.3	8.3	0.029	0.023	0.040
	3.3~2.0	4.2	0.039	0.029	0.064
	2.0~1.1	6.1	0.099	0.080	0.166
	1.1>	42.4	1.006	0.764	1.541
	total	84.4	1.212	0.943	1.865
東大和	>7.0	17.7	0.009	0.009	0.020
	7.0~3.3	6.6	0.014	0.010	0.019
	3.3~2.0	6.1	0.026	0.026	0.051
	2.0~1.1	10.6	0.070	0.076	0.156
	1.1>	37.7	0.495	0.346	0.952
	total	78.6	0.612	0.468	1.198

表9．1989年8月の粒径別の粉塵量およびPAH濃度

場所	粒径 μm	粉塵量 μg/m³	B(k)F ng/m³	B(a)P ng/m³	B(ghi)P ng/m³
0m	>7.0	60.5	0.032	0.042	0.099
	7.0~3.3	17.5	0.032	0.034	0.052
	3.3~2.0	8.5	0.047	0.053	0.074
	2.0~1.1	7.3	0.085	0.110	0.147
	1.1>	48.5	1.124	1.594	2.146
	total	142.3	1.320	1.832	2.517
20m	>7.0	31.1	0.014	0.015	0.024
	7.0~3.3	11.6	0.017	0.017	0.026
	3.2~2.0	4.7	0.027	0.029	0.046
	2.0~1.1	4.5	0.056	0.068	0.125
	1.1>	21.9	0.464	0.406	0.849
	total	73.9	0.578	0.535	1.069
150m	>7.0	36.0	0.016	0.019	0.032
	7.0~3.3	12.1	0.023	0.023	0.039
	3.3~2.0	5.4	0.041	0.048	0.087
	2.0~1.1	4.9	0.067	0.091	0.181
	1.1>	21.7	0.538	0.502	1.187
	total	80.1	0.686	0.682	1.526
東大和	>7.0	23.3	0.017	0.016	0.032
	7.0~3.3	7.4	0.011	0.010	0.022
	3.3~2.0	3.9	0.031	0.033	0.063
	2.0~1.1	5.5	0.061	0.079	0.166
	1.1>	21.7	0.326	0.339	0.976
	total	61.7	0.446	0.477	1.259

表10．1989年11月の粒径別の粉塵量およびPAH濃度

場所	粒径 μm	粉塵量 μg/m³	B(k)F ng/m³	B(a)P ng/m³	B(ghi)P ng/m³
0m	>7.0	132.6	0.138	0.192	0.297
	7.0~3.3	24.1	0.081	0.105	0.127
	3.3~2.0	14.6	0.167	0.250	0.292
	2.0~1.1	17.0	0.411	0.683	0.725
	1.1>	104.3	4.507	7.742	8.251
	total	292.6	5.305	8.972	9.692
20m	>7.0	37.4	0.053	0.061	0.090
	7.0~3.3	11.5	0.083	0.098	0.128
	3.3~2.0	6.9	0.172	0.239	0.292
	2.0~1.1	10.8	0.369	0.606	0.652
	1.1>	70.1	3.252	4.606	5.503
	total	136.7	3.930	5.609	6.665
150m	>7.0	34.6	0.047	0.053	0.081
	7.0~3.3	10.6	0.091	0.104	0.147
	3.3~2.0	6.9	0.142	0.189	0.246
	2.0~1.1	11.5	0.425	0.670	0.771
	1.1>	62.5	3.077	3.930	4.809
	total	126.0	3.782	4.946	6.054
東大和	>7.0	26.2	0.030	0.029	0.052
	7.0~3.3	8.3	0.056	0.060	0.087
	3.3~2.0	7.0	0.122	0.161	0.198
	2.0~1.1	9.6	0.262	0.378	0.442
	1.1>	47.3	1.928	2.259	3.325
	total	98.4	2.397	2.887	4.104

表11. 1990年2月の粒径別の粉塵量およびPAH濃度

場所	粒径 μm	粉塵量 μg/m³	B(k)F ng/m³	B(a)P ng/m³	B(ghi)P ng/m³
0m	>7.0	150.1	0.067	0.086	0.166
	7.0~3.3	28.6	0.063	0.075	0.100
	3.3~2.0	13.4	0.099	0.134	0.171
	2.0~1.1	14.9	0.238	0.353	0.438
	1.1>	72.8	1.939	3.058	4.112
	total	279.9	2.407	3.717	4.986
20m	>7.0	28.5	0.034	0.037	0.062
	7.0~3.3	7.4	0.046	0.049	0.073
	3.3~2.0	3.7	0.104	0.125	0.175
	2.0~1.1	9.4	0.255	0.341	0.464
	1.1>	35.9	1.291	1.332	2.182
	total	84.8	1.731	1.883	2.957
150m	>7.0	30.9	0.030	0.030	0.054
	7.0~3.3	8.9	0.038	0.039	0.058
	3.3~2.0	6.4	0.083	0.094	0.142
	2.0~1.1	8.4	0.240	0.319	0.445
	1.1>	34.8	1.374	1.369	2.500
	total	89.4	1.765	1.851	3.200
東大和	>7.0	20.5	0.018	0.017	0.030
	7.0~3.3	7.1	0.026	0.024	0.039
	3.3~2.0	6.7	0.056	0.054	0.090
	2.0~1.1	8.0	0.133	0.156	0.234
	1.1>	29.2	0.824	0.755	1.493
	total	71.5	1.057	1.007	1.886

ンゾ(ghi)ペリレン(以下B(ghi)Pと略す)との濃度間には，有意水準1％で，それぞれ有意な相関が認められた．

相関係数は，B(k)FとB(a)Pは0.973

B(k)FとB(ghi)Pは0.966

B(a)PとB(ghi)Pは0.958であった．

このことからB(k)F，B(a)PおよびB(ghi)Pの発生源は，同一源に由来すると考えられた．

1)距離別PAH濃度

沿道0m地点の3種のPAH濃度を，それぞれ1とした時，各測定点〔沿道20m，沿道150mおよび対照地点(以下東大和と略)〕の3種のPAH濃度間における濃度比は，

B(k)Fでは，それぞれ

0.665±0.153，0.636±0.133，0.363±0.110

B(a)Pでは，それぞれ

0.553±0.163，0.517±0.155，0.260±0.074

B(ghi)Pでは，それぞれ

0.569±0.107，0.557±0.106，0.342±0.083

であり，沿道20mと沿道150mとの間には，各PAH共にその濃度間には，有意差は認められなかった．しかし，沿道20mと沿道150mを後背地と考えて，沿道0mと後

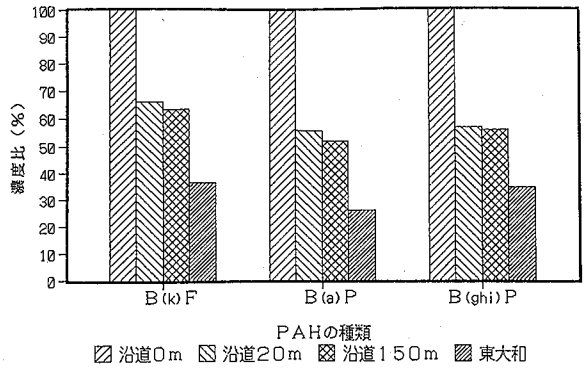


図2．PAH濃度の距離減衰

背地および東大和の各PAH濃度値を比べると，濃度間に有意差が認められ，各PAH濃度の距離減衰が明らかとなった(図2)．すなわち，沿道0mの濃度の平均値は，後背地および東大和の濃度の平均値に対して，B(k)Fは約1.6倍と約2.8倍，B(a)Pは約1.9倍と約3.9倍，B(ghi)Pは約1.8倍と約2.9倍と高い値を示した．また東京都環境科学研究所による昭和57年度から昭和59年度の小笠原父島でのB(a)Pの測定値[8]は，対照地点の東大和市のそれと比べて約10分の1から30分の1であった．今調査の対照地点である東大和市のB(a)P濃度は，小笠原父島の10~30倍を示したことから，都内のほぼ全域において，PAHによる汚染が進行しているものと考えられた．

2)季節別PAH濃度

沿道0m，沿道20m，沿道150mおよび東大和のPAH濃度の季節変化を，図3から図6に示した．季節別PAH濃度は，1989年2月(大喪の礼のための大幅な交通規制がなされた)を除いて，三物質ともその濃度は，11

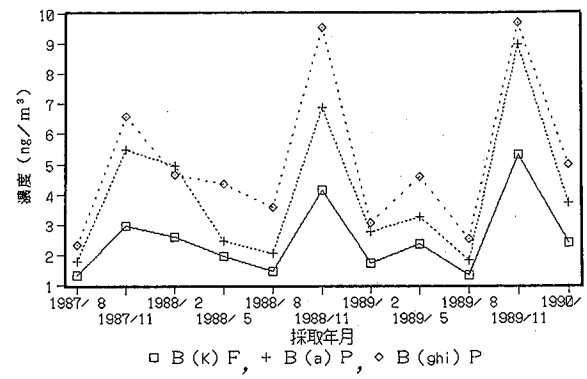


図3．PAH濃度の季節変化　沿道0m

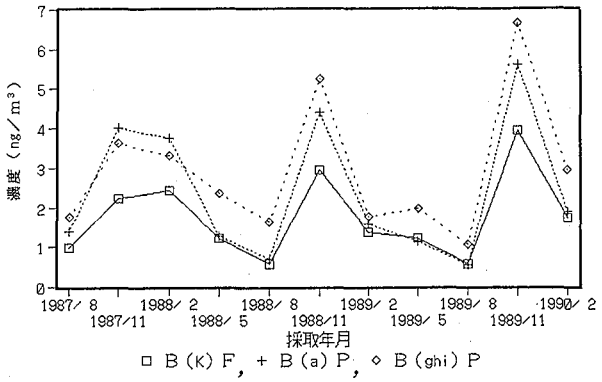


図4．PAH濃度の季節変化　沿道20m

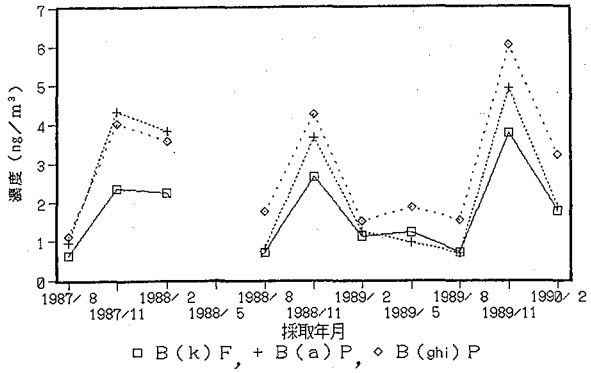


図5．PAH濃度の季節変化　沿道150m

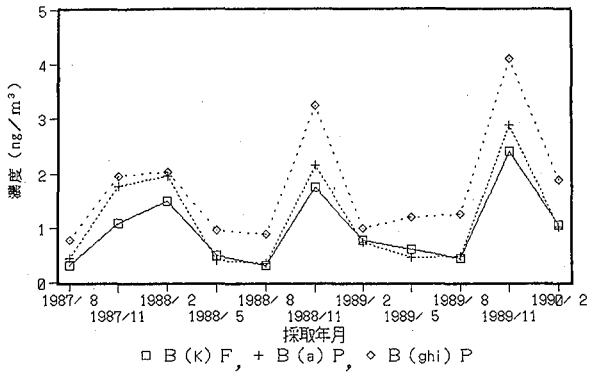


図6．PAH濃度の季節変化　東大和

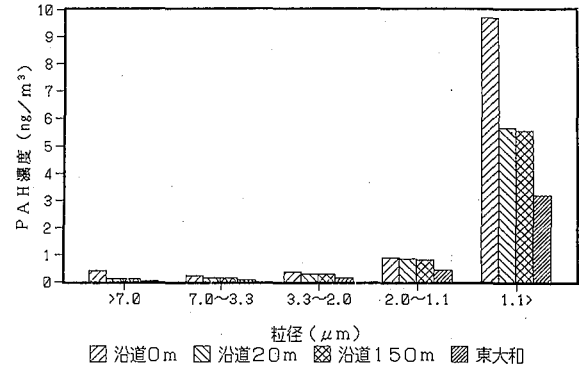


図7．粒径別PAH濃度(1)

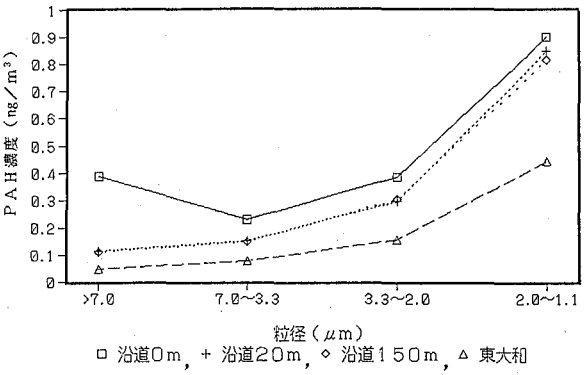


図8．粒径別PAH濃度(2)

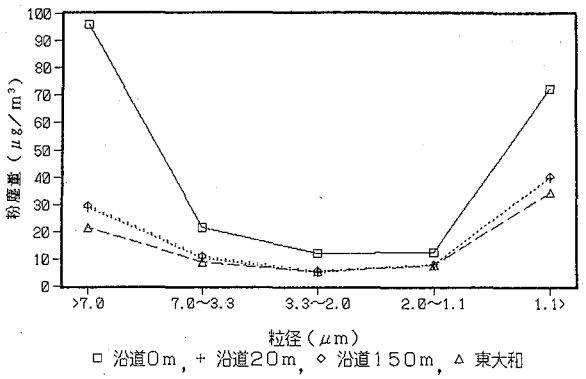


図9．粒径別粉塵量

月＞2月＞5月＞8月の順に高い値を示し，冬期は高く夏期に低かった．夏期は気温が高く紫外線量も多いため，PAHの分解が促進され低濃度を示したものと考えられた．冬季のPAH濃度が高い理由の一つとして，暖房使用により増加した大気汚染物質が，逆転層の形成により拡散しにくくなることが考えられた．

3)粒径別PAH濃度

粒径別のPAH濃度は，表1から表11に示した．沿道0m以外では粒径が小さくなるに従って，PAH濃度が高くなり，粒径1.1μm以下のPAH量は全体の約8割を占めた(図7)．しかし，沿道0mでは粒径7.0～3.3μmのPAH濃度が極小値を示した(図8)．沿道0mでは

一度沈降した粉塵が自動車などによって巻き上げられた結果，粒径の大きい7.0μm以上の粉塵量(図9)が多くなりそのPAH濃度の絶対値が高くなったためと考えられた.

粉塵単位重量あたりのPAH濃度は粒径が小さくなるほど高くなり，粒径1.1μm以下では粒径7.0μm以上と比べ約20～30倍であった.

PAH濃度が高い粒径1.1μm以下の粒子は肺胞内に取り込まれ易いことから，肺およびその他の臓器などへの影響が危惧される.

4)気象条件によるPAH濃度

測定期間中の気象要素の風向と風速については，葛飾大気汚染常時測定局の測定結果[9]を参考にした．また降水量については，東京管区気象台の測定結果[9]を参考にした．風向については2月は北よりの風，5月，8月は南から東よりの風，11月は西から北西よりの風の頻度が高かった.

風速については8月(平均風速2.0～2.5m／sec)に強く，2月(平均風速0.9～1.7 m／sec)，11月(平均風速1.0～1.2 m／sec)に弱かった.

降水量については5月(65.5～103.0 mm)，8月(42.5～76.0 mm)に多く，11月(0.0～13.0 mm)が少なかった.

これらの結果から，PAH濃度は風が弱く降水量が少ない時に高く，風が強く降水量が多い時に低く，PAH濃度と平均風速および降水量との間には，有意な逆相関が認められた.

沿道0mのB(k)F，B(a)PおよびB(ghi)Pの濃度と平均風速および降水量の相関係数は

B(k)Fが　−0.676(＊)，−0.707(＊)

B(a)Pが　−0.772(＊＊)，−0.784(＊＊)

B(ghi)Pが　−0.695(＊)，−0.696(＊)であった.

ただし(＊＊)は1％で有意，(＊)は5％で有意

このことからPAH濃度が，気象状況により大きく影響される事が推察された.

(本研究は昭和62年，63年および平成元年度の東京都衛生局公害保健課事業「大気汚染保健対策に係わる環境調査」の一環として実施したものである.)

文　献

1) 常俊義三，山口泰正，中山典子，上田美代子：日本公衆衛生雑誌，**24**，293-300，1977
2) 新田裕史，小野雅司，安達史朗，横山泰彦，青木繁伸，前田和甫，中江公祐，森沢　康：日本公衆衛生雑誌，**30**，381-389，1983
3) 松下秀鶴：油化学，**25**，711-720，1976
4) 松下秀鶴：大気汚染学会誌，**24**，418-428，1989
5) 松下秀鶴，塩崎卓哉，加藤幸彦，後藤純雄：分析化学，**30**，362-368，1981
6) 菅　邦子，石黒辰吉，松下秀鶴：大気汚染学会誌，**17**，117-125，1982
7) 塩崎卓哉，田辺　潔，松下秀鶴：大気汚染学会誌，**19**，300-307，1984
8) 東京都環境科学研究所：浮遊粒子状物質等測定データ集，昭和62年3月
9) 東京都環境保全局大気保全部：大気汚染常時測定局測定結果報告　昭和62年8月～平成2年2月

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 221-228, 1991

大気浮遊粉塵中の重金属量について
——幹線道路沿道より距離による濃度特性——

佐藤泰仁*, 加納堯子*

Heavy Metal Contents in Suspended Particulate Matters of Atmosphere
Density Profile versus Distance from Road site

YASUHITO SATO* and TAKAKO KANOH*

Keywords：heavy metals 重金属, ambient particulate matters 大気浮遊粉塵, arterial road 幹線道路, density profile 距離減衰

はじめに

昭和62年度より開始された大気汚染の健康影響を解明するための疫学調査(一定地域の大気汚染による健康影響と大気汚染状況との関連をみることにより，大気汚染の健康被害を未然に防止する)に関連しての環境調査の一環として東京都内9地域において，大気浮遊塵を採取し，その浮遊粉塵量および粉塵中の金属成分量を測定した．今回は調査開始より平成2年3月分までの3年度分の調査データについて，幹線道路沿道からの距離による濃度特性等を中心に解析を行なった結果を報告する．

測定場所及び測定方法

今回の調査では区部4地区，市町村部5地区で大気中浮遊粉塵を採取した(図1，表1)．それぞれの地域において公共または民間の建造物を用いて，幹線道路沿い(0m)およびその後背部(20m，150m)に3つの測定点を設けて試料採取を行なった．

試料の採取方法並びに分析方法は既報[1,2]に準じた．また，試料の採取は毎月の月始め3日間，全測定点で一斉に実施した．

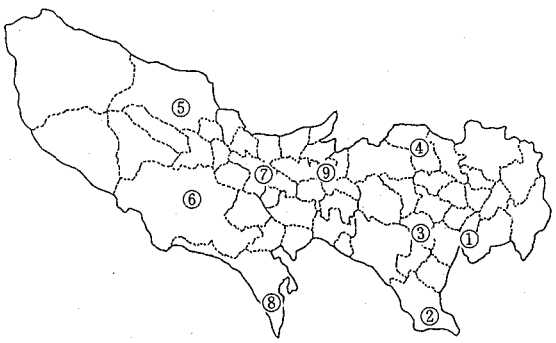


図1．都区内及び市町村部の測定点

表1．調査及び調査場所(1)

イ) 区部

No.	地区	幹線道路名	測定点	施設名
①	中央	清澄通り	0m	区立月島第一小学校前
			20m	区立月島第一幼稚園内
			150m	恵愛堂薬局内
②	大田	産業道路	0m	リリー(美容院)前
			20m	糀谷福祉事務所内
			150m	糀谷文化センター内
③	渋谷	山手通り	0m	大和クリーニング前
			20m	大和クリーニング内
			150m	区立富ヶ谷小学校内
④	板橋	中仙道	0m	志村警察署前
			20m	志村警察署内
			150m	小豆沢病院内

*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
*Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Pablic Health 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan.

表１．調査及び調査場所 (2)

ロ)市町村部

No.	地区	幹線道路名	測定点	施設名
⑤	青梅	奥多摩街道	0m	米山勇宅内
			20m	米山勇宅内
			150m	西多摩酒類協同組合
⑥	八王子	甲州街道	0m	渡部工業㈱前
			20m	渡部工業㈱内
			150m	清水クリーニング内
⑦	立川	立川通り	0m	矢嶋孝行宅前
			20m	矢嶋孝行宅内
			150m	高松地域センター内
⑧	町田	旧町田街道	0m	エミー乳業㈱前
			20m	エミー乳業㈱内
			150m	都営森野第二アパート
⑨	田無	新青梅街道	0m	レストラン京樽前
			20m	レストラン京樽内
			150m	都営本町７丁目

結果及び考察

1)浮遊粉塵量について

各調査地区における３年度分をまとめた浮遊粉塵量の平均値と標準偏差を表２に，その変動を図２に示す．今回の９調査地区の浮遊粉塵濃度は幹線０m地点でみると，中央区が49.3 μg／m³，大田区が57.3 μg／m³，渋谷区が69.9 μg／m³，板橋区が65.3 μg／m³，青梅市が35.5 μg／m³，八王子市が46.8 μg／m³，立川市が46.7 μg／m³，町田市が47.8 μg／m³，田無市が62.4 μg／m³であり，都環境保全局の資料[3]による区部の平均値である50 μg／m³を上まわっているのは４地区(大田，渋谷，板橋および田無)であった．すなわち，浮遊粉塵量の年間

表２．地区別距離浮遊粉塵量の平均値と標準偏差

(単位：μg／m³)

調査地区	0 m 平均±標準偏差	20m 平均±標準偏差	150m 平均±標準偏差
中央	49.3±19.64	46.7±21.74	51.4±22.24
大田	57.3±19.10	46.9±20.89	43.1±18.61
渋谷	69.9±28.51	38.3±19.12	41.7±19.61
板橋	65.3±30.93	50.9±25.40	48.2±24.75
青梅	35.5±15.75	29.4±15.17	30.0±15.20
八王子	46.8±17.82	36.8±16.69	39.8±18.03
立川	46.7±20.05	38.5±14.98	34.5±17.58
町田	47.8±20.66	36.0±19.30	40.2±16.88
田無	62.4±29.45	50.6±26.76	41.9±23.36

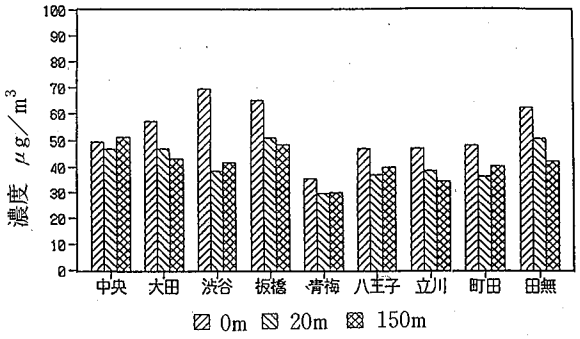


図２．地区別距離別浮遊粉塵量の変動

表３．調査地区の各地点間における浮遊粉塵量及び金属成分の平均値の差の検定結果 (1)

地区		0∞20m	0∞150m	20∞150m
中央	浮遊粉塵量			
	Pb			
	Zn			
	Cu			
	Fe			
	Mn			
	Cr			
大田	浮遊粉塵量	*	**	
	Pb			
	Zn			
	Cu		*	**
	Fe	**	**	
	Mn	*		*
	Cr			
渋谷	浮遊粉塵量	**	**	
	Pb	*		
	Zn	*		
	Cu	**	**	*
	Fe	**		**
	Mn			
	Cr	*	*	

＊＊は１％，＊は５％の危険率である。

表3．—(2)

地区		0∞20m	0∞150m	20∞150m
板橋	浮遊粉塵量	*	*	
	Pb			
	Zn			
	Cu			
	Fe			
	Mn			
	Cr			
青梅	浮遊粉塵量			
	Pb			
	Zn			
	Cu			
	Fe	**	**	
	Mn			
	Cr			
八王子	浮遊粉塵量	*		
	Pb			
	Zn			
	Cu	**		
	Fe	**	**	
	Mn			
	Cr			

表3．—(3)

地区		0∞20m	0∞150m	20∞150m
立川	浮遊粉塵量		*	
	Pb			
	Zn			
	Cu		*	
	Fe	*	**	
	Mn			
	Cr			
町田	浮遊粉塵量	*		
	Pb			
	Zn	*		
	Cu	**	**	*
	Fe	**	**	
	Mn			
	Cr			
田無	浮遊粉塵量		**	
	Pb			
	Zn			
	Cu	**	**	*
	Fe	*	**	
	Mn			
	Cr			

平均値は区部の測定値が高く，市部の測定値が低い傾向がみられるが，自動車の走行台数が多い新青梅街道に面する田無地域の沿道0m点で，区部のそれに匹敵する粉塵濃度を認めた．次に表2の結果をもとに，各調査地区の0m地点と20m地点並びに150m地点の粉塵濃度の測定値間における平均値の差を検定し，濃度の距離減衰について検討した(表3)．その結果，0mと20mの測定値間で有意差が認められた地区は大田，板橋(ともに危険率5%)，渋谷(危険率1%)の3区と八王子市，町田市(ともに危険率5%)の2市の5地区であり，0mと150m地点の測定値間で有意差が認められたのは，上記の3区と立川市(危険率5%)および田無市(危険率1%)であった．すなわち，これらの調査地区においては幹線道路沿道(0m)とその後背地点との間に粉塵濃度の距離減衰が存在すると認められる．しかし，20mと150m地点の測定値には，いずれの調査地区でも有意な差は認められなかった．

また，区部においては中央区が，市部においては青梅市が各地点間の有意差が認められなかった．この2地区は3測定地点の環境条件が酷似するため，このような結果を示したものと判断される．このことは後背地点においても0m地点と同じような交通量の道路に面していることが後日の現地調査からも確認された．

平成元年度における各調査地区の浮遊粉塵量の月別変化を図3に示した．調査地区により若干の違いはあるが，冬季に高い傾向がみられる．これは従来の大気汚染調査における浮遊粉塵の季節変動と同様の傾向である．

2)重金属成分について

各種重金属成分につき，各調査地区の距離別データの3年度分をまとめた平均値と標準偏差を表4に，各成分の変動グラフを図4～図9に示した．

なお，ヒ素(As)とバナジウム(V)はデータ数が少ないため統計処理を省略した．

粉塵中の重金属濃度は調査地区によって多少の変動がみられるが，沿道0m地点が後背地点より高く，また区部は市部より高い傾向がみられている．

各重金属成分の3年度分の平均値について，各調査地区の0m地点と20m地点並びに150m地点の間，および20m地点と150m地点の間の差の検定を行った(表3)．

大田区の調査地区では鉄(Fe)およびマンガン(Mn)の濃度は沿道0m地点に対して，後背地点(20m)が有意(危険率1%)に高かった．また，沿道0m地点に対して後背地点(150m)では，銅(Cu)の濃度が有意(危険率5%)に低値を示したが，Feの濃度は有意(危険率1%)

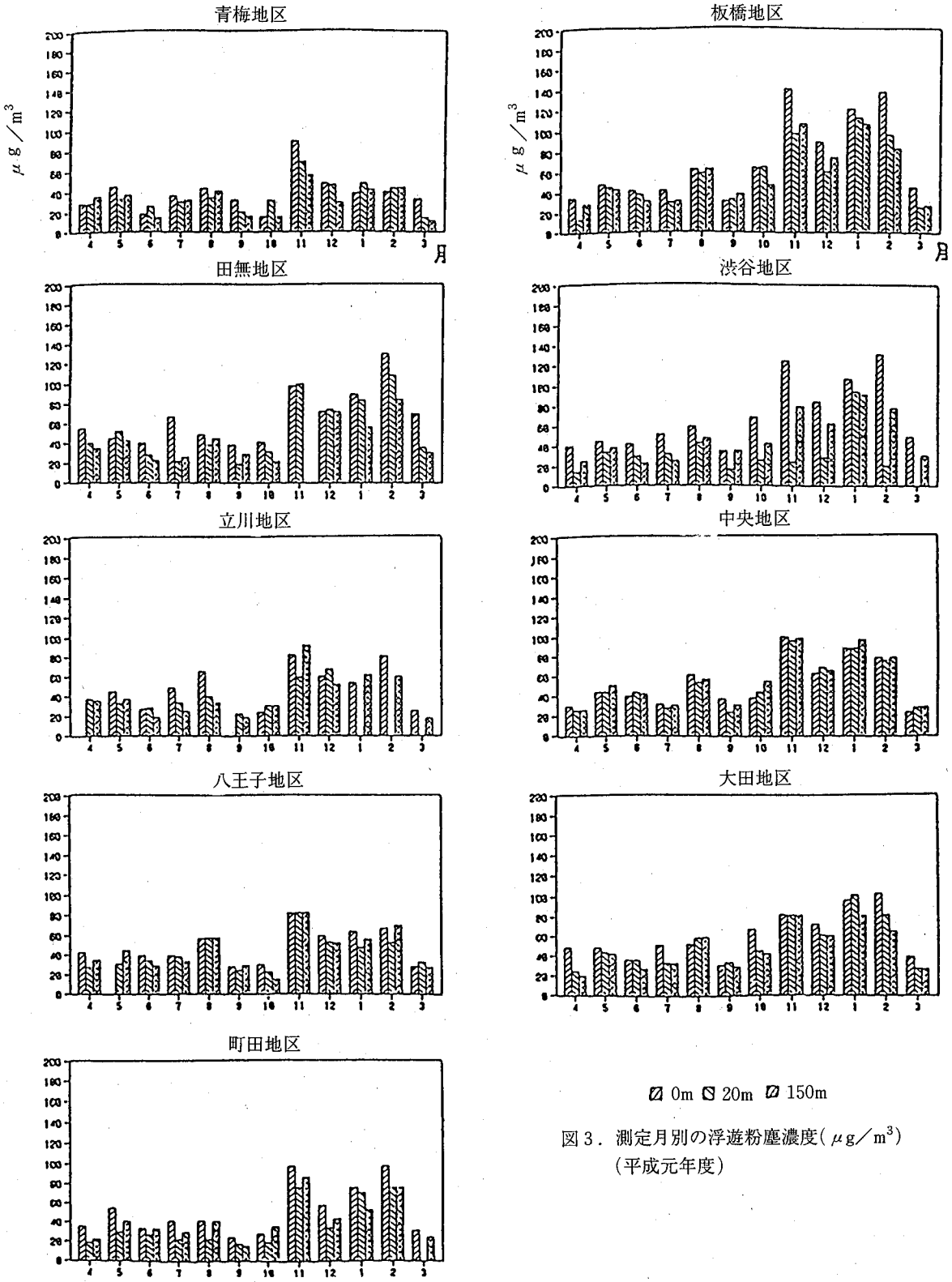


図３．測定月別の浮遊粉塵濃度（$\mu g/m^3$）
（平成元年度）

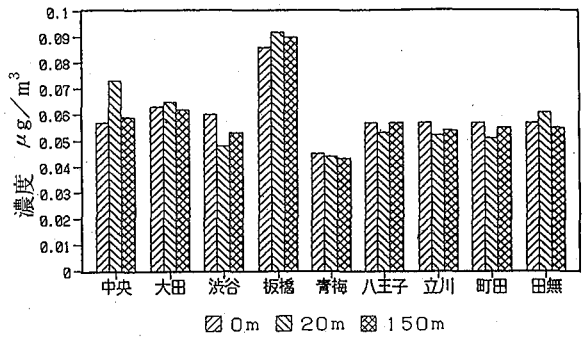


図４．地区別距離別 Pb 量の変動

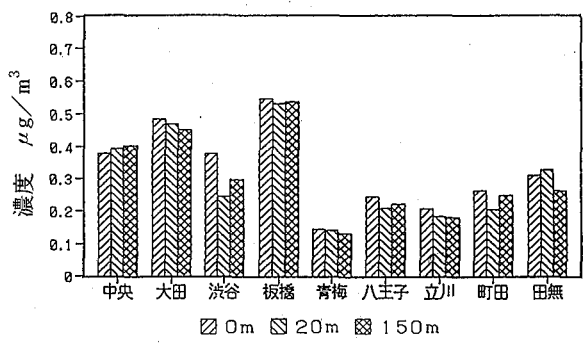


図５．地区別距離別 Zn 量の変動

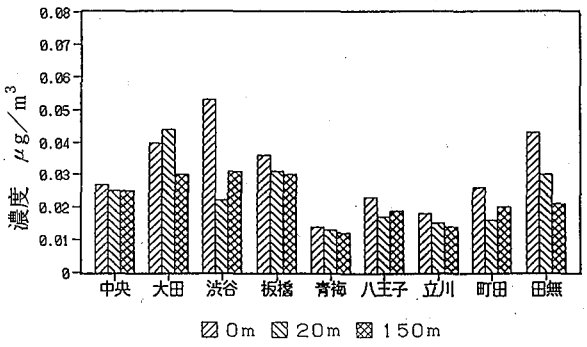


図６．地区別距離別 Cu 量の変動

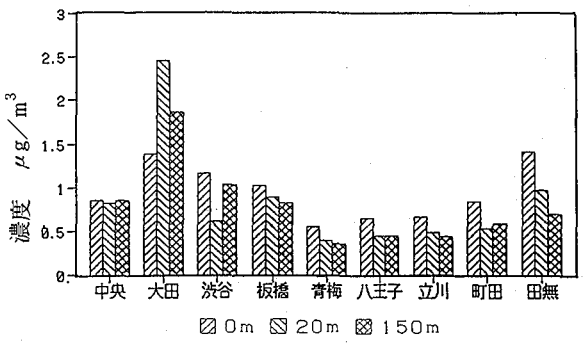


図７．地区別距離別 Fe 量の変動

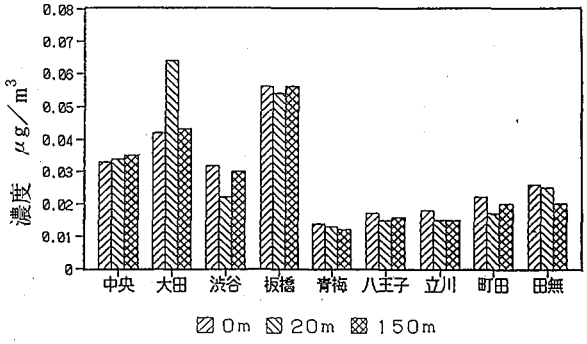


図８．地区別距離別 Mn 量の変動

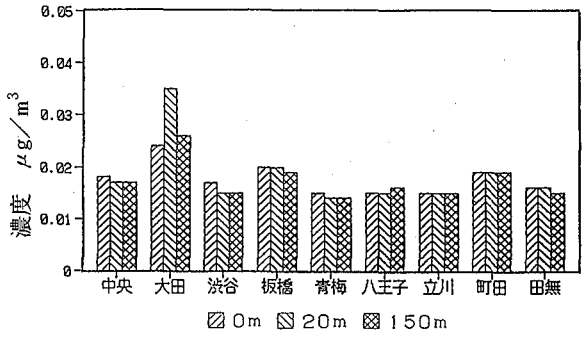


図９．地区別距離別 Cr 量の変動

に高い値であった．更に20m と150m 地点との間では，20m 地点の Cu と Mn の測定値が有意に高い値を示し，後背地点間での距離減衰が認められた．しかし，これら３成分(Fe，Cu，Mn)はいずれも20m 地点の濃度が最高で，なんらかの発生源の存在が疑われた．現場調査により近傍に鉄工所の存在を確認したことから，この影響によるものと推定された．

渋谷区の調査地区では鉛(Pb)，亜鉛(Zn)，銅(Cu)，鉄(Fe)およびクロム(Cr)の０m 地点の測定値が20m 地点に比べて有意に高く，明らかな距離減衰傾向が認められた．また，Cu と Cr 濃度は０m 地点と150m 地点間で有意な距離減衰を示したが，Cu と Fe の濃度は20m 地点に比べ，150m 地点のほうが高い値を示している．この地区の20m 地点は道路沿道に面した店舗の敷地奥にある狭い階段に接しており，大気の拡散がほとんどない状態であった．すなわち，この測定結果は立地条件の悪さによるものと推定される．

また，中央区および板橋区の調査地区においては，上述したような距離減衰等の一定の傾向は認められなかった．一方，市部ではすべての地区の測定地点間において重金属濃度の有意差がみられ，特に Fe は０m 地点と後

表4．各調査地区における金属成分の距離別平均値と標準偏差

（単位：$\mu g/m^3$）

調査地区	幹線道路よりの距離	Pb	Zn	Cu	Fe	Mn	Cr	Ni
		平均±標準偏差	平均±標準偏差	平均±標準偏差	平均±標準偏差	平均±標準偏差	平均±標準偏差	平均±標準偏差
中央	0m	0.057±0.023	0.378±0.237	0.027±0.014	0.851±0.314	0.033±0.021	0.018±0.006	0.055±0.048
	20m	0.073±0.081	0.392±0.254	0.025±0.015	0.822±0.358	0.034±0.021	0.017±0.004	0.062±0.049
	150m	0.059±0.027	0.401±0.272	0.025±0.014	0.851±0.354	0.035±0.022	0.017±0.003	0.054±0.025
大田	0m	0.063±0.023	0.485±0.267	0.040±0.020	1.384±0.488	0.042±0.022	0.024±0.007	0.077±0.046
	20m	0.065±0.024	0.470±0.245	0.044±0.025	2.457±1.776	0.064±0.043	0.035±0.058	0.091±0.077
	150m	0.062±0.022	0.451±0.243	0.030±0.014	1.862±0.870	0.043±0.019	0.026±0.013	0.084±0.051
渋谷	0m	0.060±0.026	0.377±0.289	0.053±0.021	1.163±0.700	0.032±0.026	0.017±0.004	0.054±0.038
	20m	0.048±0.021	0.245±0.186	0.022±0.013	0.612±0.337	0.022±0.019	0.015±0.003	0.047±0.041
	150m	0.053±0.023	0.298±0.190	0.031±0.016	1.026±0.477	0.030±0.022	0.015±0.003	0.039±0.026
板橋	0m	0.086±0.040	0.546±0.282	0.036±0.019	1.018±0.519	0.056±0.046	0.020±0.005	0.057±0.037
	20m	0.092±0.039	0.530±0.265	0.031±0.016	0.855±0.405	0.054±0.042	0.020±0.004	0.057±0.030
	150m	0.090±0.045	0.537±0.301	0.030±0.018	0.820±0.414	0.056±0.050	0.019±0.005	0.065±0.090
青梅	0m	0.045±0.014	0.144±0.065	0.014±0.006	0.537±0.247	0.014±0.005	0.015±0.004	0.017±0.003
	20m	0.044±0.010	0.143±0.067	0.013±0.007	0.388±0.195	0.013±0.005	0.014±0.002	0.019±0.013
	150m	0.043±0.011	0.133±0.064	0.012±0.005	0.356±0.179	0.012±0.005	0.014±0.002	0.070±0.153
八王子	0m	0.057±0.019	0.244±0.112	0.023±0.008	0.640±0.301	0.017±0.007	0.015±0.003	0.026±0.012
	20m	0.053±0.016	0.209±0.105	0.017±0.007	0.446±0.187	0.015±0.006	0.015±0.006	0.030±0.036
	150m	0.057±0.018	0.220±0.117	0.019±0.013	0.447±0.220	0.016±0.006	0.016±0.002	0.063±0.076
立川	0m	0.057±0.020	0.206±0.094	0.018±0.007	0.649±0.315	0.018±0.006	0.015±0.002	0.023±0.015
	20m	0.052±0.016	0.182±0.084	0.015±0.007	0.479±0.209	0.015±0.007	0.015±0.003	0.052±0.053
	150m	0.054±0.020	0.179±0.108	0.014±0.008	0.429±0.203	0.015±0.006	0.015±0.002	0.118±0.217
町田	0m	0.057±0.015	0.263±0.114	0.026±0.009	0.834±0.422	0.022±0.011	0.019±0.007	0.107±0.202
	20m	0.051±0.014	0.204±0.111	0.016±0.007	0.517±0.334	0.017±0.009	0.019±0.006	0.090±0.114
	150m	0.055±0.015	0.248±0.109	0.020±0.008	0.574±0.272	0.020±0.009	0.019±0.007	0.097±0.139
田無	0m	0.057±0.021	0.310±0.161	0.043±0.015	1.403±0.980	0.026±0.015	0.016±0.003	0.051±0.057
	20m	0.061±0.021	0.328±0.184	0.030±0.020	0.965±0.765	0.025±0.015	0.016±0.003	0.046±0.030
	150m	0.055±0.020	0.263±0.174	0.021±0.011	0.685±0.492	0.020±0.013	0.015±0.003	0.045±0.051

背地点(20m並びに150m)との間に高い有意差を示していた．また，Cuについても同様な傾向がみられ，この2成分は濃度の距離減衰が明らかであると考えられる．このように区部では大田区および渋谷区が，市部では5地区のすべてが3測定地点間において有意な差を示した

浮遊粉塵中の重金属成分は発生源の種類と密接な関係があることが知られている．すなわち，Fe，Mn，Crなどは自然界由来であり，Pb，Zn，V，Ni，Asなどは人為的発生源由来の可能性が高い元素とされる．

一方，本報告のごとく幹線道路沿道周辺の調査では，自動車の走行による影響も重視しなければならない．そこで，主たる発生源等を推定するため，浮遊粉塵中における各金属成分の割合を求めた(表5)．

表5．浮遊粉塵中に占める金属成分の割合

(単位：%)

調査地区	幹線道路よりの距離	Pb	Zn	Cu	Fe	Mn	Cr	Ni
中央	0m	0.12	0.77	0.05	1.73	0.07	0.04	0.11
	20m	0.16	0.84	0.05	1.76	0.07	0.04	0.13
	150m	0.11	0.78	0.05	1.66	0.07	0.03	0.11
大田	0m	0.11	0.85	0.07	2.42	0.07	0.04	0.13
	20m	0.14	1.00	0.09	5.24	0.14	0.07	0.19
	150m	0.14	1.05	0.07	4.32	0.10	0.06	0.19
渋谷	0m	0.09	0.54	0.08	1.66	0.05	0.02	0.08
	20m	0.13	0.64	0.06	1.60	0.06	0.04	0.12
	150m	0.13	0.71	0.07	2.46	0.07	0.04	0.09
板橋	0m	0.13	0.84	0.06	1.56	0.09	0.03	0.09
	20m	0.18	1.04	0.06	1.74	0.11	0.04	0.11
	150m	0.19	1.11	0.06	1.70	0.12	0.04	0.13
青梅	0m	0.13	0.41	0.04	1.51	0.04	0.04	0.05
	20m	0.15	0.49	0.04	1.32	0.04	0.05	0.06
	150m	0.14	0.44	0.04	1.19	0.04	0.05	0.23
八王子	0m	0.12	0.52	0.05	1.37	0.04	0.03	0.06
	20m	0.14	0.57	0.05	1.21	0.04	0.04	0.08
	150m	0.14	0.55	0.05	1.12	0.04	0.04	0.16
立川	0m	0.12	0.44	0.04	1.39	0.04	0.03	0.05
	20m	0.14	0.47	0.04	1.24	0.04	0.04	0.14
	150m	0.16	0.52	0.04	1.24	0.04	0.04	0.34
町田	0m	0.12	0.55	0.05	1.74	0.05	0.04	0.22
	20m	0.14	0.57	0.04	1.44	0.05	0.05	0.25
	150m	0.14	0.62	0.05	1.43	0.05	0.05	0.24
田無	0m	0.09	0.50	0.07	2.25	0.04	0.03	0.08
	20m	0.12	0.65	0.06	1.91	0.05	0.03	0.09
	150m	0.13	0.63	0.05	1.63	0.05	0.04	0.11

自動車の走行による影響を考えて，沿道0mにおいて区部と市部で割合の差がみられた成分は，ZnとMnであり，Znは1.6倍，Mnは1.8倍区部の方が高かった．寺西[4]は自動車の走行に伴って発生する粉塵として①排気ガス中のばいじん，②タイヤトレッド摩耗粉塵，③土砂の巻きあげがあるとし，①，②，③についてPb，Zn，Feをそれぞれの指標として考察している．このことから，区部においてZnの割合が市部に比して大きいことは，都区内の幹線道路の交通量の多さを反映しているものと考えられる．なお，大田区の後背地点でFeが，町田市の後背地点でNiの割合が大きかったのは，近接する固定発生源(前者は鉄工所，後者は自動車製造所)の影響を受けているものと推定された．

今後さらに，自動車排気ガスの指標元素である元素状炭素の動態についても追試したいと考えている．

結　語

今回の調査を解析した結果，浮遊粉塵量並びに重金属成分の道路からの距離による濃度分布は大要次の如くである．

(1) 幹線道路よりの距離減衰が顕著なものは，浮遊粉塵量とFe，Cu成分であった．

(2) 浮遊粉塵量(金属成分を含む)からみると距離減衰を観測する調査地区としては，田無市のそれが最もよいと考えられる．

(3) 大気中の浮遊粉塵量(金属成分を含む)は区部のそれが，市町村部に比してなお高値である．

(本研究は昭和62年度，同63年度，平成元年度東京都衛生局公害保健課事業「大気汚染保健対策に係わる環境調査」の一環として実施したものである．)

謝辞　今回の調査に際しましては，衛生局医療福祉部環境公害保健課調査係の方々並びに，青梅，八王子，立川，町田，田無の各保健所環境衛生監視員の方々の御協力のもとに行なわれたものであることを記して謝意を表します．

文　献

1) 佐藤泰仁他：大気浮遊粉塵中の重金属について，三多摩地域の濃度特性(第1報)，都衛研年報，**32-1**，218-222，1981

2) 佐藤泰仁他：大気浮遊粉塵中の重金属について，多摩地域の濃度特性(第2報)，都衛研年報，**37**，318-323，1986

3) 東京都環境保全局：大気汚染常時測定結果報告・

経年報(昭和63年度版)
4) 寺西宏保：自動車走行に伴う粉じんの排出係数について，第26回大気汚染学会講演要旨集，144-152，1985

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 229-233, 1991

^{32}P-ポストラベル法によるディーゼルエンジン排気ガス暴露ラットの肺における DNA 付加体の検出

鈴木孝人*, 加納堯子*

Detection of DNA Adducts in the Lungs of Rats Exposed to Diesel Engine Exhaust Using ^{32}P-Postlabeling Analysis

TAKAHITO SUZUKI* and TAKAKO KANOH*

Diesel-driven automobiles are expected to show a sizable increase in many countries as a result of the pressure being exerted to have more fuel economy. Diesel emission, as urban air pollutant, has been found in epidemiological studies to be potentially associated with increasing cancer risks. Components of diesel particulate extracts, particularly benzo (a) pyrene and nitroarenes, have been found to be extremely potent mutagens by the Ames assay. It has been reported that the extent of DNA binding to many polycyclic aromatic hydrocarbons is related to their carcinogenic potency. Therefore, we have examined DNA adduct levels in the lungs from rats exposed to diesel exhaust containining 4.5 mg particles/ m^3 for 7 months using the ^{32}P-postlabeling analysis to evaluate its possible effects on health. The obtained results show that high levels of DNA adducts were present in the lungs of rats exposed to diesel exhaust. Detection of DNA adducts might be useful as a health index for cancer risk caused by air pollution from diesel emission.

Keywords：DNA 付加体 DNA adduct, ディーゼルエンジン排気ガス diesel engine exhaust, ^{32}P-ポストラベル法 ^{32}P-postlabeling analysis, 大気汚染 air pollution, ラット rat

緒　言

ディーゼル車は燃費の良いこともあって今後も増加する傾向にあると思われる．特に排気ガス規制の緩い大型のディーゼル自動車の排気ガスは，都市部の大気汚染の主因であり，発癌の危険性を高めている可能性が高い．即ち，職業的にディーゼル排気ガスを暴露されているディーゼル列車の鉄道員，重工業機械の操縦者，トラック運転手などの肺癌による死亡率は，ディーゼル排気ガスを暴露されていない人々に比べて高いことが疫学的調査で確認されている[1,2]．更に，最近の報告ではディーゼル排気ガスに長期間暴露された動物の肺に癌が発生することも確認されている[3-5]．

ディーゼル排気ガス中の粒子状物質中には benzo(a) pyrene(B(a)P)や nitroarene 類などが含まれており，これらはエイムス試験において非常に高い変異原性を示し[6-7]，多環芳香族炭化水素類(PAH_S)は細胞内で代謝されDNA と結合して，発癌の原因となることが報告されている[8]．

^{32}P-ポストラベル法は複数の PAH_S の暴露によって生じた PAH_S と DNA の共有結合体(DNA 付加体)の混合物を分離操作を加えることなく，しかも高感度に検出できる方法である．Randerath ら[9]及び Gupta ら[10]は環境中に存在する複数の発癌性物質を動物に暴露し，DNA 付加体の形成並びにその付加体の組織中の存在部位について報告している．

これらのことから，癌発生の引金となる DNA 付加体を検出しそれを定量することは，発癌のリスクアセスメントに有用であると思われる．そこで我々は，ディーゼル排気ガスを暴露したラットの肺の DNA 付加体の検出と定量を ^{32}P-ポストラベル法を用いて検討した．その結果，排気ガス暴露群の肺に高レベルの DNA 付加体が検出されたので報告する．

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　169 東京都新宿区百人町 3-24-1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

実験方法

1)動物の暴露

F344，雄ラット(日本チャールスリバー社)を新生仔の時から7時間／日，5日間／週で7ヶ月間ディーゼルエンジン排気ガス(4.5mg／m^3 粒子濃度)に暴露した．対照群と排気ガス暴露群の個体数は8匹とした．排気ガスの発生源はヤンマーディーゼルエンジン(NFAD50型，直接噴射式，排気量：309cc，回転数：2,400rpm)を使用し，燃料には軽油(JIS 2号相当品，日本石油KK)を用いた．ディーゼルエンジン排気ガスはヘパフィルター処理をした清浄な空気で希釈して，電磁弁の操作で自動的に濃度コントロールしながらチャンバー(約1.6m^3)内に導入した．なお，チャンバー内の温度は23±2℃，湿度は45～65%，換気は15回／時間，照明は午前7時から午後7時のサイクルで点灯した．また，粉塵濃度計はβ線式質量濃度計(BAM-102型柴田科学器機KK)を用いた．粉塵の粒径分布の計測はアンダーセン型ローブレッシャー・インパクター(LP型，東京ダイレックKK)を用いて行った．ディーゼルエンジン排気ガス中の粉塵の粒径は，約90%以上が粒径0.5μm以下であった．

2)DNA付加体の検出と定量

7ヶ月間の暴露を終了した17時間後に両群とも解剖し，肺を採取した．分析時まで肺は－80℃に保存した．DNA付加体生成を確認する陽性対照には，B(a)Pを20mg／kg体重濃度でラット腹腔内に投与し，その24時間後に解剖採取した肺を用いた．肺からのDNA鎖の抽出，DNA鎖のDNAaseでの分解及び1-ブタノールでのDNA付加体の抽出は，Guptaの方法[11]で行った．ブタノール抽出物は200mM Tris-HCl(pH9.5)を5μl加えて中和後，遠心濃縮機(EC-57C型，佐久間製作所)を用いて乾燥させた．これを10μlの滅菌水に溶かし，20μCiの〔γ-^{32}P〕ATP，最終濃度が300mM Tris-HCl(pH9.5)，100mM dithiothreitol，10mM spermidineを含む1.5μlのバッファー溶液，5単位のT4 polynucleotide kinase及び1.5μlの滅菌水を加え，37℃で60分間反応させてヌクレオチドに^{32}Pをラベルした．ラベルされたサンプルをポリエチレンイミン(PEI)プラスチック薄層クロマトグラフィー(TLC)シート(POLY-GRAM® CELL 300PEI，MACHEREY-NAGEL社製)にスポットした．PEIシートは，使用前に蒸留水で展開後乾燥させ，冷暗所に保存したものを使用した．TLCの展開溶液とその展開方向は次の如く行った．一次元方向に展開する場合は(D-1)：2.3Mリン酸ナトリウム溶液(pH6.0)，(D-2)：2.5M蟻酸アンモニウム溶液(pH3.3)，(D-3)：3.8M蟻酸リチウム-7.3M尿素溶液(pH3.5)，二次元方向に展開する場合は(D-4)：0.8M塩化リチウム－0.5M Tris-HCl－8.5M尿素溶液(pH8.0)，(D-5)：2.3Mリン酸ナトリウム溶液(pH6.0)で順次展開した．使用したサンプルの総ヌクレオチド数を測定するために，DNAaseで分解した5μgのDNA試料を滅菌水で1000倍に希釈後，上記の^{32}Pのラベルに用いた溶液の2.5μlを加えて37℃で60分間反応させた．更に，20単位／ml apyraseの1μlに4種類のdeoxyribonucleoside 3,5-bisphosphates(dpNp)をそれぞれ最終濃度2mg／mlに調製した溶液の2μlを加え，その混合液の2.5μlを反応液に添加し37℃で60分間反応させた．ラベルしたヌクレオチドは滅菌水で20倍に希釈し，その希釈後の5μlをPEIシートにスポットした．薄層クロマトグラフィーは一方向に0.5M塩化リチウム溶液で1時間展開した．乾燥後，－80℃で1時間オートラジオグラフィーを行った．原点の部分がラベルされたヌクレオチドであり，それより上部のスポットは未反応のATPが分解して生じた^{32}P-正リン酸であるので，原点部分を切り取ってシンチレーションカウンター(LS-5801型，ベックマンCo.)で計測した．なお，付加体の位置を確認するためのオートラジオグラフィーは，展開したPEIシートを－80℃以下で，16時間フィルムに感光させた．PEIシートの付加体の存在する部位を各々切り取り，シンチレーションカウンターを用いて放射能を計測した．その際，付加体の存在しない場所の同面積を切り取り同様にカウントし，それをバックグラウド値として差し引いた．なお，総ヌクレオチド数は希釈率やシートへのチャージ量によって補正し，付加体の形成量を10^9ヌクレオチド当りで計算した．

実験結果

各群のDNA付加体のオートラジオグラフィーの結果を図1に示した．対照群ではDNA付加体の検出数は少なかった．ディーゼル排気ガス暴露群では複数のDNA付加体が検出された．陽性対照のB(a)P投与ラットでも複数のDNA付加体が検出された．また，各群の個々のラットのDNA付加体形成量を表1に示した．対照群では1匹を除いて，DNA付加体は認められなかった．一方，暴露群ではDNA付加体の明かな増加が認められ，平均すると10^9ヌクレオチド当り24個のDNA付加体形成が認められた．

考察

対照群の1匹の肺にDNA付加体が認められたが，これは恐らく加令によるものと思われる．Randerathら[12]は，生後3日目から10ヶ月までなんの処置をしないでた

Table 1. DNA adduct levels in the lungs of rats exposed to diesel engine exhaust

animals	Estimate of adduct level per 10^9 bases Exhaust exposure	Control
1	16	16
2	34	1
3	34	ND
4	14	1
5	13	ND
6	34	ND
7	22	ND
8	28	ND
Mean±SD	24±9	……

ND indicates below one adduct per 10^9 bases

だ飼育したラット臓器のDNAを^{32}P-ポストラベル法で調べ，新生仔では検出されなかったDNA付加体が，加令に従って増加することを報告している．食餌などに含まれる化学的な発癌物質や内分泌関連物質によってDNA付加体が生じることが示唆されている．更に，多くの動物実験でさまざまな遺伝子の変化が加令と係わることも報告されている[13]．また，哺乳類の細胞はDNAの損傷を除くための修復機能を持っているが，Niedermuller[14]は肺，心臓，脾臓等の多くの組織におけるDNA損傷に対する除去修復機能が加令と共に低下することを報告している．それ故，対照群の1匹に認められたDNA付加体は，修復機能が加令によって低下したためとも考えられる．

B(a)Pは生体内で7β，8α-dihydroxy-(9α，10α)-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene(BPDE)に代謝されDNAと結合するが，B(a)PによるDNA付加体の約90%はグアニン塩基のアミノ基と反応したものである[15]．本実験におけるB(a)P投与ラットでは，約10個のスポットが認められた(図1)．この結果はDNA鎖を切断するDNAase [micrococcal endonucleses とspleen phosphodiesterase] による作用が不完全であったために生成したジヌクレオチドなどと結合した付加体が検出された可能性が考えられる．Randerathら[16]，もB(a)P処理したDNAからジヌクレオチド付加体を検出している．

排気ガス暴露群とB(a)P投与ラットのDNA付加体のスポットを比較すると，数個のスポットの位置が一致した．その他のスポットは恐らくディーゼル排気ガス中に含まれているnitroarenesなどによって作られたDNA付加体のものであろう．今後は，市販のDNAとnitroarenesの個々の標準物質との結合物質を調製して，同様の実験を行い，肺に生じたDNA付加体の同定を試みる予定である．

本実験の結果(表1)はWongら[17]の結果(7.1mg／m^{3}濃度で31ヶ月間ディーゼル排気ガス暴露されたラットの肺から10～33個のDNA付加体／10^9ヌクレオチドの検出)とほぼ一致しているが，DNA付加体のオートラジオグラムのスポットの位置が異なる．我々の結果はオートラジオグラム上で複数のスポットが認められるが，彼らの結果ではスポットが明確に分離していない．この原因は恐らく薄層クロマトグラフィーにおけるD-3とD-4の展開溶液の違いによるものと思われる．即ち，彼等はD-3の展開液に3M蟻酸ナトリウム-7M尿素(pH3.5)，D-4の展開液に0.6M塩化リチウム-0.5M Tris-HCl-7M尿素(pH8.0)を使用したが，我々はD-3の展開液に3.8M蟻酸リチウム-7.3M尿素(pH3.5)，D-4の展開液は0.8M塩化リチウム-0.5M Tris-HCl-8.5M尿素(pH8.0)を用いた．それ故，彼等の場合はDNA付加体の展開が不良だったものと思われる．

本実験において，ディーゼル排気ガス暴露ラットの肺からDNA付加体形成が明らかに増加した状態で検出された．この結果はただちに発癌との係わりを示唆するものではないが，多くのPAH_SとDNAが結合することが発癌との関係を深めているとのLutz[8]の報告から考えると，DNA付加体の増加は発癌する危険性の増大を意味するものと思われる．また，コークス燃焼炉の作業現場

で働く労働者の白血球中のDNAにBPDE-DNA付加体が認められるという報告もある[18]．従って，白血球中のDNA付加体を^{32}P-ポストラベル法で検出することは，都市部住民の大気汚染物質による発癌に対するリスクアセスメントに有効な手段になると思われる．

謝辞 ^{32}P-ポストラベル法に関して懇篤な御教示を賜った国立ガンセンター研究所発癌研究部 長尾美奈子，高山京子の両博士に深謝します．

付記 （本研究の概要は大気汚染学会第31回金沢大会1990年11月で発表した．）

参考文献

1) Garshick E, Schenker MB, Munoz A et al.: *Am. Rev. Respir. Dis.*, **135**, 1242-1248, 1987
2) Boffetta P, Stellman SD and Garfinkel L: *Amer. J. Indust. Med.*, **14**, 403-415, 1988
3) Mauderly JL, Jones RK, Griffith WC et al.: *Fundam. Appl. Toxicol.*, **9**, 208-221, 1987
4) McClellan RO: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **27**, 279-300, 1987
5) Stober W: *Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust, Developments in Toxicology and Environmental Science,* **vol 13**, Ed., Ishinishi N, Koizumi A, McClellan RO and Stober W, 421-439, 1986, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford
6) Clark CR and Vigil CL: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **56**, 110-115, 1980
7) Rosenkranz HS: *Mutat. Res.*, **140**, 1-6, 1984
8) Lutz WK: *Mutat. Res.*, **65**, 289-356, 1979
9) Randerath E, Mittal D and Randerath K: *Carcinogenesis,* **9**, 75-80, 1988
10) Gupta RC, Sopori ML and Gairola CG: *Cancer Res.*, **49**, 1919-1920, 1989
11) Gupta RC: *Cancer Res.*, **45**, 5656-5662, 1985
12) Randerath K, Reddy MV and Disher M: *Carcinogenesis,* **7**, 1615-1617, 1986
13) Sohal RS, Rimbaum LS and Cutler RC: *Molecular biology of aging: Gene stability and gene expression.* 1985, Reven Press, New York
14) Niedermuller H: *Molecular biology of aging: Gene stability and gene expression.* Ed., Sohal RS, Rimbaum LS and Cutler RC, 173-193, 1985, Reven Press, New York
15) Kinoshita T, Lee HM, Harvey RG and Jeffrey AM: *Carcinogenesis,* **3**, 255-260, 1982
16) Randerath K, Randerath E, Danna TF et al.: *Carcinogenesis,* **10**, 1231-1239, 1989
17) Wong D, Mitchell CE, Mauderly JL and Jeffrey AM: *Carcinogenesis,* **7**, 1595-1597, 1986
18) Haugen A, Becher G, Benestad C et al.: *Cancer Res.*, **46**, 4178-4183, 1986

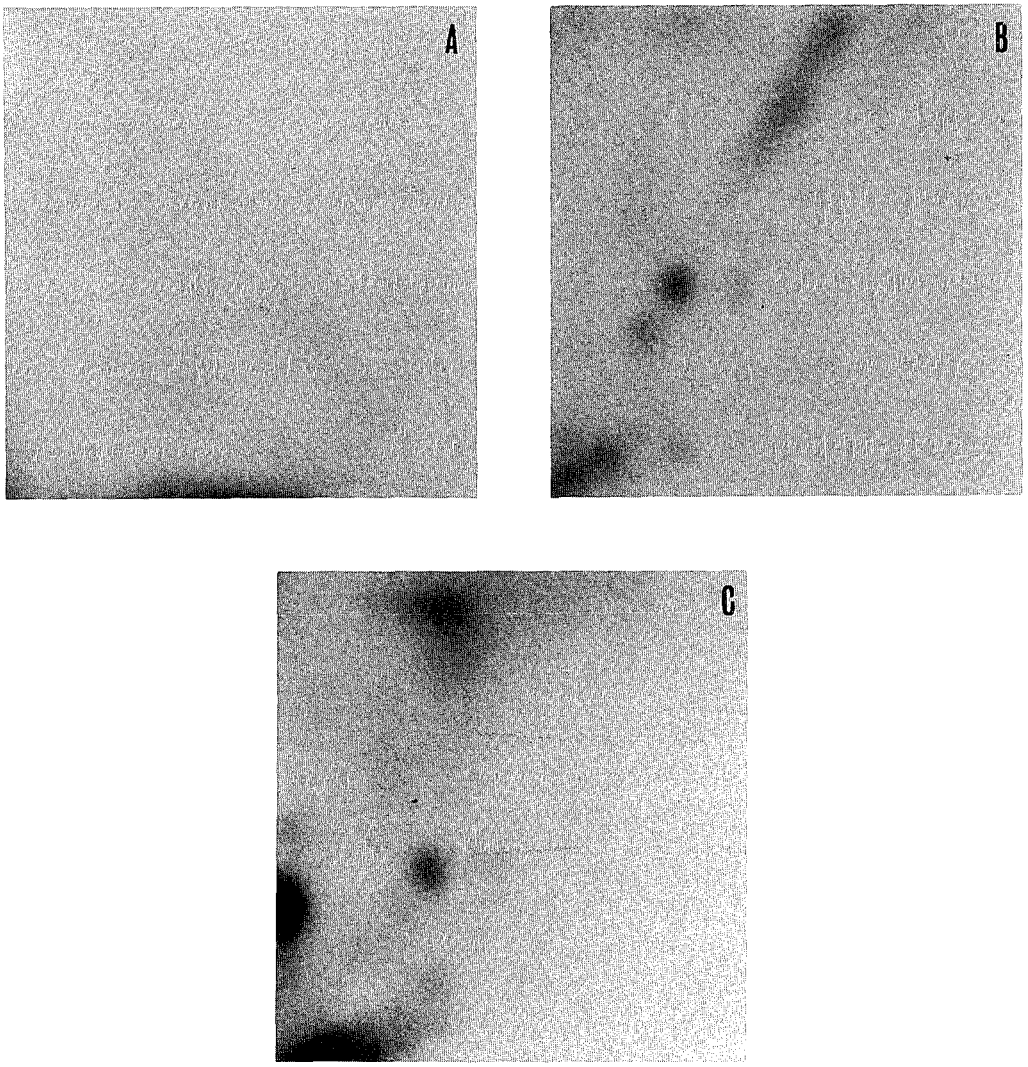


Figure. 1. Autoradiograms of chromatograms from ^{32}P-labeled DNA adducts of animals exposed to clean air (A) or diesel exhaust (B) for 7 months or given intraperitoneal injection of 20mg/ kg benzo (a) pyrene (C)

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.*,**42**, 235-242, 1991

六味丸の13週間経口投与試験

藤井　孝*, 三栗谷久敏*, 矢野範男*
湯澤勝廣*, 長澤明道*, 多田幸恵*
福森信隆*, 角　千代*, 佐々木美枝子*

Oral Toxicity Test of Rokumi-gan by Gavage to Rats for 13 Weeks

TAKASHI FUJII*, HISATOSHI MIKURIYA*
NORIO YANO*, KATSUHIRO YUZAWA*
AKEMICHI NAGASAWA*, YUKIE TADA*
NOBUTAKA FUKUMORI*, CHIYO SUMI*
and MIEKO SASAKI*

Rokumi-gan, a Chinese medicine for therapeutic use in renal diseases, was administered by gavage in 0.5% saline solution to F344/ DuCrj rats of both sexes for 13 weeks. Groups of 10 rats of each sex received daily doses of 0, 180, 470, 1220 or 3170mg/ kg. Body weights of the male and female rats at 3170mg/ kg were slightly lower than those of the controls throughout the study. However, no other changes in compound-related clinical signs or lesions were observed in the dosed rats. In the 13 week study using gavage, there was no evidence for toxic activity of the compound in the male and female rats.

Keywords：漢方薬 Chinese medicine, 六味丸 rokumi-gan, 13週間毒性試験 13-week toxicity test, ラット rats

緒　言

漢方方剤および生薬(漢方薬)は，歴史的背景と経験とに支えられた信頼性があり，東京都では，昭和63年度，都立豊島病院に東洋医学科を開設して以来，漢方薬を用いた治療も行っている．しかし，近代西洋医学の分野における漢方薬の位置づけは，必ずしも確固たるものではなく，これを打開するには，先ず，その有用性を科学的に立証することと考えられる．都衛生局では，この点を解明すべく漢方薬について多面的な研究を行い，実験データを集積する目的で，東洋医学事業の中に漢方薬の基礎研究を組み込んでいる．当所は，この事業の中で，漢方薬の安全性と有効性の評価に関する研究を担し，所内プロジェクト・チームによる検討を開始した．今回は，この事業の研究用試料で，老人性疾患，泌尿器系疾患に頻用されている六味丸を取り上げ，理化学的品質評価，有害物質の検出ならびに生物学的効果を検討することとした．

本報は，六味丸の短期間投与による安全性の検討ならびに長期投与実験での投与量選択の資料獲得を目的として，ラットに単独投与を行った実験の結果である．また，六味丸の有効性の検索を目的として，ラット尿路系に対し発癌および毒作用を有するオルトフェニルフェノールOPP[1-3]との併用投与による実験を，同時に行い，別報[4]に報告する．

実験材料ならびに方法

被検物質：六味丸の原料生薬をウチダ和漢薬株式会社(東京)より，それぞれ3-4ロット取り寄せ，当所医薬品研究科にて生薬鑑別試験を行い，この中から優良ロットを選択，購入した．その後，同社に委託し，これら原料を細切，熟地黄8，山薬4，山茱萸4，澤瀉3，茯苓

＊東京都立衛生研究所毒性部病理研究科　169 東京都新宿区百人町3-24-1
＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health. 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

3，牡丹皮3の割合で均一に混合，粉末化し，六味丸散剤(ロット番号900830)約300kgを得た．

当所医薬品研究科にて，本剤の各種定量試験を行った結果，充分満足できる品質で，均一に混和されていると確認された[5]．さらに，当所食品研究科にて本剤の有害物質の検査を行い，農薬では総BHCが0.17ppm検出された．その他の農薬およびかび毒は検出限界以下であった．現在，総BHCの食品での残留農薬基準は，牛乳，野菜，果実が0.2ppmであり，害作用発現に直結するとは考えられない．また，$^{134}C_S$および$^{137}C_S$の検出合計値は2 Bq／kg以下であり，食品の暫定限度値が370Bq／kgであることから健康に影響を及ぼさない量と推定される．すなわち，本剤は，理化学的試験検索の結果から，漢方薬としての有効性，安全性の基準を満足させる品質を有するものであると結論される．従って，六味丸の生物学的試験検索の結果を評価するに際しては，本剤に含まれる上記の有害物質等の生体に及ぼす影響が混入する可能性は，消去し得るものと考えられる．

実験動物および飼育環境：4週齢のF344／DuCrjラット雌雄(日本チャールスリバー，神奈川)を用いた．ラットを一般飼育区域内の，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設置された自動給水装置付きベルト式飼育棚のステンレス製懸垂式ケージに各3-4匹収容した．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．ラットの，各投与群への割付けは，層別化ランダム方式で行った．

投与方法および期間：六味丸は都立豊島病院では，0.5%食塩水とともに，1日9gを3回に分けて服用するよう指示している．そこで，本実験では，180mg／kg(9g／体重50kg)を最小投与用量とし，0.5%食塩水に懸濁し，胃ゾンデにより体重100g当り1mlの容量で1日1回，13週間強制経口投与した．投与用量は，180mg／kgから公比2.6で470，1220，3170mg／kgの計4段階を設定した．最大用量の3170mg／kgは，六味丸懸濁液の濃度が32%であり，これ以上の濃度は，胃ゾンデでの13週間投与が困難になると判断して決定した．六味丸は日曜，祝日を除く毎日(1週間に6日)投与した．六味丸の投与はラットが5週齢になった時点より開始した．投与群の設定は，Table 1に示した．

Table 1. Experimental Design

Group	No. of rats		Rokumi-gan[1)]
	Male	Female	
Control	10	10	0
E	10	10	180
L	10	10	470
M	10	10	1220
H	10	10	3170

1) Rats were administered each dose (mg/kg/day) of rokumi-gan in 0.5% saline solution by gavage.

一般状態および臨床病理学的検査：瀕死，死亡および異常行動の有無，被毛，可視粘膜の観察および体重測定は，1日1回，一週間に6日行った．摂餌および摂水量(重量)は1週間に1回の測定とし，(給餌，摂水量-残餌，残水量)／3(日)を，各ケージのラット数で除して一匹当りの1日摂餌，摂水量を算定した．尿検査は投与13週目に，強制排尿法にて採尿後，尿試験紙(Labstix，マイルス三共)にて，潜血，ケトン体，ブドウ糖，蛋白質，pHを検査した．

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，自動血球計数装置(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(HGB)，ヘマトクリット値(HCT)および血小板数(PLT)を測定した．その後，メイ・ギムザ染色血液塗沫標本により異常血液細胞の検索および白血球の分画を行った．

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，自動分析装置(Automatic Analyzer 705，日立)を用いて，アルブミン量(ALB)，アルカリフォスファターゼ活性(ALP)，アミラーゼ活性(AMY)，総ビリルビン量(BIL)，直接ビリルビン量(D-BIL)，カルシウム量(CA)，コリンエステラーゼ活性(CHE)，総コレステロール量(CHO)，遊離型コレステロール量(F-CHO)，クレアチンホスホキナーゼ活性(CPK)，クレアチニン量(CRE)，γ-グルタミルトランスペプチターゼ活性(GGT)，グルコース量(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)，リパーゼ量(LP)，燐(IP)，ロイシンアミノペプチターゼ活性(LAP)，乳酸デヒドロゲナーゼ活性(LDH)，燐脂質量(PL)，中性脂肪(TG)，総蛋白量(TP)，尿酸量(UA)および尿素窒素量(UN)を測定し

た.

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．途中死亡，瀕死屠殺例も，生存例に準拠して処置した．脳，心臓，肺，脾臓，肝臓，腎臓，副腎，精巣，前立腺，膀胱(固定後秤量)，子宮，卵巣は摘出後，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，包皮腺，陰核腺，乳腺，大腿骨を摘出した．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，ホルマリン固定液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分割し，実体顕微鏡にて粘膜面を観察，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た．ヘマトキシリン・エオジン重染色後，光学顕微鏡にて組織学的検索を行った．

統計学的分析：体重，摂餌・摂水量，血液，血清生化学的検査および臓器重量等の測定値の検定は，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．組織学的検査では，変化の出現率を Fisher's exact test を用いて検定した．危険率は全て5％においた．

結　　果

体重増加の推移を Fig. 1，2に示した．投与期間を通して対照群は雌雄とも順調な増加であった．対照群に比べ，雄では E 群(180mg)は高く，H 群(3160mg)はやや低く，L 群(470mg)および M 群(1220mg)は同様の増加を示した．雌では E および M 群が高く，H および L 群はやや低かった．このように雌雄とも投与量に相関した体重の増減は認められなかった．投与開始および終了時の平均値，増加または抑制割合を 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，有意差は無いものの，E および M 群雌雄は高く，他の各群は低かった．体重増加割合(投与終了時体重／投与開始時体重)を指数でみると，対照群に比べ，E 群雌および M 群雌雄はやや高く，H 群雄は低くなっており，投与量増加に伴う増加抑制ではなかった．

摂餌，摂水量を Table 2 に示した．摂餌量は対照群に比べ H 群雌雄が軽度に低い値で推移したが，他の雌雄各群は，大差無かった．摂水量に顕著な差は認められなかった．

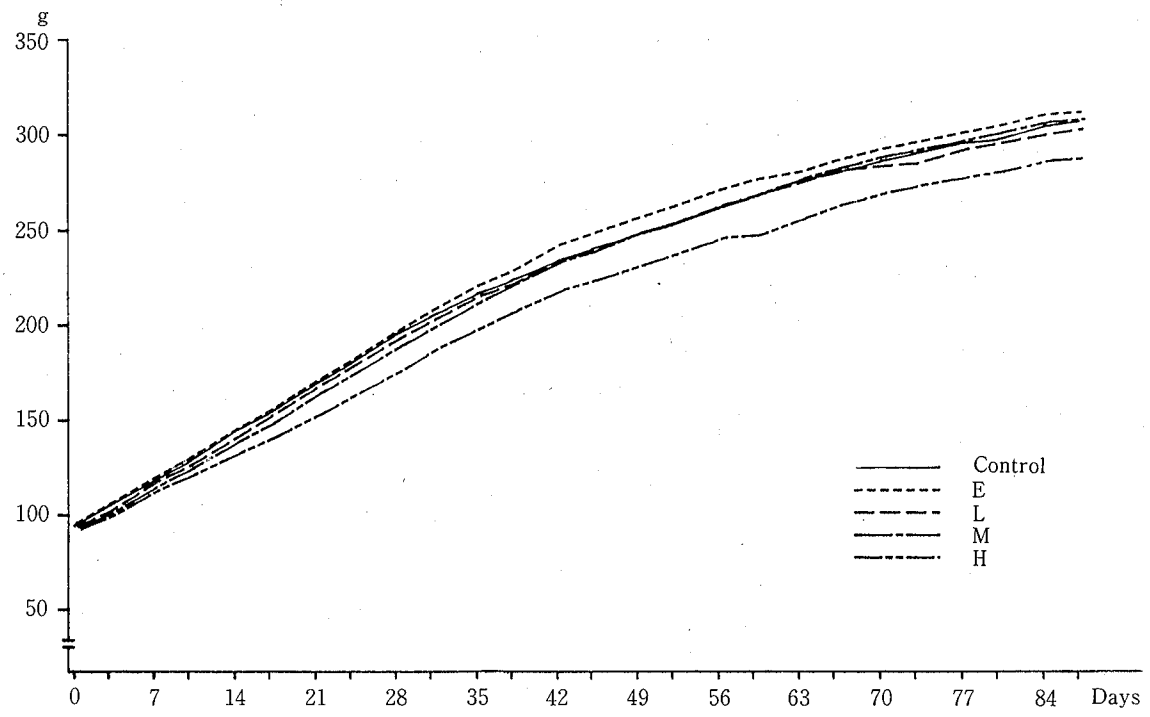


Fig. 1　Body Weight Changes in Male Rats Treated with Rokumi-gan

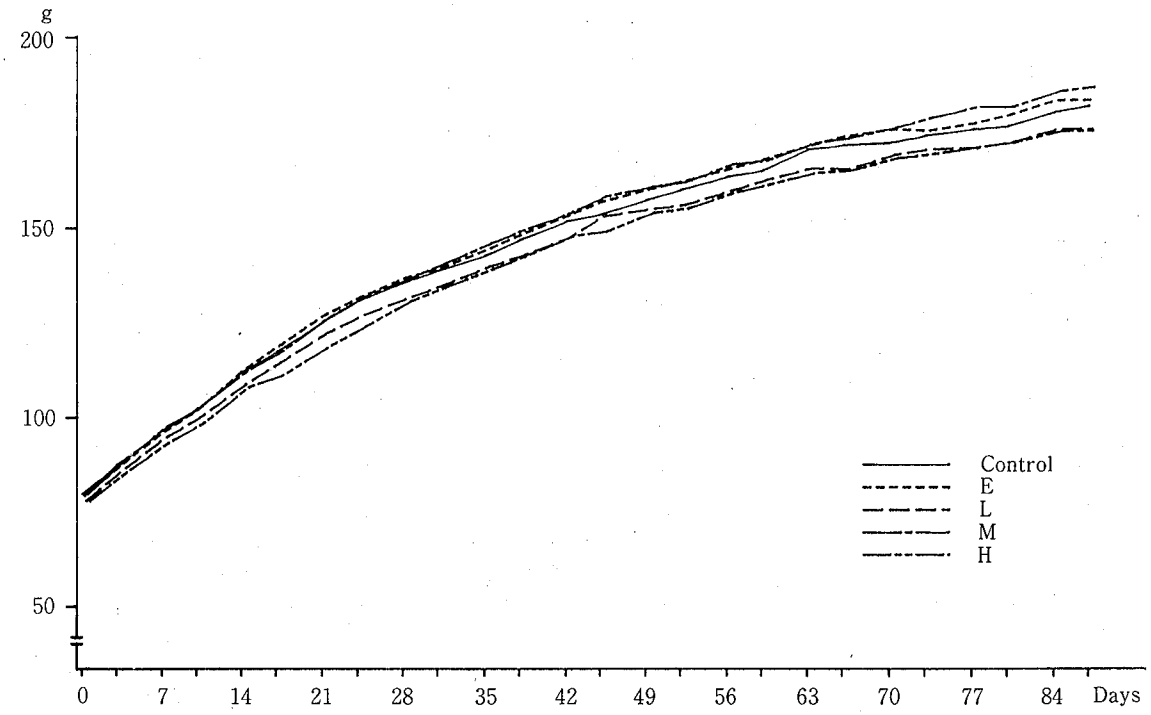


Fig. 2 Body Weight Changes in Female Rats Treated with Rokumi-gan

Table 2. Changes in Body Weight, Food Intake and Water Intake in Rats Treated with Rokumi-gan

Group	Body weight		Rate of increase		Food intake(g/rat/day)		Water intake(g/rat/day)	
	Initial[1]	Final[2]	A[3]	B[4]	wk 4	wk11	wk 4	wk11
Male								
Control	94.1±3.0(10)[5]	306.4±11.2(10)	2.26	100	14.2±0.8(10)	15.3±0.4(10)	16.4±1.0(10)	17.8±1.1(10)
E	95.5±4.0(10)	311.3±14.4(10)	2.26	100	13.8±1.5(10)	15.4±1.0(10)	15.7±1.6(10)	18.4±0.5(10)
L	93.9±3.0(10)	302.3±13.7(10)	2.22	98	13.7±1.2(10)	14.5±0.6(10)	15.5±0.9(10)	20.6±3.7(10)
M	93.9±2.5(10)	307.6±11.0(10)	2.28	101	13.7±1.0(10)	15.4±0.5(10)	15.6±2.2(10)	19.2±2.7(10)
H	92.8±2.9(10)	287.2± 9.9(10)	2.12	94	12.5±1.3(10)	13.9±0.6(10)	14.5±1.6(10)	16.8±1.1(10)
Female								
Control	79.8±1.9(10)	181.6± 8.8(10)	1.28	100	10.0±0.4(10)	10.0±0.3(10)	14.7±0.7(10)	16.2±1.8(10)
E	79.4±3.3(10)	183.1±11.0(10)	1.31	102	9.8±0.2(10)	9.9±0.4(10)	16.3±3.2(10)	15.0±1.1(10)
L	78.1±2.3(10)	175.4± 6.2(9)	1.25	98	9.5±0.1(9)	9.6±0.6(9)	13.3±1.4(9)	15.5±1.9(9)
M	80.0±3.5(10)	186.5±22.7(8)	1.33	104	10.3±0.6(8)	10.9±0.8(8)	14.9±0.7(8)	16.9±1.7(8)
H	78.1±2.1(10)	175.1± 6.3(9)	1.24	97	9.6±0.4(9)	9.2±0.1(9)	17.4±3.8(9)	14.6±0.6(9)

1) Mean body weight at the begining of the administration. 2) Mean body weight at the end of the administration.

3) Rate of body weight gain to initial weight; (Final weight−initial weight)/ initial weight.

4) Value of A in each group/ value of A×100 in the control. 5) Mean±SD; the numbers of rats examined were shown in parentheses.

Table 3. Hematological Examinationin in Rats Treated with Rokumi-gan

Group	No. of rats[1)]	RBC (10^6/mm^3)	WBC (10^3/mm^3)	HGB (gm/dl)	HCT (%)	PLT (10^3/mm^3)	Differential of leukocytes(%)			
							Neutro	Lymph	Mono	Eosino
Male										
Control	9	9.66±0.15[2)]	8.1±1.1	16.4±0.8	50.3±0.8	7.7±3.3	13.9±4.7	84.9±4.9	0.9±0.6	0.4±0.5
E	9	9.81±0.21	7.7±0.8	16.7±0.3	51.3±1.0	5.8±0.8	13.6±3.6	84.5±3.7	1.0±1.1	0.9±1.0
L	9	9.62±0.28	7.5±0.5	16.4±0.4	50.1±1.4	5.8±0.9	17.1±4.9	81.1±4.9	1.0±0.7	0.8±1.3
M	10	9.71±0.27	7.2±0.6	16.6±0.3	50.7±1.0	6.0±0.4	14.6±3.9	83.8±4.3	0.8±0.5	0.9±0.8
H	10	9.57±0.16	7.5±0.6	16.5±0.3	50.6±1.0	5.9±0.8	17.1±7.7	82.0±7.9	0.7±0.9	0.2±0.4
Female										
Control	10	9.13±0.17	8.5±1.4	16.8±0.4	50.7±0.9	7.0±0.5	14.8±3.3	84.3±3.3	0.5±0.8	0.5±0.8
E	10	9.03±0.22	6.9±0.7	16.6±0.4	50.1±1.2	6.9±0.4	14.8±5.9	84.1±6.3	0.8±0.7	0.4±0.5
L	9	9.06±0.29	7.4±1.1	16.7±0.5	50.1±1.5	7.9±2.8	12.9±7.2	85.6±7.9	0.6±1.1	0.9±0.6
M	8	9.02±0.12	7.4±0.7	16.5±0.2	50.0±0.6	7.1±0.5	16.0±7.1	82.8±7.5	1.0±1.1	0.3±0.5
H	9	9.00±0.30	7.2±0.8	16.5±0.3	49.8±1.0	7.3±0.4	16.9±6.7	82.4±6.5	0.4±0.8	0.3±0.5

1) No. of rats examined. 2) Mean±SD.

Table 4. Biochemical Examination of Serum in Male Rats Treated with Rokumi-gan

Group	No. of rats[1)]	ALB g/dl	ALP IU/l	AMY 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
Control	10	3.2±0.1[2)]	624±39	6404±347	0.3±0.1	0.2±0.0	10.3±0.1	0.05±0.02	56±2	14±1	4054±2308	0.5±0.1	3.7±0.5
E	10	3.1±0.1	598±38	6247±262	0.4±0.1	0.3±0.1	10.4±0.2	0.05±0.02	56±2	14±2	4323±1560	0.5±0.0	4.3±1.0
L	10	3.1±0.1	621±44	6315±306	0.3±0.1	0.2±0.1	10.3±0.2	0.05±0.02	52±3	12±2	3635±2431	0.5±0.0	2.9±0.8
M	10	3.2±0.0	604±29	6596±375	0.3±0.0	0.2±0.0	10.2±0.2	0.05±0.01	54±4	13±1	3909±2070	0.5±0.0	3.1±0.5
H	10	3.2±0.1	625±50	6038±206	0.3±0.0	0.2±0.0	10.2±0.1	0.05±0.01	51±3	11±1*	4715±2012	0.5±0.1	3.3±0.6

GOT IU/l	GPT U/l	LP IU/l	IP mg/dl	LAP GR-U	LDH IU/l	PL mg/dl	TG g/dl	TP mg/dl	UA mg/dl	UN mg/dl	A/G	O/P	GLU mg/dl
100±20	28±3	3±1	6.0±0.4	199±6	1213±262	129±7	177±25	6.7±0.2	1.1±0.1	22.2±0.8	0.91±0.03	3.65±0.52	174±12
106±21	31±9	3±1	5.8±0.5	198±7	1171±305	127±8	190±43	6.7±0.1	1.1±0.1	23.1±1.0	0.88±0.03	3.48±0.41	174±12
98±16	29±6	3±1	5.8±0.5	200±7	1096±234	114±9	133±33	6.7±0.2	1.1±0.2	21.6±1.3	0.87±0.03	3.43±0.66	168±8
103±24	30±6	3±1	5.7±0.3	197±5	1121±263	121±9	147±23	6.8±0.1	1.1±0.1	22.9±1.4	0.89±0.02	3.41±0.33	170±7
99±19	28±6	3±1	5.7±0.3	199±6	1227±278	113±6*	136±20	6.8±0.1	1.2±0.2	20.9±0.9	0.88±0.03	3.63±0.46	169±12

1) No. of rats examined. 2) Mean±SD. * Significant differrence from the control($P<0.05$)

Table 5. Biochemical Examination of Serum in Female Rats Treated with Rokumi-gan

Group	No. of rats[1)]	ALB g/dl	ALP IU/l	AMY IU/l	BIL mg/dl	D-BIL mg/dl	CA mg/dl	CHE △pH	CHO mg/dl
Control	10	3.3±0.1[2)]	475±58	4600±666	0.2±0.1	0.1±0.0	10.2±0.1	0.93±0.09	78±4
E	10	3.3±0.2	482±40	4378±371	0.2±0.1	0.1±0.1	10.2±0.2	0.91±0.11	75±3
L	9	3.3±0.1	427±41	4308±258	0.3±0.1	0.1±0.0	10.2±0.1	0.92±0.10	77±6
M	8	3.3±0.1	458±49	4264±192	0.3±0.1	0.1±0.1	10.1±0.2	0.85±0.11	74±4
H	9	3.3±0.1	426±48	4270±281	0.3±0.1	0.1±0.0	10.2±0.2	0.89±0.10	73±7

F-CHO mg/dl	CPK IU/l	CRE mg/dl	GGT IU/l	GOT IU/l	GPT U/l	LP IU/l	IP mg/dl	LAP GR-U	LDH IU/l	PL mg/dl
19±3	3325±9998	0.5±0.1	2.2±0.6	86±9	21±4	3±1	5.6±0.7	198±8	946±186	160±13
19±3	3038±1838	0.5±0.1	2.3±2.6	86±10	21±3	2±1	5.4±0.5	194±9	901±172	159±13
21±2	2817±1380	0.5±0.0	2.2±0.5	84±17	21±5	2±1	5.3±0.6	194±7	889±206	159±12
19±2	2076±1296	0.5±0.1	2.7±0.7	80±11	21±2	3±1	5.0±0.5	198±10	863±165	155±11
15±2	2564±1256	0.5±0.0	2.4±0.4	85±13	21±3	3±1	4.9±0.5	197±10	909±174	467±14

TG g/dl	TP mg/dl	UA mg/dl	UN mg/dl	A/G	O/P	GLU mg/dl
74±39	6.6±0.2	1.0±0.1	20.4±3.6	0.99±0.03	4.10±0.67	161±11
70±43	6.7±0.1	1.1±0.2	19.7±2.1	0.96±0.07	4.14±0.56	162±8
70±31	6.7±0.1	1.1±0.1	18.2±1.2	0.97±0.04	4.08±0.33	161±10
77±35	6.6±0.2	1.2±0.2	19.0±2.3	0.96±0.04	3.76±0.43	163±8
54±22	6.7±0.1	1.2±0.2	18.8±2.2	0.97±0.03	4.10±0.85	163±8

1) No. of rats examined. 2) Mean±SD.

死亡状況をみると，投与期間中，雌のL，MおよびH群で各1，2例の死亡がみられたが，これらは，何れも投与開始後1-2週目の発生で，肉眼，組織学的変化は認められなかった．

尿検査では，雄の対照群，投与群とも，中等度に蛋白質が認められる例が散見されたが，他の変化は，雌雄ともに顕著ではなかった．

血液学的検査の結果をTable 3に示した．対照群に比べ，投与群雌雄のWBC数，雌のHGB量およびHCT値，雄のPLT数が低い一方，雄のHGB量はやや高く，雌のPLT数は高低区々であった．これらの変化は，投与各群間で一定の増減傾向は示さなかった．WBCの分割では特記すべき変化は認められなかった．

血清生化学検査の結果をTable 4，5に示した．F-CHO，PLおよびTG量は，対照群に比べH群では雌雄とも低下しており，雄のF-CHO，PLは有意であった．この傾向はM群雄でも認められたが，雌雄ともに投与群間では投与量に比例した低下はみられなかった．CPK活性はH群雄でやや高いが，他の雌雄各群では同じか，やや低い値を示し，投与量に関連した変動は認められなかった．上記以外の検査値は，投与群，対照群とも近似していた．

臓器重量測定の結果をTable 6，7に示した．対照群に比べ投与群で絶対および相対(100g体重当り)重量ともに減少していたのは，H群雌雄の胸腺，EおよびH群雌の肺，L群雌雄，LおよびH群雄の心臓，全群の前立腺であった．絶対および相対重量とも，対照群に比べ増加していたのは，E群雄の胸腺，EおよびM群雄の肝臓，雌雄全群の副腎，全群の子宮，LおよびM群雌雄，H群雄の膀胱であった．これらの，重量変動は何れも軽度であり，また，投与量に比例した増減ではなかった．

組織学的検査の結果，胸腺で皮質の胸腺リンパ球が減少し，皮質幅が狭小化しているのが観察された．変化の発生率は，H群雌雄で高いが，変化程度の強弱は同群内でも個体によって異なっていた．また，投与量に比例した発生率，変化程度の増強は明瞭に認められなかった．

Table 6. Organ Weight in Male Rats Treated with Rokumi-gan

Group	No.of organs[1]	Brain mg	Thymus mg	Lung mg	Heart mg	Spleen mg	Liver g
Control	10	1971±37[2] (637±29)[3]	183±14 (59±4)	893±58 (288±11)	850±42 (274±12)	581±40 (187± 8)	9.84±0.35 (3.17±0.09)
E	10	1987±43 (628±27)	195±15 (61±3)	848±98 (296±17)	852±41 (269±10)	596±29 (189±10)	10.09±0.53 (3.19±0.08)
L	10	1969±31 (645±37)	182±16 (59±3)	889±61 (291±10)	814±42 (266± 6)	579±27 (189± 6)	9.61±0.74 (3.14±0.12)
M	10	1992±37 (640±22)	186±15 (60±4)	919±68 (295±21)	853±51 (274± 8)	579±27 (186± 9)	10.04±0.56 (3.22±0.10)
H	10	1951±35 (670±22)	168± 9 (58±3)	880±58 (302±19)	793±35 (272± 6)	558±24 (192± 8)	9.27±0.41 (3.18±0.07)

Kidney(R) mg	Kidney(L) mg	Adrenal(R) mg	Adrenal(L) mg	Testis(R) mg	Testis(L) mg	Prostate mg	Bladder mg
925±63 (298±14)	920±53 (297±12)	18.4±2.3 (6.0±0.7)	21.1±3.0 (6.8±1.1)	1404±69 (453±18)	1431±67 (462±25)	292±33 (94±11)	72±2(8) (23±1)
921±50 (291± 7)	930±71 (294±15)	19.7±2.6 (6.2±0.7)	22.3±2.5 (7.0±0.7)	1411±89 (446±29)	1444±69 (457±27)	253±41 (80±10)	73±9(8) (23±2)
898±52 (293± 8)	902±36 (295± 7)	19.6±1.3 (6.4±0.5)	21.1±2.5 (6.9±1.0)	1408±41 (461±21)	1447±38 (474±21)	257±47 (84±17)	75±5(8) (25±2)
925±52 (297±13)	926±54 (297±14)	20.4±2.1 (6.6±0.7)	23.4±2.3 (7.5±0.7)	1426±82 (458±19)	1452±88 (466±21)	266±57 (86±18)	74±9(8) (24±3)
877±60 (301±16)	886±41 (304±11)	19.8±2.0 (6.8±0.7)	22.1±2.9 (7.6±1.1)	1395±47 (479±20)	1431±44 (491±20)	256±24 (88± 7)	74±8(8) (25±2)

1) No. of organs weighed. 2) Mean ± SD (Absolute weight). 3) Mean ± SD (Relative weight: weight/100g body weight).

Table 7. Organ Weight in Female Rats Treated with Rokumi-gan

Group	No.of organs[1]	Brain mg	Thymus mg	Lung mg	Heart mg	Spleen mg	Liver g
Control	10	1847±35[2] (1019±49)[3]	178±14 (98± 9)	708±46 (390±19)	536±21 (295±13)	386±25 (213±12)	5.50±0.48 (3.02±0.17)
E	10	1856±41 (1013±58)	168±26 (91±14)	694±38 (376±15)	555±32 (302±14)	391±20 (213± 9)	5.47±0.59 (2.97±0.19)
L	9	1822±32 (1040±30)	155±11 (89± 7)	697±35 (398±18)	510±24 (291± 9)	377±19 (215±12)	5.13±0.20 (2.93±0.10)
M	8	1857±68 (1005±83)	174±20 (94± 6)	720±85 (387±14)	569±69 (306±12)	388±28 (210±14)	5.62±0.78 (3.01±0.09)
H	9	1809±35 (1039±32)	151±20 (87±10)	664±24 (381±14)	524±19 (300±11)	365±27 (209± 9)	5.32±0.31 (3.05±0.15)

Kidney(R) mg	Kidney(L) mg	Adrenal(R) mg	Adrenal(L) mg	Ovary(R) mg	Ovary(L) mg	Uterus mg	Bladder mg
584±41 (321±15)	581±34 (320±13)	20.9±3.1 (11.5±1.3)	23.1±2.4 (12.7±0.9)	27.4±2.6 (15.1±1.5)	29.3±5.2 (16.1±2.5)	398±80 (219±39)	63±4(8) (34±2)
590±41 (321±18)	590±30 (322±10)	22.9±4.3 (12.4±2.2)	24.9±2.5 (13.6±1.3)	28.3±4.4 (15.4±2.0)	30.3±3.0 (16.5±1.9)	469±103 (254±50)	61±7(7) (33±3)
553±25 (316±12)	552±21 (315± 9)	22.6±2.7 (12.9±1.5)	23.5±2.7 (13.4±1.4)	27.3±3.4 (15.6±1.9)	27.5±4.9 (15.7±2.6)	425±93 (243±52)	69±7(6) (39±4)
605±89 (324±15)	593±76 (318±11)	23.0±4.0 (12.3±1.5)	26.0±3.0 (14.0±1.2)	27.8±3.6 (15.1±2.6)	31.4±6.8 (16.8±2.9)	440±84 (239±53)	67±5(6) (37±2)
572±30 (328±15)	555±34 (319±17)	23.0±2.0 (13.2±1.1)	25.1±3.1 (14.4±1.7)	26.0±3.3 (15.0±2.1)	28.7±2.6 (16.5±1.8)	416±73 (239±40)	60±11(7) (35±7)

1) No. of organs weighed. 2) Mean ± SD (Absolute weight). 3) Mean ± SD (Relative weight: weight/100g body weight).

この他，心臓の局所性炎症，肺の局所性炎症および血管壁の石灰化が，何れも軽度に，対照および投与各群に散見された．

考　察

六味丸投与に関連した変化は最高投与量のH群(3170mg／kg)雌雄で認められた．同群では，体重増加がやや鈍く，成長が若干抑制されていたと考えられる．しかし，変化は軽度であり，対照群を100とした体重増加抑制指数は，雄が94，雌は97に過ぎない．H群は，摂餌，摂水量が少なく，食欲低下を示しており，胸腺の軽量化，胸腺リンパ球の減少，血清中の浮離型コレステロール，燐脂質および中性脂肪量の低下が，軽度に認められたことから，消耗性疾患あるいは対照群のラットに比べ，やや栄養不良の状態にあったと推定される．また，同群のラットは，32％と高濃度の六味丸散剤懸濁液を，毎日，胃ゾンデで強制投与されており，消化管粘膜への物理的刺激あるいはストレスが，食欲不振，消化吸収の阻害を惹起した可能性は大である．従って，成長抑制は，六味丸の特異的作用よりも，投与濃度の高さに起因する非特異的，物理的作用に主な原因を求めるべきと考えられる．

このように，最高用量での変化が軽度で，非特異的作用と考えられること，ヒトの服用量に準拠して設定したE群(180mg／kg)の体重増加は対照群を上回っていたこと，LおよびM群(470および1220mg／kg)もほぼ同等の増加であったこと，その他の各検査結果に異常はなかったことから，本実験条件下では，六味丸投与に関連した阻害は発生しなかったと考えられる．すなわち，六味丸の安全性は高く，安全域は広いと推定される．

しかし，六味丸を過剰に投与すれば，生体に害作用が発現する可能性は残されており，本実験の結果から，漢方薬は，西洋医薬に比べ，大量投与による障害が少ないとの結論を導き出すことは早計と考える．

以上のごとく，六味丸は生体に明らかな害作用を及ぼさないと考えられるが，3170mg／kgで軽度な体重増加抑制がみられたことから，長期投与試験の最高用量は，1／2量の1600mg／kgを基礎にして，飼料添加の最高濃度を3.6％に設定することとした．

謝辞　本研究にあたり，被検薬物の理化学的品質評価では，当所医薬品研究科の安田一郎氏，浜野朋子氏，有害物質の検討では，食品研究科の田村行弘氏，上村尚氏，真木俊夫氏，観公子氏，永山敏廣氏にそれぞれ，多大なるご協力を頂きました．深く感謝致します．

文　献

1) Hiraga, K. and Fujii, T.: *Fd Chem. Toxic.*, **22**, 865-870, 1984
2) Hiraga, K. and Fujii, T.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, **19**, 303-310, 1981
3) Fujii, T., Nakamura, k. and Hiraga, K.: *Fd Chem. Toxic.*, **25**, 359-362, 1987
4) 藤井　孝，三栗谷久敏，矢野範男，湯澤勝廣，長澤明道，多田幸恵，福森信隆，角　千代，佐々木美枝子：東京衛研年報，42，243-251，1991
5) 安田一郎，浜野朋子，高野伊知郎，高橋奈穂子，瀬戸隆子，渡辺四男也，秋山和幸，鈴木達夫，山川洋平：東京衛研年報，42，1991

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 243-251, 1991

六味丸とオルトフェニルフェノールとの併用による13週間の経口投与試験

藤井　孝*, 三栗谷久敏*, 矢野範男*
湯澤勝廣*, 長澤明道*, 多田幸恵*
福森信隆*, 角　千代*, 佐々木美枝子*

Inhibitory Effects of Rokumi-gan on the Lesions in Urinary System Induced by 13week Exposure to *o*-Phenylphenol

TAKASHI FUJII*, HISATOSHI MIKURIYA*
NORIO YANO*, KATSUHIRO YUZAWA*
AKEMICHI NAGASAWA*, YUKIE TADA*
NNOBUTAKA FUKUMORI*, CHIYO SUMI*
and MIEKO SASAKI*

Rokumi-gan is a Chinese medicine therapeutically used in renal diseases, and *o*-phenylphenol (OPP) is a urinary bladder carcinogen and a renal toxic agent in rats. These chemicals were simultaneously given to F344/ DuCrj rats of both sexes for 13 weeks starting at 5 week-old. Rokumi-gan was administered by gavage in 0.5% saline solution. A total of 100 male and female rats was divided into 5 groups. Two groups of each sex served as the untreated control or OPP control, respectively. Three groups of each sex received daily doses of rokumi-gan at 180, 470 or 1220mg/ kg and fed a diet containing 1.3% OPP. In the histological changes, the incidence and grade of the lesions in the kidneys and the urinary bladder were slightly lower in the male rats given combination treatment with rokumi-gan and OPP than male rats given OPP alone. In the 13-week study, it appears that rokumi-gan has an inhibitory effect on the lesions in the urinary system of rats treated with OPP.

Keywords：六味丸 rokumi-gan, オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, 同時投与 simultaneous administration

緒　言

漢方方剤で尿路系疾患薬，強壮薬として多用されている六味丸の短期間摂取での安全性評価を目的として，ラットによる13週間投与試験を実施した．その結果，明らかな害作用は認められなかったことを別報[1]で報告した．

本報は，六味丸の有効性評価を目的として，この安全性試験と並行して実施した試験の結果である．試験では，六味丸を尿路系器官に障害作用を持つ物質と併用することにより，六味丸が，この有害物質の作用を，どのように修飾するかを観察し，有効性を検討した．

実験材料ならびに方法

被検物質：六味丸(散剤)は，安全性試験と同一ロットのものを用いた．併用薬剤として，ラット膀胱に発癌作用を有し，腎臓に炎症性変化を発現させるオルトフェニルフェノール(OPP)[2-4]を選択した．OPP は Dow Chemical Co., NJ, USA の Dowicide 1 (Lot No. MM 01040)を購入し，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 Metropolitan Research Laboratory of Public Health. 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

Table 1. Experimental Design

Group	No. of rats		Chemicals	
	Male	Female	Rokumi-gan[1)]	OPP[2)]
Control	10	10	0	0
OPP	10	10	0	1.3
E-O	10	10	180	1.3
L-O	10	10	470	1.3
M-O	10	10	1220	1.3

1) Rats were administered each dose (mg/kg/day) of rokumi-gan in 50% saline solution by gavage.
2) Rats were fed diet containing each concentration (%) of *o*-phenylphenol (OPP).

実験動物および飼育環境：安全性試験と同一である[1)]．
投与方法および期間：六味丸の投与方法，期間は，安全性試験と同一である[1)]．OPP は，これまでの報告と同様に[2-4)]，飼料に1.3%の重量濃度で添加し，これを自由に摂取させた．六味丸および OPP 投与は 5 週齢時より13週間連続で行った．Table 1 に示すごとく，本試験での六味丸の最高投与量は，安全性試験での中用量1220mg／kg 体重とし，対照群雌雄は安全性試験と共通とした[1)]．

一般状態，臨床病理学的検査，血液学的，血清生化学的検査，病理学的検査および統計学的評価は安全性試験と同一方法である[1)]．

結　果

体重増加の推移を Fig. 1，2 に示した．投与期間を通して対照群は雌雄とも順調な増加傾向を示した．OPP 単独群(1.3%OPP，以下，単独群と略す)は，雌雄とも対照群より低い値で終始した．六味丸と OPP との併用投与群(以下，併用群と略す)の中では，単独群に比べ，最高用量群である M-O 群(OPP＋1220mg)雌雄はやや低いが，他の各群は同様か，または高値で推移した．投与開始および終了時の平均値，増加または抑制割合を Table 2 に示した．体重増加比(投与終了時体重／投与開始時体重)をみると，単独群は対照群より低かった．単独群に比べ，併用群は E-O 群雌，L-O 群雌雄は高い値を示したが，M-O 群雌雄は低かった．併用群間では，六味丸投与に伴い増加抑制が軽減される傾向は認められなかった．

摂餌，摂水量を Table 2 に示した．対照群に比べ，単独群では雌雄とも摂餌量は終始やや低下していた．併用群では，単独群に比べ，M-O 群雄が若干少なかったが，他の各群はほぼ同じか，やや多かった．なお，飼料のコ

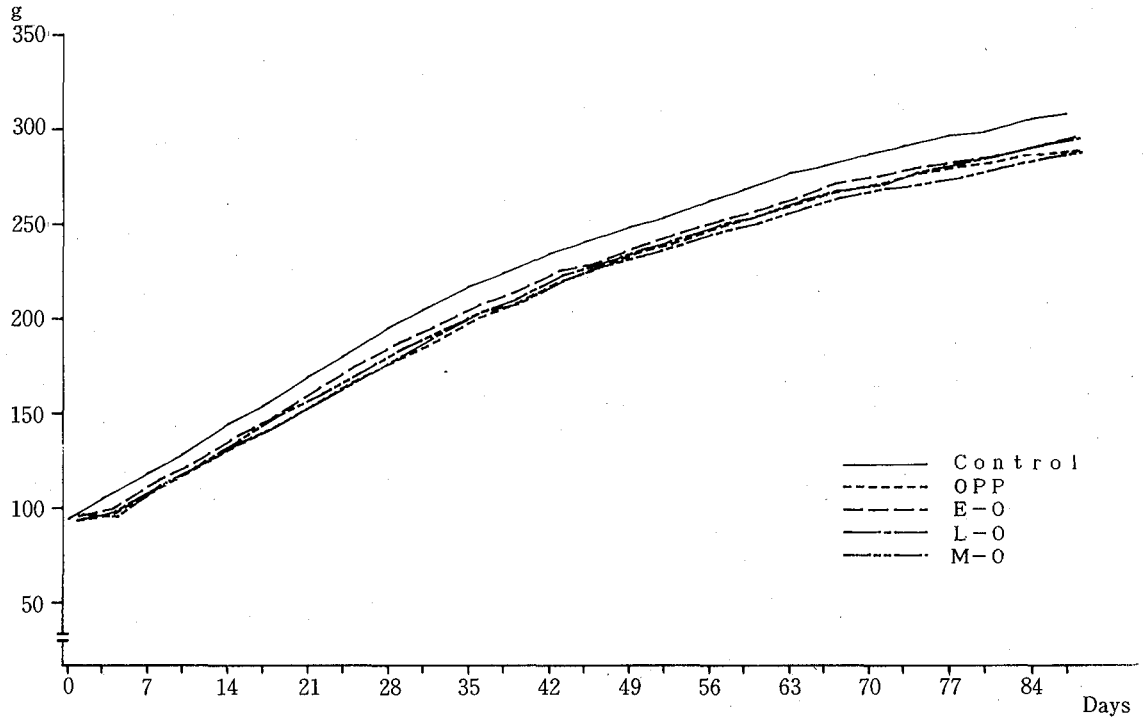


Fig. 1. Body Weight Changes in Male Rats Treated with Rokumi-gan and/ or OPP

Table 2. Changes in Body Weight, Food Intake and Water Intake in Rats Given OPP alone or in Combination with Rokumi-gan.

Group	Body weight		Rate of increase		Food intake(g/rat/day)		Water intake(g/rat/day)	
	Initial[1]	Final[2]	A[3]	B[4]	wk 4	wk11	wk 4	wk11
Male								
Control	94.1±3.0(10)[5]	306.4±11.2(10)	2.26	100	14.2±0.8(10)	15.3±0.4(10)	16.4±1.0(10)	17.8±1.1(10)
OPP	93.2±2.9(10)	286.0± 9.2(10)	2.07	92	13.6±0.8(10)	14.7±1.1(10)	18.2±1.0(10)	19.9±1.4(10)
E-O	95.7±2.3(10)	294.2±12.3(9)	2.07	92	14.5±1.4(9)	16.5±1.7(9)	19.5±1.7(9)	20.7±0.8(9)
L-O	93.9±3.1(10)	293.0±10.7(10)	2.12	94	13.8±1.2(10)	15.8±0.7(10)	18.7±2.0(10)	22.5±2.1(10)
M-O	96.8±3.0(10)	286.1±17.2(9)	1.96	87	13.4±0.7(9)	14.4±0.6(9)	18.9±0.5(9)	20.7±1.5(9)
Female								
Control	79.8±1.9(10)	181.6± 8.8(10)	1.28	100	10.0±0.4(10)	10.0±0.3(10)	14.7±0.7(10)	16.2±1.8(10)
OPP	80.6±0.8(10)	171.1± 7.5(10)	1.12	88	10.4±0.9(10)	9.7±0.7(10)	15.6±0.8(10)	16.0±1.0(10)
E-O	80.6±0.8(10)	175.4± 9.0(9)	1.18	92	10.1±0.5(9)	10.2±0.5(9)	16.0±0.5(9)	16.8±1.8(9)
L-O	79.7±2.1(10)	171.0±10.4(9)	1.15	90	9.1±0.3(9)	9.6±0.1(9)	14.7±1.7(9)	15.9±0.9(9)
M-O	81.0±4.7(10)	170.8±13.6(10)	1.11	87	10.0±0.5(10)	9.4±0.5(10)	13.7±2.0(10)	17.6±1.0(10)

1) Mean body weight at the begining of the administration. 2) Mean body weight at the end of the administration.

3) Rate of body weight gain to initial weight; (Final weight−initial weight)/ initial weight.

4) Value of A in each group/ value of A×100 in the control. 5) Mean±SD; the numbers of rats examined were shown in parentheses.

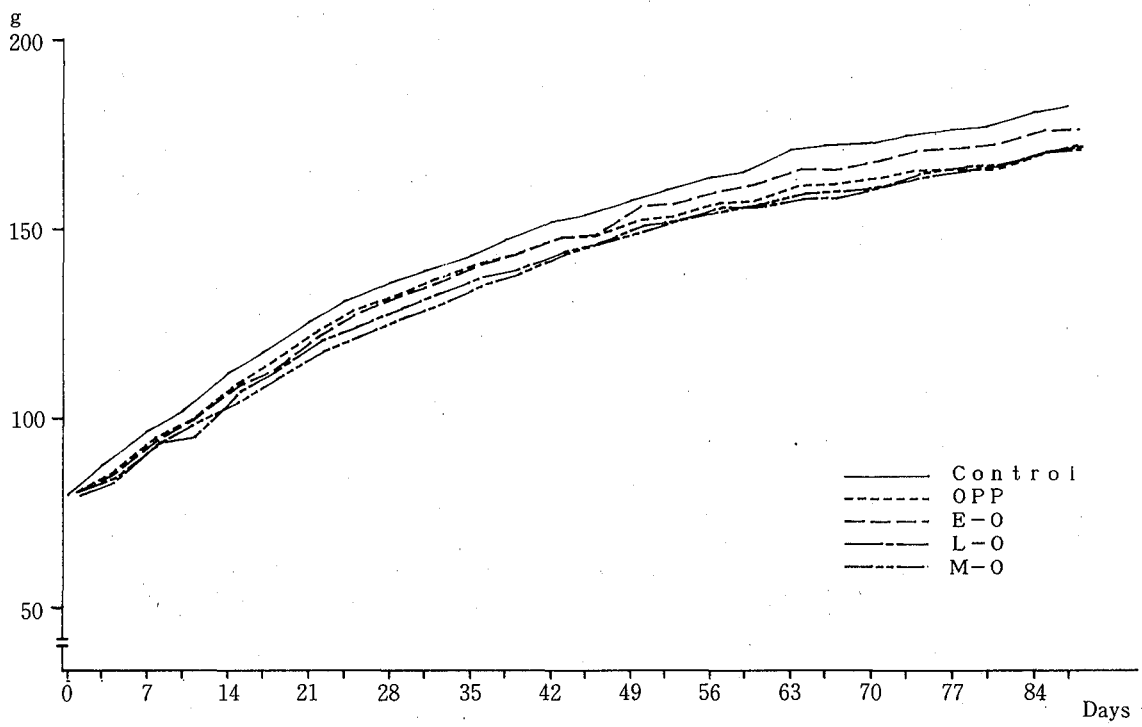


Fig. 2. Body Weight Changes in Female Rats Treated with Rokumi-gan and/ or OPP

ボシ量は，対照，単独および併用群とも約2g／ラット／日で各群間に差はみられなかった．摂水量は対照群に比べ，単独群は雌雄とも終始多かった．併用群は，単独群に比べ，雄では終始多かったが，雌では著明な差は認められなかった．摂餌，摂水量とも，併用群間では，六味丸投与量に相関した増加あるいは減少傾向はみられなかった．

死亡状況はTable 2の投与終了時平均体重の( )内に示すように，投与期間中に雌雄2群で各1例の死亡がみられたが，何れも投与初期の発生で，顕著な肉眼および組織学的変化は認められなかった．

尿検査では，対照，単独および併用各群の雄において，数例の中等度の尿蛋白が検出されたが，他の変化は認められなかった．

血液学的検査の結果をTable 3に示した．単独群では，対照群に比べ，雌の赤血球数，ヘモグロビン量およびヘマトクリット値は低下しており，有意差が認められた．併用群は，単独群に比べ，雄の白血球数は低値を示したが，雌ではこの傾向は認められなかった．これらの変動がみられた検査値には，何れも六味丸投与量の増加に伴う増強あるいは減弱の傾向はみられなかった．

血清生化学検査の結果をTable 4，5に示した．対照群に比べ単独群では，雌雄ともALB，TP，A／G比がやや高く，雌雄のLAP，雄のCAは低値を示した．これらのうち，雄のALB，CAおよびTPには有意差が認められたが，雌には認められなかった．併用群におけるこれらの検査値は，雌雄とも単独群との間に有意差はなく，六味丸投与量に比例した上昇，低下を示さなかった．また，対照群との間で，併用群雄のALB，LAPおよびTP，L-O群雌のA／G比，E-O群雌のLAPに，それぞれ有意差が認められた．

臓器重量測定の結果をTable 6，7に示した．対照群に比べ単独群において，雄では肝臓の絶対および相対(体重100g当り)重量，腎臓の相対重量がそれぞれ有意に増加し，雌では，肝臓および腎臓の相対重量が有意な増加を示した．これらの変動は併用群でも単独群と同様であり，両群間に明瞭な差は認められなかった．膀胱重量は単独群，併用群雌雄ともに対照群に比べ増加し，六味丸の用量に相関してやや減少する傾向が認められた．しかし，その他では六味丸投与量に比例した重量の増加，減少はみられなかった．

組織学的検査では，単独群および併用群で，腎臓ならびに膀胱に著明な変化がみられた．腎臓では，限局性に近位尿細管上皮の細胞質の好塩基性化，核の膨化または

Table 3. Hematological Examination in Rats Given OPP alone or in Combination with Rokumi-gan

Group	No. of rats[1)]	RBC (10^6/mm^3)	WBC (10^3/mm^3)	HGB (gm/dl)	HCT (%)	PLT (10^3/mm^3)	Differential of leukocytes(%)			
							Neutro	Lymph	Mono	Eosino
Male										
Control	9	9.66±0.15[2)]	8.1±1.1	16.4±0.8	50.3±0.8	7.7±3.3	13.9±4.7	84.9±4.9	0.9±0.6	0.4±0.5
OPP	10	9.55±0.21	7.1±0.7	16.3±0.3	50.7±1.2	7.0±1.4	14.8±5.0	83.1±6.1	1.1±1.3	1.0±1.4
E-O	9	9.66±0.13	6.7±0.9	16.5±0.2	51.1±0.7	6.1±1.2	13.8±6.5	84.8±6.8	0.8±0.7	0.8±0.9
L-O	10	9.54±0.14	6.6±0.4*	16.4±0.2	50.4±0.7	6.1±0.7	14.3±2.6	84.0±2.3	1.6±1.1	0.1±0.4
M-O	9	9.55±0.30	6.5±1.1*	16.3±0.4	50.6±1.0	6.0±0.8	17.8±7.1	80.7±7.3	1.1±1.3	0.4±0.7
Female										
Control	10	9.13±0.17	8.5±1.4	16.8±0.4	50.7±0.9	7.0±0.5	14.8±3.3	84.3±3.3	0.5±0.8	0.5±0.8
OPP	10	8.75±0.15*	7.1±0.9	15.9±0.4*	48.7±1.0*	6.9±0.3	18.9±5.2	78.9±5.8	1.4±1.3	0.9±1.2
E-O	9	8.76±0.12	6.8±0.7	15.9±0.2*	48.5±0.6*	6.9±0.6	14.3±6.2	84.4±6.4	0.9±1.0	0.8±1.2
L-O	9	8.78±0.16	7.0±1.4	15.9±0.2*	48.8±0.8*	7.3±0.5	19.8±7.3	78.5±7.2	1.3±1.2	1.0±2.0
M-O	10	8.89±0.31	6.8±0.7	15.9±0.4*	49.0±1.0	7.1±0.3	14.7±4.0	83.6±4.3	0.7±0.7	1.0±0.7

1) No. of rats examined. 2) Mean±SD.

* Significant difference from the control($P<0.05$).

Table 4. Biochemical Examination of Serum in Male Rats Given OPP alone or in Combination with Rokumi-gan

Group	No. of rats[1]	ALB g/dl	ALP IU/l	AMY 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
Control	10	3.2±0.1[2]	624±39	6404±347	0.3±0.1	0.2±0.0	10.3±0.1	0.05±0.02	56±2	14±1	4054±2308	0.5±0.1	3.7±0.5
OPP	10	3.4±0.1*	561±30	6505±425	0.3±0.1	0.2±0.1	10.1±0.1*	0.07±0.02	54±4	12±1	3764±1939	0.5±0.1	3.8±0.9
E-O	9	3.4±0.1*	555±24	6511±319	0.3±0.1	0.1±0.1	10.1±0.2	0.07±0.03	55±5	12±2	3756±1846	0.5±0.1	3.5±0.5
L-O	10	3.5±0.0*	566±42	6365±297	0.3±0.1	0.2±0.1	10.1±0.2	0.07±0.02	56±3	13±1	3246±2372	0.5±0.0	3.7±0.9
M-O	9	3.4±0.1*	570±67	6424±329	0.3±0.0	0.1±0.1	10.2±0.1	0.06±0.03	51±4	10±1*	2024±1147	0.5±0.1	3.3±0.4

GOT IU/l	GPT U/l	LP IU/l	IP mg/dl	LAP GR-U	LDH IU/l	PL mg/dl	TG g/dl	TP mg/dl	UA mg/dl	UN mg/dl	A/G	O/P	GLU mg/dl
100±20	28± 3	3±1	6.0±0.4	199±6	1213±262	129± 7	177±25	6.7±0.2	1.1±0.1	22.2±0.8	0.91±0.03	3.65±0.52	174±12
89±14	25± 4	4±1	6.2±0.2	176±5*	1276±246	121± 8	132±29	7.0±0.2*	1.2±0.2	22.3±1.0	0.95±0.06	3.63±0.77	175±13
89±17	30±11	4±1	6.1±0.3	178±7*	1228±249	121±13	124±43	7.0±0.1*	1.0±0.1	22.5±1.3	0.96±0.03	3.19±0.90	174±7
81±20	26± 6	4±1	6.0±0.5	176±4*	1119±284	125± 8	143±38	7.0±0.1*	1.1±0.2	21.9±1.8	0.97±0.02	3.11±0.48	174±9
82±17	31± 6	4±1	6.2±0.4	179±8*	1061±184	114± 7	109±22*	7.0±0.1*	1.0±0.2	21.5±1.3	0.98±0.04	2.93±0.81	170±6

1) No. of rats examined. 2) Mean±SD. *Significant differrence from the control($P<0.05$)

Table 5. Biochemical Examination of Serum in Female Rats Given OPP alone or in Combination with Rokumi-gan

Group	No. of rats[1]	ALB g/dl	ALP IU/l	AMY 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
Control	10	3.3±0.1[2]	475±58	4600±666	0.2±0.1	0.1±0.0	10.2±0.1	0.93±0.09	78±4	19±3	3325±9998	0.5±0.1	2.2±0.6
OPP	10	3.5±0.1	405±36	4662±201	0.3±0.1	0.1±0.0	10.2±0.2	0.90±0.10	73±4	16±3	2433±1320	0.5±0.1	2.9±0.3
E-O	9	3.5±0.1	424±34	4729±249	0.2±0.0	0.1±0.0	10.1±0.3	0.87±0.14	71±5	16±2	2597±855	0.5±0.1	2.9±0.8
L-O	9	3.5±0.1	429±51	5007±788	0.2±0.0	0.1±0.0	10.1±0.3	0.88±0.10	74±4	16±2	2947±1813	0.4±0.1	3.3±1.0
M-O	10	3.5±0.1	404±40	4730±324	0.2±0.0	0.1±0.0	10.2±0.3	0.79±0.12	72±8	16±3	2789±818	0.5±0.1	3.2±0.5

GOT IU/l	GPT U/l	LP IU/l	IP mg/dl	LAP GR-U	LDH IU/l	PL mg/dl	TG g/dl	TP mg/dl	UA mg/dl	UN mg/dl	A/G	O/P	GLU mg/dl
86± 9	21±4	3±1	5.6±0.7	198± 8	946±186	160±13	74±39	6.6±0.2	1.0±0.1	20.4±3.6	0.99±0.03	4.10±0.67	161±11
79±16	19±3	4±1	5.3±0.5	186± 9	935±191	152± 8	64±29	6.9±0.2	1.1±0.1	20.6±4.4	1.05±0.03	4.22±0.45	158± 8
79±14	17±4	4±1	5.3±0.4	181±12*	911±197	151± 9	76±19	6.8±0.2	1.1±0.3	21.5±3.0	1.05±0.03	4.99±1.64	162±13
76±16	20±3	3±1	4.8±0.5	182± 8	943±283	168±10	89±51	6.8±0.2	1.3±0.3	21.4±3.1	1.07±0.04*	3.83±0.64	169± 7
75± 9	17±3	3±1	5.2±0.7	184± 7	913±152	159±14	62±29	6.9±0.3	1.2±0.2	20.6±2.5	1.05±0.03	4.46±1.07	169± 6

1) No. of rats examined. 2) Mean±SD. *Significnnt difference from the control($P<0.05$)

Table 6. Organ Weight in Male Rats Given OPP alone or in Combination with Rokumi-gan

Group	No.of organs[1)]	Brain mg	Thymus mg	Lung mg	Heart mg	Spleen mg	Liver g
Control	10	1971±37[2)] (637±29)[3)]	183±14 (59±4)	893±58 (288±11)	850±42 (274±12)	581±40 (187± 8)	9.84±0.35 (3.17±0.09)
OPP	10	1985±41 (681±20)	170±23 (58±7)	859±79 (295±22)	787±40 (270± 9)	563±50 (193±11)	11.19±0.86* (3.84±0.20)*
E-O	10	1981±32 (672±32)	179±16 (61±5)	878±42 (298±18)	814±42 (275±13)	575±25 (195± 6)	11.21±0.82* (3.79±0.13)
L-O	10	1971±24 (670±24)	173±21 (59±6)	864±32 (294±13)	816±53 (277±12)	565±38 (192±10)	11.28±0.57* (3.83±0.15)*
M-O	9	1980±39 (692±32)*	169±15 (59±4)	865±69 (302±15)	800±42 (279± 5)	549±41 (191± 9)	11.01±0.56* (3.84±0.19)

Kidney(R) mg	Kidney(L) mg	Adrenal(R) mg	Adrenal(L) mg	Testis(R) mg	Testis(L) mg	Prostate mg	Bladder mg
925±63 (298±14)	920±53 (297±12)	18.4±2.3 (6.0±0.7)	21.1±3.0 (6.8±1.1)	1404±69 (453±18)	1431±67 (462±25)	292±33 (94±11)	72±2(8) (23±1)
953±63 (327±15)*	980±54 (336±11)*	19.0±3.0 (6.5±0.9)	21.1±2.8 (7.3±1.0)	1424±20 (489±18)	1452±36 (499±12)	236±42 (81±15)	94±6(9) (32±2)
983±77 (332±15)*	1013±82 (348±18)*	18.8±2.7 (6.4±0.8)	20.9±1.8 (7.1±0.4)	1414±39 (479±23)	1447±55 (490±25)	263±58 (89±18)	95±11(9) (32±4)
1009±37 (343±16)*	986±46 (335±20)*	19.8±1.2 (6.7±0.4)	21.4±1.5 (7.3±0.6)	1428±28 (486±17)	1472±31 (501±20)	246±47 (83±13)	91±10 (31±4)
1002±71 (349±13)*	1015±70 (354±14)*	19.5±2.8 (6.8±1.0)	22.8±2.5 (8.0±0.9)	1418±66 (495±27)*	1451±71 (506±22)*	256±60 (89±20)	87±15(8) (30±5)

1) No. of organs weighed. 2) Mean±SD (Absolute weight). 3) Mean±SD (Relative weight: weight/ 100g body weight). *Significant difference from the control($P<0.05$).

濃縮，基底膜の肥厚，遠位尿細管上皮の偏平化，管腔の拡張，間質の線維細胞増加が認められた．膀胱では移行上皮細胞が多層化し，密度が増加，核も大型化するなどの組織変化が観察された．これらの組織変化は，雌では各群2-3例であったが，Table 8に示すように雄では多発した．膀胱の組織所見は，OPP誘発の過形成像[2-4)]と類似していた．雄においては，単独群での変化の発現に対し，併用群では，腎臓の変化の発生率は等しいが，変化程度は軽減されており，膀胱では発生率の低下が，とくに中間用量のL-O群でみられた．これら併用群での発現様式から，六味丸の用量に依存した効果は認められなかった．また，単独群，併用群では雌雄ともに，胸腺皮質の胸腺リンパ球が減少し，皮質幅がやや狭小化しており，肝臓で肝細胞の軽度な肥大が観察された．これらの変化は，単独群，併用群間で，程度および発生率に著差は無く，六味丸投与量に相関した影響は明瞭ではなかった．この他，心臓の局所性炎症，肺の局所性炎症および血管壁の石灰化が，何れも軽度に，対照および投与各群に散見された．

考　　察

本試験では，投与各群の摂餌量はほぼ等しかったことから，単独および併用群の総OPP投与量は相互に近似すると考えられる．すなわち，OPPの影響は投与各群に強弱の差なく均等に与えられたことになる．従って，単独群と併用群との間で発現に差異が認められた変化は，六味丸の併用投与による効果の現れであると推定される．

単独群では，対照群と比較して，有意に，雌の赤血球および白血球数，ヘモグロビン量およびヘマトクリット値が低下，雄のアルブミン量，総蛋白量が増加，雄の肝臓の絶対，相対重量，雌の肝臓の相対重量および雌雄の腎臓の相対重量が増加した．さらに，対照群では非常に軽度の発現か，あるいは認められなかった変化，とくに雄で肝細胞の肥大，腎臓尿細管上皮の変性，膀胱上皮の過形成が観察された．

単独群雌での，赤血球数，ヘモグロビン量，ヘマトクリット値の低下は，軽度な貧血傾向を示唆している．こ

Table 7. Organ Weight in Female Rats Given OPP alone or in Combination with Rokumi-gan

Group	No.of organs[1)]	Brain mg	Thymus mg	Lung mg	Heart mg	Spleen mg	Liver g
Control	10	1847±35[2)] (1019±49)[3)]	178±14 (98± 9)	708±46 (390±19)	536±21 (295±13)	386±25 (213±12)	5.50±0.48 (3.02±0.17)
OPP	10	1826±36 (1079±41)	157±19 (93±13)	662±29 (391±11)	512±25 (302±16)	381±14 (225±8)	5.83±0.28 (3.44±0.19)*
E-O	9	1850±64 (1065±42)	158±12 (91± 6)	689±70 (396±29)	513±42 (295±11)	367±17 (211±6)	5.95±0.51 (3.42±0.22)*
L-O	9	1838±31 (1088±64)	159±13 (94±11)	651±36 (385±30)	513±26 (303±13)	371±16 (220±14)	5.93±0.40 (3.50±0.19)*
M-O	10	1854±50 (1098±63)	157±20 (93± 7)	688±82 (405±19)	526±41 (311±16)	370±29 (218±9)	5.99±0.65 (3.53±0.22)*

Kidney(R) mg	Kidney(L) mg	Adrenal(R) mg	Adrenal(L) mg	Ovary(R) mg	Ovary(L) mg	Uterus mg	Bladder mg
584±41 (321±15)	581±34 (320±13)	20.9±3.1 (11.5±1.3)	23.1±2.4 (12.7±0.9)	27.4±2.6 (15.1±1.5)	29.3±5.2 (16.1±2.5)	398±80 (219±39)	63±4(8) (34±2)
600±27 (354±17)*	585±32 (345±19)	19.6±2.2 (11.6±1.1)	23.4±2.6 (13.8±1.4)	25.9±3.4 (15.3±2.2)	25.8±3.3 (15.2±2.0)	437±106 (259±65)	114±107(9) (68±64)
593±30 (341±18)	601±38 (346±20)	20.7±2.9 (11.9±1.9)	20.9±3.9 (12.0±1.9)	26.3±3.5 (15.1±1.5)	26.0±6.7 (14.9±3.5)	436±87 (251±48)	86±13(8) (50±6)
596±25 (353±25)*	602±25 (357±22)*	19.7±2.3 (11.6±1.5)	22.3±3.8 (13.2±2.0)	27.9±3.0 (16.5±2.1)	28.5±4.2 (16.8±1.8)	451±87 (268±59)	83±9(8) (50±5)
563±16 (346±13)	561±21 (346±16)	21.5±2.4 (12.7±1.1)	23.4±2.4 (13.8±1.2)	24.3±7.9 (14.3±4.1)	26.0±5.8 (15.3±2.8)	415±97 (243±42)	81±15(8) (48±7)

1) No. of organs weighed. 2) Mean±SD (Absolute weight). 3) Mean±SD (Relative weight: weight/ 100g body weight). *Significant difference from the control($P<0.05$).

Table 8. Summary of Histological Findings in the Kidney and the Urinary Bladder of Male Rats

Group No. of rats[1)]		Cont 9	OPP 10	E-O 9	L-O 10	M-O 9
Kidney						
Degeneration	±[2)]	3	0	4	3	5
of tubular	+	0	10	5	6	4
epithelium	++	0	0	0	1	0
Urinary bladder						
Hyperplasia	±	0	5	4	4	3
	+	0	3	3	0	2
	++	0	0	0	0	1

1) No. of rats examined histologically.

2) ± very slight changes, + slight changes, ++ moderate changes.

れに対し，併用群雌では，赤血球数はやや増加しているが，その他は変動が判然としなかった．すなわち，六味丸が貧血傾向を著明に改善したとは考え難い結果である．また，白血球数は雌雄とも単独群に比べ併用群での減少がやや目立ち，これは安全性試験の六味丸単独投与でも現れた変化であることから[1]，六味丸投与に関連した減少と考えられる．しかし，本試験および安全性試験ともに，投与量に比例した減少ではなく，脾臓，骨髄での組織変化も見られないことから，現時点では六味丸併用による特異的変化であるか，否かは不明である．

単独群雄でのアルブミン量の増加は総蛋白量の増加にも直結し，A／G 比の上昇も招来した．さらに，この群の摂水量は，有意ではないが，多かったことを考慮に入れると，軽度ながら脱水症状[5]を呈していたと考えられる．すなわち，個体レベルでの軽度な水分バランス調節不全[6]があったと推定される．同様の傾向は，軽微であるが雌でも観察された．これまでの報告[2-4]および本試験とも，投与群のラットには OPP 曝露に関連して，腎臓に炎症を主体とする組織変化が生じている．このことから，摂水量の増加は，ホルモンのインバランスよりは，腎臓障害に起因すると考えられる．しかし，現時点では原因を腎臓障害に限定することは困難である．以上のように，これら血清生化学的検査における各変化は，併用群でも全く同様に，同程度に起こっており，六味丸併用による効果は認められなかった．

肝臓および腎臓重量の増加は，単独群雌雄と同様に併用群雌雄でも同程度に認められた．肝臓では，肝細胞の軽度肥大が観察され，重量増加との関連を示唆した．しかし，肝細胞の肥大は必ずしも障害を示唆する像ではなく，薬物による代謝機能の亢進状態の表現とも考えられる．腎臓は，相対重量のみの増加であり，体重増加抑制に起因する変化と思われる．これら肝臓，腎臓の重量増加は，併用群でも同様にみられており，軽減されていないことから六味丸投与による効果は判然としない．

単独群，とくに雄で観察された肝細胞の肥大，腎臓尿細管上皮の変性，膀胱上皮の過形成のうち，肝細胞の変化については，既に述べた．本試験でみられた単独群の腎臓および膀胱の組織変化は，著者らが，これまでに報告した像と一致しており[2-4]，OPP によって誘発された変化であろう．これらの変化は，併用群の腎臓では軽減され，膀胱では，発生率が低下する傾向が，何れも軽度ながら認められた．本試験では，六味丸と OPP とを同時に投与しており，六味丸が，OPP 曝露による障害発生過程のどの段階で作用したのか，あるいは OPP の組織障害作用を直接弱めたのかは明らかではない．しかし，六味丸は OPP 曝露によって発生する障害を軽減，または PPP と拮抗する作用があることを示唆したと考えられる．

以上のごとく，六味丸は，OPP 投与に関連した泌尿器系器官に対する障害作用を抑制または改善する効果を軽度ながら現わした．しかし，この効果の確定には，さらなる検討が必要であることは言うまでもない．

文　献

1) 藤井　孝，三栗谷久敏，矢野範男，湯澤勝廣，長澤明道，多田幸恵，福森信隆，角　千代，佐々木美枝子：東京衛研年報，**42**，235-242，1991

2) Hiraga, K. and Fujii, T.: *Fd Chem. Toxic.*, **22**, 865-870, 1984

3) Hiraga, K. and Fujii, T.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, **19**, 303-310, 1981

4) Fujii, T., Nakamura, K. and Hiraga, K.: *Fd Chem. Toxic.*, **25**, 359-362, 1987

5) 柴田　進：臨床生化学診断法，第 5 版，37-38，1972，金芳堂，東京．

6) 問田直幹，内薗耕二：新生理学，第 3 版，564-572，1971，医学書院，東京．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 252-260, 1991

八味地黄丸の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*,
安田一郎**, 角　千代*, 佐々木美枝子*

Effect of Pretreatment with Hachimi-jio-gan on Thiabendazole-Induced Teratogenicity in Mice

AKIO OGATA*, HIROSHI ANDO*, YOSHIKAZU KUBO*, ICHIROU YASUDA**, CHIYO SUMI*
and MIEKO SASAKI*

The effect of pretreatment with Hachimi-jio-gan (HJ), a traditional Chinese prescription, on the teratogenicity of thiabendazole (TBZ) was investigated. Pregnant mice were given a dose of 0, 150, 300 or 600mg HJ/kg p.o. for three consecutive days on day 7,8 and 9 of gestation. The TBZ (1000mg/kg) was given one hour after the last administration of HJ on day 9. All foetuses were removed from the uterus on day 18 of gestation, and were examined for external and skeletal anomalies.

Body-weight gains, organ weights and reproductive parameters of the pregnant mice and skeletal variations and ossifications of the foetuses in the groups pretreated with HJ were not different from those of the group treated with TBZ alone.

The total number of the foetuses with external and skeletal malformations in the groups of mice pretreated with HJ were significantly higher than that in the group treated with TBZ alone. The mean values of incidences expressed as numbers of malforfmations/litter were slightly increased. However, no clear dose-response relationship was found.

High dose (600mg/kg) of HJ without TBZ had no effects on the reproductive parameters, malformation, skeletal variation or ossification in mice.

Keywords：八味地黄丸 hachimi-jio-gan, チアベンダゾール thiabendazole, 催奇形性 teratogenicity, 増強効果 synergistic effect

はじめに

当部では漢方薬の有用性を検討する東洋医学研究の一環として，既知催奇形物質に対する漢方薬の作用について妊娠マウスを用い，試験している．

前報では被検物質として薬用人参をとりあげ，その前処置がチアベンダゾール(TBZ)の催奇形作用に拮抗することを報告した[1]．

今回は被検物質として，臨床的には主に老人性疾患の治療に応用される八味地黄丸をとりあげ，その前処置がTBZ催奇形性にどのような影響を及ぼすかについて検討した．

八味地黄丸は腎気の虚衰を治することから，中年以後老齢者に用いられることが多いが，その作用から応用して産後の浮腫等の治療にも用いられる[2]．従って妊娠中の患者に用いられる可能性はきわめて少ないと思われるが，八味地黄丸それ自体あるいは他の薬剤と併用した場合の胎児および妊娠母体への影響についての情報は殆ど知られていない．

一方，本試験に用いるTBZは当部においてその催奇形性が確認され，薬物動態およびその作用機序について

＊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 Heaith. 24-1 Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan
＊＊同理化学部医薬品研究科

も検討がなされており[3-9]，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．八味地黄丸はK社製市販品(Lot no. T19180)の水製エキス乾式細粒のものを購入，使用した．

TBZ はオリーブ油(局方)に，八味地黄丸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%，照明6：00－18：00に制御された飼育室にて，固型試料(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ケージ(225×325×110mm)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(160×225×110mm)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：八味地黄丸は投与用量が0 mg(対照群)，150mg，300mg，600mg/kg となるように調整，各々妊娠7－9日に1日1回3日間経口投与した．これらの八味地黄丸投与群は妊娠9日の八味地黄丸投与1時間後にTBZ 1000mg/kg を経口投与した．また八味地黄丸600mg投与群については妊娠9日投与1時間後にオリーブ油のみを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日にエーテル麻酔下で屠殺し，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，生児はアリザリンレッドSで骨格染色[10]を行い骨格異常の有無を調べた．

5．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[11]の他に，異常の頻度については二項確立分布に基づいた鈴木ら[12]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日の体重を基準にとった体重増加率(%)の推移は図1に示す通りで八味地黄丸前処置群と対照群との間に有意差は見られなかった．それに比べ八味地黄丸600mg 前処置後オリーブ油を投与した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25匹中，八味地黄丸0 mg 前処置群1匹，150mg 群2匹，300mg 群1匹，600mg 群3匹であり，群間に有意差は見られなかった．また八味地黄丸600mg にオリーブ油を投与した群での途中死亡はなかった．

解剖時の肉眼的所見ではいずれの群にも特記する変化を認めなかった．

母体臓器重量(表1)ではいずれの量の八味地黄丸前処置群とも対照群に比べ有意な差は見られなかった．八味地黄丸前処置後オリーブ油投与群での各々の臓器重量は当部での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，生児数では八味地黄丸前処置後 TBZ 投与群のいずれの群とも対照群に比べ有意な変動は見られなかった．また死亡児頻度，胎児体重にも有意な増減は見られなかった．

八味地黄丸前処置後オリーブ油投与群は上述したいずれの指標も当部で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．

八味地黄丸前処置群において観察された奇形の型はTBZ 単独投与(対照群)によって誘発される奇形の型と同様であった．しかしながら，総奇形児数では外表奇形での八味地黄丸300mg/kg 前処置群が対照群に比べ有意に増，骨格奇形では八味地黄丸150mg および300mg/kg 前処置群が対照群に比べ有意に増であった．また，母体当りの奇形児発現頻度でも，統計学的に有意ではなかったが，外表，骨格奇形のいずれにおいても TBZ 単独投与(対照群)で誘発された発現頻度(外表7.4%，骨格18.3%)よりも増加(150mg 群；外表9.4%，骨格34.8%，300mg 群；外表21.4%，骨格39.5%，600mg 群；外表

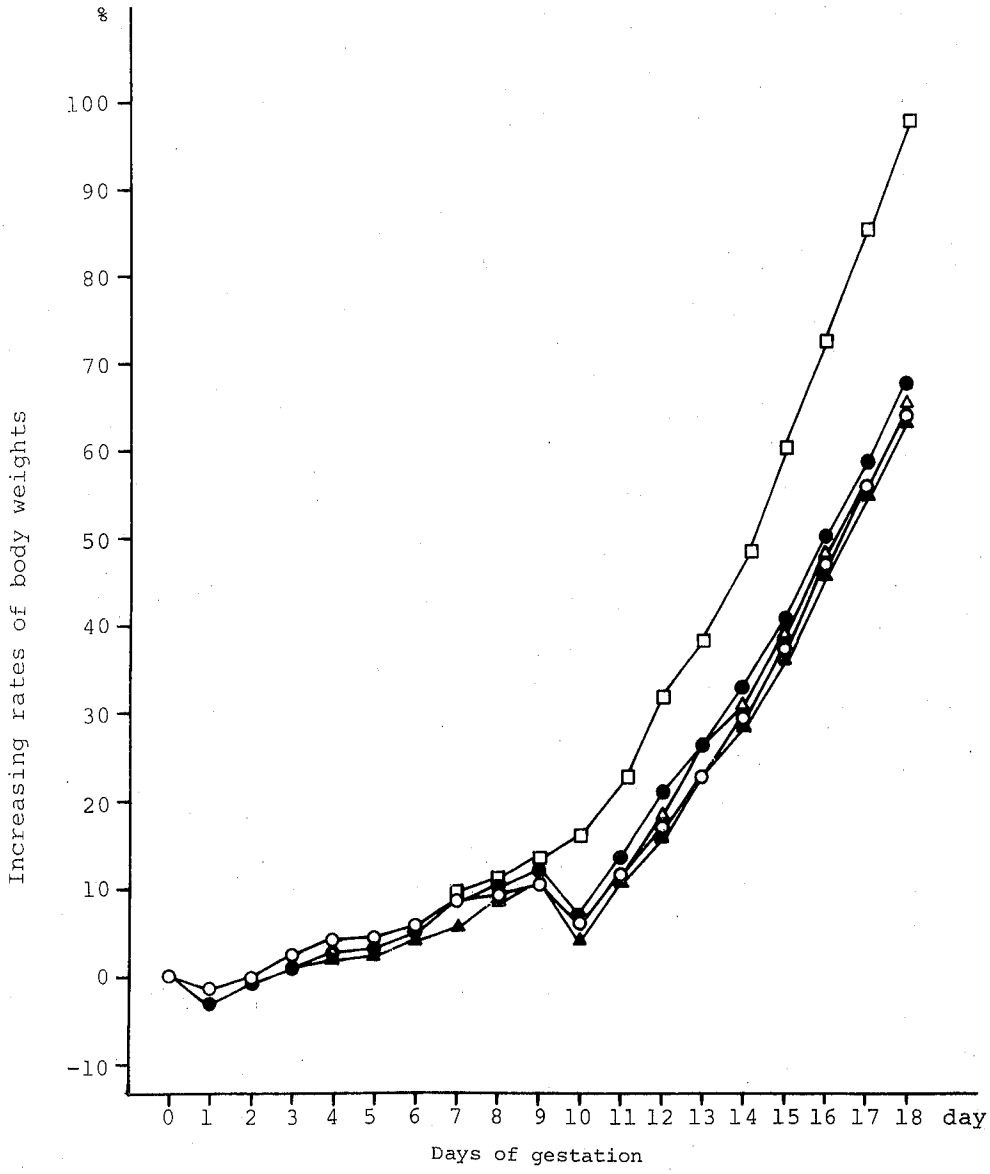


Fig. 1. Increase rates of body weights

Increase of BW was shown by the equation: $\frac{\text{BW on day n-BW on day 0}}{\text{BW on day 0}} \times 100\ (\%)$

n designates gestation period.

(○);D. W. (7-9) and TBZ, (▲); 150mg HJ (7-9) and TBZ, (△); 300mg HJ (7-9) and TBZ,(●); 600mg HJ (7-9) and TBZ,(□); 600mg HJ (7-9) and Olive oil

Table 1. Effect of treatment with hachimi-jio-gan (HJ) before thiabendazole (TBZ) administration on organ weights of mice on day 18 of gestation

Dose	No. of dam	Liver g g/100g	Heart mg mg/100g	Spleen mg mg/100g	Kidney (L) mg mg/100g	Kidney (R) mg mg/100g
D. W.(7 − 9)		2.6±0.3	133.0±10.9	113.4± 23.4	222.1±24.7	229.8±27.3
+TBZ	20	8.8±0.9	444.9±34.9	378.4± 69.8	742.2±72.2	767.1±73.6
HJ 150mg (7-9)		2.6±0.3	132.2±10.3	118.3± 22.6	209.6±20.6	215.1±24.4
+TBZ	15	8.7±0.7	438.3±34.7	391.0± 65.9	693.5±50.3	711.1±54.9
HJ 300mg (7-9)		2.7±0.3	137.6±10.4	116.9± 24.2	222.3±22.0	226.7±26.5
+TBZ	20	9.0±1.0	459.5±44.5	388.7± 75.6	740.3±61.5	754.9±77.4
HJ 600mg (7-9)		2.6±0.3	133.8±11.4	115.6± 30.0	222.9±20.7	230.2±20.2
+TBZ	14	9.0±1.0	459.0±27.3	398.7±108.0	768.7±72.4	792.6±58.9
HJ 600mg (7-9)		2.9±0.6	135.4± 8.2	113.5± 14.7	237.4±15.5	242.1±16.4
+Olive oil	18	9.6±1.8	453.3±34.0	380.2± 54.2	794.2±53.5	810.3±59.4

Dose	No. of dam	Lung mg mg/100g	Adrenal (L) mg mg/100g	Adrenal (R) mg mg/100g	Ovary (L) mg mg/100g	Ovary (R) mg mg/100g
D. W. (7-9)		178.9±10.6	3.8±0.7	3.3±0.6	8.8±2.5	9.5±2.0
+TBZ	20	599.5±45.6	12.6±2.3	10.9±1.8	29.2±7.7	31.8±5.9
HJ 150mg (7-9)		180.4±14.2	3.7±0.8	3.3±0.6	8.6±3.5	9.1±1.6
+TBZ	15	598.0±46.4	12.4±2.9	11.1±2.3	28.3±9.5	30.0±4.6
HJ 300mg (7-9)		179.9±14.2	3.9±0.5	3.3±0.6	9.3±2.2	9.3±1.7
+TBZ	20	600.2±53.1	13.1±2.2	11.0±2.3	31.0±7.5	31.3±6.4
HJ 600mg (7-9)		171.2±11.8	3.5±0.6	3.0±0.7	8.4±2.2	8.1±1.5
+TBZ	14	590.1±37.3	12.1±2.4	10.5±2.7	28.8±6.8	27.9±4.7
HJ 600mg (7-9)		176.4± 5.4	3.6±0.8	3.2±0.7	8.9±1.1	8.8±1.8
+Olive oil	18	590.6±28.3	12.1±2.6	10.6±2.2	29.6±3.4	29.4±6.2

Mice were treated with HJ on day 7,8 and 9 of gestation, then given TBZ on day 9 and sacreficed on day 18.
Upper and lower figures denote mean absolute weight±SD and mean weight/100g BW±SD, respectively.

Table 2. Effect of treatment with hachimi-jio-gan (HJ) before thiabendazole (TBZ) administration on the reproductive organs in pregnant mice

Reproductive parameter	D. W (7-9) +TBZ	HJ 150mg (7-9) +TBZ	HJ 300mg (7-9) +TBZ	HJ 600mg (7-9) +TBZ	HJ 600mg (7-9) +Olive oil
Females mated !	25	25	25	25	18
Females died"	1	2	1	3	0
Females gestated$	24	22	23	20	18
Females with›one live foetus	20	15	20	14	18
Corpora lutea/litter #	14.5± 2.0	14.5± 2.0	14.6± 1.8	14.9± 3.1	16.2± 2.1
Implantation/ litter #	12.6± 2.7	12.9± 1.9	13.3± 2.4	12.7± 1.8	14.2± 2.6
Resorption of foetuses (%)' &					
Early	23.5±26.6	27.4±34.4	26.7±25.9	27.7±40.4	4.4± 5.0
Late	0.3± 1.2	0.4± 1.6	1.9± 3.6	1.0± 2.5	0.8± 2.3
Live foetuses/ litter #	9.5± 4.0	9.7± 5.1	9.4± 3.7	9.0± 5.2	13.5± 2.9
Body wt of live foetuses (g) #					
Male	1.21±0.12	1.17±0.08	1.19±0.12	1.24±0.14	1.39±0.07**
Female	1.16±0.13	1.17±0.13	1.16±0.12	1.17±0.10	1.33±0.07**

! 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 (** $p<0.01$) 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).

Table 3. Effect of treatment with hachimi-jio-gan (HJ) before thiabendazole (TBZ) administration on foetal malformation

Observation	D. W. (7-9) +TBZ	HJ 150mg (7-9) +TBZ	HJ300mg (7-9) +TBZ	HJ 600mg (7-9) +TBZ	HJ 600mg (7-9) +Olive oil
			(External malformations)		
No. of litters with malformed foeruses/no. examined	6/20	5/15	6/20	4/14	0/18
……(%)	(30.0)	(33.3)	(30.0)	(28.6)	(0)
Malformations(%)@	7.4±14.9	9.7±21.5	21.4±35.6	20.2±38.2	0
No. malformed foetuses/no. examined	11/190	12/145	28/188**	6/126	0/243
No. of foetuses with :					
Cleft palate	0	3	1	1	0
Open eyelids	1	1	0	0	0
Reduction deformity of limbs	5	6	11	1	0
Syndactyly	0	2	1	0	0
Split of dacty1	1	0	0	0	0
Mal-position of dacty1	1	0	0	0	0
Polydactyly	0	1	0	0	0
Short tail	3	1	13	3	0
Anal atresia	0	0	2	0	0
			(Skeletal malformations)		
No. of litters with malformed foetuses/no. examined	10/20	11/15	14/20	7/14	0/18
……(%)	(50.0)	(73.3)	(70.0)	(50.0)	(0)
Malformations(%)@	18.3±26.5	34.8±33.7	39.5±39.5	25.5±35.7	0
No. malformed foetuses/no. examined	23/190	47/145***	54/188***	24/126	0/243
No. of foetuses with :					
Fusion of vertebral arches	18	39	51	23	0
Fusion of vertebral bodies	7	13	17	7	0
Fusion of vertebral ribs	5	7	7	8	0
Malformation of limb skeleton	7	2	5	0	0
Reduction deformity of rib	1	0	0	0	0

@ Calculated by averaging the percentage in each litter (i. e. no. of malformations/no. of foetuses), and shown as mean±1SD.

Values marked with asterisks are significantly different (chi-sguare test) from the corresponding control value: **$p<0.01$;***$p<0.001$.

Table 4. Effect of treatment with hachimi-jio-gan (TBZ) before thiabendazole (TBZ) administration on the skeletal variations or the ossification

Observation	D. W (7-9) +TBZ	HJ 150mg (7-9) +TBZ	HJ 300mg (7-9) +TBZ	HJ 600mg (7-9) +TBZ	HJ 600mg (7-9) +Olive oil
No. examined	20	15	20	14	18
No. of fetuses examined	190	145	188	126	243
Variation #					
Asymmetry of sternebrae"	20.8±22.6	27.0±28.1	26.5±21.0	27.3±33.4	9.2±11.5
Accessory of sternebrae	8.1±13.4	5.5±16.1	2.9± 5.5	1.0± 2.6	12.2±14.0
Cervical rib	8.4±17.5	8.1±11.2	12.7±18.0	10.3±14.8	16.3±15.0*
14the rib[2]	14.1±20.1	20.4±29.9	17.4±25.3	10.7±15.6	26.3±22.9
Splitting & branching of atlas & axis	7.3±10.5	5.9± 8.4	6.0± 9.2	6.8± 9.0	5.7± 5.9
Abnomalities in number @ of pre-sacral vertebrae	1.6± 4.0	3.3± 7.5	4.5± 8.8	4.2±13.4	0.7± 2.1
Separation or defective development of sternebrae	18.5±19.3	11.7±15.6	19.7±23.1	10.6±15.4	1.4± 4.5**
Ossification ##					
Fore limb phalanx !					
L	2.5± 0.8	2.5± 0.6	2.6± 0.7	2.8± 0.4	3.0± 0.5*
R	2.5± 0.8	2.5± 0.5	2.7± 0.7	2.9± 0.3	3.0± 0.5*
Hind limb phalanx !					
L	2.2± 0.8	2.2± 0.8	2.3± 0.8	2.5± 0.7	2.9± 0.5**
R	2.3± 0.8	2.2± 0.7	2.3± 0.8	2.6± 0.6	2.9± 0.5**
Post lumber vertebrae $	11.0± 1.7	11.2± 1.9	10.9± 1.3	11.3± 0.9	12.8± 0.8**

" Cases showing deviation over 1/2 of length of maximum sternal nucleus between left and right nuclei.

[2] Definition of lumber rib was based on kimme 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.

! Number of fore or hind limb phalanx was obtained from the following formula: (proximal phalanx+middle phalanx) /2.

Percent variation ±SD/litter.

Mean number ±SD/litter.

Values marked with asterisks are significantly different from the corresponding control value (*$p<0.05$;**$p<0.01$;***$p<0.001$) as determined by the follwing statistical test: ranked sum test (variation); t-test (ossification).

20.2%，骨格25.5%)の傾向にあった．

外表奇形では四肢の減形成および短尾が，骨格奇形では椎弓および椎体の癒合がTBZ単独投与群と同様いずれの八味地黄丸前処置群で多く観察された．

八味地黄丸前処置後オリーブ油投与の群は外表，骨格ともに奇形児の発現を認めなかった．

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TBZ単独投与により発現頻度が抑制される頸肋および腰肋に，八味地黄丸前処置による顕著な増強あるいは減弱効果は見られなかった．腰肋の平均値だけを見ると八味地黄丸前処置群ではTBZ単独投与群に比べ増加しているように見受けられるが，統計学的にはまったく有意ではなかった．その他の指標においても八味地黄丸前処置はTBZ単独投与に比べ有意な増減を認めなかった．

化骨進行度では前・後肢指骨および尾椎の平均化骨数のいずれの指標においても八味地黄丸前処置群はTBZ単独投与群と比べ統計学的に有意な増減を認めなかった．

八味地黄丸前処置後オリーブ油投与群は骨格変異，化骨進行度のいず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．

考　察

本実験の目的は八味地黄丸の前処置が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であった．

八味地黄丸前処置はTBZが誘発する奇形の型に変化を与えなかった．また，胎児発育に関しても生児体重，化骨進行度の指標からはTBZ単独投与(対照群)と比べ八味地黄丸の前処置による発育の回復あるいは一層の遅延を示す効果は認められなかった．生児で観察した骨格変異の発現頻度においても八味地黄丸前処置はTBZ単独投与により影響される骨格変異を修飾する有意な効果を示さなかった．しかしながら，外表および骨格異常を観察した生児の総奇形児数ではTBZ単独投与に比べ八味地黄丸前処置では明らかにその数が増加している群も見られ，また，母体当りの奇形発現頻度においても統計学的には有意ではなかったが増加の傾向が認められた．その際，投与した量との関係は明確にできなかった．

この八味地黄丸前処置がTBZの誘発する奇形を増加させるメカニズムについては今後の検討によるが，小曽戸ら[13]は，八味地黄丸を投与した老齢ラットにおけるグルタチオン代謝に関して行った実験で，八味地黄丸投与群は対照群に比べ水晶体，精巣でのグルタチオン量を有意に増加させると報告している．彼らはそのほかにも脳，肝，腎，血液等での還元型および酸化型グルタチオン量を測定し，八味地黄丸投与群の血液および肝において還元型グルタチオンがやや高いことを報告している．

われわれはTBZの催奇形作用機序を検討している中でグルタチオン，システィンによる前処置がTBZの奇形誘発作用を増強し，それは母体血液および胎児内での未変化体TBZの上昇と関連していることを確認した[9]．このことはグルタチオンがTBZの代謝的変換を抑制することを示唆するものであり，八味地黄丸前処置によるTBZ誘発奇形児数の増加の理由に，母体内グルタチオン量が関与していることも考えられる．

一方，本実験に用いた八味地黄丸のヒトでの1日用量は6.0gとなっており，成人の平均体重を50－60kgとすれば100－120mg/Kgとなる．従って，今回投与した八味地黄丸の最高用量600mg/kgはヒトでの1日摂取量の5－6倍となるが，この量の投与では八味地黄丸自身の催奇形性を示唆する胎児への影響は認められなかった．

文　献

1) 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：東京衛研年報，**41**，282-288，1990.

2) 矢数道明，臨床応用，漢方処方解説，452-458，1966，創元社，大阪.

3) Ogata A., Ando H., Kubo Y. and Hiraga K.: *Fd. Chem. Toxic.***22**, 509-520, 1984.

4) Yoneyama M., Ogata A., Fujii T. and Hiraga K.: *Fd. Chem. Toxic.* **22**, 731-735, 1984.

5) Yoneyama M., Ogata A. and Hiraga K.: *Fd. Chem. Toxic.* **23**, 733-737, 1985.

6) Ogata A., Yoneyama M., Sasaki M., Suzuki K. and Imamichi T.: *Fd. Chem. Toxic*, **25**, 119-124, 1987.

7) Yoneyama M. and Ichikawa H.: *Fd. Chem. Toxic.* **24**, 1283-1286, 1986.

8) 藤谷知子，米山允子，小縣昭夫，安藤弘，久保喜一，市川久次：東京衛研年報，**36**, 373-376, 1985.

9) Ogata A., Fujitani T., Yoneyama M., Sasaki M. and Suzuki K.: *Fd. Chem. Toxic.* **27**, 117-123, 1989.

10) Dawson A. B.: *Stain Technol.* **1**, 123, 1927.

11) Shane C. G. and Carrol S. W.: *Statistics for Toxicologist, Principles and Methods of Toxicology* ed. by Hayes W., 276, 1982. Ravaen Press, New York.

12) 鈴木勝士，亀井孝幸，小縣昭夫：獣医畜産新報，**817**, 49-54, 1989.

13) 小曽戸洋，原中瑠璃子，望月奈緒子，大和田滋，竹村寛，長谷川律子，渡部幸恵，小林茂三郎：Proc. Symp. WAKAN-YAKU **16**, 162-166, 1983.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 261-266, 1991

走査型電子顕微鏡のための試料作製法の検討 乾燥法について

三栗谷 久 敏*, 福 森 信 隆*, 角 千 代*

Examination of Drying Methods in Preparing Specimens for Scanning Electron Microscopy

HISATOSHI MIKURIYA*, NOBUTAKA FUKUMORI* and CHIYO SUMI*

Keywords：t－ブチルアルコール凍結乾燥法 t-butylalcohol freeze-drying method, 臨界点乾燥法 critical-point drying method, ラット腎臓 rat kidney, ラット気管 rat trachea, 走査型電子顕微鏡 scanning electron microscopy

緒　　言

走査型電子顕微鏡(以下 SEM と略す)による生物試料の観察には，その試料処理に乾燥という過程が必要である．これは水分を含んだ状態で高真空の鏡体内に入れると試料は水分の蒸発とともに収縮歪曲し，表面微細構造は全く壊れてしまう[1]からである．このことは乾燥時に生物試料がもつ水分の表面張力に起因するものであり，これまでにこの表面張力の影響をなくすために種々の工夫がなされ，現在では液化炭酸ガスによる臨界点乾燥法が一般的に主流をなしている．しかしながら，臨界点乾燥法にも①乾燥による試料の収縮が大きい[2]②高圧となるため試料室の大きさが限られ，大型の試料や大量の試料が扱えない③液化炭酸ガスによる高圧下の操作となるため爆発などの危険が伴う，などの短所がある．最近，井上らは有機溶媒を用いた乾燥法に注目し，t－ブチルアルコールによる凍結乾燥法を開発した[3]．これは生物試料に含まれる水分をｔ－ブチルアルコールに置換して凍結させ，真空下でこれを昇華によって乾燥させる方法である．この方法の特徴は，乾燥方法が簡便で，大型あるいは大量の試料にも対応でき，危険性もなく，微細構造の保存性においても臨界点乾燥法より優れていると報告[4]されている．

今回，著者らは井上らの報告をもとに，t－ブチルアルコール凍結乾燥法(FD 法)と従来からの液化炭酸ガスによる臨界点乾燥法(CPD 法)を動物の組織を用い比較することにより，FD 法の有用性について検討した．

実験方法

動物はラットを用い，ネンブタール麻酔下で開腹し，門脈より生理食塩水で灌流，血液を除去後，1.5％パラホルムアルデヒド・１％グルタールアルデヒド混合固定液(0.1M燐酸緩衝液，pH 7.3)で灌流固定を行った．灌流固定終了後，試料として気管と肝臓の一部を細切し，同固定液でさらに３時間固定した．固定された試料は，一晩冷蔵庫内にて0.1M燐酸緩衝液(pH 7.3)で洗浄後，タンニン・オスミウム酸による導電染色[5]を施した．その後，定法に従い，エタノール系列で脱水し，気管は酢酸イソアミルで置換し，HCP－２型臨界点乾燥器(日立)で臨界点乾燥またはｔ－ブルチアルコールで置換後，ID－２型凍結乾燥器(Eiko エンジニアリング)により凍結乾燥を行った．腎臓は，無水エタノールによる脱水終了後，速やかに冷却した無水エタノールが入っているゼラチンカプセルに入れ，液体窒素で凍結を行い，TF－１型凍結割断器(Eiko エンジニアリング)にて割断した．その後，再度冷却無水エタノール中に入れ，室温に戻した．凍結割断された腎臓は気管と同様に CPD 法または FD 法による乾燥を行った．乾燥した試料は，Ｅ－102型イオンスパッター(日立)で白金，パラジウム蒸着を施した．試料の観察はＳ－800型 SEM(日立)を用い，加速電圧10KV にて行った．

結果と考察

SEM 観察のための試料作製において，生物試料の微細構造をできる限り生に近い状態で保存するには，固定や脱水過程はもちろん，乾燥という操作は重要なポイントとなる．今回，組織の表面微細構造および割断後の内

＊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, Shinjiku-ku, Tokyo, 169 Japan

部微細構造の保存性という観点からFD法とCPD法を比較検討した.

図1および図2はそれぞれFD法とCPD法で乾燥した気管の管腔表面(自由表面)である. CPD法ではFD法に比べ, 図2で見られるように細胞間隙の亀裂が散見され, その周辺部では線毛の構造が乱れる傾向が認められた. このような亀裂はCPD法によるラットやマウスの膀胱の場合においてもしばしば観察され, 試料の収縮[2]によるものと思われる. FD法では亀裂はほとんど観察されなかった. 図3, 図4はFD法およびCPD法による線毛の拡大像である. 両法とも線毛はよく保存されているが, FD法に比べCPD法では全体的に線毛上部が開いている状態が多く観察され, 各線毛は先鋭化および屈曲化する傾向が認められた. これらの所見は乾燥時における液化炭酸ガスの気化に基く物理的な作用によるものと考えられる. CPD法では隣接する線毛の癒合がときどき見られると言われているが, 今回の観察では明らかでなかった.

図5, 図6は凍結割断された腎臓のFD法, CPD法による糸球体の断面である. 両法とも全体的に保存状態は良く, 毛細血管の内部やメサンギウム細胞なども良好に観察された. また, ボウマン嚢もよく保存されており, 上皮細胞に糸のような単一線毛[6]が出ているのが認められた. 近位尿細管ではFD, CPD両法とも刷子縁が整列状に分布しているのが観察された(図7, 図8).

以上, 今回の観察では, 気管はFD法がやや良好な結果を示し, 腎臓ではFD法, CPD法間に明瞭な差を認めることは困難であった. これまでに有機溶媒を用いた乾燥法はKato[7], Osatakeら[8]などによっていくつか開発, 発表されてきたが, 一般的に普及するには至らなかった. 井上らのFD法は操作も容易で, 危険性もなく, 微細構造の保存性もCPD法と比べて同等あるいはそれ以上であることから, 生物試料の乾燥法として, 特に自由表面の突起構造の保存に有効な方法であると考えられる. また, 大量処理が可能であることから, 毒性試験など多くの試料収集が必要な場合にも対応でき, 試験精度の向上や作業の効率化につながると思われる. 今後, 高倍率観察でのCPD法とFD法の比較, 他の生物試料に対しての有用性についても検討したいと考えている.

結　語

走査型電子顕微鏡を用いた生物試料観察のための乾燥法として, t－ブチルアルコール凍結乾燥法と臨界点乾燥法による微細構造の保存性について比較検討した. 両法とも同程度の保存性が得られたが, 気管などの自由表面に対してはt－ブチルアルコール凍結乾燥法に有用性が認められた.

文　献

1) 田中敬一：図説走査電子顕微鏡, 85-104, 1980, 朝倉書店, 東京
2) 加藤　勝：走査電子顕微鏡の基礎と応用, 142-156, 1983, 共立出版, 東京
3) Inoue, T. and Osatake, H.: *Arch. Histol. Cytol.*, **51**, 53-59, 1988
4) 井上貴央：電子顕微鏡, **24**, 226-229, 1990
5) Murakami, T., Yamamoto, K., Itoshima, R. and Irino, S.: *Arch. Histol. Jap.*, **40**, 35-40, 1977
6) 藤田尚男, 藤田恒夫：標準組織学各論, 第2版, 183-202, 1984, 医学書院, 東京
7) Katoh, M.: *J. Electron Microsc.*, **27**, 329-330, 1987
8) Osatake, H., Atoh, K., Mitsushima, A., Tanaka, K. and Takahashi, H.: *J. Electron Microsc.*, **29**, 72-74, 1980

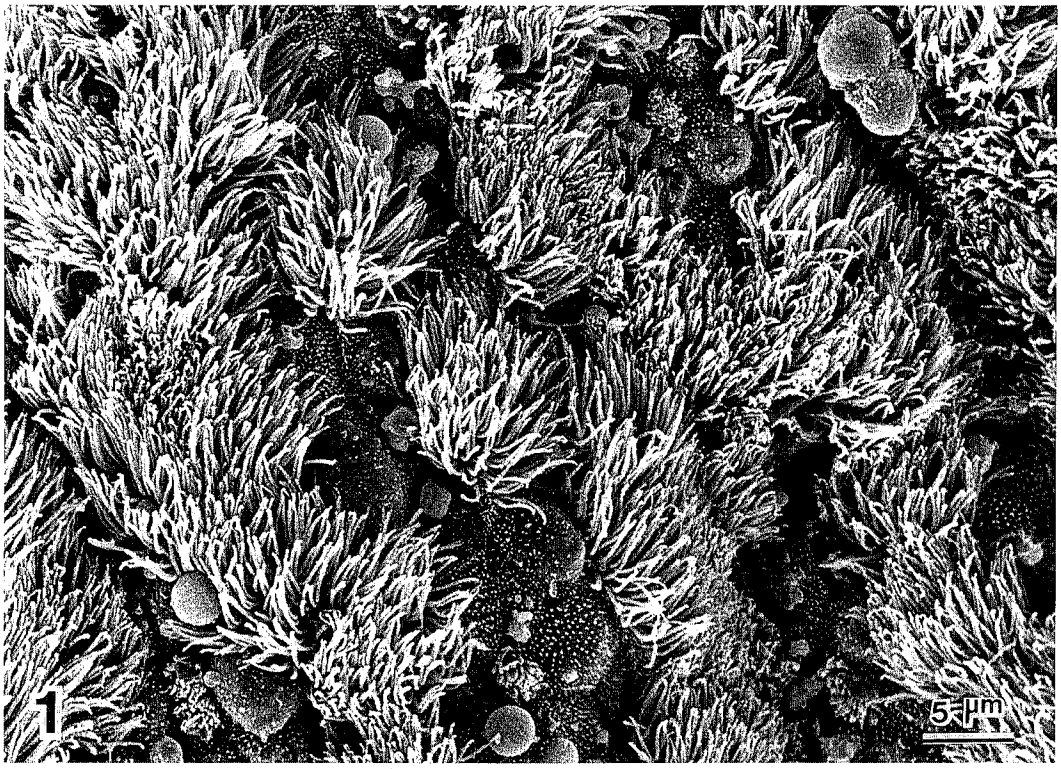


図1．FD 法で乾燥した気管の管腔表面．（×2,400）

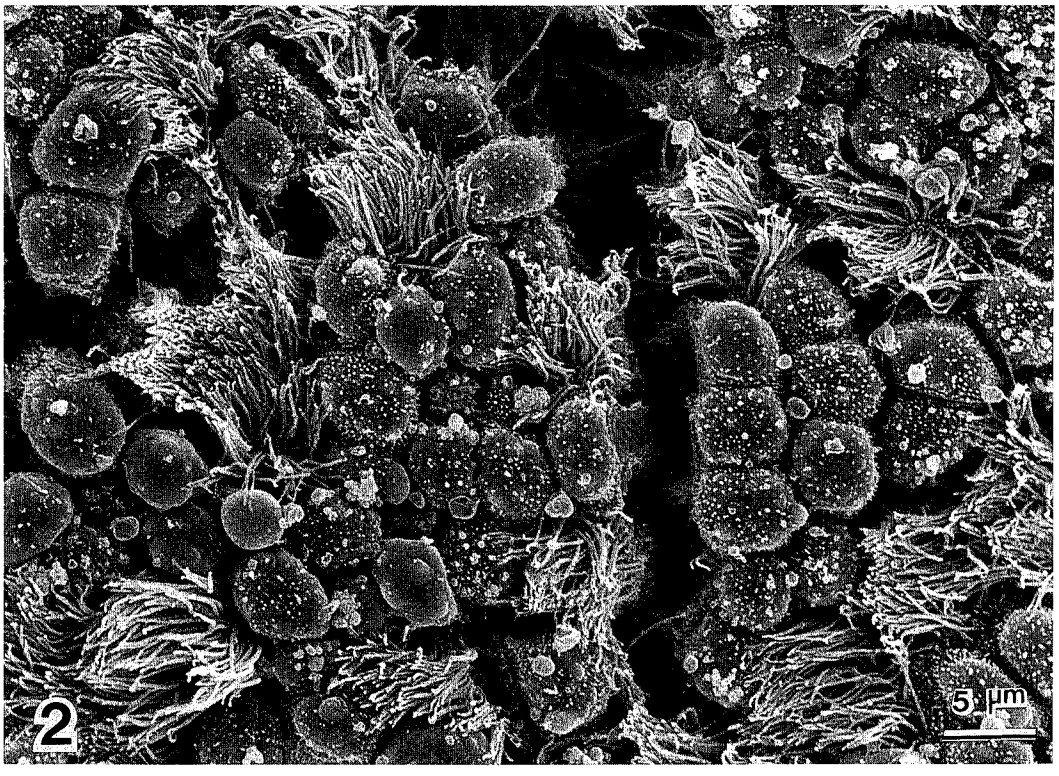


図2．CPD 法で乾燥した気管の管腔表面．細胞間隙に亀裂がみられる．（×2,400）

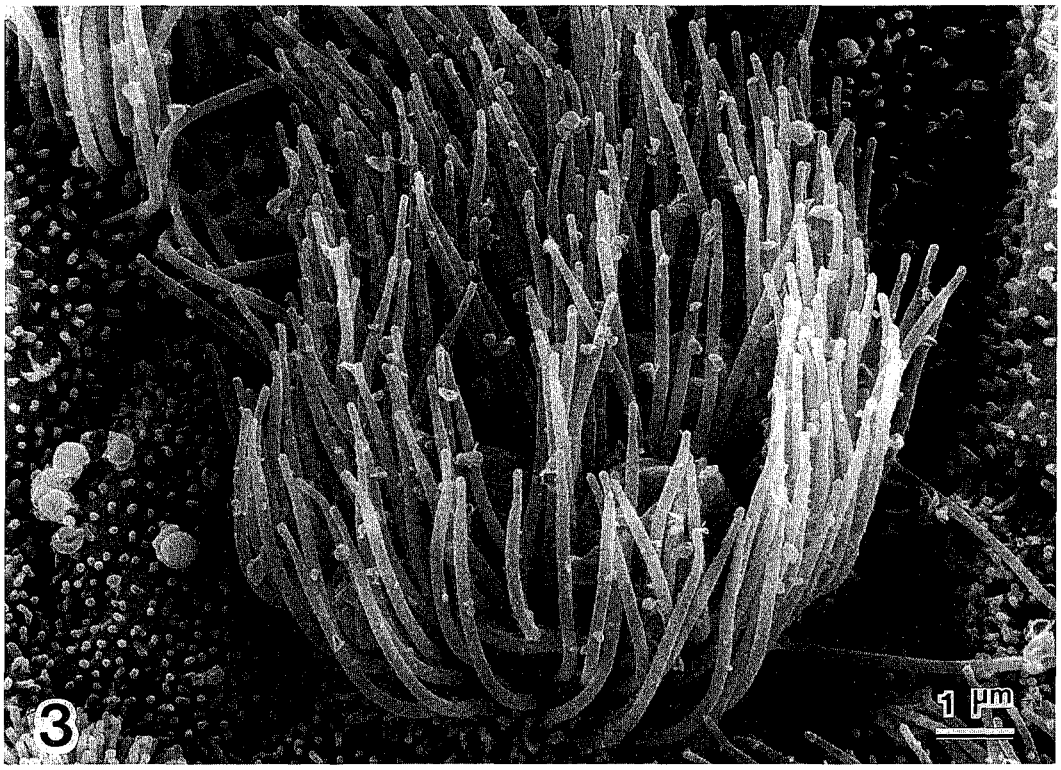


図3．FD 法で乾燥した気管の線毛．保存状態が良好である．（×9,000）

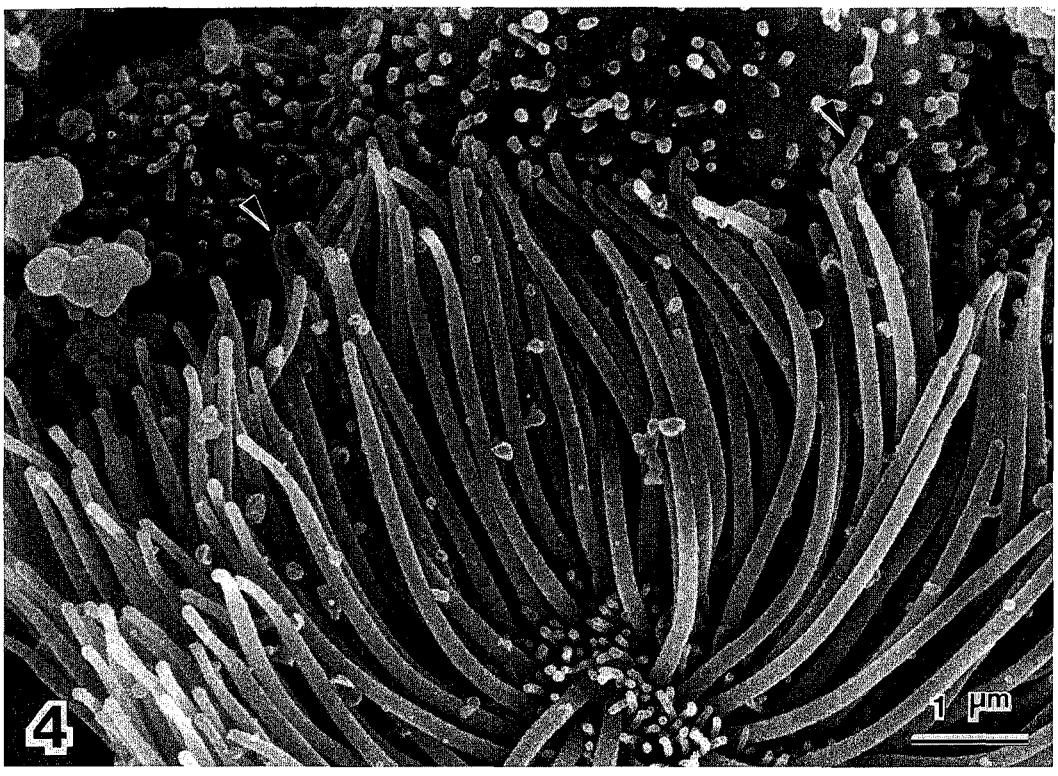


図4．CPD 法で乾燥した気管の線毛，全体的に開いた状態であり，線毛の先端部が折れ曲がっている(矢印)のが散見される．（×12,400）

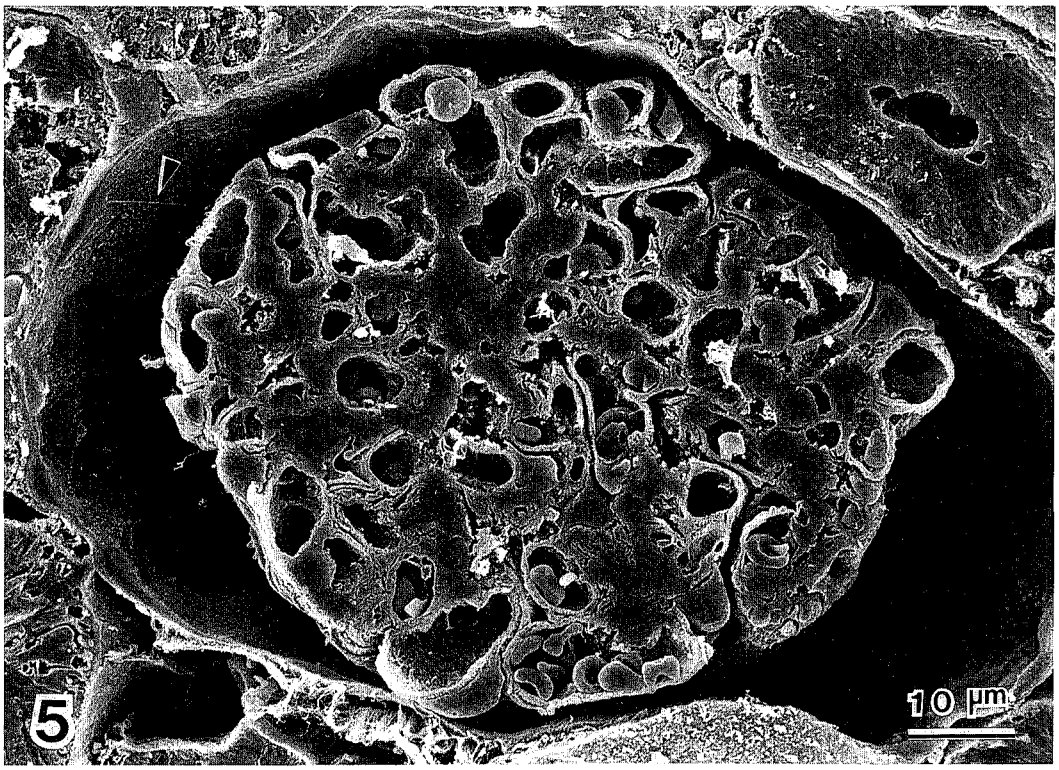


図5．FD 法で乾燥した腎臓糸球体の割断面．CPD 法と同程度に形態が保存されており，ボウマン嚢上皮細胞に単一線毛(矢印)が出ているのも認められる．(×1,300)

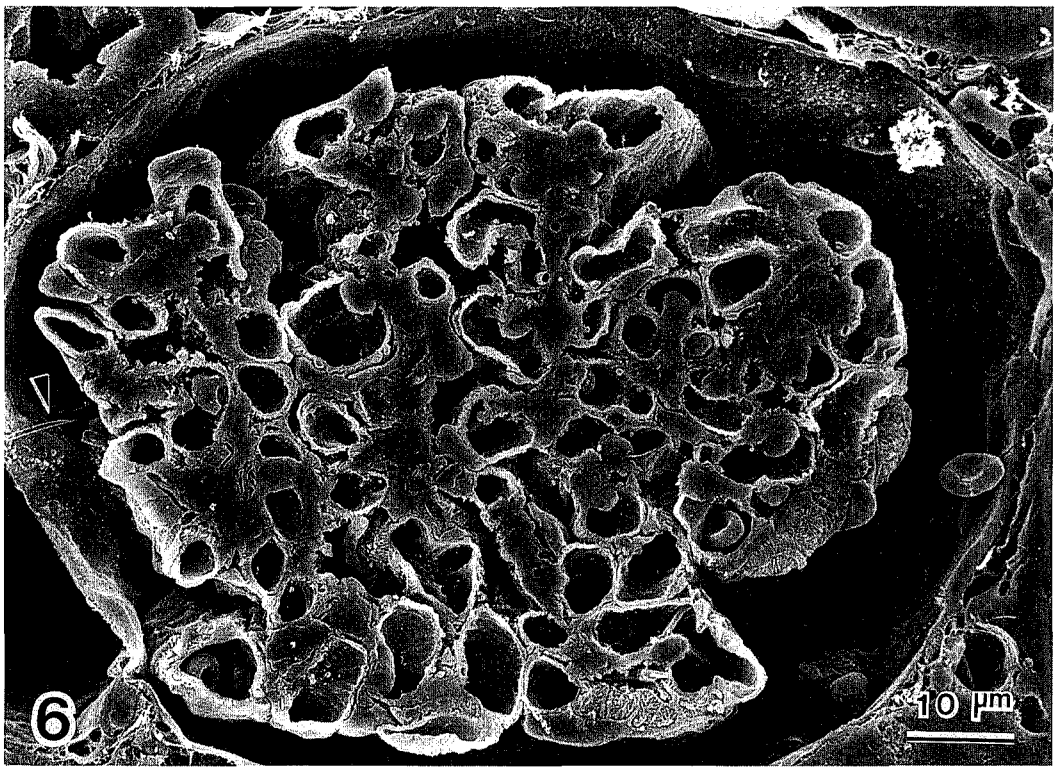


図6．CPD 法で乾燥した腎臓糸球体の割断面．ボウマン嚢上皮細胞に単一線毛(矢印)が出ているのが観察される．(×1,300)

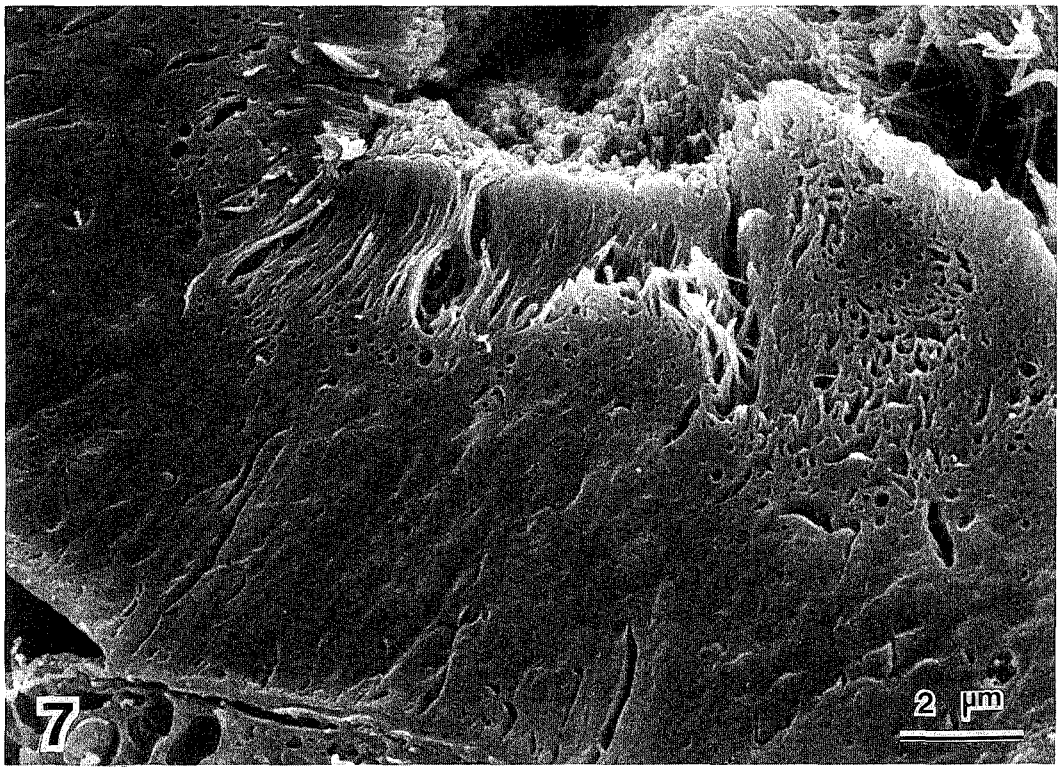


図7．FD 法で乾燥した腎臓近位尿細管の割断面．刷子縁が良好に観察される．（×7,700）

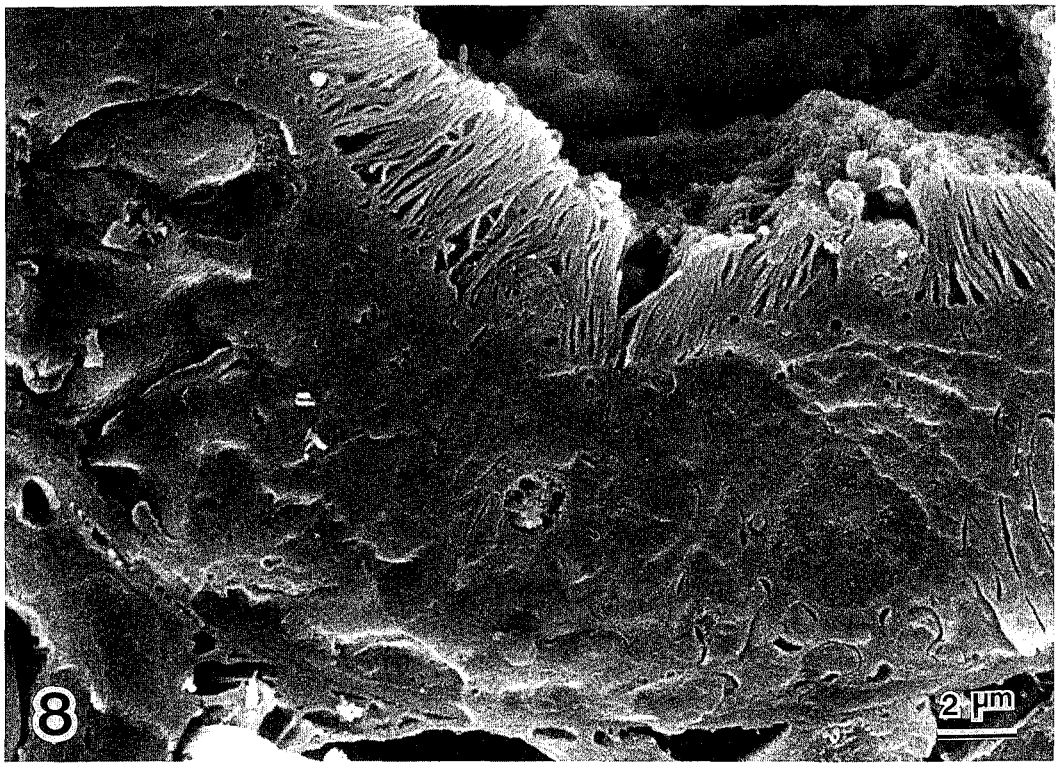


図8．CPD 法で乾燥した腎臓近位尿細管の割断面．刷子縁が整列状に管腔に伸びているのがみられる．（×7,100）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 267-275, 1991

Salmonella typhimurium TA97, TA102を用いた食品添加物の変異原性試験(第6報*)

藤田　博**, 角　千代**, 佐々木　美枝子**

Mutagenicity Test of Food Additives with *Salmonella typhimurium* TA97 and TA102 (VI*)

HIROSHI FUJITA**, CHIYO SUMI** and MIEKO SASAKI**

Mutagenicity of 33 food additives including 16 flavoring agents, 8 preservatives, dietary supplemens and so forth were examined in Ames' tester strains, *Salmonella typhimurium* TA97 and TA102. The mutation test was carried out by the preincubation procedure described by Ames *et al*[1]. The test chemicals were preincubated with S9mix or phosphate buffer (pH 7.4) for 20 min. Hydrogen peroxide showed mutagenicity in TA97 and TA102 without S9. A weak mutagenic activity in piperonal was detected in the presence or absence of S9mix with TA97. With both TA97 and TA102 strains, a weak mutagenic activity in sodium nitrite was found in the presence of S9mix. The other 30 chemicals showed no mutagenicty in TA97 and TA102.

Keywords：変異原性 mutagenicity, 過酸化水素 hydrogen peroxide, ピペロナール piperonal, 亜硝酸ナトリウム sodium nitrite, 食品添加物 food additives, 着香料 flavoring agents, 保存料 preservatives, 強化剤 dietary supplements, サルモネラ *Salmonella typhimurium* TA97, *Salmonella typhimurium* TA102

化学物質の遺伝毒性を明らかにするために種々の変異原性試験が実施されてきた．その変異原性試験の中でも，Ames[1-3]らが開発したいわゆるAmes試験は最も多用されている試験系である．Amesらは，様々な変異原性を検出するには *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100およびTA102の4株を試験に用いることを提案している[3]．しかし，初期に開発されたTA98およびTA100を用いた試験報告は非常に多いが，後から開発されたTA97およびTA102を用いた試験の報告はまだ少ない．TA97はTA98では検出しにくいフレームシフト型の変異原性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]．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では検出できなかった変異原性を検出できる[3~6]可能性がある．

食品添加物の変異原性については，TA98およびTA100を用いた試験結果についてかなり報告されているが，TA97およびTA102を用いた試験の報告はほとんど見いだすことができない．そこで我々は，食品添加物について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[7-12]までに144種の試験が終了し，11種の食品添加物に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(16種)，保存料(8種)，食品製造用剤(3種)，甘味料，殺菌料，酸化防止剤，強化剤，発色剤および膨張剤各1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：プロピオン酸ベンジル(Lot No. ECJ5451)，シンナミルアルコール(Lot No. ECM7812)，デカナール(東京化成，Lot No. FAX01)，デカノール(東京化成，

＊第5報，東京衛研年報，**41**，315-322，1990

＊＊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

Lot No. AX01), 酢酸エチル(Lot No. KI01958), デカン酸エチル(Lot No. KPK2641), フェニル酢酸エチル(Lot No. KPR7076), プロピオン酸エチル(Lot No. ECN3665), ギ酸イソアミル(Lot No. ALK2362), フェニル酢酸イソアミル(Lot No. ECJ2928), プロピオン酸イソアミル(Lot No. KPN1344), パラメチルアセトフェノン(Lot No. ECN6000), γ－ノナラクトン(Lot No. ECJ5414), ピペロナール(Lot No. KPQ5417), テルピネオール(Lot No. ECN4038), バニリン(Lot No. ECN7032), 保存料：プロピオン酸カルシウム(東京化成, Lot No. AZ01), デヒドロ酢酸(東京化成, Lot No. AX01), パラオキシ安息香酸エチル(Lot No. ECM4535), パラオキシ安息香酸イソブチル(東京化成, Lot No. AY01), パラオキシ安息香酸イソプロピル(東京化成, Lot No. AX01), プロピオン酸(Lot No. SAL4508), パラオキシ安息香酸プロピル(Lot No. ECK6119), ソルビン酸(Lot No. KPF4924), 食品製造用剤：塩酸(Lot No. ELG1171), 水酸化ナトリウム(Lot No. TSP6160), 硫酸(Lot No. DSN4606), 甘味料：アスパルテーム(Lot No. PDK7544), 殺菌料：過酸化水素(Lot No. AWN7622), 酸化防止剤：ノルジヒドログアヤレチック酸(アルドリッチ, Lot No. AX06725CP), 強化剤：L－アスコルビン酸ステアリン酸エステル(Lot No. PDL0539), 発色剤：亜硝酸ナトリウム(Lot No. KWE7007), 膨脹剤：塩化アンモニウム(Lot No. KWE6682).

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, 同仁科学, 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1983年に分与を受けた.

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[3,13]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. S9mix[3,13]中のS9量は, 10%(50μl/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(pH7.4)0.5mlを加え, さらに一夜培養した菌液を0.1ml加え, 37°Cで20分間の前培養を行った. これに45°C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°C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[14]を行い, さらにMooreら[15]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調べた. 増殖が確認された濃度を最高濃度として希釈し, 5濃度段階で試験を行った. 着香料には致死性が強く, 100μg/プレート以下からの試料が多い.

殺菌料の過酸化水素は, S9mix無添加のTA97およびTA102において復帰コロニー数が有意に増加した. 殺菌効果による増殖阻害が見られ, 復帰コロニー数は50μg以上では減少する. TA102のS9mix無添加の50μg/プレートではコントロールの復帰コロニー数の1.6倍に増加し, 過酸化水素nmoleあたり0.08個の復帰コロニーが誘発された. 復帰コロニー数の増加はわずかではあるが, 低濃度で増加することから, TA97およびTA102に対する変異原性は陽性である. なおS9mixを添加することにより復帰コロニー数は増加しなくなり, 過酸化水素の変異原性は失われると考えられる.

着香料のピペロナールは, TA97においてS9mixの添加に関わらず復帰コロニー数が有意に増加し, 用量相関も見られた. TA97のS9mix無添加の場合, 1 mg/プレートではコントロールの復帰コロニー数の2倍に増加し, ピペロナールnmoleあたり0.02個の復帰コロニーが誘発された. 増加量は, 比較的高用量においてもわずかであるが, 再現性があることから, 陽性対照に比べると弱いが変異原性は陽性と考えられる.

発色剤の亜硝酸ナトリウムは, TA97およびTA102のS9mix添加の5 mg/プレート以下においてわずかに復帰コロニー数の増加がみられた. 増加は非常にわずかで, TA97の場合, 5 mg/プレートではコントロールの復帰コロニー数の1.5倍に増加し, 亜硝酸ナトリウムnmoleあたり0.002個の復帰コロニーが誘発された. 非常にわずかな増加であるが, 再現性があり, 用いた統計手法によると有意であることから, 陽性対照に比べたら非常に弱いが変異原性は陽性であるとした.

Table 1. Results of Mutation Test on Food Additives

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate[a)]			
			TA97		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Flavoring agents						
Benzyl Propionate	DMSO	0.1	190	238	201	374
		0.05	178	247	231	408
		0.01	198	232	264	381
		0.005	170	226	279	381
		0.001	197	245	253	381
		0	192	227	250	394
Cinnamyl Alcohol	DMSO	1	147	196	93	269
		0.5	130	194	169	301
		0.1	148	210	197	283
		0.05	159	221	216	291
		0.01	141	201	196	273
		0	166	217	192	302
Decanal	DMSO	0.01	138	198	124	283
		0.005	153	195	197	271
		0.001	156	207	202	277
		0.0005	161	222	193	282
		0.0001	158	203	216	278
		0	163	227	198	277
Decanol	DMSO	0.1	0	132	0	207
		0.05	17	175	0	315
		0.01	116	187	142	266
		0.005	142	196	163	287
		0.001	167	195	178	279
		0	131	197	169	288
Ethyl Acetate	DMSO	1	145	222	162	318
		0.5	142	199	181	332
		0.1	150	191	177	325
		0.05	145	193	175	311
		0.01	151	216	200	331
		0	137	199	207	319
Ethyl Decanoate	DMSO	10	152	2	85	0
		5	133	94	74	10
		1	139	185	76	67
		0.5	138	168	101	260
		0.1	132	176	92	300
		0	166	217	192	302
Ethyl Phenylacetate	DMSO	0.1	180	241	262	399
		0.05	168	232	247	391
		0.01	187	247	237	406
		0.005	178	245	239	402
		0.001	184	232	259	387
		0	192	227	250	394

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate[a]			
			TA97		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Ethyl Propionate	DMSO	1	134	197	151	233
		0.5	141	194	171	279
		0.1	145	169	179	302
		0.05	153	199	161	281
		0.01	150	195	184	283
		0	150	206	179	265
Isoamyl Formate	DMSO	1	138	197	136	284
		0.5	144	208	150	265
		0.1	163	209	153	279
		0.05	157	209	162	252
		0.01	153	220	169	274
		0	131	196	171	292
Isoamyl Phenylacetate	DMSO	0.1	74	213	9	326
		0.05	106	220	21	297
		0.01	148	224	178	302
		0.005	179	271	188	287
		0.001	162	224	201	292
		0	178	244	171	292
Isoamyl Propionate	DMSO	0.1	146	197	160	276
		0.05	150	184	162	300
		0.01	124	204	167	272
		0.005	141	193	156	274
		0.001	136	200	165	285
		0	150	206	179	265
p-Methylacetophenone	DMSO	1	114	189	65	236
		0.5	133	218	111	250
		0.1	134	195	119	250
		0.05	135	221	119	246
		0.01	152	198	136	241
		0	119	221	127	219
γ-Nonalactone	DMSO	1	0	182	0	141
		0.5	89	187	49	216
		0.1	146	214	153	258
		0.05	170	228	145	256
		0.01	153	194	151	248
		0	142	200	159	272
Piperonal	DMSO	1	244[b]	276[b]	104	256
		0.5	203	242	114	270
		0.1	157	210	130	267
		0.05	143	198	119	249
		0.01	147	201	128	239
		0	119	221	127	219

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate[a)]			
			TA97		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Terpineol	DMSO	0.1	144	176	155	279
		0.05	161	211	185	279
		0.01	157	205	187	277
		0.005	147	237	197	270
		0.001	157	207	199	270
		0	163	227	198	277
Vanillin	DMSO	10	75	0	16	97
		5	106	135	89	274
		1	123	175	137	276
		0.5	146	183	134	269
		0.1	142	195	189	288
		0	142	200	159	272
Preseavatives						
Calcium Propionate	DW	10	154	218	196	264
		5	163	218	221	321
		1	180	211	251	324
		0.5	191	235	223	308
		0.1	164	238	241	347
		0	176	205	238	334
Dehydroacetic Acid	DMSO	1	156	194	179	281
		0.5	150	201	198	294
		0.1	161	185	220	290
		0.05	148	196	199	292
		0.01	151	208	185	298
		0	149	196	211	319
Ethyl p-Hydroxybenzoate	DMSO	1	159	205	48	296
		0.5	155	214	72	325
		0.1	144	215	198	323
		0.05	148	203	205	314
		0.01	139	200	223	326
		0	149	196	211	319
Isobutyl p-Hydroxybenzoate	DMSO	0.1	143	191	148	310
		0.05	162	208	144	279
		0.01	160	213	193	282
		0.005	167	193	198	288
		0.001	162	212	198	314
		0	167	203	227	273
Isopropyl p-Hydroxybenzoate	DMSO	1	0	169	0	0
		0.5	122	189	67	268
		0.1	157	197	169	316
		0.05	163	198	152	316
		0.01	156	189	192	315
		0	167	203	227	273

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate[a)]			
			TA97		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Propionic Acid	DMSO	1	183	222	187	280
		0.5	164	207	210	312
		0.1	180	210	220	351
		0.05	183	209	242	340
		0.01	175	219	248	347
		0	186	216	217	346
Propyl p-Hydroxybenzoate	DMSO	1	13	69	0	44
		0.5	139	213	104	281
		0.1	180	200	216	349
		0.05	187	217	269	395
		0.01	162	219	237	302
		0	186	216	217	346
Sorbic Acid	DMSO	1	126	183	168	302
		0.5	138	198	179	327
		0.1	146	200	189	323
		0.05	136	206	185	319
		0.01	154	205	177	293
		0	137	199	207	319
Acids and base						
Hydrochloric Acid	DW	1	164	216	203	305
		0.5	166	221	197	310
		0.1	163	243	191	292
		0.05	180	224	194	320
		0.01	193	222	195	324
		0	175	228	193	320
Sodium Hydroxide	DW	1	159	173	305	350
		0.5	179	258	317	424
		0.1	199	236	304	412
		0.05	212	239	322	403
		0.01	194	244	315	423
		0	199	239	300	385
Sulfuric Acid	DW	10	109	203	25	0
		5	178	251	144	65
		1	162	222	146	258
		0.5	170	206	158	247
		0.1	178	211	143	273
		0	160	221	138	252
Sweetner						
Aspartame	DW	10	156	227	127	267
		5	164	203	131	282
		1	152	222	144	291
		0.5	183	207	129	282
		0.1	161	224	119	266
		0	174	238	166	271

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate[a] TA97 −S9	TA97 +S9	TA102 −S9	TA102 +S9
Bleaching agent						
Hydrogen Peroxide	DW	0.1	198	228	300	382
		0.05	203[b]	230	364[b]	405
		0.01	169	231	256	399
		0.005	165	214	233	381
		0.001	161	213	226	404
		0	158	235	230	383
Antioxidant						
Nordihydroguaiaretic Acid	DMSO	0.1	105	172	0	393
		0.05	167	170	123	407
		0.01	145	194	210	388
		0.005	130	181	210	353
		0.001	160	203	227	370
		0	141	209	232	354
Dietary supplement						
L-Ascorbyl Stearate	DMSO	1	151	172	233	309
		0.5	163	172	262	283
		0.1	154	195	238	363
		0.05	147	192	274	346
		0.01	146	182	197	337
		0	141	209	232	354
Color fixative						
Sodium Nitrite	DW	10	0	49	91	346
		5	167	356[b]	252	422[b]
		1	199	266	241	353
		0.5	191	275	256	320
		0.1	185	218	218	319
		0	194	238	225	317
Leavening agent						
Ammonium Chloride	DW	10	151	222	156	274
		5	147	206	161	284
		1	165	216	161	261
		0.5	171	200	152	299
		0.1	151	194	156	284
		0	155	219	167	271
Positive controls						
9-Aminoacridine	DMSO	50(μg)	748 ± 200[c]			
Mitomycin C	DMSO	0.5(μg)			2,152 ± 333	
2-Aminoanthracene	DMSO	5(μg)		3,360±651		960±199

a) Mean of three plates.

b) Statisticaly significant difference by Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$) and dose-related increase by regression analysis ($P < 0.01$).

c) Mean and standard deviation (TA97 : $n=21$, TA102 : $n=20$).

その他の30種の試料については，復帰コロニー数に増加が認められなかったことから，TA97およびTA102に対する変異原性は陰性と考えられる．

過酸化水素の変異原性については多くの実験報告によって変異原性がある[5,16,17]ことは明らかである．さらに発ガン性の報告[18]も見られる．Amesの試験株において，これまでに変異原性が検出されていたTA100[16]およびTA102[5]は塩基置換型の突然変異によって復帰するものであったが，今回TA97においても変異原性が検出され，過酸化水素がフレームシフト型の突然変異も起こすことがわかった．食品添加物としては最終製品に残留しないことが使用許可条件となっているが，遺伝毒性が明らかな物質であることから，取扱いも含め十分に管理されなければならないであろう．

ピペロナールについては，Ames試験における報告は見いだせなかった．Songら[19]による鶏胚細胞およびヒトリンパ細胞においてSCEが増加することが報告されているが，実験の条件等が明らかではなく，追試が望まれる．今回TA97に対する弱い変異原性が見いだされたが，S9mixを添加することにより代謝させても変異原性が失われないことから，生体中において変異原活性が維持される可能性があり，多くの試験系による詳細な検討が必要であると考えられる．

亜硝酸ナトリウムについては，TA100において変異原性陽性の報告[16,20]がみられ，培養細胞に対する変異原性陽性の報告[21]もある．しかし，今回用いたTA97およびTA102においては，S9mix添加において非常に弱い変異原性しか検出することができなかった．これは亜硝酸ナトリウムが，これらの菌株の増殖を強く阻害する傾向があり，復帰コロニー数の増加が抑制されているのが原因であろう考えられるが，TA97およびTA102が復帰する場合の復帰型の突然変異が起こりにくいという可能性も考えられる．

今回，TA97およびTA102に対する変異原性が陰性であった30種類の食品添加物の変異原性についての報告としては，まずIshidateら[16]が，酢酸エチル，フェニル酢酸エチル，パラオキシ安息香酸エチル，プロピオン酸カルシウムおよび塩化アンモニウムについは染色体異常誘発性が陽性であることを報告している．さらに酢酸エチルについては，酵母菌に対する異数体の発生頻度の増加の報告[22]も見られる．バニリンは，ヒトリンパ細胞に対するSCEおよび染色体異常陽性[23,24]およびチャイニーズハムスター細胞に対する染色体異常陽性[25]，ソルビン酸は，チャイニーズハムスター細胞に対するSCEおよび染色体異常陽性[26]，またシンナミルアルコール，デカナール，フェニル酢酸イソアミルおよびγ－ノナラクトンについては，rec-assay陽性[27,28]の報告が見られる．以上の10種類の化合物については，Ames試験についての報告が見つからなかったシンナミルアルコール，フェニル酢酸イソアミルおよびγ－ノナラクトンを除いて，いずれもTA98，TA100に対する変異原性は陰性[16]であり，本実験におけるTA97，TA102においても陰性であった．これらの化合物については，Ames試験との結果が一致しないことから，その原因の検討も含めAmes試験でのより詳細な検討が必要であろう．

プロピオン酸エチル，ギ酸イソアミル，プロピオン酸イソアミル，プロピオン酸カルシウム，デヒドロ酢酸，パラオキシ安息香酸イソブチルおよびパラオキシ安息香酸イソプロピルについては染色体異常試験陰性，TA98およびTA100によるAmes試験陰性の報告[16]があり，今回のTA97およびTA102の結果に一致するものである．

プロピオン酸ベンジル，デカノール，デカン酸エチル，パラメチルアセトフェノン，テルピネオール，プロピオン酸，パラオキシ安息香酸プロピル，塩酸，水酸化ナトリウム，硫酸，アスパルテーム，ジヒドログアヤレチック酸およびL－アスコルビン酸ステアリン酸エステルについては変異原性に関する報告は見いだせなかった．本実験においては変異原性は検出されておらず，おそらく変異原性はないと思われるが今後とも他の試験系における陰性データの報告も確認していきたい．

食品添加物のTA97またはTA102を用いた変異原性試験は，前報[7～12]までに報告した144種類の食品添加物を加えると177種類が終了した．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いだされた化合物は，アスコルビン酸[7]，L－アスコルビン酸ナトリウム[12]，オルトフェニルフェノール[7]，チアベンダゾール[7]，塩素ピリドキシン[6]，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－システイン一塩素塩[11]，エリソルビン酸ナトリウム[11]，過酸化水素，ピペロナールおよび亜硝酸ナトリウムの14種類であった．これらの化合物のTA97またはTA102に対する変異原性は，陽性対照に用いている変異原物質に比べるといずれもかなり弱いものであった．これらの化合物には，TA98およびTA100では変異原性が検出されていない化合物が多く，TA97およびTA102で変異原性が検出されやすいことから，TA97またはTA102に共通のDNA損傷を起こす性質があるのかも知れない．TA97およびTA102において変異原性が検

出される食品添加物があることから，今後とも試験は継続する必要があり，他の変異原性試験結果の報告などとも合わせ検討して行きたい．

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，過酸化水素，ピペロナールおよび亜硝酸ナトリウムで復帰コロニー数が増加し，弱い変異原性が見られた．他の30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) 藤田　博，佐々木美枝子：東京衛研年報，**41**，315-322，1990
13) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，**20**，1178-1189，1975
14) 石居　進：生物統計学入門，133-137，1975，培風館
15) Moore, D. and Felton, J. S.: *Mutation Res.*, **119**, 95-102, 1983
16) Ishidate, M. Jr, Sofuni, T. and Yoshikawa, K.: *Fd Chem. Toxic.*, **22**, 623-636, 1984
17) Oya, Y., Yamamoto, K. and Tonomura, A.: *Mutation Res.*, **172**, 245-253, 1986
18) Ito, A., Watanabe, H. and Naito, M.: *Gann*, **75**, 17-21, 1984
19) Song, F., Chu, G. and Lu, S.: *Zhonghua Yufangyixue Zazhi*, **20**, 254, 1986
20) McCann, J., Choi, E. and Ames, B. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 5135-5139, 1975
21) Kodama, F., Umeda, M. and Tsutsui, T.: *Mutation Res.*, **40**, 119-124, 1976
22) Zimmermann, F. K., Mayer, V. W. and Resnick, M. A.: *Mutation Res.*, **149**, 339-351, 1985
23) Jansson, T., Curvall, M. and Enzell, C. R.: *Mutation Res.*, **169**, 129-139, 1986
24) Jansson, T. and Zech, L.: *Mutation Res.*, **190**, 221-224, 1987
25) Kasamaki, A., Takahashi, H. and Tsumura, N.: *Mutation Res.*, **105**, 387-392, 1982
26) Hasegawa, M. M., Nishi, Y. and Ohkawa, Y.: *Fd Chem. Toxic.*, **22**, 501-507, 1984
27) 小田美光，浜野栄一，井上　清：大阪府立公衛研所報　食品衛生編，**9**，177-181，1973
28) 兪栄植：阪市医誌，**34**，267-288，1986

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **42**, 276-284, 1991

都衛研一毒性部動物施設における実験動物管理プログラムの開発

小嶋昭江*, 神谷信行*, 林田志信*, 池田虎雄*,
高橋博*, 角千代*, 佐々木美枝子*

Personal Computer System for Management of Laboratory Animals at Department of Toxicology, the Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

AKIE KOJIMA*, NOBUYUKI KAMIYA*, SHINOBU HAYASHIDA*,
TORAO IKEDA*, HIROSHI TAKAHASHI*, CHIYO SUMI* and
MIEKO SASAKI*

Keywords：パーソナルコンピュータ Personal computer, 実験動物飼育管理 Laboratory animal care and management

はじめに

東京都立衛生研究所毒性部においては，食品添加物その他環境化学物質の安全性の追求を目的に数多くの動物実験を行っている．そのために毒性部独自の動物飼育施設を持ち，げっ歯類を主に，数千匹の動物を飼育している．

精度の高い動物実験を行うためには，優れた飼育施設，質の高い動物，高度の飼育技術とともに優れた動物管理体制が必須条件である．動物管理の作業は，施設その他の飼育環境の管理，飼育作業の管理，動物の健康状態の管理，飼育室のスケジュール管理，飼料，飼育器材などの在庫管理など多岐にわたるが，これらの作業の内，いくつかについては，コンピュータを導入することにより，作業の能率化および正確度を高めることができると考えられる．

当毒性部においては，パーソナルコンピュータによる毒性試験システム[1-4]および毒性試験データ解析システム[5]の開発が進められ，これまで多くの毒性試験に活用されてきた．今回，毒性試験システムの一環として，動物施設における動物管理プログラムの作成を試みた．今回，同プログラムがほぼ完成し，4月の新年度より稼働しているので，その概要について報告する．

システム化の対象作業と作成方針

動物管理に関して現在までに，動物数管理プログラム，動物施設落下細菌プログラム，飼育許可申請書一覧などいくつかの小プログラムを作成し，個々に活用してきた．今回のシステム化は，動物の飼育申請から実験終了までの過程を一本化することにより，飼育申請，飼育の承認，動物の発注，搬入，実験終了までの管理，動物数の管理，飼育室の収容状況管理，スケジュールの管理，各種帳票類の作成を行うことを主な目的にし，飼育室の温度および湿度の入出力に関するプログラムを追加した．

動物管理システムは飼育室の使用形態の変更その他で変更を余儀なくされることを考慮し，使用言語はプログラムの変更に対応しやすいBASICを用いた．データの入力は，マスターファイルを作成し，入力時に画面に表示させてその中から選択させることにより入力の簡素化および正確化を期した．また，毒性部に設けられているローカルエリアネットワーク(LAN)を使用することにより，作業を自室で行えるようにした．

システムの概要

1．使用機器と言語

システムの機器構成を図1に示した．動物管理責任者，管理担当者および各研究室のパーソナニコンピュータはPC-9801シリーズ(UV2, VM2, EX2, ES2, 日本電気)で構成され，それぞれコンピュータをLANで接続した．LANは伝送速度10MB/秒のethernet(10BASE-T)を敷設した．ホストコンピュータ(サーバ)にはPC-9801ES2に

＊東京都立衛生研究所毒性部病理研究科　169 東京都新宿区百人町3－24－1
＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho-3-chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

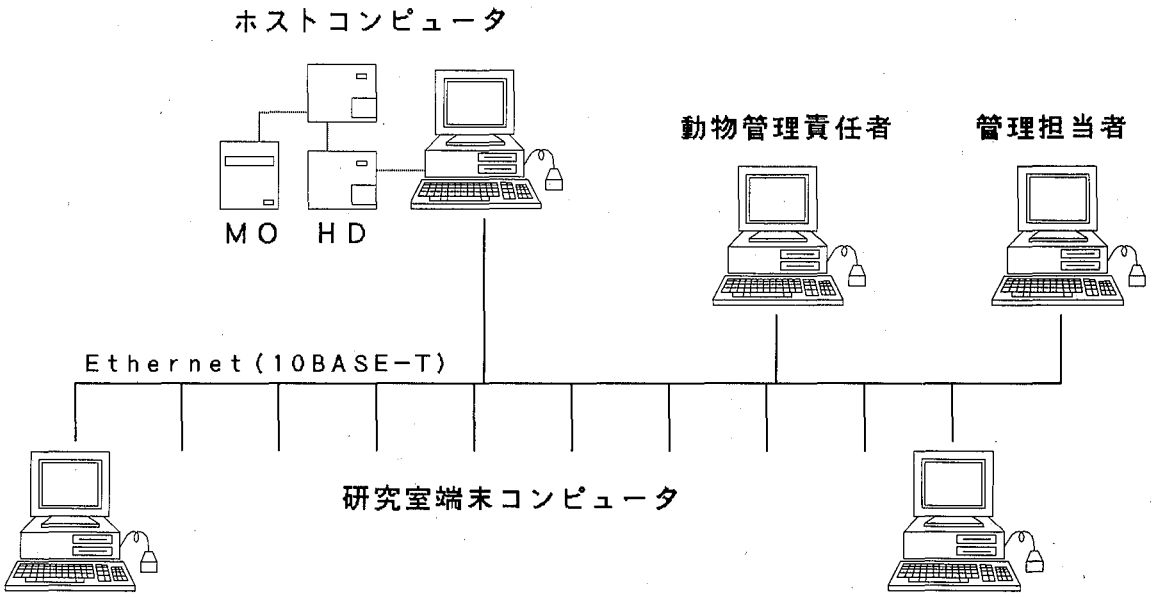


図1．システムの機器構成

100MB および40MB のハードディスク装置を接続したものを用い，ハードディスク上のデータをバックアップするために光磁気ディスク(MO)を設置した．

オペレーションシステム(OS)には MS-DOS V3.30C(マイクロソフト)を，ネットワーク用 OS には Net/One PC(ネットワンシステムズ)を用い，プログラムの作成にあたっては N_{88}－日本語 BASIC(86)(日本電気)を用いた．

2．プログラムの概要

プログラムは作業内容に沿って ①動物飼育申請から実験終了までの動物の管理 ②帳票類の出力 ③飼育室の温度，湿度の出入力 ④消毒予定日，実施日の入出力 ⑤ケージ単位の動物の管理 ⑥マスターファイルの管理 ⑦申請番号の年度更新およびデータの保存の７つに分けられる．

① 動物飼育申請から実験終了まで動物の管理

従来，動物の飼育申請から実験終了までの過程は，「毒性部動物飼育施設使用規約」および「毒性部動物飼育施設の使用心得」に基づいて行っている．

はじめに，その概略について説明する．実験者が動物実験を計画した場合，動物種，系統名，匹数，実験の種類，投与物質名，実験期間などを記載した許可申請書を動物施設の動物管理に携わる管理担当者に提出する．

管理担当者は，申請内容に従って飼育室，使用するラック，ケージの種類および数を決め，動物管理責任者の確認印を得て，許可書を実験者に渡す．搬入時には，実験者が許可書に記載されている飼育室に動物を収容し，搬入数，生年月日，体重および外見所見を管理担当者に報告する．

実験動物は一回の搬入ごとに一連番号を付け，動物のケージのラベルにはその番号を記載し，実験終了までその番号で管理する．

実験者は以後，動物数の減少，飼育期間の延長など許可書の内容に変更があった場合，管理担当者にその旨を報告する．

飼育室のスケジュール調整および飼育実績その他帳票の作成は，この許可書の内容を転記することによって行ってきた．動物数の管理は，動物数管理プログラムを用いて，飼育室ごとの動物数としての管理を行ってきた．

システム化は，従来行ってきたこの流れに沿って行うこととした．図2に動物飼育申請から実験終了までの流れとシステムとの関係を示した．システム化にネットワークを使用することにより，実験者，管理担当者および動物管理責任者は自室において各々のフロッピーディスクを起動させることによって必要な作業を選択することができる．図3に飼育申請時のデータの流れを示した．

実験者が各研究室のコンピュータを起動し，飼育申請を選択すると新しい番号が表示され，申請内容を入力する．動物管理責任者は，自室のコンピュータで新しい申請があれば内容を確認し，確認の入力を行う．

管理担当者は，確認された申請について飼育室，飼育ラック，ケージなどを決め，動物飼育承認書(図４)と搬入連絡書を出力する．動物飼育承認書は，別に手書きした購入伝票とともに実験者に手渡し，発注手続きが行われる．搬入連絡書は，搬入の準備のために飼育作業者に渡す．搬入時には，搬入数，生年月日，体重および外見所見を管理担当者が入力する．

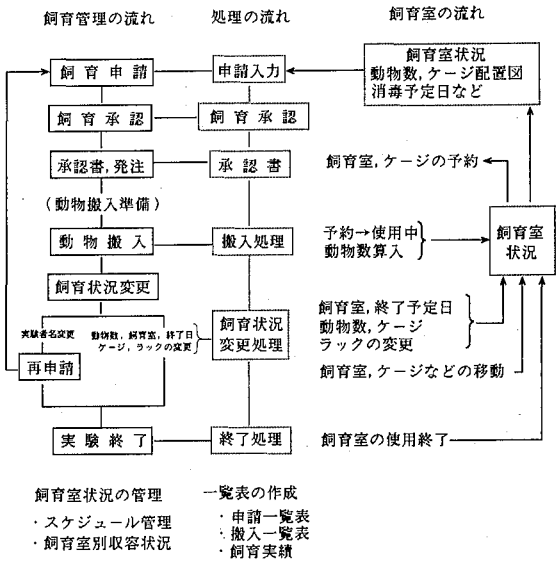


図２．動物の飼育申請から実験終了までの流れ

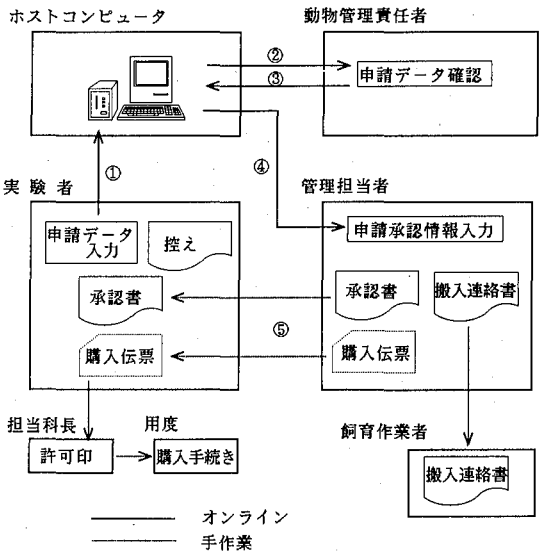


図３．動物飼育申請時のデータの流れ

実験動物は，飼育申請の搬入単位ごとに先頭に年度を付けた３桁の申請番号(例：91－024)を付け，この申請番号で実験終了まで管理する．飼育状況の変更は実験者の申し出によって管理担当者が変更事項を入力する．動物数の変更については，毎日，飼育室別の申請番号，実験者名，動物種，動物数を記載した収容状況一覧票(動物数変更記入用紙)を出力して，張り出しておく．実験者は該当する申請番号の所に処分，死亡および繁殖を伴う実験の場合は離乳数を記入し，そのデータを管理担当者が入力することによって実験者単位の動物数の管理を行う．

② 帳票類の出力

毎日，動物種別飼育表，動物数変更記入用紙を，月ごとに搬入一覧表，申請一覧表，動物種別飼育数を，年ごとに動物種・系統別搬入数，動物種・系統別飼育数を出力する．また随時，飼育室別収容状況一覧表，終了予定日一覧表を出力する(図５－９)．

③ 飼育室の温度，湿度の入出力

飼育室内の設定温度および湿度は動物種，飼育形態などによって定められ，一定に保つようにコントロールされている．しかし，外部の環境条件その他に左右されるため，常にチェックしなければならない．これらの気温，湿度を入力し，月ごとに温湿度表および飼育室単位のグラフを出力する．

動物飼育承認書

＊＊＊＊＊＊　様

申請番号	91-013
申請日	91/03/25
申請者	＊＊＊＊＊＊
共同実験者	
実験種別	＊＊＊＊
投与物質	＊＊
投与経路	＊＊＊
飼育場所	一般飼育室
動物種	マウス
系統	Crj:B6C3F1
週齢	4
条件	
匹数	♂ 0 匹　♀ 15 匹　合計 15 匹
納入業者	＊＊＊＊＊＊
飼料	実験飼料
測定有無	無
給水	給水びん
測定有無	無
飼育期間	91/04/12 ～91/05/11
飼育室	特殊２
ラック	マウス用 スチール
数量	1
ケージ	マウス用 PC TPX
数量	15
備考	

上記申請内容による動物飼育及び施設利用を承認します。

1991年06月25日

東京都立衛生研究所毒性部

動物管理責任者

図４．動物飼育承認書の出力例

申請一覧表(91/05)

91／06／05

申請番号	申請日	申請者名	動物種	系統名	週齢	納入業者	♂	♀	合計	搬入日	終了予定日	飼育室	実験種別	投与物質
91-023	91/05/10	XXXXXX	ラット	XXXXXXXX	4	XXXXXXXX	32	0	32	91/05/29	91/10/31	XXXXX	XXXXXX	XXXXX
91-024	91/05/10	XXXXXXX	マウス	XXXXXXXX	4	XXXXXXXX	21	21	42	91/05/27	91/06/30	XXXXXXX	XXXXXX	XXXX
91-025	91/05/14	XXXXXX	ラット	XXXXXXX	4	XXXXXXX	50	0	50	91/06/03	91/09/30	XXXXXX	XXXXX	XXXXX
91-026	91/05/17	XXXXXXXX	マウス	XXXXXXXXX	4	XXXXXXXXX	31	0	31	91/05/27	91/07/30	XXXXXXX	XXXXXXX	XXXX
91-027	91/05/17	XXXXXXX	マウス	XXXXXXXX	4	XXXXXXXX	30	0	30	91/05/27	91/07/30	XXXXXX	XXXXXX	XXXX
91-028	91/05/17	XXXXXXXX	ラット	XXXXXXXXX	4	XXXXXXXXX	6	0	6	91/05/27	92/05/27	XXXXXX	XXXXXXX	XXXXXX
91-029	91/05/24	XXXXXXX	ラット	XXXXXXXX	7	XXXXXXXX	40	0	40	91/06/12	91/10/31	XXXXX	XXXXXX	XXXXXX
91-030	91/05/24	XXXXXXXX	マウス	XXXXXXXXX	4	XXXXXXXXX	30	0	30	91/06/17	91/07/31	XXXXXXX	XXXXXXX	XXXXX
91-031	91/05/24	XXXXXXX	マウス	XXXXXXXX	4	XXXXXXXX	15	0	15	91/06/10	91/07/31	XXXXX	XXXXXX	XXXXXXX
91-032	91/05/29	XXXXXXX	マウス	XXXXXXXX	4	XXXXXXXX	45	0	45	91/06/10	91/08/05	XXXXXXX	XXXXXX	XXXXXX
91-033	91/05/29	XXXXXXX	マウス	XXXXXXXX	4	XXXXXXXX	45	0	45	91/06/17	91/08/15	XXXXXX	XXXXXX	XXXX
91-034	91/05/29	XXXXXXXX	マウス	XXXXXXXX	4	XXXXXXXX	45	0	45	91/06/24	91/08/22	XXXXXX	XXXXXXX	XXXXXX
91-035	91/05/29	XXXXXXX	マウス	XXXXXXX	4	XXXXXXX	40	0	40	91/06/10	91/07/10	XXXXX	XXXXXX	XXXXXX
91-036	91/05/30	XXXXXXXX	ラット	XXXXXXXXX	4	XXXXXXXXX	2	0	2	91/06/17	91/07/31	XXXXXXX	XXXXXXX	XXXXX
91-037	91/05/30	XXXXXXX	ラット	XXXXXXXX	4	XXXXXXXX	2	0	2	91/06/17	91/07/31	XXXXX	XXXXXX	XXXXXXX
91-038	91/05/30	XXXXXXX	ラット	XXXXXXXXX	4	XXXXXXXXX	2	0	2	91/06/17	91/08/31	XXXXXXX	XXXXXX	XXXXXX

図5．申請一覧表の出力例

搬入一覧表(91/05)

91／06／02

申請番号	申請日	申請者名	動物種	系統名	週齢	納入業者	♂	♀	合計	搬入日	終了予定日	飼育室	実験種別	投与物質
91-017	91/04/08	XXXXXX	マウス	XXXXXXXX	4	XXXXXXXX	41	41	82	91/05/01	91/05/31	XXXXX	XXXXXX	XXXXX
91-018	91/04/18	XXXXXXX	マウス	XXXXXXXX	4	XXXXXXXX	31	0	31	91/05/08	91/05/30	XXXXXXX	XXXXXX	XXXX
91-019	91/04/22	XXXXXX	マウス	XXXXXXX	4	XXXXXXX	16	0	16	91/05/08	91/05/30	XXXXXX	XXXXX	XXXXX
91-020	91/04/22	XXXXXXXX	マウス	XXXXXXXXX	4	XXXXXXXXX	31	0	31	91/05/13	91/05/30	XXXXXXX	XXXXXXX	XXXX
91-022	91/04/23	XXXXXXX	マウス	XXXXXXXX	4	XXXXXXXX	42	0	42	91/05/13	91/05/31	XXXXXX	XXXXXX	XXXX
91-021	91/04/22	XXXXXXXX	マウス	XXXXXXXXX	4	XXXXXXXXX	31	0	31	91/05/20	91/05/31	XXXXXX	XXXXXXX	XXXXXX
91-024	91/05/10	XXXXXXX	マウス	XXXXXXXX	7	XXXXXXXX	21	21	42	91/05/27	91/06/30	XXXXX	XXXXXX	XXXXXX
91-026	91/05/17	XXXXXXXX	マウス	XXXXXXXXX	4	XXXXXXXXX	31	0	31	91/05/27	91/07/30	XXXXXXX	XXXXXXX	XXXXX
91-028	91/05/17	XXXXXXX	ラット	XXXXXXXX	4	XXXXXXXX	6	0	6	91/05/27	92/05/27	XXXXX	XXXXXX	XXXXXXX
91-023	91/05/10	XXXXXXX	ラット	XXXXXXXX	4	XXXXXXXX	32	0	32	91/05/29	91/10/31	XXXXXXX	XXXXXX	XXXXXX

図6．搬入一覧表の出力例

動物種別飼育表（ 91 年 05 月）

91／06／04

	ラット	マウス	ウサギ	モルモット	ハムスター	サル
05/01	1,370	667	50	79	295	15
05/02	1,369	662	50	89	295	15
05/03	1,369	662	50	89	295	15
05/04	1,369	662	50	89	295	15
05/05	1,369	762	50	89	295	15
05/06	1,369	761	30	89	295	15
05/07	1,369	761	30	89	295	15
05/08	1,369	763	30	90	294	15
05/09	1,368	763	30	90	294	15
05/10	1,368	763	30	90	292	15
05/11	1,368	821	30	90	292	15
05/12	1,368	821	30	90	292	15
05/13	1,366	834	30	90	291	15
05/14	1,366	891	30	90	291	15
05/15	1,365	844	30	90	291	15
05/16	1,365	844	30	90	291	15
05/17	1,365	844	30	90	289	15
05/18	1,363	875	0	90	291	15
05/19	1,363	872	0	90	291	15
05/20	1,360	854	0	89	291	15
05/21	1,360	754	0	89	291	15
05/22	1,360	695	0	89	291	15
05/23	1,355	677	0	89	291	15
05/24	1,352	674	0	89	291	15
05/25	1,358	704	0	89	291	15
05/26	1,358	704	0	89	291	15
05/27	1,358	704	0	89	291	15
05/28	1,390	704	0	89	291	15
05/29	1,388	693	0	89	355	15
05/30	1,385	684	0	89	355	15
05/31	1,378	684	0	89	355	15
合　計	12,380	23,403	610	2,761	9,248	465

図7．動物種別飼育表の出力例

動物種・系統別搬入数（月別）

91/04/06

系統名	納入業者	週齢	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
【ラット	】														
XXXXXXXXXX	XXXXXXXXX	4	28	506	205	50	85	123	45	25	200	75	52	10	1,404
	XXXXXXXXX	6	5	0	0	0	0	0	6	0	2	20	0	0	33
	XXXXXX	8	2	0	0	0	0	0	6	0	2	4	0	0	14
	XXXXXXX	その他	50	0	50	0	0	100	0	50	0	0	0	0	250
	小計		85	506	255	50	85	223	57	75	204	99	52	10	1,701
XXXXXXX	XXXXXXXXXX	4	0	32	0	20	0	0	0	0	0	10	0	0	62
	小計		0	32	0	20	0	0	0	0	0	10	0	0	62
ラット	合計		85	538	255	70	85	223	0	0	0	0	0	0	1,763
【マウス	】														
XXXXXXXXXXX	XXXXXXXX	4	182	264	80	95	120	20	76	156	63	85	265	98	1,504
	XXXXXXXX	7	0	42	0	22	0	0	75	0	21	0	0	0	160
	小計		182	306	80	117	120	20	151	156	84	85	265	98	1,664
XXXXXXX	XXXXXXXXXXX	4	16	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	36
	小計		16	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	36
マウス	合計		198	306	80	137	120	20	151	156	84	85	260	98	1,700
【モルモット	】														
XXXXXXXXXXX	XXXXXXXX	4	32	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40
	小計		32	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40
XXXXXXX	XXXXXXXXXXX	4	10	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	20
	小計		10	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	20
モルモット	合計		42	8	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	60
【ウサギ	】														
XXXXXXXXXXX	XXXXXXXX	4	31	25	0	0	0	6	0	10	0	0	0	0	72
ウサギ	合計		31	25	0	0	0	6	0	10	0	0	0	0	72

図8．動物種・系統別搬入数(月別)の出力例

動物種・系統別飼育数（月別）

91/05/21

動物種	系統名	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
ラット	XXXXXXXXXX	29,286	29,886	28,356	29,286	29,775	28,658	30,045	29,886	29,564	31,258	29,456	29,456	354,912
	XXXXXX	302	279	425	302	279	356	365	420	364	356	264	356	4,068
	XXXXXX	451	235	225	451	265	225	451	235	225	451	235	225	3,674
	XXXXXXXX	1,258	950	1,300	1,382	1,235	1,256	1,368	1,025	1,023	1,045	1,123	998	13,963
	XXXXXXX	270	261	560	270	261	577	298	261	560	288	289	545	4,440
	XXXXXXX	150	152	253	150	152	253	175	165	226	158	186	286	2,306
	XXXXXXXX	518	500	452	518	500	452	556	598	468	559	526	498	6,145
	合　計	32,235	32,263	31,571	32,359	32,467	31,777	33,258	32,590	32,430	34,115	32,079	32,364	389,508
マウス	XXXXXXXXXX	25,891	26,456	25,005	28,456	25,718	25,955	27,526	26,485	27,595	25,889	26,445	26,856	318,277
	XXXXXXXXXX	3,200	3,150	3,102	3,324	3,526	3,125	3,265	3,201	3,204	3,400	3,261	3,564	39,322
	XXXXXXXXXX	402	29	0	65	25	0	0	500	420	406	36	0	1,883
	XXXXXXXX	810	806	805	790	790	775	702	809	810	810	450	450	8,807
	合　計	30,303	30,441	28,912	32,635	30,059	29,855	31,493	30,995	32,029	30,505	30,192	30,870	368,289
モルモット	XXXXXX	2,360	2,761	3,254	2,360	3,021	3,210	2,465	2,645	2,531	2,560	3,420	3,521	34,108
	合　計	2,360	2,761	3,254	2,360	3,021	3,210	2,465	2,645	2,531	2,560	3,420	3,521	34,108
ハムスター	XXXXXXXX	8,016	8,148	8,764	8,231	8,236	8,864	8,423	8,564	8,916	8,150	8,237	8,849	101,398
	合　計	8,016	8,148	8,764	8,231	8,236	8,864	8,423	8,564	8,916	8,150	8,237	8,849	101,398
サル	XXXXXXXXXX	750	775	750	775	775	750	1,085	1,050	1,056	1,023	924	1,023	10,736
	合　計	750	775	750	775	775	750	1,085	1,050	1,056	1,023	924	1,023	10,736
延飼育数	合　計	73,664	74,388	73,251	76,360	74,558	74,456	76,724	75,844	76,962	76,353	74,852	76,627	904,039

図９．動物種・系統別飼育数(月別)

ケージ配列表　（Ｃラット３飼育室）

91/06/21

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-109 ＊＊＊＊ 91/05/31	★90-113 ＊＊＊＊ 91/05/31	91-015 ＊＊＊＊ 91/06/30			★90-095 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-096 ＊＊＊＊ 91/07/31	
B	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-105 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-110 ＊＊＊＊ 91/06/31		91-016 ＊＊＊＊ 91/06/30			★90-095 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-096 ＊＊＊＊ 91/07/31	
C	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-105 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-093 ＊＊＊＊ 91/05/31					★90-095 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-096 ＊＊＊＊ 91/07/31	
D	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-075 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-105 ＊＊＊＊ 91/07/31	★90-094 ＊＊＊＊ 91/05/31							

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
A	★90-089 ＊＊＊＊ 91/04/30	★90-089 ＊＊＊＊ 91/04/30								★91-011 ＊＊＊＊ 91/06/30	★90-107 ＊＊＊＊ 91/04/30			
B	★90-089 ＊＊＊＊ 91/04/30	★90-089 ＊＊＊＊ 91/04/30									★91-010 ＊＊＊＊ 91/06/30			
C	★90-089 ＊＊＊＊ 91/04/30													
D	★90-089 ＊＊＊＊ 91/04/30													

図10. ケージ配列表の出力例(上段：申請番号　中段：実験者名　下段：終了予定日　★：ケージ使用　無印：予約)

④ 消毒予定日，実施日の入出力

動物実験のデータに大きな影響をおよぼす病原体の感染を予防するため，飼育室ごとに定期的に消毒を行っている．このプログラムは消毒予定日の登録，訂正，過去の消毒日データの保存および一覧表の作成を行う．また，飼育室の予約を行う際，飼育期間が消毒予定日に重なる場合，予約は受け付けられない．

⑤ ケージ管理

ベルト式飼育機を設置している飼育室において，ケージ単位の管理を行う．管理担当者は動物飼育承認書を作成する際，飼育室とともにケージ数および位置を予約する．搬入処理により使用状態になり，実験終了で使用状態を解除する．必要に応じて，画面上でケージの削除，移動処理を行い，随時，ケージ別に予約および使用状況（申請番号，実験者名，終了予定日）を画面あるいはプリンターに出力できる（図10）．

⑥ マスターファイルの管理

データ入力の簡素化と正確度を高めるため，実験者名，動物名，系統名，飼育室名などについて，あらかじめ必要なデータを登録し，必要な場合に補充，修正，削除を行い，マスター一覧表を出力する．データ入力時にマスター登録したデータがファンクションキーに割り振られ，選択入力ができる．

⑦ 年度の更新およびデータの保存

申請番号は年度ごとに管理しているため，年度末に年度の更新処理を行う．以降，申請の際，新しい年度番号が付けられ，申請番号は001に戻る．

また，ファイル内のデータ量が多くなるとデータの読み込み書き込み，あるいは検索に時間がかかるため，年度始めに前年度のデータを別ファイルに転送して保存する．

本システムの問題点および今後の展望

このように構築された動物管理プログラムは4月から実際の動物管理に導入されている．ネットワークによるデータの流れも大枠うまく流れているようである．このプログラムの開発により，①実験者が自室で飼育の申請ができるようになった．②コンピュータの画面上に飼育室の使用状況を表示させることができるようになったため，飼育室のスケジュール調整が容易になった．③飼育申請から実験終了までの管理と動物数の把握が一本化され，作業が省力化された．④帳票類の作成が容易になったなどの点がこのプログラムの効果として挙げられる．但し，言語にBASICを使用していること，データファイルがシーケンシャルファイルであることなどから，プログラムやデータの読み込みや書き込みに時間がかかること，日本語変換機能が使いにくい点などいくつか問題点が挙がってきている．ファイル内のデータが増えて行くにつれ．さらに改善すべき問題が起こってくる可能性がある．今後，これらの問題点を検討し，プログラムの改良あるいは追加を行っていく予定である．

動物管理プログラムの充実を図るため，今後，飼育作業内容の管理，飼料，飼育器材などの在庫管理の部分についてのシステム化の可能性について検討していきたいと考えている．

ま と め

東京都立衛生研究所毒性部動物飼育施設における動物管理プログラの開発を行った．今回のシステム化は，動物実験に必要な動物の飼育申請，発注，搬入，実験終了までの過程，飼育室の状況管理および帳票の印刷を目的とした．4月から実際の動物管理に使用している中でいくつかの問題点があがっているが，今後これらに対して検討を加え，より充実したシステムにして行きたいと考えている．

文 献

1) 中川好男，福田向江，市川久次，藤井孝，中尾順子，平賀興吾：東京衛研年報，**25**，517-525，1974
2) 三栗谷久敏，藤田博，神谷信行，中村清純，佐々木美枝子，平賀興吾：東京衛研年報，**34**，421-429，1983
3) 神谷信行，中川好男，三栗谷久敏，市川久次，佐々木美枝子：東京衛研年報，**38**，438-443，1987
4) 神谷信行，中川好男，三栗谷久敏，市川久次，佐々木美枝子：東京衛研年報，**40**，363-372，1989
5) 三栗谷久敏，藤田博，神谷信行，佐々木美枝子，平賀興吾：東京衛研年報，**35**，460-464，1984

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 285-295, 1991

安息香酸ナトリウムならびにピペロニルブトキシドのF344ラットにおける亜急性毒性試験

藤谷知子*, 安藤　弘**, 池田虎雄**, 大石真之*,
小縣昭夫**, 樺島順一郎*, 神谷信行**, 久保喜一**,
小島昭江**, 高橋　省*, 高橋　博**, 多田幸恵**,
藤谷和正*, 米山允子*, 市川久次*

Sub-acute Toxicity of Sodium Benzoate and Piperonyl butoxide in F344 Rats

TOMOKO FUJITANI*, HIROSHI ANDO**, KAZUMASA FUJITANI*, TORAO IKEDA**,
JUN-ICHIRO KABASHIMA*, NOBUYUKI KAMIYA**, AKIE KOJIMA**, YOSHIKAZU KUBO**,
AKIO OGATA**, SHINSHI OISHI*, YUKIE TADA**, HIROSHI TAKAHASHI**,
OSAMU TAKAHASHI*, MASAKO YONEYAMA* and HISATSUGU ICHIKAWA*

Sub-acute toxicity of the food-preservative Sodium Benzoate (SB) and the grain protectant Piperonyl Butoxide (PB) was studied in F344 rats. Groups of 10 males and 10 females were maintained on diets containing 0%SB and 0%PB (Control), 2.5%SB, 0.6%PB, 1.2%PB, 2.4%PB, 0.625%SB and 2.4%PB, 1.25%SB and 2.4%PB, 2.5%SB and 0.6%PB, 2.5%SB and 1.2%PB, 2.5%SB and 2.4%PB. Severe convulsion was observed in all rats of the SB2.5%-group but not in rats of the SB2.5%PBO.6%, SB2.5%PB1.2%, or SB2.5%PB2.4%-group. 10 males and 6 females of the SB2.5%-group and 1 ma'e and 1 female of the SB2.5%PB2.4%-group died during experimental period. Reduced growth, hepatomegaly and abnormal coloring of liver and kidneys were very predominate in the males and females of the PB2.4%, SB0.625%PB2.4%, SB1.25%PB2.4%, SB2.5%PB2.4%-group. In those groups, absolute and relative liver weight and relative kidney weight were significantly higher than those of the control group, respectively. Also, increases in the serum gamma-glutamyltrans-peptidase and nitrogen value were observed in those groups regarding both sexes. It was indicated that an intake of a high dose of piperonyl butoxide alone or in combination with sodium benzoate in diet for 13 weeks were toxic to liver and kidneys of rats.

Keywords：安息香酸ナトリウム Sodium Benzoate, ピペロニルブトキシド Piperonyl butoxide, 亜急性毒性 Sub-acute Toxicity, F344ラット F344 Rat

緒　言

安息香酸および安息香酸ナトリウムはバクテリアの増殖をおさえる作用があるところから，日本では，食品添加物として，キャビア，マーガリン，清涼飲料水，シロップ，醤油に，安息香酸として0.1から0.25%以下の濃度で使用が許可されている．安息香酸ナトリウムのラットにおける急性毒性は，経口での半数致死量(LD50)が4.07g/kg体重であると報告されている[1]．亜急性毒性については，4%あるいは5%の安息香酸ナトリウムを含む餌の投与によるラットの死亡が報告されている[2)3)]．また，ラットその他の動物による安息香酸の吸収・代謝・排泄は早く，体内への蓄積性は認められて

＊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
＊Department of toxicology, The Tokyo Metrpoplitan Research Laboratory of Public Health, 24-1, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan
＊＊同毒性部病理研究科

いない[4].

ピペロニルブトキシドはピレスロイド系殺虫剤の共力剤として広く用いられており，食品添加物としても，穀類に0.0024%以下の濃度での使用が許可されている．本化合物の経口半数致死量は，ウイスター系ラットにおいて，7.5から10g/kg体重であると報告されている[5]．また，ピペロニルブトキシドは，薬物代謝系に作用することが良く知られている[6-8]．F344ラットにおける亜急性毒性としては，体重の増加抑制，肝臓の重量増加，肝細胞の病理学的変化が報告されているが[9]，他の臓器についての詳しい報告はない．

安息香酸の使用が許可されている清涼飲料や醤油，ピペロニルブトキシドの使用が許可されている米，小麦，豆などは，日本人がほぼ毎日食している食物である．さらに，ピペロニルブトキシドは，水溶性が低く水洗されにくいうえ，光・熱に安定である[10][11]．このように，長期にわたる摂取の予測されるふたつの化合物の安全性を，ラットを用いた13週の試験で調べた．

実験材料と方法

化合物　安息香酸ナトリウム(特級)は，和光純薬工業から，ピペロニルブトキシドは，高砂香料から購入した．

動物　4週令のFischer(F344/Ducrj)ラット雌雄を，チャールスリバージャパンから購入し，1週間の馴化飼育後に使用した．ラットは，ステンレス製網ケージに1匹ずつ収容し，温度24－26℃，湿度50－60%，12時間照明，換気毎時10回の動物室にて，固形飼料CE-2(日本クレア製)と細菌ろ過した水道水を，自由に摂取させた．

13週間の試験　安息香酸ナトリウム(以下SBと略す)あるいはピペロニルブトキド(以下PBと略す)は，粉末飼料CE－2(日本クレア製)と良く混合し，熱を加えないで固形成型した．ラットは，10匹ずつの雌雄を含む10群に分け，それぞれを，SB0%PB0%(対照群)，SB2.5%，PB0.6%，PB1.2%，PB2.4%，SB2.5%とPB0.6%，SB2.5%とPB1.2%，SB2.5%とPB2.4%，SB0.625%とPB2.4%，SB1.25%とPB2.4%を含む餌で，5週令から13週間飼育した．症状観察と体重測定を，試験開始後5日間は毎日，その後は1週間に2度行なった．摂餌量と摂水量の測定は，試験開始後4，11，18および39日に，各群の6匹のラットについて個別に測った．ラットの死亡の観察は毎日行い，実験期間中の死亡ラットは，剖検した．

13週の実験期間終了後，生き残った全てのラットを，断頭屠殺し，脳，肝臓，心臓，腎臓，脾臓，肺，胸腺，副腎，こうがん，前立腺，卵巣，子宮の重量を測定した．血液学的検索のために，エチレンジアミン四酢酸2カリウム処理した試験管に血液を採取し，Coulter Counter Model S (Coulter Electric Co.)を用いて，赤血球数(以下RBCと略す)，ヘモグロビン(以下Hbと略す)，ヘマトクリット(以下Htと略す)，平均血球容量(以下MCVと略す)，総白血球(以下WBCと略す)を測定し，平均血球ヘモグロビン濃度(以下MCVCと略す)および平均血球ヘモグロビン量(以下MCHと略す)を算出した．血液塗抹標本は，メイーグリュンワルド／ギムザ染色し，白血球像を観察した．生化学検査のために，血液より血清を分離し，日立自動分析機705を用いて，アルブミン(以下ALBと略す)，総蛋白(以下TPと略す)，コレステロール(以下CHOと略す)，りん脂質(以下PLと略す)，トリグリセライド(以下TGと略す)，ビリルビン(以下BILと略す)，ぶどう糖(以下GLUと略す)，尿酸(以下UAと略す)，尿素窒素(以下UNと略す)，コリンエステラーゼ活性(以下CHEと略す)，アルカリフォスファターゼ活性(以下ALPと略す)，ガンマグルタミルトランスペプチダーゼ活性(以下GTPと略す)，グルタミックーオキザロ酢酸トランスアミナーゼ活性(以下GOTと略す)，グルタミックーピルビン酸トランスアミナーゼ活性(以下GPTと略す)を測定し，アルブミン・グロブリン比(以下A/Gと略す)，GOT・GPT比(以下O/Pと略す)を算出した．

統計解析　対照群および投与群の間の有意差の検定には，Scheffeの多重比較検定を用いた．

結　果

摂餌量・摂水量　餌に含まれる両化合物の濃度に伴い，実験前半に，摂餌量・摂水量の減少傾向が見られた(表1)．この傾向は，特に投与開始直後に著しかった．雄では，4日目のSB2.5%群，PB2.4%群，SB2.5% PB2.4%群，SB2.5% PB1.2%群，SB1.25% PB2.4%群，SB0.625% PB2.4%群の摂餌量および11日目のSB2.5% PB2.4%群の摂餌量，4日目のPB2.4%群，SB2.5% PB2.4%群，SB1.25% PB2.4%群およびSB0.625% PB2.4%群，すなわちPB2.4%を含む餌を食した全ての群の摂水量が対照群より有意に低下していた．雌では，雄よりも摂餌量摂水量の変化は少なく，PB2.4%群，SB0.625% PB2.4%群，SB1.25% PB2.4%群およびSB2.5% PB2.4%群，すなわちPB2.4%を含む餌を食した全ての群の4日目の摂餌量とSB2.5% PB2.4%群の4日目の摂水量が，対照群より有意に低かった．

症状・死亡率・体重増加　SB2.5%群の雌雄に，投与5日目から過敏が，続いて7日目頃から断続的にけいれ

Table 1. Food and water intake of male and female F344 rats fed diet containing piperonyl butoxide (PB) alone or in conbination with sodium benzoate (SB) for 13 weeks.

	Control	SB2.5%	PB0.6%	PB1.2%	PB2.4%	SB0.625% PB2.4%	SB1.25% PB2.4%	SB2.5% PB0.6%	SB2.5% PB1.2%	SB2.5% PB2.4%
Males										
Food intake (g/day/kg b. w.)										
on days 4	116.2±4.4	82.0±5.2*	112.8±5.0	99.9±4.1	63.1±13.0*	53.5±13.3*	64.4±10.0*	93.5±17.7 (5)	89.8±7.8 (5)*	58.7±4.9*
11	94.3±3.6	99.2±6.3 (3)	90.8±5.1 (5)	92.2±5.1	89.1±13.9	96.2±8.6	93.9±4.6	93.7±7.1	88.4±7.3	65.2±20.7*$@
18	89.4±5.1	137.2±53.1 (4)*	91.9±5.5	89.1±3.9	90.8±4.7	91.4±22.6	103.1±4.3	91.3±5.1	96.6±8.5	93.1±12.7 (5)
39	64.3±3.3	102.2 (1)	68.9±4.9	69.7±5.7	69.8±5.1	74.8±4.9	84.5±19.9	76.8±6.0	70.0±6.4	80.6±8.4
Water intake										
on days 4	167.1±12.5	172.1±19.0	170.3±9.6	159.3±7.9	121.1±6.9*	98.3±15.2*	108.2±18.3*	190.1±26.8 (5)	172.2±8.3	121.9±7.2*
11	133.2±5.3	170.6±18.8 (4)	155.2±17.6	145.2±13.8	164.1±29.9	149.8±42.7	182.0±10.9	181.4±21.3	185.6±10.7	116.9±92.2
18	120.7±8.2	149.7±15.6 (2)	141.3±14.2	130.3±13.3	153.4±14.8	147.1±74.1	171.0±15.1	154.7±21.3	162.4±14.5	162.9±75.2
39	88.1±8.9	165.6 (1)	96.6±10.2	94.3±10.2	98.8±7.6	105.2±14.6	118.3±11.8	126.6±17.6*	115.7±13.4	137.5±16.5*
Females										
Food intake										
on days 4	116.2±4.4	82.0±5.2	112.8±5.0	99.9±4.1	63.1±13.0*	53.5±13.3*	64.7±10.0*	89.6±18.4 (5)	87.8±8.6	58.7±4.9*
11	81.7±29.8	113.3±10.2 (5)	91.2±4.5	92.8±8.4	93.3±5.5	89.1±25.2	79.2±20.3	89.5±6.2	91.6±5.5	84.3±10.3
18	92.5±2.6	89.5±40.8 (5)	89.8±4.3	93.5±6.3	100.5±7.0	96.6±23.3	107.5±8.5	97.4±7.2	97.6±6.8	104.2±6.3
39	70.0±2.6	96.5±8.7 (4)*	64.6±5.4	67.3±4.2	76.8±5.9	79.9±10.9	77.7±21.2	70.0±4.2	69.5±7.8	84.6±4.8
Water intake										
on days 4	172.8±13.6	197.3±37.9	165.4±8.8	152.6±15.6	102.7±44.9 (5)	116.6±14.5	105.4±46.6	192.9±13.2	169.7±35.6 (5)	91.2±47.1*@
11	148.8±4.1	202.4±23.4 (5)	156.8±9.8	159.8±10.6	167.9±16.8	149.7±74.6	165.9±80.0	174.0±9.8	185.9±12.3	214.0±34.3
18	133.9±7.0	180.7±28.7 (5)	139.0±14.7	143.2±16.4	162.0±15.2	136.6±69.2	202.3±40.2	162.0±20.9	157.3±14.0	189.8±36.9
39	100.9±18.1	157.6±43.8 (4)	87.4±9.2	88.9±1.8 (5)	109.4±28.5	118.5±23.9	143.2±48.3	106.2±11.1	107.2±12.8	136.1±12.7

Values are means±SD for 6 rats of each group unless oterwise indicated in brackets, and those marked with*, $ or @ differ significantly ($p<0.05$) from that of control group, PB2.4% group or SB2.5% group, respectively.

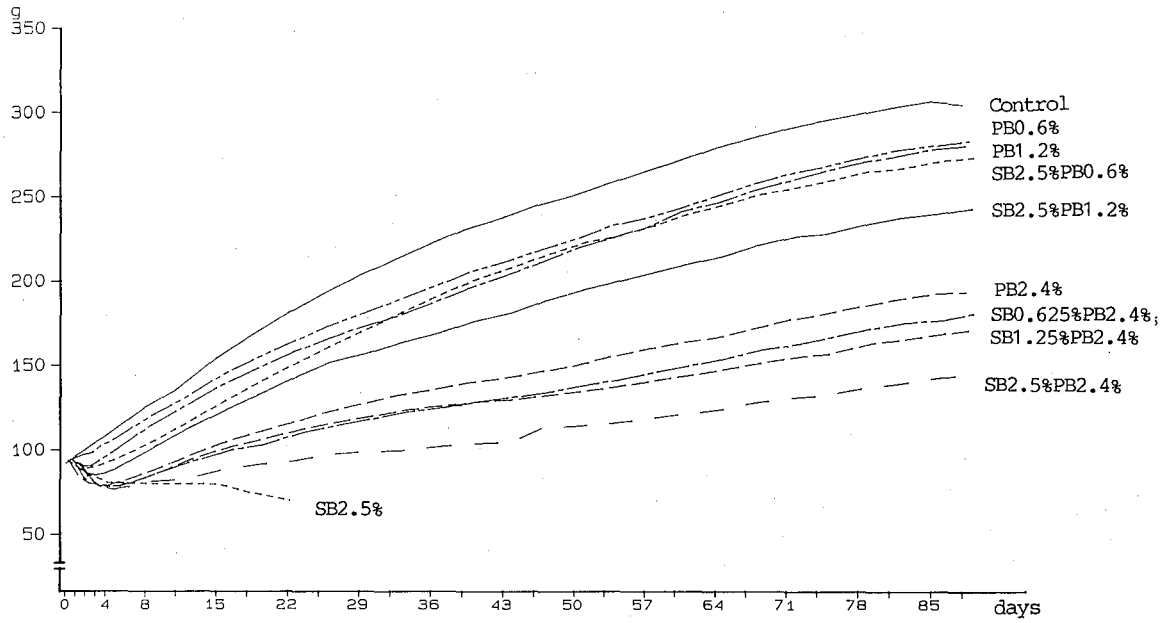


Fig. 1. Body weight gain of male F344 rats fed diet containing piperonyl butoxide (PB) alone or in conbination with sodium benzoate (SB) for 13 weeks.

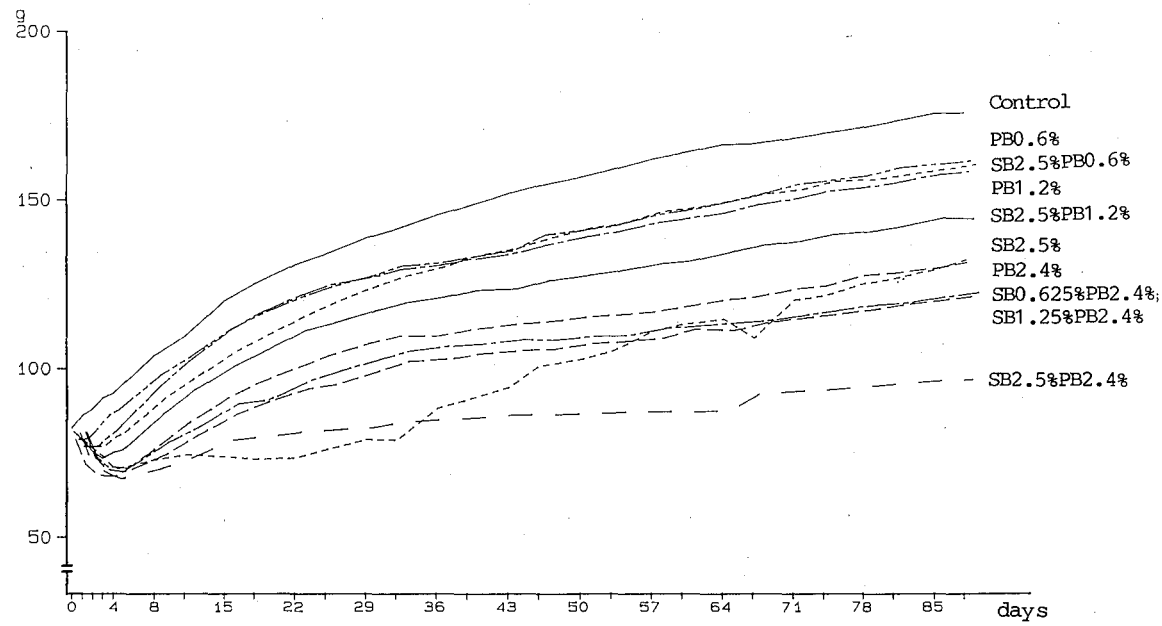


Fig. 2. Body weight gain of female F344 rats fed diet containing piperonyl butoxide (PB) alone or in conbination with sodium benzoate (SB) for 13 weeks.

んが見られた．この症状は，この群の全ての動物にあらわれ，試験終了時あるいはその動物の死亡まで継続した．SB2.5%群の雄の10匹中10匹と同群の雌の10匹中6匹が投与5日目から53日目の間に死亡した．これらの動物の剖検の際，脳がやや赤みを帯びてみえた．投与およそ25日目から45日目に，PB0.6%群，PB1.2%群，PB2.4%群の雌雄に腹部ぼうまんがみられ，その程度は食餌中のPB濃度に応じていた．投与2，3日目からおよそ3週間，SB2.5%群，PB2.4%群，SB0.625% PB2.4%群，SB1.25% PB2.4%群の雌雄に鼻出血が見られた．SB 2.5% PB2.4%群の雄の10匹中の1匹が45日目に，雌の10匹中の1匹が64日目に死亡した．雄および雌の体重増加曲線を図1，2に示した．餌に含まれる両化合物の濃度に伴い，雌雄の体重増加の抑制がみられた．SB2.5%群の雄の平均体重は，投与1日目から同群の全動物の死亡時まで対照群より有意に低かった．PB0.6%群の雄の平均体重は，全期間を通じて対照群との有意差はなかった．PB1.2%群の雄の平均体重は，投与1日目から4日目のみ対照群より有意に低下していた．PB2.4%群，SB 0.625% PB2.4%群，SB1.25% PB2.4%群およびSB 2.5% PB2.4%群，すなわちPB2.4%を含む餌を食したすべての群(PB2.4%摂取群)の雄の平均体重は，試験期間中を通して対照群より有意に低かった．SB2.5% PB 0.6%群とSB2.5% PB1.2%群の雄の平均体重は，投与1日目から25日目まで対照群より有意に低く，SB2.5% PB1.2%群では，さらに，53日目から試験終了まで対照群より有意に低かった．化合物投与による体重抑制は，雌においては雄で見られるよりわずかであった．SB 2.5%群の雌の平均体重は，投与1日目から43日目まで対照群より有意に低かったが，それ以後，生残った4匹の平均体重には有意差は見られなかった．PB2.4%群，SB0.625% PB2.4%群，SB1.25% PB2.4%群，およびSB2.5% PB2.4%群，すなわちPB2.4%摂取群の雌の平均体重は，試験期間中を通して対照群より有意に低かった．その他の群の雌の平気体重は，試験開始の直後に低下する傾向が見られたが有意でなかった．

解剖所見 PB2.4%群，SB0.625% PB2.4%群，SB 1.25% PB2.4%群およびSB2.5% PB2.4%群，すなわちPB2.4%摂取群のほとんどの雄と約半数の雌で，顕著な肝腫大がみられた．それらの肝は，暗褐色あるいは黄褐色を呈し，SB2.5% PB2.4%群の雄では，さらに黒い斑点を有するものがあった．また，それらの肝の表面は，対照群の肝と比べて，凸凹していた．同じく，これらの群の雌雄の腎臓は，暗褐色あるいは緑褐色を呈していた．SB2.5% PB2.4%群の雄の前立腺の萎縮，PB2.4%群，SB0.625% PB2.4%群，SB1.25% PB2.4%群およびSB 2.5% PB2.4%群，すなわちPB2.4%摂取群の雌の子宮の萎縮がみられた．

臓器重量 雄雌の臓器重量を表2に，相対臓器重量(臓器重量／100g体重)を表3に示した．最終体重と臓器重量における変化はおもに高濃度の化合物を含む餌を食した群に見られた．雄では，PB2.4%群，SB0.625% PB2.4%群，SB1.25% PB2.4%群およびSB2.5% PB 2.4%群，すなわち，PB2.4%摂取群で，最終体重，脳，心，脾，肺，前立腺，胸腺の重量が対照群より有意に低下していた．また，SB2.5% PB1.2%群の最終体重，心，肺と前立腺，PB1.2%群の胸腺，SB2.5% PB2.4%群の左腎と右こうがんが低下していた．これらの変化とは逆にPB1.2%群，PB2.4%群，SB0.625% PB2.4%群，SB 1.25% PB2.4%群の肝の重量は，対照群より有意に高かった．特に，PB2.4%群では体重が対照群の2/3であるにもかかわらず肝重量は対照群の1.6倍にも達していた．相対臓器重量では，PB2.4%群，SB0.625% PB 2.4%群，SB1.25% PB2.4%群およびSB2.5% PB2.4%群，すなわちPB2.4%摂取群で脳，肝，腎(左右)，こうがん(左右)と副腎(左右)が対照群より増加していた．

雌では，PB2.4%群，SB0.625% PB2.4%群，SB 1.25% PB2.4%群およびSB2.5% PB2.4%群，すなわちPB2.4%摂取群で最終体重と子宮の実重量が対照群より有意に低下していた．また，SB0.625% PB2.4%群，SB 1.25% PB2.4%群およびSB2.5% PB2.4%群の心，脾，SB2.5%群，SB1.25% PB2.4%群，SB2.5% PB2.4%群の脳，SB2.5% PB2.4%群の右腎，胸腺，卵巣(左右)などに有意な低下が見られた．そして，雄と同じく，肝重量の有為な増加がPB2.4%群，SB0.625% PB2.4%群，SB1.25% PB2.4%群に見られ，PB2.4%群の肝重量は対照群の約2倍に達していた．相対臓器重量では，SB 0.625% PB2.4%群，SB1.25% PB2.4%群およびSB 2.5% PB2.4%群の脳，腎(左右)，SB2.5% PB2.4%群の心などが対照群より有意に増加していた．また，PB 2.4%群，SB0.625% PB2.4%群，SB1.25% PB2.4%群およびSB2.5% PB2.4%群の肝の相対重量は増加し，子宮の相対重量は低下していた．

以上のような，雌雄の肝重量の著しい増加，雄の前立腺と雌の子宮の重量の著しい低下は，解剖所見と良く一致していた．

血液学的検索 両化合物の摂取に伴う血液学的変化は雄よりも雌に多く見られた(表4)．SB2.5% PB2.4%群

Table 2. Final body weight and absolute organ weight of male and female F344 rats fed diet containing piperonyl butoxide (PB) alone or in conbination weth sodium benzoate (SB) for 13 weeks

		Control	SB2.5%	PB0.6%	PB1.2%	PB2.4%	SB0.625% PB2.4%	SB1.25% PB2.4%	SB2.5% PB0.6%	SB2.5% PB1.2%	SB2.5% PB2.4%
Males											
Body weight (g)		307±19		282±16	278±16	195±19*	183±18*	173±15*	273±19	243±34*	147±34*
Brain (mg)		1927±33#		1876±81	189±49	1769±35*	1729±55*	1731±46*	1870±40	1879±80	1687±44*
Liver (g)		10.21±0.88		12.70±0.98	15.01±1.59*	16.08±1.90*	15.68±1.79*	15.20±1.55*	13.06±1.09	13.67±2.52	13.66±3.08
Heart (mg)		855±69		804±56	789±66	587±51*	563±49*	538±45*	802±60	729±84*	467±79*$
Kidney (mg)	left	1005±57		1035±66	1086±108	915±94	873±90	882±105	1090±76	1028±167	782±139*
	right	980±49		1029±69	1096±119	881±89	849±98	831±80	1056±69	1027±174	772±135
Spleen (mg)		606±34		591±41	602±33	409±54*	365±42*	358±33*	602±54	533±60	324±50*$
Lung (mg)		953±70		871±61	862±56	655±50*	649±111*	604±48*	862±66	779±67*	577±93*
Testis (mg)	left	1470±76		1469±29	1508±47	1393±68	1368±84	1331±99	1490±56	1437±89	1188±253
	right	1443±49		1425±40	1468±36	1364±75	1332±80	1267±75	1449±55	1376±120	1154±248*
Prostate (mg)		297±39		255±61	219±47	124±40*	105±33*	71±26*	237±56	180±66*	53±30*
Adrenal (mg)	left	20.0±2.3		22.7±3.3	24.1±2.1	24.5±3.4	24.8±4.0	24.4±4.9	24.7±2.3	23.0±6.1	22.4±2.4
	right	18.8±1.1		21.2±2.1	22.8±1.8	22.0±3.3	23.5±4.7	22.2±4.3	20.1±2.2	20.2±6.5	20.4±2.0
Thymus (mg)		190.5±8.7		173.7±17.5	152.6±13.8*	118.0±14.7*	111.5±20.8*	114.8±18.6*	165.6±15.5	161.2±14.9	87.9±29.3*
Females											
Body weight (g)		174±7	134±48	161±6	156±19	133±11*	123±9*	122±12*	159±11	144±11	97±16*
Brain (mg)		1810±36	1396±99*	1779±28	1768±56	1672±28	1673±27	1659±37*	1763±33	1723±60	1603±39*
Liver (g)		5.21±0.39	5.31±2.04	6.69±0.37	8.24±1.13	10.12±1.22*	9.56±0.75*	9.91±1.39*	7.09±0.74	7.83±0.87	8.55±0.90
Heart (mg)		543±34	500±145	529±22	506±61	423±32	407±34*	406±33	506±38	475±34	341±42*
Kidney (mg)	left	629±31	639±135	639±31	636±68	587±39	568±38	583±62	629±40	605±58	524±33
	right	631±35	632±135	623±27	620±71	577±51	566±42	572±58	610±61	597±49	504±35*
Spleen (mg)		398±23	355±140	362±17	362±51	299±32	265±25*	266±35*	387±35	341±31	226±21*
Lung (mg)		694±35	613±141	642±37	595±56	546±64*	537±74*	555±79	626±58	592±63	542±100
Ovary (mg)	left	26.5±4.7	23.6±11.1	26.0±3.8	24.1±6.4	17.1±4.5	13.6±3.5	14.6±3.8	26.5±2.5	22.3±4.5	12.7±4.7*
	right	28.0±3.2	23.4±9.0	28.2±4.4	26.6±6.5	17.9±5.3	15.2±4.3	13.8±2.9*	26.0±6.9	24.8±4.4	11.3±2.3*
Uterus (mg)		441±53	401±227	346±80	259±127	135±65*	106±42*	93±29*	329±81	231±59	67±11*
Adrenal (mg)	left	22.9±2.2	24.1±6.8	23.8±3.1	23.4±4.6	21.1±2.9	20.1±2.5	21.9±4.1	25.8±4.4	22.9±3.5	19.5±2.6
	right	22.1±3.6	22.2±6.9	21.8±3.4	20.2±3.5	20.1±3.0	17.9±3.0	18.6±3.9	22.6±3.2	20.3±3.5	18.0±3.5
Thymus (mg)		158.4±19.6	132.9±64.9	150.6±9.6	151.0±17.2	131.1±18.1	115.8±18.3	117.1±15.3	156.5±14.7	144.8±15.3	89.5±26.8*

Values are mean±SD for 10 rats of each group except male and female SB2.5% PB2.4% group where those are calculated from survived 9 rats and female SB2.5% group where those are calculated from survived 4 rats and no means are calculated for male SB2.5% group because of early deathes.

#This value is calculated from 9 rats.

* or $: differ significantly ($p<0.05$) from those of control group or PB2.4% group, respectively.

Table 3. Relative organ weight of male and female F344 rats fed diet containing piperonyl butoxide (PB) alone or in conbination with sodium benzoate (SB) for 13 weeks.

	Control	SB2.5%	PB0.6%	PB1.2%	PB2.4%	SB0.625% PB2.4%	SB1.25% PB2.4%	SB2.5% PB0.6%	SB2.5% PB1.2%	SB2.5% PB2.4%
Males										
Brain (mg/100g b. w.)	632±37#		665±22	683±39	915±72*	948±65*	1006±71*	687±47	783±95	1217±337*
Liver (g/100g b. w.)	3.32±0.12		4.50±0.12	5.38±0.16	8.25±0.32*	8.54±0.41*	8.78±0.44*	4.78±0.14	5.59±0.36	9.33±0.44*
Heart (mg/100g b. W.)	279±13		285±13	284±9	302±11	308±17	311±14*	293±8	301±14	324±32*
Kidney (mg/100g b. w.)										
left	328±15		367±11$	390±14	470±12*	476±16*	512±71*	399±11	421±16	543±63*
right	320±23		365±11	393±20	453±17*	463±18*	480±25*	387±11	421±21	537±66*
Spleen (mg/100g b. w.)	198±10		209±7	217±13	210±16	199±10	207±8	220±10	220±13	226±30
Lung (mg/100g b. w.)	312±33		309±16	310±13	338±18	354±44	351±29	319±18	322±19	708±90
Testis (mg/100g b. w.)										
left	480±29		522±26	544±28	719±44*	749±45*	771±44*	547±27	597±53	815±96*
right	472±31		506±22	530±33	704±45*	729±42*	734±32*	532±38	570±41	791±99*
Prostate (mg/100g b. w.)	96±14		90±19	78±15	63±18	57±16*	41±13*	86±17	73±21	33±16*
Adrenal (mg/100g b. w.)										
left	6.6±0.8		8.0±0.6	8.7±0.6	12.6±1.9*	13.5±2.0*	14.0±2.0*	9.0±1.7	9.4±1.9	16.1±4.2*
right	6.1±0.6		7.5±0.7	8.2±0.2	11.4±1.6*	12.9±2.7*	12.8±2.0*	7.4±0.6	8.3±2.5	14.6±3.8*
Tymus (mg/100g b. w.)	62.2±3.0		61.5±5.3	55.0±4.9	61.0±9.1	60.8±9.4	66.3±8.1	60.8±6.2	67.7±13.1	58.7±11.0
Females										
Brain (mg/100g b. w.)	1041±31	1202±574	1106±33	1146±118	1265±93	1363±88*	1369±121*	1112±65	1201±65	1700±272*
Liver (g/100g b. w.)	2.99±0.12	3.95±0.28	4.16±0.15	5.28±0.38	7.62±0.72*	7.75±0.26*	8.09±0.50*	4.45±0.21	5.43±0.34	8.97±0.96*@
Heart (mg/100g b. w.)	312±12	390±56	329±11	325±16	319±8	330±16	333±19	318±8	330±9	356±26*
Kidney (mg/100g b. w.)										
left	362±20	516±139	397±19	409±27	443±27	462±30*	479±30*	396±12	420±22	554±83*
right	363±21	510±133	387±17	398±17	435±30	460±18*	469±27*	383±18	415±14	532±81*
Spleen (mg/100g b. w.)	229±8	263±17	225±6	232±10	225±18	215±8	217±12	243±12	237±10	238±27
Lung (mg/100g b. w.)	399±19	490±113	399±22	383±17	412±39	436±52	461±102	394±15	413±49	568±105@
Ovary (mg/100g b. w.)										
left	15.2±2.4	16.9±3.3	16.2±2.4	15.3±3.1	12.8±3.0	11.0±2.9	12.0±2.8	16.7±1.6	15.4±2.5	12.8±3.4
right	16.1±1.6	17.5±1.4	17.5±2.7	16.8±2.7	13.4±3.2	12.2±2.9	11.3±2.1	16.2±3.7	17.2±2.5	11.7±2.2
Uterus (mg/100g b. w.)	254±36	275±110	215±47	162±67	101±49*	85±30*	76±17*	207±51	158±33	71±20*
Adrenal (mg/100g b. w.)										
left	13.1±1.0	18.9±3.0	14.8±1.6	14.9±1.5	15.8±1.5	16.3±1.5	17.6±2.3*	162±2.3	15.9±2.0	20.9±5.5*
right	12.6±1.7	17.1±1.8	13.5±1.9	12.9±0.9	15.1±1.8	14.6±2.2	15.1±2.3	14.2±1.8	14.1±2.1	19.2±5.4
Thymus (mg/100g b. w.)	90.9±9.8	93.6±22.1	93.7±6.9	97.5±10.4	98.5±10.3	93.6±11.5	96.1±9.7	98.3±4.6	100.8±9.3	90.8±15.7

Values are mean±SD for 10 rats of each group except male and female SB2.5% PB2.4% froup where those were calculated from survived 9 rats and female SB2.5% group where those are calculated from survived 4 rats and no means are calculated for male SB2.5% group because of early deathes.

#This value is calculated from 9 rats.

*, $ or @ : differ significantly ($p<0.05$) from those of control, PB2.4% or SB2.5% group, respectively.

Table 4. Haematological changes in male and female F344 rats fed diet containing piperonyl butoxide (PB) alone or in conbination with sodium benzoate (SB) for 13 weeks.

	Control	SB2.5%	PB0.6%	PB1.2%	PB2.4%	SB0.625% PB2.4%	SB1.25% PB2.4%	SB2.5% PB0.6%	SB2.5% PB1.2%	SB2.5% PB2.4%
Males										
RBC ($10^6/\mu l$)	8.44±0.45		8.19±0.28	8.07±0.19	7.66±0.51	7.97±1.34	7.90±0.50	8.08±0.26	7.67±0.14*	8.11±0.34
Hb (g/dl)	15.89±0.49		15.75±0.35	15.29±0.38	14.08±0.59*	14.77±0.45*	14.32±0.49*	15.37±0.42	14.77±0.23*	14.28±0.48*
Ht(%)	40.87±2.28		40.06±1.43	39.70±0.78	37.34±1.67	37.77±6.70	38.19±1.70	39.36±1.41	37.48±1.00	38.92±1.42
MCV (μ^3)	48.4±0.84		48.9±0.88	49.2±0.63	48.8±1.75	47.3±1.06	48.4±1.71	48.7±0.82	48.9±0.74	48.0±1.00
MCH (pg)	18.85±0.70		19.26±0.74	18.96±0.58	18.41±0.87	19.33±5.42	18.15±0.84	19.03±0.67	19.27±0.33	17.62±0.48
MCHC (%)	38.93±1.22		39.35±1.27	38.53±0.96	37.72±0.93	41.10±12.71	37.52±0.82	39.08±1.30	39.43±0.76	36.71±1.02
WBC ($10^3/\mu l$)	4.90±0.92		4.76±1.13	4.78±0.95	3.58±0.73	3.51±1.06	3.71±0.97	4.35±1.34	4.22±1.03	3.91±1.81
Percentages of										
Neutrophilis	16.6±4.4		17.3±6.6	23.7±4.3	20.6±9.0	19.5±4.0	21.1±6.4	22.7±7.8	27.6±9.2	27.1±4.6
Lymphocytes	82.9±4.4		82.0±7.0	75.6±4.3	78.2±9.3	80.0±4.5	77.3±6.7	76.2±8.1	71.2±9.6	71.7±5.1
Monocytes	0.4±0.5		0.3±0.5	0.5±0.7	0.9±0.9	0.4±0.7	0.7±0.7	0.5±1.0	0.4±0.5	0.8±1.0
Eosinocytes	0.7±0.8		0.4±0.7	0.2±0.4	0.3±0.5	0.1±0.3	0.9±0.9	0.6±1.0	0.8±0.8	0.4±0.5
Females										
RBC ($10^6/\mu l$)	8.07±0.36	8.27±0.41	7.77±1.20	7.97±0.40	8.11±0.35	8.07±0.34	8.13±0.29	8.18±0.14	7.94±0.34	8.41±0.54
Hb (g/dl)	16.27±0.25	15.83±0.26	15.88±0.45	15.18±0.47*	14.72±0.49*	14.77±0.58*	14.48±0.46*	15.52±0.38	14.90±0.51*	14.40±0.61*
Ht(%)	41.48±1.96	41.95±1.42	39.21±6.27	40.08±1.66	39.63±1.53	39.29±1.25	39.39±0.98	40.33±0.60	39.23±1.44	40.13±1.82
MCV (μ^3)	51.4±0.97	50.8±0.96	50.4±0.84	50.3±1.06	48.9±1.20*	48.7±1.16*	48.5±0.97*	49.3±0.48*	49.4±0.52*	48.0±1.32*
MCH (pg)	20.21±0.91	19.18±0.83	21.23±5.67	19.09±1.03	18.16±0.54	18.31±1.02	17.85±0.80*	18.98±0.52	18.78±0.73	17.14±0.47*
MCHC (%)	39.28±1.79	37.75±0.90	42.19±11.86	37.91±1.51	37.16±0.72	37.62±1.36	36.76±1.08	38.50±0.74	38.01±1.11	35.74±0.76*
WBC ($10^3/\mu l$)	4.85±1.31	5.00±1.68	4.34±0.78	4.13±0.69	4.04±1.09	3.20±0.55	3.13±0.55	4.48±0.64	5.41±3.68	3.04±0.55
Percentages of										
Neutrophils	15.5±6.9	21.5±12.3	14.6±4.4	16.9±6.8	18.4±8.3	15.3±5.1	15.6±8.5	16.3±3.7	17.7±6.3	15.3±6.4
Lymphocytes	83.5±7.0	75.5±14.9	84.0±4.2	82.1±7.5	80.3±7.9	83.3±5.4	83.3±9.0	83.1±4.0	81.8±6.3	83.6±6.2
Monocytes	0.5±0.7	1.5±1.7	1.0±1.6	0.6±0.8	0.6±1.0	0.8±1.0	0.6±0.8	0.2±0.6	0.3±0.7	0.9±1.2
Eosinocytes	0.5±0.7	1.5±1.3	0.4±0.7	0.3±0.7	0.7±0.9	0.5±0.8	0.5±0.8	0.4±1.0	0.2±0.4	0.2±0.4

Abbreviations : RBC=red blood cell count, Hb=haemoglobin, Ht=haematocrit, MCV=mean corpuscular volume, MCH=mean, corpusclar haemoglobin, MCHC=mean corpuscular haemoglobin concentration and WBC=white blood cell count.

Values are mean±SD for 10 rats of each group except for male and female SB2.5% PB2.4% group where those are calculated from survived 9 rats and female SB2.5% group where those are calculated from survived 4 rats and no means are calculated for male SB2.5% group because of early deathes.

* differ significantly ($p<0.05$) from those of control group.

Table 5. Serum clinical chemistry data of male and female F344 rats fed diet containing piperonyl butoxide (PB) alone or in conbination with sodium benzoate (SB) for 13 weeks.

	Control	SB2.5%	PB0.6%	PB1.2%	PB2.4%	SB0.625% PB2.4%	SB1.25% PB2.4%	SB2.5% PB0.6%	SB2.5% PB1.2%	SB2.5% PB2.4%
Males										
ALB (g/dl)	3.2±0.1		3.4±0.1	3.6±0.2	3.7±0.2*	3.7±0.2*	3.6±0.2	3.4±0.3	3.2±0.3	3.3±0.3
TP (g/dl)	6.3±0.2		6.4±0.2	6.8±0.3	6.9±0.4	7.1±0.3*	6.9±0.3	6.5±0.5	6.3±0.6	6.2±0.5
A/G	1.01±0.03		1.10±0.03	1.11±0.04	1.17±0.05*	1.08±0.06	1.08±0.04	1.05±0.04	1.04±0.04	1.13±0.16
CHO (mg/dl)	60±5		76±7	75±6	116±15*	119±11*	120±12*	63±4	73±4	113±10*
PL (mg/dl)	130±15		128±13	130±11	201±27	220±21*	224±24*	126±9	139±8	215±21
TG (mg/dl)	95±28		19±6*	11±6*	28±13	34±8	36±7	20±4*	19±8*	37±11
BIL (mg/dl)	0.3±0.1		0.3±0.1	0.3±0.1	0.2±0.1*	0.4±0.1$	0.4±0.0$	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.0
GLU (mg/dl)	130±11		118±5	119±9	107±11*	104±7*	109±7*	119±3	113±5	101±8*
UA (mg/dl)	1.0±0.1		1.1±0.1	1.0±0.1	1.2±0.2	1.2±0.3	1.2±0.2	1.0±0.2	1.2±0.2	1.2±0.2
UN (mg/dl)	22.1±1.5		22.4±1.0	23.9±0.9	27.5±1.4*	27.8±1.4*	27.6±1.1*	22.5±1.4	22.7±1.3	27.2±2.1*
CHE (ΔpH)	0.05±0.02		0.07±0.02	0.04±0.01	0.03±0.02	0.03±0.01	0.04±0.02	0.04±0.02	0.04±0.02	0.03±0.01
ALP (IU/l)	579±50		487±40	452±46	663±103	743±73	729±76	475±48	454±52	758±189
GTP (IU/l)	3±1		7±1	8±1	18±4*	21±3*	22±6*	8±1	9±1	23±8*
GOT (IU/l)	162±24		144±22	129±15	146±21	143±25	137±20	134±27	141±20	120±22*
GPT (IU/l)	31±5		23±2*	24±2	31±6	31±7	30±5	28±2	26±2	27±4
O/P	5.24±0.42		6.16±0.74	5.39±0.45	4.78±0.53	4.69±0.89	4.60±0.81	4.81±0.74	5.48±0.72	4.42±0.62
Females										
ALB (g/dl)	3.1±0.1	3.1±0.1	3.6±0.1	3.7±0.2	3.8±0.2*	4.0±0.1*	3.9±0.1*	3.6±0.1	3.6±0.1	3.8±0.2*
TP (g/dl)	6.2±0.2	6.0±0.3	6.8±0.4*	7.0±0.4*	6.9±0.3*	7.1±0.2*	6.9±0.3*	6.6±0.4	6.6±0.2	6.6±0.4
A/G	1.03±0.03	1.10±0.07	0.99±0.35	1.15±0.05	1.21±0.05	1.29±0.06*	1.27±0.08*	1.18±0.05	1.20±0.06	1.36±0.08*
CHO (mg/dl)	80±2	56±6	95±5	114±10	150±13*	146±17*	141±11*	79±8	108±11	140±15*
PL (mg/dl)	154±8	112±11	163±7	182±17	244±19*	252±29*	246±18*	144±14	191±22	250±23*
TG (mg/dl)	67±25	36±11	28±8	19±6*	32±9	33±7	35±7	26±9	23±6*	31±7
BIL(mg/dl)	0.4±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1	0.4±0.0	0.4±0.0	0.5±0.1	0.5±0.1	0.4±0.1	0.4±0.0	0.5±0.1
GLU (mg/dl)	124±3	114±8	122±5	118±5	111±6	107±5*	102±6*	112±7	109±6	98±16*
UA (mg/dl)	1.2±0.2	1.4±0.3	1.2±0.2	1.2±0.2	1.2±0.2	1.1±0.3	1.1±0.2	0.9±0.1	1.0±0.1	1.3±0.3
UN (mg/dl)	21.5±1.2	22.3±1.4	24.4±1.1	25.3±2.1	27.5±2.8	31.4±1.6*	29.5±2.8*	22.6±1.8	24.1±1.2	31.7±1.8*
CHE (ΔpH)	1.01±0.09	0.39±0.15	0.68±0.06	0.36±0.08	0.16±0.03*	0.16±0.02*	0.15±0.03*	0.52±0.07	0.32±0.04	0.11±0.04*
ALP (IU/l)	514±66	676±155	416±31	413±50	591±64	587±56	591±56	418±40	405±50	653±130
GTP (IU/l)	4±1	5±1	10±1	13±2	21±2*	20±2*	20±2*	9±1	13±3	30±9*
GOT (IU/l)	150±20	185±23	141±24	134±16	136±18	126±14	126±21	150±30	131±21	121±17
GPT (IU/l)	28±2	29±4	23±3	23±2	24±3	24±3	25±3	29±4	21±7	23±5
O/P	5.36±0.67	6.34±0.65	6.05±0.59	5.83±0.82	5.80±1.11	5.37±1.08	5.04±0.56	5.23±0.71	6.64±1.96	5.51±1.22

Abbreviations: ALB=albumin, TP=total protein, A/G=albumin-to-globulin ratio, CHO=cholesterol, PL=phospholipids,TG=triglycerides, BIL=billirubin, GLU=glucose, UA=uric acid, UN=urea nitrogen, CHE=cholinesterase, ALP=alkalinephosphatase, GTP=gamma-glutamyltranspeptidase, GOT=glutamic-oxaloacetic transaminase, GPT=glutamic-pyruvic transaminase, O/P=GOT-to-GPT ratio.

Values are mean±SD for 10 rats of each group except for male and female SB2.5% PB2.4% group where those are calculated from survived 9 rats and female SB2.5% group where those are calculated from survived 4 rats and no means are calculated for male SB2.5% group because of early deathes.

* or $ differ significantly ($p<0.05$) from control group or PB2.4% group, respectively.

の雄の RBC は，対照群より有意に低下していた．PB 2.4%群，SB2.5% PB1.2%群，SB2.5% PB2.4%群，SB 0.625% PB2.4%群および SB1.25% PB2.4%群の雌雄と PB1.2%群の雌の Hb は，対照群より有意に低下していた．雌ではさらに，PB2.4%群，SB2.5% PB0.6%群，SB2.5% PB1.2%群，SB2.5% PB2.4%群，SB0.625% PB2.4% 群および SB1.25% PB2.4% 群の MCV，SB 2.5% PB2.4%群と SB1.25% PB2.4%群の MCH，SB 2.5% PB2.4%群の MCHC が対照群より有意に低下していた．雌雄の WBC 及び白血球像には有意な変化はみられなかった．

血清生化学的検索　両化合物の摂取に伴い，血清生化学的変化が雌雄に見られた(表５)．雄では，PB2.4%群，SB0.625% PB2.4%群，SB1.25% PB2.4%群および SB 2.5% PB2.4%群，すなわち PB2.4%摂取群で CHO，UN，GTP 値の有意な上昇と GLU 値の有意な減少が見られた．また，PB2.4%群と SB0.625% PB2.4%群の ALB 値，SB0.625% PB2.4%群の TP 値，PB2.4%群の A/G 値，SB0.625% PB2.4%群と SB1.25% PB2.4%群の PS 値の有意な増加，PB0.6%群，PB1.2%群，SB 2.5% PB0.6%群，SB2.5% PB1.2%群の TG 値と PB 2.4%群の BIL 値，SB2.5% PB2.4%群の GOT 値，PB 0.6%群の GPT 値の有意な低下が見られた．雌では，PB2.4%群，SB0.625% PB2.4%群，SB1.25% PB2.4% 群および SB2.5% PB2.4%群で，ALB，CHO，PL，GTP 値の上昇と CHE 値の低下が，SB0.625% PB2.4%群，SB1.25% PB2.4%群，SB2.5% PB2.4%群の A/G，UN 値の上昇と GLU 値の低下，PB0.6%群，PB2.4%群，SB0.625% PB2.4%群，SB1.25% PB2.4%群の TP 値の上昇，PB1.2%群と SB2.5% PB1.2%群の TG 値の低下が有意に見られた．

考　　察

安息香酸ナトリウムの亜急性毒性の症状として，けいれんの発現がすでに認められていたが，いずれの報告においても本試験におけるより高い投与量においてであった[3)12)]．本試験でけいれんの発現および高い死亡率が見られた食餌中の濃度，2.5%安息香酸ナトリウムは2.1% 安息香酸に相当し，これは食品添加物としての最大許容量2.5g/kg(0.25%)の8.4倍である．しかしながら，SB 2.5%群において顕著に見られた過敏，けいれんなどの症状は，SB2.5% PB0.6%群，SB2.5% PB1.2%群，SB 2.5% PB2.5% PB2.4%群，すなわち安息香酸ナトリウム2.5%に加えてピペロニルブトキシドを含む餌を食した群にはまったく見られず，死亡率も，SB2.5%群の雄 100%雌60%にくらべて，SB2.5% PB2.4%群で雄雌とも10%が見られたにすぎない．摂餌量とそれから算出した安息香酸ナトリウムの摂取量は，雄雌とも，SB2.5% 群に比べて SB2.5% PB0.6%群，SB2.5% PB1.2%群，SB2.5% PB2.4%群が低くなる傾向はあるが，有意差は雄の SB2.5% PB2.4%群の11日目にみられるだけである．ピペロニルブトキシドは，薬物代謝酵素にさまざまな影響力を有し[6)7)]，また，抗けいれん作用もあるが[13)]，今回の試験結果からはピペロニルブトキシドによる安息香酸ナトリウムの毒性の軽減の機序はあきらかではない．

上に述べたように，安息香酸ナトリウムによるけいれん・死亡はピペロニルブトキシドの併用により軽減されているが，逆に，ピペロニルブトキシドによる体重増加抑制・臓器重量低下などには安息香酸ナトリウムは相乗的に作用している．

両化合物の投与によってみられるさまざまな臓器の実重量の低下と相対重量の増加は，おもに体重増加抑制つまり動物全体の発育の抑制を反映していると思われる．しかし，肝は PB2.4%を含む餌を食した群を中心に重量・相対重量とも顕著な増加がみられた．

血清生化学検査では，PB2.4%あるいは1.2%を含む餌を食した群で，血清蛋白(ALB，TP，A/G)，脂質(CHO，PL，TG)，GLU，酵素活性(CHE，GTP，GOT，GPT)の変動がみられ，ピペロニルブトキシドの肝毒性が示唆された．また，PB2.4%を含む餌を食した群の UN の上昇から，ピペロニルブトキシドの腎毒性も示された．

ピペロニルブトキシドの亜急性投与による肝毒性は，すでに前川らが，発ガン性試験の報告に併せて，食餌中0.25%以上ピペロニルブトキシドを13週間投与した F344ラット雄雌の肝重量の有意な増加と病理学的検索を簡略に報告している[9)]．今回の試験では，肝重量の有意な増加は PB2.4%を含む餌を食した群にのみ見られたが，血清生化学検査では低濃度の群にも肝障害が示唆され，おおよそ前川らの報告と同じ結果であったとおもわれる．ピペロニルブトキシドの一日許容摂取量(ADI)は 0.03mg/kg 体重である．これは，体重60kg の大人では 1.8mg/日，体重20kg の子供では0.6mg/日，体重12kg の幼児では0.36mg/日にあたる．この ADI をこえないで，たとえば食品添加物としての許容量の半分0.012g/kg 食品の濃度でピペロニルブトキシドを含む穀類を，体重 60kg の大人で150g，体重20kg の子供で50g，体重12kg の幼児30g まで，一日に食することができる．実際の食品中のピペロニルブトキシド濃度についての報告は少な

いが，検出された場合には許容量をはるかにしたまわる濃度であった[14]．また，小麦・ライ麦では，ピペロニルブトキシドはおもに玄麦の外皮に多く含まれていた[15]．これは，籾付きや玄麦(あるいは玄米)の状態での貯蔵段階でこの薬剤が使用されることが多いためと，この薬剤の脂溶性の高さのためとおもわれる．このような米・麦からは精白によって，ピペロニルブトキシドが糠とともに除去されうる．今回の試験で，ラットの肝，腎に影響の認められた食餌中の濃度2.4%は，食品中の許容量0.024g/kg(0.0024%)の1000倍である．

結　論

安息香酸ナトリウムは食餌中2.5%の濃度で，F344ラット雄雌に亜急性にけいれん・死亡をひきおこし，この作用は食餌中ピペロニルブトキシド0.6%から2.4%の併用投与により緩和された．ピペロニルブトキシドは13週間の投与で，食餌中の2.4%の濃度でラットの肝臓と腎臓に影響を与えることが示唆された．

文　献

1) Dauel H. J. Jr., Alfin-Slater R., Well C. S., and Smith H. F. Jr.: *Food Research*, **19**, 1-12, 1954.
2) Sodemoto Y., Enomoto M.: *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, **4**, 87-95, 1980.
3) Fanelli G. M., Halliday S. L.: *Arch. int. Pharmacodyn.*, **144**, 120-125, 1963.
4) Bridges J. W., French M. R., Smith R. L. and Williams R. T.: *Biochem. J.*, **118**, 47-51, 1970.
5) Sarles M. P., Dove W. E. and Moore D. H.: *American J. of Tropical Medicine*, **29**, 151-167, 1949.
6) Kyle M. E. and Kocsis J. J.: *Toxicology and Applied Pharmacology*, **84**, 241-249. 1986.
7) James R. C. and Harbison R. D.: *Biochemical Pharmacology*, **31**, 1829-1835, 1982.
8) Goldstein J. A., Hickman P. and Kimbrough R. D.: *Toxicology and Applied Pharmacology*, **26**, 444-458, 1973.
9) Maekawa A., Onodera H., Furuta K., Tanigawa H., Ogiu T. and Hayashi Y.: *Food and Chemical Toxicology*, **23**, 675-682, 1985.
10) Friedman M. A. and Epstein S. S.: *Toxicology and Applied Pharmacology*, **17**, 810-812, 1970.
11) Fishbein L. and Gaibel Z. L. F.: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **5**, 546-552, 1971.
12) Onodera H., Ogiu T., Matsuoka C., Yoshida K., Takeuchi M., Oono Y., Kubota T., Miyahara M., Maekawa A., Odashima S.: *Bulletin of National Institute of Hygienic Sciences*, **96**, 47-55, 1978.
13) Ater S. B., Swinyard E. A., Tolman K. G. and Franklin M. R.: *Epilepsia*, **25**, 551-555, 1984.
14) Isshiki K., Tsumura S. and Watanabe T.: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **19**, 518-523, 1978.
15) Breyer D.: *Getride Mehl und Brot*, **29**, 153-157, 1975.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 296-303, 1991

トリチウム水中に生成される過酸化水素の定量

金西信次*, 金城康人**, 渡部　真**

Assay of Hydrogen Peroxide Produced in Tritiated Water

NOBUJI KANANISHI*, YASUHITO KINJO** and MAKOTO WATANABE**

Keywords：トリチウム水 tritiated water，過酸化水素 hydrogen peroxide，G値 G-value，化学発光 chemi-luminescence

緒　言

高等動物細胞の細胞核の基本構造をなすクロマチン基本繊維の内部に，トリチウム水(HTO)がどの様に侵入し，どの様に取り込まれて，どの程度留保され，DNAないしはクロマチン高次構造に，どの様な損傷をどれだけ与えるかを明らかにすることを目的として，我々は増殖中の哺乳動物培養細胞(マウス白血病リンパ細胞L5178Y)における，HTO処理によるDNA単鎖切断をアルカリ溶出法で調べ，^{3}H-β線のRBE(生物効果比)を求めた．その反復実験中に，急激なDNA溶出が起こる例がみられた．この事実から，HTO中に混入する長寿命照射生成物H_2O_2が原因であろうと推定し，H_2O_2が確かに混入することを明らかにした[1]．我々の研究室に約4年間保管した3.7×10^{7}Bq(1 mCi)/gのHTOを，$TiCl_4$−4(2pyridylazo)resorcinolにより定量したところ，46 μMのH_2O_2が存在した[2]．

一方，^{3}H-β線のRBEを求めるには，吸収線量の算出法の違いを知っておくことが重要である．即ち標準放射線と^{3}H-β線との間の線量測定法の違いが問題となる．現在，我々は標準放射線として，^{60}Coのγ線を用い，照射線量を測定し，計算により吸収線量として使用している．また^{3}H-β線については，線源がほとんどHTOであることから，^{3}Hの崩壊数より計算して吸収線量としており，このことは一般的にも行われている方法である．このように吸収線量の求め方がγ線と^{3}H-β線とで異なっているにもかかわらず，その計算値によるRBEを問題にすることには大きな疑問が残る．可能な限り近似した方法で吸収線量を測定し，これらの計算による方法との関連を求めておく必要があるものと思われる．そこで我々は，標準放射線であるX線あるいは^{60}Co-γ線と^{3}H-β線が共にH_2O_2を生成するので，H_2O_2を定量することによって共通の方法による吸収線量を測定することが可能であると考えた．

また放射線化学において，線質の違いにより照射生成物の収率が異なることが知られている．標準放射線に比べ，^{3}H-β線により生ずるH_2O_2，DNA単鎖切断，二重鎖切断の各々のG値が，γ線のそれより大きいと言う報告もある[3]．このことが^{3}H-β線のRBEが1でないことの理由の一つであるかも知れない．またHTO中での^{3}H-β線によるH_2O_2生成のG値(100eVのエネルギー付与による生成分子数)が正確に測定されていないことも問題であり，^{3}H-β線によるH_2O_2のG値が正確に測定されねばならない．

これらのことを解決するために，新しい測定法を開発する事を試みた．すなわち電離放射線を照射した水の中にH_2O_2が生成されるが，このH_2O_2量は極めて微量であり，この微量のH_2O_2を定量できるかどうかが重要となってくる．我々はluminol-peroxidaseとH_2O_2との反応の結果発光するchemiluminescenceを，液体シンチレーションカウンターで測定することによるH_2O_2の微量定量法を確立した．この方法を用いて，^{60}Co-γ線および^{3}H-β線により生成されるH_2O_2を定量した結果を報告する．

方　法

標準過酸化水素の定量：過酸化水素(H_2O_2，関東化学)は0.005％硫酸(H_2SO_4)で希釈し，0.1N過マンガン

＊東京都立衛生研究所毒性部　169 東京都新宿区百人町3−24−1

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

＊＊東京都立アイソトープ総合研究所

酸カリウム溶液で滴定した[4].

過酸化水素の微量定量法：微量の H_2O_2 を定量するために，清浄なガラス器具と，精製された水が溶媒として必要である．ガラス器具はクロム硫酸混液に浸し，水洗乾燥し，二週間以内に使用した．水は蒸留水を更に非沸騰蒸留[5]して用いた．保存溶液として，0.1M 燐酸緩衝液 pH 8.04(P. B. と略す)，並びに0.1M 炭酸ナトリウムに溶解した 1 mM luminol(半井化学)を冷蔵庫中に保存し，P. B. に溶解した3.6U/ml peroxidase(Sigma)を小分けして冷凍保存した．P. B.: luminol: peroxidase を18：1：1の割合で混合，冷蔵庫で一夜遮光保存した．室温(約25°C)に戻した混合液 2 ml をミニバイアルにとり，遮光した液体シンチレーションカウンター(Beckman LS-230)にセットし，0.1ml の試料溶液を注入し，パスツールピペットで空気を吹き込むことによってすばやく攪拌，直ちに測定を開始した．測定時間は1分とした．試料溶液は0.005% H_2SO_4 水溶液に溶かした H_2O_2 液，あるいは照射した0.005% H_2SO_4 水溶液を用いた．

照射：0.005% H_2SO_4 水溶液 1 ml をパイレックス・ネジ口試験管にいれ，東京都立アイソトープ総合研究所ガンマルームの ^{60}Co-γ 線を照射，あるいは径 3 cm のガラスシャーレに0.005% H_2SO_4 水溶液 1 ml をとり，Softex 社の軟X線(50kVp, 3 mA)を上部から照射した．照射線量は共に Victoreen 社，660型デジタル線量計で測定した．精製したトリチウム水(HTO)に最終濃度0.005%になるように硫酸を加え，パイレックス試験管中で静置保管することで ^3H-β 線を照射した．いずれの場合も空気存在下，室温で照射した．

HTO の非沸騰蒸留による精製：HTO(NEN, 3.7×10^7Bq/ml)は貯蔵中にその β 線の照射結果として H_2O_2 を生成・蓄積する．既に含有している H_2O_2 を除去するため，2 ml の HTO に最終濃度100U/ml の catalase を添加し，10分間室温で保持した．作成したパイレックスガラス製の微量非沸騰蒸留装置に移し，アルミブロックで 98°C に加熱，蒸留した．蒸留後，HTO は重量を測定，最終濃度0.005%になるように硫酸を加えた．また一部を分取し，液体シンチレーションカウンター(Beckman LS-3801)で放射能を測定した．Aquasol 2(Beckman)

結果と考察

微量 H_2O_2 定量法の確立 H_2O_2 は peroxidase の触媒のもとに luminol を酸化し，424nm の光を発光する．この化学発光を測定することによって極めて微量の H_2O_2 を測定することができる[6]．luminol-peroxidase による H_2O_2 測定については chemiluminescence-counter 等を用いて測定することが一般的である．我々は放射性同位元素を使用すると共に，より高感度の測定をするために液体シンチレーションカウンターで測定した[7]．また我々は HTO 中の H_2O_2 を測定することが目的であるため，即ち放射性物質に対する安全性，実験室における放射性同位元素の使用限度，ならびに放射性廃棄物をできるだけ少なくする等の理由によって，測定試料の量を可能な限り少なくする必要がある．そこで化学発光の測定に luminol と peroxidase の混液に H_2O_2 等の試料を添加し，液体シンチレーションカウンターにより測定するという実験手順を確立しておく必要がある．測定のためにミニバイアルに luminol-peroxidase 混液 2 ml を入れ，液体シンチレーションカウンターの検出器の上部にセットし，0.1ml の試料溶液を注入，攪拌，直ちに計測ボタンを押した．ミニバイアルは検出部に下降し，試料注入約20秒後に測定を開始した．図1は H_2O_2 の注入後の時間の経過における化学発光を調べたもので，注入後短時間で発光し，注入から測定までの時間が重要な測定要因となることが分かった．しかし同一手順で行う限り，測定値の誤差は5%以内であった．発光はその後最大値を示し，そして減少した．この発光と経過時間によって示される曲線は H_2O_2，peroxidase, luminol の相対的な量に依存す

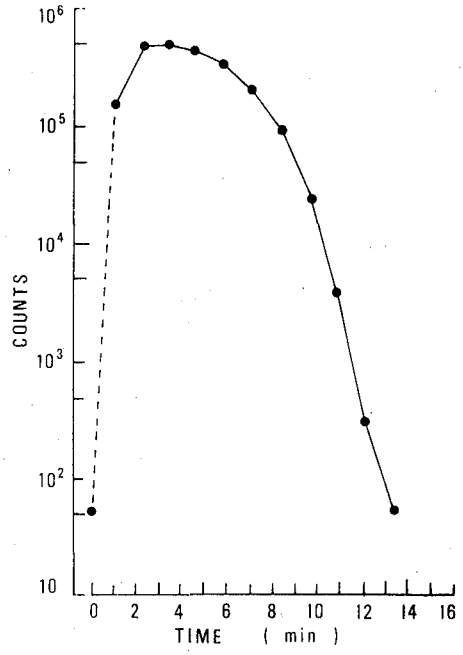


図1．H_2O_2, luminol, peroxidase による化学発光の液体シンチレーションカウンターによる測定

るが，図1は1 μgの比較的多量の H_2O_2 を測定した場合で，2分後に最大発光を示した．我々が測定しようとする微量の H_2O_2 の場合は最初の1分間でほとんどの発光を終了した．それ故我々ははじめの1分間の測定値を H_2O_2 測定のための発光量とした．

図2は1 ngの H_2O_2 を測定したときで，luminol, peroxidase 共に最大発光量を示す至適濃度があることが分かった．至適濃度は luminol 50 μM, peroxidase 0.18U/2ml であった．

peroxidase が作用する至適 pH は中性付近であり，溶媒として pH 8.04燐酸緩衝液を用いた．

H_2O_2 はアルカリ性で不安定で分解するが，酸性で安定であるとされている[8]．図3に H_2O_2 の種々の溶媒と発光量について調べた結果を示した．この実験から H_2O_2 の溶媒として0.005% H_2SO_4 が最適であると考えた．

luminol, peroxidase 混液は混合直後はブランクの値が大きいが，遮光し，冷蔵庫に保管することによってブランク値は小さくなった．また長期間保管すると peroxidase の活性の低下のためと考えられるが，H_2O_2 の測定値は徐々に減少した．そこで我々は混合後16～24時間の混合液を使用した．

H_2O_2 の検量線　化学発光を液体シンチレーションカウンターで測定するために，同時計数回路を遮断することが計数効率の上から一般的であるが[7]，我々はブランクの計数を少なくするため，同時計数回路を設定したままで測定した．図4に示すように H_2O_2 の量と液体シンチレーションカウンターのカウント数との間には相関がある．この測定系では10pg(100pg/ml, 0.1ml)の H_2O_2 を測定することが可能であった．理論的には，この方法によりピコモル量の H_2O_2 を定量することができる[6]．これは 2.58×10^{-4} C/kg(1 R)オーダーの照射の結果生成する H_2O_2 を測定し得ることになる[9]．

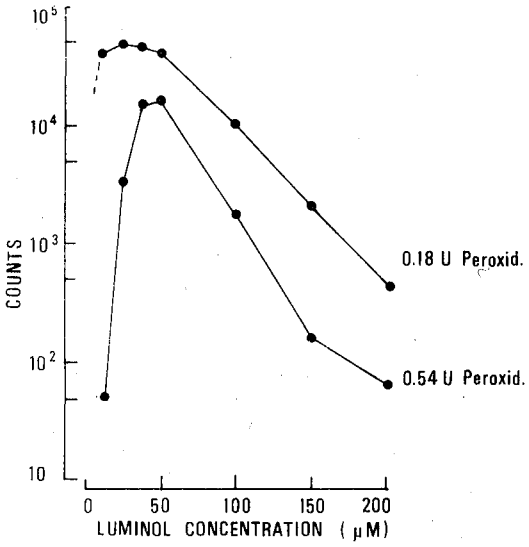


図2．化学発光の luminol, peroxidase 濃度依存性

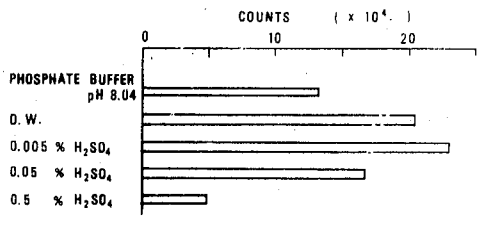


図3．H_2O_2 の種々の溶媒と発光量

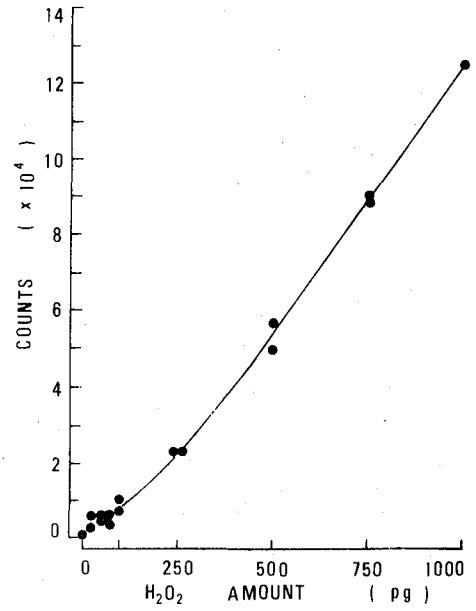


図4．化学発光による H_2O_2 の検量線

^{60}Co-γ線照射による H_2O_2 生成量と照射線量との関係　試料溶液を ^{60}Co-γ線で照射した．照射時間は1時間の短時間照射で，線源からの距離により図5に示す照射線量を照射した．照射後試料溶液を luminol-peroxidase 法により測定したところ，図5に示すように照射線量とカウント数との間には直線的な相関関係(最小自乗法，$r=0.98$)があった．図5では高線量で飽和しているが，適宜希釈すると直線関係が得られた．即ちデーターは示さないが Softex による軟X線照射において，

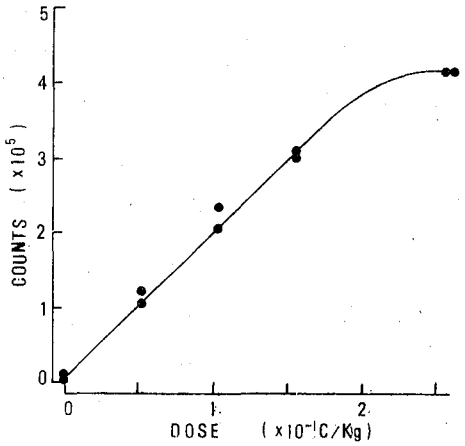


図5．^{60}Co-γ線照射によるH_2O_2生成量と照射線量との関係

広い範囲(2.58×10^{-3}～5.16×10^{-1}C/kg，10～2000R)での線量ーカウント数の直線的相関関係を得た．

照射した試料溶液をluminol-peroxidaseにより発光を測定し得ることから，われわれは照射された試料溶液の中にH_2O_2が生成され，そのH_2O_2を検出していると推定した．Mayneord等はX線照射によって生成されたH_2O_2の収量をluminolとの化学発光によって液体シンチレーションカウンターを用いて測定し，6.45×10^{-2}～3.10×10^{-1} C/kg(250～1200R)のオーダーの線量測定が可能であると報告している[10]．また，Yamamoto等はbioluminescence-readerを用いて^{60}Co-γ線，^{3}H-β線によるH_2O_2生成量を測定している[11]．

H_2O_2生成量に関する線量率の影響について　照射によって生成したH_2O_2が追加照射等によって分解し，或いは相乗的にH_2O_2が生成する可能性があり，これらについて明らかにする一つの方法として，照射によるH_2O_2生成量の線量率効果を調べた．softexによる照射において，管球からの距離により線量率を変えた．図6に示すように線量率が5.16×10^{-2}～3.35×10^{-1} C/kg (200～1300 R)/minの間の照射で，線量率によるH_2O_2生成量に差はなかった．

分割照射によるH_2O_2生成量の変動　X線照射によるH_2O_2生成量の一層低い線量率での効果を調べる必要があるが，softexでは困難である．代替方法として分割照射を行った．図7の白丸は半分の線量を照射したときのH_2O_2生成量であり，H_2O_2生成量は2分の1であった．0～6時間までの分割照射によるH_2O_2生成量に変動はなかった．

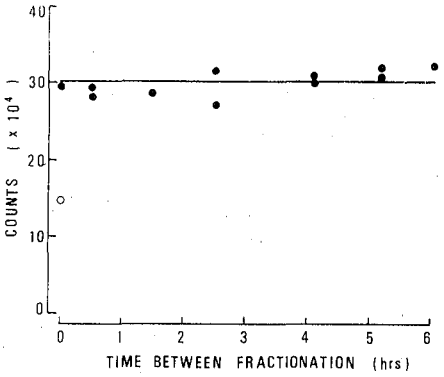


図7．分割照射によるH_2O_2生成量の変動，Softex軟X線照射

生成したH_2O_2量の分解等による変動　X線照射後室温で静置し，経時的にH_2O_2に相当するcount数を測定したところ，照射時に計測されたcount数は照射後6時間までは変動はしなかった(図8)．生成したH_2O_2の量

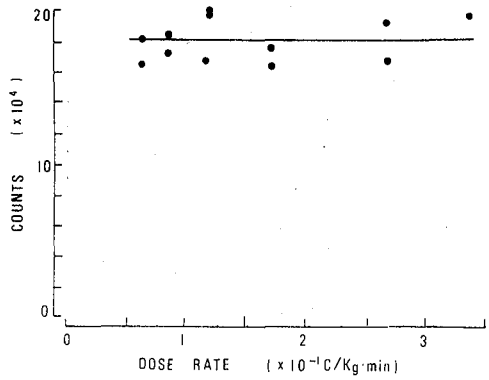


図6．線量率によるH_2O_2生成量，Softex軟X線照射

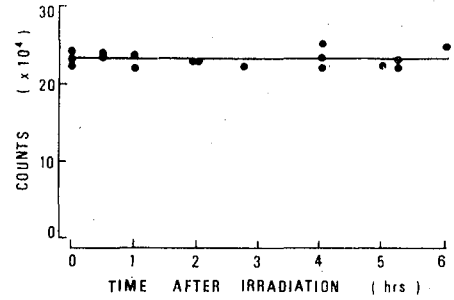


図8．生成したH_2O_2量の分解等による変動，Softex軟X線照射

は，照射後3－360分の間には分解等により減少することはなかった．

図6，7，8の実験からH_2O_2の生成は線量率によらない．また6時間までは分解等による現象はないと結論した．次にブランクの実験として，蒸留水の保存における luminol-peroxidase によって発光するH_2O_2様物質の変動を調べるべく実験を行った．

HTOを含まない蒸留水におけるH_2O_2様物質の生成・分解　我々が作製した非沸騰微量蒸留装置は1 mlのHTOの蒸留に約2時間かかり，この蒸留の間に生成するH_2O_2量を正確に把握するのは困難である．そこで蒸留後，この蒸留時間を無視しうるだけの期間，貯蔵して置くべきであると考えた．我々は初めその貯蔵期間を3日ないし10日と考えた．図8の実験で調べたように，6時間までは分解されないことを確認しているが，より長い時間保存しておく必要がある．それ故，微量のH_2O_2を貯蔵して置き，分解されるか否かを，さらに確認しておく必要がある．その対照実験として，HTOを含まない試料水(0.005% H_2SO_4を含む)を貯蔵して置き，H_2O_2としての液体シンチレーションカウンターの測定値(ブランク)を調べたところ，時間経過とともにブランクの値が変動することが分かった．図9にその結果を示した．蒸留直後では200～300カウントであるが，数日後には1000～5000カウントとなる．またその測定値は経過時間とともに大きくなると同時に，実験毎に大きく変動した．即ちH_2O_2様の物質が生成し，或いは分解しているものと考えられる．試験管内を窒素ガスで置換してもH_2O_2様の物質は同様に生成された．この結果より，長時間の貯蔵は実験データーの変動となり正確なG値の評価が不可能となると考えられる．我々は24時間程度ならば，容認できる範囲にあると判断した．

luminol-peroxidase系への放射線の直接照射による発光　luminol-peroxidaseによるHTO中のH_2O_2を測定する際，蓄積されたH_2O_2のみならず，^3Hの崩壊に伴うβ線の照射に基づく発光が起こり，H_2O_2の発光に加算される可能性がある．Yamamotoらは高濃度のHTOにより発光すると報告している[11,12]．もしH_2O_2の発光に^3H-β線による発光が加算されるならば，H_2O_2の発光の際peroxidaseによってH_2O_2は分解されるので，20～30分後再度測定すれば，^3H-β線による発光のみが測定されるであろうから，その測定値を差し引けばH_2O_2の値が算出されると考えた．まずluminol-peroxidase系で放射線発光が起こるかどうかを確かめるために，我々は図10に示すように，well型γ線シンチレーションカウンターと類似した構造を持たせたluminol-peroxidase溶液の中に^{137}Csの密封線源をセットし，外部からの放射線によるluminol-peroxidaseの発光を測定した．表1にその結果を示した．液体シンチレーションカウンターは測定するエネルギーにより，^3H領域，small^{14}C領域，$>^{14}C$領域，ならびに全エネルギー領域を測定できる．比較のため一つは液体シンチレーターであるAquasol 2を用いて測定した．Aquasol 2による^{137}Csの放射線測定は，それぞれのエネルギー領域にわたり計測され，全体として3,740カウント計測された．luminolのみの溶液でも計測され，ほとんどが^3H領域であり，$>^{14}C$領域に少しカウントされたが，全領域でのカウント数は少なく，大きなバックグランドを示した．luminol-peroxidase溶液では^3H領域のみで計測された．^{137}Csの放射線はAquasol 2によって測定したとき，全エネルギー領域にわたり計測されたが，luminol-peroxidase溶液では^3H領域のみで計測されたということは，luminol-peroxidase溶液ではH_2O_2等の照射生成物による発光を測定していると推定される．そしてAquasol 2の計測値の24%を測

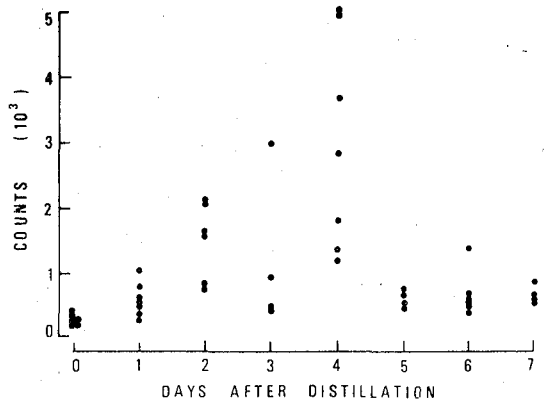


図9．HTOを含まない蒸留水におけるH_2O_2様物質の生成，分解

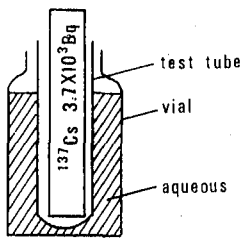


図10．luminol, peroxidase系への放射線の直接照射による発光

表1. luminol, peroxidase 系への ^{137}Cs-γ線の直接照射による発光(cpm)

	B. G.	^{3}H 領域	small ^{14}C 領域	^{14}C 領域	全領域	%
Aquasol 2	170	1279	1505	966	3740	
luminol	3481	480	-	34	514	12.6
luminol +peroxidase	253	909	-	-	905	24.2

定することが可能であった．一方HTOをAquasol 2と混合したときの計測効率は30%以上であるが，3.7×10^{5} Bq(10 μCi, 2.22×10^{7} dpm)のHTOはluminol-peroxidase溶液に混合したときには全く測定できなかった．

高濃度のHTOあるいは^{137}Csの放射線はluminol-peroxidase溶液で発光を測定できるが，低濃度のHTOで測定できないということは，低濃度HTOには発光を測定し得るほど大きなH_2O_2のclusterが生成されないためと考えられる．

HTOの蒸留 HTO中に生成される微量のH_2O_2量を定量するために，HTO中に既に生成され，混合しているH_2O_2を除去しなければならない．H_2O_2を除去するにはcatalaseやperoxidaseを加えて分解し，フィルターで濾過する方法がある[13]．しかし^{3}H-β線の照射により生成される微量のH_2O_2は，この様な方法では，除去し得ない不純物によって変動する可能性がある．そこで我々はH_2O_2量を定量するために，微量蒸留装置を作製して，非沸騰蒸留法によってHTOを蒸留精製した．なお蒸留に先立ってcatalase処理をした．1時間で約0.5mlのHTOを蒸留した．対照実験として30mMの濃度のH_2O_2に同様にcatalaseを添加，蒸留し，H_2O_2を測定したが，H_2O_2は検出できなかった．この実験からcatalaseを添加・蒸留した直後のHTOには検出できる量のH_2O_2は存在しないと考えた．蒸留したHTOは室温で保管し，^{3}H-β線照射によって生成・蓄積されたH_2O_2を定量した．

^{60}Co-γ線照射及びHTOの貯蔵によるH_2O_2生成量について H_2O_2測定の結果は表2に示した．HTOについては2回の実験を行った．HTO中の^{3}Hの比放射能は2.00×10^{7}Bq(0.54mCi)/ml, 1.89×10^{7}Bq(0.51mCi)/mlであった．それぞれ1.81Gy, 1.65Gyの線量を照射したことになり，生成したH_2O_2は6.84ng/ml, 7.74ng/ml, これらのデーターにより^{3}H-β線によるH_2O_2のG値は1.02, 1.31, 平均G値は1.16と計算された．

^{60}Co-β線照射に関しては，線量率，線量を^{3}H-β線照射と同じ条件で照射することが必要である．我々は可能な限り近似した条件で照射した．表に示した各実験について3本の試験管を用いて照射した．H_2O_2量はその測定値の平均である．これらのデーターにより^{60}Co-γ線によるH_2O_2のG値は0.439, 0.492, 0.460, 0.468, 平均G値は0.465と計算された．図5のデーターを表のexp 7に示した．急照射の時のG値は1.02であった．図11には横軸に吸収線量，縦軸に生成されたH_2O_2の量を示した．黒丸は^{60}Co-γ線の場合で，おおよそ24時間照射したものである．短時間照射の時とは異なって，H_2O_2生成量が変動している．HTOのβ線照射によるH_2O_2の生成量は白丸で示した．^{60}Co-γ線の場合よりもH_2O_2の生成量は多い．

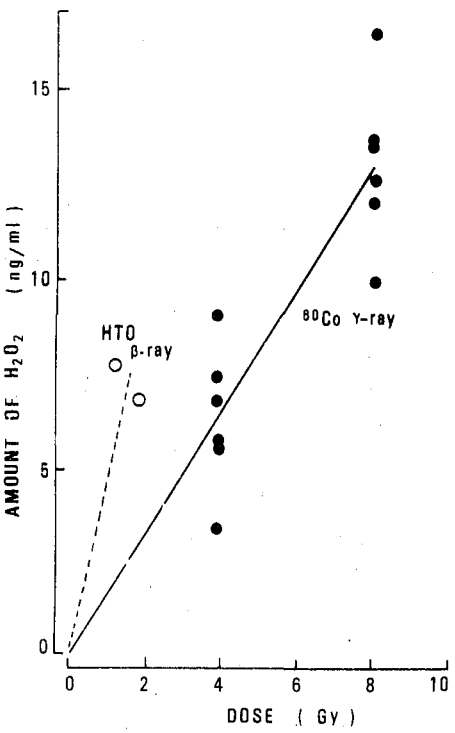


図11. 低線量率^{60}Co-γ線照射およびHTO貯蔵によるH_2O_2生成量

表2．^{60}Co γ線照射およびHTO貯蔵によるによるH_2O_2生成量およびG値

	HTO		^{60}Co γ-ray				
	exp1	exp2	exp3	exp4	exp5	exp6	exp7
放射能(×10^7Bq)	2.00	1.89					
線量率(Gy/hr)	0.065	0.061	0.175	0.175	0.36	0.36	2.98
照射時間(hr)	28	27	23.9	23.5	23.9	23.5	0.625
照射線量(Gy)	1.81	1.65	3.89	3.82	8.02	7.87	1.86
H_2O_2生成量(ng/ml)	6.84	7.74	6.02	6.62	13.0	13.0	6.70
G値	1.02	1.31	0.439	0.492	0.460	0.468	1.02
平均G値	1.16		0.465				1.02

表3．X線・γ線ならびに^{3}H-β線のG値

X線γ線	^{3}H-β線
0.70[14]	
100kV 1.65[10]	
140kvp 1.83[10]	
1.2MeV 1.50[10]	
X線 2.30[10]	
X線 1.05[10]	
1.2MeV 1.8[18]	
200kV 2.2[18]	
^{60}Co 1.6[18]	
^{60}Co 2.0[18]	
^{60}Co 0.44[19]	0.51[19]
γ線 0.71[20]	
γ線 0.80[20]	1.0[20]
γ線 0.68[16]	0.97[16]

X線，γ線によるH_2O_2のG値は一般に0.7とされているが[14]，表3に示すようないくつかの値が報告されている．H_2O_2のG値はLET(線エネルギー付与)と共に水に溶存する酸素の量ならびにpHに影響される[15]．我々はH_2O_2が生成し易い条件，即ち比較的少ない照射線量で，H_2O_2生成に十分な量の酸素を溶存させ，かつ酸性溶液で測定した．その結果我々が得たγ線急照射によるH_2O_2生成のG値は文献値に近似していると考えられる．緩照射の場合，測定値の変動が大きいと同時に，G値が低いのは長時間の照射のため分解等によるものと考えられる．線量率の極端な差はG値を変動させる可能性がある．生成したH_2O_2が分解されることについては既に示唆されている[15]．

Spinksは^{60}Co-γ線のG値は0.68，^{3}H-β線は0.97と報告しており[16]，その比は1.43である．我々もγ線に較べ^{3}H-β線のG値が大きい点で同様な傾向がみられた．すなわち^{3}H-β線によるH_2O_2のG値は1.16でほぼ同様な条件で照射したγ線の2.49倍であった．γ線の様な低LET放射線と異なり，LETの高い放射線では，水のラジカルの濃度が局所的に非常に高くなるため，ラジカル生成物の再結合，即ちH_2，H_2O，H_2O_2の生成が起こり易くなると考えられている[17]．^{3}H-β線はやや高いLET放射線であるとされている[12]．我々のデーターに関して^{60}Co-γ線の場合よりもHTOのβ線照射によるH_2O_2の生成量が多いという点は上記の理由によると考えられる．

初めに述べた^{60}Co-γ線と^{3}H-β線の吸収線量に関して，我々は共通の測定法として，照射した水のH_2O_2の生成量を測定したが，^{60}Co-γ線と^{3}H-β線でH_2O_2の生成量が異なっていた．H_2O_2の生成量から直接吸収線量を算出することはできない．しかしそれぞれのG値が正確に測定されれば，そのG値に基づいてH_2O_2の生成量を吸収線量に換算することは可能であり，さらに照射線量ならびに崩壊量の測定結果から計算により吸収線量に置き換えることも妥当であると考えられる．

結　論

(1) chemiluminescenceによるH_2O_2の測定法を確立した．

(2) 短時間照射により次の結果を得た：1)水を^{60}Co-γ線，Softex-X線で照射し，生成されたH_2O_2を測定したところ，生成量と照射線量との間には直線的な関係があった．2)Softex-X線による照射では，200-1300 R/minの線量率によるH_2O_2生成量に差はなかった．6時間までの分割照射を行ったが，H_2O_2生成量に変動はなかった．3)Softex-X線照射後室温で保存したが，生成したH_2O_2量は，照射後3－360分の間に分解等による変動はなかった．しかし一層長時間の保管では変動し

た.

(3) 非沸騰蒸留によりHTOを蒸留，貯蔵(0.53mCi/ml, 28hr, 1.73Gy)した後，H_2O_2生成量を測定したところ，7.29ng/mlのH_2O_2が生成され，G値は1.16であった．ほぼ同じ条件で照射した^{60}Co-γ線では，G値は0.465であった．一方短時間照射の^{60}Co-γ線では，G値は1.02であった．

文　献

1) 金西信次，金城康人，渡部　真，代谷次夫，田中信徳，東京衛研年報，**34**，399-405，1983
2) 金西信次，金城康人，渡部　真，田中信徳，日本放射線影響学会第26回大会，1983
3) Yamamoto, O., I. Fuji, M. Ogawa, *Biochem. Internat.*, **11**, 217-223, 1985
4) 厚生省，食品添加物公定書，180
5) 室住正世，中村精次，ファルマシア，**18**，1156-1159，1982
6) Schroeder, H. R., F. M. Yeager, *Anal. Chem.*, **50**, 1114-1120, 1978
7) Stanley, P. E., *Organic Scintillators and Liquid Scintillaton Counting*, 607-620, 1971, Academic Press
8) 千谷利三，新版無機化学，上巻，43-49, 1959，産業図書
9) 滝上　誠，私信
10) Mayneord, W. V., W. Ahderson, H. D. Evans, D. Rosen, *Radiat. Res.*, **3**, 379-392, 1955
11) Yamamoto, O. K. Higo，私信
12) Yamamoto, O., H. Ayaki, K. Munesada, *Biochem. Internat.*, **20**, 903-911, 1990
13) 高倉かほる，文部省科学研究費補助金研究成果報告書トリチウム資料集，608，1988
14) 近藤宗平，分子放射線生物学，27，1972，東京大学出版会
15) 織田暢夫，放射線生物学，森脇大五郎他編，84-149，1962，裳華房
16) Spinks, J. W. T., R. J. Woods, *An Introduction to Radiation Chemistry*, 9, A Wiley-Interscience Pub. N. Y.
17) Dertinger, H., H. Jung著代谷次夫，天笠準平訳　放射線生物学，その分子的基礎，69-89，1974，東京大学出版会
18) Ebert, M., P. Howard-Franders, R. J. Shalek, *Radiat. Res.*, **3**, 105-115, 1955
19) 伊藤隆，放射線生物学，森脇大五郎他編，150-187，1962，裳華房
20) 山口武雄，放射線障害の回復，江上信雄編，19-33，1970，朝倉書店

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*,**42**, 304-307, 1991

RRR-α-Tocopherolのラット肝への分布

市川久次*, 植田忠彦**

Distribution of RRR-α-Tocopherol in the Rat Liver

HISATSUGU ICHIKAWA* and TADAHIKO UEDA**

Keywords：天然型α-トコフェロール RRR-α-Tocopherol, ラット rat, 肝臓 liver

RRR-α-Tocopherolは，天然に存在する8種のビタミンE(E)同族体のうち生理(物)活性が最も強く，またその生理(物)活性は酸化防止作用に基づくといわれている．近年，合成酸化防止剤(BHA, BHT等)の安全性に疑問がもたれ，その代替品として，とくに天然由来の酸化防止剤として注目され，油脂製品等に使用されている．また，RRR-α-Tocopherolの生産技術の進歩とあいまって老化防止の面より健康・機能性食品，化粧品に添加使用され，その過量摂取が予想される．

これまで，腸管からの吸収も良く，生理(物)活性が高いことから注目されているにもかかわらずRRR-α-Tocopherolの高用量投与による生体への影響に関する報告は殆ど見あたらない．そこで，今回著者らは，高用量のRRR-α-Tocopherolをラットに投与し，その肝臓への分布について検討し，若干の知見を得たので報告する．

実験材料ならびに方法

1．使用動物

日本チャールスリバー社産生の生後4週齢の雌雄ラット(F344/DuCrj, 体重50－60g)を購入し，一般状態に異常の無いものを一群7匹とし，ステンレス製網ケージに入れ実験に供した．

2．試料

RRR-α-Tocopherolはエーザイ(株)製(純度98%)を用いた．

3．投与方法ならびに投与期間

試料(RRR-α-Tocopherol)は，それぞれ0.01%，0.1%，0.2%，0.5%の割合でエーザイ(株)製の処方・オリエンタル酵母工業(株)調整(Table 1)のビタミンE

Table 1. Composition of diets.

Casein	20.0%	A group：RRR-α-Tocopherol 0.01%
DL-methionine	0.3%	B group： RRR-α-Tocopherol 0.1%
Corn starch	15.0%	C group： RRR-α-Tocopherol 0.2%
Sucrose	25.0%	D group： RRR-α-Tocopherol 0.5%
Glucose	25.0%	Each group： 7 rats
Cellulose powder	5.0%	
Mineral mixture	3.5%	
Vitamin mixture	1.0%	
Choline bitartarate	0.2%	
Vitamin E free stripped corn oil	8.0%	

＊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

＊＊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, Shinjyuku-ku, Tokyo 169, Japan

欠用粉末飼料に混合，精製水を加えて練り固め，固形飼料とした．なお，0.01％の濃度は，市販の飼育用飼料中の濃度とほぼ同じである．この固形飼料を冷蔵庫に一夜放置したのち，－20℃で冷凍保存した．なお，この飼料のビタミンE無添加時の総トコフェロール量は0.0001％以下であった．投与は生後4週より8週間行い，飼料および水を毎日取り替え，自由に摂取させた．飼育室内の温度および湿度は，それぞれ24±1℃，55±3％であった．

4．血液および肝臓の採取・保存法

投与期間終了後，ラットは血液および肝臓の採取前17時間絶食させた．

血液は，無麻酔下背位に固定し頸静脈よりヘパリン処理した注射器を用いて採取した後，遠心分離(3000 rpm, 10min)により，血漿と血球とを得た．血漿は200 μl をテフロンパッキンプ付ネジ蓋試験管(10ml)にとり，安定剤として6％ピロガロールエタノール溶液1.0ml を加えて混和した後，－20℃で保存した．血球分画は，白血球，血小板等を除き，赤血球のみを得るために同容量のPBS(リン酸緩衝液加生理食塩液)を用いて3回遠心洗浄し(3000rpm, 10min)，PBS を加えて倍量とした後，ヘマトクリット値を測定し，赤血球浮遊液を得た．この得られた赤血球浮遊液400 μl に同様に安定剤として6％ピロガロールエタノール溶液1.0ml を加えて－20℃で保存した．

肝臓は，血液採取後大腿動静脈を切断し，放血屠殺した後摘出した．摘出した肝臓は生理食塩液で洗浄し，水分を濾紙で除去後，細切し100mg をテフロンパッキンプ付ネジ蓋試験管(10ml)にとり，1％ NaCl，0.1ml を加えて混和分散させ，安定剤として6％ピロガロールエタ

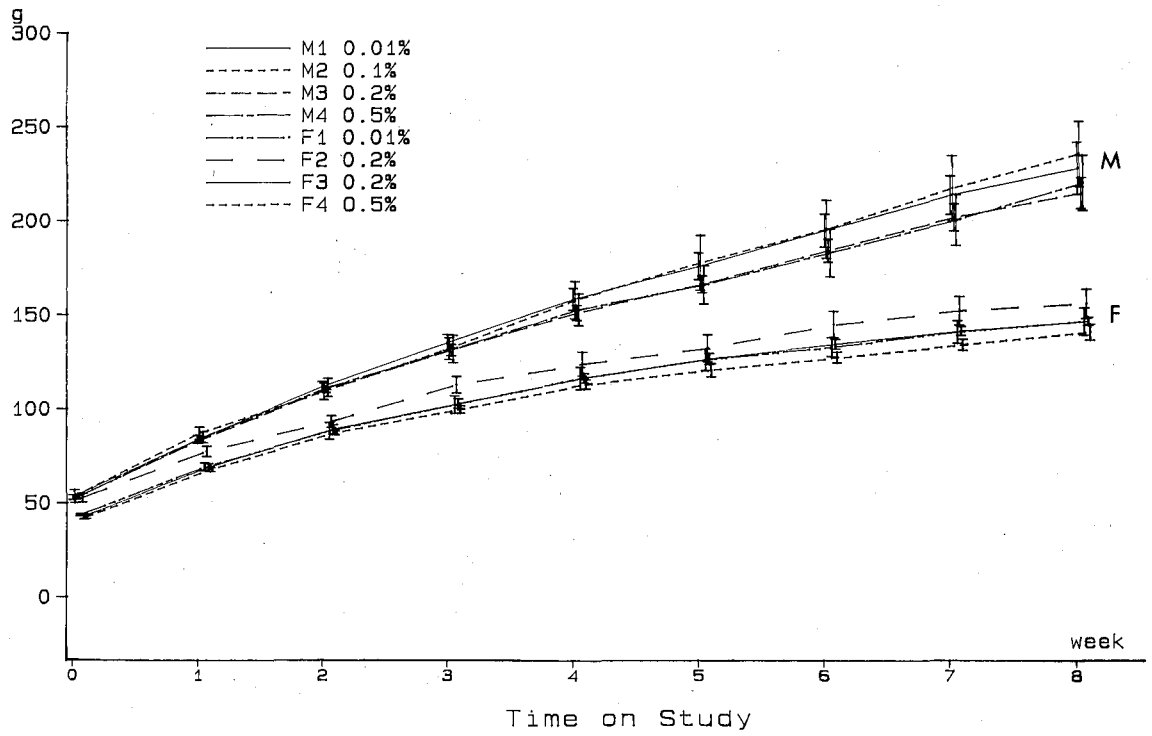


Fig. 1. Curves of Body Weight Gain of Rat Administered Drally with RRR-α-Tocopherol

M1 ：male RRR-α-Tocopherol 0.01%
M2 ：male RRR-α-Tocopherol 0.01%
M3 ：male RRR-α-Tocopherol 0.2%
M4 ：male RRR-α-Tocopherol 0.5%
F1 ：female RRR-α-Tocopherol 0.01%
F2 ：female RRR-α-Tocopherol 0.1%
F3 ：female RRR-α-Tocopherol 0.2%
F4 ：female RRR-α-Tocopherol 0.5%

Each value represents the mean±SD of 7 rats.

ノール溶液1.0ml を加えて混和した後，−20℃で保存した．

5．血液および肝臓中の RRR-α-Tocopherol の定量

植田らの HPLC 法に準じて行った[1]．

6．肝臓細胞の分画

採取した肝臓を氷冷生理食塩液中で細切後，ポッター型テフロンホモジナイザーを用いて，10%ホモジネートを調整し，小田らの分画遠心分離法により，核，ミトコンドリア，ミクロゾーム，上清の各分画を採取した．

なお，各分画の蛋白量は，ミクロビュレット法により測定した．

実験結果

1．体重の増加ならびに一般状態

Fig 1．に示した如く，飼育期間中各群とも順調な体重の増加を示し，また，一般状態に異常は認められなかった．

2．血液ならびに肝臓中の RRR-α-Tocopherol 濃度

Table 2．は，各群の血液ならびに肝臓中の RRR-α-Tocopherol 量の測定結果である．

1)血液　雌雄とも血漿中の RRR-α-Tocopherol 量は，投与量の増加とともにほぼ直線的に上昇し，血漿中への分布は投与量との間に正比例の関係が認められた．

赤血球中の濃度も，雌雄とも血漿中濃度と同様投与量の増加とともにほぼ直線的に上昇し，赤血球中への分布は投与量との間に正比例の関係が認められた．

2)肝臓　雌雄とも肝臓中の RRR-α-Tocopherol 量は，投与量の増加とともに直線的に上昇し，少なくとも投与量0.5%までは，RRR-α-Tocopherol の肝臓への取り込

Table 2. Amounnts of RRR-α-Tocopherol in Blood and Liver.

Group		A	B	C	D
Plasma[a]	M	6.87±0.41	12.8±0.37	12.0±1.10	18.9±1.20
	F	8.67±0.49	11.8±0.72	17.6±0.74	23.5±0.45
R B C[b]	M	5.72±0.22	7.24±0.15	8.13±0.53	12.2±0.58
	F	5.22±0.39	7.60±0.32	8.02±0.48	10.6±0.45
Liver[c]	M	66.2±3.9	861±65	652±64	1670±51
	F	65.0±4.2	284±39	843±79	1710±16

A：RRR-α-Tocopherol 0.01%, B：RRR-α-Tocopherol 0.1%,

C：RRR-α-Tocopherol 0.2%, D：RRR-α-Tocopherol 0.5%

M：Male　　F：Female

a) μg RRR-α-Tocopherol/ml

b) μg RRR-α-Tocopherol/ml packed cells

c) μg RRR-α-Tocopherol/g wet tissue

Each value represents the mean±SE of 7 rats.

Table 3. Amounts of RRR-α-Tocopherol in Rat liver Homogenate and Subcellular Fractions

Fraction	A	B	C	D
Hmogenate	0.55[1)]±0.18	0.94±0.12	2.85±0.25	7.44±0.56
Nuclei	0.022±0.001	0.012±0.001	0.022±0.005	0.041±0.56
Mitochondria	0.17±0.02	1.05±0.15	1.47±0.49	3.41±0.59
Microsome	0.29±0.02	1.74±0.11	3.23±0.68	5.62±0.61
Cytosol	0.02±0.002	0.07±0.05	0.08±0.01	0.50±0.10

Each value represents the mean±SE of 3 rats.

A：RRR-α-Tocopherol 0.01%, B：RRR-α-Tocopherol 0.01%,

C：RRR-α-Tocopherol 0.2%, D：RRR-α-Tocopherol 0.5%

1) μg RRR-α-Tocopherol/mg protein

みに飽和性は認められなかった.

3．肝臓細胞分画中のRRR-α-Tocopherol濃度

Table 3．は，肝臓のホモジネートおよび各細胞分画中のタンパク質量当たりのRRR-α-Tocopherol量測定結果を示した.

いずれの群においても，ミクロゾームに最も高いRRR-α-Tocopherolの分布が認められた．ついで，ミトコンドリア，上清，核の順であった.

総括ならびに考案

天然型ビタミンEのうち生理(物)活性が最も強く，かつ，腸管から吸収が最もよいRRR-α-Tocopherolの生体内動態に関する研究の一環として，ラットにRRR-α-Tocopherolを飼料とともに摂取させ，その血液ならびに肝臓への分布を検討した.

RRR-α-Tocopherolをそれぞれ0.01%，0.1%，0.2%，0.5%の割合で飼料に混合し，ラット(F 344/DuCrj)に8週間摂取させたが，いずれの群においても順調な体重の増加を示し(Fig.1)，また一般状態に異常はみられず少なくとも0.5%の投与量は，重篤な害作用を起こさないものと考えられた.

血液中のRRR-α-Tocopherolの濃度は，投与量の増加とともにほぼ直線的に上昇し，雌雄いずれにおいても，血漿中のほうが赤血球中よりも高い値を示した，また，投与量増加による濃度の上昇率も高かった．RRR-α-Tocopherolの連続経口摂取は，摂取量に依存して血液中へ分布することが推察された(Table 2).

肝臓中のRRR-α-Tocopherol濃度は，Table 2に示した如く，雌雄とも投与量の増加とともに上昇し，投与量と肝臓中の濃度との間には対数相関関係が認められ(雄，$Y= 0.806X + 3.502$，Y=log(RRR-α-Tocopherol μg/g wet tissue，X=% of RRR-α-Tocopherol in the diet，$R=0.961$，$P<0.05$，雌，$Y=0.841X + 3.444$，$R=0.986$，$P<0.05$)，特に，0.5%投与群では雌雄ともに，湿重量g当たり1600μgを越える高い値を示した．RRR-α-Tocopherolの腸管から吸収された後の各臓器への経路[2),3)](吸収された後カイロミクロンという形でリンパを経由して血液中に入り，肝臓に運ばれた後超低比重リポ蛋白という形に変換され，血液により各臓器に運ばれ取り込まれる)を考慮すると，このRRR-α-Tocopherolの肝臓への高い分布は，今後注目すべき点であろうと考えられる.

高い分布が見られた肝臓細胞分画中のRRR-α-Tocopherol濃度は，Table 3に示した如くミクロソームに最も高く，次いでミトコンドリア，上清，核の順であり，各分画中の濃度は，投与量の増加とともに上昇した．また，0.01%投与群に対する高濃度投与群(0.5%)のミクロソーム，ミトコンドリア，上清分画の上昇率は，核の約20倍であった．Krishnamurthyら[4)]は，α-Tocopherol-^{14}Cをラットに経口投与した際の肝細胞内分画の放射活性を測定し，ミトコンドリア，ミクロソームの順で活性が高かったと報告し，Taylorら[5)]もラットについて肝臓，その他の臓器の組織および細胞分画中の総Tocopherol含量を螢光法により測定し，同様の結果を得ている．今回の我々の実験結果は，ミクロソームのほうがミトコンドリア分画より高い値を示したが，測定法(試料中の妨害脂質の除去の方法)の違いによることが推察された.

文　献

1) Ueda, T. and Igarashi, O.: *J. Micronutr. Anal.*, **3**, 185, 1987.
2) Peake, I. R., Windmueller, H. G. and Bieri, J. G. *Biochim. Biophys. Acta.*, **260**, 679-688, 1972.
3) Bjoreboe, A., Bjoreboe. G., and Drevon. C.: *J. Nutr.* **120**, 233-242, 1990.
4) Krishnamurthy, S. and Bieri, J. G.,: *J. Lipid Res.*, **4**, 330, 1963.
5) Taylor, S. L., Lamden, H. P. and Tappel, A. L.,: *Lipids*, **11**, 530, 1976.

著書及び他誌発表

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1990.4—1991.3)

著　　書

工藤　泰雄他：**微生物試験法**，日本薬学会編，**衛生試験法・注解**，142-232，1990，金原出版，東京.

工藤　泰雄，大橋　　誠：**腸炎ビブリオの疫学**，三輪谷俊夫，大橋　　誠監修，竹田　美文，工藤　泰雄，篠田　純男，本田　武司編，**腸炎ビブリオ第Ⅲ集**，26-36，1990，近代出版，東京.

太田　建爾：**腸炎ビブリオおよび毒素の検査法**，三輪谷俊夫，大橋　　誠監修，竹田　美文，工藤　泰雄，篠田　純男，本田　武司編，**腸炎ビブリオ第Ⅲ集**，80-89，1990，近代出版，東京.

工藤　泰雄：**血清型別委員会記録**，三輪谷俊夫，大橋　誠監修，竹田　美文，工藤　泰雄，本田　武司編，**腸炎ビブリオ第Ⅲ集**，346-360，1990，近代出版，東京.

Tashiro, H., Miura, S., Serizawa, H., Yoshioka, M., Tanaka, S., Asako, H., Suematsu, M., Kurose, T., Tsuchiya, M. and Kudoh, Y.：**Involvement of Microcirculatory in Verotoxin (VT)-induced Hemorrhagic Enteritis**, *In* Tsuchiya, M., Asano, M. and Shozawa, T. (eds.), *Microcirculation Anuual* 1990, 111-112, 1990, Nihon-Igakukan, Tokyo.

Mise, K., Miyahara, M., Maruyama, T., Kudoh, Y. and Ohashi, M.：**Usefulness in the Epidemiology of Food Poisoning Cases of Detection of Specific Restriction Endnucleases in Some Serotypes of *Salmonella* and *Yersinia***, *In* Pohland, A. E., Dowell Jr., V. R., and Richard, J. L. (eds.), *Microbial Toxins in Food and Feeds*：Cellular and Molecular Modes of Action, 127-129, Plenum Press, New York and London.

五十嵐英夫：**遠赤外線による殺菌**，足立　鉄男，五十嵐英夫，池沢　幹彦，小川　徳雄，工藤　正顕，木村嘉孝，清水　　賢編，**遠赤外線の最新技術とその応用**，129-139，1991，技術情報センター，大阪.

伊藤　　武：**汚染指標菌**ほか，厚生省生活衛生局監修，**食品衛生検査指針　微生物編**，67-91，1990，日本食品衛生協会，東京.

丸山　　務：**エルシニア**，厚生省生活衛生局監修，**食品衛生検査指針　微生物編**，127-133，1990，日本食品衛生協会，東京.

Kaneko, S. and Maruyama, T.：**Rapid Method for Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* Using Enzyme Immunoassay.** *In* Pohland, A. E., Dowell, V. R., and Richard, J. L. (eds.), *Microbial Toxins in Foods and Feeds*; Cellular and Molecular Modes of Action. 111-118, 1990, Plenum Press, New York.

伊藤　　武：**食中毒**ほか，平山　朝子，宮地　文子編，**公衆衛生看護学体系5，地域精神保健指導論，感染症保健指導論**，241-262，1991，日本看護協会出版会，東京.

上村　　尚：**食品分析**，澤村　良二，濱田　　昭編，**衛生化学・裁判化学実習**，2-12，1991，地人書館，東京.

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**，ビタミンE研究会編，**ビタミンE研究の進歩**，18-21，1990，エイド出版，東京.

Kanoh, T., Fukuda, M., Kinouchi, T., Nishifuji, K., Miyanishi, K. and Ohnishi, Y.：**Metabolism of 1-Nitropyrene Oxides and Effect of Nitrogen Dioxide on Arene Activation.** *In* Howard, P. C. et al. (eds.), *Nitroarenes*, Environmental Science Research, vol. **40**, 85-93,

1990, Plenum Press, New York.

小久保彌太郎：**試料の調製，細菌数，大腸菌群**，厚生省生活衛生局監修，**食品衛生検査指針　微生物編**，41-44，67-91，1990，日本食品衛生協会，東京.

他誌発表論文

Uchiyama, T., Saito, S., Inoko, H., Yan, X.-J., Imanishi, K., Araake, M. and Igarashi, H.：**Relative Activities of Distinct Isotypes of Murine and Human Major Histocompatibility Complex Class II Molecules in Binding Toxic Shock Syndrome Toxin 1 and Determination of CD Antigens Expressed on T Cells Generated upon Stimulation by The Toxin,** *Infect. Immun.*, **58**, 3877-3882, 1990.

Imanishi, K., Igarashi, H. and Uchiyama, T.：**Activation of Murine T Cells by Streptococcal pyrogenic Exotoxin Type A,** *J. Immunol.*, **145**, 3170-3176, 1990.

Miyahara, M., Kudoh, Y. and Mise, K.：**Widespread of Specific Restriction Endnucleases in *Salmonella infantis*, *Salmonella thompson* and *Salmonella blockley* Isolated from Humans in Japan**, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2248-2250, 1990.

岡崎武二郎，大橋　誠，一言　広，町田　豊平，小野寺昭一：**本邦におけるアフリカ型PPNGの検出**，感染症学雑誌，**64**，280-283，1990.

松下　秀，山田　澄夫，工藤　泰雄，大橋　誠：**組織侵入性大腸菌の生化学的性状，選択分離培地での発育性，薬剤感受性，及び下痢原毒素産生性**，感染症学雑誌，**64**，734-740，1990.

斉藤　香彦，新垣　正夫，高橋　正樹，甲斐　明美，柳川　義勢，伊藤　武，大橋　誠，松原　義雄，瀬尾　威久，相楽　裕子，水岡　慶二，深見トシヱ，山崎悦子，村田三沙子，今川　八束，西川　慶繁，佐久　一枝，清水　長世，山口　剛，辻　正周，細谷純一郎，村岡　良昭，安島　勇：**散発下痢症から検出された *Campylobacter jejuni* の血清型とその年次別推移**，感染症学雑誌，**64**，787-793，1990.

山崎　悦子，小金井真理子，古田　深雪，鹿目　芳夫，坂本　芳子，上島　友幸，水口　国雄，高橋　正樹，甲斐　明美，伊藤　武：**ラテックス凝集反応による *Campylobacter jejuni/coli* の迅速同定法に関する検討**，臨床病理，**38**，1368-1372，1990.

蛭田　徳昭，日守満里子，羽布津雅子，岡村　登，松下　秀，工藤　泰雄，山田　哲夫：**海外旅行者から分離された新しい血清型の *Shigella dysenteriae***，感染症学雑誌，**65**，181-184，1991.

蛭田　徳昭，日守満里子，羽布津雅子，岡村　登，小川　正之，松下　秀，工藤　泰雄：**海外旅行者下痢症例から分離された組織侵入性大腸菌O121：H-について**，感染症学雑誌，**65**，537-539，1991.

諸角　聖，和宇慶朝昭，柳田　和代，工藤　泰雄：**食品を対象とした真菌検査用培地およびその改変培地の性能比較**，食品と微生物，**8**，45-53，1991.

小柳　潔，関　喜美子，小黒　祐子，熊田　甲喜，柏木　義勝：**1989年福島県で分離されたA群溶血レンサ球菌のT型別と薬剤感受性**，福島県衛生公害研究所年報，**7**，33-43，1990.

吉田　靖子，矢野　一好，林　志直，関根　整治，藪内　清：**東京都における発疹性疾患児からのウイルス分離状況（1979年～1988年）**，臨床とウイルス，**18**(2)，224-229，1990.

矢野 一好，吉田 靖子，土屋 悦輝，藪内 清，金子 光美，岩崎 謙二，市川 久浩：**ゼータプラスフィルターによる水道水からのウイルス検出方法の検討**，水道協会雑誌，**59**(8)，17-23，1990.

矢野 一好，吉田 靖子，寺山 武，金子 光美，岩崎 謙二，市川 久浩：**ゼータプラスフィルターによる水中ウイルス試験方法の検討**，水道協会雑誌，**59**(7)，10-15，1990.

三木 隆，大貫奈穂美，新開 敬行，藪内 清，小野 哲郎，大友 信也，松田 良夫，松山 雅子，秋吉 京子，大竹 徹，森 治代，森本 素子，上羽 昇，国田 信治，藤田 宣哉，石崎 徹，神村 紀子，永田 久紀，森下 高行，小林 慎一，三宅 恭司，石原 佑弐，磯村 思无，斉藤 隆行，小田 和正，松崎 稔，桜田 教夫，佐藤 七朗，野呂 新一，三瀬 勝利，牛島 広治，清水 博之，大野田秀樹，北村 敬，徳永 徹：**エイズ医薬品候補スクリーニング研究**，Ⅰ．1988年度報告，衛生試験所報告，**108**，128-131，1990.

Yano, K., Yoshida, Y., Kaneko, M.：**Improvement of the Zeta-plus Filter Method for Concentration of Viruses from Water**, *Water Science Technology* **24**(2), 217-220, 1991.

Ketratanakul, A., Ohgaki, S., Yano, K.：**Comparative Study on Adsorption Mechanisms of RNA-F-specific Coliphages and Poliovirus in Activated Sludge process**, *Water Science Technology* **24**(2), 407-412, 1991.

高野伊知郎，安田 一郎，浜野 朋子，瀬戸 隆子，秋山 和幸：**キャピラリーガスクロマトグラフィー／質量分析による蘇葉中のペリラケトンの分析**，衛生化学，**36**，320-325，1990.

Kamata, K. and Akiyama, K.：**High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection for the Determination of Thioctic Acid and Thioctic Acid Amide**, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **8**, 453-456, 1990.

安田 一郎，高野伊知郎，秋山 和幸，佐藤かな子，長井二三子，牛山 慶子，加納 いつ：**白朮の腎臓 Na, K-ATPase 活性阻害と阻害成分**，和漢医薬学会誌，**7**，420-421，1990.

Motohashi, N., Kamata, K. and Meyer, R.：**Interaction of Chlorpromazine with DNA**, *Anticancer Research*, **10**, 1611-1614, 1990.

Motohashi, N., Kamata, K. and Meyer, R.：**Chromatographic Separation and Determination of Carcinogenic Benz [*c*] acridines in Creosote Oils**, *Environ. Sci. Technol.*, **25**, 342-346, 1991.

Ikeda, K., Suzuki, S. and Watanabe, Y.：**Determination of Sunscreen Agents in Cosmetic Products by Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry**, *J. Chromatogr.*, **513**, 321-326, 1990.

植田 忠彦，五十嵐 脩：***d*-α-Tocopherol 過剰投与時のラット組織内分布と蓄積特異性**，栄食誌，**43**(5)，335-343，1990.

平原 文子，植田 忠彦，西宗 高弘，五十嵐 脩，美濃 真：**モデル献立法によるビタミンＥ摂取量調査**，ビタミン，**65**(3)，103-115，1991.

Kawamoto, E., Sawada, T., Suzuki, K., and Maruyama, T.：**Serotypes of *Pasteurella multocida* Isolates from Rabbits and their Environment in Japan**, *Jpn. J. Vet. Sci.*, **52**, 1277-1279, 1990.

Takeba, K., Matsumoto, M,. Shida, Y. and Nakazawa, H. : **Determination of Phenol in Honey by Liquid Chromatography with Amperometric Detection**, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**, 602-604, 1990.

Fukushima, H., Gomyoda, M. and Kaneko, S. : **Mice and Moles Inhibiting Mountainous Area of Shimane Penisula as Source of Infection with *Yersinia pseudotuberculosis***, *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 2448-2455, 1990.

Horii, S., Miyahara, K. and Momma, C. : **High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Lasalocid Sodium in Chicken Tissue**, *J. Liquid Chromatogr.*, **13**, 1411-1417, 1990.

Horii, S., Momma, C., Miyahara, K., Maruyama, T. and Matsumoto M. : **Liquid Chromatographic Determination of Three Sulfonamides in Animal Tissue and Egg**, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**, 990-992, 1990.

水谷　浩志，飯田　　孝，丸山　　務：**牛と豚の腸内容物および枝肉からの *Listeria monocytogenes* の分離**，日本獣医師会雑誌，**43**，602-605，1990.

堀井　昭三，宮原香代子，丸山　　務：**高速液体クロマトグラフィー／質量分析計による鶏肝臓中の残留ラサロシドナトリウムの確認**，食衛誌，**32**，30-37，1991.

Nakazato, M., Morozumi, S., Saito, K., Fujinuma, K., Nishima, T. and Kasai, N. : **Interconversion of Aflatoxin B_1 and Aflatoxicol by Several Fungi**, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1465-1470, 1990.

Saito, K., Nishijima, M. and Miyazaki, T. : **Further Examination on the Structure of an Alkali-Soluble Glucan Isolated from *Omphalia lapidescens***, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 1745-1747, 1990.

Ohno, N., Suzuki, T., Saito, K. and Yadomae, T. : **Enhancement of Clot Formation of Human Plasma by β-Glucans**, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **13**, 525-532, 1990.

Ohno, N., Emori, Y., Yadomae, T., Saito, K., Masuda, A. and Oikawa, S. : **Reactivity of *Limulus* Amoebocyte Lysate Towards (1→3)-β-D-glucans**, *Carbohydrate Research*, **207**, 311-318, 1990.

Koseki, M., Tsuji, K., Kazama, M., Kitabatake, N. and Doi, E. : **Interaction between Dietary Cholesterol or Fatty Acids and Water-soluble Fibers and Increase in Cholesterol Excretion by Pectin in Rats**, *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, **37**, 559-564, 1990.

平田　恵子，大西　和夫，西島　基弘：**酵素を用いた食品分析に関する研究（第2報）コンウェイ微量拡散法によるシアン配糖体定量の加工食品への適用**，衛生化学，**36**，344-348，1990.

Koseki, M., Kitabatake, N., Kazama, M. and Doi, E. : **Repression of Lipase Activity by Pectin**, *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, **38**, 62-65, 1991.

Kanoh, T., Fukuda, M., Hayami, E., Kinouchi, T., Nishifuji, K. and Ohnishi, Y. : **Nitro Reaction in Mice Injected with Pyrene during Exposure to Nitrogen Dioxide**, *Mutat. Res.*, **245**, 1-4, 1990.

Suzuki, T. and Kanoh, T. : **Increased Procollagen Type III Peptide in Serum of Rabbits Exposed to Diesel Engine Exhaust**, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **44**, 700-706, 1990.

び培養条件に関する一考察，環境感染，**5**，11-16，1990.

Seto, H., Suzuki, T., Ohkubo, T. and Kanoh, T.：**Increased Urinary Excretion of 2-Thiobarbituric Acid Reactants in Rats Exposed to Diesel Engine Exhaust**, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **45**, 582-589, 1990.

古畑　勝則，小池　和子：**院内環境から分離された *Methylobacterium extorquens* の性状と薬剤感受性**，環境感染，**5**，47-51，1990.

佐々木憲二，木下　真男，大沢　誠喜，鈴木　孝人，加納　堯子：**ラットの換気機能・ガス交換機能検査のためのマスクによる Breath-by-breath の呼気分析法**，大気汚染学雑誌，**25**(4)，263-269，1990.

Ohashi,N. Tsuchiya, Y. Sasano, H. Utsumi, H. and Hamada, A.：**Ozonation Products of Organic Pesticides found in Aqueous Solution,** *Water Pollution Research and Control*, 543-546, 1990.

Seto, H., Seto, T., Ohkubo, T. and Saitoh, I.：**Reaction of Malonaldehyde with Nucleic Acid. IV. Formation of Pyrimido [1,2-*a*] purin-10 (3*H*)-one Nucleoside by Thermal Decomposition of Diastereomers Containing Oxadiazabicyclononene Residues Linked to Guanosine**, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 515-517, 1991.

Watanabe, M. F. Watanabe, M. Kato, T. Harada, K. and Suzuki, M.：**Composition of Cyclic Peptide Toxins among Strains of *Microcystis aeruginosa* (Blue-green Algae, Cyanobacteria)**, Bot. Mag, **104**, 49-57, 1991.

渡辺　伸枝，加藤　　俊，浜井　昭夫，桜井　勝清：**ディーゼル排ガスに暴露されたラットの肺におけるヒアルロン酸の局在．ビオチン化ヒアルロン酸結合タンパクによる染色**，*Connective Tissue*，**22**(2)，71-78，1991.

Suzuki, N. and Suzuki, H.：**Supervision of Cellular Response to Radiation by Human Interferon**, *Acta Biologica Hungarica*, **41** (1-3), 243-248, 1990.

Tsuchiya, Y. Shimada, T. and Sasano, H.：**Mutagenicity of Chlorinated Products from the Reaction between Toluenediisocyanate and Hypochlorites,** *Water Pollution Research and Control*, 607-610, 1990.

Takahashi, O., Ichikawa, H. and Sasaki, M.：**Hemorrhagic Toxicity of *d*-α-Tocopherol in the Rat**, *Toxicology*, **63**, 157-165, 1990.

古畑　勝則，小池　和子：**浴室床面の淡紅色スライムに関する細菌学的検討**，防菌防黴，**18**，407-410，1990.

Nagai, F., Ushiyama, K., Sato, K. and Kano, I.：**DNA Clevage by Phenylhydroquinone : The Major Metabolite of A Fungicide o-Phenylphenol**, *Chem. Biol. Interactions*, **76**, 163-179, 1990.

古畑　勝則，小池　和子：**飲料用タンク水から高頻度に分離された *Protomonas extorquens* の塩素抵抗性に関する研究**，水道協会雑誌，**59**，17-26，1990.

Kano, I., Satoh, K., Nagai, F., Ushiyama, K, Nakao, T., Hara, Y. and Kano, K.：**Antigenic Determination of A Monoclonal Antibody : Extracellular Domein at the M3-M4 junction of the α-Subunit of Na, K-ATPase**, *Biochem. Cell Biol.*, **68**, 1262-1267, 1990.

古畑　勝則，小池　和子：**落下細菌測定時の培地およ**

佐藤かな子，安田　一郎，長井二三子，牛山　慶子，秋山　和幸，加納　いつ：**利尿作用を有する生薬のウマ腎臓（$Na^+ + K^+$）-Adenosine Triphosphatase に対する影響**，薬学雑誌，**111**(2)，138-145，1991.

Takahashi, O.：**Gastric Retention and Delayed Absorption of A Large Dose of Butylated Hydroxytoluene in the Rat**, *Xenobiotica*, **20**(12), 1319-1329, 1990.

Tayama, S. and Nakagawa, Y.：**Sulfuhydryl Compounds Inhibit the Cyto-and Geno-toxicity of *o*-Phenylphenol Metabolites in CHO-K1 Cells**, *Mutation Research*, **259**, 1-12, 1991.

Takahashi, O.：**Some Properties of Rat Platelet Aggregation and Effects of Butylated Hyddroxytoluene, Warfarin and Aspirin**, *Fd. Chem. Toxic.*, **29**(3), 173-183, 1991.

Longnecker D. S. and Sumi, C.：**Effects of Sex Steroid Hormones on Pancreatic Cancer in the Rat**, *International J. Pancreatology*, **7**, 159-166, 1990.

Sumi, C. and Longnecker D. S.：**Influence of Estrogen and Antiestrogen on the Growth and Function of Transplantable Rat Pancreatic Carcinoma**, *Proc. Amer. Assoc. cancer Res.*, **31**, 224, 1990.

Horie, S., Fukumori, N. and Suga, T.：**Induction of Hepatic Peroxisomes by a New, Non-Carboxylate-Containing Drug, Bifonazole**, *Toxicol. Lett.*, **55**, 249-254, 1991.

Ito, 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**, *Campylobacter pylori and Gastroduodenal Diseases*, **2**, 41-47, 1990.

伊藤　武，平田　一郎，新垣　正夫，高橋　信一，中野　正美，石山　業弘，山岸　郁子：***Campylobacter pylori* IV. CP と疾患との関連(4)感染実験**，臨床消化器内科，**5**，1299-1309，1990.

Suzuki, T. and Watanabe, S.：**Screening Method for Phenoxy Acid Herbicides in Ground Water by High-performance Liquid Chromatography of 9-Anthryldiazomethane Derivative and Fluorescence Detection**, *J. Chromatogr.*, **541**, 359-364, 1991.

総説・解説

大橋　誠：**目でみる保健衛生データ：戦後の感染症対策小史(1)**，公衆衛生，**54**，706-708，1990.

大橋　誠：**目でみる保健衛生データ：戦後の感染症対策小史(2)**，公衆衛生，**54**，787-790，1990.

大橋　誠：**インド旅行者間に耐性菌による腸チフス多発**，都医ニュース，**301**，7，1990.

大橋　誠：**子供の世界サミット**，東京都医薬品情報，**195**，2，1990.

工藤　泰雄：**細菌性食中毒の現況**，月刊フードケミカル，**1990-8**，31-37，1990.

太田　建爾：**病原ビブリオ食中毒**，月刊フードケミカル，**1990-8**，52-58，1990.

五十嵐英夫：**ブドウ球菌食中毒**，月刊フードケミカル，**1990-8**，44-50，1990.

工藤　泰雄：**目でみる保健衛生データ「コレラと旅行者下痢症」**，公衆衛生，**54**，854-855，1990.

五十嵐英夫：**ブドウ球菌の毒素**，Medical Technology，**18**，771-776，1990.

五十嵐英夫：**Toxic Shock Syndrome Toxin-1**，*Lab, Clin, Pract.*，**8**，56-64，1990.

五十嵐英夫：**黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンおよび Toxic Shock Syndrome Toxin-1 の検出**，検査と技術，**18**，1185-1190，1990.

潮田　弘：**食中毒を防ごう**，学校保健ニュース，**857**，1-3，1990.

大橋　誠：**腸管出血性大腸菌による下痢症と溶血性尿毒症症候群**，都医ニュース，**307**，7，1991.

工藤　泰雄：**目でみる保健衛生データ「赤痢」**，公衆衛生，**55**，48-49，1991.

工藤　泰雄：**Vero 毒素産生性大腸菌 O157：H7 による下痢症**，Today's Therapy，**15**，2-3，1991.

工藤　泰雄：**我が国における最近のサルモネラ検出動向**，モダンメディア，**37**，265-277，1991.

工藤　泰雄，甲斐　明美：**腸管出血性大腸菌（Vero 細胞毒素産生性大腸菌）とその疾病**，感染症，**21**，81-90，1991.

潮田　弘：**黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型別法**，検査と技術，**19**，555-561，1991.

甲斐　明美，工藤　泰雄：**腸管出血性大腸菌（Vero 細胞毒素産生性大腸菌）とその疾病**，モダンメディア，**37**，148-156，1991.

村田以和夫：**魚と肉の寄生虫について「安全な食生活のために」**，都薬雑誌，**13**(3)，41-47，1991.

安東　民衛：**Small Round Structured Viruses (SRSV) -最近注目されている胃腸炎ウイルス-**，モダンメディア，**36**(8)，436-438，1990.

矢野　一好：**膜処理における処理性評価としてのウイルス**，水質汚濁研究，**13**(8)，485-490，1990.

伊藤　武：***Helicobacter pylori* 感染による胃炎や消化性潰瘍の病原性や病態解析のための動物実験**，アニテックス，**2**，368-372，1990.

伊藤　武：**輸入食品と食品媒介感染症**，モダンメディア，**36**，361-377，1990.

伊藤　武：**各国の食習慣と食中毒事情**，栄養と料理，**8**，66-71，1990.

丸山　務：**リステリア症**，月刊フードケミカル，**8**，67-72，1990.

伊藤　武：**輸入食品の微生物汚染**，*New Food Industry*，**33**(5)，1-5，1991.

二島太一郎：**「国際化の中」の食の安全は**，国民生活，**9**，18-25，1990.

真木　俊夫，永山　敏廣：**輸入農産物中の残留農薬ー諸外国の規制と残留実態ー**，食品工業，**33**(16)，26-32，1990.

田村　行弘：**公害性・医原性金属ー水銀ー**，臨床検査，**34**，1445-1448，1990.

二島太一郎，真木　俊夫：**残留農薬**，臨床栄養，**78**(2)，141-147，1991.

上村　　尚：**カビ毒（マイコトキシン）汚染**，臨床栄養，**78**(2)，148-154，1991.

二島太一郎：**ＯＤＡでは果たせない安全な食糧確保**，世論時報，**6**，19-22，1991.

渡辺真利代，原田　健一：**アオコを作る *Microcystis* に含まれる毒素**，化学と生物，**28**，723-727，1990.

学 会 発 表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1990.4—1991.3)

学 会 発 表

工藤 泰雄，松下 秀，山田 澄夫，大橋 誠，相楽 裕子，山口 剛：**非定型血清型 *Shigella flexneri* が検出された散発赤痢症例について**，第64回日本感染症学会総会（1990，4）．

工藤 泰雄，他（感染性腸炎研究会）：**輸入感染性腸炎－1989年の調査成績**，第64回日本感染症学会総会（1990，4）．

熊坂 一成，工藤 泰雄，大橋 誠，河野 均也：**抗酸性染色法外部精度管理の試み－第7回東京都衛生検査所精度管理調査結果報告－**，第64回日本感染症学会総会（1990，4）．

太田 建爾，楠 淳，甲斐 明美，柳川 義勢，高橋 正樹，新垣 正夫，尾畑 浩魅，工藤 泰雄，大橋 誠：**1989年夏東京都内で起った *Salmonella* ser. Enteritidis による食中毒事件の多発について**，第64回日本感染症学会総会（1990，4）．

太田 建爾，楠 淳，工藤 泰雄 他：**集団発生由来 *Salmonella* ser. Enteritidis の保有プラスミドとそのプロファイル**，第64回日本感染症学会総会（1990，4）．

太田 建爾，松下 秀，山田 澄夫，工藤 泰雄，大橋 誠：**ナリジクス酸を含む多剤耐性，コリシン2型 *Shigella sonnei* について**，第64回日本感染症学会総会（1990，4）．

高橋 正樹，新垣 正夫，甲斐 明美，斉藤 香彦，柳川 義勢，太田 建爾，工藤 泰雄，伊藤 武，大橋 誠，相楽 裕子，山口 剛：***Campylobacter hyointestinalis* が検出された2症例とその分離株の性状について**，第64回日本感染症学会総会（1990，4）．

松下 秀，山田 澄夫，工藤 泰雄，大橋 誠：**組織侵入性大腸菌の諸性状**，第64回日本感染症学会総会（1990，4）．

松下 秀，山田 澄夫，楠 淳，甲斐 明美，工藤 泰雄，大橋 誠：**大腸菌（EPEC）の病原性に関する研究**，第64回日本感染症学会総会（1990，4）．

蛭田 徳昭，日守満里子，羽布津雅子，岡村 登，松下 秀，工藤 泰雄，大橋 誠：**A群赤痢菌の新しい血清型によると思われる海外旅行者下痢症の一例**，第64回日本感染症学会総会（1990，4）．

前田 右子，増田 剛太，味沢 篤，根岸 昌功，山口 剛，加藤伸之助，熊谷 雅史，横山 泰規，松下 秀，工藤 泰雄，大橋 誠：**コレラ症状を呈した *Vibrio cholerae* non O1（コレラトキシン非産生株）感染症の一例**，第64回日本感染症学会総会（1990，4）．

伊藤健一郎，荒川 英二，渡辺 治雄，松下 秀，工藤 泰雄，小坂 哲也，豊里 満良，水野 耕治：**PCR法およびモノクローナル抗体を用いたELISA法による赤痢菌と侵入性大腸菌（EIEC）の迅速診断法**，第64回日本感染症学会総会（1990，4）．

太田 建爾，楠 淳，柳川 義勢，甲斐 明美，高橋 正樹，新垣 正夫，尾畑 浩魅，工藤 泰雄，大橋 誠：**平成元年に多発した *Salmonella* 血清型 Enteritidis による食中毒について**，第84回東京都衛生局学会（1990，5）．

Miura, S., Tashiro, H., Yoshioka, M., Serizawa, H., Suematsu, M., Asako, H., Kurose, I., Tsuchiya, M. and Ohhashi, M.：**Verotoxin Enhances Platelet-activating Factor Induced Necrotizing Enteritis and Granulocyte Oxyradical Production**, American Gastroenterolo-

gical Association (1990, 5)

工藤　泰雄：**細菌性下痢症，シンポジウム「輸入細菌性感染症の現況と問題点」**，衛生微生物技術協議会第11回研究会（1990，7）.

今西　健一，五十嵐英夫，内山　竹彦：**A群レンサ球菌発熱性外毒素（SPE A）によるマウスT細胞活性化機能の解明**，第37回毒素シンポジウム（1990，7）.

巌　小傑，今西　健一，五十嵐英夫，内山　竹彦：**ブドウ球菌外毒素 toxic shock syndorome toxin-1 によるT細胞活性化の研究ーTSST-1 応答性マウスT細胞ハイブリドーマを用いた解析ー**，第37回毒素シンポジウム（1990，7）.

Ohashi, M. and Kudoh, Y.：**International Spread of Gastrointestinal Infection of Bacterial Origin**, IUMS Congress, Bacteriology and Mycology-Osaka, 1990 (1990, 9).

Kudoh, Y., Kusunoki, J., Kai, A., Yanagawa, Y., Takahasi, M., Shingaki, M., Obata, H., Ohta, K., Ohashi, M. and Nakamura, A.：**Epidemiological Aspects of Food Poisoning Outbreaks Due to *Salmonella enteritidis* Phage Type 34 in 1989**, The 26th Joint Conference, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel (1990, 9).

潮田　弘，藤川　浩，吉田　勲，五十嵐英夫，工藤　泰雄：**各種調理済み食品からの黄色ブドウ球菌検出法としての増菌培養法の検討**，第60回日本食品衛生学会（1990，9）.

潮田　弘：**シンポジウム，ブドウ球菌の型別ー診断・治療・疫学への応用ーコアグラーゼ型について**，第35回ブドウ球菌研究会（1990，9）.

中澤　宗生，大宅　辰夫，片岡　康，甲斐　明美：**病畜由来大腸菌の Vero 毒素産生性と血清型**，第110回日本獣医学会（1990，10）.

和宇慶朝昭，諸角　聖，工藤　泰雄，柳田　和代：**食品真菌分離用培地の性能比較とその改良**，第11回食品微生物学会（1990，10）.

諸角　聖，和宇慶朝昭，工藤　泰雄，一言　広，中里　光男，斉藤　和夫，守安　貴子，石井ふさ子，藤沼　賢司，二島太一郎：**苦情食品由来真菌の食品変質能に関する検討ー不揮発性アミン生成能及び油脂変質能についてー**，第11回食品微生物学会（1990，10）.

宮永　幸実，内山　竹彦，荒明美奈子，五十嵐英夫：**ブドウ球菌外毒素によるT細胞活性化ー血管炎形成における外毒素と血管内皮細胞の役割ー**，第20回日本免疫学会総会・学術集会（1990，11）.

山田　澄夫：**ポスターシンポジウム，ビブリオ，*Aeromonas hydrophila/sobria* の病原因子**，第64回日本細菌学会関東支部総会（1990，11）.

甲斐　明美：**ポスターシンポジウム，大腸菌，東京における下痢原性大腸菌による集団食中毒および海外旅行者下痢症ーその疫学と分離菌の諸性状ー**，第64回日本細菌学会関東支部総会（1990，11）.

新垣　正夫，高橋　正樹，柳川　義勢，工藤　泰雄，大橋　誠，伊藤　武，平田　一郎：**ポスターシンポジウム，ヘリコバクター，*Helicobacter mustelae* が産生するウレアーゼの精製およびその免疫学的検討**，第64回日本細菌学会関東支部総会（1990，11）.

永井美勢穂，市川　広美，伊藤　哲哉，水谷　文彦，

安藤　光弘，川北　　章，鈴木　賀巳，西村　　豊，高橋　正樹，甲斐　明美：**新生児 *Campylobacter jejuni* 敗血症の1例**，第175回日本小児科学会東海地方会（1990，11）．

五十嵐英夫，杉浦　　睦，藤川　　浩，大国　寿士，留目　優子，渡部準之助，池田　幹夫，奥住　捷子，十字　猛夫：**健常者におけるブドウ球菌エンテロトキシン，Toxic Shock Syndrome toxin-1 およびA群レンサ球菌発熱性毒素に対する抗体の保有状況**，第64回日本細菌学会総会（1991，3）．

戸島由美子，井口　毅裕，近藤　誠一，久恒　和仁，松下　　秀，工藤　泰雄：**新型抗原を持つ *Shigella flexneri* 88-893 のO抗原リポ多糖（LPS）の化学的，血清学的性状**，第64回日本細菌学会総会（1991，3）．

松下　　秀，山田　澄夫，工藤　泰雄，大橋　　誠：**新しい型抗原（仮称 89-141）を有すると考えられる *Shigella flexneri* について**，第64回日本細菌学会総会（1991，3）．

島田　俊雄，子迫　芳正，井上　耕博，松下　　秀，工藤　泰雄：***Vibrio fluvialis* および *V. furnissii* の2つの血清型別の統合について**，第64回日本細菌学会総会（1991，3）．

甲斐　明美，山田　澄夫，松下　　秀，尾畑　浩魅，楠　　淳，柳川　義勢，高橋　正樹，新垣　正夫，伊藤　　武，工藤　泰雄，大橋　　誠：**東京における Vero 毒素産生大腸菌の分離状況と分離菌の諸性状について**，第64回日本細菌学会総会（1991，3）．

中澤　宗生，大宅　辰夫，片岡　　康，甲斐　明美：**家畜の大腸菌症における Vero 毒素産生大腸菌の分布と血清学的性状**，第64回日本細菌学会総会（1991，3）．

阿部　章夫，尾畑　浩魅，松下　　秀，山田　澄夫，工藤　泰雄，檀原　宏文：**DNA 増幅合成法を用いた糞便中の毒素原性大腸菌の迅速検出法（第2報）：コロニー交雑法，免疫学的および生物学的方法との比較**，第64回日本細菌学会総会（1991，3）．

村田以和夫，安田　一郎，福森　信隆：**生薬由来8種化合物の Anisakis I 型幼虫に対する致死および虫体損傷作用**，第50回日本寄生虫学会東日本大会（1990，10）．

矢野　一好，吉田　靖子，新開　敬行，薮内　　清：**水系ウイルス感染症に関する基礎的研究ーセルロース凝集法による水中ウイルスの濃縮ー**，第64回日本感染症学会総会（1990，4）．

新開　敬行，吉田　靖子，矢野　一好，薮内　　清：**水系ウイルス感染症に関する基礎的研究ー凝集剤によるマガキからのウイルス回収方法ー**，第64回日本感染症学会総会（1990，4）．

長坂昌一郎，辻　　正周，山口　　剛，今川　八束，伊藤　忠彦，村田　道里：**伊豆七島・利島（としま）におけるツツガムシ病の初報告例および利島住民のツツガムシ病リケッチア抗体保有状況**，第64回日本感染症学会総会（1990，4）．

川手　恒太，槙村　浩一，近藤　朝明，荘司　貞志，滝川　　一，久山　　泰，三宅　和彦，山中　正己，加藤　厚郎，伊藤　忠彦：**恙虫病の1例**，第213回日本消化器学会関東支部例会（1990，2）．

武田佳代子，山岡　昭治，山川　泰利，鎌倉　正英，三宅　和彦，山中　正三，高浜　英人，伊藤　忠彦：**恙虫病の2例**，日本内科学会関東地方会例会（第394回）（1990，9）．

矢野　一好，吉田　靖子，新開　敬行，太田　建爾：

セルロース吸着・凝集法による環境水からのウイルス検出，第85回東京都衛生局学会（1990，10）．

矢野　一好：**生活環境における腸管系ウイルスの実態と検出方法**，平成２年度環境生物研究会（1990，11）．

関根　大正，大貫奈穂美，貞升　健志，太田　建爾，三木　　隆：**HIV-1 抗体検査判定保留例の PCR 法による検討**，第38回日本ウイルス学会総会（1990，11）．

Yano, K., Yoshida, Y., Kaneko, M.：**Improvement of the Zeta-plus Filter Method for Concentration of Viruses from Water**, IAWPRC Health-related Water Microbiology Group (1990, 4).

Ketratanakul, A., Ohgaki, S., Yano, K.：**Comparative Study on Adsorption Mechanisms of RNA-F-specific Coliphages and Poliovirus in Activated Sludge Process**, IAWPRC Health-related Water Microbiology Group, (1990, 4).

Sadamasu, K., Ohnuki, N., Sekine, H., Yabuuchi, K. and Miki, T.：**Examination of Indeterminate Samples in WB Assays of HIV-1 antibody by EIA and PCR Methods**, エイズ研究会第４回学術集会（1990，7）．

Ando, T., Hayashi, Y., Sekine, S., Ohta, K. and Miki, T.：**Prevalence of Small Round Virus Infections Involved in Influenza-like Outbreaks in Tokyo**, The 24th Joint Conference, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Viral Disease Panel (1990, 9).

瀬戸　隆子，秋山　和幸，砂金　信義，久保田和彦：**地黄に含まれる循環系作用物質について**，日本薬学会第110年会（1990，8）．

浜野　朋子，安田　一郎，秋山　和幸，木島　孝夫，高崎みどり，小塚　睦夫，徳田　春邦，西野　輔翼，岩島　昭夫：**紫雲膏のＥＢＶ活性化抑制効果と薬剤学的考察**，日本薬学会第110年会（1990，8）．

安田　一郎，高野伊知郎，秋山　和幸，佐藤かな子，長井二三子，牛山　慶子，加納　いつ：**白朮の腎臓 Na, K-ATPase 活性阻害と阻害成分**，第７回和漢医薬学会（1990，8）．

宮武ノリエ，重岡　捨身，寺島　　潔，長嶋真知子，秋山　和幸：**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**，第27回全国衛生化学技術協議会年会（1990，10）．

高橋美佐子，中山　京子，秋山　和幸：**高速液体クロマトグラフィーによる医薬品製剤中の DL 一塩化カルニチンの定量**，第27回全国衛生化学技術協議会年会（1990，10）．

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：**高速液体クロマトグラフィーによる漢方製剤防己黄耆湯の試験法について**，第27回全国衛生化学技術協議会年会（1990，10）．

安田　一郎，浜野　朋子，高野伊知郎，高橋奈穂子，瀬戸　隆子，渡辺四男也，秋山　和幸：**市場品沢瀉の化学的品質評価**，日本生薬学会第37回年会（1990，11）．

高野伊知郎，安田　一郎，渡辺四男也，竹谷　孝一，糸川　秀治：**当帰の細胞毒性成分に関する研究**，日本薬学会第111年会（1991，3）．

高橋奈穂子，安田　一郎，渡辺四男也，竹谷　孝一，糸川　秀治：**和白朮の細胞毒性画分より得られるポリアセチレン化合物について**，日本薬学会第111年会（1991，3）．

竹内　正博，水石　和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：**キャピラリーGCによる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塩化物としての定量**，第60回日本食品衛生学会（1990，9）.

水石　和子，竹内　正博，山野辺秀夫，渡辺四男也：**スズキにおける体長とトリブチルスズ化合物含有量の相関性**，第60回日本食品衛生学会（1990，9）.

山野辺秀夫，竹内　正博，水石　和子，江波戸舉秀，渡辺四男也：**玄米中の微量元素バックグランド濃度**，第60回日本食品衛生学会（1990，9）.

竹内　正博，水石　和子，山野辺秀夫，渡辺四男也：**HBr処理プレカラムを用いるキャピラリーGCによる環境試料中のトリブチルスズ及びトリフェニルスズ化合物の分析**，日本分析化学会第39年会（1990，10）.

水石　和子，竹内　正博，山野辺秀夫，中村　弘：**東京湾の有機スズ汚染調査**，第85回東京都衛生局学会（1990，11）.

竹内　正博，水石　和子，山野辺秀夫，中村　弘：**東京湾のトリブチルスズ汚染**，環境科学シンポジウム1990年会（1990，11）.

植田　忠彦，市川　久次，五十嵐　脩：***d*-α-Tocopherol高用量投与ラットにおける組織内蓄積特異性および肝細胞内分布**，第5回日本薬物動態学会年会（1990，10）.

中村　義昭，金子　正美，森　謙一郎，観　照雄，渡辺四男也：**家庭用殺虫エアゾル製品中の成分について**，第84回東京都衛生局学会（1990，4）.

観　照雄，金子　正美，森　謙一郎，中村　義昭，渡辺四男也：**繊維製品用防虫剤の研究(1)ー特にパラジクロロベンゼン，ナフタリン，樟脳成分についてー**，第27回全国衛生化学技術協議会年会（1990，10）.

金子　正美，中村　義昭，森　謙一郎，観　照雄，渡辺四男也：**繊維製品用防虫剤の研究(2)ー特にピレスロイド系成分についてー**，第27回全国衛生化学技術協議会年会（1990，10）.

鈴木　助治，岸本　清子，池田　一夫，雨宮　敬，佐藤　憲一，中村　弘：**注入口熱分解GCによるC_{12}，C_{14}，C_{16}，C_{18}ーアルキル第四アンモニウムの分析**，日本薬学会第111年会（1991，3）.

伊藤　弘一，鈴木　助治，中村　弘：**イオン対HPLCによる化粧品中の水溶性ケイ光タール色素の分析**，日本薬学会第111年会（1991，3）.

雨宮　敬，鈴木　助治，中村　弘：**GCによる市販シャンプー中の1.4ージオキサンの分析**，日本薬学会第111年会（1991，3）.

池田　一夫，倉科　周介，大橋　誠：**実世界データベース(3)情報表現**，情報処理学会第42回全国大会（1991，3）.

江波戸舉秀：**療品試験法について**，地方衛生研究所関東甲信静支部理化学部会（1991，2）.

金子　誠二，小久保彌太郎，丸山　務，福島　博：**異なったプラスミドを保有する*Yersinia pseudotuberculosis*血清型4bの病原性の比較**，第109回日本獣医学会（1990，4）.

飯田　孝，神崎　政子，小久保彌太郎，丸山　務：**家畜の腸内容物を対象とした *Listeria monocytogenes* の選択増菌法の検討**，第109回日本獣医学会（1990，4）．

井上　智，飯田　孝，丸山　務，森田　千春，福井　正信：**東京都内の都市ビルに生息するクマネズミのリステリア菌保菌状況**，第109回日本獣医学会（1990，4）．

戸塚　恭一，江成　唯子，長谷川裕美，清水喜八郎，遠藤　勝英，飯田　孝，丸山　務：***Listeria monocytogenes* が分離された母児例**，第64回感染症学会（1990，5）．

仲真　晶子，梅木富士郎，飯田　孝，小久保彌太郎，丸山　務：**ＤＮＡプローブ法による食品中のリステリア属菌の検査法**，第59回日本食品衛生学会（1990，5）．

門間　千枝，神保　勝彦，丸山　務：**酵素免疫キットによる食肉中残留抗菌性物質の確認法について**，第59回日本食品衛生学会（1990，5）．

堀井　昭三，宮原香代子，井草　京子，丸山　務：**塩基性下における食肉中のテトラサイクリン系抗生物質の定量**，第59回日本食品衛生学会（1990，5）．

神保　勝彦，門間　千枝：**微生物学的検査法による食肉中の残留抗菌性物質の推定法**，日本防菌防黴学会第17回年次大会（1990，5）．

Kaneko, S., Maruyama, T. and Fukushima, T.：**Comparison of Plasmid DNA Among Different Serogroups of *Yersinia pseudotuberculosis***, 5th International Symposium on Yersinia (1990, 9).

神保　勝彦，門間　千枝，丸山　務，松本　昌雄：**食肉中の残留抗菌性物質簡易検査法におけるＳＴＯＰ法の検討**，第60回日本食品衛生学会（1990，9）．

門間　千枝，神保　勝彦，丸山　務，松本　昌雄：**バイオアッセイによるアミノグリコシド系抗生物質検査法の検討**，第60回日本食品衛生学会（1990，9）．

宮崎　奉之，橋本　常生，丸山　務，松本　昌雄，中澤　裕之：**同位体希釈法を用いたＧＣ／ＭＳによる牛肉中の蛋白同化ホルモンの分析**，第60回日本食品衛生学会（1990，9）．

橋本　常生，宮崎　奉之，丸山　務，松本　昌雄，鈴木　澄子，中澤　裕之：**蛍光検出高速液体クロマトグラフィーによる牛肉中のプロゲステロンの分析**，第60回日本食品衛生学会（1990，9）．

水谷　浩志，小川　智徳，酒井　保宏，飯田　孝，神崎　政子，丸山　務：**牛・豚の枝肉ならびにと場内の仲卸店舗におけるリステリア菌の汚染実態調査**，日本産業動物獣医学会（1990，9）．

飯田　孝，神崎　政子，小久保彌太郎，丸山　務：**各種動物における *Listeria monocytogenes* の保菌実態**，第110回日本獣医学会（1990，10）．

宮尾　陽子，島崎　秀雄，向島　雄，平井　昭彦，神崎　政子：**国産牛における病原菌保有実態調査**，第85回東京都衛生局学会（1990，10）．

飯田　孝，神崎　政子，丸山　務：**Listeria 属菌の選択分離培地の検討（PALCAM 培地に発育するカビの抑制）**，獣医公衆衛生学会平成２年度年次大会（1991，2）．

只野　敬子，安田　和男，牛山　博文，二島太一郎：**健康食品の衛生学的評価（第5報）麻痺性貝毒マウス試験におけるカルシウムの影響**，第59回日本食品衛生学会（1990，5）.

Kamimura, H.：**A Survey of Mycotoxins in Commercial Foods**, The Korean Society of Food Hygiene (1990, 8).

Saito, K., Nishijima, M. and Miyazaki, T.：**A Heteroglycan from the Fungus *Omphalia lapidescens***, 7th International Carbohydrate Symposium (1990, 8).

石川ふさ子，斎藤　和夫，中里　光男，藤沼　賢司，守安　貴子，二島太一郎：**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**，第27回全国衛生化学技術協議会年会（1990，10）.

牛山　博文，若林　敬二，杉村　　隆，長尾美奈子：**ヒト尿中のハルマン及びノルハルマンの検出**，日本環境変異原学会第19回大会（1990，10）.

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85回東京都衛生局学会（1990，11）.

広門　雅子，平田　恵子，中島　和雄，植松　洋子，松井　敬子，風間　成孔，松本　昌雄：**化学的合成品以外の食品添加物（天然添加物）の品質の現状と問題点**，第84回東京都衛生局学会（1990，5）.

小関　正道，風間　成孔：**ペクチンの血清コレステロールレベル低下機構について**，第3回夏期コレステリン研究会（1990，7）.

植松　洋子，広門　雅子，平田　恵子，中島　和雄，松井　敬子，風間　成孔：**天然着色料製剤中の残留溶剤のヘッドスペース法による分析**，第60回日本食品衛生学会（1990，9）.

栗原　裕子，安野　哲子，荻野　周三，小関　正道，風間　成孔：**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**，第27回全国衛生化学技術協議会年会（1990，10）.

荻野　周三，倉科　周介，大橋　　誠：**地域公衆衛生情報システムの構築**，第4回公衆衛生情報研究会定期研究会（1991，2）.

門間　公夫，菊谷　典久，井口　正雄，友松　俊夫，米沢　純爾，長谷川敦子：**ヤマメ三倍体および二倍体の一般成分と無機成分**，平成2年度日本水産学会秋季大会（1990，11）.

鈴木　孝人，加納　堯子：**^{32}Pーポストラベル法によるディーゼル排気ガス暴露ラットの肺におけるＤＮＡ付加体の検出**，第31回大気汚染学会（1990，11）.

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：**ディーゼルエンジン排気ガス暴露によるラット尿中チオバルビツール酸反応性物質の経時変化**，第31回大気汚染学会（1990，11）

大久保智子，瀬戸　　博，鈴木　孝人，大沢　誠喜，池田　真悟，渡辺　伸枝，加納　堯子：**ディーゼルエンジン排気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（II）**，第31回大気汚染学会（1990，11）

Watanabe, M. F., Harada, K., Watanabe, M., Kato T. and Suzuki M.：**Peptide Toxins Contained in Natural Samples and Strains of *Microcystis***, International

Symposium on Human and Animal Disorders Caused by Algae Toxins and Aquatic Fungi (1990, 5).

Tsuchiya, Y., Shimada T. and Sasano H.：**Mutagenicity of Chlorinated Products from the Reaction between Toluenediisocyanate and Hypochlorites**, The 15th Biennial Conference of International Association on Water Pollution Research and Control (1990, 7).

Ohashi, N., Tsuchiya, Y., Sasano H.,Utsumi H. and Hamada A.：**Ozonation Products of Organic Pesticides found in Aqueous Solution**, The 15th Biennial Conference of International Association on Water Pollution Research and Control (1990, 7).

土屋　悦輝，渡辺真利代：**藍藻*Microcystis*の産生する揮発性物質について(3)ー培養物の塩素処理による化学変化ー**，日本薬学会第111年会（1990，8).

中川　順一，高橋　保雄，笹野　英雄，高田　　純，森田　昌敏：**ＨＰＬＣ／ＩＣＰ-ＡＥＳによるフェリシアンイオン及びフェロシアンイオンの定量**，日本薬学会第110年会（1990，8).

吉田奈津子，中川　順一，高橋　保雄，笹野　英雄：**水中のトリアジン系除草剤の分析法**，日本薬学会第110年会（1990，8).

大橋　則雄，土屋　悦輝，笹野　英雄，内海　英雄，濱田　　昭：**Diazinonの水中におけるオゾン酸化**，日本薬学会第110年会（1990，8).

渡辺真利代，加藤　辰巳，渡辺　真之：***Microcystis*属藍藻の種の特性３・毒素組成**，日本植物学会第55回大会（1990，10).

渡辺真利代，野沢　由香，原田　健一，鈴木　真言：***Microcystis*細胞の分解に伴う毒素の挙動**，日本陸水学会第55回大会（1990，10).

古畑　勝則，小池　和子，松本　淳彦：**飲料用タンク水中に生息する*Methylobacterium*属菌の塩素抵抗性機構について**，第６回日本微生物生態学会（1990，11).

Watanabe M. F.：**Occurrence of Toxic *Microcystis* and Characteristics of the Toxin,** 90江原大学校自然科学大学環境研究所学術研究発表会（1990，12).

Tsuchiya Y. and Watanabe M. F.：**Volatile Organic Sulfur Compounds Associated with Blue-green Algae**, Third international symposium on off-flavors in the aquatic environment (1991, 3).

土屋　悦輝，笹野　英雄：**4,4'-メチレンジアニリンの塩素処理による化学変化とその変異原活性**，日本薬学会第111年会（1991，3).

大橋　則雄，土屋　悦輝，笹野　英雄，濱田　　昭：**固相抽出法による水中農薬一斉分析法の検討**，日本薬学会第111年会（1991，3).

高橋　　省：**ラットにおけるジブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）の胃内停滞と吸収遅延**，第17回日本毒科学会学術年会（1990，6).

佐藤かな子，安田　一郎，長井二三子，牛山　慶子，秋山　和幸，加納　いつ：**腎臓Na, K-ATPaseに対する利尿作用を有する生薬の影響**，日本薬学会110年会（1990，8).

長井二三子，牛山　慶子，佐藤かな子，加納　いつ：**オルトフェニルフェノール代謝物によるＤＮＡ切断作用**，

日本生化学会63回大会（1990, 9).

藤田　博, 佐々木美枝子：**Ames 試験を用いた食品添加物の変異原性総点検**, 第84回東京都衛生局学会（1990, 5).

多田　幸恵, 米山　允子, 藤谷　知子：**マウスの腎臓に及ぼすチアベンダゾールの影響**, 日本薬学会第111年会（1990, 3).

Sumi, C. and Longnecker D. S.：**Influence of Estrogen and Antiestrogen on the Growth and Function of Transplantable Rat Pancreatic Carcinoma**, American Association for Cancer Research（1990, 5).

小縣　昭夫, 安藤　弘, 神谷　信行, 安田　一郎, 尾畑　浩魅, 佐々木美枝子, 鈴木　勝士：**薬用人参エキス前処置がチアベンダゾール（TBZ）の催奇形性に及ぼす影響**, 第30回日本先天異常学会（1990, 7).

伊藤　武, 新垣　正夫, 平田　一郎, 高橋　信一, 石山　業弘, 五十嵐秀之：***Helicobacter mustelae* のウレアーゼの免疫学的特異性ならびにフェレット胃内における本菌の動態**, The 3rd Tokyo International Symposium on Campylobacter pylori (1990, 4).

高橋　信一, 中野　正美, 石山　業弘, 五十嵐秀之, 中村　孝一, 尾崎　真人, 増渕　尚子, 小森　直起, 三浦　由紀, 小林由美子, 高木　泰, 伊藤　正高, 斉藤昌三, 青柳　利雄, 山岸　郁子, 伊藤　武, 平田　一郎：***Helicobacter pylori* と胃液中アンモニア**, The 3rd Tokyo International Symposium on Campylobacter pylori (1990. 4).

五十嵐秀之, 高橋　信一, 石山　業弘, 中野　正美, 中村　孝一, 尾崎　真人, 増渕　尚子, 小森　直起, 三浦　由紀, 小林由美子, 高木　泰, 伊藤　正高, 斉藤昌三, 青柳　利雄, 山岸　郁子, 伊藤　武, 平田　一郎：**十二指腸潰瘍における *Helicobacter pylori* と血清ガストリン値の検討**, The 3rd Tokyo International Symposium on Campylobacterpylori (1990. 4).

平田　一郎, 伊藤　武, 池島　伸至, 入倉　善久, 鈴木　敬子, 榎田　隆一, 寺山　武, 高橋　信一, 中野　正美, 石山　業弘, 五十嵐秀之, 斉藤　昌三, 青柳利雄, 赤嶺　郁子：**胃生検材料からの *Helicobacter pylori* の定量的培養と胃炎, 消化性潰瘍との関連性について**, 第64回日本感染症学会総会（1990, 4).

小久保彌太郎：**食肉および食肉製品の衛生細菌学的研究**, 第56回日本食品衛生学会（1990, 5).

Itoh, T., Shingaki, M., Hirata, I., Takahashi, S., Ishiyama, N. and Igarashi, H.：**Immunological Specificity of *Helicobacter mustelae* Urease and Colonization in Gastric Mucosa of Ferrets with Organisms**, Sixth International Congress of Mucosal Immunology (1990, 7).

大石　充男, 大西　和夫, 西島　基弘, 中込　和哉, 中澤　裕之, 佐藤　文憲, 内山　俊一, 鈴木　周一：**迅速クーロメトリーの油脂中ＰＯＶ測定への応用**, 日本薬学会第110年会（1990, 8).

鈴木　俊也, 渡辺　学：**蛍光高速液体クロマトグラフィーによる地下水中のフェノキシ系除草剤の分析**, 日本薬学会第110年会（1990, 8).

平田　一郎, 鈴木　敬子, 榎田　隆一, 池島　伸至, 新井　輝義, 神　真知子, 楠　くみ子, 入倉　善久, 伊藤　武：**"Salmonella Rapid Test" による食品からのサルモネラ検査法の検討**, 第11回食品微生物学会（1990, 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 *Listeria monocytogenes* の汚染実態**，第110回日本獣医学会（1990，11）.

平田　一郎，伊藤　武，新垣　正夫，高橋　信一，石山　業弘，五十嵐秀之：**カニクイザル胃粘膜における *Helicobacter pylori* の定着と病像の検討**，第64回日本細菌学会関東支部総会（1990，11）.

新井　輝義，池島　伸至，伊藤　武，寺山　武：**セレウス菌食中毒に関する細菌学的基礎研究　特に食品中における本菌の芽胞形成と芽胞の耐熱性**，第64回日本細菌学会関東支部総会（1990，11）.

小久保彌太郎：**食品を対象とした *Listeria* 属菌の検査法**，地研関東甲信静支部細菌研究部会第3回総会（1991，2）.

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：**ショ糖脂肪酸エステルの抗酸化剤との相乗効果**，日本薬学会第111年会（1991，3）.

鈴木　俊也，渡辺　学：**地下水中のフェノキシ系除草剤の高感度，簡易スクリーニング法**，日本薬学会第111年会（1991，3）.

栃本　博，押田　裕子，有賀　孝成，山岸　達典，加納　いつ：**河川の重金属汚染指標としてのヒゲナガカワトビケラに関する研究（第4報）モニタリングにより小河川の重金属汚染を把握した事例**，第25回水質汚濁学会（1991，3）.

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

松　本　昌　雄（委員長）
西　島　基　弘
帆　刈　祥　弘
五十嵐　英　夫
中　村　　弘
風　間　成　孔
笹　野　英　雄
土　屋　悦　輝
角　　千　代
加　納　い　つ
小久保　彌太郎

1991年12月　発行

規格表　第２類
印刷番号（３）543
刊行物番号（Ｈ）24

東京都立衛生研究所研究年報第42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（3363）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（3625）7481（代）